

JINSHUYUANSU YU ZHIWUZUZHI PEIYANG

金属元素 与植物组织培养

袁云香 著

1
西北农林科技大学出版社

Q943.1

20/41

此书系陕西省教育厅科研计划项目资助

项目编号:12JK0832

金属元素与植物组织培养

袁云香 著



西北农林科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

金属元素与植物组织培养 / 袁云香著. — 杨凌 : 西北农林科技大学出版社, 2013. 7

ISBN 978-7-81092-834-2

I. ①金… II. ①袁… III. ①金属元素—影响—植物组织—组织培养 IV. ①Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 154143 号

金属元素与植物组织培养

袁云香 著

出版发行	西北农林科技大学出版社	
地 址	陕西杨凌杨武路 3 号	邮 编:712100
电 话	总编室:029—87093105	发行部:87093302
电子邮箱	press0809@163.com	
印 刷	陕西天地印务有限公司	
版 次	2013 年 07 月第 1 版	
印 次	2013 年 07 月第 1 次	
开 本	787 mm×960 mm 1/16	
印 张	9.5	
字 数	205 千字	

ISBN 978-7-81092-834-2

定价:25.00 元

本书如有印装质量问题,请与本社联系

前言

植物组织培养是 20 世纪初发展起来的一门新技术,是现代农业生物技术中的一个重要组成部分。植物组织培养成功与否受到多种因素的影响,除了激素、基本培养基成分等外,重金属元素也被广泛地应用于植物组织培养中,其作用日益受到关注。本书是笔者在五年的植物组织培养的教学及科研工作基础上,结合近期的研究成果而著就的。书中主要介绍了植物组织培养的概念及其类型,以及影响植物组织培养的常见原因;分析了金属元素与植物组织培养的关系;对陕西卫矛、太白山常夏石竹、枇杷叶莢蕨、龙凤竹、杜仲及南方红豆杉等的组织培养进行了较为系统地研究,探讨了多种金属对其组织培养的影响,并对其再生体系进行了优化,为其进一步的遗传育种、大规模的种苗培育及次生代谢产物研究提供相关参考。本书在参照国内重点教材有关植物组织培养知识的基础上,融入了国内外最新研究进展,概念准确,实验数据及图片丰富,实验方法详细具体,可作为植物生产类、草业科学类、森林资源类、环境生态类及生物科学类等各专业学生使用,也可供相关科研人员与生产技术人员参考。书中部分实验曾经在《植物生理学报》、《贵州农业科学》、《江苏农业科学》、《北方园艺》和《湖北农业科学》等刊物上公开发表,在此对这些刊物及其编辑一并致谢!

由于水平有限,加之时间仓促,不足之处在所难免,敬请专家和读者批评指正。

著者

2013 年 5 月

目 录

第一章 组织培养概述	(1)
第一节 植物组织培养的概念及其类型	(1)
第二节 影响组织培养成败的几个关键因素	(7)
第三节 植物组织培养中的污染现象	(19)
第四节 金属元素与植物组织培养的关系	(21)
第二章 陕西卫矛的组织培养	(26)
第一节 不同外植体及激素组合对陕西卫矛愈伤组织诱导的影响	(26)
第二节 AgNO_3 对陕西卫矛愈伤组织再分化培养的影响	(32)
第三节 Ca^{2+} 对陕西卫矛愈伤组织再分化的影响	(37)
第四节 AgNO_3 对陕西卫矛再生植株生根的影响研究	(41)
第三章 太白山地区常夏石竹的组织培养	(46)
第一节 太白山地区常夏石竹不同外植体组织培养的研究	(46)
第二节 太白山地区常夏石竹愈伤组织增殖培养的研究	(51)
第三节 太白山地区常夏石竹愈伤组织再分化的研究	(54)
第四节 太白山地区常夏石竹再生植株玻璃化防止研究	(59)
第四章 枇杷叶莢蒾的组织培养	(67)
第一节 枇杷叶莢蒾不同外植体组织培养的研究	(67)
第二节 AgNO_3 对枇杷叶莢蒾外植体褐化的影响研究	(74)
第三节 Ca^{2+} 对枇杷叶莢蒾愈伤组织增殖的影响研究	(79)
第四节 Cu^{2+} 对枇杷叶莢蒾愈伤组织再分化的影响研究	(84)
第五节 枇杷叶莢蒾再生植株生根的影响研究	(88)
第五章 龙凤竹的组织培养	(91)
第一节 不同培养基及激素组合对龙凤竹再分化的影响	(91)

第二节	Ca^{2+} 对龙凤竹愈伤组织再分化的影响	(95)
第六章	杜仲的组织培养	(100)
第一节	杜仲组织培养的研究进展	(100)
第二节	杜仲叶片愈伤组织诱导及增殖培养条件的优化	(106)
第三节	杜仲幼茎愈伤组织诱导及增殖培养条件的优化	(111)
第四节	Ca^{2+} 对杜仲愈伤组织诱导及增殖效应的影响研究	(116)
第五节	硅对杜仲愈伤组织诱导及增殖培养的影响	(120)
第六节	Zn^{2+} 对杜仲愈伤组织诱导及增殖的影响	(123)
第七节	杜仲降血压成分提取方法的研究进展	(127)
第八节	杜仲在食品加工中的应用	(133)
第七章	南方红豆杉的组织培养	(139)
第一节	南方红豆杉愈伤组织诱导及褐化防止研究	(139)

第一章 组织培养概述

第一节 植物组织培养的概念及其类型

1. 植物组织培养的概念

20 世纪 30 年代初期,植物组织培养作为一项重要的生物技术孕育而生,且发展迅速,被广泛应用于工农业生产上,发挥着极其显著的作用,创造出了极大的经济价值。

广义的植物组织培养(plant tissue culture)的概念是指在无菌条件下,将离体的植物器官(如根、茎、叶、花、果实、茎尖等)、组织(如形成层、表皮、皮层、髓部细胞、花药组织、胚乳等)、细胞(如大小孢子及体细胞)甚至没有细胞壁的裸露的原生质体,培养在人工配制的含有各种营养物质并添加了植物生长调节物质等成分的培养基上,通过人工控制其生长环境,使其生长、分化最终形成完整的再生植株的过程。通俗地讲是在无菌的容器中放入植物体的一部分即外植体,通过外界提供充足的养分,以及适宜的环境,使它们得以生存和形成完整植株的一种方法。由于接种的培养物是脱离了植物母体,是在试管等容器中进行培养的,所以也叫离体培养(in vitro culture)^[1-3]。

2. 植物组织培养过程中的常用术语

在组织培养中,我们把由植物(母体)上切取下来进行离体培养的那部分组织或器官叫做外植体。外植体通常都是多细胞的,并且组成它们的细胞常常包括各种不同的类型,包括茎尖、根、茎、叶、花器官以及它们形成的体细胞胚等材料。通常将最初接种在培养基上的外植体的培养称为初始培养,将外植体在人工培养基上长出来的一团无序生长的薄壁细胞称为愈伤组织。将获得的增殖的培养体(芽、茎段或带愈伤组织的丛芽等团块)移植到新鲜配制的培养基上,经过反复多次的切割移植培养称为继代培养。继代周期是指前后两次继代培养的间隔时间(天数)。增殖系数是指后一次培养物(芽或团块)的量比前一次培养物增加的倍数。例如,一个芽(或小团块)经过 15 d 培养后长成丛芽,经过切割分离

成8个芽(或小团块)转移到新的培养基上进行继代培养,那么它的增殖系数就是8,继代周期为15 d。

脱分化是指外植体接种在初始培养基上,由成熟的停止分裂的细胞转变为分生状态,并形成未分化的愈伤组织,最后分化为不定芽或无性胚的现象。植物的种类、组织和细胞的状态决定着脱分化过程的难易程度。一般幼年细胞和组织比成年细胞和组织更易分化,二倍体细胞较之单倍体细胞更易分化。所以在选材时,幼嫩的植物组织常常是首选的实验材料。脱分化产生的愈伤组织,在人为调控下,经过继代培养又可产生分化,这些原已分化的细胞经脱分化培养后,进行再次分化的现象叫再分化,产生分生组织并进一步开始形态建成,通过分化出各组织器官,最终产生完整的植株。将无性幼胚或已分化的芽丛、小球茎即团块再进行增殖,即为增殖培养。生根培养就是通过诱导使不定芽生根,形成完整植株,即通常所称的组培苗。在有些情况下,再分化也可直接发生于脱分化的细胞,而不经愈伤组织阶段。此外,还应该考虑到,植物的再生能力可因基因型或外植体的不同而有差异,同一基因型或外植体在不同培养条件下的表现也可能不同,在条件合适的情况下,高度分化的细胞或组织,也有可能形成再生植株,人们利用植物组织和细胞培养这个优点达到了自己的目的。培养基和创造培养条件的设计原则是使植物组织和细胞进行脱分化和再分化,培养的主要关键点就是设计并筛选培养基,建立适宜该植物再生的培养条件。在植物的组织培养过程中,植物的激素调节对细胞脱分化和再分化起主导作用。植物组织对激素非常敏感,培养基中极微量的生长素类和细胞分裂素、不同种类、不同浓度都会对细胞脱分化和再分化产生直接的影响。因此,通过植物激素的种类、浓度配比的调节,促进组织培养中组织细胞的脱分化和再分化,最终达到获得完整再生植株的目的^[4-6]。

3. 植物组织培养的类型

按培养基的种类来划分,植物组织培养可分为固体培养和液体培养两大类,固体培养又可分为静止培养、旋转培养、纸桥培养、振荡培养等类型。根据培养目的来划分有试管嫁接、试管受精、试管加倍、试管育种等。按培养方法划分有平板培养、微室培养、悬浮培养、单细胞培养等类型。根据培养过程的不同,可分为初代培养和继代培养。另外,还可根据所培养的植物体的部分即外植体的不同来分类,分为植株培养、胚胎培养、器官培养、组织培养、细胞培养、原生质体培养等类型。

3.1 植株培养

指培养材料以完整植株的形态(如较大的植株和小幼苗)为外植体的无菌培养。大体可以分为扦插苗和种苗培养等类型。如果从植物组织培养的词表含义来看,在植物组织培养的范畴内似乎不包括植株培养,但小型的完整植株在实际操作中,却常被用于接种培养,这是为了便于获得适合接种的外植体,或设计某些培养基来研究植株在培养基上的生理反应等。

3.2 胚胎培养

胚胎培养指将成熟或未成熟胚从胚珠中分离出来作为外植体的离体无菌培养。胚胎培养是为了使发育不完全的胚胎部分形成完整再生植株,实验中可以通过对幼胚、子房等的培养来达到。通常把胚胎培养分为胚乳培养、原胚培养、胚珠培养及种胚培养等类型。

3.3 器官培养

器官培养指以植物体各种营养器官根、茎、叶、花、果等为外植体的离体无菌培养,具体的如根的根尖和切段,茎的茎尖和切段,叶原基、叶片、子叶;花器的花瓣、雄蕊(花药、花丝)、胚珠、子房、果实等离体无菌培养。

(1)根段培养

将根段接种在诱导培养基上,诱导其脱分化形成愈伤组织,然后再转移到分化培养基上诱导其分化出芽。

(2)茎段培养

茎段培养指将带有一个以上潜伏芽或不定芽的离体器官培养,包括块茎、球茎、鳞茎在内的幼茎切段的无菌培养。茎段培养以芽生芽的方式进行繁殖,具有成功率高、变异系数小、性状均一、繁殖速度快等优点。

(3)叶片培养

按取材部位的不同,叶片培养又可分为叶尖、叶柄、叶肉培养以及子叶培养等。培养的难易程度在不同植物各部位之间有一定差异,成熟了的叶组织一般不太容易培养,而幼叶、子叶及试管苗的叶片则容易培养成功。所以,选取实验材料时应选取易培养成功的叶组织进行培养。目前通过叶片培养而获得成功的植物很多,例如猕猴桃、杜仲、陕西卫矛、秋海棠、天竺葵、矮牵牛、水稻等。

(4)花器官培养

花器官培养指花的组成部分甚至整朵花的无菌培养,可以是花托、花柄、花瓣、花药、花丝、子房、胚珠等组成部分。现在已有花器官的各个部分诱导再生植

株的报道,实验中花器官细胞表现出较大的全能性能力。

(5)种子培养

种子培养是指对整棵种子或其组成部分进行的离体培养,如胚培养和胚乳培养。由于种子结构完整,由种皮、胚和胚乳三部分组成的,包含着植物体的雏形,且有胚乳或子叶提供营养成分,培养起来较易成功。

3.4 组织培养或愈伤组织

组织培养或愈伤组织指通过分离出植物各部位的组织(如分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮、皮层、胚乳组织等)或以诱导的愈伤组织为外植体的离体无菌培养。

(1)分生组织培养

分生组织培养指顶端分生组织的培养包括根尖、茎尖以及形成层的培养等。在离体培养的情况下,由于分生组织细胞具有持久的分裂能力,可以通过分化并最终发育成完整的植株。分生组织的培养有利于获得无病毒植株。

(2)根尖培养

根尖是植物根部的原生分生组织,是从胚胎中保留下来的,有不断生长的潜力,易于分化,是组织培养中广泛使用的材料。根尖培养有两种方法,第一种方法是将种子表面消毒,在无菌条件下使种子萌发,切取长约0.5~1.0 cm的根尖,接种于愈伤组织诱导培养基上,待愈伤组织形成后再转接到分化培养基上诱导芽的分化。第二种方法是直接取植株的根尖进行表面灭菌后再诱导愈伤组织。根是合成细胞分裂素的主要场合,所以对生长素的反应最为敏感,在培养基中加入一定量的生长素,就能促进根的萌发与生长。

(3)茎尖培养

茎尖是植物顶端的原生分生组织及由它衍生的分生组织,具有非常旺盛的细胞分裂能力和很强的生命力。茎尖分生组织培养仅指长度不超过0.1 mm茎尖的顶端圆锥区的培养,由于外植体很小,一般是很难培养成功的。目前,茎尖培养包括了小到十至几十微米的茎尖分生组织培养以及大到几十毫米的茎芽的培养。

(4)形成层培养

形成层是植物的次生分生组织,是已分化的细胞又恢复了分裂能力,转变为分生组织的。形成层细胞具有较强的细胞分裂和分化的能力。所以常用来研究植物的形态发生。由于形成层很薄,分离时对技术要求很高,有时难免在内外带着一些薄壁组织。

(5)薄壁组织培养

植物的薄壁细胞是细胞失去分裂能力,发生了分化后形成的一种成熟组织。在自然状态下,有很少的一部分细胞可以脱分化,重新转变为分生组织。但如果将其分离,培养在含有植物生长调节剂的人工培养基上则能分裂,甚至能分化为器官。所以常用薄壁组织作为细胞分裂素生物鉴定的材料。

3.5 细胞培养

细胞培养指用果胶酶、纤维素酶从组织中分离出单个的游离体细胞,如叶肉细胞或花粉细胞、卵细胞或较小细胞团等为外植体的离体无菌培养。通常分为悬浮培养、看护培养、平板培养、微室培养等类型,后三种都是单细胞培养。目前,在实际生产实践中,通过悬浮培养可生产某些有经济价值的特殊物质(如杜仲细胞培养获得代谢产物),因此占有较为重要的地位。

3.6 原生质体培养

原生质体培养指以通过质壁分离,除去细胞壁后所获得的原生质体作为外植体的离体无菌培养。通常分为融合与非融合培养等类型。原生质体没有细胞壁,可以直接吸收外源 DNA,可以进行细胞融合获得体细胞杂种,是细胞工程、遗传改良的理想材料,为作物品种选育另辟蹊径^[7-10]。

4. 植物组织培养的理论依据

4.1 植物细胞的全能性

植物的细胞或组织通过组织培养的方法为何能长出一棵完整的再生植株呢?这是由于植物细胞具有全能性,它是组织培养的理论基础。1902 年德国著名植物学家 Haberlandt 首先提出了植物细胞全能性的概念。所谓全能性是指任何生活的植物细胞,只要有完整的膜系统和细胞核,它就会带有一整套发育成一个完整植株所必需的全部遗传信息,在适宜的条件下,可以通过细胞分裂、增殖、分化再生成一个完整的植株,这就是所谓的细胞的全能性。

虽然 Haberlandt 的实验预示了在未分化的植物体细胞中有可能出现正常的胚胎发生过程,但有关全能性的肯定性实验是 1958 年 Steward 等人在以胡萝卜根的组织为外植体的组织培养实验中得到证据的。实验中他们在一种含有椰子汁的固体培养基上,把栽培胡萝卜次生韧皮部薄片用于培养,结果发现长出了由简单薄壁细胞组成的愈伤组织。当把愈伤组织转入到成分相同的液体培养基中进行振荡培养时,又产生了由单个细胞和小细胞团组成的悬浮液。经过显微镜检发现,这些细胞和大小不同的细胞团是那些从愈伤组织上散落下来的,单个

细胞发生分裂后但子细胞没有分离的产物。这些细胞团在培养基中不继代的话,会继续生长,最后可能会出现根原基。把长了根的细胞团接种在固体培养基上培养以后,茎芽进一步发育,形成了一个完整的胡萝卜试管再生植株,经过栽培,该植株能够正常生长并开花结果,其种子与正常植株的种子所繁殖出的后代遗传背景一致,该实验证实了 Haberlandt 的植物细胞具有“全能性”的设想^[11]。

只要这个细胞是一个活的有生命力的完整细胞,即使已经高度成熟和分化,仍就保持着恢复到分生状态的能力。但是在植物体内,由于所处位置及生理条件的差异,自然状态下细胞的分化还将受到其他各方面因素的调控与限制,其所具有的遗传信息不一定能全部表达出来,进而形成了构成植物体的一种组织或器官的某种特化细胞,由此证明植物的生长发育在很大程度上受生长条件的制约,或者说生长条件是极为关键的。细胞潜在的遗传能力在适宜的生长条件下就会表现出来。

4.2 再生植株的形态发生

待外植体接种后,形成的愈伤组织可以通过调节某些植物生长物质的种类、比例来诱导芽或根的分化。一般来说,生长素有利于愈伤组织向形成根的方面发展,细胞分裂素则诱导愈伤组织形成芽。当生长素与细胞分裂素的比值高时则倾向于形成根;生长素与细胞分裂素的比值低时则更易诱导成芽。在实际应用中可以通过调整培养基中的植物生长调节物质的比例,来诱导外植体形成根或芽等器官。在植株组织再分化过程中,培养基中的植物生长物质的种类、水平、配比等因素很大程度上影响着器官的分化,它们控制着植物基因的启动与表达,最终影响其生理、形态上的表现。

在植物的组织与细胞培养过程中,经过脱分化和再分化,再生出新的植株。此过程中特别是再分化阶段,通常有两条途径:

4.2.1 器官发生方式

是指在组织培养的过程中,再生植株通过愈伤组织的部分细胞先分化产生芽(或根),而不是通过胚胎形成的,转接到另一种培养基上形成根(或芽),最后形成一个完整的植株。由于芽和根都是植物的器官,所以把这个过程叫做器官发生途径。通常其可以分为器官间接与直接发生途径两种类型:

(1) 器官间接发生途径

指在培养基中植物生长调节物质等因素的诱导下,所培养的外植体经脱分化后形成愈伤组织,在适宜的植物生长调节物质等培养条件下,再分化出芽、根等器官。采用器官间接发生途径培育试管苗时,可以先将愈伤组织诱导成芽,然后再诱导芽的基部形成不定根,最后获得再生植株,这种方法繁殖系数高,在组

组织培养快速成苗方面应用较普遍。

(2) 器官直接发生途径

器官可直接从外植体上进行诱导,即外植体不需要先经过脱分化形成愈伤组织再分化成器官的途径,如罗丽在杜仲芽的诱导时,发现带芽茎段的诱导率和增殖率均很高。在器官直接发生途径过程中,培养物的染色体倍性基本没有发生变化,发生突变现象的频率较低,有利于所培养的试管苗保持其植株良好的种性。

4.2.2 胚胎发生方式

即在愈伤组织中产生出一些与种子中的胚相似的结构,这种结构同时具有双极性即苗端和根端,转移到另一种培养基上可以同时发展成带有根的苗由于这个过程通过与合子胚类似的发育途径形成幼苗的过程相似,所以叫胚状体发生或者称无性胚胎发生(无性系),即外植体按胚胎发生方式形成再生植株的过程。胚状体途径产生再生植株具有产生不定芽数量多、速度快、结构完整、再生率高等优点。

器官发生方式中的茎芽和根,分别独立形成于愈伤组织的不同部位,形成的时间也不相同,且单极性结构,维管束与愈伤组织是相连的,但在不定芽和不定根两者之间却没有共同的维管束把它们联系在一起。而体细胞胚胎发生方式中的胚状体,其结果是双极性的,有共同的维管束贯穿两极,即使在无激素的培养基上也能脱离愈伤组织而独立萌发。一般认为,愈伤组织中的不定芽起源于一个以上的细胞,而体细胞胚只起源于一个细胞,因此由后者形成的植株其遗传背景表现较一致,没有嵌合现象的发生,但也报道在这类再生植株中同样发现了嵌合现象,因此认为体细胞胚也起源于一个以上的细胞。

在组织培养的条件下,是以器官发生途径还是以胚状体的途径形成再生植株,在不同植物之间有所不同,且培养基的变化也会影响其再生,也有发现同一种植物在相同条件下这两种发生途径共存,发生频率随着基因型不同以及培养条件的变化而变化^[2,4,7,11]。

第二节 影响组织培养成败的几个关键因素

1. 外植体材料的褐化问题

组织培养过程中外植体褐变是影响组织培养成功的重要因素。褐化是植物材料受伤后,体内释放的酚类物质在酚氧化酶的作用下被氧化成褐色的醌类物质的结果,对外植体材料将产生毒害作用,影响其生长和分化,严重时导致植株

死亡。褐化主要与植物材料的基因型和生理状态、取材时期、培养基以及培养条件等有关,在植物组织培养中普遍存在。从植物材料预处理、调整培养基、控制培养条件、添加防褐剂等多方面进行褐化控制,都有大量研究报道。褐化与菌类污染和玻璃化现象并称为植物组织培养的三大难题。褐变是指外植体在培养过程中,自身组织从表面向培养基释放褐色物质,以致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^[12]。

1.1 外植体材料的褐化机理

褐化包括酶促褐化和非酶促褐化,以酶促褐化为主。前者可能是由于细胞的死亡而形成的褐化现象;后者是由于细胞中的酚类物质被多酚氧化酶(PPO)氧化成棕褐色的醌类物质从而导致外植体变褐死亡。植物组织的褐化是通过含铜的氧化酶如多酚氧化酶等起作用的,其底物通常是酪氨酸和邻位羟酚类化合物如绿原酸等。酶和底物在植物正常生长的情况下,分隔存在于完整组织的不同部位,比较稳定。但当细胞受伤或组织垂死时,切口附近的细胞受到伤害,其分隔状态被打破,酚类化合物外溢,酶和底物混合就发生作用,形成深色化合物并逐渐扩散到培养基中,从而导致组织代谢活动紊乱,生长停滞,外植体材料变褐死亡。褐变的发生频率与外植体组织中酚类化合物数量及多酚氧化酶的活性有密切关系。一般情况下,木本植物酚类化合物含量较高。

1.2 褐化发生的原因

褐变的影响因素很复杂的,随植物材料种类、基因型、外植体的部位、取材时期及生理状况、培养基及培养条件等的不同而其危害的程度也有所差异。

1.2.1 植物材料

(1) 基因型

不同种类植物、同种而不同类型、不同品种的植物材料,在组织培养过程中发生褐变的频率及程度都会有很大差异。植物材料中尤其是木本植物,单宁类和多种酚类化合物的含量高的或多酚氧化酶活性高的较容易发生褐化。多数情况下木本比草本植物更易引起褐化,多年生草本植物比一年生草本植物较易引起褐化。因此在选择实验材料时应考虑不同基因型的影响,优先采用不易褐变或褐变程度较轻的外植体作为材料。

(2) 外植体年龄

取样时外植体组织的年龄与褐化的程度有关,一般情况下,幼龄组织产生褐化较轻,成年材料更易褐化,并且随着组织的老化,褐变也逐渐加重。这与幼龄材料酚类化合物含量少,而成年材料比较多有关。因此,在外植体接种时,最好

将鳞片和大叶片剥去,切取幼嫩的芽尖或顶端分生组织(或带少量叶原基),幼嫩部位形成的酚类物质较少,而已分化的部位产生的酚类物质较多。如油棕组织培养时,采用幼嫩组织作外植体时褐变较少,而用高度分化的叶片则容易褐变。在幼苗或幼年植物采集的外植体比从较老植物上采集的外植体分化更容易成功。幼苗或幼年树木作为外植体时,茎尖和节段也会比较容易形成不定芽或根。

(3) 外植体采集季节

外植体的取样时间也影响着褐化的程度。在不同的季节导致褐化的物质的含量有差异,一般冬季褐变少,夏秋季褐变最严重,接种后存活率也最低。一般在春季采取生长旺盛部位的材料褐化现象较轻。季节性不同导致褐化程度的差异的主要原因,是由于植物体内酚类化合物含量和多酚氧化酶活性呈季节性周期变化,植物在生长季节都含有较多的酚类化合物的缘故。陈丽等^[13]研究血皮槭快速繁殖时发现不同时间采摘的外植体,其生长和褐化的程度不同,4~5月采摘的外植体褐化较少,但是分化也少;7~8月采摘的外植体褐化率较高,6月采摘的外植体褐化少,且分化高。

(4) 外植体大小及受伤害程度

切取的外植体较大时容易污染,而且是外植体越大,污染率越高。但是外植体也不能过小,外植体太小时会影响其存活率。如茎尖太小时褐变更容易发生。外植体组织受伤害程度也直接影响褐化。为了减轻褐化,在切取外植体时,应尽可能减小伤口,伤口边缘尽可能剪切得平整些。

外植体对各种化学消毒剂较敏感,其对外植体的伤害也会引起褐变。例如酒精消毒效果较好,但对外植体伤害大,消毒时间过长还导致外植体缺水;相比较而言,升汞对外植体的伤害较轻,用0.3% HgCl_2 溶液代替次氧酸钙进行消毒,可明显减轻褐变。一般来说,外植体消毒时间越长,消毒效果越好,但褐变却越严重。因此,通过调节外植体消毒的时间,有利于缓解外植体褐变程度。

1.2.2 培养基

外植体接种时的培养基的状态(固体、半固体或液体培养基)、无机盐浓度和激素种类及浓度,以及培养基的pH值,都与褐化程度有直接的关系。

(1) 培养基状态

外植体在半固体培养基上培养比在固体培养基上培养时褐化较轻,或者在液体培养基上辅以滤纸桥褐化程度也能得到缓解。这可能是由于外植体溢出的有害物质在液体培养基中很容易扩散开来,从而减轻了对外植体造成的伤害。韩碧文等在研究酚类化合物含量很高的核桃时,采用低氧的半固体培养基,发现褐化得到很好的抑制。

(2) 无机盐浓度

大量研究显示,无机盐浓度过高时对某些植物来说会表现出抑制和毒害效应,如采用 MS 培养基,在初代培养时,由于培养基中的无机盐浓度过高,导致大量的酚类物质外溢,外植体最终褐变。特别是无机盐中的部分离子如 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} ,它们是参与酚类合成和氧化酶类的组成成分或辅助因子,盐浓度过高会增强这些酶的活性,酶又反过来促进酚类合成与氧化,形成一种正性放大作用。所以在初代培养时,考虑到褐变的发生程度,可以采用低盐培养基。这样就降低了 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 离子的浓度,较之在高盐培养基上外植体的褐化程度更轻。李在留等^[14]研究珍稀濒危植物掌叶木愈伤组织诱导时发现,采用 B_5 培养基代替 MS 培养基,将大量元素降为 3/4,外加 0.1% 的维生素 C 并进行暗培养,同时降低总激素的用量,适当增加细胞分裂素的含量,并缩短继代培养周期,则可有效地抑制掌叶木愈伤组织的褐化。

(3)植物生长调节物质

外植体的褐变也与植物激素使用不当有关。在黑暗条件下,初代培养的外植体褐变的主要原因是植物生长调节剂,当去除植物生长调节剂时发现褐变减轻。培养基中的细胞分裂素如 BA、KT 等,具有促进酚类化合物合成,刺激多酚氧化酶活性,BA 浓度过高更易加重外植体的褐化。相反,生长素如 2,4-D、IAA,可以延缓酚类化合物的合成,减轻褐变的发生。

(4)其他附加物质

抗氧化剂具有改变外植体周围的氧化还原反应,抑制酚类物质的氧化,因此在培养基中加入这些物质能起到减轻褐化的目的。目前实验室中使用的抗氧化剂种类较多,抗氧化剂种类不同,其抑制褐变的效果也有差异;在不同培养基中即使同一种抗氧化剂其效果也可能表现不一致。有研究发现,在液体培养基中抗氧化剂的作用比在固体培养基中更强。若用抗氧化剂浸泡外植体一段时间,再进行外植体的接种,也能收到抑制褐化的效果。但要把握好浸泡时间,过长外植体容易褐变,主要是由于抗氧化剂对培养物产生了某种毒害作用。

此外,大量研究报道,当用活性炭或 PVP 等吸附剂添加到培养基中时,可以有效地中和酚类物质氧化造成的毒害作用。但吸附剂用来抑制褐变时,会产生既吸附有毒物质的同时也吸附生长调节剂的副作用。因此,生长调节剂在附加有活性炭的培养基中的使用浓度要比平时高一些。对酚类物质的吸附效果因不同种类的吸附剂而有不同表现,在龙眼的培养中活性炭比 PVP 效果好,而在培养甜柿时 PVP 却比活性炭效果更好。此外,由于活性炭本身的颜色,在培养基中加入活性炭,除吸附作用外,还在某种程度上起到降低光照强度的作用,这种双重作用对减轻褐化效果较好。

(5)pH 值

在 pH 值较低的培养基中,多酚氧化酶活性较低,对底物的利用率也不高,因此外植体的褐化得到减轻。反之,高 pH 值的培养基,褐变程度相应加重。

1.2.3 光照和温度

外植体初始培养时,培养的温度和光照条件也常常影响外植体的褐化程度。

(1)光照

在采集外植体时,如植株枝条在田间自然光照下,其茎尖在接种后褐变程度严重。解决方法可以先对要采样的母株进行遮光处理一段时间,然后剪取外植体,褐变现象可以得到减轻。这是因为参与酚类化合物合成和氧化的许多酶系统,其活性都受光的诱导,暗处理或弱光条件下生长,母株体内的氧化酶活性降低,从而达到抑制褐变的目的。如田间遮光不便,也可以只在接种初期进行暗处理,但抑制效果不如田间遮光处理。

(2)温度

在组织培养过程中,大多数研究表明,细胞的最适生长温度在 $26^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 之间,当然也有例外,且表现差异很大。温度对外植体的褐变程度有很大的影响。有研究报道温度过高时能促进酚类物质的氧化,而低温可以降低多酚氧化酶的活性,从而减少酚类物质的合成,减轻褐变。李云霞等^[15]对紫花苜蓿基因转化过程中褐化问题进行了探讨,发现在季节性影响因素中,培养温度冬季以恒温 25°C 为宜,夏季以白天 23°C 和黑夜 21°C 为宜。光照以 $2000\sim 3000\text{ lx}$ 为宜;夏季还要降低激素浓度或间断性去除激素作用来降低褐化。

1.2.4 更换培养基周期

在外植体接种后的初期,伤口周围积累酚类物质较多,若长时间未及时转瓶,外植体的褐变会加重,严重时甚至导致外植体的死亡。最有效且经济的办法就是在培养过程中,缩短转瓶时间,增加转瓶次数可以有效地减轻褐变。

1.3 防止褐化产生的有效方法

1.3.1 选择适宜的外植体,清洗酚类底物

用于接种的外植体应选取具有较强的分生能力,在适宜的培养条件下能脱分化和再分化。一般来说外植体的生理状态处于生长旺盛时期,褐变程度较低。

在进行表面消毒前,对外植体材料先预处理,采用流水冲洗一段时间(数小时或过夜),再进行表面消毒和接种,且接种后的短时间(1 d 后)内采取多次转瓶,更换到新鲜的培养基上培养,直至褐化基本消失为止。姚永宏等人在福鼎大白茶表面消毒后,用磁力搅拌充分清洗材料,发现对外植体褐化有较大改善。也可以先用液体培养基振荡培养外植体一段时间,再进行转瓶,短期内经过多次更换新鲜培养基,待外植体无褐化时再转移到固体培养基上培养。