

果树组织培养中褐变现象及其抑制研究进展

邹英宁, 吴强盛 (长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

[摘要] 从果树基因型、外植体的生理状态、外植体的大小和种类、培养基成分、抗氧化剂、培养条件等影响果树组织培养褐变发生的因子, 以及减少褐变的有关措施等方面进行了综述。

[关键词] 褐化; 抗褐化; 果树; 组织培养

[中图分类号] Q813.1+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-1409(2007)03-S047-04

在果树尤其是木本果树的组织培养中, 易出现外植体或培养物的褐化、枯死现象, 这种褐化现象又称为酚污染^[1], 对外植体的脱分化和营养物质的再分化产生严重的影响, 甚至对某些果树组织培养能否成功起决定作用。在果树组织培养中, 有的外植体褐变非常严重, 接种 24 h 后就开始变褐^[2,3], 导致外植体死亡, 难以建立无性繁殖体系, 限制了其组培快繁及遗传转化的进行。为此, 笔者就近年来果树组织培养中影响褐化的因子及防止褐化措施的研究进展作一综述。

1 褐变产生原因

组织培养中的褐变是指外植体在诱导分化或再分化的过程中自身组织从表面向培养基释放褐色有毒物质, 使培养基逐渐变成褐色, 以至于外植体也随之变褐死亡的现象。褐变在组织培养过程中普遍存在^[4]。褐变包括酶促褐变和非酶促褐变。目前认为植物组织培养中的褐变主要是由酶促引起。酶促褐变必须具备酶、底物和氧 3 个条件。引起褐变的酶主要有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)等, 起主导作用的是 PPO。引起褐变的酶的底物主要是酚类化合物。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, 这是因为在正常的植物细胞内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内, 这种区域性分布使底物和 PPO 不能接触。只有当细胞的结构发生变化和破坏时, 创造了酶与 PPO 接触的条件, 在氧存在的条件下, 细胞中的酚类物质和氧气在 PPO 的酶促下发生氧化反应, 形成大量有毒的醌类物质, 导致一系列的脱水、聚合反应, 最后形成黑褐色物质, 从而引发褐变^[4]。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, 严重时导致死亡。

2 影响褐变的因子

2.1 内因

(1) 果树基因型 不同种果树、同种果树不同类型或不同品种在组织培养中发生褐变的频率、严重程度存在很大差别。木本果树和单宁含量或色素含量高的果树容易发生褐变。据报道, 组织培养中存在严重褐化现象的果树植物有银杏^[5]、桃^[6]、李^[7]、板栗^[8]、无花果^[9]、葡萄^[10]、核桃^[11,12]、柿^[13]、香蕉^[14]、龙眼^[15]等多种果树。

由于酚类物质含量和 PPO 活性上存在差异, 导致有些植物种类组织培养难以成活, 有些则容易成功。如在芭蕉属中的香蕉、大蕉等品种, B 基因多, 茎尖组织中褐变程度越重, 繁殖成功率越低^[16]。

(2) 外植体 材料本身的生理状态不同, 接种后褐变程度也不同, 这可能与自身酚类物质的含量及

PPO 活性有关。一般而言,顶端分生组织接种后褐变轻,已经分化的部位褐变严重。这与分生组织生长速度快、细胞分裂频率高关系密切^[4]。

研究认为,外植体的褐变程度跟切割大小成反比,即外植体越小,切面与体积的比率越大,褐变程度越重;外植体越大,褐变越轻^[17]。此外,外植体的种类也影响褐变,在核桃、欧洲栗等果树上采用胚进行组织培养出现褐变较少,而采用叶片等高度分化的组织则容易褐变^[15]。

2.2 外因

(1)培养基成分 培养基中激素浓度(如 6-BA 或 KT 等细胞分裂素)过高时,容易产生褐变。邹英宁等^[18]通过中国李的“海湾红宝石”组织培养得出:6-BA 在 0.5~1.0 mg/L 时,褐化率较低,仅在 20%左右,诱导率为 60%以上,生长状况也较好。当 KT 浓度在 0.5~1.0 mg/L 时,褐化率略低于 BA,诱导却稍高于 BA,生长状况良好,伸长加快。当 6-BA 2.0 mg/L、KT 2.0 mg/L 时,褐化率均升高,分别为 35%、30%,诱导率明显降低,分别为 33.3%、38.3%,且生长缓慢,茎细而脆弱,呈水浸状,玻璃化现象严重。在培养后期,随着继代次数的增加,在含有 BA 的培养基中,部分丛状芽发生黄化甚至褐变死亡的现象。

培养基中无机盐含量过高,造成毒害,不利于幼茎对养分的吸收,特别是在培养后期,由于培养瓶内水分的损失,导致叶片失绿、黄化变褐而死^[19];WPM 培养基不仅能有效降低褐化率,且外植体长势良好,伸长加快,可能是因为 WPM 培养基专门为木本植物培养设计的。Emershad 等^[20]在中国李幼胚上证实了该结果,但与核果类其他果树研究结果相反^[21,22]。

此外,刘兰英^[12]还发现,将 DKW 培养基的无机盐浓度减少一半,核桃外植体的褐变率由 55.8%降至 32.5%。高浓度的糖、丝氨酸及硼都可以加剧褐变的发生,而氨态氮过高也有类似的结果。

(2)抗氧化剂 维生素 C(Vc)能有效防止褐变,是因为 Vc 为多羟基还原物质,一方面 Vc 可使 PPO 丧失活性,阻止酚类物质的氧化;另一方面,Vc 在酶的催化下能消耗溶解氧,使酚类物质因缺氧而无法氧化,从而减轻褐变的程度^[23]。

有研究表明,聚乙烯吡咯烷酮(PVP)在 2.5~10.0 g/L 时,中国李平均褐变率为 16.5%,认为可能与 PVP 对外植体分泌的有毒物质的强吸附作用有关。而且 PVP 对促进增殖和生长效果并不是很理想,尤其是高浓度的 PVP(10.0 g/L)致使培养物叶片卷曲,生长缓慢,发生畸变^[18]。因为 PVP 具有副作用,可以致使组织培养物坏死^[24]。

在培养基中加入适量的活性炭(AC)和 Vc,不仅能有效防止褐化,还能明显促进增殖和生长^[25]。因为 AC 是一种吸附剂,可吸附在组织培养过程中产生的植物碱、醌、单宁等酚类有毒物质和气体,促进植物的生理活动及分化生长。在培养基中加入 AC 后外植体增殖倍数略低于 Vc,这归结于 AC 的吸附作用是没有选择性的,在吸附有害物质的同时也吸附了一定浓度的生长激素,对外植体的诱导分化产生了一定的负面影响。卜学贤等^[26]研究表明每毫克 AC 大约能吸附 100 μg 左右的生长调节物质。

张启香等^[27]在蝴蝶兰的组织培养中发现柠檬酸(CA)抑制褐化和促进生长的效果明显优于 AC。CA 的作用机理与 Vc 基本一致,主要因为 CA 抑制了多酚氧化酶的活性或增强了醌类化合物还原剂的功能。但果树上还未见使用 CA 作为抗氧化剂的报道。

(3)培养条件 光照能促进多种植物组织培养中酚的氧化,将培养物置于低光照或暗光中培养一段时间能减轻褐变。据孔祥生^[13]报道,核桃组织培养中,一定程度的高温能促进氧化酶的活性,从而引起酚类物质的氧化,在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下褐变率为 52.75%,而在 $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下,褐变率为 29.8%。仲飞^[28]也认为,PPO 的最适温度为 28°C ,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。另外,陈正华^[15]发现,核桃在半固体培养基上不易褐变,而钟红梅^[29]报道凤梨外植体用液体培养基可以减轻褐变。

3 防止褐变的措施

3.1 母株和外植体的预处理

为降低切割对细胞造成的伤害,用于切割的解剖刀必须尽可能的锋利,解剖刀的消毒不能过分灼烧,否则会使刀刃变钝^[30]。有些果树的外植体在 5°C 下进行低温预处理一段时间均有助于减轻褐化,如核

桃、苹果。预培养有助于减轻酚类物质和其他生长抑制物的毒害作用。在20年生的柠檬母本植株上采集的茎芽,需先在液体培养基上培养3 d,然后再在半固体培养基上培养。苹果也采用类似的方法^[15]。

3.2 选择适宜的培养基及培养条件

在最适宜的条件下,外植体处于旺盛的生长状态,有较强的分生能力,便可大大减轻褐变。研究表明,不同基本培养基抑制褐变的效果是不同的。核果类果树 WPM 培养基效果最好,改良 MS 培养基居中,3/4 MS 和 MS 培养基效果较差^[18]。苹果用 1/2 MS 培养基可减轻褐化,在初始培养中把外植体处于不适合酚类合成的条件下,如在黑暗中或弱光下培养,可抑制酚类的氧化。

3.3 加入抗氧化剂

抗氧化剂的防褐效果因植物种类而异。孔祥生等^[13]在柿的组织培养中以及 Jain 等^[31]在欧洲李的组织培养中均观察到外加 PVP 效果最好。在龙眼组织培养中,AC 防褐的效果大大超过 PVP、AC;在核桃的组织培养中则以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的防褐效果最好, V_c 和 AC 的效果最差。AC 能有效抑制樱桃、苹果等组织培养中的褐变现象^[32]。对柿子而言,以 PVP 的效果最好。在有些组织培养研究中将多种防褐剂一起使用,对 PPO 活性有明显的抑制作用^[33]。

3.4 连续转移外植体

对于新接种的外植体,将其很快转移到新鲜培养基上 2~3 次,在某些情况下可以减轻褐化,这段时间外植体的切口愈合,外渗停止。如无花果、核桃等^[11]。

总之,果树在组织培养中褐变现象非常普遍,只有弄清褐变的产生原因,明白褐变的影响因子,才能对症下药,采取适当的防止措施,从而使果树的组织培养顺利进行。

[参考文献]

- [1] Torre A M, Mau-Lastovicka T, Rezzaiyan R. Total phenolics and high performance liquid chromatography of phenolics acids of avocado [J]. Agric Food Chem, 1987, 35: 921~925.
- [2] 丰 锋. 龙眼组织培养褐变抑制研究[J]. 中国南方果树, 2004, 33(6): 49~52.
- [3] 邹英宁, 李国怀, 樊青峰, 等. 不同抗氧化剂对中国李茎段培养的影响[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(1): 84~86.
- [4] 罗丽华. 板栗组织培养及褐变研究[D]. 长沙: 中南林学院, 2004. 9~17.
- [5] 陈学森, 邓秀新, 章文才. 培养基及培养条件对银杏愈伤组织黄酮产量的影响[J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 373~377.
- [6] 贝奇 YPS(张培泉译). 树木和果树生物技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991. 79, 283~362.
- [7] 邹英宁, 李国怀, 樊青峰, 等. 李组织培养研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(4): 76~80.
- [8] Vieitez A M, Ballester A, Vieitez M L, et al. *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut[J]. HortSci, 1983, 58: 457~463.
- [9] 杨增海. 园艺植物组织培养[J]. 北京: 农业出版社, 1987. 64~74.
- [10] Kikkert J R, Hebert S D, Wallace P G, et al. Transgenic plantlets of 'Chancellor' grapevine (*Vitis* sp1) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions[J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 311~316.
- [11] 袁巧平, 董茂山, 黄钦才. 核桃的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(2): 43~44.
- [12] 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.
- [13] 孔祥生, 张益民, 张妙霞. 柿树试管繁殖的研究[J]. 植物学通报, 1992, 9(增刊): 11~12.
- [14] 何琼英, 张东方, 王润华. 抗坏血酸预处理阻止香蕉吸芽外植体褐变的研究初报[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(3): 792~821.
- [15] 陈正华. 木本植物组织培养[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 34~36, 408~419, 456~465, 466~480.
- [16] Hirimburegama K, Demage N, Kshaniki H, et al. Cultivar specificity with respect to *in vitro* micropropagation of *Musa* spp (banana and plantain)[J]. HortSci, 1997, 72: 205~211.
- [17] Bonga J M, Durzan D J(阙国宁, 郭达初, 李金田, 译). 树木组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998. 25, 141~143, 175.
- [18] 邹英宁. "海湾红宝李"离体培养研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006. 36~37.
- [19] 王 然, 戴洪义, 周爱芹, 等. 矮樱桃的茎尖培养与快速繁殖[A]. 张上隆, 陈昆松. 园艺学进展[C]. 北京: 中国农业出版社, 1994. 199~202.
- [20] Emershad R L, Ramming D W. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grow *in vitro*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 37: 55~59.
- [21] 孙清荣, 孙洪雁, 刘 鹏, 等. 杏品种龙王帽茎尖培养试验[J]. 中国果树, 2005, (1): 19~21.
- [22] 孙满芝. 樱桃矮化砧木 SD-13 组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技, 2000, (4): 25~27.
- [23] 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.
- [24] Mulin M. Callus formation from thin cell layers of *Anacardium occidentale* L[J]. Silva Lusitana, 1995, 3: 205~211.
- [25] 韩文璞, 袁明莲. 活性炭在甜樱桃组织培养中的应用[J]. 落叶果树, 2001, (3): 7~8.

- [26]卜学贤,陈维伦. 活性炭对培养基中植物生长调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 401~405.
- [27]张启香,方炎明,张晓平. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 38~40.
- [28]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): 184~186.
- [29]钟红梅,曹明华. 八宝剑凤梨的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(3): 202.
- [30]周俊辉,周家容,曾浩森,等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(增刊): 481~486.
- [31]Jain N, Babbar S B. Regeneration of 'juvenile' plants of black plum, *Syzygium cuminii* Skeels, from nodal exp of mature trees[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 73: 257~263.
- [32]刘用生,李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214.
- [33]Lchihasshi S. Studied on clonal propagation of *Cattleya* tissue method. II. Browning of *Cattleya* [J]. J Jap Soc HortSci, 1977, 46: 325~330.

(上接第 41 页)

(3) 不同品种的种子对预处理的效果存在不同,应在实践中采用不同的预处理^[10]。本试验中去籽后用自来水浸泡种子的预处理是有效的。另外,新收获的李氏禾种子直接发芽试验中发芽率较低,可能与其存在一定程度的生理休眠有关,而直接用生活力四唑测定法则可以快速准确地了解到其潜在的发芽能力。

[参考文献]

- [1]颜启传. 种子检验的原理和技术[M]. 北京:农业出版社, 1992. 29~71.
- [2]Deng H, Ye Z H, Wong M H. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China[J]. Environmental Pollution, 2004, 132: 29~40.
- [3]Nandan K B, Singh C B. Useful macrophytes in Kowar Lake, North bihar, India[J]. Indian Journal of Forestry, 2004, 27: 241~244.
- [4]方 华,陈天富,林建平,等. 李氏禾的水土保持特性及其在新丰江水库消涨带的应用[J]. 热带地理, 2003, (3): 63~66.
- [5]徐是英,唐锡华,傅家瑞,等. 种子生理研究进展[M]. 广州:中山大学出版社, 1986. 57~58.
- [6]宋松泉,程红义,龙春林,等. 种子生物学研究指南[M]. 北京:科学出版社, 2005. 58~61.
- [7]孙 群,王建华,孙宝启. 种子活力的生理和遗传机理研究进展[J]. 中国农业科学, 2007, 40(1): 48~53.
- [8]应叶青,申亚梅,李 浪. 3种阔叶树种子生活力四唑法测定研究[J]. 种子, 2005, 24(1): 32~35.
- [9]盛海平,汪为民,刘华开,等. 水稻种子生活力四唑测定值与发芽率间的相关性[J]. 种子, 2000, (2): 30~31.
- [10]张伟梅,马绍利,倪日群. 不同浸种预处理对杂交稻芽谷种子活力的影响[J]. 种子科技, 2005, (3): 157~158.
- [11]Hampton J G, Martinelli A H, Farrant J M, et al. Seed technology-past present and future[J]. Seed Sci & Technol, 1999, 27: 681~702.
- [12]ISTA Technical Committees. An Introduction to the ISTA Technical Committees[J]. Seed Testing International, 2004, 127: 27~32.