

# 九个牡丹品种总酚含量及其多酚氧化酶活性的变化

王 俊<sup>1</sup>, 马玉心<sup>1</sup>, 贾文庆<sup>2</sup>, 崔大练<sup>1</sup>, 王日昕<sup>1</sup>

(1. 浙江海洋学院 海洋科学学院, 浙江 舟山 316000; 2. 河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003)

**摘 要:** 通过对 9 个牡丹品种叶片、叶柄总酚含量及多酚氧化酶活性的变化的研究, 探讨了叶片、叶柄的总酚物质的含量和多酚氧化酶的活性与褐变的关系。结果表明: 9 个品种的叶片、叶柄总酚含量相差很大, 叶柄的总酚含量比叶片低; 叶片中总酚含量的顺序: 似荷莲> 萍实艳> 洛阳红> 丹皂榴金> 金星雪浪> 白雪塔> 十八号> 金玉良缘> 如花似玉; 叶柄中总酚含量的顺序: 似荷莲> 萍实艳> 丹皂榴金> 如花似玉> 金星雪浪> 金玉良缘> 白雪塔> 洛阳红> 十八号; 外植体材料的最佳水冲洗时间是 1 h。

**关键词:** 牡丹; 总酚; 多酚氧化酶(PPO)

**中图分类号:** S 685.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0118-03

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 属芍药科芍药属宿根木本花卉, 是我国特产的传统名花, 被尊为“百花之王”<sup>[1]</sup>, 不仅具有很高的观赏价值, 还有较高的药用价值, 深受人们的喜爱。然而传统的繁殖方法, 如种子繁殖、分株繁殖、压条繁殖和嫁接繁殖等已无法满足近年来日益增长的观赏需求, 种苗和鲜切花的需求量日益增加<sup>[2]</sup>。采用组织培养是解决这一矛盾行之有效的方法。但是, 由于牡丹为木本植物, 次生代谢旺盛, 组织培养过程中常常出现褐化现象, 80%以上的茎尖都会产生褐色物质严重影响种苗的成活率, 降低了牡丹种苗的扩繁效率<sup>[3,5]</sup>。褐化的发生是由于组织中多酚氧化酶被激活, 酚类化合物被氧化形成褐色的醌类物质。牡丹的不同品种在组织培养中褐化程度不同, 安佰义<sup>[6,7]</sup>等研究表明牡丹不同花型间叶片总酚含量和 PPO 活性水平随着花型演化程度的加大而增加, 并对丹凤白品种的幼叶进行了水处理, 组织培养时褐化率明显降低。李新风<sup>[8]</sup>等测定了多酚含量、POD 活性、CAT 活性、MDA 含量并对其进行与褐化的关系进行了分析。虽然很多研究者进行了牡丹组织培养的研究和探索, 但迄今为止获得完整组培苗的报道极少。该试验从 9 个牡丹品种总酚含量及 PPO 活性出发, 研究了不同时间的水冲洗对 9 个牡丹品种的叶片、叶柄总酚含量及 PPO 活性的影响, 以期对牡丹组织培养研究提供参考。

**第一作者简介:** 王俊(1986-), 女, 河南商丘人, 在读硕士, 研究方向为植物生理生态。E-mail: wangjun436@yahoo.cn.

**通讯作者:** 马玉心(1965-), 男, 博士, 教授, 现主要从事生理生态学及植物生物学的教学科研工作。E-mail: donghai8883@163.com.

**收稿日期:** 2009-11-20

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

9 个牡丹品种采自河南科技学院牡丹园(表 1), 从牡丹植株东、西、南、北 4 个方位采取当年生枝的叶片和叶柄, 将采回的材料放于一 80℃ 的冰箱中备用。

表 1 供试的 9 个牡丹品种

序号	品种
1	金星雪浪(cv. Jin Xing Xue Lang)
2	丹皂榴金(cv. Dan Zao Liu Jin)
3	金玉良缘(cv. Jin Yu Liang Yuan)
4	洛阳红(cv. Luo Yang Hong)
5	似荷莲(cv. Si He Lian)
6	如花似玉(cv. Ru Hua Si Yu)
7	白雪塔(cv. Bai Xue Ta)
8	萍实艳(cv. Ping Shi Yan)
9	十八号(cv. Shi Ba Hao)

### 1.2 试验方法

将材料用清水洗净后设 2 种处理: I 分别测定样品的叶片、叶柄的总酚含量及 PPO 活性, II 分别测定水冲洗 0、0.5、1、2、6 h 后的叶片总酚含量及 PPO 活性。

**1.2.1 总酚含量的测定** 参考安佰义<sup>[9]</sup>的研究方法, 并进行改进。把供试材料剪碎混合均匀后精确称取 0.2 g, 进行冰冻研磨提取, 提取液为 1 mL 50% 的乙醇(pH 值 3.0)。充分提取后, 0~4℃ 下 4 000 r/min 离心 15 min, 取叶片上清液 0.15 mL 定容至 50 mL 的容量瓶中, 取叶柄上清液 0.10 mL 定容至 50 mL 的容量瓶中。之后盛入石英比色皿中于分光光度计上 270 nm 处测定 OD 值。以邻苯二酚作标准曲线, 计算样品中总酚的毫克数。

**1.2.2 多酚氧化酶的测定** 参考安佰义<sup>[9]</sup>的研究方法, 并进行改进。植物材料剪碎混合后称取 0.1 g, 加入 0.1 mol/L pH 值 6.0 的磷酸柠檬酸缓冲液 0.2 mL 和抗

坏血酸 0.01 g, 进行冰冻研磨提取, 研成匀浆后再加入 0.8 mL 0.1 mol/L pH 值 6.0 的磷酸柠檬酸缓冲液, 转入离心管, 在 0~4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min。上清液即为酶液。反应体系为 1 mL 0.1 mol/L 邻苯二酚溶液、0.1 mL 酶液、2.9 mL 磷酸柠檬酸缓冲液。充分混合 2 min, 手摇, 放至 30℃ 水浴保温, 30 min 后取出, 3 min 后测定光密度。盛入石英比色皿于分光光度计上 420 nm 处测定 OD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶片、叶柄中总酚含量的变化

植物组织培养中发生褐变是由于组织中多酚氧化酶被激活, 酚类化合物被氧化形成褐色的醌类物质。引起褐变的酶的底物主要是酚类化合物。由图 1 可知, 9 个牡丹品种叶片、叶柄的总酚含量相差很大, 并且同一品种不同部位总酚含量差异较大。叶柄的总酚含量比叶片的低; 供试品种叶片中总酚含量从高到低的顺序依次是: 似荷莲、萍实艳、洛阳红、丹皂榴金、金星雪浪、白雪塔、十八号、金玉良缘、如花似玉; 叶柄中总酚含量从高到低的顺序依次是: 似荷莲、萍实艳、丹皂榴金、如花似玉、金星雪浪、金玉良缘、白雪塔、洛阳红、十八号。9 个牡丹品种叶柄的总酚含量无显著差异 ( $F=1.4460$  ②  $F_{0.05}(8, 18)$ )。从叶片、叶柄总酚含量从高到低的顺序可以得出, 9 个品种叶片、叶柄总酚含量的变化趋势不一致, 由于酚类物质是褐变的主要底物, 从组织培养外植体的取材来看, 应选取总酚含量低的部位进行组织培养, 减少褐变的程度。牡丹幼叶较高的总酚含量不利于组织的分化, 也是诱使其产生褐变的直接原因。

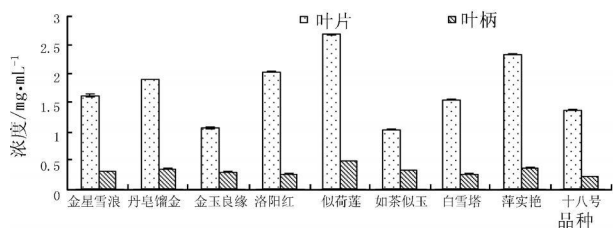


图 1 9 个牡丹品种的叶片、叶柄于自然条件下总酚含量变化

### 2.2 9 个牡丹品种叶片、叶柄中 PPO 活性的变化

由图 2 可知, 从 9 个品种的外植体同一部位的 PPO 活性差异显著 (叶片:  $F=64.18 > F_{0.01}$ ; 叶柄:  $F=114.654 > F_{0.01}$ )。叶柄的 PPO 活性水平相对较低, 而幼叶的 PPO 活性较高。从各部位的多酚氧化酶活性来看, 叶柄的酶活性普遍比叶片的酶活性低。但丹皂榴金品种叶柄的酶活性比叶片的酶活性高, 有可能是由于试验误差造成的。叶片的 PPO 活性由高到低的顺序是: 如花似玉、白雪塔、洛阳红、金星雪浪、萍实艳、似荷莲、金玉良缘、丹皂榴金、十八号; 叶柄的 PPO 活性由高到低的顺序

是: 丹皂榴金、白雪塔、萍实艳、如花似玉、似荷莲、洛阳红、金玉良缘、金星雪浪、十八号。由此可知, 9 个品种叶片、叶柄 PPO 活性的变化趋势不一致。十八号品种的叶片、叶柄的 PPO 活性在供试品种中最低。由于酶促褐变与酚类物质和多酚氧化酶活性有关, 酶活性较低时, 引起底物褐变程度也低, 采集酶活性较低的部位有利于减少褐变, 所以进行组织培养时采叶柄较佳。

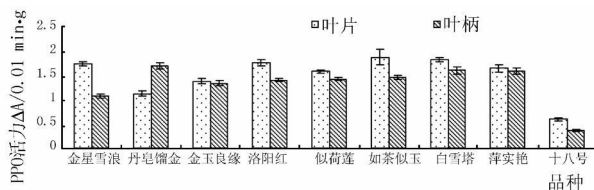


图 2 9 个牡丹品种叶片、叶柄于自然条件下 PPO 活性的变化

### 2.3 叶片经不同时间的水冲洗后总酚含量的变化

金星雪浪、丹皂榴金、洛阳红、如花似玉、似荷莲这 5 个品种在水冲洗开始后, 叶片总酚含量迅速下降, 在冲洗 1 h 时降到最低, 继续冲洗总酚含量会增加; 而洛阳红、丹皂榴金和如花似玉 3 个品种随着冲洗时间的增加总酚含量降低; 似荷莲品种的总酚含量水冲洗 0.5 h 时显著增加, 1 h 时最低; 金玉良缘和白雪塔 2 个品种经过水冲洗后总酚含量都显著降低; 似荷莲品种在水冲洗 0.5 h 时总酚含量最高, 水冲洗 1 h 时最低; 萍实艳品种在水冲洗 1 h 时总酚含量最高; 十八号品种总酚含量较低, 但在水冲洗过程中有增加的趋势。从整个冲洗时间看, 总趋势下降, 但以冲洗 1 h 为最好, 有可能是酚类物质大量被氧化引起的。

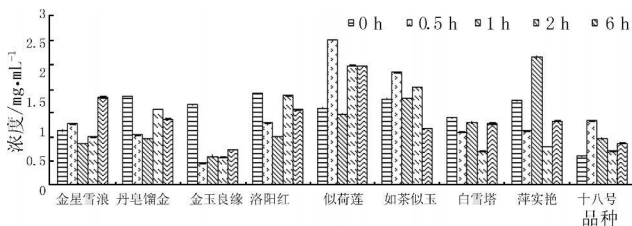


图 3 9 个牡丹品种的叶片经不同时间的水冲洗后总酚含量的变化

### 2.4 叶片经不同时间的水冲洗后 PPO 活性的变化

由图 4 可知, 丹皂榴金、似荷莲、如花似玉、萍实艳、十八号这 5 个品种叶片中 PPO 活性随水冲洗时间的增加而下降, 变化趋势一致; 丹皂榴金和金玉良缘品种经过水冲洗后 PPO 活性反而比没有冲洗的要高; 金星雪浪品种叶片中 PPO 活性随水冲洗时间的变化较大; 洛阳红品种叶片中 PPO 活性随着水冲洗时间的增加变化不大, 0.5 h 时酶活性较低。从总趋势看, 叶片中多酚氧化酶的活性经过水冲洗后比不冲洗的叶片明显下降。

因为多酚氧化酶是引起底物褐变的关键酶,它活性最低时,能够引起的褐变程度也低,所以选择水冲洗后多酚氧化酶活性最低时的材料较佳,选择的材料经过水冲洗 1 h 较好。

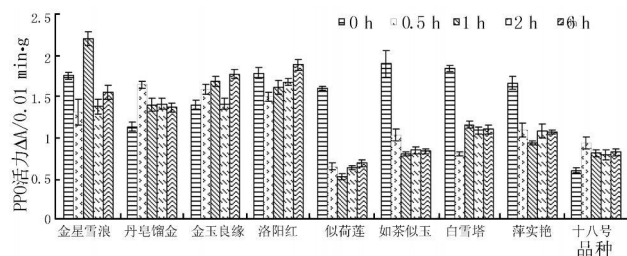


图 4 9 个牡丹品种的叶片经不同时间的水冲洗后 PPO 活性的变化

### 3 讨论

在正常发育的植物组织中,底物、氧、PPO 同时存在并不发生褐化,这是因为在正常组织细胞内多酚类物质分布在液泡,酶分布在各种质体和细胞质内,这种区域性分布使底物与多酚类物质不能接触,而当细胞膜的结构发生变化和破坏时为酶创造了与底物接触的条件,在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌,再进行一系列的脱水、聚合反应,最后形成黑褐色物质,从而引起褐化<sup>[9]</sup>。外植体在接种之前的分切过程中,细胞质体中的 PPO 与液泡中的酚类底物区域化的解除导致了外植体的酶

促褐变,从而影响外植体正常分化。褐变在牡丹组织培养快速繁殖过程中严重影响外植体分化。在外植体接种之前进行适当的处理可以降低总酚含量和 PPO 活性,为外植体的组织培养创造良好的条件。安佰义<sup>[7]</sup>选取丹凤白品种的幼叶作为外植体进行接种前的预处理,水处理对酚类物质的抑制效果明显,经组织培养后褐化率降低了 45%。牡丹在组织培养过程中褐变程度严重有一定的遗传性,但生态因子和人为因素对其也有较大的影响。

### 参考文献

- [1] 中国农业百科全书总编辑委员会. 观赏园艺卷编辑委员会. 中国农业百科全书·观赏园艺卷[M]. 北京: 农业出版社, 1996.
- [2] 高昌勇. 牡丹组织培养中褐变的研究进展[J]. 北方园艺, 2008(3): 79-81.
- [3] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生物学通报, 1999 35(6): 501-506.
- [4] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000 27(增刊): 481-486.
- [5] 高志民, 王雁, 王莲英. 牡丹、芍药繁殖与育种研究现状[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 75-79.
- [6] 安佰义, 赵飞. 牡丹不同类型总酚含量 PPO 活性研究[J]. 北华大学学报, 2005(10): 169-172.
- [7] 安佰义. 牡丹组培离体再生系统的建立[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005: 1-62.
- [8] 李新风, 巩振辉, 孙冬青, 等. 不同品种牡丹几个生理参数的比较及其与组培褐化的关系[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 142-145.
- [9] 王瑶, 岳桦. 芍药属植物组织培养中褐化问题的研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2009(2): 159-160.

## Changes of the Total Phenol Content and the Activation of Polyphenol Oxidase of Nine Tree Peony Cultivars

WANG Jun<sup>1</sup>, MA Yu-xin<sup>1</sup>, JIA Wen-qing<sup>2</sup>, CUI Da-lian<sup>1</sup>, WANG Ri-xin<sup>1</sup>

(1. College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316000; 2. College of Horticulture Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang Henan 453003)

**Abstract:** An experiment was conducted to study the total phenol content and the activation of Polyphenol oxidase(PPO) of nine tree peony cultivars. This study focused on the relationship between the total phenol content, the activation of PPO and tissue browning. However, tissue browning is the key to affect the success of the tissue culture of tree peony. Explants propagated from nine cultivars were used. The total phenol content and the activity of Polyphenol oxidase in explants were determined. The results showed that the total phenol content of petiole was lower than that of leaf in nine cultivars. The order, which was total phenol content in leaves of nine tree peony cultivars, was cv. Si He Lian> cv. Ping Shi Yan> cv. Luo Yang Hong> cv. Dan Zao Liu Jin> cv. Jin Xing Xue Lang> cv. Bai Xue Ta> cv. Shi Ba Hao> cv. Jin Yu Liang Yuan> cv. Ru Hua Si Yu. The order of total phenol content in petiole was cv. Si He Lian> cv. Ping Shi Yan> cv. Dan Zao Liu Jin> cv. Ru Hua Si Yu> cv. Jin Xing Xue Lang> cv. Jin Yu Liang Yuan> cv. Bai Xue Ta> cv. Luo Yang Hong> cv. Shi Ba Hao. The total phenol content and the activation of PPO were reduced after 1h water washing. They were lower than natural pretreatment. The best time of water washing was 1 h.

**Key words:** peony; total phenol content; activation of PPO