

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201712015

引文格式: 刘佳, 吴能表. AgNO₃对颠茄毛状根生物碱及关键酶基因表达的影响 [J]. 广西植物, 2018, 38(6): 781-787

LIU J, WU NB. Influence of AgNO₃ on tropane alkaloids and key enzyme genes in hairy roots of *Atropa belladonna* [J]. *Guihaia*, 2018, 38(6): 781-787

AgNO₃ 对颠茄毛状根生物碱及关键酶基因表达的影响

刘 佳¹, 吴能表^{2*}

(1. 西安培华学院 医学院, 西安 710000; 2. 西南大学 生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 为了研究不同浓度 AgNO₃对颠茄毛状根生长过程中托品烷类生物碱及影响其合成关键酶基因表达的影响,该研究使用五种不同浓度的 AgNO₃处理黑暗培养 12 d 的颠茄毛状根,2 d 后收集毛状根并测定其鲜、干质量、托品烷类生物碱的含量、部分生理指标(MDA、Pro、可溶性糖、可溶性蛋白)、关键酶基因(*pmt*、*trI*、*h6h*)表达量。结果表明:AgNO₃虽然抑制了颠茄毛状根的生长,但却促进了托品烷类生物碱的积累,与对照相比,50、100、150 μmol · L⁻¹处理均显著性地提高了托品烷类生物碱的产量。同时在 150 μmol · L⁻¹处理下,毛状根代谢途径中 MDA 与对照相比均具有显著性的提高,脯氨酸含量在 150 μmol · L⁻¹下也有了显著性提高,达到了 5.92 μg · g⁻¹FM,是对照的 2.91 倍。可溶性糖与可溶性蛋白含量在 150 μmol · L⁻¹浓度下处理时其含量分别是对照的 1.55 倍和 1.67 倍。托品烷类生物碱合成过程中关键酶基因(*pmt*、*trI*、*h6h*)的表达量在不同浓度 AgNO₃处理下均有不同程度的提高。由此可以推断,AgNO₃在 150 μmol · L⁻¹处理下,可能通过调控脯氨酸、可溶性蛋白、可溶性糖这几种初级代谢产物或某几种关键酶基因的表达来影响颠茄毛状根托品烷类的合成。

关键词: 颠茄, 硝酸银, 托品烷类生物碱, 毛状根, 基因表达量

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)06-0781-07

Influence of AgNO₃ on tropane alkaloids and key enzyme genes in hairy roots of *Atropa belladonna*

LIU Jia¹, WU Nengbiao^{2*}

(1. *Medical School, Xi'an Peihua University, Xi'an 710000, China*; 2. *Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China*)

Abstract: In this study, we studied the influences of different concentrations of AgNO₃ on tropane alkaloids and key enzyme genes in metabolic pathway. We all know that the accumulation of plant secondary metabolites is directly related to some tprimary metabolism and activity of key enzymes. And AgNO₃ is a heavy metal, which can induce oxidative stress in plants and which has a great effect on plant growth and key enzymes of metabolism. Therefore, we added five concen-

收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 国家自然科学基金(30500041); 重庆市科技攻关项目(cstc2012gg-yyjs80013) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500041); Science and Technology Research Program of Chongqing (cstc2012gg-yyjs80013)] 。

作者简介: 刘佳(1990-),女,陕西蒲城人,硕士,助教,主要从事药用植物生理及分子研究,(E-mail) liujiacandy@163.com。

*通信作者: 吴能表,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事药用植物生理及分子研究,(E-mail) wunb@swu.edu.cn。

tations of AgNO_3 into *Atropa belladonna* hairy roots, and cultivated in B5 liquid medium for 12 d, and then, we collected hairy roots and determined fresh weight, dry weight, contents of tropane alkaloids, some physiological indexes included MDA, Pro, soluble sugar and soluble protein, genes expression level after cultivated for 2 d. The results showed that AgNO_3 promoted the accumulation of the alkaloids, although AgNO_3 inhibited the growth of hairy roots, 50, 100, 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 could improve the contents of tropane alkaloids compared with control. Meanwhile, 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ treatment group significantly improved the hairy roots of the content of MDA compared with control. As well as the content of Pro increased to 5.92 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FM}$, 2.91 times of control. Then, the contents of soluble sugar and soluble protein were significantly improved 1.55 and 1.67 times of control respectively by treating with 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 treatment. Thus, with the treatment of AgNO_3 , gene expressions (*pmt*, *tr1*, *h6h*) of key enzymes in the metabolic pathway of *A. belladonna* hairy roots all increased their produced effects. Therefore, we could be inferred that the contents of tropane alkaloids in *A. belladonna* hairy roots could regulate and control primary metabolism such as Pro, soluble protein, soluble sugar and secondary metabolism like expressions of key enzyme genes with the treating of AgNO_3 . This study could provide the basic theories for study the synthesis mechanism of tropane alkaloids and an effective method to enhance the medicinal composition in the culture of hairy roots of *Atropa belladonna* in the future.

Key words: *Atropa belladonna*, AgNO_3 , tropane alkaloids, hairy roots, expression of gene

颠茄 (*Atropa belladonna*), 俗名野山茄、颠茄草, 茄科颠茄属多年生草本植物(中国药典, 2015)。颠茄是一种常见且常用的药用植物, 全草可入药, 叶和根含莨菪碱与东莨菪碱, 临床上可制成配剂和浸膏用于麻醉、镇痛、抗晕动症等(肖培根, 2002)。已有研究表明, 药用植物中含有多种有效的活性物质, 对人类的健康和发展都有着重要的作用(Verpoorte & Memelink, 2002)。然而, 随着市场需求的不断变化, 加之长期不当的采伐及生态环境的破坏, 使药用植物中的活性物质含量越来越低, 成为药用植物进军国际市场的一大瓶颈(Namdeo, 2007)。

近年来, 毛状根培养技术已在植物次生代谢产物的生产、品种改良和特种植物栽培等领域有了广泛且有效的应用(Georgiev et al, 2007)。在植物生长期间添加诱导子也是提高多种植物次生代谢产物含量的有效途径。诱导子能够引起植物体内特殊的次生代谢产物的合成, 所以诱导子成为一种提高毛状根生产次生代谢产物的有效方法(Savitha et al, 2006)。 AgNO_3 是一种重金属, 可诱导植物体内的氧化胁迫, 从而对植物的生长及代谢产生较大的影响(Vasconsuelo & Boland, 2007)。一般来说, 植物次生代谢产物的积累都会与代谢过程中关键酶的活性有直接或间接的关系。如黄

蕾等(2013)的研究发现, 硝酸铅可促进花楸悬浮细胞的生长并刺激次生代谢产物的积累。目前对颠茄的研究主要集中在代谢途径中关键酶基因克隆的研究(强玮, 2012); 通过调控次生代谢产物中关键酶基因的过量表达来提高颠茄托品烷类生物碱含量(李金娣等, 2013)。这种方法成本较高不利于大规模生产, 同时基因的过表达可能会存在嵌合体, 导致遗传的不稳定。但目前尚未见通过添加诱导子来研究其对颠茄毛状根生物碱含量以及代谢过程中关键酶基因影响的相关报道。本研究以颠茄毛状根为材料, 通过添加 AgNO_3 探究诱导子对颠茄毛状根的生长及代谢过程中关键酶基因表达的影响, 旨在为提高颠茄药用成分有效研究提供参考, 为颠茄毛状根的进一步扩大培养提供了依据, 同时对颠茄托品烷类生物碱的合成调控机理的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

西南大学三峡库区生态环境教育部重点实验室保存在 B5 培养基上的颠茄毛状根。

1.2 方法

1.2.1 AgNO_3 的制备 将 AgNO_3 用蒸馏水溶解定

容,配制成 100 μmol · L⁻¹的母液,过 0.22 μm 滤膜除菌备用。

1.2.2 诱导子的添加及培养 将 0.5 g 新鲜颠茄毛状根接于 150 mL 含有 B5 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,110 r · min⁻¹、恒温、(25±1) °C 避光培养 12 d,将原有培养基倒掉,换成添加不同浓度 AgNO₃的新鲜液体培养基,使 AgNO₃终浓度均分别为 25、50、100、150、200 μmol · L⁻¹。相同条件下培养 2 d。

1.2.3 毛状根鲜、干质量的测定方法 收集处理后的毛状根,用蒸馏水冲洗毛状根上残留的液体培养基,滤纸吸干水分后称重,即为毛状根的鲜质量。将新鲜的毛状根于 60 °C 烘箱中烘干至恒重后称重,即为毛状根的干质量。

1.2.4 颠茄毛状根中托品烷类生物碱的提取 参照 Zárate et al(1997)的提取方法,略有改动:将毛状根于烘箱中 60 °C 烘干至恒重,充分研磨,过 50 目筛;称取 0.100 0 g 加 10 mL 提取液(CHCl₃-MeOH-NH₄OH(15:5:1)),超声提取 30 min,室温放置过夜。提取液抽滤,2 mL CHCl₃冲洗残渣,合并所有滤液;40 °C 真空浓缩至干,残留物用 5 mL CHCl₃和 2 mL 1 mol · L⁻¹ H₂SO₄溶解,静置分层,收集硫酸相,浓氨水调 pH 至 10,再分别加入 4 mL CHCl₃提取两次,静置;分层后取下层于 40 °C 真空浓缩,残留物用 1 mL 甲醇溶解,即为样品液。0.22 μm 滤膜过滤,-4 °C 保存备用。

1.2.5 色谱条件 色谱柱为 Ultimate XB-C18 色谱柱(5 μm,4.6 mm × 250 mm);流动相为甲醇:醋酸铵(pH4.6)=58:42;流速为 1.0 mL · min⁻¹;检测波长为 215 nm;柱温为 40 °C;进样量为 10 μL。

1.2.6 部分生理指标测定 脯氨酸、可溶性蛋白含量的测定参照高俊凤(2006)的方法;MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法(赵世杰等,1991);可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法(李合生,2000)。

1.2.7 关键酶基因表达量的测定 使用 Biospin Plant Total RNA Extraction Kit 试剂盒提取总 RNA, Promega GoScript 试剂盒反转录,合成 cDNA。以 cDNA 为模板,pgk 为内参基因,使用 Promega GoTaq © qPCR Master Mix 试剂盒进行荧光定量

PCR。反应结束后,分析溶解曲线、扩增曲线和标准曲线,最终得到各基因的表达量。PCR 所用的引物见表 1。

表 1 PCR 所用的引物
Table 1 Primers for PCR

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
F-qpgk	TCGCTCTTGGAGAAGGTTGAC
R-qpgk	CTTGTCGCCAATCACTACATCAG
F-Abpmt	CCTACTTACCCTACTGGTGTATC
R-Abpmt	GCGAAAGATGGCAAATAAAAAGC
F-Abh6h	TTCCACTTGAGCAGAAAGCAAAGC
R-Abh6h	CCTCATGGTCAACTTCCTCACTTCC
F-AbtrI	TTCTTTGCTTCCTGCTGCTTC
R-AbtrI	GAGGCCAACCTTAGTATCACACAG

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 22.0 对数据进行统计整理和方差分析,Origin 8 绘图。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 AgNO₃对颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱的影响

从表 2 可以看出,AgNO₃抑制了颠茄毛状根的生长,毛状根的鲜质量随试验浓度的增加逐渐降低,浓度大于 100 μmol · L⁻¹时抑制作用与对照相比均有了显著性提高;而干质量在各处理组均表现出显著性地抑制,最高浓度时抑制效果最明显,仅为对照的 73.64%。虽然 AgNO₃对颠茄毛状根的生长产生了抑制作用,但其托品烷类生物碱的含量却提高了,东莨菪碱的含量在 50、100、150 μmol · L⁻¹时与对照相比有了显著性的增加,100 μmol · L⁻¹时含量达到了对照的 2.5 倍,莨菪碱的含量被 AgNO₃处理后均有显著性地提高;最终 50、100、150 μmol · L⁻¹处理组与对照相比依然提高了托品烷类生物碱的产量,且均具有显著性。

表 2 AgNO₃对毛状根生长及托品烷类生物碱含量的影响Table 2 Effects of AgNO₃ on growth and TAs of hairy roots

浓度 Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	鲜质量 Fresh weight ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	干质量 Dry weight ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	东莨菪碱含量 Content of hyoscyamine ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$)	莨菪碱含量 Content of scopolamine ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$)	东莨菪碱产量 Production of hyoscyamine ($\text{mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	莨菪碱产量 Production of scopolamine ($\text{mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	TAs 产量 Production of tropane alkaloids ($\text{mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$)
0	11.433±0.525a	0.884±0.025a	0.755±0.007d	0.592±0.007d	6.673±0.167cd	5.235±0.152d	11.908±0.307d
25	10.458±0.234a	0.829±0.017b	0.803±0.013cd	0.803±0.021c	6.665±0.254cd	6.661±0.235b	13.327±0.488cd
50	10.233±0.349a	0.792±0.058bc	1.272±0.025b	0.925±0.012a	10.295±0.445b	9.350±1.254a	19.645±1.628a
100	8.765±0.680b	0.684±0.012cd	1.912±0.052a	1.033±0.013a	13.095±0.579a	6.696±0.541b	19.791±1.158a
150	8.703±0.390b	0.748±0.006c	1.008±0.011c	0.842±0.006b	7.548±0.115c	6.298±0.105c	13.846±0.230b
200	7.404±0.433b	0.651±0.018d	0.862±0.007cd	0.801±0.012c	5.614±0.182d	5.215±0.182d	10.829±0.365d

注: 不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$).

2.2 AgNO₃对颠茄毛状根生长过程中部分生理指标的影响

从图 1 可以看出,除 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理外,其余四组处理均显著地增加了 MDA 的含量,150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理效果最为明显,是对照的 1.24 倍;其次毛状根中脯氨酸的含量也因为 AgNO₃ 的添加全都有了显著性地提高,150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理达到 5.92 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 是对照的 2.91 倍,且与 25、50、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理具有显著性差异;各处理组可溶性糖与可溶性蛋白的含量与对照相比也都有了显著性提高,其中可溶性糖含量在 150 与 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理时其含量分别是对照的 1.55、1.52 倍,且与 25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理具有显著性差异。可溶性蛋白含量在 50、150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 两组处理中含量的提高均比较明显,分别达到了 10.228、9.949 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 较对照分别增加了 20.08%、16.78%,同时这两组处理与 25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理具有显著性差异。

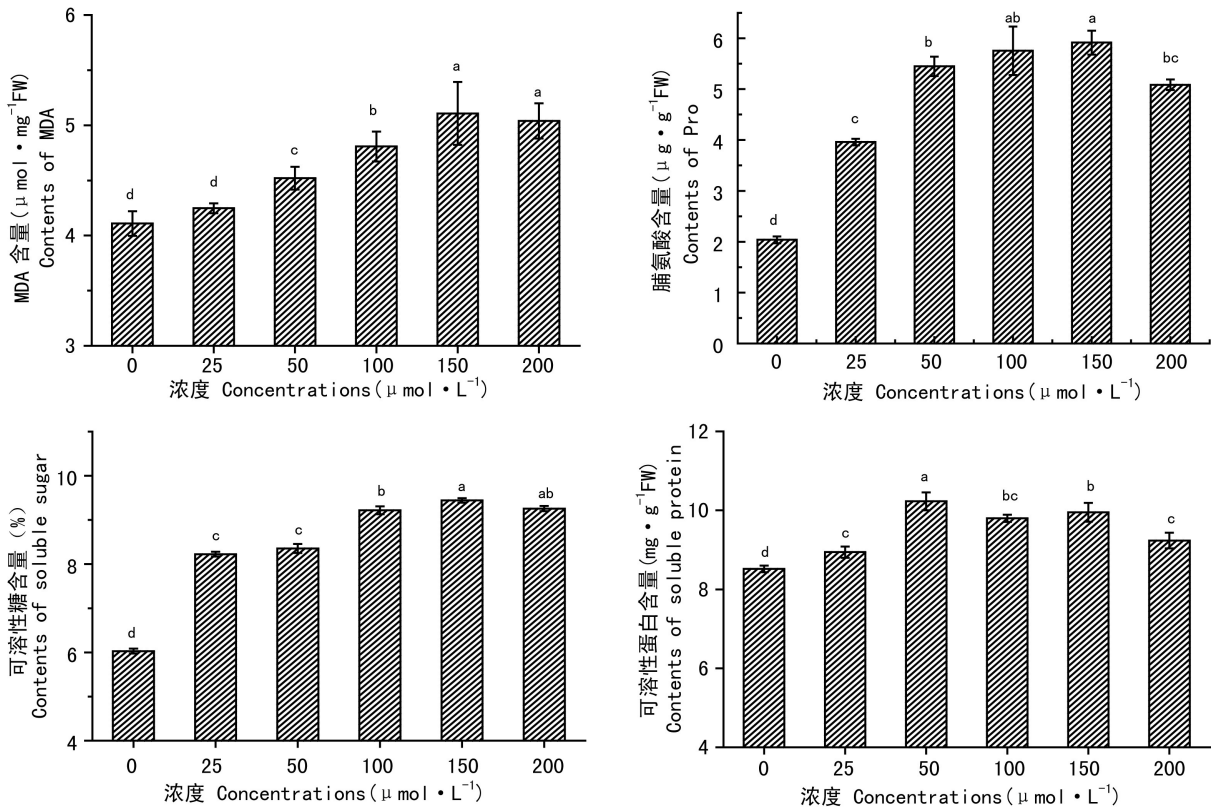
2.3 诱导子对毛状根托品烷类生物碱关键基因表达量的影响

从图 2 可以看出,五种浓度 AgNO₃ 均能显著刺激 *pmt* 基因的表达,50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组分别为对照的 3.45 倍和 3.32 倍,且与 25、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导处理组均存在显著性差异;其次,除 200

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组外的四种浓度处理均可显著地刺激 *trI* 基因的表达,50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理与其他三组存在显著性差异;最后,在 *h6h* 基因的表达中,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组与对照相比没有显著性地提高表达,而其他四组可以显著性地提高 *h6h* 基因的表达,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组对该基因的诱导效果最强烈,较对照基因表达量提高了 1.16 倍。

3 讨论与结论

AgNO₃ 作为一种非生物诱导子,可诱导植物体内的氧化及胁迫,从而对植物的生长及代谢产物产生影响 (Vasconsuelo & Boland, 2007), 因此,近几年越来越多的被用于植物次生代谢产物含量的提高。本研究发现:不同浓度的 AgNO₃ 均抑制了颠茄毛状根的生长,这可能是因为 AgNO₃ 对植物的营养吸收、呼吸作用、光合作用等生物学进程产生了干扰 (Clemens, 2006)。虽然颠茄毛状根的生长受到了抑制,但东莨菪碱的含量在 50、100、150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有了显著性的增加。这一方面可能是因为颠茄毛状根在受到 AgNO₃ 的胁迫后,产生可溶性糖、可溶性蛋白等来预防这种胁迫,这些初级代谢产物的产生会使多余的初级代谢产物转化成次级代谢产物,另一方面也有可能是因为 AgNO₃



注: 不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Different small letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). The same below.

图1 AgNO_3 对毛状根MDA、脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白含量的影响

Fig. 1 Effects of AgNO_3 on the contents of MDA, Pro, soluble sugar, soluble protein of hairy roots

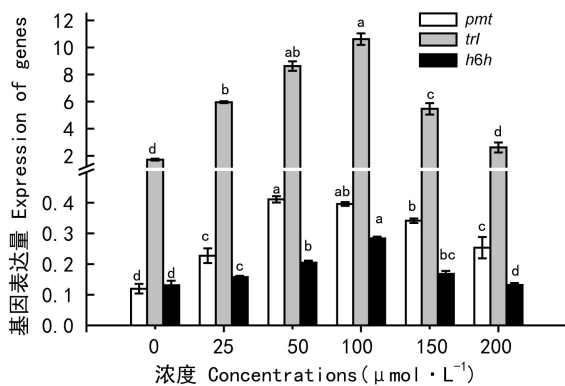


图2 AgNO_3 对颠茄毛状根 *pmt*、*trl*、*h6h* 基因的表达量

Fig. 2 Effects of AgNO_3 on expression analysis of *pmt*, *trl* and *h6h* genes of hairy roots

诱导颠茄托品烷类生物碱代谢过程中关键酶基因的表达,如 Xiao & Gao(2010)用 Ag^+ 处理丹参毛状

根后,在第6天的 mRNA 水平上检测到了 PAL 转录达到最高峰。

诱导子对植物作用的过程中,会改变植物细胞的结构从而使细胞膜发生氧化,同时植物会产生小分子物质来增强自身的渗透调节能力。MDA 是植物细胞膜氧化的产物,MDA 的含量可以作为植物受诱导子胁迫后细胞结构受到影响的重要指标。脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白等是植物体内有效的渗透调节物质及营养物质,其累计可明显地提高植物细胞的渗透调节能力,使细胞在胁迫下保持正常的功能。孙际薇(2014)研究发现,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MJ 处理曼陀罗的毛状根后,导致毛状根中 Pro 的含量显著地高于对照组。本研究同样也发现, AgNO_3 的添加导致毛状根中 MDA、脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白含量的提高。可溶性糖与可溶性蛋白的渗透能力可以防治植物细胞过度脱水,保持植物细胞

水分的平衡,减少诱导子对植物生长造成的影响(张红敏,2014)。另外,可溶性蛋白含量的增加,可能是诱导子的添加导致防御蛋白的合成,防御系统启动时会有大量的蛋白质合成。这些因素都提高了颠茄毛状根细胞的调节能力,从而对次级代谢产物的积累起到良好的作用。

诱导子可作为信号子被植物细胞膜上的受体识别并与其结合,结合后可以引起细胞膜及细胞内发生一系列的级联反应,合成与植物次生代谢合成相关的酶或使其酶的活性发生变化,从而使植物基因表达发生变化,导致次生代谢产物的合成与积累。而且诱导子在与植物相互作用时能选择性、快速、高度专一的诱导植物特定基因的表达,从而积累特定的次生代谢产物(翟俏丽,2011)。Peter & Sang(2003)在罂粟悬浮细胞培养的过程中添加真菌诱导子后,诱导子可显著地诱导了八种生物碱合成基因中的七个基因的转录。在本研究中,25~150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 AgNO_3 处理均能显著性地刺激颠茄托品烷类生物碱合成关键基因 *pmt*、*tr1*、*h6h* 的表达。表明这几个基因表达量的提高均能有效提高颠茄毛状根中托品烷类生物碱含量的积累。

本研究发现,添加 AgNO_3 后,颠茄毛状根的生长受到了抑制,但其托品烷类生物碱的产量在50、100、150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理时显著性地提高了。本研究还发现,在这三种浓度处理下,颠茄毛状根生的MDA、脯氨酸、可溶性蛋白、可溶性糖的含量与对照相比也有显著性地提高,同时颠茄托品烷类生物碱代谢过程中关键酶基因的表达量也有显著性地提高。由此可以推测, AgNO_3 胁迫后,颠茄毛状根通过脯氨酸、可溶性蛋白、可溶性糖等生理指标影响初级代谢,从而影响托品烷类生物碱生物碱的积累;同时从关键酶基因的表达影响次级代谢,从而促进了托品烷类生物碱的积累。但生理指标的改变是否会影响关键酶的表达,这个问题还有待于进一步研究。

参考文献:

CLEMENS S, 2006. Toxic metal accumulation responses to ex-

posure and mechanisms of tolerance in plants [J]. *Biochimie*, 88(9): 1707-1718.

GAO JF, 2006. Guidance on plant physiology test [M]. Beijing: Higher Education Press: 208-230. [高俊凤, 2006. 植物生理学试验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社: 208-230.]

GEORIEV MI, PAVLOV AI, BLEY T, 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 74(6): 1175-1185.

HUANG L, XIAO WJ, LIU C, et al, 2013. Effect of three heavy metals on cell suspension cultures of *Sorbus aucuparia* biomass [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*, 19(24): 226-229. [黄蕾, 肖文娟, 刘超, 等, 2013. 3种重金属对欧洲花楸悬浮细胞生物量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 19(24): 226-229.]

LI HS, 2000. Principle and technology of plant physiological and biochemical test [M]. Beijing: Higher Education Press: 195. [李合生, 2000. 植物生理生化试验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社: 195.]

LI JD, QING BF, YANG CHX, et al, 2013. Enhanced biosynthesis of scopolamine in transgenic *Atropa belladonna* by overexpression of *h6h* gene [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 38(11): 1719-1723. [李金娣, 秦白富, 杨春贤, 等, 2013. 过表达莨菪 *h6h* 基因提高颠茄东莨菪碱含量的研究 [J]. 中国中药杂志, 38(11): 1719-1723.]

LI SW, XUE LG, et al, 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings [J]. *Eev Exp Bot*, 65(1): 63-71.

MAMDEO AG, 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites [J]. *Phcog Rev*, 1: 69-79.

PETER JF, SANG P, 2003. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in *Opium poppy* [J]. *Phytochemistry*, 64: 177-186.

QIANG W, 2012. Cloning and characterization of tropinone reductase I from *Atropa belladonna* and its overexpression for enhancing the tropane alkaloids production in *Atropa belladonna* [D]. Chongqing: Southwest University. [强玮, 2012. 颠茄基因的克隆、功能验证及超量表达对颠茄托品烷生物碱合成的影响 [D]. 重庆: 西南大学.]

SAVITHA BC, THIMMARAJU R, BHAGYALAKSHMI N, 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor [J]. *Process Biochem*, 41(1): 50-60.

SUN JW, 2014. Effects of methyl jasmonate on the *Datura stramonium* L. hairy root growth and secondary metabolites [D]. Chongqing: Southwest University. [孙际薇, 2014. 茉莉酸甲酯对曼陀罗毛状根的生长及次生代谢产物产生的影响 [D]. 重庆: 西南大学.]

VASCONSUELO A, BOLAND R, 2007. Molecular aspects of

- the early stages of secondary metabolites in plants [J]. *Plant Sci*, 172(5): 861-880.
- VERPOORTE R, MEMELINK J, 2002. Engineering secondary metabolite production in plants [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 181-187.
- XIAO PG, 2002. *Modern Chinese materia medica* [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing: 402. [肖培根, 2002. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社: 402.]
- XIAO Y, GAO S, DI P, et al, 2010. Lithospermic acid B is more responsive to silvefions(As³⁺) than rosmarinic acid in *Salvia mihiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Bioscience Reports*, 30: 33-40.
- ZÁRATE R, HERMOSIN B, CANTOS M, et al, 1997. Tropane Alkaloid Distribution in *Atropa baetica* plants [J]. *J Chem Ecol*, 23(8): 2059-2066.
- ZHAI QL, 2011. Preliminary study on mechanism of triterpenoids accumulation induced by fungal elicitor in birch (*Betula platyphylla* Suk) suspension culture [D]. Harbin: Northeast Forestry University. [翟俏丽, 2011. 真菌诱导促进白桦悬浮细胞中三萜合成机理的初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学.]
- ZHANG HM, 2014. Studies of exogenous betaine on the adversity physiological characteristic and nitrogen metabolism of *Pinellisa ternate* under drought stress [D]. Chongqing: Southwest University. [张红敏, 2014. 外源甜菜碱对干旱胁迫下半夏逆境生理特性及氮代谢的影响 [D]. 重庆: 西南大学.]
- ZHAO SJ, XU CHC, ZHOU Q, et al, 1991. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues [J]. *Plant Physiol Comm*, 30 (3): 207-210. [赵世杰, 许长成, 邹琦, 等, 1991. 植物组织中丙二醛测定方法的改进 [J]. *植物生理学通讯*, 30 (3): 207-210.]
- National Pharmacopoeia Committee, 2015. *Pharmacopoeia of People's Republic of China (Part 2)* [S]. Beijing: Chemical Industry Press: 420. [国家药典委员会, 2015. 中国药典(第二部) [S]. 北京: 化学工业出版社: 420.]