

文章编号: 1000-5692(2007)02-0150-06

银杏愈合组织诱导的叶源建立及 高黄酮外植体的筛选

陈颖, 曹福亮

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 对5个银杏 *Ginkgo biloba* 优良品种无菌苗茎段产生的芽苗叶片生长进行调控, 建立愈合组织诱导的稳定叶源, 并分别对5个品种不同器官的愈合组织诱导、生长及黄酮质量分数进行了比较。结果表明, 无菌芽苗添加 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘乙酸(NAA) + $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄基腺嘌呤(6-BA)有利于叶面积的生长($P < 0.01$)。5个品种中, 28号和79号品种愈合组织诱导率较高, 与其他品种有极显著的差异; N6培养基和6-BA适于愈合组织的诱导, 但不利于愈合组织的继代培养; MS培养基和激动素(KT)对愈合组织继代有利; 28号和79号品种愈合组织中黄酮质量分数较高; 根外植体诱导的愈合组织黄酮最高, 叶片与子叶次之, 茎段诱导的愈合组织类黄酮质量分数最少。图2表4参18

关键词: 植物学; 银杏; 叶面积; 愈合组织; 类黄酮

中图分类号: S792.95; Q944.6 **文献标志码:** A

银杏 *Ginkgo biloba* 是我国的特有树种, 集药用、食用、观赏和材用于一体, 特别是银杏叶中含有2类重要的生理活性物质——黄酮类化合物(flavonoides, 主要有单黄酮类、双黄酮类和儿茶素类等)和萜内酯(银杏内酯 ginkgolides)^[1], 使银杏成为研究的最热门树种之一。利用细胞大量培养来工业化生产银杏次生物质代谢产物, 是一条比较可行, 又节省土地, 实现集约化经营的一条途径^[2]。在银杏的细胞培养方面已有相关研究^[3-7] 组织培养生产银杏黄酮有着潜在的重大意义^[8]。大批量工业化液体培养需要稳定的愈合组织, 愈合组织培养又需要稳定的叶源, 利用茎段培养可以为愈合组织的建立提供源源不断的叶片来源。建立稳定的叶源, 一方面是获得较多的叶片数量, 另一方面是获得较大的叶面积。通过对银杏芽苗的培养, 对其叶面积进行调控, 并对5个品种不同器官的愈合组织诱导、生长及其黄酮含量进行了比较, 以期细胞悬浮培养体系的建立, 实现银杏黄酮细胞培养的规模化生产提供理论参考。

1 材料与方方法

1.1 外植体的来源

从江苏邳州银杏种质基因库中, 选5个生产中常用的优良品种, 代号与实名分别是: 200244(新村16号), 200245(新村18号), 200228(马铃3号), 200279(泰兴大佛指), 200253(桂林2号)。分

收稿日期: 2006-06-06; 修回日期: 2006-11-14

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20050298008); 南京林业大学基金资助项目(163010030)

作者简介: 陈颖, 博士, 从事生物技术等研究。E-mail: chenying@njfu.edu.cn

别简称 44 号、45 号、28 号、79 号和 53 号^[9]。以这 5 个品种成熟胚培养的无菌苗幼叶、叶柄、茎段和根段做愈合组织诱导的外植体。

1.2 无菌苗茎段叶片的培养

剪取 1 个月龄的无菌苗带芽茎段 0.5 cm 左右接种在 MS (Murashige and Skoog), DCR (Douglas-fir cytyledon revised), N6 和改良 MS (NH₄NO₃ 减半) 等 4 种基本培养基上, 各培养基附加 0.1~0.5 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA), 0.1~2.0 mg·L⁻¹ 6-苄基腺嘌呤(6-BA)。

培养 25 d 后, 在原培养基上继代 1 次, 50 d 测定叶面积。将诱导生长 50 d 的芽苗继代在不加生长调节剂的伸长培养基上: MS, DCR, N6, 改良 MS 培养基培养 1 个月。

1.3 愈合组织诱导

选取均匀一致的上述同一培养基培养的芽苗叶片, 剪成 0.5 cm² 左右; 叶柄长 0.5 cm; 或将 1 个月龄无菌幼苗的茎段、子叶和根段接种在添加 NAA, 6-BA 和激动素(KT) 的愈合组织诱导培养基上。参照文献[10-12], 诱导出愈合组织后连续继代 6 次, 用于总黄酮苷质量分数测定。

1.4 总类黄酮的提取与测定

参照文献[13, 14] 的方法, 称取 1.0 g 左右干样→70%乙醇浸提→显色→定容后以芦丁作标样, 在 510 nm 波长下比色, 根据 $y=11.154x-0.1894$ ($R=0.9993^{**}$, 极显著水平, 其中 y 代表吸光度, x 代表类黄酮质量分数) 计算, 再换算成百分含量。

1.5 生长实验参数的测定

1.5.1 叶面积的测定 芽抽长到一定培养时间后, 从培养基中取出, 以 44 号为测量对象, 剪下每个外植体最大叶片, 测量叶长、宽和面积。叶面积用方格纸法测量。

1.5.2 愈合组织干质量的测定 参照文献[15] 方法, 收集愈合组织培养物, 于 60 °C 烘干至恒量, 取 4~5 个平行试样的平均值。愈合组织相对生长速率(%)=[(收获鲜质量-接种鲜质量)/接种鲜质量]×100%。

1.6 数据统计

用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 NAA, 6-BA 质量浓度和培养基对芽苗叶片生长及叶面积的影响

银杏带芽茎段(以 44 号品种为例)接种在添加不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 的培养基上培养 50 d 后, 不但高度出现不同, 其叶片的大小、叶色及面积也存在差异, 方差分析表明(表 1), 各处理叶面积间存在极显著的差异($P<0.01$)。叶片在不添加 NAA 和 6-BA (对照) 的 MS 培养基上, 生长正常, 叶片展开较早, 叶缘整齐, 但叶色偏黄; 而在添加 NAA 和 6-BA 的培养基中, 叶片数目增加, 平均比对照增加 2 片, 叶缘缺刻不整齐, 最大叶面积减小, 说明 NAA 和 6-BA 能促进叶片的分化。其中, 6-BA 对叶片的数目和叶面积影响较大, 其质量浓度越大, 叶片簇生越明显, 叶面积越小, 叶片数越多, 但当 6-BA 质量浓度达到 2.0 mg·L⁻¹ 时, 外植体愈合化程度加大。总的来看, NAA 为 0.1~0.5 mg·L⁻¹, 6-BA 为 0.5~1.0 mg·L⁻¹ 时的芽苗叶片数较多, 叶色较绿。不同基本培养基对芽苗叶片生长也出现差异, 4 种基本培养基中芽苗叶片数, MS 培养基最多, 但从叶面积及生长势上看, N6 与改良 MS 较好(表 1)。

2.2 继代后芽苗叶片的生长

在添加 NAA 和 6-BA 培养基上生长的芽苗叶片呈簇生状, 叶面积小, 但继代在不加生长调节物质的培养基上后, 叶片面积及长势较对照好。图 1 中可以看出, 对照组(未添加生长调节物质培养), 叶片有些发黄, 发干, 叶面积小, 且茎段木质化程度加大; 若先用 NAA 和 6-BA 诱导, 再继代在不加生长调节物质的培养基上, 叶缘缺刻逐渐复原, 其叶色深绿, 较厚, 叶面积较大, 这些特点对细胞培养中愈合组织诱导所需的原材料(叶片)是较有利的。

表1 不同 NAA 和 6-BA 质量浓度及培养基对芽苗叶片生长状况的影响

Table 1 Effect of concentration of NAA and 6-BA on growth of ginkgo leaves from stem cuts

培养基配方	接种数/个	平均每个外植体上叶片个数	叶片的生长情况	叶面积/cm ²
ck	20	3.5	展开叶缘较整齐	1.110±0.009 a
MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	6.0	未全展, 叶缘深裂	0.499±0.022 d
MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	6.0	叶片簇生, 未全展	0.089±0.008 f
MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	6.0	叶片簇生, 未全展	0.050±0.009 g
MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	4.0	叶片展开	0.139±0.006 e
MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	6.0	叶片簇生, 未全展	0.083±0.001 f
MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	0	叶片簇生, 只见叶缘出现	
DCR+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	3.0	未全展	0.089±0.001 f
N6+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	4.0	展开	0.611±0.016 c
改良MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	20	4.0	展开	0.667±0.007 b

说明: $P < 0.01$, 字母相同者为差异不显著, 不同者为差异显著。79号品种培养50d的测定结果。

2.3 不同品种幼苗叶片愈合组织诱导率的比较

选择均匀一致的上述培养的不同品种芽苗幼叶, 剪成 0.5 cm^2 , 接种在如表2所示3种培养基上, 不同品种愈合组织诱导率差异不大, 只有53号幼叶愈合组织诱导率较低, 28号和79号愈合组织诱导率最高。从培养基上来看, N6培养基适于愈合组织的诱导, 较MS好; 从6-BA和激动素(KT)的使用效果来看, 6-BA较KT更容易诱导愈合组织。双因素方差分析表明, 各品种之间存在极显著的差异 ($F = 35.656 > F_{\alpha} = 8.651$, $P < 0.01$), 而培养基之间没有明显的差异 ($F = 3.076 < F_{\alpha} = 7.01$, $P > 0.01$), Duncan多重对比表明, 4个品种与53号品种之间都有极显著的差异, 其他品种之间无显著性差异。

表2 不同银杏品种芽苗叶片愈合组织诱导率的比较

Table 2 Comparison of inducted rate for callus from leaves of different cultivars

品种号	培养基配方	接种数/片	出愈数/片	外植体全愈合化数/片	愈合组织诱导率/%
44	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	55	20	55
	N6+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	87	46	87
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ BA	100	87	42	87
45	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	76	30	76
	N6+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	83	24	83
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ BA	100	82	38	82
28	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	75	35	75
	N6+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	87	30	87
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ BA	100	90	50	90
79	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	89	45	89
	N6+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	90	43	90
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ BA	100	92	45	92
53	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	21	8	21
	N6+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ KT	100	28	9	28
	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ BA	100	15	7	15

2.4 不同外植体愈合组织诱导率的比较

选取79号的5种外植体进行愈合组织诱导率的比较, 结果如表3所示, 叶柄、茎段和幼叶较易诱导出愈合组织, 但茎段愈合组织继代后较易褐化, 不宜长期继代, 而叶柄的外植体较少, 根段的愈合组织诱导率最低。综合而言, 诱导愈合组织最好的外植体应是幼叶, 其外植体多, 面积大, 愈合组织诱导率高。

表 3 不同外植体愈合组织诱导率及生长状况的比较

Table 3 Comparison of induced rate and growth for callus from different explants

外植体	接种数/个	诱导率/%	生长状态
幼叶	50	92	愈合组织易诱导, 绿色继代后生长良好
叶柄	30	100	愈合组织最易发生, 较绿, 继代后生长良好
茎段	30	98	愈合组织生长较快, 较绿, 但继代后易褐化
子叶	30	86	翠绿色, 生长迅速, 继代较好
根段	30	23	黄白褐色, 愈合组织难以继代

说明: 79 号品种。

2.5 愈合组织继代后生长的状态及继代周期

银杏外植体进行愈合组织诱导, 完全愈合化需 40 d。愈合组织诱导后, 对基本培养基和生长调节物质质量浓度进行筛选发现(以 79 号为例), 尽管 N6 培养基适于愈合组织的诱导, 但愈合组织继代后褐化严重, 不利于长期继代, 而 MS 培养基更适于愈合组织的继代培养, 愈合组织生长较旺盛, 褐化较轻; 诱导和继代愈合组织的适宜 NAA 质量浓度为 $0.5 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 6-BA 和 KT 的质量浓度为 $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。6-BA 较利于愈合组织的诱导, 但继代后也易使愈合组织褐化。因此, 在以后的继代培养中都采用 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT}$ 培养基培养。

从图 2 中可以看出愈合组织(以 79 号品种愈合组织为例)的生长在第 15 天达到高峰, 以后生长下降, 至 28 d 时出现褐化, 推测银杏愈合组织培养周期在 28 d 左右, 若 28 d 以后继代时褐化严重, 考虑到黄酮合成的高峰滞后于细胞生长高峰, 最佳继代周期以 20 d 为宜。



图 1 继代后叶片的生长情况

左: 对照, 初代不加激素; 右: 初代激素处理

Figure 1 Leaf growth after secondary culture
left is the control, right is the treated one

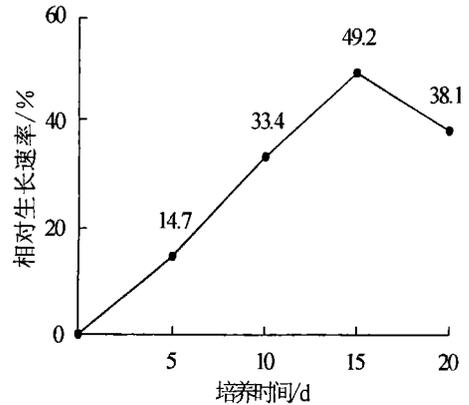


图 2 银杏愈合组织生长曲线(79 号品种)

Figure 2 Growth curve of callus of ginkgo cultivar No. 79

2.6 不同品种及不同器官愈合组织黄酮质量分数的比较

取不同品种叶片及不同器官诱导的愈合组织连续继代 6 次后(为消除原外植体所含黄酮的影响^[5-7], 在第 6 次继代后的 20 d 取样), 进行黄酮质量分数的测定, 结果发现各愈合组织中黄酮质量分数出现差异。从表 4 中可以看出, 5 个品种中以 28 号和 79 号叶片愈合组织中黄酮质量分数高, 较利于以后的继代培养; 从不同的器官来看, 各愈合组织的黄酮都比原叶片高, 其中根诱导的愈合组织黄酮质量分数最高, 达 $10.105 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 叶片和子叶次之, 茎段诱导的愈合组织黄酮质量分数最少, 只有 $5.703 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 品种之间及各器官之间诱导的黄酮质量分数出现显著性差异。

3 结论与讨论

添加 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$, $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{6-BA}$, 有利于银杏芽苗叶面积的生长。对不同品种

表4 各品种和器官愈合组织黄酮质量分数的比较

Table 4 Comparison of flavonoids contents in callus from different explants

品种号	叶片愈合组织黄酮质量分数/(mg·g ⁻¹)	79号品种外植体	产生的愈合组织中黄酮的质量分数/(mg·g ⁻¹)
44	4.022±0.012 e	原幼叶片	4.071±0.017 e
45	5.351±0.018 d	叶片	9.584±0.018 b
79	9.584±0.018 a	子叶	8.172±0.019 c
28	9.206±0.019 b	茎段	5.703±0.017 d
53	6.203±0.023 c	根段	10.105±0.016 a

说明: $P < 0.01$, 字母相同者为差异不显著, 不同者为差异显著。

及不同器官愈合组织的诱导发现, 79号和28号品种愈合组织诱导率高, 且愈合组织黄酮质量分数也较高。尽管根诱导的愈合组织黄酮质量分数最高, 但根段外植体较少, 且愈合组织诱导率低。因此, 在银杏的组织及细胞培养中, 可选择79号和28号品种叶片诱导愈合组织, 建立愈合组织和悬浮培养体系, 对它进行有目的的黄酮代谢调控。

不同外植体来源对植物组织和细胞培养诱导次生代谢物影响较大。选择适宜的外植体非常重要, 次生物质含量高的组织, 诱导的愈合组织细胞次生物质含量也高^[6]。笔者的实验研究表明, 除根诱导的愈合组织外, 叶片愈合组织中黄酮苷的质量分数高于其他器官, 与Haser等^[17]、倪静静等^[18]和陈学森等^[7]的研究结果相似。因此, 利用无菌苗茎段, 建立愈合组织诱导的稳定叶源, 可以解决室外叶片季节因素的限制, 为大规模周期性地培养银杏细胞, 生产黄酮类药物提供原材料。

参考文献:

- [1] STICHER O. Quality of *Ginkgo biloba* preparation[J]. *Planta Med*, 1993, 59(1): 2-11.
- [2] BONGA J M. 树木组织培养[M]. 阙国宁, 郭达初, 李金田, 译. 北京: 中国林业出版社, 1985.
- [3] 杨林. 银杏愈伤组织的形成及其中黄酮类化合物的产生[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(3): 48-51.
- [4] 杨林, 周吉源. 银杏细胞悬浮培养及黄酮的产生[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2002, 11(1): 55-58.
- [5] 徐刚标, 何方, 陈良昌. 银杏愈伤组织诱导与继代培养的研究[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(3): 32-36.
- [6] 姜玲, 章文才, 柯云. 几种大量元素对银杏愈伤组织细胞生长及黄酮糖苷含量的影响[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 130-132.
- [7] 楼崇, 唐二春, 汪贵斌, 等. 施肥对苗期银杏叶黄酮质量分数的影响[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(1): 61-64.
- [8] CARRIER D J, CONSENTINO G, NEUFELD R, et al. Nutrition and hormonal requirement of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture[J]. *Plant Cell Rep*, 1990, 8(11): 635-638.
- [9] 陈颖, 曹福亮, 谢寅峰, 等. 5个银杏优良品种成熟胚离体繁殖培养基的选择研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(11): 2025-2032.
- [10] 姜玲, 章文才, 马湘涛, 等. 生长素对银杏愈伤组织细胞生长和黄酮糖苷含量的影响[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(4): 378-380.
- [11] 姜玲, 章文才, 柯云. 5种有机物对银杏细胞生长和黄酮醇糖苷含量的影响[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(4): 373-376.
- [12] 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.
- [13] 胡敏, 甘璐, 姜发堂, 等. 银杏叶中黄酮类化合物最佳提取工艺研究(1)[J]. 食品工业科技, 1997(5): 49-51.
- [14] 程水源, 王燕, 李俊凯, 等. 银杏叶片色素含量与黄酮含量的关系研究[J]. 林业科学, 2001, 37(5): 31-34.
- [15] 于荣敏, 赵鸿莲, 郑玉果, 等. 银杏愈伤组织培养及其代谢产物银杏内酯的研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 52-58.
- [16] 陈发兴, 赖钟雄. 银杏愈伤组织细胞生长及其黄酮苷含量[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2004, 33(3): 456-458.
- [17] HASER A, STICHER O, MEIER B. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high performance

liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1992, **605** (1): 41—48.

- [18] 倪静静, 黄学林, 冈田芳明, 等. 银杏愈伤组织培养及其黄酮类化合物的测定 [J]. 热带亚热带植物学报, 2001, **9** (2): 163—166.

Leave source from callus induction and flavonoid content in callus from different tissues of five *Ginkgo biloba* cultivars

CHEN Ying, CAO Fu-liang

(College of Forest Resource and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The objectives of this study with *Ginkgo biloba* were to establish a callus culture system for leaf sources and to determine the flavonoid content in callus from different ginkgo tissues. Five elite cultivars (Number 44, 45, 28, 79 and 53) with mediums of N6, MS (Murashige & Skoog medium), improved MS and DCR (Douglas-fir cotyledon revised medium), and growth supplements of NAA (naphthalene acetic acid), 6-BA (6-benzylaminopurine), and KT (kinetin) were tested with roots, leaves, cotyledons, and stems as cultured explants. The induction rate, growth, and flavonoid content in the callus from different cultivars and explants were compared. Results indicated that a supplement of $0.1-0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of NAA and $0.5-1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of 6-BA in the medium favored leaf size ($P < 0.01$). The induction rates of leaf callus in cultivars '28' and '79' were significantly higher ($P < 0.01$) than the other cultivars. Medium N6 was better for inducing callus than MS, but N6 was not better for a subculture. The 6-BA supplement in a medium more readily ($P < 0.01$) induced callus than KT. Also, the flavonoid content in the callus of cultivars '28' and '79' was higher ($P < 0.01$) than the other cultivars. For all cultivars, flavonoid content in the callus from different explants was root > leaf > cotyledon > stem. [Ch, 2 fig. 4 tab. 18 ref.]

Key words: botany; *Ginkgo biloba*; leaves area; callus; flavonoids