

# 植物组织培养中存在的问题及改进方法

朱小虎<sup>1</sup>, 王晓炜<sup>1</sup>, 米立刚<sup>2</sup>

(1. 新疆农业大学林学院, 新疆乌鲁木齐 830052; 2. 克拉玛依市农科所, 新疆克拉玛依 834000)

**摘要:**植物组织培养操作过程中的经验积累和关键技术的掌握很重要。在实验过程中常常出现下列问题: 培养基母液配制时容易出现钼酸钠难溶解、母液在贮存过程中产生沉淀或有结晶析出、培养基高压蒸气灭菌后会出现灭菌不彻底。而常规的无菌操作工作效率较低且容易导致培养基污染。通过改进母液的配制方法、培养基高压蒸气灭菌时采用二次排气法以及在无菌操作过程中使用无菌培养皿等可解决实验中常出现的问题; 采用固体培养有其局限性, 而液体浅层静置培养有着明显的优点, 值得在实验中推广。

**关键词:**植物; 组织培养; 培养基

**中图分类号:**S-3      **文献标识码:**B      **文章编号:**1001-4330(2006)S1-0095-04

## Problems and Solutions in Experiments on the Culture of Plant Tissue

ZHU Xiao-hu<sup>1</sup>, WANG Xiao-wei<sup>1</sup>, MI Li-gang<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Karamay Institute of Agricultural Sciences, Xinjiang 834000, China)

**Abstract:**The accumulation of experience and acquisition of skills are of great importance in culturing plant tissue. The difficulty in dissolving Sodium Molybdate occurred in compounding mother liquor of culture medium. The sediment and crystallization occurred in the storage of mother liquor. The bacteria still survive after the extermination of them in high-pressure steam and the pollution of culture medium caused by the inefficiency of regular aseptic manipulation are the problems to be solved. The improvement in the process of compounding mother liquor was adopted by twice outlet of air when exterminating bacterium in high-pressure steam and the use of aseptic culturing instruments in aseptic manipulation help to tackle the problems mentioned above in doing experiments. Static culture in shallow liquid is superior to that in solid state, which is worth promoting.

**Key words:** plant; culturing tissue; improvement in experiments

植物组织培养研究自 Haberlandt(1902)的工作开始, 至今已有 100 多年的历史。广义的组织培养不仅包括在无菌条件下利用人工培养基对植物组织的培养, 而且包括对原生质体、悬浮细胞和植物器官的培养<sup>[1]</sup>。现在植物组织培养技术已在科研和生产中广泛应用, 成为最常用的生物技术之一。虽然植物组织培养的操作过程并不复杂, 但在实验和生产过程中常常会遇到一些问题, 重者会导致实验和生产的失败, 给科研和生产造成损失。

针对植物组织培养过程中出现的几个问题进行分析, 并提出实验改进方法。

## 1 培养基母液配制

MS 培养基是组织培养中常用的培养基, 下面以 MS 培养基为例, 简述其母液配制过程常出现的问题及改进方法。

### 1.1 大量元素母液贮存时有沉淀物

大量元素中的  $\text{Ca}^{2+}$  与  $\text{SO}_4^{2-}$  和  $\text{HPO}_4^{2-}$  容易生成  $\text{CaSO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$  沉淀。改进方法是把其中的  $\text{Ca}^{2+}$

单独配制成一个贮备液,而把其它的大量元素配制成另一个贮备液。

考虑到大量元素的溶解及使用方便,通常配制成 20 倍母液。例如配制 1 000 mL 培养基,只需取 50 mL 大量元素母液。

## 1.2 微量元素母液配制

### 1.2.1 钼酸钠难溶于水

在配制微量元素母液时常常出现加入钼酸钠( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )后,钼酸钠难溶解,即使通过加热也无法解决。较好的方法是先用室温下的蒸馏水单独溶解后再倒入微量元素母液内。

### 1.2.2 微量元素的用量

微量元素的用量极微。特别是其中的硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )和氯化钴( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )按配制 100 倍母液计算,配制 1 000 mL 的母液仅需分别称取 5 mg。若没有分析天平或分析天平的称量误差较大很难准确称取,解决的方法是分别称取 50 mg 溶解于少量的水,再加水定容至 100 mL 后,用移液管准确吸 10 mL。

### 1.2.3 铁盐溶液贮存时容易出现结晶

MS 配方中的铁盐是 EDTA 螯合铁,它是由硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )与乙二胺四乙酸钠( $\text{Na}_2 - \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )螯合而成。新配制的螯合铁颜色为淡黄色,贮存一段时间颜色会加深但无结晶析出,不影响它的质量。如果刚配制的铁盐放入冰箱后出现结晶,可能的原因有:配制螯合铁时,没有使  $\text{FeSO}_4$  与  $\text{Na}_2 - \text{EDTA}$  完全螯合,此时如果将其放入冰箱保存,由于温度降低, $\text{FeSO}_4$  和  $\text{Na}_2 - \text{EDTA}$  就会结晶析出。

配制 EDTA 螯合铁的改进方法:将  $\text{FeSO}_4$  和  $\text{Na}_2 - \text{EDTA}$  按 1 000 mL 母液的用量准确称取后分别置于盛有 500 mL 蒸馏水的烧杯中,加热并不断搅拌使之溶解,然后一边加热一边把  $\text{FeSO}_4$  溶液慢慢倒入  $\text{Na}_2 - \text{EDTA}$  溶液中并不断搅拌直至溶液接近沸腾,停止加热,待溶液冷却后倒入试剂瓶,放入冰箱保存。

## 2 培养基的灭菌及其改进方法

手提式、卧式高压蒸气灭菌锅是组培工作中最常用的灭菌装置。水蒸气的温度随其所受压力的增加而升高,因而灭菌用的高温蒸气都是通过加压获得<sup>[2]</sup>,而空气的热胀系数比水蒸气大,如果灭菌锅内的空气没排除或排除不完全,那么,即使灭菌锅的压力表反映出锅内的压强单位,有空气存在下灭菌锅内也无法达到灭菌所需的温度。

有实验显示若锅内的空气只排除一半,压力表指针达到 0.105 MPa 时。锅内的实际温度仅能达到 112℃,比要求的 121℃ 低 9℃,导致灭菌不彻底,可能造成培养基的大量污染。所以,高压灭菌锅的使用中,关键是设法排除锅内空气。

常用的排除灭菌锅内空气的方法是,先关放气阀,待锅内压强升到 0.05 MPa 时,打开放气阀排出空气,当排放至压力表指针为零时再关闭,继续加温直到锅内压强达到灭菌规定时开始计时,按不同灭菌材料,维持一定时间。

组培培养基的灭菌要求是在 0.105 MPa、维持 15~20 min。按照这种要求给培养基灭菌时,常发生有个别培养基灭菌不彻底。原因可能在于一次排空气法仍无法排除锅内的空气。采用二次排气法对培养基灭菌。经过多年的实践证明,未发生过培养基灭菌不彻底的现象。

高压蒸气灭菌锅二次排气灭菌法的做法是:先按常规第一次排气后,继续加热,当压力表再一次升到 0.05 MPa 时,再排一次锅内的空气,之后的操作与常规法相同。

## 3 无菌操作及其改进方法

无菌操作技术直接关系到组培材料及培养基的杂菌污染率,是组织培养过程的关键技术之一。若

无菌操作技术不规范或操作技术不熟练都可能引起刚接种的外植体或组织苗大面积污染,为减少组织苗的污染率,对无菌操作过程的某些环节作了改进,既提高了工作效率,又减少了污染率。

### 3.1 每次接种时只使用一个无菌铝盘

#### 3.1.1 一般作法

组织培养中外植体、愈伤组织、丛生芽及出根苗的分切皆要使用培养皿,一般的做法使用一个小培养皿,接种每一瓶组织苗之前用70%~75%的酒精擦拭后再放到酒精灯上灼烧,这种做法容易产生下面两种情况。

(1)灭菌不彻底,容易形成交叉污染,即某一瓶组织苗污染后通过未经完全灭菌的培养皿传染给它原来没杂菌的组织苗,严重者会引起同时间内接种的材料大部分污染。

(2)刚在酒精灯上灼烧的培养皿不容易冷却,经常烫伤丛生芽或出根苗。而且每次都重复灭菌过程浪费大量的时间,导致接种工作效率低下。

#### 3.1.2 改进方法

购买足量的培养皿(直径12~16 cm),具体数量可根据接种人员一个工作单元所使用的最大量计算。把培养皿洗净干燥后用报纸按每10~20个为一单位包起来,放入高压蒸气灭菌锅内,在0.144 MPa的蒸气压下灭菌40 min。经高温灭菌后的培养皿是无菌的。每次使用时只要取一个直接使用就可以了,每一瓶组织苗只使用一个无菌培养皿,采用这种方法接种,工作效率提高了,收到明显的效果。

### 3.2 使用2套镊子和手术刀提高工作效率和减少污染率

无菌操作时,手术刀和镊子是最常用的接种工具,可使用手术刀切开组织块,用镊子夹取实验材料。通常的做法是使用一套镊子和手术刀,每次灼烧灭菌后皆要等待冷却后方可使用。既浪费时间,又容易因赶时间导致灼烧灭菌不彻底。

采用2套用具后,一套在使用时,另一套可放在超净工作台的一边灼烧和冷却,工作效率可提高接近1倍。

## 4 浅层液体培养在组织培养中的应用

### 4.1 组织培养的固体培养

通常植物组织培养采用固体培养。在固体培养时琼脂是最好的固化剂,它最主要的作用是使液体培养基凝固,有一些报道提到采用滤纸、玻璃球、玻璃棉、石英砂、硅石、明胶、硅胶、丙烯酰胺、泡沫塑料,甚至南瓜、马铃薯等取代。然而直至目前为止,比琼脂更方便和更好的支持物仍未发现<sup>[3]</sup>。

琼脂又名琼胶、洋菜或冻粉,它是从海生红藻(主要是石花菜)中提取的冻胶状物质,在96℃时融化,当温度降至45℃时,又恢复凝胶状。琼脂的主要成分半乳糖,还有少量葡萄糖醛酸,组织苗无法分解吸收这些物质。所以,在培养基中不提供任何营养,在配制固体培养基时,琼脂的用量一般在4~10 g/L。

加入琼脂所配制成的固体培养基的优缺点为:

#### (1)优点

操作简便,对培养物的支持、通气较易解决,便于经常观察研究等。

#### (2)缺点

培养物与培养基的接触(即吸收)面积小,各种养分在琼脂中扩散较慢,并且各种养分的扩散速度不同,使养分补充慢,而且在培养物周围的养分比例有变化。培养物的代谢废物也不容易扩散而聚集在周围,可能抑制植物组织的代谢活动。所以,植物组织在固体培养基上生长速度较液体培养慢。

## 4.2 液体浅层静置培养

从快速繁殖的发展趋势来看,液体培养将取代固体培养。以前液体培养往往要使用恒温摇床或旋转式振荡设备来解决通气问题,这样不仅增加成本、占地多,又限制了容量,导致液体培养仅在少量研究中应用而很难应用于组培苗的大生产。在大花蕙兰等组织苗的实验中进行了液体浅层静置培养方法的试验,结果表明,这些植物的组织培养皆可采用液体浅层静置培养。其主要优点简述如下。

### 4.2.1 不增加设备投入

采用液体浅层培养不需增加设备投入,便可解决组织苗在液体培养中的通气问题。

### 4.2.2 降低培养基的生产成本

据计算,琼脂约占培养基成本的80%,采用液体浅层静置培养可大大减少培养基的生产成本。

### 4.2.3 养分吸收面积大

养分交流补充快,植物组织排出的代谢废物扩散快,自体抑制效应较弱,植物组织生长速度快,生长量也较大。例如在大花蕙兰的组织培养中,液体浅层静置培养的继代时间每代可比固体培养的缩短5~6 d,丛生芽的增殖数也可提高。

### 4.2.4 提高工作效率

采用液体浅层培养,在继代培养或生根苗的接种中省去了在瓶内用镊子栽种的工序,只要把接种的组织或小苗分散放入培养瓶内即可。另外出根苗生根培养出瓶后,也节省了冲洗附于根部琼脂的工作,可减少劳动力的投入。

由于液体浅层静置培养法在生产大面积应用的报道相对较少,使用此法时一定要进行必要的实验,成功后方可逐渐扩大,以免因经验不足或该品种对液体培养适应性较差而造成损失。

### 参考文献:

- [1]李波明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业出版社,1992,1.
- [2]朱广廉.植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题[J].植物生物学通讯,1995,31(5):373--375.
- [3]谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991:58.