

### 3种抗氧化剂对青钱柳愈伤组织褐化的影响

谢寅峰, 张志敏, 张颖颖, 李颖, 尚旭岚, 方升佐

(南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京林业大学生物与环境学院, 南京 210037)

**摘要:** 褐变是导致青钱柳组织培养失败的主要原因之一。研究维生素 C (VC)、植酸 (PA) 和柠檬酸 (CA) 3 种抗氧化剂对青钱柳愈伤组织生长、褐化及其生理生化特性的影响。结果表明, 适当浓度的抗氧化剂处理能有效抑制愈伤组织褐化率, 促进愈伤组织生长, 抑制培养过程中细胞膜透性的增加。其中 VC 的处理效果较为明显, PA 其次; 最适浓度分别为 VC 100 mg·L<sup>-1</sup>、PA 250 mg·L<sup>-1</sup> 和 CA 50~100 mg·L<sup>-1</sup>。VC 100 mg·L<sup>-1</sup> 处理的愈伤组织鲜重增长率比对照增加 73.88%, 褐化率和细胞膜透性分别比对照低 56.52% 和 45.75%, 均达到显著或极显著水平。适当浓度的抗氧化剂使苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性在一定程度上受到抑制, 但对多酚氧化酶(PPO)活性的抑制作用总体上不明显。总之, 适当浓度的 3 种抗氧化剂处理能有效降低青钱柳愈伤组织褐化及其产生的伤害, 促进生长, 对 PPO 活性的调控可能不是其控制褐化的主要方式, 有关机制尚待进一步探讨。

**关键词:** 抗氧化剂; 青钱柳; 褐化; 愈伤组织

中图分类号: S792.12; Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0493-06

### Effects of three antioxidants on callus browning of *Cyclocarya paliurus*

XIE Yinfeng, ZHANG Zhimin, ZHANG Yingying, LI Ying, SHANG Xulan, FANG Shengzuo

(Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

**Abstract:** In order to control callus browning and provide theoretical and technical basis for tissue culture of *Cyclocarya paliurus*, the effects of three antioxidants on the callus growth, browning and physiological and biochemical characteristics were studied. The results showed that an appropriate concentration of antioxidants could effectively restrain callus browning rate, promote callus growth and prevent the increase of cytoplasmic membrane permeability in the process of cultivation. Among the three antioxidants, vitamin C (VC) was the most effective, and phytic acid (PA) came next. The optimal concentration was 100 mg/L for VC, 250 mg/L for PA, and 50-100 mg/L for citric acid (CA). The growth rate of callus fresh weight with 100 mg/L VC treated group increased by 73.88%, and browning rate and membrane permeability decreased by 56.52% and 45.75%, respectively as compared with the control and the difference was statistically significant. The appropriate concentration of antioxidants could inhibit PAL activity in callus to some degree, while it had no obvious effect on PPO activity. Altogether, it was suggested that appropriate concentrations of three antioxidants could effectively reduce the callus browning, promote the growth. The regulatory effects may be associated with PAL activity. The regulation of PPO activity may not be the main pathway of browning control by antioxidants. The mechanism of PPO regulation need to be further studied.

**Key words:** antioxidant; *Cyclocarya paliurus*; browning; callus

青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja] 系双子叶植物纲胡桃科 (Juglandaceae) 青钱柳属落叶乔木, 又名青钱李、山麻柳、甜茶树、一串钱等, 是我国特有的珍稀植物<sup>[1]</sup>, 其次生代谢物对“三高”

有明显的抑制作用<sup>[2]</sup>, 但种子具有深休眠的特性, 一般播种后需隔年甚至 2 年后才萌发, 自然发芽率低, 仅为 0.1%~0.2%<sup>[1]</sup>, 组织培养技术可以有效解决这些问题。但在青钱柳组织培养中, 尤其是在愈

伤组织培养中,外植体的褐变是导致培养失败的主要原因之一。外植体的基因型、生理状态、取材部位、培养条件及机械损伤等,均能引起外植体褐变。青钱柳酚类物质含量高,是一种非常容易褐变的树种<sup>[1]</sup>。因此,对青钱柳组织培养过程中褐变控制的研究具有重要的理论和现实意义。

有关青钱柳组培褐化控制的研究目前已有少量的报道,主要集中在对外植体的预处理和调整继代时间2个方面。吴群英<sup>[1]</sup>等研究发现,青钱柳外植体先于4℃处理5d再进行接种可以有效防止褐化;用烧红的手术刀片切割茎段可将褐化率从100%降至55.5%。胡东南<sup>[3]</sup>等研究表明,在接种之前将1年生的青钱柳种子萌发芽在流水中冲洗1d,茎段、茎尖冲洗3h以上,培养过程中未发现褐化现象。王莹<sup>[4]</sup>在组培过程中发现在褐化现象发生前就将培养材料及时转入新的培养基中,褐化现象可以得到有效的抑制,青钱柳丛生芽以40d为继代周期效果最好。

培养基中添加抗氧化剂和吸附剂等理化方法是控制外植体褐变的常用方法。本研究采用单因素设计,探讨VC等3种抗氧化剂对青钱柳愈伤组织褐变及其相关代谢酶活性的影响,旨在探索控制青钱柳愈伤组织褐变的方法,了解酶活性与褐变的变化规律,为青钱柳组织培养提供理论和技术依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

用3年生青钱柳幼树当年生枝条上的嫩叶诱导愈伤组织。

### 1.2 方 法

**1.2.1 材料消毒与接种** 外植体的消毒与接种等处理参照笔者前期的研究<sup>[5]</sup>。取3年生青钱柳幼树上当年生嫩枝上的嫩叶,先用自来水冲洗叶表面,后放入体积分数为1%洗洁精溶液浸泡3min,流水冲洗约1~2h。沥水后在超净工作台上用浓度为1g·L<sup>-1</sup>的升汞浸泡4min,无菌水冲洗6~8次,无菌滤纸吸干水分,将叶片剪成0.5cm×0.5cm的方块接种到预先配好的基本培养基中,进行愈伤组织的诱导。3周后将诱导出的愈伤组织再转接到含有抗氧化剂的培养基中培养。

**1.2.2 培养基与培养条件** 愈伤组织生长的培养基配方及培养条件参考文献<sup>[5-7]</sup>及预实验选定:改良MS+2mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.5mg·L<sup>-1</sup>NAA+蔗糖30g·L<sup>-1</sup>+琼脂6g·L<sup>-1</sup>,以该培养基为基本培养基,培养条件:pH调至5.8;121℃高压灭菌20min;培养温度25

℃;光照强度50μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>;光期14h,暗期10h;相对湿度50%~70%。

**1.2.3 不同抗氧化剂的浓度选择** 的基本培养基为对照;在预实验的研究基础上,处理分别加50、100、200和250mg·L<sup>-1</sup>维生素C(VC),25、50、100和200mg·L<sup>-1</sup>柠檬酸(CA),250、500、1000和2000mg·L<sup>-1</sup>植酸(PA)。每个处理接20瓶,每瓶接4块愈伤,试验重复3次。维生素C、柠檬酸及植酸购自化学试剂商店,均为分析纯。

**1.2.4 测定指标及方法** (1)愈伤组织鲜重增量、增长率、褐化率。接种之后定期观察,并记录愈伤组织褐化状况、颜色、生长状态的变化。21d时统计愈伤组织鲜重增量、增长率、褐化率。

鲜重增加量(g·瓶<sup>-1</sup>)=收获鲜重/瓶-接种鲜重/瓶

鲜重增长率(%)=鲜重增加量/接种鲜重×100%

愈伤组织褐化率(%)=(褐化数目/接种数目)×100%

(2)生理指标的测定及方法。接种后分别在7、14、21和28d取样,以样品的鲜样进行生理指标的测定,试验重复3次。

细胞膜透性测定采用电导率法<sup>[8]</sup>,苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力测定采用比色法<sup>[8]</sup>。称取愈伤组织鲜样0.5g,加5mL预冷的含5mmol·L<sup>-1</sup>巯基乙醇、0.5g·L<sup>-1</sup>聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的硼酸缓冲液(0.2mol·L<sup>-1</sup>,pH8.8),冰浴研磨至匀浆,于4℃离心(10000r·min<sup>-1</sup>)30min后取上清液用于酶活性测定。反应体系5mL,包括0.2mol·L<sup>-1</sup>pH8.8的硼酸缓冲液3.7mL,酶液0.3mL,20mmol·L<sup>-1</sup>苯丙氨酸底物1.0mL。反应管置30℃恒温水浴中保温30min,加0.5mL1mol·L<sup>-1</sup>HCl终止反应。290nm处测光吸收值的变化,以OD值变化0.01为1个酶活力单位。

多酚氧化酶(PPO)活力测定采用邻苯二酚比色法<sup>[9]</sup>。称取愈伤组织鲜样0.5g,加入20mol·L<sup>-1</sup>pH值6.0的磷酸缓冲液2mL和聚乙烯吡咯烷酮0.25g,研磨成匀浆后再加入8mL20mol·L<sup>-1</sup>pH6.0的磷酸缓冲液,冷冻离心机(10000r·min<sup>-1</sup>)15min,上清液即为酶液。反应体系为1mL0.1mol·L<sup>-1</sup>的邻苯二酚、0.1mL酶液、2.9mL磷酸缓冲液。于UV-754型分光光度计上420nm处测定吸光值,以每分钟OD值增加0.001为一个酶活力单位。

**1.2.5 统计分析** 用Excel,STST统计分析软件对数据进行处理,用Duncan氏法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗氧化剂对青钱柳愈伤组织生长及褐化影响

表 1 表明, 培养基中添加适宜浓度的抗氧化剂能有效抑制褐化。VC 各浓度处理愈伤组织的褐化率均低于对照, 其中 100 和 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  处理效果较

好, 分别比对照低 47.83% 和 56.52%, 与对照差异分别达显著和极显著水平; CA 各浓度处理中 50 和 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  抑制褐化效果较好, 褐化率分别比对照低 26.09% 和 30.43%, 但差异不显著; PA 各浓度处理中 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  抑制褐化效果最佳, 褐化率比对照低达 60.87%, 差异达极显著水平。

表 1 抗氧化剂对青钱柳愈伤组织生长及褐化的影响

Table 1 Effects of antioxidants on the growth and browning of *Cyclocarya paliurus* callus

处理浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Treatment concentration	增长量/g Increment of callus	增长率/% Growth rate of callus	褐化率/% Callus browning rate	生长状态 Growing status of callus
CK (0)	2.23±0.24 <sup>bc</sup>	178.67±0.22 <sup>gh</sup>	38.33±0.08 <sup>abc</sup>	黄褐色, 质硬
VC 50	2.05±0.21 <sup>b</sup>	298.67±0.21 <sup>cd</sup>	23.33±0.08 <sup>defg</sup>	淡绿边缘褐色, 质硬
VC 100	2.68±0.19 <sup>a</sup>	219.33±0.22 <sup>fg</sup>	20.00±0.05 <sup>efg</sup>	淡绿边缘褐色, 松散
VC 200	3.88±0.35 <sup>b</sup>	310.67±0.25 <sup>c</sup>	16.67±0.08 <sup>fg</sup>	淡绿、粉红色, 质硬
VC 250	2.91±0.06 <sup>a</sup>	252.33±0.16 <sup>ef</sup>	33.33±0.08 <sup>abcde</sup>	淡绿、白色, 叶脉褐色, 质硬
CA 25	1.23±0.32 <sup>f</sup>	160.33±0.33 <sup>h</sup>	31.67±0.08 <sup>abcde</sup>	黄褐色, 松软
CA 50	2.68±0.33 <sup>a</sup>	470.33±0.31 <sup>b</sup>	28.33±0.08 <sup>bcdefg</sup>	淡绿、边缘褐色, 松散透明
CA 100	3.26±0.24 <sup>a</sup>	542.67±0.26 <sup>a</sup>	25.00±0.09 <sup>cdefg</sup>	淡绿、边缘褐色, 松散透明
CA 200	1.58±0.19 <sup>bcd</sup>	266.33±0.14 <sup>de</sup>	41.67±0.08 <sup>ab</sup>	褐色, 质软
PA 250	0.83±0.28 <sup>ef</sup>	163.33±0.27 <sup>h</sup>	15.00±0.05 <sup>g</sup>	淡绿色, 质硬
PA 500	1.08±0.31 <sup>def</sup>	212.67±0.16 <sup>fg</sup>	23.33±0.08 <sup>defg</sup>	淡绿色, 质硬
PA 1000	1.59±0.17 <sup>bcd</sup>	280.33±0.16 <sup>cde</sup>	30.00±0.05 <sup>abcdef</sup>	淡绿色, 质硬
PA 2000	2.01±0.26 <sup>b</sup>	269.00±0.18 <sup>cde</sup>	40.00±0.10 <sup>ab</sup>	淡绿、边缘褐色, 质硬

注: 同一列中不同小写字母表示差异达显著水平(0.01<P<0.05)。下同。

Note: Different small letters represent significant difference in the same column (0.01 < P < 0.05). The same below.

表 2 抗氧化剂对青钱柳愈伤组织细胞相对电导率的影响

Table 2 Effects of antioxidants on relative electric conductivity of callus of *Cyclocarya paliurus*

处理浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Treatment concentration	处理时间/d Treatment time			
	7	14	21	28
CK 0	8.71±0.40 <sup>de</sup>	10.27±4.52 <sup>cd</sup>	14.96±1.61 <sup>cde</sup>	50.08±2.31 <sup>b</sup>
VC 50	7.26±1.57 <sup>e</sup>	8.55±1.36 <sup>cd</sup>	8.92±1.42 <sup>def</sup>	26.90±3.05 <sup>gh</sup>
VC 100	6.15±1.18 <sup>e</sup>	6.43±1.13 <sup>d</sup>	7.23±2.58 <sup>ef</sup>	21.90±2.92 <sup>h</sup>
VC 200	6.74±2.45 <sup>e</sup>	8.13±1.13 <sup>cd</sup>	8.47±1.87 <sup>def</sup>	27.17±1.81 <sup>gh</sup>
VC 250	11.52±1.38 <sup>de</sup>	12.41±2.39 <sup>c</sup>	22.14±1.38 <sup>bc</sup>	31.22±2.30 <sup>fg</sup>
CA 25	7.80±2.32 <sup>e</sup>	7.89±2.51 <sup>cd</sup>	8.67±2.46 <sup>def</sup>	23.63±2.36 <sup>h</sup>
CA 50	7.92±4.37 <sup>e</sup>	7.79±3.68 <sup>cd</sup>	8.80±2.01 <sup>def</sup>	26.58±2.76 <sup>gh</sup>
CA 100	8.89±0.14 <sup>de</sup>	9.21±3.49 <sup>cd</sup>	14.85±3.41 <sup>cde</sup>	30.78±2.76 <sup>g</sup>
CA 200	18.19±2.67 <sup>bc</sup>	20.66±0.73 <sup>b</sup>	44.43±2.63 <sup>a</sup>	47.00±4.47 <sup>bc</sup>
PA 250	6.05±1.81 <sup>e</sup>	7.05±1.28 <sup>cd</sup>	5.26±1.18 <sup>f</sup>	15.48±1.37 <sup>i</sup>
PA 500	8.29±2.26 <sup>de</sup>	9.20±1.21 <sup>cd</sup>	8.52±1.46 <sup>def</sup>	22.32±4.88 <sup>h</sup>
PA 1000	8.38±2.63 <sup>de</sup>	10.66±7.49 <sup>cd</sup>	27.31±3.53 <sup>b</sup>	36.01±1.41 <sup>ef</sup>
PA 2000	27.34±1.51 <sup>a</sup>	27.65±4.46 <sup>a</sup>	44.10±1.91 <sup>a</sup>	70.01±4.28 <sup>a</sup>

从生长情况来看, 与对照相比, 不同种类、浓度的抗氧化剂处理对愈伤组织的生长有不同的调节作用, 大多数处理对愈伤组织的生长具有促进作用, 但高浓度下促进作用减弱。VC 处理的 4 个浓度均

不同程度地促进愈伤组织的生长, 其中 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  处理效果最佳, 增长率比对照增加 73.88%, 差异极显著(P<0.01)。CA 和 PA 处理随着浓度的增大均呈现先升高再下降的趋势, CA 处理 50 和 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

浓度效果较好, 愈伤组织增长率分别比对照高 163.25% 和 203.73%, 均与对照差异极显著; PA 的最佳浓度为  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比对照高 56.90%, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。

综合各处理褐化率数据及外部观察结果表明,

适宜浓度的抗氧化剂能有效抑制褐化, 总体上几种抗氧化剂的抑制褐化效果的顺序为  $\text{VC} > \text{PA} > \text{CA}$ , 最佳浓度分别是  $\text{VC } 100\sim 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{PA } 250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CA } 50\sim 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 3 抗氧化剂对青钱柳愈伤组织 PAL 活性的影响

Table 3 Effects of antioxidants on PAL activity of callus of *Cyclocarya paliurus*

$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

处理浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Treatment concentration	处理时间/d Treatment time			
	7	14	21	28
CK	128.57±25.28 <sup>abc</sup>	96.50±2.67 <sup>ab</sup>	113.73±2.95 <sup>cde</sup>	102.20±6.48 <sup>ab</sup>
VC 50	93.63±9.52 <sup>cde</sup>	70.00±6.34 <sup>d</sup>	120.00±1.23 <sup>bcd</sup>	115.10±9.72 <sup>a</sup>
VC 100	159.40±29.38 <sup>a</sup>	68.53±3.7 <sup>d</sup>	126.20±4.92 <sup>abc</sup>	87.40±3.11 <sup>bc</sup>
VC 200	147.63±12.96 <sup>abc</sup>	101.73±2.36 <sup>a</sup>	122.57±1.63 <sup>abcd</sup>	66.17±13.46 <sup>cd</sup>
VC 250	147.63±40.79 <sup>ab</sup>	86.80±2.79 <sup>c</sup>	119.43±0.98 <sup>bcd</sup>	64.20±14.22 <sup>cdef</sup>
CA 25	130.93±21.97 <sup>abc</sup>	41.53±3.87 <sup>f</sup>	73.83±1.89 <sup>h</sup>	71.27±6.73 <sup>cd</sup>
CA 50	115.37±17.03 <sup>abc</sup>	38.83±1.91 <sup>f</sup>	133.87±14.16 <sup>ab</sup>	67.50±19.75 <sup>cd</sup>
CA 100	106.47±11.32 <sup>bcd</sup>	37.33±1.17 <sup>f</sup>	122.07±24.51 <sup>abcdf</sup>	36.77±3.51 <sup>gh</sup>
CA 200	128.67±28.52 <sup>abc</sup>	58.50±4.70 <sup>e</sup>	101.63±1.67 <sup>eg</sup>	103.23±42.38 <sup>ab</sup>
PA 250	132.57±34.41 <sup>abc</sup>	62.73±3.75 <sup>e</sup>	41.47±6.35 <sup>i</sup>	112.63±6.70 <sup>d</sup>
PA 500	122.17±34.27 <sup>abc</sup>	85.33±3.14 <sup>c</sup>	93.83±1.72 <sup>fg</sup>	96.27±2.06 <sup>ab</sup>
PA 1000	65.87±8.16 <sup>de</sup>	41.03±3.35 <sup>f</sup>	91.23±3.35 <sup>g</sup>	46.70±5.55 <sup>defg</sup>
PA 2000	53.80±7.64 <sup>e</sup>	61.13±8.02 <sup>e</sup>	93.40±1.06 <sup>g</sup>	50.93±3.26 <sup>defg</sup>

表 4 抗氧化剂对青钱柳愈伤组织 PPO 活性的影响

Table 4 Effects of antioxidants on PPO activity of callus of *Cyclocarya paliurus*

$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

处理浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Treatment concentration	处理时间/d Treatment time			
	7	14	21	28
CK	235.00±56.47 <sup>de</sup>	98.90±3.55 <sup>fgh</sup>	50.00±24.27 <sup>bc</sup>	50.00±26.46 <sup>cd</sup>
VC 50	267.33±34.93 <sup>cd</sup>	233.33±67.99 <sup>bc</sup>	71.33±19.14 <sup>bc</sup>	75.67±19.14 <sup>bcd</sup>
VC 100	155.33±28.01 <sup>gh</sup>	59.00±25.36 <sup>h</sup>	89.00±33.65 <sup>abc</sup>	80.00±26.46 <sup>bcd</sup>
VC 200	160.67±28.99 <sup>fgh</sup>	140.00±43.59 <sup>defg</sup>	85.67±37.75 <sup>abc</sup>	71.00±16.52 <sup>bcd</sup>
VC 250	74.33±13.58 <sup>i</sup>	125.33±32.81 <sup>efgh</sup>	75.67±31.88 <sup>bc</sup>	117.90±16.52 <sup>ab</sup>
CA 25	134.33±5.13 <sup>hi</sup>	216.67±35.53 <sup>bc</sup>	60.00±8.89 <sup>bc</sup>	65.67±36.14 <sup>bcd</sup>
CA 50	247.67±24.58 <sup>cde</sup>	266.67±23.09 <sup>b</sup>	132.33±66.53 <sup>a</sup>	114.33±26.76 <sup>ab</sup>
CA 100	384.33±53.35 <sup>a</sup>	412.23±35.68 <sup>a</sup>	103.33±27.06 <sup>ab</sup>	92.33±35.30 <sup>abc</sup>
CA 200	158.33±51.01 <sup>fgh</sup>	412.00±83.14 <sup>a</sup>	40.00±10.00 <sup>c</sup>	67.67±10.79 <sup>bcd</sup>
PA 250	250.00±36.06 <sup>cde</sup>	185.67±22.28 <sup>cde</sup>	58.67±16.92 <sup>bc</sup>	102.33±35.30 <sup>abc</sup>
PA 500	199.67±7.51 <sup>efg</sup>	362.00±60.77 <sup>a</sup>	56.67±23.50 <sup>bc</sup>	103.33±32.15 <sup>abc</sup>
PA 1000	142.67±13.05 <sup>gh</sup>	204.33±22.28 <sup>bcd</sup>	59.00±7.21 <sup>bc</sup>	115.33±46.54 <sup>ab</sup>
PA 2000	220.00±14.73 <sup>def</sup>	175.57±72.01 <sup>cdef</sup>	62.33±19.66 <sup>bc</sup>	136.67±35.12 <sup>a</sup>

## 2.2 抗氧化剂对青钱柳愈伤组织生理生化特性影响

**2.2.1 细胞膜透性的动态变化** 表 2 表明, 对照及各抗氧化剂处理, 随着培养时间的延长, 愈伤组织的相对电导率总体呈现逐渐上升的趋势。各抗氧化剂处理在第 7 天和第 14 天的表现相似, CA 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 PA 2000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的细胞膜透性明显高于对

照, VC100、200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 PA 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  细胞膜透性比对照低, 但是并不明显; 第 21 天之后各抗氧化剂对细胞膜透性的影响出现明显分化, 第 21 天时 VC50、100 和 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , CA25、50 和 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , PA250、500 和 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  均降低了愈伤组织的细胞膜透性, 其中, PA 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  细胞膜透性最低,

比对照低 64.83%，而此时 CA 200 mg·L<sup>-1</sup> 的细胞膜透性最高，比对照高达 197.08%；第 28 天时除 PA 2000 mg·L<sup>-1</sup> 之外，各抗氧化剂及其各浓度处理均降低了愈伤组织的细胞膜透性，其中 PA250 mg·L<sup>-1</sup> 的降幅最大，比对照低 69.09%。

细胞膜透性的动态变化表明，各抗氧化剂随培养时间的延长，大多数处理可以降低愈伤组织的细胞膜透性，主要表现在 21 d 之后，但浓度过高时则起反作用，如 PA 2000 mg·L<sup>-1</sup> 处理明显高于对照。细胞膜透性降低效果的顺序为 PA > VC > CA，其中 PA250 mg·L<sup>-1</sup> 对细胞膜透性增加的抑制效果最佳，VC100~200 mg·L<sup>-1</sup> 与 CA50 mg·L<sup>-1</sup> 次之。

**2.2.2 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的动态变化** 表 3 表明，对照组愈伤组织在第 7 天时 PAL 活性最高，可能是由于愈伤组织刚转入新的培养基中，切割受创伤导致，随着细胞慢慢的适应，酶活力逐渐下降。

VC 处理第 7 天时除了 50 mg·L<sup>-1</sup> 比对照低 24.83%，其他处理均比对照高。第 14 天时除了 200 mg·L<sup>-1</sup> 高于对照 5.42%，其他处理分别比对照低 27.46%、28.98% 和 10.05%；第 21 天时 VC 各处理均比对照高，但差异不显著；第 28 天时 50 mg·L<sup>-1</sup> 比对照高 12.62%，其他处理均低于对照。

CA 各处理在第 7 天时 25 和 200 mg·L<sup>-1</sup> 的 PAL 活性略高于对照，50 和 100 mg·L<sup>-1</sup> 均低于对照；第 14 天各浓度处理的 PAL 活性降到最低，且均明显低于对照，其中 100 mg·L<sup>-1</sup> 最低，为对照的 38.70%；第 28 天时除了 200 mg·L<sup>-1</sup> 比对照高 1.01% 外，其他处理均比对照低。分析数据得出，CA 的加入有效地抑制了 PAL 酶活性，并且抑制效应持续时间较长，最佳浓度是 CA100 mg·L<sup>-1</sup>，其次是 CA50 mg·L<sup>-1</sup>。

PA 各浓度处理中除了 250 mg·L<sup>-1</sup> 浓度处理的愈伤组织 PAL 活性在第 7 天和第 28 天比对照略高之外，其他各浓度处理在各时间段的 PAL 活性均低于对照，可见 PA 对 PAL 活性的抑制作用较强。第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天时，抑制 PAL 活性效果最好的浓度处理分别为 2000、1000、250 和 1000 mg·L<sup>-1</sup>，分别为对照的 41.8%、42.5%、36.5% 和 45.7%。

**2.2.3 多酚氧化酶 (PPO) 的动态变化** 表 4 显示，对照组的 PPO 活性第 7 天时即达最大值，可能受切割创伤激活，随着培养时间的延长迅速下降，随后逐渐趋于稳定。

各抗氧化剂对 PPO 活性的抑制作用主要表现在第 7 天，此时 VC 各浓度处理除了 50 mg/L 比对照高以外，100、200 和 250 mg·L<sup>-1</sup> 处理分别比对照

低 33.90%、31.63% 和 68.37%；CA 以 25 和 200 mg·L<sup>-1</sup> 对 PPO 活性的抑制效果较好，分别比对照低 42.84% 和 32.62%；PA500、1000 和 2000 mg·L<sup>-1</sup> 均对 PPO 活性有抑制作用，分别比对照低 15.04%、39.29% 和 6.38%。

数据显示，各抗氧化剂在第 14 天、第 21 天和第 28 天对 PPO 活性的抑制作用不明显，许多处理还高于对照。表明本实验选择的 3 种抗氧化剂及其对应的浓度处理对 PPO 活性的抑制作用主要表现在前期。

### 3 小结与讨论

引起褐变的关键酶是多酚氧化酶 (PPO)<sup>[9]</sup>，底物主要是酚类化合物<sup>[1]</sup>，二者经过氧化作用引起外植体褐变。正常情况下，底物、氧气、PPO 同时存在并不发生褐变，这是由于酶与底物是分区定位的，酚类物质主要存在液泡中，而 PPO 主要存在于细胞质中，二者不能相互接触，当组织衰老或受损伤时，由于膜系统的破坏导致组织结构和细胞空间区划丧失，二者接触从而诱发了酶促褐变，继而进一步加深了对膜系统的毒害，使细胞功能丧失，最终导致细胞死亡<sup>[6-8]</sup>。因此褐变的内因是褐变底物酚类化合物的存在和 PPO 活性的增强，培养基中加入抗氧化剂控制酚类物质的氧化及其合成是目前防止外植体褐变的主要措施<sup>[10-13]</sup>。

高等植物的酚类物质合成途径是由苯丙氨酸脱氨基而形成，PAL 是催化该反应的关键酶和限速酶<sup>[14-17]</sup>。因此 PAL 活性是愈伤组织褐化的重要生理指标。本研究发现，加入适当浓度的 VC 等抗氧化剂处理，对青钱柳愈伤组织 PAL 活性具有一定的抑制效果，表明 VC 等抗氧化剂能通过抑制 PAL 活性，进而控制酚类物质的合成。

在抗氧化剂抑制 PPO 的效应方面，综合本实验各项数据分析可知 VC 对青钱柳愈伤组织的褐化抑制效果最优。VC 作为预防酶促褐变的最常见、最广泛的抗氧化物质和还原剂，其抗氧化机理为：邻苯二酚+1/2 氧气→邻苯二醌+水，邻苯二醌+抗坏血酸→邻二酸+脱氢抗坏血酸<sup>[18]</sup>。此外，VC 还兼具 PPO 分子中铜离子螯合剂功能，抑制 PPO 活性<sup>[19]</sup>。但通过表 3 的结果可知，VC 等抗氧化剂对愈伤组织 PPO 活性，尤其是第 7 天之后的 PPO 活性影响并不明显，有些处理还高于对照，说明 VC 等抗氧化剂对褐化的抑制作用在处理后期并非通过对 PPO 活性的抑制作用来调节，可能作为还原剂来抑制愈伤组织底物的褐化，其具体机制尚待进一步研究。

本研究初步表明, 3种抗氧化剂对青钱柳愈伤组织生长、褐化均具有一定的调控作用, 适当浓度的3种抗氧化剂处理可有效抑制青钱柳愈伤组织的褐化及其细胞质膜透性的增加, 促进愈伤组织生长, 但在处理最适浓度及其作用机理、不同抗氧化剂之间配合处理的效果等方面尚待进一步探讨。研究结果为青钱柳组组织培养及快繁技术的研究提供理论和应用基础。

### 参考文献:

- [1] 吴群英, 徐庆, 李丽亚, 等. 青钱柳不同外植体组织培养及褐变防止的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1872-1874.
- [2] 张彩珠, 潘盛武, 刘纲勇, 等. 青钱柳对家兔血液循环的影响[J]. 广西农业科学, 2010, 41(7): 723-725.
- [3] 胡冬南, 蒋艳, 吴少福, 等. 青钱柳组织培养的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(1): 39-41.
- [4] 王莹. 青钱柳离体快繁及生根机理的初步研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [5] 张志敏, 张颖颖, 谢寅峰, 等. 青钱柳愈伤组织诱导[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(9): 8-11.
- [6] 上官新晨, 郭春兰, 蒋艳, 等. 培养基和植物激素对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(5): 678-682.
- [7] 程茂高, 乔卿梅, 魏志华. 青钱柳愈伤组织培养条件研究的优化[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2009, 29(1): 12-14.
- [8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 213-214; 261-263.
- [9] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 64.
- [10] Boonsiri K, Ketsa S, Doorn W G, et al. Seed browning of hot peppers during low temperature storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 45(3): 358-365.
- [11] 张俊林, 刘庆忠, 刘松, 等. 核桃茎尖培养中防止褐变的方法[J]. 北京农学院学报, 2007, 22(2): 17-19.
- [12] 龚晓洁. 几种防褐剂对马铃薯愈伤组织培养褐化现象的抑制[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10410-10412.
- [13] 陈学森, 张艳敏. 植酸在银杏组织培养中应用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(2): 24-27.
- [14] Liu H, Song L L, Jiang Y M, et al. Short-term anoxia treatment maintains tissue energy levels and membrane integrity and inhibits browning of harvested litchi fruit[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(9): 1767-1771.
- [15] 崔堂兵, 郭勇. 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J]. 广东农业科学, 2001(3): 16-18.
- [16] 陈金印, 吴友根. 翠冠梨贮藏过程中酶促褐变及生理生化的变化[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 237-241.
- [17] Wilkinson R I, Frisina C, Partington D L, et al. Effects of 1-methylcyclopropane on firmness and flesh browning in Pink Lady TM apples[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2008, 83(2): 165-170.
- [18] 张百刚. 红枣多酚氧化酶(PPO)特性及抑制其酶促褐变的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.
- [19] 李冬杰, 魏景芳, 张进献, 等. 红豆杉细胞培养过程中抗褐变剂研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(7): 834-836.