

番木瓜组培问题与解决措施的探讨

李东海, 刘 强

(海南大学生命科学与农学院实习农场, 海南海口 570311)

摘 要:通过对番木瓜的组培技术流程的研究,对番木瓜组织培养过程中存在的主要问题:污染的发生,继代苗玻璃化、外植体褐化、组培苗的遗传变异等进行了深入的分析,并相应提出了解决对策,对番木瓜的组织快繁和工厂化育苗具有一定的意义。

关键词:番木瓜;组培;存在问题;解决对策

番木瓜(*Carica papaya* L.)为番木瓜科番木瓜属植物,别名木瓜、万寿果、石瓜、乳瓜等,多年生常年软木质乔木,我国在海南、广东、广西、福建、云南、台湾等省区均有栽种。番木瓜四季常绿,果实含有丰富的营养,特别是维生素类,未熟果实含木瓜蛋白酶,果肉可做食品或饲料,熟果可鲜食,可加工等,在医学、化工、食品、饲料上都有广泛的应用。大量研究表明,用茎尖和侧芽进行番木瓜快繁是较理想的途径^[1-3],本文就番木瓜组培快繁中存在的问题进行一些探讨。

1 污染的发生与控制

1.1 外植体污染的控制

污染问题是一直困扰番木瓜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。污染一般分为真菌性污染和细菌性污染,其来源可分成3大类:材料带菌,接种污染,培养过程感染^[4]。Litz等^[5]认为以5~11月份最适合建立番木瓜组培体系,在这段时间内虽然也存在一些污染,但易成活。冬天取材,污染要轻些^[2],但很难培养成活。Revenue等^[6]通过对温室不同季节的侧芽培养发现,3月份污染最轻,1月份最严重。

直接从田间采回的番木瓜的顶芽或侧芽,经消毒后污染率高达80%以上^[1],致使大多数的番木瓜快繁均以失败告终。外植体是否消毒彻底以及被损伤是诱导培养的关键,这取决于以下几个方面。1)外植体的自身生理情况。番木瓜快速无性繁殖常采用的外植体是茎尖和侧芽,培养的难易程度与番木瓜的株龄和株性有很大关系。从实生苗上采下的外植体比成龄树上的更容易培养^[6-9];选用茎尖比用侧芽要容易培养些^[3,10],但是用茎尖作外植体对通常不分枝的番木瓜来说意味着要牺牲所选的植株,这大大地限制了培养初期所需要的茎尖数^[2]。用侧芽作外植体,就能很好的解决这个问题。(2)顶芽的消毒:自来水

冲洗干净后,剖去叶片,将留下的茎尖组织浸于70%酒精1min,无菌水冲洗2次后,再置入0.15%升汞中消毒10min,随即用无菌水冲洗5次,然后切取1.5~2mm长茎尖,接种分化培养上;侧芽的消毒:自来水冲洗干净后,剪去侧芽叶片及过长叶柄,用杀菌剂混合液(0.25%托布津加0.25%百菌清)浸泡20min,用无菌水洗干净,置于70%的酒精中浸泡1min,无菌水冲洗2次,然后用0.15%升汞浸泡15min,无菌水冲洗5次,切取茎尖组织接种于分化培养基上^[11]。(3)外植体的采集时间:采集一般在晴天中午进行较好,空气湿度低,病虫害及病菌较少,比较容易消毒且诱导成活率较高;外植体消毒的流程和无菌操作。采回后,用洗洁精清洗1min,流水冲洗40min左右,然后移至超静台上用酒精和升汞进行消毒。外植体由外界移入超静台时要特别的注意操作人自身和超静台的消毒,严格按照无菌操作进行。成败的关键环节。接种前采用含500~1000mg/ml利福霉素、先锋霉素、羧苄青霉素或庆大霉素等药剂处理材料,可降低污染率50%~60%^[12]。表面消毒,方法是70%乙醇1min,10%次氯酸钠浸泡20min,间断摇晃数次,灭菌水冲洗3次后转入含利福平300mg/L或先锋霉素V500mg/L的液体MS培养基中,光照下振荡培养2d^[13]。

1.2 继代增殖培养污染的控制

继代增殖培养过程中的污染会导致组培苗生产成本的大大提高,对番木瓜工厂化育苗造成很大的经济损失,所以控制增殖培养的污染显得尤为重要。增殖苗污染有细菌性污染和真菌性污染^[14],真菌性污染主要是接种室、培养室内空气不清洁、超静台过滤不理想及操作不慎所引起;细菌性污染主要是接种工人的操作和材料的带菌所引起。控制增殖污染的措施主要为:接种室和培养室定期用高锰酸钾和甲醛熏蒸,一般为每周熏蒸1次,每次工人进入接种室接种前接种室内用紫外灯照射,如果接种室较长时间没有使用,则紫外灯照射时间至少要30min

以上。接种前超静台面用 75%酒精擦洗, 台内用酒精喷洒, 接种工人接触瓶苗进行无菌转接前手先用酒精消毒, 严格按照无菌操作进行。增殖苗移入接种室前, 瓶苗表面用酒精擦洗并在接种室内进行紫外灯照射 15 min。

Lirz 等^[1], De W innaart^[6], D rew 等^[15], R ajeevan 等^[10]在研究发现番木瓜组培中存在内生菌污染, 酒精和漂白粉只能对外植体表面进行消毒, 而不能控制内生菌的污染。Reuveni 等^[5,20]用抗生素利福平(Rif)来控制外植体的内生细菌的污染, 试验结果表明, Rif 不但可以减轻污染, 而且对番木瓜的生长无副作用。Mondal 等^[16]试图通过庆大霉素来解决污染问题, 在采芽前向植株喷 1000 mg/kg 的庆大霉素, 采下后再用 500 mg/kg 或 700mg/kg 的庆大霉素处理, 这样虽可减少污染, 但是培养 6~10 d 后, 外植体变褐而不能成活; 若浓度降至 250 mg/kg, 防治效果又不理想。

目前已通过侧芽的再处理部分解决了污染问题^[17-21]。选择优势 3 龄的番木瓜去顶, 刺激侧枝的生长, 当侧枝长到 10~20 cm 时, 将其置于高湿度(>90 %)的有机玻璃箱中的加热床上, 使插条生根。当植株长至约 30 cm 时, 在顶梢下 1~2 cm 处去茎尖, 并用 225 mg BA 与 1L 羊毛脂的混合物涂抹切面, 以促使其迅速长出 6~8 条腋生枝, 长到 10 cm 时, 把生长活跃的切成小外植体培养, 则 80% 不被污染。但如果直接用田间采回的芽进行组培, 污染率仍然较高^[14]。周鹏等^[22]将从田间采回的成龄番木瓜侧芽先用饱和香皂水浸泡, 再用 0.1% 高锰酸钾液处理, 然后用 4% 次氯酸钠加 0.1% 升汞消毒, 最后用含 500g/mL 先锋霉素或羧苄青霉素的无菌水洗, 污染率降低 50 %。

2 继代苗的玻璃化

植物试管苗玻璃化是指试管苗呈半透明状, 与正常试管苗相比, 玻璃苗在形态学上发生显著的变化, 可分为外观形态明显异常和基本无异常 2 种类型。玻璃化是植物组织培养中所特有的现象。

2.1 影响玻璃化苗的因素

玻璃苗是在人工提供的培养基和培养条件下形成的产物。玻璃化的发生是从茎尖、分生组织开始的, 比较茎尖处于离体培养和整体植株处于自然生长环境的差异, 主要在茎尖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, 这些在一定程度上改变了茎尖的离子平衡状况和激素平衡状况, 从而导致玻璃化现象的产生; 其次, 试管培养光照弱、培养容器内相对湿度接近饱和、氧气供应不足等都易造成继代苗的玻璃化; 第三, 培养基中的营养元素不协调。

2.2 克服玻璃化苗的措施

试管苗玻璃化后偶尔可在延长期间恢复正常, 但通常玻璃苗恢复正常的比例很低, 且玻璃苗的分化能力低下, 生理功能异常, 难以增殖生根成苗及移栽成活, 所以, 控制试管苗玻璃化是番木瓜组培快繁的关键环节。控制玻璃化苗形成的措施有: (1) 适当提高光照强度, 延长光照时间。把已经玻璃化的番木瓜继代苗转移到靠近窗口光照强的地方, 玻璃苗可以转化成正常苗。注意通气以尽可能降低培养容器内的空气相对湿度和改善氧气供应状况, 可以有效的降低试管苗的玻璃化。(2) 玻璃化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化苗的产生。饶雪琴等^[23]研究表明在分化培养基 MS + 0.5mg/L 6-BA 中加入 5g/L 琼脂, 半固体状的培养基易出现玻璃化现象; 在分化培养基 MS + 7g/L 琼脂中若 6-BA 浓度过高, 易出现玻璃化苗; 以自来水配制分化培养基 (MS + 0.5mg/L 6-BA + 7g/L 琼脂), 更容易产生玻璃化苗, 而以去离子水配制则未出现玻璃化苗; 番木瓜的玻璃化苗随着培养代数的增加而呈增加趋势; 在分化培养基中添加 0.3% 的活性炭, 可降低相应代数玻璃化苗的发生。在培养基中加入活性炭能够降低试管苗玻璃化。

3 外植体褐化

变褐是外植体伤口处分泌出的酚类化合物引起的。酚类物质在多酚氧化酶作用下可以转变为褐醌, 并可以逐渐扩散到培养基中积累起来, 产生的褐化类物质扩散到培养基中, 使培养基的组织发生褐化, 造成外植体的死亡。

3.1 影响褐化的因素

(1) 外植体的大小。带芽茎段的长度越大, 茎段切口的面积与整个茎段的体积比小, 由褐化造成茎段死亡的比率越小, 但同时增大了茎段的污染率。(2) 外植体的消毒。消毒剂不同, 消毒时间不同, 外植体的褐化程度不同, 一般是消毒时间越长, 褐化率越高。(3) 培养基。诱导培养基中各元素及其含量不同, 外植体褐化程度的不一样, 大量元素和外源激素的浓度增大都会造成褐化程度的加重, 据周鹏等^[24]报道, 蔗糖浓度的提高, 实生苗叶片愈伤组织诱导率逐渐下降, 外植体褐变坏死。在培养基中加入适量的活性炭能减轻外植体的褐化。(4) 培养条件。光照和温度对外植体的褐化有一定的影响, 高温使 PPO (多酚氧化酶) 活性提高, 增加褐化率, 高温培养可明显促使褐化的发生^[25]; 光能促进酚类物质的氧化^[26,27,28], 在同等条件下, 外植体经过 10d 左右的暗培养, 褐化率得到不同程度的降低。

3.2 减少褐化的方法

(1) 对外植体进行预处理。低温处理有助于减轻褐化, 外植体在抗氧化剂如抗坏血酸、柠檬酸等或吸收剂如活性炭(AC)中进行预处理也能有效的减轻褐化。活性炭对导致褐变的酚类氧化物有很明显的吸附效果, 叶克难等^[29]报道, 番木瓜小苗的根、茎外植体愈伤组织诱导过程中, 加入活性炭的培养基中愈伤组织完全未出现褐变现象, 而未加入活性炭时, 愈伤组织在转入悬浮培养后约有30%逐渐褐化, 甚至死亡。活性炭(AC)常用浓度为0.2%。

(2) 选择和优化基本培养基。培养基中的无机物可能是一些氧化酶合成及进行生理生化作用所必需的, 对基本培养基的无机物进行调整有利于提高诱导率、减少褐化死亡, 高浓度的细胞分裂素和生长素有可能刺激番木瓜外植体的氧化, 褐化率较高, 而在低浓度的外源激素中诱导褐化率减少。蔡英卿等^[30]认为2,4-D使用浓度过高(>5mg/L)时会引起毒害作用, 番木瓜外植体褐变坏死。

(3) 在培养基中加入防褐剂, 在培养基中加入抗坏血酸、EDTA等影响酚氧化酶活性的物质, 或加入硫脲、亚硫酸氢钠、二乙基二硫代氨基甲酸钠等影响酚类化合物与酶结合部位的物质, 都能有效的减轻褐化的发生。

4 继代苗的遗传变异

组培过程中, 经过愈伤组织途径诱导完整植株, 就会导致遗传不稳定性, 这种现象就称作体细胞无性系的变异。番木瓜离体培养中体细胞无性系变异是十分普遍的, 在番木瓜体细胞胚胎、器官发生及芽体繁殖研究中发现了许多体细胞变异现象, 如: 体细胞胚胎再生过程中高频率的出现3~6片子叶的植株、茎扁化、节间长度变异、叶柄色素差异等^[31]。Litz等^[32]在番木瓜体细胞胚胎发生研究中也曾有类似的报道。

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, (1)是材料本身的基因型, 遗传稳定性好的基因型不容易变异; (2)是培养基, 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; (3)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; (4)培养途径的不同, 对番木瓜植株的变异也有很大的影响, 通过愈伤组织途径培养完整植株发生变异的频率较高, 通过离体芽器官诱导途径培养完整植株发生变异的频率较低, 通过愈伤组织途径培养的番木瓜组培苗在同一立地条件生长不一致, 而通过离体芽器官诱导培养的番木瓜组培苗在同一立地条件下生长比较一致。

但是这种体细胞变异的广泛性对育种选择是十分有利的, 如能从由离体培养产生的体细胞变异植株中发现一些有价值的变异类型(包括抗寒、矮化等), 可使番木瓜获得常规育种手段难以获得的性状, 生产损失将大大降低^[3]。

参考文献

- [1] Litz R E, Conover R A. Recent advances in papaya tissue culture. Proc. Fla. State Hort. Soc. 1978(91):180-182.
- [2] Litz R E, Conover R A. Tissue culture propagation of papaya. Proc. Fla. State Hort. Soc. 1977(90):245-246.
- [3] Litz R E, Conover R A. Effect of sex type, season, and other factors on in vitro establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1981(106):792-794.
- [4] J.J. Le roux, J. Van staden. 番木瓜的微繁殖和组织培养[J]. 广西林业科学, 1994, 23(1): 32-40.
- [5] Reuveni O, Shlesinger D R, Lavi U. In vitro propagation of dioecious *Carica papaya* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1990(20):41-46.
- [6] De Wimaar W D. Clonal propagation of papaya in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture. 1988(12):305-310.
- [7] De Fossard R A. Tissue culture propagation. In the horizons of tissue culture propagation. Univ. of Sydney Australia. 1977:1-14.
- [8] Libby W J, Hood J V. Juvenility in hedged radiata pine. Acts Hort. 1976(56):91-98.
- [9] Vieitez E, Vieitez A M. Juvenility factors related to the rootability of chestnut cuttings. Acts Hort. 1976(56):269-274.
- [10] Rajeevan M S, Pandey R M. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 1986(6):81-188.
- [11] 窦敏, 陈兆益. 番木瓜组培快繁试验. 西南园艺 2003, 31(4):8-9.
- [12] 吕平, 韦丽君, 苏文潘, 等. 番木瓜组织培养概况. 热带农业科技, 2006, 29(2):31-33.
- [13] 叶长明, 魏祥东, 陈东红. 番木瓜无性繁殖技术的改进. 中国南方果树, 2003, 32(5):36-37.
- [14] 饶雪琴, 张曙光, 范怀忠. 番木瓜快繁研究进展 [J]. 热带作物学报, 1999, 20(1):73-77.
- [15] Drew R A, Smith N G. Growth of apical and lateral buds of papaw (*Carica papaya* L.) as effected by nutritional and hormonal factors. J. Hort. Sci. 1986(61):535-543.
- [16] Mondal M, Gupta S, Mekherjee B B. In vitro propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (Var. Honey Dew). Plant Cell Rpt. 1990(8):609-921.
- [17] Drew R A. Rapid clonal propagation of papaya in vitro from mature field grow trees. Hort. 1988(23):609-611.
- [18] Drew R A. Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) in vitro. J. Hort. Sci. 1989(64):767-773.
- [19] Yie S Y, Liaw S I. Plantlet regeneration from shoot tips and callus of papaya. In Vitro. 1977(13):564-568.
- [20] Litz R E. Papaya. In Hdbk of plant cell culture. 1984, 2:570-602.
- [21] Drew R A. The effects of medium composition and conditions on in vitro root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). J. Hort. Sci. 1987:551-556.

气相色谱-离子阱质谱测定稻谷中的三唑磷农药残留研究

温仙明

(福建省农产品质量安全检验检测中心,福州福建 350003)

摘要:建立了用气质联用-离子阱质谱做二级质谱(MS/MS)测定稻谷中的三唑磷农药残留的方法。样品用乙腈提取,液液分配,用 PestiCarb/NH₂ SPE 固相萃取小柱净化。用毛细管色谱柱分离,气相色谱-离子阱质谱(GC-Plaris Q)做二级质谱(MS/MS)测定。回收率在 89.2%~103.7%,变异系数在 3.2~5.3%之间,方法检出限为 0.001mg/kg。

关键词:气相色谱-离子阱质谱;三唑磷;水稻;残留

0 引言

三唑磷是一种高效、中毒、广谱有机磷杀虫剂,对害虫有触杀和胃毒作用,被广泛应用于水稻、棉花、玉米、豆类及蔬菜的虫害防治。但由于近年来三唑磷的在水稻等作物上的大量使用,使二化螟、三化螟等水稻害虫产生了抗药性,农民在使用过程中不断的加大用药量,导致害虫的抗性水平和三唑磷残留水平不断提高。因此,研究一种高效、快速、准确的定量、定性分析方法对检测稻谷中的三唑磷有重要意义。本文采用气质联用仪-MS/MS 检测技术,极大提高了三唑磷的检出限,并可同时完成定性分析,为三唑磷的分析提供了一种新的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Finngin-PlarisQ 气质联用仪,离子阱检测器,EI 离子源;PestiCarb/NH₂ SPE 小柱 (1g,6mL,美国艾杰尔)。N-EVAP 112 氮吹仪;纯水器;乙腈(分析纯);甲苯(分析纯);丙酮(分析纯);三唑磷标样(国家标物中心购得)。

1.2 色谱条件

气相部分,色谱柱:DB-5MS 30m × 0.25mm ×

0.25μ m;进样口:220℃;柱程序升温:80℃保持 2min,然后以 20℃/min 加温到 280℃,保持 10min;载气为高纯氦气,柱流量:1.0mL/min,不分流。质谱部分,离子源:230℃;电压:1378V;缓冲氦气 0.3mL/min。扫描起始时间:8min;扫描范围:全扫描取 m/z 45-450;sim 取 m/z 162;MS/MS 取 162 离子作为母离子,碎片离子扫描范围 m/z 80-165。

1.3 试验步骤

1.3.1 提取 称取 25g 稻谷样品(粉碎过 40 目筛)于烧杯中,加入 25mL 纯水振荡 2min 后静置 5min,加入 50mL 乙腈,匀浆 2min,过滤到加有 10g 氯化钠的具塞量筒中,充分振荡至乙腈与水相分层,准确吸取乙腈层 10mL,氮吹近干,加入 2 mL 甲苯:乙腈(1:3)溶解,待净化。

1.3.2 净化 PestiCarb/NH₂ SPE 小柱用 10mL 甲苯:乙腈(1:3)活化,溶液快到填料表面时,将提取液转移上柱,用 20mL 甲苯:乙腈(1:3)淋洗,收集洗脱液于 50mL 圆底烧瓶中,用氮吹仪氮吹近干,再用丙酮溶解并定容到 5mL,待进样。

- [22] 周鹏,郑学勤,陈向民,等. 成龄番木瓜的快繁技术. 热带作物学报. 1995,16(2):66-69.
- [23] 饶雪琴,张曙光. 番木瓜组织培养中玻璃苗的发生与预防. 植物生理学通讯,2005,41(3):331.
- [24] 周鹏,郑学勤,曾宪松. 番木瓜叶片再生植株初探[J]. 热带作物研究, 1992(4):35-42.
- [25] 周俊辉,周家容,曾浩森,等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展. 园艺学报 2000,27(增刊):481-486.
- [26] 张兴国,陈劲枫,张盛林,等. 魔芋原生质体游离和培养条件研究. 西南农业大学学报,1992,14(1):42-44. [27] 贝奇 Y P S 著. 林木和果树生物技术. 张培呆译. 北京:中国林业出版社,1991.179.283 - 362.

- [28] Scondahl M M R, Monaco L C, Sharp W R. In vitro methods applied to coffee. In: Trevor A Thorpe ed. Plant tissue culture methods and application in agriculture. New York: Academic Press. 1981:325-348.
- [29] 叶克难,黄俊潮,李宝健. 杂种一代番木瓜人工种子制作的研究[J]. 植物学报,1993,35(增刊):83-87
- [30] 蔡英卿,赖钟雄. 番木瓜生物技术研究进展. 江西农业大学学报, 2003,25(3):429-434.
- [31] 郭德章,鄢铮,林庆良,等. 番木瓜组织细胞学及遗传改良研究进展和展望. 福建农业学报 2001,16(2):49-55.
- [32] Litz R E, Conover R A. High-frequency somatic embryogenesis from Carica suspension cultures[J]. Ann. Bot, 1983,51:68-686.