

# 5 种大量元素对青钱柳愈伤组织生长及黄酮类化合物积累的影响

上官新晨 蒋 艳 米丽雪 陈继光 张清峰 邹 利

(江西农业大学 食品工程学院 江西省高校天然产物研究与开发重点实验室 江西 南昌 330045)

摘要:以 MS 为基本培养基 研究不同浓度的 5 种大量元素对青钱柳愈伤组织生长及黄酮类化合物积累的影响。结果表明:MS 培养基中  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$  浓度分别降至 1/2C 时,有利于愈伤组织生长和黄酮积累;当  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为 3/2C 时,愈伤组织生长量与黄酮含量均达到最大值,分别为 0.53 g/瓶和 4.67%; $\text{MgSO}_4$  浓度在 3/2C 时,愈伤组织生长良好,而 1/2C 有利于黄酮积累; $\text{CaCl}_2$  在一定范围内不会影响愈伤组织生长,适当提高  $\text{Ca}^{2+}$  浓度有利于黄酮积累。

关键词:青钱柳;大量元素;愈伤组织;黄酮积累

中图分类号:S792.12 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)03-0502-06

## Effects of Five Macronutrients on the Growth and Flavonoid Accumulation of *Cyclocarya paliurus* Callus

SHANGGUAN Xin-chen, JIANG-Yan, MI Li-xue, CHEN Ji-guang, ZHANG Qing-feng, ZOU Li

(College of Food Science and Engineering, Key Laboratory of Jiangxi Provincial Department of Education in Natural Product Research and Development, JAU Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The effects of five macronutrients in MS agar medium on the growth and flavonoid accumulation of *Cyclocarya paliurus* Callus were studied. The results showed that decreasing the concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{KNO}_3$  to 1/2C in MS medium favored the growth and flavonoids accumulation of callus. In contrast, 3/2C  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was the best concentration of medium, in which the dry weight of callus and flavonoids concentration were 0.52 g/bottle and 4.67%, respectively. The effect of  $\text{MgSO}_4$  concentration showed that medium with 3/2C  $\text{MgSO}_4$  was suitable for callus growth, while for flavonoid accumulation 1/2C  $\text{MgSO}_4$  was better.  $\text{CaCl}_2$  had no significant effect on callus growth. However, increasing  $\text{Ca}^{2+}$  concentration improved flavonoids accumulation in the medium.

**Key words:** *Cyclocarya paliurus*; macronutrients; callus growth; flavonoids accumulation

青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk)又名摇钱树、山沟树(浙江)、麻柳(湖北)、青钱李等,系胡桃科(Juglandaceae)青钱柳属植物,它广泛分布于我国的亚热带地区的江西、浙江、江苏、安徽、福建、台湾、湖北、四川、贵州、湖南等省<sup>[1]</sup>。据《中国中药志要》记载,其树皮、树叶具有清热解毒、止痛功能,可用于治疗顽癣,长期以来民间用其叶片制作茶<sup>[2]</sup>。青钱柳具有多种功能性成分,如黄酮、多糖、绿原

收稿日期:2011-03-22 修回日期:2011-05-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31060213)和江西省主要学科学术带头人培养计划(2009DD900)

作者简介:上官新晨(1962—)教授,博导,主要从事植物资源开发与利用研究 E-mail: shangguanxc\_818@sina.com。

酸等<sup>[3-6]</sup>。黄酮类化合物是其中一种重要的功能成分,它作为一种植物调节剂具有调节植物生长,保护植物免受紫外线的损伤;同时,作为一种药用成分具有抗氧化及抗自由基作用,可以抗癌、防癌,治疗心脑血管疾病,并可以降低血糖,增强非特异性免疫功能和体液免疫功能,以及具有抑制逆转录酶的活性等广谱的药理活性,在药物资源上具有重要的地位<sup>[7-10]</sup>。

由于青钱柳属珍稀濒危植物,且繁殖十分困难,可利用资源匮乏。为了既保护国家珍稀植物资源,又充分利用青钱柳活性成分为人类健康服务,利用植物细胞培养技术生产黄酮等次生代谢产物对青钱柳资源的开发利用具有重大意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

青钱柳愈伤组织由江西农业大学天然产物研究与开发重点实验室多次继代培养所得。

### 1.2 培养方法

MS基本培养基附加1.0 mg/LKT、0.3 mg/L NAA、0.5 mg/L 2,4-D和30 g/L蔗糖、7 g/L琼脂,pH值5.6~5.8,空气相对湿度为40%~60%,光照强度1 000~1 500 lx,光照时间12 h/d,温度(25±2)℃条件下培养。

### 1.3 愈伤组织生长及黄酮合成曲线绘制

将继代多次、均匀一致的青钱柳愈伤组织接种于盛有30 mL琼脂培养基的180 mL组培瓶中,每瓶接种愈伤组织0.8 g(FW)。每隔2 d取样1次,每次3瓶,培养至31 d,测定细胞生长量和黄酮含量,绘制愈伤组织生长及黄酮合成曲线,以确定愈伤组织继代、收获的最佳时期。

### 1.4 5种大量元素对青钱柳愈伤组织生物量及黄酮含量的影响

培养基中大量元素调整:在MS基质中,分别调整NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>的量至原浓度的0、1/4、1/2、1、3/2、2,记为0C、1/4C、1/2C、1C、3/2C、2C(C为MS培养基中该物质的标准浓度),细胞收获后测定其生长量及黄酮含量。

### 1.5 愈伤组织鲜、干质量的测定

鲜质量:将处在收获期的愈伤组织,去除底部的琼脂,用滤纸吸取表面水分,称量记为鲜质量。再将处理好的青钱柳愈伤组织放入60℃烘箱中烘至恒重,记为干质量。生长量以每瓶接种0.8 g鲜质量,每瓶培养基收获愈伤组织用干质量(g)表示,单位g/瓶。愈伤组织生物量(g/瓶)=生长量(g/瓶)-接种量(g/瓶)。

### 1.6 愈伤组织中黄酮含量的测定

1.6.1 标准曲线的制备 精密称取120℃干燥恒重的芦丁标准品10 mg,加φ=80%乙醇溶解,定容至50 mL容量瓶中,摇匀,即得浓度为0.2 mg/mL芦丁标准液。精密吸取标准品溶液0、0.5、1.5、2、2.5、3、3.5、4 mL,分别置于10 mL试管中,加5%亚硝酸钠0.3 mL,放置6 min后,加10%硝酸铝0.3 mL,放置6 min,再加4%的氢氧化钠4 mL,加水至刻度并摇匀,放置15 min。在503 nm波长处测定吸光度,经最小二乘法作线性回归,得回归方程 $C = 0.1009A + 0.0005$ , $R^2 = 0.996$ 。

1.6.2 愈伤组织黄酮提取 参考苗建英<sup>[11]</sup>的方法,精密称取500 mg青钱柳愈伤组织粉末于具塞试管中,加入35 mg/g硼砂,加入10 mL pH值9.0的石灰水在60℃下超声提取1 h,抽滤后将滤液pH调至4.5,将调好酸后的提取液加入10 mL乙酸乙酯、正丁醇分别萃取2次。将乙酸乙酯萃取液与正丁醇萃取液合并,旋转蒸干。将旋转蒸干获得的干物质,加入一定量95%乙醇溶解并定容于10 mL容量瓶中,即制备好待测液。

1.6.3 愈伤组织细胞培养物中黄酮含量测定 参照李秀信<sup>[11]</sup>方法,用NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>比色体系检测青钱柳愈伤组织中总黄酮的含量。取0.1 mL待测液于10 mL具塞试管中按照标准品的显色方法处理,测定其吸光度,并代入回归方程 $C = 0.1009A + 0.0005$ , $R^2 = 0.996$ ,计算样品中的总黄酮含量。实验均重复3次,结果取平均值。青钱柳组织细胞培养物中总黄酮含量计算公式如下:

$$\text{总黄酮含量} = \frac{(0.1009 + 0.0005) \times 10 \times V}{0.1 \times M} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{总黄酮产量}(\text{mg}/\text{瓶}) = \text{总黄酮含量} \times 10^{-2} \times \text{细胞增长量}(\text{g}/\text{瓶}) \times 10^3 \quad (2)$$

式中:  $M$  为青钱柳组织细胞培养物干粉的质量 (mg);  $A$  为吸光度;  $V$  为提取后定容的体积 (mL)。

## 2 结果与分析

### 2.1 青钱柳愈伤组织生长及黄酮合成曲线

愈伤组织生长曲线及黄酮含量变化曲线均呈“S”型。愈伤组织的增殖生长分为 4 个时期: 缓慢期、指数期、静止期、衰亡期。在延迟期(0~10 d)内, 培养物增重缓慢, 由于刚接种的愈伤组织需要适应新的环境, 并且细胞处于细胞分裂时期, 原生质合成过程缓慢, 细胞生长较慢; 在指数生长期(10~20 d)内, 原生质合成过程加快, 水分迅速进入。

细胞体积迅速加大, 培养物净干质量急剧增加; 随着时间的延长和环境条件的改变(如营养物质的消耗, 细胞生长空间的减少等), 细胞生长逐渐进入了静止期(20~25 d), 最后由于生长条件已不再适宜, 进入衰亡期(25~30 d), 愈伤组织开始褐化。因此确定青钱柳愈伤组织的最佳继代时间为第 20 天(图 1)。总黄酮含量在(3~15 d)处于一个滞后期, 黄酮含量基本没有增加, 在(15~25 d)呈上升趋势, 到第 25 天总黄酮含量达到最高值。由此可见, 青钱柳愈伤组织生长与黄酮积累并非同步, 而是先生长后合成次生产物黄酮。因此, 青钱柳愈伤组织的最佳收获时间为第 25 天(图 2)。

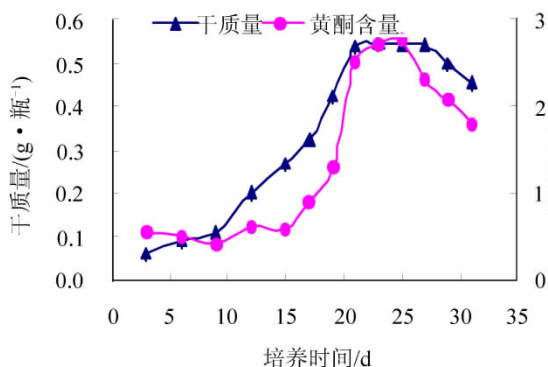


图 1 愈伤组织培养过程中生长及黄酮积累曲线

Fig.1 The curve of the growth and flavonoid accumulation during *Cyclocarya paliurus*

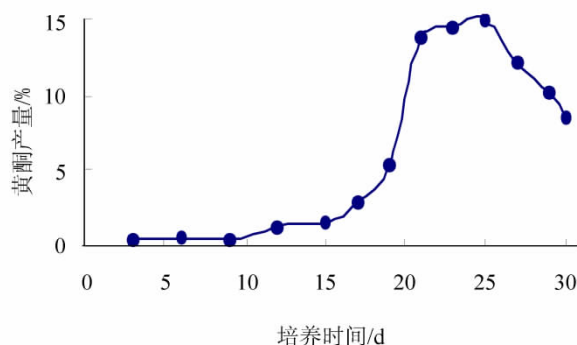


图 2 愈伤组织黄酮产量曲线

Fig.2 The yield of total flavonoids during *Cyclocarya paliurus* callus culture

### 2.2 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 对青钱柳愈伤组织生长及黄酮类化合物积累的影响

如图 3(A) 所示, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 浓度在 1/4C~3/2C 内变化时, 各处理间差异不显著, 均能较好的生长, 当 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 浓度为 3/2C 时, 细胞干质量达到最大为 0.54 g/瓶, 但在此浓度下黄酮含量较低, 仅为 1.15%。可见, 黄酮化合物的积累与生长所需的 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 浓度并非一致, 黄酮含量在 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 浓度为 1/2C 时达到

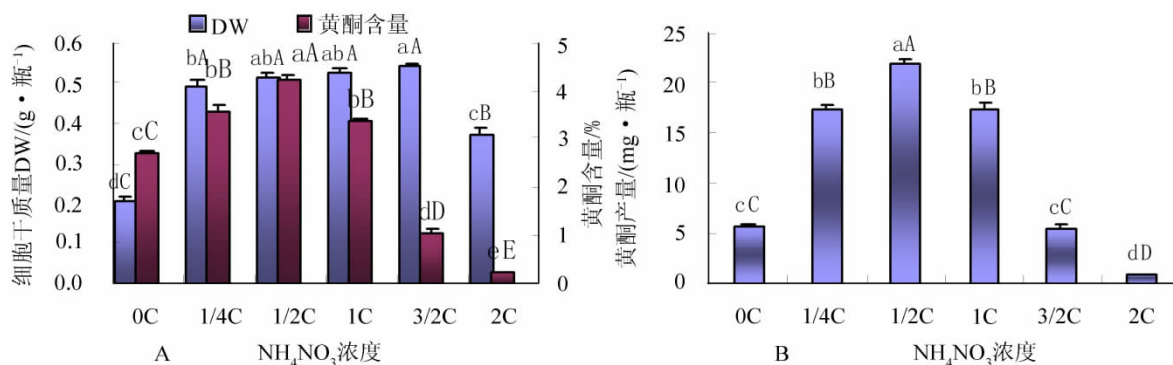


图 3 不同浓度的 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 对青钱柳愈伤组织生长及黄酮积累的影响

Fig.3 Effects of different NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentrations in MS basal mecium on the growth and flavonoids accumulation in *Cyclocarya paliurus* callus

最大值为 4.24% ,是标准浓度(1C 时为 3.36%) 的 1.26 倍。由图 3(B) 产量合成图可见 ,当  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度为 1/2C 时 ,黄酮的产量达到最大值为 21.82 mg/瓶 ,且与其他处理组差异极显著。当不添加  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  或是  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度过高时 ,都会影响愈伤组织生长及黄酮合成 ,进而影响黄酮的产量。

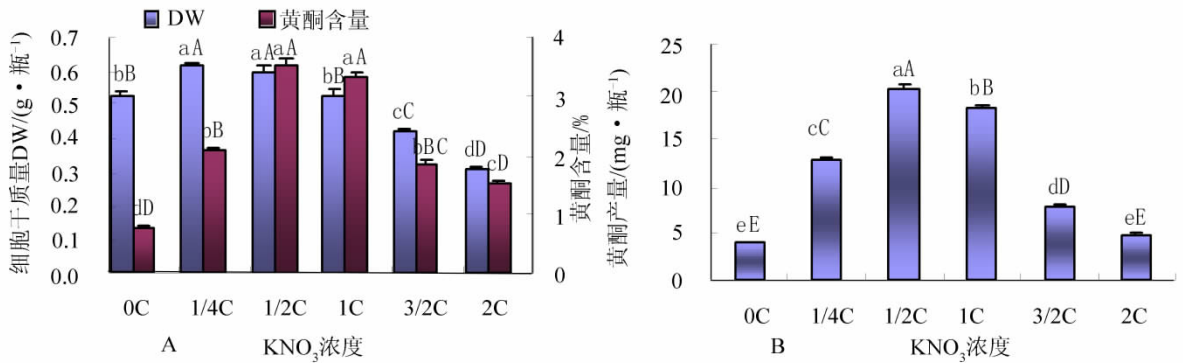


图 4 不同浓度的  $\text{KNO}_3$  对青钱柳愈伤组织生长及黄酮积累的影响

Fig. 4 Effects of different  $\text{KNO}_3$  concentrations in MS basal mecium on the growth and flavonoids accumulation in *Cyclocarya paliurus* callus

### 2.3 $\text{KNO}_3$ 对青钱柳愈伤组织生长及黄酮类化合物积累的影响

由图 4 可知 , $\text{KNO}_3$  浓度在 0 ~ 2C 内 ,细胞干质量与黄酮含量均随着  $\text{KNO}_3$  浓度的增大 ,呈先增加后减少的趋势 ,但二者并非同步。当  $\text{KNO}_3$  浓度在 1/4C ~ 1/2C 内 ,有利于愈伤组织生长 ,细胞干质量最大为 0.61 g/瓶。而黄酮含量则在 1/2C ~ 1C 内较高 ,在 1/2C 浓度时黄酮含量为 3.52%。与标准浓度 (1C) 黄酮含量 3.34% 之间差异不显著。综合考虑细胞干质量及黄酮含量 ,当  $\text{KNO}_3$  浓度为 1/2C 时 ,黄酮的产量为 20.43 mg/瓶。当不添加  $\text{KNO}_3$  或是  $\text{KNO}_3$  浓度过高时 ,都会影响细胞生长及黄酮含量 ,进而影响黄酮的产量。

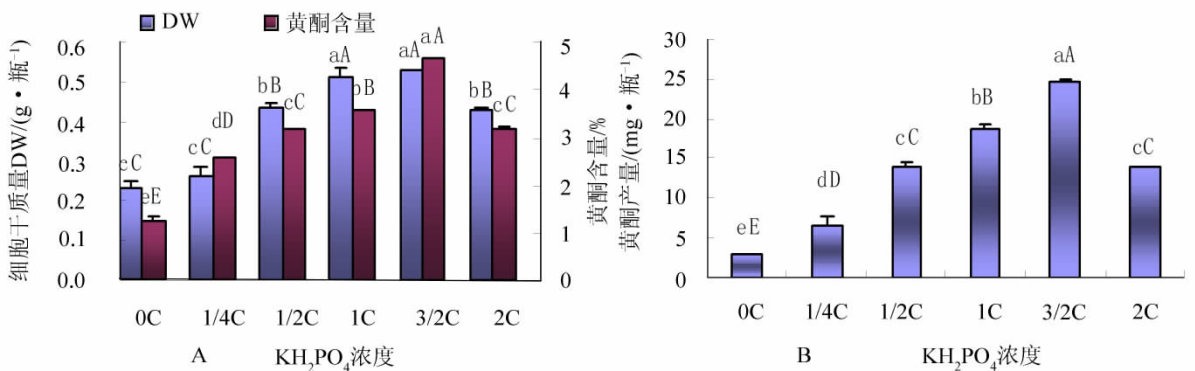


图 5 不同浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对青钱柳愈伤组织生长及黄酮积累的影响

Fig. 5 Effects of different  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentrations on the growth and flavonoids accumulation in *Cyclocarya paliurus* callus

### 2.4 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 对愈伤组织生长及黄酮类化合物积累的影响

磷酸盐中的磷是细胞膜及核酸等生命物质的重要组成部分 ,对细胞的生长与代谢具有重要作用。如图 5 所示 ,随着  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度的增大 ,愈伤组织生长量和黄酮含量都呈先增大后减小的趋势 ,且基本保持同步的增减性。当  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为 3/2C 时 ,愈伤组织生长量与黄酮含量均达到最大值 ,分别为 0.53 g/瓶和 4.67%。因此 ,要获得较高的青钱柳愈伤组织黄酮产量 ,应增加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的量至 3/2C ,黄酮产量为 24.63 mg/瓶 ,是标准浓度的 18.46 mg/瓶的 1.33 倍。

### 2.5 不同浓度 $\text{MgSO}_4$ 对愈伤组织生长及黄酮类化合物积累的影响

镁(Mg) 处于叶绿素卟啉环中央 ,是叶绿素的重要组成部分 ,影响植物细胞的能量代谢以及碳水化合物的代谢。缺乏 Mg 会严重影响植物细胞的光合作用 ,从而影响细胞的生长及代谢。本研究发现 ,当

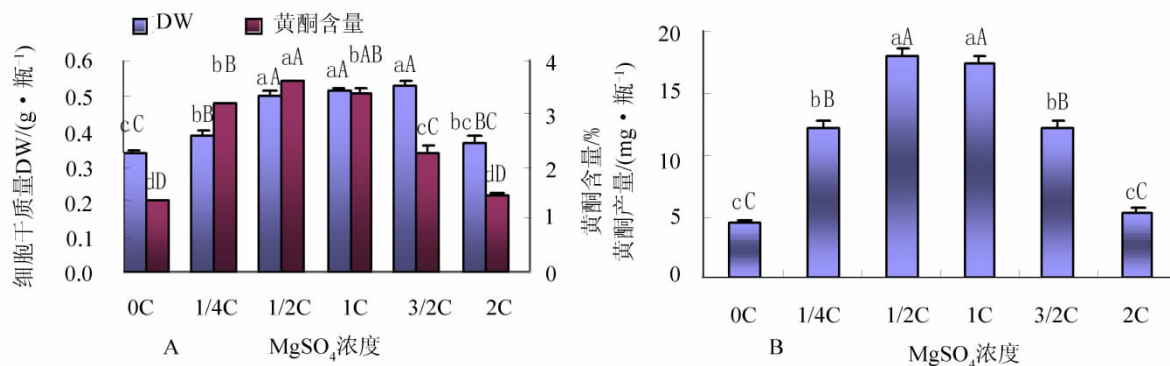


图 6 不同浓度的 MgSO<sub>4</sub> 对青钱柳愈伤组织生长及黄酮积累的影响

Fig. 6 Effects of different MgSO<sub>4</sub> concentrations on the growth and flavonoids accumulation in *Cyclocarya paliurus* callus

MgSO<sub>4</sub> 浓度在 1/2 C ~ 3/2 C 内, 细胞干质量维持在一个较高水平为 0.50 ~ 0.53 g/瓶, 几个处理间差异不显著。而黄酮含量随着 MgSO<sub>4</sub> 浓度的增大, 呈先增大后减小的趋势, 当 MgSO<sub>4</sub> 浓度为 1/2C 时, 黄酮含量达到最大为 3.61%。由产量图 6(B) 可知, 当 MgSO<sub>4</sub> 浓度在 1/2C ~ 1C 内, 可获得较高的黄酮产量, 两处理间差异不显著。在 MgSO<sub>4</sub> 浓度为 1/2C 时, 黄酮产量为 18.91 mg/瓶。

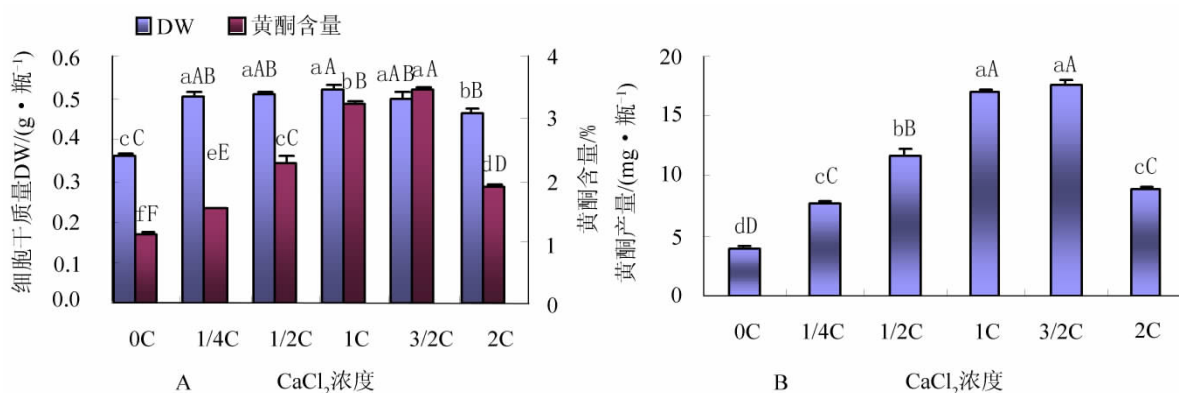


图 7 不同浓度的 CaCl<sub>2</sub> 对青钱柳愈伤组织生长及黄酮积累的影响

Fig. 7 Effects of different CaCl<sub>2</sub> concentrations on callus growth and flavonoids accumulation in *Cyclocarya paliurus* callus

### 2.6 CaCl<sub>2</sub> 对青钱柳愈伤组织生长及黄酮类化合物积累的影响

由图 7(A) 可知, 当不添加 CaCl<sub>2</sub> 或是 CaCl<sub>2</sub> 浓度过高(2C) 时都会抑制愈伤组织的生长, 而当 CaCl<sub>2</sub> 在 1/4 ~ 3/2C 内变化时, 对青钱柳愈伤组织的生长影响不大, 各处理间差异不显著, 愈伤组织干质量维持在 0.50 ~ 0.52 g/瓶。而黄酮含量却随着 CaCl<sub>2</sub> 浓度的增大呈现先增大后减小的趋势, 当 CaCl<sub>2</sub> 浓度为 3/2C 时达到最大值 3.67%, 且各处理间差异极显著。综合上述 2 个因素, 由黄酮产量图 7(B) 可知, 当 CaCl<sub>2</sub> 浓度在 1C ~ 3/2C 内时, 黄酮产量均处在一个较高值 17.00 mg/瓶左右。而李琰<sup>[12]</sup> 在研究杜仲愈伤组织培养及次生代谢产物中报道, Ca<sup>2+</sup> 在 150 mg/L( 低于标准 1/2 C) 时黄酮含量达到一个较大值。可见, Ca<sup>2+</sup> 对不同植物, 不同次生代谢产物的积累效果是不同的。

## 3 讨论与结论

在离体条件下植物细胞需要从培养基中摄取必需的营养元素, 这些元素要以适当的浓度存在, 才能有利于细胞的生长和次生代谢物的积累。迄今为止, 对影响植物细胞生长和次生代谢物含量的各种化学和物理因素已有大量研究<sup>[13-16]</sup>, 但对培养基的选择尚无一般的规律可循。Hayashi<sup>[17-18]</sup> 等研究指出, 提高培养基中硝酸盐、磷酸盐及钾盐浓度有利于促进细胞生长, 而降低氮源和磷酸盐浓度则能增加代谢物的含量。而本实验研究发现: 分别降低 KNO<sub>3</sub> 与 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 至标准浓度的 1/2 时, 既有利于细胞生

长又有利于黄酮积累;适当降低  $MgSO_4$  浓度至  $1/2C \sim 1C$  不会影响细胞生长但却能提高黄酮含量;而提高  $KH_2PO_4$  浓度至标准浓度的  $3/2C$  时,黄酮干质量增加量与黄酮含量同步增加,均达到最大值;在一定范围内,提高  $CaCl_2$  浓度对愈伤组织生长影响不大。这与有些研究报告不一致,可能是由于不同植物对于钙、磷、镁、钾等营养元素需求量不同所造成的,具体原因和机制有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1]苗建英. 银杏叶中黄酮化合物提取工艺研究[J]. 中成药, 2006, 28(7): 1060-1061.
- [2]中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 1版. 北京: 科学出版社, 1994.
- [3]谢明勇, 谢建华. 青钱柳研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1): 113-121.
- [4]徐明生, 沈勇根, 吴海龙, 等. 青钱柳水提物降糖作用的研究[J]. 营养学报, 2004, 26(3): 230-234.
- [5]上官新晨, 陈锦屏, 吴少福, 等. 青钱柳提取物对家兔实验性糖尿病模型降血糖作用的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2003(6): 117-120.
- [6]尹忠平, 上官新晨, 黎冬明, 等. 超声辅助提取青钱柳叶总三萜化合物研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(2): 373-377.
- [7]Barry V, Charlood, R H M J C. Secondary products from tissue culture[M]. Oxford Science Publication, 1990.
- [8]张德权, 台建祥, 付勤. 生物类黄酮的研究及应用概况[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(6): 52-56.
- [9]胡春. 黄酮类化合物的抗氧化性质[J]. 中国油脂, 1996, 21(4): 18-21.
- [10]谷利伟, 翁新楚. 食用天然抗氧化剂研究进展[J]. 中国油脂, 1997, 22(3): 37-39.
- [11]李秀信, 张院民. 香椿叶总黄酮含量测定方法研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5): 243-248.
- [12]李琰, 张存莉, 严忠海, 等. 杜仲愈伤组织培养及次生代谢产物含量的研究[J]. 西北农林科技大学, 2003, 18(3): 37-39.
- [13]上官新晨, 郭春兰, 蒋艳, 等. 培养基和植物激素对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(5): 678-682.
- [14]张美萍, 王义, 孙春玉, 等. 不同培养基及其元素组成对西洋参愈伤组织悬浮培养物生长和皂苷含量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 14-16.
- [15]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醇糖苷含量的影响[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 130-132.
- [16]Mentell S H, Smith H. Plant Biotechnology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983: 75-108.
- [17]Hayashi T, Yoshida K, Sano K. Formation of alkaloid in suspension - cultured colchicum Autumnal[J]. Phytochemistry, 1988, 27: 1371-1374.
- [18]Bramble J L, Graves D J. Calcium and phosphate effects on growth and alkaloid production in Coffea arabicae experimental results and mathematical model[J]. Biotechnol Bioeng, 1991, 37: 8.