

植物组织培养中的褐化现象及防治措施

谷延泽¹, 高瑞彦²

(1. 濮阳职业技术学院生物工程与农业经济系, 河南 濮阳 457000; 2. 南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 褐化是植物组织培养中一种常见的现象, 直接影响到组织培养能否取得成功。对褐化产生的机理、影响因素及防治措施进行了探讨。

关键词: 组织培养; 褐化; 防治措施

中图分类号: S336

文献标识码: A

文章编号: 1008-1631 (2008) 06-0056-03

The Browning and Prevention Measures in Plant Tissue Culture

GU Yan-ze¹, GAO Rui-yan²

(1. Department of Bioengineering and Agricultural Economy, Puyang Vocational Technical College, Puyang 457000, China; 2. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Material browning is a universal phenomenon in plant-tissue culture, and it plays a vital role in plant-tissue culture. This article introduced the generation mechanism of browning, influencing factors and prevention measures.

Key words: Plant tissue culture; Browning; Prevention measures

植物组织培养在植物离体快繁、无病毒苗木培育、遗传育种及种质资源保存等方面的应用越来越多。但是, 在植物的组织培养中易出现外植体或培养物的褐化现象。褐化现象与菌类污染和玻璃化并称植物组织培养的3大难题。

1 褐化的概念

褐化是指在植物组织培养过程中, 外植体在诱导脱分化或再分化时, 自身组织由其表面向培养基释放褐色物质, 以致培养基逐渐变成褐色, 外植体也随之进一步变褐而死亡的现象^[1]。褐化一般分为两种形式: (1) 由于细胞受胁迫或其他不利条件影响所造成的细胞死亡(称为坏死)而形成的褐化现象, 不涉及酚类物质的产生。诸多不利条件(如温度)都可以造成细胞的程序化死亡。(2) 因为酚类物质被多酚氧化酶(PPO)氧化所引起^[2-3]。在完整的组织和细胞中, 酚类物质和PPO是分隔存在的——酚类物质分布在液泡中, 而PPO则分布在各种质体或细胞质中, 这种区域性分布使底物与PPO不接触。但当外植体组织被切割和接种时, 细胞膜被破坏, 从而破坏了酚类化合物和多酚氧化酶的分隔状态, 使两者相遇, 酚类化合物在酶的催化下迅速氧化而形成褐色醌类物质^[4], 并进一步与组织中的蛋白质发生聚合, 抑制其他酶的活性, 毒害整个外植体组织, 导致组织代谢紊乱, 生长受阻, 最终逐渐死亡^[5]。以棉花为例, 对陆地棉正常愈伤组织与褐化愈伤组织研究发现,

褐化愈伤组织的PPO活性、棉酚含量均高于正常的愈伤组织, 而超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和可溶性糖的含量均低于正常的愈伤组织。这是由于细胞膜遭到破坏使PPO与棉酚在有氧条件下结合生成醌类物质, 导致愈伤组织的褐化。而愈伤组织的褐化促使SOD、CAT活性下降和可溶性糖含量降低^[6]。

2 影响褐化的因素

2.1 基因型

由于各种植物中单宁等酚类化合物的数量和多酚氧化酶的活性不同, 因此不同种植物发生褐化的频率和严重程度不同^[5-8]。一般木本植物的酚类化合物含量比草本植物高, 因此进行组织培养时, 木本植物更容易发生褐化。同种植物的不同类型、不同品种发生褐化的情况也不同。如对桉树的研究发现, 柳桉的茎段比较容易褐化, 杂交桉U6的茎段褐化程度比较轻; 邓恩桉25、13号无性系褐化程度较轻, 24号无性系褐化较重^[3]。王宏伟等^[9]发现沈农糯玉米和白糯1号褐化率较低。

2.2 外植体情况

2.2.1 材料年龄和大小 一般来说, 褐化随材料的年龄和组织木质化的程度而增加。外植体的老化程度越高, 其木质素的含量也越高, 也越易产生褐化, 成龄材料一般均比幼龄材料褐化严重。邱路等报道^[8], 用桑树基部发出的幼芽作外植体比用桑树上部高大枝条上的壮芽做外植体褐化轻, 褐化率低; 幼龄树比老龄树褐化轻, 褐化率低; 阿月浑子2年生和4年生材料组织培养易获得成功, 但8年生和26年生材料则出现褐变现象。在对早脆王品种枣的胚离体培养中发现, 完整接种的早脆王

收稿日期: 2008-03-05

作者简介: 谷延泽(1969—), 男, 河南清丰人, 硕士, 讲师, 从事园艺生产技术的教学和研究。

胚珠随其成熟度的增加褐化加重^[10]。外植体大小对褐化的影响,表现为小的材料更容易发生褐化,相对较大的材料则褐化的程度较轻。另外切口越大,酚类物质的被氧化面也越大,褐化程度就会更严重^[9]。蒋迪军等报道,金冠苹果茎尖小于 0.5 mm 时褐变严重,当茎尖长度在 5~15 mm 时褐变程度较轻^[11]。

2.2.2 取材时间和部位 由于植物体内酚类化合物含量和多酚氧化酶的活性在不同的生长季节并不相同,一般在生长季节含有较多的酚类化合物。因此,一般来说冬季褐变少,夏秋季褐变最严重,接种后存活率也最低。如卡德兰在新茎旺盛生长的 6~9 月间褐变物显著增加,在生长较弱的冬春季显著减少。核桃、欧洲栗、海枣、牡丹也有类似情况^[5]。在取材部位上存在幼嫩茎尖较其他部位褐化程度低的现象,木质化程度高的节段在进行药剂消毒处理后褐化现象更严重^[9]。Yu 等对葡萄的研究发现,从侧生蔓枝切取的茎尖比延长蔓切取的酚类物质含量低,更易存活^[11]。刘兰英在“薄壳香”核桃的组织培养中发现随着芽位的降低,褐变率显著提高^[1]。张明丽等在对金叶红瑞木的研究中发现,影响褐化的主要因素是枝芽的着生位置^[12]。

2.2.3 消毒情况 接种时各种化学消毒剂对外植体的伤害也会引起褐化。消毒剂不同,消毒时间不同,外植体的褐化程度也不同。酒精消毒虽然效果较好,但易对材料造成伤害,导致褐化,升汞对外植体伤害比较轻。且消毒时间越长,消毒效果越好,但褐变越严重^[4]。在消毒时间方面,一般是消毒时间越长,褐化率越高^[8],因而消毒时间应掌握在一定范围内才能保证较高的外植体成活率。肖显华等人通过对苹果枝条的研究发现消毒后用磁力搅动充分清洗材料对减轻褐化是有效的^[13]。

2.3 培养条件

2.3.1 光照 由于光能促进多种植物组培中酚的氧化,因此在采集外植体之前,如果将取材母株进行遮光处理,然后再切取外植体,能够有效地抑制褐化的发生。初代培养时,将接种的材料在黑暗条件下培养,对抑制褐化发生也有一定效果^[5]。在对巨桉叶片的研究中发现光照条件对巨桉叶片渗出物形成的影响从低到高依次为:黑暗、漫射光、短日照、长日照^[14]。在魔芋组织培养中发现愈伤组织诱导及不定芽分化在黑暗或散射光下培养,可大大减少切块伤口褐化程度^[15]。

2.3.2 温度 温度对褐化影响很大:高温能使 PPO 的活性提高,促进酚类氧化;而低温可以抑制酚类化合物的合成,降低多酚氧化酶活性,减少酚类氧化,从而减轻褐化。Ishii 等发现卡特兰在 15~25 ℃ 培养比在 25 ℃ 以上褐化轻^[9]。核桃组培中发现, (25±2) ℃ 条件下褐变率为 52.75%,而在 (18±2) ℃ 条件下褐变率为 29.8%^[1]。在桉树的组织培养中也发现了这一现象:把接好的不同桉树品种外植体分别培养在高温 (23~27 ℃) 和低温 (16~20 ℃) 条件下得出,高温培养可明显促使褐化的

发生,褐化率达 52.17%,而低温条件下褐化率仅为 29.18 %^[2]。

2.4 培养基

2.4.1 无机盐浓度 过高无机盐浓度会引起某些植物外植体中酚类物质氧化^[5]。在桑树组培中,1/2 MS 培养基,降低无机盐浓度能减轻褐化现象,降低褐化率^[1]。油棕用 MS 培养基容易引起外植体的褐变,而用降低了无机盐浓度的改良 MS 培养基时则可减轻褐变,并可诱导出愈伤组织和胚状体^[6]。刘兰英^[4]发现,将 DKW 培养基的无机盐浓度减少 1/2,核桃外植体的褐变率由 55.8% 降至 32.5%^[11]。

2.4.2 pH 值 pH 值可能对酚类物质和酚氧化酶结合部位产生影响。在卡特兰中发现,培养基 pH 值 4.0~5.0 时外植体褐化物多,pH 值为 5.5 时则少^[11]。

2.4.3 生长调节剂 生长调节物质使用不当,培养材料容易褐化,细胞分裂素具有刺激多酚氧化酶活性提高的作用^[4],在核桃的组培中,培养基中 BA 和 KT 的含量为 3.0~6.0 mg/L 时能显著促进褐变的发生。当 BA 为 10 mg/L 时,褐变率为 35.4%;为 30 和 60 mg/L 时,褐变率分别是 54.4% 和 72.3%。而当培养基中 KT 的含量为 3.0 和 6.0 mg/L 时,褐变率分别是 60.3% 和 70.6%,与前者差异显著,而且均高于对照。在桑树的组培中 BA 的使用浓度低,褐化轻,褐化率低,随 BA 浓度的提高,褐化重,褐化率高^[1]。

2.4.4 培养基的状态及硬度 液体培养基中外植体溢出的毒害物质可以很快扩散,相对而言对外植体伤害较轻。把核桃分别在固体、半固体和液体培养基上培养,结果半固体培养基芽的诱导成功,而其他培养基上都发生了氧化褐变。凤梨外植体用液体培养可解决褐变^[14]。在桑树组织培养中随琼脂用量的减少,培养基硬度减小,褐化重,褐化率高^[1]。

3 控制褐化的措施

3.1 合适取材

通常外植体应具有较强的分生能力,在最适宜的细胞脱分化和再分化培养条件下,使外植体处于旺盛的生长状态,可大大减轻褐变^[8]。因此多选择幼龄植株取材。在植株的一定部位取材,使材料中酚类物质含量较低,也有助于减少褐化^[1]。在对早脆王品种的胚离体培养中发现取出其胚珠,剥去珠被接种可有效防止褐化^[10]。

3.2 母株和外植体的预处理

3.2.1 黑暗预处理 对母株进行遮光处理,可以减轻褐化程度,有利于初代培养物的萌发。在月季的培养中发现,相同的外植体在初代培养结束时,重度遮光处理下褐化的百分比最低为 58.2%,而自然光照和轻度遮光处理的褐化率分别为 88.3% 和 79.6%^[4]。欧阳磊等^[2]在桉树培养中发现,在采集穗条的前几天,用黑色塑料袋将枝条套住,减少光线的照射,可以有效降低外植体诱导的

褐化率,邓恩桉离体芽诱导对比试验,褐化率减少了22.18%。

3.2.2 低温预处理 低温处理有助于减轻褐化。核桃、苹果外植体在5℃下进行低温预处理一段时间有助于减轻褐化。红豆杉采用45℃预处理对克服褐化有效,但组织的活力有较大损伤影响愈伤组织的发生^[1]。巨桉带芽茎段在5℃低温下处理几天后褐化率有所减少^[2]。

3.2.3 预培养 预培养有助于避免酚类物质的毒害。如在20年生的柠檬母本植株上采集茎芽,需先在液体培养基上培养3d,然后在半固体培养基上培养。核桃外植体需预先在只含有蔗糖的培养基中培养5~7d;板栗最初2~3d用一定浓度的咖啡碱或含有石灰的培养基使形成层的伤口的单宁沉淀有助于减轻褐化^[1]。

3.3 选择适宜的培养基

3.3.1 调整基本培养基中无机离子浓度和种类 有报道,邓恩桉诱导培养在经过改良的MS培养基中培养比在未经改良培养基中效果好,褐化死亡率有所降低^[1]。油棕用改良的MS培养基,苹果用1/2MS的培养基也可减轻褐化^[1]。

3.3.2 调整培养基中激素的含量和比例 研究发现,高浓度的细胞分裂素和生长素有可能刺激桉树外植体的氧化,巨桉和邓恩桉带芽茎段在高浓度的外源激素中进行诱导褐化率较高,而在低浓度的外源激素中诱导褐化率减少。

3.3.3 在培养基中添加适量的抗氧化剂 包括抗坏血酸(Vit C)、硫代硫酸钠、聚乙烯吡咯烷酮(pyrrolidone, PVP)、血清白蛋白、柠檬酸等^[4]。在红豆杉培养过程中,培养基添加0.01~0.2 mg/L抗坏血酸能较为有效抑制愈伤组织褐化^[16]。华盖木组织培养中,PVP、二硫苏糖醇(DTT)、抗坏血酸3种防褐化剂对褐化的抑制作用较为明显,其效果PVP>DTT>Vc^[17]。

3.3.4 在培养基中添加吸附剂吸附酚类氧化物 活性炭是一种吸附性较强的吸附剂,但应尽量使用最小浓度的活性炭^[8]。有报道,0.1%~0.5%活性炭对吸附酚类氧化物的效果很明显^[8]。但活性炭的吸附作用没有选择性,在吸附酚类氧化物的同时也吸附营养物质。蝴蝶兰的培养中发现,活性炭能有效控制褐化和促进生长,但不利于分化^[18]。PVP也是常用的吸附剂含PVP培养基的“抗褐”能力明显强于含活性炭的培养基^[19]。

3.4 外植体的连续转移

加快继代转瓶的速度,及时更换新鲜培养基,可以减轻酚类物质对培养材料的毒害作用^[4]。在兰花、黑莓、山月桂树、无花果、核桃、瑞香、大花飞燕草、紫叶黄栌茎尖或腋芽培养中均可减少褐化。番茄原生质体培养中不断添加新鲜的培养液可以减轻褐化现象。但在红豆杉中,继代培养的新鲜培养液对外植体释放酚类物质有刺激作用,可能与新鲜培养基中的氧气充足从而促进

PPO活性有关^[1]。

在实践中可将上述措施综合使用。同时针对不同的植物采取与之相对应的措施,并在实践中不断摸索、试验,才能找到最有效的防褐措施,达到最好的效果。

参考文献:

- [1] 曾 镭, 刘 燕. 植物组织培养中褐化问题的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13 (14): 49-50.
- [2] 欧阳磊. 桉树组培快繁中存在的问题与对策 [J]. 福建林业科技, 2006, 33 (1): 203-206.
- [3] 杨 柳, 李杨瑞, 李小辉. 甘蔗组织培养研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (12): 3490-3492.
- [4] 胡 彦, 赵 艳. 植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题 [J]. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 2004, 32 (S1): 130-134.
- [5] 陈 菲, 李 黎, 宫 伟. 植物组织培养的防褐化探讨 [J]. 北方园艺, 2005, (2): 69.
- [6] 师海荣, 王清连. 陆地棉新品种在体细胞培养中愈伤组织褐化机理研究 [J]. 河南农业科学, 2006, (3): 32-36.
- [7] 李桂荣, 孙 丽, 孙俊逢. 油桃组织培养过程中防止褐变的研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33 (5): 827-828.
- [8] 缪耀梅, 李开彪, 叶添谋. 组织培养过程中污染和褐化的防治 [J]. 韶关学院学报, 2003, 24 (6): 01-103.
- [9] 王宏伟, 史振声, 邢志远. 玉米幼胚组织培养褐化发生因素的研究 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (18): 665-4666.
- [10] 王玖瑞, 刘孟军, 祁业凤. 枣幼胚培养中褐化的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2004, 27 (2): 5-47.
- [11] 叶 梅, 王伯初, 段传人. 植物组织培养外植体褐变的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2004, 15 (4): 426-428.
- [12] 张明丽, 李 青. 金叶红瑞木离体培养中影响外植体褐化的因素 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33 (8): 1411, 1454.
- [13] 肖显华, 王顺珍, 林荣双. 植物材料表面消毒方法的改进 [J]. 生物技术, 1999, 9 (1): 3-45.
- [14] 周俊辉, 周家容, 曾浩森. 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 (S1): 481-486.
- [15] 黄远新, 何凤发, 张盛林. 魔芋组织培养与快繁技术研究 [J]. 西南农业大学学报, 2003, 25 (4): 309-312.
- [16] 李 丽, 张湮帆, 何 康. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制 [J]. 复旦学报 (自然科学版), 2006, 45 (6): 702-707.
- [17] 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.
- [18] 刘真华, 葛 红, 郭绍霞. 蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究 [J]. 园艺学报, 2005, 32 (4): 732-734.
- [19] 汪秀峰. 植物组织培养“抗褐”之初探 [J]. 安徽农业科学, 1999, 27 (4): 325-326.