

铁皮石斛组培快繁降低污染率的关键措施

铁皮石斛系一种用于中药材生产的珍稀植物,近年来国内开始通过组织培养的方法进行繁殖,其配套的工厂化生产技术日趋成熟。铁皮石斛组织培养、扩大繁殖过程中,可采用综合措施,降低组培过程中污染的发生。

1 原始繁殖材料的表面消毒

铁皮石斛组培中,应特别重视对作为原始繁殖材料外植体的表面消毒工作。要获取无菌材料,一般对从室外采集到的外植体及时用自来水冲洗干净,然后根据材料的大小、选用不同种类的药剂,进行时间不等的表面灭菌。常用药剂有:75%乙醇溶液、9%的次氯酸钠溶液和0.1%~0.2%的升汞溶液。消毒灭菌过程中应尽量将附着在外植体表面的微生物杀灭彻底,同时要尽可能少地伤害外植体组织和表层细胞。用75%的乙醇作杀菌剂,灭菌时间不宜过长,以30秒为宜;然后用0.1%的升汞溶液消毒8~10分钟,但经升汞灭菌的外植体,还需用无菌水冲洗6~8次后再接种。

2 培养基的灭菌

2.1 灭菌锅升压前,应把锅内的冷空气排放干净,防止仪表显示的温度、压力数据与锅内实际的温度、压力情况不符,导致灭菌不彻底。

2.2 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%,否则,将阻碍蒸汽的流通和热交换,使容器内升温减慢,造成物体内部杀菌不完全。

2.3 灭菌后至揭锅前,降温不能操之过急。否则,也会引发灭菌不彻底现象的发生。

3 接种操作的要领

3.1 无菌室消毒。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,随后再用70%酒精溶液来喷雾降尘,保证接种室的清洁,防止杂菌滋生。

3.2 容器外壁消毒。接种时,首先用棉球沾取70%酒精溶液,对盛放种苗的容器外壁进行全面的擦洗,待酒精挥发后,再打开容器取出种苗进行接种。

3.3 接种工具杀菌。接种期间,随时注意对镊子、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,防止烫伤接种材料。对镊子、剪刀等工具的灼烧灭菌,应延伸到可能触及瓶口的所有位置,且在一瓶种苗接种完毕后,及时更换使用另一套杀菌消毒完全的工具,防止连环污染的发生。

3.4 双手杀菌。接种过程中,操作人员应用70%酒精溶液及时擦洗可能接触污染物的双手,保持清洁卫生。

3.5 保持接种工作台面整洁。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,应高度重视。培养过程中,经常因环境中温度的变化或环境污染诱发容器内组培幼苗的污染。

3.7 忌频繁走动。接种前应做好准备工作,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 组培苗的适宜生长环境

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。

4.2 降尘消毒。培养室空间每7天喷洒1遍甲酚皂:水=1:2甲酚皂水溶液,作降尘消毒,用来杀死空间的真菌孢子。每年7~8月份期间,降尘消毒应每个星期进行2~3次。

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;每天给予9~10小时、1800~1900勒克斯的光照,当光照不足时及时使用日光灯予以补充。另外,平时尽量减少工作人员进出培养室的次数,严禁外来人员参访。

5 组培苗的长期无菌保存方法

快繁过程中,对一时来不及或尚不能及时进行繁殖的组培苗种苗,应采取措施予以妥善保存。否则,长时间保存很容易出现杂菌的污染问题。细菌污染:菌落附着在培养基表面或培养基中,呈黏液状,界限比较明显,一般接种后1~2天能发现,主要是大肠杆菌和链球菌;真菌污染:菌落表面呈绒毛状或絮状,界限不明显,多数伴有不同颜色的孢子出现,接种后3~10天才能发现,主要是霉菌污染。为避免污染发生。如果在培养基中加入庆大霉素、链霉素等抗生素类药物防治,效果较好。通常使用300毫克/升青霉素+180毫克/升链霉素溶液,注射到培养基表面,能有效控制细菌污染,且对组培苗生长影响很小,注入2种抗菌素还能防止细菌抗药性的产生,增强抗菌能力,有利于在较长时间内控制细菌污染的发展,且操作简便。另外,培养基中添加四环素40毫克/升对细菌的抑制作用也较好,同样适合铁皮石斛组培苗的长期无菌保存。

065000 廊坊市农林科学院 张桂海
王明耀 武惠肖

