

甘蓝组织培养中防止外植体褐化的研究

李然红¹, 于丽杰², 李晓东¹

(1. 牡丹江师范学院 生物系, 黑龙江 牡丹江 157012; 2. 哈尔滨师范大学 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:以中甘 11 号为试验材料, 探讨基本培养基(MS、1/2MS)、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、Vc(抗坏血酸)、硝酸银、母株预处理对褐化防止的有效性。结果表明: 基本培养基为以 1/2MS 时, 外植体褐化减轻, 与 MS 培养基比差异显著。抗氧化试剂抑制褐化的作用明显, PVP 对褐化的抑制作用与对照比差异显著。外植体采取前对母株进行遮光处理有利于抑制褐化, 且效果明显。

关键词: 甘蓝; 组织培养; 褐化

中图分类号: S 635; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0096-04

植物组织培养是生物技术的一个重要组成部分, 已知能在离体条件下分化芽, 得到小植株而且有快速繁殖能力的植物已有 1 000 种以上。但在植物初代培养和继代培养中经常发现外植体或培养物的褐化、枯死现象, 对诱导外植体的脱分化和再分化产生严重影响, 以致对一些植物的组织培养能否取得成功起着决定性作用^[1]。

褐化是指外植体在培养过程中, 自身组织从表面向培养基释放褐色物质, 以致培养基逐渐变成褐色, 外植体也随之进一步变褐而死亡的现象^[2]。褐化的影响因素是复杂的, 随植物种类、基因型、外植体的部位及生理状况和培养条件的不同而危害的程度有所不同^[3-4]。

甘蓝(*Brassica oleracea* L.)为十字花科芸苔属 2 a 生草本植物。甘蓝在组织培养过程中的褐化问题直接影响着甘蓝外植体的分化。该试验旨在通过不同组培试验处理的比较, 探讨克服甘蓝外植体褐化的方法, 为建立优良的甘蓝再生体系提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甘蓝种子(中甘 11 号)购于牡丹江市种子公司。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将供试品种的种子在 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中消毒 4.5 min, 无菌水冲洗 6 次后接种于不含任何激素的 MS 培养基(pH 5.8, 7 g/L 琼脂粉, 3%蔗糖)

糖)上, 黑暗条件下萌发 2 d, 再转移到 25℃, 光照强度 6 000 lx, 16 h 光照, 8 h 黑暗条件下继续培养 4 d, 取下胚轴和带柄子叶为外植体。

1.2.2 试验处理 基本培养基对外植体褐化的影响: 将外植体接种到分别以 MS、1/2MS 为基本培养基并附加 6-BA 4.5 mg/L 和 NAA 0.01 mg/L 的培养基中培养, 观察外植体状态。抗氧化剂对外植体褐化的影响: 分别在基本培养基(MS+NAA 0.01 mg/L+6-BA 4.5 mg/L)中添加不同浓度的 PVP 和 Vc, 各处理浓度见表 2、3。观察外植体的褐化情况。母株预处理对外植体褐化的影响: 按照 1.2.1 的方法接种后, 将种子放置在光照强度 6 000 lx, 16 h 光照, 8 h 黑暗条件下培养 4 d, 然后将甘蓝母株放置在 20℃、遮光条件下继续培养 2 d, 切取外植体, 接到 MS+NAA 0.01 mg/L+6-BA 4.5 mg/L 的培养基中培养, 以自然光强下取得的 6 d 苗龄的甘蓝外植体作为对照。硝酸银对外植体褐化的影响: 分别在 MS+NAA 0.01 mg/L+6-BA 4.5 mg/L 中添加不同浓度的 AgNO₃, 各处理浓度见表 4。观察外植体的褐化情况。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对外植体褐化的影响

由表 1 的试验数据可知, 2 种培养基培养外植体的过程中均有褐化现象发生, MS 培养基上外植体褐化的情况比较严重, 外植体呈严重的黑褐色; 1/2MS 培养基上的外植体褐化情况比较轻, 外植体呈浅褐色。试验数据经卡方独立性检验, 表明不同基本培养基对甘蓝带柄子叶褐化的影响差异显著, 对甘蓝下胚轴褐化的影响差异极显著。

2.2 PVP 和 Vc 对外植体褐化的影响

在 MS+NAA 0.01 mg/L+6-BA 4.5 mg/L 培养基中加入不同浓度的 PVP 和 Vc, 与不加 PVP 和 Vc 比较。抗氧化剂对外植体褐化的抑制作用列于表 2、3。经卡方

第一作者简介: 李然红(1981-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为基因工程。E-mail: swxlrh@126.com。

通讯作者: 于丽杰(1961-), 女, 博士, 教授, 现从事植物分子生物学的教学与科研工作。E-mail: yulijie1961@126.com。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014); 哈尔滨市学科后备带头人基金资助项目(0071007002); 黑龙江省教育厅科学基金资助项目(11511122)。

收稿日期: 2009-06-10

独立性检验, 结果表明, PVP 和 Vc 对外植体褐化的影响均达到差异极显著。加入 PVP 或 Vc 后外植体褐化状况有明显的改善。在克服褐化方面 PVP 的效果更加明显, 但 PVP 和 Vc 都不足以完全克服褐化。

表 1 基本培养基对外植体褐化的影响

浓度 (W/V)	褐化数		未褐化数		总数		褐化率/%	
	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶
MS	30	35	20	15	50	50	60. 0	70. 0
1/2MS	18	20	32	30	50	50	36. 0	40. 0
总数	48	55	52	45	100	100	$\chi^2=5. 769^*$	$\chi^2=9. 09^{**}$

注 $\chi^2_{0.05,1}=3. 841$ $\chi^2_{0.01,1}=6. 635$

表 2 PVP 对外植体褐化的影响

浓度 (W/V)	褐化数		未褐化数		总数		褐化率/%	
	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶
CK	30	35	20	15	50	50	60. 0	70. 0
0. 05%	8	9	42	41	50	50	16. 0	18. 0
0. 1%	7	8	43	42	50	50	14. 0	16. 0
总数	45	52	105	98	150	150	$\chi^2=32. 197^{**}$	$\chi^2=41. 384^{**}$

注 $\chi^2_{0.01,2}=9. 210$

表 3 Vc 对外植体褐化的影响

浓度 /mmol · L ⁻¹	褐化数		未褐化数		总数		褐化率/%	
	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶
CK	30	35	20	15	50	50	60. 0	70. 0
0. 1	11	10	39	40	50	50	22. 0	20. 0
0. 2	8	8	42	42	50	50	16. 0	16. 0
0. 3	13	14	37	36	50	50	26. 0	28. 0
总数	62	67	138	133	200	200	$\chi^2=27. 40^{**}$	$\chi^2=41. 54^{**}$

注 $\chi^2_{0.01,3}=11. 345$

2. 3 不同 AgNO₃ 浓度对分化率的影响

由表 4 的试验数据可见, 接种于含有硝酸银的分化培养基上的外植体(10 ~ 40 μmol/L)的褐化率均低于对照组外植体(AgNO₃ 含量为 0)的分化率。上述数据经 χ^2 独立性检验, 不同的 AgNO₃ 处理浓度对带柄子叶和下胚轴外植体褐化率的影响差异均达到极显著。

培养于含有 AgNO₃ 的培养基上的外植体, 其褐化状况被明显的改善, 并且外植体的褐化率随着硝酸银浓度的增加有先降低后升高的趋势。当 AgNO₃ 浓度为 20 μmol/L 时, 带柄子叶和下胚轴的褐化率均达最低, 此时带柄子叶的褐化率为 39. 4%, 下胚轴分化率为 31. 2%。

表 4 不同浓度 AgNO₃ 对外植体分化率的影响

AgNO ₃ 浓度 /μmol · L ⁻¹	褐化数		未褐化数		总数		褐化率/%	
	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶
0	19	23	13	10	32	33	59. 4	69. 7
10	13	15	19	18	32	33	40. 6	45. 5
20	10	13	22	20	32	33	31. 2	39. 4
30	16	14	16	19	32	33	50. 0	42. 4
40	18	17	14	16	32	33	56. 2	51. 5
总数	76	82	84	83	160	165	$\chi^2=6. 89^{**}$	$\chi^2=7. 66^{**}$

注 $\chi^2_{0.01,1}=6. 635$

2. 4 母株预处理对外植体褐化的影响

由表 5 可知, 采用自然光强下的母株为材料时, 下胚轴和带柄子叶褐化率均在 60% 以上, 外植体色泽为淡

褐色或褐色; 而采用遮光培养预处理母株时, 带柄子叶和下胚轴褐化率仅为 30% 左右, 褐化程度也较轻, 色泽略有变化。

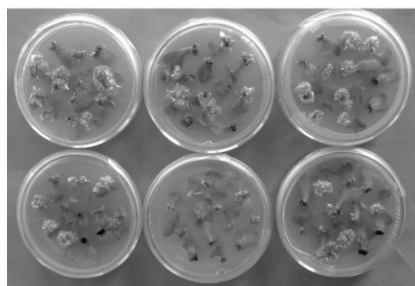
表 5 母株预处理对外植体褐化的影响

处理	褐化数		未褐化数		总数		褐化率/%	
	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶	下胚轴	带柄子叶
自然光强	32	35	18	15	50	50	64. 0	75. 0
遮光处理	16	17	34	33	50	50	32. 0	34. 0
总数	48	52	52	48	100	100	$\chi^2=10. 256^{**}$	$\chi^2=12. 981^{**}$

注 $\chi^2_{0.01,1}=6. 635$



图1 褐化的外植体

图2 AgNO_3 对带柄子叶褐化的影响

注: AgNO_3 的浓度上排由左至右为 20、30、40 $\mu\text{mol/L}$, 下排由左至右 20、0、10 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 讨论

3.1 基本培养基对外植体褐化的影响

选择合适的培养基是防止褐化的有效手段之一。从该试验结果来看,以甘蓝下胚轴和带柄子叶作为外植体诱导愈伤组织时,1/2MS 和 MS 培养基中的外植体都产生了褐化情况,但褐化的程度有所不同,MS 培养基中的外植体褐化程度较为严重,呈现黑褐色,而 1/2MS 培养基中的外植体则呈较轻的浅褐色。这主要与其无机盐离子浓度高低有关。基本培养基中无机盐的种类和浓度的选择对外植体生长的影响很大,培养基中的无机物可能是一些氧化酶合成及进行生理生化作用所必需的。浓度过高的无机盐可以引起外植体酚类外溢进而发生氧化,促进褐化的发生。因此,盐分越大,褐化程度越高。大量试验结果表明,同种外植体在不同培养基上产生褐变的程度不同^[3]。该试验说明 1/2MS 要比 MS 的培养效果好,基本培养基对外植体褐化产生了一定的影响。

3.2 PVP 和 Vc 对外植体褐化的影响

培养基中加入抗氧化剂可改变外植体周围的氧化还原反应,从而抑制酚类物质氧化,减轻褐变。抗氧化剂种类很多,不同的抗氧化剂抑制褐变的效果有所不同;同一种抗氧化剂在不同培养基中效果也不同,前人的资料中一般认为抗氧化剂在液体培养基比在固体培养基中效果好。在接种前,用抗氧化剂浸泡外植体一定时间,能收到一定效果,但浸泡时间过长褐变反而加重,因为抗氧化剂对外植体有一定毒害作用。

该试验中对 PVP 和 Vc 对褐化的影响做了纵向比

较,同时也对不同氧化剂的不同浓度进行了横向的比较。结果表明,加入抗氧化剂能明显改善外植体的褐化状况。PVP 浓度为 0.05% (W/V) 时,下胚轴褐化率为 16%,带柄子叶褐化率为 18%;PVP 浓度 0.1% (W/V) 时,下胚轴褐化率为 14%,带柄子叶褐化率为 16%,二者差异不显著。但 PVP 的浓度过高会对外植体产生一定的伤害,因此 PVP 的浓度的确定还要考虑外植体对其的耐受情况,其浓度要在一定范围之内。 Vc 也能明显改善外植体的褐化状况,但效果不如 PVP 显著。不同浓度的 Vc 对褐化的影响不同^[4],从表 3 中可以看出随 Vc 浓度的增加,外植体褐化情况有先减轻,后增加的现象。

3.3 AgNO_3 对外植体褐化的影响

一般认为,在 MS 培养基中添加硝酸银对芽再生的促进作用与促进多胺的形成有关。因为多胺能促进体细胞胚胎以及愈伤组织不定芽的发生,而乙烯与多胺存在着竞争共同的前体 SAM (S-腺苷甲硫氨酸) 的关系,当在培养基中添加硝酸银后,由于乙烯的生物合成受到抑制,降低了对多胺合成的共同前体 SAM 的竞争,从而促进了多胺的合成。

现参考高武军^[7]等的经验,在培养基中添加 10~40 $\mu\text{mol/L}$ 的 AgNO_3 , 均能显著提高外植体芽的再生率,明显减轻外植体褐化状况。当硝酸银浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,无论是带柄子叶还是下胚轴均达到最低褐化水平,分化率有一定的提高。之后,随着硝酸银浓度的增加,外植体褐化率上升,说明高浓度的硝酸银对外植体有一定的毒害作用。

3.4 母株预处理对外植体褐化的影响

在取外植体之前,对母株进行遮光处理,对防止褐变很有效果。从表 5 中可以看到,采用自然光强下的母株带柄叶柄为材料时,褐化率为 75%,外植体呈淡褐色或褐色。而采用遮光培养母株带柄子叶为材料时,褐化率仅为 34%,褐化程度也较轻,色泽略有变化。这说明对母株进行预处理对褐化产生的影响还是较大的。

参考文献

- [1] 陈菲,李黎,宫伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].北方园艺,2005(2):69-72.
- [2] 曾镭,刘燕.植物组织培养中褐化问题的研究进展[J].安徽农学通报,2007,14(13):49-50.
- [3] 王栋,买合木提·克衣木,王永雄,等.植物组织培养中的褐化现象及其防止措施[J].黑龙江农业科学,2008(1):7-10.
- [4] 杜建中,王景雪,孙毅,等.影响芸苔属植物(*Brassica*)组织培养过程中外植体褐化的因素[J].山西农业科学,2004,32(1):29-32.
- [5] 崔堂兵,郭勇,张长远.植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J].广东农业科学,2001(3):16-18.
- [6] 盛长忠,王淑芳.红豆杉愈伤组织培养中褐变现象的初探[J].南开大学学报:自然科学版,2001,34(4):120-122.
- [7] 高武军,王景雪,卢龙斗,等.硝酸银在油菜基因转化中的影响作用[J].中国农学通报,2002,18(4):43-45.

观赏型羽衣甘蓝组织培养影响因素的研究

李明银¹, 黄丽梅²

(1. 绵阳师范学院 园林科学研究所, 四川 绵阳 621000 2. 绵阳师范学院 生命科学院 四川 绵阳 621000)

摘要:以观赏型羽衣甘蓝幼嫩叶片和幼嫩叶柄为外植体, 研究了外植体、培养基类型、光照条件、不同浓度 AgNO₃ 和生长调节剂对羽衣甘蓝愈伤组织及不定芽的诱导的影响。结果表明: 幼嫩叶片作为外植体诱导分化率高于幼嫩叶柄; MS 培养基对愈伤组织的诱导效果好于 LS, LS 培养基对根的诱导效果好于 MS; 12 h/d 的光照条件有利于愈伤组织的诱导分化; AgNO₃ 对愈伤组织的培养有一定的作用, MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L 时愈伤组织诱导分化最好。低浓度 TDZ 诱导外植体分化更快, 相同浓度下的 6-BA 对愈伤组织的诱导率均高于 TDZ。

关键词:羽衣甘蓝; TDZ; AgNO₃; 愈伤组织诱导

中图分类号:S 635.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2009)11—0099—03

观赏型羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var *acephala*), 十字花科芸薹属 2 a 生草本植物, 为食用甘蓝(卷心菜、包菜)的园艺变种, 能耐-6℃低温。叶色有淡红、紫红、白、黄等, 鲜艳多样, 而不同种类的羽衣甘蓝呈现出不同的叶斑。当温度低于 15℃时, 羽衣甘蓝中心叶片由绿色开始转为各种颜色, 绚丽如花, 有红、玫瑰红、黄、紫红、白、绿色等颜色, 同时其彩斑表现与发育时期有关, 并受环境条件控制, 因此容易形成不同的奇彩异斑类型。观赏期可长达4个月, 观赏价值极高^[1]。由于种子

是由第2层细胞发育而成的, 故一般植物的嵌合性状只能通过扦插、分株等无性繁殖保持, 而通过种子繁殖则会丢失嵌合性状^[2], 而羽衣甘蓝的彩斑叶型可通过种子遗传。顾卫红研究结果表明, 羽衣甘蓝的叶型性状由显隐性基因控制, 在各种叶型的遗传中, 皱叶对圆叶、裂叶对皱叶、裂叶对圆叶均表现为显性, 同时具有数量性状的遗传特征; 花色性状的遗传也是由显隐性基因控制, 通常深色对浅色表现为显性^[3]。研究发现, 羽衣甘蓝的叶斑是由于部分细胞质体突变形成的, 但其彩斑性状能够通过种子稳定遗传, 因此控制羽衣甘蓝叶斑的基因与细胞核有关。因此对控制花斑色彩的基因进行提取, 转入其他的植物中, 可以培育出具有叶斑的新品种。而组织培养是基因转移必需过程。羽衣甘蓝的组织培养受许多因素的影响, 诸如生长素、细胞分裂素等。目前, 国内已有利用幼嫩茎段、花药、腋芽、花茎、花蕾、花丝为外

第一作者简介:李明银(1952-), 男, 博士, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: mingyinli@126.com。
基金项目:四川省教育厅资助项目(2006C-048); 绵阳师范学院科技处资助项目(MA2005008)。
收稿日期:2009-06-10

Study on Preventing Browning of Explants during *Brassica oleracea* L. Tissue Culture

LI Ran-hong¹, YU Li-jie², LI Xiao-dong¹

(1. Department of Biology, Mudanjiang Teachers College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012, China; 2. Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025, China)

Abstract: Took Zhanggan 11 as material for the trial, discussed the affection of the basic medium (MS, 1/2MS), PVP (polyethylene pyrrole-2-one), Vc(ascorbic acid), AgNO₃ and the pretreatment on the effectiveness of browning prevention. The results showed that on 1/2 MS medium, the browning phenomenon was lighter, with MS for the medium, the browning phenomenon was much more serious. The antioxidant played an important role in inhibiting browning. PVP inhibited the browning more effectively. Explants taken after tree pretreatment may be good for browning inhibition.

Key words: *Brassica oleracea* L.; Tissue culture; Browning