

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-095

植物合成生物学：植物细胞大规模培养的新机遇

颜钊涛^{1,2,3}, 周鹏飞⁴, 汪阳忠¹, 张鑫¹, 谢雯燕¹, 田晨菲^{1,2}, 王勇²

(¹ 上海烟草集团有限责任公司烟草行业卷烟烟气重点实验室, 上海 201315; ² 中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 植物生理生态研究所, 中国科学院合成生物学重点实验室, 上海 200032; ³ 中国科学院大学, 北京 100049; ⁴ 广东医科大学基础医学院, 广东 东莞 523808)

摘要: 植物细胞培养 (plant cell culture, PCC) 作为一种极具发展潜力的生物合成平台, 具有生长周期短、成本效益高、无病原危害、次生代谢产物丰富等优势, 在医药、食品和保健等领域备受关注。然而, 生产效率不足是限制 PCC 应用于商业化生产的最大阻碍, 其中, 遗传转化效率低、调控网络复杂、细胞结团及遗传稳定性差是主要困难。合成生物学遵循自下而上的工程化建造理念, 对天然植物细胞进行精准设计与改造, 为开发高效、经济可行的植物细胞工厂提供了新的解决方案。本文回顾了 PCC 作为合成平台在生产重组蛋白和次生代谢产物中的研究现状。重点探讨了植物合成生物学对 PCC 在工业化发展中的推动作用, 包括优质植物细胞系的构建、遗传转化体系的优化、表达系统的优化、生产效率与产能的提升以及赋予植物细胞合成异源产物的能力。未来, PCC 的发展更需强调合成生物学理念和技术在突破当前技术瓶颈中的关键作用, 以促进植物细胞大规模培养的进一步发展。

关键词: 植物合成生物学; 植物细胞; 生物合成; 天然产物; 基因工程

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Plant synthetic biology: new opportunities for large-scale culture of plant cells

YAN Zhaotao^{1,2,3}, ZHOU Pengfei⁴, WANG Yangzhong¹, ZHANG Xin¹, XIE Wenyan¹,
TIAN Chenfei^{1,2}, WANG Yong²

(¹Key Laboratory of Cigarette Smoke in Tobacco Industry, Shanghai Tobacco Group Co., Ltd, Shanghai 201315, China; ²Key Laboratory of Synthetic Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁴School of Basic Medical Sciences, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China)

Abstract: Plant Cell Culture (PCC) has emerged as a highly promising chassis for synthetic biology, offering a range of advantages such as short growth cycles, cost-effectiveness, absence of pathogenic risks, and abundant secondary

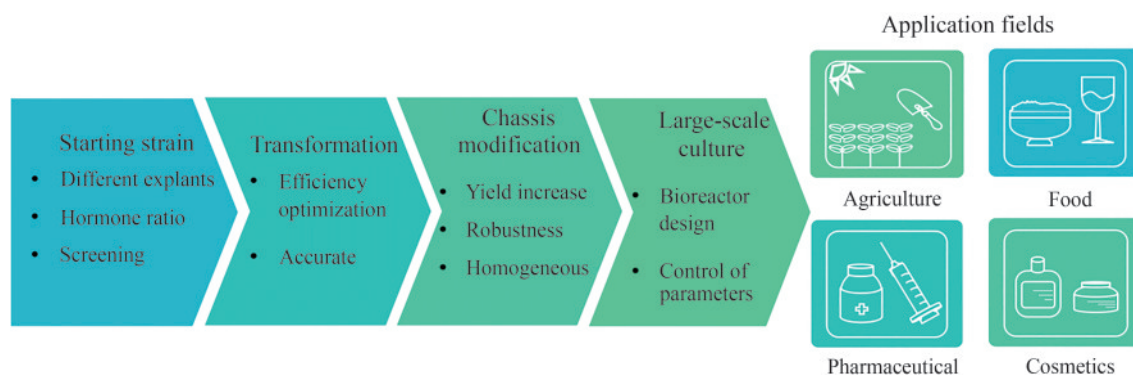
收稿日期: 2024-12-18 修回日期: 2025-02-24

基金项目: 国家重点研发计划 (SQ2024YFA1700126); 上海市市级重大专项 (24HC2820400); 上海烟草集团有限责任公司行业卷烟烟气重点实验室开放性课题 (K2023-1-044P)

引用本文: 颜钊涛, 周鹏飞, 汪阳忠, 张鑫, 谢雯燕, 田晨菲, 王勇. 植物合成生物学: 植物细胞大规模培养的新机遇[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 1107-1125

Citation: YAN Zhaotao, ZHOU Pengfei, WANG Yangzhong, ZHANG Xin, XIE Wenyan, TIAN Chenfei, WANG Yong. Plant synthetic biology: new opportunities for large-scale culture of plant cells[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(5): 1107-1125

metabolites. These features make PCC an attractive alternative for applications in medicine, food, and health. However, insufficient production efficiency due to difficulties in genetic transformation, complex regulatory networks, cell aggregation, and poor genetic stability remains a major obstacle that limits the commercialization of PCC. Synthetic biology, with its bottom-up engineering design approach, provides a powerful toolkit to address these challenges. By enabling the precise design and modification of native plant cells, synthetic biology offers innovative strategies to develop efficient and economically viable plant cell factories. In this paper, we first review the current status of PCC in synthesizing high-value compounds, particularly recombinant proteins and secondary metabolites. Recent advancements have demonstrated the potential of PCC to produce therapeutic proteins, vaccines, industrial enzymes and bioactive compounds such as alkaloids, flavonoids, and terpenoids. These successes underscore the versatility of PCC as a bioproduction platform. We then explore the role of synthetic biology in advancing PCC industrialization. Key developments include the creation of high-quality plant cell lines through genome editing tools like CRISPR/Cas9, enhancing genetic stability and metabolic efficiency. Additionally, synthetic biology has improved genetic transformation systems, overcoming a critical bottleneck in PCC. Enhanced expression systems, incorporating synthetic promoters and regulatory elements, have significantly boosted target compound yields. Furthermore, synthetic biology has expanded PCC applications by enabling the biosynthesis of heterologous compounds beyond their native metabolic pathways. Finally, we discuss future prospects, emphasizing the potential of synthetic biology to overcome current technical challenges. Emerging technologies including multi-omics integration, machine learning, and synthetic organelle development are anticipated to further enhance PCC's scalability and efficiency. By addressing these challenges, synthetic biology will pave the way for large-scale plant cell cultivation, thereby facilitating its widespread adoption in industrial bioproduction. The convergence of PCC and synthetic biology holds immense potential for the sustainable, cost-effective, and scalable production of high-value compounds.



Keywords: plant synthetic biology; plant cells; biosynthesis; natural product; genetic engineering

通过对细胞进行大规模培养，利用其代谢能力实现物质的生产加工，已成为生物制造的重要方式。这种以“细胞工厂”为核心的生产技术被广泛用于生产药物、香精香料、工业酶和色素等高附加值生物制品，这里的细胞包括微生物细胞、哺乳动物细胞和植物细胞等。其中，植物细胞培养（plant cell culture, PCC）凭借其独特的代谢能力、可持续性和生物安全性，成为生物制造领域

不可或缺的重要补充^[1]。

20世纪初，德国植物学家Gottlieb Haberlandt提出植物细胞具有全能性的理论，为植物细胞离体规模化培养奠定了理论基础（图1）。在这一理论指导下，研究人员成功建立起了烟草、水稻、小麦、胡萝卜、红豆杉、人参、银杏等多种植物的离体细胞系^[2-6]。这些离体植物细胞可以在合适的培养条件下进行大规模培养，用于生产紫草素、紫

杉醇等天然产物和葡萄糖脑苷脂酶等重组蛋白，在生物制造领域展现出了巨大的潜力^[7-10]。其中，德国Phyton生物科技公司利用PCC平台生产的抗癌药物成分紫杉醇，能够满足全球1/3的市场需求，被视为植物细胞大规模培养技术产业化应用的标志性事件^[11]（表1）。在化妆品领域，来源于PCC的活性成分也备受关注。通过不同溶剂提取的多酚、酚酸、三萜、黄酮类化合物、芪类化合物等化学物质，已经被作为天然护肤成分用于商业化产品中^[7]。在食

品工业中，可可豆细胞在生物反应器中只需要7天即可收获，被用于大量制造巧克力的原料可可脂（<https://swissfoodnutritionvalley.com/>）。

尽管植物细胞天然具备合成大量具有生物活性的复杂成分的能力，但受限于遗传转化效率低下、基因组高度复杂以及表观遗传干扰等问题，使得其遗传改造的程度远落后于经典微生物底盘，这也限制了植物细胞在生物制造领域的深度开发。相较于微生物底盘改造后的生产效益，PCC受限

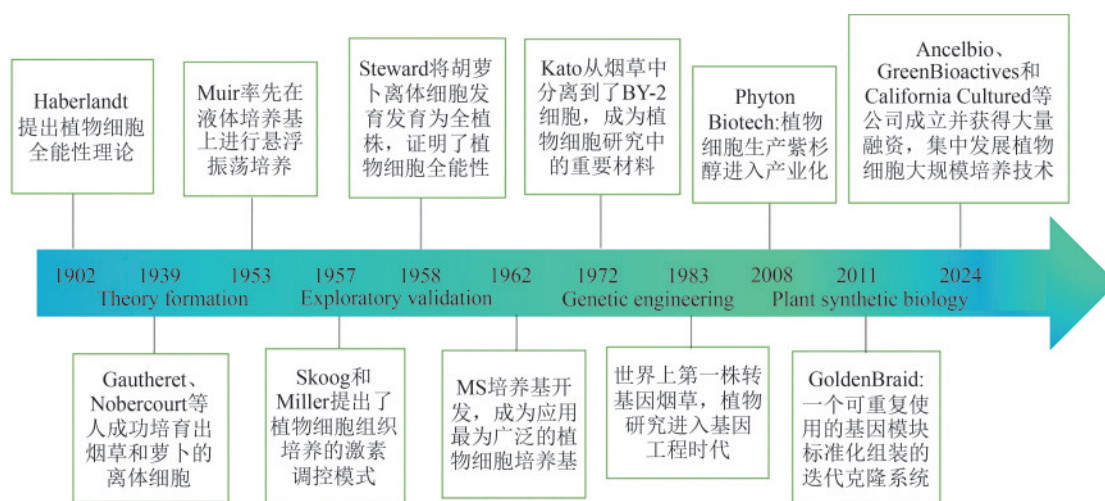


图1 植物细胞培养发展时间线

Fig. 1 Time line of plant cell culture development

表1 植物细胞大规模生产的商业化案例

Table 1 Commercial cases of mass production of plant cells

产品	物种	应用	制造商	参考资料
紫杉醇	<i>Taxus chinensis</i> L.	药物, 抗癌	Phyton Biotech	https://phytonbiotech.com/about-pcf/
迷迭香酸	<i>Melissa axillaris</i> L.	药物, 抗氧化	Aethera Biotech	https://www.aetherabiotech.it/en/
可可粉	<i>Theobroma cacao</i> L.	食品成分	California Cultured	https://www.cacultured.com/
黄烷醇	<i>Theobroma cacao</i> L.	医药、保健品成分	AyanaBio	http://www.ayanabio.com
海茴香细胞提取物	<i>Crithmum maritimum</i> L.	化妆品成分, 抗氧化	Ancebio	http://ancebio.cn/
火绒草细胞提取物	<i>Leontopodium alpinum</i> L.	化妆品成分, 抗皱	Ancebio	http://ancebio.cn/
GBL-Skin ¹	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> L.	化妆品原料, 乳化剂	Green Bioactives	https://greenbioactives.com/
白藜芦醇	<i>Graptoveria amethorum</i> L.	化妆品、保健品成分	Bioharvest Science	https://bioharvest.com/
Elelyso	<i>Daucus carota</i> L.	戈谢病治疗性蛋白	Protalix BioThera	http://protalix.com https://clinicaltrials.gov
OPRX-100	<i>Daucus carota</i> L.	溃疡性结肠炎治疗性蛋白	Protalix BioThera	http://protalix.com https://clinicaltrials.gov
PRX-102	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	法布里病治疗性蛋白	Protalix BioThera	http://protalix.com https://clinicaltrials.gov
新城疫疫苗	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	新城疫疫苗	Dow AgroSciences	https://www.dow.com/
MOSS-FH	<i>Physcomitrium patens</i> L.	溶血性尿毒症综合征治疗性蛋白	Greenovation Biotech GmbH	http://www.greenovation.com/developmental-pipeline.html

于落后的遗传改造技术，其生物制造潜力远未能达到理论上可以实现的水平，这也说明了植物细胞作为合成底盘的巨大潜力尚未得到充分挖掘。作为一门融合系统生物学、生物信息学与代谢工程等学科的交叉领域，合成生物学遵循“设计-建造-测试-学习”（DBTL）的循环过程，通过人工设计和构建生物系统，赋予生物底盘本不具备的性能。利用植物合成生物学的技术手段对植物细胞代谢网络和细胞性状进行精准改良和优化，有望突破传统PCC中面临的技术瓶颈和系统性缺陷^[12-13]。具体而言，对于天然可以合成目标产物的植物细胞，植物合成生物学可以通过加强限速酶表达、优化关键代谢途径等手段进一步提升产能；对于天然无法合成目标产物的植物细胞，则可以通过引入合成途径、重编程代谢网络等手段赋予其全新的合成能力。

1 植物细胞规模培养作为合成平台的发展潜力

值得注意的是，目前基于PCC的商业化产品（表1）绝大部分仍使用未经遗传改造的天然植物细胞进行生产。这表明尽管植物细胞底盘在技术成熟度上落后于经典微生物底盘，但其强大的合成能力仍足以支撑某些复杂化合物或特定功能蛋白的工业化生产，并在经济效益上保持竞争力。相较于传统植株种植，植物细胞培养具有生长周期短，不受地理环境和季节气候影响等优势，同时避免了杀虫剂、除草剂或其他化学物质对环境的污染，能够高效生产在植株中积累量十分有限的天然产物^[14-17]。与微生物细胞相比，植物细胞具备强大的翻译后修饰能力和精细的细胞区隔结构^[18]，支持细胞色素P450等复杂膜蛋白的空间定位与催化活性，从而高效生产出其他方式产量有限的复杂天然产物或具有生物学活性的功能蛋白。相较于哺乳动物细胞培养，PCC不需要血清，成本更低，且不存在潜在的人类病原体污染问题和动物细胞可能涉及的伦理问题^[19-20]。不仅如此，在种质资源保护方面，植物细胞的应用减少了对野生植株的依赖和破坏，且不存在转基因生物释放

等转基因污染问题，在维护生态多样性和稳定性的同时能够有效地解决供需矛盾。

1.1 用于生物合成的植物细胞

生产活性蛋白和代谢物的体外植物细胞类型包括愈伤组织细胞（dedifferentiated cell, DDC）、形成层干细胞（cambial meristematic cell, CMC）、毛状根等。

DDC是植物受伤后在伤口表面新生的组织细胞，由原有细胞脱分化形成。愈伤组织细胞需要培养在特定的激素培养基中，以保持其未分化状态。目前大部分文献中报道的体外培养植物细胞主要指DDC^[3, 21]。根据DDC的形态、生理特性或功能可将其划分为不同亚群，如易碎型或致密型、胚性或非胚性等。将植物细胞分散后转移到液体培养基中获得悬浮细胞，可以在大规模生物反应器中进行培养，符合GMP（Good Manufacturing Practice）程序，其中，易碎型DDC质地疏松，更适合体外悬浮培养。DDC是植物细胞悬浮培养用于生产高附加值产物最为常见的细胞材料，被用于生产白藜芦醇、阿魏酸、利血平、花青素等^[13]。拟南芥（*Arabidopsis thaliana* L.）和烟草作为研究最深入的模式植物，相应开发出的悬浮细胞系被广泛用于植物细胞生长调控机制、蛋白互作和重组蛋白表达等相关研究，如拟南芥来源的T87和PSB-D细胞系、烟草来源的BY-2（*Nicotiana tabacum* L. cv bright yellow 2）和NT-1细胞系^[22-25]。其中，BY-2被称为“植物中的HeLa细胞”，具有生长速度快、细胞周期同步和易于遗传转化的特点。仅需一周时间，细胞数量即可增加80~100倍^[26]。值得注意的是，BY-2细胞已丧失光合作用能力而成为专性异养细胞，而T87、PSB-D等其他的细胞系能够在光照条件下重新生成可进行光合作用的叶绿体^[27]。

CMC源于植株中负责产生木质部和韧皮部产生的形成层分生组织细胞，相较于DDC，CMC无需经历脱分化过程，全能性更高。近年来CMC被广泛用于天然产物的合成，如利用红豆杉CMC生产紫杉醇^[28]，利用长春花CMC生产文多灵、阿玛碱，利用地黄CMC生产梓醇等^[29]。DDC与CMC

可以借助染色、显微镜观察等方式区分,还可以利用一些只在CMC中表达的标记基因进行鉴别。相比DDC,部分研究认为CMC液泡更小、分散性更好、有较强的抗剪切力,更适用于生物反应器大规模培养^[28]。

此外,未分化的PCC(包括DDC和CMC)在长期培养中容易通过体细胞突变的积累而发生遗传变异,而分化组织培养物(毛状根细胞和茎尖细胞)由于遗传和代谢上的稳定性更适合特定产品的生产。毛状根是发根农杆菌侵染植物后产生的不定根,不需要额外添加激素就可以实现快速、稳定的生长,在生物反应器中培养的青蒿毛状根可以产生1.12 mg/g细胞干重的青蒿素^[30]。相比DDC和CMC,毛状根系统不存在细胞分化导致的稳定性问题,因此被认为是生产植物根部产物的最佳替代方法,并常作为模式体系被用于研究尼古丁、莨菪生物碱、人参皂苷、积雪草苷等活性成分的生物合成^[31-32]。

1.2 植物细胞大规模培养用于生产重组蛋白

植物细胞独特的结构赋予其优越的生物制造特性。坚韧的细胞壁提供支持和保护,巨大的液泡不仅能储存潜在的毒性物质,还能调节渗透压以维持稳态,使植物细胞具备卓越的机械强度和抗逆性。此外,用于疾病治疗的功能蛋白在哺乳动物细胞中往往具有生理活性,从而影响细胞生长甚至产生细胞毒性,而植物细胞通常不受这些限制,这使其在复杂蛋白的安全、稳定、高效生产上具有显著优势。PCC生产重组蛋白技术已经

被广泛用于药用蛋白(如抗原、疫苗、抗菌蛋白)、胶原蛋白和工业酶的商业化生产^[13](表2)。

例如,肿瘤辅助治疗药物槲寄生凝集素在大肠杆菌表达中易形成包涵体,在哺乳动物细胞中又因毒性问题难以高效生产。Gengenbach等^[42]在烟草BY-2细胞中合成槲寄生凝集素,省去了包涵体重新折叠的步骤,合成成本相较于大肠杆菌底盘节省了80%以上。此外,来源于粮食作物的水稻(*Oryza sativa*)愈伤组织细胞,在法规方面比BY-2等细胞系更加符合要求,也已经被用于合成人类生长激素(hGH)、人骨形态发生蛋白2(BMP2)、牛胰蛋白酶原(bovine trypsinogen)等^[33-35]。Protalix Biotherapeutics公司和辉瑞公司利用转基因胡萝卜悬浮细胞生产重组葡萄糖苷酶(PrGCD)作为治疗戈谢病的生物治疗性蛋白质药物,在欧盟和美国上市^[43]。烟草细胞培养中生产的针对新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)的重组疫苗也于2006年获美国农业部批准上市^[44]。这些进展标志着PCC作为功能蛋白的大规模生物制造平台,具有广阔的发展前景。

然而,植物系统中重组蛋白的糖基化修饰不同于哺乳动物细胞,会优先使用木糖和海藻糖而非半乳糖,这可能影响蛋白质的生物活性,甚至引发免疫原性和过敏反应。为了进一步贴合治疗性蛋白的生产需求,Hanania等^[45]利用合成生物学手段改造BY-2细胞系的糖修饰系统,去除了植物特异性的木糖修饰功能,从而构建了适用于生产人源化糖修饰蛋白的植物细胞工厂。

尽管如此,现阶段用于重组蛋白商业化生产的植物细胞系仍然较少,仅限于烟草BY-2、水稻

表2 植物细胞异源合成重组蛋白

Table 2 Heterologous synthesis of recombinant proteins in plant cells

植物物种	拉丁名	蛋白名称	细胞材料	产量	参考文献
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	人骨形态发生蛋白2(BMP2)	水稻愈伤组织细胞	21.5 µg/mL 培养液	[33]
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	人类生长激素(hGH)	水稻愈伤组织细胞	57 mg/L 培养液	[34]
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	合成牛胰蛋白酶原(synthetic bovine trypsinogen)	水稻愈伤组织细胞	15 mg/L 培养液	[35]
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	酸性葡萄糖苷酶(GAA)	水稻愈伤组织细胞	37 mg/L 培养液	[36]
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	血管内皮生长因子(VEGF)	水稻愈伤组织细胞	19 mg/L 培养液	[37]
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	包膜糖蛋白(envelope glycoprotein)	水稻愈伤组织细胞	18.5 µg/g	[38]
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	贝伐单抗(Bevacizumab monoclonal antibody)	水稻愈伤组织细胞	160.7~242.8 mg/kg	[39]
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	人抗胰蛋白酶(human α 1-antitrypsin)	BY-2 悬浮细胞	34.7 mg/L 培养液	[40]
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	人生长激素(human growth hormone)	BY-2 悬浮细胞	5.2% 总可溶蛋白	[41]

和胡萝卜等愈伤组织细胞，且蛋白产量有限，还需要增加10~100倍才能达到商业化水平^[46]。需要利用合成生物学手段对更多PCC进行系统性的优化和提升。例如，通过调控植物细胞中的代谢网络或细胞性状改造，进一步提升植物细胞的生长速度和稳定性；通过基因调控元件精细调控基因表达过程，提高外源基因的折叠正确性和表达效率；同时，通过抑制植物细胞底盘对外源基因的沉默，增强蛋白的稳定性和生产能力。这些技术手段的综合应用，有助于克服现有技术瓶颈，进一步推动植物细胞平台在重组蛋白生产中的更广泛应用。

1.3 植物细胞大规模培养用于生产次生代谢产物

许多具有药理活性的天然产物都来源于植物，例如红豆杉中的紫杉醇，鬼臼属中的鬼臼毒素，人参中的人参皂苷等。结合植物细胞在“合成调控机制”方面的独特优势，使其成为天然产物合成的理想底盘：①植物细胞具备高效的催化酶表达和后修饰能力，特别是在细胞色素P450 (cytochrome P450) 等复杂结构蛋白的功能性表达上优于微生物底盘，例如大肠杆菌因缺乏糖基化和磷酸化机制而难以表达相关蛋白；②植物细胞内的精细代谢区隔（如叶绿体、线粒体）能为不同的合成途径提供特定的反应环境，包括适宜的能量状态和辅因子，而微生物细胞往往缺乏这些关键微环境；③植物细胞对自身天然产物及其中间体具有较高耐受性，而许多次生代谢产物可能对微生物底盘具有毒害作用，从而限制了其应用。这些优势使植物细胞在复杂天然产物的高效合成方面展现出了巨大的潜力。并且，在某些情况下，植物细胞中一些代谢物的积累滴度还能高于亲本植物。

研究表明，诱导子是提高植物细胞次生代谢产物产量行之有效的方法^[15]，通过诱导植物免疫防御系统或基因调控网络等激活代谢途径，促进目标产物的积累。例如，水杨酸和茉莉酸甲酯等诱导子通过靶向细胞核中次级信号的启动，可以诱导一系列参与防御的次生代谢产物的合成，包括黄酮类、生物碱类、苯丙素类、萜类化合物等^[47]。微生物（细菌、酵母和丝状真菌）提取物也被作为诱导子用于提高PCC中产物的产量。例

如，利用黑曲霉和酿酒酵母提取物提高匙羹藤悬浮细胞培养物中三萜皂苷匙羹藤酸 (gymnemic acid) 的产量^[48]。加入黄曲霉诱导子后，长春花CMC悬浮培养液中长春花碱、长春花碱和阿玛碱的含量分别是对照组的1.45倍、3.29倍和2.14倍^[49]。

然而，诱导子策略在目标产物的提高上有很大的不确定性，由于不明确其具体的作用机制，无法对目标产物的积累量进行预测和精确提升^[50]，重复性较差。虽然已经开发了大量PCC平台用于合成天然产物，但实际产能可以达到商业化生产的案例还很有限。与重组蛋白生产不同，天然产物的合成更多依赖非模式植物衍生的植物细胞体系，因此通过转基因技术提升代谢物产量在技术上更具挑战性。此外，植物细胞中许多代谢途径的调控机制尚未完全阐明，代谢网络的复杂性增加了调控的难度。在此背景下，植物合成生物学提供了一种潜在的解决策略，对植物细胞的代谢进行精准调控和重编程，有望突破这些技术瓶颈，进一步拓展其生物制造能力和产业化应用前景。

2 植物合成生物学推动下植物细胞规模培养的新突破

传统植物细胞培养采用物理、化学或生物诱导等多种手段刺激细胞以促进次生代谢产物的合成，但由于其依赖于机制不明的“黑箱模型”，诱导效果往往不稳定，同时可能对细胞的生长和发育产生负面影响，难以满足工业化生产对效率和产量的要求。合成生物学自下而上的设计理念强调理性设计的重要性，在此基础上通过对已知元件的组装，构建可预测和可控制的合成系统，以满足改造需求。植物合成生物学在推动PCC的商业化应用中展现出巨大的潜力。通过改造代谢途径、调控代谢流量等策略，不仅显著提升了植物细胞的生产效率和目标产物的产量，也为大规模培养的工业化生产奠定了坚实基础。同时，植物合成生物学突破了植物天然代谢的局限性，使植物细胞能够合成原本无法生成的新型化合物，显著丰富了可合成产物的种类，拓展了其在食品、医药和工业原料等领域的应用潜力。

2.1 建立优质的植物细胞系

2.1.1 加速植物细胞系的建立和筛选

在植物细胞规模化培养的生产体系中，不同细胞系由于遗传背景、代谢能力及适应性等差异，因此在面对不同条件和环境时，特定产物的合成效率往往存在显著差异。植物细胞系的特性直接决定了其作为底盘生产目标代谢产物的效率。因此，丰富植物细胞的可选择性，特别是高效构建多样化的植物细胞系，不仅能针对不同目标产物筛选出最佳底盘，还能为解决传统生产体系中受限于单一底盘的适应性不足问题提供新路径。然而，由于植物细胞系的构建过程复杂且效率较低，尤其是在非模式植物中，限制了植物细胞作为工业底盘的广泛应用。

植物细胞系的构建受外植体部位、培养基成分和激素配比等多因素的综合影响，其中最关键的因素是细胞分裂素（6BA、KT、TDZ、ZT等）与细胞生长素（2,4-D、NAA、IAA等）的浓度和配比关系^[51-53]。虽然已经有许多植物细胞成功进行体外培养，但由于不同物种之间的遗传特性差异以及不同外植体部位对激素的响应速度不同，诱导条件往往存在很大的差异。不同物种来源的植物在诱导过程中需要重新对外植体部位、培养基和不同激素配比进行筛选，这些由物种和外植体部位特异性带来的差异，不仅增加了细胞系构建的难度，也限制了植物细胞工业化开发的效率（表3）。

近年来，研究人员对植物细胞脱分化的分子作用机制有了更加深入的理解。因此，结合植物合成生物技术，可以通过人为干预促进外植体脱分化形成愈伤组织细胞。*WOX4*、*WOX5*、*PAT1*、*SIWIND1*、*AtWRKY23*和*bHLH041*等，都被报道在愈伤组织细胞或干细胞的形成过程中发挥着重要作用^[55-60]。通过在拟南芥（*A. thaliana*）中过表达*PAT1*，成功促进了愈伤组织细胞的增加^[55]。通过对这些脱分化相关的关键基因靶点进行调控，可以提高愈伤细胞形成的效率和质量，甚至有望突破不同物种和外植体部位在诱导体系上的差异限制，开发出广谱的植物细胞诱发方法。

植物合成生物学不仅依赖于传统基因工程，还注重融合计算机科学、数学和物理等多领域的知识与工程化理念^[61]。利用机器学习优化植物细胞系的诱导条件，可以大大减少前期摸索实验带来的经济和时间成本^[62-64]。例如，利用广义回归神经网络（generalized regression neural network, GRNN）和随机森林模型（random forest, RF）预测植物生长调节剂（plant growth regulator, PGR）和不同外植体部位对西番莲（*Passiflora caerulea* L.）愈伤组织植株再生的影响，将外植体类型、PGR种类、PGR浓度与愈伤组织芽再生率联系起来，成功建立了愈伤组织诱导模型，大幅提高了愈伤组织的诱导效率^[65]。Navvabi团队^[66]比较了多层感知器（multilayer perceptron, MLP）和径向基函数（radial basis function, RBF）两种神经网络模型在胡萝卜愈伤组织诱导率和诱导速度上的预测

表3 常见体外植物细胞系诱导条件

Table 3 Common induction conditions of plant cell lines *in vitro*

物种	外植体部位	类型	激素	培养基	周期	参考文献
水稻	胚乳	愈伤组织	1.0 mg/L 2,4-D; 1.0 mg/L 6BA	N6培养基	6个月	[3]
葡萄	叶片	愈伤组织	0.05 mg/L NAA; 0.5 mg/L 2,4-D; 2.0 mg/L KT	B5培养基	21天	[21]
胡萝卜	茎段	愈伤组织	0.5 mg/L 2,4-D	MS培养基	14天	[54]
红豆杉	胚乳	愈伤组织	1.0 mg/L 2,4-D; 0.5 mg/L 6BA	B5培养基	15天	[4]
人参	根部	愈伤组织	1.0 mg/L 2,4-D; 0.1 mg/L KT	MS培养基	90天	[5]
地黄	根部	形成层干细胞	2.0 mg/L NAA; 2.0 mg/L 6BA	MS培养基	14天	[29]

效果, 基于MLP建立的模型, 其预测结果和实验结果相比, R^2 高达95%, 表明该模型具有较高的准确性, 能够用于高效地预测和选择最佳的愈伤组织诱导条件。在矮牵牛愈伤组织细胞诱导实验中, 研究团队利用GRNN模型结合遗传算法 (genetic algorithm, GA) 优化了植物激素组合, 使诱导效率达到了95.83%^[67]。这些新技术的发展提高了植物细胞系建立效率, 为植物细胞的产业化进程注入了强大的动力。

2.1.2 构建适应生物反应器的植物细胞系

在植物细胞大规模培养过程中, 细胞聚集体 (cell aggregate) 的形成是一个不容忽视的问题。在植物细胞聚集体中, 内部的细胞因为无法与培养基接触, 容易失去所需的营养供应, 而表面的细胞则因频繁碰撞比其他细胞更易损伤或死亡^[68]。同时, 聚集体严重影响植物细胞悬浮培养中的物质传递效率, 进而影响细胞生长和产物合成。研究发现, 细胞聚集体的大小与目标产物的产量呈负相关。例如, 在红豆杉悬浮细胞培养体系里, 小聚集体与大聚集体相比, 紫杉醇积累量高出2~20倍^[69-70]。

改造哺乳动物贴壁细胞实现大规模培养的成功案例为植物细胞的大规模培养提供了思路。其中一种方法是对细胞进行人为驯化, 使细胞系对失巢凋亡产生拮抗作用, 其中包括CHO^[71]、MDCK^[72]、Vero^[73]等细胞系。另一种方法是通过遗传改造改善细胞的贴壁特性。例如, 敲除胰岛素样生长因子结合蛋白4 (insulin-like growth factor binding protein 4) 基因 (*Igfbp4*) 和水孔蛋白 (aquaporin I) 基因 (*Aqp1*), 能够加速CHO细胞的悬浮适应过程^[74]。借鉴动物细胞的经验, 利用合成生物技术对植物细胞进行驯化或者对其细胞间的黏附机制关键基因进行调控, 有望改善植物细胞在大规模培养条件中的分散性^[75]。

目前, 通过合成生物学手段改造细胞形态已经成为现实。Wendell A. Lim团队^[76]通过设计鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 蛋白对细胞形态进行重编程, 诱导长出丝状足 (filopodia) 或者板状伪足 (lamellipodia)。随着对植物生长发育分子机制的深入理解, 有望通过基因编辑和合成生物技术改造或调控植物细

胞的一些关键特性, 包括植物细胞壁黏合力、机械强度、细胞大小形态等。例如, 可以通过调控纤维素、半纤维素或果胶相关基因优化植物细胞壁结构, 降低细胞间的黏附性, 提高悬浮培养中细胞的分散程度^[67]。此外, 还能通过调节细胞膜蛋白 (如黏附蛋白) 的表达或调整细胞信号通路来弱化细胞间的机械黏性, 使植物细胞培养更接近微生物底盘的单细胞培养模式。从而打破植物细胞悬浮培养中结团问题的限制, 为创制“单一化、标准化”的植物细胞工厂奠定基础。

2.2 促进遗传转化体系的建立和优化

植物细胞的遗传转化技术是植物合成生物学对植物细胞底盘进行设计与改造的基础, 主要有粒子轰击和农杆菌介导转化两种方法。然而, 目前能够成功进行遗传转化的植物细胞类型仍然较为有限, 许多非模式植物尚未建立有效的遗传转化体系。由于不同植物细胞在遗传转化的条件和参数往往不尽相同, 构建特定植物细胞系的遗传转化体系往往需要经过复杂且耗时的条件优化^[36, 54, 77], 这一过程为植物细胞的精确改造和优化带来了阻碍。

近年来, 基于机器学习的算法被应用于遗传转化体系的参数预测, 为非模式植物遗传转化体系的快速构建提供了强大的工具。例如, Masoud Tohidfar团队开发了一种集成多种机器学习模型的工具, 包括MLP、RBF和自适应神经模糊推理系统 (adaptive neuro-fuzzy inference system, ANFIS)。通过实验验证, 该模型能够准确预测菊花 (*Chrysanthemum L.*) 中农杆菌介导的基因转化效率, 并对影响转化效率的输入变量进行了重要性评估^[63, 78]。

利用发育调节因子 (developmental regulator, DR) 作为植物细胞形态发生的调控工具, 已被证明在一定程度上能够提高植物细胞的遗传转化效率^[79]。近期研究表明, GRF (growth-regulating factor) 与转录辅因子GIF (GRF-interacting factor) 形成的转录复合物, 在小麦、柑橘、葡萄和大麻等多种作物中显著提升了遗传转化效率, 并增强了植物的再生能力^[80]。此外, *WUS* (*wuschel*) 和

BBM (baby boom) 等关键调节因子因其与植物激素信号网络 (如生长素和细胞分裂素) 的密切关联, 通过基因过表达能够有效提高转化效率^[81-82]。操控这些新型发育调节因子, 不仅可显著优化遗传转化过程, 还能维持植物细胞的脱分化状态, 进一步促进植物细胞的诱导与再生。

对遗传转化后的细胞进行筛选是获得阳性细胞系的关键, 但目前成功转化后的细胞筛选方法相对匮乏, 主要依赖卡那霉素或潮霉素等抗生素进行抗性筛选, 难以满足多基因遗传转化的需求。为解决这一问题, Lukáš Fischer 研究团队^[83]在 BY-2 细胞系中开发了两种新的选择系统: 磺胺嘧啶和草丁膦。研究表明, 磺胺嘧啶具有较广的适用浓度范围, 可与卡那霉素或潮霉素联合使用, 进行多基因共转化和后续多重筛选。此外, 利用甜菜红素合成酶 (以酪氨酸为底物) 建立的可视化筛选系统 RUBY, 为细胞转化后的筛选提供了一种高效、直观的方法。RUBY 系统通过表达甜菜红素的三个合成酶, 在细胞中原位合成颜色鲜艳的甜菜红素, 极大地提升了筛选效率和便捷性^[84]。

2.3 表征调控元件的功能

调控元件决定了基因的表达模式与表达强度, 主要包括启动子、5'和3'非编码区、终止子、增强子、转录因子、顺式作用元件等 DNA 序列和蛋白质序列。在植物细胞体系中, 通过将调控元件序列和报告基因构建成基本表达盒或简单遗传回路, 转化到植物细胞中进行定量表征, 可用于优化植物细胞表达系统。例如, 通过双荧光素酶报告系统 (萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶), 对不同植物启动子在 BY2 愈伤细胞中进行定量表征, 可获得不同梯度强度的定量数据, 用于精细控制蛋白表达水平和目标产物产量^[85]。稳定的转基因植物细胞培养体系通常需要经过长时间的筛选过程, 因此, 将愈伤组织或悬浮细胞经酶解制备成原生质体是元件快速表征的一种高效替代方法。Ko Kato 团队^[86]通过制备水稻 (*O. sativa*) 悬浮培养细胞、黑麦 (*Secale cereale* L.) 叶片和拟南芥 (*A. thaliana*) 悬浮细胞的原生质体, 在三个体系中统一验证了 15 个 5'UTR 序列的增强子活性。这种方法显著提

升了元件表征效率, 为调控元件在植物细胞中的应用提供了重要依据。

植物细胞拥有多种功能性亚细胞区室 (如叶绿体、线粒体、内质网和液泡等), 为其作为生物制造底盘提供了独特的优势。合适的信号肽能够更好地将表达的蛋白靶向到特定的亚细胞空间, 从而进一步达到提高产物合成效率、减少代谢干扰、促进复杂蛋白功能性表达以及增强细胞耐受性的目的。例如, 在水稻悬浮培养细胞中对 α Amy3sp、CINIsp 和 33KDsp 三种分泌信号肽的分泌效果进行比较, 其中 33KDsp 对应的蛋白积累量最高, 具有最佳的分泌能力^[87]。此外, 定位蛋白质到达对应亚细胞区域的序列特征在蛋白质家族和植物中都是保守的^[88], 可以极大地简化异源植物宿主中人工合成途径的设计、构建和测试。

2.4 提高生产效率与产能

合成生物学的工程化设计理念推动了植物代谢调控从“黑箱”到“白箱”精准调控的技术转型, 比传统诱导子策略更加高效 (图2)。

2.4.1 优化合成代谢通路

途径中限速酶的过表达是提升 PCC 中产物产量最直接的手段。在红豆杉细胞中过表达苯丙基转移酶 (C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acetyltransferase, BAPT) 与苯甲酰基转移酶 (3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol-N-benzoyltransferase, DBTNBT), 紫杉醇的产量从 71.01 mg/L 提升到了 310 mg/L^[90]。环巴胺是从野生藜芦中分离出来的一种潜在抗癌药物, 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和酵母提取物 (yeast extract, YE) 两种诱导子的协同处理和培养基的优化将加州藜芦 (*Veratrum californicum* L.) 愈伤细胞中环巴胺的产量提高到了 4.135 mg/g DW, 而关键限速酶基因 *VnOSC1* 的过表达更是将产量进一步提高到了 6.14 mg/g DW, 生长率高达 276.69%^[91]。过表达芪合酶 (*Stilbene synthase*, STS) 基因的转基因悬浮培养细胞系能够生产出高达 1458 mg/L 的白藜芦醇, 比原始细胞系中的产量高了 200%^[92]。

植物细胞内叶绿体、线粒体、内质网、过氧化物酶体等不同细胞器的内部环境各异, 包括 pH、

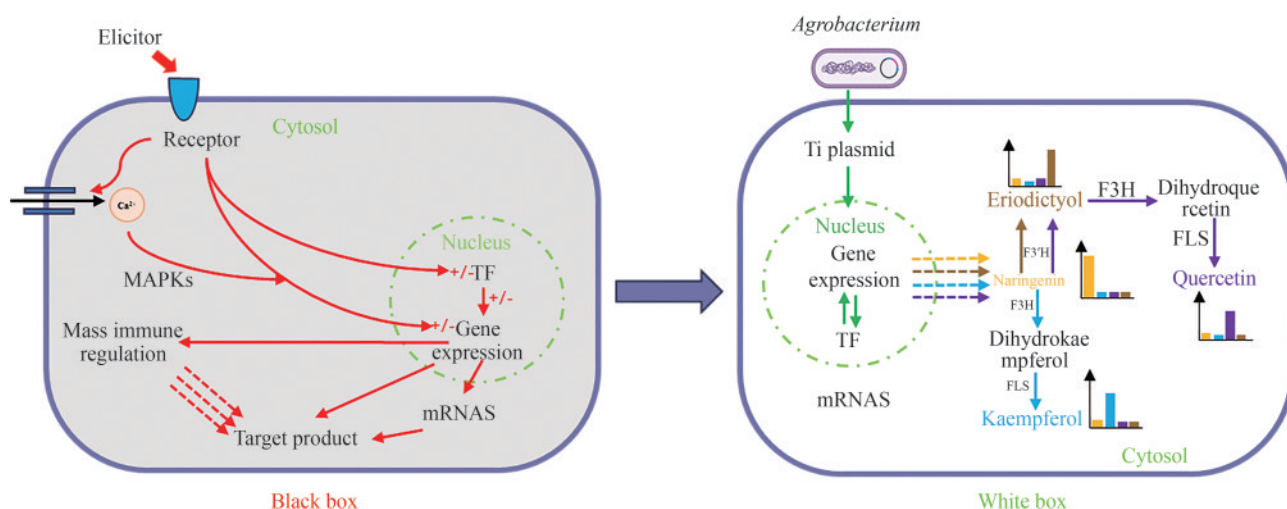


图2 植物细胞产量提升策略从“黑箱”到“白箱”^[89]

(在“黑箱”中，诱导子提升目标产物产量作用机制尚未完全明确；

在“白箱”中，通过不同基因线路可以分别实现精准的目标产物产量提升)

Fig. 2 Strategies for increasing plant cell yield from “Black box” to “White box”^[89]

(In the “Black box”, the mechanism of the inducer to increase the yield of the target product has not been fully defined; in the “White box”, the yield of target products can be increased precisely with different gene circuits)

前体浓度、辅因子浓度等，利用区室化设计可优化代谢途径的反应条件，提高代谢流畅性并减少副反应，从而提升目标产物的合成效率。例如在本氏烟草叶片中，利用叶绿体定位信号肽将紫杉二烯合酶 (taxadiene synthase, TS)、紫杉二烯 5 α -羟化酶 (taxane 5 α -hydroxylase, T5H) 和还原酶 (cytochrome P450 reductase, CPR) 定位到叶绿体，充分利用质体中的萜类前体，可以将紫杉二烯的产量提高到 56 $\mu\text{g/g}$ 鲜重，5 α -羟基紫杉二烯的产量提高至 1.3 $\mu\text{g/g}$ 鲜重^[93]。原人参二醇 (protopanaxadiol) 的前体达玛烯二醇- II (dammarenediol- II) 主要储存在细胞的脂滴 (lipid droplet, LD) 中。在酵母中，利用靶向 LD 的 PLN1 蛋白作为引导蛋白，将原定位于内质网的原人参二醇合酶 PDDS (protopanaxadiol synthase) 引到 LD 中，PPD 的合成效率提高了 394%^[94]。

抑制分支途径提高目标产物产量是合成生物学调控代谢流量的另外一种重要策略。肉桂酸-4-羟化酶 C4H (cinnamate-4-hydroxylase) 是参与类黄酮生物合成分支途径的一个酶。在烟草悬浮细胞中，通过 CRISPRi 下调 C4H，让其他分支通路中的类黄酮相关基因 (如 *Nt4CL* 和 *NtCHS*) 的表达量得以提高，从而增加了它们各自产物的产量，包括乔松酮、柚皮素和绿原酸^[95]。该研究为基于

CRISPR/Cas 系统的代谢工程在植物靶基因抑制和代谢调控方面的应用提供了宝贵的参考案例。

2.4.2 利用转录因子定向优化代谢通量

在植物中，转录因子是非常强大的转录调控元件，具有信号传递和系统协调代谢途径的能力，在接收到上游信号后能够通过特定蛋白或特定 DNA 序列结合进而控制整条代谢途径上相关基因的表达。借助这一特性，可用于促进目标产物的积累。利用 MeJA 诱导激活转录因子 *PgHHLH28*，可以同时促进 *PgHMGR2* 和 *PgDXS2* 的表达，提高了桔梗 (*Platycodon grandifloras* L.) 中皂苷的含量^[96]。同样地，研究发现欧洲越橘 (*Vaccinium myrtillus* L.) 中 MYB 家族有多个基因在植物不同部位和生长时期共同参与了对类黄酮化合物的调节。其中，*VmMYBPA1.1* 可以同时促进花青苷生物合成途径上 *VmLDOX*、*VmLAR2* 和 *VmANR* 的表达^[97]。

基于转录因子强大的协同调控能力，只需要调控单个转录因子就能实现对途径上多个基因的表达优化，进而特异性提高 PCC 中目标产物的产能。在人参愈伤组织细胞中，过表达转录因子 *pgNAC072* 能够上调人参皂苷生物合成途径中的关键酶基因表达，提高人参皂苷的积累^[79]。植物转录因子的功能序列相对保守，这意味着相同的转

录因子能够在不同植物中识别并结合相似的DNA序列，从而对代谢途径进行调控。在拟南芥悬浮细胞中引入金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 的转录因子 *AmRos1* 和 *AmDel* 能够实现花青素的大规模生产^[98]。此外，通过对天然转录因子进行人工设计改造，还可以满足更丰富的调控需求。例如，融合转录激活因子 *VPI6* 可以将负调控的 *SmBYB36* 逆转成双途径的正调控因子，同时提高了丹参毛状根细胞中丹参酮和酚酸含量，使其积累量分别达到了原本的6倍和5倍^[99]。

2.4.3 设计动态调控策略平衡细胞生长与合成

此前，对促进植物细胞中目标产物产量的设计改造还停留在基因过表达、竞争代谢抑制等静态调控策略上。植物合成生物学复杂遗传回路的设计可以在时间和空间上极大地强化对植物细胞合成目标产物过程的精准调控，并结合细胞自身的生长状态实现代谢流的动态平衡与重构。

动态遗传回路通常利用底盘细胞对诱导物、温度、细胞群体或环境压力等信号的响应来控制基因的表达，这一策略在微生物底盘的成功应用充分证明了其在降低合成途径对菌体生长的影响以及提高目标产物产量上的潜力。袁其朋研究团队^[100]在大肠杆菌中构建群体感应 (quorum sensing, QS) 变体库来响应不同细胞密度，其中 *PQS18* 能够实现基因在最合适的生长点开启水杨酸的合成，产量高达 523.2 mg/L，比原始的 QS 系统增加了 72%。赵志军团队^[101]利用两种正交的 QS 系统分别控制脂肪酸合成途径的开启和全局竞争途径的抑制，实现了智能自主的动态全局资源分配。在种群密度达到阶段 1 时 *Lux* 系统启动脂肪酸的合成；在种群密度达到阶段 2 时，*PrgX* 系统启动 *MazF* 的表达，控制全局 mRNA 的衰减，使细胞资源充分用于合成目标产物。将这些策略引入植物细胞大规模培养系统中，将有助于优化资源分配，减少不必要的消耗，实现高效生产。更进一步地，还可以考虑同时调用植物细胞中不同的区室，在空间上实现代谢途径的分工与协同，充分发挥植物细胞的优势。

2.5 赋予植物细胞合成异源产物的能力

利用植物合成生物学能够突破植物合成能力

的限制，让植物细胞得以合成原本无法产生的高附加值产物。例如，在胡萝卜愈伤组织细胞中异源表达六个拟南芥来源的苜蓿硫代葡萄糖苷生物合成途径基因，成功在细胞中实现了苜蓿硫代葡萄糖苷的积累，产量达到 2.5 nmol/g FW^[102]。

作为模式植物细胞系，烟草悬浮细胞具有成熟的遗传转化体系，被广泛用于功能蛋白和天然产物的异源生产。通过引入单萜香叶醇合酶基因 *VoGES*，在烟草悬浮细胞中合成了 16 μg/g DW 的香叶醇^[103]。在烟草悬浮细胞中过表达达玛烯二醇合酶基因 *PgDDS* 和 *CYP716A47*，合成的原人参二醇在摇瓶中的产量可达 166.9 μg/g DW，在 5 L 气升式反应器培养中更是进一步提高到 980.9 μg/g DW^[104]。

植物复杂的代谢途径往往会导致目标产物及其前体存在不希望的分流或者冗余转化。因此在引入异源合成途径的基础上可以进一步对底盘细胞中相关的基因进行抑制，从而提高目标产物的积累。天然连翘 (*Forsythia koreana* L.) 细胞无法生产芝麻素，但积累着大量芝麻素的前体松脂素，其在细胞中被松脂素-落叶松脂醇还原酶 (pinoresinol-lariciresinol reductase, PLR) 及糖基转移酶 (UGT71A18) 所消耗。因此，在异源表达芝麻素合成酶基因 *CYP81O1* 的基础上引入抗 PLR 和抗 *UGT71A18* 的 RNA 干扰 (RNAi) 序列，最终实现了芝麻素在连翘细胞中的高效异源合成^[105]。

由此可见，在植物合成生物学的助力下，植物细胞不仅可以提高自身高附加值产物的产量，还可借助细胞本身的优势高效生产异源产物。这些研究案例 (表 4) 为解决全球面临的健康、环境及食品安全等挑战提供了创新思路 and 高效解决方案，证实了植物合成生物学及植物细胞大规模培养在推动农业、医药和化工等领域可持续发展中的应用潜力。

3 展望与总结

植物细胞大规模培养在高附加值产物合成和细胞农业中具有重要意义。作为合成底盘，植物细胞符合“绿色制造”理念和全球碳中和目标，在生产过程中更加环保和安全。与此同时，植物

表4 植物细胞合成次生代谢产物案例
Table 4 Cases of secondary metabolites synthesized by plant cells

植物物种	改造策略	细胞材料	化合物类别	作用效果	参考文献
山葡萄 <i>Vitis amurensis</i> Rupr.	过表达 <i>VaCPK29</i>	悬浮细胞	多酚类	白藜芦醇 1.39 mg/L 培养液	[106]
柑橘 <i>Citrus</i> <i>reticulata</i> L.	过表达 <i>CsMADS6</i> 、 <i>PSY</i> 、 <i>PDS</i> 和 <i>CCD1</i>	愈伤组织细胞	类胡萝卜素	类胡萝卜素 23 μg/g DW	[102]
加州藜芦 <i>Veratrum</i> <i>californicum</i> var.	过表达 <i>VnOSC1</i>	愈伤组织细胞	生物碱	环巴胺 6.14 mg/g DW	[91]
红豆杉 <i>Taxus baccata</i> L.	过表达 <i>NINV</i>	悬浮细胞	二萜类	紫杉醇 94 μg/g FW	[107]
红豆杉 <i>Taxus baccata</i> L.	过表达 <i>BAPT</i> 、 <i>DBTNBT</i>	悬浮细胞	二萜类	紫杉醇 310 mg/L 培养液	[90]
灌木状辣椒 <i>Capsicum</i> <i>frutescens</i> L.	过表达 <i>VpVAN</i>	悬浮细胞	芳香族化合物	香兰素(573.39±120.70) μg/g 组织	[108]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	过表达转录因子 <i>AmRos1</i> 和 <i>AmDel</i>	BY-2 悬浮细胞	黄酮类	花青素 30 mg/g DW	[98]
甜菜 <i>Beta vulgaris</i> L.	过表达 <i>VpVAN</i>	毛状根	芳香族化合物	香兰素(0.0430 ±0.003) mg/g DW	[109]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	过表达 <i>HCHL</i>	悬浮细胞	黄酮类	花青素(75.4±6.1) μmol/g FW	[110]
竹 <i>Phyllostachys</i> <i>nigra</i> L.	过表达 <i>PpHCH</i>	悬浮细胞	酚类	4-羟基苯甲醇 1.7 g/L 培养液	[111]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	过表达 <i>CqCYP76AD1</i> 、 <i>CqDODA</i> 、 <i>CqCDOPA5GT</i> 和 <i>CqAmaSy</i>	BY-2 悬浮细胞	苷类	苜蓿苷(13.67±4.13) μmol/L； 甜菜苷(26.60±1.53) μmol/L	[112]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	过表达 <i>CqCYP76AD1-1</i> 和 <i>CqDODA-1</i>	BY-2 悬浮细胞	类黄酮	甜菜苷(19.53±8.60) μmol/L	[112]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	过表达 <i>VoGES</i>	悬浮细胞	单萜类	香叶醇 16 μg/g DW	[103]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	过表达 <i>PgDDS</i>	悬浮细胞	三萜类	达玛烯二醇-II 573 μg/g DW	[113]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	过表达 <i>PgDDS</i> 和 <i>CYP716A47</i>	悬浮细胞	三萜类	原人参二醇 980.9 μg/g DW	[104]
烟草 <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	CRISPRi 抑制 <i>NtC4H</i>	悬浮细胞	苯丙素类	绿原酸 1799.69 ng/mL 培养液； 乔松酮 384.19 ng/mL 培养液； 柚皮素 597.53 ng/mL 培养液	[95]
水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	修饰近靶顺式作用元件,激活 PHYTOENE SYNTHASE 1 启动子	愈伤组织细胞	类胡萝卜素	八氢番茄红素 7.13 μg/g DW	[114]
水飞蓟 <i>Silybum</i> <i>marianum</i> L.	过表达 <i>STS</i>	悬浮细胞	多酚类	白藜芦醇 50 ng/g FW	[115]
连翘 <i>Forsythia</i> <i>koreana</i> L.	过表达 <i>CYP81Q1</i> ； RNAi 抑制 <i>UGT71A18</i> 和 <i>PLR</i>	悬浮细胞	木质素	芝麻素(10.83±0.35) μg/g DW	[105]

来源的产品因其天然、可持续的特性，在市场上更具接受度，这一优势也将成为植物细胞未来竞争力的重要支撑。

然而，植物细胞大规模培养过程中细胞性状和目标产物产量的不稳定、不可控，使得大量实验室阶段的成果难以进一步向产业化推进。植物细胞产能的退化主要是由于培养过程中自发的基

因突变、表观遗传现象和细胞分化所导致的^[28]。例如筛选获得的生物碱高产细胞（300 mg/L 培养液）在连续培养12年后产能下降50%，在2年和3年后，产能更是下降到初始细胞系的18%和5%^[116]。在紫杉醇细胞中，长期的继代培养加剧了细胞的结团现象，并在培养22个月后出现了明显的坏死斑块^[28]。

利用植物合成生物技术及理念,设计并优化植物细胞工厂在诱发、筛选、培养、增产及扩大等过程中的技术难题,有望打破目前只有少数植物细胞系产业化这一现状,充分发挥植物细胞大规模培养生产高价值天然产物的潜力和优势。为了进一步满足植物合成生物技术改造的需求,还需围绕植物细胞系的易转化性、遗传稳定性、生长速度、代谢特性、产能鲁棒性以及产物安全性等关键因素,建立更多客观的评价指标,从而筛选出更加稳定可靠的底盘。

生物过程可以被描述为精密且复杂的代谢网络,基因组尺度代谢模型(genome-scale metabolic model, GEM)被用于描述生物体中基因-蛋白-反应(gene-protein-reaction, GPR)之间的数学关系。GEM可以进行通量平衡分析(flux balance analysis, FBA),计算函数最优解的集合,被广泛用于预测细胞表型和指导代谢改造。Dina Petranovic等^[117]利用Yeast8以及ecYeast8两种模型对酿酒酵母中血红素增产的基因进行预测,通过对其中11个相关基因的调控,使血红素产量提高了75倍(53.5 mg/L)。同样地,植物细胞GEM的建立为揭示代谢路径瓶颈和指导细胞改造提供了有力的工具。目前已经建立的植物GEM有拟南芥(*A. thaliana*)的AraGEM^[118]、青脆枝(*Nothapodytes nimmoniana* L.)的NothaGEM iSM1809^[119]、水稻(*O. sativa*)的iOS2164^[120]、玉米(*Zea mays* L.)的iZMA6517^[121]、西红柿(*Solanum lycopersicum* L.)的iHY3410^[122]和西班牙栓皮栎(*Quercus suber* L.)的iEC7871^[123]等。然而,GEM预测的准确性直接影响其在合成生物学改造中的指导作用。通过整合更高质量的组学数据、增加模型约束条件、细化亚细胞区室化信息以及增加代谢物运输和交换过程,能够提升模型对植物细胞的适配性,从而进一步提高其预测精度,为植物细胞工程改造及目标产物代谢途径的解析提供更加可靠的参考。

就近年来看,利用植物细胞培养技术生产的化妆品成分、药物、疫苗、蛋白及天然产物的案例有所增加,这并不令人惊讶,相反,它解释了在合成生物学高速发展这一趋势下植物细胞培养技术的复兴^[7]。尽管大部分文献中报道植物细胞

会在长期培养过程中出现性状波动的现象,但有一些细胞系被发现具有长期培养的潜力。以白拉索兰(*Brassavola cordata* L.)细胞系为例,该细胞系在长期的悬浮培养条件下可以生长并产生毛蕊花苷,这一化合物在化妆品和药物生产中具有重要的应用价值。研究表明,在长期培养达5年后,该细胞系的生长速度及目标产物的产量仍旧保持不变^[124]。类似的情况还出现在其他植物细胞系中,比如甜菜愈伤组织细胞生产甜菜红素^[125]、美登木(*Maytenus ilicifolia* L.)细胞生产醌甲基三萜类化合物^[126]、人参(*Panax ginseng* L.)细胞生产人参皂苷^[127]。这些产量及性状稳定的细胞系的存在证实了植物细胞工厂具备作为大规模生产次生代谢产物底盘的潜力。

未来,在植物合成生物学与人工智能等多学科交叉下,植物细胞离体培养技术必将迎来质的飞跃,进而推动植物细胞大规模培养技术的产业化应用迈上新台阶。在绿色制造、细胞农业、太空植物资源开发利用及种质资源保护等领域展现出巨大的潜力,为人类社会的可持续发展提供强有力的支持。

参 考 文 献

- [1] MURTHY H N, LEE E J, PAK K Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2014, 118(1): 1-16.
- [2] NAGATA T, KUMAGAI F. Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line[J]. *Methods in Cell Science*, 1999, 21(2): 123-127.
- [3] RAHMAN Z A, AHMAD SEMAN Z, OTHMAN A N, et al. Efficient callus induction and plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 using anther culture[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 31: 101865.
- [4] LI Y L, HUANG S W, ZHANG J Y, et al. A protocol of homozygous haploid callus induction from endosperm of *Taxus chinensis* Rehd. var. *mairei*[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 659.
- [5] OBAE S G, KLANDORF H, WEST T P. Growth characteristics and ginsenosides production of *in vitro* tissues of American ginseng, *Panax quinquefolius* L.[J]. *HortScience*, 2011, 46(8): 1136-1140.
- [6] LE V, SUKHIKH A, LARICHEV T, et al. Isolation of the main biologically active substances and phytochemical analysis of

- Ginkgo biloba* callus culture extracts[J]. *Molecules*, 2023, 28(4): 1560.
- [7] EIBL R, MEIER P, STUTZ I, et al. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(20): 8661-8675.
- [8] EMMANUEL D B, ISHAKU G A, ANDREW F P, et al. Callus culture for the production of therapeutic compounds[J]. *American Journal of Plant Biology*, 2019, 4(4): 76.
- [9] NETT R S, LAU W, SATTELY E S. Discovery and engineering of colchicine alkaloid biosynthesis[J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 148-153.
- [10] MAEDA H A. Harnessing evolutionary diversification of primary metabolism for plant synthetic biology[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(45): 16549-16566.
- [11] MEYER H P, SCHMIDHALTER D R. Industrial scale suspension culture of living cells[M/OL]. Weinheim, Germany: Wiley Blackwell, 2014. (2014-06-18) [2024-12-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527683321>.
- [12] DIRISALA V R, NAIR R R, SRIRAMA K, et al. Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 39(1): 18.
- [13] ARYA S S, ROOKES J E, CAHILL D M, et al. Next-generation metabolic engineering approaches towards development of plant cell suspension cultures as specialized metabolite producing biofactories[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 45: 107635.
- [14] HUSSAIN M S, FAREED S, ANSARI S, et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites [J]. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 2012, 4(1): 10-20.
- [15] RAMIREZ-ESTRADA K, VIDAL-LIMON H, HIDALGO D, et al. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories[J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 182.
- [16] NAGEGOWDA D A, GUPTA P. Advances in biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids[J]. *Plant Science*, 2020, 294: 110457.
- [17] FONSECA-SANTOS B, CORRÊA M A, CHORILLI M. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations [J]. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 51(1): 17-26.
- [18] GOMORD V, FAYE L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(2): 171-181.
- [19] GHAG S B, ADKI V S, GANAPATHI T R, et al. Plant platforms for efficient heterologous protein production[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2021, 26(4): 546-567.
- [20] SINGH A A, PILLAY P, TSEKOA T L. Engineering approaches in plant molecular farming for global health[J]. *Vaccines*, 2021, 9(11): 1270.
- [21] WU J P, ZHANG J X, HAO X Y, et al. Establishment of an efficient callus transient transformation system for *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' [J]. *Protoplasma*, 2024, 261(2): 351-366.
- [22] CORTESE E, CARRARETTO L, BALDAN B, et al. *Arabidopsis* photosynthetic and heterotrophic cell suspension cultures[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2200: 167-185.
- [23] LI B, TAKAHASHI D, KAWAMURA Y, et al. Plasma membrane proteome analyses of *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells during cold or ABA treatment: relationship with freezing tolerance and growth phase[J]. *Journal of Proteomics*, 2020, 211: 103528.
- [24] SEGEČOVÁ A, ČERVENÝ J, ROITSCH T. Advancement of the cultivation and upscaling of photoautotrophic suspension cultures using *Chenopodium rubrum* as a case study[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2018, 135(1): 37-51.
- [25] THORPE T A. History of plant tissue culture[J]. *Molecular Biotechnology*, 2007, 37(2): 169-180.
- [26] SRBA M, ČERNÍKOVÁ A, OPATRŇÝ Z, et al. Practical guidelines for the characterization of tobacco BY-2 cell lines [J]. *Biologia Plantarum*, 2016, 60(1): 13-24.
- [27] IKEDA N, KAMIMURA M, UESUGI K, et al. Choline chloride and *N*-allylglycine promote plant growth by increasing the efficiency of photosynthesis[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2024, 89(1): 51-61.
- [28] LEE E K, JIN Y W, PARK J H, et al. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(11): 1213-1217.
- [29] ZHOU P F, LI H H, LIN Y J, et al. Omics analyses of *Rehmannia glutinosa* dedifferentiated and cambial meristematic cells reveal mechanisms of catalpol and indole alkaloid biosynthesis[J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 463.
- [30] PATRA N, SRIVASTAVA A K. Artemisinin production by plant hairy root cultures in gas- and liquid-phase bioreactors[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(1): 143-153.
- [31] HA L T, PAWLICKI-JULLIAN N, PILLON-LEQUART M,

- et al. Hairy root cultures of *Panax vietnamensis*, a promising approach for the production of ocotillo-type ginsenosides[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2016, 126(1): 93-103.
- [32] PERASSOLO M, CARDILLO A B, MUGAS M L, et al. Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum* [J]. Industrial Crops and Products, 2017, 105: 124-132.
- [33] NGUYEN T M, WU P Y, CHANG C H, et al. High-yield BMP2 expression in rice cells *via* CRISPR and endogenous α Amy3 promoter[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 206.
- [34] KIM T G, BAEK M Y, LEE E K, et al. Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(5): 885-891.
- [35] KIM N S, YU H Y, CHUNG N D, et al. Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures[J]. Protein Expression and Purification, 2011, 76(1): 121-126.
- [36] JUNG J W, KIM N S, JANG S H, et al. Production and characterization of recombinant human acid α -glucosidase in transgenic rice cell suspension culture[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 226: 44-53.
- [37] CHUNG N D, KIM N S, VAN GIAP D, et al. Production of functional human vascular endothelial growth factor 165 in transgenic rice cell suspension cultures[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 63: 58-63.
- [38] KIM T G, KIM M Y, TIEN N Q D, et al. Dengue virus E glycoprotein production in transgenic rice callus[J]. Molecular Biotechnology, 2014, 56(12): 1069-1078.
- [39] CHEN L, YANG X Y, LUO D, et al. Efficient production of a bioactive bevacizumab monoclonal antibody using the 2A self-cleavage peptide in transgenic rice callus[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1156.
- [40] ZHANG N N, WRIGHT T, CARAWAY P, et al. Enhanced secretion of human α 1-antitrypsin expressed with a novel glycosylation module in tobacco BY-2 cell culture[J]. Bioengineered, 2019, 10(1): 87-97.
- [41] XU J F, OKADA S, TAN L, et al. Human growth hormone expressed in tobacco cells as an Arabinogalactan-protein fusion glycoprotein has a prolonged serum life[J]. Transgenic Research, 2010, 19(5): 849-867.
- [42] GENGENBACH B B, KEIL L L, OPDENSTEINEN P, et al. Comparison of microbial and transient expression (tobacco plants and plant-cell packs) for the production and purification of the anticancer mistletoe lectin viscumin[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(9): 2236-2249.
- [43] RATNER M. Genzyme resumes shipping as Sanofi-aventis hovers[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(10): 994.
- [44] MIHALIAK C A, FANTON M J, MCMILLEN J K. Preparation of vaccine master cell lines using recombinant plant suspension cultures: US2006/041305[P]. 2010-01-14.
- [45] HANANIA U, ARIEL T, TEKOAH Y, et al. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(9): 1120-1129.
- [46] HUANG T K, MCDONALD K A. Bioreactor systems for *in vitro* production of foreign proteins using plant cell cultures[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(2): 398-409.
- [47] ALCALDE M A, PEREZ-MATAS E, ESCRICH A, et al. Biotic elicitors in adventitious and hairy root cultures: a review from 2010 to 2022[J]. Molecules, 2022, 27(16): 5253.
- [48] CHODISETTI B, RAO K, GANDI S, et al. Improved gymnemic acid production in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* through biotic elicitation[J]. Plant Biotechnology Reports, 2013, 7(4): 519-525.
- [49] LIANG C X, CHEN C, ZHOU P F, et al. Effect of *Aspergillus flavus* fungal elicitor on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cells [J]. Molecules, 2018, 23(12): 3276.
- [50] NAMDEO A G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review[J]. Pharmacognosy Reviews, 2007, 1(1): 69-79.
- [51] AN Y, FENG S, XU Y, et al. ChemInform abstract: hydrothermal synthesis and characterization of a new potassium phosphoantimonate, $K_8Sb_8P_2O_{29} \times 8 H_2O$ [J]. ChemInform, 1996, 27(21): 199621020.
- [52] EFFERTH T. Biotechnology applications of plant callus cultures[J]. Engineering, 2019, 5(1): 50-59.
- [53] ZHANG Z J, SUN Y H, LI Y. Plant rejuvenation: from phenotypes to mechanisms[J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(10): 1249-1262.
- [54] TAKEDA T, MIZUKAMI M, MATSUOKA H. Characterization of two-step direct somatic embryogenesis in carrot[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(2): 206-211.
- [55] LU Y, LIU Z Y, LYU M L, et al. Characterization of *JsWOX1* and *JsWOX4* during callus and root induction in the shrub species *Jasminum sambac*[J]. Plants, 2019, 8(4): 79.

- [56] FENG M, ZHANG A, NGUYEN V, et al. A conserved graft formation process in Norway spruce and *Arabidopsis* identifies the PAT gene family as central regulators of wound healing[J]. *Nature Plants*, 2024, 10(1): 53-65.
- [57] CAO H F, ZHANG X, LI F, et al. Glucosinolate O-methyltransferase mediated callus formation and affected ROS homeostasis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2024, 30(1): 109-121.
- [58] SU Y H, TANG L P, ZHAO X Y, et al. Plant cell totipotency: insights into cellular reprogramming[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 228-243.
- [59] XU C Y, CHANG P J, GUO S Q, et al. Transcriptional activation by *WRKY23* and derepression by removal of bHLH041 coordinately establish callus pluripotency in *Arabidopsis* regeneration[J]. *The Plant Cell*, 2023, 36(1): 158-173.
- [60] YANG W T, ZHAI H W, WU F M, et al. Peptide REF1 is a local wound signal promoting plant regeneration[J]. *Cell*, 2024, 187(12): 3024-3038.e14.
- [61] 张博, 马永硕, 尚轶, 等. 植物合成生物学研究进展[J]. *合成生物学*, 2020, 1(2): 121-140.
- ZHANG B, MA Y S, SHANG Y, et al. Recent advances in plant synthetic biology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(2): 121-140.
- [62] YOOSEFZADEH-NAJAFABADI M, TORABI S, TULPAN D, et al. Genome-wide association studies of soybean yield-related hyperspectral reflectance bands using machine learning-mediated data integration methods[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 777028.
- [63] RAMEZANPOUR M R, FARAJPOUR M. Application of artificial neural networks and genetic algorithm to predict and optimize greenhouse banana fruit yield through nitrogen, potassium and magnesium[J]. *PLoS One*, 2022, 17(2): e0264040.
- [64] HESAMI M, ALIZADEH M, JONES A M P, et al. Machine learning: its challenges and opportunities in plant system biology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(9-10): 3507-3530.
- [65] JAFARI M, DANESHVAR M H. Prediction and optimization of indirect shoot regeneration of *Passiflora caerulea* using machine learning and optimization algorithms[J]. *BMC Biotechnology*, 2023, 23(1): 27.
- [66] FALLAH ZIARANI M, TOHIDFAR M, NAVVABI M. Modeling and optimizing *in vitro* percentage and speed callus induction of carrot *via* Multilayer Perceptron-Single point discrete GA and radial basis function[J]. *BMC Biotechnology*, 2022, 22(1): 34.
- [67] REZAEI H, MIRZAEI-ASL A, ABDOLLAHI M R, et al. Enhancing *Petunia* tissue culture efficiency with machine learning: a pathway to improved callogenesis[J]. *PLoS One*, 2023, 18(11): e0293754.
- [68] GRIGOREVA E I, SIDORCHUK Y V, DEINEKO E V. Aggregates' formation in higher plants' cell culture: the role of cell wall components[J]. *Biology Bulletin Reviews*, 2022, 12(2): S182-S194.
- [69] KOLEWE M E, HENSON M A, ROBERTS S C. Analysis of aggregate size as a process variable affecting paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures[J]. *Biotechnology Progress*, 2011, 27(5): 1365-1372.
- [70] PATIL R A, KOLEWE M E, ROBERTS S C. Cellular aggregation is a key parameter associated with long term variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2013, 112(3): 303-310.
- [71] NYON M P, DU L Y, TSENG C K, et al. Engineering a stable CHO cell line for the expression of a MERS-coronavirus vaccine antigen[J]. *Vaccine*, 2018, 36(14): 1853-1862.
- [72] BISSINGER T, WU Y X, MARICHAL-GALLARDO P, et al. Towards integrated production of an influenza A vaccine candidate with MDCK suspension cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(10): 3996-4013.
- [73] SHEN C F, GUILBAULT C, LI X L, et al. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines[J]. *Vaccine*, 2019, 37(47): 6996-7002.
- [74] LEE N, SHIN J, PARK J H, et al. Targeted gene deletion using DNA-free RNA-guided Cas9 nuclease accelerates adaptation of CHO cells to suspension culture[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1211-1219.
- [75] MOHNEN D. Pectin structure and biosynthesis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(3): 266-277.
- [76] YE H B J, RUTIGLIANO R J, DEB A, et al. Rewiring cellular morphology pathways with synthetic guanine nucleotide exchange factors[J]. *Nature*, 2007, 447(7144): 596-600.
- [77] GLEBA Y Y, TUSÉ D, GIRITCH A. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*[M/OL]//PALMER K, GLEBA Y. *Plant viral vectors*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, 375: 155-192. (2013-08-15) [2024-12-14]. https://link.springer.com/10.1007/82_2013_352.
- [78] HESAMI M, ALIZADEH M, NADERI R, et al. Forecasting

- and optimizing *Agrobacterium*-mediated genetic transformation via ensemble model-fruit fly optimization algorithm: a data mining approach using chrysanthemum databases[J]. *PloS One*, 2020,15(9): e0239901.
- [79] JIANG T, ZHANG Y, ZUO G G, et al. Transcription factor *PgNAC72* activates DAMMARENEDIOL SYNTHASE expression to promote ginseng saponin biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2024, 195(4): 2952-2969.
- [80] ZHAO Y, CHENG P, LIU Y, et al. A highly efficient soybean transformation system using GRF3-GIF1 chimeric protein[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(1): 3-6.
- [81] JHA P, KUMAR V. BABY BOOM (*BBM*): a candidate transcription factor gene in plant biotechnology[J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(11): 1467-1475.
- [82] LOWE K, WU E, WANG N, et al. Morphogenic regulators baby boom and wuschel improve monocot transformation[J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(9): 1998-2015.
- [83] KOBERCOVÁ E, SRBA M, FISCHER L. Sulfadiazine and phosphinothricin selection systems optimised for the transformation of tobacco BY-2 cells[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(3): 535-548.
- [84] HE Y B, ZHANG T, SUN H, et al. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 152.
- [85] TIAN C F, ZHANG Y X, LI J H, et al. Benchmarking intrinsic promoters and terminators for plant synthetic biology research [J]. *Biodesign Research*, 2022, 2022: 9834989.
- [86] YAMASAKI S, SUZUKI A, YAMANO Y, et al. Identification of 5'-untranslated regions that function as effective translational enhancers in monocotyledonous plant cells using a novel method of genome-wide analysis[J]. *Plant Biotechnology*, 2018, 35(4): 365-373.
- [87] HUANG L F, TAN C C, YE H J F, et al. Efficient secretion of recombinant proteins from rice suspension-cultured cells modulated by the choice of signal peptide[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140812.
- [88] WOJCIK S, KRIECHBAUMER V. Go your own way: membrane-targeting sequences[J]. *Plant Physiology*, 2021, 185(3): 608-618.
- [89] SELMA S, SANMARTÍN N, ESPINOSA-RUIZ A, et al. Custom-made design of metabolite composition in *N. benthamiana* leaves using CRISPR activators[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(8): 1578-1590.
- [90] PEREZ-MATAS E, HIDALGO-MARTINEZ D, MOYANO E, et al. Overexpression of BAPT and DBTNBT genes in *Taxus baccata in vitro* cultures to enhance the biotechnological production of paclitaxel[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(1): 233-247.
- [91] ZUO A Q, HE D, SUN C R, et al. Integration of induction, system optimization and genetic transformation in *Veratrum californicum* var. *vitro* cultures to enhance the production of cyclopamine and veratramine[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 216: 109087.
- [92] CHU M Y, PEDREÑO M A, ALBURQUERQUE N, et al. A new strategy to enhance the biosynthesis of trans-resveratrol by overexpressing stilbene synthase gene in elicited *Vitis vinifera* cell cultures[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 113: 141-148.
- [93] LI J H, MUTANDA I, WANG K B, et al. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4850.
- [94] SHI Y S, WANG D, LI R S, et al. Engineering yeast subcellular compartments for increased production of the lipophilic natural products ginsenosides[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 104-111.
- [95] KARLSON C K S, MOHD NOOR S N, KHALID N, et al. CRISPRi-mediated down-regulation of the cinnamate-4-hydroxylase (C4H) gene enhances the flavonoid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*[J]. *Biology*, 2022, 11(8): 1127.
- [96] ZHANG W H, ZHANG J Z, FAN Y D, et al. RNA sequencing analysis reveals *PgbHLH28* as the key regulator in response to methyl jasmonate-induced saponin accumulation in *Platycodon grandiflorus*[J]. *Horticulture Research*, 2024, 11(5): uhae058.
- [97] KARPPINEN K, LAFFERTY D J, ALBERT N W, et al. MYBA and MYBPA transcription factors co-regulate anthocyanin biosynthesis in blue-coloured berries[J]. *New Phytologist*, 2021, 232(3): 1350-1367.
- [98] APPELHAGEN I, WULFF-VESTER A K, WENDELL M, et al. Colour bio-factories: towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 218-232.
- [99] JIA E T, LI H, HE F, et al. Metabolic engineering of artificially modified transcription factor *SmMYB36-VPI6* for high-level production of tanshinones and phenolic acids[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 86: 29-40.
- [100] GE C, YU Z, SHENG H K, et al. Redesigning regulatory components of quorum-sensing system for diverse metabolic control[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 2182.

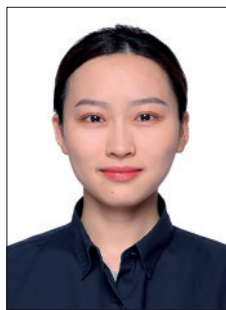
- [101] WU J J, BAO M J, DUAN X G, et al. Developing a pathway-independent and full-autonomous global resource allocation strategy to dynamically switching phenotypic states[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5521.
- [102] KURZBACH E, STRIEKER M, WITTSTOCK U. Production of benzylglucosinolate in genetically engineered carrot suspension cultures[J]. *Plant Biotechnology*, 2022, 39(3): 241-250.
- [103] VASILEV N, SCHMITZ C, GRÖMPING U, et al. Assessment of cultivation factors that affect biomass and geraniol production in transgenic tobacco cell suspension cultures[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104620.
- [104] CHUN J H, ADHIKARI P B, PARK S B, et al. Production of the dammarene sapogenin (protopanaxadiol) in transgenic tobacco plants and cultured cells by heterologous expression of *PgDDS* and *CYP716A47*[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(9): 1551-1560.
- [105] MURATA J, MATSUMOTO E, MORIMOTO K, et al. Generation of triple-transgenic *Forsythia* cell cultures as a platform for the efficient, stable, and sustainable production of lignans[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144519.
- [106] LU S W, ZHANG Y, ZHU K J, et al. The *Citrus* transcription factor *CsMADS6* modulates carotenoid metabolism by directly regulating carotenogenic genes[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(4): 2657-2676.
- [107] DONG Y S, DUAN W L, HE H X, et al. Enhancing taxane biosynthesis in cell suspension culture of *Taxus chinensis* by overexpressing the neutral/alkaline invertase gene[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(4): 651-660.
- [108] CHEE M J Y, LYCETT G W, KHOO T J, et al. Bioengineering of the plant culture of *Capsicum frutescens* with vanillin synthase gene for the production of vanillin[J]. *Molecular Biotechnology*, 2017, 59(1): 1-8.
- [109] HUSAIN Z, WARSI Z I, KHAN S, et al. Metabolic engineering of hairy root cultures in *beta vulgaris* for enhanced production of vanillin, 4-hydroxybenzoic acid, and vanillyl alcohol[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1435190.
- [110] MAYER M J, NARBAD A, PARR A J, et al. Rerouting the plant phenylpropanoid pathway by expression of a novel bacterial enoyl-CoA hydratase/lyase enzyme function[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(7): 1669-1682.
- [111] KITAOKA N, NOMURA T, OGITA S, et al. Bioproduction of glucose conjugates of 4-hydroxybenzoic and vanillic acids using bamboo cells transformed to express bacterial 4-hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(1): 89-97.
- [112] IMAMURA T, ISOZUMI N, HIGASHIMURA Y, et al. Isolation of amaranthin synthetase from *Chenopodium quinoa* and construction of an amaranthin production system using suspension-cultured tobacco BY-2 cells[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(5): 969-981.
- [113] HAN J Y, WANG H Y, CHOI Y E. Production of dammarenediol- II triterpene in a cell suspension culture of transgenic tobacco[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(2): 225-233.
- [114] SOBRINO-MENGUAL G, ALVAREZ D, TWYMAN R M, et al. Activation of the native PHYTOENE SYNTHASE 1 promoter by modifying near-miss *cis*-acting elements induces carotenoid biosynthesis in embryogenic rice callus[J]. *Plant Cell Reports*, 2024, 43(5): 118.
- [115] HIDALGO D, GEORGIEV M, MARCHEV A, et al. Tailoring tobacco hairy root metabolism for the production of stilbenes [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 17976.
- [116] DEUS-NEUMANN B, ZENK M H. Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures[J]. *Planta Medica*, 1984, 50(5): 427-431.
- [117] ISHCHUK O P, DOMENZAIN I, SÁNCHEZ B J, et al. Genome-scale modeling drives 70-fold improvement of intracellular heme production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(30): e2108245119.
- [118] CRISTIANA GOMES DE OLIVEIRA DAL MOLIN L Q. AraGEM, a genome-scale reconstruction of the primary metabolic network in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(2): 579-589.
- [119] MURALI S, IBRAHIM M, RAJENDRAN H, et al. Genome-scale metabolic model led engineering of *Nothapodytes nimmoniana* plant cells for high camptothecin production[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1207218.
- [120] LAKSHMANAN M, LIM S H, MOHANTY B, et al. Unraveling the light-specific metabolic and regulatory signatures of rice through combined *in silico* modeling and multiomics analysis[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(4): 3002-3020.
- [121] CHOWDHURY N B, SIMONS-SENFTLE M, DECOUARD B, et al. A multi-organ maize metabolic model connects temperature stress with energy production and reducing power generation[J]. *iScience*, 2023, 26(12): 108400.
- [122] YUAN H L, MAURICE CHEUNG C Y, POOLMAN M G, et al. A genome-scale metabolic network reconstruction of

- tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its application to photorespiratory metabolism[J]. *The Plant Journal*, 2016, 85(2): 289-304.
- [123] CUNHA E, SILVA M, CHAVES I, et al. The first multi-tissue genome-scale metabolic model of a woody plant highlights suberin biosynthesis pathways in *Quercus suber*[J]. *PLoS Computational Biology*, 2023, 19(9): e1011499.
- [124] ARANO-VARELA H, FERNÁNDEZ F J, ESTRADA-ZÚÑIGA M E, et al. Verbascoside production in long-term *Buddleja cordata* Kunth cell suspension cultures[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(6): 245.
- [125] TREJO-TAPIA G, BALCAZAR-AGUILAR J B, MARTÍNEZ-BONFIL B, et al. Effect of screening and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9(1): 32-36.
- [126] COPPEDE J S, PINA E S, PAZ T A, et al. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2014, 118(1): 33-43.
- [127] ZHU X F, MOHSIN A, ZAMAN W Q, et al. Development of a novel noninvasive quantitative method to monitor *Siraitia grosvenorii* cell growth and browning degree using an integrated computer-aided vision technology and machine learning[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(10): 4092-4104.



通讯作者: 王勇(1974—),男,研究员,博士生导师。研究方向为天然产物合成生物学,通过解析天然产物的生物合成途径,运用合成生物学的思想和方法,基于工程化的设计和建构,改进复杂天然产物的生物合成效率和其生产方式,开发天然的或非天然的复杂天然产物活性成分。

E-mail: yongwang@cemps.ac.cn



共同通讯作者: 田晨菲(1995—),女,博士后。研究方向为植物合成生物学。

E-mail: tianchenfei@cemps.ac.cn



第一作者: 颜钊涛(1998—),男,硕士研究生。主要研究方向为植物合成生物学及植物细胞培养。

E-mail: yanzhaotao@cemps.ac.cn