

库拉索芦荟组培中的褐变现象及防止

张红 (德州学院农学系, 山东德州 253023)

摘要 [目的] 研究库拉索芦荟组培中的褐变现象, 寻求防止褐变的有效措施。[方法] 以库拉索芦荟茎尖、中部茎段和根茎为外植体, 以 MS 为基本培养基, 分别附加 NAA 0.1 mg/L 和不同浓度的 6-BA (1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mg/L), 研究不同外植体类型、激素浓度以及培养温度、活性炭等因素对芦荟组培褐变的影响。[结果] 用库拉索芦荟茎尖做外植体, MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 做培养基, 芦荟组培褐化程度较轻; 培养基中加入活性炭 500.0 mg/L, 环境温度控制在 25 ℃ 有利于减轻褐变。[结论] 茎尖是最佳的外植体, 适宜的 6-BA 浓度 (2.0 mg/L) 可抑制褐变, 添加活性炭和适宜的培养温度均能防止褐变死亡的发生。

关键词 库拉索芦荟; 组织培养; 褐变

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)06-02257-02

Browning Phenomenon and its Prevention of *Aloe barbadensis* in Tissue Culture

ZHANG Hong (Department of Agronomy, Dezhou University, Dezhou, Shandong 253023)

Abstract [Objective] The purpose was to study the browning phenomenon of *Aloe barbadensis* in tissue culture and seek for the effective measure of preventing browning. [Method] With stem tips, middle stem segments and rhizomes of *A. barbadensis* as explants, MS was used as basic medium added NAA at 0.1 mg/L and 6-BA with different concentrations (1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 mg/L) resp. to study the influences of factors such as different explant types, hormone concentrations, culture temperature and active carbon, etc. on the browning of *A. barbadensis* in tissue culture. [Result] With the stem tips of *A. barbadensis* as explants, MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L as medium, the browning degree of *A. barbadensis* in tissue culture was lighter. Adding 500.0 mg/L active carbon into medium and controlling environmental temperature at 25 ℃ was in favor of lightening browning. [Conclusion] The stem tip was the best explant and the suitable 6-BA concentration (2.0 mg/L) could inhibit browning. Both adding active carbon and the suitable culture temperature could prevent the occurrence of browning and death.

Key words *Aloe barbadensis*; Tissue culture; Browning

库拉索芦荟为百合科芦荟属的多年生肉质植物, 其叶片厚实多肉, 含有多种活性物质, 具有医疗、保健、美容等多方面的用途, 具有广阔的开发利用前景。芦荟的常规繁殖不仅受季节限制, 而且繁殖速度慢, 易积累病毒。近年来, 通过组织培养来达到库拉索芦荟的快速繁殖已成为许多科研机构的重要课题, 但是褐变是芦荟组培中的一大难题。笔者对库拉索芦荟组培中的褐变现象进行了研究, 力求找到防止褐变的有效措施, 为库拉索芦荟的工厂化生产提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料 1 年生库拉索芦荟分蘖苗。

1.2 方法

1.2.1 外植体对褐变的影响。 将分蘖苗的叶、根去掉, 流水冲洗干净, 再将其茎剪成大小基本相同的 3 段 (茎尖、中部茎段、根茎), 经常规灭菌后接种于培养基 MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 每瓶接 1 个外植体, 每种外植体分别接种 30 瓶, 随时观察褐变情况, 以获得生长健壮的芽。培养基中加蔗糖 25 g/L、琼脂 7 g/L, pH 值调为 5.8~6.0, 培养温度为 25 ℃, 光照时数为 12 h/d, 光强为 2 000~3 000 lx (下同)。

1.2.2 不同激素浓度对褐变的影响。 以 MS 为基本培养基, 分别加 0.1 mg/L NAA 和不同浓度的 6-BA, 6-BA 浓度分为 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mg/L 5 个水平, 将由“1.2.1”获得的生长健壮的芽, 分别接种到不同的培养基中, 每处理接种 10 瓶, 每瓶 3 芽。培养 30 d 后统计褐变程度, 选出适宜的培养基。

1.2.3 活性炭对褐变的影响。 利用“1.2.2”选出的适宜的培养基。设置加入活性炭 500.0 mg/L 和不加活性炭两个处理。每瓶接种生长健壮的芽 3 个, 每个处理接种 10 瓶。培养 30 d

后统计褐变程度。

1.2.4 培养温度对褐变的影响。 将生长健壮的芽接种到选出的适宜的培养基上, 每瓶接 3 个芽, 分别取 10 瓶在 18、25、30 ℃ 3 种不同环境温度下培养, 30 d 后统计褐变程度。

2 结果与分析

2.1 外植体对褐变的影响 将茎尖、中部茎段、根茎 3 种不同的外植体接种到相同的培养基上培养。由于不同外植体的茎芽分化、再生能力不同, 其褐变发生时期与程度也不同。茎尖具有较强的分生能力, 整个外植体生长较旺盛, 不仅诱导的再生芽数明显多于根茎和茎段, 且褐变发生晚, 褐变程度低 (表 1)。

表 1 不同外植体在培养过程中的褐变情况

Table 1 Browning instance of different explants in tissue culture

外植体 Explants	接种数/个 No. of inoculated	污染数/个 No. of contaminated	褐变程度 Browning degree
茎尖 Stem tip	30	1	+
中部茎段 Middle stem segment	30	3	++
根茎 Rootstalk	30	5	+++

注: 褐变程度参照《树木组织培养》^[1]。+ 代表轻微褐变; ++ 代表中度褐变; +++ 代表严重褐变; - 代表褐变死亡。

Note: Browning degree referred to《Tissue Culture of Trees》^[1]. + means slightly browning; ++ means moderately browning; +++ means severely browning; - means browning and death. The same as below.

2.2 不同激素浓度对褐变的影响 不同激素浓度对库拉索芦荟组培中的褐变具有较大的影响, 6-BA 浓度过高或过低都对库拉索芦荟的生长分化不利, 表现为芽体暗绿, 褐化重。只有适宜的激素浓度才能使库拉索芦荟生长旺盛, 同时有效地抑制褐化的发生。试验发现, 2.0 mg/L 6-BA 对库拉索芦荟的生长分化比较适宜, 且褐变发生较轻 (表 2)。

2.3 活性炭对褐变的影响 在培养基中加入 500.0 mg/L 活

作者简介 张红 (1971-), 女, 山东德州人, 硕士, 讲师, 从事生物技术与作物遗传育种的教学和研究工作。

收稿日期 2007-11-26

性炭,能有效降低外植体的褐变(表3)。由表3可知,加入活性炭后,基本未褐变,但苗的增殖率有所下降。

表2 不同激素浓度对褐变的影响

Table 2 Effects of different hormone concentration on browning

培养基 编号 No. of medium	BA 浓度 mg/L BA concen- tration	NAA 浓度 mg/L NAA conce- ntration	芽的生 长状况 Growth status	褐变 程度 Browning degree
A ₁	1.0	0.1	分化少,生长缓慢,芽暗绿 With a little of buds differenti- ed, assumed sap green and slow growth	+++
A ₂	1.5	0.1	分化较少,芽暗绿 With less buds differentiated and assumed sap green	++
A ₃	2.0	0.1	分化较多,芽鲜绿,细长 With more buds differentiated, assumed fresh green and slight- ness	+
A ₄	3.0	0.1	分化多,芽短粗、绿 With many buds differentiated, assumed green, short and thick	+
A ₅	4.0	0.1	分化较少,芽暗绿 With less buds differentiated and assumed sap green	++

表3 活性炭对褐变的影响

Table 3 Effects of active carbon on browning

处 理 Treatment	芽的生长状况 Growth status	褐变程度 Browning degree
加活性炭 With active carbon	生长健壮,分化出苗数有所下降 Buds assumed robust growth, No. of dif- ferentiated seedling declined slightly	N
不加活性炭 Without active carbon	分化较多,芽鲜绿、细长 With more buds differentiated, assumed fresh green and slightness	+

注:N代表不发生褐变。

Note: N means no browning.

2.4 培养温度对褐变率的影响 库拉索芦荟培养过程中温

度应恒定。温度过低或过高,都不利于其生长,从而导致褐变的发生。研究认为,培养温度 25℃可降低褐变程度(表4)。

表4 不同培养温度对褐变的影响

Table 4 Effects of different temperature in tissue culture on browning

培养温度/℃ Culture temperature	芽的生长状况 Growth status	褐变程度 Browning degree
18	芽暗绿,生长慢 Buds assumed sap green and growth slowly	++
25	芽鲜绿、细长 Buds assumed fresh green and slightness	+
30	芽暗绿,生长缓慢 Buds assumed sap green and growth slowness	+++

3 结论与讨论

从库拉索芦荟不同外植体类型的褐变情况来看,几种类型的外植体材料均有不同程度的褐变,特别是随着时间的积累,外植体的褐变程度无一例外地加深,轻则抑制材料的生长,重则导致死亡。由于茎尖具有较强的分生能力,整个外植体生长较旺盛,其褐变程度较低,因此,茎尖是最佳外植体。培养基中适宜的细胞分裂素浓度可以减轻或抑制褐变,这在很多植物的组培研究中都得到证实^[2-3],该试验也表明,适宜的 6-BA 浓度(2.0 mg/L)对库拉索芦荟的褐变现象有较好的抑制作用。研究还发现,在培养基中添加 500.0 mg/L 的活性炭,采用适宜的培养温度(25℃),均能较好地防止库拉索芦荟褐变死亡的发生。

参考文献

- [1] 阙国宁,郭达初,李金田.树木组织培养[M].北京:中国林业出版社,1988.
- [2] 罗士韦,许智宏.经济植物组织培养[M].北京:科学出版社,1988.
- [3] 容世清,曾少玲.桉树无性系——湛江 6 号的工厂化微繁殖初报[J].桉树科技,1995(2):58-60.

(上接第 2252 页)

- [2] WIEGANT J, KALLE W, MULLENDERS L, et al. High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations[J]. Human Mol Genet, 1992, 1: 587-591.
- [3] PARRA I, WINDLE B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescence hybridization[J]. Nature Genet, 1993, 5: 17-21.
- [4] FRANZ P F, ALONSO-BLANCO C, LIHARSKA T B, et al. High-resolution physical mapping in Arabidopsis thaliana and tomato by fluorescence in situ hybridization to extend DNA fibers[J]. The Plant J, 1996, 9(3): 421-430.
- [5] 钟筱波, FRANZ P F, DE JONG J H. 在植物粗线期染色体和 DNA 纤维上的荧光原位杂交技术[J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 142-149.
- [6] 彭莉莉, 赵丽娟, 宋运淳, 等. 水稻中期染色体和 DNA 纤维的高效制备技术[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(4): 364-367.
- [7] LI ZONGYUN, HUANG SILUO, JIN WEIWEI, et al. Determination of copy number for 5S rDNA and centromeric sequence RCS2 in rice by Fiber-FISH[J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(3): 214-217.
- [8] BRUNNER R M, GOLDAMMER F T R. Genomic organization of the bovine aromatase encoding gene and a homologous pseudogene as revealed by DNA fiber

FISH[J]. Cytogenet cell Genet, 1998, 82(1/2): 37-40.

- [9] SUTO Y, ISHIKAWA Y, HYODO H, et al. Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis[J]. Hum Genet, 2000, 106(2): 164-171.
- [10] FRANZ P F, ALONSO-BLANCO C, LIHARSKA T B, et al. High-resolution physical mapping in Arabidopsis thaliana and tomato by fluorescence in situ hybridization to extend DNA fibers[J]. The Plant J, 1996, 9(3): 421-430.
- [11] DE JONG J H, FRANZ P F, ZABEL P. High resolution FISH in plants - techniques and applications[J]. Trend in Plant Science, 1999, 4(7): 258-263.
- [12] ZHONG X B, FRANZ P F, JANNIE WENNEKES VAN EDEN J, et al. FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato[J]. The Plant J, 1998, 13(4): 507-517.
- [13] LI JIA LI, JINLING YANG, QIONG TONG, et al. A novel approach to prepare extended DNA Fibers in plants[J]. Cytometry Part A, 2005, 63: 114-117.
- [14] MESBAH M, WENNEKES VAN EDEN J, DE JONG J H, et al. FISH to mitotic chromosomes and extend DNA fibers of Beta Procumbens in a series of monosomic addition to beet (*B. vulgaris*)[J]. Chromosome Research, 2000, 8: 285-293.