

仙客来愈伤诱导抗褐化研究

赵跃坤

(黑龙江省农业科学院 离退休职工工作处, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:以仙客来(*Cyclamen persicum* Mill)法国莫莱尔 F₂ 代植株为材料, 选取同一植株的叶片, 叶柄和块茎做为外植体进行愈伤诱导, 选取最佳愈伤诱导培养基, 针对愈伤诱导过程中出现的褐化问题, 从不同方面入手, 寻求最佳的褐化控制培养基和培养条件, 解决组织培养中褐化问题。结果表明: 最佳愈伤诱导培养基是 MS+6-BA (0.5 mg/L)+2, 4-D (2 mg/L)+KT (0.2 mg/L)+琼脂 (9 g/L)+蔗糖 (30 g/L); 最佳褐化控制培养基是在愈伤诱导培养基中添加 Vc (2 mg/L) 或 PVP (0.5 mg/L); 暗培养能一定程度上抑制褐化的发生; 活性炭虽能抑制褐化但同时也抑制仙客来愈伤组织的生长。

关键词: 仙客来; 外植体; 愈伤组织; 褐化控制

中图分类号: S 682.2⁺ 62; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0201-02

植物组织培养过程中, 褐变问题普遍存在, 与菌类污染和玻璃化现象并称为植物组织培养的三大难题。因此, 探讨褐化发生的机制及其影响因素, 采取有效的防止褐化的措施, 是保证植物组织培养成功的关键所在^[1]。有研究表明, 将外植体材料的预处理、防褐剂的使用, 适宜的培养条件 3 种措施有效的结合, 应该会取得较好的防褐效果^[2]。崔堂兵等结合近几年研究的新进展, 从多酚氧化酶(PPO)的定位、性质及其底物出发, 论述了植物组织培养过程中褐变的机理, 认为褐变的主要原因是酶促褐变, 即由多酚氧化酶催化多酚类物质生成褐色物质所致, 褐变与多酚氧化酶的活性及酚类物质的含量密切相关, 讨论了褐变的影响因子, 提出了克服褐变的方法^[3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料及药品

供试材料: 法国莫莱尔 F₂ 代, 2007 年春天购自于哈尔滨动力区花卉大市场, 在东北农业大学成栋学院基础实验室栽培和管理。MS 基本培养基的成分(普通化学试剂为国产分析纯); 6-BA, KT, 蔗糖, 75%的酒精, 5%次氯酸钠, 活性炭, 琼脂等各种氧化剂等植物生长调节剂及其他生化试剂均为进口产品, 药品均购自佳实生物公司。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体筛选 外植体的选取: 从一株生长情况最好的仙客来植株上选取 1 a 生的叶子和花柄; 剥取其球

茎; 外植体的消毒: 选取的试验材料在自来水下冲洗 6 遍, 去掉浮沉→75%的酒精处理 30 s→5%次氯酸钠处理 20 min→无菌水冲洗 6 遍→超净工作台上用消毒的刀切割成 2 cm 左右长宽的小块; 外植体的接种: 每瓶培养基接种 4 块, 每个外植体在每个不同培养基下重复 4 次; 外植体的培养: 一半的接种培养基完全置于光照条件下培养, 另一部分先置于黑暗条件下培养 1 个月, 后逐渐增加光照。全部置于 25℃室温条件下培养。

1.2.2 愈伤诱导培养基的配制 按照 Murashige and Skoog 的方法配制 MS 基本培养液, 按照以下添加不同浓度配比的激素: 激素种类有 6-BA、2, 4-D、KT 激素浓度 (mg/L), 梯度对应着有 0.2、0.5、1.0、1.2、3、0、0.2、0.5。添加琼脂 9 g/L, 蔗糖 90 g/L, 分装到三角瓶中, 每瓶 20 mL, 每个处理重复 3 次。在高温灭菌箱中 120℃灭菌 20 min, 冷却待用。

1.2.3 抗褐化培养基的配置 愈伤诱导最佳的培养基是 MS+6-BA (0.5 mg/L)+2, 4-D (2 mg/L)+KT (0.2 mg/L)+蔗糖 (30 g/L)+琼脂 (9 g/L)。按照以下添加不同浓度配比的抗氧化剂和活性炭: 种类名称: Vc (mg/L)、PVP (mg/L)、活性炭 (g/L), 对应浓度 (mg/L) 梯度: 1、2、3、0.2、0.5、1.0、0.5、10。分装到三角瓶中, 每瓶 20 mL, 每个处理重复 3 次。在高温灭菌箱中 120℃灭菌 20 min, 冷却待用。

1.2.4 继代培养基的配置 根据褐化控制的效果确定的最佳褐化控制培养基配方, 配置继代培养基(不含激素): MS+琼脂 (9 g/L)+蔗糖 (30 g/L)+Vc (2 mg/L) 或 PVP (0.5 mg/L)。愈伤组织在褐化控制培养基上连续继代 2 次后, 转入继代培养基。

第一作者简介: 赵跃坤(1982-), 男, 在职农业推广硕士, 研究方向为农林经济管理。E-mail: zhaoyuekun@sina.com。

收稿日期: 2009-01-27

2 试验结果

2.1 愈伤诱导

2.1.1 接种的外植体 分别接种的块茎、叶柄、叶片。由于块茎容易染菌,所以污染严重;叶柄容易干枯,所以叶片是最佳愈伤诱导外植体。

2.1.2 愈伤诱导结果 愈伤诱导情况下:①6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时,培养基中愈伤组织的诱导量要多于 6-BA 为 0.2 mg/L 时的培养基中愈伤组织量;②1、4、7、10、13、16 号处理中没加 KT 的培养基中,只有很少的愈伤诱导出来,且生长很慢,褐化情况严重;最佳外植体是叶片。③比较 2,4-D 发现当其浓度为 2 mg/L 时候,愈伤诱导情况最好,褐化情况最轻;④比较所有的处理培养基发现诱导最好的培养基是 6-BA 为 0.5 mg/L, 2,4-D 为 2 mg/L, KT 为 2 mg/L。

2.2 褐化控制

2.2.1 黑暗处理 在暗培养与光培养的条件下,愈伤诱导和愈伤褐化情况有明显的不同。暗处理的培养基中褐化情况明显没有完全光培养的培养瓶中严重。

2.2.2 活性炭和抗氧化剂 观察褐化处理的培养基,有以下结果:①添加活性炭的培养瓶中外植体没有褐化现象,但也没有愈伤诱导组织出现。②Vc 浓度 2 mg/L 时候愈伤呈现金黄色,含水量大,生长量小,轻度褐化;当浓度为 5 mg/L 时候愈伤呈现黄绿色,含水量大,中度生长,轻度褐化;比较 PVP 各浓度梯度的处理,发现当其浓度为 0.5 mg/L 时生长速度和控制褐化程度都好于其它浓度;Vc 浓度 2 mg/L 时, PVP 浓度为 0.5 mg/L 时褐化程度最轻,生长情况最好。

2.2.3 接种不同外植体的褐化的影响 接种培养 1 个月,观察各外植体,有以下结果,块茎由于容易染菌,基本被污染,褐化情况最严重;叶柄部分分化,但是生长的愈伤容易干枯,中度褐化;叶片愈伤分化量比较大,褐化情况最轻,所以最佳褐化控制外植体是叶片,具体外

植体比较:外植体类型,叶片、叶柄、球茎。愈伤情况:大量愈伤组织出现,轻度褐化,中度生长。中量愈伤组织出现,中度褐化,中度生长。褐化情况比较严重,愈伤量少于其它。

3 结论

比较试验结果得出以下结论:①愈伤诱导最好的培养基是 MS+6-BA (0.5 mg/L)+2,4-D (1 mg/L)+KT (0.2 mg/L)+琼脂(9 g/L)+蔗糖(60 g/L),在此培养基条件下愈伤诱导的最多,生长情况最好;②褐化处理最佳培养基是 MS+6-BA (0.5 mg/L)+2,4-D (1 mg/L)+KT (0.2 mg/L)+琼脂 (9 g/L)+蔗糖 (60 g/L)+Vc(2 mg/L)或 PVP(0.5 mg/L),此培养基条件下褐化程度最轻,愈伤组织生长情况最好;③最佳培养条件是前期进行 30 d 的暗培养,后转入光照培养,能有效抑制褐化的产生,促进外植体的诱导分化;④最佳愈伤诱导外植体选择是叶片,其诱导分化出诱导组织的能力高于其它外植体,同时褐化程度最低。

植物组织培养是生物技术的一个重要组成部分,要想提高成活率,解决褐变问题,显得十分重要^[4],还有许多植物在组织培养中都存在褐化问题,所以如何减轻愈伤组织诱导中的褐化问题对园林技术发展非常重要,试验通过此仙客来组织培养防褐化试验探讨园艺植物组织培养中的外植体褐化问题,以期寻求更好的防褐化方法。

参考文献

- [1] 谭文澄 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 25-26.
- [2] 梁称福. 植物组织培养研究进展与应用概况[J]. 经济林研究 2005 23(4): 99-105.
- [3] 吴业东 张霞. 几种外源生长调节素对仙客来开花的影响[J]. 中国科技信息, 2006(20): 85-86.
- [4] 朱美霞 王兰明. 仙客来分子育种研究进展[J]. 安徽农业科学 2007 35(26): 8138-8140.

Cyclamen Callus Induction Research on Anti-browning

ZHAO Yue-kun

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin, Heilongjiang 150086 China)

Abstract: The experimental used *Cyclamen* (*Cyclamen persicum* Mill) France Murray Mi F₂ plants as the materials, selected the same plant leaf, petiole, and tubers as explants to callus induction, to chose the best medium callus. Callus for induction in the process of browning were discussed from different aspects, found the best browning control of the medium and culture conditions, results showed that: the best callus medium was MS+6-BA (0.5 mg/L)+2,4-D (2 mg/L)+KT(0.2 mg/L)+agar(9 g/L)+sugar(30 g/L); best browning control training callus-induction in the medium to add Vc(2 mg/L) or PVP(0.5 mg/L); dark to a certain extent, curb the occurrence of browning; Although the activated carbon could inhibit browning but also inhibit *Cyclamen* callus growth.

Key words: *Cyclamen*; Explants; Callus; Browning control