

‘小×胡 8 号杨’组织培养中的褐化控制研究

朱学静^{1,2}, 金 华², 殷鸣放¹, 马树森³, 丁丽娜^{1,2}, 赵允鹏⁴, 姜国斌^{2*}

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 大连民族学院 民族地区生物资源与环境研究所, 辽宁 大连 116600; 3. 辽宁省国有林场管理局, 辽宁 沈阳 110036; 4. 新民市姚堡林业站, 辽宁 新民 110300)

摘 要:以‘小×胡 8 号杨’叶片为试验材料, 探讨叶片预处理、无机盐浓度、不同温度和光强、抗氧化剂与吸附剂等对褐化控制的有效性。结果表明: 经过 5℃、12h 预处理能减轻外植体褐化现象; 使用 1/2MS 培养基较 MS 培养基褐化程度减轻; 低温暗处理和常温暗处理都能一定程度上减轻褐化; 抗氧化剂和吸附剂对褐化作用较明显, 其中 PVP 效果较好, VC 次之, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 最差; 6-BA 和 IBA 浓度变化对褐化现象基本没有影响。

关键词:小×胡 8 号杨; 组织培养; 褐化

中图分类号:S792.11; S722.3

文献标识码:A

文章编号:1001-1714(2007)04-0019-03

外植体褐化是指无性系植物用于离体培养或进行组织培养时, 从植物体上切取的组织中多酚氧化酶被激活催化酚类物质, 生成棕褐色的醌类物质, 逐渐扩散到培养基中抑制其它酶的活性, 以致培养的外植体受到毒害。褐化是植物尤其是木本植物组织培养中的一大难题。目前许多植物的组织培养过程中发现外植体褐化现象^[1-4]。‘小×胡杨’(*Populus simonii* × *P. euphratica*) 是以抗逆性强的小叶杨为母本、高度耐盐的胡杨为父本, 通过远缘杂交培育出来的杨树品种, 具有抗旱、耐盐碱、抗病虫等多种特性。在进行组织培养过程中, 以其叶片为外植体进行初代培养时, 褐化现象十分严重。本文以‘小×胡 8 号杨’叶片为试材, 研究叶片预处理、无机盐浓度、不同温度和光强及在培养基中添加抗氧化剂与吸附剂等处理对外植体褐化的影响。

1 材料与方法

1.1 材 料

‘小×胡 8 号杨’插条由辽宁省新民市姚堡林业站提供。扦插成苗后, 于 6 月份取幼嫩的叶片作为试验材料。

1.2 方 法

1.2.1 消毒方法及培养条件

叶片用洗洁精洗净后用流水冲洗 30min, 滤纸吸干。在超净工作台表面灭菌处理, 70% 乙醇处理 30s, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% HgCl_2 消毒 6~8min, 无菌水冲洗 5~6 次。基本培养基均为 MS + 6-BA0.5mg·L⁻¹ + IBA0.05mg·L⁻¹, 蔗糖 3%, 琼脂 6.5g·L⁻¹, pH 值 5.8, 培养温度 25 ± 2℃, 光照强度为 2 500lx, 光照时间 14h·d⁻¹。

1.3 试验处理

消毒后将叶片切成 0.5cm × 0.5cm 大小, 叶背朝下接种到培养皿中, 每一处理接种 4 皿, 每皿接种 10 个外植体, 重复 3 次, 20d 后观察试验结果。

1.3.1 外植体预处理对褐化的影响

‘小×胡 8 号杨’叶片经流水冲洗干净后, 置于 2~5℃ 冰箱中 12h, 取出灭菌后接种, 以不处理的外植体作对照。

1.3.2 无机盐浓度对外植体褐化的影响

将叶片接种到分别以 MS 和 1/2MS 为基本培养基并附加 6-BA0.5mg·L⁻¹ 和 IBA0.05mg·L⁻¹ 的培养基中进行培养。

1.3.3 不同温度和光强对外植体褐化的影响

将叶片接种后分别置于 5℃ 下黑暗培养 3d、(25 ± 2)℃ 下黑暗培养 3d, 以 (25 ± 2)℃ 正常光照作对

收稿日期: 2006-11-17

基金项目: 大连民族学院人才引进科研项目启动基金(20046205)

* 通讯作者

照。

1.3.4 不同种类、浓度的吸附剂与抗氧化剂对外植体褐化的影响

将叶片接种到添加吸附剂或不同抗氧化剂的MS+6-BA0.5mg·L⁻¹+IBA0.05mg·L⁻¹培养基上培养。其中聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的浓度分别为500mg·L⁻¹、1000mg·L⁻¹、2000mg·L⁻¹、5000mg·L⁻¹,维生素C(VC)的浓度分别为100mg·L⁻¹、200mg·L⁻¹、300mg·L⁻¹、500mg·L⁻¹、1000mg·L⁻¹,硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)的浓度分别为500mg·L⁻¹、1000mg·L⁻¹、2000mg·L⁻¹、5000mg·L⁻¹。以培养基MS+6-BA0.5mg·L⁻¹+IBA0.05mg·L⁻¹为对照。

1.3.5 生长调节物质浓度变化对外植体褐化的影响

将叶片接种到不同浓度的6-BA和IBA组合的MS培养基中培养。

1.4 测定指标

褐化程度从重到轻依次为严重褐化(+++),中度褐化(++),轻微褐化(+),无褐化(-)。褐化率=有褐化现象外植体数/接种外植体数×100%。

2 结果与分析

2.1 外植体预处理对叶片褐化的影响

表1 外植体预处理对叶片褐化的影响

处 理	接种数 (个)	褐化数 (个)	褐化率 (%)	褐化 程度
5℃、12h 预处理	40	34	85	++
对 照	40	40	100	++

从表1可以看出,杨树叶片经过5℃、12h预处理后进行接种,尽管褐化程度没有减轻,但褐化率降低,由对照的100%降到85%。

2.2 无机盐浓度对叶片褐化的影响

表2 无机盐浓度对叶片褐化的影响

基本培养基	接种数 (个)	褐化数 (个)	褐化率 (%)	褐化 程度
MS	40	40	100	++
1/2MS	40	40	100	+

由表2可知,使用1/2MS培养基降低无机盐的浓度,能减轻褐化程度,但外植体生长效果不明显,故试验选用MS作为基本培养基。

2.3 不同温度和光强对叶片褐化的影响

5℃、3d暗处理和(25±2)℃、3d暗处理都可以降低褐化率,减轻褐化程度,见表3。

表3 不同温度和光照对叶片褐化的影响

处 理	接种数 (个)	褐化数 (个)	褐化率 (%)	褐化 程度
5℃	40	28	70	+
(25±2)℃	40	37	92.5	+
对 照	40	40	100	++

2.4 不同种类、浓度的吸附剂与抗氧化剂对叶片褐化的影响

从对叶片褐化程度的影响来看,PVP效果最好,VC次之,Na₂S₂O₃最差,见表4。当PVP的浓度为500~2000mg·L⁻¹时,随着浓度增加防褐化的效果越来越明显,当浓度达到2000mg·L⁻¹时褐化率降到20.0%,且外植体长势良好,部分叶片已分化出不定芽。当PVP浓度达到5000mg·L⁻¹时,防褐化效果下降,褐化率达到95%,但褐化程度减轻;当VC浓度为100~300mg·L⁻¹时,褐化率有所降低,褐化程度减轻;但当VC浓度达到500mg·L⁻¹以上时,防褐化表现较差;VC浓度为500mg·L⁻¹时,培养第2天外植体四周切口就变成褐色,且随着培养天数增加褐化面积逐渐扩大;当VC浓度达到1000mg·L⁻¹时,培养第2天整个叶片呈褐色,严重促进外植体褐化;培养到第3、4天,褐化面积基本达到100%,叶片停止生长,逐渐死亡;不同浓度的Na₂S₂O₃防褐化效果较差,随着浓度增加褐化程度加强,当浓度达到2000mg·L⁻¹以上时,虽然叶片膨大,但出现严重的褐化现象。

表4 不同种类、浓度的吸附剂与抗氧化剂对叶片褐化影响

种 类	浓度 (mg·L ⁻¹)	接种数 (个)	褐化数 (个)	褐化率 (%)	褐化 程度
VC	100	40	34	85	+
	200	40	28	70	+
	300	40	35	87.5	+
	500	40	40	100	++
	1000	40	40	100	+++
Na ₂ S ₂ O ₃	500	40	40	100	++
	1000	40	40	100	++
	2000	40	40	100	+++
	5000	40	40	100	+++
	5000	40	40	100	+++
PVP	500	40	17	42.5	+
	1000	40	12	30.0	+
	2000	40	8	20.0	+
	5000	40	38	95.0	+
对照	-	40	40	100	++

2.5 生长调节物质对叶片褐化的影响

6-BA和IBA不同浓度变化对叶片褐化的影响结果见表5。

表 5 6-BA 和 IBA 浓度变化对叶片褐化的影响

6-BA 浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IBA 浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种数(个)	褐化数(个)	褐化率(%)	褐化程度
0.1	0.05	40	40	100	++
0.5	0.05	40	40	100	++
1.0	0.05	40	40	100	++
1.5	0.05	40	40	100	++
0.5	0.1	40	40	100	++
1.0	0.1	40	40	100	++
1.5	0.1	40	40	100	++
0.5	0.2	40	40	100	++
1.0	0.2	40	40	100	++
1.5	0.2	40	40	100	++

从表 5 可以看出,随着 6-BA 和 IBA 浓度变化,褐化率和褐化程度都没有明显的变化,说明在‘小×胡 8 号杨’组织培养过程中,6-BA 和 IBA 浓度对叶片褐化现象基本没有影响。

3 讨论

褐化现象在组培中普遍存在,与外植体的基因型、材料的年龄和大小、取材时间和部位、培养基成分、培养条件等因素关系密切^[5]。选择合适的培养基和培养条件是控制褐化的有效手段之一。试验研究表明,5℃、12h 预处理能在一定程度上减轻叶片褐化现象。使用 1/2MS 培养基较 MS 培养基褐化程度减轻,主要是在初期培养过程中,MS 基本培养基中高浓度的盐可以促进酚类物质大量外渗,同时培养基中 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 的存在可以刺激多酚氧化酶的活性,促进醌的合成,加重外植体的褐化程度,但‘小×胡 8 号杨’叶片在 1/2MS 培养基上生长效果不明显。低温暗处理和常温暗处理都能在一定程度上减轻褐化,这是由于黑暗条件下一些光诱导参与酚类合成和氧化的酶活性减弱,导致酚类合成减少,氧化产物醌类也相应减少,从而使褐化得到一定程度的控制。本试验通过抗氧化剂 VC、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和吸附剂 PVP 对叶片褐化的影响效果可知,PVP 的抗褐化效果最好,VC 次之, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 最差。这种现象在牡丹^[6]的组织培养中也有类似的报道。此外,试验还发现,当 VC 浓度达到 $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,促进叶片的褐化

速度和程度,与前人的研究培养基中加入 VC($500\sim 5\,000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)可明显减少‘薄壳香’核桃褐化发生的结果相反^[7]。另外 6-BA 和 IBA 浓度变化对‘小×胡 8 号杨’叶片褐化基本没有影响。

在实际操作中还采取了其他措施,如严格控制叶片的消毒时间(不宜过长),尽量减少外植体材料的切割、接种操作过程在空气中暴露的时间,对降低‘小×胡 8 号杨’叶片褐化死亡率都有一定的影响。

参考文献:

- [1] 于志水,金红,苘胜军,等.黑杨派杨树组培再生系统的研究[J].辽宁林业科技,2002,(6):11-13.
- [2] 宋春丽,马俊莲,张子德,等.磨盘柿初代组织培养技术研究[J].河北农业科学,2002,6(1):1-7.
- [3] 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.
- [4] 周玉珍,张雨青.金叶风箱果初代离体培养中影响外植体褐化的因素(简报)[J].植物生理学通讯,2001,37(2):122-123.
- [5] 陈菲,李黎,宫伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].生物技术,2005,(2):69.
- [6] 何松林,陈笑蕾,陈莉,等.牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J].河南科学,2005,23(1):47-50.
- [7] 刘兰英.‘薄壳香’核桃组培中的褐化及防止措施研究[J].园艺学报,2002,29(2):171-172.

(责任编辑:张素清)