

植物组织培养实验中 存在的问题及方法的改进



山东 烟台农业学校 史向群

[摘要]本文对植物组织培养实验过程中出现的问题进行分析并提出实验改进方法。

[关键词]植物 组织培养 实验改进

植物组织培养在过去的40多年中得到迅速发展,已渗透到生物学科的各个领域,并广泛应用于农业、林业、工业和医药业,产生了巨大的经济效益和社会效益。尤其是快繁技术和无毒苗培育技术,在农林业生产中具有重大的实践意义。虽然植物组织培养的操作过程并不复杂,但在实验中常常会遇到一些问题,这些问题可能会导致实验的失败,给科研和生产造成损失。因此,在植物组织培养实验中积累经验和熟练掌握无菌操作技术是非常重要的。笔者根据多年从事教学实验,对植物组织培养实验过程中出现的问题进行分析并提出实验改进方法,既提高了工作效率,又能提高实验的成功率。

(一) 培养基母液的配制

MS培养基是组织培养中常用的培养基,也是植物组织培养实验过程中主要使用的培养基,下面以MS培养基为例,简述其母液配制过程中常出现的问题及改进方法。

1.大量元素母液配制。大量元素中的 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 和 HPO_4^{2-} 容易生成 CaSO_4 、 CaHPO_4 沉淀。改进的方法是把 NH_4NO_3 、 KNO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 种药品分别用蒸馏水溶解,按顺序依次混合,同时考虑到大量元素的溶解度和方便使用,通常配制成10倍的母液5000ml贮存在冰箱中,使用一个学期不会产生沉淀,例如配制1000ml培养基,只需取100ml大量元素母液。

2.微量元素母液配制。在配制微量元素母液时常常出现加入钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)后,钼酸钠难

溶解,即使通过加热也无法解决问题。解决的方法是在室温下用蒸馏水分别溶解微量元素药品,然后再依次混合在一起放入冰箱保存,用前摇匀母液。同时考虑到微量元素的用量极微,通常配制成100倍的母液1000ml例如配制1000ml培养基,只需用移液管取10ml微量元素母液。

3.铁盐溶液母液配制。MS配方中的铁盐是EDTA螯合铁,是由硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)与乙三胺四乙酸钠($\text{Na}_2\text{—EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)螯合而成。如果配制螯合铁时(Fe—SO_4 与 $\text{Na}_2\text{—EDTA}$)没有完全螯合,此时放入冰箱保存由于温度降低, FeSO_4 与 $\text{Na}_2\text{—EDTA}$ 就会结晶析出。为了不出现结晶现象,分别称取硫酸亚铁与乙三胺四乙酸钠置于烧杯中加蒸馏水加热并不断搅拌使之溶解,然后一边加热一边把硫酸亚铁溶液慢慢倒入乙三胺四乙酸钠溶液中并不断搅拌直至溶液接近沸腾,停止加热,等溶液冷却后倒入棕色试剂瓶,放入冰箱保存。当母液出现絮状沉淀时,不宜再用。为了方便使用,通常配制成100倍的母液1000ml例如配制1000ml培养基,只需用移液管取10ml铁盐溶液母液。

4.有机元素母液配制。配制有机元素母液为了方便使用通常配制成100倍的母液1000ml,放入在棕色试剂瓶中,保存在冰箱中待用。因有机溶剂易腐败变质;不要长时间存用,当母液出现絮状沉淀时,不宜再用。

(二) 培养基的灭菌

高压蒸气灭菌的操作技术是植物组织培养实验中重要的操作技术之一,直接关系到接种的成败。

首先了解高压蒸气灭菌的原理：水蒸气的温度是随着压力的增加而逐渐升高的，所以灭菌用的高温蒸气都是通过加压获得的。而空气的热胀系数比水蒸气大，如果灭菌锅内的空气不能完全排除，那么，即使灭菌锅内的压力表反映出锅内的压强单位，但有空气存在，灭菌锅内也无法达到灭菌所需的温度。有实验显示，如果锅内的空气只排除一半，当压力表指针达到0.105MPa时，锅内的实际温度只能达到112℃，比要求的121℃低9℃，这将导致灭菌不彻底，可能造成培养基的大量污染，所以高压灭菌锅的使用关键是设法排净锅内的空气。另一种减少培养基污染的方法是：当高压锅停止加热后，压力将到零点时，不要马上开锅，防止吸入外界冷空气，引起培养基污染。我们实验室主要是使用手提式高压灭菌锅和立式高压灭菌锅。

1.手提式高压灭菌锅。手提式高压灭菌锅采用二次排气灭菌法：先按常规进行第一次排气，即先关放气阀，等锅内的压强升到0.05MPa时，打开放气阀排出锅内的空气，当排放至压力表指针为零时关闭放气阀。然后继续加热，当压力表再一次升到0.05MPa时，再排一次锅内的空气，当压力表指针为零时关闭放气阀，之后继续加热直到压力表指针达到0.105MPa时开始计时，按不同的灭菌材料维持15~20min。

2.立式高压灭菌锅。立式高压灭菌锅灭菌法：首先打开上下放气阀，然后按不同的灭菌材料设好所需的温度121℃、时间15~20min，然后开始加热，当温度达到100℃时，关闭上放气阀，使下放气阀与垂直成30°角，可排出锅内大约1/10的气体，当温度达到121℃时灭菌锅自动开始计时，计时结束，自动停止加热，关闭电源。

用上述两种灭菌锅两种方法对培养基进行灭菌，经过多年的实验证明，没发生过培养基灭菌不彻底的现象。

（三）无菌操作技术

无菌操作技术是植物组织培养实验过程中的一项关键技术，直接关系到组培材料及培养基的杂菌污染率。如果操作人员未遵守操作规程或操作技术不熟练都可能引起刚接种的组培材料或组织苗的污

染。为了降低污染率，减少损失，提高工作效率，对无菌操作过程的一些环节作了改进。

1.培养皿的使用。植物组织培养过程中外植体、愈伤组织、丛生芽和出根苗的分切都要使用培养皿。每付培养皿中放入一叠比培养皿稍小的圆形滤纸，并且用报纸包好经过高温灭菌的。一般的做法是每次接种前从报纸中取出一付培养皿，先把培养皿的盖口放在酒精灯上烧，并转动培养皿使盖口各部分都烧到，然后打开培养皿，从培养瓶中取出组织苗放在培养皿内的滤纸上分切，每接种完一瓶组织苗，就用镊子把上面几张滤纸取出。这种做法虽然方便，工作效率也高，但容易形成交叉污染，即某一污染的组织苗会通过滤纸和培养皿传染给下一个没杂菌的组织苗，可能会引起同一时间内接种的材料大部分污染。

改进的方法：一是购买足量的培养皿，把培养皿洗干净，干燥后用报纸每5~10付为一个单位包，放入高压蒸气灭菌锅内，在0.105MPa压强下灭菌20min。每次使用时只要取一付培养皿，每瓶组织苗使用一付培养皿。采用这种方法接种，不但可以提高工作效率，而且降低了污染率。二是，可选用封口膜灭菌后，代替培养皿作为承接物。可反复利用，简便易行，降低工厂化生产成本。

2.使用2套镊子和手术刀。镊子和手术刀是无菌操作时最常用的接种工具，取外植体、愈伤组织、丛生芽和出根苗等实验材料要使用镊子，分切时要使用手术刀。一般的做法是使用一套镊子和手术刀，每次在酒精灯上灼烧灭菌后要等待冷却后才能使用，常常导致烫伤实验材料或者为了赶时间导致灼烧灭菌不彻底。使用2套用具后，先把2套用具先后在酒精灯上灼烧灭菌，然后放在超净工作台的一边冷却，使用先灼烧灭菌的一套用具，再接着使用另一套用具，这样既提高了工作效率，又可降低无菌操作过程中的污染率。另外，可采用接种杀菌器灭菌，不仅提高了工作效率，而且可以降低生产成本。

植物组织培养实验过程中还会遇到许多问题，有待我们进一步去分析、探讨和改进。