

植物组织培养中的褐变现象及抗褐变研究进展

王 苑 谢凝子

(黔西南民族师范高等专科学校, 贵州 兴义 562400;

韩山师范学院, 广东 潮州 521041)

摘 要:细胞受损后,由于细胞区隔作用被破坏,毒性酚类或其氧化物醌类物质毒害细胞,导致组织褐变,植物组织培养过程中培养低效或失败。目前认为组织培养中褐变程度主要受外植体材料的基因型、生理状态、种类、大小、预处理、培养条件、培养基及培养方式的影响。在目前的研究中控制褐变的有效方法主要有低温培养、暗培养、勤转种、添加抗氧化剂、增效剂或吸附剂于培养基中等。

关键词:植物;组织培养;褐变;防治方法

文章编号:1009—0673(2007)03—0109—05 **中图分类号:**Q945.51 **文献标识码:**B

褐变是植物组织培养中一种普遍存在的现象,是由于组织中多酚氧化酶被激活,使细胞酚类物质被氧化而产生棕褐色醌类物质,这种褐变现象又被称为酚污染。多酚类物质及其氧化物醌类物质会抑制其它酶的活性,从而毒害整个外植体,严重影响外植体的脱分化、再分化和生长。目前褐变已成为植物组织培养发展的一大障碍^[1,2]。

一、褐变的发生机制及控制多酚氧化机理

在正常细胞内,多酚类物质分布于液泡内,酚酶分布在各种质体或细胞质内,封闭的细胞内膜使底物多酚类物质与多酚氧化酶分隔开来形成独立的区域性分布,细胞内醌类物质水平较低。这种区隔作用也使植物细胞不会发生自毒作用。当细胞受伤或衰老时,细胞膜的结构遭到破坏发生破裂或渗漏,细胞内物质的区域性分布被破坏,代谢失调。超氧化歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)三者失调,使细胞内积累大量活性氧。同时,酚类物质与多酚氧化酶相互接触,在合适的pH、温度等条件下,植物多酚很容易于水溶液中在多酚氧化酶作用下被氧气或活性氧所氧化,使酚转变为棕褐色的醌类物质和水;醌类物质经过非酶促聚合,形成黑褐色物质(羟醌与黑色素等)抑制其他酶的活性或堵塞细胞。多酚类物质和醌类物质可逐渐扩散到培养基中,或渗入到代谢力弱的相邻细胞内,毒害外植体组织。^[1-6]

植物多酚类物质可分为水解型和合成型两种类型,其能与酶蛋白结合,使酶高级结构改变,导致酶活性降低或丧失;多酚也能与大分子底物(蛋白质或多糖)结合,降低酶与底物的结合;多酚也可与 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子激活剂或辅基产生络合,抑制酶活性。褐变可分为酶促褐变和非酶促褐变,

收稿日期:2007—05—28

作者简介:王苑(1979—),女,贵州安龙人,黔西南民族师范高等专科学校化生系教师,主要从事生物教学及研究。

目前认为植物组织培养中的褐变主要是酶促褐变。酶促褐变主要是由多酚氧化酶(PPO)引起的。

控制多酚氧化可采用抗氧化剂和增效剂。抗氧化剂通常有两类:一类是酚氧化酶抑制物,如 Vc 将该酶的 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} , V_C 、 V_E 、 β -胡萝卜素等也能使半醌或醌类物质还原为相应多酚类物质,这类物质同时也能减少活性氧;另一类是影响酚类化合物与酶结合部位的物质,如硫脲、亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠、巯基乙醇、二乙基二硫代氨基甲酸钠等。亚硫酸盐是广泛使用且最重要的 PPO 酶抑制剂,可溶液中完全抑制多酚的氧化。增效剂具有金属离子螯合作用,可使 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的催化作用丧失。一般用柠檬酸、酒石酸、磷酸等羟基酸,它们不仅有增效剂的作用,同时也能提供酸性环境,使多酚的氧化得到抑制^[1,7,8]。

二、影响褐变的因素

1、基因型

不同种植物、同种植物的不同类型或品种,在组织培养中发生褐变的频率和程度都存在差异。这是由于各种植物表达的多酚类物质种类、含量以及酚氧化酶的种类、活性存在差异,有些植物种类组织培养较易成功,有些则很困难。一般木本植物的酚类化合物含量比草本植物高,因而在组培过程中更容易发生褐变。例如在相同的培养基上诱导培养,孝顺竹比小佛肚竹和凤尾竹更易褐变^[9]。

2、外植体生理状态

材料本身的生理状态不同,接种后褐变的程度也不同。通常分生部位接种后形成醌类物质少而分化的部分形成醌类物质较多,褐变随着材料的组织木质化程度和年龄而增加。植物体内酚类化合物的含量受到取材时间的影响。例如,柿的嫩芽茎尖的多酚氧化酶活性显著高于休眠芽,以嫩枝茎尖为外植体进行培养时易褐变死亡^[10]。同年 6 月份所取的核桃半木质化新植茎芽萌发率高于冬季休眠芽和 4 月份嫩枝茎芽萌发,且褐变率及褐变死亡率都较后两者低^[11]。

3、外植体的种类和大小

一般认为,木本植物较草本植物的外植体在培养过程中更容易发生褐变。外植体小的材料,由于切口所占比例较大而较易发生褐变。切口越大,酚类物质被氧化的面积就越大,褐变程度越严重^[12]。

4、材料的预处理

材料在接种前经过一定预处理可减轻外植体在培养中的褐变。预处理一般有低温或黑暗条件下预培养;外植体在水或抗氧化剂中切割或浸泡,以减少外植体与氧的接触和使水溶性多酚和醌类物质充分的渗出外植体。例如竹在培养时外植体在无菌水或半胱氨酸(100mg/L)溶液中浸泡 2~4h 有利于控制褐变^[6];魔芋培养过程中,在 1% 的柠檬酸溶液中切割外植体,可有效抑制外植体褐变^[13];黑暗预处理能减轻蝴蝶兰 R4 品种叶片外植体的褐变程度,其中以预处理 10d 的褐变最轻;未经暗处理的褐变最重且多酚氧化酶(PPO)活性最大^[14]。

5、培养条件

培养过程中,低温比高温有利于抑制褐变,高温会促进酚类氧化;而低温抑制酚类合成,降低多酚氧化酶的活性,减少酚类氧化^[15,16]。暗培养或弱光培养对抑制褐变也有一定的作用。例如小佛肚竹在暗培养和弱光(800Lx)下培养的茎尖和茎段的褐变率比在强光(2000Lx)下培养有所下降^[5]。

6、培养基及培养方式

培养基中过高的糖、丝氨酸浓度会加剧褐变^[16,17,18]。在相同浓度下,蔗糖对褐变的抑制效果要优于葡萄糖^[19]。矿质元素也对褐变存在影响,在蝴蝶兰初代过程中,培养基中 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 浓度越高,褐变越严重^[20]。这是由于 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 可作为催化剂加速多酚与活性氧(ROS)作用而被氧化为醌类物质。棉花胚性愈伤组织培养基中,氮源配比不合适也会引起褐变^[21]。曼地亚红豆杉愈伤组织诱导及继代过程中,培养基 pH 值的变化可引起酚类与酚氧化酶结合部位的改变,从而影响酚类的氧化程度^[7]。而细胞分裂素类激素能促进酚类化合物的合成或刺激多酚氧化酶活性提高,加速褐变。例如,随着 6-BA 使用浓度增

加,可增加牡丹培养中腋芽外植体的褐变和死亡数^[22]。在培养基中加入抗氧化物质可有效降低褐变,例如在对东方杉愈伤组织培养基中加入抗坏血酸 250mg/L,亚硫酸钠 250mg/L,柠檬酸 5000mg/L 组合能有效降低褐变^[23];茶条槭带芽茎段进行芽增殖培养的培养基中加入 1/2 该组合也能有效降低污染和控制褐变^[24]。在蝴蝶兰无菌苗培养基中添加 200mg/L 谷胱甘肽对分化生长和减少褐变综合效果好;Vc 和硫代硫酸钠对褐变抑制作用强,同时也抑制外植体生长分化;活性炭抑制褐变效果好,但抑制分化^[25]。

不同的培养方式引起褐变的程度不同,提高愈伤组织和培养基接触面的氧气供给有利于抑制褐变,减少多酚分泌型外植体材料周围的多酚类物质也有利于减少褐变。有利抑制褐变的培养方式,对不同植物是不同的。例如曼地亚红豆杉以珍珠岩基质上覆盖滤纸条培养效果最好^[7];而核桃采用液态培养基可减轻外植体的褐变^[13]。在蝴蝶兰培养中 10~15d 转瓶,更换新鲜培养基,褐变的比率可明显降低^[21]。在桑树培养中,当转种周期为 15d 时褐变率为 10%,转种周期为 30d 褐变率为 66%^[26]。

三、防治方法

1、选择适宜的外植体和培养条件

成功的经验表明,选择适当的外植体并建立最佳的培养条件是克服材料褐变的最主要手段^[2]。选择适宜的外植体,材料的年龄、取材部位、材料的大小及外植体受伤害程度等均能对褐变产生影响。外植体材料应有较强的分生能力,在最适宜的细胞脱分化与再分化的条件下,使外植体处于旺盛的生长状态,便可大大减轻褐变。一般情况下,取幼龄树新萌发嫩枝条的带芽茎段、嫩叶或茎尖作为外植体,也可采用幼胚来培养。另外对于某个种的植物进行培养前,在不影响培样目的的情况下,应筛选褐变低的基因型个体。

在培养条件的许多因子中,较为重要的是适宜的无机盐成分、适宜的蔗糖浓度及激素水平。培养早期的培养基中应含较低浓度的无机盐,降低 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 浓度或不用这两种离子;在保证正常培养的需求下使用低浓度细胞分裂素;愈伤组织或细胞培养物为异养型,应使培养物获得充足的氧气,以利于分化和生长。

适宜的温度及在黑暗条件下进行培养也可减轻材料的褐变。易发生褐变的外植体,可先于低温(4—20℃)预培养数小时,也可于黑暗或弱光照下预培养数日后转入正常培养条件下培养。外植体受伤害程度直接影响褐变,切割时应尽可能减小伤口面积,并缩短切口在空气中的暴露时间。

随着 pH 增高,多酚被氧化的作用增强^[1],因此培养基 pH 值应控制在 6.0 以下。

组织培养的一些材料产生水解型多酚,这类外植体在培养过程中会由于多酚类物质分泌到培养基中使培养基的颜色加深,并进一步氧化为醌类物质,而多酚类物质及相应的醌类物质会抑制多种酶的活性,从而阻碍外植体对营养物质的主动吸收和转化。对于培养初期多酚类物质合成分泌的材料可以在液体培养基中预培养一段时间,使酚类物质充分分泌到培养基中,减少外植体内和外植体周围的多酚物质。对于培养过程中多酚类物质不断合成的材料在培养中要进行转移外植体到新鲜培养基中,一般转移周期在 2 周左右。

2、使用抗氧化剂或增效剂

组织培养时,在培养基中加入抗氧化剂、增效剂培养或预培养,使用抗氧化剂和增效剂对材料进行预处理,可抑制外植体的酶促褐变。目前在培养基中一般单独或组合添加 Vc、Ve、 β -胡萝卜素、硫代硫酸钠、巯基乙醇、酒石酸、柠檬酸、亚硫酸盐、植酸、二硫苏糖醇等。Vc 和柠檬酸主要在早期起作用,随培养时间延长作用消退,亚硫酸钠在中后期作用较好^[26],但亚硫酸盐对植物具有一定毒害作用,不宜单独添加。也可在有抗氧化剂或增效剂的无菌溶液中切割材料后再接种,这类处理适用于外植体切割后快速氧化的材料。抗氧化物质对外植体的培养会起到一定的副作用,培养基添加浓度不宜过高,一般在 200mg/L 以下,且多用于初期培养而不宜长期培养。还原性抗氧化剂在使用时应注意保持其还原性,因此一般最好过滤除菌使用,而不与培养基一起高温灭菌。

3、使用吸附剂

在培养基中加入吸附剂可以抑制褐变。吸附剂有聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和活性炭(AC)等,活性炭是吸附性较强的无机吸附剂,但在使用过程中,应尽量使用最小浓度来防止褐变,因为活性炭的吸附作用是无选择性的^[27],活性炭浓度一般在 0.1 - 0.5% 之间^[1]。PVP 是酚类物质的专一吸附剂,其对酚的结合强于酶蛋白的结合,因而可使酶从多酚-酶复合物中结合出来,从而使酶的抑制消除。但随着 PVP 用量的增加,大部分组织培养物之增殖率也随之下落,这可能是由于 PVP 在吸附培养基中引起褐变的物质之外,还吸附了部分植物激素。PVP 浓度一般在 0.3% 左右^[1, 22, 8, 28]。

四、抗褐变研究展望

目前对于多酚类物质系统的研究及应用主要集中在植物化学,食品、制革、精细化工领域,集中于对多酚的生产应用,而在活细胞中的生化动态代谢机理及其对细胞的作用研究很少。目前国内植物组织培养关于褐变的研究文献中,多数是针对具体材料进行试验性处理,处理的抗褐变物质种类多样,且各种试剂配比、浓度、及具体作用差别较大。部分研究开始对总酚含量、多酚氧化酶活性、过氧化物酶活性、可溶糖含量、可溶蛋白含量进行测定。测定褐变组织中具体多酚类物质种类及其相关基因研究的报道极少。

由于植物种甚至品种,由于基因型不同所产生的酚类物质种类和量都有不同,而不同的酚类物质对细胞的毒害作用机理不一样且比较复杂,从而造成在培养过程中解决方法的多样化。因此,可着手于测定分析引起褐变的多酚类物质的种类,分析其危害细胞的生化原理,从根本上找出合理的解决方法,以形成完整体系。

参考文献:

- [1] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 陈正华. 木本植物组织培养及其运用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [3] ASMUB B, HAMME H. Enzymatic browning of vegetables Calibration and analysis of variance by mutiway methods[J]. Chemometrics Intelligent Laboratory Systems, 1996.
- [4] 师海荣,王清连等. 陆地棉品种在体细胞培养中愈伤组织褐变的生化基础研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6).
- [5] 师海荣,王清连. 陆地棉新品种在体细胞培养中愈伤组织褐变机理研究[J]. 河南农业科学, 2006, 3.
- [6] 孙敬三,桂耀林. 植物细胞工程技术[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [7] 胡 凯,祝顺琴等. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐变的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2004, 29(4).
- [8] 周俊辉,王国彬等. 观赏凤梨嫩吸芽离体培养中褐变防止的初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2000, 13(1).
- [9] 顾小平,苏梦云等. 几种从生竹愈伤组织诱导与防褐变技术研究[J]. 林业科学研究, 2005, 19(1).
- [10] 张妙霞. 柿树组织培养防止外植体褐变的研究[J]. 河南农业大学学报, 1999, 33(1).
- [11] Bonga J M, Durzan D J 著. 树木组织培养. 阙国宁等译[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988.
- [12] 张小红,代侃初等. 核桃离体培养中外植体褐变的研究[J]. 陕西林业科技, 2005, 4.
- [13] 柳俊,谢从华等. 魔芋(Amor phophallus)离体繁殖研究[J]. 华中农业大学学报, 2001, 3.
- [14] 赵伶俐,范崇辉等. 黑暗预处理对蝴蝶兰组培中外植体褐变的影响[J]. 西北农业学报, 2006, 15(5).
- [15] 韩文军,周宏等. 毛竹愈伤组织培养中褐变现象的研究[J]. 湖南林业科技, 2004, 31(3).
- [16] 陈菲,李黎等. 植物组织培养的防褐变探讨[J]. 北方园艺, 2005, 2.
- [17] 谭兴杰,李月标. 荔枝果皮多酚氧化酶的部分纯化及性质[J]. 植物生理学报, 1984, 10(4).

- [18] 张明文, 陈力耕. 银杏组织培养中控制褐变的研究[J]. 中国南方果树, 2003, 32(3).
- [19] 赵伶俐, 葛红等. 不同光照强度对蝴蝶兰组培中外植体褐变的影响[J]. 北方园艺, 2006, 4.
- [20] 印芳, 彭克勤等. 矿质元素对蝴蝶兰组培褐变的影响[J]. 北方园艺, 2006, 6.
- [21] 张朝军, 李付广等. 降低棉花胚性愈伤褐变研究[J]. 棉花学报, 2005, 17(5).
- [22] 张俊琦, 罗晓芳. 牡丹组织培养中褐变发生的原因与防治方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 10(37).
- [23] 周音, 张建军等. 三种试剂对东方杉(*Taxodium mucronatum* × *Cryptomeria fortunei*)愈伤组织抑制褐变的影响[J]. 上海农业学报, 2005, 21(3).
- [24] 周音, 张智奇等. 3 种抗氧化剂对茶条槭(*Acer ginnala Maxim.*)组织培养污染及褐变的影响[J]. 上海农业学报, 2007, 23(1).
- [25] 刘真华, 葛红等. 蝴蝶兰组织培养中的褐变控制研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(4).
- [26] 邱璐, 陈善娜等. 桑树组织培养中褐变问题的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版) 2000, 22(1).
- [27] 姚丽娟, 徐晓薇等. 洋兰组培快繁褐变抑制因子探讨[J]. 北方园艺 2006, 4.
- [28] 王照红, 衣葵花等. 几种药物防治组培苗褐变的研究[J]. 山东蚕业, 2006, 3.

责任编辑:李隽群

(上接第 104 页)度);11……。这些经验对于进一步认识其它数量、认识抽象的数,学习用抽象的数来表示具体的量,在解决问题中产生有用的策略,估计解决问题的结果的合理性,是十分重要的背景知识。教学中应结合学生的生活现实,使学生对常见数量有切实的感悟。

(2) 注重理解、总结和提炼基本数量关系。教学中应在注重理解和感悟数量间关系的基础上,经常通过概括和整理,使一些基本的数量关系在学生头脑中确定下来,以利于迁移。数学中的基本数量关系大致可分为两类:① 抽象的数量关系,如数的顺序、大小关系;有关分数、百分数的相对性关系;和与加数(差与被减数减数)的关系、积与因数(商与被除数除数)的关系;加、减、乘、除、乘方、开方、指数运算与对数运算等运算之间的关系;比例关系;约数与倍数关系;等式、不等式基本性质;方程中未知量与已知量关系;函数中变量之间的关系;有关向量的关系;各种运算规律反应出来的关系等。② 有实际意义的数量关系。如长度、面积、体积关系;有关量与量的进率关系;有关行程问题、工程进度问题中的关系;有关打折购物、产品合格率、储蓄利率、销售利润的关系;有关物质密度、溶液浓度的关系;有关常量、变量的关系;其它在具体情境中反映出来的数量关系。

事实上,对数量关系不仅可以作如上分类,还可作进一步提炼。如速度与路程、时间关系,有关工程进度的关系,有关物质密度、溶液浓度的关系等常常是商与被除数、除数关系的具体化。而这种关系又可以进一步概括为“1 倍量、倍数和多倍量的关系”。例如:“某人骑自行车的速度是 15 千米/小时,若按此速度匀速行驶,3 小时行多少千米?”这里的“15”是 1 倍量,“3”是倍数,答案“45”是多倍量。

2、把培养数量意识作为数学教育的重要目标

数学教师应整体认识数学课程改革理念,注重结合具体数量认识数、运用数表示具体数量,重视估算,引导学生勇于面对具有现实背景的数学问题,善于发掘、感悟现实世界蕴涵的数量和数量关系,在解决问题的活动中发展定量描述事物和量化分析、解决问题的能力。

参考文献:

- [1] 徐文彬,喻平.“数感”及其形成与发展[J]. 数学教育学报,2007,2.
- [2] 郑毓信. 数学方法论[M]. 南宁:广西教育出版社,1996.

责任编辑:王家鑫