

牡丹组织培养中褐变的研究进展

高昌勇

(菏泽学院生命科学系 山东 菏泽 274015)

摘要:介绍了牡丹组织培养中褐变产生机理,综述了牡丹组织培养中影响褐变产生的因素,防止褐变的措施等研究现状,归纳了减轻褐变的方法。

关键词:牡丹;组织培养;褐变

中图分类号:S 685.11; S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2008)03—0079—03

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)属芍药科芍药属宿根木本花卉,是我国特产的传统名花,不仅具有很高的观赏价值,还有较高的药用价值,深受人们的喜爱。然而传统的繁殖方法,如种子繁殖、分株繁殖、压条繁殖和嫁接繁殖等已无法满足近年来日益增长的观赏需求。采用组织培养是解决这一矛盾行之有效的方法。牡丹基因组杂合程度高,常规杂交育种培育新品种需要很长时间,效果往往并不理想。通过现代分子生物学技术如基因工程、遗传转化等方法可定向改良某一形状,培育新品种。而这些技术的应用都离不开高效的再生体系。但由于牡丹为木本植物,次生代谢旺盛,组织培养过程中褐化现象严重,80%以上的茎尖都会产生褐色物质^[1],褐色物质可能酚类化合物在多酚氧化酶作用下发生氧化作用形成醌类物质所致。这类褐色物质在培养基中不断扩散,抑制其它酶的活性,毒害培养材料^[2],甚至死亡^[3-5],严重影响种苗的成活率,降低了牡丹种苗的扩繁效率^[6-7]。虽然很多研究者进行了牡丹组织培养的研究和探索,但迄今为止获得完整组培苗的报道极少,其中一个十分重要的因素是外植体的严重褐变现象制约了组织细胞的进一步分化^[8]。现就近年来牡丹组织培养中褐变的研究现状和进展进行综合评述,以期为牡丹研究者提供一些参考。

1 植物组织培养中褐变产生的原因

褐变包括酶促褐变和非酶促褐变。植物组织培养中的褐变主要是酶促褐变,引起褐变的酶有多酚氧化酶、过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶,酶促褐变现象的产生主要是由于PPO(多酚氧化酶)作用于天然底物酚类物质而引起的。多酚氧化酶被激活,使细胞中的代谢发生变化,酚类物质被氧化后产生醌类物质(这类物质为棕褐色),从而毒害自身的现象。酶促褐变的产生必须具

备3个条件:酶、底物和氧。在正常的植物组织中,酶分布在各种质体和细胞质内,底物(酚类物质)分布在细胞的液泡内,酶与底物不能相遇,因此不会发生褐变;但当细胞膜结构发生变化或遇到人为破坏时,则为酶和底物创造了相互接触、结合反应的条件,在氧的存在下,褐变现象产生。

2 影响褐化的因素

2.1 品种

牡丹的不同品种在组织培养中褐化程度不同^[9],安佰义^[10]等研究表明牡丹不同花型间叶片总酚含量和PPO活性水平随着花型演化程度的加大而增加。叶片总酚含量高的花型PPO活性水平也相对较高,在组织培养中发生褐变的可能性就越大。花色差异与牡丹叶片总酚含量和PPO活性有一定关系。由于酚类物质含量和PPO活性水平上的差异,所以有些牡丹品种组织培养难于成功,有些则容易成功。李丽霞等^[11]在牡丹“荷包紫”和“大胡红”诱导愈伤组织时发现,在相同的培养基中二者的褐化率差别明显。

2.2 外植体的种类和生理状态

在组织培养中,胚培养较少褐变,而叶片等高度分化的组织容易褐变^[12]。在牡丹组织培养中也有类似结果,胚培养中出现褐变的报道较少。从组织培养外植体的取材来看,选取幼嫩器官有利于组织的分化,但牡丹幼叶较高的总酚含量和较高的PPO活性水平容易诱发褐变^[10]。陈怡平等^[13]研究表明,由于叶片组织的分化程度较高,叶柄和顶芽组织分化程度较低,而土芽的组织分化程度最低,最容易脱分化产生愈伤组织,褐化情况也最轻。何松林等^[14]研究表明不同的取材季节对牡丹褐化也有较大的影响,褐变程度随着材料年龄和组织木质化程度的增加而增加,对母株进行遮光处理可以减轻其组织的木质化程度,因此也相应减缓了牡丹褐化现象的发生。

2.3 培养基

培养基成分会影响牡丹组织培养的褐变程度。何

作者简介:高昌勇(1976-),男,山西汾阳人,讲师,硕士,主要从事生物技术研究与应用。

收稿日期:2007-09-21

松林等^[14]以牡丹叶柄作为外植体诱导愈伤组织时,随着基本培养基中无机盐离子浓度的降低,褐化现象减轻,其中以 WPM 培养基为最好,1/2 MS 次之,MS 最差。但李萍等^[9]研究发现牡丹组织在 WPM 培养基褐化情况较改良 MS (Ca^{2+} 加倍)培养基严重。这可能是不同牡丹品种所适合的培养基不同的缘故。

2.4 培养条件及其它因素

光能促进多种植物组织培养中酚的氧化^[15-19],因此将培养物在低光照或置于暗光中培养一段时间能减轻褐变^[17-18]。温度过高使 PPO 的活性提高,从而加速培养的组织褐变^[9]。有研究认为^[20] PPO 的最适温度为 28℃,pH 为 6.2 当 pH 为 3.0 时,其活性仅为前者的 15%,pH 为 8.6 时,几乎没有活性。

培养基硬度对褐变也有影响,接种或继代后培养时间过长,未及时转移,也会引起材料的褐变,甚至导致全部死亡,这在培养过程中是经常可见的。

3 减少褐化的措施

在牡丹组织培养工作中,为了防止褐变的发生和减轻褐变的危害,针对褐变现象发生的原因,目前主要有以下几种防止措施。

3.1 选择适当的外植体和适当的培养条件

在冬春季取牡丹幼嫩的材料作外植体,因为冬春季多酚氧化酶的活性较弱,随着生长季节的到来,酶活性逐渐增强;幼龄材料中酚类化合物的含量少,褐变轻。防褐变另一有效的措施是对母株遮光,母株遮光处理的外植体在培养基褐化率较自然光下外植体的低,褐化程度也较轻。在最适宜的培养条件下,外植体处于旺盛的生长状态,有较强的分生能力,便可大大减轻褐化。对于易发生褐变的品种在初始培养时把植物的外植体处于不适合酚类合成的条件下,如在低温、黑暗或弱光中培养,可抑制褐变的发生^[14]。

3.2 培养基中加入防褐剂

防褐剂根据其作用原理可分为防止酚氧化的抗氧化剂和吸收酚类物质的吸收剂。其中防止酚氧化的抗氧化剂一类是酚氧化酶抑制剂,如抗坏血酸(VC)^[21]将该酶的 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ ; EDTA 可以把 Cu^{2+} 从酶中整合出来抑制酶的活性,但 EDTA 同时也螯合了部分 Ca^{2+} , Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等离子,使其他酶的活性受到一定影响^[22]。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、二乙基二硫代氨基甲酸钠等^[23]。常用的吸收剂有 PVP 和活性炭(AC)等,其中 PVP 效果好于 AC^[24],因为 AC 除能吸附多酚氧化物外,还能吸附培养基中的营养成分,会使外植体由于得不到应有的养分而逐渐衰竭,变褐乃至死亡。在牡丹研究中使用 PVP 的效果要好于 AC, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 最差,且当 PVP 浓度大于 500 mg/kg 时褐化率为 0^[4]。另外在静止的液体培养基中

加入防褐剂的效果比在固体培养基中加入要明显得多。

3.3 连续转移外植体

对于易褐变的材料,可在接种后 1~2 d,将外植体很快转移到新鲜培养基上,这样可以减轻因褐变产生的醌类物质对培养物的毒害作用,连续转接 2~4 次后,这段时间内外植体的切口愈合,外渗停止,可以缓解褐化。但此法耗费大量人力、物力,因此在大规模生产组培苗中难以开展。

3.4 其它措施

在培养初始采用液体培养基可有效克服外植体褐变,液体培养基再加上滤纸做成的纸桥,效果更好,因为在液体培养基中,外植体溢出的有毒物质可以很快扩散,从而减轻对外植体的伤害。另外应尽量减少对外植体的伤害,表面消毒时,酒精消毒效果很好,但对外植体伤害很重,升汞对外植体伤害比较轻;外植体消毒时间越长,消毒效果越好,但褐变也越严重,因此要选用合适的表面消毒剂和适当的消毒时间。

4 小结

在牡丹组织培养中引起褐变的因素是多方面的,但主要为:一是外植体本身,包括外植体的遗传特性、外植体的生理、生长状态等;二是外植体的培养环境,包括培养基的成分及培养条件的影响。抑制褐变的措施也是针对引起褐变的不同的原因着手,主要包括抑制多酚氧化酶活性,降低总酚含量和根据不同外植体选择不同的培养条件。

参考文献

- [1] 李嘉钰. 中国牡丹与芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [2] 曹汝义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1999.
- [3] 张桂花. 牡丹繁殖技术[J]. 山东农业科学, 2001(5): 16-18.
- [4] 孔祥生, 张妙霞. 牡丹离体快繁技术研究[J]. 北方园艺, 1998, 120(3): 87-89.
- [5] 黄守印. 牡丹胚培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1987(2): 54.
- [6] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生物学通报, 1999, 35(6): 501-506.
- [7] 陈秀芳, 王坤范. 桃果实发育中褐变因子变化规律的研究[J]. 园艺学报, 1995, 22(3): 230-234.
- [8] 高志民, 王雁, 王莲英. 牡丹、芍药繁殖与育种研究现状[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 75-79.
- [9] 李萍, 成仿云, 何桂梅. 牡丹组织培养的初步研究[M]. 园艺学进展第6辑. 西安: 陕西科技出版社, 2004: 626-630.
- [10] 安佰义, 赵飞. 牡丹不同类型总酚含量与 PPO 活性研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2005, 6(2): 169-172.
- [11] 李丽霞, 曲复宁, 由翠琴等. 应用正交设计方法筛选牡丹(*Paeonia suffruticosa*)愈伤诱导培养基的研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2005, 18(1): 41-44.
- [12] 陈正华. 木本植物组织培养[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [13] 陈怡平, 丁兰, 赵敏桂. 用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织的研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2001, 37(3): 66-69.
- [14] 何松林, 陈笑蕾, 陈莉, 等. 牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J]. 河南科学, 2005, 26(1): 47-50.

日光温室串番茄长季节栽培技术

胡志峰

(甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 甘肃省中部沿黄灌区及河西走廊冬季光热资源丰富, 年日照时数约 3 000 h, 日照率 70% 左右, 是日光温室设施栽培的最佳地区之一。串番茄(truss tomato), 又名穗番茄(cluster tomato), 是一种整串收获上市的番茄新品种, 其特点是持续结果能力强、果肉硬、货架期长、果形好、色泽艳丽、整串采收。日光温室串番茄长季节栽培经济效益好但难度较大, 经在河西走廊的武威市等地 3 a 多点试验, 自 12 月上旬采收上市直到来年 5 月拉秧, 其产量高、经济效益显著, 深受种植者欢迎。

关键词: 日光温室; 串番茄; 长季节; 栽培技术

中图分类号: S 641.226.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2008)03-0081-02

1 品种选择

通过对多个品种的对比选择, 由沈阳农业大学育成的串番茄一代杂种“ST04”表现较好。该品种无限生长型, 生长势中等, 承果能力强, 果穗呈鱼骨状成串排列, 每穗 5~6 个果, 果实大小、形状和颜色整齐一致, 果实深红色有光泽, 扁圆形, 果肉硬, 单果质量 180 g 左右, 抗病性强, 耐低温弱光, 抗裂果, 耐贮运, 货架寿命长。

2 棚型及棚膜的选择

番茄喜温喜光, 要求栽培温室采光好, 早晨升温快, 保温能力达 22℃ 以上, 室内最低温度不低于 10℃。因此要选用采光及保温效果较好的西北型节能日光温室, 一般墙厚 1.2 m 以上, 跨度 7.0 m 左右, 脊高 3.6~4.0 m, 后屋面仰角 38° 以上、厚度 1 m, 采光屋面为半拱圆形, 采光屋面前设置防寒沟。棚膜宜选用高保温醋酸乙烯膜或聚乙烯膜。

3 育苗

育苗时间为 8 月上中旬, 9 月下旬定植, 苗龄 40 d 左右。播种前用 100 g/kg 的磷酸三钠浸种 20 min 进行种子消毒, 然后将种子用清水反复清洗, 消毒后进行催芽, 至种子露白时播种。苗床选取土质疏松, 肥沃, 排水良好的地块。苗床宽 1 m, 东西延长, 长 5~6 m 左右, 床埂高 10 cm, 床内耙平踩实, 铺 3 cm 厚营养土。营养土由 50%~60% 优质有机肥, 40%~50% 疏松园土过筛后掺匀。播种时于苗床内浇透底水, 待水渗下后将催好芽的种子均匀撒于床面上, 然后覆盖 1 cm 厚的营养土。覆土后用 50% 的多菌灵 8~10 g/m² 拌营养土均匀撒于床面消毒, 防止猝倒病的发生。播种后及时用旧棚膜加灰色遮阳网覆盖以遮光、降温、保湿。出苗时白天 28~30℃, 夜间 24℃。出苗后及时降低温度, 白天 20~24℃, 夜间 10~15℃, 适时通风见光, 防止徒长, 保证秧苗健壮。番茄苗期灌溉土壤水分以下限 60%、上限 90% 为佳。定植前 1 周撤去覆盖物, 进行练苗, 严格控制浇水, 温度控制在白天 22~26℃, 夜间 10~15℃, 但如遇强光高温仍需用遮阳网覆盖。

作者简介: 胡志峰(1974), 男, 助理研究员, 从事番茄育种及栽培研究。E-mail: huzf@gsagr.ac.cn.
收稿日期: 2008-01-08

[13] 张兴国, 陈劲枫, 张盛林等. 魔芋原生质体分离和培养条件研究[J]. 西南农业大学学报, 1992, 14(1): 42-44.
[14] 崔堂兵, 郭勇, 张长远. 植物组织培养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.
[15] 许传俊, 李玲. 几种培养基及光照对蝴蝶兰叶片外植体褐变的影响[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(1): 9-12.
[16] 贝奇 YPs 著. 林木和果树生物技术[M]. 张培果译. 北京: 中国林业出版社, 1991: 179, 283-284, 36.
[17] 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.
[18] 仲飞. 红星苹果多酚氧化酶某些特性及其抑制剂的研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 186.
[19] 丁连忠. 抗坏血酸衍生物抑制蘑菇的多酚氧化酶[J]. 食品科学, 1991, 67(2): 22-25.
[20] 夏铭, 吴绛云, 张丽梅. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究[J]. 生物技术, 1996, 6(3): 18-20.
[21] 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): 339-345.
[22] 夏小环, 王静, 尹梅. 非洲菊叶外植体组培中影响褐化因素及机理初探[J]. 西南农业学报, 2006, 19(1): 136-138.