

组培过程中的难点及解决办法

许庆芬, 杨艳华, 王明明 (黑龙江省农垦科学院经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150038)

摘要: 玻璃苗、褐化和污染是植物组织培养过程中公认的3大难点。阐述了这3种现象形成的原因及其预防措施, 对植物的组织快繁和工厂化育苗具有一定的意义。

关键词: 组织培养; 玻璃化; 褐变; 污染; 预防

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-1631 (2008) 08-0064-02

Problems and Measures Research in Plant Tissue Culture

XU Qing-fen, YANG Yan-hua, WANG Ming-ming

(Institute of Cash Crops, Heilongjiang Academy of Land Reclamation Sciences, Harbin 150038, China)

Abstract: Vitrification, browning and contamination are generally accepted as three difficult problems in plant tissue culture. Their forming reasons and essential precautions were briefly introduced. It was very important to plant culture, rapid propagation and industrial seedling.

Key words: Tissue culture; Vitrification; Browning; Contamination; Precautions

植物组织培养技术具有可人为控制环境、周期短、繁殖率高和方便管理等优点, 近40 a来, 在快速繁殖优良品种、脱毒复壮植物、培养新品种、种质资源保存、提供加工原材料和基因工程中起着作用, 产生了巨大的经济效益和社会效益。目前组织培养过程中仍存在着一些制约因素, 玻璃苗、褐化和污染是组培的3大难点。为此, 阐述了这3种现象形成的原因和防控措施。

1 玻璃苗

1.1 玻璃化现象

在进行植物组织培养时, 经常会发现试管苗呈半透明状, 植株矮小肿胀、失绿; 叶片皱缩或卷曲、脆弱易破碎^[1]; 叶表无角质层蜡质, 没有功能性气孔, 仅有海绵组织, 没有栅栏组织。这种试管苗生长异常现象被称为“玻璃化”^[1,2], 是植物组织培养中特有的一种生理性病变, 是培养环境中的一些物理、化学和生化因子共同作用使植物组织新陈代谢紊乱所造成的^[3]。玻璃苗的光合能力和酶活性低, 器官功能不全, 分化能力低, 很难继续用作继代培养和扩大繁殖的材料。

1.2 玻璃苗发生的因素

1.2.1 培养材料种类和外植体类型影响玻璃苗的发生

梅菜外植体玻璃苗发生率依次是下胚轴 $\geq$ 茎尖 $\geq$ 子叶^[4]。瑞香基部茎段玻璃苗的发生率最低, 其次是茎尖, 中部茎段产生的玻璃苗几率最高^[5]。此外, 玻璃化还可能与外植体大小有关^[6]。

1.2.2 组培苗生长的微环境能够影响玻璃化的发生
有研究^[7]表明, 光照时间太长会导致玻璃化现象的增

加, 超过14 h玻璃化现象较严重。使用透气性较差的塑料薄膜封口或组培温度过高时, 由于引起组培瓶内气体组成的改变, 也提高了玻璃化率^[8,9]。

1.2.3 培养基成分 (如大量元素、植物激素和蔗糖浓度等) 与玻璃化现象有关 培养基中的 NH_4^+ 过多容易导致试管苗玻璃化的发生^[5]。在BA质量浓度0.5~1.0 mg/L条件下, 玻璃苗率随BA浓度的增加而显著上升^[10,11]。蔗糖浓度与玻璃化呈负相关, 在一定范围内, 蔗糖浓度越高, 玻璃苗的比率越低^[3]。

1.3 防止和克服玻璃苗的措施

1.3.1 增加组培室内通气, 并改善培养容器的通风换气条件, 适当缩短继代间隔时间 许多研究^[3,11]表明, 使用透气性好的容器或封口材料 (如牛皮纸和棉塞) 可显著降低玻璃苗率。作者在马铃薯的组培过程中发现, 使用较大的培养容器能降低组培苗玻璃化。

1.3.2 增加自然光照 在芦荟和秋海棠上的研究^[9,12]表明, 强光照 (3000 lx) 有利于降低玻璃化率。

1.3.3 组培室温度 组培室温度控制在20~25℃, 可缓解玻璃化现象。另外, 采用昼夜变温交替取代恒温也是不错的选择。

1.3.4 适当提高培养基中蔗糖含量 在培养基中添加4.0%和3.5%的蔗糖, 能分别较好地预防光叶楮和山桐子组培玻璃苗的发生^[11]。

1.3.5 调节培养基中植物生长调节剂的浓度和比例 蒋泽平等^[13,14]在MS培养基中附加BA 1.5 mg/L + NAA 0.15 mg/L, 可有效促进试管苗的增殖和生长。

2 褐变

2.1 影响褐变的因素

2.1.1 植物种类、基因型及外植体类型 橡胶树不同

收稿日期: 2008-04-18

作者简介: 许庆芬 (1979-), 女, 黑龙江鹤岗人, 博士, 助理研究员, 主要从事马铃薯栽培育种及种薯繁育工作。

品种或品系的褐变程度不同,海星2号的花药褐变较少,而有些品种极易褐变^[15]。除了木本植物,豆科植物和芸苔属植物原生质体培养中也普遍存在着褐化问题。甜菜品系的染色体倍数性、无菌苗的苗龄、外植体部位等因素对甜菜组织培养过程中外植体褐变均有影响^[16]。在辣椒的组织培养中,下胚轴分生能力较强,其外植体生长旺盛,褐变程度低于子叶^[17]。

2.1.2 培养条件 光照过强或光照时间超过16 h的外植体很快褐变^[16]。温度过高也能促进培养物的褐变^[18]。CO₂浓度过高引发细胞内积累过多的CO₃²⁻,并与细胞膜上Ca²⁺结合而使有效Ca²⁺减少,导致内膜系统紊乱和瓦解,致使褐变发生^[18,19]。培养基pH值不适宜也是某些植物种类产生褐变的原因之一。

2.1.3 培养基成分 对一般桉树来说,大量元素和外源激素的浓度增大会造成褐化程度的加重。激素使用不当时,外植体也容易褐变。NAA浓度超过0.2 mg/L时,褐变率明显增高^[16]。

2.1.4 外植体消毒 一般消毒时间越长,褐化率越高。

2.2 克服褐变的方法

2.2.1 选择适当的外植体 处于旺盛时期的外植体,具有较强的分裂能力,其褐变程度低。因此,最好选用实生幼苗和早春的材料作为外植体。取材时,还应根据植物种类选择适宜的基因型和部位。

2.2.2 进行材料的预处理 外植体经流水冲洗后,放在2~5℃的低温下处理12~24 h,再用升汞或70%酒精消毒,然后接种于只含有蔗糖的琼脂培养基中培养5~7 d,使组织中的酚类物质部分渗入培养基中。取出外植体用0.1%漂白粉溶液浸泡10 min,再接种到合适的培养基中,如果仍有酚类物质渗出,接种后1~2 d立即转移到新鲜培养基中或同一瓶培养基的不同部位,这样连续转移5~6次可基本解决外植体的褐变问题^[20]。

2.2.3 选择适宜的培养基和培养条件 调节光照和温度、改善通风、调节培养基的pH值,均能够缓解外植体褐变。使用静态培养和固体培养交替进行,使外植体在液体培养基上将伤口愈合后,再转至固体培养基上培养,也能减轻褐变^[21]。

2.2.4 添加合适的褐变抑制剂和吸附剂 比较有效的褐变抑制剂有水解乳蛋白(LH)、乙二胺四乙酸(EDTA)、血清白蛋白、柠檬酸和硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)等。常用的吸附剂有聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和活性炭,但使用时应注意选择适宜的浓度,否则培养基中的营养成分也会被吸附^[20]。

3 污染

3.1 污染原因

造成污染的原因很多,如工作环境空气不清洁,超净工作台过滤装置失效,培养基及器皿灭菌不彻底,外植体带菌及操作违规等。造成污染的病原主要为细菌、

真菌和内源菌。细菌性污染的主要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。细菌性污染除外植体带菌或培养基灭菌不彻底外,主要是操作人员的不慎造成的^[22]。真菌污染表现在培养基上产生灰褐色、暗绿色或白色等菌落,严重时可导致组培苗出现病状,甚至导致苗腐烂、死亡。真菌污染除直接接触传播外,主要通过空气媒介传播^[23]。对外植体带菌引起的污染,情况则比较复杂,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^[22]。

3.2 污染防治

①保持组织培养室和接种室的洁净。操作人员应定期用84灭菌和酒精喷雾处理。注意除尘,定时用紫外灯消毒。②减少或消除操作人员带来的污染,接种前,操作人员必须洗净手,并用75%的酒精擦拭。每接种完2~3瓶材料后,最好再用75%的酒精擦拭一下手。每接种一瓶材料,接种器械都要在酒精灯上烧灼灭菌。③外植体消毒应根据不同材料选择合适的消毒剂 and 消毒方法。对于材料内部带菌的组织,必要时在培养基中加入适量抗生素除菌。④人员来访时应注意在大量人员离开后,及时进行污染防治处理。⑤如果发现被污染的组培苗,要及时移出培养室,并及时高压灭菌。

参考文献:

- [1] 高红兵, 亓鑫, 王欢, 等. 酸樱桃组培过程中产生玻璃苗的影响因子[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(1): 31-32, 51.
- [2] 丰锋. 试管苗玻璃化现象的研究进展[J]. 北方园艺, 2003, (3): 71-73.
- [3] 曹善东. 组培条件对草莓脱毒试管苗玻璃化影响的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2006, (2): 172-174.
- [4] 丁运华, 王鸿博. 3种因素对试管苗玻璃化的影响[J]. 热带农业科学, 2003, 23(2): 5-9.
- [5] 周菊花, 林证明, 梁海曼. 控制瑞香试管苗玻璃化的研究[J]. 园艺学报, 1990, 17(3): 229-232.
- [6] 郭东红. 某些因素对玻璃苗形成的影响和玻璃苗在形态解剖上的特点[J]. 植物学通报, 1989, (6): 151-155.
- [7] 孙满芝, 尹成涛. 植物组培过程中玻璃化现象的发生与解决措施[J]. 山东林业科技, 2001, (6): 19-20.
- [8] 胡开林, 杨瑞环. 青花菜试管苗玻璃化发生及克服途径的初步研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 63-66.
- [9] 谢建英, 丰锋, 李洪波. 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.
- [10] 周音, 张智奇, 张建军, 等. 生菜遗传转化过程中克服玻璃苗的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(2): 62-64.

高最高,与 M81-E 无明显差异,而 Roma 株高最矮,但均属高秆型品种,高秆为糖分的大量贮存打下了基础。

表 4 不同品种的糖锤度、株高和抗逆性
Table 4 The brix, plant height and resistance of different sweet sorghum varieties

品种	糖锤度 (%)	株高 (cm)	抗逆性 (级)
M81-E	17.0	366.0 aA	1
原甜一号	17.9	351.1 aAB	4
Rio	16.8	368.5 aA	2
BJK156	17.8	299.7 bBC	2
Roma	16.9	296.1 bC	2

* 糖锤度是以参试品种从地面向上第 7 节 10 株平均估测全株的。

全生育期没有采用农药进行防治,所有品种前中期抗病性较强,灌浆后期部分单株叶片变红;抗虫性也较强,没有发现明显虫蛀现象,孕穗期有轻度蚜虫发生。各品种全生育期没有进行过灌溉,生长季节没有任何萎蔫,没有对生长产生任何抑制,雨季降水能满足生长需要,因此抗旱性也较强。孕穗期间由于风力过大,不同品种茎倒程度不同(表 4)。其中,原甜一号倒伏最为严重,多数从植株中部起身,不能完全恢复;Rio、BJK156、Roma 抗倒性为 2 级,稍好于原甜一号,基本能够恢复;M81-E 抗倒性最强,植株虽然高大,但抵抗风能力强,基本没有倒伏。

3 结论与讨论

3.1 M81-E 和原甜一号为晚熟品种,生育期在 150 d 以上;Rio、BJK156 和 Roma 生育期 120 d 左右。

3.2 5 个甜高粱在试验地种植均具有较高的生物产量,晚熟品种 M81-E 在茎秆产量、产糖量和籽粒产量方面,产量最高,虽然生育期较长,但利用生长季充分,春播较早熟品种更适宜推广应用;早熟品种以 Rio 生物产量较高,夏播利用更具优势。

3.3 该试验晚熟品种以高节位糖锤度含量较高,早熟品种以中间节位糖锤度含量较高。平均糖锤度含量以原

甜一号最高;BJK156 和 M81-E 次之。

3.4 5 个甜高粱基本不产生分蘖;株高以 Rio 最高, M81-E 次之,较高的植株为糖分的大量贮存打下了基础;抗病性、抗虫性和抗旱性均较强,孕穗期有轻度蚜虫发生;M81-E 抗倒性最强。

3.5 试验引进品种较少,而且只采用了 1 a 的试验数据,为使研究结果更为可靠,尚需进一步开展试验研究。本试验只进行了产量等性状的比较,早熟品种夏播情况下能否正常成熟,有待进一步试验研究。生产过程中要注意鸟害和蚜虫防治。甜高粱品种发展前景虽然广阔,但应根据需求种植,不要盲目生产。

参考文献:

- [1] 阎鸿雁,付立中,胡国宏,等.国内外甜高粱研究现状及应用前景分析[J].吉林农业科学,2006,31(5):63-65.
- [2] 曹玉瑞,曹文伯,王孟杰.我国高能作物甜高粱综合开发利用[A].中国科学院广州能源研究所,中国生物质能技术开发中心:中国太阳能学会生物质能专业委员会论文集[C].广州:中国太阳能协会生物质能专业委员会,2001.
- [3] 徐锦章,王经武,李桂茹.高粱蔗和甜高粱拉马达、罗马、丽欧等品种的比较试验[J].中国甜菜糖业,1981,(3):45-48.
- [4] 刘烈权.甜高粱引种观察及综合利用初探[J].江西农业学报,1990,2(2):76-80.
- [5] 席庆国.甜高粱 Sorghum bicolor 13 个不同品种的生物产量与汁液含糖量的初步评价[J].运城高专学报,1994,(4):20-22.
- [6] 赵立欣,张艳丽,沈丰菊.能源作物甜高粱及可供性研究[J].可再生资源,2005,(4):37-40.
- [7] 阿依古丽艾买提,依再提姑阿不都克里木.甜高粱品种的引种及品种比较研究[J].新疆农业科学,2006,43(S1):206-208.

(上接第 65 页)

- [11] 蒋泽平,梁珍海,汪有良,等.苦楝优良无性系试管苗玻璃化的影响因素[J].浙江林学院学报,2006,23(4):420-423.
- [12] 杜启兰.丽佳秋海棠试管苗玻璃化现象的控制研究[J].安徽农业科学,2006,34(7):1337,1339.
- [13] 蒋泽平,梁珍海,李荣锦,等.光叶楮组织培养快速繁殖技术的研究[J].江苏林业科技,2006,33(6):10-13.
- [14] 田英翠,杨柳青.不同激素配比对蜘蛛兰组织培养的影响[J].安徽农业科学,2006,34(24):6445,6449.
- [15] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州:广东高教出版社,2000.
- [16] 吴永英,张喜林,高兴武,等.甜菜组织培养中外植体褐变影响因素的研究[J].中国甜菜糖业,2004,(1):17-20.
- [17] 范志强,杜希华,蹇兆忠,等.辣椒组织培养中褐变问题的研究[J].山东农业科学,2000,(6):35-36.
- [18] 张红,库拉索芦荟组培中的褐变现象及防止[J].安徽农业科学,2008,36(6):2257-2258.
- [19] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,21(3):78-83.
- [20] 王东霞,李长杰.如何对抗植物组培的组织褐变[J].中国花卉盆景,2002,29(2):17.
- [21] 邱璐,陈善娜,杨跃仙,等.云桑组织培养中褐化问题的研究[J].蚕业科学,2000,26(2):118-119.
- [22] 胡彦,赵艳.植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题[J].陕西师范大学学报(自然科学版),2004,(6):130-134.
- [23] 朱德蔚.植物组织培养与脱毒快繁技术[M].北京:中国科学技术出版社,2001.