

草莓组培苗工厂化生产中控制污染的措施

廖俊杰

李艳 李英慧

(广东轻工职业技术学院食品与生物工程系 广州 510300) (辽宁师范大学辽宁省植物基因工程重点实验室)

近几年,草莓组培苗的工厂化生产在我国发展迅速,并取得了明显的经济效益和社会效益。但是,微生物污染一直是影响组培苗工厂化生产效益的主要问题,在接种和培养过程中污染率常常高达10%以上,严重时,导致组培苗大量死亡。笔者基于近几年对草莓组织培养技术的研究及在生产工作中积累的实践经验,就如何预防和控制污染总结如下。

1 产生污染的原因及注意事项

在草莓组培苗工厂化生产过程中,一些不正确的处理和操作是导致污染的主要原因。

1.1 工作环境和工作台的无菌消毒 对工作间要定期熏蒸消毒,每天用紫外线灭菌,达到无菌室的要求。在实践中常见一些不严格的操作,如用紫外线对工作间杀菌时间短,忽视对工作台正面、顶部及左右两侧壁的灭菌等。

1.2 培养基的充分灭菌 高温蒸汽灭菌是植物组织培养中常用的培养基灭菌方法,其主要装置是高压灭菌锅。在草莓组培苗的工厂化生产中,为了提高工作效率、降低生产成本及减少占用面积,现在常常使用罐头瓶等较大的培养瓶来代替三角瓶,相应地加大了培养基的体积,所以要适当延长灭菌时间。

罐头瓶等培养瓶呈圆柱形,放入消毒筒内进行灭菌时如排列紧密,瓶间几乎无空隙,不利于蒸汽的流通和热交换,使培养基升温缓慢,易导致杂菌不能被完全杀灭,因此,在灭菌时要注意消毒筒内培养瓶不要放得太紧,留出一定的空隙。冷空气排放不彻底,排气管没有插入消毒筒的下部,排气管断裂或缺失也会导致培养基灭菌失败。通常情况下,未充分灭菌的培养基在室温下放置2~3天后会在培养基内部长出絮状的细菌团或在培养基表面长出真菌的菌丝体,易于观察。但是在生产中,一般很少会将培养基放置2~3天再用,故难以辨别灭菌充分与否。因此,要严格掌握灭菌时间,确保接种用的培养基不带菌。

1.3 材料的灭菌 为了获得无菌材料,应尽可能地利用温室或人工气候室生长的草莓匍匐茎或茎尖作接种材料,而且在有条件时喷杀菌剂或抗生素对植株或外植体进行适当的预处理,然后用自来水冲洗采来的外植体,再用不同种类的药剂进行表面灭菌。实践中采用75%酒精和0.1%升汞溶液对草莓匍匐茎和茎尖灭菌。酒精的作用主要是杀灭外植体表面的微生物。升汞有一定的渗透作用,可杀灭材料缝

不同。下面对生产中应用较多的自然开心形造形作一介绍:先从全树中选择3~4个方位合理的大枝作为主枝培养,保持长势,直线延长;其次,根据主枝多少,在每个主枝上安排2~3个侧枝,侧枝间合理间隔,左右分开,高低排列,以充分利用空间;多余的大枝和徒长枝应在冬剪时锯去,为避免修剪过重,使树冠出现空缺,从而影响产量,可视树冠状况逐年剪去。对暂时选不出主枝的树不必强求,以后可利用背上枝和徒长枝拉枝培养主枝和侧枝。

3.2 树体结构的维持 油桃树冠改造定形后,树体也基本封行,这时主枝的延长头就可用长果枝来领头了,不能再用徒长性结果枝来领头,以避免树体上强下弱。水平延伸的侧枝,为了维持其长势,仍要用较强的枝条来领头。枝梢的修剪工作由造形转向结果枝组的培养。

结果枝组分大、中、小3种,大枝组一般在主侧枝的背后或背斜处,中型枝组一般在主侧枝的两侧,

主侧枝的背上以留小枝组为宜。结果枝组的修剪要“缩放结合,长短结合”,不能让其自然生长,连年往外延伸,从而变成“长脚”枝组,造成内膛空虚,结果枝数量减少最后导致结果平面化,影响产量。不同部位与长势的结果枝组,其修剪方法不同。对长势旺的来讲,可以“剪头挖心”,即把枝组顶部的旺枝疏去,以改善下部枝的发育,同时,选下部直立的长果枝短截,让其抽枝更新复壮。对长势偏强的,宜去强留弱,以控为主。位于树冠下部或背后的结果枝组,则要去弱留强,以促发为主,保持或加强其长势。这样可达到控上促下,维持全树平衡的目的。对于过弱和方位不当的枝组应及时回缩或调整。主枝、侧枝这些大枝一般很少需要调整,只要不断回缩和变换延长头以保持树冠即可,若需要更换时,可用徒长枝拉枝或是大型枝组重剪改造而成。

隙中的微生物和内生菌。不过在进行茎尖脱毒时建议以次氯酸钠代替酒精,因为酒精的杀伤力较强,影响茎尖的成活率,而次氯酸钠残留少,易于除去。

1.4 接种过程中的无菌操作 接种操作要做到完全避免污染是不可能的,但注意接种操作的基本技术环节就可以将污染率控制在最低。

(1)操作要规范。在接种时穿戴经灭菌处理的工作服装,转苗接种部位应控制在超净工作台台面的中部,而且注意使接种瓶口与所送风的流动方向平行。

(2)待接种的培养瓶外往往带有大量的微生物,需彻底消毒,防止放入工作台后造成交叉污染,从而引发大规模的组培苗污染。

(3)对接种时所用的工具和器皿要彻底灭菌。常用的方法是使用灭菌器或者酒精灯进行灼烧灭菌。操作中要注意对剪子和镊子大范围灭菌,而不是仅限于尖端。对培养瓶的灼烧不要过度,否则会使棉塞焦化或封口膜老化、融化,因密封不严而导致污染。

(4)保持工作台空气流通。在生产中有时为了单纯追求日工作量,在工作台内堆积大量的培养基以节省时间,使得工作区的空气得不到净化,造成不可避免的污染。

1.5 培养室的灭菌 保持培养室的洁净无菌是草莓组培苗工厂化生产中值得注意的一个问题,也是容易忽视的一个死角。很多人会认为培养瓶的瓶口已封好,杂菌不会污染到组培苗,但实际情况是组培苗常常在培养期间发生污染,而且,多是真菌污染。因此,对培养室要定期熏蒸灭菌及每天紫外线杀菌。保持培养室的湿度也很重要,一般相对湿度在60%~70%左右。湿度太大,容易增加污染的几率。湿度太小,会加速培养基内的水分蒸发,影响培养效果。

2 污染发生后的控制措施

污染产生后病原菌的增殖较为迅速,且易传播,如果处理不当会对草莓组培苗的工厂化生产造成毁灭性打击。一般情况下依据所感染的病原体不同,将污染分为两类——真菌污染和细菌污染。前者主要是指由霉菌和酵母菌引起的污染,其特点是易于被观察到,但污染迅速且难于控制,往往造成较大的损失。后者主要是指由各种细菌及内生菌引起的污染,其特点是有很长的潜伏期,有时在继代几次后才表现出来。

2.1 真菌污染的控制 笔者在利用杀菌剂抑制苹果和草莓试管苗青霉菌效果试验中发现,培养基加入75%百菌清可湿性粉剂可有效地控制青霉菌的污染。此外,在处理真菌污染的组培苗和培养瓶时要特别小心,如果污染的数量较少或污染的材料不是特别重要可以放弃时,最好不要开盖,直接进行高压灭菌,否则,培养瓶的盖子或封口膜一旦打开,真菌孢子就有可能飞出来污染周围的环境。

2.2 细菌污染的控制 无论在科学研究还是在工厂化生产中,都倾向于使用各种抗生素来控制细菌污染。但抗生素的种类很多,作用也不尽相同,在用抗生素防治草莓组培苗工厂化生产中出现的细菌污染时,要预先做好预备试验。不但要考虑抗生素的可溶性、稳定性、广谱性及副作用的大小,还要分析pH值和培养基对抗生素效果的影响以及引起细菌产生抗性的可能性,更要观察草莓组培苗的反应。抗生素可以直接加入到培养基中,也可以用抗生素直接浸泡受污染的组培苗。在各种抗生素中,大多数氨基糖苷类抗生素是应用较广泛的、对细菌的抑制能力较强的抗生素。而随着细菌抗性的增强,现在多使用两种或两种以上的抗生素,效果比单独使用更好。Reed采用庆大霉素12.5 mg/L+链霉素1 000 mg/L能消除大多数的细菌污染^[1]。

最近的研究表明,杀菌剂如多菌灵、甲基托布津、丙酸钠和甲霜灵等也可用于控制细菌污染,其中多菌灵和丙酸钠有较好的抑菌效果^[2-4]。值得注意的是,不论是抗生素还是杀菌剂在绝大多数情况下都只能是抑制细菌生长而不能将细菌完全杀死,而且长期使用必然会对草莓组培苗的培育产生影响。因此,这种消除污染的方法只是暂时的解决方案,还需进一步筛选更合适的方法来消除已产生的污染。

参 考 文 献

- [1] Reed B M, Mentzer J, Tanprasert P. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut; identification and antibiotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 52: 67~70
- [2] 许婉芳,龚福生,萧华山. 杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制作用, *福建果树*, 1999(4): 6~7
- [3] 周俊辉,李宏彬,杨耀强,等. 植物组织培养中污染的鉴定与防止初步研究. *微生物学杂志*, 2002, 22(2): 53~55
- [4] 周俊辉,周厚高,刘花全. 植物组织培养中的内生菌污染问题. *广西植物*, 2003, 23(1): 41~47

收稿日期:2006-02-16;修回日期:2006-05-10