

34-36

珠子参愈伤组织培养与花色甙的形成*

周立刚¹ 贺震旦² 王君健¹ 王锦亮² 杨崇仁^{2*}¹华中理工大学药物研究所 武汉 430074)²中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

S 867 5-10.3

摘要 从珠子参(*Panax japonicus* var. *major*)叶柄诱导的愈伤组织在暗培养条件下主要形成3种花色甙色素,且均以矢车菊素为甙元。2,4-二氯苯氧乙酸和激动素的组合能明显地促进色素的合成,色素含量可达34.14mg/g lw。

关键词 花色甙,珠子参,愈伤组织,矢车菊素

0 前言

花色甙(anthocyanins)为植物中广泛分布的黄烷-3-醇配糖体。多存在于花中,是花的主要色素成分。这类色素是食品添加剂和化妆品的天然原料,但从植物中提取大量而又稳定的花色甙却是一个棘手的问题。近年来,国外报道采用植物组织培养,细胞在一定的培养条件下能形成色素,其中有不少色素为花色甙类化合物^[1]。珠子参(*Panax japonicus* var. *major*)属于五加科入参属草本植物,主要分布在云南和四川,具有疗伤、止血、滋补等功效^[2]。珠子参的根茎中富含皂甙成分^[3]。我们在诱导珠子参愈伤组织时,发现某些愈伤组织能形成色素物质,并对此进行了初步的研究。本文报道珠子参愈伤组织中花色甙类成分的形成。

1 材料和方法

1.1 实验材料

珠子参采自云南丽江,将其叶柄表面消毒,在附加激素的MS培养基上诱导出愈伤组织,在21±1℃下暗培养,每30~40d转代一次。

1.2 高色素含量细胞系的筛选

用肉眼观察法在无菌条件下将珠子参愈伤组织中深红色细胞团挑出进行培养,如此连续筛选数代,并在每次继代培养时注意淘汰色素含量低的细胞团。

1.3 花色甙的分离、水解和化学分析

新鲜的愈伤组织用含1%的盐酸甲醇溶液冷浸,重复提取3次,滤液在40℃以下浓缩,然后冰冻干燥至恒重。将提取物溶解于甲醇中,加入等体积4N的盐酸,在100℃水浴中回流40min。

收稿日期:1997年1月16日

*国家自然科学基金资助项目(39500075)和云南省应用基础研究基金资助项目(95C082M)

*通讯联系人 Author to whom correspondence should be addressed

薄层层析条件为:60F254 高效薄层板(MERCK),溶剂系统为正丁醇:冰醋酸:水(40:10:20,V/V),用于分离花色甙;纤维素高效薄层板(MERCK),溶剂系统为冰醋酸:浓盐酸:水(30:30:10,V/V),用于分离甙元。甙元标准品天竺葵甙元(pelargonidin)、矢车菊素(cyanidin)、芍药花素(paeonidin)和锦葵花素(malvidin)均购自 Sigma 公司。

2 结果

2.1 愈伤组织中花色甙的形成

当愈伤组织培养在附加萘乙酸(NAA) 2mg/l 和激动素(KT)0.1mg/l 的 MS 培养基中,肉眼观察无任何色素产生;当愈伤组织培养在附加 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 2mg/L 和 KT0.1mg/L 的 MS 培养基中,愈伤组织中可出现细小的红色或深红色细胞团。用肉眼观察法筛选出色素含量高而稳定的愈伤组织系,愈伤组织培养 40d 后,色素含量为 34.14mg/g fw。含色素的愈伤组织和无色素的愈伤组织如图 1 所示。

2.2 生长素对色素形成的影响

为了了解各种生长素对珠子参愈伤组织生长和花色甙形成的影响,将浓度为 0.1mg/L 的 KT 分别与 2mg/L 的 2,4-D、NAA、IAA 和 IBA 组合,培养时间为 40d,结果(表 1)表明,只有 2,4-D 能明显地促进花色甙的合成,其它生长素未观察到色素的形成,而 NAA 有利于愈伤组织的生长。

2.3 花色甙的化学分析

珠子参愈伤组织中色素物质能溶于 0.1% 的盐酸甲醇溶液中,在波长为 400nm 至 800nm 范围内,最大光吸收波长为 530.4nm(如图 2 所示)。当加入 10N 的 KOH,溶液颜色由红变蓝。薄层层析结果表明,提取物中主要含 3 种花色甙,Rf 值分别为 0.1833、0.3500 和 0.4167,且在波长为 254nm 的紫外光下可见强烈荧光。将花色甙进行酸水解,经高效薄层层析,与标准品对照,确定珠子参愈伤组织中仅含有一种甙元,为矢车菊素(cyanidin)。

3 讨论

珠子参愈伤组织在形成皂甙的同时,亦能

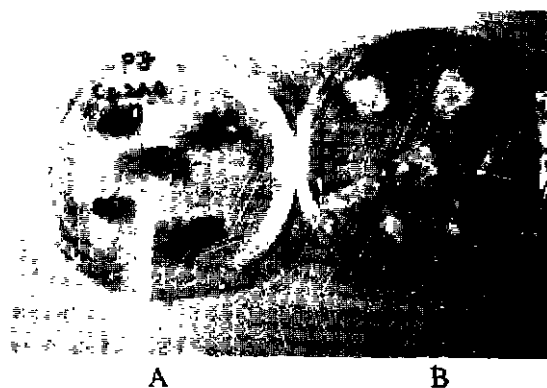


图 1 珠子参愈伤组织培养

Fig 1 Callus culture of *P. Japonicus* var. major

A: MS+2,4-D 2mg/L+KT0.1mg/L

B: MS+NAA 2mg/L+KT0.1mg/L

表 1 生长素与 KT 的组合对珠子参愈伤组织生长和花色甙含量的影响

Table 1 Effects of auxins in combination with KT on callus growth and anthocyanin formation of *P. Japonicus* var. major

生长素 Auxins	愈伤组织产率 Yield of callus (g dw/L)	色素含量 Content of pigments (mg/g fw)
IAA	8.42±0.11	0
NAA	13.51±0.09	0
IBA	8.26±0.12	0
2,4-D	10.47±0.13	16.44±0.12

* 浓度为 0.1 mg/L 的 KT 分别与 2 mg/L 的 IAA、NAA、IBA 和 2,4-D 组合。

0.1 mg/L of KT was in combination with 2 mg/L of auxins such as IAA, NAA, IBA and 2,4-D respectively.

形成花色甙。在暗培养条件下,2,4-D 能明显地促进花色甙的形成。薄层层析表明,珠子参色素细胞主要含有 3 种花色甙,其甙元均为矢车菊素。至于 2,4-D 促进花色甙合成的机理,如何提高培养细胞中花色甙的含量和产量,以及花色甙的形成与皂甙形成的关系等还有待深入研究。鉴于本研究所用的珠子参细胞系具有形成花色甙的能力,且无需光照等特殊的培养条件,这为放大培养提供了方便。因此,进行珠子参愈伤组织培养与色素形成的研究具有一定的实用价值和理论意义。上述花色甙的化学结构研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Seitz HU, Anthocyanins. In: Constabel F, Vasil IK, eds. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. 5, *Phytochemicals in Plant Cell Cultures*. London: Academic Press, Inc., 1988; 49~76
- 2 云南省植物研究所. 云南植物志(第二卷). 北京: 科学出版社, 1979: 515
- 3 杨崇仁等. 珠子参叶的三萜皂甙成分. 云南植物研究, 1984; 6: 118

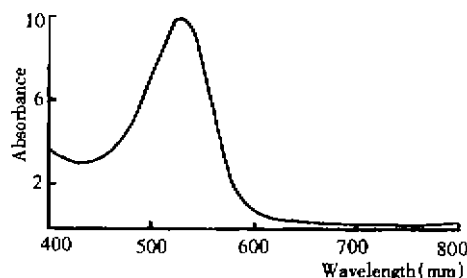


图 2 溶于 0.1% 的盐酸-甲醇溶液中花色甙的可见光吸收

Fig. 2 Visible spectroscopy of anthocyanins from callus of *P. japonicus* var. *major* in 0.1% of HCl-MeOH solution

CALLUS CULTURE AND ANTHOCYANINS FORMATION OF *PANAX JAPONICUS* VAR. *MAJOR*

Zhou Ligang¹, He Zhengdan², Wang Junjian¹, Wang Jinliang², Yang Chongren²

(¹Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

(²Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract Callus derived from petiole explants of *Panax japonicus* var. *major* produced three cyanidin glycosides as major anthocyanin pigments in darkness. Anthocyanin synthesis was remarkably stimulated by 2,4-dichlorophenoxycetic acid in combination with kinetin in MS medium. The pigment content of the callus reached up to 34.14 mg/g fw.

Key words Anthocyanin, *Panax japonicus* var. *major*, callus, cyanidin

《中国输血杂志》征订启事

《中国输血杂志》是卫生部主管、中国输血协会暨中国医学科学院输血研究所主办的国内输血医学专业唯一公开发行的国家级学术刊物,是中文临床医学类核心期刊。辟有“论著”、“研究报告”、“经验与方法”、“个例报告”、“综述”、“输血医学病案讨论”等栏目,多角度地客观反映国内输血医学及输血科学的进展与水平,以医院、各级血液中心(或血站)及血液制品科研和开发单位的专业人员为读者对象。欢迎订阅(季刊,1998 年每期定价 3.50 元,全年 14.00 元),本刊邮发代号 62-186。也可汇款至:610081 成都 268 信箱《中国输血杂志》编辑部订阅组。