

3 种抗氧化剂对茶条槭(*Acer ginnala* Maxim.) 组织培养污染及褐化的影响

周 音¹, 张智奇^{1*}, 张建军¹, 顾佳清¹, 顾旭忠², 徐桂林²⁽¹⁾上海市农业科学院林木果树研究所,上海 201106; ⁽²⁾上海市松江区林业站,上海 201600)

摘 要:研究了3种抗氧化剂(抗坏血酸、亚硫酸钠、柠檬酸)对茶条槭外植体组织培养中抑制污染及褐化的影响。结果表明:在一定浓度下抗坏血酸、亚硫酸钠、柠檬酸三者配合能明显抑制菌类污染及褐化的产生,在含有抗坏血酸0.125 g/L,亚硫酸钠0.125 g/L,柠檬酸2.5 g/L及BA 2 mg/L的培养基上增殖系数达3.76,与对照相比差异达极显著水准,但高浓度抗氧化剂对茶条槭产生伤害。

关键词:茶条槭;组织培养;褐化;菌类污染

中图分类号: S792.35; Q943.1

文献标识码: A

茶条槭(*Acer ginnala* Maxim.)是槭树科的落叶乔木或灌木,树形优美,叶形清秀,尤其是秋后叶色鲜艳艳丽,观赏价值高,其木材可供细木加工。茶条槭还具有较强的抗污染及抗水分胁迫能力,可用于园林绿化;嫩叶加工制成茶叶,具有生津止渴、退热明目之功效;更主要的是其树叶可提取大量的没食子酸(Gallic acid),被广泛应用于医药、化工、食品、轻工、印染及军工等方面,由此可见茶条槭是一种极具开发利用前景的树种。通过组织培养的繁殖方法,既可以保留具有优良性状的单株,又为该树种的开发应用提供优质种苗。茶条槭的组培繁殖方法已有报道^[1],但在组培过程中外植体的菌类污染及褐化问题一直是影响芽分化的因素。为了减少褐化对芽分化及生长的影响,优化组培条件,本试验选用3种作用机理不同的抗氧化剂(亚硫酸钠、抗坏血酸和柠檬酸)对茶条槭组织培养进行处理,以期减少茶条槭在组织培养中的褐化。试验显示,3种抗氧化剂不仅能明显抑制褐化的产生,同时对培养过程中不断出现的污染有十分明显的抑制作用。亚硫酸钠、抗坏血酸和柠檬酸在茶条槭组织培养中对污染及褐化的影响研究未见报道。本文报道该项研究结果。

1 材料与方 法

1.1 材 料 供试材料为上海市农业科学院田间栽培的二年生茶条槭当年生枝条。

1.2 方 法

1.2.1 外植体处理 剪取当年生枝条,去除叶片,每一枝条剪成长度约为5~6 cm的切段,保留2~3个节间。用洗洁精溶液浸洗5 min,流水冲洗15~20 min。在超净工作台上,用10%的次氯酸钠溶液浸泡消毒10 min,再用70%的乙醇浸1~2 min,无菌水冲洗3~4次。用消毒纱布吸干水分备用。

1.2.2 芽的诱导培养条件 芽诱导培养基为MS+BA 1~2 mg/L,含3%蔗糖,琼脂粉为0.7%~0.8%,pH 5.8。培养温度25℃,光照时间12 h/d,光照强度1 500~2 000 lx。

1.2.3 几种抗氧化剂的处理 在研究抗氧化剂种类及用量时,参考胡庆风等^[2]在东北红豆杉细胞培养中效果最佳的亚硫酸钠、抗坏血酸和柠檬酸3种抗氧化剂,及在东方杉愈伤组织抑制褐化时3种抗氧化剂的最佳用量^[3],并设减半剂量,以不加抗氧化剂为对照,进行以下设计(表1)。

表1 几种试剂的处理
Table 1 Treatment of reagents

处理号 No. of treatment	柠檬酸/g·L ⁻¹ Citric acid	亚硫酸钠/g·L ⁻¹ Sodium sulfite	抗坏血酸/g·L ⁻¹ Ascorbic acid	BA/mg·L ⁻¹
1	5.0	0.250	0.250	0
2	2.5	0.125	0.125	0
3	2.5	0.125	0.125	1
4	2.5	0.125	0.125	2
5	0	0	0	2

收稿日期: 2006-06-20 初稿; 2007-02-15 二改稿

作者简介: 周 音(1962-),女,硕士研究生,副研究员,目前研究方向:林木生物技术。Tel:(021)62208660-3079

* 通讯作者

每瓶接5个外植体,4次重复,培养3d后调查污染率(污染率=污染株数/接种株数×100%)。1周后调查褐化率(褐化率=褐化株数/接种株数×100%)。1个月后调查芽分化增殖系数(增殖系数=增殖芽数/接种外植体数)。每项调查结果均进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 3种抗氧化剂对菌类污染的抑制作用 培养3d后观察,未加3种抗氧化剂的5号处理培养基污染严重,而加有3种抗氧化剂的处理污染较轻。随后对每瓶污染株数进行调查统计(表2)。

表2 抗坏血酸、亚硫酸钠及柠檬酸对茶条槭外植体污染的影响

Table 2 Inhibiting effects of ascorbic acid, sodium sulfite and citric acid on contamination of explants of *Acer ginnala*

处理号 No. of treatment	处理 Treatment	平均污染株数/瓶 Mean contaminated explant number per flask	污染率/% Percentage of contamination	平均数差异显著性 Significance of difference between means $LSD_{0.01} = 1.59$
5	BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4.50	90	A
2	1/2(CA+SS+AC)	1.25	25	B
3	1/2(CA+SS+AC)+BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.00	20	B
4	1/2(CA+SS+AC)+BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.00	20	B
1	CA+SS+AC	0.25	5	B

表2显示,5号处理(未加3种抗氧化剂)污染株数平均达到4.5株(由于取样时连续降雨污染较严重),与其他加3种抗氧化剂的各处理相比均达到差异极显著,表明3种抗氧化剂的组合无论在低剂量和加倍剂量时均能显著抑制污染。据观察,1号处理由于3种抗氧化剂的浓度较高,外植体基部产生白化,说明高浓度氧化剂对茶条槭产生了伤害。BA的用量与污染程度关系不大,2,3,4号处理间在BA的剂量上有区别,但污染株数未达显著差异。

2.2 3种抗氧化剂对褐化的抑制作用 培养1周后调查各处理的褐化情况(表3)。5号处理褐化株数均为5株,达100%,与其他加抗氧化剂的各处理相比呈极显著差异,表明3种抗氧化剂的组合在本供试植物上有显著抑制褐化的功效。这与在东方杉上的结果一致^[3]。1号处理3种抗氧化剂浓度高于其他处理1倍可100%抑制褐化产生。但考虑高浓度氧化剂对茶条槭产生了伤害,以选低剂量抗氧化剂浓度为好。

表3 抗坏血酸、亚硫酸钠及柠檬酸对茶条槭外植体褐化的影响

Table 3 Effects of ascorbic acid, sodium sulfite and citric acid on browning of explants of *Acer ginnala*

处理号 No. of treatment	处理 Treatment	平均褐化株数/瓶 Mean browned explant number per flask	褐化率/% Percentage of browning	平均数差异显著性 Significance of difference between means $LSD_{0.01} = 0.81$
5	BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	5.00	100	A
2	1/2(CA+SS+AC)	1.25	25	B
3	1/2(CA+SS+AC)+BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.25	25	B
4	1/2(CA+SS+AC)+BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.25	25	B
1	CA+SS+AC	0.00	0	C

2.3 3种抗氧化剂对芽分化的影响 培养1个月后调查各处理对芽分化的影响,表4显示:(1)4号处理芽数最多,与5,1,2号处理相比达极显著差异,与3号处理相比达显著差异,3号处理芽数次之,与5,1,2号处理相比达极显著差异,说明芽的分化数与BA浓度有关,BA浓度为2mg/L时能较好地促进茶条槭芽的分化。(2)5号处理由于未加3种抗氧化剂,污染严重,使得最后总芽数减少。说明3种抗氧化剂的使用抑制了污染与褐化,从而提高了芽的总数。(3)2号处理芽数与1号处理相比差异不显著,表明3种抗氧化剂用量增加或减少对芽的分化有影响但不明显。(4)4号配方最好,芽分化增殖系数最高。

表4 各处理对茶条槭芽增殖的影响

Table 4 Effects of different treatments on regeneration and multiplication of buds

处理号 No. of treatment	处理 Treatment	平均芽数/瓶 Mean bud number per flask	增殖系数 Multiplication coefficient	平均芽数差异显著性 Significance of difference between means	
				$LSD_{0.05} = 3.08$	$LSD_{0.01} = 2.19$
4	1/2(CA+SS+AC)+BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	18.8	3.76	a	A
3	1/2(CA+SS+AC)+BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	16.0	3.20	b	A
2	1/2(CA+SS+AC)	5.0	1.00	c	B
1	CA+SS+AC	4.0	0.80	c	B
5	BA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	2.3	0.46	d	B

3 结论与讨论

污染与褐化是植物尤其是木本植物组织培养过程中的两大难题。污染问题主要是通过组织培养前对外植体的表面消毒来解决,但对于木本植物的枝条由于存在内生菌就更难消毒完全,在培养的过程中会不断地出现污染,因此也有在培养基中加入抗生素^[4]、抑菌剂^[5]和酸化培养基^[6]等手段来抑制菌类产生的报道。本试验选用的 3 种抗氧化剂是在食品保鲜加工中常用的食品保鲜剂,均具有良好的抑制微生物生长的作用。试验结果表明,在培养基中加入一定浓度的柠檬酸、亚硫酸钠和抗坏血酸对茶条槭组织培养中菌类污染有明显的抑制作用,为以上 3 种抗氧化剂在其他植物组织培养抑制菌类污染的应用提供了依据。本试验 5 个处理中以 1 号处理抑制污染效果最好,但抗氧化剂的较高浓度使茶条槭外植体基部白化,产生了伤害,而 4 号处理既能抑菌又不使外植体受到伤害,效果较理想。

能否有效控制褐化是植物组织培养成功的关键所在。由于组织中多酚氧化酶被激活,酚类物质被氧化后产生醌类物质,这类棕褐色物质会扩散到培养基中,抑制其他酶的活性,毒害整个外植体组织,即褐化^[7]。在克服植物组织培养褐化的措施中,除了选择适宜的外植体及最佳培养基外,人们多选用抗氧化剂处理,作者曾在东方杉愈伤组织培养中选用柠檬酸、亚硫酸钠和抗坏血酸抑制其褐化,得到很好的效果。本试验选用以上 3 种抗氧化剂抑制茶条槭外植体褐化同样得到良好结果。由于污染和褐化得到良好抑制,从而提高了芽的总分化数,证明 3 种抗氧化剂在茶条槭的组织培养中起优化作用。在本试验中,以 4 号处理为最佳,处理 3 d 统计菌类污染情况,每瓶平均污染株数为 1 株;培养 1 周后统计褐化情况,每瓶平均褐化株数为 1.25 株;培养 1 月后统计芽分化情况,每瓶平均芽分化数为 18.8 个芽。

参 考 文 献

- [1] 孟月娥,周子发,李艳敏,等. 茶条槭的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005,41(6):790.
- [2] 胡风庆,王森林,马 辉,等. 东北红豆杉细胞培养物 PPO 活性研究[J]. 植物研究, 2001,21(4):583-586.
- [3] 周 音,张建军,张智奇,等. 三种试剂对东方杉 (*Taxodium mucronatum* × *Cryptomeria fortunei*) 愈伤组织抑制褐变的影响[J]. 上海农业学报, 2005,21(3):21-25.
- [4] 韩美丽,陆荣生,黄华艳,等. 绿巨人组培苗继代过程中玻璃苗及细菌污染的消除方法研究[J]. 广西林业科学研究, 1999,28(1):16-19.
- [5] 许婉芳,龚福生,萧华山. 杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制作用[J]. 福建果树, 1999 (4):6-7.
- [6] Cooke DL, W aites W M, Leifert C. Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue cultures of *Aster*, *Cheiranthus*, *Delphinium*, *Iris* and *Rosa*; disease development in vivo as a result of latent infection in vitro[J]. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 1992,99(5):469-481.
- [7] 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.

Inhibiting effects of 3 antioxidants on contamination and browning of tissue culture of *Acer ginnala* Maxim.

ZHOU Yin¹, ZHANG Zhi-qi¹, ZHANG Jian-jun¹, GU Jia-qing¹, GU Xu-zhong², XU Gui-lin²

¹ Forestry and Pomology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;

² Songjiang District Forestry Station, Shanghai 201600, China)

Abstract: The inhibiting effects of ascorbic acid, sodium sulfite and citric acid on the explant contamination and browning were studied in the tissue culture of *A. ginnala*. The results showed that the combination of these 3 antioxidants at some concentration could significantly inhibit the occurrence of contamination and browning. The bud multiplication coefficient could reach 3.76 when the explants were cultured on MS medium containing 0.125 g/L ascorbic acid, 0.125 g/L sodium sulfite, 2.50 g/L citric acid and 2 mg/L BA, which was significantly different from on the medium without the antioxidants. But the antioxidants of a higher concentration could harm the explants.

Key words: *Acer ginnala* Maxim.; Tissue culture; Contamination; Browning