

文章编号: 1003-8701(2007)02-0028-03

马铃薯组织培养中常见的污染问题及解决办法

高华援, 王楠, 王庆峰, 张磊, 王丽, 仲义

(吉林省农业科学院经济植物开发研究中心, 吉林 公主岭 136105)

摘要: 概述了植物组织培养的基本概念。讨论了马铃薯组织培养过程中易出现的问题, 包括污染产生的途径、污染来源及主要菌类、培养基污染问题, 提出了减少污染的措施。

关键词: 马铃薯; 组织培养; 污染; 防治

中图分类号: S532.035.3

文献标识码: A

植物组织培养是从 20 世纪 30 年代初期发展起来的一项生物技术, 它是指在人工配制的培养基上, 在无菌的条件下, 将离体的植物器官(如根尖、茎尖等)、组织(如花药组织、胚乳等)、细胞(如体细胞、生殖细胞)、胚胎(如成熟的和未成熟的)、原生质体, 在人工控制的条件下, 在培养基上培养, 诱发产生愈伤组织或潜伏芽等或长成完整植株的一套技术与方法^[1]。近年来, 这项技术应用的范围十分广泛, 尤其在马铃薯组织培养(茎尖脱毒和快速扩繁)方面更具其他技术手段无法比拟的优势。虽然马铃薯组织培养操作并不困难, 但对于一些技术环节的要求却十分严格, 稍有疏忽, 就会使试验无法进行下去, 甚至导致整个试验的失败, 给科研和生产造成损失。其中污染问题是马铃薯高效组织培养中需要解决的关键技术问题, 它直接影响组培苗的产量^[2]。因此, 分析和控制马铃薯组织培养过程中的污染, 意义非常重要。

1 污染产生的途径

在马铃薯茎尖培养及快速扩繁过程中, 经常有部分接种苗瓶被污染, 其主要途径有 3 个方面:

1.1 苗源及苗源瓶带菌

苗源瓶中的苗源已被污染, 但由于是初期污染, 菌源太小, 肉眼不易发现, 接种到培养基瓶中引发多瓶感菌; 苗源瓶表面消毒不彻底, 常常粘有真菌、细菌、霉菌及一些杂菌, 在接种过程中带入接种瓶内引起污染^[2-4]。

1.2 培养基带菌

经过湿热灭菌的培养基内有时还存在未杀死的耐高温的杂菌或因灭菌时间短、压力不够而造成培养基高压灭菌不彻底, 绝大部分杂菌未杀死, 而且经高压消毒的培养基没有缓放 3~4 d 就直接随高压灭菌消毒应用于接种, 造成污染。

1.3 操作环节及气流带菌

在接种时, 工作人员的身体和操作器械带菌, 如工作人员双手不经过细心消毒, 镊子、剪刀消毒不彻底, 在培养基接种的同时, 也将杂菌接于培养基上, 从而造成接触污染; 工作人员接种时未戴口罩并大声说话, 取物不轻拿轻放等, 传播了接种室和组培室内空气中的杂菌, 从而引起脱毒苗及培养基再度被污染, 形成气流传菌污染。

2 污染来源及主要菌类

收稿日期: 2006-10-21; 修回日期: 2007-02-05

作者简介: 高华援(1964-), 男, 副研究员, 硕士, 主要从事马铃薯育种与栽培技术研究。

造成污染的病原菌主要分为真菌类和细菌类。

2.1 真菌污染及解决办法

真菌污染出现很快,一般接种后的2~3 d就会发现菌丝,继而很快地出现黑、白、黄、绿孢子。真菌污染一般是由空气污染和瓶口边缘以及取放封口纸扬起的灰尘和真菌孢子落入器皿造成的。

在湿度大的季节和培养室内,封口纸上也会长出真菌孢子引起大量污染。应严格进行无菌操作,定期(4~5 d)用甲醛与高锰酸钾按1 m³:1熏蒸消毒10~12 h,杀死空气中污染的菌源;每次使用接种室或超净工作台前,先用75%酒精喷雾降尘,再用紫外线灯杀菌30~40 min;接种前用75%酒精棉球擦拭瓶外部后放入超净工作台;接种过程中,瓶子呈斜角,瓶口放在酒精灯火焰上方,利用气流上升的原理,以阻止空气中飘扬的孢子落入瓶内;取封口纸时动作要轻;外地引进的试管苗,由于在运输过程中瓶口及封口纸往往积落灰尘和孢子,应仔细用75%酒精擦拭2~3次,接种时再烧瓶口1次;接种后要及时打扫卫生,用2%的新洁尔灭溶液擦拭地面、墙壁及门窗。

2.2 细菌污染及解决办法

细菌污染是指在培养过程中,在培养基表面或材料表面出现黏液状物体、菌落或浑浊的水迹状,有时甚至出现泡沫发酵状。细菌污染中又以芽孢杆菌最普遍、最严重。这种芽孢杆菌能耐一定高温高压,对消毒剂及紫外线也有一定的抗性,常由于高压灭菌不彻底造成。因此,每次培养基灭菌后抽取样品放在培养室2~3 d,观察培养基表面和内部无任何细菌痕迹才能使用。如果培养基内部或在表面出现浑浊的孢子状团块,表明已有芽孢杆菌生长,这批培养基就不能再用,必须重新高压灭菌后方可倒掉。细菌性污染主要是工作人员使用了未经消毒的工具,如镊子、剪刀、容器等,或是由于呼吸排出的细菌;有时也因操作人员用手接触材料或器皿边缘,使微生物落入培养基中;有时也会因剪取某一带菌材料后,用具又未彻底灭菌造成继续污染。因此,对器械、器皿和未接种的培养基彻底消除污染源最关键:把需要灭菌的器械、器皿或培养基装入高压灭菌锅内灭菌,待锅内压力升到0.5 kg时打开排气阀,彻底排空冷空气,再关闭排气阀,使压力稳定在1.1 kg/cm²,温度为120 ℃下灭菌20~25 min,灭菌时间不能超过30 min,以免引起培养基成分变化。

3 培养基污染问题及解决办法

3.1 接种前培养基出现大面积污染

若菌落只存在于培养基表面且主要为真菌时,可能是由于培养瓶封闭不严,或放置培养基的环境不洁净,菌类种群密度过大所致;若菌落存在于培养基内,则很可能是由各种贮藏母液污染引起;另外,培养瓶不洁净,灭菌不彻底也是导致接种前培养基污染的原因。因此,在配制培养基母液时,严把水质关,必须用蒸馏水并将母液置于4 ℃冰箱中保存;灌装培养基的瓶子必须清洁干净,最后一道工序最好用蒸馏水涮一遍,达到瓶湿时水珠分布均匀、瓶干时透明感强;培养基灌装必须干净利索,瓶口及瓶壁不要黏结培养基,而且封口要严密及时。

3.2 接种后培养基出现大面积污染,菌落分布不均匀

主要原因是接种过程中发生的污染所致,可能是接种室不洁净,菌类孢子过多、镊子带菌、操作人员手未彻底消毒、操作人员呼吸及超净工作台滤布不洁净等引起。因此,在操作过程中用75%酒精擦洗手部、器械高温灭菌消毒、接种室接种前紫外线灯灭菌30~40 min、75%酒精喷雾杀菌降尘及甲醛与高锰酸钾按1 m³:1熏蒸消毒(50 mL 甲醛倒入15 g的高锰酸钾中)12 h^[4-6]。

3.3 接种后在外植体周围出现真菌污染

无菌的外植体是马铃薯组织培养取得成功的基本前提,在高温高湿条件下,表面会滋生大量的微生物,一些菌丝体甚至侵入表皮内的薄壁组织,不能被一般的表面消毒方法所清除,材料被带入组织培养过程中易引起内生菌的污染^[8-9]。如真菌的污染,主要是外植体消毒不彻底造成。在采取外植体(如花药)后,用自来水反复冲洗约10 min,用70%酒精消毒30 s,再用0.1%升汞或2%次氯酸钠溶液浸泡5~10 min,最后用无菌水冲洗3~5次,可达到良好灭菌效果^[4,5]。同时,采取外植体时间也很重要,避免阴雨天在户外采取外植体,在晴天采取时,下午采取优于早晨采取,原因是经过日晒后可杀死部

分细菌或真菌^[10]。

在马铃薯初代培养(茎尖培养),选用茎尖作为外植体,在室内或无菌条件下,对块茎进行预培养,块茎发出新芽后,将顶芽、侧芽切下 2 cm 长若干段,放入烧杯,用自来水冲洗 1 h,再用 75%酒精漂洗 30 s,最后用 0.1%的升汞或 2%次氯酸钠灭菌 10 min,无菌水冲洗 3~5 次备用,即达到了材料消毒的目的。

在初代培养获得无菌材料后期或试管苗快速繁殖的增殖培养阶段,也可能出现污染,除去操作不慎的原因,可能还会有初代培养基中使用营养相对简单的培养基,使污染不易表现出来,在增殖培养阶段,在培养室内被真菌污染。因此,增殖阶段一定要按程序操作进行,在获得的最初无菌材料后,应将其中一部分作为“原种”保存下来,分批繁殖和复检后再大规模生产;也可通过在培养基中加入抑菌剂的方法:在初代培养基中加入 25 μg/mL 苯甲酸钠,在增殖培养基中加入 25 μg/mL 四环素^[2],对微生物污染(包括细菌和真菌)有很好的防止作用。

3.4 接种后在外植体周围出现细菌污染

主要原因是由于镊子、解剖刀带菌或操作人员手未消毒干净或操作台消毒不净。在马铃薯茎尖培养中,应在无菌条件下,将清洗干净的芽置于 40 倍双目解剖镜下,用解剖针去掉幼叶直至露出半圆形光滑生长点,用解剖刀从 0.3 mm 切下,用酒精灯灼烧后退热的镊子将剥离后的茎尖接种在茎尖培养基内,包上封口纸;切段扩繁过程中,转接瓶与被转接瓶应紧挨酒精灯,手尽量不要在器皿上方晃动,而且在接种时,镊子不要上下滑动,目的是避免细菌掉入瓶中;应养成良好的卫生习惯,用固定的专用拖鞋及工作服,避免走动引起菌雾;在超净工作台,一次性堆放物品不宜过多,保持气流流动的空间;并在下风方向操作,避免病菌顺风飘入器皿。

参考文献:

- [1] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1992.
- [2] 李清萍.降低马铃薯组培苗工厂化生产中污染率的有关措施[J]中国马铃薯,2002,16(4):230-231.
- [3] 黄萍,颜谦,童安毕,等.马铃薯茎尖培养及快速繁殖抗污染的效果研究[J].贵州农业科学,2003,31(3):44-45.
- [4] 杨萍,张涛.马铃薯脱毒试管苗接种污染原因及防除技巧[J].内蒙古农业科技,2005,(7):21-22.
- [5] 柴向华,李军,张秀珊,等.植物组织培养中污染的控制[J].热带农业科学,2003,23(6):40-44.
- [6] 郝云凤,杨瑞平,张培宏,等.马铃薯脱毒试管苗组培扩繁技术规程[J].内蒙古农业科技,2005,(1):54-55.
- [7] 程广有.名优花卉组织培养技术[M].北京:科学技术出版社,2001.
- [8] 周俊辉.植物快速繁殖技术中存在的问题与对策[J].仲恺农业技术学院学报,1999,12(4).
- [9] 朱广廉.植物组织培养中外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6).
- [10] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州:广东教育出版社,2001.

The Solution Approach to the Contamination Problem Frequently Appeared in Tissue Culture of Potato

GAO Hua-yuan^{1,2}, WANG Nan^{1,2}, WANG Qin-feng^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, WANG Li^{1,2}, ZHONG Yi^{1,2}

(1. Sugarbeet and Sugar Institute of JinLin Province; 2. Economic Plant Research and Development Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Fanjiatun, Jinlin 136105, China)

Abstract: The definition of plant tissue culture was briefly introduced in the paper. Problems frequently appeared in potato tissue culture were discussed, which including the way in which the contamination appeared, the source of the contamination and the main species of fungus and the contamination of nutrient medium. Measures to reduce the contamination were proposed.

Keywords: Potato; Tissue culture; Contamination; Prevention and controlling