

三种抗褐化剂对南荻外植体褐变及愈伤诱导率的影响

夏亚男, 蒋建雄, 易自力, 刘清波, 黄红梅, 陈智勇

(湖南农业大学 芒属植物研究所, 湖南 长沙 410128)

摘要:以能源植物南荻的幼穗为外植体, MS 为基本培养基, 通过在诱导培养基中分别添加一定浓度梯度的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、维生素 C(vitamin C)及柠檬酸(citric acid, CA), 对比研究 3 种抗褐化剂对南荻外植体褐变及愈伤诱导率的影响。结果表明:在诱导培养基中, 添加 PVP、维生素 C 和 CA 均能减轻外植体的褐化程度; 相对于对照(CK)35.83%的诱导率, 在试验浓度范围内, 添加 PVP、维生素 C 和 CA 后愈伤组织诱导率可分别提高至 55.42%、50.42%和 124.00%, CA 处理组与对照组之间愈伤诱导率差异达极显著水平($P < 0.01$)。因此, CA 为南荻幼穗愈伤组织诱导的最佳抗褐化剂, 且浓度为 0.2 g/L 时诱导率显著提高 2.46 倍。

关键词:南荻; 组织培养; 褐化; 聚乙烯吡咯烷酮; 抗坏血酸; 柠檬酸

中图分类号:Q 813.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0093-04

南荻(*Miscanthus lutarioriparius*)属禾本科芒属(*Miscanthus*), 多年生、高生物产量、高纤维的 C4 草本植物。南荻耐湿、耐瘠薄, 为中国特有种^[1], 广泛分布于长江流域, 目前主要用于造纸、水土保持和矿区生态修复, 也可用作牧场饲料、燃烧发电、工业原料及发酵乙醇等^[2]。南荻作为能源材料比其它芒荻类植物具有更大的优势, 首先在株高上, 远高于柳枝稷等能源植物, 高可

达 4~7 m, 其次在纤维素含量上, 达到 32.5%~53.9%^[3], 居于较高水平, 是一类极具开发潜力的纤维类能源植物^[4]。

国内外研究表明, 幼穗是南荻离体培养的最佳外植体^[5], 利用组织培养技术改良培育南荻优良株系, 是解决南荻种子生命期短、经多代扦插造成种性退化、甚至病毒积累等问题的有效手段, 但如何减缓或抑制幼穗诱导愈伤组织时的褐变以提高愈伤诱导率, 是目前亟待解决的问题。该研究选用南荻幼穗为外植体, 通过在 MS 诱导培养基中分别添加一定浓度梯度的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、维生素 C(vitamin C)及柠檬酸(citric acid, CA), 对比研究 3 种抗褐化剂对南荻外植体褐变及愈伤诱导率的影响, 筛选出南荻幼穗愈伤组织诱导时最佳的抗褐化剂, 提高愈伤组织诱导率, 以期建立高效的无性繁殖体系, 从而为多倍体诱导、体细胞突变及品种遗传改良研究提供基础。

第一作者简介:夏亚男(1989-), 女, 湖南益阳人, 硕士研究生, 研究方向为能源植物细胞遗传学。E-mail:xiayanan1213@163.com.

责任作者:陈智勇(1971-), 女, 湖南衡阳人, 博士, 副教授, 研究方向为植物细胞遗传学。E-mail:zhongchen71@163.com.

基金项目:国家“863”科技支撑计划区域重大专项资助项目(2011AA10020901); 教育部高校博士点基金资助项目(20124320110007)。

收稿日期:2014-04-18

Study on Translational Ecological Environment in Ecological Translatology and Translation Ecology

TAO Xiao-ting

(School of Foreign Languages, Sanjiang University, Nanjing, Jiangsu 210012)

Abstract: The two most influential studies into translatology from the ecological perspective were ecological translatology and translation ecology, both of which regard the translational ecological environment as a key notion. The definition from each study was compared and contrasted, and tried to figure out the components of the ecological environment of the translation of scenic spot's name in Suzhou gardens in order to contributed to the clearer defining of this notion.

Keywords: translational ecological environment; component; ecological translatology; translation ecology; comparison; scenic spots' names in Suzhou gardens

1 材料与方法

1.1 试验材料

以采自湖南华容的野生二倍体南荻种质为试材,种植于湖南农业大学芒属植物资源圃,采集其幼穗作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 愈伤组织诱导培养基:MS+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+8 g/L 琼脂粉+30 g/L 蔗糖,pH 调至 5.8。培养基添加物:PVP、维生素 C 及 CA,各设置 4 个浓度(表 1)。其中,将不添加任何抗褐化剂的处理作为对照(CK)。

表 1 抗褐化剂类型及浓度设计

Table 1 Design of the type and concentration of antioxidants g/L

水平 Level	因素 Factor		
	聚乙烯吡咯烷酮 PVP	维生素 C Vitamin C	柠檬酸 CA
CK	0	0	0
1	0.25	0.1	0.1
2	0.50	0.2	0.2
3	0.75	0.3	0.3

1.2.2 外植体的准备 于晴天 9:00—10:00 剪取南荻颖花原基形成期的幼穗,于 4℃冷藏 24 h。取出幼穗,小心剥离幼穗外层叶片和叶鞘,保留旗叶,然后在超净工作台上用含 70%酒精棉擦拭幼穗表面,用 0.1%(w/v)的升汞灭菌 10 min 后,无菌水清洗 4~5 次。

1.2.3 外植体诱导 无菌剥离出幼穗,切分长 0.8 cm 的小段,将上述幼穗切段接种于添加了不同浓度 PVP、维生素 C 和 CA 的诱导培养基上,每个浓度处理 5 次重复,每次重复接 4 段,展开使其充分接触培养基表面。(25±1)℃暗培养,每隔 5 d 记录 1 次褐化现象和愈伤诱导情况,40 d 后统计全部试验结果。

1.2.4 统计方法 褐化等级划分:+,外植体无褐变,周围培养基呈半透明状;++,外植体轻度褐变,切口处渗出褐色物质,周围培养基少许变色;+++,外植体较严重褐变,切口处渗出褐色物质,周围培养基大范围变色;++++,外植体严重褐变,切口处渗出褐色物质,周围培养基大范围深度变色。出愈率(%)=出愈数/外植体数×100%。相对诱导率(%)=(处理组出愈数-对照组出愈数)/对照组出愈数×100%。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 软件和 DPS 7.05 软件对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同抗褐化剂在愈伤诱导阶段对外植体及愈伤组织的影响

将南荻幼穗接种于添加了不同浓度 PVP、维生素 C 和 CA 的诱导培养基上,进行暗培养 40 d 后,观察外植

体的褐化情况及愈伤生长状态(表 2)。结果显示,培养基中不添加抗褐化剂(CK),外植体褐变严重,且渗出较多褐色物质于培养基中,培养基呈紫褐色(图 1),诱导出的愈伤组织水渍化较严重,为黄色颗粒(图 1-D)。

在低浓度 PVP 处理下,外植体的褐变较严重,随 PVP 浓度增大而稍有减轻,浓度增大至 0.75 g/L 时,培养基中出现大量深褐色物质。但外植体周围并没有褐色物质渗出,培养基色浅且较呈半透明状(图 1-A),诱导出的愈伤组织为黄色或者黄褐色颗粒,PVP 浓度增大至 0.75 g/L 时,颗粒较小(图 1-E)。

随维生素 C 浓度从 0.1 g/L 增大至 0.3 g/L,外植体褐变加深;当维生素 C 浓度为 0.1 g/L 时培养基为紫褐色,维生素 C 浓度增大为 0.2 g/L 后,培养基呈现橙黄色、且随维生素 C 浓度增大逐渐加深(图 1-B),随浓度增大愈伤组织褐化程度减轻,呈黄褐色或黄色颗粒,颗粒较小(图 1-D 和 E)。

随维生素 C 浓度从 0.1 g/L 增大至 0.3 g/L,外植体褐变逐渐减轻,培养基呈橙红色并逐渐加深(图 1-C),愈伤组织为淡黄色或少许淡紫色,呈致密型颗粒状,浓度小于 0.3 g/L 时颗粒较大(图 1-F 和 G)。

综合考虑,0.5 g/L PVP、0.2 g/L 维生素 C 或 0.2 g/L CA 的抗褐化效果最明显。

表 2 抗褐化剂对外植体、培养基及愈伤状态的影响

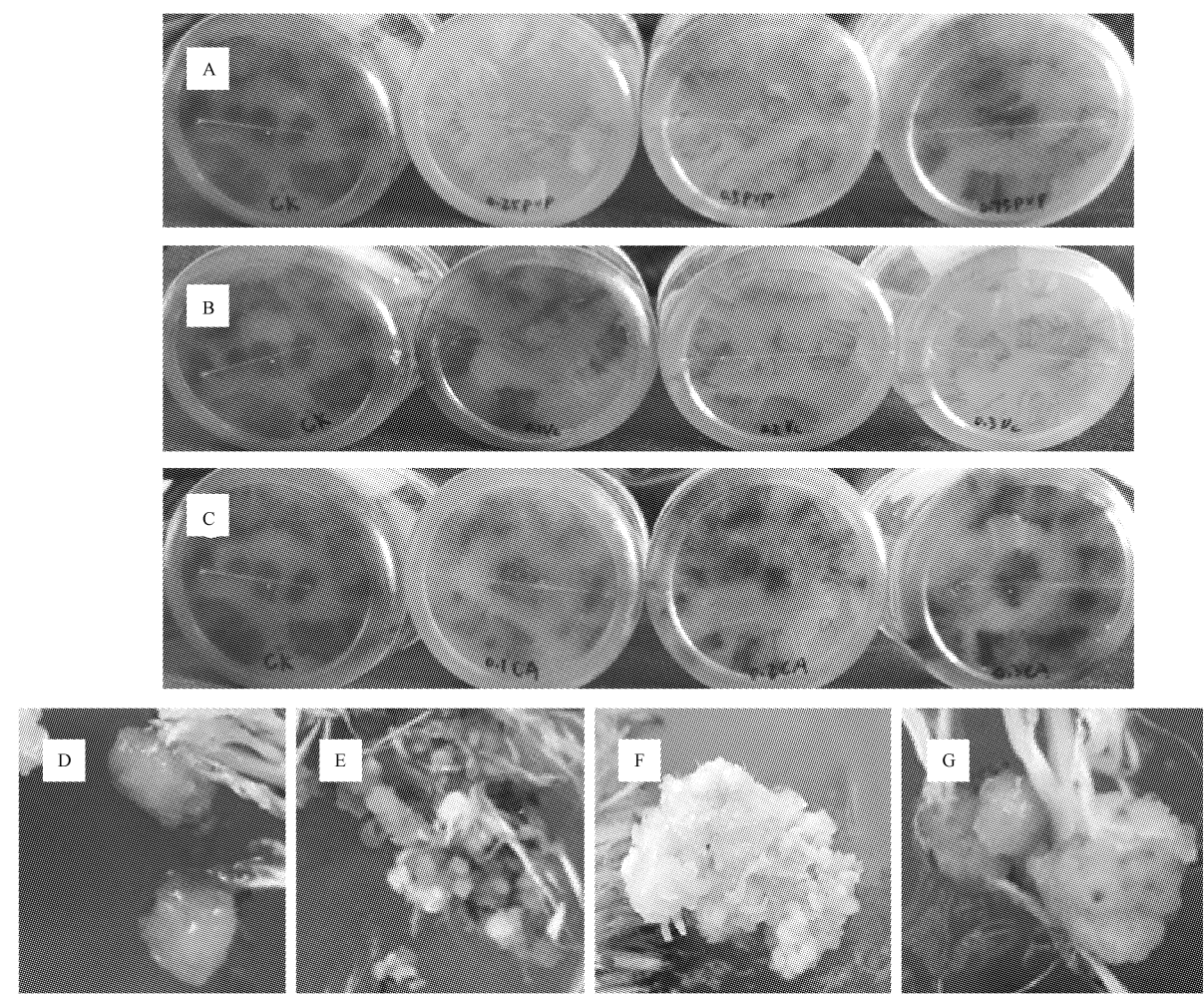
Table 2 Effect of different antioxidants on explants, culture medium and callus

处理 Treatment	添加浓度 Concentration of addition/(g·L ⁻¹)	外植体褐化程度 Browning degree of explants	培养基状况 Status of culture medium	愈伤颜色及大小 Color and size of callus
CK	0	++++	++++	紫褐 黄 中
聚乙烯吡咯 烷酮 PVP	0.25	++++	+	基本透明 黄褐 中
	0.50	+++	+	乌色 黄 中
	0.75	+++	++	乌青 黄褐 中
	0.1	+++	+++	橙黄 黄褐 小
维生素 C Vitamin C	0.2	+++	++	橙黄 黄、褐 小
	0.3	++	+++	橙黄 黄 小
	0.1	+++	+	橙红 淡黄 大
柠檬酸 CA	0.2	++	++	橙红 淡黄、浅紫 大
	0.3	++	+++	橙红 淡黄 中

2.2 不同抗褐化剂对南荻幼穗愈伤组织诱导率的影响

分别对 3 种抗褐化剂不同浓度处理下的南荻幼穗愈伤组织诱导率进行差异显著性分析,结果如表 3 所示。

相对于对照(CK)35.83%的诱导率,当培养基中添加的 CA 浓度为 0.1 g/L 时,愈伤组织诱导率显著增大,平均诱导率在 86.87%以上($P<0.05$),甚至出现一段幼穗长出多块愈伤的现象,故 CA 浓度为 0.2 g/L 时经统计最高可达 124.00%,当浓度增大至 0.3 g/L 时,愈伤组



注:A. PVP 从左到右浓度依次为:0、0.25、0.50、0.75 g/L;B. 维生素 C 浓度从左到右依次为:0、0.1、0.2、0.3 g/L;C. CA 浓度从左到右依次为:0、0.1、0.2、0.3 g/L;D. 褐色;E. 黄色;F. 淡黄;G. 浅紫。

Note:A. The concentration of PVP is 0,0.25,0.50,0.75 g/L(from left to right in the order);B. The concentration of vitamin C is 0,0.1,0.2,0.3 g/L; C. The concentration of CA is 0,0.1,0.2,0.3 g/L;D. Brown;E. Yellow;F. Light yellow;G. Light purple.

图 1 应用不同抗褐化剂后外植体褐化程度、培养基颜色及愈伤状态

Fig. 1 Browning degree of explants,color of culture medium and the status of callus after the application of different antioxidants

织诱导率有所降低,但仍高达 87.50%,显著高于对照 ($P<0.05$)。

0.2 g/L时,愈伤组织诱导率相对于对照均有提高,但当维生素 C 浓度继续增大至 0.3 g/L 时,愈伤组织诱导率有降低的趋势,甚至低于对照,降至 34.17%($P>0.05$)。

随培养基中添加的 PVP 浓度从 0.25 g/L 增大至 0.75 g/L,或者随维生素 C 浓度从 0.1 g/L 增大至

表 3 聚乙烯吡咯烷酮、抗坏血酸及柠檬酸对南荻愈伤诱导率的影响

Table 3 Effect of polyvinylpyrrolidone,ascorbic acid and citric acid on the callus induction rate of <i>M. lutarioriparius</i> explants						
处理	添加浓度	平均诱导率	相对诱导率	显著差异		Significance level
Treatment	Concentration of addition/g · L ⁻¹	Mean induction rate/%	The relative induction rate/%	LSD _{0.05}	LSD _{0.01}	
聚乙烯吡咯烷酮 PVP	0	35.83±9.55	0	d	D	
	0.25	56.25±18.29	56.9767	bcd	BCD	
	0.50	51.56±6.16	43.8953	cd	BCD	
	0.75	55.42±10.10	54.6512	bcd	BCD	
维生素 C Vitamin C	0.1	46.25±23.95	29.0698	d	CD	
	0.2	50.42±12.58	40.6977	d	BCD	
	0.3	34.17±22.02	-4.651	d	D	
柠檬酸 CA	0.1	86.87±23.42	142.4419	bc	ABC	
	0.2	124.00±35.06	246.0465	a	A	
	0.3	87.50±32.46	144.186	b	AB	

综合比较可以看出,相对于对照(CK)35.83%的诱导率,在试验浓度范围内,添加 PVP、维生素 C 和 CA 后愈伤组织诱导率可分别提高至 55.42%、50.42% 和 124.00%。当在培养基中添加 CA 时,愈伤组织诱导率显著高于对照组 ($P < 0.05$),差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。其中,与对照组相比,0.2 g/L CA 处理下,南荻愈伤组织诱导率提高了 2.46 倍,增长幅度最大。因此,CA 可以作为应用于南荻组织培养的最佳抗褐化剂。

3 讨论与结论

褐化现象在芒属植物的组织培养过程中普遍存在,是由于酚类物质被氧化成醌,醌聚合后形成深色物质而产生褐变。选择适宜的外植体、最佳培养基成分及激素配比,以及控制培养条件等因素,都能阻缓或抑制褐变的产生。

PVP 具有良好的粘连性和吸附性,在酚类物质被多酚氧化酶氧化形成褐变之前,对其进行强吸附作用,未能形成醌类物质,因此,培养基呈透明状,该试验结果充分证明了这一观点(图 1-A)。然而,过量的 PVP 可能使愈伤诱导率降低^[6],可能是因为高浓度的 PVP 会减缓植物对 6-BA 等有益物质的吸收利用。

维生素 C 作为还原剂,能够在组织受到机械伤害时,清除产生的氧自由基,使细胞从氧损伤中得到保护,从而减少植物因褐变而受到的二次伤害。Ko 等^[7]研究发现,维生素 C 对某些植物的褐化具有较好的抑制作用,而对另一些植物可能没有抑制作用,甚至还加剧了褐化^[8]。该试验中维生素 C 的抗褐化效果亦不佳,当维生素 C 添加量达到 0.3 g/L 时,出愈率相对对照有所下降,因此,维生素 C 并不是南荻的理想抗褐化剂。

CA 通过提供酸性环境抑制多酚氧化酶的活性防止褐化,从而提高愈伤诱导率。该试验中,在一定浓度范

围内,愈伤诱导率随 CA 的浓度增加而增加,这与徐耀华等^[9]的研究结果相符。

综上所述,培养基中添加适量 CA 能有效抑制南荻幼穗愈伤组织诱导阶段的褐变,并能显著提高愈伤组织诱导率,是最佳抗褐化剂。然而,维生素 C 和 CA 不能高温灭菌,这给试验操作带来了不便。Qu 等^[10]研究表明采用抗褐化剂溶液直接浸泡法对外植体进行预处理,也可以有效地抑制培养物的褐化。因此,运用浸泡法对于南荻幼穗进行预处理,其抗褐化效果亦值得进一步研究。

参考文献

- [1] Chen S L, Renvoize S A. *Miscanthus Andersson* [M]//Wu Z Y, Raven P H. Flora of China. Beijing: Science Press, 2006: 581-583.
- [2] Chung J H, Kim D S. *Miscanthus* as a potential bioenergy crop in East Asia[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2012, 15(2): 65-77.
- [3] 易自力. 芒属能源植物资源的开发与利用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2012(5): 455-463.
- [4] 桑涛. 能源植物新秀—芒草[J]. 生命世界, 2011(1): 38-43.
- [5] Głowacka K, Jeżowski S. Genetic and nongenetic factors influencing callus induction in *Miscanthus sinensis* (Anderss.) anther cultures[J]. Journal of Applied Genetics, 2009, 50(4): 341-345.
- [6] 陈彪, 陈伟栋, 梁卿贤, 等. 利用聚乙烯吡咯烷酮防止甘蔗组织培养接种物褐变的研究[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(3): 63-66.
- [7] Ko W H, Su C C, Chen C L, et al. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of *Cavendish banana* cv. Formosana with ascorbic acid[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2009, 96(2): 137-141.
- [8] 吕宗友, 苏衍菁, 赵国琦, 等. 不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究[J]. 草业学报, 2011, 20(3): 174-181.
- [9] 徐耀华, 杨春华, 刘晓波, 等. 扁穗牛鞭草组织培养中褐化控制技术初探[J]. 草业科学, 2013, 30(2): 212-217.
- [10] Qu R, Chaudhury A. Improved young inflorescence culture and regeneration of 'Tifway' bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *C. dactylon*) [J]. International Turfgrass Society, 2001, 9: 198-201.

Effect of Three Antioxidants on Browning of Explant and Callus Induction Rate of *Miscanthus lutarioriparius*

XIA Ya-nan, JIANG Jian-xiong, YI Zi-li, LIU Qing-bo, HUANG Hong-mei, CHEN Zhi-yong
(Research Institute of Miscanthus, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract: Taking the immature inflorescences of *M. Lutarioriparius* as explants and MS medium with polyvinylpyrrolidone (PVP), vitamin C or citric acid (CA) were used as medium in this research, the effect of 3 antioxidants to inhibit browning of explants and on callus induction rate of *Miscanthus lutarioriparius* were studied. The results showed that treating with PVP, vitamin C and CA could improve callus induction rate and reduce the browning of explants in a certain degree. Compared with the control whose callus induction rate were 35.83%, adding PVP, vitamin C or CA in the medium increased the induction rate to 55.42%, 50.42% and 124.00% respectively; and adding CA made highly significant difference ($P < 0.01$). CA was the best anti-browning agent of immature inflorescences culture of *M. lutarioriparius*, and 0.2 g/L CA could significantly increase the callus induction rate by 2.46 times.

Keywords: *Miscanthus lutarioriparius*; tissue culture; browning; polyvinylpyrrolidone; vitamin C; citric acid