

软枣猕猴桃组织培养过程中外植体褐变的防止

刘延吉¹, 任飞荣^{1,2}

(1. 沈阳农业大学 农学院 辽宁 沈阳 110116; 2. 沈阳农业大学 生物技术科学院, 辽宁 沈阳 110116)

摘要:以软枣猕猴桃带芽茎段为试材, 对其分化过程中褐变现象进行研究。经多次试验初步表明: 接种 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.01 mg · L⁻¹+聚乙烯吡咯烷酮(PVP)3%的培养基, 每隔 10~15 d 转换 1 次培养基可有效控制褐变并保持植株正常生长。

关键词: 组织培养; 外植体; 抑制褐化; 抗氧化剂; 诱导

中图分类号: S 663.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)11-0175-03

外植体褐化是指在进行组织培养时, 从植物体上切取的组织切段中, 多酚氧化酶被激活, 催化酚类物质生成棕褐色的醌类物质, 抑制其它酶的活性, 以致培养的外植体受到毒害死亡^[1]。

软枣猕猴桃 (*Actinidia arguta* Planch.) 新品种——“魁绿”(品系号 8025)^[2], 是吉林省集安县复兴林场 1980 年选自野生软枣猕猴桃, 系猕猴桃科猕猴桃属多年生草本植物^[3], 果实含有 B 族维生素、氨基酸、类胡萝卜素及镁、铁、钾、钠等多种营养成分, 对高血压、心绞痛、高血脂等症有一定的疗效。经济价值高、发展前途广^[4]。由于软枣猕猴桃是雌雄异株。种子实生苗发生高度分离, 且约有 70% 为雄株。用传统的嫁接法和扦插法, 由于枝条数量有限, 短期内难以繁殖大批苗木。而用组织培养法快速繁殖软枣猕猴桃比较理想^[5]。但在进行其离体快繁的过程中, 常出现初代培养中外植体褐化现象, 且已经成为软枣猕猴桃离体快繁的主要障碍。试验拟在培养基中加抗氧化剂, 或用抗氧化剂处理外植体^[6]、改变转瓶周期以及使用不同激素培养等方法防止外植体褐化, 比较各处理的效果, 并且研究不同枝芽着生部位褐化的难易, 找出软枣猕猴桃组织培养过程中防止褐化的最佳条件, 具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

软枣猕猴桃新品种——“魁绿”。

1.2 试剂

Vc 间苯三酚、20% 硫代硫酸钠、水解乳蛋白 LH、活性碳 AC、PVP。6-BA (6(卞氨基)嘌呤, Benzy laminopurine)、NAA (α-萘乙酸 α-Naphthalene acetic acid)、IAA (吲哚乙酸, 3-Indoleacetic acid)。试验所用的试剂除了蔗糖

和琼脂粉为化学纯, 其他均为分析纯。

1.3 方法

前期工作发现, 基本培养基 MS 最佳, 所以以此培养基为基础, 添加不同浓度抗氧化剂、抑制剂、吸附剂 (Vc、间苯三酚、20% 硫代硫酸钠、水解乳蛋白 LH、活性碳 AC、PVP); 不同浓度植物生长调节剂 (6-BA、IAA、NAA), 上述培养基均加入 2.5% 蔗糖和 0.7% 琼脂, pH 5.8~6.0。培养温度为 23~26 ℃, 光照时间为 12 h/d, 光强 34 mol · m⁻² · s⁻¹。取着生不同部位的枝芽分别接种 (软枣猕猴桃枝条一般为 12~14 个芽, 将枝条上部 1~6 芽称上部芽, 第 6 个芽以下称下部芽、顶部为茎尖); 接种后, 分别 10 d、20 d、30 d 转 1 次瓶。接种 10 d 观察褐化情况, 统计褐化率, 接种 20 d 后观察分化情况, 并统计开叶率。

2 结果分析

2.1 不同抗氧化剂处理对外植体分化及褐化的影响

表 1 不同抗氧化剂处理对外植体分化及褐化的影响

处理	浓度	接种数/个	褐化率/%	开叶率/%
活性炭	0.2—0.5 mg · L ⁻¹	50	14.0	34.4
PVP	0.1%—0.5%	50	16.5	80.2
Na ₂ S ₃ O ₂ (20%)	0.5—2.5 mL	50	40.1	59.0
柠檬酸	0.05—0.1 mg · L ⁻¹	50	38.0	48.0
Vc	0.1—0.3 mg · L ⁻¹	50	43.0	47.0
间苯三酚	0.005—0.01 mg · L ⁻¹	50	53.0	53.4
水乳蛋白	0.01—0.05 mg · L ⁻¹	50	72.0	49.8
PVP 处理试材	0.1%—0.5%	50	15.1	79.6
对照	—	50	32.7	40.3

注: 褐化情况为外植体接种 10 d 后的观察结果, 开叶率为外植体接种 20 d 后观察结果。

以接种培养 10 d 的褐化率衡量各处理抗褐化效果, 鉴定各处理对外植体生长的副作用, 结果列于表 1。在培养基中加活性炭、PVP、Na₂S₃O₂、柠檬酸、Vc、间苯三酚、水乳蛋白以及用 PVP 处理外植体, 都具有抗褐化效果。其中, 以加活性炭、PVP 和 PVP 处理外植体 3 个处

第一作者简介: 刘延吉, 博士, E-mail: yanjiliu@yahoo.com.cn.
收稿日期: 2007-05-24

理的褐化率最低。培养 10 d 的褐化芽数约比对照降低 66.7%。但是,活性炭对茎叶生长有抑制作用。因此,PVP 对防止猕猴桃组织培养培养过程中外植体褐化的效果较好。

2.2 不同浓度植物生长调节剂对外植体分化及褐化的影响

在添加 PVP 培养基中添加不同种类和浓度的生长调节剂,对外植体的生长和褐化影响不同(表 2、3)。由表 2 可以看出,随 6-BA 浓度的升高,褐化率随之增高,开叶率降低,褐化反应时间也提早,先是出现丝状物,以后逐渐扩散,最终停止生长或死亡;植株分化生长缓慢,茎细而脆弱,水浸状,颜色失绿,逐渐呈暗灰色。较低浓度的 6-BA 适宜外植体的分化生长,褐化反应慢,部分已无明显的褐化现象,少部分只是产生絮状物,无碍于外植体分化生长,生长周期也较长,分化倍率较高,茎较粗稍短,但 6-BA 浓度太低抑制茎叶生长,添加 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA,20 d 的开叶率比添加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 的低 50%。添加 IAA、NAA 的组合中,褐化反应时间稍推迟,褐化程度降低,培养基有絮状物产生,此现象可维持一段时间。试验表明 采用 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.01 mg · L⁻¹+PVP 3% 的培养基 可有效控制褐变并保持植株正常生长。

表 2 6-BA 对外植体褐化的影响			
6-BA 的浓度/mg · L ⁻¹	褐化率/%	褐化程度	开叶率/%
0.0	13.2	++	20.0
0.5	14.0	++	40.0
1.0	13.0	++	80.0
3.0	48.0	+++	32.5
5.0	70.6	++++	14.0

注 褐化情况为外植体接种 10 d 后的观察结果(用“+”表示褐化程度“+”多表示褐化程度高)。

表 3 不同浓度植物生长调节剂对外植体分化褐化的影响

生长调节剂处理组合/mg · L ⁻¹	褐化率/%	褐化程度	开叶率/%
6-BA1.0+IAA0.01	70.0	+	34.0
6-BA1.0+NAA0.01	35.0	+	87.0
6-BA1.0+IAA0.03	56.0	++	40.0
6-BA1.0+NAA0.02	43.7	++	57.8

注 褐化情况为外植体接种 10 d 后的观察结果,开叶率为外植体接种 20 d 后观察结果

2.3 枝芽着生位置对外植体褐化的影响

结果显示,用室内活化后的冬芽作外植体时,褐化率,上部芽为 48%,下部芽为 12%,茎尖为 65%。枝条下部芽充实饱满,芽径大于上部芽。因此,可以认为芽的着生位置和大小对外植体褐化有影响。

2.4 转瓶周期对外植体的分化及褐化的影响

转瓶时间也是影响分化生长及褐变的重要因子。在试验中,10 d 转瓶 1 次,植株色泽正常,茎生长正常,培养基中无浑浊物产生;20d 转瓶 1 次,植株色泽较暗淡,培养基有丝状或浑浊物产生,这是植物分泌的酚类等有害物质;30 d 转瓶 1 次,植株色泽暗灰,生长缓慢,培养基较为浑浊,植株基部产生絮状物向四周逐渐扩散。由此可见,对于易褐变的材料,若接种后转瓶周期时间长,伤口周围积累酚类物质增多,会加重褐变。结果表明,10 d 转瓶 1 次,既不影响茎生长分化,又可有效抑制褐变。

3 讨论与结论

试验是针对软枣猕猴桃组培中产生褐变的外因进行的研究。通过添加抗氧化剂、抑制剂、吸附剂,筛选最为适合的抗褐化成分。结果表明,添加 3% 聚乙烯吡咯烷酮能有效抑制褐化且不影响植株生长,硫代硫酸钠、Vc 或间苯三酚抑制褐化效果不显著。在培养基中加入抗氧化剂可改变外植体周围的氧化还原电势,从而抑制酚类氧化,减轻褐变。抗氧化剂种类很多,效果有所不同,在软枣猕猴桃组织培养过程中聚乙烯吡咯烷酮效果较好,而活性碳是一种吸附剂,在抑制褐变的同时有一定副作用,即吸附有毒酚类的同时,也会吸附培养基中的生长调节剂,有碍植物的生长^[7]。

植物生长调节剂不同浓度对软枣猕猴桃生长及褐变有一定影响^[8],高浓度细胞分裂素刺激酚类产生,而生长素 NAA 及 IAA 能够延缓多酚合成,减轻褐变。试验证明 6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.02 mg · L⁻¹ 浓度配比比较适宜软枣猕猴桃生长。同时,适当缩短转瓶周期可减少伤口周围酚类物质积累,减轻褐变。枝芽不同着生位置对褐化影响较大,下部芽比较壮,不易褐化。

参考文献

[1] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[J]. 北京: 高等教育出版社 1986: 456—466.
[2] 刘慧涛, 张冰冰, 吕耀双. 东北地区野生猕猴桃资源现状及开发利用[J]. 河北林业研究 1999 14(4): 326-329.
[3] 王晓东. 软枣猕猴桃利用与栽培[J]. 特种经济动植物 2006(2): 33.
[4] 黄贞光, 谭素英. 木本植物组织培养及应用[M]. 高等教育出版社 1986: 432-443.
[5] 江苏医学院. 猕猴桃梨[M]. 中药大词典(下册)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
[6] 宋平, 沈丙辉. 活性炭培养基对棉花愈伤组织诱导的效果[J]. 植物生理学通讯, 1988(5): 47-48.
[7] Maria Victoria Gonzalez etc. plant regeneration from Petioles of Kiwi fruit microshoots[J]. Hortsciencs 1995 30(6): 1302-1303.
[8] Matkowski A, Przywara L. Callus induction and plant regeneration in vitro in Actinidia[J]. Acta Societatis Botanicum Poloniae 1995 64(2): 131-138.

香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆及其正义反义表达载体的构建

李 涵¹, 张 婷¹, 张 颢¹, 李树发¹, 姚有林², 于丽霞², 鄢 波¹

(1. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明, 650205; 2. 西南林学院 植物保护学院, 云南 昆明 650205)

摘 要: 利用在 Genbank 上已报道的香石竹 ACC 氧化酶(ACO)基因的 cDNA 序列设计特异引物,以香石竹品种‘MASTER’的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,克隆香石竹 ACC 氧化酶(ACO)基因。测序结果显示,克隆基因的序列与报道序列完全一致。将克隆的 ACC 氧化酶(ACO)基因分别连接到植物表达载体 PBI121 启动子 CaMV 35S 的上游及下游,构建香石竹 ACC 氧化酶(ACO)基因的正义表达载体 PBI121-ACO 及反义表达载体 PBI121-anti ACO。经 PCR 鉴定,基因已成功构建到表达载体上。为香石竹抗衰老基因工程育种奠定了基础。

关键词: 香石竹;ACC 氧化酶基因;正义反义表达载体

中图分类号: S 681.5; Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)11—0177—03

香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)是世界四大鲜切花之一。其切花在瓶插过程中自身释放的乙烯促进了花瓣衰老,并呈加速老化趋势,故香石竹切花的保鲜在鲜切花产业中显得尤为重要^[1]。基因工程技术的发展,为乙烯敏感型花卉瓶插寿命改良提供了一个新的可能途径。

1 材料与方法

1.1 材料

香石竹品种‘MASTER’采自云南省农业科学院花卉所;质粒载体 pMD18-T Vector、Taq DNA polymerase、dNTPs、限制性内切酶等连接试剂盒购自 TaKaRa

公司;总 RNA 提取试剂盒(RNArose LS Reagent)购自上海华舜生物工程有限公司;M-MLV (RNase H⁻)RTase (逆转录酶)购自 TOYOBO 公司;PCR 产物回收纯化试剂盒、B 型质粒小样快速提取试剂盒等购自 BioDev-Tech 公司;常用的化学试剂均为国产分析纯试剂;PBI121、E.coli DH5α由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 香石竹花瓣总 RNA 的提取及电泳分析 RNA 的提取采用上海华舜生物工程有限公司的 RNArose LS Reagent 总 RNA 提取试剂盒,步骤按产品使用说明进行。RNA 电泳采用甲醛凝胶电泳。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 采用 20 μL 反应体系。0.5 mL Eppendorf 管加入 9 μL RNA (约 1 μg)、RNase-free DEPC H₂O 3.5 μL、oligo(dT)₁₀ (2 μg/μL)0.5 μL、5× first strand buffer 4 μL、RNase Inhibitor (30 u/μL) 1 μL、M-MLV RTase (30 u/μL) 1 μL、dNTPs (2.5 mM) 1 μL。42 ℃反应 60 min,置于-20 ℃备用。

Study on Browning Control in Tissue Culture of *Actinidia arguta* Planch.

LIU Yan-ji¹, REN Fei-rong^{1,2}

(1. College of Agronomy, Shengyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 11016 China;
2. Bio-technical College Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110116 China)

Abstract: Experiment was aimed at studying the problem of browning control during the stem segment with buds culture of *Actinidia arguta* Planch.. Results showed that the best way for the browning control of explanted tissue is that the explants of *Actinidia arguta* Planch. were cultured in MS, added with 6-BA (0.1 mg · L⁻¹), NAA (0.02%) and PVP (3%). And the subculture plantlets were transplanted on the same medium at intervals of 10-15 d.

Key words: Tissue culture; Explants; Browning control; Antioxidant; Induction