

武玉婷, 石 岭, 张建中, 等. 构树再生体系的建立及防褐变研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(22): 61–64.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.012

构树再生体系的建立及防褐变研究

武玉婷¹, 石 岭¹, 张建中², 贾建宇², 云利俊²

(1. 内蒙古农业大学农学院, 内蒙古呼和浩特市 010019; 2. 内蒙古自治区呼和浩特市科学技术局, 内蒙古呼和浩特 010000)

摘要:以构树茎段为外植体, 探究构树再生体系中生长调节剂组合以及再生过程抗褐变剂种类和浓度对构树再生的影响, 结果表明, 适宜构树启动培养基配方为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L, 构树初代最适培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L 和 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L。添加 0.1 g/L 抗坏血酸对构树抗褐变效果最好, 构树继代最适培养基配方为 MS + IBA 0.1 mg/L + CPPU 1.0 mg/L + 维生素 C 0.1 mg/L。

关键词: 构树; 初代培养; 褐变研究; 继代培养

中图分类号: S792.990.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)22-0061-04

构树 [*Broussonetia papeyriifera* (L.) Vent.] 又名楮树、谷浆树、野杨梅子等, 属被子植物门双子叶植物纲, 荨麻目^[1] 桑科 (Moreaceae) 构树属 (*Broussonetia*) 多年生落叶乔木或灌木^[2], 古称“穀树”, 古幽州人称“桑穀”^[3]。构树的叶、枝、皮、根皮、果实等都可以作药用, 构树皮被广泛用于制造礼品包装纸、书画纸等各种高档纸型^[4], 构树果实含有丰富的营养物质, 如氨基酸、糖类、矿物元素等^[5], 具有抗氧化、美容、健身、缓解疲劳、提高人体免疫力等功能^[6-7], 果实可生食和酿酒, 有补肾、壮筋骨、健胃消肿之功效^[8-9]。

褐变是指外植体在诱导脱分化或再分化过程中, 从组织表面向培养基释放分泌物质, 氧化后使培养基逐渐变成褐色 (或黑色), 从而使外植体进一步变褐而死亡的现象^[10-13]。影响褐变的主要因素有暗培养、培养种类、培养基状态、组成、生长调节物质及组合等^[14-16]。除此之外, 可向培养基中加入一些化学添加剂如吸附剂 [活性炭和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)^[17]]、抗氧化剂 [维生素 C、柠檬酸、半胱氨酸 (Cys)] 及其盐酸盐、谷胱甘肽、硫代硫酸钠、二硫苏糖醇等^[18]。

构树在自然条件下生长周期较长, 满足不了社会的需求, 近几年来, 构树组培快繁技术发展较快, 但对于构树组培研究的资料较少, 主要集中在构树增殖方面, 而对于构树组织培养过程中发生的褐变现象目前还鲜有研究。因此, 以构树茎段为外植体, 利用组织培养快速繁殖技术, 对构树增殖过程以及抗褐变条件进行系统研究, 从而进行大量扩繁, 以期解决构树种苗大量需求的问题, 为造纸、饲料等相关产业提供充足的苗木来源, 在生产实践及理论研究上具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采自内蒙古武川县宝坤农业园区内生长旺盛的构树嫩茎

作为试验材料, 采集时间为 2017 年 6 月, 在内蒙古农业大学新区实验室进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 启动培养 以 MS + 6-BA 1.0 mg/L 为基础培养基, 添加不同浓度 NAA (0.1、1.0 mg/L) 和 IBA (0.1、1.0 mg/L) 组合共 4 个处理, 接种 1 个/瓶, 每个处理 10 瓶, 3 次重复, 30 d 后统计数据。

1.2.2 初代培养 以 MS 培养基上添加不同浓度 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L) 和 IBA (0.1、0.2、0.5 mg/L) 组合共 9 个处理, 接种 1 个/瓶, 每个处理 10 瓶, 重复 3 次, 30 d 后统计数据。

1.2.3 褐变控制研究 以 MS 为基础培养基, 添加不同浓度活性炭 (0.50、1.00、1.50 g/L)、抗坏血酸 (0.10、0.50、1.00 g/L) 和半胱氨酸 (0.10、0.50、1.00 g/L), 接种 1 个/瓶, 每个处理 10 瓶, 重复 3 次, 30 d 后统计褐变率、褐变等级。

1.2.4 继代培养 以 MS + 0.1 g/L 维生素 C 为基本培养基, 分别添加不同浓度细胞分裂素如 6-BA、CPPU、生长素如 NAA、IBA 等, 接种 1 个/瓶, 每个处理 10 瓶, 重复 3 次, 30 d 后统计数据。

1.3 培养条件

培养温度为 25 ℃, 在 GTOP-280B 光照培养箱中培养, 光照度为 2 000 lx, 光照时数为 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 启动培养

由表 1 可知, A3 处理的平均株高、分化率和增殖倍数均高于其他 3 个处理, 且显著高于 A2 和 A4 处理, 但与 A1 处理无显著性差异, A2 和 A4 处理之间差异性不显著, A3 处理极显著高于 A2 和 A4 处理。从试管苗生长状态来看, A3 与 A1 处理试管苗生长旺盛, 分化率高, 而 A2 处理下的试管苗分化植株较少, 且试管苗生长缓慢, 叶片较小, 生长较弱。

2.2 初代培养

由表 2 可知, B5 试管苗分化率最高, 达到 97%, B6 和 B8 处理平均株高均在 2.70 cm 及以上, 高于其他处理, 各处理平均株高均在 2.51~2.71 cm 之间。增殖倍数显著性差异分析

收稿日期: 2018-07-31

作者简介: 武玉婷 (1993—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士, 主要从事蔬菜育种及其生物技术研究。E-mail: 283161618@qq.com。

通信作者: 石 岭, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事蔬菜育种及其生物技术研究。E-mail: shiling60@126.com。

表 1 不同激素浓度组合对构树启动培养的影响

处理	植物生长调节剂浓度 (mg/L)			平均株高 (cm)	分化率 (%)	增殖倍数
	6-BA	NAA	IBA			
A1	1.00	0.10		2.03	83	2.33aAB
A2	1.00	1.00		1.69	47	1.70bC
A3	1.00		0.10	2.25	90	2.57aA
A4	1.00		1.00	2.11	77	1.93bBC

注:同列数据后不同小写、大写字母代表在 0.05、0.01 水平差异显著。

表 2 不同激素浓度组合对构树初代培养的影响

处理	植物生长调节剂浓度 (mg/L)		平均株高 (cm)	分化率 (%)	增殖倍数
	6-BA	IBA			
B1	0.5	0.1	2.51	67	1.93dC
B2	0.5	0.2	2.65	80	2.23cdBC
B3	0.5	0.5	2.43	60	1.83dC
B4	1.0	0.1	2.53	70	2.27cdBC
B5	1.0	0.2	2.65	97	3.33aA
B6	1.0	0.5	2.70	80	3.03abAB
B7	1.5	0.1	2.62	80	2.70abcABC
B8	1.5	0.2	2.71	90	2.70abcABC
B9	1.5	0.5	2.54	83	2.63bcABC

结果显示,B5、B6、B7 和 B8 处理之间不存在显著差异,B1 ~ B4 处理之间不存在显著差异但都显著低于 B5 处理;B5 ~ B9 处理之间差异不显著,B5 处理与 B1 ~ B4 处理存在极显著差异。从试管苗生长状态来看,B5、B6 处理下叶片颜色深绿,叶大而平展,植株生长发育良好,长势旺;B6 ~ B9 处理下植株生长健壮;B1 和 B3 处理下分化的植株少,植株矮小,生长缓慢,出现黄叶,少量植株因褐变死亡。

2.3 褐变控制研究

根据表 3 不同抗褐变剂对构树褐变的影响显著性差异结果分析可知,C3 和 C6 处理褐变程度差异不显著但显著低于其他 7 个处理,C1、C4 和 C7 处理之间不存在显著差异,C2、C5、C8 和 C9 处理之间差异不显著;C1、C4 和 C7 处理褐变度极显著高于 C3、C6 和 C9 处理,C3、C6 和 C9 处理抗褐变效果较好。

表 3 抗褐变剂对构树褐变的影响

处理	抗褐变添加剂浓度 (g/L)			褐变率 (%)	褐变度
	活性炭	维生素 C	Cys		
C1	0.5			80	2.40abAB
C2	1.0			70	2.10eBCD
C3	1.5			63	1.67eE
C4		0.1		87	2.43abAB
C5		0.5		67	2.10eBCD
C6		1.0		57	1.80deDE
C7			0.1	93	2.57aA
C8			0.5	83	2.20bcBC
C9			1.0	70	1.93cdCDE

根据图 1 分析可知,构树褐变程度随着抗褐变剂活性炭、维生素 C 以及半胱氨酸浓度的增加而降低,活性炭抗褐变效果强于其他 2 种抗褐变剂,但加入活性炭的构树试管苗虽然叶片大而绿,但随着培养时间的增加而出现枝条细软、叶片下垂的现象,长势越来越弱,影响增殖效果,因此在增殖阶段不适合添加活性炭;在各个浓度下维生素 C 抗褐变效果均强于半胱氨酸,当维生素 C 浓度为 0.1 g/L 时,试管苗生长健壮并可以继续增殖,但随着维生素 C 和半胱氨酸浓度的增加,构树试管苗均出现叶片发黄甚至死亡的现象,综合考虑,最适宜的抗褐变剂为维生素 C 且浓度为 0.1 g/L。

2.4 继代培养

2.4.1 细胞分裂素种类和浓度对构树增殖的影响 由表 4 可知,随着 6-BA 浓度的增加,试管苗分化率和增殖倍数均增加;随着 CPPU 浓度增加,试管苗的平均株高、分化率和增殖倍数呈增加趋势;D6 处理下构树无菌苗平均株高最大,为 2.75 cm,D3 处理下无菌苗分化率达 100%。增殖倍数显著性差异分析结果显示,在显著水平为 0.05 水平时,D6 处理显著高于其他 5 个处理,D4 处理下增殖倍数最小,显著低于其他 5 个处理,D1 和 D5 之间不存在显著差异;在显著水平为 0.01 水平时,D6 处理极显著高于其他处理,D4 极显著低于其他处

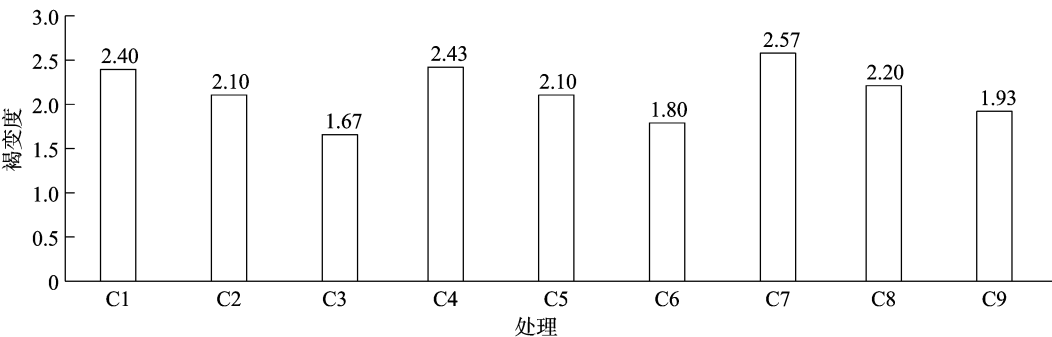


图1 抗褐变剂对构树褐变的影响

表 4 细胞分裂素种类和浓度对构树增殖的影响

处理	植物生长调节剂浓度 (mg/L)			平均株高 (cm)	分化率 (%)	增值倍数
	NAA	6 - BA	CPPU			
D1	0.1	1.0		2.46	90	2.67dC
D2	0.1	1.5		2.56	97	3.00cBC
D3	0.1	2.0		2.35	100	3.37bB
D4	0.1		0.1	2.08	73	2.07eD
D5	0.1		0.5	2.29	90	2.87cdC
D6	0.1		1.0	2.75	97	3.90aA

理,D1、D2 和 D5 之间差异不显著,添加 1 mg/L CPPU 的试管苗平均株高和增殖倍数均高于其他组合,因此 CPPU 是最适宜试管苗增殖的细胞分裂素。

2.4.2 生长素种类和浓度对构树增殖的影响 由表 5 分析可知,D12 处理下试管苗分化率达到 100%。增殖倍数显著性差异分析结果显示,在显著水平为 0.05 水平时,D10 和

D12 处理显著高于 D7 ~ D9 处理,二者之间差异性不显著,D7、D8、D9 和 D11 处理之间差异不显著,在显著水平为 0.01 水平时,D7、D10、D11 和 D12 处理无显著差异。从株高、分化率和增殖倍数综合考虑,添加 NAA 的处理对构树的作用效果好于 IBA。

表 5 生长素种类和浓度对构树增殖的影响

处理	植物生长调节剂浓度 (mg/L)			平均株高 (cm)	分化率 (%)	增值倍数
	6 - BA	IBA	NAA			
D7	1.0	0.2		2.59	93	2.77bABC
D8	1.0	0.4		2.72	90	2.57bBC
D9	1.0	0.8		2.46	90	2.53bC
D10	1.0		0.05	3.08	93	3.57aAB
D11	1.0		0.10	2.91	97	3.07abABC
D12	1.0		0.20	3.01	100	3.67aA

2.4.3 CPPU 和 IBA 不同浓度组合对构树增殖的影响 由表 6 分析可知,当 IBA 浓度为 0.1 mg/L 时,试管苗增殖倍数先升高后降低又略升高,D14 处理试管苗分化率达到 100%,平均株高 3.11 cm;IBA 浓度为 0.2 mg/L 时,试管苗分化率和增殖倍数均为先增加后减少。增殖倍数显著性差异分析结果显示,在显著水平为 0.05 水平时,D14 和 D16 处理显著高于其他处理,D13、D15、D16、D17 和 D18 之间差异不显著;在显著水平为 0.01 水平时,D14 与 D13、D17、D19 和 D20 差异极显著,与 D15、D16 和 D18 之间差异不显著。当 IBA 为 0.1 mg/L、CPPU 为 1.0 mg/L 时,试管苗分化率、增殖倍数最大,分别为 100%、4.33。

3 结论与讨论

3.1 启动培养

通过对构树进行不同浓度 NAA 和 IBA 处理,结果显示,

NAA 和 IBA 对构树的生长均有促进作用,这一作用会因各激素浓度不同而作用不同,IBA 处理效果总体高于 NAA,且浓度为 0.1 mg/L 的 NAA 和 IBA 处理效果强于浓度为 1.0 mg/L,这与万文报道的高浓度生长素会使得杂交构树组培苗的分化率下降研究结果^[19]相一致,通过初代培养,筛选出了最适宜构树启动培养的培养基配方,为 MS + 6 - BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L。

3.2 初代培养

通过研究 6 - BA 和 IBA 2 种生长调节剂对构树初代培养的影响,结果表明,适当浓度的 6 - BA 和 IBA 组合对构树生长和增殖有促进作用。各处理之间增殖倍数显著性差异分析结果显示,当 6 - BA 浓度为 1.0 mg/L 时,IBA 浓度为 0.2、0.5 mg/L,构树试管苗增殖效果显著,增殖倍数较高,分别为 3.33、3.03,二者无显著差异,试管苗生长状况良好,叶绿,长势旺盛,因此可得出构树初代培养最适培养基为 MS + 6 - BA

表 6 CPPU 和 IBA 不同浓度组合对构树增殖的影响

处理	植物生长调节剂浓度(mg/L)		平均株高 (cm)	分化率 (%)	增殖倍数
	IBA	CPPU			
D13	0.1	0.5	3.08	97	3.30bcBC
D14	0.1	1.0	3.11	100	4.33aA
D15	0.1	1.5	3.05	97	3.63bABC
D16	0.1	2.0	2.98	93	3.90abAB
D17	0.2	0.5	2.96	93	3.33bcBC
D18	0.2	1.0	3.00	97	3.66bABC
D19	0.2	1.5	3.16	90	2.83cC
D20	0.2	2.0	3.13	90	2.73cC

1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L 和 MS + 6 - BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L。

3.3 褐变控制研究

在植物组织培养过程中,木本植物均存在着不同程度的褐变现象。添加抗褐变剂可有效防止褐变,本试验研究了不同抗褐变剂以及不同浓度对构树褐变的影响,选用活性炭(活性炭)、维生素 C 和半胱氨酸(Cys)3 种抗褐变剂,试验证明,随着抗褐变剂浓度的增加,构树试管苗褐变程度逐渐减轻,但高浓度抗褐变剂会对构树生长造成影响。何琼英等研究表明,维生素 C 对褐变的控制作用是有消耗性的,所以用维生素 C 作抗褐变添加物时,应适当减短转接时间^[20];活性炭的防褐变效果虽然好,但会吸附培养基中其他营养物质,对组培苗的生长造成一定的影响^[18];半胱氨酸与醌类物质醌结合,能抑制多酚氧化酶活性^[21],因此可抑制组培苗褐变发生,当维生素 C 浓度为 0.1 g/L 时,防褐变效果最佳。

3.4 继代培养

通过对构树继代培养的研究可知,生长素类的 IBA 和 NAA 对构树增殖均有促进作用,但 NAA 作用效果好于 IBA,这与初代培养中的结果存在差异,可能是由于二者浓度不同所造成的,须进一步探索;在培养基中添加 CPPU 试管苗的平均株高、分化率和增殖倍数普遍强于 6 - BA,有研究证明 CPPU 诱导桑树下胚轴分化新梢的效果显著好于 BA^[22],这与本试验结果一致。CPPU 是近年来从苯脲衍生物中筛选出一种廉价细胞分裂素类物质,具有促进细胞分裂的作用^[23]。本试验中 CPPU 的作用效果主要表现在促进植株伸长以及侧芽分化,且 CPPU 浓度越高,作用效果越明显,但高浓度 CPPU 虽然对构树株高有良好的促进作用,但会抑制构树叶片生长,造成构树叶片色浅、叶面积小、长势较弱,所以使用 CPPU 浓度不宜太高。当 IBA 浓度为 0.1 mg/L、CPPU 浓度为 1.0 mg/L 时,试管苗平均株高 3.11 cm,分化率 100%,增殖倍数 3.33,是继代培养中效果最好的处理,因此,MS + IBA 0.1 mg/L + CPPU 1.0 mg/L + 维生素 C 0.1 mg/L 为构树继代培养最佳配方。

参考文献:

[1]王高琦,梁双丽,王建民. 浅议构树的生长习性及其价值[J]. 绿色科技,2013(1):188-189.
[2]李爱华,邓华平,杨柳,等. 日本构树再生体系建立[J]. 湖北林业科技,2007(2):14-17.

[3]张秀实,吴征镒,曹子余. 中国植物志(第23卷第1分册)[M]. 北京:北京科技出版社,1998.
[4]白淑云,刘秉钺,何连芳. 造纸原料新材种——杂交构树[J]. 工艺与技术,2008(3):7-9.
[5]林文群,陈忠,李萍. 构树聚花果及其果实原汁营养成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2001(3):45-47,42.
[6]胡俊达. 构树的开发利用价值和河北省发展前景[J]. 河北林业科技,2008(5):100-101.
[7]李党法. 构树的培育与开发利用[J]. 中国林副特产,2007,9(1):49-76.
[8]杨祖达,陈华,叶要妹,等. 构树叶资源利用潜力的初步研究[J]. 湖北林业科技,2002(1):1-3.
[9]周峰. 构树叶、花序及果实的氨基酸分析[J]. 药学实践杂志,2005,23(3):154-156.
[10]杨玲. 应用热激处理抑制蝴蝶兰组培褐变[D]. 海口:华南热带农业大学,2007.
[11]于守超,张秀省,杨重军. 紫枝玫瑰组织培养中抑制褐化措施的研究[J]. 浙江林业科技,2007,27(5):41-43.
[12]傅作中. 玉米耐 N 活性炭 1 幼胚愈伤组织的筛选及特性分析[D]. 长春:长春农牧大学,1996.
[13]Bruun H H. Prospects for biocontrol of invasive *Rosa rugosa* [J]. Bio Control,2006,51(2):141-181.
[14]赵伶俐,范崇辉,葛红. 黑暗预处理对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响[J]. 西北农业学报,2006,15(5):248-250.
[15]马文卿,李青,刘燕. 大花蕙兰试管苗增殖过程中的褐化研究[J]. 中国农学通报,2010,26(7):186-190.
[16]张忠和. 蝴蝶兰的组织培养技术[J]. 现代园艺,2008(8):18-19.
[17]张红. 库拉索芦荟组培中的褐变现象及防止[J]. 安徽农业科学,2008,36(6):2257-2258.
[18]刘真华,葛红,郭绍霞,等. 蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究[J]. 园艺学报,2005,32(4):732-734.
[19]万文. 杂交构树再生体系的建立及其抗盐性研究[D]. 北京:北京林业大学,2010.
[20]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.
[21]Hotchkiss D E D. Cysteine as an inhibitor of polypeptide-nol oxidase [J]. Journal of Food Biochemistry,1989,13:65-75.
[22]侯勇,马国瑞,夏中梅,等. CPPU 研究进展[J]. 植物营养与肥料学报,1999,5(2):11-19.
[23]李荣富,张伟平,董志宏,等. CPPU 的生理效应及其在园艺作物上的应用[J]. 内蒙古农业科技,1996(4):29-34.