

# 山茶花组织培养过程中的防外植体褐化试验\*

张志兰

(云南省林业职业技术学院, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 针对山茶花组织培养过程中外植体出现褐化的问题, 用山茶花的嫩茎段及芽尖为外植体作不同的处理试验, 以比较其减轻外植体褐化的效果。得出的结论为: 黑暗条件下培养外植体、用 1/1000 抗坏血酸处理外植体、在培养基中加入一定比例的活性炭、在接种前再剪去一部分茎段外植体、对外植体勤转瓶这些措施在一定程度上可以减轻山茶花组培过程中外植体的褐化程度, 从而提高其组培的成功率。

**关键词:** 山茶花; 组织培养; 外植体; 褐化

**中图分类号:** S 722    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1672-8246 (2007) 02-0118-04

## Experiment on Prevention Method of Brown Turning in Tissue Culture of Camellia

ZHANG Zhi-lan

(Yunnan Forestry Vocational Technology College, Kunming Yunnan 650224, P. R. China)

**Abstract:** Aiming at the brown turning problems in tissue culture of camellia, experiments to release the brown turning by different treatments were conducted using the tender stem segments and bud tips as the experimental materials. The experimental results indicated that under dark condition, treating the explants with 1/1000 ascorbic acid, adding some activated carbon to the medium, cutting part of the explant before inoculation and often transferring culture bottle could release brown turning to some extend.

**Key words:** Camellia; tissue culture; explant; brown turning

山茶花 (*Camellia japonica*) 原产我国, 是世界观赏园艺的重要花卉树种。因木本植物尤其是象山茶花这样的木本植物, 组织培养的难度较大, 目前国内外对其组培成功的报道并不多。在山茶花组织培养过程中, 剪切外植体时, 其伤口常因出现酚类物氧化造成毒害 (酚污染), 而产生褐化现象, 增加了其组织培养的难度。本项试验, 对山茶花组织培养过程中外植体出现的褐化问题进行了分析研究, 通过采取相应减低褐化的措施, 以提高山茶花组织培养的成功率。

### 1 试验材料与方法

#### 1.1 外植体的采集及处理

以同一株山茶树春季当年生长的枝条 (采集树上部 10~15 cm 处的枝条) 上的嫩茎段和芽尖作为本项组培试验的外植体。其山茶花生于株洲市中南林学院院内夕阳红花圃, 树龄为 6~8 年。

枝条采来后, 先在自来水下冲洗干净, 从嫩枝条上剪取 1~1.5 cm 长的嫩茎段 (带一个腋芽) 和嫩芽尖, 在无菌操作台上先用 75% 的酒精消毒

\* 收稿日期: 2006-12-15

作者简介: 张志兰 (1977-), 女, 云南昆明人, 助教, 主要从事生物多样性保护与利用方面的教学工作。

2~3 min, 再用 0.1 % 的升汞消毒 3~4 min, 用灭菌水冲洗 3~4 次, 待用。两种外植体接种过程中的消毒方式、培养基配方(激素配比: MS+6-BA2.5 mg/L+NAA0.05 mg/L) 等处理都相同。

1.2 防褐化试验

1.2.1 外植体在黑暗及光照条件下培养

山茶花的茎段外植体经过相同的消毒处理以后接种在培养基上, 一部分先放在黑暗条件下培养, 另一部分则放于光照条件下培养, 一星期后, 二者全部转瓶后都放光照条件下培养, 观察暗培养和光照培养对其褐化的影响。

1.2.2 用抗坏血酸对外植体进行处理

分别用抗坏血酸处理山茶花的嫩茎段和芽尖, 以观察其组培过程中的褐化情况。

试验用的嫩茎段、芽尖两种外植体在无菌操作台上先用 1/1000 的抗坏血酸浸泡约 10 min, 再按一般步骤作消毒灭菌处理, 接种后放光照条件下培养。以外植体不浸泡抗坏血酸, 按同样方式消毒处理后接种, 然后放光照条件下培养作为对照。

1.2.3 在培养基中加入活性炭

煮培养基时, 在放蔗糖的同时加入活性炭。分为 3 组:

- 第一组(作对照): 不加活性炭;
- 第二组: 加入 1 % 的活性炭;
- 第三组: 加入 3 % 的活性炭。

此 3 组培养基的其他成分相同; 采用的茎段、芽尖外植体和其他条件相同。以比较在培养基中加入活性炭是否能减轻组培中山茶花外植体褐化程度。并观察加入不同活性炭浓度的效果。

1.2.4 在接种前剪去一部分茎段

以山茶花的嫩茎段作为本试验用的外植体。先剪取长约 2~3 cm 长的嫩茎段, 在无菌工作台上进行消毒灭菌处理后, 再用无菌剪刀剪去其的一段以不伤及腋芽为度, 处理后其茎段只剩长约 1~1.5 cm。然后接入培养瓶中, 放光照条件下培养。

以直接剪取长约 1~1.5 cm 的嫩茎段, 经消毒灭菌处理后, 接入培养基中放光照条件下培养作为对照。

1.2.5 外植体勤转瓶

以山茶花的嫩茎段为外植体在相同的培养条件下, 分两组作试验, 比较两组茎段褐化的程度及死亡情况。第一组, 接种后外植体每隔一个星期转一次瓶, 共转 3 次; 第二组为对照组, 接种后外植体不转瓶。

2 结果与分析

2.1 暗培养减轻外植体褐化的效果

山茶花嫩茎段外植体, 暗培养与光照下培养的实验结果见表 1。

表 1 暗培养和光照下培养的嫩茎外植体褐化程度

Tab. 1 Brown turning extends of explant culture under dark and light conditions

| 培养条件 | 试验茎段数/个 | 褐化死亡数/个 | 褐化程度 | 一星期转瓶后的培养条件 | 褐化死亡数/个 | 褐化程度 |
|------|---------|---------|------|-------------|---------|------|
| 暗培养  | 38      | 4       | +    | 光培养         | 6       | +++  |
| 光培养  | 38      | 0       | +++  | 光培养         | 0       | +    |

注: 表中用代号表示外植体的褐化程度。①不明显, 基本无褐色, 代号“0”; ②明显, 有轻微褐变, 褐色较浅, 代号“+”; ③很明显, 褐色较深, 代号“+++”; ④严重, 褐色特深, 代号“++++”。余表同。

从整体情况来看, 前期暗培养的外植体褐化不太严重, 而放光照条件下培养的外植体则褐化相当严重; 经一星期后全部转瓶, 都放光照条件下培养一段时间后, 可以看出暗培养过的外植体反而比光照条件下培养的外植体褐化严重。这说明暗处理在一定程度上能控制山茶花嫩茎外植体的褐变, 因为在酚类化合物合成和氧化过程中, 需要许多酶系统, 其中一部分酶系统的活性是受光诱导的, 这些酶在光照条件下生长的外植体内比较活跃, 而把外植体放黑暗条件下培养, 外植体组织内受光诱导的

那些参与酚类合成的氧化酶活性就大大减弱, 以致使其的酚类化合物合成减少, 氧化产物醌类也相应减少, 从而使褐化得到控制。虽然暗培养开始能控制褐化, 但当转至光照条件下培养后其褐化反而加重了。这是因为在室外光下生长的植株体内酚类含量已经很高, 接种后放在黑暗中并不能马上降低酚类含量, 一移到光照条件下, 在光的诱导下反呈现严重的褐化。

2.2 抗坏血酸处理外植体减轻褐化的效果

抗坏血酸处理外植体后的褐化试验结果见表 2。

表 2 抗坏血酸处理外植体后的褐化情况

Tab. 2 Brown turning of explant culture after treated with ascorbic acid

| 外植体 | 处理方式      | 试验数/个 | 第二天褐化程度 | 一个星期后褐化程度 |
|-----|-----------|-------|---------|-----------|
| 茎段  | 浸泡 1%抗坏血酸 | 45    | 0       | +         |
| 茎段  | 对照        | 45    | +       | ++        |
| 芽尖  | 浸泡 1%抗坏血酸 | 35    | 0       | +         |
| 芽尖  | 对照        | 35    | +       | ++        |

由表 2 可知:浸泡过 1 %抗坏血酸的山茶花外植体不论是茎段还是芽尖,其褐化程度都比没浸泡过抗坏血酸的茎段和芽尖稍轻。这是因为加入抗坏血酸可改变外植体周围的氧化还原电势,从而抑制了酚类的氧化,以减轻其的褐化。

### 2.3 在培养基中加入活性炭减轻褐化的效果

活性炭对减轻外植体褐化的试验结果见表 3。

表 3 活性炭对减轻外植体褐化的效果

Tab. 3 Effect of activated carbon on brown turning release of explant

| 外植体 | 培养基中加入活性炭的量/% | 试验数/瓶 | 第二天褐化程度 | 一个星期后褐化程度 |
|-----|---------------|-------|---------|-----------|
| 茎段  | 3             | 10    | 0       | +         |
| 茎段  | 1             | 10    | 0       | +         |
| 茎段  | 0 (对照)        | 10    | +       | ++        |
| 芽尖  | 3             | 10    | 0       | +         |
| 芽尖  | 1             | 10    | 0       | +         |
| 芽尖  | 0 (对照)        | 10    | +       | ++        |

从表 3 可以看出,在山茶花两种外植体的组培培养基中加入活性炭在一定程度上能减轻其的褐化。这是因为活性炭作为吸附剂可去除酚类氧化造成的毒害效应。活性炭的主要作用在于通过氢键、范德华力等作用把有毒物质从外植体周围吸附掉。活性炭除了有吸附作用外,在一定程度上还有降低光照强度的作用,以此减轻山茶花外植体的褐变。不过,有关文献表明:用吸附剂抑制褐变有一个副作用,即吸附剂在吸附有毒酚类的同时,也会吸附培养基中的生长调节剂,所以在都能减轻褐化的基础上,活性炭的浓度应倾向于偏低为好,因此山茶花组培的培养基中放 1 %的活性炭的效果应比 3 %的好。

### 2.4 接种前再剪去一部分茎段对减轻褐化的效果

茎段的的不同剪切方式对减轻褐化的试验结果见表 4。

表 4 茎段的的不同剪切方式对减轻褐化的效果

Tab. 4 Effect of different cutting methods on brown turning release

| 处理       | 试验数/瓶 | 第二天褐化程度 | 一个星期后褐化程度 |
|----------|-------|---------|-----------|
| 再剪切      | 12    | 0       | +         |
| 不再剪切(对照) | 12    | +       | ++        |

由表 4 可知,山茶花的茎段外植体消毒后再剪去一段茎段而直接接入培养瓶后可在一定程度上减轻其的褐化。这是因为先剪的外植体放在空气中的时间长,而植物在切割时会溢泌一些酚类物质,这些酚类物接触空气中的氧气后,会自动氧化或由酶类催化为相应的醌类,产生可见的茶色、褐色以致黑色,这就造成酚污染,而当消毒灭菌后再剪去一部分外植体后直接接入培养基中,则缩短了其伤口与外界接触的时间而减少酚对其的污染。

### 2.5 外植体勤转瓶对减轻褐化的效果

山茶花茎段外植体转瓶次数不一样,其褐化的情况见表 5。

表 5 茎段外植体勤转瓶处理的褐化情况

Tab. 5 Explant brown turning of often transferring culture bottle

| 转瓶次数 | 试验数/瓶 | 褐化程度 |        |        |        |  | 褐化死亡数/个 |
|------|-------|------|--------|--------|--------|--|---------|
|      |       | 转瓶前  | 第一次转瓶后 | 第二次转瓶后 | 第三次转瓶后 |  |         |
| 3    | 18    | ++   | ++     | +      | 0      |  | 0       |
| 0    | 18    | ++   | ++     | +++    | +++    |  | 10      |

表 5 的试验结果说明勤转瓶也可减轻山茶花茎段外植体的褐化程度,提高其组培的成活率。对于这种易褐变的材料,接种后转瓶时间长或不转瓶,伤口周围积累的醌类物质增多,褐变加重而增加外植体受毒害死亡的机率,而增加转瓶次数可减轻其的褐变。

## 3 讨论

通过试验得出结论:茎段外植体在黑暗条件下培养,用 1 %抗坏血酸处理茎段及芽尖外植体、在培养基中加入一定比例的活性炭、在茎段外植体行接种前再剪去一部分茎段、对外植体勤转瓶等措施

可以在一定程度上减轻山茶花嫩茎段及芽尖外植体组培过程中的褐化。但连续黑暗处理会降低外植体的生理活力,从而导致外植体的死亡,所以采取长期黑暗条件下培养以减轻外植体褐化并不可取。试验中得出的结论,大部分是通过试验观察,并且查阅相关资料总结得出的。在园艺植物组织培养中,还有许多植物例如蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*)、观赏凤梨等都存在褐化问题,希望通过此山茶花组培防外植体褐化试验与大家一起探讨园艺植物组织培养中的防外植体褐化问题,相信还有其他的一些方法也可减轻其的褐化。

#### 参考文献:

- [1]谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991.
- [2]程广有. 名优花卉组织培养[M]. 北京:科学技术出版社,2001.
- [3]杜耀林,马 成. 植物组织培养[M]. 北京:科学技术出版社,1995.
- [4]朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯,1996,32(6):444-449.
- [5]颜吕敬. 植物组织培养手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990.
- [6]杨增编. 园艺植物组织培养[M]. 北京:农业出版社,1987.
- [7]余朝秀,关文灵. 野百合组织培养的研究[J]. 西部林业科学,2005,34(2):76-78.
- [8]范贤熙,胡 秀,王 奇,等. 木本切花植物极美泰洛泊的组织培养研究[J]. 西部林业科学,2006,35(2):86-89.