



# 不同激素对青钱柳外植体和愈伤组织褐化的影响

冯莹<sup>1\*</sup>, 钱莲文<sup>1</sup>, 林庆良<sup>2</sup>

<sup>1</sup>泉州师范学院资源与环境学院, 泉州 362000; <sup>2</sup>福建农林大学, 福州 350002

**摘要** 以青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)叶片为研究材料, 采用单因素完全随机试验法比较不同激素(6-BA、GA<sub>3</sub>和NAA)浓度组合对叶片外植体褐化的影响; 在此基础上, 分别采用二因素、单因素完全随机试验法比较6-BA+NAA不同浓度组合、不同基本培养基对愈伤组织褐化的影响。结果表明, 改良MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA是抑制青钱柳叶片外植体褐化的最佳培养基, 其褐化率为0, 愈伤组织诱导率100%; 改良MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA是抑制愈伤组织褐化的最佳培养基, 其褐化率为0, 愈伤组织增殖倍数达4.80倍, 愈伤组织呈黄绿色或黄色, 颗粒状, 颗粒小而紧密、质硬且表面干燥。该方法有效解决了青钱柳叶片外植体和愈伤组织褐化问题, 为青钱柳组织培养褐化控制提供了一条简单高效的离体培养途径, 也为青钱柳叶片离体再生体系的建立奠定基础。

**关键词** 褐化, 青钱柳, 愈伤组织, 诱导, 增殖

冯莹, 钱莲文, 林庆良 (2019). 不同激素对青钱柳外植体和愈伤组织褐化的影响. 植物学报 54, 634–641.

青钱柳(*Cyclocarya paliurus*), 又称青钱李、摇钱树, 属于胡桃科(Juglandaceae)青钱柳属, 不仅是我国独有的单种属乔木植物和国家重点保护二级濒危植物之一, 也是集观赏、造林、药用和材用等多用途于一身的珍贵树种。自然条件下, 青钱柳种子具有深休眠特性(Fang et al., 2006), 且发芽率仅为0.1%–0.2% (方升佐和杨万霞, 2003), 严重制约了青钱柳繁殖与推广。组织培养是青钱柳繁殖的有效途径, 目前, 研究者已从愈伤组织诱导与分化(谢寅峰等, 2012; 王纪等, 2012; 阮氏钊等, 2014; 张文泉和邓洁, 2016)和茎段诱导不定芽(谢寅峰等, 2011; 鲁萌等, 2013)等方面开展研究。

青钱柳组织培养过程中外植体和愈伤组织易产生褐化(吴群英等, 2008; 王纪等, 2012; 谢寅峰等, 2015), 这是限制青钱柳组织培养的关键因素之一。基本培养基成分和激素含量均能引起外植体和愈伤组织褐化。目前, 主要通过对青钱柳外植体进行预处理(吴群英等, 2008)和愈伤组织培养时添加抗氧化剂(王纪等, 2012; 谢寅峰等, 2015)等措施来抑制外植

体和愈伤组织褐化。吴群英等(2008)将青钱柳外植体先于4℃处理5天后再培养, 可有效防止其褐化; 谢寅峰等(2015)研究表明, 使用100 mg·L<sup>-1</sup>维生素C (Vc)可有效抑制青钱柳愈伤组织褐化, 褐化率为20%; 王纪等(2012)研究表明, 添加200 mg·L<sup>-1</sup> Vc对抑制青钱柳愈伤组织褐化效果最好, 褐化率仅为5.71%; 但随着愈伤组织培养次数的增加, 愈伤组织质量下降, 褐化亦严重。综上, 采取添加抗氧化剂等措施可在一定程度上降低青钱柳外植体或愈伤组织的褐化率, 但仍存在不同程度的褐化问题。

本研究以青钱柳叶片为材料, 通过调整基本培养基成分和优化激素组合, 探索出一套有效抑制叶片外植体和愈伤组织褐化的方法, 旨在解决青钱柳组织培养过程中叶片外植体和愈伤组织易褐化问题, 亦为青钱柳工厂化生产提供理论依据和技术参考。

## 1 植物材料

试验材料为二年生青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.)植株当年生枝条上着生的新叶。

收稿日期: 2018-09-11; 接受日期: 2019-02-19

基金项目: 福建省科技厅引导性项目(No.2017N0028)、泉州市科技计划(No.2018N007、No.2016N002)和泉港区科技计划(No.2016N06)

\* 通讯作者。E-mail: fengy0919@126.com

## 2 培养基成分和培养条件

### 2.1 外植体消毒

叶片外植体用75%乙醇浸泡30秒,再用0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒3分钟,最后用无菌水冲洗3次。

### 2.2 抑制叶片外植体褐化试验

采用单因素完全随机试验,将消毒后的叶片外植体切割成(0.5–1.0)  $\text{cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的薄片,然后接种到诱导培养基上(诱导培养基组成为:改良MS基本培养基、不同浓度激素组合(6-BA+GA<sub>3</sub>+NAA)、30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、6.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉, pH5.8)。每瓶接种4块叶薄片,每10瓶为1个组合,重复3次。30天后统计叶片外植体褐化率和愈伤组织诱导率,并观察愈伤组织生长情况。

针对诱导培养基中不同浓度6-BA (1.0、2.0和3.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、GA<sub>3</sub> (0.0、0.5、1.0和1.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和NAA (0.0、0.1、0.3和0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )对叶片外植体褐化的影响分别进行试验,诱导培养基中添加的激素浓度组合详见表1。

表1 6-BA+GA<sub>3</sub>+NAA激素浓度组合

Table 1 6-BA+GA<sub>3</sub>+NAA hormone combination

Treatment	6-BA content ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	GA <sub>3</sub> content ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NAA content ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
6-BA1	1.0	1.0	0.3
6-BA2	2.0	1.0	0.3
6-BA3	3.0	1.0	0.3
GA <sub>3</sub> 1	1.0	0.0	0.3
GA <sub>3</sub> 2	1.0	0.5	0.3
GA <sub>3</sub> 3	1.0	1.0	0.3
GA <sub>3</sub> 4	1.0	1.5	0.3
NAA1	1.0	1.0	0.0
NAA2	1.0	1.0	0.1
NAA3	1.0	1.0	0.3
NAA4	1.0	1.0	0.5

### 2.3 抑制愈伤组织褐化试验

挑取长势一致的II类型愈伤组织(该类愈伤组织呈黄绿色或绿色、颗粒大且表面干爽,来自叶片),接种到增殖培养基上(除特殊说明外,增殖培养基组成为:改良MS基本培养基、6-BA+NAA组合、30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、6.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉, pH5.8)。每瓶接种4团愈伤

组织,每10瓶为1个组合,重复3次。40天后统计愈伤组织的褐化率和增殖倍数,并观察愈伤组织的生长状态。

#### 2.3.1 6-BA+NAA组合对愈伤组织褐化的影响

采用二因素完全随机试验,探讨增殖培养基中不同浓度6-BA+NAA组合(6-BA浓度为0.2、0.5、0.8和1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; NAA浓度为0.05、0.2和0.4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )对愈伤组织褐化的影响。

#### 2.3.2 基本培养基对愈伤组织褐化的影响

采用单因素完全随机试验,探讨增殖培养基中不同基本培养基(改良MS、改良MS1、改良MS2、改良MS3,其无机盐浓度比例为1:2:3:4)对愈伤组织褐化的影响。增殖培养基内添加0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA。

### 2.4 培养条件

采用日光灯作为培养光源,光照强度为283.02  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时光照/12小时黑暗,培养温度为(25±1)°C。

### 2.5 数据统计

诱导率(%)=(诱导出愈伤组织的叶片数/原叶片总数)×100%;

叶片褐化率(%)=(褐化的叶片总数/原叶片总数)×100%;

愈伤组织褐化率(%)=(褐化的愈伤组织总团数/原培养的愈伤组织总团数)×100%;

增殖倍数(倍)=转接的愈伤组织总瓶数/原培养的愈伤组织总瓶数。

## 3 结果与讨论

### 3.1 激素对叶片外植体褐化的影响

叶片外植体在诱导培养基上培养30天后,可见添加不同种类和浓度激素的培养基均可诱导出愈伤组织。愈伤组织分为3种类型:I类型愈伤组织为红色或红棕色、粉质状、表面潮湿(图1A);II类型愈伤组织为黄绿色或绿色、颗粒大、表面干爽(图1B);III类型愈伤组织为黄棕色、团块状、表面潮湿(图1C)。

3.1.1 6-BA对叶片外植体褐化的影响

在添加1.0–3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA的诱导培养基中,以添加1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA对青钱柳外植体褐化的抑制效果最佳,叶片外植体褐化率为0,与其它浓度处理的褐化率差异显著,愈伤组织诱导率达100% (表2);随着6-BA浓度的增加,叶片外植体褐化率升高,愈伤组织诱导率降低。

3.1.2 GA<sub>3</sub>对叶片外植体褐化的影响

与对照组(0.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>的诱导培养基)相比,添加

0.5–1.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>可显著降低叶片外植体褐化率,并显著提高愈伤组织诱导率,以添加1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>处理效果最佳,叶片外植体褐化率为0,愈伤组织诱导率达100% (表3)。

研究结果表明,未添加GA<sub>3</sub>的诱导培养基(对照组)中叶片外植体未出现膨大,仅部分外植体切口边缘着生愈伤组织(图2A),愈伤组织生长较为缓慢,部分愈伤组织甚至停止生长。而在添加GA<sub>3</sub>的诱导培养基培养5天时,其叶片开始逐渐膨大,培养15

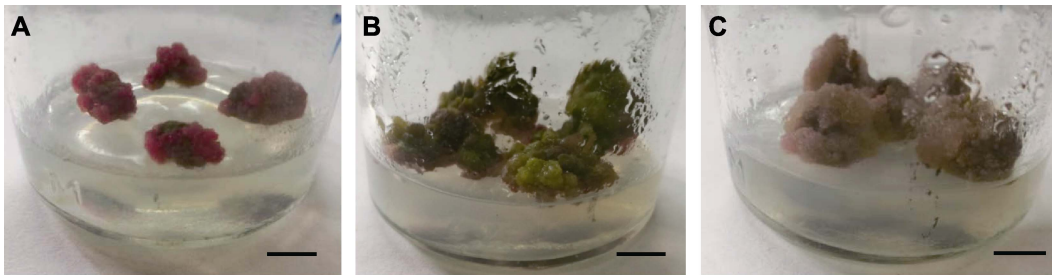


图1 青钱柳叶片诱导出的愈伤组织类型  
(A) I类型愈伤组织; (B) II类型愈伤组织; (C) III类型愈伤组织。Bars=1 cm

Figure 1 The type of callus induced from leaves of *Cyclocarya paliurus*  
(A) Callus of the type I; (B) Callus of the type II; (C) Callus of the type III. Bars=1 cm

表2 6-BA对青钱柳叶片外植体褐化的影响(平均值±标准差)

Table 2 The effect of 6-BA on leaf browning in *Cyclocarya paliurus* (means±SD)

Medium	The rate of callus induction (%)	The rate of leaf browning (%)	Callus	
			Type	Growth
1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA	100.00±0.00 a	0.00±0.00 a	I, II	I (++), II (+)
2.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA	95.24±8.25 a	4.76±8.25 b	I, II	I (+++), II (++)
3.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA	66.67±18.04 b	33.33±18.04 b	I, III	I (++), III (+)

+越多,表示愈伤组织生长势越好。同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The more + means the better growth of callus. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at  $P<0.05$ .

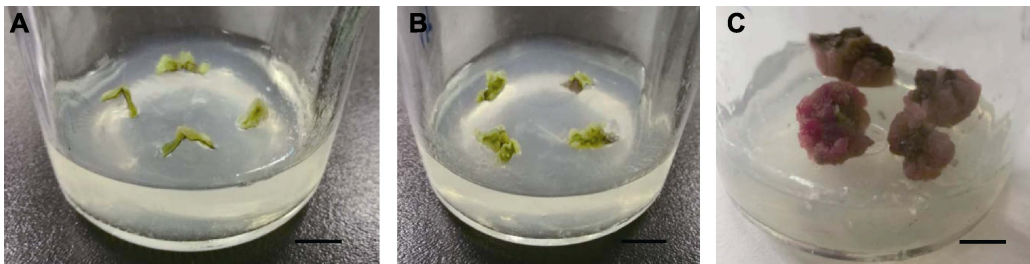


图2 GA<sub>3</sub>对青钱柳叶片诱导愈伤组织的影响  
(A) 在未添加GA<sub>3</sub>的诱导培养基中培养愈伤组织诱导效果; (B) 在添加GA<sub>3</sub>的诱导培养基中培养15天的愈伤组织; (C) 在添加GA<sub>3</sub>的诱导培养基中培养30天的愈伤组织。Bars=1 cm

Figure 2 The effect of GA<sub>3</sub> on callus induction of leaves in *Cyclocarya paliurus*  
(A) Callus in the induction medium without GA<sub>3</sub>; (B) Callus cultured for 15 days in the induction medium with GA<sub>3</sub>; (C) Callus cultured for 30 days in the induction medium with GA<sub>3</sub>. Bars=1 cm

**表3** GA<sub>3</sub>对青钱柳叶片外植体褐化的影响(平均值±标准差)**Table 3** The effect of GA<sub>3</sub> on leaf browning in *Cyclocarya paliurus* (means±SD)

Medium	The rate of callus induction (%)	The rate of leaf browning (%)	Callus	
			Type	Growth
1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA+0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA	48.96±4.77 c	51.04±4.77 a	I, III	I (++), III (+)
0.5 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA+0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA	86.67±10.41 b	13.33±10.41 b	I, II, III	I (++), II (+), III (-)
1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA+0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA	100.00±0.00 a	0.00±0.00 c	I, II	I (++), II (+)
1.5 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA+0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA	86.11±2.78 b	13.89±2.78 b	I	I (++)

+越多, 表示愈伤组织生长势越好; -越多, 表示愈伤组织生长势越差。同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The more + means the better growth of callus; the more - means the worse growth of callus. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at  $P<0.05$ .

**表4** NAA对青钱柳叶片外植体褐化的影响(平均值±标准差)**Table 4** The effect of NAA on leaf browning in *Cyclocarya paliurus* (means±SD)

Medium	The rate of callus induction (%)	The rate of leaf browning (%)	Callus	
			Type	Growth
1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	23.15±11.25 c	76.85±11.25 a	I	I (-)
0.1 mg·L <sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	71.39±7.01 b	18.61±7.01 b	I, II	I (++), II (+)
0.3 mg·L <sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	100.00±0.00 a	0.00±0.00 c	I, II	I (++), II (+)
0.5 mg·L <sup>-1</sup> NAA+1.0 mg·L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> +1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	96.99±0.20 a	3.11±0.20 c	I, II	I (+), II (+)

+越多, 表示愈伤组织生长势越好; -越多, 表示愈伤组织生长势越差。同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

The more + means the better growth of callus; the more - means the worse growth of callus. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at  $P<0.05$ .

天, 叶片切口处开始着生少量的愈伤组织(图2B), 随后愈伤组织覆盖整个外植体切块(图2C)。

### 3.1.3 NAA对叶片外植体褐化的影响

与对照组(0.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA的诱导培养基)相比, 添加0.1–0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA可有效降低叶片外植体褐化率, 显著提高愈伤组织诱导率, 以添加0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA处理效果最佳, 叶片外植体褐化率为0, 愈伤组织诱导率高达100% (表4)。

## 3.2 不同激素组合和基本培养基对愈伤组织褐化的影响

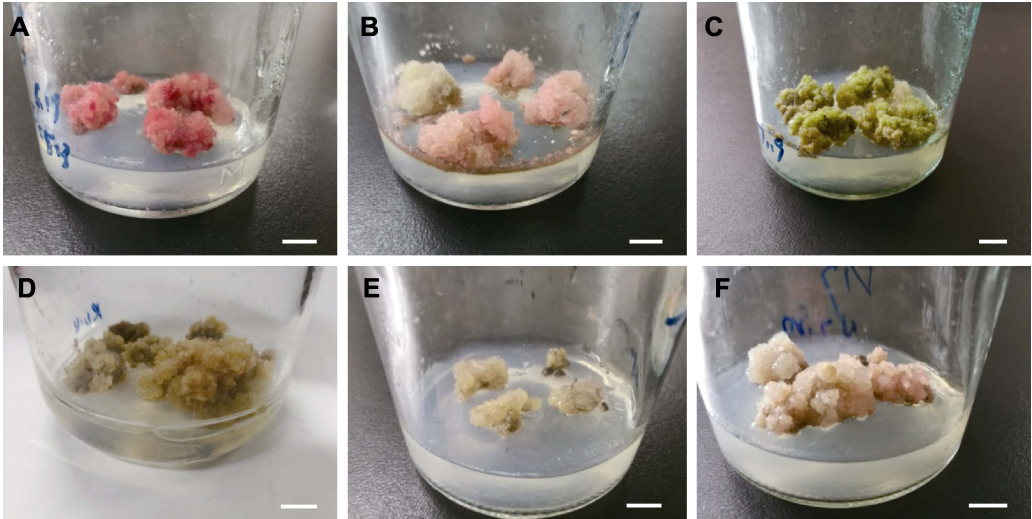
通过观察愈伤组织在增殖培养基中的生长情况, 我们发现增殖过程中的愈伤组织主要包括3种类型: I类愈伤组织为红色或粉红色、粉质状、质软且表面湿润(图3A, B); II类愈伤组织为黄绿色或黄色、颗粒状、

质硬且表面干燥、颗粒小而紧密(图3C, D); III类愈伤组织为米白色、团块状、质软而表面湿润、块大而松散(图3E, F)。

### 3.2.1 6-BA+NAA组合对愈伤组织褐化的影响

研究表明, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA组合对愈伤组织褐化的抑制效果最佳, 愈伤组织褐化率为0, 增殖倍数达4.80倍, 与其它组合呈显著性差异(表5), 以II类愈伤组织居多, 愈伤组织长势好、生活力强, 有效解决了愈伤组织增殖过程中的褐化问题。

不同浓度6-BA、NAA对愈伤组织褐化的影响不同(表6)。在添加0.2–1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA培养时, 愈伤组织褐化率先降低后升高, 增殖倍数先增加后降低。在添加0.05–0.4 mg·L<sup>-1</sup> NAA培养时, 愈伤组织褐化率逐渐升高, 增殖倍数先增加后降低。



**图3** 青钱柳愈伤组织增殖类型  
(A), (B) I类愈伤组织; (C), (D) II类愈伤组织; (E), (F) III类愈伤组织。Bars=1 cm

**Figure 3** The type of callus propagation in *Cyclocarya paliurus*  
(A), (B) The callus of type I; (C), (D) The callus of type II; (E), (F) The callus of type III. Bars=1 cm

**表5** 6-BA+NAA组合对青钱柳愈伤组织褐化的影响

**Table 5** The effect of 6-BA+NAA on callus browning in *Cyclocarya paliurus*

Plant growth regulator (mg·L <sup>-1</sup> )		The time of callus propagation (time)	The rate of callus browning (%)	Callus	
6-BA	NAA			Type	Growth
0.2	0.05	1.25 de	0 e	II	II (+++)
0.5	0.05	3.87 b	0 e	I, II	I (+++), II (++)
0.8	0.05	3.51 b	0 e	I, II	I (++), II (+++)
1.0	0.05	0.69 e	0 e	I, III	I (++), III (+)
0.2	0.2	0.75 e	0 e	I, II, III	I (+), II (+), III (+)
0.5	0.2	4.80 a	0 e	I, II	I (++), II (+++)
0.8	0.2	3.55 b	0 e	I, II, III	I (++), II (+++), III (++++)
1.0	0.2	1.30 de	40.00 a	I, II	I (++), II (+)
0.2	0.4	0.97 de	33.33 ab	I, III	I (+), III (+)
0.5	0.4	1.65 d	28.33 bc	II, III	II (+), III (+)
0.8	0.4	2.57 c	20.00 d	II, III	II (++), III (+)
1.0	0.4	1.75 d	21.67 cd	II, III	II (+), III (+)

+越多, 表示愈伤组织长势越好。同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。  
The more + means the better growth of callus. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at  $P<0.05$ .

**3.2.2 基本培养基对愈伤组织生长及褐化的影响**  
随着基本培养基中无机盐浓度升高, 愈伤组织褐化率增加, 愈伤组织的增殖倍数降低(图4A, B); 改良MS培养基是抑制愈伤组织褐化和促进愈伤组织繁殖的适宜基本培养基, 其褐化率为0, 繁殖倍数达4.80倍, 与其它类型的基本培养基呈显著性差异。  
改良MS基本培养基中愈伤组织以II类居多, 长

势好(图5A)。改良MS1基本培养基中愈伤组织共有2种类型, 分别为I类(生长势+++ )和II类(生长势++) (图5B, C), 以I类居多。改良MS2基本培养基中愈伤组织未能着生新愈伤组织, 或仅自身膨大, 呈黄褐色或黄棕色(图5D, E)。改良MS3基本培养基中愈伤组织随着培养时间的延长, 逐渐褐化死亡, 培养至40天, 愈伤组织全部死亡(图5F)。



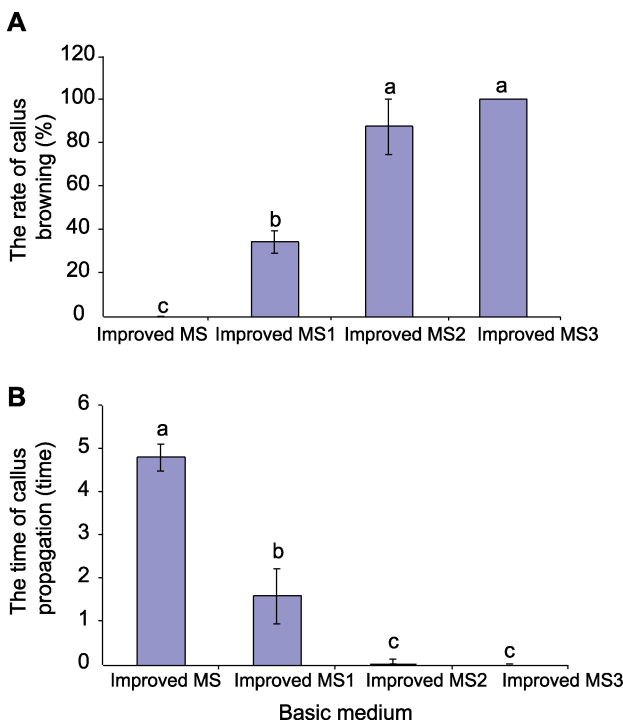
**表6** 分别添加6-BA和NAA对青钱柳愈伤组织褐化的影响(平均值±标准差)

**Table 6** The effect of 6-BA and NAA on callus browning in *Cyclocarya paliurus*, respectively (means±SD)

Plant growth regulator	The time of callus propagation (time)	The rate of callus browning (%)
0.2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	0.98±0.33 b	11.11±17.64 b
0.5 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	3.44±1.47 a	9.44±15.09 b
0.8 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	3.21±0.67 a	6.67±10.00 b
1.0 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA	1.25±0.55 b	20.56±17.40 a
0.05 mg·L <sup>-1</sup> NAA	2.33±1.49 a	0.00±0.00 c
0.2 mg·L <sup>-1</sup> NAA	2.59±1.75 a	10.00±18.09 b
0.4 mg·L <sup>-1</sup> NAA	1.73±0.74 b	25.83±8.75 a

同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at  $P<0.05$ .



**图4** 基本培养基对青钱柳愈伤组织褐化(A)和愈伤组织增殖(B)的影响(平均值±标准差)

不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

**Figure 4** The effect of basic medium on callus browning (A) and callus propagation (B) in *Cyclocarya paliurus* (means±SD). Different lowercase letters indicate significant differences at  $P<0.05$ .

### 3.3 讨论

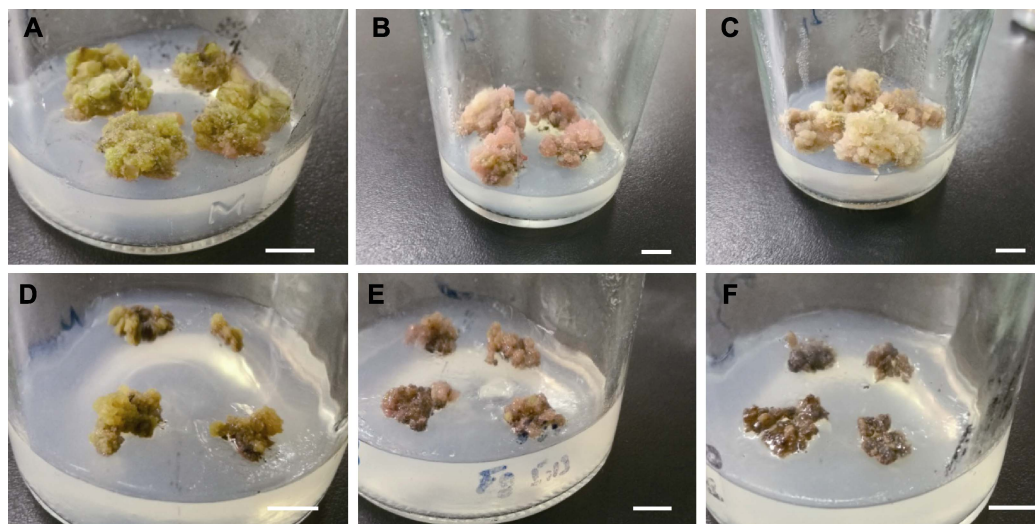
青钱柳植株中酚类物质含量较高(舒任庚和舒积成,

2007), 导致其离体培养过程中易产生褐化, 成为限制青钱柳离体培养成功的瓶颈之一。本研究中, 在调整基本培养基成分的基础上, 通过优化激素组合, 成功解决了青钱柳叶片外植体和愈伤组织的褐化问题。

基本培养基中无机盐浓度过高可使外植体或愈伤组织中的酚类物质外溢, 进而发生氧化反应, 导致褐化发生(赵伶俐等, 2006)。任丽梅等(2008)指出, 随着无机盐浓度的下降, 红叶石楠(*Photinia fraseri*)愈伤组织的褐化程度下降。郎玉涛和罗晓芳(2007)发现, 牡丹(*Paeonia ostii* var. *liishizhenii*)愈伤组织在较低无机盐浓度的继代培养基中褐化程度较轻。研究表明, 采用改良MS基本培养基, 降低培养基中无机盐含量, 可抑制叶片外植体或愈伤组织中的酚类物质发生氧化反应, 从而降低叶片外植体和愈伤组织褐化, 这与前人的研究结果一致(上官新晨等, 2006; 郎玉涛和罗晓芳, 2007; 任丽梅等, 2008; 周凤等, 2010)。

外源激素调控植物生长发育, 适宜浓度的激素及组合可促进愈伤组织的诱导和繁殖(Kumar et al., 2013), 同时也影响褐化程度(侯建华等, 2015)。本研究表明, 高浓度( $\geq 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 6-BA可使青钱柳叶片外植体和愈伤组织褐化严重, 其中叶片诱导出的红色或红棕色愈伤组织易褐化, 这与Creasy等(1968)、唐利球等(2005)和肖莉杰等(2011)的研究结果一致。他们的研究表明, 在组织培养过程中, 随着6-BA浓度的增加, 外植体或愈伤组织的褐变与死亡数量增加, 褐变程度加剧。卢其能和杨清(2007)认为, 高浓度的6-BA促进马铃薯(*Solanum tuberosum* cv. 'Chief-tain')红色愈伤组织中花色苷的积累, 由于消耗大量的物质和能量而不利于愈伤组织生长。

多酚氧化酶(PPO)在受伤组织中的活性升高(盛长忠等, 2001; 杨文婷和匡倩, 2016), 可通过作用于酚类物质, 将其氧化为醌类物质, 从而引起外植体和愈伤组织褐化。盛长忠等(2001)认为,  $\text{GA}_3$ 通过抑制PPO活性降低红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)愈伤组织褐化。本研究表明,  $\text{GA}_3$ 可显著降低叶片外植体褐化程度。这可能是由于 $\text{GA}_3$ 抑制切割后的叶片外植体PPO活性, 通过抑制叶片中酚类物质发生反应而降低叶片外植体褐化。此外, 本研究还显示, NAA有利于降低叶片外植体和愈伤组织的褐化。杨文婷和匡倩(2016)研究表明, 用  $1.0\text{--}3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA



**图5** 青钱柳愈伤组织在不同基本培养基中的生长情况

(A) 改良MS基本培养基中愈伤组织生长情况; (B), (C) 改良MS1基本培养基中愈伤组织生长情况; (D), (E) 改良MS2基本培养基中愈伤组织生长情况; (F) 改良MS3基本培养基中愈伤组织生长情况。Bars=1 cm

**Figure 5** Callus of *Cyclocarya paliurus* growth in the different basic medium

(A) Callus growth in the improved MS basic medium; (B), (C) Callus growth in the improved MS1 basic medium; (D), (E) Callus growth in the improved MS2 basic medium; (F) Callus growth in the improved MS3 basic medium. Bars=1 cm

培养红豆杉腋芽时, NAA浓度越高, 外植体褐化越严重。陈雪等(2011)指出, 添加NAA的培养基诱导出的月季(*Rosa chinensis*)愈伤组织在继代培养过程中会严重褐化。这与本研究结果不同, 可能是由于材料内活性物质及其含量或培养基内激素浓度不同所致。

## 参考文献

- 陈雪, 张金柱, 潘兵兵, 桑成瑾, 马雪, 杨涛, 车代弟 (2011). 月季愈伤组织的诱导及植株再生. 植物学报 **46**, 569–574.
- 方升佐, 杨万霞 (2003). 青钱柳的开发利用与资源培育. 林业科技开发 **17**, 49–51.
- 侯建华, 李正红, 马宏, 刘秀贤, 万友名 (2015). 地涌金莲组织培养中的褐化抑制. 林业科学研究 **28**, 217–221.
- 郎玉涛, 罗晓芳 (2007). 牡丹愈伤组织的诱导及愈伤褐化抑制的研究. 河南林业科技 **27**, 4–6, 29.
- 卢其能, 杨清 (2007). 激素等外源物质对马铃薯愈伤组织花色苷积累的影响. 西北植物学报 **27**, 2233–2239.
- 鲁萌, 阮氏钊, 王纪, 方升佐 (2013). 青钱柳茎段腋芽的离体培养技术. 南京林业大学学报(自然科学版) **37**(6), 6–10.
- 任丽梅, 张洁, 赵立红, 王冬梅 (2008). 红叶石楠愈伤组织抗褐化研究以及悬浮细胞系的建立. 河北农业大学学报 **31**(5), 46–51.

- 阮氏钊, 方升佐, 尚旭岚, 杨万霞 (2014). 青钱柳愈伤组织不定芽诱导技术. 南京林业大学学报(自然科学版) **38**(2), 52–56.
- 上官新晨, 郭春兰, 蒋艳, 沈勇根, 吴少福, 胡冬南 (2006). 培养基和植物激素对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的研究. 江西农业大学学报 **28**, 678–682.
- 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 王勇 (2001). 红豆杉愈伤组织培养中褐变现象的初探. 南开大学学报(自然科学版) **34**(4), 120–122.
- 舒任庚, 舒积成 (2007). 青钱柳中的酚类化学成分. 中草药 **38**, 507–508.
- 唐利球, 唐君海, 陆祖正, 周婧 (2005). 金钱树愈伤组织的诱导及其褐化的防止. 广西热带农业 (3), 12–13.
- 王纪, 谢寅峰, 方升佐 (2012). 青钱柳愈伤组织诱导与增殖的初步研究. 安徽农业科学 **40**, 1309–1312.
- 吴群英, 徐庆, 李丽亚, 梁荣感, 龚受基 (2008). 青钱柳不同外植体组织培养及褐变防止的研究. 时珍国医国药 **19**, 1872–1874.
- 肖莉杰, 王丽艳, 闵丽, 方淑梅, 韩毅强, 张红梅 (2011). 玉米成熟胚愈伤组织诱导及褐化控制研究. 玉米科学 **19**(4), 37–42.
- 谢寅峰, 张志敏, 尚旭岚, 杨万霞, 王纪, 方升佐 (2011). 青钱柳茎段腋芽萌发和丛生芽增殖. 林业科学 **47**, 50–55.

- 谢寅峰, 张志敏, 张颖颖, 李颖, 尚旭岚, 方升佐 (2015). 3种抗氧化剂对青钱柳愈伤组织褐化的影响. 安徽农业大学学报 42, 493–498.
- 谢寅峰, 张志敏, 张颖颖, 孙朦, 尚旭岚, 方升佐 (2012). 青钱柳愈伤组织增殖. 东北林业大学学报 40(6), 16–18.
- 杨文婷, 匡倩 (2016). 红豆杉组织培养的防褐变措施研究. 北方园艺 (17), 111–114.
- 张文泉, 邓洁 (2016). 青钱柳叶片诱导愈伤组织研究. 内蒙古农业大学学报(自然科学版) 37(2), 28–33.
- 赵伶俐, 葛红, 范崇辉, 印芳, 李秋香, 周玉杰 (2006). 不同光照强度对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响. 北方园艺 (4), 160–161.
- 周凤, 于卉, 葛占宇, 周芝辉, 邓燕燕, 付永彩 (2010). 微量元素浓度对3个籼稻品种愈伤组织褐化和分化的影响. 农业生物技术学报 18, 702–706.
- Creasy LL (1968). The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. *Phytochemistry* 7, 441–446.
- Fang SZ, Wang JY, Wei ZY, Zhu ZX (2006). Methods to break seed dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljin-skaja. *Sci Hort* 110, 305–309.
- Kumar S, Mangal M, Dhawan AK, Singh N (2013). Callus induction and plant regeneration from leaf explants of jojoba [*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider]. *India J Biotechnol* 12, 544–547.

## The Effect of Different Hormones on Explant Browning and Callus Browning in *Cyclocarya paliurus*

Ying Feng<sup>1\*</sup>, Lianwen Qian<sup>1</sup>, Qingliang Lin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Resource and Environmental Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China; <sup>2</sup>Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

**Abstract** To determine the effect of different hormones on explant browning and callus browning in *Cyclocarya paliurus*, leaf browning was controlled on medium with different kinds and content of hormones (6-BA, GA<sub>3</sub>, NAA) by a single-factor completely random test. Callus browning was controlled on the medium with different content of 6-BA+NAA and different basic medium by a double- and single-factor completely random test, respectively. The rate of leaf browning reached 0, and the rate of callus induction was up to 100% on the improved MS medium with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> and 0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The rate of callus browning reached 0, and the callus propagation was up to 4.80 times on the improved MS medium with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The callus was yellow with green or yellow, granular, small and compact, hard and dry. This system effectively solved the problem of leaf browning and callus browning and provided a simple and effective way for tissue culture and a solid foundation for the regeneration system from leaf of *C. paliurus*.

**Key words** browning, *Cyclocarya paliurus*, callus, induction, propagation

Feng Y, Qian LW, Lin QL (2019). The effect of different hormones on explant browning and callus browning in *Cyclocarya paliurus*. *Chin Bull Bot* 54, 634–641.

\* Author for correspondence. E-mail: fengy0919@126.com

(责任编辑: 朱亚娜)