

几种影响沙棘组织培养外植体褐化因子分析

杜 研¹, 李 毅¹, 马彦军¹, 杨潇杰²

(1. 甘肃农业大学 林学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省张掖市种子管理稽查站, 甘肃 张掖 734000)

摘要: 为解决沙棘组织培养中易褐变死亡的问题, 本研究通过对沙棘组织培养中外植体取材类型、无机盐浓度、光照和培养温度、不同的 6-BA 浓度、转接周期、培养基硬度以及活性炭 7 种影响外植体褐化因子进行分析。结果表明: 选取沙棘水培 2 周以后休眠芽做外植体褐化率与取 1 年生枝条和 2 年生枝条作外植体的褐化率之间差异显著; 使用 1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的低盐和低 6-BA 浓度的培养基可以降低褐化且促进植株生长; 接种后进行 5 d 的低温暗处理可以推迟褐变产生的时间, 褐化率降低 30% 左右; 在培养基中加入 6~7 g/L 的琼脂可使褐化率降低为 12.67%, 接种后在没有出现褐变物质前转接一次, 然后慢慢延长转接时间比每 14 d 转接一次降低了 30%, 比每 25 d 转接一次降低了 50% 左右; 附加 1~2 g/L 的活性炭可以减小褐变物的直径, 推迟褐变始出物出现的时间, 进而降低褐化率。

关键词: 沙棘; 组织培养; 褐化**中图分类号:** S 722.3**文献标识码:** AFactors affecting explant browning in tissue culture of *Hippophae rhamnoides* L.DU Yan¹, LI Yi¹, MA Yan-jun¹, YANG Xiao-jie²

(1. Forest College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Seeds Administration Station of Zhangye, Zhangye 734000, China)

Abstract: To control the browning and dying of the *Hippophae rhamnoides* L. tissue cultures, the analysis of seven factors which influence the rate of browning of explants, such as the concentration of inorganic salt, temperature and light, the different concentration of 6-BA, the length of cycle, the hardness of medium and AC. The results indicate that the rate of browning was significantly different when we choose dormancy buds, which have been cultured in water for two weeks, and annual or biennial as explant respectively. The medium 1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L reduces the rate of browning and promotes growth. Five days dark processing after inoculation delayed the time of browning, and the rate of browning reduced by 30% or so. After putting 6~7 g/L agar in medium, the rate of browning reduced to 12.67%. Before browning occurs at the beginning, inoculation was performed first, then every fourteen days, when the rate of browning reduced by 30%, and it reduced by 50% while inoculation was done every twenty-five days. The adding of 1~2 g/L AC shortened the diameter of browning substance and delayed the exudation time of browning, so it decreased the rate of browning.

Key words: *Hippophae rhamnoides* L.; tissue culture; browning**收稿日期:** 2006-12-10**基金项目:** 国家林业局局重点项目(2006-35)和甘肃农业大学科技创新基金(GAU-CX0521)**作者简介:** 杜 研(1981-), 女, 甘肃高台人, 硕士, 主要从事植物组织培养技术研究。**通讯作者:** 李 毅(1962-), 男, 湖北汉川人, 教授, 博士, 主要从事林木遗传育种研究。Liyi@gsau.edu.cn

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)属胡颓子科沙棘属的一种落叶灌木或小乔木,具有广泛的生态效益和社会效益。它既具有防风固沙、保持水土、改善环境等作用,又具有很高的营养及药用价值。利用沙棘的顶芽,腋芽,幼叶等部分进行组织培养,已有很多成功的报道^[1-3]。但沙棘组织培养中存在初代培养、继代培养褐化现象,如处理不当常导致组培苗死亡,组培失败。因此如何克服褐化成了沙棘组培成功与否的关键。为此本文研究了影响沙棘外植体褐化的7种因素与组培中外植体褐化率的关系,以便为更好地解决沙棘组培中褐化死亡的问题提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试外植体

外植体选自兰州种苗繁育中心中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)。

1.2 方 法

采用单因子实验,每组实验均设对照并重复3次。褐化率=褐化芽数/接种总芽数×100%;分化率=分化芽数/接种总芽数×100%(统计数据均为3次试验结果的平均值)。

1.2.1 取材类型 材料3种:①一年生幼枝上的顶芽,②二年生幼枝上的顶芽,③冬季休眠芽在室内水培2周后萌动的顶芽。以上三种外植体材料,每种接种50个芽,培养基均为1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L,蔗糖20 g/L,琼脂6 g/L,pH值为6.0,温度(25±2)℃,光照15 h/d,光照强度4 000 Lx。以下实验条件均与此相同。

1.2.2 无机盐浓度 培养基分为4种处理:①MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;②1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;③1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;④1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

1.2.3 光照和培养温度 将外植体接种在1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基中,分为2种处理:①接种后进行5 d的暗处理,温度15~18℃,然后转入正常试验条件;②接种后直接置于4 000 Lx,25~28℃的温度下培养。

1.2.4 不同6-BA浓度 ①1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;②1/4MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;③1/4MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;④1/4MS+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

1.2.5 转接周期 分为3种处理:①接种以后7 d

转接一次,然后14 d转接一次,而后25 d转接一次;②每14 d转接一次;③每25 d转接一次。培养基均为1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

1.2.6 培养基硬度 1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基添加不同浓度的琼脂:①4 g/L;②5 g/L;③6 g/L;④7 g/L。

1.2.7 活性炭 将培养基1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L分为2种处理:①空白对照实验;②附加活性炭1~2 g/L。

2 结果与分析

2.1 外植体取材类型对褐化的影响

用水培以后的休眠芽,一年生和两年生枝条上的顶芽做外植体(如表1),解除休眠的冬芽作外植体其褐化率20 d统计结果为20.67%,与1年生和2年生枝条上的顶芽做外植体的褐化率之间差异显著,而1年生枝条与2年生枝条褐化率之间差异不显著。因此,将休眠枝在室内水培2周后取萌动出的顶芽作外植体,可以降低褐化率。

表1 外植体生长状况对褐化的影响

Table 1 Effect of the *Hippophae rhamnoides* of explant on the browning

处理 Treatment	接种芽数/个 No. of explants	褐化率/% Rating of browning
休眠水培芽	50	20.67 ^b
一年生顶芽	50	30.00 ^a
二年生顶芽	50	31.33 ^a

注:用LSD法进行多重比较(F=5%),不同字母表示差异显著“(下表同)”。

2.2 无机盐浓度对褐化的影响

采用MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS进行对比试验,试验结果表明,在MS、1/2MS、1/3MS的培养基中,小苗与培养基接触的地方7 d左右开始有褐色物质渗出,到20 d左右褐化率已分别达到52.67%、36.00%和32.67%,而1/4MS的培养基中,褐化较轻,部分培养基已无明显褐化现象,20 d统计褐化率为18.00%。1/4MS与MS、1/2MS、1/3MS褐化率之间均差异显著。从分化情况来看,在1/4MS的培养基中分化率达到64.00%,植株生长正常,茎伸长明显,MS、1/2MS、1/3MS中分化率分别为20.00%、36.33%、42.67%,植株生长缓慢,茎细而弱,颜色多灰绿色,随着时间的延长开始死亡。多重比较结果表明(表2)1/4MS培养基与MS、1/2MS、1/3MS分化率之间均差异显著。因此,应选用1/4MS的培养基及能抑制褐化又可使植株生长正常。

表 2 无机盐浓度对褐化的影响
Table 2 Effect of the concent ration of inorganic salt on the browning

处理 Treatment	接种芽数/个 No. of explants	分化率/% Differentiation rates	褐化率/% Rating of browning
MS	50	20.00 ^c	52.67 ^a
1/2MS	50	36.33 ^b	36.00 ^b
1/3MS	50	42.67 ^b	32.67 ^b
1/4MS	50	64.00 ^a	18.00 ^c

表 3 光照和培养温度对褐化的影响
Table 3 Effect of the temperature and Light on the browning

处理 Treatment	褐化率/% Rating of browning	褐化情况 Browning situation	生长情况 Growth situation
5 d 暗处理	16.0	褐变反应 11~12 d 左右,有较轻的浑浊现象	茎开始分化生长,伸长明显
正常光照处理	40.0	褐变反应 7~8 d 出现,为棕褐色絮状物,培养基一半变黑	植株随褐变加重死亡

2.4 不同的 6-BA 浓度对褐化的影响

在 1/4MS+NAA 0.2 mg/的基础上,附加不同浓度的 6-BA,试验结果表明:不同浓度间差异明显,褐化率随着 6-BA 浓度的增大而增大。多重比较结果表明:0.5 mg/L、1.5 mg/L 之间差异不显著,与 3.0 mg/L、5.0 mg/L 之间差异显著。因此,较低浓度的 6-BA 能减少褐化的产生,浓度应控制在 0.5~1.5 mg/L。

表 4 6-BA 浓度对褐化的影响
Table 4 Effect of the 6-BA concentration on the browning

处理/(mg·L ⁻¹) Treatment	接种芽数/个 No. of explants	褐化率/% Rating of browning
0.5	50	12.67 ^c
1.5	50	16.67 ^c
3.0	50	30.33 ^b
5.0	50	41.33 ^a

2.5 转接周期的长短对褐化的影响

在试验中,接种后 7 d 转瓶一次,过 14 d 后再转瓶一次,然后 25 d 转瓶一次者,60 d 统计结果,褐化率为 10.00%,植株色泽正常,生长良好;每 14 d 转瓶一次者,瓶内有褐色混浊物质产生,褐化率达到 42.70%,而 25 d 后再转瓶,沙棘植株 60~70%已经褐化,生长缓慢或死亡。由此可见,对于沙棘等易褐化的材料,若接种后转瓶周期过长,伤口周围的酚类物质增多,会加重褐变。试验表明:接种后应该在褐化出现以前先转接一次,然后延长转接的周期 14 d 转接一次,最后 25 d 转接一次可以很有效的抑制褐变。

2.6 培养基硬度对褐化的影响

本试验采用在培养基中加入 4 g/L、5 g/L、6 g/L

2.3 光照和培养温度对褐化的影响

把接种在 1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的外植体进行两种处理:5 d 的暗处理和正常光照处理,20 d 统计结果表明(表 3):暗处理可以明显抑制褐化,褐化率为 16.00%,植株生长旺盛,色泽正常;而正常光照下的褐化率 20 d 已达到 40.00%并且随褐变加重开始大量死亡。因此,接种后进行 5 d 的暗处理是降低褐变率的有效方式。

L、7 g/L 的琼脂进行对比试验。表 5 数据显示,培养基硬度加大,褐化率会随之降低。多重比较结果表明,5 g/L、6 g/L 之间差异显著;4 g/L、5 g/L 之间差异不显著;6 g/L、7 g/L 之间差异也不显著。因此,选择 6~7 g/L 的琼脂能有效的抑制褐化。

表 5 培养基硬度对褐化的影响
Table 5 Effect of the hardness of medium on the browning

处理/(g·L ⁻¹) Treatment	接种芽数/个 No. of explants	褐化率/% Rating of browning
4	50	29.33 ^a
5	50	28.67 ^a
6	50	12.67 ^b
7	50	10.67 ^b

2.7 活性炭对褐化的影响

在培养基中加入 1~2 g/L 活性炭,能有效地降低外植体的褐化率。试验结果(见表 6)表明褐化率由不加时的 44.67%降低为 12.00%;并且使培养物始现渗出物的时间有 7~8 d 推迟为 11~12 d;培养基变褐部分的直径也由 2.3 cm 减小为 1.1 cm。

表 6 活性炭对褐化的影响
Table 6 Effect of AC on the browning

处理 Treatment	接种芽数/个 Inoculation buds	始现渗出物的时间/d Come forth exudation time	变色部分直径/cm Change colors Portion diameter	褐化率/% Rating of browning
对照 Control	50	7~8	2.3	44.67
活性炭 AC	50	11~12	1.1	12.00

3 结论与讨论

沙棘,在组织培养中褐化现象严重。其组织创

伤面的酚类物质,一旦接触空气便氧化为醌类有毒物质,这些有毒物质积累在培养基中,而使培养材料中毒死亡^[4]。本实验针对沙棘组培中产生褐变的外因进行研究。采用冬季休眠芽在室内水培2周后萌动的顶芽,接种在1/4MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基中在暗室培养5 d,然后置于25℃自然光照下培养,可在一定时期内维持外植体生长不受褐变的影响。但随时间延长,褐变就会加重,尤其是在接种初期。因此在接种初期褐化产生前先转接一次,而后慢慢延长转接周期。另外还可添加吸附剂来抑制褐变,本试验选取得是1~2 g/L的活性炭。

褐变一般随着培养材料的年龄和组织木质化程度的提高而加剧^[5]。生长旺盛的芽,代谢速度快,但褐化较重,对消毒液极敏感。经过水培以后的沙棘幼芽,耐消毒,褐化较轻,组培苗成功率高。在无菌苗初期进行勤转接,较为重要,它能有效防止褐化死亡,消除褐化产物的积累。初期培养可在黑暗或弱光下进行,转接后3~5 d内进行低温及暗处理,能有效防止褐化的产生,减弱褐化。这主要是由于低温暗处理减弱了代谢速度,减少了醌类物质的形成^[6]。

培养基中无机盐浓度过高,可致使酚类物质的大量产生,导致细胞褐变;降低盐浓度可以减少酚类外溢,从而减轻褐变^[7]。使用低浓度的无机盐,在沙棘的组织培养中较为重要。试验表明,顶端分生组织的生长不仅需要低无机盐的培养基,而且需要较低水平的激素物质,这和徐虹^[1]、孙兰英^[2]等对沙棘组织培养研究中得到的结果是相同的。较低浓度的6-BA适宜茎尖的分化生长,褐化反应慢,这在邱璐^[4]等对桑树的组织培养中褐化问题的研究中也得到证实。

在离体繁殖中加入一定量活性炭(AC)可减轻醌类物质的毒害,有效地抑制褐化^[8]。活性炭是一种较强的吸附剂,它可以吸附培养物分泌到培养基

中的酚、醌等有害物质,从而有效地减轻褐变^[9]。但在使用过程中,应注意尽量用最低浓度的活性炭来对抗褐变的产生,因为活性炭的吸附作用也会吸附培养基中的其他成分^[8,10]。培养基的硬度对褐变有一定的影响。在一定范围内,琼脂用量大,培养基硬度大,褐变率低^[4,11]。这可能是培养基的硬度影响了酚类物质的扩散速度的缘故。

参考文献:

- [1] 徐虹,王俊峰,梁宗锁.沙棘组织培养技术研究现状及存在问题[J].沙棘,1999,12(1):11-13.
- [2] 孙兰英.沙棘组织培养与植株再生研究[J].国际沙棘研究与开发,2004,6(2):28-30.
- [3] 李师翁,范小蜂,卢东平,等.大果良种沙棘愈伤组织诱导及植株再生的研究[J].西北植物学报,2001,21(2):262-266.
- [4] 邱璐,陈善娜,等.桑树组织培养中褐化问题的研究[J].云南大学学报(自然科学版),2000,22(1):76-78.
- [5] 王东霞,李长杰.如何对抗植物组织中的组织褐变[J].中国花卉盆景,2002,12:29-30.
- [6] 姬惜珠,王红,张爱军.木本植物离体快繁中常见问题及解决方法[J].河北果树,2005(2):13-14.
- [7] 刘用生.植物组织培养中活性炭的使用[J].植物生理学通讯,1994,30(3):214.
- [8] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986,456-466.
- [9] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.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):78-83.
- [10] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州:广东高教出版社,2000.
- [11] 汪秀峰.植物组织培养“抗褐”之初探[J].安徽农业科学,1999,27(4):325-326.

(编辑:祁振声)