

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201610015

引文格式: 王倩颖, 唐佳妮, 刘志高, 等. 景宁木兰组织培养外植体选择与抗褐化研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(9):1088-1095  
WANG QY, TANG JN, LIU ZG, et al. Explant selecting and anti-browning of *Magnolia sinostellata* in tissue culture [J]. *Guihaia*, 2017, 37(9): 1088-1095

## 景宁木兰组织培养外植体选择与抗褐化研究

王倩颖<sup>1</sup>, 唐佳妮<sup>2</sup>, 刘志高<sup>1</sup>, 张明如<sup>1</sup>, 申亚梅<sup>1\*</sup>

( 1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300 )

**摘要:** 该研究以景宁木兰 (*Magnolia sinostellata*) 为材料, 从外植体类型的选择、消毒时间、预处理方法、离体培养条件和抗褐化剂类型选择等方面进行综合研究, 以期筛选出景宁木兰组织培养的最佳方案。结果表明: 利用 0.1% 氯化汞 ( $\text{HgCl}_2$ ) 浸泡处理 14 和 8 min 分别是景宁木兰叶片和带芽茎段、根部的最佳消毒时间; 景宁木兰叶片及茎段的褐化率在暗培养 7 d 时, 分别为 60.00% 和 56.67%, 14 d 时显著升高, 而根部则在暗培养 14 d 时褐化率最低 (45%); 利用  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 浸泡预处理景宁木兰外植体 6 h 可显著降低 ( $P < 0.05$ ) 其褐化程度, 处理后叶片、带芽茎段和根部的褐化率分别降至 45.00%、28.33% 和 63.33%。不同的抗褐化剂均可减轻外植体的褐化程度, 但针对不同外植体其效果不同。景宁木兰叶片最佳抗褐化剂为  $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸银 ( $\text{AgNO}_3$ ), 可使其褐化率降低至 16.67%, 成活率为 11.67%; 带芽茎段和根部的最优抗褐化剂为  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸 (CA), 褐化率分别降至 30.00% 和 5.00%, 成活率依次为 50.00% 和 76.67%。综上所述, 带芽茎段和根部抗褐化处理后褐化率较低且成活率较高, 为景宁木兰组织培养最佳外植体。

**关键词:** 景宁木兰, 消毒时间, 暗培养, 抗褐化剂, 组织培养, 抗褐化, 成活率

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)09-1088-08

## Explant selecting and anti-browning of *Magnolia sinostellata* in tissue culture

WANG Qian-Ying<sup>1</sup>, TANG Jia-Ni<sup>2</sup>, LIU Zhi-Gao<sup>1</sup>, ZHANG Ming-Ru<sup>1</sup>, SHEN Ya-Mei<sup>1\*</sup>

( 1. College of Landscape Architecture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Forestry and Life Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China )

**Abstract:** *Magnolia sinostellata* is one of the endangered plants in Magnoliaceae, and is also facing the challenge of tissue culture for browning. Therefore, the leaf, stem with bud and root of *M. sinostellata* as explants were treated in different disinfection time (8, 10, 12, 14 min), light and dark condition, pretreated by PVP and Vc, and the basic media was MS (Murashige and Skoog) +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA, pH5.8) in this study. And then, three explants

收稿日期: 2017-01-04 修回日期: 2017-02-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31400599); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2012C12909-4, 2016C02056-12) [ Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400599); the 12th Five-Year-Plan for Floriculture Special Breeding of Zhejiang Province, China (2012C12909-4, 2016C02056-12) ]。

作者简介: 王倩颖 (1992-), 女, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 从事园林植物应用与育种研究, (E-mail) 1463156503qq.com。

\* 通信作者: 申亚梅, 博士, 副教授, 从事园林植物应用与育种研究, (E-mail) yameishen@zafu.edu.cn。

were treated by the basic media with 0.5, 1, 2 g · L<sup>-1</sup> anti-browning substance (Vc, PVP, CA, AgNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) for getting the optimal tissue culture methods. All culture processes were put in 25 °C condition. The results showed that 14 min was the best sterilization time for the leaves and stems with bud, and 8 min was the optimal sterilization time for the roots under 0.1% HgCl<sub>2</sub> disinfection. The browning rates of leaves and stems were the lowest at 7 d during the early stage under dark culture condition, which was 60.00% and 56.67% respectively, and the browning rate of root was 45.00% at 14 d. Soaking explants in 1 g · L<sup>-1</sup> PVP for 6 h as pretreatment can significantly reduce the browning rate ( $P < 0.05$ ), the browning rate of leaves, stems with buds and roots were reduced to 45%, 28.33% and 63.33% respectively. Anti-browning agents and concentrations can effectively reduce the degree of browning of the explants in *M. sinostellata*. The best anti-browning substance for leaves was 0.02 g · L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> and its browning rate reduced to 16.67%, the survival rate was 11.67%; 2 g · L<sup>-1</sup> CA was the optimal anti-browning substance for stems with buds and root, the browning rate were 30% and 50%, the survival rate was 50.00% and 76.67%. In conclusion, we found that the stem segment with bud and root were the best explants for tissue culture of *M. sinostellata*. This research had obtained the best scheme for preventing the browning of explants in *M. sinostellata*, which is helpful for the rapid propagation technique of *M. sinostellata*, and to provide reference for the study of other species of Magnoliaceae.

**Key words:** *Magnolia sinostellata*, disinfection time, dark culture, anti-browning substance, tissue culture, anti-browning, survival rate

木兰科 (Magnoliaceae) 植物为古老的木本植物类群,因其具有较高的观赏价值而得到广泛关注。但是,该类植物多因结实率低、繁殖能力弱、生长势弱等问题而面临灭绝。植物组织培养技术是保存植物种质资源的一种有效手段,也是开展植物基因组研究的重要条件。国内对木兰科植物的研究主要集中在遗传多样性(王佳媛等,2012;杨梅等,2014)、濒危机制(袁春明等,2012;陈红峰等,2011)以及分类学(方大风等,2015;刘克旺和杨旭红,2001)等方面。相较于其他模式植物,因没有完善的组培再生体系,木兰属 (*Magnolia*) 植物极少开展基因组学研究。仅有的对于木兰属植物的基因功能验证,也只能进行模式植物转化间接验证(Jing et al,2014),从而影响了木兰属植物的研究和育种工作。因此,建立木兰科植物完整的扩繁体系,不仅可以解决其无性繁殖的问题,更好地保护木兰科种质资源,还可为木兰科植物基因功能验证等相关研究奠定技术基础。

目前,仅鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*) (郭治友等,2008)、北美鹅掌楸 (*L. tulipifera*) (陈颖等,2009)、红花山玉兰 (*Magnolia delavayi*) (唐军荣等,2014)等少数几个木兰科植物具有外植体再生体系或外植体无菌再生体系。木兰科植物本身含有诸多酚类物质,造成其组培过程中褐化现象严重。因

此抑制褐化现象是木兰科植物组织培养能否取得成功的关键步骤。褐化主要分为两种,即酶促褐化和非酶促褐化。植物体内的多酚氧化酶(PPO)和外植体分泌的酶类、酚类、单宁类等次生代谢底物发生化学反应产生毒害物质,致使细胞失活、外植体死亡的现象即为酶促褐化。如木兰科植物外植体切割后,分泌的酚类化合物发生氧化反应后形成醌类化合物,在酪氨酸酶的作用下,与培养材料中的蛋白质发生聚合,导致其他酶系统的失活,代谢紊乱,进而影响植物的生长(黄烈健和王鸿,2016)。非酶促褐化是指由外界环境(如温度等)所引起的植物细胞程序性死亡或细胞坏死现象,其不会引起酚类物质的产生。外植体的褐化与其树龄、选取部位、大小等均有密切关系,因此选择合适外植体与培养条件是解决褐化的基本条件。预防组织培养中的外植体褐化问题,主要方式有选择最适外植体、对外植体浸泡预处理、培养基中加入抗褐化剂和适宜的培养条件。在木兰科植物组培研究中,体胚繁殖虽取得一定的进展(陈颖等,2009),但木兰科植物多为濒危物种,本身存在结实率低,甚至不结实等问题,使得一些种类的体胚繁殖受到阻碍,因此茎段与芽成为研究者采用最多的外植体(曾宋君等,2000;黎明和马焕成,2003)。对白玉兰 (*Magnolia denudata*) (周丽艳等,2008)、天女木兰

(*M. sieboldii*) (王欢等, 2012) 的研究表明, 适当的暗培养及低温可有效降低外植体的褐化率, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、抗坏血酸(Vc)等抗褐化剂预处理外植体或加入至培养基中亦可有效降低外植体褐化率。

景宁木兰(*M. sinostellata*)是木兰科木兰属新种, 落叶灌木, 花瓣数量9~18瓣不等, 分布于浙江南部地区, 属于极度濒危物种。该物种在组培过程中存在严重的褐化现象, 阻碍了组织细胞的分化。因该物种结实率极低, 故本研究选择嫩叶、带芽茎段和根为外植体, 通过比较不同消毒时间、外植体预处理方式、离体培养的环境条件和抗褐化剂类型及浓度等, 筛选出景宁木兰组织培养最佳外植体、最佳消毒时间及防止外植体褐化的最佳方案, 以期为景宁木兰的离体快繁技术奠定基础, 并为木兰科其他物种的研究提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

1.1.1 外植体的选取 外植体选取景宁木兰生长健壮, 无病虫害的当年生嫩叶、带芽茎段和根部。2016年6月1日采自浙江农林大学苗圃内种植的景宁木兰。

1.1.2 培养基 基本培养基为MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.3 mg·L<sup>-1</sup>IAA, MS培养基附加8 g·L<sup>-1</sup>的琼脂, pH 5.8。

### 1.2 处理方法

将采回的景宁木兰嫩叶、带芽茎段及根部先用洗洁精清洗, 去除表面灰尘和杂物等, 再用流水冲洗2 h, 放在超净工作台上用75%的酒精对其表面消毒30 s, 无菌水冲洗3~4次。之后, 用0.1%的HgCl<sub>2</sub>浸泡消毒, 无菌水冲洗3~4次, 无菌纸吸干, 最后将带芽茎段、根部修剪成1~1.5 cm, 叶片修剪成1 cm×1 cm, 分别接种于相应的培养基上。培养温度为(25±2)℃, 光照时间为12 h·d<sup>-1</sup>, 光照强度为2 000~2 500 lx。实验处理采用单因素实验。每个处理接种5瓶, 每瓶接种4个外植体, 3次重复。30 d后统计污染率及成活率。

1.2.1 消毒时间的设置 设4个时间处理: 处理时间分别为8、10、12和14 min。将消毒后的三种景宁木

兰外植体接种于基本培养基上, 并统计污染率及成活率。

1.2.2 培养条件的设置 基于1.2.1的研究结果, 将3种外植体按其最佳消毒时间消毒后, 接种于基本培养基上, 之后在三种培养条件下培养外植体, 统计褐化率及成活率并比较。三种培养条件如下: (1)接种后于25℃暗培养14 d, 转入光培养, 光照时间为12 h·d<sup>-1</sup>; (2)接种后于25℃暗培养7 d, 转入光培养, 光照时间为12 h·d<sup>-1</sup>; (3)接种后直接25℃光培养, 光照时间为12 h·d<sup>-1</sup>, 并以此组作为对照组(CK)。

1.2.3 抗褐化剂预处理 将景宁木兰外植体在接种前分别在1 g·L<sup>-1</sup>聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和1 g·L<sup>-1</sup>L-抗坏血酸(Vc)中浸泡6 h, 之后接种到MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.3 mg·L<sup>-1</sup>IAA基本培养基上, 并统计褐化率及成活率。

1.2.4 抗褐化剂及用量(添加入培养基) 在基本培养基中分别加入不同用量的不同种类的抗褐化剂: 0.5、1、2 g·L<sup>-1</sup>活性炭(AC); 0.5、1、2 g·L<sup>-1</sup>抗坏血酸(Vc); 0.5、1、2 g·L<sup>-1</sup>聚乙烯吡咯烷酮(PVP); 0.5、1、2 g·L<sup>-1</sup>柠檬酸(CA); 0.01、0.02、0.03 g·L<sup>-1</sup>硝酸银(AgNO<sub>3</sub>); 0.1、0.2、0.5 g·L<sup>-1</sup>硫代硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)。将三种外植体接种在加入了褐化剂的培养基中, 并统计褐化率及成活率。

### 1.3 数据统计与处理

在第30天统计各处理培养的污染率、褐化率。污染率=污染的外植体数/接种的外植体数×100%; 褐化率=褐化外植体数/接种的外植体数×100%。采用Excel 2007与SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒时间对三种外植体灭菌效果的影响

对景宁木兰嫩叶、带芽茎段和根部的消毒处理结果表明(表1), 随着消毒时间的延长, 景宁木兰嫩叶及带芽茎段的污染率显著降低( $P<0.05$ ), 在14 min时达到最佳, 其污染率分别降至78.33%和25.00%; 而根部的污染率则随着消毒处理时间的延长呈增长趋势, 在消毒处理8 min时, 消毒效果最好, 污染率为0, 而同样处理14 min后, 根部污染率

表 1 不同消毒时间三种外植体污染率的比较

Table 1 Comparison of contamination rate of three explants at different disinfection time

消毒时间 Disinfection time (min)	污染率 Contamination rate (%)		
	嫩叶 Young leaf	带芽茎段 Stem segment with bud	根部 Root
8	100.00Aa	66.67Ba	0.00Cd
10	91.67Ab	51.67Bb	36.67Cc
12	88.33Ac	40.00Cc	51.67Bb
14	78.33Ad	25.00Cd	56.67Ba

注: 大写字母表示同一消毒时间内不同外植体之间差异显著性( $P<0.05$ ), 小写字母表示同种外植体不同消毒时间之间的差异显著性( $P<0.05$ )。

Note: Capital letters indicate significant differences among different explants in the same disinfection time ( $P<0.05$ ), the lower case letters indicate the significant difference between the different disinfection time of the same explant ( $P<0.05$ ).

反而增加到 56.67%。经观察发现, 消毒处理 14 min 的嫩叶培养到第 3 天时开始出现污染; 相同处理时间的带芽茎段第 5 天出现污染, 培养到 15 d 后, 污染极少出现。而处理 10 min 的根在第 5 天出现污染, 培养到 15 d 后不出现污染。30 d 后统计成活率显示(图 1:A), 嫩叶、带芽茎段与根部之间差异显著( $P<0.05$ ), 然而处理时间之间差异不显著( $P>0.05$ )。

## 2.2 不同培养条件对三种外植体褐化的影响

由表 2 可知, 将外植体放入黑暗环境中预培养适当时间可以降低景宁木兰外植体的褐化程度, 但不同外植体暗培养时间与褐化率的关系不同。在暗培养 0 d 和 7 d 时, 嫩叶和带芽茎段的褐化率均为 80%; 而在持续暗培养 7 d 后, 嫩叶及带芽茎段的褐化率显著降低( $P<0.05$ ), 分别降至 60.00% 和 56.67%。但此后再延长暗培养时间, 无法再降低这两种外植体的褐化率, 反而会使褐化率提高。表 2 结果表明, 暗培养 14 d 后, 嫩叶与带芽茎段的褐化率分别升高到 73.33% 和 66.67%, 显著高于对照组( $P<0.05$ )。由此可知, 对于这两种外植体, 暗培养时间并非越长越好, 合适的暗培养时间为 7 d。而当外植体为景宁木兰根部时, 褐化率随着暗培养时间的延长而显著降低( $P<0.05$ ), 在暗培养 14 d 后, 其褐化率从 66.67% 降低到 45%, 且三种培养条件下,

表 2 不同培养对三种外植体褐化的影响

Table 2 Effects of different culture conditions on browning of three explants

暗培养 时间 Treatment	褐化率 Browning rate (%)		
	嫩叶 Young leaf	带芽茎段 Stem segment with bud	根部 Root
14 d	73.33Ab	66.67Bb	45.00Cc
7 d	60.00Ac	56.67Bc	55.00Cb
CK	80.00Aa	80.00Aa	66.67Ba

注: 大写字母表示同一培养条件下不同外植体之间差异显著性( $P<0.05$ ), 小写字母表示同种外植体不同培养条件下的差异显著性( $P<0.05$ )。

Note: Capital letters indicate significant differences between different explants under the same culture condition ( $P<0.05$ ), the lower case letters indicate the significant difference of the same explants under different culture conditions ( $P<0.05$ ).

根部褐化率皆显著低于嫩叶及带芽茎段褐化率( $P<0.05$ )。30 d 后统计成活率显示(图 1:B), 暗培养后, 嫩叶、带芽茎段与根部之间成活率差异显著( $P<0.05$ ), 而同一外植体在不同暗培养处理时间下, 成活率差异不显著( $P>0.05$ )。

## 2.3 不同抗褐化剂预处理对三种外植体褐化的影响

将景宁木兰外植体用  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Vc 和  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PVP 分别浸泡 6 h, 结果显示景宁木兰嫩叶、带芽茎段及根部的褐化率均低于未经处理的对照 CK( $P<0.05$ ) (表 3)。  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PVP 预处理后的外植体抗褐化效果最好, 与未经预处理(CK)存在显著差异( $P<0.05$ )。带芽茎段经过  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PVP 预处理后, 褐化率由 80.00% 降为 28.33%, 显著低于嫩叶(45.00%) 及根部褐化率(63.33%) ( $P<0.05$ )。成活率统计结果显示(图 1:C), 嫩叶、带芽茎段与根部之间差异显著( $P<0.05$ ), 处理时间之间差异不显著( $P>0.05$ )。

## 2.4 不同浓度抗褐化剂处理对三种外植体褐化的影响

从表 4 可以看出, 在培养基中加入不同浓度的抗氧化剂、吸附剂均能显著降低( $P<0.05$ ) 景宁木兰的褐化程度, 但对于不同的外植体, 降低褐化程度的有效抗褐化剂不同。景宁木兰嫩叶作为外植体时,  $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  为最佳抗褐化剂, 褐化率降低至 16.67%, 显著低于其他抗褐化剂( $P<0.05$ ); 而  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  CA 为景宁木兰带芽茎段及根部的最优抗褐

表 3 不同抗褐化剂预处理对三种外植体褐化的影响  
Table 3 Effects of pretreatment different anti-browning agents on the browning of three explants

处理 Treatment	褐化率 Browning rate (%)		
	嫩叶 Young leaf	带芽茎段 Stem segment with bud	根部 Root
CK	80.00Aa	80.00Aa	70.00Ba
1 g · L <sup>-1</sup> Vc	58.33Bb	46.67Cb	66.67Ab
1 g · L <sup>-1</sup> PVP	45.00Bc	28.33Cc	63.33Ac

注: 大写字母表示同一预处理不同外植体之间差异显著性 ( $P < 0.05$ ), 小写字母表示同种外植体不同预处理之间的差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

Note: Capital letters indicate significant differences between different explants in the same pretreatment ( $P < 0.05$ ), the lower case letters indicate the significant differences between the different pretreatment ( $P < 0.05$ ).

化剂, 褐化率分别从 80.00% 和 70.00% (与 CK 对比) 降低至 30.00% 和 5.00%, 与其他抗褐化剂相比, 其抑制景宁木兰褐化率效果最好 ( $P < 0.05$ )。成活率统计结果显示 (图 1; D), 嫩叶、带芽茎段与根部之间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同处理间也差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论与结论

多数木本植物组培研究结果表明, 外植体的褐化与外植体本身的年龄、部位、大小以及取材有着密切的关系 (黄烈健等, 2012)。高度分化的组织、树龄越大、木质化程度越高的外植体褐化程度高, 幼嫩的材料褐化率相对较低, 同时取材时间也是影响褐化的重要原因 (崔堂兵等, 2016)。一般植物外植体取材以冬春季的嫩稍、嫩茎为主 (黄烈健和王鸿, 2016), 但景宁木兰为先花后叶植物, 叶芽在夏初萌动, 因此本研究选择初夏季节景宁木兰的嫩叶、带芽茎段为外植体, 取材时间在夏初, 有别于其他物种。同时, 首次尝试使用根部作为外植体, 经 75% 的酒精消毒处理 8 min 时, 根部污染率为 0, 消毒 14 min 时, 叶片及茎段的污染率分别为 78.33% 和 25.00%, 但因褐化的原因导致三种外植体组培成活率较低。

培养初期的黑暗环境培养可以降低景宁木兰

表 4 不同抗褐化剂及浓度对三种外植体褐化的影响  
Table 4 Effects of different concentrations of anti-browning agents and concentrations on browning of three explants

抗褐化剂 Anti-browning substance	浓度 Concentra- tion (g · L <sup>-1</sup> )	褐化率 Browning rate (%)		
		嫩叶 Young leaf	带芽茎段 Stem segment with	根部 Root
AC	0.5	38.33Bg	46.67Cg	35.00Ai
	1.0	48.33Ce	53.33Ad	51.67Be
	2.0	63.33Aa	58.33Cb	61.67Ba
PVP	0.5	40.00Af	53.33Bd	53.33Bd
	1.0	33.33Ch	48.33Af	46.67Bg
	2.0	21.67Cl	45.00Ah	38.33Bh
CA	0.5	28.33Bk	36.67Ak	6.67Cp
	1.0	30.00Bj	40.00Aj	10.00Co
	2.0	21.67Bl	30.00Am	5.00Cq
Vc	0.5	48.33Be	36.67Ck	50.00Af
	1.0	40.00Af	35.00Bl	33.33Cj
	2.0	31.67Bi	50.00Ae	28.33Ck
AgNO <sub>3</sub>	0.01	20.00Bm	45.00Ah	15.00Cm
	0.02	16.67Bn	43.33Ai	11.67Cn
	0.03	20.00Bm	45.00Ah	16.67Cl
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.1	60.00Bb	60.00Ba	61.67Aa
	0.2	53.33Ce	56.67Be	60.00Ab
	0.4	50.00Bd	45.00Ch	55.00Ac

注: 大写字母表示同种同浓度的抗褐化剂不同外植体之间差异显著性 ( $P < 0.05$ ), 小写字母表示同种外植体不同抗褐化剂及浓度之间的差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

Note: Capital letters indicate the significant differences between different explants of the same concentration of anti-browning agents ( $P < 0.05$ ), the lower case letters indicate the significant differences between different anti-browning agents and different concentrations of the same explants ( $P < 0.05$ ).

外植体的褐化程度 (周丽艳等, 2008; 王欢等, 2012; 叶小玲等, 2016)。这应该是由适当的黑暗处理降低了外植体内受光诱导的多酚氧化酶等的活性, 且使伤口细胞活化, 在一定程度上减少了外植体酚类物质的溢出, 有利于芽的分化。但是, 随着暗处理时间的延长, 叶片和茎段的褐化率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 推测其原因可能是由于光合作用被抑制, 叶片和茎段自身保护酶活性降低, 电解质外渗, 导致细

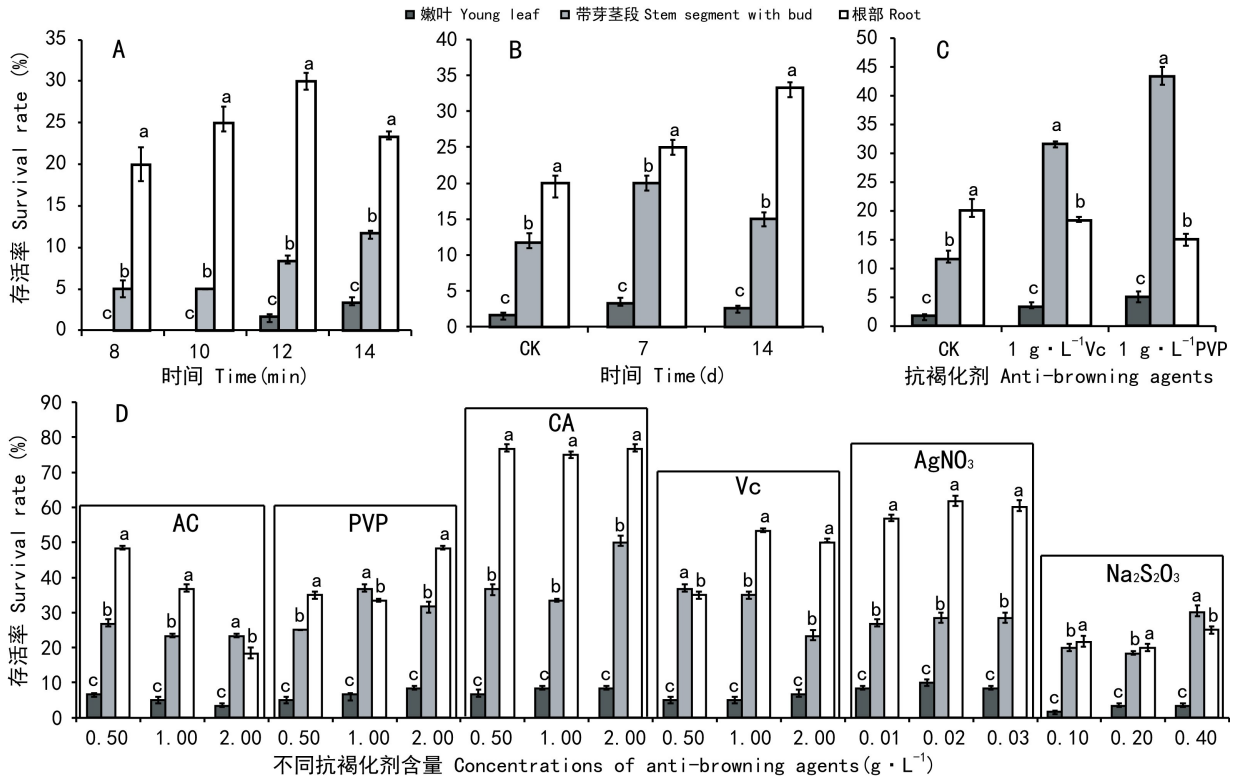


图 1 不同处理下三种外植体的存活率 A. 不同消毒时间; B. 不同培养条件; C. 不同抗褐化剂预处理; D. 不同褐化剂浓度。  
Fig. 1 Survival rate of three explants under different conditions A. Different disinfection time; B. Different culture conditions; C. Different anti-browning agent pretreatments; D. Different concentrations of anti-browning agents.

胞膜系统受到损伤,最终引起褐化。而根部本身对光不敏感,因而随着暗培养时间的延长,根部褐化率显著下降( $P < 0.05$ )。本研究中暗处理 7 d 时,叶和茎段的褐化率最低,根部暗处理 14 d 时褐化率最低验证了以上观点。

本研究中,使用 PVP 或 Vc 两种抗褐化剂浸泡处理过的叶和茎段的褐化率明显低于根,并且 PVP 对茎段褐化抑制效果最明显。而在抗褐化剂处理下,根的褐化率反而最高,可能由于根部细胞组织结构有别于叶片和茎段组织,在 PVP 等抗褐化剂长时间处理下,其细胞组织更容易受到抗褐化剂的破坏从而导致在处理 8 min 后,褐化率反而随时间延长而增加的现象。将抗氧化剂和吸附剂加入培养基是遏制抗褐化的有效办法(黄烈健和王鸿, 2016)。不同部位和生理状态下的外植体,酚类物质含量及多酚氧化酶活性是有差异的(徐石等, 2008;唐军荣等, 2014)。因此不同抗褐化剂对景宁

木兰的不同组织防褐化的效果存在差异。研究得出:接种前将景宁木兰外植体在  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PVP 浸泡 6 h 后可以有效降低外植体的褐化率;培养基中加入  $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  AgNO<sub>3</sub> 景宁木兰叶片褐化率最低,加入  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  CA 景宁木兰带芽茎段及根部褐化率最低。MS 培养基含有大量的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,容易引起酚类物质的产生,培养基中加入 AgNO<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 降低 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 浓度(Fett-Neto et al, 1992),促进了景宁木兰愈伤组织的生长,降低了其褐化率。CA 通过降低 POD 活性或结合培养基中的金属离子抑制多酚氧化酶(PPO)的活性,防止酶促褐变,降低景宁木兰外植体的褐化率。PVP 通过吸附外植体产生的酚类和醌类物质防止外植体的褐化。将 PVP 加入培养基中,防褐化及启动效果显著低于 AgNO<sub>3</sub> 和 CA ( $P < 0.05$ ),可能是因为 PVP 在吸附外植体分泌到培养基中的有害物质时,同时延缓了细胞分裂素 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)的作用(陈彪等, 1999),刺激了多酚氧化酶

的活性(Mulin,1995)。故而得出结论,在景宁木兰的组织培养中,宜将外植体在 PVP 溶液中浸泡,而不适宜将其作为抗褐化剂加入至培养基中。

综上所述,带芽茎段及根部适宜作为景宁木兰最佳外植体,在单因素的处理下,适当的黑暗处理、 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVP 预处理、培养基中加入  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CA,都可有效防止景宁木兰褐化。但对于景宁木兰组培过程中防褐化的问题仍需进一步的研究。

## 参考文献:

FETT-NETO AG, DICOSMO F, REYNOLDS WF, et al, 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxtol and related taxanes [J]. *Biotechnology*, 10(12): 1572-1575.

CHEN B, CHEN WD, LIANG JX, et al, 1999. Studies on preventing brown turning of explants with PVP in *Sugarcane* tissue culture [J]. *J S Chin Agric, Uruv*, 20(3): 63-66. [陈彪,陈伟栋,梁钾贤,等,1999.利用聚乙烯吡咯烷酮防止甘蔗组织培养接种物褐变的研究[J].华南农业大学学报,20(3):63-66.]

CHEN HF, ZHANG RJ, ZHOU JS, et al, 2011. Distribution and conservation strategy of endangered *Parakmeria lotungensis* [J]. *Plant Sci J*, 29(4): 452-458. [陈红峰,张荣京,周劲松,等,2001.濒危植物乐东拟单性木兰的分布现状与保护策略[J].植物科学学报,29(4):452-458.]

CHEN Y, ZHOU TJ, CAO FL, et al, 2009. Establishment of rapid in-vitro propagation system of *Liriodendron tulipifera* [J]. *J Zhejiang Sci Technol*, 29(6): 29-31. [陈颖,周统建,曹福亮,等,2009.北美鹅掌楸组织快繁技术体系的建立[J].浙江林业科技,29(6):29-31.]

CUI TB, GUO Y, ZHANG CY, 1999. Mechanism of browning in plant tissue culture and its overcoming methods [J]. *Guangdong Agric Sci*, (3): 16-18. [崔堂兵,郭勇,张长远,2001.植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J].广东农业科学,(3):16-18.]

FANG DF, ZHANG CG, KANG YX, et al, 2015. Study on classification of plant species of *Magnolia* in Guanzhong area, Shaanxi Province [J]. *J Fujian Sci Technol*, 42(3): 29-34. [方大凤,张昌贵,康永祥,等,2015.陕西关中地区木兰属植物品种分类研究[J].福建林业科技,42(3):29-34.]

GUO ZY, XIAO GX, LONG YX, et al, 2008. Research on the technology of tissue culture and vitro rapid micropropagation of the rare plant *Liriodendron chinense* [J]. *Pract For*

*Technol*, (4): 42-43. [郭治友,肖国学,龙应霞,等,2008.珍稀植物鹅掌楸组织培养与离体快繁技术[J].林业实用技术,(4):42-43.]

HUANG LJ, CHENG ZX, ZHANG SQ, et al, 2012. Culture tissue technique of *Acacia mangium* Elite tree [J]. *For Res*, 25(2): 227-230. [黄烈健,陈祖旭,张赛群,等,2012.马占相思优树组培快繁技术研究[J].林业科学研究,25(2):227-230.]

HUANG LJ, WANG H, 2016. Advances in tissue culture techniques of trees and the problems existed [J]. *For Res*, 29(3): 464-470. [黄烈建,王鸿,2016.林木植物组织培养及存在问题的研究进展[J].林业科学研究,29(3):464-470.]

JING M, LIU Z, ZHANG B, et al, 2014. Two ancestral AP-ETALA3, homologs from the basal angiosperm *Magnolia wufengensis*(Magnoliaceae) can affect flower development of *Arabidopsis* [J]. *Gene*, 537(1): 100-107.

LI M, MA HC, 2003. The review of the asexual propagation on Magnoliaceae [J]. *J SW F Coll*, 23(2): 92-95. [黎明,马焕成,2003.木兰科植物无性繁殖研究概况[J].广东农业科学,23(2):92-95.]

LIU KS, YANG XH, 2001. Studies on classification and geographical distribution of Magnoliaceae species in Hunan [J]. *J Wuhan Bota Res*, 19(2): 121-127. [刘克旺,杨旭红,2001.湖南木兰科植物分类和地理分布研究[J].武汉植物学研究,19(2):121-127.]

MULIN M,1995. Callus formation from thin cell layers of *Anacardium occidentale* L. [J]. *Sil Lusit*, 3: 205-211.

TANG JR, GAO Z, LIU TY, et al, 2014. Selection and disinfection methods of explants of *Magnolia delavayi* in tissue culture [J]. *Guizhou Agric Sci*, 42(11): 42-45. [唐军荣,高柱,刘腾云,等,2014.红花山玉兰组织培养外植体的选择及消毒方法[J].贵州农业科学,42(11):42-45.]

WANG H, DU FG, ZHANG ZX, et al, 2012. Study on browning controlling of *Magnolia sieboldii* in tissue culture [J]. *Hubei Agric Sci*, 51(14): 3107-3118. [王欢,杜凤国,张志翔,等,2012.天女木兰组织培养的抗褐化研究[J].湖北农业科学,51(14):3107-3118.]

WANG JY, WU CF, TANG Y, et al, 2012. Preliminary study on genetic diversity of *Magnolia Sargentiana* through SNP marker [J]. *Guihaia*, 32(4): 542-547. [王佳媛,吴传芳,唐亚,等,2012.基于SNP分子标记的凹叶木兰遗传多样性初步研究[J].广西植物,32(4):542-547.]

XU S, LU XJ, LI TL, 2008. Studies on tissue culture of *Magnolia sieboldii* to get bacteria-free explants [J]. *J NW For Univ*,23(3): 127-129. [徐石,陆秀君,李天来,2008.天女木兰组织培养中有效获得无菌外植体的研究[J].西北林学院学报,23(3):127-129.]

- YANG M, ZHANG M, SHI SG, et al, 2014. Analysis of genetic structure of *Magnolia sprengeri* populations based on ISSR markers [J]. *Sci Sil Sin*, 50(1): 76–81. [杨梅, 张敏, 师守国, 等, 2014. 武当木兰种群遗传结构的 ISSR 分析 [J]. *林业科学*, 50(1):76–81.]
- YE XL, HU XM, YE CH, et al, 2016. Tissue culture and rapid micropagation of superior individual of *Cerasus yunnanensis* [J]. *Plant Physiol J*, 52(5): 645–652. [叶小玲, 胡晓敏, 叶超宏, 等, 2016. 云南樱桃优良单株的组织培养与快繁技术 [J]. *植物生理学报*, 52(5):645–652.]
- YUAN CM, MENG GT, FANG XJ, et al, 2012. Age structure and spatial distribution of the rare and endangered plant *Alcimandra cathcartii* [J]. *Acta Ecol Sin*, 32(12): 3866–3872. [袁春明, 孟广涛, 方向京, 等, 2012. 珍惜濒危植物长蕊木兰种群的年龄结构和空间分布 [J]. *生态学报*, 52(5):645–652.]
- ZENG SJ, PENG XM, ZENG QW, 2000. Tissue culture and rapid propagation of *Michelia maudiae* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 8(3): 264–268. [曾宋君, 彭晓明, 曾庆文, 2000. 深山含笑的组织培养和快速繁殖 [J]. *热带亚热带植物学报*, 8(3):264–268.]
- ZHOU LY, GUO ZQ, QIN ZY, et al, 2008. Browning control in tissue culture of *Magnolia* [J]. *J Hebei Norm Univ Sci Technol*, 22(4): 19–22. [周丽艳, 郭振清, 秦子禹, 等, 2008. 白玉兰组织培养中的褐化控制 [J]. *河北科技师范学院学报*, 22(4):19–22.]