

文章编号:1674-7054(2014)02-0127-05

香蕉愈伤组织诱导培养中褐化抑制剂的筛选

赵惠^{1,2}, 周雪娟^{1,2}, 穆雷^{1,2}, 谢俊^{1,2}, 韦双双^{1,2}, 夏幽泉^{1,2},
吴繁花^{1,2}, 阮云泽^{1,2}, 汤华^{1,2,3}

(1. 海南热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地, 海南海口 570228; 2. 海南大学农学院, 海南海口 570228; 3. 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南海口 570228)

摘要: 为解决香蕉愈伤组织诱导培养过程中的外植体的褐化现象, 分别用 AgNO_3 ($10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), AC ($1, 2, 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), PVP ($1, 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), VitC ($100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 等防褐化剂, 对香蕉的愈伤组织诱导进行防褐化研究。结果表明: 外植体培养 10 d 后, 所有防褐化处理实验组的褐化率均低于对照组, 说明在愈伤组织诱导的早期, 不同的防褐化剂均有一定的防褐化效果; 随着培养时间延长, 不同的防褐化处理逐渐出现差异, 在愈伤组织诱导培养 40 d 后, 活性炭的防褐化效果最好, 其中 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭的褐化率仅为 20%, 效果最佳。

关键词: 香蕉; 愈伤组织诱导; 褐化现象; 褐化抑制剂

中图分类号: S 668.1

文献标志码: A

在香蕉愈伤组织诱导的培养过程中, 有效地控制外植体的褐化现象是实验成功的重要因素^[1]。褐化现象是指外植体在诱导脱分化或再分化过程中, 自身组织从表面向培养基释放褐色物质, 导致培养基逐渐变成褐色, 外植体也逐渐褐变而死亡的现象。褐化包括酶促褐化和非酶促褐化, 植物组织培养中的褐化现象主要由酶促褐变引起^[2-3]。褐化现象的发生与植物材料的基因型、生理状态、取材时期、培养基以及培养条件等有关^[4], 在植物组织培养中普遍存在。为了控制褐化现象, 通常在培养基中添加褐化抑制剂^[5-6], 如在玉米成熟胚、苏丹草、马尾松等的愈伤组织诱导过程中, 添加一定浓度的硝酸银 (AgNO_3)、活性炭 (AC)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、维生素 C (VitC)、甘露醇等, 均起到了一定程度的防褐化作用, 但是, 不同的褐化抑制剂对不同遗传材料的褐化抑制效果存在差异^[7-8]。近年来, 一些研究人员通过不同的方法来抑制香蕉外植体褐化现象, 并取得了一定的成效。如 2008 年, 李敬阳等^[9]将 MS 培养基中铵态氮 (NH_4^+) 与硝态氮 (NO_3^-) 的摩尔比改为 20.6:67.6 时, 发现对抑制巴西蕉雄花褐化具有一定的抗褐化能力; 2012 年, 陈友等^[10]通过添加不同含量的 PVP、活性炭和 VitC 来抑制海南野生蕉吸芽组织培养中的褐化现象, 结果表明, 防褐化效果最好的是 VitC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 但继代时出芽一般; 防褐化较理想且继代时出芽也好的是 PVP $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为了解决巴西蕉愈伤组织诱导培养过程中外植体的褐化问题, 笔者在诱导愈伤培养基中添加了不同质量浓度的 AgNO_3 , AC, PVP 和 VitC 等褐化抑制剂, 旨在筛选出适宜香蕉愈伤组织诱导的最佳褐化抑制剂及其用量。

1 材料与方法

1.1 遗传材料 巴西蕉的吸芽取自海南大学农学院实验基地。

收稿日期: 2014-04-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360364); 教育部热带作物新品种选育工程中心与作物学重点学科联合资助项目 (lhxm-2012-2); 海南省重大科技项目 (ZDZX2013023) 及“中央财政支持中西部高校提升综合实力专项”子课题

作者简介: 赵惠 (1986-), 男, 海南大学农学院 2011 级硕士研究生, E-mail: 510456471@qq.com

通信作者: 汤华 (1974-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 植物遗传育种与分子生物学, E-mail: thtiger@163.com

1.2 培养基配方 香蕉愈伤组织诱导培养基配方为:MS^[11] + 2.4 - D 4 mg · L⁻¹ + IAA 1 mg · L⁻¹ + NAA 1 mg · L⁻¹ + 生物素 1 mg · L⁻¹ + 麦芽提取物 100 mg · L⁻¹ + 谷氨酰胺 100 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 琼脂 7 g · L⁻¹ pH5.7。分别添加 AgNO₃ (10 20 mg · L⁻¹) ,AC(1 2 3 g · L⁻¹) ,PVP(1 2 g · L⁻¹) , VitC(100 200 mg · L⁻¹) 等褐化抑制剂,并设置空白对照。

1.3 愈伤组织诱导接种实验 取巴西蕉吸芽球茎,清洗干净,剥除松动的叶鞘,用小刀切取生长点(约 2 cm³) ,置于超净工作台上进行消毒(φ = 75% 的酒精浸泡 10 min μ = 0.1% 的升汞浸泡 8 ~ 10 min) ,再用无菌水冲洗 3 ~ 4 次,并用无菌滤纸吸干表面水分,将巴西蕉吸芽切成约 0.5 mm × 0.5 mm × 0.5 mm 的小块,接入到不同处理的愈伤组织诱导培养基中。每瓶接种 4 个外植体,每组处理共接种 20 个外植体,3 次重复。

1.4 褐化程度的观察与记录 接种后每隔 10 d 观测 1 次,拍照并记录褐化情况,计算褐化率(褐化率 = (褐化个数/总接种数) × 100%) 和褐化程度。褐化程度的统计与计算方法:外植体颜色不变计 0;颜色发黄每块计 0.1;黄色偏深以递增计 0.05;4 个角发黑每块计 0.25;半块发黑每块计 0.5;整块发黑每块计 1,每个处理组分别计算褐化程度总和及平均值。根据褐化程度的数值,采用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同褐化抑制剂处理对香蕉外植体褐化率的影响 从表 1 可知,外植体培养 10 d 后,空白对照组的褐化程度最高,达 20%;加入了防褐化剂的 9 个处理中,添加 AgNO₃ 10 mg · L⁻¹ 处理的褐化率与对照组相近,其他处理的褐化率均低于 10%。实验证明,在诱导愈伤组织早期,所试的褐化抑制剂均可以抑制球茎切片的褐化。培养 20 d 后,活性炭的防褐化作用最强,褐化率在 10% ~ 15% 之间,AgNO₃ 20 mg · L⁻¹ 和 PVP 2 g · L⁻¹ 也有一定的防褐化作用,褐化率分别为 25% 和 15%,而 AgNO₃ 10 mg · L⁻¹ 和 PVP 1 g · L⁻¹ 的防褐化效果不明显,褐化率与对照组一致,均为 50%。培养 30 d 后,对照组、AgNO₃ 10 mg · L⁻¹ ,PVP 1 g · L⁻¹ ,VitC 100 mg · L⁻¹ 和 VitC 200 mg · L⁻¹ 褐化程度严重;褐化程度较轻的是 AgNO₃ 20 mg · L⁻¹ , PVP 2 g · L⁻¹ 和 AC 3 g · L⁻¹ ,褐化率分别是 75% ,70% ,50%;添加 1 和 2 g · L⁻¹ 的活性炭的处理具有很强的褐化抑制作用,褐化率分别为 20% 和 35%。培养 40 d 后,对照组和 AgNO₃ ,PVP ,VitC 实验组基本上全部褐化死亡,而活性炭处理组依然保持较好的褐化抑制作用,其中,添加 1 g · L⁻¹ 的活性炭处理褐化抑制效果最佳,外植体的褐化率仅为 20%。

表 1 不同褐化抑制剂处理后香蕉外植体的褐化率

Tab. 1 Browning rate of explants treated with different anti-browning agents

实验处理 Treatment	接种数 NEI	10 d		20 d		30 d		40 d	
		褐化数 NEB	褐化率 /% BR						
		CK	20	4	20.0	10	50.0	19	95.0
AgNO ₃ 10 mg · L ⁻¹	20	4	20.0	16	80.0	19	95.0	20	100.0
AgNO ₃ 20 mg · L ⁻¹	20	2	10.0	5	25.0	15	75.0	17	85.0
AC 1 g · L ⁻¹	20	2	10.0	2	10.0	4	20.0	4	20.0
AC 2 g · L ⁻¹	20	2	10.0	3	15.0	7	35.0	11	55.0
AC 3 g · L ⁻¹	20	2	10.0	3	15.0	10	50.0	12	60.0
PVP 2 g · L ⁻¹	20	2	10.0	10	50.0	18	90.0	19	95.0
PVP 4 g · L ⁻¹	20	2	10.0	3	15.0	14	70.0	15	75.0
VitC 100 mg · L ⁻¹	20	2	10.0	7	35.0	18	90.0	18	90.0
VitC 200 mg · L ⁻¹	20	2	10.0	6	30.0	19	95.0	20	100.0

注:NEI 为接种的外植体数;NEB 为褐化的外植体数;BR 为褐化率

Note: NEI: number of explants inoculated; NEB: number of explants with browning; BR: browning rate

2.2 不同褐化抑制剂处理对香蕉外植体褐化程度的影响 采用不同褐化抑制剂处理后,对香蕉愈伤诱导培养的褐化程度进行记录和分析,并进行了差异显著性测验。从表 2 可知,只有活性炭(AC)的 3 个处

理与空白对照达到了差异显著性水平,其中,添加 AC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理与对照的差异最大。在培养 10 d 后,各实验组都出现了不同程度的褐化,其中空白对照组和添加 AgNO_3 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的褐化程度最重,其他 8 个实验组的褐化程度均低于对照组;在培养 20 d 后,添加 AgNO_3 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的褐化程度要高于对照组,添加 AgNO_3 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、PVP $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、VitC $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 VitC $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的褐化程度与对照相当,但是添加 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的活性炭及 PVP $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 褐化程度要远低于对照组;在接种 30 d 后,添加 AgNO_3 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 AgNO_3 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、PVP $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、VitC $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、VitC $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理和对照组的褐化程度十分严重,添加 AC $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AC $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 PVP $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的褐化程度稍低于对照组,而添加 AC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的褐化程度最低;接种 40 d 后,实验结果与接种 30 d 时的基本一致。

表 2 不同褐化抑制剂处理后香蕉外植体的褐化程度

Tab.2 Browning degrees of banana explants treated with different anti-browning agents

实验处理 Treatment	褐化均值 Average value of browning					<i>t</i> 测验 <i>t</i> Test
	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d	
CK	0.00	0.73	1.88	3.97	3.97	AB
AgNO_3 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.80	3.25	3.89	3.89	A
AgNO_3 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.41	1.01	3.14	3.18	ABCD
AC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.35	0.45	0.75	0.78	E
AC $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.41	0.63	1.53	1.90	DE
AC $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.35	0.88	2.07	2.28	CDE
PVP $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.40	2.05	3.66	3.75	ABC
PVP $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.38	0.50	2.82	3.02	BCDE
VitC $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.43	1.43	3.70	3.75	ABC
VitC $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.39	1.20	4.00	4.00	ABC

从图 1 可知,活性炭 (AC) 组的防褐化效果最佳,在所试的浓度中,低质量浓度 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的活性炭防褐化效果比高质量浓度 ($3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的好,其原因可能是高质量浓度的活性炭具有更强的吸附性,它不仅将培养组织的代谢产物吸收,同时也吸收培养基的营养成分,导致外植体缺乏营养而褐化。

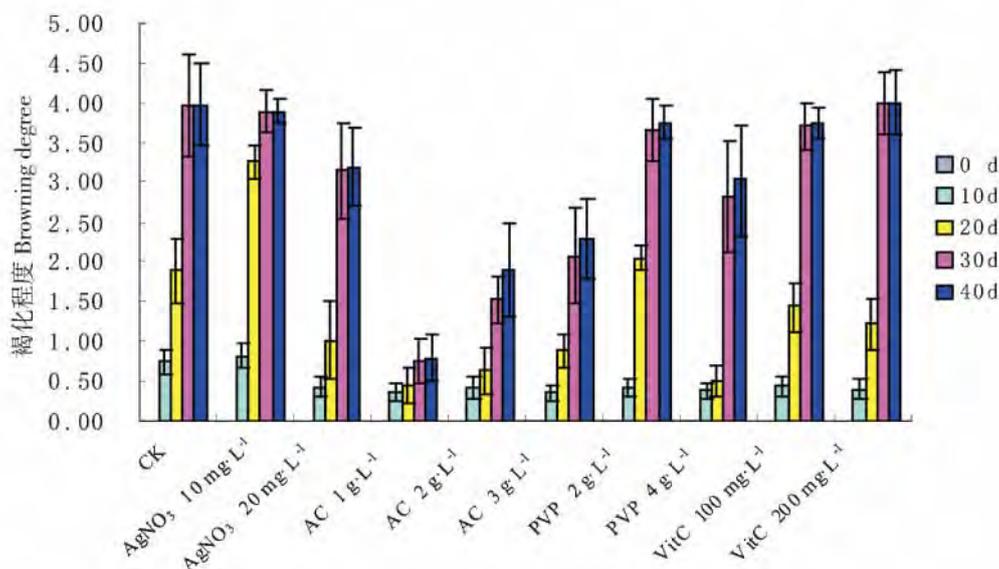


图 1 不同褐化抑制剂处理的褐化程度比较

Fig. 1 Comparison of browning degrees of explants treated by different anti-browning agents

2.3 最佳褐化抑制剂的筛选 在褐化抑制剂的筛选实验中,通过持续的观察发现,添加活性炭表现出更好的防褐化效果,其中,添加 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭处理的防褐化效果最好。在培养后的 10、20、30、40 d 都进行拍照记录。图 2 将防褐化效果最好的最佳处理组 ($\text{AC } 1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 与空白对照组 (不添加任何褐化抑制剂) 进行了比较。从图 2 可以看出,在空白对照组 CK 中,培养 20 d 时,球茎薄切片开始褐化,培养 40 d 时,球茎薄切片完全褐化;而在添加 $\text{AC } 1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理组中,外植体培养 40 d 后,仍未发生明显的褐化现象。在培养基中添加 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭,无论是在诱导愈伤组织的早期还是后期,均能有效降低外植体的褐化率和褐化程度。

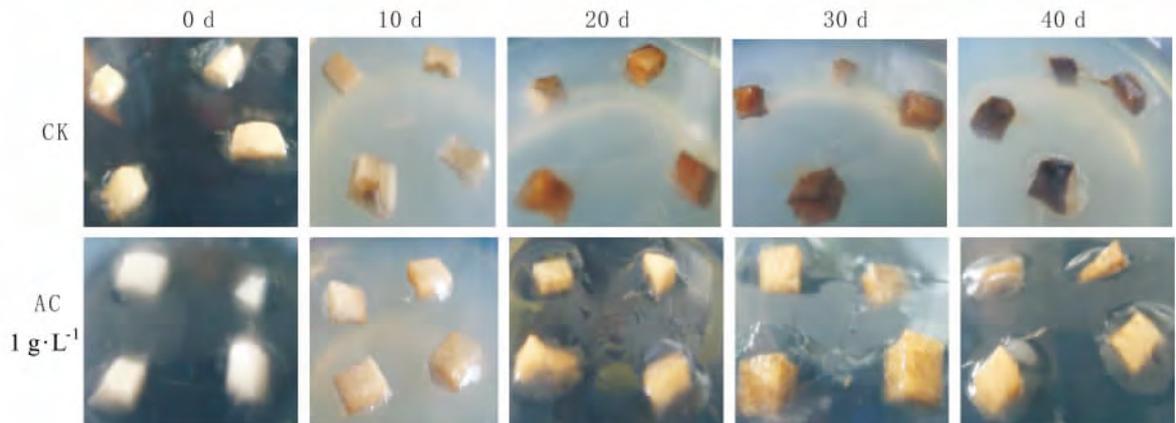


图 2 最佳处理组与对照组在不同培养阶段的褐化程度比较

Fig. 2 Comparison of browning degree at different culture stages between the best treatment and the control

3 讨论

在植物愈伤组织诱导培养中,组织褐变现象普遍存在,给实验研究带来很多困扰。其产生的因素是多方面的,内在因素包括接种材料的生理状态、品种、培植条件、营养状况、取材时间及外植体大小等;外在原因则包括培养基的浓度、盐度、糖度和激素的含量、温度、光照、通气状况等^[12]。因此,选择合适的外植体、培养基、培养条件和防褐化剂,对抑制褐化现象具有重要的作用。

不同的抗褐化剂对抑制外植体褐化有不同的效果,利用抗氧化剂来抑制褐化现象是比较有效的方法。抗氧化剂能够阻止多酚氧化物对酚类物质的氧化作用,减少褐变,但抗氧化剂对外植体有一定毒害作用,培养时间过长会加重外植体褐变^[13]。在本实验中,香蕉外植体如长期培养于含抗氧化剂硝酸银和维生素 C 的培养基中,早期虽能抑制褐化,但后期却出现了相反的作用;活性炭具有强大的吸附能力,它主要吸附非极性分子和色素等大分子,能吸附外植体在培养过程中分泌的酚、醌类物质,从而减少有害物质的影响,降低褐化率。但活性炭的吸附作用是没有选择性的,在吸附有害物质的同时,也能吸附培养基中的营养成分和生长调节类物质,会对外植体诱导愈伤组织或愈伤组织的生长产生一定的反作用^[14]。笔者发现,添加 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭比添加 $2\text{--}3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭的处理抑制香蕉外植体褐化的效果更好,所以在香蕉愈伤组织诱导过程中,选择合适质量浓度的活性炭对抑制香蕉外植体褐化有着重要意义。PVP 是酚类物质的专一性吸附剂,在生化制备中常用作酚类物质和细胞器的保护剂,可用于防止褐变。在本实验中,PVP 的抗褐化能力并不明显,这也可能与物种有关,别的物种可能在组织培养过程中产生的酚类物质较多,所以 PVP 抗褐化效果明显,但香蕉组织培养中可能产生的酚类较少,所以抗褐化效果不明显。

本研究结果表明,在香蕉诱导愈伤组织过程中,所试的 4 种褐化抑制剂 (AgNO_3 , AC, PVP, VitC) 在培养早期都能有效抑制外植体的褐变,但随着培养时间的延长,不同的褐化抑制剂及同种褐化抑制剂的不同质量浓度,抑制褐变效果存在差异。在今后香蕉愈伤组织诱导的研究中,可在培养基中添加 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭来抑制外植体的褐化。

参考文献:

- [1]刘庆昌,吴国良.植物细胞组织培养[M].北京:中国农业大学出版社,2003:39-40.
- [2]HE Y, GUO X, LU R, et al. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009, 98(1):11-17.
- [3]ASMUS B, HAMME H. Enzymatic browning of vegetables. Calibration and analysis of variance by multiway methods [J]. *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 1996, 34(3):85-89.
- [4]陈正华.木本植物组织培养[M].北京:高等教育出版社,1986:57-60.
- [5]刘真华,葛红,郭绍霞,等.蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究[J].园艺学报,2005,32(4):732-734.
- [6]刘兰英.‘薄壳香’核桃组培中的褐化及防止措施研究[J].园艺学报,2002,29(2):171-172.
- [7]温睿婷,王汉宁,杨如涛,等.降低玉米成熟胚愈伤组织褐化的初步研究[J].分子植物育种,2010,8(3):483-487.
- [8]吕宗友,苏衍菁,赵国琦,等.不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究[J].草业学报,2011(6):174-181.
- [9]李敬阳,张建斌,金志强,等.香蕉转化中的抗褐化及再生研究[J].生物技术通报,2008(5):114-117.
- [10]陈友,冯慧敏.海南野生蕉吸芽组培防褐化研究[J].热带农业工程,2012,6(36):12-15.
- [11]MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. [J]. *Plant Physiology*, 1962(3), 15:473-497.
- [12]马均,马明东,周宇燊.曼地亚红豆杉愈伤组织诱导试验[J].林业科学,2006,31(1):12-14.
- [13]潘娟,李先源,李名杨.植物组织培养过程中常见问题及解决方法[J].安徽农业科学,2009,37(6):2392-2394.
- [14]何康,樊正球.复旦南方红豆杉愈伤组织培养及褐化抑制[J].中国林业产业,2005(12):53-55.

Screening of Anti-browning Agents in Banana Callus-inducing Culture

ZHAO Hui^{1,2}, ZHOU Xuejuan^{1,2}, MU Lei^{1,2}, XIE Jun^{1,2}, WEI Shuangshuang², XIA Youquan²,
WU Fanhua^{1,2}, RUAN Yunze^{1,2}, TANG Hua^{1,2,3}

(1. National Key Laboratory Base of Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Key Laboratory of Protection, Development and Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Ministry of Education, Haikou 570228, China)

Abstract: Anti-browning agents, AgNO_3 (10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), activated carbon (1, 2, 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) (1, 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), Vitamin C (100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were supplemented in the banana culture medium to inhibit explant browning of banana during the callus inducing process. Ten days after cultured the explants treated with anti-browning agents showed a lower browning rate than those in the control. This indicated that all the anti-browning agents were effective in inhibiting explant browning at the early stage of callus inducing culture. However, with the time of tissue culture going on, the anti-browning agents tended to be significantly different in inhibition of explant browning, and 40 days after callus-inducing culture the activated carbon treatments showed the highest inhibition of explant browning, of which the $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ activated carbon was optimum with a browning rate of only 20% of the banana explants.

Key words: banana; callus induction; browning; anti-browning agents