

银杏愈伤组织生长和黄酮类 化合物积累的关系*

房建军 阙国宁

摘要 本文以银杏幼苗茎段为外植体诱导产生愈伤组织,测定了其中的黄酮类化合物的积累量,并初步探索了愈伤组织生长与黄酮类化合物积累的关系和影响积累的有关因素。研究结果表明:诱导幼苗茎段愈伤组织产生的最适培养基为 MS+ 2.5 mg/L NAA+ 1mg/L KT+ 200 mg/L LH+ 30 g/L 蔗糖;愈伤组织生长周期约 30 d;为使愈伤组织维持较长时间的生长,要在其生长 25~30 d 时用中等盐分浓度的基本培养基继代培养;光下诱导的愈伤组织中有黄酮类化合物产生;总量最高为 1.0 mg/g DW;其中槲皮素甙元为 17.5 μ g/g DW, 0.5 mg/L 2,4-D+ 1 mg/L KT, 0.5 mg/L GA₃+ 1 mg/L KT 有利于黄酮类化合物的积累;愈伤组织生长与黄酮类化合物积累两者趋势大体一致;NH₄⁺ 的浓度与黄酮类化合物产生有关。

关键词 银杏 愈伤组织培养 黄酮类化合物

植物次生代谢物细胞工程是生物工程的重要组成部分,这一技术的兴起不仅为生理学、遗传学、医药学等的基础理论研究提供了新的手段,更重要的是为这些学科的生产应用开辟了新的途径。其产物从医药、香料、试剂、色素、农药到化妆品,显示了实际应用的巨大潜力。我国自 70 年代起,已经对分属于 25 个科的 40 余种植物进行了研究,并已使有些植物的有效成份产率超过原植物^[1]。但从目前看,这一领域研究较多的还是草本植物,本文以我国特有种——银杏(*Ginkgo biloba* L.) 为材料,通过愈伤组织方式研究了离体培养组织的生长情况、黄酮类化合物的积累量和与积累有关的初步因子。近几年掀起的银杏热,就是因为它的提取物中含有两类重要的生理活性物质——黄酮类化合物(flavonoids)和萜内酯(ginkgolides and bilobalide),它们具有治疗和预防心脑血管疾病的作用,可用于开发药品、保健食品和化妆品,而且已有产品上市^[2];但目前用于开发的均为银杏叶,离体培养有可能成为另一条开发途径。以离体组织培养的方式系统研究银杏中黄酮类化合物的文章尚未见报道,而近年银杏中的黄酮类化合物又引起了人们新的重视^[3]。由于愈伤组织的生长不受季节和地区的限制,生长周期短,条件容易控制,此研究可为进一步的细胞培养和工业化生产打下良好基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料的处理与接种

1996 年 2 月,将低温沙藏后的种子植入细纱,室内培养,温度约 15~22 ,一个月左右长

1997—07—30 收稿。

房建军,阙国宁(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

* 本文属第一作者硕士学位论文的一部分,同时得到林业部亚热带林木培育重点开放实验室基金等的资助。测试部分得到亚林所费学谦高级工程师大力帮助,特此致谢。

出幼苗, 切取距顶端 3 cm 以上的茎段。将上述外植体用自来水冲洗后用滤纸吸干, 在超净工作台上用 75% 的酒精浸 30 s, 再用 0.15% 的 HgCl_2 溶液浸泡约 4 min, 最后用无菌水漂洗 4~5 次, 用无菌滤纸吸干。接种于灭菌后的半固体培养基上。

1.2 愈伤组织培养

将上述接种好的培养瓶分别置光下(约 1 800 lx)和暗中培养, 观察并记录生长情况, 同时, 选择一定数量的各种外植体诱导的愈伤组织, 每 10 d 转换培养瓶一次, 每次转培养瓶称重, 了解鲜重生长周期。

在愈伤组织生长 25 d 时, 进行继代培养, 同时改变基本培养基(即将 MS 改为 B₅、WPM 和 1/2MS), 观察并选择出适合继代的培养基。

1.3 黄酮类化合物含量的测定

1.3.1 黄酮类化合物总量的测定方法 采用 AlCl_3 比色法^[4]。

1.3.2 槲皮素组分的测定方法 称取愈伤组织 10 g, 用酸催化甲醇解法水解糖甙, 然后用液相色谱仪测定甙元含量, 色谱条件: 仪器, Water Mellinium 2010 色谱系统; 柱: μ -Bondapak C18 (3.9 × 30 mm); 流动相: 甲醇-水 (53:47), 用磷酸调 pH 为 4.0; 流速: 1.0 mL/min; 检测器: UV254 × 0.1A UFS^[5]。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及生长情况

根据沈敏娟^[6]和 Carrier D. J. 的结论^[7], 用胚诱导愈伤组织的最适培养基为 MS, 并根据不同实验条件添加不同比例的萘乙酸(NAA, 1~5 mg/L)和激动素(KT, 0~10 mg/L)。在本实验中以茎段为材料, 经预备实验得出其最适的 NAA/KT 为 2.5, (即: NAA 2.5 mg/L, KT 1 mg/L)。

光下和暗中诱导的愈伤组织均生长良好, 诱导率高, 且生长量大, 所不同的是: 光下诱导的愈伤组织呈鲜绿色, 质地较硬; 暗中诱导的愈伤组织呈浅黄、浅褐或乳白色, 质地较软。经压片观察, 光下得到的愈伤组织胞质较浓, 而暗中培养得到的愈伤组织胞质淡。

2.2 愈伤组织的生长周期

银杏幼苗茎段所诱导的愈伤组织的生长周期约为 35 d 左右(见图 1), 其生长延缓期约为 10 d, 第 10 至 28 天进入生长的指数及对数生长期, 此后进入稳定期, 过了稳定期后, 愈伤组织很快衰老, 变褐死亡。为了继续维持愈伤组织生长, 要在 25~30 d 左右进行继代培养。

2.3 黄酮类化合物积累量

2.3.1 黄酮类化合物总量 通过测定, 光下培养的愈伤组织可以积累黄酮类化合物(最高可达 1.0 mg/gDW); 而暗中培养的愈伤组织中测不到此类物质。为了了解整个愈伤组织生长过程中黄酮类化合物的产生时期, 选取一定量的暗中诱导的愈伤组织继代后转于光下培养, 定期测定整个生长周期内黄酮类化合物的含量(见图 2)。由图中可看出, 愈伤组织中黄酮类化合物的积累和生长两者的趋势大体上是一致的, 组织细胞迅速生长时主代谢旺盛, 很少合成次生代谢产物, 当迅速生长阶段接近结束时, 主代谢减弱, 次生代谢加强, 黄酮类物质含量增加。目前, 黄酮类化合物合成的苯丙烷代谢途径是次生物质中研究最为清楚的一个, 由于其代谢途径中一主要的限速酶——苯丙氨酸解氨酶(PAL)为诱导酶, 光、机械伤害、病原菌感染等都可诱导

其产生,故培养于暗中的愈伤组织几乎测不到黄酮类化合物^[8,9]。

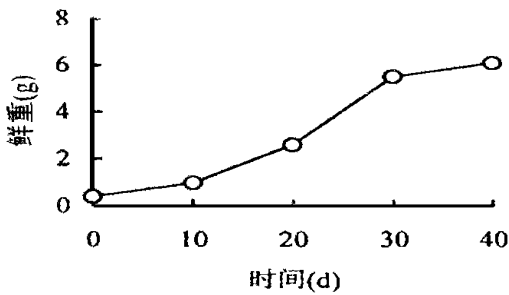


图1 愈伤组织的生长周期

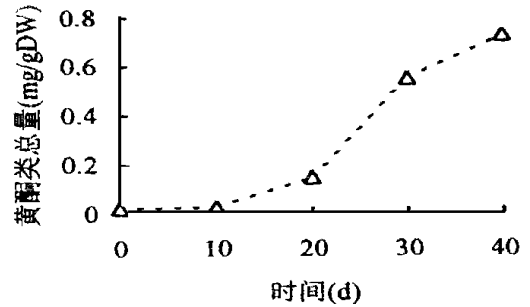


图2 愈伤组织生长过程中黄酮类化合物的积累

2.3.2 槲皮素组分的测定 称取生长30 d的愈伤组织10 g,用高效液相色谱(HPLC)法测定其组分——槲皮素的含量,结果见图3。从测定结果看,愈伤组织中槲皮素的含量很低,为 $17.5 \mu\text{g/gDW}$ 。

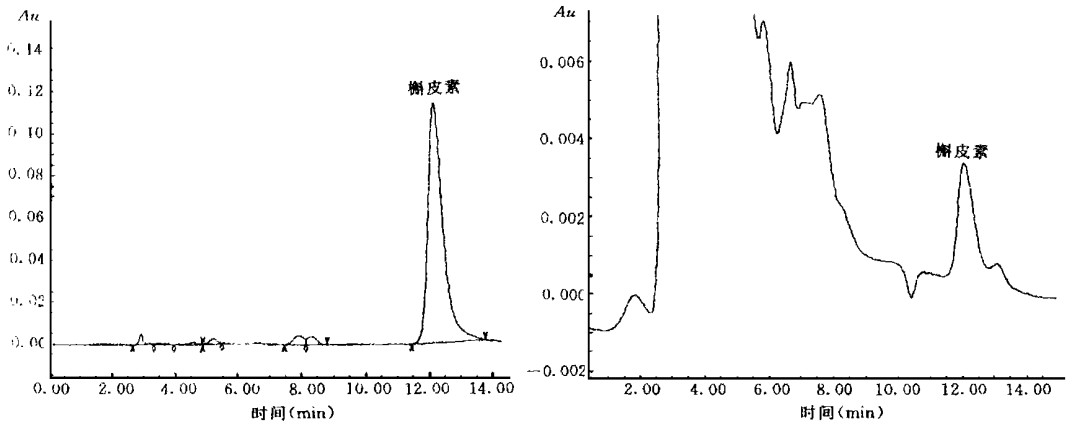


图3 槲皮素组分的HPLC测定(左:标样;右:样品)

分析有效成分最好莫过于直接定量测定,但对于银杏黄酮来讲目前尚作不到这一点,一是由于没有商品标样可用,二是因为银杏黄酮的组分极其复杂,所以一般通过间接方式测定。由于甙元(aglycone)含量与黄酮甙(flavonoid glycoside)含量密切相关,人们将得到的甙元含量再转换成银杏黄酮甙含量。Sitcher O.用HPLC法测定银杏叶中的黄酮类化合物时,按其峰高及出峰顺序依次为槲皮素(quercetin)、4,5,7-三羟黄酮醇(kaempferol)、异鼠李黄素(isorhamnetin)及其它一些微峰,并测定其中甙元总量为 $0.2\% \sim 0.4\% (W/W)$,相当于银杏黄酮甙 $0.5\% \sim 1\% (W/W)$ ^[10]。由于没有其它标样,在本实验中只测定了槲皮素,尚不能说明愈伤组织中所产生黄酮类物质组分与原植株是否相同,只能证明其中有此成份,其它内容尚需进一步深入研究。

2.4 愈伤组织的继代培养研究

2.4.1 在不同盐分浓度的基本培养基上愈伤组织的生长状况及其黄酮类物质积累的比较 本实验中,虽然MS基本培养基上幼苗茎段的诱导率高,愈伤组织生长量大,但该培养基用于

继代培养时,效果不佳,继代后的愈伤组织生长周期明显缩短,15 d 左右便出现明显的老化现象。为了寻求较理想的继代培养基,在原培养基中激素不变的情况下,改变基本培养基,分别选用比较有代表性的几种基本培养基进行继代培养,观察其生长情况并测定黄酮类化合物积累量(见表 1)。不同盐分浓度的几种基本培养基在愈伤组织继代中的表现差异较明显,高盐培养基不利于较长时间维持愈伤组织生长但易于黄酮类物质积累;中等盐分浓度培养基适宜继代培养但不易于黄酮类物质积累;低盐分浓度培养基既不利于继代也不利于黄酮类物质积累。可见基本培养基中的差异是导致黄酮类化合物积累差异的一个重要因素,下文将对此作更为深入的研究。为使愈伤组织维持较长时间的生长,要在其生长 25~30 d 左右用中等盐分浓度的基本培养基进行继代培养。

表 1 不同盐分浓度基本培养基上继代培养情况

项 目	高 盐		中 盐	低 盐
	MS	B ₅	1/2MS	WPM
老化容易程度	++++	+++	+	++
30 d 时形态	褐化死亡	表面变红褐	鲜绿色	黄绿色
黄酮类化合物积累量 (平均)(mg/gDW)	0.85	0.80	0.11	0.12

2.4.2 对几种培养基的分析 根据愈伤组织在几种基本培养基中的不同表现,分析配方,详见表 2。MS 和 B₅ 比 1/2MS 和 WPM 明显易于黄酮类物质积累,故推测前两者的配方中起主要作用的离子浓度可能明显高于(或低于)后两者,而 MS 和 B₅ 之间又有比较明显的差异。推测可能的因子为 NO₃⁻、NH₄⁺、K、硫酸素(在以后的试验中曾排除了硫酸素因素),故设计正交试验,以 1/2MS 基本培养基不变,分别增加 KNO₃(1 400 mg/L, 1 850 mg/L),减小 NH₄⁺(200 mg/L, 400 mg/L),使之改变后的 NO₃⁻、K 与原 B₅ 和 MS 接近,而 NH₄⁺ 与 B₅ 和 WPM 的接近,并配合激素 KT、NAA 和浓度改变设计正交试验,改变后的离子浓度见表中 1/2MS* (以含 KNO₃ 1 850 mg/L, NH₄NO₃ 200 mg/L 为例)。

表 2 所用培养基主要成份的比较

(单位:mmol/L)

主要成分	MS	B ₅	WPM	1/2MS	1/2MS*
NO ₃ ⁻	39.41	25.00	9.68	19.70	20.80
NH ₄ ⁺	20.62	2.00	4.98	10.30	2.50
总 N	60.03	27.03	14.66	30.10	23.30
p ⁵⁺	1.25	1.08	1.25	0.63	0.62
K ⁺	20.05	25.00	12.61	10.02	18.92
Ca ²⁺	2.99	1.02	3.00	1.50	1.50
Mg ²⁺	1.50	1.00	1.50	0.75	0.75
Cl ⁻	5.98	2.04	1.30	2.99	2.99
盐酸硫酸素(mg/L)	0.4	10	1.0	0.4	0.4

选取生长约 25 d 的愈伤组织,转入下述正交试验培养基(表 3),各处理 5 次重复,30 d 后测类黄酮类化合物含量。方差分析结果表明: NH₄NO₃ 这一因素达到显著水平($P < 0.10$),其它因素影响均不显著,分析上述正交试验因子和方差分析结果,可排除 K⁺ 浓度的影响,部分排除 NO₃⁻ 的影响,说明 NH₄⁺ 的浓度是影响黄酮类化合物积累的一个重要因素,为此在细胞

培养阶段应对其进一步加以研究。

表 3 改变基本培养基成份正交试验设计与分析

编号	NH ₄ NO ₃ 140/185	KNO ₃ 200/40	KT 0.5/1	NAA 0.5/1	吸光值 OD	黄酮类化合物 含量(mg/gDW)
1	1	1	1	1	0.037	0.319
2	1	1	2	2	0.012	0.116
3	1	2	1	2	0.027	0.238
4	1	2	2	1	0.022	0.197
5	2	1	1	2	0.055	0.463
6	2	1	2	1	0.060	0.505
7	2	2	1	1	0.059	0.497
8	2	2	2	2	0.042	0.359

2.5 激素对黄酮类化合物积累量的影响

将茎段暗培养 25 d 获得的愈伤组织转移到 1/2MS+ 1 mg/L KT+ 200 mg/L LH 的培养基上,并添加不同种类和浓度的激素(为保证愈伤组织的继续生长,每处理都保留了 1 mg/L 的 KT),操作时尽量使同一激素的不同处理采用同一外植体切分,这样能使材料均匀,排除干扰,保证可比性。接种后转于光下,30 d 检测类黄酮类化合物含量(图 4)。图中显示不同激素种类、浓度对类黄酮类化合物积累的影响,2,4-D、GA₃ 对黄酮类化合物有较明显的影响;而 NAA 的影响不显著。一般来讲,生长素首先影响的是细胞的分裂与生长,然后涉及到次生代谢物的产生与积累。激素对代谢的调控是极其复杂的问题,许多问题要搞清还有待于基础学科的发展。

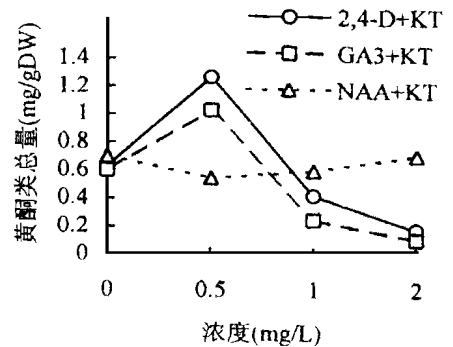


图 4 激素对黄酮类化合物积累量的影响

3 结论与讨论

诱导幼苗茎段愈伤组织产生的最适培养基为 MS+ 2.5 mg/L NAA+ 1 mg/L KT+ 200 mg/L LH+ 30 g/L 蔗糖;愈伤组织生长周期约 30 d;为使愈伤组织维持较长时间的生长,要在其生长 25~30 d 用中等盐分浓度的基本培养基继代培养;光下诱导的愈伤组织生长后期有黄酮类化合物产生;总量最高为 1.0 mg/gDW;其中槲皮素甙元为 17.5 μg/gDW;0.5 mg/L 2,4-D+ 1 mg/L KT,0.5 mg/L GA₃+ 1 mg/L KT 有利于黄酮类化合物的积累;愈伤组织生长与黄酮类化合物积累两者趋势大体一致;NH₄⁺ 的浓度与黄酮类化合物产生有关。

通过植物细胞产生次生代谢物技术是一项复杂的系统工程,需要成熟的培养条件和完善的设备与工艺流程,才能真正应用于生产实践。目前,国内外已经有少数几例植物(人参、紫草、黄连等)达到这一水平,多数植物仍处于培养条件的研究中,这一步骤的研究其实质进行的是对植物代谢调控的研究,使植物代谢专门朝某一产物方向进行——是研究人员的追求目标,这一愿望的实现仍然受到当今科技水平的制约,不过近年来在此领域中产生的新技术诸如固定化技术、发状根技术、反义技术等都为这类研究注入了新的活力,其发展前景是广阔的。本文只

是一个起步性探索性的研究,进一步的工作可进行细胞培养、高产突变体筛选和先进培养方式的应用,这些工作正在进行中。

参 考 文 献

- 1 王蜀秀,温远影,胡昌序.我国利用植物组织和细胞培养产生药用成分的研究概况.植物学通报,1995,12(1):33~37.
- 2 姚渭溪.银杏叶中活性成分的提取工艺、测定及其进展.中草药,1995,26(3):157~159.
- 3 梁立兴.银杏叶的开发利用及其研究进展.世界林业研究,1996,9(3):44~51.
- 4 中国农业科学院茶叶研究所编.茶树生理及茶叶生化实验手册.北京:农业出版社,1983.
- 5 中国林业科学研究院分析中心编.现代实用仪器分析方法.北京:中国林业出版社,1994.156~157.
- 6 沈敏娟,王亚男,姜家华.银杏愈伤组织之诱导与培养.台大实验林研究报告,1993,7(2):51~66.
- 7 Carrier D J, Cosentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryoderived callus and suspension cell culture. Plant Cell Reports, 1990, 8: 635~638.
- 8 Reinert J, Bajaj Y P S. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1977. 676~678.
- 9 欧阳光察,薛应龙.植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控.植物生理学通讯,1988,(3):9~16.
- 10 Sticher O. Quality of ginkgo preparations. Planta Med., 1993, 59(1): 2~11.

Relation between Callus Growth and Flavonoids Accumulation of *Ginkgo biloba*

Fang Jianjun Que Guoning

Abstract Young stem of *Ginkgo biloba* were used to induce callus, and the relation between callus growth and flavonoids accumulation were studied. The result indicated that the ideal medium for a large volume of callus induction is MS supplemented with 2.5 mg/L 1-Naphthaleneacetic acid and 1 mg/L kinetin. In order to subculture callus for several cycles, it is suitable to subculture the callus by using middle salt concentration medium in 25~30 days. The flavonoids were identified in the callus cultured under light. The supreme quantity of flavonoids reached to 1.2 mg/g DW, within it there were 17.5 μ g/g DW quercetin. Production of flavonoids was related to callus growth, and the con. of NH_4^+ was an effective factor.

Key words *Ginkgo biloba* callus culture flavonoids