

## 刺葡萄幼胚愈伤组织诱导及其高产原花青素细胞系筛选

赖呈纯\*, 范丽华, 黄贤贵\*, 谢鸿根

福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福州350003

**摘要:** 以刺葡萄幼胚为材料, 研究不同培养方式、培养基配方和培养条件对其愈伤组织诱导的影响, 采用正交试验设计法筛选刺葡萄愈伤组织继代增殖的培养基配方, 并对继代保持的培养条件和方式进行优化, 同时进行了高产原花青素刺葡萄愈伤组织细胞系的筛选研究。结果表明, 刺葡萄幼胚以平放的方式接种到MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D或MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT的固体培养基上, 在黑暗的条件下, 能有效的诱导出愈伤组织, 诱导效率为80%; 刺葡萄愈伤组织继代增殖以MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D或MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT的固体培养基为佳, 并且采用此两种培养基交替继代培养, 在光照条件下能长期保持旺盛且生长一致的刺葡萄愈伤组织; 筛选出了紫红色松脆状的高产原花青素的刺葡萄愈伤组织细胞系, 培养35 d后每克鲜样的原花青素含量可达1 671.16 μg。

**关键词:** 刺葡萄; 幼胚; 愈伤组织; 花青素; 原花青素

## Callus Induction in Brier Grape (*Vitis davidii* Foëx) from Immature Embryos and Screening of Cell Lines with High-Production of Oligomeric Proanthocyanidins

LAI Cheng-Chun\*, FAN Li-Hua, HUANG Xian-Gui\*, XIE Hong-Gen

Institute of Agricultural Engineering and Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

**Abstract:** The effects of different culture methods, culture medium formula and culture condition on callus induction were studied using immature embryos of brier grape as plant materials. The culture media for brier grape callus subculture multiplication were screened with orthogonal experiment design. The culture condition and culture method for brier grape callus subculture were further optimized. Meanwhile, screening of cell lines with high yield of oligomeric proanthocyanidins was studied in this experiment. The results showed that the brier grape callus was induced effectively while immature embryos was horizontal onto the medium MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D or MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT in the dark, with a 80% callus induction rate. The best medium to callus subculture multiplication were MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D or MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT, and they grew well and conformably through alternative subculture of the two media. Cell lines with high yield of oligomeric proanthocyanidins were screened from these callus, and these cell lines present some characters with aubergine and friable. The yield of oligomeric proanthocyanidins of these cell lines reached up to 1 671.16 μg in 1 g fresh sample after being cultured for 35 days.

**Key words:** brier grape (*Vitis davidii* Foëx); immature embryo; callus; anthocyanosides; oligomeric proanthocyanidins

刺葡萄(*Vitis davidii* Foëx)是葡萄科葡萄属东亚种群的一个野生种, 为落叶强大藤本植物, 在我国南方广泛分布, 向北分布至陕西南部(孔庆山2004; 金燕等2008)。刺葡萄果实紫黑色, 营养极为丰富(廖文雪等2009), 含有具保健功能的黄酮类化合物(主要是花青素和原花青素)、白藜芦醇、齐墩果酸、鞣质、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和维生素C等天然活性成分(杨敬芝等2001)。刺葡萄果皮厚, 种子多, 在加工制汁和酿

酒, 以及从果皮、种子提取天然活性物质具有很好的应用前景(王仁才2006)。研究表明, 刺葡萄果实中富含的花青素(anthocyanosides)和原花青素(oligomeric proanthocyanidins, OPCs)有很强的清除自由基的能力, 具有抗氧化、抗突变、抗肿瘤、

收稿 2014-08-22 修定 2014-10-13

资助 福建省自然科学基金项目(2012J01102)。

\* 共同通讯作者(E-mail: lccisland@163.com, Tel: 0591-83839109; E-mail: hxg323@163.com, Tel: 0591-87884297)。

保护心血管等方面的功能,尤其是原花青素,是目前国际上公认清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂(Thorne Research Inc 2003; Zi等2009; Praphasawat等2011)。目前,天然的原花青素还主要来源于松树皮和葡萄籽,随着市场需求的不断扩大,原有的从葡萄、松树皮或其他替代植物中来源的生物活性物质已不能满足需要,必须寻求更多更可靠的材料来源。植物细胞培养是生物技术领域的一个重要分支,具有不受季节影响、生长周期短、产物均一可控、活性物质成分高等优点。因此,解决药用植物资源匮乏和药效成分低的药用植物的有效途径是采用规模化植物细胞培养,以满足需求(Donnez等2009)。近年来,植物细胞培养进行天然有效成分的生产已经取得了令人瞩目的成就(吕春茂等2007)。然而,刺葡萄的细胞培养还处在愈伤组织诱导、原生质体分离与培养等阶段(刘金亮等2005; 吕长平等2005; 石雪晖等2005; 廖文雪等2009)。要开展刺葡萄细胞培养进行天然产物的生产,亟待解决刺葡萄优良细胞系的筛选、长期继代保持和悬浮细胞系建立等诸多问题。本研究以刺葡萄幼胚为材料,以期诱导出高质量且能长期继代保持的松散型愈伤组织,从而筛选并建立刺葡萄高效产生生物活性物质(花青素或原花青素)的细胞系,为通过刺葡萄细胞培养生产生物活性物质提供实验体系,同时也可作为刺葡萄生物技术其他方面的研究提供理想的技术平台。

## 材料与方法

### 1 材料及外植体处理

本试验所用材料为来源于福建福安溪塔葡萄沟的刺葡萄(*Vitis davidii* Foëx)幼果。取花后20 d左右的幼果,剪取整串葡萄,装入自封袋,带回实验室贮于4 °C冰箱备用。

### 2 试验方法

#### 2.1 材料的灭菌

从4 °C冰箱中取出刺葡萄幼果,去除果穗和果柄,置入加有洗涤剂的自来水中浸泡30 min,后用自来水冲洗干净,自然晾干备用。将幼果转入超净工作台内,用75%酒精(V/V)浸泡30 s内,再用0.1%升汞(W/V)溶液灭菌15 min,最后用无菌水冲洗5次,备用。

#### 2.2 幼胚获取与培养

将上述灭菌好的葡萄幼果,小心切开,取出完整的幼胚。将幼胚接种在诱导愈伤组织的培养基上培养。外植体接种后每隔2~3 d观察培养材料的污染情况、愈伤组织的诱导情况和生长状态,并作记录和数码拍照。

#### 2.3 不同配方培养基的设计

根据预实验设计不同的培养基配方,用于幼胚愈伤组织的诱导,具体的培养基配方见表1。基本培养基均为MS,各培养基中均含有6 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉,30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖,pH 5.8~6.0。

表1 愈伤组织所用培养基配方

Table 1 The culture medium formula of callus induction

培养基	2,4-D/mg·L <sup>-1</sup>	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	IBA/mg·L <sup>-1</sup>	BA/mg·L <sup>-1</sup>	KT/mg·L <sup>-1</sup>	AgNO <sub>3</sub> /mg·L <sup>-1</sup>
F1	1.0	-	-	-	-	-
F2	1.0	-	-	-	0.5	5.0
F3	-	0.2	-	2.0	-	-
F4	-	-	0.1	1.5	-	-
F5	1.0	-	-	-	0.5	-

### 2.4 愈伤组织继代增殖培养与继代增殖培养基配方优化的正交试验

刺葡萄幼胚愈伤组织诱导培养35 d左右后,挑取不同类型的愈伤组织进行继代增殖培养。继代增殖培养基配方优化采用正交设计L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>),对外源生长物质2,4-D,KT、AgNO<sub>3</sub>等3个因素在3

个水平上进行试验,共9个处理,每处理3次重复。筛选继代培养基时,挑选增殖后松散的、生长状态良好的、淡黄色的愈伤组织为材料,接种到表2所列的9种培养基中,培养25 d后观察愈伤组织的生长情况。愈伤组织在9个培养基中的生长情况采用愈伤组织的颜色、生长状态和生长量等指标

进行赋值;用DPS软件进行数据分析。

## 2.5 筛选与继代保持

根据正交试验的结果和愈伤组织的生长情况,采用两种培养基交替继代培养,长期继代保持松散型的刺葡萄愈伤组织。从白色、淡黄色、黄色、浅紫红色、紫红色等颜色的愈伤组织中,挑选紫红色的愈伤组织进行培养,筛选出高产原花青素的刺葡萄愈伤组织细胞系,并进行继代保持。

## 2.6 培养条件

培养室温度设置在 $(25\pm 1)$  °C。愈伤组织诱导和继代保持时,都设置了一组在黑暗中培养,另一组于 $10\sim 15\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 左右的光照下培养,光照时间 $10\ \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

## 2.7 刺葡萄愈伤组织花青素含量测定

花青素提取:取刺葡萄愈伤组织DLR和DLW两个细胞系的不同培养阶段的培养物鲜样各1.0 g,用液氮研磨成粉末,转入10 mL离心管中并加入10 mL  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸乙醇溶液,在60 °C水浴中浸提30 min,4 °C下 $2\ 500\times\text{g}$ 离心5 min,取上清液转入50 mL的试管中,沉淀再次加入10 mL  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸乙醇溶液,按上述方法重复提取一次,最后合并上清液,备用。试验设3次重复。

花青素测定与计算:以 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸乙醇溶液做空白对照,利用Varian Cary 50 Probe紫外可见分光光度计测定花青素提取液在530、620和650 nm波长下的吸光值,并用Greay公式 $OD_{\lambda}=(OD_{530}-OD_{620})-0.1\times(OD_{650}-OD_{620})$ ,准确计算出花青素的吸光值。花青素含量按下列公式计算:花青素含量 $[\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})]=OD/\varepsilon\times V/m\times M\times 10^3$ ,其中 $OD_{\lambda}$ 为花青素吸光值, $\varepsilon$ 为花青素摩尔消光系数 $4.62\times 10^4$ , $V$ 为提取液总体积(mL), $m$ 为取样质量(g), $M$ 为花青素摩尔分子量287.24, $10^3$ 为计算结果换算成 $\mu\text{g}$ 的倍数(马志本等1984)。

## 2.8 刺葡萄愈伤组织原花青素含量测定

刺葡萄原花青素含量测定采用正丁醇-盐酸法(董瑞霞等2008)。

原花青素提取:取刺葡萄愈伤组织DLR和DLW两个细胞系的不同培养阶段的培养物鲜样各1.0 g,用液氮研磨成粉末,转入10 mL离心管中并加入10 mL 80%甲醇,于50 °C水浴中浸提1 h,4 °C下 $2\ 500\times\text{g}$ 离心5 min,取上清液转入50 mL的试管

中,沉淀再次加入10 mL 80%甲醇,按上述方法重复提取一次,最后合并上清液,备用。试验设3次重复。

标准曲线绘制:准确称取20.00 mg原花青素标准样品,加入1 mL 80%甲醇溶解,所得浓度为 $20.00\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作标样。精确吸取标样溶液0、5、10、15、20、25和30  $\mu\text{L}$ 分别于25 mL具塞试管中,加80%甲醇定容至3 mL,然后分别加入0.2 mL 2%  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 溶液( $W/V$ )和6 mL盐酸正丁醇溶液(正丁醇:浓盐酸=19:1),盖塞,摇匀,于95 °C水浴中加热反应40 min后,取出用冷水迅速冷却,以0  $\mu\text{L}$ 溶液作为空白对照,利用Varian Cary 50 Probe紫外可见分光光度计,于546 nm处测定其吸光值。采用最小二乘法作原花青素浓度( $C$ )与吸光值( $A$ )线性回归方程。

样品原花青素测定:分别精确吸取3 mL原花青素提取液,按标准曲线的方法进行操作,测定各提取液的吸光值,然后根据标准曲线回归方程计算出各样品中原花青素的含量。

## 实验结果

### 1 刺葡萄幼胚愈伤组织诱导

#### 1.1 不同接种方式和培养条件对愈伤组织诱导的影响

刺葡萄幼胚诱导愈伤组织时,采用两种方式接种,一种是将胚轴端插入F1培养基中,另一种是将幼胚平放在F1培养基上,并略微下压,于黑暗下培养。培养30 d后观察两种接种方式对刺葡萄幼胚愈伤组织诱导的影响。结果表明,完整的幼胚,诱导愈伤组织时,胚轴会伸出种皮,并形成愈伤组织;将胚轴端插入培养基的接种方式,形成的愈伤组织数量极少,培养一段时间后会褐变死亡(图1-A)。采用平放的接种方式,并分别在光照和黑暗下培养;在黑暗下培养的幼胚,下胚轴冲破种皮后产生愈伤组织,愈伤组织不断膨大,最终会长到约1.5 cm见方,愈伤组织有松软状(DF1)、松脆状(DF2)、棉絮状(DF3)、坚硬状(DF4)等4种状态,颜色有白色、淡黄色、浅红紫色、红紫色等(图1-B)。光照下培养的幼胚,会逐渐转变成绿色,愈伤组织的诱导率30%左右,愈伤组织一般呈现白色或浅黄色松软状(图1-C),容易发生褐变,继代保持

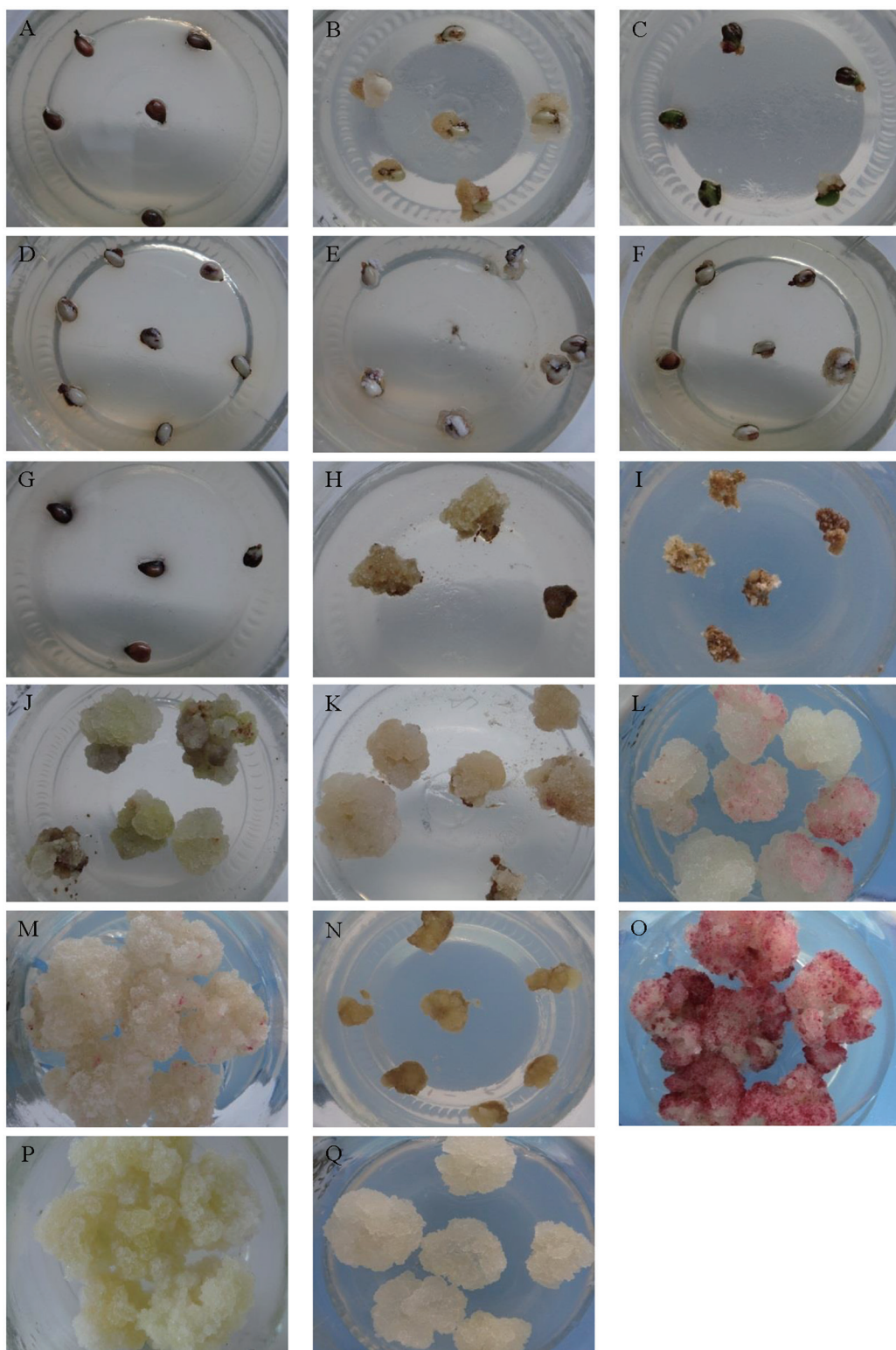


图1 刺葡萄幼胚愈伤组织诱导与继代保持

Fig.1 Callus induction from immature embryos and subculture maintenance of brier grape

A: 褐变死亡的幼胚; B: 幼胚诱导出愈伤组织; C: 愈伤组织诱导(光照); D: 切口褐变的幼胚; E: 愈伤组织诱导(F1培养基); F: 愈伤组织诱导(F2培养基); G: 愈伤组织诱导(F3培养基); H: 松软愈伤组织; I: 褐变的愈伤组织; J: 浅黄绿色松脆愈伤组织; K: 浅紫红色松脆愈伤组织; L: 紫红色松脆愈伤组织; M: 棉絮状愈伤组织; N: 坚硬状愈伤组织; O: 紫红色愈伤组织; P: 浅黄绿色愈伤组织; Q: 黄白色愈伤组织。

一段时间后褐变加重, 直至死亡。培养的时候还发现, 如果幼胚受伤, 培养中比较容易褐变, 但在切口处可见少量愈伤组织产生(图1-D)。

### 1.2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

将刺葡萄幼胚接种到F1~F5等5种培养基中诱导愈伤组织。从诱导的效果看, F1和F5两种培养基诱导的效果比较一致, 诱导30 d后会形成大量的愈伤组织, 诱导率可达到80%以上(图1-E); 在F2培养基中, 诱导率只有30%左右, 并且愈伤组织的生长量很小, 呈黄褐色, 质地较坚硬(图1-F), 培养一段时间后, 愈伤组织会褐变死亡, 如果及时转接, 愈伤组织可以继代保持, 但要得到松脆状的愈伤组织, 需要较长的在不加AgNO<sub>3</sub>培养基上培养, 说明不利于刺葡萄愈伤组织的诱导; 在F3、F4培养基中, 未见刺葡萄幼胚的胚轴伸出, 幼胚会慢慢的

褐变死亡(图1-G), 这说明, BA与IBA或NAA的组合, 不适于作为刺葡萄幼胚愈伤组织诱导。综上所述, 刺葡萄幼胚诱导愈伤组织的较佳培养基是MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D或MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT。

## 2 刺葡萄愈伤组织继代保持

### 2.1 刺葡萄愈伤组织继代培养基正交试验的直观分析

在刺葡萄愈伤组织继代培养基正交试验的结果分析中, 将愈伤组织的颜色、生长状态和生长量等指标最佳的处理记为9分, 依此类推, 最差的记为1分。9个处理3次重复的分数见表2, 将其用DPS软件进行极差和方差分析, 结果见表3和表4。

从表3的极差分析和表4的方差分析结果可以看出, 培养基中2,4-D、KT和AgNO<sub>3</sub>浓度对刺葡萄

表2 刺葡萄愈伤组织继代培养基正交试验设计与试验结果

Table 2 The culture media with orthogonal experiment design for brier grape callus subculture multiplication and its test results

处理组合	2,4-D /mg·L <sup>-1</sup>	KT /mg·L <sup>-1</sup>	AgNO <sub>3</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	赋值结果			描述
				重复1	重复2	重复3	
1	0.5	0	0	5	5	5	愈伤组织淡黄色, 呈颗粒状, 生长量小
2	0.5	0.25	0.25	4	4	4	愈伤组织褐黄色, 呈颗粒状, 生长极小
3	0.5	0.5	0.5	1	1	1	愈伤组织褐色, 水渍状, 不生长最后死亡
4	1.5	0	0.25	6	7	6	愈伤组织淡黄褐色, 松散状, 生长量中等
5	1.5	0.25	0.5	2	2	3	愈伤组织黄褐色至褐色, 水渍状, 生长量小, 大部分愈伤组织死亡
6	1.5	0.5	0	9	8	8	愈伤组织淡黄色, 松散蓬松状, 生长量大
7	2.5	0	0.5	3	2	2	愈伤组织黄褐色至褐色, 水渍状, 生长量小, 大部分愈伤组织死亡
8	2.5	0.25	0	8	8	8	愈伤组织淡黄色, 蓬松状, 生长量大
9	2.5	0.5	0.25	4	3	4	愈伤组织黄褐色至褐色, 水渍状, 生长量小, 部分愈伤组织死亡

表3 正交设计试验结果的极差分析

Table 3 The range analysis of test results of orthogonal experiment design

结果	因素		
	2,4-D	KT	AgNO <sub>3</sub>
K <sub>1</sub>	30	45	64
K <sub>2</sub>	53	45	39
K <sub>3</sub>	43	36	23
k <sub>1</sub>	3.33	5.00	7.11
k <sub>2</sub>	5.89	5.00	4.33
k <sub>3</sub>	4.78	4.00	2.56
R	2.30	0.90	4.10

K<sub>i</sub>为每个因素同一水平下的试验值之和; k<sub>i</sub>为每一因素水平下的数据平均值; R为同一因素不同水平间平均值的极差。

表4 正交设计试验结果的方差分析

Table 4 The variance analysis of test results of orthogonal experiment design

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
2,4-D	29.56	2.00	14.78	99.75***	0.0001
KT	6.00	2.00	3.00	20.25**	0.0001
AgNO <sub>3</sub>	94.89	2.00	47.44	320.25***	0.0001
误差	2.67	18.00	0.15		

\*\*表示达到显著水平, \*\*\*表示达到极显著水平。

愈伤组织增殖都存在极显著影响, 同时极差R反映了每个因素对刺葡萄愈伤组织增殖的影响程度, R值越大, 表明该因素对试验结果的影响越显著, 3个因素对反应体系影响从大到小的顺序依次为

AgNO<sub>3</sub>、2,4-D、KT。通过试验处理因素各水平间差异显著性SSR检验分析,得出的刺葡萄愈伤组织增殖培养基中3个因素最佳理论反应水平组合为: 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D、0 mg·L<sup>-1</sup> KT和0 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>, 该组合没有在正交表中体现出来,但最接近分值最高的第6个处理,只是KT使用的浓度不同,前者培养基中不含有KT,而后者培养基中含有0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT。这个分析结果说明,在进行正交试验设计时,可不经直观分析,而根据试验组合中各培养物的生长情况直接对刺葡萄愈伤组织增殖培养基进行选择,也能获得较佳的培养基配方。

## 2.2 刺葡萄愈伤组织继代增殖培养方式优化

根据上述刺葡萄愈伤组织继代增殖培养基正交试验的结果,选出2个培养基配方进行优化培养试验,分别为MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D或MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT固体培养基。将DF2类型愈伤组织接种到上述两种培养基配方中,于光照条件下培养。培养25 d后观察愈伤组织的生长情况,结果表明,在两种培养基中培养的愈伤组织,生长状态基本一致,只是在后一种培养基中,愈伤组织生长更为迅速,生长量会略大于在前一种培养基培养的愈伤组织,同时愈伤组织有趋向松软状或棉絮状的情况。如果长期将刺葡萄愈伤组织继代培养在前一种培养基上,愈伤组织会慢慢转为颗粒状,并且颜色比较深黄;长期培养在后一种培养基中的愈伤组织,生长量会很大,慢慢的转为松软状或棉絮状;而采用两种培养基交替继代培养,可以长期使刺葡萄愈伤组织保持松软状的生长状态,颜色黄色或淡黄色。

## 2.3 不同状态愈伤组织对愈伤组织继代增殖的影响

将上述诱导得到的不同类型愈伤组织接种到附加1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D的MS固体培养基中培养。培养25 d后观察不同类型愈伤组织的生长情况,结果表明,松软状类型的愈伤组织(DF1,图1-H)接种培养后,生长量很小,并且会慢慢的褐变,最后出现水渍状不能再次继代(图1-I)。松脆状愈伤组织(DF2)一般呈浅黄绿色(图1-J)、浅紫红色(图1-K)或紫红色(图1-L),这类愈伤组织接种继代后能旺盛的生长,培养到25 d后生长量是接种时的10倍左右,并且可以长期继代保持;棉絮状愈伤组织(DF3,图1-M)接种到培养基后,能快速生长,愈伤组织还

是呈棉絮状,并且十分蓬松,愈伤组织体积会增大到接种时的10~15倍,这类愈伤组织也可长期继代保持;坚硬状愈伤组织(DF4,图1-N),在接种时要用解剖刀切成小块,这类愈伤组织接种后在切口处容易褐变,新长出的愈伤组织有松软状、松脆状和棉絮状。从后期培养的情况和次生代谢产物研究出发,以松脆状的愈伤组织为最佳的细胞系。

## 2.4 不同培养条件对愈伤组织继代增殖的影响

将DF2类型愈伤组织接种到F1培养基上,分别于光照和黑暗两种条件下培养。在光照条件下培养的DF2类型愈伤组织,基本与上述的生长状态一致,在颜色和质地上没有发生大的改变,一般呈紫红色(图1-O)、浅紫红色或浅黄绿色(图1-P),并可长期继代保持。在黑暗条件下培养的DF2愈伤组织,生长状态也比较良好,但生长量明显小于在光照条件下培养的愈伤组织,并且经多代培养后,愈伤组织颜色会渐渐的淡化,尤其是紫红色会逐渐变成白色、黄白色(图1-Q),但愈伤组织可长期继代保持。从以上分析可以看出,刺葡萄愈伤组织颜色的保持,要在光照的条件下培养,且愈伤组织的生长量优于黑暗培养。

## 3 刺葡萄愈伤组织高产原花青素细胞系筛选与保持

在刺葡萄愈伤组织诱导中,从获得的愈伤组织颜色来看,有白色、淡黄色、黄色、浅紫红色、紫红色等颜色。通过观察发现,刺葡萄紫红色愈伤组织只是表面一层的细胞呈紫红色,而越往里颜色越浅直至无色。培养筛选过程中发现,如果选取外层的紫红色愈伤组织作为接种材料继代,愈伤组织生长量很小,并有水渍化、褐变的现象出现,多次继代保持后,愈伤组织最终死亡。

根据上述继代增殖培养基筛选和培养方式优化的结果,结合紫红色愈伤组织的特性,在进行刺葡萄愈伤组织高产原花青素细胞系筛选时,选取质地松脆的、颜色紫红色的愈伤组织进行继代保持,接种时剥去表层紫红色的愈伤组织,选取较里层的愈伤组织进行接种,于光照条件下培养,同时采用两种培养基交替继代培养,能长期继代保持紫红色的刺葡萄愈伤组织。因此,选用合适的接种材料,采用合适的培养条件是获得刺葡萄愈伤组织高产原花青素细胞系的关键。

## 4 不同培养时间的刺葡萄愈伤组织花青素和原花青素含量变化分析

### 4.1 花青素含量变化分析

将紫红色愈伤组织细胞系(DLR)和浅黄色愈伤组织细胞系(DLW)分别接种到 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的MS固体培养基中培养, 分别于10、15、20、25、30和35 d收集其培养物。利用盐酸乙醇法分别提取其花青素, 并通过其吸光值计算出各培养物中花青素的含量, 结果如图2所示。

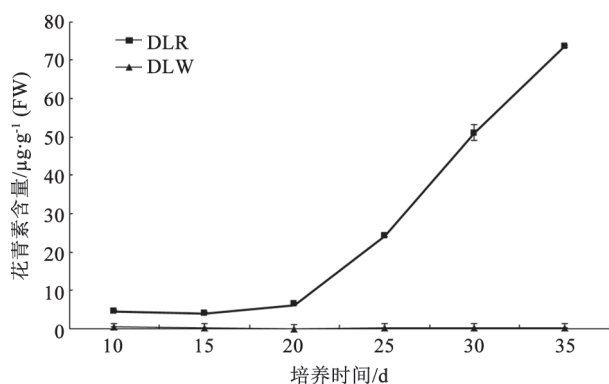


图2 不同培养时间刺葡萄愈伤组织花青素含量变化情况  
Fig.2 The content change of anthocyanosides in brier grape callus at different culture periods

从图中可以看出, DLR和DLW两个刺葡萄愈伤组织细胞系花青素含量变化存在很大差异。在整个细胞培养过程中(10~35 d), DLW细胞系花青素的含量极低, 最高也只有 $0.48 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 并且培养过程中, 其花青素含量的变化无规律。DLR细胞系花青素含量呈有规律的变化, 总体表现为先略微下降后升高, 再急剧升高的变化趋势; 培养10~20 d时含量较低, 培养15 d含量为最低, 只有 $4.17 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 而培养20 d后, 花青素含量急剧增加, 到35 d时花青素含量达到 $73.57 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)。

### 4.2 原花青素含量变化分析

以原花青素标准样品进行标准曲线绘制, 得到的原花青素浓度(C)与吸光值(A)线性回归方程为:  $A=0.0015C+0.0022$ , 相关系数 $R^2=0.9903$ , 符合试验要求。

将紫红色愈伤组织细胞系(DLR)和浅黄色愈伤组织细胞系(DLW)分别接种到 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的MS固体培养基中培养, 分别于10、15、20、

25、30和35 d收集其培养物。利用80%甲醇水浴浸提法分别提取其原花青素, 并通过其吸光值和标准曲线回归方程计算出各培养物中原花青素的含量, 结果如图3所示。

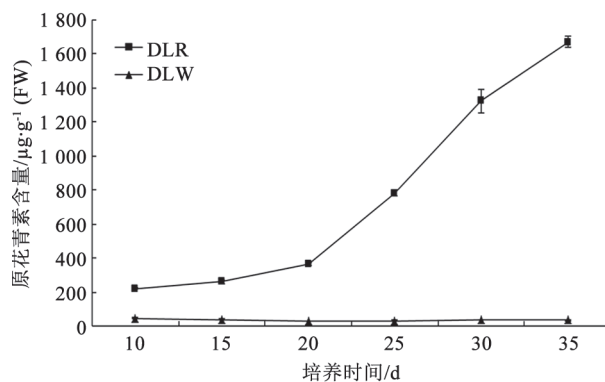


图3 不同培养时间刺葡萄愈伤组织原花青素含量变化情况  
Fig.3 The content change of oligomeric proanthocyanidins in brier grape callus at different culture periods

从图中可以看出, DLR和DLW两个刺葡萄愈伤组织细胞系原花青素含量变化也存在很大差异。在整个培养过程中, DLW细胞系原花青素含量变化不大, 并始终维持在一个很低的水平, 最高为培养10 d时, 含量为 $47.91 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)。DLR细胞系原花青素含量呈有规律变化, 整个培养过程中, 原花青素含量不断升高, 培养20 d后原花青素含量急剧升高, 这与花青素含量变化相一致, 培养到35 d时, 原花青素含量可达 $1671.16 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)。

从以上分析表明, DLW细胞系合成花青素或原花青素的量极少, 而DLR细胞系能合成较高的花青素或含量极高的原花青素, 这表明本研究中获得了高产原花青素的刺葡萄愈伤组织细胞系。

## 讨 论

在刺葡萄幼胚愈伤组织的诱导过程中, 不同培养方式和培养条件对其诱导的效果有很大的影响, 黑暗条件下并采用平放的接种方式, 可以较好的诱导出刺葡萄的愈伤组织; 采用胚轴端插入培养基的接种方式, 由于胚轴端长期浸没在培养基中, 可能使细胞在生长的过程中容易受到固体培养基的挤压, 生长量受到限制, 同时细胞生长产生的次生有害物质容易累积, 对细胞的生长产生毒

害作用, 而进一步影响愈伤组织的生长, 不利于刺葡萄幼胚诱导愈伤组织。不同种类的激素组合对愈伤组织的诱导效果不同, 本研究的结果说明刺葡萄幼胚诱导愈伤组织以生长素2,4-D为宜, 也可配合较低浓度的KT进行诱导。在长期的继代保持过程中, 为了得到旺盛生长、且生长一致的细胞系, 对愈伤组织的筛选是十分必要的, 一般是淘汰质地坚硬或松软状的愈伤组织, 而选择酥脆状愈伤组织, 这些愈伤组织可以长期继代保持。同时为了能长期保持愈伤组织的浅紫红色和紫红色, 必须在光照的条件下培养。

在刺葡萄愈伤组织的长期继代保持过程中, 研究发现要保持刺葡萄愈伤组织细胞系的旺盛生长并能长期继代保持, 必须满足其生长过程体内对激素动态平衡的需求, 这在其他植物愈伤组织组织长期继代保持过程中也有类似的发现(赖钟雄等1997; 范丽华等2012)。这种动态平衡的维持, 仅靠一种培养基配方是很难实现的, 必须在不同培养基配方中培养来获得。在本研究中, 长期培养在附加 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的MS固体培养基上的刺葡萄愈伤组织会产生较多的类型, 并且愈伤组织有呈现颗粒化的趋势, 这极不利于后期的长期继代保持; 而长期培养在附加 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D、 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  KT的MS固体培养基上的愈伤组织, 会趋向松软状或棉絮状类型的愈伤组织, 也不利于长期继代保持。因此, 本研究在试验的基础上, 将刺葡萄愈伤组织交替继代到上述两种培养基上进行培养, 可以较好的保持愈伤组织的生长状态, 达到长期继代保持的目的。

花青素属黄酮类化合物, 是植物呈色的重要色素之一(葛翠莲等2012), 而原花青素是花青素合成过程的一个分支(赵文军等2009), 是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂。由于花青素和原花青素有很强的清除自由基的能力, 保健功能突出, 越来越受到人们的重视, 对其合成和代谢的研究已经取得了一定的进展, 这也是目前研究的热点, 尤其是在分子水平上进行了大量的研究(Jaakola等2002; Bogs等2005; Almeida等2007)。而关于愈伤组织或细胞培养产生花青素或原花青素的报道还比较少见, 研究主要集中在愈伤组织培养中花青素或原花青素含量

的测定, 不同培养基中其累积量的变化, 不同来源的愈伤组织原花青素含量变化, 以及悬浮细胞培养等方面(Madhavi等1995; Feucht等1998; Zeng等2009; Gryszczyńska等2012), 这很大的原因在于没有真正建立一个生长状态良好且能长期继代保持的稳定的细胞系。本研究筛选出的两个旺盛且生长一致的刺葡萄细胞系DLR和DLW, 其中DLR细胞系表现出高产花青素和原花青素的优良特性, 这为本研究的后续研究提供了良好的实验体系。

在对DLR细胞系研究的过程中发现, 培养35 d后细胞虽然开始出现衰老, 但其原花青素的含量是最高的, 随着细胞培养时间的延长, 可能原花青素含量还会继续升高, 会达到一个最高值后再下降, 推测原花青素含量的增加与细胞的衰老存在相关性, 在后续的研究中, 将继续考察该细胞系衰老过程中原花青素的累积情况。在研究中还发现, 光照条件下, 刺葡萄紫红色愈伤组织只是表面一层的细胞呈紫红色, 而越往里颜色越浅直至无色, 基于该细胞系的特性, 为了提高细胞系花青素或原花青素的含量, 将对增加培养细胞表面积的培养方式进行研究。

在环境污染日益严重、人类面临能源危机和资源短缺的情况下, 研究与利用植物细胞培养有重大的意义, 而要达到大规模培养就首先必须采用植物悬浮细胞培养的方式。因此, 在获得刺葡萄高产原花青素细胞系DLR后, 下一步将进行其悬浮细胞培养的研究, 并对添加不同诱导子或代谢前体等方面进行研究, 以提高该细胞系原花青素的累积量, 为通过生物和工程技术方法的结合, 实现高效生产花青素或原花青素次生代谢产物的研究提供基础。DLR细胞系表现出高产花青素和原花青素的优良特性, 而DLW细胞系却具有没有或合成效率极低的特点, 对DLR细胞系花青素和原花青素代谢合成的深入研究, 并以DLW细胞系为参照, 可以避免基因型差异的影响, 直接从细胞水平上进行, 将有助于人们对花青素和原花青素合成代谢有更进一步的了解, 该方面的研究对果实着色调控和其他植物细胞次生产物的生产将提供有益的借鉴。

#### 参考文献

董瑞霞, 李立祥, 王茜, 徐瑞瑞(2008). 植物中原花青素含量测定. 茶



- 业通报, 30 (2): 67~69
- 范丽华, 赖呈纯, 谢鸿根, 余亚白(2012). 福建野生葡萄松散型愈伤组织的诱导及其继代保持. 福建农业学报, 27 (7): 711~716
- 葛翠莲, 黄春辉, 徐小彪(2012). 果实花青素生物合成研究进展. 园艺学报, 39 (9): 1655~1664
- 金燕, 石雪晖, 熊兴耀, 秦丹(2008). 刺葡萄种质资源的研究与利用现状. 中外葡萄与葡萄酒, 127 (4): 60~62, 69
- 孔庆山(2004). 中国葡萄志. 北京: 中国农业科学技术出版社, 28
- 赖钟雄, 潘良镇, 陈振光(1997). 龙眼胚性细胞系的建立与保持. 福建农业大学学报, 26 (2): 160~167
- 廖文雪, 石贵玉, 韦颖, 周影(2009). 刺葡萄愈伤组织的诱导和分化培养. 南方园艺, 20 (6): 3~6
- 刘金亮, 吕长平, 石雪晖, 徐艳, 陈冲(2005). 刺葡萄愈伤组织的分化、芽的增殖及生根培养. 作物研究, 19 (2): 106~108
- 吕春茂, 范海延, 姜河, 孟宪军(2007). 植物细胞培养技术合成次生代谢物质研究进展. 云南农业大学学报, 21 (1): 1~5
- 吕长平, 石雪晖, 徐艳, 叶云(2005). 刺葡萄原生质体分离研究. 湖南农业大学学报(自然科学版), 31 (4): 392~395
- 马志本, 程玉娥(1984). 关于苹果果实表面花青素含量的化学测定方法. 中国果树, (4): 49~51
- 石雪晖, 陈祖玉, 刘昆玉, 钟晓红, 杨国顺(2005). 野生刺葡萄果实品质及愈伤组织诱导初报. 中外葡萄与葡萄酒, (5): 4~6
- 王仁才(2006). 刺葡萄天然功效成分的提取、药理评价及果汁加工研究. 长沙: 湖南农业大学[博士论文], 1~24
- 杨敬芝, 周立新, 丁怡(2001). 刺葡萄化学成分的研究. 中国中药杂志, 26 (8): 533~555
- 赵文军, 张迪, 马丽娟, 柴友荣(2009). 原花青素的生物合成途径、功能基因和代谢工程. 植物生理学通讯, 45 (5): 509~519
- Almeida JRM, D'Amico E, Preuss A, Carbone F, Ric de Vos CH, Deiml B, Mourgues F, Perrotta G, Fischer TC, Bovy AG et al (2007). Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). Arch Biochem Biophys, 465: 61~71
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. Plant Physiol, 139: 652~663
- Donnez D, Jeandet P, Clément C, Courot E (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. Trends Biotechnol, 27 (12): 706~713
- Feucht W, Treutter D, Keukenkamp I (1998). Growth enhancement of grapevine callus by catechin on auxin-free media. Vitis, 37 (2): 67~71
- Gryszczyńska A, Krajewska-Patan A, Dreger M, Buchwald W, Pietrosiuk A, Zych M, Karasiewicz M, Bogacz A, Kujawski R, Furmanowa M et al (2012). Proanthocyanidins in *Rhodiola kirilowii* and *Rhodiola rosea* callus tissues and transformed roots - determination with UPLC-MS/MS method. Herba Polonica, 58 (4): 52~61
- Jaakola L, Määttä K, Pirttilä AM, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. Plant Physiol, 130: 729~739
- Madhavi DL, Smith MAL, Dolores Berber-Jimenez M (1995). Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait). J Food Sci, 60 (2): 351~355
- Praphasawat R, Klungsunya P, Muangman T, Laovithayangoon S, Arunpairajana V, Himakoun L (2011). Antimutagenicity and antioxidative DNA damage properties of oligomeric proanthocyanidins from thai grape seeds in TK6 cells. Asian Pac J Cancer P, 12: 1317~1321
- Thorne Research Inc (2003). Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) (monograph). Altern Med Rev, 8 (4): 442~450
- Zeng FS, Wang WW, Zhan YG, Xin Y (2009). Establishment of the callus and cell suspension culture of *Elaeagnus angustifolia* for the production of condensed tannins. Afr J Biotechnol, 8 (19): 5005~5010
- Zi S-X, Ma H-J, Li Y, Liu W, Yang Q-Q, Zhao G, Lian S (2009). Oligomeric proanthocyanidins from grape seeds effectively inhibit ultraviolet-induced melanogenesis of human melanocytes *in vitro*. Intern J Mol Med, 23: 197~204