

山药组织培养褐化反应的研究

蔡建荣

(福建省龙岩市农业科学研究所, 福建龙岩 364000)

摘要:笔者从山药不同外植体(叶、茎段、零余子)、培养基中添加抗氧化剂和不同培养基质3个方面进行试验研究。结果表明, 山药不同外植体的褐化程度也不一样, 茎段褐化程度最轻;MS培养基中添加150mg/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)能有效抑制外植体的褐化;在山药组培苗的快繁阶段采用液体基质培养方式能显著降低褐化程度, 提高山药组培苗成活率。

关键词:山药;组织培养;外植体;褐化;抗氧化剂;培养基质

中图分类号:S188 **文献标识码:**A

Studies on Browning Reaction of Chinese Yam in Tissue Culture

Cai Jianrong

(Institute of Agricultural Sciences, Fujian Longyan 364000)

Abstract: The different explants of Chinese yam, different antioxidants in medium and culture method were tested in this study. The results showed that different explants' degree of browning were different, the browning degree of stem was the lightest; Adding 150mg/L PVP to MS medium could prevent browning effectively. Using the method of liquid medium in rapid propagation could reduce the degree of browning and improve the survival rate of plants obviously.

Key words: Chinese yam, tissue culture, explant, browning, antioxidant, medium

山药(Chinese yam)具有较高的药用价值及营养价值, 主要食用器官为地下块茎, 为大众化的滋补食品, 通过组织培养技术不仅可进行快速繁殖, 而且能使优良品种特性得以保存延续^[1,2]。但山药在组织培养过程中存在着严重的褐化反应, 经常发现山药组培苗或外植体枯死及其基部培养基颜色黑褐化, 这种褐化现象又称为酚污染, 严重影响外植体的脱分化和培养物的再分化^[3]。因此, 为了山药组织培养工厂化育苗的顺利进行, 笔者就山药组织培养过程中的褐化现象及有效控制等方面进行了研究探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为寸金薯叶片、茎段、零余子等常用组培外植体为材料^[4], 山药品种寸金薯来自福建龙岩大池镇。

1.2 方法

1.2.1 不同外植体褐化反应研究观察 从生长植株上取

其幼嫩茎节间部茎段、完全伸展的叶片及结出的零余子为外植体, 先将外植体用自来水反复冲洗后, 在无菌条件下, 用70%酒精消毒20~30s, 再放入2%次氯酸钠溶液中消毒10~15min, 再用无菌水漂洗3~4次, 最后将外植体切成大小适合的小块接种在已配好的MS培养基中进行培养^[1,2,4]。叶片大小为0.3~0.5cm方形, 茎段(含节间)0.6~0.8cm, 零余子切成0.5~0.6cm左右大小的方块, 琼脂0.7%, PH值为5.8, 培养温度25±2℃, 光照强度为2000lx, 每天光照时间16h。共3种处理, 每种处理30瓶, 每瓶一个外植体, 重复3次, 培养30d后观察外植体褐化程度。

1.2.2 不同外源物质(抗氧化剂)对外植体褐化的抑制作用 以山药含节间部的茎段(0.6~0.8cm)为外植体, 经灭菌处理后, 接种在以下3种处理的MS培养基(PH=5.8)中进行培养: A: MS+150mg/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), B: MS+80mg/L 半胱氨酸^[5,6], C: MS+0.1%活

基金项目: 福建省科技厅重大项目(2003T004)。

第一作者简介: 蔡建荣, 男, 1973年出生, 助理研究员, 主要从事生物技术、信息技术等研究工作。通信地址: 364000 福建省龙岩市农业科学研究所, Email: ccjr_1@163.com。

收稿日期: 2008-06-17, 修回日期: 2008-06-24。

性炭,每处理 30 瓶,每瓶一个外植体,重复 3 次,观察外植体的褐化情况。

1.2.3 不同培养基质对外植体褐化的影响 以山药茎段愈伤组织分化出的组培苗为外植体,分别接种在 MS+0.7%琼脂(固体培养)和未加琼脂的 MS 培养基(液体培养)中进行快繁培养,每处理 30 瓶,每瓶一个外植体,重复 3 次,观察其在快繁过程中的褐化情况。

2 结果与分析

2.1 不同外植体的褐化反应

由此次试验结果可知,利用山药不同外植体进行组织培养时,其褐化的程度也不同。当外植体为含节

间的茎段时,其褐化程度最轻,当外植体为切成小方块的零余子时,褐化现象最严重,叶片的褐化程度居中。表 1 为此次试验观察统计,由表中的原始数据可看出,零余子褐化程度极其严重,在试验观察过程中发现采用零余子小块为外植体的培养基均大面积出现黑褐色现象,甚至发现有外植体枯死。可能是因为本身零余子内所含酚类物质较多,再加上进行接种前切成小块材料,损伤面较大,损伤面细胞中的酚类物质,与氧气聚合发生氧化反应,形成较多的有毒醌类物质,扩散到培养基中,从而抑制其它酶的活性,毒害整个外植体组织^[7,8]。

表 1 不同外植体褐化反应

外植体材料		褐化程度统计(瓶数)		
		轻度褐化数	中度褐化数	严重褐化数
叶片	重复 1	3	15	12
	重复 2	9	12	9
	重复 3	6	10	14
茎段	重复 1	15	10	5
	重复 2	15	9	6
	重复 3	18	6	3
零余子块	重复 1	0	10	20
	重复 2	1	12	17
	重复 3	5	8	17

2.2 不同外源物质对褐化的抑制作用

根据试验观察结果,加入 3 种外源物质在早期均能有效抑制外植体的褐化,但随着培养时间的延长,3 种外源物质抑制褐化作用开始分化,C 处理(MS+0.1%活性炭)最早发现外植体褐化,而且随着培养时

间的再次延长,褐化现象越来越重,外植体基部培养基褐化块直径最大达到 4cm;MS+80mg/L 半胱氨酸组合在褐化抑制作用上较好于 C 处理,此次试验表现出最佳抑制效果的是 A 组合,即:MS+150mg/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),其在培养早期发现只有 2 个样本有轻微褐化现象,而且随着培养时间的逐步增加,褐化程度表现也并不十分明显,仅仅在培养 35d 左右时,在外植体基部培养基出现了少量的褐化现象,而且褐化块的直径仅为 0.8cm 左右,各处理褐化抑制作用趋势见图 1 所示,组合 B 与组合 C 的发生褐化平均瓶数在同一培养时间段均高于组合 A,同时组合 A 在培养 20d 至 40d 时间段出现褐化样本数增幅不大,所以图 1 组合 A 的抑制作用趋势图也较组合 B 与组合 C 平稳,因此组合 A 对样本褐化的抑制起到了较好的作用。

2.3 不同培养基质对外植体褐化的影响

外植体褐化现象在固体基质培养与液体基质培养

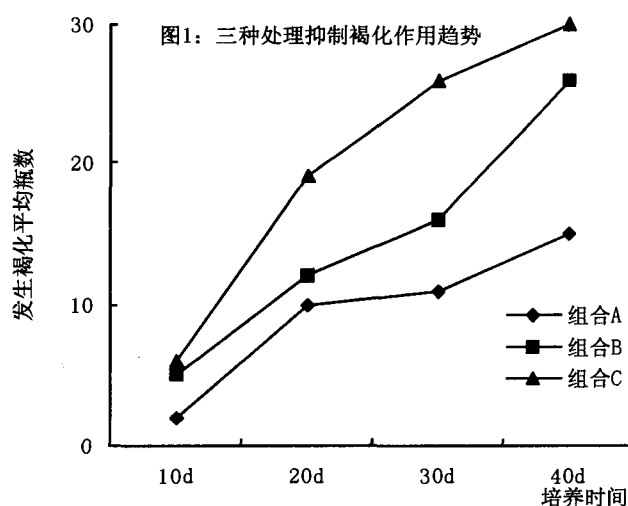


图 1 3 种处理抑制褐化作用趋势

两种方式表现差别十分明显,根据试验结果,外植体的褐化程度在加了 0.7%琼脂的固体培养基中表现明显大于液体培养基,在培养时间达到 15d 左右时,外植体基部的固体培养基均出现较明显的褐化现象,以外植体基部为中心,培养基褐化平均直径为 1.5cm;培养时间逐步延长至 30d,组培苗基部培养基褐化直径达到了 4cm 左右,部分组培苗出现轻度枯化现象。液体

培养方式在培养时间达到 30d 时,未发现组培苗有明显的褐化现象,外植体生长状况良好,但培养时间达 40d 后,有少量外植体出现枯化现象,原因可能是因酚类物质氧化反应产生的有毒醌类物质在液体中容易被稀释,在短时间内无法在液体培养基中形成一个有效作用浓度点,所以外植体生长状况在一定时间内正常。外植体褐化率与培养时间在固体培养与液体培养之间的区别如图 2 所示,液体培养的外植体褐化率在 30d 后仅为 3%左右,而固体培养褐化率在此时间段达到了 50%,两种处理在图 2 表现出的走势有显著区别,液体培养方式比固体培养方式更适宜山药组培苗的快繁。

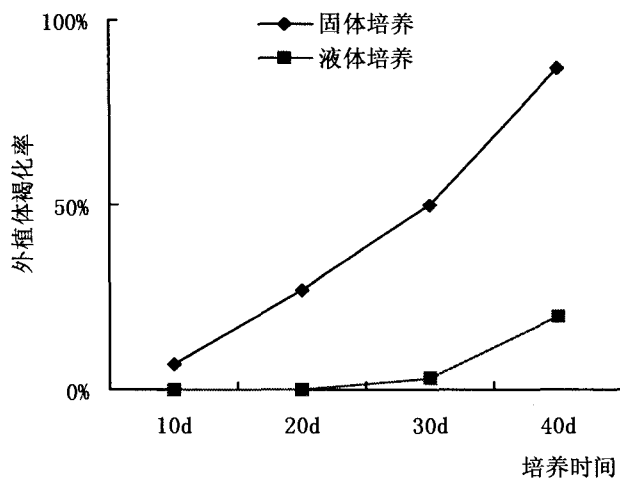


图 2 培养基对抑制外植体褐化作用

3 讨论

褐化是指植物组织培养过程中,由于外植体组织被切割和接种快繁时,损伤切面细胞中酚类物质(底物)在酚氧化酶的作用下与氧气聚合而发生氧化反应,形成有毒的醌类物质,外植体切面迅速变成棕褐色或暗褐色,并逐步扩散至培养基中,抑制其它酶的活性,导致组织代谢紊乱,生长受抑制,最终致使外植体死亡^[5,9,10]。组织培养中抑制褐变方法目前已有大量的研究,如选择适宜的外植体、培养温度、PH 值,培养时对外植体进行多次转移,在培养基中添加防褐剂(抗氧化剂),如抗坏血酸(Vc)、亚硫酸钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等^[4,6,11]。但在山药组织培养中还鲜见相关抑制外

植体褐化报道。

研究表明,山药组织培养中不同外植体褐化程度也不同,山药植株后期结出的零余子褐化程度最严重,而其幼嫩节间部褐化程度最轻。在培养基中添加抗氧化剂均在一定时间内能有效抑制外植体的褐化,但山药外植体愈伤组织分化的时间大约为 25d 左右^[2],所以,只有 MS+150mg/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为最适宜配方。因山药组培苗快繁周期大约 30d 左右^[2],而液体基质培养方式正好在这一段时间内能使有毒醌类物质无法形成一个有效作用浓度点,因此,在山药组培苗的快繁阶段采用未加琼脂的液体培养基能有效预防其褐化,提高成活率。褐化是植物组织培养中较为普遍的现象,要从根本上解决这种褐化问题,需对褐化发生的原因、生理生化、遗传因素及植物品种等方面进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 颜昌敬.植物组织培养手册[M].上海:上海科学技术出版社,1990.
- [2] 蔡建荣,曾军,等.怀山药茎段组织培养及增殖的研究[J].福建农业科技,2002,(2):14-15.
- [3] Mager AM, Harel. Polyphenol Oxidases in plants[J]. Phytochemistry, 1979, 18:193-215.
- [4] 刘用生.植物组织培养中活性炭的使用.植物生理学通讯,1994,30(3):214.
- [5] 鲁旭东.植物组织培养中褐变的发生与防止[J].农业与技术,1999,19(4):9.
- [6] 王东霞,等.如何对抗植物组织中的组织褐变.中国花卉盆景,2002,12:29-30.
- [7] Alfred M Mayer. Polyphenol oxidase in plants--resent progress[J]. Phytochemistry, 1987, 26:11-20.
- [8] 谢春艳,等.多酚氧化酶及其生理功能.生物学通报,1999,34(6):11-13.
- [9] 丁连忠.抗坏血酸衍生物抑制蘑菇的多酚氧化酶.食品科学,1991,67(2):22-25.
- [10] 于清章,史国荣,等.几种防褐变剂对去皮切片马铃薯储藏的影响[J].长江蔬菜,1998,(11):25-26.
- [11] Mohsen K.H. Influence of medium solidification and PH value on in vitro propagation of marauta.leuconeura CV[J]. Kerchoviana Science Horticulture, 2000,(86):211-221.