

非洲菊组织培养抑制褐变现象的研究

张素勤^{1,2}, 邹志荣^{2*}, 耿广东^{1,2}, 张亚娟²

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为控制非洲菊组织培养中的褐变提供有效的解决方法,研究了不同外植体及抗氧化剂对非洲菊褐变现象的影响。试验结果表明,非洲菊幼嫩叶片、花蕾、花托和花梗等不同外植体中叶片的褐变程度最重,花蕾的褐变程度最轻。在非洲菊叶片组织培养时,接种前将外植体用 100 mg/L Vc 溶液浸泡 1h,再在以后的继代培养中加入 200 mg/L PVP 使褐变现象得到有效控制。

[关键词] 非洲菊; 组织培养; 褐变; 外植体; 抗氧化剂

[中图分类号] S682.1⁺9

[文献标识码] A

Study on Inhibiting Browning Reaction of *Gerbera jamesonii* Bolus *in vitro*ZHANG Suqin^{1,2}, ZOU Zhirong^{2*}, GENG Guangdong^{1,2}, ZHANG Yajuan²

(1. Agricultural College, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: The different explants and antioxidants were tested to find the effective method of inhibiting browning reaction of gerbera *in vitro*. The results show that the browning degree of leaf was the most serious, and that of floweret was the lightest among young leaf, floweret, floral receptacle and floral peduncle, and soaking leaves 1 hour in 100 mg/L Vc before planting and adding 200 mg/L PVP during subculture could control browning reaction effectively.

Key words: gerbera; tissue culture; browning; explant; antioxidant

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)为菊科非洲菊属草本植物,是世界各地广泛栽培的主要花卉作物之一^[1]。其风韵秀美,花色艳丽,周年开花,供应期长且耐长途运输,为世界著名切花之一。非洲菊在组织培养中存在严重的褐变现象,然而对于非洲菊褐变现象控制及其克服措施的研究,在国内外尚少见报道。褐变是指培养物表面分泌出黑褐色物质,导致培养基和培养物变褐的现象^[2]。褐变现象在组织培养中普遍存在,这种现象与污染和玻璃化现象并称为植物组织培养的三大难题^[3]。严重的褐变常常会使组织培养中外植体生长发育不良,甚至导致死亡。所以,很有必要对非洲菊褐变的有效控制进行研究。

1 材料与方

1.1 材料

以非洲菊幼嫩叶片、花托、花蕾和花梗等外植体为试材。非洲菊购自河南濮阳一家花卉公司的荷兰优质品种 Whitsun。

1.2 方法

1.2.1 不同外植体褐变程度的观察 取非洲菊幼嫩的叶片、花蕾、花托和花梗等外植体,先用自来水反复冲洗,再用毛刷蘸洗洁精洗一遍后用自来水冲洗干净。外植体用 70% 的乙醇消毒 15s,用无菌水冲洗 2 次,再用 0.1% 的升汞(氯化汞)消毒约 5min,随后用无菌水反复冲洗 3~5 次,然后切成适宜大小的小块接到配好的 MS 培养基中(其中附加

30g/L 的蔗糖、6g/L 的琼脂和 300mg/L 水解酪蛋白,用 1mol/L 的盐酸或 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节培养基 pH 值至 5.8)。叶片大小为 0.3~0.4cm 见方,一个幼嫩花蕾或花托平均分成 3 块或 4 块,花梗长为 0.5cm 左右。培养 20d 后观察外植体的褐变程度。

1.2.2 不同抗氧化剂对外植体褐变的影响 以非洲菊幼嫩叶片为外植体,在培养基中分别添加 200mg/L 聚乙烯吡咯吡烷酮(PVP)、100mg/L 半胱氨酸、0.1% 活性炭、MS 大量元素减半,在接种前用 100mg/L 维生素 C(Vc)浸泡叶片 1h 和接种前用 100mg/L Vc 浸泡叶片 1h 后在其继代过程中再加入 200mg/L PVP,共 6 个处理,观察外植体的褐变程度。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对褐变的影响

由表 1 可知,以不同外植体进行组织培养时,其褐变程度不同。当外植体为叶片时,其褐变程度最重;当以花蕾为外植体时,其褐变程度最轻;花托和花梗居中。其原因可能是由于叶片内所含的酚类物质较多,再加上接种时其四周均被切割,受到的伤害较重;而花蕾中可能含有的酚类物质则较少。

表 1 不同外植体对褐变的影响

处理	褐变程度	处理	褐变程度
叶片	严重	花托	较轻
花蕾	最轻	花梗	较轻

(下转第 59 页)

[收稿日期] 2006-05-25; 2007-01-26 修回

[基金项目] 陕西省“十五”科技攻关项目(99K04-G7)

[作者简介] 张素勤(1974—),女,博士,教授,从事园艺作物栽培及生理与生物技术研究。zsqqin2002@163.com

* 通讯作者。

差异,说明只要控制物料的碳氮比(C/N)在 30~35,堆肥腐熟后的性状均相差不大。

3 讨论

3.1 4 个处理与作对照的秸秆、草炭等比较,均达到腐熟,其有机质含量虽略低于红原草炭,但含量较高,为 55%左右。从发酵过程中的温度、颜色、臭味以及体积变化等来看,发酵进行比较缓慢,且温度不高(未超过 60℃),不利于堆内物质中纤维素的分解和杀灭致病微生物。主要原因有三:一是试验在春季进行,气温不高,且每堆鲜重只有 1t,量太少,热量容易散失;二是牛粪属冷性材料,其腐熟需要较长的时间;三是水分控制不好,堆内水分约 65%,应该是前期水分控制在 60%左右,中后期控制在 40%~50%,才有利于堆内空气的流通,并通过翻堆等技术调节堆内通气性。

3.2 发酵的关键技术在于选择适宜的发酵材料,调节碳氮比(C/N)在 30~35,本试验中的牛粪属冷性肥料,发酵缓慢,在生产上应选择养分含量高的热性肥料,如鸡粪、猪粪等;控制合适的水分,前期控制

在 60%左右,中后期控制在 35%~50%,水分过少,微生物活动受到抑制,水分太多,影响好气微生物的活动;调节通气性,通气过旺则好气细菌繁殖过快,导致有机质大量分解,腐殖质化系数低,氮素损失大,通气不良则抑制好气微生物的活动,使堆肥温度不易升高,堆肥腐熟迟缓。若在发酵物料中添加微生物,需按产品要求使微生物能在物料中扩繁。

3.3 关于秸秆粉碎发酵后作为基质全部或部分替代漂浮育苗基质中草炭,在改用发热性较强的马粪、鸡粪等有机材料发酵腐熟后替代及其替代用量有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 全国农业技术推广服务中心. 中国有机肥料资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999, 4.
- [2] 周 明, 姜晓清. 酵素菌速腐堆腐木屑试验初报[J]. 耕作与栽培, 2004(1): 45-46.
- [3] 刘卫星, 顾金刚, 姜瑞波, 洪坚平. 有机固体废物堆肥的腐熟度评价指标[J]. 中国土壤肥料, 2005(3): 3-7.

(责任编辑: 杨 林)

(上接第 56 页)

2.2 不同抗氧化剂对褐变的影响

由表 2 可知,半胱氨酸、0.1%的活性炭和 MS 大量元素减半均不能抑制褐变现象,随着继代时间的延长,外植体的褐变程度加重。用 100mg/L Vc 在叶片接种前浸泡 1h,在接种一代没有发生褐变现象,但是在其后继代过程中褐变现象出现了。这是因为通过 Vc 浸泡外植体后在一定的时间内起到控制褐变的作用,超过了一定时期 Vc 被氧化而失去了防褐变的能力。接种前先用 100mg/L Vc 浸泡 1h,在其以后的继代过程中加入 200mg/L PVP,使褐变现象得到了有效地控制,大约继代培养 2~3 代后褐变现象基本消失,黄绿色的愈伤组织分化出了不定芽。这时要及时地撤去培养基中的 PVP,以防长期使用 PVP 对愈伤组织或不定芽产生毒副作用。

表 2 不同抗氧化剂抑制非洲菊叶片褐变的效果

处 理	抑制褐变效果
1 200 mg/L PVP	+
2 100 mg/L 半胱氨酸	-
3 0.1%的活性炭	-
4 MS 大量元素减半	-
5 Vc 100mg/L 浸泡叶片 1h	+
6 Vc 100mg/L 浸泡叶片 1h, 在以后的继代培养中培养基加入 200mg/L PVP	++

*“-”表示没有抑制褐变的效果,“+”和“++”分别表示有抑制褐变的效果,后者效果大于前者。

3 讨论

褐变主要是由于外植体受伤分泌酚类物质过多,同时又被氧化成醌类物质的结果。抑制褐变的方法已有大量的研究。如选择适宜的外植体、降低培养温度^[4]、pH^[5],添加抗氧化剂 Vc^[6]、PVP^[7]、亚硫酸钠^[7]和活性炭^[8]等。但在非洲菊组织培养上还

鲜见报道。

本研究表明,不同的外植体褐变程度也不一样。叶片褐变程度严重,花蕾褐变程度最轻,花托和花梗居中。在叶片愈伤组织诱导中,在接种前用 100mg/L 的 Vc 浸泡外植体 1h,以后继代培养再加入 200mg/L 的 PVP,使褐变现象得到了很好的控制。当褐变现象不再发生时,要及时停止添加 PVP,以防长期使用 PVP 对外植体产生毒副作用。褐变是植物组织培养中较为普遍存在的现象,也是其遇到的三大难题之一。要从根本上解决组织培养中的褐变问题,应进一步从褐变发生的原因、生理生化以及遗传等方面进行更深入的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 赵兰勇. 商品花卉生产与经营[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.
- [2] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [3] 赵蓬晖, 张江涛, 马红卫. 植物组织培养中的几个常见问题与对策[J]. 河南林业科技, 2001, 21(2): 27-28.
- [4] 于清章, 史国荣, 等. 几种防褐变剂对去皮切片马铃薯储藏的影响[J]. 长江蔬菜, 1998(11): 25-26.
- [5] 王异星. 荔枝细胞培养的初步研究[J]. 自然与医学报, 1997, 18(5): 84-88.
- [6] 王清章, 刘怀超. 莲藕贮藏中褐变度及多酚氧化酶活性的初步研究[J]. 中国蔬菜, 1997(3): 4-6.
- [7] 夏 铭, 吴细云, 张丽梅. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究[J]. 生物技术, 1996, 6(3): 18-20.
- [8] Mohsen K. H., Ebrahim, Ibrahim A. Influence of medium solidification and pH value on in vitro propagation of maranta. leuconeura CV[J]. Kerchoviana Science Horticulture, 2000(86): 211-221.

(责任编辑: 聂克艳)