

利用细胞和基因工程技术提高植物三萜皂苷合成策略的研究进展

孙凤阳, 胡 盈, 赵 越, 由香玲*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 三萜皂苷是一类很重要的植物次生代谢产物, 是很多药用植物的主要活性成分, 其在抗癌、抗炎、抗过敏、防治心脑血管疾病等方面有很好的功效。由于三萜皂苷自然产量低, 限制了其商业应用。从植物细胞工程和基因工程技术角度, 分析了影响三萜皂苷合成的主要因素: 组织材料的筛选、培养条件的优化、规模化生产以及与三萜皂苷合成相关酶基因的诱导和过表达等, 概述了提高三萜皂苷合成的相关研究成果。

关键词: 三萜皂苷; 关键酶基因; 细胞工程技术; 基因工程技术; 诱导子

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)23-3422-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.028

Advances in studies on strategies of enhancing plant triterpene saponin synthesis by cell and gene engineering technology

SUN Feng-yang, HU Ying, ZHAO Yue, YOU Xiang-ling

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Key words: triterpene saponins; key enzyme genes; cell engineering technology; gene engineering technology; elicitor

三萜皂苷是植物中广泛存在的次生代谢产物, 由三萜皂苷元和糖、糖醛酸和其他有机酸组成, 已发现达 30 余种类型^[1], 主要为四环三萜和五环三萜两大类^[2]。三萜皂苷是很多药用植物如人参^[3]、柴胡^[4]、西洋参^[5]、三七^[6-7]等的主要活性成分, 具有抗癌、抗炎、抗过敏、降血糖、防治心脑血管疾病等作用^[1], 有广阔的应用前景和可观的经济效益。2008 年, 全球传统医学产品市场大约为 830 亿美元, 并将以每年 5%~18% 的增长率增长, 全球草药贸易金额有可能在 2050 年达到 7 万亿美元^[8]。

目前, 三萜皂苷主要从栽培植物中提取, 但植物生长周期长, 皂苷量较低且受到各种环境因素的影响, 限制了其广泛应用。通过组织培养技术可以解决植物在自然环境中生长周期长等问题, 生物反应器的应用可以在短时间内获得大量植物材料。此外, 在培养基中添加诱导子可增加三萜皂苷的质量分数^[9-12]。

随着在分子水平上对三萜皂苷生物合成途径研究的不断深入, 很多上游关键酶基因如法尼基焦磷

酸合酶(FPS)、鲨烯合成酶(SS)、鲨烯环氧酶(SE)等在不同植物中得以克隆^[13-15], 下游的关键酶基因如细胞色素 P450 酶(CYP450)等的研究近年来也取得了较大的进展^[16-20]。这使得通过植物次生代谢工程的方法调控三萜皂苷生物合成途径中的关键酶基因表达, 进而提高植物中三萜皂苷的含量成为可能。本文从大量获得植物材料及提高植物中三萜皂苷质量分数两个方面对目前提高三萜皂苷产量的研究进展进行了综述, 以期对三萜皂苷的商业化生产有所帮助。

1 利用细胞工程技术促进三萜皂苷合成

三萜皂苷结构复杂, 目前皂苷主要从栽培植物中提取。这种途径存在许多问题, 栽培植物易受到周围环境如栽种区域、季节变化、光、潮湿度、温度、土壤肥沃度等以及栽培技术的影响, 从而导致三萜皂苷的量发生变化^[21]。另外, 一些栽培植物生长周期长, 产量低。例如三七分布范围狭窄, 仅限于北纬 23°30'附近的中高海拔地区^[22], 而且种子有

收稿日期: 2013-07-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(J1210053)

作者简介: 孙凤阳(1989—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物细胞工程。Tel: (0451)82191752 E-mail: daisynefu@163.com

*通信作者 由香玲 Tel: (0451)82191752 E-mail: yxiangling@yahoo.com

后熟特性,经过130 d左右才能完成后熟过程^[23],生长周期长^[24],加之病虫害严重^[25],且具有连作障碍^[26],导致三七产量较低。此外,栽培植物在形态和遗传上具有多样性,如含有三萜皂苷的主要植物人参,其根由于尺寸、形状、外貌等无法统一,而影响了其经济效益^[27]。植物组织培养可以有效解决上述问题,其繁殖方式不受地理区域、季节等的影响,且通过组织培养获得的组织、器官及植株等还可以通过生物技术等手段改变目标产物的量。目前,多种含三萜皂苷的药用植物如三七^[6]、西洋参^[27]、人参^[28]等已建立了离体培养系统。

1.1 筛选三萜皂苷合成的最佳离体培养组织材料

不同地域、不同品种的植物中三萜皂苷种类和量均有所差异;同种植物不同组织、器官中三萜皂苷的量也不同,根据需求选择合适的外植体种类及稳定且高产的组织材料是极为重要的。

三萜皂苷在某些植物叶片中的量较高。李科志等^[29]采集分析了广西不同地域五、七叶绞股蓝、不同组织中总三萜皂苷的量。结果显示,广西南部产五叶绞股蓝叶片三萜皂苷质量分数(41%)高于广西北部产五叶绞股蓝(36%);七叶绞股蓝叶片三萜皂苷质量分数显著高于五叶绞股蓝;绞股蓝叶片中三萜皂苷的平均量(4.72%)显著高于茎的平均量(1.85%)。从组织培养角度,绞股蓝茎比叶片更适合作为诱导愈伤组织的外植体。其茎的愈伤组织诱导率(96%)及愈伤组织生长情况都明显好于叶片(20%)。绞股蓝愈伤组织中人参二醇的质量分数为0.027%,比栽培绞股蓝(0.007 3%)和野生绞股蓝(0.025%)的量均高^[30]。

三萜皂苷在某些植物中根部的量较高。如五加科植物人参中的皂苷成分主要集中在根部,Huang等^[31]以人参根为外植体,诱导愈伤组织,后经发根农杆菌侵染获得毛状根。比较了人参愈伤组织、不定根及毛状根培养过程中生长量、皂苷的累积情况。结果表明,人参愈伤组织和毛状根中总皂苷的量低于自然生长人参根中总皂苷的量,而人参不定根中总皂苷量(0.67%)高于自然生长的人参主根中总皂苷的量(0.27%),其生长速度亦较快,因此,推断人参不定根是生产人参皂苷的较好选择。

此外,不同来源的细胞系中含有的三萜皂苷量亦有所差异。郑光植等^[32]比较了由三七的根、块根、根茎、茎、叶柄、叶和花蕾等各部位诱导出的愈伤组织,发现茎愈伤组织在干质量增加、生长速率、

总皂苷量和产率、皂苷元的量等方面均优于其他部位愈伤组织。

1.2 优化培养体系

培养条件影响植物中三萜皂苷的量,对培养条件进行优化以寻求最佳培养条件,提高植物生长速率和三萜皂苷含量是其最终目标。目前的研究主要集中于基本培养基种类、培养基组分(无机盐浓度、蔗糖浓度、氮源、磷酸盐等)、植物生长调节因子、光照、接种条件及培养方式等方面。

不同的基本培养基(MS、SH、B₅)对西洋参细胞生长及皂苷的积累有一定影响。MS培养基最有利于西洋参细胞生长,B₅培养基同时使得多糖和皂苷的量达到最高,说明较低的总氮浓度有利于多糖和皂苷的合成;而SH培养基也使得皂苷的量达到较高程度,这可能与该培养基中高浓度的无机盐有关^[33]。Huang等^[31]研究了用250 mL锥形瓶悬浮培养人参不定根过程中,MS培养基盐强度(1/2~2 MS)、蔗糖质量分数(2%~6%)、氮源(NH₄⁺/NO₃⁻比例)、磷酸盐(0~3.75 mmol/L)对人参皂苷量的影响。结果表明,人参不定根在3/4 MS盐强度、4%蔗糖、NH₄⁺-NO₃⁻为9:36、1.25 mmol/L磷酸盐条件下,人参皂苷产量达到了最高(132.90 mg/L)。

对人参^[34-36]、积雪草^[37]等的研究表明,植物生长调节因子不仅对组织材料的生长也对其三萜皂苷的积累有重要影响。Bonfill等^[35]研究了不同植物生长激素对人参愈伤组织器官发生能力及人参皂苷量的影响,发现2,4-D对愈伤组织器官发生能力起抑制作用,而3-吲哚丁酸钾盐(IBA)和萘乙酸(NAA)增强了这种作用,2,4-D、IBA及NAA均促进了愈伤组织形成的根或芽中皂苷的合成,其中,添加了NAA的培养基中愈伤组织形成的根中人参皂苷量最高。

此外,接种条件、培养方式、光照等对外植体的生长及皂苷量都有一定的影响。例如,长7~10 mm的人参根,接种比例为5 g/L,最适于人参不定根生长及皂苷的积累^[34];朴炫春等^[38]比较了间歇浸没式和完全浸没式两种方式培养人参不定根,发现完全浸没式培养的不定根鲜质量和干质量比间歇浸没式培养的不定根分别高出23.2%和9.5%;较高的光照强度可促进离体培养的人参根的生长,1 700 lx光强度下培养的人参根的生长量比3 500 lx光强度下培养的人参根降低了10%^[39]。

1.3 利用植物生物反应器培养技术

利用生物反应器大量或规模化培养植物细胞、

组织、器官,生产三萜皂苷是目前研究的热点。Paek等^[40]建立了500 L鼓泡式生物反应器大规模培养人参不定根体系,经56 d培养后三七不定根生长率提高150倍,收获的人参不定根中总皂苷量达到了1%;通过添加诱导子[如茉莉酸甲酯(MeJA)]的方法使总皂苷量增加到4%~5%。从20世纪90年代,韩国已经实现了大型生物反应器生产人参不定根及其皂苷的产业化,其中Vitress公司的生物反应器的最大容量为10吨;其生产的各种人参皂苷商品已被认可^[41]。

目前利用小型生物反应器进行传统药用植物不定根^[42]、毛状根^[43]、胚性细胞^[44]等培养的报道较多,如人参、三七、西洋参、黄芪等。Han等^[45]利用17 L气升型生物反应器培养三七悬浮细胞,经15 d培养后,细胞干质量(24 g/L)和皂苷产量(91 mg/L)均达到最大值。随后,研究了糖饲养法(在第13天添加)对三七悬浮细胞及皂苷量的影响,在第17天时,细胞干质量达到30 g/L,皂苷产量达到113 mg/L,均增加了25%。Kochan等^[46]利用10 L营养喷洒型生物反应器培养西洋参毛状根,初始接种量为27 g鲜质量(2.65 g干质量),经30 d培养后收获的毛状根为初始接种量的5倍,人参皂苷量为6 mg/g。Wu等^[47]利用5 L气球型泡沫生物反应器培养黄芪不定根,初始接种量为30 g鲜质量,经40 d培养后,收获的黄芪不定根鲜质量为540 g,皂苷量为3.4 mg/g,几乎与三年生黄芪根中皂苷量(3.6 mg/g)一致。

2 利用基因工程技术促进三萜皂苷合成

2.1 植物三萜皂苷生物合成途径

植物萜类化合物通过2个途径独立合成,即位于细胞质中的甲羟戊酸(MVA)途径和位于质体中的1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DXP)途径(图1)。MVA途径生成异戊烯基焦磷酸(IPP),IPP可在异戊烯基焦磷酸异构酶(ippi)作用下生成二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP),而DXP途径同时生成IPP和DMAPP^[48]。IPP和DMAPP在牻牛儿基焦磷酸合成酶(GPS)作用下形成牻牛儿基焦磷酸(GPP),接着利用FPS转化成法尼基焦磷酸(FPP),又在SS的作用下合成鲨烯,然后经SE催化转变为2,3-氧化鲨烯^[49-50]。接着氧化鲨烯环化酶家族(OSC)[包括达玛烷二醇合成酶(DS)、 β -香树素合成酶(β -AS)、环阿屯醇合成酶(CAS)、羽扇豆醇合成酶(LS)等]催化2,3-氧化鲨烯环化生成结构、功

能各异的植物甾醇和三萜类骨架,被认为是植物甾醇和三萜化合物生物合成的关键分支点^[50]。三萜碳环骨架合成后,还必须经过复杂的修饰作用才能形成三萜皂苷,目前对这一过程的具体步骤还不是十分清楚。CYP450和糖基转移酶(GT)被认为参与了这一过程^[49]。

2.2 利用诱导子调控三萜皂苷关键合成酶基因

利用诱导子来提高次生代谢产物的量,是目前在药用植物细胞培养中常用的方法。诱导子可分为生物诱导子(病原菌及植物细胞成分等)和非生物诱导子(MeJA、水杨酸、重金属、稀土元素等)^[51]。MeJA是诱导三萜皂苷合成最有效的诱导子。Wang等^[9]用10 mg/L MeJA诱导人参不定根24 h,SE及DS基因均表达上调,总皂苷量为对照组的4.76倍。Kim等^[10]用0.1 mmol/L MeJA诱导人参毛状根,改变了人参皂苷合成相关基因表达水平及其合成量。FPS、SS、SE及DS基因的表达水平相对于对照组均升高,而CAS基因的表达水平略有降低, β -AS基因的表达水平无显著变化,CYP450家族的5个基因表达水平与对照组无差别,但糖基转移酶的3个候选基因表达上调;原人参二醇型皂苷(Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd)和原人参三醇型皂苷(Rg₁、Rg₂、Rf、Re)量都显著增加,特别是Rb组人参皂苷的量比对照组增加了5.5~9.7倍,而Rg组人参皂苷的量比对照组增加了1.85~3.82倍。但是,Kim等^[52]用0~150 μ mol/L MeJA处理人参不定根时发现,MeJA在促进人参皂苷量增加的同时,也抑制了人参不定根的生长。对此问题,Kim^[12]和Bae^[53]分别在利用MeJA作为诱导子处理人参不定根的同时,利用植物生长调节剂来改善不定根的生长。25 μ mol/L IBA和100 μ mol/L MeJA共同处理人参不定根,极大促进了其生长,人参皂苷产量(10 mg/L)是100 μ mol/L MeJA单独处理的1.37倍^[12];而50 μ mol/L 乙烯磷和100 μ mol/L MeJA共同处理人参不定根时,人参皂苷产量是MeJA单独处理的2.17倍^[53]。

2.3 调控三萜皂苷关键合成酶基因过表达方式

三萜皂苷生物合成途径及其关键酶基因的深入研究为提高其在植物组织中的量提供了理论依据。因此利用生物工程技术对关键酶基因进行调控是提高三萜皂苷量的重要手段。

目前,三萜皂苷合成途径上游关键酶基因的研究较为清晰,主要有FPS、SS、SE、 β -AS、DS、

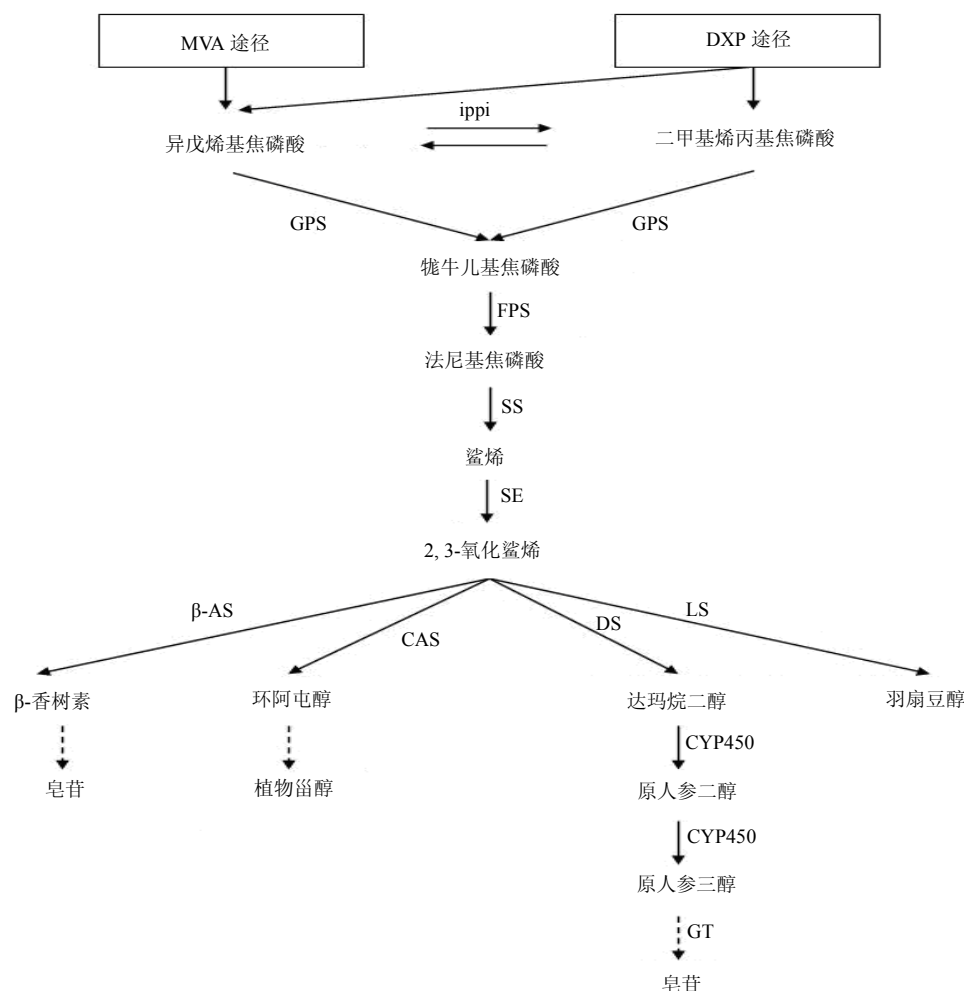


图 1 三萜皂苷生物合成途径^[48,50]

Fig. 1 Biosynthesis pathway of triterpene saponin^[48,50]

CAS。Kim 等^[54]将人参的 FPS 转移到积雪草毛状根中并让其过量表达,发现积雪草 DS 和 CAS 酶 mRNA 表达水平显著提高,三萜皂苷及总甾醇量均升高。人参 SS 基因在人参中的过表达使编码 SS、SE、 β -AS、CAS 等酶的基因表达上调,且增加了三萜皂苷和甾醇的量^[55]。Han 等^[56]研究编码人参 SE 的 2 个基因 SE1 和 SE2 时发现,人参 SE1 基因主要作用于人参皂苷的生物合成,且在一定程度上可以决定甾醇和三萜皂苷生物合成的走向,沉默人参 SE1 基因可导致人参中三萜皂苷量急剧下降,同时基因 SE2 和 CAS 的表达上调,甾醇的积累增加。赵寿经等^[57]构建了人参 β -AS 基因的 RNAi 植物表达载体,经发根农杆菌介导转化人参根外植体获得了表达反义 β -AS 基因的人参发根系;表达反义 β -AS 的 5 个人参发根系在液体培养条件下生长 30 d 后,齐墩果烷型人参皂苷 R_g 量比对照组均有所降低(幅度达 13%~40%),达玛烷型人参皂苷的量呈逐

渐增加趋势, β -AS 酶活性下降, DS 酶活性升高, 这表明通过抑制人参 β -AS 基因的表达, 使代谢能量主要流向达玛烷型皂苷合成支路, 提高了达玛烷型人参皂苷的量^[58]。

三萜碳环骨架合成后, 必须经过复杂的修饰作用才能形成三萜皂苷, 这一过程的具体步骤还不是十分清楚, CYP450 家族和 GT 家族是目前研究的三萜皂苷合成途径最下游关键酶。CYP450 是一种以铁卟啉为辅基的 b 族细胞色素, 具有高度保守的 FxxGxRxCx 的结构域, 多催化羟化反应^[59], 但其催化底物多样并且往往需要多个 CYP450s 的参与才能完成最终产物的合成^[60]。GT 家族在三萜皂苷合成中主要起糖基化作用, 该酶种类繁多但具有高度专一性。在三萜皂苷元合成皂苷时, GT 使得原人参二醇型骨架 C-3 和 C-20 的羟基进行了糖基化, 形成了原人参二醇型人参皂苷; 而原人参萜三醇则是 C-6 和 C-20 进行了糖基化, 形成了原人参三

醇型人参皂苷^[61]。

少数植物如三七^[16]、西洋参^[17]、人参^[18]等有筛选参与三萜皂苷合成途径的 CYP450 家族和 GT 家族基因的报道,并发现可能参与三萜皂苷合成的候选基因。但 CYP450 家族和 GT 家族功能验证方面的研究较少,仅人参和西洋参等几种植物有报道。Sun 等^[19]从西洋参中首次克隆并鉴定了一个催化达玛烷二醇形成原人参二醇的 CYP450 基因 PqD12H,并对其功能进行验证,在体外,将其导入 WAT21 酵母中,在添加达玛烷二醇的培养基中成功异源表达获得原人参二醇皂苷,在体内对其进行 RNAi 时,原人参二醇皂苷和原人参三醇皂苷的量均减少,说明 PqD12H 基因编码的酶参与了原人参二醇皂苷的合成。Han 等^[62]鉴定了人参中一个 CYP450 家族的基因 CYP716A47,该基因编码的酶催化达玛烷二醇 C-12 位羟基化,形成原人参二醇。因此,三萜皂苷合成途径下游关键酶还有待于进一步研究。

3 结语与展望

植物组织培养具有生长周期短、培养条件可控等优点,可以解决生长在自然环境中的植物生长周期长、有效成分量低且受多种环境因素影响等问题。但因不同地域、不同品种的植物中三萜皂苷种类和量均有所差异,同种植物不同组织、器官中含有的三萜皂苷量也不同,根据需求选择合适的外植体种类及稳定且高产的组织材料是极为重要的,目前仅少数几种植物研究较多,且这项工作极为繁重,以后还需投入大量的人力、物力进行实验研究。在培养过程中,培养条件对植物材料中三萜皂苷的量影响非常大,所以,必须对培养条件进行优化以求能提高三萜皂苷产量的最佳培养条件。利用生物反应器可以在较短时间内获得大量的植物材料,在培养基中添加诱导子可以明显增加皂苷的量,但常用的诱导子 MeJA 对人参不定根的生长有抑制作用,同时获得大量植物材料及较高的三萜皂苷量的研究还需进一步展开。

目前对三萜皂苷合成途径已经有了一定了解,且通过基因超表达可以显著提高三萜皂苷的量,利用 RNAi 等手段可以调控代谢方向,增加目的皂苷的量。但对下游关键酶的了解还不够清晰,这使得通过生物工程合成有重要药理作用的三萜皂苷和稀有三萜皂苷依然存在很多问题。因此未来的研究应进一步补充和完善植物三萜生物合成途径及其网络,明确相关酶基因表达的组织和发育的调控机制^[63]。

与植物生产系统相比,微生物异源表达系统由于其繁殖快、生产条件下的稳定性、易扩展性及产品纯化的简单性而成为一种有吸引力的替代系统^[64]。以基因工程方法为主要技术手段的合成生物学已成功应用于青蒿素、紫杉醇等重要天然产物的人工合成应用中。如何选择合适的宿主、优化前体物质的合成体系以及实现三萜皂苷合成途径中前体物质下游基因的功能性表达,是利用合成生物学技术实现三萜皂苷人工合成的关键。近年来迅速发展的酶工程、蛋白质工程、体外合成生物学及基于途径重构的组合生物合成,都极大地促进了三萜皂苷生物合成的研究。

随着生物信息学、基因组学及转录组学的应用,cDNA 文库的建立,测序手段的提高,必然能加快三萜皂苷生物合成途径的解析进程,进而使人工调控三萜皂苷生产成为可能。

参考文献

- [1] 张云峰,魏东,邓雁如,等.三萜皂苷的生物活性研究新进展[J].中成药,2006,28(9):1349-1353.
- [2] 陈颖,孙海燕,曹银萍.三萜皂苷生物合成途径研究进展[J].中国野生植物资源,2012,31(6):15-17.
- [3] Choi D W, Jung J D, Young I H, et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 557-566.
- [4] Kim Y S, Cho J H, Park S, et al. Generegulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum* [J]. *Planta*, 2011, 233: 343-355.
- [5] 孙永珍,牛云云,李滢.西洋参 PqERF1 基因的克隆和生物信息学分析[J].药学学报,2011,46(8):1008-1014.
- [6] You X L, Tan X, Dai J L, et al. Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2012, 108: 333-338.
- [7] 孙凤阳,胡盈,赵越,等.三七体细胞胚发生及植株再生过程中主要皂苷成分的累积[J].中草药,2013,44(19):2753-2758.
- [8] Sen S, Chakraborty R, De B. Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine: India's position and role in a global context [J]. *J Herb Med*, 2011, 1(3/4): 67-75.
- [9] Wang J, Gao W Y, Zuo B M, et al. Effect of methyl jasmonate on the ginsenoside content of *Panax ginseng*

- adventitious root cultures and on the genes involved in triterpene biosynthesis [J]. *Res Chem Intermed*, 2013, 39: 1973-1980.
- [10] Kim O T, Bang K W, Kim Y C, *et al*. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in *ginseng* hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2009, 98: 25-33.
- [11] Ali M B, Yu K W, Hahn E J, *et al*. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 613-620.
- [12] Kim Y S, Yeung E C, Hahn E J, *et al*. Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 1789-1792.
- [13] 陈莉, 蓝秀万, 朱华, 等. 三七法呢基焦磷酸酶的基因克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1080-1083.
- [14] Kim O T, Seong N S, Kim M Y, *et al*. Isolation and Characterization of Squalene Synthase cDNA from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *J Plant Biol*, 2005, 48(3): 263-269.
- [15] 李坤. 三七三萜皂甙合成途径鲨烯环氧化酶基因的克隆及初步表达 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2006.
- [16] Luo H M, Sun C, Sun Y Z, *et al*. Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin biosynthetic genes and genetic markers [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(Suppl 5): 5-19.
- [17] Sun C, Li Y, Wu Q, *et al*. De novo sequencing and analysis of the *American ginseng* root transcriptome using a GS FLX Titanium plat form to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 262.
- [18] Chen S, Luo H, Li Y, *et al*. 454 EST analysis detects genes putatively involved in ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1593-1601.
- [19] Sun Y, Zhao S J, Liang Y L, *et al*. Regulation and differential expression of protopanaxadiol synthase in Asian and American *ginseng* ginsenoside biosynthesis by RNA interferences [J]. *Plant Growth Regul*, 2013, 71: 207-217.
- [20] 徐洁森, 魏建和, 陶韵文, 等. 植物细胞色素P450在三萜皂苷生物合成中的功能研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1635-1640.
- [21] Szakiel A, paczkowski C, Henry M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10: 471-491.
- [22] 李晓琳, 邵爱娟, 陈敏, 等. 三七种子研究进展 [J]. 种子, 2011, 30(7): 63-65.
- [23] 段承俐, 杨莉, 萧凤回. 三七种胚形态发育的解剖观察 [J]. 种子, 2010, 29(1): 1-7.
- [24] 黄勇, 张铁, 张文生, 等. 三七组织培养研究综述 [J]. 文山学院学报, 2012, 25(6): 13.
- [25] 王勇, 范昌, 陈昱君, 等. 三七的主要病害及防治现状 [J]. 人参研究, 2003, 15(1): 43-45.
- [26] 张子龙, 王文全. 连作对三七种子萌发及种苗生长的影响 [J]. 生态学杂志, 2010, 29(8): 1493-1497.
- [27] Punja Z K., Feeney M, Schluter C, *et al*. Multiplication and germination of somatic embryos of *American ginseng* derived from suspension cultures and biochemical and molecular analysis of plantlets [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2004, 40: 329-338.
- [28] 王义, 赵文君, 杨忠, 等. 人参体细胞胚胎发生及植株再生研究 [J]. 药物生物技术, 2008, 15(4): 278-281.
- [29] 李科志, 蒋军富, 吴耀生, 等. 广西不同地域五、七叶绞股蓝中三萜皂苷含量差异研究 [J]. 中药材, 2010, 33(5): 680-683.
- [30] 刘贤旺, 唐福圃. 绞股蓝的组织培养和植株再生 [J]. 中药材, 1989, 12(6): 8-10.
- [31] Huang T, Gao W Y, Wang J, *et al*. Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32: 765-772.
- [32] 郑光植, 王世林, 甘烦远. 三七组织培养的建立 [J]. 生物工程学报, 1989, 5(1): 64-69.
- [33] 王娟, 高文远, 黄滔, 等. 培养条件对西洋参悬浮细胞生物量和活性成分的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4): 375-378.
- [34] Jeong C S, Murthy H N, Hahn E J, *et al*. Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 219-222.
- [35] Bonfill M, Cusidó R M, Palazón J, *et al*. Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2002, 68: 73-78.
- [36] Lian M L, Chakrabarty D, Paek K Y. Effect of plant growth regulators and medium composition on cell growth and saponin production during cell suspension culture of mountain ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mayer) [J]. *J Plant Biol*, 2002, 45(4): 201-206.
- [37] Kim O T, Kim M Y, Huh S M, *et al*. Effect of Growth Regulators on Asiaticoside Production in Whole Plant Cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *J Plant Biol*, 2004, 47(4): 361-365.

- [38] 朴炫春, 廉美兰, 王守明. 利用生物反应器大量生产人参不定根 [J]. 林业科技, 2007, 32(6): 54-56.
- [39] Lee J G, Seong E S, Goh E J, *et al.* Factors involved in mass propagation of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) using bioreactor system [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2009, 52(5): 466-471.
- [40] Paek K Y, Chakrabarty D, Hahn E J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2005, 81: 287-300.
- [41] Paek K Y, Murthy H N, Hahn E J, *et al.* Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009, 113: 151-176.
- [42] 由香玲, 谭 啸, 贾洪柏, 等. 小型生物反应器内人参不定根的人参皂苷累积 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(8): 1700-1705.
- [43] Jeong G T, Park D H, Hwang B, *et al.* Comparison of growth characteristics of *Panax ginseng* hairy roots in various bioreactors [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2003, 107: 493-503.
- [44] Choi Y E, Jeong J H, Shin C K. Hormone-independent embryogenic callus production from ginseng cotyledons using high concentrations of NH_4NO_3 and progress towards bioreactor production [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2003, 72: 229-235.
- [45] Han J, Zhong J J. High density cell culture of *Panax notoginseng* for production of ginseng saponin and polysaccharide in an air lift bioreactor [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 1927-1930.
- [46] Kochan E, Króllicka A, Chmiel A. Growth and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy roots cultivated in flasks and nutrient sprinkle bioreactor [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34: 1513-1518.
- [47] Wu S Q, Lian M L, Gao R, *et al.* Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus* [J]. *In Vitro Cell Dev-PL*, 2011, 47: 719-724.
- [48] 王 莉, 史玲玲, 张艳霞. 植物次生代谢物途径及其研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.
- [49] 明乾良, 韩 婷, 黄 芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1913-1917.
- [50] Wang J, Gao W Y, Zhang J, *et al.* Advances in study of ginsenoside biosynthesis pathway in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34: 397-403.
- [51] 王和勇, 罗 恒, 孙 敏. 诱导子在药用植物培养中的应用 [J]. 中草药, 2004, 35(8): 附 3-附 7.
- [52] Kim Y S, Hahn E J, Murthy H N, *et al.* Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 1619-1622.
- [53] Bae K H, Choi Y E, Shin C G, *et al.* Enhanced ginsenoside productivity by combination of ethephon and methyl jasmonate in ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) adventitious root cultures [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 1163-1166.
- [54] Kim O T, Kim S H, Ohyama K, *et al.* Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(4): 403-411.
- [55] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, *et al.* Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.
- [56] Han J Y, In J G, Kwon Y S, *et al.* Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- [57] 赵寿经, 曹豪杰, 何沐阳, 等. 人参 β -AS 基因 RNAi 表达载体工程菌的构建 [J]. 吉林大学学报: 工学版, 2012, 42(6): 1605-1612.
- [58] 赵寿经, 侯春喜, 徐立新, 等. 抑制齐墩果烷型人参皂苷合成支路对达玛烷型人参皂苷生产能力的影响 [J]. 吉林大学学报: 工学版, 2011, 41(3): 865-868.
- [59] 陈 颖, 孙海燕, 曹银萍. 三萜皂苷生物合成途径研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(6): 15-17.
- [60] 牛云云, 罗红梅, 黄林芳, 等. 细胞色素 P450 在人参皂苷生物合成途径中的研究进展 [J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2012, 14(1): 1177-1183.
- [61] 廖一帆. 五环三萜皂苷的合成途径及生物活性研究进展 [J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(3): 60-62.
- [62] Han J Y, Kim H J, Kwon Y S, *et al.* The Cyt P450 Enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12): 2062-2073.
- [63] 张凤侠, 梁新华, 王 俊. 植物三萜皂苷生物合成及关键酶鲨烯合酶的研究进展 [J]. 农业科学研究, 2009, 30(3): 64-68.
- [64] Moses T, Pollier J, Thevelein J M, *et al.* Bioengineering of plant(tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro* [J]. *New Phytologist*, 2013, 200(1): 27-43.