

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201412035

唐明,汪超,谭韵雅,等. 不同种类无机盐对灰毡毛忍冬“渝蕾1号”悬浮培养体系中细胞生长和绿原酸含量的影响 [J]. 广西植物, 2016, 36(5): 582-588

TANG M, WANG C, TAN YY, et al. Effects of different species of inorganic salt on the chlorogenic acid content and the growth of cell in suspension cultures of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1” [J]. Guihaia, 2016, 36(5): 582-588

不同种类无机盐对灰毡毛忍冬“渝蕾1号” 悬浮培养体系中细胞生长和绿原酸含量的影响

唐明,汪超,谭韵雅,李群*

(四川师范大学生命科学学院, 成都 610101)

摘要: 为提高灰毡毛忍冬“渝蕾1号”悬浮培养体系中绿原酸的含量,该研究探讨了 B₅培养基中不同浓度的无机盐对灰毡毛忍冬“渝蕾1号”悬浮培养细胞生物量及绿原酸含量的影响,通过在悬浮培养体系中添加不同浓度的无机盐,采用重量法测定灰毡毛忍冬“渝蕾1号”悬浮培养细胞的生物量及采用高效液相色谱法测定绿原酸的含量。结果表明:当硝态氮和铵态氮配比与 B₅培养基中硝态氮和铵态氮配比一致时,即 NO₃⁻/NH₄⁺摩尔比值为 13:1 时,培养体系有利于细胞的生长和绿原酸的积累。当 KNO₃浓度为 3.5 g·L⁻¹时,细胞生物量达到最大,为 19.26 g·L⁻¹;当 KNO₃在较低浓度(0.5 g·L⁻¹和 1.5 g·L⁻¹)时,积累较多的绿原酸。NO₃⁻的两项研究结果均与对照浓度(2.5g·L⁻¹)有一定的差异。另外,对 (NH₄)₂SO₄来说,在高于对照浓度 0.134 g·L⁻¹,即浓度为 0.268 g·L⁻¹时,生物量和绿原酸含量都达到了最大。P、Ca、Mg 三种矿质元素的研究结果表明,当 NaH₂PO₄·2H₂O 浓度为 0.10 g·L⁻¹、CaCl₂的浓度为 0.20 g·L⁻¹时,细胞的生长和绿原酸的积累均可达到最大值;而对 Mg²⁺来说,低浓度促进细胞的生长,高浓度促进绿原酸的积累。兼顾细胞生物量和绿原酸含量两个指标,需选择适中的浓度。这些结果均与对照浓度有一定的差异。这说明灰毡毛忍冬“渝蕾1号”悬浮细胞所需无机盐的浓度与 B₅培养基无机盐的浓度有一定的差异,选择适宜的浓度可促进其悬浮细胞的生长及次生代谢产物绿原酸的积累。该研究结果为绿原酸的工业化生产打下了基础。

关键词: 灰毡毛忍冬“渝蕾1号”, 悬浮培养, 绿原酸, 高效液相色谱, 无机盐

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)05-0582-07

Effects of different species of inorganic salt on the chlorogenic acid content and the growth of cell in suspension cultures of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”

TANG Ming, WANG Chao, TAN Yun-Ya, LI Qun*

(College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China)

Abstract: In order to improve the content of chlorogenic acid in cell suspension cultures of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”, this paper discussed that the different species of inorganic salt had many effects on the chlorogenic acid content and growth of cell in suspension cultures of *L. macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”. We weighed the

收稿日期: 2014-12-23 修回日期: 2015-01-15

基金项目: 四川省教育厅成果培育项目(12ZZ009) [Supported by the Achievement Cultivation Program of Education Office of Sichuan Province (12ZZ009)].

作者简介: 唐明(1988-),男,甘肃人,在读硕士研究生,主要从事细胞生物学研究,(E-mail)1326665453@qq.com。

*通讯作者: 李群,博士,副教授,研究生导师,主要从事植物细胞工程方面的研究,(E-mail)Liqun01234@163.com。

biomass of the *L. macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1” cells and analyzed the content of chlorogenic acid by HPLC through the additions of different concentrations of inorganic salt in cell suspension cultures of *L. macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”. The result showed that the optimal $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio was consisted with $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (nitrate nitrogen/ammonium nitrogen) ratio in B₅ medium. In other words, the suspension culture would be beneficial for the accumulation of chlorogenic acid and growth of cell when $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (nitrate nitrogen/ ammonium nitrogen) ratio was 13 : 1. When single N source was added, the biomass of callus reached the maximum ($19.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) in $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$. However, when KNO_3 concentration was at relatively low levels (0.5 and $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), high chlorogenic acid production was accumulated. The two studies of NO_3^- had some differences from the control concentration ($2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). What's more, while $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration ($0.268 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) exceeded control concentration ($0.134 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), the highest growth of biomass of the *L. macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1” and the high chlorogenic acid production were observed. In the same way, different species and different concentrations of P, Ca and Mg might have different impacts on the chlorogenic acid content and growth of cell. The result showed that when the highest growth of biomass and the high chlorogenic acid production were accumulated, when $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentration was $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. In addition, when the highest growth of biomass and the high chlorogenic acid production were accumulated, when CaCl_2 concentration was $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. So far as Mg^{2+} was concerned, a low $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration could promote the growth of cell, while excessive $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration would promote the accumulation of chlorogenic acid. Taking the biomass growth and chlorogenic acid production into consideration, the optimal concentration of Mg was moderate. These results had some differences from the control. Our study demonstrated that inorganic salt concentration had some differences from inorganic salt concentration of B₅ in suspension cultures of *L. macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”. This study suggested that the optimized conditions could improve biomass accumulation and chlorogenic acid production through the addition of moderate concentration of inorganic salt in cell suspension cultures of *L. macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”. These results lays a foundation for large-scale production of chlorogenic acid by using the cell suspension cultures of *L. macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”. This study also has practical significance to large-scale productions of chlorogenic acid.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1”, suspension culture, chlorogenic acid, HPLC, inorganic salt

金银花(*Flos Lonicera japonicae*)为忍冬科植物忍冬的花蕾以及它们初开的花(徐晓兰等,2013)。金银花为中医临床使用的传统中药材,药用历史悠久(倪付勇等,2015)。灰毡毛忍冬“渝蕾 1 号”(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. ‘Yulei 1’)是以灰毡毛忍冬为砧木嫁接而成,经重庆市有关专家审定的重庆首个药用植物新品种(黄昌银,2009)。同时,该品种具有高产量、高品质、整个花期不开花等优点(姜法强,2013),同时,该品种的主要次生代谢产物绿原酸含量较高。因此,自从该品种被发现以来,得到了重庆市政府的足够重视。众所周知,绿原酸具有清除自由基、抗菌(王世宽等,2010)等多种功能,且绿原酸在医药和食品方面也有着广泛的应用(Ilaiyaraja et al, 2015; 马烽等,2010;王利等,2009),加之我国目前对于绿原酸的开发利用水平远低于发达国家(邓良等,2005),因此绿原酸供需缺口会持续相当长的时间。

工业化生产中,要获得大量植物次生代谢产物,植物细胞培养技术是继微生物发展技术之后的重要

发展领域(李冬杰等,2003)。本研究希望通过细胞悬浮培养的方法,优化培养条件以获得灰毡毛忍冬“渝蕾 1 号”的主要次生代谢产物绿原酸。在优化培养条件过程中,大多研究均是报道优化培养过程中的基础条件如 pH、接种量、糖的种类或浓度、培养中激素组合等(Nagella et al,2010;李蕤等,2011),也有不少的文章研究培养基的成分对代谢产物的影响。对灰毡毛忍冬“渝蕾 1 号”来说,基础条件方面的优化已经研究过,本研究旨在前期研究的基础上,进一步研究培养基成分,探究培养基中无机盐成分对灰毡毛忍冬“渝蕾 1 号”悬浮培养体系中细胞生长和绿原酸积累的影响,为进一步提高绿原酸的含量提供相关的理论依据。由于灰毡毛忍冬“渝蕾 1 号”为新品种,以上研究没有相关报道。

1 材料与方 法

1.1 材料

采自原产地重庆秀山县苗圃园,经宜宾学院魏

琴教授鉴定为灰毡毛忍冬“渝蕾1号”(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. ‘Yulei 1’)。

1.2 方法

1.2.1 悬浮培养体系的建立 取灰毡毛忍冬“渝蕾1号”的幼嫩叶片为外植体,先将外植体用自来水连续冲洗1 h后,移至超净工作台,然后将外植体用75%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗2次,再用0.1%升汞溶液浸泡4 min,无菌水清洗4次,最后放置超净工作台上备用。接下来将材料用自来水连续接种到添加有 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, pH为5.8的 B_5 培养基中,25℃条件下自然光照培养。1月左右,将诱导出的愈伤组织进行多次继代培养,培养基及培养条件同初代培养,直至愈伤组织比较松散。选取松散的愈伤组织作为悬浮培养的起始材料。经过几次悬浮培养后,建立了合适的悬浮培养体系。在培养体系中,准确称取2.00 g悬浮培养细胞,接种于40 mL B_5 培养基中,最后转移至(25±1)℃,16 h光周期,110 r·min⁻¹摇床中震荡培养。

1.2.2 B_5 培养基中主要矿质元素对“渝蕾1号”悬浮培养体系中细胞生长和绿原酸含量的影响 首先考察不同 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 摩尔比值对细胞生长和绿原酸含量的影响。设计如下:保持总N量不变($27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),在去除无机氮源的 $B_5+2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的悬浮培养体系中添加不同 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 摩尔比值(14:0、13:1、10:4、5:9、0:14),其中13:1为 B_5 培养基中的 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 摩尔比值,也为本实验的对照。在2.1建立的悬浮培养体系中培养25 d后,检测其生物量和绿原酸的含量。其次,考察单一添加 NO_3^- 或 NH_4^+ 氮源对细胞生长和绿原酸含量的影响。设计如下:分别各自在去除无机氮源的 $B_5+2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的悬浮培养基中添加不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0.033 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.067 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.134 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.268 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.536 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 KNO_3 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),其中 $0.134 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 为 B_5 培养基中各自的浓度,为本实验的对照,在2.1建立的悬浮培养体系中培养25 d后检测其生物量和绿原酸的含量。

1.2.3 H_2PO_4^- 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 分别在去除 H_2PO_4^- 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 $B_5+2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的悬浮培养基中添加不同浓度的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和

$0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 CaCl_2 ($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),值得指出的是,本实验是以 B_5 培养基中各自的浓度为对照(即 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 以及 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),再分别在2.1建立的悬浮培养体系中培养25 d后检测其生物量和绿原酸的含量。

1.3 生物量测定和绿原酸提取

25 d后将收获的鲜重细胞于50℃烘箱中烘干至恒重,称重并计算其生物量。将烘干的愈伤细胞粉碎过60目筛,精密称取其中0.10 g于10 mL 60%的甲醇试管中并称重,放入超声波清洗机中超声萃取30 min,再用60%的甲醇补足其重量,取其上清液用于HPLC检测绿原酸的含量。

1.4 HPLC检测

HPLC检测:Alltech C18色谱柱(4.6 mm×150 mm);流动相甲醇:醋酸水=22:78(pH=2.6);检测波长328 nm;柱温35℃;流速1 mL·min⁻¹;进样量10 μL。

1.5 数据分析

以上试验3次平行,2次重复,采用SPSS 17.0统计软件对所得试验数据进行单因素方差Duncan分析($P \leq 0.05$)

2 结果与分析

2.1 “渝蕾1号”愈伤组织和悬浮培养体系的建立

图1:a为成功诱导的愈伤组织,从图1:a可以看出,愈伤组织呈翠绿淡黄色,其长势旺盛,比较松散,适宜作为悬浮的材料。图1:b为在添加有 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的 B_5 培养基中建立的悬浮体系,从图1:b可以看出细胞呈淡黄色,且生长旺盛。

2.2 HPLC条件的建立

图2表示HPLC检测所获得的色谱图,图2:a为样品色谱图;图2:b为绿原酸标品色谱图。从图2:b可看出,主峰保留时间为6.29 min,标记为CA。通过比较,图2:a和图2:b主峰出峰时间是一致的,表明样品中的主峰即为CA绿原酸。根据以上标准曲线,即可计算出样品中绿原酸的含量。Wu(2007)曾报道过用高效液相色谱对杜仲悬浮体系中绿原酸含量定性以及定量,测得的保留时间为13.97 min,

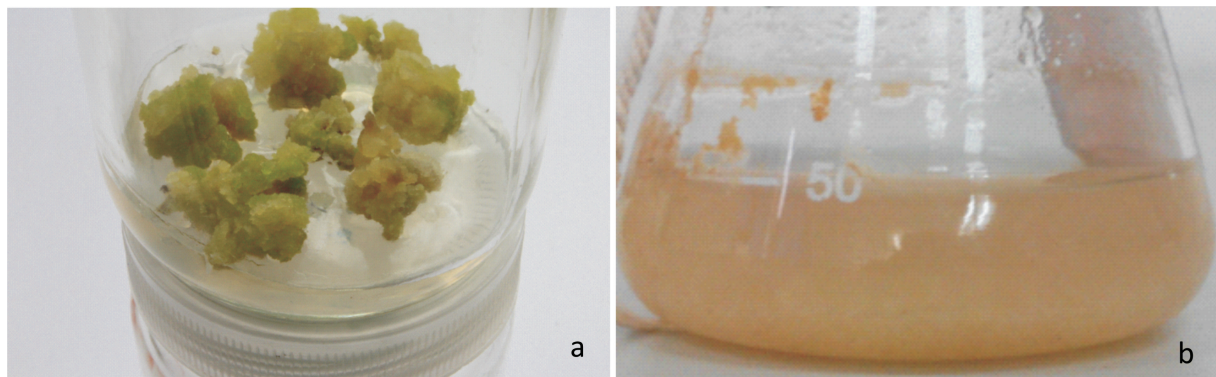


图 1 “渝蕾 1 号”愈伤组织与悬浮培养体系 a. 诱导出的愈伤组织; b. 建立的悬浮培养体系。

Fig. 1 Induced callus and cell suspension cultures of “Yulei 1” a. Induced callus; b. Established cell suspension cultures.

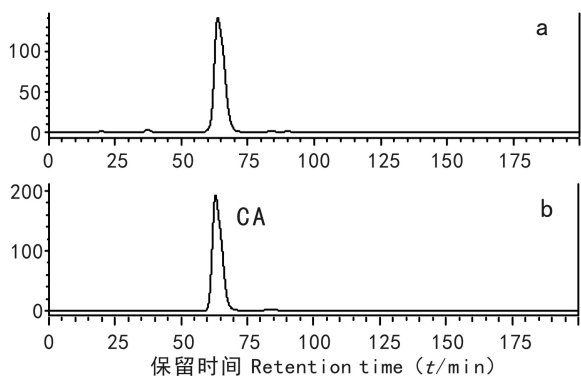


图 2 绿原酸 HPLC 分析 a. 样品 HPLC 色谱分析图; b. 绿原酸标准品 HPLC 色谱分析图。

Fig. 2 HPLC analysis of chlorogenic acid a. Representative HPLC chromatogram of chlorogenic acid extracted from *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. “Yulei 1” cell suspension culture; b. Representative HPLC chromatogram of chlorogenic acid standard.

这与我们的结果不太一致,可能是植物材料、不同的流动相和色谱柱长度不一致有关。

2.3 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 对“渝蕾 1 号”悬浮培养体系中细胞的生长和绿原酸含量的影响

从图 3 可以看出,对生物量来说,当 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 低于 13 : 1 时,细胞生物量呈现出逐渐递增的趋势,且各梯度之间差异性显著;当 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 为 13 : 1 (对照)时,其细胞生物量达到最大值,为 $17.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;而当 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 高于 13 : 1 时,细胞生物量呈现出逐渐递减的趋势,差异性同样显著。这表明 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 的比值为 13 : 1 时最适合悬浮细胞生长,这也正是 B_5 培养基中 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 的比值。对于绿原酸含量来说,总体看来,随着 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比值的增加,绿原酸含量逐渐增加。当 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 达到

14 : 0 时,绿原酸的含量达最大,为 $13.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ 。当比值超过 10 : 4 以后,绿原酸含量增加较为明显,保持了较高的绿原酸含量。综合细胞生物量和绿原酸含量两个指标,得出 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 为 13 : 1 时有利于积累,这和 B_5 培养基中的含量是一致的。

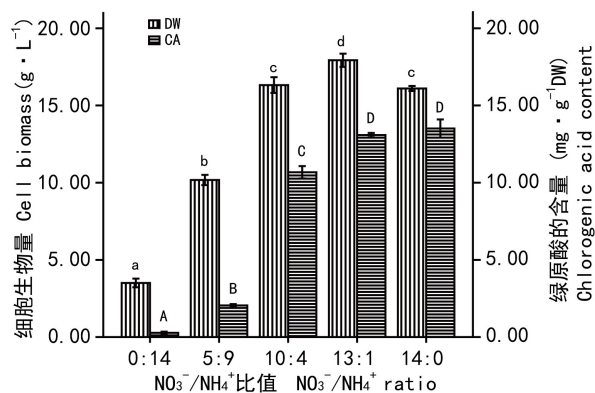


图 3 不同 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比值对细胞生物量和绿原酸含量的影响 数据以平均值 \pm 标准误差来表示, DW. 细胞生物量; CA. 绿原酸含量。下同。

Fig. 3 Effects of different $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratios on cell biomass and chlorogenic acid production in cell suspension cultures Data represents means \pm SE, DW. Biomass accumulation; CA. Chlorogenic acid production. The same below.

2.4 NO_3^- 对“渝蕾 1 号”悬浮体系中细胞生长和绿原酸含量的影响

由图 4 可知,当 KNO_3 浓度在 $1.5 \sim 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量都维持了较高的生长量,且差异不显著。当 KNO_3 浓度在 $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量达到最大值,为 $19.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对于绿原酸的含量来说,在 KNO_3 较低浓度 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 时,维持了

较高的绿原酸含量,且当 KNO_3 浓度在 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿原酸的含量达到最大值($18.48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$);当 KNO_3 浓度高于 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿原酸的含量呈现出随着 KNO_3 浓度的增加而减少的趋势,但各梯度之间差异性不显著。可以得出,稍高于对照组浓度($2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的 NO_3^- 浓度有利于细胞的生长,稍低于对照组浓度的 NO_3^- 浓度有利于绿原酸的合成。

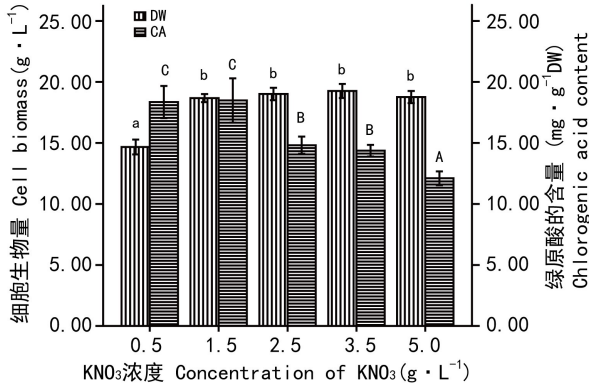


图4 不同浓度的 KNO_3 对细胞生物量和绿原酸含量的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of KNO_3 on cell biomass and chlorogenic acid production in cell suspension cultures

2.5 单一无机氮源 NH_4^+ 对“渝蕾1号”悬浮体系中细胞生长和绿原酸含量的影响

由图5可知,随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加,生物量逐渐增加,当其浓度达到 $0.268 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量达最大值($10.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),浓度进一步增加时,生物量略有减少,但各浓度梯度间差异不大。对于绿原酸的含量来说,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度低于 $0.134 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照)时,绿原酸含量呈现出逐级递减的趋势,各浓度间差异显著;但当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度高于 $0.134 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照)时,绿原酸含量呈现出逐级递增的趋势,各浓度间差异亦显著。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度在 $0.268 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿原酸含量达到最大值,为 $9.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$ 。

2.6 H_2PO_4^- 对“渝蕾1号”悬浮体系中细胞生长和绿原酸含量的影响

由图6可知,当 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度小于 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量随 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度的增加而增加,且各浓度间差异显著。当 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量达到最大

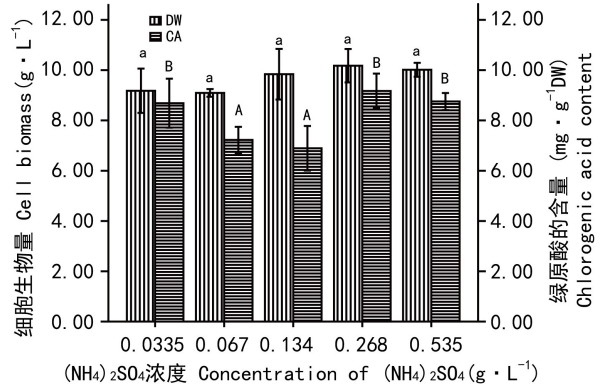


图5 不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对细胞生物量和绿原酸含量的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on cell biomass and chlorogenic acid production in cell suspension cultures

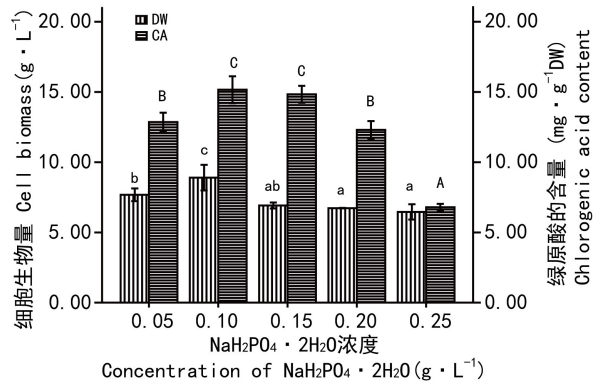


图6 不同浓度的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 对细胞生物量和绿原酸含量的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ on cell biomass accumulation and chlorogenic acid production in cell suspension cultures

值,为 $8.90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度大于 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量随 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度的增加而减少,各浓度间差异不大。对于绿原酸的含量来说,当 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度小于 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿原酸含量同样随 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度的增加而增加,各浓度间差异显著;当 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿原酸含量达最大值,为 $15.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$;当 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照)时,绿原酸的含量也较大,并和 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间没有显著差异。可以得出,当 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生物量和绿原酸的积累

均可达到最大值,是最适的浓度。

2.7 Ca^{2+} 对“渝蕾 1 号”悬浮体系中细胞生长和绿原酸含量的影响

由图 7 可知,对于生物量来说,当浓度低于 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量随 CaCl_2 浓度的增加而增加,且差异显著;当 CaCl_2 浓度为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量达到最大值($8.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$);当浓度高于 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生物量随 CaCl_2 浓度的增加而减少,除 CaCl_2 浓度在 $0.10 \sim 0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间差异不显著外,其他各浓度间差异均显著。对于绿原酸的含量,当 CaCl_2 浓度为 0.05 、 0.10 和 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿原酸含量差异不大。当 CaCl_2 浓度为 $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,绿原酸含量达到最大值($11.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$),与其它各浓度均保持显著差异。因此, CaCl_2 浓度并非在对照浓度即 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时生物量和绿原酸含量最高,而是稍有偏离。

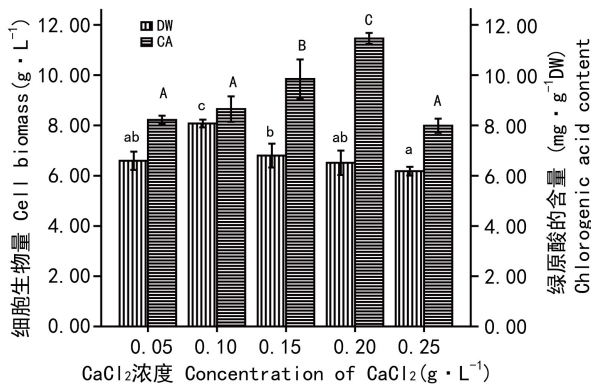


图 7 不同浓度的 CaCl_2 对细胞生物量和绿原酸含量的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations of CaCl_2 on cell biomass and chlorogenic acid production in cell suspension cultures

2.8 Mg^{2+} 对“渝蕾 1 号”悬浮体系中细胞生长和绿原酸含量的影响

由图 8 可知,生物量和绿原酸的含量趋向于相反的走势,对于生物量来说,随着 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度的增加,生物量逐渐减少,且各梯度间差异基本不大,且在 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,达到最大值($7.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$);而对于绿原酸的含量,随着 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的增加,绿原酸含量亦在增加,各浓度梯度间差异还是较为显著,且在 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,达到最大值($15.92 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$

DW)。特别值得一提的是,在本研究中,对 Mg^{2+} 来说,低浓度促进生物量的积累,高浓度促进绿原酸的合成。兼顾细胞生物量和绿原酸含量,只能选择适中的浓度,即与对照组($0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)相差不大的浓度较为合适。

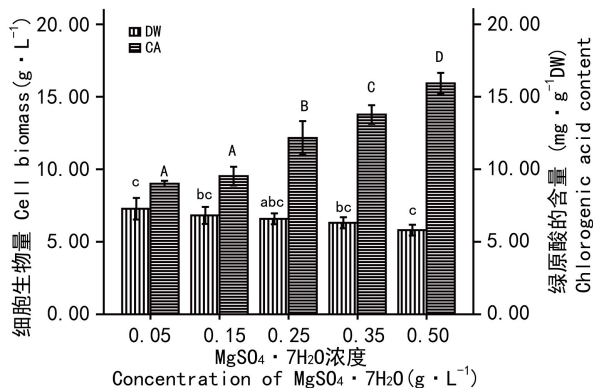


图 8 不同浓度的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对细胞生物量和绿原酸含量的影响

Fig. 8 Effects of different concentrations of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on cell biomass and chlorogenic acid production in cell suspension cultures

3 讨论

植物细胞培养中常用培养基成分区别主要在于无机盐的种类和含量,而培养基成分又与植物细胞生长和次生代谢产物的形成有密切的关系,因此,在选择培养基时,既要考虑培养基的种类,更要注重无机盐的种类及含量,尤其是总氮水平、氮源种类及比例,还有 K、P、Ca、Mg 等大量元素的含量等(李玉平等,2010)。本研究从无机总氮水平、无机氮源种类及比例、P、Ca、Mg 浓度等方面,探究其对灰毡毛忍冬“渝蕾 1 号”悬浮培养体系中生物量和绿原酸含量的影响,旨在优化培养条件,为工业化生产其次生代谢产物——绿原酸打下基础。实验结果表明,在总氮源方面,保持总 N 量 $27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变, $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ 摩尔比值为 B₅ 培养基中 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ 摩尔比值 13 : 1 (即对照) 时,即 NO_3^- 远多余 NH_4^+ , 细胞的生物量和绿原酸含量都比较高,原因可能如李莉等(2006)研究一样。李莉等(2006)研究表明,当过量的氨存在以及在较高 pH 条件下,苯丙氨酸解氨酶(PAL)能逆向催化代谢,不利于植物绿原酸代谢体系的进行,这或许就是较低浓度的 NH_4^+ 比较适合目

标产物绿原酸合成的原因。高日等(2011)研究发现,在MS培养基中硝态氮比铵态氮更有益于人参细胞皂苷的合成,这与本研究结果基本一致。Yin et al(2013)发现,保持 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 总无机氮源不变,当 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 为 2:1 时,有利于柳钱属植物细胞的生长和三萜类化合物的积累,这与本研究结果稍有差异,可能与物种有关。单一氮源的研究中,对硝态氮来说, NO_3^- 浓度稍高于对照组 ($2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 时有利于细胞的生长,稍低于对照组时有利于绿原酸的合成。对铵态氮来说,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度高于 $0.134 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照) 时,绿原酸含量呈现出逐级递增的趋势。可见单一氮源和复合氮源之间的结果差异较大。对于 P、Ca、Mg 离子浓度的选择,本研究表明均应考虑适中浓度 (即 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 与 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。李玉平等(2010)报道,适中浓度的 H_2PO_4^- ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 有利于大花金挖耳细胞生长和黄酮的合成;Yin et al(2013)也报道,适中浓度的 KH_2PO_4 ($1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 CaCl_2 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 均有利于柳钱属植物细胞的生长和三萜类化合物的积累,这与本研究结果一致。但也有不同的研究结果,如 Remya et al (2013) 研究表明,在地钱细胞悬浮培养产黄酮的体系中,加入不同浓度的 Ca 或 Mg 都不能使细胞生物量和黄酮产量有显著变化。另外,高永超等(2003)在大量元素对牛角藓愈伤组织悬浮细胞的研究中指出,大量元素明显促进细胞的生长发育,大量元素浓度越高,促进作用越明显。以上结果表明不同植物对于 Ca 或 Mg 的吸收有差异,从而造成次生代谢产物积累有所不同。总之,植物在生长发育过程中,无机盐是必不可少的一大营养成分,对于不同的植物材料,需要进行具体的研究,得到的结果也千差万别。本研究对灰毡毛忍冬“渝蕾 1 号”悬浮培养体系中的主要无机元素进行了探索,旨在获得更高产量的绿原酸,为绿原酸的生产化打下基础。

参考文献:

DENG L, YUAN H, YU ZY, 2005. Research progress of chlorogenic acid [J]. Chem & Bioeng, 7:4-6. [邓良, 袁华, 喻宗沉, 2005. 绿原酸的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 7:4-6.]

GAO R, PIAO XC, YU XK, et al, 2011. Effect of sucrose and inorganic salt on ginsenoside production of *Panax ginseng* during cell suspension culture [J]. J Agric Sci Yanbian Univ, 33(2): 89-93. [高日, 朴炫春, 于晓坤, 等, 2011. 人参细胞悬浮培养中蔗糖和无机盐对皂苷生产的影响 [J]. 延边大学农学学报, 33(2): 89-93.]

GAO YC, XU H, SHA W, et al, 2003. Physiological effect of major elements on the suspended cells of *Cratoneuron filicinum* [J]. Plant Physiol Comm, 39(6): 595-598. [高永超, 薛红, 沙伟, 等, 2003. 大量元素对牛角藓愈伤组织悬浮细胞的生理效应 [J]. 植物生理学通报, 39(6): 595-598.]

GONG ZH, REN GP, SHU QX, et al, 2011. Study on separation and purification of chlorogenic acid from honeysuckle flower by macroporous resin [J]. J Instr Anal, 30(1): 85-90. [龚志华, 任国谱, 舒青孝, 等, 2011. 大孔吸附树脂分离纯化金银花绿原酸研究 [J]. 分析测试学报, 30(1): 85-90.]

HU KJ, SUN KX, WANG L, et al, 2001. Inhibited effect of chlorogenic acid on virus *in vitro* [J]. J Harbin Med Univ, 35(6): 430-432. [胡克杰, 孙孝祥, 王璐, 等, 2001. 氯原酸体外抗病毒研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 35(6): 430-432.]

HUANG CY, 2009. The first new medicinal plant of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. 'Yulei 1' callus in Chongqing [J]. Farm Sci Technol, 6:53. [黄昌银, 2009. 重庆市首个药用植物新品种——“渝蕾一号”金银花 [J]. 农家科技, 6:53.]

ILAIYARAJA N, DEVI A, KHANUM F, 2015. Chlorogenic acid-loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability [J]. Asian J Pharm Sci, 10(3): 203-211.

JIANG FQ, 2012. Study on tissue culture and major secondary-metabolism product content of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. Yulei No. 1 [D]. Chengdu: College of Life Sciences Sichuan Normal University. [姜法强, 2012. 金银花新品种“渝蕾一号”的组织培养及主要次生代谢产物含量的研究 [D]. 成都: 四川师范大学生命科学院.]

KE MQ, 1982. physicochemical and pharmacological properties of effective ingredients of Chinese herbal medicine [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press. [柯铭清, 1982. 中草药有效成分理化与药理特性 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社.]

KRISHNAN R, ANIL KVS, MURUGANK, 2014. Establishment of cell suspension culture in *Marchantia linearis* Lehm & Lindenb. for the optimum production of flavonoids [J]. 3 Biotech, 4:49-56.

LI DJ, WEI JF, LIU SQ, et al, 2003. Research progress in medicinal plant cell suspension culture [J]. J Hebei For Sci Technol, (4): 22-23. [李冬杰, 魏景芳, 刘淑青, 等, 2003. 药用植物细胞悬浮培养研究进展 [J]. 河北林业科技, (4): 22-23.]

LI L, ZHAO Y, MA JL, 2006. Recent progress on key enzymes: PAL, C4H, 4CL of phenylalanine metabolism pathway [J]. Chin J Bioinform, 5(4): 187-189. [李莉, 赵越, 马君兰, 2006. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、C4H、4CL 研究新进展 [J]. 生物信息学, 5(4): 187-189.]

LI R, TAN XF, CHEN Q, 2011. Cell suspension culture of *Dendrobium huoshanenes* and its optimal conditions [J]. Chin Trad Herb Drugs, 42(2): 358-362. [李蕤, 谭晓芳, 陈群, 2011. 霍山石斛细胞悬浮培养及条件优化 [J]. 中草药, 42(2): 358-362.]

LI YP, ZHANG N, CHENG XX, et al, 2010. Allelopathy potential of intracellular secondary metabolic products and cell suspension culture of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav [J]. Acta Agr, 18(5): 708-713. [李玉平, 张妮, 陈晓旭, 等, 2010. 大花金挖耳细胞悬浮培养及其胞内代谢产物化感潜力的研究 [J]. 草地学报, 18(5): 708-713.]

MA F, ZHU YL, CHEN MH, et al, 2010. Research progress on extraction process of chlorogenic acid from *Flos loniceraceae* [J]. (下转第 618 页 Continue on page 618)