

王霞霞,高平,李栋,等.银杏愈伤组织诱导及其双黄酮含量的测定[J].江苏农业科学,2018,46(23):65-67.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.015

银杏愈伤组织诱导及其双黄酮含量的测定

王霞霞¹,高平¹,李栋¹,郝旺林¹,何真²

(1. 吕梁学院生命科学系,山西吕梁 033000; 2. 山西省农业科学院,山西太原 030006)

摘要:为了提高银杏中双黄酮的提取量,满足市场对双黄酮的需求,通过正交试验建立银杏诱导愈伤组织和增殖体系,采用高效液相色谱法测量愈伤组织中双黄酮的含量。试验结果表明:最适合的外植体为叶片,最适消毒组合为 10% NaClO 消毒 6 min,75% 乙醇消毒 40 s;诱导愈伤组织最佳培养基为 0.4 mg/L KT + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L 2,4-D;愈伤组织增殖最佳培养基为 1.5 mg/L KT + 1.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L NAA;通过诱导愈伤组织提取双黄酮得率为 15.622 mg/g,比银杏叶中双黄酮含量高,可避免自然条件的限制。

关键词:银杏;愈伤组织;诱导;激素;高效液相色谱法;双黄酮

中图分类号:S664.304+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0065-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属落叶乔木,别称白果、公孙树、鸭脚树、蒲扇^[1-3],素有裸子植物“活化石”之称,为中国独存的珍稀名贵树种^[4-6]。银杏及其愈伤组织中含有黄酮、双黄酮等黄酮类化合物^[7],对心脑血管疾病具有独特疗效^[8-9],因此银杏叶提取物及其制剂在国际市场上供不应求^[3]。自然条件下,银杏叶中黄酮含量也较高^[10]。但银杏栽培需要大量面积,生长周期长,且易受多种外界条件影响^[11-12]。近年我国研究人员发现诱导的银杏愈伤组织中也含有黄酮类物质,目前有利用银杏愈伤组织的细胞悬浮培养来生产黄酮类次生代谢产物的研究^[13-15]。从愈伤组织中提取黄酮类物质,能有效缩短生产周期,满足工业化生产需要^[1],对黄酮类物质生产量提高和加工产业发展有重大意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

银杏叶片、叶柄、树皮等外植体均采自吕梁学院校园内银杏树。

1.2 试验方法

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表选择最适合外植体的消毒配比,

外植体(A)选择叶片、叶柄、树皮。将 10% 次氯酸钠消毒时间(B)设计为 3 个梯度 3、6、9 min,将 75% 乙醇消毒时间(C)设计为 3 个梯度分别为 40、50、60 s(表 1)。

表 1 外植体和消毒时间的正交设计因素和水平

水平	因素		
	A:外植体	B:10% 次氯酸钠消毒时间(min)	C:75% 乙醇消毒时间(s)
1	叶片	3	40
2	叶柄	6	50
3	树皮	9	60

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表选择诱导银杏愈伤组织最适宜激素种类和浓度配比,KT 水平设置为 0、0.2、0.4 mg/L,6-BA 水平设置为 0.5、1.0、1.5 mg/L,2,4-D 水平设置为 0、0.5、1.0 mg/L(表 2)。

表 2 诱导愈伤组织的正交设计因素和水平

水平	因素			
	D:KT(mg/L)	E:6-BA(mg/L)	F:2,4-D(mg/L)	
1	0.0	0.5	0.0	
2	0.2	1.0	0.5	
3	0.4	1.5	1.0	

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表选择愈伤组织增殖最适宜激素浓度配比,KT 水平设置为 1.0、1.5、2.0 mg/L,6-BA 水平设置为 0.5、1.0、1.5 mg/L,2,4-D 水平设置为 0.0、1.0、2.0 mg/L,NAA 水平设置为 0.5、1.0、1.5 mg/L(表 3)。

收稿日期:2018-03-14

基金项目:山西省高等学校教学改革项目(本科)(编号:J2013114);

吕梁学院自然科学基金(编号:IRQN201611)。

作者简介:王霞霞(1986—),女,山西吕梁人,助教,从事园林植物栽培、养护和应用研究。E-mail:619170001@qq.com。

[16] Benfey P N, Chua N H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants [J]. Science, 1990, 250(4983): 959-966.

[17] Christensen A H, Sharrock R A, Quail P H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18(4): 675-689.

[18] McElroy D, Zhang W, Cao J, et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation [J]. The Plant Cell, 1990, 2

(2): 163-171.

[19] Kumpatla S P, Chandrasekharan M B, Lyer L M, et al. Genome intruder scanning and modulation system and transgene silencing [J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(3): 97-104.

[20] Shirasawa - Seo N, Mitsuahara I, Nakamura S, et al. Constitutive promoters available for transgene expression instead of CaMV 35S RNA promoter; *Arabidopsis* promoters of tryptophan synthase protein subunit and phytochrome B [J]. Plant Biotechnology, 2002, 19(1): 19-26.

表 3 愈伤组织增殖的正交设计因素和水平

水平	因素			
	G;KT (mg/L)	H;6-BA (mg/L)	I;2,4-D (mg/L)	J;NAA (mg/L)
1	1.0	0.5	0.0	0.5
2	1.5	1.0	1.0	1.0
3	2.0	1.5	2.0	1.5

1.3 双黄酮提取

应用十字交叉法随机取样愈伤组织,放置在 60 ℃电热鼓风干燥箱中烘干至恒质量;把烘干的愈伤组织置于研磨器中研磨成粉末,在冷冻箱中冷冻保存备用。

用醇提法^[16]提取愈伤组织中的双黄酮;以芸香苷为标准品制作标准曲线^[17-18],采用高效液相色谱仪^[19-20]测量双黄酮的含量。

1.4 计算及数据处理

存活率 = 存活的外植体数/接种的外植体数 × 100%;
愈伤组织诱导率 = 诱导产生愈伤组织的个体数/存活个体数 × 100%;
愈伤组织增殖倍数 = (培养 30 d 后装有愈伤组织培养皿质量 - 取出愈伤组织培养皿质量)/(接种愈伤组织后培养皿质量 - 接种前装有培养基的培养皿质量)。
数据用 SPSS 软件处理。
芸香苷标准曲线方程为: $y=0.062\ 4x+13.943\ 6$;双黄酮得率依据梁文惠等的方法^[18]计算。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂消毒时间对不同外植体成活率的影响

由表 4 可知,叶片作为外植体成活率明显高于叶柄和树皮。10% NaClO 消毒时间 6 min 成活率明显高于 3 min 和 9 min,说明 10% NaClO 消毒时间过长和过短都不利于外植体的成活。75% 乙醇消毒时间为 40 s 成活率高于 50 s 和 60 s,说明乙醇消毒时间不宜过长。又经极差分析可知,外植体、10% NaClO、75% 乙醇的成活率极差分别为 13.36、26.75、9.30 百分点,因此,影响外植体成活的主次关系为:10% NaClO > 外植体 > 75% 乙醇。由此可得到最优水平组合为 A₁B₂C₁,即外植体为叶片、10% NaClO 消毒时间为 6 min,75% 乙醇消毒时间为 40 s。

表 4 不同消毒时间外植体成活率 L₉ (3⁴) 正交试验结果

序号	因素			成活率 (%)
	A	B	C	
1	1	1	1	67.67
2	1	2	2	69.49
3	1	3	3	82.62
4	2	1	2	51.92
5	2	2	3	78.00
6	2	3	1	69.52
7	3	1	3	28.53
8	3	2	1	79.86
9	3	3	2	72.30
k ₁	73.59	49.37	72.35	
k ₂	66.48	76.12	64.90	
k ₃	60.23	74.81	67.05	
R	13.36	26.75	9.30	

将上述最优消毒条件组合进行一次验证试验,得到外植体成活率为 84.21%,高于表 4 中所有 9 组试验的成活率,故确定最优试验组合为 A₁B₂C₁。

2.2 不同激素浓度对愈伤诱导的影响

由表 5 可知,0.2 mg/L 的 KT 诱导率均高于不加 KT 和 0.4 mg/L KT,说明 KT 浓度过低和过高都不利于诱导愈伤组织。1.0 mg/L 6-BA 诱导率高于 0.5 mg/L 6-BA 和 1.5 mg/L 6-BA,说明适宜的 6-BA 浓度有利于诱导愈伤组织。1.0 mg/L 2,4-D 诱导率高于 0.5 mg/L,说明要诱导愈伤组织 2,4-D 浓度不能过低。经极差分析可知,KT、6-BA、2,4-D 的诱导率极差为 11.11、8.89、15.55 百分点,因此,影响愈伤组织诱导的主次关系为:2,4-D > KT > 6-BA。由此可得到最优水平组合为 D₂E₂F₃,即 0.4 mg/L KT、1.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L 2,4-D。

表 5 不同激素浓度对愈伤诱导率 L₉ (3⁴) 正交试验结果

序号	因素			诱导率 (%)
	D	E	F	
1	1	1	1	33.33
2	1	2	2	53.33
3	1	3	3	40.00
4	2	1	2	46.67
5	2	2	3	60.00
6	2	3	1	40.00
7	3	1	3	53.33
8	3	2	1	26.67
9	3	3	2	33.33
k ₁	42.22	44.44	35.56	
k ₂	48.89	46.67	44.44	
k ₃	37.78	37.78	51.11	
R	11.11	8.89	15.55	

设计的 9 组试验中 5 号试验与理论最优组合吻合,故不用再做对比试验,最优组合为 5 号试验,即 D₂E₂F₃。

2.3 不同激素浓度对愈伤组织增殖的影响

由表 6 可知,1.5 mg/L KT 的增殖倍数均高于 1.0 mg/L KT 和 2.0 mg/L KT,说明 KT 浓度过低和过高都不利于愈伤组织增殖。1.0 mg/L 6-BA 增殖倍数高于 0.5 mg/L 6-BA 和 1.5 mg/L 6-BA,说明适宜的 6-BA 浓度有利于愈伤组织增殖。2.0 mg/L 2,4-D 增殖倍数高于不加和加 1.0 mg/L 2,4-D,说明愈伤组织增殖的 2,4-D 浓度不能过低。1.5 mg/L NAA 增殖倍数高于 0.5 mg/L 和 1.5 mg/L NAA,说明愈伤组织增殖 NAA 浓度也不能过低。经极差分析可知,KT、6-BA、2,4-D、NAA 的增殖倍数极差为 1.08、0.18、0.28、0.17,因此,影响愈伤组织诱导的主次关系为:KT > 2,4-D > 6-BA > NAA。由此可得到最优水平组合为 G₂H₂I₃J₃,即:1.5 mg/L KT、1.0 mg/L 6-BA、2.0 mg/L 2,4-D、1.5 mg/L NAA。验证试验结果表明:该组合条件下的愈伤组织增殖倍数为 2.92,高于设计的 9 组试验的增殖倍数,可以确定该组合为最优条件。

2.4 愈伤组织中双黄酮的含量

试验结果表明,愈伤组织中双黄酮在波长 260 nm 处有最大吸收峰,与双黄酮标准样品的吸收峰波长在 60 min 出峰,峰形尖锐而且没有杂峰。样品在相应的时间段内也出峰,与

表 6 不同激素对愈伤组织增殖 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	因素				增殖倍数
	G	H	I	J	
1	1	1	1	1	1.52
2	1	2	2	2	2.08
3	1	3	3	3	1.99
4	2	1	2	3	2.56
5	2	2	3	1	2.61
6	2	3	1	2	2.32
7	3	1	3	2	1.51
8	3	2	1	3	1.42
9	3	3	2	1	1.33
k_1	1.86	1.86	1.75	1.82	
k_2	2.50	2.04	1.99	1.97	
k_3	1.42	1.88	2.03	1.99	
R	1.08	0.18	0.28	0.17	

标准样品出峰时间基本吻合。由标准曲线、峰面积,对标样浓度计算相关系数为 0.9962,相关性好。参照芸香苷标准曲线算得的双黄酮得率为 15.62 mg/g。

3 讨论与结论

由于主客观条件的局限性,对成活的外植体没有进行脱毒检测,再后期的继代增殖中容易爆发大范围的感染。对于外植体消毒试验应该对试验过程产生的各种微生物进行分离纯化,鉴定微生物的种类和分析微生物产生的原因。

在正交试验中 2,4-D 的浓度没有筛选出最佳浓度,在后期的试验中应对其设置多个浓度梯度进行单因素试验,筛选出 2,4-D 的浓度对诱导愈伤组织的最佳浓度,这样试验才更具完整性和精确性。

愈伤组织双黄酮的得率比自然条件下叶片的得率高,但与邓祥宜等的得率^[21]有差别。可能与愈伤组织的生长增殖的速率和继代次数有关,也可能与双黄酮的提取条件有关。在后续的试验中应进一步研究不同时期的愈伤组织和增殖代数对双黄酮含量的影响和提取条件的优化。

用银杏愈伤组织提取双黄酮的提取率比较高^[21],而且比用银杏叶提取双黄酮提取率要高得多^[22]。这样可以打破季节的束缚,也可以提高双黄酮的获得量,可以很好地满足市场需求。

参考文献:

- [1] 任鹏斌,王阿姣,李 波,等. 银杏叶片愈伤组织诱导的激素组合培养条件分析[J]. 湖北农业科学,2016(1):216-219.
- [2] 葛金涛,吴秋月,刘兴满,等. 银杏雄株叶片聚戊烯乙酸酯水解的最佳工艺研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(16):170-173.

- [3] 金党琴. 银杏酚酸与印楝素及其复合混配剂对小菜蛾的毒效研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):76-77.
- [4] 王莲辉,邓龙玲,杨方成,等. 银杏快速繁殖及脱毒技术研究[J]. 中国野生植物资源,2003,22(2):53-55.
- [5] 段芋竹,赵兴云,杨德菊,等. 银杏树轮中的铅元素对山东临沂环境变化的指示作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):474-477.
- [6] 张 斌,周广柱,聂义丰,等. 干旱胁迫对银杏幼苗叶片光合性状的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):202-205.
- [7] 周建钟,赵琦君,陈如祥,等. 银杏叶化学成分提取状况及其开发利用[J]. 江西林业科技,2009(3):35-37.
- [8] 李长龄,王银叶. 血小板活化因子及其受体拮抗剂[J]. 中国药理学通报,1993,9(4):2465-2466.
- [9] 卢 鑫,高 尔. 银杏苦内酯药理作用的研究进展[J]. 中国药房,2006,17(3):221-223.
- [10] Leng P S,Su S C. Distribution of terpene lactones in *Ginkgo biloba* and the regulation effect of chlorocholine chloride on their biosynthesis[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2004,13(2):54-55.
- [11] Wang H F,Ju X. Effects of altitudes and seasons on the flavonoid content of *Ginkgo biloba* leaves[J]. Chemistry and Industry of Forest Products,2002,22(4):47-50.
- [12] Cheng S Y,Gu M R. Comments on the factors influencing flavonoid content of leaf in *Ginkgo biloba*[J]. Journal of Hubei Agricultural College,1999,19(2):110-112.
- [13] 秦卫东,高明侠,吕兆启. 银杏愈伤组织培养及其黄酮生物合成的初步探讨[J]. 食品科学,2002,23(11):38-41.
- [14] 胡燕梅,唐兴国,宋鹏飞,等. 银杏叶愈伤组织培养及黄酮积累的正交实验优化[J]. 化学与生物工程,2009,9(9):59-62.
- [15] 邵菊芳,朱红威,马 毅,等. 银杏愈伤组织细胞中总黄酮提取工艺的比较[J]. 中国农学通报,2011,27(30):237-240.
- [16] 王宝文. 贡菊茎尖愈伤组织诱导及其黄酮类化合物提取的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2008.
- [17] 马云峰. 理化因子对银杏组织培养中黄酮类化合物产生影响的研究[D]. 开封:河南大学,2003.
- [18] 梁文惠,黄 翔,林丽春,等. 银杏愈伤组织黄酮提取条件的正交实验优化[J]. 食品工业科技,2015,36(9):209-213.
- [19] 吕金丽,杨 彪,李孟璇,等. 高效液相法同时测定银杏叶中 11 种成分的含量[J]. 中国中药杂志,2017,35(5):931-935.
- [20] 张锁科,马晖玲. 不同施肥下草地早熟禾 GA_3 含量动态变化与生长相关性分析[J]. 甘肃农业大学学报,2015,50(1):103-109,115.
- [21] 邓祥宜,刘孟雪,盛煜纯,等. 正交实验及响应面法在银杏愈伤组织黄酮提取条件优化中的比较[J]. 应用化工,2015,11(11):2148-2151.
- [22] 王霞霞,薛瑞婷,李 栋,等. 季节和光照对银杏叶双黄酮含量得影响[J]. 中国园艺文摘,2017(12):39-41.