

番茄组织培养中应注意的问题

刘士勇¹, 刘守伟²

(1. 黑龙江省农业广播电视学校, 哈尔滨, 150021; 2. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨, 150030)

中国分类号: S641.203.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2006)02-0119-02

番茄营养丰富, 风味香郁, 深受人们的喜爱, 在世界各地被广泛种植, 成为各国的主要蔬菜作物之一。由于它是典型的双子叶植物, 具有自花授粉、染色体图谱较清楚、较易栽培等优点, 成为生物学领域研究最多的模式植物之一。作为各国实验室植物转基因工作的基础, 番茄再生系统的建立至关重要, 它是遗传转化成功的前提和保障。但在组织培养过程中, 常会遇到一些问题, 如污染、褐变、玻璃化等, 这都使得试验无法进行下去, 甚至导致整个试验的失败, 给科研和生产造成损失。在总结相关文献的基础上, 并依据在番茄组织培养方面的研究体会, 现从这些问题的发生原因及控制措施等方面进行分析探讨。

1 浸种时间

种子萌发包括三个阶段, 首先是吸水膨胀阶段, 然后是萌动阶段, 最后是发芽阶段。一般情况下, 在做番茄组织培养实验之前最好进行浸种处理, 这样在播种后种子发芽快, 相对减少污染的概率。在进行浸种时, 如果浸种时间过长, 超过了吸水膨胀阶段, 已经进入萌动阶段, 那么, 在进行种子消毒处理时, 会因为用次氯酸钠或升汞消毒而将萌动的种子杀死, 使种子不出芽或出芽率极低。曾做过实验, 在番茄组织培养前, 浸种时间超过 20h, 种子发芽率极低, 低于 6h 种子发芽较正常慢 2d 左右。所以, 在做番茄组织培养前, 浸种时间不要超过 20h, 也不要低于 6h, 一般 15h 较适宜。

2 种子消毒方式和时间

综合文献, 对于种子消毒常用的是用酒精和升汞溶液或者酒精和次氯酸钠溶液。曾多次用这两种方法做实验, 结果是两种方法的消毒效果都很好。基于这样的结果, 认为用次氯酸钠比较合适, 主要是因为升汞对人体有危害。用次氯酸钠溶液消毒, 如果怕消毒不彻底, 可以事先搓一下种子, 将种子表面的绒毛搓掉, 这样效果更好。酒精消毒时间不要超过 1min, 如果用 10% 的次氯酸钠, 消毒 20min, 20% 的次氯酸钠, 消毒 10min~15min 比较合适。

3 培养基的灭菌时间

培养基的灭菌时间不能过长, 灭菌温度不能过高。一般 25ml~150ml 的培养基灭菌时间不要超过 15min, 其中 250ml 培养基用 500ml 的三角瓶装, 100ml 培养基用 250ml 三角瓶装。灭菌时间过长营养成分被破坏, 一般的植物激素或某些营养成分在温度过高时均宜分解, 灭菌的温度切记不

可太高, 121℃~122℃即可。

4 外植体褐变

外植体的褐变是由于组织中的酚类物质经氧化后产生棕褐色的醌类物质造成的。这类物质可抑制细胞中其它酶的活性, 影响细胞的正常代谢, 严重时可导致组织的死亡。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活性有直接关系, 番茄是含酚类物质较多的蔬菜, 这些酚类化合物在完整的组织和细胞中与多酚氧化酶分离存在, 因而比较稳定。在切割外植体时, 切口附近的细胞受到伤害, 其分离效应被打破, 酚类化合物外溢, 在溢出过程中与多酚氧化酶接触, 迅速氧化成褐色的醌类物质和水, 醌类又与蛋白质发生聚合, 进一步引起其它酶系统失活, 从而导致组织代谢活动紊乱, 生长停滞, 最终衰老死亡。为了避免或减少褐变, 一是要选择适宜的外植体, 所选材料的苗龄、取材部位、材料的大小及外植体受伤程度等均能对褐变产生影响。一般幼龄材料接种后褐变很轻, 随着苗龄增长, 褐变逐渐加重, 试验发现苗龄较长的子叶和高度分化的真叶容易褐变。试验观察一般选 7d~9d 苗龄的番茄子叶较为适宜, 此时期的番茄苗子叶已经展平, 真叶刚刚有 0.5cm 左右。二是所切的外植体大小也很重要, 过小易发生褐变。子叶的大小应该不小于 0.5cm×0.5cm, 小于 0.5cm×0.5cm 的子叶褐变严重, 一般 1cm×1cm 比较合适。如果切下胚轴, 长度应是 0.5cm~0.7cm。外植体的受伤程度直接影响褐变, 切割时应尽可能减少伤口面积, 尽量使切口平整。实验发现, 用刀切割和用剪刀铰的效果都很好, 但建议用剪刀。因为如果对经验不太丰富的操作人员来说, 用刀切, 有时不能一次就完全切下, 要中间停顿一下或反复“拉锯”式切割, 这样很容易使切口受伤, 将来外植体产生褐变。另外, 通过多次连续转移培养也可减少褐化的发生。

5 污染

番茄组织培养中的污染主要细菌性污染和真菌性污染。细菌性污染的症状是培养材料附近出现粘液状和发酵泡沫状物体, 或在材料附近的培养基中出现混浊和云雾状痕迹。一般在播种后种子还没发芽前或者是在接种后 1d~2d 即可发现。如果是在播种后在种子周围出现细菌污染, 一般是种子消毒不彻底, 解决的办法是延长用 70% 的酒精和 10% 的次氯酸钠的消毒时间。如果是接种后在外植体周围出现细菌污染, 可能是镊子带菌或操作台及操作人员的手未消毒干净。解决的办法是待超净台开启 15min 后用 70% 的酒精擦

阿拉善舌喙象药剂防治试验

李 清¹, 强建才², 李东荣³

(1. 西北农林科技大学农药研究所, 杨凌 712100; 2. 陕西省榆林农业学校, 719000; 3. 陕西省榆林市农技服务中心, 719000)

阿拉善舌喙象(*Diglossotrox alashanicus* Suvrov), 鞘翅目, 象甲科, 是榆林沙地的一种常见昆虫(该虫曾经赵养昌先生鉴定, 为西北新记录), 过去寄主以杂草为主, 危害性不大。但近年来发现其危害多种果树, 从3月底到6月初, 盛期4月下旬~5月中旬, 取食多种果树的幼嫩部分, 特别喜欢危害刚刚萌动的芽子。危害时间在早晨和傍晚。自2000年在陕西榆林刘官寨的川水地建立3.5hm²葡萄新品种引种栽培试验园以来, 该虫成为葡萄春季的主要害虫。该虫在葡萄各品种间的危害性无明显差异。检索中外期刊库, 未见有该虫的报

阿拉善舌喙象药剂防治结果表

药剂	各处理死虫数										合计
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
对硫磷	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
辛硫磷	0	1	0	1	1	2	0	1	1	1	8
久效磷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
甲拌磷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
六六六	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	3
氧乐果	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
敌敌畏		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
氯氢菊酯	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
灭扫利	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
呋喃丹	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
敌百虫 (喷雾)	4	6	5	4	3	4	6	7	4	5	48
敌百虫 (毒饵)	9	11	14	12	12	8	10	17	14	10	121

道。为防治这种害虫, 使用多种药剂和方法, 防治均在下午进行。经过几年的防治实践, 逐渐摸索出了较为理想的方

法, 在此基础上, 于2004年做了药剂对比试验, 现总结如下。

1 材料与方法

1.1 供试药剂 50%对硫磷乳油2000倍液, 喷雾; 50%辛硫磷乳油1000倍液, 喷雾; 40%久效磷乳油1000倍液, 喷雾; 5%甲拌磷颗粒剂, 每株20g, 撒施, 轻耙; 六六六粉, 每株20g, 撒施, 轻耙; 40%氧化乐果乳油1000倍液, 喷雾; 80%敌敌畏乳油1000倍液, 喷雾; 10%氯氢菊酯乳油2000倍液, 喷雾; 20%灭扫利乳油2000倍液, 喷雾; 3%呋喃丹颗粒剂, 每株20g, 撒施, 轻耙; 80%敌百虫可溶性粉剂1000倍液, 喷雾; 80%敌百虫可溶性粉剂80g+20kg水, 泡新鲜杨树叶5min~30min。每株放一把(约20片叶子)。

1.2 试验地点、供试植物 试验地点: 陕西省榆林市刘官寨乡。供试植物: 葡萄100余个品种。

1.3 试验设计 每种药剂处理一行葡萄。每行固定调查10株葡萄。

1.4 调查方法 下午4~7时施药, 第二天早8时统计死虫数。

2 结果与分析

阿拉善舌喙象药剂防治结果(见表), 试验结果表明, 只有敌百虫能够较好地防治阿拉善舌喙象, 其中敌百虫毒饵诱杀效果最好, 比较理想。

3 讨论与结论

用敌百虫稀释液浸泡杨树叶(或鲜杂草)制成毒饵诱杀阿拉善舌喙象, 是一个成功的办法。而敌百虫喷雾后, 一方面药效不易持久, 另一方面待药效发作后, 害虫已经取食了很多。毒饵的办法解决了生产中的难题, 值得推广。至于阿拉善舌喙象为什么对敌百虫较敏感而对其它有机磷杀虫剂及其它作用机制的很多杀虫剂却非常不敏感, 基本无效, 这种现象少见, 值得进一步研究。

榆林沙地昆虫阿拉善舌喙象于4月下旬~5月中旬严重危害多种果树幼嫩部分。在害虫发生期, 采用80%敌百虫可溶性粉剂80g+20kg水浸泡杨树叶(或鲜杂草)5~30min, 制成毒饵, 于傍晚放在树下或树上, 可有效防治该害虫。施用时, 根据天气, 间隔1~2d、或3~4d更换一次毒饵。

洗台面, 再将镊子蘸取酒精后烧红做到彻底消毒, 接种时镊子接完一瓶就要消毒一次, 操作过程中要经常用75%的酒精擦洗手部, 同时尽量不要频繁出入无菌室。

真菌性污染主要指霉菌引起的污染, 一般接种后3d~8d才可发现。多数是因为接种室内的空气不洁净, 超净工作台的过滤装置失效, 操作不慎等原因引起的, 此类污染可通过完善操作、培养环境、严格操作程序来克服。如果接种后发现真菌大面积污染, 原因可能是接种室的孢子过多或超净台的滤布不洁。解决办法是: 更换或清洗滤布, 用甲醛熏蒸接种室。

6 玻璃化

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。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: 一是培养条件对玻璃化的影响很大。例如: 培养基的成分、光照、温度、湿度及透气性。二是玻璃苗的叶绿素含量很低, 因此其光合作用减弱, 物质合成能力下降, 导致发育不良而发生畸形。三是玻璃苗苯丙氨酸解氨酶活性降低, 而这种酶是植物木质素和纤维素合成途径的关键酶之一, 因而导致粗纤维的含量下降, 细胞壁膨压下降, 水势降低, 细胞吸水过多造成发育不良而发生畸形。解决的办法是: 适当提高培养基中蔗糖以及Ca²⁺、Mn²⁺等离子体的浓度; 在长期继代培养中逐步降低细胞分裂素的用量; 在培养过程中控制好温度、湿度, 温度不要过高、湿度不要过大; 适当提高培养基中琼脂的浓度; 适当降低培养基中氨态氮的含量, 提高硝态氮的含量; 改善培养容器的通风换气条件, 选用通气好的封口膜封口。