

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2007)02-0113-02

马铃薯脱毒试管苗常见的污染问题及防治措施

张丽莉

(东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

马铃薯在脱毒快繁过程中, 脱毒试管苗经常出现不同程度的污染, 造成严重的经济损失, 而且还有可能导致组织培养工作的中断。因此控制污染是组织培养过程中的重要技术环节。本文就常见的污染类型及原因, 提出相应的防治措施。

1 主要病原及症状

从污染产生的病原来看主要有真菌和细菌两类。细菌污染在接种 1~2 d 即可出现, 常表现为在培养基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。真菌污染其症状出现慢, 一般在接种 5~10 d 时才有表现。真菌污染在初期如针状的雾斑, 以后长出菌丝, 继而很快出现黑、白、黄、绿等孢子。

2 常见的污染及产生原因

2.1 真菌污染

2.1.1 接种前培养基出现真菌污染

培养基表面存在大量真菌污染, 多数情况为封

口不严或培养基存放的环境中孢子浓度过大; 培养基内部存在大量真菌污染, 可能是母液储备液已经污染。

2.1.2 接种后培养基出现真菌污染

接种后培养基表面存在大量真菌污染且位置不定, 如果是初期, 可能是接种室孢子浓度过大或超净工作台的滤布不洁净。如果接种时间较长, 主要原因是封口不严或是培养材料携带内生菌。

2.1.3 接种后外植体周围出现真菌污染

主要是苗源瓶中的苗源已感染了杂菌, 但由于是初期感染, 菌源太小, 肉眼不易发现, 接种到培养基瓶上引起感染, 或是苗源瓶表面消毒不彻底, 在接种过程中带入接种瓶内而引起感染。

2.2 细菌污染

2.2.1 接种前培养基出现细菌污染

接种前培养基被细菌污染, 可能是培养瓶不洁净携带不易被杀死的耐高温杂菌或培养基灭菌不彻底, 绝大部分杂菌未杀死。

2.2.2 接种后培养基出现细菌污染

接种后外植体周围出现细菌污染, 主要是由于使用了未消毒好的工具以及操作者呼吸时排出的细菌或者是操作人员的手接触了材料或器皿边缘所致。

收稿日期: 2007-01-06

作者简介: 张丽莉(1976-), 女, 硕士, 实习研究员, 主要从事马铃薯组织培养与脱毒快繁研究。

8 制定行之有效的扶持政策

政府和有关部门要制定与之相适应的扶持政策, 包括政策倾斜、资金扶持、技术培训、减免企业税收、积极引进新技术, 创造一个外商投资的宽松环境, 引进资金, 兴办马铃薯深加工企业, 以精深加工拓展市场, 逐步构建良种扩繁, 精深加工, 鲜薯贮藏, 市场营销“四位一体”的产业链条, 坚

持走“市场搭平台, 窖藏促销售, 订单保加工, 品牌占市场”的营销路子, 走一条马铃薯特色产业兴县富民的小康之道。

我们要本着打造在省内、市内为最大的马铃薯生产加工基地, 马铃薯集散中心, 价格形成中心、信息发布中心的目标, 依靠科技提高品质, 扩充总量, 延伸链条, 打响品牌, 把我县马铃薯特色产业真正做大做强。

3 防治措施

3.1 接种前消灭污染菌源

保证容器清洁, 清洗容器时, 应将未污染的与污染的分开来洗。洗净的玻璃容器应发亮, 内外壁水膜均匀, 瓶壁不挂水珠。容器取拿过程中尽量不接触内壁。而对于瓶盖, 也应认真涮洗, 凉干后与瓶子一起存放备用。

培养基母液必须用蒸馏水配置, 并将母液置于4℃冰箱中保存。培养基最好用蒸馏水或用纯净、无色透明、无悬浮物的食用水制作, 以减少菌源和避免杂菌滋生蔓延。培养基灌装必须干净利索, 瓶口及瓶壁不要黏结培养基, 及时封口, 及时灭菌。严格湿热灭菌, 待锅内压力升到 $0.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时打开排气阀, 彻底排完冷空气, 再关闭排气阀使压力稳定在 $1.1 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$, 温度为 $120\sim 121^\circ\text{C}$ 下灭菌 $20\sim 25 \text{ min}$, 灭菌时间不宜超过 30 min , 以免引起培养基成分变化。

选择无污染培养基, 把经高温、高压灭菌的培养基置于缓冲室内, 在常温下 $3\sim 4 \text{ d}$, 剔除被杂菌污染的培养基, 认真仔细挑选干净无菌的培养基再接种。

工作人员使用的工作服、帽子、口罩等, 要保持干净, 并定期进行消毒。经常检查消毒锅的灭菌质量, 若发现问题要立即检修。定期检查超净工作台的工作质量。保持接种室(无菌室)、组织培养室空气清洁, 室内窗户应加空气过滤条, 并对空气过滤条定期进行清洗。

3.2 接种时严格无菌操作

仔细观察待转基础苗, 确认无污染才能取用。用酒精棉擦拭待转瓶苗的外壁(及瓶盖), 消除附着在瓶外壁上的杂菌后转入无菌室。

接种室(无菌室)杀灭菌源, 在每次接种前, 用紫外线灯光照射, 杀菌 $30\sim 35 \text{ min}$, 用75%酒精作降尘处理(喷雾)。工作人员进入无菌室前要洗手更衣并戴口罩, 进入后还需用75%酒精仔细擦手, 方可进行下一步工作。工作台面及台壁用75%的酒精擦拭消毒。

超净工作台上物体不能堆放过多, 苗源瓶(基础苗)、接种瓶不能堆放过满, 以免造成气流不畅通, 使操作区的空气得不到净化, 达不到真正无菌操作而造成不可避免的污染。

接种用的工具彻底灭菌, 接种所用镊子、剪

刀、支架要从正到反、从外到内在酒精灯的外焰上来回消毒冷却后待用, 接种时瓶口靠近酒精灯火焰, 每接一瓶所用工具消毒一次。

操作人员操作动作要熟练、动作快、规范、严禁交谈, 减少污染。

接种后的培养基瓶口必须封严, 减少瓶内与室内空气的对流, 控制气流传菌。

3.3 内生细菌的防治

内生细菌由于它潜伏的较深, 表面消毒方法无法将其消灭。有时在外植体的初级培养中不易被发现, 随着继代次数的增加, 菌量慢慢累积发展才在培养基上显现出来。可通过在培养基中添加抑菌剂或抗生素来防止和减少细菌等内生菌的污染。

使用抗生素时需要注意下列事项: 要对症下药; 确定最适抑制浓度; 要确定抗生素在培养基上是否有作用, 是否稳定; 要确定抗生素不会对植物造成伤害或突变。

除此之外, 扩大繁殖时应有合理程序。在获得脱毒试管苗之后, 应将其中一部分作为“原种”保存起来, 分批繁殖和复检后再扩大繁殖规模。

3.4 接种后严格管理

每隔 $2\sim 3 \text{ d}$ 用甲醛溶液或百菌清洒地消毒一次。每隔 $4\sim 5 \text{ d}$ 用甲醛熏蒸, 将 50 mL 甲醛倒入 15 g 左右高锰酸钾中, 使甲醛蒸汽散发出来, 密闭接种室门窗 24 h , 杀死空气中的污染菌源, 同时结合75%酒精作降尘处理(喷雾)。

严禁吸烟和非工作人员出入, 工作人员入内必须穿清洁工作服并套鞋套, 控制外界杂菌传入无菌区。及时挑除培养室被污的瓶苗, 对染污苗用高压锅灭菌后远距离销毁, 坚决消灭再污染源。

当特别珍贵、稀少的资源被污染时, 如果污染程度较轻, 可以对其进行挽救。首先将瓶苗移出培养室, 用酒精棉将污染处盖住, 将植株顶部剪下来, 用75%酒精冲洗 30 s , 再用无菌水冲洗 2 次, 容器表面消毒后移入超净工作台, 然后用 0.1% HgCl_2 浸泡 $5\sim 10 \text{ min}$, 最后用无菌水冲洗 5 次, 再转接到新培养基上。注意操作要轻, 不要伤到茎段。处理后的材料要远离其它脱毒苗放置, 观察一段时间确定无污染可放回原处保存。为了增强灭菌效果, 可采用混合的消毒液或多次消毒的方法, 也可起到很好的消毒作用。如果效果不理想, 可以在培养基中加适宜的抗生素, 也能起到较好的效果。