

文章编号:1001-4829(2006)04-0719-03

魔芋组织培养中褐变成因的探讨

王玲,房亚南,马继琼,李勇军

(云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所,云南昆明 650223)

摘要:研究了魔芋在组培时制约其成功的瓶颈问题——褐变的成因。结果表明,培养物的生理状态,培养的光、温条件及外源激素的种类、水平、组合影响了培养物酚类物质的多少、多酚氧化酶的活性,从而决定了培养物的褐变程度,通过试验比较,一龄芋的顶芽在培养基 MS + 6BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L + 4.5 % 琼脂,温度 25 ~ 30 °C、光照 1500 lx 的条件下培养物褐变率仅为 6 %,愈伤组织诱导率达 94 %,成功率最高。

关键词:魔芋;组织培养;褐变;酚类物质;多酚氧化酶;
中图分类号:S632 **文献标识码:**A

Studies on factors of browning in the tissue culture of *Amorphophallus rivieri* Durieu

WANG Ling, FANG Ya-nan, MA Ji-qiong, LI Yong-jun

(Biotechnology and Genetic Resource Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Kunming 650223, China)

Abstract: Factors of browning formation in the tissue culture of *Amorphophallus rivieri* Durieu were studied. The results showed that: (i) Physiological state of explants, cultural conditions of temperature and light and types, content and combination of hormone affected actives of phenol Oxidases, content of phenolic compounds and degrees of browning in explants. (ii) Browning rates of apical buds of one year old *Amorphophallus rivieri* Durieu were only 6 % and inductive rates of callus were 94 % higher in MS + 1.0 mg·L⁻¹6BA + 1.0 mg·L⁻¹NAA + 4.5 % agar and conditions of light 1500 lx and temperature 25 - 30 °C.

Key words: *Amorphophallus rivieri* Durieu; tissue culture; browning; Phenolics; PPO

魔芋(*Amorphophallus rivieri* Durieu)是天南星科魔芋属的植珠,具有极高的经济价值和较大的开发潜力,通过植物组织培养能有效地解决魔芋自身繁殖系数低,种性退化等问题^[1]。但在魔芋的组培中,组织、细胞常常发生褐变,影响其诱导和分化,甚至导致培养物死亡,整个培养过程前功尽弃。本文就魔芋组培过程中导致其褐变的几个因素进行了探讨。国内有关魔芋组织培养的研究多集中在培养基的筛选^[2],而对引起材料褐变的成因尚未见相关报道。

1 材料与方法

1.1 材料

采自云南省富源县的花魔芋(*A. rivieri*

Durieu),种龄为1,2,3龄刚萌发的健壮顶芽。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 种龄为1,2,3龄的花魔芋球茎,顶芽萌发1 cm左右,自来水冲洗数次,切取顶芽,75 %乙醇表面消毒3 s→0.1 % HgCl₂灭菌15 min→无菌水冲洗3次→无菌条件下剥取顶端生长点,分别接种于不同激素配比、浓度和不同琼脂浓度的诱导培养基上培养。

1.2.2 培养基 不同激素配比及浓度的诱导培养基:① MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + 2,4-D 0.2 mg·L⁻¹;② MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + 2,4-D 0.1 mg·L⁻¹;③ MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + 2,4-D 0.05 mg·L⁻¹;④ MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹;⑤ MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + NAA 1 mg·L⁻¹。

不同琼脂浓度的诱导培养基:⑥ MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + NAA 1 mg·L⁻¹ + 琼脂 0 mg·L⁻¹;⑦ MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + NAA 1 mg·L⁻¹ + 琼脂 4.5 mg·L⁻¹;⑧ MS + 6-BA 1

收稿日期:2006-02-09

基金项目:云南省科技厅“十五”攻关项目(2001NG59)

作者简介:王玲(1958-),女,副研究员,从事魔芋研究。

表 1 培养基中不同激素浓度对比对培养材料褐变的影响

Table 1 Effects of different hormones on browning induction

培养基 Medium	接种数(块) No. of culture	培养天数(d) Days of culture	褐变数(块) No. of browning	褐变率(%) Ratio of browning	培养天数(d) Days of culture	褐变数(块) No. of browning	褐变率(%) Ratio of browning	出愈数(块) No. of calls	诱导率(%) Ratio of culture
①	50	10	20	40	20	48	96	2	4
②	50	10	15	30	20	31	62	19	38
③	50	10	10	20	20	17	34	33	66
④	50	10	3	6	20	7	14	43	86
⑤	50	10	2	4	20	3	6	47	94

注:1 龄种芋健壮顶芽作外植体,在培养温度 25~30℃、光照 1500~2000 lx、琼脂浓度 4.5 mg·L⁻¹的条件下培养。

mg·L⁻¹ + NAA 1 mg·L⁻¹ + 琼脂 7 mg·L⁻¹。

1.3 培养条件

接种的材料置于温度 10~15℃、15~20℃、25~30℃,光照 500、1500、2000 lx 的条件下培养。

2 结果与分析

2.1 外源激素的类型、水平及组合对培养材料褐变的影响

培养基中外源激素的种类、浓度及组合对培养材料的褐变起着重要作用^[2]。对多数植物材料来说,2,4-D 是诱导愈伤组织和细胞悬浮培养的最有效物质,常用浓度为 0.2~2.0 mg·L⁻¹,但在魔芋顶端生长点的诱导培养中,极少量的 2,4-D(0.05 mg·L⁻¹)就能抑制其愈伤组织的诱导、生长,并且还会引起材料的褐变,导致细胞的死亡^[3]。且随着生长素 2,4-D 浓度的不断增加,细胞分裂素 6-BA 浓度的相对下降,外植体的褐变速度加快,褐变率提高。用生长素 NAA 代替 2,4-D,褐变率大大下降,愈伤组织块大、鲜活。

在细胞分裂素类中一般认为 6-BA 有刺激多酚氧化酶(PPO)活性提高、加重褐变的作用^[4],这在甘蔗组培中表现最明显^[5]。但在魔芋的组培中 6-BA 对材料的褐变似乎具有抑制作用,魏海蓉等^[6]认为 6-BA、GA₃ 减缓了酚类物质的积累,这和本试验的结果一致。

魔芋愈伤组织的诱导及生长,6-BA 与 NAA 的组合优于 6-BA 与 2,4-D 的组合,其中 MS + 6-BA 1 mg·L⁻¹ + NAA 1 mg·L⁻¹ 培养基上培养的材料褐变率小,愈伤组织诱导率高(表 1)。

2.2 琼脂浓度对培养材料褐变的影响

一般认为液体培养容易使有毒物质扩散^[2],在魔芋的组织培养过程中,可通过调整琼脂浓度来降低培养物的褐变,减少材料的死亡。由表 2 可知,当把诱导出来的愈伤组织转接在几组不同琼脂浓度的培养基上培养时,其结果完全不同。琼脂浓度为 0 时,培养物完全浸泡在液体中,最终培养物因缺氧,褐变而死亡;琼脂粉 4.5 mg·L⁻¹,培养物在半固体状态下培养,培养物生长旺盛,培养至 20 d 时褐变率仅只 6%;琼脂粉 7 mg·L⁻¹时,培养物处在全固体状态下,由于对营养物质的吸收不畅,培养物分泌的酚类物质不易扩散,导致培养物生长缓慢,材料褐变、死亡。

2.3 培养条件

高温、强光照的培养条件,会提高多酚氧化酶 PPO 的活性,促进酚类物质的氧化,加速褐化^[5]。因此大多数植物在组培时为了防止褐变,多进行一段时间暗培养而减少或克服褐变。但也有研究表明,有的培养材料在光下培养,愈伤组织诱导率和生长量是光培养优于暗培养^[7]。魔芋的组培如表 3 所示,低温、弱光的培养条件,反而加快、加重了培养物

表 2 培养基中不同浓度的琼脂对培养材料褐变的影响

Table 2 Effects of different agar on browning induction

培养基 Medium	接愈伤组织数(块) No. of callus	培养天数(d) Days of culture	褐变数(块) No. of browning	褐变率(%) Ratio of browning	培养天数(d) Days of culture	总褐变块数 No. of browning	总褐变率(%) Ratio of browning	愈伤组织愈伤组织诱导率(块)(%) No. of calli Ratio of culture
⑥	50	10	20	40	20	50	100	0
⑦	50	10	2	4	20	3	6	47
⑧	50	10	5	10	20	26	52	25

注:以一龄种芋健壮顶芽作外植体,培养温度 25~30℃、光照 1500 lx。

表3 温度、光照对魔芋组培材料褐变的影响

Table 3 Effects of different temperature, light on browning induction

培养温度 (℃) Temperature	光照 (lx) Light	接种数 (块) No. of culture	培养 天数(d) Days of culture	褐变 块数 No. of browning	褐变率 (%) Ratio of browning	培养 天数(d) Days of culture	总褐变 块数 No. of browning	总褐变 率(%) Ratio of browning	愈伤组织 块数 No. of callus	诱导率 (%) Ratio of culture
15~20	200	50	10	15	30	20	38	76	12	24
25~30	1500	50	10	2	4.0	20	3	6	47	94
30~40	2000	50	10	5	10	20	17	34	33	66

注:以1龄种芋健壮顶芽作外植体,培养基⑤MS+6BA 1 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹。

表4 种龄对魔芋组培材料褐变的影响

Table 4 Effects of different age on browning induction

培养材料 Explants	接种数 (块) No. of culture	培养天数 (d) Days of culture	褐变数 (块) No. of browning	褐变率 (%) Ratio of browning
1龄种	50	20	3	6
2龄种	50	20	7	14
3龄种	50	20	16	32

注:培养温度 25~30℃、光照 1500 lx,培养基⑤MS+6BA 1 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹

的褐变,培养物在在 25~30℃、1500 lx 的培养条件下培养,褐变率最低,诱导率最大,而在高温、强光下培养,培养物的褐变率有所提高,愈伤组织诱导率相对降低,这可能是不同植物对其不同的生态环境长期适应的一种表现。

2.4 培养材料的生理状态

和魏海蓉等^[6]的研究结果一致,酚类物质的多少及相关氧化酶的活性与植株的生理状况有着密切的关系。在魔芋组培过程中发现,同样的培养条件下,种龄愈大的魔芋球茎,在培养时愈易褐变,成功的几率愈小。

3 讨论

魔芋球茎中含有多种多酚类物质,在多酚氧化酶的作用下极易发生褐变^[8],不仅影响了魔芋的产品加工,并且在魔芋组培时也成了制约其成功的瓶颈问题。本试验从外源激素、培养基浓度、培养条件及培养材料的生理状态 4 方面着手对魔芋组培过程中出现褐变的成因进行了探讨。魔芋在组培过程中培养物的褐变与酚类物质多寡及多酚氧化酶的活性有着密切的关系,而酚类物质多寡及多酚氧化酶的

活性又受其培养物生理状态、培养的光、温条件及外源激素的种类、水平、组合的影响。幼嫩的植株生理活性强,酚类物质含量相对少,组培中不易褐变,如一龄种的褐变率比三龄种的褐变率低。魔芋组培的培养条件与其原始的生长环境有着密切的关系,多数植物在培养过程中采取一定的低温、弱光或暗培养,预防材料褐变,而魔芋则在低温、弱光或暗培养时褐变率达 76%。魔芋生长的最适光、温条件(25~30℃、1500 lx)也是魔芋组培时的最佳培养条件,褐变率低,愈伤组织诱导率高达 94%。不同的激素水平及组合对不同培养物酚类物质的积累、多酚氧化酶活性的激活反应不同,如 6-BA 在甘蔗组培中有刺激多酚氧化酶(PPO)活性提高、加重褐变的作用,而在魔芋的组培中并非如此,6-BA 对材料的褐变似乎具有抑制作用,这可能与培养材料的内源激素及内含物有着密切的关系。

参考文献:

- [1]黄远新,何凤发,张盛林.魔芋组织培养与快繁技术研究[J].西南农业学报,2003,25(4):300-312.
- [2]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(5):636-638.
- [3]黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995.30-40.
- [4]李冬杰,张进献,魏景芳,等.培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系[J].植物生理学通讯,2005,41(1):95-98.
- [5]曹孜义,刘国民,王蒂,等.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996.48-49.
- [6]魏海蓉,高东升,李宪利.植物生长调节剂对樱桃休眠的调控及花芽酚类物质含量的影响[J].园艺学报,2005,32(4):584-588.
- [7]赵芳,倪良,耿征,等.南方红豆杉组织培养研究.1.愈伤组织诱导和培养条件优化[J].中草药,1999,30(3):213-215.
- [8]刘佩瑛.魔芋学[M].北京:中国农业出版社,2004.250.

(责任编辑 谢晓慧)