

“金薄香”核桃组培中灭菌及防止褐变的研究

王娟^{1,2}, 田建保², 贺小红², 吉意斌³

(1. 山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西省农业科学院 果树研究所, 山西 太谷 030815;
3. 山西农业大学 学生处, 山西 太谷 030801)

摘要: 以“金薄香”核桃的茎段为外植体试验材料, 对其外植体材料灭菌和组织培养过程中褐变的防止措施做了探讨。结果表明: 于较细的外植体 A 用 0.075% HgCl₂ 处理 4 min 效果最佳; 对于较粗的外植体 B 用 0.1% HgCl₂ 处理 4 min 效果最佳。采用前期暗培养、缩短转瓶时间(以 10 d 期)和培养基中添加活性炭 2.0 g·L⁻¹ 的方法能使褐变得得到有效控制。

关键词: 核桃; 茎段; 组织培养; 灭菌; 褐变

中图分类号: S339.4⁺¹ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-8151(2008)03-0290-03

Studies on Sterization and Browning of "Jinboxiang" Walnut Explants with *in Vitro* Propagation

WANG Juan et al.

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801, China)

Abstract: A study was carried out on explant sterization and browning of walnut explants *in vitro* propagation. The explants were collected from stems of Jinboxiang. The results showed that the best explant A sterization was 4 min treatments of 0.075% HgCl₂ and the best explant B sterization was 4 min treatments of 0.1% HgCl₂. Browning could be effective controlled by using dark culture in prophase, shorting shift time (took 10 d as a cycle) and adding activated carbon with 2.0 g·L⁻¹.

Key words: Walnut; Stem segment; *In Vitro* propagation; Sterization; Browning

核桃 (*Juglans regia* L.) 隶属于胡桃科胡桃属, 是世界四大干果之一, 因其很高的经济、生态和社会效益以及潜在的营养、保健和医疗价值在世界各地广泛栽培。但由于核桃扦插不易生根, 嫁接又因接口处易发生氧化褐变而难以成活, 从而限制了核桃苗木的生产和推广。20 世纪 60 年代兴起的核桃组织培养技术为其快速繁殖、细胞水平的遗传改良和无病毒苗木群体的获取开辟了一条有效途径, 但在初培过程中核桃外植体芽孢杆菌侵染较多, 污染现象严重。目前国外少数几个国家的专家如 Driver, Gale McGranahan, Jay 等有成功应用生物技术繁殖核桃的报道^[1~3]。在国内傅玉兰, 姚洪军, 吕守芳, 刘淑兰和刘兰英等也进行了一些相关的研究和探索^[4~8], 处于该方面研究的初步阶段。

为了突破核桃初代培养污染和褐变的困境, 建立稳定的外植体材料灭菌体系并探索出有效防

止组培过程褐变的措施, 本试验以金薄香核桃大树树冠上方生长健壮的当年生带腋芽的新梢茎段为材料, 研究了无菌培养体系建成过程中外植体灭菌和有效防止褐变的措施, 为以后的继代增殖、试管苗培养打下良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 材料采集

于 2006 年 5 月 9 日自山西省农科院果树研究所核桃园采集外植体材料, 最好在连续数日无雨的天气为宜, 选取金薄香核桃十年生大树树冠上方生长健壮的当年生新梢, 以带腋芽的茎段为外植体。

1.2 试验方法及处理

1.2.1 材料处理

将带腋芽的茎段去掉顶部的幼嫩部分, 留下半木质化的茎段, 每个茎段长约 2~3 cm, 先将

收稿日期: 2007-04-13 修回日期: 2007-06-27

作者简介: 王娟 (1980-), 女 (汉), 山西孟县人, 主要从事果树的组织培养与遗传育种方面的研究。

茎段用清水洗两次，然后泡入放有洗洁精的水中，不停摇晃 10 min 左右，用清水冲洗掉洗洁精。

1.2.2 外植体材料灭菌试验

在超净工作台上，先用无菌水冲洗两次，再用 70% 酒精处理 30 s。然后用 HgCl₂ 浸泡，浓度分别为：0.05%，0.075%，0.1%；处理时间为：3 min，4 min，6 min。根据品种和外植体的粗度及木质化程度，由细到粗用 a、b 表示（a 表示直径小于 0.5 cm 的茎段，b 表示直径大于 0.5 cm 的茎段）。最后用无菌水清洗 4~5 次，接种在初培培养基（MS+BA1.5 mg·L⁻¹）上，20 d 后观察灭菌效果。

1.2.3 褐变防止处理

前期暗培养：时间分别为：5 d、10 d、15 d，然后置于弱光（400~500 lx）下进行培养，每处理 10 瓶。

缩短转瓶时间：分别以 5 d、10 d、15 d 和 20 d 作为不同的转瓶周期处理，每处理 8 瓶。

添加活性炭：在初培培养基（MS+BA1.5 mg·L⁻¹）中分别添加浓度为 1.0 mg·L⁻¹、1.5 mg·L⁻¹、2.0 mg·L⁻¹ 和 2.5 mg·L⁻¹ 的活性炭作为不同的处理，每处理 8 瓶。

以上各处理均在弱光（400~500 lx）条件下进行培养，每天光照 10~14 h，培养室温度为 25~28℃，观察外植体的褐变情况。

2 结果与分析

2.1 不同处理对外植体灭菌效果的影响

不同处理对外植体灭菌效果的影响（表 1，表 2）。

表 1 不同处理对外植体 a 灭菌效果的影响

Table 1 Effect of different treatments on explant a sterilization

处理编号 Treatment number	A (浓度/%) Concentration	B (时间/min) Time	N (无菌率/%) No bacillus efficiency
1	1 (0.05)	1 (3)	23.5
2	1 (0.05)	2 (4)	64.4
3	1 (0.05)	3 (6)	78.3
4	2 (0.075)	1 (3)	37.7
5	2 (0.075)	2 (4)	83.5
6	2 (0.075)	3 (6)	59.6
7	3 (0.1)	1 (3)	43.6
8	3 (0.1)	2 (4)	47.8

处理编号 Treatment number	A (浓度/%) Concentration	B (时间/min) Time	N (无菌率/%) No bacillus efficiency
9	3 (0.1)	3 (6)	17.4
T ₁	166.2	104.8	
X ⁽¹⁾	55.4	34.9	
T ₂	180.8	195.7	
X ⁽²⁾	60.3	65.2	
T ₃	108.8	155.3	
X ⁽³⁾	36.3	51.8	
极差 R	24.0	30.3	

表 1 中 A、B 为二因素，T₁、T₂、T₃ 为各列对应三水平无菌率的和，X⁽¹⁾、X⁽²⁾、X⁽³⁾ 依次表示各列对应三水平的平均无菌率，R 为极差，是每一列中 X⁽¹⁾、X⁽²⁾、X⁽³⁾ 中最大值与最小值之差，N 为无菌率。从极差分析，选取平均增殖最高水平 A₂B₂，因此，A₂B₂ 就是最佳试验方案。同理可得：表 2 的结果分析中 A₃B₂ 为最佳试验方案。

表 2 不同处理对外植体 b 灭菌效果的影响

Table 1 Effect of different treatments on explant b sterilization

处理编号 Treatment number	A (浓度/%) Concentration	B (时间/min) Time	N (无菌率/%) No bacillus efficiency
1	1 (0.05)	1 (3)	16.7
2	1 (0.05)	2 (4)	24.6
3	1 (0.05)	3 (6)	68.9
4	2 (0.075)	1 (3)	37.8
5	2 (0.075)	2 (4)	61.1
6	2 (0.075)	3 (6)	56.4
7	3 (0.1)	1 (3)	75.8
8	3 (0.1)	2 (4)	88.9
9	3 (0.1)	3 (6)	38.5
T ₁	110.2	130.3	
X ⁽¹⁾	36.7	43.4	
T ₂	155.3	174.6	
X ⁽²⁾	51.8	58.2	
T ₃	203.2	163.8	
X ⁽³⁾	67.7	54.6	
极差 R	31.0	14.8	

2.2 前期暗培养对褐变的影响

前期暗培养对褐变的影响（表 3）。

试验结果表明：前期暗培养 10 d，防止褐变的效果最佳。前期暗培养 15 d，虽然褐变率也不高，能达到防止的效果，但部分新萌发的试管苗发黄，出现光照不足的现象。

表3 暗培养对褐变的影响

Table 3 Effect of dark culture on browning

处理时间/d Treatment time	接种数/个 Inoculation number	无菌数/个 No bacillus	无菌率/% No bacillus efficiency	褐变数/个 Browning number	褐变率/% Browning efficiency
5	10	8	80	5	62.5
10	10	8	80	2	25.0
15	10	7	70	2	28.6

2.3 缩短转瓶时间对褐变的影响

试验结果表明:以5 d为周期,试管苗生长缓慢,尚未能适应培养基,没有任何褐变现象;以10 d为周期,试管苗生长正常,基本无褐变发生;以15 d为周期,外植体生长良好,但出现部

分褐变;以20 d为周期,大部分试管苗有褐变,影响正常生长分化。因此,以10 d为周期转瓶效果最佳。

2.4 添加活性碳对褐变的影响(表4)

添加活性碳对褐变的影响(表4)。

表4 添加活性炭对褐变的影响

Table 4 Effect of adding activated carbon on browning

浓度/g·L ⁻¹ Concentration	接种数/个 Inoculation number	无菌数/个 No bacillus	无菌率/% No bacillus efficiency	褐变数/个 Browning number	褐变率/% Browning efficiency
1	8	6	75	4	66.7
1.5	8	5	62.5	3	60.0
2	8	7	87.5	2	28.6
2.5	8	6	75	2	33.3

试验结果表明:浓度为2 g·L⁻¹时,可以较明显地减轻褐变的发生,低于2 g·L⁻¹时,褐变不能得到有效控制。

3 小结与讨论

酒精对外植体表面有较好的润湿作用,具有一定的杀菌能力,但处理时间过长也会伤害幼嫩组织,一般用70%酒精处理30 s为宜。傅玉兰等^[4]文章报道,青霉素和链霉素混合液浸泡外植体有一定的效果,但效果不甚显著,不宜提倡。本试验只用HgCl₂处理,试验结果比较理想。在整个消毒灭菌过程中,HgCl₂灭菌的浓度和时间是最重要的,对于较细的外植体a用0.075% HgCl₂处理4 min效果最佳;对于较粗的外植体b用0.1% HgCl₂处理4 min效果最佳。对于较细的外植体a用0.1% HgCl₂处理6 min效果最

差,是因为HgCl₂灭菌时间太长,在灭死杂菌的同时,也杀死了组织,从而导致外植体死亡。

前期暗培养之所以能控制外植体褐变,是因为在酚类化合物合成和氧化的许多酶系统中,一些酶系统的活性是受光诱导的。试验结果显示在前期进行暗培养对防止组培中核桃茎段外植体褐变有很好的效果。

对易褐变的外植体材料进行连续转移和预处理可以减轻酚类物质对培养物的毒害作用^[5]。适当缩短转瓶周期可减少茎段伤口周围酚类物质的积累,从而抑制褐变的发生,试验结果显示以10 d为周期转瓶效果最佳。

在培养基中加入吸附剂可以抑制褐变^[5]。添加活性碳有利于吸附外植体周围的酚类物质,对降低褐变率效果较好。试验结果表明,浓度为2 g·L⁻¹时,可以较为明显地减轻褐变的发生。

参 考 文 献

- [1] Driver J A, Kuniyuki A H. In vitro propagation of paradox walnut rootstock [J]. Hortscience, 1984, 19 (4): 507-509.
- [2] Gale McGranahan, Charles A Leslie. In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars [J]. Horticulture, 1988, 23 (1): 220.
- [3] Jay-Alle C, Peng S, Capelli P. Micropropagation of hybrid walnut tree [J]. Acta Horticulture, 1993 (300): 117-123.
- [4] 傅玉兰, 谷凤. 美国山核桃组培中材料灭菌的研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31 (2): 169-172.
- [5] 姚洪军, 罗晓芳. 植物组织培养外植体褐变的研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 1999, 21 (3): 78-84.
- [6] 吕守芳, 闫爱玲. 核桃离体繁殖技术 [J]. 经济林研究, 2004, 22 (1): 12-14.
- [7] 刘淑兰, 朝碧文. 核桃的离体繁育 [J]. 北京农业大学学报, 1986, 12 (2): 113-117.
- [8] 刘兰英. “薄壳香”核桃组培中的褐化及防止措施研究 [J]. 园艺学报, 2002, 29 (2): 171-172.