

# 茉莉酸甲酯和水杨酸对西洋参愈伤组织生长和皂苷形成的影响

郝甜甜,陈艳阳,苗佳琪,牛晨,梁佳,许永华\*

吉林农业大学中药材学院 人参新品种选育与开发国家地方联合工程研究中心,长春 130118

**摘要:**本文旨在探究不同诱导子对西洋参愈伤组织生长、相关酶活性及其人参皂苷含量的影响,在西洋参愈伤组织中,应用 HPLC 检测了添加诱导子茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和水杨酸(salicylic acid, SA)后西洋参愈伤组织皂苷生物合成的变化。结果显示,MeJA 抑制生长,但 SA 对其生长影响较小;2 种诱导子均可以显著激活西洋参愈伤组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量;培养基中 MeJA 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时,愈伤组织中总皂苷含量和产量均达到最大值,人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re、R<sub>b1</sub>、R<sub>c</sub> 的含量最高,在 SA 诱导子试验组中,当 SA 浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$  时,西洋参愈伤组织中总皂苷含量和产量均达到最大值,人参皂苷 R<sub>b1</sub> 的含量最高。结果表明,在西洋参愈伤组织中添加适当浓度 MeJA 和 SA 诱导子会提高人参皂苷化合物含量,其中以 MeJA 诱导人参总皂苷的效果最好,同时也会影响西洋参愈伤组织的生长量。说明在培养过程中添加外源诱导子,有利于提高西洋参愈伤组织中皂苷含量。

**关键词:**西洋参;茉莉酸甲酯;水杨酸;愈伤组织;抗氧化酶活性;人参皂苷

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)12-2063-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.12.010

## Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on callus growth and saponins production of American ginseng

HAO Tian-tian, CHEN Yan-yang, MIAO Jia-qi, NIU Chen, LIANG Jia, XU Yong-hua\*

State Local Joint Engineering Research Center of Ginseng Breeding and Application, College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of different inducers on callus growth, related enzyme activities and ginsenoside content of American ginseng (*Panax quinquefolium* L., AG). The changes of methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) on saponin biosynthesis in callus of AG were determined by HPLC. The results showed that MeJA inhibited the growth, but SA had little effect on the growth. Both inducers could significantly activate the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and malondialdehyde (MDA) content in callus of AG. When the concentration of MeJA in the medium was 100  $\mu\text{mol/L}$ , the content and yield of total saponins in callus reached the maximum, and the contents of ginsenosides R<sub>g1</sub>, Re, R<sub>b1</sub> and R<sub>c</sub> were the highest. In the SA-induced sub-experimental group, when the concentration of SA was 300  $\mu\text{mol/L}$ , the content and yield of total saponins in callus of AG reached the maximum, and the content of ginsenoside R<sub>b1</sub> was the highest. The results showed that adding appropriate concentrations of MeJA and SA inducers in the callus of AG could increase the content of ginsenosides, and MeJA had the best effect in inducing total ginsenosides, and also affected the growth of AG callus. The results indicated that the addition of exogenous inducers was beneficial to increase the content of saponin in callus of AG.

**Key words:** American ginseng; methyl jasmonate; salicylic acid; callus; antioxidant enzyme activities; ginseng saponin

西洋参(American ginseng, AG) *Panax quinquefolium* L. 是五加科人参属多年生草本植物,其主要活

性成分是人参皂苷、皂苷类化合物,它是世界上最常用的中草药之一<sup>[1]</sup>。根据现代研究表明,其在降血脂、改善心肌缺血、预防癌症等方面有显著功效<sup>[2,3]</sup>,具有极高的医学价值和商业价值。目前,我国西洋参长期依靠进口且面临野生资源稀缺,生产

收稿日期:2022-07-28

接受日期:2022-10-31

基金项目:吉林省科技厅科技支撑计划—重大专项(20200504004YY)

\* 通信作者 Tel:86-013756943327; E-mail: xuyonghua777@yeah.net

成本高、生长周期长,特别是西洋参中稀有皂苷的含量极低,难以满足临床应用需求<sup>[4,5]</sup>。采用药用植物细胞培养技术,不受时间、地域和材料生长时期的限制,可以在较短时间内获得大量的西洋参生物量及目标次生代谢产物<sup>[6]</sup>,值得注意的是,建立起来的西洋参愈伤组织培养系统仍然存在着人参皂苷产量低的问题,影响着西洋参产业的快速发展<sup>[7]</sup>。

随着诱导子的不断发展和广泛应用,关于诱导子作为一种特定信号,诱导细胞中目的基因表达,从而调节植物细胞中次生代谢产物合成已成为热点<sup>[8]</sup>,而将诱导子用于植物组织培养中促进次生代谢产物的积累研究也变的尤为重要。茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和水杨酸(salicylic acid, SA)作为一种常用的诱导子,对多种代谢产物合成具有促进作用,已成功应用于雷公藤、红花、黄芩、丹参等多种药用植物次生代谢产物的诱导中<sup>[9-12]</sup>。目前利用 MeJA 和 SA 处理西洋参愈伤组织提高皂苷含量的报道很少。因此,本试验以西洋参愈伤组织为材料,研究了 MeJA 和 SA 处理后对西洋参愈伤组织生长、相关酶活性及主要化学成分人参皂苷含量的影响,为西洋参愈伤组织培养及其次生代谢产物生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料:供试材料培养于吉林农业大学中药材学院温室 A04,两年生西洋参叶片为试验材料。由吉林农业大学许永华副教授鉴定为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolius* L.。以 1/4 MS 培养基为基本培养基,分别添加 6-BA 1.0 mg/L、2,4-D 2.0 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 6.5 g/L, pH = 5.8。培养条件为暗培养,温度(25 ± 2) °C,湿度 60%。

实验仪器:实验高压灭菌器(致微仪器有限公司,GI54DWS 型);双人单面净化工作台(浙江苏净化设备有限公司,SW-CJ-2FD 型);智能人工气候室(南京恒裕仪器设备制造有限公司,FYS-10 型);高效液相色谱仪(美国通微公司,Dionex UltiMate 3000 型);Multiskan GO 酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司-中国);ST16R 高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司-中国)。

实验试剂:MeJA(北京索莱宝科技有限公司,批号:20200118,纯度 ≥ 95.0%);SA(北京中科质检生物技术有限公司,批号为: B20191128,纯度 ≥ 98.0%);乙腈和甲醇均为色谱纯(赛默飞世尔科技

有限公司-中国);纯净水(杭州哇哈哈集团有限公司);SOD 试剂盒、CAT 试剂盒、POD 试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司,货号分别为 SOD-1-Y、CAT-1-Y、POD-1-Y)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试验设计

西洋参愈伤组织在培养第 15 d 加入诱导子,浓度分别设置为 MeJA (50、100、200、300 μmol/L);SA (50、100、200、300 μmol/L);以不添加任何诱导子为对照,每个浓度 3 次重复,10 瓶为一重复,25 °C 暗培养,至 35 d 收获。

#### 1.2.2 西洋参愈伤组织中生长量的测定

将收获的人参愈伤组织用滤纸吸干其表面水分,称其重量记为鲜重(fresh weight, FW),每 6 盘一组,重复 3 次,然后置于 50 °C 烘箱中烘干至恒重,称重记为干重(dry weight, DW)。

#### 1.2.3 抗氧化酶活性的测定

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定采用羟胺法,过氧化物酶(peroxidase, POD)活性测定采用愈创木酚法,过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定采用可见光法,丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸比色法,具体操作方法参照试剂盒说明书。

#### 1.2.4 西洋参愈伤组织中单体皂苷含量的测定

(1)色谱条件:Waters XBridge<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流速:1 mL/min;柱温:35 °C;流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱:0 ~ 35 min, 19% A; 35 ~ 50 min, 19% A → 22% A; 50 ~ 108 min, 22% A → 45% A;蒸发光散射检测器漂移管温度:75 °C,气体流量:2.5 L/min,增益值:1。

(2)样品中皂苷的提取方法:称取愈伤组织 100 mg,精密加入 1 mL 的甲醇,超声 1 h,置于 4 °C 冰箱过夜,取出,超声 3 h,5 000 r/min 离心 5 min,取上清,过 0.22 μm 滤膜,待高效液相色谱仪检测,进样量 20 μL。

(3)标准曲线制备:精密称取标准品人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rf、Rg<sub>2</sub>、Rb<sub>1</sub>、Rc、Rb<sub>2</sub>、Rb<sub>3</sub> 和 Rd 适量,加甲醇制成每 1 mL 分别含上述人参皂苷 0.200、0.200、0.194、0.200、0.224、0.210、0.200、0.190、0.204 mg 的混合标准品溶液。取上述混合标准品溶液,分别进样 1、2、4、8、16、20 μL,测定各种人参皂苷的峰面积,色谱图见图 1。

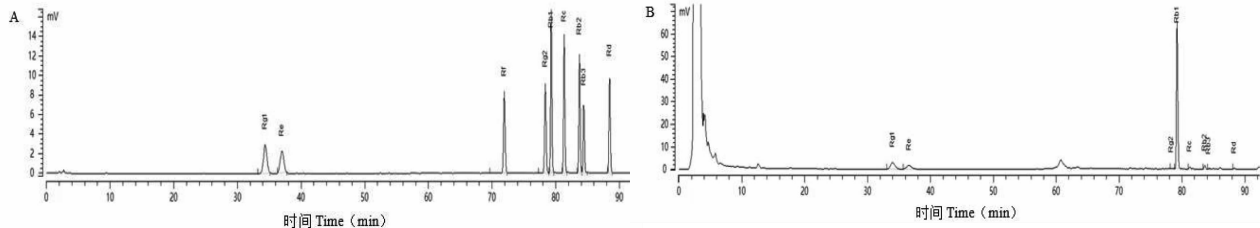


图1 标准品(A)与西洋参愈伤组织提取物(B)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of standard (A) and AG callus extract (B)

1.2.5 西洋参愈伤组织中总皂苷含量的测定

采用香草醛-高氯酸法测定愈伤组织中总皂苷的含量,参考于2020版《中国药典》<sup>[13]</sup>,修改处为:取愈伤组织100 mg,精密加入1 mL 甲醇,超声60 min,4 °C 冰箱过夜,超声3 h。5 000 r/min 离心5 min,取上清,待测。其他步骤均同《中国药典》。以人参皂苷Re为对照品,所得标准曲线为 $Y = 0.0022X + 0.0387, R^2 = 0.9975$ 。

1.2.6 数据统计与分析

本试验数据均使用Microsoft Excel 2019 进行统计整理,SPSS 18.0 软件进行统计分析,通过方差分析对比数据差异显著性;采用OriginPro 2018 软件绘制试验数据图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织生长的影响

由图2分析可知,不同浓度诱导子处理对西洋参愈伤组织FW及DW的影响不同。在西洋参愈伤组织中,(1)与对照组相比,各浓度MeJA诱导子处理均显著降低了愈伤组织的FW,但各浓度处理间的愈伤组织FW并无显著性差异( $P > 0.05$ ),说明

MeJA能明显抑制西洋参愈伤组织的生长;不同浓度的MeJA均会不同程度抑制西洋参愈伤组织干物质的积累,其浓度越高,抑制效果越强。当MeJA浓度为300 ( $\mu\text{mol/L}$ )时,西洋参愈伤组织DW最低,为0.6707 g,比对照组降低了27% ( $P < 0.05$ )。(2)在供试浓度内,SA诱导子对西洋参愈伤组织的生长表现为一定的抑制作用,且诱导浓度不同,对愈伤组织生长的抑制强弱有明显差异;与对照组相比,各浓度SA均不利于愈伤组织干物质的积累。

2.2 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织抗氧化酶活性及MDA含量的影响

由图3分析可知,在西洋参愈伤组织中,(1)同一诱导子处理组下,西洋参愈伤组织中SOD和CAT的活性随诱导子浓度变化的趋势并不一致。在供试浓度内,MeJA和SA处理组SOD、CAT活性均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。经50  $\mu\text{mol/L}$ 浓度MeJA和100  $\mu\text{mol/L}$ 浓度SA处理后的西洋参愈伤组织中SOD的活性均达到峰值,分别为对照组的1.84、2.04、1.94、1.90倍;经100  $\mu\text{mol/L}$ 浓度MeJA、50  $\mu\text{mol/L}$ 浓度SA处理后的西洋参愈伤组织中CAT活性均达到活性高峰。(2)MeJA和SA的作用浓度对西洋参愈伤组织中POD活性的影响趋势一致,均随着诱导子浓度的增加呈现出先上升后下降的趋势,POD活性诱导峰值分别出现在50  $\mu\text{mol/L}$ 浓度MeJA和100  $\mu\text{mol/L}$ 浓度SA诱导下。与对照组相比,50  $\mu\text{mol/L}$ 至200  $\mu\text{mol/L}$ 浓度MeJA能显著促进MDA含量的增加( $P < 0.05$ );在SA诱导子试验组内,低浓度SA对MDA含量无显著影响,高浓度SA能显著促进MDA含量的积累。

2.3 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织皂苷的影响

2.3.1 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织总皂苷的影响

由图4分析可知,与对照组相比,各浓度诱导子

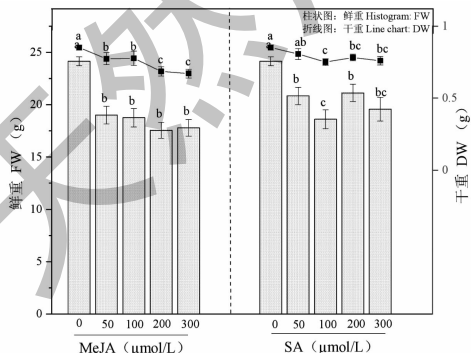


图2 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织FW和DW的影响  
Fig. 2 Effects of different concentrations of inducers

on FW and DW in callus of AG

注:图中不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。Note:

Different lowercase letters in graph indicate significant differences

( $P < 0.05$ ), the same below.

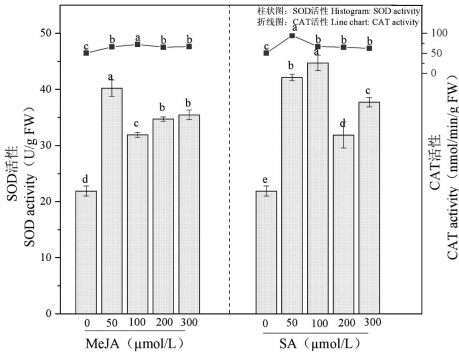


图3 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织中抗氧化酶活性及MDA含量的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of inducers on antioxidant enzyme activity and MDA content in callus of AG

均能显著促进西洋参愈伤组织中总皂苷含量和产量的增加( $P < 0.05$ )。在MeJA诱导作用下,总皂苷的含量和产量随着其作用浓度的增加呈现先增加后下降的趋势,但在SA诱导子作用下,总皂苷的含量和产量随着作用浓度的增加呈现出先增加后趋于平稳的趋势。(1)当MeJA浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,愈伤组织中总皂苷含量和产量均达到最大值,分别为 $31.4958 \text{ mg/g}$ 和 $24.4653 \text{ mg}$ ,是对照组的4.23和3.86倍。(2)在SA诱导子试验组中,当SA浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$ 时,西洋参愈伤组织中总皂苷含量和产量均达到最大值,分别为 $18.5376 \text{ mg/g}$ 和 $14.0853 \text{ mg}$ ,是对照组的2.49和2.22倍,但与 $200 \mu\text{mol/L}$ 浓度SA处理组之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。

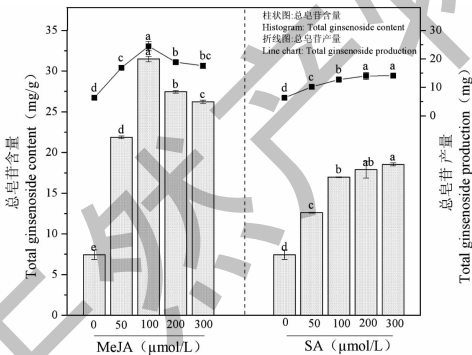


图4 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织中总皂苷的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of inducers on total saponins in callus of AG

### 2.3.2 不同浓度诱导子对西洋参愈伤组织单体皂苷含量的影响

由图5分析可知,与对照组相比,经适宜浓度MeJA和SA处理的西洋参愈伤组织中单体皂苷的含量均有明显提高( $P < 0.05$ )。(1)当MeJA浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>、Rc的含

量最高,其含量为 $2.5760$ 、 $2.2913$ 、 $7.4933$ 、 $0.6007 \text{ mg/g}$ ,是对照组的3.78、3.74、3.77、3.11倍。(2)经 $200 \mu\text{mol/L}$ 浓度SA处理的人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rg<sub>2</sub>、Rb<sub>2</sub>的含量最高,其含量为 $1.8740$ 、 $1.7123$ 、 $0.5173$ 、 $1.5170 \text{ mg/g}$ ,是对照组的2.75、2.79、11.50、1.45倍。当SA浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$ 时,人参皂苷Rb<sub>1</sub>的含量最高,为 $2.8853 \text{ mg/g}$ ,是对照组的5.78倍。

### 3 讨论与结论

虽然诱导子能够促使植物细胞有目的性的分泌某些次生产物,满足人类所需求的药用价值,但所产生的这类次生产物也可能对植物细胞自身的生长发育造成损伤,降低植物细胞的生物总量。Mao等<sup>[14]</sup>通过不同浓度的诱导子进行正交实验研究表明,不同浓度的MeJA和酵母提取物对朱砂愈伤组织的生长具有不同的生理作用;此外,Miao等<sup>[15]</sup>在试验中用HPLC测定香豆素含量结果表明,SA和MeJA对北沙参愈伤组织生长及香豆素均有一定的促进作用;Wang等<sup>[16]</sup>在试验中指出 $50 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 浓度MeJA会促进银杏悬浮细胞中黄酮含量的积累, $150 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 浓度则会抑制其合成。本试验中选用的MeJA和SA诱导子均对西洋参愈伤组织的生物量产生影响,均阻碍西洋参愈伤组织生长。这可能是因为高浓度的诱导子能激发植物体内多种胁迫反应,致使细胞内膜系统膨胀、收缩或破损等,破坏了细胞的正常结构,进而抑制了植物组织的生长。

正常条件下生长的植物细胞受到外源诱导子刺激时,细胞内的活性氧水平会表现出不同程度的失调。植物细胞会启动自身的抗氧化酶系统,利用SOD、CAT、POD等酶的相互协调配合,以清除体内过剩的自由基,从而保护植株在不良环境下免遭破

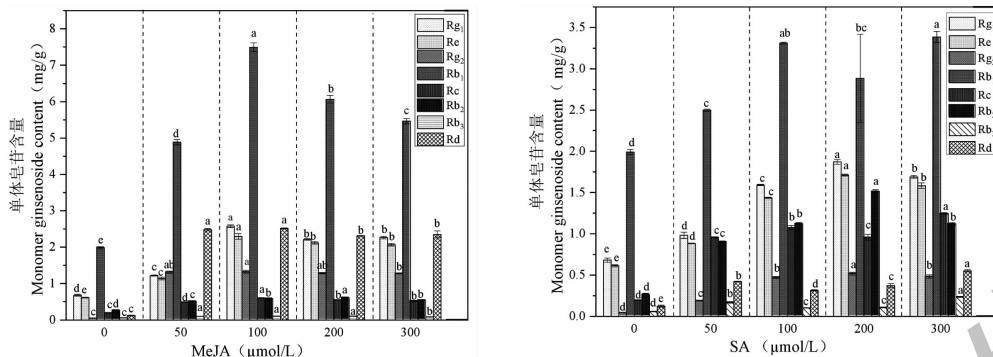


图5 不同浓度 MeJA 和 SA 对西洋参愈伤组织中单体皂苷含量的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of MeJA and SA on monoside saponins content in callus of AG

坏。MDA 作为细胞膜脂发生过氧化时的产物,能间接反应植物细胞膜系统受损程度以及植物的抗逆性<sup>[17,18]</sup>。Li 等<sup>[19]</sup>研究指出,SA 和 MeJA 对 SOD、POD、CAT 活性,MDA 含量及远志酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖的积累均具有促进作用。Taimoor 等<sup>[18]</sup>发现荞麦愈伤组织中 POD 和 SOD 活性随着 SA 作用时间的延长呈现出先上升后下降的趋势,在第 7 周时活性最高。Marziyeh 等<sup>[20]</sup>发现 4% 和 6% 浓度聚乙二醇显著增加了红豆杉愈伤组织中 MDA 含量,但 1%、2%、3% 和 5% 浓度聚乙二醇对 MDA 含量没有影响。在本研究中发现 2 种诱导子在适宜浓度下均可以显著激活西洋参愈伤组织中抗氧化酶 SOD、CAT、POD 活性和 MDA 含量,超出浓度范围相关酶活性低于对照组,这可能是由于诱导子对抗氧化酶活性影响都有一定限度,如果超过限度,会使酶活性大大降低,致使细胞内活性氧大量积累,从而危害植物细胞的正常生长。

大量研究表明,不同诱导剂和浓度对同一植物材料的影响有很大差异。例如,通过添加乙酸钠、SA 和  $\text{Cu}^{2+}$  能不同程度有效的提高北柴胡不定根的产量和柴胡皂苷的含量<sup>[21]</sup>;低浓度的稀土元素  $\text{Ce}^{3+}$  能增加银杏悬浮细胞中黄酮类化合物的产生,但是高剂量的  $\text{Ce}^{3+}$  会导致细胞死亡<sup>[22]</sup>。在同一植物中,诱导子诱导次生代谢产物的最佳浓度也不相同。Qi 等<sup>[23]</sup>发现在绞股蓝毛状根培养中,MeJA、SA 和酵母提取物的最佳添加浓度不同,分别不同程度增加毛状根生长量及总皂苷含量。本试验中发现,在西洋参愈伤组织中,2 种诱导子均能显著促进人参皂苷的积累,其中 MeJA 和 SA 诱导人参皂苷的最佳浓度分别为 100、200  $\mu\text{mol/L}$ ,分别是对照组的 4.23、2.49 倍。另外发现,不同诱导子及浓度影响

西洋参愈伤组织中单体皂苷的合成,其中对单体皂苷  $\text{Rg}_1$ 、Re、 $\text{Rb}_1$ 、Rd、Rc、 $\text{Rb}_2$  的影响变化很大。由此得出,在西洋参愈伤组织中,诱导效果为  $\text{MeJA} > \text{SA}$ 。在西洋参组织培养中,酵母提取物、SA、硝酸银、氯化钙、MeJA、真菌诱导子都能提高人参皂苷的含量,我们的结果与其一致<sup>[24-26]</sup>。这种结果可能是由多种因素共同作用导致,原因可能与不同诱导子的受体种类、数量有关,虽然低浓度的诱导子对细胞的伤害较小,但可能只会引起植物细胞的部分诱导,使次生代谢产物的含量达不到最高值;也可能与西洋参愈伤中各个内源细胞分裂素水平不同有关,导致次生代谢产物在植物体内涉及多个合成途径及反应步骤不同,不同诱导子所参与的合成通路不同。因此,选择合适的诱导子以及最佳的浓度促进西洋参愈伤生长和人参皂苷积累尤为重要。

次生代谢产物是植物在长期进化中对生态环境适应的结果,在植物生命活动中有重要意义,还是许多药物、染料、香料等化合物的重要来源<sup>[27]</sup>。诱导子是在植物组织培养中诱导新的次生代谢产物或增强生物合成以及积累次生代谢产物最有效和最广泛使用的生物技术工具之一<sup>[14]</sup>。本试验考察了 MeJA 和 SA 诱导子对西洋参愈伤组织生长、相关酶活性及人参皂苷含量的影响,结果表明在西洋参愈伤组织中添加适当浓度 MeJA 和 SA 均可以显著激活相关酶活性,提高人参皂苷化合物含量,虽然 MeJA 抑制生长,但是 MeJA 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时,愈伤组织中总皂苷含量和产量均达到最大值,人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、Re、 $\text{Rb}_1$ 、Rc 的含量最高,所以 MeJA 诱导人参总皂苷的效果最好。本文为利用诱导子促进西洋参有效成分合成提供了依据,但关于诱导子调控西洋参愈伤中人参皂苷积累的机理,以及如何更有效地

协同利用诱导子促进西洋参愈伤品质的提高,是后续实验中需要解决的问题。

### 参考文献

- Szczuka D, Nowak A, ZakŁos-Szyda M, et al. American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) as a source of bioactive phytochemicals with pro-health properties [J]. *Nutrients*, 2019, 11:1041.
- Yu YH, Zhang P, Wang CL, et al. *Panax quinquefolium* saponin optimizes energy homeostasis by modulating AMPK-activated metabolic pathways in hypoxia-reperfusion induced cardiomyocytes [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27:613-620.
- Tang HL, Wang XC, Li J, et al. Research progress on saponins, biological activities and quality control of *Panax quinquefolium* [J]. *China J Chin Meter Med* (中国中药杂志), 2022, 47:36-47.
- Liu TC. Introduction and cultivation of Ginseng in China [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1990, 13:42-45.
- Guo QS, Wang CL. Overview and prospect of cultivation history of medicinal plants in China [J]. *China J Chin Meter Med* (中国中药杂志), 2015, 40:3391-3394.
- Lu JX, Guo RQ, Lin HB. Recent status of tissue culture research of *Panax quinquefolium* and discussion on related technical issues [J]. *Shandong Agric Sci* (山东农业科学), 2021, 53:125-129.
- Liu H, Gao WY, Zuo BM, et al. Advances in tissue culture of *Panax quinquefolium* [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2012, 14:1-4.
- Chamkhi I, Benali T, Aanniz T, et al. Plant-microbial interaction: the mechanism and the application of microbial elicitor induced secondary metabolites biosynthesis in medicinal plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 167:269-295.
- Liu N, Wu XY, Song YD, et al. Establishment of Tissue culture system of safflower and analysis of secondary metabolites in suspension cells [J]. *China J Chin Meter Med* (中国中药杂志), 2021, 46:4380-4388.
- Fang YM, Cui MY, Liu J, et al. Advances in flavonoid biosynthesis in *Scutellaria* [J]. *China J Chin Meter Med* (中国中药杂志), 2020, 45:4819-4826.
- Zhang JJ, Tan RH. Effect of inducers on accumulation of salvianolic acids in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Univ Tradit Med Sin Pharm Shanghai* (上海中医药大学学报), 2017, 31:91-94.
- Zhang Q, Song P, Zhu LG, et al. Effect of inducer on triptolide accumulation in *Tripterygium wilfordii* suspension cells [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi* (江西农业大学学报), 2021, 43:1149-1158.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:15.
- Mao MQ. Effects of inducers on callus growth and triterpenoid saponins synthesis in *Cinnabar* root [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University (四川农业大学), 2018.
- Miao XY, Zhu WH, Zhang XM, et al. Effects of salicylic acid, methyl jasmonate and ultrasonic wave on callus growth and coumarin production of *Panax mongolicum* [J]. *Food Sci* (食品科学), 2016, 37:181-185.
- Wang JY. Effect of exogenous inducers on the accumulation of flavonoids in *Ginkgo biloba* tissue culture [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology (中南林业科技大学), 2019.
- Ewa K, Ewa B, Piotr S, et al. Abscisic acid regulates the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene promoter and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy root cultures [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:1310.
- Taimoor K, Tariq K, Christophe H, et al. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica* [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 129:525-535.
- Li J, Hu BX, Peng L, et al. Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on the growth, enzyme activities and chemical constituents of callus of *Polygramus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50:2976-2982.
- Marziyeh S, Naser K, Javier P, et al. Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. callus culture [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2019, 137:319-328.
- Wang M, Song Y, An H, et al. Effects of exogenous inducers on the accumulation of secondary metabolites in plant suspension cells [J]. *J Plant Physiol* (植物生理学报), 2021, 57:739-748.
- Chen Y, Luo Y, Qiu N, et al.  $Ce^{3+}$  induces flavonoids accumulation by regulation of pigments, ions, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes in suspension cells of *Ginkgo biloba* L. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2015, 123:283-296.
- Qi MJ. Effect of inducer on growth and total saponins content of hairy root of *Gynostemma pentaphyllum* [D]. Guiyang: Guizhou Normal University (贵州师范大学), 2021.
- Zhao SJ, Hou Y, Jia DM, et al. Induction of *Panax quinquefolium* root and effects of different exogenous substances on root growth and saponin content [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22:98-103.