

# 香水白掌离体培养褐化反应的初步研究

毛红俊, 孔祥生, 张妙霞, 李海刚

(河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:**采用  $L^9(3^4)$  正交设计, 研究不同因素对降低白掌叶片愈伤组织褐化的作用, 三因素为大量元素、PVP 和继代次数; 另外还比较了不同继代周期、抗褐化剂、琼脂浓度对叶柄褐化的影响。结果表明: 叶片在 1/2MS 培养基中, 添加 PVP 1 000 mg/L, 5 d 继代 1 次, 抗褐化效果较好; 叶柄在 PVP 为 1 000 mg/L、琼脂浓度为 7 g/L 的培养基中, 5 d 继代 1 次的条件下, 抗褐化效果明显。

**关键词:** 白掌; 组织培养; 褐化

**中图分类号:** S 682.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)10-0182-03

香水白掌(*Spathiphyllum floribundum* Supreme)为天南星科白鹤芋属观赏植物, 它可以抑制人体呼出的废气如氨气和丙酮, 同时也可过滤空气中的苯、三氯乙烯和甲醛<sup>[1]</sup>。适宜作盆栽, 但是在自然条件下, 只能靠分株繁殖, 不能满足消费者的需求。通过组织培养可以加快繁殖速度, 但在组织培养过程中, 首先遇到的是外植体严重褐化而导致培养物死亡的问题, 阻碍了快繁的过程。该研究就白掌离体培养过程中外植体褐化的防止措施进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

香水白掌生长良好植株的叶片、叶柄为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 消毒方法及培养条件** 将材料用洗洁精水浸泡 30 min, 流水冲洗 30 min, 70% 的乙醇进行表面消毒 20~30 s, 0.1% 的升汞溶液处理 15 min, 无菌水冲洗 5~6 次。将消毒后的叶柄切成长度为 1 cm 左右的小段, 叶片切成 0.5 cm<sup>2</sup> 大小, 分别接种到相应的培养基中。叶片采用正交设计法, 叶柄设计单因子试验, 每个处理各重复 3 次。每种处理的培养基中均加入质量浓度为 30 g/L 蔗糖, 6 g/L 琼脂, 调节 pH 5.8。放置到温度 (25±2)℃, 光照时数 12 h/d, 光强 2 000 lx, 培养时间 30 d。每个处理的培养基中分别加入 2,4-D 1.0 mg/L, BA 1.0 mg/L, NAA 0.2 mg/L。

**1.2.2 各因素对降低叶片愈伤组织褐化率的影响** 取

未展开幼叶, 采用  $L_9(3^4)$  正交设计法, 因素为 A: 大量元素 (MS, 1/2MS, 1/4MS); B: PVP (500 mg/L, 800 mg/L, 1 000 mg/L); C: 继代时间 (5, 10, 20 d); D: 空白。研究不同因素对降低叶片愈伤组织褐化的作用。

**1.2.3 叶柄的抗褐化培养试验处理** 将材料经消毒后接种到 100 mL 的三角瓶中, 每种处理接种 6 瓶, 每瓶接 4 个外植体。每处理接种数都是 24 个。①不同继代周期: a. 培养每 10 d 转瓶 1 次; b. 培养每 20 d 转瓶 1 次; c. 培养每 30 d 转瓶 1 次。②不同种类和浓度抗褐化剂: 将材料接种到附加有不同抗褐化剂 MS+2,4-D 1.0 mg/L+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基中: a. VC, 分别为 5、10、15 mg/L; b. 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 分别为 500、800、1 000 mg/L; c. 对照 (空白)。③琼脂浓度分别为 5、6、7 g/L。

### 1.3 测定指标

褐化指数: 0 级为无或轻度褐变; 1 级为淡褐色; 2 级为较严重褐变, 褐色; 3 级为严重褐变, 黑褐色<sup>[3]</sup>。褐化率 = (有褐化现象外植体数 / 接种外植体数) × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同因素对叶片褐化的影响

从表 1 中可以看出, 不同因素处理中均有褐化现象的出现, 最高褐化率达 89.2%。表 1 极差分析表明, 各因素对叶片褐化的影响依次为 C>A>B。其中继代次数为最佳影响因素。A、B、C 3 个因素的理论最佳组合是 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>, 即按 1/2MS 的培养基, PVP 为 1 000 mg/L, 继代次数为 5 d 1 次。经验证, 在此条件下, 褐化率可降低到 12.1%。

### 2.2 叶柄褐变的试验处理

**2.2.1 不同继代周期对叶柄褐化的影响** 从表 2 中可知, 随着继代周期的延长, 褐化指数逐渐升高, 以 10 d 的继代周期褐化程度最低。转接的间隔时间越短, 褐化产

第一作者简介: 毛红俊(1983-), 女, 河南新乡人, 硕士, 研究方向为植物细胞工程。E-mail: maohongjun1208@163.com。

通讯作者: 孔祥生(1955-), 男, 河南省鲁山县人, 教授, 现主要从事植物生理学和生物技术的教学和科研工作。

收稿日期: 2010-03-01

生的酚类化合物就越少,褐化率就越低。

表 1 不同因素对叶片抗褐化的影响 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

试验号	A: 大量元素	B: PVP	C: 继代时	D: 空白	褐化率 / %
		/ mg · L <sup>-1</sup>	间/ d		
1	MS	500	5	1	89. 2
2	MS	800	10	2	67. 7
3	MS	1 000	20	3	23. 9
4	1/2MS	500	10	3	44. 5
5	1/2MS	800	20	1	61. 5
6	1/2MS	1 000	5	2	12. 1
7	1/4MS	500	20	2	78. 7
8	1/4MS	800	5	3	37. 3
9	1/4MS	1 000	20	1	31. 6
k <sub>1</sub>	62. 26	70. 80	46. 20	B> A> C	
k <sub>2</sub>	39. 37	55. 50	47. 93	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	
k <sub>3</sub>	49. 20	22. 53	54. 70		
R	22. 89	48. 27	8. 5		

表 2 不同继代周期对褐化的影响

继代周期 d	接种数/ 个	褐化数/ 个	褐化率/ %	显著差异/ P	
				0. 05	0. 01
10	24	3	13. 12	a	A
20	24	8	33. 34	b	B
30	24	22	91. 27	c	C

表 3 不同种类和浓度的抗褐化剂对褐化的影响

种类	浓度 / mg · L <sup>-1</sup>	接种数 / 个	褐化数 / 个	褐化率 / %	褐化程 度 级	差异显著/ P	
						0. 05	0. 01
VC	10	24	13	54. 23	2	d	D
	15	24	11	46. 78	2	e	E
	20	24	7	29. 12	1	g	G
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	600	24	16	67. 25	2	e	C
	1 000	24	7	29. 47	1	g	G
	1 500	24	18	75. 56	2	b	B
PVP	500	24	9	38. 67	2	f	F
	800	24	3	13. 36	1	h	H
	1 000	24	1	4. 21	1	i	I
CK		24	23	96. 37	3	a	A

2. 2. 2 不同种类和浓度的抗褐化剂对叶柄褐化的影响

从表 3 可知, VC、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 PVP 对白掌叶柄褐变的控制均有很大作用, 与对照相比, 单独使用 20 mg/ L 的 VC、1 000 mg/ L 的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 1 000 mg/ L 的 PVP 均能有效抑制褐变, 其褐变率分别 29. 12%、29. 47%、4. 21%, 其中 PVP 的抗褐化效果最好, VC 与 PVP 均是随着浓度的升高, 褐化率逐渐变低, 而 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 则是在 1 000 mg/ L 的条件下控制的褐化率最低。这说明不同的植物要选择适宜的抗褐化剂种类和浓度。抗褐化剂种类不同, 其效果不同。

表 4 不同琼脂浓度对褐化的影响

琼脂浓度 / g · L <sup>-1</sup>	接种数 / 个	褐化数 / 个	褐化率 / %	显著差异/ P	
				0. 05	0. 01
5. 0	24	21	88. 12	a	A
6. 0	24	13	54. 23	b	B
7. 0	24	4	16. 56	c	C

2. 2. 3 不同琼脂浓度对叶柄褐化的影响 从表 4 中可知, 琼脂量较少时, 褐化率平均可达 88. 12%; 但随着琼脂量的增加, 硬度增大, 褐化率随之下降。试验表明, 这 3 个处理差异显著, 但是在试验中发现培养基的琼脂量

过大会影响植物的生长和分化<sup>[9]</sup>。

3 讨论

组织培养中抑制褐变方法目前已有大量的研究, 如选择适宜的外植体、培养温度、pH 值, 培养时对外植体进行多次转移, 在培养基中添加抗坏血酸(VC)、亚硫酸钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等<sup>[6-8]</sup>。但在白掌组织培养中还未见相关抑制外植体褐化报道。该试验分别对白掌叶片、叶柄 2 个外植体做了不同抗褐化处理。

在筛选出白掌叶片抗褐化时, 最佳组合是 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>, 即按 1/2MS 的培养基, PVP 为 1 000 mg/ L, 继代次数为 5 d 1 次, 褐化率可降低到 12. 1%。叶柄接种转移到新培养基上, 间隔的时间越短, 褐变现象就会得到控制或大为减轻。在试验中可看出 PVP 对叶柄的抗褐化效果较好。PVP 是酚类物质的专一吸附剂, 在生化分离制备中常用于酚类物质和细胞器的保护剂。VC 抗褐化剂可以改变外植体周围的氧化还原电势, 对酚类物质的氧化起到抑制的作用, 从而减轻褐变<sup>[9,10]</sup>。试验中发现 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 也能有效的防止褐化, 可是阻碍了不定芽和愈伤组织的发生, 影响外植体的培养, 可能是在培养过程中产生了有害物质, 阻碍了培养的继续进行。而对于琼脂浓度来看, 琼脂浓度越高, 褐化率越低, 但是发现琼脂浓度过高会影响外植体的分化和生长, 所以要选择适宜的琼脂浓度。

褐化是植物组织培养中较为普遍的现象, 要想从根本上解决褐化问题, 需要对褐化发生的原因、生理生化遗传因素、植物品种等方面进行深入的研究。

参考文献

[ 1 ] 余亚白, 陈源, 赖呈纯. 室内空气净化植物的研究与利用现状及应用前景[ J ]. 福建农业学报, 2006, 21(4): 425-429.  
[ 2 ] 邹英宁, 李国怀, 樊青峰. 不同抗氧化剂对中国李茎段培养的影响[ J ]. 华中农业大学学报, 2006(25): 84-86.  
[ 3 ] 何松林, 陈笑蕾, 陈莉. 牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[ J ]. 河南科学, 2005, 23(1): 47-50.  
[ 4 ] 夏小环, 王静, 尹梅等. 非洲菊叶外植体组培中影响褐化因素及机理初探[ J ]. 西南农业学报, 2006, 9(1): 136-138.  
[ 5 ] 谢丽霞, 杜建伟, 李海杰. 植物组织培养中的褐变现象及解决途径[ J ]. 垦殖与稻作, 2006, (1): 62-63.  
[ 6 ] Ding J Q, Wang X M, Chander S, et al. Identification of QTL for maize resistance to common smut by using recombinant inbred lines developed from the Chinese hybrid Yuyu22[ J ]. J. Appl Genet, 2008, 49(2): 147-154.  
[ 7 ] 赵伶俐, 葛红, 范崇辉. 不同光照强度对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响[ J ]. 北方园艺, 2006(4): 160-161.  
[ 8 ] Ordas B, Malvar R A, Hill W G. Genetic variation and quantitative trait loci associated with developmental stability and the environmental correlation between traits in maize[ J ]. Genet Res, 2008, 90(5): 385-395.  
[ 9 ] 朱至清. 二十世纪我国植物学家对植物组织培养的贡献[ J ]. 植物学报, 2002, 44(9): 75-84.  
[ 10 ] 夏志会, 于志勇. 碧桃的繁殖与栽培管理[ J ]. 河北林业科技, 2005(8): 113.

# 利用 SSR 技术对黄瓜新品种津优 35 号进行种子纯度鉴定

张桂华, 李家旺, 张文珠, 李愚鹤

(天津科润农业科技股份有限公司 黄瓜研究所 天津 300192)

**摘要:** 利用天津科润农业科技股份有限公司建立并优化的黄瓜种子纯度鉴定技术体系, 筛选黄瓜新品种津优 35 号特异分子标记。所试验的 80 多对 SSR 引物中, 有 2 对引物(85 号和 212 号)在杂交种和亲本间表现多态性, 杂交种条带为父母本的互补型, 且特异性强, 适合做杂交种纯度鉴定。用该 2 对引物对津优 35 号 50 粒种子进行 SSR 鉴定。结果表明: 该 2 对引物鉴定结果相同, 且与田间鉴定结果吻合率高达 96% 以上, 表明所筛选到的 2 个 SSR 标记可以作为津优 35 的特异分子标记用于其种子纯度的鉴定。

**关键词:** 关键词: 津优 35 号; 纯度; SSR

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)10-0184-02

种子纯度鉴定是保证种子质量的关键环节。田间纯度鉴定一直是各育种单位采用的方法, 但是田间种子纯度鉴定需要等到结瓜期才能看到结果, 周期长、工作量大; 易受环境因素影响, 导致表型特征会有一定程度偏差; 或者由于不可抗拒的自然因素如连阴雨或冰雹等恶劣天气, 导致观察不到结果。以上种种不足都直接影响了种子的及时推广和销售, 造成种子积压。

分子标记技术的快速发展为种子的纯度鉴定提供了一种更为快速、高效的方法<sup>[1-4]</sup>。天津科润黄瓜研究所近几年来一直致力于建立利用分子标记技术进行种

子纯度鉴定的技术体系, 取得了很好的效果<sup>[5]</sup>。自 2007 年开始, 利用成熟的分子标记技术对大量的不同黄瓜品种进行了纯度检测, 纯度检测结果与田间纯度鉴定的结果吻合率高达 90% 以上, 为新品种的及时推广与销售赢得了时间, 提高了效率。该试验以天津科润黄瓜研究所培育的黄瓜新品种津优 35 号及其亲本为试材, 进行特异引物的筛选研究, 以期对津优 35 号新品种种子纯度的鉴定提供快速高效的鉴定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

“津优 35”黄瓜新品种及其亲本。

### 1.2 种子基因组 DNA 提取

采用催芽 48 h 的黄瓜根尖部分, 进行种子基因组 DNA 的提取, 在王全等<sup>[5]</sup>采用的提取方法的基础上稍作改动。

取单粒黄瓜发芽种子的根尖, 放到 1.5 mL 离心管

**第一作者简介:** 张桂华(1972-), 女, 博士, 副研究员, 现从事黄瓜生物育种研究。

**基金项目:** 天津市农业科技成果转化与推广资助项目(0802160); 天津市应用基础研究计划资助项目(07JCYBJC12200)。

**收稿日期:** 2010-01-04

## The Preliminary Studies on Browning Reactions *in vitro* of *Spathyllum patinii*

MAO Hong-jun, KONG Xiang-sheng, ZHANG Miao-xia, LI Hai-gang

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471003)

**Abstract:** This paper studied the effects of various on decreasing browning of *Spathyllum patinii* by L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) Orthogonal Design. Three factors were macroelement, pvp, subculture times; In addition, comparing of different subculture cycle, browning preventative reagent, agar concentration, on the browning of petioles. The results showed that blade in 1/2MS medium, adding pvp-1 000 mg/L, 5 days subculture once, anti-browning were better; petiole in the pvp of 1 000 mg/L, agar concentration of 7 g/L of the medium, 5 days subculture once, the effect of carbon source was obvious.

**Key words:** *Spathyllum floribundum*; tissue culture; browning