

防止紫叶黄栌组织培养中外植体褐变的研究

刘艳芬¹, 田春雨¹, 孙晓梅^{2*}, 杨宏光², 王亚斌²

(1. 河北工程学院, 河北 邯郸 056001; 2. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 文章研究了紫叶黄栌组织培养过程中, 取材时期、灭菌时间、培养基中附加物种类和浓度对外植体褐变的影响。结果表明, 1月取休眠枝条水插培养后抽生的嫩茎作外植体, 经0.1% HgCl₂ 灭菌2~3min, 外植体褐变程度最轻。培养基中添加1.0 mg·L⁻¹ Vc可以有效抑制褐变的发生。

关键词: 紫叶黄栌; 外植体; 褐变

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1714(2006)04-0014-03

Studies on preventing explants from browning in tissue culture of *Cotinus coggygia* 'purpureus'

LIU Yan-fen¹, TIAN Chun-yu¹, SUN Xiao-mei², YANG Hong-guang², WANG Ya-bin²

(1. Hebei Engineering College, Handan 056001, China; 2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstracts: The effects of different periods, sterilization time, various kinds and levels of additives in the medium were studied on browning of explants in tissue culture of *Cotinus coggygia* 'purpureus'. The results indicate that the optimum explant is the infant shoots sprouting from dormant buds after cultured in water in January, which browns the lightest after sterilized in 0.1% HgCl₂ for 2~3 minutes. It can repress browning effectively to add 1.0 mg·L⁻¹ Vc in the medium.

Key Words: *Cotinus coggygia* 'purpureus'; explant; browning

外植体褐变是影响植物离体培养成功的重要因素之一, 尤其是在紫叶黄栌的离体培养过程中, 由于其体内多酚类物质含量较高, 褐变更为严重。防止外植体褐变成为紫叶黄栌离体培养过程中的关键。虽然目前可以通过培养基中附加抗氧化剂、吸附剂等多种方法减轻褐变的发生, 但不同植物材料、不同外植体类型在具体附加物种类和浓度上有较大差别。本试验从外植体取材时期、消毒时间、培养基中附加不同浓度抗坏血酸(Vc)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等方面对防止紫叶黄栌外植体的褐变进行了研究, 为这一优良彩叶树种的离体快繁提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用材料是胖龙园艺公司从美国引进的

紫叶黄栌(*Cotinus coggygia* 'purpureus')

1.2 试验方法

①不同时期取材。分别于1月上旬(前一年12月中旬取休眠枝条插于500mg·kg⁻¹ GA的水溶液, 抽出嫩茎后取材)、5月下旬、7月下旬、9月下旬不同时期选取紫叶黄栌茎段为外植体, 常规消毒后切成1cm左右单芽茎段, 接种于启动培养基1/2MS+6-BA0.5+IBA0.1+Vc1.0, 2周后统计污染率、褐变率, 4周后统计存活率、褐变死亡率。

②采用不同的灭菌时间。将1月上旬嫩茎、5月上旬的茎段分别用70%酒精表面灭菌15s和30s, 再用0.1%升汞处理2~9min, 接种于启动培养基(同上)。统计方法同上。

③添加不同浓度的附加物。在启动培养基1/

收稿时间: 2006-03-26

* 孙晓梅为通讯作者。

2MS + 6 - BA0.5 + IBA0.1 中添加不同浓度的 Vc、PVP,无添加物作对照,以 1 月上旬半木质化茎段为外植体,进行单因子随机区组试验,每处理 3 个区组,每区组 10~15 次重复^[1-2]。3 周后统计褐变指数,4 周后统计褐变死亡率。

2 结果与分析

2.1 取材时期对褐变的影响

表 1 取材时期对外植体褐变的影响

取材时间	1 月上旬	5 月下旬	7 月下旬	9 月下旬
接种数量(个)	35	52	35	30
污染个数(个)	5	24	26	27
污染率(%)	14.3	46.2	74.3	90.0
褐变率(%)	86.7	100.0	100.0	100.0
褐变死亡率(%)	26.7	42.9	57.1	72.7
存活数(个)	22	16	9	3
存活率(%)	62.9	30.8	14.6	8.6

表 2 灭菌时间对外植体褐变的影响

灭菌时间	2~3min		4~5min		6~7min		8~9min	
	1 月取材	5 月取材	1 月取材	5 月取材	1 月取材	5 月取材	1 月取材	5 月取材
接种数量(个)	35	16	24	31	25	52	20	26
污染个数(个)	51	53	20	32	41	10		
污染率(%)	14.3	93.8	12.5	64.5	12.0	46.2	5.0	38.5
褐变率(%)	86.7	100.0	90.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
褐变死亡率(%)	26.7	0.0	52.4	45.5	81.8	42.9	100.0	62.5
存活数(个)	22	1	10	6	4	16	0	6
存活率(%)	62.9	6.3	41.7	19.4	16.0	30.8	0.0	23.1

2.3 不同浓度的附加物对褐变的影响

培养基中添加 Vc、PVP 均可有效抑制紫叶黄栌外植体褐变的发生。由表 3 可见,添加不同浓度 PVP 和 Vc 各处理的褐变指数均显著低于对照的褐变指数。其中处理 3(Vc1.0mg·L⁻¹)和处理 4(Vc 1.5 mg·L⁻¹)的褐变指数显著低于其他处理,但二者之间差异不显著。

褐变指数 = (∑褐变级数 × 该级个数 × 100) / (褐变总数 × 4);

褐变级数:0 级:茎段基部无褐色物质渗出,茎芽萌动,生长正常;1 级:茎段基部有少量褐色物质渗出,未扩散至茎段横截面之外,茎芽萌动;2 级:褐色物质扩散到茎段横截面之外,渗出物直径为茎段直径的 1~2 倍,茎芽未萌动;3 级:渗出物直径为茎段直径的 2 倍以上,芽鳞边缘渐黑;4 级:茎段基部有大量褐色物质渗出,茎芽黑色死亡。

取材时间对紫叶黄栌外植体的污染率、褐变率以及褐变死亡率均有重要影响。其中 1 月上旬接种的外植体平均污染率最低(14.3%),褐变死亡率最低(26.7%)。而在生长季取材时,污染率、褐变死亡率随着生长时间的延长均会明显增加。9 月取材时外植体的褐变死亡率已达 72.7%,最后存活率只有 8.6%(见表 1)。

2.2 灭菌时间对褐变的影响

灭菌时间对外植体的褐变率也有重要影响。1 月嫩茎为外植体时,0.1% 升汞的最佳灭菌时间是 2~3min。水插抽生的幼嫩枝条,随着灭菌时间的延长,所受药害越重,褐变死亡率增加,而存活率降低。而 5 月取材时,灭菌时间 6~7min 的外植体的褐变死亡率虽然最低,但仍明显高于 1 月取材的外植体(见表 2)。

表 3 不同浓度的附加物对外植体褐变的影响

处 理	附加物(mg·L ⁻¹)	褐变死亡率(%)	褐变指数
1	0	90.5	76.5d
2	0.1(Vc)	63.8	55.7c
3	0.5(Vc)	46.1	42.3b
4	1.0(Vc)	32.2	31.6a
5	1.5(Vc)	29.5	30.4a
6	0.5(PVP)	78.6	64.0c
7	1.0(PVP)	65.4	58.7c
8	2.0(PVP)	57.9	44.3b
9	3.0(PVP)	51.5	40.9b

注:表中标有相同字母间差异不显著。

3 讨 论

植物组织培养过程中,外植体的褐变程度受取材时期、外植体类型和消毒时间的影响,不同植物材料合适的取材时期不尽相同^[3-4]。本试验结果表明,紫叶黄栌组织培养时,最合适的外植体是 1 月上旬休眠枝条经水插培养后抽生的嫩(下转第 20 页)

通过 AFLP 标记试验,初步证明银×榆 F₁ 植株属于偏母本型杂种,称得上为树木界的“狮虎兽”,丰富了基因和物种资源。

4.2 银×榆继承了父母本双亲的遗传特征,在抗旱、抗虫、及适应性等方面表现出一定的杂种优势,本项研究为以后杨树进行科、属间远缘杂交,培育更好新品种奠定了遗传基础。

4.3 从上面远缘杂交植株的早花性、两花性分析,我们提出以下几点看法供讨论。

①白榆一般3年开花,银×榆 F₁ 开花期提前是榆树的早花基因显性遗传给银×榆 F₁ 的结果。

②杨树一般雌雄异株。银×榆 F₁ 出现雌雄同株、同花序现象,可能是在受孕过程中,正常的银白杨生殖细胞在异科花粉的作用下,染色体发生了突变,产生了基因重组,出现了有背常规的现象。

③银白杨×白榆是一个比较特殊的珍稀物种资源,值得保护和研究。

4.4 由于银×榆具有较强的抗旱、抗虫能力和适应性,可在我国适生于银白杨的土壤瘠薄、气候恶劣的地区进行区域试验后推广。

参考文献:

- [1]别婉丽.值得推广的新树种银×榆[J].新农业,1990,(7).
- [2]杨成超.银白杨×白榆亲子鉴定及子代利用研究[D].北京:中国林业科学研究院图书馆,2005.
- [3]王明麻.林木遗传育种学[M].北京:中国林业出版社,2001.
- [4]李善文.杨树杂交亲本与子代遗传变异及其分子基础研究[D].北京:北京林业大学图书馆,2004.
- [5]VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23, (21): 4407 - 4414.
- [6]何承忠.毛白杨遗传多样性及起源研究[D].北京:北京林业大学图书馆,2005.

(责任编辑:韩素梅)

(上接第15页)茎。此时的外植体的褐变程度最低,成活率最高。这可能与此时其生理活动较弱、酚类物质含量较低有关。

培养基中附加不同浓度的抗氧化剂、吸附剂均能有效抑制褐变的发生,但不同植物材料、不同外植体类型在具体附加物种类和浓度上有较大差别^[5-9]。黄霞^[5]等研究表明,Vc与活性炭配合使用可以改善香蕉茎尖外植体的褐变情况,但单独使用Vc反而使褐变程度加深。而何琼英^[6]等报道则不同:用Vc预处理香蕉吸芽可以防止外植体褐变的发生。张妙霞^[7]等研究发现,PVP可以有效防止柿树外植体褐变,而Vc的效果不明显。陈彪^[8]等研究发现PVP也可有效防止甘蔗外植体的褐变。但姚洪军^[3]等在对阿月浑子外植体褐变的研究中指出,PVP的防止效果不明显,较高浓度的PVP反而会加重外植体的褐变程度。而Vc对阿月浑子外植体的褐变有很好的抑制作用。这与本研究结果相似:即Vc对紫叶黄栌外植体褐变的抑止效果明显优于PVP。这可能与二者同属漆树科、体内酚类物质含量均很高有关。对于酚类物质含量很高的培养材料,培养基中加入PVP后,由于其专一的吸附作用,可能会加剧外植体内外酚类物质的浓度差,造成酚类物质的过度外渗,被氧化成过多的醌类物质,反而不能有效抑止褐变发生。而Vc作为还原剂,可以阻

止酚类物质向醌类物质的氧化,从而有效抑制褐变的发生。

由此表明,植物组织培养中,通过添加抗氧化剂、吸附剂防止外植体的褐变仍没有一定的规律,外植体褐变的机理还需进一步研究。

参考文献:

- [1]周仲铭.林木病理学[M].北京:中国林业出版社,1985.
- [2]续九如.林业试验设计[M].北京:中国林业出版社,1993.
- [3]姚洪军,罗小芳,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 - 84.
- [4]高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯.1999,35(6):501 - 506.
- [5]黄霞,黄学林,高东徽.防止香蕉茎尖培养中外植体褐变的研究[J].广西植物,1999,19(2):78 - 80.
- [6]何琼英,张东方,王润华.抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体褐变的研究[J].华南农业大学学报,1995,16(3)79 - 82.
- [7]张妙霞,孔祥生,郭秀璞,等.柿树组织培养防止外植体褐变的研究[J].河南农业大学学报,1999,33(1):87 - 90.
- [8]陈彪,陈伟栋,梁钾贤,等.利用聚乙烯吡咯烷酮防止甘蔗组织培养接种物褐变的研究[J].华南农业大学学报,1999,20(3):63 - 66.
- [9]夏铭,吴绛云,张丽梅.红豆杉组织培养中褐变问题的研究[J].生物技术,1996,6(3):18 - 20.

(责任编辑:韩素梅)