

文章编号:1001-4829(2007)04-0702-04

木立芦荟叶片愈伤组织诱导过程中防褐化的研究

李桂荣,赵润洲,梁玉陈

(河南科技学院园艺系,河南 新乡 453003)

摘要:以木立芦荟叶片作外植体,培养于附加6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L的MS培养基上。添加不同浓度的活性炭及维生素C附加物成分,研究木立芦荟在叶片愈伤组织诱导过程中,各种附加物成分对防止褐化的影响。结果表明:活性炭和维生素C均可有效防止褐化,2.0 g/L的活性炭或0.2 g/L的维生素C能不同程度的减轻褐化,效果最好,活性炭和维生素C配合使用时,以2.0 g/L活性炭与0.1 g/L维生素C配合使用时最理想。

关键词:木立芦荟;组织培养;褐化;活性炭;维生素C

中图分类号:S682.39 **文献标识码:**A

Study on browning control of leaf callus inducement in tissue culture of *Aloe arborescens* Mill.

LI Gui-rong, ZHAO Run-zhou, LIANG Yu-cheng

(Department of Horticulture, Henan College of Science and Technology, Henan Xinxiang 453003, China)

Abstract: Leaf of *Aloe arborescens* Mill. was cultured on MS + 6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L. Their effect was studied when we appended different concentration of active carbon and Vc to the medium. The result showed that the active carbon and Vc all could effectively prevent *Aloe arborescens* Mill. from browning. The optimal concentration of active carbon was 2.0 g/L. 0.2 g/L Vc was optimal. The optimal concentration of active carbon together with Vc was 2.0 g/L, and the Vc was 0.1 g/L.

Key words: *Aloe arborescens* Mill.; tissue culture; browning; active carbon; Vc

木立芦荟(*Aloe arborescens* Mill.)又名日本芦荟、树芦荟,为百合科(Liliaceae)芦荟属(*Aloe*)多年生肉质常绿草本植物,原产于非洲东南和阿拉伯半岛等热带地区,是一种集药用、观赏、美容保健于一身的植物^[1-2]。木立芦荟的繁殖一般采用扦插和分株方法,但繁殖速度较慢,而且容易积累病菌,影响生长,甚至造成退化。现阶段主要通过试管繁殖途径达到复壮、快繁的目的^[3-6]。但是在木立芦荟的组织培养过程中,经常发生外植体的褐化现象。它是由于组织中的酚类物质经氧化后产生棕褐色的醌类物质造成的。这类物质可抑制细胞中其他酶的活性,影响细胞的正常代谢,严重时可导致组织的死亡。外植体的褐化是植物组织培养成功的主要障碍

之一^[7-8]。木立芦荟在叶片愈伤组织诱导过程中总是存在组织褐化现象,这一现象严重影响了其分化和再生能力。本文利用木立芦荟的叶片作外植体,研究木立芦荟在叶片愈伤组织诱导过程中,不同浓度的活性炭和维生素C附加物成分对防止褐化的影响作用,以期今后木立芦荟叶片愈伤组织诱导过程中防止褐化的产生提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为盆栽日本木立芦荟(*Aloe arborescens* Mill.),在新乡市花卉市场购买。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 选取健壮芦荟叶片在自来水下冲洗干净,然后在无菌条件下用75%的酒精消毒30 s,再置于0.1%升汞溶液中处理10~14 min,最后用无菌水冲洗5~6次,切成约0.5~1 cm的小段,接种到培养基上进行培养。

收稿日期:2006-03-18

作者简介:李桂荣(1974-),女,回族,河南淮阳人,硕士研究生,讲师,从事园艺植物育种与生物技术教学与科研工作。

表 1 不同浓度的活性炭对外植体褐化的影响

Table 1 Effect of different concentration of active carbon on browning of the explant

活性炭浓度 Concentration of active carbon (g/L)	未褐化率(%) Rate of no browning	褐化率(%) Rate of browning	褐化颜色等级 Brown color grade *	愈伤组织性状描述 Callus character description
0.0	20.73	79.27	++++	淡绿色或绿色,霜状
0.5	23.78	76.22	++++	淡绿色,水渍状小颗粒
1.0	50.80	49.20	+++	灰白色,松软湿润
1.5	72.67	27.33	++	灰褐色,松软湿润
2.0	80.17	19.83	+	白色,雪状
2.5	77.26	22.74	++	乳白色,雪状
3.0	77.26	31.25	++	雪白色,雪状

注:1)褐化颜色等级共分成4个等级:最严重为第4级,黑褐色:++++;第3级,褐色:+++;第2级,淡褐色:++;第1级,轻度褐变:+。

2)褐化率=有褐变现象的外植体数/接种外植体数×100%。

1.2.2 培养基 均以 MS 为基本培养基,其中附加 6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L,并添加不同浓度水平的活性炭、维生素 C,组成各种培养基,pH 调至 5.8~6.0,蔗糖 3%,琼脂 0.7%。活性炭浓度设为 7 个水平:0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g/L。维生素 C 的浓度设为 4 个水平:0.0, 0.05, 0.1, 0.2 g/L 共 28 种处理。

1.2.3 培养条件 培养室温度:26±2℃,以日光灯为光源,每天光照 10~12 h,光照强度为 1800~2200 lx。培养一个月后,分别统计未褐化外植体和褐化外植体的数量,并对褐化情况以及愈伤组织的生长情况进行观察描述。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的活性炭对外植体褐化的影响

从表 1 可以看出:在 0.5~2.0 g/L 活性炭浓度范围内,随着浓度的增加,外植体未褐化的百分率逐渐增大。当活性炭的浓度增至 2.0 g/L 时,未褐化外植体的百分率达到最大值,达到 80.17%。然后随着浓度的增加,百分率却开始下降。说明在 0.5~2.0 g/L 的范围内,可发挥活性炭吸附特性的正

效应,防止木立芦荟的褐化;当浓度继续增加,则出现负效应。说明一定浓度范围的活性炭可促使褐化得到一定程度的控制。

2.2 不同浓度的维生素 C 对外植体褐化的影响

从表 2 可以看出:在培养基中加入抗氧化剂维生素 C,也可防止褐化,但效果不是太明显。在浓度为 0.20 g/L 时,防止效果较好,未褐化外植体的百分率达到 26.43%,但同对照相比效果并不显著。随着维生素 C 浓度的提高,对愈伤组织的形成却有明显的促进作用。所以当维生素 C 浓度达到 0.20 g/L 时,对于木立芦荟叶片愈伤组织的诱导及防止褐化的产生效果最佳。

2.3 不同浓度的活性炭和维生素 C 共同处理对褐化的影响

从表 3 可以看出:活性炭与维生素 C 配合使用在 0.05~0.10 g/L 浓度范围内,未褐化外植体的百分率随浓度增加而增大,其中 2.0 g/L 活性炭与 0.1 g/L 维生素 C 配合使用时最理想,能减少褐化的发生,未褐化率达到 85.73%,但是两者配合使用时诱导愈伤组织的效果没有单个使用时效果好。

表 2 不同浓度的维生素 C 对外植体褐化的影响

Table 2 Effect of different concentration of Vc on browning of the explants

维生素 C 浓度 Concentration of Vc (g/L)	未褐化率(%) Rate of no browning	褐化率(%) Rate of browning	褐化颜色等级 Brown color grade *	愈伤组织性状描述 Callus character description
0.00	28.11	71.89	++++	灰白色或灰褐色,松软湿润
0.05	21.96	78.04	++	淡绿色,水渍状小颗粒
0.10	23.82	76.18	+++	绿色,结构致密
0.20	26.43	73.57	++++	绿色,结构致密

表3 活性炭结合维生素C共同处理对外植体褐化的影响

Table 3 Effect of different concentration of active carbon and Vc on browning of the explants

活性炭浓度 Concentration of active carbon (g/L)	维生素C浓度 Concentration of Vc (g/L)	未褐化率(%) Rate of no browning	褐化率(%) Rate of browning	褐化颜色等级 Brown color grade	愈伤组织性状描述 Callus character description
0.5	0.05	21.74	78.26	++++	灰褐色,松软湿润
	0.1	31.90	68.10	++++	灰白色,松软湿润
	0.2	24.48	75.52	++++	乳白色,霜状
1.0	0.05	47.39	52.61	+++	白色,生长速度慢
	0.1	52.17	47.83	+++	白色,一些绿色突起
	0.2	59.78	40.22	++	雪白色,水渍状小颗粒
1.5	0.05	67.40	32.60	++	淡绿色,水渍状小颗粒
	0.1	71.28	28.72	++	淡绿色,霜状
	0.2	66.86	33.14	++	雪白色,雪状
2.0	0.05	81.75	18.25	+	淡绿色,结构致密
	0.1	85.73	14.27	+	淡绿色,生长速度快
	0.2	80.00	20.00	+	灰白色,生长速度最快
2.5	0.05	65.11	34.89	+	乳白色,分生能力差
	0.1	76.50	23.50	++	绿色,水渍状小颗粒
	0.2	71.23	28.77	+	绿色,分生能力强
3.0	0.05	73.65	26.35	++	灰褐色,分生能力一般
	0.1	66.82	33.18	+++	淡绿色,结构致密
	0.2	72.45	27.54	+++	雪白色,许多绿色突起

3 讨论与结论

褐化在植物组织培养过程中普遍存在,主要是由于外植体中的多酚氧化酶被激活,使细胞的代谢发生变化,酚类物质被氧化后产生呈棕褐色的醌类物质,它们会逐渐扩散到培养基中,抑制其他酶的活性,毒害培养的材料,对诱导外植体的脱分化和再分化产生重大影响,以至对一些植物的组织培养能否取得成功起到决定性的作用。褐化的影响因素极其复杂,培养材料的种类与品种、外植体材料的生理状态、营养状况、生长部位等内因,以及培养基成分、添加激素的种类和浓度、培养条件等外因,都会影响褐化发生^[7-8]。大量资料表明在组织培养中,添加活性炭和一些抗氧化剂氧化剂可大大减轻醌类物质的毒害。

一般认为^[9-10],活性炭能吸附培养基中的有害物质,如琼脂中所含的杂质,培养物在培养过程中分泌的酚、醌类物质,以及蔗糖在高压消毒时产生的5-羟甲基糠醛等。但是,我们知道活性炭的吸附作用是没有选择性的,在吸附褐化物质的同时,也会吸附培养基中的生长调节物质,而使其失去作用,因而对外植体的诱导分化会产生一定的负面影响。卜学贤等^[11]研究表明,每毫克的活性炭大约能吸附

100mg左右的生长调节物质。尤其是当较高浓度的活性炭与常量的生长调节物质同时使用时,活性炭常常抵消生长调节物质的作用。因此,我们在使用活性炭的时候,必须考虑其两面性,调整好活性炭与生长调节物质的用量,以使其能发挥最好的作用。从目前大量的组织文献^[9]来看,活性炭的使用浓度多在0.02%~1.0%之间,尤以0.1%~0.5%最常用。从本试验的研究可以看出,在一定浓度范围内,活性炭可以发挥其吸附特性的正效应,即吸附对外植体分化发育有害的物质,防止褐化;当浓度继续增加则出现负效应,逐渐开始吸附对外植体分化发育有益的物质,防止褐化的作用也在一定程度上开始减弱。另外,通过添加VC可改变外植体周围的氧化还原电势,从而抑制酚类氧化,减轻褐变^[10]。通过本试验的研究,接种在MS+6-BA 2.0mg/L+2,4-D 0.5mg/L培养基上诱导木立芦荟叶片愈伤组织的形成过程中,添加2.0g/L的活性炭或0.2g/L的维生素C或2.0g/L活性炭与0.1g/L维生素C配合使用时均能有效防止褐化的发生。

参考文献:

- [1] 史进元. 药用芦荟的主要品种[J]. 陕西农业, 2000(1): 17.
- [2] 张镜清. 芦荟[J]. 生物学通讯, 1999, 34(11): 44.
- [3] 丰 锋, 李洪波, 吕庆芳, 等. 芦荟的组织培养[J]. 北方园艺, 2000(1): 38-39.

- [4] 杨美纯,周歧伟,许鸿源. 芦荟的叶片组织培养[J]. 广西农业科学,2001(5):241-242.
- [5] 吴红芝. 木立芦荟的组织培养及快速繁殖[J]. 园艺学报,2000,27(2):151-152.
- [6] 傅术琳,徐重益,程智慧. 木立芦荟愈伤组织的诱导及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2002,38(2):139.
- [7] 王东霞,李长杰. 如何对抗植物组培中的组织褐化[J]. 中国花卉盆景,2002(12):29.
- [8] 高国训. 植物组织培养中的褐化问题[J]. 植物生理学通讯,1999,35(6):501-504.
- [9] 刘用生,李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯,1994,30(3):214-217.
- [10] 崔堂兵,郭勇,张长远. 植物组织培养中褐化现象的产生机理及克服方法[J]. 广东农业科学,2001,(3):16-18.
- [11] 卜学贤,陈维伦. 活性炭对培养基中生长调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报,1988,14(4):401-404.

(责任编辑 谢成英)