

· 综述 ·

# 毛状根研究进展及其在博落回资源创新中的应用前景<sup>△</sup>

夏丽琼<sup>1</sup>, 黄鹏<sup>2</sup>, 唐昭山<sup>3</sup>, 曾建国<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南农业大学 兽用中药资源与中兽药创制国家地方联合工程研究中心, 湖南 长沙 410128;

3. 湖南美可达生物资源股份有限公司, 湖南 长沙 410005)

[摘要] 发根农杆菌作为一种天然菌株可用于诱导多种植物产生毛状根性状。毛状根组织能够稳定高效地生产次生代谢产物, 该研究领域正受到越来越多的关注。本文对发根农杆菌及毛状根的特性、遗传机制和应用进行了综述。同时结合本课题组前期研究基础, 对毛状根在博落回资源创新与新药源途径开发上的应用前景进行展望。

[关键词] 毛状根; 次生代谢产物; 发根农杆菌; 博落回; 资源创新

## Research progress of Hairy Roots and Application Prospect in *Macleaya cordata* Resource Innovation

XIA Liqiong<sup>1</sup>, HUANG Peng<sup>2</sup>, TANG Zhaoshan<sup>3</sup>, ZENG Jianguo<sup>1,2\*</sup>

(1. School of pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. National and Local Union Engineering Research Center for the Veterinary Herbal Medicine Resources and Initiative, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. Micollta Bioresource Inc, Changsha 41005, China)

[Abstract] *Agrobacterium rhizogenes* as a natural strain can be used to induce a variety of plants to produce hairy root. The research of hairy root tissues of many plants is able to produce secondary metabolites in a stable and efficient way, which is attracting more and more attentions. In this paper, we reviewed the characteristics, genetic mechanism and application of *Agrobacterium rhizogenes* and hairy roots. Meanwhile, we combined with our previous research to discuss the application prospects of hairy root in resource innovation and new drug sources development in *M. cordata*.

[Keywords] Hairy root; secondary metabolites; *Agrobacterium rhizogenes*; *Macleaya cordata*; resource innovation  
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.10.028

毛状根(hairy roots)是植物宿主经过发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)浸染后, 在植株的创伤表面被诱导而出现的一种特殊表现型。目前, 发根农杆菌已被广泛应用于植物分子育种、植物代谢工程与次生代谢产物生产等领域, 具有很强的应用价值和研究意义。目前发现, 该技术适用于几乎所有双子叶植物及少数单子叶植物, 如黄芪<sup>[1]</sup>、曼陀罗<sup>[2]</sup>、人参<sup>[3]</sup>、西洋参<sup>[4]</sup>、颠茄<sup>[5]</sup>、莨菪<sup>[6]</sup>、决明子<sup>[7]</sup>、丹参<sup>[8]</sup>、辣椒<sup>[9]</sup>、长春花<sup>[10]</sup>、罂粟<sup>[11]</sup>等物种中。本文对发根农杆菌机制和原理进行简单介绍, 并重点关注毛根技术在次生代谢产物开发中的进展, 然后对毛状根技术在博落回资源开发中的优势进行

展望。

## 1 毛状根特性与形成机制

发根农杆菌属于根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)农杆菌属的一种革兰氏阴性好氧土壤细菌, 具鞭毛, 外形呈杆状, 其能感染大多数双子叶植物和少数单子叶植物及个别裸子植物<sup>[12]</sup>。发根农杆菌浸染植物宿主后会产生大量毛絮状不定根, 又被称作发根或毛状根。其根诱导的主要机制是发根农杆菌所含的 Ri 质粒。毛状根诱发机制<sup>[13]</sup>是由于农杆菌中的 Ri 质粒上存在 T-DNA(转移区)和 Vir(致病区)这2个与转化有关的功能区。其中转移区的主要功能是在转化时

<sup>△</sup> [基金项目] 湖南省科技重点计划(2016SK3002)

\* [通信作者] 曾建国, 教授, 研究方向: 中药资源综合利用; Tel: (0731)84673824, E-mail: zengjianguo@hunau.edu.cn

整合到宿主植物基因组,并表达决定毛状根形成的基因;致病区的作用是协助转移区完成转化。转移区中共包括左边界序列 TL-DNA 和右边界 TR-DNA 区。其中 TL-DNA 区中包含有 *rolA*<sup>[14-15]</sup>、*rolB*<sup>[16]</sup>、*rolC*<sup>[17]</sup>、*rolD*<sup>[18-19]</sup>这几个与毛状根表型性状产生有关的基因。这些基因在转入植物宿主后,对植物宿主表型产生影响,而其中的 *rolB* 基因是毛状根形成最关键的基因<sup>[20-22]</sup>。而在 TR-DNA 上有能指导吡啶乙酸合成的 *tms1* 和 *tms2* 基因,同时能促进毛状根的生成<sup>[23-24]</sup>。

## 2 毛状根技术的现状

### 2.1 毛状根技术的优点

相比户外田间种植的传统农作物或者转基因作物,毛状根组织始终处于人工可控的封闭环境中,产生基因漂移的风险大大降低;能快速生长,在培养过程中会高速增殖;与根瘤农杆菌相比毛状根的遗传性能稳定,继代与扩大培养后生化特性不易改变;毛状根能在培养基中产生代谢产物,为提取和分离提供了便利的条件。由于其具有稳定的生物合成能力,在对培养条件进行优化后可以实现可持续天然产物的工业化生产;目前已经发现有超过450种不同种类的植物易受发根农杆菌侵染<sup>[25-26]</sup>,包括多种双子叶植物、单子叶植物家系<sup>[27]</sup>及一些裸子植物,为代谢通路中靶基因的挖掘和筛选提供了方便。如杨蕊等<sup>[28]</sup>通过诱导并筛选出了高产量桃叶珊瑚苷的杜仲毛状根,其质量分数高于自然根及皮,最高可达  $30.105 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。Matsuda 等<sup>[29]</sup>通过发根农杆菌诱导甜瓜生成毛状根,能提高其中精油如(Z)-3-己烯醇,(E)-2-己烯醛,1-壬醇和(Z)-6-壬烯醇含量,且均高于天然成熟瓜果。Jiao Jiao 等<sup>[30]</sup>通过诱导黄芪产生毛状根来生产异黄酮,其最佳培养条件下,34日龄的总异黄酮积累量达到了  $234.77 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重(DW),比田间生长3年的黄芪根中( $187.38 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  DW)含量更高;除了植物宿主本身的代谢产物以外,毛状根材料还能够通过生物转化产生有价值的化合物,如东莨菪碱、尼古丁、莨菪碱、洋地黄毒苷等<sup>[31]</sup>。通过底物饲喂可以改变毛状根天然产物生产,比如 Faria 等<sup>[32]</sup>对苜蓿毛状根组织培养15d后,通过加入薄荷醇或香叶醇( $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )这两种含氧单萜底物,转化生成为10种新的香叶基乙酸酯,以及芳樟醇和橙花醇氧

化物。

### 2.2 毛状根技术的不足

毛状根技术虽然具有以上一些优点,但是由于还处于发展和完善阶段有以下不足之处:毛状根组织培养虽然在许多物种中都能够成功建立体系,但是目前真正能够实现商业化大规模生产的主要是人参,其中最成功的例子是韩国 CBN Biotech 公司(<http://cbnbiotech.com>)对人参根进行毛状根的生物反应器组培并实现了工业化大规模生产。CBN Biotech 公司生产的人参毛状根能够在45d的周期中产生850kg新鲜和85.4kg干生物质。目前,CBN生物技术公司每年生产30-35吨人参不定根,其产品大规模应用于制药、食品和化妆品行业<sup>[33]</sup>。但是经过诱导产生的毛状根多次继代培养后,其体内的有效成分会逐渐减少,甚至丢失,因此许多高价值的药用植物毛状根培养还仅仅停留在实验室阶段。且就目前情况来看,发根农杆菌诱导木本植物与单子叶植物成功率还很低,因此为进一步获得能稳定遗传的高产量的毛状根株系,其培养条件仍待继续优化。此外,毛状根工业化生产需要较高成本的装置与设备,这使其大规模生产受限,因此还需要进一步研制出廉价的新型生物反应器来提高产量和降低生产成本,实现工业化生产。

## 3 博落回毛状根工业化生产的可行性

博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 是罂粟科(Papaveraceae)博落回属(*Macleaya*)多年生草本植物,在中国作为一种传统天然药物已经使用有很长时间。其具有较好的抗炎、杀虫、抗癌、抗肿瘤、杀菌、调节动物肠道菌群,促进动物生长等作用<sup>[34]</sup>。国内研发的美佑壮已经被农业部批准为药物饲料添加剂,以替代饲用抗生素在国际上使用。血根碱(SAN)、白屈菜红碱(CHE)、小檗碱(BBR)等苜蓿基异喹啉类生物碱(BIAs)是博落回主要的生物活性成分。血根碱、白屈菜红碱等生物碱由于具有良好的抑菌、抗炎作用<sup>[35]</sup>,在欧洲已成为饲用抗生素的良好替代品<sup>[36]</sup>。市场对这些生物碱的需求逐年增加,而博落回作为一种野生资源,数量逐年减少。目前还未能实现大规模人工种植博落回,且环境因素对于人工种植影响很大。而BIAs分子结构复杂,因此通过化学合成血根碱的成本很高,也不利于产品开发。本课题组正在通过博落回“野生变家种”

及“定向培育”等研究手段培育高血根碱含量植株,但是这些传统育种手段有培育周期长、成本高等问题。因此,找到一种周期较短且能替代和可持续高效生产生物碱的方法是当务之急。

发根农杆菌诱导毛状根的技术已经在产生物碱类化合物植物中得到广泛应用。如罂粟中的可卡因还原酶基因(CodR),在植物表达载体中过表达后再通过发根农杆菌转移到罂粟中,可以使毛状根中的吗啡含量显著提高<sup>[37-39]</sup>。长春花<sup>[40]</sup>毛状根比叶和根中长春新碱的含量分别高0.5倍和23.5倍,长春碱含量分别高23.5倍和27.4倍。烟草<sup>[41]</sup>经发根农杆菌诱导不仅能合成烟碱,而且其烟碱含量均比对照高;其中以毛状根多倍体再生植株的烟碱含量最高,达到432.52 mg·g<sup>-1</sup>(干重),且分别约为对照和二倍体烟草毛状根再生植株的6.90倍和4.57倍。同样,一些罂粟科植物也已建立起毛状根体系,并获得了高产量的生物碱。如Borbiro<sup>[42]</sup>早在2000年就已经建立起了罂粟的发根农杆菌遗传转化体系。在此基础上,有学者利用该遗传体系,将可卡因还原酶基因(CodR)在罂粟毛根培养物中过量表达,将可卡因还原酶基因(CodR)的转录水平提高了10倍和24倍,并显著提高了吗啡和可待因的含量。除了通过基因过表达,不同发根农杆菌对植物宿主产生的效果也有差异,通过比较几种不同的发根农杆菌,筛选出了比野生型罂粟高出3倍可待因含量的高产细胞株。2010年,有研究通过蓟罂粟毛状根生产血根碱取得了成功,但是由于其中含有一些成瘾性物质,导致通过蓟罂粟工业化生产血根碱的方案无法实现<sup>[43]</sup>。而博落回作为一种完全不含有吗啡和可待因的植物,可以通过建立毛状根体系工业化生产血根碱。

目前,我们已经建立了完整的博落回体细胞再生体系<sup>[44]</sup>,为细胞悬浮培养以及未来的毛状根组培生产血根碱等次生代谢产物奠定了研究基础。之后,我们通过建立博落回花药离体培养技术,培育出了博落回单倍体材料,为构建博落回加倍单倍体或双单倍体(DH)系提供了基础数据<sup>[45]</sup>。2012年通过对博落回和小果博落回转录组进行高通量测序<sup>[46]</sup>,预测了大量参与血根碱合成的功能基因<sup>[47-49]</sup>。2017年在博落回全基因组测序基础上对14个参与合成血根碱与白屈菜红碱的功能基因进行了验证。同时,通过已经得到解析的博落回血根碱合成通路,利用发根农杆菌介导的遗传转化,过表达血根碱通路中的一些关键

基因,来提高血根碱含量。前期,本课题组已经初步建立了根癌农杆菌介导的博落回遗传转化体系<sup>[51]</sup>,这为发根农杆菌体系的建立提供了研究基础。

下一步,课题组拟通过使用多种发根农杆菌浸染博落回叶片组织,诱导外植体产生毛状根。然后通过超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法(UPLC-QQQ-MS)定量、通过高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF-MS)定性等方法检测毛状根组织中BIAs代谢产物的含量,来筛选高血根碱含量的材料以及最优化的培养方式。本课题组期望通过前期建立毛状根体系来实现博落回资源改良和血根碱新药源途径开发,若能实现将降低血根碱生产成本和资源的可持续开发。

#### 4 展望

迄今为止,绝大部分的生物碱只能从植物中提取。许多含有生物碱的植物属于野生资源,具有生长周期长、受环境影响大、采集困难、难以大规模种植或野生变家种后成本过高等问题。近年来,一些科研团队运用合成生物学方法在微生物中构建整个植物次生代谢合成途径,并实现了在酿酒酵母等微生物中合成生物碱。虽然通过微生物合成生物碱类化合物能够节省生产周期,但是由于合成生物碱类化合物的酶种类多且结构复杂,难以在微生物中高效表达。特别是一些合成路径很长的生物碱,如吗啡、血根碱等的产率很低,目前还无法实现大规模的工厂化生产。因此,在有革命性的新技术和新发现出现之前,运用代谢工程技术开发博落回毛状根技术也许也是开辟博落回新药源的一种现实选择。

虽然发根农杆菌和毛状根的研究取得了很多成果,但由于其利用时间还比较短,还有很多地方值得进一步研究。首先,不同的发根农杆菌菌株诱导植物产生毛状根的能力有差异,因此需要筛选出适合诱导博落回的发根农杆菌菌株。其次,在生物反应器中培养博落回毛状根来实现次生代谢产品的生产,其对于生物反应器的大小、形状等条件,对其次生代谢产物产量的影响,需要充分的研究,摸索出合适的培养条件及培养方式,使其得到最优化,最大限度地提高目的产物。目前,博落回资源的开发还主要集中在传统育种与提取工艺的改进上,通过毛状根技术来扩大博落回资源的开发利用将是未来一个重要的研究方向。

## 参考文献

- [1] Park Y J, Thwe A A, Li X, et al. Triterpene and Flavonoid Biosynthesis and Metabolic Profiling of Hairy Roots, Adventitious Roots, and Seedling Roots of *Astragalus membranaceus* [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(40): 8862-8869.
- [2] Sharafi A, Sohi H H, Mousavi A, et al. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression of codeinone reductase in transgenic hairy roots of *Papaver bracteatum*, the Iranian poppy [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(3): 445-453.
- [3] Saema S, Rahman L U, Singh R, et al. Ectopic overexpression of *WsSGTL1*, a sterol glucosyltransferase gene in *Withania somnifera*, promotes growth, enhances glycowithanolide and provides tolerance to abiotic and biotic stresses [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(1): 195-211.
- [4] Sivanandhan G, Kapil D G, Jeyaraj M, et al. A promising approach on biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L) Dunal [J]. *Protoplasma*, 2013, 250(4): 885-898.
- [5] 李姣姣. 颠茄胚性悬浮细胞遗传转化系的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [6] 张显强, 罗正伟, 张鸿, 等. 白花曼陀罗毛状根的诱导及东莨菪碱和莨菪碱的合成[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(21): 3223-3228.
- [7] 李素红. 决明毛状根诱导培养体系优化及成分分析[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [8] 崔北米, 梁宗锁, 刘岩, 等. ABA及其生物合成抑制剂对丹参毛状根酚酸类成分和关键酶的影响[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(6): 754-759.
- [9] Md S N, Jaafar S N, Abdul R Z, et al. Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum* species explants [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7(1): 414.
- [10] Peebles C A, Sander G W, Hughes E H, et al. The expression of 1-deoxy-D-xylulose synthase and geraniol-10-hydroxylase or anthranilate synthase increases terpenoid indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots [J]. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 234-240.
- [11] Ehrenberg R. Engineered yeast paves way for home-brew heroin [J]. *Nature*, 2015, 521(7552): 267-268.
- [12] Akhgari A, Yrjonen T, Laakso I, et al. Establishment of transgenic *Rhazya stricta* hairy roots to modulate terpenoid indole alkaloid production [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(11): 1939-1952.
- [13] 刘彤, 杨淑慎, 方荣锋, 等. Ri质粒介导的毛状根体系建立及其在植物次生代谢产物合成中的研究进展[J]. *植物科学学报*, 2015, 33(2): 264-270.
- [14] Bulgakov V P. Functions of rol genes in plant secondary metabolism [J]. *Biotechnol Adv*, 2008, 26(4): 318-324.
- [15] Bulgakov V P, Shkryl Y N, Veremeichik G N, et al. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2013, 134: 1-22.
- [16] Shkryl Y N, Veremeichik G N, Bulgakov V P, et al. The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *J Biotechnol*, 2013, 168(1): 64-70.
- [17] Vereshchagina Y V, Bulgakov V P, Grigorchuk V P, et al. The rolC gene increases caffeoylquinic acid production in transformed artichoke cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(18): 7773-7780.
- [18] Komarovska H, Kosuth J, Giovannini A, et al. Effect of the number of rol genes integrations on phenotypic variation in hairy root-derived *Hypericum perforatum* L. plants [J]. *Z Naturforsch C*, 2010, 65(11/12): 701-712.
- [19] Shkryl Y N, Veremeichik G N, Bulgakov V P, et al. Individual and combined effects of the rolA, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(1): 118-125.
- [20] 姜伊娜, 武天龙. 毛状根的研究进展及应用 [J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(1): 27-32.
- [21] Dilshad E, Cusido R M, Ramirez E K, et al. Genetic Transformation of *Artemisia carvifolia* Buch with rol Genes Enhances Artemisinin Accumulation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e140266.
- [22] Bulgakov V P, Gorpenchenko T Y, Veremeichik G N, et al. The rolB gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense [J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(3): 1371-1381.
- [23] Huang Y, Su C Y, Kuo H J, et al. A comparison of strategies for multiple-gene co-transformation via hairy root induction [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(19): 8637-8647.
- [24] Bulgakov V P. Functions of rol genes in plant secondary metabolism [J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(4): 318-324.
- [25] Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *agrobacterium rhizogenes*; Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype [J]. *Cell*, 1984, 37(3): 959-967.
- [26] D J R P P, D H F P. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1991, 10(4): 387-421.
- [27] Tepfer D. Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a

- source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology, and evolution[J]. Plant-microbe interactions (USA), 1989, 3:294-342.
- [28] 杨蕊, 张家辉, 孙雪梅, 等. 杜仲毛状根培养条件优化及其桃叶珊瑚苷药用成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15):1902-1905.
- [29] Matsuda Y, Toyoda H, Sawabe A, et al. A hairy root culture of melon produces aroma compounds [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(4):1417-1420.
- [30] Jiao J, Gai Q Y, Fu Y J, et al. Efficient production of isoflavonoids by *Astragalus membranaceus* hairy root cultures and evaluation of antioxidant activities of extracts [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(52):12649-12658.
- [31] Peng C X, Gong J S, Zhang X F, et al. Production of gastrodin through biotransformation of p-hydroxybenzyl alcohol using hairy root cultures of *Datura tatula* L [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 7(3):211-216.
- [32] Faria J M S, Nunes I S, Figueiredo A C, et al. Biotransformation of menthol and geraniol by hairy root cultures of *Anethum graveolens*: effect on growth and volatile components [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(6):897-903.
- [33] Murthy H N, Georgiev M I, Kim Y S, et al. Ginsenosides; prospective for sustainable biotechnological production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(14):6243-6254.
- [34] 杨军衡, 汪葵. 中药博落回的药理实验研究 [J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(6):60-62.
- [35] 彭懿, 左姿, 卿志星, 等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 技术鉴定博落回叶中化学成分 [J]. 中中药学, 2016(5):465-470.
- [36] 卿志星, 程辟, 曾建国. 博落回中生物碱质谱裂解规律研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(20):2929-2939.
- [37] 罗玉. 利用毛状根的培养生产植物次生代谢物 [J]. 云南农业科技, 2001(2):40-42.
- [38] Le Flem-Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Fliniaux M A. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402 [J]. Planta, 2004, 218(5):890-893.
- [39] Xool-Tamayo J, Serrano-Gamboa G, Monforte-Gonzalez M, et al. Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity in in vitro rootless shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy [J]. Biotechnol Lett, 2016:1-8.
- [40] 陈艺璇, 朱帅旗, 龚一富, 等. 共转 orca3/g10h 双基因长春花毛状根生物碱量及转录差异研究 [J]. 中草药, 2016, 47(18):3272-3278.
- [41] 王英娟, 步怀宇, 李多伟, 等. 烟草毛状根诱导及其茄尼醇含量初探 [J]. 植物学通报, 2006, 23(4):334-340.
- [42] Borbiri I, Lisztes E, Toth B I, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth [J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(8):1605-1614.
- [43] Chandra S, Chandra R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots [J]. Phytochemistry Reviews, 2011, 10(3):371.
- [44] 芦强, 彭琼, 李炎林, 等. 不同激素对博落回愈伤组织血根碱代谢累积水平的影响 [J]. 湖南农业科学, 2014(9):20-24.
- [45] 宋锡帅, 彭琼, 柳亦松, 等. 博落回花药离体培养及植株再生研究 [J]. 湖南农业科学, 2014(7):28-31.
- [46] 朱鹏程, 柳亦松, 黄鹏, 等. 博落回 SSR 引物的开发以及遗传多样性分析 [J]. 生命科学研究, 2013, 17(2):120-124.
- [47] 黄鹏, 刘金凤, 卿志星, 等. 博落回中四氢小檗碱氧化酶 Mc STOX 基因的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017(6):2458-2463.
- [48] 黄鹏, 刘金凤, 卿志星, 等. 博落回去甲乌药碱合成酶基因的克隆及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2017(2):454-459.
- [49] 刘金凤, 黄鹏, 柳亦松, 等. 博落回 Mc TYDC 基因的克隆与实时定量表达分析 [J]. 分子植物育种, 2017(2):501-506.
- [50] Liu X, Liu Y, Huang P, et al. The genome of the medicinal plant *Macleaya cordata* provides new insights into benzyloquinoline alkaloids metabolism [J]. Molecular Plant, 2017, 10(7):975.
- [51] 卓奕秀, 柳亦松, 谢红旗, 等. 博落回遗传转化体系的初步建立 [J]. 生命科学研究, 2016, 20(3):224-229.

(收稿日期 2017-02-20)