

甘蔗茎尖培养中减轻酚害

黄诚梅^{1,*} 李杨瑞^{1,2} 叶燕萍²

¹广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007; ²广西大学农学院, 南宁 530005

提要 甘蔗茎尖组织预先在无菌水中浸泡 30 min 后, 再接种到附加 6-BA 2.0 mg·L⁻¹、NAA 0.1 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基中, 可减轻外植体的褐变; 茎尖诱导培养基中直接附加适量的活性炭 (AC, 以 0.02% 为宜, 最高不超过 0.05%), 减轻茎尖组织酚害的效果最理想。另外, 在培养基中附加抗氧化剂 (如: 聚乙烯吡咯烷酮, PVP), 或根据外植体的褐变情况及时转移到新鲜的培养基中, 均能减轻甘蔗茎尖组织的酚害。

关键词 甘蔗; 茎尖培养; 酚害

Minimizing the Detrimental Effect of Phenol Pollution in Stem Apical Culture of Sugarcane

HUANG Cheng-Mei^{1,*}, LI Yang-Rui^{1,2}, YE Yan-Ping²

¹The Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Biotechnology of Guangxi, Nanning 530007; ²College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005

Abstract The stem apical tissues of sugarcane were pretreated with sterile water for 30 min and inoculated in MS media with 6-BA 2.0 mg·L⁻¹ and NAA 0.1 mg·L⁻¹. The best result of minimizing phenol pollution was obtained when 0.02% (not higher than 0.05%) active carbon (AC) was directly added into the media. The antioxidant (i.e. polyvinylpyrrolidone, PVP) was added into the media or the explants were transferred onto fresh media when they became brown. These measures could minimize the phenol pollution.

Key words sugarcane; apical culture; phenol pollution

酚害 (又称酚污染或褐变) 在植物组织培养中是普遍存在的问题, 其发生与外植体组织中所含的酚类化合物多少以及多酚氧化酶活性有直接关系^[1]。这些酚类化合物很不稳定, 一旦与多酚氧化酶接触, 在其催化下迅速氧化成为褐色的醌类物质。甘蔗是一种多元酚类物质含量较高的作物, 尤其是幼嫩茎尖和嫩叶鞘中含量更高^[2]。目前, 以幼嫩茎尖组织作为外植体的茎尖离体培养技术结合热处理, 获得脱毒健康的甘蔗种苗, 并用于生产, 可使甘蔗增产 20%~40%, 蔗糖含量增加 0.5% 以上 (绝对值)^[3]。这一项脱毒技术已经得到世界甘蔗生产大国——巴西、古巴、美国、澳大利亚等国的高度重视, 在国内近几年来也有不少相关报道^[4~6]。采用甘蔗茎尖培养技术结合热处理, 可以把蔗株上的花叶病、宿根矮化病等用常规方法难以防治的病害根除, 生产健康种苗。但在茎尖培养时, 由于切取茎尖组织过程中细胞受到破坏, 细胞内的多元酚类化合物氧化成为对细胞有害的褐色醌类物质的速度加快, 这些醌类物质聚集在茎尖组织上, 或扩散污染培养基, 严重时会导致茎尖褐死。茎尖培养是以脱毒为主要目的, 要求茎尖很小 (本文用 1~2 mm 的茎尖组织), 这使得褐变问题更加突出。因此,

解决酚害问题是甘蔗茎尖培养获得成功的关键。本文探讨几种减轻甘蔗茎尖培养中酚害的方法。

材料与方法

材料为甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 品种: 黑皮果蔗 Badila、桂糖 11 号 (GT11) 和新台糖 16 号 (T16), 试验用其茎尖组织。分别取回各参试品种植株的有叶鞘包被部分, 剥去外部叶片和老叶鞘, 用自来水冲洗干净后, 先用 75% 酒精进行表面消毒, 再用 2% 次氯酸钠溶液消毒 10~15 min 或 0.1% 升汞消毒 8 min, 然后用无菌水冲洗 4~5 次。移至无菌条件下, 用接种针和解剖刀小心剥离茎尖生长点以外的组织, 直至露出生长点为止 (最好在解剖镜下进行)。切下 1~2 mm 的茎尖组织 (一个生长点带 1~2 个叶原基), 在无菌水中浸泡 30 min 后, 接种到培养基上进行培养。茎尖诱导培养基共设 5 个处理, 作了液体与固体培养基对比实验。以 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹ (单位下同)+NAA 0.1+3% 蔗糖作为基

收稿 2003-03-03 修定 2003-08-29

* E-mail: huangchengmei@eyou.com, Tel: 0771-3279430

本培养基, 分别附加0、0.01%、0.02%、0.03%、0.05%、0.10%活性炭(AC)及0.01%、0.05%、0.10%聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 观察各种培养基对减轻甘蔗茎尖组织酚害的效果。培养条件为光照12 h·d⁻¹左右, 光照度为1 500 ~ 2 000 lx, 培养室温度25~30℃。记录所有接种的外植体总数(处理间接种总数一样, 真菌或细菌引起的污染

予以扣除)、酚污染褐死茎尖数和茎尖存活数。

实验结果

1 不同培养基对黑皮果蔗Badila茎尖培养的影响

从表1可见, 一定浓度的6-BA对茎尖成苗是必要的, 但6-BA浓度较高时, 茎尖酚害更严重些。NAA对茎尖成苗影响不大, 这可能是由于

表1 不同培养基对黑皮果蔗Badila茎尖培养的影响

Table 1 Effects of different media on apical culture of sugarcane variety Badila

茎尖诱导培养基 (浓度 / mg L ⁻¹)	接种茎 尖数/个	污染茎 尖数/个	培养开始后茎尖褐变数/个					茎尖存 活数/个	成活 率/%	丛芽诱 导数/个	诱导 率/%
			1 d	2 d	5 d	7 d	10 d				
MS+6-BA 2.0	15	3	—	—	2	3	7	5	41.7b	2	16.7b
MS+6-BA 3.0	15	4	—	3	4	5	9	2	18.2b	0	0b
MS+6-BA 1.5+NAA 0.2	15	2	—	—	3	4	6	7	53.8ab	4	30.8ab
MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	15	2	—	1	2	3	5	8	61.5ab	7	53.8a
MS ₀ 3 d后转入MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	15	2	—	—	—	1	1	12	92.3a	8	61.5a

茎尖富集生长素, 添加少量的NAA对苗生长有利^[4]。MS+6-BA 2.0+NAA 0.1培养基的酚害较其它处理的轻, 诱导成苗效果也较好。

2 培养方式对黑皮果蔗Badila茎尖成苗的影响

液体培养基有利于多酚等次生代谢物质扩散, 减少醌类物质在茎尖组织周围富集; 而固体培养基扩散性差, 酚类和醌类等物质富集于茎尖组织周围, 致使茎尖褐化。从表2可见, 液体培养的酚污染率小于固体培养, 其诱导效果也比固体培养的好, 成苗率高出37.1%。

3 AC对果皮果蔗Badila茎尖培养中抗酚污染的影响

AC具有很强的吸附性, 植物组织培养中常用来吸附多酚物质, 防止其氧化^[4,7-9]。从表3可见, 加入AC处理的酚污染率比不加AC的低, 0.01%与0.05%AC之间无差异。

4 AC及PVP对GT11与T16茎尖培养中抗酚污染的影响

AC用于植物组织培养, 既可吸附培养过程中培养基或外植体产生的生长抑制性物质, 也可吸附植物生长调节剂与有机物质^[7,8]。从表4来看, 除了0.01%AC处理外, 其它处理之间的酚污染率差异不明显, 所以在茎尖诱导培养中选择0.02%AC即可, 最高不要超过0.05%。另外, PVP也是一种强的抗氧化剂, 用于防止褐变也曾

有过报道^[1,9,10]。本文用3个浓度的PVP作为附加成分直接加入培养基中, 也有一定的抗酚污染作用, 但其抗酚污染效果比AC略差些。

表2 不同培养基状态对黑皮果蔗Badila茎尖成苗的影响

Table 2 Effect of different media conditions on apical culture of sugarcane variety Badila

培养基	接种茎 尖数/个	污染茎 尖数/个	茎尖褐 死数/个	酚污染 率/%	成苗茎 尖数/个	成苗 率/%
液体	15	2	5	38.5	7	53.8
固体	15	3	10	83.3	2	16.7

表3 AC在黑皮果蔗Badila茎尖培养中抗酚污染的作用

Table 3 Effects of active carbon on decreasing phenol pollution in apical culture of sugarcane variety Badila

加入活性 炭浓度/%	接种茎 尖数/个	污染茎 尖数/个	酚污染褐死 茎尖数/个	酚污染 率/%
0	15	2	5	38.5
0.01	15	2	3	23.1
0.05	15	2	3	23.1

液体培养。

表4 AC及PVP对GT11与T16茎尖离体培养中抗酚污染的影响

Table 4 Effects of active carbon and polyvinylpyrrolidone on decreasing phenol pollution in apical culture of GT11 and T16

处理浓度/ %	GT11				T16			
	接种茎 尖数/个	污染茎 尖数/个	酚污染褐死 茎尖数/个	酚污染 率/%	接种茎 尖数/个	污染茎 尖数/个	酚污染褐死 茎尖数/个	酚污染 率/%
0	5	0	4	80.0	5	0	3	60.0
AC 0.01	5	0	3	60.0	5	1	2	50.0
0.02	5	0	1	20.0	5	0	1	20.0
0.03	5	0	1	20.0	5	0	1	20.0
0.05	5	0	1	20.0	5	0	1	20.0
0.10	5	0	1	20.0	5	0	2	40.0
PVP 0.01	5	0	3	60.0	5	0	4	80.0
0.05	5	0	2	40.0	5	0	3	60.0
0.10	5	0	2	40.0	5	0	3	60.0

液体培养。

讨 论

甘蔗茎尖组织富含多酚类物质。切割后,多酚物质在多酚氧化酶作用下,逐渐氧化成棕褐色醌类物质。这些氧化物阻碍茎尖的正常生理代谢和养分吸收,从而使组织坏死^[4]。有研究表明,酚污染普遍存在于甘蔗组织培养中^[2,4]。因此,解决酚污染是甘蔗茎尖培养获得成功的关键。目前尚无解决酚污染的有效方法。从培养过程中各个阶段加以控制,可能会减轻酚污染。

外源激素是加重酚害的重要原因之一^[2]。一定浓度的细胞分裂素类物质(如6-BA)是茎尖诱导所必需的。实验中选择合适的比例的外源激素,可使茎尖在较短的周期内诱导出丛芽,避免茎尖长期接触空气而褐死。本文结果表明MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹最适宜。

液体培养基有较强的物质交换和扩散功能,对有毒物质的扩散、缓冲培养基的酸化和养分吸收等功效显著^[11]。液体在抗多酚氧化中也有一定的功效^[4]。而固体培养基扩散性差,以致醌类等有毒物质常富集在茎尖基部,严重时茎尖褐化。本文用液体培养方法,以滤纸桥为载体,效果显著。接种前用无菌水浸泡茎尖组织30 min的效果也较佳。水是一种抗氧化剂,无需额外费用,比较经济。本文用此种方法,即浸泡过程中,茎尖中部分褐色物质可扩散出来,减轻酚害,效果与前人报道一致^[11]。

另外,在茎尖培养过程中,根据外植体的褐

变情况,不断地将外植体转移到新鲜的培养基中,也可减少外植体褐死率。本文采用此种方法,效果也较佳(数据略)。一般平均7~10 d换一次培养基,可提高茎尖成苗率。但此法花费人力、物力,成本也高。因此,在大规模组织培养中此法不太合适。

总之,抗多酚污染的方法很多,各有优缺点。在组培过程中,不管哪种方法,都应以是否有抗酚害效果、是否经济以及与外植体进一步增殖分化生长不矛盾为原则^[1]。

参考文献

- 1 高国训. 植物组织培养中的褐变问题. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501~506
- 2 秦廷豪, 邹宗兰, 吴才文. 浅析甘蔗组培中的酚害. 甘蔗, 1997, 4(2): 12~14
- 3 游建华, 何为中, 曾慧等. 谈脱毒健康种苗在广西甘蔗生产中的应用及效益展望. 甘蔗糖业, 2001, (1): 13~17
- 4 章文水, 潘大仁, 林彦铨等. 果蔗Badila花叶病茎尖脱毒技术的研究. 甘蔗, 2002, 9(2): 8~14
- 5 贤武, 王伦旺, 王天算等. 甘蔗茎尖脱毒培养研究初报. 广西甘蔗, 2000, 12(4): 3~5
- 6 许莉萍, 陈如凯, 李跃平. 利用愈伤组织培养和茎尖培养去除甘蔗花叶病毒. 福建农业大学学报(自然科学版), 1994, 23(3): 253~256
- 7 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的作用. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214~217
- 8 刘根林, 梁珍海, 朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述. 江苏林业科技, 2001, 28(5): 46~48
- 9 李小娟, 李继红. 减轻甘蔗组培苗酚害, 提高甘蔗外植体出苗率. 热带农业科学, 2000, 4(2): 13~15
- 10 陈彪, 陈伟栋, 梁钾贤等. 利用聚乙烯吡咯烷酮防止甘蔗组织培养接种物褐变的研究. 华南农业大学学报, 1999, 20(3): 63~66
- 11 许莉萍, 陈如凯, 薛其清. 甘蔗离体培养的变异机理及筛选技术. IV. 茎尖培养技术的筛选. 福建农学院学报(自然科学版), 1993, 22(3): 280~284