

柑橘胚性愈伤组织总多酚含量影响因素的研究

段艳欣^{1,2}, 郭文武^{1*}

(1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109)

摘要: 研究了甲醇水溶液浓度和浸提时间、品种/基因型、培养时间对柑橘胚性愈伤组织总多酚含量的影响。结果表明,用40%的甲醇溶液在55℃水浴条件下浸提30 min,柑橘胚性愈伤组织总多酚的得率最高;总多酚含量受品种/基因型的影响,在所比较的6个柑橘品种/基因型暗柳橙、椪柑、默科特橘橙、无酸甜橙、锦橙和红马叙葡萄柚中,暗柳橙胚性愈伤组织的总多酚含量最高;总多酚含量随培养时间的改变而变化,在培养40 d时各品种/基因型胚性愈伤组织的总多酚含量均达到最大值。

关键词: 总多酚; Folin-Ciocalteu(福林酚)法; 柑橘胚性愈伤组织; 基因型

中图分类号: S666; Q945

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2010)01-0105-04

Study on Factors Influencing Total Polyphenol Content in *Citrus* Embryogenic Calli

DUAN Yan-Xin^{1,2}, GUO Wen-Wu^{1*}

(1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Landscape and Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: The influences of methanol/water solution, extracting time, cultivar/genotype, and culturing days on extraction of total polyphenols in citrus embryogenic calli were studied. The results showed that the highest production of total polyphenols was obtained when citrus calli were homogenized with 40% methanol and incubated at 55℃ for 30 min. Total polyphenol content was cultivar/genotype dependent and highest in 'Anliucheng' sweet orange compared with that in 'Jincheng', 'Succari' sweet orange, 'Ponkan' tangerine, 'Murcutt' hybrid, and 'Red Marsh' grapefruit. In addition, total polyphenol content was changed with culturing days, and the highest production of total polyphenols was obtained in citrus calli 40 d after culturing.

Key words: Total polyphenols; Folin-Ciocalteu; Citrus embryogenic callus; Genotype

多酚(polyphenols)又名单宁、鞣质,广义的多酚物质是羟基直接连接在芳环上的酚类及其聚合物的总称。多酚物质具有多种生物活性功能(抗氧化性、消除体内自由基、抑菌等)以及药理作用(抗衰老、降血脂、降血压、预防心血管疾病、抗癌防癌等),在油脂、食品、医药、日化生产等领域具有广阔的应用前景^[1]。已知柑橘果实中富含酚类物质^[2,3],但取材受限制。而柑橘胚性愈伤组织取材不受时间和季节的限制,且繁殖系数高。因此,是分

离次生代谢产物的良好试材,然而有关这方面的研究未见报道。笔者以柑橘胚性愈伤组织为材料,对总多酚的提取条件进行了探索,从品种/基因型及不同培养时间对总多酚含量的影响进行了研究,以期对柑橘胚性愈伤组织生产多酚提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

不同品种/基因型的柑橘胚性愈伤组织,均放在

收稿日期:2009-03-09,修回日期:2009-06-03。

基金项目:农业部行业公益项目(200903044-3)资助。

作者简介:段艳欣(1978-),女,博士,讲师,从事果树基因工程研究(Email: duanyanxin@yahoo.com.cn);郭文武(1970-),男,博士生导师,教授,主要从事细胞工程与分子育种研究。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: guoww@mail.hzau.edu.cn)。

附加蔗糖(40 g/L)的 MT^[4] 固体培养基上培养, 30 d 左右继代一次。

1.2 总多酚的提取及含量测定

总多酚提取用甲醇水溶液浸提法^[5]: 取培养 20 d (对数生长中后期) 的新鲜柑橘胚性愈伤组织 0.4 g 装于 10 mL 离心管中, 用玻璃棒磨碎, 加入 5 mL 甲醇浸提液(浸提液浓度设 3 个梯度, 分别为 40%、50%、60%), 于 55℃ 水浴浸提一段时间(设 3 个处理时间: 30、60、90 min)。浸提完毕后, 于 2000 r/min 离心 10 min, 获得总多酚粗提液。每处理进行 3 次重复。总多酚含量测定方法采用 Folin-Ciocalteu (福林酚) 法^[6,7], 取 1 mL 总多酚提取液, 按下述标准曲线制备条件进行显色反应, 测定其吸光值, 再由标准曲线方程计算原料中总多酚的含量。

标准溶液: 精确称取没食子酸 10 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 浓度为 0.10 mg/mL。

一元线性回归方程: 用移液器准确吸取没食子酸标准液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 置于 10 mL 的离心管中, 加水至总体积为 2 mL, 再加入福林酚试剂 0.5 mL, 然后加入 7.5% 的 Na₂CO₃ 溶液 0.5 mL, 充分混匀后, 室温反应 1 h, 在紫外分光光度计 765 nm 处测定吸光度值(A), 以水为对照。用 SAS 软件分析测定值, 以没食子酸标准液的浓度为 X 值, 以其吸光度值为 Y 值, 获得一元线性回归方程。

总多酚含量计算: 将所得的吸光值代入上述一元线性方程, 计算柑橘胚性愈伤组织的总多酚含量。

6 种不同种类的柑橘(包括暗柳橙、椪柑、默科特橘橙、无酸甜橙、锦橙和红马叙葡萄柚)胚性愈伤组织的总多酚提取和含量计算按照上述方式进行。

1.3 不同培养天数柑橘胚性愈伤组织的总多酚含量变化

以暗柳橙、无酸甜橙、锦橙和红马叙葡萄柚的胚性愈伤组织为材料, 在附加蔗糖(40 g/L)的 MT 固体培养基上培养 20、30、40、50 d 后, 分别提取其总多酚并进行含量测定。

2 结果与分析

2.1 一元线性回归方程的获得

分别移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的没食子酸标准品溶液于 5 mL 试管中, 加入 0.5 mL 的 Folin-Ciocalteu 显色剂, 然后加入 0.5 mL 7.5% 的 Na₂CO₃ 溶液, 用水稀释到 3 mL, 水为对照, 用 1 cm 的比色皿在 765 nm 处测定吸光度值。将标准品浓度(X)和吸光值(Y)进行线性回归, 求得回归方程和相关系数分别为:

$$Y = 0.04967 + 0.03172X \quad (r^2 = 0.9972)$$

结果表明, 没食子酸浓度在 0.006 ~ 0.03 mg/mL 范围内与吸光度值有良好的线性关系。

2.2 不同浸提条件对总多酚提取的影响

采用正交设计, 浸提柑橘胚性愈伤组织的总多酚并测定其含量。结果表明浸提时间与浸提液浓度影响浸提效果(见表 1)。当浸提液浓度为 40% 时, 在设定的 3 个浸提时间范围内, 所得的多

表 1 总多酚浸提条件的正交设计 L₉(3³) (波长: 765 nm)
Table 1 Orthogonal design of total polyphenol extraction combinations L₉(3³) (wave length: 765 nm)

处理 Treatment	浸提时间 (min) Extracting time	浸提液浓度 (%) Concentration of extracting buffer	浸提量* (μg/g FW) Extracted total polyphenols	差异显著性** Significance level
1	30	40	545.2 ± 22.3	a
2	30	50	479.32 ± 19.6	b
3	30	60	411.53 ± 21.83	de
4	60	40	449.72 ± 20.39	bc
5	60	50	439.22 ± 18.96	cd
6	60	60	401.98 ± 15.44	e
7	90	40	446.85 ± 19.28	c
8	90	50	229.16 ± 10.37	g
9	90	60	308.41 ± 11.61	f

* 每克愈伤组织中总多酚物质的含量(由没食子酸 765 nm 的标准曲线计算而来); ** 表示 5% 的差异显著水平。

* Values of extracted polyphenols are calculated with equation at 765 nm; ** Small letters indicates 5% significant level.

酚含量均高于其他两个浓度的处理。因此,确定40%的甲醇溶液适用于柑橘愈伤组织总多酚的提取。用40%的甲醇溶液浸提不同时间时,结果表明浸提30 min可以提取到较高含量的总多酚,浸提时间为60或90 min时所得总多酚含量较低。

2.3 柑橘胚性愈伤组织总多酚含量受品种/基因型的影响

取培养20 d的6种柑橘的胚性愈伤组织0.4 g,用于提取总多酚,获得柑橘胚性愈伤组织总多酚含量在98.9~310.4 $\mu\text{g/g}$ FW之间(见图1)。由图1可以看出,不同种类柑橘之间(无酸甜橙与桄柑、葡萄柚等)总多酚含量不同,同一种类柑橘(甜橙)不同品种之间,如暗柳橙、无酸甜橙和锦橙,其总多酚含量也不同。其中,暗柳橙的总多酚含量最高,其次是桄柑、无酸甜橙、默科特橘橙、红马叙葡萄柚和锦橙,表明柑橘胚性愈伤组织的总多酚含量受品种/基因型影响。

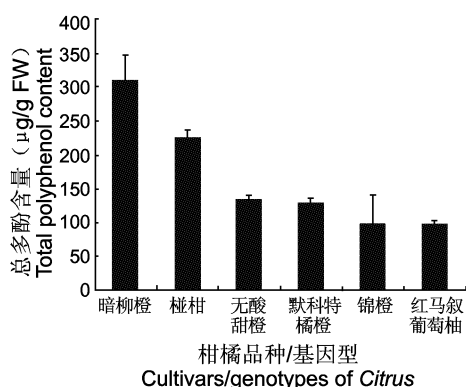


图1 不同柑橘胚性愈伤组织的总多酚含量
Fig.1 Total polyphenol content in different citrus embryogenic calli

2.4 培养时间影响柑橘胚性愈伤组织的总多酚含量

以暗柳橙、锦橙、红马叙葡萄柚和无酸甜橙为材料,分别培养20、30、40、50 d后测其总多酚含量。结果表明,在培养20~50 d范围内,不同品种/基因型柑橘胚性愈伤组织中的总多酚含量均呈现先下降后上升然后再下降的趋势,在培养40 d时各胚性愈伤组织的总多酚含量均达最高值。锦橙和红马叙葡萄柚的胚性愈伤组织在培养过程中,其总多酚含量变化幅度较小,而暗柳橙和无酸甜橙的变化幅度较大(图2)。

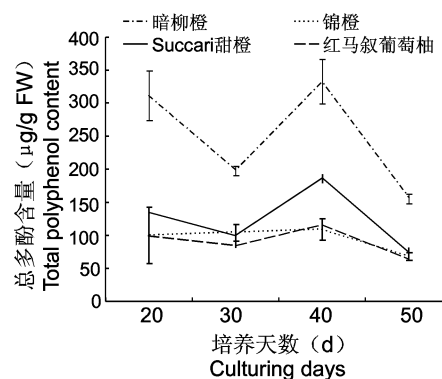


图2 不同培养时间柑橘胚性愈伤组织的总多酚含量变化
Fig.2 Changes of total polyphenol content in citrus embryogenic calli at different culturing days

3 讨论

笔者采用甲醇溶液浸提法提取了柑橘胚性愈伤组织的总多酚类物质,发现在55℃水浴中用40%的甲醇浸提液浸提30 min所得总多酚含量最高。在所分析的6个柑橘品种/基因型的胚性愈伤组织中,总多酚含量在98.9~310.4 $\mu\text{g/g}$ FW之间,虽然比前人报道的甜橙果皮及果肉中的含量^[5,8]偏低,但由于其取材方便的原因,仍可作为生产多酚的来源。同时,比较了不同种类及同一种类不同柑橘品种/基因型愈伤组织之间的总多酚含量,结果表明不同种类柑橘愈伤组织中总多酚含量不同,同一种类不同品种间也有差异,说明柑橘愈伤组织总多酚含量受品种/基因型影响,可选取总多酚含量高的品种作为生产多酚的材料来源。前人研究结果表明,多酚类物质含量与组织的褐化有关^[6,9],而柑橘胚性愈伤组织继代培养过程中,会发生不同程度的褐化,推测与多酚类物质含量有关。此外,多酚物质与植物的阶段转变密切相关,可作为阶段转变的定性标记^[10-12]。本研究结果表明,同一柑橘胚性愈伤组织的总多酚含量随培养时间的改变而变化,与前人结果一致,但多酚的具体种类有待进一步研究。该研究结果为利用柑橘愈伤组织生产多酚类物质奠定了基础,并为研究酚类物质在柑橘愈伤组织中的代谢提供了参考。

参考文献:

- [1] 李妍,刘学铭,刘吉平,唐翠明,王振江,陈智毅,肖更生. 不同桑果品种桑椹成熟过程中非花青素酚类物质的含量变化[J]. 蚕业科学,2008,34(4): 711 - 717.

- [2] Peleg H, Naim M, Rouseff R L, Zehavi U. Distribution of bound and free phenolic acid in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*) [J]. *J Sci Food Agric*, 1991, 57: 417–426.
- [3] Belitz H D, Grosch W. Fruits and Fruit Products, in Food Chemistry [M]. Springer, Berlin; Hadziyev D. 1999: 748–799.
- [4] Murashige T, Tucker D P H. Growth factor requirements of citrus tissue culture [J]. *Proc 1st Int Citrus Symp*, 1969, 3: 1155–1161.
- [5] Gorinstein S, Haruenkit R, Park Y S, Jung S T, Zachwieja Z, Jastrzebski Z, Katrich E, Trakhtenberg S, Martin O. Belloso bioactive compounds and antioxidant potential in fresh and dried Jaffa sweeties, a new kind of citrus fruit [J]. *J Sci Food Agric*, 2004, 84: 1459–1463.
- [6] Rocha A M C N, de Moraes A M M B. Polyphenoloxidase activity of minimally processed 'Jonagored' apples (*Malus domestica*) [J]. *J Food Processing and Preservation*, 2005, 29: 8–19.
- [7] Singleton V L, Rossi Jr J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents [J]. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16: 144–158.
- [8] Moussaid M, Caillet S, Nketsia-Tabiri J, Boubekri C, Lacroix M. Phenolic compounds and the colour of oranges subjected to a combination treatment of waxing and irradiation [J]. *J Sci Food Agric*, 2004, 84: 1625–1631.
- [9] Coseteng M Y, Lee C Y. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning [J]. *J Food Sci*, 1987, 52: 985–989.
- [10] Claudot A C, Drouet A, Jay-Allemand C. Tissue distribution of phenolic compounds in annual shoots from adult and rejuvenated hybrid walnut trees [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1992, 30: 565–572.
- [11] Fernandez-Lorenzo J L, Rigueiro A, Ballester A. Polyphenols as potential markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures [J]. *Tree Physiol*, 1999, 19: 461–466.
- [12] 刘国俭, 陈东玫, 李春敏, 赵永波, 王广鹏, 常瑞峰, 张新忠. 苹果实生树阶段转变过程中内源多酚含量的动态变化 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(6): 126–130.