

植物组织培养快繁中存在的主要问题及防止措施

巩 健

(淄博职业学院 山东 淄博 255013)

【摘 要】阐述了植物组织培养快繁中褐变、玻璃化、污染和移栽成活率低等问题出现的原因,提出预防和控制措施。

【关键词】组织培养;褐变;玻璃化;污染

Main Problems and Counterplans in Plant Tissue Culture and Rapid Propagation

Gong Jian

(Zibo Vocational Institute, Zibo, Shandong, 255013)

【Abstract】In plant tissue culture and rapid propagation, there are many problems such as browning, vitrification, pollution and low survival rate of transplant. In this paper, the reason of these phenomenon is studied and some counterplans are proposed.

【Key words】plant tissue;browning;vitrification;pollution

植物组织培养技术自 20 世纪初德国植物生理专家 Haberlandt 提出植物细胞全能性理论以来,至今已经发展成为现代生物技术的重要组成部分,并且广泛应用于农业、林业、医药工业等方面,产生了巨大的经济效益和社会效益。虽然植物组织培养过程并不复杂,但在实验和生产过程中常常会遇到一些问题,重者会导致试验和生产的失败,给科研和生产造成损失。本文针对组织培养过程中常出现的几个问题提出相应的防止措施。

1. 褐变问题及防止措施

褐变是组织培养中常遇到的问题,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,使培养基逐渐变成褐色,外植体也随之进一步褐变而死亡的现象。

1.1 褐变的原理

植物组织培养过程中的褐变现象是由多种因素综合产生的结果,随植物的种类、基因型、外植体生长部位以及生理状态、培养基及培养条件等的不同而不同。豆科植物和芸苔属植物在原生质体培养中容易发生褐变是一个普遍性问题,在芸苔及其衍生种或变种中的褐化问题尤为严重。

王永清等(1997)^[1]曾在樱花于不同培养基中生长状况的比较中发现,1/4MS 在一定程度上能减轻樱花外植体的褐变。培养条件如温度、光照等对褐变均有影响。温度过高或光照过强,都可以提高 PPO 的活性,从而加速被培养组织的褐变。

外植体的褐变是一种酶促褐变,这一点已为大多数的学者认可。植物组织培养中褐变的发生与外植体组织中所含的酚类化合物多少和多酚氧化酶(PPO)活性有关。特别是木本植物都含有较高的酚类化合物。正常条件下,酚类化合物分布在细胞的液泡内,酚酶分布在各种质体或胞质内^[2],这种区域性分布使得底物多酚类化合物与多酚氧化酶(PPO)被质膜分隔开来,因而比较稳定。

在建立外植体时,细胞膜的结构被破坏,酚类化合物外溢,在溢出过程中与多酚氧化酶发生氧化形成棕褐色的醌类物质和水,醌类物质又会在酪氨酸酶等的作用下,与外植体组织蛋白中的蛋白质发生聚合,形成黑褐色物质(羟醌与黑色素等),引起褐变发生^[3]。

1.2 防止褐变的措施

1.2.1 选择适宜的外植体

由于所选择的外植体材料的年龄、取材部位、材料大小等均能对褐变产生影响。Chevre 分析了欧洲栗的酚类含量的变化,结果表明,幼龄材料酚类化合物含量少,而成龄材料比较多。当茎尖小于 0.5mm 时,褐变达 70%以上,而随着切割长度增大,褐变减轻;以茎尖 8~15mm 褐变较轻,组织培养苗成活率达 87%。此外,外植体受伤程度直接影响褐变,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。

1.2.2 外植体材料预处理

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。李焕秀^[4]等用 6 种不同的预处理来研究其对苍溪梨外植体褐变和成活的影响,结果发现,低温处理对降低褐变有一定作用。用抗氧化剂或 PPO 溶液进行预处理也可起到减轻褐变的作用。

1.2.3 选择适宜的培养基和培养条件

培养基的状态、组成、生长调节物质及组合等要适宜,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);大多数植物种类要求 pH 值在 5.0~6.0。适当降低培养基的 PH 值可以降低多酚氧化酶的活性和底物利用率,从而抑制褐变。张妙霞等(1999)^[5]在进行柿树组织培养中发现,改良的 MS 培养基能促进外植体分化,减轻外植体的褐变程度。培养基中加入的生长调节物质不当,也会使外植体产生褐变。张卫芳等(2003)^[6]在对一年生薄壳核桃的茎尖培养中发现,随着培养基中 6-BA 浓度的升高,褐化率随之增高,褐化反应时间也提早;较低浓度的 6-BA 适宜茎尖的分化生长,褐化反应慢,部分培养基已无明显褐化现象;添加 2,4-D、IAA 的组合中,褐化反应稍有推迟^[7]。

培养过程中还要注意适宜的培养条件。因为在酚类物质的合成和氧化过程中,有许多酶系统参与,其中部分酶系统是光活性的。由于较强的光照和较高的温度,都可以提高 PPO 的活性从而使酶促褐变加强。所以建议在培养初期保持较低的温度(15~20℃),黑暗或弱光下培养,均可减轻培养材料的褐变。

1.2.4 使用抑制剂和吸附剂

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。在培养基中加入 Vc 可有效地防止褐变。一方面可以使多酚氧化酶失活阻止酚类物质氧化;另一方面 Vc 在酶的催化下能消耗溶解氧,使酚类物质因缺氧而无法氧化^[8]。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。

2. 玻璃化问题及其防治措施

玻璃化现象是指在培养过程中材料呈半透明状,组织结构发育畸形的现象,又称过度水化。玻璃化的苗由于组织畸形,分化能力降低,不易成活。因此不宜用作继代和移栽的材料。

2.1 玻璃化的原因

迄今为止,对于玻璃化的成因尚无定论,目前认为玻璃苗的形成可能有以下几方面的原因。

2.1.1 培养条件的影响

试管苗培养过程中,光照、温度、湿度、pH 值均间接影响着玻璃化的发生^[9]。培养时光照远较自然环境下弱,一般仅为 1000~3000lx,培养器皿内相对湿度过高,氧气供应逐日下降,CO₂ 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。肖玉兰等^[10]研究发现,光照度在 10000~20000lx 范围内,随着光照度提高,玻璃化苗显著减少。降低培养温度、相对湿度,提高 pH 值也可有效防止玻璃苗发生。

2.1.2 培养材料的影响

培养的植物种类、外植体类型及大小显著影响着玻璃苗的发生。外植体越幼小,玻璃苗发生机率越大,这可能是外植体的较老组织中含有防止玻璃苗产生的物质,或者是较大外植体的分生组织远离培养基表面,而使其生长环境的水分状况得到改善。周菊花^[11]发现瑞香外植体取材部位显著影响玻璃苗发生频率,对枝条而言,取芽和茎基之

间的中段茎作外植体易发生玻璃化现象。

2.1.3 培养基成分的影响

许多研究表明,琼脂的成分变化对玻璃苗的形成有重要影响。戴桂林等发现,由于琼脂中 Ca、N、Mg、Mn、Fe、B、Zn 等含量的差异,导致玻璃苗发生率明显不同。琼脂在固体组织培养中作为凝固剂,它的主要作用是使培养基在常温下凝固,使用浓度常为 0.6%~0.8%。一般认为,琼脂含量低容易导致玻璃化现象发生。

糖在植物组织培养中作为碳源,为细胞提供合成新化合物的碳骨架,同时可以维持一定的渗透压,与玻璃苗发生率呈显著负相关。关于植物外源激素,普遍认为较高的细胞分裂素易于诱发玻璃苗形成,而且 BA+NAA 比 KT+TBA 的激素组合更易诱发玻璃苗形成,且随着浓度升高,玻璃化率升高。外源赤霉素和乙烯对玻璃化的发生没有显著影响。

2.2 防止玻璃化发生的措施

随着对玻璃化产生机理研究的深入,某些植物的玻璃化已得到了有效的控制。而且研究发现,玻璃化现象只是一种表现特征,玻璃化的组织在一定条件下,可以恢复为正常苗^[14]。

在控制玻璃苗发生时,一般可采用如下措施:①选不易玻璃化的基因型及部位做外植体。②适当提高光照强度,改善培养材料的通气状况;固体培养时,增加琼脂使用浓度,降低培养基中的水势,可以有效地降低玻璃苗的发生频率。③培养基中增加 K、P、Fe、Cu、Mn、Zn 元素的含量,降低 B 含量,增加硝态氮,降低铵态氮。④选择适宜的糖源及外源激素种类和浓度,并注意生长素与分裂素的配合,在未出现严重玻璃化之前,适当降低激素特别是细胞分裂素类激素的用量,可以减少玻璃苗的出现^[15]。⑤添加有机物,如添加根皮苷,可有效地抑制玻璃苗形成。添加植物激素合成前体如 ACC 等,对防止芦荟玻璃化有效^[16]。

3. 污染问题及其防止

3.1 污染的原因

在组织培养中污染经常发生,其原因也是多种多样,可归结为两个方面:一是接种前和操作过程的污染;二是接种后的污染。

3.1.1 接种前的污染

接种前的污染一是接种室环境杂菌含量过高。二是接种时各器具灭菌时间短,操作没有严格按照要求进行。另外,接种人员自身消毒不严。此类污染可通过完善操作、培养环境,严格操作程序来克服。

3.1.2 接种后的污染

接种后真菌大面积污染可能原因一是接种室的孢子过多或超净台的滤布不洁。二是外植体消毒处理不完全。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。三是继代、生根培养等阶段培养物的转接操作比较粗糙,将微生物带入培养瓶内,引起新的污染。操作人员无菌意识不强,无菌操作技术不熟练也是一个重要因素。

3.2 防止污染的措施

针对以上原因,对整个组织培养工作进行改进,采取了如下一些措施。

3.2.1 接种室

经常对接种室进行空间消毒。用 70% 的酒精喷雾降尘消毒,用消毒水擦拭地面、墙壁、工作台等;用紫外线照射消毒;用甲醛加少量的高锰酸钾熏蒸灭菌。(甲醛用量 4~6ml/m³,高锰酸钾 3~6g/m³。^[15])使用前打开超净工作台紫外灯,照射 20~60min;操作前 10min 使超净工作台处于工作状态,让过滤空气吹拂工作台面和四周台壁,然后关闭紫外灯,用 70% 的酒精擦拭工作台面,以确保工作台处于无菌状态。

3.2.2 外植体材料的选择和灭菌

外植体的选择要以污染少易启动(易培养)为原则。如植物胚不易被污染且具有幼嫩的分生组织细胞^[16,21]是常用的外植体。在用茎尖作

外植体时,可在室内或无菌条件下对枝条进行预培养,如将枝条用水冲洗干净后插入无糖的营养液或自来水中,使其抽枝,然后以这种新抽的嫩枝条作为外植体,污染率可下降到 20~30%^[17]。在选择茎段进行组织培养时,可采用 2 次灭菌法,如将月季茎段用 70% 酒精浸泡 30S。以 0.1% 升汞处理 8min,无菌水冲洗 5 次后,再用 2% 的次氯酸钠液消毒 10min,在无菌水冲洗 3~5 次后接种,效果较好。所以要想取得理想的无菌材料,除精选材料外,要求操作人员严格按照无菌操作顺序操作。

对材料内部带菌的组织,在培养基中加入适量抗生素,以达最佳消毒效果。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^[18]。

另外,瓶苗从培养瓶中取出后其周围的光照、温度、湿度和基质都发生了一定变化,如果适应性差,或操作稍有不慎,极易死亡。就会降低成活率,还会增加工厂化生产苗木的成本。可通过遮阳、保温、保湿等措施提高移栽成活率。总之,深入系统地研究各种植物的组织培养再生体系建立的条件和各个影响因素,对于完善生物技术的理论体系,指导生产和实践有着重要意义。

【参考文献】

- [1]王永清,汤浩茹,邓群仙.樱花离体培养芽外植体的建立[J].四川农业大学学报,1997,15(3):314—334,387.
- [2]黄海波等.植物组织培养中存在的主要问题与对策[J].安徽农业科学,2006,34(12):2632—2633,2894.
- [3]马莉贞.植物组织培养中褐变现象的研究[J].安徽农业科学,2006,34(15):3583—3584.
- [4]李焕秀,乔爱娟.降低苍溪梨外植体组培褐变途径的研究[J].西南农业大学学报,2000,23(6):524—526.
- [5]张妙霞,孔祥生,郭秀璞.柿树组织培养防止外植体褐变的研究[J].河南农业大学学报,1999,33(1):87—91.
- [6]张卫芳,高疆生,欧勇慧,等.抑制核桃组培中的褐化现象初探[J].落叶果树,2003,(3):4—7.
- [7]陈凯.植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施[J].安徽农业科学,2004,32(5):1034—1036.
- [8]宁正祥,赵建明.食品生物化学[M].广州:华南理工大学出版社,1995,293—301.
- [9]郭达初.培养基对香石竹试管苗生长及玻璃化的影响[J].浙江农业学报,1990,(2):174—180.
- [10]肖玉兰,仇明华,周永和.克服香石竹试管苗玻璃化现象的研究[J].云南农业大学学报,1997,12(3):188—193.
- [11]周菊花.试管苗玻璃化现象的生理生化和机理[J].武汉植物学研究,1994,12(3):281—288.
- [12]高国训,李光晨,张漪生.逆转苹果试管苗玻璃化的研究[J].广西农业大学学报,1998,(12):48—51.
- [13]卜学贤,陈维伦.试管植物的玻璃化现象[J].植物生理学报,1987,(5):13.
- [14]丰峰,李洪波,谢建英.芦荟组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止[J].西南农业大学学报,2001,23(5):449—451.
- [15]杜雪玲.植物组织培养中的污染成因及其预防[J].草业科学,2005,1,24—27.
- [16]王彭伟.肾蕨组织培养快速繁殖的研究[J].北京林业大学学报,1998,20(2):107.
- [17]徐妙珍.林木组织培养的障碍因素及对策(一)[J].林业科技,1991,16(4):5—6,9.
- [18]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.

作者简介:巩健,1967 年,讲师,主要研究方向:生物技术教学与研究。作者单位:淄博职业学院。

【责任编辑:张艳芳】

(上接第 125 页)构在 44 岁以下。近年来,本专业教师承担各类项目 10 余项,发表高质量的教学与学术研究论文 500 多篇。因此,可以说该专业具有一支年富力强,教学、科研能力较强的教师队伍。

总之,信息与计算科学专业是一个新兴的复合型数学专业,各高校还没有对它的培养模式、专业内涵等形成统一的认识,希望本文能起到抛砖引玉的作用,引起大家更有益地讨论。

【参考文献】

- [1]中华人民共和国教育部高等教育司编.普通高等学校本科专业目录和专业介绍(1998 年颁布)[M].北京:高等教育出版社,1998.

【责任编辑:田瑞鑫】