

变异冬红果组织培养中褐化控制研究

韦晨¹, 丁悦来², 王醒³ (1. 江苏大学, 现代农业装备与技术教育部重点实验室, 江苏镇江 212013; 2. 江苏省溧阳中学, 江苏常州 213357; 3. 江苏艺轩园林景观工程有限公司, 江苏镇江 212000)

摘要 [目的]研究不同因素对变异冬红果茎段褐化的影响。[方法]以变异冬红果茎段为外植体,研究茎段木质化程度、不同消毒方法、茎段转移频率、不同6-BA浓度、不同活性炭浓度对褐化的影响。[结果]同一灭菌处理下,木质化茎段的褐化率最高;单独用0.1% HgCl₂溶液消毒更有利于减轻变异冬红果茎段的褐化程度;转移频率为1 d时,更有利于减轻变异冬红果茎段的褐化程度;低浓度的6-BA有利于减轻变异冬红果茎段的褐化程度;在培养基中添加活性炭并不一定适合变异冬红果茎段的防褐化处理。[结论]该研究可为变异冬红果茎段的继代培养提供一定的参考。

关键词 变异冬红果;组织培养;褐化;外植体

中图分类号 S 723.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)17-0102-03

Research about Controlling Browning of Mutant *Malus spectabilis*

WEI Chen¹, DING Yue-lai², WANG Xing³ (1. Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013; 2. Liyang Middle School of Jiangsu Province, Changzhou, Jiangsu 213357; 3. Jiangsu Yixuan Landscape Engineering Co., Ltd., Zhenjiang, Jiangsu 212000)

Abstract [Objective] To study the effect of different factors on the degree of browning in the stem segments of mutant *Malus spectabilis*. [Method] With mutant *M. spectabilis* stem segments as explant, to study the lignification degree of stem segments, different disinfection methods, transfer frequency of stem segments, different concentrations of 6-BA, different concentrations of activated carbon on the degree of browning. [Result] Under the same sterilization treatment, the browning rate of the lignified stem segments was the highest; disinfection with 0.1% HgCl₂ solution alone was more conducive to reduce the degree of browning of stem segments; when the transfer frequency was 1 d, it was more conducive to the reduction of browning of stem segments. Low concentration of 6-BA was beneficial to reduce the degree of browning of stem segments; adding activated carbon in the medium was not necessarily suitable for browning of stem segments of mutant *M. spectabilis*. [Conclusion] It provides some reference for the subculture of mutant *M. spectabilis*.

Key words Mutant *Malus spectabilis*; Tissue culture; Browning; Explant

冬红果(*Malus spectabilis*)是蔷薇科苹果属落叶灌木或小乔木^[1-2],因该品种的变异植株叶片呈紫色,且果实颜色初期至深秋由紫入红,寓意万紫千红,相较于正常冬红果,它前期的紫叶紫果增添了色彩变化的多样性,使得观果期在一定程度上向前延伸,也更具有观赏价值,因此,具有这一特性状状的冬红果变异植株未来将更受市场欢迎。

变异冬红果用传统的嫁接繁育技术不仅优良性状难以保存,而且繁殖效率较低,极大地限制了变异冬红果的优树选育和规模化扩繁。而采用组织培养繁殖方法,不仅可对变异母本的优良性状进行保持、提纯或复壮,而且离体培养下繁殖体个体小、群体大,且可控的环境还能消除季节因素的限制,从而显著地提高繁殖系数^[3-4]。因此,组织培养繁殖方法在变异冬红果的繁殖方面优势明显,但在组织培养的过程中外植体很容易褐化,严重影响了变异冬红果组织培养的成活率,找到解决褐化问题的方法成为当务之急。目前鲜见有关冬红果组织培养快繁技术的报道。而在苹果属植物组织培养进行防褐化处理时,选择合适的外植体、消毒处理、连续转移、在培养基中添加不同浓度的细胞分裂素和添加活性炭等方法,均能很好地控制褐化^[5-6]。笔者以变异冬红果茎段为外植体,通过研究外植体木质化程度、不同消毒处理、连续转移的时间、在培养基中添加不同浓度的细胞分裂素和添加

不同浓度的活性炭等对褐化的影响程度,为变异冬红果组织培养中控制褐化现象研究以及进一步进行继代培养提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料 试验以采自江苏艺轩园林景观工程有限公司的一株变异冬红果的未木质化、半木质化和木质化茎段为外植体。

1.2 方法

1.2.1 同一消毒处理对变异冬红果不同木质化程度茎段褐化的影响。取变异冬红果1年生枝条,用洗衣粉水浸泡3~5 min,流水下冲洗30~60 min,冲洗干净后,剪取2 cm左右单芽茎段,经常规消毒后接种于MS+6-BA 0.5 mg/L的培养基中。设置未木质化、半木质化和木质化茎段3种外植体处理,每瓶接种1个茎段,每个处理接种30个带芽茎段,重复3次。培养温度为24~26℃,光照时间为10 h/d,光照强度为1 800~2 200 lx,30 d后统计褐化率、污染率、存活率。

1.2.2 不同消毒处理对变异冬红果茎段褐化的影响。取变异冬红果的茎段,用洗衣粉水浸泡3~5 min,流水下冲洗30~60 min,冲洗干净后设置6个处理:①用75%乙醇消毒30 s后,再用0.1% HgCl₂溶液消毒7 min;②用75%乙醇消毒30 s后,再用0.1% HgCl₂溶液消毒8 min;③用75%乙醇消毒30 s后,再用0.1% HgCl₂溶液消毒9 min;④用0.1% HgCl₂溶液消毒7 min;⑤用0.1% HgCl₂溶液消毒8 min;⑥用0.1% HgCl₂溶液消毒9 min。无菌水冲洗3~4遍,冲洗干净后,剪取2 cm左右单芽茎段,经常规消毒后接种于MS+6-BA 0.5 mg/L的培养基中,每瓶接种1个茎段,每个处理接种30个带芽茎

基金项目 镇江市重点研发计划—现代农业(NY2015013);江苏省农业科技自主创新项目[CX(15)1004]。

作者简介 韦晨(1994—),女,江苏镇江人,硕士研究生,研究方向:植物组织培养。

收稿日期 2018-03-16

段,重复3次,培养温度为24~26℃,光照时间为10 h/d,光照强度为1 800~2 200 lx,观察其褐化程度。

1.2.3 接种后变异冬红果茎段的转移频率对褐化的影响。取变异冬红果1年生枝条,用洗衣粉水浸泡3~5 min,流水下冲洗30~60 min,冲洗干净后,剪取2 cm左右单芽茎段,经常规消毒后接种于MS+6-BA 0.5 mg/L的培养基中,并设3种处理:①1 d转接1次;②3 d转接1次;③5 d转接1次。每个处理接种30个,重复3次,培养温度为24~26℃,光照时间为10 h/d,光照强度为1 800~2 200 lx,30 d后统计褐化率。

1.2.4 不同浓度的6-BA对变异冬红果茎段褐化的影响。取变异冬红果1年生枝条,用洗衣粉水浸泡3~5 min,流水下冲洗30~60 min,冲洗干净后,剪取2 cm左右单芽茎段,经常规消毒后接种于添加不同6-BA浓度的MS培养基中,6-BA浓度是0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L,记为处理①~⑥。每个处理接种30个,重复3次,培养温度为24~26℃,光照时间为10 h/d,光照强度为1 800~2 200 lx,30 d后统计褐化程度。

1.2.5 不同浓度的活性炭对变异冬红果茎段褐化的影响。

取变异冬红果1年生枝条,用洗衣粉水浸泡3~5 min,流水下冲洗30~60 min,冲洗干净后,剪取2 cm左右单芽茎段,经常规消毒后接种于添加不同活性炭浓度的MS培养基中,活性炭浓度是0.5~2.0 g/L。每个处理接种30个,重复3次,培养温度为24~26℃,光照时间为10 h/d,光照强度为1 800~2 200 lx,30 d后统计褐变率。

2 结果与分析

2.1 同一消毒处理对变异冬红果不同木质化程度茎段褐化的影响 由表1可知,在同一消毒处理下,变异冬红果茎段不同木质化程度对褐化的影响较大。木质化茎段的褐化率明显大于未木质化茎段和半木质化茎段,褐化率达23.33%,未木质化茎段褐化率为11.11%,半木质化茎段褐化率最低,仅为5.55%。未木质化茎段褐化率稍高于半木质化茎段,主要是因为消毒剂对幼嫩茎段的毒害作用稍大于半木质化茎段,导致其容易褐化死亡。木质化茎段自身所含的酚类物质较多,更容易褐化^[7],因此,同一灭菌处理下,木质化茎段的褐化率最高。

表1 同一消毒处理对变异冬红果不同木质化程度茎段褐化的影响

Table 1 The effects of the same disinfection treatment on the browning of mutant *M. spectabilis* stem segments with different lignification %

外植体 Explant	褐化率 Browning rate	污染率 Contamination rate	存活率 Survival rate
未木质化茎段 Unlignified stem segments	11.11±1.92 b	17.78±3.85 b	71.11±5.09 a
半木质化茎段 Semi-lignified stem segments	5.55±1.93 c	22.22±5.09 b	72.22±3.85 a
木质化茎段 Lignified stem segments	23.33±3.34 a	33.33±3.34 a	43.33±0.00 b

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P < 0.05$)

2.2 不同消毒处理对变异冬红果茎段褐化的影响 由表2可知,变异冬红果茎段随着消毒时间的增加,其褐化程度越高;当使用75%乙醇和0.1% HgCl₂溶液结合消毒时,茎段的褐化程度明显高于单独使用0.1% HgCl₂溶液消毒,且在接种第1天后就发生了中度褐化;而单独使用0.1% HgCl₂溶液消毒,其褐化程度较轻,在消毒7 min时,褐化程度较低,大于7 min时,茎段的褐化程度也比较明显,由此可知,单独使用0.1% HgCl₂溶液消毒更有利于减轻变异冬红果茎段的褐化程度。

表2 不同消毒处理对变异冬红果茎段褐化的影响

Table 2 The effects of different sterilization treatments on the browning of mutant *M. spectabilis* stem segments

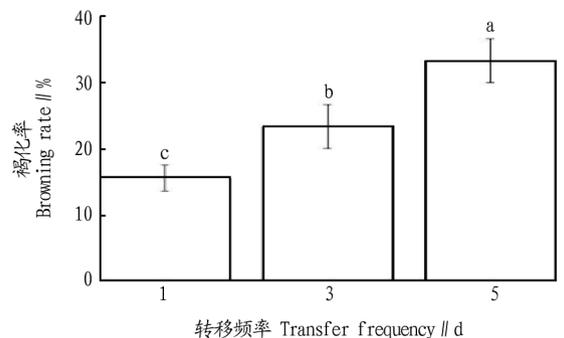
处理 Treatment	处理时间 Time//d			
	1	2	3	4
①	++	++	+++	+++
②	++	++	+++	+++
③	++	+++	+++	+++
④	+	+	++	++
⑤	+	++	++	++
⑥	++	++	+++	+++

注:+.轻度褐化;++.中度褐化;+++严重褐化

Note:+. Light browning; ++. Moderate browning; +++. Serious browning

2.3 接种后变异冬红果茎段的转移频率对褐化的影响 由图1可知,变异冬红果茎段的转移频率对褐化的影响很大,

转移频率越低,褐化率越高。当转移频率为1 d时,褐化率最低,仅为15.56%;当转移频率为3 d或5 d时,褐化率均高于1 d;当转移频率为5 d时,褐化率高达33.33%。因此,转移频率为1 d时,更有利于减轻变异冬红果茎段的褐化率。



注:小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters mean significant differences ($P < 0.05$)

图1 接种后变异冬红果茎段的转移频率对褐化的影响

Fig. 1 The effects of the transfer frequency on the browning of mutant *M. spectabilis* stem segments

2.4 不同浓度的6-BA对变异冬红果茎段褐化的影响 由表3可知,6-BA浓度对变异冬红果茎段褐化有一定的影响。当6-BA浓度在0.5~1.5 mg/L时,褐化程度较轻;当6-BA浓度大于2.0 mg/L时,褐化程度较高。因此,低浓度的6-

BA 有利于减轻变异冬红果茎段的褐化程度。

表 3 不同浓度的 6-BA 对变异冬红果茎段褐化的影响

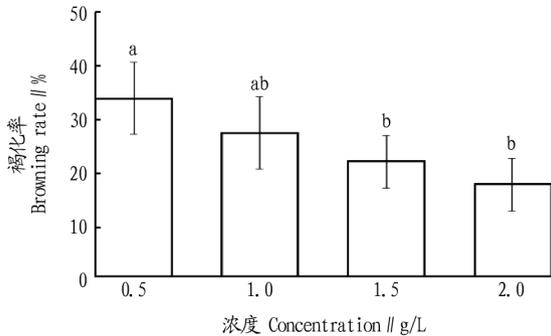
Table 3 The effects of different concentrations of 6-BA on the browning of mutant *M. spectabilis* stem segments

处理 Treatment	6-BA 浓度 6-BA concentration//mg/L	褐化程度 Browning degree
①	0.5	+
②	1.0	+
③	1.5	+
④	2.0	++
⑤	2.5	++
⑥	3.0	++

注: +, 轻度褐化; ++, 中度褐化

Note: +, Light browning; ++, Moderate browning

2.5 不同浓度的活性炭对变异冬红果茎段褐化的影响 由图 2 可知,随着活性炭浓度逐渐升高,变异冬红果茎段的褐化率逐渐降低,说明活性炭对变异冬红果茎段的防褐化效果有一定的作用。当活性炭浓度为 0.5 g/L 时,褐化率最高,达 34.44%;当活性炭浓度为 2.0 g/L 时,褐化率最低,为 17.78%。虽然随着活性炭浓度的升高,变异冬红果茎段的褐化率降低,但是总体而言,变异冬红果茎段的长势不佳,生长缓慢,将不利于后续的继代增殖,因此,在培养基中添加活性炭并不一定适合变异冬红果茎段的防褐化处理。



注:小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different small letters mean significant differences ($P < 0.05$)

图 2 不同浓度的活性炭对变异冬红果茎段褐化的影响

Fig. 2 The effects of different concentrations of activated carbon on the browning of mutant *M. spectabilis* stem segments

3 结论与讨论

木本植物在组织培养过程中,很容易发生褐化现象。因为木本植物中所含的酚类物质较多,转接过程中切口处一旦氧化,很容易转化为有毒的醌类物质,导致外植体褐化甚至死亡^[8-9]。外植体部位、培养基成分、添加激素、外植体消毒

处理、培养环境等多种因素都会引起褐化现象的发生,若褐化现象不加以控制,则会造成试验失败^[10]。通过研究不同木质化程度茎段对褐化的影响,发现幼嫩茎段和木质化茎段褐化率都较高,而半木质化茎段褐化率较低,比较适合作为初代培养的材料。不同的消毒处理,变异冬红果茎段的褐化程度不同,通过研究不同消毒处理对变异冬红果茎段褐化的影响,比较 75% 乙醇和 0.1% HgCl₂ 溶液结合消毒与单独用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒对变异冬红果茎段褐化程度的影响,发现乙醇加重了变异冬红果茎段的褐化程度,且消毒时间越长,其褐化程度越高,因此,单独用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 7 min 更有利于减少变异冬红果茎段的褐化程度。通过研究接种后变异冬红果茎段的转移频率对褐化的影响,发现转移频率越高,褐化率越低,该方法能有效地减少酚类物质的积累,更有利于接种苗正常生长,并能有效地控制褐化率。通过研究不同浓度 6-BA 对褐化的影响,发现 6-BA 浓度越高,褐化越严重,低浓度 6-BA 有利于减轻变异冬红果茎段的褐化程度。通过研究不同浓度的活性炭对褐化的影响,发现随着活性炭浓度逐渐升高,变异冬红果茎段的褐化率逐渐降低,活性炭对变异冬红果茎段的防褐化效果有一定的作用,但变异冬红果茎段长势不佳,生长缓慢,说明活性炭虽然可以吸附培养基中的醌类物质,但是与此同时,也能吸附培养基中的营养成分,导致变异冬红果茎段生长不良,因此,在培养基中添加活性炭将不利于变异冬红果茎段的继代增殖培养^[11-13]。

参考文献

- [1] 汤秋雁. 盆栽观果花卉——冬红果[J]. 中国果菜, 2013(7): 23.
- [2] 邓运川, 靳文滨. 冬红果栽培技术[J]. 中国花卉园艺, 2012(24): 38-39.
- [3] 饶光厚. 红果累累冬红果[J]. 中国花卉盆景, 2012(9): 35.
- [4] 张文庆, 胡忠惠, 杨丽芳. 冬红果盆景快速生产技术[J]. 中国花卉盆景, 2009(6): 48-49.
- [5] 万莹. 来安花红茎段组织培养研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2014: 1-7.
- [6] 高兵, 孙俊, 章镇. 不同处理对嘎拉苹果单芽系外植体褐化的影响[J]. 经营管理者, 2009(23): 373.
- [7] 李晓强, 岑秀芬, 韦鹏霄, 等. 杨梅组织培养防污染与防褐化研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 9965-9967.
- [8] 周俊辉, 周家容, 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(S1): 481-486.
- [9] 张卫芳, 高疆生, 欧勇慧, 等. 抑制核桃组培中的褐化现象初探[J]. 落叶果树, 2003, 35(3): 4-7.
- [10] 蔡小东, 吴俊清, 谢志军. 一品红愈伤组织诱导? 增殖及悬浮系建立的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11417-11418.
- [11] 李桂荣, 孙丽, 孙俊逢. 油桃组织培养过程中防止褐变的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(5): 827-828.
- [12] 刘真华, 葛红, 郭绍霞, 等. 蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 732-734.
- [13] 龚晓洁. 几种防褐剂对马铃薯愈伤组织培养褐化现象的抑制效应[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10410-10412.

科技论文写作规范——作者

论文署名一般不超过 5 个。中国人姓名的英文名采用汉语拼音拼写, 姓氏字母与名字的首字母分别大写; 外国人姓名、名字缩写可不加缩写点。