

植物组织培养中的褐化现象及其防止措施

王 栋¹, 买合木提·克衣木², 王永雄¹, 胡 艳¹

(1. 西南大学动物科技学院, 重庆市牧草与草食家畜重点实验室, 重庆 400716;

2. 新疆巴州动物疾病控制与诊断中心, 新疆 841000)

摘要: 从外植体的种类和生理状态、培养基的种类和成分、培养条件几方面, 介绍植物组织培养中影响褐变发生的因素、最新研究进展, 并提出了防止褐化的措施及对策。

关键词: 褐化; 植物组织培养; 防止褐化措施

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2008)01-0007-04

Browning Phenomenon in Plant Tissue Culture and Its Prevention Measures

WANG Dong¹, KEYIMU·Maihemuti², YU Yong-xiong¹, HU Yan¹

(1. Chongqing Key Laboratory of Forage and Herbivore, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716; 2. Bazhou Disease Controlling and Diagnosis Center, Xinjiang 841000)

Abstract: The influence factors of browning and the newly research were introduced from sorts and physiological conditions of explant, medium sorts and ingredients, culture condition, etc, finally, some antibrowning techniques were provided.

Key words: browning; tissue culture; antibrowning techniques

褐化是植物组织培养中较为常见的一种现象, 也称为褐变, 在植物组织培养、细胞悬浮培养和原生质体培养中常有发生^[1]。

1 褐化现象的原因

1.1 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^[2]。诸多不利条件都可以造成细胞的程序化死亡, 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。

1.2 酶促褐变

多数认为, 植物组织培养中的褐化现象主要是由酶促褐变引起的^[3], 即由多酚氧化酶(PPO, Polyphenol Oxidase)作用于天然底物酚类物质而引起的^[4]。在正常条件下, 细胞中的酚和醌之间保持一

种动态平衡, 醌类物质水平较低; 而酚氧化酶及其底物分布在正常组织的不同部位, 酚类物质分布在细胞的液泡内, 酶则分布在各种质体或细胞质内, 这种区域性分布致使底物与酶被质膜分隔开来; 但当外植体或培养材料处于机械损伤等逆境, 或细胞受伤或衰老时, 细胞膜结构或细胞中物质区域化分布的破坏会导致酚氧化酶释放或合成, 如果此时在合适的 pH 和温度等条件下, 酚氧化酶、酚类(底物)和氧发生酶促氧化反应, 形成有毒的棕褐色醌类物质, 从而使组织发生褐变。此外, 组织的老化或病变也可激活酚氧化酶而引起褐变。

一般认为, 褐化是指外植体或培养材料接种后在组织培养过程中, 由于切割造成机械损伤, 伤口处分泌出酚类化合物, 在有氧的条件下, 切面细胞中的酚类物质为多酚氧化酶催化, 氧化为醌, 醌再通过非酶促反应产生有色物质而导致组织褐变, 变成棕褐色或暗褐色, 并逐渐扩散到培养基中, 抑制细胞内其它酶的活性, 影响细胞的正常代谢, 毒害整个组织, 甚至导致组织死亡。尤其是木本植物组织的外植体褐变死亡是其培养难度较大的主要因素。因此, 探讨褐化发生的机制及其影响因素, 采取有效的防止

收稿日期: 2007-08-29

基金项目: 重庆市重点基金(CSTX, 2006BA1008)

第一作者简介: 王栋(1982-), 男, 山西省阳泉市人, 硕士, 从事遗传育种研究。 Tel: 023-68251080, 13220279368; E-mail: wdong0726@163.com.

褐化的措施,是保证植物组织培养成功的关键所在^[5-6]。

2 影响褐化的因素

植物组织培养过程中的褐化现象,引起植物材料褐变的因子是复杂的,往往是多种因素共同作用的结果。

2.1 培养材料或外植体种类与品种或基因型

褐化与植物本身的内在因素有关,不同种类植物、同种植物的不同类型和品种在组织培养中褐变程度有很大差别。一般来说,多年生木本植物比草本植物容易发生褐变,因为木本植物的单宁或色素含量较高,而酚类的糖苷化合物是木质素、单宁和色素的合成前体,所以易褐变^[7]。

2.2 外植体的生理状态

在植物组织培养中,培养材料或外植体的褐变是导致培养失败的主要原因,材料本身的生理状态不同,接种后褐变程度也不同。刘兰英在薄壳香核桃组培的实验中发现,木质化程度高的外植体会促进褐化的发生^[8]。大量实验表明,材料在培养过程中的褐化程度与多酚氧化酶(PPO, Polyphenol Oxidase)活性及酚含量有关。

2.3 外植体的取材

有关植物组织培养中褐变现象的研究已经很多,大量实验表明组织培养中褐变的发生及褐化的严重程度和外植体取材的时期、取材的部位、类型及外植体取材的大小及取材前的预处理有关。

2.3.1 外植体取材的时期 刘淑兰等对新疆核桃的试验证明,不同季节、不同树龄的外植体,褐化发生的情况不同^[9],通常幼龄外植体比老龄外植体褐化轻,褐化率低。

2.3.2 外植体取材的部位、类型和大小 大量实验结果表明,外植体类型和取材部位是影响褐化重要因素。外植体的大小对褐变的发生及褐化和程度也有一定影响^[4]。小的材料更容易发生褐化,相对较大的材料褐化的程度较轻^[10]。

2.3.3 外植体取材前的预处理 取材前外植体预处理对褐变的发生及程度有一定影响。周玉珍等实验发现取材母株放入温室和在相对弱光照下生长,其外植体的褐化率比在露地全光照下栽培母株低^[11]。低温预处理外植体可减少组织氧化褐变^[9]。

有研究认为,外植体接种于培养基中的放置方式对组织培养过程中的褐变现象也有影响^[2];此外,外植体切口越大,酚类物质的被氧化面也越大,褐化程度就会更严重^[10]。

2.4 培养基成分

培养基的成分会影响外植体培养的褐变与褐化程度。

2.4.1 无机盐种类及含量 基本培养基中无机盐

的种类和浓度的选择对外植体生长的影响很大,培养基中的无机物可能是一些氧化酶合成及进行生理生化作用所必需的^[8]。浓度过高的无机盐可以引起外植体酚类外溢进而发生氧化,促进褐化的发生^[12]。因此,盐份越大,褐化程度越高^[4]。大量实验结果表明,同种外植体在不同培养基上产生褐变的程度不同。

2.4.2 激素的种类和浓度配比 培养基中植物生长物质的种类、浓度及其组合对褐变起着重要的作用。培养基中附加激素种类的不同搭配,产生褐化程度也不同。有报道,细胞分裂素类物质会促使褐化的发生^[8]。生长素2,4-D或IAA可延缓酚的合成,减轻褐变产生^[2]。培养基中较高浓度的激素也会促进褐化发生。

此外,邱璐等研究表明,培养中使用含杂质较多的市售白糖褐化较重,出现褐化死亡,而用纯度较高的化学纯蔗糖褐化轻,褐化率低,无褐化死亡^[13];有研究发现葡萄糖为碳源的培养基能有效防止褐变,麦芽糖次之,蔗糖最差^[14]。可见,作为碳源的糖类也是影响褐化的因素之一。培养基中的附加成分也对褐化产生影响,如有研究发现水解酪白及谷胺酰胺有利于褐化产生^[2]。

2.5 培养的条件和方式

2.5.1 温度 较高的培养温度会促进褐化的发生。一定程度的高温,能促进氧化酶的活性,从而促进酚类物质的氧化,引起外植体褐化。有研究结果表明,高温培养可明显促使褐化的发生,褐化率达52.7%,而低温条件下褐化率为29.8%^[8]。

2.5.2 光照 光照强度也能影响褐变的发生及褐化程度。有实验表明,在黑暗条件下外植体褐变严重,在光照条件下外植体褐变发生晚,程度轻^[15];而许传俊等人研究蝴蝶兰外植体褐变发生时结果表明,黑暗培养的外植体褐变发生较晚,且程度轻,光照强度增加外植体褐变严重^[16]。王玉珍等研究发现当光强低于 $18\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,植株出现褐化,认为由于光照不足会降低外植体的生理活力,因而褐化加重^[12]。赵伶俐等研究结果表明,1000 lx和3000 lx光强培养可降低褐化率,2000 lx光强培养的外植体褐化严重且PPO活性高于其他两处理,差异显著^[17]。有研究表明,在不同光质照射下产生褐化的程度也不同^[18]。

2.5.3 培养周期 即培养时间的长短也是影响褐变的重要因子。有实验发现转瓶时间早与晚是影响分化生长及褐变的重要因子^[19]。在试验中15 d转瓶一次,植株体色泽正常,茎正常生长,培养基中无浑浊物产生;25 d转瓶一次,植株体色泽较暗淡,培养基有丝状或浑浊物产生;30 d转瓶一次,植株体色泽暗灰,生长缓慢,培养基较为浑浊,植株体基部

释放絮状物体, 向四周逐渐扩散^[10]。梁钾贤等实验结果表明, 甘蔗愈伤组织诱导分化苗培养时的褐化率随继代次数增加而显著提高^[18]。

2.6 培养基的形态

液体培养基可以减轻外植体褐变, 但液体培养要求条件严格, 培养过程复杂。培养基硬度对褐化也有影响, 有研究发现琼脂用量大, 培养基硬度大, 褐化率低, 随着琼脂用量的减少, 培养基硬度减小, 褐化重, 褐化率高^[13], 并认为这可能是培养基的硬度影响了酚类物质扩散速度的缘故^[1]。

此外, 外植体受伤害的程度包括机械伤害和药剂伤害及培养基的 pH, 也是影响褐化发生的重要因素。此外, 灭菌时间对外植体的褐变率也有重要影响。酸性环境(pH 为 4.5~5.0)不利于褐变过程的发生, 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^[13]; 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 防止褐化的措施

3.1 培养基中添加防褐剂

防褐剂一般可分为防止酚氧化的抗氧化剂和吸收醌类物质的吸收剂两大类。选用适宜的抗氧化剂与吸收剂种类及含量是防止外植体褐变的常用的方法。

在植物组培中用于抑制褐化常用的抗氧化剂有: 抗坏血酸(Vitamin C)、硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃), 此外还有柠檬酸、L-半胱氨酸(L-Cys)、谷胱甘肽、芸香苷、二硫苏糖醇、酪氨酸、巯基乙醇、卵清蛋白、维生素 B、维生素 E、有机酸、蛋白质水解产物、氨基酸、亚硫酸氢钠、氰化钾、多胺等。

常用的吸附剂有聚乙烯吡咯烷酮(乙烯聚合物 poly vinyl pyrrolidone, PVP)、活性炭(AC)等。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^[1]。活性炭是一种吸附性较强的无机吸附剂, 能吸附各种微量物质和微小颗粒, 但活性炭的吸附作用是没有选择性的; 有报道, 由于活性炭除能吸附多酚氧化物及有毒物质外, 还能吸附培养基中的营养成分和生长调节剂, 所以也有研究认为 AC 会使外植体由于得不到应有的养分而逐渐衰竭, 变褐乃至死亡等负效应; 因此在使用时应注意, 尽量用最低浓度的活性炭来防止褐变的产生; 一般在培养基中加入 1~4 g·L⁻¹的活性炭, 粉末状的活性炭与颗粒状的活性炭相比吸附性更强。

防褐剂的防褐效果因植物材料的不同而不一。在外植体接种之前, 用抗氧化剂浸泡一定时间, 也能收到一定效果。

3.2 选择适宜的培养基, 改善培养条件

降低无机盐浓度, 可以减少酚类外溢, 因而降低褐化程度。降低微量元素中的锰等的含量也可以有效抑制褐化的发生。筛选适合的激素种类及配比, 大量实验表明选择适宜的植物激素种类和浓度可以减轻外植体褐变。此外, 还可以采取改变碳源的种类和浓度等措施。在实践中, 采用适宜的培养光照、温度及培养周期, 提供适合的培养环境, 也能够对褐变起到一定的防止效果。连续转移外植体, 缩短转瓶周期也可以减轻褐变程度。

3.3 外植体或培养材料的选择和处理

选择年龄越小的外植体、切取外植体的体积适当的较大, 可以减轻褐化程度。在所培养材料中多酚氧化酶活性和总酚含量低的时期取材, 可以减少褐变的发生。对母株和外植体预处理, 有利于减轻褐化, 可采用低温或黑暗预处理外植体减少褐化程度。

3.4 其它

3.4.1 改变培养基的状态 如采用滤纸桥培养可使外植体溢出的有毒物质很快扩散到液体培养基中, 对外植体危害较轻; 或采用液体培养、半固体培养、液体培养与固体培养交替进行培养等也能减轻褐变的危害。

3.4.2 选择适宜的接种方式 把培养体切面浸入培养基中, 减少了褐化发生的表面积, 且较大组织切块的创伤面积相对较小, 有利于保持转培初期切块浅表层细胞或组织处于原来的生长发育状态, 从而减轻了因切面褐化带来的毒害作用。

3.4.3 通过试验选择适宜的消毒方式 可减少对外植体的伤害程度, 从而减轻褐化程度。

3.4.4 添加天然附合物 有试验表明, 添加 10% 椰子水可提高洋兰原球茎的存活率, 减少褐化死亡现象^[20]。

4 结语

在植物组织培养中, 由于取材的遗传因素及生理状态、培养条件等因素的差异, 防止外植体的褐变采用的方法、效果也各不相同, 并且每种措施都有一定的适用范围和局限性, 应根据培养的实际情况选择不同的方法, 使其有效地抵制或减轻组织培养中褐变的发生。实践中, 一般多同时将以上多种措施方法搭配使用。我们认为, 如果能将外植体材料的预处理、防褐剂的使用, 适宜的培养条件三种措施有效的结合, 应该会取得较好的防褐效果。

参考文献:

[1] 黄丹莹, 江贵波. 植物组织培养褐变产生的因素及对策[J]. 广西轻工业, 2006(5): 31-32.
[2] 徐振彪, 傅作申, 原亚萍 等. 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.
[3] Asmus B Hamme H. Enzymatic browning of vegetables. Cali-

bration and analysis of variance by mutiway methods[J] . Chemometrics Intelligent Laboratory Systems, 1996, 34: 85.

[4] 李凤兰, 胡国富, 胡宝忠. 八种不同花色一串红组织培养快繁的研究[J] . 生物技术, 2005, 15(4): 71-73.

[5] Debergh P C, Zimmerman, R H. Micropropagation technology and application[M] . Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1991: 1-13.

[6] Lahji M, Uemoto S, Fujieda K. Studies on tissue culture in cattceya speciesII Preventive methods for the browning of explant tissue[J] . J Jap soc Hort Sci. 1979, 48: 199-204.

[7] 谢丽霞, 杜建伟, 李海杰, 等. 植物组织培养中的褐变现象及解决途径[J] . 垦殖与稻作, 2006(1): 61-63.

[8] 刘兰英. 核桃的组织培养和快速繁殖[J] . 植物生理学通讯, 2000(5): 434-435.

[9] 刘淑兰, 韩碧文. 核桃的离体繁殖[J] . 北京农业大学学报, 1986, 2(1): 143-148.

[10] 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.

[11] 周玉珍, 张雨青. 金叶风箱果初代离体培养中影响外植体褐化的因素[J] . 植物生理学通讯, 2001, 37(2): 122-123.

[12] 王玉珍, 董玉惠, 史印山, 等. 霍霍巴的组织培养与快速繁殖[J] . 植物生理通讯, 2005, 41(6): 853-840.

[13] 邱璐, 陈善娜, 夏跃明, 等. 桑树组织培养中褐化问题的研究[J] . 云南大学学报(自然科学版), 2000, 22(1): 76-78.

[14] 闫桂琴, 张伟, 张艳芳. 翅果油树脱毒试管苗的组织培养技术研究[J] . 西北植物学报, 2003, 23(7): 1297-1303.

[15] 夏小环, 王静, 尹梅, 等. 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.

[16] 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] . 亚热带植物学报, 2006, 35(1): 9-12.

[17] 赵伶俐, 葛红, 范崇辉, 等. 不同光照强度对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响[J] . 北方园艺, 2006(4): 160-161.

[18] 梁钟贤, 陈彪. 光质对甘蔗愈伤组织分化出苗的影响[J] . 中国糖料, 2006(3): 9-12.

[19] 淡明, 黄海波, 郭安平, 等. 黄灯笼辣椒组织培养中防褐变的研究[J] . 福建热作科技, 2006, 31(2): 1-3.

[20] 姚丽娟, 徐晓薇, 林绍生, 等. 洋兰组培快繁褐变抑制因子探讨[J] . 北方园艺, 2006(4): 162-163.

水稻杂草的防治

通河县农广校 张敏杰 陈香丽

在生产中, 水稻主要杂草有稻稗、慈菇水绵、葡茎剪股芦、田埂杂草、扁秆蔗草、三江蔗草(日本蔗草)等, 提出几种防治方法, 供农民朋友参考。

1 稻稗

旱改水田早期以稗草为主, 种植 5 a 以上稻稗逐渐上升为优势种, 近几年一些地方反映丁草胺、二氯喹啉酸对稻稗无效。怀疑稻稗对丁草胺, 二氯喹啉酸产生了抗性, 经研究药效差的原因是使用技术问题和除草质量问题。通河县稻稗出苗期为 5 月上旬, 高峰期在 5 月末至 6 月初, 水稻插秧期在 5 月中下旬, 丁草胺只能防治 1. 5 叶期的稻稗, 施药时田间稻稗有的已达 2~3 叶期, 水稻插后 5~7 d 施丁草胺总有一些稻稗漏网, 采用插前 5~7 d, 插后 15~30 d 两次施药才能有效地防治稻稗, 还有的将丁草胺药瓶扎个小孔甩施。分布不均匀, 且局部造成药害, 近几年天旱缺水, 施丁草胺后无水造成草荒, 二氯喹啉酸及其混剂用于水稻采用喷雾法施药, 近几年一些厂商错误地推荐毒土法施药, 用量偏低。因此没有药效, 有效措施一是选择对水稻安全, 质量好的除草剂如禾大壮、瑞飞特、阿罗津(莎稗磷)、苯噻草胺、拜田净等, 二是瑞飞特、阿罗津(莎稗磷)、苯噻草胺、拜田净等分期施药, 移栽前 5~7 d, 移栽后 15~20 d 分两次施药, 三是严格施药技术, 瑞飞特、阿罗津(莎稗磷)、苯噻草胺、拜田净等撒毒法, 毒砂, 不得甩施; 二氯喹啉酸喷雾, 不能撒毒土。

2 慈菇

近几年通河县水稻主要产区反映苄嘧磺隆, 吡嘧磺隆, 丁苄、苯噻酰等对慈菇无放。药效差的原因一是某些苄嘧磺隆, 吡嘧磺隆、丁苄、丁吡等除草剂质量有问题, 含量不足或混配不合理; 二是近几年干旱缺水, 施药后水层浅或短期内无水, 药效难以发挥, 如苄嘧磺隆产生抗性, 吡嘧磺隆(草克星)效果也不好。有效的防治措施, 一是轮换使用原理不同的除草剂, 草克星(吡嘧磺隆)、金秋、太阳星等磺酰脲类除草剂与排草丹(灭草松)等轮换使用; 二是选择对慈菇有效的

除草剂, 不用假药或劣质药, 通过试验可知, 选用吡嘧磺隆防治效果好; 三是改进施药技术。

3 水绵

近几年由于施肥方法问题导致了水绵发生严重, 磷、钾肥应做基肥深施, 一些农民错误地在水稻插秧后表施磷酸铵, 有利于水绵发生。施草克星、吡嘧磺隆、金秋等除草剂, 水绵在短期内得到控制, 待除草剂有效期一过, 水绵又快速繁殖为害, 应采取深耕深翻, 磷肥深施, 再施除草剂, 才能控制其危害。

4 葡茎剪股颖

防治方法主要有: (1) 10% 千金 1 050~12 00 mL \cdot hm $^{-2}$, 或 600~900 mL \cdot hm $^{-2}$ + 喷液量 0. 5% 药笑宝、信得宝等枯油型的喷雾助剂; (2) 30% 阿罗津(莎稗磷) 900 mL \cdot hm $^{-2}$ + 50% 扑草净 1. 5 kg \cdot hm $^{-2}$ 撒毒土; (3) 50% 瑞飞特(丙草胺) 1 050 mL \cdot hm $^{-2}$ + 50% 扑草净 1. 5 kg \cdot hm $^{-2}$ 撒毒土。

芦苇用精稳杀得 10 倍液涂抹防除。

5 田埂杂草

20% 克无踪 3 000 mL \cdot hm $^{-2}$, 或 41% 农达 3 000 mL \cdot hm $^{-2}$, 或 74. 7% 农达 1 125~1 500 g \cdot hm $^{-2}$ 喷雾。

6 扁秆蔗草, 三江蔗草(日本蔗草)

主要防治方法有:

(1) 撒毒土——插秧前 10% 草克星 375~450 g \cdot hm $^{-2}$ 。(2) 撒毒土——插秧前 10% 草克星 150 g \cdot hm $^{-2}$ 或 30% 威农 150 g \cdot hm $^{-2}$, 插秧后 10% 草克星 150 g \cdot hm $^{-2}$ 或 30% 威农 150 g \cdot hm $^{-2}$, 或插后两次施药。(3) 喷雾——48% 排草用(灭草松) 3 000 mL \cdot hm $^{-2}$ 或 10% 草克星 150 g \cdot hm $^{-2}$, 或 15% 太阳星 150 g \cdot hm $^{-2}$ (或 10% 银立富 225 g \cdot hm $^{-2}$)+ 喷液量 0. 5% 药笑宝、信得宝。