

外源激素对紫苏愈伤组织诱导及迷迭香酸积累的影响

吕晓玲, 孙晶磊, 王芳, 郝磊, 孙雪梅

(天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 以紫苏叶片为外植体, 通过向 B5 培养基中添加不同浓度的激素组合, 进行正交实验, 研究其对紫苏叶片愈伤组织诱导率的影响。结果表明, 在 B5 培养基中, 添加 2, 4-D 1.0 mg/L + KT 0.4 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L 时, 愈伤组织诱导率最高。通过高效液相色谱法测定, 紫苏叶片中迷迭香酸含量为 0.25%, 而在最佳培养基中培养 40 d 的愈伤组织中的含量为 3.85%, 有了显著的提高。研究为紫苏迷迭香酸高产细胞系的建立提供了理论依据。

关键词: 紫苏; 愈伤组织; 正交试验; 迷迭香酸

中图分类号: Q813.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)06-0575-05

Effects of External Hormone on Inducing *Perilla frutescens* Callus and Accumulation of Rosmarinic Acid

LU Xiao-ling, SUN Jing-lei, WANG Fang, HAO Lei, SUN Xue-mei

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this study, with the leaves of *Perilla frutescens* were used as explant, effect of different concentrations of the hormone combination on inducing callus in B5 medium were studied by orthogonal test. It was found that the optimum medium for callus induction is B5 + 2, 4-D 1.0 mg/L + KT 0.4 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L, under the optimum conditions, the highest induction rate was achieved. Furthermore, the content of rosmarinic acid in calli after 40 days culture was achieved at 3.85%, however, the value in the leaves of *Perilla frutescens* was only 0.25%. The results here provided a theoretical basis for the establishment of high-yielding cell lines.

Key words: *Perilla frutescens*, callus, orthogonal test, rosmarinic acid

紫苏 (*Perilla frutescens*) 别名赤苏、红苏、香苏, 为唇形科一年生草本植物, 是中国传统的药食植物, 在中国有着悠久的种植历史和广泛的种植范围^[1]。迷迭香酸 (Rosmarinic acid) 是紫苏中的一种主要活性成分, 其化学名称 [R(E)] α -[[3-(3, 4-二羟

基苯基)-1-氧代-2-丙烯基]氧基]-3, 4-二羟基苯丙酸, 分子式是 C₁₈H₁₆O₈, 其结构见图 1^[2]。据报道, 迷迭香酸是一种多功能酚酸类化合物, 具有着多方面的生物活性, 如: 抗氧化、抗炎、抗血栓和抗血小板凝集、抑制 HIV 整合酶、抑制透明质酸酶等^[3]。

收稿日期: 2011-06-08

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA100401)。

作者简介: 吕晓玲 (1960-), 女, 安徽巢湖人, 教授, 主要从事食品科学、粮食、油脂与植物蛋白工程的研究。

E-mail: lxling@tust.edu.cn

它分布广泛,从低等苔藓到高等双子叶植物都有报道,主要分布于唇形科、紫草科、葫芦科、椴树科、伞形科中,但是在植株中的含量比较低,并且生产受到产地、季节、生长周期的限制。本文采用植物组织培养技术提高了紫苏中迷迭香酸的含量,并且为进一步进行悬浮细胞的培养打下了基础。

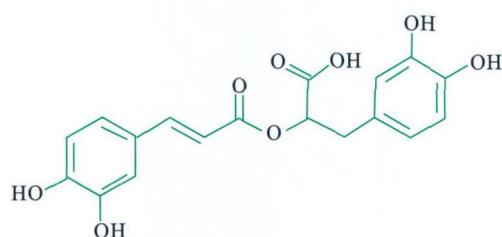


图 1 迷迭香酸结构式
Fig. 1 Structure of Rosmarinic acid

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的紫苏种子由黑龙江省饶河县饶河农场提供,将紫苏种子在蒸馏水中浸泡约 8 h,使其吸足水分,然后将种子播种于有适量土壤的盆中,置于室温,让其自然萌发。待其幼苗长至 20 cm 左右时采取叶片。迷迭香酸标品购于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司。

1.2 紫苏外植体的消毒处理

选长势好的叶片用自来水冲洗 1h,放入洗衣粉溶液中浸泡 5 min,用水继续冲洗 1h。在超净工作台上,先用体积分数 75% 酒精浸泡 30s,无菌水洗涤 2 次后,再用体积分数 0.1% 升汞处理 7min,最后无菌水洗涤 5 次(每次不少于 3 min)。将无菌的叶片用灭菌滤纸吸去表面水分,用刀切成小块(宽 5mm,长 5mm 左右),接种到培养基上。

1.3 培养基及培养条件

诱导培养基:以 B5 为基本培养基,30 g/L 的蔗糖为碳源,琼脂 10 g/L, pH5.5,以 2,4-D,KT,6-BA,NAA 为植物生长调节剂,设计正交试验。见表 1。

继代培养基:以正交表结果分析得出的最佳培养基为继代培养基。

培养条件:将外植体接种后,于 3960LX 光强下 12 h/d,温度(25±1)℃ 恒温培养箱中进行培养。当

形成愈伤组织后转入继代培养基中,在相同的条件下进行培养。试验中所用培养基及器皿全部经过 121 ℃、20 min 的高温高压灭菌后使用。

表 1 不同激素配比的正交设计表

Tab. 1 Different combination of hormone in orthogonal design

水平	因素			
	2,4-D (mg/L)	KT (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
1	0.5	0.4	1.0	0.5
2	1.0	0.6	1.5	1.0
3	1.5	0.8	2.0	1.5

1.4 愈伤组织诱导率测定

愈伤组织诱导率的测定^[4]:外植体接种 30 d 后计算愈伤组织的诱导率。愈伤组织的诱导率=出现愈伤组织的外植体数/总的接种外植体数×100%。同时观察愈伤组织的生长情况、颜色、质地以及褐化状况。

1.5 迷迭香酸的提取

取样品 80 ℃ 烘干至恒重,研磨成粉末,立即称取 0.5 g 粉末溶于 25 mL 甲醇中,称重后将混匀的溶液放入超声波破碎仪,提取 60 min,冷却后再称重,用甲醇补足减少的重量,摇匀后过滤,精密量取滤液 15 mL,浓缩定容至 5 mL 容量瓶中,0.22 μm 滤膜过滤,所得滤液 4℃ 保存^[5]。

1.6 迷迭香酸的测定

根据文献报道^[6],利用高效液相色谱法定量测定迷迭香酸质量分数,实验条件是:色谱柱 C₁₈,柱温为 25 ℃,检测波长 280 nm,流动相为水(含 0.1% H₃PO₄):乙腈为 60:40,体积流量为 0.5 mL/min,进样量 20 μL。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的激素组合对紫苏叶片愈伤组织诱导率的影响

为了考察不同浓度激素组合对紫苏叶片诱导率的影响,进行正交试验,结果表明(见表 2),不同激素对紫苏愈伤组织的诱导率的影响作用依次为:2,4-D 质量浓度>6-BA 质量浓度>NAA 质量浓度>KT 质量浓度。在 B5 培养基中,紫苏叶片愈伤组织诱导的最佳激素组合为 A₂B₁C₁D₃,即 B5+2,4-D1.0mg/L + KT0.4mg/L + 6-BA1.0mg/L +

NAA1.5mg/L。

表 2 紫苏叶片愈伤组织的诱导 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Tab.2 The result of orthogonal design $L_9(3^4)$ from callus inducing of *Perilla frutescens*

试验号	因素				诱导率/%
	2,4-D (mg/L)	KT (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	
1	0.5	0.4	1.0	0.5	87.2
2	0.5	0.6	1.5	1.0	83.5
3	0.5	0.8	2.0	1.5	84.1
4	1.0	0.4	1.5	1.5	94.9
5	1.0	0.6	2.0	0.5	88.7
6	1.0	0.8	1.0	1.0	90.8
7	1.5	0.4	2.0	1.0	79.1
8	1.5	0.6	1.0	1.5	86.0
9	1.5	0.8	1.5	0.5	77.4
X_1	84.933	87.067	88.000	84.433	
X_2	91.467	86.067	85.267	84.467	
X_3	80.833	84.100	83.967	88.333	
R	10.634	2.967	4.033	3.900	

2.2 紫苏叶片以及愈伤组织中迷迭香酸含量的测定

2.2.1 迷迭香酸标准曲线 按照 1.6 方法制作迷迭香酸标准曲线,如图 2 所示。

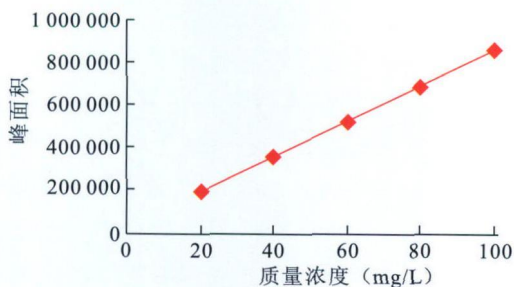
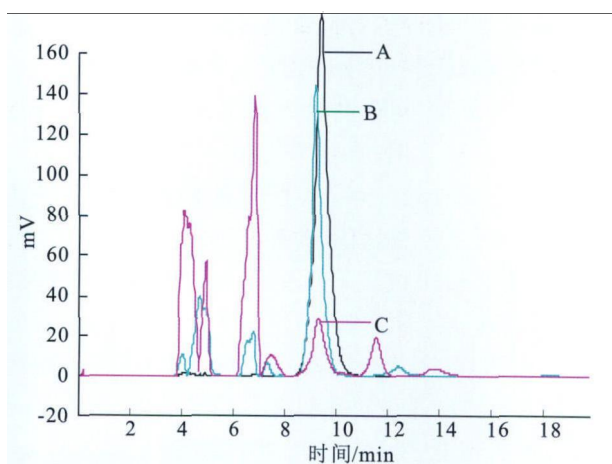


图 2 迷迭香酸标准曲线

Fig.2 HPLC standard curve of Rosmarinic acid

由标准曲线求得线性回归方程为 $Y = 8424.8X + 16953$, 其中 $R^2 = 0.9994$, 质量浓度在 20.0~100.0 mg/L 范围内成较好的线性关系。

2.2.2 紫苏叶片与愈伤组织中迷迭香酸含量比较 采用 HPLC 法测定紫苏叶片和在最佳培养基中培养 40 d 时的愈伤组织提取液的迷迭香酸含量, HPLC 图谱如图 3。



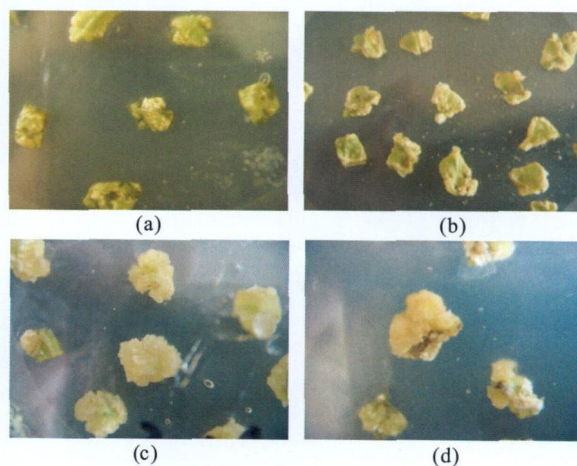
A:迷迭香酸标准品; B:愈伤组织中迷迭香酸; C:紫苏叶片中迷迭香酸

图 3 迷迭香酸高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of Rosmarinic acid

图 3 为迷迭香酸标准品溶液、紫苏叶片和在最佳培养基中培养 40 d 时的愈伤组织提取液的 HPLC 图谱。迷迭香酸标准品测定的出峰保留时间为 9.430 min,叶片与愈伤组织中出峰保留时间分别为 9.293、9.193 min,与迷迭香酸标品保留时间基本一致,可以判断提取液中含有迷迭香酸。通过标准曲线回归方程计算,得出紫苏叶片中迷迭香酸质量分数为 0.25%,在最佳培养基中培养 40 d 时愈伤组织中为 3.85%,迷迭香酸含量有了显著的提高。

2.2.3 愈伤组织在不同时期的生长状况与迷迭香酸含量 在添加最佳激素组合的培养基中,观察愈伤组织不同时期的生长状况,结果见图 4。



(a) 14 d 时愈伤组织生长状况; (b) 18 d 时愈伤组织生长状况; (c) 35 d 时愈伤组织生长状况; (d) 45 d 时愈伤组织生长状况

图 4 愈伤组织生长状况

Fig.4 The growth state of callus

由图4可以观察到,叶片接种14 d时(a),叶片开始肿胀卷曲,并且切口处增厚。接种18 d时(b),在叶片切口周围有乳白色愈伤组织生成,生长速度较为缓慢。35 d时(c)愈伤组织呈团块状,质地疏松,生长速度较快。45 d时(d)愈伤组织体积进一步增大并且颜色加深,有些开始出现褐变。

对紫苏愈伤组织在不同时期进行迷迭香酸的测定结果如图5所示。由图5可知,随着时间的增加,愈伤组织中迷迭香酸的质量分数也在不断增加,但45 d之后,迷迭香酸含量趋于平稳,基本不再变化,这可能是由于当愈伤组织在培养45 d时,愈伤组织出现褐变,停止生长的缘故。

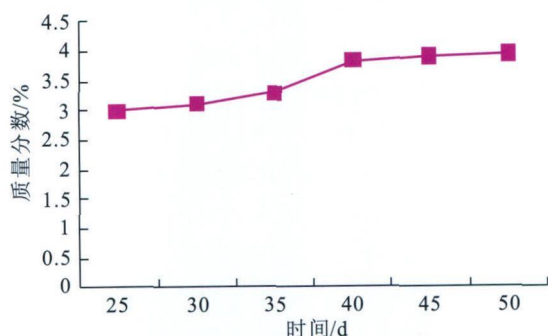


图5 愈伤组织不同时期迷迭香酸含量

Fig. 5 Rosmarinic acid production of callus in different time

综合愈伤组织的生长状况和迷迭香酸含量的变化,应该选择生长期在35~40 d的愈伤组织进行细胞的悬浮培养,此时,愈伤组织中迷迭香酸含量较高并且生长状况良好,质地疏松,比较适合悬浮培养。

3 结 语

本试验通过不同激素的浓度正交试验得到诱导紫苏愈伤组织的最佳培养基为:B5培养基+2,4-D

1.0 mg/L + KT0.4mg/L + 6-BA1.0mg/L + NAA1.5 mg/L, 30 g/L的蔗糖为碳源,琼脂10 g/L,pH 5.5。在此培养基中,生成的愈伤组织为乳白色和浅黄色,质地疏松,生长较快,比较适合建立紫苏细胞悬浮液培养体系。本试验采用的激素组合使愈伤组织诱导率达到了94.9%,与周川云、戴向辰、胡彦等人^[7]的研究相比,诱导率有了明显的提高。在愈伤组织诱导过程中,外源激素是培养基中不可缺少的关键物质,虽然用量极少,但它们对外植体愈伤组织的诱导起着重要作用,其中以生长素和细胞分裂素最为常用^[8]。2,4-D和NAA均为生长素,能促进细胞伸长生长和细胞分裂,愈伤组织生物量的增加主要靠此来调节。6-BA为应用最广的分裂素,对愈伤组织的诱导起着重要的调节作用,它可以促进细胞分裂,促进非分化组织分化,促进生物体内物质的积累,促进侧芽发生,防止老化。KT是非天然植物激素,属于细胞分裂素,可诱导离体组织的细胞分裂和调节分化,在植物组织培养的培养基中,常需加入适量的KT,以促进愈伤组织块细胞分裂和芽的形成。除了培养基中激素的种类、添加量外,外植体、温度、pH及光照条件等均对愈伤组织的诱导有影响,要获得最佳效果还需进一步试验。

通过HPLC法对紫苏叶片以及愈伤组织中迷迭香酸的测定,得出紫苏叶片中迷迭香酸质量分数为0.25%,在最佳培养基中培养40 d时的愈伤组织中为3.85%,迷迭香酸的量有了显著的提高,说明可以利用植物组织培养方法提高植物中次生代谢产物迷迭香酸的含量,这与鞠倩等^[9]对彩叶草进行愈伤组织诱导提高迷迭香酸含量的研究相符合。在后续研究中,将进行悬浮细胞的培养,以期对紫苏进一步的利用开发提供研究模型和理论依据。

参考文献(References):

- [1] 赵静,于淑玲.药用紫苏的资源开发[J].资源开发与市场,2006,22(6):549-551.
ZHAO Jing, YU Shu-ling. Resource development of perilla frutescens in medicine[J]. Resource Development & Market, 2006,22(6):549-551. (in Chinese)
- [2] 黄幼霞,黄荣桂,郑兴中.迷迭香酸药理作用的研究进展[J].海峡药学,2010,22(5):17.
HUANG You-xia, HUANG Rong-gui, ZHENG Xing-zhong. Progress in the research on the pharmacological actions of Rosmarinic Acid [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010,22(5):17. (in Chinese)
- [3] Psotova, Svobodova, Kolarova, et al. Photoprotective properties of prunella vulgaris and rosmarinic acid on human kerati-

- nocytes[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2006,84:167-174.
- [4] 崔刚,唐蕾,王武.培养基和外源激素对银杏愈伤组织诱导、生长及叶绿素含量的影响[J].食品与生物技术学报,2008,27(2):117-122.
- CUI Gang, TANG Lei, WANG Wu. Effects of medium and external hormone on inducing growth and chlorophyll content of *Ginkgo biloba* callus[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008,27(2):117-122. (in Chinese)
- [5] 张鑫,张志军,李会珍等.紫苏叶中迷迭香酸的提取及测定[J].食品工业科技,2009,11(2):235-236.
- ZHANG Xin, ZHANG Zhi-jun, LI Hui-zhen, et al. Extraction and determination of rosmarinic acid from perilla leaves[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009,11(2):235-236. (in Chinese)
- [6] 吴良,袁干军,苏秋玲.高效液相色谱法测定迷迭香中迷迭香酸的含量[J].海南医学院学报,2006,12(2):112.
- WU Liang, YUAN Gan-jun, SU Qiu-ling. Determination of rosmarinic acid in *rosmarinus officinalis* L. by HPLC[J]. *Journal of Hainan Medical College*, 2006,12(2):112. (in Chinese)
- [7] 周川云,戴向辰,胡彦.紫苏不同外植体组培灭菌条件研究[J].广西农业科学,2009,40(4):340-343.
- ZHOU Chuan-yun, DAI Xiang-chen, HU Yan. Sterilization conditions for tissue culture of different explants derived from *Perilla frutescens* (Linn) Britt[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2009,40(4):340-343. (in Chinese)
- [8] 周凤丽,唐蕾,廖祥儒.外源激素和糖类对银杏离体叶叶绿素降解的调节[J].食品与生物技术学报,2008,27(5):117-119.
- ZHOU Feng-li, TANG Lei, LIAO Xiang-ru. Regulation of chlorophyll degradation by exogenous application of hormones and sugars in ginkgo[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008,27(5):117-119. (in Chinese)
- [9] 鞠倩.生长调节剂及蔗糖浓度对彩叶草组织培养物迷迭香酸含量的影响[D].山东:山东农业大学硕士学位论文,2007,19-28.

科技信息

卫生部关于征求《食品添加剂 醋酸酯淀粉》等 16 项食品安全国家标准(征求意见稿)意见的函(卫办监督函〔2012〕441 号)

卫生部组织制定了《食品添加剂 醋酸酯淀粉》、《食品添加剂 氧化淀粉》、《食品添加剂 凹凸棒粘土》等 16 项食品安全国家标准(征求意见稿)。现向社会公开征求意见,请于 2012 年 7 月 16 日前以传真或电子邮件形式反馈卫生部。传真:010-67711813、电子信箱:gb2760@gmail.com

[信息来源]卫生部.卫生部关于征求《食品添加剂 醋酸酯淀粉》等 16 项食品安全国家标准(征求意见稿)意见的函.卫办监督函〔2012〕441 号。(2012-05-21).

欧盟发布加工食品中致病菌风险评估工作报告

欧洲食品安全局 4 月 19 日发布《某些含动物源成分加工食品健康风险科学建议》研究报告,对加工食品和普通食品中微生物生长主要影响因素进行了全面分析,这些因素包括:水分活度、酸碱度(pH 值)、储藏温度和储藏时间、加工过程,以及所涉及非热加工条件。

报告中还提出:食品中致病菌存在情况对确定食品产生健康风险具有重要意义。另外,评价致病菌风险使用了两种模型,分别是建立在数据记录和历史事件基础上的“经验数据模型”和考虑食品组分及加工条件对致病菌影响基础上“决策模型”。

经过风险评估后,将加工食品中致病菌风险划分为高、中、低 3 类。低风险食品包括:面包、低水分含量饼干、糕点、糖果及巧克力制品、干面条、食品膳食补充成分、以及明胶胶囊壳,致病菌无法在这些食品中生长。经热加工处理不会被再次污染的食品,如汤类罐头、商业灭菌产品,都属于低风险产品。高风险产品或潜在的高风险产品,指食品中可能含致病菌的产品,例如水分含量高、适于致病菌生长的食品。

欧洲食品安全局称“有必要在现有缺乏约束的加工食品管理工作中引入和制定协调的欧共体健康风险管理机制”。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟发布加工食品中致病菌风险评估工作报告 [EB/OL]. (2012-5-18). <http://www.foodmate.net/news/yujing/2012/05/206448.html>.