

银杏次生代谢物生产与体胚诱导研究进展

张光琴, 李竞芸

(江苏省徐州生物工程高等职业学校, 江苏徐州 221006)

摘要: 从离体培养生产次生代谢产物和体细胞胚诱导两个方面综述了银杏组织培养研究进展, 讨论了外植体种类、基本培养基、植物激素、营养成分和抗褐变剂等对银杏愈伤组织的诱导、继代培养、悬浮培养和体细胞胚发生的影响, 并对存在问题和发展前景做了简单评述。

关键词: 银杏; 组织培养; 次生代谢产物; 体细胞胚

中图分类号: S664.303.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)03-0118-04

银杏(*Ginkgo biloba* L.) 主要含有黄酮类和银杏内酯类等药用成分。黄酮类化合物具有抗衰老、提高免疫机能、防治心血管病的作用^[1-2]; 银杏内酯具有显著的 PAF 拮抗作用, 是公认的治疗气管炎、哮喘病等多种疾病的新型治疗剂。近年我国银杏叶产业发展迅速, 并已开始叶用银杏的育种工作^[3], 但大面积栽培银杏占用大量耕地, 给农业生产造成一定影响。同时叶片中的药用成分含量非常低, 提取工艺复杂, 成本高。利用细胞培养生产黄酮、银杏内酯等药用成分, 可以节省土地资源, 而且能够通过控制培养条件和选择优良细胞系得到较高含量的代谢产物。银杏组织和细胞培养的研究很多, 仅有少数关于离体再生研究的报道^[4-5], 多数研究集中于离体培养生产次生代谢物和体细胞胚的诱导方面。我

国学者利用细胞培养生产黄酮糖苷的含量达到 0.70%, 接近叶片含量^[6-7], 银杏内酯的含量达到 0.01%, 属国际领先水平^[8]。

1 离体培养生产次生代谢物

1.1 愈伤组织的诱导

1.1.1 外植体 已在叶片、幼叶、子叶和茎段愈伤组织中检测到黄酮, 在子叶、胚和根愈伤组织中检测到银杏内酯^[9]。一般认为, 次生物质含量高的组织诱导的愈伤组织, 其次生物质含量也高。陈学森等发现, 叶愈伤组织黄酮含量显著高于茎段和子叶愈伤组织的黄酮含量^[10]。目前生产黄酮类物质的细胞培养都以叶片(幼叶)为外植体。受多种因素限制, 1990 年以前一直未能在细胞培养物中检测到银杏内酯^[8], 直到 1990 年才由 Carrier 等在胚愈伤组织悬浮培养物中检测到银杏内酯^[11]。生产银杏内酯多以种子萌发的无菌苗根为外植体。

1.1.2 基本培养基 叶片和叶柄的诱导愈伤组织

收稿日期: 2005-11-17

作者简介: 张光琴(1975—), 女, 河南光山人, 助理讲师, 从事园林植物研究。Tel: (0516) 83628122; E-mail: hanboxzsw@sohu.com。

(上接第 117 页)

本试验中利用 20% H₂O₂ 处理种子 5 min, 在 20℃ 下的发芽率大幅提高, 说明在没有低温催芽情况下, 可用 H₂O₂ 处理种子以提高发芽率。

参考文献:

- [1] 李曙轩, 李树德, 蒋先明, 等. 中国农业百科全书: 蔬菜卷[M]. 北京: 农业出版社, 1990.
- [2] 赵兰枝, 齐振威, 王明玲. 合欢种子不同温度的发芽试验[J]. 山东林业科技, 2004(4): 10-11.
- [3] 李玉红, 唐爱均, 张恩让. 化学处理对菠菜种子萌发的影响[J]. 西北农业学报, 2003, 12(2): 116-118.

- [4] 郑群, 葛晓光, 吕国华, 等. 双氧水、磷酸二氢钾和肌醇低温处理对瓜尔豆种子活力和萌发的影响[J]. 种子, 2002(6): 10-12.
- [5] 吴震, 王广东, 翁忙玲, 等. 山葵种子发芽特性的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 287-290.
- [6] 王广东, 周素平, 吴震, 等. 几种化学药剂处理对蔬菜劣变种子生活力的影响[J]. 华北农学报, 2000, 15(2): 123-127.
- [7] 吴宇芬, 周卫川, 陈宏, 等. H₂O₂ 对薤菜种子活力影响的研究[J]. 福建省农科院学报, 1996, 11(2): 25-30.
- [8] Greipasson S. Effects of stratification and GA₃ on seed germination of a sand stabilising grass *leymus arenarius* used in reclamation[J]. Seed Sci Technology, 2001, 29(1): 1-10.

最适培养基为 B5, 茎的最适培养基为 N6, MS 对叶、胚、叶柄、茎都比较适宜, 根在各种培养基上诱导效果都不理想^[8]。MT 培养基诱导幼叶产生愈伤组织的效果显著优于 White 培养基^[12]。MS 较 White 培养基易于诱导胚产生愈伤组织^[13], 而 White 培养基较 MS 更易于诱导成熟胚乳产生愈伤组织^[14]。

1.1.3 植物激素 NAA 与 BA 和 KT 组合诱导子叶产生愈伤组织的效果优于 2,4-D 与 BA 和 KT 组合, 但后者诱导产生的愈伤组织中银杏内酯的含量高于前者^[9]。胚在添加 5 mg/L BA 和 2 mg/L NAA 的 MS 培养基上诱导愈伤组织效果最佳^[15]。Camper 等则发现, 胚在附加 4.7 μmol/L KT 和 4.5 μmol/L 2,4-D 的 MS 培养基上诱导愈伤组织效果最好^[16]。吴元立等进一步研究表明, 单独添加 2,4-D 或生长素与细胞分裂素的比例在 0.05~2.5 的范围内, 均能诱导胚产生愈伤组织, 但 2,4-D 为 2 mg/L 时产生的愈伤组织部分水浸状, 易褐化死亡, 不同细胞分裂素与生长素组合时 BA 的诱导效果优于 KT^[13]。诱导银杏胚乳愈伤组织的发生不需胚的存在, 单独使用生长素或生长素/细胞分裂素在 0.5~0.9 之间均能诱导部分胚乳产生愈伤组织^[14]。

1.2 愈伤组织的固体继代培养

1.2.1 培养基与植物激素 陈学森等证实, MT 培养基利于叶愈伤组织生长, 愈伤组织生物量高, 但黄酮含量低; White 培养基对愈伤组织生长不利, 但利于黄酮的产生与积累, 黄酮的含量高。在继代培养基(MT)中添加 PVP(聚乙烯吡咯烷酮, 2.0%)和 MES(对氧氮乙环乙烷吡咯磺酸, 0.5%)复合物, 能够实现黄酮含量和生物产量的同步增长^[10]。继代培养时, MS 和 Gamborg/B5 培养基对胚愈伤组织有大致相同的促进作用^[11]。雌株幼叶在附加 BA 和 NAA 的 MT 培养基上诱导的愈伤组织生长缓慢, 继代后松散不易褐变, 附加 BA 和 2,4-D 诱导的愈伤组织前期生长快, 但继代后易褐变^[13]。于荣敏等对根愈伤组织继代培养时发现, KT 与 NAA 组合促进愈伤组织的生长效果优于 KT 与 IBA 组合; 2,4-D 在 6 mg/L 时愈伤组织的生长量最大, 2,4-D 对银杏内酯-A 的含量影响不大, 银杏内酯-B 含量则随 2,4-D 含量的提高而提高, 当 2,4-D 为 8 mg/L 时, 银杏内酯-B 含量达最高值^[8]。

1.2.2 营养物质 继代培养时碳源、氮源等营养物质的种类和浓度对愈伤组织的生长有很大影响^[17]。愈伤组织继代培养时, 一定范围内蔗糖浓度越大, 愈

伤组织生长越快, 倍增时间也越短。姜玲等也发现, 继代培养基中添加蜂蜜能促进愈伤组织生长, 防止褐化^[6]。氮源的形式也影响愈伤组织的生长。NH₄⁺ 是愈伤组织生长过程中氮源的主要吸收形式, 因此以 NO₃⁻ 为唯一氮源时愈伤组织的生长量仅为 MS 基本培养基的 40%, NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 分别为 20.6 mmol/L 和 30.0 mmol/L 时生长量为 MS 基本培养基的 1.3 倍, 继代效果最佳。培养基中缺乏磷酸盐易引起愈伤组织表面褐化, 生长量降低^[8]。

1.2.3 褐变抑制剂 银杏愈伤组织继代培养时, 易发生褐化和生长缓慢的现象, 在培养基中加入适宜的褐变抑制剂可有效防止褐变, 增进细胞活性, 加速细胞生长^[18-19]。姜玲等发现, 在芽和幼叶愈伤组织继代培养基中, 添加 Na₂S₂O₃ 可抑制愈伤组织褐化, 促进生长, 缩短倍增时间, 最适浓度为 75 mg/L^[6]。陈学森等研究不同抗褐变剂的抗褐变效果发现, PA(植酸)或 PVP 与 MES 组合的抗褐变效果显著优于 PVP、维生素 C、Na₂S₂O₃ 和 AC(活性炭)的抗褐变效果, 且 PA 的抗褐变效果与培养基和激素组合密切相关, MT 优于 White 培养基, BA 与 NAA 组合的抗褐变效果优于 2,4-D 与 KT 组合^[10,12]。

1.3 液体悬浮培养

Archipoff 等最早利用银杏叶愈伤组织进行悬浮培养, 对冷冻干燥的细胞和浓缩的培养基经 TLC 和 HPLC 检测, 发现其中主要含有两种生物碱^[20]。悬浮培养不仅愈伤组织生长速度快, 倍增时间短, 而且能抑制褐化, 获得最佳培养产物和最大生物产量。胚、子叶、根等固体培养时其产物均为银杏内酯-A 和银杏内酯-B^[8,21], 而根愈伤组织悬浮培养培养产物中仅含银杏内酯-B^[22-24]。这对于细胞培养生产银杏内酯-B 非常有利。

1.3.1 植物激素 植物激素是影响细胞培养和次生代谢物积累的重要因素。Carrier 等对胚愈伤组织进行悬浮培养发现, 附加 1.0 mg/L NAA 和 0.1 mg/L KT 的 MS 培养基(30 g/L 蔗糖)细胞生长速率为 0.13/d, 而含同样激素的 B5 培养基(20 g/L 蔗糖)细胞生长速率为 0.08/d^[11]。Byun 等发现, 液体培养基 B5 或 MS 中增加 NAA 的浓度, 可促进细胞生长, KT 则没有这种促进作用^[25]。

Jeon 等用叶愈伤组织进行悬浮培养发现, Shenck-Hidebrandt 培养基促进细胞的生长, 但 MS 获得的银杏内酯-B 的生物产量高于前者^[22]。姜玲等^[26]以幼叶诱导的愈伤组织进行细胞悬浮培养

发现,2 mg/L KT 与 NAA 组合,1 mg/L NAA 与 6-BA 组合均能使细胞干重和黄酮糖苷含量同时提高;1 mg/L NAA 与 ZT 组合或单独使用 GA₃ 仅可促进细胞干重增加,但对黄酮糖苷含量无影响。2,4-D 与 KT 组合和 2 或 4 mg/L GA₃ 不仅不能提高细胞干重,而且使黄酮糖苷含量显著低于对照,说明 GA₃ 和 2,4-D 对产生黄酮糖苷有明显的抑制作用。一个成功的悬浮培养系应具备良好的分散性、均一性和较好的生长速度。细胞倍增时间、分散度和培养基澄清晰度是衡量一个悬浮培养系的主要标准。通过选择适宜的培养基、激素配比,调节营养物质和添加附加物能够获得良好的培养系^[6]。

1.3.2 营养和前体物质 碳源的形式影响银杏细胞对它的吸收和细胞的生长。Carrier 等指出,银杏细胞吸收蔗糖前先将蔗糖分解成葡萄糖和果糖,于荣敏等对根愈伤组织进行悬浮培养时发现,以葡萄糖为唯一碳源对愈伤组织的促进作用不大,说明细胞生长需要果糖,蔗糖与葡萄糖比例为 6 时生长最好,但其效果不如单独添加 30 g/L 蔗糖^[8]。

在继代培养基中加入次生代谢物的前体(precursor),可以提高次生代谢物的产量。在银杏离体培养中添加前体物质的报道非常少,仅见 Carrier 等报道在培养基(1/2MS + 1 mg/L NAA)中加入银杏内酯的前体 GGPP(geranylgeranyl pyrophosphate,牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸),并加入异戊烯焦磷酸,监测培养周期,取得了良好的培养效果^[27]。

1.3.3 培养条件 目前关于培养条件对愈伤组织生长和代谢产物积累影响的研究内容包括培养时间、光照、温度和 pH 值。Jeon 等对叶愈伤组织进行悬浮培养发现,培养第 13 d 银杏内酯-B 含量最高,以后迅速降低^[22]。根愈伤组织悬浮培养第 14 d 银杏内酯含量最高,但愈伤组织生长量较小,第 18 d 银杏内酯含量略下降,但产量最高^[23,28]。光照利于愈伤组织生长,能够促进继代培养和悬浮培养细胞中代谢产物含量提高。光照较黑暗利于胚愈伤组织的生长^[21],叶愈伤组织继代培养时光照可显著提高黄酮的含量^[10],光照条件下细胞悬浮培养促使形成更多槲皮素和山柰素^[4]。培养温度一般认为 25 ℃ 最为适宜^[25]。

2 体细胞胚的诱导

银杏外植体易于产生愈伤组织,但难以产生体细胞胚或胚性组织。关于银杏体细胞胚诱导成功的

报道多以胚(成熟胚、幼胚)或胚乳为外植体。Yates 发现,尽管各种外植体都能用简单的培养基诱导愈伤组织,且愈伤组织生长旺盛但无体细胞胚发生,仅在附加 KT 和 NAA 的 MS 培养基上,由成熟胚诱导的愈伤组织继代培养 4~6 周产生暗绿色球状体,继续培养产生体胚^[15]。胚在仅添加 BA 的改良 MT 培养基上可直接产生体胚,BA 与 NAA 组合则不能直接产生体胚,仅产生愈伤组织,愈伤组织转于不含激素的培养基继代后产生体胚,在含 10 μmol/L BA 的改良 MT 培养基上获得了最高胚性组织发生率(90%~95%)和每外植体最多体胚数(9.6)^[29]。培养基中氮素的种类和含量与胚状体的发生也有一定关系,NH₄⁺/NO₃⁻ 为 0.52 时有体胚发生,比例大于 0.60 则无体胚发生^[13]。

Laurain 等从小孢子叶中分离出单核小孢子,用附加 11.4 μmol/L IAA 和 0.93 μmol/L KT 的 Bourbin-Nitsch 液体培养基诱导体胚获得成功,并发现电激预处理可促进提早形成体胚,电压以 750 V/cm 为最佳^[30]。Laurain 等从雌株原叶体分离出原生质体,在添加 BA 和 NAA 的改良 MT 培养基和不含激素的 Bourgin-Nitsch 培养基上诱导体胚获得成功,培养效果以改良 MT 培养基为最佳^[31]。Fontanel 等利用胚珠原叶体在添加生长素和激动素的 MS 培养基和 Gupta-Darzan 培养基上诱导体胚获得成功,且体胚发生率与取材时间密切相关,以授粉后 8~11 周的胚珠原叶为最佳^[32]。

3 存在问题及展望

与其他药用植物一样,尽管对银杏愈伤组织的诱导、细胞悬浮培养等方面的研究非常多,但真正用于次生代谢产物工业化生产的为数甚少,这主要是因为离体细胞生长缓慢,次生代谢物含量太低,同时离体植物组织的生长必须依赖于外源植物激素,因而成本太高。为提高生物产量,降低生产成本,各国学者进行了大量的研究,发展应用了一些新技术,其中以发根培养技术发展最快。

发根培养技术是利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染植物器官、组织或细胞而产生的多分枝的、生长迅速的发根(Hairy Root),进而从发根中提取次生代谢物的培养方法^[33]。由于发根生长迅速且具有不需外源激素、遗传性稳定等优点,因此特别适合工业化生产^[34]。目前,已在人参、长春花、丹参等多种药用植物上进行发根培养获得良好

的效果^[35]。但是银杏作为裸子植物诱导发根非常困难,一直未能成功,直到最近才由 Laurain 等利用发根农杆菌的农杆菌碱型菌株 CFBP2409 侵染胚进行发根培养获得成功。发根培养系总内酯含量为干重的 0.087%,银杏内酯含量为 200 $\mu\text{g}/\text{g}$,而由雌株原叶体建立的细胞培养系两者含量分别为 0.065% 和 160 $\mu\text{g}/\text{g}$ ^[36],前者分别高出 33.8% 和 25%。说明可以通过一定途径进行银杏的发根培养,且具有广阔的利用前景。关于银杏发根条件和发根培养技术的研究值得深入进行。

参考文献:

- [1] 李兆龙,胡季强,胡耀明. 银杏叶的开发利用[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1995:148-169.
- [2] 周维书,黄振强,郑爱云. 银杏叶及其制剂[M]. 北京:化学工业出版社,1995:73-83.
- [3] 陈学森,张艳敏,李健,等. 叶用银杏资源评价及选优的研究[J]. 园艺学报,1997,24(3):215-219.
- [4] 胡蕙露,胡翠玲,杨枝发. 银杏茎段组织培养正交试验[J]. 安徽农业大学学报,1997,24(2):129-133.
- [5] Chu MC, Skirvin RM, Jung H. Micropropagation of shoots of *Ginkgo biloba*[J]. Hort Science,1987,22(5):1069.
- [6] 姜玲,章文才. 银杏悬浮细胞系的建立及其黄酮糖苷的产生[J]. 果树科学,1999,16(2):131-134.
- [7] 徐利钧,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.
- [8] 于荣敏,赵鸿莲,郑玉果,等. 银杏愈伤组织培养及其代谢产物银杏内酯的研究[J]. 生物工程学报,1999,15(1):52-58.
- [9] Camper ND, Wedge DE, Keese RJ, et al. *In vitro* culture of *Ginkgo*[J]. In Vitro Plant,1995,31(3):2.
- [10] 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.
- [11] Carrier DJ, Chauret N, Mancini M. Detecion of ginkgolides - A in *Ginkgo biloba* cell cultuers[J]. Plant Cell Rep,1991,10(5):256-259.
- [12] 陈学森,邓秀新,章文才. 银杏组织培养与黄酮生产的研究 I. 银杏愈伤组织的诱导与褐变调控的研究[J]. 中国农业科学,1997,30(6):55-60.
- [13] 吴元立,严学成. 银杏成熟胚培养的细胞组织学观察[J]. 林业科学,1998,34(4):8-12.
- [14] 吴元立,严学成. 银杏成熟胚乳培养的细胞组织学观察[J]. 果树科学,1998,15(4):327-331.
- [15] Yates WF. Induction of embryogenesis in embryo-derived callus of *Ginkgo biloba* L. [R]. Int Congr Plant Tissue Cell Cult, 1986.
- [16] Camper ND, Coker PS, Wedge DE, et al. *In vitro* culture of *Ginkgo*[J]. In Vitro Plant,1997,33(2):125-127.
- [17] 徐刚标,易文,李美娥,等. 银杏愈伤组织超低温保存的研究[J]. 林业科学,2001,37(3):30-34.
- [18] 马云峰,尚富德,薛瑰玲. 镉离子对银杏幼叶愈伤组织生长的影响[J]. 河南大学学报,2002,32(1):78-79.
- [19] 秦卫东,高明侠,苗敬芝,等. 银杏愈伤组织单细胞克隆的研究[J]. 食品科学,2005,26(12):68-70.
- [20] Archipoff G, Linder C, Lobstein GA, et al. Bioconversion of morphine by cell suspensions of *Ginkgo biloba* growing *in vitro*[J]. Planta Med,1986,6:515.
- [21] Carrier DJ, Consentino G, Neufeld R, et al. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture[J]. Plant Cell Rep, 1990,9(11):635-638.
- [22] Jeon MH, Sung SH, Huh H, et al. Ginkgolide - B production in cultured cells derived from *Ginkgo biloba* L. leaves [J]. Plant Cell Rep,1995,14(8):501-504.
- [23] 于荣敏,赵鸿莲,张辉,等. 银杏细胞悬浮培养及其银杏内酯产生的研究[J]. 生物工程学报,1999,15(2):207-210.
- [24] 刘佳佳,李晓如,郭勇. 缺氧胁迫法选育高产银杏内酯悬浮细胞系研究[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(2):1-4.
- [25] Byun SY, Ryu YM, Kim DI. Studies on production of flavonol glycosides in cell cultures of *Ginkgo biloba*[J]. Biochem Eng,2001,19:246-249.
- [26] 姜玲,章文才. 植物生长调节剂对银杏悬浮细胞生长和黄酮糖苷含量的影响[J]. 果树科学,2000,17(2):110-113.
- [27] Carrier DJ, Archambault J, Vander HR, et al. Formation of terpenoid products in *Ginkgo biloba* L. cultivated cells[J]. Plant Cell Rep, 1996,15(12):888-891.
- [28] 王关林,李春斌,方宏筠. 提高银杏悬浮培养细胞内酯合成的研究[J]. 园艺学报,2002,29(4):321-325.
- [29] Laurain D, Chenieux JC, Tremoiuillaux GJ. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba* [J]. Plant Cell Rep,1996,15(1):19-24.
- [30] Laurain D, Tremoiuillaux GJ, Chenieux JX, et al. Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species [J]. Plant Cell Rep,1993,12(9):501-505.
- [31] Laurain D, Chenieux JC, Tremoiuillaux GJ. Direct embryogenesis from female haploid protoplasts of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species [J]. Plant Cell Rep,1993,12(11):656-660.
- [32] Fontanel A, Isabells S, Vincent P. Regeneration in *Ginkgo biloba* L.: Induction of embryogenesis from megagametophyte according to the development stage [J]. Comptes Rendus de Academic des Sciences Serie III. Sciences de la Vie,1994,317(2):149-155.
- [33] 罗言云,贾勇炯. 银杏茎段的组织培养及其植株再生[J]. 四川大学学报,2001,38(3):412-416.
- [34] 郭力耕,陈力耕,胡西琴,等. 银杏组织培养及其利用研究进展[J]. 果树学报,2003,20(5):399-403.
- [35] 戴均贵,朱蔚华. 发根培养技术在植物次生代谢物生产中的应用[J]. 植物生理学通讯,1999,35(1):69-76.
- [36] Laurain D, Tremoiuillaux GJ, Chenieux JC, et al. Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba*[J]. Phytochemistry,1997,46(1):127-130.