

三种抗氧化剂对曼地亚红豆杉愈伤组织褐化及相关物质含量的影响

郑超, 徐晟, 夏冰, 郑玉红, 贺佳, 彭峰, 汪仁*

江苏省中国科学院植物研究所, 南京210014

摘要: 采用不同浓度聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、维生素C (VC)、柠檬酸3种抗氧化剂处理褐化的曼地亚红豆杉愈伤组织, 检测结果表明, 在柠檬酸 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、VC $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或PVP $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下总酚含量为最低, VC、柠檬酸处理后总酚含量下降显著, 分别比对照减少77.8%、87.4%, 而PVP处理后下降不显著; 与愈伤组织褐化相关的多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD), 在PVP浓度为 2.5 和 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时活性分别达到最低, 与对照相比下降72.6%和97.8%。相关性分析结果表明, 愈伤组织褐化程度与总酚含量呈显著正相关, 而总酚含量与PPO、POD活性则呈负相关。可见, 抗氧化剂VC和柠檬酸处理红豆杉愈伤组织, 能有效抑制总酚的积累, 降低其褐化程度。

关键词: 曼地亚红豆杉; 愈伤组织褐化; 总酚含量; POD; PPO

Effects of Three Antioxidants on Callus Browning and Its Related Substance Contents in *Taxus media* Rehder

ZHENG Chao, XU Sheng, XIA Bing, ZHENG Yu-Hong, HE Jia, PENG Feng, WANG Ren*

Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: Different concentrations of polyvinylpyrrolidone (PVP), vitamin C (VC) and citric acid were performed on callus browning of *Taxus media*. The result showed that the total phenolic content was the lowest at $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of citric acid, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of VC or $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of PVP. Compared with the control, the total phenolic content was significantly decreased by 77.8% and 87.4% after treatment with VC and citric acid. Additionally, activities of callus browning-related enzymes PPO and POD were reduced by 72.6% and 97.8% at their lowest levels under treatments with 2.5 and $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP respectively. The correlation analysis among the browning degrees of callus, total phenolic content, PPO and POD activities was also carried out. A significant positive correlation between total phenolic content and callus browning was found. But total phenolic content was negatively correlated to PPO and POD activities. It indicates that VC and citric acid are more effective to inhibit total phenolic accumulation in *T. media* callus, and thus reducing callus browning.

Key words: *Taxus media*; callus browning; total phenolic content; POD; PPO

自在太平洋紫杉中发现紫杉醇(Wani等1971)以来, 红豆杉的相关研究已成为植物研究领域的一大热点。但迄今为止, 红豆杉愈伤组织分化诱导成植株的体系仍未建立。这一体系的建立不仅能为红豆杉种苗生产提供新的方法, 而且能为紫杉醇半合成提供大量的原料来源。夏铭等(1996)和李冬杰等(2005)的研究结果表明, 愈伤组织在培养过程中严重褐化是阻碍这一体系构建的主要原因。我们也发现, 生长良好的初代愈伤组织经过继代后迅速生长, 但褐化也随之加快。因此, 培养良好的胚性愈伤组织既要使愈伤组织能正常生长, 同时又要抑制其褐化。

红豆杉愈伤组织褐化的直接原因是醌类物质氧化导致酚醛类物质的产生, 而酚醛类物质的含

量又直接影响愈伤组织褐化的程度(Rocha和De Morais 2005)。郭艳和杨海玲(2009)报道, 导致褐化的总酚按照组成结构可以分为苯氨基羧酸类(包括邻羟基苯酚、儿茶酚、没食子酸、莽草酸)、苯丙烷衍生物(包括绿原酸、肉桂酸、木质素等)、黄烷衍生物(花青素、黄酮芸香碱)等, 但在不同的植物中酚酸的种类也不一样。研究表明, 多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxi-

收稿 2012-12-26 修定 2013-02-06

资助 国家高技术研究发展计划(“863”计划)子课题(2011AA-10A206)、江苏省农业自主创新资金项目[CX(12)2041]、江苏省苏北发展计划(BN2012078)。

* 通讯作者(E-mail: jswangren@yahoo.com.cn; Tel: 025-84347111)。

dase, POD)都参与褐化物质合成,其中PPO是植物体内催化酚类物质的主要酶,能催化游离酚酸的羟基化反应和羟基酚脱氢变成醌类物质,醌类物质再与细胞内的蛋白结合生成黑色素(Yoruk和Marshall 2003),POD是由单一肽链与一个铁卟啉辅基结合构成的血红蛋白,催化过氧化氢氧化酚类的反应,这两种酶在植物愈伤组织的褐化过程中起重要作用(Kolattukudy等1992; Winkel-Shirley 1999)。目前,红豆杉褐化的机制仍不清楚。本研究采用抗氧化剂聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、维生素C (vitamin C, VC)、柠檬酸处理曼地亚红豆杉的褐化愈伤组织,从而了解愈伤组织褐化程度、PPO和POD活性及总酚含量之间的关系。此外,通过分析不同抗氧化剂对愈伤组织褐化程度的影响,旨在为抑制红豆杉愈伤组织褐化提供一定的理论依据。

材料与方法

1 材料及处理

曼地亚红豆杉(*Taxus media* Rehder)愈伤组织是本实验室利用改良的B₅培养基诱导获得,外植体采自江苏省·中国科学院植物研究所苗圃地,为当年生的嫩茎,经数次继代,愈伤组织表面为褐色,内部为浅黄色。用不同抗氧化剂处理继代后的褐化愈伤组织,抗氧化剂为过滤灭菌后的PVP、VC、柠檬酸,浓度分别为0、2.5、5.0、7.5、10.0 mg·L⁻¹。每个处理设置3个重复,于处理1周后观察愈伤组织褐化程度并检测PPO和POD活性及总酚含量。

2 方法

2.1 总酚含量的测定

采用Singleton (1999)的Folin-Ciocalteu方法检测总酚含量。具体操作如下:取经处理后的愈伤组织0.5 g,充分研磨,加入5 mL 40%甲醇,55 °C浸提30 min。4 000×g离心15 min,上清液备用。取100 μL上清液与1 mL Folin-Ciocalteu试剂(Sigma公司产品,使用时稀释10倍)混合,放置3 min,再加入0.4 mL 7.5%的Na₂CO₃,充分混匀后,在765 nm下检测吸光度,最后结果换算成每克提取物含有的毫克数[mg·g⁻¹ (FW)]。以没食子酸为标准物,绘制标准曲线:精确称取没食子酸100 mg,置于100 mL容

量瓶中,使其终浓度为1 mg·mL⁻¹。用移液器分别准确吸取没食子酸标准液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL,建立一元线性回归方程,具体操作方法同上所述。

2.2 PPO和POD活性测定

PPO活性测定采用陈建勋和王晓峰(2006)书中的方法进行,并略作修改。具体操作如下:准确称取0.5 g经不同处理的愈伤组织,加入0.1 mol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH 6.8),研磨并定容至5 mL,4 °C下4 000×g离心15 min,取上清粗酶液备用。酶活测定体系为:3.5 mL磷酸缓冲液(pH 6.8)、1 mL邻苯二酚、0.5 mL粗酶液,在398 nm波长下每30 s记录一次吸光值,共记录5 min。空白对照为反应液中加入煮沸5 min后的粗酶液。

POD活性检测采用Abeles和Biles (1991)的愈创木酚法。

2.3 数据统计与处理

所有实验均有3个平行设计,愈伤组织褐化程度、总酚含量、POD和PPO活性的相关性及其显著性评价采用Graphpad Prism 5.0和SPSS 17.0软件完成。

实验结果

1 不同抗氧化剂下愈伤组织的褐化程度

由B₅培养基诱导的愈伤组织在数次继代后,褐化程度加深(图1-A);褐化的愈伤组织经不同抗氧化剂处理后,表面重新长出绿色的愈伤组织(图1-B),且比处理前更绿。每个处理下的个体差异较大,整体的褐化状况如表1所示。

2 不同抗氧化剂处理对总酚含量的影响

以没食子酸为标准品,测定得到没食子酸的标准曲线,其相关系数 $R > 0.999$,标准曲线的适合浓度在0~0.6 mg·mL⁻¹之间。

由图2可见,3种抗氧化剂以不同浓度处理愈伤组织后总酚含量有差异:随着PVP处理浓度的上升,愈伤组织总酚含量先降低后升高,浓度为5.0 mg·L⁻¹时,总酚含量最低,但与对照相比无显著下降;VC处理后的愈伤组织,随着处理浓度的升高,其总酚含量先上升后下降,VC浓度为10.0 mg·L⁻¹时,总酚含量最低,与对照相比下降显著(减少77.8%);经5.0 mg·L⁻¹柠檬酸处理的愈伤组织中总酚含量最低,比对照减少了87.4%,下降显著,10.0 mg·L⁻¹柠檬酸

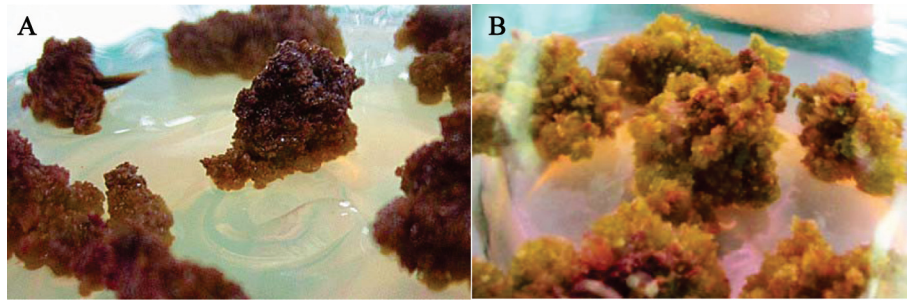


图1 抗氧化剂处理前(A)后(B)的愈伤组织状态

Fig.1 Callus status before (A) and after (B) antioxidant treatment

表1 三种不同抗氧化剂处理下愈伤组织的褐化程度

Table 1 Browning degrees of callus treated with three different antioxidants

抗氧化剂	浓度/mg·L ⁻¹	褐化程度
对照	0	+++
PVP	2.5	+++
	5.0	++
	7.5	+++
	10.0	+++
VC	2.5	+++
	5.0	++
	7.5	++
	10.0	+
柠檬酸	2.5	++
	5.0	+
	7.5	++
	10.0	+

“+”多少代表褐化程度。

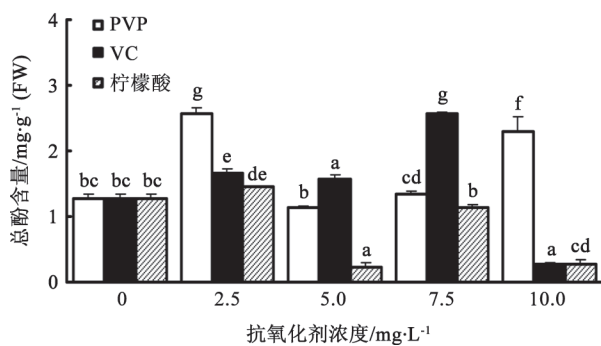


图2 三种抗氧化剂处理对总酚含量的影响

Fig.2 Effects of three antioxidants on total phenolic content
同一测定指标上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 图3
同此。

处理也能显著降低愈伤组织中的总酚含量(比对照降低76.2%)。可见, 3种抗氧化剂在0~10.0 mg·L⁻¹

的浓度范围内, 柠檬酸处理对总酚含量降低的效果最为显著, 其次是VC, 而PVP处理的效果不显著。

3 不同抗氧化剂对POD和PPO活性的影响

不同抗氧化剂处理1周后, 愈伤组织中POD活性存在差异(图3-A): 不同浓度(2.5、5.0、7.5和10.0 mg·L⁻¹)的PVP处理后, POD活性与对照相比均有显著下降, 降幅分别为97.5%、97.1%、91.6%和97.8%, 各处理浓度之间差异不显著; 不同浓度(2.5、5.0、7.5和10.0 mg·L⁻¹)的柠檬酸处理后, 也较为显著地降低了愈伤组织POD的活性, 与对照相比, 分别下降了89.9%、85.2%、93.1%和83.8%, 其中7.5 mg·L⁻¹柠檬酸处理的效果最显著; 不同浓度的VC处理后, 愈伤组织中POD的活性呈现出先下降后上升的趋势, 在5.0 mg·L⁻¹的浓度处理下, POD活性最低, 与对照相比降低了93.1%, 10.0 mg·L⁻¹ VC处理则提高了POD活性, 与对照相比提高了25.7%。综合比较3种抗氧化剂处理对愈伤组织中POD活性的影响, 发现PVP处理抑制POD活性的效果最为明显, 其次为柠檬酸, VC在大部分处理浓度下抑制POD活性。

图3-B显示, 经PVP处理的愈伤组织, 其PPO活性先下降后上升, 在2.5 mg·L⁻¹浓度处理下, PPO活性最低, 与对照相比降低72.6%; 随着PVP处理浓度的增加(5.0~10.0 mg·L⁻¹), 与对照相比, PPO活性均显著增加。VC处理后, 愈伤组织中PPO活性先下降后上升, VC浓度为5.0 mg·L⁻¹时, PPO活性最低, 与对照相比下降了58.8%; 随着VC处理浓度的增加, PPO活性上升, 但与对照相比没有显著差异。采用柠檬酸处理的愈伤组织, 其PPO酶活表现为先上升后下降, 在7.5 mg·L⁻¹柠檬酸处理下, PPO活性最低, 与对照相比下降了20.3%, 但并没有达到显著

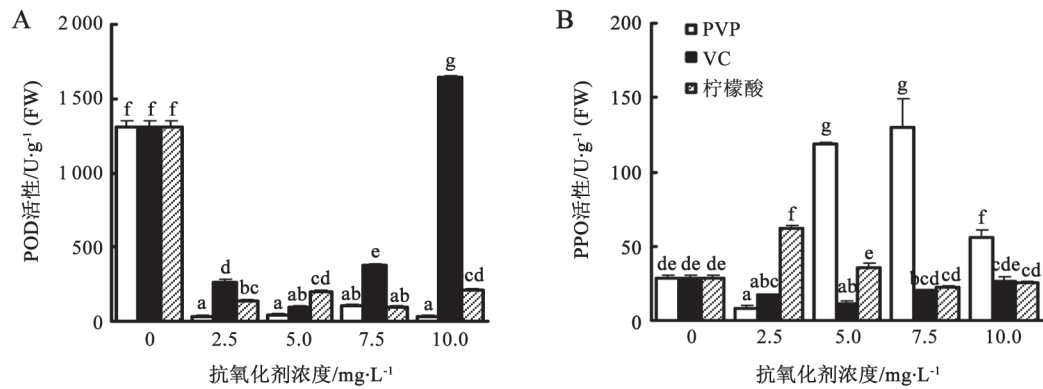


图3 三种抗氧化剂处理对POD (A)和PPO (B)活性的影响
Fig.3 Effects of three antioxidants on POD and PPO activities

性差异。可见, PVP抑制PPO活性的效果最为明显。

4 总酚含量、POD和PPO活性与褐化程度的相关性分析

由图2和图3可见, 不同抗氧化剂处理后, PPO和POD活性与总酚含量的积累之间没有明显的相关性, 而愈伤组织褐化程度与总酚含量之间则表现出较为一致的变化趋势。通过Graphpad Prism 5.0软件分析发现, 褐化程度与总酚含量的相关度最高, 为0.729, 褐化程度与PPO活性呈正相关, 与POD活性呈负相关; PPO和POD活性与总酚含量呈负相关, 且POD与总酚含量的相关度要高于PPO与总酚含量的相关度(表2)。尽管总酚含量与PPO和POD活性的变化不太一致, 但是总酚含量的多少基本可以反映出植物愈伤组织的褐化程度。

表2 愈伤组织褐化程度、总酚含量、PPO和POD活性的相关性

Table 2 The correlation among the browning degree of callus, total phenolic content and activities of PPO and POD

	总酚含量	PPO活性	POD活性	褐化程度
总酚含量	1	0.756	0.229	0.005
PPO活性	-0.096	1	0.435	0.566
POD活性	-0.359	-0.237	1	0.507
褐化程度	0.729	0.176	-0.202	1

对角线下方为相关性系数, 对角线上方为P值。

讨 论

张彦波等(2007)研究发现, 柠檬酸和抗坏血酸处理喜树愈伤组织, 不同程度地降低了其褐化程度。其中, 培养基中附加30 mg·L⁻¹抗坏血酸和

5 g·L⁻¹活性碳可以有效抑制继代培养中愈伤组织的褐化率。这与我们的部分结果存在一定的相似性。印芳等(2008)在蝴蝶兰的研究中发现, 褐化程度高的品种, 总酚含量也较高; 并且PPO活性与褐化程度呈正相关, 总酚含量与PPO和POD活性呈负相关。本实验结果与上述研究较为一致。

此外, 研究还发现, 红豆杉嫩枝中含有丰富的木质素类、黄酮类和酚类衍生物(Yang等1999), 而这些物质均极易引起植物的褐化。其中, 植物细胞中木质素类物质的生成又依赖于PPO和POD(Chittoor等1999; Kolattukudy等1992), 因此PPO和POD与红豆杉的褐化在理论上存在正相关的关系。然而, 在墨西哥红豆杉中, Hector等(2009)发现矮壮素浓度在0.5 mg·L⁻¹时PPO活性和紫杉醇含量最高, 在5 mg·L⁻¹时酚类含量最高, PPO活性和酚类含量没有直接的相关性变化。在本研究中, 我们发现PPO和POD活性与总酚含量的积累呈负相关, 相关性较小; 与Hector等(2009)的结果一致。Hector等(2009)认为, PPO活性与酚类物质相关性不大可能源于其参与了紫杉醇代谢途径的调节; Yoruk和Marshall (2003)发现, PPO在褐化过程中生成中间产物5,6-苯醌吡啶; Ajikumar等(2010)通过大肠杆菌人工合成紫杉醇时发现, 伴随着紫杉醇的生成, 代谢产物中还检测到吡啶类物质, 而且其含量与紫杉醇的合成呈负相关变化。因此, PPO活性可能直接影响着紫杉醇的代谢, 但是其具体机制仍需进一步研究。

本研究发现, 总酚含量基本可以反映红豆杉愈伤组织的褐化程度。因此, 通过降低愈伤组织

中总酚含量来抑制褐化在理论上是可行的。不过, 由于不同浓度的抗氧化剂处理后, PPO和POD活性与愈伤组织的褐化程度之间并没有显著的相关性, 所以通过抑制PPO和POD活性, 并不能达到降低褐化程度的效果。在后续的研究中, 需要寻找并调节与总酚含量直接相关的酶及其基因的表达, 从而达到抑制红豆杉愈伤组织褐化的目的。

参考文献

- 陈建勋, 王晓峰主编(2006). 植物生理学实验指导. 第2版. 广州: 华南理工大学出版社, 30
- 郭艳, 杨海玲(2009). 植物组织培养中的褐化现象及解决途径. 山西农业科学, 37 (7): 14~16, 31
- 李冬杰, 张进献, 魏景芳, 李世杰(2005). 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系. 植物生理学通讯, 41 (1): 95~98
- 夏铭, 吴绛云, 张丽梅(1996). 红豆杉组织培养中褐变问题的研究. 生物技术, 6 (3): 18~20
- 印芳, 葛红, 彭克勤, 赵伶俐, 周玉杰, 李秋香(2008). 蝴蝶兰组培褐变与酚酸类物质及相关酶活性的关系. 中国农业科学, 41 (7): 2197~2203
- 张彦波, 龚霞峰, 胡江琴, 庞基良, 王利琳(2007). 喜树愈伤组织诱导与抑制褐化的研究. 安徽农业科学, 35 (36): 11902~11904
- Abeles FB, Biles CL (1991). Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. Plant Physiol, 95: 269~273
- Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G (2010). Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. Science, 330: 70~74
- Chittoor JM, Leach JE, White FF (1999). Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds). Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Boca Raton, Florida: CRC Press, 171~193
- Hector B, Yue LZ, Consuelo S, Zun AX (2009). Increase of taxol production in *Taxus globosa* shoot callus by chlorocholine chloride. Open Nat Prod J, 2: 33~37
- Kolattukudy PE, Mohan R, Bajar MA, Sherf BA (1992). Plant peroxidase gene expression and function. Biochem Soc Trans, 20 (2): 333~337
- Rocha AMCN, De Morais AMMB (2005). Polyphenoloxidase activity of minimally processed 'Jonagored' apples (*Malus domestica*). J Food Process Pres, 29 (1): 8~19
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol, 299: 152~178
- Wani MC, Taclor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 93 (9): 2325~2327
- Winkel-Shirley B (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. Physiol Plant, 107: 142~149
- Yang SJ, Fang JM, Cheng YS (1999). Lignans, flavonoids and phenolic derivatives from *Taxus mairei*. J Chin Chem Soc, 46: 811~818
- Yoruk R, Marshall MR (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. J Food Biochem, 27: 361~422