

植物组织培养的防褐化探讨

陈菲, 李黎, 官伟

(黑龙江省科学院自然资源研究所, 哈尔滨 150040)

中图分类号: S603.6 文献标识码: B
文章编号: 1001-0009(2005)02-0069-01

褐化是指在植物组织培养过程中, 由培养材料向培养基中释放褐色物质, 以致培养基逐渐变成褐色, 培养材料也随之进一步变褐而死亡的现象。由于组织中多酚氧化酶被激活, 使细胞中的代谢发生变化, 酚类化合物被氧化后产生醌类化合物, 这类物质是棕色的, 它们会逐步扩散到培养基中, 抑制其它酶的活性, 毒害整个外植体组织, 导致组织代谢紊乱, 生长受阻, 最终逐渐死亡。褐化在植物组织培养过程中普遍存在, 对诱导外植体的脱分化和再分化产生重大影响, 以至对一些植物的组织培养能否取得成功起到决定性的作用。

1 影响外植体褐化的原因

1.1 基因型

不同种植物、同种植物的不同类型、不同品种在组织培养中褐化发生的频率、严重程度都存在很大差异。这是因为各种植物所含的单宁及其它酚类化合物的数量不同。一般木本植物的酚类化合物含量比草本植物高, 因此进行组织培养时, 木本植物更容易发生褐化。以蝴蝶兰为例: 初代培养时外植体从启动到形成原球茎的时间较长, 生长缓慢, 极易产生褐化夭折; 继代增殖中, 原球茎也易发生褐化死亡。

1.2 材料的年龄和大小

一般来说, 褐化随材料的年龄和组织木质化的程度而增加。外植体的老化程度越高, 其木质素的含量也越高, 也越易产生褐化, 成龄材料一般均比幼龄材料褐化严重。

外植体大小对褐化的影响, 表现为小的材料更容易发生褐化, 相对较大的材料则褐化的程度较轻。另外切口越大, 酚类物质的被氧化面也越大, 褐化程度就会更严重。

1.3 取材时间和部位

由于植物体内酚类化合物含量和多酚氧化酶的活性在不同的生长季节并不相同, 一般在生长季节含有较多的酚类化合物。有人在苹果、核桃上试验证明, 冬春季取材褐化死亡率最低, 夏季时取材容易被氧化褐化。在取材部位上存在幼嫩茎尖较其它部位褐化程度低的现象, 木质化程度高的节段在进行药剂消毒处理后褐化现象更严重。

1.4 光照

在采集外植体之前, 如果将取材母株进行遮光处理, 然后再切取外植体, 能够有效地抑制褐化的发生。初代培养时, 将接种的材料在黑暗条件下培养, 对抑制褐化发生也有一定效果。暗处理之所以能控制外植体褐化, 是因为与褐化有关的酶在黑暗条件下减少, 从而使褐化得到控制。

1.5 温度

温度对褐化影响很大, Ishii 等发现卡特兰在 15℃~25℃培养比在 25℃以上褐化轻。王明华等在褐化严重的苹果品种上验证了低温抑制褐化的作用。Hildebrandt 和 Harney 在培养天竺葵茎尖过程中, 不仅发现在 7℃下培养的茎尖比 17℃和 27℃褐化轻, 而且还证明高温能促进酚类氧化, 而低

温可以抑制酚类化合物的合成, 降低多酚氧化酶的活性, 减少酚类氧化, 从而减轻褐化。

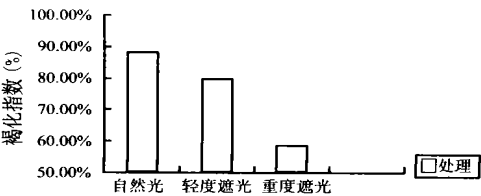
1.6 培养基成分的影响

过高的无机盐浓度会引起某些植物外植体中酚类物质的氧化。生长调节物质使用不当培养材料容易褐化, 细胞分裂素有刺激多酚氧化酶活性提高的作用, 液体培养基可有效克服外植体褐化。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危害较轻。

2 减少褐化的措施

2.1 母株和外植体的处理

对母株进行遮光处理, 可以减轻一些品种的褐化程度, 以月季为例: 2004 年 9 月接种两种遮光处理和自然光照条件下的月季外植体, 在初代培养结束时进行褐化情况的调查, 其褐化百分数如图所示。重度遮光处理下褐化的百分比最低, 在初代结束时为 58.2%, 而自然光照和轻度遮光处理下, 褐化百分比分别为 88.3%和 79.6%。由此说明, 对母株预先进行遮光处理可以减轻褐化, 有利于初代培养物的萌发。



不同光照强度对月季初代培养物褐化指数的影响图

2.2 在培养基中加入抗氧化剂, 或用抗氧化剂进行材料的预处理或预培养, 可预防酚类物质的形成

抗氧化剂包括抗坏血酸、硫代硫酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、血清白蛋白、柠檬酸等。用抗氧化剂溶液(由浓度为 0.05%~0.5%的柠檬酸和抗坏血酸混合而成)处理外植体可以减轻褐化程度。

2.3 在培养基中加入吸附剂、活性炭对吸附酚类氧化物的效果也很明显

以蝴蝶兰为例: 在初代培养基中加入 1 g/L~2 g/L(克/升)活性炭, 能有效降低外植体的褐化率(见表 1)。基本培养基为 MS, 加入活性炭的量为 2 g/L(克/升), 每瓶接入 1 个蝴蝶兰花梗侧芽, 培养 15 d(天)后统计变色部分直径大小。加入活性炭后, 能推迟培养物始现渗出物的时间, 培养基变色部分的直径也变小, 最终降低了外植体的褐化率。

表 1 活性炭对蝴蝶兰花梗侧芽褐化的影响

	始现渗出物 时间(d)	变色部分 直径(cm)	褐化死亡数 接种总数	褐化率 (%)
加入活性炭组	15	0.7	4/15	26.6
对照组	7	1.2	11/15	73.3

表 2 更换新鲜培养基对蝴蝶兰花梗侧芽褐化率的影响

	供试外植体数 (个)	褐化外植体数 (个)	褐化率
更换培养基组	18	7	38.8
对照组	18	14	77.7

2.4 对于褐化材料注意改善培养条件, 加快继代转瓶的速度, 及时更换新鲜培养基, 可以减轻酚类物质对培养材料的毒害作用

仍以蝴蝶兰为例: 为了避免褐化物质积累在培养基中, 将培养物的褐化部分切除, 接种在新的培养基上, 经过 15 d(天)左右再更换一次新培养基, 结果表明, 褐化率明显降低(见表 2)。

收稿日期: 2004-12-22