

植物离体快繁中的常见问题及防止措施

郭艳茹¹, 詹亚光²

(1. 运城学院生命科学系, 运城 044000; 2. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 简述了利用植物组织培养技术进行离体快繁过程中经常遇到的问题: 污染、遗传稳定性、玻璃化、褐化、黄化等, 并针对以上问题提出相应的防治措施。
关键词: 植物; 离体快繁; 问题; 防止措施
中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2008)01-0019-03

Problems and Countermeasures in Plant Rapid Propagation in Vitro

GUO Yan-ru¹, ZHAN Ya-guang²

(1. Life Science Department, Yuncheng University, Yuncheng 044000;
2. Life Science College, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract: This paper presented problems which often appeared in plant rapid propagation in vitro, such as pollution, genetic stability, vitrification, browning and Chlorotic character, at the same time brought forward corresponding countermeasures.
Key words: plant; Plant Rapid Propagation in Vitro; problems; countermeasures

广义的植物组织培养不仅包括在无菌条件下利用人工培养基对植物组织的培养, 而且包括对原生质体、悬浮细胞和植物器官的培养^[1]。因为培养的器官已经脱离了母体, 所以也称之为离体培养。植物组织培养研究自德国的植物生理学家 G. Haberlandt 的工作开始, 及 1934 年美国学者 White 等用番茄根进行组织培养, 首次建立了活跃生长的无性繁殖系以来, 至今已有 100 多年的历史。现在植物组织培养技术已在科研和生产中广泛应用, 成为最常用的生物工程技术之一。植物组织培养可以进行植物离体快繁、无病毒苗木培育、培育新品种或创制新物种、次生代谢产物的生产、植物种质资源的离体保存、人工种子等方面的应用^[2]。其中离体快繁是组织培养在林木生产上应用最广泛、最成功的一个领域^[3]。虽然利用植物组织培养技术进行离体快繁的操作过程并不复杂, 但在实验和生产过程中常常会遇到一些问题, 下面针对植物离体快繁过程中出现的几个问题进行分析, 并提出一些防治措施。

- 1 污染
- 污染是指在组培过程中, 由于细菌、真菌等微生物的侵染, 在培养容器中滋生大量菌斑, 使培养材料不能正常生长和发育的现象。
- 1.1 受污染的因素
- 培养基及各种接种器皿灭菌不彻底; 外植体灭菌不彻底; 操作时人为带入; 环境不清洁; 超静工作区域不清洁等, 这些原因中的任何一种情况都可能导致培养材料的细菌性或真菌性污染。
- 1.2 控制的方法
- 灭菌前充分排尽灭菌锅内的冷空气^[4], 当灭菌锅的压力达 1.055~1.406 kg·cm⁻²、温度为 121~126℃时, 应保持灭菌时间 15~20 min; 接种器具每次使用后应用酒精灯灼烧; 污染的外植体材料应及时淘汰, 如果种源有限, 对外植体材料可在一定的可控范围内进行二次灭菌; 操作人员接种时应用 75% 的酒精擦拭双手和培养瓶的表面, 操作区内不要放入过多待用培养瓶, 防止阻挡无菌风的流动; 接种环境和培养环境都应该定期用福尔马林等熏蒸灭菌, 经常用紫外灯照射灭菌; 超静工作台应定期对初过滤器清洗和更换, 提前打开超静工作台内的紫外灯 15~20 min, 并用 75% 酒精擦拭整个工作台。
- 2 遗传稳定性
- 植物组织培养中, 细胞、组织和再生植株均会出现

收稿日期: 2007-10-11
基金项目: 运城学院创新项目(20060235)
第一作者简介: 郭艳茹(1980-), 女, 内蒙古赤峰市人, 硕士, 助教, 从事生物技术研究。 Tel: 13835930478; E-mail: yanru-guo2003@126.com.

各种变异, 且具普遍性, 涉及的植物性状也相当广泛。

2.1 影响培养材料遗传稳定性的因素

2.1.1 基因型 培养材料的基因型不同, 发生变异的频率也不相同。

2.1.2 继代次数 试管苗继代培养次数和时间是造成遗传变异的关键因素, 一般随继代次数的增加, 变异频率呈上升趋势, 如用基因枪法将雪花莲外源凝集素基因(*gna*)转移到优良粳型杂交稻恢复系蜀恢527中, 通过PCR、PCR—Southern blotting和Southern blotting等分子方法检测证明, 外源基因已稳定遗传到转基因第三代(T_2)。转基因第一代植株(T_0)在株高和结实率上与相应的组培、种子实生苗植株相比, 发生明显的不可遗传的变异。随着繁殖代数的增加, 转基因植株恢复到与对照植株一致^[5]。

2.1.3 器官发生方式 离体器官的几种发生方式中, 以茎段、茎尖、腋芽等形成的不定芽、单芽、丛生芽的方式繁殖, 不易发生变异或变异的频率极低^[1]。

2.2 降低遗传变异的方法

选用不易发生遗传变异的基因型材料; 缩短继代时间, 限制继代次数; 选用不易发生遗传变异的增殖途径和器官发生方式; 采用适当的生长调节物质和激素浓度, 减少或不使用易引起诱变的物质, 及时剔除生理和形态异常苗。

3 玻璃化

玻璃化是试管苗的一种生理失调症状, 表现为试管苗叶片、嫩梢呈水浸透明或半透明状。玻璃化苗的叶片皱缩呈纵向卷曲, 脆弱易碎, 叶表缺少角质层腊层, 仅有海绵组织, 没有功能气孔^[6]。玻璃化苗由于体内含水量高, 干物质、叶绿素、蛋白质、纤维素和木质素含量低, 角质层、栅栏组织发育不全, 因而光合能力和酶活性较低, 组织畸形, 器官功能不全, 分化能力较低, 生根困难, 移栽后不易成活。

3.1 玻璃化苗发生的原因

3.1.1 培养基中琼脂和蔗糖的浓度 琼脂和蔗糖的浓度与试管苗玻璃化的程度呈负相关, 即琼脂和蔗糖的浓度越高, 试管苗的玻璃化程度越低, 琼脂和蔗糖的浓度影响着培养基的渗透势, 渗透势不适时, 试管苗的玻璃化程度呈负相关, 琼脂浓度还影响着培养瓶内空气湿度, 高湿条件下试管苗生长快, 玻璃化的发生频率相对高。

3.1.2 培养温度 培养温度与玻璃化程度呈正相关。温度影响着试管苗的生长速度, 一定范围内的高温, 试管苗的生产和代谢受到影响, 促进玻璃化的产生。

3.1.3 生长调节剂浓度 高浓度的细胞分裂素可促进芽分化, 也使玻璃化发生比例提高。细胞分裂素和生长素的比例失调, 试管苗正常生长所需要的激素水平失衡, 导致玻璃化发生。

3.1.4 培养瓶内乙烯浓度 非受伤的物理和化学

胁迫可加速乙烯的合成, 促使玻璃化的发生。

3.1.5 光照 当光照不足在加上高温, 易引起试管苗过度生长, 加速玻璃化发生。

3.1.6 培养基含氮量 培养基含氮量高, 特别是铵态氮含量高, 易引起玻璃化发生^[7]。

3.2 防止玻璃化发生的措施

提高培养基硬度, 降低培养基水势; 提高培养基中蔗糖含量或加入渗透剂, 降低培养基渗透压^[8]; 利用可透气性瓶塞材料, 降低培养瓶中的过饱和湿度; 减少培养基中的含氮化合物、生长调节剂的用量; 增加光照强度, 适当降低培养温度, 并进行昼夜变温处理; 添加一些可减少或防止玻璃化发生的物质或抗生素, 如: 马铃薯汁、CCC、聚乙烯醇、PP₃₃₃等^[9]。

4 褐化

褐化是指培养材料向培养基中释放褐色物质, 致使培养基和培养材料逐渐变褐而死亡的现象。褐化的发生是由于组织中多酚氧化物被激活, 酚类化合物被氧化形成褐色的醌类物质, 醌类化合物在酪氨酸酶的作用下, 与培养材料组织中的蛋白质发生聚合, 引起其他酶系统失活, 导致代谢紊乱, 生长受阻。

4.1 影响褐化发生的因素

4.1.1 植物种类和品种 植物体内所含单宁及其他酚类化合物的数量不同, 发生褐化的频率和严重程度也相差很大, 一般木本植物酚类化合物的含量较草本植物高, 因此, 木本植物更易发生褐化, 增加组织培养的难度。

4.1.2 外植体年龄、大小和取材时间 材料越小、越老化和处于生长季节的外植体含有较多的酚类物质的材料易老化。

4.1.3 外植体损伤 外植体的伤口越大, 酚类物质的被氧化面积越大, 褐化程度越严重^[10]。

4.1.4 光照 外植体取材前进行母株遮光处理, 可有效抑制褐化发生, 因为氧化过程中的许多反应受酶系统的控制, 而酶系统的活性又受光照影响。

4.1.5 温度 低温可减轻褐化发生, 因为低温抑制酚类化合物氧化, 降低多酚氧化酶的活性。

4.1.6 培养时间过长 接种材料转移不及时, 导致褐化发生, 甚至全部死亡。

4.1.7 培养基成分 培养基中无机盐浓度和细胞分裂素浓度过高时, 易导致材料褐化^[11-12]。

4.2 防止褐化的措施

在冬春季节选择适当的外植体, 即外植体应具有较强分生能力; 选择适宜的培养基, 调整激素的浓度; 控制温度和光照, 在不影响正常生长和分化的前提下, 应降低温度, 减少光照; 培养基中添加抗氧化剂和其他抑制剂或吸附剂等; 加快继代转移的速度, 缩短周期。

5 黄化

黄化是指试管苗幼苗整株失绿, 全部或部分叶片黄化、斑驳的现象。

5.1 黄化发生的影响因素

5.1.1 培养基成分 培养基中铁元素不足, 矿物质营养不均衡, 激素配比不当。糖用量不做活已耗尽。

5.1.2 培养条件 培养瓶通气不良, 温度不适, 光照不足。

5.1.3 pH pH 变化过大。

5.1.4 抗生素类 培养基中添加一些抗生素类物质, 如头孢霉素等。

5.2 控制黄化发生的措施

检查培养基的配置过程, 保证培养基成分的正确添加; 调节培养基组成的 pH。控制培养室温度, 增加光照, 使用透气瓶塞改善瓶内通气情况; 减少或不用抗生素类的物质。

植物组织培养过程中, 褐变问题普遍存在, 与菌类污染和玻璃化现象并称为植物组织培养的三大难题^[13], 加上离体快繁过程中出现的其它不利因素, 如黄化、遗传变异等, 重者会导致实验和生产的失败, 给科研和生产造成损失, 因此, 要在实践中不断寻求更好的解决措施, 以提高工作效率和创造更大的经济效益。

参考文献:

[1] 李浚明. 植物组织培养教程[M] . 北京: 中国农业出版社, 1992

[2] 王家麟. 植物组织培养及其应用研究概况[J] . 黑龙江农业科学, 2006(3): 86-89.

[3] 张彦妮. 影响植物组织培养成功的因素[J] . 北方园艺, 2006(3): 132-133.

[4] 高树春, 丁加军. 高压蒸气灭菌过程中为什么要排出锅内的冷空气[J] . 生物学教学, 2004(3): 78.

[5] 周开达, 朱祯, 李平, 等. 转抗虫基因优良粳型恢复系的获得及其外源基因的遗传稳定性研究[J] . 中国水稻科学, 2002, 16(3): 211-215.

[6] 李胜, 李唯, 杨德龙, 等. 植物试管苗玻璃化现象研究进展[J] . 甘肃农业大学学报, 2003(1): 1-16.

[7] Kevers C, Coumans—Gilles M F. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro[J] . Physiologia Plantarum, 1984, 61: 69-74.

[8] 周朴华, 唐前瑞, 张宏志. 观赏植物试管苗玻璃化现象及防治研究进展[J] . 湖南农业大学学报(自然科学版), 2000(4): 81-85.

[9] 李娅莉, 张健, 潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J] . 四川农业大学学报 2004(3): 278-282.

[10] 王玖瑞, 刘孟军, 祁业凤 等. 枣幼胚培养中褐化的研究[J] . 河北农业大学学报, 2004(2): 50-52.

[11] 祝展平, 王国彬, 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[J] . 园艺学报, 2000(1): 481-486.

[12] Block R. Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during in vitro establishment[J] . Gartenbauwissenschaft, 1995(6): 276-279.

[13] 蒋剑刚. 植物组织培养中的褐变问题及对策[D] . 广西: 广西职业技术学院毕业论文, 2002.

马铃薯病虫害的发生与综合防治技术

通河县农广校 陈香丽 张敏杰

随着产业化的调整, 黑龙江省通河县种植面积逐年增加, 总面积达 667 hm²。每年由于病虫害危害, 降低了产量和品质。在生产中常见的病害有: 马铃薯晚疫病、早疫病、环腐病、病毒病; 常见的虫害有: 二十八星瓢虫、地下害虫、蛴螬。在病虫害防治中, 要全面贯彻“预防为主, 综合防治”的方针, 使病虫害得到有效控制。经过多年的调查和实践, 总结出以下防治方法。

1 农业防治

1.1 选用抗病品种, 实行合理轮作

品种选择可根据当地危害马铃薯的主要病害种类, 选择适合的抗病、高产、优质的优良品种栽培。目前选择马铃薯的品种有: 克新 9 号、爱薯 6 号、7 号、东农 303、克新 1~3 号、德友 1 号、波友 1 号等品种。应实行合理轮作, 一般可与禾本科作物实行 4~5 a 的轮作。

1.2 精选健薯, 做好种薯处理

这是阻断病害初侵染、综合防治马铃薯病害的基础措施。马铃薯在收获、入窖、出窖及播前切薯时, 应彻底剔除病薯, 选留健康种薯播种。播前可用 75% 敌克松可湿性粉剂处理种薯, 每 100 kg 种薯用药 280 g, 加细土拌种, 或用 50% 托布津可湿性粉剂 500 倍液浸种薯。

1.3 加强田间管理是增产保障

主要采用适时晚播、夏播留种以及芽栽和顶芽播种等方法生产小整薯。然后用健壮的小整薯播种。既抗病又增产。

多中耕, 在植株周围高培土, 注意排水, 降低土壤湿度。合理施肥, 注意除草, 均能起到防病治虫作用。

2 药剂防治

2.1 病害防治

2.1.1 晚疫病 应拔除中心病株后, 立即喷药防治。适用的药剂有: 72. 2% 的普力克水剂 800 倍液、或 64% 杀毒矾可湿性粉剂 500 倍液喷雾, 或用 72. 2% 霜霉威类杀菌剂 600~1 000 倍液。采收前 15 d 停止用药。

2.1.2 早疫病 可选用 50% 扑海因可湿性粉剂 1 000~1 500 倍液, 或 75% 百菌清可湿性粉剂 600 倍液, 或 58% 甲霜灵猛锌可湿性粉剂 500 倍液, 或 64% 杀毒矾粉剂 500 倍液。对早疫病防效高低的关键, 在于用药的迟早, 看见病斑开始用药防治, 效果达 70% 以上。

2.1.3 环腐病 主要采用切刀消毒与药液浸种等措施。常用的切刀消毒液有 5% 来苏尔, 75% 酒精、5% 食盐水等。种薯消毒液可用链霉素或多抗霉素 4 000~4 500 倍液。

2.1.4 病毒病 可用 1. 5% 植病灵乳剂 1 000 倍液, 或 20% 病毒 A 可湿性粉剂 500 倍液进行防治。

2.2 虫害防治

2.2.1 二十八星瓢虫 可采用 80% 敌敌畏乳油 1 000 倍液或菊酯类杀虫剂喷雾。

2.2.2 蛴螬 在发生密度小时可进行人工扑杀, 密度大时可采用敌百虫毒饵或 90% 晶体敌百虫 800~1 000 倍液灌根。