

黄灯笼辣椒组织培养中防褐变的研究

淡明¹ 黄海波 郭安平² 贺立卡

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘要:以黄灯笼辣椒无菌苗子叶为外植体,对其分化生长过程中的褐变现象进行研究。结果表明,通过在子叶不定芽分化培养基中添加0.2%活性炭(AC)、6 mg/L 硝酸银(AgNO₃)和40 mg/L 维生素C(VC),均能不同程度的减轻褐变的程度,其中以6 mg/L AgNO₃效果最佳。

关键词:黄灯笼辣椒 组织培养 褐变 硝酸银

中图分类号:Q943.1; S641.3 **文献标识码:**A

文章编号:1006—2327—(2006)02—0001—03

外植体的酶促褐变是植物组织培养中常见的现象。酶促褐变是在有氧的条件下,多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase, 即PPO)氧化组织中酚类物质形成醌,醌再进一步氧化聚合形成褐色色素^[1]。这类物质可抑制细胞中其他酶的活性,影响细胞的正常代谢,严重时可导致组织的死亡。外植体的酶促褐变是植物组织培养成功的主要障碍之一。黄灯笼辣椒是目前海南最热销的旅游商品之一,因此,黄灯笼辣椒是海南最具发展潜力的特色农作物之一。黄灯笼辣椒组织培养过程中,褐变现象尤其严重。正常情况下继代培养1-2次后即可导致组织褐变,这一现象是影响其芽分化和再生的主要障碍。本文利用黄灯笼辣椒的子叶作为外植体,研究了物理因素和化学因素对褐变的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

辣椒品系黄灯笼辣椒(*Capsicum chinense* Jacquin),由海南省农科院提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获取

取黄灯笼辣椒种子于70%乙醇浸泡30 s,1 g/L 升汞(HgCl₂)灭菌7 min,无菌水冲洗4-6次,接种于不含激素的MS培养基(蔗糖30 g/L、琼脂6 g/L, pH 5.8),置于25℃±2℃,光照1400 lx×12 h/d下发芽。自种子萌发、露出白色根尖开始计算苗龄。

1.2.2 不定芽的诱导分化及继代培养、伸长、生根

切取无菌苗苗龄12-16d的子叶接种到筛选出的不定芽分化培养基(MS+6-BA 5 mg/L+IAA 1 mg/L)中,随后每隔10-18d转到新鲜的不定芽分

化培养基培养;不定芽分化后切割成小块转到芽伸长培养基(MS+6-BA 3 mg/L+IAA 1 mg/L+GA₃ 4 mg/L)中;分化的不定芽伸长至3 cm左右即可切下移入生根培养基(MS+IAA 0.5 mg/L)进行不定根的诱导。

1.2.3 继代培养中不同因素对褐变的影响

以不定芽分化培养基为对照(CK),在不定芽分化培养基中分别添加吸附剂(0.2%活性炭,即2000 mg/L)、抑制剂(6 mg/L AgNO₃)和抗氧化剂(40 mg/L 维生素C),比较其对子叶不定芽分化、生长及褐变的影响。

调节不定芽分化培养基中6-BA(6-苄氨基嘌呤)的浓度,比较其对子叶不定芽分化、生长及褐变的影响。

调节外植体转瓶周期和光照(暗培养、弱光培养)对子叶不定芽分化、生长及褐变的影响。

2 结果与分析

2.1 活性炭对褐变的影响

从表1可以看出,在不定芽分化培养基中加入2g/L的活性炭可减轻褐变的发生。但在添加2g/L活性炭的不定芽分化培养基上,不定芽的生长纤细、瘦弱,生长迟缓,这种不定芽在伸长培养基中较难伸长,不易诱导生根形成正常的幼苗。关于活性炭在组织培养中对不定芽增殖和伸长、根诱导的作用,有促进和抑制相反的报道结果^[2]。报道中活性炭对不定芽增殖和伸长有促进作用的用量一般为1-2g/L,而报道有抑制作用的用量都为5-10g/L, Bach^[3]也证实了这一点,即低浓度的活性炭促进不定芽增殖和伸长,高浓度的活性炭却起减

1、作者简介:淡明(1979~),女,在读硕士研究生。E-mail: danming2004@163.com。

2、通讯作者:郭安平(1962~),农学博士、作物学博士后,研究员,国家农业转基因生物安全委员会委员。E-mail: gap211@126.com。

缓作用。本试验在培养基中加入 2g/L 的活性炭, 虽可减轻褐变, 但对不定芽增殖与伸长表现出抑制作用, 可能与活性炭的吸附特性有关。活性炭的非选择吸附特性, 表现在不仅能吸附组织中产生的酚醌类物质, 有效防止褐变, 同时也吸附培养基中的生长调节物质, 而使其失去作用, 影响不定芽的正常发育。因此, 在加入活性炭的培养基中, 应当适当改变激素的配比, 如适当提高 6-BA 的浓度, 在防止褐变的同时, 使不定芽能够正常的发育。

表 1 添加剂对不定芽分化、褐变及生长的影响

添加剂种类	浓度 (mg/L)	分化率 (%)	褐变及生长情况
CK	0	18	接种培养 6~8d 出现褐变, 外植体切口呈黑色, 大多数外植体慢慢变成棕褐色, 直至溃烂死亡; 分化的不定芽生长迟缓。
AC (活性炭)	2000	50	继代培养 1 代后出现褐变, 外植体切口及周围培养基呈棕褐色, 部分外植体慢慢变成棕褐色, 直至溃烂死亡; 分化的不定芽生长迟缓。
AgNO ₃	6	70	继代培养 2 代后出现褐变, 外植体切口及周围培养基呈棕褐色, 少数外植体慢慢变成棕褐色, 直至溃烂死亡; 分化的不定芽生长较快。
VC	40	28	继代培养 1 代后出现褐变, 外植体切口及周围培养基呈黑色, 大多数外植体慢慢变成棕褐色, 直至溃烂死亡; 分化的不定芽生长迟缓。

2.2 AgNO₃ 对褐变的影响

试验表明在不定芽分化培养基中加入 6 mg/L AgNO₃ 可有效减轻褐变的发生。从表 1 可以看出, 在培养基中添加 6 mg/L AgNO₃ 对不定芽分化有较大的影响, 能够促进不定芽分化率的提高, 将分化率提高至 70%, 而且切口处形成旺盛的不定芽丛。

2.3 维生素 C 对褐变的影响

从表 1 可以看出, 在不定芽分化培养基中加入 40 mg/L 维生素 C 可减轻褐变的发生。这是因为维生素 C 为多羟基还原物质, 一方面维生素 C 可使多酚氧化酶失活, 阻止酚类氧化; 另一方面维生素 C 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^[4,5]。但在含维生素 C 不定芽分化培养基中连续培养 2 代后易出现玻璃化。因此, 尽管维生素 C 可减轻褐变的发生, 但不利于长期用于继代培养。

2.4 6-BA 的浓度对褐变的影响

在筛选出的较佳不定芽分化培养基 (MS + 6-BA 5 mg/L + IAA 1 mg/L + AgNO₃ 6 mg/L) 中调节

6-BA 的浓度, 对子叶不定芽的分化和褐变影响不同 (表 2)。从表 2 可以看出, 随 6-BA 浓度的升高, 褐变率随之增高, 分化率降低。因此, 在有效减轻褐变, 保证子叶不定芽分化率的情况下, 不定芽分化培养基应使用浓度 5 mg/L 6-BA 为佳。

表 2 6-BA 浓度对不定芽的分化率和褐变的影响

浓度 (mg/L)	褐变率 (%)	分化率 (%)
4	10	11
5	16	70
6	25	34
7	42	18

2.5 外植体转瓶周期和光照对褐变的影响

转瓶时间早晚也是影响子叶不定芽的分化、生长及褐变的重要因子。在试验中, 10d 转瓶 1 次, 子叶外植体色泽正常, 子叶外植体切口接触的培养基周围呈淡棕褐色, 培养基中无浑浊物产生; 15-20d 转瓶 1 次, 子叶外植体色泽较暗淡, 子叶外植体切口接触的培养基周围呈淡棕褐色, 培养基中有浑浊物产生, 向四周逐渐扩散, 子叶不定芽的分化率降低, 生长缓慢。由此可见, 若接种后转瓶周期时间长, 伤口周围积累酚类物质增多, 会加重褐变。试验表明, 10d 转瓶 1 次, 既不影响子叶不定芽生长分化, 又可有效的抑制褐变。

本试验前期采用暗培养和弱光培养处理, 期望能够通过抑制酚类化合物合成, 降低多酚氧化酶的活性, 减少酚类氧化, 从而减轻褐变^[6,7]。但是试验表明采用暗培养和弱光培养处理, 未能有效减轻褐变, 且子叶不定芽分化率有所降低。

3 结论与讨论

外植体的酶促褐变是酚类物质被氧化的结果。培养材料的种类与品种、外植体材料的生理状态、营养状况、生长部位等内因, 以及培养基成分、添加激素的种类和浓度、培养条件等外因, 都会影响褐变发生。本试验以黄灯笼辣椒无菌苗子叶为外植体, 主要针对子叶不定芽分化过程中产生褐变的外因进行研究。通过在子叶不定芽分化培养基中添加 0.2% 活性炭、6 mg/L AgNO₃ 和 40 mg/L 维生素 C, 均能不同程度的减轻褐变的程度, 其中以 6 mg/L AgNO₃ 效果最佳。AgNO₃ 的作用机制还未研究清楚, 初步认为: 植物组织培养是在密闭或半密闭的容器中进行的, 因此外植体切口处细胞会产生乙烯并逐渐积累, 积累的乙烯可使外植 (下转第 4 页)

表 2 单位林分出材表

处 理	1	2	3
定植亩株数	110	90	70
保留株数	103	81	63
平均胸径(cm)	11.5	14	14.5
平均树高(m)	13	14	14
平均亩立木蓄积(m ³)	6.6435	8.8290	6.7410
平均亩出材按 80%(m ³)	5.3148	7.0632	5.3928

表 3 不同密度林分径阶分布及效益分析

处理	径阶比例长度	材积(m ³)	比例(%)	价格(元/m ³)	金额(元/亩)
1	4	0.8450	15.9%	400	338.00
	6	0.9885	18.6%	480	474.48
	8	0.8238	15.5%	600	494.28
	10	1.0629	20.0%	620	659.00
	12	1.5944	30.0%	660	1052.30
	合计				
2	4	0.5430	7.7%	400	217.20
	6	0.8300	11.8%	480	398.40
	8	1.2000	17.0%	600	720.00
	10	1.4200	20.0%	620	880.40
	12	1.3120	18.5%	660	865.92
	14	1.7658	25.0%	700	1236.06
合计					4317.58
3	4	0.3750	7.0%	400	150.00
	6	0.5392	10.0%	480	258.82
	8	1.07856	20.0%	600	647.14
	10	1.07856	20.0%	620	668.70
	12	0.7010	13.0%	660	462.66
	14	1.6600	30.0%	700	1162.00
合计					3349.32

4317.58 元; 处理 1 最低, 为 3018.06 元; 处理 3 介于两者之间。说明了不同种植密度, 单位面积的产值不同, 而且并不是密度越高, 收益越高, 而是要有适当的密度。

表 4 列出不同密度的投入及产出效益分析, 处理 2 (90 株/亩) 的经济效益最高, 为 3989.38 元/亩; 处理 3 (70 株/亩) 次之, 为 3072.72 元/亩; 处理 1 (110 株/亩) 最差, 为 2638.26 元/亩。

3 小结

以上不同的造林密度, 得出不同的经济效益, 从成本投入方面看, 不是投资大产出就越大, 而是要合理科学的密度才能达到最好的经济效益和节约成本投入。由此可见, 在大面积发展桉树的情况下, 一定要科学种树, 不要盲目投资。在同等的立地条件下, 不同的造林密度, 会产生不相同的出材量及不同的经济效益。

表 4 不同密度的投入及产出效益分析

处 理	成本投入(元/亩)	木材产出(m ³ /亩)	经济效益(元/亩)	扣成本余额(元/亩)
1	343.80	5.3148	3018.06	2674.26
2	292.20	7.0632	4317.58	4025.38
3	276.60	5.3928	3349.32	3072.72

参考文献

廖祖辉. 福建桉树人工林材积表和蓄积量表编制的研究. 福建林业科技, 2005, 32(2): 17-20

(上接第 2 页) 体的生长分化受到影响, 而 Ag⁺ 可以抑制乙烯活性^[8]。其作用主要表现在: 促进愈伤组织的器官发生与体细胞胚胎发生; 促进一些再生困难种芽的产生; 增加外植体产生不定芽的数目及提高植株的再生频率; 防止外植体的褐变与玻璃化。

参考文献

- 1、Asmus B, Hanne H. Enzymatic browning of vegetables. Calibration and analysis of variance by mutiway rmethods[J]. Chemometrics Intelligent Laboratory Systems, 1996, 34: 85
- 2、卜学贤, 陈维纶. 活性炭对培养基中植物生长调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 401-405
- 3、Bach A. Effect of AC on in vitro propagation of Irisx

- Houandica. Bulletin of the Polish Academy of Science[J]. Biological Science. 1998, 36 (4-6): 107
- 4、Darvill A. G., P. Albersheim. Phytoalexins and their elicitors-A defense against microbial infection in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 1984, 35: 243-275
 - 5、Thompson J. E., R. L. Legge and R. F. Barbe. The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytol., 1987, 105: 317-344
 - 6、Creasey LL. The increase in phenylalanine ammonialyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis[J]. Phytochem, 1968, 7: 441-446
 - 7 Davies ME. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's scarlet rose[J]. Planta, 1972, 104: 50-65
 - 8 Beyer EM Jr. A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol, 1976, 73: 201