

培植體分生組織的褐化與壞死之因素

王美琪¹⁾ 林瑞松²⁾

關鍵字：培植體褐化、壞死、多酚氧化酶、過氧化酶、苯丙胺酸脫氨酶

摘要：植物組織培養技術是利用植物細胞全能性分化的能力從其細胞、組織或器官（或稱培植體）分化且生長成完整的植物體。培植體分生組織的褐化與壞死是植物組織培養時常發生的現象，尤其是木本植物和某些蘭科植物如嘉德麗亞蘭或仙履蘭。事實上，影響植物培植體分生組織的褐化與壞死之因素是複雜的，會因植物的種類、基因型、培植體部位及生理狀態的不同，而有不同程度的褐化與壞死。其中，又以培養條件不當，如缺少硼、鈣或鹽類濃度過高，導致莖頂組織發生褐化、壞死。因此，本篇從培植體組織褐化、培養基成分、發根生理過程在莖頂組織壞死之角色探討培植體分生組織的褐化與壞死之因素。

前 言

植物組織培養技術發展的原理是利用植物細胞全能性分化的能力，可在適當的培養條件下，誘導植物體部分的細胞、組織或器官（或稱培植體）分化且生長成完整的植物體 (Bonner, 1936)。由於在植物組織培養的過程中，培植體經常會發生褐化與壞死而影響其再生 (McCown and Sellmer, 1987)，主要導因於培植體會在切割面處釋放出褐色的物質至培養基中，抑制培植體分生組織的分化並對其細胞產生毒害作用，遂導致培植體逐漸變褐和壞死 (Krishna et al., 2008)。其中，莖頂組織的壞死為試管培養時常見的生理障礙，通常是因培養條件不當，如培養基中缺少硼、鈣或鹽類濃度過高，造成頂芽和幼葉先發生褐化，而後壞死的症狀 (Barghchi and Alderson, 1996)。

植物組織褐化現象概分為兩種：酵素型褐化和非酵素型褐化。(1) 酵素型褐化:細胞內的酵素和其胞內的多酚類物質（又稱酚類化合物）反應，產生褐色的物質，抑制培植體的生長並造成植物體的褐化。(2) 非酵素型褐化:當細胞受到威脅或逆境時，如高溫造成植物

1) 國立中興大學園藝系博士班研究生。
2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

體的褐化、死亡，非關多酚類物質的產生(Litz and Vijayakumar, 1988)。

培植體褐化

培植體的褐化是屬於酵素型褐化，主要與酵素和多酚類物質發生氧化反應有關；目前已知引起褐化的酵素有多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, 簡稱PPO)、過氧化酶 (peroxidase, 簡稱POD)及苯丙胺酸脫氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, 簡稱PAL)，但最主要的催化酶是PPO，其次是POD (Krishna et al., 2008)。

PAL是合成多酚類物質的關鍵酶，當植物組織受到創傷時，PAL的活性就會增加 (Dixon and Paiva, 1995)，催化苯丙胺酸 (L-phenylalanine)進行非氧化性脫氨反應，產生肉桂酸 (trans-cinnamic acid)和氨。肉桂酸再經由細胞色素P450單氧酶 (mono-oxygenase)催化形成香豆酸 (p-coumaric acid)後，再衍生出許多的酚類化合物 (如黃酮素、酚酸、木質酚和單寧等)後儲存於液泡內 (Saltveit, 2000)。事實上，在正常的植物細胞中，位於各種質體和細胞質的PPO、POD和液泡內的酚類物質會因細胞的完整結構而分隔，不會發生反應 (Mayer and Harel, 1979)；但當植物培植體被切割和接種時，細胞結構損壞，細胞膜遭到破壞，PPO、POD和酚類物質即能接觸而作用，PPO、POD會將酚類化合物迅速氧化，變成醌類 (quinones)，醌類進一步再與胺基酸、蛋白質、其他醌類或酚類物質經過一連串的聚合反應後，就會生成褐色的色素，此氧化過程造成培植體褐化(圖1) (Krishna et al., 2008)。

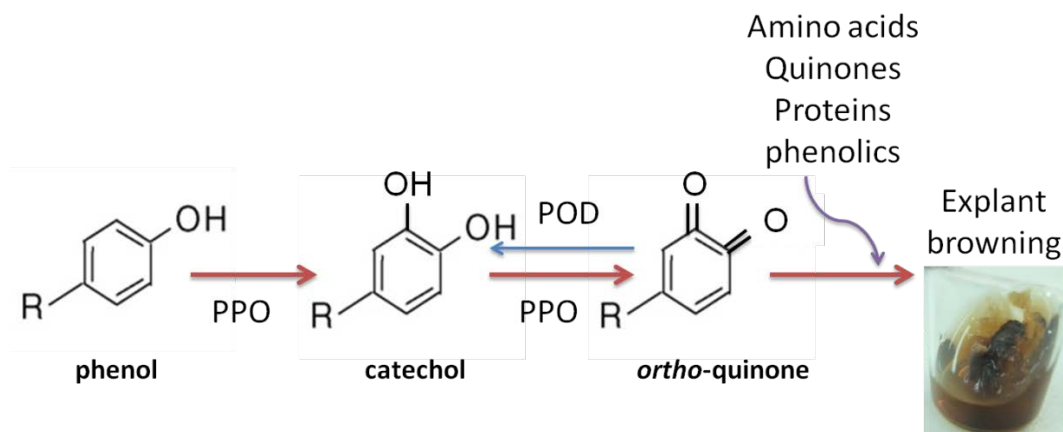


圖1. 培植體褐化。

Fig. 1. Explant browning resulted from enzymatic browning.

PPO, polyphenol oxidase; POD, peroxidase.

由於PAL合成的酚類化合物是酵素型褐化反應的受質，其含量和培植體褐化密切相關，研究顯示蝴蝶蘭培植體的褐化是和PAL合成的總酚含量呈正相關，且在褐化發生的前期酵素型褐化反應的關鍵酶PPO和POD的活性會顯著增加，但褐化產生後其活性即會漸減(許和李，2006)。

(一)自由基與培植體褐化 (free radicals and explant browning)

氧是生物體賴以生存的必要分子，也是植物行光合作用之副產物，氧分子或其他分子其價殼通常具有成對電子較為安定，但有時出現含一個單一電子或一個以上單電子時，這些分子都叫自由基 (Lushchak, 2014)。

當培植體處於機械損傷等逆境時，促使體內自由基產生過多，因為自由基分子本身具高能量，會與其他分子發生化學反應，使之破壞及分解，造成體內清除防禦系統失去平衡，導致超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (catalase)和POD的失常，累積過氧化氫 (H_2O_2)殘害細胞，從而引起褐化的發生 (Housti *et al.* 1992)。有研究顯示抗氧化物的應用能抑制試管組織的褐化，如蘋果培植體在培養前先預措於抗氧化物穀胱甘肽 (Glutathione) (Nomura *et al.*, 1998)或帝王花 (*Protea cynaroides* L.)培植體預措於抗壞血酸和檸檬酸溶液後，就能抑制褐化，且達到100%的存活率 (Wu and Toit, 2004)。

(二)乙烯與培植體褐化 (ethylene and explant browning)

乙烯 (化學分子式是 C_2H_4)是構造最簡單的烯類化合物，在常溫下為氣態，是石油裂解的主要產物，也是植物體內重要的植物荷爾蒙 (Kumar *et al.*, 1998)。許多試管培養的研究亦證實乙烯會影響癒傷組織的生長、體胚的生成，芽的再生和發根 (Biddington, 1992; Pua and Chi, 1993; Giridhar *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005)。就生理而言，植物一旦被切割，就會合成創傷乙烯，引發呼吸作用上升並加速其組織劣變、老化 (Saltveit, 2000)。此外，乙烯會誘導鮮切莖莖PAL的活性上升，累積酚類物質，經PPO和POD作用後，造成組織褐化 (Ritenour *et al.*, 1995)。因此為了控制創傷乙烯引起的培植體褐化，通常會在培養基中添加乙烯抑制劑 (如硝酸銀和aminoethoxyvinyl glycine (AVG))干擾乙烯對植株的作用；研究顯示應用乙烯抑制劑能成功誘導石榴培植體不定芽的生長及提高其再生率 (Naik and Chand, 2003)。

(三)其他因素與培植體褐化

不同部位的培植體，因來自植物不同的生長部位，其生理狀態亦不同，故酚類化合物的含量及PPO的活性亦有差異，於接種培養後，褐化產生的程度也不同。強光 (2,500 lx以上)會提高PPO的活性，因而可能會促使酵素型褐化的發生，而黑暗或弱光下培養可減緩培植體褐化 (Hu and Wang, 1983)。溫度亦對培植體褐化影響很大，溫度升高會促進PPO的酵素反應速率，促進酚類的氧化，較低的溫度 (15-20°C)可以抑制酚類化合物的合成，降低PPO的活性，減少酚類的氧化，從而減輕褐化 (吳等，2002)。此外，培植體的大小和其傷口面積亦會影響褐化，有研究報導較小的 (1 mm以下的材料)和切口面積大的培植體較易褐化、死亡 (姚等，1999)。

二、癒傷組織褐化

癒傷組織是由一群經逆分化形成之薄壁細胞所組成，當培養在含有適當植物生長調節劑之培養基就能分化成芽體或根等組織(Skoog and Miller, 1957)。如麻瘋樹下胚軸癒傷組織發生褐化時，其葉綠素和類胡蘿蔔素的含量會降低，且呈不規則和鬆散的組織結構，導致再生能力的減少，且PPO比POD更能影響癒傷組織的褐化，嚴重時癒傷組織會壞死(He *et al.*, 2009)。

三、植物抗氧化之角色

當植物體受到生物性或非生物性逆境時，可能促使體內有氧代謝的失常，產生活性氧，特別是超氧化物 (superoxide)， H_2O_2 和氫氧化物。由於活性氧分子具有高細胞毒性和活性，所以植物體利用酵素型和非酵素型 (如穀胱甘肽(glutathione)、抗壞血酸 (ascorbate)和生育醇 (tocopherol)等)的抗氧化物來清除活性氧，保護其細胞免於氧化的損害並維持平衡的代謝作用 (Sharma *et al.*, 2012)。

(一)內生參與酵素之生理

植物細胞內生酵素型的抗氧化物有超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、catalase和POD (表一)。SOD歧化超氧化物為氧氣和 H_2O_2 ，按照結合不同金屬離子種類可分為三種：含銅與鋅超氧化物歧化酶 (Cu-Zn SOD)、含錳超氧化物歧化酶 (Mn-SOD)和含鐵超氧化物歧化酶 (Fe-SOD) (Sharma *et al.*, 2012)。SOD主要存在於液泡、葉綠體、過氧化體和粒線體基質中，是防禦植物細胞氧化損傷的關鍵酶 (Scandalios, 1993)。經SOD作用生成的 H_2O_2 ，因對植物細胞和組織有毒性，會再經catalase催化成較無害的水和氧氣 (Willekens *et al.*, 1997)。相同地，POD如抗壞血酸過氧化酶 (Ascorbate peroxidase)的作用也是將有害的 H_2O_2 催化為水和氧氣。因此，培植體自身的抗氧化能力強時，就能快速清除活性氧，免於遭受氧化逆境的損害 (Dan, 2008)。

(二)植物生長調節劑之參與角色

人工合成或萃取的植物生長調節劑是仿效植物體內生的細胞分裂素 (Cytokinin)與生長素 (Auxin)來調控培養的培植體或癒傷組織 (Phillips, 1987)。在植物不同的生長階段，可利用培養基內適當(適時、適量)的生長素和細胞分裂素的比率來誘發各種組織與器官之分化與形成 (Dhar and Joshi, 2005)。一般而言，細胞分裂素是刺激細胞的分裂，促使芽體分化及發育，而生長素則是控制芽體的外表型態 (Teale *et al.*, 2006)。

培養基成分

培養基的成分顯著影響試管植物的生長和發育且攸關培植體分生組織是否能成功再生的關鍵 (El Badaouie *et al.*, 1996；Nas and Read, 2004)。

一、培養基種類與濃度對分生組織壞死之影響

人工培養基中的一些大量元素 (如碳、氮、氫、氧、硫、磷)、微量元素 (如鉀、鈣、鎂及鐵)和微量元素 (如錳、鋅、鈷、鉬、鎳與銅等)是培植體賴以生長和繁殖的營養來源，其種類與鹽類濃度 (即離子濃度)對分生組織 (如莖頂)的壞死頗具影響 (Bairu *et al.*, 2009b)。相較眾多常用的培養基配方後，發現最常用的MS培養基的總氮含量 (KNO₃加NH₄NO₃是60 mM)比其他配方還高。一般當培植體分生組織發生壞死時，通常會歸咎是MS的鹽類濃度過高 (尤其是氮的含量) (Lakshmi and Raghava, 1993)；因此，透過修改培養基中NO₃/NH₄的比率就能改善培植體分生組織的壞死，如南非鈎麻或仙履蘭的培植體分別培養在半量或1/4量的MS培養基時，莖頂或花芽組織的壞死即可降低且能再生 (Bairu *et al.*, 2009a；Liao *et al.*, 2011)。事實上，若培養基內缺乏植物所需之必要元素亦會造成組織之壞死 (Sha *et al.*, 1985；Singha *et al.*, 1990)。

表 1. 植物細胞內生酵素型的抗氧化物。

Table 1. Endogenous enzymatic antioxidants in plant cell.

內生酵素 (endogenous enzymes)	種類 (Types)	位置 (Localization)	受質 (substrate)
超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)	Cu-Zn SOD Mn-SOD Fe-SOD	液泡、葉綠體、質外體、 過氧化體和粒線體	O ₂ ⁻
過氧化氫酶 (Catalase)		過氧化體	H ₂ O ₂
過氧化酶 (Peroxidases)	Glutathione peroxidase	葉綠體	H ₂ O ₂ , ROOH
	Ascorbate peroxidase	細胞質、質外體、過氧化 體和粒線體	H ₂ O ₂

二、培養基之pH值

培養基的pH值會影響植物培植體分生組織對離子的吸收和植物器官的生成 (Pasqua *et al.*, 2002)。通常pH值在5.6-5.9之間能使離子易於在培植體和培養基之間作交換。若pH值出現異常的變動 (低於pH 4.5或高於pH 7.0)很可能會不利培植體吸收培養基的組成而導致分生組織的壞死 (Butenko, 1968)。

三、鈣和硼在分生組織壞死的角色

鈣和硼是植物的必要營養元素，一般認為其在植物體內不易移動，故幼芽或新葉的生

長會從蒸散流作用中取得離子的供應 (Bairu *et al.*, 2009b)。鈣主要和細胞的核膜、細胞膜和液泡膜結構的形成有關，也在植物細胞扮演「次級訊息傳遞者」的角色，調控各種生理功能 (Kudla *et al.*, 2010)。硼主要參與植物細胞膜的完整性和功能性、細胞壁的組成、酵素的活性以及糖的轉運等 (Apostol and Zwiazek, 2004)。培養基若缺少鈣和硼，有可能破壞培植體分生組織的生長 (尤其是莖頂組織) 並促使其迅速的惡化，甚至造成莖頂壞死 (Barghchi and Alderson, 1996)。

四、活性碳與凝膠劑

活性碳是具有孔洞的吸附劑，培養基中添加活性碳是用來吸附培植體切割處滲出的有毒酚類化合物質，降低其毒害作用。當然活性碳亦會吸附培養基中所添加之營養元素和植物生長調節劑，從而妨礙培植體之生長 (Thomas, 2008)。凝膠劑—洋菜是高分子量的多醣體可與水作結合，故可用來固化培養基，其濃度會影響培養基的固化程度，一般約使用 0.5%-1.0% (W/V) 之間 (George *et al.*, 2008)。活性碳之使用也會影響培養基的凝膠狀態。高濃度的洋菜會減少培植體對細胞分裂素的吸收，間接導致分生組織的壞死 (Debergh, 1983)。

五、植物生長調節劑

植物生長調節劑包含生長素、細胞分裂素、激勃素 (gibberellins)、乙烯、離層酸 (abscisic acid) 和油菜固醇 (brassinosteroid) 等類型的化學物質，只要微量就能調控植物組織的生長和發育 (Santner *et al.*, 2009)。而調整細胞分裂素和生長素比例是目前最常應用在培養基中，調控培植體的生長和型態生成。然而，有些作者以為細胞分裂素的使用，可能會造成莖頂分生組織的壞死 (Piagnani *et al.*, 1996)。

發根生理過程在莖頂組織壞死之角色

植物根部是細胞分裂素生合成的主要場所之一，無根會造成內生細胞分裂素的合成減少，導致細胞分裂的停止和莖頂組織的壞死 (Chen *et al.*, 1985)。

一、發根生理與芽體之關係

草本植物芽體的發根是由形成層外的薄壁細胞起始分裂形成根原體，木本芽體則是在形成層附近之韌皮部細胞分裂形成根原體 (Geiss *et al.*, 2009)。芽體頂端分生組織是植物內生生長素合成之主要場所，而生長素的作用之一是促使植物發根，莖頂組織一旦壞死，植物生長素的合成會減少，可能會抑制植物發根 (Kataeva *et al.*, 1991)；或是莖頂壞死後，側芽的生長誘導更多的莖頂，產生更多的生長素，促使強力發根 (Thomas, 2000)。此外，植物芽體的基部若出現癒傷組織就會抑制南非鈎麻的發根，故必須在發根出現之前將其去除；這有可能是因為基部的癒傷組織成為積存庫，吸收一些培養基的成分或間接抑制根的形成而影響植物的發根 (Bairu *et al.*, 2009a)。

二、植物生長調節劑之調控

通常為了促使植物發根，培養基中添加生長素是有效果的。然而也有因使用植物生長素造成莖頂壞死的報導；如榛樹 (*Corylus avellana*) 培養在含吲哚丁酸 (IBA) 的發根培養基導致頂芽的退化 (Perez *et al.*, 1985)。有一些作者認為當植物培養在極少量或無細胞分裂素的發根培養基時，芽體的細胞分裂素會逐漸的減少和耗盡就會造成莖頂的壞死。此外，細胞分裂素使用的類型和濃度與莖頂的壞死有關。在培養南非鈎麻時發現，細胞分裂素的濃度增加會提高莖頂的壞死。此外，處理細胞分裂素 meta-Topolin riboside 的植物相較於處理 benzylaminopurine (BAP) 的植物較能顯著降低壞死率 (Bairu *et al.*, 2009a)。

結 論

影響培植體分生組織的褐化與壞死之因素非常複雜。不同的物種受到不同因素的影響。培植體的褐化是酵素型褐化，其形成要件是酵素 (PAL、PPO、POD)、受質 (酚類化合物) 和氧氣反應而成。此外，莖頂組織發生褐化和壞死可能是因不當的培養條件如缺少硼、鈣或鹽類濃度過高。因此，抗培植體褐化與壞死的試驗應考量多樣的組織培養條件，如選擇適當的培植體、適宜的培養基配方 (適量的鹽類濃度) 或培養條件 (適當的添加硼和鈣)、使用抗氧化劑、乙烯抑制劑或酚類吸附劑，以及連續轉移培養 (減少酚類化合物的累積及毒害) 等，以利培植體成功抗褐化並能再生。

參 考 文 獻

- 吳曉霞、陳剛、張彪、崔月花、淮虎銀。2002。植物組織培養中褐變的研究進展。河北林果研究。17: 284-288。
- 姚洪軍、羅曉芳、田硯亭。1999。植物組織培養外植體褐變的研究進展。北京林業大學學報。21: 78-84。
- 許傳俊、李玲。2006。蝴蝶蘭外植體褐變發生與總酚含量、PPO、POD和PAL的關係。園藝學報。33: 671-674。
- Apostol, K. G. and J. J. Zwiazek. 2004. Boron and water uptake in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 51: 145-153.
- Bairu, M. W., N. Jain, W. A. Stirk, K. Dolezal, and J. van Staden. 2009a. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *S. Afr. J. Bot.* 75: 122-127.
- Bairu, M. W., W. A. Stirk, and J. van Staden. 2009b. Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 98: 239-248
- Barghchi M. and P. G. Alderson. 1996. The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. *in*

- vitro*. Plant Growth Regul. 20: 31-35.
- Biddington, N. L. The influence of ethylene in plant tissue culture. 1992. Plant Growth Regulation 11: 173-178.
- Bonner, J. 1936. Plant tissue cultures from a hormone point of view. Proc. Nat. Acad. Sci. 22: 426-430.
- Butenko, R. G. 1968. In: Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis, Isr. Prog. For Scient. Transla. Jerusalem. pp. 40-45.
- Chen, C. M., J. R. Ertl, S. M. Leisner, and C. C. Chang. 1985. Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plant and carrot roots. Plant Physiol. 78: 510-513.
- Dan, Y. 2008. Biological functions of antioxidants in plant transformation. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 44: 149-161.
- Debergh, P. C. 1983. Effect of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant 59: 270-276.
- Dhar, U. and M. Joshi. 2005. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (*Asteraceae*): effect of explant type, age and plant growth regulators. Plant Cell Rep. 24: 195-200.
- Dixon, R. A. and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7: 1085-1097.
- El Badaouie, H., P. Morard, and M. Henry. 1996. Stimulation of the growth and solamargine production by *Solanum paludosum* multiple shoot cultures using a new culture medium. Plant Cell Tissue Organ Cult. 45: 153-158.
- He, Y., X. L. Guo, R. Lu, B. Niu, P. Vijaya, H. Pei, C. Feng, X. Ying, and C. Fang. 2009. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. Plant Cell Tissue Organ Cult. 98: 11-17.
- Housti, F., C. Michel, and J. D'Auzac. 1992. Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of *Hevea brasiliensis* callus. Physiologia Plantarum 86: 445-450.
- Hu, C. Y. and P. J. Wang. 1983. Handbook of plant cell culture. Macmillan, 1: 77- 227.
- Geiss, G., L. Gutierrez, and C. Bellini. 2009. Adventitious root formation: New insights and perspectives. In Root Development, T. Beekman, ed. (Oxford: Wiley-Blackwell), p. 376.
- George E. F., M. A. Hall, and G. J. de Klerk. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. Plant propagation by tissue culture. pp. 115-173.
- Giridhar, P., E. P. Indu, K. Vinod, A. Chandrashekar, and G. A. Ravishankar. 2004. Direct somatic embryogenesis from *Coffea arabica* L and *Coffea canephora* P ex Fr. under the influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate. Acta Physiologiae Plantarum 26:

- 299-305.
- Gong, Y., F. Gao, and K. Tang. 2005. In vitro high frequency direct root and shoot regeneration in sweet potato using the ethylene inhibitor silver nitrate. *S. Afr. J. Bot.* 71: 110-113.
- Kataeva, N. V., I. G. Alexandrova, R. G. Butenko, and E. V. Dragavtceva. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 27: 149-154.
- Krishna, H., R. K. Sairam, S. K. Singh, V. B. Patel, R. R. Sharma, M. Grover, L. Nain, and A. Sachdev. 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Sci. Hort.* 118: 132-138.
- Kudla J., O. Batistic, and K. Hashimoto. 2010. Calcium signals: The lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22: 541-563.
- Kumar, P. P., P. Lakshmanan, and T. A. Thorpe. 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34: 94-103.
- Lakshmi, S. G. and S. B. V. Raghava. 1993. Regeneration of plantlets from leaf disc cultures of rosewood: control of leaf abscission and shoot tip necrosis. *Plant Sci.* 88: 107-112.
- McCown, B. H., and J. C. Sellmer. 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: Bonga JM, Durzan L (eds) *Cell and tissue culture in forestry. General principles and biotechnology*, vol 1. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp 4-16.
- Liao, Y. J., Y. C. Tsai, Y. W. Sun, R. S. Lin, and F. S. Wu. 2011. In vitro shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 47: 702-709.
- Litz, R. E. and N. Vijayakumar, 1988. In vitro somatic embryogenesis from the nucellus of mango. *Acta Hort.* 231:473-475.
- Lushchak, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224: 164-175.
- Mayer A. M. and E. Harel. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.
- Naik, S. K. and P. K. Chand. 2003. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote in vitro adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). *J. Plant Physiol.* 160: 423-430.
- Nas, M. N. and P. E. Read. 2004. A hypothesis for the development of a defined medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Sci. Hort.* 101: 189-200.
- Nomura, K., S. Matsumoto, K. Masuda, and M. Inoue. 1998. Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M.26. *Plant Cell Rep.* 17: 597-600.
- Pasqua, G., F. Manes, B. Monacelli, L. Natale, and S. Anselmi. 2002. Effects of the culture

- medium pH and ion uptake in in vitro vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco. *Plant Sci.* 162: 947-955.
- Perez, C., R. Rodriguez, and R. Tames. 1985. In vitro filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoots and cotyledonary segments. *Plant Cell Rep.* 4: 137-139.
- Phillips, R. 1987. Effects of sequential exposure to auxin and cytokinin on xylogenesis in cultured explants of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Ann. Bot.* 59: 245-250.
- Piagnani, C., G. Zocchi, and I. Mignani. 1996. Influence of Ca²⁺ and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in vitro shoot-tip necrosis. *Plant Sci.* 118: 89-95.
- Pua, E. C. and G. L. Chi. 1993. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. *Physiologia Plantarum* 88: 467-474.
- Ritenour, M. A., M. J. Ahrens, and M. E. Saltveit. 1995. Effects of temperature on ethylene-induced phenylalanine ammonia lyase activity and russet spotting in harvested iceberg lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 84-87.
- Saltveit, M. E., 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 61-69.
- Santner, A., L. I. Calderon-Villalobos, and M. Estelle. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5: 301-307.
- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101:7-12.
- Sha, L., B. H. McCown, and L. A. Peterson. 1985. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 110: 631-634.
- Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey, and M. Pessarakli. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012: 1-26.
- Singha, S., E. C. Townsend, and G. H. Oberly. 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 23: 135-142.
- Skoog, F. and C. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
- Teale, W.D., I. A. Paponov, and K. Palme. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847-859.
- Thomas, P. 2000. Micro-cutting leaf area, weight and position on the stock shoot influence root vigor, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 61: 189-198.
- Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.* 26: 618-631.

- Willekens, H., S. Chamnongpol, M. Davey, M. Schraudner, C. Langebartels, M. Van Montagu, D. Inzé, and W. van Camp. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.
- Wu, H. C. and E. S. D. Toit. 2004. Reducing oxidative browning during in vitro establishment of *Protea cynaroides*. *Sci. Hortic.* 100: 355-358.

The Factors Affecting Explant Meristematic Browning and Necrosis

M. C. Wang ¹⁾ Ruey-Song Lin ²⁾

Key word: Explant browning, Necrosis, Polyphenol oxidase, Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase

Summary

Plant tissue culture techniques depend mainly on the totipotency of a plant, using a part of the plant such as single cell, tissue or organ (or called explants) to differentiate and grow a whole plant on artificial media. The phenomena of explant meristematic browning and necrosis are very common throughout the period of plant tissue culture; particularly the woody plants and certain orchid species like *Cattleya* or *Paphiopedilum*. In fact, the factors affecting explant meristematic browning and necrosis are complicated. Different plant species, genotypes, explant part and physiological state usually result in different extent of explant browning and necrosis. Moreover, inadequate culture conditions, such as calcium or boron deficiency, "high salt" level in culture medium, induce shoot tip browning and necrosis. Therefore, this review article summarizes the factors affecting explant meristematic browning and necrosis in terms of explant tissue browning, the components of culture media and the role of rooting processes in shoot tip necrosis.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.