

葡萄松散型愈伤组织的培养及其 白藜芦醇含量的测定

崔兴华^{1,2}, 李兴林^{1,2}, 周 鑫^{1,2}, 王丹丹^{1,2}

(1 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457; 2 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457)

【摘要】【目的】获得葡萄(*Vitis vinifera* L.)松散型愈伤组织,并了解其白藜芦醇含量的变化。【方法】以葡萄的叶、叶柄和茎分别作为外植体,在不同激素组合(6-苄氨基嘌呤(6-BA)、激动素(KT)、吲哚丁酸(IBA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D))的培养基(以 B₅ 培养基为基本培养基,含 30 g/L 蔗糖和 6 g/L 琼脂)上,进行愈伤组织的诱导和继代培养,并利用高效液相色谱法(HPLC)对不同来源愈伤组织中的白藜芦醇含量进行测定。【结果】以葡萄叶为外植体时,诱导的愈伤组织出愈率很低;以叶柄和茎为外植体时,愈伤组织的出愈率均较高。利用叶柄和茎获得松散愈伤组织时,其诱导培养基组成分别是: B₅ 培养基+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 和 B₅ 培养基+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L,其继代培养基均为 B₅ 培养基+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。在诱导培养基产生的愈伤组织中,白藜芦醇含量由高到低的顺序为叶柄>叶>茎。以叶、叶柄和茎为外植体诱导愈伤组织时,其白藜芦醇含量最高的培养基分别为 B₅ 培养基+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L、B₅ 培养基+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 和 B₅ 培养基+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L。【结论】葡萄叶柄和茎易被诱导产生松散的愈伤组织,且经多次继代可以用于建立悬浮培养体系;葡萄愈伤组织中的白藜芦醇含量随外植体及培养基组成的不同而有所差异。

【关键词】 葡萄;愈伤组织;继代培养;白藜芦醇;激素组合

【中图分类号】 S663.1;Q943.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)05-0161-05

Relaxed calli culture of grape and resveratrol content determining from its calli by using HPLC

CUI Xing-hua^{1,2}, LI Xing-lin^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2}, WANG Dan-dan^{1,2}

(1 Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China ;

2 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: 【Objective】 Relaxed grape's (*Vitis vinifera* L.) calli was acquired and resveratrol content change was studied. 【Method】 The leaves, leafstalk, and stems from grapes were used as explants to induce calli and subculture in medium (100 mL B₅ medium containing 3 g sucrose and 0.6 g agar) with different plant hormone combinations (6-BA, KT, IBA, 2,4-D), and then the resveratrol content from those calli was determined by using HPLC. 【Result】 The results indicated that, the calli development rate from leaves inducement was lower than that from leafstalk and young stems. The inducement medium was as follows respectively: for the leafstalk, B₅ medium with 6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L, and for stems, B₅ medium with 6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L, and subculture medium both were B₅ medium with 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L. Under the same culture condition, the calli resveratrol contents from high to low from different explants were leafstalk, leaves, and young stems in turn. About calli from different explants, there

* [收稿日期] 2008-07-01

[基金项目] 天津应用技术及前沿技术研究计划项目(08JCEDTC15300)

[作者简介] 崔兴华(1983—),男,天津宝坻人,在读硕士,主要从事植物生物技术研究。E-mail: bdsizhong@163.com

[通信作者] 李兴林(1964—),男,安徽和县人,副教授,博士,主要从事植物生物技术研究。

were significant differences in their resveratrol content, and their medium of the highest content expressed were respectively: for leaves, B₅ medium+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L; for leafstalk, B₅ medium+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L; for stems, B₅ medium+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L. 【Conclusion】 The leafstalk and stem are facile induced to relaxed callis, and it could be the original of suspension culture by subculture many times. Its content of resveratrol is influenced by the different parts of plant and culture condition.

Key words: grape; calli; subculture; resveratrol; plant hormone combination

白藜芦醇是最先在葡萄属植物中发现的一种抗逆物质^[1], 其因具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、影响骨代谢、保护神经系统及雌激素功能等特点而日益受到重视^[2-5]。目前的研究表明, 野生葡萄和虎杖中的白藜芦醇含量均较高^[6], 从其中提取白藜芦醇是惟一的生产手段。随着白藜芦醇使用量的日益增加, 仅靠从天然材料中提取白藜芦醇难以满足市场的需求。目前, 利用植物细胞大规模培养生产代谢产物已成为一种新的趋势^[7], 因此为了实现白藜芦醇的工业化生产, 就需要利用葡萄等悬浮细胞来大量积累白藜芦醇, 而为了满足悬浮细胞的培养, 必须要获得松散、不分化的愈伤组织^[7-8]。利用叶和茎等作为外植体的葡萄组织培养已有较多报道^[9-11], 而其中为制备悬浮细胞而进行愈伤组织诱导^[12]研究较少, 且其最终目的是为了获得再生植株。为了制备松散、不分化的愈伤组织, 本研究从外植体部位及培养基激素组成等方面, 研究了诱导和继代的葡萄愈伤组织特点, 并对积累的白藜芦醇含量进行了比较, 以期对葡萄悬浮细胞的大量制备及白藜芦醇的生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

巨峰葡萄秧苗, 购自天津市宝坻区种子分公司; 白藜芦醇标准品(色谱纯), 购自天津市尖峰天然产物研究开发有限公司。

1.2 葡萄愈伤组织的培养

1.2.1 愈伤组织的诱导 将葡萄秧苗外植体(叶、叶柄、茎)用体积分数 5% 的洗衣粉水浸泡 3~5 min, 再用蒸馏水冲洗 30 min 后, 风干放入超净台备用。考虑到 3 种外植体的组织有一定差异, 因此其消毒时间也有所区别: 叶于体积分数 75% 的乙醇中浸泡 5 s 后, 用无菌水冲洗干净, 再用体积分数 10% 的次氯酸钠浸泡 1 min, 用无菌水冲洗 2~3 次后, 切成 5 mm×5 mm 的小片分别接种到 01~04 号培养基中(表 1); 叶柄和茎均用体积分数 75% 的乙醇浸泡 15 s 后, 用无菌水冲洗干净, 再用体积分数 10%

的次氯酸钠浸泡 5 min, 用无菌水冲洗干净, 切成 0.5~1.0 cm 的小段, 分别接种到 01~04 号培养基中, 每种培养基接种 40 个外植体, 每处理 3 个重复。接种后于(25±2)℃、12 h 光照条件下进行培养, 并观察、记录愈伤组织的诱导情况。

表 1 葡萄愈伤组织诱导培养基的组成

Table 1 Component of medium of grape's

编号 Number	calli development		mg/L
	6-苊氨基嘌呤 6-BA	激动素 KT	吲哚丁酸 IBA
01	1.0	0.5	0
02	1.0	0	0.2
03	0.5	0	0.2
04	0.5	0	0.1

注: 所用基本培养基均为 B₅ 培养基, 且培养基中蔗糖的质量浓度均为 30 g/L, 琼脂质量浓度均为 6 g/L。表 2 同。

Note: All of the medium is B₅ medium, and the concentration of sucrose is 30 g/L; the concentration of agar is 6 g/L. Table 2 is same.

1.2.2 愈伤组织的继代 愈伤组织的继代试验分 2 部分进行: 首先, 用 1.2.1 中不同外植体最佳愈伤组织诱导培养基继代, 培养 10 d 后, 统计愈伤存活率, 观察愈伤组织的形态; 其次, 采用培养基 05~08 (表 2), 分别对不同外植体诱导的愈伤组织进行继代, 每种培养基继代培养 40 个愈伤组织, 每处理重复 2 次, 在(25±2)℃、12 h 光照条件下进行培养, 15 d 后观察愈伤组织的形态并统计愈伤存活率。

表 2 葡萄愈伤组织继代培养基的组成

Table 2 Component of medium of grape's

编号 Number	calli subculture		mg/L
	6-苊氨基嘌呤 6-BA	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D	
05	2.0	0.5	
06	2.0	0.1	
07	1.0	0.5	
08	1.0	0.1	

1.3 愈伤组织白藜芦醇含量的测定

1.3.1 白藜芦醇标准曲线的制作 精确称取 5.6 mg 白藜芦醇标准品, 置于 10 mL 容量瓶中用甲醇定容, 混匀, 得到 560 μg/mL 标准溶液, 再分别用甲醇对其进行稀释, 得到质量浓度分别为 112, 22.4, 4.48, 0.896 μg/mL 的溶液, 用高效液相色谱法

(HPLC)对这5个梯度的标准品溶液进行测定。其色谱条件为:色谱柱为 Supelcosil[™] LC₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈水溶液(V(乙腈):V(蒸馏水)=26:74), 流速为1 mL/min, 波长为303 nm, 柱温35℃, 进样量为10 μL^[13]。用最小二乘法进行线性回归, 得到样品质量浓度(C)和峰面积(A)的线性回归方程: $A=12\ 573C-36\ 425(R^2=0.999\ 4)$, 绘制标准曲线。

1.3.2 白藜芦醇的提取与测定 参照文献[14]中外植体白藜芦醇的提取方法, 先将愈伤组织置于60℃烘箱中干燥至恒质量, 磨碎后过孔径0.175 mm的筛, 精确称取0.2 g愈伤粉末置于25 mL三角瓶中, 加入8 mL甲醇超声提取30 min后, 将此提取液置于10 mL容量瓶中定容至刻度, 混匀、静置、避光、低温保存备用。用1.3.1中的HPLC方法进行

测定, 依据峰面积和回归方程计算白藜芦醇的含量。

2 结果与分析

2.1 葡萄愈伤组织的诱导

本研究观察发现, 不同外植体在01~04号培养基上均可诱导出愈伤组织, 但是愈伤组织的发生早晚、以及愈伤组织的形态等, 均与外植体和培养基激素组合的选择有关。由表3可知, 在4种培养基中, 用叶片作为外植体时, 愈伤组织的诱导效果均不佳, 因此叶片不宜作为诱导愈伤组织的起始外植体。相比叶片而言, 用叶柄和茎作为外植体时, 愈伤组织的诱导效果均较好。根据出愈时间、出愈率及愈伤组织形态可知, 叶柄选择04号培养基、茎选择02号培养基进行愈伤组织的诱导效果均最佳。

表3 不同培养基对葡萄叶、叶柄和茎愈伤组织诱导效果的影响

Table 3 Result of calli of grape's leaf, leafstalk and stem induced by different media

外植体类型 Type of the plant	编号 Number	出愈时间/d Time for calli	出愈率/% Rate of calli	愈伤组织形态 Shape of calli
叶 Leaf	01	18	4.2	体积小、白色、很干 Small size, white, dry
叶 Leaf	02	22	9.2	颜色发黑、体积小 Blacken, small size
叶 Leaf	03	16	2.5	绿色愈伤、分化 Green calli, differentiation
叶 Leaf	04	19	3.3	黑色、干 Blacken, dry
叶柄 Leafstalk	01	10	66.7	松散、白色、分化 Relaxed, white, differentiation
叶柄 Leafstalk	02	11	80.0	淡黄色、松散 Light yellow, relaxed
叶柄 Leafstalk	03	16	84.2	绿色、致密、发干 Green, dense, dry
叶柄 Leafstalk	04	10	96.7	黄色、体积大、松散 Yellow, big bulk, relaxed
茎 Stem	01	8	69.2	松散、白色、分化 Relaxed, white, differentiation
茎 Stem	02	13	94.2	淡黄绿色、松散、软 Yellowish green, relaxed, soft
茎 Stem	03	12	81.7	淡黄色、部分为灰色 Yellow, partly to be gray
茎 Stem	04	14	88.3	白色、致密、干 White, dense, dry

2.2 葡萄愈伤组织的继代

鉴于叶片不宜作为诱导愈伤组织的起始外植

体, 故本研究只对叶柄和茎的愈伤组织进行了继代。

葡萄叶柄和茎愈伤组织的继代培养情况见表4。

表4 葡萄叶柄和茎愈伤组织的继代培养情况

Table 4 The calli of grape's leaf stalk and stem growth around subculture

外植体类型 Type of the plant	编号 Number	观察时间/d Time of observation	愈伤存活率/% Survival rate of calli	愈伤组织形态 Shape of calli
叶柄 Leafstalk	05	15	20.0	褐化死亡、部分白色 Brown and drying, partly to be white
叶柄 Leafstalk	06	15	32.5	褐化、愈伤体积变小 Brown, size of calli becomes smaller
叶柄 Leafstalk	07	15	11.3	深棕色、无生命力 Dark brown, no viability
叶柄 Leafstalk	08	15	95.0	松散、淡黄色、生长快 Relaxed, light yellow, grow fast
茎 Stem	05	15	16.3	愈伤变黑、部分分化 Calli change dark, partly to be differentiation
茎 Stem	06	15	20.0	深黄色和褐色、变小 Deep yellow and brown, size of calli becomes smaller
茎 Stem	07	15	36.3	褐化、无生命力、变小 Brown, no viability, size of calli becomes smaller
茎 Stem	08	15	91.3	雪白色、质地疏松 Snowy white, relaxed

对叶柄在04号培养基和茎在02号培养基上诱导出的愈伤组织进行继代时, 起初用1.2.1中不同外植体最佳愈伤组织诱导培养基进行继代, 愈伤存

活率均为0(0/50), 且所有愈伤组织全部死亡; 而用05~08号培养基进行继代, 可知叶柄和茎的最佳继代培养基均为08号培养基, 用其他激素组合的培养

基(05~07)进行继代时,愈伤存活率均很低,且大部分愈伤组织褐化、生长缓慢缺乏生命力,甚至死亡(表 4)。

为了更直观地观察不同激素组合在诱导和继代时对愈伤组织的影响,挑选了 2 个典型激素组合下愈伤组织诱导和继代的效果进行比较(图 1)。

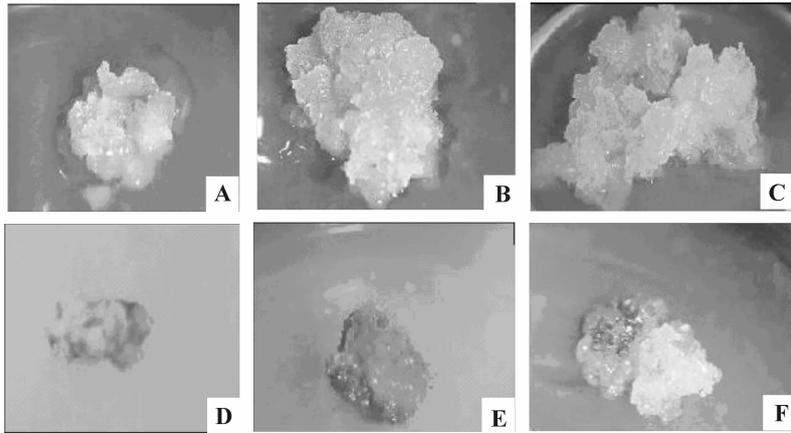


图 1 葡萄叶柄松散型和致密型愈伤组织诱导和继代的效果

A. 叶柄在 04 号培养基上诱导的松散型愈伤组织;B. A 在 08 号培养基上继代 1 次的愈伤组织;C. A 在 08 号培养基上继代 2 次的愈伤组织;
D. 叶柄在 03 号培养基上诱导的致密型愈伤组织;E. D 在 08 号培养基上继代 1 次的愈伤组织;F. D 在 08 号培养基上继代 2 次的愈伤组织

Fig. 1 Induced and subculture result of relaxed and compact calli of grape's leaf stalk

A. The calli of leafstalk induced on NO. 04 medium;B. The calli of A subculture on NO. 08 medium once;C. The calli of A subculture on NO. 08 medium twice;D. The calli of leafstalk induced on NO. 03 medium;E. The calli of D subculture on NO. 05 medium once;
F. The calli of D subculture on NO. 05 medium twice

从图 1 可以看出,葡萄叶柄松散的愈伤组织和致密的愈伤组织在继代培养过程有一定区别,即松散的愈伤组织生长旺盛,颜色呈黄白色;致密的愈伤组织生长缓慢且易褐化死亡。

2.3 葡萄愈伤组织白藜芦醇含量的测定

测定葡萄不同外植体在不同培养基上诱导产生的愈伤组织的白藜芦醇含量,结果见图 2。

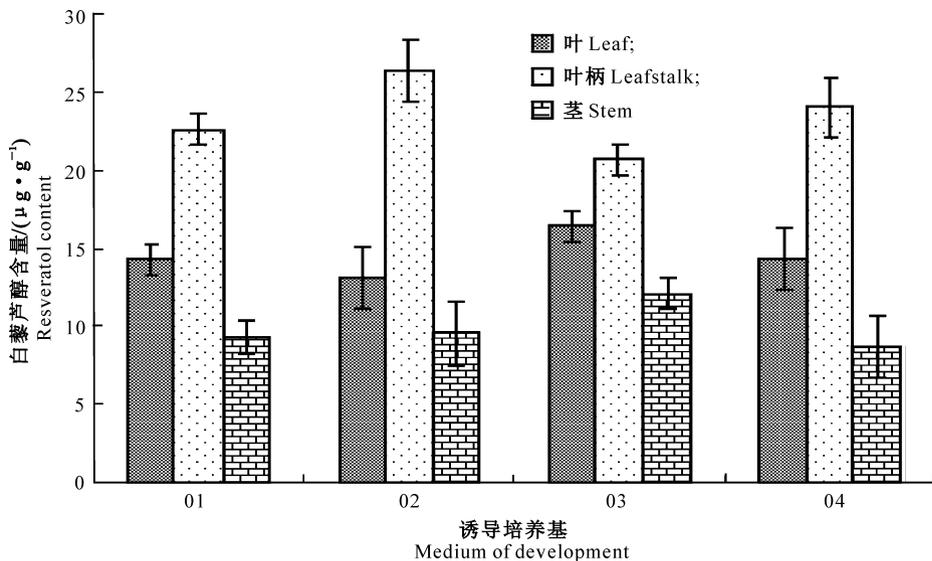


图 2 葡萄不同外植体在不同诱导培养基中产生愈伤组织的白藜芦醇含量

Fig. 2 Resveratrol content of calli from different explants of grape and media with different plant hormone combinations

从图 2 可以看出,在 01~04 培养基中,不同外植体诱导产生的愈伤组织的白藜芦醇含量存在差异,其中以叶柄的白藜芦醇含量最高,其次为叶,茎

最低;同一种外植体在不同培养基上,诱导产生的愈伤组织中白藜芦醇的含量也不同,其中叶和茎在 03 号培养基上诱导时,白藜芦醇含量均最高,叶柄在

02号培养基上诱导时,白藜芦醇含量最高。

3 讨论

叶片是愈伤组织诱导中常见的外植体^[15],而本研究中,葡萄叶片诱导愈伤组织的能力在4种诱导培养基中较叶柄和茎差,这可能与叶片表面的消毒时间和消毒液浓度难以把握有关。因此在进行外植体选择时,应该选择容易诱导产生愈伤组织的叶柄和茎作为原料。不同的外植体及培养基,诱导的愈伤组织特性差异很大^[15],而且其中符合悬浮细胞培养、不分化、松散型愈伤组织并不是很多。据文献[8]报道,通过多次继代培养后,可以获得符合需要的愈伤组织,且多数继代培养基的组成与愈伤组织的诱导培养基一致。但是本研究发现,葡萄愈伤组织诱导和继代培养基组成相同时,愈伤组织经过继代培养后不会变大,相反会褐化甚至死亡。在本试验中,葡萄愈伤组织外植体来源不同,其继代培养基的组成也有差异;且外植体来源和培养基组成均会影响葡萄愈伤组织中白藜芦醇的含量。

[参考文献]

- [1] 王 华,尉亚辉,王庆俐,等.葡萄酒中的白藜芦醇的 HPLC 测定 [J].西北农业大学学报,1999,27(4):83-87.
Wang H,Wei Y H,Wang Q L,et al. Analysis of trans resveratrol in wines by direct injection of HPLC [J]. Journal of Northwest Agricultural University,1999,27(4):83-87. (in Chinese)
- [2] 刘 娅,王光慈.白藜芦醇生理活性作用研究进展 [J].中国食品添加剂,2002,12(6):19-21.
Liu Y,Wang G C. Research progression of resveratrol on its physiology function [J]. China Food Additives,2002,12(6):19-21. (in Chinese)
- [3] Sun A Y, Agnes S, Sun G Y. The "French paradox" and beyond; neuroprotective effects of polyphenols [J]. Free Radical Biology & Medicine,2002,5(8):314-318.
- [4] Chistian I, Markus K, Stefan B. Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies,2001,2(1):239-243.
- [5] Tomera J F. Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption [J]. Trends in Food Science & Technology,2001,6(10):129-138.
- [6] 刘树文,王 华.葡萄与葡萄酒中白藜芦醇的研究进展 [J].西北植物学报,1999,19(5):144-148.
Liu S W,Wang H. Studying development of resveratrol existing in grapes and wines [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinca,1999,19(5):144-148. (in Chinese)

- [7] 王素芳,王志林,蒋琳兰,等.植物细胞悬浮培养 [J].中国生物制品学杂志,2002,15(6):381-384.
Wang S F,Wang Z L,Jiang L L,et al. Plant cell suspension culture [J]. Chinese Journal of Biologicals,2002,15(6):381-384. (in Chinese)
- [8] 方文娟,韩烈保,曾会明.植物细胞悬浮培养影响因子研究 [J].生物技术通报,2005(5):11-15.
Fang W J,Han L B,Zeng H M. Research advances in factors affecting establishment of plant cell suspension culture [J]. Biotechnology Information,2005(5):11-15. (in Chinese)
- [9] 周 鹏,郭安平,王跃进,等.2个葡萄品系外植体愈伤组织诱导和植株再生 [J].热带作物学报,2002,23(3):53-58.
Zhou P,Guo A P,Wang Y J,et al. Plant regeneration induced from calli of explants of grapes [J]. Chinese Journal of Tropical Crops,2002,23(3):53-58. (in Chinese)
- [10] 刘金亮,吕长平,石雷晖,等.刺葡萄愈伤组织的分化、芽的增殖及生根培养 [J].作物研究,2005,16(2):106-108.
Liu J L,Lv C P,Shi L H,et al. Callus differentiation bud multiplication and rooting culture of *Vitis davidii* Foex [J]. Crop Research,2005,16(2):106-108. (in Chinese)
- [11] 彭向永,张岳峰,宋 敏.不同处理对黑后葡萄枝条愈伤组织形成的影响 [J].山东农业科学,2007(2):52-53.
Peng X Y,Zhang Y F,Song M. Effect of different treatments on the callus formation of heihou frappe branches [J]. Shandong Agricultural Sciences,2007(2):52-53. (in Chinese)
- [12] 陈 辉,白庆武,李 波,等.抗寒葡萄的悬浮细胞系的建立 [J].高师理科学刊,2004,24(2):51-53.
Chen H,Bai Q W,Li B,et al. The establishment of suspension cell of cold-resistant frappe [J]. Journal of Science of Teachers College and University,2004,24(2):51-53. (in Chinese)
- [13] 向 阳,张 彤,张 焯,等.高效液相色谱法测定葡萄皮和葡萄籽中白藜芦醇的含量 [J].卫生研究,2003,32(5):490-492.
Xiang Y,Zhang T,Zhang X,et al. Quantitative analysis of resveratrol from grape seeds and grape skins by high performance liquid chromatography method [J]. Journal of Hygiene Research,2003,32(5):490-492. (in Chinese)
- [14] 侯斌峰,马 龙,张 焯,等.新疆葡萄叶中白藜芦醇的含量分析 [J].新疆医科大学学报,2006,29(5):418-420.
Hou B F,Ma L,Zhang X,et al. Analysis of the resveratrol contents in Xinjiang grape leaves [J]. Journal of Xinjiang Medical University,2006,29(5):418-420. (in Chinese)
- [15] 吕惠平,王起才,马 纪.木那格葡萄快速繁殖及愈伤组织的诱导和继代 [J].生物技术,2006,16(5):75-77.
Lv H P,Wang Q C,Ma J. Research on rapid propagation and callus inducing and maintenance of grape cultivar 'Munage' of *Vitis vinifera* [J]. Biotechnology,2006,16(5):75-77. (in Chinese)