



热娜古丽·吐鲁洪, 闫芬芬, 崔刚闯, 等. 植物组织培养中褐变和玻璃化及污染的治理研究[J]. 黑龙江农业科学, 2019(11):154-157.

植物组织培养中褐变和玻璃化及污染的治理研究

热娜古丽·吐鲁洪^{1,2}, 惠浩亮¹, 刘甜甜¹, 闫芬芬¹, 王新建^{1,2}

(1. 新疆塔里木大学 植物科学学院/南疆特色果树高效优质栽培与深加工技术国家地方联合工程实验室, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:褐变、玻璃化和污染是植物离体微繁中常常出现的现象, 严重影响了外植体的生长与分化, 导致生产中损失, 是生产中亟待解决的问题。本文通过分析植物茎段培养中存在的原因, 并对植物组织培养中褐变、玻璃化和污染治理措施展开探讨, 旨在为今后研究植物组织培养工作提供参考。

关键词:植物营养器官培养; 褐变; 玻璃化; 污染

植物组织与细胞培养是通过无菌操作分离植物体的一部分, 接种到培养基上, 在人工控制条件下进行培养, 使其产生完整的植株或生产有经济价值的其他产品的技术。现阶段我国植物组织与细胞培养工厂化不断发展, 技术越来越成熟, 在随之而来的市场竞争之下, 如何减少成本提高利润是提高市场竞争优势的重中之重。褐变、玻璃化和污染是植物组织培养中常见的问题, 也是植物组织培养和管理的工作难点, 在植物营养器官培养中防控这 3 个问题的发生可以大大减少成本损失, 解决这三大障碍面临的困难, 是由微生物的特性导致^[1], 微生物是三大问题的根本成因, 应结合实际情况来采取不同的防控措施。由此可见, 植物组织培养中的褐变、玻璃化和污染方面展开研究有着极其重要的现实意义, 本文就以上 3 个方面进行了分析并提出了相应的防控措施, 旨在为今后的研究植物组织培养工作提供参考。

1 褐变

褐变(Browning)是植物离体微繁中经常会出现的问题, 大部分褐化都在木本植物和外植体比较大的植物组织培养中经常出现。褐变是因为离体组织培养中的酚类物质被激活, 使细胞的生理代谢发生变化, 酚类物质被氧化后产生棕褐色的醌类物质而引发植物外植体褐变, 接种时切的外植体块儿越大, 其氧化越严重, 酚类物质快速扩

散到培养基表面, 抑制其他酶的活性, 从而毒害植物外植体材料使实验材料污染。为防止外植体的褐变, 进行试验时可选择使用抗氧化剂, 人工降低醌类物质的产生。

1.1 发生褐变的因素

1.1.1 材料的基因型差异 不同植物种类, 同一植物的不同类型和品系, 组织培养过程中褐变程度和频率不同, 普遍存在于各种植物体的组织培养过程中。

1.1.2 材料的生理状态 植物组织培养外植体的选取以叶片、茎段、子叶、胚轴、花瓣等多种外植体为主, 在蔷薇科果树离体再生中均有应用, 关键是最适外植体类型常与果树种类相关。幼龄的幼嫩外植体材料一般比成熟外植体材料褐变轻, 分生部位接种后比分化部位褐变轻, 采样时冬春季取材褐变死亡率最低, 其他季节取样则不同程度地加重, 植物组织培养中幼嫩外植体的褐变比成熟外植体的褐变更严重。另外酚类物质含量差异和多酚氧化酶活性差异是褐变发生的直接原因^[1]。木本植物比草本植物容易褐变, 对于木本植物, 单宁含量或色素含量高的植物容易发生褐变。

1.1.3 培养基状态与种类 植物组织与细胞培养中选择合适的基础培养基是培养出优质组培苗的根本, 所以, 研究出不同的植物品种及植物器官所适宜的基础培养基是其中的重要内容之一。植物外植体准备接种时也应注意培养基中的生长激素、无机盐浓度、培养基酸碱性和一些抗褐化物质浓度和用量^[2], 这些因子也是让外植体发生褐化的原因之一。此外, 培养基所含有的细胞分裂

收稿日期: 2019-05-28

基金项目: 新疆生产建设兵团科技攻关计划(2011BA003)。

第一作者简介: 热娜古丽·吐鲁洪(1995-), 女, 在读硕士, 从事果树遗传育种研究。E-mail: 1584222874@qq.com。

通讯作者: 王新建(1963-), 男, 硕士, 教授, 从事果树遗传育种研究。E-mail: wxjzky@163.com。

素 6-BA 或 KT 能刺激多酚氧化酶活性提高,培养基 pH 低于 5.0 较易褐化^[3]。

1.1.4 温度和光照的影响 组织培养过程中,培养环境的温度和光照等环境因子对植株组织培养影响明显。温度与光照是控制酶活性的重要指标,低温抑制外植体的 PPO 活性,降低 PPO 催化多酚类物质的氧化和合成机率,从而使外植体的褐变程度减轻^[4]。光照条件也影响褐化现象的发生,暗处理能明显降低褐变的发生^[5]。

1.1.5 外植体消毒液的浓度及存放时间 植物组织与细胞培养中消毒的彻底也直接关系到整个试验的成败,选择最佳消毒剂及消毒时间是很重要的。茎段进行消毒时发现用 75%酒精泡 1 min 后,0.1%HgCl₂处理 6~10 min 时效果最好。春季外植体消毒时次氯酸钠浓度越高,外植体褐化越严重。

1.2 防止褐变的措施

1.2.1 选择适当的外植体和培养条件 许多成功的试验表明,选择适当的外植体和培养条件是解决褐变的最主要途径。在外植体材料最适宜的细胞脱分化和再分化的条件下,使外植体处于旺盛的状态,便可大大地减轻褐变,酶就是致褐化的罪魁祸首,可通过抑制相关氧化酶类活性进而抑制褐变。另外,温度为 23 ℃·d⁻¹时对控制褐变有明显的效果。外植体受伤会导致外植体的细胞脱分化和再分化能力大幅度降低,外植体越容易褐变死亡。

1.2.2 抗氧化剂和抑制剂的作用 在 MS 培养基中加入抗坏血酸聚乙炔吡咯烷酮(PVP) 0.01 mg·L⁻¹、半胱氨酸 100 mg·L⁻¹、VC 50~100 mg·L⁻¹、柠檬酸 150 mg·L⁻¹等抗氧化剂来进行试验前的预处理或预培养也可以有效防止酚类物质的形成,也可以降低培养基中的无机盐、6-BA、KT 的用量就能降低外植体的褐化率,培养基偏碱性也可以减轻褐化。此外,在生根培养中添加 500~1 000 mg·L⁻¹活性炭可以吸收外植体所形成的酚类物质,就可以起到减轻褐化的有效作用。但是应该注意的是,活性炭虽然有减轻褐化的作用,但与此同时也会吸收培养基中的营养成分及生长调节物质,从而外植体得不到自身需要的养分,影响外植体的生长发育。因此,在培养基中添加活性炭的同时也适当调节生长调节物质,从而避免外植体生长发育受到限制。

1.2.3 基因型 在植物体的组织培养条件下,有些植物体的二倍体系外植体的褐变率比相同四倍体品系的褐化率低。所以,在植物组织培养中应该要注意植物外植体不同基因型的筛选,可以选取二倍体的褐变程度小的外植体材料来进行组织培养。

1.2.4 取材时间 致褐化物质的含量会因季节的不同而不同,冬季褐变少,夏秋季褐变比较严重,存活率最低。为了防控褐化在 2 月取休眠芽在冰箱里存放 3~4 d 后,再进行水培培养,褐化率可以大幅度的减少。由此可见,取材时间以冬季和春季为宜,低温可以减少褐变。

1.2.5 培养基状态与种类 进行组织培养的接种材料全都依赖于培养基给予的营养成分,所以培养基的状态与所含物质对外植体褐变程度有一定的影响。固体培养基比液体培养基更易累积酚类毒害物质致褐,因为外植体溢出的有害物质在液态培养基中可快速流动和扩散,而固体培养基中琼脂浓度越低,褐化越易扩散。在组培过程中加入可以吞噬酚类物质的工程菌,直接降低酚类物质含量^[3]。当培养基为液体时,培养过程中分泌的有毒物质扩散,在纸板培养基中较快,并且纸板培养基的滤纸条有吸附作用可进一步减轻褐化^[6]。

1.2.6 其他防止褐变的措施 发现愈伤组织有褐变则应及时转接到干净的培养基,并切除发生褐变的外植体组织,让外植体正常生长发育,此过程中尽量减少对愈伤组织的伤害,否则外植体伤口会积累更多的酚类物质反而加重褐变。外植体块儿大容易褐变,所以应适当切小一点。

2 玻璃化

试管苗玻璃化(Vitrification)是指组织培养过程中所表现的一种生理失调或生理病变,要进行外植体接种时一碰就会掉芽点,苗呈半透明状外观形态异常的现象。绝大多数玻璃化苗来自于茎尖或茎段培养物的不定芽。且通常玻璃化苗恢复正常的比例很低,因此玻璃化苗是试管苗生产中需要解决的重要问题。

2.1 形成玻璃化的主要因素

2.1.1 外植体及培养环境 植物体组织与细胞培养时,取材材料的类型,幼嫩程度及大小对组培玻璃化苗的影响很明显,茎尖是最容易产生玻璃化的部位。试管苗在培养过程中,光照、温度、湿

度、pH 均会影响玻璃化苗的发生。

2.1.2 培养基成分 MS 培养基是控制玻璃化发生较理想的培养基,当 MS 培养基浓度降低时可以降低外植体玻璃化 5% 左右,适当增加培养基钙、锌、锰、钾、铁、铜、镁的含量,降低氮和氯的比例,降低硼含量,增加硝态氮,降低铵态氮,可起到降低玻璃化率的作用。

除此之外,经过试验可知,玻璃化苗的产生受植物激素、合成纤维、有机物、外部取材等因素的影响,所以在进行植物组织培养时,必须把握好各个因素的影响效果,最大程度提升植物培养的效率与品质。

2.2 玻璃化苗的综合控制

2.2.1 培养基成分 适当增加培养基中钙、锌、锰、钾、铁、铜、镁的含量,降低氮和氯的比例,特别是降低铵态氮浓度,提高硝态氮浓度,可减少玻璃化苗的比例^[2]。在培养基中适当增加无机营养成分,减少氮素含量。

2.2.2 适当提高培养基中琼脂的浓度 目前的研究表明,液体培养基比固体培养基更容易产生试管苗玻璃化,而且更加严重,此外培养容器内的温差过大也会形成玻璃化苗。因此,提高培养基中琼脂浓度能够降低玻璃化苗的发生频率,但值得一提的是如果培养基内的琼脂浓度过高导致培养基过硬,接种的时候插外植体块儿弹出来,影响养分吸收,所以琼脂粉浓度也不能过高,因此,培养基中琼脂的浓度为 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较适宜。

2.2.3 适当降低细胞分裂素的浓度 适当降低培养基中 NH_4^+ 浓度,添加 IAA、 GA_3 、IBA 的用量浓度控制在 $0.5\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,PVP 的用量控制在 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,ZT 浓度过低会不利于组培苗的生长分化,ZT 浓度以 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 较适宜^[3],减少 BA 用量均可降低玻璃化苗的发生频率。

2.2.4 增加自然光照,控制光照时间 适当提高培养时的光照度、延长光照时间、降低培养容器内的空气相对湿度、改善供氧状况、采用有透气膜的培养容器等培养条件的改良,均可以防止和降低玻璃化苗的发生频率。将玻璃化苗放在自然光下 3~5 d 后,茎叶变红,玻璃化逐渐消失,但光照时间不能过长,这样就能有效防止玻璃化^[3]。

2.2.5 选择合适的外植体 选择对逆境耐受能力较强的材料是避免产生玻璃化苗的基本措施,顶芽部位一般有利于减少玻璃化苗产生。

3 污染

植物组织培养中的污染指的是组织培养期间培养基、培养材料生成杂菌,造成培养实验整个都会失败的现象,是个十分常见的现象。从病原菌污染的原因角度展开分析,植物组织与细胞培养中引发污染的主要原因包括细菌、真菌两方面。这其中引发污染的因素除了接种人员操作不正规以外,外植体携带的细菌还跟外植体种类、处理方法、采样季节有很大的关系。真菌性污染是因霉菌而引发的,一般是接种 2~10 d 后就在培养基出现各种颜色的霉斑。真菌性污染是因超净工作台过滤效果不好、接种室环境不干净、操作不正规所引起的。

3.1 引发污染的因素

3.1.1 植物材料 如植物植料表面所带有的各种细菌、真菌等微生物由于表面消毒不完全而带入培养过程,或是不能被一般表面消毒所清除的植物材料内部的微生物(包括侵入的细菌、真菌、内生菌、病毒、类菌原体等)随着材料带入培养过程,这类污染不容易清除。成熟的外植体材料和表面积比较大的外植体材料带菌多,室外生长的外植体带菌比室内的多,雨季菌类繁殖旺,晴天紫外线强,杀菌效果好。

3.1.2 外界环境 在植物外植体接种时外界环境引起的污染,如培养基、接种工具、器皿消毒或接种操作不严格,没有严格按照正规的无菌操作技术规程进行,封口部分老化或霉变造成培养过程中微生物进入培养容器中引发污染。这类污染可通过严格操作进行控制。

3.2 控制措施

3.2.1 操作人员注意卫生 植物组织培养是非常注意细节的研究过程,其中除了要求接种环境的洁净外,还得更注意接种人员的私人卫生,进入接种室前必须用肥皂洗手,进入接种室就禁止吃东西、聊天、抽烟等,接种人员应经常剪指甲,接种前最好洗个澡、换身干净的衣服再接种。接种服要每 7 d 消毒 1 次,夏季更要勤换和消毒接种服,最好准备两身接种服,更换接种服需在缓冲间更换,手套、口罩等一次性用品要勤换。

3.2.2 合理选择供体材料的种类 为防止污染,采样时要选择健康、无病虫害的材料,此外也要尽可能地使用温室和人工气候条件中培养的植物作材料。只有在田间或天然条件下才能取到的材料

可先在温室和人工条件下培养一段时间,再进行接种试验,接种时使用新生长的部分。一般以材料具备丰富的营养和内源激素为宜,此时材料抵抗病原菌的能力较强或病菌较少,以材料休眠末期或萌动前期取材较为有利,取材多在晴天中午阳光最强时进行^[7-9];取材部位以材料中下部较好。

3.2.3 改善接种室环境条件 外植体接种之前必须保证接种室的清洁及各种接种工具的彻底灭菌,接种室的地面和墙壁上喷 75% 的酒精进行杀菌,之后打开紫外灯照射 20 min,再打开超净台吹风 20 min,再用 75% 的酒精擦拭超净台台面和四壁面,严禁随意进出接种室和培养室,防控接种人员进出无菌室而带入杂菌,将超净工作台置于清洁的房间,定期清洗过滤装置^[10]。为改善接种室内环境的清洁,应每次接种工作结束后仔细地打扫整个实验室,用臭氧灭菌,或者用甲醛熏蒸接种室^[5],还应该周期性地检查超净工作台过滤装置的能力。

3.2.4 添加抗生素 为顺利完成植物组织培养试验,在熬培养基的时候可以适当添加一些防止污染的药剂,从而减少经济损失。但添加抗生素之前必须搞清楚抗生素的具体作用。植物组织培养中不可能有对所有植物都有效的抗生素,都是通过实际操作来总结经验的,所以在培养基中添加一些防控污染的抗生素只有辅助作用^[6]。此外也可以降低培养基的 pH 来预防和控制内生菌的污染。

4 结语

随着科学技术愈来愈成熟的发展,植物组织培养技术得到了广泛的应用。而要想使该项技术得到进一步应用,则必须更加完善对植物组织培养中的褐化、玻璃化及污染的防控措施。因此,植物组织与细胞培养研究工作有关人员必须加强这方面的研究,为促进今后的植物组织培养工作奠定基础。

参考文献:

- [1] 程遥. 组织培养过程中污染和褐化的防治[J]. 农业与技术, 2017(16):18.
- [2] 韦继光. 罗汉松科山茶科和红豆杉科植物内生拟盘多毛孢的多样性及拟盘多毛孢属分子系统学研究[D]. 杭州:浙江大学, 2004.
- [3] 陈婷, 张东亚, 虎海防, 等. 不同品种海棠果及其浓缩汁品质指标的测定[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(1):74-79.
- [4] 周亚辉. 植物组织培养中褐变的影响因素及防止措施[J]. 现代农业科技, 2016(5):117-118.
- [5] 邱璐, 陈善娜, 夏跃明, 等. 桑树组织培养中褐化问题的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2000, 22(1):76-78.
- [6] 陈世昌. 植物组织培养[M]. 北京:高等教育出版社, 2015.
- [7] 黄海波, 淡明, 郭安平, 等. 植物组织培养中存在的主要问题与对策[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12):2632-2633, 2894.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 李云. 林果花菜组织培养快速育苗技术[M]. 北京:中国林业出版社, 2001.

Study on the Control of Browning, Vitrification and Pollution in Plant Tissue Culture

RENAGULI Tuluhong^{1,2}, HUI Hao-liang¹, LIU Tian-tian¹, YAN Fen-fen¹, WANG Xin-jian^{1,2}

(1. College of Plant Science, Xinjiang Tarim University, National Local Joint Engineering Laboratory of High Efficiency and High Quality Cultivation and Deep Processing Technology for Fruit Trees with Southern Xinjiang Characteristics, Alar 843300, China; 2. Key Laboratory of Biological Resources Conservation and Utilization Corps, Xinjiang Production and Construction Corps, Alar 843300, China)

Abstract: Browning, vitrification and pollution are common phenomena in plant micropropagation *in vitro*, which seriously affect the growth and differentiation of explants, and cause great loss in production, which is an urgent problem to be solved in production. This paper analyzed the causes of stem culture, and discussed the measures of browning, vitrification and pollution control in plant tissue culture, in order to provide reference for future research on plant tissue culture.

Keywords: plant vegetative organ culture; browning; vitrification; pollution