

蝴蝶兰组培褐变与酚酸类物质及相关酶活性的关系

印芳^{1,2}, 葛红¹, 彭克勤², 赵伶俐^{1,3}, 周玉杰¹, 李秋香¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²湖南农业大学植物激素重点实验室, 长沙 410128;

³西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】寻找与蝴蝶兰褐变相关的主要酚酸, 并了解与总酚含量及相关酶活性之间的关系。【方法】以 3 个褐变程度不同的蝴蝶兰品种 *P. 'China Best Girl'* (A1)、*P. amabilis* BL. 'Jude Butterfly' (B3) 和 *Dtps. King Shiang's Rose × Jetgreen Firbird* (R4) 为材料, 利用高效液相色谱对其进行了 9 种酚酸的定性定量分析, 并在以叶片为外植体的初代培养过程中, 研究了总酚含量、苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、多酚氧化酶 (PPO) 和过氧化物酶 (POD) 的动态变化。【结果】初步证明绿原酸、邻苯二酚、儿茶酚、咖啡酸及没食子酸、对羟基苯甲酸、香豆酸可能与蝴蝶兰褐变相关, 苯甲酸对蝴蝶兰褐变影响很小; 在褐变过程中, 褐变程度高的品种, 总酚含量也高; PAL 和 PPO 活性与褐变程度呈正相关, POD 与褐变有很大关系; 总酚含量与 PAL 活性呈正相关, 与 PPO 和 POD 活性呈负相关。【结论】初步阐明了与蝴蝶兰褐变相关的酚酸种类, 以及褐变程度与总酚含量及相关酶活性的关系。

关键词: 蝴蝶兰; 褐变; 酚酸; 总酚; 苯丙氨酸解氨酶 (PAL); 多酚氧化酶 (PPO); 过氧化物酶 (POD)

Relationship Between Tissue Browning and Phenolic Acids and Related Enzymes in *Phalaenopsis*

YIN Fang^{1,2}, GE Hong¹, PENG Ke-qin², ZHAO Ling-li^{1,3}, ZHOU Yu-jie¹, LI Qiu-xiang¹

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²Key Laboratory of Phytohormones of Hunan Agricultural University, Changsha 410128; ³Horticultural College, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to find out the main phenolic acids which related with tissue browning, and analyze the relationship between tissue browning and total phenols and related enzymes in *Phalaenopsis*. 【Method】Three varieties of *Phalaenopsis* spp. including *P. China Best Girl* (A1), *P. amabilis* BL. Jude Butterfly (B3) and *Dtps. King Shiang's Rose × Jetgreen Firbird* (R4) were used as materials, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyze phenolic acids of them qualitatively and quantitatively. And the dynamic changes of total phenolic acids contents and the activity of PAL, PPO and POD were studied. 【Result】Chlorogenic acid, catechol, catechuic acid, caffeic acid and gallic acid, p-hydroxybenzoic acid, coumaric acid correlated with browning, and the influence of benzoic acid on browning was neglectable. Total phenols, PAL and PPO were positively correlated with browning; POD played an important role in browning; content of total phenols showed a positive corelation with PAL and a negative corelation with PPO and POD. 【Conclusion】The related types of phenolic acids in browning of *Phalaenopsis*, as well as the relationship between tissue browning and phenolic acids and related enzymes are clarified preliminarily.

Key words: *Phalaenopsis*; Browning; Phenolic acid; Total phenols; Phenylalanine ammonia-lyase (PAL); Polyphenol oxidase (PPO); Peroxidase (POD)

0 引言

【研究意义】蝴蝶兰为单茎附生兰, 分株繁殖系

数很低, 组织培养为其主要的繁殖方式。褐变在蝴蝶兰组织培养快速繁殖过程中普遍存在, 严重影响外植体分化^[1]。系统研究蝴蝶兰组培褐变机理, 对于寻找

收稿日期: 2006-03-23; 接受日期: 2006-06-01

基金项目: 国家“863”项目 (2004AA241200), 国家“十五”科技攻关计划项目 (2004BA521B02)

作者简介: 印芳 (1977-), 女, 湖南常德人, 硕士, 研究方向为植物生理生化。Tel: 010-68919542; E-mail: lindar0508@126.com。通讯作者葛红 (1964-), 女, 浙江平湖, 研究员, 研究方向为花卉遗传育种与组培快繁。E-mail: gehong@mail.caas.net.cn

控制褐化的有效方法,生产高质量的蝴蝶兰种苗和产品的规模化、工厂化生产具有重要的指导意义。【前人研究进展】近年来,国内外有关专家针对蝴蝶兰组培快繁做了大量研究工作,但制约蝴蝶兰组织培养成功率和增殖率的褐化问题尚未见深入系统的研究报告。研究表明,褐变是由于酚酸类物质在多种氧化酶催化作用下形成醌类,醌类物质通过聚合作用产生有色物质而导致组织呈褐色,酶、底物和氧是引起外植体褐变的3个基本条件^[2,3]。酚类化合物是一类非常重要的植物次级代谢产物,是酶促褐变的天然底物,植物种类不一样,引起褐变的酚酸物质种类和含量不同。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是酚酸类物质合成的关键酶,多酚氧化酶(PPO)是引起酚类物质氧化的主要催化酶,过氧化物酶(POD)是植物体内一类非常重要的氧化酶,3种酶对植物组织褐变都有很重要的影响^[4,5]。

【本研究切入点】本试验以3个褐变程度不同的蝴蝶兰品种为材料,利用高效液相色谱对其进行酚酸定性、定量分析,并研究在叶片分化过程中总酚含量及相关酶活性的动态变化。【拟解决的关键问题】寻找与蝴蝶兰褐变相关的主要酚酸,并了解与总酚含量及相关酶活性之间的关系,探讨引起蝴蝶兰褐变的生理机制,为防止蝴蝶兰组培褐变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中国农业科学院蔬菜花卉研究所蝴蝶兰品种 *P. 'China Best Girl'* (A1)、*P. amabilis* BL. '*Jude Butterfly*' (B3) 和 *Dtps. King Shiang's Rose* × *Jetgreen Firbird* (R4)。在以叶片为外植体的组织培养过程中褐变程度 A1>B3>R4 (图1)。

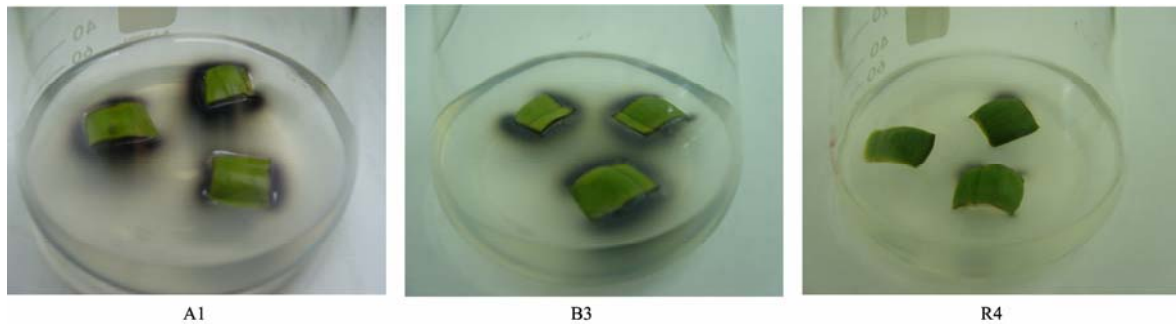


图1 培养15 d 3个品种叶片外植体的褐变情况

Fig. 1 Browning explants after 15d's inoculation of A1, B3 and R4

1.2 指标测定

1.2.1 酚酸定性定量分析 选取以上3个品种已生根未褐变组培苗,培养条件为:培养基1/2MS+IBA 0.4 mg·L⁻¹、pH 5.8、温度25℃、光照2000 lx,对第2片叶进行酚酸定性定量分析;将以上已生根的未褐变组培苗第2片叶进行愈伤组织诱导培养,组培条件为:外植体大小0.8 cm×0.8 cm,培养基MS+6-BA 3 mg·L⁻¹, pH 5.8,温度25℃,光照2000 lx,在接种后第7天外植体褐变后进行酚酸定性、定量分析。比较分析褐变前后测定酚酸的种类,找出与蝴蝶兰褐变相关的酚酸。

1.2.2 总酚及相关酶活性分析 将生根未褐变的组培苗第2片叶进行愈伤组织诱导培养,在接种后第0、2、4、6、9、14天测定外植体总酚含量和相关酶活性的动态变化。培养条件均为:外植体大小0.8 cm×0.8

cm,培养基MS+6-BA 3 mg·L⁻¹, pH 5.8,温度25℃,光照2000 lx。试验均重复3次,数据用DPS软件统计分析。

1.3 测定方法

1.3.1 酚酸的定性定量分析 参见文献[6]。仪器为Waters244型高效液相色谱仪。柱:μ-Bonkapak Phenyl (0.4 cm×30 cm);流动相:35% CH₃OH-65% H₂O (用H₃PO₄调pH 4.5);流速:1.0 ml·min⁻¹;检测器:UV254 nm×0.1 AUFS。标准溶液的配制:精密称取9种酚酸标样各0.25 g,用流动相溶解定容,浓度为1 g·L⁻¹,摇匀备用。称取2 g样品用甲醇研磨,转入三角瓶用甲醇定容至50 ml。超声波中振荡30 min。放置过夜后过滤,残渣用50%甲醇50 ml加热回流1 h,过滤,滤液浓缩至25 ml定容。将Waters公司Sep-pak C₁₈小柱用5 ml甲醇冲洗活化,再用5 ml水冲洗。吸

取 5 ml 样品提取液通过小柱，弃去最初洗出液 1 ml，再收集 2 ml 洗出液用于测定。

1.3.2 总酚测定 采用 Folin-Ciocalteu 试剂法，参考 Bonilla 等的方法^[7]。提取液为 2% HCl 甲醇（分析纯）研磨，在室温、黑暗条件下提取 24 h。12 000×g 4℃ 离心 10 min，取上清液 200 μl，加入 1.0 ml 福林-肖卡试剂（Sigma 公司产品），0.8 ml 7.5% 的碳酸钠溶液，缓慢搅拌反应 30 min 后，765 nm 处比色测定吸光度（OD 值）。以没食子酸（Sigma 公司）为标准物，步骤同上，建立标准曲线。总酚含量表示为 mg·g⁻¹ FW。

1.3.3 PAL 活性测定 参考 Solecka 和 Kacperska 的方法^[8]。酶提取液组成为：50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl: pH 8.9, 15 mmol·L⁻¹ β-巯基乙醇, 5 mmol·L⁻¹ EDTA, 5 mmol·L⁻¹ Vc, 10 μmol·L⁻¹ Leupeptin, 1 mmol·L⁻¹ PMSF, 0.15%: (W/V) PVP。酶反应液组成为：0.5 ml 酶提取液, 2.5 ml [16 mmol·L⁻¹ L-苯丙氨酸, 3.6 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ (pH 8.9) Tris-HCl]。分成两份，一份混匀加入 500 μl 6 mol·L⁻¹ HCl 后立即测定在 290 nm 处的 OD 值；另一份在 37℃ 下振荡反应 1 h 后，加入 500 μl 6 mol·L⁻¹ HCl 终止反应在 290 nm 处比色。参比为不加 L-苯丙氨酸（加入 0.5 ml ddH₂O），以加入酶液煮沸后来验证反应是由酶液引起的。OD 值每变化 0.01 就生成 1 μg 反式肉桂酸。以每小时生成的肉桂酸的量来表示酶活性，酶活性表示为：μmol·L⁻¹ cinnamic acid·mg⁻¹ protein·h⁻¹。

1.3.4 PPO 活性测定 参考朱广廉等^[9]的方法，略作改进，研磨提取液为 pH 5.8、0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液。在 UV-1601 型分光光度计上测定 525 nm 处的 OD

值。

$$\text{酶活性} = \Delta A / (0.01 \times W \times t) \times D \quad (1)$$

式 (1) 中， ΔA 为反应时间内吸光值的变化； W 为试验材料鲜重 (g)； t 为反应时间 (min)； D 为稀释倍数。酶活性单位为 U·g⁻¹·min⁻¹。

1.3.5 POD 活性测定 参考李合生等^[10]的愈创木酚法。酶提取液为 0.05 mol·L⁻¹、pH 5.5 的磷酸缓冲液。酶活性测定体系为：2.9 ml 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液；1.0 ml 2% H₂O₂；1.0 ml 0.05 mol·L⁻¹ 愈创木酚和 0.1 ml 酶液。反应体系加入酶液后立即于 34℃ 水浴中保温 3 min，然后迅速稀释到 1 倍，470 nm 波长下比色，每隔 1 min 记录 1 次吸光度，共记录 5 次，然后以每分钟内 A₄₇₀ 变化 0.01 为一个酶活性单位 (U)。

$$\text{酶活性} = (\Delta A_{470} \times V_T) / (W \times V_S \times 0.01 \times t) \quad (2)$$

式 (2) 中， ΔA_{470} 为 470nm 条件下，反应时间内吸光值的变化； V_T 为酶液总体积 (ml)； W 为试验材料鲜重 (g)； V_S 为测定时所取的酶液体积 (ml)； t 为反应时间 (min)；酶活性单位为 U·g⁻¹·min⁻¹。

2 结果与分析

2.1 不同褐变程度蝴蝶兰品种酚酸物质定性定量分析

2.1.1 3 个品种生根未褐变组培苗酚酸种类和含量 从图 2 可以看出，3 个品种未褐变时均没有检测出苯甲酸；褐变相对严重的 A1 和 B3 未发现对羟基苯甲酸；褐变程度越严重的品种，其咖啡酸、邻苯二酚、儿茶酚及绿原酸的含量也越高，即在褐变最严重的品种 A1 中含量最高，B3 次之，在褐变最轻的品种 R4 中含量最低；没食子酸含量在褐变最严重的品种 A1 中含量

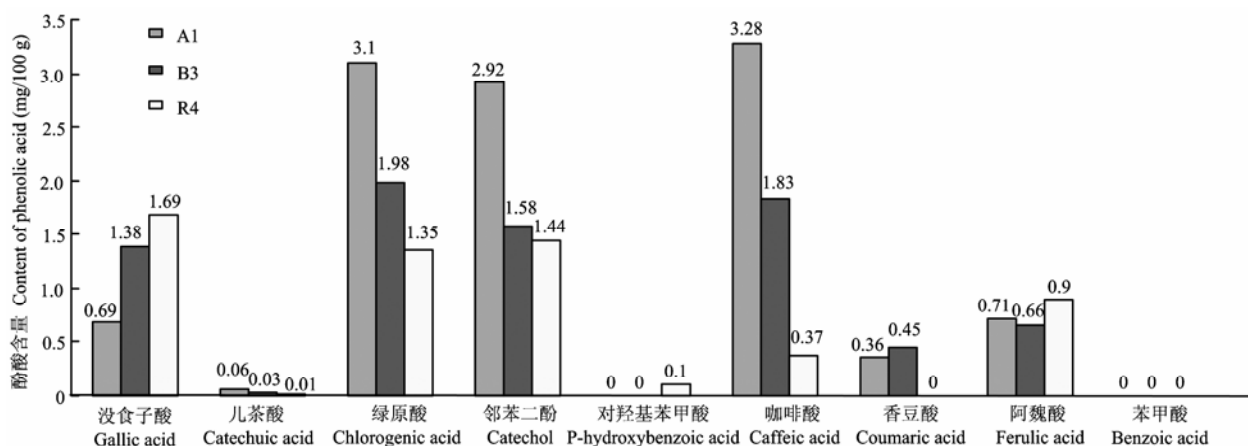


图 2 A1、B3 和 R4 3 个品种酚酸种类及含量

Fig. 2 Contents and types of phenolic acids of A1, B3 and R4

最低, B3 次之, R4 中含量最高; 阿魏酸的含量与褐变程度没有明显的关系。

2.1.2 3 个品种外植体褐变后酚酸种类和含量 通

常蝴蝶兰一般在接种后 5 d 便开始褐化。从图 3 可以看出, 3 个品种在接种 7 d 褐变后都只检测出 3 种酚酸, 即没食子酸、对羟基苯甲酸和香豆酸。

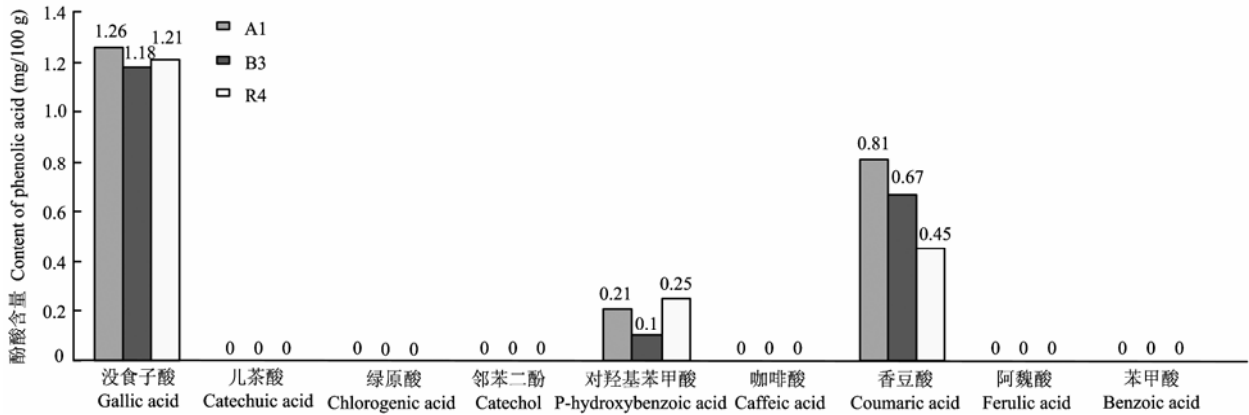


图 3 A1、B3 和 R4 3 个品种愈伤组织诱导培养 7 d 褐变后酚酸种类及含量
Fig. 3 Contents and types of phenolic acids in A1, B3 and R4 after browning

2.2 酚酸类物质相关酶活性动态变化

2.2.1 总酚含量的动态变化 蝴蝶兰在褐化过程中, 3 个品种的总酚含量的变化一致, 都呈下降、上升、下降的趋势 (图 4)。在整个培养过程中, 褐变严重的品种 A1 和 B3 的总酚含量始终高于褐变轻的品种 R4, 除接种的第 9 天外, A1 与 R4 的差异都达显著水

平 (表 1)。表明总酚含量与褐变程度呈正相关。3 个品种总酚含量在接种 9 d 后都减少, 有可能是酚类物质大量被氧化引起的。

2.2.2 PAL、PPO 和 POD 活性动态变化 在蝴蝶兰褐化过程中, 3 个品种的 PAL 变化趋势一致 (图 4), 说明 PAL 参与了蝴蝶兰褐变的过程。除接种后的第 2

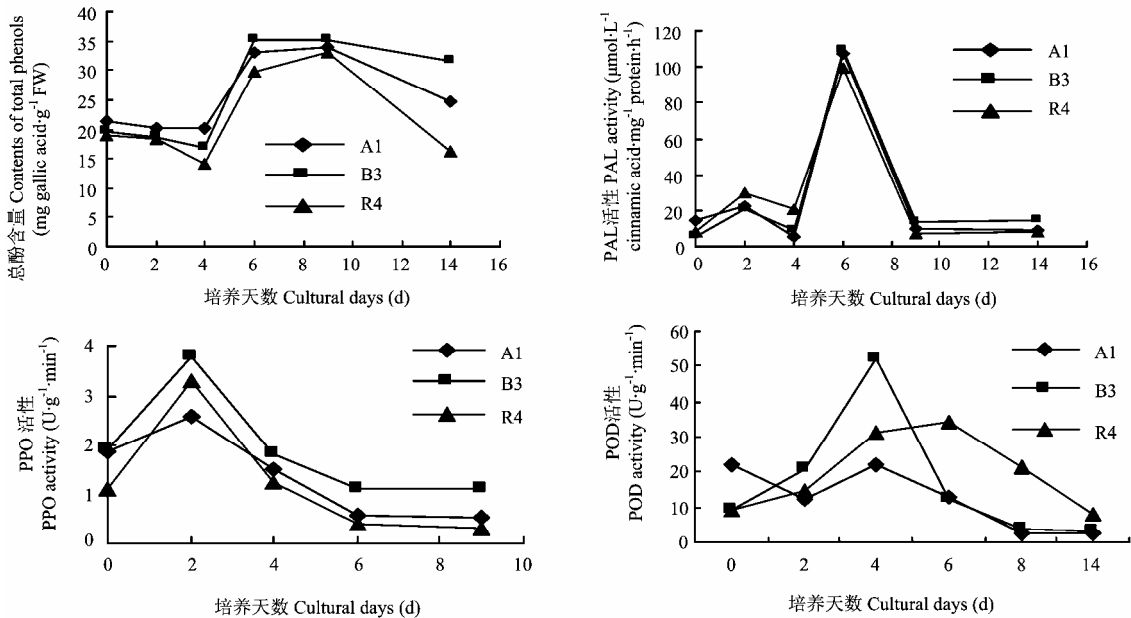


图 4 总酚含量、PAL 活性、PPO 活性及 POD 活性的动态变化
Fig. 4 Dynamic changes in total phenols, PAL activity, PPO activity and POD activity

表 1 褐变过程中总酚含量、PAL、PPO 和 POD 活性的方差分析

Table 1 Variance analysis of PAL, PPO and POD activity and contents of total phenols

接种天数 Cultural days(d)	品种 Varieties	方差分析 Variance analysis			
		PAL 活性 PAL activity	POD 活性 POD activity	PPO 活性 PPO activity	总酚 Total phenols
0	A1	12.99±6.11a	21.84±4.39A	1.87±0.57a	21.53±4.31a
	B3	5.93±1.17b	9.12±1.05B	1.91±1.23a	19.46±3.85b
	R4	6.85±4.39b	8.99±1.23B	1.10±0.95b	18.94±3.06b
2	A1	21.53±8.02a	12.18±0.96aA	2.56±0.57B	20.29±4.15a
	B3	20.60±4.93a	20.58±3.87bB	3.79±0.42A	18.73±5.46ab
	R4	25.42±11.88a	14.68±2.31cA	3.27±0.69AB	18.41±3.04b
4	A1	9.51±0.91a	20.02±4.12A	1.89±0.50B	20.12±4.03aA
	B3	4.70±1.41a	52.02±12.56B	1.80±1.58B	16.68±1.79bB
	R4	15.79±19.31a	31.29±4.39C	1.25±0.68A	14.19±2.30cB
6	A1	105.49±3.47a	12.60±0.93aA	0.58±0.31aA	33.18±6.47ab
	B3	110.02±4.16a	11.95±2.16bA	1.29±0.62cB	35.19±4.42a
	R4	101.23±5.71a	34.25±13.47cB	0.73±0.55 bAB	29.84±4.48b
9	A1	10.28±1.21AB	2.23±0.35A	0.59±0.53B	33.93±6.47a
	B3	12.69±4.10A	3.85±1.21A	1.12±0.28A	35.32±7.35a
	R4	7.33±1.23B	21.36±5.99B	0.39±0.10B	33.16±5.24a
14	A1	7.63±1.83B	2.18±0.13aA	0.54±0.15aA	24.77±3.41B
	B3	15.16±5.83A	2.96±1.42bA	1.10±0.18bB	31.67±5.24A
	R4	6.96±2.85B	8.26±2.36cB	0.29±0.14cB	16.03±3.69C

表中数据为平均值±标准误。同列不同大写字母为差异极显著 ($\alpha=0.01$)，不同小写字母为差异达显著水平 ($\alpha=0.05$)

Values represent the means±SE, and the same capital or small letter within the same column indicated no significance at $\alpha=0.01$ or 0.05 level

天和第 4 天外，褐变严重的品种 A1 的 PAL 活性始终高于褐变轻的品种 R4，褐变重的 B3 在接种后第 9 天和第 14 天其 PAL 活性也比 R4 高，且差异达极显著水平（表 1），表明褐变越严重的品种，PAL 活性越高。

3 个品种的 PPO 活性高峰出现在接种后第 2 天，其变化趋势一致（图 4），除在接种的第 2 天和第 6 天，R4 的活性比 A1 和 B3 高以外，其余时间褐变严重的品种 A1 和 B3 的 PPO 活性均高于褐变轻的品种 R4，并达极显著差异水平（表 1）。说明蝴蝶兰的褐变与 PPO 有很大关系，褐变越严重，其活性也越高。

3 个品种的 POD 活性变化趋势不一致，B3 和 R4 呈先上升后下降的趋势，而 A1 呈下降、上升、下降的趋势（图 4）。品种 B3 的 POD 活性在接种后第 4 天是鲜样的 5 倍，在其它品种中变化幅度也很大，说明参与了其褐化的过程。而变化趋势不一样，说明 POD 的活性可能因品种不同、或者受其它因素的影响而有很大差异。

2.3 PAL、PPO 和 POD 与总酚含量变化相关性分析

在蝴蝶兰初代培养过程中，总酚在第 4 天含量最低，在第 6~9 天含量最高，PAL 活性在第 4 天最低，第 6 天活性最高，两者呈正相关，相关系数 0.4699（表 1、表 2）；而 PPO 在接种后第 2 天活性高峰出现，以后一直下降，和总酚含量呈负相关，相关系数为 -0.41326（表 1、表 2）。3 个品种 POD 活性在第 4 天最高，与总酚含量呈负相关，相关系数为 -0.37258。从相关系数来看，3 类酶中与总酚含量相关性最大的

表 2 总酚含量、PAL、PPO 和 POD 之间的相关性分析

Table 2 The relativity among total phenols, PAL, PPO and POD

	PAL	POD	PPO	总酚 Total phenols
PAL	1	0.70701	0.83205	0.0491
POD	0.09727	1	0.57061	0.12784
PPO	0.05381	0.14327	1	0.08826
总酚 Total phenols	0.4699	-0.37258	-0.41326	1

左下角为相关系数，右上角为显著水平

The lower left corner represented relative coefficient, and the upper right corner represented significance level

酶为 PAL; PPO 次之; POD 的相关性最低。

3 讨论

3.1 与蝴蝶兰褐变相关酚酸

在组织培养过程中, 植物种类不一样, 导致褐变的酚酸物质种类也不一样, Chever 等发现, 影响板栗组织褐变的酚酸有水解型和浓缩型两种, 单宁是核桃的主要褐变酚酸, 引起云杉褐变的是单宁和苯酚, 而油橄榄主要褐变酚酸是绿原酸^[2]。

综合本文研究分析, 在所测定的 9 种酚酸中, 正常培养和接种诱导后都没有检测出苯甲酸, 说明苯甲酸对蝴蝶兰褐变影响可能很小或没有; 绿原酸、邻苯二酚、儿茶酚、咖啡酸及没食子酸、对羟基苯甲酸、香豆酸可能是与蝴蝶兰褐变相关的酚酸。绿原酸、邻苯二酚、儿茶酚及咖啡酸在 3 个品种正常培养条件下含量很高, 而在接种后未检测出, 有可能被相关的氧化酶氧化成醌类或其它物质, 从而导致褐变, 因而进一步了解它们的合成途径、代谢机理及与各类合成酶和氧化酶之间的关系, 对于了解蝴蝶兰褐变都有重要意义; 没食子酸、对羟基苯甲酸、香豆酸在培养后含量升高, 可能有两个原因: 一是这 3 种酸并不是导致褐变的酚氧化酶的作用底物, 没有参与褐变过程; 二是可能是在外植体被切割刺激后, 刺激了几类酚酸的合成酶不断合成酚类物质来应对外界伤害刺激, 它们所起的作用并不是单纯地加重或减轻褐变, 可能在其它逆境生理方面有重要作用, 有待进一步研究。

3.2 总酚含量与蝴蝶兰褐变

有许多资料显示在植物组织培养中的外植体褐变的问题与植物体内酚的含量密切相关, 酚类含量高的植物材料, 离体培养难度大, 褐变容易发生^[11]。罗晓芳等发现玫瑰、牡丹、枣树、葡萄等在组织培养过程中总酚含量越高, 褐变程度越严重^[12,13]。

本试验在对蝴蝶兰初代培养的整个研究过程中, 褐变严重的品种 A1 和 B3 的总酚含量始终高于褐变轻的品种 R4, 且差异达显著水平, 也说明总酚含量越高, 褐变越严重。这一结果也证明在蝴蝶兰组织培养中对外植体进行减少总酚含量的预处理是行之有效的方法; 另外, 从图 3 和表 1 可以看出品种间的总酚含量变化幅度不一样, 这也许是由于品种之间酚类合成酶和氧化酶活性不一样或其它因素的制约所致。

3.3 PAL、PPO 和 POD 与蝴蝶兰褐变及总酚的关系

本试验的研究结果表明, 3 种酶活性变化与蝴蝶兰组培褐变密切相关, 酶活性越高, 褐变也越严重。

蝴蝶兰外植体褐变发生的过程中, PAL 酶的活性变化与总酚含量的变化基本上保持一致, 两者有基本相同的变化趋势, PAL 酶活性随蝴蝶兰外植体褐变的而增加, 总酚的含量也是随外植体褐变的增加而增加, 二者呈显著正相关, 说明在蝴蝶兰褐变发生过程中 PAL 参与总酚的合成。这与 Murata 及 Hisaminato 在 PAL 对莴苣褐变的影响研究中的结果一致^[14,15]。

蝴蝶兰外植体褐变发生的过程中, PPO 和 POD 与总酚含量呈负相关。PPO 和 POD 的活性增加, 同时总酚含量降低, 这可能是由于在 PPO 和 POD 两种氧化酶的作用下, 相应的酚酸被氧化成醌类物质, 有待进一步研究。

通过 3 种酶与总酚的相关性分析, 可以初步认为, 蝴蝶兰外植体切割后, 刺激 PAL 活性增高, 总酚合成增加, 含量升高; 而 PPO 和 POD 通过氧化 PAL 合成的酚酸变成醌类使褐变加重, 所以 PPO 和 POD 含量高时, 总酚含量低。

4 结论

本文通过对褐变程度不同的 3 个蝴蝶兰品种 9 种酚酸高效液相色谱定性定量分析, 初步证明绿原酸、邻苯二酚、儿茶酚、咖啡酸及没食子酸、对羟基苯甲酸、香豆酸可能与蝴蝶兰褐变相关, 苯甲酸对蝴蝶兰褐变影响很小; 通过蝴蝶兰褐变过程中总酚含量, PPO、POD 和 PAL 活性动态变化测定分析, 表明褐变程度高的品种, 总酚含量也高; 褐变过程中 PAL 和 PPO 活性与褐变程度呈正相关, POD 与褐变有很大关系; 总酚含量与 PAL 活性呈正相关, 与 PPO 和 POD 活性呈负相关。

References

- [1] 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)
- [2] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 王国彬, 祝展平. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展. 园艺学报, 2000, 27(增刊): 481-486.
- Zhou J H, Zhou J R, Zeng H S, Wang G B, Zhu Z P. Advance of studies on browning and antibrowning techniques in the tissue culture

- of horticultural plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(Suppl.): 481-486. (in Chinese)
- [3] Loomis W D, Battaile J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, 1966, 5:423-438.
- [4] Winkel-Shirley B. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum*, 1999, 107: 142-149.
- [5] Weisshaar B, Jenkins G I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1(3): 251-257.
- [6] 于建国, 王文芝. 现代实用仪器分析方法. 北京: 中国林业出版社, 1994: 138-139.
- Yu J G, Wang W Z. *Analytical Methods of Contemporary Applied Apparatus*. Beijing: Chinese Forestry Press, 1994: 138-139. (in Chinese)
- [7] Pastrana-Bonilla E, Akoh C C, Sellappan S, Krewer G. Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(18): 5497-5503.
- [8] Solecka D, Kacperska A. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiologia Plantarum*, 2003, 119: 253-262.
- [9] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理实验. 北京: 北京大学出版社, 1990: 37-39.
- Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. *Plant Physical Experiment*. Beijing: Peking University Press, 1990: 37-39. (in Chinese)
- [10] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2003: 164-165.
- Li H S. *Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment*. Beijing: Higher Education Press, 2003: 64-165. (in Chinese)
- [11] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986: 34-36, 408-419, 466-480.
- Chen Z H. *Tissue Culture of Plant and Its Application*. Beijing: Higher Education Press, 1986: 34-36, 408-419, 466-480. (in Chinese)
- [12] 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 Y 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)
- [13] 杨 博, 韩振海, 张 永, 李天红. 不同光照强度对玫瑰组织培养中初代培养物褐化的影响. 中国农学通报, 2003, 19(6): 194-196.
- Yang B, Han Z H, Zhang Y, Li T H. Effect of different light intensity on browning of rose (*Rosa rugosa*) initially cultured *in vitro*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2003, 19(6): 194-196. (in Chinese)
- [14] Murata M, Nishimura M, Haruta M, Homma S, Itoh Y. A transgenic apples callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65(2): 383-388.
- [15] Hisaminato H, Murata M, Homma S. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65: 1016-1021.

(责任编辑 曲来娥)