

不同培养条件对黄栀子愈伤的生长和绿原酸类物质积累的影响

林萍, 陈继光, 尹忠平, 吴少福

(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省天然产物与功能食品重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 本文以生长指数、绿原酸类物质含量和每升培养基中绿原酸的产量为评价标准, 研究了培养基种类、碳源、蔗糖浓度、光照条件及水解酪蛋白(CH)浓度对黄栀子愈伤组织的生长及其次级代谢产物绿原酸类物质积累的影响, 旨在为生产绿原酸类物质提供依据。研究显示, 培养条件对黄栀子愈伤组织生长状况和绿原酸类物质积累有显著影响, 适合生长的培养条件与适合绿原酸类物质积累的条件并不一致; 适合黄栀子愈伤组织生长的最佳培养条件为: 以MS为基础培养基, 麦芽糖+蔗糖为碳源、糖浓度为3%、半光照条件下鲜重增长指数最大, 达到47.11%。适合绿原酸类物质积累使得总产量达到最大的最佳培养条件为: MS培养基、蔗糖为碳源、蔗糖浓度为5%、不添加水解酪蛋白、半光照条件下培养, 最高产量达每升培养基含35.55 mg绿原酸类物质。

关键词: 黄栀子; 愈伤组织; 绿原酸类物质; HPLC

文章编号: 1673-9078(2017)4-181-188

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.028

Effects of Different Culture Conditions on Callus Growth and Chlorogenic Acid Accumulation in *Gardenia jasminoides* Ellis

LIN Ping, CHEN Ji-guang, YIN Zhong-ping, WU Shao-fu

(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Jiangxi Key Laboratory of Natural Products and Functional Foods, Nanchang 330045, China)

Abstract: Using the growth index, the content of chlorogenic acids, and the production of chlorogenic acid per liter of medium as evaluation criteria, the effects of different culture media, carbon sources, sucrose concentrations, illumination conditions, and casein hydrolysate (CH) concentrations on callus growth and the accumulation of the secondary metabolite chlorogenic acids in *Gardenia jasminoides* Ellis were studied. The results indicated that different culture conditions had significant effects on the growth of *Gardenia jasminoides* Ellis and the accumulation of chlorogenic acids, and conditions suitable for growth were not optimal for the accumulation of chlorogenic acids. The optimal conditions for growth were as follows: Murashige and Skoog (MS) medium was used as basal medium, sucrose and maltose were used as carbon sources (at a concentration of 3%), and an alternating period of light and dark was applied. Under the above conditions, the highest fresh weight gain index was obtained (47.11%). The optimal conditions for the accumulation of chlorogenic acids were as follows: MS medium, 5% sucrose as the carbon source, no added CH, and application of an alternating period of light and dark. Under the above conditions, the highest yield of chlorogenic acids was 35.55 mg per liter of medium.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; callus; chlorogenic acids; high performance liquid chromatography

黄栀子, 又称栀子和山栀子, 属茜草科植物, 是我国传统的中药材, 以果实供药用, 具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒、护肝、降压镇静及止血消肿等功能, 有明显的胆囊收缩, 利胆排石作用^[1,2]。除了药

收稿日期: 2016-06-15

基金项目: 江西省教育厅青年项目 (GJJ14314)

作者简介: 林萍 (1994-), 女, 硕士在读, 研究方向: 天然产物和功能性食品

通讯作者: 陈继光 (1985-), 男, 博士在读, 助理实验师, 研究方向: 植物细胞培养

用价值外, 还具有观赏价值和经济价值。黄栀子为常绿灌木, 花香形美, 是一种极好的盆栽观赏植物, 生命力强, 耐干旱适应贫瘠土壤^[3,4]。黄栀子中含有大量的化学成分, 如环烯醚萜类、二萜类化合物、三萜类化合物、黄酮类化合物、有机酸酯类和挥发油等^[5], 其中使黄栀子具有抗菌功效的成分包含绿原酸和异绿原酸^[6]。黄栀子是一种重要的经济树种, 可用于生产天然色素和绿原酸。随着中药及兽药的迅速开发和发

展, 黄栀子中的天然黄色素被越来越广泛的应用在食品和化妆品等行业。其中绿原酸类物质也是一种重要

的生物活性物质, 具有抗菌、抗病毒、增高白血球、保肝利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂、抗氧化及兴奋中枢神经系统等多种药理作用^[7]。随着黄栀子应用领域不断的扩大, 需求越来越大, 目前研究黄栀子成分的材料都是取自植株, 这对栀子资源有一定的需求量, 然而黄栀子天然资源在不断地减少, 加上黄栀子植物生长周期长, 产量低, 且受到季节的影响, 天然黄栀子资源远远不能满足市场的需求, 以愈伤组织培养生产绿原酸可以解决黄栀子生长周期长的问题。大多文献都是研究黄栀子中的色素和活性成分提取, 而对黄栀子愈伤组织积累绿原酸的研究极少。本文就是以黄栀子的愈伤组织为材料, 探讨不同的培养条件对黄栀子愈伤组织的生长和绿原酸类物质积累的影响, 以解决市场需求大的问题, 和为大规模生产绿原酸类物质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与主要试剂

甲醇(色谱纯, 美国天地有限公司); 乙腈(色谱纯, 美国天地有限公司); 冰乙酸(分析纯, 天津大茂化学试剂厂); 绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 标准品(>97%, 上海同田生物科技有限公司); 黄栀子愈伤组织(实验室自培)。

1.1.2 主要仪器设备

超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); 安捷伦高效液相色谱仪 1260 系统(美国安捷伦科技公司); 超纯水制备器(美国 Milli-Q 公司); SB-3200 超声波清洗机(浙江新芝生物科技有限公司); JW-1042 低速离心机(安徽嘉文仪器设备有限公司); 自动蒸汽灭菌锅 D-1(北京发恩科贸有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制

不同培养基的配制: 分别称取 MS 培养基、1/2MS 培养基、B5 培养基、WPM 培养基、White 培养基, 加入等量的 3%蔗糖, NAA 0.4 mg/L, KT 0.3 mg/L, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 6, 加入 6 g/L 的琼脂; 不同碳源培养基配制: 以 MS 培养基为基础培养基, 分别称取 3%的葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、1.5%蔗糖和 1.5%麦芽糖混合糖, 加入 NAA 0.4 mg/L, KT 0.3 mg/L, 定容至 1 L, 调 pH 6, 加入 6 g/L 琼脂; 不同糖浓度培养基配制: 以 MS 培养基为基础培养基, 分别加入 1%、2%、3%、4%和 5%的蔗糖, 用蒸馏水溶

解后, 加入 NAA 0.4 mg/L、KT 0.3 mg/L, 定容至 1 L, 调 pH 6, 加入 6 g/L 的琼脂; 不同光照条件: MS+蔗糖 3%+NAA 0.4 mg/L+KT 0.3 mg/L, 调 pH 6+琼脂 6 g/L, 分别置于全光照、半光照、全暗条件下培养; 不同水解酪蛋白浓度培养基的配制: 以 MS 培养基为基础培养基, 加入 3%蔗糖, 分别加入水解酪蛋白(CH) 100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L 和 500 mg/L, 加入 NAA 0.4 mg/L, KT 0.3 mg/L, 定容至 1 L, 调节 pH 6 加入 6 g/L 琼脂。将配制好的培养基放入高压灭菌锅中, 121 °C、20 min 灭菌。

1.2.2 愈伤组织的接种及收获

用消毒好的镊子取约 0.5 g 愈伤组织接种在新配制的培养基中, 分十个生长点接种, 接种好后放在 25 °C 培养室中培养, 除单因素条件为光照、半光照和黑暗条件外, 其余全为半光照培养室中培养 20~25 d。将生长好的愈伤组织分别刮取下来, 称量鲜重, 再放入干燥箱 60 °C、24 h 烘干, 称取干重。再研磨成粉状, 备用。

1.2.3 HPLC 法测定黄栀子绿原酸类物质含量的方法学考察

1.2.3.1 样品的预处理

称取 0.1 g 左右干燥的愈伤组织粉末于 10 mL 离心管中, 加 4 mL、50%甲醇, 漩涡摇匀, 超声(30 °C、40 kHz)辅助提 30 min, 用离心机 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 重复提取一次, 合并提取液于 10 mL 离心管, 用 50%甲醇定容至 10 mL, 制得供试样品溶液。

1.2.3.2 色谱条件

色谱柱: Symmetry C₁₈ (5 μm, 4.6×250 mm column)。流动相: 乙腈-1%醋酸水; 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 40 °C, 检测波长为 327 nm, 进样量 10 μL。

1.2.3.3 HPLC 法初步鉴定愈伤中的绿原酸类化合物

用 1.2.3.1 中的方法处理样品后, 分别在预处理好的同一样品中加入绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 标准品, 再用 2.3.2 中的色谱条件进行测定。以初步鉴定三种绿原酸。

1.2.3.4 标准曲线的绘制

精密称取绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 标准品各 1 mg, 至于 2 mL 离心管中, 加甲醇定容至 2 mL, 摇匀。得到绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 标准品储备液, 将标准品储备液依次稀释后依法测定, 得到三个线性回归方程:

绿原酸回归方程: $y=41094x-41.17$, $R=0.999$

异绿原酸 A 回归方程: $y=41330x-18.20$, $R=0.999$

异绿原酸 C 回归方程: $y=22468x-11.88$, $R=0.999$

式中, y 为峰面积, x 为质量浓度 mg/mL。

1.2.3.5 精密性试验

将标准品储备液连续进样 5 次, 进样量 10 μL, 得到峰面积并计算 RSD。

1.2.3.6 稳定性试验

将用样品制得的供试品溶液在 0、3、6、9、12 h 进样 10 μL, 得到峰面积并计算 RSD。

1.2.3.7 重复性试验

将同一样品进行 5 次平行试验, 依法测定, 得到峰面积并计算 RSD。

1.2.3.8 加样回收率试验

准确称取 0.1 g 已知浓度的愈伤组织粉末 5 份, 分别精密加入一定量的绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品, 依法制备供试液, 依法测定, 得到 HPLC 分析。

1.2.4 计算公式及数据统计分析

数据统计和分析采用 DPS 6.55 统计软件, 采用 Origin 8.0 版作图, 每组样品三个重复, 每个样品平行四次, 结果表示为平均值±标准偏差。计算公式如下:

$$\text{鲜重增长指数 (\%)} = \frac{\text{收获的愈伤质量}}{\text{接种的愈伤质量}} \times 100\%$$

$$\text{绿原酸含量} = \frac{\text{绿原酸浓度} \times \text{供试液体积}}{\text{称取质量}}$$

$$\text{绿原酸产量} = \frac{\text{绿原酸含量} \times \text{干重}}{\text{培养基体积}}$$

2 结果与讨论

2.1 HPLC 法测定黄栀子绿原酸类物质含量的

方法学考察

2.1.1 HPLC 法初步鉴定愈伤中的绿原酸类化

合物

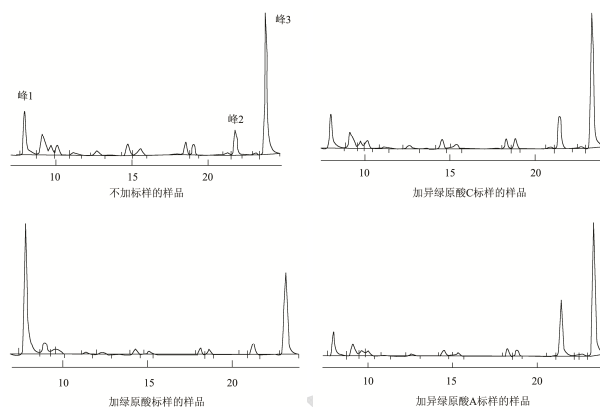


图 1 液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatograms showing chlorogenic acid peaks

实验结果得到图 1, 可得出, 峰 1 为绿原酸, 峰 2 为异绿原酸 A, 峰 3 为异绿原酸 C。

2.1.2 精密性试验

结果绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 1.52%、0.54%和 0.73%。

2.1.3 稳定性试验

结果绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 1.08%、0.64%和 0.33%。

2.1.4 重复性试验

结果绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 1.06%、0.78%和 0.46%。

2.1.5 加样回收率试验

结果绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的回收率分别为 101.31%、104.72%和 99.83%。RSD 分别为 0.63%、0.33%和 0.65%。

2.2 培养基对愈伤生长和绿原酸类物质积累

的影响

表 1 培养基对愈伤的影响

Table 1 Effect of different culture media on callus growth

培养基	鲜重增长指数/%	干重平均数		生长状况
MS	26.43±0.70 ^{aA}	0.50±0.083 ^{aA}	+++++	疏松, 呈灰黄色, 表面干燥
1/2MS	18.63±0.46 ^{bB}	0.50±0.020 ^{aA}	++++	疏松, 呈灰黄色, 表面干燥
WPM	13.53±0.62 ^{cC}	0.41±0.066 ^{bAB}	+++	疏松, 呈灰黄色, 表面干燥
White	5.58±0.72 ^{dD}	0.24±0.024 ^{cC}	++	疏松, 呈黄绿色, 表面湿润
B5	3.74±0.07 ^{eE}	0.08±0.005 ^{dD}	+	轻微褐化

注: 上标小写字母不同时表示各列平均值在 p<0.05 水平具有显著差异, 上标大写字母不同时表示各列平均值在 p<0.01 水平具有极显著差异, 下同。

由表 1 可知, 愈伤组织在五种培养基中的生长状况有显著差异, MS 培养基是五种培养基中最适合黄栀子愈伤生长的培养基, B5 和 White 培养基均不利于

愈伤的生长, 生长状况见图 2。由各培养基的组成成分可知, MS 培养基属于高无机盐离子浓度, B5 属于低铵培养基, White 培养基含大量 Mg²⁺且无机盐离子

浓度仅为 MS 的 1/2, 所以, 初步推测, 在一定离子浓度范围内, 高无机盐离子浓度利于黄栀子愈伤的生长, 而低铵抑制生长。由图 3 可知, 不同培养基对绿原酸类物质的积累也存在显著差异, 其中 White 培养基中绿原酸类物质含量最多, 其次是 MS 培养基, WPM 培养基中未检测出绿原酸类物质, 1/2MS 培养基的大量元素和 Ca^{2+} 是 MS 培养基的 1/2, 由 MS、1/2MS 和 White 培养基成分比较可知, 高无机盐离子浓度对黄栀子愈伤中绿原酸类物质有积累作用。从表 2 中可知, 尽管 White 培养基中的绿原酸类物质含量最高, 但 MS 培养基中绿原酸类物质的总产量最高, 高达每升培养基含 25.40 mg, 是 White 培养基的 1.9 倍, 是 1/2MS 培养基的 9.2 倍。

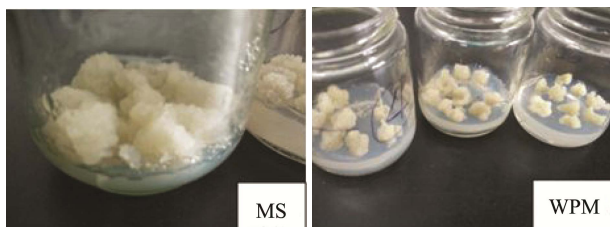


图 2 不同基础培养基愈伤生长情况

Fig.2 Images of callus growth in different culture media

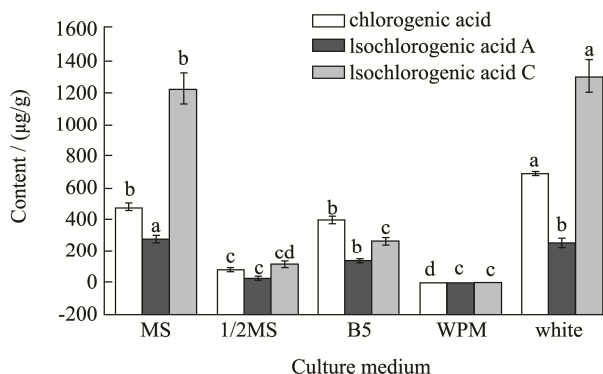


图 3 不同培养基对应的绿原酸类物质的含量

Fig.3 Content of chlorogenic acid in different culture media

表 2 培养基对应的绿原酸类物质产量及总产量 (每 1 L 培养基)

Table 2 Yields and total yields of chlorogenic acids per liter in different culture media

培养基	平均干重/g	绿原酸产量/mg	异绿原酸 A 产量/mg	异绿原酸 C 产量/mg	总产量/mg
MS	0.50±0.083 ^{aA}	5.40±0.41 ^{aA}	3.66±0.21 ^{aA}	16.34±1.02 ^{aA}	25.40±1.61 ^{aA}
1/2MS	0.50±0.020 ^{aA}	1.00±0.11 ^{cC}	0.31±0.19 ^{cC}	1.44±0.21 ^{cC}	2.75±0.52 ^{cC}
WPM	0.41±0.066 ^{bAB}	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
White	0.24±0.024 ^{cC}	4.11±0.080 ^{bB}	1.52±0.12 ^{bB}	7.77±0.66 ^{bB}	13.40±0.86 ^{bB}
B5	0.080±0.0050 ^{dD}	0.75±0.18 ^{dC}	0.25±0.029 ^{dC}	0.50±0.075 ^{dD}	1.50±0.29 ^{dC}

2.3 碳源对愈伤生长和绿原酸类物质积累的影响

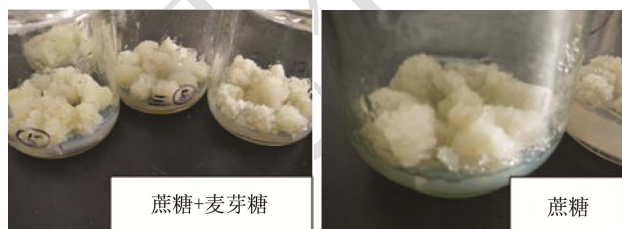


图 4 不同碳源条件下愈伤生长情况

Fig.4 Images of callus growth with different carbon sources

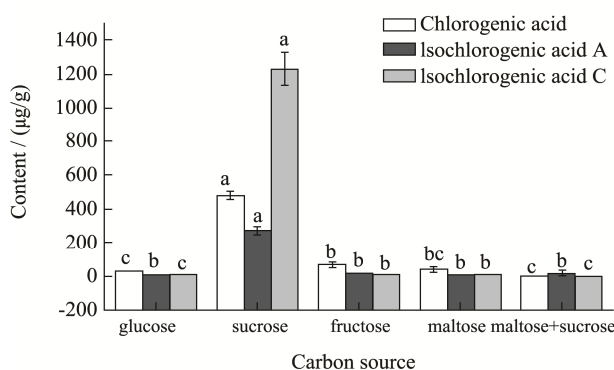


图 5 碳源对应的绿原酸类物质的含量

Fig.5 Content of chlorogenic acids with different carbon sources

由表 3 和图 4 可知, 当添加碳源为 1.5%蔗糖+1.5%麦芽糖混合糖时, 愈伤生长的最旺盛, 疏松, 表面干燥, 适合继代培养。蔗糖、麦芽糖和葡萄糖之间差异不大, 愈伤状态类似于 1.5%蔗糖+1.5%麦芽糖混合糖, 但生长量低于 1.5%蔗糖+1.5%麦芽糖混合糖, 当碳源为果糖时, 出现了轻微的褐化, 基本上没有生长, 果

糖抑制生长的原因可能是黄栀子愈伤组织内缺少相应的酶。由图 5 可知,绿原酸类物质积累最多的是蔗糖,明显高于其他四种碳源。由表 4 可知,从绿原酸类物质的总产量来考虑,当碳源为蔗糖时绿原酸总产量最高,高达每升培养基 24.86 mg,是麦芽糖的 28 倍,葡萄糖的 37 倍。尽管愈伤在 1.5%蔗糖+1.5%麦芽糖条件下生长最旺盛,但绿原酸类物质的积累几乎没有,

原因是次级代谢产物一般是植物在逆境条件下产生的一种保护剂或者废弃物,他们往往是在细胞停止生长时累积,或者是他们的累积导致了细胞停止生长^[8],由于生长量最大的是 1.5%蔗糖+1.5%麦芽糖混合糖,积累量最大的是蔗糖,下一步实验中,可以探究采用不同的蔗糖和麦芽糖的比例来使得绿原酸提高产量,或是采用二步培养法来提高产量。

表 3 碳源对愈伤的影响

Table 3 Effect of different carbon sources on callus growth

碳源	鲜重增长指数/%	干重平均数	生长状况
葡萄糖	23.53±0.55 ^{cC}	0.49±0.024 ^{bB}	++++ 疏松,呈灰黄色,表面湿润
蔗糖	23.60±0.43 ^{cC}	0.50±0.092 ^{bB}	+++++ 疏松,呈灰黄色,表面干燥
果糖	5.11±0.71 ^{dD}	0.13±0.024 ^{cC}	+ 呈半透明状,轻微褐化
麦芽糖	25.44±0.14 ^{bB}	0.50±0.014 ^{bB}	++++ 疏松,呈灰黄色,表面干燥
蔗糖+麦芽糖	47.11±0.19 ^{aA}	0.68±0.012 ^{aA}	++++++ 疏松,呈灰黄色,表面干燥

表 4 碳源对应的绿原酸类物质产量及总产量 (每 1 L 培养基)

Table 4 Yields and total yields of chlorogenic acids per liter of medium with different carbon sources

碳源	平均干重/g	绿原酸产量/mg	异绿原酸 A 产量/mg	异绿原酸 C 产量/mg	总产量/mg
葡萄糖	0.49±0.024 ^{bB}	0.44±0.0071 ^{bBC}	0.13±0.0035 ^{cC}	0.11±0.050 ^{bB}	0.68±0.0017 ^{bB}
蔗糖	0.50±0.092 ^{bB}	6.01±0.44 ^{aA}	3.46±0.22 ^{aA}	15.40±0.69 ^{aA}	24.86±1.34 ^{aA}
果糖	0.13±0.024 ^{cC}	0.23±0.069 ^{cCD}	0.068±0.0019 ^{cC}	0.047±0.0032 ^{bB}	0.35±0.006 ^{bB}
麦芽糖	0.50±0.014 ^{bB}	0.56±0.036 ^{bB}	0.14±0.0034 ^{cC}	0.19±0.0030 ^{bB}	0.89±0.04 ^{bB}
麦芽糖+蔗糖	0.68±0.012 ^{aA}	未检测到	0.37±0.0029 ^{bB}	未检测到	0.37±0.0029 ^{bB}

2.4 蔗糖浓度对愈伤生长和绿原酸类物质积累的影响

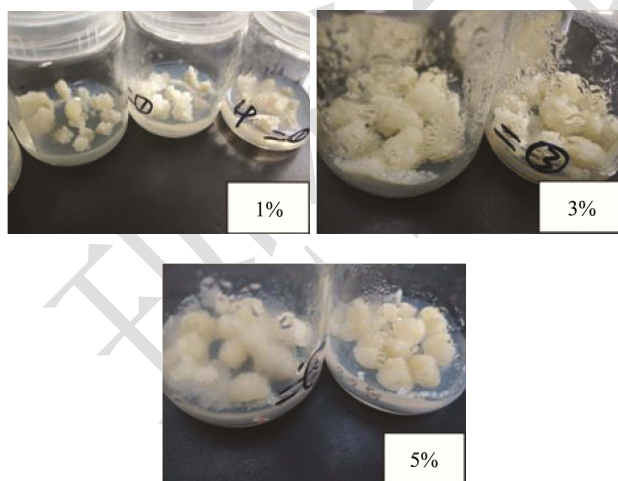


图 6 不同蔗糖浓度条件下愈伤生长情况

Fig.6 Images of callus growth with different sucrose concentrations

由表 5 和图 6 可知,当蔗糖浓度为 3%和 4%时,愈伤生长的最旺盛,但两者间愈伤组织的状态有差异,蔗糖浓度为 3%时愈伤组织呈黄灰色,疏松,表面干

燥,这时的浓度适合继代培养累积次生代谢物,当浓度为 4%时,愈伤组织呈致密的黄绿色,此时的愈伤适合分化出芽或生根。当蔗糖浓度为 1%和 2%时,由于添加的碳源浓度太低,不能满足愈伤的生长需求,所以生长受到了抑制,当浓度为 5%时,浓度太高,影响了渗透压,也抑制了愈伤的生长。

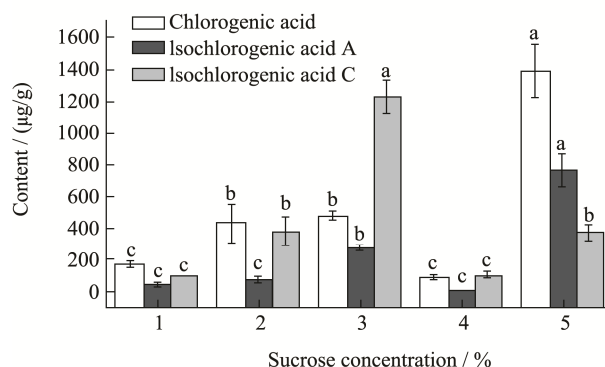


图 7 蔗糖浓度对应的绿原酸类物质的含量

Fig.7 Content of chlorogenic acids with different sucrose concentrations

由图 7 可知,当蔗糖浓度达到了 5%时,绿原酸类物质积累的最多,且三种绿原酸的比例差异极大,由植物中绿原酸的形成途径^[9]可知,在植物的有氧呼吸的过程中,葡萄糖经过一系列转化后形成绿原酸,

葡萄糖作为基本原料,可推断,在不考虑其他因素的情况下,蔗糖越多,生成的绿原酸类物质就越多。由表 6 可知,当蔗糖浓度为 5%时,绿原酸类物质的产量最大,达到了 35.55 mg/L 培养基,其中,绿原酸的

产量占了近一半,产量明显高于其他浓度的蔗糖。为了进一步提高产量,后期实验可以采取分两步法进行培养,前期先用 3%蔗糖浓度进行培养,后期再用 5%进行培养使产量提高。

表 5 蔗糖浓度对愈伤的影响

Table 5 Effect of different sucrose concentrations on callus

糖浓度/%	鲜重增长指数/%	干重平均数	生长状况	
1	8.62±0.27 ^c	0.13±0.033 ^d	+	疏松,呈灰黄色,表面干燥
2	12.51±5.91 ^{bb}	0.24±0.14 ^c	++	疏松,呈灰黄色,表面湿润
3	25.95±0.43 ^{aa}	0.56±0.092 ^{bb}	+++++	疏松,呈灰黄色,表面干燥
4	25.70±0.18 ^{aa}	0.73±0.025 ^{aa}	+++++	致密,呈淡黄绿色,表面湿润
5	15.68±0.17 ^{bb}	0.56±0.092 ^{bb}	++++	致密,呈淡黄绿色,表面湿润

表 6 蔗糖浓度对应的绿原酸类物质产量及总产量(每 1 L 培养基)

Table 6 Yields and total yields of chlorogenic acids per liter of medium with different sucrose concentrations

糖浓度/%	平均干重/g	绿原酸产量/mg	异绿原酸 A 产量/mg	异绿原酸 C 产量/mg	总产量/mg
1	0.13±0.033 ^d	0.55±0.039 ^d	0.14±0.023 ^c	0.32±0.0025 ^d	1.01±0.058 ^d
2	0.24±0.14 ^c	2.58±0.81 ^c	0.48±2.27 ^c	2.28±0.74 ^{cc}	5.34±1.62 ^c
3	0.56±0.092 ^{bb}	6.01±0.44 ^{bb}	3.46±0.22 ^{bb}	15.40±0.69 ^{aa}	24.86±1.34 ^{bb}
4	0.73±0.025 ^{aa}	1.67±0.11 ^{cd}	0.21±0.0064 ^c	1.93±0.10 ^c	3.81±0.21 ^c
5	0.56±0.092 ^{bb}	19.51±1.93 ^{aa}	10.75±1.14 ^{aa}	5.29±0.67 ^{bb}	35.55±2.80 ^{aa}

表 7 光照条件对愈伤的影响

Table 7 Effect of different lighting conditions on callus growth

光照条件	鲜重增长指数/%	干重平均数	生长状况	
全光照	46.62±0.65 ^{aa}	0.72±0.071 ^{aa}	+++++	疏松,呈灰黄色,表面干燥
半光照	26.43±0.43 ^{bb}	0.44±0.092 ^{bb}	++++	疏松,呈灰黄色,表面干燥
全暗	9.86±0.21 ^c	0.26±0.022 ^{cc}	+++	疏松,呈淡黄色,表面干燥

表 8 光照条件对应的绿原酸类物质产量及总产量(每 1 L 培养基)

Table 8 Yields and total yields of chlorogenic acids per liter of medium in different lighting conditions

光照条件	平均干重/g	绿原酸产量/mg	异绿原酸 A 产量/mg	异绿原酸 C 产量/mg	总产量/mg
全光照	0.72±0.071 ^{aa}	0.47±0.026 ^c	0.13±0.0017 ^{bb}	0.11±0.022 ^{cc}	0.71±0.0031 ^c
半光照	0.44±0.092 ^{bb}	6.01±0.44 ^{aa}	3.46±0.22 ^{aa}	15.40±0.69 ^{aa}	24.86±1.33 ^{aa}
全暗	0.26±0.022 ^{cc}	2.42±0.40 ^{bb}	0.19±0.0025 ^{bb}	2.98±0.75 ^{bb}	5.59±0.94 ^{bb}

2.5 光照条件对愈伤生长和绿原酸类物质积累的影响

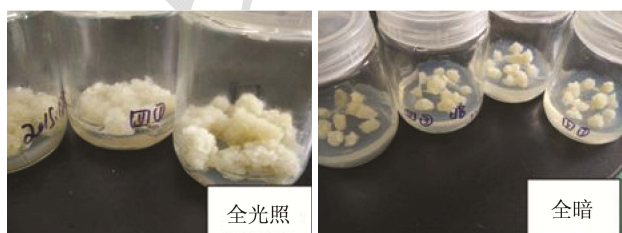


图 8 不同蔗糖浓度条件下愈伤生长情况

Fig.8 Images of callus growth in different lighting conditions

不同光照对愈伤组织的生长有一定的影响,对次

级代谢产物的积累也有一定的影响,光照对有效成分的累积是必须的^[10]。由表 7 可知,光照时间越长,愈伤生长的越旺盛,暗处理下的愈伤虽然生长的不旺盛,但与有光照条件下不同的是愈伤的颜色,呈现的是淡黄色,而非灰黄色,可能是长时间的光照对另外一些色素的合成有一定的影响。由图 9 可知,三种光照条件之间存在显著差异,其中半光照条件最利于绿原酸类物质的积累,植物生长和发育离不开光,光可参与众多生理、生化反应。光对于体内的许多酶具有诱导和抑制作用^[11]。光照强度主要通过影响次生代谢途径的 PAL 酶的活性来调控次级代谢产物的积累^[12],而在绿原酸积累途径中 PAL 酶起着重要的作用。由表 8 可知,绿原酸类物质产量最高的光照条件是半光照培养,

高达 24.86 mg/L 培养基。

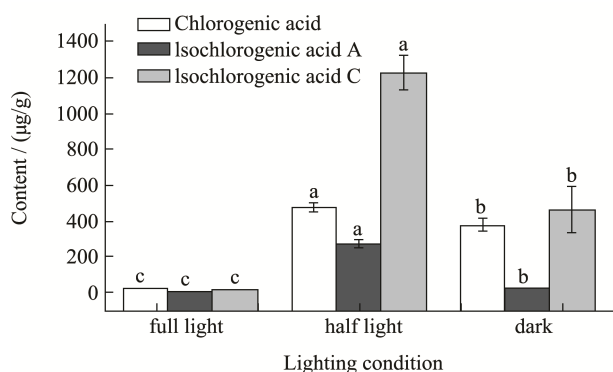


图 9 不同光照条件对应的绿原酸类物质的含量

Fig.9 Content of chlorogenic acids in different lighting conditions

2.6 水解酪蛋白浓度对愈伤生长和绿原酸类物质积累的影响

CH 作为一种有机添加物，经常被用在组织培养中，CH 富含多种氨基酸，是很好的外源氮，也可作为诱导子。由表 9 可知，当浓度在 100~300 mg/L 时 CH 对愈伤生长并没有什么显著影响，反而在浓度大于 400 mg/L 时会抑制愈伤的生长，以愈伤的生长量为指标，CH 的添加对其没有显著影响，但 CH 富含氨基酸，对愈伤的进一步分化可能有影响，高浓度的 CH 抑制生长的原因可能是改变了渗透压，使得细胞的生长受到抑制。由图 6 可知，CH 浓度对异绿原酸 A 的

作用较大，与不添加 CH 的培养基相比，添加 CH 对异绿原酸 C 的积累有抑制作用，但是对于异绿原酸 A 来说，有明显的促进积累的作用，原因可能是，异绿原酸 A 和异绿原酸 C 互为同分异构，水解酪蛋白中的氨基酸对这两种同分异构的转化有作用，可能是促进异绿原酸 C 转化为异绿原酸 A，或者是抑制异绿原酸 A 转化为异绿原酸 C。由表 10 可知，添加 CH 时绿原酸最大的产量为 24.26 mg，小于不添加 CH 的培养基，从总产量考虑，不添加 CH 更好，但是从异绿原酸 A 的产量来说，添加水解酪蛋白对于异绿原酸 A 来说有明显的促进作用，最高可达不添加时的 3 倍。可见添加 CH 对提高总产量没有显著效果甚至高浓度 CH 有抑制作用，但能改变三种绿原酸的比例。

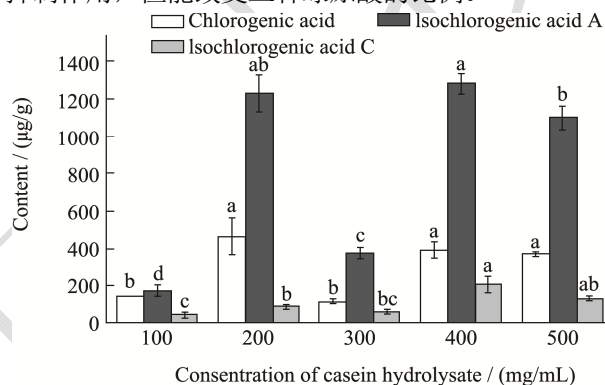


图 10 CH 浓度对应的绿原酸类物质的含量

Fig.10 Content of chlorogenic acids with different CH concentrations

表 9 CH 浓度对愈伤的影响

Table 9 Effect of different CH concentrations on callus growth

CH 浓度/(mg/mL)	鲜重增长指数/%	干重平均数	生长状况	
100	23.17±0.17 ^{bB}	0.55±0.064 ^{aAB}	++++	疏松，呈灰黄色，表面干燥
200	21.51±0.18 ^{cC}	0.54±0.069 ^{aAB}	++++	疏松，呈灰黄色，表面湿润
300	26.27±0.14 ^{aA}	0.58±0.074 ^{aA}	+++++	疏松，呈灰黄色，表面干燥
400	16.95±0.23 ^{dD}	0.41±0.080 ^{bC}	+++	致密，呈灰黄色，表面湿润
500	17.20±0.21 ^{dD}	0.45±0.024 ^{bBC}	+++	疏松，呈灰黄色，表面湿润

表 10 CH 浓度对应的绿原酸类物质产量及总产量（每 1 L 培养基）

Table 10 Yields and total yields of chlorogenic acids per liter of medium with different CH concentrations

CH 浓度/(mg/mL)	平均干重/g	绿原酸产量/mg	异绿原酸 A 产量/mg	异绿原酸 C 产量/mg	总产量/mg
100	0.55±0.064 ^{aAB}	1.98±0.028 ^{cC}	2.38±0.13 ^{eD}	0.63±0.036 ^{eE}	4.99±0.19 ^{eD}
200	0.54±0.069 ^{aAB}	6.34±1.25 ^{aA}	16.71±1.19 ^{aA}	1.21±0.0065 ^{cC}	24.26±2.44 ^{aA}
300	0.58±0.074 ^{aA}	1.71±0.0068 ^{cC}	5.52±0.14 ^{dC}	0.91±0.035 ^{dD}	8.14±0.16 ^{dC}
400	0.41±0.080 ^{bC}	4.09±0.17 ^{bB}	13.25±0.32 ^{bB}	2.18±0.18 ^{aA}	19.52±0.67 ^{bB}
500	0.45±0.024 ^{bBC}	4.20±0.070 ^{bB}	12.45±0.35 ^{cB}	1.50±0.11 ^{bB}	18.15±0.17 ^{cB}

3 结论

从实验结果显示，适合黄栀子愈伤生长的最优培

养条件并不是绿原酸类物质积累的最优条件。以 MS 为基础培养基，麦芽糖+蔗糖为碳源，糖浓度为 3%，半光照条件下生长指数最大，达到 47.11%。产量最大

的培养基配方是: MS 培养基、蔗糖为碳源、蔗糖浓度是 5%、不添加水解酪蛋白、在半光照条件下培养,最高时产量达到每升培养基 35.55 mg。

参考文献

- [1] 饶月辉,游党程.黄栀子扦插繁殖技术[J].农业科技通讯,2012,1:134-135
RAO Yue-hui, YOU Dang-cheng. Cutting propagation technique *Gardenia Jasminoides Ellis* [J]. Bulletin of Agricultural Science, 2012, 1: 134-135
- [2] Kang J J, Wang H W, Liu T Y. Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from *Gardenia jasminoides* [J]. Canadian Metallurgical Quarterly, 1997, 35(10-11): 957-965
- [3] 曾妮.栀子离体培养及愈伤组织成分提取[D].成都:四川大学,2007
ZENG Ni. Studies on *in vitro* culture and callus extraction and isolation of *Gardenia Jasminoides Ellis* [D]. Chengdu: Sichuan University, 2007
- [4] 付小梅,周光雄,葛菲,等.栀子类药材的研究概况及展望[J].中国野生植物资源,2001,20(2):24-26,30
FU Xiao-mei, ZHOU Guang-xiong, GE Fei, et al. Survey of studies on gardenia [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2001, 20(2): 24-26, 30
- [5] 钟传文,温达志.黄栀子栽培技术与利用[J].林业科技通讯,2001,2:9-12
ZHONG Chuan-wen, WEN Da-zhi. Cultivation techniques and utilization of *Gardenia Jasminoides Ellis* [J]. Forest Science and Technology, 2001, 2: 9-12
- [6] Lee J H, Ko W S, Kim Y H, et al. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaB α degradation in rat liver [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2001, 7(1): 79-83
- [7] 王辉,田呈瑞,马守磊,等.绿原酸的研究进展[J].食品工业科技,2009,5:341-345
WANG Hui, TIAN Cheng-rui, MA Shou-lei, et al. Research progress of chlorogenic acid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 5: 341-345
- [8] 李琰,张朝红,马希汉.培养基成分对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响[J].武汉植物学研究,2004, 22(4): 359-363
LI Yan, ZHANG Zhao-Hong, MA Xi-Han. Effects of medium concentration on callus growth and secondary metabolites of *eucommiaulmoides* [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2004, 22(4): 359-363
- [9] CHANG J L, Luo J, He G Y. Regulation of polyphenols accumulation by combined overexpression, silencing key enzymes of phenylpropanoid pathway [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2009, 41(2): 123-30
- [10] 文涛,梁莉,曾杨,等.不同光照强度对虎杖愈伤组织的影响[J].中国中药杂志,2007,32(13):1277-1280
WEN Tao, LIANG Li, ZENG Yang, et al. Effect of different light intensity on *Polygonum cuspidatum* callus [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32(13): 1277-1280
- [11] 孔祥海.植物次生代谢物的细胞培养技术研究进展[J].龙岩学院学报,2005,23(6):60-64
KONG Xiang-hai. Research progress of cell culture for plant secondary metabolites [J]. Journal of Longyan University, 2005, 23(6): 60-64
- [12] Alissa K Salmore, Mark D Hunter. Environmental and genotypic influences on isoquinoline alkaloid content in *sanguinaria canadensis* [J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 27(9): 1729-1747