

银杏愈伤组织培养及其黄酮类化合物的测定(简报)

倪静静¹, 黄学林^{1*}, 冈田芳明², 黄家总³

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 日本奈良县立山边立高等学校;
3. 广东省农业科学院良种苗木中心, 广东 广州 510640)

摘要: 采用银杏胚、胚乳及3个月苗龄的苗叶为外植体, 在附加不同激素的培养基上诱导出愈伤组织, 从愈伤组织中提取黄酮类化合物并测定其含量。结果表明, 由胚诱导的愈伤组织中黄酮类化合物含量最高。

关键词: 银杏; 愈伤组织; 黄酮类化合物

中图分类号: Q944.6 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2001)02-0163-04

CALLUS CULTURE OF GINKGO AND THE CONTENT OF FLAVONOID COMPOUNDS IN THE CALLI

Ni Jingjing¹, HUANG Xue-lin¹, YOSHIKI Okada², HUANG Jia-zong³

(1. Department of Biology, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Yamabe High School Nara-ken Japan, Japan; 3. Guangdong Academy of Agriculture Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The embryos, endosperm and young leaves of 3-month-seedling of *Ginkgo biloba* L. were used as explants for callus induction experiment. Calli induced from embryos on MS medium supplemented with 3 mg L⁻¹ NAA and 5 mg L⁻¹ KT gave highest growth rate (100%), whereas calli induced from endosperms on MS with 3 mg L⁻¹ NAA and 2 mg L⁻¹ KT gave 42.3% growth rate. MS with 1 mg L⁻¹ NAA and 3 mg L⁻¹ BA was best for callus induction from leaves. The content of flavonoid compounds was highest in calli from embryos, and lowest in calli from endosperms.

Key words: *Ginkgo biloba*; Callus induction; Flavonoid compounds

银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶中含有多种生理活性物质, 主要有黄酮类、萜类、酚类。其中黄酮类有效成分含量最高, 约为2.5%—3.8%^[1], 其药理作用主要为: 扩张血管, 增加血流量, 改善心脑血管循环; 降低血清胆固醇, 同时升高血磷脂; 解除气管平滑肌痉挛, 松弛支气管, 治疗喘息性气管炎^[2-4]。随着世界人口老龄化, 以银杏叶提取物为原料的加工产业更具现实意义, 市场前景广阔, 但同时, 也出现了若干问题: 采摘银杏树叶受季节限制; 提取分离银杏叶中有效成分的过程相当繁琐, 流失严重^[5]。因此, 近几年, 采用细胞工程技术生产银杏体内特有活性成分成为一个热门课题, 国内外均有相关研究报道^[6-9]。

为了通过细胞工程技术扩大银杏可利用资源及获得可调控黄酮等有效成分的合成细胞系,本文从银杏胚、肉质胚乳、幼苗叶片三种不同外植体诱导出愈伤组织并对其黄酮类化合物含量进行比较。

1 材料和方法

材料和仪器 供试材料为银杏(*Ginkgo biloba* L.)种子,三个月苗龄的叶片(均由仲凯农学院何生根老师提供)。黄酮类化合物测定时的标准样品为芦丁(生化试剂,上海试剂二厂)。

愈伤组织的诱导 用0.1% HgCl_2 将新鲜种子及苗叶进行表面灭菌,将种子去壳,取出胚(注意保持胚轴的完整)。将胚接种到培养基上,使胚芽向上,胚根向下,每一瓶接种一个,共30瓶。将肉质胚乳切成约 1 cm^3 的小块,接种到培养基上,每一瓶接4块,共30瓶。将叶片剪成约 1 cm^2 的小块,每一瓶接4块,共30瓶。将培养瓶置于黑暗条件下培养,温度为 $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$,待培养物脱分化后,转入光暗周期为12 h光/12 h黑暗的条件下培养,温度 $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$,光强1500 lx。

愈伤组织诱导频率和生长量的测定 胚接种后1周,肉质胚乳接种后4周,叶片接种后4周计算愈伤组织诱导频率。愈伤组织诱导频率 = 出现愈伤组织的外植体数/总的接种外植体数 $\times 100\%$ 。胚培养3周,胚乳培养6周,苗叶培养6周后,测定愈伤组织生长量。接种量 = 接种后瓶重 - 接种前瓶重(g/瓶);收获量 = 收获后瓶重 - 收获前瓶重(g/瓶);愈伤组织生长量 = 收获量 - 接种量(g/瓶)。胚愈伤组织2周继代1次,而胚乳愈伤组织、叶愈伤组织均为3周继代1次。

愈伤组织中黄酮类化合物的提取和测定 精密称取芦丁20 mg置100 ml容量瓶中,加30%乙醇-水适量,稀释成各种浓度,绘出含量测定的标准曲线(参考庄向平等^[1]的方法,稍作修改)。

分别准确称量100 g鲜重继代培养的胚愈伤组织、胚乳愈伤组织、叶愈伤组织,于索氏提取器中用50%乙醇-水提取8 h,浓缩并转入容量瓶中,用30%乙醇-水定容至50 ml,摇匀后作为样品液供分析用。取1 ml样品液(2 g愈伤组织鲜重/ml),用30%乙醇稀释成各种浓度作为待测液,然后各取1 ml置10 ml具塞试管中,加30%乙醇-水至5 ml,取蒸馏水5 ml作为空白对照,然后按标准曲线法操作,在波长510 nm处测吸收度,由标准曲线计算含量。

2 结果和分析

2.1 不同激素对愈伤组织诱导的影响

本文采用的培养基均为MS培养基,附加不同种类及比例的激素。

接种后5-10 d,胚即开始脱分化。胚愈伤组织一般为浅绿色、浅黄色或白色。愈伤组织诱导频率因培养基中的生长调节物质而异,一般在50.5%-100%(表1)。MS+3 mg L^{-1} NAA+5 mg L^{-1} KT诱导愈伤组织迅速,诱导率高,是适宜的诱导培养基,而培养物在MS+3 mg L^{-1} NAA+2 mg L^{-1} KT培养基上生长量最高,因此选择其作为继代培养基。从表1还可看出,NAA、KT、BA对诱导胚的愈伤组织都是有效的,相对而言,KT+2,4-D组合的效果不十分明显。

胚乳愈伤组织诱导频率较低,约为15.6%-50.1%(表1)。其中一个重要的原因是:约50%

表1 不同激素组合对离体胚、胚乳和叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of growth regulators on callus induction from embryo, endosperm and young leaves of ginkgo

激素组合 Growth regulators (mg L ⁻¹)	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)			平均生长量 Average callus weight (mg)		
	胚	胚乳	叶	胚	胚乳	叶
	Embryo	Endosperm	Leaves	Embryo	Endosperm	Leaves
MS+NAA 3+KT 5	100.0	25.1		858.1	301.9	
MS+NAA 3+KT 2	99.6	42.3		956.9	351.4	
MS+NAA 1+BA 1	99.6	15.6		686.1	215.7	
MS+NAA 1+BA 2	97.1	28.5		900.5	281.2	
MS+NAA 1+BA 3	98.5	20.8		845.7	250.5	
MS+NAA 1+KT 2	94.0	35.8		788.2	300.5	
MS+NAA 1+KT 3	78.5	29.6		698.5	297.8	
MS+KT 1+2,4-D 1	70.0	34.2		428.1	255.4	
MS+KT 1+2,4-D 2	50.5	50.1		325.8	299.5	
MS+NAA 1+BA 1			84.6			450.7
MS+NAA 1+BA 2			88.5			436.2
MS+NAA 1+BA 3			95.8			490.6

的培养物分泌出大量白色物质, 严重者逐渐变为褐色, 死亡。仅胚乳外表面可诱导出愈伤组织, 其内部组织软化, 变为乳白色。愈伤组织为浅绿色或浅黄色, 少数为白色。MS+1 mg L⁻¹ KT+2 mg L⁻¹ 2,4-D 诱导效果明显, 是适宜的诱导培养基。培养物在 MS+3 mg L⁻¹ NAA+2 mg L⁻¹ KT 上生长量最大, 因此选择其作为继代培养基。

叶片接种2周后, 叶边缘卷曲、稍膨大, 4周后, 叶边缘长出颗粒状浅绿色愈伤组织, 至第6周, 叶表面长满愈伤组织。从表1可以看出, NAA+BA 是合适的激素组合, 诱导率及生长量都较高, 其中 MS+1 mg L⁻¹ NAA+3 mg L⁻¹ BA 的效果最好, 选择其作为继代培养基。

2.2 不同外植体来源的愈伤组织的黄酮类化合物含量

离体胚诱导的愈伤组织中黄酮类化合物含量最高, 超过 0.13% (鲜重含量, 下同)。叶片愈伤组织中黄酮类化合物含量约为 0.06%, 胚乳愈伤组织中含量很低(表2)。

表2 不同种类愈伤组织中的黄酮类化合物含量

Table 2 Content of flavonoid compounds in calli from various explants

待测液稀释倍数 Dilution of sample (×)	黄酮类化合物含量(%) Content of flavonoid compounds		
	离体胚愈伤组织 Calli from embryos	胚乳愈伤组织 Calli from endosperms	叶片愈伤组织 Calli from leaves
	100	0.132	0.001
40	0.151	0.002	0.063
20	0.162	0.002	0.064
10	0.147	0.002	0.064
5	0.143	0.002	0.063

实验结果表明, 采用离体胚做外植体诱导愈伤组织并提取黄酮类化合物具有以下优点: 1. 银杏种子可存放, 取材无季节性; 2. 从离体胚中诱导愈伤组织较容易, 诱导时间短, 诱导率高; 3. 离体胚诱导的愈伤组织中黄酮类化合物含量较高。

参考文献:

- [1] 庄向平, 虞杏英, 杨更生, 等. 银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法 [J]. 中草药, 1992, 23(3):122-124.
- [2] 刘玲玲, 于心若. 银杏药用价值 [J]. 中草药, 1994, 4:45-46.
- [3] 史清文. 银杏叶的研究开发概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(1):70-76.
- [4] 陈秀珍. 银杏叶不同生长期总黄酮的含量测定 [J]. 广西植物, 1988, 8(4):363-364.
- [5] 王成章, 郁青, 谭卫红, 等. 溶剂萃取银杏萜内酯的因子研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(2):53-57.
- [6] 刘淑兰, 袁宗泉, 韩碧文. 银杏叶片愈伤组织诱导及其悬浮培养细胞中银杏黄酮的产生 [A]. 中国植物生理学会第七次全国会议学术论文汇编 [C]. 1996, 195.
- [7] 涂艺声. 银杏愈伤组织诱导及其萜内酯的生成 [A]. 中国植物生理学会第七次全国会议学术论文汇编 [C]. 1996, 194.
- [8] Carrier D J, Cosentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture [J]. Plant Cell Report, 1990, 8:635-638.
- [9] Camper N D, Coker P S, Wedge D E, et al. *In vitro* culture of ginkgo [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 1997, 33: 125-127.
- [10] 姚渭溪. 银杏叶中活性成分的提取工艺、测定及其进展 [J]. 中草药, 1995, 26(3):157-159.