

文章编号:1001-4829(2006)01-0136-03

非洲菊叶外植体组培中影响褐化因素及机理初探

夏小环¹,王 静¹,尹 梅²,陈志伟¹,陈善娜^{1*}

(1. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091; 2. 云南省农业科学院, 云南 昆明 650205)

摘 要:用5种不同成分的培养基分别在光照和黑暗条件下对非洲菊叶外植体进行组织培养,筛选出对褐化影响最重和最轻的分别是Fe盐加倍和1/2MS培养基。并对影响非洲菊叶片组培褐变中的几个相关酶活性和总酚含量变化做了一些初步研究,结果表明,随着褐化程度加深POD活性有下降趋势,PAL活性和总酚含量有上升趋势。为防止褐化,应在POD活性下降和PAL活性及总酚含量上升前加入抑制褐化的试剂。

关键词:非洲菊;组织培养;褐化;POD;PAL;总酚

中图分类号:S682.1⁺1 **文献标识码:**A

Study on factors and mechanism affecting browning of *Gerbera jamesonii* in tissue culture

XIA Xiao-huan¹, WANG Jing¹, YIN Mei², CHEN Zhi-wei¹, CHEN Shan-na^{1*}

(1. College of Life Science, Yunnan University, Yunnan Kunming 650091, China; 2. Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Kunming 650205, China)

Abstract: The leaf of flameray gerbera was cultured with five different culture media in dark and light respectively. Results showed that the worst and lightest browning were double Fe and 1/2MS culture medium separately. Studies on the changes of enzymic activity and phenol content concerned with browning indicated that the POD activity descended with the increasing of browning, while the PAL activity and phenol content increased with the degree of browning increasing. To prevent browning, reagents of anti-browning should be added before POD activity descends and PAL activity and phenol content increase.

Key words: flameray gerbera; tissue culture; browning; POD; PAL; phenol

非洲菊(*Gerbera jamesonii*)又名扶郎花,为菊科(Compositae)扶郎花属多年生宿根草本观赏植物,是目前世界上极为普遍的鲜切花之一。目前,在以转花色基因和抗病虫基因的非洲菊遗传转化体系中,通常采用非洲菊外植体愈伤组织与根癌农杆菌共培养获得转化植株。而在诱导愈伤过程中,由于材料基因型、生理状况和培养条件等因素影响,外植体会发生不同程度的褐化,严重影响了诱导愈伤分化、再生芽形成。因此,解决非洲菊诱导愈伤过程中褐化问题具有重要的意义。本研究针对影响非洲菊组培褐变中的几个相关酶活性和总酚含量的变化做了一些初步探索,同时,对几种常见的抗褐化剂防止褐化效果作了一些比较实验,以期为进一步解决褐化问题提供理论依据和可能的实施方案。

1 材料与方法

1.1 植物材料及预处理

非洲菊无菌苗及盆栽非洲菊均由云南省农科院提供。

筛选实验:为比较不同培养基对褐化程度的影响,选取1/2MS、MS和大量元素加倍、微量元素加倍、Fe加倍5种基本培养基,选取生理状况相似的非洲菊无菌苗叶片剪切成0.5 cm×0.5 cm大小分别接种到5种培养基中,分别置于黑暗和光照条件下培养。接种后开始连续观察数天,15 d后褐化达到稳定,筛选出褐化程度最轻和最重的两组。

外植体消毒:选取生长状况相似的盆栽非洲菊叶片若干,自来水洗净,流水冲洗30 min,用75%酒精浸泡15 s,0.1%升汞加吐温-20数滴溶液浸泡15 min,并用玻棒搅动,用无菌水冲洗5次^[1],滤纸吸干,打孔器打孔,将打下的叶片分别接种到Fe加倍和MS培养基中,25℃光照(10 h/d)条件下培养。

收稿日期:2005-09-21

基金项目:云南省科技攻关项目(2001NT22)

作者简介:夏小环(1980-),女,湖北孝感人,在读硕士,主要从事植物生理及分子生物学方面的研究,*为通讯作者。

外植体培养:前期实验结果证实,微量元素加倍、大量元素加倍及 Fe 盐加倍等有促进外植

体发生褐变的作用,其中 Fe 盐加倍使褐变发生最为严重。因此,本实验设定两组不同的培养

基进行非洲菊叶片外植体的培养,第一组用 MS 培养基(正常)培养材料,第二组采用 MS 培养基 Fe 加倍进行外植体培养。对第 2、4、6、8、10 d 的叶片外植体材料,分别测定不同褐变阶段的 PAL 活性,POD 活性和总酚含量。

1.2 实验方法

1.2.1 POD 的测定^[2] 称取植物材料 0.5 g,加 20 mmol/L KH_2PO_4 5 mL 于研钵中磨成匀浆离心 15 min,倾出上清液,残渣再用 KH_2PO_4 5 mL 溶液提取一次,合并两次上清液存于冰箱备用。取比色杯两只,在一只中加入 POD 反应液 3 mL, KH_2PO_4 1 mL,作零对照,另一只中加入 POD 反应液 3 mL,上述酶液 1 mL,开始计时。于 470 nm 波长下测量吸光度值,每隔 1 min 读数 1 次,共记录 5 次。

1.2.2 PAL 的测定^[3] 取待测叶片 0.45 g,加 10 mL 含 5 mmol/L 的巯基乙醇硼酸缓冲液,0.5 g 聚乙吡咯烷酮(PVP),加少量石英砂在研钵中于冰上研磨,10 000 r/min 离心 15 min,上清液为酶粗提液。测定与计算:1 mL 酶液加 1 mL 0.02 mol/L 苯丙氨酸,2 mL 蒸馏水,总体积为 4 mL。以蒸馏水作对照,反应液先 30 ℃ 恒温水浴,0.5 h 后在 290 nm 处测定吸光度。以每小时在 290 nm 处吸光度变化 0.01 所需酶量为一个单位(相当每毫升反应液混合物形成 1 μg 肉桂酸)。

1.2.3 总酚含量的测定 取剪碎的非洲菊叶片 0.5 g,用 80 % 的甲醇作提取液研磨,过滤,定容 15 mL。取提取液 1 mL,加蒸馏水 6 mL,酚试剂 0.5

mL,充分混匀后静置 3 min,然后加入饱和碳酸钠 1 mL,再加入蒸馏水 1.5 mL。反应 1 h 后测定 725 nm 处的吸光值,以蒸馏水为空白。用 (+) - 儿茶素作标准曲线,计算总酚含量,以 mg/gFW 表示^[4]。

标准曲线的制备,采用香荚兰素盐酸法,方法见参考文献^[5]。得到回归方程 $C = 0.0901A - 0.0182$,相关系数为 0.9995,且标准品儿茶素在 0.398~5.179 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系。

1.2.4 添加抑制剂 在诱导愈伤培养基 MS + 6-BA 6 mg/L + NAA 1.5 mg/L + 琼脂 9 g/L + 蔗糖 30 g/L (pH=5.8) 中分别加入 0.5 g/L PVP、1 g/L 硫代硫酸钠、3 g/L 活性炭和 15 mg/L 维生素 C,诱导愈伤,观察非洲菊叶片褐化情况。

2 结果与分析

2.1 筛选实验结果

褐化程度从重到轻次为 Fe 盐加倍、微量元素加倍、MS、大量元素加倍、1/2MS,并且在黑暗条件下外植体褐变严重,在光照条件下外植体褐变发生晚,程度轻。这与许传俊等^[6]人研究蝴蝶兰叶外植体褐变发生时结果有所不同,这可能与外植体材料、光照、基因型、培养基成分差异有关。

2.2 过氧化物酶(POD)的测定结果

由图 1 可见,在培养开始的前两天,POD 活性呈上升趋势,Fe 盐加倍组在第 4 天出现一个峰值,MS 组在第 2 天出现一个峰值,该结果与张君诚^[7]等在银杏细胞培养中结果一致。这个峰值的出现可能是叶片组织被切割接种而引起的损伤反应,因为 POD 是一种诱导酶,在植物体内易被诱导。我们的结果也证实了 Calston 等^[8]和 Ridge 等^[9]提出关于 POD 的“由于机械切割使合成受阻抑,或使该酶合成抑制物渗漏而使该酶活性增加”的观点。POD 分别在第 2 天和第 4 天以后酶活性有所降低,这是因

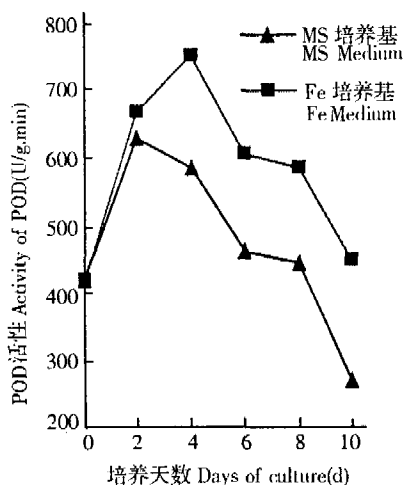


图 1 过氧化物酶活性与培养时间的关系

Fig.1 The relationship between the enzymic activity of POD and culturing time

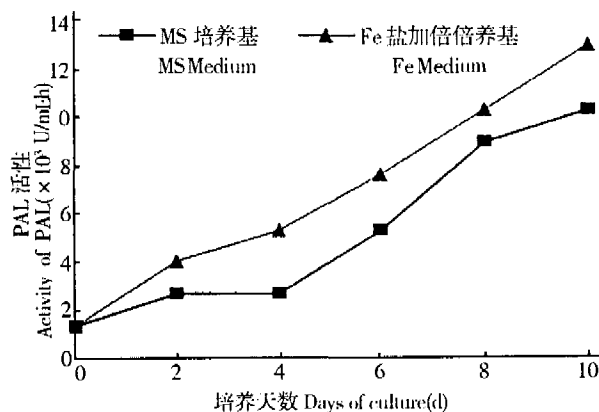


图 2 苯丙氨酸解氨酶活性与培养时间的关系

Fig.2 The relationship between PAL activity and culturing time

为此材料开始出现褐化且随着培养时间的推移褐化程度逐渐加深。这就验证了 POD 与褐化的相关性。在培养过程中我们还可以观察到培养在 Fe 加倍培养基中的材料其褐化在程度和量上都比培养在 MS 培养基中的材料深。从图 1 我们也可以看出 Fe 加倍组的酶活总体水平都比 MS 培养基组高。这是因为培养的起始阶段 Fe 加倍组比 MS 组 POD 的积累量要大,尽管后来二者酶活都有所降低,但 POD 总体水平还是 Fe 盐加倍组高。

2.3 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的测定结果

由图 2 可以看出,在材料培养过程中,随着时间推移和褐化程度加深, PAL 活性有上升趋势,并且 Fe 盐加倍组比 MS 培养基活性更高。可以看出在开始培养后 PAL 活性快速增加,第 10 天时 Fe 加倍组酶活性约为开始培养时的 10 倍;1/2MS 组酶活约为开始培养时的 7 倍。原因可能是植物在遭受机械诱导时,其防御系统特别是苯丙烷类代谢开始被激活,促使 PAL 活性上升以产生较多植保素、木质素等来减少植物所受的伤害^[6-7]。

2.4 总酚含量的测定结果

从图 3 可以看出,随着外植体褐变增强总酚含量逐渐提高,与总酚含量显著正相关,说明非洲菊外植体褐变时酚类与褐变关系密切。

2.5 添加抑制剂

在诱导愈伤培养基中添加抗褐化抑制剂实验中,得出 0.5 g/L PVP 对于防止外植体褐变效果最好,1 g/L 硫代硫酸钠次之,3 g/L 活性炭和 15 mg/L 维生素 C 的效果不明显的结论。

3 讨 论

关于植物组织培养的褐化问题,前人做过许多研究,但以非洲菊为材料还未见报道。

在筛选实验中,对褐化程度影响从重到轻依次是 Fe 盐加倍、微量元素加倍、MS 培养基、大量元素加倍、1/2MS 培养基。理论上我们应该选择 Fe 盐加倍培养基和 1/2MS 培养基进行下一步实验,但是考虑到 1/2MS 培养基虽然能减轻褐化,但它所有成分都减半不利于材料生长和愈伤分化,同时在实际材料培养中通常采用的都是 MS 培养基,所以,我们选择 Fe 盐加倍和 MS 培养基更具有现实意义。

由于无菌材料数量有限,所以选用盆栽非洲菊外植体进行前期培养,并在材料的选择上,尽量取苗龄相同、生长部位相似的叶片,以保证试验材料处于同一生长水平。

本实验充分证实了植物材料基因型、培养条件、培养基成分可能共同影响着非洲菊外植体的褐化。

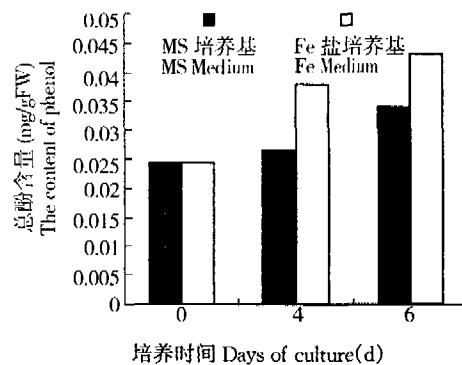


图 3 总酚含量与培养时间的关系

Fig. 3 The relationship between the content of phenol and the culturing time

实验还表明,外植体在褐变发生前 POD 活性升高,褐变发生后酶活下降;总酚含量随着褐变增强而逐渐提高,同时 PAL 活性与总酚含量呈显著正相关,说明非洲菊外植体褐变时总酚与褐变密切相关, PAL 参与了褐变的发生过程。因此,为防止组培过程中的褐化,添加抑制褐化的试剂应选择在 POD 活性开始下降, PAL 活性和总酚含量开始显著上升之时。这样,既不会抑制组织的正常生长,又能解决褐化问题。

在添加抗褐化抑制剂实验中,0.5 g/L PVP 对防止外植体褐变效果较好,而当高于此浓度时,褐化情况有所加重。另外,对目前组培中常用的防褐化剂活性炭(A.C.),虽有较强的吸附能力,能吸附外植体表面所形成的多酚氧化物,但因 A.C. 除能吸附多酚氧化物外,还能吸附培养基中的营养成分,会使外植体由于得不到应有的养分而逐渐衰竭,变褐乃至死亡。

参考文献:

- [1]肖显华,王顺珍.植物材料表面消毒方法的改进[J].生物技术,1999,9(1):43-45.
- [2]张志良.植物生理学实验指南(第二版)[M].北京:高教出版社,1990.
- [3]李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高教出版社,2000.
- [4]严守雷,王清章.藕节中总酚含量的福林法测定[J].华中农业大学学报,2003,22(4):412-414.
- [5]陈炳华,李淑慧.4种鳞毛蕨科植物中总酚含量的分析[J].福建师范大学学报,2003,19(1):86-90.
- [6]许传俊,李玲.蝴蝶兰叶外植体褐变发生机理研究[A].见:中国植物生理学会,中国植物生理学会第九次全国会议论文摘要汇编[C].贵阳:2004.
- [7]张君诚.银杏叶愈伤组织增殖过程中生理生化特性的研究[J].三明师专学报,1999(3):21-25.
- [8]Calston A W. Hormonal regulation in higher plants [J]. Science, 1969, 163: 1228-1292.
- [9] Ridge, Regulation of peroxidase activity by ethylene in *Pisum sativum*: requirements for protein and RNA Synthesis [J]. EXP. Bot., 1970, 21: 720-734.

(责任编辑 王家银)