

白及原球茎褐变过程中总酚及相关酶活性的变化

蔡英豪¹, 龚宁¹, 李德琴¹, 张明生²

(1. 贵州师范大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550001)

摘 要:以不同褐变程度的白及原球茎为试材,研究了白及原球茎褐变度与总酚含量、多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的关系。结果表明:在一定褐变度范围内,随褐变程度的增加,总酚含量升高,超过一定范围,总酚含量随褐变程度增加而降低;PPO与PAL活性变化趋势一致,在褐变前期与褐变度呈正相关,后期活性随褐变度增加而降低;POD活性随褐变度增加而略有降低。

关键词:白及原球茎;褐变;总酚含量;PPO;POD;PAL

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0097-03

白及(*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.) 属兰科(Orchidaceae)白及属(*Bletilla*)植物^[1]。白及不仅具有补肺、消肿、生肌、止血、敛创等功效,而且花色艳丽,具有较高的观赏价值。近年来,随着人们生活水平的提高,受药用需求和园艺花卉市场需求量增长的影响,在我国白及受重视的程度越来越高,野生资源遭到了无限制人工采挖,加上生态环境的破坏,其野生资源量日益减少^[2]。目前白及不仅已列入国家珍稀濒危植物加以保护,而且还收载于“国际贸易公约(CITES)附录二”中,受到国际保护^[3]。由于白及种子细小,萌发困难,主要采用分株方式进行繁殖,不仅繁殖率低,繁殖速度慢,而且耗种量大,还与药用争夺原料^[3]。目前许多学者尝试采用组织培养技术进行白及的快繁,其中利用种子萌发获得原球茎,以原球茎的形式增殖,进一步分化成苗是白及快速繁殖的一种行之有效的技术手段。但在试验过程发现白及原球茎褐变尤为突出,这成为白及组培快繁及工厂化生产的一大障碍。

褐变现象是指外植体在诱导脱分化或再分化过程中,自身组织从表面向培养基释放褐色物质,以致培养基逐渐变成褐色,外植体也随之进一步褐变而死亡的现象。组织培养过程中引起褐变的主要为酶促褐变,与酶促褐变的相关酶类有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)等^[4-7]。现对白及原球茎

生长过程中总酚含量与多酚氧化酶、过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶酶活性的变化情况进行研究,以期对白及原球茎培养过程中防褐变提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用白及原球茎由贵州师范大学生命科学院实验室提供,均为同一时期接种萌发得到,取正常生长的白及原球茎,每隔1周测定1次其酶活性。试验中0 d表示原球茎刚发生褐变迹象。所用仪器为TU-1901紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 褐变度的测定 采用改进的Lee^[8]的方法。滤纸吸干白及原球茎表面水分,称取白及原球茎1 g,加入2.5 mL 95%乙醇,研磨成匀浆,在12 000 r/min离心15 min,取上清液在410 nm下测其吸光度值,以吸光度大小表示褐化程度。

1.2.2 总酚含量的测定 精确称取0.5 g白及原球茎,于研钵中加入4 mL甲醇,滴2~3滴盐酸溶液,研磨好后倒入离心管中于暗处提取24 h,后经12 000 r/min提取15 min,上清液为待测液。

1.2.3 粗酶提取 精确称取0.5 g白及原球茎,加入预冷的酶提取液(50 mmol/L、pH 7.4 磷酸缓冲液,内含0.1 mmol/L EDTA 液,0.3% TritonX-100,4% PVP)4 mL,冰浴中研磨,后以12 000 r/min的转速冷冻离心15 min,上清液用于酶活测定。

1.2.4 PPO活性测定 酶活测定采用分光光度法,取磷酸盐缓冲液3.0 mL,加入0.02 mol/L焦性没食子酸溶液1.0 mL,PPO粗酶液0.1 mL混匀后在30℃下反应5 min,在420 nm波长下测定其吸光度的变化。酶活性单位U定义为每分钟A₄₂₀变化0.001为1个活性单位。

第一作者简介:蔡英豪(1985-),男,硕士,研究方向为应用生物化学。E-mail:caiyinghao0311@163.com

责任作者:龚宁(1963-),女,硕士,教授,硕士生导师,研究方向为植物生理生化。E-mail:gn2033@126.com

基金项目:贵州省中药材现代产业技术体系建设专项资助项目(GZCYTX-02)。

收稿日期:2012-12-10

酶活 $= (\Delta A \times V_T) / (W \times V_S \times 0.001 \times T)$ 。 ΔA 为 470 nm 条件下, 反应时间内吸光度的变化值; V_T 为提取酶液的总体积(mL); W 为提取酶液所用试验材料的鲜重(g); V_S 为测定时取用的酶液体积(mL) T 为反应时间(min)。

1.2.5 POD 活性测定 酶活测定采用愈创木酚法。于 50 mL 锥形瓶中依次加入 1.9 mL 0.2% 愈创木酚, pH 7.0 磷酸缓冲液 2.0 mL, 0.2% H_2O_2 4 mL, 酶液 0.2 mL; 另取 50 mL 锥形瓶, 加前 2 种溶液, 不加 H_2O_2 而加入 4 mL 蒸馏水作为对照, 然后加酶液 0.2 mL。在 30℃ 下反应 2 min 后, 于 470 nm 波长下测其 OD 值, 计算酶活力。酶活力单位定义为 A_{470} , 每分钟变化 0.001 为 1 个活性单位, 计算公式同 PPO。

1.2.6 PAL 活性测定 参考 Solecka 等^[10]的方法, 略作修改。反应液中包含: 4 mL/L 苯丙氨酸(0.02 mol/L), 2 mL 硼酸缓冲液(pH 8.8), 0.4 mL 粗酶液。将反应液分作 2 份, 1 份立即测定其 290 nm 吸光度值, 另 1 份放入 40℃ 保温 30 min 后, 煮沸 5 min 结束反应, 测定其 290 nm 吸光度值。对照为不加 L-苯丙氨酸, 加蒸馏水代替, 以加入酶液煮沸后来验证反应是由酶液引起。OD 值每变化 0.01 就生成 1.0 μg 反式肉桂酸。以每小时生成的肉桂酸的量来表示酶活性。

2 结果与分析

2.1 总酚含量的变化

由图 1 可知, 白及原球茎在褐变发生过程中, 总酚含量褐变初期稳中有升, 培养至 21 d 时含量达到最高, 约为初期的 2 倍, 21~28 d 下降。前期总酚含量与褐变度有很大关系, 随着褐变度增加, 总酚含量也升高。

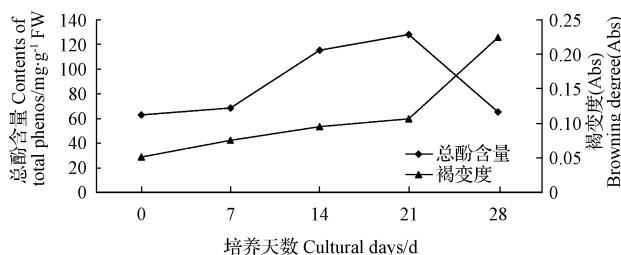


图 1 总酚含量与褐变度变化关系

Fig. 1 Relation between total phenols and browning degree

2.2 多酚氧化酶(PPO)活性的变化

由图 2 可以看出, PPO 活性在白及原球茎发生褐变过程中呈先上升再下降的趋势。刚发生褐变即培养 0~7 d 时, PPO 活性大幅度升高。而在随后 1 周内, 酶活性涨势减缓, 培养后期酶活性一直处于下降趋势。

2.3 过氧化物酶(POD)活性的变化

由图 3 可以看出, 白及原球茎褐变发生过程中, POD 活性变化无明显规律性。在培养前 2 周期间酶活性下降, 经过 1 周后, 酶活性有所回升, 随后基本保持持

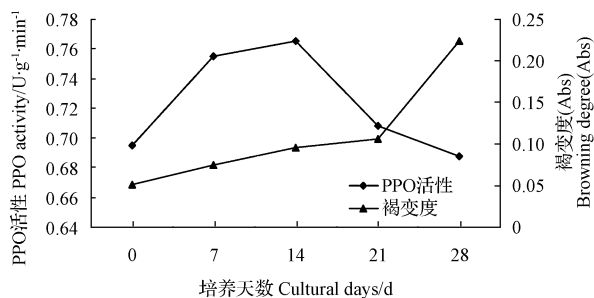


图 2 PPO 活性与褐变度变化关系

Fig. 2 Relation between PPO activity and browning degree

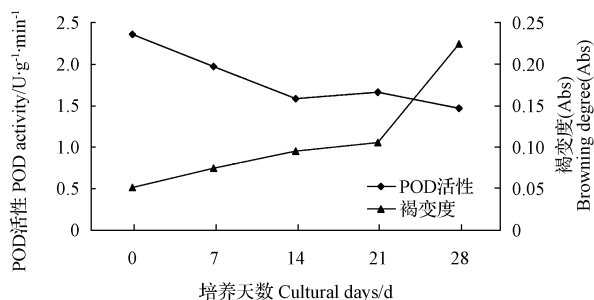


图 3 POD 活性与总酚变化关系

Fig. 3 Relation between POD activity and browning degree

平状态。

2.4 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性变化

在白及原球茎褐变前期, PAL 活性持续大幅上升, 培养 14 d 时达到最高峰, 活性约为培养初期的 6 倍之多, 随后酶活性经过 1 周左右的平稳期后出现大幅下降, 到培养 28 d 时, 酶活性已回落到培养 0 d 时的水平。

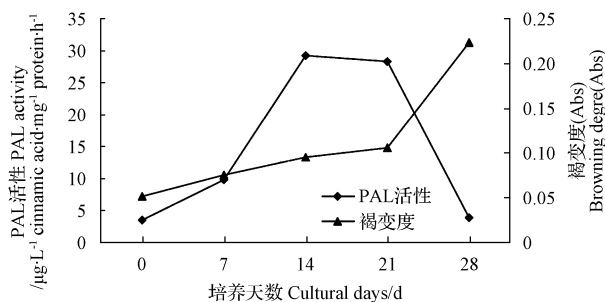


图 4 PAL 活性与总酚含量变化

Fig. 4 Relation between PAL activity and browning degree

3 讨论与结论

人们普遍认为植物组织培养过程中发生褐变是由于植物组织中的酚类物质在相关氧化酶催化下形成醌类物质, 从而导致褐变程度的加重^[9]。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^[10]。

该试验中, 在一定褐变度范围内随褐变度的增加, 总酚含量升高。这与许传俊等^[5]在蝴蝶兰外植体褐变

发生与总酚含量及相关酶活性的关系研究中得出的结论是一致的。而在褐变度超出一定范围时,总酚含量降低,而褐变度依然升高。这一点是与许传俊等^[5]的研究结论不同之处。这可能是由于酚类物质的合成与 PAL 酶密切相关,而此时 PAL 活性由于褐变度升高,醌类物质影响,活性降低,同时酚类物质进一步氧化消耗,因此总酚含量降低;而白及原球茎在醌类物质毒害作用下,褐变度进一步升高。

多数学者认为褐变是由多酚氧化酶(PPO)催化其底物酚类物质形成醌和水,醌再经非酶促聚变,形成对植物材料产生毒害作用的褐色物质^[11]。在该试验中,PPO 活性在褐变度 0.051~0.095 范围内呈现出显著上升趋势,从而加速了酚类物质的氧化,促进褐变度进一步升高。在褐变度 0.095~0.224 范围内,PPO 活性随褐变度的增加而降低。这可能是由于褐变产生的氧化产物对材料的毒害作用使材料的生活力下降,从而导致酶活力下降。

过氧化物酶(POD)作为植物防御的第一道防线,是植物体内一类非常重要的氧化酶。印芳等^[6]在对蝴蝶兰褐变的研究中发现 POD 活性随褐变度增加而降低,且总酚含量与 PPO、POD、PAL 3 种酶的相关性为 PAL>PPO>POD。该试验中在白及原球茎在褐变发生后,POD 活性随褐变度增加而降低,二者呈负相关。这与印芳等得出的结论是一致的。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是连接初级代谢和苯丙烷类代谢,催化苯丙烷类代谢第一步反应的关键酶和限速酶,它为酚类物质合成提供前体物质^[12]。该试验中,PAL 活性与 PPO 活性变化趋势一致,在褐变度 0.051~0.095 范围内,PAL 活性随褐变度的增加而升高;在褐变度 0.095~0.224 范围内随褐变度增加而降低。当总酚含

量在原球茎中达到最大积累量时,PAL 活性也处于最高,二者呈现正相关,说明白及原球茎褐变发生过程中 PAL 参与了酚类物质的合成。有试验证实,抑制酚类物质的合成可以抑制褐变的发生^[13],因此可推测抑制 PAL 活性亦可以减缓褐变发生进程。

参考文献

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 18 卷. 北京:科学出版社, 1999:50.
- [2] 石晶,罗毅波,宋希强. 我国白及市场调查与分析[J]. 中国园艺文摘, 2010(8):1751-1755.
- [3] 石云平,李峰,凌征柱. 白及组织培养与快繁技术研究[J]. 广西农业科学, 2009,40(11):1408-1410.
- [4] 刑会琴,李敏权,徐秉良,等. 过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶与苜蓿白粉病抗性的关系[J]. 草地学报, 2007(4):376-380.
- [5] 许传俊,李玲,李红,等. 蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD 和 PAL 的关系[J]. 园艺学报, 2006,33(3):671-674.
- [6] 印芳,葛红,彭克勤,等. 蝴蝶兰组培褐变与酚酸类物质及相关酶活性的关系[J]. 中国农业科学, 2008,41(7):2197-2203.
- [7] 张宽朝,金青. 苯丙氨酸解氨酶与其在重要次生代谢产物调控中的作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2008,24(12):59-62.
- [8] 贾慧敏,韩涛,李丽萍,等. 可食性涂膜对鲜切桃褐变的影响[J]. 农业工程学报, 2009,25(3):282-286.
- [9] 刘玲玲. 植物组织培养中外植体发生褐变的原因及防止措施[J]. 喀什师范学院学报, 2011,3(32):44-46.
- [10] Soleka D, Kacperska A. Phenylpropanoid deficiency effects the course of plant acclimation to cold[J]. Physiologia Plantarum, 2003,119:253-262.
- [11] 曾镭,刘燕. 植物组织培养中褐化问题的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007,13(14):49-50.
- [12] 江昌俊,余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展(综述)[J]. 安徽农业大学学报, 2001,28(4):425-430.
- [13] 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[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001,65:1016-1021.

Changes of Total Phenols and Related Enzymes Activity in the Browning Process of *Bletilla striata* Protocorm

CAI Ying-hao¹, GONG Ning¹, LI De-qin¹, ZHANG Ming-sheng²

(1. College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001; 2. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550001)

Abstract: Taking *Bletilla striata* protocorm of varying browning degrees as the basic materials, the relation between the *Bletilla striata* protocorm browning degree and the activity of PPO, POD and PAL were studied. The results indicated that within some limits, the total phenols went up as the browning degree increased. On the contrary, the total phenols decreased as the browning degree went up over a range. The activity variation of PPO tended to be on accordance with that of PAL, which kept a positive correlation with browning degree in prophase and they went down as browning degree went up at the latter stage. The activity of POD went down slightly as the browning degree increased.

Key words: *Bletilla striata* protocorm; browning; total phenols content; PPO; POD; PAL