

芍药属植物组织培养中褐化问题的研究进展

王 瑶,岳 桦
(东北林业大学,黑龙江哈尔滨 150001)

摘要: 芍药属植物在组织培养中存在严重的褐化现象,已经成为影响组织培养成功的重要因素。结合近年的研究,对芍药属植物在组培褐化问题上的研究进行了综述,以期以后的研究工作提供参考。
关键词: 芍药属; 组织培养; 褐化
中图分类号: S682.1⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)02-0159-02

Advances in Browning Researches in Plant Tissue Culture of *Paeonia*

WANG Yao, YUE Hua
(The Northeast Forest University, Harbin, Heilongjiang 150001)

Abstract: Browning takes place in tissue culture of *Paeonia* siereceely. It is frequently encountered plant tissue culture. Integrating the lately studies, the advances in tissue culture of *Paeonia* anti-browning were summarized to offer reference to research.
Key words: *Paeonia*; tissue culture; browning

1946 年 Stern F C 提出将芍药属分为三个组,即牡丹组、芍药组、北美芍药组。近年来的研究多集中在牡丹组上,对于芍药组的研究发展相对滞后,由于该组植物的组织培养比较困难,存在着褐化、菌类污染等基础难题,因此,一直以来较难取得大量的组织培养成苗。而褐化问题的研究也多集中在牡丹组,芍药组未见有进行过系统研究的报道。

芍药属牡丹组植物为灌木至亚灌木,共 9 种,全部原产中国,分布于中国中部、西南部至西北部。芍药组植物为多年生草本,约有 24 种,主要分布在欧亚大陆温带地区,中国分布有 9 个种 6 个变种^[1]。

1 组培中褐化问题的概述

1.1 褐化现象

褐化是指外植体在诱导脱分化或再分化过程中,自身组织从表面向培养基释放褐色物质,以至培养基逐渐变成褐色,外植体也随之进一步变褐而死亡的现象。

1.2 褐化机理

褐化包括酶促褐化和非酶促褐化,目前认为主要是由酶促引起的。酶促褐化必须具有酶、底物和氧三个条件。引起褐化的酶有多酚氧化酶(PPO)、过氧化

物酶(POD)等,但最主要是 PPO。褐化的发生是由于组织中多酚氧化酶被激活,酚类化合物被氧化形成褐色的醌类物质。引起褐化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、PPO 同时存在并不发生褐化,这是因为在正常组织细胞内多酚类物质分布在液泡,而底物则分布在各种质体或细胞质中,这种区域性分布使底物与多酚类物质不能接触,而当细胞膜的结构发生变化和破坏时,则为酶创造了与底物接触的条件,在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌,再进行一系列的脱水、聚合反应,最后形成黑褐色物质,从而引起褐化。

1.3 影响褐化的因素

影响褐化的因子是复杂的,随植物的种类、基因型、外植体部位及生理状态、培养方式等的不同,褐化程度也有所不同。

1.4 防止褐化的措施

从理论上讲,酶促褐化可以通过三种方法加以抑制:一是除去引起氧化的物质氧;二是捕捉或减少聚合反应的中间物;三是抑制有关的酶。以下几点措施可以防止褐化,提高组培成功率:(1)在适当的时间取材,选择幼年植株取材;在植株的一定部位取材,使材料中的酚类物质含量较低,有助于减少褐化。(2)母株和外植体的预处理:对植物母株进行遮光处理、低温预处理一段时间、切割外植体时在抗氧化剂或吸附剂中进行,或用这些药剂保存切下来的组织也可达到目的等。(3)选择适宜的培养基和培养条件。(4)添加抗褐化剂

收稿日期:2008-07-12
第一作者简介:王瑶(1983-),女,黑龙江哈尔滨人,硕士,从事园林植物与观赏园艺研究。Tel: 13936323576; E-mail: Wang_yaojie@163.com.
通讯作者:岳桦,教授,从事园林植物研究。E-mail: Yuehua0123@126.com.

与吸附剂防止褐化。(5)外植体的连续转移:将外植体很快转移到新鲜的培养基上2~3次,在某些情况下可以缓解褐化,这段时间内外植体的伤口愈合,外渗停止。

2 牡丹组植物褐化问题的研究进展

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,研究涉及两个方面:褐化内在机理和褐化的防止方法。

2.1 有关机理的研究

学者对影响褐化发生的生理指标进行了测定,包括多酚含量、PPO 活性^[2,3]、POD 活性、CAT 活性、MDA 含量^[4]。

安佰义等^[2]指出牡丹幼茎的总酚含量远远低于幼叶、成龄叶,而且幼茎的 PPO 活性水平也相对较低,是牡丹组织培养的理想外植体来源。花型差异与叶片总酚含量和 PPO 活性水平有较大关系,在单花千层亚类花型演化途径中,叶片总酚含量先期随着花型演化程度的加大而增加,当花型演化到菊花型时,总酚含量达到最高,之后总酚含量下降;单花楼子亚类花型演化途径中除托桂型外,随演化程度的增加,叶片总酚含量也随之增加,至绣球型时,其叶片总酚含量达到最高,PPO 活性水平的变化与叶片总酚含量差异一致。花色差异与总酚含量和 PPO 活性有一定关系,同一色系品种随颜色加深,叶片总酚含量相应增加 PPO 活性的差异无显著规律可循。

李新风、巩振辉^[4]等测定了多酚含量、POD 活性、CAT 活性、MDA 含量并对其与褐化的关系进行了分析,结果表明:不同品种牡丹间的各个生理指标及其褐化率之间差异显著,同一品种同一部位的不同外植体间各个生理指标及褐化率之间也存在极显著的差异;叶柄的总酚含量、POD 活性与褐化率存在着显著的相关性($P=0.0292<0.05$, $P=0.0186<0.05$),相关系数分别为0.6256, -0.7942。叶片的 MDA 含量与褐化率存在显著的相关性($P=0.0202<0.05$),相关系数为0.7980。

2.2 防止方法的研究

目前,学者在这方面进行了防褐剂^[5,8]、基本培养基^[6,7]、培养条件^[5,9,10]、预处理^[6]四方面的比较研究。

张俊琦、罗晓芳^[5]研究后得出结果:添加生长素会加剧启动培养中外植体的褐化程度。培养基中生长调节物质 BA、NAA 的浓度变化对褐化没有明显的影响。何松林、陈笑蕾^[6]等初步研究表明,以 WPM 为基本培养基时褐化现象最轻,1/2MS 次之,MS 褐化现象最为严重;郎玉涛、罗晓芳^[7]认为以 1/2 改良 WPM 为最佳基本培养基。

防褐剂聚乙烯吡咯烷酮、活性炭、结冷胶(Phytage)、维生素 C、硫代硫酸钠、硝酸银对褐化的抑制均有一定的作用,其中以 PVP 最好^[5,8],但也有人研究后得到抑褐剂硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、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^[5],维生素 C 还易导致组培苗玻璃化^[18]。

活性炭、硝酸银、PVPP 在一定浓度下还可以促进愈伤组织的增殖^[8]。

黑暗、低温、较短的继代周期都能不同程度的减缓愈伤褐化,悬浮培养未能减缓褐化却能使愈伤快速增殖^[2,5,9-10]。

外植体采取前对母株进行遮光处理也能减轻褐化的程度^[6]。

3 芍药组植物褐化问题的研究进展

芍药组织培养的研究相对牡丹的研究滞后,虽然学者在芍药的组织培养上进行了很多研究,但是仍然存在很多需要解决的问题:外植体褐化、难分化、增殖困难^[11]、根诱导困难^[12]等,而有关于褐化的系统研究未见过报道。

芍药的组织培养过程中,同时存在着初代培养中的细菌和真菌问题。大多研究表明,外植体状况、环境条件和操作过程是引起污染的主要原因^[13]。

4 小结

芍药属植物在组织培养方面的研究已经有一定的成果,而这也多集中在牡丹组植物上,对于芍药组组织培养中的各种问题进行深入研究的很少,这也是制约其发展的重要原因。有关褐化的研究也证明了这点,牡丹组的研究已经深入到内在机理层面上,而芍药组却未进行褐化方法和机理的系统研究,因此有待进一步完善。

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: 21-36.
- [2] 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.
- [3] Bhat S R, KPS Chandel. A Novel Technique to Overcome Browning in Tissue Culture[J]. Plant Cell Reports 1991, 10(6/7): 358-361.
- [4] 李新风, 巩振辉, 孙冬青, 等. 不同品种牡丹几个生理参数的比较及其与组培褐化的关系[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 142-145.
- [5] 张俊琦, 罗晓芳. 牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(5): 720-724.
- [6] 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, 23(1): 47-50.
- [7] 郎玉涛, 罗晓芳. 牡丹愈伤组织的诱导及愈伤褐化抑制的研究[J]. 河南林业科技, 2007, 27(1): 4-6, 29.
- [8] 李萍, 成仿云, 张颖星. 防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用[J]. 北京林业大学学报, 2008(3): 72-76.
- [9] Razmology V P. Tissue induction from anther culture of Paeonia hybrid[C] // Stimulatory and inhibitory Rostovskiy Protseessov u Rase-nii Moscow: 1988: 62-64.
- [10] Hu C Y, Wang P J. Meristem, shoot tip, and bud culture[J] // Evans D A, Sharp W R Ammirato P V. Handbook of plant cell culture. New York: Macmillan Publishing Co., 1983: 171-227.
- [11] 金颢, 何小弟, 吴建华, 等. 芍药离体培养初步研究[J]. 江苏农业科学, 2005(4): 69.
- [12] 于惠敏, 路朋, 何晓光. 植物组织培养技术及常见问题和解决措施[J]. 山东教育学院学报, 2005(6): 103.
- [13] 梁称福. 植物组织培养研究进展与应用概况[J]. 经济林研究, 2005, 23(4): 102.