

汾阳核桃组织培养过程中常见问题的研究

张燕¹, 张鹏飞¹, 张国强¹, 范宏伟¹, 吴国良^{2*}

(1. 信阳农业高等专科学校, 河南信阳 464000; 2. 山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801)

摘要 针对汾阳核桃组织培养过程中容易碰到的污染和褐变问题进行了研究。结果表明, 用 80 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素和 3 g 多菌灵浸泡处理核桃外植体, 控制污染效果显著; 而用 250 mg/L 的 PVP 预处理核桃外植体和用 100 mg/L 的 PVP 作为培养基附加成分, 外植体褐变都可以得到有效控制。

关键词 汾阳核桃; 组织培养; 污染; 褐变

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)11-2365-03

Study on the Problems in the Tissue Culture of Fenyang Walnut

ZHANG Yan et al (Xinyang Agricultural College, Xinyang, Henan 464000)

Abstract The experiment studied the effect of Penicillin on controlling contamination of walnut explants. The results showed the method of Penicillin (80 $\mu\text{g/ml}$) and Derosal (3 g) to soak walnut explants was significant in preventing contamination. This experiment studied the effect of PVP (polyvinylpyrrolidone) on inhibiting browning of walnut explants. The results showed browning was effectively controlled with PVP (250 mg/L) to soak walnut explants and using PVP (100 mg/ml) as the additional ingredients of medium.

Key words Fenyang Walnut; Tissue culture; Contamination; Browning

核桃(*Juglans regia* L.)属胡桃科(Juglandaceae)胡桃属, 是世界四大干果之一, 以其很高的经济、生态及社会效益在世界各地广泛栽培^[1,2]。虽然在长期栽培和人为选择过程中, 形成了很多的核桃优良品种和类型, 但是不完善的繁殖技术一直是制约核桃优良品种推广的巨大障碍^[3]。近年来, 我国的植物组织培养技术已由实验室中试验阶段, 逐步向商品化生产过渡, 使得组培快繁所建立的商业化生产体系的开发前景非常广阔^[4]。但是核桃组织培养过程中常遇到污染和褐变的问题, 所以研究如何解决该问题对于核桃组织培养成功有着很重要的意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料 试验于 2003 年 2 月至 2004 年 3 月在山西农业大学园艺学院组织培养室进行。试验材料为 1 年生汾阳核桃实生苗。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌营养繁殖系的建立。

1.2.1.1 外植体材料的采集。 2003 年 1 月, 选择大小相对一致的汾阳核桃种子, 清洗干净后进行催芽处理, 即先用自来水浸泡 1 d 后, 在恒温培养箱内 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 d, 然后再泡水, 循环 1 周后, 检查并统计裂壳数。裂开壳的核桃先置于冰箱(10 $^{\circ}\text{C}$)中, 然后待全部裂开壳后, 用富含有机质的土壤和砂土按照 2:1 混合做基质进行播种。播种后 25~30 d, 种子先后发芽出土, 待苗高至 30 cm 左右时, 即可选择茎段作为接种材料。

1.2.1.2 清洗与消毒。 不同的外植体材料消毒程序基本一致, 只是根据材料的来源、被污染程度等对各种消毒剂的浸泡时间略作调整。清洗与消毒程序: ①用自来水冲洗材料 30 min。②用洗洁净清洗材料, 若大田材料污染较重, 可以用软毛刷轻轻刷洗茎段和叶片, 然后用自来水冲洗干净。③用滤纸吸干其表面水分。④置于 2% 硫代硫酸钠溶液中浸泡

20~30 min。⑤用蒸馏水冲洗 4~5 次。⑥将材料移至超净工作台, 在无菌条件下, 用灭过菌的纱布吸干材料表面水分, 置于灭过菌的烧杯中; 以下的消毒程序有所不同(表 1)。⑦每个处理消毒后都用无菌水冲洗 4~5 次。⑧取出后浸入无菌的 0.2% 硫代硫酸钠溶液中备用。

表 1 核桃外植体消毒方法

	消毒时间//min	
	75%酒精	0.1%升汞
大田茎段	3~5	8~10
大田叶片	1	5
实生苗茎段	0.5~1	3~5
实生苗叶片	0.083	1

1.2.1.3 接种材料与培养室环境。 取出材料, 置于灭过菌的滤纸上, 切割外植体成适宜的大小(将茎段切成 1~2 cm 长的小段; 叶片分别取叶边、叶尖、叶柄处, 切成 1 cm 见方的小片), 立即接种, 视三角瓶容量不同分别接种叶片 4~6 块, 茎段 4~6 个不等。培养室白天温度为(25 $\pm$ 3) $^{\circ}\text{C}$, 夜间温度为(18 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 光照时间 15 h/d, 光照强度 2 000 lx。如无特殊说明, 以下培养条件均按照此要求设置。

1.2.2 利用青霉素和多菌灵防止核桃污染研究。 由于核桃树体内可能存在内生菌, 仅靠单纯的材料表面灭菌估计效果不佳, 所以笔者研究了抗生素类和农药类物质对外植体污染控制的效果。首先要制取无菌水, 将蒸馏水装入玻璃瓶中, 封口, 在 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高温灭菌 30 min, 冷却后备用。然后配制青霉素梯度溶液, 并且在每一处理中加入多菌灵粉剂 3 g。

试验基本培养基为改良 DKW + BA 1 mg/L + IBA 0.001 mg/L, 分别接种实生苗茎段和叶片、大田茎段和叶片, 接种后 4~5 d 观察培养基污染情况, 若为人为污染, 则剔除此污染瓶。15 d 后统计由于材料内生菌而引起的污染情况。根据不同的材料进行不同时间的浸泡处理。每个处理 4 瓶, 每瓶接种 5 个材料, 3 次重复。

1.2.3 利用 PVP 防止核桃褐变的研究。

1.2.3.1 设置不同质量浓度的 PVP 预处理核桃外植体。 取核桃叶片经常规消毒后, 切成约 1 cm 见方的小块, 设置 6 种

基金项目 山西省自然科学基金项目(20001091); 山西省攻关项目(021036)。

作者简介 张燕(1979-), 女, 山西潞城人, 硕士, 讲师, 从事园艺植物组织培养等研究。* 通讯作者, 博士生导师。

收稿日期 2006-03-30

不同质量浓度的 PVP 溶液浸泡 5 min。PVP 的 6 种质量浓度处理为:①无菌水(CK);②50 mg/L;③100 mg/L;④150 mg/L;⑤200 mg/L;⑥250 mg/L。经预处理后,将叶片接入激素组合为 NAA 0.01 mg/L + BA 0.01 mg/L 的培养基中诱导愈伤组织。3 次重复,每次重复接种叶片 30 块,接种后 15 d 进行调查。

1.2.3.2 以不同质量浓度的 PVP 作为培养基附加成分处理核桃外植体。基本培养基如前,共有 5 种处理:①无附加成分(CK);②10 mg/L;③30 mg/L;④50 mg/L;⑤100 mg/L。处理方法同上。将得到的愈伤组织进行分级观察,统计褐变指数。

$$\text{褐变指数} = \frac{\sum(\text{褐变级数} \times \text{该级株数})}{\text{总株数} \times 4} \times 100\%$$

1.3 试验设计及统计分析 试验采用了完全随机设计,重复 3 次。试验结果采用 SAS 软件处理,部分数据采用方差分析和邓肯氏新复极差法^[5]。

2 结果与分析

2.1 青霉素和多菌灵对核桃组培污染的控制效果 大田材料经过不同浓度青霉素处理后,污染率仍高达 100%,青霉素浓度间无差异性。图 1 所示为青霉素处理实生苗茎段后污染率和分化率的调查结果,由图 1 看出,随着青霉素浓度的提高,污染率呈现明显的下降趋势,而分化率在青霉素浓度为 80 μg/ml 时最高。

试验表明,多菌灵能有效地杀灭真菌,污染中仅为细菌污染。当发生细菌污染时,细菌大量分布于培养基内,并与组培苗争夺营养,导致茎段茎叶发黄、生长缓慢、芽分化数目少,严重时叶完全脱落、苗停止生长、大量死亡^[6]。青霉素对于细菌污染的控制是有一定的效果的,但如果浓度过大,浸泡过的材料其生长活性已受到影响,导致死亡率增加。青霉素作为抗生素,其廉价的成本有利于其应用。

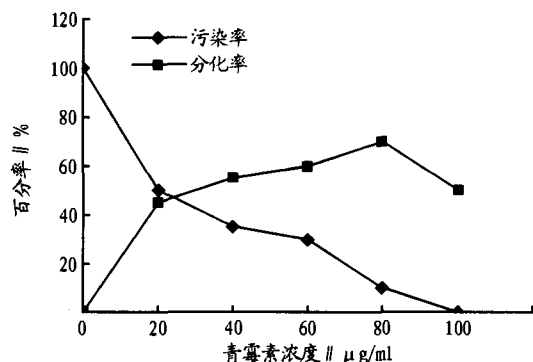


图 1 青霉素和多菌灵对核桃外植体污染和分化的影响

2.2 利用 PVP 防止核桃外植体褐变的研究

2.2.1 预处理的 PVP 质量浓度与核桃外植体褐变率的关系。由表 2 可见,处理⑥与以上 5 种处理的褐变率均达到极显著差异,即通过 PVP 250 mg/L 预处理核桃外植体,可使褐变率降为 9.63%。而处理⑤与处理①、②、③、④达极显著差异,与处理④差异不显著。由此可见,应以大于 200 mg/L 浓度的 PVP 预处理核桃外植体为宜。

2.2.2 以不同质量浓度的 PVP 作为培养基附加成分的效果。由表 3 可见,PVP 作为培养基附加成分质量浓度在 50 mg/L 以上时,防止褐变效果较为理想。处理⑤和以上 4 组差异均达极显著。说明当质量浓度增加到 100 mg/L 时,防止

褐变效果有显著提高,这与陈彪^[7]的研究有所不同。建议以后在类似研究中把 PVP 质量浓度再适当调整到大于 100 mg/L,以选择出抑制褐变最佳浓度。

表 2 PVP 预处理核桃外植体对褐变率的影响

处理浓度 mg/L	褐变率 %	差异显著性	
		0.05	0.01
①无菌水(CK)	77.24	a	A
②50	67.06	ab	AB
③100	58.46	b	BC
④150	41.08	c	CD
⑤200	29.54	c	D
⑥250	9.63	d	E

表 3 PVP 作为培养基附加成分对褐变率的影响

处理浓度 mg/L	褐变率 %	差异显著性	
		0.05	0.01
①无菌水(CK)	74.65	a	A
②10	64.95	b	A
③30	38.45	c	B
④50	33.34	c	B
⑤100	26.06	d	C

3 结论与讨论

3.1 关于培养环境问题 金晓玲^[8]发现:在黑暗条件下,子叶、胚轴、嫩枝叶片和茎段的愈伤组织诱导率均达到 90% 以上,没有发现枯死现象;强光照条件下(3 000 lx),愈伤组织的色泽有较大的变化,茎段的愈伤组织为黄色和黄绿色,子叶的愈伤组织为绿色或深绿色,且愈伤组织褐变情况严重。而在该试验中却发现黑暗条件下,在最初叶片诱导形成愈伤组织时,叶色失绿严重;在黑暗条件处理 5 d 后,发现叶片全部枯死,愈伤组织诱导率为 0,这可能与叶片中贮藏的物质仅够其在黑暗中呼吸消耗以抵抗切割后所引起的强烈的生理生化代谢,不能维持其要再脱分化和再分化所需要的能量有关,并且在黑暗条件下对愈伤组织诱导增殖,也发现类似现象,其表面分泌出一层油性物质,愈伤组织褐变现象十分严重。

KOZAI^[9]等认为,常规培养容器内的空气环境与温室和大田的环境相比有很大的差异,主要有以下特点:相对湿度高(96% 以上);照光期和暗期的温度相同;照光期 CO₂ 质量浓度低,暗期 CO₂ 质量浓度高;气体流动差;乙烯含量高;光照强度低(约为室外的 10%、温室内的 20%)。从培养基环境来看:含有高质量浓度的糖及其他无机盐;通气性差;有毒物质浓度高;大多含有生长调节物质而无微生物的存在等。

最近几年的植物组织培养研究中却很少有相关组培环境改善的报道,以后的研究中应该注意到组培的瓶外环境因子和瓶内的小环境因子对组织培养的影响。

3.2 关于污染问题 核桃为多年生木本植物,初代培养污染率高,它是制约核桃组织培养快速发展的重大障碍之一。笔者利用青霉素和多菌灵来控制污染,达到了较好的效果。多菌灵能有效地杀灭真菌,青霉素在初代培养时只能起抑制细菌作用^[6]。在植物组织培养中要注意根据 3 条原则来使用抗生素,首先必须弄清楚要杀死的是真菌、细菌还是病毒,是哪类真菌、细菌、病毒;其次应知道使用的抗生素是否对培养的植物组织有不良影响;最后要确定抗生素使用浓

度、使用时期和处理时间的长短。抗生素不能完全代替灭菌技术,没有一种抗生素能对所有引起污染的微生物都有效^[10]。崔德才^[10]提出将青霉素作为培养基附加成分,但在该试验中发现,经高温灭菌后青霉素失活并有异味产生,培养基也往往变成褐色,所以青霉素不适宜作为培养基附加成分,它作为预处理材料的溶液是比较适合的。

作为控制污染的常用消毒剂升汞也有很多缺点。如使用升汞消毒时间过长,会把植物组织杀死或杀伤,虽污染率很低,但成活率也随之下降;而消毒时间过短,虽成活率提高,但污染率会上升。并且升汞为重金属物质对环境污染严重,其残留在土壤中进入地下水,从而影响人们身体健康。从长期看,其不适宜作为组织培养中的消毒剂。建议使用安替福民即次氯酸钠来进行消毒,具体浓度及处理时间有待进一步研究。

另外,陶建敏等^[11]研究葡萄无菌体系的建立与不同条件的田间取材、不同品种、不同消毒方法、消毒时间等因子有关,得出不同基因型的材料污染率各不相同,并得出葡萄不同品种的最佳消毒方法。在核桃上目前尚缺少这类系统研究,以后的研究中应予以加强。

3.3 关于防止褐变问题 防止褐变的措施很多,如增加转接次数来减少酚类物质的毒害作用^[12]。李焕秀等在不同梨品种多酚氧化酶活性和总酚含量低的时期取材,可以减少褐变的发生^[13]。理论上如果将褐变反应中的底物酚类物质保护起来或将它吸附掉,即使再有高的酶活性也不会发生褐变。宋平和沈丙辉研究了活性炭抑制褐变的作用。而 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)在生化分离制备中常用作酚类物质和细胞器的保护剂,于是人们研究了 PVP 防止褐变的效果。试验结果证明,利用 PVP 提前预处理核桃外植体或者作为培养基附加成分接种核桃外植体都能起到较好的控制褐变效果。但由于酚类物质种类很多,且 PVP 也有不同的分子量,因此防止褐变的效果对 PVP 说法不一,需进一步加

强研究^[12]。还有加入抗氧化剂和蛋白质、氨基酸、多胺、亚硫酸氢钠等其他 PPO 活性抑制剂来防止褐变的发生,以及改善组培苗生长的培养基、培养瓶、培养室环境等以达到防止褐变发生的目的^[14-20]。

参考文献

- [1] 郝荣庭,张毅萍.中国核桃[M].北京:中国林业出版社,1992.
- [2] 郝荣庭,张毅萍.中国果树志(核桃卷)[M].北京:中国林业出版社,1996.
- [3] 高清华.我国核桃繁殖技术的研究进展[J].果树科学,2000,17(3):220-224.
- [4] 崔辉梅,向珣.加速我国植物组织培养产业发展的对策[J].林业科技,2002,27(3):1-3.
- [5] 盖钧镒.试验统计方法[M].北京:中国农业出版社,2000:290.
- [6] 李颖,李春燕.多菌灵和青霉素在组培污染中的应用[J].林业科技,2002,27(1):6-8.
- [7] 陈彪,陈伟栋.利用 PVP 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.
- [8] 金晓玲,何平.大叶桉愈伤组织诱导与继代培养的影响因素[J].中南林学院学报,2003,23(1):32-36.
- [9] KURATA K, KOZAI T. Transplant production systems[M]. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic Publishers,1992:247-282.
- [10] 崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京:化学工业出版社,2003:48.
- [11] 陶建敏,章镇,林惠莲,等.葡萄无菌体系建立试验初探[J].中外葡萄与葡萄酒,2003(2):16-18.
- [12] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [13] 李焕秀,王乔春,李春秀.梨芽和茎尖 PPO 活性和总酚含量的初步研究[J].四川农业大学学报,1994,2(2):218-222.
- [14] 罗丽华,陈建华,苏冬梅,等.板栗组培过程中褐变研究初探[J].经济林研究,2003,21(4):30-31.
- [15] 丰锋.龙眼组织培养褐变抑制研究[J].中国南方果树,2004,33(6):49-51.
- [16] 李桂荣,孙丽,孙俊逢.油桃组织培养过程中防止褐变的研究[J].安徽农业科学,2005,33(5):827-828.
- [17] 于守超,赵兰勇,王芬,等.植物组织培养过程中外植体褐变机理研究进展[J].山东林业科技,2004(5):61-63.
- [18] 吴晓霞,陈刚,张彪,等.植物组织培养中褐变的研究进展[J].河北林果研究,2002,17(3):284-288.
- [19] 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,2004,32(5):1034-1036.
- [20] 吴晓霞.植物组织培养中褐变的研究进展[J].河北林果研究,2002,17(3):284-288.

(上接第 2361 页)

种,并制定与之相配套的栽培技术措施,实现品种的高产优质高效。黄河流域棉区,改变麦棉套种模式,适当缩小小麦播种幅度,增大棉花播种行宽度,改善棉行光、温条件,促苗早发。小麦收获后及时灭茬松土,合理施肥,促使早现蕾,早结桃,提高成熟度和纤维品质。强化棉铃虫和棉叶螨的防治工作,及时收获籽棉,避免干枯叶片、风沙污染,保持优良的原棉品质。西北内陆棉区推广以“矮、密、早”为特征的栽培技术体系。合理运筹肥、水和化学调控,协调营养生长和生殖生长的矛盾,促进纤维充分发育。棉花生育后期严格控制棉蚜的危害,降低棉纤维含糖量,及时采摘籽棉,提高棉花纤维综合品质。

2.3 提高收购加工质量,完善棉花纤维品质评价体系 大力宣传异性纤维的危害,并通过一定措施在棉花收购、晾晒、储藏、运输等过程中减少异性纤维污染。按级别分收分藏,杜绝小型轧花机械,提高棉花加工质量。植棉业和商业部门的从业人员要提高思想认识,充分认识目前我国原棉和棉纺织品、服装在国际市场上所面临的严峻考验,重振我

国世界纺织王国的地位。农业行政管理部门必须顺应市场需求的发展,尽早出台纤维长度系列化的新的品种审定标准。在制定标准时,不仅要纤维长度、强度、细度和成熟度等内在品质做出明确的文字规定,而且要将色泽特征、水分、杂质含量和轧工质量等外观品质纳入检验的范围。商业部门在进行原棉品质检测时,可重点考虑纤维长度、比强度、麦克隆值、含水量、杂质及异性纤维含量,将棉花品质评价标准由外观品质转向内在品质与外观品质并举,实行优质优价,提高我国原棉在国际市场的竞争力。

参考文献

- [1] 项时康,余楠,胡育昌,等.论我国棉花质量现状[J].棉花学报,1999,11(1):1-10.
- [2] 肖松华,狄佳春,刘剑光,等.我国棉花品种纤维品质的现状及发展对策[J].江西棉花,2002,24(6):7-13.
- [3] 马山荣,韦聪敏.新疆棉花品质调查及提高途径[J].新疆农业科技,2004(5):11-13.
- [4] 房卫平,王家典,孙玉堂,等.河南省棉花优质生产存在的问题与对策[J].河南农业科学,2000(7):5-7.
- [5] 高艳平,张晓艳,顾恒琴,等.辽宁省棉花纤维品质现状及发展优质棉生产措施[J].中国棉花,2004,31(11):7-8.
- [6] 谢德意.我国棉花品质的现状与对策[J].河南农业科学,2000(6):15-17.