

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

陈彪¹ 陈伟栋² 梁钾贤¹ 王润华²

(1 湛江海洋大学生物技术中心, 广东湛江, 524088; 2 华南农业大学农学系)

摘要 用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)预处理甘蔗顶端外植体,并以 PVP 作为附加成分直接加入培养基,均可取得防止接种物褐变坏死的良好效果;但同时发现,当加入培养基中的 PVP 达到一定浓度,则会表现出延缓分化芽增殖速度的不良作用;对 PVP 在植物组织培养中的应用作出评价。

关键词 甘蔗;组织培养;接种物褐变;聚乙烯吡咯烷酮

中图分类号 Q 946

以植物组织培养技术加速繁殖甘蔗优良品种种苗,近年来被广泛应用。无论是以甘蔗茎端作为外植体,直接利用“芽生芽”的繁殖方式,或者是以幼嫩叶鞘作为外植体,通过愈伤组织再诱导分化芽都能获得成功。然而,一般情况下,从外植体接种开始,直至 5 次继代以前,增殖率都不高。原因可能是多方面的。首先,具有潜在再生性的非液泡化致密组织仅占愈伤组织总量的 1%~10%(Кучеренко, 1984)。更为重要的是,在早期继代每次都几乎不可避免地出现培养物褐变、坏死。严重时褐变率高达 30% 以上以致失去生产价值。培养物褐变被认为是由于多酚氧化物积累的结果(林哲甫等, 1965; 何琼英等, 1995, 1998)。多酚氧化物是次生代谢的产物,其产生不具特异性,植物组织受机械损伤或病原菌的浸染均可导致多酚氧化物的迅速积累,其生物化学特征表现为有关酶系统的活性迅速增强(王润华等, 1997; 阿久津美惠, 1978)。

本研究在甘蔗的组织培养中,以聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对外植体作预处理,并在继代培养中以 PVP 作为培养基的附加成分,探讨防止接种物褐变、提高分化芽诱导率的效应,为改进甘蔗组织培养技术提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试甘蔗品种 ROC16。材料取自华南农业大学实验场。

1.2 试验方法

1.2.1 PVP 预处理茎端外植体 取甘蔗茎端,除去叶鞘。经常规消毒后,切成约 1 cm 茎段。设置 6 种不同质量浓度的 PVP 溶液浸泡 20 min。PVP 的 6 种质量浓度处理为:(1)无菌水(作对照);(2)50 mg/L;(3)100 mg/L;(4)150 mg/L;(5)200 mg/L;(6)250 mg/L。

经预处理后,接入下列成分的培养基:MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.02 mg/L + 糖 40 g/L。以 5 g/L 琼脂固化。pH = 5.8。

设 3 次重复,每次重复接种外植体 20 块。接种后 15 d 进行调查。但由于不可避免出现污

染,最后每次重复均不足20块外植体.统计分析按实际数处理.

1.2.2 以不同质量浓度的PVP作为培养基的附加成分 基本培养基如前.加入PVP附加成分,共分5种质量浓度处理:(1)无附加成分(作为对照);(2)PVP 10 mg/L;(3)PVP 30 mg/L;(4)PVP 50 mg/L;(5)PVP 100 mg/L;

以经4次继代的分化芽作为接种物.设3次重复,每次重复接种15块.接种后15 d调查褐变坏死情况.也由于不可避免的污染,最后每次重复均不足15块.统计分析按实际数处理.

2 结果与分析

2.1 PVP预处理效果分析

6种浓度的PVP预处理甘蔗外植体.各个处理各重复褐变坏死率经反正弦转换后作方差分析及多重比较见表1及表2.

表1 PVP 6种浓度预处理效果的方差分析

变因	Df	SS	MS	F ¹⁾
处理	5	6 727.327 7	1 345.465 5	31.19* *
误差	12	517.653 8	43.137 8	
总和	17	7 298.981 5		

1) $F_{0.05} = 3.106$; $F_{0.01} = 5.064$

表2 PVP 6种浓度预处理效果的多重比较¹⁾

$\rho(\text{PVP})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	T_i	$50.90 - T_i$	$52.48 - T_i$	$49.53 - T_i$	$39.18 - T_i$	$11.73 - T_i$
0	50.90					
50	52.48	-1.58				
100	49.53	1.38	2.95			
150	39.18	11.72	13.30	10.32		
200	11.73	39.17*	40.75*	37.77*	27.45	
250	4.68	46.22*	47.80*	44.82*	34.50	7.05

1) 总和差异显著值;L.S. $D_{0.05} = 35.06$; L.S. $D_{0.01} = 49.15$

从表1、表2的分析结果可见,PVP预处理对防止甘蔗茎端外植体褐变坏死具有显著效果.但在浸泡20 min的条件下,PVP的浓度在100 mg/L以下几乎无效,而150 mg/L与200、250 mg/L 2种浓度相比较差异也不显著.由此可见,应以150~200 mg/L浓度效果为佳.

当以PVP的浓度作为横坐标,以各处理3次重复的 $\sin^{-1}\sqrt{\%}$ 平均再转换为百分率为纵坐标作出折线(见图1),可以看出,随PVP质量浓度提高,外植体褐变坏死率下降的趋势.PVP质量浓度在100 mg/L以下几乎不起作用;当PVP质量浓度达到150 mg/L,褐变坏死率明显下降,但褐变坏死率还保持在39.18%的高水平,这在生产上是不能接受的;当PVP质量浓度提高到200 mg/L,褐变坏死率降为11.73%,这被认为已是很理想的效果.

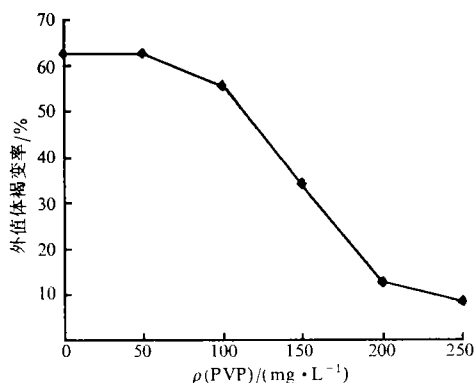


图1 预处理的PVP质量浓度与甘蔗外植体褐变率的关系

2.2 PVP 作为培养基附加成分的效果

2.2.1 对防止接种物褐变坏死的效果 在基本培养基中分别加入 5 种不同浓度的 PVP, 接入经 4 次继代的甘蔗分化苗. 经 15 d 后, 调查褐变坏死亡率. 各个处理各重复的褐变坏死亡率经反正弦转换后作方差分析及多重比较, 结果见表 3 及表 4.

从表 3、表 4 的分析结果看, PVP 作为培养基的附加成分对防止甘蔗培养物的褐变坏死具有很显著效果. 其质量浓度必需在 50 mg/L 或以上. 但当质量浓度增加到 100 mg/L, 其效果也不见得有所提高.

2.2.2 对分化芽增殖的影响

为观测 PVP 作为培养基的附加成分对甘蔗分化芽增殖的影响, 每种处理选出不受污染的 10 瓶, 在 28 °C 培养条件下, 于接种后 3、6、9、12、15、18 及 21 d 连续计数分化芽数. 以观测时间 (t) 为横坐标、以每种处理的 10 瓶平均值为纵坐标, 分别作出 5 种处理随时间 (t) 而增殖的折线图 (见图 2).

从图 2 看, 从接种后经过 21 d 的培养, 不论培养基中是否加入 PVP 或加入的分量多少, 在试验范围内, 最终每瓶平均获得的分化芽数差异不大, 只在 18.3 ~ 22.0 之间. 但从分化芽增殖的趋势看, 不同处理存在明显差异. 没有加入 PVP 及加入 PVP 的质量浓度只有 10 mg/L 时, 接种后出现分化芽时间提前, 增殖进度快, 实际上于接种后 15 d 就达到最高值. 加入 PVP 的质量浓度为 30 mg/L 时, 分化芽增殖进度稍有推迟, 但不大明显. 加入 PVP 质量浓度在 50 及 100 mg/L 时, 分化芽的出现及增殖进度明显推迟, 接种后 6 d 还未见新的分化芽出现, 直到接种后 21 d 分化芽数才达到最高值. 即分化芽达到最高值的时间比其他处理推迟 5 ~ 6 d.

3 讨论

(1) 植物组织培养中, 普遍出现接种物褐化坏死现象, 虽然不同植物可能有明显的程度上

表 3 5 种浓度 PVP 作为培养基附加成分效果的方差分析¹⁾

变因	Df	SS	MS	F
处理	4	2 328.980 9	582.245	11.302**
误差	10	515.168 7	51.516 9	
总和	14	2844.149 6		

1) $F_{0.05} = 3.478$; $F_{0.01} = 5.994$

表 4 5 种浓度 PVP 作为培养基附加成分效果的多重比较¹⁾

$\rho(\text{PVP})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	T_i	$105.23-T_i$	$106.03-T_i$	$93.97-T_i$	$39.60-T_i$
0	105.23				
10	106.03	-0.8			
30	93.97	11.26	12.06		
50	39.60	65.63**	66.43**	54.37**	
100	15.50	89.73**	90.35**	78.47**	24.10

1) 总和差异显著值: $L.S.D_{0.05} = 39.17$; $L.S.D_{0.01} = 55.72$

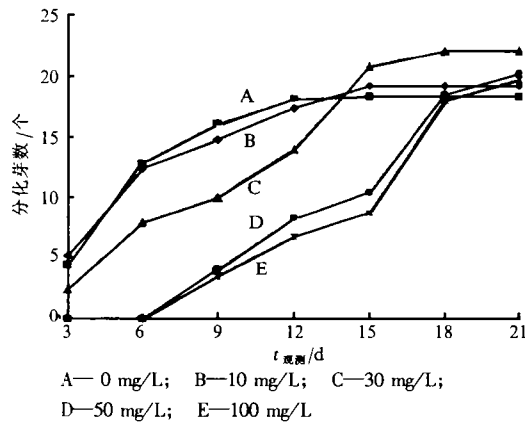


图 2 培养基附加成分 PVP 5 种浓度分化芽数与培养时间的关系

差异。实际上,凡是能够钝化或抑制多酚氧化酶、过氧化物酶等酶系统活性的抗氧化剂,理论上都具有阻缓或防止接种物的褐化。何琼英等(1995)、蒋跃明等(1990)及林哲甫等(1965)曾用抗坏血酸作为氧化酶系统的抑制剂有效地抑制多酚氧化物的产生与积累。但某些抗氧化剂(如抗坏血酸)不耐高温,给组织培养的无菌操作增加一定困难。如欲作为附加成分直接加入培养基再进行高温灭菌就不可能了。PVP 能耐高温,不失为组织培养中理想的抗氧化剂。

(2) 接种物的褐变通常仅出现在初期继代。因此,选定适当的抗氧化剂对外植体作预处理就会取得理想效果。然而,甘蔗组织培养中,从外植体初次接种直至第5次继代甚或以后,均可能连续或间歇出现培养物褐变。因此,仅以抗氧化剂作预处理往往不能彻底解决问题。在这种情况下,以适当的抗氧化剂(如 PVP)作为附加成分直接加入培养基是可取的。

(3) 以 PVP 作为培养基的附加成分,当 PVP 达到有效浓度(如 50 mg/L 或以上)时,会延缓分化芽的增殖进度。这可能由于 PVP 具有延缓 6-BA 的吸收作用所致。对每次继代需 20 d 以上的植物组织培养,其影响也许不大。但就甘蔗而言,在适温条件下每次继代所需时间约为 12~15 d。PVP 对分化芽增殖的延缓实际上降低了单位时间的繁殖系数。这个问题,能否从调整激素的种类及浓度加以解决,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 王润华,陈伟栋,刘桂富,等.1997.过氧化物酶活性变化值与水稻白叶枯病抗性的遗传相关研究.华南农业大学学报,18(1):75~80
- 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
- 何琼英,张东方,王润华.1995.抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体褐变的研究.华南农业大学学报,16(3):79~82
- 何琼英,李斌,张志诚.1998.苦丁茶体细胞组织培养再生植株的研究.华南农业大学学报,19(2):41~44
- 蒋跃明,陈锦达,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
- 阿久津美惠.1978.イネ白叶枯病の病态生理に关する研究Ⅱ.感染 peroxidase 活性の变动.日本植物病理学会报,44:499~502
- Кучеренко л. А. 1984. Условия получения растений-растенорантов в культуре Тканей риса. Сельскохозяйственная Биология,4:70~72

Studies on Preventing Brown Turning of Explant with PVP in Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Tissue Culture

Chen Biao¹ Chen Weidong² Liang Jiaxian¹ Wang Runhua²

(1 Biotechnology Centre, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, Guangdong, 524088;

2 Dept. of Agronomy, South China Agric. Univ.)

Abstract When the PVP(Polyvinylpyrrolidone) was used in pretreatment of sugarcane explant and used as an additive in medium, a positive result was obtained which prevented brown turning and necrosis of inoculum. Meanwhile, it was found that the proliferous rate of differentiated bud was delayed when the PVP concentration in the medium increased in a certain extent. The application of PVP in the plant tissue culture was evaluated affirmatively.

Key words sugarcane; tissue culture; brown turning of inoculum; PVP

【责任编辑 李玲】