

园艺植物组培无菌培养建立

园艺植物组培是利用细胞的全能性原理,采取植物器官、组织或细胞,在人工创造条件下进行无菌培养、快速繁殖植株乃至创造出新物种的过程。此过程可划分为几个阶段,其中无菌培养建立阶段是指无菌培养环境条件的创造,外植体表面消毒及正确的无菌操作,这些都是防止染菌、保证组培材料正常生长及分化的关键,是组培工作中最基本的技术。

一、无菌环境的培养

1. 无菌室灭菌

①高锰酸钾+甲醛 高锰酸钾为强氧化剂,本身有杀菌作用,0.1%的溶液可作为种子、土壤、皮肤、器皿表面消毒剂,它可使酶失活导致菌体、芽孢死亡,当高锰酸钾与甲醛混合时发生强烈氧化反应,产生甲酸挥发,从而起熏蒸作用,使菌体蛋白质变性,引起菌体和芽孢死亡。

②乙醇灭菌 乙醇具有脱水作用,导致蛋白质变性,致使微生物死亡。乙醇的脱水作用在一定的浓度范围内随浓度增加而加强,但95%~100%的乙醇能使菌体表面形成一层蛋白质膜,降低乙醇进入细胞的穿透力。70%~75%乙醇既具有较强的杀菌力又有较强的穿透力,杀菌作用好。在实际应用时还要根据被灭菌物体表面的含水量灵活掌握,表面干燥的物体用70%乙醇,表面湿润用75%乙醇杀菌。

③紫外线照射 每星期必须用紫外灯对接种室照射,每次接种前还需用紫外灯对操作工作台照射,一只30瓦紫外灯管照射9米³的容积灭菌效果好。灯应安置在工作位置上方距地2~2.2米,每次照射半小时以上。

④消毒剂擦拭 消毒剂种类多,如乙醇、来苏水、过氧化氢、溴水,每次接种前需用消毒剂对工作台上下全面擦拭除尘、接种室地、墙面,保持洁净。工作室最好全密闭,否则不但会缩短超静工作台使用寿命,也会增加染菌的机率。

2. 工具与器械灭菌

①高温蒸汽灭菌 蒸汽灭菌属湿热灭菌,由于湿热灭菌有潜热存在,被灭菌物体的温度比蒸汽低,蒸汽在其表面凝结成水,放出潜热,可迅速提高被灭菌物体的温度。又由于水和水蒸汽比空气的热容量大,导热快穿透力强,灭菌需要温度低、时间短,实践中常用于工具和器皿灭菌,水蒸汽的温度随其所受

压力增加而升高。因为灭菌用高温蒸汽是通过加压获得的,如对原理不清难免会造成以下错误:

I.在升压前应将锅内冷空气排净,因空气是热不良导体,若不排净,冷空气就会聚集并滞留在灭菌锅中消毒筒的中下部,围绕在待灭菌物体的周围,若锅内空气仅排除一半,当压力表指针达到1千克/厘米²,即1.05个大气压,锅内实际温度仅能达到112℃,比要求的121℃低9℃,导致灭菌不彻底,大面积染菌。

II.手提式高压锅的排气管未按要求插入灭菌筒内的下部或排气管损坏、缺失,致使灭菌筒内的空气排放受阻。

III.消毒筒内物品堆积太紧,阻碍蒸汽的流通和热交换,使容器内升温减慢,造成杀菌不完全。

IV.灭菌的物体体积过大和容器中溶液过多。组培中培养基通常在121℃下保温15分钟,器械保温25~30分钟,这一规定仅适用于试管和三角瓶中小容量的培养基,一般要小于250毫升,若体积过大或内容液过多,会造成灭菌不彻底。

V.规定的灭菌温度和时间是经过科学试验制订的,任意延长灭菌时间,忽视了杀菌过程中温度对培养基成分的破坏和干锅造成重大事故或因安全阀失灵等问题。

②灼烧灭菌 即直接用酒精灯将微生物灼烧致死,接种时常用于接种工具和器皿的灭菌,但此过程也存在许多错误操作:接种工具的灭菌范围不够,如对接种剪刀、镊子灭菌,长度应大于插入容器中长度且内外侧灭菌,接种工具没有降至常温即接种使幼苗灼伤。

二、外植体消毒或表面灭菌

在组培中,外植体在进入培养基前首先要表面灭菌,但表面灭菌掌握不好往往会把表面细胞杀死,甚至杀死一部分组织乃至全部培养材料,常用的消毒剂灭菌程序如下:

1.流水冲洗,除去灰尘,并使植物细胞吸水。

2.用70%~75%酒精处理,漂洗5~8秒,可溶去蜡质和油污,使材料表面湿润,以便于其他杀菌剂与材料表面的菌类接触而死,但酒精浸洗时间不能过长,嫩植物时间短些,木质化程度高的植物时间长些。

3.升汞是消毒剂中效果最好也是最常用的消毒



欧洲山杨的育苗技术

欧洲山杨树为杨柳科杨属落叶乔木,生长速度快,在伊犁多分布于天山北坡、伊犁河二、三级以下支流的两岸,适应性强,成材早,轮伐期短,是新疆山区的主要阔叶树种之一。它能促进云杉更新,是云杉林的主要先锋树种和伴生树种之一,欧洲山杨在提供用材、保持山区水土方面均有重要的作用。

一、对环境的要求

欧洲山杨喜温暖或稍凉爽的气候,耐寒能力比耐高温能力强,是喜水、喜肥、喜氧的速生树种。由于其生长速度很快,所以在育苗期要求充足的水肥条件和充足的光照,要求土壤通透性良好,有利于根系生长发育及呼吸作用,从土壤中吸收大量水分和养分。

二、种实的采集

欧洲山杨是雌雄异株树种,花先于叶开放,所以采种前要做好母树调查登记,在种子成熟期方可采种。欧洲山杨花期为4月底5月初,果熟期5月中旬到6月上旬。5月中旬至6月上旬当果实由绿变黄、部分蒴果裂嘴吐露白絮时即可及时采收果实。采收果实后,放在室内晒种布上,不要堆得太厚。经常翻动,并用柳条抽打,使白絮飞出,然后抖落种子过筛,净种后即可得到纯净种子。种子贮存适宜含水率为4%~5%。欧洲山杨种子不宜久存,种子调制出来后即可播种。

三、育苗及播种

1.欧洲山杨每千克种子350万粒,种子纯度90%,发芽率70%~80%,每667^m²播量1.5~2千克。

2.欧洲山杨种粒小,因此整地做床要比一般树种苗床质量更高。欧洲山杨播种适宜用高床,床面要平,表土要细,床高30厘米、床宽1米为宜。

3.于5月中旬至6月上旬种子调制出来后即可播种。把种子混入一定比例细沙或细土,喷少量水,种、沙、土混拌均匀。在播种前床面浇一层水,播种后种子黏附表土上,然后用细眼筛薄薄地筛一层细土,约1毫米。也可以播种后不覆土,而覆一层草。然后少量喷水,经常保持苗床表土湿润,3天后即可出苗。

四、苗期管理

1.播种后用细眼喷壶或喷雾器喷水,保持床面湿润,出苗期不能浇水过多,否则会引起幼苗根腐病。如果水分不足会造成芽干。播种后3天即可出苗。当长出5~7片叶时,可适当减少浇水次数,增加浇水量。

2.当幼苗生出侧根后,可进行松土除草。每年人工除草6~8次,结合除草进行松土。

3.生长期追施氮肥,生长后期追钾肥,促进苗木木质化。

4.欧洲山杨叶部病害主要是灰斑病,可喷施1:500倍代森锌,或多菌灵。黄粉病可用石灰硫磺合剂防治。叶部害虫可用1:500倍乐果药液喷洒。

5.当苗高2~3厘米时进行第1次间苗,苗长到5~10厘米高时进行第2次间苗定苗,每^m²保留150株苗木为宜。

9月中下旬天气转凉后,停止浇水及一切促进苗木生长的措施。

(天山西部林业局巩留林场 何传荣)

剂,一般浓度0.1%~0.2%,浸泡8~10分钟。升汞渗透能力弱,故只能表面灭菌,而且去除很难。因此,升汞灭菌后必须用无菌水冲洗4~5次并搅拌,否则汞残留会继续杀害外植体。

三、无菌培养的操作

无菌操作技术直接地关系到组培材料染菌率,实践中遇到许多错误做法:

1.环境污染严重,地面、桌面灰尘多。

2.紫光灯杀菌时间短,必须照射30分钟才有效。工作人员的手只用肥皂清洗,没用乙醇彻底擦拭,消毒后任意抓摸带菌的器皿、用具。

3.擦拭工作台时,只擦洗台面,而不擦工作台的正、顶部、左右壁。

4.接种时,三角瓶和封口膜的方向不是与风向平行,而是垂直造成逆风向,致使染菌机率加大。

5.接种时,剪子、镊子接触到带菌的瓶子、苗木而未进行火焰灭菌,造成交叉感染。此外接种时手臂太往里或太往外,或离酒精灯太远,或接种时苗木在瓶外停留时间太长。

总之,对组培有关原理的正确理解和规范的无菌操作,不仅可降低染菌率,减少事故发生,更重要是保证组培材料健康生长。因此,在实践中,每个工作人员必须不仅懂原理,又要精于操作。

(奎屯市园林管理处 刘红 赵孝伟
新疆石油管理局 何多春)