

贾晓梅,周悦,崔彬彬,等.北美海棠组织培养中褐变影响因子分析[J].江苏农业科学,2016,44(12):91-93.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.024

北美海棠组织培养中褐变影响因子分析

贾晓梅,周悦,崔彬彬,曹柳青

(保定学院生化系,河北保定 071001)

摘要:为解决北美海棠组培快繁和组织再生中的褐变问题,分析北美海棠组织培养中外植体褐变影响因子。结果表明,茎段、嫩叶、嫩芽 3 种外植体中,褐变程度最低的为茎段;MS + 1.0 mg/L 2,4-D 的培养基上外植体褐变程度最低;暗培养下褐化程度低于光照培养;遮光暗处理外植体母株枝条可减轻褐变;低温条件下培养可抑制褐变;4 月进行培养时外植体褐化程度最低,随后随月份增加褐变程度加重;培养基中附加聚乙烯吡咯烷酮(PVP)可减轻外植体褐变,而附加柠檬酸(CA)、维生素 C 以及维生素 C 预处理外植体均不能明显降低褐变率。

关键词:北美海棠;褐变;组织培养;PVP;维生素 C

中图分类号:S685.990.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0091-03

北美海棠(*Malus micromalus* cv. “American”)为蔷薇科苹果属落叶乔木^[1-2],花、叶、枝条和果实颜色多样,在不同季节中形态多样,观赏价值极高,具有耐寒、抗病等特性,还具有较强的观赏性和长时间的观赏周期,是优秀的园林植物种类^[3],在我国的园林绿化中有非常大的应用潜力。北美海棠主要通过扦插嫁接进行繁殖,虽然操作简单,但是繁殖速度较慢,难以在短期内满足市场需求,对北美海棠进行组织培养则可以加快繁殖速度^[4]。在果树尤其是木本果树的组织培养中,易出现外植体或培养物的褐化、枯死现象,即褐变现象,又称酚污染^[5-6],褐变在北美海棠组织培养过程中也普遍存在。北美海棠接种 24 h 便开始出现褐变,导致外植体活性明显降低甚至死亡,难以建立组培快繁体系,限制了其组织培养及遗传转化工作的开展。有关褐变的研究在板栗^[7]、芭蕾苹果^[8]、龙眼^[9]、核桃^[10]、中国李^[11]和油桃^[12]等植物上已获得一定结果,但关于北美海棠组培过程还鲜有报道。本试验使

用常规组培方法,比较不同取材时间、不同外植体、不同激素种类与配比、不同培养条件及预处理方法下培养过程中褐化程度的差异,以期找到适合控制褐变的措施,为北美海棠组培快繁和组织再生奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用外植体为北美海棠的嫩芽、嫩叶和茎段,于 2015 年 4 月至 8 月采自生长健壮、无病虫害的北美海棠。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的接种培养 剪取的外植体用 20% 皂粉水浸泡 25 min,自来水冲洗 1.0~1.5 h。随后将材料在超净工作台上,用 75% 乙醇消毒 20~30 s,再用 0.1% HgCl₂ 消毒 7~8 min,无菌水冲洗 5 遍,置于无菌干燥滤纸上吸干水分。将枝条切分成 0.5~1.0 cm 的带芽茎段、不带芽茎段,将叶片切为 0.5 cm²,接种至培养基中。以 MS 培养基为基本培养基,添加蔗糖 30 g/L,琼脂 8 g/L,调节 pH 值为 5.8。培养条件为温度(23±2)℃,光照度 1 500~2 000 lx,时间 12 h/d。

1.2.2 不同外植体及培养基对褐变的影响 以 MS 为基本培养基,添加不同浓度 6-BA、NAA、2,4-D 的 3 种增殖培养基:(1)MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA;(2)MS + 1.0 mg/L 2,4-D;(3)MS + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L 2,4-D。将北美海棠的茎段、嫩芽、嫩叶 3 种外植体接种在上述 3 种培养基中,每个处理接种 30 个外植体,培养 7 d 后

收稿日期:2016-02-01

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划(编号:15227527);河北省高等学校科学技术研究(编号:Z2013008);保定学院科研基金(编号:2012Z08);保定学院本科教学工程建设项目(编号:20120205);保定学院科研团队(编号:KYTD2013001);保定学院本科教学工程建设项目重点发展学科(编号:Xk20130601)。

作者简介:贾晓梅(1978—),女,河北曲阳人,硕士,副教授,主要从事植物生理和生物技术研究。E-mail:jxmjiang@aliyun.com。

185-197.

[6] Wintz H, Fox T, Wu Y Y, et al. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis[J]. J Biol Chem, 2003, 278(48):47644-47653.

[7] Mukherjee I, Campbell N H, Ash J S, et al. Expression profiling of the *Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO)* gene family reveals differential regulation by iron and copper[J]. Planta, 2006, 223(6):1178-1190.

[8] Mira H, Martínez N, Peñarrubia L. Expression of a vegetative-storage-protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper,

senescence and ozone[J]. Planta, 2002, 214(6):939-946.

[9] Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, et al. *SQUAMOSA* promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2009, 21(1):347-361.

[10] Bernal M, Casero D, Singh V, et al. Transcriptome sequencing identifies *SPL7*-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2012, 24(2):738-761.

[11] Cardon G, Höhmans S, Klein J, et al. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes[J]. Gene, 1999, 237(1):91-104.

统计褐变率和出愈率。

1.2.3 光照、温度对褐变的影响 对接种在不同激素组合的 3 种培养基的 3 种外植体进行光培养、暗培养和低温培养。光培养条件:光照度 1 500 ~ 2 000 lx,时间 12 h/d,温度 (23 ± 2)℃。暗培养温度不变,进行遮光处理。低温遮光培养,在遮光条件下温度设为 4℃。培养 7 d 统计褐变率和出愈率,每个处理接种外植体 30 个。

1.2.4 光线预处理对褐变的影响 将植株上正常生长的北美海棠新生枝条用厚纸袋罩住,密封上部分,下部分留口保证枝条能够生长但不能接受阳光,处理 20 d 后接种到 3 种不同配方的培养基中,每种方案接种 30 个外植体,以没有遮光的嫩茎为对照,培养 7 d 后统计褐变率和出愈率。

1.2.5 不同取材时间对褐变的影响 分别于 4—8 月取北美海棠的茎段、嫩芽、嫩叶,接种在不同激素组合的 3 种培养基中,每处理接种外植体 30 个,7 d 后统计褐变率和出愈率。

1.2.6 抗氧化剂对褐变的影响 茎段消毒后分别接种在 1/2 MS、1/2 MS + 100 mg/L 维生素 C + 150 mg/L 柠檬酸 (CA)、1/2MS + 1 g/L 聚烯吡络烷酮 (PVP) 3 种培养基中,每个处理接种 30 个外植体,培养 7 d 后统计褐变率。

1.2.7 外植体维生素 C 预处理对褐变的影响 茎段浸泡在

100 mg/L 维生素 C 水溶液中 0、0.5、1.0、2.0、4.0、12.0 h,对照为清水浸泡 12h,材料经灭菌后接种于 1/2 MS 培养基,每个处理接种 30 个外植体,培养 7 d 后统计褐变率。

2 结果与分析

2.1 外植体类型和培养条件对褐变的影响

由表 1 可见,茎段、嫩叶、嫩芽 3 种外植体均出现褐变,并且褐变程度表现不同,嫩芽和嫩叶的褐变程度都很严重,褐变率高达 100.0%,茎段相比较低 (93.3%)。3 个培养基配方的褐变程度和出愈情况也有所不同,培养基 2 褐变程度低于培养基 1、3,出愈率高于培养基 1、3。暗培养平均褐变率为 14.8%,光照培养平均褐变率为 100.0%,暗培养比光照培养明显降低;暗培养の出愈率为 3.7%,光照培养の出愈率为 0;低温条件褐变率最低,培养 7 d 平均褐变率为 0,出愈率也较低,仅为 1.0% (表 1)。

2.2 遮光预处理对褐变的影响

遮光预处理可以抑制褐变的发生,遮光处理枝条的褐变率为 20.4%,远低于未遮光处理的 38.9%,二者相差 18.5 个百分点,遮光处理平均出愈率也达 5.6%,未遮光处理没有愈伤发生 (表 2)。

表 1 不同外植体和不同培养条件的褐变率 %

处理类别	处理名称	培养基 1		培养基 2		培养基 3		平均	
		褐变率	出愈率	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率
外植体类型	嫩芽	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0
	茎段	100.0	0	80.0	1	100.0	0	93.3	0.3
	嫩叶	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0
培养条件	光照培养	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0
	暗培养	20.0	2.2	13.3	8.9	11.1	0	14.8	3.7
	低温培养	0	0	0	3	0	0	0	1.0

表 2 遮光预处理对褐变率的影响 %

处理	培养基 1		培养基 2		培养基 3		平均	
	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率
遮光	27.8	0	11.1	16.7	22.2	0	20.4	5.6
未遮光	44.4	0	22.2	0	50.0	0	38.9	0

2.3 不同取材时间对褐变的影响

取材时间会影响外植体褐变的情况,由表 3 可知,4 月外植体平均褐变率为 37.0%,褐变程度最低;随采样时间的推移,外植体平均褐变率有整体提高的趋势,而且接种后材料污

染的情况也愈加严重。6 月取材的外植体平均出愈率最高,达 5.2%,其次是 4 月,出愈率为 3.7%,其他月份均未有愈伤组织发生。

表 3 取材时间对褐变率的影响 %

月份	培养基 1		培养基 2		培养基 3		平均	
	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率	褐变率	出愈率
4	38.9	0	0	11.1	11.1	61.1	37	3.7
5	100.0	0	93.3	0	100.0	0	97.8	0
6	100.0	0	100.0	13.3	86.7	2.2	95.6	5.2
7	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0
8	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0

2.4 添加抗氧化剂对褐变的影响

培养基中添加 PVP 及维生素 C + CA 组合培养后外植体褐变率和褐变程度如表 4 所示。附加 PVP 的培养基褐变率为 27.8%,外植体基部切口的褐变情况较轻,而附加维生素 C + CA 的培养基褐化率为 66.7%,与对照 68.9% 的褐变

率差异不明显。

2.5 抗氧化剂维生素 C 预处理材料对褐变的影响

外植体浸在 100 mg/L 的维生素 C 水溶液中 0 ~ 12.0 h,外植体培养褐变都不能被抑制,反而随浸泡时间的延长,接种后的外植体褐变率升高,褐变程度加深,清水浸泡处理平均褐

表 4 抗氧化剂对褐变率的影响

处理	褐变率(%)	褐变情况
1/2MS	68.9	+++
1/2MS + 维生素 C + CA	66.7	+++
1/2MS + PVP	27.8	+

注:“+”表示褐变程度,其数量越多表示褐变越严重。表 5 同。
变率高于维生素 C 预处理(表 5)。

表 5 抗氧化剂维生素 C 预处理材料对褐变率的影响

处理时间(h)	褐变率(%)	褐变情况
0	38.9	+++
0.5	47.4	+++
1.0	56.3	+++
2.0	80.0	++++
4.0	88.9	++++
12.0	88.9	++++
CK(清水)	89.5	++++

3 讨论与结论

在本试验中,不同外植体、不同培养基组成对外植体褐变均有不同程度影响。试验所选的 3 种外植体(茎段、嫩叶、嫩芽)褐变程度不同,褐变程度最低的为茎段,达 93.3%,而嫩叶和嫩芽褐变程度都较重,平均褐变率均为 100.0%。3 种培养基配方中,MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 褐变率最高,MS + 1.0 mg/L 2,4-D 培养基褐变率最低。推测可能与细胞分裂素 6-BA 对酚类化合物的合成有促进作用,而 2,4-D 作为生长素类能延缓酚类物质的合成,减轻褐化程度^[13]有关。

光照和温度也会对外植体褐变的程度产生影响。光照条件下,酚类物质的生物合成也随光照度增加而增加,外植体褐变程度也加重。暗处理可以一定程度地抑制褐变的发生,可能原因是在酚类化合物合成和氧化过程中需要许多酶的参与,部分酶的活性受光照的诱导^[14]。本试验表明,暗培养平均褐变率为 14.8%,光照培养平均褐变率高达 100.0%,暗培养的北美海棠外植体褐变程度明显低于光照培养,并且遮光处理也可起到抑制褐变的作用。王明华等的研究结果同样显示对芭蕾苹果母株枝条进行遮光处理能抑制褐变的发生^[8]。母株进行遮光处理后,需要光诱导合成的酚类与氧化酶的生物活性降低,使酚类化合物的合成减少。本试验中低温培养外植体褐变率低,这与高汝勇在进行天竺葵茎尖培养时得出的结果类似^[15]。低温能够抑制褐变是由于温度低时酚类物质的合成降低,外植体中的酚含量下降或者多酚氧化酶的活性降低,均可使褐变减轻或受到抑制。

试材采集时间会对植物材料接种后褐变有明显影响,4 月采集的北美海棠外植体褐变程度低于其他月份,5 月及以后采集的外植体褐变率达 86% 以上,7—8 月外植体全部褐变。由此可知,北美海棠在春季取材时褐变程度最低,随着采样时间的后移,植株体内的酚类化合物含量不断提高,多酚氧化酶的活性不断升高,所以外植体褐变呈现加重趋势。

在培养基中添加抗氧化剂或对植物材料进行预处理也是

有效抑制褐变加重的措施之一^[16]。本试验添加不同抗氧化剂的培养基中,附加 PVP 的培养基效果好于附加维生素 C + CA 的培养基,附加 PVP 的培养基中外植体基部切口的褐变情况明显减轻。这与罗丽华的研究结果^[7]不同,推测与植物多样性有关。对芭蕾苹果褐变的研究表明,将外植体浸在清水或抗氧化剂中,褐变程度不能得到抑制^[8],同样在本试验中,外植体无论是浸在清水中还是在含 100 mg/L 维生素 C 溶液中,褐变都不能被抑制,而且随着浸泡时间延长,外植体褐变程度加重,褐变率提高。这可能是由于茎段长时间浸在清水或抗氧化剂中,处于无氧呼吸状态,生命力降低,另外外植体细胞水势低于外部溶液而吸水,使其含水量升高引起细胞膨胀,此时的细胞对于消毒剂乙醇和氯化汞的刺激更敏感,易受到损伤,使植物组织受到破坏,加重褐变程度。所以北美海棠的外植体组培时不宜采用清水浸泡或维生素 C 浸泡预处理。

参考文献:

- [1] 赵志新. 北美海棠微扦插繁殖试验[J]. 天津农业科学, 2012, 18(1): 123-125.
- [2] 徐基平, 李艳红, 胡秀琴. 克拉玛依地区北美海棠的引种栽培及推广应用研究[J]. 园艺与种苗, 2011(1): 51-53.
- [3] 郭蕾, 郑大睿, 仇兰芬, 等. 不同北美海棠品种抗螨性调查[J]. 广东农业科学, 2008(12): 103-104.
- [4] 赵志新. 北美海棠组培快繁技术[J]. 农业科技通讯, 2011, 17(12): 186-187.
- [5] 邹英宁, 吴强盛. 果树组织培养中褐变现象及其抑制研究进展[J]. 长江大学学报 B: 自然科学版, 2007, 4(3): 47-50.
- [6] Torre A M, Mau - Lastovicka T, Rezzaiyan R. Total phenolics and high performance liquid Chromatography of phenolics acids of avocado[J]. Agric Food Chem, 1987, 35: 921-925.
- [7] 罗丽华. 板栗组织培养及褐变研究[D]. 长沙: 中南林学院 中南林业科技大学, 2004: 9-17.
- [8] 王明华, 李光晨, 李正应. 芭蕾苹果微繁殖中抑制褐化的研究[C]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 365-369.
- [9] 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.
- [10] 王法章, 张春梅. 培养基种类及成分对核桃叶片组织培养褐变的影响[J]. 吉林农业, 2016(1): 87-88.
- [11] 邹英宁, 李国怀, 樊青峰, 等. 不同抗氧化剂对中国李茎段培养的影响[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(1): 84-86.
- [12] 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.
- [13] 付 影, 荣俊冬, 陈礼光, 等. 植物组织培养中褐变问题研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2007, 3(3): 190-195.
- [14] 张 伟, 程蕾洁, 洪 波. 植物组织培养中克服外植体褐变的研究[J]. 河北农业科技, 2008(8): 55-56.
- [15] 高汝勇. 植物组织培养中褐变产生的因素和预防措施[J]. 科技风, 2009(10): 83-84.
- [16] 杜敬然, 赵 斌, 李英丽, 等. 红掌组织培养过程中外植体褐变的研究[J]. 北方园艺, 2010(9): 160-162.