



植物组织培养中克服外植体褐变的研究

在植物组织培养过程中,外植体发生褐变的现象普遍存在,这一问题经常成为影响外植体分化,甚至存活的主要因素,本文根据近年来国内外关于克服植物组织培养过程中外植体褐变的最新研究成果,对影响外植体褐变的因素和解决方法进行了系统的总结和分析,以期对植物组织培养快速繁殖以及再生的研究提供参考。

1 影响外植体褐变的因素

1.1 植物材料

1.1.1 植物种类及基因型。不同的植物、同种的不同类型、同种不同品种的植物发生褐变的程度,都具有很大的差别,这主要取决于植物体中含有的酚类物质多少以及酚氧化酶活性的强弱。褐变主要是由多酚氧化酶(PPO)作用于天然底物酚类物质形成醌,进行一系列的脱水、聚合反应,最后形成黑褐色物质,影响了植物的正常生长甚至导致死亡。就植物而言,木本植物在培养过程中易发生褐变。木本植物中含有较多的酚类物质,如核桃富含单宁;兰科植物在组培快繁过程中也极易发生褐变。同属的植物,其褐变程度不同,能够控制的程度也不同,在对宿根福禄考和丛生福禄考叶片愈伤的诱导中发现,两种植物的叶片都会出现严重褐变,但宿根福禄考叶片通过Vc浸泡处理后,可再生出苗,而丛生福禄考则不可以。同种植物不同品种褐变程度也不同,粉叶珊瑚凤梨褐变程度较红星凤梨和黄莺歌凤梨严重。水稻基因型对其褐变的影响也很明显。但有研究表明,褐变的发生与酚氧化酶活性的强弱关系不明显,而与繁殖材料的总酚含量关系很大,罗晓芳在对阿月浑子、枣树和葡萄组织培养苗生长过程中多酚氧化酶(PPO)活性和总酚含量变化的研究中发现,褐变严重、褐变指数高的材料多酚含量特别高。说明褐变是一个极其复杂的过程。

1.1.2 外植体类型及生理状态。外植体的类型及其生理状态是褐变又一重要影响因素。同一种植物不同的外植体褐变的程度是不同的,这与植物体不同部位总酚含量和PPO的活性有关。魏芳等人在对阿月浑子的研究中发现,其富含多酚物质,叶片总酚含量最高,不适合组培试验;茎段含量较少,较适宜组培且春季取材最佳,同时研究表明阿月浑子的褐变与外植体中总酚含量有关而与PPO的活性没有相关性。这与Harel等认为苹果的褐变与酚含量有关结论一致。而Kahn等研究表明,鳄梨中酚类物

质的含量与PPO活性对其褐变均有影响。外植体的类型是影响核桃褐变和腋芽生长分化的重要因素,核桃幼嫩茎段,褐变最为严重,半木质化的茎段是适宜的初代接种材料。鹤望兰的胚芽和种子切段褐变较其他外植体轻。同时,同一外植体,不同的生理时期,其褐变的可能性及程度不同。翅果油树用幼嫩的茎段诱导愈伤组织的褐变率比老茎段的低。王续衍等对24个苹果品种进行茎尖培养,发现冬春季取材褐变率低于其他季节。李焕秀等对金花梨和苍溪梨的茎尖和茎段组培褐变的周年变化规律进行了研究,发现一年中金花梨外植体的POD和PPO活性最高期在4月,最低期在1月和12月;苍溪梨外植体两种氧化酶最高活性均在4月,最低活性出现时间与金花梨相似。一般而言,分化部位比分生部位接种后产生的醌类物质多,褐变严重。

1.1.3 外植体的大小及消毒时间。植物组织培养过程中,外植体的褐变程度受到外植体大小、消毒时间的影响。不同植物材料适宜的大小和消毒时间不同。据报道,一些木本植物茎尖小于0.5 mm时褐变严重,而当茎尖长度在10~15 mm时褐变较轻。在卡德兰新茎的培养中也有类似的结果,新茎越大成活率越高。各种化学消毒剂对外植体的伤害也可能造成褐变,酒精对外植体的伤害大于升汞。消毒时间的长短也不尽相同,黄栌一月取材0.1%升汞消毒1~3 min即可,而在五月取材需消毒5~6 min。

1.2 光照及温度。光照对某些植物的褐变具有较重要的影响。一般情况,暗培养有利于减轻褐变,因为在酚类化合物合成和氧化过程中,需要许多酶的参与,而其中一部分酶系统的活性受到光的诱导。桉树在全黑暗的状态下培养,效果较好。特洛皮(一种澳洲落叶灌木)在遮荫情况下培养,褐变较轻。Das等对外植体进行一段时间的暗培养以减缓酚类化合物的合成。暗培养对黑松成熟胚诱导愈伤有促进作用。总而言之,不同植物对光的需求不同,情况不同。

温度同样是一个对褐变有较为重要影响的因素。低温不仅可以抑制褐变,同时会降低PPO的活性,从而减轻褐变;而高温易促进酚类氧化。桑树茎段在黑暗低温的条件下褐变较轻,辣椒的花药在低温预处理之后易产生愈伤。杜建中等研究发现,温度对油菜外植体褐变影响显著,当培养温度高于30℃时,外植体的褐化程度非常严重,而当培养温度为25℃~26℃时,褐化率大大降低,褐化程度也较轻。

1.3 培养基

1.3.1 培养基成分及类型。大量试验结果证明,液体培养基可以有效地控制褐变。在液体培养基中,外植体产生的酚类物质可以较快的扩散,因此对外植体的伤害较轻。在金钱松的继代培养中采用液体培养基防止褐变的效果最佳。不同的基本培养基对不同植物而言,效果不同,一般来说,在初代培养时,无机盐的浓度过高,酚类物质就会大量外溢,导致外植体的褐变。油茶在降低无机盐浓度的培养基上褐变率较低,WPM培养基适宜牡丹叶柄的培养,褐变最轻,华盖木

的外植体在 1/2MS 的培养基上褐变率最低。

1.3.2 植物调节剂。据报道,初代培养处在黑暗的条件下,生长调节剂的存在是影响褐变的主要原因。细胞分裂素会促使褐变的发生,培养基中 BA 的浓度在 $3 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,促进了沾化冬枣外植体褐变,在甘蔗的培养中有同样的效果。据报道,提高生长调节物质浓度(2,4-D 提高到 $1.0 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),能有效促进细胞生长、缓解褐变。总而言之,每种植物都有其最适合的激素浓度配比,只有找到适合的配比,才能有效抑制褐变的发生。

1.3.3 抗氧化剂和吸附剂。培养基中加入抗氧化剂可以改变外植体周围氧化还原反应,从而抑制酚类氧化,减轻褐变。但不同的抗氧化剂对同一种植物的效果不同,而且使用的方式不同,效果也不尽相同。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茶条槭外植体褐变的产生,柠檬酸和抗坏血酸对中国李茎段抑制褐变都有较明显的效果,Acacia sinuata 的外植体用柠檬酸浸泡后可有效抑制其褐变。同时,吸附剂活性炭(AC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)都可以去除酚类氧化造成的毒害效应。同时 AC 和 PVP 对中国李茎段的褐变也有一定的作用。用 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,但加入达到一定浓度时就会延缓外植体的生长。新疆紫草在继代培养基上加入 PVP 可以有效地防止褐变。对于一些植物,同时使用多种抗氧化剂和吸附剂才能达到较理想的效果。

1.3.4 pH 值。培养基 pH 值较低时可降低多酚氧化酶活性和底物利用率,从而抑制褐变。水稻的培养过程中,pH 值对褐变的影响很大,较低的 pH 值可以减轻红豆杉的褐变。

1.4 继代周期。接种后,继代周期过长,导致外植体伤口周围积累的醌类物质将会增多,褐变加重。软枣猕猴桃组织培养时,每隔 10~15 d 转瓶可有效地抑制褐变。而水稻的愈伤组织培养,在培养时间延长的情况下,褐变反而变轻,这与其他植物的情况不同,有待于进一步研究。

2 防止褐变的措施

2.1 选择适合的外植体及采集时期。由于植物的基因型,外植体自身的生物学特性,应选择合适的外植体和正确的采集时期。非洲菊的花蕾褐变较其他外植体轻,进行其快繁时即可选择花蕾。黑松可采用成熟的胚作为外植体,其褐变率较低。有些植物适宜在幼嫩期进行,有些植物需要采用半木质化的外植体,还有的需要休眠的芽。这需要在进行培养之前对植物有较全面的了解。

2.2 对外植体及母株进行预处理。对于一些植物而言,对外植体或母株进行预处理,可有效地控制褐变。预处理的方式多种多样,抗氧化剂浸泡外植体,对外植体进行低温预处理、热击处理,对母株进行遮光处理等。目前,在防止菱角褐变用双氧水浸泡至于 4°C 保存,可有效防止褐变,此方法可在组织培养中进行尝试。用于切割的解剖刀必须尽可能

地尖锐,解剖刀的消毒不能过分灼烧,否则会使解剖刀变钝,影响切割,导致对外植体造成较大的伤害。此外,在水稻成熟胚的培养过程中,可以先用水浸泡,或用紫外线照射都有较好的效果。

2.3 培养基及培养条件。在适合外植体生长的培养环境下,外植体可以生长强壮,减轻褐变。不同的基本培养基适合不同植物的培养,SSS 和 RW 对东北红豆杉的愈伤诱导率可达 95% 以上,而东北矮紫杉在 WPM 上褐变最轻。调节培养基中激素的配比,适宜的配比有利于植物的生长,同时对褐变有一定的控制作用,软枣猕猴桃在 $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg/L} + \text{NAA } 0.01 \text{ mg/L} + \text{PVP } 3\%$ 的培养基,有效控制褐变并保持植株正常生长。李东杰等人的研究发现,在 $2,4\text{-D } 2 \text{ mg/L} + \text{KT } 0.2 \text{ mg/L} + \text{GA}_3 \text{ } 0.5 \text{ mg/L}$ 的培养基上,冬凌草愈伤率高且抑制了褐变。

但是目前使用较多的方法仍是加入抗氧化剂。不同的抗氧化剂对不同的植物具有不同的效果。所以在添加抗氧化剂时,应根据植物不同而选择适宜的抗氧化剂。在培养基中加入 PVP、DTT、Vc 对华盖木顶芽培养可以有效的控制其褐变。Vc、AC、PVP、CA 对中国李茎段的增殖都有促进作用,但效果最好的是抗坏血酸。李桂荣等人研究发现活性炭及维生素 C 在木立芦荟叶片愈伤的诱导过程中,对褐变有一定的抑制作用。刘真华等人在对蝴蝶兰组织培养中褐变控制的研究中指出,谷胱甘肽对蝴蝶兰培养过程中褐变的控制综合效果最佳。虽然活性炭抑制效果强于谷胱甘肽,但不利于分化。因此,在使用抗氧化剂的过程中,不仅要有有效的控制褐变,还要注意到抗氧化剂对外植体的影响。既要控制褐变又要防止抗氧化剂对植物的副作用。

降低培养温度,暗培养有利于抑制褐变,华盖木在培养初期置于 8°C 暗培养 4 d 后,与对比相比较差异显著。沙棘在 $15^\circ\text{C} \sim 18^\circ\text{C}$ 暗培养 5 d 有利于抑制褐变。调节培养基的 pH 值,水稻愈伤组织的培养对 pH 值非常敏感。

2.4 其他因子。缩短培养的周期,选择适宜的外植体大小,确定合适的消毒剂 and 消毒时间,寻找适宜的碳源,均可有效的控制褐变。

3 结语

目前对植物外植体褐变的机理已有多种假说,只有了解外植体褐变的生理机制,才能从根本上解决这个难题。通过几十年的研究探索,已经掌握了一些比较有效的防止褐变的方法,但对于一些特殊的植物种类而言,解决外植体褐变问题仍然是一个难题。针对某一种植物,只能通过试验确定适合其控制褐变的方法。

总而言之,目前防止褐变的手段都是治标不治本,只有切断酶与底物之间的作用途径才能够从本质上达到防治褐变的目的。由于底物和酶的分布具有区域性的特点,那么今后可以在如何切断二者的作用途径方面加强研究。

150040 东北林业大学 张伟 程蕾洁 洪波