

霍山石斛组培快繁过程中存在的问题与解决对策

胡万群

(六安市农业科学研究所, 安徽六安 237009)

摘要:通过对霍山石斛组培技术流程的观察与研究,对霍山石斛组织培养过程中存在的三个主要问题:污染的发生、继代苗的玻璃化、组培苗的遗传变异进行了深入分析,并根据多年生产实践及大量资料的研究,提出了相应的解决对策。

关键词:霍山石斛;组培快繁;存在问题;解决对策

中图分类号 Q343.6

文献标识码 A

文章编号 1007-7731(2008)15-62-01

霍山石斛为珍稀名贵中药,有“千金草”、“软黄金”之美誉,是石斛家庭中的极品。近代医学研究证明,霍山石斛对增强免疫力、抗疲劳、延缓衰老、养颜养肌、降低血糖、抑制肿瘤等有明显作用。霍山石斛生长慢,繁殖系数低,因此采用组培快繁是拯救这一珍贵物种的主要途径^[1]。然而,在组培快繁中,其影响因子复杂多变,如何解决霍山石斛组培过程中存在的问题已成了霍山石斛建立无性系的关键。鉴于此,对霍山石斛组培过程中存在的问题进行了分析与探讨,以期对霍山石斛组培工厂化提供依据。

1 霍山石斛组培问题与解决措施探讨

1.1 污染的发生与控制 污染一般分为真菌性污染和细菌性污染,细菌污染的特点是菌斑呈粘液状物,在接种1-2d即可发现^[2]。除材料带菌或培养基灭菌不彻底外,操作人员的不慎是造成细菌污染的重要原因。真菌污染的特点是污染部分长有不同颜色的霉菌,接种3d甚至10d后才发现。其原因多为周围环境的不清洁、超净工作台的过滤装置失效、培养用具的口径过大等。在霍山石斛组培快繁过程中,污染是个重要的难题,尤其在高温高湿的夏季污染相当高,轻者影响当季的生产计划,重者造成品种的丢失。所以如何控制霍山石斛组培快繁过程中的污染问题已成为霍山石斛组培育苗的关键。

要解决污染问题,首先组织培养人员必须分清哪些物品或者部位是有菌的,哪些物品或者部位是无菌的,这样才能做到心中有数,才能做到严格的无菌操作。暴露在空气中的物品,未灭菌的培养基、未作处理的双手和外植体均是带菌的。而经过彻底灭菌过后的物体,经过各种物理或化学的灭菌方法处理后物体是无菌的。在组织培养过程中,尽量将有菌的物体经处理转化为无菌的物体,这是组织培养的关键所在。第一,采取外植体的方法。可将要采的植物移入室内盆栽让其抽出新枝条,再将新抽嫩枝作为外植体,这样可以大大降低污染^[3]。第二,培养基的灭菌。在灭菌时,冷空气应充分放尽,否则易造成相对高压低温现象,从而达不到灭菌的目的。尽管培养基在高压锅内是无菌的,但离开高压锅,许多空气细菌就会附着在高

湿的器皿上,所以一定要看瓶口、瓶盖是否有破损,有则毫不吝惜地扔掉。第三,接种室及其接种操作是无菌培养的关键,也是减少污染的关键之关键。日常工作中要有清洁卫生的好习惯,用专用的拖鞋及实验服,可避免因走动引起“菌雾”,并定期对培养室、接种室进行熏蒸,方法是用高锰酸钾加上甲醛。在接种操作时,预先鼓风30min,吹散工作台中的带菌空气。接种时先用酒精擦洗双手与超净工作台,然后再操作。接种时千万不要在器皿上方来回晃动,否则可能会有不安分的病菌飞入器皿,造成污染。不管超净工作台是平行风还是垂直风,一定要在下风方向操作,可最大限度避免病菌顺风飘入器皿。

1.2 继代苗的玻璃化 玻璃苗是在试管内控制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要的结果,培养基和培养条件不适宜、不平衡是试管苗玻璃化发生的直接原因。植物试管苗玻璃化是组培过程中的三大难题之一,试管苗玻璃化问题的解决必将有助于提高整个植物组织培养的科学水平和经济效益,因此,在实际工作中有必要采取措施使霍山石斛试管苗的玻璃化现象降低到最低限度,直至消除玻璃化现象。

利用固体培养基,增加琼脂浓度,选择适当的碳源,提高培养基中蔗糖含量,从根本上降低培养基中的渗透势,造成细胞吸水阻遏,减少培养基中植物材料可获得的水分,因而可明显降低霍山石斛试管苗玻璃化现象。采用通气性好的封口材料如纱布、脱脂棉等代替聚乙烯塑料膜作为封口材料,可降有效低培养容器内部环境的相对湿度,减轻有害气体的积累,使植物光合作用顺畅。培养基中BA是导致试管苗玻璃化的一个重要原因,选择搭配合适的激素,适当降低培养基中BA的浓度均可减轻玻璃苗的出现。通过培养条件(温度和光照)减少玻璃苗的发生。控制温度,避免过高的培养温度,进行变温处理,适当低温处理可消除玻璃化,提高光照强度,适当延长光照时间,充分利用自然光照也可以减低玻璃苗的发生频率。

1.3 霍山石斛继代苗的遗传变异 培养细 (下转 70 页)

方式革新。Lancashing^[8]根据同源重组的原理,通过自克隆技术改造啤酒酵母工业菌株 G03,工程菌的谷胱甘肽含量比受体菌株提高 16.6%,啤酒的抗老化能力得到了显著提高,而常规指标没有发生显著变化。

2.3.3 改良酿酒酵母菌的性能 应用基因克隆技术将黑曲霉产糖化酶基因 cDNA 转入经优化的受体菌(酿酒酵母京龙 JL108 号),再经反复筛分、驯化获得 JL1(Yip128D.17N),经包埋制得具有糖化酒化“双功能”的固定化酵母,载体产酶能力在 10u/g·h 以上,酒精发酵醪液中酶活达 20u/mL 以上^[9]。

2.4 开发保健食品和食品疫苗 食品疫苗就是将致病微生物的有关蛋白(抗原)基因,通过转基因技术导入植物受体中进行表达,得到具有抵抗相关疾病的疫苗。已获成功的有狂犬病病毒、乙肝表面抗原、链球菌突变株表面蛋白等 10 多种转基因马铃薯、香蕉、番茄的食品疫苗。英国科学家宣布,未来几年内,他们将培养一种新型生物鸡,这种鸡所产的鸡蛋里具有抗肿瘤因子,癌症患者食用鸡蛋后体内癌细胞的扩散就会受到抑制^[10]。

2.5 改善食品风味 利用基因工程技术还可以生产独特的食品香味剂和风味剂,如香草素、可可香素、菠萝风味剂,以及高级的天然色素,如类胡萝卜素、花色苷素、咖喱黄、紫色素、辣椒素和靛蓝等,并且通过杂种选育的色素含量高、色调和稳定性好。例如转基因的 E. coli 的玉米黄素最高产量达 289μg/g。通过把风味前体转变为风味物质的酶基因的克隆或通过发酵产生风味物质都可使食品芳香风味得以增强。另外 VB2 和 VC 也都有已经商品化的基因工程产品^[11]。

3 展望

随着生物化学和分子生物学的进一步发展,基因工程

技术在食品工业中的应用日益广泛,这极大促进食品工业的发展,也为人类最终解决食物短缺、消除饥饿带来了希望,在食品工业上的应用具有极为广阔的前景和美好的未来。但对于发展基因工程技术必须持有谨慎的态度,因为这一高新技术的发展也有可能给人类带来潜在的负面影响。对于基因工程食品来讲,在进入市场之前必须经过充分的毒理学鉴定及安全性评价,向消费者确保它们的质量和安,同时也需要考虑伦理道德方面的因素,充分尊重消费者的生活习惯。

参考文献

- [1] Per Vretblad. 生物技术与食品科学[J]. 生物工程进展, 1994, 4: 55-58
- [2] 江梅. 生物技术的应用[J]. 生物学通报, 1996, 6: 4-8
- [3] A. L. C. H. Villavi, M. M. Araújo, J. G. Baldasso, et al. Irradiation influence on detection of genetic - modified soybeans [J]. Radiation PhysCS and Chemistry, 2004, 71: 489-492
- [4] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海科学技术出版社, 1998
- [5] 郑铁松, 何国庆, 应铁进. 基因工程技术在食品品质改良中的应用[J]. 食品工业科技, 2000, 21(4): 70-72
- [6] 陈宗道, 赵国华, 李洪军等. 食品基因工程研究进展[J]. 中国食物与营养, 2000, 4: 14-16
- [7] Lancashine WE. Supertenuating Brewihg Yeast [C]. EuroBio Congress, 1989: 48-98
- [8] Lancashing WE. Modern genetics and brewing technology [J]. Brewer, 1986, 72: 345
- [9] 吴淑魁, 罗进贤, 陈海滨等. 固定化“双功能”酵母基因工程菌在酒精工业生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2004, 2: 61-64
- [10] Ruther A. Funtional Genomics of the Ciliun [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 4: 16-22
- [11] 许新德, 徐尔尼, 高荫榆. 生物技术在食品领域中的应用[J]. 食品工业科技, 1999, 20(4): 68-70 (责编: 张琪琪)

(上接 62 页)胞的遗传行为较为简单,通过有丝分裂即得以实现,但在组织培养过程中,由于外植体的切离、培养基的诱导和培养条件的影响等,导致变异较为普遍。影响霍山石斛继代苗遗传变异的因素中,培养基是最重要最复杂的因素。其中基本培养基不适合,营养元素不协调和不足均会对细胞有丝分裂发生干扰,导致继代苗生长不正常。植物生长调节剂的浓度和种类对再生植株的变异影响也很大,在高浓度的激素作用下,细胞分裂和生长加快,不正常分裂频率增加,再生植株的变异也增多。

2 小结与讨论

第一,污染问题是一直困扰霍山石斛的组培快繁及工厂化育苗,特别是外植体的消毒。因为外界环境的千变万化和材料本身生理特点的不同,导致很难掌握外植体处理的方法和消毒时间的长短一般霍山石斛的诱导培养在春季比较好,采集新芽,用酒精和 0.1% 升汞配合进行消毒,诱导成功率高;在夏季不宜进行诱导培养,由于气温较高,消毒很困难,继代苗的污染主要由接种室和培养室空气不清洁以及工人接种造成,只要对接种和培养环境进行严格

的消毒,工人操作严格按照无菌操作进行,继代污染问题就容易得到解决。第二,玻璃苗主要是由培养基和培养环境不适合继代苗的生长所引起培养基中的营养元素不协调,激素种类和浓度不适合,瓶内的湿度过高,光照不足或光质不良等都会造成玻璃苗的产生。降低霍山石斛继代苗玻璃化的措施主要是改良基本培养基,调整激素种类、浓度和增强光照。第三,继代苗的遗传变异是一个非常复杂的问题,引起遗传变异的因素相当多,主要是材料本身的基因型,遗传稳定性好的基因型不容易变异;其次是培养环境,培养基的营养元素不协调,激素种类和浓度不适合,光照、温度、湿度等都会引起植株的遗传变异现象的发生。

参考文献

- [1] 杨其光, 陈静娴. 珍稀特植物微繁殖技术[M]. 安徽科学技术出版社, 2003, 194-195
- [2] 胡万群, 霍山石斛的组织培养和快速繁殖技术的研究[J]. 现代农业科学, 2008, (1): 43-44
- [3] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 中国农业出版社, 1995, 159-161 (责编: 张琪琪)