

大叶栎组织培养中外植体褐变的初步研究

刘光金, 黄寿先[✉], 刘芳, 梁机, 周传明 (广西大学林学院, 国家林业局中南速生材繁育重点实验室, 广西南宁 530004)

摘要 [目的] 分析大叶栎多酚类物质含量对初代培养外植体褐变的影响情况。[方法] 将大叶栎外植体接种在添加不同浓度的活性炭和抗坏血酸的 MS 培养基上, 观察其褐变致死情况。同时对大叶栎不同年龄、不同部位试样的多酚类物质含量进行测定, 分析其对初代培养外植体褐变的影响, 初步研究降低大叶栎初代培养外植体褐变的措施。[结果] 大叶栎不同器官、不同部位的试样多酚类物质含量不同, 多酚类物质含量与大叶栎初代培养外植体褐变呈极显著的正相关 ($r=0.899$), 在培养基中添加 1.0~3.0 g/L 活性炭和 0.1~0.3 mg/L 抗坏血酸有利于降低大叶栎初代培养外植体的褐变, 活性炭的效果略优于抗坏血酸。[结论] 大叶栎初代培养外植体的褐变与多酚类物质含量密切相关。

关键词 大叶栎; 多酚类物质; 组织培养; 褐变

中图分类号 S722.3⁺7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)16-07343-02

Preliminary Study on Browning of Explant in *Castanopsis fissa* Tissue Culture

LIU Guang-jin et al (Forestry College, Guangxi University, Key Laboratory for Breeding Fast-growing Tree in Central South China of State Forestry Administration, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract [Objective] The purpose was to analyze the effects of polyphenol substance content in *Castanopsis fissa* on explant browning in initial culture. [Method] The browning caused death of *C. fissa* explant was observed by inoculating *C. fissa* explant on the MS medium with different concentration of the active carbon and ascorbic acid. Meanwhile, the polyphenol substance contents in the samples of *C. fissa* with different ages in various positions were determined, its effects on explant browning of initial culture were analyzed and the measures of reducing explant browning in initial culture for *C. fissa* were researched preliminarily. [Result] The polyphenol substance contents in the samples of *C. fissa* in different organs and different positions were varied, and the polyphenol substance contents had extremely significant positive correlation with explant browning in initial culture of *C. fissa* ($r=0.899$). Adding 1.0-3.0 g/L active carbon and 0.1-0.3 mg/L ascorbic acid in medium was in favor of decreasing the browning of explant of *C. fissa* in initial culture, and the effect of active carbon was slightly better than that of ascorbic acid. [Conclusion] The browning of explant of *C. fissa* in initial culture was closely related with polyphenol substance contents.

Key words *Castanopsis fissa*; Polyphenol substance; Tissue culture; Browning

大叶栎 (*Castanopsis fissa*) 又名鸢萼栲, 属壳斗科栲属植物, 是南亚热带常绿阔叶速生树种。该树种生长快、萌芽力强, 具有较高的工业利用价值及良好的生态效益^[1-3]。大叶栎的器官富含多酚类物质, 在组织培养中易导致初代培养外植体褐变死亡。笔者对大叶栎不同年龄、不同部位试样的多酚类物质含量进行测定, 分析其对初代培养外植体褐变的影响, 并初步试验了降低大叶栎初代培养外植体褐变的措施。

1 材料与方法

1.1 材料 大叶栎试样采自广西南宁市广西大学林学院实验基地。

1.2 方法

1.2.1 多酚类物质的含量测定。 测定采用比色法^[4]。

1.2.1.1 样品制备。 将 1 g 试样研磨后置于 200 ml 三角瓶中, 加入 50 ml 沸蒸馏水, 沸水浴浸提 30 min, 每隔 10 min 轻摇三角瓶。冷却至室温后, 蒸馏水定容至 100 ml。

1.2.1.2 多酚类物质的测定。 吸取 1 ml 样品液, 加入蒸馏水 4 ml, 酒石酸铁溶液 5 ml, 用磷酸缓冲液定容至 25 ml, 用 UV755B 紫外分光光度计在 540 nm 处测其吸光度, 3 次重复。

1.2.1.3 标准曲线的绘制。 ①酒石酸铁溶液的配制: 取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (AR 级) 100 mg, 酒石酸钾钠 (AR 级) 500 mg, 用水溶解并定容至 100 ml 容量瓶。②磷酸缓冲液的配制: 将 0.066 7 mol/L 磷酸氢二钠 (AR 级) 溶液与 0.066 7 mol/L 磷

酸二氢钾 (AR 级) 溶液按 84:16 比例混合, 调节 pH 值至 7.5。
③没食子酸丙酯标准溶液的配制: 准确称取干燥的没食子酸丙酯 (CR 级) 50 mg, 置于 100 ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 浓度为 0.5 mg/ml。

准确吸取没食子酸丙酯标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml, 分别置于 25 ml 容量瓶中, 加水至体积为 5 ml; 再各加入 5 ml 酒石酸铁溶液, 用磷酸缓冲液定容至 25 ml, 混匀, 在 540 nm 处, 测定光密度。然后以没食子酸浓度为横坐标, 以其吸光度为纵坐标作标准曲线 (图 1)。计算回归方程为: $y = 12.782\ 857\ 14\ x + 0.015\ 142\ 857$, $r = 0.999\ 471\ 077$ 。

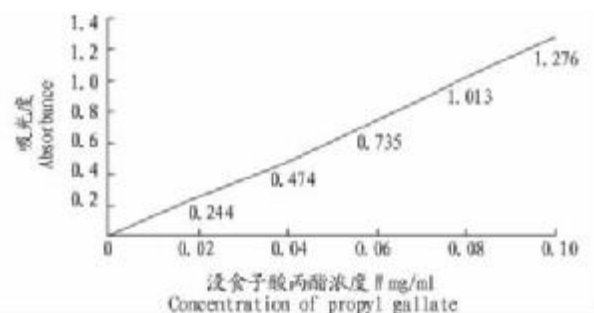


图 1 没食子酸丙酯标准溶液标准曲线

Fig. 1 Standard curve of propyl gallate standard solution

1.2.2 大叶栎初代培养褐变试验。 外植体接种在 MS 培养基上, 接种后第 30 天观察外植体褐变致死情况。

1.2.3 抗褐变试验。 在 MS 培养基上添加不同浓度的活性炭和抗坏血酸, 外植体接种第 30 天观察记录其褐变致死情况。

2 结果与分析

2.1 不同器官不同取样部位的多酚类物质含量变化 由表 1 可知, 3 年生大叶栎半木质化枝条茎段与叶子多酚含量均

基金项目 广西“十五”林业科技项目 (林科字 2002[18])。

作者简介 刘光金 (1983 -), 男, 山东肥城人, 硕士研究生, 研究方向: 林木遗传改良。* 通讯作者, E-mail: huangshouxian@163.com。

收稿日期 2009-03-17

高于新生萌芽条茎段与叶子;半木质化枝条和新生萌芽条的叶子多酚类含量明显高于其茎段,约为茎段含量的3~5倍。形态学位置不同,半木质化枝条和新生萌芽条茎段多酚含量也有差异,形态学上端含量高于形态学下端。

表1 大叶栎不同试样多酚类物质的含量

Table 1 Polyphenols content of sample from different parts of *Castanopsis fissa*

半木质化枝条 Half lignified branch	多酚类物质 含量//% Polyphenols content	新生萌芽条 New coppice shoot	多酚类物质 含量//% Polyphenols content
上段 Upper part	3.37	上段 Upper part	5.20
中段 Median part	3.05	中段 Median part	2.01
下段 Lower part	2.41	下段 Lower part	1.71
幼叶 Young leaf	11.90	幼叶 Young leaf	11.36
成熟叶 Climax leaf	8.83	成熟叶 Climax leaf	7.44

2.2 大叶栎多酚类物质含量对初代培养外植体褐变的影响

取新生萌芽条的顶位芽、中位芽、基位芽和3年生半木质化枝条的顶位芽、中位芽、基位芽,经0.1%氯化汞消毒灭菌后分别接种于MS基本培养基上,接种后30d观察统计褐变结果。由表2可知,半木质化枝条和新生萌芽条都表现出取自形态学上端的外植体褐变率高于形态学下端外植体。用不同部位的外植体初代培养的褐变率与相对应的多酚类物质含量进行相关分析,褐变率与多酚类物质含量呈极显著的正相关($r=0.899$)。

表2 大叶栎不同部位外植体初代培养的褐变率

Table 2 Browning rate of explant from different parts of *Castanopsis fissa* in initial culture

不同部位 Different parts	新生萌芽条 New coppice shoot		半木质化枝条 Half lignified branch	
	接种外植体数 Explant number	褐化率 % Browning rate	接种外植体数 Explant number	褐化率 % Browning rate
上段 Upper part	33	87.9	35	71.4
中段 Median part	35	20.0	30	60.0
下段 Lower part	30	13.3	34	55.9

2.3 活性炭和抗坏血酸对大叶栎初代培养外植体褐变的影响 由表3可知,在培养基中添加活性炭和抗坏血酸对褐变有良好的抑制作用。不添加活性炭和抗坏血酸的培养基上,

初代培养外植体的褐变死亡率高达80%;添加活性炭和抗坏血酸的培养基上外植体的平均褐变率分别为47.5%和50.8%。

表3 活性炭和抗坏血酸对大叶栎外植体初代培养褐变的影响

Table 3 Effect of activated carbon and ascorbic acid on explant browning rate of *Castanopsis fissa* in initial culture

活性炭 g/L Activated carbon	接种外植体数 Explant number	褐化死亡 率//% Browning rate	抗坏血酸 g/L Ascorbic acid	接种外植体数 Explant number	褐化死亡 率//% Browning rate
0	30	80.0	0	30	80.0
1.0	30	48.3	0.1	30	50.0
2.0	30	42.5	0.2	30	58.3
3.0	30	51.7	0.3	30	44.2

3 小结

(1) 大叶栎不同器官、不同年龄、不同部位材料多酚类物质含量不同。3年生大叶栎半木质化枝条茎段和叶子的多酚类物质含量高于新生萌芽条的茎段与叶子;3年生半木质化枝条和新生萌芽条叶子多酚类含量明显高于茎段;同一枝条形态学上端多酚类物质含量高于形态学下端。

(2) 大叶栎初代培养外植体的褐变与多酚类物质含量呈极显著的正相关。

(3) 在培养基中添加1.0~3.0 g/L活性炭和0.1~0.3 mg/L抗坏血酸有利于降低大叶栎初代培养外植体的褐变,活性炭的效果略优于抗坏血酸。在培养基中添加抗褐变物质是减轻褐变影响的常用方法,但由于植物种类不同、抗褐变剂种类和浓度不同,组织培养材料的褐变程度有很大的差异^[5-6]。

参考文献

- [1] 苏小青. 不同演替阶段中蕈菌种群的大小结构与分布格局[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(6): 499-504.
- [2] 詹怀宇, 岳保珍, 张旭坊, 等. 黎蒴栲纤维形态及制浆漂白性能的研究[J]. 广东造纸, 1998(2): 1-4.
- [3] 黄寿先, 李耀斌, 周传明, 等. 广西苍梧县大叶栎生长量变异规律的初步研究[J]. 广西林业科学, 2001, 30(S1): 41-44.
- [4] 雷桂兰, 吴中华, 刘世旺, 等. 苦荆茶中多酚类物质的含量测定[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2005, 2(1): 37-40.
- [5] 罗丽华, 陈建华, 苏冬梅, 等. 板栗组培过程中褐变研究初探[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 30-31.
- [6] 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 等. 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.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率), 单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时), 则可取各主要词首字母写成缩写, 但需在第一次出现处写出全称, 表及图中则用注解形式在下方注明, 以便读者理解。