

文章编号:1001-1498(2004)06-0757-06

乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导与褐变控制的研究

苏梦云, 姜景民

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:利用乐东拟单性木兰成龄树嫩枝茎段作外植体,研究了控制褐变和组织培养的技术。试验结果表明,抗氧化剂控制褐变的效果比吸附剂好,以抗坏血酸最好,其次是巯乙醇和二硫苏糖醇。在培养基中分别加入抗坏血酸(10 mg L^{-1})、巯基乙醇(1 mL L^{-1})和二硫苏糖醇(1.5 mg L^{-1})使外植体的褐变率分别比对照降低 67%、53%和 33%。在接种前,将外植体在 4℃ 下冷处理 2 h,能使外植体的褐变率从对照的 35%降低为 25%。1/2MS 和 WPM 均是较合适的基本培养基。外植体在 BA 1.5 mg L^{-1} + NAA 0.2 mg L^{-1} + 2,4-D 1.0 mg L^{-1} 的激素组合下,能诱导出较多的愈伤组织;在 WPM + BA 1.5 mg L^{-1} + KT 0.5 mg L^{-1} + NAA 0.2 mg L^{-1} + 2,4-D 0.2 mg L^{-1} 的培养基上,能产生较多的不定芽和愈伤组织;WPM + BA 1.5 mg L^{-1} + KT 0.5 mg L^{-1} + NAA 0.2 mg L^{-1} + IAA 1 mg L^{-1} 的培养基适合于芽增殖;在 1/2 MS + NAA 0.3 mg L^{-1} + IBA 0.2 mg L^{-1} 的培养基上,添加 15 g L^{-1} 活性炭有利于生根。

关键词:乐东拟单性木兰;茎段;组织培养;褐变控制

中图分类号:S722.3⁺7 **文献标识码:**A

木兰科(Magnoliaceae)植物以花大、美丽、清香著称于世,是世界著名的观赏园林绿化植物。我国是木兰科树种资源最丰富的国家。全世界共有 15 属 250 余种,其中我国自然分布有 11 属 130 多种。由于不少种类分布狭窄,采种困难等原因,致使该科植物的繁殖研究滞后,其中 30 多种被列为国家珍稀濒危植物^[1]。加强木兰科植物的保护和扩繁,特别是无性繁殖的研究受到广泛关注^[2]。由于常规无性繁殖方法(扦插、嫁接等)难度大,成活率低,研究组织培养快繁技术已受到高度重视,但是木兰科树种在生长旺盛季节含较多的酚类化合物^[3],此时取外植体组培极易产生褐变,严重影响组织培养的成功率,所以至今只有含笑属(*Michelia* L.)^[4,5]、木兰属(*Magnolia* L.)^[6~10]、和鹅掌楸属(*Liriodendron* L.)^[11~13]几个树种有报道。

乐东拟单性木兰(*Plarakermia lotongensis* (Chun et C. Tsoong) Law)是木兰科拟单性木兰属的重要常绿乔木,是我国的特有种。树形美观,叶革质,狭椭圆形,叶面暗绿色,叶背淡绿色,树干高大、笔直,材质优良,纹理细密,是优良的用材和绿化树种^[14]。本文以乐东拟单性木兰成龄树(18年生)为试材,研究组织培养和控制褐变的技术,通过诱导丛生芽与植株再生的方法,以期乐东拟单性木兰的快速繁殖提供一条有效途径,为木兰科其它树种的快繁提供参考。

收稿日期:2004-02-03

基金项目:科技部基础性工作专项子课题“亚热带珍贵经济树种资源收集、保存和利用”和亚热带林木培育实验室基金课题“难繁殖阔叶树种组织培养技术的研究”

作者简介:苏梦云(1942—),女,福建莆田人,研究员。

1 材料与方法

1.1 外植体及培养基

选取本所成龄(18年生)的乐东拟单性木兰,分别在4—5月份采取嫩枝,用洗洁精清洗,用流水冲洗1 h,沥干,切成长1 cm左右的茎段,每一个茎段带1腋芽,先后用体积百分数75%的乙醇处理10 s,1 g L⁻¹的氯化汞10 min灭菌,无菌水冲洗4次,吸干,接种到培养基上。以MS,1/2 MS和WPM为基本培养基。添加3种生长调节剂,即BA(质量浓度设0.5、1.0、1.5 mg L⁻¹),NAA(质量浓度设0、0.2、0.5 mg L⁻¹),2,4-D(质量浓度设0、1.0、2.0 mg L⁻¹),以4因素3水平进行正交设计试验(L₉3⁴)。培养基含蔗糖30 g L⁻¹、琼脂7.5 g L⁻¹,pH值5.8,培养温度25 ±1 ℃,每日照光12 h,光强度为1 500~2 000 lx,每个处理10瓶,每瓶接4个外植体(约0.5 cm ×0.5 cm)。

1.2 防褐化试验

分外植体处理、培养基加抗氧化物质和培养条件3种。外植体处理:在接种前作以下处理:(1)将采回的嫩枝用湿纱布包好在4 ℃下分别冷藏2 h和4 h后,切成茎段,灭菌;(2)将外植体在灭菌前先在1 g L⁻¹的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)溶液中分别浸1 h和2 h;(3)灭菌后的茎段在PVP溶液中切割,接种;(4)对照(按常规处理)。抗氧化试验:在培养基中分别加入二硫苏糖醇(0.5 mg L⁻¹)、巯基乙醇(1 mL L⁻¹)、抗坏血酸(10 mg L⁻¹)、PVP(1 g L⁻¹)和活性炭(1.5 g L⁻¹),并设对照。培养条件试验:培养条件分为3种:(1)对照(在25 ℃下,每天照光12 h);(2)遮光处理(在25 ℃下遮光15 d后,转入光下);(3)低温遮光处理(在15 ℃下遮光15 d后,转入25 ℃光下)。

1.3 生长调节剂组合试验

采用4种生长调节物质:BA(质量浓度为0.5、1.0、1.5 mg L⁻¹),KT(质量浓度为0、0.5、1.0 mg L⁻¹),NAA(质量浓度为0、0.2、0.5 mg L⁻¹),2,4-D(质量浓度为0、0.2、0.5 mg L⁻¹),进行正交设计(L₉3⁴)。以WPM为基本培养基,培养基中加入10 mg L⁻¹抗坏血酸。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对茎段初代培养的影响

为了选择适合的培养基和生长调节剂的组合配比,按试验要求,将外植体分别接种在9类培养基上,培养40 d统计外植体愈伤组织诱导和褐变情况(表1)。从表1可见,BA极差最大,其次是2,4-D和培养基,说明BA在诱导茎段愈伤组织形成的培养过程中是主导因素。3种培养基都可作为基本培养基,但以1/2MS和WPM培养基较为合适。根据分析,适合茎段初代培养的最佳理论配方为1/2 MS(或WPM) + BA 1.5 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + 2,4-D 1.0 mg L⁻¹。在初代培养中,外植体褐变的现象比较严重,对初代培养影响比较突出。

2.2 几种防褐化措施对控制外植体褐变的作用

组织培养过程中的褐变是指外植体在切割时酚类化合物外溢,通过自动氧化或酶催化形成褐色的醌类物质向培养基中扩散,使外植体褐变甚至死亡。为了寻求有效地控制褐变的方法,分别从外植体处理、在培养基中加入防止酚氧化物质及培养条件3个方面,进行了比较试验。培养基采用WPM + BA 1.5 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + 2,4-D 1.0 mg L⁻¹培养40 d统计防褐效果。

表 1 培养基及生长调节剂组合对初代培养的影响

处理	培养基	植物生长调节剂/(mg L ⁻¹)			褐变率/%	愈伤组织诱导率(X)/%	数值转换 $X = \sin^{-1} \sqrt{X}$
		BA	NAA	2,4-D			
1	MS	0.5	0	0	40.0	20.0	26.57
2	MS	1.0	0.2	1.0	35.0	50.0	45.00
3	MS	1.5	0.5	2.0	47.5	52.5	46.43
4	1/2MS	0.5	0.2	2.0	25.0	42.5	40.69
5	1/2MS	1.0	0.5	0	22.5	45.0	42.13
6	1/2MS	1.5	0	1.0	30.0	60.0	50.77
7	WPM	0.5	0.5	1.0	20.0	37.5	37.76
8	WPM	1.0	0	2.0	27.5	50.0	45.00
9	WPM	1.5	0.2	0	35.0	57.5	49.31
T ₁	118.00	105.02	122.34	118.01			T = 383.66
T ₂	133.59	132.13	135.00	133.53			T ² = 147 195.00
T ₃	132.07	146.51	126.32	132.12			
X ₁	39.33	35.01	40.78	39.34			
X ₂	44.53	44.04	45.00	44.51			
X ₃	44.02	48.84	42.11	44.04			
极差	5.20	13.83	4.22	5.17			

注:褐变率指褐变的外植体数占外植体总数的百分比;愈伤组织诱导率指形成愈伤组织的外植体占总数的百分比。表 2~5 同。

2.2.1 外植体处理对褐变的影响 接种前外植体防褐变预处理的试验结果见表 2。外植体预冷处理有一定的降低褐变率的效果,使褐变率从对照的 35%降低为 25%~27.5%。这可能与低温可以降低多酚氧化酶活性和减少酚类氧化有关^[15]。接种前在 PVP 溶液中切割外植体能减轻褐变,主要是 PVP 能及时除去外植体切割时分泌的酚类物质,防止氧化或酶催化。外植体用 PVP 溶液浸泡处理没有防褐变效果,这主要在浸泡处理后,切割外植体接种时,切口仍有酚类物质外溢。

2.2.2 几种防酚氧化物质对外植体褐变的影响 在培养基中加入抗氧化剂能明显的防止外植体褐变。在培养基中分别加入抗坏血酸(10 mg L⁻¹)、巯基乙醇(1 mL L⁻¹)和二硫苏糖醇(0.5 mg L⁻¹),外植体的褐变率从对照的 37.5%分别降低为 12.5%、17.5%和 25%,而且还不同程度地提高了愈伤组织的诱导率,但吸附剂活性炭和 PVP 的防止外植体褐变效果不明显(表 3)。

2.2.3 培养条件对控制褐变的影响 不少研究者证明,较高的培养温度能加速外植体褐变,而在弱光下培养有减缓外植体褐变的作用,但用不同树种试验所得的结果并不完全一致^[16]。乐东拟单性木兰在含有 BA 1.5 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + 2,4-D 1.0 mg L⁻¹ 和 10 mg L⁻¹ 抗坏血酸的 WPM 基本培养基上,经低温遮光条件预处理后,培养 40 d 褐变率下降 1/3,而遮光处

表 2 不同处理对控制外植体褐变的效果比较

处理	褐变率/%	愈伤组织诱导率/%	
冷藏	2 h	25.0	70.0
	4 h	27.5	72.5
PVP 溶液浸泡	1 h	35.0	65.0
	2 h	32.5	67.5
在 PVP 溶液中切割	27.5	70.0	
对照	35.0	65.0	

表 3 几种防酚氧化物质对控制褐变的效果比较

处理	褐变率/%	愈伤组织诱导率/%
二硫苏糖醇(0.5 mg L ⁻¹)	25.0	72.5
巯基乙醇(1 mL L ⁻¹)	17.5	82.5
抗坏血酸(10 mg L ⁻¹)	12.5	87.5
PVP(1 g L ⁻¹)	32.5	70.0
活性炭(1.5 g L ⁻¹)	35.0	67.5
对 照	37.5	62.5

理没有效果(表 4)。低温遮光处理能降低褐变率,这可能与低温可抑制酶活性、减少酚类氧化的作用有关^[15],而遮光处理没有明显效果,说明乐东拟单性木兰的外植体褐变对光不敏感。

2.3 不同生长调节剂对不定芽诱导和增殖的影响

为找出适当的生长调节剂组合,进行了该方面的组合试验。在 4 因素 3 水平的正交试验的 9 个组合中,以 WPM 为基本培养基(培养基中加入 10 mg L^{-1} 抗坏血酸),培养 60 d 进行统计。试验结果见表 5,处理 9、6、5 的不定芽的诱导率较高;从极差来看,BA 的极差最大,其次是 KT,说明细胞分裂素是诱导不定芽的主要因素。较高质量浓度的 BA 和 KT,有利于愈伤组织形成不定芽。添加适当的低质量浓度的 NAA 或 2,4-D 可提高诱导不定芽的速率,而质量浓度较高有利于形成新的愈伤组织。根据表 5 的试验结果分析可知,从愈伤组织诱导形成不定芽的最佳理论配方是:WPM + BA 1.5 mg L^{-1} + KT 0.5 mg L^{-1} + NAA 0.2 mg L^{-1} + 2,4-D 0.2 mg L^{-1} 。

表 5 不同生长调节剂组合对不定芽诱导的影响

处理	BA	KT	NAA	2,4-D	愈伤组织 诱导率/%	不定芽 X/ %	数值转换 $X = \sin^{-1} X$
1	0.5	0	0	0	25.0	2.5	9.10
2	0.5	0.5	0.2	0.2	75.0	32.5	34.79
3	0.5	1.0	0.5	0.5	87.5	15.0	22.79
4	1.0	0	0.2	0.5	80.0	30.0	33.21
5	1.0	0.5	0.5	0	65.0	50.0	45.00
6	1.0	1.0	0	0.2	80.0	52.5	46.43
7	1.5	0	0.5	0.2	80.0	32.5	34.76
8	1.5	0.5	0	0.5	90.0	47.5	43.57
9	1.5	1.0	0.2	0	87.5	55.0	47.87
T_1	66.68	77.07	99.10	101.97			$T = 417.41$
T_2	124.64	123.36	115.87	115.98			$T^2 = 174\ 231.11$
T_3	126.20	117.09	102.55	99.57			
X_1	22.23	25.69	33.03	33.99			
X_2	41.55	41.12	38.62	38.66			
X_3	42.07	39.03	34.18	33.19			
极差	23.19	15.43	5.59	5.47			

注:指增殖不定芽的外植体数占外植体总数的百分比。

不定芽的增殖:将初代培养所得的不定芽切割成单芽后,接种到含有不同生长调节剂的 WPM 培养基上,培养 50 d 后统计增殖结果。结果显示,在加入 IAA 的培养基上,芽丛生长较好,以 BA 1.5 mg L^{-1} + KT 0.5 mg L^{-1} + NAA 0.2 mg L^{-1} + IAA 1 mg L^{-1} 的组合较为合适,增殖倍数为 4.1 倍(表 6)。

2.4 根诱导培养

将继代培养的不定芽长至 2.5 cm 左右时,进行根诱导培养。培养基为 3 种:(1) 1/2 MS +

表 4 低温和遮光处理对褐变控制的效果

处理	褐变率/%	愈伤组织诱导率/%
对照	15	85
遮光处理	15	70
低温遮光处理	10	75

表 6 生长调节剂对不定芽增殖的影响

生长调节剂组合及其质量浓度/(mg L^{-1})	不定芽/ %	增殖 倍数
BA 1.5 + KT 0.5 + NAA 0.2	55.0	3.8
BA 1.5 + KT 0.5 + NAA 0.2 + 2,4-D 0.2	52.5	3.6
BA 1.5 + KT 0.5 + NAA 0.2 + IAA 0.5	57.5	3.9
BA 1.5 + KT 0.5 + NAA 0.2 + IAA 1.0	60.0	4.1
BA 1.5 + KT 0.5 + NAA 0.2 + IAA 1.5	55.0	3.7

NAA 0.5 mg L⁻¹; (2) 1/2 MS + IBA 0.5 mg L⁻¹; (3) 1/2 MS + NAA 0.3 mg L⁻¹ + IBA 0.2 mg L⁻¹, 每种培养基均加入 15 g L⁻¹的活性炭。结果表明,以 1/2 MS + NAA 0.3 mg L⁻¹ + IBA 0.2 mg L⁻¹的效果较好,培养 40 d,开始生根。

3 小结与讨论

木本植物的组织培养比草本植物困难得多,主要是木本植物含有较多的酚类化合物。在外植体切割时,酚类化合物溢出并氧化成褐色醌类物质,使外植体褐变,甚至造成死亡^[16]。特别是在生长旺盛季节酚类化合物含量增加,多酚氧化酶活性明显提高,极易产生褐变^[3]。所以不少研究指出,能否有效地控制褐变是植物组织培养能否成功的关键^[17,18]。根据已报道的木兰科植物组织培养资料看,都存在着不同程度的褐变现象。一般采取加入抗氧化剂^[13]或活性炭^[5],或采取及时转接^[9]等措施控制褐变,但在乐东拟单性木兰的组织培养中,外植体的褐变现象比较突出,即使及时转接,还会产生褐变,所以作者认为用乐东拟单性木兰茎段,特别是用成龄树嫩枝的茎段作外植体进行组织培养能有效地控制褐变。本文通过对外植体进行冷处理和接种后先在 15℃ 培养 15 d,可使褐变率明显降低,这与冷处理可降低酶活性有关。在培养基中加入抗氧化剂,有明显的防褐化效果,以加入抗坏血酸的效果最佳,这与杂交鹅掌楸(*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. × *L. tulipifera* L.)中的结果相同^[13]。吸附剂可吸附外植体分泌的酚类物质,防止其氧化从而减少褐变^[19],但在培养基中分别加入活性炭和 PVP,对乐东拟单性木兰组培的防褐化效果不太明显,这可能是不同树种间及外植体取材上存在的差异。在愈伤组织继代培养时,加 0.2 mg L⁻¹ 2,4-D 有利于增殖,这与深山含笑(*Michelia maudiae* Dunn)相同^[5]。在不定芽增殖培养时,加入 1 mg L⁻¹ IAA 有利于丛芽生长。

参考文献:

- [1] 傅立国,金鉴明. 中国植物红皮书(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1992. 404~455
- [2] 黎明,马焕成. 木半科植物无性繁殖研究概况[J]. 西南林学院学报,2003,23(2):92~96
- [3] Biederman E C. Factors affecting establishment and development of *Magnolia hybrids* in vitro[J]. Acta Hort, 1987, 212:625~629
- [4] 柳蔓琼,梁士观. 火力楠茎段组织培养[J]. 植物生理学通讯,1985(1):37
- [5] 曾宋君,彭晓明,曾庆文. 深山含笑组织培养和快速繁殖[J]. 热带亚热带植物学报,2000,26(4):23~26
- [6] 黎京度,余诗群. 二乔木兰茎段培养完整植株[J]. 植物生理学通讯,1988(5):49~50
- [7] Merkle S A, Wiecho A T. Somatic embryogenesis in three *Magnolia* species[J]. Amer Hort Sci, 1990, 115(5):858~860
- [8] Merkle S A, Watson-Pauley B A. Regeneration of begleaf *Magnolia* by somatic embryogenesis[J]. Hortsci, 1993, 28(6):473~479
- [9] 张林. 广玉兰组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,1992,28(4):285
- [10] 刘贤旺,杜勤,赖学文,等. 凹叶厚朴组织培养的研究[J]. 江西林业科技,1997(2):1~4
- [11] Merkle S A. Somatic embryogenesis in tissue culture of *Liriodendron tulipifera*[J]. Can For Res, 1986, 16:420~422
- [12] 刘根林. 杂交鹅掌楸组织培养技术研究初报[J]. 江苏林业科技,2000,27(6):24~26
- [13] 陈金慧,施季森,诸葛强. 杂交鹅掌楸的不定芽诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯,2002,38(5):459
- [14] 福建省科学技术委员会,福建植物志编写组. 福建植物志(第二卷)[M]. 福州:福建科学技术出版社,1985. 68~69
- [15] Hildebrandt V, Hamey P M. Factors affecting the release of phenolic exudates from explants of *Pelargonium hortorum* Bailey 'Sprinter Scarlet'[J]. J Hort Sci, 1988, 96(4):651~657
- [16] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯,1999,35(6):501~506
- [17] Debergh P C, Read P E. Micropropagation[A]. In: Debergh P C, Zimmerman R H. Micropropagation[M]. Kluwer Academic Publishers, 1991. 1~13

- [18] 孔祥生,张妙霞,杜玲,等.甜柿离体快繁技术研究[J].华中农业大学学报,1998,17(2):178~186
[19] 刘用生,李友勇.植物组织培养中活性炭的使用[J].植物生理学通讯,1994,30(3):214~217

A Study on Techniques of Inducing Callus and Controlling Browning of Stem Segments of *Parakmeria lotongensis*

SU Mengyun, JIANG Jingmin

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: Techniques of controlling browning and tissue culture on stem segments of young branches on mature trees of *Parakmeria lotongensis* were researched. Results obtained showed that 1/2 MS medium and WPM medium were more suitable to tissue culture of *Parakmeria lotongensis*. A lot of callus were induced on WPM medium containing BA 1.5 mg L⁻¹, NAA 0.2 mg L⁻¹ and 2,4-D 1.0 mg L⁻¹. A large number of adventitious buds and some calluses induced from calluses were observed on WPM medium supplemented with BA 1.5 mg L⁻¹, KT 0.5 mg L⁻¹, NAA 0.2 mg L⁻¹ and 2,4-D 0.3 mg L⁻¹. The medium of WPM + BA 1.5 mg L⁻¹ + KT 0.5 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + IAA 1.0 mg L⁻¹ was fit to shoot proliferation. Plantlets rooted well on 1/2 MS medium containing NAA 0.3 mg L⁻¹ and IBA 0.2 mg L⁻¹ with 1.5 percent active charcoal. The effects of antioxidant on controlling oxidative browning was better than that of adsorbent. There were difference among various antioxidants on controlling browning. Their capacities of preventing browning were as follows: ascorbic acid (vitamin C) > β -mercapto ethanol > dithiothreitol. Effects of polyvinylpyrrolidone (PVP) and active charcoal on preventing browning were not obvious. Oxidative browning rates of explants on WPM medium supplemented with ascorbic acid (10 mg L⁻¹), β -mercapto ethanol (1 mL L⁻¹) and dithiothreitol (0.5 mg L⁻¹) were 67%, 53% and 33% lower than that of without any antioxidant in initial culture and subculture. The treatment that explants were put for 2 h at 4 °C before inoculation favor the decreasing browning, explants browning rate decreased from 35% (CK) to 25%.

Key word: *Parakmeria lotongensis*; stem segment; tissue culture; controlling of browning