

# 白木香悬浮培养细胞中 2-(2-苯乙基)色酮化合物的诱导形成

何梦玲<sup>1,2</sup>, 戚树源<sup>2</sup>, 胡兰娟<sup>2</sup>

(1. 广东药学院 中药学院, 广州 510224; 2. 中国科学院 华南植物园, 广州 510650)

**摘要:** 白木香是我国生产沉香的唯一植物资源, 为研究其中次生代谢产物的生物合成, 从国产沉香中分离并鉴定了 4 种已知的 2-(2-苯乙基)色酮化合物, 实验中以此作为标准品, 以白木香根悬浮培养细胞为材料, 黄绿墨耳真菌提取物为诱导子, 首次在组织培养物中成功诱导了 2-(2-苯乙基)色酮化合物的产生, 为研究中药沉香活性成分 2-(2-苯乙基)色酮化合物的生物合成建立了一个试验体系。

**关键词:** 沉香; 黄绿墨耳真菌; 2-(2-苯乙基)色酮; 白木香

**中图分类号:** Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)04-0627-06

## Inducible formation of 2-(2-phenylethyl) chromones in cell suspension culture of *Aquilaria sinensis*

HE Meng-Ling<sup>1,2</sup>, QI Shu-Yuan<sup>2</sup>, HU Lan-Juan<sup>2</sup>

(1. Department of Chinese Traditional Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China;

2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** *Aquilaria sinensis* is the only species of *Aquilaria* in China for agarwood resources and has been recorded as endangered plant since 1992. The present dissertation was undertaken to study the inducible formation of the second metabolites in *A. sinensis*. Four 2-(2-phenylethyl)chromones existed in agarwood were identified. For the first time, fungal extracts of *Menanotus flavolivens* elicited the production of these chromones in cell suspension culture of *A. sinensis*, whereas they were not existing in normal condition. And a cell suspension culture system of *A. sinensis* was established.

**Key words:** agarwood; *Menanotus flavolivens*; 2-(2-phenylethyl) chromone; *Aquilaria sinensis*

白木香(*Aquilaria sinensis*), 又名土沉香, 为瑞香科沉香属植物, 是我国特有的珍贵树种, 也是我国生产沉香的唯一植物资源, 现已被列为国家濒危保护植物(中国科学院植物研究所, 1992)。沉香是我国、日本、印度以及其他东南亚国家的传统名贵药材和名贵的天然香料, 其性辛、苦, 微温, 能行气止痛、温中止呕、纳气平喘(国家药典委员会, 2000)。商业上的巨大利润和非法贸易正导致世界各地的沉香越来越少。

WWF(世界野生生物基金会)和 IUCN(国际自然与自然资源保护联合会)已提出报告, 敦促沉香出口国关注与沉香管理、贸易控制相关的问题, 以保护这种古老并极具经济价值的资源。

2-(2-苯乙基)色酮类化合物是中药沉香的活性成分(杨峻山, 1998)。沉香是由于白木香木材组织受伤或感染真菌形成的。华南植物研究所发现黄绿墨耳真菌(*Menanotus flavolivens*)感染白木香木材伤口

收稿日期: 2005-11-20 修回日期: 2006-08-13

基金项目: 国家自然科学基金(30070066); 广东省自然科学基金(000974); 广东药学院课题(43548008)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070066); Natural Science Foundation of Guangdong Province (000974); Foundation of Guangdong Pharmaceutical University (43548008)]

作者简介: 何梦玲(1975-), 女, 广东梅州人, 博士, 讲师, 主要研究方向: 植物组织培养和次生代谢, (E-mail) hmldf@hotmail.com。

后能加速沉香的形成(广东省植物研究所,1976)。沉香中的化学成分主要有两大类:倍半萜类化合物和色酮类化合物,且健康的白木香木材中未检出色酮化合物。Yoshii 等(1978)首次报道从沉香(*A. agallocha*)中分离和鉴定一个命名为“agarotetrol”的 2-(2-苯乙基)色酮化合物,近 10 年来先后在沉香属植物中发现近 30 种具有 2-(2-苯乙基)结构的色酮类衍生物(Qi, 1995)。Picker 等(1976)从芸香科巨盘木属的一个澳大利亚种(*Flindersia laevicarpa*)的树皮和树叶中、Wang 等(2001)从禾本科的白羊草(*Bothriochloa ischaemum*)中也分离得到这种具有 2-(2-苯乙基)结构的色酮化合物,此外,未见报道其它植物分离到该类化合物,这是一种新结构类型的稀有的色酮类化合物,其合成途径或生源途径未见报道。

本文以白木香根悬浮培养细胞为材料,试验了黄绿墨耳真菌提取物对悬浮培养细胞中色酮化合物的诱导生成作用,为进一步研究 2-(2-苯乙基)色酮化合物在白木香中的生物合成提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 2-(2-苯乙基)色酮化合物的鉴定

参照林立东等(2000)的方法,国产沉香 5 kg 打粉,用 95%乙醇提取,提取液浓缩后,用 5%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液皂化,再用乙醚提取,提取液浓缩后得中性部分浸膏。经反复硅胶层析分离,以石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱和制备 TLC 分离、重结晶。

### 1.2 2-(2-苯乙基)色酮化合物 HPLC 分析方法

配制色酮化合物 1#、2#、3#、4# 的标准甲醇溶液,浓度分别为 0.7、0.6、0.8、0.65 mg/mL,精确量取 10、25、50、100 μL 标准液混合后稀释至 200 μL,浓度较大者自然挥发至干后定容至 200 μL,加上原液共组成 5 个浓度梯度,进样 20 μL,依色谱条件分离,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,重复 3 次。结果表明,四种色酮化合物在此范围内峰高与样品浓度呈良好线性关系。4 个线性回归方程分别为:色酮 1#:  $Y=48.959X-820.55$ ,  $r=0.9974$ ; 色酮 2#:  $Y=55.161X-939.94$ ,  $r=0.9803$ ; 色酮 3#:  $Y=12.494X+28.943$ ,  $r=0.9979$ ; 色酮 4#:  $Y=42.126X+648.54$ ,  $r=0.9983$ 。

精密度的试验:吸取上述标准液 20 μL 依色谱条件进行分析,重复进样 3 次,所得数据进行统计分析后,求得四种色酮化合物的相对标准偏差 RSD 分别

为:4.5%、4.4%、3.3%和 4.6%。

### 1.3 细胞系及培养方法

愈伤组织的诱导:实验室培养的白木香无菌苗,剪取 1~2 cm 长的根,接入愈伤组织诱导培养基 MS+BA0.5+NAA2.0 中,诱导愈伤组织的产生,并在同样的培养基内每 3 周继代一次。诱导得到的愈伤组织系为 A<sub>R</sub> 细胞系。

悬浮培养体系的建立:培养 3~4 代的疏松愈伤组织,取处于对数生长期的长势较好、结构较疏松的细胞接入培养液(为不加琼脂的愈伤组织诱导培养基),建立悬浮培养细胞系,每 10 d 继代一次。

培养条件:500 mL 三角瓶,内加 150 mL 培养液,用无菌培养容器封口膜封口,接种后 120 r/min 摇床上黑暗培养,温度(26±1)℃,继代培养 2 代以上作为种子,试验时接种于装有 80 mL 新鲜培养基的 250 mL 三角瓶中。

生长曲线的测定:将种子细胞接种于 150 mL 三角瓶内,50 mL 培养液/瓶,接种密度为 100 g/L,每 3 d 收获一次;做加真菌的细胞生长曲线时,在细胞培养第 7 天加入无菌的黄绿墨耳真菌提取物(MFFE),其他和一般生长曲线的测定一样,细胞抽滤后在 60℃烘干至恒重,称重,做成生长曲线,实验重复 3 次,取平均值,所有培养均为暗培养(下同)。

### 1.4 真菌的培养及提取液的制备

黄绿墨耳真菌培养:黄绿墨耳真菌购自中国科学院微生物研究所菌种保藏室。菌种于 4℃冰箱中保存,每 2~3 个月继代一次。欲制备提取液的真菌在马铃薯培养液中静置黑暗培养 3 周,温度(26±1)℃。

马铃薯液体培养基:每 1 000 mL 20%马铃薯汁中含葡萄糖 20 g、磷酸二氢钾 3 g、7 水硫酸镁 1.5 g、维生素 B10.06 mg,调整 pH 至 6.0,每 500 mL 三角瓶中分装 80 mL 培养液,高压灭菌锅中 121℃下消毒 20 min。

黄绿墨耳真菌提取液(fungal extracts of *M. flavolivens*, MFFE)的制备:收获的菌丝体经水洗后,在 60℃烘干至恒重,打粉称重,加 5 倍量的蒸馏水 100℃回流 1.5 h,抽滤收集上清,渣再加 3 倍量的蒸馏水 100℃回流 1 h,抽滤,合并两次上清,在水浴上蒸发至干,得到浸膏状真菌提取物,称重。

### 1.5 黄绿墨耳真菌提取液对白木香悬浮培养细胞中 2-(2-苯乙基)色酮化合物的诱导产生

在 A<sub>R</sub> 悬浮细胞培养的第 7 天,加入无菌的 MFFE 进行诱导,于黑暗中继续培养 11 d 收获。收

获得的细胞按图 1 的方法分离提取,取中性部分进行 HPLC 分析和 LC-MS 检测。

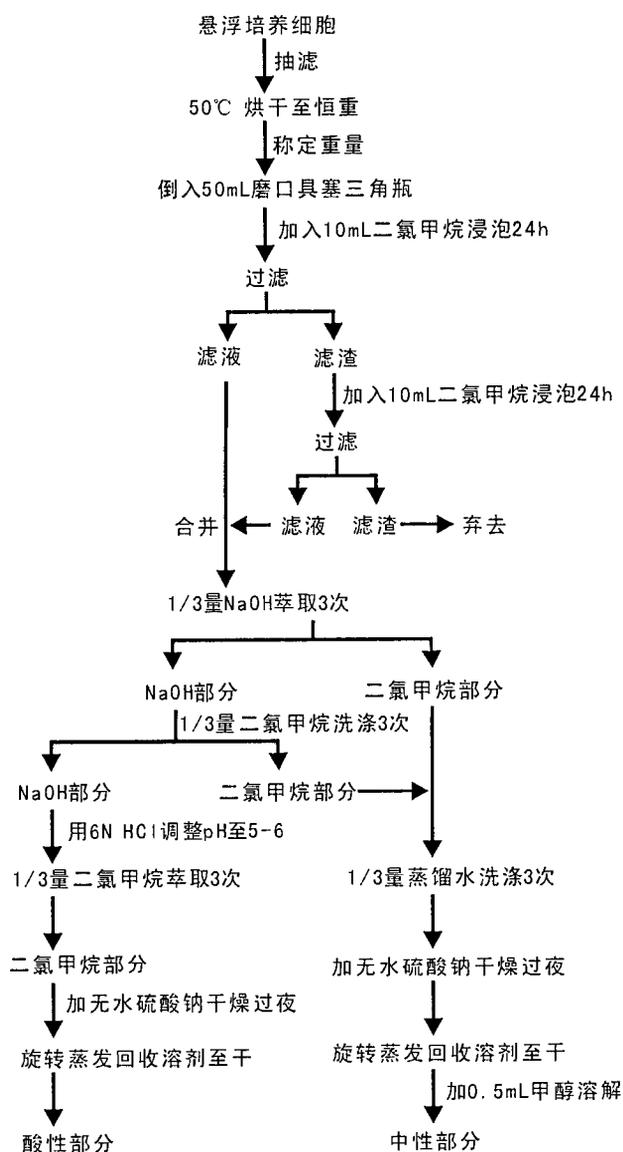


图 1 样品提取方法

Fig. 1 Extractive methods of samples

LC-MS 系统包括 PE200 高效液相色谱仪和 ABI 公司的 API 2000 质谱仪,配置 Turboion Spray 离子源 (ABI), 色谱柱 Nova-Pak (Waters)  $C_{18}$ , 150 mm  $\times$  3.9 mm (i. d.)  $\times$  4  $\mu$ m, 流动相为甲醇:水 (60:40), 流速 0.7 mL/min. 试剂:均为分析纯,色谱为色谱纯。无水硫酸钠在使用前于烘箱中 100  $^{\circ}$ C 下烘 2 h 后使用。

### 1.6 色酮含量的 HPLC 测定

提取溶液均为分析纯;色谱用甲醇为色谱纯,色谱用水为双蒸水。

HP1100 高效液相色谱仪,紫外检测器,色谱柱

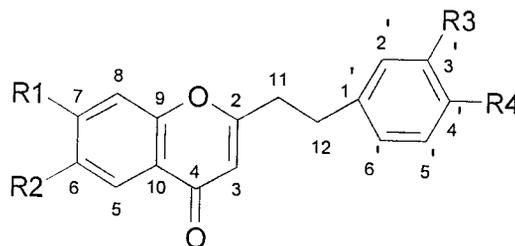
Kromasil- $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, d5  $\mu$ m)。柱温室温,流动相甲醇-四氢呋喃-水 (50:5:55), 流速: 0.8 mL/min, 检测波长 210 nm。

样品测定:将中性部分加入 0.5 mL 甲醇,旋涡混匀器混匀,用滤膜 (孔径 0.25  $\mu$ m) 过滤后备用。每次进样 20  $\mu$ L, 记录峰高。

## 2 结果与讨论

### 2.1 2-(2-苯乙基)色酮化合物的鉴定

得到下列 4 个色酮化合物:色酮 1#:6,7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯)乙基]色酮 ( $R_1=R_2=R_4=OCH_3$ ;  $R_3=H$ ); 色酮 2#:6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 ( $R_1=R_2=OCH_3$ ,  $R_3=R_4=H$ ); 色酮 3#:6-甲氧基-2-[2-(3'-甲氧基苯)乙基]色酮 ( $R_2=R_3=OCH_3$ ,  $R_1=R_4=H$ ); 色酮 4#:6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 ( $R_2=OCH_3$ ,  $R_1=R_3=R_4=H$ )。



它们的  $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR 数据见表 1,其结果与文献一致 (Hashimoto 等, 1985; Nakanishi 等, 1986; 宋振玉, 1997)。

### 2.2 MFFE 对 $A_R$ 细胞生长的影响

真菌诱导子 (fungal elicitor) 是来源于真菌的一种确定的化学信号,在植物与真菌的相互作用中,它们可以快速、高度专一和选择性地诱导植物细胞中特定次生代谢物的形成和积累。由于植物次生代谢物常具有重要的医药和经济价值,近 20 年来,国内外在植物组织和细胞培养中利用不同的真菌诱导子提高目的次生代谢产物产量的研究至今仍是一个热点 (Di-Cosmo 等, 1985; Eilert, 1987; Dixon 等, 1986, 1990; 宁文等, 1993), 如真菌诱导子可促进异黄酮类、萜类和某些生物碱类次生代谢产物的合成 (Eilert, 1987)。

由图 2 看出,未添加 MFFE 的白木香正常悬浮培养细胞中是没有色酮化合物的产生的,这一点和戚树源等在白木香植物上直接实验的结果一致 (戚

树源等,1998,2000)。由图 3 看出,白木香正常悬浮培养细胞的生长曲线呈近似的“S”型。即按逻辑生长模型(Logistic Growth Model)进行增殖生长,此

生长曲线可大致分为 3 个时期:延迟期(0~3 d),指数生长期(3~15 d),静止期(15~18 d)。而在培养第 7 天添加了 MFFE 的细胞生长曲线却有所不同。

表 1 四种色酮化合物 1#、2#、3#、4# 的氢谱和碳谱数据  
Table 1 <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of chromone 1#, 2#, 3#, 4#

碳 Carbon	1#		2#		3#		4#	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
2		169.0		167.4		168.0		169.0
3	6.38,1H(s)	108.5	6.07,1H(s)	109.5	6.23,1H(s)	109.1	6.20,1H(s)	109.2
4		177.3		177.4		178.2		178.2
5	7.52,1H(s)	103.9	7.47,1H(s)	104.2	7.55,1H(d,J=3.0 Hz)	104.7	7.55,1H(d,J=3.0 Hz)	104.7
6		148.2		147.3		157.0		156.9
7		155.6		154.1	7.19,1H(m)	123.9	7.20,1H(m)	124.0
8	7.12,1H(s)	99.6	6.82,1H(s)	99.5	7.38,1H(d,J=9.1 Hz)	119.3	7.38,1H(d,J=9.1 Hz)	119.3
9		153.4		152.4		151.5		151.4
10		117.0		116.9		124.2		124.0
11	2.92,2H(m)	32.3	2.87,2H(dd,J=7.2,8.4 Hz)	35.9	2.95,2H(m)	36.1	2.93,2H(m)	36.1
12	3.00,2H(m)	29.3	3.01,2H(dd,J=7.2,8.4 Hz)	33.0	3.04,2H(m)	33.1	3.04,2H(m)	33.0
1'		131.4		139.7		141.2		139.6
2'	7.10,1H(s)	129.2	7.15~7.28,5H(m)	128.5	7.27,1H(m)	114.1	7.20~7.29,5H(m)	128.6
3'		114.1		128.2		159.8		128.2
4'	6.81~6.83,3H(m)	158.3		126.4	6.74~6.78,3H(m)	111.8		126.6
5'		114.1		128.2		129.7		128.2
6'		129.2		128.5		120.6		128.6
OCH <sub>3</sub>	3.78,3H(s)	55.3	3.92,3H(s)	56.2		55.2	3.89,3H(s)	55.9
OCH <sub>3</sub>	3.98,3H(s)	56.5	3.95,3H(s)	56.3		55.9		
OCH <sub>3</sub>	4.00,3H(s)	56.6						

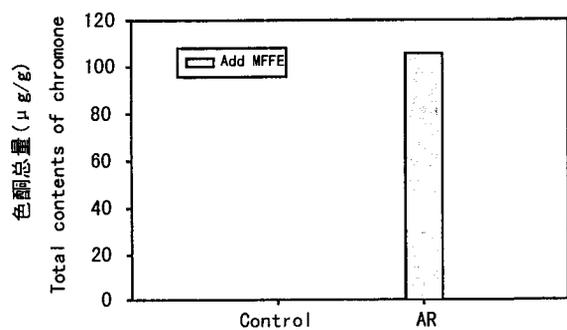


图 2 MFFE 对细胞中色酮化合物产生总量的影响  
Fig. 2 Effects of MFFE on total contents of chromone in cell

从图上看,细胞干重几乎无增殖,说明作为诱导子的 MFFE,对细胞生长有较强的抑制作用。

诱导子能引发植物细胞中次生代谢产物合成关键酶的基因表达(Roberts 等,1997),同时它的加入也会导致细胞生长的抑制和细胞活性的丧失(Wang 等,2001),这一点在我们的研究中也得到了证实。

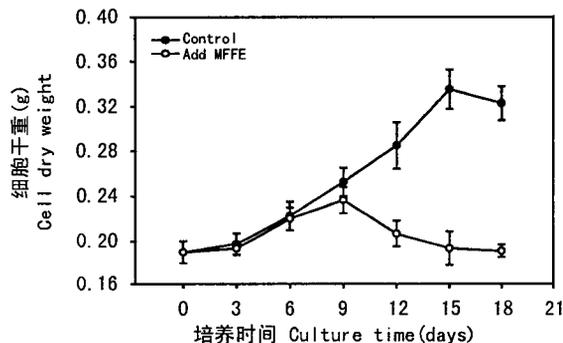


图 3 MFFE 对 AR 细胞生长的影响  
Fig. 3 Effects of MFFE on the growth of AR cell

### 2.3 细胞中 2-(2-苯乙基)色酮化合物的分离鉴定

在加入 MFFE 的培养细胞中分离和检测出了四种色酮化合物,通过 HPLC 分析和 LC-MS 鉴定,这四个色酮化合物与四个标准化化合物的 HPLC 保留值和 LC-MS 的碎片信号(图 4)一致。

药材沉香中存在两种主要的成分——倍半萜类

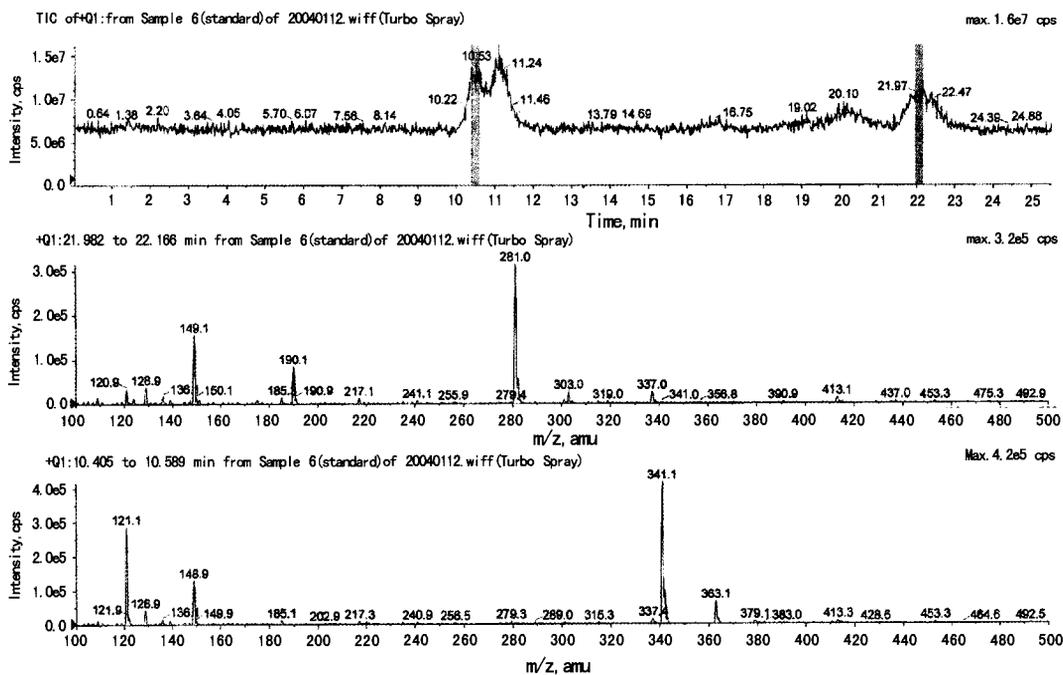


图 4-a 四种标准色酮中 1# 与 4# 的 LC-MS 图谱  
Fig. 4-a LC-MS data of chromone 1# and 4#

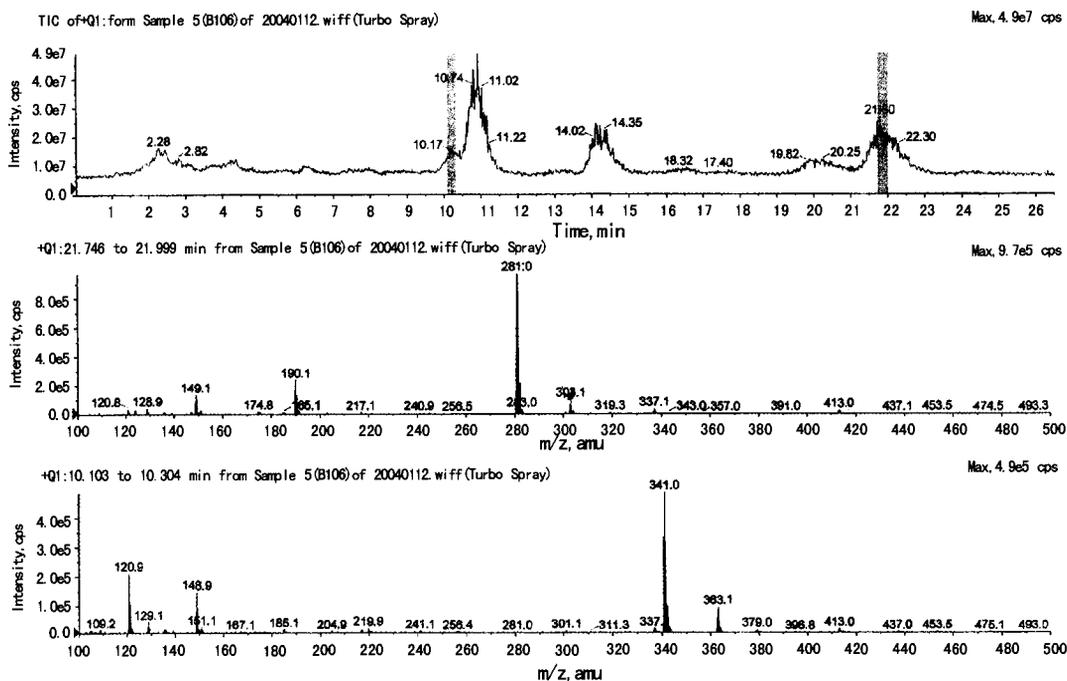


图 4-b 样品中 1# 与 4# 色酮的 LC-MS 图谱  
Fig. 4-b LC-MS data of chromone 1# and 4#

化合物和 2-(2-苯乙基)色酮化合物, 沉香的品质主要由这两类化合物决定。黄绿墨耳真菌是诱导白木香植物产生沉香的真菌, 感染真菌后的白木香植物最先产生的化合物就是此类色酮化合物(戚树源等, 2000), 而健康的白木香木材和未经诱导的悬浮培养

细胞中都不能检测到色酮化合物, 这些结果说明色酮化合物是白木香细胞在逆境状态下重新合成的次生代谢产物, 而且白木香细胞的次生代谢物合成机制与白木香整体植株组织薄壁细胞的次生代谢物合成机制(Yu 等, 1980)是相似的。

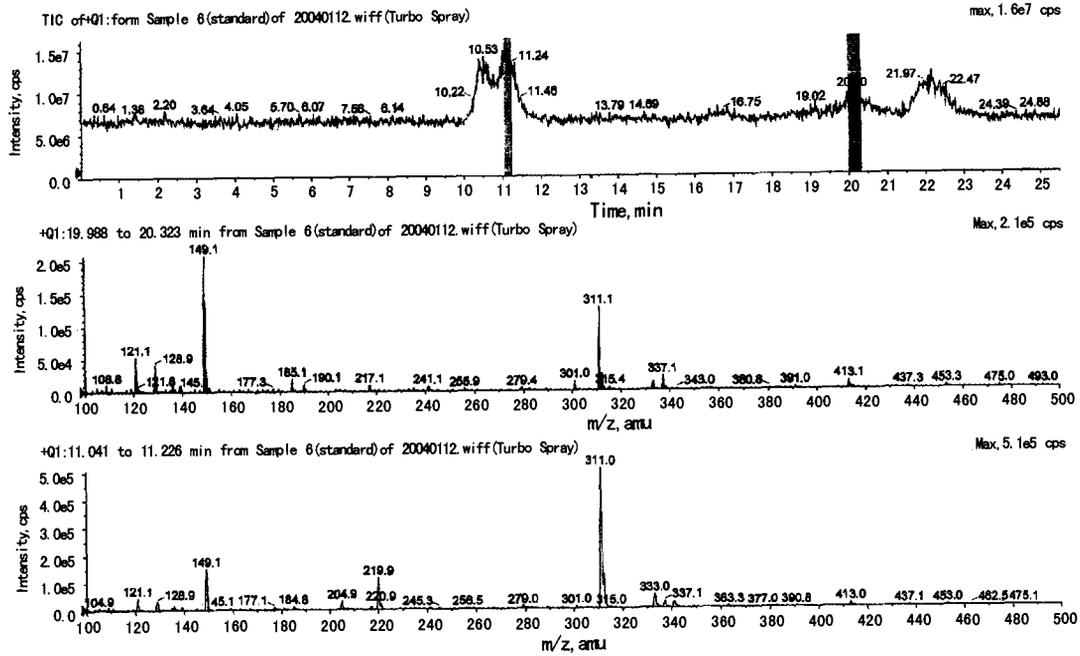


图 4-c 四种标准色酮中 2# 与 3# 的 LC-MS 图谱  
Fig. 4-c LC-MS data of chromone 2# and 3#

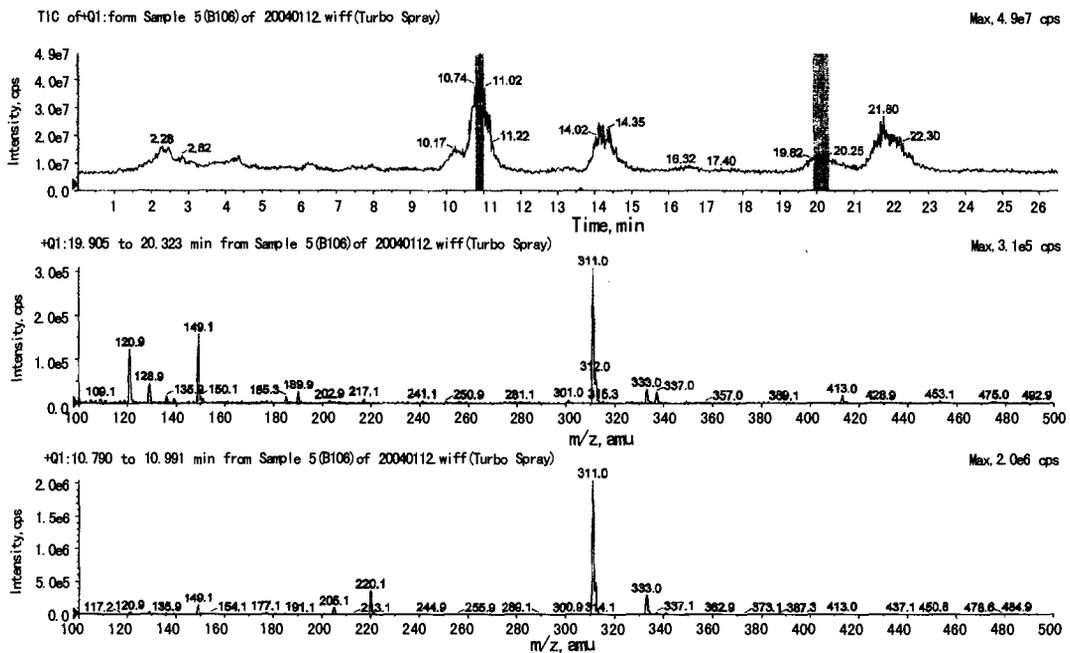


图 4-d 样品中 2# 与 3# 色酮的 LC-MS 图谱  
Fig. 4-d LC-MS data of chromone 2# and 3#

本研究中,黄绿墨耳真菌是从沉香木材中分离出来的,生产实践已经证明这种真菌能诱导沉香的生成,而且到目前为止,还没有任何其他的文献报道此种真菌可以诱导其他代谢物的合成,也没有任何文献报道其他真菌可以诱导沉香的合成。因此就目

前的试验结果来看,我们认为黄绿墨耳真菌可能是专一诱导白木香产生沉香的诱导物。

参考文献:

广东省植物研究所. 1976. 初步揭示沉香结香的秘密[J]. 植物 (下转第 657 页 Continue on page 657)

- Heo J W, Kubota C, Kozai T. 1996. Effects of CO<sub>2</sub> concentration, PPFD and sucrose concentration on *Cymbidium* plantlet growth *in vitro* [J]. *Acta Hort*, **440**:560—565
- Huang LD(黄炼栋), Xu YZ(徐寅泽), Hu ZB(胡之璧). 1998. *In vitro* propagation of *Salvia prionitis* (红根草的离体快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **34**(5):365
- Kartha K K, Mroginski L A, Pahl K K, et al. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L) by *in vitro* culture of shoot apical meristems[J]. *Plant Sci Letters*, **22**:301—307
- Lin LZ, Blasko G, Cordell G A, et al. 1989. The diterpenes of *Salvia prionitis* [J]. *Phytochemistry*, **28**:177—181
- Langford P J, Wainwright H. 1987. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of shoots *in vitro* [J]. *Annals of Botany*, **60**:633—640
- Luo JF(罗吉凤), Cheng ZY(程治英), Long CL(龙春林). 2006. Studies on the rapid propagation and *in vitro* storage of *Dendrobium candidum* (铁皮石斛快速繁殖和离体种质保存的研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **26**(1):69—73
- Shi YZ(史永忠), Pan RC(潘瑞炽), Wang XJ(王小菁), et al. 1999. *In vitro* conservation of germplasm at room temperature in *Dendrobium officinale* (铁皮石斛解种质室温离体保存)[J]. *J South China Normal Univ* (华南师范大学学报), (4):73—77
- Tang FL(唐凤鸾), Li F(李锋), Fu CM(付传明), et al. 2006. Tissue culture and rapid propagation of *Salvia prionitis* (红根草的组织培养与快速繁殖研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **26**(3):282—285
- Wang JF(王家福), Liu YX(刘月学), Lin SQ(林顺权). 2002. A study of the preservation *in vitro* of loquat germplasm II: Effect of plant growth inhibitor (枇杷种质资源的离体保存研究 II 生长抑制剂的影晌)[J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), **31**(4):1—4
- Xu PW(徐培文), Qu SS(曲士松), Liu HY(刘恒英), et al. 2002. A preliminary study on *In vitro* conservation of the garlic germplasm resources in China (中国大蒜种质资源离体保存初步研究)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), **35**(3):314—31
- Yang BJ(杨保津), Huang XL(黄秀兰), Huang Y(黄勇), et al. 1988. Study on the chemical constituents of *Salvia prionitis* (红根草化学成分的研究)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **30**(5):524—527
- Zhao MZ(赵密珍), Diao MN(刁曼妮), Qian YM(钱亚明), et al. 2003. Effect of paclobutrazol on conservation of strawberry germplasm *in vitro* (多效唑对草莓种质离体保存的影响)[J]. *J Plant Genet Res* (植物遗传资源学报), **4**(3):242—244
- Zhao MZ(赵密珍), Wang ZW(王壮伟), Qian YM(钱亚明), et al. 2006. Effects of different media on the conservation *in vitro* of strawberry germplasm (不同培养基对草莓种质离体保存的影响)[J]. *J Fruit Sci* (果树学报), **23**(1):27—30

( 上接第 632 页 Continue from page 632 )

- 学报, **18**(4):287—291
- 中国科学院植物研究所. 1992. 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第 1 册)[M]. 北京: 科学出版社: 670—671
- 宋振玉. 1997. 中草药现代研究(第 3 卷)[M]. 北京: 医科大学中国协和医科大学联合出版社: 1—30
- 国家药典委员会. 2000. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 科学出版社: 146
- 戚树源, 林立东, 胡厚才. 2000. 白木香中色酮类化合物的形成[J]. *中草药*, **31**(9):658—659
- DiCosmo F, Misawa M. 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures[J]. *Trend Biotech*, **3**:318—322
- Dixon RA, Harrison MJ. 1990. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense plants[J]. *Adv Genet*, **28**:165—171
- Dixon RA. 1986. The phytoalexin response: elicitation, signaling and control of host gene expression [J]. *Bio Rev*, **61**:239—245
- Eilert U. 1987. Elicitation: methodology and aspects of application [M]//Constabel F and Vasil IK(eds.) Cell culture and somatic cell genetics of plants. New York: Academic press, **4**:153
- Hashimoto K, Nakahara S, Inoue T, et al. 1985. A new chromone from agarwood and pyrolysis products of chromone derivatives [J]. *Chem Pharm Bull* **33**(11):5 088—5 091
- Lin LD(林立东), Qi SY(戚树源). 2000. Triterpenoid from Chinese eaglewood (*Aquilaria sinensis*) (国产沉香中的三萜成分) [J]. *Chin Trad Herb Drug* (中草药), **31**(2):89—90
- Nakanishi T, Inada A, Nishi M, et al. 1986. A new and a known derivatives of 2-(2-phenylethyl) chromaone from a kind of agarwood ("kanankoh" in Japanese) originating from *Aquilaria agallocha* [J]. *J Nat Product*, **49**(6): 1 106—1 108
- Ning W(宁文), Cao RQ(曹日强). 1993. Regulation of fungi elicitor in plant secondary metabolism (真菌诱导物在植物次生代谢中的调节作用)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **29**(5):321—329
- Picker K, Ritchie E, Taylor WC. 1976. The chemical constituents of Australian *Flindersia* species. X [J]. An examination of the bark and the leaves of *F. laevicarpa* [J]. *Aust J Chem*, **29**:2 023—2 036
- Qi SY. 1995. III *Aquilaria* species: *In vitro* culture and the production of Eaglewood (agarwood) [C]//Bajaj YPS, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Biotechnology in Agriculture and forestry, Medicinal and Aromatic Plant VIII, **33**:36—46
- Roberts SC, Shuler ML. 1997. Large-scale plant cell culture [J]. *Curr Opin Biotech*, **8**:154—159
- Wang CG, Wu JY, Mei XG. 2001. Enhancement of Taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal [J]. *Appl Microbiol Biotech*, **55**:404—410
- Wang T, Li LF, Zhang K, et al. 2001. New 2-(2-phenylethyl) chromones from *Bothriochloa ischaemum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, **3**(2):45—49
- Yang JS(杨峻山). 1998. Review of the chemical constituents isolated from chen-xiang (沉香化学成分的研究概况) [J]. *Nat Pro Res Develop* (天然产物研究与开发), **10**(1):99—103
- Yoshii E, Koizumi T, Oribe T. 1978. The structure of agarotretrol, a novel highly oxygenated chromone from agarwood (Jinko) [J]. *Tetrahedron Letter*, (41):3 921—3 924
- Yu CH, Liang YH. 1980. Anatomical and histochemical studies on oleoresin formation in the wood of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [C]. Fourth Asian Symposium on Medical Plants and Spices-ASOMPS IV, September, 15—19, Bangkok, Thailand