

无花果组织培养中防止外植体褐化的研究

孙丽娟, 关洪斌^{*}, 赵晶, 马英, 崔晓伟 (山东大学威海分校海洋学院, 山东威海 264209)

摘要 [目的] 探讨防止无花果组织培养中外植体褐化的最佳方法。[方法] 以无花果幼树顶芽为试材, 研究了2种外植体类型、4种消毒方法、同一种消毒剂的不同消毒时间、5种激素组合和3种防褐化剂对无花果组织培养中外植体褐化的影响。[结果] 与刚长出幼叶的顶芽相比, 未发芽的顶芽适宜作防褐化外植体; 先将外植体用1 000 mg/L 维生素C溶液浸泡30 min, 再用浓度0.1% 升汞消毒为最佳消毒方法; 在一定时间范围内, 外植体用浓度10% 次氯酸钠消毒时间越长防褐化效果越好; 防褐化的最佳激素搭配为6-BA和NAA; 3种防褐化剂中以1 500 mg/L 维生素C的抗褐化效果最明显。[结论] 选用未分化的顶芽为外植体, 浓度0.1% 的升汞为消毒剂, MS为基本培养基并附加6-BA 1.0 mg/L和NAA 0.1 mg/L进行组织培养, 防止外植体褐化的效果最佳。

关键词 无花果; 组织培养; 褐化

中图分类号 S722.3⁺7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)02-00535-02

Preliminary Study on Preventing Explant from Browning in Tissue Culture of *Ficus carica*

SUN Li-juan et al (Marine College, Shandong University (Weihai), Weihai, Shandong 264209)

Abstract [Objective] The study aimed to discuss the best method for preventing explant from browning in *Ficus carica* tissue culture. [Method] With the terminal bud of *F. carica* young tree as tested material, the effect of 2 kinds of explants, 4 disinfection methods, a same sort of disinfectant with different sanitizing time, 5 hormone combinations, 3 anti-browning agents on explant browning in *F. carica* tissue culture. [Result] Compared with the terminal buds that just grew young leaves, the terminal buds without sprouting was suitable to act as anti-browning explant. The best disinfection method was to immerse the explant in Vc solution at 1 000 mg/L for 30 min. First, and then sterilize with 0.1% mercuric chloride. In a certain time range, with the 10% sodium hypochlorite for sterilization, the explant anti-browning effect was better when the sanitizing time was longer. The optimal hormone collocation for anti-browning was 6-BA and NAA. Among 3 anti-browning agents, the 1 500 mg/L Vc was in the most anti-browning effect. [Conclusion] The best effect of preventing explant from browning was to select the terminal bud without differentiation as explant, 0.1% mercuric chloride as disinfectant, MS as basic medium with 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L for tissue culture.

Key words *Ficus carica* L.; Tissue Culture; Browning

无花果 (*Ficus carica*) 为桑科榕树属落叶灌木或小乔木。其果实皮薄无核, 肉质松软甘甜, 可食率达92%以上, 具有很高的营养和药用价值。栽培无花果具有很高的经济、生态和社会效益。组织培养是快速繁殖加大栽培规模的方法之一, 但组织培养过程中, 外植体褐变是导致失败的主要原因, 因此防止褐变非常关键^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为取自山东大学威海分校温室内无花果幼树顶芽。

1.2 方法

1.2.1 试验步骤。 外植体用洗衣粉清洗浸泡10 min, 流水冲洗3 min, 沥干; 用浓度70%的酒精处理30 s, 无菌水冲洗3~4次; 浓度0.1% 升汞灭菌7~9 min, 无菌水冲洗3~4次; 无菌滤纸吸干水分, 去外苞片, 切割成0.5 cm长的芽尖, 接种到培养基上。基本培养基为MS, 添加激素类物质有6-BA、NAA、KT、GA, 附加蔗糖30 g/L, 琼脂8 g/L。接种后12℃下培养2 d再转入25℃光照、22℃黑暗处培养, 光照强度1 500~2 500 lx, 每天光照12 h。

1.2.2 试验设计。 ①以刚长出幼叶的顶芽和未发芽的顶芽2种类型的外植体进行接种试验, 研究不同外植体类型对褐化的影响。②外植体消毒过程中设置常规消毒、浓度1 000 mg/L 维生素C (Vc) 30 min + 0.1% 升汞、浓度1 000 mg/L 半胱氨酸溶液30 min + 0.1% 升汞、浓度1 000 mg/L Vc 30 min + 10% 的次氯酸钠溶液4种消毒方法, 研究消毒方法对外植体褐化的影响。③先将外植体用1 500 mg/L Vc 溶液浸泡30

min, 然后用次氯酸钠溶液分别消毒不同的时间, 培养5 d后观察褐变情况, 研究同一种消毒剂的消毒时间对外植体褐化的影响。④在培养基中分别附加不同浓度的6-BA、KT、NAA、GA等激素, 研究激素组合对外植体褐化的影响。⑤培养基中添加不同浓度的Vc、半胱氨酸和硫代硫酸钠, 研究抗褐化剂对外植体褐化的影响。

2 结果与分析

2.1 不同外植体类型对外植体褐化的影响 以刚长出幼叶的顶芽和未发芽的顶芽2种类型的外植体进行接种试验, 培养35 d后, 结果表明, 刚刚长出幼叶的顶芽相比未发芽的顶芽, 褐化现象较严重, 分化率也较低^[2]。

2.2 不同消毒方法对外植体褐化的影响 由表1可知, 将外植体用浓度1 000 mg/L的Vc溶液浸泡30 min, 再用升汞消毒的方法为最佳消毒方法, 外植体培养过程中褐变程度最轻。

2.3 同一种消毒剂的消毒时间对外植体褐化的影响 由表2可知, 在一定时间范围内, 外植体用浓度10% 次氯酸钠消毒时间越长, 效果越好, 外植体的生长也较好, 但是与浓度0.1% 升汞相比效果还是稍差^[4]。

2.4 不同激素组合对外植体褐化的影响 由表3可知, 既防褐化又使外植体生长良好的最佳激素搭配为6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L。另外, 在培养基中加入100 mg/L的PG (间苯三酚) 对愈伤组织及幼芽的产生有促进作用^[5]。

2.5 防褐化剂对外植体褐化的影响 培养基用Vc由低到高不同浓度处理的抗褐化效果随浓度的增高而明显。由表4可知, 当Vc浓度达到1 500 mg/L时, 抗褐化效果最明显。半胱氨酸处理效果和Vc类似, 但是没有Vc效果明显^[6]。

作者简介 孙丽娟 (1986-), 女, 辽宁朝阳人, 本科, 专业: 生物科学。
*通讯作者, 博士, 副教授。

收稿日期 2008-10-29

表 1 外植体不同消毒方法的消毒结果

Table 1 Results of different disinfection methods for the explant

消毒方法 Disinfection method	褐变度 Browning degree		外植体生长情况 Growth situation of explants
	15 d	35 d	
常规消毒 Conventional disinfection	++	++	一般 Normal
1 000 mg/L Vc 30 min + 0.1% 升汞	+	++	良好 Fine
1000 mg/L Vc 30 min + 0.1% mercuric chloride			
1 000 mg/L 半胱氨酸溶液 30 min + 0.1% 升汞	++	++	一般 Normal
1 000 mg/L cysteine solution 30 min + 0.1% mercuric chloride			
1 000 mg/L Vc 30 min + 10% 的次氯酸钠溶液	++	+++	差 Bad
1 000 mg/L Vc 30 min + 10% sodium hypochlorite solution			

注: + 为轻微褐变; ++ 为中度褐变; +++ 为严重褐变。褐变度的调查是以同一处理绝大部分接种材料的表现来界定^[3]。下表同。

Note: +. Light browning; ++. Medium browning; +++. Serious browning. Investigation on browning degree was defined by the performance of the most inoculated materials in the same treatment. The same as follows.

表 2 次氯酸钠不同消毒时间对外植体褐化的影响

Table 2 Effects of different disinfection time of sodium hypochlorite on explant browning

消毒时间 // min Disinfection time	褐变度 Browning degree	外植体生长情况 Growth situation of explants
10	+++	一般 Normal
11	+++	一般 Normal
12	++	一般 Normal
13	++	良好 Fine
14	+	较好 Relatively good

表 3 不同激素对外植体生长分化的影响

Table 3 Effects of different hormones on growth and differentiation of explant

激素种类及浓度 // mg/L Hormone type and concentration				外植体生长情况 Growth situation of explants	褐变度 Browning degree	
6-BA	KT	NAA	GA		15 d	35 d
1.0	0	0.1	0	好 Good	+	+
1.0	0	0.2	0	差 Bad	++	+++
1.0	0	0.1	0.2	好 Good	+	++
0	2.0	0.1	0	一般 Normal	++	++
1.0	0	0.1	0	良好 Fine	+	+

3 结论与讨论

在木本植物组织培养中,外植体的褐化是导致培养失败

表 4 防褐化剂对外植体褐化的影响

Table 4 Effects of different reagents on the browning of explant

防褐化剂 Browning prevention agent	浓度 // mg/L Concentration	褐变度 Browning degree		外植体生长情况 Growth situation of explants
		15 d	35 d	
Vc	500	+	+++	一般 Normal
Vc	1 000	+	++	良好 Fine
Vc	1 500	+	+	良好 Fine
半胱氨酸 Cysteine	1 000	++	++	一般 Normal
硫代硫酸钠 Sodium thiosulfate	1 000	+	++	良好 Fine

的主要原因。由于无花果含有较多的组织浆汁,浆汁含有大量易氧化酚类物质,褐化问题严重,阻碍了芽体的萌发和愈伤组织的增殖^[7],因此褐化的控制成为无花果组织培养首先要解决的问题。该试验结果表明,选用未分化的顶芽为试材能更好地防止褐化;采用 MS 为基本培养基,适当增加培养基硬度可减轻褐化;生长调节物质的种类与浓度对愈伤组织的产生和褐化有明显影响,6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L,再添加适量的 PG 应是愈伤组织产生和防褐化的最适宜激素组合;外植体不同的消毒方法对防褐化影响明显,其中以浓度 1 500 mg/L Vc 为最佳选择;用浓度 10% 次氯酸钠消毒时,在 10 ~ 14 min 范围内,消毒时间越长,防褐化效果越明显。

参考文献

[1] 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.
 [2] 罗丽华. 板栗组织培养及褐变研究[M]. 长沙:中南林学院,2004:9-17.
 [3] 刘均利,马明东. 华盖木组织培养中褐化控制研究[J]. 浙江林业科技,2007,27 (1):20-23.
 [4] 德庆措姆,布穷. 银白杨组织培养中外植体消毒时间初探[J]. 辽宁林业科技,2000 (4):29.
 [5] 段新玲,任东岁,赵书珍. 无花果组织培养再生系统的研究[J]. 林业科学研究,2001,14 (6):621-627.
 [6] 陈凯,刘颖. 如何控制植物组织培养中褐变的产生[J]. 邯郸农业高等专科学校学报,2004,21 (3):5-6.
 [7] 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.
 [8] 林淦,吴传兵. 大豆组织离体培养有效防止褐变的方法探讨[J]. 天津农业科学,2006,12 (1):23-24.
 [9] JIANG Q, DONG L, NING Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense* Turcz and its *in vitro* rooting technique[J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9 (5):47-49,62.
 [10] 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.
 [11] LIU H M, LINGHU K Y, FANG X B. The study on induction and proliferation of tube bulbs in *Lilium brownii* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9 (1):18-20,53.