

热激处理对蝴蝶兰组培褐变的影响

杨玲^{1,2}, 葛红^{2*}, 黄绵佳¹, 赵滢²

(¹ 华南热带农业大学园艺学院, 海南儋州 571737; ² 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 以蝴蝶兰叶片为试验材料, 研究热激处理在抑制组织褐变中的作用。采用 45 ℃ 条件下热激处理 10 min, 再经过常温下的不同恢复时间后, 对叶片切割接种, 然后在不同培养时间, 对组织的褐化指数、总酚含量以及 PAL 等褐变相关指标进行测定比较。结果表明, 采用热激处理的蝴蝶兰, 再经过常规培养条件 (25 ℃) 培养 48 h 后, 进行切割接种, 可显著减轻随后培养过程中的褐变程度。

关键词: 蝴蝶兰; 组织培养; 褐变; 热激处理; 恢复时间; 酚类; 苯丙氨酸解氨酶

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 01-0143-04

The Influence of Heat Shock on Tissue Browning of *Phalaenopsis*

YANG Ling^{1,2}, GE Hong^{2*}, HUANG Mian-jia¹, and ZHAO Ying²

(¹ College of Horticulture, South China University of Tropical Agriculture, Danzhou, Hainan 571737, China; ² Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: To clarify the effect of heat shock on tissue browning of *Phalaenopsis*, the post-subculture changes in browning index, total phenolic content and PAL activity in tissues recovered under 25 ℃ for different time after heat shock treatment at 45 ℃ for 10 min were determined and analysed. The results suggested that the browning of cultured *Phalaenopsis* tissue could be significantly inhibited by heat treatment when the treated tissue was covered for 48 h under 25 ℃.

Key words: *Phalaenopsis*; tissue culture; browning; heat shock; restoration time; phenols; phenylalanine ammonia-lyase

褐变在植物组织培养过程中普遍存在 (Hildebrandt & Hamey, 1998)。而在兰科植物组织培养过程中, 褐变的严重发生在很大程度上制约了其成功率。

目前控制褐变最常用的方法是在培养基中加入活性炭和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 用以吸附分泌到培养基中的有害物质, 但这样会抑制蝴蝶兰外植体分化和芽的产生。抗氧化剂也用于蝴蝶兰组培试验中, 但效果甚微。生产中仍采用频繁将外植体转入新鲜培养基中的办法来减少褐变的影响, 从而提高外植体分化率和组培成活率 (Ernst, 1994; Duan et al., 1996), 但这种方法大大增加了组培过程中的劳动量和生产成本。

近年来发现, 热激处理可以减轻褐化的发生。在受伤的莴苣中, 短期的热激处理能减小苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性, 减少酚类化合物积累和组织褐变 (Loaiza-Velarde et al., 1997; Saltveit, 2000)。热激处理离体的芹菜叶柄 (如 50 ℃ 处理 90 s) 能显著减少 PAL 活性的增加及降低褐变率 (Julio et al., 2003)。

本试验以蝴蝶兰叶片为材料, 研究在采用热激处理抑制组织培养褐变的过程中不同恢复时间对褐变的影响。

收稿日期: 2007-05-29; 修回日期: 2007-08-18

基金项目: 国家 '863' 项目 (2004AA241200); 国家 '十五' 科技攻关计划项目 (2004BA521B02)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: gehong@mail.caas.net.cn)

1 材料与方 法

1.1 材料与处理方 法

试验材料为中国农业科学院蔬菜花卉研究所花卉组培室蝴蝶兰品种 B3 (迷你型白花黄心)。

将瓶苗于烘箱中 45 ℃ 处理 10 min, 然后于正常培养条件 [温度 25 ℃, 光照 (2 000 ± 500) lx] 下分别培养 0、24、48、72 h 后, 将处理过的叶片切割为 1.0 cm × 1.0 cm 方块, 接种于 MS + 6-BA 5.0 mg · L⁻¹ 培养基上。以未经过热激处理的瓶苗为对照。每处理接种 30 瓶, 每瓶 4 个外植体, 用于观察统计褐变指数; 另外每处理接种 30 瓶用于测定总酚含量与 PAL 活性变化。

1.2 测定指标及测定方 法

以培养基的变黑程度将褐变程度分为 4 级。1 级: 未变色或只在外植体切口处有轻微变色; 2 级: 浅黑色; 3 级: 黑色; 4 级: 深黑色。用褐变指数表示外植体褐变的程度。褐变指数 (%) = $\sum$ 褐变级别的瓶数 × 该褐变级别 / (调查的总瓶数 × 最高褐变级别) × 100。

采用 Folin-Ciocalteu 试剂法, 参考 Bonilla 等 (2003) 方法测定总酚含量。称取 0.1 g 样品用 5 mL 含 2% HCl 的甲醇研磨, 在室温、黑暗条件下提取 24 h。4 ℃ 下 12 000 × g 离心 10 min。取上清液 200 μL 置于 5.0 mL 试管中, 加入 1.0 mL 福林—肖卡试剂和 1.6 mL 7.5% 的碳酸钠溶液, 缓慢搅拌反应 30 min 后, 用日本 UV-1601 紫外—可见分光光度计在 765 nm 处比色, 测定吸光度 OD 值。分别取浓度为 20、40、60、80、100 mg · L⁻¹ 的没食子酸为标准物, 步骤同上, 建立标准曲线。总酚含量表示为没食子酸 mg · g⁻¹ FM。

参照 Given 等 (1988) 方法测定 PAL 活性。称取 0.3 g 新鲜叶片, 用 0.1 mol · L⁻¹ 硼酸缓冲液 (pH 8.8) 提取, 4 ℃ 下 10 000 × g 离心 15 min 得粗酶液。检测液总体积 5 mL, 内含 0.1 mol · L⁻¹ 硼酸缓冲液 (pH 8.8), 120 μmol · L⁻¹ 的 L-苯丙氨酸, 粗酶液 1 mL。取两份: 一份混匀加入 500 μL 6 mol · L⁻¹ HCl 后立即测定在 290 nm 处的 OD 值; 另一份在 30 ℃ 反应 60 min 后, 加入 500 μL 6 mol · L⁻¹ HCl 终止反应, 在 290 nm 处比色。以 OD 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位。

试验重复 3 次。数据用 DPS 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分 析

2.1 热激处理后不同恢复时间对褐变程度的影响

45 ℃ 条件下热激处理 10 min, 在接种第 5 天开始出现褐变现象, 随着培养时间增加, 褐变程度逐渐加重。其中热激处理后立即进行接种的褐变程度最重, 与对照相当。处理后 24 h 和 72 h 接种的, 褐变程度稍轻。处理后 48 h 接种的褐变最轻 (图 1)。

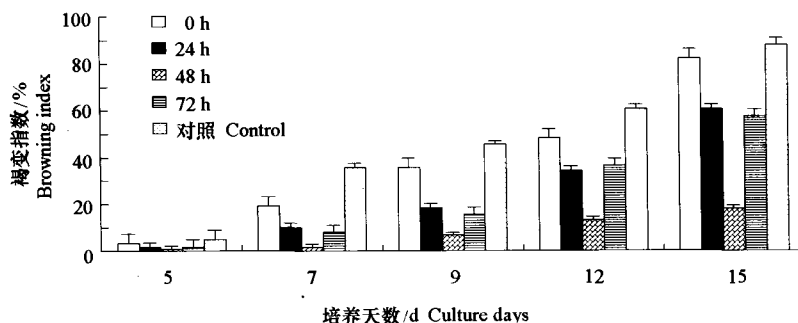


图 1 45 ℃ 处理 10 min 经不同恢复时间后继代培养过程中褐变指数的变化

Fig. 1 The changes of browning index in tissues at different cultural days after heat shock treatment followed by different restoration time

2.2 热激处理后不同恢复时间对总酚含量的影响

由图2可知, 切割后立即测定的蝴蝶兰叶片中总酚含量非常低, 接种后9 d内随着培养时间的延长, 总酚含量上升。经 DPS 统计分析, 接种后第3天, 各处理总酚含量都比刚接种时增加一倍, 但各处理间差异不显著; 接种后第6天, 经热激处理后在正常培养条件下培养48 h后再接种的叶片, 总酚含量显著低于对照及其他处理。接种后第9天, 对照与热激处理后, 经24、48和72 h恢复的样品间总酚含量均差异显著, 而48 h处理的叶片总酚含量又显著低于24 h及72 h处理的。

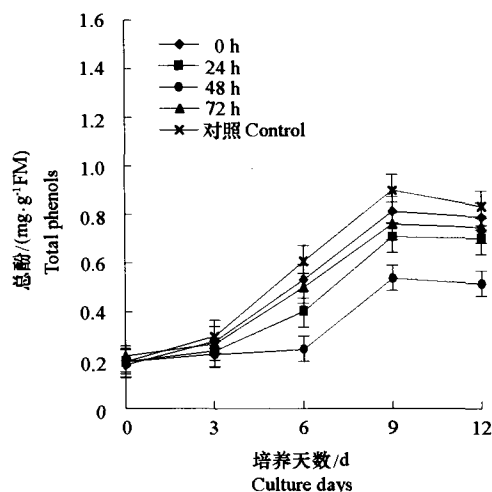


图2 45 ℃处理10 min 经不同恢复时间后接种培养的组织总酚含量变化

Fig. 2 The total phenolic contents at different cultural days after heat shock treatment followed by different restoration time

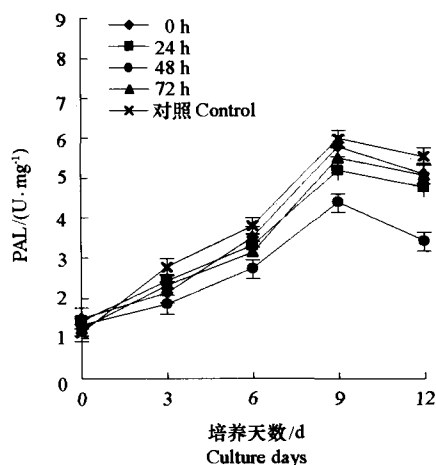


图3 45 ℃处理10 min 经不同恢复时间后接种培养的组织 PAL 活性变化

Fig. 3 PAL activity in tissues at different cultural days after heat shock treatment followed by different restoration time

2.3 热激处理后不同恢复时间对 PAL 活性的影响

叶片切割接种后, PAL 活性随培养天数增加而上升, 到第9天达到最高峰, 随后活性开始下降, 经 DPS 统计分析, 接种后第3天, 经过热激的各处理 PAL 活性显著低于对照; 接种后第6天, 对照与24、48和72 h处理的 PAL 活性差异显著; 而在第9天, 经正常培养条件下培养48 h的处理与对照的差异达到极显著水平 (图3)。

3 讨论

PAL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶, 也是苯丙烷类代谢途径中研究最多的酶。植物在遭受机械伤害、低温、高温、紫外辐射等逆境时, PAL 活性迅速升高, 同时积累大量酚酸、类黄酮、木质素等苯丙烷类次生代谢物质 (Beckman, 2000; Sgarbi et al., 2003)。

Peiser 等 (1998) 使用 PAL 抑制剂 AOA (氨基氧基乙酸) 等处理莴苣, 有效抑制了莴苣的褐变。Hisaminato 等 (2001) 利用 AIP (苯丙氨酸途径的抑制剂) 和草甘磷 (莽草酸途径的抑制剂) 两个酶的抑制剂也有效抑制了莴苣的褐变, 说明通过影响酚类合成可以防止褐变发生。

近年来的研究发现, 热激处理能产生热激蛋白, 减少伤害诱导的 PAL 活性的增加, 降低由 PAL 催化的酚类化合物的合成, 进而阻止组织褐变。Saltveit (2000) 的研究还发现, 植物组织在同时受到热激和受伤两种刺激时, 优先诱导产生热激蛋白而不是 PAL。热激也能降低转基因烟草的 PAL 活性 (Moriwaki et al., 1999)。夏铭等 (1996) 采用 45 ℃ 处理红豆杉外植体, 发现热激处理对克服褐

变是有效的。

本研究发现,在受到伤害后,蝴蝶兰叶片内总酚含量和 PAL 活性的变化趋势较为一致,均表现为随着培养时间的延长而逐渐增加。但经过热激处理后,外植体中的 PAL 活性明显低于未经处理的,这与 Julio 等(2003)在莴苣中的研究结果一致。

Saltveit(2000)认为,细胞的总蛋白质合成能力是有限的,热激处理对蛋白质合成进行了重新定向。热激蛋白优先合成,占据了大量的蛋白质合成能力,“关闭”了非热激蛋白的合成,使细胞没有足够的能力合成 PAL。而热激蛋白在热激处理一定时间后才开始进行表达,表达量持续增加到高峰后又逐渐下降,可能是由于这个原因,在本试验中观察到恢复 48 h 后对褐变的抑制最为显著,而之后的抑制效果又呈下降趋势。

References

- Beckman C H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. *Physiol Mol Plant Pathol*, 57 (3): 101 - 110.
- Bonilla E P, Akoh C C, Sellappan S, Krewer G. 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J Agric Food Chem*, 51 (18): 5497 - 5503.
- Duan J X, Chen H, Yazawa S. 1996. *In vitro* propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinin-induced nodes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 15 (3): 133 - 137.
- Ernst R. 1994. Effect of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39 (3): 273 - 275.
- Given N K, Venis A, Grierson D. 1988. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *J Plant Physiol*, 133 (11): 25 - 30.
- Hildebrandt V, Hamey P M. 1998. Factor affecting the release of phenolic exudates from explant of *Pelargonium hortorum* Bailey 'Sprinter Scarlet'. *J Hort Sci*, 63 (4): 651 - 657.
- 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 (5): 1016 - 1021.
- Julio G, Loaiza-Velarde J G, Mangrich M E, Campos-Vargas R, Saltveit M E. 2003. Heat shock reduces browning of fresh-cut celery petioles. *Postharvest Biology and Technology*, 27 (3): 305 - 311.
- Loaiza-Velarde J G, Toma's-Barberan F, Saltveit M E. 1997. Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound induced phenolic metabolism in iceberg lettuce. *J Am Soc HortSci*, 122: 873 - 877.
- Loaiza-Velarde J G, Saltveit M E. 2001. Heat shock applied either before or after wounding reduce browning of lettuce leaf tissue. *J Am Soc Hort Sci*, 126: 227 - 234.
- Moriwaki M, Yamakawa T, Washino T, Kodama T, Igarashi Y. 1999. Suppressed phenylalanine ammonia-lyase activity after heat shock in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* containing an *Arabidopsis* HSP18.2-parsley PAL2 chimera gene. *J Bioscience Bioeng*, 87 (5): 588 - 593.
- Peiser G, López-Gálvez G, Cantwell M, Saltveit M E. 1998. Phenylalanine ammonia-lyase inhibitors control browning of cut lettuce. *Postharvest Biol Tech*, 14: 171 - 177.
- Saltveit M E. 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology and Technology*, 21 (1): 61 - 69.
- Saltveit M E. 2001. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Post Biol Technol*, 21 (2): 169 - 177.
- Sgarbi E, Fornasiero R B, Lins A P, Bonatti P M. 2003. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Science*, 165 (55): 951 - 957.
- Xia Ming, Wu Jiang-yun, Zhang Li-mei. 1996. Studies on the problem of darkening in tissue culture of taxus. *Biotechnology*, 6 (3): 18 - 20. (in Chinese)
- 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.