

红掌组织培养过程中外植体褐变的研究

杜敬然¹, 赵 斌¹, 李英丽¹, 李荣华², 方正¹

(1. 河北农业大学 河北省生物无机化学重点实验室 河北 保定 071001; 2. 沧州师范专科学校 生物系, 河北 沧州 061001)

摘 要: 在红掌组织培养过程中, 外植体易发生褐变, 严重阻碍了红掌组织培养的正常进行。现以红掌‘红粉佳人’(Anthurium andraeanum cv. Sonate)品种为试材, 取健康植株幼嫩叶片为外植体, 对其愈伤组织培养过程中褐变现象进行研究。研究不同抗氧化剂、吸附剂(柠檬酸、抗坏血酸 VC、叶酸、聚乙烯吡咯烷酮 PVP、活性炭 AC)以及不同培养基硬度的防褐化效果。结果表明: 使用硬度为 5 g/L 琼脂的 MS 培养基, 并添加 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 0.2%可有效控制褐变并获得较高的愈伤诱导率。

关键词: 红掌; 组织培养; 外植体; 褐化

中图分类号: S 682.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)09-0160-03

红掌(*Anthurium andraeanum*)属天南星科(Araceae)花烛属(*Anthurium Schott*)^[1], 又名火鹤、安祖花、大叶花烛、红鹤芋、哥伦比亚花烛等, 是多年生附生常绿草本花卉, 原产于哥伦比亚和厄瓜多尔^[2]。其肉穗花序黄色^[3], 具有红色、橙色、黄色、粉色、绿色及白色蜡质佛焰苞, 高雅别致, 适合于高档场所和家庭室内摆放。红掌花期很长, 盆栽品种可以四季开花, 并且瓶插水养期可

长达 1 个月^[4] 是一种花叶兼赏的价值很高的名贵盆栽及切花的高档花卉, 深受人们喜爱。红掌通常以分株繁殖为主, 以扦插为辅, 繁殖速度很慢, 自然繁殖远不能满足市场需求, 所以组织培养已成为重要的繁殖途径, 但在组培过程中外植体的褐化现象成为亟待解决的难题。该研究旨在找出红掌组织培养过程中防止褐化的最佳条件, 从而提高红掌组培诱导率和繁殖系数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红掌品种‘红粉佳人’(Anthurium andraeanum cv. Sonate) 购自北京大兴苗圃, 以健康植株的幼嫩叶片为试材, 试验于 2009 年 3~5 月在河北农业大学生物无机化学重点实验室组培室进行。

第一作者简介: 杜敬然(1982-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士, 研究方向为植物营养与品质。E-mail: djr518@yahoo.com.cn

通讯作者: 方正(1963-), 男, 河北万全人, 博士, 研究员, 现主要从事植物营养研究方面的工作。E-mail: Fangzheng555@hebau.edu.cn

基金项目: 河北省科技厅博士基金资助项目(00547001 D-3)。

收稿日期: 2010-02-02

Optimization of Chromosome Sectioning and Karyotype Analysis of *Carthamus tinctorius* L.

NIU Li-tao^{1,2}, WANG Xiao-jun¹, HAO Xiu-ying³, LIU Min¹, KANG Xi-liang¹, YUAN Yong-xian^{1,2}

(1. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi, Xinjiang 830091)

Abstract: The different methods of the pretreatments and dissociations in chromosome sectioning of *Carthamus tinctorius* L. were compared. 500 top of root cells were observed, the proportions of metaphase cells and the metaphase cells which were suitable for karyotype analysis were compared. The results showed that the pretreatment with the mixture of 0.002 mol/L 8-Hydroxyquinolin and 0.1% Colchicine(v :v=1 :1) 8 h, 1 mol/L HCl at normal temperature 6 min performed well in the sectioning. The karyotype analysis revealed that the karyotype of *Carthamus tinctorius* L. was $2n=2X=24=24m$ and its index of $AS.K\%$ was 58.25%, the karyotype asymmetry belonged to 1 B type, its karyotype was symmetrical. This suggested that it was relatively primitive forms.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; karyotype analysis; chromosome number

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选取及预处理 以红掌品种‘红粉佳人’健康植株的幼嫩叶片为外植体试材, 首先用自来水冲洗干净, 于无菌室超净工作台上用 75% 的酒精处理 30 s, 再用 0.1% 的升汞处理 8 min, 最后用无菌水反复冲洗 5~6 次, 并反复震荡以彻底将升汞清除掉, 再用无菌滤纸吸干多余的水分后, 将叶片切成 4~6 mm 小方块接种于不同处理培养基中。每瓶接种 5 块外植体, 每个处理接 10 瓶, 重复 3 次。

1.2.2 培养基的选取 基本培养基均采用 MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L, 加入蔗糖 30 g/L, 除不同硬度试验培养基中加入不同浓度琼脂外, 其它试验处理均加入琼脂 5 g/L, 培养基 pH 5.8。培养基在 121℃下灭菌 25 min。

1.2.3 培养条件 培养温度为(25±2)℃, 光照时间为 13 h/d, 光照强度为 1 000~1 500 lx, 30 d 转瓶 1 次, 接种 60 d 后, 观察褐化情况, 并统计褐化率和愈伤诱导率。

1.2.4 不同添加物处理对外植体褐化及愈伤组织诱导影响 以 MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L 培养基为基本培养基, 添加不同抗氧化剂、吸附剂(柠檬酸、抗坏血酸(VC)、叶酸、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、活性炭(AC)), 设计不同添加物质试验处理, 以不添加任何吸附剂和抗氧化剂处理为对照。

1.2.5 不同硬度培养基处理对外植体褐化及愈伤组织诱导影响 以 MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L 培养基为基本培养基, 添加不同浓度琼脂, 设计不同硬度处理试验, 琼脂用量分别为 2、3、4、5、6 g/L, 同时每个处理加入 0.2% PVP。

2 结果与分析

2.1 不同添加物处理对外植体褐化及愈伤组织诱导的影响

表 1 不同添加物处理对外植体褐化的影响

处理	浓度	总数	褐化率/%	差异显著性	愈伤诱导率/%	差异显著性
柠檬酸	1 mg/L	50	35	b	B	65
抗坏血酸	1 mg/L	50	37	b	B	63
叶酸	1 mg/L	50	74	a	A	26
PVP	0.2%	50	26	bc	B	74
活性炭	0.2%	50	13	c	B	0

注: 小写字母表示方差分析差异显著(P<0.05); 大写字母表示方差分析差异显著(P<0.01)。

以接种培养 60 d 的褐化率衡量各处理抗褐化效果(见表 1), 在培养基中加入柠檬酸、抗坏血酸(VC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、活性炭(AC)都具有抗褐化效果。其中, 以加活性炭处理的褐化率最低。活性炭具有强大的吸附能力, 可以吸附褐色有毒物质, 减少有害物质对接种外植体的影响, 降低褐化率。虽然添加活性炭能使外植体褐化率显著低于其它处理, 使褐化率降到 13%, 但

活性炭同时也会吸附培养基中的生长调节剂, 使愈伤诱导率大大降低, 有碍红掌愈伤组织的形成。由此可见, 虽然活性炭能够有效降低红掌外植体的褐化率, 同时也抑制外植体愈伤组织的形成。因此, 活性炭并不是红掌愈伤组织形成过程中最佳的防褐化剂。在红掌愈伤组织形成过程中, 使用添加 PVP 的处理对防止外植体褐化的效果仅次于活性炭, 效果较好, 并且愈伤组织的诱导率也最高, 达到了 74%, 高于添加柠檬酸、抗坏血酸、叶酸的处理。即 PVP 在防止红掌外植体褐化的同时也促进了红掌愈伤组织的形成。因此, 5 个处理中, 0.2% PVP 处理效果最佳, 是防褐化的最佳处理。

2.2 培养基硬度对外植体褐化及愈伤组织诱导的影响

由表 2 可以看出, 培养基的硬度对红掌外植体褐变的影响较大。使用 2 g/L 的琼脂, 培养基硬度小, 几乎呈液体状, 接种后外植体褐变程度最深且愈伤诱导率最低。加大琼脂的用量, 可以增加培养基的硬度, 适当加大培养基硬度时, 褐变程度减轻。当培养基硬度达到处理 4, 即琼脂用量 5 g/L 时, 褐变率达到最低值 27%, 愈伤组织诱导率达到最高值 73%。随着培养基硬度进一步加大, 褐化率又出现上升趋势。分析认为, 当培养基硬度增大时, 虽然培养之初限制了褐色有毒物质外渗的量, 但是由于硬度过大, 使外植体外渗的有毒褐色物质聚集在外植体伤口附近难以扩散, 造成有毒物质的局部累积, 从而加大了褐化程度。试验结果表明, 以加入 5 g/L 琼脂的处理防止褐变的效果最好, 并且能够得到较高的愈伤诱导率。

表 2 不同硬度培养基对褐变的影响

不同硬度处理	琼脂浓度 / g · L ⁻¹	接种数 / 个	褐化率 / %	愈伤诱导率 / %
1	2	50	54 ^a	46 ^b
2	3	50	48 ^{ab}	52 ^{ab}
3	4	50	36 ^{ab}	64 ^{ab}
4	5	50	27 ^b	73 ^a
5	6	50	43 ^{ab}	57 ^{ab}

注: 小写字母表示方差分析差异显著(P<0.05)。

3 讨论与结论

外植体褐化是指在组培过程中, 由外植体向培养基中释放褐色物质, 致使培养基逐渐变成褐色, 培养材料也随之慢慢变褐而死亡的现象^[5]。Harel^[6]和 Kahn^[7]等的研究表明, 苹果和梨的组织褐变程度与其酚类物质含量密切相关。酚类物质含量高的品种更容易发生组织褐变。Dala 等^[8]对葡萄的褐变进行研究得到了同样的结论。褐化的发生是由外植体中的酚类化合物与多酚氧化酶作用被氧化形成褐色的醌类化合物, 醌类化合物在酪氨酸酶的作用下与外植体组织中的蛋白质发生聚合, 进一步引起其它酶系统失活, 导致组织代谢紊乱, 生长受阻, 最终逐渐死亡^[5]。在正常组织中, 由于酶与酚

被定位分隔或酶未受活化, 而不易发生褐变^[9]。因此外植体材料的生理状态, 不同的培养条件都能影响外植体中的酚类化合物与多酚氧化酶的作用, 因此均成为影响外植体褐变的因子。木本植物、单宁含量或色素含量高的植物容易发生褐变^[10]。这是由于酚类的糖苷化合物是木质素、单宁和色素的合成前体^[8]。酚类化合物含量高, 木质素、单宁或色素形成就多了, 而酚类化合物含量高同时也导致了褐变的发生。季节因素也不容忽视, Chevre^[11]曾报道, 欧洲栗在1月份酚类形成较少, 到5、6月份酚类含量明显提高, 褐变率达到最高。Reuveni 和 Kipnis^[12]用椰的完整胚、叶片作外植体进行培养, 很少发生褐变现象。因此, 外植体组织受伤害程度直接影响褐变。在切取外植体时, 应尽量减小伤口面积, 以减少褐变。采用叶片为外植体更容易褐化, 有研究表明, 油棕组织培养中采用胚培养较少褐变, 而叶片因组织高度分化容易褐变^[13]。研究并解决以叶片为外植体的褐化问题, 对于红掌的成功组织培养具有重要意义。该试验针对红掌组培中产生褐变的现象进行研究, 通过设置不同硬度培养基、添加抗氧化剂、吸附剂等处理方式, 筛选适宜的防止红掌外植体褐化的处理, 为红掌的组织培养提供更有效的技术方法。研究表明, 在防止褐化过程中具有重要作用的吸附剂活性炭具有强大的吸附能力, 王立娅等人研究表明活性炭对蝴蝶兰防褐化效果最佳^[14], 它主要吸附非极性分子和色素等大分子, 可以吸附褐色有毒物质, 从而减少一些有害物质的影响, 降低褐化率, 但活性炭同时也会吸附培养基中的生长调节剂, 有碍红掌愈伤组织的形成。有研究表明, 在棕榈组织培养中, 培养基中加入0.3%活性炭, 需要加入高浓度的生长素以诱发愈伤组织的形成^[15-16]。该试验也验证了活性炭的吸附无选择性这一重要结论。试验结果显示, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是酚类物质的专一吸附剂, PVP处理不仅能够有效的防止外植体褐化, 同时还能促进愈伤组织的形成, 培养基硬度为5 g/L时, 添加0.2%聚乙烯吡咯烷

酮(PVP)能有效抑制褐化并促进愈伤组织的形成。在植物组织培养过程中, 褐化现象普遍存在, 深入了解褐变机理, 寻找适合外植体培养的条件, 解决外植体褐变问题在植物组织培养发展过程中具有重要意义。

参考文献

- [1] 王若祥, 王赟. 花烛[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 1-2.
- [2] 李平英, 独军, 韩云花. 火鹤组织培养与快繁技术研究[J]. 甘肃林业科技 2005. 30(4): 30-33.
- [3] 北京市花卉研究所编. 室内花卉-新引进的国外观叶植物[M]. 北京: 中国经济出版社, 1989: 128-130.
- [4] 尤雅宜. 切花生产技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1994: 149.
- [5] 熊丽, 吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京: 化工出版社, 2003: 83.
- [6] Mager M, Harel. Polyphenol Oxidases plants [J]. Phytochemistry, 1979, 18: 173-215.
- [7] Kahn V. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rate [J]. Food Sci. 1977, 42: 38-43.
- [8] Dala M A, Sharma B B, Rao M S. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in in vitro cultures of grapevine [J]. Sci Hort, 1992, 51: 35-41.
- [9] 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, 1997: 238.
- [10] Davies M E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Planta, 1972, 104: 50-65.
- [11] Chevre A M. In vitro vegetative multiplication of chestnut [J]. Jhortsci 1983, 58(1): 23-29.
- [12] Reuveni O, Kipnis H L. Studies of the in vitro culture of date plant tissues and organs [J]. Pamphlet, 1974: 145: 20.
- [13] 陈正华主编. 木本植物组织培养[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 34-36, 408-419; 456-465; 466-480.
- [14] 王立娅, 方正. 蝴蝶兰组织培养中防褐化技术研究[J]. 河北农业大学学报 2008(5): 42-45.
- [15] Bonga J M, Durzan D J. 树木组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988: 25-26, 141-143; 175.
- [16] 周俊辉, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(增刊): 481-486.

Study on the Browning of Explants in Tissue Culture of *Anthurium andraeanum*

DU Jing-ran¹, ZHAO Bin¹, LI Ying-li¹, LI Rong-hua², FANG Zheng¹

(1. Key Lab of Bio-inorganic Chemistry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001; 2. Department of Biology, Cangzhou Teachers' College, Cangzhou, Hebei 061001)

Abstract: Tissue oxidative browning is a big problem which interferes with normal propagation of *Anthurium andraeanum* tissue culture. The young leaves of *Anthurium andraeanum* cv. Sonate were used as explants in order to study the browning of tissue culture. The treatments included two adsorbents; active carbon, PVP, three antioxidants; citric acid, VC, folic acid, and five culture medium. Results showed that the best treatment for the browning control of explanted tissue is the explants were cultured in MS with agar (5 g/L), added with 6-BA (1.0 mg/L), 2,4-D (0.2 mg/L), and PVP (0.2%).

Key words: *Anthurium andraeanum*; tissue culture; explant; browning