

## 魔芋组织培养中的褐变机理及防控措施

李剑美, 寸湘琴, 谢世清

(云南农业大学魔芋研究所, 昆明 650201)

**摘要:**从魔芋组织培养中褐变发生的原因, 发生的条件和现象分析了魔芋组织培养中褐变产生的机理。并结合近年来的研究总结了褐变的防控措施: 选择魔芋的外植体年龄越小、切取外植体的体积适当的较大、避免在高温季节采收外植体并对其进行预培养; 培养基中生长激素 2,4-D 浓度适当的降低和细胞分裂素浓度相对提高; 把培养基放在低温和黑暗条件下进行培养; 接种时将培养体切面浸入培养基中, 将初代接种后的外植体尽快转移到新鲜培养基中; 在培养基中分别添加活性炭(500mg/L)、半胱氨酸、二氧化硫、(100mg/L)PVP (聚乙烯吡咯烷酮)或抗坏血酸 (Vc)等都能有效降低魔芋组织培养中的褐变率。

**关键词:**魔芋; 褐变; 防控措施

**中图分类号:**S53 **文献标识码:**A

### The Mechanism and Preventing Measure of Browning in Tissue-culture on *Amorphophallus konjac* C. Koch

Li Jianmei, Cun Xiangqin, Xie Shiqing

(The institute of *Amorphophallus konjac* C. Koch in Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

**Abstract:** The article analyzes the mechanism of browning in tissue-culture on *Amorphophallus Konjac* C. Koch from its generating reason, qualification and phenomenon. And concludes the preventing measures according to the fresh progress in recent years: choosing the young and the big explants, gathering the explants should avoid the time which the temperature is high, advance-cultivating the explants; the concentration of 2,4-D is proper low and the CTK is related high; Putting the culture medium under the low temperature and dark condition; Immersing the cut-surface in the culture medium, transforming the first inoculated generation explants into fresh culture medium as soon as possible; respectively adding the active carbon(500mg/L), cysteine, sulfur dioxide, (100mg/L)PVP or Vc into the medium.

**Key words:** *Amorphophallus konjac* C. Koch, Browning, Preventing action

魔芋 (*Amorphophallus konjac* C. Koch) 为天南星科 (Araceae) 魔芋属 (*Amorphophallus*) 的多年生宿根性草本植物, 它主要分布于四川、云南等地<sup>[1]</sup>, 具有较发达的地下块茎, 富含葡甘露聚糖。葡甘露聚糖由于其特殊的理化性质, 在工业、食品、医药等上有着广泛的利用价值和开发价值<sup>[2,3]</sup>。产品器官为球茎, 传统的魔芋繁殖主要是用其根状茎进行无性繁殖, 繁殖系数

低, 其收获期可能长达三年, 这样不仅不利于工业化的生产而且使耕地面积的利用率降低; 用球茎作种芋进行繁殖, 用种量大, 品种繁殖系数低, 导致种芋供应量严重不足, 且种芋的表皮极易损伤, 易感病和腐烂, 加之用球茎作种芋其萌发出苗能力各异。而利用组织培养技术不但可以产生无病毒的试管苗, 缩短生长周期, 进行大批量的快速繁殖, 而且利用组织培养可以

基金项目: 云南省科技攻关项目“魔芋细胞工程品种改良、无病毒快繁及高效栽培示范”(NG200159)。

第一作者简介: 李剑美, 女, 1981 年出生, 云南普洱人, 在读硕士研究生, 主要从事薯蓣类作物栽培研究。E-mail: 1981jlm@163.com。Tel: 0871-2229404, 通信地址: 650201 云南农业大学 73#

通讯作者: 谢世清, 男, 1967 年出生, 教授, 1988 年毕业于四川农业大学, 现任云南农业大学科研服务处主任, 云南农业大学魔芋研究所所长, 云南省农学会副秘书长。一直以来从事根茎类作物的科研及教学工作, 并收集了大量的魔芋种和魔芋品种资源, 主持云南省重大农业推广项目“十万亩魔芋优良品种及高产栽培技术示范推广”, 在各种学术期刊上发表关于魔芋的文章 20 余篇。

收稿日期: 2005-12-12, 修回日期: 2005-12-29。

一年四季的生产魔芋人工种子,魔芋人工种子不仅需用的空间小,也无需占用土地,易运输,且胚状体在培养过程中具有繁殖速度快、数量多等特性。因此组织培养的利用是魔芋产业得以快速发展的保障。而魔芋组织培养能否成功,控制组织培养中的褐变是一项关键的工作。

### 1 魔芋组织培养中褐变的危害及防控的意义

植物的组织培养中多是细胞结构由于人为的受到破坏而将多酚氧化酶暴露在空气中使之与氧接触从而发生了褐变。褐化现象虽是植物体自身产生的一种保护性反应,但在组织培养中却具有自杀性,褐变产物不仅使外植体、细胞、培养基等变褐,而且对许多酶有抑制作用从而影响培养材料的生长与分化,严重时导致死亡。在魔芋的组织培养中外植体供体有主芽、侧芽和皮上芽孢组织、皮下组织、主芽基部组织,其中前三者出现褐化现象,根据王平华和谢庆华的报道魔芋的最佳外植体是皮上芽孢组织,其他的外植体分化率低<sup>[4]</sup>。褐变是魔芋组织培养中常见的问题之一,如果处理不当或不及时的进行防控,则魔芋的组织培养将受到危害,严重时彻底的失败,因此深入了解组织培养中褐变产生的机理并进行合理有效的控制,对魔芋产业的发展是至关重要的。

### 2 魔芋组织培养中褐变的产生机理

褐变主要是由于多酚氧化酶被激活,使细胞中的代谢发生变化,酚类物质被氧化后产生醌类物质(这类物质为棕褐色),从而毒害自身的现象。褐变包括酶促褐变和非酶促褐变。引起褐变的酶有多酚氧化酶、过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶,酶促褐变现象的产生主要是由于PPO(多酚氧化酶)作用于天然底物酚类物质而引起的。酶促褐变的产生必须具备3个条件:酶、底物和氧。在正常的植物组织中,酶分布在各种质体和细胞质内,底物(酚类物质)分布在细胞的液泡内,酶与底物不能相遇,因此不会发生褐变;但当细胞膜结构发生变化或遇到人为破坏时,则为酶和底物创造了相互接触、结合反应的条件,在氧的存在下,褐变现象产生。

植物组织培养中多是酶促褐变。以底物为邻苯二酚(儿茶酚)为例说明酶促褐变反应的过程。第一步:邻苯二酚在多酚氧化酶催化下被氧化成邻醌;第二步:一部分邻醌在羟基酶的作用下生成苯三酚,另一部分邻醌再将苯三酚氧化成羟基醌;第三步羟基醌合成褐色素。从以上褐变过程可看出,酚酶催化着两类反应,一类是氧化反应,一类是羟基化反应。其特点是速度快,有反应基质存在,需要氧参与,必须由酶催

化。

### 3 魔芋组织培养中褐变现象的防控措施

在进行魔芋组织培养时,外植体的切取部位、大小、年龄;培养基中生长调节剂类型和剂量;培养条件;接种方式和制剂的使用等都影响着魔芋褐变。防控措施:从理论上讲,对酶促褐变可以通过以下3种方法加以抑制:一防止与氧接触或去除氧化物质;二控制好底物浓度(一般来说底物浓度很低时并非所有的酶分子都与底物相结合)和抑制中间产物;三是抑制有关的酶主要是多酚氧化酶。具体防控措施如下:

#### 3.1 魔芋外植体处理

①外植体年龄的选择:一般外植体的年龄越小其褐化程度也就相应的越小;②外植体大小的控制:外植体越小,切面与体积的比率越大,氧化褐化反应的面积就越大,相对来说伤害程度就加大,褐变程度也就相应增加。反之,外植体越大,褐变程度就相应降低。因此,在接种时应注意,外植体材料不能太小,切割时应尽可能减小伤口面积,伤口剪切尽可能平整,并缩短切片在空气中暴露的时间<sup>[5]</sup>。避免在高温季节采收外植体也能抑制褐变的危害<sup>[6]</sup>。对外植体进行预培养,即可有效地克服由于微生物造成的污染问题,又可减轻褐变。

#### 3.2 培养基中生长调节剂类型和剂量的选择

根据王玲等的报道:外植体对不同激素配比的培养基其反应不同。随着生长激素2,4-D浓度的不断下降,细胞分裂素浓度的相对提高,外植体愈伤组织诱导率在不断提高,而褐变率也随之下降<sup>[7]</sup>。

#### 3.3 培养条件的控制

培养条件不适宜,如温度过高或光照过强均可使PPO活性提高,因此将魔芋进行暗培养可以降低褐化率<sup>[8]</sup>。魔芋的低温培养能否降低褐化率目前还没有报道但对薯蓣的低温培养降低褐化率也已得到证实<sup>[9]</sup>。

#### 3.4 接种方式的选择

据黄远新等的报道:把培养体切面浸入培养基中,减少了褐化发生的表面积,且较大组织切块的创伤面积相对较小,有利于保持转培初期切块浅表层细胞或组织处于原来的生长发育状态,从而减轻了因切面褐化带来的毒害作用<sup>[10]</sup>。另外初代接种后尽快将外植体转移到新鲜培养基中,防止多酚氧化酶的大量积累从而减轻毒害现象<sup>[11]</sup>。

#### 3.5 制剂的使用

①活性炭(500mg/L)一方面是一种吸附性较强的无机吸附剂,能吸附各种微量物质和微小颗粒;另一方面在一定程度上还降低了光照强度,能从两方面减

轻褐变<sup>[12]</sup>。②半胱氨酸能与酶促反应的醌类物质生成稳定的无色物质,组织了黑色素的生成,从而抑制了褐变的发生。二氧化硫能不可逆的与醌加成,生成无色物质,抑制 PPO(多酚氧化酶)的褐变;另一方面还有漂白和防止微生物污染的作用。将一些抗氧化剂加入到培养基中对防止培养基的褐变有一定效果。在培养基中添加(100mg/L)PVP(聚乙烯吡咯烷酮)或抗坏血酸 Vc,外植体褐变都得到了控制,但有一个问题这两种添加剂同时也抑制了愈伤组织的生长<sup>[13]</sup>。在有的植物上通过调节 pH 值呈弱酸性;液体静态培养与固体培养交替进行培养<sup>[14]</sup>;纸桥培养<sup>[15]</sup>等也能减轻褐变的危害。魔芋组织培养中的褐变现象和防控措施虽然前人进行了不少的探究,但是建立一个完善的防控体系还需要进一步深入的研究。

#### 参考文献

- 1 张朝贤,张跃进,倪汉文,等. 农田杂草防除手册[J].北京:中国农业出版社,2000.24~25
- 2 孔凡真. 魔芋的开发利用与市场前景[J].生态经济,2002,(11):92~93
- 3 黄挺. 魔芋产品世界市场潜力大[J].世界农业,2000,(8):39~40
- 4 王平华,谢庆华,吴毅歆,等. 白魔芋不同外植体组培分化条件研究[J].西南农业大学学报,2001,(23):63~65
- 5 赵蓬晖,张江涛,马红卫. 植物组织培养中的几个常见问题与对策[J].河南林业科技,2001,(21):27~28
- 6 李海明,潘世明,李瑞美,等. 甘蔗组织培养中褐变的研究进展[J].福建甘蔗,2003,(2):18~21
- 7 王玲,李勇军,房亚南,等. 魔芋组织培养的一步成苗技术研究[J].西南农业学报,2004,(17):636~638
- 8 刘贵周,赵庆云,谢世清,等. 魔芋组织培养技术研究进展[J].中国农学通报,2003,(19):101~102,125
- 9 陈艳乐,贾守菊,林梦野. 低温对薯蓣褐变相关生理生化的影[J].甘肃科学学报,2005,(17):57~60
- 10 黄远新,何凤发,张盛林. 魔芋组织培养与快繁技术研究[J].西南农业大学学报,2003,(25):309~312
- 11 珠海,王东霞,李长杰. 如何对抗植物组培的组织褐变[J].中国花卉盆景,2002,(12):29
- 12 谢庆华,吴毅歆,张勇飞,等. 白魔芋外植体组培分化条件的研究[J].云南师范大学学报(自然科学版),2001,(21):66~69
- 13 刘贵周,谢世清,赵庆云,等. 优质魔芋组培快繁技术研究[J].云南农业大学学报,2005,(20):795~799
- 14 于守超,赵兰勇,王芬,等. 植物组织培养过程中外植体褐变机理研究进展[J].山东林业科技,2004,(5):61~63
- 15 尚旭岚,张健,夏晗. 鹤望兰组织培养的褐变因素及防止措施[J].四川农业大学学报,2003,(21):247~250

(责任编辑:回文广)