

# Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和柠檬酸处理对康定木兰一年生枝多酚氧化酶活性的影响

张霓雯<sup>1</sup>, 吴越<sup>2</sup>, 吴云<sup>2</sup>, 刘光立<sup>2</sup>

(1. 四川航天职业技术学院, 四川 广汉 618300; 2. 四川农业大学 风景园林学院, 四川 成都 611130)

**摘要:**以康定木兰一年生枝条为实验材料,采用不同浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液和柠檬酸溶液对枝条进行处理,测定其多酚氧化酶(PPO)活性及其变化规律。结果表明:不同 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和柠檬酸处理浓度均对康定木兰枝条 PPO 活性具有抑制作用,其中 1.0 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和 0.2 g·L<sup>-1</sup> 柠檬酸处理对康定木兰枝条中 PPO 活性的抑制效果最佳;随着处理时间的增加,PPO 活性亦呈现先下降后上升的趋势,处理 6 h 时的抑制作用最强。综合来看,1.0 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或 0.2 g·L<sup>-1</sup> 柠檬酸溶液处理 6 h 对康定木兰枝条 PPO 活性的抑制效果最好。

**关键词:**康定木兰;多酚氧化酶活性 PPO;Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>;柠檬酸

中图分类号: Q948 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2016)04-0068-04 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2016.04.0068

木兰科(*Magnoliaceae*)植物是现存被子植物中较原始的类群,属世界珍稀濒危树种,是古老孑遗植物的群体,许多品种已经在地球上永久的消失了<sup>[1-4]</sup>。木兰科植物也是世界著名的观赏园林绿化植物,树形优美多姿,花色艳丽,以花大、美丽、清香著称,是珍贵的用材树种。几乎被公认为有花有果植物的先驱和代表,是植物中的国宝,许多品种已被列入《中国植物红皮书》<sup>[5]</sup>。根据刘玉

壶等的系统,全世界的木兰科植物有 15 属约 300 种,我国有野生木兰科植物 11 属 110 多种(含变种和亚种),分别占世界分布属种的 73.3% 和 35.7%。我国被认为是木兰科植物的现代分布和起源中心<sup>[6]</sup>。木兰科植物在四川省的分布较为普遍,在全省的 159 个县市中<sup>[7]</sup>,49 个有木兰科的种类分布。

木兰科植物在树形、花形以及气味等方面均具有独特的价值,近年来越来越受到人们的广泛关注。目前,木兰科植物已经广泛应用于园林绿化、药用、材用、化工等多个领域,特别是在园林绿化方面有了长足的发展。但是相对在我国分布约 110 种的植物大科来说,对其开发利用实在太少,只有木兰属、含笑属、木莲属中的一小部分,这与其在园林应用上的优势极不相称。随着木兰科植

收稿日期: 2016-02-25  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370436)  
第一作者简介: 张霓雯(1989-),女,四川省广元市人,学士,助教,从事园林植物栽培应用研究。E-mail: 631991145@qq.com。  
通讯作者: 刘光立(1977-),男,山东省德州市人,博士,副教授,从事园林植物栽培与野生植物应用研究。E-mail: liugl\_1@163.com。

## Researchon Growth Characters And Cultivation of Six *Hemerocallis Hybridas* in Harbin Area

CHEN Xi, LIU Ping

(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150029)

**Abstract:** In order to enrich perennial garden flowers species of Harbin area, six new *Hemerocallis hybridas* species were introduced, through the investigation and study on the cultivation of characters for three years , the six species could overwintering safely and grow well; tissue culture was the best method for rapid and mass propagation; *Hemerocallis hybridas* were used in landscape widely.

**Keywords:** *Hemerocallis hybrida*; tissue culture; garden use

物的需求越来越大,快速高效的育苗方法成为人们争相研究的重点,而无性繁殖无疑是一种很有前景的办法,目前部分木兰科植物的扦插已经取得了一定的成果,但是组织培养依旧较为薄弱,而一般认为由于该科植物酚性成分较多,外植体的褐化是组织培养中常见的问题<sup>[7]</sup>。因此,解决木兰科植物组织培养中生根问题和组织褐化是其组织培养及扦插能否成功的关键<sup>[8]</sup>。在酚性成分中多酚氧化酶是引起褐化的重要因素,因此研究多酚氧化酶的含量变化对于木兰科的无性繁殖意义重大。

康定木兰(*Magnolia dawsoniana*)又名光叶木兰,是木兰科木兰属落叶乔木,花期4-5月,果期9-10月。康定木兰是我国川西山区特有的一种原始古老孑遗树种,属国家保护珍稀树种,分布区域小,数量少,处于濒临灭绝边缘。主要分布于川西泸定县海螺沟、燕子沟及九龙县坝等海拔2000~2500 m的湿润沟谷地带<sup>[9]</sup>。本文开展不同浓度的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和柠檬酸处理对康定木兰一年生枝多酚氧化酶活性的抑制作用研究,有助于理解此物种濒危的内在机制,为康定木兰的保护与引种驯化提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为崇州市桤泉镇四川农业大学现代化农业研发基地引种的康定木兰当年生半木质化枝条,2013年11月上旬采集,嫩枝取回后枝下部浸水保湿,带回试验室进行处理。枝条剪切为长度大约10 cm的枝段,每枝段上保留一枚叶。

### 1.2 方法

1.2.1 康定木兰枝条的处理 将剪切好的枝段用0.1%的高锰酸钾溶液消毒5 min后分别放入装有100 mL 0.5、1.0、2.0、4.0 g·L<sup>-1</sup>的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和清水的烧杯中,每个烧杯放入12枝剪切好的枝段用0.1%的高锰酸钾溶液消毒5 min后分别放入装有100 mL 0.2、0.5、1.0、2.0 g·L<sup>-1</sup>的柠檬酸和清水烧杯中,每个烧杯放入12枝剪切好的枝段。

放置于室内,保持光照、温度相同的条件下,分别于第2、4、6、8 h对枝段同一部位采样测定多酚氧化酶的活性,每个处理各取3枝。

### 1.2.2 多酚氧化酶活性的测定 ①酶液制备。

从浸泡的溶液中取出嫩枝枝段用消毒后的剪刀截取最下端1 cm茎段,洗净擦干,用电子天平准确称取0.5 g,剪碎,每种浓度溶液处理下每次各3份分别处理,迅速放入研钵中并加入适量的磷酸缓冲液和少许石英砂,研碎,用纱布过滤倒入离心管中,再加磷酸缓冲液定容至7 mL,加入1 mL的30%硫酸铵,摇匀,5 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃,离心15 min。取出上清液,加入4 g的硫酸铵至60%的饱和度,搅拌均匀,再次离心15 min(10 000 r·min<sup>-1</sup>),收集沉淀,将所得沉淀溶于3 mL,0.01 mol·L<sup>-1</sup>,pH6.5磷酸缓冲液中,即为酶液。

②酶活性测定及酶活力计算。在试管中加入3.9 mL 0.05 mol·L<sup>-1</sup> pH5.5磷酸缓冲液,1.0 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>儿茶酚在37℃恒温水浴中保温10 min,然后加入0.5 mL酶液,迅速摇匀,倒入比色杯内,于525 nm波长处以时间扫描方式,以3.9 mL磷酸缓冲液加1 mL儿茶酚,再加0.5 mL蒸馏水为空白对照,在3 min内测定吸光度变化(A)值,每30 s读数1次,共读6次。以每分钟A<sub>525</sub>值变化0.01为1个酶活力单位,按公式计算多酚氧化酶的活力。

$$\text{酶活力}(0.01 \text{ A} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{A}{0.01 \times \text{反应时间}} \times$$

$$\frac{\text{酶提取液总量}(\text{mL})}{\text{测定时酶液用量}(\text{mL})}$$

1.2.3 数据分析 采用SPSS软件进行数据分析,并进行不同浓度处理间的差异显著性检验,利用Excel进行图表的制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理康定木兰枝条PPO活性的变化

由表1可知,通过与CK组比较可以发现Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理,可显著抑制多酚氧化酶活性。随着处理浓度的增加,PPO活性呈现先下降后上升的趋势,1.0 g·L<sup>-1</sup>时,PPO活性最低且显著低于其它浓度处理( $P < 0.05$ ),说明1.0 g·L<sup>-1</sup>处理时效果最好。处理2 h后,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1.0、2.0 g·L<sup>-1</sup>浓度处理下PPO活性显著低于其它处理( $P < 0.05$ );处理4 h后,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1.0、2.0 g·L<sup>-1</sup>浓度处理下PPO活性显著低于4.0 g·L<sup>-1</sup>与对照( $P < 0.05$ );处理6 h后,各浓度处理下均存在显著差异( $P < 0.05$ ),说明此时的处理效果最佳;处理8 h后,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>各浓度间PPO活性的差异与处理

4 h 后相似。这说明,浓度为 1.0 g·L<sup>-1</sup> 的作用最好。  
Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理对康定木兰枝条 PPO 活性的抑制

表 1 不同浓度 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理对 PPO 活性的影响

Table 1 Effects of different concentration of Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> on PPO activity of <i>Magnolia dawsoniana</i> .	
浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	PPO 活性/(0.01 A·min <sup>-1</sup> ) PPO activity
Concentration	2 h4 h6 h8 h
CK	13.258±0.057 a13.250±0.201 a13.219±0.015 a13.305±0.008 a
0.5	12.910±0.022 a12.815±0.205 b9.849±0.271 d10.347±0.111 c
1.0	9.620±0.344 c8.503±0.166 d5.380±0.039 e8.962±0.246 d
2.0	12.417±0.236 b12.413±0.141 c11.216±0.180 c12.222±0.193 b
4.0	13.098±0.124 a13.014±0.077 ab12.224±0.098 b13.215±0.176 a

表中每列数据后不同字母表示差异显著(P<0.05)。表中数据为平均值±标准差。下同。  
Different letters indicate significant difference (P<0.05). Data were mean ± S. D. The same below.

由表 1 可知,除对照外,随着处理时间的增加,各浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理康定木兰枝条的 PPO 活性变化趋势较为一致。即随着处理时间的增加,PPO 活性呈先下降后上升的趋势,在处理 6 h 时达到最低值,但当浸泡时间增加到 8 h 时,PPO 活性出现上升趋势,这说明 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对 PPO 活性的抑制作用是有一定时间限制的。综上所述,处理 6 h 且 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>浓度为 1.0 g·L<sup>-1</sup>时对 PPO 活性的抑制效果最好。

2.2 不同浓度柠檬酸处理康定木兰枝条 PPO 活性的变化

由表 2 可知,不同浓度柠檬酸处理下,康定木兰枝条 PPO 活性均显著低于对照(P<0.05),说明柠檬酸处理抑制康定木兰枝条 PPO 活性效果明显。随着处理浓度的增加,康定木兰枝条中 PPO 活性呈现逐渐上升的趋势,各时间段,柠檬酸浓度为 0.2 g·L<sup>-1</sup>时,PPO 活性最低。具体而言,处理 2 h 后,0.2 g·L<sup>-1</sup>的柠檬酸浓度处理下的

PPO 活性显著低于其它处理和对照(P<0.05);处理 4 h 后,0.2 g·L<sup>-1</sup>的柠檬酸浓度处理的 PPO 活性依然最低,但 0.5、1.0、2.0 g·L<sup>-1</sup>浓度处理间 PPO 活性差异不显著;处理 6 h 后,柠檬酸各浓度处理均达到最低值,其中 0.2 g·L<sup>-1</sup>处理后的 PPO 活性最低;处理 8 h 后,0.2 g·L<sup>-1</sup>柠檬酸处理的 PPO 活性依然最低。这说明,0.2 g·L<sup>-1</sup>柠檬酸处理后能够显著抑制康定木兰枝条中的 PPO 活性,且在 8 h 内均有较好效果。

由表 2 可知,除对照外,随着处理时间的增加,不同浓度柠檬酸处理后,康定木兰枝条 PPO 活性变化趋势基本一致。即随着处理时间的增加,PPO 活性呈先下降后上升的趋势,在处理 6 h 时达到最低值,但当处理时间增加到 8 h 时,PPO 活性出现上升趋势,这说明柠檬酸对康定木兰枝条 PPO 活性的抑制作用亦受到时间的限制。总而言之,0.2 g·L<sup>-1</sup>的柠檬酸处理 6 h 对康定木兰枝条的 PPO 活性抑制效果最好。

表 2 不同浓度柠檬酸处理对 PPO 活性的影响

Table 2 Effects of different concentrations of citric acid on PPO activity of <i>Magnolia dawsoniana</i> .	
浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	PPO 活性/(0.01 A·min <sup>-1</sup> ) PPO activity
Concentration	2 h4 h6 h8 h
CK	12.395±0.325 a12.382±0.165 a12.621±0.234 a12.395±0.325 a
0.2	9.126±0.718 d8.329±0.093 d4.590±0.314 e9.126±0.718 c
0.5	11.413±0.283 c11.258±0.120 c10.316±0.171 c11.413±0.283 b
1.0	11.462±0.413 c11.338±0.099 c9.648±0.266 d11.462±0.413 b
2.0	12.269±0.228 b12.135±0.099 c11.313±0.271 b12.269±0.228 a

### 3 结论与讨论

#### 3.1 不同浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及柠檬酸处理对 PPO 活性的抑制

抗氧化剂(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>及柠檬酸)能清除由于外植体机械损伤而渗出的酚类物质和已被酚酶氧化的醌类物质,减轻褐化危害的作用<sup>[10]</sup>,起到抑制多酚氧化酶(PPO)活性的作用。周丽艳<sup>[11]</sup>对白玉兰的研究表明,抗氧化剂对于降低组培中的褐化率有重要作用,不同浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>及柠檬酸处理的效果不同,其中以 1.0 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和 0.2 g·L<sup>-1</sup>柠檬酸处理对 PPO 活性的抑制效果最佳。本研究亦发现相似结果,即 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>及柠檬酸处理对康定木兰枝条的 PPO 活性具有显著的抑制作用,其中 1.0 g·L<sup>-1</sup>的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和 0.2 g·L<sup>-1</sup>的柠檬酸处理后的抑制效果最佳。本研究中,仅初步研究了两种抗氧化剂对康定木兰枝条中 PPO 活性的抑制作用,未来的研究中需要弄清抗氧化剂对 PPO 活性抑制的具体机制以及这种机制的运行方式。

#### 3.2 不同处理时间对 PPO 活性的抑制

一般而言,随着处理时间的延长,各类抗氧化剂(如 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、柠檬酸等)会发生一系列的化学分解反应,这就使得抗氧化剂对 PPO 活性的抑制效果降低。本研究亦表明,随着处理时间的延长,不同浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>及柠檬酸处理下,康定木兰枝条 PPO 活性呈现先下降后上升的趋势。这说

明,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>及柠檬酸处理对康定木兰枝条 PPO 活性的抑制具有时效性,且在处理后 6 h 时,达到最佳效果。本研究表明,相对降低浓度的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>及柠檬酸与 6 h 的处理,对康定木兰枝条 PPO 活性的抑制效果最好,这为康定木兰的组培、无性繁殖、引种驯化提供较好的科学依据与参考。

#### 参考文献:

- [1] 李捷. 木兰科植物的分支分析[J]. 云南植物研究, 1997, 19(4): 342-356.
- [2] 徐凤霞. 木兰科植物的分支分析[J]. 热带亚热带植物学报, 1997, 8(3): 207-214.
- [3] 刘玉壶, 周仁章. 中国木兰科植物及濒危种类的引种繁殖研究初报[J]. 植物引种驯化集刊, 1987 (5): 39-41.
- [4] Gooding P S, Bird C, Robinson S P. Molecular cloning and characterisation of banana fruit Polyphenol oxidase[J]. Planta, 2001, 213(5): 748.
- [5] 傅立国, 金鉴明. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 404-455.
- [6] 刘玉壶, 夏念和, 杨惠秋. 木兰科的起源进化和地理分布[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4): 1-12.
- [7] 程永现, 周俊, 丁中涛. 粗榧木莲的酚性成分[J]. 云南植物研究, 2000, 22(3): 365-367.
- [8] 黎明, 马焕成. 木兰科植物无性繁殖研究概况[J]. 西南林学院学报, 2003(2): 92-96.
- [9] 黄海欣. 河南辛夷生长习性观察[J]. 中药材, 1990(4): 3-6.
- [10] 王曼玲, 胡中立, 周明全, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(2): 215-222.
- [11] 周丽艳, 郭振清, 秦子禹, 等. 白玉兰组织培养中的褐化控制[J]. 河北科技师范学院学报, 2008(4): 19-22.

## Effect of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Citric Acid on PPO Activity of Annotinous Branch of *Magnolia dawsoniana*

ZHANG Ni-wen<sup>1</sup>, WU Yue<sup>2</sup>, WU Yun<sup>2</sup>, LIU Guang-li<sup>2</sup>

(1. Sichuan Aerospace Vocational College, Guanghan, Sichuan 618300; 2. College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130)

**Abstract:** The effect of different concentration of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and citric acid solution on PPO activity and its variations with time of *Magnolia dawsoniana* was studied. The results showed that PPO activity reduced significantly under the treatments of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and citric acid. The lowest PPO activity was when the concentration was 1.0 g·L<sup>-1</sup> and 0.2 g·L<sup>-1</sup> for Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and citric acid, respectively. Similar with the concentration treatments, with the rising of time, PPO activity was reduce-increase trend, the lowest was 6 h treatment. In a word, might carefully make conclusion that concentration of 1.0 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.2 g·L<sup>-1</sup> citric acid and 6 h treatment bestly reduced PPO activity of *Magnolia dawsoniana*.

**Keywords:** *Magnolia dawsoniana*; PPO activity; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; citric acid