

龙眼组培的褐变抑制研究

曹鸿斌, 刘魁英*, 赵宗芸, 黄米丽 (广东海洋大学农学院, 广东湛江 524088)

摘要 [目的]探求有效抑制龙眼组培时外植体褐变的方法。[方法]以龙眼嫩梢茎段为材料,采用多种抗褐变方法,筛选对龙眼组织培养中的外植体褐变抑制效果最好的方法。[结果]采用 6.00 g/L PVP 溶液进行预处理对龙眼外植体褐变的抑制效果最好。当 6-BA 浓度为 1.92~1.93 mg/L、KT 浓度为 0.88~1.93 mg/L、NAA 浓度为 0.05~0.06 mg/L 时,外植体的褐变程度最轻。添加 2.00 g/L 的 PVP 和活性炭的培养基对外植体褐变的抑制效果最好。[结论] 选取培养基 MS+NAA 0.05~0.06 mg/L+6-BA 1.92~1.93 mg/L+KT 0.88~1.93 mg/L+PVP 2.00 g/L,结合 6.00 g/L PVP 溶液的预处理,对龙眼组织培养时外植体褐变的抑制效果最好。

关键词 龙眼;组培;褐变

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)08-03132-02

Study on the Browning-inhibition of Longan in Tissue Culture

CAO Hong-bin et al (College of Agronomy, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] The aim was to seek for the effective method of inhibiting the browning of Longan explants in tissue culture. [Method] With stem segments of tender Longan shoot as material, many methods of resisting browning were used to screen out the method with best inhibition effect on the browning of Longan explants in tissue culture. [Result] The inhibition effect on the browning of Longan explants pretreated with 6.00 g/L PVP solution was best. When the 6-BA was 1.92~1.93 mg/L, KT was 0.88~1.93 mg/L and NAA was 0.05~0.06 mg/L, the browning degree of explants was lightest. The inhibition effect of medium with 2.0 g/L PVP and active carbon on the browning of explants was best. [Conclusion] The combination of medium MS+NAA 0.05~0.06 mg/L+6-BA 1.92~1.93 mg/L+KT 0.88~1.93 mg/L+PVP 2.00 g/L and pretreatment with 6.00 g/L PVP solution had the best inhibition effect on the browning of Longan explants in tissue culture.

Key words Longan; Tissue culture; Browning

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour. *Euphorialongana* Lam.)为无患子科龙眼属植物,是我国南亚热带名贵木本果树。在木本植物果树的组织培养中普遍存在着接种材料表面污染、褐变和培养成活率不高等问题,这在龙眼的离体培养中更为突出。龙眼材料中富含酚类化合物,在建立外植体时形成伤口,酚类化合物与多酚氧化酶接触迅速氧化成褐色的醌类物质,继而与外植体组织中的蛋白质发生聚合,进一步引起其他酶系统失活,从而导致组织代谢活动发生紊乱,生长停滞,最终衰老死亡^[1]。能否有效抑制外植体褐变是组织培养成功与否的关键,笔者以龙眼嫩梢茎段为材料,研究组织培养过程中影响外植体褐变的因子,旨在探求一种有效抑制外植体褐变的方法,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 供试材料取自广东海洋大学农学院园林基地龙眼苗圃,品种为石硖,于 2007 年春选取品种相同、树龄一致的同部位嫩枝。

1.2 方法

1.2.1 材料灭菌。将龙眼嫩梢去掉枝叶后剪成 2~3 cm 的带芽茎段,放入烧杯中,用清水冲洗去除杂物,用浓度 10% NaClO 溶液浸泡 30 min,无菌水漂洗 2 次;再用浓度 75% 酒精消毒 1 min,无菌水漂洗 2 次;放入 0.15% HgCl₂ 溶液中灭菌 8 min,无菌水漂洗 3~4 次;在无菌碟中切去两端后接种。

1.2.2 预处理。接种前,分别用浓度 4.00、5.00 及 6.00 g/L 的无菌聚乙烯吡咯烷酮(PVP)溶液浸泡材料 20 min,以无菌水浸泡为对照,研究不同处理对褐变的抑制作用。

1.2.3 抑制外植体褐变的最佳激素组合筛选。激素使用不当,材料容易褐变,选择最佳的生长调节剂,使外植体快速生长分化是减轻外植体褐变的重要手段^[2]。该试验采用 3 因

素完全实施的二次回归正交旋转组合设计^[3],以 MS 作为基本培养基,附加以下激素:6-BA(0~2.00 mg/L),KT(0~1.00 mg/L),NAA(0~0.50 mg/L)^[4],筛选出抑制外植体褐变效果最好的处理组合。

1.2.4 不同褐变抑制剂及浓度的筛选。以 MS+6-BA 1.00 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L 为基本培养基,设置 3 个处理,分别添加 PVP、Na₂S₂O₃、活性炭,每处理均设 5 个水平,分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L。以基本培养基不加任何附加成分为对照。

2 结果与分析

2.1 预处理的效果分析 由表 1 可见,采用浓度 6.00 g/L 的 PVP 溶液进行预处理对外植体褐变的抑制效果最好,显著好于浓度为 4.00 和 5.00 g/L 的 PVP 溶液,极显著好于对照,而浓度为 4.00 和 5.00 g/L 的 PVP 溶液之间无显著差异。

表 1 不同预处理外植体的褐变差异比较
Table 1 Comparison of the browning differences of explants under different pre-treatments

处理 Treatment	褐变指数 Browning index %	差异显著性 Difference significance	
		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
空白处理 Blank treatment	25.00	a	A
蒸馏水 Distilled water	16.00	b	B
4.00 g/L PVP	16.00	b	B
5.00 g/L PVP	16.00	b	B
6.00 g/L PVP	11.00	c	B

2.2 不同浓度激素组合的效果分析 利用 DPS3.01 统计软件求得回归方程: $Y=5.4348-0.2416x_1+0.0273x_2+0.2240x_3-0.6375x_1x_2+0.2375x_1x_3+0.1125x_2x_3-0.5597x_1'+0.0810x_2'-0.0436x_3'$,方差分析结果表明,回归关系达到显著水平,失拟未达到显著水平,因此认为 BA、KT 和 NAA 对外植体褐变有一定影响。根据回归方程进行组合寻优,筛选出 $Y < 2.2$,优选组合有 179 个,其 Y 设计参数=1.858195,设计允许误差为 ± 0.0395702 ; x_1 设计参数(规范变量)=1.552077,设计允许误差为 $\pm 1.214022E-02$; x_2 设计参数(规范变量)=1.302916,设

基金项目 广东海洋大学资助项目。

作者简介 曹鸿斌(1983-),男,天津人,硕士研究生,研究方向:龙眼的组织培养。* 通讯作者,教授。

收稿日期 2007-11-18

计允许误差为 $\pm 3.951\ 319\ E-02$; x_3 设计参数(规范变量) $= -1.323\ 341$, 设计允许误差为 $\pm 4.579\ 482\ E-02$ 。

根据公式运算可知, 当 BA 浓度为 1.92~1.93 mg/L、KT 浓度为 0.88~0.90 mg/L、NAA 浓度为 0.05~0.06 mg/L 时, 外植体褐变程度最轻。

2.3 不同褐变抑制剂的效果分析 由表 2 可知, 添加 2.00 g/L 的 PVP 和 2.0 g/L 的活性炭对外植体褐变的抑制效果最好, 两者之间无显著差异, 但均极显著好于 1.50 g/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和对照, 1.50 g/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和对照之间差异不显著, 说明 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 不能作为龙眼组织培养中的有效褐变抑制剂。

表 2 不同褐变抑制剂效果比较

Table 2 Comparison of the effects of different browning inhibitors

处理 Treatment	褐变指数 Browning index %	差异显著性 Difference significance	
		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
空白对照 Blank control	33.33	a	A
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1.50 g/L	33.11	a	A
活性炭 2.00 g/L Activated carbon	12.22	b	B
PVP 2.0 g/L	12.22	b	B

3 讨论

选择适当的外植体是抑制褐变的有效手段, 多数植物都表现为嫩梢部位的褐变较轻, 木质化程度高的部位褐变较重。而该试验得出的结论恰恰相反, 以龙眼嫩梢茎段作外植体, 其褐变比较严重, 接种后 2~3 d 外植体就出现严重褐变, 而有一定程度木质化的茎段只是在切口部位有褐色物质渗出, 接种后 7 d 其内部仍保持绿色, 但切开嫩梢发现已全部褐变, 并有腐烂现象发生。对于生长了一段时间的龙眼枝条, 其外植体越靠近茎尖褐变情况越轻, 反之则越重。该试验还发现, 经过 15 d 的培养, 龙眼外植体无论是茎尖材料还是茎段材料, 都能在一定程度上产生愈伤组织, 但只有木质化程度较高的茎段才能偶尔萌生出芽。因此, 龙眼的组织培养宜选取具有一定木质化的茎段, 不宜选取刚长出不久的嫩梢茎段, 这可能与本身的生理特性有关。当切口处的细胞受到伤害产生褐变时, 由于嫩梢的体内结构还不完整, 抵御外界伤害的能力不及较老的茎段, 所以在受到醌类物质毒害时, 损伤较为严重, 不能在短时间内形成愈伤, 从

而导致整体褐变死亡。

对较易褐变的外植体进行预处理可以减轻醌类物质的毒害作用。龙眼茎段外植体在切割后, 会立即产生褐变, 而在含有抗氧化剂的溶液中浸泡一段时间, 能使伤口与空气隔绝并使外植体处于抗氧化剂的保护中, 从而防止进一步褐变; 而褐变产生的有害物质也会扩散到溶液中被溶液中的氧化还原物质分解, 把带有浸泡液的外植体直接接种, 浸泡液会在培养基中继续发挥作用。

在筛选抗褐变抑制剂的试验中发现, 在培养初期, 用浓度为 2.00 g/L 的活性炭与 PVP 均可有效抑制外植体褐变, 但经过一段时间的培养后, 加入 2.00 g/L PVP 的培养基产生愈伤组织的机率明显比加入相同浓度的活性炭高, 这可能与活性炭的特性有关。活性炭是吸附性很强的无机吸附剂, 但它并没有选择性, 在吸附酚类物质的同时, 也把培养基中的营养物质吸附掉^[9], 短时间内对培养物没有影响, 时间长了外植体就因缺少营养而枯死, 因此应在加入活性炭的同时, 适当提高培养基的营养成分和激素浓度。

张卫芳等研究得出, 15 d 转瓶 1 次既不影响茎生长分化, 又可将褐变控制在有效范围内^[6]。但笔者通过试验发现, 培养初期是外植体褐变最严重的时期, 因此这段时间能否有效抑制褐变, 应是组培成功与否的关键。在培养后 1~2 d 内进行移位能减轻酚类物质的积累和对外植体的毒害作用, 使外植体能够正常生长, 从而有效地抑制褐变, 但由于培养基的营养成分有限, 在培养 7 d 后必须转移到新鲜的培养基中继续培养。

参考文献

- [1] 张明文, 陈力耕. 银杏组织培养中控制褐化的研究[J]. 中国南方果树, 2003, 32(3): 51-52.
- [2] 孔祥生, 张妙霞, 李亮琴, 等. 影响柿树外植体褐变因素的研究[J]. 洛阳农业专科学校学报, 1997, 17(4): 1-3.
- [3] 刘魁英, 王有年. 园艺植物试验与分析[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998: 9.
- [4] 陈菁瑛, 陈景耀, 陈熹. 龙眼的茎尖培养[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(2): 159-164.
- [5] 崔堂兵, 郭雨, 张长远. 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J]. 广东农业科学, 2001(3): 16-18.
- [6] 张卫芳, 高疆生, 欧勇慧, 等. 核桃组培中抑制褐化现象初探[J]. 中国农学通报, 2003, 19(5): 43-46.

(上接第 3102 页)

低浓度盐碱胁迫时, 各种牧草 CAT 和 SOD 活性均急速上升, 随盐碱浓度增加酶活性降低, 表现出先抑制后促进的趋势。在盐碱浓度达 200 mmol/L 时, SOD 活性变化为: 细茎冰草>北冰草>披碱草>黑麦草>扁穗冰草, CAT 活性变化为: 北冰草>细茎冰草>披碱草>黑麦草>扁穗冰草。二者之间的表现稍有不同, 可能是北冰草中 CAT 对高盐碱浓度不敏感所致, 但不影响整体变化趋势。

参考文献

- [1] 高红兵, 刘保东, 杨春波. 吉林西部加拿大牧草引种及筛选试验[J]. 北华大学学报, 2004, 5(6): 557-560.
- [2] 赵彤堂, 邵治君. 生态草建设在可持续发展战略中的地位和作用[J]. 吉林林业科技, 2002, 31(1): 20-23.
- [3] 徐安凯. 吉林省中西部沙漠化土地治理的建议[J]. 吉林林业科技, 2002, 31(2): 22-25.
- [4] GREENWAY H, MUNNER R. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1980(31): 149-190.
- [5] MUNNS R, TEMAAT A. Whole plant responses to salinity[J]. Aust J Plant physiol, 1986(13): 143-160.

GB/T 7714-2005

著录信息源

文后参考文献的著录信息源是被著录的文献本身。专著、论文集、学位论文、科技报告、专利文献等可依据书名页、版本记录页、封面等主要信息源著录各个著录项目; 专著、论文集中析出的篇章与报刊上的文献本身著录析出文献的信息, 并依据主要信息源著录析出文献的出处; 缩微制品可依据题名帧、片头、容器上的标签、附件等著录; 光盘依据标签、附件著录; 网络信息依据特定网址中的信息著录。