

山药茎段愈伤组织褐变与外源药物抑制效应的研究

蔡建荣

(福建省龙岩市农业科学研究所, 福建 龙岩 364000)

摘 要: 以山药节间部茎段愈伤组织及其分化出的组培苗为外植体, 在外源药物预处理、培养基中添加抗氧化剂及不同培养基质等方面进行试验。结果表明, 将茎段外植体在接种前用 100 mg/L Vc 溶液浸泡 30 min, 褐变现象能得到明显抑制; MS 培养基中添加 150 mg/L 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 能有效抑制茎段分化过程中的褐变; 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变程度, 提高组培苗成活率。

关键词: 山药; 愈伤组织; 组织培养; 褐变; 抗氧化剂

中图分类号: S632.1

文献标识码: B

文章编号: 0528-9017(2008)05-0523-03

怀山药具有较高的药用价值及营养价值, 通过组织培养技术不仅可进行快速繁殖, 而且能使优良品种种性得以保存延续^[1,2]。但山药在组织培养过程中存在着严重的褐变现象, 组培幼苗或外植体分化时经常有枯死现象, 其基部培养基颜色呈黑褐化, 这种现象又称为酚污染, 严重影响山药离体快繁技术的发展^[3]。山药组织培养目前以节间茎段作为常用外植体^[2], 因此我们就茎段分化培养及组培苗快繁过程中的褐变现象及有效抑制等方面进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为山药品种寸金薯茎段(带节间)及其分化的幼苗, 来自福建龙岩大池镇。

1.2 方法

1.2.1 Vc 预处理对外植体分化褐变的抑制

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 ~ 30 s, 再放入 2% 次氯酸钠溶液中消毒 10 ~ 15 min, 再用无菌水漂洗 3 ~ 4 次^[1,4], 最后将外植体切成长 0.6 ~ 0.8 cm 含节间部的小段, 处理分接种前用 100 mg/L Vc 浸泡 30 min 和未经 Vc 处理 2 种, 每处理各 30 瓶, 重复 3 次, 然后放入 MS 培养基培养, 琼脂 0.7%, pH 值为 5.8, 培养温度 25 ± 2℃, 光照强度为 2 000 lx, 每天光照时间 16 h^[2], 观察其褐变程度。

1.2.2 抗氧化剂对外植体褐变的抑制

将经灭菌处理后的外植体茎段接种在以下 3 种处理的 MS 培养基 (pH 值 5.8) 中进行培养。A: MS + 150 mg/L 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), B: MS + 80 mg/L 半胱氨酸, C: MS + 100 mg/L 偏二亚硫酸钠^[5-7], 每处理 30 瓶, 重复 3 次, 培养条件同上, 观察外植体的褐变情况。

1.2.3 茎段分化组培苗在不同培养基质的生长观察

以山药茎段愈伤组织诱导出的多芽体形成的组

收稿日期: 2008-07-15

基金项目: 福建省科技厅重大项目 (2003T004)

作者简介: 蔡建荣 (1973 -), 男, 福建省长汀人, 助理研究员, 主要从事农作物组织培养等相关生物技术的研究工作。

- [12] 苏小俊, 袁希汉, 徐海, 等. 丝瓜部分农艺性状的变异情况及相关性分析 [J]. 江苏农业科学, 2007, (5): 111 - 113.
- [13] 徐海, 苏小俊, 袁希汉, 等. 普通丝瓜种质资源熟性性状的评价指标和相关性分析 [J]. 江苏农业科学, 2007, (6): 128 - 131.
- [14] 袁希汉, 汪玉清, 侯喜林, 等. 丝瓜主要农艺性状的相关

- 及通径分析 [J]. 江苏农业学报, 2006, 22 (1): 64 - 67.
- [15] 周黎丽, 孙红霞, 袁希汉, 等. 江蔬一号丝瓜及其配套栽培技术 [J]. 果蔬天地, 2005, (4): 20 - 21.
- [16] 陈再廖, 周雪平. 丝瓜病毒病原的初步研究 [J]. 浙江农业学报, 1997, 9 (1): 36 - 39.
- [17] 苏小俊, 袁希汉, 徐海, 等. 丝瓜病毒病分级标准和种质抗性鉴定的研究 [J]. 江苏农业科学, 2008, (1): 111 - 113.

培幼苗为外植体,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,重复3次,培养条件同上,观察其在快繁增殖过程中的褐变情况。

2 结果与分析

2.1 经Vc预先处理后的外植体褐变程度

根据试验结果可知,山药含节间部茎段进行组织培养时,2种处理的褐变情况差别很大,未经过VC预处理的样本在接种后2d就全部出现一定程度的褐变现象,在外植体基部培养基出现浅褐色斑,直径约0.6~1cm,10~30d后随着培养时间的增加,褐变程度也越严重,外植体基部褐色培养基色斑直径平均达到了3~4cm,而且由最先的浅褐色斑逐步转成了深褐色,褐变现象极其严重,在40d左右时,发现有外植体枯死现象;而经过100mg/L Vc浸泡预处理的样本在培养10d以前均未发现培养基有褐化块,在20d左右,在外植体基部陆续出现极浅色褐斑,褐块直径约0.6cm,但茎段愈伤组织诱导出的多芽体生长状况良好,培养30~40d后所有样本也都出现浅色褐斑,由此可见,随着培养时间的延长,经预处理的样本也会出现不同程度的褐变,但褐变程度明显轻于未经预处理的样本。

目前对组织培养中褐变反应的程度值还没有计算标准,笔者根据外植体褐变数百分比、培养基褐化块直径与培养瓶底部直径的比值等综合状态设计了一个数学计算公式:

$$R = \frac{m}{F} + \sum_{n=1}^m \left(\frac{d_n}{D} \right)$$

其中 m 为褐变样本累加数, F 为总样本数,试验中 F 值为30, d 为褐变样本基部培养基褐化块直径(单位:cm), D 为培养瓶底部直径,经测量,本试验所用的培养瓶底部直径为6cm, n 为褐变样本求和计数器。采用该数学公式计算得出的2种处理的外植体褐变程度 R 值(3次重复平均值),经Vc预处理后的外植体褐变程度值低,培养10、20、30和40d的 R 值分别为0、0.7、2.8和6.3,而未经Vc处理的 R 值分别为5.8、9.0、18.9和23.6。经100mg/L Vc浸泡30min后的样本能表现出较强的抗褐变效果,可能是因为山药茎段外植体吸收并附着的Vc在短期内将外植体伤口切面因酚类物质与氧气聚合产生的有毒醌类物质重新还原成为酚物质^[8,9],从而暂时抑制有毒醌类物质扩散到培

养基中,在短时间内未能影响其它酶的活性,外植体保持正常的生长状况。

2.2 外源抗氧化药剂对外植体褐变的抑制

从图1的试验统计结果可看出,发生褐变平均数在培养早期均保持一个较低的水平,因此,加入3种抗氧化剂在茎段分化早期均能有效抑制外植体的褐变,但随着培养时间的延长,3种抗氧化剂抑制褐变效果出现差异,MS+100mg/L偏二亚硫酸钠(C处理)在外植体培养10d左右时有较多样本出现褐变现象,而且随着培养时间的再次延长,褐变现象越来越严重,外植体基部培养基褐化块直径最大达到4cm;MS+80mg/L半胱氨酸组合虽然在外植体培养10d左右时也出现少量样本褐变现象,但随着培养时间的延长,发生褐化平均数 P 变化趋势相对较好,因此在褐化抑制作用上略好于C处理,A处理在此次试验中表现出最佳抑制效果,即:MS+150mg/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP),其在培养早期发现只有2个样本有轻微褐变现象,而且随着培养时间的逐步增加,褐变程度表现也并不十分明显,仅在培养35d左右时,在外植体基部培养基出现了少量的褐变现象,而且褐化块的直径仅为0.8cm左右。

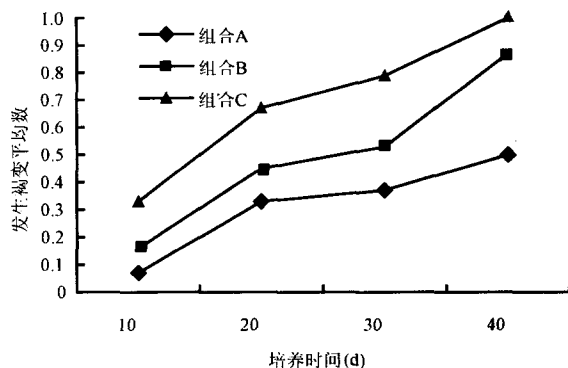


图1 抗氧化剂抑制褐变作用效果的趋势

2.3 固态与液态培养基对外植体褐变的影响

根据试验结果,由茎段愈伤组织分化出的组培苗的褐化程度在固体培养基中明显比液体培养基严重,在培养时间达到15d左右时,组培苗根部的固体培养基均出现较明显的褐化现象,以根部为中心,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块直径达到了4cm左右,部分组培苗出现轻度枯化现象(图2)。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变现象,幼苗生长状况良好,但随

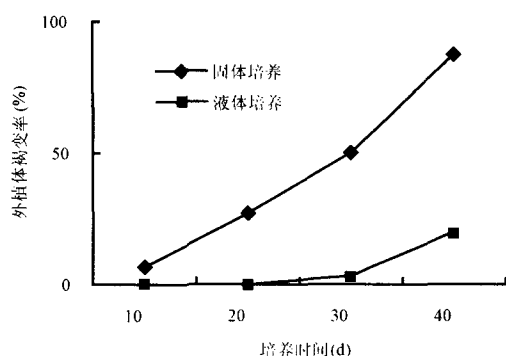


图2 培养基质对抑制外植体褐变作用

着培养时间的进一步延长,也有少量组培苗出现枯化现象,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。

3 结论与讨论

褐变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^[7,8,10]。目前花卉、果树等组织培养中抑制褐变方法已有大量的研究,如选择适宜的外植体、培养温度、pH值、琼脂浓度,培养时对外植体进行多次转移,在培养基中添加吸附剂和防褐剂(抗氧化剂),如活性炭、抗坏血酸(Vc)、亚硫酸钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等^[4-6]。但在怀山药组织培养中报道较少。

本研究表明,山药茎段组织培养过程中预先对外植体用100 mg/L Vc溶液浸泡30 min,可在一段时期内表现出较强的抗褐变效果;在适宜培养基中

添加一定量的抗氧化剂均可在一定时间内能有效抑制外植体的褐变,但山药外植体愈伤组织分化诱导出多芽体的时间大约为25 d左右^[2],所以,MS+150 mg/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为最适宜配方,因长期使用PVP容易对外植体产生毒副作用,因此在培养25~30 d时应及时对分化组织进行转移。山药组培苗快繁周期大约30 d^[2],而液体基质培养方式在这段时期内不会使有毒醌类物质浓度达到有毒的程度,因此,在山药组培苗的快繁阶段采用液体培养基能有效预防其褐变,提高怀山药组培苗增殖系数。褐变现象普遍存在于植物组织培养中,本文仅在组织培养中短期抑制褐变方面进行了实验探讨,若能从植物生理生化、品种遗传等方面对褐变现象发生的原因、规律进行研究分析,从根本上解决这种褐变现象,那将是很有价值的,因此,在这方面仍需要作进一步的研究探讨。

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, 张志勇, 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 A M, 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 [J]. 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] 珠海, 王东霞, 李长杰, 等. 如何对抗植物组培中的组织褐变 [J]. 中国花卉盆景, 2002, 12: 29.
- [7] Alfred M Mayer. Polyphenol oxidase in plants-resent progress [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 11-20.
- [8] 谢春艳, 宾金华, 陈兆平, 等. 多酚氧化酶及其生理功能 [J]. 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 [J]. 食品科学, 1991, 67 (2): 22-25.
- [10] 于清章, 史国荣, 魏承银. 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.