

银杏悬浮细胞叶绿体的分化与黄酮类产物积累^{*}

莫小路, 黄学林, 孟 辰

(中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究了来源于银杏 *Ginkgo biloba* L. 胚和萌发 30 d 幼苗茎的悬浮细胞在培养过程中, 细胞叶绿体的分化和黄酮类化合物累积的关系。研究表明, 有叶绿体分化细胞中的黄酮类化合物的质量分数高于无叶绿体分化的细胞。光照培养、增加培养基中的微量元素、添加低浓度的 TDZ 等促进细胞中叶绿体分化的方法都有利于悬浮细胞中黄酮类化合物的积累, 选育的绿色细胞悬浮培养物中黄酮类化合物质量分数最高可达细胞干质量的 0.798%。

关键词: 银杏 *Ginkgo biloba* L.; 黄酮类化合物; 悬浮细胞; 叶绿体

中图分类号: Q946.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 06-0094-04

银杏 *Ginkgo biloba* L. 是传统药用植物, 目前从银杏叶中分离出的化合物有 140 多种, 其中有效成分以黄酮类化合物的质量分数最高, 一般为 0.5%~1.0%^[1]。银杏叶制剂对脑损伤、脑缺血、哮喘、器官移植排斥等有显著作用^[2], 是心脑血管疾病的主要用药之一。目前商品化的银杏黄酮均来源于银杏叶, 生产受原料产地、季节等因素的限制, 通过植物组织培养和细胞工程技术生产银杏黄酮是一条有效途径。

目前有关银杏离体培养产生黄酮类化合物的研究多是用愈伤组织, 产量低, 生长慢, 周期长^[3,4]。考虑到以种子为外植体可以不受季节和原料产地等因素的限制, 我们用银杏的种子胚及萌发 30 d 的银杏幼苗茎段诱导愈伤组织, 建立细胞悬浮体系进行次生代谢物的研究, 以期找出悬浮培养细胞中黄酮类化合物产生的限制因子, 从而培育高产的悬浮细胞系。在植物细胞悬浮培养中, 有关细胞器的发育和次生代谢物的研究报道甚少。研究发现培养细胞的叶绿体分化与黄酮类化合物的积累呈正相关。通过改变培养基组分及培养条件促进细胞叶绿体的分化, 筛选出绿色细胞, 其悬浮培养物中黄酮类化合物的质量分数最高可达细胞干质量的 0.798%。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为产自江苏盐城地区的银杏 *Ginkgo biloba* L. 种子的胚及由该种子萌发的一月龄幼苗的茎段。黄酮类化合物测定的标准品为芦丁 (中国药

品检定所)。

1.2 愈伤组织的诱导

胚愈伤组织的诱导培养基和继代培养基参照倪静静等^[5]的配方; 茎愈伤组织的诱导培养基参照罗紫娟^[6]的配方。

培养条件: 23℃, 暗培养 3 周, 后转入黑暗 8 h/光照 16 h 培养, 光照强度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.3 细胞悬浮培养体系的建立

选取继代两次以上的生长旺盛、结构疏松的愈伤组织, 用接种铲稍加分散, 以鲜重 2.0~2.5 g/瓶的接种量接入 200 mL 三角瓶 (50 mL 培养基) 中, 培养基同愈伤组织继代培养基, 不加琼脂。培养条件: 23℃, 光照培养, 摇床转速为 120 r/min。培养 6 d 后, 以 60 目尼龙网筛滤除大的细胞团块, 悬浮细胞培养 18 d 后继代培养。

1.4 细胞悬浮培养的生长参数测定

生长动态分析: 胚来源的悬浮细胞每 4 天测一次细胞鲜质量, 每次测定为 5 个平行试样的平均值; 茎来源的悬浮细胞每 3 天测一次细胞鲜质量, 每次测定为 4 个平行试样的平均值, 绘制生长曲线。

增长指数 = $\frac{\text{收获的细胞鲜质量} - \text{接种的细胞鲜质量}}{\text{接种的细胞鲜质量}}$

1.5 悬浮细胞团中黄酮类化合物的提取和质量分数测定

以收获的细胞于 60℃ 烘干至恒量 (约 24 h), 用 $\varphi=80\%$ 的乙醇-水溶液于索氏提取器内提取 7 h, 过滤, 滤液浓缩后用石油醚萃取 2 次除去叶绿

* 收稿日期: 2003-01-08

作者简介: 莫小路 (1967 年生) 女, 博士研究生; 通讯联系人: 黄学林, E-mail: ls17@zsu.edu.cn

素等杂质, 用 $\varphi=30\%$ 的乙醇—水定容至 50 mL 供测定。

黄酮类化合物的测定采用络和—分光光度法, 精确配制 0.010 7~0.085 6 mg/mL 各浓度的芦丁标准溶液, 测定吸收度, 作线性回归, 得出芦丁浓度 (Y) 与吸收度 (X) 间的关系: $Y = 0.09108X + 0.0008774$, $r = 0.996$ 。样品的测定方法参照庄向平等^[7]的方法。

黄酮类化合物积累的动态分析为每 3 d 或 4 d 取样, 其余测定样品除特别注明的外, 均为培养 24 d 取样。

1.6 叶绿体分化程度的鉴别

1.6.1 显微镜下观察悬浮细胞内部叶绿体的数量
在光学显微镜下观察, 细胞中叶绿体的数量占细胞体积的 3/4 以上为高度分化。

1.6.2 叶绿素含量的测定 称取干质量 0.2 g 的悬浮细胞, 以 $\varphi=80\%$ 丙酮提取, 按 Amon^[8] 方法测定叶绿素 a 和 b 的总量和 a/b 值。

1.7 微量元素对悬浮细胞的生长、分化和黄酮含量的影响

以 N₆ 培养基为对照, 分别用 2, 4, 6 倍于 N₆ 培养基中的微量元素浓度的培养基培养茎来源的悬浮细胞, 21 d 后测定对照和各处理组的细胞的生长指数和黄酮质量分数, 观察培养物的颜色和培养细胞内的叶绿体数量。

2 结 果

2.1 悬浮细胞中的生长与黄酮类化合物积累的关系

胚来源的悬浮细胞的生长及黄酮类化合物的积累 (图 1) 大致为平行, 但细胞的生长在 21 d 后进入平稳期, 黄酮类化合物的产量在 24 d 才达到最大, 故黄酮类化合物的收获时间为培养后的 24 d 较宜。

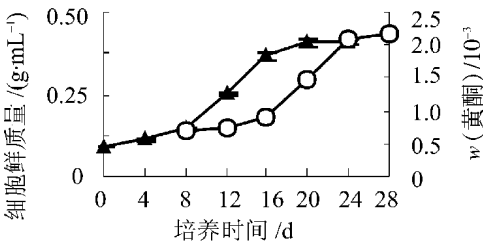


图 1 胚来源的悬浮细胞生长和黄酮的质量分数变化
Fig 1 The time course of growth and the flav content in suspension culture from seedling stem

茎来源的悬浮细胞的生长在 9 d 进入对数增长期, 21 d 达到最大生长量 (图 2)。黄酮类化合物

的质量分数在 24 d 进入稳定期, 但 21 d 以后, 细胞的颜色变暗, 逐渐褐化, 继代后不易成活, 故继代培养的时间为 18 d。

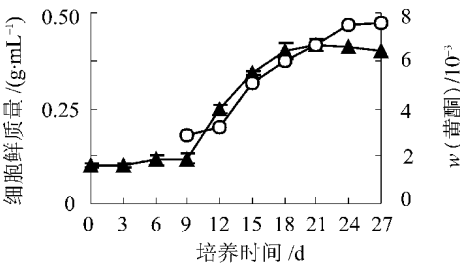


图 2 茎来源的悬浮细胞生长和黄酮的质量分数变化
Fig 2 The time course of growth and the flav content in suspension culture from embryo

2.2 悬浮细胞团中的叶绿体的分化与黄酮类化合物的积累

在悬浮细胞培养初期, 同一批培养的悬浮细胞颜色在各瓶间有一定差异, 呈现浅黄、黄绿、鲜绿或黄褐色, 在显微镜下观察, 黄褐色的细胞大多已死亡, 细胞内部结构消失; 浅黄和黄绿色的细胞中叶绿体的分化水平较低, 叶绿体的数量较少; 而颜色鲜绿的细胞中叶绿体多而密集 (图 3)。

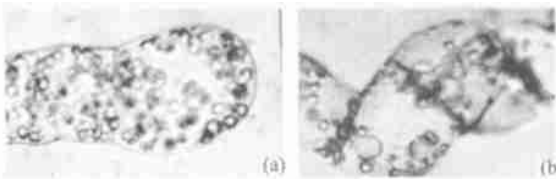


图 3 鲜绿色的悬浮细胞 (a) 和黄绿色的悬浮细胞 (b)
Fig 3 Bright green cell (a) and Yellowish green cell (b)

通过目视法筛选颜色鲜绿的细胞反复继代培养, 得到稳定的鲜绿色悬浮细胞培养体系。从表 1 中可看出, 鲜绿和褐绿色的悬浮细胞中的黄酮类化合物质量分数为 7.053×10^{-3} 和 7.81×10^{-3} 分别比黄绿色的细胞 (3.291×10^{-3}) 高 1.14 和 1.37 倍, 褐绿色的细胞叶绿素和黄酮质量分数都达到最高, 发育成熟, 继续培养会很快褐化, 褐化后的细胞黄酮质量分数大大降低。叶绿体的出现表明细胞已有了细胞器的分化, 而黄酮类化合物质量分数与细胞中叶绿素的质量分数呈正相关, 说明了银杏悬浮细胞中黄酮类化合物的积累与细胞叶绿体的分化水平有关。

2.3 光照条件对黄酮类化合物积累的影响

银杏胚来源和茎来源的悬浮细胞在光照条件下都能形成叶绿体, 合成叶绿素, 茎来源的悬浮细胞叶绿素总质量分数高于胚来源的悬浮细胞, 细胞中聚集了大量的叶绿体, 培养细胞呈鲜绿色; 胚来源

的悬浮细胞呈黄绿色 (图 3)。

表 1 悬浮细胞中叶绿素质量分数对
黄酮质量分数的影响¹⁾
Tab 1 The effect of chlo (a+b) to the flav.
content in suspension culture

悬浮细 胞颜色	w(叶绿素(a+b)) 10 ⁻⁶	w(叶绿素 a) w(叶绿素 b)	w(黄酮) 10 ⁻³
黄绿色	12.8±1.62	1.36±0.115	3.291±0.382
鲜绿色	17.64±3.76	1.91±0.113	7.053±0.816
褐绿色	20.9±0.56	3.97±0.057	7.81±1.03
褐色	8.3±0.42	0.77±0.172	2.6±1.13

1) n=3~5, $\bar{x} \pm SD$

将光照 ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下生长旺盛的悬浮细胞分为两组, 分别进行在光照、黑暗下培养, 结果黑暗下培养的悬浮细胞呈黄色、白色或淡绿色, 其生长仍很旺盛, 但合成黄酮类化合物能力大大低于光照培养的细胞 (图 4)。在显微镜下观察, 这些细胞内仍有少量的叶绿体, 可能与细胞仍能合成少量的黄酮类化合物有关。

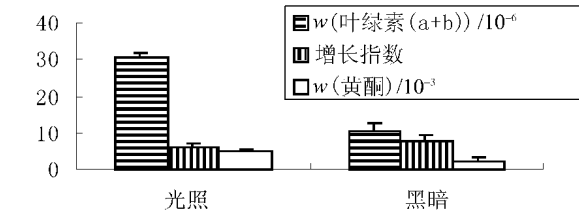


图 4 光照对细胞生长、叶绿素和黄酮质量分数的影响
Fig 4 The effect of light on the growth, chlo (a+b)
and flav. content of suspension culture

2.4 微量元素对悬浮细胞的生长、分化和黄酮质量分数的影响

从表 2 中的结果看, 4 倍于 N_6 培养基的微量元素对茎悬浮细胞的生长及叶绿体的分化均有利, 而高于此浓度的微量元素对细胞的生长不利, 在培养 14 d 后褐化。

表 2 微量元素对茎悬浮细胞的生长、
叶绿体分化和黄酮质量分数的影响¹⁾
Tab 2 The effect of micro-element on suspension' growth,
chloroplast and flav content

微量元素		增长指数	悬浮细 胞颜色	$\frac{w(\text{黄酮})}{10^{-3}}$
对照	N ₆	3.527±0.02	黄—绿	2.85
	2×N ₆	3.740±0.43	黄—绿	5.3
处理	4×N ₆	6.289±1.17	Bright—绿	6.5
	6×N ₆	1.72±0.03	棕	1.8

1) n=3~5, $\bar{x} \pm SD$

2.5 TDZ 对胚悬浮细胞的生长和次生代谢的影响

在培养基中加入不同浓度的 TDZ (thidiazuron, 噻重氮苯基脲), 结果 (图 5) 显示, 低浓度的 TDZ 能使悬浮细胞增绿, 并且促进细胞的生长和黄酮类化合物的积累, 当 TDZ 的浓度高于 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 时, 影响细胞的生长 (增长指数降低), 培养物中的黄酮类化合物的质量分数开始下降, 悬浮细胞培养后期由褐绿色逐渐转为褐色, 死亡。在 $0.1 \mu\text{mol/L}$ TDZ 浓度下, 对变绿的胚来源的悬浮细胞进一步培养, 可使其黄酮类化合物的产量提高到 7.98 mg/g , 与茎来源的悬浮细胞黄酮产量相近 (图 6)。

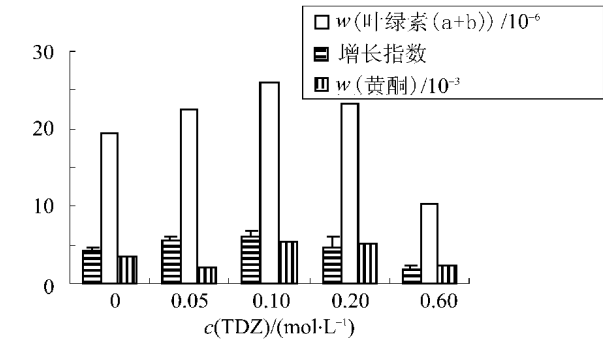


图 5 TDZ 对胚来源的悬浮细胞的生长、
叶绿素和黄酮质量分数的影响
Fig 5 The effect of TDZ on the growth, chlo.
and flav. cont. of suspension cell from embryo

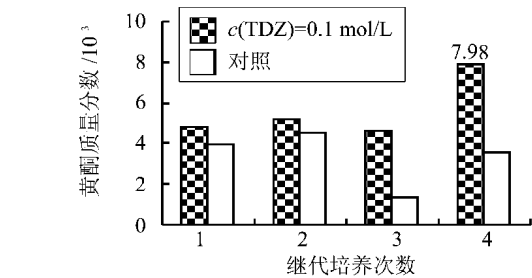


图 6 添加 TDZ 对继代培养中胚来源的
悬浮细胞黄酮质量分数的影响
Fig 6 The effect of TDZ on the flav. cont.
of suspension cell from embryo in susculture

3 讨 论

一般认为选用植物中次生代谢物质量分数高的部分作为外植体诱导的愈伤组织和悬浮细胞培养物中次生代谢物的质量分数也高, 因此, 大部分关于银杏愈伤组织和悬浮细胞培养中黄酮产生的研究都是以银杏叶为外植体。尽管种子胚中的黄酮类化合物含量很低, 本研究从银杏幼苗茎和种子胚来源的悬浮细胞中都获得了黄酮类化合物, 体系中的悬浮细胞保持了母本植物合成黄酮类化合物的能力。但黄

酮类化合物的合成和积累主要在有叶绿体分化的细胞(表1,图4),且黄酮类化合物的质量分数与细胞的叶绿体分化呈正相关。对培养细胞中影响叶绿体形成的培养条件(光照、培养基中的微量元素质量分数)的研究结果也进一步证实了这一点。

在起初的培养中,胚来源的细胞偏黄绿色,即使在光照下培养,叶绿素质量分数和黄酮质量分数仍低于相同培养时间的茎来源的细胞(表1,图6)。添加植物生长调节物质可以改变细胞中叶绿素的质量分数,而TDZ是选定的较为有效的生长调节物质。TDZ是一种取代的苯脲化合物,已发现在很多植物中有促绿作用^[9]。结果表明,添加低浓度的TDZ可提高胚来源的悬浮细胞中的叶绿素和黄酮质量分数,多次培养后的黄酮质量分数与茎来源的悬浮细胞相近(图6)。本文用分光光度法对悬浮细胞中的黄酮类化合物质量分数进行定量测定,在测定前曾用石油醚萃取3次,第3次萃取时,醚层近无色,可以认为,石油醚萃取两次已将提取液中的叶绿素等脂溶性杂质基本去除,故本研究结果中,绿色细胞的黄酮类化合物质量分数测定结果基本不存在叶绿素的干扰,作为初步的定量方法已能反映银杏悬浮细胞培养物中的黄酮类化合物质量分数的变化。由于分光光度法是以芦丁为标准品在510 nm进行比色,可能提取液中还有某些成分在此波长下有吸收,测定值通常比HPLC法稍高^[7],因此,本研究的下一步工作还需用HPLC法对黄酮类化合物的质量分数作精确的定量检测。

植物中黄酮类化合物在细胞内的合成部位还未完全清楚,花色苷是由细胞的有色体产生,分泌到液泡中。叶绿体和有色体都是由前质体发育而来,有

的叶绿体在发育后期能转变为有色体,这可能是叶绿体发达的细胞能积累较高的黄酮类化合物的原因之一。图5的实验是将在光照下生长正常的绿色细胞在黑暗条件下培养,细胞在失去叶绿素合成功能的同时,黄酮类化合物的生成量也大大降低,可以肯定在银杏的离体培养中,叶绿体出现是黄酮类化合物产生的结构基础。因此,进一步优化培养基组分和培养条件,筛选培育出叶绿体发达的悬浮细胞系,是提高银杏悬浮细胞培养物中黄酮类化合物质量分数的有效途径。

参考文献:

- [1] STICHER O. Quality of *Ginkgo preparations* [J]. *Planta Med*, 1993, 59: 2—11.
- [2] 王筠默. 银杏叶的药理研究[J]. *中草药*, 1998, 29(增刊): 9—11
- [3] 房建军, 阙国宁. 银杏愈伤组织生长和黄酮类化合物积累的关系[J]. *林业科学研究*, 1998 11(2): 124—129.
- [4] 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—50.
- [5] 倪静静, 黄学林, 冈田芳明等. 银杏愈伤组织培养极其黄酮类化合物的测定[J]. *热带亚热带植物学报*, 2000, 9(2): 163—166.
- [6] 罗紫娟. 银杏茎段的组织培养[J]. *植物生理学通讯*, 1985(1): 35.
- [7] 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.
- [8] ARNON D J. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiology*, 1949, 24: 1—15.
- [9] MURTHY B N S, MURCH S J, SAXENA P K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis [J]. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant*, 1998, 34: 267—275.

The Chloroplast's Differentiation and Flavonoids Accumulation in Suspension Culture of *Ginkgo biloba*

MO Xiao lu, HUANG Xue lin, MENG Chen

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education //

School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The relationship of chloroplast's differentiation and flavonoids' accumulation in suspension cell derived from embryo and stem of 30 days old seedlings of *Ginkgo biloba* L. was investigated. The flavonoids content in suspension cells which had large amount of chloroplasts was higher than that of the cell with lower chloroplast's differentiation. The culture condition such as cultured in light, increasing microelement consistency in medium, addition of thidiazuron at $0.1 \mu\text{mol/L}$, which improved the chloroplast differentiation could also increased the flavonoids production. The maximal flavonoids content in selected green cell line was 7.98 mg/g . It was conjectured that the chloroplast maybe one of the site for flavonoids synthesis in the cell of *Ginkgo biloba* L.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; flavonoids; suspension culture; chloroplast