

牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究

张俊琦, 罗晓芳 *

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 在牡丹组织培养过程中, 褐化现象普遍发生, 并影响着牡丹培养物的正常生长与增殖。因此通过改变培养条件、培养方式以及在培养基中添加抑褐剂的方法, 对品种为青龙卧墨池的牡丹组培物褐化的防止进行了研究, 结果表明: 添加生长素会加剧启动培养中外植体的褐化程度, 暗培养对愈伤组织抑制褐化很有效, 悬浮培养未能减缓褐化却能使愈伤快速增殖。吸附剂聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和结冷胶 (Phytigel) 能够有效地缓解褐化。抑褐剂硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、抗坏血酸 (VC) 和铜试剂 (DDTC) 在牡丹的组培中加剧了组织培养物的褐化程度。

关键词: 牡丹; 组织培养; 褐化现象; 抑褐剂; 外植体

中图分类号: Q942.1; S685.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-1700(2006)05-0720-05

Occurrence and Prevention Method of Brown Turning in Tissue Culture of *Peonia suffruticosa* Andr

ZHANG Jun-qi, LUO Xiao-fang *

(College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Browning takes place generally in tissue culture of peony and becomes serious during the whole processes, so the growth of cultures was affected. By means of changing culture environment and method, appending anti-browning into the culture medium, to prevent the browning of cultures of *P. suffruticosa* cv. Qinglongwomochi was carried on. The results showed that adding auxin into the culture medium accelerated the cultures browning in the initial stage of the aseptic culture. Dark culture was most effective to prevent callus browning, the liquid suspending culture proliferated callus quickly though not prevent the browning effectively. The adsorbent PVP and Phytigel performed an effective action in alleviating browning. However, the anti-oxidant, such as $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, VC, and DDTC were ineffective to diminish the browning, even turned worse the degree of browning.

Key words: *Peonia suffruticosa* Andr; tissue culture; browning; anti-browning chemicals; explant

我国栽培牡丹 (*Peonia suffruticosa* Andr.) 至今已有 1500 多年历史。牡丹广泛分布于我国^[1], 作为我国原生的、古老的特有植物是研究栽培植物起源、人工选择理论, 进行科学试验的良好材料^[3]。牡丹具有特殊的药用价值、观赏价值以及较高的经济价值, 但其自然繁殖系数小、繁殖速度慢, 而且生产周期相对较长, 这些都严重地影响并制约了牡丹的规模化生产^[2]。到目前为止, 国内外的科研人员已经对牡丹的组织培养技术进行了一些研究, 并取得了一定的进展, 但在生产工艺上还存在外植体污染率高、褐化严重、生根与移栽成活率低等问题^[3,4]。这使得以组织培养方式繁殖牡丹还难以成为可行的商业化生产方式^[5]。其中, 褐化现象不仅影响牡丹外植体与继代植株的正常生长与分化增殖, 而且还影响愈伤组织的诱导。而在组织培养过程中往往会因褐化严重而造成愈伤组织难以继代保存。同时, 褐化还在一定程度上影响组培苗诱导生根, 从而直接导致植株分化过程中根的形成及发育不良, 而有些植株形成了根, 却因褐化严重而腐烂死亡, 这些都给组培苗最终的移栽成活造成了严重的影响^[6]。因此, 本研究从抑止褐化的角度, 对牡丹组培快繁技术的重要影响因子进行了较为全面的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

腋芽于 2005 年 3 月取自山东菏泽地区露地栽培 4 年生品种为青龙卧墨池的牡丹实生苗。该品种牡丹组

收稿日期: 2005-10-20

基金项目: 北京林业大学人才振兴计划资助项目 (200203084)

作者简介: 张俊琦 (1980-), 男, 北京林业大学硕士研究生, 从事植物组织培养研究。* 通讯作者 Corresponding author: 罗晓芳 (1938-), 女, 北京林业大学教授, 从事生物科学与技术研究。

育苗、愈伤组织及试验试剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、结冷胶(Phytigel)、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、抗坏血酸(VC)、铜试剂(DDTC)均由北京林业大学林果花卉良种繁育研究中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体启动培养与褐化的抑制试验 ①消毒处理:将清洗干净的外植体在自来水下冲洗1h,然后以70%的乙醇表面灭菌30s,然后用5%的NaClO灭菌14min,再用无菌水冲洗4次,每次3min,然后放置在已消毒的培养皿中,拨去鳞片,将芽接种到MS基本培养基中。②暗培养处理:外植体接种后进行5d的暗培养,然后转入正常培养,以正常培养的材料为对照。对照与处理各15个芽。③激素处理:分别在MS基本培养基中添加浓度为 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6-BA,以不加激素的处理为对照。每种处理接种20个芽。④硬度处理:分别在基本培养基中添加浓度为 $3.0, 6.0, 9.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂,每处理接种15芽。

1.2.2 组培苗继代与诱导生根培养时褐化的抑制试验 ①继代抑褐处理:为8个处理,分别在培养基中各添加5种浓度的VC、DDTC、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和PVP,添加 $3.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $6.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂和 $1.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的结冷胶。②生根抑褐处理:为2个处理,分别在诱导培养基中添加4种浓度的PVP和 $1.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的结冷胶。

以上每处理20株苗,以普通继代和诱导培养基为对照,重复两次,随时观察,30d后进行统计。

1.2.3 愈伤组织培养褐化的抑制试验 ①暗培养处理:将接种后的愈伤组织进行7d的暗培养,然后转入正常培养,以正常培养的材料为对照。②液体悬浮培养:将愈伤组织接入未添加琼脂的液体培养基中,以正常培养的材料为对照。③添加吸附剂及更换固体支持物:分别在培养基中添加 $1.0, 3.0, 5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PVP,以及 $1.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的结冷胶。将愈伤组织切割成体积大小为 1cm^3 ,每瓶接4块愈伤,每处理5瓶。重复2次。定期进行观察,于30d后进行统计记录。

1.2.4 培养条件 基本培养基为MS培养基,加蔗糖 $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $6.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。继代培养基添加 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA。生根培养基添加 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA。愈伤继代培养基添加 $1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA和 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA。pH值为6.0。培养温度为 $(23\pm3)^\circ\text{C}$,每天光照14h,光照强度为 $2\sim3\text{klx}$ 。

2 结果与分析

2.1 外植体的抑褐培养

外植体消毒处理后,经过5d的暗培养,观察发现与在光照下培养的材料比较,褐化与死亡芽数都较低(表1)。再经过14d光照培养后发现其褐化程度^[8]与正常光照培养的外植体基本相同。虽然经过暗培养的外植体褐化有所缓解,但随着培养时间的增加,褐化程度也随之加重。这可能是因为暗培养只是暂时降低了多酚氧化酶的活性,一旦恢复正常培养,其活性也马上活跃起来。

表1 暗处理对牡丹外植体褐化的影响

Table 1 Effect of dark treatment on the browning of the peony explants

处理 Treatment	接种数 No. of inoculation	5d后效果 Effect after 5d		褐化程度 Browning degree
		褐化株数 No. of browning	死亡株数 No. of death	
暗培养 Dark culture	15	5	2	+
光照培养 Light culture	15	9	1	++

6-BA是牡丹组织培养中常用的植物激素,很多试验在外植体的启动培养时就进行添加^[9]。本试验选择了2个浓度,从表2中可以看出,随着6-BA使用浓度的增加,牡丹的褐化与死亡数也增加,而且褐化程度也加剧了。原因有可能是分裂素类能够促进酚类化合物的合成或者是刺激多酚氧化酶活性提高^[10]。

表2 添加6-BA对牡丹外植体褐化的影响

Table 2 Effect of 6-BA on the browning of the peony explants

6-BA 浓度 Concentration of 6-BA $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种株数 No. of inoculation	5d后效果 Effect after 5d		褐化程度 Browning degree
		褐化株数 No. of browning	死亡株数 No. of death	
1.0	20	13	0	+++
0.5	20	10	2	++
--	20	8	1	++

表 3 结果表明,培养基的硬度对牡丹外植体的褐化有很大影响。使用 $3.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂,培养基呈半液体状,接种的外植体很容易在培养基中倒伏。培养 5d 时其褐化的程度很大,培养 14d 时外植体大部分褐化死亡,加大琼脂的用量,可以增加培养基的硬度。当琼脂使用量为 $9.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,5d 时褐化程度很轻,观察到外植体切口只有少量褐色物质,但是 14d 后其褐化程度仍然很高。这可能是较高的培养基硬度限制了外植体启动培养时褐化物质的外渗,使得有毒物质难以扩散,因此造成了对外植体的危害,以致培养后期的褐化率仍然很高。

表 3 培养基硬度对外植体褐化的影响

Table 3 Effect of hardness of culture medium on the browning of the peony explants

琼脂/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Agar	接种株数 No. of inoculation	5d 后效果 Effect after 5days		5d 褐化程度 Browning degree
		褐化株数 No. of browning	死亡株数 No. of death	
3.0	15	11	3	+++
6.0	15	7	2	++
9.0	15	4	0	++

2.2 组培苗继代与诱导生根时的抑褐培养

添加 PVP 后,植株褐化得到缓解(表 4),仅有少数植株表现出轻微褐化。植株生长良好,茎段伸长明显,增殖度高,其中当添加量为 $0.3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增殖度达最高,为 1.59。但随着用量增加,增殖有减缓的趋势。添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 后,重度褐化株数减少,但总体褐化现象并未得到缓解,反而比对照严重,当使用浓度为 $0.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,增殖度最高,为 1.33。随使用浓度增加,增殖度开始下降,并出现大量黄叶,褐化也逐渐加重。加入铜试剂后,褐化物质向四周的扩散得到抑制,但褐化程度加重。从使用量为 $1.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始,植株 100% 褐化,增殖度下降。在添加 VC 的培养基中,在浓度为 $0.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,仅有少量植株出现褐化,而且程度轻微,植株生长正常。随着浓度的增加,褐化现象逐渐消失,但植株生长不良,从添加浓度 $0.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始出现叶片大量黄化,并且有植株开始死亡,当用量达到 $0.9\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时全部死亡。在一般培养基中褐化现象普遍发生,植株正常生长,增殖度为 1.56。在半固体培养基中褐化并未得到抑制,少数植株褐化严重,并且出现玻璃化现象,增殖度为 1.48。在添加结冷胶的固体培养基中,褐化现象得到明显缓解,褐化物质在培养基中迅速扩散,植株生长状况良好,增殖度远高于对照,为 2.59。牡丹在进行根原基诱导时,因为褐化严重,一些材料出现基部坏死,形成碳化状硬壳,通过添加吸附剂与改变固体支持物可以缓解褐化。

表 4 不同种类抑褐剂浓度和培养基硬度对褐化的影响

Table 4 Effect of anti-browning concentration and culture medium hardness on the browning

处理 Treatment	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	褐化程度及株数 No. and degree of browning			增殖度 Incremental ratio
		+	++	+++	
聚乙烯吡咯烷酮	0.1	37	11	0	1.4
咯烷酮	0.3	40	4	0	1.59
PVP	0.5	31	0	0	1.31
	1.0	15	0	0	1.18
	1.5	4	0	0	0.86
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.1	18	15	11	1.33
	0.2	20	8	17	1.27
	0.3	12	11	19	1.29
	0.4	8	16	23	1.28
	0.5	9	11	27	1.25
琼脂	3.0	14	15	13	1.48
Agar	6.0	12	21	9	1.56
铜试剂	0.4	10	13	22	1.0
DDTC	0.6	4	9	35	0.9
	0.8	0	0	44	1.2
	1.0	0	0	48	0.7
	1.2	0	0	48	0.4
抗坏血酸	0.1	7	2	0	0
VC	0.3	3	0	0	0
	0.5	0	0	0	0
	0.7	0	0	0	0
	0.9	0	0	0	0
结冷胶	1.5	27	0	0	2.59
Phytigel					

牡丹组培苗的生根分为 2 步,先是进行诱导生根,然后是生根培养。诱导生根时植株基部先形成愈伤组织,然后生长出根。从表 5 中就可以看出,结冷胶抑褐效果比较好,虽然植株在培养基中仍然褐化,但褐化物质可以得到迅速扩散,而不是滞留在植株基部的愈伤组织周围,因而对植株的毒害也比较小。PVP 的抑褐效果也很好,但它的吸附作用却在一定程度上影响了愈伤组织的正常形成。

表5 PVP和结冷胶对诱导生根时褐化的影响

Table 5 Effect of PVP and Phytagel on the browning of induced rooting

处理 Treatment	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	褐化株数与程度 No. and degree of browning		
		+	++	+++
PVP	0.5	4	9	2
PVP	1.0	8	5	0
PVP	1.5	3	7	4
PVP	2.0	3	5	1
结冷胶 Phytagel	1.2	6	0	0
对照 Ck	0	2	0	0

2.3 愈伤组织的抑褐培养

从表6可以看出,在正常光照和暗培养两种处理中,都有褐化现象的发生。但就褐化程度来看,暗培养较轻,为2级。而在正常光照条件下为3级,愈伤颜色为淡褐色或褐色,褐化严重的愈伤死亡,整个培养基都变成暗褐色。悬浮培养的愈伤组织虽然死亡率较暗培养的多,但成活的愈伤组织增殖快,而且生长良好。这说明光照是加剧愈伤褐化的重要原因,而愈伤组织本身的褐化产物加重了其对自身的毒害,因为褐化程度的加剧而最终导致植株的死亡。

PVP和结冷胶对愈伤组织褐化的防止差不多有同样的效用,从表7可看出,当PVP的使用量为 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,褐化为零,但愈伤的生长缓慢。

表6 光照培养、暗培养和悬浮培养对愈伤组织褐化的影响

Table 6 Effect of light culture, dark culture and suspension culture on the browning of callus

处理 Treatment	褐化数 No. of browning	褐化程度 Degree of browning
光照培养 Light culture	全部褐化 Brown	+++
悬浮培养 Suspension culture	15	++
暗培养 Dark culture	10	++

表7 吸附剂(PVP)及结冷胶(Phytagel)对愈伤褐化的影响

Table 7 Effect of PVP and Phytagel on the browning of callus

PVP/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	褐化数 No. of browning	褐化程度 Degree of browning
1.0	11	+++
3.0	4	++
5.0	0	+
1.2	13	+

3 结论与讨论

在植物组织培养中,褐化指的是培养材料在诱导脱分化或在分化过程中,向培养基中释放出褐色物质,使其变色,并随之加重变褐而最终死亡的现象。诱发褐化现象发生的原因有很多,如基因型、材料的年龄和大小、取材时间和部位、光照、温度^[10]以及在培养时植物细胞受伤、衰老或是发生病变等^[10]。多数学者都认为其机理主要是由多酚氧化酶(PPO)作用于其底物酚类物质而引起的。PPO是植物体内普遍存在的一类末端氧化酶,酚类物质也是植物界中种类最多,分布最广的一种次生代谢物质。PPO催化酚类化合物形成醌和水,醌再经非酶促聚合,形成对植物材料产生毒害作用的褐色物质。

目前关于牡丹组培褐化防治的报道,仅限于外植体和叶柄培养两方面^[12]。本试验在此基础上,对牡丹组培整个过程中褐化的防治进行了研究。试验所采用的抑褐剂根据其作用机理一般可分为防止酚氧化的抗氧化剂和吸收酚类物质的吸收剂两大类。抗氧化剂VC是一种酚氧化酶抑制物,它可以将该酶的 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} ,而DDTC和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 则是影响酚类化合物与酶的结合。PVP是酚类物质的专一吸附剂,在生化分离制备中常用作酚类物质和细胞器的保护剂,因此PVP被许多学者用于防止褐化的主要物质。

DDTC和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 在本试验中,加剧了牡丹褐化的发生。这说明一方面是由于植物材料的不同,抑褐剂的效果也不同;另一方面也表明牡丹组织培养过程中褐化现象的发生可能是由多种因素综合作用的结果,而不是仅与多酚氧化酶活性有关,也可能与其总酚含量有关,或是与细胞内酚类物质和PPO的区域性分布有关^[13]。活性炭在培养基中仅是提供暗环境,它起到的吸附作用其实并不大,这与Msrineau和Hanson^[14]的观点相反,试验中没有应用。试验应用了结冷胶作为培养基固化剂替代物,作为新型的微生物胶体材料它可在极低的用量下即产生澄清透明的凝胶,而且稳定性好。结冷胶及PVP的抑褐效果最好,牡丹组织培养物质的褐化都能

够得到缓解。但随着 PVP 用量的增加,大部分组织培养物质增殖度也随之下降,这应该与 PVP 在吸附培养基中褐化物质的同时,也吸附了部分植物激素有关,可以考虑增加植物激素的用量^[15]。也有一些学者通过试验证明了 PVP 有时并不能有效地防止褐化,其原因是在植物体内存在着不同的酚类物质。结冷胶价格过于昂贵,不利于推广应用。外植体在启动培养时可以添加适量的 PVP,而抗氧化剂会导致外植体发生畸变,所以应该慎重使用。

牡丹愈伤组织在进行悬浮培养时死亡率较其他处理高,但存活下来的却生长良好且增殖很快,其机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 喻 衡. 中国名花丛书 - 牡丹[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998.
- [2] 高志民,王 雁,王莲英. 牡丹、芍药繁殖与育种研究的现状[J]. 北京林业大学学报,2001,23(4):75-79.
- [3] 郭绍霞,张玉刚,任 茹. 中国牡丹研究进展[J]. 莱阳农学院学报,2003,20(2):116-121.
- [4] 徐金光. 牡丹生产技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [5] BOUZA L. Requirements for *P. suffruticosa* Andr. cv. Mme. de vetry[J]. Sientia Horticulture,1991,58(3):223-233.
- [6] 徐振彪,傅作申,原亚萍. 植物组织培养过程中的褐化现象[J]. 国外农学 - 杂粮作物,1997,(1):55-56.
- [7] 罗晓芳,田硕亭,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):93.
- [8] 李浚明编译. 植物组织培养教程(第2版)[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002.
- [9] 程建军,王震新,于静波. 苹果梨和鸭梨酶促褐变机理的研究[J]. 食品科学,2000,21(2):71-73.
- [10] CREASEY L L. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis[J]. Phytochem,1968,(7):441-446.
- [11] 陈 菲,李 黎,宫 伟. 植物组织培养的防褐化探讨[J]. 北方园艺,2005,(2):69.
- [12] 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,(1):47-50.
- [13] MAYER, HAREL. Polyphenol Oxidases in plants[J]. Phytochemistry, 1979,(18):173-215.
- [14] MSRTINEAU B, HANSON M R, AUSUBEL F M. Effect of charcoal and hormones on anther culture of *Petunia* and *Nicotiana*[J]. Z Pflanzenphysiol,1981,102:109.
- [15] 周俊辉,王国彬,曾浩森. 观赏凤梨嫩吸芽离体培养中褐化防止的初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报,2000,13(1):5-9.

[责任编辑 于洪飞]