

李树丽. 培养基中不同因素对中华红叶杨外植体褐变的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 44-46.

# 培养基中不同因素对中华红叶杨外植体褐变的影响

李树丽

(滨州职业学院, 山东滨州 256603)

**摘要:**中华红叶杨外植体在固体培养过程中褐变严重, 因此针对培养基的 pH 值、无机盐浓度、培养基硬度、蔗糖浓度及活性炭添加量进行试验。结果表明: 在一定 pH 值范围(5.0~6.5)内, pH 值越低, 褐化率越低; 无机盐浓度低, 褐化率低; 在琼脂浓度为 5.0~6.5 g/L 时, 琼脂浓度越高, 培养基越硬, 褐化率越低; 低蔗糖浓度有利于降低褐化率; 活性炭对褐化率的影响与添加量有关, 适宜的添加量有利于降低褐化率。

**关键词:**中华红叶杨; 外植体; 褐变

**中图分类号:** S792.110.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0044-02

杨树是世界各国普遍栽培的树种, 其栽培历史悠久。杨树具有生长迅速、轮伐期短、适应性强、易繁殖等特点, 各地广泛用作行道树、防护林及速生用材树种。中华红叶杨(*Populus euramericana* cv. Zhonghuahongye) 是近几年才发展起来的一个杨树新品种, 它不仅保持了杨树的速生特性, 而且其叶色随季节呈现不同的变化, 具有较高的观赏性, 是集观赏与用材于一身的优良树种, 发展潜力巨大。应用组织培养方法实现植物离体快繁的突出优点是快速、遗传背景均一、不受季节和地区等限制、重复性好, 应用这种方法已实现了多种苗木的快速繁殖。但中华红叶杨在组织培养过程中由于外植体的褐变影响了试管苗的分化及生长, 因此本试验就培养基中不同因素对中华红叶杨外植体褐变的影响进行探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中华红叶杨: 选自惠民红叶杨发展公司的红叶杨生产基地。外植体: 选取中华红叶杨一年生的枝条, 将其切割成适当大小的茎段。

### 1.2 仪器

电子分析天平, 上海天平仪器厂生产; 立式高压蒸汽灭菌锅, 日本三洋公司生产; 超净工作台, 苏净集团安泰公司生产。

### 1.3 试剂

盐酸、氢氧化钠、无水乙醇等均为国产分析纯; pH 试纸, 上海三爱思试剂有限公司生产; 精密 pH 计( PHS-3C 型), 上海双赢科学仪器有限公司生产。

### 1.4 方法

基本培养基: 除特殊说明外, 基本培养基为 MS 培养基, 蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂浓度为 5.5 g/L, pH 值为 5.8。

**1.4.1 pH 值对褐变的影响** 分别配制 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5 的培养基(其他同基本培养基), 每种 pH 值的培养基接种 10 瓶。接种后每 5 d 观察 1 次。每处理重复 3 次。

**1.4.2 无机盐浓度对褐变的影响** 设置 3 组处理, 每组处理

接种 10 瓶。接种后每 5 d 观察 1 次。每处理重复 3 次。处理 1: 采用改良 MS 培养基(大量元素减半); 处理 2: 采用 1/2MS 培养基; 处理 3: 采用 MS 培养基(对照)。

**1.4.3 培养基硬度对褐变的影响** 分别配制琼脂含量为 5.0、5.5、6.0、6.5 g/L 的培养基(其他同基本培养基) 每种培养基接种 10 瓶。接种后每 5 d 观察 1 次。每处理重复 3 次。

**1.4.4 蔗糖浓度对褐变的影响** 分别配制蔗糖浓度为 2.0%、2.5%、3.0%、4.0% 的培养基(其他同基本培养基), 每种培养基接种 10 瓶。接种后每 5 d 观察 1 次。每处理重复 3 次。

**1.4.5 活性炭添加量对褐变的影响** 设置 4 组处理, 每组处理接种 10 瓶。接种后每 5 d 观察一次。4 组处理分别重复 3 次。处理 1: 基本培养基, 不添加活性炭(对照); 处理 2: 基本培养基, 添加 1 g/L 的活性炭; 处理 3: 基本培养基, 添加 3 g/L 的活性炭; 处理 4: 基本培养基, 添加 5 g/L 的活性炭。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH 值对褐化率的影响

随着培养时间的延长, 不同 pH 值培养基上培养的外植体的褐化率都逐步提高。外植体的褐化率随 pH 值变化也呈规律性的变化, 在相同的观察时间内, pH 值越低, 褐化率越低, 随着 pH 值的增加, 褐化率也增加, 不同处理之间差异显著。说明不同的 pH 值对褐化率有明显影响。从图 1 可以看出, pH 值 5.0 水平下的褐化率最低, 说明低的 pH 值可以在一定程度上抑制褐变。

### 2.2 无机盐浓度对褐化率的影响

接种后 5 d, 改良 MS 培养基和 1/2MS 培养基上培养的外植体褐化率较低, 而且水平相当; 而 MS 培养基上培养的外植体褐化率较高。随着培养时间延长, 3 种处理褐化率都逐步增加, 其中, MS 培养基上培养的外植体褐化率一直处于最高水平, 改良 MS 培养基和 1/2MS 培养基上培养的外植体的褐化率在整个培养过程中水平相当, 两者与 MS 培养基(对照) 间差异显著(图 2), 说明无机盐浓度对褐化率有影响。

### 2.3 培养基硬度对褐化率的影响

外植体的褐化率随琼脂浓度的增加呈现规律性的变化, 琼脂浓度越低, 褐化率越高, 随琼脂浓度的增加, 褐化率逐渐

收稿日期: 2013-05-05

作者简介: 李树丽(1974—), 女, 山东沾化人, 讲师, 主要从事植物组织培养方面的教学与研究。E-mail: bzlishuli@163.com。

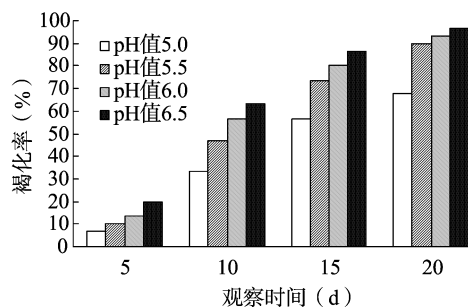


图1 pH值对中华红叶杨外植体褐化率的影响

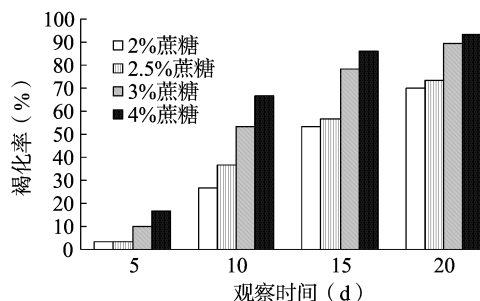


图4 蔗糖浓度对中华红叶杨外植体褐化率的影响

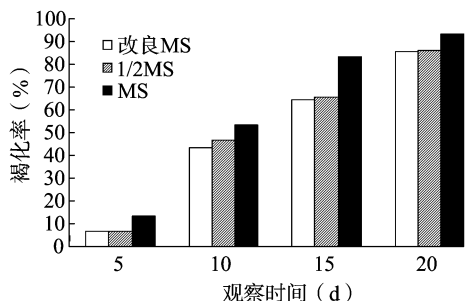


图2 无机盐浓度对中华红叶杨外植体褐化率的影响

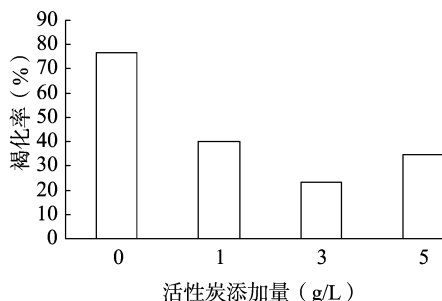


图5 活性炭添加量对褐化率的影响

降低。不同处理之间差异显著(图3),说明培养基硬度对褐化率有显著影响。虽然在一定范围内琼脂浓度越高,外植体的褐化率越低,但琼脂浓度过高,会造成培养基过硬,在接种时,外植体较难插入,还容易造成培养基的裂缝和分块现象,同时培养基过硬,培养基中的营养物质和激素难以运输,影响外植体的生长。

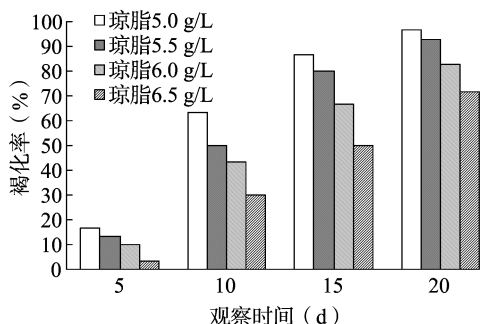


图3 培养基硬度对中华红叶杨外植体褐化率的影响

## 2.4 蔗糖浓度对褐化率的影响

在蔗糖浓度的处理试验中,接种第5 d时,4种处理都出现了褐化现象,含2%蔗糖的培养基上培养的外植体褐化率最低;而含4%蔗糖的培养基上培养的外植体褐化率最高,两者差异较大。随着培养时间的延长,各组处理的褐化率都随之增加,含2%蔗糖的培养基上培养的外植体的褐化率一直处于最低水平,而含4%蔗糖的培养基上培养的外植体的褐化率一直处于最高水平,不同处理之间差异显著(图4)。说明蔗糖浓度对褐化率影响较大,低的蔗糖浓度有利于抑制褐化。

## 2.5 活性炭添加量对褐化率的影响

图5显示,培养基中加入活性炭后外植体的褐化率明显低于培养基中不加活性炭的。培养基中活性炭添加量影响外植体的褐化率,培养基中加入1 g/L的活性炭,外植体的褐化率从不添加活性炭对照的76.7%降到40.0%;培养基中加入

3 g/L的活性炭,外植体的褐化率最低,为23.3%;而培养基中加入5 g/L的活性炭,外植体的褐化率反而增加。

## 3 讨论

### 3.1 pH值对褐变的影响

pH值能影响外植体的褐变,在一定范围内(pH值5.0~6.5),pH值越高,褐化现象越严重,低的pH值能明显地抑制褐变。其原因可能是培养基中低pH值可降低PPO活性和底物利用率,从而抑制褐变<sup>[1]</sup>。在水稻体细胞培养中,pH值为4.5~5.0时MS液体培养基可保持愈伤组织处于良好的生长状态,其表面呈黄白色,而pH值为5.5~6.0时,愈伤组织严重褐变<sup>[2]</sup>。

### 3.2 无机盐浓度对褐变的影响

无机盐浓度影响外植体的褐化率,低的无机盐浓度能减轻褐变现象,其原因可能是培养基中无机盐浓度过高可引起酚类物质的大量产生,导致外植体褐变,降低盐浓度则可减少酚类外溢,减轻褐变<sup>[1]</sup>。邹英宁等在中国李的组织培养中也认为改良MS培养基的褐化率低于MS培养基<sup>[3]</sup>。张妙霞等在柿树组织培养防止褐变所进行的试验中,培养基以改良MS培养基(大量元素减半)和1/2MS培养基的效果最好,MS培养基的效果较差,表明低浓度的无机盐可促进外植体生长与分化,减轻外植体褐变程度<sup>[4]</sup>。

### 3.3 培养基硬度对褐变的影响

在一定范围内(琼脂5.0~6.5 g/L),琼脂用量越大,培养基硬度越大,褐变越轻,这与金坚敏在水稻上的试验结果<sup>[2]</sup>一致,其原因可能是培养基的硬度影响了酚类物质扩散速度的缘故。但培养基过硬,也影响外植体对营养物质和激素的吸收,造成外植体生长不良。

蔗糖浓度对褐变的影响:蔗糖浓度明显地影响外植体的褐变,蔗糖浓度越高,褐化率越高,低的蔗糖浓度有利于减轻褐变。王苑等在植物组织培养的褐变现象及研究进展中指出过高的糖浓度会加剧褐变<sup>[5]</sup>。

骆美蓉,江明锋,张 鹏,等. 山羊分子生物学研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):46-49.

# 山羊分子生物学研究进展

骆美蓉<sup>1,2</sup>, 江明锋<sup>1,2</sup>, 张 鹏<sup>1,2</sup>, 王 永<sup>1</sup>

(1. 青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室,四川成都 610041; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

**摘要:**综述了近年来国内外关于山羊分子生物学方面的研究进展,介绍了山羊起源分化和遗传多样性的分子标记研究、山羊相关经济性状的主要功能基因以及山羊在基因组、转录组和蛋白质组方面的研究进展,讨论了山羊研究存在的问题和发展趋势。

**关键词:**山羊;分子标记;功能基因;基因组;转录组;蛋白质组

**中图分类号:** S827.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0046-04

山羊是世界上最早驯养的家畜之一,其品种多样,适应性强,分布广泛,经济效益大。据联合国粮食和农业组织统计,目前世界上共有 1 000 多个山羊品种,近 8.3 亿只山羊。近年来,发展中国家养羊业发展迅速。我国已成为世界上山羊饲养量、出栏量、羊肉产量最多的国家。同时山羊产业成为我国大部分地区畜牧业的重要支柱。但是国内外关于山羊的研究尤其是功能基因的研究大多是通过牛和绵羊相关研究成果来进行的。山羊在分子生物学上的研究远落后于猪、牛、绵羊等家畜。随着山羊全基因组测序的完成和全基因组图谱的公布,山羊的科学研究随之进入到一个全新时代。

## 1 山羊分子标记及遗传多样性分析

分子标记是以 DNA 多态性为基础的遗传标记,是 DNA 水平上遗传变异的直接反映,目前已发展到第 3 代分子标记。在山羊产业中应用广泛的分子标记技术包括限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机

扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)标记、简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)等。

山羊分子标记研究主要应用于山羊的起源分化和遗传多样性分析。虽然科研人员早在 1962 年就开始研究家山羊的起源和遗传多样性,但至今家山羊的起源和遗传多样性仍具有不确定性<sup>[1]</sup>。近 10 年来,家山羊起源分化和遗传多样性的研究主要是通过线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)进行的。mtDNA 基因组序列一般无间隔、结构简单、突变率高、严格的母系遗传,而这是其成为首要研究对象的主要原因。科研人员通过对 mtDNA 的研究发现山羊有 7 个支系起源(A 至 G),其中 B 支系只存在于亚洲东南部。因此 Lin 等对东南亚 12 个国家共计 1 661 只山羊 mtDNA 进行 RFLP 分析,以期进一步探究亚洲山羊的起源<sup>[1]</sup>。结果表明,亚洲家山羊可分为 4 个支系:A 和 B 支系山羊占主导地位,C 和 D 支系山羊频率低且只存在于中国、巴基斯坦和印度。近期,A 支系山羊向东南亚地区渗透,但 B 支系山羊在东南亚仍具有优势,且有向东南方向增加的趋势。王杰等也根据前人的研究对我国 7 个山羊品种的 mtDNA D-loop 区进行了 RFLP 标记,发现我国山羊有 4 个支系起源(A 至 D)且具有很高的遗传多样性<sup>[2]</sup>。王志刚等对我国 39 个地方山羊品种进行 SSR 标记,其关于我国山羊遗传多样性的分析与王杰一致<sup>[3]</sup>。总的来说,我国山羊具有较高水平的遗传多样性,其中北方地区山羊遗传多样性最为丰富。遗传变异主要存在于品种内,品种间遗传分化处于中等水平,选育潜力大。在遗传资源保护方面,

出版社,2003:40.

[2] 金坚敏,张静兰,唐定台. 水稻幼穗和成熟种子诱导胚状体时的有关因子探讨[J]. 植物学通报,1992,9(2):53-54.

[3] 邹英宁,李国怀,吴强盛. 中国李组织培养过程中褐变的抑制研究[J]. 山地农业生物学报,2007,26(6):508-512.

[4] 张妙霞,孔祥生,郭秀璞,等. 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.

[5] 王 苑,谢凝子. 植物组织培养中的褐变现象及抗褐变研究进展[J]. 黔西南民族师范高等专科学校学报,2007(3):109-113.

[6] 曹鸿斌,刘魁英,赵宗芸,等. 龙眼组培的褐变抑制研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(8):3132-3133.

收稿日期:2013-04-22

资助项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD13B06);教育部科学技术研究重点项目(编号:210265);四川省科技创新产业链示范工程重大项目(编号:2011NZ0003);西南民族大学研究生创新型科研项目(编号:CX2011SP44)。

作者简介:骆美蓉(1987—),女,河南信阳人,硕士研究生,主要从事羊遗传育种方面的研究。E-mail:xygzlmr@126.com。

通信作者:王永,博士,教授,博士生导师,研究方向为动物遗传育种。E-mail:wangyong010101@swun.cn。

活性炭对褐变的影响:培养基中加入一定量的活性炭能明显地抑制褐变,因为活性炭能吸附外植体产生的有害物质,从而减轻褐变。曹鸿斌等在对龙眼外植体褐变的研究中也证实加入活性炭能较好地抑制褐化<sup>[6]</sup>。但活性炭加入的量要适宜,因为活性炭的吸附作用是无选择性的,它在吸附有害物质的同时,也吸附了营养物质和激素,从而影响外植体生长。

除培养基外,影响外植体褐变的因素还有很多,如外植体的生理状态、温度、光照等,需要进一步研究探讨。

## 参考文献:

[1] 刘庆昌,吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京:中国农业大学