

- Helianthus debilis*, implications for a chemotaxonomy of genus *Helianthus* [J]. *Z Naturforsch*, 1986, 41c: 695-698.
- [20] Macias F A, Oliva R M, Varela R M. Allelochemicals from sunflower leaves cv. Peredovick [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 613-621.
- [21] Chou J C, Mullin C A. Distribution and antifeedant associations of sesquiterpene lactones in cultivated sunflower on western corn rootworm [J]. *J Chem Ecol*, 1993, 19(7): 1439-1452.
- [22] Spring O, Albert K, Hager A. Three biologically active heliangolides from *Helianthus annuus* [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(10): 2551-2553.
- [23] Macias F A, Toores A, Galindo J L G. Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61: 687-692.
- [24] Meragelman K M, Espinar L A, Sosa V E. New sesquiterpene lactones and other constituents from *Helianthus petiolaris* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 105-107.
- [25] Hernz W, Bruno M. Heliangolides, kauranes and other constituents of *Helianthus heterophyllus* [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(8): 1913-1916.
- [26] Gao F, Wang H, Mabry T J. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Helianthus* species [J]. *J Nat Prod*, 1987, 50(1): 23-29.
- [27] Spring O, Rodon U, Macias F A. Sesquiterpenes from non-capitate glandular trichomes of *Helianthus annuus* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(5): 1541-1544.
- [28] Macias F A, Molinoli J M C, Varela R M. Structural elucidation and chemistry of a novel family of bioactive sesquiterpenes: heliannuols [J]. *J Org Chem*, 1994, 59: 8261-8266.
- [29] Macias F A, Varela R M, Torres A. New bioactive plant heliannuols from cultivar sunflower leaves [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 1636-1639.
- [30] Macias F A, Varela R M, Torres A. Novel sesquiterpene from bioactive fractions of cultivar sunflowers [J]. *Tetrahedron Lett*, 1993, 34(12): 1999-2002.

肉苁蓉组织培养研究进展及应用前景

杨 坤, 焦智浩, 张根发*

(北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

摘 要: 肉苁蓉由于采挖过度而濒临灭绝, 组织培养是合理利用肉苁蓉, 防止其资源枯竭的有效方法。组织培养研究较多的是荒漠肉苁蓉和盐生肉苁蓉, 分别对这两种肉苁蓉愈伤组织的诱导、培养基的优化和药用成分的诱导条件等方面的研究进行综述, 介绍了应用组织培养生产肉苁蓉药用成分的经济价值和生态效益, 以及利用组织培养进行肉苁蓉快速繁殖的实践意义, 浅析了肉苁蓉大规模细胞培养的产业化前景。

关键词: 肉苁蓉; 组织培养; 荒漠肉苁蓉; 盐生肉苁蓉; 苯乙醇苷类化合物

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0140-04

Research progress and application prospect on tissue culture of *Herba Cistanche*

YANG Kun, JIAO Zhi-hao, ZHANG Gen-fa

(School of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Key words: *Herba Cistanche*; tissue culture; *Cistanche deserticola* Y. C. Ma; *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f.; phenylethanoid glycosides

肉苁蓉为列当科多年生寄生草本植物, 全球分布大约有 22 种^[1], 我国共有 4 种和 1 变种^[2], 分别为荒漠肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma、盐生肉苁蓉 *C. salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f.、管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) R. Wight、沙苁蓉 *C. sinensis* G. Beck 和白花盐苁蓉 *C. salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f. var. *albiflora* P. F. Tu et Z. L. Lou。肉苁蓉是中药复方中用量最大的中药材之一, 特别是荒漠肉苁蓉、盐生肉苁蓉和管花肉苁蓉被大量应用, 并且大量出口日本、韩国及东南亚地区。近年来由于狂采滥挖, 肉苁蓉野生资源遭到严重破坏。目前, 虽然肉苁蓉人工种植已取得重要进展, 但受各种条件的限制, 仍不能满足市场需求。应用组织培养的方法, 可以在不受寄主和

季节气候等条件影响的情况下大量生产肉苁蓉细胞, 是解决市场需求和保护野生资源的有效途径, 具有很高的经济价值和生态效益。近年来研究人员在肉苁蓉愈伤组织的诱导、愈伤组织最佳培养条件的探索和提高愈伤组织中药用成分等方面进行了不少工作, 本文对相关的研究进行概述, 并指出肉苁蓉大规模产业化的应用前景。

1 肉苁蓉组织培养的研究进展

肉苁蓉组织培养的主要目的是产业化生产肉苁蓉细胞及其药用成分, 或者通过愈伤组织诱导植株再生为高产栽培提供种质资源。通过大规模细胞培养生产愈伤组织, 从中提取药用成分, 需要摸索诱导愈伤组织的培养条件、适宜愈伤组织快速生长的培养条件和提高药用成分量的培养条件, 以

收稿日期: 2005-06-20

基金项目: 国家教育部高等学校骨干教师资助计划项目; 北京师范大学本科生科研基金项目

作者简介: 杨 坤 (1984—), 女, 山西运城人。 Tel: (010)58806496 E-mail: yk19840405@163.com

* 通讯作者 张根发 Tel: (010)58809453 E-mail: gfzh@bnu.edu.cn

便获取最多的生物量和药用成分。作为另一个主要用途,体外培养种苗主要是通过组织培养的方法使种子在体外条件下萌发,再通过激素诱导愈伤组织发芽,产生人工种苗。这种方法可以提高种子的发芽率,大大提高人工栽培生活能力。

苯乙醇苷类化合物(phenylethanoid glycosides, PhGs),是肉苁蓉的次生代谢产物,也是其主要药效成分。肉苁蓉中 PhGs 的种类很多,有松果菊苷、麦角甾苷、海胆苷、顺式麦角甾苷、异麦角甾苷、乙酰基麦角甾苷、肉苁蓉苷等^[3]。目前组织培养肉苁蓉的研究大多数都集中在提高 PhGs 产量方面。近年来兴起的生物转化系统生产药用成分的研究在肉苁蓉 PhGs 的生产中也有应用。生物转化是利用生物体系,将加入到反应系统中的外源有机底物某一特定部位或功能基团进行特异性的结构修饰,以获得有价值的不同化学产物的工艺^[4]。这方面的研究对于产业化生产肉苁蓉药用成分具有重要的意义。

不同种肉苁蓉的愈伤组织中 PhGs 的种类和质量分数不同。在我国作为药用植物使用的主要有荒漠肉苁蓉、盐生肉苁蓉和管花肉苁蓉。研究证明 3 种肉苁蓉均有补肾壮阳的作用^[5]。其中荒漠肉苁蓉是《中国药典》规定的正品肉苁蓉,自古以来就作为药用植物大量使用。盐生肉苁蓉所含的 PhGs 与荒漠肉苁蓉类似,而管花肉苁蓉中所含 PhGs 的种类比前两种要少,但某些成分的量却比荒漠肉苁蓉要高^[5],总体药用功效与荒漠肉苁蓉类似。目前组织培养中使用的外植体基本都来自荒漠肉苁蓉和盐生肉苁蓉。以下分别对这两种肉苁蓉组织培养的研究现状进行概述。

1.1 荒漠肉苁蓉组织培养的研究进展:目前已从荒漠肉苁蓉的茎、幼芽、鳞片、花瓣、子房、雄蕊和种子等多种组织和器官中诱导得到愈伤组织。对其诱导条件和继代培养条件进行研究发现,温度、培养基、激素配比、pH 值、光照和诱导子等对愈伤组织的培养和 PhGs 的合成都有影响。利用高温处理可以提高种子的愈伤组织诱导率并诱导其分化出芽^[6]。

1.1.1 愈伤组织的诱导:影响愈伤组织诱导率的主要因素有外植体的种类和培养基、激素配比、温度、光照、pH 值等培养条件。

不同外植体诱导愈伤组织时,诱导率和诱导条件都不相同。通过荒漠肉苁蓉茎、幼芽、鳞片、花瓣、子房、雄蕊和种子等多种组织和器官的比较发现,子房、茎无论在脱分化的时间,还是在愈伤组织的诱导率及生长状况上都比鳞片、幼芽好^[7],而用种子进行愈伤组织的诱导较难,诱导率非常低^[8]。这可能是由于肉苁蓉的寄生性造成的,自然条件下肉苁蓉种子具有一个近球形胚,只有在宿主梭梭根穿入之后才能够萌发^[9],因此从种子中诱导愈伤组织需要克服其对寄主的依赖性。欧阳杰等研究了用荒漠肉苁蓉种子诱导愈伤组织的条件,发现在接种前剥去种皮并进行热处理可以明显提高诱导率,最佳的处理方法是 50℃ 处理 1 h,此时愈伤组织的诱导率可达 25%^[10]。

培养条件对愈伤组织的诱导率和生长状况也非常重要。通常高盐离子浓度的 MS 培养基和 B₅ 培养基诱导愈伤组织

的效果比较好。在诱导过程中,激素的种类和浓度很关键,需要设置多个梯度进行对比选择最佳条件,实验中采用正交设计是较科学的一种方法。pH 值过低不利于愈伤组织的生长,过高会使培养基凝结成块,不利于营养成分的吸收,需要设置多个梯度选择最佳 pH 值。温度和光照等对诱导效果的影响不是很大^[10],目前的研究大都采用 25℃ 暗培养的条件^[7,8]。

对荒漠肉苁蓉幼芽、种子和鳞片的研究发现,B₅+CH 500 mg/L 为基本培养基,添加 IAA 0.58 mg/L+KT 2mg/L,pH 值为 6.0 诱导效果最好^[8];若采用 MS+2,4-D 2 mg/L+NAA 1 mg/L,配方简单,同时对各种愈伤组织也都能达到较好的诱导效果^[7]。采用正交设计研究其种子的诱导发现,最佳诱导条件为去除种皮,添加 2,4-D 2 mg/L、KT 0.5 mg/L 和 GA₃ 1 mg/L,pH 值为 6.0^[10];此实验对各影响因子的分析非常科学,但设置激素水平未设置 0 水平,即默认了 3 种激素必须同时存在。若多设置 1~2 个激素水平(包括 0 水平)将会获得更佳的培养条件。

1.1.2 适宜愈伤组织快速生长的培养条件:对温度、基本培养基、植物激素的浓度、蔗糖浓度、水解酪蛋白的浓度以及光照进行多梯度比较发现,25℃,固体 B₅ 培养基,pH 值 5.5~6.5,添加 6-BA 0.5 mg/L、赤霉素 10 mg/L、蔗糖 20 g/L、水解酪蛋白 800 mg/L,每天光照 16 h,光照强度为 24 μmol/(m²·s),最有利于 PhGs 的合成,其量比外植体中高了 42%~127%^[11]。方差分析表明光照对 PhGs 合成和积累的影响非常显著,这可能是由于愈伤组织的生长和 PhGs 的合成与光形态发生作用有关。通过研究光照强度和光谱特性对于愈伤组织生长和 PhGs 产生和积累的影响,发现 435 nm 蓝光强度为 24 μmol/(m²·s)时,愈伤组织干重和 PhGs 达到最高值,分别比白光照射下提高了 19% 和 41%^[12]。同时分别测定了 PhGs 合成途径中的限速酶——苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性在蓝光和白光照射下随时间的变化,发现蓝光照射下 PAL 的活性明显高于白光照射下的水平,推测光照对 PhGs 合成的影响可能是由于光受体被蓝光激活后提高了植物体内 PAL 的活性,促进了 PhGs 合成和积累的增加^[12]。

1.1.3 添加诱导子提高愈伤组织中的药用成分:由于促进肉苁蓉愈伤组织生长与促进次生代谢产物大量合成、积累的培养条件并不相同,因此肉苁蓉大规模细胞培养可以采用两步培养法,第 1 步先在生长培养基上使细胞快速增殖,再将处于对数生长期的细胞到诱导培养基上增殖第 2 步培养,以便获得最多的药用成分。探索第 2 步培养中最适宜药用成分合成并大量积累的条件是研究中最关键的问题。利用生物转化的方法生产药用成分是一条有效的途径,这种方法是将愈伤组织作为生物转化系统,通过前体饲喂和添加诱导子,使廉价的前体转化为价值很高的药用成分。

诱导子是一类能引起植物细胞代谢强度改变或代谢途径改变的物质,包括生物诱导子和非生物诱导子两类。生物诱导子又分内源性和外源性两类,内源诱导子来源于植物本身,如降解细胞壁的酶类、细胞壁碎片和寡聚糖等;外源诱导

子多来源于微生物,包括经处理的菌丝、微生物机体浸提物及产物等。非生物诱导子常用辐射、金属离子等。近年来研究发现稀土元素化合物是一类诱导活性很高的诱导子^[15]。在药用植物愈伤组织培养的第 2 步,加入诱导子往往能够刺激细胞的次生代谢、提高药用成分的量,对于降低工业化生产的成本有重要的影响。目前已有研究表明加入真菌诱导子茄病镰孢 *Fusarium solani* 或非生物诱导子稀土元素都可以提高肉苁蓉愈伤组织的生物量和其中 PhGs 的量。

李森等用从梭梭根茎及肉苁蓉植物体内分离出的真菌镰孢菌属茄病菌菌丝作为诱导子,研究其对荒漠肉苁蓉愈伤组织中氨基酸量的影响。结果证明,7 种人体必需氨基酸(除苏氨酸略低外)均高于野生植株,其中苯丙氨酸的量是野生植株 10 倍以上^[13]。鲁翠涛等采用同样的真菌诱导子茄病菌研究其对荒漠肉苁蓉 PhGs 量的影响。用不同剂量(碳水化合物当量)的诱导子诱导液体培养的愈伤组织,经过 27 d 后测得剂量为 20 mg/L 时 PhGs 的总产量最高,比不加诱导子时提高了近 100%^[14]。这可能与植物遇到微生物侵袭时的防御机制有关。当植物遭到有害物质威胁的情况下,倾向于合成抗病的次生代谢产物。

欧阳杰等用稀土元素作为诱导子研究其对荒漠肉苁蓉愈伤组织生长和 PhGs 合成的影响,发现稀土元素钕(Nd)、镧(La)、铈(Ce)都可在适当的浓度范围对愈伤组织生长和 PhGs 合成有促进作用,一种稀土元素的混合物(MER, $\text{La}_2\text{O}_3 : \text{CeO}_2 : \text{Pr}_6\text{O}_{11} : \text{Sm}_2\text{O}_3 = 225 : 175 : 3 : 1, \text{mol/mol}$)表现出最强烈的促进作用。经过 30 d 的培养,加入 0.02 mol/L MER 的愈伤组织中 PhGs 的量和总产量都提高最多,分别是 20.8% 和 1.6 g/L,比对照(没有加入稀土元素)提高 104% 和 167%^[5]。原因可能跟稀土元素的化学结构类似于 Ca 有关。低浓度的稀土元素与 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 竞争细胞膜上的受体,从而影响了营养物质的吸收、利用和转化。同时根据实验研究组织培养不同时间的苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性变化,推测可能 Ce^{4+} 影响了 PAL 的活性,从而影响 PhGs 的合成^[15]。

1.2 盐生肉苁蓉组织培养的研究:对于盐生肉苁蓉的研究较荒漠肉苁蓉要少,主要研究集中在确定适合愈伤组织生长和药用成分合成的培养基、生长素、激素配比、温度和光照等培养条件。对肉苁蓉愈伤组织进行前体饲喂,可以定向的提高某种 PhGs 成分的质量分数,并明显缩短培养周期。目前这方面已有一项组织培养的专利^[16]和一项生物转化的专利^[17]。

1.2.1 愈伤组织的诱导:研究表明,盐生肉苁蓉茎段、子房在添加 2,4-D 的培养基上诱导愈伤组织分别成块状、颗粒状,都为白色;而在添加 KT 的培养基上诱导的愈伤组织都呈颗粒状,黄绿色;添加 KT、NAA 的 MT 培养基诱导效果最好^[18]。

1.2.2 促进愈伤组织快速生长的培养条件:郭志刚等将盐生肉苁蓉愈伤组织在 20~25 °C 避光的条件下培养 10~20 d,培养出悬浮单细胞系,并从中筛选高产单细胞系^[16]。用驯化筛选的快速生长细胞系为材料,进行培养基、生长素、激素

配比、温度和光照等条件的筛选,结果表明用改良 Miller 或改良 MS 培养基、25 °C 暗培养、激素配比为 IAA 1 mg/mL 或 BA 0.5 mg/mL、IAA 3 mg/mL 最有利于愈伤组织的生长^[19]。用高效液相色谱法比较愈伤组织与野生盐生肉苁蓉的主要成分,发现二者的活性成分基本相同,其中主要药用成分的质量分数所培养的愈伤组织比野生肉苁蓉要高^[19]。松果菊苷、洋丁香酚苷和 2'-乙酰基洋丁香酚苷 3 种主要 PhGs 物质的总量可达到 95.7 mg/g,是野生盐生肉苁蓉的 1.4 倍,是药材酒苁蓉的 10.1 倍^[20]。

1.2.3 适宜 PhGs 合成的培养条件:通过研究碳源、生长素和培养条件对细胞中松果菊苷、洋丁香酚苷(类叶升麻苷)和 2'-乙酰基洋丁香酚苷 3 种 PhGs 合成的影响,发现添加葡萄糖比蔗糖更有利于 3 种 PhGs 的合成。但不利于细胞的增殖,最后 PhGs 总的产量反而低于蔗糖培养基中的产量;添加 2,4-D、15 °C 暗培养或 25 °C 光照培养都可以促进松果菊苷和洋丁香酚苷的合成;在 IAA 2 mg/L 与 6-BA 1 mg/L、25 °C 暗培养时,3 种 PhGs 的总量最高,达 1 937.7 mg/L;通过比较,愈伤组织中的主要成分与肉苁蓉药材基本相同,但 3 种 PhGs 的量远远高于天然肉苁蓉^[21]。

1.2.4 通过前体饲喂缩短 PhGs 合成周期:前体是目的产物合成途径中的中间代谢物。肉苁蓉组织培养生产 PhGs 时,通过前体饲喂可以定向的提高某种 PhGs 的量,并大大缩短培养周期。通过加入放射性同位素标记的前体,可以确定 PhGs 的活性位点是由哪个前体的活性基团转化而来,这种方法对于研究 PhGs 的生物合成途径具有重要的意义。

目前尚无这方面的研究报道,但一项肉苁蓉生物转化的专利显示,在培养基中添加氨基酸前体(苯丙氨酸和/或酪氨酸)、黄瓜汁前体或咖啡酸前体,可以大大缩短 PhGs 的合成周期,在 25 °C 避光振荡培养一周后即可获得 PhGs^[17]。

2 肉苁蓉组织培养的应用前景

2.1 利用组织培养生产肉苁蓉药用成分的价值

2.1.1 经济价值:肉苁蓉是我国的传统中药,有“沙漠人参”之称,应用历史已有 1 800 余年。肉苁蓉具有补肾阳、益精血、润肠通便、延缓衰老、提高免疫力等多种功效,在中药复方中被广泛的应用。现代医学研究发现其主要药效成分 PhGs 具有增强记忆力、抗衰老等重要功效^[17]。国内外已经开发了多种以肉苁蓉作为主要成分的保健食品,如御苁蓉口服液。日本将从肉苁蓉中提出的肉苁蓉苷作为应激性机能障碍的改善剂或治疗剂,用于治疗各种机能性障碍,特别是性机能障碍和健忘症,并认为其对心身疾病也具有预防或治疗作用。在欧洲专利局数据库所收录的 51 个国家的专利中,有 280 余项是有关肉苁蓉的药理学作用或用其作为药用成分生产药物、保健品等。

肉苁蓉被大量出口到日本、韩国以及东南亚地区,美国也已将其作为食品添加剂大量使用^[22]。国内外市场对肉苁蓉的需求量不断增长,到 2002 年,国内市场对肉苁蓉的年需求量大约在 3 500 t,国际市场的需求量约为 1 000 t^[23]。

在需求快速增长的同时,肉苁蓉野生资源因被大量采挖

而日益减少,乃至濒临灭绝。1989 年调查表明全国肉苁蓉的蕴藏量仅为 2 000 t,1989—2002 年实际采挖量为年约 209 t^[23],远不能满足市场需求。人工栽培虽已取得重要进展,但由于受到寄主数量、分布与根系发育情况等限制,仍难以满足市场的大量需求。研究表明,人工种植管花肉苁蓉的主要药用成分松果菊苷的量还不到野生肉苁蓉的一半^[24],故产品质量的提高还有待进一步研究。而组织培养肉苁蓉愈伤组织具有药用成分高、培养成本低等优点,可以全年不间断的大量生产高质量的肉苁蓉药用成分。大规模肉苁蓉组织培养技术的产业化推广,能够有效缓解肉苁蓉市场供不应求的状况。

2.1.2 生态效益:1984 年肉苁蓉就被列为国家二级保护植物,在 2000 年 4 月召开的第 11 届“濒危野生动植物种国际贸易公约”缔约国大会上肉苁蓉被列于附录 I。肉苁蓉的寄主梭梭也属国家珍稀濒危保护植物(渐危 3 级)。梭梭林具有防风固沙的作用,对于沙生环境的维持也非常重要。近年来由于乱采滥挖,肉苁蓉野生资源遭到严重破坏,梭梭资源也由于根系被破坏而受到损害^[25]。即使通过人工种植肉苁蓉,对梭梭的生长也有一定的影响,研究表明被寄生后的梭梭树高、地径和冠幅都普遍小于未被寄生个体,总生物量也减少了 49.29%^[26]。因此通过组织培养方法生产肉苁蓉细胞,替代天然肉苁蓉,作为药品或保健品的原料,成为保护野生肉苁蓉资源及其寄主梭梭的重要途径,对沙生环境也能起到有效的保护作用,具有很高的生态效益。

2.2 利用组织培养生产肉苁蓉快繁种苗的价值:通过愈伤组织培养和植株再生进行肉苁蓉的快速无性繁殖,可以为肉苁蓉的人工栽培提供充足的种苗。人工栽培肉苁蓉受到寄主数量、分布与根系发育情况等限制,通过愈伤组织诱导植株再生技术^[6],使种子克服对寄主的依赖而萌发,可以为人工栽培提供种苗,提高栽培的成功率。这样可以解决目前人工栽培发芽率低、发芽时间长等缺点,有助于提高人工栽培的产量。

2.3 大规模产业化生产的前景展望:扩大细胞培养的规模可以降低培养成本,提高经济效益。在生物反应器中进行植物细胞培养生产次生代谢物的方法可用于多种细胞体系,常与大规模相关的 3 种细胞体系是悬浮培养、固定化培养和发状根培养。适合于肉苁蓉组织培养的细胞体系主要是悬浮培养和固定化培养,目前悬浮培养在摇瓶中已经获得了成功,但规模扩大中的一些技术问题还有待解决;固定化培养肉苁蓉愈伤组织已经获得了成功。随着工程技术的进一步成熟,通过组织培养的方法大规模生产肉苁蓉愈伤组织,提取药用成分具有广阔的应用前景。

References:

- [1] Lei L, Song Z H, Tu P F. Advances in research of chemical constituents in plants of *Cistanche* Hoffing et Link [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(5): 473-476.
- [2] Tu P F, He Y P, Lou Z C. Survey and protection of medicinal resources of desert living *Cistanche* (*Cistanche deserticola*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(4): 205-208.
- [3] Guo Z G. Method of obtaining saline cistanche phenylethanoid glycoside kind compound using bio-conversion technique [P]. CN: 1556200, 2004-12-22.
- [4] Xe X Z, Guo Y. Researches and applications of biotransformation using plant cultures in drugs synthesis [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2003, 10(6): 405-408.
- [5] Xu W H, Qiu S X, Shen L Z, et al. Comparison of the chemical constituents and pharmacological effects between *Cistanche deserticola* and *C. salsa* (C. A. Mey.) G. Beck [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(3): 143-146.
- [6] Ouyang J, Wang X D, Zhao B, et al. Method for producing callus and differentiating sprout by inducing *Cistanche salsa* seed [P]. CN: 1457632, 2003-11-26.
- [7] Zhu Y H, Chen C Y, Luo Z M, et al. Studies on calluses induced from various explants of *Cistanche deserticola* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24(4): 242-243.
- [8] Wu X, Li S, Dong X C, et al. Callus culture of *Cistanche deserticola* [J]. *J Northwest Pharmacol* (西北药学杂志), 1998, 13(3): 103-104.
- [9] Li T R, Xu Y Y, Ge J X. Germination from the seed of *Cistanche* and relationship with host *Haloxylon* [J]. *Acta Sci Nat Univ Neimongol* (内蒙古大学学报:自然科学版), 1988, 20(3): 395.
- [10] Ouyang J, Wang X D, Chen S A, et al. Studies on callus induction from *Cistanche deserticola* seeds [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2002, 37(7): 491-493.
- [11] Ouyang J, Wang X D, Wang Y C, et al. Formation of phenylethanoid glycosides by *Cistanche deserticola* callus grown on solid media [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 223-225.
- [12] Ouyang J, Wang X D, Wang Y C, et al. Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of *Cistanche deserticola* and biosynthesis of phenylethanoid glycosides [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 657-661.
- [13] Li S, Wu X, Lou Z C, et al. Effect of elicitor of *fasarium solani* on the aminoacid contents of *Cistanche deserticola* callus [J]. *J Northwest Pharmacol* (西北药学杂志), 1998, 13(6): 247-248.
- [14] Lu C T, Mei X G. Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola* [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 1437-1439.
- [15] Ouyang J, Wang X D, Zhao B, et al. Effects of rare earth elements on the growth of *Cistanche deserticola* cells and the production of phenylethanoid glycosides [J]. *J Biotechnol*, 2003, 102: 129-134.
- [16] Guo Z G. Method for obtaining secondary metabolism product of broomrape by using biotechnology [P]. CN: 1446458, 2003-10-08.
- [17] Guo Z G. Method of obtaining saline cistanche phenylethanoid glycoside kind compound using bio-conversion technique [P]. CN: 1556200, 2004-12-22.
- [18] Liu D H, Zhu Y H. Studies on tissue culture of *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) G. Beck [J]. *J Hunan Agric Univ; Nat Sci* (湖南农业大学学报:自然科学版), 2003, 29(1): 35-37.
- [19] Guo Z G, Yu J M, Liu R Z. Effect of culture conditions on the callus growth of *Cistanche salsa* [J]. *J Tsinghua Univ; Sci Technol* (清华大学学报:自然科学版), 2002, 42(12): 1598-1600.
- [20] Zhao L, Guo Z G, Liu R Z, et al. Comparison of main constituents of *Herba Cistanche* and cultured cells of *Cistanche salsa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 814-817.
- [21] Guo Z G, Yu J M, Liu R Z, et al. Studies on culture of *Cistanche salsa* callus and synthesis of phenylethanoid glycosides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 204-207.
- [22] Liu G J. *Cistanche and Its Artificial Cultivation* (肉苁蓉及其人工种植) [M]. Beijing: China Labour and Social Security Publishing House, 2003.
- [23] Tan D, Guo Q, Wang C. Study on the status of *Cistanche deserticola* and its exploitation and utilization in China [J]. *Forest Resour Manag* (林业资源管理), 2004, 2: 29-32.
- [24] Wang C L, Tu P F, Guo Y H, et al. Chemical constituents in artificial cultivated *Cistanche tubulosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(6): 676-679.
- [25] Tan D Y, Guo Q S, Wang C L, et al. Effects of the parasite plant (*Cistanche deserticola*) on growth and biomass of the host plant (*Haloxylon ammodendron*) [J]. *Forest Res* (林业科学管理), 2004, 17(4): 472-478.