

国槐种胚愈伤组织培养与异黄酮量的分析

溥丽华^{1,2}, 刘忠华^{1*}, 魏振园¹, 王晋飞¹, 董倩倩¹, 范亚丽¹

1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

2. 贵阳市花溪农业局, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 构建国槐 *Sophora japonica* 种胚愈伤组织培养体系, 并对愈伤组织中的异黄酮量进行初步分析。方法 通过添加不同浓度不同种类的植物生长调节剂, 得到国槐种胚愈伤组织诱导、悬浮细胞培养、异黄酮量最高的最佳培养基; 通过对愈伤组织和悬浮细胞在生长中的生长量和异黄酮量进行测定, 得到悬浮细胞最佳收获期。结果 国槐种胚愈伤组织诱导的最佳培养基为 B5+2, 4-D (1.0 mg/L) + 6-BA (0.2 mg/L) + 蔗糖 (20 mg/L)。固体培养基上, 愈伤组织培养 7 d 之后组织进入迅速生长期, 第 35 天, 愈伤组织的生长量达到最高 (鲜质量 7.413 7 g), 但其异黄酮量均无显著变化。悬浮培养中, 愈伤组织培养 24 d 达到最高生长量 (鲜质量 11.563 8 g), 24 d 后进入衰亡期, 继续培养细胞其鲜质量、干质量均呈现下降趋势, 且细胞逐渐变褐, 最终死亡, 其中异黄酮量的变化趋势与生长曲线相反, 在 24 d 达到最低 (4.826 mg/g)。结论 国槐种胚愈伤组织诱导、培养和异黄酮量与植物生长调节剂种类及浓度均具较大关联。

关键词: 国槐种胚; 愈伤组织; 异黄酮; 悬浮培养; 生长曲线

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1984-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.022

Callus culture of embryos in *Sophora japonica* and analysis on isoflavones content

PU Li-hua^{1,2}, LIU Zhong-hua¹, WEI Zhen-yuan¹, WANG Jin-fei¹, DONG Qian-qian¹, FAN Ya-li¹

1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. Guiyang Huaxi Bureau of Agriculture, Guiyang 550025, China

Abstract: **Objective** To establish the callus culturing system of embryos in *Sophora japonica*, and to analyze the contents of isoflavones in callus. **Methods** Through adding the plant growth regulators of different kinds and at different concentration, the optimal media for callus induction, suspension cell culture, and the highest isoflavone content were obtained. **Results** The optimal medium for callus induction of embryos in *S. japonica* was B5 + 2, 4-D (1.0 mg/L) + 6-BA (0.2 mg/L) + sucrose (20 mg/L). In solid medium, the callus was growing rapidly after 7 d, and the yield reached to the highest on the day 35 (fresh weight 7.413 7 g), but the isoflavone content had no significant changes. In suspension culture, the yield of callus reached to the highest on the day 24 (fresh weight 11.563 8 g), and the callus turned into decline phase after 24 d, in which the fresh and dry callus weights were descending. With continuous culture, the cells were browning gradually, aging, and dying at last, but the isoflavone content was opposite to growth curve, and reached its lowest point (4.826 mg/g) on the day 24. **Conclusion** The induction and cultivation of embryos callus in *S. japonica* and the isoflavone content have a larger correlation with the plant growth regulators of the kinds and the concentration.

Key words: embryos in *Sophora japonica*; callus; isoflavones; suspension culture; growth curve

国槐 *Sophora japonica* L. 属于豆科 (Leguminosae) 槐属, 又名豆槐、白槐、细叶槐、为落叶乔木, 其荚果念珠状, 即槐角。我国对槐的应用和栽培有着悠久的历史。最早解释词义专著《尔雅》中就记述有: “槐有数种, 叶大而黑者名榦槐, 昼合夜开者名守宫槐, 叶细而青绿者但谓之槐, 其

功用不言有别……今医家用槐者最多”。槐角作为药用首次载于东汉《神农本草经》, 以后历代本草均有记载。槐角性寒, 味苦, 归肝, 有清热泻火之功效, 用于肠热便血、痔肿出血、肝热头痛、眩晕目赤。由国槐种子 (炒)、黄芩、枳壳、当归、防风、地榆 (炭) 6 味中药合成的槐角丸, 具有清肠疏风、凉血止

收稿日期: 2012-12-25

基金项目: 北京林业大学生物科学与技术学院国家自然科学基金 (J1103516) 资助子项目 (ZD008)

作者简介: 溥丽华 (1986—), 女, 硕士, 研究方向为药用植物及其次生代谢。Tel: (0851)3625082 E-mail: pulh_p@163.com

*通信作者 刘忠华 Tel: (010)62338717 E-mail: liuzh6@bjfu.edu.cn

血的功效;常用于治疗痔疮便血、高血压等疾病^[1]。槐角中含有大量的黄酮类物质,据权硕亨等^[2]研究发现,槐角约含有 29.58 g/kg 异黄酮;魏先华等^[3]的实验也表明,从槐角中可获得高质量分数的槐角异黄酮、槐角黄酮醇和槐角总黄酮。大量研究也表明,黄酮类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、抗菌和调节免疫、防治血管硬化、降血糖、调血脂、降血清胆固醇量等功能^[4-6]。还有许多黄酮类化合物被证明有抗 HIV 病毒活性^[7]。

国槐虽原产于我国,但多用作行道树或庭院树种,且受污染严重。尽管槐角中含有较高量的黄酮类物质,鉴于资源有限以及不断被开发利用,难以满足需求。另一方面,目前大部分研究工作都是从国槐的器官中直接提取黄酮类物质或对其进行分析,权硕亨等^[2]于 2008 年申请了“含异黄酮的槐角提取物的制备方法”的专利;魏先华等^[3]也于 2008 年申请到了“槐角黄酮有效部位、生产方法及其应用”的专利,唐于平等^[8]对国槐果皮中的脂溶性成分进行了分析;刘景东等^[9]人对国槐槐叶不同生长时间总黄酮的量变化进行了研究;吕元琦等^[10]于 2008 年用毛细管电泳法研究了槐角生长过程中黄酮类化合物量的变化;刘海兴等^[11]用毛细管电色谱法测定了槐花、槐角中总黄酮的量。采用国槐槐角中的种胚进行细胞培养生产黄酮类化合物,国外未见报道,国内研究尚少,仅王丽娟等^[12]采用槐米作为外植体,建立了槐米组织培养获得黄酮类化合物的基本条件和最佳激素的浓度配比;袁秀云等^[13]通过组培实验,建立了国槐再生植株的完整体系;张晓英等^[14]以国槐叶片作为外植体,筛选出诱导不定芽分化的最佳培养基,并利用根癌农杆菌介导法建立了国槐高效稳定的再生和基因转化体系;张先云^[15]以国槐枝条为材料,研究了国槐离体培养及再生体系。本实验根据细胞的全能性原理,采用国槐种胚进行细胞培养,建立其愈伤组织培养体系,并对愈伤组织中的异黄酮的量进行初步分析,以期对国槐种胚细胞培养生产次生代谢产物的相关研究提供技术原理和工艺基础。

1 材料

于 2010 年 9 月 20 日,从北京市海淀区颐和园路两旁的行道树国槐上采集试验材料国槐种胚,药材由北京林业大学生物科学学院药用植物学专家刘玉军教授鉴定。槐角苷对照品购自上海同田生物技术有限公司,质量分数大于 98%;2.0%次氯酸钠、乙醇、琼脂等均为分析纯。

高速冷冻离心机(北京五洲东方科技发展有限公司)、电热恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂)、UV—2102C 型紫外可见光分光光度计(北京瑞利科技公司)等。

2 方法

2.1 愈伤组织的诱导与增殖培养

将采集到的生长良好、无病虫害的国槐槐角剥开果皮,取出种子,再剥开种皮,取出子叶和胚,保留有胚的子叶置于烧杯中,洗洁精浸泡 10 min 后,自来水冲洗 3 h。在超净工作台上,采用无菌水漂洗 2~3 次,75.0%乙醇浸泡 30 s,无菌水漂洗 2~3 次,每次 5 min;再用 2.0%次氯酸钠消毒 10 min,无菌水冲洗 3~4 次,每次 10 min。用小刀轻轻地将胚划一个 2 mm 左右的伤口,分别接种于添加 2, 4-D 和 6-BA 不同激素配比(表 1)的 B5 培养基上,先黑暗培养 20 d,再进行光照培养。每个激素配比培养基接 6 块完整胚,5 个重复。诱导 30 d 后进行诱导率的统计和愈伤组织的观察。

表 1 国槐种胚愈伤组织诱导激素配比
Table 1 Different hormone proportion for callus induction of embryos in *S. japonica*

编号	2, 4-D / (mg·L ⁻¹)	6-BA / (mg·L ⁻¹)	编号	2, 4-D / (mg·L ⁻¹)	6-BA / (mg·L ⁻¹)
1	1.0	0.2	5	1.0	0.2
2	1.0	0.5	6	1.0	0.5
3	2.0	0.2	7	2.0	0.2
4	2.0	0.5	8	2.0	0.5

选择色泽鲜黄发亮、松散易碎的种胚愈伤组织 1.0 g 接种在添加 2, 4-D、6-BA 和 NAA 不同激素配比(表 2)的 B5 培养基上,筛选出增殖培养的最佳培养基,再用筛选出的培养基进行培养,每隔 7 d 测定 1 次细胞的鲜质量、干质量、异黄酮量。

愈伤组织的诱导与增殖培养的 pH 值均为 6.05~6.10,培养温度(25±2)℃,光照强度 2 000 lx,每天光照 12 h。

2.2 国槐种胚愈伤组织的悬浮培养

选取在固体培养基上培养的颜色淡黄、质地疏松的国槐种胚愈伤组织 1.0 g 接种于 60 mL 悬浮培养液中,每隔 4 d 分别对细胞的鲜质量、干质量和异黄酮量进行测定。7 d 继代 1 次,培养基为 B5+2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L, pH 值 6.05~6.10,培养温度(25±2)℃,光照强度 2 000

表 2 国槐种胚愈伤组织培养的不同激素配比
Table 2 Different hormone proportion for callus culture of embryos in *S. japonica*

编号	2, 4-D / (mg·L ⁻¹)	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)
1	0.50	0.00	0.05
2	0.50	0.20	0.00
3	0.50	0.50	0.50
4	0.50	1.00	0.10
5	1.00	0.00	0.10
6	1.00	0.20	0.50
7	1.00	0.50	0.00
8	1.00	1.00	0.05
9	2.00	0.00	0.50
10	2.00	0.20	0.10
11	2.00	0.50	0.05
12	2.00	1.00	0.00

lx, 每天光照 10 h, 转速 128 r/min。

2.3 细胞培养物生长量的测定

无菌条件下称取 1.0 g 愈伤组织接种在新鲜的继代培养基上, 每隔 7 d 取出愈伤组织, 称鲜质量, 之后于 65 ℃ 烘至恒质量, 称其干质量。

将培养液倒入放有滤纸的漏斗中抽滤多余的水分, 称其细胞鲜质量, 之后于 65 ℃ 烘至恒质量, 称其干质量。

统计生成愈伤组织的国槐种胚个数, 计算愈伤组织诱导率 (愈伤组织诱导率 = 生成愈伤组织的国槐种胚个数/30)。

采用 SPSS13.0 软件对国槐种子愈伤组织鲜质量和干质量、异黄酮的量进行分析。

2.4 异黄酮的测定

2.4.1 检测波长的确定 称取 2.0 mg 槐角苷对照品, 用 70%乙醇溶解, 定容至 100 mL 量瓶中, 得质量浓度为 0.02 mg/mL 的槐角苷对照品溶液。采用紫外-可见分光光度计在 200~800 nm 对对照品溶液进行扫描。结果槐角苷对照品溶液在 261.5 nm 波长处具有最大吸收, 因此选择 261.5 nm 为异黄酮量的测定波长。

2.4.2 标准曲线的绘制 分别取 1、2、3、4、5 和 6 mL 的槐角苷对照品溶液定容至 10 mL, 分别得到浓度为 2、4、6、8、10 和 12 μg/mL 的槐角苷溶液, 以 70%乙醇为空白溶液。在 261.5 nm 处测定槐角苷吸光度, 采用 SPSS13.0 进行线性回归分析绘制出标准曲线, 槐角苷回归方程为 $Y=7.977X-0.015$, $r=0.9997$ 。

2.4.3 样品中异黄酮的提取与测定 准确称取 0.10 g 烘干的国槐种胚愈伤组织于 10 mL 离心管中, 加入 70%乙醇 6 mL, 放 75 ℃ 的电热恒温水浴锅中浸提 7 h, 取出后以 9 000 r/min 离心 5 min, 取其上清液作为供试样品, 供试样品用 70%乙醇稀释 30 倍后在 261.5 nm 测定其吸光度值。

$$\text{异黄酮的提取量} = 30YV/1\ 000W$$

异黄酮的量以槐角苷计, Y 表示有色溶液中异黄酮的质量浓度 (μg/mL), V 表示提取异黄酮溶液的体积 (mL), W 表示精确称取国槐种胚愈伤组织的质量 (g)

3 结果与分析

3.1 植物生长调节剂对国槐种胚愈伤组织诱导的影响

国槐种胚在添加不同质量浓度不同激素培养基上培养 7 d 后, 鲜绿色种胚逐渐变成淡黄色, 15 d 后种胚伤口边缘有颗粒状的愈伤组织生成。设计的 8 种植物生长调节剂配比均能诱导出愈伤组织, 但诱导率及愈伤组织的形态、质地等明显不同 (表 3)。其中, 2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 组合的诱导率最高, 诱导率为 100.00%, 且通过多重比较, 诱导率与其他处理差异显著, 愈伤组织色泽鲜亮质地疏松呈小颗粒状, 继代后易成活。结果表明, 2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 组合的诱导率最高, 且诱导的愈伤组织性状最佳, 是下一步增殖培养和悬浮培养的最佳材料。

3.2 植物生长调节剂对国槐种胚愈伤组织生长及异黄酮量的影响

将淡黄鲜亮疏松的愈伤组织接种在不同生长调节剂配比的培养基中, 其生长量、色泽、质地和异黄酮量均有差异 (表 4)。愈伤组织在含有 2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基上鲜质量和干质量的生长量均达到最大值, 分别为 3.245 g 和 0.196 g, 并且呈现出淡黄鲜亮、疏松颗粒状的愈伤组织, 但其异黄酮的量不高 (图 1); 愈伤组织虽然在含有 2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的培养基上异黄酮量达到最大值 (图 1), 为 17.347 mg/g, 且和其他 11 种处理差异显著, 但其鲜质量生长量和干质量生长量都相对较小, 并且愈伤组织为褐色大颗粒状, 有的呈块状, 继代后生长较慢, 且容易死亡。通过多重比较, 2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 培养的愈伤组织鲜质量生长量与 2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的培养基培养的愈

表 3 不同植物生长调节剂对国槐种胚愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulators on callus induction of embryos in *S. japonica*

编号	诱导率 / %	愈伤颜色	质地
1	100.00 a	淡黄色、鲜亮	愈伤疏松，较小颗粒状，少部分长有白色絮状毛
2	66.67 e	淡黄色、鲜亮	疏松，小颗粒状，偶见白色絮状毛
3	95.00 b	浅黄色，色泽较暗	疏松，颗粒状
4	87.50 d	浅黄色，色泽较暗	疏松，愈伤数较少
5	91.30 c	淡绿色，较暗	块状
6	90.91 c	绿色，较暗，无光泽	基部块状，顶端疏松
7	15.00 g	淡黄绿色	块状，愈伤较少，诱导率较低
8	50.00 f	褐绿色，较暗	有的块状，有的较大颗粒状

不同字母表示在 0.05 水平差异显著

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$)

表 4 不同激素对比对国槐种胚愈伤组织生长量和异黄酮量的影响

Table 4 Effects of different hormone proportion on callus of embryos in *S. japonica* and isoflavone content

编号	鲜质量 / g	干质量 / g	异黄酮 / (mg·g ⁻¹)	愈伤组织状况
1	0.311 f	0.020 fg	4.903 f	褐色，湿润毛绒状
2	2.177 c	0.104 c	9.507 cde	黄色鲜亮，颗粒状
3	0.596 ef	0.073 ef	11.953 b	褐色，块状，长有白色絮状毛
4	0.236 f	0.018 g	9.928 cd	黄色鲜亮，块状
5	0.171 f	0.043 g	5.190 f	褐色暗淡，疏松毛绒状
6	3.245 a	0.196 a	9.268 de	黄色鲜亮，疏松颗粒状
7	2.668 b	0.147 b	8.875 de	淡黄色鲜亮，疏松颗粒状
8	1.323 d	0.070 d	17.347 a	褐色，暗淡，疏松颗粒状
9	0.240 f	0.010 g	5.238 f	褐色暗淡，疏松毛绒状
10	0.870 e	0.059 e	8.258 e	淡黄色鲜亮，疏松毛绒状
11	2.997 a	0.184 a	10.929 bc	淡黄色鲜亮，疏松颗粒状
12	0.320 f	0.025 fg	9.517 cde	淡黄色鲜亮，小颗粒状，偶见白色絮状毛

不同字母表示在 0.05 水平差异显著

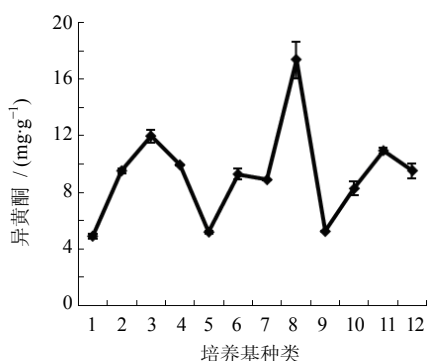
Different letters mean significant difference ($P < 0.05$)

图 1 不同植物生长调节剂对国槐种胚愈伤组织中异黄酮的影响

Fig. 1 Effects of different plant growth regulators on isoflavone content in embryos callus of *S. japonica*

伤干质量生长量差异不显著，但其异黄酮量差异显著，仅次于 2, 4-D 1.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L 的培养基培养出来的愈伤组织。综上所述，将 2, 4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L 作为愈伤组织增殖培养和下一步悬浮培养的最佳培养基。

将疏松颗粒状、生长旺盛的愈伤组织转接到筛选出的增殖培养基上培养 42 d，其生长量呈现 S 型生长曲线（图 2），由图可知，0~7 d 内细胞处于迟滞期，细胞生长缓慢，7~35 d 快速生长，鲜质量从 1.0 g 生长到 7.413 7 g，干质量从 0.082 2 g 生长到 0.587 0 g，培养 35 d 后细胞进入静止期。在该培养体系中，愈伤组织生长量大，质地较好，42 d 后仍呈淡黄鲜亮疏松状态。愈伤组织中的异黄酮在生长过程中

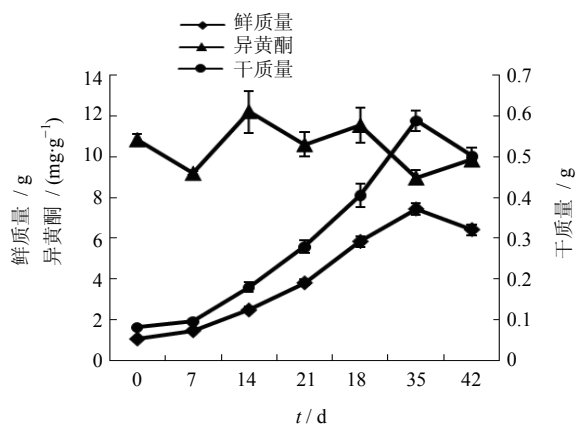


图 2 国槐种胚愈伤组织生长曲线与异黄酮量的关系

Fig. 2 Relationship between growth curves on callus of embryos in *S. japonica* and isoflavone content

均没有显著的变化,也没有特定的规律。

3.3 国槐种胚悬浮细胞培养体系及异黄酮量分析

将淡黄鲜亮疏松的国槐种胚愈伤组织细胞进行悬浮培养,细胞生长呈现 S 型生长趋势(图 3)。细胞经过 4 d 迟滞期之后迅速进入生长期,24 d 达到生长的最高点,其鲜质量、干质量均增长了 10.699、6.714 倍,24 d 后进入静止期,鲜质量的最大生长量为 11.563 8 g;细胞干质量的生长规律与鲜质量类似,4 d 迟滞期后为生长期,24 d 进入静止期,其最大生长量为 0.750 4 g。细胞在悬浮培养中异黄酮的量与悬浮培养的生长曲线相反,开始培养时最高,均为 10.196 mg/g,之后依次下降,24 d 量最低,均为 4.826 mg/g,下降 2.113 倍,之后又慢慢升高。异黄酮的量可能与细胞生长的快慢有关。

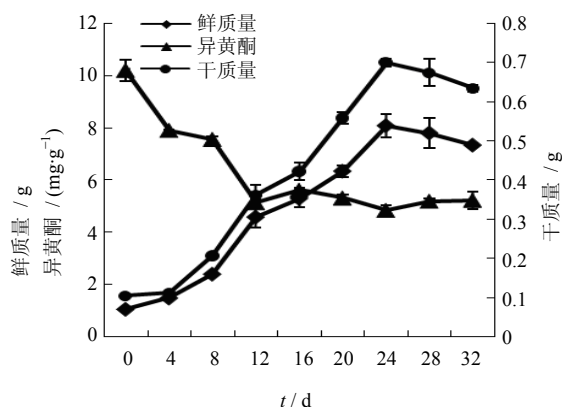


图 3 国槐种胚悬浮细胞培养生长曲线与异黄酮量的关系

Fig. 3 Relationship between growth curves on suspension cell culture of embryos in *S. japonica* and isoflavone content

4 讨论

光照对国槐种胚愈伤组织的诱导有明显的影。研究发现,诱导愈伤时,采用光照条件进行诱导,其得到的愈伤颜色较暗,发褐,有的成块状,且愈伤组织较少,诱导率较低;采用暗培养诱导的愈伤组织,虽然颜色淡黄鲜亮,但是质地较软,并且大部分长有白色絮状绒毛,水分相对较高;采用暗—光培养方式,即先将国槐种胚暗培养 20 d 后,再置于光照条件下,培养出的愈伤淡黄鲜亮,呈疏松小颗粒状。因此,采用暗—光培养的方式得到的国槐槐角愈伤组织最优,方法最佳。

在采用 8 种不同生长调节剂配比组合对国槐种胚愈伤组织诱导中发现,2, 4-D+6-BA 组合诱导的愈伤组织其诱导率平均为 87.29%,其中 2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 组合的诱导率最高,达到 100.00%,且诱导的愈伤组织性状最佳。胡海英等^[16]采用香花槐的叶片作为外植体,在生长调节剂配比与国槐种胚一致时,愈伤组织的诱导率均为 100.00%。实验说明,不同的外植体在生长调节剂一致时,愈伤组织的诱导率有差异,国槐种胚做外植体时对植物生长调节剂的要求比香花槐更为严格。

不同颜色,不同质地的愈伤组织继代培养的效果不同。淡黄鲜亮疏松的愈伤组织继代培养很容易成活,且生长较快;鲜绿较硬呈块状的愈伤组织继代培养虽能成活但生长较慢,并且后期还会有类似芽状体的组织生成;长有白色絮状毛较湿润的愈伤组织继代培养 15 d 后变褐,逐渐老化,不适合做继代培养。因此,在愈伤组织继代培养时,应选用淡黄鲜亮疏松的愈伤组织进行继代培养。这与胡海英等^[16]采用香花槐叶片作外植体诱导出愈伤组织进行继代培养的结果相符。

国槐种胚愈伤组织中的异黄酮量在未添加 6-BA 的培养基中最低,而随着 6-BA 浓度的增加,异黄酮量显著增加,但国槐种胚愈伤组织生长量无显著增加,这一结果表明,6-BA 对国槐种胚愈伤组织的生长促进作用不明显,但是对愈伤组织中的异黄酮量具有明显的促进作用。在添加 2, 4-D 的培养基中,国槐种胚愈伤组织总的生长量及异黄酮量随着 2, 4-D 的增加呈现先增加后下降的趋势,在 1.0 mg/L 2, 4-D 的培养基中,愈伤组织总的生长量及异黄酮量最高,表明适当浓度的 2, 4-D 对国槐种胚愈伤组织生长和异黄酮的生成均具有一定的促进作用。在添加 NAA 的培养基中,愈伤组织中总的异

黄酮在添加 1.0 mg/L 的 NAA 与未添加 NAA 的差异不显著, 这表明 NAA 对愈伤组织中异黄酮量的促进作用不明显。由此可见, 在培养国槐种胚愈伤组织获取异黄酮的过程中, 2, 4-D 和 6-BA 组合较有利于提高愈伤组织的生长量和异黄酮量。

参考文献

- [1] 王丽华, 段玉峰, 丁红军, 等. 槐角丸的研究进展 [J]. 现代生物学进展, 2007, 7(5): 793-795.
- [2] 权硕亨, 皇甫植, 金国焕, 等. 含异黄酮的槐角提取物的制备方法: 韩国, CN200380110595 [P]. 2006-11-08.
- [3] 魏先华, 刘习良, 牛性来, 等. 槐角黄酮有效部位、生产方法及其应用: 中国, CN03156282 [P]. 2004-04-21.
- [4] 唐浩国. 黄酮类化合物研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [5] 龙 春, 高志强, 陈凤鸣, 等. 黄酮类化合物的结构-抗氧化活性关系研究进 [J]. 重庆文理学院学报: 自然科学版, 2006, 5(2): 13-17.
- [6] Allred C D, Ju Y H, Allred K F, *et al.* Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(10): 1667-1673.
- [7] Habtemariam S. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor in L-929 tumor cells [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60(8): 775-778.
- [8] 唐于平, 楼凤昌, 胡 杰, 等. 槐果皮中的脂溶性成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(3): 4-7.
- [9] 刘景东, 王 憬, 刘景惠, 等. 国槐槐叶不同生长时间总黄酮的含量变化的研究 [J]. 黑龙江医药, 2007, 20(5): 417-418.
- [10] 吕元琦, 李玉美, 李辉信, 等. 毛细管电泳法研究槐角生长过程中黄酮类化合物含量变化 [J]. 德州学院学报, 2008, 24(4): 45-48.
- [11] 刘海兴, 刘凤芹, 于爱民, 等. 毛细管电色谱法测定槐花、槐角中总黄酮含量 [J]. 化学试剂, 2006, 28(6): 349-350.
- [12] 王丽娟, 李 峰, 杨建雄. 培养槐米花药、花柱愈伤组织获取黄酮类化合物 [J]. 西安交通大学学报, 2002, 36(3): 328-330.
- [13] 袁秀云, 张先云, 马 杰, 等. 国槐植株再生技术的研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 11418-11419.
- [14] 张晓英, 王华芳, 朱 桢, 等. 国槐离体再生及抗虫基因 *sck* 的转导 [J]. 林业科学, 2006, 42(9): 34-35.
- [15] 张先云. 国槐离体培养及高效再生体系的优化 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(11): 227-230.
- [16] 胡海英, 赵亚美, 阎晓磊, 等. 香花槐愈伤组织的诱导与细胞悬浮培养技术 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 26-30.