

木本植物组织培养褐化控制策略

翟晓巧

(河南省林业科学研究院, 郑州 450008)

摘要: 木本植物组织培养过程中褐化现象严重, 采取有效措施进行褐化控制是木本植物组织培养成功的关键。在进行木本植物组织培养过程中先进行培养材料的基因型、生理状态和长部位的影响研究, 然后通过培养基的调控、抗褐化剂的使用以及培养条件改变来控制培养材料的褐化是一条有效的途径, 对今后顺利开展木本植物组织培养研究有重要的借鉴意义。

关键词: 木本植物; 组织培养; 褐化

中图分类号: S722.3⁷

文献标识码: A

文章编号: 1003-2630(2008)01-0038-03

browning control strategy of Woody plant tissue culture

ZHAI Xiao-qiao

(Henan Academy of Forestry, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract: Woody plant tissue culture process of browning phenomenon is serious and take effective measures to control browning woody plant tissue culture is the key to success. Mody in the process of plant tissue culture to a culture of the genotypes, physiological state and the impact on long positions, and then through the medium of control, the use of anti-browning agents and culture conditions to control the browning training materials is an effective way to the future smooth woody plant tissue culture research has important reference.

Key words: woody plants; tissue culture; Browning

在木本植物组织培养过程中, 外植体褐化现象经常发生。褐化的发生主要是当外植体组织被切割后, 切口附近的细胞受到伤害, 其分隔效应被打破, 酚类化合物向外分泌, 酚氧化酶释放或合成, 在合适的pH, 温度等条件下, 酚氧化酶、酚类物质(底物)和氧气聚合发生氧化反应, 形成褐色醌类物质, 切面迅速变成棕褐色或暗褐色, 褐色物逐渐扩散到培养基中, 抑制其它酶的活性, 毒害整个外植体组织, 外植体随之进一步变褐而最终死亡的现象^[1, 2]。褐化可以影响外植体的脱分化和再分化, 甚至决定某些植物组织培养能否成功, 其能否得到有效的控制是植物组织培养能否成功的关键所在^[3]。

在木本植物组织培养过程中影响褐化的因素较多, 所选材料的种类与品种、外植体材料的生理状态、营养状况、生长部位、培养基成分、外加激素的含量及比例、培养条件等都会影响褐化的发生^[4]。在对一种木本植物进行组织培养研究时如何在众多的因素中快速找到控制褐化的措施是关键。在对木本植物进行组织培养时, 首先要

查阅文献, 了解当前所用木本植物所属的科、属和种, 别人是否在组织培养方面有研究, 褐化程度怎样, 采取哪些措施比较有效, 这些都可以借鉴。但如果此种材料以前没有人做过研究, 从以下几个方面入手是一条有效的途径。

1 外植体的基因型和生理状态

首先要判断自己培养材料是否有基因型和材料生理状态的选择, 因为不同植物种类和品种在组织培养中发生褐变的频率和程度都存在很大的差别。在枣幼胚培养中不同发育时期的胚珠褐化不同^[5]。华盖木在进行组织培养时, 上部粗壮枝条顶芽为外植体褐化严重, 中部枝条顶芽为外植体褐化明显降低, 而下部枝条顶芽褐化最轻^[6]。因此, 根据自己具体培养的木本植物进行适宜培养的材料筛选, 在不进行任何褐化控制的条件下培养, 褐化发生轻的应为适宜的培养材料。

2 基本培养基和植物生长调节剂的选择

当组织培养的材料确定后, 首先要进行的就是诱导培养时培养基和植物生长调节剂的选择应用,

收稿日期: 2008-2-20

基金项目: 河南省杰出青年基金(0612001900)

作者简介: 翟晓巧(1971-), 女, 河南宜阳人, 高级工程师, 从事林木生物技术育种研究。

不同植物发生的褐化程度与培养基和植物生长调节剂的种类密切相关。

基本培养基对植物愈伤组织和细胞褐化影响较大, 有些培养基能减轻褐化, 而有些促进褐化。培养基中无机盐浓度过高可引起酚类外溢物质的大量产生, 导致外植体褐化, 降低无机盐浓度, 减少酚类物质外溢, 从而减轻褐化^[7, 8], 尤其是其中的 NH_4^+ 和 NO_3^- 的浓度对愈伤组织的褐化影响较大, 增加 NO_3^- 、减少 NH_4^+ 明显促进愈伤组织生长, 减轻褐化^[9]。

通常用于植物组织和细胞培养的植物生长调节剂有生长素如 NAA、IBA、IAA、2, 4-D 等, 细胞分裂素如 BA、KT、ZT 等。不同的激素对愈伤组织和细胞的作用不一样。因此, 对愈伤组织和细胞褐化的影响也不同。一些研究认为 BA 或 KT 不仅能促进酚类化合物的合成, 而且能刺激多酚氧化酶活性, 增强酚类物质氧化成醌类物质的能力, 从而加剧褐化程度^[10]。但在试验中发现, 6-BA 的作用表现出两重性: 一方面, 6-BA 不适合紫杉芽的诱导, 明显引起外植体的褐化; 另一方面, 在南方红豆杉细胞培养中附加 0.1~0.5 mg/L 的 6-BA, 对愈伤组织生长量的增加、保持质地, 尤其是抑制褐化效果明显^[11]。银杏愈伤组织的诱导与褐变调控时, BA 与 NAA 的培养基诱导的愈伤组织生长较慢, 乳黄色, 继代培养后很快变成松散型的愈伤组织, 不容易褐变; 而附加 BA 与 2, 4-D 的培养基诱导的愈伤组织, 前期生长较快, 乳白色, 继代培养后容易褐变^[12]。

3 抗褐化剂的应用

在进行培养基和植物生长调节剂的选择使用都不能消除培养材料褐化时抗褐化剂的使用就成为首选的控制褐化的方法。抗褐化剂由防止酚氧化的抗氧化剂和吸收酚类物质的吸收剂^[13]。在组织培养过程中常用的抗褐化剂有维生素 C (Vc)、硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、柠檬酸 (CA)、半胱氨酸 (Cys)、脱落酸 (ABA)、二巯苏糖醇 (DTT)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、活性炭 (AC)、硝酸银 (AgNO_3)、植酸 (PA)、水解酪蛋白 (LH)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 等^[14], 不同的抗褐化剂对植物材料的褐化抑制作用不同。

中国李愈伤组织培养时, PVP 的抗氧化能力最强、AC 次之, CA 最差。并且同一抗氧化剂的不同浓度对褐化的影响较大, PVP 在 5 000 mg/L 时, 褐变率最低, Vc 在 3 000 mg/L 时褐变率最低, CA 在

1 000 mg/L 时, 褐变率最低^[15]。在银杏组织培养中, 抗褐变剂中以 0.1% 的植酸 PA 效果最好, 其次为 PVP 和 Vc, 活性炭和硫代硫酸钠效果最差^[12]。油茶茎尖培养中采用吸附剂活性炭、PVP 和 3 种抗氧化剂 (Vc、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和柠檬酸) 控制褐化实验中发现, 活性炭和 PVP 的抗褐化效果最好, Vc 效果次之, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和柠檬酸效果最差^[16]。引进爬山虎组织培养中的褐化及其控制中采用活性炭 (AC)、PVP) 维生素 C (Vc) 3 种抑制褐化发生, Vc 抗褐化效果优于另外两种^[17]。3 种抗氧化剂 (抗坏血酸、亚硫酸钠、柠檬酸) 对茶条槭外植体组织培养中在一定浓度下抗坏血酸、亚硫酸钠、柠檬酸三者配合能明显抑制菌类污染及褐变的产生^[18]。

4 培养条件的调整

当抗褐化剂的使用不十分有效时就要结合培养条件的改变来控制褐化。培养条件主要结合光照、培养温度、接种密度、培养方法和缩短继代周期来控制褐化。

光照 光照会提高 PPO 的活性, 促进多种植物组织培养中酚类物质的氧化^[19], 因为在酚类化合物合成和氧化过程中, 有许多酶系统参与, 其中部分酶系统的活性是受光诱导的^[20, 21], 因此在黑暗或遮光条件下培养外植体可防止褐变的发生。但在东北红豆杉的研究中发现, 光照 12 h/d 条件下, 愈伤组织诱导率达 100%, 愈伤组织呈强烈的生长势头; 而暗培养的愈伤组织则变褐、变黑, 褐化加重^[22]。核桃茎尖接种于 1/2 MS+活性炭 2 g 培养基中, 置于 5℃ 冰箱中黑暗培养 7 d 后取出和转接于 DKW+6-BA 1.0 mL+0.01L+20% 硫代硫酸钠 5 mL, 培养基中置于 25℃, 无光照环境下培养, 此方法抑制褐化效果为佳, 可确保常分化生长的整个阶段^[2]。

温度 温度过高时能促进 PPO 的生物活性, 从而促进酚类物质的氧化, 加速外植体褐化^[19], 而低温可以抑制酚类化合物的合成, 降低多酚氧化酶的活性, 减少酚类氧化, 从而减轻褐化^[23]。在‘薄壳香’核桃的愈伤组织诱导时, 把外植体分别培养在高温 (25 ± 2)℃ 和低温 (18 ± 2)℃ 条件下培养, 高温培养可明显促使褐化的发生, 褐化率达 52.7%, 而低温条件下褐化率为 29.8%^[2]。油茶茎尖在 10℃ 恒温箱中处理 3 d 后再置于 (25 ± 2)℃ 的培养室内培养褐化率降低^[16]。

继代周期与接种密度 继代周期和接种密度对褐化也会产生一定的影响。在东北红豆杉愈伤组织诱导初期, 频繁继代反而愈伤组织生长延迟、并

且褐化;以30 d为继代周期,愈伤组织生长旺盛;继代周期过长(如50 d),愈伤组织会萎缩褐化加重^[24]。油松胚珠愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立中采用缩短继代培养周期的方法抑制褐化效果较好^[25]。曼地亚红豆杉茎段和叶片的愈伤组织诱导条件和愈伤组织继代褐化研究发现在继代培养中发现在第20 d就开始转移继代和提高愈伤组织与培养基接触面的氧气供给能够较好克服褐化^[26]。接种密度过大时,由于培养基中的营养物质难以满足愈伤组织或细胞的需求,导致褐化死亡,东北红豆杉悬浮培养时,接种量以0.6~0.9 g/瓶(50 mL)为最佳密度,大于1.0 g/瓶(50 mL)时培养物易褐化,密度增加时褐化更严重^[27]。

培养方法与培养基硬度 在进行金钱树愈伤组织的诱导与增殖过程中,如果培养方法不恰当会出现严重的褐化现象,从而影响愈伤组织的生长,甚至使愈伤组织受毒害而死亡。采用液体培养,对防止愈伤组织的褐化效果明显^[27]。华盖木培养基硬度对褐化的影响研究发现,培养基较稀时,酚类、醌类物质很易渗入培养基,使培养基变为褐色,同时使接触它的外植体也变为褐色,褐化严重;硬度较高时,培养基基本不变色,外植体大多颜色青绿,褐化较轻,随琼脂用量增加,培养基硬度加大,褐化程度减轻,褐死率降低^[6]。

各种影响因子在实际研究中一般综合应用。在牡丹组织培养过程中,褐化现象普遍发生,通过改变培养条件、培养方式以及在培养基中添加抑褐剂的方法来控制,青龙卧墨池的牡丹组培物在添加生长素会加剧启动培养中外植体的褐化程度,暗培养对愈伤组织抑制褐化很有效,悬浮培养未能减缓褐化却能使愈伤快速增殖,吸附剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和结冷胶能够有效地缓解褐化,抑褐剂硫代硫酸钠、抗坏血酸和铜试剂(DDTC)在牡丹的组培中加剧了组织培养物的褐化程度^[28]。‘罗田甜柿’幼胚培养培养基以MS(1/2N)最适;蔗糖浓度以7%,抗褐化剂以活性炭效果最好^[29]。因此在进行木本植物组织培养时,要根据培养材料的褐化程度,综合考虑褐化控制措施,以便达到理想的控制效果。

参考文献:

- [1]周俊辉,周家容,曾浩森,等.园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J].园艺学报,2000,27(增刊):481-486.
- [2]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.
- [3]孔祥生,张妙霞,杜爱玲,等.甜柿离体快繁技术研究[J].华中农业大学学报,1998,17(2):178-186.

- [4]陈菲,李黎,官伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].北方园艺.2005.2:69-71.
- [5]王玖瑞,刘孟军,祁业凤,等.枣幼胚培养中褐化的研究[J].河北农业大学学报,2004,27(2):45-47.
- [6]刘均利,马明东.华盖木组织培养中褐化控制研究[J].浙江林业科技,2007,27(1):20-23.
- [7]梅兴国,董妍玲,潘学武.红豆杉细胞继代培养防褐化措施的研究[J].天然产物研究与开发,2001,13(4):8-11.
- [8]Pierik RLM. In vitro culture of higher plant. Mattinus[M]. Nijhoff Publishers, 1987, 102-104.
- [9]Fett-Neto AG, Dicosmo F, Reynolds WF, et al. cell culture of Taxus as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes[J]. Bio / Technol, 1992, 10:1572-1575.
- [10]潘学峰,黄凤娇.海南蝴蝶兰的组织培养研究[J].海南大学学报自然科学版,1997,15(3):206-211.
- [11]张宗勤,杨建英,吴耀武.南方红豆杉组织培养及紫杉醇的产生[J].西北植物学报,1998,18(4):488-492.
- [12]陈学森,邓秀新,章文才.银杏组织培养与黄酮生产的研究[J].中国农业科学,1997,30(6):55-60.
- [13]高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501-506.
- [14]汤绍虎,孙敏,周启贵,等.降低“雪青”梨的外植体褐化研究[J].西南农业大学学报(自然科学版),2005,27(2):231-233.
- [15]邹英宁,李国怀,樊青峰,等.不同抗氧化剂对中国李茎段培养的影响[J].华中农业大学学报,2006,25(1):84-86.
- [16]阙生全,彭凌,朱必凤,等.油茶组织培养过程中防止褐变的研究[J].韶关学院学报(自然科学版),2006,27(3):67-69.
- [17]冯大领,李云,孙振元,等.引进爬山虎组织培养中的褐化及其控制[J].农业生物技术科学,2006,22(11):54-56.
- [18]周音,张智奇,张建军,等.3种抗氧化剂对茶条槭(*Acer ginnala Maxim*)组织培养污染及褐化的影响[J].上海农业学报,2007,23(1):5-7.
- [19]Scandahl MMR, Monaco LC, Sharp WR. In vitro methods applied to coffee. In: Trevor A Thorpe ed. Plant tissue culture methods and application in agriculture[M]. New York: Academic Press, 1981, 325-348.
- [20]Creasey LL. The increase in phenylalanine ammonialyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis[M]. Phytochem, 1968, 7:441-446.
- [21]Davies ME. Polyphenol synthetases in cell suspension cultures of Paul's scarlet rose[J]. Planta, 1972, 104:50-65.
- [22]王森林,胡风庆.东北红豆杉愈伤组织培养研究[J].辽宁大学学报,2002,29(1):75-77.
- [23]Hildebrandt V, Hamey PM. Factors affecting the release of phenolic exudates from explants of pelargonium hortorum Bailey 'Springer Scarlet' J Hor Sci, 1988, 63(4):651-657.
- [24]胡风庆,任娟.东北红豆杉细胞悬浮培养研究[J].辽宁大学学报,2002,29(3):279-282.
- [25]杨远媛,贺容青,郑彩霞.油松胚珠愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立[J].植物生理学通讯,2005,41(5):591-594.
- [26]胡凯,祝顺琴,谈锋等.曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究[J].西南师范大学学报(自然科学版),2004,29(4):659-663.
- [27]唐利球,唐君海,陆祖正等.金钱树愈伤组织的诱导及其褐化的防止[J].广西热带农业,2005,(3):12-13.
- [28]张俊琦,罗晓芳.牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(5):720-724.
- [29]谷晓峰,唐仙英,罗正荣.罗田甜柿幼胚培养条件的研究[J].果树学报,2001,18(2):80-83.

(责任编辑:王文彬)