

文章编号:1673-1689(2008)03-0083-05

南果梨愈伤组织及花青素诱导的初步研究

刘延吉¹, 向文娟¹, 田晓艳², 王学密³, 吕德国⁴

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁石油化工大学 环境与生物技术学院, 辽宁 抚顺 113000; 3. 鞍山千山王绿色果品有限公司, 辽宁 鞍山 114047; 4. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:通过对南果梨愈伤组织的诱导,选择形成花青素最佳的愈伤组织相关因素,为后期研究南果梨的花青素代谢调控打下基础。通过正交试验,观察花色素形成,寻找最佳外植体试材及其培养基,并且确定愈伤组织生物量周期,以及促进花色素形成的决定因素。结果表明:最佳外植体为子房,其愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D; 愈伤组织生物量周期为 33 d,第 30 天时细胞生物量达到最大值,为初始生物量的 6.32 倍。花青素的含量也随着愈伤组织生物量的增加而积累。葡萄糖是最佳碳源。利用外植体试材在最适培养基上培养 30 d,可得到最大量愈伤组织及花青素。

关键词: 南果梨; 愈伤组织; 诱导; 花青素

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Study on Inducing Callus and Cyanidin of Nanguo Pear

LIU Yan-ji¹, XIANG Wen-juan¹, TIAN Xiao-yan², WANG Xue-Mi³, LV De-Guo⁴

(1. College of Biotechnology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China; 2. School of Environment and Biotechnology, Liaoning University of Petroleum and Chemical Technology, Fushun 113001, China; 3. Anshan Qianshanwang Green Fruit Ltd, Anshan 114047, China; 4. College of Horticulture, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: In this manuscript, the optimum factors of formatting cyanidin in the callus of nanguo pear through inducing callus of nanguo pear were investigated. This supplied essential information for continue study on the metabolic regulation of cyaniding. The optimum explant, medium, biomass cycle of callus and formatting cyaniding were determined by orthogonal design through observing the formation of cyanidin. Ovary was the best explant. The optimum medium was MS+ 0.5 mg/L, 6-BA+ 0.5 mg/L, IAA+1.0 mg/L 2,4-D, the biomass cycle of callus was 33 days. The maximum biomass occurred at 30th. It was 6.32-fold than the initial biomass. Glucose was the best carbon source. With the above mentioned explant and medium, it only need 30 days to get the maximum biomass and cyanidin.

Key words: Nanguo pear ; callus; induce; cyanidin

收稿日期: 2007-07-05.

基金项目: 国家企业博士后基金项目(2006-1270).

作者简介: 刘延吉(1959-),男,辽宁大连人,农学博士,副教授。主要从事细胞工程、细胞信号转导研究。

Email: yanjiliu@yahoo.com.cn

花色素苷是一种非常有效的天然色素食品添加剂,它比人造色素更容易使食品上色。如今花色素苷已广泛应用于多种食品工业^[1]。花色素苷所表现出来的突出色泽经常被作为鉴定食品以及评价消费者接受程度的基础^[2]。花色素苷由花青素和糖构成^[3]。花青素是类黄酮类水溶性色素,它存在于液泡中,是决定果色的主要色素。类胡萝卜素和叶绿素在着色中起辅助作用^[4]。花色素苷具有抗氧化、抗变异原、抗肝炎,预防心血管疾病、癌症,改善肝脏、血清脂质,防止动脉硬化,提高视力等生理保健功能^[2,5-6]。

利用愈伤组织的诱导来获得植物的次生代谢物质是目前国内外研究的主要技术手段^[7]。试验中通过对南果梨愈伤组织的诱导,建立愈伤组织生长体系,通过添加不同的糖分,以及本试验后续工作中将要添加的不同植物生长调节剂、诱导子等物质,从微观上协同调控花青素的形成,为南果梨花青素的提取及相关农业生产上的应用,如促进果实着色等研究提供理论依据。目前,在国内尚无关于南果梨愈伤组织和花青素诱导的报道。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2007 年 4 月,采集沈阳农业大学果树试验园未萌发的南果梨两年生枝条,25℃水培一周后,分别取萌发的幼嫩茎段、嫩叶、子房 3 种外植体为材料进行接种。

1.2 供试材料的消毒处理

将外植体于清水中加几滴 Tween-20 冲洗 30 min 后,超净工作台上先用质量分数 75% 的酒精浸泡 30 s,用无菌水冲洗 3 次后,用质量分数 0.1% 的升汞灭菌 1~2 min(茎段 3 min),最后无菌水冲洗 3~5 次。

1.3 培养基及培养条件

诱导培养基:以 MS 为基本培养基,30 g/L 的蔗糖为碳源,琼脂 7 g/L,pH 5.8,附加不同种类和浓度的激素,茎段和子房采用 6-BA,IAA,2,4-D,分别用 3 种不同的质量浓度设计 $L_9(3^4)$ 正交试验(前期单因素实验筛选出该几种激素,其中叶的 B 因素为 IBA 质量浓度)。

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。所有试验培养基均是分装好再进行高压灭菌,灭菌温度 121℃,灭菌时间为 20 min。

培养条件:将外植体接种后,于 2 000 lx 光强下

12 h/d,温度(25±1)℃下进行培养。长出愈伤组织后转入继代培养基中同样条件下进行培养。

1.4 愈伤组织的生长曲线与花色素含量的关系

愈伤组织生长曲线:将继代培养 3 代后的愈伤组织接种于无激素的 MS 培养基上,将接种量控制在 0.15 g/瓶左右,连续培养 33 d,每 3 d 取样称重。3 次重复,取平均值。

花青素含量的测定:盐酸-甲醇法^[8]。花青素含量(mg/g)= $OD_{530} \times D(\text{稀释倍数}) \times 10^6 / \epsilon \lambda w$

1.5 不同糖对愈伤组织的生长及花青素含量的影响

以筛选出来的最佳激素组合为基本培养基,分别添加 30 g/L 蔗糖、葡萄糖和麦芽糖,7 g/L 的琼脂,接种继代 3 代后的愈伤组织进行培养,方法同 1.4。

花青素的含量在生长的第 9 天和第 27 天进行测定,方法同 1.4。

2 结果与分析

2.1 不同的外植体对愈伤组织诱导的影响

外植体不同,产生愈伤组织也不同。从表 1 可以看出,在同样条件下,利用子房诱导愈伤组织,所得的愈伤组织状态最有利于进行次生物质代谢的研究,诱导率也高,产生愈伤组织所需的时间也短(见图 1)。叶产生的愈伤组织由于质地较硬,且愈伤组织生长后期(大约 20 d 以后)褐化较为严重,不利于以后进行次生代谢物质的研究(见图 2)。而茎段产生的愈伤组织玻璃质化现象严重,较易分化出苗(见图 3),也不利于后期研究。故本实验中采用子房作为外植体进行研究。

表 1 南果梨不同外植体愈伤组织的诱导情况

Tab. 1 The callus induced condition from difference explant of nanguo pear

外植体类型	愈伤组织状态	产生愈伤组织的时间/d	诱导率/%
叶	黄绿色颗粒,质地较硬	12	82.2
子房	黄色松散颗粒,部分水质状	5	86.6
茎段	多数水质状,白绿色紧密颗粒	8	52.3

2.2 不同激素对比对子房愈伤组织诱导的影响

见表 2。正交试验结果表明,2 号培养基愈伤组织的诱导率最高,产生的愈伤组织的效果也最好,诱导前期产生黄色松散颗粒状的愈伤组织,生长较快,后期也不发生褐变。且不同激素对南果梨愈伤组织的诱导影响作用依次为:2,4-D>IAA>6-BA。南果梨愈伤组织诱导的最佳激素组合为 A_1B_3

C₂,即 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D。

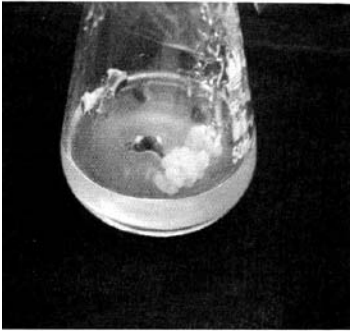


图 1 子房所产生的愈伤组织
Fig. 1 The callus induced from ovary

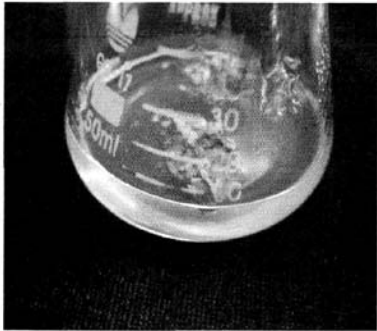


图 2 叶片产生的愈伤组织
Fig. 2 The callus induced from leaves



图 3 茎段产生的愈伤组织
Fig. 3 The callus induced from stem

2.3 子房愈伤组织的生长与花色苷含量的关系
将继代培养 3 代后的子房愈伤组织接种到上述筛选出来的最佳培养基上,附加 30 g/L 的蔗糖和 7 g/L 的琼脂,pH 5.8。

由图 4 可以看出,南果梨愈伤组织的生长曲线与花青素的含量均呈线性关系,符合愈伤组织生长

的“S”型曲线。随着培养时间的延长,愈伤组织的生物量增加,花青素的含量也在增加,但效果不如愈伤组织的生长明显。

表 2 南果梨子房愈伤组织诱导 L₉(3⁴) 正交试验结果
Tab. 2 The result of orthogonal design L₉(3⁴) from ovary's callus inducing

试验号	6-BA 质量浓度/ (mg/L)	IAA 质量浓度/ (mg/L)	2,4-D 质量浓度/ (mg/L)	D 误差 空列	愈伤组 织诱导 率/%
1	0.5	0	0	1	73.8
2	0.5	0.1	1.0	2	96.9
3	0.5	0.5	2.0	3	92.3
4	1.5	0	1.0	3	94.6
5	1.5	0.1	2.0	1	85.2
6	1.5	0.5	0	2	81.6
7	2.5	0	2.0	2	83.9
8	2.5	0.1	0	3	75.0
9	2.5	0.5	1.0	1	96.3
X ₁	87.7	84.1	76.8	85.1	
X ₂	87.1	85.7	95.9	87.5	
X ₃	85.1	90.1	87.1	87.3	
R	2.6	6.0	9.1	2.4	

在接种的 0—9 天时间里,细胞生长缓慢,处于适应阶段,是愈伤组织生长的适应期。在第 9 天,细胞开始迅速生长,进入对数生长期,此阶段是细胞生物量积累的主要阶段。直到第 27 天,细胞进入平稳期,此阶段,细胞生长开始减慢。在第 30 天,生物量达到最大值 0.732 g,为初始生物量的 6.32 倍。随着愈伤组织生物量的积累,花青素的含量也随之增加,在愈伤组织生长的后期,花青素的含量仍然增加。

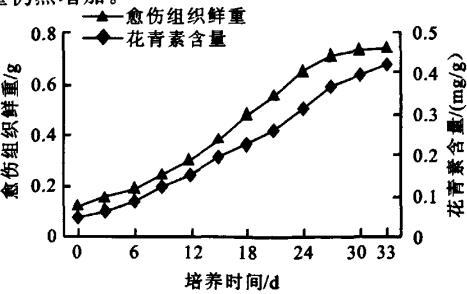


图 4 南果梨愈伤组织生长与花青素含量的关系
Fig. 4 The relation between callus growth and anthocyanin content

此阶段产生的花青素是在没有添加任何诱导子的情况下诱导出来的,可能由于含量太低,在生长初期并不为肉眼所见,到后期花青素则生长非常明显,但由于褐变以及有害物质积累等原因,使愈伤组织变黑。

2.4 不同糖对愈伤组织的生长及花青素含量的影响

由于葡萄糖是花青素的糖配体,所以糖含量也是影响花青素合成的因子之一^[9],蔗糖和麦芽糖在一定条件下可以转换成葡萄糖,所以选择了蔗糖、葡萄糖和麦芽糖这 3 种糖分进行试验。结果见图 5。由图 5 可以看出,在其他条件相同的情况下,3 种糖分中,添加 30 g/L 的葡萄糖时,愈伤组织生长得最快,生物量的增加速度比添加其他糖分的增加显著,尤其到后期,都没有明显停止生长的迹象。

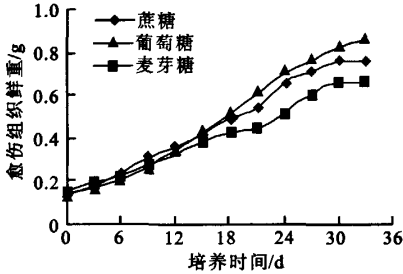


图 5 不同的糖分对愈伤组织生长的影响

Fig. 5 Effect of sugar concentration on callus growth

见图 6,在生长的初期,蔗糖和葡萄糖对花青素的影响差别不大,生长后期,葡萄糖条件下积累的花青素含量增长最显著。葡萄糖对花青素的形成有显著促进作用,其次是蔗糖,麦芽糖的效果最差。

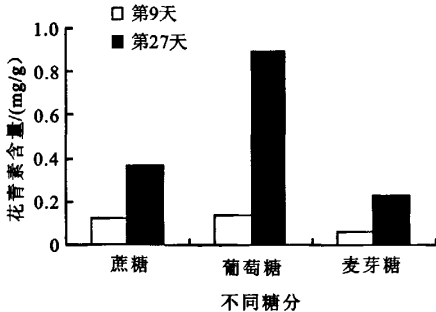


图 6 不同糖分对花青素含量的影响

Fig. 6 Effect of sugar concentration on anthocyanin

3 讨论

在南果梨愈伤组织诱导中,以子房为外植体的

效果最好,产生的愈伤组织为黄色松散颗粒,且到后期不易褐变。最适宜生长的培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,pH 5.8。在植物组织培养中,不同的激素对比对植物的生长影响很大。常用的激素有生长素和分裂素两类,其中 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,能促进细胞扩大^[10]。当 6-BA 的质量浓度为 2.5 mg/L 时,可能由于渗透压过大,产生的愈伤组织呈玻璃状,不利于愈伤组织的生长。IAA 和 2,4-D 均为生长素,能促进细胞生长,愈伤组织生物量的增加主要靠此来调节。

在细胞生长过程中,愈伤组织的生物量和花青素的含量均与培养时间呈线性关系。花青素的含量随着愈伤组织生物量的增加而增加。愈伤组织的生长曲线 33 d 为一个周期,在细胞生长的初始阶段,花青素的含量不明显,其生物量增长缓慢,这时细胞需要适应环境的变化,生长缓慢。在对数生长期,细胞开始迅速生长,细胞适应了环境以后,在分裂素和生长素的作用下,吸收营养进行细胞分裂和生长,并积累次生代谢物质,此阶段花青素尽管由于没有添加诱导子而含量不高,但也有少数形成。可能由于 3 种激素共同作用的结果。27—33 天为稳定生长期,细胞不再生长,但花青素的含量仍然增加,这可能与花青素的不稳定性以及后期有害物质的积累有关,因为花青素的出现对植物生长有一定的警示作用^[11]。

蔗糖是组织培养中主要的碳源,但实验结果表明葡萄糖最利于愈伤组织的生长,以蔗糖和麦芽糖做对照,发现葡萄糖条件下愈伤组织的生长速率显著高于蔗糖和麦芽糖。这可能是因为在一般情况下,愈伤组织在生长的过程中需要将蔗糖和麦芽糖转化为葡萄糖或果糖后才加以利用,而当直接以葡萄糖为碳源时就不需要转化而直接加以利用,这样在生长的同一阶段(适应期除外),葡萄糖条件下的愈伤组织生长量就会比添加其他碳源时所得的愈伤组织生物量要高。另外,葡萄糖是花色苷分子最为常见的糖基,其他单糖如鼠李糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、果糖等也可能存在,但由于这些单糖相对于蔗糖、麦芽糖、葡萄糖而言,在组织培养中添加这些糖分会使细胞的营养相对缺乏,故并未使用。由于葡萄糖作为糖基能影响花色苷的稳定性,在愈伤组织产生的花青素中,表现为其含量在葡萄糖条件下最高。

参考文献(References):

- [1] 丁锐. 国外花色素苷的研究现状与进展[J]. 汉中师范学院学报:自然科学版, 2004 (2): 73-78.
DING Rui. Advances on the research of anthocyanins at abroad[J]. *Journal of Hanzhong Teachers College: Natural Science*, 2004 (2): 73-78. (in Chinese)
- [2] 唐传核. 植物生物活性物质[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 218-249.
- [3] 耿玉韬. 果实着色的理论与实践[J]. 山西果树, 1989 (1): 36-39.
GEN Yu-tao. Theories and practices of fruit pigment[J]. *Shanxi Fruits*, 1989 (1): 36-39. (in Chinese)
- [4] 赵玉辉, 郭印山, 李作轩. 果实花青素研究进展[J]. 北方园艺, 2006(3): 46-47.
ZHAO Yu-hui, GUO Yin-san, LI Zuo-xuan. Advances in research on fruit anthocyanin[J]. *Northern Horticulture*, 2006 (3): 46-47. (in Chinese)
- [5] 任雁, 张惟广. 花色素苷的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2006 (4): 71-77.
REN Yan, ZHANG Wei-guang. Research advances of anthocyanin[J]. *China Food Additives*, 2006 (4): 71-77. (in Chinese)
- [6] 李春阳, 许时婴, 王璋. DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 102-105.
LI Chun-yang, XU Shi-ying, WANG Zhang. Measuring the antiradical efficiency of prcanthocyanidin from grape seed by the DPPH assay[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2): 102-105. (in Chinese)
- [7] 郑光植. 植物细胞培养及其次级代谢[M]. 第一卷. 昆明: 云南大学出版社, 1992: 58-60.
- [8] Mori T, Sakurai M, Shigeta J, et al. Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plants[J]. *Food Sci*, 1993, 58: 788-793.
- [9] 闫海芳. 光环境影响花青素合成途径中相关基因表达的机制[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2003.
- [10] 李宗霆, 周燮. 植物激素及其免疫检测技术[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996: 114-134.
- [11] 崔德才, 徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 53-54.

(责任编辑: 秦和平, 朱明)

您的包装能否确保产品的质量安全?

肉眼看得到的问题 您来解决
肉眼看不到的问题 Labthink 来解决



Labthink

除了新, 查信任! 历经生产、运输、仓储、上架销售等各个环节, 如果包装存在任何质量隐患, 都可能导致产品出现霉变、潮解、破损、保质期缩短等严重问题。Labthink三光——包装检测国际知名品牌, 为您提供全方位包装质量与安全解决方案。

济南兰光机电技术有限公司
咨询热线: 0531-8502155
E-mail: labthink@labthink.cn
www.labthink.cn