

文章编号:1007-4961(2007)04-0348-04

不同培养条件对黧蒴栲组培苗褐变的抑制作用

周冰彬,陈晓阳,李 慧

(北京林业大学 林木花卉与遗传育种教育部重点实验室,北京 100083)

摘要:黧蒴栲外植体在组织培养过程中,褐变现象十分严重。不同培养条件比较试验的结果表明,WPM为黧蒴栲初代培养的最适培养基,抗坏血酸(Vc)、活性炭(AC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对抑制外植体褐变均有作用,其中,PVP效果最佳,最适浓度为3 g/L。光照条件和温度对黧蒴栲褐变的影响都很大,初期暗培养和降低温度到19℃,能显著抑制外植体的褐变。

关键词:组织培养;培养基;褐化

中图分类号:S 792

文献标识码:A

Effect of different conditions on browning of *Castanopsis fissa* in tissue culture

ZHOU Bin-bing, CHEN Xiao-yang, LI Hui

(Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants,
Ministry of Education; Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Browning phenomena is often very severitous for *Castanopsis fissa* in tissue culture. Different factors have different effects in controlling it. The results indicate that: WPM is the best beginning culture medium for *Castanopsis fissa*; Vc, AC and PVP are good for controlling explant browning, and PVP is the best one with an optimum concentration of 3 g/L. Illumination and temperature are more important for browning, and dark and low temperature(19℃) at the beginning of its in vitro culture effective to control browning.

Key words: tissue culture; culture medium; browning

黧蒴栲(*Castanopsis fissa* (Champ. ex Benth) Rehd. et Wils),又名闽粤栲、裂斗锥、大叶栲、裂壳锥等,为壳斗科(Fagaceae)栲属(*Castanopsis* Spach)常绿乔木,树体高大,是亚热带林区主要常绿阔叶树种之一,为亚热带森林建群树种,次生林先锋树种。黧蒴栲生长极为迅速,采伐后,萌芽更新容易,萌条年平均高生长可达1 m,年平均胸径生长量可达1.5 cm左右,3~5 a可采伐一次。因此,是优良的薪炭林树种,也是优良的纤维板和纸浆原料树种。此外,由于抗性强,对土壤要求不严,成为广西和广东部分地区退耕还林及山地造林绿化首选树种^[1]。

然而,黧蒴栲种子不能较长时间贮藏,且扦插繁殖很难^[1],因此,有必要探索通过组织培养,开展黧蒴栲规模化育苗的技术。同时,通过组织培养,建立起适合转基因和改良基因的再生体系。在组织培养

过程中,黧蒴栲组培苗褐变现象非常突出。本试验从基本培养基配方筛选及改变培养条件入手,探索减轻褐变的作用。

1 材料与方法

1.1 材料的来源

将取自广西和江西的黧蒴栲种子播于温室,分别取胚以及发芽后生长3个月的茎段作为组培的外植体材料。

1.2 方法

采用MS、1/2MS、WPM作为基本培养基,附加6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + Vc 50 mg/L,添加蔗糖3%,琼脂5%,调节pH值到6.0。观察不同培养基对外植体生长情况的影响。

分别采用添加不同浓度的抗氧化剂Vc、PVP,加

入不同浓度的吸附剂活性炭,在不同的光照条件(黑暗、12 h 光照、全光照)和不同的温度(19℃、25℃和 27℃)进行培养,初期液体培养,在固体培养基中转瓶等方法,观察不同的处理对外植体褐化的影响。

对试验数据(百分率经反正弦平方根转化)用 DPS 数据处理系统进行方差分析,差异显著者使用 Tukey 法进行多重比较,检验不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同培养基初代培养的效果

胚相对生长比较容易,在试验初始阶段采用胚进行初代培养基的选择。胚经灭菌后,分别接种于添加了激素的 MS、1/2MS、WPM 3 种培养基上,在 20 d 和 40 d 后,对培养情况作两次观察,结果见表 1。

表 1 不同培养基初代培养的效果

Table 1 Effect of different mediums on initial culture						
培养基 Mediums	20 d			40 d		
	根端萌	芽端萌	完全萌	根端萌	芽端萌	完全萌
	动率/%	动率/%	发率/%	动率/%	动率/%	发率/%
MS	20b	0b	0b	20b	0c	0c
1/2MS	46.67a	0b	0b	46.67a	6.67b	6.67b
WPM	46.67a	26.67a	26.67a	60a	53.33a	53.33a

注:同一列中字母相同为无显著差异。

从表 1 可以看出,不同培养基对蕹荊栲的初代培养影响很大,40 d 后 WPM 培养基上的外植体完全萌发率达到 53.33%,植株生长表现出旺盛的长势,1/2MS 的效果次于 WPM,只有个别植株生长良好,而 MS 培养基的外植体完全萌发率为 0,且根的生长也停滞,完全无生长迹象。由此得出,WPM 为适合蕹荊栲初代培养的基本培养基。经方差分析,不同培养基间的差异达到显著水平,多重比较结果也表明 WPM 显著优于其他两种培养基(见表 1)。

2.2 不同处理对抑止褐化的作用

2.2.1 不同浓度抗氧化剂和吸附剂对抑制褐化的效果 以 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA 为基本培养基,外植体选用发芽后生长 3 个月的茎段,添加不同浓度的 Vc、AC、PVP,试验结果见表 2。

从表 2 可以看出,培养基中添加不同浓度的抗褐化剂均能够抑止外植体的褐变,从而促进外植体的生长。抗褐化剂的种类不同,其效果不同,其中 PVP 对于防止外植体褐化效果最好,外植体褐化程度最轻,褐化率最小仅为 13.34%,为对照的 1/5 左右;Vc 效果次之;AC 亦能有效的减轻褐化现象,从试验中的观测来看,抗褐化效果随浓度的增加而增加,但未产生愈伤组织。抗褐化剂的浓度不同,效果也不同,随着 PVP 浓度的增加,外植体的褐化程度也降低,浓度为 3 g/L 时的效果最好,愈伤组织的褐

表 2 不同浓度抗氧化剂和吸附剂对褐化程度的影响

Table 2 Effect of antioxidants and sorbent concentration on browning						
抗褐化剂种类	抗褐化剂浓度	接种瓶数	褐化情况	愈伤组织褐化率/%	差异显著性 Significance	
Kind	Concentration	Count of inoculation	Effect of browning	Rate of browning	0.05	0.01
抗坏血酸(Vc)	50	15	++	45.45	d	D
	100	15	++	72.73	b	B
	150	15	++	66.67	c	C
	200	15	++	81.82	a	A
活性炭(AC)	1	15	++	无愈伤组织产生		
	2	15	++			
	3	15	++			
	4	15	++			
聚乙烯吡哆	0.5	15	++	40	d	D
烷酮(PVP)	1	15	+	33.34	e	E
/(g·L ⁻¹)	2	15	+	20	f	F
	3	15	+	13.34	g	G
对照(CK)	无	15	+++	76.92	a	AB

注:“+”越多表明褐化程度越严重。

化率仅为 13.34%; Vc 为 50 mg/L 和 150 mg/L 的效果比 100 mg/L 和 200 mg/L 时的好。方差分析结果表明,不同浓度之间的抗褐化剂差异极显著。将不同处理的褐化率进行多重比较, Vc 50 mg/L 与 PVP 0.5 g/L 的处理差异不显著, Vc 200 mg/L 与对照差异不显著, Vc 50 mg/L 与对照在 $F_{0.01}$ 水平上差异不显著(表 2)综合分析,可以得出 3 g/L 的 PVP 是鳶蒴栲外植体培养最佳的抗褐化剂。

2.2.2 不同光照条件对褐化程度的影响 不同光照条件对褐化程度的影响见表 3。从表 3 可以看出,不同光照时间对外植体的褐化影响存在差异。方差分析结果 $F = 109.43 < F_{0.01} = 10.9$, 显示差异极显著。经对不同光照造成的褐化率进行多重比较, 12 h 光照和全光照在 $F_{0.01}$ 水平上差异不显著。从试验结果可以看出,全光照下外植体的褐化程度最严重。在培养初期,暗处理有助于减轻褐化,但长期处于黑暗状态下不利于植株生长,植株叶绿素含量不足,叶片呈现黄白色,因此,应合理控制暗培养的时间。试验中发现,3 d 的暗培养足以大大降低褐化率。

表 3 不同光照条件对褐化程度的影响

Table 3 Effect of different illuminations on browning

培养条件 Condition of culture	接种瓶数 Count of inoculation	褐化情况 Effect of browning	褐化率/% Rate of browning	差异显著性 Significance	
				0.05	0.01
黑暗	15	++	50	C	B
12 h 光照	15	+++	86.67	b	A
全光照	15	+++	96.67	a	A

2.2.3 不同温度条件对褐化程度的影响 在暗培养下,温度对于外植体褐化的影响很大。从表 4 可以看出,温度不同,褐化率的差异也很大,温度降低到 19℃,褐化率就下降到 33.33%,两种温度差异的多重比较结果也表明存在着极显著的差异。因此,在培养初期,19℃比较有利于减轻外植体的褐化。

表 4 不同温度条件对褐化程度的影响

Table 4 Effect of different temperatures on browning

培养条件 Condition of culture	接种瓶数 Count of inoculation	褐化情况 Effect of browning	褐化率/% Rate of browning	差异显著性 Significance	
				0.05	0.01
19℃	15	++(+)	33.33	c	C
25℃	15	+++	86.67	b	B
27℃	15	+++	72.73	a	A

另外,在培养中还看到,初期采用液体培养(液

体培养基为 1/2MS + 糖,不加琼脂),3 d 天后转移到固体培养基,均能有效的抑止褐化;初期采用固体培养,3 d 后在瓶中转位或转瓶,亦能有效减轻褐化。通过试验,摸索出适合鳶蒴栲的最适培养条件为: WPM + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PVP 3 g/L, 暗培养 3 d 后采用 12 h 光照,于 19℃下进行培养。

3 结论与讨论

适宜的基本培养基对于林木外植体的组织培养起着关键的作用,通常不同的植物所需的基本培养基不同。比较 3 种培养基的离子浓度,可以看出, WPM 的总 N 含量和总 K 含量要远远低于 MS 培养基,由此说明,鳶蒴栲的组织培养要求相对较低的盐浓度。

在木本植物的组织培养中,外植体的褐变也是导致培养失败的一个主要原因。主要是与单宁含量、色素含量、多酚氧化酶的活性有关,在切割外植体时,切口附近的细胞受到伤害,酚类化合物外溢,与多酚氧化酶接触,并在其催化下氧化成褐色的醌类物质,导致组织代谢紊乱,生长停滞,最终死亡。鳶蒴栲在木本植物中属于单宁含量高的一种,初代培养极易发生褐化,而且在形成愈伤组织后还会因此褐化而死亡^[2]。抗褐化剂一般分为抗氧化剂和吸附剂两大类,不同植物所适宜的抗氧化剂和酚类物质吸附剂也有所不同,且不同浓度的抗褐化剂也有很大差异。

从试验中可以看出, PVP 效果最好,在一定范围内,随着浓度的增大,抗褐化效果也越好。而抗坏血酸的效果与减轻褐化程度并不成正相关, 50 mg/L 和 150 mg/L 的效果要好于 100 mg/L 和 200 mg/L,这可能是由于当抗坏血酸浓度为 50 mg/L 时,其全部作用于多酚氧化酶,产生低浓度的脱 H 抗坏血酸(DHAA);当浓度超过 50 mg/L 时,多余抗坏血酸也被氧化,产生 DHAA,多余的 DHAA 易与氨基酸反应产生褐变^[3];而当浓度为 150 mg/L 时,产生的 DHAA 与氨基酸发生的褐变抵消了它的抗褐变效果;当浓度为 200 mg/L 时, DHAA 与氨基酸发生的褐变超过了它的抗褐变效果。试验中也看到,抗坏血酸浓度为 50 mg/L 时,外植体的生长情况、繁殖系数要好于后 3 种浓度,平均苗高 2.5~3 cm,叶片绿色,长势旺盛。吸附剂活性炭也能减轻褐化现象,但凡是添加活性炭的培养基,外植体均未产生愈伤组织,可能由于活性炭不仅吸附有害物质,也吸附了培养

(下转第 354 页)

- method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(3): 601 - 605.
- [6] Nover L, Bharti K, Doring P, *et al.* Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(3): 891 - 897.
- [7] 李跃建, 姬红丽, 彭云良, 等. 应用双向电泳技术研究条锈菌侵染后小麦蛋白质的改变[J]. *四川大学学报(工程科学版)*, 2005, 37(2): 80 - 85.
- [8] 朱林友, 吴健胜, 王金生. 水稻对白叶枯病菌抗性相关蛋白的双向电泳分析[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(4): 91 - 93.
- [9] Cheng Rongzhi, Weng Qingmei, Huang Zhen. Analysis of related proteins in rice against brown panthopper by two - dimensional electrophoresis [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(4): 427 - 432.
- [10] 范国强, 李有, 郑建伟, 等. 泡桐丛枝病发生相关蛋白质的电泳分析[J]. *林业科学*, 2003, 39(2): 119 - 122.
- [11] 刘岩, 彭学贤, 谢友菊. 植物抗渗透胁迫基因工程研究进展[J]. *生物工程进展*, 1997, 7(2): 31 - 36.
- [12] 张建秋, 陆海, 王智, 等. 双向电泳技术分析白刺盐胁迫蛋白的表达[J]. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(5): 511 - 514.
- [13] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L, *et al.* A proteomic approach to analyzing drought - and salt - responsiveness in rice[J]. *Field Crops Research*, 2002, 76: 199 - 219.
- [14] 王振英, 彭永康, 郑坚瑜. 盐胁迫下水稻和黑麦幼苗蛋白质组分的变化[J]. *南开大学学报(自然科学版)* 2001, 34(3): 112 - 115.
- [15] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L, *et al.* Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery[J]. *Proteomics*, 2002, 2: 1131 - 1145.
- [16] 尚忠林, 傅晓瑞, 李云荫. 干旱和 ABA 对同核异质冬小麦叶片蛋白的影响[J]. *西北植物学报*, 2001, 21(6): 1147 - 1151.
- [17] 李妮亚, 高俊凤. 干旱对小麦幼芽蛋白质组分及等电点的影响[J]. *西北农业大学学报*, 1997, 25(3): 6 - 11.
- [18] 王伟, 崔红, 陈亮, 等. 盐胁迫对不同生境铺地黍叶片蛋白质合成的影响[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(3): 417 - 420.
- [19] 赵军, 赵玉田, 梁博文. 寒胁迫过程中冬小麦叶片组织可溶性蛋白质含量的变化和功能[J]. *中国农业科学*, 1994, 27(2): 57 - 61.
- [20] Skylas O J, Cordwell S J, Hains P G, *et al.* Heat shock of wheat during grain filling: proteins associated with heat tolerance[J]. *Journal of Cereal Science*, 2002, 35: 175 - 188.
- [21] 姜蕊, 胡永红, 蒋昌华, 等. 热胁迫下月季叶片蛋白双向电泳分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(4): 91 - 94.
- [22] Song W Y. A receptor kinase - like protein encoded by the rice disease resistance gene Xa 21[J]. *Science*, 1995, 270: 1804 - 1806.

(编辑 刘彦琴)

(上接第 350 页)

基中的激素和有益元素,使培养基的实际激素浓度和各种元素含量下降,从而抑止了愈伤组织的生成。

光照对于褐变也有一定的影响,适当的暗处理有利于减轻褐变。温度对褐变的影响亦很大,温度降到 19℃ 时,褐化率降低到 33.33%,低温可以降低酶的活性,但温度的降低也要在一定的范围内,过低的温度甚至会造成外植体不同程度的冻害。

参考文献:

- [1] 陈存及,陈伙法. 阔叶树种栽培[M]. 北京:中国林业出版社, 2000.
- [2] 李云. 林果花菜组织培养快速育苗技术[M]. 北京:中国林业出版社, 2001. 117 - 118.
- [3] Kacem B, Cornel J A. Nonenzymatic browning in aseptically package drinks: Effect of ascorbic acid, amino acid and oxygen[J]. *Food Sci*, 1987, (52): 1668 - 1672.

(编辑 刘彦琴)