

驱蚊香草不同外植体的多酚氧化酶活性及褐变控制的研究

庞发虎, 王正德

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘 要: 研究了驱蚊香草不同外植体的多酚氧化酶(PPO)活性, 比较了单一抑制剂对驱蚊香草褐变控制的效果, 采用正交试验, 确定复合抑制剂在驱蚊香草褐变控制中的最佳组合。结果表明: 驱蚊香草幼嫩芽的 PPO 活性最高, 幼嫩叶片的 PPO 活性最低; 单一抑制剂对驱蚊香草褐变抑制效果为: 聚乙烯吡咯烷酮(PVP) > 抗坏血酸 > 柠檬酸 > 活性炭(AC), 复合抑制剂对驱蚊香草的褐变最佳抑制效果为: 抗坏血酸 0.2%、PVP 0.4%、柠檬酸 0.5%。

关键词: 驱蚊香草; 多酚氧化酶; 抑制剂; 褐变

中图分类号: S 681.903.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)09-0117-03

驱蚊香草 (*Pelargonium citrosum* vanleerii) 属牻牛苗科天竺葵属多年生植物, 是澳大利亚生物学家通过生物工程技术, 将来自澳洲的天竺葵植物细胞与中国的一种含有香茅醛物质的植物细胞融合而成, 它能挥发出柠檬香气, 有驱蚊、清新、净化空气的效果, 其主茎柔软, 可

以塑造各种盆景供观赏, 市场潜力和经济效益良好^[1]。但褐化影响其组培苗的成活率。研究表明, 褐化主要是多酚氧化酶(PPO)作用下天然底物酚类物质形成醌而引起的^[2,3]。有关驱蚊香草不同外植体 PPO 特性及褐变控制的机理还未见报道。该研究比较了驱蚊香草不同外植体的 PPO 活性, 以单一抑制剂对驱蚊香草的褐变控制效果研究为基础, 采用正交试验设计, 确定复合抑制剂在驱蚊香草褐变控制中的最佳组合, 旨在为组织培养中驱蚊香草不同外植体的选择和 PPO 抑制剂的选用提供依据, 为驱蚊香草的离体培养及大规模生产奠定了理

第一作者简介: 庞发虎(1975-), 男, 山西运城人, 硕士, 讲师, 现从事植物生理生化方面研究工作。E-mail: pangfahu@163.com。
基金项目: 南阳师范学院资助项目 (ny nu200730)。
收稿日期: 2008-03-28

[4] 陈登文, 高爱琴, 王飞, 等. 杏品种的低温需求量研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(2): 331-336.
[5] 高东升, 束怀瑞, 李宪利. 几种适宜设施栽培果树需冷量的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 263-289.

[6] Fekrer C, Robitaille H A. Chilling accumulation and rest of sour cherry flower buds[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1985, 110(2): 227-232.
[7] Shaltout A D, Unrat LC R. Rest completion Prediction model for Starkrimson and Delicious apple[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1983 108 (6): 957-961.

Study on The Chilling Demand of Japanese Quince Forcing Culture

ZHANG Gui-rong

(Landscape Engineering Department of Heze University, Heze, Shandong 274000, China)

Abstract: Used Japanese quince as experimental materials, an experiment was carried out to observe the chilling requirement of 4 different varieties for breaking dormancy, which indicated the chilling requirement of different varieties for breaking dormancy were obviously different. In the southwest of Shandong province, belonging to the warm temperate zones, the duplicate longevity crab-apple and silver longevity crab-apple broke their natural dormancy in the first ten days of December; the longevity crown crab-apple broke its natural dormancy in the middle ten days of December; the world optimum crab-apple broke its natural dormancy in the first ten days of January of next year. Based on the comparison and analysis of 7.2℃model, 0~7.2℃model, Utah model, 7.2℃model was regarded as the most appropriate criterion for calculating the chilling requirement of Japanese quince in the southwest of Shandong province. According to 7.2℃model, the chilling requirement of the 4 varieties for experiment was from 383 hours to 916 hours.

Key words: Japanese quince; Chilling requirement; Forcing culture

论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

驱蚊香草来自南阳师范学院生命科学与技术学院花木繁育研究所,取其幼嫩叶片、幼嫩芽、叶柄和带皮茎段为组织培养外植体。

1.2 试验仪器

仪器为 722 分光光度计、FA1104 电子天平、5804 高速冷冻离心机、HH 数显恒温水浴锅、研钵、离心管若干等。

1.3 试验方法

1.3.1 PPO 粗酶液的提取^[4] 将洗净的研钵放入-20℃冰箱中预冷 4 h,然后称取上述干净各样品 10 g,分别放入加有 10 mL pH 6.8 的磷酸缓冲提取液的研钵中进行研磨,研好的样品分装于离心管中,在 8 000 r/min、4℃下低温离心 20 min,取上清液即为不同材料 PPO 的粗酶液。

1.3.2 不同外植体的 PPO 活性测定 吸取 3 mL 0.1 mol/L pH 6.8 缓冲液,再加入 1 mL 的 0.1 mol/L 邻苯二酚,0.3 mL 粗酶提取液,于 25℃水浴 10 min 后在 420 nm 波长下测定 OD 值的变化,20 s 读数,共 5 min。一个活力单位(U)定义为测定条件下每毫升酶液 1 min 引起吸光值改变 0.001。取不加粗酶液的样品为空白对照(3 mL pH 6.8 缓冲液、1 mL 的 0.1 mol/L 邻苯二酚、0.3 mL 蒸馏水)。

1.3.3 单一抑制剂对 PPO 活力的影响 分别配制 0.1%、0.2%、0.4%、0.6%的聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)溶液,0.05%、0.1%、0.3%、0.6%的活性炭(AC)溶液,

0.05%、0.1%、0.25%、0.4%的抗坏血酸溶液,0.1%、0.2%、0.3%、0.4%柠檬酸溶液。吸取 3 mL 0.1 mol/L pH 6.8 缓冲液,再加入 1 mL 的 0.1 mol/L 邻苯二酚,0.3 mL 粗酶提取液,以不加酶液的样品为空白溶液,分别加入配好的抑制剂 0.3 mL,在 25℃水浴 10 min 后在 420 nm 波长下测定 OD 值的变化,20 s 读数,共 5 min,转化成 PPO 活力,最后根据公式转化成相对抑制率。相对抑制率(%)=(A₀-A₁)/A₀,A₀—未添加抑制剂的 PPO 活性 A₁—添加了抑制剂的 PPO 活性。

1.3.4 复合抑制剂对 PPO 活力的影响 试验中选用 PVP、柠檬酸和抗坏血酸 3 种 PPO 抑制剂,采用 L₁₆(4⁵) 正交设计试验对 3 种抑制剂的配比进行筛选,因子水平设计见表 1。配制 16 种混合液各 50 mL 待用,取 3 mL 0.1 mol/L pH 6.8 缓冲液,再加入 1 mL 的 0.1 mol/L 邻苯二酚,0.3 mL 粗酶提取液,蒸馏水 0.3 mL (作为空白溶液),分别加入配好的复合抑制剂 0.5 mL,在 25℃水浴 10 min 后在 420 nm 波长下测定 OD 值的变化,20 s 读数,共 5 min,转化成 PPO 活力,最后根据公式转化成相对抑制率,找出最佳复合抑制剂的配比。

表 1 复合抑制剂因素水平试验设计

水平	A 抗坏血酸/%	B PVP/%	C 柠檬酸/%
1	0.1	0.1	0.2
2	0.2	0.25	0.3
3	0.4	0.4	0.4
4	0.6	0.55	0.5

表 2 不同驱蚊香草外植体 PPO 活性测定结果

PPO 活性/U	驱蚊香草				
	空白	幼嫩叶片	幼嫩芽	叶柄	带皮茎段
	0	45.1	108.2	69.7	82.0

表 3 各种抑制剂对 PPO 活性的影响

浓度/%	PVP				AC				抗坏血酸				柠檬酸			
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.05	0.1	0.3	0.6	0.05	0.1	0.25	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4
相对抑制率/%	27.1	46.9	37.3	42.7	4.4	12.7	37.3	14.6	9.6	22.8	35.7	39.5	15.1	32.3	38.6	43.7

2 结果与分析

2.1 不同外植体的 PPO 活性测定结果

从表 2 可知,驱蚊香草不同外植体的 PPO 活性有明显差别,从大到小依次是幼嫩芽、带皮茎段、叶柄、幼嫩叶片,且幼嫩芽的 PPO 活性分别是幼嫩叶片、叶柄的 2.4 倍、1.13 倍。驱蚊香草幼嫩芽的 PPO 活性比较高,在组织培养中是比较容易褐变的外植体材料,而幼嫩叶片 PPO 活性较低,是防止褐变的理想材料。

2.2 单一抑制剂对 PPO 活性的影响

从表 3 可知,不同抑制剂对 PPO 活性均有一定的作用效果,在浓度基本相同下,其抑制效果的强弱顺序是 PVP>抗坏血酸>柠檬酸>AC,其中 PVP 的作用效果分别比抗坏血酸、柠檬酸、AC 高 15.8%、44.2%、53.1%。PVP 的添加量在 0.2%时,其抑制相对率最高,酶活性达

到最佳控制,随后下降,当添加到 0.6%时,酶活性又相对偏高。抗坏血酸和柠檬酸的添加量为 0.1%时,相对抑制率最低,随着浓度的升高,相对抑制率上升,酶活性可以有效控制,而柠檬酸对褐变的抑制主要是因为柠檬酸的三个羧基对 PPO 的铜有较强的螯合作用^[5];而 AC 浓度在 0.3%相对抑制率较高,随着浓度的升高,抑制率下降,可能是 AC 对培养基中的生长调节剂也有吸附作用^[8],因此浓度不宜太高。

2.3 复合抑制剂对 PPO 活性的影响

由表 4 可知,R_A 为 11.8%,R_B 为 28.6%,R_C 为 12.1%,3 种因子对褐变抑制的作用大小顺序为 B>C>A,即 PVP>柠檬酸>抗坏血酸,表明 PVP 在对褐变的控制中是主要因子。由 K 值大小可以看出,复合抑制剂对褐变的抑制效果的最佳配比为 A₂B₃C₄,即:抗坏血酸

0.2%、PVP0.4%、柠檬酸 0.5%。由表 5 可知,因素 A、C 具有显著作用,因素 B 具有极显著作用,表明 PVP、柠檬酸、抗坏血酸三因素在褐变中都起重要影响。

表 4 复合抑制剂对 PPO 活性的结果

实验号	A	B	C	相对抑制率/%
1	1	1	1	49.5
2	1	2	2	66.7
3	1	3	3	81.6
4	1	4	4	76.3
5	2	1	2	54.8
6	2	2	1	85.6
7	2	3	4	93.3
8	2	4	3	68.4
9	3	1	3	51.7
10	3	2	4	90.9
11	3	3	1	78.5
12	3	4	2	73.5
13	4	1	4	52.4
14	4	2	3	71.3
15	4	3	2	69.6
16	4	4	1	61.8
K ₁	68.5%	52.1%	68.8%	
K ₂	75.5%	78.5%	66.1%	
K ₃	73.6%	80.7%	68.2%	
K ₄	63.7%	70.0%	78.2%	
R	11.8%	28.6%	12.1%	

表 5 正交试验方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	P
因素 A	337.382	3	112.461	4.932	0.046
因素 B	2 040.434	3	680.145	29.827	0.001
因素 C	346.358	3	115.453	50.63	0.044
误差	136.820	6	22.803		
总和	2 860.933	15			

3 结论与讨论

试验结果表明,在驱蚊香草不同外植体中幼嫩叶片的 PPO 活性最低,幼嫩芽 PPO 活性最高,这与蔡汉权^[9]对几种橄榄材料的研究结果相一致。因此在驱蚊香草离体培养过程中,相比较而言幼嫩叶片是较理想材料。

在防止外植体褐变的措施中,加入抗氧化剂或吸附剂是研究者常用的方法。不同的植物所适宜的抗氧化剂及物质吸附剂也有所不同^[67]。结果表明:柠檬酸、抗

坏血酸、PVP 和 AC 单一使用在驱蚊香草离体培养中对褐变控制具有明显的效果,但复合抑制剂的效果更加明显,当抗坏血酸 0.2%、PVP 0.4%和柠檬酸 0.5%时可有效的控制驱蚊香草组培过程中的褐变。

在植物组织培养中,外植体的褐变是导致培养失败的主要原因。其主要原因与多酚氧化酶的活性有关,PPO 引起组织褐化的程度与外植体的基因型、生理状态、组织密切相关外,还与培养条件有关^[1011]。在组织培养中可能由于离体培养条件下植物内源激素的变化引起基因调控的差异表达也同样影响 PPO 的活性^[1213],其中的机理还需进一步进行探讨。

参考文献

[1] 任秋萍,张复君,张秀省.环保型植物—驱蚊香草栽培管理技术[J].农业新技术 2004(3):26-27.

[2] 乜兰春,孙建设,辛蓓,等.苹果果实酶促褐变底物及多酚氧化酶活性的研究[J].园艺学报 2004 31(4):502-504.

[3] 许传俊,李玲,蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD 和 PLA 的关系[J].园艺学报 2006 33(4):671-674.

[4] 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,1999:56-57.

[5] 姜绍通,罗志刚,潘丽军.甘薯中多酚氧化酶活性的测定及褐变控制[J].食品科学 2001 22(3):19-22.

[6] 顾林,鲁茂林,姜军,等.山药多酚氧化酶学特性及褐变控制研究[J].食品与机械 2006 22(6):26-29.

[7] 罗丽华,陈建华,苏冬梅,等.板栗组培过程中褐变研究初探[J].经济林研究,2003,21(4):30-31.

[8] 刘根林,梁珍海,朱军.活性炭在植物组织培养中的作用概述[J].江苏林业科技 2001,28(5):46-48.

[9] 蔡汉权,李粉玲,周山勇,等.几种橄榄材料的多酚氧化酶活性[J].亚热带农业研究,2005(4):34-36.

[10] 王涛,王蒂.温度、pH 对马铃薯多酚氧化酶活性的影响[J].中国马铃薯,2003,17(3):157-161.

[11] 赵伶俐,葛红,范崇辉,等.蝴蝶兰组培中 pH 和温度对外植体褐化的影响[J].园艺学报 2006 33(6):1373-1376.

[12] 郭玉琼,赖钟雄,郭志雄,等.茶树生物技术研究进展[J].福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(4):470-475.

[13] 刘高琼,李式武,张学平.温光条件下大蒜鳞茎形成和内源激素变化的效应[J].园艺学报,1997,24(2):165-169.

Study on Polyphenol Oxidase Activity of Several Materials and Anti-browning Effects of *Citrosun*

PANG Fa-hu, WANG Zheng-de

(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal College Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: In these experiment, the activity of polyphenol oxidase (PPO) in different materials was studied on *citrosun*. Based on formal research results of single inhabitor anti-browning effects and orthogonal experiment, the optimum combined inhabitor and the reasonable anti-browning effects were obtained. The results showed that the activity of polyphenoloxidase in young buds was highest and young leave was lowest; the anti-browning effect sequence of single inhibitors was PVP> ascorbic acid> aitrac acid> AC. The best composition of combined inhibitors was 0.2% ascorbic acid, 0.4% PVP and 0.5% aitrac acid.

Key words: *Citrosun*; Polyphenol oxidase; Inhibitor; Browing