



玫瑰压花花瓣酶促褐变机理分析及相关酶基因表达研究

周徐子鑫¹,黄郑涛¹,林伟¹,刘晴¹,马均²,陈国菊³

(1. 宜宾职业技术学院 人文与旅游学院/素质教育学院,四川宜宾 644000; 2. 四川农业大学
风景园林学院,成都 611100; 3. 华南农业大学 园艺学院,广州 510642)

摘要 为了减轻红色玫瑰品种‘卡罗拉’(*Rosa rugosa* ‘Carola’)花瓣在压花过程中的褐变程度,利用理化分析和转录组学挖掘出在玫瑰压花过程中影响酶促褐变的主要多酚氧化酶(PPO)基因,并依据其启动子元件信息探究了脱落酸(ABA)和茉莉酸甲酯(MeJA)对玫瑰压花花瓣酶促褐变的作用。结果表明:(1)‘卡罗拉’花瓣在压花过程中总酚和总黄酮含量降低,多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性升高,表明花瓣在压花过程中存在显著的酶促褐变;(2)比较转录组与 qRT-PCR 结果表明 *RrPPO1*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5* 的表达水平在压花过程中显著上调,皮尔森相关性系数表明三者的表达水平与多酚氧化酶活性变化存在显著正相关,启动子分析表明三者启动子上主要的化学激素响应元件为 ABA 响应元件和 MeJA 响应元件;(3)与对照相比,经 ABA 或 MeJA 处理后的玫瑰压花花瓣中 PPO 活性均显著降低,MeJA 对 PPO 活性抑制作用比 ABA 更加显著,而 ABA 在抑制 PPO 活性的同时能够有效激活超氧化物歧化酶和过氧化氢酶(CAT)的活性及其编码成员的表达。

关键词 压花艺术;玫瑰;酶促褐变;多酚氧化酶;转录组

压花艺术(Art of pressed flower)是将植物素材进行干燥压制后制作成文创作品的艺术形式^[1]。由于压花艺术是利用植物的自然色彩来表现作品,植物色彩特征的稳定性是影响压花作品展陈效果的关键,因此探究植物压花素材的保色方法对于创作不同类型的压花作品具有重要意义^[2]。

玫瑰(*Rosa rugosa*)是压花作品创作中常用的植物素材,玫瑰色彩多样、花朵硕大,花瓣平滑且厚度适中,在压花制作的过程中易于干燥压制成形,因此在压花作品中常用于大面积的背景色调铺垫^[1]。但玫瑰通常含有酚类和黄酮类物质,利用玫瑰花瓣制成的压花作品在干燥压制后容易发生显著的色变现象^[3-4]。目前,玫瑰在压花色泽方面的研究仍然缺乏,虽然已有研究表明可以使用物理、化学和生物方法对桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)、彩叶草(*Plectranthus scutellarioides*)、“世纪红”非洲菊(*Gerbera jamesonii* ‘century red’)的压花花瓣进行保色处理,但是对于多

色玫瑰花瓣的保色技术研究甚少,在基于压花色泽机理探究保色技术方法领域仍存在空白^[5-7]。

褐变(Browning)是植物器官在离体后发生的生理响应机制,研究认为采后植物组织在高温、失水等胁迫条件下均可引起褐变,该过程会严重影响采后植物组织的商品价值^[8]。在植物褐变过程中酶促褐变具有主导作用,导致酶促褐变的酶包括多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT),其中多酚氧化酶是影响酶促褐变的主要催化酶^[9-11]。植物在胁迫状态下通常会大量产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS),活性氧对细胞结构的破坏会导致酚类物质与多酚氧化酶接触,产生大量醌类物质,而醌的多聚化以及与氨基酸等其他物质的聚合反应最终形成黑褐色代谢产物^[12-13]。研究认为由于酶蛋白由基因编码而来,因此可以通过调控基因表达来抑制酶的编码及其活性^[9,14]。基因的表达调控与

收稿日期:2024-12-13 修回日期:2025-03-15

基金项目:国家自然科学基金(31971704);四川省自然科学基金(22NSFSC0090);宜宾职业技术学院自然科学基金项目(24ZRYB-14)。

第一作者:周徐子鑫,男,博士,讲师,研究方向为园林植物培育与应用。E-mail: 491575336@qq.com

通信作者:周徐子鑫,男,博士,讲师,研究方向为园林植物培育与应用。E-mail: 491575336@qq.com

基因启动密码子(ATG)上游启动子(Promoter)中的顺式作用元件(*Cis*-element)直接相关,这些元件能够响应反式作用因子(*Trans*-factors)、光、温度、激素等,当启动子元件响应特定条件时,对应基因表达发生变化进而影响蛋白合成甚至植物的表型^[15-17]。

在使用红色玫瑰品种‘卡罗拉’(*Rosa rugosa* ‘Carola’)花瓣进行压花素材制作的过程中,发现经过干燥压制后的玫瑰花瓣颜色加深,影响了压花作品后期的展陈效果。为了探究玫瑰压花花瓣素材的保色方法,本研究通过理化测定方法确定了玫瑰花瓣色变与酶促褐变之间的关系,利用基因表达和相关性分析筛选出影响玫瑰压花花瓣PPO活性的主要编码基因,并依据其启动子上的激素响应元件探究了脱落酸与茉莉酸甲酯在玫瑰压花花瓣中对酶促褐变的抑制作用。本研究有助于了解和掌握玫瑰在干燥压制过程中的褐变机理,

对玫瑰的压花保色技术研究有一定的借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用玫瑰品种‘卡罗拉’从云南省昆明市(24°53′18.9″N,102°49′14.7″E)获得,选取10株新鲜且形状一致的玫瑰,将花朵中间轮舒展且大小相近的花瓣快速取下20片后放置于压花器中(图1-A),将样品按照图1-B所示方法放置好之后使用螺丝固定压花板以压紧材料,并将压花器装入密封袋后在23℃~25℃条件下进行干燥压制,24h后随机抽取10片花瓣作为样品组D2,剩余10片花瓣继续干燥压制24h后取出作为样品组D3。同时,从花朵上另取10片新鲜花瓣作为对照组(D1)。将花瓣样品在液氮中速冻后置于-80℃保存。

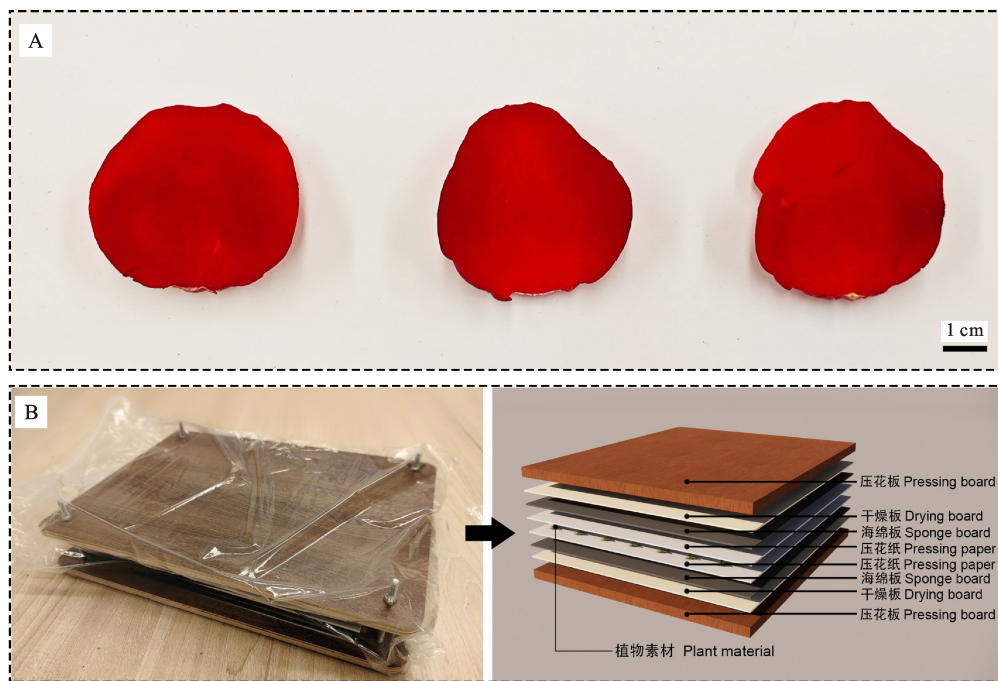


图1 玫瑰‘卡罗拉’花瓣和压花器示意图

Fig.1 Petals of rose variety ‘Carola’ used in this study and pressing toolkit

依据前期相关研究,采用100 mg/L(378 151 μmol/L)的脱落酸溶液和50 μmol/L的茉莉酸甲酯溶液对玫瑰花瓣进行预处理^[18-19]。取新鲜且大小一致的玫瑰花瓣30片,随机抽取10片浸泡于蒸馏水中作为对照组(CK),剩余花瓣作为试验组。从试验组中随机取10片浸泡于100 mg/L的脱落酸(ABA)溶液中(T1),剩余10片浸泡于

50 μmol/L的茉莉酸甲酯(MeJA)溶液中(T2)。将3个样品组在23℃~25℃下浸泡24h后取出拭干并置于压花器中,在相同温度条件下密封干燥压制48h。干燥压制后的样品置于密封袋中备用。

1.2 表型颜色测定

将样品平铺在白色背景板上后,使用Konica

色度计 (Konica Minolta, CM-2600d, Japan) 在 CIELab 模式下测定样品的表型颜色。色度指标包含 L、a 和 b 3 个值,其中 L 表示样品明暗度,数值从 0~100,数值越小样品越暗,反之则越明亮;(-a,0)和(0,+a)分别表示绿色和红色数值,-a 越小表示样品越绿,+a 越大表示样品越红;(-b,0)和(0,+b)表示样品蓝色和黄色数值,-b 越小表示样品越蓝,+b 越大表示样品越黄^[20]。

1.3 生化指标测定

取 1 g 速冻花瓣样品,在液氮中充分研磨至粉末,测定相关生化指标。总酚含量测定采用 Folin-Ciocalteu 比色法^[21],总黄酮含量测定采用氢氧化钠-亚硝酸钠-硝酸铝法^[22],PPO 和

POD 活性的测定参考姬懿珊^[4]的方法,CAT 和 SOD 活性的测定按照李合生^[23]的方法进行。

1.4 基因组 DNA 的提取与启动子元件预测

使用 CTAB 法提取样品的总 DNA 以扩增基因的启动子。依据基因组序列设计扩增基因启动子的特异性引物(表 1),并使用 Takara[®] Amplification Kit 试剂盒进行扩增。扩增体系和程序按照产品说明书设置(<https://www.takara-biomed.com.cn/ProductShow.aspx?productID=20141226101216657223>)。将扩增测序得到的序列导入 PlantCare(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)中进行启动子元件分析。

表 1 基因启动子扩增用引物

Table 1 Primers used for promoter amplification

引物名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequences	片段长度/bp Length
ProRrPPO1	F:TGGCTCAATCAGTTACCGACT R:TCATGCCTTAACTTCTGCTTCC	2 006
ProRrPPO2	F:GACAGTGAGGATCAATACGATAGT R:AAAAAAGACCATCGTGGTACGGA	2 010
ProRrPPO3	F:ACCATAACCCAGAATGGAAACC R:CATGTAGCTTCTTAGCAGCTCG	2 013
ProRrPPO5	F:GTGACTGCTGCATCCATTGGTCA R:AGCTTCTTAGTGAGATATGAGC	2 002

注:RrPPO. 玫瑰多酚氧化酶基因。

Note:RrPPO. rose polyphenol oxidase gene.

1.5 转录组测序与数据分析

使用 LabGene[®] 多酚多糖植物总 RNA 提取试剂盒提取压花花瓣的总 RNA^[24]。转录组试验与分析由武汉康测科技有限公司完成,质检合格后的样品进行序列拼接并上机进行读取和过滤。将过滤后获得的高质量序列(clean reads)与玫瑰基因组(<https://www.rosaceae.org/Publication/11745272>)进行比对以获得序列注释信息^[25]。以 logFC 的绝对值>1 且 P value <0.05 作为标准筛选差异表达基因(Differentially ex-

pressed genes,DEGs),基因的表达水平以 Reads per kilo bases per million mapped reads(RPKM)值表示,并将 Unigenes 信息注释到 Gene Ontology(GO)数据库^[26]。

1.6 qRT-PCR 分析

使用艾科瑞[®]Evo M-MLV RT for PCR kit 反转录试剂盒将总 RNA 进行反转录并合成为 cDNA,依据转录组序列使用 Primer Premier 5.0 设计引物,所用引物如表 2 所示。

表 2 qRT-PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences used for qRT-PCR

引物名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段长度/bp Length
P-RrPPO1	F:ATCGTCGGAAGCCTAATTGG R:GCATCCGCTCTTTGTTTTCC	439
P-RrPPO2	F:CGAGTCAAAGAAGCTGGTTC R:CTAGGCACTGAAATACTCGATC	246
P-RrPPO3	F:CCAAGATGTGGACATTCATGG R:CGATCACAAGTATCTCCTCC	261
P-RrPPO5	F:GAAGGTCAAAGGTGGCATTTC R:TTGGAATCAAAGTCACCACCAC	324
P-RrPOD3	F:CTCTCTGTCTCGCTTTTC R:TAGTCTTGAGGAGCTCCTTG	276
P-RrPOD4	F:GTTTGTCTCGCATTGGACAC R:AGCGCGAATTTACCTTTGG	312
P-RrSOD1	F:AATCCCTAGCCGATCAGG R:TCCCAAACATCAATGCCAAGC	428
P-RrSOD2	F:TGCTCTTGGTGACACAACAAAC R:ATTTGCTAAGCTCATGTCCACC	332
P-RrCAT1	F:GGGAAGAGTTAGTGTGCTG R:GCATAAAAGTGCACCGACTG	385
P-RrCAT4	F:CCGTTACCCTTCATATCCAG R:TGAGGAAAGGATCCTCTCAC	292

注:RrPPO. 玫瑰多酚氧化酶基因;RrPOD. 玫瑰过氧化物酶基因;RrSOD. 玫瑰超氧化物歧化酶基因;RrCAT. 玫瑰过氧化氢酶基因。

Note:RrPPO. Rose polyphenol oxidase gene; RrPOD. Rose peroxidase gene; RrSOD. Rose superoxide dismutase gene; RrCAT. Rose catalase gene.

使用艾科瑞®SYBR Green Premix Pro TaqHS qPCR Kit 荧光定量试剂盒进行相对表达量的测定,扩增体系和程序按照产品说明书设置 (<https://agbio.com.cn/product/sybr-green-premix-pro-taq-hs-qpcr-kit/>)。其计算方法为以 D1 和 CK 分别作为对照组,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算其他试验组样品分别相对于对照组的表达水平值^[27]。

1.7 统计分析方法

使用 Excel 2025 软件绘制数据柱状图,柱状图数据以“平均值±标准差”表示。使用 SPSS 27 软件中的 *t*-test 对测定结果进行差异显著性分析,* 和 ** 分别表示试验组与对照组之间存在差异显著性($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。同时利用软件中的皮尔森相关性(Pearson correlation)对

酶活性与基因表达变化进行解析。使用 Graphpad Prism 软件将测定数据绘制统计图形,使用 R package 和 TBtools 对转录数据结果进行可视化绘制。所有试验包含 3 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 压花花瓣色度变化分析

在‘卡罗拉’花瓣干燥压制过程中,花瓣表型颜色由亮红色逐渐变为黑红色(图 2-A),花瓣的亮度值 L 由 32.16 显著降低至 16.78(图 2-B)。花瓣的 a 值保持正数,但在 D2 至 D3 阶段的变化幅度大于 D1 至 D2 阶段(图 2-C),同时花瓣的 b 值由正数显著降低至负数(图 2-D),表明此时花瓣呈现出少量蓝紫色。

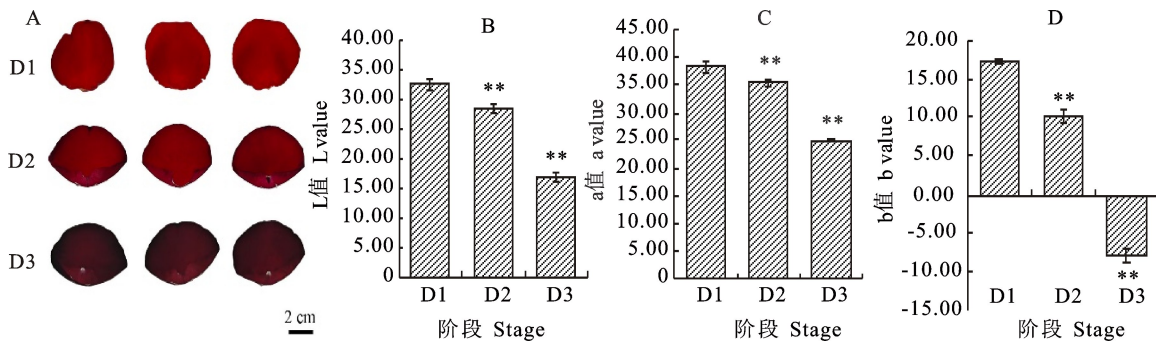


图 2 压花干制过程中玫瑰‘卡罗拉’花瓣的表型变化和色度变化

Fig. 2 Phenotypic and chromatic changes in petals of the ‘Carola’ rose during pressing and drying process

2.2 酶促褐变相关指标分析

在压花花瓣的颜色变化过程中,酶促褐变相关指标也发生了显著变化,结果如图 3 所示。在花瓣干燥压制的 D1 至 D2 阶段,样品中的总酚含量由(16.96±0.43) mg/g 显著降低至(12.24±0.45) mg/g。而在 D2 至 D3 阶段,样品中的总酚含量降低幅度大于 D1 至 D2 阶段,并且在 D3 阶段该含量仅约为 D1 阶段的 1/3。D1 至 D3 阶段的总黄酮含量从(28.75±1.82) mg/g 下降至(19.28±1.04) mg/g,总黄酮含量变化程度与总酚含量变化相比幅度较小。

另一方面,PPO 作为酶促褐变的关键催化酶,在压花过程中其活性由(108.63±6.69) U/mg 显著升高至(184.79±12.50) U/mg,且在 D2 至 D3 阶段上升幅度大于 D1 至 D2 阶段,这与总酚含量的下降相对应。SOD 活性在整个阶段呈现出与 PPO 相近的变化趋势,但 SOD 的活性总体高于 PPO。推测 PPO 酶解的产物会诱导 SOD 活性升高。POD 活性在 D2 和 D3 阶段分别

为(176.41±8.78) U/mg 和(164.81±8.03) U/mg,均显著高于 D1 阶段。样品中的 CAT 活性在 D2 阶段增加至(194.09±10.59) U/mg,而在 D3 阶段降低到约(160.00±6.40) U/mg,与 D1 阶段的 CAT 活性无显著差异。综合物质含量测定和酶活分析,确定‘卡罗拉’花瓣在压花过程中存在显著的酶促褐变现象。

2.3 转录组分析结果

2.3.1 差异表达基因的筛选 为了挖掘导致酶促褐变产生的关键基因,分别提取 D1、D2 和 D3 阶段的花瓣总 RNA 进行转录组分析,同时将 D2 和 D3 两个组别的样品分别与 D1 相对照,构成比较组 D2_D1 和 D3_D1(图 4)。在比较组 D2_D1 中筛选到的上调差异表达基因为 3 053 个,下调差异表达基因为 3 939 个。在比较组 D3_D1 中筛选到的上调差异表达基因为 3 945 个,下调差异表达基因为 5 235 个。

2.3.2 差异表达基因的功能注释 通过 GO 注释对 DEGs 的功能进行分析,在两个比较组中,

DEGs 均注释到了生物过程(Biological process)、细胞组分(Cellular component)和分子功能(Mo-

lecular function) 3 个类别,且注释到的词条(Term)总数均为 32 个。值得注意的是,虽

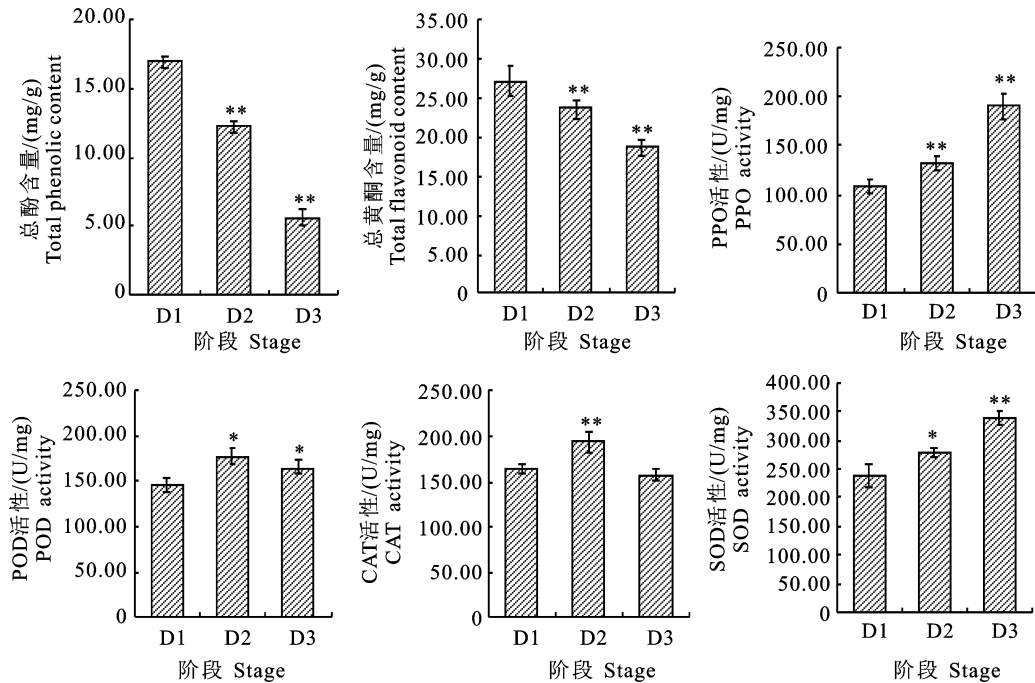


图 3 玫瑰‘卡罗拉’花瓣在压花过程中的总酚、总黄酮、PPO、POD、CAT 和 SOD 活性变化
 Fig. 3 Changes in total phenols, total flavonoids, PPO, POD, CAT, and SOD activities in petals of ‘Carola’ rose during pressing process

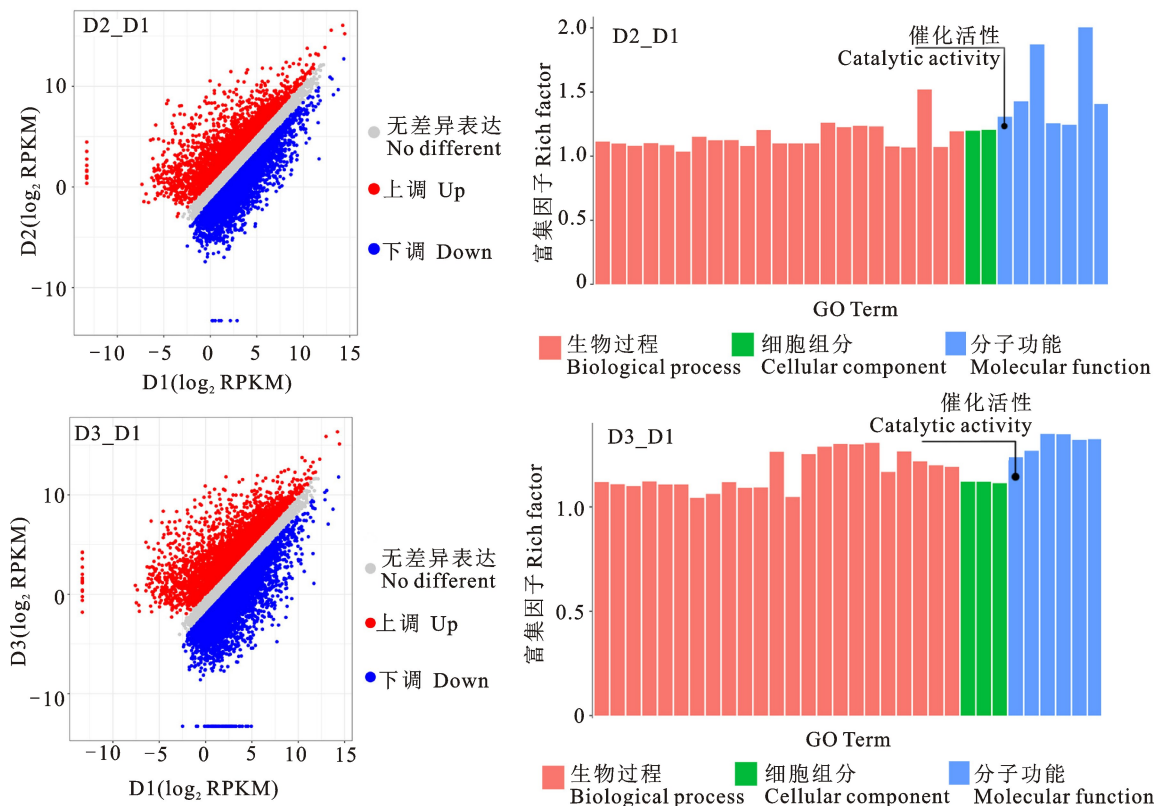


图 4 D1_D2 与 D1_D3 转录组比较火山图与 GO 注释分析

Fig. 4 Volcano plots and GO annotation analysis of transcriptome comparisons between D1 vs D2 and D1 vs D3

然 D2_D1 和 D3_D1 中 GO 词条存在差异,但“催化活性”(Catalytic activity)均在两个比较组中注释到,这表明编码催化酶的部分基因呈现出差异表达。

2.4 编码 PPO、POD、SOD 和 CAT 酶的基因表达分析

催化酶由其对应基因编码而来,其基因表达水平对酶活性具有重要影响。对此查找编码 PPO、POD、SOD 和 CAT 4 个酶的基因,共发现了 21 个成员(表 3)。从比较转录组来看,*Rr-POD* 在样本中共有 10 个成员且均呈现出差异表达。*RrPPO* 和 *RrCAT* 的成员数量分别为 5 个和 4 个,其中 *RrPPO4* 未显示出差异表达,*Rr-SOD* 的成员有 2 个且均显示差异表达。从编码 PPO 的成员来看, *RrPPO1*、*RrPPO3* 和 *RrP-*

PO5 在 D2 和 D3 阶段的 RPKM 值均高于 D1 阶段,在 D3 阶段达到最大值,并且 *RrPPO5* 在 D2 和 D3 阶段的 RPKM 值(3 个生物学重复平均值)高于其他 4 个成员。另外,除 *RrPOD4*、*RrCAT1*、*RrCAT2* 和 *RrCAT4* 以外,POD、SOD 和 CAT 的其他编码成员在 D2 和 D3 阶段的表达水平均低于 D1 的表达值。

为了验证表 3 中酶基因的表达水平,以 log-FC 的绝对值 > 2 且 P value < 0.05 的标准筛选 10 个基因进行 qRT-PCR 验证(图 5),其中 *RrP-PO1*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5* 在 D2 和 D3 阶段相对于 D1 阶段上调表达,而 *RrPPO2* 在 D2 和 D3 阶段相对于 D1 阶段下调表达,其他筛选的基因表达趋势与 RPKM 的数据变化趋势相近,表明转录组结果可信。

表 3 样品中 *RrPPO*、*RrPOD*、*RrSOD* 和 *RrCAT* 成员及其 RPKM 值

Table 3 RPKM value of *RrPPO*, *RrPOD*, *RrSOD* and *RrCAT* members in samples

基因名 Name	基因 ID Gene ID	D1	D2	D3	基因表达水平变化 Changes of DEGs
<i>RrPPO1</i>	EVM_20prediction_20Chr2.4596	36.41±1.90	<u>59.07±2.42</u>	<u>79.95±3.51</u>	上调 Up-regulated
<i>RrPPO2</i>	EVM_20prediction_20Chr5.6425	465.99±22.21	<u>45.66±0.77</u>	<u>15.93±0.38</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPPO3</i>	EVM_20prediction_20Chr5.6428	0.80±0.13	<u>11.28±0.27</u>	<u>27.27±0.43</u>	上调 Up-regulated
<i>RrPPO4</i>	EVM_20prediction_20Chr5.6431	2.73±0.33	2.39±0.37	3.00±0.45	无差异 None
<i>RrPPO5</i>	EVM_20prediction_20Chr5.6432	0.45±0.14	<u>120.86±3.87</u>	<u>440.63±10.20</u>	上调 Up-regulated
<i>RrPOD1</i>	EVM_20prediction_20Chr2.1230	3.72±0.70	<u>0.33±0.06</u>	<u>0.09±0.02</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD2</i>	EVM_20prediction_20Chr2.1336	3.30±0.48	<u>1.10±0.05</u>	<u>0.87±0.08</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD3</i>	EVM_20prediction_20Chr2.1498	40.70±1.22	<u>9.39±0.93</u>	<u>6.65±0.34</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD4</i>	EVM_20prediction_20Chr2.3765	7.49±0.82	<u>91.56±0.79</u>	<u>178.16±12.05</u>	上调 Up-regulated
<i>RrPOD5</i>	EVM_20prediction_20Chr2.6068	39.96±1.98	<u>14.01±1.34</u>	<u>7.53±0.36</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD6</i>	EVM_20prediction_20Chr2.709	1.48±0.39	<u>0.31±0.11</u>	<u>0.25±0.03</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD7</i>	EVM_20prediction_20Chr3.5028	8.32±0.78	<u>0.62±0.13</u>	<u>0.75±0.07</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD8</i>	EVM_20prediction_20Chr6.1302	2.25±0.14	<u>0.68±0.15</u>	<u>0.32±0.02</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD9</i>	EVM_20prediction_20Chr6.6598	54.59±4.96	<u>0.94±0.22</u>	<u>0.32±0.15</u>	下调 Down-regulated
<i>RrPOD10</i>	EVM_20prediction_20Chr7.5199	2.18±0.20	<u>0.89±0.32</u>	<u>0.43±0.13</u>	下调 Down-regulated
<i>RrSOD1</i>	EVM_20prediction_20Chr3.4255	95.38±6.85	<u>25.21±1.17</u>	<u>14.64±2.12</u>	下调 Down-regulated
<i>RrSOD2</i>	EVM_20prediction_20Chr4.444	118.21±4.98	<u>31.99±2.58</u>	<u>14.99±2.82</u>	下调 Down-regulated
<i>RrCAT1</i>	EVM_20prediction_20Chr1.1078	32.78±0.82	<u>72.75±3.57</u>	<u>126.64±2.59</u>	上调 Up-regulated
<i>RrCAT2</i>	EVM_20prediction_20Chr1.1216	112.99±1.78	<u>135.00±5.68</u>	<u>164.33±8.02</u>	上调 Up-regulated
<i>RrCAT3</i>	EVM_20prediction_20Chr1.127	19.15±0.49	<u>70.86±4.93</u>	<u>67.20±3.07</u>	上调 Up-regulated
<i>RrCAT4</i>	EVM_20prediction_20Chr1.151	369.79±8.77	<u>3 991.11±115.89</u>	<u>5 467.93±346.81</u>	上调 Up-regulated

注: D1、D2 和 D3 列数值分别代表对应阶段不同基因的 RPKM 值, RPKM 值以 3 个生物学重复的“平均值±标准差”表示, 数据值的下划线代表该组对应基因的 RPKM 值与 D1 之间满足差异表达基因的筛选条件。

Note: The values in columns D1, D2, and D3 represent the RPKM values of different genes at the corresponding developmental stages. Each RPKM value is presented as the mean ± standard deviation based on three biological replicates. An underlined value indicates that the gene's RPKM at that stage meets the criteria for differential expression relative to D1.

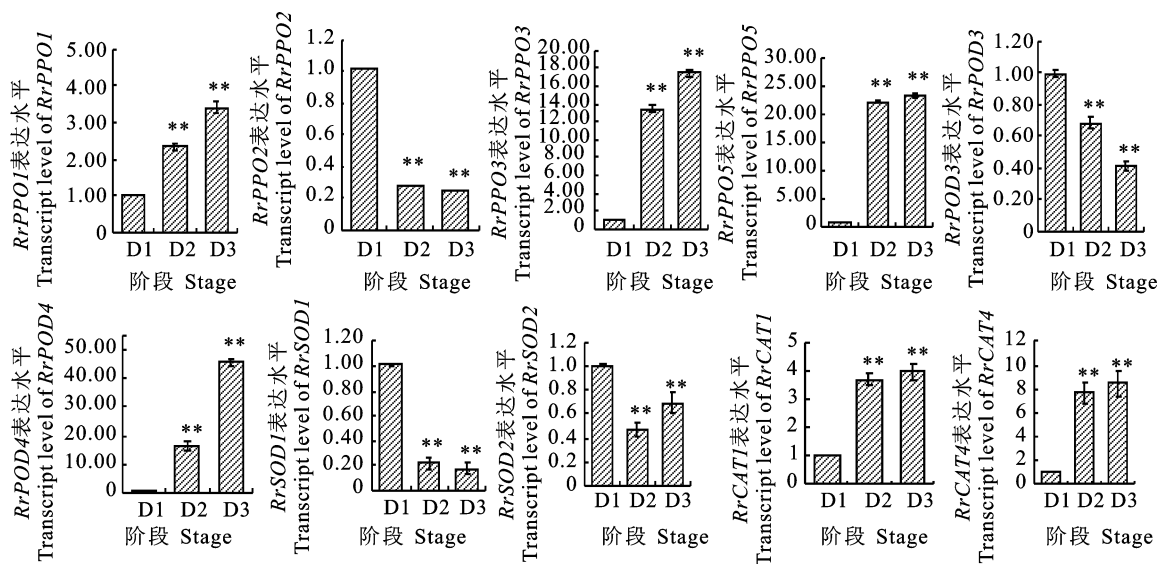


图 5 qRT-PCR 转录水平分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of gene transcription levels

2.5 PPO 活性大小与其编码基因表达水平的相关性分析

基于 RPKM 数据验证结果,将 PPO 活性与 5 个 *RrPPO* 的 RPKM 值进行皮尔森相关性分析 (Pearson correlation),结果表明在‘卡罗拉’花瓣的压花过程中,PPO 活性与 *RrPPO1*、*RrPPO3*

和 *RrPPO5* 呈极显著正相关,且相关性系数均在 0.95 以上,且 *RrPPO5* 与 PPO 活性的相关性系数最高(表 4)。另外,*RrPPO2* 与 PPO 活性呈显著负相关,*RrPPO4* 与 PPO 活性无相关性。以上结果表明 *RrPPO1*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5* 是玫瑰压花过程中影响 PPO 活性的主要基因。

表 4 PPO 活性变化与 5 个 *RrPPOs* 表达水平变化的皮尔森相关性分析Table 4 Pearson correlation analysis of changes in PPO enzyme activity and expression levels of five *RrPPOs*

项目 Items	PPO	<i>RrPPO1</i>	<i>RrPPO2</i>	<i>RrPPO3</i>	<i>RrPPO4</i>	<i>RrPPO5</i>
PPO	—					
<i>RrPPO1</i>	0.954 **	—				
<i>RrPPO2</i>	-0.754 *	-0.895 **	—			
<i>RrPPO3</i>	0.968 **	0.981 **	-0.833 **	—		
<i>RrPPO4</i>	0.302	0.253	0.023	0.339	—	
<i>RrPPO5</i>	0.975 **	0.955 **	-0.750 *	0.991 **	0.417	—

注: * 和 ** 分别表示两个变量之间存在显著相关($P < 0.05$)和极显著相关($P < 0.01$)。

Note: * and ** indicate statistically significant correlations between the two variables at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

2.6 *RrPPOs* 启动子元件分析

依据相关性分析,将 *RrPPO1*、*RrPPO2*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5* 的启动密码子 ATG 上游约 2 000 bp (base pair) 序列克隆后导入 PlantCare 网站进行启动子元件预测。结果表明(图 6),4 个 *RrPPO* 的启动子元件包含 4 种化学激素类响应元件,分别为水杨酸响应元件(TCA-element)、茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-element)、脱落酸响应元件(ABRE)和生长素响应元件(TGA-ele-

ment)。CGTCA-element 和 ABRE 在 4 个 *RrPPO* 的启动子上均有分布,其中启动子 *ProPPO1* 上的 CGTCA-element 数量最多,而 ABRE 更集中分布于 *ProPPO3* 上。有且仅有 1 个 TGA-element 分布在 *ProPPO5* 中。总的来看,启动子元件的类型和分布数量表明脱落酸(abscisic acid, ABA)和茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)对于以上 *RrPPO* 基因可能具有显著的调控作用。

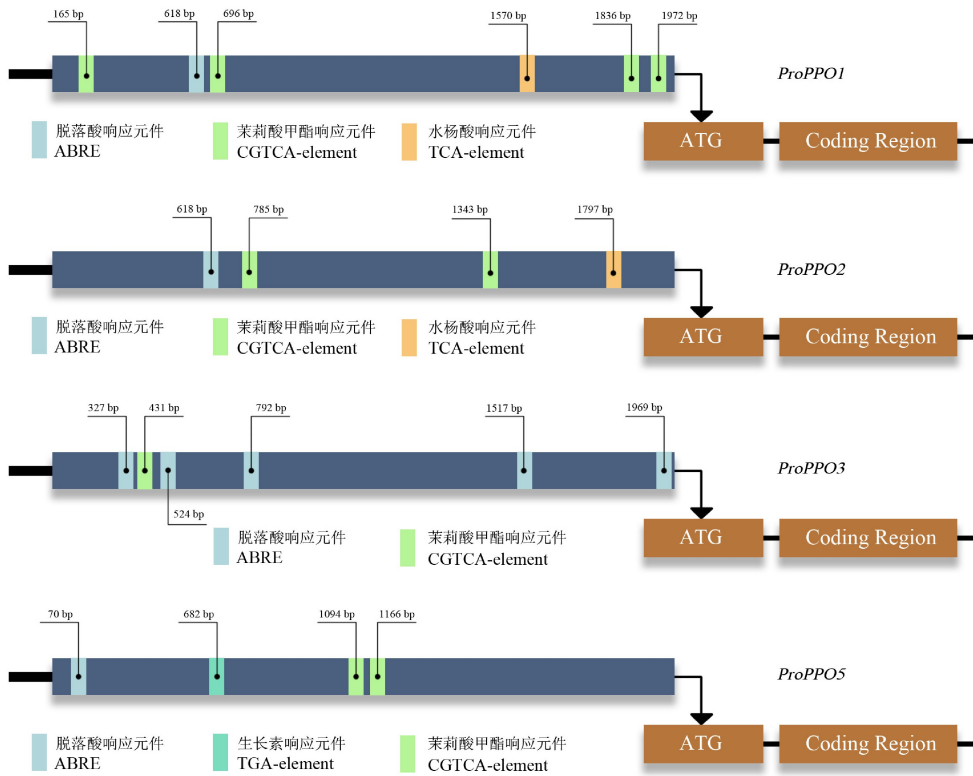


图 6 *RrPPOs* 启动子激素响应元件分析

Fig. 6 Analysis of hormone response motifs of *RrPPOs* promoter

2.7 外源脱落酸和茉莉酸甲酯对玫瑰压花花瓣酶促褐变的影响

为了探究外源 ABA 和 MeJA 对玫瑰压花花瓣酶促褐变的影响,将新鲜的‘卡罗拉’花瓣分别浸泡于蒸馏水、100 mg/L 的 ABA 溶液和 50 μmol/L 的 MeJA 溶液中,24 h 后进行干燥压制,48 h 后测定其表型和酶促褐变相关指标变化。

结果如图 7 所示,3 个样品组之间的表型颜色相近,肉眼难以观察到颜色的显著差别。使用色度计测定样品,发现 T1 组样品的 L 值和 a 值均显著高于对照,而 b 值为(-11.71±1.04),在 3 个组中最小。T2 组样品的 L 值略高于对照组但无显著差异,a 值和 b 值与对照组之间具有差异显著性,但与 T1 组相比变化幅度更小。

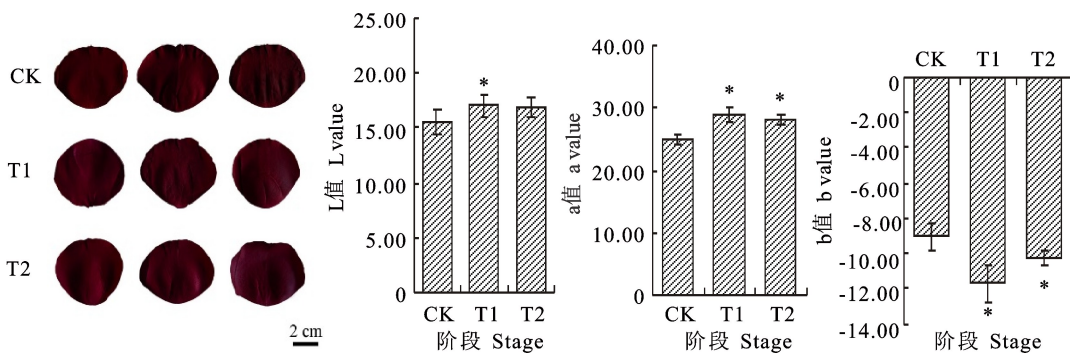


图 7 处理后的‘卡罗拉’压花花瓣表型和色度

Fig. 7 Phenotype and chroma of ‘Carola’ petals after treatments

酶活性测定结果表明(图 8),试验组的 PPO 和 POD 活性均显著低于对照组,MeJA 对 PPO

的活性抑制作用强于 ABA,而 ABA 对样品的 POD 活性抑制作用更加显著。同时,试验组的

CAT 活性均显著提升,且 T1 组样品的 SOD 活性变化量与 T2 组存在明显差异,表明 ABA 除了

能够正调控样品中的 CAT 活性以外,还能够激发样品中 SOD 活性,进一步提高样品的抗氧化能力。

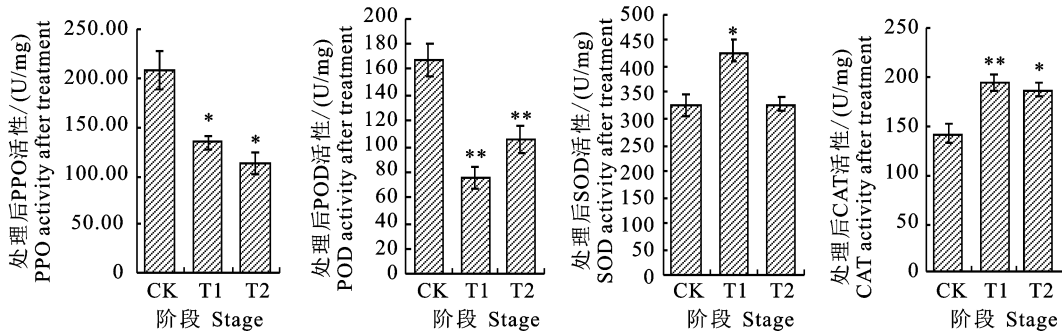


图 8 处理后样品中 PPO、POD、SOD 和 CAT 活性

Fig. 8 Enzyme activities of PPO, POD, CAT and SOD in samples after treatment

从相关基因表达来看(图 9),外源 ABA 和 MeJA 能够对 *RrPPO1*、*RrPPO2*、*RrPPO5*、*RrPOD3* 和 *RrSOD2* 的表达产生明显的抑制作用,而 *RrPPO3* 的表达则被激活。另外,外源 ABA 和 MeJA 对 *RrSOD1*、*RrCAT1* 具有不同程度的

正向调控作用,ABA 对这两者的激活表达作用相对于 MeJA 更加显著。总的来看,虽然两种激素对相关酶及其编码成员表达的作用存在差异,但均能够有效地减轻‘卡罗拉’花瓣的酶促褐变。

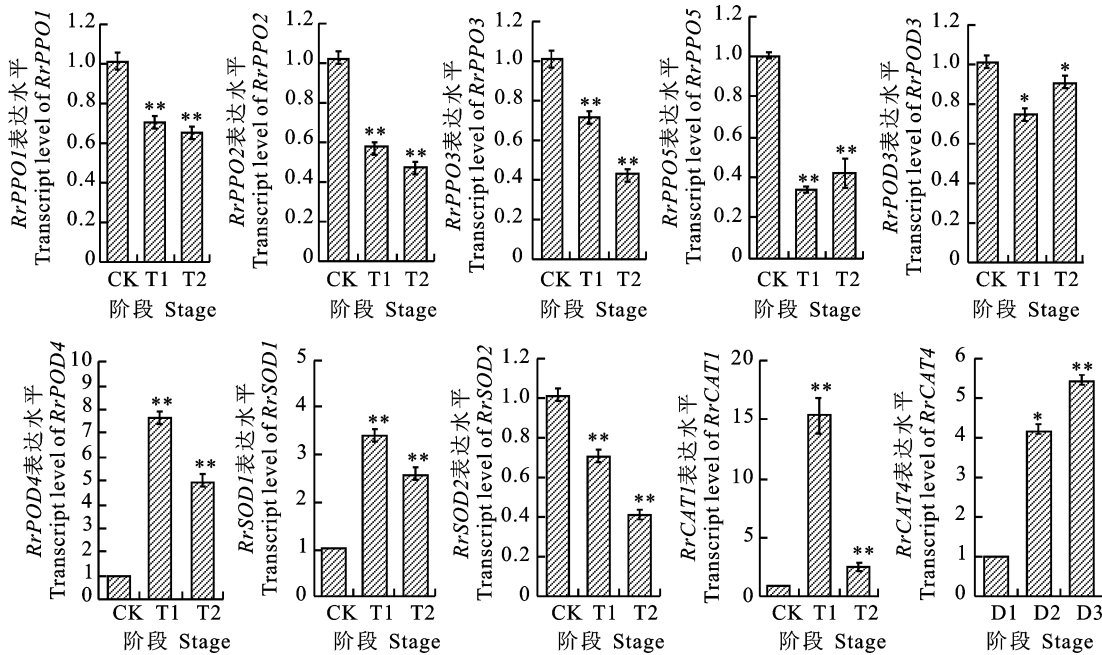


图 9 处理后相关基因的转录水平分析

Fig. 9 Transcriptional analysis of related genes after treatment

3 讨论与结论

有研究表明适当浓度的柠檬酸的混合试剂能够对红色月季压花花瓣起到良好的护色效果,但是对于为何选用该类试剂处理红色月季压花花瓣缺乏原始的科学论证^[28-29]。一般来说,花青苷的最适 pH 为 1~2,因此使用酸处理压花素材可能

是为了减缓样品中的花青苷及其辅色物质在样品干燥压制中的降解,从而减轻压花花瓣色变的程度^[30]。

本研究的色度测试与理化试验数据表明,酶促褐变所导致的醌类物质积累可能是样品亮度值 L 显著降低的主要因素。当酶促反应产物积累到能够覆盖花青苷的红色时,会自然地导致样品的

a 值与 b 值发生显著变化,引起样品的色变。从代谢途径来看,花青苷属于黄酮类物质的一种,而在形成花青苷的前体物质中,L-苯丙氨酸、查尔酮等关键中间代谢产物均可以在形成花青苷前转化为绿原酸、儿茶酚等酚类物质,当花青苷的前期代谢途径发生底物竞争时,花青苷途径能够利用的反应底物会显著降低,从而抑制花青苷的合成^[31-32]。因此,减轻红色玫瑰‘卡罗拉’压花花瓣的褐变反应能够间接地降低花青苷总量的降解速率。

通过转录组学、qRT-PCR 试验和相关性分析,本研究筛选出影响 PPO 活性的主要多酚氧化酶基因 *RrPPO1*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5*,并通过启动子分析发现 *RrPPO1*、*RrPPO2*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5* 的表达主要响应 ABA 和 MeJA。使用外源 ABA 和 MeJA 处理样品后,试验组样品的 a 值显著高于对照组,表明这两种试剂能够减轻干燥压制所导致的表型色变。ABA 与 MeJA 在减轻‘卡罗拉’花瓣酶促褐变的机制上存在差异。酶活分析表明,ABA 在抑制 PPO 和 POD 酶活的同时还能够激发 SOD 和 CAT 的酶活,而 MeJA 对于 PPO 的酶活抑制作用强于 ABA。研究表明施加外源脱落酸能够提高酶促抗氧化体系中 SOD 的活性,进而提升作物和园艺植物在干旱和低温条件下的抗逆性^[33-35]。另一方面,适当浓度的 MeJA 不仅能够有效降低 PPO 酶活和丙二醛含量,还能够减少酚类物质和黄酮类物质在酶促褐变中的消耗量^[36-37]。因此两种试剂在减轻‘卡罗拉’压花花瓣的酶促褐变方面均具备可行性。

在花瓣干燥压制的过程中,4 种酶基因中上调表达基因有 *RrPPO1*、*RrPPO3*、*RrPPO5*、*RrPOD4* 和 4 个 *RrCAT* 成员,同时 PPO 酶在该过程中酶活提高,表明 *RrPPO1*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5* 在玫瑰花瓣干制过程对酶促褐变起主要调控作用。样品经 ABA 或 MeJA 处理后进一步解析 *RrPPO* 成员表达水平,发现 *RrPPO1*、*RrPPO2* 和 *RrPPO5* 与对照相比均有不同程度的下调表达,*RrPPO1* 与 *RrPPO5* 的下调表达可能直接导致了试验组中 PPO 酶活的降低。值得注意的是,在样品干燥压制过程中 *RrPPO1*、*RrPPO3* 和 *RrPPO5* 显著上调表达且与 PPO 酶活变化呈现显著正相关,而经处理后样品中的 *RrPPO3* 的表达与另外两个 *RrPPO* 基因存在差

异,表明 *RrPPO3* 可能存在组织表达特异性,而 *RrPPO1* 和 *RrPPO5* 在花瓣中响应 ABA 和 MeJA 并且与 PPO 酶活变化具有相关性,表明了这两个 *RrPPO* 在玫瑰的花瓣中特异性表达^[38]。另外,ABA 对 *RrSOD1* 和 *RrCAT1* 的表达激活作用强于 MeJA,这与 ABA 对玫瑰 SOD 和 CAT 酶活的促进效果相对应。

总的来看,使用 ABA 或 MeJA 处理‘卡罗拉’压花花瓣能够一定程度上减轻酶促褐变,但在减轻压花花瓣色变方面仍存在局限性。研究认为,使用物理协同化学处理的方式可能比单一化学激素处理具有更好的保色保鲜效果^[39]。将蚕豆(*Vicia faba*)置于 45 °C 热水处理后,使用 1-甲基环丙烯(1-Methylcyclopropene, 1-MCP)熏蒸,能够有效延长蚕豆商品货架期^[40]。使用差压预冷协同 1-MCP 处理红杏果实(*Armeniaca vulgaris* Lam.)能够有效提高其贮藏品质^[41]。本研究结果表明可以同时采用 ABA 和 MeJA 对玫瑰压花花瓣进行处理以提高样品抗酶促褐变的能力,并通过试剂浓度、温度等条件的梯度试验优化其处理效果。

综上,本研究以玫瑰‘卡罗拉’压花花瓣酶促褐变为切入点,通过理化分析和差异表达基因筛选出影响 PPO 活性的主要多酚氧化酶基因,并依据其启动子元件信息选用脱落酸和茉莉酸甲酯作为玫瑰压花花瓣酶促褐变的抑制剂,两种试剂能够有效降低酶促褐变中 PPO 的活性,减轻玫瑰压花花瓣的酶促褐变。本试验在玫瑰压花花瓣保色技术的研究方面具有一定的借鉴作用。

参考文献 Reference:

- [1] 陈国菊,赵国防. 压花艺术[M]. 北京:中国农业出版社,2009:1-2.
- [2] 周徐子鑫,黄郑涛,李 璟. 高校压花艺术与技术课程理论体系构建初探[J]. 现代园艺,2024,47(17):194-196.
- [3] 唐红枫,孙 茜,穆 婷,等. 玫瑰色素的提取及稳定性分析[J]. 湖北农业科学,2012,51(6):1218-1221.
- [4] 姬懿珊. 和田玫瑰花酶促褐变中的生理生化变化及其多酚氧化酶学特性研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2019.
- [5] 鲍文敏. 不同铜盐药剂处理对压花叶材保绿效果的影响[J]. 北方园艺,2016,12(21):128-132.
- [6] 张晶晶. 彩叶草叶片色素及压花保色研究[D]. 河北保定:河北农业大学,2021.
- [7] 王青青. 两种菌发酵液对非洲菊保鲜及压花花色影响的研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
- [8] 林河通,席巧芳,陈绍军. 果实贮藏期间的酶促褐变[J]. 福

- 州大学学报(自然科学版),2002,30(S1):696-703.
- [9] 孙 蕾,王大明,乔勇进,等.果实褐变机理及研究进展[J].经济林研究,2002,20(2):92-94.
- [10] 李京赞,刘玉德,石文天,等.植物果蔬的褐变及抑制的研究[J].包装与食品机械,2019,37(1):63-68.
- [11] 黄 彭,丁 捷,胡晓敏,等.鲜切果蔬物理防褐保鲜的研究进展[J].园艺学报,2021,48(6):1217-1232.
- [12] 陈坚生,杨幼慧,詹金花,等.果酒中酚类物质及其非酶褐变的研究进展[J].食品科学,2009,30(7):281-284.
- [13] 薛梦林,张继澍,张 平,等.减压对冬枣采后生理生化变化的影响[J].中国农业科学,2003,36(2):196-200.
- [14] 黄祥富,黄上志,傅家瑞.植物热激蛋白的功能及其基因表达的调控[J].植物学通报,1999,16(5):530-536.
- [15] 张春晓,王文棋,蒋湘宁,等.植物基因启动子研究进展[J].遗传学报,2004,31(12):1455-1464.
- [16] 陈雨倩.麻疯树 *JcGAST1* 基因启动子克隆及其功能分析[D].贵阳:贵州大学,2022.
- [17] HUANG D, YUAN Y, TANG Z, *et al.* Retrotransposon promoter of *Ruby1* controls both light-and cold-induced accumulation of anthocyanins in blood orange[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2019, 42(11):3092-3104.
- [18] 张 园.外源脱落酸处理对冷藏南果梨果皮褐变抑制作用机理研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2023.
- [19] 李娟娟,李梦蝶,谢湘汝,等.茉莉酸甲酯处理下鲜莲子采后品质的变化[J].现代食品科技,2024,40(7):99-105.
- [20] MCGUIRE R G. Reporting of objective color measurements[J]. *Hortscience*, 1992, 27(12):1254-1255.
- [21] 曹 炜,索志荣. Folin-Ciocalteu 比色法测定蜂蜜中总酚酸的含量[J].食品与发酵工业,2003,5(12):80-82.
- [22] 梁柱华,杨建设,杨艺虹,等.酸枣仁中总黄酮的含量测定研究[J].分析测试技术与仪器,2008,14(1):34-37.
- [23] 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,2000:164-169.
- [24] 毛美琴. *AbGLK1* 和 *Ksu* 调控金边红苞凤梨绿白嵌合叶色形成的机制研究[D].成都:四川农业大学,2022.
- [25] CHEN F, SU L, HU S, *et al.* A Chromosome-level genome assembly of rugged rose (*Rosa rugosa*) provides insights into its evolution[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 1476-1282.
- [26] YUAN Y P, ZENG L, KONG D, *et al.* Abscisic acid-induced transcription factor PsMYB306 negatively regulates tree peony bud dormancy release[J]. *Plant Physiology*, 2024, 194(4):2449-2471.
- [27] LIVAK K J and SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [28] 许 佳,王雪松,张海娇,等.适合压花的月季品种筛选及保色技术研究[J].北京农业职业学院学报,2019,33(1):14-21.
- [29] 黄子锋,王凤兰.月季花瓣的保色护形研究[J].安徽农业科学,2009,37(28):3576-3578.
- [30] 左 玉,田 芳.花青素稳定性研究进展[J].粮食与油脂,2014,27(7):1-5.
- [31] 尚 军,吴旺泽,马永贵.植物苯丙烷代谢途径[J].中国生物化学与分子生物学报,2022,38(11):1467-1476.
- [32] 邓素芳.基于 RNA-Seq 的野生蕉 (*Musa itinerans*) 果皮颜色差异形成的分子机制研究[D].福州:福建农林大学,2018.
- [33] 陆 敏,陆贵清.脱落酸与植物非生物逆境抗性研究进展[J].北方园艺,2014(8):184-188.
- [34] 桑月英.外源水杨酸和脱落酸调控冬枣采后抗氧化系统研究[D].新疆石河子:石河子大学,2022.
- [35] 赵思涵.脱落酸在木薯耐采后生理变质中的作用及其抗氧化系统的调控研究[D].海口:海南大学,2020.
- [36] 薛鹏宇,殷菲彤,刘云芬,等.茉莉酸甲酯处理对采后龙眼果皮褐变的影响[J].食品科学,2023,44(5):169-178.
- [37] 张姣姣,郝晓磊,李喜宏,等.热空气协同茉莉酸甲酯处理对冷藏石榴冷害及果实品质的影响[J].中国果树,2016(5):29-33.
- [38] 方宝华,王伟平,赵 杨,等.水稻 *BBX* 基因家族生物学及表达模式分析[J].分子植物育种,2020,18(20):6586-6594.
- [39] 陈晓彤,潘艳芳,郑桂霞,等.热处理协同臭氧对沃柑贮藏品质调控研究[J].食品研究与开发,2020,41(12):21-25.
- [40] 柳晓晨.热水和 1-MCP 处理对鲜食蚕豆常温保鲜效果的研究[D].南京:南京农业大学,2021.
- [41] 付云开,雷用东,李自芹.不同处理对采后小红杏贮藏品质及生理特性的影响[J].包装工程,2024,45(17):96-104.

Analysis of Mechanism of Enzymatic Browning in Pressed Rose Petals and Expression of Related Enzyme Genes

ZHOU Xuzixin¹, HUANG Zhengtao¹, LIN Wei¹, LIU Qing¹,
MA Jun² and CHEN Guoju³

(1. Faculty of Humanities and Tourism/College of Quality Education, Yibin Vocational and Technical College, Yibin Sichuan 644000, China; 2. College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 571000, China; 3. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract To alleviate enzymatic browning in petals of the red rose cultivar ‘Carola’ (*Rosa rugosa* ‘Carola’) during the flower the pressing process, this study employed physicochemical analysis and transcriptomic profiling to identify the major polyphenol oxidase (PPO) genes involved. Based on the analysis of promoter cis-elements, the study also investigated the effects of abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MeJA) on enzymatic browning in pressed rose petals. The results showed that: (1) During the process pressing, the total phenol and total flavonoid contents decreased, while the activities of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), and superoxide dismutase (SOD) significantly increased, indicating pronounced enzymatic browning; (2) Comparative analysis of transcriptomic and qRT-PCR data showed that the expression levels of *RrPPO1*, *RrPPO3*, and *RrPPO5* were significantly upregulated during the flower pressing process. Pearson correlation analysis indicated a significant positive correlation between the expression levels of these genes and PPO activity. Promoter analysis revealed that the major hormone-responsive elements in the promoters of these genes were ABA- and MeJA-responsive elements; (3) Compared with the control, PPO activity was significantly reduced in petals treated with either ABA or MeJA, with MeJA exhibiting a stronger inhibitory effect. Additionally, ABA treatment not only suppressed PPO activity but also enhanced the activities and expression of SOD and catalase (CAT).

Key words Pressed flower art; *Rosa rugosa*; Enzymatic browning; Polyphenol oxidase; Transcriptome

Received 2024-12-13

Returned 2025-03-15

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. 31971704); the Natural Science Foundation of Sichuan Province (No. 22NSFSC0090); Natural Science Project of Yibin Vocational and Technical College (No. 24ZRYB-14).

First author ZHOU Xuzixin, male, Ph. D, lecture. Research area: cultivation and application of horticultural plants. E-mail: 491575336@qq.com

Corresponding author ZHOU Xuzixin, male, Ph. D, lecture. Research area: cultivation and application of horticultural plants. E-mail: 491575336@qq.com

(责任编辑:潘学燕 **Responsible editor: PAN Xueyan**)