

• 生物技术

大豆组织离体培养有效防止褐变的方法探讨

林 淦, 吴传兵

(襄樊学院化学与生物科学系, 湖北襄樊 441053)

摘要: 针对大豆离体组织在灭菌条件下培养生长过程中会出现不同程度褐变的问题, 探讨了不同类型外植体和添加不同类型外源物质对大豆组织培养过程中褐变程度的影响。结果表明, 带腋芽茎段是大豆离体培养再生系统的理想外植体, 添加 0.3% 的超氧化物歧化酶, 0.5% 的维生素 B, 或 0.9% 的维生素 E 均可不同程度地消除大豆培养过程中的褐变现象。

关键词: 大豆; 组织培养; 褐变; 超氧化物歧化酶; 维生素 B; 维生素 E

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6500(2006)01-0023-02

Study on Resistance Methods of Brown Discoloration in Soybean Explants Culture

LIN Gan, WU Chuan-bing

(Department of Chemistry and Bioscience, Xiangfan University, Hubei Xiangfan 441053, China)

Abstract: Brown discoloration could decrease growth of soybean explants and injure process of its culture. The test result reported that different explants and some reagents had brown discoloration resistance in soybean tissue culture. Stem and bud are the appropriate explants, with additives of 0.3% SOD, 0.5% VB and 0.9% VE had effective resistance on brown discoloration.

Key words: soybean; tissue culture; brown discoloration; SOD; VB; VE

大豆组织培养过程中的褐变现象是较为常见的问题, 它是由组织体内的酚类物质经氧化后产生棕褐色的醌类物质造成的。该物质及其类似物可抑制细胞中多种酶的活性, 从而影响到细胞的正常代谢和其它生理功能, 严重时可导致再生组织死亡^[1,2]。本文利用大豆植株的不同部位进行了组织培养, 探讨解决褐变问题的有效方法, 并找出能防止褐变的外源物质。

1 材料和方法

1.1 不同外植体褐变程度观察

大豆(中豆 32)植株叶片、无腋芽茎段、带腋芽茎段以及根系, 均取自襄樊市郊生产田。

大豆离体组织先用自来水冲洗干净, 然后用 70% 乙醇处理外植体表面, 再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 10 min, 并用灭菌水冲洗 3 次。把消毒过的外植体切成均匀的小块, 接种在培养基上, 每种外植体各接种 10 瓶, 每瓶 3 小块^[2]。

诱导培养基配方: MS+0.3 mg/L NAA+0.3 mg/L

6-BA+0.3g/L 蔗糖

上述外植体通过 8 d 的连续光照培养, 观察不同部位的外植体的褐变程度和褐变状况。

1.2 添加不同外源物质对外植体培养褐变的影响^[3]

在诱导培养基中分别加入 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% 浓度超氧化物歧化酶^[3], 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9% 浓度维生素 B^[4], 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%, 1.5% 浓度维生素 E^[5]。连续培养腋芽嫩枝条 8 d, 观察上述不同浓度的添加物对抑制外植体褐变的作用。

2 结果与分析

2.1 不同外植体在培养过程中的褐变程度

试验结果表明(表 1), 不同外植体都具有茎芽分化和再生能力, 它们之间存在不同程度的褐变。经过 3 次的重复试验, 带腋芽茎段具有较强的分生能力, 整个外植体生长较旺盛, 不仅再生茎芽明显多于子叶, 且每个外植体上诱导的簇生叶片数量也多于子叶, 其褐变程度远低于其它三种外植体。因

收稿日期: 2005-10-19; 修订日期: 2006-01-10

基金项目: 襄樊学院科学研究项目基金 KJ04043.

作者简介: 林淦(1978—), 男, 福州人, 讲师, 硕士, 主要从事分子生态学研究。

此,带腋芽茎段更适宜于作为大豆植株培养的再生系统,旺盛的生长状态和较强的分生能力对防止外植体褐变具有一定的作用。

表 1 不同外植体在培养过程中的褐变情况

外植体	接种数/个	褐变数/个	褐变百分率/%
叶片	90	38	42.2
无腋芽茎段	90	28	31.1
带腋芽茎段	90	20	22.2
根	90	42	46.7

2.2 超氧化物歧化酶对抑制褐变的作用

从表 2 看出,培养带腋芽茎段时加入不同浓度的超氧化物歧化酶可有效防止褐变的发生,其中,加入 0.3% 的超氧化物歧化酶的效果最好,比对照(表 1)的褐变率下降 7.8 个百分点。这表明,超氧化物歧化酶具有较强的消除氧化酚醌类物质的能力,可以有效防止褐变。少量超氧化物歧化酶的存在,不能在植株生长过程充分发挥它的作用,而大量超氧化物歧化酶的存在,也会影响到植株正常的发育和生长。因此,在植物组织培养过程中加入的超氧化物歧化酶必须适量。

表 2 超氧化物歧化酶抑制褐变的效果

超氧化物歧化酶浓度/%	接种数/个	褐变数/个	褐变率/%
0.1	90	21	23.3
0.2	90	18	20.0
0.3	90	13	14.4
0.4	90	17	18.8
0.5	90	19	21.1

2.3 抗氧化剂维生素 B 对褐变的抑制作用

在大豆培养基中加入抗氧化剂维生素 B(表 3),可以有效地防止组织培养过程中的褐变。维生素 B 为多羟基还原物质,可使多酚氧化酶失活,阻止酚类氧化,并且维生素 B 在酶的催化下能消耗溶解氧,使酚类物质因缺氧而无法氧化,从而减轻了褐变的程度。试验结果表明,在培养基中加入 0.5% 的维生素 B,带腋芽茎段离体培养的褐变率最低,比不加维生素 B 的对照(表 1)下降 8.9 个百分点。

表 3 维生素 B 抑制褐变的效果

VB 浓度/%	接种数/个	褐变数/个	褐变率/%
0.1	90	20	22.2
0.3	90	17	18.8
0.5	90	12	13.3
0.7	90	15	16.7
0.9	90	16	17.8

2.4 抗氧化剂维生素 E 对褐变的抑制作用

在大豆培养基中加入抗氧化剂维生素 E,可以同样有效地防止组织培养过程中的褐变。结果表明(表 4),0.9% 的维生素 E 可以产生最优的抗褐变的作用,比对照(表 1)的褐变率降低 10 个百分点。

表 4 维生素 E 抑制褐变的效果

VE 浓度/%	接种数/个	褐变数/个	褐变率/%
0.3	90	19	21.1
0.6	90	15	16.7
0.9	90	11	12.2
1.2	90	14	15.6
1.5	90	16	17.8

3 小结

大豆的组织培养对于培育新品种有着非常重要的作用,选择合适的外植体或利用一些抗氧化剂都能不同程度地减轻褐变。本试验的研究表明,大豆组织培养以带腋芽茎段为外植体,同时在培养基中添加 0.3% 超氧化物歧化酶,0.5% 维生素 B 或 0.9% 维生素 E 等任意一种抗氧化剂,均可不同程度地消除大豆培养过程中的褐变现象。

参考文献:

- [1]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.
- [2]袁鹰,刘德璞,郑培和,等.大豆组织培养再生植株研究[J].大豆科学,2001,20(1):9—13.
- [3]卢少云,郭振飞,陈永传.狗牙根的组织培养及其矮化变异体研究初报[J].园艺学报,2003,30(4):482—484.
- [4]郭向云,尹钧,余桂荣,等.VB1 和干燥处理对小麦幼胚愈伤组织培养的影响[J].华北农学报,2003,18(4):19—22.
- [5]丰锋.龙眼组织培养褐变抑制研究[J].中国南方果树,2004,33(6):49—51.