

蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD和PAL的关系

许传俊^{1,2} 李玲^{1*}

(¹华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东广州 510631; ²福建省亚热带植物研究所, 福建厦门 361006)

摘要: 蝴蝶兰外植体在褐变发生前期 PPO 和 POD 活力皆升高, 褐变发生后酶活力下降。同工酶谱分析发现, 培养 0 d 的蝴蝶兰外植体 PPO 没有酶带出现, 而 POD 有 1 条弱带。离体培养 2 d POD 出现 3 条酶带, 第 4 天有新酶带发生, 随后消失, 其余 3 条带, 随培养天数的延长, 酶带活性渐弱。PPO 同工酶谱在培养 2 d 出现 3 条酶带, 迁移率为 0.28 的酶带在培养 4 d 活性较强, 随后 3 条酶带减弱。总酚含量和 PAL 活力随外植体褐变增强而逐渐增加, 两者呈现极显著正相关。

关键词: 蝴蝶兰; PPO; POD; PAL; 外植体褐变; 总酚

中图分类号: S 682.31 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0671-04

Changes of Total Phenol Content and the Activities of PPO, POD and PAL during the Browning in *Phalaenopsis* Explant in Vitro

Xu Chuanjun^{1,2} and Li Ling^{1*}

(¹College of Life Science, South China Normal University, Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou, Guangdong 510631, China; ²Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian 361006, China)

Abstract: In the early stage of *Phalaenopsis* explant browning, the activities of PPO and POD increased, while in the later stage, their activities declined. The PPO and POD isoenzyme showed that no PPO band appeared in 0 day culture, while a weak band of POD appeared. After 2 days culture, there were three bands of POD appeared, and the band appeared after cultured for 4 days and dispersed in another day; and three bands of PPO isoenzyme in browning cell appeared and the band had a higher activity when cultured for 4 days, the activities of PPO and POD declined with the culture extension. As explant turned black, the content of total phenol compounds and the activity of PAL increased and there was an extremely positive correlation between them.

Key words: *Phalaenopsis*; PPO; POD; PAL; Explant browning; Total phenol content

1 目的、材料与方法

外植体褐变是植物组织培养中遇到的重要问题, 一般认为酚类物质是外植体酶促褐变的反应中的底物, 其含量与外植体褐变密切相关^[1], 多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 是催化褐变反应的关键酶^[2], 过氧化物酶 (peroxidase, POD) 是植物防御中的第一道防线, 有报道说 POD 和 PPO 共同氧化酚成醌, 醌转变成缩合型鞣质, 最后形成褐色的聚合物^[3]。关于酚和 PPO 在植物组织 (如果实等) 褐变中的关系报道较多, 对在离体培养组织发生褐变时酚与 PAL 之间的关系, 以及外植体褐变发生过程中 PPO 和 POD 同工酶谱变化与褐变之间的关系尚未有研究。作者研究蝴蝶兰外植体褐变发生过程中 PPO 和 POD 活力及其同工酶谱的变化, 探讨总酚含量和 PAL 活力与褐变发生的相关性, 为全面了解离体培养组织发生褐变的机理提供基础。

收稿日期: 2005-05-18; 修回日期: 2005-09-07

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (05300272); 广东省科技计划项目 (2005B20901019)

* 通讯作者 Author for correspondence

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*), 取自华南师范大学生物园, 取其第 2 和第 3 片叶的上半部接种。在 MS + 3 mg/L 6-BA 培养基上、(24 ± 2)、光照 16 h/d、2 000 lx 条件下培养。培养 5 d 外植体开始出现褐变, 14 d 外植体已经全部褐变。随机取蝴蝶兰离体培养 0 ~ 14 d 外植体, 测定 PPO 活性^[1]、总酚含量^[1]、POD 活性^[4]和 PAL 活性^[5], 重复 3 次。以培养 0 d 的外植体为对照。PPO 和 POD 同工酶谱分析参照薛俊杰等^[6]的方法。

数据采用 SPSS “One - Way ANOVA” 过程进行统计分析, 多重比较采用 LSD 法。

2 结果分析和讨论

2.1 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 PPO 和 POD 活力的变化

蝴蝶兰叶片外植体在 MS 培养基中培养 5 d 开始发生褐变, 分析 PPO 活力可见 (表 1), 离体培养 2 d 酶活力极显著升高, 为接种前的 7.0 倍, 4 d 与 2 d 酶活力无显著差别, 6 d 后酶活力显著下降。离体培养 2 d 外植体 POD 的活力约为对照的 7 倍, 4 d 酶活力极显著提高, 第 6 天 POD 酶活力又极显著下降, 第 8 天酶活力再次上升, 随后活力显著下降。

2.2 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 PPO 同工酶谱的变化

蝴蝶兰叶片在离体培养前 PPO 活性极低, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 不出现酶带 (图 1), 经离体培养 2 d 的外植体出现 1 条酶带, 迁移率 (Rf 值) 为 0.28 (谱带 I), 另有两条弱带隐约可见, 迁移率分别为 0.21 和 0.24 (谱带 II 和 III), 在离体培养第 4 天谱带 I 增强, 谱带 II、III 较弱。培养 6 d 后的外植体都出现 3 条酶带。

2.3 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 POD 同工酶的变化

对照样品 POD 活性较低, 经聚丙烯酰胺电泳图谱中只出现 1 条弱带, 培养 2 d 的外植体出现两条活性较强谱带即 I 带和 II 带 (图 2), 迁移率分别为 0.3 和 0.37, 有 1 条弱带 III (迁移率为 0.43); 培养第 4 天的外植体 POD 有 4 条酶带 (谱带 I、II、III 和 IV), 且活性增强, 其中谱带 I 和 II 活性较强, 酶带 III (迁移率 0.26) 新出现。培养 6 d 的同工酶谱有活性较强谱带 I、II 和 III, 谱带 IV 消失。第 8 天到第 10 天也只出现 I、II 和 III 带, 活性较强, 以后这 3 条带活性减弱。

2.4 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 PAL 活力和总酚含量变化

表 1 蝴蝶兰外植体发生褐变过程中 PPO 和 POD 活力的动态测定

培养天数 Culture days (d)	POD (U/mg)	PPO (U/mg)
0 (对照, Control)	0.54Ee	1.11Dd
2	3.73CDd	7.79ABab
4	9.39Aa	7.93ABab
6	4.41Ccd	6.82BCb
8	7.28Bb	5.5BCbc
10	4.79Cc	2.41Dd
12	3.64Dd	2.64CDcd
14	4.23CDcd	1.92Dd

注: 大写字母表示差异达极显著 ($P < 0.01$), 小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下表同。

Note: Different capital and small letters mean significance at 0.01 and 0.05 level, respectively. The same below.

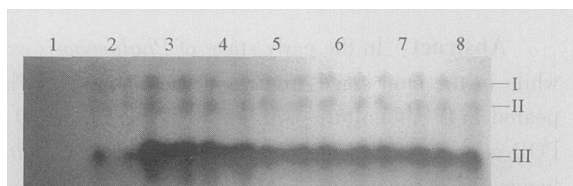


图 1 蝴蝶兰外植体褐变过程中 PPO 同工酶谱的变化

1: 对照; 2~8: 培养了 2、4、6、8、10、12、14 d 的蝴蝶兰外植体 PPO 同工酶。

Fig 1 PPO isoenzyme during *Phalaenopsis* explant browning

1: Control; 2 - 8: PPO isoenzyme of *Phalaenopsis* explants cultured for 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 days

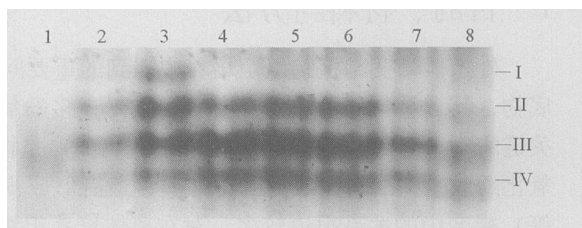


图 2 蝴蝶兰外植体褐变过程中 POD 同工酶谱的变化

1: 对照; 2~8: 培养了 2、4、6、8、10、12、14 d 的蝴蝶兰外植体 POD 的同工酶。

Fig 2 POD isoenzyme during *Phalaenopsis* explant browning

1: Control; 2 - 8: POD isoenzyme of *Phalaenopsis* explants cultured for 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 days

对照样品 PAL 酶活力很低, 检测不到 (表 2), 培养 2 d 后能检测到该酶的活力, 随着外植体开始褐变, 酶活力逐渐增强, 培养 8 d 的外植体 PAL 活力比培养 2 d 的显著增加, 12 d 和 14 d 比 2 d 和 4 d 的又为极显著或显著增强。酚含量的变化与 PAL 变化有相似的趋势, 初期总酚含量略增加, 第 6 天总酚含量比前几天显著增加, 并一直维持在较高的水平, 到第 14 天又比第 6 天极显著增加 (表 2)。

PPO 和 POD 都是植物体内参与防御反应的酶, 接种后可以发现, 蝴蝶兰外植体内 PPO 和 POD 活力都显著增加 (表 1), 褐变发生后活力开始降低; 同工酶分析也表明, 离体培养前 PPO 和 POD 几乎没有酶带出现, 活力很低; 离体培养后, PPO 和 POD 都出现新的酶带, 且活力增强; 说明接种后外植体内可能有新的 PPO 和 POD 合成。褐变发生后, PPO 和 POD 活力降低, 说明它们参与褐变的开始。而随着褐变的加重, 总酚的含量增加, 与 PAL 活力呈极显著正相关 ($r = 0.8673$, $P < 0.01$), PAL 应该与随后的褐变加重有密切的关系。

一直认为褐变与外植体材料的总酚含量关系密切^[1], 总酚含量低的材料容易成功^[7]。试验表明, 在褐变发生过程中酚类物质并没有随褐变的加重而氧化减少, 而是逐渐的增加, 与其合成酶 PAL 活性增强呈现显著的正相关, 褐变的发生可能并不只是由于酚的氧化, 而主要在于在此过程中酚类合成的增加。有试验证实, 抑制酚类的合成可以抑制褐变的发生^[8]。抑制 PAL 活性, 褐变发生也会被抑制^[8,9]。作者证实在外植体褐变中, 酚类产生鞣质^[10], 鞣质对细胞有毒害作用, 同时细胞结构被破坏 (另文发表), 代谢发生紊乱, 导致培养失败。这些结果解释了在组织培养过程中, 使用 PPO 氧化的抑制剂柠檬酸或抗坏血酸以及酚类的吸附剂如 PVP、活性炭等物质虽然在有些材料上可以成功, 但有一定局限, 不能有效的抑制褐变的原因。

参考文献:

- 1 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. 北京林业大学学报, 1999, 21 (1): 92~95
Luo X F, Tian X T, Yao H J. Polyphenol oxidase activities and phenol contents in tissue culture. Journal of Beijing Forestry University, 1999, 21 (1): 92~95 (in Chinese)
- 2 乜兰春, 孙建设, 辛 蓓, 吕新琼. 苹果果实酶促褐变底物及多酚氧化酶活性的研究. 园艺学报, 2004, 31 (4): 502~504
Nie L C, Sun J S, Xin B, Lü X Q. Studies on phenolic composition and polyphenol oxidase activity in apple fruits. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (4): 502~504 (in Chinese)
- 3 Hanna Laukkanen, Hely Hagman, Sari Kontunen-Soppela, Anja Hohtola. Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. Physiologia Plantarum, 1999, 106: 337~343
- 4 Kochba J, Lavee S, Spiegel R P. Difference in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and nonembryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. Plant Cell Physiol, 1977, 18: 463~467
- 5 Engelsma G. On the mechanism of the changes in phenylalanine ammonia-lyase activity induced by ultraviolet and blue light in germinating hypocotyls. Plant Physiol, 1974, 54 (5): 702~705
- 6 薛俊杰, 张震云, 弓春瑞, 乔文平, 邵晓军. 几种木本豆科植物的过氧化物酶和多酚氧化酶同工酶研究. 山西农业大学学报, 2000, 20 (1): 55~58
Xue J J, Zhang Z Y, Gong C R, Qiao W P, Shao X J. Studies on the peroxidase and polyphenol oxidase from Fabaceae plants. J. Shanxi Agric Univ, 2000, 20 (1): 55~58 (in Chinese)
- 7 Roussos P A, Pontikis C A. Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage in vitro. Gartenbauwissenschaft, 2001, 66 (6): 298~303
- 8 Hisaminato H, Murata M, Homma S. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce,

表 2 蝴蝶兰外植体褐变过程中 PAL 活力和总酚含量变化

Table 2 Changes in PAL activity and total phenolic content during Phalaenopsis explant browning

培养天数 Culture days (d)	PAL (U/mg)	总酚 Total phenolic (μg/mg)
0	-	11.37Dc
2	0.59Cc	15.80CDc
4	1.05BCc	15.45CDc
6	1.41ABCbc	24.05BCD b
8	2.19ABCab	36.96AB b
10	1.95ABCabc	33.54ABCb
12	3.25Aa	35.84AB b
14	2.64ABab	52.99Aa

- and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65: 1016 ~ 1021
- 9 Peiser G, López G G, Cantwell M, Saltveit M E Phenylalanine ammonia-lyase inhibitors control browning of cut lettuce Postharvest Biology and Technology, 1998, 14: 171 ~ 177
- 10 许传俊, 李 玲, 李 红, 张铭光. 蝴蝶兰褐变外植体的显微结构观察以及褐变成分的初步分析. 园艺学报, 2005, 32 (6): 1111 ~ 1113
- Xu C J, Li L, Li H, Zhang M G Preliminary studies on the elements of browning and the changes in cellular texture of leaf explant browning in *Phalaenopsis* Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (6): 1111 ~ 1113 (in Chinese)

海南钻喙兰离体繁殖及植株再生

李志英 徐 立* (中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 571737)

In Vitro Propagation and Plant Regeneration of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl) Ridl

Li Zhiying and Xu Li* (Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

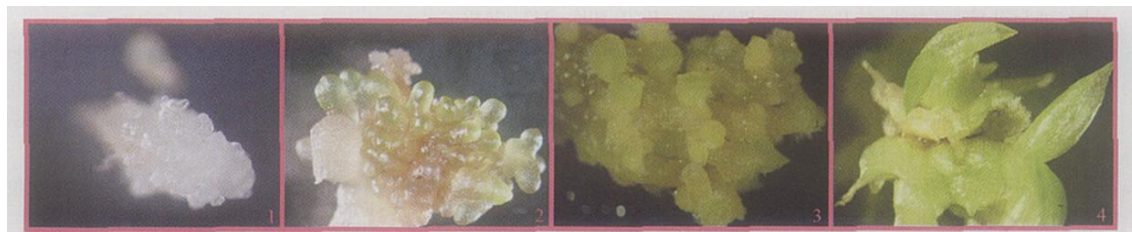
关键词: 海南钻喙兰; 类原球茎体; 植株再生

中图分类号: S 68 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0674-01

海南钻喙兰 [*Rhynchostylis gigantea* (Lindl) Ridl] 是兰科钻喙兰属植物, 为我国云南、海南特有的野生兰花品种。近年来由于无限制采挖, 海南的野生海南钻喙兰数量锐减, 严重影响了海南钻喙兰生态群的构成, 几近濒危。由于其种子在自然条件下不易萌发, 分株法繁殖速度太慢, 因此, 作者以海南钻喙兰未成熟种子为外植体, 通过类原球茎体途径, 对海南钻喙兰进行了离体快速繁殖。

分期取海南热带植物园中海南钻喙兰授粉后 90 d 的蒴果, 先用自来水冲洗表面, 然后在超净工作台用 70% 乙醇进行表面消毒 2 次, 每次 2 min, 吹干后, 小心剖开蒴果, 用镊子取出细小的种子接种在添加不同植物生长调节剂的 MS 固体培养基上。培养温度 (25 ± 2), 光照 12 h/d, 光照强度 1 000 ~ 1 500 lx。

结果表明: 未成熟种子接种到 1/2MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0 ~ 0.2 mg/L 的培养基上 40 d 开始膨大, 60 d 左右开始分化出白色愈伤组织 (图版, 1)。诱导 60 d 的愈伤组织转入添加 BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.2 ~ 2.0 mg/L 的 1/2MS 培养基上, 60 d 左右可形成指状胚状体 (图版, 2), 类似种子萌发形成的早期原球茎, 称类原球茎 (protocorm-like bodies, PLBs)。其中以 BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 对 PLBs 的诱导率最高, 为 75.7%。降低 NAA 的浓度, 胚性愈伤组织容易转绿, 形成少量类原球茎并萌发成苗; 提高 NAA 浓度, 外植体容易玻璃化。PLBs 每 50 d 转入相同的新鲜培养基可保持不断增殖的状态。PLBs 在不添加任何外源生长调节剂的培养基上培养 20 d 后, 顶部膨大并分化出子叶, 同时在膨大部位的基部分化出假根 (图版, 3), 类似种子萌发形成的原球茎; 继续培养, 可逐渐分化出真叶, 培养 60 d, 可形成具有 2 ~ 3 片真叶的不定芽, 并带有已经发育的根 (图版, 4)。分离具有 2 ~ 3 片真叶的小苗, 接种到添加 100 g/L 香蕉的 MS 培养基上培养 80 d, 即可获得叶片长 1 ~ 2 cm, 根长 0.5 ~ 1 cm 的健壮植株。离体培养的海南钻喙兰植株洗净培养基, 沥干水分, 移栽到粗椰糠河沙 (1:1) 的基质中, 湿度保持 85% 左右, 适度遮荫, 成活率可达 95% 以上。该体系能够使 PLBs 在相同的培养基中不断增殖, 而多种兰花的 PLBs 均可用于基因的遗传转化, 因此, 该体系的建立不仅为海南钻喙兰的快速繁殖提供了技术参考, 也为海南钻喙兰的深入研究奠定了基础。



图版说明: 1. 胚性愈伤组织; 2. 类原球茎体; 3. 类原球茎体萌发; 4. 芽丛。

Explanation of plates: 1. Embryonic callus; 2. Protocorm-like bodies; 3. Germinated protocorms with rhizoid; 4. Shoots

收稿日期: 2005 - 12 - 08; 修回日期: 2006 - 04 - 30

基金项目: 科研院所社会公益研究专项 (2005D B4J045)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xlzy@263.net)