

锁阳愈伤组织诱导和增殖及不定根分化

岳鑫, 段园园, 陈贵林*

内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古自治区中蒙药材规范化生产工程技术研究中心, 呼和浩特010021

摘要: 以药用寄生植物锁阳的不同部位肉质茎为外植体, 研究外植体形态及植物生长调节剂对比对愈伤组织形成、增殖及不定根分化的影响, 建立了高效的锁阳肉质茎愈伤组织诱导、增殖和不定根分化体系。结果表明, 锁阳茎下部大小为1.5 cm×1.5 cm×1.5 cm的外植体, 维管束平行于培养基放置, 有利于愈伤组织形成; 外植体培养50 d, 愈伤组织形成。高效的愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 3.0 mg·L⁻¹, 愈伤组织诱导率可达67%; 增殖培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹, 增殖系数为74%; 在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 2.0 mg·L⁻¹分化培养基中, 不定根诱导率达56%。

关键词: 药用寄生植物; 肉质茎; 不定根; 愈伤组织

In vitro Callus Induction, Proliferation and Adventitious Root Organogenesis of *Cynomorium songaricum*

YUE Xin, DUAN Yuan-Yuan, CHEN Gui-Lin*

The Good Agriculture Practice Engineering Technology Research Center of Chinese and Mongolian Medicine in Inner Mongolia, College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract: Effects of different explants and plant growth regulators on callus formation, proliferation and differentiation were studied to establish high-performance tissue culture method of succulent stems of medicinal-parasitic plant *Cynomorium songaricum*. The results indicated that the lower part of the succulent stems were of highest callus formation rate with the size 1.5 cm×1.5 cm×1.5 cm and vascular bundle parallel placing. The optimal callus induction medium was MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D, the inductivity of which would be 67%. It was MS medium containing 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA and 1.5 mg·L⁻¹ 2,4-D that promoted the proliferation of callus with the proliferation coefficient 74%. It was MS medium including 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA that benefited the differentiation of callus to adventitious root with the differentiation ratio 56%.

Key words: medicinal-parasitic plant; succulent stems; adventitious root; callus

锁阳(*Cynomorium songaricum* Rupr.)是多年生药用寄生植物, 寄生于蒺藜科(Zygophyllaceae)白刺属(*Nitraria* L.)植物的根部及该科的骆驼蓬(*Peganum hamala* L.)根部(Nickrent等2005)。锁阳是常用的中蒙药材, 具有调节哺乳动物生殖细胞活力、促进性腺激素分泌及睾丸发育的作用; 同时还具有抗氧化(Jin等2012)及抑制HIV蛋白活性的作用(Nakamura 2004)。目前, 锁阳药材几乎全部来源于野生资源, 过度采挖导致资源蕴藏量剧减, 野生居群已不多见。因此, 通过人工种植锁阳药材既可解决当前燃眉之急, 又能使野生资源得到可持续利用。在自然条件下, 锁阳对寄主依赖性极强, 种子萌发率低, 人工栽培难度大。本课题组在已经公开专利“锁阳肉质茎愈伤组织诱导方法”的基础上(陈贵林等2009), 深入研究了锁阳肉质茎不同部位、

大小及放置方式对愈伤组织形成的影响; 选用广泛的植物生长调节剂配比筛选更高效的愈伤组织诱导培养基; 进而对愈伤组织继代培养及不定根分化进行了研究, 拟推进锁阳寄生生物学研究及微繁方法的建立, 促进锁阳产业的发展。

材料与方法

1 材料及保存

锁阳(*Cynomorium songaricum* Rupr.)肉质茎取自内蒙古鄂尔多斯市杭锦旗独贵塔拉镇(东经

收稿 2013-09-05 修定 2013-10-21

资助 国家科技支撑计划课题(2011BAI07B07)、高等学校博士点基金(20091501110002)、国家自然科学基金(30660015)和内蒙古大学“211工程”创新人才培养计划。

* 通讯作者(E-mail: guilinch@aliyun.com; Tel: 0471-4992577)。

108°42'; 北纬40°36')。锁阳肉质茎经表面灭菌后, 置于4 °C冰箱冷藏待用。

2 方法

2.1 锁阳外植体筛选与愈伤组织诱导培养

2.1.1 愈伤组织诱导培养基 MS培养基添加蔗糖30 g·L⁻¹, 酪蛋白(AHC) 0.5 g·L⁻¹, 琼脂6.8 g·L⁻¹, 并分别添加不同浓度的6-苄基腺嘌呤(6-BA)和2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D), 或者不同浓度的6-BA和萘乙酸(NAA)(表2)。调节pH值至6.0, 灭菌, 冷却, 待用。

2.1.2 外植体前处理及培养条件 将锁阳肉质茎用自来水冲洗30 min。参照段园园等(2012)的方法, 将锁阳肉质茎依上至下分为茎上部、茎中部和茎下部(图1-A)。在超净工作台上进行灭菌与接种: 70%乙醇浸泡外植体0.5 min, 无菌水冲洗3次; 0.1%氯化汞浸泡9 min, 无菌水冲洗5次, 用灭菌滤纸吸干表面水分, 切成0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm、1.0 cm×1.0 cm×1.0 cm及1.5 cm×1.5 cm×1.5 cm的块茎, 以块茎维管束平行或垂直于培养基接种。每瓶接种2~3块, 每种外植体接种10瓶。将接种了外植体的三角瓶随机置于培养箱中, 25 °C暗培养50 d后,

统计愈伤组织形成率。

2.1.3 分泌物观察 黑暗培养20 d后, 观察外植体上是否有白色分泌物的出现。分泌物形成率(%)=有分泌物的外植体数/接种外植体总数×100。

2.2 锁阳愈伤组织增殖与不定根培养基筛选

2.2.1 愈伤组织增殖培养基 对6-BA和2,4-D诱导的愈伤组织进行增殖培养。增殖培养基以MS为基本培养基, 添加蔗糖30 g·L⁻¹、AHC 0.5 g·L⁻¹、琼脂7 g·L⁻¹以及不同浓度2,4-D与6-BA组合(表3), 调节pH值至5.8~6.0, 灭菌。将2.1节中得到的愈伤组织切成0.3 cm×0.3 cm×0.3 cm的小块, 或将愈伤组织和外植体共同接入增殖培养基中暗培养, 20 d后测定愈伤组织生长量。

2.2.2 不定根分化培养基 对6-BA和NAA诱导的愈伤组织进行不定根分化培养。分化培养基以MS培养基添加蔗糖30 g·L⁻¹、AHC 0.5 g·L⁻¹、琼脂7 g·L⁻¹和6-BA 1.0 mg·L⁻¹为固定因素, 分别添加0、1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹ NAA; 调节pH值至5.8~6.0; 灭菌。将愈伤组织及外植体共同接入分化培养基中暗培养。以上每瓶接种2块, 每个处理3瓶, 设3次重复。每7 d

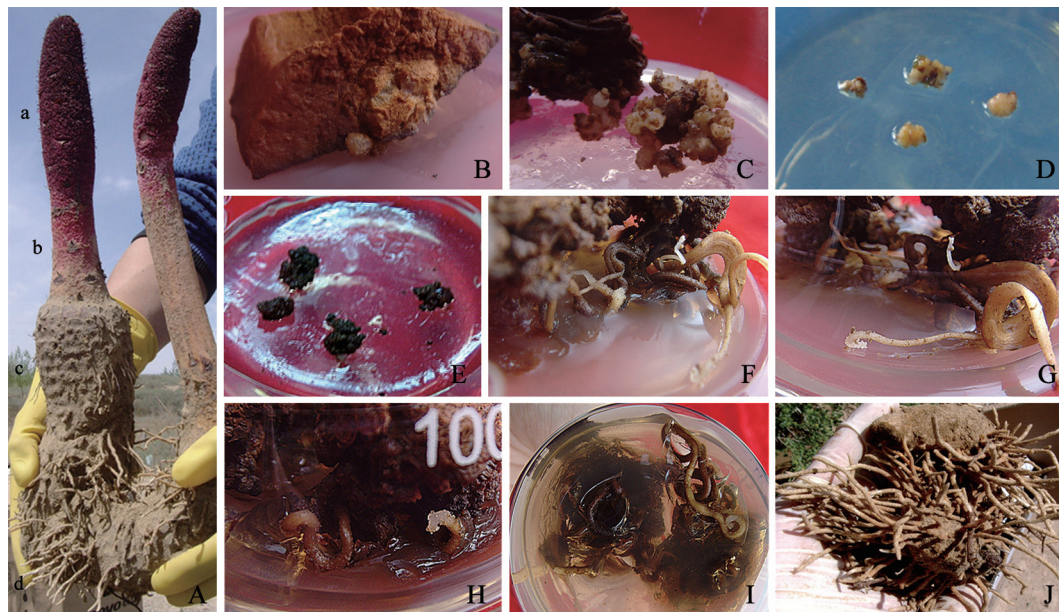


图1 锁阳肉质茎愈伤组织形成、增殖及不定根分化

Fig.1 Callus formation, proliferation and adventitious root differentiation from *C. songaricum* succulent stems

A: 完整的锁阳肉质茎, a为茎上部, b为茎中部, c为茎下部, d为不定根; B: 茎下部外植体形成的愈伤组织; C: 茎上部外植体形成的愈伤组织; D: 继代愈伤组织; E: 继代培养20 d的愈伤组织; F: 愈伤组织分化为不定根; G: 与培养基接触的不定根尖形成愈伤组织; H: 未与培养基接触的不定根尖形成愈伤组织; I: 生长在培养基中不定根的形态; J: 全身布满不定根的未出土锁阳(球形, 直径约3 cm)。

观察1次, 50 d时统计各处理的不定根分化率、不定根的数量及不定根根尖形成愈伤组织的数量。

愈伤组织增殖系数($\%$)= $(W_2-W_1)/W_1 \times 100$, 其中 W_2 =培养后愈伤组织质量, W_1 =接种时愈伤组织质量; 愈伤组织不定根分化率($\%$)=形成不定根的愈伤组织数/接种愈伤组织总数 $\times 100$ 。

实验结果

1 锁阳愈伤组织形成

1.1 外植体形态对褐变程度的影响

不同部位、大小和放置方向的锁阳肉质茎外植体, 接种到愈伤诱导培养基中。培养5 d后, 部分外植体上有白色的分泌物产生, 在培养20 d后进行统计(表1)。结果显示, 分泌物的产生与外植体大小相关, 0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm的3个部位的外植体, 产生分泌物的比例达26%, 而1.5 cm \times 1.5 cm \times 1.5 cm的3个部位的外植体, 产生分泌物的比例为18%; 其次, 不同部位外植体产生分泌物的比例差异明显, 3种大小的茎上部和茎中部外植体产生分泌物的比例分别为26%和25%, 而下部产生分泌物的比例为16%; 再次, 放置方式对分泌物的产生也有影响, 维管束平行放置的所有外植体, 产生白色分泌物的比例为20%, 而维管束垂直放置的外植体, 产生白色分泌物的比例为25%。产生分泌物的外植体褐化程度大, 未形成愈伤组织。

1.2 锁阳愈伤组织最适培养条件的筛选

外植体接种到培养基2 d后出现褐变, 且褐变

表1 锁阳肉质茎外植体形态与褐变程度的关系

Table 1 The relationships between appearance and browning of explants from *C. songaricum* succulent stems

部位	外植体大小/cm	放置方向	分泌物/ $\%$	褐化程度
上部	0.5 \times 0.5 \times 0.5	平行	29	***
中部	0.5 \times 0.5 \times 0.5	垂直	33	****
下部	0.5 \times 0.5 \times 0.5	平行	17	***
上部	1.0 \times 1.0 \times 1.0	垂直	26	***
中部	1.0 \times 1.0 \times 1.0	平行	23	***
下部	1.0 \times 1.0 \times 1.0	垂直	20	**
上部	1.5 \times 1.5 \times 1.5	平行	20	**
中部	1.5 \times 1.5 \times 1.5	垂直	22	**
下部	1.5 \times 1.5 \times 1.5	平行	12	**

“*”代表褐化的程度, “*”越多褐化程度越大。放置方向: 外植体的维管束与培养基的相对位置。n=3。

程度随培养时间的延长不断加深。不同部位的外植体, 褐变程度有显著差异。茎上部外植体褐变后的颜色为紫红色, 中部外植体为淡红色, 而下部外植体为褐色。培养50 d, 愈伤组织开始形成, 对于不同的外植体, 愈伤形组织成的部位不同。茎下部外植体的维管组织处增厚膨大(图1-B), 膨大组织出现裂缝, 愈伤组织从裂缝处产生, 颜色为白色; 茎上部和中部的外植体, 整体膨大, 维管组织处形成愈伤组织, 颜色为白色(图1-C)。因此, 下部愈伤组织产生于外植体内部, 由内而外生长; 茎上部和中部的愈伤组织形成于接触培养基的维管组织处。培养70 d左右, 愈伤组织生长量达到最大值。

生长素和细胞分裂素对锁阳愈伤组织形成的协同作用效果见表2。单独添加NAA或2,4-D的培

表2 植物生长调节剂比对锁阳肉质茎愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on callus formation of *C. songaricum* succulent stems

编号	NAA/mg \cdot L $^{-1}$	6-BA/mg \cdot L $^{-1}$	愈伤诱导率/ $\%$	编号	2,4-D/mg \cdot L $^{-1}$	6-BA/mg \cdot L $^{-1}$	愈伤诱导率/ $\%$
1	0.5	0	0	11	0.5	0	0
2	1.0	0	0	12	1.0	0	0
3	2.0	0	0	13	2.0	0	0
4	3.0	0	0	14	3.0	0	0
5	0.5	0.5	1.7 \pm 1.1 ^d	15	0.5	0.5	33 \pm 8.5 ^{bc}
6	1.0	1.0	16 \pm 9.1 ^{cd}	16	1.0	1.0	41 \pm 13 ^b
7	2.0	1.0	32 \pm 12.9 ^{bc}	17	2.0	1.0	46 \pm 8.1 ^b
8	3.0	1.0	16 \pm 8.1 ^{cd}	18	3.0	1.0	67 \pm 10 ^a
9	2.0	0.5	1.3 \pm 0.1 ^d	19	2.0	0.5	34 \pm 12 ^{bc}
10	3.0	0.5	1.0 \pm 0 ^d	20	3.0	0.5	16 \pm 8.1 ^{cd}

数字旁不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

培养基上,无愈伤组织形成。NAA和6-BA组合对锁阳愈伤组织形成的促进作用普遍低于2,4-D和6-BA组合。添加NAA和6-BA组合的培养基上,愈伤组织形成率最高可达32%。当NAA与6-BA的比例为1:1~3:1时,愈伤诱导效果良好。添加 $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA的培养基上,愈伤组织形成率可达NAA和6-BA最佳诱导率的2倍。当2,4-D与6-BA的比例为1:1~6:1时,愈伤组织诱导效果良好。因此,锁阳愈伤组织最佳诱导培养基为MS+ $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, NAA和6-BA的组合中最好的是MS+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA。

2 锁阳愈伤组织的继代增殖

锁阳愈伤组织在添加不同质量浓度的6-BA和2,4-D的培养基中进行继代增殖培养(表3)。结果发现,外植体和愈伤组织一起继代的增殖培养中,添加 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, $0.25\sim 0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA,愈伤组织增殖快,生长良好,但增殖系数较小,各个处理间无明显差异;添加 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA时,愈伤组织无增长。接种愈伤组织的继代培养中,2,4-D和6-BA的比例为3:1时,愈伤组织质地紧密,呈淡黄色,增殖系数为74%;当2,4-D和

6-BA的比例为2:1时,愈伤组织为淡褐色、增殖系数较小。当2,4-D和6-BA的比列为6:1时,愈伤组织呈褐色,增殖慢(图1-E)。总之,当2,4-D和6-BA比值为3:1时,有利于锁阳愈伤组织的增殖;比值增大不利于愈伤组织增殖。在随后的培养中,继代愈伤组织未出现分化。因此,锁阳最适愈伤增殖培养基为MS+ $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA。

3 锁阳愈伤组织的分化

锁阳愈伤组织在添加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和不同浓度NAA的培养基中进行不定根分化培养。结果发现,在分化培养基中培养20 d后,愈伤组织表面出现白色突起;25 d不定根出现,且生长很快,形态粗壮、纤细或宽扁(图1-F);40 d不定根顶端出现愈伤组织(图1-G、H),后续未观察到愈伤组织继续分化为不定根。分化培养基中NAA浓度对锁阳愈伤组织不定根分化、不定根数量和不定根尖形成愈伤组织的影响见表4。结果显示,在NAA浓度低时,锁阳愈伤组织不定根分化率和不定根数量随着NAA浓度的增加而增加。当NAA为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定根分化率下降。因此,锁阳愈伤组织不定根分化最佳培养基为MS+6-BA $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

讨 论

1 锁阳肉质茎愈伤组织诱导的外植体选择

在本实验中,分泌物广泛出现在各部位外植体上,且出现分泌物的外植体褐变严重、最终不能形成愈伤组织。作者对分泌物进行了细菌平板划线培养,但是未得到菌落;同时对其成分进行了初步测定,结果显示含有多糖(硫酸-苯酚比色法)、氨基酸(茚三酮显色法)以及黄酮类化合物(硝酸铝显色法)(本文未显示上述实验结果)。这些成

表3 植物生长调节剂对锁阳愈伤组织增殖的影响

Table 3 Effects of plant growth regulators on proliferation of *C. songaricum* callus

植物生长调节剂/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	外植体+愈伤组织		愈伤组织	
	增殖系数/%	生长状况	增殖系数/%	生长状况
6-BA 0.75+2,4-D 1.5	26	++	53	++
6-BA 0.50+2,4-D 1.5	30	++	74	+++
6-BA 0.25+2,4-D 1.5	26	++	39	+
6-BA 0.50+2,4-D 1.0	0	+	57	++

“+”越多,说明愈伤组织生长越好。 $n=3$ 。

表4 NAA对锁阳愈伤组织分化为不定根的影响

Table 4 Effect of NAA on differentiation of *C. songaricum* callus to adventitious root

NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	不定根分化率/%	不定根数/条	根尖形成愈伤组织的不定根/条
0	0	0	0
1.0	22 ± 10^b	1.2 ± 0.7^b	0
2.0	56 ± 10^a	5.6 ± 2.0^a	2.3 ± 0.7^a
3.0	33 ± 17^b	2.0 ± 0.7^b	0.5 ± 0.4^b

同列数字旁不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。 $n=3$ 。

分均为锁阳中所含有的成分,说明分泌物是由外植体产生的。这种现象类似于伤流,而分泌物即为伤流液(时向东等2006)。产生伤流液的外植体,由于营养成分流失,外植体迅速死亡,所以褐变程度快,且最终不能形成愈伤组织。同时在锁阳破土后,全植株的营养物质优先供给茎上部,因此,组织培养过程中,茎上部和中部外植体的分泌物较多。

锁阳的维管组织与寄主根部的维管组织连通,从下至上运送营养物质。维管束在肉质茎中呈波浪式环状排列,随着茎的增粗,“波浪”上下幅度逐渐增大,维管束数目由4个逐渐增加到10~12个。而且上、下维管束周围的细胞类型也不相同(李志军等2002)。因此将锁阳肉质茎从上至下分为茎上部、中部和下部3种外植体用于愈伤组织培养。本研究发现,体积较大的锁阳外植体更适合组织培养,这一结论与肉苁蓉的外植体大小研究结果是一致的(朱咏华等2001)。但是由于锁阳与肉苁蓉的肉质茎在解剖结构上有本质的区别:即肉苁蓉肉质茎为草本双子叶植物茎结构,由表皮、皮层、维管组织、髓组成;而锁阳肉质茎结构类似于单子叶植物茎的结构,由表皮、基本组织、散布于基本组织中的维管束组成(宋玉霞等2002)。因此,肉苁蓉的外植体分为维管组织和髓组织(徐亮胜2005);而锁阳不能特化出“髓组织”,只能根据维管束的分布及外植体最适大小的要求,将切口选在维管束周围。在3种外植体中,愈伤组织均形成于维管组织处,其形成率的高低取决于维管组织分布情况。这一结果与报道的肉苁蓉维管组织为诱导愈伤组织的最佳外植体一致(Ouyang等2005)。

2 锁阳愈伤组织的继代增殖

在培养初期,植物生长调节剂是诱导外植体脱分化、愈伤组织生长的必要条件,尤其对于寄生植物而言,植物生长调节剂的作用还包括解除寄生植物对寄主的依赖性。在寄生植物组织培养中,使用较多的植物生长调节剂包括2,4-D、NAA、KT和6-BA (Deeks等1999)。增殖培养中需要降低植物生长调节剂的用量,愈伤组织生长更好(刘德华和朱咏华2003)。本研究发现,锁阳增殖培养中添加2,4-D和6-BA的比例与诱导培养基中的比例

相同,只是用量减少。将外植体与愈伤组织一起移入增殖培养基,愈伤组织生长良好,增殖量大。而增殖系数较小的原因可能是外植体失水造成质量减轻,从而使继代培养后总质量增加较小。直接继代的愈伤组织,在培养后期褐化严重,生长缓慢。有报道将槲寄生愈伤组织置于山毛榉愈伤组织上共培养,发现2种愈伤组织一起生长良好而无任何接触抑制作用(Deeks等1999)。因此推断外植体的母体或者寄主的愈伤组织可能起到提供营养或过滤矿质元素的作用,从而与外植体共同继代的愈伤组织生长良好,这很可能是其寄生生长的特性决定的。

3 锁阳愈伤组织的分化

本研究发现,当NAA与6-BA比例为2:1时,不仅有利于愈伤组织诱导,还有利于愈伤组织分化为不定根,而且不定根很快产生愈伤组织,这说明根尖部分的细胞分化能力很强。野生锁阳下部生有不定根,根尖在接触到寄主根时粘于其上,膨大并将其具有分生能力的细胞植入寄主根中,这些细胞在寄主根内沿皮层向四周扩展,呈带状分布,并产生新的芽体(李天然等1994)。目前,寄生植物愈伤组织诱导出不定根的有分布于桑寄生科、檀香科、玄参科和列当科的共8种植物(Deeks等1999)。本方法丰富了寄生植物组织培养研究,并为锁阳寄生生物学研究探索了新的方法。

参考文献

- 陈贵林,岳鑫,任良玉,马丽杰,邢菊展(2009). 一种诱导锁阳肉质茎愈伤组织的方法及其专用培养基. 专利申请号 200810240383.4
- 段园园,岳鑫,陈贵林(2012). 脱落酸对锁阳茎切口愈合及抗氧化酶活性的影响. 植物生理学报, 48 (3): 298~302
- 李天然,苏格尔,刘基焕,许月英,阎国(1994). 寄生药用有花植物锁阳在寄主体内的繁殖. 内蒙古大学学报(自然科学版), 25 (6): 673~679
- 李志军,段黄金,吕春霞,于军(2002). 寄生植物锁阳茎的发育解剖学研究. 西北植物学报, 22 (3): 526~529
- 刘德华,朱咏华(2003). 肉苁蓉组织培养的研究. 湖南农业大学学报(自然科学版), 29 (1): 35~37
- 时向东,刘艳芳,文志强,王卫武(2006). 植物根系伤流研究进展. 安徽农业科学, 34 (10): 2043~2045
- 宋玉霞,郭生虎,马洪爱(2002). 两种药用沙生寄生植物的比较研

- 究. 中草药, 33 (5): 463~466
- 徐亮胜(2005). 肉苁蓉组织培养及毛状根诱导的初步研究[硕士论文]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学
- 朱咏华, 陈彩艳, 唐前瑞, 罗泽民(2001). 肉苁蓉不同外植体愈伤组织诱导比较. 中药材, 24 (4): 241~243
- Deeks SJ, Shamoun SF, Punja ZK (1999). Tissue culture of parasitic flowering plants: methods and applications in agriculture and forestry. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 35: 369~381
- Jin SW, Eerdun B, Doi A, Kuroda T, Zhang GX, Hatano T, Chen GL (2012). Polyphenolic constituents of *Cynomorium songaricum* Rupr. and antibacterial effect of polymeric proanthocyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Agric Food Chem*, 60: 7297~7305
- Nakamura N (2004). Inhibitory effects of some traditional medicines on proliferation of HIV-1 and its protease. *Yakugaku Zasshi*, 124 (8): 519~529
- Nickrent DL, Der JP, Anderson FE (2005). Discovery of the photosynthetic relatives of the "Maltese mushroom" *Cynomorium*. *BMC Evol Biol*, 5 (38): 77~99
- Ouyang J, Wang XD, Zhao B, Wang YC (2005). Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola*. *Process Biochem*, 40: 3480~3484