

王兰明,刘艳芬,高彦魁.影响牡丹石榴外植体褐变的因素分析[J].江苏农业科学,2016,44(9):181-183.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.051

影响牡丹石榴外植体褐变的因素分析

王兰明,刘艳芬,高彦魁

(河北工程大学,河北邯郸 056021)

摘要:褐变是影响牡丹石榴离体培养成功的关键因素之一。为减轻牡丹石榴初代培养中的褐变问题,研究基本培养基类型、附加物、光照条件、继代周期、取材时间 5 种因素对外植体褐变的影响。结果表明:适宜的基本培养基为 1/2MS;黑暗处理对褐变的影响不明显;聚乙烯吡咯烷酮对褐变有明显的抑制作用,最佳处理浓度为 2.0 mg/L;4 月下旬取带芽的半木质化茎段为外植体,其褐变程度最轻;取材时间和转接次数对褐变的影响明显。

关键词:牡丹石榴;聚乙烯吡咯烷酮;外植体;褐变;因素

中图分类号:S665.404⁺.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0181-03

石榴(*Punica granatum*)为石榴科石榴属植物,是我国重要的果树和观赏花木之一。牡丹石榴是近年来选育的新优品种,其花朵硕大似牡丹,花期长达 5 个月,果大味美,且花果同期同树,是花果俱佳的珍贵石榴品种^[1-2],颇具推广价值。

石榴常规的扦插、分株等繁殖方法,繁殖速度慢,难以满足日益增多的种苗需求。目前,已有学者致力于通过组织培养进行石榴快速繁殖的研究^[3-5]。但是由于石榴体内酚类物质含量高,组织培养过程中外植体褐变严重^[6-7],常造成外植体死亡,成为石榴离体培养过程中的关键制约因素。目前,关

于牡丹石榴离体再生技术虽然鲜有报道^[8],但没有关于其褐变这一关键问题进行报道和系统研究。本试验以牡丹石榴带芽茎段为外植体,研究基本培养基、附加物、光照条件、转接次数、取材时间 5 种因素对外植体褐变的影响,以探讨减轻牡丹石榴离体培养中褐变现象的因素条件,为其离体再生体系的建立和规模化繁殖提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自河北工程大学实验基地引进的 3 年生牡丹石榴树苗。

1.2 试验方法

试验于 2014 年 4 月下旬进行,以牡丹石榴半木质化茎段为外植体,经过常规消毒后,剪切成单芽茎段,接种于各处理

收稿日期:2015-07-31

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:14236810D-8)。

作者简介:王兰明(1964—),女,河北深州人,教授,主要从事观赏植物方面的教学与科研工作。E-mail:wanglanming198@126.com。

期均与其他果园呈明显差异;果园 1 在萌芽期、开花期、花芽分化期、果实成熟期、落叶休眠期与其他果园呈明显差异,这说明在不同物候期内高山坡地和山沟坡地地形的差异会明显影响果园太阳辐射的获取。

由于果园监测数据的限制,本研究仅对现有的果园环境监测数据进行分析,因此可能存在一些不全面的地方,但对第一手监测数据进行深入分析,得到的结论合理,对理解典型地形苹果园生态因子在不同物候期的变化特征是有益的,对指导苹果生产和果园精细化管理具有一定现实意义。

参考文献:

- [1]杨振锋,丛佩华,李 壮,等.辽西地区富士苹果质量调查分析[J].中国果树,2011(5):64-66.
- [2]樊晓春,王位泰,杨晓华,等.六盘山东西两侧苹果物候期对气候变化的响应[J].生态学杂志,2010,29(1):50-54.
- [3]殷淑燕,张钰敏,李美荣,等.气候变化对洛川苹果物候期的影响[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2011,39(6):86-90,95.
- [4]屈振江,郑小华,栗 珂.陕西渭北塬区苹果气候生态适应性研究[J].陕西农业科学,2008,54(2):28-31.
- [5]王景红,高峰,刘 璐,等.陕西省富士系苹果花晚霜冻指标研究[J].干旱地区农业研究,2015,33(4):268-272,285.

- [6]李会科,梅立新,高 华.黄土高原旱地苹果园生草对果园小气候的影响[J].草地学报,2009,17(5):615-620.
- [7]李 倩,王 莹,林 毅,等.基于 GIS 辽宁省“红富士”苹果农业气候区划[J].中国农学通报,2013,29(28):173-178.
- [8]范元广,李 壮,李 敏,等.辽西红富士苹果叶片矿质营养分析及诊断研究[J].中国果树,2014(3):20-25.
- [9]王 莹,李琳琳,张晓月,等.辽宁省苹果花期冻害时空分布规律及其风险区划[J].江苏农业科学,2015,43(6):376-379.
- [10]闫文涛,仇贵生,张怀江,等.辽西苹果园三种地面管理模式对土壤理化性状和昆虫群落的影响[J].果树学报,2014,31(5):801-808.
- [11]夏 雪.基于 3G 网络的苹果园环境监测系统设计[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [12]李 洁.晋西黄土果农复合系统苹果树耗水特征及影响因素研究[D].北京:北京林业大学,2008.
- [13]朱 敏,夏福华,杜池坡,等.基于自动气象观测站的日光温室小气候特征分析[J].安徽农业科学,2008,36(31):13783-13786,13848.
- [14]张光论.生态因子对果实品质的影响[J].果树科学,1994,11(2):120-124.
- [15]苏宏斌,张 莉,滕保琴.防雹网的搭建对苹果园内各生态因子的影响[J].经济林研究,2011,29(3):84-87,96.

培养基,进行单因子试验。培养基和培养条件若无特殊说明,蔗糖含量均为 30 g/L,琼脂含量均为 5.5 g/L,pH 值 5.8,培养温度 25 ℃,光照时间 16 h/d,光照度 2 500 lx。接种 1 周后统计各处理的褐变率和褐变系数,5 周后统计褐变死亡率、萌芽率、腋芽生长状况。

相应计算公式:外植体污染率=污染的外植体总数/接种的外植体总数×100%;褐变率=存活褐变总数/存活的外植体总数×100%;存活率=存活的外植体总数/接种的外植体总数×100%;褐变指数=(∑褐变级数×该级个数×100)/(褐变总数×最高级级数)。褐变级数:0 级,茎段基部褐色物质渗出不明显,5 周后腋芽正常萌动;1 级,茎段基部有少量淡褐色物质渗出,5 周后腋芽正常萌动;2 级,茎段基部褐色物质扩散至茎段直径的 1~2 倍,5 周后茎芽萌动缓慢;3 级,深褐色物直径扩散至茎段直径的 2 倍以上,茎段部分变黑褐色,腋芽不萌动;4 级,茎段基部有大量褐色物质渗出,5 周后腋芽、茎段变黑死亡。

1.2.1 基本培养基的确定 2014 年 4 月中旬,将表面灭菌的外植体接种于 MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS 4 种含有不同浓度无机盐的基本培养基中,每种培养基均添加 0.5 mg/L 6-BA、0.1 mg/L IBA。每个处理接种 8~10 瓶,每瓶接种 2 个外植体。重复 3 次,数据用 SPSS 统计软件分析。

1.2.2 光照条件的确定 2014 年 4 月中旬,将外植体表面灭菌后接种于 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA 培养基中,光照条件共设 3 个处理,分别为黑暗、光照时间 16 h/d、全光照。每个处理接种 12~13 瓶,每瓶接种 2 个外植体。

1.2.3 附加物浓度的确定 2014 年 4 月下旬,附加物聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone,简称 PVP)共设 5 个处理,

每个处理接种 8~10 瓶,每瓶接种 2 个外植体,重复 3 次。数据用 SPSS 统计软件分析。各处理配方:处理 1,1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA;处理 2,1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+1.0 g/L PVP;处理 3,1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+2.0 g/L PVP;处理 4,1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+3.0 g/L PVP;处理 5,外植体用含 4.0 mg/L PVP 无菌溶液浸泡 5 min 后接入处理 1 培养。

1.2.4 不同取材时期和转接次数的确定 分别于 2014 年 4 月下旬、5 月下旬、6 月下旬、7 月下旬、8 月下旬 5 个不同时期进行取材接种,将外植体表面灭菌后接种于 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+2.0 g/L PVP 培养基上。每个处理接种 12~13 瓶,每瓶接种 2 个外植体。以 2 d 为继代周期,分别统计各取材时期不再发生褐变所需的转接次数。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对外植体褐变的影响

由表 1 可见,在 MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS 4 种基本培养基上,褐变发生率均为 100.0%,但褐变指数、褐变死亡率以及萌芽率、腋芽生长状态不尽相同;MS 培养基与 1/2MS、1/3MS、1/4MS 培养基的褐变指数、褐变死亡率和萌芽率均有显著差异,说明无机盐含量对褐变程度有明显影响;虽然 MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS 培养基的褐变程度呈逐渐减轻的趋势,但是接种 5 周后,1/3MS、1/4MS 培养基上的新叶较小,可能是无机盐含量低造成的。因此,选择 1/2MS 作为基本培养基,既可以减轻褐变程度,又不影响腋芽的生长。

表 1 基本培养基对外植体褐变的影响

基本培养基类型	褐变率(%)	褐变指数	褐变死亡率(%)	萌芽率(%)	腋芽生长状态
MS	100.0	78.2a	85.6a	11.3a	腋芽茎尖较短,新叶较大
1/2MS	100.0	71.5b	62.8b	16.8b	腋芽茎尖较短,新叶较大
1/3MS	100.0	70.5b	51.9c	17.0b	腋芽茎尖不伸长,新叶较小
1/4MS	100.0	69.0b	42.9d	21.2c	腋芽茎尖不伸长,新叶很小

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。表 3 同。

2.2 光照条件对外植体褐变的影响

由表 2 可以看出,外植体在 3 种光照条件下的褐变程度均较严重,褐变率依然均为 100%;虽然褐变指数有逐渐减小

的趋势,但是 3 个处理间整体变化与褐变死亡率、萌芽率均无明显差异。结果表明,仅黑暗处理对于减轻牡丹石榴外植体褐变的效果并不明显。

表 2 不同光照条件对外植体褐变的影响

处理	褐变率(%)	褐变指数	褐变死亡率(%)	萌芽率(%)	腋芽生长状态
全光照	100.0	81.6	83.2	10.1	萌芽慢,新叶绿色
光照时间 16 h/d	100.0	78.2	85.6	11.3	萌芽慢,新叶绿色
黑暗	100.0	75.1	84.3	9.7	萌芽慢,弱嫩,黄绿色

2.3 附加物对外植体褐变的影响

由表 3 可见:添加不同浓度 PVP 的褐变指数、褐变死亡率均显著低于不加 PVP(对照)的处理;其中 2.0、3.0 mg/L PVP 的处理效果最好,但是后者萌发的新芽平均长度和新叶数均低于前者;4.0 mg/L PVP 溶液浸泡的褐变率与对照相同,依然为 100%,虽然褐变指数、褐变死亡率、萌芽率与对照相比均差异显著,但是仍然显著高于 2.0、3.0 mg/L PVP 的效果。因此可见,1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+2.0 mg/L PVP 为减轻牡丹石榴外植体褐变最有效的培养

方法。

2.4 不同取材时期和转接继代次数对外植体褐变的影响

取材时间对外植体的褐变率、褐变指数、褐变死亡率以及萌芽率均有明显影响,严重时甚至可导致外植体全部死亡。在生长季枝条半木质化后,取材时间越早,褐变越轻。由表 4 可以看出,4 月下旬接种的外植体褐变指数最小,为 18.8%,褐变死亡率为 0,萌芽率可达 89.7%;而随着取材时间的推移,褐变程度明显加重,虽然培养基中 2.0 mg/L PVP 为附加物,但是 6 月下旬开始,外植体褐变发生率已达 100%;8 月下

表 3 不同浓度 PVP 附加物对外植体褐变的影响

PVP 浓度 (mg/L)	褐变率 (%)	褐变指数	褐变死亡率 (%)	萌芽率 (%)	萌芽均长 (cm)	新叶数 (张)
0 (CK)	100.0a	80.0a	60.0a	10.6c	1.8	3.5
1.0	86.4b	42.0c	15.9c	60.1b	1.8	4.5
2.0	50.1c	18.8d	0.0d	89.7a	1.8	5.2
3.0	47.4c	22.6d	4.8d	82.0a	1.5	4.9
4.0 (浸泡)	100.0a	66.3b	37.5c	25.0c	1.8	4.1

表 4 取材时期和转接次数对外植体褐变的影响

取材时间	褐变率 (%)	褐变指数 (%)	褐变死亡率 (%)	萌芽率 (%)	不再褐变需要转接次数 (次)
4 月下旬	50.1	18.8	0.0	89.7	0
5 月下旬	90.5	34.5	2.4	70.4	1
6 月下旬	100.0	52.6	15.8	40.9	2
7 月下旬	100.0	68.8	47.5	21.7	2
8 月下旬	100.0	85.3	84.7	0.0	3

旬取材时外植体的褐变死亡率已达 84.7%，萌芽率为 0。

转接继代对于保证外植体的成活有明显的作用。在添加 2.0 mg/L PVP 的培养基上,4 月下旬取材时,不需要转接,外植体就能正常萌芽。5 月下旬时,需要 2 d 后转接 1 次,即可抑制褐变的发生。以后需要多次转接,才能保证外植体的成活。而 8 月下旬取材时,褐变死亡率高达 84.7%,虽然有个别外植体成活,但 5 周后由于褐变严重,没有萌芽。

3 结论与讨论

3.1 结论

牡丹石榴组培过程中,外植体褐变严重。本试验表明,无机盐浓度、PVP 附加物对减轻褐变有明显效果,1/2MS 无机盐浓度、2.0 mg/L PVP 附加物可作为最适培养基成分。暗处理对褐变影响效果不明显。取材时间对外植体褐变程度影响极大,河北省中南部 4 月下旬为最佳的取材时期。多次转接可以起到较好的减轻褐变、保证外植体成活的效果。

3.2 讨论

植物组织培养过程中,外植体的褐变时有发生。尤其是木本植物与单宁、酚类物质含量高的植物,如板栗^[9]、核桃^[10]、黄连木^[11]等,褐变程度尤其明显,严重时可导致外植体死亡。除外植体基因型外,褐变程度还受取材时期、外植体类型、培养基成分、培养条件等多种因素的影响。

降低无机盐浓度对于减轻褐变的发生有较好的作用。但无机盐浓度过低,随着培养时间的延长,会影响外植体的正常生长。培养基中附加不同浓度的抗氧化剂、吸附剂均能有效抑制褐变的发生,但植物材料不同,附加物种类和浓度会有差别。王菲等在三白石榴^[6]、王立娅等在蝴蝶兰的研究^[12]中,均认为 PVP 对减轻褐变有较好的效果。而有些研究认为,活性炭抑制蝴蝶兰褐变的效果优于 PVP。由此可见,植物组织培养中,加入酚类物质的吸附剂 PVP 对于减轻外植体的褐变仍没有一定的规律,其抑制褐变的机制还须进一步研究。

一般认为,暗培养由于可以抑制光诱导的多酚氧化酶的活性,因此可以减轻褐变的发生。这在减轻蝴蝶兰的褐变程度^[12]、延缓黄连木^[11]、沙棘^[13]的褐变时间方面均有报道。本试验发现,暗培养对褐变程度的减轻或延缓均没有明显作用,推测牡丹石榴褐变的发生过程除与多酚氧化酶相关外,可能还

有不受光诱导的其他酶的参与,这一机制仍有待进一步研究。

本试验表明,取材时期对褐变程度有明显影响,褐变程度最轻的取材时期为 4 月下旬半木质化的枝条,这与在紫叶黄栌^[14]、牡丹^[15]研究中的报道一致。这可能与不同生长时期植物体内酚类物质含量不同有关。枝条生长早期,牡丹石榴体内酚类物质的含量较低,随着生长的继续,酚类物质含量逐渐增高,褐化日趋严重。

参考文献:

[1]袁 丽,高瑞昌,田永全. 石榴营养保健功能及开发利用[J]. 农业工程技术,2007,2(10):38-42.

[2]王焕兴. 牡丹石榴[J]. 落叶果树,2002,34(2):59-60.

[3]黄剑华,王亦非,周润梅,等. 软籽石榴组培原种苗的诱导及快繁[J]. 上海农业科技,2002,32(6):16.

[4]王雪婧. 黄花石榴组织培养及植株再生研究[D]. 雅安:四川农业大学,2008.

[5]李佳娣. 软籽石榴组织培养再生体系的研究[D]. 淮北:淮北师范大学,2011.

[6]王 菲,苑兆和,招雪晴,等. 三白石榴再生体系的构建[J]. 中国农学通报,2013,29(19):125-133.

[7]张爱民,李佳娣,薛建平,等. 降低软籽石榴组织培养过程中外植体褐化的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(6):3182-3183.

[8]刘广甫,李洪涛,陈延惠,等. 牡丹花石榴的茎尖组织培养再生体系研究[J]. 河南林业科技,2007,27(3):17-19.

[9]刘玉芬,赵国强,曹庆芹,等. 板栗短雄花序芽变的离体培养研究[J]. 中国农学通报,2008,24(10):99-102.

[10]王 娟,田建保,贺小红,等. “金薄香”核桃组培中灭菌及防止褐变的研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2008,28(3):290-292.

[11]程世平,施 江,史国安,等. 黄连木茎段组织培养中防褐化技术研究[J]. 河南农业科学,2010,38(10):110-113.

[12]王立娅,方 正,李英丽,等. 蝴蝶兰组织培养中防褐化技术研究[J]. 河北农业大学学报,2008,31(5):42-45.

[13]杜 研,李 毅,马彦军,等. 几种影响沙棘组织培养外植体褐化因子分析[J]. 河北农业大学学报,2007,30(5):42-42.

[14]刘艳芳,田春雨,孙晓梅. 防止紫叶黄栌组织培养中外植体褐变的试验研究[J]. 辽宁林业科技,2006,33(4):14-15.

[15]田 真,郭 倩,曹 满,等. 牡丹组培鳞芽外植体最佳取材时期的研究[J]. 园艺学报,2014,41(增刊1):2761.