

金磊磊,李泽坤,金 慧,等. 间歇浸没植物生物反应器培养栀子愈伤组织及产藏红花素条件研究[J]. 江苏农业科学,2022,50(2):42-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.02.007

间歇浸没植物生物反应器培养栀子愈伤组织 及产藏红花素条件研究

金磊磊¹, 李泽坤¹, 金 慧¹, 朱星扬¹, 张保钱¹, 蒋海侠¹, 陈集双^{1,2}

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 211816; 2. 遵义医科大学生物资源健康利用研究中心, 贵州遵义 563000)

摘要:为建立栀子愈伤组织的间隙浸没植物生物反应器高通量培养体系,同时探讨诱导剂对栀子愈伤组织中藏红花素合成的影响。以 MS+2.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.2 mg/L 萘乙酸(NAA)+30 g/L 蔗糖为增殖培养基,在 40 d 的培养时期内,栀子愈伤组织在植物生物反应器中生长状况良好,增殖系数呈升高趋势。对不同培养时间(20、30、40 d)和添加诱导剂处理的栀子愈伤组织中的藏红花素含量进行检测,结果表明,随着培养时间的增加,栀子愈伤组织中的藏红花素含量显著提高,在培养 40 d 时达到了 0.206 5 mg/g;添加 CuSO₄ 和茉莉酸甲酯(MeJA)促进了栀子愈伤组织中藏红花素的合成,单位质量栀子愈伤中的藏红花素含量显著增加,培养 30 d 时达到 0.372 3 mg/g。

关键词:栀子;愈伤组织;藏红花素;植物生物反应器;诱导剂

中图分类号:S567.04 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)02-0042-05

栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis.),别称黄栀子、山栀子、林兰等,属于茜草科栀子类植物,栀子花是卫生部颁布的第 1 批药食两用资源。栀子作为传统中药,具有护肝、利胆、降压、镇静、止血、消肿等作用^[1]。栀子含有黄酮类、有机酸酯类、多糖类、醛类、醇类、长链烷烃类等化合物成分,其中栀子果实中主要的有效成分为藏红花素(crocine)、藏红花

酸和栀子苷^[2]。藏红花素又名西红花苷,主要来源于藏红花的成熟花丝中,是藏红花的有色成分且是主要成分^[3]。研究表明,藏红花素具有降血脂、抗肿瘤等功效。由于藏红花以柱头入药,且藏红花适宜种植区域有限,高品质的藏红花资源短缺,年产量极低。栀子繁殖以扦插和实生苗种植为主,现有资源量大,可作为制备藏红花素的植物资源。

不同品种和产地栀子果中藏红花含量不同,目前报道的栀子果中藏红花素含量均在 1% 以内^[4-8]。石凤鸣等发现随着栀子果实的成熟,藏红花素的含量显著增加^[9]。付小梅等通过研究发现,藏红花素在 pH 值为 6.0~7.0 之间最稳定并且光照、温度均能影响其稳定性^[10]。陈雁等利用高效液相色谱(HPLC)法测定了不同产地栀子中的藏红花素含量,其中江西吉安栀子果实的藏红花素含量

收稿日期:2021-05-16

基金项目:江苏先进生物与化学制造协同创新中心项目(编号:XTD1825);国家自然科学基金(编号:31560079)。

作者简介:金磊磊(1987—),男,浙江东阳人,硕士,实验师,从事植物细胞工程、药用植物天然产物开发方面的研究。E-mail:jinleilei2011@163.com。

通信作者:陈集双,博士,教授,博士生导师,从事生物资源学研究。E-mail:biochenjs@njtech.edu.cn。

Scientia Horticulturae,2005,106(2):213-227.

[12] Zhao X, Du Y N, Zhang Y C, et al. Effective detection of Lily Symptomless Virus using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method[J]. Australasian Plant Pathology, 2019,48(4):373-374.

[13] 席梦利,王节萍,章静娟,等. 宜兴百合脱毒技术[J]. 江苏农业学报,2001,17(1):49-51.

[14] 徐品三,栾雨时,刘纪文,等. 百合不定芽培养脱毒种球生产的研究[J]. 植物学通报,2003,20(3):313-318.

[15] Kumar S, Kanwar J K, Sharma D R. In vitro propagation of *Lilium* [J]. Advances in Horticultural Science,2006,20(2):181-188.

[16] 孙红梅,宋胜利,申屠玥,等. 亚洲百合 Strawberry and Cream 花器官组织快繁技术研究[J]. 沈阳农业大学学报,2015,46(1):7-12.

[17] 高 洁,王元忠,黄衡宇. 绿花百合胚性愈伤组织诱导与植株再生研究[J]. 植物研究,2016,36(1):52-57.

[18] 柯义强,郭鹏辉,马洪鑫,等. 兰州百合组培快繁体系的构建[J]. 浙江农业学报,2020,32(6):1000-1008.

[19] 任明波,杨 毅,刘 杰,等. 南川百合资源现状及组培快繁技术研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2019,41(11):19-24.

[20] 吴青青,王维泽,崔 崑,等. 百合茎尖培养材料的筛选及其组培配方的优化[J]. 贵州农业科学,2019,47(9):69-73.

最高,达到了 0.68%^[11]。据研究报道,栀子的愈伤组织中也存在微量的藏红花素。陈书安等对产藏红花素的栀子愈伤组织进行了诱导和筛选,从而筛选出产藏红花素的栀子细胞系,其中 1 个细胞系的藏红花素含量达 0.348 mg/g^[12]。

笔者所在课题组自主开发了用于植物高通量繁育的间歇浸没式植物生物反应器,前期研究表明,该系统有利于带块茎(鳞茎)的植物繁殖体、植物愈伤组织、兰科植物原球茎等的增殖扩繁,在白芨、半夏、金钗石斛等药用植物种苗和组织器官的繁育上取得了较好的应用效果^[13-15]。本研究基于植物生物反应器培养系统,以期建立栀子愈伤的高通量增殖体系,并探索通过植物生物反应器持续生产栀子愈伤、产藏红花素的优化方法。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 4 月,选取固体组培瓶中培养 30 d 的山栀子愈伤组织作为增殖材料,开展植物生物反应器培养体系研究及藏红花素含量检测。栀子果实为购买的药用山栀子果实。本试验在南京工业大学

生物资源工程研究所开展。

1.2 植物生物反应器培养

取 30 d 固体预培养的愈伤组织 15 g,转接至含有 1 000 mL 液体培养基的植物生物反应器内,于 24 ℃ 下进行暗培养,间歇浸没频率为 3 min/4 h。液体培养基配方为 MS + 2.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA) + 0.2 mg/L 萘乙酸(NAA) + 30 g/L 蔗糖, pH 值为 5.8。在培养基中添加 CuSO₄、茉莉酸甲酯(MeJA)进行藏红花素合成诱导试验,设置 2 种添加方式: 500 μmol/L CuSO₄、500 μmol/L CuSO₄ + 100 μmol/L MeJA,处理组和空白对照均重复接种 3 个植物生物反应器。

1.3 栀子愈伤的细胞结构观察

将植物生物反应器培养 30 d 的愈伤组织放入 1% 的 NaCl 溶液中,于 120 r/min、28 ℃ 下摇瓶培养 2 d。取少量愈伤组织细胞用中性红染色,放于光学显微镜下观察。

1.4 栀子愈伤增殖系数的测定

栀子愈伤在反应器中培养 30 d 后,观察其生长情况并统计分析。用分析天平称量栀子愈伤的鲜质量。栀子愈伤增殖系数的测定公式:

$$\text{栀子愈伤增殖系数} = \frac{\text{培养 30 d 后栀子愈伤的鲜质量} - \text{转接时栀子愈伤的鲜质量}}{\text{转接时栀子愈伤的鲜质量}}$$

1.5 藏红花素的提取

将不同培养处理的栀子愈伤组织以及栀子果实样品置于 60 ℃ 恒温烘箱中 5~6 h 至恒质量后研磨得粉末。称取粉末样品 1 g,用 50% 甲醇稀释倒入 50 mL 离心管中,超声破碎 30 min。再放入振荡培养箱中室温振荡提取 2 h,3 500 r/min 转速下离心 20 min,取上清液。向离心沉淀物中加入 10 mL 50% 的甲醇,继续再振荡提取 1 h,离心后再次回收上清液。将 2 次上清液合并,于 50 ℃ 旋转蒸发,50% 甲醇(色谱级)溶解浸膏,定容至 10 mL,保存备用。

1.6 藏红花素的检测

液相色谱检测前,将 50% 甲醇溶解的样品通过 0.22 μm 有机滤膜过滤。

1.6.1 液相色谱条件的选择 色谱柱选用 Innoval AQ C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流速设置为 0.7 mL/min;检测波长为 440 nm;柱温为 25 ℃;流动相: 甲醇与水体积比为 53 : 47;进样量为 10 μL。

1.6.2 液相色谱标准曲线的建立 用分析天平精密称取藏红花素标准品 0.005 g,用 50% 甲醇稀释配成 0.5 mg/mL 藏红花素标准品母液。取藏红花素标准品母液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 至 5 mL 容量瓶中,配成浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.50 mg/mL 的标准品溶液。检测时进样 10 μL,重复 3 次,测定完后,建立和绘制标准曲线及线性回归方程(横纵坐标分别为溶液浓度和出峰面积)。

1.6.3 数据分析 取处理好的栀子愈伤样品和对照样品按照“1.6.1”节中设定的液相色谱条件进行检测,并按照“1.6.2”节中建立的标准曲线,将与标准品同一出峰时间的峰面积换算成甲醇溶解液中的藏红花素含量,再根据以下公式,计算得到样品和对照品中的藏红花素含量。 A 为根据标准曲线计算到的浓度(mg/mL),粉末质量为 1 g 栀子愈伤干质量。

$$\text{样品中藏红花素含量(mg/g)} = \frac{A \times 10 \text{ mL 甲醇定容体积}}{1 \text{ g 栀子愈伤粉末质量}}$$

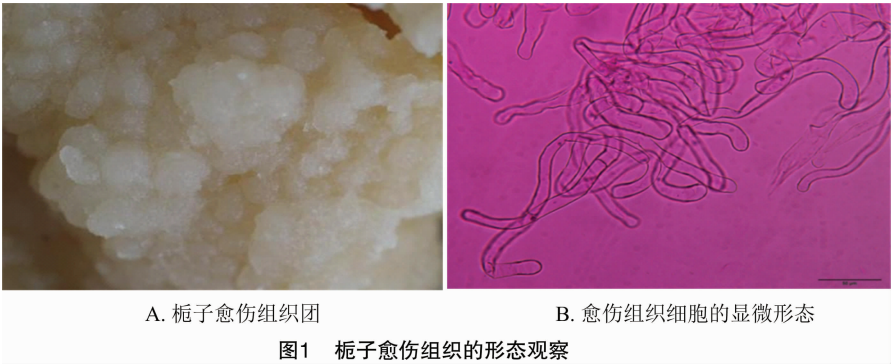
试验数据通过 SPSS 20.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 栀子愈伤的植物生物反应器培养体系

栀子愈伤组织的质地结构疏松,随着培养时间的增加,愈伤块逐步增大,颜色从白色变为淡黄色,与固体组培培养的愈伤状态一致;栀子愈伤组织团

整体呈淡化黄色,表面较为光滑湿润,见少量丝状毛刺(图 1 - A)。由于细胞重叠不易将其平铺展开,遂取少量愈伤放于摇瓶培养将细胞分散,加入 1% NaCl 溶液可以让愈伤组织失水,以便观察细胞结构。在光学显微镜下,单个愈伤细胞呈长条状,中间无隔膜,细胞壁较薄(图 1 - B)。



从增殖系数来看(表 1),不添加 CuSO₄,当培养时间为 40 d 时,增殖系数达到 1.902。培养 20 d 时,增殖系数最低,为 1.175。由此可知,在 40 d 的培养时期内,栀子愈伤组织在植物生物反应器中增殖状态良好,且仍有继续增殖的趋势(图 2 - A、图 2 - B)。

表 1 不同处理下的栀子愈伤组织增殖系数

处理	增殖系数
培养 20 d	1.175 ± 0.013
培养 30 d	1.427 ± 0.016
培养 40 d	1.902 ± 0.023
培养 30 d (添加 CuSO ₄)	0.487 ± 0.012
培养 30 d (添加 CuSO ₄ + MeJA)	0.348 ± 0.007

添加 CuSO₄ 和 MeJA 后,在植物生物反应器中培养 30 d 栀子愈伤细胞团颜色基本呈褐色(图 2 - C、图 2 - D),愈伤细胞团的数量比对照培养组少,愈伤组织增殖缓慢。添加 500 μmol/L CuSO₄ 的栀子愈伤增殖系数为 0.487,添加 2 种诱导剂的栀子愈伤增殖系数为 0.348(表 1)。由此可知,添加一定浓度的 MeJA、CuSO₄ 对栀子愈伤的生长具有抑制作用,不利于愈伤组织的增殖。

2.2 产藏红花素培养条件的优化

2.2.1 藏红花素标准曲线的建立 根据不同浓度藏红花标准品的 HPLC 检测峰图数据,绘制藏红花素浓度的标准曲线(图 3),并得到计算公式: $y = 64\,584.0x - 1\,407.9$, $r^2 = 0.998\,1$ 。其中, y 为峰面积, $\text{mAu} \cdot \text{s}$; x 为藏红花素含量, mg/mL 。

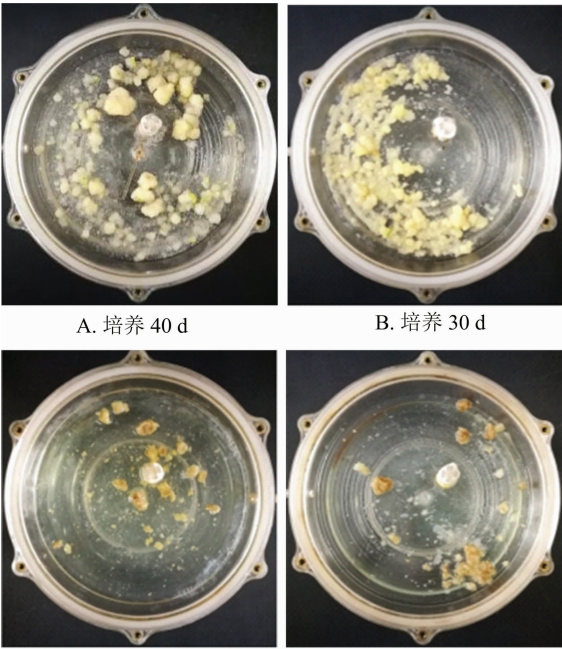
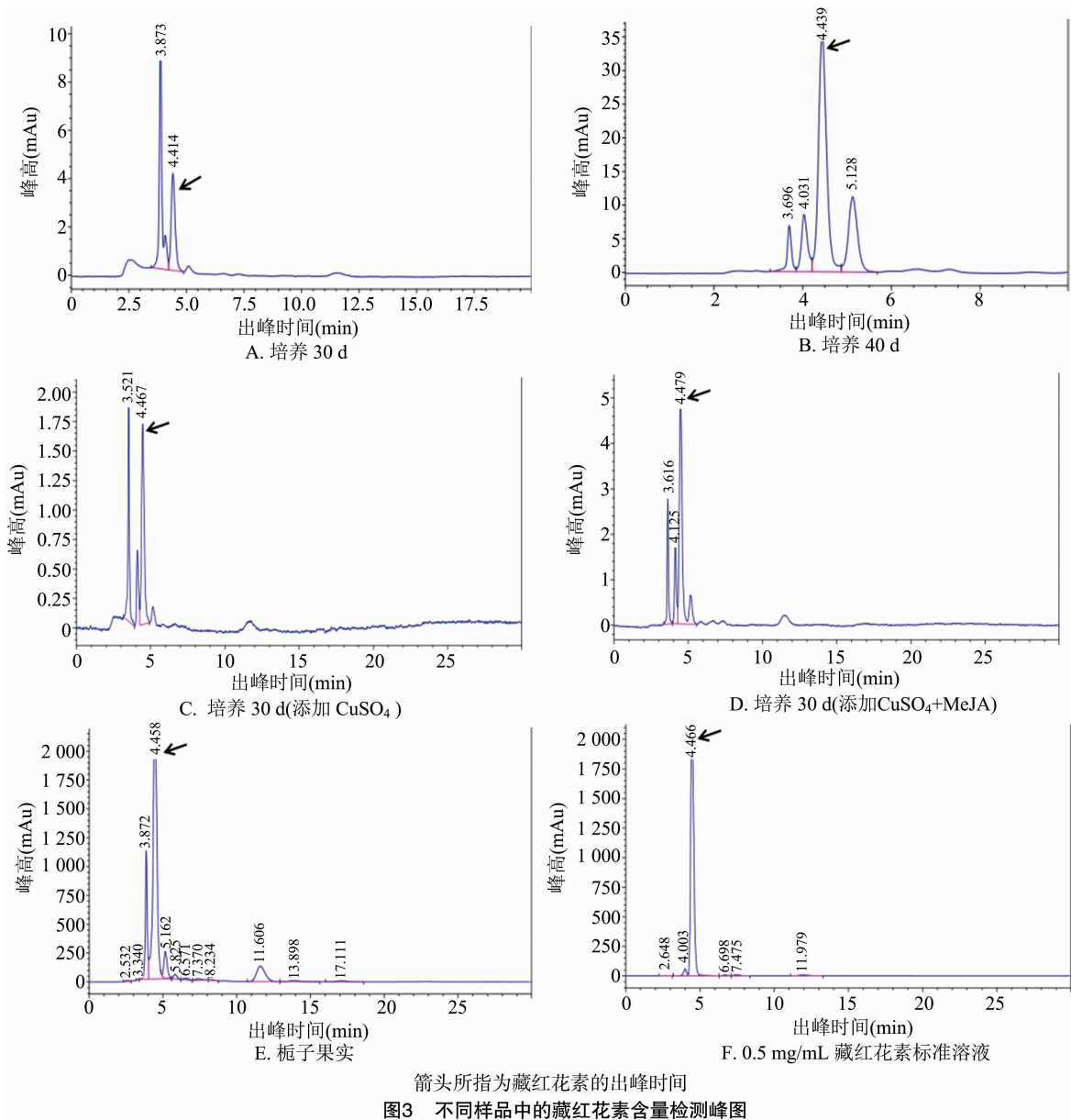


图2 不同处理植物生物反应器中栀子愈伤的培养形态

2.2.2 不同处理栀子愈伤组织中的藏红花素含量

试验中发现,固体培养 30 d 和反应器培养 20 d 的样品峰面积太小,含量达不到检测下限。除此之外,栀子果实、植物生物反应器中培养 30、40 d,以及添加 CuSO₄ 和 MeJA 后培养 30 d 的栀子愈伤的提取物中均有明显的藏红花素检测峰。本试验中藏红花素的出峰时间为(4.4 ± 0.1) min(图 3)。

根据标准曲线计算进样样品中藏红花素含量,



箭头所指为藏红花的出峰时间
图3 不同样品中的藏红花素含量检测峰图

并利用“2.2.1”节中的计算公式换算各个样品中藏红花素的质量浓度。不同样品中的藏红花素含量见表 2。

由表 2 可知, 梔子果实中的藏红花素含量为

表 2 不同处理样品中的藏红花素含量

样品名	藏红花素含量 (mg/g)
梔子果实	6.740 0±0.023 4
梔子愈伤(添加 CuSO ₄ 、培养 30 d)	0.350 9±0.003 3
梔子愈伤(添加 CuSO ₄ +MeJA、培养 30 d)	0.373 2±0.003 4
梔子愈伤(培养 30 d)	0.145 4±0.000 2
梔子愈伤(培养 40 d)	0.206 5±0.001 6

注:以上含量均以梔子愈伤干质量计算。

6.74 mg/g,与相关报道的梔子果实中藏红花素含量^[9]基本一致。植物生物反应器中培养 30 d 的愈伤组织中藏红花素含量为 0.145 4 mg/g,40 d 为 0.206 5 mg/g,二者间差异显著(图 4)。添加诱导剂处理后,藏红花素含量显著增加,其中添加 CuSO₄ 处理后藏红花素含量为 0.350 9 mg/g,2 种诱导剂组合处理为 0.373 2 mg/g(表 2),相较不添加诱导剂的处理中藏红花素含量差异显著。由此可得,诱导剂的添加能显著提高梔子愈伤中藏红花的含量。

3 讨论与结论

本试验建立了梔子愈伤的植物生物反应器高通量扩繁体系,并分析了不同培养时间(20、30、

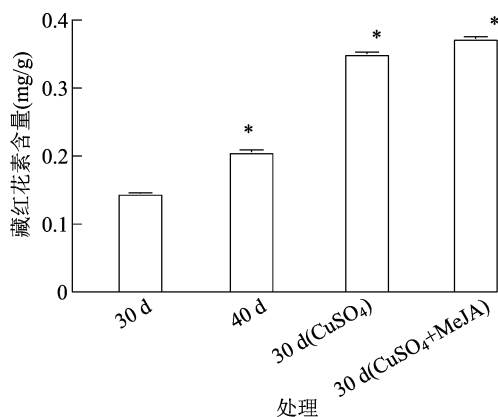


图4 诱导剂处理后栀子愈伤中的藏红花素含量变化

40 d)和诱导剂处理的栀子愈伤组织中的藏红花素含量。以固体组培瓶中培养 30 d 的栀子愈伤为增殖材料,在培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖, pH 值为 5.8 的条件下,植物生物反应器中栀子愈伤的增殖状态良好,增殖系数高,优于同期的固体培养。同时,培养 40 d 的单质量栀子愈伤的藏红花素含量显著高于培养 20、30 d 的栀子愈伤组织,表明在一定的培养时期内藏红花素含量随愈伤的增殖而积累。诱导剂可促进栀子愈伤组织中藏红花素合成,添加 CuSO₄ 和 MeJA 2 种诱导剂时,单质量栀子愈伤中的藏红花素含量显著增加,达到 0.372 3 mg/g。

按照结实情况,栀子分为药用栀子和赏花栀子。广泛种植的赏花栀子(如重瓣栀子、大花栀子)只开花不结果;山栀子及其变种水栀子为主要的药用栀子品种,由于栽培条件、品种资源和生产加工方式的制约,其栽培和利用尚未形成规模,影响了藏红花素等活性物质的制备和开发应用。植物细胞工程手段为藏红花素的快速高效生产提供了可行的技术方案。已有相关研究利用选育的藏红花细胞系和栀子细胞系来制备藏红花素^[12,16],并有研究利用固液 2 步法来提高栀子愈伤组织中藏红花素的产量^[17]。本试验利用植物生物反应器培养栀子愈伤组织,表现了较高的增殖效率,且培养周期短,不受土地、环境、季节的影响,具备生产藏红花素的潜力。

本试验结果表明,栀子愈伤中藏红花素含量明显低于栀子果实中的含量;添加诱导剂在一定程度上抑制了愈伤组织的增殖,实际每罐植物生物反应器的栀子愈伤产量较低,影响了藏红花素收率。后

续试验将根据反应器中栀子愈伤的生长状态和藏红花素含量积累规律,重点研究植物生物反应器的培养条件优化,如生长激素浓度、诱导剂组合和诱导剂添加时间等,探讨栀子愈伤组织在植物生物反应器中的有效培养周期以及藏红花素的有效积累时间,以期建立持续制备藏红花素的高产体系。

参考文献:

- [1] 任治军,张立明,何开泽. 栀子主要成分的提取工艺及药理研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(6):831-836,803.
- [2] 潘媛,李隆云,王钰,等. 我国主要栀子栽培资源分布与综合利用调查[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(10):1823-1830.
- [3] 袁丽红,陆玉婷,黄晶. 藏红花愈伤组织诱导和褐化抑制[J]. 南京工业大学学报(自然科学版),2009,31(6):21-26.
- [4] 杨艳,汤玉喜,唐洁,等. 药食两用黄栀子果实有效成分及其与农艺性状的相关性[J]. 中南林业科技大学学报,2019,39(1):15-19.
- [5] Chen Q C, Zhang W Y, Youn U, et al. Iridoid glycosides from gardeniae fructus for treatment of ankle sprain[J]. Phytochemistry, 2009,70(6):779-784.
- [6] 段启,陈华师. HPLC 法测定不同产地栀子中藏红花素的含量[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):299-301.
- [7] 吴敏,谷令彪,刘华敏,等. 栀子果油及藏红花素的分步萃取研究[J]. 食品科技,2017,42(1):231-235.
- [8] 倪勤学,高前欣,徐志丰,等. 2 种栀子果主要经济性状及栀子果仁油成分分析[J]. 中国粮油学报,2017,32(10):78-84.
- [9] 石凤鸣,王文君,陈维,等. 栀子指纹图谱及不同生长期西红花苷和栀子苷含量的研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(8):1874-1876.
- [10] 付小梅,王峰涛. 西红花苷-1 的稳定性研究[J]. 食品科学,2012,33(5):71-73.
- [11] 陈雁,杨中林,张雷红,等. HPLC 法同时测定栀子中藏红花素和藏红花酸的含量[J]. 内蒙古中医药,2011,30(2):64-65.
- [12] 陈书安,王晓东,赵兵,等. 产藏红花素栀子愈伤组织的诱导和筛选[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(6):50-54.
- [13] 陈集双,张本厚. 高通量植物生物反应器及其在遗传资源挖掘中的应用[J]. 生物资源,2020,42(1):117-123.
- [14] 张保钱,樊小宽,金磊磊,等. 利用植物生物反应器培养白及种苗的动力学模型[J]. 科技通报,2019,35(9):35-42.
- [15] 张杰,张本厚,贾明良,等. 利用间歇浸没植物生物反应器进行半夏组培快繁的研究[J]. 科技通报,2018,34(1):95-100.
- [16] Chen S, Wang X D, Zhao B, et al. Screening of *Crocus sativus* L. callus lines for crocin production[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2004,39(4):455-460.
- [17] 郭志刚,邓颖,刘瑞芝. 固液两步法的藏红花素生物合成[J]. 清华大学学报(自然科学版),2003,43(12):1609-1612.