

梨外植体组培褐变的影响因子及预防措施

刘杰¹, 张希⁴, POUDYAL Bharat Kumar², 张玉星^{1*}, 董祯³, 史青纯¹

(¹河北农业大学园艺学院,保定 071001; ²Nepal District Agriculture Development Office, Bhojpur District, Kosi Zone, The Kingdom of Nepal; ³河北女子职业技术学院,石家庄 050091)

摘要:以鸭梨、黄金梨、阿巴特梨和杜梨为试材,对梨组培过程中影响外植体褐化的因素及防褐措施进行了研究。结果表明,品种、采样时期以及外植体内酚类物质含量等因素都显著地影响材料褐化率。抗褐剂试验表明,培养基中添加 0.2 g/L 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或 100 mg/L 抗坏血酸(Vc),或将外植体在 200 mg/L 抗坏血酸水溶液中浸泡 30 min 后接入添加 2 g/L 活性炭的培养基,均能显著抑制鸭梨褐化的发生。低温试验表明,鸭梨外植体经 4℃低温处理 6 h 后接种,或接入初期在 4℃低温中培养 12~24 h,褐化程度明显减轻。

关键词:梨; 外植体; 组织培养; 褐变; 酚

中图分类号:S661.2 文献标识码:A 文章编号:1009-9980(2008)05-727-05

Studies on factors affecting browning of pear explants *in vitro* and anti-browning measures

LIU Jie¹, ZHANG Xi⁴, POUDYAL Bharat Kumar², ZHANG Yu-xing^{1*}, DONG Zhen³, SHI Qing-chun¹

(¹College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001 China; ²Nepal District Agricultural Development Office, Bhojpur District, Kosi Zone, The Kingdom of Nepal; ³Hebei Women's Vocational College, Shijiazhuang, Hebei 050091 China; ⁴College of Life Science, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001 China)

Abstract: A study on factors affecting pear explants browning and anti-browning measures during *in vitro* culture was carried out. The results showed that the browning percentages of pear explants were significantly affected by cultivars, sampling stages and position, and content of total phenol. When 0.2 g/L polyvinylpyrrolidone (PVP) or 100 mg/L ascorbic acid (Vc) was added in the medium, or the explants were immersed in the 200 mg/L ascorbic acid solution for 30 min and then inoculated in the medium in which 2 g/L activated carbon (AC) was added, the browning of Yali cultivar's explants was significantly inhibited. When Yali explants were pretreated at 4℃ in dark for 6 h before inoculation, or cultured at 4℃ in dark from 12 h to 24 h at the initial stage of culture, the browning was also effectively alleviated.

Key words: Pear; Explants; Tissue culture; Browning; Phenol

梨外植体在组培过程中极易发生褐化,给梨无菌系的建立带来了极大困难,严重制约了梨组培技术的应用和发展^[1-2]。人们对组培褐变的研究颇多,然而对梨组培褐化的研究很少,已有的抗褐措施效果仍不尽理想,且现有研究大多只是围绕苍溪梨、金花梨、雪青梨等少数几个梨品种进行^[1,3-5],对其它梨品种的褐化特性及防褐措施鲜有报道。因此我们对梨不同试材褐化的影响因素和抗褐措施进行了研究,试图寻找防止梨组培褐化的有效途径,并为梨组织褐变的机理研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd)中的鸭梨(Yali),砂梨(*P. pyrifolia* Nakai)中的黄金梨(Whangkeumbae),西洋梨(*P. communis* L.)中的阿巴特梨(Abate Fetel)以及砧木品种杜梨(*P. betulaefolia* Bunge)的田间外植体为试材,采自河北农业大学西校区梨园。试验于2007年进行。采样母株为5a生盛果期梨树,每品种采样株数10株。取树冠外围粗细长短一致,无病虫害的当年生新梢中上部枝条(不同部位褐化试验除外),剪成2cm左右单芽茎段,混合后备用。组培材料为本实验室继代保存1a的梨组培苗。

1.2 培养基的类型及灭菌

使用 Murashige and Skoog (MS) 培养基,其中添加 6-苄基腺嘌呤(6-Benzyladenine, 6-BA) 1.0 mg/L,

收稿日期:2008-04-25 接受日期:2008-06-17

作者简介:刘杰,男,在读硕士生。Tel:13932264576,E-mail:liujie13251@163.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel:0312-7521298,E-mail:jonzhyx@yahoo.com.cn

吲哚丁酸(Indole butyric acid, IBA)0.1 mg/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L。用氢氧化钠和盐酸调 pH 至 5.8~6.0。培养基经 121 ℃高温灭菌 20 min 后凝固备用。

1.3 外植体的杀菌及接入

田间外植体取回后自来水冲洗 2 h 以去除表面泥土和灰尘,然后剪成 2 cm 长的带芽茎段,75%乙醇(Ethanol, C₂H₅OH)杀菌 20 s,1 g/L 的升汞(Mercuric chloride, HgCl₂)浸泡 7 min,无菌水冲洗 5 遍,切去两端伤口,保留中部约 1.5 cm 带芽茎段正向接入 MS 固体培养基。每处理 10 个外植体,重复 5 次。培养室温度为(25±2) ℃,每天照光 14 h,光照强度 3 000 lx。

1.4 褐化率的统计及总酚含量测定

自接入培养基起 15 d 统计褐化率,褐化以培养基严重污染变褐,外植体枯死为标准。水溶性酚和非水溶性酚含量的测定参照鞠志国^[6]的方法略作改动,以对羟基苯甲酸作标准曲线,质量浓度范围 0~100 mg/L,计算每 g 鲜样中酚类物质的 mg 数。测定波长为 700 nm。

1.5 试验处理

1.5.1 不同品种褐化率差异 于 4 月 15 日分别采集鸭梨、黄金梨、杜梨和阿巴特梨新梢进行试验。

1.5.2 采样时期对褐化的影响 分别于 4 月 15 日、4 月 30 日、5 月 15 日、5 月 30 日、6 月 15 日和 6 月 30 日定株采集鸭梨新梢进行试验。

1.5.3 酚含量与褐化的关系 于 7 月 6 日采集鸭梨、黄金梨、杜梨和阿巴特梨的田间枝条进行试验。将材料分为 1~3 节嫩尖和 8~10 节基部茎段 2 部分,分别测定酚类物质的含量与褐化率,并以保存 1 a 的梨组培苗为对照。其中酚类物质含量测定设 3 次重复。

1.5.4 低温暗培养对褐化的影响 4 月 15 日采集鸭梨新梢,分 2 种处理。处理 1:将枝条在 4 ℃冰箱中黑暗预处理 6、12、24 h 后,接入 MS 培养基 25 ℃培养;处理 2:外植体接入培养基后,在 4 ℃冰箱中暗培养 6、12、24 h,然后转入 25 ℃环境正常培养。对照直接置于 25 ℃光下培养。

1.5.5 抗褐剂对褐化的影响 研究抗褐剂活性炭(Activated carbon, AC)、抗坏血酸(Ascorbic acid, Vc)和聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone, PVP)对鸭梨外植体褐化的控制作用。4 月 15 日采集鸭梨新梢,做如下 7 种处理:(1)外植体在 2 g/L 的 AC 水溶液中浸泡 30 min 后接入;(2)接入前外植体在 200 mg/L 的 Vc 水溶液中浸泡 30 min;(3)培养基中添加

1 g/L 的 PVP;(4)培养基中添加 0.2 g/L 的 PVP;(5)培养基中添加 100 mg/L 的 Vc;(6)培养基中加入 2 g/L 的 AC;(7)外植体先经 200 mg/L 的 Vc 浸泡 30 min,再接入添加 2 g/L AC 的培养基中。对照不经抗褐剂处理。

1.6 数据分析

用 SPSS12.0 软件进行数据分析,多重比较采用 Tukey HSD (Tukey's honestly significant difference),相关性分析采用 Spearman 双尾测验。

2 结果与分析

2.1 梨不同品种褐化率的差异

不同梨品种的田间外植体褐化程度存在显著差异。在同一时期所采的不同品种材料中,以鸭梨、杜梨、黄金梨 3 个品种的褐化程度较为严重,褐化率均在 60%~70%范围内变化;而阿巴特梨褐化较轻,褐化率仅为 20%,与其它品种的差异达到极显著(图 1)。在本试验中,不同品种采用了相同的杀菌时间。由于品种之间存在差异,其最佳杀菌时间不同,所以经相同时间的杀菌剂处理后不同品种的组织所受到的伤害必然不同,这也可能是造成品种间褐化率不同的原因。所以,在今后试验中为降低褐化的发生率,鸭梨、杜梨、黄金梨等品种的杀菌时间应当适当缩短,而阿巴特梨则可以进行较长时间的杀菌处理。

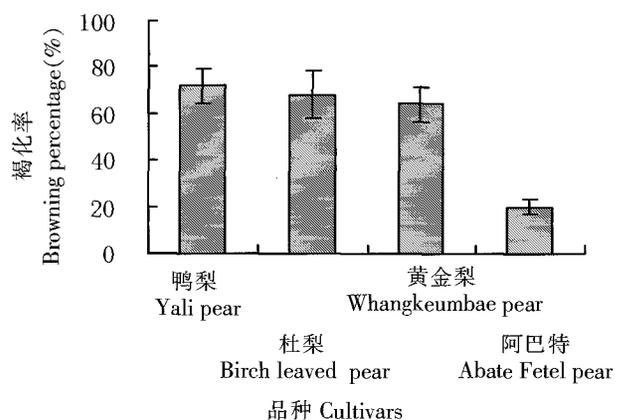


图 1 不同品种梨外植体褐化率比较

Fig. 1 Browning percentage of pear explants from different cultivars

2.2 采样时期对褐化率的影响

采样时期不同,鸭梨外植体的褐化率也会随之发生变化。4 月 30 日和 5 月 15 日所采外植体,褐化较轻,褐化率不足 40%,而其它时期采样,褐化严重,死亡率高(图 2)。本试验中鸭梨褐化率的变化情况与李焕秀等^[2]在金花梨与苍溪梨上的研究结果相

似。采样时期对褐化的影响主要是由于不同时期外植体内酚类物质含量及 PPO、POD 的活性变化造成的^[2,4]。根据李焕秀的测定结果,梨茎尖中 PPO 在 4 月份活性最高^[2],且这个时期的材料组织细嫩,对杀菌过程较敏感,这可能是本试验中 4 月 15 日采集的鸭梨外植体褐化严重的原因;随着 PPO 活性的降低和新梢成熟度的增加,4 月 30 日至 5 月 15 日所采

材料褐化率降低;在 5、6 月份,POD 的活性出现一个小高峰,且酚类物质含量较高^[2],导致梨茎尖的褐化率再次升高。基于这一变化趋势,从控制褐化的角度考虑,4 月下旬至 5 月 15 日之前为鸭梨外植体采集的较适宜时期。

2.3 总酚含量对褐化率的影响

对梨组培苗酚类物质含量的测定显示(图 3),不同品种、不同部位材料的总酚含量几乎相等,大约在 27~28 mg/g(鲜质量);不溶性酚和可溶性酚含量之间亦没有显著差异。而这几个品种的组培苗在继代过程中也无褐化发生。

田间材料的总酚含量明显高于组培苗,从 34 mg/g 到 66 mg/g 不等,且不同品种、不同部位含量存在显著差异。由图 3 可以看出:黄金梨、鸭梨梢部及杜梨梢部总酚含量较高,均在 65 mg/g 以上,而鸭梨基部和杜梨基部含量较低,前者 and 后者差异达极显著;黄金梨、鸭梨梢部以及杜梨梢部可溶性酚含量较高,其余外植体含量则很低;不溶性酚,除杜梨含量

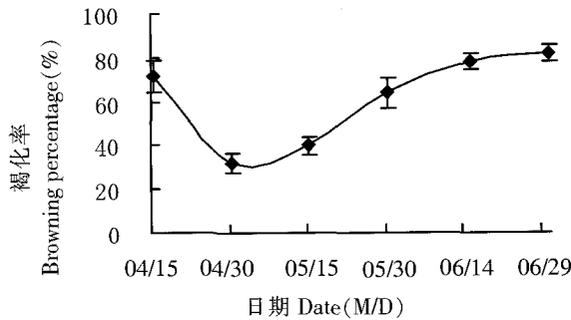


图 2 不同采样时期鸭梨外植体褐化率比较
Fig. 2 Browning percentage of Yali pear explants collected in different days

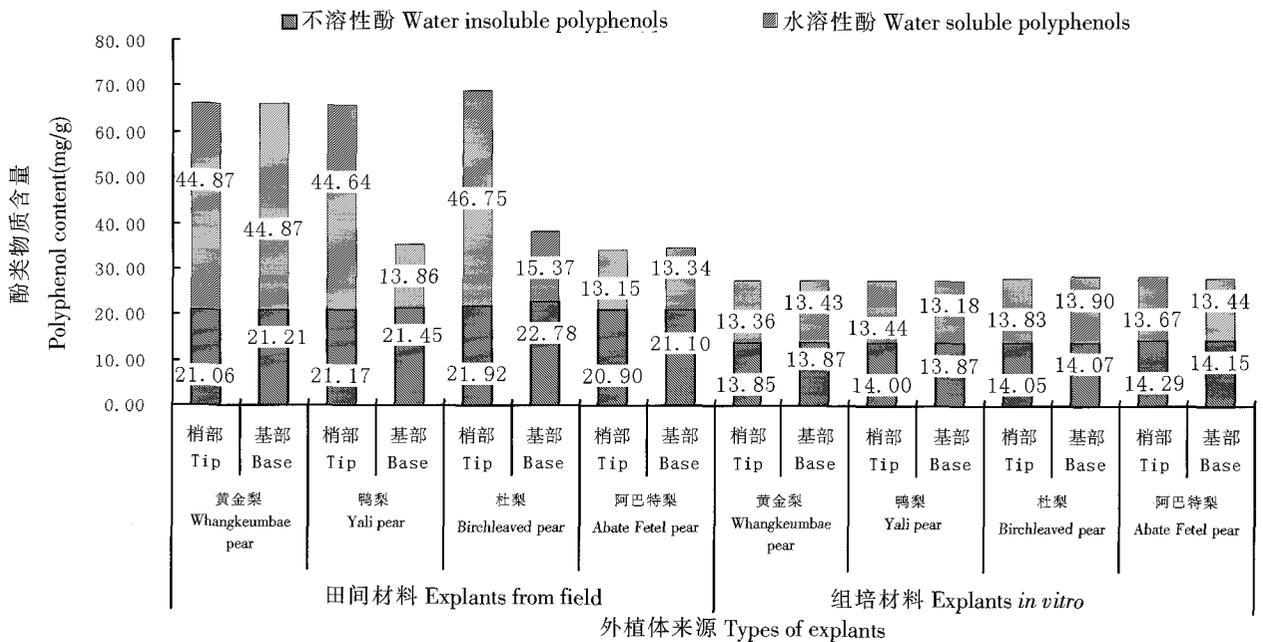


图 3 梨外植体酚类物质含量
Fig. 3 Phenols content in the shoot tip and base of pear explants

稍高外,各品种之间无显著差异。总体来看,与组培苗不同,田间外植体总酚含量的差异很大,且差异主要来自可溶性酚。

褐化试验显示,黄金梨、鸭梨梢部及杜梨梢部褐化率显著高于其它外植体(图 4),与酚含量对照可看出,酚物质含量高,外植体褐化就严重,反之褐化就轻。相关性分析也表明,材料的褐化率与总酚含量、可溶性酚含量之间均达到极显著正相关,相关系数分

别为 0.881 ($P=0.004$) 和 0.898 ($P=0.002$);而不溶性酚含量与褐化率无显著相关。这表明,酚类物质的含量是影响褐化程度的主要因素之一,且造成褐化的主要酚类为可溶性酚。另外我们注意到,鸭梨和杜梨顶部幼嫩外植体褐化率要高于木质化程度稍高的基部茎段,所以,在建立鸭梨、杜梨无菌系时,采集基部较成熟茎段作为外植体可以减轻褐化的发生。

2.4 抗褐剂对褐化的控制

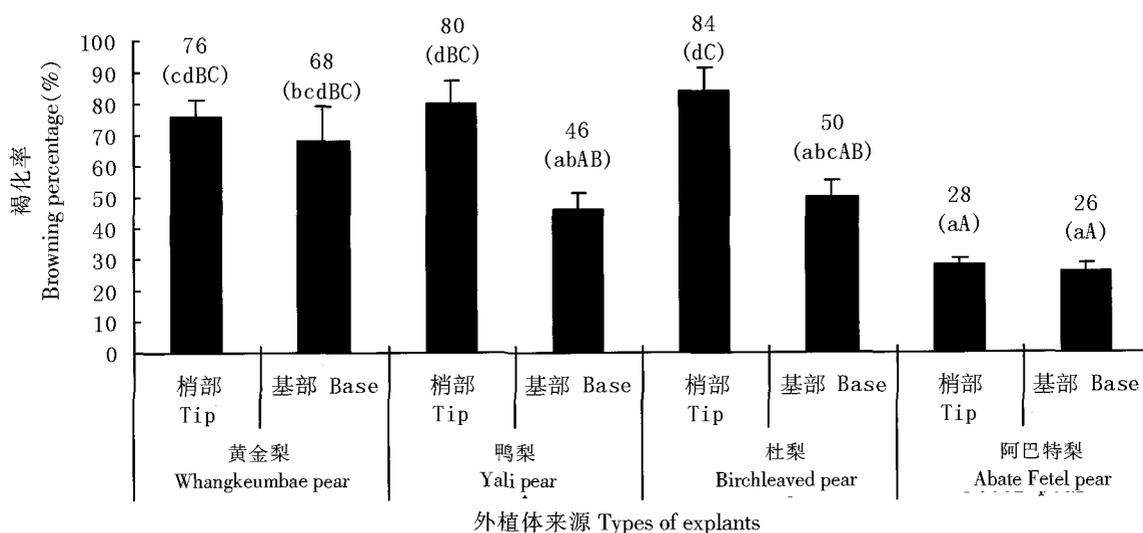


图 4 不同来源田间梨外植体褐化率比较

Fig. 4 Browning percentage of different pear explants from field

抗褐剂试验表明,所有处理的褐化率均低于对照。其中培养基中添加 0.2 g/L 的 PVP、100 mg/L 的 Vc 和将 Vc 与 AC 结合使用 3 种处理,鸭梨外植体的褐化率显著降低,分别由对照的 78% 下降至 42%、26% 和 46% (表 1)。

2.5 低温暗处理对褐化的控制

鸭梨外植体在接入培养基前经 4 °C 低温暗处理 12 h 或 24 h, 或者在培养初期于 4 °C 环境中暗培养 6 h, 褐化率分别由对照的 78% 下降到 26%、30% 及 42%; 而在低温暗培养试验中,若处理时间超过 12 h, 则处理对褐化的抑制效果消失 (表 2)。

3 讨 论

AC 具有多孔结构,能够有效吸附培养基中的有害物质^[7],从而减轻褐化对组培苗的伤害。本试验中 2 g/L 的 AC 未能对鸭梨外植体的褐化产生显著抑制,但其对褐化的影响还是不容忽视的。从表 1 我们可以看出,培养基中添加 2 g/L 的 AC 和使用 200

表 1 抗褐剂处理对褐化的影响

Table 1 Effects of antioxidants and phenols absorbents on explants browning

处理 (Treatment)	褐化率 (Browning percentage (%))
对照 (Control)	78 aA
2 g/L AC 预处理 (2 g/L AC pretreatment)	68 abAB
200mg/L Vc 预处理 (200 mg/L Vc pretreatment)	62 abAB
培养基添加 1 g/L PVP (1 g/L PVP in medium)	58 abABC
培养基添加 0.2 g/L PVP (0.2 g/L PVP in medium)	42 bcBC
培养基添加 100 mg/L Vc (100 mg/L Vc in medium)	26 cC
培养基添加 2 g/L AC (2 g/L AC in medium)	70 abAB
200 mg/L Vc 预处理+培养基添加 2 g/L AC (200 mg/L Vc pretreatment + 2 g/L AC in medium)	46 bcABC

注:字母不同表示差异显著,小写字母达到显著差异 ($P < 0.05$),大写字母达极显著差异 ($P < 0.01$)。

Note: The different capital and small letters in the table stand for $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

表 2 4 °C 低温暗处理对褐化率的影响

Table 2 Effects of 4 °C dark treatment on browning percentage

低温黑暗预处理 4 °C dark pretreatment		低温暗培养 4 °C dark culture	
处理时间 (Pretreatment time (h))	褐化率 (Browning percentage (%))	处理时间 (Pretreatment time (h))	褐化率 (Browning percentage (%))
0	78 aA	0	78 aA
6	62 aAB	6	42 bA
12	26 bB	12	60 abA
24	30 bB	24	68 abA

mg/L Vc 溶液浸泡外植体这 2 种处理分别进行都未能明显抑制鸭梨的褐化,但若将 2 者结合起来处理,抗褐效果大大增强,外植体的褐化率显著地降低了。

这说明本试验中 AC 对褐化还是产生了一定的抑制作用,只是可能由于用量不太适宜,其抗褐效果较弱未达到显著水平。汤绍虎等^[8]对雪青梨茎尖愈伤组织

的褐化进行研究后发现培养基中添加 5 g/L 的 AC, 对梨的褐变抑制作用明显, 据此我们推测, 本试验中 AC 的使用量可能偏低, 所以今后在鸭梨组培中可以尝试通过加大 AC 使用量以得到更好的抗褐效果。

本研究表明, 适度低温对梨茎尖的酶促褐变有显著的抑制作用。但同时我们发现, 低温处理的时间超出一定限度后, 材料的褐化率有回升的迹象, 且在后期外植体的发育过程中, 低温处理时间较长的材料生长势明显偏弱, 发育迟缓。这说明低温处理会对外植体的后期生长带来不利影响。所以低温处理时间应当适度, 不宜过长。

前人普遍认为, 褐变随材料组织木质化程度的增加而加重^[3,9], 但本试验在鸭梨和杜梨外植体上却得到了相反的结果, 茎尖的褐化反而比中下部木质化程度高的茎段要严重得多。通过对酚类物质含量的测定后发现, 这 2 个品种的新梢中可溶性酚含量的分布规律为中下部茎段低于茎尖, 这可能就是导致茎尖褐化更加严重的原因。另外还与茎尖的组织较细嫩, 杀菌过程中受到伤害较重有一定的关系。

此外我们注意到, 梨组培苗的多酚物质含量大大低于田间外植体, 这就部分解释了为什么田间材料在刚接入培养基时褐化较严重而继代多次的组培苗则不再发生褐化。至于由田间转移至室内进行培养的过程中, 材料的多酚化合物含量为何会降低, 以及具体的变化过程, 在果树上还未见有相关的研究报道。人们通过对烟草及茶叶进行研究后发现, 植物体内多酚类化合物的合成和积累过程受环境因素的影响很大。一般认为, 露地环境中的强光照^[10]、紫外线辐射^[11]、骤寒^[12]等因素都会导致植物体内苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性及多酚类化合物的含量提高, 而组培环境中没有这些因子的影响, 并且较高浓度的植物生长调节剂还会对组培苗酚类物质的积累产生抑制^[12], 这些可能是导致梨组培苗酚类化合物含量较低的原因。另外还与组培苗的多代筛选有关。对这一过程中酚类物质含量降低机理的研究有助于我们深入了解植物体内酚类物质的代谢规律以及控制酚代谢的相关信号因子。

参考文献 References:

- [1] LI Huan-xiu, QIAO Ni-jiao. Approaches for reducing explant browning of 'Cangxili' pear (*Pyrus pyrifolia* NAKAI) in tissue culture[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2001, 23(6): 524-526.
李焕秀, 乔霓娇. 降低苍溪梨外植体组培褐变途径的研究[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(6): 524-526.
- [2] LI Huan-xiu, YAN Ben-ju. Preliminary study on the relationship of oxidases and their isozymes with browning rate of pear explants in tissue culture[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2001, 23(5): 432-434, 437.
李焕秀, 晏本菊. 梨外植体组培褐变与氧化酶活性和同工酶的关系[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(5): 432-434, 437.
- [3] HUANG Zu-zhen, YOU Kai-zhe. Litchi stem *in vitro* culture[J]. Chinese bulletin of botany, 1992(Suppl): 31-32.
黄组珍, 游恺哲. 荔枝茎段离体培养[J]. 植物学通报, 1992(增刊): 31-32.
- [4] YAN Ben-ju, LI Huan-xiu. The relationship between browning ratio *in vitro* PPO and phenols of pear explants[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 1998, 16(3): 310-313.
晏本菊, 李焕秀. 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. 四川农业大学学报, 1998, 16(3): 310-313.
- [5] TANG Hao-ru, WANG Yong-qing, DENG Qun-xian. Using 8-Hydroxy-Quinolinol-Sulfate for prevention of the browning of apple and pear shoot-tip explants cultured *in vitro*[J]. Journal of Fruit Science, 1998, 15(2): 112-115.
汤浩茹, 王永清, 邓群仙. 用 8-羟基喹啉硫酸盐防止梨、苹果外植体褐变[J]. 果树科学, 1998, 15(2): 112-115.
- [6] JU Zhi-guo. Introduction to a modified colorimetric method for measuring phenolics[J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 1989, 6(2): 48-51.
鞠志国. 一种改进的酚类物质测定方法[J]. 莱阳农学院学报, 1989, 6(2): 48-51.
- [7] TANG Hao-ru, LIU Cui-qiong, LUO Ya, WANG Xiao-rong. Effects of media and cultural conditions on the rooting ability *in vitro* of 4 genotypes of *Pyrus* spp.[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(2): 283-286.
汤浩茹, 刘翠琼, 罗娅, 王小蓉. 培养基和培养条件对 4 个梨基因型试管苗生根的影响[J]. 果树学报, 2006, 23(2): 283-286.
- [8] TANG Shao-hu, SUN Min, ZHOU Qi-gui, LI Dao-gao, LIU Jia. Decreasing browning of explants of Xueqing pear [J]. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science, 2005, 27(2): 230-233.
汤绍虎, 孙敏, 周启贵, 李道高, 刘加. 降低雪青梨的外植体褐化研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(2): 230-233.
- [9] ZHOU Jun-hui, ZHOU Jia-rong, ZENG Hao-sen, WANG Guo-bing, ZHU Zhan-ping. Advance of studies on browning and anti-browning techniques in the tissue culture of horticultural plants[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(Suppl): 481-486.
周俊辉, 周家容, 曾浩森, 王国彬, 祝展平. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(增刊): 481-486.
- [10] ZHANG Jian-gen, HU Qi-kai. Affecting factors of catechin concentration in tea[J]. Sericulture and tea communication, 2007, 131(5): 26-28.
张贱根, 胡启开. 茶叶中儿茶素类物质含量的影响因素[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2007, 131(5): 26-28.
- [11] ZUCKER M, NITTSCH C, NITTSCH J P. The induction of flowering in *Nicotiana* II: Photoperiodic alternation of the chlorogenic acid concentration[J]. Amer J Bot, 1985, 52: 271-277.
- [12] XU Xiao-yan, SUN Wu-san, WANG Neng-ru. Synthesis of polyphenolic compounds and their effects on tobacco quality[J]. Chinese Journal of Tobacco Science, 2003(1): 3-5.
徐晓燕, 孙五三, 王能如. 烟草多酚类化合物的合成与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2003(1): 3-5.