

# 正交试验优化银杏胚愈伤组织继代培养及黄酮积累

胡燕梅, 张治华, 周骏江, 梅双喜, 宋鹏飞

(武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415)

**摘要:** 采用正交试验研究了基本培养基、NAA、6-BA、植酸(PA)4因素各3水平对银杏胚愈伤组织继代培养及黄酮积累的影响,并测定了愈伤组织生长曲线。结果表明:银杏胚愈伤组织继代培养的最佳组合是N<sub>6</sub>+NAA 3.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+0.1%PA,各因子影响程度为基本培养基>NAA>6-BA>PA;愈伤组织黄酮积累量最佳组合是B<sub>5</sub>+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+0.05%PA,各因子影响程度为NAA>PA>6-BA>基本培养基。愈伤组织生长曲线基本呈“S”型,黄酮积累的适宜培养周期为40~50 d。

**关键词:** 银杏;正交试验;愈伤组织;黄酮;植酸

**中图分类号:** S 664.303.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)12-0034-04

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是国际上近代植物药研究开发的热点之一<sup>[1-2]</sup>。这主要源于其叶中含有较高含量的黄酮类天然药物。黄酮类物质可使冠状动脉扩张,降低血脂,增加脑血流量,对心脑血管循环有明显的改善作用<sup>[3]</sup>。近年来,以银杏叶为原料加工提取黄酮的银杏产业在我国得到了迅速发展<sup>[4]</sup>。然而,大面积栽培银杏树占用了许多农作物耕地,同时银杏叶的生长及叶中黄酮含量也会受到自然环境的影响<sup>[5]</sup>。而利用植物细胞培养生产药用成分是近年来发展起来的新领域,它已成为开发药用植物资源的重要途径<sup>[6,7]</sup>。为了获得生长快速且生物量大的愈伤组织和积累最大量黄酮类物质,该试验以银杏胚愈伤组织为材料,采用正交试验设计方法研究愈伤组织继代培养和黄酮积累的影响因子,为银杏愈伤组织后期的悬浮培养及工业化生产提供一定的技术参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料武汉生物工程学院植物细胞工程实验室继代3次以上的银杏胚愈伤组织。培养方式为固体培养。50 mL三角瓶内分装20 mL固体培养基,每瓶接种量为鲜重0.3 g左右,于光照16 h/d、(25±1)℃光照培养箱中培养。

### 1.2 正交试验设计

正交表选用4因素3水平的L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)<sup>[8]</sup>,各因素的不同水平见表1。培养基为:试验号+3.0%蔗糖+0.7%琼脂,pH 5.8,各试验号设计见表2。

表1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验因素和水平表

水平 Levels	因素 Factors			
	基本培养基 Basic medium(A)	NAA /mg·L <sup>-1</sup> (B)	6-BA /mg·L <sup>-1</sup> (C)	PA (D)/%
1	N <sub>6</sub>	0.1	0.5	0.05
2	B <sub>5</sub>	1.0	1.0	0.1
3	MS	3.0	2.0	0.3

表2 4因素3水平L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计

试验号 Test teans	基本培养基 Basic medium(A)	NAA /mg·L <sup>-1</sup> (B)	6-BA /mg·L <sup>-1</sup> (C)	PA (D)/%
1	1(N <sub>6</sub> )	1(0.1)	1(0.5)	1(0.05)
2	1(N <sub>6</sub> )	2(1.0)	2(1.0)	2(0.1)
3	1(N <sub>6</sub> )	3(3.0)	3(2.0)	3(0.3)
4	2(B <sub>5</sub> )	1(0.1)	2(1.0)	3(0.3)
5	2(B <sub>5</sub> )	2(1.0)	3(2.0)	1(0.05)
6	2(B <sub>5</sub> )	3(3.0)	1(0.5)	2(0.1)
7	3(MS)	1(0.1)	3(2.0)	2(0.1)
8	3(MS)	2(1.0)	1(0.5)	3(0.3)
9	3(MS)	3(3.0)	2(1.0)	1(0.05)

### 1.3 愈伤组织生长参数测定

以1 L愈伤组织的鲜重(FW)表示培养过程中的愈伤组织生物量。培养50 d后测量愈伤组织鲜重,愈伤组织生长指数(Growth index)=(收获愈伤组织鲜重-接种愈伤组织鲜重)/接种愈伤组织鲜重。2次重复,每次6瓶,共计12瓶的平均值。

褐变程度等级划分:0级,外观鲜艳,淡黄色;1级,轻度褐变,基本呈黄白色;2级,褐变,黄褐色;3级,较严重褐变,褐色;4级,严重褐变,黑褐色<sup>[9]</sup>。

第一作者简介:胡燕梅(1979),女,硕士,讲师,现从事植物生物技术方面研究工作。E-mail: yanmeihuxia@foxmail.com.

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究资助项目(B20094008);武汉市高校科学研究资助项目(2008K079)。

收稿日期:2009-06-20

1.4 愈伤组织生长曲线测定

将胚愈伤组织继代于正交试验中筛选的优势组合  $N_6 + NAA 3.0 \text{ mg/L} + 6-BA 2.0 \text{ mg/L} + 0.1\%PA$  培养基中, 培养后每 10 d 随机抽取 6 瓶培养物, 称其鲜重, 计算愈伤组织生长指数, 绘制生长曲线。并将愈伤组织烘干, 测其总黄酮含量。

1.5 愈伤组织中黄酮的提取与含量测定

1.5.1 黄酮的提取 将培养 40 d 的愈伤组织称鲜重, 在  $70^\circ\text{C}$  烘干至恒重, 研细, 过 100 目筛, 精密称取 1 g, 20 mL 甲醇溶解, 超声波水浴 30 min, 过滤, 滤液加入  $1.5 \text{ mol/L HCl } 10 \text{ mL}$  于  $80^\circ\text{C}$  水浴回流 1 h, 冷却后甲醇定容至 50 mL, 最后通  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤后稀释 5 倍备用<sup>[10]</sup>。

1.5.2 槲皮素波谱峰值测定 槲皮素标准品购自上海融禾医药科技发展有限公司, 浓度为  $24 \mu\text{g/mL}$ , TU-1810 紫外可见分光光度计测其最大吸收峰值波长 366 nm。

1.5.3 槲皮素标准曲线 参考江静等方法<sup>[11]</sup> 准确称取烘至恒重的标样槲皮素, 甲醇完全溶解, 配成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{g/mL}$ , 以甲醇溶剂为空白对照, 366 nm 测各浓度吸光值, 重复 3 次, 取平均值绘制标准曲线

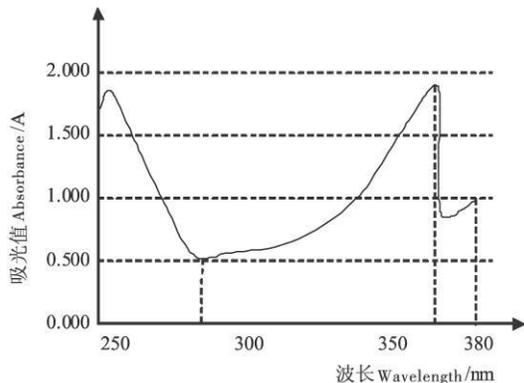


图 1 槲皮素波谱曲线图

Fig.1 Quercetin spectrum character curve

$$y = 0.1434x - 0.0549, R^2 = 0.9991.$$

1.5.4 黄酮含量测定 于 366 nm 测定各试验号愈伤组织提取物, 由标准曲线得槲皮素浓度, 并计算黄酮含量。总黄酮含量 = (槲皮素)  $\times 2.51 \times 5 \times 50 \text{ mg/愈伤组织干粉(g)}$ 。

表 3 银杏胚愈伤组织生长指数、黄酮含量及褐变影响

Table 3 *Ginkgo biloba* L. embryo callus growth index, flavonoids content and browning

试验号 Test teams	愈伤组织生长指数 Growth index of callus			黄酮含量 Flavonoids content/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			褐变等级 Class of browning
	平均 1 Average1	平均 2 Averag2	平均 Average	平均 1 Averag1	平均 2 Averag2	平均 Average	
1	4.56	5.26	4.91	3.86	4.30	4.08	1
2	6.34	7.08	6.71	2.42	2.74	2.58	2
3	8.29	9.49	8.89	2.55	2.73	2.64	3
4	1.65	1.85	1.75	2.95	3.17	3.06	4
5	4.24	4.54	4.39	3.37	2.91	3.14	3
6	5.00	5.40	5.20	3.20	3.48	3.34	3
7	7.19	7.87	7.53	3.20	3.28	3.24	0
8	3.98	4.60	4.29	2.82	2.58	2.7	0
9	6.57	7.57	7.07	3.03	3.17	3.1	2

2 结果与分析

2.1 各因素对试验效果影响的主次

培养 50 d 后, 可见多数处理的愈伤组织均有不同程度的生长, 但观察到接触培养基的愈伤组织生长较快, 而距培养基较远的愈伤组织已有褐变现象产生, 记录褐变等级。将各种处理愈伤组织取出, 称其鲜重, 计算愈伤组织生长指数。并将愈伤组织烘干称干重, 提取并检测黄酮量(结果如表 3)。

从试验结果的直观分析可以看出(表 4), A 因素(基本培养基)、B 因素(NAA)对银杏愈伤组织生长的影响较大, 而 C 因素(6-BA)和 D 因素(PA)对其影响较弱。从 4 因素的 R 值可确定它们对愈伤组织生长的影响程度的主次顺序为:  $A > B > C > D$ , 根据表 4 中各因素水平平均值(K)的大小, 可得银杏胚愈伤组织生长最优组合为  $A_1B_3C_3D_2$ , 即  $N_6 + NAA 3.0 + BA 2.0 + 0.1\%PA$  为

银杏胚愈伤组织生长的较适宜培养基。

表 4 胚愈伤组织生长指数和黄酮含量正交试验结果直观分析

Table 4 Intuitive analysis of embryo callus growth index and flavonoids content by orthogonal test

平均值 Average	A 生长指数 (黄酮含量)	B 生长指数 (黄酮含量)	C 生长指数 (黄酮含量)	D 生长指数 (黄酮含量)
$K_1$	6.830(3.100)	4.727(3.460)	4.797(3.373)	5.453(3.440)
$K_2$	3.780(3.180)	5.127(2.870)	5.173(2.913)	6.477(3.053)
$K_3$	6.297(3.013)	7.053(3.024)	6.937(3.007)	4.977(2.800)
R	3.050(0.167)	2.326(0.683)	2.140(0.460)	1.500(0.640)

注: 括号中为黄酮含量直观分析。

根据表 4 中 4 因素的 R 值可确定它们对愈伤组织黄酮积累量的影响程度的主次顺序为:  $B > D > C > A$ , 而根据各因素水平平均值(K)的大小, 可得银杏胚愈伤组织积累黄酮的最优条件组合为  $A_2B_1C_1D_1$ , 即  $B_5 + NAA 0.1 + BA 0.5 + 0.05\%PA$  银杏胚愈伤组织积累黄酮量

的较适宜培养基。

试验结果表明,影响银杏愈伤组织增殖和黄酮积累量的因子各不同,基本培养基对于银杏愈伤组织增殖是最主要的影响因子,而 NAA 却是影响黄酮积累量的主要因子。但 6-BA 对于两者的影响均较小。

### 2.2 各因素对试验效果影响的趋势分析

2.2.1 基本培养基对试验效果影响的趋势分析 从图 2 可以看出,3 种基本培养基对银杏愈伤组织生长和黄酮含量影响有很大区别。N<sub>6</sub> 和 MS 培养基均较适合于愈伤组织生长, B<sub>5</sub> 培养基却对愈伤组织生长不太理想。反之, B<sub>5</sub> 培养基较适合于总黄酮的积累,而 N<sub>6</sub> 和 MS 对黄酮的积累量却不理想。

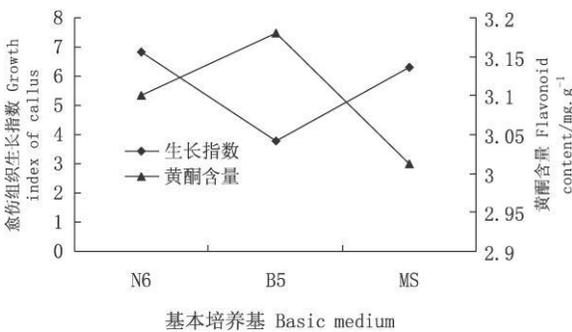


图 2 基本培养基与愈伤组织生长指数和黄酮积累关系

Fig.2 The effect of minimal midium on callus growth index and the content of flavonoid

2.2.2 其它 3 因素对试验效果影响的趋势分析 从图 3、4 可以看出,愈伤组织生长均随 2 种激素 NAA 和 6-BA 浓度的增加而呈递增趋势,即高浓度激素 NAA 3.0+BA 2.0 有助于愈伤组织增殖,而低浓度激素 NAA 0.1+BA 0.5 有助于黄酮积累。高浓度植酸对于愈伤组织增殖和黄酮积累量都不适合,但 0.1%植酸对于愈伤组织生长有促进作用,而 0.05%植酸有利于黄酮积累。同时从表 3 中可以看出,7、8、9 号处理褐变较轻,而 4、5、6 号处理褐变较重,表明愈伤组织褐变不仅受植酸浓度影响,还受基本培养基种类的影响。

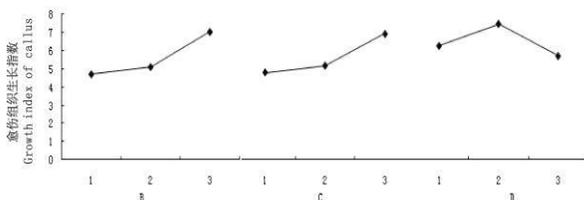


图 3 因素与愈伤组织生长指数

Fig.3 The effect of concentration of B C and D on callus growth index

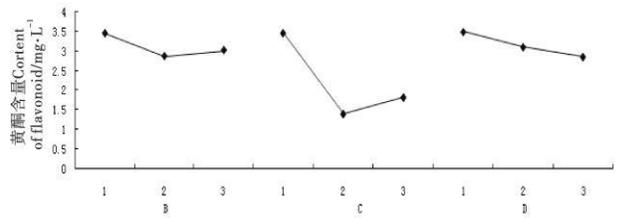


图 4 因素与黄酮积累量关系

Fig.4 The effect of concentration of B C and D on the content of flavonoid

该试验结果表明,从愈伤组织生长指数和黄酮积累量 2 个指标综合来看,很难达到培养基一致的情况。愈伤组织增殖要求在 N<sub>6</sub> 培养基上,且对 2 种激素水平均要求较高,而黄酮积累量却要求在 B<sub>5</sub> 培养基上,且要求 2 种激素浓度处于较低水平。而这 2 个指标均要求植酸浓度不能过高。

### 2.3 愈伤组织生长曲线及黄酮合成时间进程的测定

试验结果(图 4)表明,银杏愈伤组织生长曲线基本为 S 型,其中 0~10 d 为生长延缓期,10~40 d 为指数生长期,40~50 d 时生长平稳,鲜重增加量有所减缓,基本进入静止期。虽然愈伤组织的生长动态曲线与细胞培养中的生长曲线相似,但由于愈伤组织中细胞的同步化程度没有悬浮细胞培养中的高,在培养后期还有一部分细胞在增殖,从而造成愈伤组织生长曲线不是标准的“S”型。

随着培养时间的延长,黄酮含量基本随愈伤组织增长而逐渐增加,40 d 后黄酮含量的增长速度变慢。从图 4 中可以看出,黄酮的合成曲线与愈伤组织生长曲线生长同步,属于同步合成型。在利用愈伤组织生产黄酮过程中,较适宜的培养周期为 40~50 d。

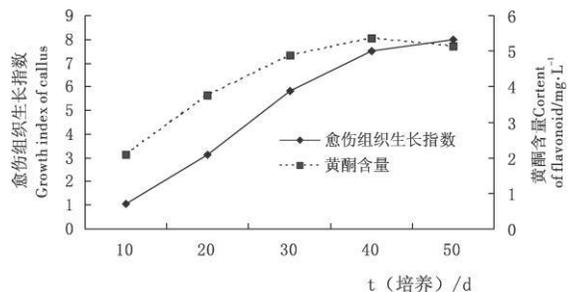


图 5 银杏愈伤组织生长曲线和黄酮含量变化曲线

Fig.5 Growth curve of callus of *Ginkgo biloba* L. and flavonoid content curve

### 3 讨论

正交设计是多因素多水平分析的有力工具,采用正交设计的方法,可以精简试验次数,提高试验结果的正确性和可靠性<sup>[8]</sup>。前人对银杏愈伤组织的培养和黄酮积累量的研究多采用单因素和双因素试验,未对试验结果进行统计学方法的处理和分析<sup>[12,13]</sup>,试验按照正交设计分别对银杏 2 种外植体来源愈伤组织进行了 4 因素 3

水平的 9 个组合试验, 优化和筛选了银杏胚愈伤组织继代培养和黄酮积累量的主要因素, 大大提高了试验效率。结果表明, N<sub>6</sub> 有利于愈伤组织的继代培养, 而 B<sub>5</sub> 有利于黄酮的积累; 高浓度的生长素和适中浓度植酸 (0.1%) 有利于愈伤组织的继代培养, 而低浓度生长素和植酸 (0.05%) 有利于黄酮的积累; 愈伤组织生长与黄酮收获时间以 40~50 d 为宜, 对今后银杏液体悬浮培养的营养因子的提供具有一定的指导意义。

进行愈伤组织继代培养时, 要求愈伤组织生长量大且有较高的次生代谢物含量。但研究发现, 这二者往往是对立的。陈学森等曾报道<sup>[14]</sup>, MT 培养基利于愈伤组织形成, 但黄酮量低, 而 White 培养基对愈伤组织培养不利, 但有利于黄酮物质的产生和积累。这与该研究结果有相似之处, 即 N<sub>6</sub> 培养基适合愈伤组织的增殖, 而 B<sub>5</sub> 却适合于愈伤组织黄酮类的积累。刘贤旺报道若二者同时兼顾, 则 SH 培养基最优<sup>[15]</sup>, 但该试验中没有涉及此培养基。

植物生长调节物质中, 2, 4-D 生理活性强, 诱导快, 但易使培养物老化和褐变, 而 NAA 生理活性弱, NAA 与 BA 配合能调节激素平衡, 有利与愈伤组织保持旺盛活力。Carrier 等报道<sup>[19]</sup> NAA 与 6-BA 组合调节可使细胞干重和黄酮苷含量同时提高。王洪善等发现<sup>[17]</sup> 在银杏继代培养中 NAA 和 6-BA 浓度在 0.8~1.0 mg/L 时效果较好, 而该试验结果表明, 对于愈伤组织继代培养时以 NAA 3.0 mg/L 和 6-BA 2.0 mg/L 最高设定浓度时最好, 而黄酮积累量要求低浓度激素。

植酸具有抑制多酚氧化酶活性的作用, 从而有效地控制愈伤组织的褐变, 促进愈伤组织生长, 该试验研究结果表明, 0.1% 植酸有利于愈伤组织生长, 0.05% 植酸却有利于黄酮积累, 陈学森等也发现<sup>[9]</sup> 0.1% 植酸对细胞生长最有利, 但更关键的是要选择适宜的培养基及激素组合, 使外植体或细胞处于旺盛生长的状态, 才能最终取得满意的效果。

## Optimizes the Callus Growth and Flavonoids Formation in Embryo of *Ginkgo biloba* L. by Orthogonal Test

HU Yan-mei, ZHANG Zhi-hua, ZHOU Jun-jiang, MEI Shuang-xi, SONG Peng-fei

(Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415, China)

**Abstract:** The effects of different concentration and combinatibns of NAA, 6-BA, PA and minimal medium on embryo a callus of *Ginkgo biloba* L. for subculture and flavonoids formation were studied by using orthogonal test, and combinations of optimum treatment were selected. The results showed; the optimum combinations were N<sub>6</sub>+NAA 3.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+0.1%PA for embryo callus subculture and effect sequence of four effects was minimal medium>NAA>6-BA>PA; the optimum combinations were B<sub>5</sub>+NAA 0.1mg/L+6-BA 0.5 mg/L+0.05%PA for flavonoids formation and effect sequence of four effects was NAA>PA>6-BA>minimal medium. Growth curve of callus of *Ginkgo biloba* L. was curve "S" and the optimum culture cycle of flavonoid content was 40~50 d.

**Key words:** *Ginkgo biloba* L.; Orthogonal test; Callus; Flavonoids

## 参考文献

- [1] Hasler A, Stider O. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1992, 60(5): 41-48.
- [2] Laurain D, Tremouillaux G, J, Chenieux J, et al. Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba*[J]. Phytochemistry, 1997, 16(01): 127-130.
- [3] 王德伟, 朱红, 高尔. 银杏黄酮的药理作用和临床应用[J]. 食品和药品, 2006, 8(6): 7-9.
- [4] 谢燕, 张均寿. 银杏叶提取物制剂研究概况[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1267-1269.
- [5] 邢世岩. 银杏种质资源评价[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 13-15.
- [6] Razdan M K. Introduction to Plant Tissue Culture (Second Edition) [M]. 肖尊安 祝扬 译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 221-240.
- [7] Stockigt J, Obitz P, Falkenhagen H, et al. Natural products and enzyme from plant cell cultures[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43: 97-109.
- [8] 宋代军. 生物统计附试验设计[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 131-137.
- [9] 陈学森, 张艳敏, 董会. 植酸在银杏组织培养应用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 9(2): 24-27.
- [10] 张平安, 祝美云, 高向阳 等. 反相高效液相色谱法测定银杏叶及其提取物中的总黄酮[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(4): 98-100.
- [11] 江静, 尚富德, 高清雨. 银杏细胞悬浮培养及其黄酮类物质生产[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2002, 32(3): 20-24.
- [12] 徐利均, 谢永红, 甘霖 等. 银杏组培繁殖及黄酮糖苷的产生[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(4): 368-370.
- [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] 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.
- [15] 刘贤旺, 谢少贤, 罗光明 等. 银杏组织培养及其代谢调控的研究[J]. 江西林业科技, 1998(6): 3-6.
- [16] Carrier D, J, Consentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture[J]. Plant Cell Reports, 1990, 8(11): 635-638.
- [17] 王洪善, 孙满芝, 孙庆访 等. 银杏愈伤组织培养形态建成的研究[J]. 林业科技通讯, 1997(9): 27-28.