

抗褐化剂对葡萄愈伤组织继代培养过程中酚类物质、相关酶及其基因表达的影响

饶慧云¹, 邵祖超¹, 柳海宁^{1,*}, 吴月燕¹, 刘蓉¹, 李学孚^{1,2}, 李美芹^{1,2}, 钱萍仙¹

¹浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波315100; ²上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306

摘要: 本文研究不同浓度的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、维生素C (Vc)、甘露醇、柠檬酸、硝酸银(AgNO₃)、活性炭(AC)和硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃) 7种抗褐化剂对葡萄愈伤组织继代培养过程中抗褐化效果的影响。结果表明, 与对照比较, 除Na₂S₂O₃处理外, 其余处理的愈伤组织褐化率皆极显著下降。抗褐化的效果依次为PVP (2.0 g·L⁻¹)>甘露醇(20.0 g·L⁻¹)>AgNO₃ (0.02 g·L⁻¹)>Vc (0.006 g·L⁻¹)>AC (2.5 g·L⁻¹)>柠檬酸(0.6 g·L⁻¹), 其褐化率分别比对照降低62.28%、58.29%、53.13%、50.17%、42.33%和35.67%。葡萄愈伤组织的褐变与对羟基苯甲酸的含量和阿魏酸的含量呈正相关, 与咖啡酸的含量呈负相关。愈伤组织的褐化程度与多酚氧化酶(PPO)活性呈极显著负相关, 与苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性呈极显著正相关; 与PPO基因的表达量呈极显著正相关, 与PAL基因的表达量呈显著负相关。因此, 在葡萄愈伤组织继代培养的过程中添加PVP (2.0 g·L⁻¹)、甘露醇(20.0 g·L⁻¹)和AgNO₃ (0.02 g·L⁻¹)等能够有效地防止愈伤褐变。

关键词: 抗褐化剂; 葡萄; 愈伤组织; 酚类物质; 酶活性; 基因表达

Effect of Browning Inhibitors on Callus Subculture of Phenolic Compounds, Enzyme and Gene Expression of Grape

RAO Hui-Yun¹, SHAO Zu-Chao¹, LIU Hai-Ning^{1,*}, WU Yue-Yan¹, LIU Rong¹, LI Xue-Fu^{1,2}, LI Mei-Qin^{1,2}, QIAN Ping-Xian¹

¹College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China; ²College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Grape calli were selected as suitable materials and treated with different concentrations of a variety of different browning inhibitors, including polyvinyl pyrrolidone (PVP), vitamin C (Vc), mannitol, citric acid, silver nitrate (AgNO₃), activated carbon (AC) and sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃), under grape callus subculture conditions to assess the effects of these agents on the browning rate of the calli. The results showed that the callus browning rate decreased significantly in all cases compared with the control, except for the callus subculture treated with Na₂S₂O₃. The anti-browning effects of the different browning inhibitors were as follow, PVP (2.0 g·L⁻¹)>mannitol (20 g·L⁻¹)>AgNO₃ (0.02 g·L⁻¹)>Vc (0.006 g·L⁻¹)>AC (2.5 g·L⁻¹)>citric acid (0.6 g·L⁻¹), and the associated browning rates had decreased by 62.28%, 58.29%, 53.13%, 50.17%, 42.33% and 35.67%, respectively. The para-hydroxybenzoic acid and ferulic acid contents were positively correlated with the browning rate of the callus, and negatively correlated with the content of caffeic acid. Negative and positive correlations were also found between the PPO, PAL activities and the browning rate of the callus, respectively. Furthermore, the expression levels of PPO and PAL were significantly positively and negatively correlated with the browning rate of the callus, respectively. These results therefore demonstrated that the addition of PVP (2.0 g·L⁻¹), mannitol (20 g·L⁻¹) or AgNO₃ (0.02 g·L⁻¹) could be useful to prevent callus browning during the subculturing of grape calli.

Key words: browning inhibitors; grape (*Vitis vinifera*); callus; phenolic compounds; enzyme activity; gene expression

褐化、污染和玻璃化是制约植物组培快速繁殖的3大重要因素。褐化现象主要发生在外植体, 在植物愈伤组织的继代培养、悬浮细胞培养、花药培养以及原生质体的分离与培养中也经常发生(郭艳和杨海玲2009)。褐化反应产生的醌类物质进一步与组织中的蛋白质发生聚合, 产生棕褐色或暗褐色物质而导致组织褐变, 并逐渐扩散到培

养基中, 抑制细胞内其它酶的活性, 导致整个组织代谢紊乱, 甚至死亡(胡彦和赵艳2004)。已有研究

收稿 2015-04-14 修定 2015-07-07

资助 宁波市重大科技专项(2015C110016)、浙江省科技厅项目(2013C24002)和宁波市科技创新团队项目(2011B82019)。

* 通讯作者(E-mail: nblhn@126.com; Tel: 13805863011)。

表明使用活性炭(active carbon, AC)、维生素C (VC)、硝酸银(AgNO₃)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)及柠檬酸(citric acid)等抗褐化剂能一定程度降低植物组织培养过程中愈伤组织的褐化, 如龚晓洁(2009)发现硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)、活性炭、Vc、柠檬酸和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等抗褐化剂都能减轻马铃薯的褐化率。周俊辉等(2000)认为植物组培中的褐变大多是由酶促褐变引起的, 酶、底物和氧是引起外植体褐变的3个基本条件。酚类化合物是褐变发生的主要底物, 与褐化有关的酚类主要有咖啡酸、阿魏酸、香豆酸、绿原酸、儿茶酚和对羟基苯甲酸等, 相关研究认为酚类物质的含量与褐变有关, 如阿月浑子、‘红地球’葡萄组培苗叶片(罗晓芳等1999)和蝴蝶兰组培叶片(许传俊等2005; 印芳等2008)的褐变。但还有一些研究认为褐变与酚类物质的含量没有必然联系, 而可能与它的种类关系密切(Degl’ Innocenti等2007)。引起褐变的相关酶有多种, 如南果梨贮藏褐变(马岩松等2001)和枇杷果肉褐变(陈绍军等2004)的研究认为褐变是酚类物质在有氧条件下被多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)催化的酶促褐变引起的。除PPO氧化酚类物质外, 过氧化物酶(peroxidase, POD)也可利用切割等胁迫释放的H₂O₂来催化酚类物质氧化, 导致组织褐变发生过氧化物酶(Degl’ Innocenti等2005)。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia, PAL)属于酚类合成酶, 是合成酚类物质的关键酶类之一, 因此可以通过抑制PAL活性, 抑制酚类的积累和合成, 从而抑制器官褐变的发生(Peiser等1998; Hisaminato等2001; Murata等2001)。研究认为PPO、POD和PAL等对植物组织发生褐变有着极其重要的作用(Weisshaar和Jenkins 1998; Brenda 1999; Henriksen等1999)。对于相关基因与褐变的关系的研究表明, 果实和蔬菜的褐变与PPO基因及其酶活性有关(Hunt等1993; Bachem等1994), Coetzer等(2001)认为马铃薯褐变中PPO基因的表达、活性和褐变程度呈正相关; 李正国等(2006)首次证实脐橙PAL活性变化以及PAL基因的表达与果皮褐变具有非常密切的关系。褐化是葡萄愈伤组织诱导和继代培养过程中常见的现象, 迄今为止, 葡萄愈伤组织继代培养过程中PPO、POD和PAL酶活性的变化及其基因表达与褐化之间的关系鲜有报道。

葡萄在愈伤组织诱导和继代培养过程中极易褐变, 因此控制其褐变对于建立快速繁殖无性系, 获得无病毒株系以及为转基因、细胞融合等深入研究均具有重要意义。本研究以葡萄茎段形成的愈伤组织为材料, 选择AgNO₃、AC、Na₂S₂O₃、PVP、Vc、甘露醇和柠檬酸7种抗褐化剂, 研究并探讨葡萄愈伤组织继代培养过程中褐化与不同酚类物质的含量, PPO、POD和PAL酶活性及其基因表达量之间的相关联系, 为葡萄愈伤组织继代培养过程中控制褐变提供理论依据和技术支撑。

材料与方 法

1 试验材料与方案设计

供试葡萄(*Vitis vinifera* L.)品种为‘金手指(Gold Finger)’, 以其茎段诱导的愈伤组织为材料。选取生长良好且一致的愈伤组织分别接种到继代培养基MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹上, 培养基分别添加抗褐化剂PVP (1.0、2.0、2.5和3.0 g·L⁻¹)、Vc (0.002、0.004、0.006和0.008 g·L⁻¹)、AC (0.5、1.5、2.5和3.5 g·L⁻¹)、柠檬酸(0.2、0.4、0.6和0.8 g·L⁻¹)、甘露醇(10.0、20.0、30.0和40.0 g·L⁻¹)、AgNO₃ (0.005、0.010、0.020和0.025 g·L⁻¹)和Na₂S₂O₃ (2.0、4.0、6.0和8.0 g·L⁻¹), 以不加抗褐化剂的为对照。

培养条件为温度(25±1) °C、光照强度25 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间16 h/8 h, 培养20 d后观察并统计不同处理愈伤组织的褐化率、褐化等级和生长状态。++++表示褐化最严重, +++表示大部分褐化, ++表示褐化较少, +表示褐化极少。同时选择不同浓度抗褐化剂处理中褐化率较低和生长状况良好的愈伤组织为材料, 分析其中没食子酸、绿原酸、咖啡酸、儿茶酚、香豆酸、对羟基苯甲酸和阿魏酸7种酚类物质的含量, PPO、POD和PAL的活性及其基因表达量, 每个样品均3次重复, 测定结果取平均值。

愈伤组织褐化率(%)=(褐化愈伤组织块数/愈伤组织总块数)×100

2 不同抗褐化剂处理愈伤组织中酚类物质的定性定量分析

选择没食子酸、绿原酸、咖啡酸、儿茶酚、香豆酸、对羟基苯甲酸和阿魏酸, 皆为标准品(≥99%), 均购自Sigma公司。标准溶液的配制和

样品溶液的制备参考吕海涛等(2007)的方法,并作适当的改动。

使用仪器为美国Agilent 1100LC HPLC仪,配有VWD紫外检测器,流动相乙酸、甲醇均为色谱纯;水用Milli-Q (美国Millipore公司)超纯水仪处理;流动相经0.45 μm 滤膜过滤。

色谱柱: EclipseXDB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μL), 流动相: A为甲醇; B为1% (V/V)乙酸水溶液;梯度洗脱程序: 流动相A在40 min内由5%上升到30%, 然后变为100%, 并维持5 min, 最后再返回到初始状态。柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 进样量: 20 μL 。

3 不同抗褐化剂处理愈伤组织中PPO、POD和PAL活性的测定

PPO活性测定参照朱广廉等(1990)的方法,并适当的改动。POD活性的测定采用李合生(2003)的愈创木酚比色法,并稍作修改。PAL活性的测定参考Solecka和Kacperska (2003)的方法。

4 PPO、POD和PAL基因相对表达量的分析

实时荧光定量PCR主要参考李晖等(2015)的方法适当改进。总RNA提取试剂盒购于Genotheramics公司, DNaseI酶液购于康为世纪公司。按康为世

纪公司的SuperRT cDNA第一链合成试剂盒的方法合成cDNA第一链。反转录反应体系(20 μL)为: dNTP Mix 4 μL 、primer Mix 2 μL 、RNA Template 5 μL 、5 \times RT Buffer 4 μL 、Super RT 1 μL 、RNase-free Water 4 μL 。根据葡萄POD、PPO和PAL全长序列,按照相对荧光定量RT-PCR引物设计原则在基因3'区设计3对特异引物(表1)。以Actin为内参设计一对特异引物(赵晓等2010),分别用于添加抗褐化剂的愈伤组织中PPO、POD和PAL的基因表达分析。反应在Invitrogen公司ABI7500FAST实时定量PCR仪上进行,方法参照全式金生物技术有限公司荧光定量试剂盒TransStart Green qPCR SuperMix UDG说明书。荧光定量PCR扩增体系为: cDNA模板1 μL 、Forward Primer 0.4 μL 、Reverse Primer 0.4 μL 、2 \times TransStart Green qPCR SuperMix UDG 10 μL 、Passive Reference Dye (50 \times) (optional),加水补足至20 μL 。扩增程序采用两步法: 50 $^{\circ}\text{C}$ UDG孵育2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min UDG失活, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性34 s, 共40个循环,反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。每个反应3个重复,采用ABI7500分析软件中Comparative CT ($\Delta\Delta\text{CT}$)法分析试验结果。

表1 荧光定量PCR引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	基因登录号	正向引物	反向引物
<i>Actin</i>	AF369524	5' CCCCATGCTATCCTTCG 3'	5' AGGCAGCTCAIAGTTCCTTCTC 3'
<i>POD</i>	XM_002279848	5' AGTTGGCTGGAGTTGTTGCT 3'	5' GTGATCGCATCCTTTGGTGG 3'
<i>PPO</i>	VVU83274	5' CCTTGAGCACGTCCACATA 3'	5' GGCGTGGTGACCGAAGAATA 3'
<i>PAL</i>	JN858957	5' GTGTCACCACTGGGTTTGGT 3'	5' GTGGCATGACTCTGTCCCGT 3'

实验结果

1 不同抗褐化剂对葡萄愈伤组织褐化的影响

抗褐化剂的种类和浓度对愈伤组织的抗褐化效果均表现差异极显著(表2和图1)。添加不同浓度柠檬酸、甘露醇、AC、Vc、PVP和AgNO₃的愈伤组织的褐化率均极显著低于对照,而添加Na₂S₂O₃的褐化率均极显著高于对照。随着柠檬酸浓度的上升,褐化率呈先上升后下降再上升的变化。其中添加0.6 g \cdot L⁻¹柠檬酸的愈伤组织的褐化率最低,比对照下降35.67%。随着甘露醇、AC、Vc、PVP

和AgNO₃浓度的上升,褐化率呈先下降后上升的变化。其中添加20.0和30.0 g \cdot L⁻¹甘露醇的愈伤组织的褐化率较低,分别比对照下降58.29%和55.65%;添加1.5和2.5 g \cdot L⁻¹AC的愈伤组织的褐化率较低,分别比对照下降38.28%和42.33%;添加0.006和0.008 g \cdot L⁻¹Vc的愈伤组织的褐化率较低,分别比对照下降50.17%和48.05%;添加2.0和2.5 g \cdot L⁻¹PVP的愈伤组织的褐化率较低,分别比对照下降62.28%和60.05%;添加0.020 g \cdot L⁻¹AgNO₃的愈伤组织的褐化率最低,比对照下降53.13%。随着Na₂S₂O₃浓度的上升,褐化率呈上升的变化。

表2 不同抗褐化剂对葡萄愈伤组织褐化的影响

Table 2 Effects of different browning inhibitors on browning of grape callus

处理	浓度/g·L ⁻¹	褐化率/%	褐化等级	生长状态
对照	—	73.62±1.15 ^{Aa}	++++	黄褐色, 疏松颗粒状, 生长状况一般
柠檬酸	0.2	42.36±1.14 ^{Cc}	+++	黄白色, 疏松颗粒状, 生长状况较差
	0.4	57.82±1.33 ^{Bb}	+++	黄白色, 疏松颗粒状, 生长状况较差
	0.6	37.95±0.92 ^{Cd}	++	淡黄色, 疏松颗粒状, 生长状况一般
	0.8	55.73±1.03 ^{Bb}	+++	黄白色, 疏松颗粒状, 生长状况较差
	甘露醇	10.0	20.52±1.36 ^{Bb}	++
甘露醇	20.0	15.33±1.44 ^{Cc}	+	黄绿色, 颗粒状, 生长状况一般
	30.0	17.97±0.47 ^{BCbc}	++	黄白色, 颗粒状, 生长状况一般
	40.0	21.45±0.89 ^{Bb}	++	黄白色, 颗粒状, 生长状况一般
	AC	0.5	53.58±1.37 ^{Bb}	++++
AC	1.5	35.34±1.86 ^{Ccd}	+++	淡黄色, 颗粒状, 生长状况一般
	2.5	31.29±1.13 ^{Cd}	++	淡黄色, 颗粒状, 生长状况一般
	3.5	36.98±1.02 ^{Cc}	+++	淡黄色, 疏松颗粒状, 生长状况较差
	Vc	0.002	38.34±0.66 ^{Bb}	+++
Vc	0.004	29.38±0.90 ^{Cc}	++	乳白色, 疏松颗粒状, 生长状况差
	0.006	23.45±1.47 ^{Dd}	+	黄绿色, 颗粒状, 生长状况一般
	0.008	25.57±1.29 ^{CDd}	++	乳白色, 疏松颗粒状, 生长状况一般
	PVP	1.0	16.18±0.38 ^{Bb}	++
PVP	2.0	11.34±0.70 ^{Cc}	+	黄绿色, 颗粒状, 生长状况较好
	2.5	13.57±1.36 ^{BCbc}	++	黄白色, 颗粒状, 生长状况好
	3.0	15.21±1.22 ^{BCb}	++	黄白色, 致密颗粒状, 生长状况好
	AgNO ₃	0.005	30.74±0.96 ^{Bb}	+++
AgNO ₃	0.015	25.62±1.11 ^{BCc}	++	黄白色, 颗粒状, 生长状况一般
	0.020	20.49±1.55 ^{Cd}	++	黄白色, 颗粒状, 生长状况一般
	0.025	30.32±0.90 ^{Bb}	+++	黄褐色, 颗粒状, 生长状况一般
	Na ₂ S ₂ O ₃	2.0	79.63±1.59 ^{Bb}	++++
Na ₂ S ₂ O ₃	4.0	81.49±1.20 ^{Bb}	+++++	黄白色, 雪花状, 生长状况较差
	6.0	86.73±0.75 ^{Cb}	+++++	黄白色, 雪花状, 生长状况较差
	8.0	89.67±1.41 ^{Cb}	+++++	黄白色, 雪花状, 生长状况较差

不同大写字母表示与对照间极显著差异1%水平, 小写字母表示显著性差异5%水平, 表中数据为平均值±标准误。下图表同此。

抗褐化剂的种类和浓度影响愈伤组织的生长状况(表2和图1)。对照的愈伤组织大部分褐化, 呈黄褐色、疏松颗粒状, 生长状况一般。添加2.0 g·L⁻¹ PVP的愈伤组织褐化极少, 呈黄绿色、颗粒状, 生长状况较好。添加0.006 g·L⁻¹ Vc和20.0 g·L⁻¹ 甘露醇的愈伤组织褐化极少, 呈黄绿色、颗粒状, 但生长状况一般。添加0.6 g·L⁻¹ 柠檬酸、2.5 g·L⁻¹ AC和0.02 g·L⁻¹ AgNO₃的愈伤组织褐化较少, 且生长状况介于对照和添加2.0 g·L⁻¹ PVP、0.006 g·L⁻¹ Vc以及20.0 g·L⁻¹ 甘露醇的愈伤组织之间。此外, 随着Na₂S₂O₃浓度的增加, 愈伤组织褐化严重, 由疏松颗粒状变为更加疏松的雪花状, 且生长状况较差。

综上所述, 抗褐化的效果依次为PVP (2.0 g·L⁻¹)>甘露醇(20.0 g·L⁻¹)>AgNO₃ (0.02 g·L⁻¹)>Vc (0.006

g·L⁻¹)>AC (2.5 g·L⁻¹)>柠檬酸(0.6 g·L⁻¹), 而Na₂S₂O₃不仅不能防止褐化, 反而促进了褐化。之后实验均采用此浓度的抗褐化剂。

2 不同抗褐化剂对葡萄愈伤组织中酚类物质的影响

由表3可知, 添加甘露醇和Na₂S₂O₃的处理中没食子酸的含量显著或极显著高于对照, 其余处理中没食子酸的含量均与对照差异不显著。添加甘露醇、AgNO₃和Na₂S₂O₃的处理中香豆酸的含量极显著高于对照, 其余处理中香豆酸的含量均与对照差异不显著。添加柠檬酸和AgNO₃的处理中儿茶酚的含量极显著高于对照, 而添加PVP和AC的处理中儿茶酚的含量显著或极显著低于对照, 其余处理均与对照差异不显著。除了添加Na₂S₂O₃的处理中对羟基苯甲酸的含量极显著高于对照外,

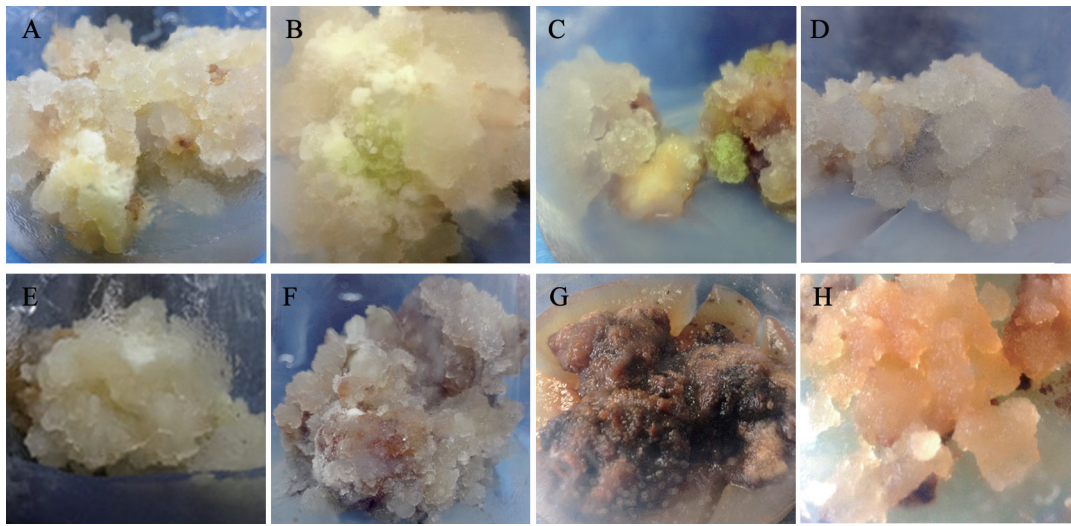


图1 不同抗褐化剂对葡萄愈伤组织生长的影响

Fig.1 Effects of different browning inhibitors on grape callus growth

A: 2.0 g·L⁻¹ PVP; B: 0.006 g·L⁻¹ Vc; C: 20 g·L⁻¹甘露醇; D: 0.6 g·L⁻¹柠檬酸; E: 2.5 g·L⁻¹ AC; F: 0.02 g·L⁻¹ AgNO₃; G: 2.0 g·L⁻¹ Na₂S₂O₃; H: 对照。

表3 不同抗褐化剂对愈伤组织酚类物质含量的影响

Table 3 Effects of different browning inhibitors on phenolic contents of grape callus

抗褐化剂	没食子酸含量/ μg·g ⁻¹	香豆酸含量/ μg·g ⁻¹	儿茶酚含量/ μg·g ⁻¹	对羟基苯甲酸含量/ μg·g ⁻¹	绿原酸含量/ μg·g ⁻¹	咖啡酸含量/ μg·g ⁻¹	阿魏酸含量/ μg·g ⁻¹
对照	0.95±0.01 ^{BCb}	0.63±0.03 ^{DEde}	0.74±0.08 ^{Bbc}	1.64±0.09 ^{Bb}	1.34±0.03 ^{Bb}	1.76±0.03 ^{Aa}	1.62±0.07 ^{Aa}
PVP	0.43±0.04 ^{Cb}	0.58±0.03 ^{DEde}	0.42±0.01 ^{Cd}	0.51±0.06 ^{De}	0.30±0.01 ^{Ff}	0.65±0.05 ^{Ef}	1.18±0.09 ^{Bc}
Vc	0.48±0.10 ^{Cb}	0.47±0.01 ^{Ee}	0.69±0.08 ^{Bbc}	0.71±0.01 ^{Dd}	0.95±0.02 ^{Cc}	1.18±0.04 ^{Cc}	1.40±0.10 ^{ABbc}
甘露醇	2.31±0.11 ^{ABa}	1.58±0.08 ^{Bb}	0.59±0.01 ^{BCcd}	0.73±0.04 ^{Dd}	0.59±0.05 ^{DEde}	0.80±0.02 ^{DEe}	0.78±0.05 ^{Cd}
柠檬酸	0.22±0.05 ^{Cb}	0.71±0.10 ^{Dd}	1.46±0.05 ^{Aa}	0.72±0.03 ^{Dd}	1.83±0.08 ^{Aa}	0.94±0.03 ^{Dd}	1.22±0.07 ^{Bc}
AgNO ₃	0.46±0.15 ^{Cb}	1.16±0.02 ^{Cc}	1.33±0.03 ^{Aa}	1.41±0.08 ^{BCc}	0.66±0.06 ^{Dd}	1.44±0.02 ^{Bb}	0.82±0.02 ^{Cd}
AC	0.55±0.02 ^{Cb}	0.60±0.08 ^{DEde}	0.45±0.06 ^{Cd}	1.37±0.04 ^{Cc}	0.48±0.01 ^{Ee}	0.71±0.06 ^{Eef}	1.39±0.09 ^{ABbc}
Na ₂ S ₂ O ₃	2.99±0.94 ^{Aa}	1.87±0.03 ^{Aa}	0.76±0.07 ^{Bb}	2.08±0.05 ^{Aa}	0.71±0.02 ^{Dd}	0.76±0.04 ^{Eef}	1.44±0.07 ^{ABab}

其余处理中对羟基苯甲酸的含量均显著或极显著低于对照。除添加柠檬酸的处理中绿原酸的含量极显著高于对照外,其余处理均极显著低于对照。各处理中咖啡酸的含量均极显著低于对照。除添加Na₂S₂O₃的处理中阿魏酸的含量与对照差异不显著外,其余处理中阿魏酸的含量均显著或极显著低于对照。综上所述,葡萄愈伤组织的褐变与对羟基苯甲酸的含量和阿魏酸的含量呈正相关,与咖啡酸的含量呈负相关。

3 不同抗褐化剂对葡萄愈伤组织中PPO、POD和PAL活性的影响

从图2-A可以看出,添加AC和Na₂S₂O₃的愈伤组织中PPO活性与对照差异极显著,其中AC处理中PPO活性极显著高于对照,而Na₂S₂O₃处理中

PPO活性极显著低于对照,其余处理中PPO活性均与对照差异不显著。从图2-B可以看出,各处理中POD活性均极显著低于对照。从图2-C可以看出,除添加Na₂S₂O₃的处理中PAL活性极显著高于对照外,其余处理中PAL活性均与对照差异不显著。可见,抗褐化剂的种类和浓度对愈伤组织中PPO、POD和PAL活性的影响不同。

4 不同抗褐化剂对葡萄愈伤组织中PPO、POD和PAL基因表达的影响

从图3-A可以看出,各处理中PPO基因的表达量均与对照差异极显著,其中Na₂S₂O₃处理的PPO基因表达量极显著高于对照,其余处理中PPO基因的表达量均极显著低于对照。从图3-B可以看出,除PVP、Vc和Na₂S₂O₃处理的POD基因的表达量极

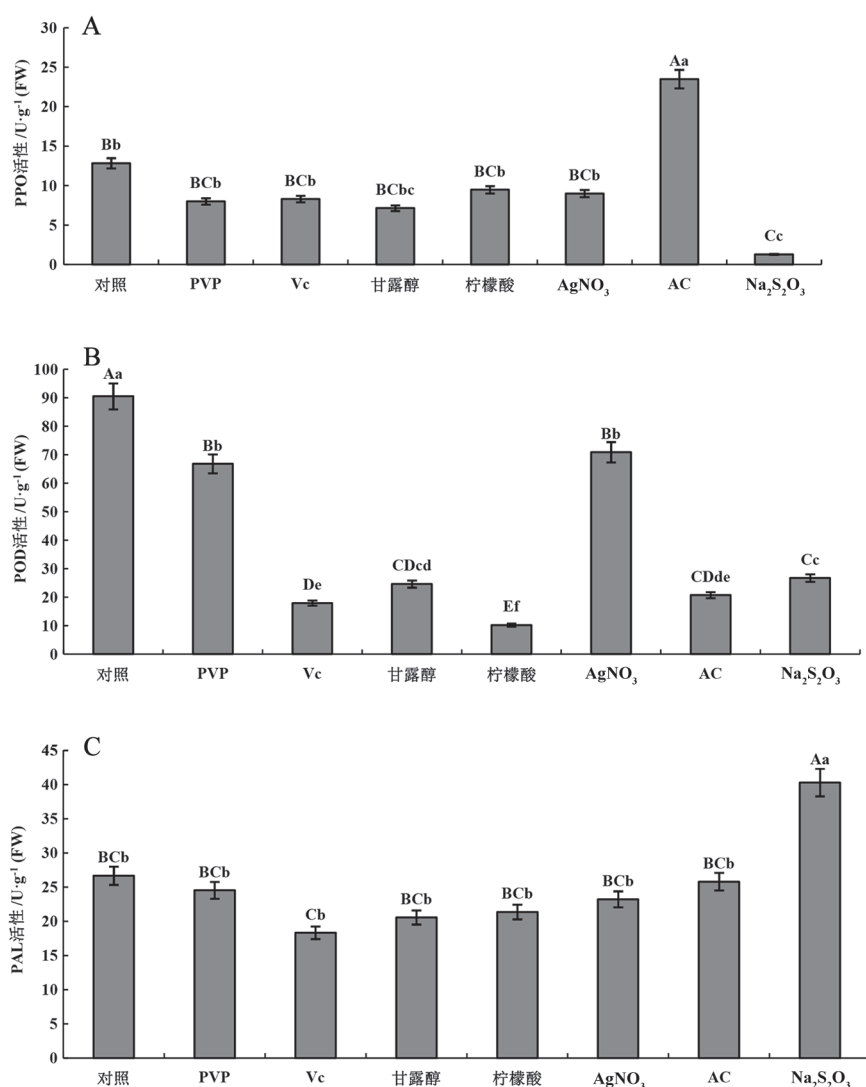


图2 抗褐化剂对葡萄愈伤组织中PPO、POD和PAL活性的影响

Fig.2 Effects of browning inhibitors on PPO, POD and PAL activities of grape callus

显著高于对照外, 其余处理中 POD 基因的表达量均与对照差异不显著。从图3-C可以看出, 添加AC的处理中 PAL 基因的表达量与对照差异不显著, 添加 $Na_2S_2O_3$ 的处理中 PAL 基因的表达量显著低于对照, 而其余处理中 PAL 基因的表达量均极显著高于对照。可见, 抗褐化剂的种类和浓度对愈伤组织中 PPO 、 POD 和 PAL 基因表达量影响不同。

讨 论

褐化是复杂的生化过程, 与该过程中的底物和酶活性及相关基因的表达有关。抗褐化剂抑制愈伤组织的褐化主要通过降低底物(如酚类物

质)、相关酶活性以及改变相关基因的表达方式而实现。由于植物体本身含有酚类物质的种类不同, 其褐化过程的酶促反应机理差异很大, 而不同抗褐化剂与植物体内酚类物质发生的生化反应过程也会显著不同。PVP和AC是无机吸附剂, 吸附性较强, 可以防止植物组织自身的酚类物质排泌和变褐老化; Vc和柠檬酸是抗氧化剂, 可改变外植体周围的氧化还原电势, 从而抑制酚类氧化, 减轻褐变(吕宗友等2011); 甘露醇具有调节细胞渗透压的作用, 防止细胞吸水过度, 使愈伤组织呈水渍状逐渐褐化死亡; $AgNO_3$ 对乙烯的活性具有抑制作用, Ag^+ 通过与细胞膜上的乙烯受体蛋白竞争性的结

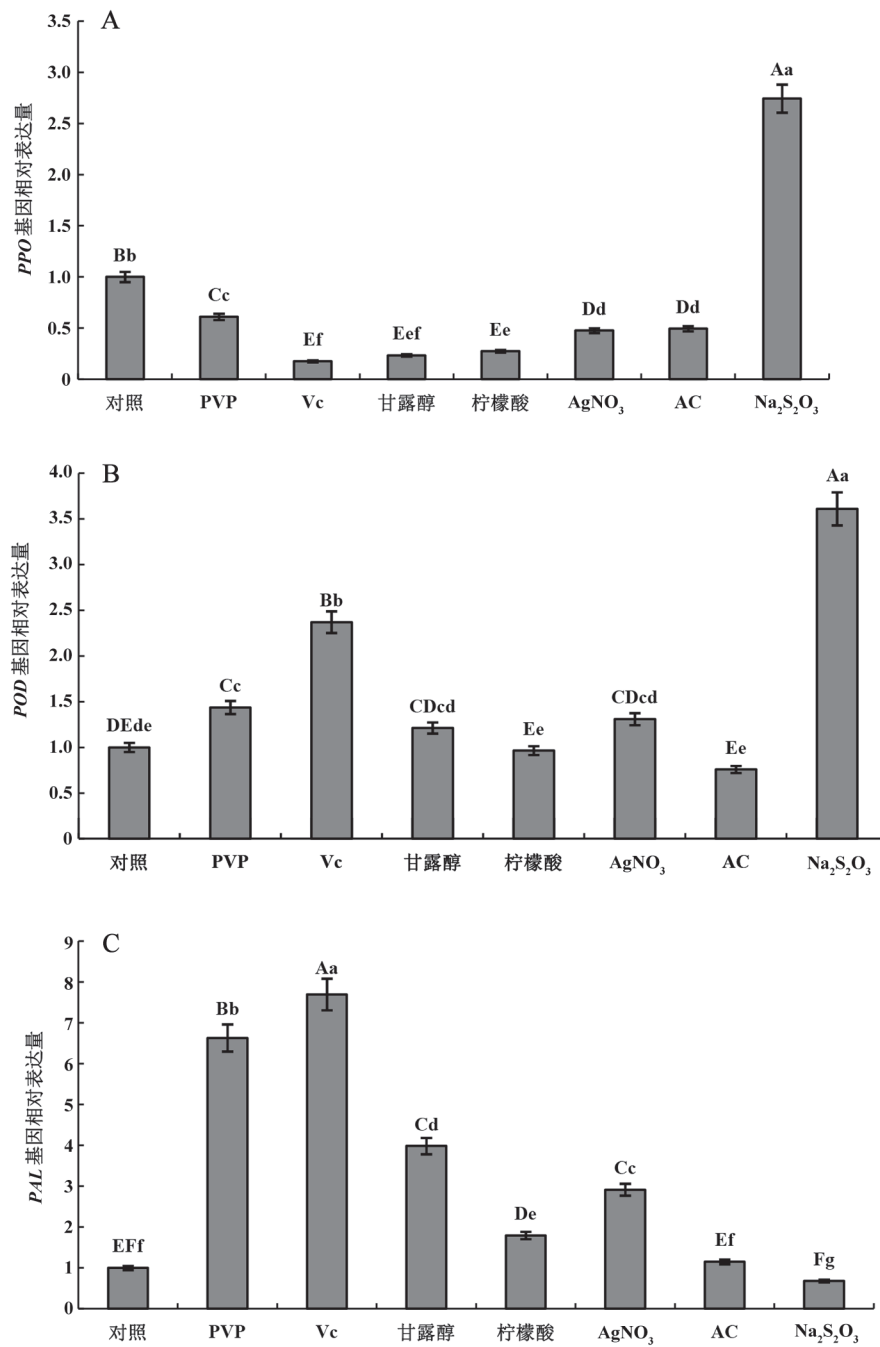


图3 抗褐化剂对葡萄愈伤组织中PPO、POD和PAL基因表达的影响

Fig.3 Effects of browning inhibitors on PPO, POD and PAL gene expression of grape callus

合,从而消除或降低乙烯的作用(宋钦虎等2012)。本研究发现,适当浓度的PVP、甘露醇、Vc、柠檬酸和AC能够有效地防止愈伤组织褐化,这与郑超等(2013)对曼地亚红豆杉愈伤组织褐变的研究结果存在一定的相似性。添加甘露醇、AgNO₃和Vc的愈伤组织在继代培养过程中有变绿现象,可

在成苗培养基中分别添加适当浓度的以上三种物质,可能对诱导成苗有影响。酚类物质作为褐变的物质基础,其种类和含量对组织褐变起到至关重要的作用。多项研究表明,酚类物质和外植体褐变密切相关,酚类物质含量越高,褐变越严重(罗晓芳等1999;张峻等2001;刘闻川等2008),本试验

中除 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 外, 培养基中添加不同的抗褐化剂均显著或极显著降低了对羟基苯甲酸、咖啡酸、阿魏酸的含量, 这与印芳等(2006)对蝴蝶兰组培褐变的研究发现香豆酸、绿原酸、邻苯二酚和咖啡酸对其褐变可能有重要的影响结果相似。此外, 甘露醇促进了没食子酸的发生, 柠檬酸和 AgNO_3 促进了几茶酚的发生, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 促进了没食子酸、香豆酸和对羟基苯甲酸的发生。

目前有关研究多集中在褐变过程中总酚含量及PPO、POD和PAL活性变化以及培养环境的影响方面(赵伶俐等2006; 杨玲等2008)。有报道发现, 褐变与PAL、PPO和POD的活性呈正相关关系(许传俊和李玲2006; 印芳等2006, 2008), 尤其某些组织褐变与POD活性呈正相关(黄品湖等2001; 蒋益虹2003); 但Boonsiri等(2007)对低温贮藏中尖辣椒种子的褐变进行研究后却发现, 褐变与POD活性呈负相关。PPO催化酚类物质氧化成醌是引起植物褐变的主要原因(Coetzer等2001; 卮兰春等2004), 但本试验中添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的处理中PPO的活性却极显著降低, 可能是褐变产生的醌类物质发生聚合反应产生黑色或褐色的物质抑制了PPO的活性, 表明PPO活性与葡萄愈伤组织褐变之间的关系较为复杂, 很有可能并非为引起褐化的主要原因。添加7种抗褐化剂的处理均极显著降低POD活性, 表明POD参与酚类物质的氧化和褐色物质的形成; 添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的处理极显著提高了PAL活性, 表明褐变的发生与PAL活性呈正相关, 但机理方面有待于进一步研究。

有研究发现果实和蔬菜的褐变与PPO基因有关(Hunt等1993; Bachem等1994), 也有研究结果表明PPO基因在特定的组织、不同的生长发育时期其表达模式和表达量不同(Kim等2001; Lan等2011); 许传俊等(2007)的研究证明蝴蝶兰叶片外植体褐变过程与PAL基因表达相关。本试验中PPO、POD和PAL基因在添加不同种类和浓度抗褐化剂的愈伤组织中都有不同程度的表达, 其中添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的处理中PPO基因的表达量极显著高于对照, 可能是因为基因表达的滞后性, 表明褐变可能与PPO基因的表达量呈正相关。添加PVP、Vc和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的处理中POD基因的表达量极显著高于对照, 而其余处理中POD基因的表达量均与对照差异不显著,

表明POD基因的表达量与愈伤组织褐变相关性较为复杂。添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的处理中PAL基因的表达量显著低于对照, 表明褐变与PAL基因的表达量呈负相关。可见, 抗褐化剂的种类和浓度对金手指葡萄愈伤组织中PPO、POD和PAL基因的表达量均有差异, 3种基因在愈伤组织发育过程中的表达模式和表达量有待于进一步研究。

综上所述, 培养基中添加PVP ($2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、甘露醇($20.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 AgNO_3 ($0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、Vc ($0.006 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、AC ($2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和柠檬酸($0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)能够有效地防止愈伤组织褐化; 褐变的发生与对羟基苯甲酸、咖啡酸和阿魏酸含量、PPO和PAL的活性以及PPO和PAL基因的表达量相关。

参考文献

- 陈绍军, 陈明木, 康彬彬, 林缘源, 陈青青(2004). 机械伤害对枇杷果实采后生理的影响. 福建农林大学学报: 自然科学版, 33 (2): 250~253
- 龚晓洁(2009). 几种防褐剂对马铃薯愈伤组织培养褐化现象的抑制效应. 安徽农业科学, 37 (22): 10410~10412
- 关军锋, 及华, 冯云霄, 李丽梅, 孙玉龙, 司建丽(2005). 黄冠梨果皮褐变斑病与酚类物质代谢的关系. 华北农学报, 20 (6): 80~83
- 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
- 胡彦, 赵艳(2004). 植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题. 陕西师范大学学报(自然科学版), 32: 130~134
- 黄品湖, 郭秀珠, 叶茂宗, 陶月良, 贾守菊(2001). 板栗果肉褐变原因初探. 植物生理学通讯, 37 (5): 413~414
- 蒋益虹(2003). 百合褐变与多酚氧化酶和过氧化物酶活性的关系. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 29 (5): 518~522
- 李合生(2003). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 164~165
- 李晖, 牛宏伟, 刘娜, 陈琰, 侯春燕, 王冬梅(2015). 小麦与叶锈菌互作过程中实时定量PCR内参基因的选择及TaSGR基因的表达分析. 植物生理学报, 51 (5): 642~648
- 李正国, 高雪, 樊晶, 杨迎伍, 李道高, Angelos K. Kanellis (2006). 奉节脐橙果实苯丙氨酸解氨酶活性及其基因表达与果皮褐变的关系. 植物生理与分子生物学报, 32 (3): 381~386
- 刘闻川, 俞慧娜, 戎华磊, 刘鹏(2008). 不同光照条件对槲蕨组织培养外植体褐化的影响. 广东农业科学, (8): 21~25
- 罗晓芳, 田砚亭, 姚洪军(1999). 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, 21 (1): 92~95
- 吕海涛, 孙海峰, 曲宝涵, 戴洪义(2007). 高效液相色谱法同时测定苹果汁中6种酚类物质. 分析化学, 10: 1425~1429
- 吕宗友, 苏衍菁, 赵国琦, 郭彩霞(2011). 不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究. 草业学报, (3): 174~181
- 马岩松, 车芙蓉, 张平, 周亚凤(2001). 南果梨多酚氧化酶最适用酶促褐变底物的分析确定. 食品科学, 21 (1): 11~13
- 卮兰春, 孙建设, 辛蓓, 吕新琼(2004). 苹果果实酶促褐变底物及多酚氧化酶活性的研究. 园艺学报, 31 (4): 502~504

- 宋钦虎, 郭新梅, 裴玉贺, 宋希云(2012). 抑制玉米幼胚愈伤组织褐化的研究. 农学学报, 2 (5): 24~27
- 许传俊, 李红, 李玲(2007). 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中PAL基因的表达变化. 热带亚热带植物学报, 15 (1): 50~54
- 许传俊, 李玲(2006). 蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD和PAL的关系. 园艺学报, 33 (3): 671~674
- 许传俊, 李玲, 李红, 张铭光(2005). 蝴蝶兰褐变外植体显微结构观察及褐变成分的初步分析. 园艺学报, 32 (6): 1111~1113
- 杨玲, 葛红, 黄绵佳, 赵滢(2008). 热激处理对蝴蝶兰组培褐变的影响. 园艺学报, 35 (1): 143~146
- 印芳, 葛红, 彭克勤, 赵伶俐, 周玉杰, 李秋香(2006). 酚类物质与蝴蝶兰褐变关系初探. 园艺学报, 33 (5): 1137~1140
- 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
- 张峻, 吉伟之, 齐欢(2001). 葡萄籽中多酚类物质的提取及其对油脂的抗氧化作用. 食品科学, 22 (10): 43~45
- 赵伶俐, 葛红, 范崇辉, 印芳, 李秋香, 周玉杰(2006). 蝴蝶兰组培中PH和温度对外植体褐化的影响. 园艺学报, 33 (6): 1373~1376
- 赵晓, 马会勤, 陈尚武, 徐海英(2010). 葡萄果实发育后期半定量RT-PCR内参基因的优选. 中国农业大学学报, 15 (3): 7~14
- 郑超, 徐晟, 夏冰, 郑玉红, 贺佳, 彭峰, 汪仁(2013). 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. 植物生理学报, 49 (3): 259~263
- 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 王国彬, 祝展平(2000). 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, 27 (增刊): 481~486
- 朱广廉, 钟海文, 张爱琴(1990). 植物生理实验. 北京: 北京大学出版社, 37~39
- Bachem CWB, Speckmann GJ, van der Linder PCG, Verheggen FTM, Hunt MD, Steffens JC, Zabeau M (1994). Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic expression in potato tubers. Bio/Technology, 12: 1101~1105
- Boonsiri K, Ketsa S, Doorn WG (2007). Seeding browning of hot peppers during low temperature storage. Postharvest Biol Technol, 45: 358~365
- Brenda WS (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. Physiol Plant, 107: 142~149
- Coetzee C, Corsini D, Love S, Pavek J, Tumer N (2001). Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. J Agric Food Chem, 49: 652~657
- Degl'Innocenti E, Guidi L, Pardossi A, Tognoni F (2005). Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *acephala*). J Agric Food Chem, 53: 9980~9984
- Degl'Innocenti E, Pardossi A, Tognoni F, Guidi L (2007). Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and 'rocket salad' when stored as fresh-cut products. Food Chem, 104: 209~215
- Henriksen A, Smith AT, Gajihede M (1999). The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. J Biol Chem, 274: 35005~35011
- Hisaminato H, Murata M, Homma S (2001). Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. Biosci Biotechnol Biochem, 65: 1016~1021
- Hunt MD, Eannetta NT, Haifeng Y, Newman SM, Steffens JC (1993). cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. Plant Mol Biol, 21: 59~68
- Kim JY, Sea YS, Kim JE, Sung SK, Song KJ, An G, Kim WT (2001). Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the fuji apple. Plant Sci, 161 (6): 1145~1152
- Lan T, Tran C, Constabel P (2011). The polyphenol oxidase gene family in poplar: phylogeny, differential expression and identification of a novel, vacuolar isoform. Planta, 234 (4): 799~813
- Murata M, Nishimura M, Haruta M, Homma S, Itoh Y (2001). A transgenic apples callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. Biosci Biotechnol Biochem, 65 (2): 383~388
- Peiser G, Cantwell MI, Saltveit ME (1998). Phenylalanine ammonia-lyase inhibitors control browning of cut lettuce. Postharvest Biol Technol, 14: 171~177
- Solecka D, Kacperska A (2003). Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. Physiol Plant, 119: 253~262
- Weisshaar B, Jenkins GI (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. Curr Opin Plant Biol, 1: 251~257