

不同光质光对葡萄愈伤组织增殖和白藜芦醇含量的影响

张真^{1,2}, 李胜^{1,2,*}, 李唯¹, 刘媛^{1,2}, 吴兵^{1,2}, 张青松^{1,2}, 李婷^{1,2}

¹甘肃农业大学生命科学与技术学院植物组织培养研究室, 兰州 730070; ²兰州汇通生物科技有限公司, 兰州 730000

提要: 研究不同光质影响‘黑比诺’种子诱导并继代10个月的葡萄愈伤组织增殖及白藜芦醇含量的结果表明: 不同光质下愈伤组织的增殖顺序依次为黄光>绿光>红光>蓝光>白光; 白藜芦醇的含量依次为白光>黄光>红光>蓝光>绿光; 白藜芦醇的生产量是白光>黄光>红光>蓝光>绿光。

关键词: 葡萄; 愈伤组织; 光质; 白藜芦醇; 增殖

Effects of Different Light Qualities on the Multiplication of the Callus from *Vitis vinifera* L. and Resveratrol Content

ZHANG Zhen^{1,2}, LI Sheng^{1,2,*}, LI Wei¹, LIU Yuan^{1,2}, WU Bing^{1,2}, ZHANG Qing-Song^{1,2}, LI Ting^{1,2}

¹Laboratory of Plant Tissue Culture, Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

²Lanzhou Huitong Biological Science & Technology Ltd., Lanzhou 730000, China

Abstract: The effects of different light qualities on the multiplication of the callus which was induced from the seeds of *Vitis vinifera* ‘Pinot Noir’ and subcultured for 10 months, and the resveratrol content were studied in this paper. The results showed that the light qualities for the multiplication were in the order of yellow > green > red > blue > white, but as for resveratrol accumulation and production in the calli were in that of white > yellow > red > blue > green.

Key words: *Vitis vinifera*; callus; light quality; resveratrol; multiplication

白藜芦醇(resveratrol)化学名为芪三酚, 是一种主要存在于葡萄叶表皮和浆果果皮中的多酚类化合物, 在藜芦、虎杖、桑子、花生、凤梨等70多种植物中也含有(向阳等2003; 陈雷和韩雅珊1999), 以葡萄皮中含量为最高, 达到50~100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。它以游离态(顺式、反式)和糖苷结合态(顺式、反式)两种形式存在, 无味、白色粉末, 完全溶解于有机溶剂。是一种天然的抗氧化和植物抗毒素。有多种医疗效用, 近年来, 欧美各国已将其开发成保健食品上市, 国内也出现了一些白藜芦醇产品, 但市场缺口较大, 用细胞培养的方法生产可能是一种有效的途径。因此, 本文研究了不同光质光对葡萄愈伤组织增殖和白藜芦醇含量的影响。

材料与方法

以葡萄(*Vitis vinifera* L.)品种‘黑比诺’(‘Pinot Noir’)种子诱导并继代10个月的葡萄愈伤组织为实验材料。将继代的愈伤组织接种于增殖培养基 $\text{B}_5+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{KT}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}+0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酪蛋白。所有培养基均附加2%蔗糖和0.6%琼脂, pH 5.8, 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌20 min。

每瓶接种5块大小一致的愈伤组织, 分别置于白(410~690 nm)、红(660 nm)、黄(580 nm)、绿(525 nm)和蓝(435 nm)5种光质的培养箱中培养, 各种光源均系冷光源, 不同光源的主要技术参数见表1, 培养温度为(26 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ (李胜等2005)。每处理重复10瓶。

表1 不同光质光的主要技术参数

Table 1 Major technique parameters of different light qualities

	波长范围/nm	波长峰值/nm	光照强度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
白光	410~690	—	20.3~20.6
红光	600~900	660	19.6~19.7
蓝光	410~540	435	20.2~20.4
绿光	490~590	525	19.6~19.9
黄光	520~650	580	19.5~19.8

收稿 2007-11-05 修定 2008-01-10

资助 科技部中小企业创业基金(06C26226201858)、甘肃省科技攻关项目(2GS064-A41-002-09)、甘肃省高校研究生导师项目(0602-01)、兰州市高层次人才项目(06-007)。

* 通讯作者(E-mail: lish@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7631547)。

接种 45 d 后取出所有的愈伤组织, 将相同处理的愈伤组织合并, 称其鲜重, 然后置于 80 °C 恒温烘箱内烘至恒重并称重, 研磨至粉末状, 过 60 目筛后, 精确称取 4 g, 转移至 150 mL 三角瓶中后, 按照以下步骤提取: 愈伤组织粉末 → 100 mL 乙酸乙酯 30 °C, 1 h → 过滤 → 50 mL 乙酸乙酯 30 °C, 0.5 h → 过滤 → 20 mL 乙酸乙酯 30 °C,

10 min → 过滤 → 收集所有滤液。

白藜芦醇含量采用日本岛津高效液相色谱仪 (Pascual-Martí 等 2001) 测定分析。采用 C₁₈ (150 mm×4.6 mm) 色谱柱, 流动相采用乙腈 - 重蒸水 (CH₃CN-H₂O) (15%:85%) 混合溶剂进行洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长为 303 nm, 每次进样 20 μL, 柱温为 30 °C (图 1)。

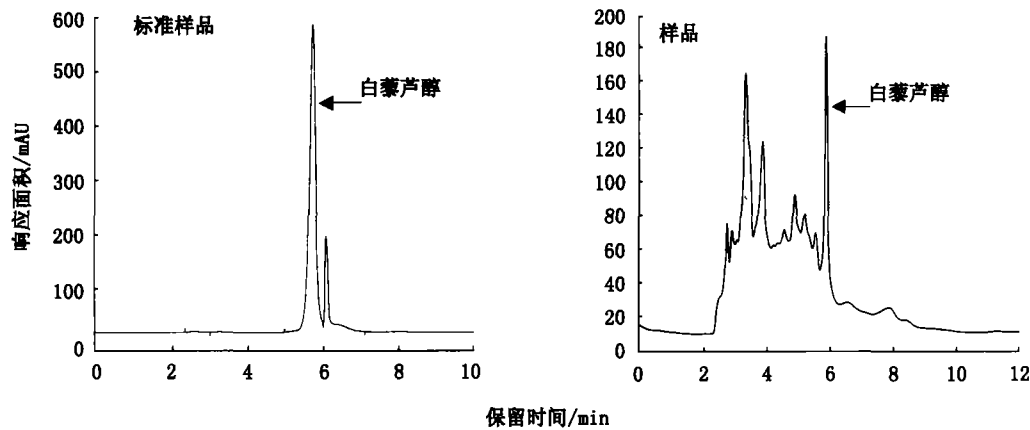


图 1 白藜芦醇标准样品和样品的色谱图

Fig.1 Resveratrol curves of standard sample and test sample

绘制标准曲线时, 精确称取 5.0 mg 99% 白藜芦醇标准样品, 用乙酸乙酯溶解并定容至 50 mL。分别准确吸取上述标样溶液 0.10、0.625、1.25、2.50、5.0 mL, 均用乙酸乙酯定容至 10 mL, 制成浓度依次为 0.001、0.00625、0.0125、0.025、0.05 mg·mL⁻¹ 的标准溶液。依次取 20 μL 进样, 每个浓度重复 3 次。在上述色谱条件下分析, 以白藜芦醇测定的峰面积(y)为纵坐标, 以对照品进样量(μL)为横坐标(x)进行线性回归, 得到回归方程 $y=ax+b$ 。根据上述标准曲线绘制方法, 得到回归曲线为 $y=151621x$, $R^2=0.9935$ 。样品中白藜芦醇含量按下式计算: 白藜芦醇含量(mg·g⁻¹) = $[5(y-b)/a]/m$ (m 为愈伤组织干重)。葡萄愈伤组织增殖倍数和含水量分别按下式计算: 接种量(g·瓶⁻¹) = 接种后瓶重 - 接种前瓶重; 收获量(g·瓶⁻¹) = 收获前瓶重 - 收获后瓶重; 增殖倍数 = 收获量 / 接种量; 含水量 = [(愈伤组织湿重 - 愈伤组织干重) / 愈伤组织湿重] × 100%。

实验结果

1 不同光质光对葡萄愈伤组织增殖的影响

图 2 显示, 黄光下, 葡萄愈伤组织生物量增加 5.7 倍, 说明黄光能有效促进愈伤组织的生长。虽然白光也能够促进细胞的增殖(约 4 倍), 但效果

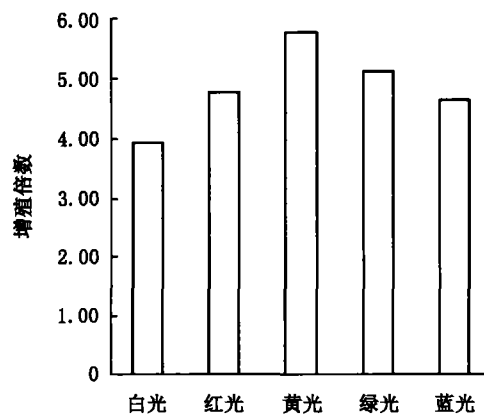


图 2 不同光质光对愈伤组织增殖的影响

Fig.2 Effect of different light qualities on the callus multiplication

不及单色光。增殖效果从高到低依次为黄光 > 绿光 > 红光 > 蓝光 > 白光。

2 不同光质光对葡萄愈伤组织中白藜芦醇含量和生产量的影响

由图 3 可见, 不同光质光下生长的葡萄愈伤组织中白藜芦醇含量不同。其中白光条件下的愈伤组织中白藜芦醇的含量最高, 达到 38.0 μg·g⁻¹, 黄光下(22.1 μg·g⁻¹)次之, 红光下(11.7 μg·g⁻¹)和蓝光下(11.1 μg·g⁻¹)的含量更低一些, 而绿光下只检

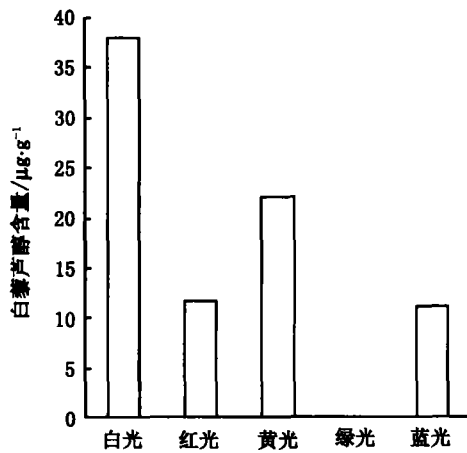


图3 不同光质光对愈伤组织中白藜芦醇含量的影响

Fig.3 Effect of different light qualities on resveratrol content in the callus

测到痕量,表明绿光不利于白藜芦醇的合成。白藜芦醇的含量大小依次为白光>黄光>红光和蓝光>绿光。由此可见,对于提高葡萄愈伤组织中白藜芦醇来说,复合光比单色光更适宜。

在几种不同光质中,白光条件下的白藜芦醇生产量(平均每瓶的白藜芦醇生产量)最高。对于细胞生长的促进效应来说,白光较差,但比蓝光、红光、黄光和绿光有明显的促进,差异达极显著水平(图4);与此相反,虽然绿光能有效促进愈伤组织的增殖,但白藜芦醇的合成和累积却受抑。就其产量而言,白光下最佳(16.9 μg·瓶⁻¹),黄光下次之(9.9 μg·瓶⁻¹),红光和蓝光条件下更低些,两者之间差异不显著,绿光对白藜芦醇生产来说为无效光。

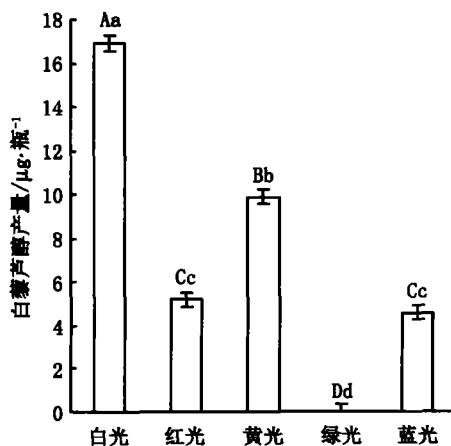


图4 不同光质光对愈伤组织中白藜芦醇产量的影响

Fig.4 Effect of different light qualities on resveratrol production in the callus

图中大写字母表示差异显著($P < 0.05$),小写字母表示差异达极显著($P < 0.01$)。

讨 论

不同波长光作为一种物理因子已广泛地应用于植物组织培养过程中的形态发生、生长控制、光形态建成及其各种反应机制的研究(Seibert等1975)。不同光质光对植物愈伤组织、器官及原生质体培养过程中的生长、分化、代谢与基因表达等也有一定程度的影响(De Capite 1955; 崔堂兵等2001)。不同光质光对植物组织培养中愈伤组织的诱导和器官的发生已多有报道,但对植物次生代谢产物形成和积累影响的报道尚少(冯敏等1994)。本文中,白光不利于葡萄愈伤组织的生长但有利于白藜芦醇的积累,可能与白光光照能影响细胞分裂素的形成有关,这与张泽岑和王能斌(2002)的实验结果一致;黄光对于愈伤组织的增殖效应最大,而对白藜芦醇的积累效应仅次于白光;虽然绿光的增殖效应也较好,但细胞内未检测到白藜芦醇。

自从 Seibert 和 Kadade (1980)报道光可提高愈伤组织生长以后,这方面的报道不多,不同实验室所得到的结果并不一致,且互相矛盾甚至有相反的情况,因此在植物组织培养过程中,仅注意光的波长是不够的,还应注意光的幅射强度、光照时间、外植体本身的生理生化与发育年龄一致性问题。

参考文献

- 陈雷,韩雅珊(1999). 葡萄不同品种和组织白藜芦醇含量的差异. 园艺学报, 26 (2): 118~119
- 崔堂兵,郭勇,林炜铁(2001). 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法. 植物生理学通讯, 37 (5): 479~482
- 冯敏,毛学文,陈荃(1994). 不同光质和培养基对毛地黄叶组织中强心苷积累的效应研究. 韶关大学学报(自然科学版), 15 (4): 70~73
- 李胜,李唯,杨德龙,武季玲,杨宁,曹孜义(2005). 不同光质对葡萄试管苗根系生长的影响. 园艺学报, 32 (5): 872~874
- 向阳,张彤,张焯,马龙(2003). 高效液相色谱法测定葡萄皮和葡萄籽中白藜芦醇的含量. 卫生研究, 32 (5): 490~492
- 张泽岑,王能斌(2002). 光质对茶树花青素含量的影响. 四川农业大学学报, 20 (4): 37~382
- De Capite L (1955). Action of light and temperature on growth of plant tissue culture *in vitro*. Am J Bot, 42: 869~873
- Pascual-Martí MC, Salvador A, Chafer A, Berna A (2001). Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis vinifera* and determination by HPLC. Talanta, 54: 735~740
- Seibert M, Kadade PG (1980). Environmental factor: a light. In: Staba EJ (ed). Plant Tissue Culture as A Source of Biochemicals. Florida: CRC Press, 123~141
- Seibert M, Wetherbee PJ, Job DD (1975). The effects of limist intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. Plant Physiol, (56): 130~139