

降低苹果梨组培过程中外植体褐化的研究

陈 蕾, 曹后男, 宗成文, 朴日子, 周 兰

(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

摘 要:为克服苹果梨组织培养过程中外植体的褐变现象,提高试验材料的成活率,试验以苹果梨 1 a 生营养枝嫩梢为试材,通过不同培养基配方、不同药剂处理及水培处理,探讨降低苹果梨外植体褐变的影响因素。结果表明:1/3 MS 培养基中的外植体成活率较高;液体培养基较固体培养基对降低外植体的褐变的效果好;水培处理可有效降低外植体的褐变率;生长季节取材,随外植体木质化程度的加深,随水培期的延长,外植体的褐变率呈现先降低后上升的趋势,水培 4 d 处理的外植体成活率最高;最佳取材时期为盛花后期,将材料水培 6 d,在 1/3 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+Vc 75 mg/L 中获得 83.3% 的外植体成活率。

关键词:苹果梨;外植体;褐变;水培处理

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)10-0139-04

在植物组织培养过程中,外植体的褐变是导致培养失败的主要原因^[1]。因为诱发褐变的原因比较复杂,目前还没有一种既定有效的方法来避免褐变现象的产生,故褐变问题是植物组织培养过程中经常遇到的问题,已在许多植物的组织培养中发现此类现象,尤其在木本植物的组织培养中更为常见^[2]。关于用抗氧化剂解决褐变的报道有很多,何琼英等在抗坏血酸(Vc)对香蕉吸芽外植体预处理阻止褐变的研究中发现,Vc 处理外植体能减轻外植体褐变,提高芽丛诱导率^[3]。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是酚类物质的专一性吸附剂,在生化置备中常用做酚类物质和细胞器的保护剂,可用于防止褐变^[4]。但也有报道吸附剂有时有副作用,如活性炭(AC)和 PVP 可以使腰果的组织培养物坏死^[5]。

苹果梨(*Pyrus Pyrifolia* C V. Pingguoli)个大、耐寒、丰产、质优,极耐贮藏。是吉林省特产,已有 70 多年的栽培历史。栽培面积很大,在辽、冀、蒙、甘、宁、青、新等北方十几个省区市均有栽培。在北方梨产区的许多地方已成为主栽品种。在延边地区,仅 1996 年栽培面积就达 19 000 hm²,年产量约 6 万 t。但梨园多为 40 年以上的老园,亟待更新。实现无病毒化栽培是当前国内外急待并一直努力解决的问题。脱毒和病毒检测技术是实现无病毒栽培的关键。梨树组织培养技术又为梨树脱毒提供了手段^[6]。

试验初步探讨培养基配方、褐变抑制剂和预处理等因素对降低苹果梨外植体褐变和提高成活率的影响,以降低梨树外植体褐变率提供可参考的解决途径,以确保梨组织培养过程中无菌培养苗的建立,为进一步研究提供充足的试验材料。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

试验材料均采自延边大学农学院实验果园,在所选 10 株 30 a 树龄的试验树四周随机采取 1 a 生营养枝嫩梢。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的消毒及培养条件 将取自果园的试验材料剪去叶片,取 3 cm 长度的带腋芽嫩梢。先用少许洗涤剂清洗,再用自来水流水冲洗 30 min。在无菌条件下用 75%酒精表面消毒 30 s,再用 0.1%升汞溶液消毒 3 min,之后用无菌水冲洗 3~5 次后,将与消毒液接触的两端剪去,取约 2 cm 长的嫩梢,接入相应的附加 20 g/L 蔗糖,5.8 g/L 琼脂的培养基中。培养温度(25±2)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 14 h/d。

1.2.2 不同培养基配方对苹果梨外植体组培苗成活率的影响 将消毒材料接种于表 2 所示的 1、2、3 号培养基中,15 d 后调查其褐变数及成活率。

1.2.3 不同培养基状态对苹果梨外植体组培苗褐变及成活率的影响 在培养基 1/3 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 中添加一定量的抗坏血酸(Vc)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。药剂处理见表 3,其中 4、5 号培养基为液体培养基(无特殊说明,均为固体培养基)。在 4、5 号培养基中培养的外植体每 2 d 更换 1 次培养液,置于恒温震荡培养箱中培养,160 r/min,培养温度及光照条

第一作者简介:陈蕾(1982-),女,在读硕士,研究方向为园艺植物育种与生物技术。E-mail:chenleisofia@yahoo.com。

通讯作者:曹后男。E-mail:hncao@ybu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30560091)。

收稿日期:2008-04-23

件如上,第7天时将外植体转入相应的固体培养基中。15 d后调查外植体的褐变数及成活率。

1.2.4 水培处理对苹果梨组培苗成活率的影响 试验材料取自2005年5月21日(盛花后期)和6月21日(盛花期后1个月)。将苹果梨1a生营养枝插在自来水中于室内培养,分别处理1~6 d,经消毒处理后接种于1/3 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L培养基中。对照处理为从试验果园采摘的材料经消毒处理后直接接种于如上培养基中,调查方法同上。

1.2.5 不同年限取材对苹果梨组培苗成活率的影响 试验材料分别采自2004年5月14日,2005年5月21日和2006年5月26日,各年限的取材时间均为苹果梨的盛花后期,因物候期不同取材时间略有差异。材料消毒后接种于1/3 MS+ 6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L培养基中。调查方法同上。

1.2.6 药剂处理结合水培处理对苹果梨组培苗成活率的影响 试验材料采自2005年5月21日,经水培处理0(CK)、3、6 d,消毒后接种到表1所示配方的培养基中。调查方法同上。

表1 培养基配方 mg·L⁻¹

培养基编号	基本培养基	6-BA	IBA	PVP	Vc
1	1/3 MS	1.0	0.2		
6	1/3 MS	1.0	0.2	100	
7	1/3 MS	1.0	0.2		75
8	1/3 MS	1.0	0.2	100	75

1.2.7 统计方法 试验每处理重复3次,结果用SPSS 11.5统计软件进行方差分析。不同小写字母代表显著水平 P=0.05。

2 结果与分析

2.1 不同培养基配方对苹果梨外植体组培苗褐变影响

由表2可知,3种不同组合的培养基配方中1号培养基接种的外植体成活率为29.67%,显著高于2、3号两个处理,且组培苗生长正常。说明以1/3 MS为基本培养基的浓度防止褐变的效果好于1/2 MS和MS培养基。说明低浓度的无机盐可以促进外植体的生长与分化,减轻外植体褐变程度。

表2 不同培养基配方对苹果梨外植体组培苗褐变及成活率的影响

培养基编号	培养基配方	接种数 /个	褐变数 /个	成活率 /%
1	1/3 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L	91	64	29.67a
2	1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L	48	42	12.50b
3	MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L	33	30	9.09b

注:材料为2004年5月14日采自延边大学农学院实验果园的苹果梨1a生枝条。

2.2 不同培养基状态对苹果梨外植体组培苗褐变及成活率的影响

在培养基中添加抗氧化剂和吸附剂可抑制组织培

养中外植体的褐变。培养基的状态对外植体的褐变也有影响。如表3所示,液体培养基抑制褐变效果均好于固体培养基,其中加Vc 75 mg/L的5号液体培养基成活率达20%,与8号培养基有显著差异,由于液体培养时外植体溢出的有害物质可以很快扩散,及时的更换培养液则可减少有毒物质对外植体的伤害。试验筛选出的较适合的抑制外植体褐变的培养基配方为5号培养基;而加PVP 100 mg/L的4号液体培养基与7号固体培养基差异不显著。4、5两个处理中外植体的成活率差异显著,即在试验所采用的药剂范围内,Vc防止苹果梨外植体褐变的效果优于PVP。由于液体培养需要及时更换培养基,耗费人力和物力,故采用7号作为后续试验的培养基。图1、2分别为苹果梨茎段在5、7号培养基中的褐变情况。

表3 不同药剂处理对苹果梨外植体组培苗褐变及成活率的影响

培养基编号	药剂处理/mg·L ⁻¹	接种数 /个	褐变率 /%	成活率 /%
4		38	86.84	13.16 b
5	75	40	80.00	20.00 a
6		30	90.00	10.00 b
7	75	31	90.32	9.68 b

注:材料为2004年7月19日采自延边大学农学院实验果园的苹果梨1a生枝条。

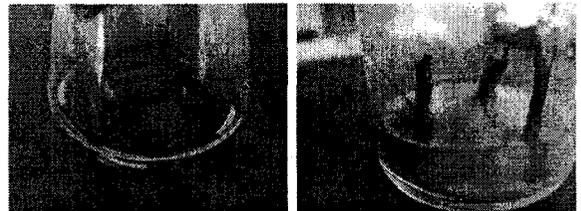


图1

图2

图1 5号培养基中外植体的褐变情况

图2 7号培养基中外植体的褐变情况

2.3 水培处理对苹果梨外植体成活率的影响

由图3可知,5、6月份取材外植体的成活率,随水培时间的增加呈现的趋势不同。5月份取材的外植体成活率随水培时间的增加呈上升趋势,水培6 d处理的外植体成活率高达93.33%,水培0~3 d各处理之间成活率差异显著,水培4~6 d外植体的成活率差异不显著;6月份取材的外植体对照处理的成活率为0,水培1 d后成活率呈上升趋势。水培4 d成活率达到最高值83.33%,水培5 d后由于材料自身营养消耗过多,导致组培苗生长势减弱,成活率下降。图4、5分别为5月份取材对照(0 d)处理和水培4 d的组培苗生长情况。

一般在春夏季,尤其是春季采取生长旺盛的外植体产生褐变较轻,已木栓化或木质化的枝条和处于休眠状

态的芽作为外植体的褐变严重^[8]。由于6月份苹果梨的1a生枝条逐渐木质化,故其褐变程度较5月份严重。所以适宜的取材时间为外植体新梢刚刚抽出的盛花后期,结合适当的水培处理可获得较高的成活率。

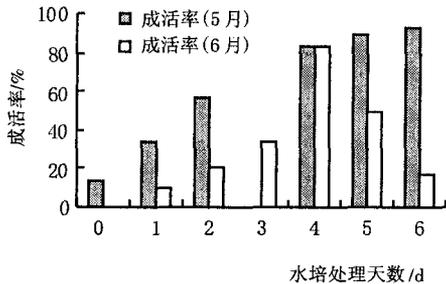


图3 不同时间水培处理对苹果梨外植体组培苗成活率的影响



图4

图4 对照试验中外植体的褐变情况



图5

图5 水培4d苹果梨外植体的生长情况

2.4 不同年限取材对苹果梨组培苗成活率的影响
各年限的取材时期均为苹果梨的盛花期,因物候期

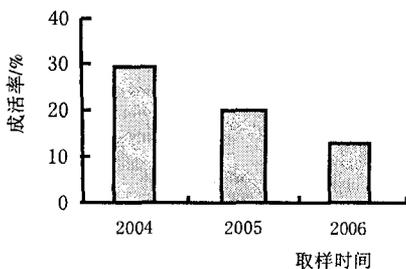


图6 不同年限取材对苹果梨外植体成活率的影响

就外因而言,培养基的成分、外加激素的含量及比例、培养条件(温度、光照时间、光照强度、通气状况等)等也会影响褐变的发生,褐变的发生往往是多种因素同时作用的结果^[5]。一般说来,酸性环境不利于褐变的发生^[11]。培养基的状态、类型与培养基的组成如无机盐和蔗糖浓度、激素水平与组合等要适宜^[12]。培养基的成分

的不同,时间略有不同。由图6可知,不同年限取材对苹果梨组培苗成活率的影响不同,不同年份之间苹果梨组培苗的成活率有显著差异。此结果可能是由于取材的具体时间或周年之间树体营养状况不同所致。该试验中2004年5月14日取材的苹果梨组培苗成活率最高达29.67%。

2.5 药剂及水培处理对苹果梨组培苗成活率的影响

材料取自2005年5月21日,如图7所示,从对照处理可以看出,在培养基中加入75 mg/L Vc可抑制组培苗的褐变现象,成活率达到30%,与1、6和8号培养基中的成活率有显著的差异。随水培时间的延长,苹果梨组培苗的成活率呈上升的趋势。当水培3d时,7号培养基中外植体的成活率达70%,与1、6、8处理差异显著。当水培6d时各处理的外植体成活率均高达90%以上。以上试验结果可知,在该试验所选的药剂种类和用量范围内,在培养基中附加一定量的抗坏血酸可显著抑制外植体褐变的发生而PVP抑制褐变的效果次之,但外植体成活率均与对照试验有显著的差异。

3 讨论

引起褐变的因素是复杂的,就内因而讲外植体的生理状态、基因型、同一基因型的不同栽培条件、营养状况、生长部位和大小都会影响褐变的发生^[9],同时Bonga^[10]认为外植体越小,切面与体积的比率越大,伤害及褐变的程度就越大。外植体过大不宜于消毒处理,过小又褐变现象严重。梨、苹果等蔷薇科植物多酚类物质含量高,多酚氧化酶的活性强,外植体褐变严重。尤其在生长季节更是如此。研究结果发现,不同年限取材的外植体褐变率差异很大,这与树体周年营养状况有关。

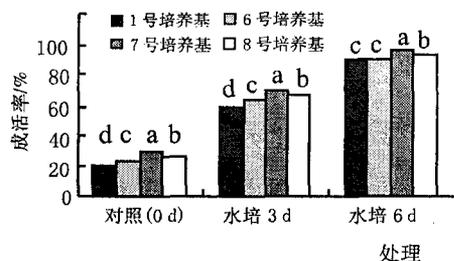


图7 药剂及水培处理对苹果梨外植体成活率的影响

可影响褐变的程度,当无机盐浓度较低时可适当降低外植体的褐变程度,试验得到的结论为1/3 MS培养基抑制褐变的效果好于1/2 MS和MS培养基。培养基中某些激素的含量明显影响褐变的发生,刘兰英^[13]在“薄壳香”核桃的组织培养中发现,MS培养基中6-BA和KT的含量为3.0~6.0 mg/L时,褐变程度加深。当6-BA

为 1.0 mg/L 时,褐变率为 35.4%,6-BA 为 3.0 mg/L 和 6.0 mg/L 时,褐变率分别是 54.4%和 72.3%;而当培养基中 KT 的含量为 3.0 mg/L 和 6.0 mg/L 时,褐变率分别是 60.3%和 70.6%,与前者差异显著,而且均高于对照,说明较高浓度的 6-BA 和 KT 可促进褐变的发生。

该试验将培养基状态对外植体成活率的影响进行了对比。结果表明,液体培养基抑制外植体褐变的效果好于固体培养基。这是由于组培初期,外植体渗出的毒液可随液体培养基的震荡而迅速扩散,随着培养液的更换,毒液逐渐减少,对自身的伤害也小,故可降低外植体的褐变率。而固体培养基中培养的外植体渗出的毒液导致培养基呈棕褐色,不利于毒害物质扩散,从而导致植株慢慢变色导致溃烂死亡。

在培养基中加入抗氧化剂可以明显减少褐变发生。何琼英^[3]认为,抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体时,Vc 在 PPO 的作用下,能将醌还原成酚,可以减少褐变的发生。试验得到的结论为在培养基中添加 75 mg/L 的 Vc 可减少褐变的发生,但褐变率仍然高达 60%。可能是采用的 Vc 用量过小,没有起到较好的防褐效果。Vc 在苹果梨组织培养中防止褐变现象发生的用量及使用应作进一步的研究。

将外植体进行预处理可降低褐变程度。该试验采用的室内水培处理,降低了外植体内氧化酶的活性,从而降低了褐变的发生。不同的取材时间,外植体褐变程度不同,外植体木质化程度高,褐变率高。水培及药剂处理的外植体褐变率与未经水培和药剂处理的对照试验相比显著减少。生长季节取材,随水培时间的延长,

外植体的褐变率呈下降的趋势,当水培处理 4 d 时,由于外植体自身营养的消耗,外植体的褐变率呈上升的趋势。故要根据外植体的生理状态采取适宜的水培天数,才能达到较好的防治褐变的效果。

参考文献

- [1] 崔堂兵,郭勇,张长远. 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J]. 广东农业科学,2001(3):16.
- [2] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1986:456-466.
- [3] 何琼英,张东方,王润华. 抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体褐变的研究初报[J]. 华南农业大学学报,1995,16(3):79-82.
- [4] 姚洪军. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [5] Mulin M. Callus formation form thin cell layers of Anacardium occidentale L[J]. Silvalusitana,1995,3(2):205-211.
- [6] 李俊芳,侯义龙. 果树组织培养脱毒技术和病毒检测技术研究进展[J]. 大连大学学报,2006,2(2):10-15.
- [7] 张妙霞,孔祥生. 柿树组织培养防止外植体褐变的研究[J]. 河南农业大学学报,1999,33(1):87-91.
- [8] 谢丽霞,杜建伟. 植物组织培养中的褐变现象及解决途径[J]. 垦殖与稻作,2006(1):61-63.
- [9] 于守超,赵兰勇. 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.
- [10] Bonga J M, Duran D J. Tissue culture in forestry [M]. 1982. 15.
- [11] 王东霞,李长杰. 如何对抗植物组培的组织褐变[J]. 中国花卉盆景,2002(12):29.
- [12] 吴晓霞,陈刚. 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.
- [13] 刘兰英. 薄壳香核桃组织培养中的褐变及防止措施研究[J]. 园艺学报,2002,29(2):171-172.

Decreasing the Browning of Explants in the Process of Pingguoli Tissue Culture

CHEN Lei, CAO Hou-nan, ZONG Cheng-wen, PIAO Ri-zi, ZHOU Lan
(Agriculture Collage of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China)

Abstract: To overcome the explants browning in tissue culture process of Pingguoli and improve the survival rate of test materials, this test adopted one year-old tender vegetative shoots of Pingguoli, set up several treatments of different media, different chemicals and water culture to explore the factors which reduce browning in plant of Pingguoli. The results showed that explants which in 1/3 MS medium had higher survival rate. Liquid medium had better effect than solid medium for decreasing browning rate of explants. Water culture treatment could effectively reduce the explants browning rate. When the materials adopted in the growing season, as the explants lignification deepening and period of water culture extending, a tendency could be found that the browning rate of explants rose at the beginning and dropped in the following. The explants had the highest survival rate with water culture for 4 days. Optimum material adopted period was anaphase of florescence, we could get 83.3% survival rate on media 1/3 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+Vc 75 mg/L in which materials water culture for the 6 days.

Key words: Pingguoli (*Pyrus Pyrifolia* C V. Pingguoli); Explant; Browning; Treatment with water