

温度、pH 对马铃薯多酚氧化酶活性的影响

王 清, 王 蒂

(甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

摘 要: 对加工型马铃薯试管苗、茎段愈伤组织、块茎及块茎芽在不同温度、不同 pH 条件下 PPO 活性的检测结果表明: pH 对马铃薯 PPO 活性具有明显的影响, 块茎芽以及愈伤组织 PPO 活性均在 pH5~5.5 之间最高, 分别为 94.20 及 20.40 (0.01ΔOD/min), 而试管苗在培养基 pH 为 8 时 PPO 活性最高 (19.80 (0.01ΔOD/min))。不同温度下不同品种 PPO 活性表现不同, 甘农薯 1 号、Atlantic 试管苗 PPO 活性在 18~25 °C 之间达到高峰, 分别为 16.80 和 37.20 (0.01ΔOD/min); Shepody、Snowden 试管苗在 5 °C 下 PPO 活性较高; 除此之外, 不同品种贮藏块茎 PPO 活性均在 25 °C 表现最高。

关键词: 温度; pH; 马铃薯; 多酚氧化酶

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 03-157-05

多酚氧化酶 (简写 PPO) 含量的高低是影响植物组织褐变的内在原因。PPO 引起组织褐化的程度除与外植体基因型、生理状态、组织部位密切相关外, 也与培养基成分、温度、pH、光照强度、通气状况密切相关^[1]。据研究, 果实褐变程度与细胞总酚及酶活性有关^[2]; 不同品种, 酶促褐变程度不同, 甚至在植物的不同组织及同一组织的不同部位 PPO 活性也不同, 如: 香蕉果肉的内部组织酶活力远高于外部组织酶活力^[3]; 马铃薯匍匐茎、块茎、花及根中的 PPO 活性明显强于叶和茎, 而块茎外皮和花中子房及花药 PPO 活性也高于同器官的其他部位^[4]。

果实贮藏过程中的外界条件也会影响组织中的 PPO 活性。荔枝采后 2 d 内, PPO 活性仍在增高, 但随着果实的后熟逐渐下降^[5]; 苹果随贮藏期的延长 PPO 活性也存在下降趋势; 采后低温贮藏的菠萝^[6], 其 PPO 活性的升高, 是引发菠萝黑心病的主要原因之一; 低温贮藏的鸭梨, 一旦后熟完

成, 机体由于受到冷害将导致 PPO 活性的提高, 使果心组织发生褐变^[7]。

PPO 通常在 0~20 °C 之间活性较高。提取组织粗酶液, 通过体外 PPO 活性检测发现, 马铃薯块茎 PPO 活性在 15.5 °C 时最高, 在 65 °C 左右被抑制; 葡萄 PPO 活性最高的温度是 20 °C, 50 °C 以上的温度可使 PPO 酶迅速失活。酸度同样也是影响 PPO 活性的重要外界因素, 姚晓敏提取马铃薯块茎粗酶液, 并进行了一系列 pH 梯度试验, 发现马铃薯 PPO 反应的最适 pH 为 6.0, 并在 pH 4.6~4.9 和 pH 7.8~8.0 之间有两个小峰^[8]; 林向东对无核白葡萄多酚氧化酶的研究中也发现, pH 7.0 时, PPO 活性最高, 并在 pH 3.0 时, 也具有一个活力高峰^[9]。

组织培养中的褐化是组培能否成功的限制因素。Mager 等在花卉组培时发现酚类物质的含量与褐变率呈正相关, 与成活率呈负相关^[10]。罗晓芳则认为, 在组织培养过程中, 褐变发生的条件非常复杂, PPO 活性与组织培养材料褐变指数相关性并不明显, 但总酚含量与培养材料的褐变程度具有一定的相关性^[11]。冉毅东通过在培养基中加入 AgNO₃, 明显推迟了马铃薯花药褐化进程, 使花药胚状体产生频率大幅度提高^[12]。

有关马铃薯 PPO 的研究早有报道, 如 PPO 活

收稿日期: 2003-05-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划项目)

项目编号: 2001AA241131

作者简介: 王清 (1961—), 女, 副教授, 主要从事生物技术及遗传育种研究

性在不同组织中的表现, 有机酸对组织中 PPO 活性的影响^[13], 加工过程中粉丝的褐化^[14], 外界条件对提取的组织粗酶液 PPO 的影响和一些抑制剂对 PPO 活性的抑制作用。但是, 关于马铃薯外植体组织培养条件对褐化的影响报道不多, 尤其是培养基 pH、温度对试管苗、愈伤组织 PPO 的影响, 以及马铃薯贮藏温度对 PPO 活性影响尚少见报道; 因此, 本文针对此问题进行初步研究, 以便有目的选择适当的外植体, 建立最佳酸度、温度培养条件来克服组织培养过程中的褐化现象。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试管苗

甘农薯 1 号、Atlantic、Snowden、Shepody 试管苗由甘肃农业大学农业生物工程研究所保存, 采用单节切段繁殖, 并于 25 °C 左右进行培养。

1.1.2 愈伤组织

剪取 Atlantic 试管苗茎段 (不含节), 于下列培养基中进行愈伤组织诱导, 20 d 后用作实验材料。

愈伤组织培养基:

① MS+2 mg/L NAA+2.5 mg/L BAP+3%蔗糖+0.7%琼脂 pH 5.8;

② MS+2 mg/L 2, 4-D+2.5 mg/L BAP+3%蔗糖+0.7%琼脂 pH 5.8。

1.1.3 块茎

采用当年收获的 Favorita、甘农薯 1 号、甘农薯 2 号马铃薯块茎。

1.2 材料处理

1.2.1 配制 pH 为 4、5、6、7、8、9 的 MS 培养基, 将生长 15 d 的试管苗和 20 d 的愈伤组织转移到上述不同酸度的 MS 培养基中, 每一供试材料 3~5 瓶, 继续培养 5 d 后进行 PPO 活性检测。

1.2.2 将生长 15 d 的试管苗及转移到不同酸度 MS 培养基上的部分试管苗, 于 5 °C、10 °C、25 °C 和 30 °C 下处理 5 d; Favorita、Snowden 块茎放置在上述 4 种温度梯度下处理 5 d、10 d 和 17 d, 然后进行 PPO 活性测定。

1.3 PPO 活性测定

1.3.1 取样

取处理的试管苗、愈伤组织各 2 g, 测定 PPO 活性。而块茎的取样按下列方法进行:

将块茎平均切为 4 块, 对其中一块沿髓切取 2 g 重的楔状块茎组织 (包含髓、中间组织和外皮), 测定块茎 PPO 活性。

取块茎外皮 (靠近表皮 2~3 mm 内的组织)、髓以及中间部位 (外皮与髓之间的组织) 各 2 g, 作为检测块茎不同部位 PPO 活性的样品。

1.3.2 粗酶液的制备

将洗净的研钵放入冰箱冷冻室 (-20 °C) 中预冷 4 h, 然后将上述各样品 (每样 2 g) 分别放入加有 2 ml pH 6.24 的磷酸缓冲提取液的研钵中进行研磨, 研好的样品分装于 1.5 ml 的离心管中, 并在 10000 rpm 的条件下离心 20 min, 取上清液即为不同组织 PPO 的粗酶液。

1.3.3 比色液制备与比色

吸取 50 μl 不同组织 PPO 粗酶液、200 μl 磷酸缓冲液及 400 μl 临苯二酚 (0.2%) 依次加入到 10 ml 试管后, 用蒸馏水定容至 5 mL, 实验中以煮过失活的酶液为对照, 在 25 °C 保温 10 min 后, 于 721 型分光光度计, 525 nm 波长下测定光密度, 以每分钟内 OD 525 值变化 0.01 为一个酶活力单位。

配制浓度为 0.001%、0.003%、0.004%、0.008%、0.012%、0.016%、0.020%、0.024%、0.028%、0.032%、0.036%、0.04% 临苯二酚为底物的比色反应液, 检测底物浓度对 PPO 活性的影响。

2 结果与分析

2.1 品种及不同底物浓度与马铃薯 PPO 活性的关系

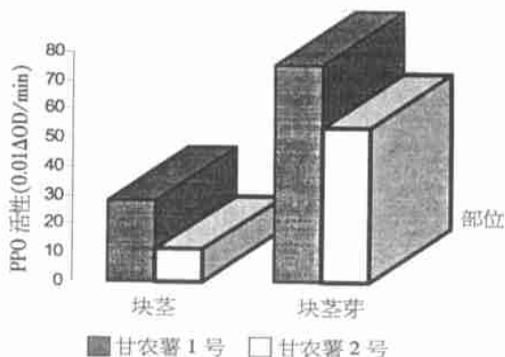


图1 甘农薯 1 号、甘农薯 2 号块茎及块茎芽 PPO 活性的差别

在相同底物浓度下 (0.016% 临苯二酚), 对甘农薯 1 号、甘农薯 2 号块茎及块茎芽 PPO 活性测

定的结果表明, 甘农薯 1 号块茎及块茎芽的 PPO 活性均高于甘农薯 2 号 (图 1), 分别为 28.6 和 75.8 (0.01 Δ OD/min), 表现出品种 PPO 活性的差异。

不同底物浓度下块茎及块茎芽 PPO 活性测定结果也验证了品种 PPO 活性的差异 (图 2), 并显示出底物浓度与 PPO 活性具有一定的关系。甘农薯 1 号块茎 PPO 活性在底物浓度为 0.008%~0.016% 之间最强, 其活性保持在 112~117 (0.01 Δ OD/min) 之间。但是, 随底物浓度的继续升高, PPO 活性反而急剧下降。而甘农薯 2 号块茎与块茎芽 PPO 活性在底物浓度为 0.003%~0.004% 之间略强于其他浓度, 且块茎芽与块茎 PPO 活性的变化趋势相一致 (图 2)。

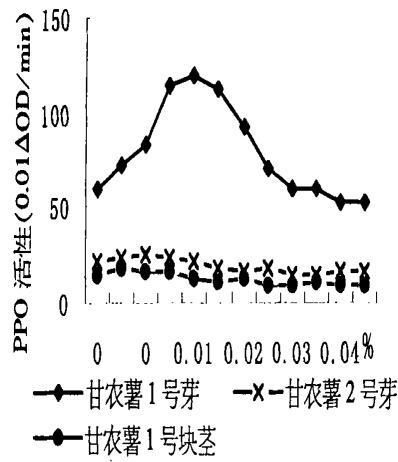


图 2 不同底物浓度下, 马铃薯块茎及块茎芽 PPO 活性的变化

2.2 pH 对马铃薯 PPO 活性的影响

2.2.1 pH 对块茎芽 PPO 活性的影响

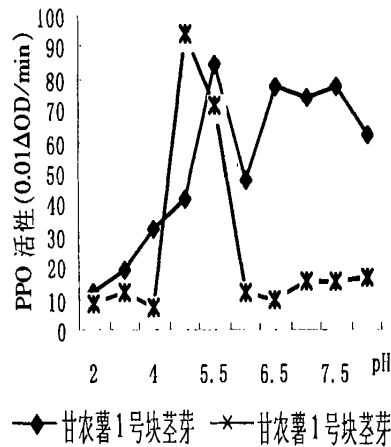


图 3 pH 对马铃薯块茎芽 PPO 活性的影响

反应液酸度对马铃薯 PPO 活性具有明显的效应。实验表明: 甘农薯 1 号、甘农薯 2 号块茎芽 PPO 活性在 pH 5~5.5 之间最高, 分别为 84.1 和 94.2 (0.01 Δ OD/min)。除此之外, “甘农薯 1 号”在 pH 6~7 之间也有 PPO 活性高峰 (图 3)。

2.2.2 pH 对愈伤组织 PPO 活性的影响

将通过 NAA 或 2, 4-D 诱导的茎段愈伤组织在不同 pH 培养基中进行培养, 以探索 pH 对活体植物材料 PPO 活性的影响。结果表明: 培养基 pH 为 5~5.5 时, 无论是在以 NAA 还是 2, 4-D 为生长素的培养基中形成的愈伤组织 PPO 活性均达到高峰 (20.40 和 17.00 (0.01 Δ OD/min))。而当 pH 升高为 7~8 时, PPO 活性保持相对稳定 (图 4)。

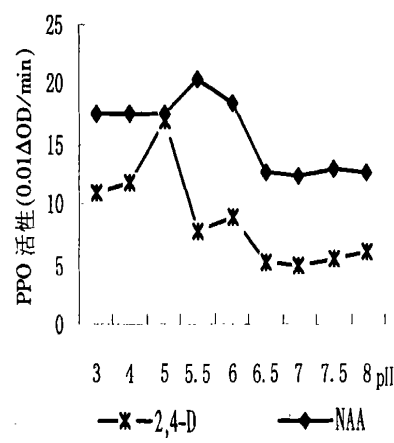


图 4 pH 对马铃薯愈伤组织 PPO 活性的影响

2.2.3 pH 对试管苗 PPO 活性的影响

将 Atlantic 试管苗放置在不同 pH 培养基中生长 5 d, 然后测定试管苗 PPO 活性, 发现培养基 pH 为 8 时, 试管苗 PPO 活性最高, 尤其在 18 $^{\circ}$ C 培养下的试管苗, PPO 活性高达 19.2 (0.01 Δ OD/min); 但随着培养基 pH 继续升高, 试管苗 PPO 活性急剧下降 (图 5)。

2.3 温度对马铃薯 PPO 活性的影响

2.3.1 温度对试管苗 PPO 活性的影响

不同品种试管苗 PPO 活性对温度的敏感程度不同。Shepody 和 Snowden 试管苗在低温 5 $^{\circ}$ C 时的 PPO 活性明显高于常温, 达 14.60、40.20 (0.01 Δ OD/min)。而甘农薯 1 号、Atlantic 试管苗 PPO 活性则在 18 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 之间达到高峰, 分别为 16.80、37.20 (0.01 Δ OD/min) (图 5、6)。

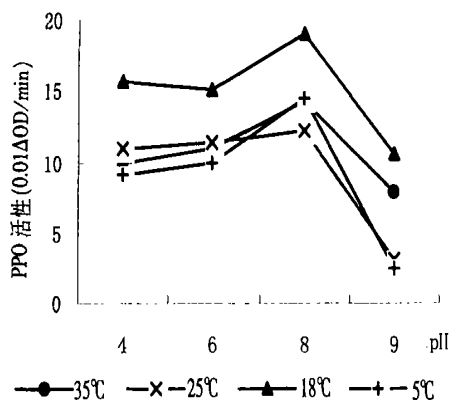


图5 不同品种试管苗在不同温度下 PPO 活性的变化

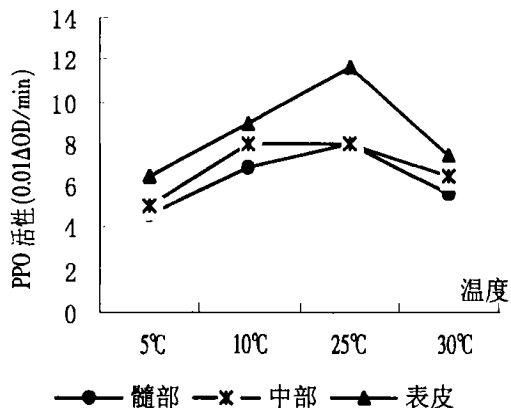


图8 不同温度下 Favorita 块茎不同部位 PPO 活性变化

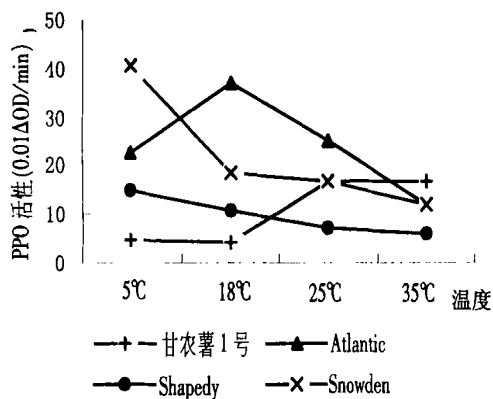


图6 温度、pH 对 Atlantic 试管苗 PPO 活性的影响

2.3.2 温度对马铃薯块茎 PPO 活性的影响

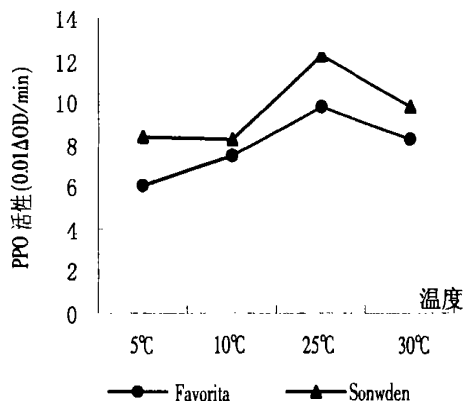


图7 温度对马铃薯块茎 PPO 活性的影响

品种 Favorita、Snowden 块茎的 PPO 活性在不同温度下表现不同。在供试温度范围内, 2 品种块茎 PPO 活性均在 25 °C 时达到最高 (9.80、12.20

(0.01ΔOD/min)); 5 °C 最低 (6.00、8.40 (0.01ΔOD/min)) (图 7)。而块茎不同部位的 PPO 活性也表现出与块茎同样的趋势, 并以表皮 PPO 活性最高 (25 °C, 11.6 (0.01ΔOD/min)); 髓 PPO 活性最低 (5 °C, 4.60 (0.01ΔOD/min)) (图 8)。

酶促褐化和非酶促褐化是组织褐化的两种形式。根据已有的研究, 一般认为外植体褐化主要是酶促褐化, 是由 PPO 与其底物相互作用的结果。目前, 在许多植物的组织培养过程中均有褐化现象, 尽管在许多组培中采用了褐化抑制剂, 但所获得的效果并不明显^[1], 因此, 选择适当的培养基, 给予组织培养最适合的培养条件促进植株生长, 降低褐化程度, 就显得十分重要。

进行 PPO 活性测定时, 品种、底物浓度与 PPO 活性通常具有一定的相关性。本实验中甘农薯 1 号块茎 PPO 活性在底物浓度为 0.012%~0.016% 范围内最强。而甘农薯 2 号块茎与块茎芽对底物浓度的要求不严格; 故实验选择 0.016% 作为检测 PPO 活性的底物浓度。

实验还发现, pH 对块茎、愈伤组织和试管苗 PPO 活性的影响不同。当培养基 pH 大于 5.5 时, 可以有效降低愈伤组织的 PPO 活性, 但不能有效抑制试管苗 PPO 活性, 因为试管苗 PPO 活性在培养基 pH 为 8 时达到高峰; 尽管供试的愈伤组织和试管苗直接生长于不同 pH 梯度的培养基中, 并受到不同酸度的作用; 然而, 不同的组织内部调节和

适应外界条件酸度的能力不尽相同, 它们受制于许多复杂的因素; 因此, 具有根、茎、叶的试管苗表现出了较愈伤组织更强的适应高 pH 的能力。至于实验中块茎 PPO 活性在 pH 5.0~5.5 之间最高, 此结果与姚晓敏结果不太一致, 可能与所用的品种有关^[8]。

温度与 PPO 活性密切相关, 这在众多植物中均有体现^[5,6,8]。在本实验中, 25℃ 的温度可导致块茎各部位 PPO 活性最强。但温度对不同品种试管苗 PPO 活性的影响却不尽相同, 甘农薯 1 号和 Atlantic 试管苗 PPO 活性在 18℃~25℃ 间最强; 而 Shepody、Snowden 试管苗 PPO 活性在 5℃ 最强, 说明低温同样可以诱导 PPO 活性。因此, 在试管苗培养过程中, 为了降低 PPO 活性, 应针对具体品种制定具体培养方案。

参 考 文 献

[1] 姚洪军, 田晓芳, 田砚亭等. 植物组织培养外植体褐变的研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 1999, 3 (21): 78—84.
[2] 陈秀芳, 王坤范等. 桃果实发育中褐变因子变化规律的研究 [J]. 园艺学报, 1995, 22 (3): 230—234.
[3] 林哲甫, 张维钦. 香蕉果肉组织的多酚氧化酶 [J]. 植物生理

学报, 1965, 2 (2): 95—103.
[4] Peter W Thygesen, Lan B Dry, and Simon P Robinson. Polyphenol oxidase in potato. Plant Physiol, 1995, 109: 525—531.
[5] 林植芳, 李双顺, 张东林等. 采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化 [J]. 植物学报, 1988, 30 (1): 40—45.
[6] 周玉婵, 潘小平. 采后低温诱导菠萝 PPO 活性升高的机理及其抑制途径 [J]. 园艺学报, 1997, 24 (3): 235—238.
[7] 田梅生, 盛其潮, 李钰. 低温贮藏对鸭梨乙烯释放、膜通透性及多酚氧化酶活性的影响 [J]. 植物学报, 1987, 29 (6): 614—619.
[8] 姚晓敏, 赵金香, 储刘明. 马铃薯褐变的控制 [J]. 上海农学院学报, 2000, 18 (1): 40—44.
[9] 林向东, 张琪, 李冀新等. 无核白葡萄多酚氧化酶特性研究 [J]. 食品科学, 2000, 21: 43—45.
[10] Mager A M, and Harel E. Phytochemistry, 1979, 18: 193—215.
[11] 罗晓芳, 田砚亭, 姚洪军. 组织培养过程中 PPO 活性和总酚含量的研究 [J]. 北京林业大学学报, 1999, 21 (1): 92—95.
[12] 冉毅东, 戴朝曦. 马铃薯花药培养硝酸银对诱导胚状体效果的研究 [J]. 西北农学报, 1993, 2 (4): 43—47.
[13] 刘曼西, 于秀芝. 有机酸对马铃薯多酚氧化酶活性的影响 (演示文稿). 植物生理学通讯, 1991, 27 (5): 350—353.
[14] 胡晓松, 李积红, 刘文英等. 马铃薯丝加工中的褐变因素及其控制 [J]. 食品科学, 1994, (5): 35—42.

THE EFFECTS OF TEMPERATURE AND PH ON THE
POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY OF POTATOES

WANG Qing, WANG Di

(Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT: The plants in vitro, calluses, tubers and buds on tuber of processing potatoes were used to test the polyphenol oxidase (PPO) activity. The PPO activities of tuber, tuber bud and callus were highest at pH 5 to 5.5, but the PPO activity of plants in vitro was not high until the pH was 8. The PPO activities varied with different varieties. The PPO activities in the plants in vitro from cvs Gannong No. 1 and Atlantic were highest (16.80 0.01ΔOD/min and 37.20 0.01ΔOD/min, respectively) when the temperature was 18 to 25℃; whereas the PPO activities in plants in vitro from cvs Shepody and Snowden were higher at 5℃. The PPO activities in all of the tubers tested were highest at 25℃.

KEY WORDS: temperature; pH; potatoes; polyphenol oxidase

更正

本刊收到读者刘肖的来信, 对本刊 2003 年第 2 期 85 页李功轶等同志撰写的《大兴安岭地区马铃薯测土配方施肥研究》一文中的“每生产 1000 kg 马铃薯需钾 2.2 kg”提出质疑, 经与作者核实, 确系笔误, 应以本页倒数第三行的计算公式为准, 特此更正。