

儿茶素对蝴蝶兰叶片离体培养褐变发生的影响

谭汝芳¹, 周文灵¹, 许传俊^{1,2}, 李 玲¹

(1. 华南师范大学 生命科学院 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:用 0.3 g/L 儿茶素处理蝴蝶兰叶片外植体, 在 MS+3 mg/L 6-BA (pH 5.8) 培养基上培养 4 d, 外植体褐变率高于对照 227.6%。用香草醛-盐酸溶液染色反应法发现鞣质分布在维管束和细胞间隙。叶片剪切的外植体(培养 0 d)鞣质含量较高, 培养 4 d 降低, 8 d 后再升高。儿茶素处理的外植体鞣质含量明显高于对照。在培养期间, 儿茶素处理的外植体 PPO、POD 和 PAL 活性高于对照外植体, 其中 POD 活性在第 8 天达到最大值, PPO 和 PAL 活性在培养第 12 天达到高峰。

关键词:儿茶素; 蝴蝶兰; 叶片外植体; 褐变; 鞣质

中图分类号:S 682.31; S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)03-0065-04

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp.)在组织培养过程中, 外植体的褐变问题是影响培养成功的重要因素。有关褐变发生的条件和影响因素已有报道, 如培养基中蔗糖浓度增加到 4.0% 时, 容易褐化^[1]。MS 培养基中 Fe 盐含量增加会导致褐变情况加重, 6-BA 会影响褐变的发生, 光照强度增加导致外植体褐变加剧^[2]。蝴蝶兰叶片外植

体离体培养 5 d 开始出现褐变, 培养 14 d 外植体已经全部褐变, 证实蝴蝶兰外植体培养过程中细胞产生鞣质^[3]。用鞣质处理外植体是否影响其褐变的发生还不明确。

目前认为植物组织培养中的褐变主要是由酶催化引起的, 引起褐变的酶的底物主要是酚类化合物^[4]。在外植体褐变发生过程中, 过氧化物(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。鞣质在褐变发生的作用与 PPO 和 POD 活性变化如何, 儿茶素类鞣质(简称儿茶素)是缩合型鞣质的代表^[5], 该试验研究儿茶素对蝴蝶兰叶片褐变发生的影响, 以及与过氧化物(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性变化的关系, 为认识其在植物体组织培养过

第一作者简介:谭汝芳(1981-), 女, 广东清远人, 硕士, 现从事植物生理学研究。E-mail: lilab@scau.edu.cn。

通讯作者:李玲(1958-), 女, 湖南桂阳人, 博士, 教授, 博士生导师, 现从事植物细胞工程研究工作。E-mail: lilab@scau.edu.cn。

基金项目:广东省科技计划资助项目(2005B20901019)。

收稿日期:2008-11-11

In vitro Culture and Rapid Propagation of *Syngonium Podophyllum* Schott

JIANG Ya-lian, GUI Min, LI Xia, LONG Jiang, WU Min

(Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, China)

Abstract: The lateral tender buds of *Syngonium Podophyllum* Schott as explants were used. Effect on tissue culture of MS containing different content BA, NAA and IAA were studied. The results indicated that the rate of survived buds could approach to 75% when they were sterilized for 35 min in 0.1% HgCl₂+3 drops Tween20. The medium MS+BA 5.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L was suitable for introduction of callus or adventitious buds. The medium BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L was the best for multiplication. The optimum rooting medium was MS+NAA 0.3 mg/L+IAA 0.2 mg/L. After the rooting plantlets in vitro were treated for 7 d in natural light, they were transplant in medium containing humus, perlite and soil (1:1:1), the living rate of the plantlets could reach 94%.

Key words: *Syngonium Podophyllum* Schott; Tissue culture; Rapid propagation; Culture medium

程中的褐变发生作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与儿茶素处理

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp.) 取自华南师范大学生物园, 按照文献^[2]的方法, 取其第2和第3片叶片, 经表面消毒后, 用0.3 mg/L 儿茶素浸泡10 min, 置于MS+3 mg/L 6-BA 培养基上, 在24℃、2000 lx 光照16 h/d 条件下培养。以等量蒸馏水处理的外植体为对照。

1.2 褐变率统计

对离体培养4、8、12 d 的外植体统计褐变率, 既褐变外植体数占培养外植体总数的百分率。

1.3 叶片显微结构观察

叶片经徒手切片后, 按照石碧等^[9]方法, 用8%香草醛-盐酸溶液染色, 用光学显微镜观察显微结构。

1.4 鞣质含量测定

用50%丙酮溶液提取, 离心, 收集提取液。按照王坤和鲁静(2004)^[7]方法测定鞣质含量。以新鲜外植体的研磨液作为对照。

1.5 PPO、POD 和 PAL 活性测定

按照 Lee and Smith 等^[8]和 Lee and Liu 等^[9]方法分别测定蝴蝶兰叶片外植体在离体培养期间 PPO 活性和 POD 活性, 按照许传俊等^[10]方法测定 PAL 活性。

不明显(图 1A); 培养第 8 天的对照(图 1C)和儿茶素处理(图 1D)的外植体, 培养基中皆有褐色物质渗入, 儿茶素处理的外植体分泌到培养基中的褐色物质较多(图 1D)。

0.3 mg/L 儿茶素处理的外植体培养第 4 天, 褐变率高于对照 227.6%(图 2), 随着培养时间的延长, 褐变率不断升高, 培养第 8 天, 儿茶素处理的外植体褐变率高于对照 118.1%, 培养 12 d 的褐变率为 98.7%高于对照 117.2%。

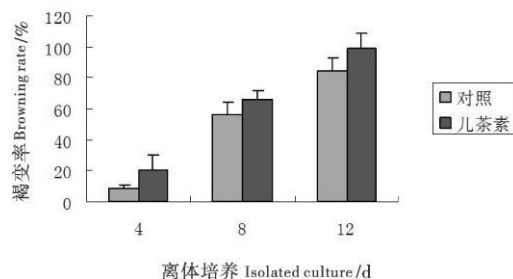


图 2 0.3 mg/L 儿茶素处理对蝴蝶兰叶片外植体褐变率的影响

Fig. 2 Effect of catechin at 0.3 mg/L on the browning percentage in leaf explants in *Phalaenopsis* sp.

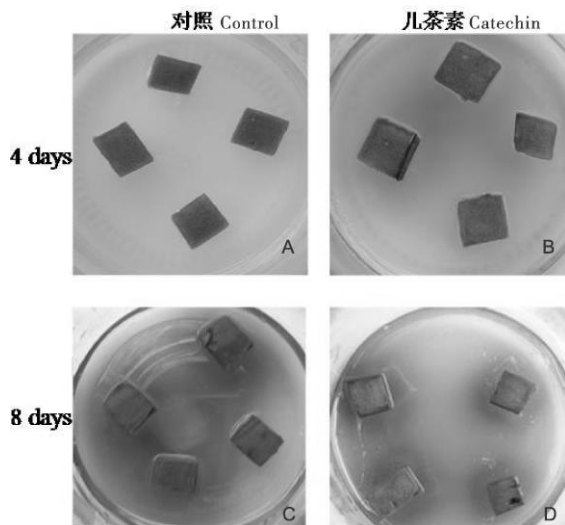


图 1 0.3 mg/L 儿茶素处理对蝴蝶兰叶片外植体褐变的影响

Fig. 1 Effect of catechin at 0.3 mg/L on the browning in leaf explants in *Phalaenopsis* sp.

2 结果与分析

2.1 儿茶素促进蝴蝶兰叶片外植体褐变发生

蝴蝶兰外植体经 0.3 mg/L 儿茶素浸泡处理后, 在 MS 培养基上培养第 4 天, 外植体边缘出现褐变, 有褐色物质分泌到培养基中(图 1B), 对照外植体肉眼观察褐变

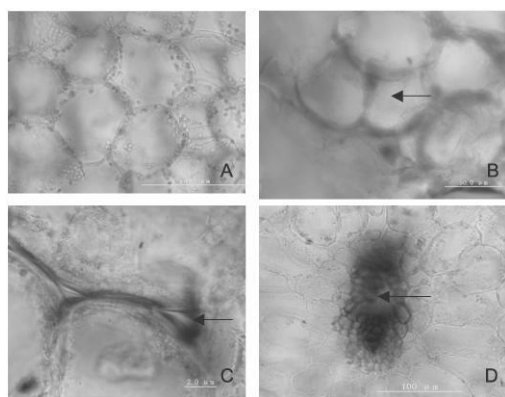


图 3 蝴蝶兰叶片外植体经香草醛-盐酸溶液染色后的叶肉细胞(箭头指向)

Fig. 3 The mesophyll cell of leaf explants in *Phalaenopsis* sp. by coloration with vanillin-hydrochloric acid solution

香草醛-盐酸溶液与鞣质反应能产生桃红色。蝴蝶兰对照叶片外植体培养 0 d, 经香草醛-盐酸溶液染色后, 叶肉细胞不出现桃红色(图 3A), 处理的蝴蝶兰外植体培养 4 d 叶肉细胞(图 3B)、以及维管束(图 3C)和细胞间隙(图 3D)被染成桃红色, 说明外植体褐变发生过程中产生的鞣质主要分布在维管束和细胞, 毒害细胞。

2.2 儿茶素对蝴蝶兰叶片外植体鞣质含量的影响

对照和儿茶素处理的蝴蝶兰叶片外植体培养 0 d, 体内鞣质含量较高, 培养第 4 天外植体内的鞣质含量降

低,第8天后再增加(图4);儿茶素处理的外植体经离体培养后,体内鞣质含量都高于对照,培养第8天外植体的边缘出现大量褐色物质并分泌到培养基内,可能是鞣质分泌的结果。

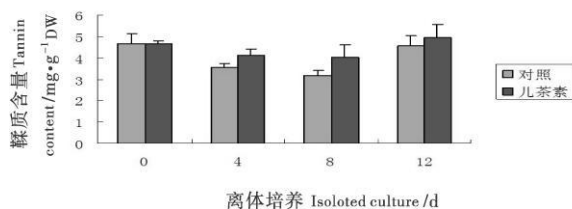


图4 儿茶素处理对蝴蝶兰叶片外植体培养期间鞣质含量的影响

Fig. 4 Effect of catechin on tannin content in leaf explants in *Phalaenopsis* sp.

2.3 儿茶素对蝴蝶兰叶片外植体 PPO、POD 和 PAL 活性的影响

对照叶片外植体在离体培养后, PPO 活性升高, 第4天与第8天外植体 PPO 活性差别不明显, 第8天后活性急剧增加, 培养第12天达到最大值(图5a)。儿茶素处理的外植体 PPO 活性不断升高, 在培养期内高于对照。在培养期间, 儿茶素处理的蝴蝶兰外植体 POD 活性高于对照, 在培养前期(0~8 d), 对照和儿茶素处理的 POD 活性大幅度升高, 第8天达到最大值, 儿茶素处理的外植体 POD 活性略高于对照, 培养8 d后的降低速率比对照缓慢(图5b)。蝴蝶兰叶片外植体离体培养初期 PAL 活性较低, 随着培养时间的延长 PAL 活性升高, 培养第8天达到最大值, 儿茶素处理的外植体 PAL 活性高于对照(图5c)。

3 讨论

香草醛-盐酸反应出现桃红色或淡红色, 是鞣质的特征颜色反应, 用于鞣质进行的定性检测^[11]。该试验发现儿茶素处理的蝴蝶兰叶片外植体, 经香草醛-盐酸溶液染色后, 均出现桃红色或淡红色。Laukkanen^[12]对松褐变的组织, 用香草醛-盐酸溶液染色, 发现褐变的愈伤组织呈现草红色, 愈伤组织具有较高鞣质含量。该试验也发现, 蝴蝶兰叶片外植体在培养0 d 鞣质含量较高, 推测是切割叶片获外植体时, 破坏部分细胞的结构, 使存在于细胞内的鞣质以及单宁囊细胞被释放出来^[13-14]; 离体培养4 d 和8 d 的外植体鞣质量减少, 该时期外植体褐变已明显, 推测蝴蝶兰自身所含有的鞣质是褐变发生的底物, 与酶接触发生反应, 形成褐变, 随着褐变发生的加剧, 外植体伤口处细胞膜透性增加, 更多的酚类物质渗出, 酶进一步与这些物质反应, 产生大量的黑色或褐色的物质(包括鞣质), 毒害外植体。

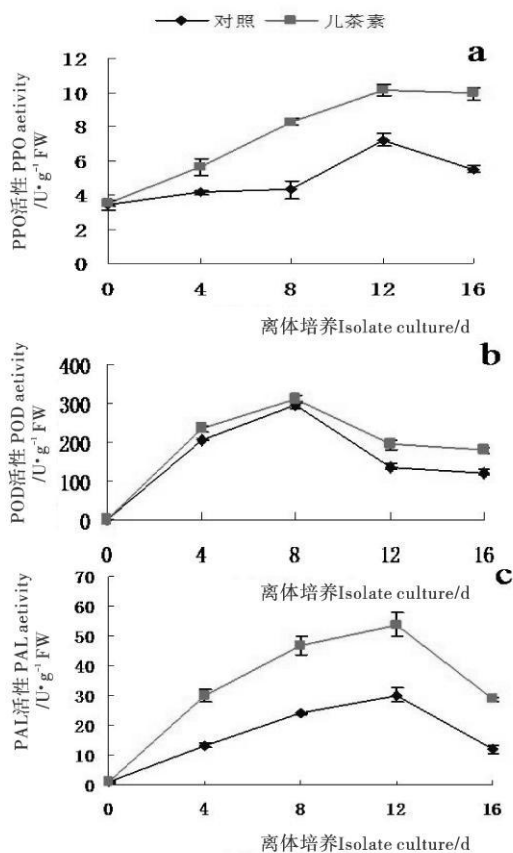


图5 儿茶素处理对蝴蝶兰外植体培养过程中 PPO、POD 和 PAL 活力的影响

Fig. 5 Effect of catechin on the specific activities of PPO, POD and PAL during tissue culture of leaf explants in *Phalaenopsis* sp.

经儿茶素处理的蝴蝶兰外植体鞣质含量高于对照, 褐变发生在第4天, 而对照外植体一般在第5天发生褐变。PAL、PPO、POD 活性在第4天明显升高, 进一步说明鞣质可能是蝴蝶兰外植体褐变的底物。也有报道认为鞣质可能是褐变的产物^[6, 15]。蝴蝶兰外植体褐变与外植体内多酚氧化酶(PPO)的活性有着密切的关系^[3], 外植体经鞣质儿茶素处理后, 体中PPO 活性在培养0~4 d(即褐变发生前)与对照差别不大, 培养第4天后PPO 活性急剧增加, 高于对照, 第8天外植体的褐变程度严重, 大量褐变产物分泌到培养基中, 儿茶素通过PPO 作用导致褐变加重。第12天外植体PPO 活性下降, 可能与褐变组织中酶反应产物较高起制约作用有关。推测POD 不是蝴蝶兰褐变发生的主要催化酶系, 因为儿茶素处理的蝴蝶兰外植体在培养4~8 d后POD 的活性却降低, 褐变加重。而蒋益红^[6]认为POD 是引起百合褐变的主要因素。不同植物材料POD 的作用机制可能不同。

PAL 是植物细胞次生代谢物质合成的一个关键酶, PAL 活性高, 褐变容易发生。蝴蝶兰外植体褐变发生过程中, PAL 酶活力随蝴蝶兰外植体褐变加剧而增加, 褐变过程中 PAL 基因的表达与褐变成正相关^[10]。使用 PAL 抑制剂氨基氧基乙酸能有效的抑制莴苣^[17] 和马铃薯^[18] 愈伤组织的褐变。通过抑制缩合鞣质合成的途径限制性关键酶的活性, 可能是实现抑制褐变的目的。

参考文献

- [1] 伍成厚, 叶秀姝, 梁承邺. 蝴蝶兰愈伤组织诱导研究[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(4): 29-31.
- [2] 许传俊, 李玲. 几种培养基及光照对蝴蝶兰叶片外植体褐变的影响[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(1): 9-12.
- [3] 许传俊, 李玲, 李红, 等. 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[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1111-1113.
- [4] 于守超, 赵兰勇, 王芬, 等. 植物组织培养过程中外植体褐变机理研究进展[J]. 山东林业科技, 2004(5): 61-63.
- [5] 谭仁祥. 植物成分分析[M]. 1 版. 北京: 科学出版社, 2002: 514-530.
- [6] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000, 18: 21-23.
- [7] 王坤, 鲁静. 中药材中鞣质含量测定方法的研究[J]. 中国药事, 2004, 18(6): 361-365.
- [8] Lee C Y, Smith N L. Blandhing elect on polyphenol oxidase activity in table beet[J]. J Food Sci, 1979, 44(1): 82-86.
- [9] Lee F M, Liu Y H. Peroxidase activity in ethylene-, ABA-, or MeJA-

treated rice roots[J]. Bot Bull Acad Sinica, 1996, 37: 201-207.

- [10] 许传俊, 李红, 李玲. 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 PAL 基因的表达变化[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(1): 50-54.
- [11] 徐勤. 鞣质的研究进展[J]. 华夏医学, 2004, 17(1): 113-115.
- [12] Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of scots pine callus derived from mature buds[J]. Tree Physiology, 2000(20): 467-475.
- [13] Sami-Manchado P, Le R E, Le G et al. Phenolic composition of litchi fruit pericarp[J]. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 2000, 48(12): 5995-6002.
- [14] 慈志娟, 陈学森, 张立杰, 等. 杏果实酶促褐变机理的研究初报[J]. 山东农业科学, 2006(6): 17-21.
- [15] Marita I C, Galen P, Edmundo M S. Induction of chilling injury in jicama (Pachyrhizus erosus) roots: changes in texture/color and phenolics/Postharvest[J]. Biology and Technology, 2002(25): 311-320.
- [16] 蒋益红. 百合褐变与多酚氧化酶和过氧化物酶活性关系的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(5): 518-522.
- [17] Murata M, Tanaka E, Minoura E. Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning repression of phenylalanine ammonia-lyase activity and improvement on sensory evaluation during storage[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2004, 68(3): 501-507.
- [18] Cantos E, Tudela J A, Gil M I et al. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(10): 3015-3023.

Effect of Catechin on Browning of Leaf Explants in Tissue Culture of *Phalaenopsis* sp.

TAN Ru-fang¹, ZHOU Wen-ling¹, XU Chuan-jun^{1,2}, LI Ling¹

(1. College of Life Science, Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China; 2. Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen Fujian 316006, China)

Abstract: The browning percentage of leaf explants of *Phalaenopsis* sp., treated with 0.30 mg/L of catechin and cultured in MS medium containing 3 mg/L 6-BA (pH 5.8) for first four days, were higher 227.6% than that of the controls. 8% (w/v) vanillin-hydrochloric acid assay confirmed that tannins were distributed in intracellular fractions and vascular bundle of leaf explants. Cutting of leaf explants caused more accumulation of tannin in them cultured 0 day. Tannin contents reduced in the first four days and then increased after first eight days. It was found that increased activities of PPO, POD and PAL, as well as the more tannin contents in catechin treated leaf explants resulted in promotion of browning development, leaf explants treatment with catechin had a high POD activity in them culture at 8th days, while the activities of PPO and PAL were higher cultured at 12th days.

Key words: Catechin; *Phalaenopsis* sp; Leaf explants; Browning; Tannin