



组织培养过程中的关键问题探讨

撰文 张桂海

摘要:采用组织培养方法繁殖是一种有效快捷途径。但对于在组培过程中容易出现的问题,没有相关的或过深的探讨。本文着重讨论如何使组培的材料成功的转育成完整植株,使组培过程简单化。

关键词:组织培养 消毒 灭菌 接种 组培苗的培养。

植物组织培养技术起源于二十世纪,目前多数应用在生物研究领域和一些科技型企业,主要用于植物无性繁殖材料的无毒种苗生产,稀有珍贵植物的快速繁殖以及种质资源的保存、遗传育种等方面。笔者近几年一直从事组培快繁的实践和研究,积累了较多的经验和教训,认为:组织培养应采取环环相扣,每环之间紧密结合,不能有半点疏漏才能使组培成功。以下从原始繁殖材料消毒,灭菌,接种,培养四个方面作一阐述。

1、原始繁殖材料的消毒

1.1 组培中,作为原始繁殖材料的外植体的消毒,直接影响整个培养过程的进行。一般对从室外采集到的外植体,据材料的性质用自来水冲洗的时间不同,据材料的部位一般在5~15分钟即可,关键的在于带入超净工作台的外植体以后用何药剂处理,现今常用的为70%乙醇溶液、9%的次氯酸钠溶液和0.1%~0.2%的升汞溶液。最常用的为70%的乙醇和用0.1%的升汞溶液,或者对于较难灭菌的就用二者组配,先用70%的乙醇8~10秒,再用0.1%的升汞溶液消毒8~10分钟,即可杀死附着在外植体表面的芽孢、细菌、真菌。应注意的是经升汞灭菌的外植体必须需用无菌水冲洗6~8次,否则外植体上残留的汞离子对后期组培苗生长不利。

1.2 对于利用种子进行的组培,有萌果的应在7~8月份成熟时采摘,带回实验室,冲洗干净,用以上的方法消毒之后,无菌水冲洗,放入工作台。注意萌果内的种子是无菌的,可放心接种。不是萌果的,则只能用裸种用1.1所提供的方法进行灭菌。成功率可达95%以上。

对于以上的种子与外植体在放入超净工作台之后,应用紫外灯灭菌至少30分钟~60分钟。

2、灭菌

2.1 培养瓶的灭菌 在灌装培养基之前,用84消毒液浸泡30分钟以上,之后用自来水

冲洗干净,可直接使用。此项措施对于以后的培养过程中防止污染有效。

2.2 培养基的灭菌 目前一般所采用的灭菌方法为加压湿热灭菌法进行培养基的灭菌,加压湿热灭菌过程中灭菌不彻底的原因是高压灭菌锅内冷空气未排放干净,最重要的是灭菌时间过短造成的,如用500ml的容器的瓶子,至少要灭菌30分钟,书中的15~20分钟不能解决问题,此问题不能忽略,因容器加大,培养基增多(一般为120ml左右),故灭菌时间应相应延长。灭菌锅升到124~126℃之前,不作为灭菌计时,所说的灭菌时间指升到124℃且稳定在124~126℃之间的计时。灭菌锅内装填的灭菌物不能堆放过满,一般不超过锅内容积的80%,此是对于纺织品(如工作服,棉纱之类),但对于瓶子并无大碍。灭菌完成后至揭锅前,降温应采取自然降温法,如时间紧急,要等到气压到0.5大气压之下再打开放气阀,否则会引发灭菌不彻底现象的发生。

3、接种

3.1 无菌室消毒 一般以3个月为一个周期,用甲醛添加高锰酸钾熏蒸消毒1次。要求:甲醛与高锰酸钾的比例为1:1或1:0.5。每次接种前,接种室须用紫外灯进行照射,时间不少于30分钟,同时超净工作台也同樣用紫外灯消毒,随后超净工作台吹风30分钟以上,每周用70%酒精溶液来喷雾除尘一次,每次工作完成后要用浸有来苏水的拖布擦净地面,保证接种室的清洁。

3.2 双手杀菌 接种开始之前,操作人员应注意用70%酒精溶液完全擦遍全手,或用70%的酒精加新洁尔灭完全擦遍全手,效果会更好。

3.4 接种工具灭菌 接种期间,注意对镊子、剪刀等接种工具进行杀菌处理,每次接种后及时灼烧直至烧红接种工具的尖端为止,待冷却后再进行下一次接种,一般每人配备2把镊子,轮换使用,提高工作效率,请注意无菌工具的中后半截不能接触瓶口,在操作过程中因不能确认工具的中后半截是否已经有菌,如工具(主要指镊子)碰到了瓶口,瓶口的灭菌可能不完全,瓶口的灭菌一般的情况,也只是仅限于用酒精灯的火焰进行灼烧,故易引发接种后污染的发生。

3.5 接种工作台上摆放的物品不宜过多,否则会造成室内的气流流通不畅,致使操作区

的空气得不到净化,诱发污染。

3.6 严格检查封口膜的质量 一般培养瓶的封口膜反复使用几次,常常出现因封口膜老化造成的轻微开裂或老化后发硬,致使培养容器的透气孔隙变大等现象,但没有引起人们足够的重视。

3.7 接种完成后瓶口的封闭,如是塑料盖,一定要拧紧瓶盖,如用聚丙烯薄膜则用绳子捆紧,本人主张越紧越好。此项工作应是整个接种过程中最容易忽略的问题。

3.8 忌频繁走动 接种前应做好准备工,接种时操作人员严禁在接种室内频繁走动或进出接种室,防止接种室内气体的无序流动和由此引发的有害杂菌的传播。

4、组培苗的培养

组培过程中,创造一个适宜组培苗生长,抑制有害菌类繁衍的环境条件十分重要。因此定期对培养室进行熏蒸,保持相对无菌的环境;平时保持培养室适宜的温度、湿度和光照,促进组培苗健壮生长,是必需的措施。具体方法包括:

4.1 定期熏蒸 一般以3个月为一个周期,用甲醛添加高锰酸钾熏蒸消毒1次。要求:甲醛与高锰酸钾的比例为1:1或1:0.5。一般每年的7~8月份期间,温度偏高、空气湿度较大,是有害菌类繁衍的高峰季节,每月熏蒸1次。但须在培养室内腾空的情况下进行。

4.2 降尘消毒 培养室空间每7天喷洒一遍甲醛水溶液,作降尘消毒,用来杀死空间的真菌孢子。每7天全室紫外灯消毒一次,时间为2~3小时。

4.3 环境调控 及时降温、排湿,将培养室的室内温度控制在25~28℃、空气相对湿度调至60%以下;光照以植物的特征特性而定,不足时及时使用日光灯予以补充。平时尽量减少工作人员进出培养室的次数,避免室内空气流动。室内的窗户应密封,不与外界流通,换气用空调进行抽湿换气即可。

综上所述,组培过程中,只要注意以上四个问题,就能成功的组培出苗木,对于组培脱毒,基因导入,细胞质融合,只有在此基础之上,才有可能进一步的深入实施及研究。

* 作者单位:河北省廊坊市农科院