

银杏叶愈伤组织和叶中超氧化物歧化酶、 总黄酮类抗氧化活性剂活性的比较分析

胡云虹^{1*}, 彭斌^{1*}, 齐小晴, 刘学群, 余光辉^{**}

(中南民族大学生命科学院, 武汉 430074)

摘要: 以银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶片为外植体进行愈伤组织的诱导和培养,筛选到适合银杏叶片愈伤组织诱导和继代的培养基。以此愈伤组织为研究材料,比较了叶片愈伤组织和叶片中两种活性成分超氧化物歧化酶(SOD)、黄酮的活性差异。结果表明,银杏叶片愈伤组织中SOD的活性明显比叶片中的SOD活性高,同时愈伤组织中SOD同工酶谱带也比叶中有更多表达,但愈伤组织中总黄酮含量却比叶片中的含量低。实验证实SOD和黄酮类物质具有清除超氧阴离子的作用,表明银杏叶片愈伤组织和叶片中具有不同的占主导作用的抗氧化活性的机制。

关键词: 银杏; 超氧化物歧化酶(SOD); 黄酮; 自由基

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2010)04-0521-06

Comparative Assay of Superoxide Dismutase and Total Flavone Antioxidant Activities in Leaf-Callus and Leaves of *Ginkgo biloba* L.

HU Yun-Hong^{1*}, PENG Bin^{1*}, QI Xiao-Qing, LIU Xue-Qun, YU Guang-Hui^{**}

(College of Life Science, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract: Optimum media for *Ginkgo biloba* L. leaf callus induction and successive transfer culture were investigated. Callus that arose from *Ginkgo* leaf explants was used as the research materials, and two varieties of active integrants, superoxide dismutase (SOD) and total flavones, were compared between leaves and its callus. The results demonstrated that SOD activity in callus was markedly higher than that in leaves, as were SOD isoenzymes. However, the content of flavones in callus was lower than that in leaves. The fact that SODs and flavones can scavenge the production of superoxide anion indicated that different predominant mechanisms were used to resist free radicals in *Ginkgo* callus and leaves.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; Superoxide Dismutase (SOD); Flavonoids; Free radical

银杏(*Ginkgo biloba* L.)原产中国,是当今世界上最古老的孑遗植物,素有植物王国的“活化石”之称。银杏由于具有重要的药用价值而被学者广泛研究。研究表明,银杏叶中含有许多生理活性成分,包括黄酮类化合物和银杏内酯等成分,银杏叶提取物和活性成分具有改善血液循环、抗心肌缺血再灌注损伤及保护肝组织正常的自由基代谢等功效^[1]。银杏叶提取物及其制剂在国际市场上供不应求。近

几年来,以银杏叶加工为主的银杏产业在我国得到了迅速发展,然而,银杏的大面积栽培占用了大量耕地,因此利用细胞培养进行黄酮的工业化生产,是银杏研究领域的重要研究方向^[2]。利用细胞培养和组织培养技术进行银杏天然活性成分的提取和加工,具有减少用地、不受季节控制、可规模化生产的优势。在组织培养过程中,天然活性产物的产量在很大程度上受到培养条件、培养时间、激素水平和外

收稿日期: 2009-08-27; 2009-10-28。

基金项目: 中南民族大学大学生创新创业基金重点项目(KYCX100003E); 中南民族大学植物发育遗传学术团队课题资助。

作者简介: 胡云虹(1988-),女,彭斌(1988-),女,均为中南民族大学生命科学院2007级生物技术专业本科生;余光辉(1972-),男,副教授,博士,研究方向为植物发育生物学。

* 同为第一作者。

** 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yusheen@163.com)。

源添加物等的影响^[3]。在银杏组织培养中,如何优化培养条件以达到天然活性成分产量最优化的研究具有重要的意义^[4]。本实验首先以银杏叶为外植体进行愈伤组织的诱导,然后分析比较叶愈伤组织和叶片中两种天然活性成分——超氧化物歧化酶(SOD)、总黄酮的活性和含量的差异,希望为这两种天然活性成分的生产提供有益的参考。

SOD是有机体清除活性氧反应中第一个发挥作用的抗氧化酶,能将超氧阴离子自由基 O_2^- 快速歧化为过氧化氢(H_2O_2)和分子氧;因此,SOD对于清除氧自由基,防止氧自由基破坏细胞的组成、结构和功能,保护细胞免受氧化损伤具有十分重要的作用^[5]。植物来源的SOD提取和应用,可使其成为补偿人体自由基抗氧化系统的保健品。此外,植物中提取的许多天然产物都具有清除自由基的能力,其中黄酮类化合物是活性较强的一类。黄酮类化合物因其广谱的药理作用引人瞩目,已成为当今众多学者研究的热点之一^[6]。我们以SOD和黄酮对超氧阴离子的清除作用为研究对象,比较了银杏叶片愈伤组织和叶片提取物中两类活性成分在活性氧清除中的作用,并分析和探讨了这种差异的可能机制。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织诱导

银杏(*Ginkgo biloba* L.)幼嫩枝条采于中南民族大学生命科学院植物园。选取幼嫩枝条上的叶片为外植体,用蒸馏水清洗,75%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3~4次;然后用0.5%次氯酸钠浸泡15 min,无菌水反复冲洗5~7次,将叶片切成小块,分别接种到含不同激素浓度的培养基中进行愈伤组织的诱导和培养基筛选,不同激素的浓度配比用正交实验法设计。实验所用培养基共6种, M_1 : MS+NAA 1(mg/L下同)+6-BA 1+3%蔗糖; M_2 : MS+NAA 1+6-BA 2+3%蔗糖; M_3 : MS+NAA 1+6-BA 3+3%蔗糖; M_4 : MS+NAA 1+2,4-D 1+3%蔗糖; M_5 : MS+NAA 1+2,4-D 2+3%蔗糖; M_6 : MS+NAA 1+2,4-D 3+3%蔗糖;培养条件为26℃黑暗培养。

将诱导出的质地松软、生长情况良好的叶片愈伤组织进行继代培养。选取继代50 d的愈伤组织进行SOD和黄酮活性成分的提取。

1.2 SOD的提取

分别取银杏叶片与银杏叶片愈伤组织0.3 g,加入聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)0.05 g,在液氮中研磨成粉末,然后将冰冻的粉末转入液氮预冷的1.5 mL离心管中,加入50 mmol/L的磷酸缓冲液(pH 7.8)1 mL,再加入3 μ L蛋白酶抑制剂(P9599, Sigma),充分混匀。然后4℃ 12000 r/min离心1 h,取上清液,即为蛋白粗提取液,4℃下保存备用。以系列浓度牛血清白蛋白(BSA)为标准品,测定215 nm和225 nm的吸收值制作标准曲线以测定提取蛋白浓度。

1.3 SOD活性和同工酶检测

SOD酶活性的测定采用SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行测定。一个酶活力单位定义为:以每分钟反应液中黄嘌呤氧化抑制率达50%时所对应的蛋白量为一个活力单位(U)。SOD同工酶的测定以4%~20%聚丙烯酰胺活性凝胶电泳进行分离。SOD同工酶的谱带染色采用硝基氮蓝四唑(NBT)活性染色法^[7,8]。

1.4 黄酮提取和含量测定

银杏叶片和叶片愈伤组织中黄酮的提取按照文献[9]的方法提取,其含量测定比照槲皮素标准品在256 nm的吸收值绘制的标准曲线计算。超氧阴离子的产生以SOD试剂盒中的嘌呤氧化酶产生,黄酮对超氧阴离子的清除作用以其与对照管在550 nm下吸收值的下降幅度来衡量。

2 实验结果

2.1 银杏叶片愈伤组织培养基的筛选和优化

在愈伤组织诱导培养基筛选中,采用NAA和6-BA、2,4-D激素的配比组合。NAA的浓度为1 mg/L,6-BA和2,4-D的浓度分别设定为1、2、3 mg/L 3种浓度。在6种培养基中, M_2 (MS+NAA 1+6-BA 2+3%蔗糖); M_3 (MS+NAA 1+6-BA 3+3%蔗糖)和 M_4 (MS+NAA 1+2,4-D 1+3%蔗糖)3种培养基能够有效地诱导银杏叶片愈伤组织的生成,诱导率分别为98%、75%和67%(图1)。而 M_1 (MS+NAA 1+6-BA 1+3%蔗糖)、 M_5 (MS+NAA 1+2,4-D 2+3%蔗糖)和 M_6 (MS+NAA 1+2,4-D 3+3%蔗糖)3种培养基不能诱导愈伤组织的生成,其诱导率在0.5%左右。实验结果表明,在NAA浓度(1 mg/L)固定的情况下,过低的

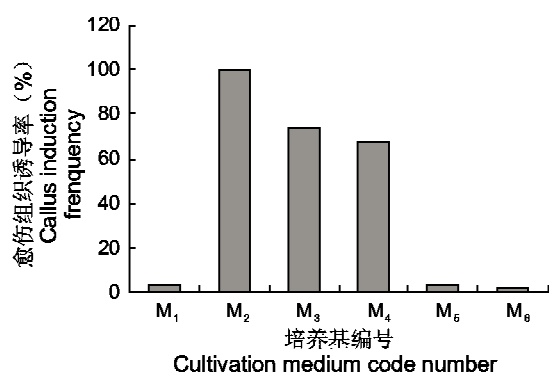


图1 不同激素水平对银杏愈伤组织诱导的影响

Fig.1 Different effect of hormone concentration on *Ginkgo biloba* L. callus induction

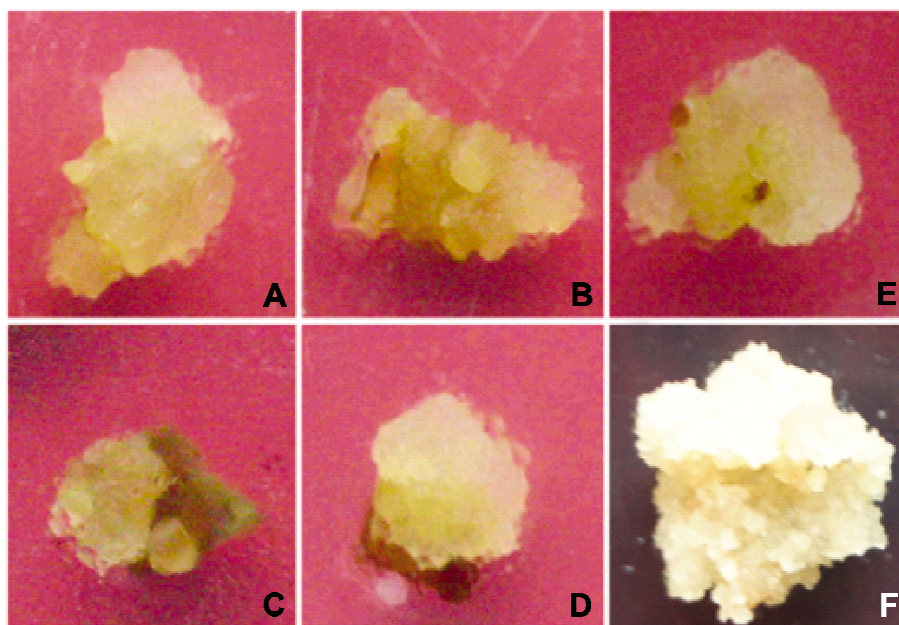
6-BA 浓度 (1 mg/L) 和过高的 2,4-D 浓度 (大于 2 mg/L) 都不能有效诱导银杏叶片愈伤组织的生成。

在愈伤组织诱导培养过程中,发现生长在 M₂ 和 M₃ 培养基的愈伤组织团块体积大,颜色黄绿透明,质地松软(图 2: A, B);而生长在 M₁ 培养基上的愈伤组织颜色黄绿透明,但是团块体积小,生长缓慢(图 2: C, D);生长在 M₄ 培养基上的愈伤组织团块体积大,颜色浅黄,质地松软(图 2: E)。实验结果表明,M₂ 和 M₃ 两种培养基虽然对愈伤组织的诱导率较高,但愈伤组织的生长状况并不理想;M₄

培养基的诱导率虽然相对较低,但愈伤组织生长情况良好,经继代培养,愈伤组织结构疏松,颜色为乳白色(图 2: F)。根据研究结果,我们以 M₄ (MS + NAA 1 + 2,4-D 1 + 3% 蔗糖) 培养基作为银杏叶片愈伤组织诱导和继代的培养基。实验结果表明,在 NAA 浓度 (1 mg/L) 固定的情况下,低浓度的 2,4-D 浓度 (1 mg/L) 比高浓度的 6-BA 浓度 (大于 2 mg/L) 更有利于银杏叶片愈伤组织的生长和维持。

2.2 愈伤组织中 SOD 活性和叶片中 SOD 活性比较

为评估组织培养中的活性物质和自然生长条件下活性物质的差异,我们比较了银杏叶片愈伤组织和叶片中超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性。结果表明,银杏愈伤组织中 SOD 的活性明显高于叶片提取物中 SOD 的活性 (高出 25.3 个活力单位),二者的差异达到显著差异水平 ($p < 0.05$) (图 3: A)。为探讨这一差异的原因,我们用硝基氮蓝四唑对活性梯度凝胶电泳中的 SOD 同工酶进行染色。结果表明,在银杏叶片愈伤组织中检测到 10 条 SOD 同工酶的谱带,而在叶片中检测到 5 条 SOD 同工酶谱带(图 3: B)。从凝胶电泳的方向 (见图 3: B 中负极到正极箭头线标示),叶片中明亮的两个 SOD 同工酶 (见图 3: B 中黑色三角标示) 的迁移率较高,

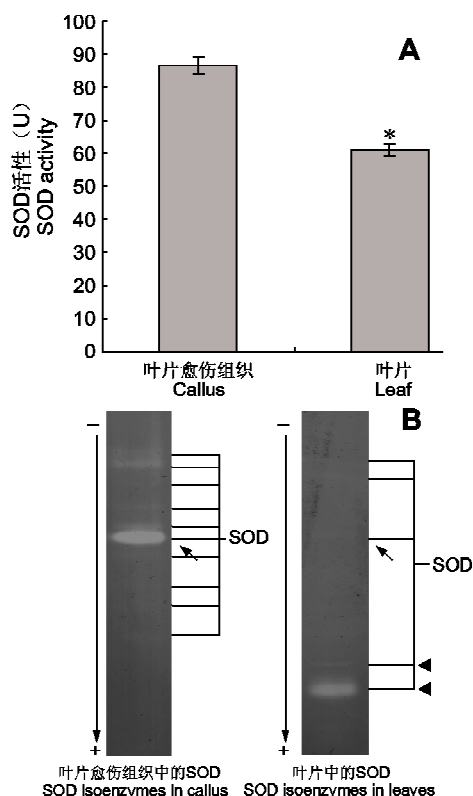


A: M₂ 培养基; B: M₃ 培养基; C, D: M₁ 培养基; E: M₄ 培养基; F: M₄ 培养基继代培养

A: M₂ culture medium; B: M₃ culture medium; C, D: M₁ culture medium; E: M₄ culture medium; F: Callus subculture on M₄ culture medium

图2 生长在不同培养基上的银杏愈伤组织

Fig.2 The callus of *Ginkgo biloba* L. grown on different media



A: 银杏叶片愈伤组织和叶片中 SOD 活性比较, 为 3 次实验重复, * 表示差异显著水平 ($p < 0.05$); B: 银杏叶片愈伤组织和叶片中 SOD 同工酶检测。负极 (-) 到正极 (+) 的箭头线表示电泳方向; 横线表示 SOD 同工酶的条带; 黑色三角形表示快速泳动的 SOD 同工酶; 黑色箭头表示慢速泳动的 SOD 同工酶。

A: SOD activity comparison in the leaf-callus and leaves of *Ginkgo biloba* L. Data represents triplicate means $\pm$ SE. * denotes significant difference ($p < 0.05$); B: SOD isoenzymes detection in the leaf-callus and leaves of *Ginkgo biloba* L. The direction of electrophoresis is marked by an arrow head from cathode (-) to anode (+); SOD isoenzymes are indicated by horizontal lines; the black triangle denotes the fast mobilizable SOD isoenzymes, and the black arrow indicates the slow mobilizable SOD isoenzymes.

图 3 银杏叶片愈伤组织和叶片中 SOD 的活性分析和同工酶检测

Fig. 3 Comparison assay of SOD activity and isoenzymes in the leaf-callus and leaves of *Ginkgo biloba* L.

表明叶片中这两个 SOD 同工酶具有较小的分子量, 其中一个 SOD 同工酶的表达量最高; 叶片中分子量较大的 SOD 同工酶谱带较叶片愈伤组织的弱, 表明这些分子量较大的 SOD 同工酶在叶片中的表达量较低。在银杏叶片愈伤组织 SOD 同工酶中, 检测到一个表达量最高的 SOD 同工酶, 其谱带活性明显高于叶片中与其对应的谱带活性 (图 3: B, 箭头所示)。实验结果表明, 在银杏叶片愈伤组

织和叶片中, SOD 同工酶具有不同的表达模式。

2.3 叶片中黄酮的含量高于叶片愈伤组织中的含量

为进一步分析银杏叶片愈伤组织和叶片中活性成分的差异, 我们以水提法提取了叶片愈伤组织和叶片中总黄酮, 并用槲皮素标准作对照, 测定了总黄酮的含量。结果表明, 每克干重材料中, 叶片愈伤组织中的黄酮含量为 13.2 mg, 而叶片中黄酮的含量为 41.07 mg, 二者的差异呈现极显著差异水平 ($p < 0.01$) (图 4)。这一结果表明叶片中的黄酮含量明显高于叶片愈伤组织中的黄酮含量。

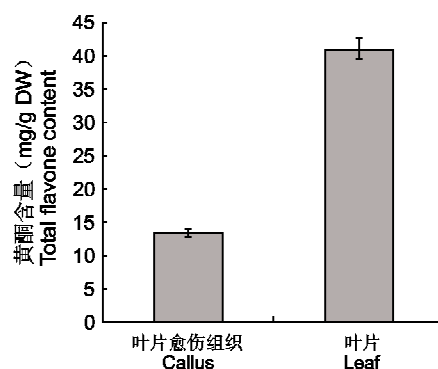


图 4 银杏叶片愈伤组织和叶片中总黄酮含量的比较 (为 3 次实验重复)

Fig. 4 Content comparison of total flavone in callus and leaves (data represents triplicate means $\pm$ SE)

2.4 黄酮具有清除超氧阴离子的作用

为探讨银杏叶片中黄酮的作用, 我们以黄嘌呤氧化法产生超氧阴离子 (O_2^-)。在超氧阴离子产生体系中, 生成的 O_2^- 氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 550 nm 具有最大光吸收值。在反应体系中, 加入不同体积的叶片黄酮提取物, 并观察和记录光吸收值的变化。结果表明, 对照管的吸收值高于含有黄酮的测试管, 并且随着黄酮含量的增高, 吸收值呈现明显的降低趋势。以对照管为参比, 计算加入黄酮的相对抑制率。结果表明, 黄酮的加入明显抑制了超氧阴离子的产生, 且随着黄酮含量的增高, 抑制率也明显增加 (图 5)。在加入 60 μ L 银杏叶黄酮提取物的情况下, 超氧阴离子产生的抑制率达 80% 以上。这一结果表明, 黄酮可以有效抑制或清除超氧阴离子的产生。

3 讨论

3.1 不同激素水平对银杏叶片愈伤组织的诱导效果

植物激素是影响植物组织培养的关键因素, 不

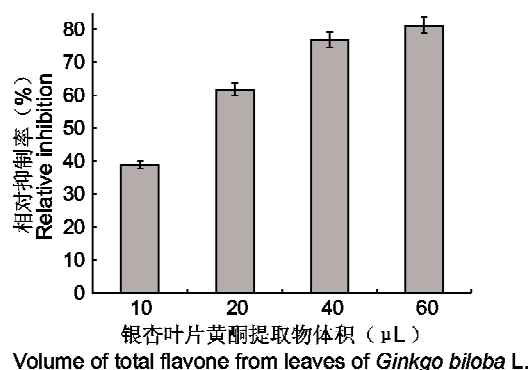


图5 总黄酮对超氧阴离子产生的抑制作用
(为3次实验重复)

Fig.5 Inhibition of total flavone on the production of superoxide anion (data represents triplicate means $\pm$ SE)

同的激素水平会调控植物分化和去分化的过程^[10]。同时不同部位、不同生理阶段的外植体对激素刺激信号的反应类型和敏感程度是不同的,这可能主要取决于外植体本身的内源激素水平,因为外源激素最终是通过内源激素水平的调整变化起作用的^[11]。在本实验中,我们采用正交实验来设计银杏叶片愈伤组织的诱导培养基,成功地筛选到了银杏叶片可以诱导和继代培养的培养基。实验中我们发现在NAA浓度固定的情况下,较高浓度的6-BA(大于2 mg/L)有利于愈伤组织的诱导,但不利于愈伤组织的继代培养。在愈伤组织的诱导和继代培养中,2,4-D的浓度也很关键,在高浓度(大于2 mg/L)情况下,不利于银杏叶片愈伤组织的诱导,大于2 mg/L浓度可能抑制了叶片细胞的去分化状态;在2,4-D浓度为1 mg/L的情况下,有利于愈伤组织的诱导和继代培养。前人以N₆培养基进行愈伤组织的培养和诱导,认为N₆培养基营养配方比MS培养基更适合银杏愈伤组织生长^[12]。他们认为,在诱导和继代培养两个阶段,激素组合以NAA和6-BA组合最好;在N₆+NAA 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L培养基上诱导快,愈伤组织的质地好、颜色好、活力强,有利于进一步组织培养^[12]。也有用MS作为培养基研究不同激素比对愈伤组织诱导的影响,认为MS+NAA 1 mg/L+6-BA 3.0 mg/L效果最好,并选择其作为继代培养基^[13]。但我们在研究中发现过高浓度的6-BA不利于愈伤组织的继代。在本实验中,我们以2,4-D取代6-BA既有利于愈伤组织的诱导又有利于愈伤组织的继代培养。

3.2 激素可能是影响SOD同工酶表达的信号

植物体内的SOD是植物清除活性氧(ROS)的重要系统。在愈伤组织培养中SOD的活性明显高于叶片中的SOD活性,并且呈现更多的SOD同工酶的表达。这可能是愈伤组织中SOD的活性比叶片中SOD活性高的原因所在。愈伤组织中SOD活性高的原因尚不清楚,有可能与激素的诱导有关。已有报道认为,生长素的处理可以引起SOD的表达差异,可以促进SOD同工酶的表达^[14]。Tyburski等的研究表明,外源生长素的处理能够影响番茄幼苗根Cu/Zn SOD的活性^[15]。因此,银杏叶片愈伤组织中有更多的SOD同工酶的存在,可能与培养基中存在的生长素有关。这一有趣的问题值得深入研究。前人的研究虽然分析了银杏叶片中SOD同工酶的活性,但未能确定SOD同工酶的种类^[16]。我们的研究中明确检测到叶片中和叶片愈伤组织中SOD同工酶的差异,为进一步研究SOD同工酶的种类提供了有益的参考。

3.3 不同培养方式对黄酮类化合物产量的影响

在本实验中,叶片中的黄酮含量明显高于叶片愈伤组织中的黄酮含量。这可能与黄酮合成的前提物质在叶片光照条件下有更多积累有关。研究表明,黄酮类化合物的质量分数与细胞的叶绿体分化呈正相关^[17]。因此,在进行银杏组织培养中,应根据培养目的,比如是为了更多地得到黄酮类活性物质还是SOD等等,采用有效的培养手段以得到更多的目的活性产物。研究表明,银杏叶片愈伤组织的黄酮含量受限于外植体的种类(如叶、茎、胚、胚乳等)、培养条件(如蔗糖和激素含量)、培养方式(是固体还是悬浮培养等)等^[2-4,18]。倪静静等的研究表明,以离体胚为外植体进行愈伤组织的诱导和培养获得的黄酮类化合物含量最高,占植物鲜重的0.13%,而叶片愈伤组织中黄酮类化合物含量为0.06%^[13]。本实验以干重计算,叶来源愈伤组织中黄酮类含量达到4.2%。远高于前人用胚和胚乳诱导的外植体的黄酮类化合物含量的结果^[13,19],其可能原因是由于提取方法的差异造成的。

在银杏叶片愈伤组织培养中一个不可忽视的问题是愈伤组织的褐化问题。前人的研究在培养系统中加入植酸或其它的抗氧化剂可以减缓或降低愈伤组织的褐化率^[20,21]。我们在本培养体系中加入0.05%的活性碳也起到很好的抑制褐化的目的。此外,培养体

系中活性碳还可以促进黄酮含量的积累^[19]。

3.4 银杏可能动用不同的防御系统来清除自由基的毒害

在本研究中,我们还证实了黄酮类物质具有清除活性氧的作用。研究表明,黄酮类物质之所以能够清除自由基,与其分子苯环结构上的酚羟基有关。酚羟基在黄酮类化合物清除自由基时起到供氢和稳定自由基中间体的作用,并可以与金属离子络合^[22]。本实验中,银杏叶片中的黄酮含量明显高于叶片愈伤组织中的黄酮含量。从自由基清除的角度来讲,叶片中较高的黄酮含量似乎弥补了叶片中SOD活性低和SOD同工酶表达量低的不足。二者之间是否存在着代谢途径上的相关性尚不清楚。这一结果表明,植物在不同的生长条件下可以灵活运用其自身的防御系统来对抗自由基的攻击,同时也表明植物在进化过程中演化出多种防御系统以维护物种的繁衍和生存。

参考文献:

- [1] 马东晓. 银杏叶提取物的抗氧化功能[J]. 中国临床康复, 2004, 8 (27): 5814-5820.
- [2] 陈学森, 邓秀新, 章文才. 培养基及培养条件对银杏愈伤组织黄酮产量的影响[J]. 园艺学报, 1997, 24 (4): 373-377.
- [3] 郭长禄, 徐仲, 戴正, 何新华, 陈力耕, 解秋菊, 李艳召. 银杏组织培养生产黄酮、内酯的研究[J]. 生物技术, 2006, 16(4): 91-93.
- [4] 于荣敏, 高越, 宋丽艳, 张德志, 叶文才, 姚新生. 银杏细胞固定化培养及银杏内酯的产生[J]. 云南植物研究, 2004, 26(3): 338-344.
- [5] 汪本勤. 植物SOD的研究进展[J]. 河北农业科学, 2008, 12 (3): 6-9, 12.
- [6] 张海凤, 张绍良, 张春雷, 孟庆华. 具抗自由基与紫外防护功效黄酮类化合物的研究进展[J]. 日用化学工业, 2008, 38(1): 54-57.
- [7] 罗广华, 王爱国. 植物SOD的凝胶电泳及活性的显示[J]. 植物生理学通讯, 1983, 6: 44-45.
- [8] 罗广华, 王爱国, 付爱根. 鉴别超氧化物歧化酶类型的定位染色法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(4): 356-359.
- [9] 戴余军, 江德安. 银杏叶总黄酮水浸提法的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (1): 20-21, 25.
- [10] 王小菁, 李玲. 植物生长调节剂在组织培养中的作用和使用方法[M]//王小菁, 李玲, 编. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2002: 42-43.
- [11] 杜希华, 孙秀玲, 郝岗平, 侯福林. 不同外植体和激素对银杏愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 2008, 23(1): 129-133.
- [12] 江静, 尚富德, 李锁平. 银杏愈伤组织的诱导与激素优化组合研究[J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2000, 30 (3): 51-54.
- [13] 倪静静, 黄学林, 冈田芳明, 黄家总. 银杏愈伤组织培养及黄酮类化合物的测定[J]. 热带亚热带植物学报, 2001, 9 (2): 163-166.
- [14] Shi F, Takasaki H, Komatsu S. Quantitative analysis of auxin-regulated proteins from basal part of leaf sheaths in rice by two-dimensional difference gel electrophoresis [J]. *Photochemistry*, 2008, 69: 637-646.
- [15] Tyburski J, Dunajska K, Mazurek P, Piotrowska B, Tretyn A. Exogenous auxin regulates H₂O₂ metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of Cu/Zn-superoxide dismutase, catalase, and peroxidase[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31: 249-260.
- [16] 徐华杰, 王成双, 盛良全. 银杏叶超氧化物歧化酶(SOD)活性研究[J]. 阜阳师范学院学报: 自然科学版, 2006, 23(3): 37-40.
- [17] 莫小路, 黄学林, 孟辰. 银杏悬浮细胞叶绿体的分化与黄酮类产物积累[J]. 中山大学学报, 2003, 42 (6): 94-97.
- [18] 李琰, 张朝红, 马希汉. 培养基成分对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(4): 359-363.
- [19] 朱红威, 邵菊芳, 李庆, 王丹. 不同培养条件对银杏愈伤组织生长及黄酮含量的影响[J]. 食品科学, 2007, 28 (11): 102-105.
- [20] 陈学森, 张艳敏. 植酸在银杏组织培养中应用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9 (2): 24-27.
- [21] 张智, 邵菊芳, 滕婷婷, 张明. 抗氧化剂对银杏愈伤组织褐变的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (30): 13051-13052, 13082.
- [22] 魏朝良, 于德红, 安利佳. 黄酮类化合物及清除自由基机制的探讨[J]. 中成药, 2005, 27(2): 239-241.

(责任编辑: 张平)