

油茶组织培养过程中防止褐变的研究

阙生全^{1,2}, 彭 凌², 朱必凤², 钟德华²

(1. 南昌大学 生命科学学院, 江西 南昌 330047; 2. 韶关学院 英东生物工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要:以油茶为试验材料, 对其组织培养过程中褐化的发生及防止措施作了探讨, 结果表明: 褐化发生程度与培养温度、培养基中激素浓度和无机盐含量等因素有关; 较高的培养温度、培养基中较高浓度的无机盐、较高浓度的激素及木质化程度高的外植体都会促进褐化的发生; 培养基中加入吸附剂能有效地抑制褐化的发生。

关键词:油茶; 组织培养; 吸附剂; 褐化

中图分类号: S573

文献标识码: A

文章编号: 1007-5348(2006)03-0067-03

油茶(*Camellia oleifera*)是我国重要的木本油料树种, 油茶组织中酚类物质含量较高。酚类的糖苷化合物是木质素、单宁和色素的合成前体^[1]。因此, 当酚类化合物含量高时, 木质素、单宁或色素形成就多, 易导致褐变的发生^[2-4], 有些细胞会因褐变而死亡。我们进行油茶带腋芽茎段培养后发现: 在茎段腋芽的愈伤组织诱导过程中, 褐化平均直径达 0.63 cm, 有的甚至达 2.10 cm, 因严重的褐化现象抑制了诱导愈伤组织产生, 甚至出现死亡。为抑制褐变发生, 进行了多次重复比较试验, 该试验在培养基为 MS+2-4D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 中加入不同浓度的活性炭和抗氧化剂(维生素 C、柠檬酸、硫代硫酸钠和 PVP), 培养温度为(25±2)℃, 每天光照 14 h, 光照强度为 2 500~3 000 lx^[5]。另外, 还观察了不同培养基和植物激素的不同浓度对油茶组培褐化的影响。培养 15 d 后对外植体的褐化情况进行统计分析, 研究它们在不同处理上的防褐化效应, 并筛选出了较好的抑制方法, 为顺利进行油茶组培提供了保证。

1 实验材料与方法

1.1 材料

采自广东韶关大塘镇油茶林, 选取树势健壮, 新梢长短一致, 粗而嫩, 生长势强, 无病虫害, 多分布在树冠的中部外围茎尖为实验材料, 采后立即送回实验室进行处理。

1.2 外植体消毒

将外植体首先浸在洗衣粉液中, 用试管刷轻轻刷洗外植体表面后用流水冲洗 4~5 次, 然后用浓度 70% 的酒精浸泡 30 s, 再用浓度 0.1% 的升汞浸泡 7 min, 最后用无菌水漂洗 4~5 次, 接种于培养基上。

1.3 培养基及应用方法

实验采用 2 种基本培养基(1/2MS、MS)与添加 2-4D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+1 g/L 活性炭的组合培养基进行对比。在培养基上添加 7.0 g/L 琼脂粉, 30 g/L 蔗糖, pH 5.8。在培养基为 MS+2-4D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 中加入不同浓度的活性炭和抗氧化剂(维生素 C、柠檬酸、硫代硫酸钠和 PVP)(见表 1), 在 121℃、0.15 MPa 条件下高压灭菌 20 min。

在 MS+2-4D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 培养基中添加不同浓度植物生长调节剂(2,4-D、NAA、KT), 比较其对生长及褐变的影响。

收稿日期: 2005-11-02

作者简介: 阙生全(1975-), 男, 江西吉安人, 南昌大学生命科学学院在读硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。

2 结果与分析

2.1 减轻油茶褐变的培养基筛选

试验表明,在 1/2MS + 1 g 活性炭培养基中,茎尖褐化率较低,但生长不明显或无生长;在 MS + 2 - D 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L 组合培养基中,褐化率偏高,但外植体有生长.降低无机盐浓度,能减轻褐化现象,降低褐化率.改变培养环境进行试验,将接种好的外植体置于 10℃ 恒温箱中 3 d 后取出,再置于 (25 ± 2)℃ 室内光照强度为 2 500 ~ 3 000 lx 条件下培养,褐化率在原基础上有一定降低.

2.2 添加不同浓度的抗氧化剂、吸附剂对防止油茶茎尖褐变的影响

以 MS + 2 - 4D 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L 组合培养基中添加不同浓度的抗氧化剂、吸附剂的试验结果见表 1.

表 1 培养基中添加不同浓度的抗氧化剂和吸附剂对防止油茶茎尖褐变的影响*

添加剂种类	浓度/mg·L ⁻¹	接种数	茎褐变数	茎褐变率/%	愈伤组织生长状况
活性炭	500	50	13	26	一般
	1 000	50	8	16	
	2 000	50	4	8	
PVP	1 000	50	12	24	较好
	1 500	50	8	16	
	2 000	50	3	6	
维生素 C	50	50	27	54	好
	100	50	19	38	
	300	50	9	18	
柠檬酸	1 000	50	45	90	慢
	2 000	50	36	72	
	3 000	50	31	82	
硫代硫酸钠	500	50	42	84	慢
	1 000	50	36	72	
	1 500	50	29	58	
对照组	0	50	48	96	无

* 接种后 15 d 观察到的结果

由表 1 可以看出,不同种类和不同浓度的抗氧化剂、吸附剂对油茶茎尖褐变有不同的影响.在各种配比的培养基中,以添加吸附剂(活性炭和 PVP)的培养基效果最好,褐变得到一定控制;添加抗氧化剂的培养基褐化较严重,其中添加硫代硫酸钠培养的外植体褐化最严重.在添加 Vc 的培养基上,愈伤组织生长好,颜色为黄绿色;在添加吸附剂的培养基上,愈伤组织长势一般.

2.3 生长调节剂对茎段愈伤组织诱导及褐变的影响

在 MS 培养基中添加不同种类和浓度的生长调节剂,对茎尖愈伤组织诱导和褐化影响不同,结果见表 2.

表 2 MS 培养基中添加不同种类和浓度的生长调节剂对茎尖愈伤组织诱导率和褐化的影响

添加的生长调节剂种类和浓度/mg·L ⁻¹	茎尖褐化率/%	茎段愈伤组织诱导率/%
2 - 4D 1.0 + NAA 0.5	36	48
2 - 4D 2.0 + KT 1.0	44	63
2 - 4D 3.0 + NAA 0.5	56	28
2 - 4D 2.0 + NAA 1.0	36	45

表 2 显示,随 2 - 4D 浓度的升高,褐化率随之增高,愈伤组织诱导率下降,褐化反应时间也提早,先是出

现淡褐红,以后颜色逐渐加深,最终外植体停止生长或死亡;植株愈伤组织诱导缓慢,其颜色由淡黄逐渐变成灰白.添加2-4 D 2.0 + KT 1.0 的组合中,愈伤组织诱导率最高为63%.在添加NAA的组合中,褐化率相同,反应时间稍推迟,但愈伤组织诱导缓慢,呈淡黄绿色.

实验表明:MS + 2-4 D 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + 100 mg/L Vc 的培养基,在培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,每天光照14 h,光照强度为2 500 ~ 3 000 lx 条件下培养,带腋芽的外植体愈伤组织诱导率高,并可有效控制褐变.

3 讨论

褐化现象在组织培养中普遍存在,其与外植体的基因型、外植体年龄、大小、部位、种类、培养基和培养条件等因素关系密切^[7].选择合适的培养基是防止褐化的有效手段之一.有研究表明,选择合适的培养基、蔗糖浓度、激素水平等条件均可减轻材料的褐变^[6-9].从本文实验结果来看,以油茶茎段作为外植体诱导愈伤组织时,随着基本培养基中无机盐离子浓度的降低,褐化现象减轻.此外,在培养基中加入吸附剂也是防止外植体褐变的有效方法.在组织培养中,活性炭、PVP 能吸附培养基中的有害物质,并在植物组织培养的许多方面都有积极的作用.但是,活性炭的吸附作用是没有选择性的,在吸附褐变物质的同时,也会吸附培养基中的生长调节物质,而使其失去作用,因而对外植体的诱导愈伤组织会产生一定的负面影响^[10].本实验通过研究对吸附剂活性炭、PVP 和3种抗氧化剂(Vc、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和柠檬酸)对褐化的影响发现,吸附剂的抗褐化效果最好,随着其浓度的升高,抗褐化效果提高,Vc 效果次之, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和柠檬酸效果最差.另外,在培养基中添加不同浓度的2-4D、KT 和 NAA 对褐化有不同的影响;接种后进行暗处理,可在一定程度上减轻褐化反应.

参考文献:

- [1] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1997:86-87.
- [2] 张卫芳,高疆生,欧勇慧,等. 抑制核桃组培中的褐化现象初探[J]. 落叶果树,2003,(3):4-7.
- [3] 高国训. 植物组织培养中褐变问题[J]. 植物生理学报,1999,25(6):501-506.
- [4] 李风华,汤绍虎,孙一铭,等. 降低何首乌愈伤组织褐化研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2005,30(2):337-340.
- [5] 毕方铤,谭晓风,张智俊,等. 油茶离体培养诱导再生植株的研究[J]. 经济林研究,2004,22(2):5-9.
- [6] 邱璐,陈善娜,夏跃明,等. 桑树组织培养中褐化问题的研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,2000,22(1):76-78.
- [7] 陈菲,李黎,官伟. 植物组织培养的防褐化探讨[J]. 北方园艺,2005,2:69-71.
- [8] 刘兰英. 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.
- [9] 章铁,汪莹. 大别山核桃组培中防褐变措施的研究[J]. 经济林研究,2005,23(1):21-23.
- [10] 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.

Control Browning of the Tissue Culture of *Camellia oleifera*

QUE Sheng-quan^{1,2}, ZHU Bi-feng², PENG Ling², ZHONG De-hua²

(1. Life Sciences College Nanchang University, Nanchang 330047, Jiangxi, China;

2. Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, Guangdong, China)

Abstract: Experiments were carried out to discuss the affecting factors and solve the problem of browning of *Camellia oleifera* during the tissue culture. The results showed that the browning rate of *Camellia oleifera* in invitro culture could be increased with using the higher cultureing temperature, using the stem segment lignified as explant and supplementing with higher concentration of salt and hormone in medium. Some additions like sorbent could be effectively prevent *Camellia oleifera* explants from browning.

Key words: *Camellia oleifera*; tissue culture; sorbent; browning

(责任编辑:颜志森)