

DOI:10.11937/bfyy.201508030

过氧化氢诱导不同色素水平葡萄愈伤组织 白藜芦醇及白藜芦醇苷含量差异

李月荣¹, 颜欢¹, 张波^{1,2}, 杨晓燕¹, 李荣飞¹, 王晓琴¹

(1. 石河子大学药学院, 新疆石河子 832002; 2. 省部共建新疆特种资源植物药重点实验室, 新疆石河子 832002)

摘要:以不同状态的“红地球”葡萄愈伤组织为试材,采用高效液相色谱法,研究 H_2O_2 对其白藜芦醇和白藜芦醇苷含量的影响。结果表明:经 H_2O_2 诱导后 3 种愈伤组织中白藜芦醇苷含量为:红色愈伤组织>褐化的愈伤组织>白色愈伤组织,而白藜芦醇在白色愈伤组织中的含量高于红色和褐化的愈伤组织。2.5 μM H_2O_2 诱导红色愈伤组织 24 h 后,白藜芦醇苷含量高达 306 $\mu g/gFW$,而白藜芦醇的含量变化不明显。红色愈伤组织中的白藜芦醇苷响应 H_2O_2 的胁迫较为明显,其对 H_2O_2 最佳的响应浓度为 2.5 μM 。

关键词:葡萄愈伤组织;白藜芦醇;白藜芦醇苷;过氧化氢

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0114-03

白藜芦醇(Resveratrol,简称 Res)又称芪三酚,存在于虎杖、花生、葡萄等植物中。白藜芦醇与植物抗病性具有密切的关系^[1],在动物体上又具有良好的抗炎、抗氧化、调血脂及抗肿瘤活性,是一种重要的原料药^[2]。白藜芦醇主要从中药虎杖中提取,膳食植物葡萄虽也含白藜芦醇但含量远低于虎杖。虎杖中白藜芦醇的含量为 1~3 mg/g FW,而葡萄叶中白藜芦醇含量仅为 0.06~46.00 $\mu g/gFW$ ^[3]。采用诱导剂升高葡萄相关材料中白藜芦醇的含量成为解决目标。已知的葡萄材料白藜芦醇的非生物诱导剂有 UV、 CO_2 、臭氧、氯化铝、乙磷铝、硫酸铜、茉莉酸甲酯、水杨酸等^[4]。这些诱导剂可以显著升高在体或离体葡萄材料中白藜芦醇含量。该课题组前期研究发现超生理浓度 H_2O_2 (2.5%和 5%质量百分比浓度)对离体葡萄叶片中的芪类物质呈现显著的诱导作用^[4-5]。但从天然植物资源中提取活性次生代谢产物受到可耕地面积日益减少、栽培过程的自然环境等因素的影响,使其活性产物的产量和质量均难以控制。利用细胞培养技术得到的植物愈伤组织同样具有原植物次生代谢产物生物合成的全能性,且其具有结构疏松、容易分散、易于固相培养和液相培养的特点,不受地理、气候等条件的限制,可节省土地,降低成本,缩短生产周

期,方便实行工业化生产^[6-7]。该试验拟采用 H_2O_2 处理葡萄叶愈伤组织,研究其对不同状态下的愈伤组织中白藜芦醇含量变化的影响,以期为此类活性成份的大规模组织培养提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“红地球”葡萄(*Vitis vinifera* L. cv. Red Globe)由新疆石河子葡萄研究所提供,于石河子大学药园培育(25℃),选择顶端的嫩叶作为外植体材料。

岛津 Essentia LC-15C 高效液相色谱仪 (SHIMADZU, 日本);色谱柱:Waters Atlantis C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);色谱纯乙腈 (Fisher Scientific);相机 (Canon 400D);白藜芦醇(Res,纯度≥99%),白藜芦醇苷(PD,纯度≥99%)(Sigma);其余试剂均为分析纯,稀释及空白处理中的水为实验室制备双蒸水。

1.2 试验方法

1.2.1 葡萄外植体的处理及诱导 以“红地球”葡萄顶端嫩叶作为外植体材料诱导愈伤组织。采用 B5 培养基附加 1 mg/L 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸),1 mg/L 6-BA(6-苄基氨基嘌呤),2%蔗糖和 0.6%琼脂,pH 3.2~5.7,于 121℃ 高压灭菌 30 min。培养温度(25±1)℃,无光照培养。每 20 d 继代 1 次,取继代 3 次后的愈伤组织作为试验材料中的白色愈伤组织,白色愈伤组织经过光照培养可促进花色苷等红色色素生成,从而形成红色愈伤组织^[8-9],继代、光照培养获得试验材料中的红色愈伤组织;而白色愈伤组织一直不继代便可获得褐化的愈伤组织(图 1)。

1.2.2 愈伤组织的处理 称取 2 g 愈伤组织置于 24 孔板(Costar,3473)中,然后向孔板中加入浓度为 0(CK)、

第一作者简介:李月荣(1990-),女,四川威远人,硕士研究生,研究方向为生物技术制药。E-mail:yuerongr512@163.com.

责任作者:张波(1978-),男,陕西宝鸡人,博士,教授,研究方向为肿瘤药理及生物技术制药。E-mail:Bozhang_lzu@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160058);新疆兵团重点领域科技攻关资助项目(2014BA029)。

收稿日期:2015-01-19



注:1 为白色愈伤组织;2 为红色愈伤组织;3 为褐化的愈伤组织。

Note:1 is white callus;2 is red callus;3 is callus browning.

图1 3种不同状态的葡萄愈伤组织

Fig.1 The appearance of three different states grape callus

2.5、5.0、10.0、50.0 μM 的 H_2O_2 (用蒸馏水溶解)并用蒸馏水处理 3 种愈伤组织测其本底的白藜芦醇及白藜芦醇苷含量,混匀,置于 25°C 恒温箱中,避光处理 24 h,每个处理重复 3 次。处理完毕,离心,弃上清, -20°C 冰箱中保存,备用。

1.3 项目测定

将冷冻的愈伤组织用甲醇研磨,超声提取 20 min,然后振荡离心,提取 3 次,再将上清液收集蒸干,干样品溶解于甲醇溶液中。通过 HPLC 法对愈伤组织中的芪类物质进行定量分析,方法参照文献[5]。试验操作均在避光条件下进行。高效液相色谱法检测:把配好的样品 $10\,000\times\text{g}$ 离心 10 min,取上清液过有机膜,0.2%磷酸水过水膜。色谱条件:采用二元梯度洗脱,流动相 A 为乙腈,B 为双蒸水(0.2%磷酸),柱温 25°C ,进样量 $20\,\mu\text{L}$,流速 $1\,\text{mL}/\text{min}$,检测波长 306 nm。洗脱程序:0~4 min,80%~76% B;4~20 min,76%~69% B;20~25 min,69%~60% B。每个样品重复 3 次。芪类物质含量采用($\mu\text{g}/\text{g}$ FW)表示。

1.4 数据分析

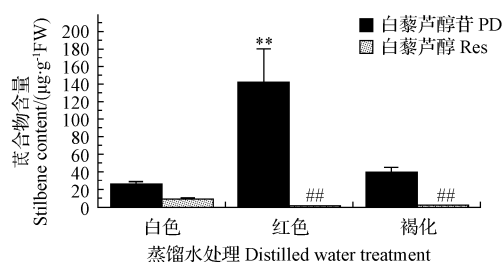
试验数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同状态的葡萄愈伤组织白藜芦醇苷及白藜芦醇的含量

白色、红色、褐色 3 种愈伤组织经过蒸馏水处理

24 h 后,红色愈伤组织中的白藜芦醇苷含量最高,为 $142\,\mu\text{g}/\text{g}$ FW;其次是褐化的愈伤组织,为 $39\,\mu\text{g}/\text{g}$ FW;白色愈伤组织中的白藜芦醇苷含量最低,为 $26\,\mu\text{g}/\text{g}$ FW。白藜芦醇在白色愈伤组织中的含量显著高于红色与褐化愈伤组织(图 2)。



注:与白色愈伤组织 PD 相比 ** $P<0.01$, Res 相比 ## $P<0.01$ 。

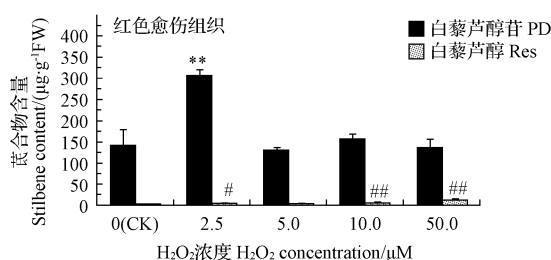
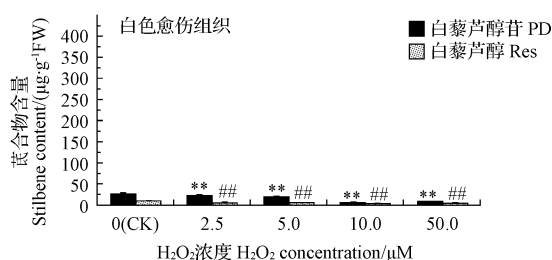
Note: ** $P<0.01$ compared with PD of the white callus group, ## $P<0.01$ compared with Res of the white callus group.

图2 蒸馏水处理 24 h 后不同状态的葡萄愈伤组织白藜芦醇苷和白藜芦醇的含量变化

Fig.2 The content changes of resveratrol and piceid in different states callus grape after distilled water for 24 hours

2.2 不同浓度过氧化氢对白色、红色愈伤组织芪类物质的影响

由图 3 可知,随着 H_2O_2 处理浓度的增加,白色愈伤组织中白藜芦醇苷及白藜芦醇的含量都在下降;红色愈伤组织在 H_2O_2 浓度为 $2.5\,\mu\text{M}$ 时白藜芦醇苷含量高于



注:与对照组 PD 相比 ** $P<0.01$, Res 相比 # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

Note: ** $P<0.01$ compared with PD of CK group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with Res of CK group.

图3 不同状态下葡萄愈伤组织经不同浓度 H_2O_2 处理后白藜芦醇及白藜芦醇苷的含量变化

Fig.3 The content changes of resveratrol and piceid in different stages grape callus response to different concentrations of hydrogen peroxide

对照, 5.0、10.0、50.0 μM 时白藜芦醇苷含量都与对照接近, 但其白藜芦醇的含量略微增加。结果表明 H_2O_2 对葡萄愈伤组织的诱导特性中, 仅对红色愈伤组织能诱导升高, 且限定于 H_2O_2 浓度为 2.5 μM 时, 白藜芦醇苷含量最高。

3 讨论

该试验结果表明, 3 种不同状态的葡萄愈伤组织中白藜芦醇苷含量均高于白藜芦醇, 这可能与逆境促使细胞分泌白藜芦醇, 而白藜芦醇经糖苷化代谢为更加稳定的白藜芦醇苷有关^[9], 这一代谢变化在相关文献中也得到了报道^[10]。不同状态的愈伤组织中白藜芦醇含量差异较小而白藜芦醇苷含量差异较大, 说明白藜芦醇苷的含量与愈伤组织的状态有一定的相关性。

该试验研究还发现, 3 种愈伤组织经过双蒸水处理 24 h 后, 红色愈伤组织中的白藜芦醇苷含量明显高于白色和褐化的愈伤组织, 说明红色愈伤组织中的白藜芦醇苷响应 H_2O_2 胁迫较为明显, 红色愈伤组织更易合成芪类物质, 也表明了愈伤组织色素积累水平影响其 H_2O_2 胁迫后芪类物质的响应水平。Nettleship 等^[11] 在研究烟草愈伤组织和骆驼蓬茎愈伤组织中的次生代谢产物积累时, 也发现其愈伤组织均有一定的发红现象。

H_2O_2 诱导的实质是引起愈伤组织的氧化胁迫, 而白藜芦醇的产生可能作为抗氧化剂参与了抗氧化防御反应。随着 H_2O_2 处理浓度的增加, 白色愈伤组织中的芪类物质含量下降, 当在 H_2O_2 浓度为 2.5 μM 时红色愈伤组织芪类物质的含量最高, 而其它浓度下其芪类物质含量与空白组接近, 故红色愈伤组织对 H_2O_2 最佳的响应浓度为 2.5 μM 。这与课题组前期关于 H_2O_2 对红地球葡萄叶片芪类物质的诱导作用的研究结果类似^[4], 其原因可能是活性氧 H_2O_2 在一定程度上可以诱导愈伤组织积累芪类物质, 大量活性氧 H_2O_2 会消耗愈伤组织中原有的芪类物质。

另外发现, 与其它 2 种愈伤组织相比, 红色愈伤组织中芪类物质的含量最高, 且其对一定浓度的 H_2O_2 表

现出较高的诱导率, 白藜芦醇苷含量高达 306 $\mu\text{g/g}$ FW, 是其对应的外植体葡萄叶片中白藜芦醇苷含量的 3.1 倍^[12]。说明可利用细胞工程技术, 用于白藜芦醇与葡萄色素的工业化生产。

该试验研究结果还表明, 白藜芦醇在愈伤组织中的积累不仅与过氧化氢的胁迫有着密切的关联, 而且与愈伤状态(色素含量)也有关联, 对于明确三者之间相互作用及关系需要进一步探索研究。

参考文献

- [1] Pool R M, Creasy L L, Frackelton A S. Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs [J]. Vitis, 1981, 20: 136-145.
- [2] 郭景南, 刘崇怀, 潘兴, 等. 葡萄属植物白藜芦醇研究进展[J]. 果树学报, 2002(3): 199-204.
- [3] Moreno A, Castro M, Falqué E. Evolution of trans-and cis-resveratrol content in red grapes *Vitis vinifera* L. cv Mencia, Albarello and Merenzao, during ripening[J]. Eur Food Res Technol, 2007, 227: 667-674.
- [4] 黄方爱, 张波, 杨晓燕, 等. H_2O_2 对葡萄离体叶片白藜芦醇的诱导作用[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(10): 1799-1804.
- [5] 田春芳, 张波, 李荣飞, 等. H_2O_2 对 2 种红葡萄离体叶中主要芪类物质含量的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(6): 85-90.
- [6] 张东旭, 周增产, 卜云龙, 等. 植物组织培养技术应用研究进展[J]. 北方园艺, 2011(6): 209-213.
- [7] 杨丽琴, 李瑞, 王俊, 等. 植物组织培养的三大难题[J]. 北方园艺, 2008(4): 104-107.
- [8] Makunga N P, J van Staden, Cress W A. The effect of light and 2,4-D on anthocyanin production in *Oxalis reclinata* callus[J]. Plant Growth Regulation, 1997, 23: 153-158.
- [9] Archana M, Ajay K M, Anita G, et al. Anthocyanin production in a callus line of *Panax sikkimensis* ban[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 2010, 46: 13-21.
- [10] Liu W, Liu C Y, Yang C X, et al. Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation[J]. Food Chemistry, 2010, 122(3): 475-481.
- [11] Nettleship L, Slaytor M. Adaptation of *Peganum harmala* callus to alkaloid production[J]. Journal of Experimental Botany, 1974, 25(89): 1114-1123.
- [12] 黄方爱, 张波, 杨晓燕, 等. 3 种非生物诱导剂对红地球葡萄离体叶片中主要芪类物质的诱导作用[J]. 农垦医学, 2012(34): 393-396.

The Differences Between Resveratrol and Piceid in Grapevine Callus Responded to the Hydrogen Peroxide Treatment

LI Yue-rong¹, YAN Huan¹, ZHANG Bo^{1,2}, YANG Xiao-yan¹, LI Rong-fei¹, WANG Xiao-qin¹

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002; 2. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, Shihezi, Xinjiang 832002)

Abstract: Taking three different stages grape callus (*Vitis vinifera* L. cv. Red Globe) as test materials, with H_2O_2 solution to investigate the effect of resveratrol and piceid content by HPLC. The results showed that the content of piceid in red callus was the highest, following by brown callus, and white callus. The content of resveratrol in white callus was higher than red and browning callus. The maximum content of piceid 306 $\mu\text{g/g}$ FW in treated red callus was achieved by 2.5 μM H_2O_2 for 24 hours treatment. It was not significant that the content of resveratrol changes in three different stages grape callus. It was very obvious that the response of piceid in red callus to H_2O_2 , which limited to 2.5 μM H_2O_2 .

Keywords: grape callus; resveratrol; piceid; H_2O_2