

不同理化因子对雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

Effects of Physical and Chemical Factors on Hairy Root Growth and Flavonoids Biosynthesis in the Cultures of *Saussurea medusa* Maxim Hairy Root

杨 睿^{1,2}, 付春祥¹, 金治平¹, 赵德修^{1*}

YANG Rui^{1,2}, FU Chun-Xiang¹, JIN Zhi-Ping¹ and ZHAO De-Xiu^{1*}

1. 中国科学院植物研究所, 北京 100093

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

1. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 在 1/2MS 液体培养基上研究了不同理化因子对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响。实验结果表明:氮源总浓度(包括 NH_4^+ 和 NO_3^-)为 30mmol/L; $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例为 5:25; 2% 蔗糖和 3% 葡萄糖组合; 0.5mg/L GA_3 和 0.5mg/L IBA; pH 5.8; 18h/d 的光照(光强为 3500lx); 24℃; 摇床转速为 100r/min 有利于毛状根生长及总黄酮的生物合成。在此培养条件下, 经过 21d 的培养毛状根生长量达到 12.8g/L(DW), 总黄酮合成量为 1922mg/L, 即总黄酮含量占毛状根干重的 15%, 约为干重野生水母雪莲植株总黄酮含量的 25 倍。

关键词 水母雪莲, 毛状根, 理化因子, 黄酮, 生物合成

中图分类号 Q831.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0233-06

Abstract The effects of different physical and chemical factors on hairy root growth and flavonoids production were studied in suspension culture of *Saussurea medusa* hairy root in 1/2 MS medium. The results showed that the following culture conditions, nitrogen concentration (involved NH_4^+ and NO_3^-), 30mmol/L; the ratio of ammonium to nitrate, 5:25; the combination of 2% sucrose and 3% glucose; 0.5mg/L GA_3 ; 0.5mg/L IBA; initial pH 5.8; light cycle, 18h/d (3500lx); temperature, 24℃; shaker revolutions per minute, 100r/min, were favourable to hairy root growth and flavonoids production. Under the above culture conditions, up to 12.8g/L (DW) of hairy root and 1922mg/L of flavonoids were obtained after 21 days of culture. The content of total flavonoids in hairy root was 15%, which was about 25 times as that in the wild plantlet.

Key words *Saussurea medusa* Maxim, hairy root, physical and chemical factors, flavonoids biosynthesis

水母雪莲 (*Saussurea medusa* Maxim) 为菊科 (Compositae) 凤毛菊属 (*Saussurea*) 植物, 分布于我国青海、甘肃、西藏等地, 是我国高山地区常用的一种名贵药材^[1]。民间常用来治疗风湿性关节炎、妇女

小腹冷痛、闭经、肺寒咳嗽和高山不适应症等。水母雪莲中含多种有效成分, 以黄酮类化合物为主^[2]。然而水母雪莲生长环境恶劣, 人工栽培又相对困难, 加上近年来的过度采挖, 野生资源正面临灭绝的

Received: September 30, 2004; Accepted: November 10, 2004.

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30472158).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62836201; E-mail: zhaodx@ibcas.ac.cn

国家自然科学基金资助项目 (No. 30472158)。

危险。

水母雪莲中有效成分种类较多,如:黄酮类、生物碱、多糖等多种有效成分。但用野生水母雪莲研制的多种成药及制剂均是以雪莲总黄酮为质量标准研制的,如雪莲通脉丸、雪莲注射液等。利用毛状根培养技术生产水母雪莲中的黄酮类物质,是一条经济有效的途径。毛状根培养系统不但具有生长迅速、次生代谢物质合成能力强的优点,而且生产能力稳定,利于天然药物的开发和利用^[3]。因此利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)侵染水母雪莲外植体产生毛状根,并对毛状根进行离体培养,是雪莲药用资源可持续发展的有效途径之一。

影响毛状根生长及其次生代谢物形成的因素很多,而且常常是多因素综合作用,包括培养基、外源激素、光照以及温度等各种理化因子。本文在已建立水母雪莲毛状根离体培养系统的基础上,进一步研究各种不同理化因子对其生长和总黄酮生物合成的影响,以期获得最佳培养条件,为水母雪莲毛状根的大规模培养和产业化开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料及基本培养条件

水母雪莲毛状根系由本实验室用发根农杆菌 R1601 感染水母雪莲无菌苗叶片诱导获得^[4]。

毛状根培养采用 1/2MS 液体培养基为基本培养基并附加 0.8mg/L GA₃、30g/L 蔗糖。高压灭菌前用 1mol/L NaOH 调 pH 至 5.8~6.0。将 13 条生长旺盛长约 5cm 的毛状根根尖接入装有 30mL 1/2MS 培养基的 100mL 三角瓶中,经过 20 代培养得到稳定的毛状根培养体系。24h 连续光照(光强为 800lx),温度为 24℃ ± 1℃,摇床转速 100r/min,每 18d 传代 1 次。在进行各项理化因子研究时,除特别已说明的条件外,其它条件与基本培养条件一致。收获时测定毛状根干重(DW)和总黄酮含量,每次取 3 个平行样进行分析,重复 3 次。

1.2 方法

1.2.1 水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成动态曲线的获得:切取培养 18d 长约 5cm 的水母雪莲毛状根根尖,每瓶接种 13 条,基本培养条件下进行培养。每隔 3d 取样,测定毛状根干重及总黄酮含量,观察 27d。

1.2.2 氮源对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:调节培养基中的总氮浓度分别为 7.5mmol/L、15mmol/L、30mmol/L、45mmol/L 和 60mmol/L

(按基本培养基中 NH₄⁺/NO₃⁻ 的比例配制)。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

保持培养基中总氮浓度为 30 mmol/L,调节 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例分别为 0:30、5:25、10:20、15:15、20:10、25:5 和 30:0。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.2.3 碳源对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:分别采用蔗糖、葡萄糖和果糖单独做碳源,使各自浓度分别为 3%、5% 和 7%。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

保持培养基中总碳浓度为 5%,组合蔗糖和葡萄糖,调节二者比例分别为 0:5、1:4、2:3、3:2、4:1 和 5:0。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.2.4 激素对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:在基本培养基中添加 GA₃,使其终浓度分别为 0 mg/L、0.25 mg/L、0.5 mg/L、0.75 mg/L、1.0 mg/L、1.25 mg/L 和 1.5mg/L。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

用 0.5 mg/L GA₃ 分别与 NAA、IBA、IAA 和 BA 组合,组合后四种植物激素浓度分别为 0 mg/L、0.25 mg/L、0.5 mg/L、0.75 mg/L 和 1.0 mg/L。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.2.5 pH 对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:用过滤灭菌的 1mol/L NaOH 和 1mol/L HCl 调节基本培养基的初始 pH,使其分别为 5.0、5.4、5.8、6.2、6.6 和 7.0。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.2.6 光周期对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:在 3500lx 光强下,采用 0h/d、6h/d、12h/d、18h/d 和 24h/d 光照条件进行培养。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.2.7 温度对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:分别在 20℃、24℃、28℃、32℃ 条件下进行培养。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.2.8 摇床转速对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:调节摇床转速分别为 50r/min、100 r/min、150 r/min 和 200 r/min。21d 时测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.2.9 培养条件的组合对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响:采用氮源总浓度(包括 NH₄⁺ 和 NO₃⁻)为 30mmol/L;NH₄⁺/NO₃⁻ 比例为 5:25;2% 蔗糖和 3% 葡萄糖;0.5mg/L GA₃ 和 0.5mg/L IBA; pH 5.8;18h/d 的光照(光强为 3500lx);24℃;摇床转

速为 100r/min 的条件培养 21d 后,测定毛状根干重和总黄酮含量。

1.3 测定分析

收集生长 21d 的水母雪莲毛状根,蒸馏水冲洗干净,滤纸吸干,称取鲜重(FW)。置于 50℃ 烘箱中 24h,称量干重。总黄酮含量的测定采用比色法^[5],以芦丁的含量进行换算。芦丁标准品浓度与其吸光度的直线方程: $c = 0.08089A - 0.0005324$ (其中, c 表示总黄酮浓度,单位 mg/mL; A 为光的吸收变量),相关系数 $r = 0.9991$,测定波长 510nm,仪器型号:Beckman Coulter 的 DU 640 可见-紫外分光光度计。

2 结果与讨论

2.1 水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的动态曲线

在基本培养条件下,水母雪莲毛状根生长曲线基本符合“S”型(Fig.1)。经过短时间延迟期后,第 12 天开始进入对数生长期,第 21 天时达到生长最高峰,生长量为 7.4g/L(DW)。21d 以后进入生长停滞期,干重基本不增加。在培养周期 0~21d 时,随着毛状根生长量的增加,总黄酮产量也随着提高,第 21d 时达到最大值,为 633mg/L,21d 后总黄酮产量开始下降。实验证明水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成是平行关系的次生代谢类型。

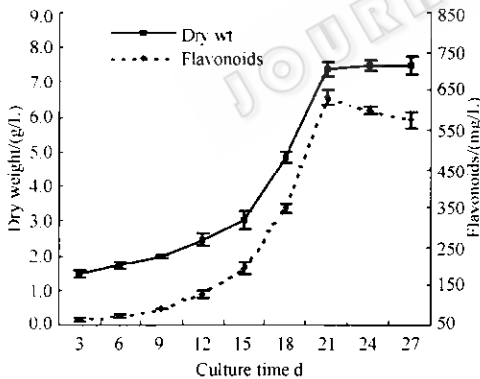


图 1 水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的时间进程

Fig.1 Time-course of the hairy root growth and flavonoids production of *Saussurea medusa Maxim*

2.2 氮源对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

氮源总浓度($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1/2.15)对毛状根干重增长和总黄酮生物合成的影响比较明显(Fig.2A)。氮源总浓度为 30mmol/L 时,毛状根生长量和总黄酮合成量均达到最大,分别为 7.3 g/L (DW)和 617 mg/L。同时当氮源总浓度为 30mmol/L

时,在不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例下,水母雪莲毛状根生长和总黄酮的生物合成量也有一定差别(Fig.2B)。 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例为 5:25 时,毛状根生长量和总黄酮合成量均达到最大,分别为 8.0g/L(DW)和 821mg/L。硝态氮(NO_3^-)浓度为零时,第 5 天毛状根开始出现黄褐色。本实验证明高浓度的氮(包括 NH_4^+ 和 NO_3^-)会抑制总黄酮合成,而硝态氮(NO_3^-)在总氮(包括 NH_4^+ 和 NO_3^-)中含量大于 50% 时更有利于毛状根生长和总黄酮积累,这一现象与 *Atropa belladonna*^[6]、*Centaurea calcitrapa*^[7]、*Datura candida* × *D. aurea*^[8]、*Artemisia annua*^[9] 和 *Psoralea species*^[10] 毛状根的生长及其次生代谢物合成相似。原因可能是氮(包括 NH_4^+ 和 NO_3^-)为一种重要的大量元素,它与植物生长和基因表达的信号传导有关,硝态氮(NO_3^-)可提高氨基酸和蛋白质含量,改变激素含量、根结构,降低根/冠,同时调节碳代谢^[7],从而影响总黄酮的生物合成。另外,孙敏等(2002 年)发现在长春花毛状根培养中水解乳蛋白(LH)有利于其生长和次生代谢物的积累^[11]。而水解乳蛋白中氨态氮占 50%,这与我们的结果不一致,可能是由于水解乳蛋白成分复杂,不能简单与 1/2MS 中的氮源做对比。

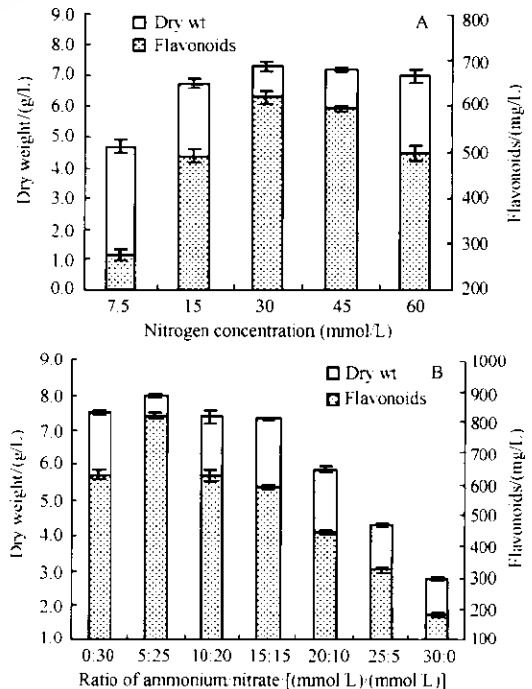


图 2 氮源浓度(A)和 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例(B)对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

Fig.2 Effect of nitrogen concentration(A) and $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (B) on hairy root growth and flavonoids production in the cultures of *Saussurea medusa Maxim*

2.3 碳源对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

使用蔗糖或葡萄糖单独做碳源时,50g/L 葡萄糖效果最好,毛状根干重和总黄酮合成量分别达到7.6g/L(DW)和773mg/L;70g/L 蔗糖或葡萄糖对毛状根生长和总黄酮合成都不利(Fig.3),说明高糖浓度对毛状根生长和总黄酮生物合成有抑制作用,这与龙胆毛状根生长及龙胆苦甙的生物合成^[12]极为相似。我们还发现使用组合碳源效果更好,20g/L 蔗糖和30g/L 葡萄糖组合时,毛状根生长量达到7.6g/L(DW),总黄酮合成量达到850mg/L,比二者单独做碳源效果都好,这与水母雪莲愈伤组织^[13]相似。另外果糖会强烈抑制毛状根生长和总黄酮合成,5d之内培养基颜色变黄,毛状根生长停滞,褐化死亡(数据未给出)。

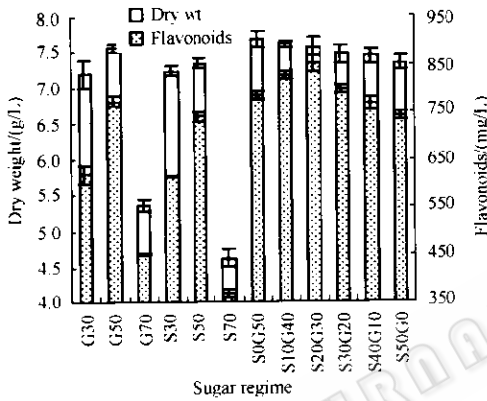


图3 碳源对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

Fig.3 Effect of carbon sources on hairy root growth and flavonoids production in the cultures of *Saussurea medusa Maxim*

G30: Glucose 30g/L; G50: Glucose 50g/L; G70: Glucose 70g/L; S30: Sucrose 30g/L; S50: Sucrose 50g/L; S70: Sucrose 70g/L; S0G50: Sucrose 0g/L + Glucose 50g/L; S10G40: Sucrose 10g/L + Glucose 40g/L; S20G30: Sucrose 20g/L + Glucose 30g/L; S30G20: Sucrose 30g/L + Glucose 20g/L; S40G10: Sucrose 40g/L + Glucose 10g/L; S50G0: Sucrose 50g/L + Glucose 0g/L.

2.4 激素对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

植物激素是植物组织培养中的关键因子,不仅影响细胞生长,还影响细胞次生代谢产物的合成^[14]。GA₃ 对水母雪莲毛状根侧根的产生有强烈促进作用,GA₃ 浓度为0.5mg/L时,毛状根生长量达到9.1g/L(DW),是基本培养条件下的1.2倍;总黄酮合成量达到936mg/L,是基本培养条件下的1.5倍(Fig.4A)。0.5mg/L GA₃ 和0.5mg/L IBA组合对毛状

根生长和总黄酮合成最有利,生长量为12.6g/L(DW),比基本培养条件时提高了70%;总黄酮合成量为1287mg/L,比基本培养条件时提高了1倍(Fig.4B)。而对于水母雪莲愈伤组织生长和总黄酮合成而言,以添加1mg/L NAA和0.2mg/L K⁺为效果最优^[13],这可能是由于毛状根培养属于器官培养^[15],愈伤组织不具备器官的形态、结构及性质,两者次生代谢物合成方式有较大差别,受外源激素调控的能力不同。

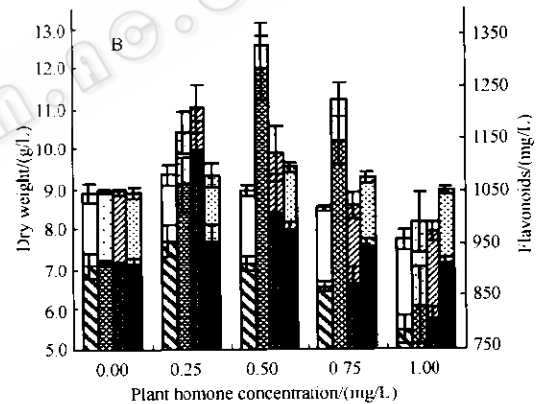
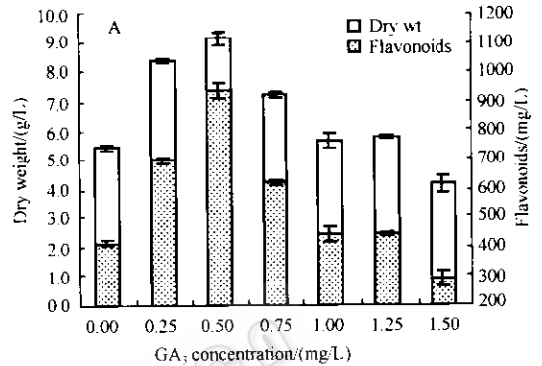


图4 GA₃ 浓度(A)及植物激素(B)对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

Fig.4 Effects of GA₃ concentration (A) and different combination of plant hormone (B) on hairy root growth and flavonoids production in the cultures of *Saussurea medusa Maxim*

■ Dry wt supplemented with 0.5mg/L GA₃-NAA
 □ Dry wt supplemented with 0.5mg/L GA₃-IBA
 ▨ Dry wt supplemented with 0.5mg/L GA₃-IAA
 ▩ Dry wt supplemented with 0.5mg/L GA₃-BA
 ▪ Flavonoids supplemented with 0.5mg/L GA₃-NAA
 ▫ Flavonoids supplemented with 0.5mg/L GA₃-IBA
 ▬ Flavonoids supplemented with 0.5mg/L GA₃-IAA
 ▮ Flavonoids supplemented with 0.5mg/L GA₃-BA

2.5 培养基 pH 值对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

水母雪莲毛状根生长及总黄酮生物合成的最适 pH 为 5.8 (Fig. 5), 总黄酮合成量达到 633mg/L, 是

pH 7.0 时的 1.8 倍, pH 5.0 时的 3.9 倍, 说明过高和过低的 pH 都不适合水母雪莲毛状根总黄酮形成, 这与青蒿毛状根培养^[16]相似。

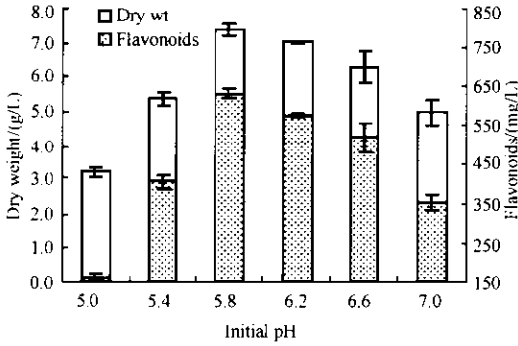


图5 pH 对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响
Fig. 5 Effect of pH on hairy root growth and flavonoids production in the cultures of *Saussurea medusa Maxim*

2.6 光周期对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

光照对诱导分化通常是必要的, 可激活某些酶的活性以及光诱导的叶绿体或叶绿体代谢产物的存在^[17]。光强为 3500lx 光周期为 18h/d 时, 毛状根生长量达到 12.4g/L(DW), 是全黑暗时的 2.1 倍, 是全光照时的 1.2 倍; 总黄酮合成量为 1179mg/L, 比全黑暗时提高了 160%, 比全光照时提高了 20% (Fig. 6)。实验还发现采用 12h/d 以上光照时, 毛状根呈现黄绿色。另外在水母雪莲毛状根培养过程中, 因接种材料来自光照培养物, 若利用黑暗培养物进行几次继代培养则毛状根会较大程度丧失合成总黄酮的能力。

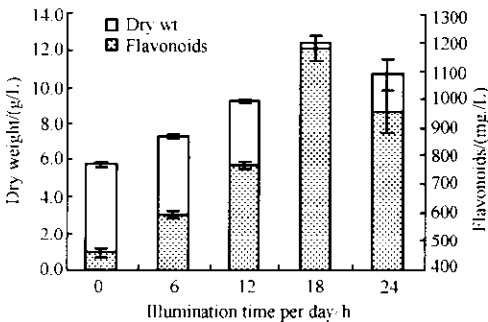


图6 光周期对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

Fig. 6 Effect of illumination on hairy root growth and flavonoids production in the cultures of *Saussurea medusa Maxim*

2.7 温度对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

一般植物组织培养的温度在 20 ~ 25℃。次生代谢产物的积累对温度的依赖性依不同培养系而

异^[16]。水母雪莲毛状根生长及总黄酮生物合成适宜温度为 24℃, 此时毛状根生长量及总黄酮合成量均达到最大, 分别为 7.3g/L(DW) 和 619 mg/L (Fig. 7)。温度为 28℃ 时毛状根生长及总黄酮合成开始受到强烈抑制。温度为 32℃ 时毛状根生长量仅为 2.4 g/L(DW), 总黄酮合成量为 135mg/L。说明高温对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的抑制影响较低温更加明显。

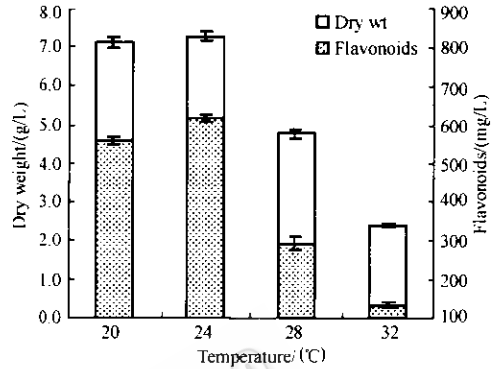


图7 温度对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

Fig. 7 Effect of temperature on hairy root growth and flavonoids production in the cultures of *Saussurea medusa Maxim*

2.8 摇床转速对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

在液体培养中植物组织对剪切力较为敏感。摇瓶转速升高, 瓶内传质效果好, 溶氧相对提高, 但转速过高, 剪切力变大, 容易引起培养物损伤及次生代谢物合成量的降低^[16]。转速在 100r/min 时, 剪切力对水母雪莲毛状根影响小, 具有好的传质和氧传递, 毛状根生长量及总黄酮合成量均达到最大, 分别为 7.5g/L(DW) 和 631mg/L (Fig. 8), 均比 50 r/min 时提高了约 20%。随着摇床转速提高, 毛状根生长量和

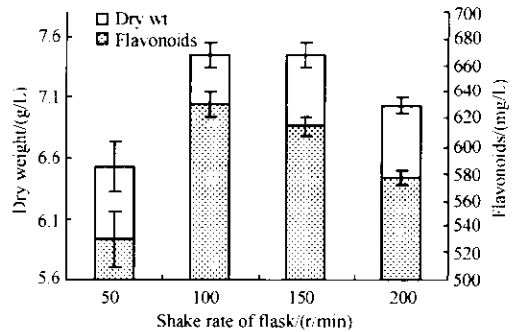


图8 摇床转速对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

Fig. 8 Effect of shaker revolutions rate on hairy root growth and flavonoids production in the cultures of *Saussurea medusa Maxim*

总黄酮合成量开始下降, 200 r/min 时毛状根生长量和总黄酮合成量均为 100r/min 时的 90%, 同时观察到毛状根团块因剪切力的作用变得紧密, 出现愈伤化, 这与青蒿毛状根^[16]基本一致。

2.9 各种最佳因素组合对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响

组合各项最佳培养条件经过 21d 培养, 水母雪莲毛状根生长量可达到 12.8g/L(DW), 总黄酮生物合成量为 1922mg/L, 是基本培养条件下总黄酮产量的 3 倍; 毛状根干重中总黄酮含量达到 15%, 约为野生水母雪莲植株黄酮含量的 25 倍, 说明各项最佳培养条件的组合总体上可以促进水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成。

在各种理化因子中 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例、激素和光周期对水母雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响最为明显, 今后可在此基础上对水母雪莲毛状根的扩大培养做进一步研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Li GH(李观海), Liu F(刘发), Zhao RC(赵荣春). Studies on pharmacological actions of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. ex Maxim. *Acta Pharmaceutica Sin* (药学报), 1980, **15**:368 - 369
- [2] Liu LS(刘力生), Xiao XH(肖显华), Zhang LD(张龙弟) et al. Effect of the flavonoids from *Saussurea involucrata* on DNA synthesis of cancer cells. *J Lanzhou Unive Natu Scie* (兰州大学学报自然科学版), 1985, **21**:80 - 83
- [3] Dai JG(戴均贵), Zhu WH(朱蔚华). Application of hairy root culture technology to production of plant secondary metabolites. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1999, **35** (2):69 - 76
- [4] Dexiu Zhao, Chunxiang Fu, Yaqiong Chen et al. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production. *Plant Cell Reports*, 2004 (in press)
- [5] Guan JY(关家彦), Wang WW(王玮文), Ma MT(马慕提) et al. Investigation of technological preparation on soak of *Saussurea involucrata*. *J Shenyang Pharma Univ* (沈阳药科大学学报), 1995, **12**:209 - 211
- [6] Lamine Bensaddek, Francoise Gillet, Jose Edmundo Nava Saucedo et al. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *Journal of Biotechnology*, 2001, **85**:35 - 40
- [7] Pedro ML Lourenco, Susana de Castro, Tiago M Martins et al. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **31**:242 - 249
- [8] Nussbaumer P, Kapetanidis I, Christen P. Hairy roots of *Datura candida* × *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports*, 1998, **17**:405 - 409
- [9] Wang JW, Tan RX. Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium. *Biotechnology Letters*, 2002, **24**:1153 - 1156
- [10] Christophe Nguyen, Frederic Bourgaud, Paul Fortot et al. Establishment of hairy root culture of *Psoralea species*. *Plant Cell Reports*, 1992, **11**:424 - 427
- [11] Sun M(孙敏), Wang H(汪洪), Wang Y(王颖) et al. Induction and culture of transformed hairy root in *Catharanthus Roseus*. *Journal of Southwest China Normal University(Natural Science)* (西南师范大学学报自然科学版), 2002, **27**(4):549 - 552
- [12] Jiang HR(江洪如), Tu YS(涂艺声). Effects of culture conditions on the hairy roots growth of *Gentiana manshurica* and gentiopicroside production. *JIANXISI SCIENCE* (江西科学), 1997, **15**(2):81 - 85
- [13] Zhao DX(赵德修), Wang Y(汪沂), Zhao JF(赵敬芳). Effect of physical and chemical factors on callus growth and flavonoids biosynthesis in the callus cultures of *Saussurea medusa*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**(3):259 - 264
- [14] Meyer HJ, Van Standen J. The in vitro production of an anthocyanin from cell cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, **40**:55 - 58
- [15] Bourgaud F, Gravot A, Milesi S et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 2001, **161**:839 - 851
- [16] Liu CZ(刘春朝), Wang YC(王玉春), Ouyang F(欧阳藩) et al. Technical factors of artemisin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy root culture. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1998, **40**(9):831 - 835
- [17] Wang P, Flores HE, Humphrey AE. Production of expansin from light/dark growing *Trichosanthes kirilouii* var. *japonium* root cultures. *Biotechnology Letters*, 1994, **16**:955 - 958