

黑莓外植体褐化影响因素分析及适宜培养条件筛选

王小敏, 吴文龙, 李海燕, 于 旻, 李维林^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要: 以黑莓(*Rubus* spp.)品种‘Kiowa’为实验对象,研究了基本培养基类型、外植体类型、枝条暗处理时间、防褐化剂以及光照度对组织培养中外植体褐化及腋芽诱导的影响。结果表明,在供试的6种基本培养基(MS、1/2 MS、B5、1/2 B5、N6和1/2 N6)中,在MS培养基上外植体的褐化率较低(37.78%)、腋芽诱导率最高(67.89%)且生长状况良好;褐化程度与外植体的木质化程度及取材部位均有一定的关系,以1年生半木质化枝条的上部茎段为外植体,褐化率最低(19.67%)、腋芽诱导率较高(91.89%)且生长状况良好;接种前进行一定时间的暗处理对外植体褐化有一定的抑制作用,对枝条暗处理3 d,防褐化效果最佳;在培养基中添加不同类型和浓度的防褐化剂对外植体褐化和腋芽诱导也有一定的影响,以添加3 000 mg·L⁻¹活性炭或200 mg·L⁻¹ V_C的防褐化效果较好;培养过程中的光照度与外植体褐化也有一定的关系,在1 500 lx光照度下外植体的褐化率较低(15.66%)且腋芽诱导率和生长状况均较好。根据实验结果,筛选出防止黑莓外植体褐化的适宜培养条件为:以1年生半木质化枝条的上部茎段为外植体,15℃暗处理3 d后,消毒并接种在添加了3 000 mg·L⁻¹活性炭或200 mg·L⁻¹ V_C的MS培养基(含20 g·L⁻¹蔗糖、5.6 g·L⁻¹琼脂及0.2 mg·L⁻¹ 6-BA, pH 5.8)上,置于光照度1 500 lx的条件下培养。

关键词: 黑莓; 组织培养; 外植体; 防褐化; 腋芽诱导

中图分类号: Q943.1; S663.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)03-0063-06

Analysis of influence factors on browning of blackberry explants and selection of suitable culture condition WANG Xiao-min, WU Wen-long, LI Hai-yan, YU Xu, LI Wei-lin^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(3): 63-68

Abstract: Effects of five factors including types of basic medium and explant, branch dark treatment time, anti-browning agent and illumination intensity on explant browning and axillary bud inducing were investigated using blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Kiowa’ as experimental object. The results show that on six basic media (MS, 1/2 MS, B5, 1/2 B5, N6 and 1/2 N6), the explants inoculated on MS medium show a lower browning rate (37.78%), the highest inducing rate of axillary bud (67.89%) and good growth status. The browning degree of explant has a certain relationship with lignification degree and sampling part. The lowest browning rate (19.67%), higher inducing rate of axillary bud (91.89%) and good growth status are obtained using the upper stem segment of semi-lignification branch of one year old as explants. Dark treating for a certain time before inoculating can inhibit the browning of explants and the anti-browning effect of dark treating for 3 d is the best. Different types and concentrations of anti-browning agents added in media have some effects on explant browning and axillary bud inducing, and the anti-browning effects of adding 3 000 mg·L⁻¹ active carbon or 200 mg·L⁻¹ V_C are better. Certainly, the browning degree of explant associates with the illumination intensity in culture process, and under 1 500 lx illumination condition, the browning rate is lower (15.66%) and the inducing rate and growth status of axillary bud are better. According to the results, the culture conditions suitable for anti-browning of blackberry explants are as follows: using the upper stem segment of semi-lignification branch of one year old as explants, treating them in dark condition for 3 d with 15℃, then inoculating on MS

收稿日期: 2008-07-04

基金项目: 国家科学技术部农业科技成果转化资金项目(2007GB2C100118); 江苏省农业高技术项目(BG2007311); 江苏省科技基础设施建设工程(BM2008101)

作者简介: 王小敏(1980—),女,山东苍山人,硕士,研究实习员,主要从事植物栽培与生物技术研究。

^①通信作者 E-mail: lwlenbg@mail.cnbg.net

medium added $3\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ active carbon or $200\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ V_c (containing $20\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, $5.6\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar and $0.2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, pH 5.8), under $1\ 500\ \text{lx}$ illumination condition for culture.

Key words: blackberry (*Rubus* spp.); tissue culture; explant; anti-browning; axillary bud inducing

黑莓(*Rubus* spp.)果实含有丰富的营养成分,是近年来兴起的第三代水果之一^[1-2]。黑莓是一种生态效益及经济效益均较好的多年生果树,具有广阔的发展前景^[3-4],但目前生产上仍主要采用压条及扦插等传统方法进行繁殖,繁殖系数低、速度慢。对黑莓进行组织培养,可在短期内获得大量的优质种苗。迄今为止,国内外学者已经对黑莓组织培养技术进行了一些研究,并取得了一定的研究进展^[5-8],但在组织培养过程中黑莓容易出现褐化现象^[9-10],特别是初代培养时外植体褐化率较高。褐化现象不仅影响黑莓外植体与继代植株的正常生长与分化增殖,而且还影响愈伤组织的诱导,进而影响组培效率和组培苗的质量。

作者对黑莓组织培养中与外植体褐化有关的基本培养基类型、外植体类型、枝条暗处理时间、防褐化剂种类及浓度以及光照度等影响因子进行了研究,以期摸索出防止外植体褐化的培养条件,为黑莓优良品种的推广及种质离体保存提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试外植体取自江苏省·中国科学院植物研究所苗圃,为黑莓品种‘Kiowa’的带腋芽茎段及叶片。

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌 于2007年4月采集‘Kiowa’的带腋芽茎段和叶片,洗衣粉液浸泡10 min后流水冲洗1~2 h,在超净工作台上用体积分数70%的乙醇消毒30 s,再用质量体积分数0.1% HgCl_2 溶液处理5 min,最后用无菌水冲洗3~5次。将消毒后的外植体修剪至长度约1.5 cm后分别接种到相应的培养基中。

1.2.2 基本培养基的比较实验 选择MS、1/2 MS、B5、1/2 B5、N6和1/2 N6为基本培养基,均添加 $20\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $5.6\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂及 $0.2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, pH 5.8。以1年生未木质化的‘Kiowa’带腋芽茎段为外植体,按上述方法消毒后分别接种到各培养基上,每处理15个外植体,均重复3次。于温度

(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $14\ \text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度 $1\ 500\ \text{lx}$ 、空气相对湿度约70%的条件下培养10 d,统计外植体的褐化率、褐化级别、腋芽诱导率以及腋芽的生长状况。

1.2.3 外植体类型的比较实验 以‘Kiowa’的1年生未木质化枝条茎段、1年生半木质化枝条的上部茎段和中部茎段、2年生结果枝条的未木质化茎段以及1年生枝条上的幼嫩叶片为外植体,取材时各茎段均有1个腋芽;按上述方法消毒后分别接种在添加了 $20\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $5.6\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $0.2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的MS培养基(pH 5.8)上,每处理接种15个外植体,均重复3次。于温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $14\ \text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度 $1\ 500\ \text{lx}$ 、空气相对湿度约70%的条件下培养10 d后,统计外植体的褐化率、褐化级别、腋芽诱导率以及腋芽的生长状况。

1.2.4 枝条暗处理时间的比较实验 以‘Kiowa’的1年生半木质化上部枝条为实验材料,取其中的50%,剪去底部较大叶片后置于培养箱内暗处理,温度保持 $15\ ^{\circ}\text{C}$,分别于3、5和8 d后各取一批枝条,按上述方法消毒后接种;另50%枝条修剪消毒后直接接种(对照组);每处理15个外植体,均重复3次。所用培养基均为添加了 $20\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $5.6\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $0.2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的MS培养基(pH 5.8)。于温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $14\ \text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度 $1\ 500\ \text{lx}$ 、空气相对湿度约70%的条件下培养,并分别于接种后1、3、5、7和10 d观察记录外植体的褐化状况。

1.2.5 防褐化剂的比较实验 在含 $20\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $5.6\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂和 $0.2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的MS培养基(pH 5.8)中,分别添加不同浓度的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、活性炭(AC)、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)和抗坏血酸(V_c),其中,PVP浓度分别为300、500和 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; AC浓度分别为1 000、3 000和 $5\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浓度分别为200、500和 $800\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; V_c 浓度分别为100、150和 $200\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以‘Kiowa’的1年生半木质化枝条的上部茎段为外

植体,按上述方法消毒后分别接种到各培养基上,每处理接种15个外植体,均重复3次。于温度(25±2)℃、光照时间14 h·d⁻¹、光照度1 500 lx、空气相对湿度约70%的条件下培养10 d后,观察统计外植体的褐化率、褐化级别、腋芽诱导率以及腋芽的生长状况。

1.2.6 光照度的比较实验 以‘Kiowa’的1年生半木质化枝条的上部茎段为外植体,按上述方法消毒后接种到含有20 g·L⁻¹蔗糖、5.6 g·L⁻¹琼脂和0.2 mg·L⁻¹6-BA的MS培养基(pH 5.8)上;分别置于光照度1 000、1 500、2 000和2 500 lx,光照时间14 h·d⁻¹,温度(25±2)℃,空气相对湿度约70%的条件下培养,10 d后观察统计外植体的褐化率、褐化级别、腋芽诱导率以及腋芽的生长状况。每处理接种15个外植体,均重复3次。

1.3 数据处理

采用SPSS 11.0软件对数据进行统计和差异显著性分析。褐化率和腋芽诱导率的计算公式分别为:褐化率=(褐化的外植体数/接种外植体数)×100%;腋芽诱导率=(萌发腋芽的外植体数/成活的外植体数)×100%。根据褐化程度的不同将褐化级别划分为6个等级:1级为轻微褐化;2级为较轻褐化;3级为中等褐化;4级为较深褐化;5级为重度褐化;6级为褐化致死。

2 结果和分析

2.1 基本培养基类型对黑莓外植体褐化和腋芽诱导的影响

不同类型基本培养基对黑莓组织培养过程中外植体褐化及腋芽诱导率的影响差异较大(表1)。在供试的6种基本培养基中,采用1/2 MS培养基,外植体的褐化级别最低,平均值仅为2.07,褐化率只有28.67%;采用N6培养基,褐化级别最高,达到5.20,褐化率高达88.33%。采用MS培养基,腋芽生长状况最好,腋芽诱导率也最高,达到89.33%;采用1/2 MS培养基,腋芽生长状况及腋芽诱导率仅次于MS培养基;1/2 N6培养基的腋芽诱导率最低,仅为13.33%,腋芽生长状况也最差。

由表1还可以看出,在MS、B5、N6培养基上,外植体的褐化率和腋芽诱导率均比各自的1/2培养基高。褐化率差异最大的是B5和1/2 B5培养基,前

者的褐化率是后者的1.47倍;差异最小的是MS和1/2 MS培养基,前者的褐化率是后者的1.32倍。腋芽诱导率差异最大的是N6和1/2 N6培养基,前者是后者的2.08倍;差异最小的是MS和1/2 MS培养基,前者是后者的1.32倍。在6种培养基中,虽然在1/2 MS培养基中外植体的褐化率最低,但其腋芽诱导率却较MS培养基低21.44个百分点,且腋芽的生长状况也比在MS培养基中差。因而,综合外植体褐化率及腋芽诱导率2个指标的测定结果,选择MS培养基为黑莓品种‘Kiowa’外植体初代培养的最佳基本培养基。

表1 基本培养基类型对黑莓品种‘Kiowa’外植体褐化和腋芽诱导状况的影响¹⁾

Table 1 Effect of basic medium types on browning and axillary bud inducing status of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Kiowa’ explants¹⁾

培养基 Medium	ABR/%	ABC	AIA/%	GS
MS	37.78d	2.33d	89.33a	良好 Good
1/2 MS	28.67e	2.07de	67.89b	一般 General
B5	55.33c	4.40b	58.67c	一般 General
1/2 B5	37.56d	3.11c	37.22d	差 Poor
N6	88.33a	5.20a	27.78e	差 Poor
1/2 N6	64.89b	4.46b	13.33f	更差 Poorer

¹⁾ ABR: 平均褐化率 Average browning rate; ABC: 平均褐化级别 Average browning grade; AIA: 平均腋芽诱导率 Average inducing rate of axillary bud; GS: 腋芽生长状况 Growth status of axillary bud. 表中所有数据均为3次重复的平均值 All datums in the table are the average of three replications; 同列中不同的字母表示差异显著(P<0.05) The different letters in the same column indicate the significant difference (P<0.05).

2.2 外植体类型对黑莓外植体褐化和腋芽诱导的影响

外植体的取材部位及木质化程度与黑莓外植体的褐化及腋芽诱导状况有明显关系(表2)。以‘Kiowa’1年生半木质化枝条中部茎段为外植体,褐化级别最高(4.60),褐化率也最高,达89.33%;以1年生半木质化枝条的上部茎段为外植体,褐化率最低,仅为19.67%,褐化级别也最低;以1年生未木质化枝条茎段和2年生结果枝条的未木质化茎段为外植体,褐化率相差不大,仅差0.94个百分点,但前者的褐化级别较后者高0.80;以1年生枝条上的幼嫩叶片为外植体,褐化率达56.33%,褐化级别达3.82。

腋芽诱导率最高的是1年生未木质化枝条茎段,其次为1年生半木质化枝条上部茎段,腋芽诱导率均达到90%以上,二者的腋芽诱导率仅相差2.24

百分点;1年生半木质化枝条中部茎段的腋芽诱导率最低,仅为28.67%。从腋芽的生长状况看,以1年生未木质化枝条茎段和1年生半木质化枝条上部茎段作为外植体,腋芽的生长状况均较好。

综合考虑褐化状况和腋芽诱导状况,在黑莓品种‘Kiowa’的初代培养中应选择1年生半木质化枝条上部茎段为外植体。

表2 外植体类型对黑莓品种‘Kiowa’外植体褐化及腋芽诱导状况的影响¹⁾
Table 2 Effect of explant types on browning and axillary bud inducing status of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Kiowa’ explants¹⁾

外植体 Explant	平均褐化率/% Average browning rate	平均褐化级别 Average browning grade	平均腋芽诱导率/% Average inducing rate of axillary bud	腋芽生长状况 Growth status of axillary bud
1年生未木质化枝条茎段 Stem segment of non-lignification branch of one year old	34.62c	3.57c	93.13a	较好 Better
1年生半木质化枝条上部茎段 Upper stem segment of semi-lignification branch of one year old	19.67d	1.33e	91.89b	好 Good
1年生半木质化枝条中部茎段 Middle stem segment of semi-lignification branch of one year old	89.33a	4.60a	28.67d	差 Poor
2年生结果枝条未木质化茎段 Non-lignification stem segment of bearing branch of two years old	35.56c	2.77d	47.22c	一般 General
1年生枝条上的幼嫩叶片 Tender leaf on one year old branch	56.33b	3.82b	-	-

¹⁾表中所有数据均为3次重复的平均值 All datums in the table are the average of three replications; 同列中不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)
The different letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$).

2.3 枝条暗处理时间对黑莓外植体褐化的影响

在消毒接种前对黑莓品种‘Kiowa’1年生半木质化上部枝条进行暗处理,均可降低外植体的褐化率,但随培养时间的延长,外植体褐化率均持续增加(表3)。与对照相比,接种前对枝条进行暗处理均可降低外植体褐化率,且暗处理时间不同褐化率也不同。3个暗处理组外植体的褐化率在培养第1天差别不大;暗处理3和5d的外植体在接种后5d内褐化率差别不大,且均低于暗处理8d的外植体;培养5d后,按外植体褐化率从小到大对各处理组进行排序,依次为暗处理3d、暗处理5d、暗处理8d、对照。

表3 暗处理时间对黑莓品种‘Kiowa’外植体褐化率的影响¹⁾
Table 3 Effect of dark treatment time on browning rate of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Kiowa’ explants¹⁾

暗处理 时间/d Dark treatment time	不同培养时间外植体的褐化率/% Browning rate of explant at different culture times				
	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
3	3.23de	6.67d	11.11bc	14.33b	19.56a
5	2.33e	6.14d	11.68c	16.11b	25.89a
8	5.42e	10.45d	19.32c	28.67b	43.15a
0(CK)	11.22e	18.78d	26.22c	37.11b	48.33a

¹⁾表中所有数据均为3次重复的平均值 All datums in the table are the average of three replications; 同行中不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$) The different letters in the same row indicate the significant difference ($P < 0.05$).

暗处理8d的外植体褐化率从光照培养3d后开始增加,培养10d时褐化率已接近对照组。另外还观察到,暗培养时间长的枝条,随接种后光照培养时间的延长,外植体的污染率也呈递增趋势,以暗培养3d的外植体污染率最低。因此,经过综合比较后确定,黑莓品种‘Kiowa’枝条暗处理的最佳培养时间是3d。

2.4 防褐化剂对黑莓外植体褐化和腋芽诱导的影响

在培养基中添加一定浓度的防褐化剂对黑莓外植体的褐变有一定程度的抑制作用(表4)。以活性炭(AC)和 V_C 作为防褐化剂,外植体的褐化率随其添加量的增加而降低;以聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为防褐化剂,当浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外植体的褐化率最低,随其浓度的增加褐化率有所增加;而以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 作为防褐化剂,随其浓度的增加,黑莓外植体的褐化率也不断增加。添加AC作为防褐化剂,外植体褐化级别最低;添加 V_C 和PVP作为防褐化剂,外植体的褐化级别也较对照组低;而以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为防褐化剂,褐化级别最高。

虽然PVP浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外植体的褐化率最低,但腋芽诱导率不高,且腋芽生长状况也较差。当AC浓度为 $5000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,外植体的褐化率较 $3000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AC处理组仅低2.56百分点,但

其腋芽诱导率却比后者低 22.22 百分点,且后者的褐化级别仅为 2.11。V_C浓度为 200 mg · L⁻¹时,外植体的褐化率最低,比 150 mg · L⁻¹ V_C处理组低 9.45 百分点,而腋芽的诱导率比后者仅低 1.45 百分点,且其褐化级别仅为 1.98。以 Na₂S₂O₃为防褐化剂,腋芽的诱导状况最差,浓度为 200 mg · L⁻¹时腋芽的诱导率最高,但也仅为 16.11%;浓度为 800 mg · L⁻¹时,腋芽的诱导率降至最低,仅为 3.49%。研究结果显示,在添加了 V_C的培养基上外植体的腋芽生长状况最好,腋芽诱导率也较高;在添加了 AC 的培养基上外植体的腋芽生长状况也较好。

综合上述结果后认为,在进行黑莓品种‘Kiowa’的组织培养时,在培养基中添加 3 000 mg · L⁻¹ AC 或 200 mg · L⁻¹ V_C可保持适宜的腋芽诱导率并能有效防止外植体褐化。

表4 防褐化剂对黑莓品种‘Kiowa’外植体褐化及腋芽诱导状况的影响¹⁾

Table 4 Effect of anti-browning agents on browning and axillary bud inducing status of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Kiowa’ explants¹⁾

防褐化剂 Anti-browning agent	浓度/ mg · L ⁻¹ Conc.	ABR/% ^a	ABC	AIA/%	GS
PVP	300	48.44d	3.27f	51.24f	好 Good
	500	14.33j	2.20gh	36.78h	一般 General
	1 000	29.11f	3.87d	13.49ij	差 Poor
AC	1 000	51.11c	3.20f	75.43c	一般 General
	3 000	16.78i	2.11h	66.34d	好 Good
	5 000	14.22j	1.73j	44.12g	差 Poor
V _C	100	36.33e	3.56e	67.53d	一般 General
	150	19.56hi	2.33g	90.22a	好 Good
	200	10.11k	1.98i	88.77b	一般 General
Na ₂ S ₂ O ₃	200	25.56g	3.60e	16.11i	一般 General
	500	37.78e	4.67b	9.67k	差 Poor
	800	68.89b	5.00a	3.49l	差 Poor
CK	-	82.22a	4.11c	58.62e	一般 General

¹⁾ ABR: 平均褐化率 Average browning rate; ABC: 平均褐化级别 Average browning grade; AIA: 平均腋芽诱导率 Average inducing rate of axillary bud; GS: 腋芽生长状况 Growth status of axillary bud. 表中所有数据均为 3 次重复的平均值 All datums in the table are the average of three replications; 同列中不同的字母表示差异显著 (P < 0.05) The different letters in the same column indicate the significant difference (P < 0.05).

2.5 光照度对黑莓外植体褐化和腋芽诱导的影响

在组织培养过程中,光照度对黑莓外植体褐化状况及腋芽诱导率均有较大的影响(表 5)。随着光照度的增加,外植体的褐化率逐渐升高,褐化级别也逐渐提高;光照度为 2 500 lx 时,外植体的褐化率最

高,达到 55.51%,褐化级别也最高,为 4.11。较弱 (1 000 lx) 或较强 (2 500 lx) 的光照度均不利于腋芽的诱导和生长。尽管在光照度 1 000 lx 条件下,外植体的褐化率最低,但其腋芽诱导率也较低;而当光照度为 1 500 lx 时,外植体的褐化率和褐化级别仅次于 1 000 lx 处理组,腋芽诱导率却最高,腋芽的生长状况也最好。

对外植体的褐化状况和腋芽诱导状况进行综合分析后认为,黑莓品种‘Kiowa’初代培养时最适宜的光照度为 1 500 lx。

表5 光照度对黑莓品种‘Kiowa’外植体褐化及腋芽诱导状况的影响¹⁾

Table 5 Effect of illumination intensity on browning and axillary bud inducing status of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Kiowa’ explants¹⁾

光照度/lx Illumination intensity	ABR/%	ABC	AIA%	GS
1 000	11.11d	1.57d	25.14d	一般 General
1 500	15.66c	2.00c	89.87a	较好 Better
2 000	33.33b	2.73b	68.52b	一般 General
2 500	55.51a	4.11a	37.22c	差 Poor

¹⁾ ABR: 平均褐化率 Average browning rate; ABC: 平均褐化级别 Average browning grade; AIA: 平均腋芽诱导率 Average inducing rate of axillary bud; GS: 腋芽生长状况 Growth status of axillary bud. 表中所有数据均为 3 次重复的平均值 All datums in the table are the average of three replications; 同列中不同的字母表示差异显著 (P < 0.05) The different letters in the same column indicate the significant difference (P < 0.05).

3 讨论和结论

植物褐化是指离体繁殖过程中培养材料向培养基中释放褐色物质,使培养基逐渐变褐,培养材料也随之变褐死亡的现象^[11]。在果树尤其是木本果树的组织培养过程中,比较容易出现外植体或培养物的褐化、枯死现象^[12]。由于各种因素的影响,黑莓外植体在组织培养过程中也极易出现褐化现象。

培养过程中过高的无机盐浓度能引起某些植物外植体中酚类物质的氧化,从而产生褐化现象^[13]。因此,在 MS、B5 和 N6 三种基本培养基上黑莓外植体的褐化率均高于各自的 1/2 培养基。由于 MS 培养基的总盐浓度相对低于 B5 和 N6 培养基,因此,使用 MS 基本培养基可减轻黑莓外植体的褐化。

取材部位及木质化程度对培养过程中黑莓外植体的褐变有重要影响。研究结果显示,2 年生结果枝条未木质化茎段的褐化率高于 1 年生枝条上的幼嫩叶片,而后者的褐化率又高于 1 年生枝条,导致这种

现象的原因可能是生长部位和生理状态不同的外植体中酚类物质的含量及多酚氧化酶(PPO)的活性有一定差异^[14]。选择处于旺盛生长状态的1年生半木质化枝条的上部茎段作为外植体,可大大减轻黑莓外植体的褐化程度,降低褐化率。

在培养前对材料进行一定时间的暗处理可使黑莓外植体的褐化率有所降低,但随接种后培养时间的延长,褐化级别也随之增加。这可能是因为暗培养只是暂时降低了多酚氧化酶的活性,减缓了酚类化合物的合成,一旦恢复正常培养,多酚氧化酶的活性又会有所提高^[15]。暗培养超过5 d,培养材料的生活力降低、木质化程度加深,进而导致外植体褐化率升高。此外,长时间的暗培养也会使培养材料滋生大量细菌,导致外植体污染率增加。因此,黑莓枝条暗处理的最佳时间是3 d。

聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对外植体褐化有一定的抑制作用,但是对腋芽的生长却十分不利,可能是由于PVP有一定的毒害作用,在一定程度上影响了腋芽的正常生长。活性炭(AC)可有效抑制黑莓外植体的褐化,可能是因为活性炭有较强的吸附能力,对外植体产生的褐色物质有一定的吸附作用,从而有效抑制了外植体褐化,但AC同时也吸附了培养基中的营养物质,导致培养材料营养缺失,因此在添加AC作为防褐化剂的培养基中,蔗糖和激素等的浓度应适当提高。在培养基中加入V_c也可有效防止培养材料褐变,这是因为V_c为多羟基还原物质,既可以使PPO失活、阻止酚类物质氧化,又能在酶的催化下消耗溶解氧,使酚类物质因缺氧而无法氧化^[14]。Na₂S₂O₃对外植体的褐化没有显著的抑制作用,反而影响腋芽的产生,可能是Na₂S₂O₃自身对植物细胞有一定的毒害作用所致。因此,在培养基中添加一定浓度的AC或V_c可以有效防止黑莓外植体的褐化。

培养过程中,低光照度(1 000 lx)可有效抑制黑莓外植体褐化,但不利于腋芽萌发;较强的光照度(2 500 lx)虽可增加腋芽诱导率但也提高了PPO活性,催化更多的酚类物质氧化形成醌,从而使外植体褐化程度增加。因此,在黑莓组织培养初期,光照度

应设定为1 500 lx,有利于降低外植体的褐化。

综上所述,黑莓品种'Kiowa'组织培养的最佳条件为:以1年生半木质化枝条的上部茎段为外植体,接种前枝条在培养箱内(15 ℃)暗处理3 d,然后经过消毒、修剪后接种到添加了3 000 mg·L⁻¹AC或200 mg·L⁻¹V_c的MS培养基(含20 g·L⁻¹蔗糖、5.6 g·L⁻¹琼脂及0.2 mg·L⁻¹6-BA,pH 5.8)上,并置于光照度1 500 lx的培养室内培养。

参考文献:

- [1] 吴文龙, 顾 嫻. 新经济植物黑莓的引种[J]. 植物资源与环境, 1994, 3(3): 45-48.
- [2] 吴文龙, 李维林, 闫连飞, 等. 不同品种黑莓鲜果营养成分的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 58-61.
- [3] 徐玉秀, 王友升, 王贵禧. 树莓的利用研究及其在我国的发展前景[J]. 经济林研究, 2003, 21(1): 64-66.
- [4] 李维林, 孙醉君, 吴文龙, 等. 江苏省黑莓区域性栽培试验[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(1): 38-42.
- [5] 徐桂娟, 罗晓芳, 姚洪军. 黑树莓的组织培养与快速繁殖[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(1): 99-100.
- [6] 蒋桂华, 吴延军, 谢 鸣, 等. 树莓、黑莓组织培养及遗传转化研究进展[J]. 果树学报, 2006, 23(4): 593-598.
- [7] Popescu A N, Isac V. High frequency shoot regeneration from leaf-derived callus in raspberry (*Rubus idaeus* L.) [J]. Acta Horticulturae, 2000, 538(2): 667-670.
- [8] Bobrowski V L, Mell-Farias P C, Peters J A. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars [J]. Revista Brasileira de Agrociência, 1996, 2(1): 17-20.
- [9] 蒋小满, 柏新富, 赵建萍. 黑莓的组织培养快速繁殖技术[J]. 北方园艺, 2007(10): 173-175.
- [10] 傅建敏, 高筱慧, 杨绍彬, 等. 美国黑莓快繁技术研究[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 54-56.
- [11] 姬惜珠, 王 红, 张爱军. 木本植物离体快繁中常见问题及解决方法[J]. 河北果树, 2005(2): 13-14.
- [12] 邹英宁, 吴强盛. 果树组织培养中褐变现象及其抑制研究进展[J]. 长江大学学报: 农学卷, 2007, 4(3): 47-50.
- [13] 陈 菲, 李 黎, 宫 伟. 植物组织培养的防褐化探讨[J]. 北方园艺, 2005(2): 69.
- [14] 陈惠娟. 植物组织培养中褐变的产生机理及克服措施[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 79-82.
- [15] 张俊琦, 罗晓芳. 牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(5): 720-724.