

蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 *PAL* 基因的表达变化

许传俊^{1,2}, 李红¹, 李玲^{1*}

(1. 华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; 2. 福建省亚热带植物研究所, 福建 厦门 361006)

摘要: 研究了蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp.)叶片外植体褐变过程中 *PAL* 基因表达的变化。结果表明,在整个褐变过程中,外植体的 *PAL* 基因表达出现差异,离体培养第 3 天的表达明显提高,一直到第 8 天还维持较高表达水平,以后随着外植体褐变的加重,*PAL* 基因表达水平逐渐降低。与对照相比,在 Fe 盐浓度加倍为 55.6 mg L⁻¹ 培养基中培养的外植体 *PAL* 基因表达水平提高发生的时间比对照早,培养第 2 天就明显增强,随培养天数的延长,一直维持较高的表达水平;其 *PAL* 活性也高于对照,两种培养条件下,外植体总酚含量都随着其褐变加重而增加,说明 *PAL* 基因表达与蝴蝶兰外植体褐变过程相关。

关键词: 蝴蝶兰;外植体褐变;苯丙氨酸解氨酶;半定量 RT-PCR

中图分类号:Q786

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2007)01-0050-05

Phenylalanine Ammonialyase (*PAL*) Gene Expression Correlated with *Phalaenopsis* sp. Leaf Explant Browning

XU Chuan-jun^{1,2}, LI Hong¹, LI Ling^{1*}

(1. College of Life Science, Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 316006, China)

Abstract: Semi-quantitative RT-PCR was performed to detect the expression pattern of phenylalanine ammonialyase (*PAL*) gene during *Phalaenopsis* sp. leaf explant browning. Transcript RNA of *PAL* was rapidly increased at day 3 after *in vitro* culture, maintained at a high level until day 8 after culture and then declined. *PAL* mRNA was present one day earlier than the control after cultured on MS containing 55.6 mg L⁻¹ FeSO₄, and *PAL* activity was higher than the control. The total phenol content in leaf explants on both media increased with browning. It is suggested that *PAL* gene expression is associated with *Phalaenopsis* sp. leaf explant browning.

Key words: *Phalaenopsis* sp.; Explant browning; Phenylalanine ammonialyase; Semi-quantitative RT-PCR

外植体褐变是影响组织培养的一大因素,虽然人们用各种方法如吸附剂、抗氧化剂来防止褐变的发生,以提高组织培养的成功率,但对外植体褐变发生机理较少研究,Peiser 等^[1]和 Hisaminato 等^[2]的研究表明果蔬的褐变与苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonialyase, *PAL*)有关。我们曾报道蝴蝶兰叶片外植体的 *PAL* 活性随着培养时间的

延长和褐变程度的加重而升高,总酚含量也随之增加^[3],但在植物组织培养外植体发生褐变的研究中,关于 *PAL* 在褐变过程中的基因表达情况未见报道。我们还报道培养基中 Fe 盐含量增加会导致褐变情况加重^[4],因此我们克隆了 *PAL* 基因片断,并运用半定量 RT-PCR 技术分析在蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中以及培养基中 Fe 盐含量增加情况下 *PAL* 的

收稿日期:2006-06-05 接受日期:2006-10-16

基金项目:广东省科技计划项目(2005B20901019);广东省自然科学基金项目(05300272)资助

* 通讯作者 Corresponding author

表达差异,了解 PAL 基因表达与外植体褐变之间的关系,为认识褐变发生的分子机理提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp.)植株取自华南师范大学生物园。以在 MS 培养基上培养的外植体为对照,在 Fe 盐浓度加倍为 55.6 mg L^{-1} 的 MS 培养基上培养的外植体为处理。

1.2 总 RNA 的提取

参照 Vanlerberghe 和 McIntosh^[6]的方法,采用天为时代离心柱型试剂盒提取总 RNA。称取 100 mg 新鲜的蝴蝶兰叶片于液氮预冷的研钵中,迅速研成粉末后转入含 1 ml 裂解液 RZ 的离心管中,充分混匀后,室温放置 5 min,使其充分裂解;然后于 4°C 、 $13\ 400\times\text{g}$ 下离心 10 min,将上清液转入另一离心管中,加入 200 μl 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 5 min;离心后,吸取上层水相至另一离心管中,加入等体积 70%乙醇,混匀后全部转入吸附柱 CR 中;于 4°C 、 $9\ 300\times\text{g}$ 下离心 30 s,弃收集管中的废液;加入 0.5 ml 去蛋白缓冲液 RD,离心弃废液;加入 0.7 ml 漂洗液 RW,再次离心弃废液;将离心柱转入一个新的离心管中,加 20 μl 的 DEPC 水,室温放置 2 min 后离心,滤液即为总 RNA。

1.3 RT-PCR 克隆 PAL 片段

根据 GenBank 中 *Phalaenopsis* \times *Doritaenopsis* hybrid cultivar 和 *B. finlaysoniana* 的 PAL 的 cDNA 序列信息 (AY281156, X99997),设计特异引物,目的片段约 720 bp。PAL1: 5'-GAGAGCGTGGACAAAGGAAGTATGAT-3'; PAL3: 5'-TAAAGGATCCATCTCATGGAG-3'。引物由上海生工合成。进行 RT-PCR 反应。RT 反应体系: 2 μl 总 RNA ($1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$), 1 μl dNTP (10 mmol/L), 2 μl OligodT (10 mmol/L), 8 μl DEPC 水; 65°C 水浴 5 min 后,立即冰浴,再加入: 8 μl DEPC 水, 4 μl 5 \times RT 缓冲液, 1 μl DTT (100 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl Superscript III RTase (200 U μl^{-1}), 1 μl RNA 酶抑制剂 (40 U μl^{-1}), RT 反应条件: 50°C 55 min, 70°C 15 min。合成的 cDNA 链进行 PCR 反应。PCR 反应体积 50 μl , 含 2 μl cDNA, 5 μl 10 \times Ex Taq 缓冲液, 4 μl dNTP (2.5 mmol/L), 2 μl PAL1

(10 mmol/L), 2 μl PAL3 (10 mmol/L), 0.5 μl Ex Taq ($5 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$), 34.5 μl 水。PCR 反应程序: 95°C 预变性 5 min; 然后 94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 1 min 共 35 个循环; 最后 72°C 10 min。凝胶电泳检测 PCR 反应产物。

1.4 目的片段的克隆、阳性克隆的鉴定及测序

对目的 DNA 进行电泳;使用 TAKARA 公司的 Agarose Gel DNA Purification Kit Veeer.2.0 的试剂盒回收 DNA 片段。具体操作按产品说明书进行。DNA 片段与载体 PMD18-T 连接,并转化大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性克隆,进行 PCR 扩增和酶切,电泳检测并测序。

1.5 PAL 基因表达变化的检测

取培养不同时间的蝴蝶兰叶片外植体,按上述方法提取总 RNA。根据获得的 PAL 的 cDNA 序列信息,设计半定量 RT-PCR 所用引物,目的片段约 500 bp。PAL2: 5'-GAAATCCTTGAAGCTATCGCC-3'; PAL3: 5'-TAAAGGATCCATCTCATGGAG-3'。根据 GenBank 中 *Caucaea phalaenopsis* 和 *Miltoniopsis phalaenopsis* 的 18S 核糖体 RNA 的序列设计特异引物,目的片段约 100 bp。18S1: 5'-TCGCCGCCGTGACTAGGCGA-3'; 18S2: 5'-CAATGATCCTTCCGCAGGTTC-3'。引物由上海生工合成。进行半定量 RT-PCR 反应。1 μl 总 RNA ($1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$), 1 μl dNTP (10 mmol/L), 8 μl DEPC 水; 65°C 水浴 5 min 后,加入 4 μl 5 \times RT 缓冲液, 1 μl DTT (100 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl Superscript III RTase (200 U μl^{-1}), 1 μl RNA 酶抑制剂 (40 U μl^{-1}), RT 反应条件: 50°C 55 min, 70°C 15 min。PCR 反应程序: 95°C 预变性 5 min, 然后 94°C 30 s; 54°C 30 s; 72°C 25 s; 共 30 个循环。最后 72°C 10 min。在另一个管中进行 18S 内标反应,凝胶电泳检测。

1.6 PAL 活性测定和总酚含量测定

取培养不同时间的蝴蝶兰叶片外植体,测定 PAL 活性和总酚含量。PAL 活性测定参考 Engelsma^[6]的方法。按 1:5 (W:V) 的比例加入 pH 8.8 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液 (含 5 mmol/L 巯基乙醇和 4 g L^{-1} 的 PVP), 用少量石英砂于冰浴研磨, 4°C 、 $12\ 000\times\text{g}$ 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。取 2 ml 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.8), 加入 1 ml 的

0.02 mol/L 的 L- 苯丙氨酸和 1 ml 的粗酶液, 测定其吸光值, 35℃ 水浴 1 h 后, 再于 290 nm 处测 OD 值, 以每小时 OD 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位, 用 $U\ mg^{-1}\ Protein$ 表示酶的活性。采用考马斯亮兰测定蛋白质含量。总酚含量测定参照罗晓芳等^[7]的方法, 以邻苯二酚做标准曲线。实验重复 3 次, 采用 Excel 进行数据分析。

2 结果和分析

2.1 获得目的基因 *PAL*

根据 GenBank 中 *Phalaenopsis × Doritaenopsis* hybrid cultivar 和 *B. finlaysoniana* 的 *PAL* 的 cDNA 序列信息, 设计特异引物。以蝴蝶兰新鲜叶片的总 RNA 为模板、*PAL1* 和 *PAL3* 为引物进行 RT-PCR 反应, 回收约 720 bp 的目的片段。电泳结果显示, 在约 750 bp 处有特异带扩增, 测序和同源性分析也证明该片段即为 *PAL* 目的基因的部分 cDNA 序列。利用 NCBI 的 BLASTn 分析表明, 该序列与 *Phalaenopsis × Doritaenopsis* hybrid cultivar 的 *PAL* 核苷酸序列的同源性为 97%, 与 *B. finlaysoniana* 的同源性为 91%。

2.2 半定量 RT-PCR 分析 *PAL* 基因表达

取对照和 Fe 盐加倍的两组褐变发生过程中的叶片外植体, 分别提取其总 RNA。将 RNA 严格定量后, 同时取各 RNA 样品 1 μg 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 进一步确定模板的等量性。然后以完全等

量、不同培养时间的外植体的两组 RNA 为模板, 分别进行反转录反应。再取等量的反转录产物, 用引物 *PAL2* 和 *PAL3* 分别进行 PCR 反应。

对照的外植体在培养第 5 天开始褐变, 10 d 后褐变严重; 半定量 RT-PCR 的结果表明, 其 *PAL* mRNA 表达在第 3 天显著增加, 一直到第 8 天表达水平都比较高, 10 d 后 *PAL* mRNA 表达水平开始逐渐降低 (图 1)。在 Fe 盐加倍培养基上培养的外植体褐变出现的时间比对照早, 而且严重, 其外植体的 *PAL* mRNA 表达量均高于对照; 在第 2 天就出现大幅度增加, 比对照早 1 d, 随后一直维持较高水平的表达, 到 12 d 才明显降低。

2.3 蝴蝶兰叶片外植体褐变发生过程中 *PAL* 活性和总酚含量变化

培养 0 h 的外植体均测不到 *PAL* 活性, 之后随着培养时间的延长, 对照组的 *PAL* 活性逐渐增加, 在第 12 天达到最高; 在 Fe 盐加倍培养基上培养的外植体的 *PAL* 活性变化与对照组略有不同, 酶活高峰出现在培养的第 4 天和第 6 天, 以后随褐变发生严重, 活性降低, 但总体酶活性都远高于同期对照组 (图 2A)。

随着培养时间的延长, 在两种培养基上培养的叶片外植体总酚含量都增加, 但两组的差异不显著; 培养 4 d 之后, 叶片外植体的总酚含量增幅显著; 培养 14 d 的 Fe 盐处理组叶片外植体总酚含量是培养 0 h 的 9 倍 (图 2B)。

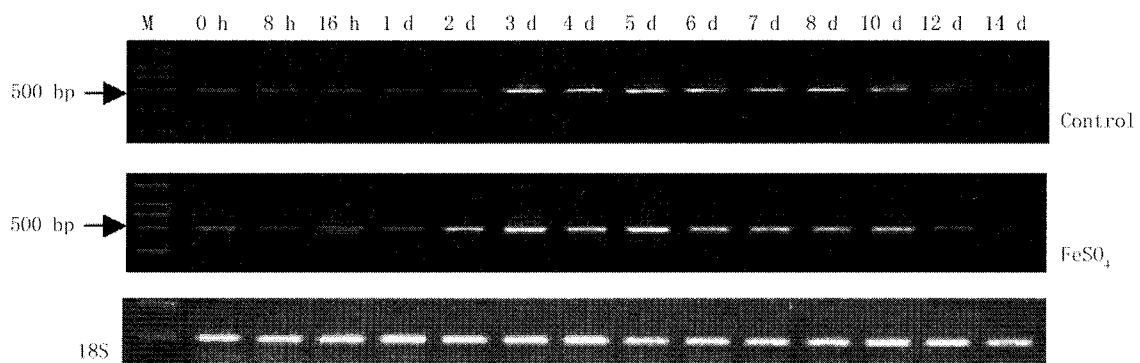


图 1 蝴蝶兰叶片外植体 *PAL* 基因在褐变过程中的表达

Fig.1 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *PAL* transcript levels during the browning of *Phalaenopsis* sp. leaf explants *in vitro*

分别取在含 $55.6\ mg\ L^{-1}\ FeSO_4$ 培养基上培养 0 h、8 h、16 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、10 d、12 d 和 14 d 的外植体, 检测其 *PAL* 表达, 以在 MS 培养基上培养的外植体为对照, 18S RNA 为内标。Total RNA was isolated from leaf explants of *Phalaenopsis* sp. cultured on MS containing $55.6\ mg\ L^{-1}\ FeSO_4$ for 0 h, 8 h, 16 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d, 7 d, 8 d, 10 d, 12 d and 14 d, respectively. Explants were cultured on MS medium as control, and 18S RNA was used as internal control.

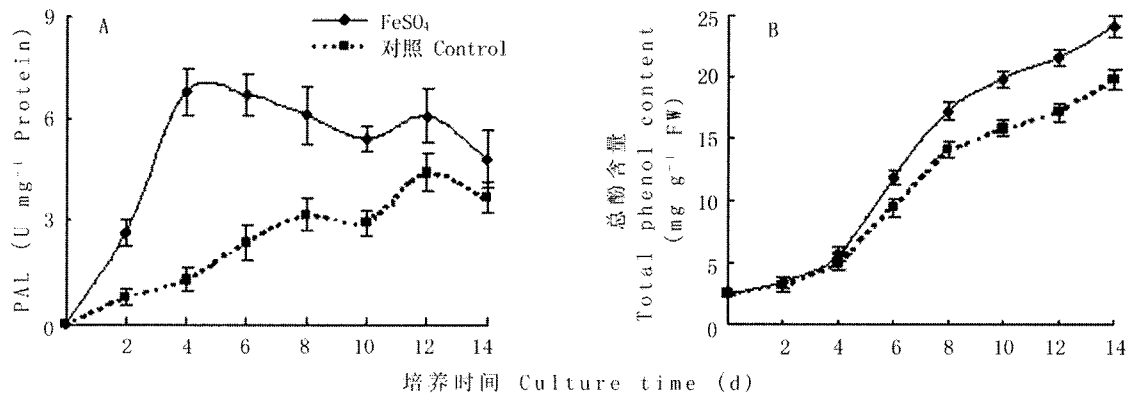


图 2 褐变过程中蝴蝶兰叶片外植体的 PAL 活性 (A) 和总酚含量 (B) 变化

Fig. 2 Changes in PAL activity (A) and total phenol content (B) during the browning of *Phalaenopsis* sp. leaf explants cultured on MS medium containing 55.6 mg L⁻¹ FeSO₄, 以在 MS 培养基培养的外植体为对照。Explants cultured on MS medium as control.

3 讨论

外植体褐变是组织培养初期面临的问题之一, 在木本植物组织培养中尤其严重, 在兰花的组织培养中也面临这个问题, 一直都认为外植体褐变与酚类物质的氧化有关, 有研究认为香蕉皮和莴苣褐变与 PAL 活性和总酚含量有密切的关系^[1,8-9]。Murata^[10]也证明通过抑制 PAL 活性可以降低总酚含量和莴苣的褐变。我们发现蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 PAL 活性与总酚含量变化有显著的相关性^[3], 对其基因表达的研究结果表明, 叶片外植体 PAL 基因在褐变过程中表达存在差异。PAL 是一种与植物防御反应相关的酶, 伤害可以诱导其活性和表达增加^[11-12]; 从对照可以看出, 在培养 0 h 的外植体中检测不到该酶的活性, 随培养时间的延长, 褐变开始出现, PAL 活性逐渐上升。可能因为在培养初期对材料的处理, 如切割、冲洗、消毒等过程的影响, 诱导了 PAL 的基因表达, 随褐变的发生其表达逐渐增加, 其酶活逐渐增强。我们发现当培养基中 Fe 盐含量增加后, 蝴蝶兰叶片外植体的褐变更严重, 并且褐变现象发生的也比对照早^[4], 分析 PAL 表达也可见其表达量增加发生比对照早 1 d, 而且在较长的时间里都维持较高的表达量, PAL 酶活性远高于对照, 活性高峰出现的比对照早, 与其现象差异一致。表明 PAL 基因表达与蝴蝶兰外植体褐变相关, 而且在褐变发生前 PAL 表达增加, 褐变发生后表达降低, PAL 是否直接参与了诱导褐变发

生, 其作用还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Peiser G L, pez-Galvez G, Cantwell M, et al. Phenylalanine ammonia-lyase inhibitors control browning of cut lettuce [J]. *Postharv Biol Techn*, 1998, 14:171-177.
- [2] 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 [J]. *Biosci Biotechn Biochem*, 2001, 65: 1016-1021.
- [3] Xu C J (许传俊), Li H (李红), Zhang M G (张铭光), et al. Preliminary studies on the elements of browning and the changes in cellular texture of leaf explant browning in *Phalaenopsis* [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 2005, 6:1111-1113. (in Chinese)
- [4] Xu C J (许传俊), Li L (李玲). Influence of medium and light intensity on the leaf explant browning in *Phalaenopsis* sp. *in vitro* [J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), 2006, 35(1):9-12. (in Chinese)
- [5] Vanlerberghe G C, McIntosh L. Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression: Studies with the alternative oxidase gene of tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105:867-874.
- [6] Engelsma G. On the mechanism of the changes in phenylalanine ammonia-lyase activity induced by ultraviolet and blue light in hypocotyls [J]. *Plant Physiol*, 1974, 54(5):702-705.
- [7] Luo X F (罗晓芳), Tian Y T (田砚亭), Yao H J (姚洪军). Polyphenol oxidase activities and phenol contents in tissue culture [J]. *J Beijing For Univ* (北京林业大学学报), 1999, 21(1):92-95. (in Chinese).
- [8] Nguyen T B T, Ketsa S, van Doorn W G. Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel browning in banana [J]. *Postharv Biol Techn*, 2004, 31:313-317.

- [9] Tomas-Barberan F A, Gil M I, Castaner M, et al. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce [J]. *J Agri Food Chem*, 1997, 45(3):583–589.
- [10] Murata M, Tanaka E, Minoura E, et al. Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanine ammonia-lyase activity, and improvement on sensory evaluation during storage [J]. *Biosci Biotechn Biochem*, 2004, 68(3):501–507.
- [11] Dyer W E, Henstrand J M, Handa A K, et al. Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in Solanaceae [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(19):7370–7373.
- [12] Liu Y (刘艳), Hao Y Y (郝燕燕), Liu Y Y (刘艳艳), et al. Membrane lipid peroxidation mediated by mechanical wounding and jasmonic acid in pea seedlings [J]. *Sci Agri Sin(中国农业科学)*, 2005, 38(2):388–393.(in Chinese)