

桃儿七组织培养体系的建立及鬼臼毒素的检测

栗孟飞, 李 唯*

(甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:目的 建立桃儿七组织培养体系及其鬼臼毒素的提取检测方法。方法 以桃儿七成熟分离胚为材料, 研究了不同浓度激素、活性炭(AC)对无菌苗诱导的影响; 以桃儿七无菌苗切除后约2.0 cm的根茎为材料, 考察不同浓度激素对根继代及生长发育的影响, 并定期对继代根、叶(叶柄)及培养基进行鬼臼毒素的提取及HPLC法检测。结果 分离胚在MS+2.0%蔗糖+0.4%琼脂+1.0 mg/mL GA₃+1.0 g/L AC的培养基培养20 d后, 无菌苗诱导率为92.0%, 无菌苗生长发育良好; 切除后约2 cm的根茎接种在MS+2.0%蔗糖+0.4%琼脂+1.0 g/L AC+1.0 mg/mL IBA继代40 d后, 根长11.59 cm, 植株生长发育良好; 对继代根、叶(叶柄)及培养基进行鬼臼毒素的提取及HPLC法检测显示, 鬼臼毒素量大小依次为根>培养基>叶(叶柄), 50 d后分别为33.17、12.97、4.55 μg/mL。结论 本研究建立了桃儿七组织培养体系, 证明了利用桃儿七根培养生产鬼臼毒素的可行性。

关键词: 桃儿七; 根继代; 鬼臼毒素; HPLC

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1366-05

Establishment of tissue culture system of *Sinopodophyllum emodi* and identification of podophyllotoxin

LI Meng-fei, LI Wei

(College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Objective To establish the tissue culture system of *Sinopodophyllum emodi* and the extraction and identification methods of podophyllotoxin. **Methods** The effects of seedling induced rate by different concentrations of hormones and activated charcoal (AC) were studied, taking the separated mature embryo as material; Then the effect of growth and development of excised rhizome (2.0 cm) of the seedling sub-cultured were conducted by different concentrations of hormones; In addition, the contents of podophyllotoxin in rhizome, cultured media, and leaf (leafstalk) were extracted and identified by HPLC at regular stages. **Results** After 20 d the seedling induced rate reached 92.0% with better growth and development with the separated mature embryo of *S. emodi* seeds cultured on the Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 2.0% sugar, 0.4% agar, 1.0 mg/mL GA₃, and 1.0 g/L activated charcoal (AC); After 40 d sub-culture of excised rhizome (2.0 cm), the sub-cultured plantlets showed better growth and development with root length 11.59 cm and the cultured medium was MS supplemented with 2.0% sugar, 0.4% agar, 1.0 mg/mL IBA, and 1.0 g/L AC. In addition, the podophyllotoxin in different parts of *S. emodi* including cultured media at different growth stages was extracted and identified by HPLC. The results indicated that the content of podophyllotoxin was rhizome > cultured media > leaf (leafstalk) with 33.17, 12.97, and 4.55 μg/mL, respectively after 50 d. **Conclusion** The tissue culture system of *S. emodi* could be established and the method of production podophyllotoxin by root culture of *S. emodi* is feasible.

Key words: *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying; root sub-culture; podophyllotoxin; HPLC

桃儿七 *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying 是小檗科桃儿七属多年生草本植物, 主要分布在我国西部^[1], 为我国民间中草药, 主要用于痛疽肿毒、风湿性骨痛、气管炎等症^[2], 近年来研究发现, 桃儿七的根及根茎中主要含有木脂素类、黄酮类、皂

苷、多糖等, 其中木脂素类鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 量最高 (2.7~4.2%)^[3]。自 King 和 Sullivan 报道鬼臼毒素具有类似于秋水仙碱作用之后, 引起了人们的普遍关注, 并导致一系列医学、生物学和化学的研究^[4]。研究证明鬼臼毒素具有广泛的药

* 收稿日期: 2009-11-15

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20096202110006)

作者简介: 栗孟飞 (1980—), 助教, 主要从事植物细胞工程及天然药物化学教学与研究。E-mail: lmf@gsau.edu.cn

学活性,如 0.5% 鬼臼毒素酊在治疗尖锐湿疣方面具有起效快、治愈率高、安全性好等特点^[5],1990 年世界卫生组织推荐其为一线药物,1994 年我国《国家基本药物》皮肤类抗病毒唯一入选药物^[6];鬼臼毒素还是合成抗癌药物 GP7、VP-16、VM-26、NK611 等^[7]及抗艾滋病^[8]药物的前提物质。由于鬼臼毒素独特的药理作用及近年来药用市场需求的逐渐增加,加剧了桃儿七自然资源的开发与利用,使得其自然资源已面临匮乏与濒危^[9],1992 年已被列入《中国珍稀濒危植物名录》,并被《中国植物红皮书》收录。

为了解决桃儿七资源匮乏问题,国内外学者通过细胞组织培养^[10-11]、化学合成^[12]等方法进行生产鬼臼毒素的大量研究,从目前研究看,还不能通过化学方法大量合成鬼臼毒素。而细胞组织培养多集中在利用愈伤组织、细胞悬浮培养进行鬼臼毒素的生产,存在着愈伤组织易褐化、增殖缓慢及鬼臼毒素量低的特点。目前,尚无关于利用桃儿七根培养生产鬼臼毒素的报道。本实验以桃儿七成熟胚为材料,建立了桃儿七组织培养体系及其鬼臼毒素的 HPLC 检测方法。

1 材料

桃儿七成熟种子,采自甘肃省渭源县会川镇山区林地自然生长的桃儿七植株。由甘肃省农业科学院漆燕玲研究员鉴定后确认为桃儿七 *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying 种子。

2 方法

2.1 无菌苗诱导: 首先将种子冲洗干净,洗去表面黏液,用 70% 酒精漂洗 10 s,无菌水冲洗 4~5 次,再用 0.1% 的升汞灭菌 20 min,无菌水冲洗 4~5 次;然后将种子用 0.5 mg/mL GA_3 浸泡 36 h。接种前按照上述灭菌方法对浸泡后的种子进行灭菌,后用解剖刀取种子成熟胚,接种在 MS+2.0% 蔗糖+0.4% 琼脂附加不同浓度激素 GA_3 、NAA、6-BA 及活性炭 (AC) 的培养基上,pH (5.5~6.0),每处理接种胚数为 30 个,重复 3 次。置于温度 $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 1 000 lx 的条件下进行无菌苗的诱导。培养 20 d 后,目测法统计无菌苗诱导率和生长势。生长势分为:优+++,良++,中+,差-。无菌苗诱导率=(无菌苗诱导数/接种成熟胚总数)×100%,除去由于解剖损伤的胚,余下完整的为接种成熟胚总数。

2.2 无菌苗的继代: 将生长 40 d 后的桃儿七无菌苗(基部已丛生出抱窝的鳞茎)除去子叶及茎,根截取至约 2 cm,转接到 MS+2.0% 蔗糖+0.4%

琼脂+1.0 g/L AC 附加不同浓度激素 NAA、 GA_3 、IBA 的培养基上进行继代培养,并分别在接种后 10、20、30、40 d 测量无菌苗的根长。

2.3 鬼臼毒素标准曲线的制作: 用电子天平精密称取鬼臼毒素对照品 10.00 mg (质量分数 $\geq 98\%$, Sigma, CAS: 518-28-5),用无水乙醇溶解并定容至 10 mL,充分摇匀,即得浓度为 1.0 mg/mL 的对照品母液,然后利用梯度稀释法分别配制不同浓度 (0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1, 1.00 mg/mL) 的鬼臼毒素对照品溶液。利用 HPLC 法进行回归曲线的制作。HPLC 色谱条件: 紫外检波长 292 nm,流动相甲醇-水 (90:10),体积流量 1.0 mL/min,进样量 20 μL ,柱温 20°C 。色谱柱为安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)。得到回归曲线方程 $Y = 11\,914.5716X + 87.169\,916$, $r = 0.999\,66$ 。说明鬼臼毒素在 0.000 1~1.00 mg/mL 线性关系良好。

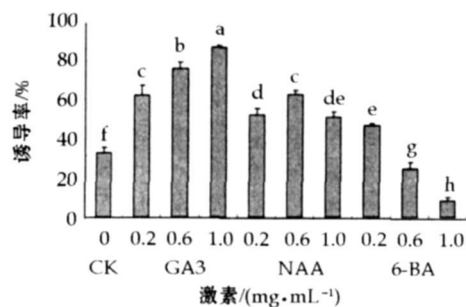
2.4 鬼臼毒素的提取与检测: 取桃儿七无菌苗根、叶(叶柄),分别放置在烘箱中 110°C 杀青 30 min,后再 60°C 下烘干 6 h,准确称取根、叶柄干质量各 2.0 g,研磨成粉末,用滤纸盒包好后分别放置在索氏提取器中,先用醋酸乙酯冷浸 6 h,然后连续回流提取 8 h,提取液待用;准确称取桃儿七继代培养后的培养基 50.0 g,加适量蒸馏水加热溶化后用醋酸乙酯进行萃取(连续萃取 3 次),萃取液待用;将桃儿七根、叶柄提取液及培养基萃取液分别在 80°C 下进行减压浓缩去除醋酸乙酯,待浓缩至少许棕色液体时,用中压柱色谱进行洗脱,洗脱液经浓缩后用无水乙醇定容至 10 mL,利用 HPLC 法在 292 nm 处检测。

3 结果与分析

3.1 桃儿七无菌苗的诱导

3.1.1 不同激素对无菌苗诱导的影响: 在利用桃儿七成熟胚进行无菌苗诱导过程中,通过在 MS+2.0% 蔗糖+0.4% 琼脂基本培养基上分别添加不同浓度 0.2、0.6、1.0 mg/mL 的 GA_3 、NAA、6-BA,以不添加激素作为对照,考察其对成熟胚无菌苗诱导的影响,结果见图 2,在成熟胚培养 20 d 后,对照的诱导率为 32.99%;添加 GA_3 的诱导率随着浓度的增加而提高,在 1.0 mg/mL 时诱导率达到最大,86.73%;添加 NAA 的诱导率在 0.6 mg/mL 时相对于 0.2、1.0 mg/mL 处理显著提高,为 62.65%;添加 6-BA 的诱导率随着浓度的增加而降低,在 0.2 mg/mL 时诱导率仅 46.95%。以上表明,添加

适当外源激素对于提高成熟胚无菌苗的诱导率具有促进作用,在 GA_3 、NAA、6-BA 3 种激素处理中, GA_3 对于提高无菌苗诱导率效果较好,以 1.0 mg/mL 最为显著。



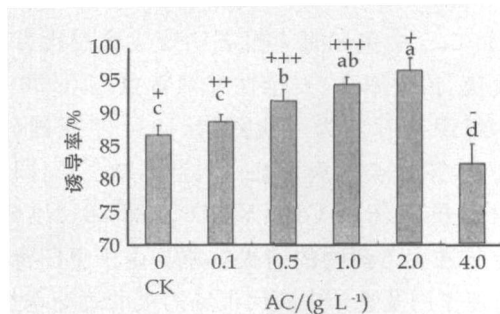
不同字母表示 Duncan's 新复极差检验在 0.05 水平上差异显著;下同

Different letters represent significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's test; Same as below

图1 不同激素对桃儿七无菌苗诱导率的影响

Fig.1 Effect of different hormones on induction rate of *S. emodi* seedling

3.1.2 活性炭对无菌苗诱导及生长的影响: 在 MS+ 2.0% 蔗糖+ 0.4% 琼脂+ 1.0 mg/mL GA_3 的培养基上,通过添加不同浓度 AC 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 g/L,以不添加作为对照,考察 AC 对无菌苗诱导及生长的影响。在成熟胚培养 20 d 后,进行观察统计,结果见图2,在 0.1~2.0 g/L,无菌苗的诱导率随着 AC 浓度的增加而逐渐提高,为 88.67%~96.59%,相对于对照 86.73% 均有所提高,其中以 1.0、2.0 g/L 诱导率较高,分别为 92.00%、96.59%,但是 2.0 g/L 的 AC 不利于无菌



+++、++、+、- 分别代表无菌苗的生长势优、良、中、差

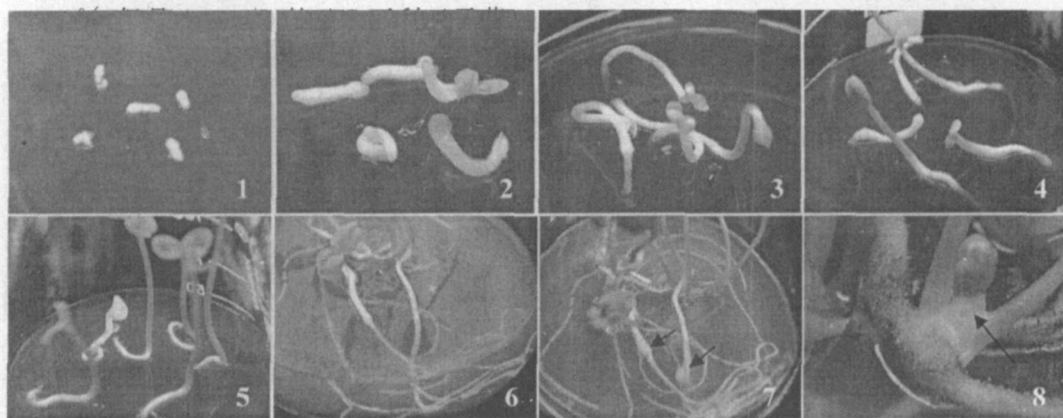
+++、++、+、- represent seedling growth potential excellent, good, moderate, and poor, respectively

图2 活性炭对桃儿七无菌苗诱导率及生长势的影响

Fig.2 Effect of different AC concentration on induction rate and growth potential of *S. emodi* seedling

苗的生长,其生长势中等,而 1.0 g/L 的呈现出优秀的生长势;当 AC 浓度为 4.0 g/L 时,无菌苗诱导率显著下降,仅为 82.32%,且生长势差。以上表明,在 1.0 mg/mL GA_3 的基础上,添加 1.0 g/L AC 不仅有利于提高无菌苗的诱导率,而且有利于无菌苗的生长发育 (图3)。

3.2 桃儿七无菌苗的继代中不同激素对根生长的影响: 在 MS+ 2.0% 蔗糖+ 0.4% 琼脂+ 1.0 g/L AC 的培养基上,通过添加不同浓度 (0.1、0.5、1.0、2.0 mg/mL) 激素 NAA、 GA_3 、IBA,以不添加外源激素作为对照,考察外源激素对继代桃儿七生长和发育的影响。结果见图4。不同浓度激素处理相对于对照对继代桃儿七根的生长和发育均有不同程度的促进作用。在不添加外源激素的培养基上培养 40 d 后,根在原来的基础上增长 1.63 cm;在添加不



1~8 分别表示桃儿七成熟胚在第 5、10、15、20、25、35、40、45 天的生长发育情况,图中箭头 7、8 分别表示

桃儿七根部抱窝鳞茎的膨大及鳞茎发育而来的幼苗

1-8 showed growth and development on day 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40, and 45, respectively

Black arrows in 7 and 8 showed rhizome began to expand and three leaves plantlets induced from rhizome bulbs

图3 不同生长时期桃儿七生长发育情况

Fig.3 Characteristics of growth and development of *S. emodi* in vitro at different stages

同浓度的 NAA 培养基上,随着培养时间的延长,低浓度处理对根的伸长(0.1 mg/mL、0.5 mg/mL)呈现出促进作用,在培养 40 d 后,根长分别为 6.23、6.85 cm,而高浓度处理(1.0、2.0 mg/mL)则呈现出一定程度的抑制作用;添加不同浓度 GA_3 的培养基,随着浓度的增加,总体呈现出促进作用,其中以添加 1.0 mg/mL 效果较好,40 d 后根长为 8.12 cm;添加不同浓度 IBA 的培养基上,其促进根

伸长的趋势与 GA_3 相似,其中以添加 1.0 mg/mL 效果最为显著,1.0 mg/mL IBA 在不同时期(10、15、20、25、30、35、40 d)对继代桃儿七生长与发育的状况见图 5。培养 40 d 后,根长达 11.59 cm。综上所述,在促进继代桃儿七根的生长和发育方面,添加外源激素 IBA 较 GA_3 、NAA 及对照效果显著,其中以添加 1.0 mg/mL 效果最为显著。

3.3 不同部位及不同时期鬼臼毒素量的变化

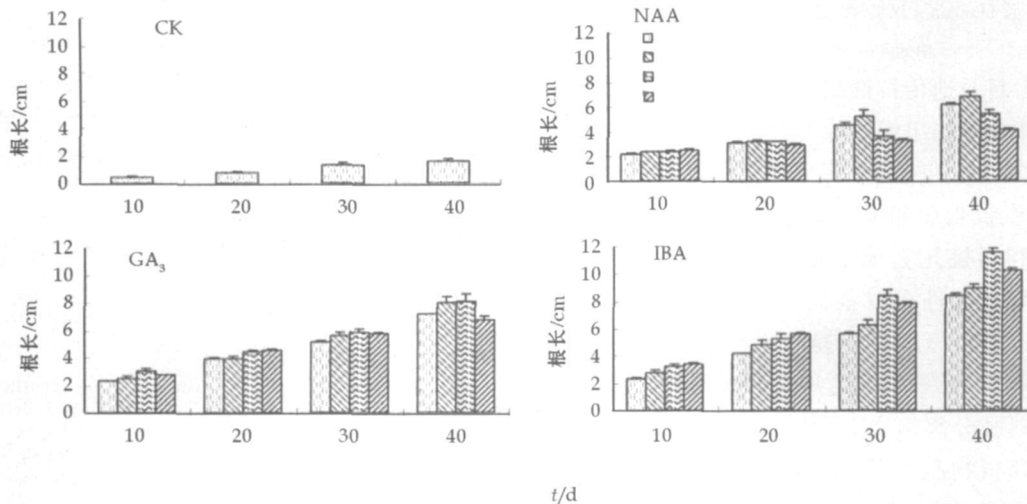


图 4 不同激素对继代桃儿七根长的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of hormones on sub-cultured root length of *S. emodi*



1~7分别为继代桃儿七根 10、15、20、25、30、35、40 d 后生长发育状况

1—7—showed growth and development of sub-cultured *S. emodi* on 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35-, and 40-d-old, respectively

图 5 1.0 mg/mL IBA 对继代桃儿七不同生长时期生长与发育的影响

Fig. 5 Effect of 1.0 mg/mL IBA on growth and development of sub-cultured *S. emodi* at different stages

通过利用 HPLC 法测定继代桃儿七根在 MS+2.0% 蔗糖+0.4% 琼脂+1.0 mg/mL IBA+1.0 g/L AC 培养基中不同生长时期 10、20、30、40、50 d 根、叶(叶柄)及培养基中鬼臼毒素的量,结果见表 1。随着桃儿七的生长发育,其根、叶(叶柄)及其培养基中的鬼臼毒素积累量逐渐增加,鬼臼毒素积累量依次为根>培养基>叶(叶柄);在所测定时期 10~50 d 内,根、叶(叶柄)及其培养基中的鬼臼毒素积累量均逐渐增加,培养 50 d 后,鬼臼毒素的量依次为 33.17、12.97、4.55 μ g/mL。以

上表明,根最有利于次生代谢物质鬼臼毒素的积累;另外,尽管培养基中鬼臼毒素的量显著低于根,但是可以证明根在生长发育过程中也将鬼臼毒素释放到培养基中,这可以在不损伤桃儿七植株的基础上,利用桃儿七继代培养进行鬼臼毒素的提取。

4 讨论

对于桃儿七组织细胞培养等有关方面的研究,国内外已有很多研究报道,但多集中在通过愈伤组织诱导^[10]、细胞悬浮培养等方法提取生物活性物质鬼臼毒素^[11,13],达到解决桃儿七野生资源匮乏的目的。可

表 1 不同生长期桃儿七根、叶 (叶柄) 及培养基中
鬼臼毒素的量

Table 1 Content of podophyllotoxin in root, leaf (leafstalk),
and cultured medium of *S. emodi* at different stages

部 位	鬼臼毒素/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
根	4.22 $\pm$ 0.25 a	7.52 $\pm$ 0.07 a	12.36 $\pm$ 0.23 a	22.90 $\pm$ 0.14 a	33.17 $\pm$ 0.85 a
叶(叶柄)	1.02 $\pm$ 0.14 b	1.63 $\pm$ 0.23 b	3.23 $\pm$ 0.32 c	4.02 $\pm$ 0.22 c	4.55 $\pm$ 0.62 c
培养基	1.31 $\pm$ 0.11 b	3.22 $\pm$ 0.49 b	7.49 $\pm$ 0.22 b	9.81 $\pm$ 0.23 b	12.97 $\pm$ 0.38 b

不同字母表示 Duncan's 试验中的显著性 ($P < 0.05$)

Different letters represent significance at $P < 0.05$ by Duncan's test

能由于桃儿七自身遗传特性或生长条件苛刻等原因, 使得其外植体在愈伤组织诱导、细胞悬浮培养等方面存在着分化难度大、增殖缓慢、易褐化等困难, 目前均未获得增殖快、抗褐化和生长稳定的细胞系。

而通过利用桃儿七成熟胚进行无菌苗的诱导, 在无菌苗的基础上进行根茎的快速增殖, 进而利用根茎及培养液进行鬼臼毒素提取这一途径的研究还未见报道。本研究在前期桃儿七种子休眠特性^[14]和桃儿七成熟胚分离培养^[15]研究的基础上, 通过进一步优化外源植物激素及 AC 的浓度, 结果表明在 1.0 mg/mL GA_3 的基础上, 添加 1.0 g/L AC 最有利于提高无菌苗的诱导率及无菌苗的生长发育, 其诱导率为 92.00%, 并且在培养 45 d 后, 无菌苗基部抱窝鳞茎出能发育出无菌植株。这与 Rekha 等^[16]研究发现的 GA_3 在加速桃儿七栽培植株生长发育方面的结果是一致的; 另外, 由于 AC 在培养过程中能给特定的外植体提供一个比较适宜的环境^[17-18], 这也是桃儿七无菌苗诱导率高、根生长快的又一重要因素。Yang 等^[19]、Berta 等^[20]研究表明 IBA 有益于植株根茎增殖及生长发育, 本实验通过在桃儿七根切除后对根茎进行继代培养, 其中在培养基中以添加 1.0 mg/mL IBA 效果最好, 相对于其他处理更有利于促进桃儿七根的生长和发育, 在继代培养 40 d 后, 其根长可达 11.59 cm, 说明 IBA 在桃儿七根切除创伤后, 对于根茎的继续生长及植株发育是有益的。

通过对桃儿七不同部位、不同培养时期进行鬼臼毒素的提取及 HPLC 法检测, 发现随着桃儿七的生长发育, 其根、叶 (叶柄) 及其培养基中的鬼臼毒素积累量逐渐增加, 培养 50 d 后, 鬼臼毒素的量依次为 33.17、12.97、4.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Uden 等^[21]、Chattopadhyay 等^[11]分别对桃儿七进行细胞悬浮培养, 在培养 15、21 d 后, 其鬼臼毒素的量分别为 24.3、48.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Purohit 等^[22]对桃儿七野生植

株进行鬼臼毒素的提取与检测, 其量在 4% ~ 6%。尽管利用桃儿七组织细胞培养的方法获取鬼臼毒素的量显著低于野生桃儿七植株, 但是相比桃儿七自然条件下发育缓慢、资源匮乏而言, 组织细胞培养具有生长周期短、保护野生资源的优点。

参考文献:

- [1] 刘海军, 徐 艳, 苏国庆, 等. 桃儿七的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 98-100
- [2] 吴 刚, 虞 泓, 崔光芬. 云南桃儿七遗传多样性的 DALL 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 951-955
- [3] 尚明英, 徐国钧, 徐路珊, 等. HPLC 法测定鬼臼类生药中鬼臼木脂素的含量 [J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(4): 219-222
- [4] King L S, Sullivan M. Similarity of podophyllin and colchicine and their use in treatment of condylomata acuminata [J]. Science, 1946, 104: 244-245
- [5] White D J, Dillingham C, Champman S, et al. Podophyllin 0.5% or 2.0% podophyllotoxin 0.5% for the self-treatment of penile warts: A double blind randomized study [J]. Genitourin Med, 1997, 73: 184-187
- [6] 申 金. 鬼臼毒素酊治疗尖锐湿疣临床观察 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(5): 112-113
- [7] Giri A, Narasu M L. Production of podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum*: A potential natural product for clinically useful anticancer drugs [J]. Cytotechnology, 2000, 34: 17-26
- [8] Chen S W, Wang Y H, Jin Y, et al. Synthesis and anti-HIV-1 activities of novel podophyllotoxin derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17: 2091-2095
- [9] Bhadula S K, Singh A, Lata H, et al. Genetic resource of *Podophyllum hexandrum* Royle, an endangered medicinal species from Garhwal Himalaya, India [J]. Plant Gene Resour Newsl, 1996, 106: 26-29
- [10] Kadkade P G. Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum* [J]. Plant Sci Lett, 1982, 25: 107-115
- [11] Chattopadhyay S, Srivastava A K, Bhojwani S S, et al. Development of suspension culture of *Podophyllum hexandrum* for the production of podophyllotoxin [J]. Biotechnol Lett, 2001, 23(24): 2063-2066
- [12] Bush E J, Jones D W. Asymmetric total synthesis of (-)-podophyllotoxin [J]. J Chem Soc Perkin Transactions, 1996, 2: 151-155
- [13] Chattopadhyay S, Mehra R S, Srivastava A K, et al. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60(5): 541-546
- [14] 李城德, 李 唯, 栗孟飞, 等. 濒危植物桃儿七种子休眠特性的研究 [J]. 植物研究, 2008, 28(5): 618-621
- [15] 漆燕玲, 栗孟飞, 孙 萍, 等. 桃儿七成熟胚的离体培养研究 [J]. 生物学报, 2008, 25(4): 39-41
- [16] Rekha K, Subedar P, Sanjoy C, et al. GA_3 induced changes in slow growing endangered Himalayan plant *Podophyllum hexandrum* and hastening of vegetative growth [J]. Plant Growth Regul, 2007, 51: 207-215
- [17] Pan M J, Van Staden J. The use of charcoal in vitro culture—a review [J]. Plant Growth Regul, 1998, 26: 155-163
- [18] Deepak P, Kadambari G, Gautam S, et al. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea* [J]. Plant Cell, Tiss Org Cult, 2008, 93: 269-282
- [19] Yang M J, Xie X M, He X Q, et al. Plant regeneration from phyllode explants of *Acacia crassicaarpa* via organogenesis [J]. Plant Cell, Tiss Org Cult, 2006, 85: 241-245
- [20] Berta E L, Leonardo M J, Nancy M A. Exogenous trehalose affects morphogenesis in vitro of jojoba [J]. Plant Cell, Tiss Org Cult, 2007, 89: 193-201
- [21] Uden W, Pras N, Malingre T M. On the improvement of the podophyllotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1990, 23: 217-224
- [22] Purohit M C, Bahuguna R, Maithani U C, et al. Variation in podophylloresin and podophyllotoxin contents in different populations of *Podophyllum hexandrum* [J]. Curr Sci, 1999, 77: 1078-1080