

无花果组培中培养条件对外植体褐化的影响

李景蕓, 刘艳丽

(湖北第二师范学院 化学与生命科学学院, 湖北 武汉 430205)

摘 要:以无花果为组织培养试验材料,采用改变培养条件和使用不同培养基的方法,研究培养条件对外植体褐化的影响。结果表明:无花果外植体褐化在 WPM 培养基上比 MS 培养基上较轻,培养基中琼脂为 9 g 的无花果外植体褐化较轻,经过暗处理的无花果外植体褐化程度较轻,以及低温条件能有效缓解外植体褐化。

关键词:无花果;组织培养;褐化

中图分类号:S 688.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0099-03

外植体褐化是植物组织培养中常见现象,主要是细胞中的酚类化合物等发生氧化反应而形成褐色醌类物质,进而造成外植体组织变褐死亡^[1-3]。能否抑制褐化现象是决定着植物组织培养成功的关键^[4]。无花果(*Ficus carica* L.)属桑科榕树属落叶灌木或小乔木,其果实具有很高的食用和药用价值,具有健胃清肠、消炎、抗肿瘤作用,组织培养是无花果快速繁殖加大栽培规模的重要方法,但无花果植株含有较多的组织浆汁,褐化现象严重,是导致组织培养失败的主要原因^[5-6]。现采用 2 种不同的培养基(WPM 木本专用培养基、MS 培养基)和 3 种培养条件(不同琼脂浓度、不同温度、不同光照)研究无花果组织培养过程中的褐化现象。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于 4 月在湖北第二师范学院校园内剪取自然光照下的母株,取其幼嫩枝条为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 消毒方法及培养条件 将材料先用流水冲洗 1 h,用剪刀剪成 3 cm 左右的小段,在超净工作台上,依次分别用 75%乙醇、0.1% HgCl₂ 溶液进行消毒处理,无菌水冲洗 5~6 次后,茎段剪成 1 cm 左右,然后分别接种到相应的培养基中。光照 12 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx 的恒温箱中培养,待用。培养 10 d 后开始观察统计试验结果。

1.2.2 不同培养基处理 分别将材料接种到 MS 培养基和 WPM 培养基上进行培养,MS 培养基附加的生长调节剂是 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L;WPM 培养基附加的生长调节剂是 6-BA 5.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 和 KT 0.5 mg/L,其它培养条件相同。WPM 和 MS 培养基的配方见表 1。

表 1 WPM 和 MS 培养基的配方比较

Table 1 Comparison of WPM and MS medium for culturing

成分 Component	分子量 Molecular weights	WPM /(mg · L ⁻¹)	MS /(mg · L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	80.04	400	1 650
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236.16	556	
K ₂ SO ₄	174.26	990	
大量元素 KNO ₃	101.11		1 900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	147.02	96	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.47	370	370
KH ₂ PO ₄	136.09	170	170
KI	166.01		0.83
H ₃ BO ₃	61.83		6.2
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241.95	0.25	0.25
微量元素 CoCl ₂ · 6H ₂ O	237.93		0.025
MnSO ₄ · H ₂ O	223.01	22.4	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287.54	8.6	8.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	249.68	0.25	0.025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	278.03	27.8	27.8
铁盐 Na ₂ -EDTA	372.25	37.3	37.3
肌醇		100	100
盐酸硫胺素 VB ₁		1	0.1
有机成分 烟酸 VB ₃ 或 VPP		0.5	0.5
盐酸吡哆醇 VB ₆		0.5	0.5
甘氨酸		2	2
蔗糖	342.31	20 g/L	30 g/L
琼脂		6 g/L	7 g/L
pH	5.2	5.7~5.8	

1.2.3 不同的琼脂质量浓度处理 将材料分别接种到琼脂为 6 g/L 和 9 g/L 的 WPM 培养基中培养,其它培养条件相同。

第一作者简介:李景蕓(1967-),男,博士,副教授,研究方向为植物学及其应用。E-mail:15527608267@163.com.

基金项目:湖北第二师范学院“植物抗癌活性物质提纯与应用湖北省重点实验室”建设资助项目。

收稿日期:2015-01-22

1.2.4 不同温度条件处理 将材料接种到 WPM 基本培养基中,分别置于 10、18、25℃ 的条件下进行培养,其它培养条件相同。

1.2.5 不同光照条件处理 将材料接种到 WPM 基本培养基中,在 18℃ 条件下置于黑暗环境中进行培养,以光照条件处理作为对照,其它培养条件相同。

1.3 项目测定

1.3.1 褐化表现级别 参照黄浩等^[7]、余阿梅等^[8]的褐化等级标准进行划分:0 级-无或轻微褐变,外植体及其周围培养基呈乳白色;1 级-材料及其周围培养基色泽呈淡褐色;2 级-材料及其周围培养基色泽较严重褐变呈褐色;3 级-材料及其周围培养基色泽严重褐变呈黑褐色。

1.3.2 褐化率 褐化率=(出现褐化的外植体个数/接种外植体总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同培养基类型对褐化的影响

无花果外植体的褐化现象在 2 种不同类型的培养基处理中均有发生(图 1),且褐化率分别高达 85%、100%。从褐化程度上看,在 MS 培养基上褐化最严重,褐化程度为 3 级,外植体仅 1/3 保持绿色;WPM 褐化程度较轻,材料周围培养基色泽为浅褐色,材料 1/2 保持绿色。此结果与前人研究结果一致^[9-10]。

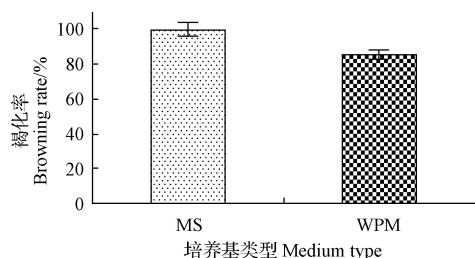


图 1 培养基对无花果外植体褐化的影响

Fig. 1 Effect of culture medium on the browning of fig explants

2.2 培养基中琼脂质量浓度对褐化的影响

WPM 培养基中不同的琼脂质量浓度对无花果外植体褐化的影响见图 2,从外植体褐化程度来看,9 g/L 的琼脂浓度褐化的程度较轻,褐化级别为 1 级,褐化率 5%,颜色淡褐色;当琼脂质量浓度为 6 g/L 时,外植体的褐化程度为 2 级,褐化率 15%,颜色是褐色的。这与大部分的研究结果不一致,如徐振彪等^[11]、李浚明^[12]、梅兴国等^[13]提出用液体、半固体培养基,降低琼脂浓度,可以及时冲洗、扩散产生的褐化有毒物,有助于减轻褐化,减轻对外植体发育所造成的毒害。但该试验结果与王箫等^[14]、叶添谋^[15]的结论相近,即随着琼脂用量增加,外植体褐化率降低,相反,液体培养褐化率明显高于固体培养。截然相反的研究结果,正好说明了影响褐化的因素是多种多样的,抗褐变剂的选择也应该因外植体种

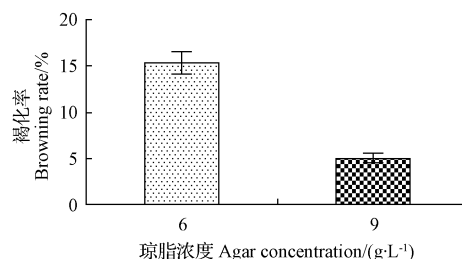


图 2 琼脂浓度对无花果外植体褐化的影响

Fig. 2 Effect of agar concentration on the browning of fig explants

类、激素多少、基本培养基成分、培养条件的不同而不同。

2.3 温度对褐化的影响

在 10、18、25℃ 温度条件下,无花果外植体都有发生褐变(图 3)。尽管 18℃ 和 25℃ 的褐化率都为 90.1%,但是它们的褐化程度不同,18℃ 条件下无花果外植体的褐化程度是 2 级,颜色为褐色;而 25℃ 条件下是 3 级,颜色为黑褐色。10℃ 培养条件下褐化率 85.2%,无花果外植体褐化程度最轻为 1 级,颜色是淡褐色。前人的研究表明,温度高时能促进多酚氧化酶活性及酚类物质的氧化,从而加速褐化;相反,低温能抑制多酚氧化酶活性及酚类物质的氧化,从而减轻褐化^[16]。

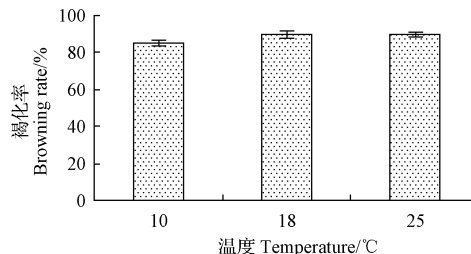


图 3 温度对无花果外植体褐化的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the browning of fig explants

2.4 光照对褐化的影响

该试验结果表明,在正常光照和黑暗处理中,褐化现象均有发生(图 4),暗处理的褐化程度较轻,褐化率为 85%,褐化级别为 1 级,表现出颜色稍有变化;而在正常

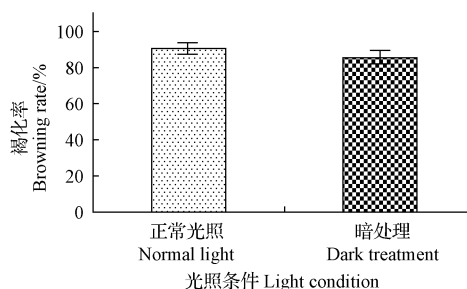


图 4 光照对无花果外植体褐化的影响

Fig. 4 Effect of light condition on the browning of fig explants

光照条件下,褐化率为 90%,褐化级别为 2 级,颜色表现为淡褐色或褐色,培养 10 d 以后,严重时整个培养基都变成暗褐色。这表明光照是加剧无花果外植体褐化的重要原因,而且外植体的褐化产物加重了其对自身的毒害,因褐化程度的加剧最终导致外植体死亡。

3 结论与讨论

该研究结果表明,不同培养基类型和不同的培养条件对无花果外植体褐化程度有明显的影响。高盐的 MS 培养基和相对低盐的 WPM 培养基相比,其褐化率及其褐化程度都较高。相对正常光照条件,暗处理更适合防止褐化发生;低温、高温、较高温都能影响褐化的发生,其中低温褐化程度最轻,较高温次之,高温褐化程度最重。培养基的硬度对褐化也存在一定的影响,培养基中其它成分不改变的前提下,琼脂的质量浓度提高,其褐化程度相对就会轻些,对褐化有减轻的效果。

当然,这些都是治标而非治本的处理措施,如何采取一种从根本上根除组织培养中产生褐化及有毒物质的方法,还需要进一步对褐化产生的原因条件、生理生化以及遗传机理等方面进行更加广泛而深入的研究,才能得到满意的结果^[1]。另外,该试验只是单因子试验设计,目的是想探讨同一个因子在不同梯度下对无花果外植体褐化的影响由此得出一些基础数据,今后,还将进一步展开多因子试验,找出几个因子的主效应和互作效应,从而筛选出对无花果外植体褐化影响最小的培养条件组合,最终为无花果的组织培养及其快速繁殖提供理论 and 实际指导作用。

参考文献

[1] 周俊辉,周家荣,曾浩森,等.园艺植物组织培养中的褐化现象及抗

褐化研究进展[J].园艺学报,2000,27(增刊):481-486.

[2] 刘兰英.薄壳香核桃组织中的褐化及防止措施研究[J].园艺学报,2002,29(2):171-172.

[3] ROBERT C S,PEDRO E,MERCE S,et al. Evaluation of browning effect on avocado puree[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies,2001,1: 261-268.

[4] 孔祥生,张妙霞,杜爱玲,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.

[5] 张小红,代侃初,马兆平,等.核桃离体培养中外植体褐化的研究[J].陕西林业科技,2005(4):7-9.

[6] 朱建华,关丽霞.无花果的组织培养研究[J].北方果树,2002(3):9-10.

[7] 黄浩,鲁明波,梅兴国.红豆杉细胞培养中抗褐变剂的筛选[J].华中理工大学学报,1999,27(4):107-109.

[8] 余阿梅,苏智先,胡进耀,等.珙桐愈伤组织诱导和继代培养中的褐化研究[J].绵阳师范学院学报,2008,27(8):70-74.

[9] 侯巨梅,叶水英,程仁根,等.红豆杉组织培养中防褐变措施的研究概述[J].景德镇高专学报,2008,23(4):9-10.

[10] 王关琳,方宏筠,胡风庆,等.东北矮紫杉组织、细胞培养及其紫杉醇生成的研究[J].中国农业科学,2001,34(4):373-378.

[11] 徐振彪,傅作申,原亚萍,等.植物组织培养过程中的褐化现象[J].国外农学-杂粮作物,1997(1):55-56.

[12] 李凌明.植物组织培养教程[M].北京:北京农业大学出版社,1992: 349-350.

[13] 梅兴国,董妍玲,潘学武.红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究[J].天然产物研究与开发,2001,13(4):8-11.

[14] 王箫,黎云祥,邹利娟.白筋愈伤组织的诱导及褐化的防治[J].西华师范大学学报(自然科学版),2008,29(3):263-268.

[15] 叶添谋.植物组织培养过程中的常见技术难题研究进展[J].韶关学院学报(自然科学版),2010,31(3):84-90.

[16] HILDEBRANDT V,HAMEY P M. Factors affecting the release of phenolic exudates from explants of pelargonium hortorum Bailey 'Springer Scanlet' [J]. J Hor Sci,1988,63(4):651-657.

Effect of Culture Conditions on Explants Browning of *Ficus carica* L.

LI Jinghong,LIU Yanli

(School of Chemistry and Life Science,Hubei University of Education,Wuhan,Hubei 430205)

Abstract: Taking *Ficus carica* L. as a tissue culture experiment material, adopting the method of changing culture conditions and using different culture medium, the effect of culture conditions on the explants browning was studied. The results showed that on WPM medium the explant browning was lighter than on MS medium; the explant browning was lighter on 9 g agar medium and under dark treatment; low temperature could effectively alleviate the explant browning.

Keywords: *Ficus carica* L.; tissue culture; browning