

引进爬山虎组织培养中的褐化及其控制

冯大领¹, 李云², 孙振元³, 孟祥书¹

(¹河北农业大学, 河北保定 071001; ²北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

³中国林业科学研究院花卉研究中心, 北京 100091)

摘要:以引进爬山虎种子无菌苗为试验材料,对爬山虎组织培养中褐化现象进行了研究。试验结果表明,引进爬山虎种子无菌苗在组培诱导中褐化率高达 89.3%,严重影响了脱分化和再分化。在培养基中添加不同浓度的 AC、PVP、V_C 表明,V_C 是爬山虎组织培养中防止褐化较有效的方法,比 AC 和 PVP 的效果好,V_C 适宜的浓度为 1.5g/L。

关键词:爬山虎;组织培养;褐化;褐化控制

中图分类号:Q813.1+2 **文献标识码:**A

Studies on the Browning and Antibrowning in the Tissue Culture of *Parthenocissus tricuspidata*

Feng Daling¹, Li Yun², Sun Zhenyuan³, Meng Xiangshu¹

(¹Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, ²School of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, ³Flowers Research & Development Centre Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: In this paper, the browning and antibrowning in the tissue culture of *Parthenocissus tricuspidata* was studied. The materials are aseptic stem segments with cotyledons from Canada. The results showed that aseptic stem segments with cotyledons appeared more browning. Its browning rate reached even over 89.3%. Different concentrations of V_C or AC or PVP was added in medium, The results showed that V_C is the best method on antibrowning and its suitable concentration is 1.5 g/L.

Key words: *Parthenocissus tricuspidata*, Tissue culture, Browning, Antibrowning

褐化是指在植物组织培养过程中,由培养材料向培养基中释放褐色物质,以致培养基逐渐变成褐色,培养材料也随之进一步变褐而死亡的现象^[1]。褐化的发生是由于在组织培养中,外植体被损伤,酚类物质释放出来,刺激了多酚氧化酶的活性,使得酚类物质被多酚氧化酶氧化形成醌类物质,扩散到培养基中,造成培养基和植物材料出现褐化。很多植物在组织培养中都会出现不同程度的褐化现象,褐化的出现严重影响了外植体的脱分化和再分化,最终导致外植体的死亡。

爬山虎 (*Parthenocissus tricuspidata* Planch.) 又名

“爬墙虎”、“地锦”,是葡萄科 (Vitaceae) 爬山虎属 (*Parthenocissus* Planch.) 植物^[2]。爬山虎的组织培养不仅能为其快速繁殖提供更好的途径,而且还为基因工程、原生质体杂交、体细胞培养等提供研究基础。笔者曾报道过爬山虎的离体培养^[3]及体细胞胚发生^[4],曾以引进爬山虎种子为试验材料,但在爬山虎的组织培养过程中出现了不同程度的褐化现象,尤其是引进爬山虎种子无菌苗的诱导,其褐化现象更为突出。能否减轻褐化的发生,这对引进爬山虎的组织培养成功与否至关重要。

基金项目:国家高技术研究发展计划“地锦(爬山虎)种质资源创新及优良品种培育”(863计划)资助项目(2001AA244031)和河北农业大学校基金“爬山虎体细胞胚发生体系优化的研究”资助项目(2006020)。

第一作者简介:冯大领,女,1969年出生,河北雄县人,硕士,讲师,现河北农业大学生命科学学院从事植物学教学与研究工作。通信地址:071001河北省保定市,乐凯南大街2596号;河北农业大学西校区生命科学学院植物组, Tel: 0312-7528241 或 0312-7528240 E-mail: dalingfeng@eyou.com 或 shuqfeng@sina.com。

通讯作者:孙振元,男,博士,研究员,主要研究方向:林木花卉生物技术。Tel: 010-62889626 Email: sunzy@rif.forestry.ac.cn 地址:100091 中国林业科学研究院花卉研究中心

收稿日期:2006-07-26 **修回日期:**2006-08-10。

由于种子比植株具有携带方便、便于保存等优点,因此是国外引进植物资源中首选的材料。对种子进行组织培养,又是保存种质资源和生物技术育种不可缺少的研究手段,本试验研究也对其他引进植物的研究利用提供了一定的参考价值。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理方法

采用加拿大引进爬山虎的无菌种子苗为试验材料。

种子的表面灭菌过程是先用室温下的自来水冲洗2~4h,以除去外植体表面的大部分微生物。为了软化种皮再用自来水浸泡10h,然后用70%酒精表面灭菌2min,无菌水冲洗2次,接着用0.1%HgCl₂表面灭菌10min,无菌水冲洗5次。随后接种在B₅基本培养基中,30d后,得到展开了叶的无菌种子苗。

1.2 培养基及添加物

1.2.1 种子的启动培养基 启动培养基采用B₅基本培养基,不添加任何植物生长调节剂。

1.2.2 带子叶茎段的培养 剪取无菌种子苗的带子叶茎段接种在B₅+BA 1.0mg/L+NAA 0.05mg/L培养基中。

1.2.3 不同添加物对防止褐化的影响 仍采用B₅+BA

1.0mg/L+NAA 0.05mg/L培养基培养带子叶茎段。

在培养基中添加不同浓度的活性炭(以下用AC表示)(0.5、1.0、2.0g/L)、聚乙烯吡咯烷酮(以下用PVP表示)(0.2、1.0、2.0g/L)、抗坏血酸(以下用V_C表示)(0.2、0.8、1.5、2.0g/L),观察其对褐化的影响。统计出现褐化的时间及接种30d后的褐化率及分化芽的生长情况。

$$\text{褐化率} = \frac{\text{褐化茎段数量}}{\text{接种茎段数量}} \times 100\%$$

上述培养基内均含有20g/L蔗糖,5g/L琼脂。培养基采用1mol/L NaOH或HCL调pH值为5.8~6.2高压蒸汽灭菌20min。

1.3 培养条件

培养室保持温度22~28℃,光/暗周期15h/9h,光强2000~2500 Lx,湿度45%~57%。

2 结果与分析

2.1 带子叶茎段的褐化情况

引进爬山虎带子叶茎段接种在培养基B₅+BA 1.0mg/L+NAA 0.05mg/L中30d后,统计其褐化情况如表1。

试验材料接种数量(个) 褐化数量(个) 褐化率(%)
分化芽生长情况

表1 带子叶茎段的褐化情况

试验材料	接种数量(个)	褐化数量(个)	褐化率(%)	分化芽生长情况
引进种带子叶茎段	28	25	89.3	分化芽较少,多见顶芽有少量生长,有的顶芽不生长。

引进种带子叶茎段282589.3分化芽较少,多见顶芽有少量生长,有的顶芽不生长。

由表1得知,引进的爬山虎种子作外植体得到的带子叶茎段接种在培养基中培养30d后,其褐化率高达89.3%,这严重影响了其在培养基中的进一步生长分化。而笔者曾研究过本地爬山虎(取材于北京林业大学校园内)的组织培养^[9],以茎尖为试验材料,接种在同一种培养基中褐化较少,生长分化良好。这可能是由于引进种与本地种的遗传背景不同以及所含单宁及其他酚类化合物的数量各异,从而影响了褐化的发生程度。此外,培养材料的不同发育阶段也可能是造成褐化发生的原因。

2.2 不同添加物对防止褐化的影响

褐化发生的原因很多,如植物种类和品种、材料的年龄和大小、取材时间和部位、光照、温度、培养基成分

和方式等等^[9]。由于本试验的试验材料是从种子得到的试管苗,试验材料受到了一定的限制,因此本试验主要从培养基的添加成分考虑以减轻褐化的发生。在培养基中添加不同浓度的AC、PVP、V_C,接种30d后观察对褐化的影响效果。不同添加物对褐化的影响均以表1为对照。

2.2.1 添加AC对褐化的影响 在培养基中添加不同浓度的AC,观察对褐化的影响,见表2。

由表2可以看出,添加AC浓度0.5g/L时,接种15d后开始褐化,接种30d后褐化率为25%,比对照明显降低,这说明活性炭对防止褐化能够起到一定的作用。当AC浓度增大到1.0g/L以上时,褐化不明显,这主要是因为添加AC后使培养基的颜色变为蓝色,浓度小时培养基颜色浅,浓度大时颜色深,影响了对褐化的观察。虽然添加AC后褐化率降低,但观察发现,芽

表2 不同AC浓度对爬山虎组织培养褐化的影响

AC浓度(g/L)	接种数量(个)	接种后开始褐化时间	褐化率(%)	分化芽生长情况
0.5	20	15 d	25.0	
1.0	19	不明显	—	芽分化少,且生长量小,最大只有0.5 cm
2.0	20	不明显	—	

注:分化芽生长情况是统计各浓度相比最好的生长分化情况

的分化较少,甚至无分化,生长非常缓慢,生长量最大的只有0.5cm,且在茎段底部形成了1~3条细长的根,

这说明添加活性炭对芽的分化和生长没有显著影响,但有利于根的形成,只不过形成的根较细。

表3 不同AC浓度对爬山虎组织培养褐化的影响

PVP浓度 (g/L)	接种数量 (个)	接种后开始褐化时间	褐化率 (%)	分化芽生长情况
0.2	18	7 d	94.4	分化芽为1~2个,芽生长量与添加AC相当
1.0	20	12 d	85.0	
2.0	19	18 d	84.2	

注:分化芽生长情况是统计各浓度相比最好的生长分化情况

2.2.2 添加PVP对褐化的影响 在培养基中添加不同浓度的PVP,观察对褐化的影响,见表3。

由表3得知,添加PVP浓度为0.2g/L时,接种7d开始出现褐化,随PVP浓度的提高,出现褐化的时间延长。但培养30d后,其褐化率均较高,与对照相当。

PVP浓度为0.2g/L时褐化率达到了94.4%,浓度提高时,褐化率仍为80%以上,这严重影响了爬山虎试管苗的分化生长,其分化芽的数量也较少,只有1~2个。由此看来,PVP对引进爬山虎无菌苗的褐化没有起到有效的控制。

表4 不同V_C浓度对爬山虎组织培养褐化的影响

VC浓度 (g/L)	接种数量 (个)	接种后开始褐化时间	褐化率 (%)	分化芽生长情况
0.2	18	15 d	88.9	分化芽数量较多,多达12个,且生长量较AC和PVP大,平均为1.98 cm
0.8	20	20 d	50.0	
1.5	20	25 d	25.0	
2.0	19	25 d	21.1	

注:分化芽生长情况是统计各浓度相比最好的生长分化情况

2.2.3 添加V_C对褐化的影响 在培养基中添加不同浓度的V_C,观察对褐化的影响,见表4。

由表4可以看出,添加V_C的培养基,随浓度的提高,褐化率逐渐降低,浓度提高时,褐化得到了明显的控制。不同浓度的培养基开始褐化的时间均在15d以后,尤其是添加V_C浓度为1.5g/L时,接种后出现褐化的时间为25d,褐化率只有25%,从芽的生长情况看,分化芽明显增多,最多的达12个,且生长状况良好,当V_C浓度提高时,褐化率稍有改善,但芽的分化及生长情况与浓度为1.5g/L相比没有提高。

通过以上三种添加物的试验得知,V_C对引进爬山虎控制褐化的效果明显比AC和PVP好。

3 结论与讨论

(1)前人多认为,植物不同发育阶段,褐化发生有所不同。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。外植体的老化程度越高,其木质素的含量也越高,也越容易产生褐化,成龄材料一般均比幼龄材料褐化严重^[1-6]。而该试验通过对引进种爬山虎带子叶茎段进行组织培养发现,其褐化现象比较严重。看来引进爬山虎幼嫩阶段的组织培养仍然存在着高的褐化率。

(2)同是一个种,在同一种培养基上,当地种的组织培养芽生长分化较好,褐化率较低^[6],而引进爬山虎的褐化率较高。引进爬山虎和本地爬山虎不同发育阶段的褐化现象是否有差异以及褐化的机理还有待于进一步研究。

(3)综合来看,V_C是爬山虎组织培养中防止褐化较有效的方法,比AC和PVP的效果好。V_C适宜的浓度为1.5g/L。这可能是由于V_C不仅起到了防止酚类物质氧化的作用,还以辅酶的形式参与了生物催化

剂——酶系的活动。而AC和PVP的效果不如V_C好,这可能是由于AC不仅吸附了酚类物质,还吸附了一些营养物质和植物生长调节剂,从而影响了爬山虎芽的分化和生长。而PVP防止褐化的能力不如V_C好,这与陈正华(1986)叙述的对龙眼的组织培养研究^[7]结果相一致。

(4)由试验得知,褐化是影响引进爬山虎种子无菌苗组织培养中分化和再分化的主要障碍。因此,控制褐化的研究对于引进爬山虎种质资源的保存和利用非常重要。控制褐化发生的因素很多,如培养基内的蔗糖浓度、细胞分裂素的多少、pH值以及光照、培养温度等都有可能防止褐化的发生^[8],今后有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 陈菲,李黎,宫伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].北方园艺,2005,(2):69
- [2] 中国植物志第四十八卷第二分册 [M].北京:科学出版社,1998.1~2,21
- [3] 冯大领,李云,孙振元.爬山虎离体培养的初步研究[J].河北林果研究,2005,20(2):99~102
- [4] 冯大领,李云,孙振元.爬山虎体细胞胚的发生及组织学研究[J].北京林业大学学报,2004,26(4):97~99
- [5] 熊丽,吴丽芳主编.观赏花卉的组织培养与大面积生产[M].北京:化学工业出版社,2002.83~84
- [6] 庞勇.果树组织培养中褐化现象的研究进展 [J].甘肃林业科技,2004,29(1):16~18
- [7] 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,1986.408~419
- [8] Bonga J M, Durzan D J 著.树木组织培养.阙国宁,郭达初,李金田译[M].北京:中国林业出版社,1988.25~26,141~143,175

(责任编辑:张铁锋)