

华盖木组织培养中褐化控制研究

刘均利¹, 马明东^{1,2*}

(1. 四川农业大学 林学院艺学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 都江堰分校, 四川 都江堰 611830)

摘要:以木兰科濒危植物华盖木顶芽为试材, 对其组织培养过程中褐化的发生及防止措施作了系统研究, 结果表明: 选取华盖木下部枝条顶芽为外植体, 选用 1/2MS 为基本培养基并附加 0.1 ~ 1.5 mg/L BA 和 0.1 ~ 1.0 mg/L IBA, 适当提高培养基硬度, 培养初期适宜的低温处理是褐化控制的有效措施; 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、二硫苏糖醇 (DTT)、抗坏血酸 (VC) 3 种防褐化剂对褐化的抑制作用较为明显, 其效果 PVP > DTT > VC。

关键词: 华盖木; 组织培养; 褐化

中图分类号: S687.9

文献标识码: A

华盖木 (*Manglietiastrum sinicum*) 属木兰科华盖木属常绿大乔木, 我国特有的一级重点保护濒危树种。在中国野生植物受威胁定量评价等级标准中, 被列为红色警报级几乎绝迹种^[1]。导致其濒临绝迹的原因可能是该物种在历史演化过程中, 由于存在着某些脆弱环节, 如繁育系统的缺陷或基因突变和生物生态学的特化而依赖于单一特殊的环境条件, 由于急剧变化着的环境和特殊生境的丧失, 加之历史上林木砍伐、植物破坏等人为活动干扰使该物种处于绝迹状态。该物种是厚壁木兰型植物中最原始的类群, 对木兰科分类系统和古植物区系等研究具有很高的学术价值。利用现代生物技术进行组织培养, 建立华盖木离体快繁体系, 对抢救这一几乎绝迹的基因资源有着重大的科学价值。

但在华盖木的组织培养中发现其褐化十分严重, 阻碍了芽体的萌发和愈伤组织的增殖。为此, 笔者开展了不同外植体部位、不同外植体处理、不同基本培养基、不同激素种类、不同防褐化剂和不同培养条件对华盖木初代培养中外植体褐化影响的研究, 旨在为挽救该珍稀濒危树种资源以及进行快速繁殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2005 年 11 月至 2006 年 2 月进行, 试材取自四川农业大学都江堰分校苗圃华盖木 3 年生嫁接苗当年生健壮枝条顶芽。

1.2 试验方法

采用单因子实验, 每个处理 30 瓶, 每瓶接种一个外植体, 重复 3 次。外植体用洗衣粉清洗浸泡 20 min, 流水冲洗 3 h 后沥干, 在超净工作台上先后用体积百分数 75% 乙醇处理 20 s, 无菌水冲洗 3 次, 0.1% HgCl₂ 灭菌 8 ~ 9 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次, 无菌滤纸吸干水分, 剥去外苞片, 再逐层剥去尚未展开的幼叶, 将 0.5 ~ 0.8 cm 的茎尖接种到培养基上。如无特别说明, 灭菌前 pH 为 5.8, 接种后 20℃ 暗培养 7 d 再转入 25℃ 光下, 光照 2 000 lx, 12 h/d, 分别在培养 15 d、35 d 时统计褐变的程度, 45 d 时统计褐死率, 生长情况差异明显的计入统计, 结果采用 3 次重复的平均值。

收稿日期: 2006-10-15; 修回日期: 2006-12-01

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目“红色警报级几乎绝迹种华盖木人工繁育技术体系研究”

作者简介: 刘均利 (1982 -), 女, 四川雅安人, 硕士, 从事林业生物技术研究; *通讯作者

1.2.1 不同基本培养基对褐化的影响 采用 MS、1/2MS、B5、1/2B5、WPM 5 种培养基, 并分别附加激素 BA0.5 mg/L 和 NAA0.1 mg/L。

1.2.2 不同植物生长调节剂对褐化的影响

1.2.2.1 不同细胞分裂素对褐化的影响 选用 1/2MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 BA、ZT、KT、2ip, 浓度设为 0.1、0.5、1.5、3.0、4.5 mg/L。

1.2.2.2 不同生长素对褐化的影响 选用 1/2MS + BA0.5mg/L 为基本培养基, 附加不同浓度的 NAA、IBA、2, 4-D, 浓度设为 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0mg/L。

1.2.3 不同防褐化剂对外植体褐化的影响 以 1/2MS + 0.5mg/LBA + 0.1mg/LNAA 为基本培养基, 附加不同浓度与种类的防褐化剂: (1) 抗坏血酸 (VC): 5、10、25mg/L; (2) 活性炭 (AC): 0.5、1.5、3.0 g/L; (3) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP): 1.0、2.0 g/L; (4) 二硫苏糖醇 (DTT): 2.0 mg/L; (5) 硫代硫酸钠 (ST): 2.0 g/L; (6) 柠檬酸 (CA): 0.5 g/L; (7) 巯基乙醇 (BME): 1.0 ml/L, 该组处理在 10、25、40 d 时统计褐变度, 50 d 时统计褐死率。

1.2.4 不同部位外植体对褐化的影响 试验材料分 3 种: (1) 3 年生嫁接苗下部枝条顶芽; (2) 中部枝条顶芽; (3) 上部粗壮枝条顶芽。将以上 3 种外植体接种于 1/2MS + 0.5mg/LBA + 0.1mg/LNAA + 1.5g/LPVP (以下培养基均与此相同)。

1.2.5 培养基硬度对褐化的影响 将培养基分为琼脂 5.5、6.5、7.5、8.0g/L 4 种。

1.2.6 温度和光照对褐化的影响 将培养基分 6 种处理: (1) 接种后 8℃低温暗培养 4 d, 后转入 25℃光下培养; (2) 接种后 4℃低温暗培养 8 d, 后转入 25℃光下培养; (3) 接种后 8℃低温暗培养 8 d, 后转入 25℃光下培养; (4) 接种后马上转入 25℃光下培养; (5) 接种后放于 25℃下遮光培养; (6) CK (20℃暗培养 7 d 后再转入 25℃光下培养)。

1.2.7 测定指标 褐变度参照《树木组织培养》^[2]制定, N (没有褐变)、+ (轻微褐变)、++ (中度褐变)、+++ (严重褐变)、- (褐变死亡)。褐变度的调查是以同一处理绝大部分接种材料的表现来界定。褐变死亡率于培养 45 d 或 50 d 时调查。褐死率 = (褐化死亡的外植体数/接种外植体数) × 100% (污染不计入统计)。CK 为对照。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对褐化的影响 (表 1)

从表 1 可知, 外植体在较低无机盐浓度的 1/2MS 和 1/2B5 培养基上褐化较轻, 其中以 1/2MS 褐死率最低; 在 B5 和 WPM 培养基上褐变度没有明显差别, 但 WPM 培养基的褐死率较低, 这可能与它是一种低盐培养基有关; 在高无机盐浓度的 MS 培养基上褐化和褐死率均最高。

表 1 不同基本培养基对褐化的影响

基本培养基	褐变度		45 d 褐死率 /%
	15d	35d	
1/2MS	+	+	17
MS	++	+++	50
1/2B5	+	+	27
B5	+	++	37
WPM	+	++	30

2.2 不同激素种类对褐化的影响

2.2.1 不同细胞分裂素对褐化的影响 (表 2) 有报道, 细胞分裂素类物质会促使褐化的发生, 但研究多集中在 BA、KT 两种。本试验研究了 BA、KT、ZT、2ip 四种细胞分裂素对华盖木外植体褐化与生长的影响。结果表明: BA 与 ZT 均可较好的促进茎尖的膨大生长, 但 ZT 的褐化整体上重于 BA; BA 含量在 3 mg/L 以上时, 外植体褐化加重; KT 与 BA 的褐化情况相似,

表 2 不同细胞分裂素对褐化的影响

激素种类	浓度水平 /mg · L ⁻¹	褐变度		45d 平均 褐死率/%	外植体生长情况
		15d	35d		
BA	0.1/0.5/1.5	+	++	27	良好
	3.0/4.5	++	+++	43	一般
KT	0.1	++	++	31	一般
	0.5/1.5	+	++	25	良好
ZT	3.0/4.5	++	+++	40	差
	0.1/0.5/1.5	++	+++	40	一般
2ip	3.0/4.5	++	+++	43	良好
	0.1	+++	+++	52	差
	0.5-4.5	+++	-	70	差

但促进外植体生长的效果明显差于 BA; 在附加 2ip 的培养基上外植体长势极差且褐化十分严重。总体上外植体褐化情况为: 2ip > ZT > KT = BA; 外植体生长情况为: ZT > BA > KT > 2ip (表 2)。从生长与褐化控制二者综合考虑, BA 应是最佳的细胞分裂素选择, 浓度范围以 0.1 ~ 1.5 mg/L 为宜。

2.2.2 不同生长素对褐化的影响 (表 3) 试验结果

表明: 不同浓度生长素与 BA 配合均可诱导出不定芽, IBA 与 NAA 的含量达到 2.0 mg/L 时褐化均有所加重, 2,4-D 在 1.0 mg/L 以上时褐化就开始加重, 用量在 2.0 ~ 3.0 mg/L 时虽可诱导出较多不定芽, 但芽很小且褐化十分严重。总体上外植体褐化情况为: 2,4-D > NAA > IBA; 外植体生长情况为: IBA = NAA > 2,4-D。因此, NAA 和 IBA 是较适宜的生长素选择, 而 IBA 要略好于 NAA, 浓度范围以 0.1 ~ 1.0 mg/L 为宜。

2.3 不同防褐化剂对外植体褐化的影响 (表 4)

在培养基中添加适当的抗氧化剂和吸附剂, 可在一定程度上防止或减轻褐化^[3]。因为抗氧化剂可以改变外植体周围的氧化还原电势, 对酚类物质的氧化起到抑制的作用, 从而减轻褐变; 而吸附剂则可吸附分泌到培养基中的酚、醌类物质, 有效地防止此类物质所诱发的褐变^[4], 但防褐效果因植物材料的不同而差异显著^[5]。华盖木防褐化试验亦表明, 选择适宜种类和浓度的防褐化剂可不同程度降低外植体的褐变。

PVP、DTT、VC 的防褐化效果十分明显, 其中以 PVP 在 2.0 g/L 时最优; VC 用量需在 10 mg/L 以上时

才有较好效果, 且随培养时间的延长褐化明显加重, 需及时转瓶。AC 的防褐作用也较明显, 但 AC 作为一种无选择性的吸附剂, 在吸附培养基中的有害物质的同时还会吸附植物生长所需的营养物质。当其含量达到 3.0 g/L 时, 虽然褐化很轻但严重阻碍了外植体的生长。ST 和 CA 不能减轻华盖木外植体的褐变。乐东拟单性木兰褐变控制实验中, BME 的使用使外植体的褐变率明显降低^[6], 但本实验中附加了巯基乙醇的培养基上外植体 4 d 时就开始变褐, 10 d 时全部褐化死亡, 培养基变为蓝黑色, 这可能与华盖木对巯基乙醇的毒性敏感有关。由表 4 可知, 不同防褐化剂的效果为: PVP > DTT > VC > AC > ST > CA > BME。

2.4 不同部位外植体对褐化的影响 (表 5)

从表 5 可知, 以华盖木上部粗壮枝条顶芽为外植体褐化严重, 以中部枝条顶芽为外植体褐化明显降低, 而下部枝条顶芽褐化最轻。下部枝条顶芽虽较小, 但较耐消毒液处理, 而顶部壮芽一经消毒褐化就出现, 十分敏感。

2.5 培养基硬度对褐化的影响 (表 6)

研究发现, 培养基较稀时, 酚类、醌类物质很易渗入培养基, 使培养基变为褐色, 同时使接触它的外植体也变为褐色, 褐化严重; 硬度较高时, 培养基基本不变色, 外植体大多颜色青绿, 褐化较轻。实验结果表明, 随琼脂用量增加, 培养基硬度加大, 褐化程度减轻, 褐死率降低。

2.6 温度和光照对褐化的影响 (表 7)

表 5 不同部位外植体对褐化的影响

芽位	褐变度		45d 褐死率 /%
	15d	35d	
下部枝条顶芽	N	+	7
中部枝条顶芽	+	+	16
上部枝条顶芽	++	+++	43

表 6 培养基硬度对褐化的影响

琼脂用量/g · L ⁻¹	褐变度		45d 褐死率 /%
	15d	35d	
5.5	++	+++	36
6.5	++	+++	38
7.5	+	++	25
8.0	+	++	20

表 3 不同生长素对褐化的影响

激素种类	浓度水平 /mg · L ⁻¹	褐变度		45d 褐死率 /%	外植体 生长情况
		15d	35d		
NAA	0.1/0.5/1.0	+	+	24	良好
	2.0/3.0	++	++	35	一般
IBA	0.1/0.5/1.0	+	+	19	良好
	2.0/3.0	+	++	28	一般
2,4-D	0.1/0.5	++	++	38	一般
	1.0/2.0/3.0	++	+++	50	差

表 4 不同的防褐化剂对褐化的影响

防褐化剂	浓度	褐变度			50d 褐死率/%	外植体 生长情况
		10d	25d	40d		
VC	5.0mg/L	N	+	+++	35	一般
	10.0mg/L	N	+	++	24	良好
	25.0mg/L	N	+	++	20	良好
AC	0.5 g/L	N	+	++	32	一般
	1.5 g/L	N	+	++	28	一般
	3.0 g/L	N	+	+	18	差
PVP	1.0 g/L	N	+	+	18	良好
	2.0 g/L	N	+	+	12	良好
DTT	2.0 mg/L	N	+	+	16	良好
ST	2.0 g/L	+	++	+++	45	差
CA	0.5 g/L	+	++	+++	48	差
BME	1.0 ml/L	-	-	-	100	全部褐死
CK		+	++	+++	36	一般

不少研究证明, 较高的培养温度和光照强度能加速外植体褐化^[7], 而弱光和低温培养有减缓外植体褐化的作用, 但用不同树种试验所得的结果并不完全一致。由表 7 表明, 华盖木在 8℃ 低温暗培养 4 d 后褐化程度和褐死率与对照相比均有明显的降低, 这可能与低温抑制了酶的活性和减少了酚类氧化有关。但低温处理的时间和温度须十分注意, 当低温处理时间过长 (8 d 时), 褐化明显加重; 若温度过低且处理时间过长 (4℃ 低温暗培养 8 d), 则褐化程度与褐死率均极高。这可能与华盖木自身不耐低温有关。而遮光处理没有明显效果, 说明华盖木外植体的褐化对光不敏感, 这与乐东拟单性木兰褐化表现一致^[6]。

3 结论

木兰科植物酚类含量高, 组织培养中褐化问题严重^[8-10]。华盖木组培实验中发现, 其茎段虽可诱导出愈伤组织, 但愈伤组织很快会变褐死亡, 根本无法增殖、分化。而利用茎尖培养可发现有时其外苞片虽未褐化, 但切开后其茎尖生长点部分往往已褐化死亡, 根本无法萌发。因此, 褐化的控制成为华盖木组织培养要解决的首要问题。

本实验以顶芽为试材对其初代培养中的褐化问题进行了系统研究。结果表明: ① 采用 1/2MS 为基本培养基, 通过降低无机盐浓度来控制褐化有较明显的效果; ② 生长调节物质的种类与浓度对褐化有较明显的影响, 外植体在附加 0.1 ~ 1.5 mg/LBA 与 0.1 ~ 1.0mg/LIBA 激素组合的培养基上应是褐化表现最轻的; ③ 培养基中加入不同的防褐剂对褐化控制的效果差异明显, 其中 PVP 效果最好, 其次是 DTT 与 VC; ④ 选用下部枝条顶芽为外植体褐化显著降低, 这可能与植物体不同部位酚类物质含量差异有关; ⑤ 不少研究表明, 连续转瓶是褐化控制的有利手段^[11], 但本实验中转瓶对褐化控制并无明显影响。培养基硬度对褐化的影响表现为硬度较高时褐化较轻, 这与云桑组织培养中褐化表现一致^[12]; ⑥ 遮光处理对华盖木外植体褐化控制并无明显作用, 在适宜的温度与处理时间范围内, 培养初期低温处理对降低褐化效果明显。

参考文献:

- [1] 顾云春. 中国国家重点保护野生植物现状[J]. 中南林业调查规划, 2003, 22 (4): 1-7.
- [2] [美] J M Bonga, D J Durzan. 阙国宁, 郭达初, 李金田, 译. 树木组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988. 141-143.
- [3] 耿莉, 周洁. 沙棘组织培养的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33 (12): 2404-2405.
- [4] 陈凯, 刘颖. 如何控制植物组织培养中褐变的产生[J]. 邯郸农业高等专科学校学报, 2004, 21 (3): 5-6.
- [5] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27 (增刊): 481-486.
- [6] 苏梦云, 姜景民. 乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导与褐变控制的研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17 (6): 757-762.
- [7] 陈凯. 植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施[J]. 安徽农业科学, 2004 (5): 1034-1036.
- [8] 褚建民, 周凌娟, 王阳, 等. 白玉兰离体培养和快速繁殖[J]. 防护林科技, 2002 (4): 29-31.
- [9] 陈金慧, 施季森, 诸葛强. 杂交鹅掌楸的不定芽诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38 (5): 459.
- [10] 周丽华, 许冲勇, 曾雷, 等. 紫玉兰组织培养繁殖研究[J]. 经济林研究, 2002, 20 (4): 37-38.
- [11] 鲁旭东. 植物组织培养中褐变的发生及防止[J]. 农业与技术, 1999 (4): 9.
- [12] 邱璐, 陈善娜, 杨跃仙, 等. 云桑组织培养中褐化问题的研究[J]. 蚕业科学, 2000, 26 (2): 118-119.

表 7 温度和光照对褐化的影响

培养条件	褐变度		45d 褐死率 /%
	15d	35d	
接种后 8℃ 低温暗培养 4d	N	+	15
接种后 4℃ 低温暗培养 8d	++	+++	75
接种后 8℃ 低温暗培养 8d	+	++	48
接种后 25℃ 光下培养	+	++	28
接种后 25℃ 遮光培养	+	++	24
CK	+	++	25

reevesi at Qingliangfeng National Nature Reserve. Principal component analysis on these factors showed that *M. reevesi* preferred western and northern slope with more shrubs but less herbage for plentiful forage, and selected closed forest with farther water-source.

Key words: *Muntiacus reevesi*; habitat; selection; factors; analysis; Qingliangfeng

[illegible]

Study on Browning of Endangered *Manglietiastrum sinicum* in Tissue Culture

LIU Jun-li¹, MA Ming-dong^{1,2*}

(1. Sichuan Agricultural University College of Forestry and Horticulture, Ya'an 625014; China;

2. Sichuan Agricultural University (Dujiangyan campus, Dujiangyan 611830, China)

Abstract: Study on causes and control of browning of endangered *Manglietiastrum sinicum* during tissue culture with terminal bud showed that it had effective result when taking the terminal bud of lower branches of *M. sinicum* as explant, choosing 1/2MS medium with 0.1 ~ 1.5 mg/LBA and 0.1 ~ 1.0 mg/LIBA, increasing a little the hardness of medium and low temperature treatment in early stage of culture. Polyvinylpyrrolidone (PVP), dithiothreitol (DTT) and Vitamin C (VC) had evident effect for browning.

Key words: *Manglietiastrum sinicum*; tissue culture; browning

 信息

浙江省林业科学研究院舟山分院在舟山成立

2006年12月22日,浙江省林业科学研究院和舟山市林业科学研究所舟山分院在舟山举行了浙江省林业科学研究院舟山分院成立大会与授牌仪式。会议由浙江省林业厅副厅长吴鸿主持,会上浙江省林业科学研究院院长汪奎宏和舟山市林业科学研究所所长李鸿斌签定了合作协议,浙江省林业厅厅长陈铁雄和舟山市人民政府副市长虞洁夫为分院授牌并分别作了重要讲话。浙江省林业厅、舟山农林局、浙江省林业科学研究院等单位的部分领导出席了会议,浙江省林业科学研究院部分中层干部和舟山市林业科学研究所的全体职工参加了会议。

浙江省林业科学研究院舟山分院是为进一步加强自主创新能力,提高科学研究水平,实现人才、项目技术、信息、实验条件等资源共享,促进院、所共同发展而建立的,以海岛森林植被为主要研究方向,针对沿海地区立地环境存在的土壤脊薄、盐渍化、风力大及适生树种缺乏等实际问题开展研究,通过科学的模式配置、合理的布局和营造林技术集成等相关科技攻关及其成果推广,加快推进浙江省沿海地区林业的发展。

本刊讯