

白玉兰组织培养中的褐化控制

周丽艳,郭振清,秦子禹,苏孟立

(河北科技师范学院 生命科学系,河北 秦皇岛,066600)

摘要:为探讨白玉兰组织培养中抑制褐化的方法,以白玉兰芽为试材,利用组织培养方法,研究了光照、取材季节、预处理、抗氧化剂、吸附剂等条件对褐化的影响。结果表明:黑暗培养有利于抑制褐化;冬季和春季取材褐化率较低,夏季取材褐化率较高;接种前分别用1 000 mg/L 柠檬酸和1 000 mg/L 硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)预处理外植体可防止褐化;向培养基中添加低浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,柠檬酸,聚乙烯吡咯烷酮(PVP),维生素C(Vc)能有效降低褐化率。

关键词:白玉兰;组织培养;褐化控制

中图分类号: S685.150.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-7983(2008)04-0019-04

白玉兰(*Magnolia denudata* Desr.)为木兰科木兰属植物,花繁而大,美观典雅,清香远溢,是优良的观赏树种,常用于园林设计、庭院栽培等。白玉兰一般通过嫁接、压条、扦插法繁殖,但成苗率低,速度慢,数量少,成本高,栽培和扩大利用存在很大困难^[1]。可利用组织培养方式进行繁殖^[1,2]。但在组织培养过程中,容易发生褐化,致使组织培养的效率不高。有研究表明,褐化主要是由于多酚氧化酶将植物体内酚类化合物氧化形成醌而引起的^[3,4]。控制氧化条件,如改变光照强度可以减轻褐化^[5,6]。用抗氧化剂对外植体进行预处理、向培养基中添加抗氧化剂、吸附剂等能够抑制外植体褐化^[7-11]。

目前,褐化是限制白玉兰大规模组织培养的主要因素,而关于白玉兰褐化的相关研究较少,为此,笔者研究了光照条件、取材季节、预处理、培养基中添加抗氧化剂、吸附剂对白玉兰组织培养中褐化的影响,旨在探讨有效抑制白玉兰外植体褐化的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为白玉兰芽,长度为2 cm,采自河北科技师范学院内4年生,生长良好的白玉兰植株。

1.2 试验方法

1.2.1 材料消毒与接种 将白玉兰芽先用洗洁精水浸泡20 min,再用流水冲洗1 h,在超净工作台上用体积分数为0.75的酒精进行表面消毒30 s,然后用体积分数为0.001的升汞处理7~8 min,再用无菌水冲洗4~5次,最后用无菌吸水纸吸去材料表面的水分,接种到相应的培养基上。

1.2.2 培养基 基本培养基为MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA。

1.2.3 培养条件 培养温度为25℃±0.5℃,每天光照11 h,光照度2 500 lx或暗处理。

1.2.4 取材季节 分别于春季(4月5日)、夏季(6月5日)、冬季(11月15日)取材。冬季取植株上的枝条,在室内用0.25 mg/L的 GA_3 催芽,使其逐渐解除休眠,待芽长度为2 cm时接种。

1.2.5 药剂预处理 将白玉兰芽分别在1 000 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,1 000 mg/L 柠檬酸中浸泡6 h,然后消毒接种到基本培养基中。

1.2.6 培养基中添加药剂 将4月5日采取的白玉兰芽分别接种于附加不同种类的抗氧化剂、吸附剂的基本培养基中(表1),观察药剂对白玉兰褐化的影响。

1.3 试验设计与统计分析

每个处理接种8瓶,每瓶接2个芽,重复3次。接种15 d调查白玉兰芽的褐化和生长状况,计算褐化率。试验采用完全随机设计,试验结果采用DPS统计软件进行分析。

表 1 基本培养基与不同抗氧化剂、吸附剂组合

处理代号	培养基成分
1	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 25 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃
2	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 50 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃
3	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 100 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃
4	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 150 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃
5	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 500 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃
6	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 1 000 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃
7	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 2 000 mg/L Na ₂ S ₂ O ₃
8	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 200 mg/L 柠檬酸
9	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 500 mg/L 柠檬酸
10	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 1 000 mg/L 柠檬酸
11	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 2 000 mg/L 柠檬酸
12	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 200 mg/L PVP
13	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 500 mg/L PVP
14	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 1 000 mg/L PVP
15	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 2 000 mg/L PVP
16	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 1 mg/L Vc
17	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 5 mg/L Vc
18	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 10 mg/L Vc
19	MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA + 15 mg/L Vc

2 结果与分析

2.1 不同光照条件对白玉兰褐化的影响

分别在光照和黑暗条件下培养,白玉兰芽都发生褐化,但褐化程度不同(表 2)。黑暗条件下,褐化程度较轻,外植体有一定生长,但较缓慢,褐化率为 33.3%;而在正常光照条件下,褐化严重,部分外植体褐化死亡,褐化率为 60%,极显著高于黑暗条件。由此表明,黑暗培养对抑制白玉兰芽褐化有一定作用。

2.2 取材季节对白玉兰褐化的影响

不同季节的白玉兰芽褐化程度不同(表 3)。夏季(6 月 5 日)取材的褐化率为 60%,显著高于春季(4 月 5 日)和冬季(11 月 15 日)取材的。从芽的状态来看,春季和冬季取材的生长状态好于夏季取材的。由此可见,从控制褐化的角度来考虑,白玉兰不宜在夏季取材进行组织培养。

表 2 不同光照条件对外植体褐化的影响				表 3 不同取材季节对外植体褐化的影响			
处理	褐化率 /%	t 值	外植体生长状况	取材季节	褐化率 /%	差异显著性	外植体生长状况
						0.05 0.01	
光照	60.0	2.652**	褐化严重,有些因褐化而死亡	春季	33.3	b B	生长良好
黑暗	33.3		生长缓慢,无死亡	夏季	60.0	a A	生长缓慢,部分芽死亡
				冬季	30.8	b B	生长良好

2.3 抗氧化剂预处理外植体对白玉兰褐化的影响

白玉兰芽通过抗氧化剂预处理 6 h,对抑制褐化有一定作用(表 4)。两种药剂处理的褐化率均低于对照(清水)。用 1 000 mg/L 柠檬酸处理效果比较好,褐化率为 10%,外植体长势好,有新芽出现;用 1 000 mg/L Na₂S₂O₃ 处理褐化率为 30%。

2.4 培养基中添加抗氧化剂、吸附剂对白玉兰褐化的影响

在 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA 培养基中添加适宜浓度的抗氧化剂、吸附剂有利于抑制白玉兰褐化。由表 5 中处理 1 ~ 处理 7 可以看出:添加低浓度(≤500 mg/L)的 Na₂S₂O₃ 能抑制白玉兰芽褐化,而且促进外植体生长,其中 50 ~ 100 mg/L 为最佳浓度,浓度过高则不能抑制褐化。处理 8 ~ 处理

11 可以看出:向培养基中添加低浓度(≤500 mg/L)的柠檬酸能有效抑制白玉兰芽的褐化,其中添加 200 mg/L 柠檬酸的效果最佳,白玉兰褐化率为 0。处理 12~处理 15 可以看出:向培养基中添加低浓度(200 mg/L)的 PVP 能抑制白玉兰芽的褐化,但高浓度 PVP 不能抑制褐化。处理 16~处理 19 看出:向培养基中添加低浓度(1 mg/L)的 Vc 能抑制白玉兰芽的褐化,但 Vc 浓度过高反而不能抑制褐化发生。在所选用的抗氧化剂、吸附剂中,Na₂S₂O₃ 和柠檬酸抑制白玉兰褐化的效果好于 PVP 和 Vc。

表 4 抗氧化剂预处理对外植体褐化的影响

抗氧化剂	抗氧化剂的 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	褐化率/%	差异显著性		外植体生长状况
			0.05	0.01	
清水(对照)		50	a	A	生长缓慢,褐化程度重
Na ₂ S ₂ O ₃	1 000	30	b	B	生长良好,褐化程度轻
柠檬酸	1 000	10	c	C	长势好,有新生芽

表 5 不同抗氧化剂、吸附剂对外植体褐化的影响

添加药剂	质量浓度/(mg·L ⁻¹)	褐化率/%	差异显著性		外植体生长状况
			0.05	0.01	
Na ₂ S ₂ O ₃	25	11.1	h	H	生长良好,褐化轻微
Na ₂ S ₂ O ₃	50	0	i	I	生长迅速,叶展开,有新生芽
Na ₂ S ₂ O ₃	100	0	i	I	生长迅速,叶展开,有新生芽
Na ₂ S ₂ O ₃	150	12.5	g	G	生长良好
Na ₂ S ₂ O ₃	500	12.5	h	GH	生长良好,叶展开
Na ₂ S ₂ O ₃	1 000	33.3	d	D	生长缓慢,叶干枯
Na ₂ S ₂ O ₃	2 000	50.0	a	A	不生长,褐化严重,个别死亡
柠檬酸	200	0	i	I	生长较好
柠檬酸	500	25.0	e	E	生长一般,叶干枯
柠檬酸	1 000	37.5	c	C	生长缓慢
柠檬酸	2 000	37.5	c	C	不生长,褐化严重,个别死亡
PVP	200	12.5	h	GH	生长迅速,叶展开
PVP	500	22.2	f	F	生长一般
PVP	1 000	25.0	e	E	生长缓慢
PVP	2 000	33.3	d	D	生长缓慢,叶干枯
Vc	1	12.5	gh	GH	生长良好,叶展开
Vc	5	25.0	e	E	生长缓慢,叶干枯
Vc	10	37.5	c	C	生长缓慢,叶呈黄褐色
Vc	15	40.0	b	B	生长缓慢,叶干枯

3 结论与讨论

3.1 黑暗培养可抑制白玉兰外植体褐化

将白玉兰在黑暗条件下培养其褐化率显著低于光照条件的。这一结果与其它植物上的研究一致^[5,6]。组织培养中,褐化是由于植物体内含有的酚类物质在酚氧化酶的作用下被氧化为棕褐色的醌类物质,醌又经过非酶促聚合形成黑褐色物质,从而毒外植体。酚类化合物合成和氧化过程中,需要许多酶的参与,其中有一部分酶的活性是受光诱导的,如多酚氧化酶(PPO)在光照条件下活性提高。因此,黑暗培养可以抑制酶活性,从而减轻白玉兰外植体褐化程度。

3.2 春季、冬季取材可减轻白玉兰外植体褐化

由于春季、冬季白玉兰植株体内代谢活动较弱,其细胞内参与氧化反应的多酚氧化酶活性较低,因此,这两个季节取材褐化率较低;而夏季白玉兰生长旺盛,内部生理活性增强,其褐化程度严重。这一结

果与张明丽等^[12]的研究一致。

3.3 接种前用抗氧化剂对外植体进行预处理可减轻其褐化

用抗氧化剂进行材料的预处理或预培养可预防酚类物质的形成。本次试验利用 1 000 mg/L 柠檬酸, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浸泡白玉兰外植体有效降低了褐化率。抗氧化剂能清除由于外植体机械损伤而渗出的酚类物质和已被酚酶氧化的醌类物质, 减轻褐化危害的作用。

3.4 培养基中添加抗氧化剂、吸附剂可减轻白玉兰外植体褐化

很多研究表明, 培养基中添加抗氧化剂、吸附剂能减轻植物组织培养中外植体的褐化^[7-11]。本次试验发现, 向培养基中添加低浓度的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 柠檬酸, PVP, Vc 能有效抑制白玉兰褐化; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 柠檬酸的抑褐效果好于 PVP, Vc。

参考文献:

- [1] 孟雪. 白玉兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 339.
- [2] 李艳, 王青, 李洪艳, 等. 3 种玉兰的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 633.
- [3] 许传俊, 李玲. 蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD 和 PAL 的关系[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 671-674.
- [4] 师海荣, 王清连. 陆地棉新品种在体细胞培养中愈伤组织褐化机理研究[J]. 河南农业科学, 2006(3): 32-36.
- [5] 邱璐. 桑树组织培养中褐化问题研究[J]. 云南大学学报, 2000, 22(1): 76-78.
- [6] 黄远新, 何凤发, 张盛林. 魔芋组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(4): 309-312.
- [7] 王义强, 蒋舜村, 石明旺, 等. 不同抗氧化剂对银杏愈伤组织褐变影响的研究[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 21-23.
- [8] 李丽, 张湮帆, 何康, 等. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2006, 45(6): 702-707.
- [9] 张俊琦, 罗晓芳. 牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(5): 720-724.
- [10] 刘均利, 马明东. 华盖木组织培养中褐化控制研究[J]. 浙江林业科技, 2007, 27(1): 20-23.
- [11] 聂卫卓, 贝利霞. 蝴蝶兰叶片组织培养中褐化的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(1): 28-31.
- [12] 张明丽, 李青. 金叶红瑞木离体培养中影响外植体褐化的因素[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(8): 1 411; 1 454.

作者简介: 周丽艳(1968-), 女, 硕士, 副教授。主要研究方向: 植物组织培养。

(责任编辑: 朱宝昌)

Browning Control During Tissue Culture of *Magnolia denudata* Desr.

ZHOU Li-yan, GUO Zhen-qing, QIN Zi-yu, SU Meng-li

(Dept of Life Science, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao Hebei, 066600, China)

Abstract: The purpose of the study was to explore how to inhibit browning in tissue culture of *Magnolia denudata* Desr. Illumination, season, selected explants treated with medicines before inoculating, anti-oxidants and absorbents added into medium were studied to determine their influence on browning control. The results showed that darkness was good for controlling browning. The browning rate of explants picked in winter and spring were lower than in summer. Soaking explants with 1 000 mg/L Citric acid and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ could inhibit browning. The addition of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Citric acid, PVP and Vc of low concentration into medium could effectively reduce browning rate.

Key words: *Magnolia denudata* Desr; tissue culture; browning control