

植物组织培养中存在的主要问题与对策

黄海波, 淡明, 郭安平*, 贺立卡 (中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验, 海南海口 571101)

摘要 论述了植物组织培养中污染、褐变和玻璃化现象出现的原因, 提出预防和控制措施。

关键词 组织培养; 污染; 褐变; 玻璃化

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)12-2632-02

Main Problems and Their Countermeasures in Plant Tissue Culture

HUANG Hai-bo et al (State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology / Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101)

Abstract There are three difficult problems in plant tissue culture: contamination, browning and vitrification. These badly affect the construction of plant culture and rapid propagation in vitro system. This article not only explains why these phenomena come out, but also poses some suggestions on how to prevent and control them.

Key words Tissue culture; Contamination; Preventive; Vitrification

自 20 世纪初德国植物生理学家 Haberlandt 提出植物细胞全能性理论以来, 植物组织培养技术发展迅速。植物组织培养是在无菌条件下, 将植物的离体器官、组织、细胞以及去除细胞壁的原生质体, 经过人为控制环境条件, 在合成培养基上对植物进行克隆, 使其生长、分化并成长为完整植株。Murashige 认为, 所有作物都有可能使用植物组织培养技术进行“种子”或“种苗”生产, 任何优良的个体基因型都可以形成无性系从而使作物的产量和质量大大提高^[1]。但在植物组织培养过程中常会遇到一些问题, 使试验无法进行下去, 甚至导致整个试验失败, 给科研和生产造成严重损失, 如污染、褐变和玻璃化。它们是植物组织培养中公认的 3 大难题。笔者论述了植物组织培养过程中 3 大难题出现的原因及解决措施。

1 污染的原因及对策

在植物组织培养过程中污染经常发生, 造成污染的原因很多, 如工作环境空气不清洁, 超净工作台过滤装置失效, 培养基及器皿灭菌不彻底, 外植体带菌及操作违规等。造成污染的病原主要为细菌、真菌、内源菌。

1.1 细菌污染及对策 细菌污染主要由外植体带菌或培养基灭菌不彻底以及操作人员操作不慎造成。对外植体带菌引起的污染, 情况比较复杂, 与外植体的种类、取材季节、部位、预处理方法及消毒方法等密切相关。要想取得理想的无菌材料, 除要求操作人员严格按照无菌操作顺序操作外, 取材时应选择春夏生长旺季当年生的嫩梢(取材应尽量选择晴天中午进行), 离体枝梢在洁净空气条件下抽生的新芽或胚作为外植体材料。

外植体带菌污染的解决措施是对外植体进行彻底消毒。即根据不同材料选择合适的消毒剂 and 消毒方法; 对特殊材料先进行预处理; 对材料内部带菌的组织, 在培养基中加入适量抗生素, 以达到最佳消毒效果。

1.2 真菌污染及对策 真菌污染主要指由霉菌引起的污染。多由接种室内的空气不清洁, 超净工作台的过滤装置失效, 操作不慎等原因引起。细菌污染的主要症状是培养材料附近出现粘液状和发酵泡沫状物体, 或在培养材料附近的

培养基中出现混浊和云雾状痕迹。

此类污染可通过完善操作、培养环境, 严格操作程序来克服。

1.3 内源菌污染及对策 在植物组织培养过程中, 较难处理的是内源菌污染。内源菌污染是由于外植体材料内部(细胞内或细胞间)的微生物(如内生细菌、真菌等)不能被一般的表面消毒方法所清除, 随着材料带菌入培养过程造成的。在组织培养早期会导致培养失败, 增殖效率降低, 培养物生长减缓, 玻璃化苗增加等; 在组织培养后期会导致试管苗移栽困难和死亡。如彩色海芋在快速繁殖 4~5 代后, 组织、培养苗内会出现内生菌(小杆菌), 如不及时采取有效措施, 该内生菌会很快蔓延, 导致组培苗快繁无法继续^[2]。

针对内源菌污染, 有以下防治对策: ①改进外植体消毒方法。结合常规的消毒方法, 采用间隙消毒法。即经过一般的消毒过程后, 把外植体放在不含激素和维生素的培养基中, 培养一段时间后取出, 再消毒 1 次。②反复检查培养物。有的污染很长时间后才会表现, 有的污染不经细致检查不易发现, 所以在初代培养成功后要反复检查, 不要急于扩大繁殖。③使用抗生素。抗生素能抑制污染菌的生长, 在使用初期效果较好。但抗生素不能完全杀死污染菌, 因此潜伏的污染可能会给植物以后的生长带来问题。田永亮等在葡萄组织培养接种初期使用 2 种抗生素, 结果对污染菌的抑制都比较好, 但随时间推移, 2 种抗生素对污染菌的抑制作用都降低^[3]。④再消毒。陈维伦等对已污染的毛白杨、花烛培养物用 0.01% HgCl₂ 消毒 3~5 min 重新接种, 减轻了污染^[4]。

2 褐变的发生机制及对策

2.1 褐变的发生机制 褐变是植物组织培养中一种常见的现象, 目前已成为植物组织培养发展的一大障碍。褐变可分为酶促褐变和非酶促褐变, 目前认为植物组织培养中的褐变主要是酶促褐变。酶促褐变是由多酚氧化酶(PPO)引起的^[5]。正常条件下, 多酚类物质分布在细胞的液泡内, 酚酶分布在各种质体或细胞质内, 这种区域性分布使底物多酚类物质与酚酶被质膜分隔开来。当外植体处于机械损伤等逆境时, 细胞膜的结构遭到破坏, 超氧化歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)3 者作用失调, 积累大量自由基, 进而打破活性氧的产生和清除平衡体系, 使植物

作者简介 黄海波(1979-), 男, 广西武鸣人, 硕士研究生, 研究方向: 基因工程。* 通讯作者。

收稿日期 2006-05-22

细胞受到伤害^[6]。同时,酚酶催化多酚类化合物,使其发生氧化形成棕褐色的醌类物质和水;醌类物质经过非酶促聚合,形成黑褐色物质(羟醌与黑色素等),引起褐变的发生。

2.2 防治对策

2.2.1 选择适宜的外植体和培养条件。

(1)选择适宜的外植体。所选材料的年龄、取材部位、材料的大小及外植体受伤害程度等均能对褐变产生影响。处于生长旺盛时期的材料,具有较强的分裂能力,其褐变程度低,是植物组织培养之首选。一般幼龄材料褐变较轻,成龄材料茎尖的褐变则较严重。当茎尖小于 0.5 mm 时,褐变达 70 % 以上,而随着切割长度增大,褐变减轻;以茎尖 7~15 mm 褐变较轻,组织培养苗成活率达 87 %。此外,外植体受伤害程度直接影响褐变,切割时应尽可能减小伤口面积,并缩短切口在空气中的暴露时间。

(2)选择适宜的培养条件。培养基的状态、类型与培养基的组成如无机盐和蔗糖浓度、激素水平及组合等要适宜。温度、pH 值要尽量调整到褐化物分泌最少的状态(酸性环境不利于褐变的发生);使用静态培养和固体培养交替进行,以减轻褐变。

2.2.2 进行细胞筛选和材料预处理。在组织培养过程中经常进行细胞筛选,可以剔除易褐变的细胞。对较易褐变的外植体材料进行预处理,可减轻醌类物质的毒害^[7]。将易褐变的外植体材料放在黑暗条件下培养一段时间,连续转移,可以减轻褐变。

2.2.3 使用抑制剂。组织培养时,在培养基中加入抗氧化剂和其他抑制剂可抑制外植体的酶促褐变。

2.2.4 使用吸附剂。在培养基中加入吸附剂可以抑制褐变。活性炭是吸附性较强的无机吸附剂,但在使用过程中,应尽量使用最小浓度来防止褐变,因为活性炭的吸附作用是无选择性的。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是酚类物质的专一吸附剂,常用作酚类物质的保护剂来防止褐变。

3 玻璃化的原因及对策

植物组织培养中,常可以见到一些半透明状的畸形试管苗,这类植物体被称为“玻璃苗”,这种现象被称为“玻璃化现象”,又称过度水化现象。发生玻璃化的组织培养苗,其组织结构和生理功能异常,分化能力低下,难以增殖成芽和生根成苗,移栽大田更难成活。目前,玻璃化已成为组织培养工作中的一大难题。

3.1 玻璃化发生的规律及原因 玻璃化是植物组织培养中特有的现象,在自然环境中的陆生植物未见玻璃化现象。众多研究表明,玻璃苗大多来自茎尖或茎切段培养物的不定芽,仅极少数来自愈伤组织的再生芽。已经玻璃化的试管苗,随着培养基和培养环境的变化有可能逆转,也可通过诱导愈伤组织形成后再生成正常苗。导致玻璃化的因素很多,但不同植物种类的玻璃化诱发因素往往不同。除人为增加染色体导致玻璃化的 1 例报道外,未见玻璃化与遗传直接相关的研究^[8]。高国训等将玻璃化苗逆转为正常植株,说明玻璃化并不能遗传^[9]。有关试管苗的玻璃化现象发生原因已形成以下共识:①玻璃化苗是在试管内受控条件下培养植物的产物,是人工提供的培养基和培养条件不完全符合培

养物固有需求的结果。②与愈伤组织再生苗相比,从茎尖、茎段培养物直接增殖不定芽形成试管苗的进程快、时间短,部分外植体的分生组织还不能适应新的环境,导致玻璃化的发生。③不论试验设计千变万化,但试验培养条件有许多方面相似,如光照弱、培养容器内相对湿度近乎饱和、氧气供应不足、培养基内各成分大多相似、无机盐供应处于完全速效状态和植物体处于异养等。但相似的培养基和培养条件,与特定植物适宜生长环境差距不同。这也是不同植物产生不同程度玻璃化苗的原因。④在一定程度上可认为,组织培养过程中试管苗的玻璃化现象主要是适应性的生理问题。

3.2 玻璃化发生机制 茎尖、茎段处于离体培养和整体植株处于自然生长环境的差异主要在于:①茎尖、茎段离体培养时切断了与根的联系,而丧失了由根承担的对离子选择吸收和原来由根供应的细胞分裂素和脱落酸,这在一定程度上改变了茎尖、茎段内的离子平衡状况和激素平衡状况;②茎尖、茎段离体培养时碳营养由自养变为异养,这在一定时期内必然会使茎尖、茎段内的碳代谢和有关的生物合成受到影响,其中包括对 NH_4^+ 的同化;③培养时光照远较自然环境下弱,一般仅为 1 000~3 000 lx,培养器皿内相对湿度过高,氧气供应逐日下降, CO_2 浓度逐渐上升,培养基中各化学成分往往开始浓度过高而后又供应不足。玻璃化发生原因的研究报道不少,其中关于乙烯和根皮苷在玻璃化中的作用研究较系统、深入。乙烯对玻璃化的诱导作用目前已基本否定,根皮苷克服玻璃化的效应在植物种类上有较大的局限性。目前研究主要集中在水势过高的影响和以细胞分裂素为代表的激素平衡及以 NH_4^+ 为代表的矿质元素平衡供应 3 个方面。关于玻璃化原发机制的研究仍无结论。目前的研究还不够系统深入,例如玻璃化是否与脱落酸有关, NH_4^+ 以外的其他离子间是否存在平衡失调问题和培养基水势过高、渗透失调的生理影响等都还有待探讨。从适应性角度考虑,不同植物发生玻璃化原因不同,至于不同的起因最后如何会导致相同的结果——木质素合成受阻、细胞分化受抑,是需要深入研究的问题。

3.3 防治对策

(1)利用固体培养,增加琼脂浓度,降低培养基的衬势,造成细胞吸水阻遏,可降低玻璃化^[10-11]。琼脂浓度应不低于 0.8 %,条状琼脂先用双蒸水浸泡 24 h 去除杂质,粉状琼脂应尽可能选用含灰量低于 2.5 % 的琼脂粉。因为琼脂杂质中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等含量较高,会影响培养基中矿质元素的含量和比例。

(2)玻璃化发生是“生长因子不平衡的产物”,是培养物“中毒”、不能很好适应培养基和培养环境的结果。因而提高培养物对逆境的耐受能力是有益的。可适当提高培养基中蔗糖含量或加入渗透剂,降低培养基中的渗透势,减少培养基中植物材料可获得的水分,造成水分胁迫。

(3)注意通气,尽可能降低培养容器内的相对空气湿度和改善氧气供应状况。目前较多使用塑料薄膜封口,要注意薄膜的通透性或改用透气膜^[12-13]。

(4)适当降低培养基中 NH_4^+ 浓度,或者及时转移,使

(下转第 2894 页)

期、减轻农民负担、按保护价敞开收购余粮等农村基本政策,优化增收环境;四是加强劳动力市场的培育,搞好劳务输出提高农民收入;五是把增收和减负结合起来,坚决落实减轻农民负担的相关政策。

3.2 加快小城镇和新农村建设,努力优化农村消费环境 推进小城镇和新农村建设,有利于增加农民收入,有利于改变农民消费倾向和消费方式,是启动农村市场的切入点和突破口。要以“农村城镇化、农业现代化、城乡一体化”为目标,按照“高标准、严要求、创特色”的原则,因地制宜,分类指导,总体推进,并在税费返还、用地审批、投资融资、户籍管理、二三产业发展等方面给予优惠倾斜,抓好小城镇建设,尤其是重点城镇建设和乡镇机关所在地集镇建设,加快新农村建设步伐。同时,要针对当前农村基础设施建设投入不足的实际,运用基础设施建设股份化、民营化、市场化的办法,多方位筹措资金,大力改造农村电网,建设自来水供应系统,改善交通条件,提高电视接收覆盖面,发展农村电话网,加强售后服务,努力创造有利于农村消费的环境条件。

3.3 发展高产优质高效农业,推进农业现代化 从一定意义上讲,现代农业是一个用先进的工业生产设施和工业物资技术手段不断改造传统农业的过程,农业生产环节的科技含量越来越高,所需求的工业技术装备就越多,农业现代化的过程,实际是一个农业生产资料市场不断扩大的过程。与此同时,农业科技进步,使得有些农业生产项目已形成制度化、规范化、标准化,这就为工业领域开拓了新的行业,形成工业与农业联动的新局面。

3.4 捕捉农村市场新亮点,创造消费需求新热点 农村市场商机无限,关键在于能否准确把握农村的需求,为此,企

业要坚持面向农村,服务农村,研究农村市场的需求结构,探索农村的收入水平、文化层次、生活环境、消费习惯以及消费的新特点,并以此来调整生产结构和产品结构,加快产品更新,用物美价廉、功能简单、经济实惠、经久耐用的商品打开农村市场。目前,要重点在建筑建材、农业机械、化肥、农药、农膜等生产资料和洗衣机、彩电、冰箱、摩托车、电话等生活消费品上下功夫,更多地生产适销对路的产品,提高对农村市场的有效供给,刺激农村消费形成新热点。

3.5 引导农民正确消费,拓宽消费领域和层次 更新消费观念是开拓农村市场的先导,要引导农民破除小农意识,激发农民通过勤劳致富,换取生活的改善,提高生活质量,领略新的消费时尚,拓宽消费领域。同时,要着重提高农民的素质,引导农民追求文明、健康、向上的生活方式,加大科技、文化、教育、娱乐、旅游等非商品性消费,改善消费结构,提高农民消费水平和档次。在更新农民消费观念的基础上,还要发展农村的消费信用,改变传统的积累型支付方式,重点扩大住房、农用车、大型家电、农机产品等市场,实现从滞后型消费转为适当超前消费,将潜在需求转变为现实需求。

参考文献

- [1] 杨素群.中国农业现代化重大关系研究[M].北京:中国人民公安大学出版社,2002.
- [2] 余红.中国农民社会负担与农村发展研究[M].上海:上海财经大学出版社,2000.
- [3] 姜法竹.论农产品批发市场组织形态的演进与交易方式的更新[J].广东商学院学报,2002(1):53-56,60.
- [4] 陈吉元,彭建强,周文斌.中国农业与农村经济[M].郑州:河南人民出版社,2000.
- [5] 赖昭瑞.现阶段农民负担过重的深层原因分析[J].经济问题,2000(5):32-35.

(上接第 2633 页)

NH_4^+ 浓度高低交替;适当提高培养基中的 Ca^{2+} 浓度;注意细胞分裂素和生长素的配合以及激素和 K^+ 之间的配合,以兼顾不定芽增殖系数和抑制玻璃化的发生。

(5)控制温度,适当进行低温处理,避免过高的培养温度,可消除玻璃化^[14]。

(6)增加自然光照。试验发现,玻璃苗放于自然光下几天后,玻璃化逐渐消失^[15]。

4 展望

近年来,已从发病机理入手,使控制措施从治标走向治本。相信不久的将来,植物生理学、生物化学、组织培养学等学科的合作,将为组织培养中这 3 大难题的机理研究和经济、有效预防措施的使用提供更有力的证据,使组织培养技术日臻成熟和完善,从而发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 孙敬三,桂耀林.植物细胞工程技术[M].北京:科学出版社,1995:200-225.
- [2] 王亦菲,陆瑞菊,周润梅,等.彩色海芋组织培养过程中内生菌的抑制[J].上海农业学报,2001,17(2):82-83.
- [3] 田永亮,张文,张国珍,等.两种抗生素对葡萄组培中污染菌的抑制作用[J].北方园艺,2005(5):84-85.
- [4] 陈维伦,杨善英,郭东江.一种以黄化法为基础提高毛白杨快速繁殖

效率的新方法[J].植物学报,1991,33:14-18.

- [5] ASMUS B, HAMME H. Enzymatic browning of vegetables. Calibration and analysis of variance by multiway methods [J]. Chemometrics Intelligent Laboratory Systems, 1996, 34: 85.
- [6] 寇莉苹.温度和气体成分对富士苹果果肉褐变的影响[D].陕西:西北农林科技大学,2001.
- [7] 崔唐兵,郭勇,张长远.植物组织培养中褐变现象的生基理及克服方法[J].广东农业科学,2001(3):16.
- [8] LANGE W. Monosomic additions in beet (*Beta vulgaris*) carrying extra chromosomes of *B. Procumbens*. 2. Effects of the alien chromosomes on in vitro and in vitro plant development [J]. Theor Appl Genet, 1988, 76: 656-664.
- [9] 高国训,李光晨,张潞生.逆转苹果试管苗玻璃化的研究[J].华北农学报,1997,12(专集):48-51.
- [10] 韩美丽,唐玉贵,黄华艳.神灯白掌组培再生体系的建立与玻璃化现象的控制[J].广西林业科学,2000,29(3):111-114.
- [11] 张晓军.香石竹离体快繁过程中玻璃化现象的研究[J].牡丹江师范学院学报,1999(2):4-5.
- [12] JOM H, HAM I K. Effects of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plantlets in vitro [J]. Journal of the Korean Society for Horticulture Science, 2002, 43(2): 133-136.
- [13] 高疆生,张卫芳,段黄金,等.克服香石竹试管苗玻璃化研究[J].北方园艺,2001(3):34-36.
- [14] 储成材,李大卫.牡丹组织培养中玻璃化现象的出现及初步观察[J].信阳师范学院学报:自然科学版,1993,6(1):98-101.
- [15] 韩建军.叶子花组织培养中培养条件与玻璃化的相关性[J].中国林副特产,2002(1):48.