甜叶菊毛状根培养系统的建立及绿原酸类成分的诱导

邹凯，刘泽波，许小向，上官新晨，尹忠平，陈继光，蒋艳

（江西农业大学食品科学与工程学院，江西省天然产物与功能食品重点实验室，江西南昌 330045）

摘要：本文利用发根农杆菌 A4 诱导甜叶菊毛状根再生，建立毛状根生产绿原酸类物质的培养体系，并研究茉莉酸甲酯和水杨酸对毛状根中绿原酸类物质积累的影响。结果表明，经发根农杆菌 A4 侵染的甜叶菊叶片外植体在共培养 14 d 后诱导出了毛状根；PCR 检测结果表明，发根农杆菌 Ri 质粒中 *rolB* 和 *rolC* 基因均已整合到毛状根中；毛状根在 MS 液体培养基中，培养到第 14 d 时分别加入不同浓度（50、100、200 μmol/L）的水杨酸和茉莉酸甲酯进行诱导，处理第 1、3、6 d 后均抑制了毛状根的生长，但茉莉酸甲酯促进了毛状根中绿原酸类物质的积累，而水杨酸却抑制了毛状根中绿原酸类物质的积累。由此说明，发根农杆菌 A4 侵染甜叶菊可诱导出毛状根，该毛状根可用于绿原酸类物质的生产，茉莉酸甲酯可提高绿原酸类物质的含量。

关键词：发根农杆菌；毛状根；茉莉酸甲酯；水杨酸；绿原酸类

文章篇号：1673-9078(2017)6-118-124 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.018

Establishment of *Stevia rebaudiana* Bertoni Hairy Root Culture System and Induction of Chlorogenic Acids

ZOU Kai, LIU Ze-bo, XU Xiao-xiang, SHANG GUAN Xin-chen, YIN Zhong-ping, CHEN Ji-guang, JIANG Yan

(Food Science and Technology College, Jiangxi Agricultural University, Jiangxi Key Laboratory of Natural Products and Functional Food, Nanchang 330045)

Abstract: *Stevia rebaudiana* hairy roots were induced using *Agrobacterium rhizogenes* A4. A culture system to produce chlorogenic acids in hairy roots was then established, and the effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the accumulation of chlorogenic acids in hairy roots were studied. The results showed that *Stevia rebaudiana* hairy roots were successfully reproduced after 14 days' culture of *Stevia rebaudiana* leaf explants infected with *Agrobacterium rhizogenes A4.* Polymerase chain reaction (PCR) results indicated that genes *rolB* and *rolC* from *Agrobacterium rhizogenes* were integrated into the genome of *Stevia rebaudiana*. Hairy roots were cultured in Murashige and Skoog (MS) liquid medium for 14 d, and various concentrations (50, 100, and 200 μmol/L) of methyl jasmonate and salicylic acid were added to the cultures, respectively. After 1 d, 3d, and 6 d treatments, both plant elicitors inhibited the growth of hairy roots. However, methyl jasmonate promoted the accumulation of chlorogenic acids in hairy roots, and salicylic acid inhibited the accumulation of chlorogenic acids. Thus, *Stevia rebaudiana* hairy root was induced by *Agrobacterium rhizogenes A4* and could be used to produce chlorogenic acids; this could be promoted by methyl jasmonate elicitor.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*; hairy root; methyl jasmonate; salicylic acid; chlorogenic acids

甜叶菊（*Stevia rebaudiana* Bertoni）为菊科甜菊属双子叶草本植物，是最常见的重要工业原料之一，具有特殊的营养和药用价值[1]。其叶片中的绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸等活性物质是应用较广泛的天然抗氧化剂[2]，具有抗氧化、抗炎、抑菌和降压等生物活性[3,4]，以及补肾、利尿、增强机体免疫的功效[5]，但这些活性成分在天然植物中的含量较少，难以满足工业的需求。

目前，甜叶菊多采用人工栽培的方式进行种植，但人工栽培不仅周期长，且时常伴有疾病发生，严重影响甜叶菊叶片中次生代谢物的含量，从而限制了甜叶菊资源的开发及利用，因此急需寻求新的途径解决

收稿日期：2016-12-01

基金项目：赣鄱英才 555 工程；江西高校科技落地计划项目（KJLD12021）；江西省食品药品监督管理局科技计划（2015yp17）；江西省科技支撑计划项目（2010BNB00503）

作者简介：邹凯（1990-），男，硕士研究生，研究方向：天然产物与功能食品

通讯作者：上官新晨（1962-），男，博士，教授，研究方向：天然产物与功能食品

此资源问题，利用发根农杆菌诱导植物产生毛状根，建立离体培养体系，是解决植物资源持续利用的有效途径之一[6]。发根农杆菌可以诱导植物生根，产生的毛状根能合成该植物中特有的次生代谢物，有效提高植物中次生代谢物的含量[7]，并且已成功应用在新疆雪莲、长春花、丹参等植物中[7~9]。此外，通过采用添加生物或者非生物诱导子来提高毛状根中次生代谢物产量成为了一个研究热点，Yukimune 等人在培养基中加入 100 μmol/L 茉莉酸甲酯能明显提高紫杉醇的含量[10]；Pitta-Alvarez 等人考查了不同的生物(SA，YE)和非生物($CaCl_2$，$AgNO_3$，$CdCl_2$)诱导子对曼陀罗毛状根中莨菪碱生产的影响，且所选用的生物和非生物诱导子都可以不同程度地提高莨菪碱的产量[11]。研究表明，在培养的毛状根中添加不同的诱导子可以提高其次生代谢物产量，但关于不同诱导子对甜叶菊毛状根中绿原酸类物质的研究，目前未见报道。因此，本研究利用发根农杆菌 A4 从甜叶菊叶片诱导出毛状根，研究水杨酸和茉莉酸甲酯这两种诱导子对毛状根中绿原酸类物质积累的影响，为绿原酸类物质的开发利用提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及菌株

甜叶菊无菌苗由本实验室提供；发根农杆菌 A4 由上海师范大学开国银教授馈赠。

1.2 仪器及试剂

聚合酶链式反应仪(PCR)，美国 Bio-Rad 有限公司；水平电泳仪，美国 Bio-Rad 有限公司；UVP 电泳成像仪，美国 UVP 有限公司；MS、WPM、B5 培养基，青岛高科园海博生物技术有限公司；甲醇(色谱纯)，美国 Tieda 试剂有限公司；茉莉酸甲酯（MJ），sigma-aldrich 公司；水杨酸(SA)，成都市科龙化工试剂厂；DNA Maker，北京全式金生物技术有限公司；高效液相色谱仪(HPLC 1260)，美国 Aglient 科技有限公司；绿原酸(HPLC，>98%)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(HPLC，>97%)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(HPLC，>97%)，上海同田生物科技有限公司。

1.3 菌株活化及毛状根的诱导

挑取 A4 单菌落接种到含卡那霉素的 YEB 液体培养基中，27±1 ℃、115 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8，用等体积的 1/2 MS 液体培养基重悬浮，30 min 后侵染预培养 2 d 的外植体。然后用无菌滤纸吸干多余菌液，置于无外源激素、含 100 μmol/L 乙酰丁香酮的 1/2 MS 固体培养基中共培养 2 d，再转至含 50 mg/mL 头孢塞圬钠的 1/2 MS 固体培养基中继代培养，每 7 d 除菌一次[12]。

1.4 毛状根的 PCR 检测

称取无菌毛状根和甜叶菊无菌苗正常根各 100 mg，参考 TransGen EasyPure Plant Genomic DNA Kit 提供的方法提取毛状根和正常根基因组 DNA。以发根农杆菌 A4 质粒为阳性对照，甜叶菊无菌苗正常根为阴性对照，根据 *rolB* 基因(423 bp)和 *rolC* 基因(626 bp)序列引物进行 PCR 扩增，扩增产物经琼脂糖电泳分析。引物设计参考周伟[13]等人，如表 1 所示，引物均由北京全式金生物技术有限公司合成。PCR 扩增反应体系为 15 μL，1 μLDNA、0.5 μL 上游引物和 0.5 μL 下游引物，7.5 μL 2×EasyTaq PCR SuperMix(包含 Taq DNA 聚合酶、$MgCl_2$ 和 dNTP)，5.5 μL ddH_2O。*rolB* 和 *rolC* 基因 PCR 扩增参数见付晓等人[12]，具体操作如下：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 45 s；60 ℃退火 45 s；72 ℃延伸 60 s，进行 35 个循环；72 ℃终延伸 10 min。PCR 产物在 1.0%琼脂糖(Gel View 染色)上电泳 30 min 后，在 UVP 凝胶成像仪上观察结果。

表 1 *rolB* 和 *rolC* 基因 PCR 扩增引物及序列

Table 1 Primers and primer sequences of genes *rolB* and *rolC* used for PCR amplification

Size (bp)	Primer name	Primer sequence(5'-3')
rolB (423 bp)	5'-primer	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT
	3'-primer	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC
rolC (626 bp)	5'-primer	CTCCTGACATCAAACTCGTC
	3'-primer	TGCTTCGAGTTATGGGTACA

1.5 液体培养基的筛选

选取生长迅速的毛状根根尖，将其接入到装有 50 mL MS、WPM 和 B5 液体培养基（pH 6.0、蔗糖 30 g/L）的 100 mL 三角瓶中，27±1 ℃、115 r/min 恒温震荡暗培养 2 周。称取鲜重为 0.3 g 的毛状根，再分别接种于 WPM、MS 和 B5 培养基中，培养 5 周后收获，60 ℃烘至恒重后称其干重，测定绿原酸类物质的含量。

1.6 茉莉酸甲酯和水杨酸对甜叶菊毛状根的处理

称取鲜重为0.3 g毛状根接种于装有50 mL MS液体培养基中，培养14 d后，添加不同浓度的MJ和SA进行诱导，分别处理0、1、3、6 d后收获、烘干、称重；测定毛状根中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的含量。

1.7 绿原酸类物质的提取

将收获的毛状根烘干后研磨成粉，称取0.1 g于10 mL离心管，加入4 mL 50%甲醇溶液，超声辅助（180 W 30 ℃）提取30 min，冷却，5000 r/min离心10 min，收集上清液，重复提取一次，合并提取液，定容至10 mL，过0.45 μm有机相膜，滤液待测。

1.8 绿原酸类物质的检测

参考付晓等人[12]检测方法测定其绿原酸类物质含量，具体方法如下：色谱柱：Waters Symmetry C18柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相：0.2%醋酸水(A)和甲醇(B)；流速：1 mL/min；洗脱条件：0~10 min 70% A；10~15 min 70%~45% A；15~25 min 45% A；25~26 min 45%~70% A；26~30 min 70% A；检测波长：327 nm；柱温：40 ℃；进样量：10 μL。

1.9 绿原酸类物质含量的计算

毛状根粉末经50%甲醇溶液超声辅助提取，提取液经检测后，参照表2的标准曲线计算其中含量。

表2 绿原酸类化合物标准曲线

Table 2 Standard curves of chlorogenic acids

化合物	标准曲线	浓度范围/(μg/mL)	R^2
绿原酸	Y=28.052X-121.540	9.50~285.00	0.9997
3,5-二咖啡酰奎宁酸	Y=24.989X-82.588	9.25~277.50	0.9995
4,5-二咖啡酰奎宁酸	Y=27.167X-162.680	9.75~292.50	0.9992

1.10 统计分析

测定结果重复3次，Excel软件求平均值，采用DPS软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 毛状根的诱导及形态特征

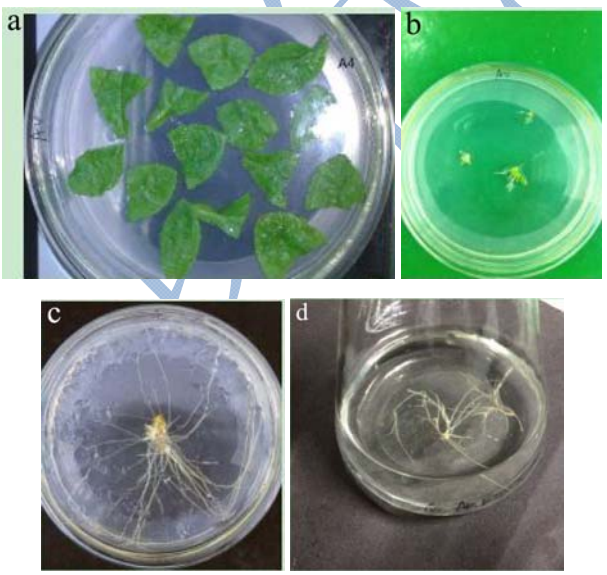




图1 毛状根的诱导、除菌培养及液体培养图片

Fig.1 Induction of hairy roots in sterile culture and liquid culture

注：a表示被发根农杆菌侵染的叶片；b表示培养2周后，叶片长出的毛状根；c表示1/2 MS固体培养基上除菌培养的毛状根；d表示刚接入MS液体培养基中的毛状根；e表示在MS液体培养基中培养3周的毛状根。

甜叶菊叶片外植体经发根农杆菌A4侵染（图1a），培养2周后，会陆续从叶片伤口部位处分化出明显的白根，将其挑选到1/2 MS固体培养基上进行培养（图1b），长出的根具有无向地性生长、呈白色、多纤毛、多分枝等特征，初步判定诱导的根为甜叶菊毛状根。但随着时间的延长外植体逐渐褐化，35 d后几乎所有外植体全部褐化，不再具有产生毛状根的能力。剪取生长旺盛的根尖部分置于50 mg/mL头孢噻圬钠的1/2 MS固体培养基中进行除菌培养，每隔7 d转接

一次，重复 3~5 次即可完全除菌。在 1/2 MS 固体培养基上毛状根呈现密集生长，分枝较多，贴壁或者沿培养基表面生长（图 1c），这与李金亭等人[13]报道的 1/2 MS 固体培养基利于怀牛膝毛状根培养生长的结果一致。待毛状根除菌完全后，挑选分枝较多，生长旺盛的根尖置于 MS 液体培养基里（图 1d），培养 3 周后长满整瓶（图 1e）。

2.2 毛状根的鉴定

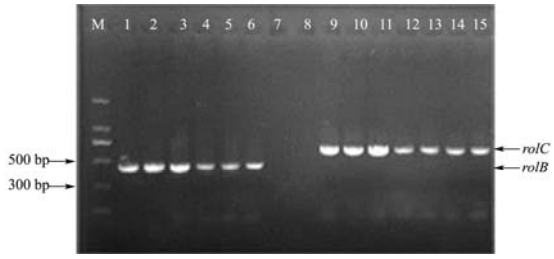


图 2 甜叶菊毛状根 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of *Stevia rebaudiana* hairy roots

注：1、2、3、9、10 和 11 表示作为阳性对照的 A4 菌株质粒；4、5、6、12、13、14 和 15 表示不同单克隆的毛状根；7 和 8 表示作为阴性对照的甜叶菊正常根。

研究表明 *rolB* 和 *rolC* 是发根农杆菌 Ri 质粒 TL-DNA(T-DNA 左臂)上的 2 个与毛状根形成相关的基因[14]，因此，检测 *rolB* 和 *rolC* 基因可以作为鉴定毛状根的一种有效方法。称取甜叶菊毛状根 100 mg，采用试剂盒提取毛状根中 DNA，分别根据设计的 2 对引物进行 PCR 扩增，扩增产物经琼脂糖电泳分析。结果如图 2 所示，从甜叶菊毛状根的基因组中扩增到期望的 423 bp 和 626 bp 左右的特异性 DNA 片段，该片段与从发根农杆菌 A4 Ri 质粒 DNA 中扩增出的特异性片段大小相同，而从甜叶菊无菌苗根系总 DNA 中没有扩增到任何特异性片段（图 2）。表明发根农杆菌 Ri 质粒上的 *rolB* 和 *rolC* 基因已整合到毛状根中，由此判定，所得到的根为发根农杆菌 A4 诱导出的甜叶菊毛状根。

2.3 毛状根中绿原酸类物质的测定结果

发根农杆菌 A4 诱导产生的毛状根在 MS 液体培养基里培养 35 d 后，收获并按照 2.6 测定方法计算甜叶菊毛状根中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的产量，分别为 4.57 mg/g、15.91 mg/g 和 3.92 mg/g，由图 3 可以看出，在毛状根提取液中检测到该绿原酸类成分，且三种物质在此色谱条件下可以很好地被分离出来（图 3b）。因此，本实验采用 HPLC 的方法测定毛状根中绿原酸类物质的含量。

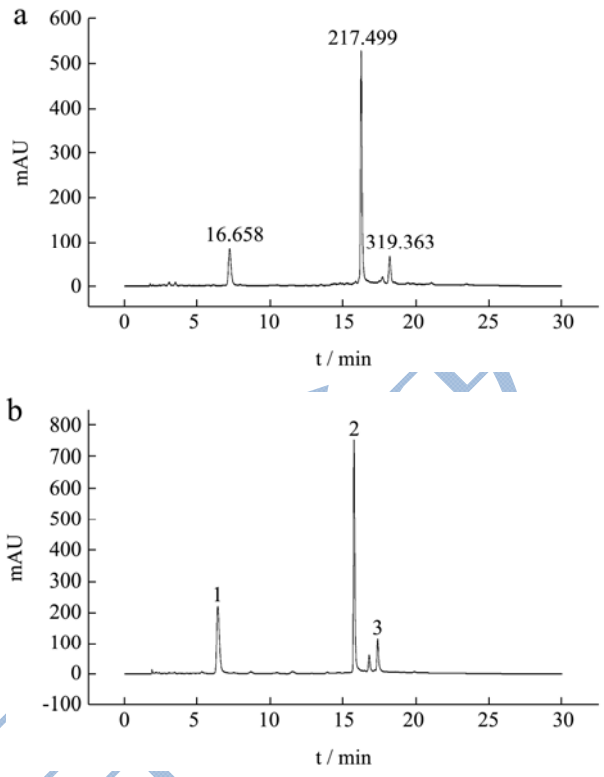


图 3 甜叶菊毛状根样品液相图

Fig.3 HPLC chromatograms of a *Stevia rebaudiana* hairy root sample

注：a 表示对照品；b 表示毛状根样品；1 表示绿原酸；2 表示 3,5-二咖啡酰奎宁酸；3 表示 4,5-二咖啡酰奎宁酸。

2.4 毛状根最优液体培养基的筛选

不同培养基组成成分及各成分的含量不同，对毛状根生长状态、生物量积累以及次级代谢物产量均有不同程度的影响。特别是培养基中的无机元素含量，若无机元素含量差别较大，对植物组织和细胞的生长造成的差异也就较大[15]。从表 3 中可看出，毛状根在不同培养基里培养到第 35 d 后，其生长状况差异很明显，其中 MS 培养基培养的毛状根，生物量和绿原酸类物质含量较其他培养基增长明显，干重增值倍数约为 24 倍，绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的最高产量分别为 4.57 mg/g、15.91 mg/g 和 3.92 mg/g。因此，选择 MS 液体培养基作为毛状根生长的最佳培养基，这与陈观水等人[16]报道 MS 液体培养基利于太子参毛状根次级代谢物积累的情况类似。在上述 3 种培养基中 MS、WPM 液体培养基中含有较高浓度的 Fe^{2+}、K^{+}属于高盐培养基；B5 液体培养基中含有较高的 NO^{3-}，较低的 $NH4^{+}$。由此可知，甜叶菊毛状根更适合在较高盐浓度的培养基中生长。

表 3 三种培养基对毛状根生长及绿原酸类物质积累的影响

Table 3 Effects of three basic media on growth and chlorogenic acid accumulation in hairy roots

培养基	接种量(g/bottle)	干重增长倍数	绿原酸含量/(mg/g)	3,5-二咖啡酰奎宁酸含量/(mg/g)	4,5-二咖啡酰奎宁酸/(mg/g)
MS	0.30	24.21^{aA}	4.57 ± 0.05^{aA}	15.91 ± 0.23^{aA}	3.92 ± 0.07^{aA}
B5	0.29	14.73^{bB}	2.89 ± 0.04^{bB}	10.44 ± 0.18^{bB}	1.49 ± 0.03^{bB}
WPM	0.29	21.16^{aA}	3.12 ± 0.02^{cB}	6.78 ± 0.13^{cC}	0.45 ± 0.02^{cC}

注：“a，b，c”表示差异 5%水平显著性；“A，B，C”表示差异 1%水平显著性。

2.5 茉莉酸甲酯和水杨酸诱导子对毛状根生长的影响

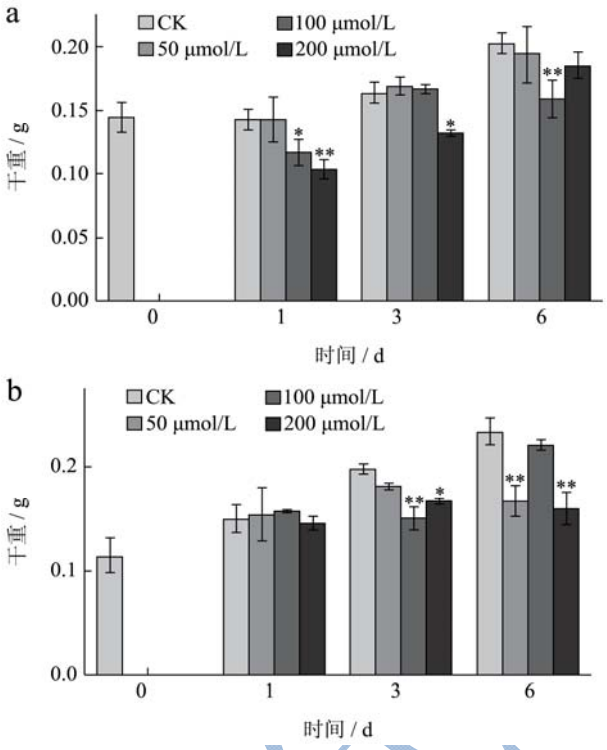


图 4 茉莉酸甲酯和水杨酸对甜叶菊毛状根生长的影响

Fig.4 Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the growth of *Stevia rebaudiana* hairy roots

注：a 表示茉莉酸甲酯；b 表示水杨酸；*表示差异 5%水平显著性；**表示差异 1%水平显著性。

图 4 显示，MJ 和 SA 在不同添加时间、添加浓度下均抑制了毛状根的生长。添加 100 μmol/L 的 MJ 在诱导到第 6 d 时，对毛状根生长的抑制作用较显著（$p<0.01$），抑制率达 21.19%（图 4a）；添加 200 μmol/L 的 SA，在抑制作用上较对照组差异极显著（$p<0.01$），抑制率高达 31.62%（图 4b）。结果表明，不同浓度的诱导子对毛状根生长的抑制作用不同，这与王瑜等人[17]报道不同浓度的茉莉酸甲酯、水杨酸对王不留行毛状根生长抑制程度不一样的结果相似。

2.6 茉莉酸甲酯对毛状根绿原酸类物质积累的影响

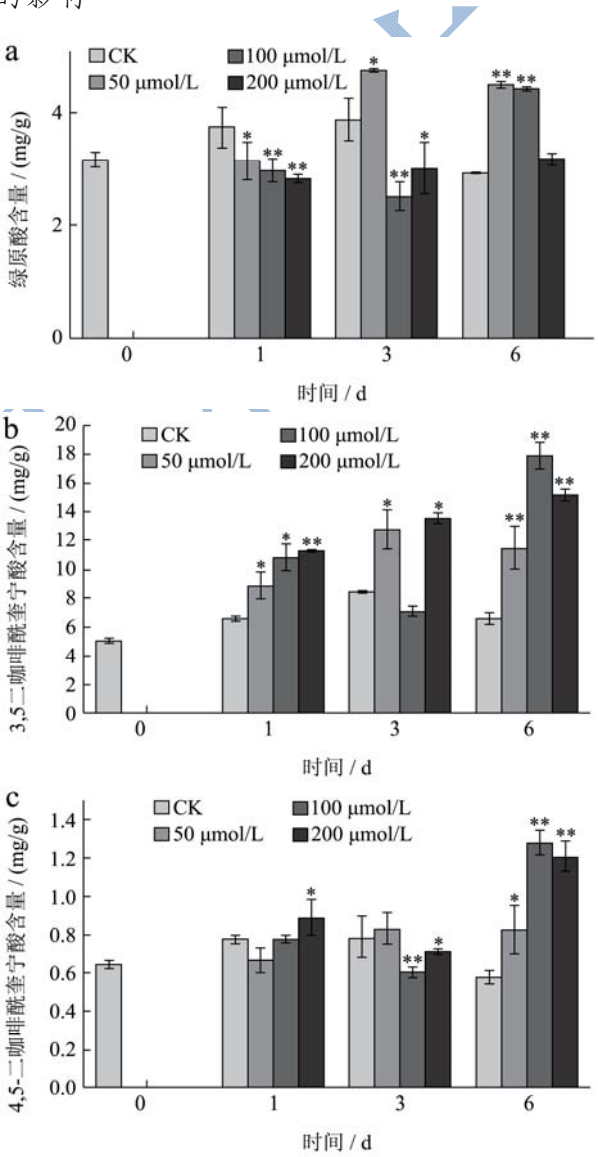


图 5 茉莉酸甲酯对甜叶菊毛状根绿原酸类化合物含量的影响

Fig.5 Effect of methyl jasmonate on the chlorogenic acid content of *Stevia rebaudiana* hairy roots

注：a 表示绿原酸；b 表示 3,5-二咖啡酰奎宁酸；c 表示 4,5-二咖啡酰奎宁酸；*表示差异 5%水平显著性；**表示差异 1%水平显著性。

从图 5 可以看出，MJ 对绿原酸类化合物积累量在诱导后的第 1 d 到第 3 d 时表现出无明显促进作用，甚至有略微下降，但在诱导第 6 d 后则表现出显著性

提高。当添加 100 μmol/L 的 MJ 时，绿原酸含量为 4.40 mg/g，较对照组提高了 1.51 倍（p<0.05）；3.5-二咖啡酰奎宁酸含量高达 17.85 mg/g，与同期对照组相比，显著性提高了 2.71 倍(p<0.01)；4,5-二咖啡酰奎宁酸含量为 1.279 mg/g，为对照组的 2.21 倍。结果表明，甜叶菊毛状根在经 100 μmol/L 的 MJ 诱导第 6 d 后，绿原酸类物质能快速且大量积累，这与 Yukimune 等报道[10]添加 100 μmol/L MJ 能明显提高紫杉醇含量的结果相似。

2.7 水杨酸对毛状根绿原酸类物质积累的影响

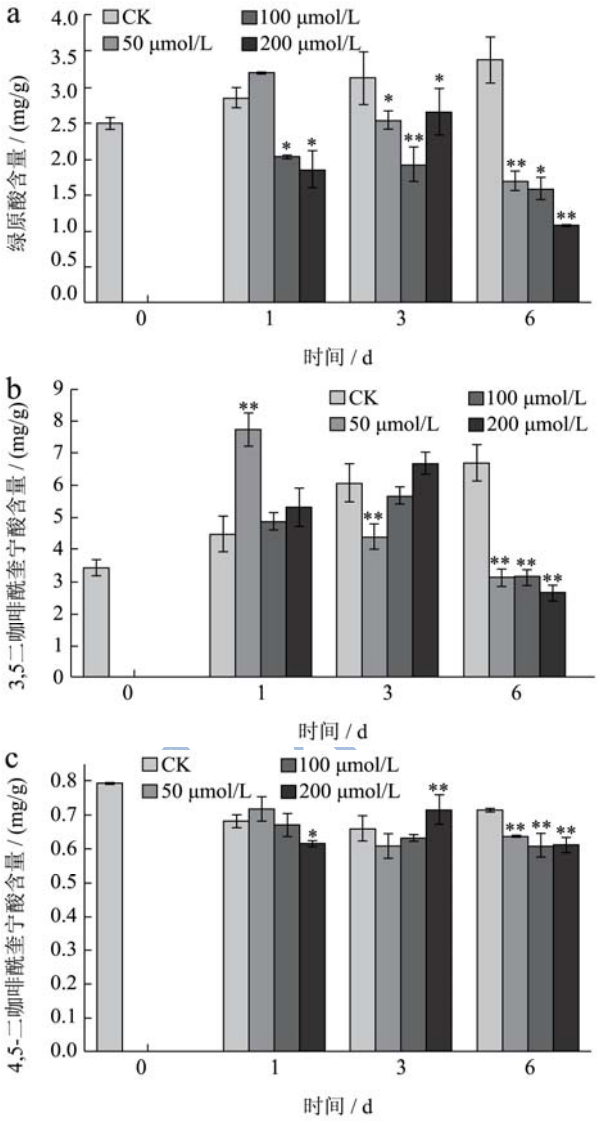


图 6 水杨酸对甜叶菊毛状根绿原酸类化合物含量的影响

Fig.6 Effect of salicylic acid on the chlorogenic acid content of *Stevia rebaudiana* hairy roots

注：a 表示绿原酸；b 表示 3,5-二咖啡酰奎宁酸；c 表示 4,5-二咖啡酰奎宁酸；*表示差异 5%水平显著性；**表示差异 1%水平显著性。

如图 6 所示，毛状根经 SA 诱导第 1 d 到第 3 d 时，抑制了其中绿原酸类成分的积累；诱导到第 6 d 时，抑制效果较明显，其中当添加 200 μmol/L 的 SA 诱导后，极显著地抑制了绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的积累，抑制率分别为 68.04%（p<0.01）、59.9%（p<0.01）、14.03%。结果表明，甜叶菊毛状根经 200 μmol/L 的 SA 诱导第 6 d 后，显著性地抑制了毛状根中绿原酸类成分的积累。

3 讨论

本文采用双子叶植物甜叶菊作为发根农杆菌 A4 转化对象，实验证明发根农杆菌 A4 同样能诱导甜叶菊产生毛状根。本实验室已利用发根农杆菌 C58C1 和 ACCC10060 诱导出甜叶菊毛状根并建立了毛状根培养产生绿原酸类化合物体系，通过研究发现在适宜的条件下不同发根农杆菌诱导的甜叶菊毛状根，其积累绿原酸类物质的能力不同，利用发根农杆菌 A4 诱导的甜叶菊毛状根，其生产绿原酸类物质能力略高。当挑选出生长旺盛的毛状根根系置于 MS 液体培养基培养 35 d 时生物量可增加 24 倍，通过比较发现，不同诱导子对毛状根生物量和绿原酸类物质含量的影响很大，选择适当浓度的诱导子可大幅度提高毛状根中绿原酸类物质含量。

本文研究了茉莉酸甲酯和水杨酸对甜叶菊毛状根中绿原酸类物质积累的影响，由实验结果可知，添加 MJ 诱导 6 d 后，促进了甜叶菊毛状根中绿原酸类物质的积累，而经 SA 诱导后却抑制了绿原酸类物质的积累，表明毛状根在生长阶段遇到不同诱导子会启动不同的响应机制来抵制外来环境对自身的影响，产生的效果也不一样[10]。诱导子作为一种外界信号，可以被甜叶菊毛状根细胞膜上的受体识别并与之结合，使细胞膜成分和性质发生变化，从而改变酶的活性，导致次生代谢物的含累随之增强或减弱[18]。即不同的诱导子在细胞膜上的受体不同，致使过敏反应特异性地抑制或者促进某一种或者某一类次生代谢产物的产生[10]，这可能是不同诱导子对甜叶菊毛状根中绿原酸类物质积累产生相反作用的原因。

目前，大量研究表明，诱导子对水溶性物质比对脂溶性物质的诱导效果差[10]，Ng 等人报道在培养 18 d 的丹参毛状根中加入不同浓度的 Ag^+，处理 7 d 后收获，结果只在最低浓度的 15 μmol/L 的处理组中检测到了水溶性类的迷迭香酸和总酚酸有所提高[19]；而 cheuk 等人报道了在培养 12 d 的丹参毛状根中分别添加 15~40 μmol/L 的 Ag^+，处理 10 d 后收获，发现脂溶

性类丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA 和隐丹参酮的含量均比对照增加 2 倍以上[20]。本文在培养 14 d 的甜叶菊毛状根中添加 MJ 诱导后，毛状根中水溶性的绿原酸类物质含量增长倍数最高也为 2.71 倍。chen 等人认为唇形科和紫草科植物中普遍存在的酚酸类成分如迷迭香酸，其含量可能与毛状根的生长状况有关，毛状根的生物量越大，总含量也就越高[21]。但本文中添加 MJ 和 SA 诱导处理后，毛状根的生长均受到抑制，而绿原酸类物质的含量却表现出不同趋势，其中的原因有待进一步研究。

参考文献

[1] Mosettig E, Beglinger U, Dolder F, et al. The absolute configuration of steviol and isosteviol [J]. Journal of the American Chemical Society, 1963, 85(15): 2305-2309

[2] Karaköse H, Jaiswal R, Kuhnert N. Characterization and quantification of hydroxycinnamate derivatives in *Stevia rebaudiana* leaves by LC-MS^n [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(18): 10147-10150

[3] Kim I S, Yang M, Lee O H, et al. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana*, water extracts [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(5): 1329-1332

[4] Michalik A, Hollinshead J, Jones L, et al. Steviamine, a new indolizidine alkaloid from *Stevia rebaudiana* [J]. Phytochemistry Letters, 2010, 3(3): 136-138

[5] Ibrahim N A, El-Gengaihi S, Motawe H, et al. Phytochemical and biological investigation of, *Stevia rebaudiana* Bertoni; 1-labdane-type diterpene [J]. European Food Research & Technology, 2007, 224(4): 485-488

[6] 张海弢,包京姗,杨世海,等.王不留行毛状根的诱导及培养[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):141-144
ZHANG Hai-tao, Bao Jing-shan, YANG Shi-hai, et al. Induction and culture of hairy roots of vaccaria segetalis [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(6): 141-144

[7] 付春祥,金治平,杨睿,等.新疆雪莲毛状根的诱导及其植株再生体系的建立[J].生物工程学报,2004,20(3):366-371
FU Chun-xiang, JIN Zhi-ping, YANG Rui, et al. Establishment of saussurea involucrata hairy roots culture and plantlet regeneration [J]. Chin. J. Biotech., 2004, 20(3): 366-371

[8] 孙敏,曾建军.长春花毛状根培养及抗癌生物碱产生的研究[J].中国中药杂志,2005,30(10):741-743
SUN Min, ZENG Jian-jun. A study on the hairy root culture and antitumor alkaloids production of *Catharanthus roseus* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(10): 741-743

[9] 宋经元.丹参毛状根培养的建立和丹参酮的产生[J].中国中药杂志,1995,20(5):269-271
SONG Jing-yuan. Establishment of salvia miltiorrhiza hairy root culture and tanshinone [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 1995, 20(5): 269-271

[10] 张顺仓,刘岩,沈双,等.诱导子对丹参毛状根酚酸类和丹参酮类成分积累的影响[J].中国中药杂志,2011, 36(10): 1269-1274
ZHANG Shun-cang, LIU Yan, SHEN Shuang, et al. The elicitors effects of phenolic acids and tanshinones component accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy root [J]. Traditional Chinese Medicine 2011, 36(10): 1269-1274

[11] Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, et al. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin Ⅲ in *Taxus* cell suspension cultures [J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(9): 1129-1132

[12] Fu X, Yin Z P, Chen J G, et al. Production of *Chlorogenic Acid* and its derivatives in hairy root cultures of *Stevia rebaudiana* [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(1): 262-268

[13] 李金亭,张元昊,郭晓双,等.怀牛膝毛状根诱导及培养体系的建立[J].河南师范大学学报:自然科学版,2013, 41(5):111-114
LI Jin-ting, ZHANG Yuan-hao, GUO Xiao-shuang, et al. Establishement of induction and culture system for hairy roots of achranthes bidentata BL [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2013, 41(5): 111-114

[14] 万小荣,李玲.发根农杆菌 Ri 质粒 *rolB* 基因研究进展(综述)[J].亚热带植物科学,2001,30(3):63-68
WAN Xiao-rong, LI Ling. Advances in studies on *rolB* gene of Ri plasmid from *Agrobacterium rhizogenes* (a review) [J]. Subtropical Plant Science, 2001, 30(3): 63-68

[15] 徐艳.麻疯树毛状根培养体系建立及诱导子对其有效成分含量的影响[D].徐州:江苏师范大学,2013
XU Yan. Establishment of *Jatrophacurcas* L. hairy root culture system and the effect of elicitors on content of active ingredient [D]. Xuzhou: Jiangsu Normal University, 2013

[16] 陈观水,陈来,林思妮,等.太子参毛状根诱导及培养体系的建立[J].时珍国医国药,2015,26(8):2021-2023
CHEN Guan-shui, CHEN Lai, LIN Si-ni, et al. Establishment of induction and culture system for hairy

roots of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(8): 2021- 2023

[17] 王瑜,杨世海.不同诱导子对王不留行毛状根生长和王不留行黄酮苷含量的影响[J].人参研究,2014,26(2):51-53
WANG Yu, YANG Shi-hai. Effect of different elicitors on the growth and vaccarin of *Vaccaria segetalis* hairy roots [J]. Ginseng Reseaarch, 2014, 26(2): 51-53

[18] Scheel D, Parker J E. Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation [J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, 2014, 45(6): 570-575

[19] Yan Q, Shi M, NG J, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Science, 2006, 170(4): 855-858

[20] Zhang C, Yan Q, Cheuk W K, et al. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag^{+} elicitation and nutrient feeding [J]. Planta Medica, 2004, 70(70): 149-151

[21] Hui C, Feng C, Chiu F C K, et al. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2001, 28(1): 102-105

现代食品科技