

植物组织培养中褐变的产生机理及控制措施

赵苏海, 周 瑾, 李桂祥, 仲秀娟, 王玮玮

(江苏省淮安市农业科学院, 江苏 淮安 223001)

摘要: 阐述了植物组织培养概况及其在农业中的应用和植物组织培养中褐变的产生机理, 提出了植物组织培养中褐变的控制措施。

关键词: 植物; 组织培养; 褐变; 控制措施

中图分类号: Q945.5

文献标识码: A

文章编号: 1008-1631(2007)05-0059-03

Analysis on the Browning of Callous in Tissue Culture and Controlling Measures

ZHAO Su-hai, ZHOU Jin, LI Gui-xiang, ZHONG Xiu-juan, WANG Wei-wei

(Huai'an Academy of Agricultural Sciences, Huai'an 223001, China)

Abstract: The application of tissue culture in agriculture and mechanism of callous browning were described. The controlling measure of callous browning was reported.

Key words: Plant; Tissue culture; Callous browning; Controlling measures

植物组织培养是生物工程的基础和关键环节之一, 在农业生产中发挥着越来越重要的作用。植物组织培养是一项技术性较强的工作, 褐变是植物组织培养工作中经常遇到的难题^[1], 有效控制褐变是植物组织培养成功的关键。

1 植物组织培养概况及其在农业中的应用

1.1 植物组织培养概况

植物组织培养技术既是植物遗传工程的基础和关键技术之一, 也是一种实用性极强的高新技术。20世纪80年代以来, 植物组培技术迅速发展, 已经成为生物工程研究开发的新热点。迄今为止已获得400多种植物的细胞, 不仅可通过细胞的再分化生成完整植株, 而且可以通过细胞培养获得600多种人类所需的各种物质, 植物细胞培养已经建立起专门技术, 形成新的学科体系。

1.2 组培技术在农业中的应用

1.2.1 在植物育种上的应用 植物细胞组织培养已广泛应用于植物育种, 在单倍体育种、胚培养、体细胞杂交、细胞突变体筛选、遗传转化等方面均取得显著成效。采用遗传转化方法, 解决植物育种中用常规杂交方法所不能解决的问题, 并与常规育种方法相结合, 建立高效育种技术体系是目前各国

努力的方向。目前通过这种方法已获得抗虫棉等一批新品种, 并已在生产上大面积推广应用。

1.2.2 在植物脱毒和离体快繁上的应用 植物离体繁殖的突出优点是快速, 而且材料来源单一, 遗传背景均一, 不受季节和地区等限制, 重复性好。目前世界上已建立许多年产百万苗木的组织培养工厂, 成为一个新兴产业, 组培苗市场已国际化。

1.2.3 在次生代谢产物生产上的应用 利用植物细胞组织的大规模培养, 可高效生产各种天然化合物, 如蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱、天然色素及其他活性物质。该领域已引起人们广泛兴趣和重视, 国际上已获得专利100余项。

1.2.4 在植物种质资源保存和交换上的应用 利用植物细胞组织培养进行离体低温或冷冻保存, 可大大节约人力、物力和土地, 还可挽救濒危物种。同时, 离体保存的材料不受各种病虫害侵染、不受季节限制, 利于种质资源的地区间及国际间的交换。目前, 我国在多个地方建立了植物种质资源离体保存设施。

2 褐变的产生机理

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。

2.1 褐变的产生机理

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。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。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,醌类物质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^[2-4]。苍溪梨、金花梨组培褐变率的高低取决于PPO活性和总酚含量^[5];总酚含量高、PPO活性高,褐变率并不高^[5,6]。褐变指数高低与总酚含量及PPO活性间的关系因品种而异。

2.2 褐变的影响因素

2.2.1 植物种类及基因型 组培中不同种植物、同种植物不同类型、不同品种褐变发生的频率、严重程度都存在很大差异。木本植物、单宁或色素含量高的植物易发生褐变,如核桃单宁含量很高,组织培养难度很大,往往会因为褐变而死亡。

2.2.2 与外植体生理状态有关 (1) 褐变随着年龄和组织木质化程度增加而加强。因此,外植体接种时常需剥去鳞片和大叶片,尤其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;(2) 不同生长季节取材的培养成功率亦不同。王续衍等^[8]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,其他季节取材死亡率较重;(3) 外植体大小也会影响褐变程度;(4) 受伤程度大小也影响褐变发生。切取外植体时伤口尽可能平整可减轻褐变发生程度。除机械伤害外,接种时各种化学消毒剂对外植体的伤害也会引起褐变。一般外植体消毒时间越长,消毒效果越好,褐变程度也越严重,因此消毒时间应掌握在一定范围内,才能保证较高的外植体存活率^[9]。

2.2.3 培养基的成分及培养条件 王永清等^[10]对樱花组织在不同培养基中的生长状况比较发现,1/4MS培养基在一定程度上能减轻樱花外植体的褐变。张妙霞等^[11]进行柿树组织培养发现,改良的MS培养基能促进外植体分化,减轻外植体的褐变程度。培养基中加入的生长调节物质不当,也会使外植体产生褐变。张卫芳等^[12]在对1a生薄壳核桃的茎尖培养中发现,随着培养基中6-BA浓度的升高,褐化率随之增高,褐化反应时间提前;较低浓度的6-BA适宜茎尖分化生长,褐化反应慢,部分培养基已无明显褐化现象;添加2,4-D、IAA的组合中,褐化反应稍有推迟。在荔枝的组织培养过程中,培养基中添加1mg/L BA + 0.5mg/L 2,4-D时,愈伤组织较坚硬,增殖缓慢,易产生褐变,而培养基中添加1mg/L BA + 1mg/L 2,4-D时,愈伤组织浅黄疏松,增殖快^[13]。说明,选择适当的培养基及最佳的生长调节物质可有效克服褐变。

培养条件对褐变也有影响。温度过高或光照过强,都可提高PPO的活性,从而加速被培养组织的褐变;CO₂浓度过高也会促使褐变发生^[14]。

2.2.4 培养时间过长 接种后,材料培养时间过长,未及时转移,也会引起材料的褐变甚至死亡。

3 褐变的控制措施

3.1 选择适宜的外植体

选择生长旺盛、分生能力强的植物部位作为外植体材料,在进行组织培养过程中不易产生褐变。取材时还应注意外植体的基因型,选择褐变程度较小的品种作为外植体。

3.2 对外植体进行预处理

将外植体用流水冲洗,然后在50℃左右条件下处理12~24h,消毒后先接种在只含有蔗糖的培养基上5~7d,使组织中的酚类物质部分先渗入培养基。取出外植体,用适当方法清洗,再接种到适合的培养基上,可减轻外植体的褐变。李焕秀等^[15]用6种不同的预处理研究其对苍溪梨外植体褐变和成活的影响,结果发现,低温处理对降低褐变有一定作用;用抗氧化剂或PPO溶液进行预处理也可起到减轻褐变的效果。

3.3 选择适宜的培养基和培养条件

选择适宜的无机盐成分、蔗糖浓度、激素水平、pH值及培养基状态、类型等是十分重要的。初期培养可在黑暗或弱光下进行,因为光照会提高PPO的活性,促进多酚类物质的氧化。另外,还要

注意培养温度不宜过高,保持较低温度(15~20℃)也可降低褐变作用。

3.4 添加褐变抑制剂和吸附剂

培养基中加入抗氧化剂和其他抑制剂可有效减轻外植体在组培过程中的酶促褐变。培养基中加入Vc可有效防止褐变^[16]。黄霞等^[18]发现活性炭与Vc配合使用可有效防止香蕉茎尖培养中外植体的褐变^[17]。此外,蛋白水解产物、氨基酸、2-巯基苯并噻唑等物质都可作为抑制剂防止褐变。活性炭可吸附培养物分泌到培养基中的酚、醌等有害物质,从而有效减轻褐变,但活性炭也吸附培养基中的生长调节物质,从而影响外植体的正常发育。因此,加入活性炭的培养基中应适当改变激素配比,在防止褐变的同时外植体能够正常发育。

3.5 连续转移

外植体接种后1~2d立即转移到新鲜培养基中,可减轻酚类物质对培养物的毒害作用,连续转移五六次可基本解决外植体褐变问题。此法比较经济,简单易行,应是首选克服褐变的方法。

关于组培中的褐变现象各种假说^[19-20]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控制褐变的有效方法,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、甘薯等的PPO基因已被克隆;此外,利用反义RN技术也成功获得了抗褐变的马铃薯新品系^[21-22],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] 陈凯. 植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(5): 1034-1036.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 马莉贞. 植物组织培养中褐变现象的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(15): 3583-3584.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 王续衍, 林泰碧, 徐碧玲. 苹果组织培养研究简报[J]. 西南农业学报, 1988, (1): 30-35.
- [8] 刘庆昌, 吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [10] 王永清, 汤浩茹, 邓群仙. 樱花离体培养芽外植体的建立[J]. 四川农业大学学报, 1997, 15(3): 314-334.
- [11] 张妙霞, 孔祥生, 郭秀璞. 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初探[J]. 落叶果树, 2003, (3): 4-7.
- [13] 王异星. 荔枝细胞培养的初步研究[J]. 暨南大学学报, 1997, 18(5): 84-85.
- [14] 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): 78-83.
- [15] 李焕秀, 乔霓娟. 降低苍溪梨外植体组培褐变途径的研究[J]. 西南农业大学学报, 2000, 23(6): 524-526.
- [16] 宁正祥, 赵谋明. 食品生物化学[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1995. 293-301.
- [17] 黄霞, 黄学林, 高东徽. 防止香蕉茎尖培养中外植体褐变的研究[J]. 广西植物, 1999, 19(1): 78-80.
- [18] 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, 1991, 27(5): 350-353.
- [19] 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.
- [20] 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的影响[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1): 80-83.
- [21] 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.
- [22] 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.

[责任编辑 李布青]