

抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体 褐变的研究初报

何琼英¹ 张东方² 王润华¹

(1华南农业大学农学系, 2华南农业大学农业生物系, 广州, 510642)

摘要 研究了抗坏血酸预处理对防止香蕉吸芽外植体褐变的可能性及其作用方式。结果表明: 用抗坏血酸处理吸芽, 能减轻外植体褐变, 提高芽丛诱导率。验证了抗坏血酸对香蕉吸芽褐变抑制作用是通过将多元酚氧化酶作用下形成的醌类物质, 重新还原为酚, 因此是消耗性的。讨论了香蕉快繁中有关阻止褐变经验的生理基础。

关键词 香蕉; 抗坏血酸; 外植体褐变

中图分类号 S668.1

植物组织培养技术应用于作物优良品种的加速繁殖已逐渐形成新的产业。其中, 香蕉试管苗的生产, 由于技术的成熟及具有较高的经济效益而得到极为迅速的发展。然而, 在香蕉试管苗生产过程中, 由于外植体接种及早期继代常出现褐变导致成活率降低, 造成生产上损失。虽然采用抗氧化剂防止吸芽外植体褐变, 提高成活率, 已成为一种生产经验, 但至今尚未见有关研究的正式报导。本试验采用抗坏血酸对香蕉吸芽外植体进行预处理, 试图探讨抗氧化剂防止褐变的可能性; 并分析其作用方式, 为有关生产经验提供理论依据和改进的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 香蕉 (*Musa AAA Cavendish subgroup*)

1.1.2 供试抗氧化剂 抗坏血酸, 分子式为 $C_6H_8O_6$, 分子量 176.12, 略带淡黄色结晶体 (广东石岐化工厂生产)。

1.2 试验步骤和方法

1.2.1 香蕉茎尖外植体的预处理 将台湾 8 号、威廉斯 2 个品种的吸芽, 经常规消毒后, 取茎尖生长点 $0.8 \sim 1 \text{ cm}^3$ 纵切成 2~4 块, 用 $10 \sim 20 \text{ mg/L}$ 的抗坏血酸预处理, 浸泡 $10 \sim 15 \text{ min}$ 。

1.2.2 培养方法 将茎尖外植体接种在培养基上。20~30 d 继代一次。

培养基在诱导芽丛及增殖阶段均使用改良的 MS+BA $4 \sim 5 \text{ mg/L}$ +IBA 或 NAA $0.1 \sim 0.5 \text{ mg/L}$ +白砂糖 4%+卡拉胶 0.4% 的培养基。

培养室温度 $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。外植体接种后先采用自然光培养, 当诱导出芽丛后采用弱光培养 (500 lx)。

1995-01-16 收稿

1.2.3 香蕉吸芽多酚氧化酶活力的测定 多酚氧化酶酶液制备 取香蕉吸芽生长点四周组织 1 g, 用 4 mL 50 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, pH6.0, 研磨提取, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。操作在冰冻条件下进行。

多酚氧化酶活力测定 参照谭兴杰等(1984)及林哲甫等(1965)的方法。取 1.4 mL 50 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH6.0), 0.5 mL 0.1% 邻苯二酚, 0.5 mL H₂O, 30℃ 恒温, 加入 0.1 mL 酶液, 每 10s 读 OD₃₉₈值, 光程 1 cm。反应液总体积 2.5 mL。活力单位定义: 测定条件下, 每分钟 OD₃₉₈增加 0.001 所需酶量。

然后, 将 H₂O 换成等量的抗坏血酸, 使反应液中抗坏血酸浓度为 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 抑制邻苯二酚氧化。在 0.4 mmol/L 抗血酸条件下, 改变邻苯二酚浓度(0.1%, 0.08%, 0.06%, 0.04%, 0.02%), 测定抗坏血酸抑制作用与邻苯二酚浓度的关系。

2 试验结果

2.1 香蕉吸芽外植体褐变过程的观察

香蕉吸芽接种后, 外植体四周易氧化变褐, 褐变程度由最初的表面进入组织内面, 最后死亡, 死亡率随时间的增长而增加。据对未经预处理接种的吸芽生长情况调查, 接种 120 d 后, 存活率只有 50%。

用抗坏血酸处理吸芽外植体的试验结果如表 1。

表 1 抗坏血酸对防止香蕉吸芽外植体褐变的效果

品 种	处 理 /mg·L ⁻¹	接种数 /个	处理时间 /min	颜 色 变 化	
				第 7 d	第 21 d
台湾 8 号	抗坏血酸 10~20	330	10~15	白	浅褐
威 廉 斯	抗坏血酸 10~20	64	10~15	白	浅褐
台湾 8 号	无菌水(对照)	20	0	褐	深褐
威 廉 斯	无菌水(对照)	10	0	褐	深褐

经预处理的吸芽, 在 1 周内呈现白色, 1 周后表层浅褐, 切去表面仍为白色。接种 10 d 后吸芽开始萌动, 20 d 叶鞘展开变绿。对接种 21 d 的外植体继代时, 切去表层褐变物后再重复进行上述预处理, 效果更好。我们对 76 个外植体进行跟踪观察, 发现继代 42 d, 产生 44 个侧芽, 再经 6 次继代, 共获 6912 个不定芽。芽丛诱导率为 93%, 而对照的只有 15%。根据初步试验结果看, 抗坏血酸能减轻褐变, 提高芽丛诱导率。

2.2 香蕉吸芽多元酚氧化酶活力的测定

香蕉吸芽多元酚氧化酶活力测定结果如表 2。

表 2 可见, 香蕉吸芽内存在多元酚氧化酶。

2.3 抗坏血酸对邻苯二酚氧化的抑制作用

抗坏血酸抑制邻苯二酚氧化。当反应物中邻苯二酚浓度为 0.1% 时, 用同一次提取的酶液做不同抗坏血酸浓度试验。当抗坏血酸浓度为 0.2 mmol/L 时, 邻苯二酚的氧化速度减缓; 抗坏血酸浓度为 0.4 mmol/L 时, 约 70 s 迟滞期后才见 OD 值的明显上升, 且 OD 值上升很快

表 2 香蕉(威廉斯)吸芽生长点组织多酚氧化酶活力

样 品	I	II	III	平均
酶 活 力 /×10 ³ 单位·g ⁻¹ 鲜重	11.4	14.4	8.7	11.5

趋于平缓,而当抗坏血酸浓度为0.6 mmol/L 时,观察 10 min OD 值仍没有上升。而在第2d测定时,OD 值趋于 ∞ ,表明经过相当长迟滞期后,邻苯二酚最后仍被氧化了。反应进程曲线如图 1。

2.4 抗坏血酸抑制作用与邻苯二酚浓度的关系

抗坏血酸抑制邻苯二酚氧化还与邻苯二酚的浓度有关。当反应液中抗坏血酸浓度为0.4 mmol/L 时,用同一次提取的酶液做不同邻苯二酚浓度的试验,降低邻苯二酚浓度,氧化的迟滞期增长。反应进程曲线如图 2。

3 讨论

试验结果表明:香蕉吸芽茎尖多元酚氧化酶的活性较强。在香蕉组培苗快速繁殖中,未用抗坏血酸预处理的外植体会很快变褐,这是由于酚类物质在多酚氧化酶作用下被氧化成醌的结果。这导致褐变后的组织细胞部分坏死(蒋跃明等,1990)。前人的工作发现抗坏血酸能使邻苯醌重新还原成邻苯二酚(林哲甫等,1965)从而阻止了褐变。我们在香蕉组培苗快繁的试验结果与前人的研究是一致的。

试验结果还表明,在相同酶活力条件下,抗坏血酸抑制邻苯二酚的氧化与其二者的浓度有关。当邻苯二酚浓度一定时,较低浓度的抗坏血酸使邻苯二酚氧化速度减缓;足够量的抗坏血酸能在一定时间内完全抑制邻苯二酚的氧化,经过一定迟滞期后,邻苯二酚则开始氧化。当抗坏血酸浓度一定时,邻苯二酚浓度愈低,迟滞期愈长。可见,抗坏血酸抑制邻苯二酚氧化是消耗性的,由该酶催化产生的醌类物质重新还原为酚的过程中,抗坏血酸逐渐被氧化。可以推论,抗坏血酸完全抑制邻苯二酚氧化所需浓度,与多酚氧化酶活力呈正相关。

本研究用 10~20 mg/L 浓度的抗坏血酸处理香蕉吸芽,使外植体在 7 d 内保持白色,是因为抗坏血酸使生成的醌类物质立即重新还原为酚。而 7 d 后开始变褐,是因为参试的抗坏血酸逐渐消耗的缘故。可以预测,7 d 后若补加抗坏血酸将延长阻止褐变时间。这就解释了为什么继代过程中,重复预处理,效果会更好的道理。这就为香蕉快繁中用抗氧化剂阻止褐变的经验,提供了生理依据和改进的路子。

致谢 本文承蒙肖敬平教授提出宝贵意见,深表谢意。

参 考 文 献

- 林哲甫,张维钦.1965.香蕉果肉组织的多酚氧化酶.植物生理学报,2(2):94~103
 蒋跃明,陈绵达,林植芳,等.1990.香蕉低温贮藏期果皮褐变与膜结构的关系.中国科学院华南植物研究所集刊,(6):145~151

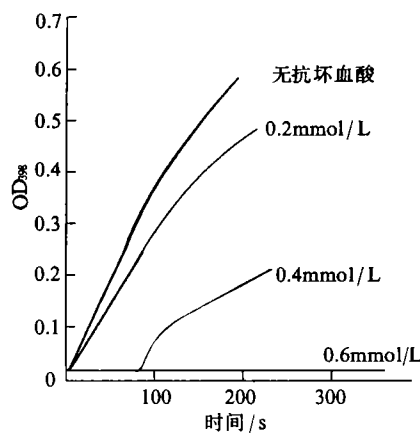


图1 不同抗坏血酸浓度的酶反应进程曲线(邻苯二酚浓度为0.1%)

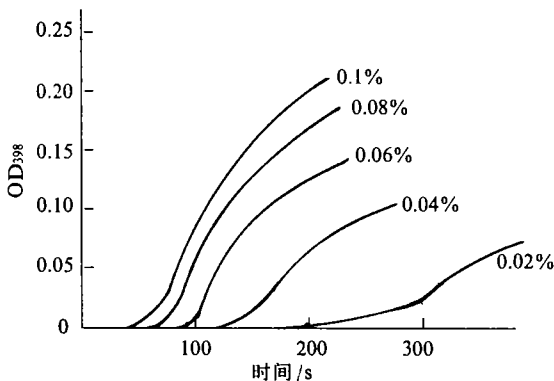


图2 不同邻苯二酚浓度的酶反应进程曲线(抗坏血酸0.4 mmol/L)

谭兴杰, 李月标. 1984. 荔枝 (*Litchi chinensis*) 果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质. 植物生理学报, 10(4): 339 ~ 344

A PRELIMINARY STUDY ON PREVENTING BROWN TURNING OF SUCKER EXPLANTS FROM BANANA BY ASCORBIC ACID PRE-TREATMENT

He Qiongying¹ Zhang Dongfang² Wang Runhua

(1 Dept. of Agronomy, 2 Dept. of Agr.Biology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Possibility and mode of action of preventing brown turning in sucker explants from Banana were studied. The result showed that ascorbic acid pre-treatment can prevent explant 's brown turning and improve the induced efficiency of plantlet. The results showed that the action of preventing brown turning of the explants was the function of quinones produced by polyphenol oxidase catalysis. The physiological basis of related production experiences in banana rapid multiplication was also discussed.

Key words banana; ascorbic acid; explant brown turning

更正 1995 年第 16 卷第 2 期因付印拼版过程中有误, 将第 38 页第 1 行误移至第 41 页第 1 行, 现更正如下, 特向作者、读者致歉。

第 38 页增加第 1 行, 应为 lobe. Dorsal lob large, furnished with many tiny pubescence, ventral lobe bare.

第 41 页第 1 行删去。