

蔗糖和光对三裂叶野葛毛状根生长及次生物质产生的影响

Effects of Sucrose and Light on the Growth and Production of Secondary Metabolites in *Pueraria phaseoloides* Hairy Roots

何含杰¹, 梁 朋^{1,2}, 施和平^{1*}

HE Han-Jie¹, LIANG Peng^{1,2} and SHI He-Ping^{1*}

1 华南师范大学生命科学学院广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631

2 广东医学院生物学教研室, 湛江 524023

1 Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2 Department of General Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

摘 要 研究了蔗糖浓度和光对固体培养的三裂叶野葛毛状根生长及其总异黄酮和葛根素产生的影响。结果表明:在供试的分别添加 1%、3%、5%、7% 和 9% 蔗糖的 MS 固体培养基中, 3% 蔗糖能促进三裂叶野葛毛状根的生长及其异黄酮类化合物和葛根素的积累。培养 20d 后, 其生物量达到 0.48g DW (干重)/瓶, 总异黄酮和葛根素含量分别为 25.44mg/g DW 和 11.64mg/g DW。与添加 3% 蔗糖的 MS 培养基培养的三裂叶野葛毛状根相比, 含 5% 蔗糖的培养基培养的毛状根干重增殖倍数提高了 7.0%, 而含 1%、7% 和 9% 蔗糖的培养基培养的毛状根干重增殖倍数分别下降 62.4%、42.8% 和 65.3%; 其总异黄酮含量分别降低 57.4%、13% 和 33.4%, 葛根素含量分别下降 47.9%、15.8% 和 35.1%, 但其毛状根培养物的可溶性糖含量则分别增加了 0.52、1.45 和 1.54 倍。暗培养 30d 的毛状根的生物量达到 0.83g DW/瓶, 分别比蓝光和白光培养的毛状根提高 37.1% 和 23.3%。在蓝光和白光下培养的部分毛状根的表面呈淡绿色, 但白光处理的毛状根中总异黄酮含量比蓝光和暗培养处理的分别提高了 14.7% 和 19.2%, 蓝光抑制毛状根中葛根素含量的积累, 白光和暗培养的毛状根培养物中的葛根素含量分别是蓝光处理的 1.61 倍和 1.52 倍。

关键词 三裂叶野葛, 毛状根, 总异黄酮, 葛根素, 蔗糖, 光

中图分类号 Q945 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-1003-06

Abstract Effects of sucrose concentrations and light on the growth and production of total isoflavones and puerarin in *Pueraria phaseoloides* hairy roots cultured onto solid MS media supplemented with 1%, 3%, 5%, 7% and 9% sucrose, respectively, were investigated. The results showed that among the sucrose concentrations tested, 3% sucrose in the medium enhanced the growth and stimulated accumulation of total isoflavones and puerarin in *P. phaseoloides* hairy roots. After cultured for 20 days, the biomass of hairy roots reached 0.48g (DW dry weight)/flask and its contents of total isoflavones and puerarin were 25.44mg/g DW and 11.64mg/g DW, respectively. In comparison with 3% sucrose, the dry weight proliferation of hairy roots cultured with 5% sucrose was increased by 7.0%, while cultured with 1%, 7% and 9% sucrose, the dry weight proliferation of hairy roots was decreased by 62.4%, 42.8% and 65.3%, their total isoflavones content was decreased by 57.4%, 13% and 33.4% and their puerarin content was decreased by 47.9%, 15.8% and 35.1%; but their content of total soluble sugars was increased 0.52, 1.45 and 1.54 times, respectively. Compared with hairy roots in blue light and white light,

the biomass of hairy roots cultured in the dark for 30 days was 0.83g (DW)/flask and was increased by 37.1% and 23.3%, respectively. The content of total isoflavones in hairy roots cultured in white light was as much as 1.15 times and 1.19 times that in blue light and in the dark, respectively. It was also observed that hairy roots cultured in blue light and white light partly became light green and that blue light could inhibit accumulation of puerarin in hairy roots and the puerarin content in hairy root cultured in white light and in the dark were 1.61 times and 1.52 times that in blue light, respectively.

Key words *Pueraria phaseoloides*, hairy roots, total isoflavones, puerarin, sucrose, light

三裂叶野葛 (*Pueraria phaseoloides*) 是药、食两用的多年生豆科藤本植物,其根部含有葛根素 (puerarin) 和大豆甾 (daidzin) 等异黄酮类化合物,具有改善心脑血管循环、降低心肌耗氧量、抑制血小板凝集、抗肿瘤、抗氧化、降低血脂、增强免疫力及具有类似雌性激素的功能作用等^[1-3]。但目前制药业均采用挖掘的野生葛根或经多年栽培的葛根来提取葛根素等异黄酮类化合物,至今为止未见利用野葛毛状根的大规模培养来生产葛根素的报道。我们曾利用含野生型 Ri (root inducing) 质粒的发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) ATCC15834 对三裂叶野葛的遗传转化,获得了能在无激素 MS 培养基上自主生长又能产生葛根素的毛状根^[4]。但如何建立三裂叶野葛毛状根离体培养的最佳条件,是利用毛状根技术进行葛根素等药用成分规模化生产的前提和基础。已有的研究表明,毛状根在不同培养基及不同培养条件下如光照、温度、碳源和氮源等,其生长速率及其药用次生代谢物含量均有差异^[5-7]。蔗糖是毛状根离体培养过程中最常用的碳源和能源,其浓度大小可与细胞或器官的生长形态及次生代谢物的累积密切相关^[8-9]。而光作为影响植物生长发育的重要因子,其光质和光强度不仅可影响毛状根的生长及其次生代谢物的积累和分布,还可调节植物次生代谢合成过程中一些关键酶的基因表达^[10-12]。毛状根离体培养的方式主要包括固体培养和液体培养,而有关蔗糖浓度对液体培养三裂叶毛状根的生长及其次生代谢的影响,我们已进行了探讨^[6]。本文报道蔗糖浓度和光对固体培养的三裂叶野葛毛状根生长和次生代谢物异黄酮类化合物及葛根素产生的影响,以期为今后利用野葛毛状根来生产葛根素等次生物质奠定基础 and 提供可能性。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本实验选用由发根农杆菌 ATCC15834 遗传转化三裂叶野葛 (*P. phaseoloides*) 叶片外植体产生的能在无外源激素的 MS 培养基上自主生长且已继代培养保存了近两年的毛状根,其诱导和继代保存方法见文献[4]。

1.2 培养基

为探讨蔗糖浓度对三裂叶野葛毛状根生长和次生代谢产物产生的影响,本文图 1 至图 4 所用的编号为 A、B、C、D 和 E 的培养基,为蔗糖浓度分别为 1%、3%、5%、7% 和 9% 的 MS 固体培养基。而探讨不同光源对毛状根生长和次生代谢影响时,则采用含 3% 蔗糖的 MS 固体培养基。所有培养基的

琼脂浓度均为 1%,pH 为 5.8~6.0。接种前,每 150mL 锥形瓶中分装 40mL 培养基。

1.3 方法

1.3.1 毛状根固体培养及其生长测定 :选择来自同一克隆系生长旺盛的三裂叶野葛毛状根,剪切成长约 2~3cm、具根尖的根段,接种到含不同蔗糖浓度的 MS 固体培养基上进行暗培养,每瓶毛状根的接种量约为 0.5g 鲜重,培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。在为期 25d 的培养过程中,从第 10d 开始每隔 5d 取样进行毛状根的生长测定。所取的毛状根经自来水冲洗去除琼脂培养基后,用吸水纸吸干毛状根表面的水分后,进行毛状根鲜重测量,然后将毛状根置于 60°C 烘干至恒重后测定其干重,并保存在 -20°C 冰箱中供进行总异黄酮和葛根素含量以及其可溶性糖含量测定用。

另将剪切好的毛状根根尖段 (约 0.5g 鲜重) 接种到 MS 固体培养基中并分别置于蓝光、日光灯、黑暗处理的培养架中, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下培养,其中蓝光是用日本クティエン株式会社生产的截止型滤膜过滤得到的光,其光强为 $10\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,最强波长为 456nm;白光光强为 $400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间为 12h/d。培养 30d 后收获毛状根,经鲜重和干重测量后,保存于 -20°C 冰箱中供进行总异黄酮和葛根素含量测定。

1.3.2 毛状根中可溶性糖含量的测定 :不同浓度蔗糖培养的三裂叶野葛毛状根中可溶性糖含量的测定,参照张志良等^[13] (2003) 的方法。

1.3.3 毛状根中葛根素及总异黄酮含量的测定 :三裂叶野葛毛状根中葛根素及总异黄酮含量的测定,基本参照仲英等^[14] 的方法,并略有改动。将烘干的三裂叶野葛毛状根研磨成粉末,准确称取 0.1g 毛状根干粉,置于试管中,加入 10mL 95% 乙醇超声波萃取 30min,滤纸进行过滤,滤渣按上述方法再抽提 1 次,合并滤液并定容到 25mL,即得到葛根素及异黄酮类化合物的 95% 乙醇提取液。毛状根样品中的葛根素含量采用高效液相色谱仪 (HPLC) 测定,其色谱条件为: Beckman System Gold[®] 高效液相色谱仪 (125 型 Solvent Module 泵和 168 型 System Gold Model 紫外检测器), 大连 Elite Hypersil BDS C18 色谱 ($\Phi 5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$), 柱温: 25°C , 柱压: $2.2 \sim 2.8\text{kPSI}$, 流动相: 甲醇:水 = 85:15 (V/V), 流速: $1.0\text{mL}/\text{min}$, 进样量为 $20\mu\text{L}$, 检测波长为 248nm。另取上述异黄酮类化合物的 95% 乙醇溶液 1mL 稀释 20 倍后,于 250nm 波长处测定 OD 值,并依葛根素标准曲线计算毛状根各样品中的总异黄酮含量。

2 结果

2.1 不同浓度蔗糖对三裂叶野葛毛状根生长及次生代谢的影响

2.1.1 不同浓度蔗糖对三裂叶野葛毛状根生长及形态的影响 图1所示为不同浓度蔗糖对固体培养三裂叶野葛毛状根生长的影响。从图1可见,培养基中的蔗糖对毛状根的生长都有促进作用,其中尤以3%和5%的蔗糖对生长的促进效果最明显。毛状根培养20d后,添加3%蔗糖的培养基培养的毛状根生物量达到0.48g DW(干重)/瓶,其干重增值倍数达4.4;与3%蔗糖培养的毛状根相比,5%蔗糖培养的毛状根的干重增值倍数较之提高了7.0%,而用1%、7%和9%蔗糖培养的毛状根的干重增值倍数则有不同程度下降,分别下降62.4%、42.8%和65.3%。当蔗糖浓度大于或小于5%时,毛状根的形态和颜色也随之发生了改变。蔗糖浓度1%时,毛状根生长缓慢,毛状根细小且侧根较少,颜色始终是淡黄色;而毛状根在添加3%或5%蔗糖的固体培养基上培养时,在0~15d内其生长迅速、侧根多,颜色为白色;培养17d后毛状根开始褐化,到30d时为深褐色。而当蔗糖浓度为9%时,毛状根生长很慢,侧根更少而短粗,脆而易断;培养20d后变成黑色,用水洗涤后有滑腻感,这可能与其细胞内某些内含物的外泄有关。

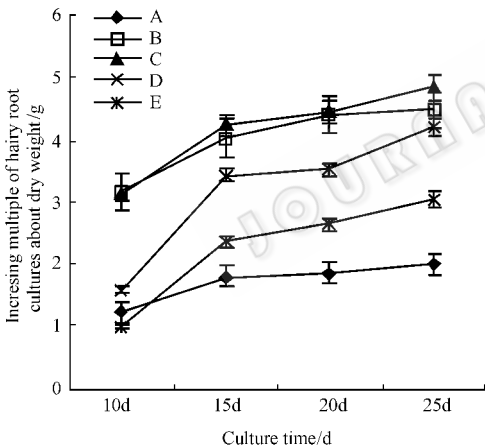


图1 蔗糖浓度对三裂叶野葛毛状根生长的影响

Fig. 1 Effects of sucrose concentrations on the growth of hairy roots of *P. phaseoloides*

2.1.2 蔗糖浓度对三裂叶野葛毛状根中可溶性糖含量的影响 图2所示为培养基中蔗糖浓度对三裂叶野葛毛状根培养物中可溶性糖含量的影响。从图2可见,在培养10~20d期间,不同浓度蔗糖(1%、3%、5%、7%和9%)培养的毛状根中的可溶性糖含量随着毛状根的生长而逐渐升高,培养至20d时达到最高。与3%蔗糖培养相比,1%、5%、7%和9%蔗糖培养的毛状根中的可溶性糖含量分别约为3%蔗糖培养的0.52、1.50、1.45和1.54倍;但培养25d后,不同浓度蔗糖培养的毛状根中可溶性糖含量都有不同程度的下降。在毛状根培养过程中,1%和3%蔗糖浓度培养的毛状根中可溶性糖的含量始终处于较低水平,这可能与毛状根的生长速率及培

养基中起始的蔗糖浓度有关。

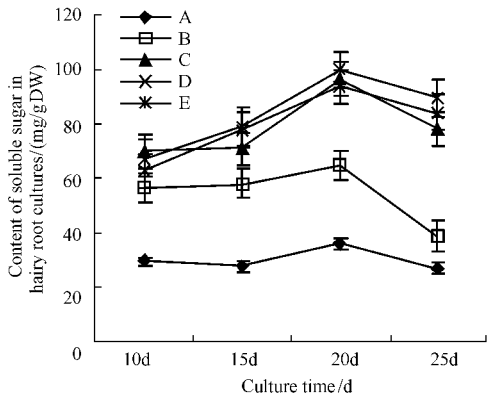


图2 蔗糖浓度对三裂叶野葛毛状根中可溶性糖含量的影响

Fig. 2 Effects of sucrose concentrations on the content of soluble sugar in hairy roots of *P. phaseoloides*

2.1.3 蔗糖浓度对毛状根异黄酮类化合物及葛根素含量的影响 图3与图4是不同蔗糖浓度对固体培养三裂叶野葛毛状根培养物中总异黄酮及葛根素积累的影响。由图3可知,培养10d后,毛状根培养物中的总异黄酮含量达到最高,其中尤以7%蔗糖培养的毛状根中含量最高,达到27.44mg/g(DW);而在10~25d培养期间,总异黄酮含量则逐渐下降,其中尤以1%蔗糖培养的毛状根的下降幅度最大。而从图4可见,毛状根的葛根素含量则在培养20d后达到最高,其中尤以3%蔗糖培养的毛状根中含量最高,约为11.64mg/g(DW),以9%蔗糖培养的毛状根中葛根素含量最低。当毛状根培养25d后,其葛根素含量均有所下降。虽然不同浓度蔗糖培养的毛状根的每克干物质中总异黄酮及葛根素的含量相近,但结合毛状根的干重来看,它们间的差别则很大。与3%蔗糖培养的毛状根相比,培养20d后,5%蔗糖培养的毛状根中总异黄酮含量与之接近,但1%、7%和9%蔗糖培养的毛状根的总异黄酮含量则分别下降了57.4%、13%和33.4%;而1%、5%、7%和9%蔗糖培养的毛状根中的葛根素含量则分别比3%蔗糖培养的毛状根下降约47.9%、2%、15.8%和35.1%。

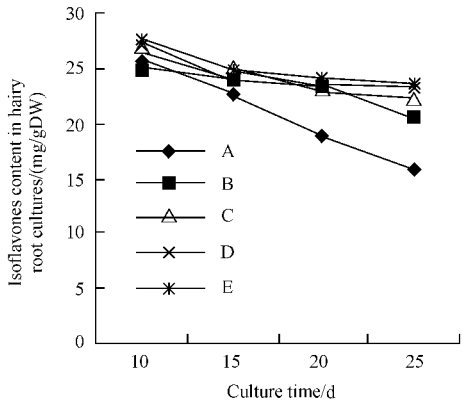


图3 蔗糖浓度对三裂叶野葛毛状根总异黄酮含量的影响

Fig. 3 Effects of sucrose concentrations on the content of total isoflavones in hairy root cultures of *P. phaseoloides*

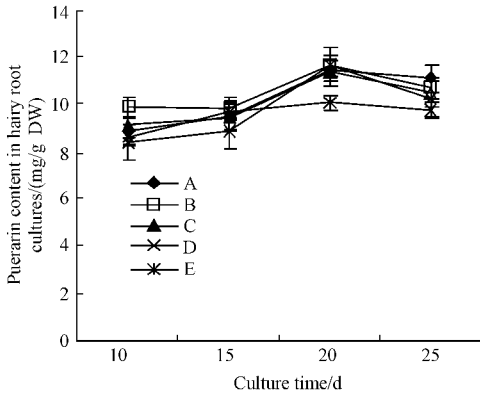


图4 蔗糖浓度对三裂叶野葛毛状根培养物中葛根素含量的影响

Fig. 4 Effects of sucrose concentrations on the content of puerarin in hairy root cultures of *P. phaseoloides*

2.2 不同光照处理对三裂叶野葛毛状根生长及次生代谢的影响

图5表示不同光照处理对三裂叶野葛毛状根生长及其次生代谢的影响。从图5可见,当毛状根在蓝光、白光及暗培养条件下分别培养30d后,以暗培养最有利于毛状根的生长,其生物量达到0.83g(DW)/瓶,分别比蓝光和白光下培养的毛状根提高了37.1%和23.3%;与白光和暗培养相比,蓝光则可明显抑制三裂叶野葛毛状根生物量的积累。与暗培养不同的是,培养在蓝光和白光下的毛状根,于培养基表面的毛状根均呈淡绿色,虽然其形态没有明显变化,但光照处理有助于毛状根培养物中总异黄酮的积累,其中白光作用较蓝光明显,其含量约为20.55mg/g(DW),分别比蓝光和暗培养提高了14.7%和19.2%。此外,白光和暗培养的毛状根中葛根素含量相当但均高于蓝光处理,它们的葛根素含量分别是蓝光处理的1.61倍和1.52倍。

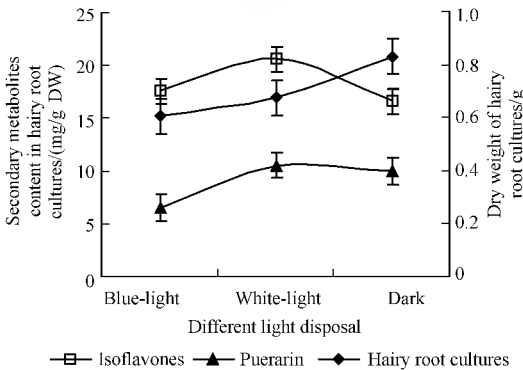


图5 不同光照对三裂叶野葛毛状根总异黄酮和葛根素含量及其生长的影响

Fig. 5 Effect of different light-irradiation on the content of total isoflavones and puerarin and the growth of *P. phaseoloides* hairy roots

3 讨论

建立和确定遗传转化毛状根的最佳离体培养条件,是利用毛状根进行药用次生代谢物质生产的前提和基础。蔗糖

是毛状根离体培养最常用的能源和碳源,其浓度大小及其在生长过程中的代谢变化与毛状根的形态生长及次生代谢物的积累密切相关^[6,7]。如在培养青蒿(*Artemisia annua* L.)毛状根时发现,在一定范围内提高蔗糖浓度能促进青蒿毛状根的生长,其中尤以5%的蔗糖最有利于毛状根青蒿素的积累;但当蔗糖浓度达到8%时,毛状根的形态发生明显的改变,生长则受到严重的抑制^[8]。Yu等(1996)发现培养基中蔗糖浓度在2%~12%时能明显影响 *Solanum aviculare* 毛状根的生长及其生物量的积累,并且在含4%~6%蔗糖的培养基中培养28d的毛状根中类固醇类生物碱的含量最高,约比在含3%蔗糖的培养基高出60%^[9]。可见,培养基中的蔗糖浓度对毛状根生长及其次生代谢物质的影响可因植物种类的不同而有所差异。在本实验中,3%~5%的蔗糖浓度是三裂叶野葛毛状根生长的最适浓度,但高于或低于该浓度梯度时,毛状根的生长则受到抑制,其形态与颜色也相应发生改变,这与步怀宇等(2000)的实验结果基本一致^[15]。同时发现,培养10d后毛状根异黄酮类化合物含量达到最大值,而葛根素含量则在培养20d时达到最高,而毛状根的生长速率则在培养15d时达到最大,这表明三裂叶野葛毛状根的生长与其次生代谢物异黄酮类化合物的积累及其葛根素含量的转化不同步。此外,我们所选用的由发根农杆菌遗传转化产生的三裂叶野葛毛状根克隆系固体培养20d后,其葛根素含量可达到11.64 mg/g(DW),这比顾志平等(1996)对产自广西的三裂叶野葛葛根素含量的测定结果高得多^[16]。有研究证实,在不同的生长季节及不同的产地采掘的野葛块根,其有效成分如葛根素的含量与组成相差甚远,以6月份采集的根葛根素含量最高,8月份采集的最低^[14]。产自陕西太白山的野葛块根葛根素及异黄酮含量分别为6.64%和14.54%,而产自河南信阳的野葛块根葛根素及异黄酮含量则仅为2.90%和6.49%^[16]。我们认为,造成这种差异的原因可能与药材的产地及采收季节及生药制备过程中的损失以及农杆菌质粒T-DNA在植物基因组中的整合和表达对三裂叶野葛细胞次生代谢的影响等因素有关。

蔗糖作为培养基中的重要碳源,以往的研究大都集中在研究培养基中的蔗糖浓度对毛状根生长及其次生代谢物积累的影响,而对毛状根培养过程中蔗糖本身的代谢变化或消耗速率与毛状根生长和次生物质积累的研究较少^[17,18]。Vani等(2004)在培养 *Hosta tokudama* 过程中,植株体内可溶性糖浓度随培养基中蔗糖浓度(1%~7%)的增大而升高,其中,含7%蔗糖培养基培养的幼芽中可溶性糖含量约为1%蔗糖的4倍,而3%蔗糖培养的芽中可溶性糖含量比根中高出20%^[19]。另有研究表明,蔗糖浓度的升高可导致玉米植株体内磷酸转移酶活性及可溶性蛋白浓度及总氮含量的降低,进而降低植物的生长速度^[20]。而在我们的实验中,在0~20d固体培养过程中,三裂叶野葛毛状根中可溶性糖含量与其培养基中的蔗糖浓度成正比,但较高浓度蔗糖培养的毛状根的生长速率及生物量(干重)反而逐渐下降,并且培养20d后毛状根开始不断褐化,其中可溶性糖含量也随之不断

下降。三裂叶野葛毛状根在培养 20d 后就开始褐化,毛状根培养过程中不断消耗体内的营养物质,从而导致培养物中可溶性糖含量与异黄酮类化合物及葛根素含量的下降。这可能表明,毛状根褐化可能是其对生长环境不适应的表现,也可能与三裂叶野葛毛状根培养基中较高蔗糖的影响有关。

许多研究表明,光作为调节植物生长发育的重要影响因素,不仅可调节植物的多种生理功能,还可调节离体培养物的生长及其次生代谢水平^[11-21]。在培养青蒿毛状根时发现,在一定范围内提高光照强度和光照时间可以促进青蒿毛状根的生长及其青蒿素的合成和积累,当毛状根在 3000lx 白光下光照 16h,青蒿毛状根的干重及其培养物中青蒿素含量均达到最大^[11]。Shin 等(2003)在培养 *Beta vulgaris* L. 毛状根时发现,蓝光加远红光处理最有利于其毛状根生物量的增长及其甜菜碱的积累^[12]。利用高效液相色谱(HPLC)测定不同光照处理的大豆(*Glycine max* L.)幼苗的异黄酮类含量时发现,幼苗内的异黄酮含量随光照时间的增加而显著升高,相反,黑暗中幼苗的异黄酮含量则随苗龄的增加呈下降趋势,表明光照可明显促进大豆植株的异黄酮积累^[21]。这与本实验的结果不一致。在本试验中,与暗培养相比,蓝光和白光处理下的毛状根虽生长较缓慢,但其毛状根培养物中异黄酮类化合物含量均比暗培养高,且白光的效果更明显。我们的结果还表明,蓝光抑制毛状根中葛根素的积累,而白光则促进毛状根中葛根素含量的积累,这与光照影响人参(*Panax ginseng*)毛状根培养的结果相一致^[22]。一些研究表明,植物毛状根的生长及其次生代谢水平可受光的调节,并可因光质不同而有所差异,如业已证实,光对从植物中克隆出 4CL 和 CHI 等基因的表达有促进作用,并发现蓝光可调控拟南芥中查尔酮合成酶基因的表达^[23-25]。而查尔酮也是三裂叶野葛毛状根中异黄酮类化合物合成的直接前体物质,因而,在本实验中,光照虽不利于三裂叶野葛毛状根的生长,但却利于提高毛状根中异黄酮类化合物含量,而这种影响是否与光通过对异黄酮合成途径中关键酶的基因表达的调节有关,尚待进一步研究。而我们的工作为今后进一步研究糖与光对三裂叶野葛毛状根次生代谢合成关键酶的转录、翻译以及酶活力的影响奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Guo JR(郭建平),Sun QR(孙其荣),Zhou Q(周全). Advances of pharmacological research of gegan. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药),1995 **26**(3):163-165

[2] Chai XS(柴象枢),Wang ZX(王志新),Chen PF(陈平平) *et al.* Function of puerarin resisted the out of gear of heart rate. *Chinese Journal of Pharmacology*(中国药理学报),1985 **6**(3):166-168

[3] Boue SM, Wise TE, Nehls S *et al.* Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *Agric Food Chem* 2003 **51**(8):2193-2199

[4] Shi HR(施和平),Quan HC(权宏),Kintzios S. Induction of hairy roots of *Pueraria phaseoloides* and its culture in liquid and solid medium. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),2003 **19**(3):307-311

[5] Jacob A, Malpathak N. Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2005 **80**:247-257

[6] Liang F(梁朋),Shi HR(施和平),Qi Y(齐莹). Effects of sucrose concentrations on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*(实验生物学报)2004 **37**(5):384-390

[7] Shin KS, Chakrabarty D, Ko JY *et al.* Sucrose utilization and mineral nutrient uptake during hairy root growth of the red beet (*Beta vulgaris* L.) in liquid culture. *Plant Growth Regulation*, 2003 **39**:187-193

[8] Liu CZ(刘春朝),Wang YC(王玉春),Ouyang F(欧阳藩) *et al.* Kinetics of artemisinin production growth and nutrient exhaustion in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Acta Bot Boreal-Occident. Sin*(西北植物学报),1999 **19**(4):571-577

[9] Yu SX, Kwok KH, Doran PM. Effects of sucrose, exogenous production concentration and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme Microbiol Technol*,1996 **18**:238-243

[10] Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas VW. Establishment of hairy root culture of *Datura stramonium*: characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,1993 **33**:321-329

[11] Liu CZ,Guo C,Wang YC *et al.* Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*,2002 **38**:581-585

[12] Shin KS, Murthy HN, Heo JW *et al.* Induction of betalain pigmentation in hairy roots of red beet under different radiation sources. *Biologia Plantarum* 2003 **47**:149-152

[13] Zhang ZL(张志良),Qu WJ(瞿伟菁). Experiment Book for Plant Physiology. Beijing: Higher Education Press 2003 pp.127-129

[14] Zhong Y(仲英),Ding XB(丁杏苞),Zuo CX(左春旭) *et al.* Measurement the content and quality of puerarin in gegen in different growth reasons. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药),1992 **23**(6):294-295

[15] Bu HY(步怀宇),Jing JZ(景建洲),Hao JC(郝建国) *et al.* Effects of different factors transformation of *Alhagi pseudalhagi* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),2000 **20**(4):577-584

[16] Gu ZR(顾志平),Chen BZ(陈碧珠),Feng RH(冯瑞芝) *et al.* The source utilization and evaluation of medical kudzu and roots from the genus plants *Pueraria* DC. in China. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学报),1996 **31**(5):387-393

[17] Hu ZH(胡之璧),Alfermann AW. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*,1993 **32**(2):699-703

[18] Wang I(王莉),Yu RM(于荣敏),Zhang H(张辉) *et al.* Hairy root culture of *Polygonium Thunb* and the production of its active constituents anthraquinones. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报)2002 **18**(1):69-73

- [19] Vani G , Jeffrey WA , James R *et al.* Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates , biomass , storage quality of micropropagated hosta. *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* , 2004 ,**77** :125 – 131
- [20] Nurit SK , David M , Merchuk , JC. Sugar utilization and invertase activity in hairy-root and cell-suspension cultures of *Symphytum officinale* . *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* , 2000 ,**62** :89 – 94
- [21] Sun JM(孙君明) , Ding AI(丁安林) , Shen LM(沈黎明) . Light effect on the tissue contents and distribution of isoflavones in the developing seedling of soybean. *Acta Botanica Sinica*(植物学报) , 1998 ,**40**(1) :1015 – 1021
- [22] Yu KW , Murthy HN , Hahn EJ *et al.* Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng* : influence of temperature and light quality. *Biochemical Engineering Journal* 2005 ,**23** :53 – 56
- [23] Estabrook E , Sengupta-Gopalan C. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *The Plant Cell* ,1991 ,**23** :299 – 308
- [24] Haker GL , Noel Ellis TH , Coen ES. Identification and genetic regulation of the chalcone synthase multigene family in pea. *The Plant Cell* ,1990 ,**2** :185 – 194
- [25] Long JC , Gareth IJ. Involvement of plasma membrane redox activity and calcium homeostasis in the UV-B and UV-A/Blue light induction of gene expression in *Arabidopsis* . *The Plant Cell* ,1998 ,**10** :2077 – 2086