

不同品种牡丹几个生理参数的比较及其与组培中褐化的关系

李新风, 巩振辉*, 孙冬青, 王军娥

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 以 8 个牡丹品种为试材, 对外植体多酚含量、POD 活性、CAT 活性、MDA 含量及其与褐化的关系进行了分析。结果表明, 不同品种牡丹间的各个生理指标及其褐化率之间差异显著, 同一品种同一部位的不同外植体间各个生理指标及褐化率之间也存在极显著的差异。叶柄的总酚含量、POD 活性与褐化率存在着显著的相关性 ($P=0.0292<0.05$, $P=0.0186<0.05$), 相关系数分别为 0.6256, -0.7942。叶片的 MDA 含量与褐化率存在显著的相关性 ($P=0.0202<0.05$), 相关系数为 0.7980。

关键词: 牡丹; 组织培养; 生理指标; 褐化

中图分类号: S685.11

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2008)01-0142-04

The Comparison of Physiological Indexes and the Relation with Browning in Tissue Culture about Different Peony Species

LI Xin-feng, GONG Zhen-hui*, SUN Dong-qing and WANG Jun-e

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: Polyphenol content, POD activity, CAT activity and MDA content were detected, the correlation of physiological indexes and browning index were analyzed about 8 peony species. The result showed that there was significant difference in different species and in different explants of a species. There was significant correlation between polyphenol content and browning rate in petiole. There was negative correlation between POD activity and browning rate in petiole. In leaf, there was significant correlation between MDA content and browning rate.

Key words: Peony; Tissue culture; Physiological index; Browning

牡丹花朵硕大, 多姿多彩、雍容华贵、富丽端庄, 被誉为“国色天香”、“花中之王”, 是中国的传统名花, 有着悠久的栽培历史, 被广泛应用于园林绿化和环境美化中。然而长期以来牡丹靠分株和嫁接等传统方法进行繁殖, 繁殖系数低, 已经不能满足当今花卉市场的需求^[1]。因此, 国内外许多学者都希望能通过组织培养进行牡丹快繁, 从而进行了大量的研究工作^[2-11]。然而, 牡丹在组织培养过程中褐化现象严重, 甚至导致死亡, 严重制约着其培养材料的增殖系数和植株的再生。因而, 褐化能否得到有效控制是其组织培养能否成功的关键所在。本试验通过对牡丹不同品种, 同

一品种不同外植体中 POD、CAT 活性以及多酚含量、MDA 含量与褐化的关系的研究分析, 以期有效控制牡丹组织培养中的褐变、选择适合组培的外植体提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试 8 个牡丹品种选自西北农林科技大学牡丹园(表 1)。

1.2 试验方法

组织培养供试外植体为叶片和叶柄。采样后, 一部分试材叶片迅速剪成 1 cm², 叶柄切成约

收稿日期: 2007-07-23 修回日期: 2007-09-12

作者简介: 李新风, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜生物技术。E-mail: lxfqhd@126.com.

* 通讯作者: 巩振辉, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。E-mail: gzhh168@yahoo.com.cn.

1 cm 长后存放在超低温冰箱(-74℃)中,用于生理指标的测定;另一部分试材用流水冲洗 1 h,然后用 0.1% 的升汞消毒,叶片消毒 3 min,叶柄消毒 4 min。然后用无菌水冲洗 3 次,把叶片切成 1 cm²,叶柄切成约 1 cm 长,接种到 1/2MS 培养基上,培养基中加入 30 g/L 的蔗糖,7 g/L 的琼脂,调节 pH 值 5.7~5.8。叶片每瓶接 3 个,叶柄每瓶接 4 个,每种各接 12 瓶。接完后放置到温度(25±1)℃,光照时数 13 h/d(每日 8:00~21:00),光照强度为 2 500 lx 的培养间进行培养。

表 1 8 个牡丹品种的外型特征

Table 1 Morphologic character of 8 peony varieties in the experiment

编号 Number	品种 Species	花色 Flower colors	花型 Flower type	株型 Plant type
A	姚黄 Yaohuang	黄色	皇冠型	直立型
B	银红巧对 Yinhongqiaodui	粉色	蔷薇型	半开展型
C	昆山夜光 Kunshanyeguang	白色	皇冠型	开展型
D	珊瑚台 Shanhutai	浅红色	皇冠型	半开展型
E	赛雪塔 Saixueta	白色	皇冠型	半开展型
F	白鹤卧雪 Baihewoxue	白色	荷花型	开展型
G	金阳 Jinyang	黄色	荷花型	直立型
H	金阁 Jinge	红黄复合色	蔷薇型	直立型

1.3 测定指标

褐化程度的测定 褐化率=(有褐化现象的外植体数/接种外植体数)×100%。接种后 15 d 统计褐化率。过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法^[12],以每分钟 OD 变化值为一个单位。过氧化氢酶(CAT)活性的测定参考何文亮^[13]的研究方法,以每 20sOD 值变化为一个活性单位。丙二醛(MDA)含量的测定采用硫代巴比妥酸法^[13]。总酚含量的测定参考李焕秀^[14]的研究方法,在 UV-7100 型分光光度计上读取吸光值,检测波长为 430 nm。以邻苯二酚作标准曲线,计算每克样品中总酚的毫克数。

2 结果与分析

2.1 不同品种间褐化的差异

接种后 15 d 统计的褐化结果见表 2。从表 2 可以看出,不同牡丹品种间的褐化程度差异较大,8 个品种叶片间褐化率 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 617.105,差异达极显著水平。从供试 8 个品种来看,不同花色之间没有显著的相关性,黄色的姚黄褐化率高达 91.67%,复色但是偏重于黄色的品种金阁褐化率为 4.76%,而同为黄色品种的金阳褐化率却是

0.00%。从花型的进化角度荷花型、蔷薇型、皇冠型来看,进化程度越高,褐化越严重。从株型来看,株型与褐化间没有必然的联系,同为直立型,但是褐化率差异极显著,姚黄最高为 91.67%,最低的金阁褐化率却为 0.00%。从叶柄来看,8 个品种叶片间褐化率 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 157.679,差异达极显著水平。

从表 2 还可以看出,同一品种不同外植体间也存在差异。供试 8 个品种间差异最大的为白鹤卧雪,叶片的褐化率为 90.48%,而其叶柄的褐化率为 25%。

表 2 不同品种褐化率 /%

Table 2 The browning rate of different species

品种 Species	A	B	C	D	E	F	G	H
叶片 Leaf	91.67	95.83	79.47	100.00	14.29	90.48	0.00	4.76
叶柄 Petiole	90.63	53.13	56.25	100.00	21.43	25.00	3.57	0.00

2.2 不同品种几个生理参数的比较

2.2.1 不同品种总酚含量的比较 从表 3 可以看出,供试 8 个牡丹品种总酚含量差异较大。8 个品种叶片总酚 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 96.494,差异达极显著水平;8 个品种叶柄总酚 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 65.530,差异达极显著水平。

表 3 不同品种总酚含量(mg/g FW)

Table 3 Determination results of total phenols content (mg/g FW) in different species

品种 Species	A	B	C	D	E	F	G	H
叶片 Leaf	26.575	10.908	2.242	13.825	6.408	7.742	4.992	8.825
叶柄 Petiole	16.242	13.492	10.100	19.989	9.325	21.211	9.325	7.075

2.2.2 不同品种 POD 活性的比较 从表 3 可以看出,8 个牡丹品种的 POD 活性差异较大,8 个品种叶片 POD 活性 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 126.91,差异达极显著水平;8 个品种叶柄 POD 活性 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 119.18,差异达极显著水平。

2.2.3 不同品种 CAT 活性的比较 从表 4 可以看出,供试 8 个牡丹品种的 CAT 活性差异较大,8 个品种叶片 CAT 活性 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 166.79,差异达极显著水平;8 个品种叶柄 CAT 活性 $\alpha=0.01$ 的 F 统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于 30.87,差

异达极显著水平。

表4 不同品种 POD 活性 (unit/g FW)

Table 4 Determination results of POD activity (unit/g FW) in different species

品种 Species	A	B	C	D	E	F	G	H
叶片 Leaf	11.811	3.796	5.972	13.620	9.656	4.368	25.508	10.524
叶柄 Petiole	2.019	5.349	2.424	2.592	4.293	3.702	7.296	9.703

表5 不同品种 CAT 活性 (unit/g FW) 变化

Table 5 Determination results of CAT activity (unit/g FW) in different species

品种 Species	A	B	C	D	E	F	G	H
叶片 Leaf	0.392	0.465	0.409	0.849	0.498	0.506	0.421	0.509
叶柄 Petiole	0.636	0.903	0.258	0.272	0.848	0.428	0.237	0.350

2.2.4 不同品种间 MDA 含量的比较 从表5可以看出,供试8个牡丹品种的MDA含量差异较大,8个品种叶片MDA含量 $\alpha=0.01$ 的F统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于41.90,差异达极显著水平;8个品种叶柄MDA含量 $\alpha=0.01$ 的F统计量临界值 $F_{crit}=4.0259$ 远远小于45.93,差异达极显著水平。

表6 不同品种的 MDA 含量 ($\mu\text{mol/g FW}$)

Table 6 Determination results of MDA content ($\mu\text{mol/g FW}$) in different species

品种 Species	A	B	C	D	E	F	G	H
叶片 Leaf	275.64	227.90	197.50	199.58	154.74	262.88	163.24	52.56
叶柄 Petiole	138.34	90.78	99.20	107.20	82.98	168.40	61.28	75.48

表7 叶片各个指标的相关系数

Table 7 Coefficient of correlation of different indexes in leaf of peony

	X1	X2	X3	X4	X5
X1	1.0000				
X2	0.0123	1.0000			
X3	0.0767	0.0519	1.0000		
X4	0.4537	-0.2808	-0.0915	1.0000	
X5	0.4354	-0.5565	0.2645	0.7980	1.0000

注: X₁-总酚含量; X₂-POD活性; X₃-CAT活性; X₄-MDA含量; X₅-褐化率

Note: X₁- Total phenols content; X₂-POD activity; X₃-CAT activity; X₄-MDA content; X₅-Browning rate

2.3 各个生理指标与褐化率的综合相关分析

用 Matlab 方法分析了供试8个品种生理指标与褐化率的相关关系(表7和表8),结果表明,总酚含量、CAT活性、MDA含量与褐化率呈正相关;POD活性与褐化率呈负相关。在叶片中MDA含量与褐化率存在显著相关性($P=0.0202$),

<0.05),相关系数为0.7980。叶柄中褐化率与总酚含量、POD活性存在显著的相关性($P=0.0292<0.05$, $P=0.0186<0.05$),相关系数分别为0.6256, -0.7942。

表8 叶柄各个指标的相关系数

Table 8 Coefficient of correlation of different indexes in petiole of peony

	X1	X2	X3	X4	X5
X1	1.0000				
X2	-0.6275	1.0000			
X3	0.1439	-0.1024	1.0000		
X4	0.8272	-0.6179	0.1879	1.0000	
X5	0.6256	-0.7942	0.2177	0.4134	1.0000

注: X₁-总酚含量; X₂-POD活性; X₃-CAT活性; X₄-MDA含量; X₅-褐化率

Note: X₁-Total phenols content; X₂-POD activity; X₃-CAT activity; X₄-MDA content; X₅-Browning rate

3 讨论

同一植物种类的不同基因型,其组织培养的特点有时甚至比不同植物种间的差异还要大,此点往往为人们所忽视^[15]。本试验表明,供试品种间差异达极显著水平。同一品种不同外植体类型间也存在着显著的差异。因此,在牡丹组织培养中应注意基因型的选择,同一基因型也要注意不同外植体类型的选择。从基因型来讲供试的8个品种中,金阳、金阁、赛雪塔褐化程度较轻,适合做外植体选择。对于同一基因型的不同外植体来说,金阁的叶片比叶柄褐化程度轻,太阳的叶柄比叶片褐化程度轻,但是总体来说,叶柄比叶片褐化程度轻,更适合做外植体。

外植体从植株上切割离体后,由于胁迫,细胞内自由基的产生和清除的平衡遭到破坏,自由基的增加会导致细胞的伤害。首先受到自由基伤害的是膜系统,造成膜脂过氧化。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化最重要的产物,可以扩散到其他部位,破坏体内多种反应的正常进行,膜质过氧化的结果,使膜结构和功能受到损伤,使膜透性增加和细胞代谢失调,严重时导致细胞死亡。叶片的切割面积比叶柄的要大,因此叶片中膜脂过氧化的程度比叶柄就更严重。

鞠志国^[16]研究报道,多酚和多酚酶在细胞内存在区域化分布。牡丹外植体中膜质过氧化导致膜透性增加,酚、酶的区域化分布被打破,进而导致酚类物质的酶促氧化,从而导致褐化。

通过综合相关分析可以得知,叶片中MDA

含量与褐化率之间存在显著的相关性,但是这只是对大多数品种而言,对于个别品种不适合这一规律。因为生物本身具有多样性,很难用同一个标准进行衡量。叶柄中总酚含量与褐化之间存在正相关性,这与魏芳^[17]在阿月浑子中的研究报道相一致。

张月玲等^[18]研究报道,POD 增高既能促进细胞分裂增长,又能提高细胞的抗逆性,与本试验的 POD 活性与褐化率存在着显著的负相关性相一致。因此,我们可以通过降低外植体的 MDA 含量和总酚含量,或提高其 POD 活性来降低牡丹组织初代培养中的褐化问题。

参考文献:

- [1] 高志民,王 雁. 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.
- [2] 黄守印,李玉龙. 牡丹试管苗繁殖技术的研究[J]. 科学通报,1984,(8):500-502.
- [3] 谢静萱. 枯枝牡丹的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1987,(2):54-55.
- [4] 孔祥生,张妙霞. 牡丹离体快繁技术研究[J]. 西北园艺,1998,(4):87-89.
- [5] 陈怡平,丁 兰,赵敏桂. 用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织的研究[J]. 西北师范大学学报,2001,37(3):66-69.
- [6] 李丽霞,曲复宁,由翠荣,等. 应用正交设计方法筛选牡丹愈伤诱导培养基的研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版),2005,18(1):41-49.
- [7] 何松林,陈笑蕾,陈 莉,等. 牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J]. 河南科学,2005,23(1):47-50.
- [8] 朗玉涛,罗晓芳. 牡丹愈伤组织的诱导及愈伤褐化抑制的研究[J]. 河南林业科技,2007,27(1):4-7,29.
- [9] Bouza L, Jacques M, Sotta B, et al. The differential effect of N6benzyl-adenine and N6-(Δ 62 isopentemyladenine) on *in vitro* propagation of *P. suffruticosa* is correlated with different hormone contents[J]. Plant Cell Reports,1993,12(10):593-596.
- [10] Bouza L, Jacques M, Miginiac E. *In vitro* propagation of *P. suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de vetry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase[J]. Plant Science (Limerick),1994,57(3):241-251.
- [11] Bouza L. Requirements for *in vitro* rooting of *P. suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de vetry' [J]. Scientia Horticulture,1994,58(3):223-233.
- [12] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2003.
- [13] 何文亮,黄承红,杨颖丽,等. 盐胁迫过程中抗坏血酸对植物的保护功能[J]. 西北植物学报,2004,24(12):2196-2201.
- [14] 李焕秀,苏冬梅,赵 彬. 不同预处理对板栗叶片中总酚含量和多酚氧化酶活性的影响[J]. 经济林研究,2005,23(4):11-13.
- [15] 熊 丽,吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京:化学工业出版社,2002.
- [16] 鞠志国,朱广廉,曹 宗. 莱阳在梨果实褐变与 PPO 及酚类物质区域化分布的关系[J]. 植物生理学报,1988,14(4):256-261.
- [17] 魏 芳,苏淑钗,富丰珍,等. 阿月浑子总酚含量与褐变关系研究[J]. 河北林果研究,2007,22(1):50-53.
- [18] 张月玲,肖尊安,熊 红. 红豆杉愈伤组织生长与 PPO, POD 比活性和多酚质量分数变化的研究[J]. 北京师范大学学报,2002,39(6):800-804.