

# 外源 $\text{NH}_4^+$ 对非洲菊舌状花着色与生长的影响

黄志刚<sup>1,2</sup>, 梁敏婷<sup>1</sup>, 邹德乐<sup>1</sup>, 高苏娟<sup>1</sup>, 王小菁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; <sup>2</sup>湖南农业大学生物科学技术学院, 植物激素与生长发育湖南省重点实验室, 长沙 410128)

**摘要:** 在非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 舌状花离体培养条件下, 研究了外源  $\text{NH}_4^+$  对花瓣着色与生长的影响。结果表明,  $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4^+$  明显抑制舌状花花瓣的着色与展开, 宽度、鲜样质量和干样质量也明显下降。对照 (3%蔗糖溶液) 舌状花花色素含量在 36 h 后开始缓慢增加, 54 ~ 84 h 快速积累, 以后增加较慢。在 36 h 之内进行  $\text{NH}_4^+$  处理, 可完全抑制着色与展开, 而 36 h 之后进行处理则抑制作用减弱。 $\text{NH}_4^+$  处理时间长于 12 h, 则抑制作用更加明显。 $\text{NH}_4^+$  处理下, 蔗糖含量的增加能够促进花色素苷的积累, 果糖、乳糖、麦芽糖和葡萄糖等不影响  $\text{NH}_4^+$  对着色的抑制作用。

**关键词:** 非洲菊; 氨态氮; 舌状花; 着色; 花色素苷; 生长

中图分类号: S 682.1<sup>+</sup>1; Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 04-0599-06

## Effects of Exogenous Ammonium on the Pigmentation and Growth in *Gerbera hybrida* Ray Floret

HUANG Zhi-gang<sup>1,2</sup>, LIANG Min-ting<sup>1</sup>, ZOU De-le<sup>1</sup>, GAO Su-juan<sup>1</sup>, and WANG Xiao-jing<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, South China Normal University, Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China; <sup>2</sup>College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohomones and Growth Development, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Ray floret (rf) petals detached from inflorescences of *Gerbera hybrida* were cultured *in vitro* and the effects of exogenous ammonium on petal pigmentation and growth were investigated.  $\text{NH}_4^+$  of  $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  obviously blocked petal pigmentation and the petal expansion, the width, fresh weight and dry weight were also declined significantly. The anthocyanin content of the petals of ray floret cultured *in vitro* began to increase 36 h and accumulated greatly fast between 54 h and 84 h after the incubation, which was followed by a gradually decline. The application of  $\text{NH}_4^+$  within 36 h was completely effective on the inhibition of the pigmentation, while the effect was gradually decreased when  $\text{NH}_4^+$  was applied after 36 h. Moreover, stronger inhibition was observed when the working time of the  $\text{NH}_4^+$  was longer than 12 h. The anthocyanin accumulation was promoted by the increase of sucrose content in the present of  $\text{NH}_4^+$ . Other sugars such as fructose, lactose, maltose and glucose in the media had little effect on the  $\text{NH}_4^+$ -induced inhibition of pigmentation.

**Key words:** *Gerbera hybrida*; ammonium; ray floret; anthocyanin; growth

花色和花形是观赏类植物的两个重要品质特性, 其形成受植物本身发育信号、营养水平及诸如光、温度和病原体侵染等环境因素的调节 (Weiss, 2000; Winkel-Shirley, 2002; Dela et al, 2003)。深入开展花着色与生长的调控研究, 对实践中通过改变关键因素而改变花色与花形、获得新的花

收稿日期: 2008 - 07 - 08; 修回日期: 2009 - 03 - 09

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2005B20901014, 2006A20101007)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangxj@snu.edu.cn)

卉品种具有重要意义。

氮素是植物的重要营养元素,广泛参与植物的生长发育过程。花色主要成分花色素苷的积累也受氮源的调节,但相关的报道几乎都是以悬浮培养的植物细胞为材料(Kanabus et al, 1986; Konczak-Islam et al, 2001; Kim & Kim, 2002),与完整植株的正常花色素苷积累相差甚远。Huang等(2008)的研究表明,在非洲菊花序与舌状花离体培养过程中, $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 中的 $\text{NH}_4^+$ 通过代谢形成谷氨酰胺,从而抑制非洲菊花色素苷的积累和花瓣的展开。本研究在此基础上,进一步研究 $\text{NH}_4^+$ 抑制作用的有效浓度和时间、 $\text{NH}_4^+$ 作用的普遍性以及糖类的影响等,旨在为阐明非洲菊花色与花瓣形态形成的生理生化及分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材及取样

试验于2006年11月—2007年4月进行。供试的非洲菊(*Gerbera hybrida*)品种为S5(金黄色)、F3(桃红色)、F4(黄色)、F30(红色)和F39(粉色)。除特殊指定外,均使用S5为材料。将非洲菊种植于华南师范大学生命科学学院实验基地温室大棚,昼夜温度为 $(26 \pm 2) / (18 \pm 2)$ ,湿度为65%~80%。参照Meng和Wang(2004)的方法把非洲菊花发育的整个过程分为6个时期。试验均采用P1.5期(P1与P2期之间)花序,此时花序直径为 $(1.5 \pm 0.3)$  cm,舌状花花瓣高出盘状花 $(0.3 \pm 0.1)$  cm,长度为 $(0.6 \pm 0.1)$  cm。

### 1.2 离体培养

采集新鲜花序,用75%酒精表面消毒45 s后,加入1% NaClO处理10 min,无菌水冲洗后,移至超净工作台已灭菌的滤纸上吸干水分,取最外轮舌状花接种到直径10 cm的培养皿中。培养皿底部预先垫放两层平铺的载玻片,上面铺一张直径9 cm的圆形滤纸,每个培养皿分装9 mL对照培养基(3%蔗糖溶液, pH 5.8),接种舌状花20~24朵,每种处理至少接种4个培养皿, $(25 \pm 1)$  下暗培养2.5 d作为预处理。预处理后,将舌状花转移至含有不同浓度 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 蔗糖或不同糖类的新鲜培养基上进行光照培养。一是在 $\text{NH}_4^+$ 处理12、24、36和48 h时再转移至对照培养基上进行培养。二是在光照培养12、24、36、48和60 h时转移至添加有 $\text{NH}_4^+$ 的培养基上进行培养。除特殊指定外,均使用 $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4^+$ 和3%蔗糖。培养条件为14 h光照/10 h黑暗,光源采用40 W冷光型国产白色荧光灯,光照强度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在光照培养7 d后观察测量花瓣生长情况以及花色素苷的相对含量。

### 1.3 花色素苷含量的测定

按照Meng和Wang(2004)的方法进行。每100 mg舌状花花瓣浸泡在2 mL 1%盐酸甲醇溶液中,移置4℃冰箱中抽提过夜, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心2 min,取上清液,测量530 nm、657 nm处的吸收光值。3次重复。利用公式 $A = A_{530} - 1/4A_{657}$ 校正提取液中叶绿素的吸收量,计算花色素苷的相对含量,结果以 $A \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示。

### 1.4 舌状花花瓣长度、宽度、鲜样质量及干样质量的测定

长度的测定:舌状花花瓣至少取自3个培养皿,每处理15朵。测量花瓣纵向垂直的最大长度与宽度。花瓣用吸水纸吸干,通过EPSON扫描仪扫描原物,用Photoshop 8.0软件进行测量。

鲜样质量的测定:用吸水纸吸干花瓣,以5个为1组在电子天平上称量,每种处理至少3组。

干样质量的测定:把花瓣放在烘箱里烘干至恒重,以8个为1组在电子天平上称量,每种处理至少3组。试验至少3次重复,结果取其平均值。

### 1.5 数据处理与分析

试验数值以平均数±标准偏差表示,采用Microsoft Excel软件作图,并用DPS系统进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度 $\text{NH}_4^+$ 对舌状花花色素苷含量的影响

在所试验的  $\text{NH}_4^+$  浓度下，非洲菊（S5 品种）舌状花的着色都有所下降，且随着浓度的增大，着色越来越浅（图 1）。

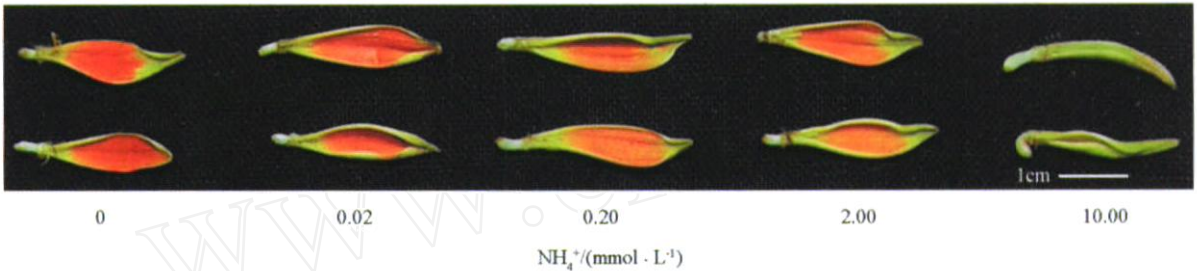


图 1  $\text{NH}_4^+$  对非洲菊（S5 品种）舌状花花瓣着色的影响

Fig. 1 Effects of  $\text{NH}_4^+$  on the pigmentation of the ray floret petals in S5 of *Gerbera hybrida*

培养基中  $\text{NH}_4^+$  浓度增至  $2.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时，花色素苷的含量下降显著， $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时仅为对照的 25.4%（图 2）。

选用  $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  培养基，对其他 4 个不同颜色的非洲菊品种舌状花进行培养，发现  $\text{NH}_4^+$  的抑制作用依然存在。花色素苷含量下降率最高的是深色系 F30，达 78.6%，其次是 F3，下降了 54.5%，浅色系的 F4 与 F39 也分别下降了 43.0% 和 37.0%，处理与对照的差异都达到了显著水平（图 3）。

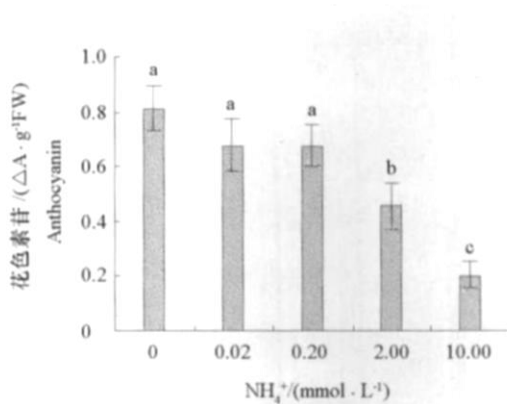


图 2  $\text{NH}_4^+$  对非洲菊（S5 品种）舌状花花瓣花色素苷含量的影响  
不同字母表示在 5% 水平上差异显著。下同。

Fig. 2 Effects of  $\text{NH}_4^+$  on the anthocyanin contents of the ray floret petals in S5 of *Gerbera hybrida*

Different letters mean significant difference at 5% level.

The same below.

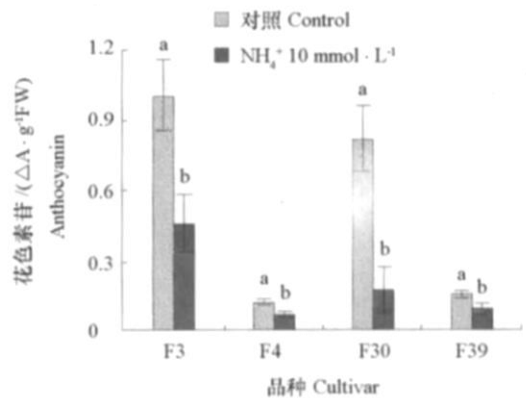


图 3  $\text{NH}_4^+$  对不同非洲菊品种舌状花花瓣花色素苷含量的影响

Fig. 3 Effect of  $\text{NH}_4^+$  on the anthocyanin contents ray of the floret petals in different *Gerbera hybrida* cultivars

### 2.2 $\text{NH}_4^+$ 对舌状花生长的影响

$\text{NH}_4^+$  浓度低于  $2.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时并不影响舌状花的正常展开，但增至  $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时，除了显著抑制舌状花的着色外，对舌状花展开的抑制也非常明显（图 1）。

如表 1 所示，在添加  $10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$  进行培养后，舌状花花瓣的宽度、鲜样质量和干样质量都受到明显的影响，与对照的差异都达到了显著水平，而舌状花的长度无显著差异。

表 1  $\text{NH}_4^+$ 对非洲菊舌状花花瓣生长的影响Table 1 Petal growth in response to  $\text{NH}_4^+$  in Gerbera ray florets

处理 Treatment	长度 /cm Length	宽度 /cm Width	鲜样质量 /mg Fresh weight	干样质量 /mg Dry weight
对照 Control	1.26 $\pm$ 0.13 a	0.46 $\pm$ 0.09 a	18.64 $\pm$ 2.17 a	1.86 $\pm$ 0.42 a
$\text{NH}_4^+$ 10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$	1.25 $\pm$ 0.13 a	0.38 $\pm$ 0.07 b	13.24 $\pm$ 1.35 b	1.33 $\pm$ 0.12 b

注：不同字母表示在 5%水平上差异显著。

Note: Different letters mean significant difference at 5% level

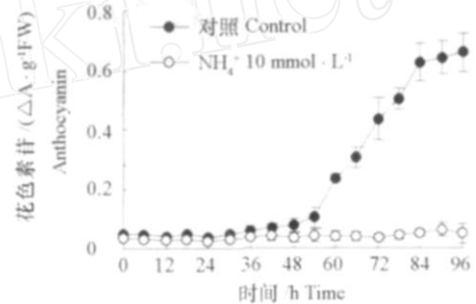
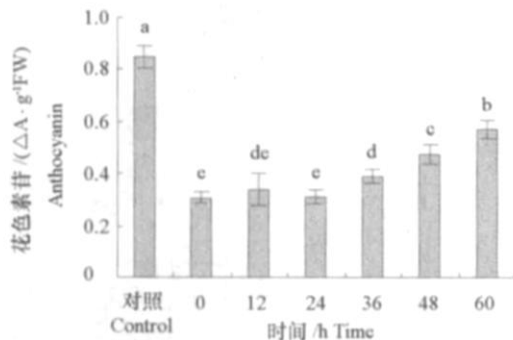
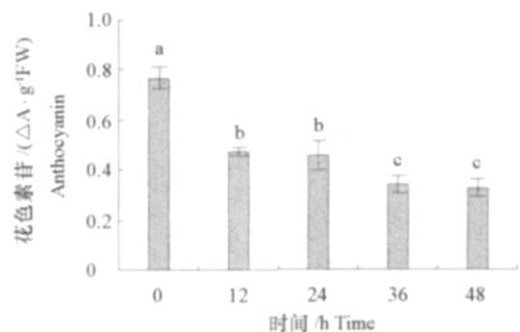
### 2.3 舌状花着色的时间进程

如图 4所示, 对照的舌状花花色素苷含量在 36 h开始缓慢增加, 54 h到 84 h间花色素苷积累显著增加, 而添加 10.00 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$   $\text{NH}_4^+$ 进行培养的舌状花在整个培养期间均保持低水平。

### 2.4 $\text{NH}_4^+$ 处理时间对舌状花着色的影响

离体培养的舌状花在照光之后的不同时间转移至添加有  $\text{NH}_4^+$ 的培养基上进行培养, 以无  $\text{NH}_4^+$ 的培养作为对照。结果表明, 照光培养 60 h内进行  $\text{NH}_4^+$ 处理, 舌状花花色素苷的积累水平都较低, 与对照的差异都达到显著水平。36 h内进行处理, 舌状花不能正常着色, 但推后进行处理, 舌状花表现出不同程度的着色与展开;  $\text{NH}_4^+$ 处理的时间越晚, 花色素苷的积累水平越高, 花瓣的着色情况也越好 (图 5)。

舌状花经黑暗预培养 2.5 d后, 转入添加有  $\text{NH}_4^+$ 的培养基进行培养, 培养不同时间后再转为对照培养。结果如图 6所示,  $\text{NH}_4^+$ 处理超过 12 h时, 舌状花花瓣花色素苷的积累都受到明显的抑制, 处理时间越长, 花色素苷的含量越低。

图 4  $\text{NH}_4^+$ 对舌状花花瓣花色素苷积累进程的影响Fig. 4 Effects of  $\text{NH}_4^+$  on the time course of anthocyanin accumulation in ray floret petals图 5 照光培养时间对  $\text{NH}_4^+$ 处理后舌状花花瓣花色素苷积累的影响Fig. 5 Anthocyanin accumulation of ray floret petals after application of  $\text{NH}_4^+$  in response to the light culture time before treatment图 6  $\text{NH}_4^+$ 处理时间对舌状花花瓣花色素苷积累的影响Fig. 6 Anthocyanin accumulation of ray floret petals in response to the incubation time of  $\text{NH}_4^+$ 

### 2.5 蔗糖浓度与其它种类糖对 $\text{NH}_4^+$ 抑制作用的影响

对于舌状花的离体培养来说, 蔗糖必不可少。在添加  $\text{NH}_4^+$ 的培养基中将蔗糖浓度分别提高至 6%和 12%, 则花色素苷积累水平较 3%时有所增加 (图 7), 但仍然都比无  $\text{NH}_4^+$ 对照含量明显要低;

此外，花色苷较多地积累在下表皮，而非正常着色的上表皮（结果未显示）。

在非洲菊舌状花离体培养过程中加入 3% 的果糖、乳糖、麦芽糖和葡萄糖等均不影响  $\text{NH}_4^+$  对着色的抑制作用（图 8）。当以半乳糖作为碳源时，舌状花会褐化死亡。

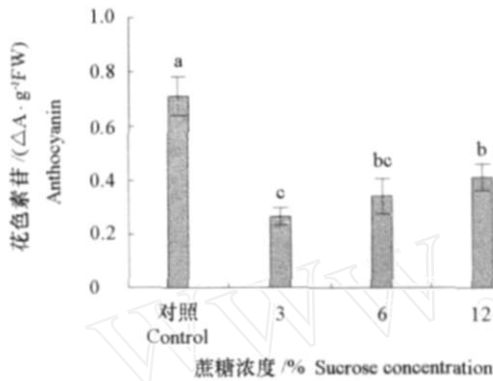


图 7 蔗糖浓度对  $\text{NH}_4^+$  抑制花色苷积累的影响

Fig. 7 Effects of sucrose concentration on  $\text{NH}_4^+$ -induced inhibition of anthocyanin accumulation

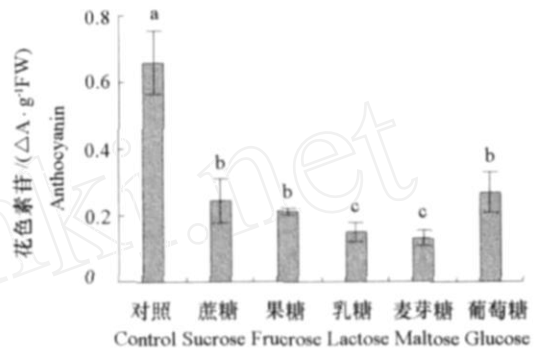


图 8 不同糖种类对  $\text{NH}_4^+$  抑制花色苷积累的影响

Fig. 8 Effects of different sugars on  $\text{NH}_4^+$ -induced inhibition of anthocyanin accumulation

### 3 讨论

在葡萄的组织与细胞悬浮培养中，缺少  $\text{NO}_3^-$  而只供给  $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4^+$  时花色苷的积累量增加 (Kim & Kim, 2002)。而马铃薯的细胞悬浮培养过程中，高浓度氮素 ( $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 会抑制花色苷的产生 (Konczak-Islam et al, 2001)。本研究发现，在非洲菊舌状花的离体培养中， $\text{NH}_4^+$  对花瓣花色苷的积累具有抑制作用；在不同非洲菊品种中， $\text{NH}_4^+$  的抑制作用均存在（图 3），表明  $\text{NH}_4^+$  抑制非洲菊舌状花花瓣花色苷积累是一种普遍的现象。对照培养条件下不同品种花瓣花色苷积累的差异较大，主要是因为深色系花中决定花色的主要是花色苷。不仅花瓣的着色受  $\text{NH}_4^+$  的影响，舌状花花瓣的生长也受其抑制（表 1）。 $\text{NH}_4^+$  单盐毒害症状已有诸多报道 (Findenegg, 1987; Kionzucker et al, 1999; Guo et al, 2002)，但  $\text{NH}_4^+$  对舌状花着色的抑制并非由  $\text{NH}_4^+$  盐毒害所引起 (Huang et al, 2008)。

对照培养条件下，舌状花花色苷含量在照光培养 36 h 时开始缓慢增加，而  $\text{NH}_4^+$  处理下花色苷含量一直较低（图 4）；舌状花在照光培养 36 h 后再进行  $\text{NH}_4^+$  处理时，舌状花可出现不同程度的着色（图 5），表明  $\text{NH}_4^+$  的关键作用时间应在在此之前。这一时间点的确定为进一步研究  $\text{NH}_4^+$  的作用机理奠定了基础，如筛选差异表达基因、相关基因的表达分析等的取样应在照光培养 36 h 之内。 $\text{NH}_4^+$  显著抑制舌状花着色的有效浓度较高（图 2），并且需要持续较长的时间（图 6），暗示  $\text{NH}_4^+$  并非作为信号参与该过程，这与  $\text{NH}_4^+$  通过代谢形成谷氨酰胺，从而抑制非洲菊花色素苷的积累和花瓣展开的报道 (Huang et al, 2008) 相一致。

在离体培养的大草原龙胆和玫瑰中，提高培养介质中蔗糖的浓度可以促进花色苷的积累水平 (Kuiper et al, 1991; Kawabata et al, 1995)。在矮牵牛花冠花色苷合成中，糖也具有代谢性功能 (Moalem et al, 1997)。在  $\text{NH}_4^+$  处理下，蔗糖浓度的提高虽能提高舌状花花瓣花色苷的积累水平（图 7），但并未促进正常的着色。不同糖类型对花发育及着色的影响也不同，如蔗糖、葡萄糖和果糖可促进矮牵牛花中 *CHS* 基因的表达和花色苷积累，而甘露醇和山梨醇无此作用 (Moalem et al, 1997; Neta et al, 2000)。在非洲菊中，代谢性的蔗糖、葡萄糖和果糖对花瓣花色苷的积累有效

(孟祥春等, 2005), 有蔗糖存在时, 光强烈诱导 *CHS*、*DFR* 基因的表达 (孟祥春等, 2007)。但本试验所用的 5 种糖都不能明显影响  $\text{NH}_4^+$  的抑制作用 (图 8)。

## References

- Dela G, Or E, Ovadia R, Nissim-Levi A, Weiss D, Oren-Shamir M. 2003. Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. *Plant Science*, 164 (3): 333 - 340.
- Findenegg G R. 1987. A comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution. *Plant Soil*, 103 (2): 239 - 243.
- Guo S, Bruck H, Sattelmacher B. 2002. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant Soil*, 239 (2): 267 - 275.
- Huang Z G, Liang M T, Peng J Z, Xing T, Wang X J. 2008. Exogenous ammonium inhibits petal pigmentation and expansion in *Gerbera hybrida*. *Physiologia Plantarum*, 133 (2): 254 - 265.
- Kanabus J, Bressan R A, Capita N C. 1986. Carbon assimilation in carrot cells in liquid culture. *Plant Physiology*, 82 (2): 363 - 386.
- Kawabata S, Ohta S M, Kusuhara Y. 1995. Influences of low light intensities on the pigmentation of *Eustoma grandiflorum* flowers. *Acta Horticulturae*, 405: 173 - 178.
- Kim S H, Kim S K. 2002. Effect of nitrogen source on cell growth and anthocyanin production in callus and cell suspension culture of 'Sheridan' grapes. *Journal of Plant Biotechnology*, 4 (2): 83 - 89.
- Konczak-Islam I, Nakatani M, Yoshinaga M, Yamakawa O. 2001. Effect of ammonium ion and temperature on anthocyanin composition in sweet potato cell suspension culture. *Plant Biotechnology*, 18 (2): 109 - 117.
- Kronzucker H J, Siddiqi M Y, Glass A D M, Kirk G J D. 1999. Nitrate-ammonium synergism in rice: A subcellular flux analysis. *Plant Physiology*, 119 (3): 1041 - 1046.
- Kuiper D, Reenen H S, Ribot S A. 1991. Effect of gibberellic acid on sugar transport into petals of 'Madelon' rose flowers during bud opening. *Acta Horticulturae*, 298: 93 - 95.
- Meng Xiang-chun, Peng Jian-zong, Wang Xiao-jing. 2007. Anthocyanin accumulation and *CHS*, *DFR* gene expression regulated by light and sugar in *Gerbera hybrida* ray floret. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (1): 227 - 230. (in Chinese)
- 孟祥春, 彭建宗, 王小菁. 2007. 光和糖对非洲菊花色素苷积累及 *CHS*、*DFR* 基因表达的影响. *园艺学报*, 34 (1): 227 - 230.
- Meng Xiang-chun, Zhang Yu-jin, Wang Xiao-jing. 2005. *In vitro* culture of *Gerbera hybrida* inflorescence and regulation of anthocyanin accumulation in ray florets. *Journal of South China Agricultural University*, 26 (3): 56 - 59. (in Chinese)
- 孟祥春, 张玉进, 王小菁. 2005. 非洲菊花序的离体培养及其舌状花花色素苷积累的调控. *华南农业大学学报*, 26 (3): 56 - 59.
- Meng X C, Wang X J. 2004. Regulation of flower development and anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. *Journal Horticulture Science & Biotechnology*, 79 (1): 131 - 137.
- Moalem D, Tamari G, Leitner Y, Borochov A, Weiss D. 1997. Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in petunia corollas. *Plant Physiology*, 113 (2): 419 - 424.
- Neta I, Shoseyov O, Weiss D. 2000. Sugars enhance the expression of gibberellin-induced genes in developing petunia flowers. *Physiologia Plantarum*, 109 (2): 196 - 202.
- Weiss D. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiologia Plantarum*, 110 (2): 152 - 157.
- Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (3): 218 - 223.