

植物组培材料酚类物质 HPLC 特性及其与褐变的关系*

姚洪军, 罗晓芳

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 该文研究了阿月浑子、枣树和红地球葡萄2年生叶片与组织培养苗叶片、愈伤组织酚类物质含量的变化并对其进行了HPLC分离特性的研究。结果表明:酚类物质的含量与组织培养过程中外植体的褐变有一定的正相关性,愈伤组织酚类物质含量普遍高于相应的组培苗叶片,酚类物质是促使愈伤组织易于褐变的主要原因之一。邻苯二酚类的酚类化合物是植物材料发生褐变的主要底物。

关键词: 组织培养; 酚类物质; HPLC; 褐变

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3575(2007)02-0111-03

HPLC CHARACTERISTIC OF PHENOL CONTENTS EXTRACTED
FROM DIFFERENT MATERIAL OF TISSUE CULTURE
AND ITS RELATIVITY WITH BROWNING

YAO Hong-jun, LUO Xiao-fang

(College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The regulation of phenol contents and its HPLC characteristic of *Zizyphus jujuba* Mill, *Vitis vinifera* L. and *Pistacia vera* L. were studied. The results showed that: phenol contents have interrelation with browning. The phenol content in callus is higher than that of their shoot and this is the reason why callus is easy browning. Catechol is one of the substrate of plant material browning.

Key words: Key words; tissue culture; phenol contents; HPLC; browning

褐变现象主要是由多酚氧化酶作用于天然底物酚类物质而引起的^[1]。罗晓芳等^[2-4]研究发现,果实内总酚含量与其褐变密切相关。Maira 和 Halevy^[5]进行花卉(*Strelizia. reginae* L)组培时发现酚类物质的含量与其褐变率成正相关,与成活率成负相关。研究表明^[6-9]褐变的底物是以绿原酸为主的酚类物质,组织培养过程中的褐变现象已经成为影响组培成功的重要因素。因此,研究不同种植物实生苗与组培苗总酚含量的变化规律,对提高组织培养的成功率,更大程度地发挥组织培养在生产和生活中的作用有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所选用的材料是北京林业大学良种繁育中心组织培养成功的苹果枣(*Zizyphus jujuba* Mill)、红

地球葡萄(*Vitis vinifera* L.)、阿月浑子(*Pistacia vera* L.)3个品种的瓶苗、愈伤组织与其2年生实生苗。罗晓芳等^[2]研究发现它们的褐变程度为阿月浑子>苹果枣>红地球葡萄。供试材料的组织培养苗及其愈伤组织为同步培养、接种和培养条件一致。取材方法为随机取样和混合采样,即先在组培室内的培养材料中随机取3瓶,测定时在3瓶中进行混合取样,每个品种重复3次。

1.2 方法

1.2.1 总酚含量的测定 参考李焕秀^[10]的研究方法,进行改进。取2年生阿月浑子、苹果枣、红地球葡萄叶片洗净、擦干、剪碎后在分析天平上精确各称取3份。将上述材料用50%的乙醇盐酸溶液(pH=3.0)作浸提液进行研磨浸提。充分提取后过滤在容量瓶中定容,适当稀释后,在岛津UV-120型分光光度计上读取光密度值。检测波长为270nm。以提取

* 收稿日期: 2006-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570580)

作者简介: 姚洪军(1973—),男,理学博士,讲师,主要从事植物组培与光合生理研究。

液为空白。以邻苯二酚作标准曲线,计算每克鲜样中含酚类物质的 mg 数。同时取培养时间相同的阿月浑子、苹果枣、红地球葡萄 3 种材料组培苗叶片、组培苗愈伤组织重复上述试验,测定其酚类物质的含量。3 种材料的培养基分别为:阿月浑子 MS + 6 - BA6.0mg/L + NAA1.0mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 5.0g/L;苹果枣 MS + 6 - BA1.0 mg/L + IBA1.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.0 g/L;红地球葡萄 B5 + 6 - BA0.8 mg/L + IAA0.6 mg/L + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 5.0 g/L。3 者 pH 值均为 6.5。

标准曲线的测定:用提取液将分析纯的邻苯二酚配制出 0.5×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 10×10^{-6} 、 20×10^{-6} 的溶液,以提取液为空白用上述方法进行测定。绘制标准曲线,作出标准方程后,以此计算出各材料酚类物质的含量。

1.2.2 酚类物质的 HPLC 分析^[11] 酚类物质的定性分析采用 HP1100 型高压液相色谱仪。具体操作是取培养时间、培养条件相同的阿月浑子、苹果枣、红地球葡萄 3 种组培材料的叶片精确称取 1g,提取酚类物质(取材和分析方法同上),将提取液用 1:1 (V/V) 的石油醚萃取 3 次,取水相再用 1:1 (V/V) 的乙醚 (pH = 0.5) 萃取 3 次后将乙醚相减压浓缩至干,最后高压液相色谱分离。

用 3ml 50% pH = 3 的甲醇溶解、洗涤样品,苹果枣、红地球葡萄进样量各 10ml。阿月浑子进样量 1ml。

高压液相色谱条件:将充分干燥后的样品加 0.1ml 50% 甲醇溶解后进样分析。流动相:50% 甲醇;色谱柱:Li - Chrospher Si 60 担体 (5 μ m), 154mm $\times$ 4mm (i. d.);流速:1ml/min;检测器:紫外检测器,检测波长(λ)254nm;进样量:10ml。

高压液相色谱标准酚的配制及测定:取分析纯的水杨酸、焦性没食子酸、邻苯二酚、阿魏酸、香豆酸,用 50% 甲醇配制成 100×10^{-6} 的标准液,待高压液相色谱仪稳定后,各取 10ml 混合,取混合后的标样 10ml 进样分离,记录保留时间。取各标样单独进样,记录保留时间。将高压液相色谱分离后得到的图谱与标准酚的图谱相对照,根据峰的形状及保留时间可分析出材料中酚类物质的类型。

2 结果与分析

2.1 不同种植物材料酚类物质含量的变化

易于褐变的材料的实生苗叶片的酚类物质含量相对较高,如:阿月浑子 2 年生苗叶片为 259.1mg/g。不易褐变的材料的酚类物质含量相对较少,红地球

葡萄叶片的酚类物质含量为 7.480mg/g。说明外植体的褐变与其酚类物质含量有一定相关性(图 1)。

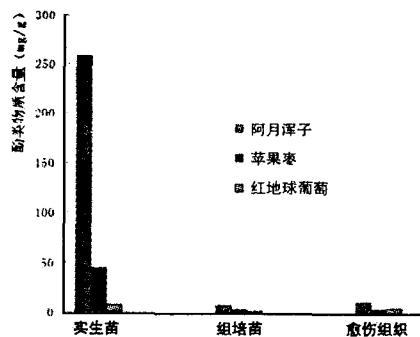


图 1 不同材料酚类物质的含量

Fig. 1 Polyphenol contents of different metrial

由图 1 还可以看出,组培苗叶片中酚类物质的含量为阿月浑子 > 苹果枣 > 红地球葡萄,与其 2 年生苗含量有一定的相似性。易褐变的阿月浑子组培苗叶片酚含量最高。3 种材料的愈伤组织中酚类物质的含量均高于相应的叶片。说明愈伤组织具有比叶片更加易于发生褐变的条件,而且愈伤组织由于比较幼嫩,其膜系统的结构不完整、不稳定、透性较强,这更加利于酚类物质外渗发生自身氧化和酶催化氧化。这有可能是在实际实验工作中愈伤组织易于褐变的原因。

2 年生苗酚类物质的含量均高于相应的组织培养苗 5 倍 ~ 20 倍,说明外植体材料中的酚类物质可以通过材料的不断幼化使其相对含量减少。对同一材料而言愈伤组织中的酚类物质的含量均比相应的叶片高,而愈伤组织是在损伤的情况下产生的,同时,损伤又是外植体材料褐变发生的关键因素。相对较高的酚类物质含量正是褐变发生的前提条件之一。

2.2 不同种培养材料酚类物质 HPLC 分析

经 HPLC 测定 5 种标准酚的分离顺序为水杨酸、焦性没食子酸、邻苯二酚、阿魏酸、香豆酸(图 2)。

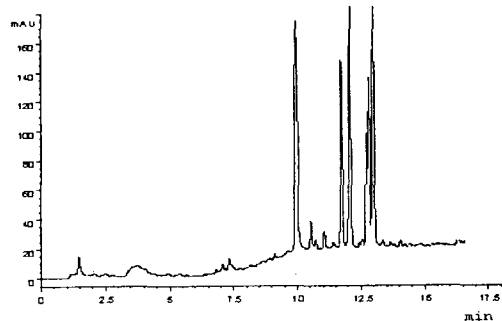


图 2 标准酚 HPLC 分离图

Fig. 2 HPLC separation of criteria phenol

(图中出峰顺序依次是水杨酸、焦性没食子酸、邻苯二酚、阿

魏酸、香豆酸)

通过对各标准酚的 HPLC 测定,得到了各自的保留时间。在相同的条件下,对经过萃取提纯的样品进行 HPLC 分离后得到了各自峰(图3)。阿月浑子仅有2个峰,其保留时间与焦性没食子酸和邻苯二酚一致,其中邻苯二酚峰面积较大。苹果枣有焦性没食子酸、邻苯二酚、阿魏酸3种标样所对应的峰,其邻苯二酚峰面积也比其它两者大。红地球葡萄得到了4个峰,分别与焦性没食子酸、邻苯二酚、阿魏酸、香豆酸相对应。其中以邻苯二酚峰面积最大,其它3个峰面积较小。

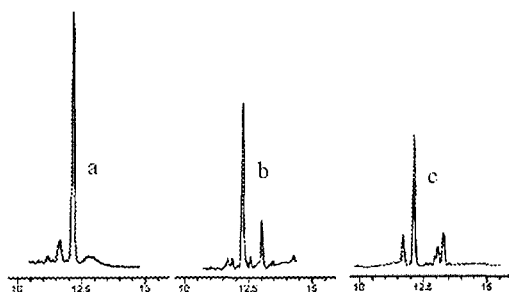


图3 阿月浑子(a)、苹果枣(b)、
红地球葡萄(c)酚类物质 HPLC 分离

Fig.3 HPLC separation of phenol extracted from
Pistacia vera L. (a), *Zizyphus jujuba* Mill (b)
and *Vitis vinifera* L. (c)

3种材料经提取、萃取、HPLC 分离后都得到与邻苯二酚同一类型的酚类物质,这种类型的酚可能就是褐变发生的底物。并且从峰的相对面积也可以看出,酚类物质的相对含量是:阿月浑子>苹果枣>红地球葡萄。

3 结论与讨论

由以上研究可知,酚类物质含量与褐变呈正相关性,酚类物质含量较高,相应的外植体材料也较容易发生褐变,而且酚类物质含量特别高的外植体材料的褐变现象是难以防止和克服的。含酚较高的外

植体材料可以通过对其不断的幼化,减少酚类物质的相对含量,提高组织培养的成功率。

在不同材料酚类物质的 HPLC 分析中均检测到有较高含量的邻苯二酚类型的酚类化合物的存在。因此,可以认为邻苯二酚类的酚类化合物是植物材料发生褐变的主要底物之一。

参 考 文 献:

- [1] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78~84.
- [2] 罗晓芳,田砚亭,姚洪军. 组织培养过程中 PPO 活性和总酚含量的研究[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1): 92~95.
- [3] 鞠志国. 酚类物质与梨果实品质的研究进展[J]. 莱阳农学院学报, 1988, 5(3): 59~65.
- [4] 鞠志国. PPO 及其底物对梨组织褐变的影响[J]. 莱阳农学院学报, 1987, 2: 42~47.
- [5] Mager A M., Harel. Polyphenol oxidases in plants[J]. Phytochemistry, 1979, 18: 193~215.
- [6] 胡彦,赵艳. 植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2004, 32(Sup.): 130~134.
- [7] 尚旭岚,张健,夏晗. 鹤望兰组织培养的褐变因素及防止措施[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(3): 247~250.
- [8] 吴永英,张喜林,高兴武,等. 甜菜组织培养中外植体褐变影响因素的研究[J]. 中国甜菜糖业, 2004, 1: 17~20.
- [9] 李焕秀,王乔春,李春秀. 梨芽和茎尖多酚氧化酶活性和总酚含量的初步研究[J]. 四川农业大学学报, 1994, 2(2): 218~222.
- [10] 陈秀芳,王坤范. 桃果实发育中褐变因子变化规律的研究[J]. 园艺学报, 1995, 22(3): 230~234.
- [11] Bouga JM and Durzan DJ. Tissue Culture in Forestry. 1982, The Hadue, Boston, London, 158~181.