

多酚含量及多酚氧化酶活性与柑橘胚性愈伤组织褐化的关系

段艳欣^{1,2}, 郭文武¹

(¹华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070;

²青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109)

摘要: 研究测定了9种不同品种/基因型柑橘胚性愈伤组织的多酚含量和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)的活性, 探讨了其与柑橘愈伤组织褐化的关系。结果表明, 不同柑橘品种/基因型间多酚含量和PPO活性明显不同; 多酚含量高的宽皮柑橘类胚性愈伤组织容易褐化, 葡萄柚与甜橙类次之, 说明柑橘胚性愈伤组织褐化与多酚含量成正相关; PPO活性与柑橘愈伤组织褐化无明显相关。

关键词: 柑橘; 愈伤组织; 多酚; 多酚氧化酶; 褐化

中图分类号: S666 文献标识码: A 论文编号: 2009-0620

Study on Callus Browning in Relation to Polyphenol Content and Polyphenol Oxidase Activity among Various *Citrus* Embryogenic Calli

Duan Yanxin^{1,2}, Guo Wenwu¹

(¹National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan Hubei 430070;

²College of Landscape and Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong 266109)

Abstract: Polyphenol content and polyphenol oxidase (PPO) activity of nine different embryogenic calli in citrus were detected, and the correlation with callus browning was analyzed. The results showed that there was significant difference of polyphenol content and PPO activity in different genotypes/varieties. Polyphenol content in tangerines was much higher than that in sweet oranges and grapefruit, which was in accordance with callus browning degrees, while PPO activity had no relation to callus browning. This study indicated that genotype-dependent polyphenol content of citrus callus was positively correlated with callus browning.

Abstract: *citrus*, embryogenic callus, polyphenol, polyphenol oxidase, browning

0 引言

褐变是影响植物组织培养成功的重要因素。褐化现象在多种果树植物中存在, 如苹果、桃、李、板栗、无花果、葡萄、核桃、柿、香蕉、梨等, 详见综述^[1-2]。柑橘胚性愈伤组织作为遗传转化的良好受体具有来源广泛、取材方便、再生频率高等优点; 与实生苗或节间茎段等外植体相比, 更容易获得较大的转基因植株群体和得到纯合的转基因植株, 近年被广泛用于转基因研究^[3-7]。然而,

柑橘胚性愈伤组织在培养过程中, 随培养时间的延长, 不同品种/基因型存在不同程度的褐化, 而且笔者研究发现柑橘愈伤组织的褐化影响转基因效率^[8]。前人研究指出总多酚含量与褐化的关系密切^[9-11]。多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)能催化游离酚酸的羟基化反应以及羟基酚到醌的脱氢反应, 醌在果蔬体内自身缩合或与细胞内的蛋白质反应, 产生褐色色素或黑色素^[12]。PPO活性的抑制可以阻止褐化的发生^[13-14]。

基金项目: 国家863计划项目“特色植物高效转化技术的建立”(2007AA10Z182)。

第一作者简介: 段艳欣, 女, 1978年出生, 河北衡水人, 讲师, 研究方向: 果树基因工程。通信地址: 266109 青岛农业大学园林园艺学院, Tel: 0532-86080740, E-mail: duanyanxin@yahoo.com.cn。

通讯作者: 郭文武, 男, 1970年出生, 湖北省郧县人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞工程、分子育种。通信地址: 430070 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, Tel: 027-87281543, E-mail: guoww@mail.hzau.edu.cn。

收稿日期: 2009-03-24, 修回日期: 2009-04-17。

因此,笔者对柑橘胚性愈伤组织中酚类物质含量及其多酚氧化酶活性与褐化的关系进行了研究,为揭示柑橘愈伤组织褐变的机理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于2005—2006年在华中农业大学作物遗传

改良国家重点实验室柑橘课题组研究室内进行。

1.2 材料

柑橘胚性愈伤组织在MT(Murashige and Tucker, 1969)固体培养基上培养,每隔30天继代一次。培养20天的柑橘胚性愈伤组织用于多酚的提取和多酚氧化酶活性的测定。供试柑橘品种如表1所示。

表1 供试的9种不同基因型的柑橘胚性愈伤组织材料

柑橘种类	中文名	英文名
宽皮橘 <i>C. reticulata</i> Blanco.	本地早橘	Bendizao mandarin
	茶枝柑	Chazhigan mandarin
	广东酸橘	Guangdong sour tangerine
	椪柑	Ponkan
甜橙 <i>C. sinensis</i> Osbeck.	伏令夏橙	Valencia
	无酸甜橙	Succari
	锦橙	Jincheng
橘橙杂种 <i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	默科特橘橙	Murcott
葡萄柚 <i>Citrus paradisi</i> Macf.	红马叙葡萄柚	Red marsh grapefruit

1.3 方法

1.3.1 不同柑橘胚性愈伤组织褐化表现的观察 取生长20天的新鲜的柑橘胚性愈伤组织接种在MT固体培养基上,培养30~60天后观察柑橘胚性愈伤组织的颜色变化,颜色分黄褐色(I)、浅黄色(II)、白色(III)3个等级,统计各愈伤组织的褐化情况。

1.3.2 多酚提取 多酚提取采用甲醇水溶液浸提法^[15]进行,取不同基因型的胚性愈伤组织0.4 g装于10 ml离心管中,用玻璃棒磨碎,加入5 ml 40%甲醇浸提液,55 ℃水浴浸提30 min。浸提完毕后2000 r/min离心10 min,得多酚粗提液。每处理3次重复。多酚含量测定方法采用Folin-Ciocalteu(福林酚)法^[10,16]。

标准溶液:精确称取没食子酸10 mg,置于100 ml容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,浓度为0.10 mg/ml。

一元线性回归方程:用移液器准确吸取没食子酸标准液0 ml,0.1 ml,0.2 ml,0.4 ml,0.6 ml,0.8 ml,1.0 ml,置于10 ml的离心管中,加水至体积为2 ml,再加入福林酚试剂0.5 ml,然后加入7.5%的Na₂CO₃溶液0.5 ml,充分混匀后,室温反应1 h,在765 nm处测定吸光度值(A),以水为对照。用SAS软件分析所测值,以没食子酸标准液的浓度为x值,以其吸光度值为y值,得一元线性回归方程。

多酚含量计算:将所得的各基因型吸光值代入一元线性方程,获得多酚含量。

1.3.3 多酚氧化酶(PPO)酶液制备 参考宋士任^[17]方法略作修改。PPO提取采用匀浆法:准确称取胚性愈伤组织0.5 g,加入PVP 0.1 g、1 ml 0.01 mol/L磷酸缓冲溶

液(pH 6),冰浴研磨成匀浆,用缓冲液定容至5 ml,冷冻离心(10 000 r/min, 10 min)。取上清液为酶的粗提液。重复3次。

PPO活性测定:参考Rocha和Morais^[10]的方法,略作修改。3 ml磷酸缓冲液和0.6 ml 0.1 mol/L邻苯二酚(用磷酸缓冲液配制),加入0.15 ml粗提液,室温下反应30 s,摇匀后,于UV-1601型紫外分光光度计420 nm测比色值,每30 s读数1次,共5次读数,记录吸光度。以每克组织每分钟吸光值变化0.001个单位定义为一个PPO活性单位(U/(g·min))^[18]。按公式(1)计算酶活:

$$\text{PPO活性(U/(g·min))} = \Delta A \times D / (0.001 W \times t) \dots \dots (1)$$

(1)式中:ΔA:反应时间内吸光度的变化;W:鲜样品的质量(g);t:反应时间(min);D:总酶液为反应系统内酶液的倍数。酶液的测定做3组重复实验,同时作对照。

2 结果与分析

2.1 不同柑橘胚性愈伤组织在MT固体培养基上的褐化反应不同

在MT固体培养基上培养30~60天后,各柑橘胚性愈伤组织颜色差异较大(表2)。培养30天后,宽皮橘类各品种胚性愈伤组织颜色表现为I级黄褐色;默科特橘橙杂种表现为II级浅黄色;甜橙中伏令夏橙、锦橙和Succari甜橙愈伤组织表现为III级白色。培养60天后,宽皮橘类愈伤组织颜色进一步加深,褐化现象严重;默科特橘橙愈伤组织也表现严重褐化;伏令夏橙、Succari甜橙和葡萄柚愈伤组织有轻微的褐变,表现为II级浅黄色,锦橙愈伤组织始终为III级白色。

表2 不同柑橘基因型胚性愈伤组织在MT基本培养基上的生长反应

愈伤组织等级	培养30天	培养60天
I(黄褐色)	本地早橘、茶枝柑、广东酸橘、椪柑	本地早橘、茶枝柑、广东酸橘、椪柑、默科特橘橙
II(淡黄色)	默科特橘橙	红马叙葡萄柚、伏令夏橙、Succari甜橙
III(白色)	红马叙葡萄柚、伏令夏橙、锦橙、Succari甜橙	锦橙

2.2 各柑橘基因型胚性愈伤组织的多酚含量

2.2.1 一元线性回归方程的获得 分别移取0.0 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml、1.0 ml的没食子酸对照品溶液于5 ml试管中,加入0.5 ml的Folin-Ciocalteu显色剂,然后中加入0.5 ml 7.5%的Na₂CO₃溶液,用水稀释到3 ml,水为对照,用1 cm的比色皿在765 nm处测定吸光度值。将标准品浓度(X)和吸光值(Y)进行线性回归,求得回归方程(2)和相关系数分别为:

$$Y=0.04967+0.03172X \quad r^2=0.9972\cdots\cdots\cdots (2)$$

结果表明,没食子酸浓度在0.006~0.03 mg/ml范围内与吸光度值有良好的线性关系。

2.2.2 不同柑橘胚性愈伤组织的多酚含量存在明显差异 取培养20天的9种柑橘基因型的胚性愈伤组织

0.4 g,用于提取总多酚,代入回归方程,获得柑橘胚性愈伤组织总多酚含量在92.3~567.5 μg/g(图1)。由图1可以看出,宽皮橘类胚性愈伤组织的多酚含量要比其他种类稍高,以广东酸橘最为明显,其多酚含量在所测基因型中最高,其次是本地早橘,这两种基因型的胚性愈伤组织在正常培养时极容易发生褐化,而其他的宽皮橘类及其杂种类愈伤组织也很容易褐化;甜橙类中多酚含量较高的是Succari甜橙,其次是伏令夏橙和锦橙,该类基因型一般不易发生褐化;葡萄柚愈伤组织多酚含量较低,其愈伤组织在培养过程中很少发生褐化。说明,愈伤组织的褐化与其多酚含量有很大相关性。据报道柑橘果皮的颜色和多酚的含量有显著相关性^[19],这种相关性在苹果中也有报道^[10,20]。

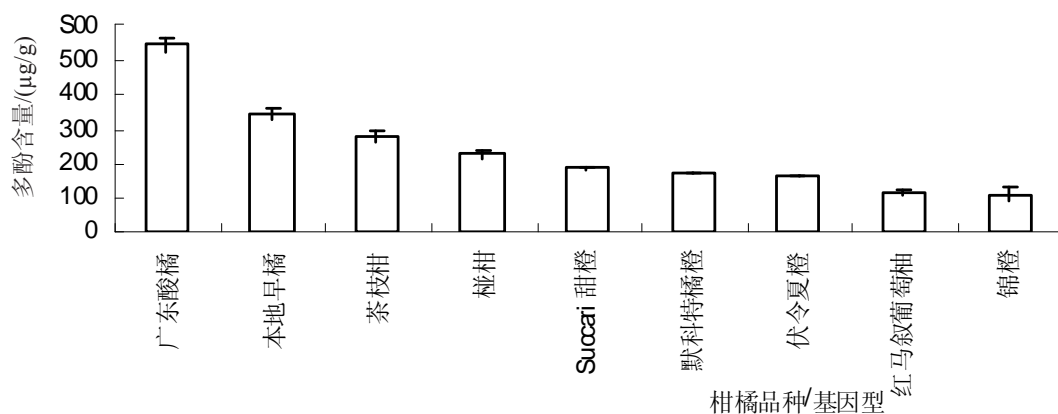


图1 不同柑橘基因型胚性愈伤组织的总多酚含量

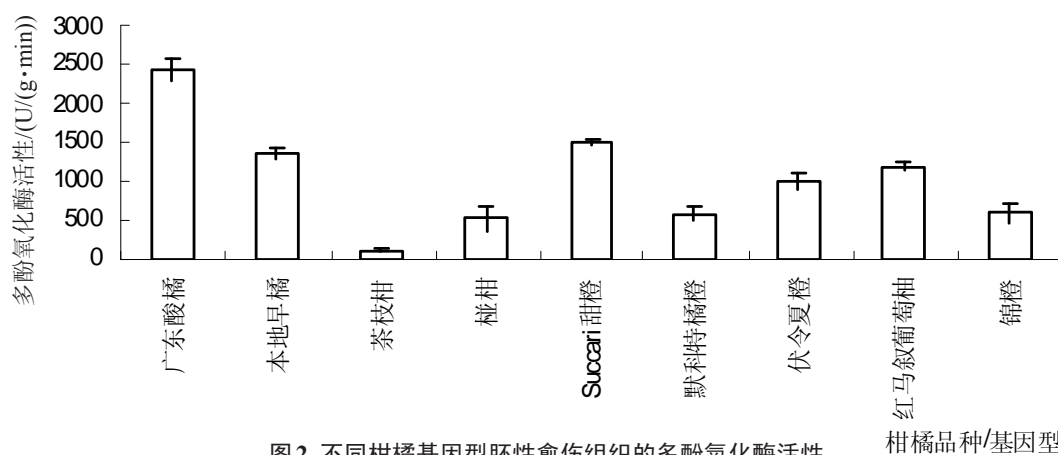


图2 不同柑橘基因型胚性愈伤组织的多酚氧化酶活性

2.3 不同柑橘胚性愈伤组织的多酚氧化酶活性不同

取培养20天的各柑橘基因型胚性愈伤组织0.5 g,用于提取多酚氧化酶粗提液,测得多酚氧化酶活性在

451.0~2528.1 U/(g·min)。由图2可以看出,不同柑橘基因型胚性愈伤组织的多酚氧化酶活性之间有较大差异,广东酸橘的氧化酶活性最强,茶枝柑的最低,其他

7种基因型的介于两者之间。结合各基因型多酚含量进行分析,表明多酚含量与多酚氧化酶活性之间没有显著相关性。

3 讨论

在继代培养过程中,柑橘胚性愈伤组织会发生不同程度的褐变,宽皮橘类柑橘胚性愈伤组织褐化程度较严重,甜橙类次之,红马叙葡萄柚和橘橙杂种介于两者之间,说明柑橘胚性愈伤组织的褐变程度与柑橘种类有关,愈伤组织褐化与柑橘品种/基因型有关。而在所分析的9种柑橘胚性愈伤组织中,总酚含量在92.3~567.5 $\mu\text{g/g}$ 之间,表明不同种类柑橘愈伤组织中总酚含量不同,同一种类不同品种间也有差异,说明柑橘愈伤组织多酚含量同样受品种/基因型的影响。比较分析柑橘胚性愈伤组织的褐化与多酚含量的关系,可以看出前者与后者成正相关,这与前人研究结果一致^[19-20]。PPO能催化酚类物质形成醌,导致褐变产生。抗坏血酸和活性炭可有效抑制PPO的活性,从而减少褐化的发生^[13]。而笔者在对柑橘胚性愈伤组织多酚氧化酶的研究中发现,PPO活性与品种/基因型有关,但与愈伤组织的褐化之间没有显著相关性,与多酚含量关系不大。综上所述,推测柑橘愈伤组织中某一种或几种多酚物质是导致其褐化的主要原因,这有待进一步研究。

参考文献

- [1] 邹英宁,吴强盛.果树组织培养中褐变现象及其抑制研究进展.长江大学学报:自科版·农学卷,2007,4(3):47-50.
- [2] 庞勇.果树组织培养中褐化现象的研究进展.甘肃林业科技,2004,29(1):16-18.
- [3] 石玮,李东栋,邓秀新,等.根瘤农杆菌介导绿色荧光蛋白转化印度酸橘的研究.园艺学报,2002,29(2):109-112.
- [4] Li DD, Shi W, Deng XX. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Reports*,2002,21:153-156
- [5] Li DD, Shi W, Deng XX. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the pTA29-barnase gene. *Tree Physiology*,2003,23:1209-1215
- [6] 刘歆,段艳欣,范净,等.绿色荧光蛋白基因转化柑橘胚性愈伤组织与高效再生.果树学报,2006,23:670-675.
- [7] Duan YX, Guo WW, Meng HJ, et al. High efficient transgenic plant regeneration from embryogenic calli of *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum*,2007,51:212-216.
- [8] 段艳欣,李鼎立,邓秀新,等.柑橘胚性愈伤组织的褐化与转化.园艺学进展(第八辑),2008,1:110-115.
- [9] 刘杰,张希,POUDYAL Bharat Kumar,等.梨外植体组培褐变的影响因子及预防措施.果树学报,2008,25(5):27-731.
- [10] Rocha AMCN, de Morais AMMB. Polyphenoloxidase activity of minimally processed 'Jonagored' apples (*Malus Domestica*). *Journal of Food Processing and Preservation*,2005,29:8-19.
- [11] Mayer AM. Polyphenol oxidases in plant-recent progress. *Phytochemistry*,1987,26:11-20.
- [12] 杨昌鹏,黄淮海.果蔬多酚氧化酶促褐变的控制.食品研究与开发,2008,29(10):135-138.
- [13] 张彦波,龚霞峰,胡江琴,等.喜树愈伤组织诱导与抑制褐化的研究.安徽农业科学,2007,35:11902-11904.
- [14] 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. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*,2001,65:1016-1021.
- [15] Gorinstein S, Haruenkit R, Park YS, et al. Belloso Bioactive compounds and antioxidant potential in fresh and dried Jaffa sweets, a new kind of citrus fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,2004,84:1459-1463.
- [16] Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal for Enology and Viticulture*,1965,16:144-158.
- [17] 宋士任,王华.葡萄多酚含量和多酚氧化酶活性与组培苗生根关系的初步研究.农业生物技术科学,2005,21(9):70-73.
- [18] Lee CY, Kagan V, Jaworski AW, et al. Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*,1990,38:99-101.
- [19] Moussaïd M, Caillet S, Nketsia-Tabiri J, et al. Phenolic compounds and the color of oranges subjected to a combination treatment of waxing and irradiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,2004,84:1625-1631.
- [20] Coseteng MY, Lee CY. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*,1987,52:985-989.