

观赏凤梨组织培养中防止外植体褐化的初步研究

彭筱娜, 易自力, 蒋建雄, 刘 亮

(湖南农业大学生物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 外植体褐化是观赏凤梨等许多植物离体培养过程中的常见问题。通过研究发现, 不同种类的观赏凤梨的褐化程度不一, 粉叶珊瑚凤梨褐化程度较红星凤梨和黄莺歌凤梨严重; 不宜选取凤梨的花序轴和花托部分作为外植体进行诱导; 而减少基本培养基中的氨态氮和 2, 4-D 浓度, 初始阶段进行 7 d 暗培养同样有助于减少褐化的发生。不同防褐化剂处理观赏凤梨外植体的实验表明, 在培养基中添加 200 mg/L 的抗坏血酸可以有效防止褐化产生, 而不影响外植体的培养过程。

关键词: 褐化; 观赏凤梨; 外植体

中图分类号: S686.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-060X(2007)04-0067-03

Preliminary Studies on Anti-browning During the Tissue Culture of *Bromeliaceae*

PENG Xiao-na, YI Zi-li, JIANG Jian-xiong, LIU Liang

(College of Bioscience and Technology, HNAU, Changsha 410128, PRC)

Abstract: Explant browning is a common problem during the tissue culture of *Bromelia*. Study was carried out on the factors resulting in browning of *Bromelia* in vitro culture. Results showed that the browning of *Aechmea fasciata* was more severe than that of *Guzmania* and *Vriesea charlotte*, and thalamus and inflorescence were not the suitable explant. Decreasing NH_4^+ and 2, 4-D, or 7 day's dark culture would reduce the browning. Results also showed that the medium supplemented with Vc (200 mg/L) could control browning of *Bromelia* efficiently.

Key words: browning; *Bromelia*; explant

观赏凤梨又名菠萝花, 为凤梨科多年生常绿草本花卉, 是国际花卉市场十分畅销的花卉之一。但是它的繁殖主要是通过分株方式, 时间限制十分明显, 只有当母株开花后才有子株的产生, 繁殖率低, 且苗期不整齐; 通过植物组织培养可以加快繁殖速度, 短期内可大量获得整齐度高的种苗, 因此通过组织培养快速繁殖凤梨是一条很理想的途径。然而, 在一些常见的观赏凤梨的离体培养过程中, 首先遇到的就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。笔者就观赏凤梨部分种类离体培养过程中的外植体褐化的防止措施进行了研究。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-03-26

基金项目: 长沙市科技局资助项目(K051003-22)

作者简介: 彭筱娜(1982-), 女, 湖南长沙市人, 在读硕士生, 研究方向为植物遗传学。

通讯作者: 易自力

1.1 试验材料

粉叶珊瑚凤梨(*Aechmea fasciata*), 红星凤梨(*Guzmania*), 黄莺哥凤梨(*Vriesea charlotte*)。

1.2 方 法

取粉叶珊瑚凤梨、红星凤梨以及黄莺哥凤梨的幼苗、花托和花序轴, 在流水下冲洗干净, 剥掉幼苗外层老的叶片, 剩下幼嫩的叶丛中央部分, 分别用 75% 酒精和 0.1% 的 HgCl_2 溶液浸泡消毒, 在 Na_2SO_3 、 NaHSO_3 溶液中浸泡 30 min 或在培养基中添加抗坏血酸等不同的防褐化剂处理后, 切下的幼苗茎段, 接种于诱导培养基, 暗培养 7 d, 转入光照培养(13 h/d)中, 培养温度 25 ~ 27 °C。采用粉叶珊瑚凤梨幼苗茎段来进行防褐化剂的筛选研究, 每个处理接种 10 个, 设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 基因型对外植体褐化的影响

将切割好的外植体不做任何处理直接放入培养基中, 不同供试材料其褐变的程度不同(见表 1)。研究发现, 花序轴纤维化程度过高, 接种后均快速褐

化死亡;而茎段普遍比叶片的褐化严重。就品种而言,粉叶珊瑚凤梨的褐化程度比红星凤梨、黄莺歌凤梨更加严重一些,黄莺歌凤梨的褐化程度相对较轻;并且不采取任何防止褐化的措施,外植体均会由于褐化而死亡。

表1 观赏凤梨种类与褐化的关系

品 种	培 养 天 数			
	1 d	2 d	3 d	4 d
粉叶珊瑚凤梨	++	++	+++	+++
红星凤梨	+	++	++	+++
黄莺歌凤梨	+	+	++	++

注:N(没有褐化),+(轻度褐化),++(中度褐化),+++ (严重褐化),下同。

2.2 不同消毒剂处理对外植体褐化的影响

取粉叶珊瑚凤梨的幼苗,流水下洗净后做4个处理:(A)先用75%酒精浸泡5 s后,于0.1%的 HgCl_2 溶液中浸泡8 min;(B)先用75%酒精浸泡5 s后,于0.1%的 HgCl_2 溶液中浸泡10 min;(C)直接用0.1%的 HgCl_2 溶液消毒8 min;(D)0.1%的 HgCl_2 溶液消毒10 min,作为对照。研究发现(表2),用75%酒精处理外植体,明显地加剧了褐化程度;用0.1%的 HgCl_2 溶液消毒8 min和10 min,褐化程度的差别不大,证明用0.1%的 HgCl_2 溶液消毒处理对褐化的影响不大。

表2 不同消毒剂处理对褐化的影响

消毒剂处理	培 养 天 数			
	1 d	2 d	3 d	4 d
A	++	+++	+++	+++
B	++	+++	+++	+++
C	+	++	++	+++
D	+	++	++	+++

2.3 光照条件及培养方式对外植体褐化的影响

在诱导阶段的培养过程中,将接种后的培养物分别进行光照培养和暗培养。研究发现,开始阶段适当的暗培养有助于减少褐化的产生或者减轻褐化的程度。但长时间的暗培养会阻碍愈伤组织和不定芽的产生。在培养的起始阶段连续暗培养7 d是比较适合的。

将外植体分别用固体和浅层液体培养两种方式进行培养,培养基中没有添加防褐化的物质。实验结果显示,浅层液体培养^[1]对于防止褐化并没有明显作用;而在添加防褐化物质的前提下,固体培养相比浅层液体培养更加简单,容易操作。

2.4 基本培养基对外植体褐化的影响

将基本培养基设为 N_6 、 B_5 、MS、1/2MS和改良MS(有机成分改为 B_5 培养基的,其余不变),以MS培养基作为对照,分别附加相同的激素成分,蔗糖3%,琼脂0.8%, $\text{pH}5.8 \sim 6.0$ 。由表3可以明显地看出,MS培养基要比其它培养基褐化速度更快,而其它基本培养基之间则没有明显的差异。

表3 基本培养基对褐化的影响

基本培养基	培 养 天 数			
	1 d	2 d	3 d	4 d
MS(CK)	+	++	++	+++
1/2MS	+	+	++	+++
改良 MS	+	+	++	+++
N_6	+	+	++	+++
B_5	+	+	++	+++

2.5 不同防褐化剂处理对外植体褐化的影响

采用了在培养基中添加抗坏血酸,以及将切割后的茎段和叶片在防褐化剂 Na_2SO_3 和 NaHSO_3 溶液中浸泡30 min的方法,以没有任何防褐化处理的外植体作为对照。研究发现(见表4),添加200 mg/L抗坏血酸的培养基,以及用800 mg/L的 Na_2SO_3 溶液浸泡切割后的外植体30 min,都能够很好的防止褐化的产生;暗培养一周后转移至光照培养,外植体都没有发生褐化现象。然而在接下来的培养过程中,添加了抗坏血酸的培养基中的茎段在15~20 d的时间内都有不定芽的产生,叶片也有愈伤组织的产生;用800 mg/L的 Na_2SO_3 溶液浸泡后的材料则很少有不定芽和愈伤组织产生。因此认为,在培养基中添加200 mg/L的抗坏血酸能够较好地防止褐化,并且不影响分化。

表4 不同的防褐化处理对外植体褐化的影响

防褐化剂	处理 用量(mg/L)	培 养 天 数			
		2 d	4 d	6 d	8 d
Na_2SO_3	500	N	+	+	+
Na_2SO_3	800	N	N	N	N
Na_2SO_3	1 000	N	N	N	N
NaHSO_3	500	+	+	++	++
NaHSO_3	800	N	+	++	++
NaHSO_3	1000	N	+	++	++
Vc	45	++	++	+++	+++
Vc	100	+	++	++	+++
Vc	200	N	N	N	+
Vc	300	N	N	N	+
对照	0	++	+++	+++	+++

2.6 激素 2,4-D 对外植体褐化的影响

设4个处理,在所有培养基中都添加了200 mg/L的抗坏血酸和不同浓度的2,4-D,以没有添加2,4-D的培养基作为对照。由表5可以看出随着浓度的升高,其褐化程度也随着加剧。在能有效诱导愈伤组织的前提下,4 mg/L的2,4-D是比较合适的。

表5 2,4-D 对外植体褐化的影响

处 理		培 养 天 数			
培养基	用量(mg/L)	2 d	4 d	6 d	8 d
改良 MS	对照	N	N	N	N
改良 MS+2,4-D	2	N	+	+	+
改良 MS+2,4-D	4	N	+	+	+
改良 MS+2,4-D	6	+	++	++	++

3 讨 论

3.1 观赏凤梨基因型及外植体种类、大小与褐化的关系

实验表明,不同种类的观赏凤梨因其基因型不同,可能导致其褐化程度有所不同,如本实验中红星凤梨的褐化程度比粉叶珊瑚凤梨要轻,在其它种类的风梨中可能存在更大的差异,这与周俊辉等^[2]的实验结果相似。由于凤梨科植物的茎段都非常短,所以取材时注意不要选取太小的幼苗,在切割外植体如茎段、叶片的时候,大小适宜是非常重要的,每一个外植体在0.5 cm左右,尽可能地减少伤口,这样能够减轻褐化程度,大大提高外植体的成活率。在诱导愈伤组织的过程中,无论用哪种对于其它外植体均有效的防褐化措施来处理黄莺哥凤梨的花托和花序轴,都不能有效改善其褐化的程度。而笔者曾经用莺哥凤梨属的其它种类的茎段成功地诱导出不定芽,因此认为观赏凤梨的花序轴和花托部分不适合作为外植体进行组织培养。

3.2 培养基成分与褐化的关系

褐化是由植物伤口分泌出的酚类化合物引起的。一般认为当切割外植体时,正是损伤细胞内的酚类物质被氧化成醌,才导致外植体褐化。而培养基中的无机物可能是一些氧化酶合成及进行生理生化作用所必需的,因此对基本培养基的无机物进行调整有利于减少褐化死亡,提高诱导率。王玉珍等^[3]认为, Mn^{2+} 是参与酚类合成与氧化酶类的组成成分或辅因子,可促进褐化发生,因此锰含量降低有利于外植体生长。本实验中,其它4种培养基中均

减少了无机物的成分,因此,外植体生长均优于MS培养基,推测认为氨态氮的减少可能是褐化减轻的重要原因之一。而激素2,4-D的使用明显地加剧了褐化的产生,因此要严格控制2,4-D的浓度。

3.3 培养条件和培养方式与褐化的关系

本实验中,初始阶段7 d的暗培养有效地减轻了褐化程度,这与桉树^[4]、中国李^[5]的组织培养情况相似,而与霍霍巴的情况相反。这可能是由于光照加速了各类氧化酶的活动,而暗培养则在不影响外植体生理活力的前提下减缓了氧化过程,才会减轻褐化程度。在金钱树愈伤组织诱导过程中,采用液体培养对防止褐化有很好的作用^[6],而本实验中,培养方式的改变并没有起到防止褐化的作用。这可能是因为凤梨外植体不大,在液体培养时外植体呼吸不良,生理活力降低,虽然液体培养有利于毒性物质扩散,但是与固体培养并没有明显差异。

3.4 防褐化剂的作用

防褐化剂一般分为两种:一种是防止酚氧化的抗氧化剂;一种是吸收醌类物质的吸附剂。在外植体诱导过程中,吸附剂虽然可以吸附毒性物质,减轻褐化,可是同时也吸收培养基的营养物质,不利于外植体的培养。本实验中有效防止褐化的是两种抗氧化剂,其作用机制是不同的: Na_2SO_3 和 $NaHSO_3$ 主要是影响酚类化合物与酶结合;Vc是将酶还原^[7]。虽然 Na_2SO_3 的防褐化作用最佳,可是不利于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200 mg/L的Vc作为一种有益的添加物,可以有效地防止褐化,促进外植体的培养。

参考文献:

- [1] 钟红梅,曹明华.八宝剑凤梨的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,1998,34(3):202.
- [2] 周俊辉,王国彬,曾浩森.观赏凤梨嫩吸芽离体培养中褐化防止的初步研究[J].仲凯农业技术学院学报,2000,13(1):5-9.
- [3] 王玉珍,董玉惠,史印山,等.霍霍巴的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2005,41(6):835-840.
- [4] 欧阳磊.桉树组培快繁中存在的问题与对策[J].福建林业科技,2006,33(1):203-206.
- [5] 邹英宁,李国怀,樊青峰,等.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(1):84-86.
- [6] 唐利球,唐君海,陆祖正,等.金钱树愈伤组织的诱导及其褐化的防止[J].广西热带农业,2005,(3):12-13.
- [7] 丁连忠.抗坏血酸衍生物抑制蘑菇的多酚氧化酶[J].食品科学,1999,20(2):22-25.