

中国李组织培养过程中褐变的抑制研究*

邹英宁^{1,2}, 李国怀^{1**}, 吴强盛²

(1. 华中农业大学 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

摘要:研究了影响中国李(海湾红宝石)*Prunus salicina* Lindl. cv. Gulf ruby 茎段培养褐变的因素,包括基本培养基组分、抗氧化剂、细胞分裂素等。结果表明,WPM 作为基本培养基培养效果较好;维生素C $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 有效抑制褐变(褐变率16.7%),且能明显促进增殖(增殖倍数3.00)和生长;KT $0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 外植体生长良好,褐变减轻。适宜的培养方案为 WPM + IBA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 6-BA/KT $0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + Vc $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,低温弱光下培养7d后转入光下继续培养。

关键词:中国李;茎段培养;褐变;抗氧化剂;细胞分裂素

中图分类号:S662.301 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0457(2007)06-0508-05

Study on browning control in the shoot-tip tissue culture of Chinese plum*

ZOU Ying-ning^{1,2}, LI Guo-huai^{1**}, WU Qiang-sheng² (1. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Hubei Wuhan 430070, China; 2. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434025, China)

Abstract: Factors affecting browning of the stem segments culture of Chinese plum *Prunus salicina* Lindl. cv. Gulf ruby were studied with basal media, antioxidants and cytokinins. The results indicated that WPM as basal medium could achieve the better effect. $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Vc availablely depressed the browning of explants (16.7% browning percentage) and obviously enhanced the multiplication (3.00 multiplication time) and growth of explants. The growth of explants with $0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT was well, and a slight browning was observed in these explants. The feasible protocol to the stem segment culture of Chinese plum was that the half-lignification explants were cultured on WPM media including Vc $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and IBA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ added with either 6-BA $0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ or KT $0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Subsequently, the explants were placed under the conditions of low temperature and slight light. Seven days after the culture, the explants were transferred to light culture.

Key words: Chinese plum; stem segments; browning; antioxidants; cytokinins

在植物组织培养中易出现外植体或培养物的褐化、枯死现象,这种褐化现象又称为酚污染^[1],其对外植体的脱分化和营养物的再分化产生严重的影响,甚至对某些果树组织培养成功与否起决定作用。目前国内外对桃、杏、樱桃等核果类果树研究进展较快,建立了无性繁殖体系,并且已进入遗传转化阶段^[2-4],但对李 *Prunus salicina* Lindl. cv. Gulf ruby 的研究较少。这可能因其组织中酚类物质含量较高,在组培中褐变非常严重,极易导致外植体死亡,难以建立无性繁殖体系,限制了李的组培快繁。这种褐变现象的有效控制是李组织培养取得成功的关键。基于此,笔者在中国李茎段培养中多次重复比较试验研究,筛选出较好的抑制方法,为顺利进行李的组织培养提供保证。

收稿日期:2007-10-08;修回日期:2007-11-07

基金项目:湖北省重点科技攻关项目资助(2001AA209B-140)

作者简介:邹英宁(1978-),女,山东烟台人,长江大学园艺园林学院助教,从事园艺植物生物技术工作。

** 通讯作者: E-mail liguohuai@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

外植体取自华中农业大学果树试验园3年生(用于1.2.1、1.2.2、1.2.3试验)和湖北省武汉市东西湖走马岭农场6年生海湾红宝石李 *Prunus salicina* Lindl. cv. Gulf ruby 嫩梢。常规杀菌后无菌操作下切割成长度为0.5~1.0cm的茎段进行接种。

1.2 方法

1.2.1 基本培养基 采用4种基本培养基,即MS、3/4MS、改良MS($1/2 \text{ NH}_4\text{NO}_3$)、WPM,并添加6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的组合进行比较。

1.2.2 抗氧化剂 在WPM+IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中添加不同种类、不同浓度的抗氧化剂:柠檬酸(CA)0.5、1.0、3.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;维生素C(Vc)0.5、1.0、3.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;活性炭(AC)0.25、0.50、1.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;聚乙烯吡咯烷酮(PVP)2.5、5.0、10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;CK(不添加抗氧化剂),比较其对生长及防褐变的影响。

1.2.3 细胞分裂素 在含Vc $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的WPM培养基中,添加不同种类的细胞分裂素(KT 0.5~2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6-BA 0.5~2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),比较其对分化和褐变的影响。

培养基pH值5.5~5.8,接种后先将外植体置于低于室温(25 ± 1)℃和弱光下培养7d后,转移到光下培养;[光]照度为3000lx,光周期为16h(光照)/8h(黑暗)。每个处理的外植体接种数均为50个以上,30d后统计褐变率和记录生长状况。

其计算公式为:褐变率(%) = 褐变数/接种数 $\times 100$;增殖倍数 = 增殖后芽苗数目/成活数。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对外植体增殖和生长的影响

基本培养基中影响外植体诱导、增殖的主要因素是大量元素即无机盐的浓度,特别是对芽的伸长有明显的影响。本研究比较了MS、3/4MS、改良MS和WPM 4种基本培养基对中国李茎段培养增殖、生长的影响,结果见表1。表1结果表明,在MS培养基中,虽然前期增殖倍数(2.50)较高,生长较快,但到培养后期增殖倍数升高不明显(3.94),并出现生长缓慢、叶片发黄、逐渐变褐死亡的现象(见图1);在3/4MS培养基中,增殖倍数(2.47)略低于MS培养基,培养后期生长略有改善,但仍有叶片黄化、逐渐变褐死亡的现象;在改良MS、WPM培养基中,外植体生长较快,长势较好,增殖倍数分别为2.40、2.44,60d后,WPM培养基中外植体的长势明显好于改良MS,且增殖倍数最高,达4.07,>1cm嫩梢的比例升高(28.2%),这有利于以后的生根培养。由此可见,中国李茎段培养以WPM培养基最好(见图2)。

表1 基本培养基对外植体增殖和生长的影响

Tab. 1 The effect of different media on multiplication and growth of explants

培养基	增殖倍数(30d)	增殖倍数(60d)	>1cm嫩梢(%)
MS	2.50	3.94	18.3
3/4 MS	2.47	3.93	19.2
改良 MS	2.40	3.93	23.7
WPM	2.44	4.07	28.2

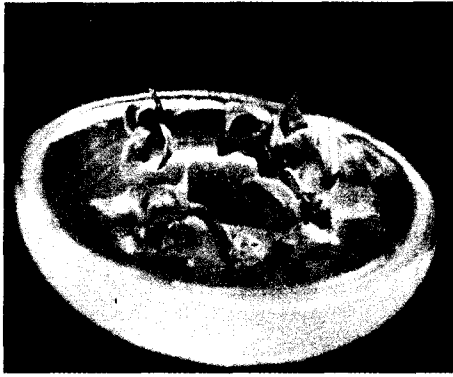


图1 MS培养基培养后期黄化变褐现象

Fig.1 Etiolation and browning of explants on MS media



图2 WPM培养基正常生长状况

Fig.2 Growth status of explants on WPM media

2.2 抗氧化剂对外植体褐变抑制和生长的影响

在中国李茎段培养中,酚类物质含量较高,外植体褐变非常严重,接种 24h 后外植体开始褐变。针对此现象,添加不同种类和浓度的抗氧化剂研究其对中国李抑制褐变和生长的影响,其结果见表 2。表 2 结果表明,不同种类的抗氧化剂均对抑制褐变有一定的效果,处理后褐变率均低于 CK,其抗氧化能力顺序依次为 PVP > Vc > AC > CA。其中,PVP 在 $5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时褐变率最低,为 13.3%;CA 在 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时褐变率较高,达 32.1%。4 种抗氧化剂在适宜浓度下对中国李茎尖增殖和生长均具有明显的促进作用,其大小顺序为 Vc > AC > PVP > CA。在所试浓度范围内,CA 在 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时不定芽增殖倍数为 2.43;Vc $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为 3.0;AC $0.50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为 2.30;PVP $5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为 2.33,增殖倍数均明显高于 CK。从生长状况来看,Vc 以 $0.5\sim 1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、AC 以 $0.50\sim 1.00\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果较好,其中 Vc $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时不仅增殖倍数高,且生长也很好,是较为理想的浓度。由此可见,抗氧化剂以 Vc $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果最好(见图 3)。

图3 Vc $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 外植体生长状况Fig.3 Growth status of explants with Vc $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

表2 不同抗氧化剂对防止中国李褐变及生长的影响

Tab.2 The effects of different antioxidants on browning percentage and growth of Chinese plum

抗氧化剂	浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	褐变率(%)	增殖倍数	生长状况(30d)
对照(CK)	-	38.6	0.83	生长缓慢,叶片尚未展开。
柠檬酸(CA)	0.5	32.1	2.43	叶片尚未展开,芽体部分伸长。
	1.0	26.9	2.33	5d 出现大量愈伤团,15d 出现不定芽。
	3.0	29.4	1.69	叶片尚未展开,芽体尚未伸长。
维生素C(Vc)	0.5	18.9	2.08	生长较好,部分叶片展开。
	1.0	16.7	3.00	生长较好,部分叶片展开。
	3.0	14.3	1.86	叶片尚未展开,部分芽体伸长。
活性炭(AC)	0.25	21.4	1.89	个别叶片展开。
	0.50	18.2	2.31	生长较好,部分叶片展开。
	1.00	17.0	2.09	生长较好,少数叶片展开。
聚乙烯吡咯烷酮(PVP)	2.5	15.7	1.58	叶片尚未展开,部分芽体伸长。
	5.0	13.3	2.33	芽体伸长,叶片未展开。
	10.0	20.4	1.89	叶片尚未展开,部分叶片畸变。

2.3 细胞分裂素对茎段生长及褐变的影响

从表3可见,在WPM培养基中添加不同种类和浓度的细胞分裂素,对中国李褐化和生长的影响是不同的。随KT和6-BA浓度的升高,褐化率随之增高,诱导率降低。6-BA在 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,褐化率较低,仅为20.0%左右,诱导率为60.0%以上,生长状况也较好;当KT浓度在 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,褐化率略低于6-BA,诱导率却稍高于6-BA,生长状况良好,伸长加快;当6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、KT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,褐化率均升高,分别为35.0%、30.0%,诱导率明显降低,分别为33.3%、38.3%,且生长缓慢,茎细且脆弱,呈水浸状,玻璃化现象严重。在培养后期,随着继代次数的增加,在含有6-BA的培养基中,部分丛状芽发生黄化甚至褐变死亡的现象。当KT $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 代替6-BA后,其幼苗黄化现象逐渐消失,叶色浓绿,伸长加快,1cm以上长度的嫩茎数目多于6-BA。若考虑节约成本,那么,添加6-BA $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 也可到达较为满意的效果。

表3 不同种类和浓度的细胞分裂素对中国李茎尖生长和褐变的影响

Tab. 3 The effects of different concentrations of BA and KT on growth and browning percentage of Chinese plum

激素种类	浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	褐变率(%)	诱导率(%)	生长状况
6-BA	0.5	18.3	60.0	生长较好,后期部分丛状芽黄化变褐,1cm以上嫩茎数目在20.0%左右(见图4)。
	1.0	23.3	66.7	
	2.0	35.0	33.3	生长缓慢,褐化、玻璃化现象严重。
KT	0.5	15.0	71.7	生长良好,少数外植体黄化变褐,1cm以上嫩茎数目在30.0%左右(见图5)。
	1.0	21.7	75.0	
	2.0	30.0	38.3	生长缓慢,褐化、玻璃化现象严重。



图4 6-BA $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 外植体生长状况

Fig. 4 Growth status of explants with 6-BA $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$



图5 KT $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 外植体生长状况

Fig. 5 Growth status of explants with KT $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4 树龄及新梢形态对褐变的影响

树龄及取材部位对褐变的影响是不同的。选用未木质化、半木质化和木质化新梢进行比较。结果表明,半木质化新梢褐变率较低,仅为18.0%,而未木质化和木质化新梢的褐变率均在34%以上。树龄越高,褐化现象越严重,6年生李褐变率为68.0%,是3年生李(20.0%)的3倍多。说明在中国李茎尖培养中采用树龄较低的半木质化新梢能有效防止褐变。

3 讨论

3.1 本研究表明,不同基本培养基抑制褐变的效果不同。WPM培养基效果最好,改良MS培养基居中,而3/4MS和MS培养基效果较差。这可能是MS、3/4MS培养基中无机盐含量过高,造成外植体的毒害,不利于幼茎对养分的吸收,特别是在培养后期,由于培养瓶内水分的损失,导致叶片失绿、黄化变褐而死^[5];

WPM 培养基不仅能有效降低褐化率,且外植体长势良好,伸长加快,其原因可能是 WPM 培养基专门为木本植物培养设计的^[6]。本试验结果与 Emershad 等^[7]对中国李幼胚的研究结果一致,但与其他核果类果树研究结果则相反^[8-9]。

3.2 本试验通过在培养基中添加不同种类和浓度的抗氧化剂对抑制褐变和促进增殖、生长的效果进行研究,其总体结果为 $Vc > AC > PVP > CA > CK$,这与仲飞^[10]在苹果上的试验结果一致。孔祥生等^[11]在柿的组织培养中以及 Jain 等^[12]在欧洲李的组织培养中均观察到外加 PVP 效果最好。研究表明,PVP 在 $2.5 \sim 10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,平均褐变率为 16.5%,是最低的,初步认为可能与 PVP 对外植体分泌的有毒物质的强吸附作用有关。笔者在试验中还观察到 PVP 对促进增殖和生长效果并不是很理想,尤其是高浓度的 PVP ($10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)致使培养物叶片卷曲,生长缓慢,发生畸变。因为 PVP 具有副作用,可致组织培养物坏死^[13]。果树上使用 CA 作为抗氧化剂的研究还未见报道。张启香等^[14]在蝴蝶兰的组织培养中发现 CA 抑制褐化和促进生长的效果明显优于 AC,但在本试验中,加入 $CA 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5d 后外植体叶腋处出现大量微黄的愈伤团,经培养发现这种愈伤组织不能正常生长,10d 内逐渐变褐死去,仅极少数外植体于 15d 后出现不定芽。由此可见,在中国李茎段培养中选用 CA 作抗氧化剂不合适,其原因目前尚不清楚,还有待于进一步研究。

3.3 不同种类和浓度的细胞分裂素对中国李茎尖生长及褐变有一定影响。从本试验结果看,高浓度的 6-BA 可诱导腋芽的大量增殖,但抑制芽的伸长并发生黄化褐变现象;当 6-BA 和 KT 交替使用时,既可保持较高的增殖速度,又可得到较多的健壮幼苗,有利于诱导生根,且节约成本。

参 考 文 献:

- [1] TORRE A M, MAU-LASTOVICKA T, REZZAIYAN R. Total phenolics and high performance liquid chromatography of phenolics acids of avocado[J]. Agric Food Chem, 1987, 35: 921 - 925.
- [2] 江虎军,潘季淑,孟新法. 桃(*Prunus persica* L.) 茎尖培养技术的研究[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(1): 49 - 52.
- [3] HARADA H, MURAI Y. Micropropagation of *Prunus mume* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1996, 46: 265 - 267.
- [4] 阎贤伟. 甜樱桃茎尖培养和快速繁殖研究[J]. 园艺学报, 1990, 17(4): 275 - 279.
- [5] 王 然,戴洪义,周爱芹,等. 矮樱桃的茎尖培养与快速繁殖[C]//张上隆,陈昆松. 园艺学进展. 北京:中国农业出版社, 1994: 199 - 202.
- [6] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社, 2003: 34 - 35.
- [7] EMERSHAD R L, RAMMING D W. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grow in vitro[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 37: 55 - 59.
- [8] 孙清荣,孙洪雁,刘 鹏,等. 杏品种龙王帽茎尖培养试验[J]. 中国果树, 2005(1): 19 - 21.
- [9] 孙满芝. 樱桃矮化砧木 SD-13 组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技, 2000(4): 25 - 27.
- [10] 仲 飞. 红星苹果多酚氧化酶某些特性及其抑制剂的研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 184 - 186.
- [11] 孔祥生,张益民,张妙霞. 柿树试管繁殖的研究[J]. 植物学通报, 1992(增刊): 11 - 12.
- [12] JAIN N, BABBAR S B. Regeneration of 'juvenile' plants of black plum, *Syzygium cumini* Skeels, from nodal exp of mature trees[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2003, 73: 257 - 263.
- [13] MULIN M. Callus formation from thin cell layers of *Anacardium occidentale* L.[J]. Silva Lusitana, 1995, 3(2): 205 - 211.
- [14] 张启香,方炎明,张晓平. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 38 - 40.