

文章编号:1007-5003(2006)01-0061-03

植物组织培养中的褐变现象及解决途径

谢丽霞¹, 杜建伟², 李海杰², 吴芷君³

(1 辽宁省盐碱地利用研究所, 辽宁 盘锦 124010;

2 吉林市种子管理站, 吉林 吉林 132013;

3 大石桥市农业中心, 辽宁 营口 115000)

摘 要:褐变是植物组织培养中三大难题中的首要问题, 决定组培的成功与否。本文分析了褐变的原因及影响因素, 讨论了几种防止措施和解决途径, 供组培工作者参考。

关键词:组织培养; 褐变; 影响因素; 解决途径

中图分类号:S511.035.3

文献标识码:B

组织培养是用植物的任何器官、细胞进行人工培养, 使之分化成完整植株的过程。被培养的部分称为外植体。外植体在培养过程中体内的多酚氧化酶被激活, 使细胞里的酚类物质氧化成棕褐色的醌类物质, 导致培养材料褐变死亡的现象叫褐变。这种褐化物不但向外扩散导致培养基逐渐变成褐色, 而且还会抑制其他酶的活性, 严重影响外植体的脱分化和器官分化, 造成培养失败, 这已成为组织培养中的一个棘手问题, 同时也成为植

物快繁体系建立的一大障碍, 这种现象与菌类污染和过度含水化(玻璃化)并称为植物组织培养中的三大难题, 尤其是褐变。因此, 能否有效地控制褐变是组培能否成功的关键。

1 褐变的原因

很多植物尤其是木本植物体内含有较多的酚类化合物。在完成植物体的细胞中, 当切割外植体后, 切口附近细胞的分隔效应被打破, 酚类化合物和多酚氧化物便流出, 多酚氧化酶氧化酚类化合物使之而成为褐色的醌类物质和水。醌类物质又

收稿日期:2005-07-12

作者简介:谢丽霞(1963—), 女, 副研究员。

抽穗期早2 d, 成熟期早2 d。

2.4 对产量的影响

处理1与对照比较, 株高增加2.0 cm, 穗长增加0.7 cm, 平方米穗数相同, 每穗实粒增加1.4个, 秕粒减少0.4个, 千粒重增加0.5 g, 增产25.5 kg/667 m², 增产幅度达5.3%(表2)。

表2 考种测产调查

处理	穗数 (穗/m ²)	总粒数 (粒/穗)	实粒数 (粒/穗)	空秕率 (%)	千粒重 (g)	产量 (kg/667 m ²)	增产 (%)
1	670	46.8	44.2	5.6	25.6	505.4	5.3
2(CK)	670	45.8	42.8	6.6	25.1	479.9	

2.5 增产原因分析

①壮秧粉富含活性氧化硅、有机酸、锌、硼等

植物营养元素。水稻应用后, 秧苗素质好, 地下部根系发达, 白根多, 地上部不徒长, 秧苗健壮整齐, 单株分蘖增加, 干物质积累多, 抗逆性强, 插秧后返青快, 分蘖早; ②能促进秧苗根系有机酸分泌增多, 在根系周围形成一个适合秧苗生长的小环境, 给秧苗生长发育创造了良好条件; ③能有效防除立枯、青枯、黄秧等病害; ④对因营养失调导致的生理性病害也具有较好的预防及调理功效。

3 结论

通过试验, 水稻应用壮秧粉后, 秧苗素质好, 具有一定的增产效果, 是水稻培育壮秧的一种有效产品, 建议扩大示范推广面积。

会在酪氨酸酶等酶的作用下,使外植体的蛋白质聚合,生长停顿,最终导致死亡。

2 影响褐变的因素

影响褐变的因素极其复杂,随着植物种类、基因型、外植体的部位及生理状况等的不同,褐变的程度也有所不同。

2.1 与基因型有关

不同种植物、同种植物不同类型、不同品种在组织培养中褐变程度有很大差别。一般来说,多年生木本植物一般比草本植物容易发生褐变,因为木本植物的单宁或色素含量较高,而酚类的糖苷化合物是木质素、单宁和色素的和成前体,所以木本植物易褐变。

2.2 与外植体生理状态有关

褐变随着年龄和组织木植化程度增加而加强。因此,在外植体接种时常需要剥去鳞片和大叶片,尤其是以切取幼嫩的芽尖或切取顶芽分生组织(或带少量叶原基)接种更为理想;如在欧洲栗的培养中,幼年型的外植体培养含醌类物质少,而用成年型材料培养时含醌类物质多;在卡得德亚兰的培养中,较短的新生茎致褐物质含量高,而较长的新生茎致褐物质含量低。不同生长季节取材的培养成功率亦不同。王续衍等(1988)对24个苹果品种进行茎尖培养时,发现冬春季取材褐变死亡率低,其他季节取材较重。外植体大小也会影响褐变,例如,用油棕幼嫩外植体(胚)培养较少褐变,而用高度分化的叶片接种后,则褐变。受伤程度大小也影响褐变。为了减轻褐变,切取外植体尽可能减少伤口面积,切口尽可能平整些。

2.3 与外植体取材时间有关

一般在春夏季,尤其是春季采取生长旺盛的外植体产生褐变较轻,已木栓化或木质化的枝条和处于休眠状态的芽作为外植体时褐变严重。即分生部位接种后形成醌类物质少,而分化的部位则形成醌类物质较多。

2.4 与外植体培养条件有关

从田间自然光照下植株取苹果、桃、葡萄等的茎尖,接种后易褐变;事先对母株或枝条遮光处理,之后再切取外植体,则减少褐变。因为酚类化合物合成和氧化过程中,有一部分酶系统的活性是受光诱导的。此外,光照促进组培中酚的氧化,光照条件对巨桉叶片渗出物形成的影响从低到高

为:黑暗、漫射光、短日照、长日照。因此,在黑暗或低光照培养一段时间能减轻褐变。培养温度、光照、培养时间等都对褐变有很大影响。卡特兰在15~25℃褐变轻。苹果和桃的茎尖培养也是低温条件下抑制褐变。咖啡组织培养在光照过强、培养时间过长时,加速褐变。

2.5 与培养基有关

在初代培养时,培养基中无机盐浓度过高,会引起酚类物质大量产生,导致褐变;降低盐的浓度,尤其是 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 离子浓度较低时,可减少酚类外溢减轻褐变。

培养基的pH值较低时常有利于减轻外植体的褐变。

植物生长调节物质使用不当时,材料也容易褐变。在黑暗条件下初代培养,生长调节剂是影响褐变的主要原因,6-苄氨基腺嘌呤或激动素不仅促进酚类化合物生成,而且刺激多酚氧化酶的活性,增加褐变;而生长素类如2,4-D和NAA可延缓多酚合成,减轻褐变。细胞分裂素BA有刺激多酚氧化酶活性提高的作用,这一现象在甘蔗的组织培养中十分明显;水稻MS培养基中多效唑(MET)含量高时褐变严重。

许多试验证明,在液体培养基和半固体培养基上,褐变程度比在固体培养基上轻,液体培养基有效地克服外植体褐变。液体培养基再加上滤纸桥,效果就更好。因为外植体溢出的有毒物质很快扩散到液体培养基中,对外植体危害较轻。

3 解决褐变的途径

3.1 选择适宜的外植体和培养条件

许多研究表明,选择适宜的外植体和培养条件是克服褐变的最主要手段。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培养条件下,使外植体处于旺盛的生长状态,便可大大减轻褐变。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。适宜的温度及在黑暗条件下进行培养也可显著减少材料的褐变。据报道,如在芽初始培养的1~6周内用暗培养,或在150 Lx左右的光强下进行光培养,或在取外植体之前对母株进行遮光处理20~40 d,可抑制酚类物质氧化。

3.2 在培养基中加入抗氧化剂

在组织培养中,加入一些抗氧化(下转72页)

种子真实性是指一批种子所属品种、种或属与文件(品种证书、标签等)是否相同,是否名副其实。品种纯度是指品种在特征特性方面典型一致的程度。真实性和品种纯度鉴定是保证良种遗传性充分发挥,防止良种混杂退化,提高种子质量和产品品质的必要手段。

2.4 种子水分测定

种子水分是指种子中所含水分的重量占供试种子总重量的百分率。认真进行水分测定,掌握种子水分情况,并及时采取措施,使种子达到并保持标准水分要求,是保证种子贮藏运输安全,防止种子劣变的关键。测定种子水分的方法很多,有烘干法、真空干燥法、电测法、甲苯蒸馏法、近红外线技术、核磁共振技术和微波技术等。

2.5 种子生活力测定

种子生活力是指种子发芽的潜在能力或种胚所具有的生命力。种子生活力测定方法有四唑染色法、甲烯兰法、红墨水染色法等。

2.6 种子健康测定

种子既是病虫害危害的对象,也是病虫害传播的媒介。种子健康检验具有检疫检验和种用价值鉴



定双重任务,是防止农作物病虫害传播的重要措施。其主要方法有直观观察法、培养检验法、幼苗症状法。

总之,田间检验和室内检验是保证水稻种子质量必不可少的重要措施,二者缺一不可。田间检验是种子形成过程的质量控制,室内检验是种子形成后的把关,只有二者的有机结合并严格按照检验标准和规程操作,才能从源头上把住种子质量关,确保进入流通领域的种子质量。

(上接 62 页)剂进行材料的预处理或预培养,可大大减轻酚类物质的毒害。这些抗氧化剂包括:有机酸、蛋白质水解产物,氨基酸,二氨基二硫化甲酸钠,亚硫氢酸钠,氰化钾,二硫苏糖醇多氨等。在倒挂金钟茎尖培养中加入 0.01% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对褐变有抑制作用,而用 0.7% PVP、 $0.28 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸、双氧水(5%)一起加入到 $0.58 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液中震荡 45min,对褐变有明显抑制作用。而在卡特利亚兰茎尖培养中,将 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰化钾、抗坏血酸、半胱氨酸和硫脲加入到液体培养基中,对多酚氧化酶的活性有明显的抑制作用。在静止的液体培养基中加入抗氧化剂比在固体培养基中加入的效果要明显得多。

3.3 加活性炭

0.1%~0.5% 活性炭对吸附酚类氧化物效果明显(王敬驹等,1983),在许多热带树木的组织培养中均曾观察到活性炭防止外植体褐变的明显效果。

3.4 缩短转瓶周期

对于易褐变的材料进行连续转移可以减轻酚类物质对培养物的毒害作用。在无刺黑莓的茎尖培养中,接种后 1~2 d 就转入新鲜培养基;在山月桂树的茎尖培养中,接种 12~24 h 便转入液体培养基,然后继续每天转移 1 次,连续 7 d,褐化便得到了完全控制。在山月桂树的茎尖培养中,接种后 12~24 h,便转入液体培养基中,在此之后的一周内,每天转一次瓶,外植体褐变可得到完全控制。

总而言之,在植物组织培养中,褐变是个常见的棘手的问题,虽然不可避免,但我们可以在培养的各个环节加以控制,使之减轻,大大提高组织培养成功率。

参考文献

- [1] 高国训.植物组织培养中的褐变问题.植物生理学通报,1999,35(60):501~506
- [2] 周俊辉等.园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展.园艺学报,2000(27)(增刊):481~486
- [3] 刘用生等.植物组织培养中活性炭的使用.植物生理学通讯,1994,30(3):214~217