植物组织培养中褐变现象的研究

马莉贞 (青海大学农牧学院, 青海西宁 810003)

摘要 阐述了植物组织培养中褐变现象的原理及影响褐变的因素, 提出了防止褐变的措施和方法。

关键词 组织培养; 褐变

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)15-3583-02

Research on Browning in Plant Tissue Culture

MA Li-zhen (Faculty of Agriculture and Animal Science, Qinghai University, Xining, Qinghai 810003)

Abstract The principle of explant browning was stated in this paper, and the factors causing browning and the methods to overcome browning in plant tissue culture were put forward.

Key words Tissue culture; Browning

褐变是指外植体在培养过程中, 自身组织从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褐变而死亡的现象。

1 褐变的原理

褐变的发生与外植体组织中所含的酚类化合物多少和多酚氧化酶活性有关。很多植物, 特别是木本植物都含有较高的酚类化合物, 这些酚类化合物在完整的组织和细胞中与多酚氧化酶(PPO)分隔存在, 因而比较稳定。在建立外植体时, 切口附近的细胞受到伤害, 其分隔效应被打破, 酚类化合物外溢。在溢出过程中与多酚类氧化酶接触, 在 PPO 的催化下迅速氧化成褐色的醌类物质和水, 醌类又会在酪氨酸酶等的作用下, 与外植体组织中的蛋白质发生聚合, 进一步引起其他酶系统失活, 从而导致组织代谢活动紊乱, 生长停滞, 最终衰老死亡^[1-3]。

通过研究^[4]发现, 苍溪梨、金花梨外植体 PPO 活性、总酚含量与组培褐变率存在一定关系, 其组培褐变率的高低取决于 PPO 活性和总酚含量 2 种因素。但也有研究^[5,6]发现, 总酚含量高、PPO 活性高, 褐变率并不高。如总酚含量高和 PPO 活性高的苹果枣其褐变指数并不高, 而 PPO 含量很低的阿月浑子的褐变指数则远高于苹果枣, 可能正是由于易褐变的阿月浑子材料本身的区域化分布被打破所致。褐变指数高低与总酚含量以及 PPO 活性之间的关系因品种而异, 有些品种与 PPO 活性有关, 有些则与总酚含量密切相关, 而有些则与两者均有关。

2 影响褐变的因素

2.1 植物材料 木本植物, 单宁含量或色素含量高的植物容易发生褐变^[7]。因为酚类的糖苷化合物是木质素、单宁或色素合成前体, 酚类化合物含量高, 木质素单宁或色素形成就多, 而酚类化合物含量高将导致褐变的发生, 因此, 木本植物一般比草本植物容易发生褐变。

幼龄材料一般比成龄材料褐变轻, 可能与幼龄材料中酚类化合物含量少有关。

2.2 取材部位及时期 用油棕幼嫩器官或组织, 如胚等外植体进行培养, 褐变较轻, 而用高度分化的叶片作外植体, 接种后则很容易褐变^[8]。对濒危植物翅果油树的组织褐变研

究也表明^[9], 幼龄的茎段是诱导愈伤组织的最佳材料。

植物体内酚类化合物含量和 PPO 活性呈季节性变化, 植物在生长季节都含有较多的酚类化合物。PPO 活性和酶类含量基本是对应的, 春秋季节较弱, 随着生长季节的到来, 酶活性逐渐增强。所以, 一般都选在早春和秋季取材^[1,8]。

2.3 培养基

2.3.1 无机盐。在初代培养时, 降低盐浓度可以减少酚类物质外溢, 从而减轻褐变。如将 DKW 培养基的无机盐浓度减少 1/2^[10], 核桃外植体的褐变率就由 55.8% 降至 32.5%。无机盐中有些离子, 如 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 是参与酚类合成与氧化酶类的组成成分或辅因子, 因此盐浓度过高会增加这些酶的活性, 酶进一步促进酚类合成与氧化^[6]。

2.3.2 植物生长调节剂。激素浓度也会改变组培材料的褐变程度。在柿树的组培中^[11], 用改良的 MS 培养基(ZT 9.13 $\mu\text{mol/L}$, IAA 0.57 $\mu\text{mol/L}$)能促进外植体的生长与分化, 减轻外植体的褐变程度。细胞分裂素有刺激 PPO 活性提高的作用。在桑树培养过程中, BA 的使用浓度低, 褐化轻, 随 BA 浓度的提高, 其褐化率升高^[7]。另外, 在薄壳核桃的茎尖培养中也发现^[12], 随着培养基中 6-BA 浓度的升高, 褐化率随之增高, 褐化反应时间也提早。

2.3.3 抗氧化剂。加入抗氧化剂可改变外植体周围氧化还原电势, 从而抑制酚类氧化, 减轻褐变^[13,14]。如在辣椒^[15]中加入 Vc 可明显减轻褐变程度, 但不能长期用于继代培养。在用不同褐变抑制剂对梨 PPO 活性抑制研究中发现^[16], L-半胱氨酸(L-Cys)、抗坏血酸(Vc)、 NaHSO_3 对梨翠冠 PPO 活性抑制效果较佳, 而植酸(PA)和 EDTA-2Na 抑制效果较差。

在外植体接种之前, 用抗氧化剂浸泡一定时间, 也能收到一定效果。

2.3.4 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。在蚕豆幼叶离体培养研究中发现^[17], 加 PVP 的培养基中外植体的褐变率明显比加 AC 的低。

活性炭除了有吸附作用外, 在一定程度上还降低了光照强度, 从而减轻褐变。

2.3.5 培养基状态。采用液体培养基可以有效克服外植体褐变^[18,19]。在液体培养基中, 外植体溢出的有毒物质可以很快扩散, 因而对外植体造成的伤害较轻。在半固体培养系统^[20]中, 加入低浓度琼脂, 愈伤组织位于培养基表面, 这种培

作者简介 马莉贞(1974-), 女, 青海西宁人, 讲师, 从事植物学及植物组织培养研究。

收稿日期 2006-05-06

养系统对褐化有毒物起到了很好的扩散作用,减轻了对根发育所造成的毒害,收到了很好的效果。

2.4 其他因素

2.4.1 外植体大小及受伤害程度。为了减轻褐变,在切取外植体时,应尽可能减小其伤口面积,伤口剪切尽可能平整些,接种时各种化学消毒剂对外植体的伤害也会引起褐变。一般来讲,外植体消毒时间越长,消毒效果越好,但褐变也越严重,因而消毒时间应掌握在一定范围内,才能保证外植体存活率较高。

2.4.2 光照。暗处理能控制外植体褐变^[21],是因为在酚类化合物合成和氧化过程中,需要许多酶系统,其中一部分酶系统的活性是受光诱导的。

2.4.3 温度。低温不仅可以抑制褐变^[1,22],还可以抑制酚类化合物的合成,降低 PPO 的活性,减少酚类氧化,从而减轻褐变。

2.4.4 转瓶周期。缩短转瓶周期可减轻褐变。

3 防止褐变的方法

3.1 外植体的选择 不同基因型、不同时期、不同年龄的外植体在培养中褐变的程度不同。所以,应选取褐变程度低的种或品种;选用幼龄材料;最好选用早春和秋季的材料作为外植体。

3.2 适宜的培养基和培养条件 注意培养基的状态、类型、组成,如无机盐浓度、激素浓度等;初期培养可在黑暗或弱光下进行;对外植体进行预处理^[23],如先用流水冲洗,然后进行低温处理。

3.3 在培养基中加入抗氧化剂和吸附剂 在培养基中加入偏亚硫酸钠、抗坏血酸、柠檬酸等抗氧化剂,但应注意添加量。而且不同吸附剂在不同植物上有效程度不同。

3.4 反复转移 在外植体接种后 1~2 d 立即转移到新鲜培养基中,能减轻醌类物质对培养材料的毒害作用,连续转移 5~6 d,可基本解决外植体褐变问题^[1,7,24]。

4 结语

关于组培中的褐变现象学者已经提出了各种假说^[25,26],认为褐变的发生往往是多种因素共同作用的结果。因此,只有深入了解有关机制,找到影响褐变的主导因子和克服褐变的有效方法,才能在实践中防止褐变的发生。

目前,十种植物如番茄、马铃薯、甘薯、菠菜、蚕豆、葡萄、香蕉、茶树等的 PPO 基因已被克隆。此外,利用反义 RNA 技术也成功获得了抗褐变的马铃薯新品系^[27,28]。这将为探索与培育抗褐变的转基因作物开辟新途径。

参考文献

- [1] 程广有. 名优花卉组织培养技术[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2003.
- [2] ROBERT C S, PEDRO E, MERCE S, et al. Evaluation of browning effect on avocado puree[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2001, 1: 261 - 268.
- [3] 吴红梅, 萧慧, 刘刚, 等. 多酚氧化酶的研究进展[J]. *茶业通报*, 2004, 26(2): 62 - 64.
- [4] 晏本菊, 李焕秀. 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. *四川农业大学学报*, 1998, 16(3): 310 - 313.
- [5] 罗晓芳, 田砚亭, 姚洪军. 组织培养过程中 PPO 活性和总酚含量的研究[J]. *北京林业大学学报*, 1999, 21(1): 92 - 95.
- [6] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. *北京林业大学学报*, 1999, 21(3): 78 - 84.
- [7] 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.
- [8] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 456 - 466.
- [9] 闫桂琴, 赵丽宏, 杨利艳. 濒危植物翅果油树愈伤组织诱导中褐变问题的研究[J]. *西北植物学报*, 2004, 24(8): 1 384 - 1 389.
- [10] 刘兰英. '薄壳香' 核桃组织培养中的褐变及防止措施研究[J]. *园艺学报*, 2002, 29(2): 171 - 172.
- [11] 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): 87 - 91.
- [12] 张卫芳, 高疆生, 欧勇慧, 等. 抑制核桃组培中的褐化现象[J]. *落叶果树*, 2003(3): 4 - 7.
- [13] 黄浩, 鲁明波. 红豆杉细胞培养中抗褐变剂的筛选[J]. *华中理工大学学报*, 1999, 4(2): 107 - 108.
- [14] 刘曼西, 于秀芝. 有机酸对马铃薯多酚氧化酶活性的影响[J]. *植物生理学通讯*, 1999, 27(5): 350 - 353.
- [15] 范志强, 杜希华, 蹇兆忠, 等. 辣椒组织培养中褐变问题的研究[J]. *山东农业科学*, 2000(6): 35 - 36.
- [16] 漆巨容, 曾顺德, 张迎君, 等. 几种褐变抑制剂对“翠冠”梨 PPO 活性抑制效果分析[J]. *西南园艺*, 2004, 32(5): 53 - 54.
- [17] 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.
- [18] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 349 - 350.
- [19] 钟红梅, 曹明华. 八宝凤梨的组织培养与快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(3): 202.
- [20] 徐振彪, 傅作申, 原亚萍, 等. 植物组织培养过程中的褐化现象[J]. *国外农业—杂粮作物*, 1997, 1: 55 - 56.
- [21] 鲁旭东. 植物组织培养中褐变的发生与防止[J]. *农业与技术*, 1999, 19(4): 9.
- [22] 熊丽, 吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 83.
- [23] 崔堂兵, 郭勇, 张长远. 植物组织培养中褐变现象的产生机理及克服方法[J]. *广东农业科学*, 2001(3): 16 - 18.
- [24] 王东霞, 李长杰. 如何对抗植物组培的组织褐变[J]. *中国花卉盆景*, 2002, 29(2): 17.
- [25] 孙彩霞, 沈秀英, 刘志刚. 作物抗旱性生理生化机制的研究现状和进展[J]. *杂粮作物*, 2002, 22(5): 285 - 288.
- [26] 寇莉萍, 刘兴华, 李金龙, 等. 富士苹果果肉褐变对保护酶活性和膜质过氧化物的影响[J]. *西北农业学报*, 2004, 13(1): 80 - 83.
- [27] 陈桂信, 潘东明, 赖钟雄, 等. 园艺植物多酚氧化酶的分子生物学研究进展[J]. *江西农业大学学报: 自然科学版*, 2003, 25(1): 107 - 110.
- [28] 吴青, 孙远明. 基因工程技术在食品品质改良中的应用[J]. *生物技术通报*, 2001(5): 13 - 15.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率), 单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时), 则可取各主要词首字母写成缩写, 但需在第一次出现处写出全称, 表及图中则用注解形式在下方注明, 以便读者理解。