

培养基成分对葡萄愈伤组织生长和白藜芦醇含量的影响

邓建平¹, 杨国顺², 黄益鸿¹, 李益锋¹, 周杰良¹

(1. 湖南生物机电职业技术学院 植物科技系, 湖南 长沙 410427; 2. 湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:以巨峰葡萄果皮愈伤组织为试材, 利用不同成分的 B₅ 继代培养基对其进行诱导, 测定愈伤组织生长量及白藜芦醇含量。结果表明: 5%蔗糖有利于愈伤组织的生长及白藜芦醇含量的积累; NO₃⁻/NH₄⁺ 比例过高或过低均不利于愈伤组织的生长及白藜芦醇含量的积累, 二者比例为 2:1 时效果最佳; 添加 5 mg/L NAA 与 0.7 mg/L 6-BA 有利于愈伤组织的生长及白藜芦醇含量的积累。在最适宜培养基条件下, 愈伤组织的生长量为 56.12 g/L, 白藜芦醇为 464.520 μg/g, 白藜芦醇总含量为 23.312 mg/L。白藜芦醇的含量和产量分别是对照的 2.6 倍和 2.9 倍。

关键词:培养基成分; 葡萄愈伤组织; 白藜芦醇

中图分类号: S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0099-(2010)11-0134-04

白藜芦醇 (Resveratrol, 3, 5, 4'-基苯代乙烯-反-均二苯代乙烯) 是一种活性非黄酮类多酚化合物, 是植物体在恶劣环境下或遇到病原侵害时自身分泌的一种抗毒素, 有“植物杀菌素”之称^[1-3]。白藜芦醇被证实具有许多重要的生理活性, 如: 抗癌、保护心血管系统、雌激素样作用、影响骨代谢等^[3-6]。白藜芦醇存在于许多植物中, 在葡萄、花生、虎杖等植物中含量较高。目前白藜芦醇的提取主要依靠葡萄皮、虎杖等植物, 这需要消耗大量的原料, 并对环境及野生资源破坏极大。而利用植物组织及细胞培养生产有用的次生代谢产物是行之有效的方法。1982 年, 日本学者山田康之^[7]首次用细胞培养的方法生产紫草宁及其衍生物获得成功, 但目前能成功利用细胞培养的方法生产白藜芦醇的报道并不多见, 且都存在植物细胞生长缓慢和次生代谢产物含量太低的问题, 很大程度上限制了这一技术在生产中的应用。大量研究已经证明, 不同培养条件对所培养细胞次生代谢物的积累都有很大的影响^[8-10], 特别是不同种类的碳源和氮源及其浓度对所培养细胞次生代谢物的积累至关重要。现以经过筛选的优良巨峰葡萄果皮愈伤组织为试材, 通过筛选培养基的碳源、氮源和生长调节物质等组分, 找出葡萄愈伤组织生长和进行其有效成分生物合成的最佳条件, 为葡萄细胞培养生产白藜芦醇的工厂化生产和产业化开发提供理论依据。

第一作者简介: 邓建平(1968-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事园艺植物栽培与育种研究工作。E-mail: djien@163.com。

基金项目: 湖南省农业厅资助项目(湘农业计 2007(354 号))。

收稿日期: 2010-03-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材为参考文献[11]中的第 6 代巨峰葡萄果皮愈伤组织。继代培养基为: B₅ 培养基(附加 5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 激素)、蔗糖 3%、琼脂 0.8%、pH 5.8。

1.2 试验方法

将巨峰葡萄果皮愈伤组织接种在不同的培养基上, 每组接种 30 瓶, 光照培养, (25±1)℃, 培养 25 d 后每组挑选 20 瓶生长较好的, 测定葡萄皮愈伤组织的干重, 采用高效液相色谱(HPLC)测定愈伤组织中白藜芦醇的含量。

1.2.1 不同碳源处理 将巨峰葡萄果皮愈伤组织接种在分别加入 4%蔗糖、4%葡萄糖、4%麦芽糖的 3 组 B₅ 培养基上(表 1 编号 1~3), 培养 25 d 后分别测定葡萄皮愈伤组织生长量和白藜芦醇的含量, 确定最佳碳源种类。将确定的碳源按 2%、3%、4%、5%和 6%的浓度分别加入 B₅ 培养基上(表 1 编号 4~8), 培养 25 d 后测定各处理下的葡萄皮愈伤组织生长量和白藜芦醇的含量, 确定最佳碳源浓度。

表 1 不同碳源培养基

编号	培养基
1	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+4%蔗糖
2	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+4%葡萄糖
3	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+4%麦芽糖
4	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+2%蔗糖
5	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+3%蔗糖
6	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+4%蔗糖
7	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+5%蔗糖
8	B ₅ +5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+6%蔗糖

1.2.2 生长调节物质处理 通过改变培养基中 NAA 与 6-BA 的浓度(表 2 编号 9~20), 筛选出最适宜的 NAA

表 2 不同生长调节物质的培养基

编号	培养基
9	B5+6 mg/L NAA+0 mg/L 6-BA+5%蔗糖
10	B5+6 mg/L NAA+0.2 mg/L 6-BA+5%蔗糖
11	B5+6 mg/L NAA+0.4 mg/L 6-BA+5%蔗糖
12	B5+6 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA+5%蔗糖
13	B5+6 mg/L NAA+0.8 mg/L 6-BA+5%蔗糖
14	B5+6 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+5%蔗糖
15	B5+0 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA+5%蔗糖
16	B5+2 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA+5%蔗糖
17	B5+4 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA+5%蔗糖
18	B5+6 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA+5%蔗糖
19	B5+8 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA+5%蔗糖
20	B5+10 mg/L NAA+0.6 mg/L 6-BA+5%蔗糖

与6-BA的浓度。

1.2.3 不同氮源处理 在培养基中总氮量不变的情况下(50 mmol/L), NO_3^- 和 NH_4^+ 的比例分别设为 1:0、0:1、1:1、1:2、1:1:2 硝酸盐和铵盐分别用 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 来配置。测定各处理中的葡萄皮愈伤组织生长量和白藜芦醇积累量, 确定 NO_3^- 和 NH_4^+ 的最佳比例。再将培养基氮源的浓度分别设为 10、30、50、70、90 mmol/L, 测定葡萄皮愈伤组织生长和白藜芦醇积累量, 确定培养基最佳的氮源浓度。

1.2.4 最佳培养基条件下巨峰葡萄果皮愈伤组织培养 根据预计试验结果, 确定最佳的培养基, 与对照同时进行巨峰葡萄果皮愈伤组织的培养, 比较二者的愈伤组织生长量和白藜芦醇积累量。

2 结果与分析

2.1 碳源对愈伤组织生长和白藜芦醇积累的影响

表 3 结果表明, 添加 4% 蔗糖的培养基上产生的愈伤组织干重最大, 达 46.02 g/L, 显著高于添加了麦芽糖或葡萄糖的培养基的产量, 其愈伤组织中的白藜芦醇含量和总产量也均为最高, 为 190.718 $\mu\text{g/g}$ 和 8.483 mg/L , 也显著高于后二者。故对于巨峰葡萄皮愈伤组织的生长量和白藜芦醇含量而言, 蔗糖是 1 种最佳碳源之一。培养基中蔗糖浓度在 2%~5% 范围内, 愈伤组织的生物量生长和总白藜芦醇积累量都随着蔗糖浓度的加大而增大, 当蔗糖浓度达 5% 时, 二者均达最大值, 显著高于其它浓度。但蔗糖浓度在 5%~6% 范围内, 葡萄愈伤组织的生物量生长和总白藜芦醇含量都随着蔗糖浓度的增大逐渐降低(见图 1)。故应选择浓度 5% 的蔗糖为巨峰葡萄果皮愈伤组织培养基的碳源。

表 3 碳源对愈伤组织生长和白藜芦醇含量积累影响

碳源	干重重量 /g·L ⁻¹	白藜芦醇含量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Res 总产量 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
葡萄糖	29.63 c	106.715 c	3.181 c
麦芽糖	35.41 b	120.246 b	4.369 b
蔗糖	46.02 a	190.718 a	8.782 a

注: 均值后小写英文字母表示 5% 的显著水平, 下同。

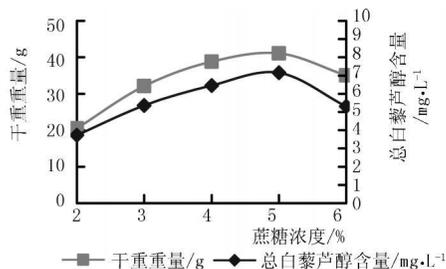


图 1 蔗糖对愈伤组织生长和白藜芦醇积累量的影响

2.2 生长调节剂对愈伤组织生长和白藜芦醇积累影响

由图 2 可见, 6-BA 浓度在 0~0.7 mg/L 时, 愈伤组织的生物量和总白藜芦醇含量也随之明显增加, 当 6-BA 浓度为 0.7 mg/L 时, 二者均达最大值, 之后愈伤组织的生物量和总白藜芦醇的含量随着 6-BA 浓度的增大而降低。故 6-BA 的最合适浓度为 0.7 mg/L。

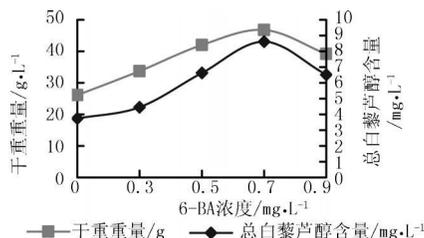


图 2 6-BA 对愈伤组织生长和白藜芦醇积累的影响

由图 3 显示, NAA 的浓度为 5 mg/L 时, 巨峰葡萄果皮愈伤组织生长和白藜芦醇积累量均达到高峰, 低于或高于此浓度, 都会降低愈伤组织生长量和白藜芦醇积累量。因此认为 NAA 的最合适浓度为 5 mg/L。

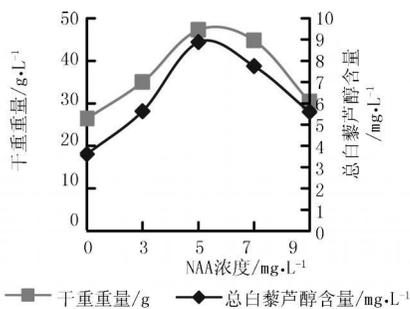


图 3 NAA 对愈伤组织生长和白藜芦醇积累的影响

2.3 氮源对果皮愈伤组织和白藜芦醇积累量的影响

由表 4 的 21~25 的处理中可知, $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 为 1:2 时, 愈伤组织的生物量和白藜芦醇含量分别为 46.85 g/L 和 190.631 $\mu\text{g/g}$ 干重, 均为最大值, 据此确定 NO_3^- 与 NH_4^+ 的适宜比例为 1:2。

表 4 的 26~30 处理结果表明, 培养基中总氮浓度为

50 mmol/L 时愈伤组织生长量最大,干重为 48.20 g/L,白藜芦醇含量最高,为 192.256 $\mu\text{g/g}$ 。据此确定当 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 为 1/2 时,总氮浓度为 50 mmol/L 最佳。

表 4 不同的氮源对愈伤组织生长和白藜芦醇积累的影响

培养基编号	总氮浓度 / mmol·L ⁻¹	$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	干重重量 / g·L ⁻¹	白藜芦醇含量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重	总白藜芦醇含量 / mg·L ⁻¹
21	50	1:0	22.89	61.643	1.403
22	50	0:1	29.87	73.681	2.219
23	50	1:1	36.21	125.726	4.718
24	50	2:1	46.85	190.631	8.646
25	50	1:2	33.62	115.081	4.008
26	10	2:1	36.52	115.019	4.410
27	30	2:1	46.71	133.748	6.163
28	50	2:1	48.20	192.256	8.652
29	70	2:1	39.94	92.042	3.418
30	90	2:1	29.81	71.317	2.145

2.4 综合最佳培养基条件下葡萄果皮愈伤组织的培养

根据试验结果,确定了最佳的培养基成分: B₅ 培养基中附加 5%蔗糖、5 mg/L NAA、0.7 mg/L 6-BA。在温度 25℃,光照培养 25 d 后,收获的巨峰葡萄皮愈伤组织生物量干重为 56.12 g/L,白藜芦醇为 464.520 $\mu\text{g/g}$,白藜芦醇总含量为 23.312 mg/L。白藜芦醇的含量和产量分别是对照的 2.6 倍和 2.9 倍。

3 讨论

利用植物组织培养生产次生代谢产物的关键在于提高愈伤组织的生长量和增加次生代谢产物的含量,可以通过筛选愈伤组织来源、优化培养基成分、改善培养条件等手段来实现^[2]。

碳源在植物组织培养中起到提供物质能量和维持渗透压的作用,是细胞生长的能量来源和构成细胞骨架的重要成分,对次生代谢物的积累常常起决定性作用^[13-14]。培养基中糖不仅起到碳源的作用,而且还有调节渗透的作用,碳源的种类和浓度对愈伤组织细胞生长和次生代谢产物的含量有明显影响^[15-17]。该研究表明,不同的碳源对葡萄愈伤组织的生物量生长和总白藜芦醇积累的影响很大。以蔗糖效果最好,麦芽糖效果次之,葡萄糖效果最差。蔗糖的浓度以 5% 为最佳,过高或过低均不利于愈伤组织生长和白藜芦醇积累。

氮主要以硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)二种形式被利用,单独以铵盐或硝酸盐为氮源,都对细胞的生长和次生代谢物的生成不利。因此其种类和浓度对细胞生长和次生产物合成的影响非常显著^[8]。该研究结果表明,当总氮浓度为 50 mmol/L, $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 为 2:1 时,是愈伤组织生长和白藜芦醇积累的最佳比例,过高或过低都会影响愈伤组织的生长和白藜芦醇的积累,培养基中 NH_4^+ 的浓度过高则导致培养基酸化,细胞毒性

增加,从而抑制愈伤组织的生长和次生代谢产物的合成^[8]。

培养基成分对葡萄皮愈伤组织生长和白藜芦醇含量的影响程度不同,且都存在着最佳浓度。该研究结果表明:在光培养条件下,巨峰葡萄皮愈伤组织中白藜芦醇积累的最佳培养条件为:基本培养基 B₅ 中的氮源浓度为 50 mmol/L ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 为 2:1),附加 5%蔗糖 0.7 mg/L 6-BA, 5 mg/L NAA, 培养温度 (25±1)℃,光照培养。

参考文献

- [1] 王劲松. 葡萄干葡萄酒中白藜芦醇的含量及其影响因素[J]. 宁夏农业科技, 2003(6): 81-83.
- [2] Jeandet P, Seaghi M, Bessis R, et al. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine [J]. Agric Food Chem, 1995, 43(2): 316.
- [3] Jang M, Cail E, Vdeanl G, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997, 275(10): 218-220.
- [4] Kopp P. Resveratrol a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox' [J]. European Journal of Endocrinology, 1998, 138: 619-620.
- [5] 冯永江, 许实波. 白藜芦醇药理作用研究进展[J]. 国外医药. 植物药分册, 1996, 11(4): 155-157.
- [6] 郭景南, 潘兴, 王季栓. 葡萄属植物白藜芦醇研究进展[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 199-204.
- [7] Jang M, Cai L. Cancer chemopreventive activity of resveratrol a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997(1): 212.
- [8] 于荣敏, 赵鸿莲, 郑玉果等. 银杏愈伤组织培养及其代谢产物银杏内酯的研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 52-58.
- [9] 刘幼琪, 汤行春. 连翘的组织培养和连翘苷的形成研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 321-323.
- [10] 陈永勤, 朱蔚华, 吴祺祺等. 组培条件对云南红豆杉愈伤组织生长和形成紫杉醇的影响[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 269-272.
- [11] 邓建平, 姜丰, 杨国顺. 葡萄细胞培养生产白藜芦醇的研究[J]. 湖南农业大学学报, 2009(6): 274-277.
- [12] 张光辉, 陈春秋, 李竞芸等. 银杏离体培养生产次生代谢物研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(2): 130-134.
- [13] Memelink J. The use of genetics to dissect plant secondary pathways [J]. Curr Opin Plant Biol, 2005(8): 230-235.
- [14] 赵淑娟, 刘涤, 胡之璧. 植物次生代谢基因工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 52-56.
- [15] Kim Jin Hoon, Yun Jeonghwan, Hwang Yngsoon, et al. Production of taxol and taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: effect of sugar [J]. Biotechnology, 1995, 17(1): 101-106.
- [16] Smith M A L, Madhavi D L, Fang Y, et al. Continuous cell culture and product recovery from wild *Vaccinium palmarum* [J]. Plant Physiol, 1997, 150: 462.
- [17] 董诚明, 苏秀红, 王伟丽. 氮碳源对冬凌草再生植株生长及次生代谢产物的影响[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 494-498.
- [18] 郭肖红, 高文远, 李克峰. 丹参不定根组织培养的研究(II) 碳源、氮源和磷源对丹参不定根培养的影响[J]. 中草药, 2007, 38(6): 907-911.

浅议等电聚焦电泳技术在种子纯度检测中的应用

邢宝田, 吴萍

(北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘要: 结合多年试验从制胶方法、凝胶浓度、样品提取、染色液的储备及染色方法等方面总结了利用酯酶、过氧化物酶、磷酸葡萄糖变位酶、苹果酸脱氢酶等同工酶谱带鉴别大白菜、黄瓜、番茄、甘蓝等多种蔬菜几十个品种的种子纯度, 综述了等电聚焦电泳技术在种子纯度检测中的应用。

关键词: 等电聚焦; 同工酶; 种子纯度

中图分类号: S 603.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)11-0137-03

等电聚焦电泳技术是 1980 年慕尼黑工业大学食品科学和化学分析研究所的 Radola B J 发展起来, 并经国外一些种子检验实验室改进的一种非常实用的电泳技术^[1], 广泛应用于生物学的各个领域^[2-5]。该方法是利用蛋白质分子具有两性解离及等电点的特征, 加入有 pH 梯度的凝胶介质中, 在电场内经一定时间后, 各组分将分别聚焦在各自等电点相应的 pH 位置上, 形成分离的蛋白质区带。主要特点是: 灵敏度及分辨率高、重复

性好, 特别适用于大批量种子纯度检测和真实性鉴定以及遗传多样性等群体生物学领域的研究。

1 等电聚焦电泳技术在种子纯度检测中的应用

用等电聚焦电泳技术检测种子纯度的主要原理是: 通过分析亲本和 F₁ 样品之间的同工酶谱带的差异, 确定 F₁ 样品中真正的杂交种子占总样品的比率。但是在实际应用过程中, 由于不同的杂交组合, 亲本和 F₁ 样品之间的差异条带也不相同, 有时不能得到满意的分析结果。根据多年实验室工作经验, 从以下几方面进行探索。

1.1 胶的浓度

聚丙烯酰胺是丙烯酰胺和交联剂在催化剂的作用下聚合而成的高分子胶状聚合物, 凝胶孔的大小和胶的

第一作者简介: 邢宝田(1968-), 女, 大专, 助理农艺师, 现主要从事蔬菜种子室内纯度检测及品种真实性鉴定工作。

通讯作者: 吴萍(1962-), 女, 硕士, 副研究员, 现主要从事种子生理研究及种子检测工作。E-mail: wuping@nercv.org。

收稿日期: 2010-03-05

Effects of Medium Concentration on Callus Growth and Resveratrol of Grape

DENG Jian-ping¹, YANG Guo-shun², HUANG Yi-hong¹, LI Yi-feng¹, ZHOU Jie-liang¹

(1. College of Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha, Hunan 410127; 2. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract: Taking Kyoho grape peer callus for materials, using callus at different subculture medium, callus growth and the resveratrol content were determined. The results showed that 5% sucrose in medium was favorable for callus growth and the resveratrol content; High or low of NO₃⁻/NH₄⁺ was unfavorable for callus growth and the resveratrol content, the maximum were achieved when NO₃⁻/NH₄⁺ ratio was 2:1; B₅ subculture medium added 5 mg/L NAA and 0.7 mg/L 6-BA was favorable for callus growth and the resveratrol content. In the most suitable medium under the conditions of callus growth was 56.12 g/L, the yield of resveratrol was 464.520 μg/g, the total content of resveratrol was 23.312 mg/L. The resveratrol content and yield of the control were 2.6 times and 2.9 times.

Key words: medium concentration; grape callus; resveratrol