

采用植物离体培养技术生产精油

邓盾^{1,2}, 王永飞¹, 马三梅¹, 李晓东^{2,*}

¹暨南大学生物工程学系, 广州 510632; ²深圳职业技术学院, 广东深圳 518055

Production of Essential Oil by *in vitro* Culture Techniques of Plant

DENG Dun^{1,2}, WANG Yong-Fei¹, MA San-Mei¹, LI Xiao-Dong^{2,*}

¹Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055, China

摘要: 本文对近三十年来采用植物离体培养技术生产精油的研究进展作了介绍。

关键词: 植物离体培养; 精油; 毛状根培养; 细胞悬浮培养; 细胞固定化

植物精油又称挥发油、芳香油等, 其成分比较复杂, 包括萜类、酯类和黄酮类等物质。其中单萜是植物精油的主要成份, 酯类和氧化形式的单萜是其香味的主要来源。常见的氧化单萜有芳樟醇(linalool)、香茅醇(cephrol)、薄荷醇(menthol)、柠檬醛(citral)、1,8-桉叶素(1,8-cineole)、聚伞花素(ρ -cymene)和百里酚(thymol)等。此外, 植物精油中还含有一些不含氧的单萜, 它们主要是一些烯烃, 但是不具有香味, 较常见的有 α -蒎烯(α -pinene)、 β -蒎烯(β -pinene)、樟烯(camphene)、月桂烯(myrcene)等(许任生等 2006)。单萜具有共同的生物合成途径, 即由异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和它的同分异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyldiphosphate, DAMPP)在异戊烯转移酶(prenyltransferase)催化下合成牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP), GPP 则是所有单萜合成的共同前体(Roberts 2007)。

植物精油的经济价值和药用价值均较高, 有“液体黄金”的美誉。但是它在植株中的含量较低, 而且传统的精油生产方式易受到环境的制约。因此, 人们期望采用植物细胞培养技术生产精油。本文对这方面的研究进展作了介绍。

1 采用几种离体培养技术生产植物精油

为了弥补传统精油生产方式的缺陷, 科学家期望采用各种植物离体培养技术实现精油的工厂化生产, 这些技术主要包括细胞悬浮培养(cell suspension culture)、细胞固定化(cell immobilization)、毛状

根培养(hairy-root culture)和畸状茎(shooty teratomas)培养等。

1.1 细胞悬浮培养技术的利用 单萜的合成比较特殊, 植物细胞内有特定的合成和储存单萜的部位, 如腺毛(glandular trichomes)、树脂道(resin ducts)和裂生腺(schizogenous glands)等。一些科学家认为分化程度不高的植物培养物不能够合成精油, 而且随着继代次数的增加单萜在愈伤组织中有不断减少的趋势(Charlwood 和 Brown 1988)。但是更多的研究认为这些培养物可以产生单萜类物质和植物精油, 如表 1 中列出的一些文献报道。甚至, 一些研究还指出采用细胞悬浮培养技术还可以提高精油产量, 如 Joshi 等(2000)利用素馨花(*Jasminum grandiflorum*)节间诱导出的愈伤组织建立了细胞悬浮培养体系, 12 d 后精油产量是花的 3 倍, 达 1.12% (V/W, FW)。在液体培养基中加入前体芳樟酸(50~100 mg·L⁻¹)或芝麻、花生和大豆的提取液(0.5~1.0 g·L⁻¹)都能够较大幅度地提高精油的产量。在优化的条件下, 细胞悬浮培养体系中的芳樟醇产量是花的 8 倍。又如 Kintzios 等(2003)建立的罗勒(*Ocimum basilicum*)细胞悬浮培养体系产迷迭香酸的能力是愈伤组织或植株产迷迭香酸的能力的 8.5~11 倍, 产量达 10 mg·g⁻¹ (DW)。

但是采用愈伤组织或细胞悬浮培养技术生产

收稿 2008-08-06 修定 2008-10-06
资助 深圳职业技术学院重点课题(06KJX012)。
* 通讯作者(E-mail: lxd1819@yahoo.com.cn; Tel: 0755-26019169)。

表1 用植物细胞培养技术获得的一些挥发性成份

| 物种名 | 培养方式 | 主要挥发性成份 | 精油产量 | 参考文献 |
|---|-------------|---|--|-----------------------------------|
| 洋蓍草(<i>Achillea millefolium</i> ssp. <i>millefolium</i>) | 细胞悬浮培养 | 丁香酚、桉萜、 ρ -聚伞花素 | 0.001%~0.002% (W/W, FW) | Figueiredo 等 1995 |
| 洋蓍草(<i>Achillea millefolium</i>) | 毛状根培养 | 异戊酸橙花酯、橙花醇、反- β -法呢烯 | 0.05% (V/W, FW) | Lourenço 等 1999 |
| 母菊(<i>Chamomilla recutita</i>) | 愈伤组织 | 母菊醇、库贝醇、Gossonorol | | Magiatis 等 2001 |
| 印度藏茴香(<i>Carum copticum</i>) | 细胞悬浮培养 | 榄香醇、 α -杜松醇、 δ -杜松烯(7.8%) | | Lockwood 等 2002 |
| 印度藏茴香(<i>Carum copticum</i>) | 愈伤组织 | 百里酚 | | Prabha 等 1991 |
| 圆金柑(<i>Citrus japonica</i>) | 愈伤组织和细胞悬浮培养 | <i>d</i> -柠檬烯、 α -蒎品醇 | | Lockwood 等 2007 |
| 葡萄柚(<i>Citrus paradisi</i>) | 愈伤组织 | 瓦伦烯、努特卡酮 | 瓦伦烯(8.0±0.6) $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ 努特卡酮(160±13.6) $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ | del Río 等 1991 |
| 甜橙(<i>Citrus sinensis</i>) | 愈伤组织 | 氨基苯甲酸甲酯、柠檬烯、 β -丁香烯、罗勒烯 | | Alonzo 等 2001 |
| 赤桉(<i>Eucalyptus camaldulensis</i>) | 愈伤组织 | β -蒎烯、 α -蒎烯、樟脑烯(camphene) | | Giamakis 等 2001 |
| 素馨花(<i>Jasminum grandiflorum</i>) | 细胞悬浮培养 | 芳樟醇、丁香酚、顺-茉莉花素、茉莉酮酸甲酯 | 1.12% (V/W, FW) | Joshi 等 2000 |
| 欧当归(<i>Levisticum officinale</i>) | 毛状根 | 正庚醛、 γ -榄烯、反- β -法呢烯 | 0.006%~0.018% (V/W, FW) | Santos 等 2005 |
| 胡椒薄荷(<i>Mentha arvensis</i>) | 愈伤组织 | 薄荷酮、异薄荷酮、薄荷醇 | | Phatak 和 Heble 2002 |
| 辣薄荷(<i>Mentha piperita</i>) | 细胞悬浮培养 | 薄荷醇 | 薄荷醇 166 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | Chang 等 1998 |
| 柠檬留兰香(<i>Mentha citrata</i>) | 畸状茎 | 芳樟醇、乙酸芳樟酯 | 精油含量约为植株的 10% | Hilton 等 1995 |
| 柠檬留兰香(<i>Mentha citrata</i>) | 畸状茎 | 芳樟醇、乙酸芳樟酯 | 精油含量为叶片的 20% | Spencer 等 1990 |
| 辣薄荷(<i>Mentha piperita</i>) | 畸状茎 | 薄荷醇、薄荷呋喃 | | Spencer 等 1993 |
| 肉豆蔻天竺葵(<i>Pelargonium fragrans</i>) | 细胞悬浮培养 | 柠檬烯、月桂烯、 β -蒎品烯 | 单蒎含量约为植株的 1%~3% | Brown 和 Charlwood 1986 |
| 橙花糙苏(<i>Phlomis fruticosa</i>) | 愈伤组织 | | | Nikolakaki 和 Christodoulakis 2007 |
| 茴芹(<i>Pimpinella anisum</i>) | 畸状茎 | β -没药烯 | 精油含量为植株的 0.0727% | Salem 和 Charlwood 1995 |
| 茴芹(<i>Pimpinella anisum</i>) | 毛状根 | 反-环氧假异丁香酚-2 甲基丁酸、 β -没药烯、青枝烯 | 0.1% (V/W, DW) | Santos 等 1998 |
| 毛缘光萼苔(<i>Porella vernicosa</i>) | 细胞悬浮培养 | β -没药烯、水蓼二醛、去绿片酮甲酯 | | Ono 等 1996 |
| 迷迭香(<i>Rosmarinus officinalis</i>) | 细胞悬浮培养 | 十六烷酸、2,6-二异丁基-4-甲基苯酚、樟脑、桉精油 | | 朱汝幸等 1996 |
| 银灰菊(<i>Santolina chamaecyparissus</i>) | 愈伤组织 | α -雪松烯、 β -雪松烯、vulgarone | | Ahuja 等 2005 |
| 缬草(<i>Valeriana officinalis</i>) | 毛状根 | 野缬草醇、乙酞野缬草酯、乙酸冰片酯、 β -丁香烯 | 0.3% (V/W, DW) | Gränicher 等 1995 |
| <i>Zataria multiflora</i> Boiss (Labiatae, <i>Zataria</i>) (唇形科, 新塔花属) | 愈伤组织 | 百里酚、香芹酚、乙酸百里酚酯(thymol acetate)、乙酸香芹酯(carvacrol acetate)、 γ -蒎品烯、 ρ -伞花烯 | | Mohagheghzadeh 等 2000 |

植物精油也存在着一些问题。一方面,在愈伤组织中合成的单萜,在植株中含量很低或是不存在。如从迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)细胞悬浮培养物的精油中含有柳杉烯,而在植株中却不存在(朱汝幸等1996)。在欧芹(*Petroselinum crispum*)愈伤组织中合成的柠檬烯(limonene)和苯乙酮(acetophenone)也没有在植株中发现(López等1999)。黑暗培养的肉豆蔻天竺葵(*Pelargonium fragrans*)愈伤组织中,柠檬烯占挥发性物质的50%,而在植株中柠檬烯仅占挥发性成份的5% (Brown和Charlwood 1986)。

另一方面,更多的情况是愈伤组织或悬浮培养细胞的精油产量较低。如洋蓍草(*Achillea millefolium*)悬浮培养细胞中精油最大得率仅有0.002% (W/W, FW),而植株的精油产量则达到0.2% (W/W, FW) (Figueiredo等1995)。又如,在已分化出毛状体(trichome),但未生根的肉豆蔻天竺葵(*P. fragrans*)愈伤组织中的精油含量仅为植株的0.3% (Brown和Charlwood 1986)。因此如何提高植物离体组织或细胞合成精油的质量和产量是一个亟待解决的问题。

1.2 毛状根和畸状茎培养技术的利用

1.2.1 毛状根培养技术 与愈伤组织和悬浮培养的细胞相比,毛状根培养物具有遗传和化学性状稳定、分化程度高的特点,也不需要植物生长调节剂去刺激它的生长。从产量上比较,采用毛状根培养技术获得的精油量相对较高。如洋蓍草(*A. millefolium* ssp. *millefolium*)毛状根培养物的精油产率为0.05% (V/W, FW),和植株中的精油含量相当(Lourenço等1999)。但悬浮培养的洋蓍草(*A. millefolium*)细胞的精油产量仅是植株水平的0.5% (Figueiredo等1995)。Santos等(1998)建立了茴芹(*Pimpinella anisum*)毛状根培养体系,在光照培养条件下毛状根培养物的精油量为1.2% (V/W, DW),高于茴芹(*P. anisum*)根和果实中的精油含量。可见毛状根培养技术在植物精油离体生产方面具有较大的应用价值。但是也有研究报道称,由毛状根培养物产生的精油在产量和化学成分上都与植株不同,如Santos等(2005)获得的欧当归(*Levisticum officinale*)毛状根培养物的精油产量仅为0.006%~0.018% (V/W, FW)。另外,欧当归(*L. officinale*)植株中的挥发性成份 β -芹子烯(β -selinene)也未在毛状根培养物中发现(Santos等2005)。又如反式茴

香脑(trans-anethole)在茴芹(*P. anisum*)果实中比例高达92.5%,但是在毛状根培养物中只占1%左右(Santos等1998)。再如,虽然缬草(*Valeriana officinalis*)毛状根精油产量和植株根中的相当,但是缬草毛状根精油中的单萜比例却下降了10倍(Gränicher等1995)。

1.2.2 畸状茎培养技术的利用 畸状茎同毛状根的特点类似,也不需要植物生长调节剂去刺激生长。不同的是,畸状茎常常被用来研究植物地上部分的次生产物合成,而毛状根常常被用来研究植物地下部分的次生产物合成。畸状茎一般是由根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)侵染植物茎段形成的,但不是所有的根癌农杆菌都能够引起畸状茎的形成。Spencer等(1990)比较了10个不同的根癌农杆菌株系诱导柠檬留兰香(*Mentha citrata*)产生畸状茎的效果时发现仅有胭脂碱(nopaline)型的根癌农杆菌T37和C58才能诱导柠檬留兰香产生畸状茎,并且在畸状茎上发现了油腺(oil gland)。虽然畸状茎的精油含量比植株叶片低4倍,但是精油的质量有了很大提高。芳樟醇和乙酸芳樟酯(linalyl acetate)是柠檬留兰香(*M. citrata*)精油的主要成分,在叶片中它们占精油93%,在畸状茎中的约占精油的94%。柠檬留兰香(*M. citrata*)畸状茎的精油成分和植株的十分接近,但产量却比叶片的低4倍。Salem和Chailwood(1995)利用根癌农杆菌T37感染茴芹(*P. anisum*)茎,获得了茴芹畸状茎。畸状茎中精油的含量比植株茎低18%,比完整植株低89%,但是精油的主要成分和植株较为相似。

从上面的研究可以看出畸状茎的精油产量不一定比植株高,一般比植株低几倍到10倍。但是畸状茎的优点在于产生的精油质量较高,而且生长速度快,这可以弥补精油产量不高的缺陷。因此采用畸状茎培养技术去实现植物精油的离体生产有很好的应用前景。

1.3 细胞固定化培养技术的利用 细胞固定化技术的优点在于固定化后的细胞相对密集,生长缓慢,有利于细胞的聚集和分化。另外,由于固定化介质对细胞起到保护作用,细胞受到剪切力和渗透压的影响较小,因而可能有利于精油的合成。郝建平等(1995)建立了一种薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq)的细胞固定化生产薄荷醇的方法,他们用3%海藻酸钠固定愈伤组织,并进行细胞悬浮培养,成功获得

了薄荷醇。

但也有报道称采用细胞固定化的方法并不能提高精油的产量, Kintzios等(2003)就发现固定化后的罗勒(*O. basilicum*)细胞的产迷迭香酸能力比悬浮培养的罗勒细胞要低。Kintzios等(2003)还发现使用1.5%藻酸钙(calcium alginate)固定罗勒(*O. basilicum*)愈伤组织时,迷迭香酸的合成完全被抑制;使用3%藻酸钙时,细胞仅合成少量的迷迭香酸;使用2%藻酸钙的固定效果最好。原因可能是浓度为1.5%藻酸钙会造成细胞表面包裹层的空隙较大,使细胞易于受到微环境的影响。而浓度为3%藻酸钙固定细胞则造成包裹层的空隙太小,影响了营养物质的交换。因此,采用细胞固定化技术生产精油还需要进一步深入研究。

2 离体条件下影响精油合成的因素

2.1 植物生长调节剂对精油合成的影响 如何提高离体的细胞和组织中精油产量是个亟待解决的问题。研究发现,植物生长调节剂能够影响离体细胞和组织中精油的合成。当培养基中2,4-D浓度调整到 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,辣薄荷(*Mentha piperita*)细胞悬浮体系中薄荷醇的产量最大(Chang等1998)。可见适当浓度的植物生长调节剂能够促进精油的合成。

但是植物生长调节剂促进精油的合成并不是通过提高生物合成量来实现的,当IBA浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和6-BA浓度为 $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,夏风轮菜(*Satureja hortensis*)愈伤组织的生物合成量达到最大,但是迷迭香酸的合成量却在IBA浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和6-BA浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大(Tepe和Sokmen 2007)。Sudriá等(1999)研究了细胞分裂素对齿叶薰衣草(*Lavandula dentata*)精油合成的影响,它们发现6-BA虽然能够提高齿叶薰衣草生物合成量,但是6-BA对精油合成量的影响却是通过改变腺毛的分泌状态来实现的。

2.2 光照对精油合成的影响 Brown和Charlwood(1986)发现光照可以促进单萜积累,当肉豆蔻天竺葵(*P. fragrans*)愈伤组织在连续黑暗的培养条件下,单萜产量为植株的1%,而在18h的光照培养条件下,单萜的产生量为植株的3%。说明光照肉豆蔻天竺葵的愈伤组织合成单萜。Giamakis等(2001)报道赤桉(*Eucalyptus camaldulensis*)愈伤组织在光照培养条件下,氧化形式的1,8-桉叶素含量比在黑暗条件下培养的高,但是另一种单萜 β -蒎烯的含量却比

黑暗条件下培养的低。Figueiredo等(1995)发现与光照条件下培养的洋蓍草(*A. millefolium*)细胞相比,黑暗环境更能刺激洋蓍草合成丁香酚。看来光对单萜的影响比较复杂,因为光不但能够改变一些酶的活性,也能够导致一些萜类的降解,这两方面都是导致植物挥发油成分发生改变的原因。

2.3 低温和诱导物 植物次生代谢是和防御反应密切联系的,在逆境环境下植物次生代谢往往被刺激。有研究说明低温能够促进精油合成。未分化的辣薄荷(*M. piperita*)愈伤组织在酵母提取物的诱导下精油合成量为 $0.39\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,如果把培养温度降低到 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 则精油产量可达到 $0.53\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Dörnenburg和Knorr 1996)。

真菌细胞壁成份中的壳聚糖(chitosan)和果胶(pectin)能够模拟植物病原菌与植物作用模式,从而刺激植物防御反应并提高精油产量。在植株水平上,添加诱导物是提高精油产量常用的方法,但是在细胞水平上这方面的报道还不多见,Chang等(1998)报道在培养基中添加 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 壳聚糖可以使薄荷醇的产量增加40倍。可见采用诱导物刺激精油的合成是一个不错的方法。

3 采用植物离体培养技术生产精油时需要注意的问题

3.1 植物精油的合成能力与细胞的分化程度有关 一般认为如果某种次生产物是在特化的器官中合成,那么这种物质在未分化的组织中出现的几率就较低,甚至不出现。尽管精油是在特殊的器官中合成的,但大量的研究证明未分化的愈伤组织和悬浮培养细胞也能够进行单萜和精油的合成(表1),这就说明组织是否分化不是精油是否能够合成的前提。

但是,从另一方面看组织分化程度的高低确实和精油的质量和产量有着密切关系。Lockwood等(2002)发现2,4-D和激动素(kinetin, KT)能诱导印度藏茴香(*Carum copticum*)形成未分化的愈伤组织,不过这种愈伤组织并不能够合成百里酚。而有趣的是半组织化的愈伤组织合成百里酚的能力是未分化愈伤组织的6倍,这可能是半分化愈伤组织中含有较多叶绿素II的缘故(Prabha等1991)。Pasqua等(2001)认为精油的合成和根的次生分泌管(secondary secretory duct)分化程度有密切关系,因为完整欧白芷(*Angelica archangelica*)植株的根中有

较多的单萜, 而由愈伤组织诱导后的根仅能合成少量的挥发性萜类, 原因是这种再生根的中柱鞘仅含有两个发育程度较低的初级管(primary duct), 而植株根的中柱鞘则含有分化程度相对较高的次生分泌管。Alonzo等(2001)发现甜橙非胚状体中检测不到单萜的存在, 而在胚状体中可检测出柠檬烯的存在。

又如, 在细胞悬浮培养体系中固定后细胞的精油生产能力比游离细胞的精油生产能力强。以前一种方式获得的精油产量约是植株的20%, 而以后一种方式获得精油产量仅为植株的1%, 原因可能就是固定后细胞的排列方式更接近植株(Brown和Charlwood 1986)。

这些研究说明分化程度的高低和单萜的合成有密切关系。因此从具有一定分化程度的愈伤组织或细胞入手才是提高精油合成能力的合理途径。

3.2 选择合适的植物离体培养技术 对于细胞悬浮培养技术而言, 由于单萜对植物细胞的毒性, 剪切力和渗透压力对植物细胞生长的影响, 细胞的精油产生能力很难提高。应采取相应的措施避免这些不利因素, 如采用两相培养技术等。

一般认为毛状根培养技术较为适合生产积累于植物根部的次生代谢物, 畸状茎培养技术则适合生产积累于植物地上部分的次生代谢物, 植物精油一般以植物地上部分, 如花、叶和茎中的含量最为丰富。因此多数研究认为毛状根产生的植物精油质量不高的现象也就不足为奇了(Santos等1998; Lourenço等1999)。

从不同的植物离体培养方式来看, 畸状茎培养技术在精油生产中最具应用前景。与其他植物离体培养方式相比, 畸状茎最大的优势在于所获得的精油质量较高, 主要成分基本上与植株的一致。尽管精油产量较低, 但是畸状茎生长周期短的特点可以弥补这一缺点, 例如茴芹(*P. anisum*)畸状茎的生长周期仅有30 d (Salem和Charlwood 1995), 短时间内即可获得大量原材料。因此, 在离体条件下, 畸状茎培养技术是目前最有可能实现精油工厂化生产的技术。需要注意的是畸状茎在不断继代培养后, 精油的成分可能会发生改变。如Hilton等(1995)认为辣薄荷(*M. piperita*)畸状茎在培养之初精油中以薄荷呋喃(menthofuran)为主, 而继代5年之后则以薄荷醇和薄荷酮(menthone)为主, 显然精油

的主要成分发生了改变。但是这种改变也是相对的, 柠檬留兰香(*M. citrata*)畸状茎的精油成分相对稳定的多, 在继代培养5年之后还基本保持不变。这可能是由于在继代培养过程中一些酶不稳定的表达导致了精油成分的改变。

4 结语

虽然分化程度低或未分化的愈伤组织和悬浮培养细胞也具有精油合成能力, 但是精油的产量和质量均不高。精油的合成和储存与组织的分化程度相关, 因此建立植物离体培养体系需要从具有一定分化程度的组织入手, 如毛状根和畸状茎等。相对而言畸状茎的精油成分与植株最为接近, 因而畸状茎培养技术是目前离体生产精油的最佳选择。

参考文献

- 郝建平, 周小梅, 张江涛(1995). 薄荷固定化细胞培养产生薄荷醇. 山西大学学报(自然科学版), 18 (4): 445~448
- 许任生, 叶阳, 赵维民(2006). 天然产物化学导论. 北京: 科学出版社, 92~106
- 朱汝幸, 饶红宇, 宫澜(1996). 迷迭香细胞悬浮培养及挥发油的产生. 植物生理学通讯, 32 (1): 9~12
- Alonzo G, Saiano F, Tusa N, Fatta Del Bosco S (2001). Analysis of volatile compounds released from embryogenic cultures and somatic embryos of sweet oranges by head space SPME. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 66 (1): 31~34
- Ahuja A, Bakshi SK, Sharma SK, Thappa RK, Agarwal SG, Kichlu SK, Paul R, Kaul MK (2005). Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour Frag J*, 20 (4): 403~406
- Brown JT, Charlwood BV (1986). The accumulation of essential oils by tissue cultures of *Pelargonium fragrans* (Willd.). *FEBS Lett*, 204 (1): 117~120
- Chang JH, Shin JH, Chung IS, Lee HJ (1998). Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnol Lett*, 20 (12): 1097~1099
- Charlwood BV, Brown JT (1988). The accumulation of mono- and sesquiterpenes in plant-cell cultures. *Biochem Soc Trans*, 16: 61~63
- Dörnenburg H, Knorr D (1996). Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Crit Rev Plant Sci*, 15 (2): 141~168
- del Río JA, Ortuño A, García Puig D, Iborra JL, Sabater F (1991). Accumulation of the sesquiterpenes nootkatone and valencene by callus cultures of *Citrus paradisi*, *Citrus limonia* and *Citrus aurantium*. *Plant Cell Rep*, 10 (8): 410~413
- Figueiredo AC, Salomé M, Pais S, Scheffer JJC (1995). Composition of the essential oil from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 40 (2): 113~118
- Giamakis A, Kretsi O, Chinou I, Spyropoulos CG (2001). *Eucalypt-*

- tus camaldulensis*: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and β -pinene by *in vitro* cultures. *Phytochemistry*, 58 (2): 351~355
- Gränicher F, Christen P, Kapetanidis I (1995). Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia*. *Phytochemistry*, 40 (5): 1421~1424
- Hilton MG, Jay A, Rhodes MJ, Wilson PD (1995). Growth and monoterpene production by transformed shoot cultures of *Mentha citrata* and *Mentha piperita* in flasks and fermenters. *Appl Microbiol Biot*, 43 (3): 452~459
- Joshi A, Nanawati GC, Rajamani G, Sharma V (2000). Cell suspension culture of *Jasminum grandiflorum*: synthesis and accumulation of essential oils. *Indian perfumer*, 44 (3): 119~122
- Kintzios S, Makri O, Panagiotopoulos E, Scapeti M (2003). *In vitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biotechnol Lett*, 25 (5): 405~408
- Lockwood GB, Asghari G, Hakimi B (2002). Production of essential oil constituents by cultured cells of *Carum copticum* L. *Flavour Frag J*, 17 (6): 456~458
- Lockwood GB, Bunrathep S, Songsak T, Ruangrunsi N (2007). Production of d-limonene in chitosan elicited *Citrus japonica* suspension cultures. *J Essent Oil Res*, 19 (2): 113~116
- López MG, Sánchez-Mendoza IR, Ochoa-Alejo N (1999). Comparative study of volatile components and fatty acids of plants and *in vitro* cultures of Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill) Nym ex hill). *J Agr Food Chem*, 47 (8): 3292~3296
- Lourenço PM, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Oliveira MM, Deans SG, Scheffer JJ (1999). Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. *Phytochemistry*, 51 (5): 637~642
- Magiatis P, Michaelakis A, Skaltsounis AL, Haroutounian SA (2001). Volatile secondary metabolite pattern of callus cultures of *Chamomilla recutita*. *Nat Prod Lett*, 15 (2): 125~130
- Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M, Ghannadi A (2000). Volatile constituents of callus and flower-bearing tops of *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae). *Flavour Frag J*, 15 (6): 373~376
- Nikolakaki A, Christodoulakis NS (2007). Secretory structures and cytochemical investigation of the leaf of *Phlomis fruticosa*, a seasonally dimorphic subshrub. Secreting activity of the leaf-originating calluses. *Flora*, 202 (6): 429~436
- Ono K, Sakamoto T, Tanaka H, Asakawa Y (1996). Sesquiterpenoids from a cell suspension culture of the liverwort *Porella vernicosa* Lindb. *Flavour Frag J*, 11 (1): 53~56
- Pasqua G, Monacelli B, Silvestrini A, Manganaro R (2001). *In vitro* root differentiation and essential-oil accumulation in *Angelica archangelica*. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 37 (6): 763~766
- Phatak SV, Heble MR (2002). Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. *Fitoterapia*, 73 (1): 32~39
- Prabha TN, Agrawal R, Ramasharma PR, Patwardhan MV (1991). Intermediary metabolism and thymol formation in *in vitro* cultures of *Carum copticum*. *Plant Physiol Bioch*, 14 (3): 256~264
- Roberts SC (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol*, 3 (7): 387~395
- Salem KMSA, Charlwood BV (1995). Accumulation of essential oils by *Agrobacterium tumefaciens*-transformed shoot cultures of *Pimpinella anisum*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 40 (3): 209~215
- Santos PAG, Figueiredo AC, Oliveira MM, Barroso JG, Pedro LG, Deans SG, Scheffer JJC (2005). Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). *Plant Sci*, 168 (4): 1089~1096
- Santos PM, Figueiredo AC, Oliveira MM, Barroso JG, Pedro LG, Deans SG, Younus AKM, Scheffer JJC (1998). Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*. *Phytochemistry*, 48 (3): 455~460
- Spencer A, Hamill JD, Rhodes MJC (1990). Production of terpenes by differentiated shoot cultures of *Mentha citrata* transformed with *Agrobacterium tumefaciens* T37. *Plant Cell Rep*, 8 (10): 601~604
- Spencer A, Hamill JD, Rhodes MJC (1993). *In vitro* biosynthesis of monoterpenes by *Agrobacterium* transformed shoot cultures of two *Mentha* species. *Phytochemistry*, 32 (4): 911~919
- Sudriá C, Piñol MT, Palazón J, Cusidó RM, Vila R, Morales C, Bonfill M, Cañigual S (1999). Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 58 (3): 177~184
- Tepe B, Sokmen A (2007). Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. *Nat Prod Res*, 21 (13): 1133~1144