

3 结语

就目前的研究结果而言,对草胡椒属植物的化学特性和药理作用的认识是比较肤浅的。在化学成分研究方面大多集中在极性较小的部位,得到的单体以木脂素居多。而在这些木脂素化合物中,含有  $\gamma$ -丁内酯结构片段的也较为多见,既往的构效关系研究提示它是鬼臼毒素的重要药效基团之一<sup>[22]</sup>。此外,近年来的一些实验表明人和灵长类动物体内的木脂素很可能在某一浓度下通过阻断雌二醇与受体的结合而发挥对抗雌激素的效应<sup>[23]</sup>。同时,越来越多的事实也证明食用含大量木脂素类化合物的食品会大大降低一些癌症的发生率<sup>[24]</sup>。随着对草胡椒属植物的了解不断深入,它们的活性成分和作用机制将得到全面的阐明,进而为开发抗肿瘤、抗炎和镇痛新药提供新的思路 and 方向。

References:

[1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicia, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 20. Beijing: Science Press, 1982.  
 [2] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.  
 [3] Seeram N P, Lewis A W, Jacobs H, et al. Proctoriones A—C: 2-acetylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 399-402.  
 [4] Chen C M, Jan F Y, Chen M T, et al. Peperomins A, B and C, novel secolignans from *Peperomia japonica* [J]. *Heterocycles*, 1989, 29: 411-414.  
 [5] Monache F D, Compagnone R S. A secolignan from *Peperomia glabella* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(5): 1097-1098.  
 [6] Govindachari T R, Krishna Kumari G N, Partho P D. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49: 2129-2131.  
 [7] Cheng M J, Lee S J, Chang Y Y, et al. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63: 603-608.  
 [8] Li N, Wu J L, Sakai J, et al. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1421-1426.  
 [9] Mbah J A, Tchuendem M H K, Tane P, et al. Two chromones from *Peperomia vulcanica* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 799-801.

[10] Sibi M P, Joshon M D, Punniyamurthy T. Enantioselective synthesis of peperomins A, C, D, and analogs—examination of diastereoselective cuprate conjugate additions to *N*-enoyl-4-diphenylmethyl-2-oxazolidinonees [J]. *Can J Chem*, 2001, 79: 1546-1555.  
 [11] Tanaka T, Asai F, Iinuma M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49 (11): 229-232.  
 [12] Seeram N P, Jacobs H, McLean S, et al. A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49: 1389-1391.  
 [13] Trost B M, Shen H C, Dong L, et al. Synthesis of chiral chromans by the Pd-catalyzed asymmetric allylic alkylation (AAA): scope, mechanism, and applications [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 11966-11983.  
 [14] Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, et al. New prenylated quinones from *Peperomia galioides* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59: 694-697.  
 [15] Bayms J C, Arruda M S P, Müller A H, et al. A dimeric Ar<sub>2</sub>C<sub>2</sub> compound from *Peperomia pellucida* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55: 779-782.  
 [16] Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, et al. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(2): 324-328.  
 [17] Villegas L F, Marcalo A, Martin J, et al. (+)-Epi- $\alpha$ -bisbolor is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the *in vivo* wound-healing activity of related terpenoids [J]. *J Nat Prod*, 2001 (64): 1357-1359.  
 [18] Arrigoni-Blank M de F, Dmitrieva E G, Franzotti E M, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 91: 215-218.  
 [19] Aziba P I, Adedeji A, Ekor M, et al. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72: 57-58.  
 [20] Khan M R, Omoloso A D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida* [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73: 251-254.  
 [21] Langfield R D, Scarano F J, Heitzman M E, et al. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 94: 279-281.  
 [22] Bohin L, Borje R. Podophyllotoxin derivatives, drug discovery and development [J]. *Drug Discovery Today*, 1996 (1): 343-351.  
 [23] Yu P Z, Wang L P, Chen N Z, et al. Current Advances in research of lignans [J]. *World Notes: Plant Med* (国外医药: 植物药分册), 1991, 6(1): 4-8.  
 [24] Ward R S. Lignans, neolignans and related compounds [J]. *Nat Prod Rep*, 1997, 14(1):43-74.

刺五加组织培养与细胞工程进展

邢朝斌,陈正恒,曹 蕾,郭 鑫

(华北煤炭医学院 生物科学系,河北 唐山 063000)

摘要:综述了国内外对刺五加组织培养与细胞工程研究的现状。分别从体细胞胚胎发生的影响因素:外植体的发育程度和类型、培养基、植物生长调节剂的种类和浓度以及作用特点、体细胞胚胎的形态发生过程与解剖学和人工种子的包埋与萌发;茎尖外植体的离体培养与快速繁殖;根癌农杆菌和发根农杆菌对愈伤组织和新生体胚的遗传转化;毛状根培养生产刺五加次生代谢产物的研究现状进行了评述,并进一步分析了其中存在的问题,提出了一些建议。

中图分类号:R282.13

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)12-1896-04

收稿日期:2005-04-20

作者简介:邢朝斌(1975—),男,河北省定州市人,讲师、硕士,主要从事药用植物细胞工程的研究。

Tel:(0315)3725859 E-mail:xingzhib@mail.edu.cn

## Research progress of tissue culture and cell engineering in *Acanthopanax senticosus*

XING Zhao-bin, CHEN Zheng-heng, CAO Lei, GUO Xin

(Department of Biology, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

**Key words:** *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; somatic embryogenesis; artificial seeds; genetic transformation; hairy roots

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 是我国医药珍品,根、茎、叶均可入药。历代本草医药记载,其有益气健脾、补肾安神之功效。自20世纪70年代末以刺五加为原料生产的各种片剂、冲剂、针剂和刺五加参茶等产品远销国外,因而使刺五加资源消耗与日俱增。经过几十年掠夺式的采挖,严重地破坏了野生刺五加资源。在自然状态下刺五加结实的株丛少,种子产量低、质量差、传播力弱、休眠程度深,并且扦插成活率低、插穗来源少、管理程序繁琐<sup>[1,2]</sup>。1992年出版的《中国植物红皮书》已把刺五加列为了濒危物种。

植物组织、细胞培养具有快速、高效、低成本的优点,因而近年来利用植物组织、细胞培养快速繁殖刺五加和生产其药用成分的研究成为热点。目前多数研究集中于刺五加体细胞胚胎发生和人工种子包被方面,并取得了可喜成果,对茎尖的快速繁殖、遗传转化和毛状根生产药用成分也有初步探索。

### 1 体细胞胚胎发生

自1990年桂耀林等<sup>[3]</sup>首次报道刺五加体细胞胚胎发生以来,相继对刺五加体胚发生和人工种子的包埋进行了大量研究。与其他植物相同,刺五加体细胞胚胎发生是个十分复杂的过程,其机制还不十分清楚。刺五加的体细胞胚胎发生受多种因素的影响,其中,外植体与植物生长调节剂起决定性作用。

1.1 外植体:植物的每个细胞均有形成体胚的潜力,但成胚频率最高的是那些具有较高胚性感受能力的细胞<sup>[4]</sup>。在刺五加中,合子胚及其组成成分具有较高的胚性感受水平。因而,刺五加的体胚发生主要是采用合子胚及其组成成分(子叶、胚轴等)作为外植体而获得的。

刚刚采收完的刺五加种子中的胚尚未完全发育成熟,需要经过长达18个月的变温层积处理后才能萌发<sup>[5]</sup>。取出层积处理后种子中的合子胚,在1/2MS培养基中培养2周即可萌发,当幼苗长到2cm高时,分别切取子叶、下胚轴、胚根作为外植体<sup>[6,7]</sup>,下胚轴产生体细胞胚胎的频率最高(75%),是子叶(56%)的1.34倍、胚根(12%)的6.25倍。与大多数植物一样,刺五加的组织维持高水平胚性感受状态的时间较短。合子胚的体细胞胚胎产生率最高(94%),萌发1周幼苗的下胚轴次之(75%),萌发3周幼苗的下胚轴最低(23%)<sup>[6]</sup>,这说明合子胚期的下胚轴,在合子胚萌发后,体细胞胚胎形成能力急速下降。但合子胚产生的体胚彼此相互融合,最终和原初的外植体融合在一起<sup>[3,6,8]</sup>。由幼苗下胚轴产生的体胚,89%都能发育成正常的体细胞胚胎;萌发1周幼苗的下胚轴产生体胚的数量最高(17个体胚/外植体)<sup>[6]</sup>。伴随着体胚的产生,新产生的体胚的胚根根尖同时形成胚性愈伤组织<sup>[3,6,8]</sup>,将这些胚性

愈伤组织悬浮培养后也可间接获得体胚。

虽然获得刺五加体细胞胚胎的多数外植体都直接或间接取自层积处理种子的胚,但桂耀林等<sup>[8]</sup>使用未经层积处理种子中的胚作为外植体,培养在添加了0.5 mg/L 2,4-D的MS培养基中,1~2个月后外植体也普遍肿大伸展,并从肿胀的子叶及胚轴上直接分化出黄白色的胚状体。

1.2 培养基和植物生长调节剂:MS培养基是诱导刺五加体细胞胚胎发生的常用培养基,但在未加任何激素的该种培养基中,所有外植体均不能产生体胚<sup>[6]</sup>。在多数植物组织、细胞培养中,外源生长素和细胞分裂素是细胞离体培养所必须的植物生长调节剂<sup>[9]</sup>。

2,4-D是多数植物体细胞胚胎诱导所必须的<sup>[9]</sup>,刺五加的体胚诱导中,2,4-D也起着决定性作用。在含0.5、1.0 mg/L 2,4-D的MS培养基中培养3周后,从刺五加外植体表面即可直接产生体细胞胚胎<sup>[3,6,8]</sup>。如果体胚不是由外植体直接产生,而是经由愈伤组织产生,则早期必须在含有2,4-D的培养基中培养,之后转入去除2,4-D的培养基后才能产生大量的球形体细胞胚胎<sup>[7]</sup>。在经由愈伤组织产生体胚的过程中,所用的诱导方法不同,其产生体细胞胚胎的频率也不同。Choi等将刺五加胚性愈伤组织先培养在含1.0 mg/L 2,4-D的MS液体培养基中,转入不含2,4-D的MS液体培养基培养5周,200 mg的细胞团块产生了大约5500个体胚,显著高于在固体培养基上产生的体细胞胚胎数(1570个/500 mg)。但来自固体培养基的体胚,子叶比液体培养基上的大、体胚成苗率和幼苗驯化成活率均高于液体培养基。将刺五加体胚继代人含0.5 mg/L 2,4-D的培养基后,在早期产生的体胚上又可产生新的次级体胚<sup>[3,7,9]</sup>,如果继代培养基中未添加2,4-D,则胚状体的子叶容易变绿,少数还能发育成正常的小植株<sup>[3]</sup>。体细胞转化成胚性细胞的前提条件是基因的差别表达,基因的差别表达需要一定内外条件的诱导,也就是说细胞分化必须有相应的诱导因子<sup>[9]</sup>。在这些因子中,植物激素发挥着重要的作用。植物激素对体细胞胚胎发生的调节作用已有很多报道。在不少植物中,2,4-D只对胚性细胞和胚性细胞团的形成起到诱导作用,而对胚状体的进一步发育与生长却是抑制因素<sup>[9,10]</sup>。但在刺五加的体细胞胚胎发生中,不管它的胚胎发生途径如何,2,4-D对胚性细胞的诱导及胚状体的分化均起了决定性的作用,且只需在培养基中添加2,4-D一种植物激素,就足以保证大量体细胞胚胎的产生,这一特点与禾本科植物体细胞胚胎发生中只要求单一、高浓度的2,4-D就能获得体胚的情况十分相似。

现在大量研究证明细胞分裂素与生长素结合使用有利于体细胞胚胎的发生,甚至单独使用细胞分裂素时有的植物

也能产生体胚<sup>[10]</sup>。桂耀林等的研究表明细胞分裂素的存在反而抑制了体胚的形成<sup>[3]</sup>。在同时含有 BA 和 NAA 的培养基上,刺五加外植体仅稍有增大但无体胚产生;BA 与 2,4-D 配合使用时,虽产生了愈伤组织,但长期培养后愈伤组织老化死亡,失去体胚发生能力;只有在单独使用 2,4-D 的情况下才能产生体细胞胚胎。

1.3 体细胞胚胎发生的解剖学:有关五加科植物的体细胞胚胎发生,在人参、西洋参上也有成功的报道,它们均为先从不外植体产生愈伤组织,由愈伤组织再分化出体细胞胚胎。刺五加与这些植物不同,在植物激素的作用下,即可经过愈伤组织间接产生体胚,也可不经过愈伤组织阶段,而从胚和胚的组成部分外植体上直接产生体胚。最初产生的胚状体为一些小的圆柱形突起,表面十分光滑,在纵向伸长以后,顶端开始出现瓣状裂片,此裂片为体胚子叶联合成桶状后子叶的先端。进入鱼雷形胚时期后,由于胚轴伸长及两片子叶出现联合,致使整个鱼雷形胚呈现喇叭状<sup>[3,8]</sup>。切片观察表明,刺五加的体胚起源于子叶或胚轴外植体表皮层及表皮层下的细胞团,随着细胞团的不断扩大,很快发展到球形及心形胚阶段。从球形胚期直至鱼雷形胚阶段,体胚的胚柄均十分发达,因此刺五加的体胚在发育的早期阶段不易从外植体上脱离<sup>[3]</sup>。外植体表面所产生的胚状体非常密集,并且常常几个胚状体通过基部相连,聚集成团,较难分离,继代培养时只能将成团的胚状体团块集体进行继代培养<sup>[3,6,8]</sup>。

1.4 体细胞胚胎的萌发:Choi 等<sup>[7]</sup>认为在刺五加体细胞胚胎形成后,GA<sub>3</sub> 处理是体胚萌发的必须。刚刚产生的体胚在含 1.0 mg/L GA<sub>3</sub> 的培养基中培养 2 周才能促使其萌发。如果将 GA<sub>3</sub> 的质量浓度提高到 7.0 mg/L,仅处理 3 d,即可刺激体胚萌发。但桂耀林等<sup>[3]</sup>报道,未经任何处理的体胚萌发率也高达 98.4%。之所以出现上述两种截然不同的结果是因为刺五加的体胚发生速度快、体积小且容易再分化产生次级体胚,而子叶期体胚的萌发率(96.3%)要远远高于鱼雷形胚或多子叶等不正常体胚的萌发率(15%~58.3%)。

Choi 等<sup>[7]</sup>的研究表明体细胞胚胎的密度、培养基的强度也影响着刺五加体胚的萌发。低密度(每个容器 20 g 体胚)时,体胚虽萌发且幼苗生长迅速,但总产量很低(135 g),每个容器 35、50 g 体胚的产量显著高于 20 g 体胚。需要指出的是,高密度(每个容器 50 g 体胚)时,植株老化相对较快,因此 35 g 体细胞胚胎是最佳的萌发密度;体胚在 1/3 和 1/5 MS 培养基上植株的产量要比全量 MS 培养基上的高,但 1/5MS 培养基中产生大量植株之后容易枯竭,因此 1/3MS 培养基应该是最佳强度。

桂耀林等<sup>[3]</sup>报道,在再生培养基中使用麦芽糖取代蔗糖后,更有利于体胚的萌发。麦芽糖可能作为一种催熟因子诱导停滞在前期的体胚发育至成熟的体胚,从而有利于体胚的萌发<sup>[12]</sup>。即使同种碳源,若质量浓度不同作用也明显不同。刺五加早期子叶体细胞胚胎在含 1% 蔗糖的培养基中萌发 97%,而在 9% 蔗糖中均未萌发<sup>[13]</sup>。高质量浓度蔗糖抑制萌发的原因主要有两个:一是直接改变培养基的渗透压,使细胞失水,

内含物浓度升高,从而直接影响体胚的成熟<sup>[11]</sup>;二是添加高质量浓度蔗糖(9%)后,体胚中 ABA 的量(487.8 ng/g)比低质量浓度蔗糖(3%)处理中体胚的 ABA 量(258.4 ng/g)显著提高<sup>[19]</sup>,促使体胚成熟并休眠,因而降低体胚的萌发率。

## 2 人工种子的包埋

利用体细胞胚胎制作人工种子除了需要高转化率的体胚之外,对体胚的质量也有要求,只有那些体积较大、易于分离且具有发育成完整植株能力的高质量体胚才能制作出健壮的人工种子。刺五加在产生体胚时多数聚集成团、非常密集,且在刚刚产生的体胚上容易产生次级体胚,因此需要从获得的体胚中挑选长度在 3~5 mm 的子叶期体胚才能获得较高的人工种子萌发率(≥80%)<sup>[3]</sup>。但从大量不同发育阶段的丛生体胚中分离出一定大小的子叶期体胚的效率很低,若体胚同步化成熟后可大大降低工作量。Choi 等<sup>[13,14]</sup>认为将不同发育阶段的刺五加体胚集集在含高浓度蔗糖的培养基中培养 3 周,更有利于未成熟的体胚发育成熟,从而提高人工种子的制作效率和萌发率(100%)。作为人工胚乳的包裹材料也有特殊的要求,目前刺五加人工胚乳的制作多采用藻酸盐的水凝胶胶囊系统。Jung 等<sup>[15]</sup>发现,当海藻酸钠包被中含有 2% 蔗糖时,人工种子萌发后的成活率为 23.5%,不含蔗糖的成活率仅有 10.0%,同时添加 2% 蔗糖和 1% 淀粉时成活率可达 42.1%。不过上述刺五加人工种子的萌发率均是在无菌条件下得到的结果,在土壤或蛭石等有菌情况下,发芽率通常很低,即使是加入灭菌剂后最高也仅为 21.1%<sup>[3]</sup>。

## 3 茎尖培养

张喜春等<sup>[16]</sup>对刺五加茎尖培养做了初步的探索。作为木本植物的刺五加其茎尖增殖系数要低于大多数的草本植物,仅为 3~4 倍<sup>[16,17]</sup>。MS 培养基对刺五加体细胞胚胎发生是一种适合的培养基,但在添加 0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 时,White 培养基中茎尖的分化率(87.2%)要高于 MS 培养基(76.1%)。葡萄糖作为碳源时比蔗糖作为碳源时幼茎生长快 20%<sup>[16]</sup>。春季萌芽时茎尖的成活率和生长后的平均高度均优于夏、秋和冬季的茎尖<sup>[16,17]</sup>。

## 4 遗传转化与毛状根培养

李学宝等<sup>[18]</sup>用刺五加愈伤组织作为外植体,以带致癌质粒的农杆菌作感染转化,诱导获得了能在无生长调节剂的培养基上生长的愈伤组织。尽管未能获得转基因植株,但证明农杆菌能够感染刺五加。人工栽培刺五加过程中,每年需要数次除草。Choi 等<sup>[19]</sup>将刺五加胚性愈伤组织、球形体胚和携带有抗除草剂的 uidA 基因的根癌农杆菌共培养 3 d,成功导入目的基因,胚性愈伤组织的转导率(5.1%)显著低于体胚(27.3%)。继代培养 10 次筛选出的转基因体胚至子叶胚阶段,经 PCR 和 Southern 杂交鉴定确认目的基因转导成功。

刺五加根中含有很高的药用成分,产业化生产毛状根将会是很好的药物原料来源。Seo 等<sup>[20]</sup>对此做了一些对比研究。取萌发体细胞胚胎上含有下胚轴的胚根外植体,产根的频率比单用胚根培养要高得多,具体机制还不清楚;对于培养基,如果去掉 MS 中的 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>,其产根率比正常 MS 培

培养基要高 2~3 倍;激素也存在一定的影响,固体 MS 培养基含有 NAA 时更有利于毛状根的产生,而液体培养基含有 IBA 会更有利毛状根的产生;通过生物反应器培养时,加入 0.5 mg/LIBA 可使根质量提高 5.5 倍,若培养基中不加激素则仅提高到 3.7 倍。毛状根中的刺五加苷 E 和 E<sub>2</sub> 量比三年生刺五加要高,而刺五加苷 B 量显著低于三年生刺五加。

## 5 问题与展望

为了解决野生刺五加资源日渐枯竭与人们对刺五加产品需求日益增长的矛盾,通过组织培养进行快速繁殖和细胞工程大规模生产刺五加药用成分已势在必行。刺五加的组织培养和细胞培养,经近十几年的研究取得了很大进展,但仍面临着一些问题,一是目前对刺五加的研究远不如对其他经济作物研究深入,如体细胞胚胎的发育程度差异大、人工种子在有菌条件下萌发率和成苗率低、毛状根中药用成分量不高、茎尖来源少及遗传转化程序复杂等问题,多数还不能应用于实践。二是研究的不平衡发展。现在,刺五加组织、细胞培养的研究不仅表现为体细胞胚胎发生轻细胞工程生产药用成分,还表现在只侧重影响因子方面,对其内在机制的研究尚为空白。三是国内研究基础滞后。刺五加主要分布在我国东北、华北、俄罗斯的西伯利亚和朝鲜、韩国等地。但我国对其的研究仅有零星报道。与此形成鲜明对比的是韩国进行了大量工作,尤其应注意的是其刚刚开展的刺五加毛状根培养,更为该国工业化生产刺五加药用成分奠定了基础。

现代生物技术的迅速发展,为药用植物带来了新的契机,并取得了大批成果。具体到刺五加组织、细胞培养的研究还应该在下面几个方面加强工作:建立起高效、稳定的体细胞胚胎发生体系和人工种子制作工艺,为刺五加的快速繁殖和基因工程育种奠定基础;系统地研究刺五加组织、细胞培养中的内在机制及其调控机制,从而为更好地利用植物细胞全能性,深入开展其他药用植物的研究提供理论依据;筛选药用成分高产细胞系,完善毛状根培养体系,建立起适合生物反应器生产刺五加药用成分的培养体系,从而应用于工业化生产。

## References:

- [1] Zhao S L, Shen Y J. A research on the reproduction of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms by green branch cuttage [J]. *Spec Wild Econom Anim Plant Res* (特产研究), 2003, 3: 1-2.
- [2] Chen C J, Ma W L, Piao C B. Cuttage technology of *Acanthopanax senticosus* [J]. *J Agric Sci Yanbian Univ* (延边大学农学院学报), 2003, 25(4): 250-253.
- [3] Guo Z C, Gui Y L. *Plant Somatic Embryogenesis and Artificial Seed* (植物体细胞胚胎发生和人工种子) [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [4] Tang H R, Wang Y Q, Ren Z L. An overview of progress on somatic embryogenesis and transformation in walnut [J]. *Sci Silv Sin* (林业科学), 2000, 36(3): 102-110.
- [5] Dulin A F. Change in the hormonal status of ovaries and depth of dormancy of siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) seeds under the effect of epin [J]. *Russian Agric Sci*, 2002, 10: 9-12.
- [6] Choi Y E, Yang D C, Yoon E S. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1999, 58: 93-97.
- [7] Choi Y E, Lee K S, Kim E Y, et al. Mass production of siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 21: 24-28.
- [8] Gui Y L, Guo Z, Ke S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus* [J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 9: 514-516.
- [9] Cui K R, King G S. The induced and regulatory effects of plant hormones in somatic embryogenesis [J]. *Hereditas* (遗传), 2000, 22(5): 349-354.
- [10] Yuan S, Jia Y J, Lin H H. Several physiological factors inducing somatic embryogenesis of plant [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2003, 39(5): 508-512.
- [11] Jia Y H, Xiong Q E. Advance in research on plant somatic embryogenesis [J]. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 2003, 21(1): 59-63.
- [12] Bai S X, Liu L Q, Chen W L. Review on high quality somatic embryogenesis in artificial seed of plant [J]. *J Agric Univ Hebei* (河北农业大学学报), 1998, 21(1): 97-101.
- [13] Choi Y E, Jeong J H. Dormancy induction of somatic embryo of siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 20: 1112-1116.
- [14] Choi Y E, Ko S K, Lee K S, et al. Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2002, 69: 201-204.
- [15] Jung S J, Yoon E S, Jeong J H, et al. Enhanced post-germinative growth of encapsulated somatic embryo of siberian ginseng by carbohydrate addition to the encapsulation matrix [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 23: 365-370.
- [16] Zhang X C, Liu H W, Zhang H, et al. Effective elements of shoot-tip culture of mangprickle *acanthopanax* [J]. *J Northeast Forest Univ* (东北林业大学学报), 1996, 24(6): 107-110.
- [17] Zhang J F. A study of tissue culture and rapid breeding of *Acanthopanax senticosus* Harms [J]. *J Changchun Univ* (长春大学学报), 2004, 14(4): 73-75.
- [18] Li X B, Jing B, Chen G R. Study on genetic transformation of *Acanthopanax senticosus* [J]. *J Centr China Norm Univ: Nat Sci* (华中师范大学学报:自然科学版), 1995, 29(4): 494-497.
- [19] Choi Y E, Jeong J H, Baek S H, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of *Eleutherococcus sessiliflorus* by phosphinothricin acetyl transferase gene [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2004, 40: 51-56.
- [20] Seo J W, Shin C G, Choi Y E. Mass production of adventitious roots of *Eleutherococcus sessiliflorus* through the bioreactor culture [J]. *Plant Biotechnol*, 2003, 5(3): 187-191.