

植物组织培养褐变产生的因素及对策

黄丹莹^{1,2} 江贵波¹

(1.揭阳职业技术学院,广东 揭阳 522000;2.华南农业大学生命科学院,广东 广州 510640)

【摘要】 本文针对植物组织培养中常见的褐变现象,详细地分析了其产生的机理及影响因素,并提出了相应的对策,为科研和生产提供了一定的理论和实践依据。

【关键词】 植物组织培养,褐变,对策

【中图分类号】 Q943.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1003-2673(2006)05-0031-02

目前,在许多植物组织培养过程中,常遇到褐变问题。褐变主要发生在外植体,在植物愈伤组织的继代、悬浮细胞培养以及原生质体的分离与培养中也经常发生。褐变产物不仅使外植体、细胞、培养基等变褐,而且对许多酶有抑制作用,从而影响培养材料的生长与分化,严重时甚至导致死亡。本文探讨植物组织培养中褐变现象的影响因素、机理及防范措施,对我们进行科学研究或工厂生产,包括植物组织的培养,原生质体、悬浮细胞和植物器官的培养都有着十分重要的现实意义。

1 褐变产生的影响因素

影响植物组织培养褐变的因子是复杂的,因植物的种类、基因型、外植体部位及生理状态等不同,褐变的程度也有所不同。

1.1 植物种类及基因型

不同的植物和不同的基因型决定了不同的褐化程度。在组织培养中,品种褐化难易可能是与该品种中多酚类物质含量的多少及多酚氧化酶(PPO)活性的差异有关。

1.2 外植体部位及生理状态

外植体的部位及生理状态不同其褐化程度不同,同时,不同时期和不同年龄的外植体在培养中褐变的程度也不同。

1.3 培养基成分

培养基成分中的无机盐、蔗糖浓度、激素水平等对褐变的程度的影响尤为重要。另外,其pH值也与褐变程度有较大关系。

1.4 培养条件

温度过高或光照过强,均可加速被培养组织的褐变。不利环境条件都能造成细胞的程序化死亡,温度是诱导程序化死亡的主要因素^[1]。

2 褐变产生的机理

2.1 非酶促褐变

非酶促褐变是由于细胞受胁迫或其他不利条件影响所造成的细胞程序化死亡或自然发生的细胞死亡,即坏死形成的褐变现象,并不涉及酚类物质的产生。徐振彪等^[2]将生长正常的愈伤组织转移到含NaCl的培养基中,组织周围尤其是接触培养基部分发生褐变,但培养基中没有看到扩散的褐化物质。当温度升高时继代保存时间过长,也会发生此类现象。但这种褐

变若采取适当措施或者愈伤组织适应了胁迫环境就不再发生了^[3]。

2.2 酶促褐变

目前认为植物组织培养中的褐变主要是由酶促褐变引起的,培养材料变褐主要是由伤口处分泌的酚类化合物引起的^[4]。酶促褐变如同一般的酶促反应,其发生必须具备三个条件,即酶、底物和氧。引起褐变的酶有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶等。从初次培养和继代培养过程中试管苗的褐变程度和PPO的活性来看,表明PPO活性的高低是引起培养材料褐变的关键。引起褐变的酶的底物主要是酚类化合物,按其组成可分成3类:苯基羧酸(包括邻羟基苯酚、儿茶酚、没食子酸、莽草酸等),苯丙烷衍生物(包括绿原酸、肉桂酸、香豆酸、咖啡酸、单宁、木质素等),第三类是黄烷衍生物(包括花青素、黄酮、芸香苷等),但并非所有的酚类物质都是PPO的底物。

在正常发育的植物组织中,底物、氧气、PPO同时存在并不发生褐变,是因为在正常的组织细胞内由于多酚类物质分布在细胞的液泡内,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不能接触。而当细胞膜的结构发生变化和破坏时,则为酶创造了与PPO接触的条件,在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌,进行一系列的脱水、聚合反应,最后形成黑褐色物质,从而引起褐变。

3 防止外植体产生褐变的对策

从理论上讲,酶促褐变可以通过以下三种方法加以抑制:一是除去引起氧化的物质——氧;二是捕捉或减少聚合反应的中间产物;三是抑制有关的酶。实际操作上,下列措施是被认为行之有效的。

3.1 适当外植体的选择

取材时应注意选择褐变程度较小的品种和部位作外植体。成年植株比幼苗褐变程度厉害,夏季材料比冬季及早春和秋季材料的褐变要严重。冬季的芽不易生长,宜选用早春和秋季的材料作为外植体。王异星^[5]用荔枝无菌苗不同组织的诱导试验表明,茎最容易诱导出愈伤组织,培养2周后长出浅黄色的愈伤组织;叶大部分不能产生愈伤组织或诱导出的愈伤组织中度褐变;而根极大部分不产生愈伤组织,诱导出的愈伤组织全部

褐变。

3.2 对外植体的处理

通过对较易褐变的外植体材料的预处理能减轻醌类物质的毒害作用。处理方法如下:外植体经流水冲洗后,在 2-5℃ 的低温下处理 12-24 小时,再用升汞或 70%酒精消毒,然后接种于只含有蔗糖的琼脂培养基中培养 5-7 天,使组织中的酚类物质部分渗入培养基中。取出外植体用 0.1%漂白粉溶液浸泡 10 分钟,再接种到合适的培养基中。若仍有酚类物质渗出,3-5 天后再次转移培养基 2-3 次,当外植体的切口愈合后,酚类物质减少,这样可使外植体褐变减轻或完全被抑制。何琼英等^[6]用抗坏血酸预处理香蕉吸芽外植体,能减轻外植体褐变,从而提高芽丛诱导率。

3.3 适宜的培养基

培养基的成分与褐变程度有关,要考虑所选培养基的状态和类型。

3.3.1 适当的无机盐浓度

张妙霞等^[7]在柿树组织培养防止褐变所进行的试验中,4 种培养基的无机盐以改良 MS(大量元素减半)和 1/2MS 的效果最好,MS 的效果较差,结果证明低浓度的无机盐可促进外植体的生长与分化,减轻外植体褐变的程度。徐振彪^[8]在对玉米幼胚耐 NaCl 愈伤组织的筛选表明,随 NaCl 浓度升高,褐变现象加重。

3.3.2 适当和适量的激素

王异星^[9]在荔枝的组织培养过程中,培养基中添加 1 mg/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。培养基中添加 1mg/L BA+1mg/L 2,4-D 时,愈伤组织浅黄疏松,增殖也快。

3.3.3 培养基的硬度

在一定范围内,琼脂用量大,培养基硬度大,褐变率低^[6],这可能是培养基的硬度影响了酚类物质的扩散速度的缘故。

3.3.4 培养基中水的硬度的影响

硬度低的蒸馏水褐变率低,而使用硬度较高的自来水,褐变严重,甚至会出现褐变死亡^[6]。这可能是配制培养基的水改变了培养基中无机盐的浓度,间接地影响了植物外植体的褐变。

3.3.5 培养基的 pH 值

在水稻体细胞培养中,pH 值为 4.5-5.0 时 MS 液体培养基可保持愈伤组织处于良好的生长状态,其表面呈黄白色,而 pH 值为 5.5-6.0 时,愈伤组织严重褐变^[9]。一般来说,酸性环境(pH 值为 4.5-5.0)不利于褐变过程的发生^[10]。

3.3.6 培养条件

如温度过高或光照过强,光照会提高 PPO 的活性,促进多酚类物质的氧化,从而加速被培养的组织褐变。高浓度 CO₂ 也会促进褐变,其原因是环境中的 CO₂ 向细胞内扩散,细胞内 CO₃²⁻ 增多,CO₃²⁻ 与细胞膜上的 CO₂ 结合,使有效 CO₂²⁻ 减少,导致内膜系统瓦解,酚类物质与 PPO 相互接触,产生褐变^[11]。因此,初期培养要在黑暗或弱光下进行。

3.4 添加褐变抑制剂和吸附剂

褐变抑制剂主要包括抗氧化剂和 PPO 抑制剂。在培养基中加入偏亚硫酸钠、L-半胱氨酸、抗坏血酸、柠檬酸、二硫苏

糖醇等抗氧化剂都可以与氧化产物醌发生作用,使其重新还原为酚^[12]。由于其作用过程均为消耗性的,在实际应用中应注意添加量,其中 L-半胱氨酸和抗坏血酸均对外植体无毒副作用,在生产应用中可不受限制。在水稻细胞的培养基中,添加植酸(PA),可防止褐变,PA 分子中众多的羟基产生抗氧化作用,使生色物质的含量下降或 PA 与 PPO 分子中的 Cu²⁺ 结合,从而降低了其活力。陈学森等^[13]在对植酸在银杏组织培养中应用的研究中也证实了植酸具有抑制多酚氧化酶活性的作用。

常用的吸附剂有活性炭和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。活性炭是一种吸附性较强的无机吸附剂,能吸附培养基中的有害物质,包括琼脂中的杂质、培养物在培养过程中分泌的酚、醌类物质以及蔗糖在高压消毒时产生的 5-羟甲基糠醛等,从而有利于培养物的生长。粉末状的活性炭与颗粒状的活性炭相比吸附性更强,一般在培养基中加入 1-4g/L 的活性炭。在使用过程中应注意,尽量用最低浓度的活性炭来对抗褐变的产生,因为活性炭的吸附作用是没有选择性的,在吸附物质的同时,也会吸附培养基中的其他成分,对外植体的诱导分化会产生一定的负面影响^[14]。而聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是酚类物质的专一性吸附剂,在生化制备中常用作酚类物质和细胞器的保护剂,可用于防止褐变^[15]。

3.5 进行细胞筛选和多次转移

在组织培养过程中,经常进行细胞筛选,可以剔除易褐变的细胞。在外植体接种 1-2 天后应立即转移到新鲜培养基中,能减轻酚类物质对培养物的毒害作用,降低抑制作用,使外植体尽快分生,连续转移 5-6 次,可基本解决外植体的褐变问题。

参考文献

- [1] 符近.三种不同类型种子休眠萌发及马占相思种子老化过程的研究.北京农业大学硕士研究生论文,1996.
- [2] 徐振彪等.植物组织培养过程中的褐化现象.国外农学——杂粮作物,1997(1):55~56.
- [3] 傅作中.玉米耐 NaCl 幼胚愈伤组织的筛选及特性分析.长春农业大学硕士论文,1996.
- [4] 颜昌敏编著.植物组织培养手册,上海科学技术出版社,1990.
- [5] 王异星.荔枝细胞培养的初步研究.暨南大学学报,1997,18(5):84~85.
- [6] 何琼英等.抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体褐变的研究初报.华南农业大学学报,1995,16(3):79~82.
- [7] 张妙霞.柿树组织培养防止外植体褐变的研究.河南农业大学学报,1999,33(1):87~91.
- [8] 金坚敏.水稻幼穗和成熟种子诱导胚状体时的有关因子探讨.植物学通报,1992,9(2):53~54.
- [9] 金坚敏.水稻幼穗和成熟种子诱导胚状体时的有关因子探讨.植物学通报,1992.
- [10] 王东霞等.如何对抗植物组织中的组织褐变.中国花卉盆景,2002,12:29~30.
- [11] 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.北京林业大学学报,1999,21(3):78~83.
- [12] 蔡金星等.不同品种梨多酚氧化酶特性及其抑制剂的研究.河北农业技术师范学院学报,1999,13(1):55~57.
- [13] 陈学森,张艳敏等.植酸在银杏组织培养中应用的研究.天然产物研究与开发,1997,9(2):24~27.
- [14] 刘用生.植物组织培养中活性炭的使用.植物生理学通讯,1994,30(3):214.