

平阴玫瑰组培苗多酚含量及多酚氧化酶活性与其生根的关系

卢绪娟¹, 丰震¹, 赵兰勇^{1*}, 冯立国², 于守超³

(¹山东农业大学林学院, 山东泰安 271018; ²山东农业大学园艺学院, 山东泰安 271018; ³聊城大学农学院, 山东聊城 252059)

摘要: 对平阴玫瑰 (*Rosa rugosa*) 多酚含量及多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 活性与组培苗生根的关系进行了研究, 对多酚含量、PPO 活性与生根指数进行了相关性分析。结果表明: 平阴玫瑰不同品种间的多酚含量、PPO 活性及生根指数存在极显著差异。多酚含量与生根指数显著负相关, PPO 活性与生根指数极显著负相关。对不同 pH 条件下‘紫枝玫瑰’组培苗的 PPO 活性和生根指数的研究表明, ‘紫枝玫瑰’组培苗的 PPO 活性及生根指数与 pH 均有密切联系, pH 为 6.5 时 PPO 活性最高, 而生根指数最低, pH 5.5 最适宜生根。

关键词: 玫瑰; 平阴玫瑰; 多酚; 多酚氧化酶; 生根

中图分类号: S 685.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 03-0695-04

The Effect of Polyphenol Content and Polyphenol Oxidase Activity on *in Vitro* Rooting of Pingyin Rose Cultivars

LU Xu-juan¹, FENG Zhen¹, ZHAO Lan-yong^{1*}, FENG Li-guo², and YU Shou-chao³

(¹College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ²College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ³College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China)

Abstract: Polyphenol content, polyphenol oxidase (PPO) activity and *in vitro* rooting ability of 5 Pingyin rose (*Rosa rugosa* Thunb.) cultivars were investigated to seek for the physiological mechanism of rooting. The results showed that polyphenol content, polyphenol oxidase activity and rooting index of different cultivars were different significantly. According to analysis of correlation, polyphenol content, polyphenol oxidase activity was correlated negatively to rooting index at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. Polyphenol oxidase activity and rooting index of *R. rugosa* Purple Branch at different pH conditions were also studied. The results showed that both polyphenol oxidase activity and rooting index had significant correlation with pH, and the optimal pH of PPO was 6.5, while the optimal pH of *in vitro* rooting was 5.5.

Key words: *Rosa rugosa*; Pingyin rose; Polyphenol; Polyphenol oxidase; Rooting

平阴玫瑰 (*Rosa rugosa* Thunb.) 是蔷薇科蔷薇属落叶灌木, 以其花大色艳, 香气浓郁, 含油量高而驰名中外。但长期以来, 其组培苗生根困难的问题一直没有得到解决。有报道证实多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 作用于多酚导致外植体褐变, 而褐变与组培苗生根难有密切关系 (Mayer, 1987; Oktay et al., 1995; 裴东等, 2002; 宋士任和王华, 2005)。调控温度、湿度、pH 值等可抑制 PPO 活性 (尹建雄和卢红, 2005)。

收稿日期: 2006-10-30; 修回日期: 2007-04-17

基金项目: 山东省良种产业化资助项目 [鲁科农字 (2002) 228 号]

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: sdzly369@sohu.com)

作者以 5 个具有代表性的平阴玫瑰品种为试材, 对组培苗多酚含量和 PPO 活性与生根的关系进行了研究, 在此基础上, 进一步探讨了 pH 对组培苗 PPO 活性和生根的影响, 以期深入揭示平阴玫瑰组培苗生根困难的内在原因, 确定其生根的最佳 pH 值, 为其微体快繁和工厂化生产提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2006 年 2~8 月在山东农业大学花卉研究所进行。以平阴玫瑰的代表性品种‘紫枝玫瑰’、‘紫霞点翠’、‘锦绣江山’、‘重瓣玫瑰’和‘唐紫’的健壮组培苗为试材。培养基为 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, pH 5.5, 温度 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照 3 000 lx, 12 h/d, 培养周期 30 d。

多酚的提取与含量测定参照何照范和张迪清 (1998) 的方法, 重复 3 次。

不同玫瑰品种组培苗的 PPO 活性测定参照朱广廉等 (1990) 的方法略有改进。酶液制备: 将试验材料分别剪碎混匀, 准确称取样品 0.500 g, 加入 PVP 0.25 g, pH 6.5 的预冷磷酸缓冲液 5 mL, 冰浴研磨, 用缓冲液定容至 10 mL, 冷冻离心 (8 000 r/min, 30 min), 上清液即为 PPO 粗提液。PPO 活性测定: 反应试管中分别加入 3.7 mL 磷酸缓冲液, 0.3 mL 粗提酶液, 1 mL 0.1 mol/L 的邻苯二酚。混匀后于 37°C 保温 15 min, 迅速放入冰浴中, 立即加入 2 mL 质量分数为 20% 的三氯乙酸, 以 8 000 r/min 离心 20 min, 测定上清液吸光度值 (420 nm), 计算酶活。以每分钟每克样品吸光度值变化 0.001 为 1 个酶活力单位。重复 3 次。

不同 pH 条件下‘紫枝玫瑰’PPO 活性测定是采用不同 pH (4.5~8.0, 间隔 0.5, 温度 37°C) 的磷酸缓冲液进行酶液的制备和活性测定, 其余方法同上。

褐变度的测定参照 Coseteng 和 Lee (1987) 的方法, 重复 3 次。

将继代培养 30 d 的不同玫瑰品种组培苗分别接种于 1/4MS + IBA 0.5 mg/L 生根培养基上, pH 5.5, 温度 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照 3 000 lx, 12 h/d, 20 d 后统计平均根数、平均根长和生根率, 并计算生根指数 (平均根长 $\times$ 平均根数 $\times$ 生根率) (裴东等, 2002), 每品种每次统计 30 瓶。重复 3 次。

将继代培养 30 d ‘紫枝玫瑰’接种于不同 pH 的生根培养基上, pH 4.5~8.0, 间隔 0.5, 其余培养条件同上, 并按照上述方法统计生根指数。

2 结果与分析

2.1 不同玫瑰品种组培苗的多酚含量、PPO 活性、褐变度和生根状况

由表 1 可以看出, 不同玫瑰品种之间多酚含量、PPO 活性及褐变度在 $P < 0.01$ 存在极显著差异, 三者均以‘锦绣江山’最高, 分别是 14.46 mg/g、169.95 U/g 和 0.95, ‘紫霞点翠’、‘重瓣玫瑰’、‘唐紫’次之, ‘紫枝玫瑰’最低, 分别为 10.92 mg/g、70.00 U/g 和 0.51。试验中所选用的玫瑰品种均是平阴玫瑰的代表性品种, 但其多酚含量和 PPO 活性以及褐变度却均有极显著的差异, 这可能与不同品种自身的基因型及遗传进化有关。

表 1 不同品种组培苗的多酚含量、PPO 活性、褐变度和生根状况

Table 1 Polyphenol content, PPO activity, browning degree and rooting status of different Pingyin rose (*Rose rugosa*) cultivars

品种 Cultivars	多酚 Polyphenol (mg/g)	PPO (U/g)	褐变度 Browning degree	平均根数 Number of root	平均根长 Average length of root (cm)	生根率 Rooting rate (%)	生根指数 Rooting index
紫枝玫瑰 Purple Branch	10.92E	70.00E	0.51E	4.89C	0.79A	91.72A	3.55A
紫霞点翠 Zixiadiancui	12.95B	141.00B	0.86B	3.01D	0.59C	48.21D	0.86D
锦绣江山 Beautiful Homeland	14.46A	169.95A	0.95A	2.38E	0.33E	37.57E	0.29E
重瓣玫瑰 Plena	12.19C	125.03C	0.74C	5.21B	0.53D	54.44B	1.51C
唐紫 Tang Purple	11.21D	91.04D	0.61D	6.67A	0.62B	50.00C	2.06B

注: Duncan's 显著性检验, 不同字母表示在 0.01 水平下差异显著。

Note: Duncan's multiple test, different letters indicate the significant difference at 0.01 level.

组培苗生根情况的调查结果表明: 平均根长和生根率均以‘紫枝玫瑰’为最高, 平均根数以‘唐紫’最高, 而‘锦绣江山’的平均根数、平均根长和生根率均最低, 其平均根数比‘唐紫’低 4.29 条, 平均根长和生根率比‘紫枝玫瑰’分别低 0.47 cm 和 54.15%。以生根指数作为衡量生根状况的综合指标, 发现不同玫瑰品种之间生根指数在 $P < 0.01$ 水平差异极显著, ‘紫枝玫瑰’最高, 为 3.55, ‘锦绣江山’最低, 只有 0.29, ‘紫枝玫瑰’的生根指数是‘锦绣江山’的 12.24 倍。生根指数作为衡量生根状况的综合指标能够充分说明组培苗生根的难易程度。

对褐变度和生根指数进行相关性分析发现, 二者在 $P < 0.01$ 水平极显著负相关, 相关系数为 -0.971 。这说明玫瑰组培苗的褐变度对其生根指数有极显著负影响。

结合生根指数、多酚含量和 PPO 活性的测定结果, 进行综合分析发现, 多酚含量和 PPO 活性均最高的‘锦绣江山’的生根指数最低, 而多酚含量和 PPO 活性均最低的‘紫枝玫瑰’其生根指数最高, 其它 3 个品种也表现出同样的规律。初步说明多酚含量和 PPO 活性对玫瑰组培苗的生根指数均有负影响。

2.2 多酚含量及 PPO 活性与生根指数的相关性

对 5 个玫瑰品种组培苗的生根指数、多酚含量以及 PPO 活性进行相关性分析, 结果表明: 多酚含量与生根指数负相关 ($P < 0.05$), 相关系数为 -0.908 ; PPO 活性与生根指数负相关 ($P < 0.01$), 相关系数为 -0.966 , 这说明组培苗生根受多酚含量和 PPO 活性的共同影响。

2.3 不同 pH 条件下‘紫枝玫瑰’组培苗的 PPO 活性及生根状况

由图 1 可知: 在 pH 4.5 ~ 8.0 的范围内, ‘紫枝玫瑰’组培苗的 PPO 活性呈单峰型变化, 而生根指数则呈双峰型变化。

pH 6.5 时, PPO 活性最高, 组培苗的生根指数最低。当 pH 低于或高于 6.5 时, 随着生根指数的迅速上升, 峰值分别出现在 pH 5.5 和 pH 7.0 时, 且 pH 5.5 时组培苗的生根指数比 pH 7.5 时高 0.8。说明 PPO 活性和生根指数与 pH 均有密切的联系, 并且适当的酸性环境更有利于玫瑰组培苗的生根。

但当 pH < 5.5 或 pH > 7.0 时, 随着酸碱性的继续增强, 生根指数开始降低, 且 pH > 7.5 时急剧下降, 表现为接种 3 d 后组培苗叶片开始变黄, 10 d 后, 55% 苗木枯死, 部分苗虽可生根, 但幼苗枯黄无力。这是因为 PPO 是一种含铜酶, 过酸或过碱的环境可导致铜与酶的解离及蛋白质的变性, 使酶失活, 进而引起代谢紊乱 (程建军等, 2002)。说明过酸或过碱的环境虽能达到降低 PPO 活性的目的, 但却对植物材料造成了伤害。

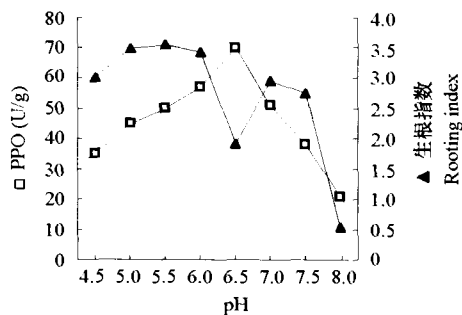


图 1 不同 pH 条件下 PPO 活性和生根指数

Fig. 1 Effect of pH on PPO activity and rooting index

3 结论与讨论

植物材料多酚含量及多酚氧化酶活性的差异除受遗传特性决定外, 还与植物生长发育的环境及代谢活动密切相关 (晏本菊和李焕秀, 1998; 仲飞, 1998)。外植体褐变与组培苗生根难易程度有密切的联系。组培苗褐变率的高低取决于多酚含量与 PPO 活性两个因素, 但在不同的生长发育时期由其中之一起主导作用 (Mayer, 1987; Okay et al., 1995; 晏本菊和李焕秀, 1998)。

本试验研究发现, 不同的玫瑰品种组培苗的多酚含量及 PPO 活性均有极显著的差异, 这可能是由于品种遗传特性不同所致。正是因为植物材料自身的这种差异, 最终导致其组培苗的生根指数差异

显著。多酚含量、PPO 活性均与生根指数负相关。

多酚氧化酶是一种含铜酶,其活性依赖于铜的氧化还原作用,过酸或过碱的环境可导致铜与酶的解离及蛋白质的变性,从而使酶失活(程建军等,2002)。因此我们可以通过调节培养基的 pH 来降低 PPO 活性,从而降低褐变度,促进组培苗的生根。

有研究表明,不同的植物材料,其体内 PPO 的最适 pH 是不同的(仲飞,1998;程建军等,2002),故组织培养过程中,为减轻褐变,促进组培苗生根,所用培养基的最佳 pH 值也不同。有关平阴玫瑰组培苗生根的最适 pH 尚未见报道。

本研究以‘紫枝玫瑰’为试材,对不同 pH 条件下组培苗的 PPO 活性及生根指数进行了研究,发现当 pH 为 6.5 时,组培苗的 PPO 活性最高,生根指数最低,当 pH 低于或高于 6.5 时,随着酸碱性的增强,PPO 活性迅速下降,组培苗的生根指数迅速上升,当 pH 为 5.5 时,组培苗的生根指数最高,而当 pH < 5.5 或 pH > 7.0 时,植物材料受到伤害,生根指数迅速下降。因此,pH 5.5 左右的弱酸性培养基是玫瑰组培苗生根的最佳培养基。

References

- Cheng Jian-jun, Ma Ying, Yang Yong-li, Ling Hai-bo, Jiao Ming-jing, Zhuang Yan. 2002. Study on characteristics of polyphenoloxidase in Ping-guoli pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (3): 261 - 262. (in Chinese)
- 程建军,马 莺,杨咏丽,凌海波,焦明晶,庄 严. 2002. 苹果梨中多酚氧化酶酶学特性的研究. *园艺学报*, 29 (3): 261 - 262.
- Coseteng M Y, Lee C Y. 1987. Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.*, 52 (4): 985 - 989.
- He Zhao-fan, Zhang Di-qing. 1998. *Health food and chemical detection technology*. Beijing: China Light Industry Press; 107 - 108. (in Chinese)
- 何照范,张迪清. 1998. 保健食品化学及其检测技术. 北京:中国轻工业出版社; 107 - 108.
- Mayer A M. 1987. Polyphenol oxidase in plants: recent progress. *Phytochemistry*, 26: 11 - 20.
- Oktay M, Kufrevioglu I, Kocacaliskan. 1995. Polyphenol oxidase from Amasya apple. *J. Food Sci.*, 60 (3): 494 - 496.
- Pei Dong, Yuan Li-chai, Xi Sheng-ke, Gu Rui-sheng. 2002. Shoot rooting *in vitro* for walnut cultivars. *Scientia Silvae Sinica*, 38 (2): 32 - 37. (in Chinese)
- 裴 东,袁丽钗,奚声珂,谷瑞升. 2002. 核桃品种试管嫩茎生根的研究. *林业科学*, 38 (2): 32 - 37.
- Song Shi-ren, Wang Hua. 2005. The effect of polyphenol content and polyphenol oxidase activity on rooting of tissue cultured seedlings in *Vitis* L. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 21 (9): 70 - 73. (in Chinese)
- 宋士任,王 华. 2005. 葡萄多酚含量和多酚氧化酶活性与组培苗生根关系的初步研究. *中国农学通报*, 21 (9): 70 - 73.
- Yan Ben-ju, Li Huan-xiu. 1998. The relationship between browning ratio in vitro PPO and phenols of pear explants. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 16 (3): 311 - 313. (in Chinese)
- 晏本菊,李焕秀. 1998. 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系. *四川农业大学学报*, 16 (3): 311 - 313.
- Yin Jian-xiong, Lu Hong. 2005. Advancement of study on polyphenols and polyphenol oxidase in tobacco. *Guangxi Agricultural Science*, 36 (3): 284 - 286. (in Chinese)
- 尹建雄,卢 红. 2005. 烟草中多酚化合物及多酚氧化酶研究进展. *广西农业科学*, 36 (3): 284 - 286.
- Zhong Fei. 1998. Characteristics of polyphenol oxidase and its inhibition in Red Delicious apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 25 (2): 184 - 186. (in Chinese)
- 仲 飞. 1998. 红星苹果多酚氧化酶某些特性及其抑制剂的研究. *园艺学报*, 25 (2): 184 - 186.
- Zhu Guang-lian, Zhong Hai-wen, Zhang Ai-qin. 1990. *Plant biology experiments*. Beijing: Beijing University Press; 37 - 39. (in Chinese)
- 朱广廉,钟海文,张爱琴. 1990. 植物生理实验. 北京:北京大学出版社; 37 - 39.