

植物组织培养的三大难题

杨丽琴, 李 瑞, 王 俊, 胡海英, 吴晓玲

(宁夏大学, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 在植物组织培养过程中, 常发生褐变、污染、玻璃化现象三大难题, 严重影响了组织培养材料的正常发育, 给组织培养带来了一定的困难。结合近些年的研究, 对三者发生的原因以及控制措施进行了综述, 以期对科研和生产提供一定的理论依据和实践指导。

关键词: 组织培养; 褐变; 污染; 玻璃化

中图分类号: Q 943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)04-0104-04

植物组织培养技术是指在无菌条件下, 将离体的植物器官、组织、细胞以及原生质体, 在人工配制的培养基上培养成完整植株的过程^[1]。植物组织培养研究自 Haberlandt (1902)的工作开始, 至今已有 100 年的历史。现在植物组织培养技术已在科研和生产中广泛应用, 成为最引人注目的生物技术之一。特别是近 30 年来, 不少组织培养工厂应用该技术大量生产花卉、蔬菜及特种经济植物幼苗、脱毒苗, 使作物种植逐步走向集中控制化、规模化、自动化、不受自然影响的工厂化生产^[2]。尽管组织培养方面理论研究已相当精深, 但在试验和生产过程中常常会遇到褐变、菌类污染和玻璃化现象三大难题^[3], 严重者会导致试验和生产的失败, 给科研和生产造成巨大的经济损失。所以, 植物组织培养操作过程中的经验积累和技术的掌握是很重要的。现根据国内外的研究成果, 对植物组织培养中的三大难题进行了分析, 并提出了相应的解决方法。

1 褐变现象

1.1 褐变概念及产生机理

褐变是指外植体在诱导脱分化或再分化过程中, 自身组织从表面向培养基释放褐色物质, 以至培养基逐渐变成褐色, 外植体也随之进一步变褐而死亡的现象^[4]。目前认为褐化主要是由酶促引起的。酶促褐化必须具有酶、底物和氧 3 个条件。引起褐化的酶有多酚氧化酶 (PPO)、过氧化物酶 (POD)、苯丙氨酸解氨酶等^[5-7]。在正常发育的植物组织中, 底物、氧、PPO 同时存在并不发生褐化, 这是因为在正常组织细胞内, 多酚类物质分布在液泡, 而 PPO 则分布在各种质体或细胞质中, 这种区

域性分布使底物与 PPO 不能接触。而当细胞膜的结构发生变化和破坏时, 则为酶创造了与 PPO 接触的条件, 在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌, 再进行一系列的脱水、聚合反应, 最后形成黑褐色物质, 从而引起褐化^[8-9]。

1.2 克服外植体褐变的措施

褐变在植物组织培养过程中普遍存在, 尤以木本植物组织培养中褐变严重^[10-11]。控制褐变比控制污染和玻璃化更加困难, 因而有人认为褐变能否得到有效控制是植物组织培养能否成功的关键^[12-13]。从理论上讲, 酶促褐变可以通过以下三种方法加以抑制: 一是除去引起氧化的物质—氧; 二是捕捉或减少聚合反应的中间产物; 三是抑制有关的酶。实际操作中, 下列措施被认为是行之有效的。

1.2.1 选择适当的外植体 选择生长旺盛的, 分生能力强的部位作为外植体材料, 在进行组织培养过程中不易产生褐变。油棕用幼嫩的外植体培养时褐变较轻, 而用高度分化的叶片接种后, 褐变严重。在取材时还应注意外植体的基因型, 选择褐变程度较小的品种作为外植体^[14]。

1.2.2 培养材料进行预处理 将外植体用流水冲洗后, 在 5℃左右处理 12~24 h, 消毒后先接种在只含有蔗糖的培养基上 5~7 d, 使组织中的酚类物质部分先渗入培养基。取出外植体, 用适当方法清洗, 再接种到适合的培养基上, 可减轻外植体的褐变。李焕秀等^[15]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抑制褐变有一定作用。

1.2.3 选择适当的培养基和培养条件 在培养基的选择上应注意适当的无机盐成分、蔗糖浓度、激素水平与组合以及配合一些抗褐变剂等都可减轻褐变现象的发生。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。较高的温度会使酶促褐变加强。

第一作者简介: 杨丽琴(1984), 女, 宁夏灵武人, 硕士, 主要从事植物学方面的研究。E-mail: y_lq616@163.com。

通讯作者: 王俊。E-mail: w_jun@nxu.edu.cn。

基金项目: 国家科技攻关资助项目(2005BA901A18)。

收稿日期: 2008-01-11

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 抑制剂和吸附剂的作用 在培养基中加入抗氧化剂和其他抑制剂可以有效地减轻外植体在组培过程中的酶促褐变^[6]。在培养基中加入Vc可有效的防止褐变。这是因为Vc为多羟基还原物质, 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^[17]。此外, 蛋白水解产物、氨基酸、2-巯基苯丙噻唑、硫脲、二氨基二硫代硫酸钠、氰化钾、多胺等物质都可作为抑制剂来防止褐变的发生。活性炭是一种较强的吸附剂, 它可以吸附培养物分泌到培养基中的酚、醌等有害物质, 从而有效地减轻褐变。需要注意的是, 活性炭在吸附有害物质的同时也吸附培养基中的生长调节物质, 而使其失去作用, 影响外植体的正常发育。因此, 在加入活性炭的培养基中应适当改变激素配比, 使得在防止褐变的同时, 外植体能够正常的发育^[18-19]。

1.2.5 其他防止褐变的措施 在外植体接种后1~2 d即转移至新鲜培养基中或同一培养基的不同部位, 可以防止酚类物质在伤口周围积累过多, 连续转移几次即可防止褐变^[20]。此外, 在外植体的培养过程中适当缩短转瓶周期, 适当改变培养基的硬度等方法均可减轻褐变的毒害。

2 污染的原因及对策

污染是指在植物组织培养过程中, 培养基和培养材料滋生杂菌, 最终导致培养失败的现象。从时间角度可以将污染发生原因归纳为3个阶段: ①前期准备阶段: 包括培养基灭菌不彻底、器皿的灭菌不完全, 外植体的选择不当与消毒不彻底; ②无菌操作阶段: 包括无菌操作室灭菌和超净工作台有问题, 操作不规范, 操作工具的消毒不彻底等; ③培养阶段: 培养环境不清洁和培养体系意外开放等。由于这三方面的作用, 存在细菌性污染、真菌性污染、内源菌污染。

2.1 细菌污染及对策

细菌性污染的主要症状是材料附近出现黏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。一般在接种后1~2 d即可发现^[21]。细菌污染主要由外植体带菌或培养基灭菌不彻底以及操作人员操作不慎造成。外植体带菌污染的解决措施是对外植体进行彻底消毒。即根据不同材料选择合适的消毒剂和消毒方法; 对特殊材料先进行预处理; 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。此外, 培养基的灭菌力求彻底, 而且操作人员要严格按照无菌操作顺序操作^[22]。

2.2 真菌污染及对策

真菌性污染主要指霉菌引起的污染, 一般接种后

3~8 d可在培养基中发现各种颜色的菌斑。多由空气污染和瓶口边缘以及取放封口纸扬起的灰尘和真菌孢子落入器皿中造成。因此, 每次使用接种室和超净工作台前, 先用紫外线灯杀菌20 min, 再用75%的酒精喷雾降尘。接种时先用75%的酒精棉球擦拭瓶子外部, 然后再放入超净台。接种时, 瓶子要拿成斜角, 瓶口放在火焰上方, 利用气流上升的原理, 以阻止空气中飘扬的孢子落入瓶内, 取封口纸时动作要轻。另外, 如发现霉菌污染应及时清除^[23-29]。

2.3 内源菌污染及对策

在植物组织培养过程中, 较难处理的是内源菌污染。内源菌污染是由于外植体材料内部的微生物(如内生细菌、真菌等)不能被一般的表面消毒方法所清除, 随着材料带入培养过程造成的。在组织培养早期会导致培养失败, 增殖效率降低, 培养物生长减缓, 玻璃化苗增加等; 在组织培养后期会导致试管苗移栽困难和死亡。针对内源菌污染, 有以下防治对策: ①改进外植体消毒方法。结合常规的消毒方法, 采用间隙消毒法。即经过一般的消毒过程后, 把外植体放在不含激素和维生素的培养基中, 培养一段时间后取出, 再消毒1次。②反复检查培养物。有的污染很长时间后才会表现, 有的污染不经细致检查不易发现, 所以在初代培养成功后要反复检查, 不要急于扩大繁殖。③使用抗生素。抗生素能抑制污染菌的生长, 在使用初期效果较好。但抗生素不能完全杀死污染菌, 因此潜伏的污染可能会给植物以后的生长带来问题^[30-31]。

3 玻璃化现象

3.1 玻璃化概念及形成原因

玻璃化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”^[32]。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。目前认为玻璃苗的形成可能有以下几方面的原因。

3.1.1 由于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, 细胞吸水过多而发生畸变。

3.1.2 由于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变。

3.1.3 培养条件对试管植物的玻璃化影响很大, 人们认为: 培养容器中的相对湿度, 培养基中无机盐和碳水化合物含量, 氮素的供应形态, 琼脂含量以及培养温度等因素皆可影响玻璃苗的发生率。

3.2 玻璃化防治对策

3.2.1 利用固体培养, 增加琼脂浓度, 降低培养基的衬质势, 造成细胞吸水阻遏, 可降低玻璃化^[33-34]。琼脂浓

度应不低于 0.8%, 条状琼脂先用双蒸水浸泡 24 h 去除杂质, 粉状琼脂应尽可能选用含灰量低于 2.5% 的琼脂粉。因为琼脂杂质中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等含量较高, 会影响培养基中矿质元素的含量和比例。

3.2.2 玻璃化发生是“生长因子不平衡的产物”、是培养物“中毒”、不能很好适应培养基和培养环境的结果。因而提高培养物对逆境的耐受能力是有益的。可适当提高培养基中蔗糖含量或加入渗透剂, 降低培养基中的渗透势, 减少培养基中植物材料可获得的水分, 造成水分胁迫。

3.2.3 注意通气, 尽可能降低培养容器内的相对空气湿度和改善氧气供应状况。目前较多使用塑料薄膜封口, 要注意薄膜的通透性或改用透气膜^[35-36]。

3.2.4 适当降低培养基中 NH_4^+ 浓度, 或者及时转移, 使 NH_4^+ 浓度高低交替; 适当提高培养基中的 Ca^{2+} 浓度; 注意细胞分裂素和生长素的配合以及激素和 K^+ 之间的配合^[37], 以兼顾不定芽增殖系数和抑制玻璃化的发生。

3.2.5 控制温度, 适当进行低温处理, 避免过高的培养温度, 可消除玻璃化^[38]。

3.2.6 增加自然光照。试验发现, 玻璃苗放于自然光下几天后, 玻璃化逐渐消失^[39]。

4 结语

科学的不断发展, 使得植物组织培养技术的应用前景越来越广阔, 完善此项技术, 控制污染、褐化和玻璃化这三大难题是一大关键。相信不久的将来, 植物生理学、生物化学、组织培养学等学科的合作, 将为组织培养中这三大难题的机理研究提供更有力的证据, 使控制措施从治标走向治本, 三大难题必将得到彻底解决。

参考文献

- [1] 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]. 陕西师范大学报, 2004, 32: 130-134.
- [2] 吴洪生. 组织培养中的染菌及预防[J]. 药物生物技术, 2001, 8(2): 239-240.
- [3] 赵蓬晖, 张江涛, 马红卫. 植物组织培养中的几个常见问题与对策[J]. 河南林业科技, 2001, 21(2): 27-28.
- [4] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501-506.
- [5] Ichihashi S, Kako S. Studies on clonal propagation of cattleya through tissue culture method; Broxming of cattleya[J]. J Jap Soc Hort Sci, 1977 (46): 325-330.
- [6] Ishii M, Uemoto S, Fujieda K. Studies on tissue culture in cattleya species II. Preventive methods for the browning of explanted tissue[J]. J Jap Soc Hort Sci, 1979(48): 199-204.
- [7] Maier V, Metzler D M. Quantitative changes in date polyphenols and their relation to browning[J]. J Food Sci, 1965(30): 80-84.
- [8] Zaid A. In vitro browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures-A review[J]. Acta Hort, 1987(212): 561-566.
- [9] Ioomis W D, Battaile J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes[J]. Phytochem, 1966(5): 423-438.
- [10] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 456-466.
- [11] Hillebrandt V, Harvey P M. Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of Pelargonium hortorum Bailey Sprinter Scarlet[J]. J Hort Sci, 1988, 63(4): 651-657.
- [12] Debergh P C, Read P E. Micropropagation[M]// Debergh P C, Zimmerman (eds). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, 1991: 1-13.
- [13] 孔祥生, 张妙霞, 杜爱玲, 等. 甜柿离体快繁技术研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(2): 178-186.
- [14] 付影, 荣俊冬, 陈礼光, 等. 植物组织培养中褐变问题研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2007, 3(3): 190-195.
- [15] 李焕秀, 乔爱娇. 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.
- [16] 黄霞, 黄学林, 高东徽. 防止香蕉茎尖培养中外植体褐变的研究[J]. 广西植物, 1999, 19(1): 78-80.
- [17] 宁正祥, 赵谋明. 食品生物化学[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1995: 293-301.
- [18] 陈惠娟. 植物组织培养中褐变的产生机理及克服措施[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 79-82.
- [19] Preil W, EngehaRdt N. Meristem culture of azaleas (Rhododendron Sirsi)[J]. Acta Hort, 1997(73): 203-207.
- [20] 胡凯, 祝顺琴, 谈锋, 等. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究[J]. 西南师范大学学报, 2004, 29(4): 659-663.
- [21] 许红梅. 植物组织培养中的污染及防止措施[J]. 北方园艺, 2006(6): 148-149.
- [22] 高华援, 王楠, 王庆峰, 等. 马铃薯组织培养中常见的污染问题及解决办法[J]. 吉林农业科学, 2007, 32(2): 28-30.
- [23] 杜雪玲, 张振霞, 余如刚, 等. 植物组织培养中的污染成因及其预防[J]. 草业科学, 2005, 22(1): 24-27.
- [24] 杨萍, 张涛. 马铃薯脱毒试管苗接种污染原因及防除技巧[J]. 内蒙古农业科技, 2005(7): 21-22.
- [25] 柴向华, 李军, 张秀珊, 等. 植物组织培养中污染的控制[J]. 热带农业科学, 2003, 23(6): 40-44.
- [26] 郝云凤, 杨瑞平, 张培宏, 等. 马铃薯脱毒试管苗组培扩繁技术规程[J]. 内蒙古农业科技, 2005(1): 54-55.
- [27] 张艳玲, 姚雷, 申晓辉. 芳香植物唇萼薄荷组织培养中污染控制[J]. 上海农业学报, 2005, 21(1): 4-6.
- [28] 张桂芳, 贺红. 广佛手组织培养中污染及防治研究[J]. 中医药学刊, 2005, 23(2): 269.
- [29] 刘进平. 胡椒组织培养中污染问题的研究[J]. 热带农业科学, 2003, 23(6): 6-10.
- [30] 李颖, 李春燕. 多菌灵和青霉素在组培污染中的应用[J]. 林业科技, 2002, 27(1): 6-8.
- [31] 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.
- [32] 陶铭. 组织培养中畸形胚状态及超度含水态的研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(5): 1048-1058.
- [33] 韩美丽, 唐玉贵, 黄华艳. 神灯白掌组培再生体系的建立与玻璃化现象的控制[J]. 广西林业科学, 2000, 29(3): 111-114.
- [34] 张晓军. 香石竹离体快繁过程中玻璃化现象的研究[J]. 牡丹江师范学院学报, 1999(2): 4-5.
- [35] Jom H, Ham I K. Effects of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitification in carnation plantlets in vitro[J]. Journal of the Korean Society for Horticulture Science, 2002, 43

桃种质资源糖酸品质研究进展

赵剑波¹, 吴本宏², 姜全¹, 郭继英¹, 陈青华¹

(1. 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093; 2. 中国科学院植物所, 北京 100093)

摘要: 阐述了桃果实糖酸含量及其与果实风味的关系、桃果实糖酸遗传规律的研究进展, 存在的主要问题, 并对今后的研究进行了展望。

关键词: 桃; 糖酸品质; 遗传规律

中图分类号: S 662.102.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2008)04—0107—03

我国果树生产在世界上占有重要的地位。据世界粮农组织统计, 2003 年我国果树栽培面积和水果总产量为 9 889 820 hm² 和 72 015 402 t, 分别占世界的 19.5% 和 15.1%, 均居世界第一位。我国桃生产在世界上居更重要的地位, 2003 年栽培面积和产量分别为 1 402 700 hm² 和 4379 366 t, 分别占世界桃栽培面积和产量的 63.4% 和 32.1%。我国果树生产尤其是在过去 10 年里获得了迅猛的发展, 几种主打水果出现了相对过剩, 部分果园出现卖果难和销毁果园的现象, 但高品质的果品在市场上竞争力强, 经济效益高^[1-3], 目前果树生产正处于从数量型向质量型的转化阶段。因此, 提高果品的质量成为我国目前果树产业的首要任务。

品种自身的品质特性在优质果品生产中起着决定性作用。桃是多年生果树, 育种周期长、效率低, 优良新品种的选育速度慢, 尤其是高内在品质的品种选育在世界范围内均未能获得突破性进展^[4]。导致桃品质育种陷入目前困境的原因主要有两个: 一是对现有的种质资源的品质特点了解不够, 尤其是缺少对特殊种质资源的挖掘和利用; 二是对果实品质形状的遗传特点了解不多, 育种盲目性大, 难以实现预定的品质育种目标^[5]。我国是桃起源中心, 种质资源特别丰富, 且具有悠久的利用历史, 拥有大量的优秀的或特异的桃种质, 尤其是古老的或农家的品种资源, 而这些资源很少被欧美国家乃至我国的育种家所利用^[6]。在进行桃种质资源果实品质的评价基础上建立桃种质的品质信息平台, 并同时积极开展果实品质遗传规律的研究, 对于实现科学地选配亲本, 提高育种效率, 加快优质品种的育种过程, 实现果实品质育种的突破, 具有重要的意义。

第一作者简介: 赵剑波(1973-), 女, 博士生, 副研究员, 主要从事桃资源研究与育种工作。E-mail: zjianb@126.com。
收稿日期: 2008-01-11

- (2): 133-136.
- [36] 高疆生, 张卫芳, 段黄金. 等. 克服香石竹试管苗玻璃化研究[J]. 北方园艺, 2001(3): 34-36.
- [37] Kevers C, Coumans M, Caspar T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plant culture in vitro[J]. Physiol Plant, 1986(61): 69-74.
- [38] 储成林, 李大卫. 牡丹组织培养中玻璃化现象的出现及初步观察[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 1993 6(1): 98-101.
- [39] 韩建军. 叶子花组织培养中培养条件与玻璃化的相关性[J]. 中国林副特产, 2002(1): 48.

Three Difficult Problems in Plant Tissue Culture

YANG Li-qin, LI Rui, WANG Jun, HU Hai-ying, WU Xiao-ling
(Ningxia University, Ningxia, Yinchuan 750021, China)

Abstract: There are three difficult problems in plant tissue culture: browning, contamination and vitrification. These badly affect the normal development of tissue culture material, and influence the proceedings of tissue culture. Combined with the recent years research, this paper analyzed the reason why these phenomenons come out and poses some suggestions on how to control them, which can provide theory and practice evidence for science research and production.

Key words: Tissue culture; Browning; Contamination; Vitrification