

蝴蝶兰叶片离体培养中与褐变相关的酶研究

黄象男, 吕晓辉, 宿显瑞, 郭晓慧, 臧新* (郑州大学生物工程系, 河南郑州 450001)

摘要 对蝴蝶兰叶片在离体培养中与褐变相关的酶进行了研究, 结果表明: 蝴蝶兰叶片在褐变发生前期 POD 和 PPO 活力都升高, 褐变发生后酶活力下降。PAL 活力随外植体褐变的增强而逐渐增加。POD 同工酶谱分析发现, 对照组中 POD 有 2 条弱带。离体培养 3 d 时 POD 出现 4 条酶带, 酶活性最强。

关键词 蝴蝶兰; 酶; 褐变; 活性

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)27-08455-02

Study on the Enzyme Related to Phalaenopsis Leaf-browning in vitro Culture

Lü Xiao-hui et al. (Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001)

Abstract The study on the enzyme related to Phalaenopsis leaf-browning in vitro culture was conducted. The result showed that in the early stage of Phalaenopsis leaf-browning, the activity of POD and PPO was increased, while in the later stage, their activities were declined, respectively. The activity of PAL was increased as explant turned black. The POD isoenzyme showed two weak bands of POD appeared in control group. After 3 days culture, there were four bands of POD appeared and the activity was the highest.

Key words Phalaenopsis; Enzyme; Browning; Activity

蝴蝶兰(Phalaenopsis)是多年生热带单茎性气生兰,分株繁殖系数极低^[1]。国内外对其组培过程中出现的褐变问题的研究报道较少。有研究表明,导致褐变的主要原因是过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(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^[2]。笔者通过研究蝴蝶兰叶片在离体培养过程中,POD、PPO和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力及POD同工酶谱的变化,探讨褐变发生机理。

1 材料与方 法

1.1 材料 蝴蝶兰无菌苗的叶片。

1.2 方法 将蝴蝶兰叶片的上半部切割成0.5 cm×0.5 cm大小,接种在MS+5 mg/L 6-BA培养基上,叶片近轴部位接触培养基,25℃、3 000 lx光照强度、16 h/d光照的条件下培养。取蝴蝶兰接种后3~21 d的外植体,进行POD、PPO和PAL活力的测定,以蝴蝶兰新鲜叶片为对照。同时对POD同工酶谱进行分析^[3]。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰外植体褐变过程中 POD 活力的变化 叶片在接种后6 d周围开始变黑,出现了轻微的褐变现象,8 d时褐变现象比较明显。测定表明:叶片在接种3 d后POD活力达到最大值(图1),为对照组的13倍;第6天时褐变开始发生,POD活力下降;第9天POD活力略有上升,比第6天高22.2%;随后随着培养天数的增加,褐变程度不断加深,POD活力也逐渐下降。到第21天时POD活力最低,约为第6天的1/4,但也为对照组的2倍。

2.2 蝴蝶兰外植体褐变过程中 PPO 活力的变化 PPO活力在接种后的第3天开始升高且达到最大值,为接种前的6.5倍(图2),从第6天开始,PPO活力逐渐下降,直到第18天时PPO活力较第15天有所上升,之后再次下降。

2.3 蝴蝶兰外植体褐变过程中 PAL 活力的变化 对照组中PAL活力很小,几乎检测不到(图3),叶片接种3 d后可以检测到PAL值,随着外植体褐变程度的不断加重,PAL活力也逐渐增加。到第12天PAL活力达到最大,为第6天的2.31

倍;第15天时略有下降,但也高于第6天的水平;第18天又升高,第21天下降,但都高于第6天的PAL活力。

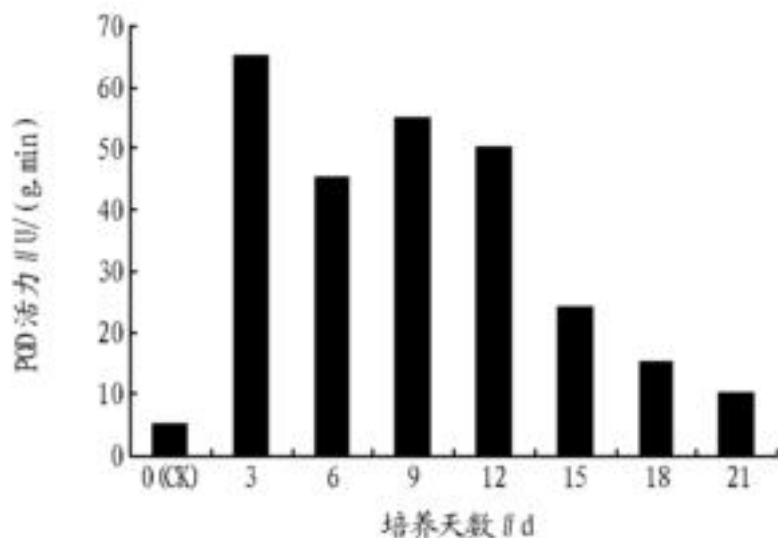


图1 蝴蝶兰外植体褐变过程中POD活力的变化

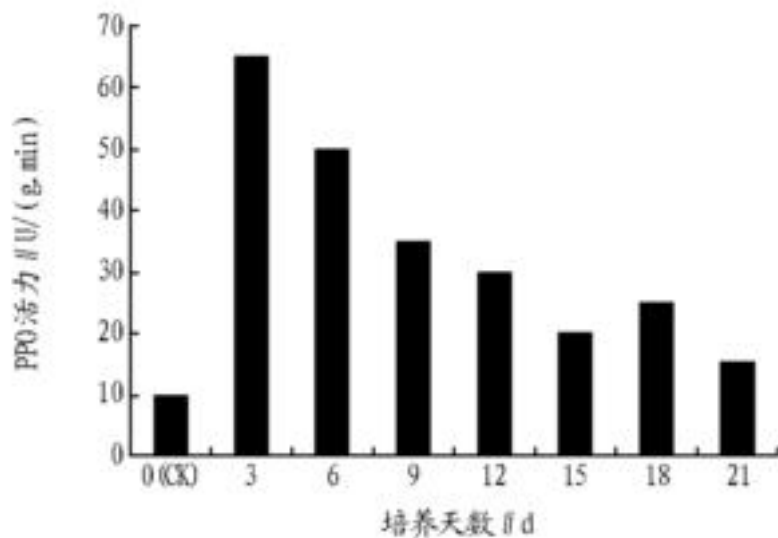


图2 蝴蝶兰外植体褐变过程中PPO活力的变化

2.4 蝴蝶兰叶片在褐变过程中 POD 同工酶的变化 在对照样品POD中有两条微弱带出现,POD活性较低,迁移率为0.313和0.388(图4,谱带和);培养3 d的外植体出现4条活性相对强的谱带(谱带~),从上到下迁移率分别为0.2,0.263,0.338和0.413,迁移率为0.338和0.413的酶带活性较高。培养6~18 d的同工酶谱都有2条酶带出现(谱带、)。第21天酶活性降低,只有1条隐约可见的酶带出现(谱带),迁移率为0.338。

3 结论与讨论

3.1 PPO、POD和PAL活性分析 PPO是一种含有铜原子

作者简介 黄象男(1968-),女,河南郑州人,在读硕士,实验师,从事植物组织培养的研究。*通讯作者。

的酶,活性较高,与多种植物代谢过程有关。它存在于质体中,但它的酚作用底物却位于液泡中,这种区域性分布使底物与PPO不能接触^[4]。PPO介导的褐变反应只发生在细胞膜的结构发生变化或受到损伤之后。

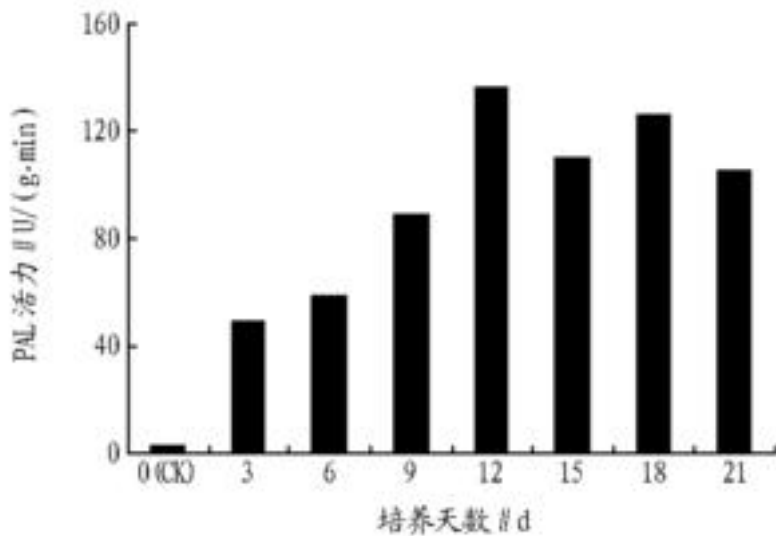
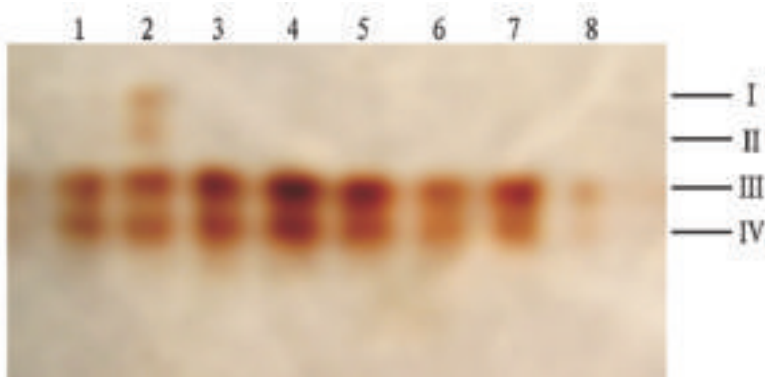


图3 蝴蝶兰外植体褐变过程中PAL活力的变化



注:泳道1~8分别为1.对照;2.培养3d的外植体;3.培养6d的外植体;4.培养9d的外植体;5.培养12d的外植体;6.培养15d的外植体;7.培养18d的外植体;8.培养21d的外植体。

图4 蝴蝶兰叶片褐变过程中POD同工酶谱的变化

试验结果表明,PPO和POD活力的变化与蝴蝶兰外植体褐变发生有一定的关系。在褐变发生前(培养3~6d),PPO和POD的活力开始升高;褐变发生后,PPO的活力下降,POD的活力在第6天下降,第9天升高,然后又下降。PPO和POD活力的变化说明了在蝴蝶兰外植体褐变过程中这2种酶参与了褐变的开始。Murata等^[5]利用抗卡那霉素的根癌农杆菌对苹果进行转基因时发现,含有反义PPO DNA的转基因苹果根抑制了PPO活性,与正常的苹果相比表现出较低的褐变程度。Graham等^[6]采用PPO基因沉默抑制了PPO活性,从而有效控制了采摘后菠萝的褐化。Bachem等^[7]利用适宜的启动子去表达反义PPO RNA,显著地抑制了马铃薯块茎上黑色素的形成,降低了马铃薯块茎被碰伤后所发生的褐变现象。

由机械损伤所诱导的植物褐变长久来一直被认为与PPO活性呈正相关^[8]。然而,Hia等^[9]在研究PPO活性和木质素含量对凉薯褐变的影响时发现,PPO活性和褐变指数呈现出较低的相关性,指出PPO很可能并不直接参与褐变过程。罗晓芳等^[10]也在实验中发现,褐变现象较严重的材料阿月浑子的PPO活性最低,而不褐变的苹果枣PPO活性却相当高,说明PPO活性与组织培养材料的褐变不呈正相关,酶活性的高低不是判断褐变是否严重的充分条件。在该试验中,蝴蝶兰叶片PPO活性在褐变发生前增加,褐变发生后降低,且褐变程度随着PPO活性的降低而加深,与罗晓芳等报道的结果相一致。出现这种现象可能是由于褐变的毒害使

材料的生活力下降,从而导致酶活力下降。

PAL是植物次生代谢中的关键酶之一,在蝴蝶兰外植体褐变过程中,随着培养时间的增加,PAL活力逐渐上升,褐变程度越来越严重,PAL活力变化基本上与褐变程度保持一致。PAL是酚类合成的关键酶,抑制PAL活性可以抑制酚类的积累和合成,降低器官褐变的发生。Peiser等^[11]使用PAL抑制剂AOA(氨基氧基乙酮)处理莴苣,有效地抑制了莴苣的褐变。Wang^[12]等在红豆杉细胞培养中通过NO抑制了PAL活性,减轻了培养过程中的褐变现象。

3.2 蝴蝶兰叶片褐变过程中PPO、POD和PAL之间的关系

植物组织培养过程中的褐变是由多种因素综合作用的结果。试验中,PPO活性在褐变发生前增加,褐变发生后降低,且与褐变程度呈负相关;POD活性的变化较大,第3天活性即为对照的13倍;PAL活性在试验中基本呈上升趋势,且褐变程度随培养天数增加而增加。说明PPO和POD参与了褐变的开始,而PAL却是褐变发生后的关键酶。罗晓芳^[10]认为,单一的PPO活性和总酚含量并不能说明褐变的机理,形成酚和酶区域化分布的膜系统是褐变发生的关键因素。

3.3 蝴蝶兰叶片在褐变过程中POD同工酶分析

从POD同工酶谱可以看到在新鲜叶片中活力很低,当发生褐变后POD酶带有所增加,这有可能是由于环境的变化而在外植体内重新合成。当蝴蝶兰叶片从母体上切割下来接种到培养基中,环境的改变导致细胞从机制上产生反应,引起一系列酶和蛋白质合成发生变化,以适应环境的变化。木质素是植物体内具有防御功能的酚类聚合物,POD是植物体内木质素合成的相关酶,因此若POD的合成增加,酶的活性增强。外植体褐变后,由于细胞膜的完整性被破坏,细胞被褐变产生的物质毒害,外植体的生活力下降,酶的活力也随之下降。

参考文献

- [1] 周志宏,梁小敏,吴森生.蝴蝶兰试管生根实验研究[J].江西园艺,2003(4):37-38.
- [2] HANNA LAUKKANEN, HELY HAGGMAN, SARI KONINEN SOPPELA, et al. Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase[J]. Physiologia Hartorum, 1999, 106: 337-343.
- [3] 汤章成. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 263-265.
- [4] LOBREAUX S, THIRON S, BRIAT J F. Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron mediated oxidative stress[J]. Hart J, 1995, 8: 443-449.
- [5] MURATA M, HARUIA M, MURAI N, et al. Transgenic apple (Malus domestica) shoot showing low browning potential[J]. J Agric Food Chemistry, 2000(48): 5243-5248.
- [6] GRAHAM MW, HARDV, JOHNMKOL, et al. The development of blackheart resistant pineapples through genetic engineering[J]. Acta Hort, 1998, 529: 133-136.
- [7] BACHEM CWB, SPECKMANN G J, IINDE P C G, et al. M. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers[J]. Bio/Technology, 1994, 12(11): 1101-1105.
- [8] MAYER A M. Polyphenol oxidases in plants: recent progress[J]. Phytochemistry, 1987, 26: 11-20.
- [9] HIA N, AQUINO BOLANOS, MERCADO SILVA E. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicana[J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 33: 275-283.
- [10] 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.
- [11] PEISER GALEN, GLORIA LOPEZ-GALVEZ, MARTA CANTWELL, et al. Phenylalanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce[J]. Postharvest Biology and Technology, 1998, 14: 171-177.
- [12] WANG J W, WU J Y. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate induced defense responses and secondary metabolite activities of Taxus cells[J]. Plant and Cell Physiology, 2005, 6: 923-930.