

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.02.013

魏振园 汤若风 王晋飞 等. pH 对槐角愈伤组织黄酮类化合物产量的影响[J]. 广西植物 2013, 33(2): 203–207

Wei ZY, Tang RF, Wang JF et al. Effects of pH value on yield of flavonoids in callus tissues of *Sophora japonica* fruits[J]. Guihaia 2013, 33(2): 203–207

pH 对槐角愈伤组织黄酮类化合物产量的影响

魏振园, 汤若风, 王晋飞, 董倩倩, 范亚丽, 刘忠华*

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 培养基酸碱度是影响植物生长和次生代谢的重要因素之一。将生长稳定的国槐槐角愈伤组织在不同 pH 值的 B5 悬浮培养基中培养, 比较其生长状况、生物量及苯丙氨酸转氨酶活性和黄酮类化合物的产量。结果表明: pH 为 6.6 时, 国槐细胞生长状况好, 且不同 pH 下的苯丙氨酸转氨酶活性差异显著; 培养基呈弱酸性(即 6.6 ± 0.05) 时, 细胞黄酮类化合物含量较高。综合生长天数和产量, 最佳的收获时期为继代后的第 25~30 天。

关键词: 槐角愈伤; pH 值; PAL 活性; 黄酮类化合物

中图分类号: Q946.83 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)02-0203-05

Effects of pH value on yield of flavonoids in callus tissues of *Sophora japonica* fruits

WEI Zhen-Yuan, TANG Ruo-Feng, WANG Jin-Fei,

DONG Qian-Qian, FAN Ya-Li, LIU Zhong-Hua*

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The pH value of the medium is one of the important factors that affects plant growth and secondary metabolism. The stable growth callus tissues of *Sophora japonica* fruits were respectively cultured in B5 liquid medium with different pH values. The growth state and production phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and total yields of flavonoids were compared. The results showed 6.6 was suitable for the growth of callus tissues. PAL activity could be significantly affected by the pH value. Weak acid (6.6 ± 0.05) medium was better for the most flavone compounds accumulation; in consideration of growth days and total yields, the best harvest period should be chosen at the 25th–30th day after subcultured.

Key words: callus tissues of fructus sophorae; pH value; PAL activity; flavonoids

槐角为豆科植物国槐(*Sophora japonica*)的果实, 荚果, 念珠状。其性寒、味苦, 有清热泻火、凉血止血、清肝明目的功效, 始载于《神农本草经》, 是常用中药材品种。黄酮类化合物是槐角中的主要活性成分之一(王景华等, 2002), 药理作用主要表现为抗生育、抗癌、降低血压和转氨酶等, 为《中华人民共和国药典》历版所收载的品种。国槐原产我国, 多用作行道或庭院树种, 槐角中含有较高的黄酮

类物质, 但其受污染及病虫害影响较大, 药用资源开发利用率低, 难以满足需求, 因此采用槐角愈伤组织大规模培养技术生产黄酮类化合物是解决药用植物资源有限及满足需要的最佳途径。早期周立刚等(1991)进行了人参细胞培养合成皂苷的研究, 研究显示当 pH 稳定在 5.8 ± 0.2 时有利于人参细胞的生长和皂苷产生, 皂苷合成高峰出现在细胞生长对数期稍后, 结果表明细胞生长和皂苷累积需要一个

* 收稿日期: 2012-11-24 修回日期: 2013-01-26

基金项目: 国家自然科学基金(子项目编号: ZD008)

作者简介: 魏振园(1986-), 女, 甘肃靖远县人, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物及其次生代谢 (E-mail) jianrywei@163.com。

通讯作者: 刘忠华, 博士, 副教授, 研究方向为植物生长发育及系统进化 (E-mail) liuzh6@bjfu.edu.cn。

稳定而适宜的 pH 值环境。培养基的 pH 影响细胞次生代谢产物的积累和释放,降低培养基 pH 能有效诱导高山红景天细胞释放红景天苷。怀槐子叶或下胚轴产生的无菌苗在 B5 + 2 μ D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 的培养基上可诱导出愈伤组织且经过筛选建立了稳定的细胞培养体系,表明怀槐愈伤组织具有合成异黄酮的能力(罗建平等 2003)。培养基的酸碱度对植物的生长及次生代谢有一定的影响(李品等 2007)。本文以培养基 pH 为变化因子,比较了不同 pH 培养下国槐愈伤组织生长的鲜重干重,苯丙氨酸转氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)的活性以及总黄酮的产量,为更好建国槐愈伤组织高效生产黄酮类化合物的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料于 2010 年 9 月 20 日采自北京圆明园外行道两旁的国槐树上。挑选无病虫害、生长饱满的国槐槐角,以其胚诱导出愈伤组织。该愈伤组织在含蔗糖 2% 琼脂 0.6% 的 B5 + 1.0 mg/L 2 μ -D + 0.2 mg/L 6-BA 固体培养基中继代培养,待生长稳定后接入含蔗糖 3% 的 B5 + 2.0 mg/L 2 μ -D + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 悬浮培养基中,建立槐角愈伤组织细胞悬浮培养体系。该悬浮体系每隔 30 d 继代 1 次,光照强度 2 000 lx,光照 12 h,温度为 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,转速 125 r/min。

实验仪器有 UV-2102 型紫外分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)、梅特勒-托利多电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)、高速离心机(sigma 公司)、数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。槐角苷标准品纯度 > 98% (上海同田生物技术有限公司提供),其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 供试材料的制备 选用上述悬浮培养基,以 0.1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH 值分别为 5.6、6.1、6.6、7.1、7.6;取生长 25 d 后活性较高的愈伤继代在不同 pH 液体培养基中,上述相同条件下培养,每隔 5 d 测定 1 次鲜重干重、PAL 活性及槐角苷含量,共 35 d 结束,每个样品 3 个重复。

1.2.2 生长量的测定 供试材料收获:去离子水冲洗 2 次、以滤纸吸干测鲜重 FW (g);70 $^{\circ}$ C 烘干 10 h

至恒重后测干重 DW (g)。

1.2.3 PAL 活性的测定 称取 0.3 g 新鲜材料液氮固定后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。测定时将材料放入预冷研钵中,迅速加入 4 mL 0.2 mol/L 预冷的硼酸缓冲液(pH8.8,含 0.02 g/mL 水溶性聚乙烯吡咯烷酮 0.35 μ L/mL 巯基乙醇),冰浴研磨至匀浆,8 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 得上清,即为酶粗提取液。测定 PAL 活性参照申宏波等(2005)的方法并加以改进,即 5 mL 反应介质(0.02 mol/L 苯丙氨酸 2 mL 2 mL ddH₂O,1 mL 酶液;对照不加底物,加 1 mL ddH₂O),测定初始吸光值,之后 40 $^{\circ}$ C 恒温水浴 60 min,加 1 mol/L HCl 终止反应,测定 OD_{290nm} 值,每个样品重复测定 3 次,PAL 活性表示为 OD_{290nm}/g $\cdot$ fr $\cdot$ w $\cdot$ min $\cdot$ cm。即 PAL 活性(OD_{290nm}/g $\cdot$ fr $\cdot$ w $\cdot$ min $\cdot$ cm) = OD_{290nm} $\cdot$ N/W $\cdot$ T $\cdot$ n $\cdot$ d。其中,OD_{290nm} 为反应后和反应前的吸光度差值,N 为酶提取液总体积(mL),W 为样品鲜重(g),T 为反应时间(min),n 为反应体系中所用酶液体积(mL),d 为比色皿直径(cm)。

1.2.4 黄酮类化合物含量的测定 异黄酮含量的测定采用紫外分光光度法(溥丽华等 2012),选用槐角苷为标准品。称取烘干后的粉末 0.1 g,加入 7 mL 60% 的乙醇,75 $^{\circ}$ C 水浴提取 9 h 后离心,取上清稀释 30 倍后测 OD_{261.5nm} 值,每个样品 3 次重复。异黄酮的含量以槐角苷计:

$$\text{槐角苷含量 (mg/g)} = 30 \text{ CV} / 1000 W$$

式中,C 为稀释后的提取液中槐角苷的浓度(μ g/mL),V 为提取槐角苷溶液的体积(mL),W 为精确称取的供试材料的质量(g)。

2 结果与分析

利用 SPSS11.5 和 Excel 软件处理数据,第 5 天、第 10 天、第 15 天、第 20 天、第 25 天、第 30 天、第 35 天收获测定分别表示为 T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7。

2.1 培养基 pH 值对国槐细胞生长及生物量的影响

接入新鲜培养基后细胞进入新一轮的增殖阶段,不同 pH 下的干重生长曲线如图 1。从图 1 可以看出,不同 pH 下的生长量积累随着生长时期的增加差异越来越明显,T5、T6 时期 pH 为 6.6,细胞干重积累高于其它 pH 值。

如图 1 所示,适应期代谢较慢,初生生长和次生代谢都保持平稳,T1 ~ T2 时期细胞生长缓慢,颜色

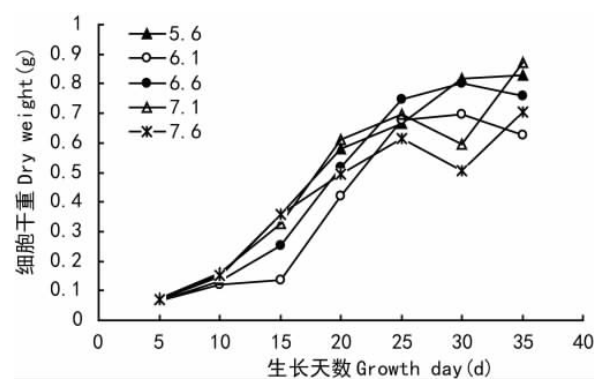


图 1 不同 pH 下的细胞干重
Fig. 1 Dry weight under different pH values

表 1 pH 对 PAL 活性的影响
Table 1 Effect of pH value on PAL activity

不同时期 Different periods	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
不同 pH 处理 pH value							
5.6	45.63 ± 0.08c	42.41 ± 0.26d	11.16 ± 0.05c	35.73 ± 0.18b	58.71 ± 0.29c	37.59 ± 0.50c	21.68 ± 0.22c
6.1	46.67 ± 0.38b	44.92 ± 0.81b	13.79 ± 0.11a	37.54 ± 0.25a	59.38 ± 0.11b	54.44 ± 0.09b	31.84 ± 0.13b
6.6	47.41 ± 0.36a	46.67 ± 0.36a	12.27 ± 0.16b	37.37 ± 0.11a	62.75 ± 0.06a	56.41 ± 0.28a	45.06 ± 0.06a
7.1	44.17 ± 0.28d	42.41 ± 0.26c	12.31 ± 0.07b	23.35 ± 0.11c	28.28 ± 0.28d	25.25 ± 0.12d	17.75 ± 0.10d
7.6	42.47 ± 0.30e	41.46 ± 0.29e	9.48 ± 0.17d	12.17 ± 0.18d	15.43 ± 0.45e	13.58 ± 0.29e	12.43 ± 0.06e
平均 Average	45.27 ± 1.85	43.76 ± 1.93	11.80 ± 1.48	29.23 ± 10.38	44.91 ± 19.99	37.45 ± 17.11	25.75 ± 11.96

注: 表中数据后的不同字母表示在 0.05 水平差异显著。
Note: Values in each column followed by different letters mean significant difference at $P < 0.05$.

PAL 活性总体变化趋势为 0 ~ 5 d 内 PAL 活性较初始值稍有下降, T1 时继续保持平稳, T2 时 PAL 活性急剧下降, T3 ~ T4 时细胞已吸收大量养分, 随着次生代谢的加强, PAL 活性开始上升, T4 ~ T5 时酶活性继续上升、趋势相比前一时期变缓; T1、T2、T5 ~ T7 时期表现为 pH6.6 时最大, 第 25 天时, pH6.6 下的酶活性达到整个过程中酶活性的最大值; T5 ~ T6 和 T6 ~ T7 间测 PAL 活性亦呈现下降状态, 表明这两个时期次生代谢十分缓慢。

2.3 培养基 pH 值对国槐细胞黄酮类化合物含量的影响

收获不同时期材料, 提取槐角苷并测定其含量, 不同 pH 值下的槐角苷变化趋势如图 2 所示。首先快速上升, 之后再下降, 出现低峰后再次上升, 整个周期呈现两次高峰。

从图 2 可以看出, T1 时不同 pH 下的槐角苷含量差异: pH 为 7.1 和 7.6 时的槐角苷含量较 5.6、6.1、6.6 的多。T2 时 5 种 pH 下的差异不明显。T3 和 T4 时期表现为 pH6.1 时的含量较高。随着生长天数的增加, 细胞生长状态日趋稳定, 表现为 T5、T6

浅褐色, 培养基少见浑浊; T2 ~ T3 时期除 pH6.1 时细胞生长较慢, 其它均迅速生长、材料表面附着淡黄色新生愈伤; T3 ~ T4 时期各 pH 下的细胞生长无明显差异, 颜色继续加深; T4 ~ T5 时期整体生长变缓, 瓶壁有大量附着, 培养基浑浊, 材料褐色加深, pH6.6 下的干重积累最大; T5 ~ T7 时期培养基渐呈糊状, 球状愈伤为深褐色, 小颗粒状愈伤接近黑褐色, pH 为 5.6 和 6.6 下的鲜重干重下降幅度较低; T7 时期后营养物质消耗殆尽, 细胞开始死亡。

2.2 培养基 pH 值对国槐细胞 PAL 活性的影响

测定不同 pH 下的 PAL 活性结果见表 1, 5 种 pH 间酶活性差异显著。

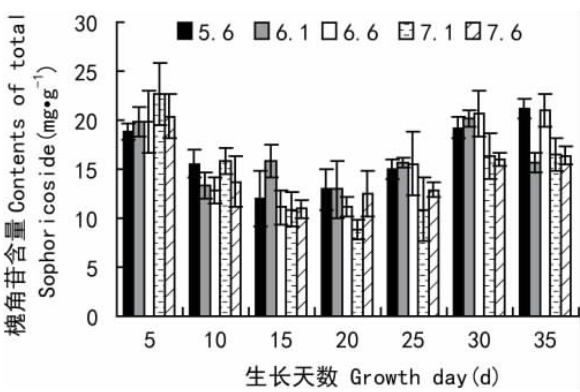


图 2 不同 pH 下的槐角苷含量
Fig. 2 Contents of total sophoricoside under different pH values

和 T7 时 pH 值为 5.6 和 6.6 下槐角苷含量明显高于其它。

2.4 培养基 pH 对国槐细胞培养中黄酮类化合物产量的影响

不同 pH 条件下槐角愈伤组织悬浮培养体系中材料的生长状况有所不同, 在实际的生产过程中, 应权衡生长量和黄酮类化合物含量选择适当 pH 及收

获时期。本实验从代谢水平深入研究槐角细胞生产黄酮类化合物所需的最佳 pH,选取 pH 为 6.6 时的槐角苷含量和 PAL 活性加以比较(图 3)。

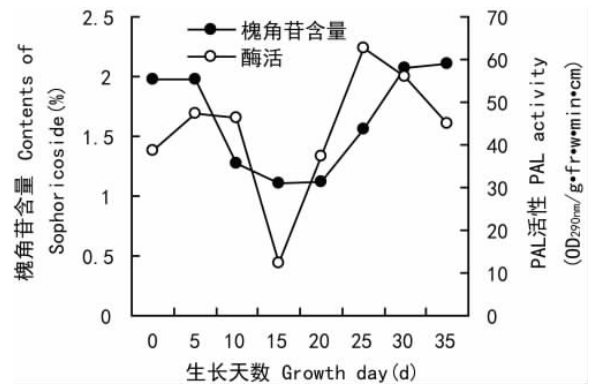


图 3 pH6.6 时的槐角苷含量及 PAL 活性
Fig.3 Contents of sophoricoside and PAL activity under pH6.6

结果显示愈伤组织在接种后第 5 天 PAL 活性迅速上升,出现第一个高峰,而槐角苷合成则相对滞

后;5~15 d 槐角苷含量和 PAL 活性都为下降状态,此时细胞适应了环境并积累干重;第 15 天二者均降至最低,槐角 2 含量变化相比 PAL 酶活变化平缓;第 15~25 天二者开始上升,至第 25 天 PAL 活性出现第二个高峰并且为最高峰,槐角苷积累第 30 天达到稳定。另外,槐角苷含量和 PAL 活性变化趋势基本一致:从第 10 天起愈伤适应了新环境快速积累重量, PAL 活性急剧下降、槐角苷积累也下降;随着生长稳定期的到来, PAL 活性和槐角苷含量均表现为上升状态;第 30 天以后营养物质消耗殆尽,生长过程基本结束, PAL 活性槐角苷产量都开始下降,细胞褐化、衰老死亡。

黄酮类化合物的产量是选择最佳 pH 值和收获时间的良好参考,其值为愈伤组织干重和槐角苷含量(%)的乘积,不同 pH 下的产量见表 2。从表 2 看出, pH6.1 时,第 35 天收获可得最大黄酮类化合物产量为 0.969 g,这同 pH6.6 时,第 25 天收获产量 0.655 g 和第 30 天收获产量 0.922 g 差异不显著。

表 2 不同 pH 下黄酮类化合物的产量
Table 2 Yields of total flavonoids under different pH

pH 值 pH value	槐角苷产量 Yields of total sophoricoside (g)						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
6.1	0.073 ± 0.004a	0.127 ± 0.016ab	0.235 ± 0.032a	0.41 ± 0.027a	0.556 ± 0.062ab	0.868 ± 0.042a	0.969 ± 0.049a
6.5	0.075 ± 0.017a	0.088 ± 0.022b	0.118 ± 0.004c	0.286 ± 0.067b	0.587 ± 0.040ab	0.773 ± 0.092a	0.545 ± 0.013c
6.6	0.074 ± 0.014a	0.095 ± 0.015ab	0.155 ± 0.029bc	0.322 ± 0.012b	0.655 ± 0.191a	0.922 ± 0.123a	0.875 ± 0.077ab
7.1	0.095 ± 0.030a	0.119 ± 0.026ab	0.192 ± 0.05ab	0.296 ± 0.045b	0.408 ± 0.142b	0.549 ± 0.146b	0.793 ± 0.063b
7.6	0.078 ± 0.011a	0.130 ± 0.019a	0.219 ± 0.041ab	0.3345 ± 0.01b	0.435 ± 0.049ab	0.448 ± 0.018b	0.637 ± 0.125c

注:表中数据后的不同字母表示在 0.05 水平差异显著。
Note: Values in each column followed by different letters mean significant difference at $P < 0.05$.

3 结论和讨论

利用植物细胞培养技术生产次生代谢产物受多种因素的影响,包括培养基的种类、酸碱度、组分及营养物质的含量、光照、温度、外植体自身特性、添加外源刺激物(Udomsuk *et al.* 2011)等。培养基的不同酸碱度影响细胞对养分(例如铁离子)的吸收利用,很大程度上影响细胞的次生代谢。

本实验探究了 5 种 pH 下悬浮细胞的生长量及生长状态,结果表明,从细胞生长的对数期开始,不同 pH 下细胞重量积累开始有差异,但并不显著;最利于细胞增殖的 pH 随着细胞生长进程的变化而不同;至稳定期,弱酸性环境更利于生长。盛长忠等(2001)研究了南方红豆杉愈伤组织在 5 种 pH

(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 下的 PAL 活性和紫杉醇含量的实验表明,随着 pH 值的增大,细胞的 PAL 活性变大、紫杉醇含量积累增多; pH 为 5.5 时对生长最为有利,而紫杉醇的含量较低; pH 为 7.0 时生长量有所下降,但紫杉醇含量却达到 pH5.5 时的两倍多。毛玉东等(2011)研究了土壤不同 pH 下的滇重楼生长状况、各器官营养元素含量和根茎总皂苷含量,结果表明随 pH 增加,根茎生长状况呈先增后降的趋势;新老根茎的总皂苷含量随土壤 pH 升高而增加;本研究中不同 pH 下的 PAL 活性差异显著但没有呈现随 pH 变大而变大的规律,不同 pH 能显著影响细胞的 PAL 活性,可能与细胞受到外界刺激后迅速做出应激反应,加强次生代谢有关。总体而言,酶活性变化趋势同次生代谢产物含量的变化趋势一致,一定程度上反映了槐角苷含量的高低;最适于细

胞生长的 pH 不一定有利于黄酮类化合物的积累。当植物受到外界刺激或是伤害时体内 PAL 活性快速升高,黄酮类和木质素等次生代谢物质增多有助于细胞的存活,这是一种应激反应。

槐角愈伤组织合成黄酮类化合物的最佳 pH 为 6.6,同杜仲细胞产生桃叶珊瑚苷的最佳 pH5.8 相比较(王亚琴等 2007),但都为弱酸性,其原因是弱酸性环境下黄酮类化合物的羰基更易结合溶液中的氢离子形成羟基(徐璐等 2005),使得结构更稳定。实际应用中应考虑生长天数和槐角苷的产量,选择最佳收获时间以节约成本。综合不同 pH 下槐角苷的积累及生长天数,选择 pH 值为 6.6 ± 0.05 ,第 25~30 天收获。

目前对槐角药用成分的利用是通过槐花、槐角直接提取,通过测定槐角细胞在不同 pH 下的生物量、PAL 活性和黄酮类化合物的产量为植物组织培养生产药用成分的开发与利用奠定基础,在一定程度上打破地域和季节的限制,为今后的研究提供科学合理的依据。

参考文献:

- 中华人民共和国国家药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社: 247
- Li P(李品), Yue CP(岳彩鹏), Wang XJ(王新建) et al. 2007. Impact factors of plant cell culture production of secondary metabolites(植物细胞培养生产次生代谢物的影响因素) [J]. *J Henan For Sci Technol*(河南林业科技) 27(1): 21-23
- Luo JP(罗建平), Shen GD(沈国栋), Jiang ST(姜绍通). 2003. Analysis of isoflavones and its hepatoprotective function in callus cultures of *Maackia amurensis*(怀槐培养细胞中异黄酮分析及其保肝作用) [J]. *Food Sci*(食品科学) 24(10): 139-142
- Mao YD(毛玉东), Liang SW(梁社往), He ZJ(何忠俊) et al. 2011. Effects of soil pH on growth, nutrient content and total saponin contents of *Pairs polyphylla* var. *yunnanensis*(土壤 pH 对滇重楼生长、养分含量和总皂甙含量的影响) [J]. *Southwest Chin J Agric Sci*(西南农业学报) 24(3): 985-989
- Pu LH(溥丽华), Liu ZH(刘忠华), Wei ZY(魏振园) et al. 2012. Study on ethanol extraction of isoflavone from callus of *Sophora japonica* fruits(乙醇浸提法提取槐角愈伤组织中异黄酮的研究) [J]. *Seed*(种子) 31(1): 1-4
- Shen HB(申宏波), Wen JZ(文景芝), Ma CY(马成云) et al. 2005. The research of mechanism that using harpins protein to prevent and cure cucumber forst mildewed disease I the activity variety of PAL enzyme after inoculating harpins protein(Harpins 蛋白防治黄瓜霜霉病机理研究 I 黄瓜接种 Harpins 蛋白后 PAL 酶活性的变化) [J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报) 21(12): 330-332
- Sheng CZ(盛长忠), Wang SF(王淑芳), Wang Y(王勇) et al. 2001. Effect of pH on callus growth, PAL activity and paclitaxel content of plants of *Taxus*(pH 对红豆杉愈伤组织生长、PAL 活性和紫杉醇含量的影响) [J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药) 32(10): 929-931
- Udomsuk LK, Jarukamjorn H, Tanaka WP. 2011. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation [J]. *Biotechnol Lett* 33: 369-374
- Wang JH(王景华), Tang YP(唐于平), Lou FC(楼凤昌). 2002. The chemical composition and pharmacological effects of *Sophora japonica* Fruits(槐角化学成分与药理作用) [J]. *World Phytomed*(国外医药: 植物药分册) 17(2): 58-60
- Wang YQ(王亚琴), Zhu Y(朱媛). 2007. Studies on the cell suspension culture of *Eucommia ulmoides* and its metabolite-aucubin(杜仲细胞悬浮培养生产桃叶珊瑚甙的研究) [J]. *Guizhou J Bot*(广西植物) 27(2): 236-239
- Xu L(徐璐), Zheng JX(郑建仙). 2005. Review on vaccinium myrtillus anthocyanins(欧洲越桔花色苷的研究概况) [J]. *Chin Food Add*(中国食品添加剂) 4: 43-46
- Zhou LG(周立刚), Zheng GZ(郑光植). 1991. The study on cell culture of *Panax ginseng*(人参细胞大量培养的研究) [J]. *Nat Prod Res & Dev*(天然产物研究与开发) 3(1): 22-27
- 栎 [J]. *Sci Silv Sin*(林业科学) 47(4): 57-62
- Wei Y(魏勇), Tian RN(田如男), Fang YM(方炎明). 2004. The static life-table of *Liriodendron chinense* in Longwang Mountain [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Edit*(南京林业大学学报·自然科学版) 28(6): 61-63
- Hett JM, Loucks OL. 1976. Age structure models of balsamfir and eastern hemlock [J]. *J Ecol* 64: 1 029-1 044
- Yin DS(殷东生), Zhang HF(张海峰), Wang FD(王福德). 2009. The size structure and life table analysis of *Betula platyphylla* population in Xiaoxing'anling(小兴安岭白桦种群径级结构与生命表分析) [J]. *Chin For Sci Technol*(林业科技开发) 23(6): 40-43
- Yin ZF(尹增芳), Fan RW(樊汝汶). 1994. Ultrastructure observations on the development of male gametophyte in *Liriodendron chinense*(Hesml) Sarg(中国鹅掌楸雄配子体发育的超微结构研究) [J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境) 3(1): 1-8
- Zhou JY(周建云), Li R(李荣), Zhang WH(张文辉) et al. 2012. Effects of thinning intensity on structure characteristics and spatial distribution of *Quercus wutaishanica* populations(不同间伐强度下辽东栎种群结构特征与空间分布格局) [J]. *Sci Silv Sin*(林业科学) 48(4): 149-155
- Zhu XQ(朱晓琴), He XA(贺善安), Yao QJ(姚青菊) et al. 1997. Population genetic structure and conservation strategy of *Liriodendron chinense*(鹅掌楸居群遗传结构及其保护对策) [J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境) 6(4): 7-14

(上接第 246 页 Continue from page 246)