

培养基配制和灭菌中的注意事项？

第二章 外植体选择和灭菌 (P48)

一般来说，无论何种类型的细胞工程技术，起始阶段均涉及外植体取材、灭菌、接种与培养等基本过程。

§ 1、外植体的选择和灭菌 (P48)

一、外植体的选择

(一) 外植体的基因型

- 不同种类的植物
- 同一植物的不同器官

对诱导条件反应是不一致的，有的部位诱导分化的成功率高，有的部位却很难脱分化，或者再分化频率很低

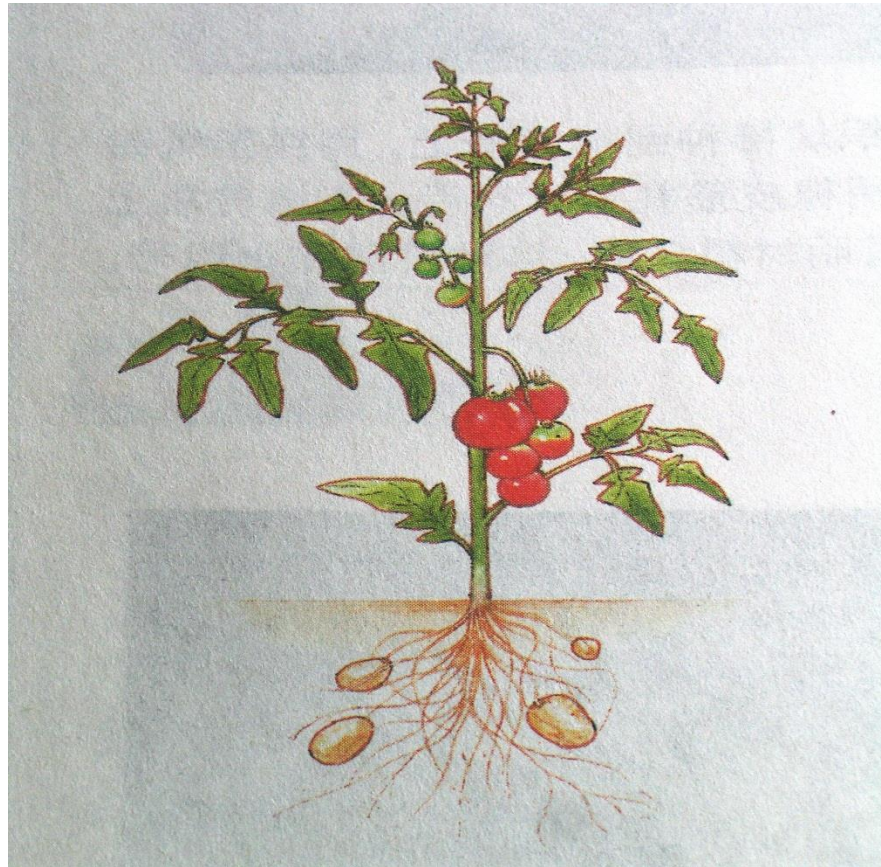
- a. 单子叶植物不易诱导器官发生。
- b. 木本植物较难诱导。
- c. 存在基因型差异（如番茄**29%~63%**）
- d. 开始生长季节取材容易诱导。

外植体种类及基因型

表 3-1 各类植物用于器官发生再生植株的外植体情况 *

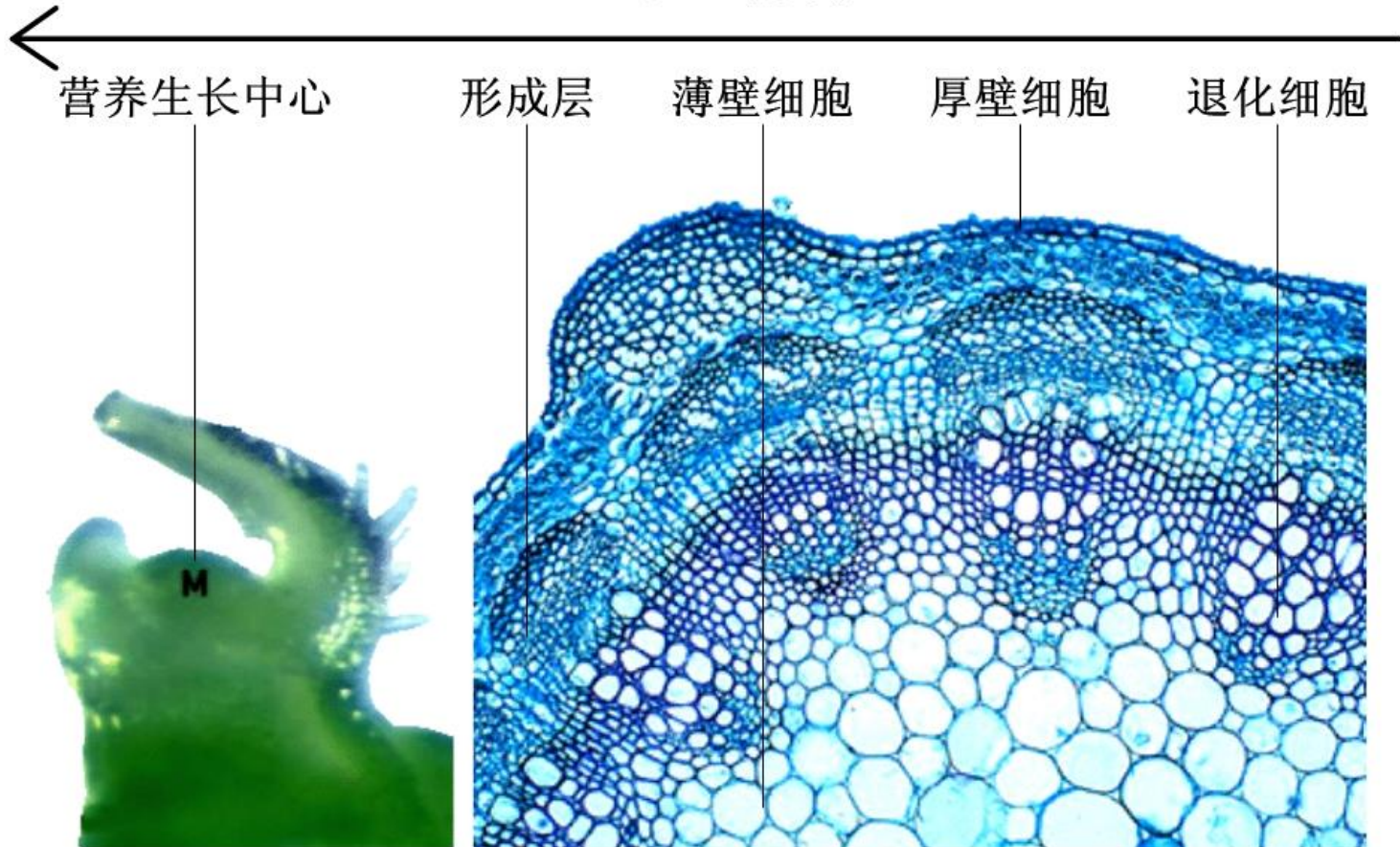
外植体使用频率 植物种类 外植体		双子叶植物 170 种	单子叶植物 62 种	裸子植物 18 种
叶		67 (39)	18 (29)	3 (16)
根		11 (6.5)	2 (3.2)	0
茎		43 (25)	13 (20)	2 (11)
幼胚		3 (1.8)	12 (19)	4 (22)
子叶		17 (10)	0	8 (44)
胚轴		28 (16)	8 (13)	2 (11)
幼花序		10 (5.8)	10 (16)	0

(二)外植体的部位



对于大多数植物来讲，茎尖是最好的部位，由于其形态已基本建成，生长速度快，遗传性稳定，也是获得无病毒苗的重要途径，但茎尖往往受到材料来源的限制，而采用茎段等其他组织可解决培养材料不足的困难。

脱分化能力



常用的外植体种类:

- ①茎尖（园艺植物组织培养中应用最多，繁殖率高，不易发生遗传变异，但取材有限）
- ②茎段（采用嫩茎的切段促进腋芽萌发，取材容易）
- ③叶（幼嫩叶片组织通过愈伤组织或不定芽分化产生植株，取材容易，操作方便，但易发生变异）；
- ④花球和花蕾
- ⑤种子、根、块根、块茎、花瓣、胚等。

- 在选择植物外植体进行组织培养时，还要求考虑待培养材料的来源是否有保证，是否容易成苗；同时考虑到该外植体，特别是经过脱分化产生的愈伤组织，是否会引起不良变异，丧失原品种的优良性状。

选取适宜的外植体；常用外植体有茎尖、茎段、节间、叶片、叶柄等。

C、流水冲洗外植体；

D、外植体切割、分离及灭菌处理；

E、外植体接种于诱导培养基。

F、环境条件控制促进外植体的生长。

(三)取材季节

取材的季节以早春为好

- 不同植物的取材季节要求各有不同。对大多数植物而言，应在其生长开始的季节采样。
- 在生长末期或已进入休眠期时取样，则外植体可能对诱导反应迟钝或无反应，较难成活。
- 在母株生长旺盛的季节取材，不仅成活率高，而且增殖率也大。

(四)器官的生理状态和发育年龄

1、幼年组织具有较高的形态发生能力

作为外植体的器官，其生理状态和发育年龄直接影响形态发生。一般情况下，幼年组织比老年组织具有较高的形态发生能力，生理年龄越老的组织或器官，越接近发育上的成熟，其再生能力逐渐减弱甚至完全失去再生能力。

外植体状态:

表 3-2 *Brassica cavinata* 苗龄对于其下胚轴上段,
不定芽、苗再生能力的影响^[47]

苗龄(天数)	接种外植体数	芽、苗再生频率(%)	每个外植体形成芽、苗数
4	17	18	0.6
5	22	68	/
6	22	96	3.6
7	20	100	5.2
9	20	55	0.8
12	20	65	1.0
14	20	60	1.0
18	15	60	1.0

培养基: MS+4mg/L 激动素和 0.01mg/L 2,4-D

2、外植体的来源

- 生长在自然环境下的植物
- 有目的地培育在温室控制条件下生长的植物
- 无菌环境下已经过离体培养的植物

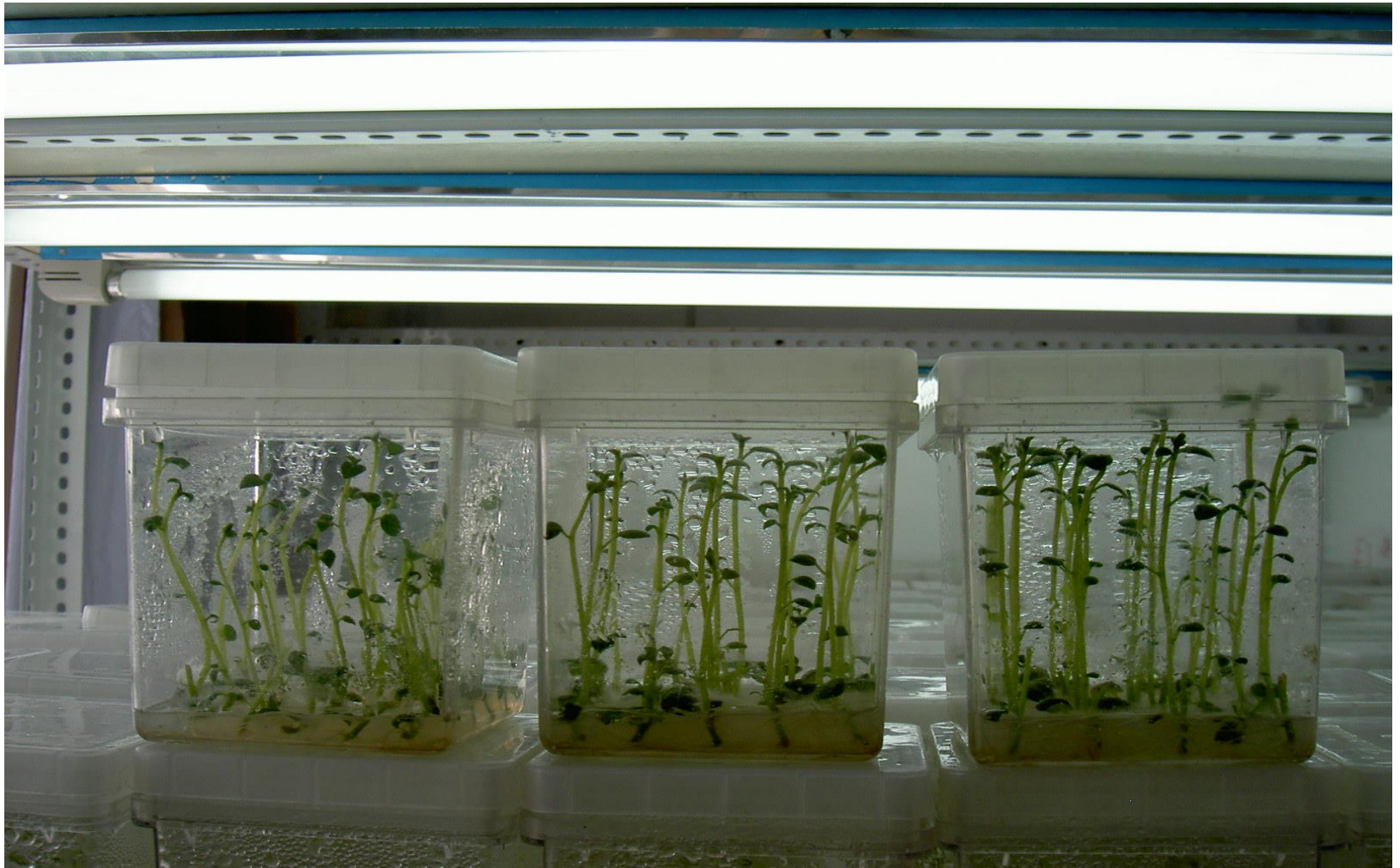
自然环境中生长的植株，一般带有微生物，甚至与某些微生物具有寄生关系，使植株具有**内生菌**。取自这些植物的外植体，在培养过程中会有微生物滋生，从而影响培养效果。

自然环境生长植株





温室控制条件下生长植株



已离体培养植株

多数情况下，应尽量使用温室或人工气候室控制培养的植物材料作为外植体来源，减少培养过程中的微生物感染概率。同时，生长在控制条件下的植物可以保持培养材料间的一致性，提高实验的可重复性，也便于培养技术的规范。

某些多年生植物或特殊材料，必须取自自然生长的植物，就需要尽可能避免使用那些生长过于潮湿和不洁净环境中的植物。对于培养过程中可能出现内生菌污染的材料，应尽量取生长旺盛期的生长点部位作为起始培养的材料。

3、供体植株的管理

取自室外的外植体材料，供体植株的管理十分重要，这与外植体培养时的污染率密切相关。植株管理中应注意：

(1)避免昆虫危害 许多昆虫如蚜虫、螨类和飞虱是许多植物病虫害的传播媒介，会引起植物组织的潜在感染。

(2)注意防病 尤其是真菌和细菌病害的侵染，取自感病植株的外植体，在培养中的污染率远远高于来自健康植株的外植体，必要时需使用化学药剂防治病害。

(3)控制湿度 给供体植株浇水时应从根部给水，避免从上部浇水，以免上部形成易于病原侵染的湿度环境；尽可能降低温室湿度；取材前尽可能保持植株干爽。

3、材料取材

(1)材料选择

培养材料应选择有**代表性**的主要植物、选择**性状优良**的种质或特殊的基因型。

快速繁殖时应在植株生长的最适时期取材，花药培养应在花粉发育到单核期取材。

(五) 外植体大小

选取材料的大小一般在0.5-1.0cm之间。胚胎培养或脱毒在0.5cm以下。材料太大易污染，材料太小难于成活。

外植体取材方法--确定大小



取大小适中的茎段、芽体进行清洗、灭菌，大了容易污染，小了不易成活。

外植体极性：

当外植体以形态学的基本部接种于培养基上时，从远离基部的表面诱导出芽、苗数目较多。

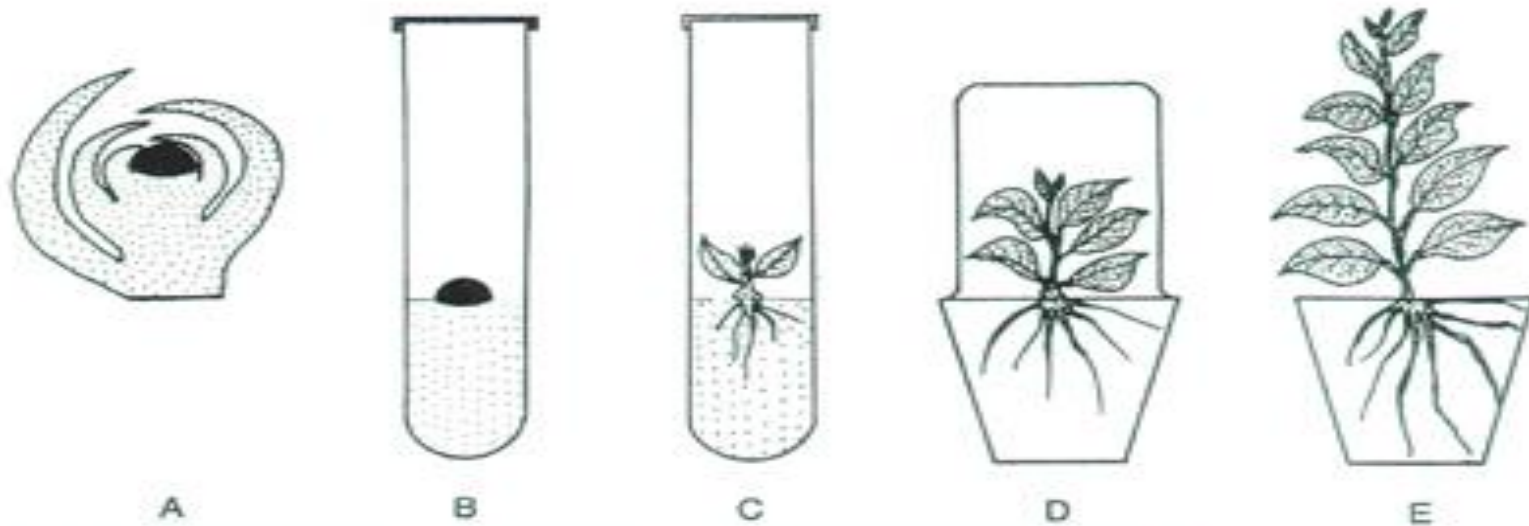
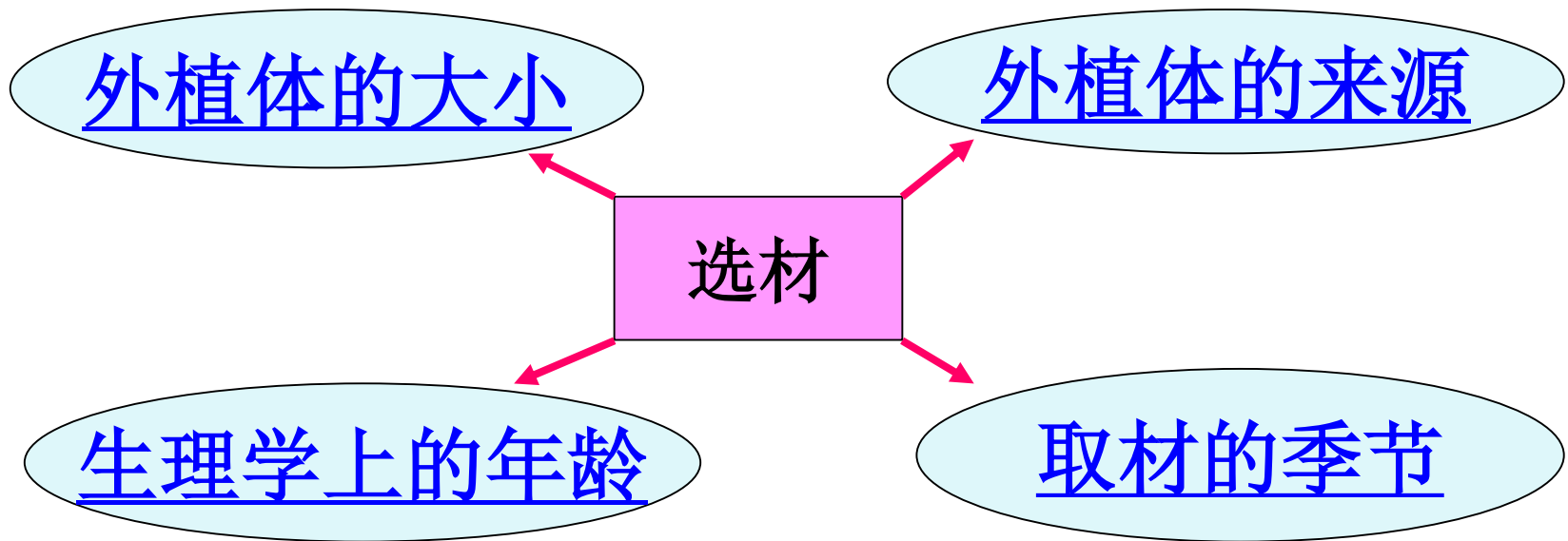


FIG. 8.3. Meristem-tip culture. (A) Apical meristem showing section to be excised. (B) Excised meristem tip cultured on agar medium. (C) Plantlet regenerated from excised meristem tip. (D) Plantlet transferred to sterile soil. (E) Virus-free plant growing in soil.

■外植体的选择有什么要求？



二、外植体的灭菌

灭菌：是指用物理或化学方法将所有致病和非致病的微生物全部杀灭。

- **常用灭菌方法：**

干热灭菌：150度，40’

120度，120’

湿热灭菌：高压灭菌锅，压力达0.5kg/cm²时放气，
压力达1.1 kg /cm², 121度, 16-30’

射线灭菌：紫外灯

过滤灭菌：细菌过滤器（孔径0.45um）

熏蒸灭菌：每立方米体积2-8mL甲醛 + 甲醛一半量的高锰酸钾

火烧灭菌：酒精灯

药剂灭菌：外植体

外植体的灭菌

原则：杀菌又不伤害活细胞。（选择消毒剂，浓度、时间）

药剂：能自动分解成低毒性或容易除去的药剂，如次氯酸钠能分解成杀菌的氯气，并易散失，是常用的，低浓度氯化汞效果好但难除；多次无菌水冲洗，用镊子翻动使药液均匀。

1、预处理

先对植物材料进行修剪整理，去掉不需要部分，将准备使用的植物材料（外植体）在流水中冲洗20-60分钟，备用。如特别不洁的外植体，可先用加有洗涤剂的水清洗10-15分钟，再用流水冲洗干净。

2、表面灭菌

（1）操作人员穿戴灭菌过的工作服、口罩。进入接种室前双手用洗涤剂清洗干净，操作前再用70%酒精或消毒剂擦洗双手。

（2）操作期间双手和台面常用70%酒精或消毒剂擦拭。超净工作台使用前必须用紫外灯照射杀菌，然后开启风机。

(3) 接种用工具（解剖刀、剪刀、镊子）可放入70-75%酒精中，使用时需火焰灼烧灭菌，冷却后使用。

(4) 外植体放入超净工作台内，置70-75%酒精中5-60 秒。

材料消毒前常用**70%**酒精漂洗：**70%**具较强穿透力和杀菌力，湿润表面，驱尽茸毛间气泡，使药剂杀菌效果好。但时间太长会损伤材料。

(5) 外植体消毒

- 幼穗、花蕾、花药：饱和漂白粉上清液**10-20**分钟
- 茎段、茎尖：**0.1-0.2%**升汞**5-10**分钟
- 成熟胚：次氯酸钠 **15-30**分 （活性氯**2.5%**）（ **$\geq 5.2\%$** ）
- 厚种皮种子：**0.1-0.2%**升汞**30分-60分**，水稻幼胚（带壳）

次氯酸钠 **90-120**分

- 表面活性剂(**TWEEN 20**)，抽气、搅拌或超声振动，使消毒剂与材料充分接触。

(三)污染原因和预防措施

1、污染原因

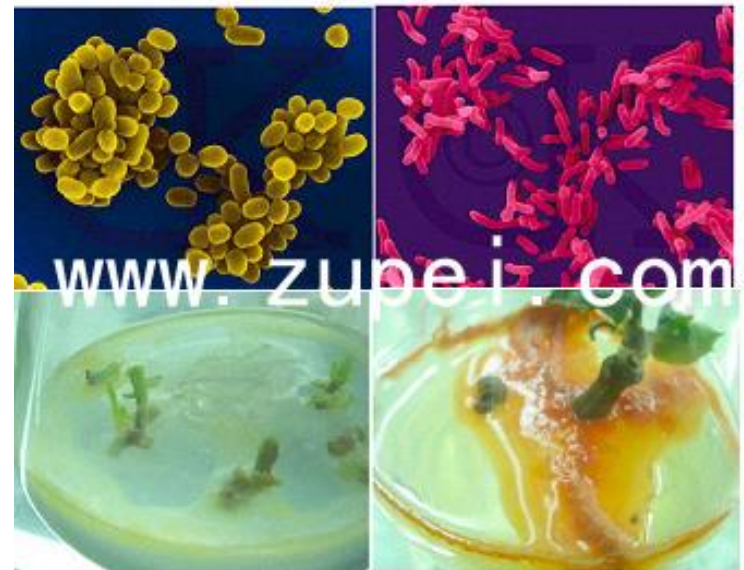
污染是指在组织培养过程中培养基和培养材料滋生杂菌，导致培养失败的现象。

病原菌：细菌及真菌两大类。

(1)细菌污染特点-菌斑呈黏液状，接种后1-2天发现。

污染途径：

- 外植体带菌
- 培养基及器皿灭菌不彻底
- 操作人员未遵守操作规程



(2)真菌污染的特点-污染部分长有不同颜色的霉菌，接种后**3-10**天发现。

污染途径：

- 材料内部带菌
- 周围环境不清洁
- 超净工作台过滤装置失效
- 培养瓶的口径过大



2、污染的预防措施

(1)防止材料带菌的措施

- 茎尖作外植体时，进行预培养（无糖）或暗培养。无糖营养液或自来水使枝条抽枝，以新抽嫩枝作外植体。
- 晴天取材，下午取材，经日晒过可杀死部分细菌或真菌。
- 接种时除去外部韧皮组织，只接内部的分生组织。

(2) 外植体的灭菌

-多次灭菌法，次氯酸钠-无菌水-次氯酸钠

-多种药液交替浸泡法，肥皂水-酒精-次氯酸钠-无菌水。

(3) 严格按照操作程序。

§ 2、 外植体无菌接种和培养 (P51)

污染源：空气中微生物，接种工具、材料、工作人员带菌

一、接种室的消毒

新洁尔灭擦地板、墙壁:使用前**0.1%**新洁尔灭擦地板、墙壁

甲醛熏蒸: 在接种前一天进行, 按每立方米体积2-6mL甲醛, 倒入烧杯中, 取甲醛一半量的高锰酸钾倒入烧杯中, 利用高锰酸钾的强氧化性而使甲醛挥发达到杀菌目的)

(**紫外线照射**: 接种前1小时进行, 打开紫外灯照射20—30分钟, 利用臭氧(O_3)杀菌, 停15—20分钟后开始接种)

酒精喷雾

二 外植体的接种—无菌接种

外植体的接种是把经过表面灭菌后的植物材料切碎或分离出器官、组织、细胞、转放到无菌培养基上的全部操作过程。整个过程均需无菌操作。

烧烤瓶口，换滤纸，消毒剪刀，在酒精灯下方操作等。

(一) 工作人员：洗手，戴帽、口罩，**70%酒精**擦手。

(二) 无菌操作：烧烤瓶口，换滤纸，消毒剪刀，在酒精灯下方操作等。



(1) 借助接种用工具将材料切割分离。

(2) 将培养基放入超净工作台内，火焰灼烧培养瓶瓶口，然后打开培养瓶口，置培养瓶为斜角，避免灰尘落入器皿中。

(3) 迅速将切割分离下的所需组织、细胞、器官，放入培养基上，及时盖上瓶盖。

(4) 工具用后应及时灭菌，避免交叉污染。

(5) 工作人员操作时禁止不必要的谈话。

三、外植体的培养

接种只是完成了离体培养的第一步，植物离体培养和栽培植物一样，生长过程中也受到各种环境因素的影响。培养条件是离体培养能否成功的关键。在培养基条件适宜的基础上，影响试管苗生长的主要因素有光照、温度、湿度、氧气。

外植体的培养条件

1、光照

光照对植物生长发育有重要作用，是离体培养中非常重要的环境因素。光照**强度**、**光质**以及**光照时间**，对细胞的增殖、器官的分化都有很大影响。除特殊要求外，一般都采用日光灯作光源，光照强度1000-5000Lx，根据不同植物或器官需要，可以每天连续光照12-16小时。

(作物对红光和蓝紫光吸收能力最强，所以灯源以日光灯、高压汞灯、弧氙气灯为好。灯源强度：40瓦的日光灯三根合在一起，离苗45厘米高处照射，光强为3千～3.5千勒克斯，100瓦的高压汞灯离苗80厘米处，光强为0.8千～1千勒克斯)

例：

- 马铃薯连续光照，葡萄要求短日照。
- 光质也影响芽的再生，蓝光有利于器官发生，烟草实验，红光有利于根的发生。

2、温度

离体培养中对温度的控制比光照更为重要，大多数植物最适温度在23-32℃之间。培养室温度是 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。低于15℃时，培养的组织生长停顿，高于35℃对生长也不利。因此，培养室应安装空调或其他控温设备。

变温处理对有些植物器官发生有促进作用，如豌豆。

3、湿度

培养瓶内相对湿度通常是100%，而环境中的相对湿度会直接影响培养基的水分蒸发。因此，培养过程中，培养室一般要求相对湿度保持在70-80%，相对湿度过低影响培养物生长和分化，应向室内喷洒水，以提高湿度；过高杂菌滋生，大量污染，应及时地通风除湿。

4、氧气

离体培养的试管苗是需要氧气的，在固体培养或液体静置培养时，如果组织完全浸入培养基中，与氧气隔绝，就会停止生长。因此，接种时要有部分组织与空气接触。振荡培养是解决通气的良好办法。固体培养中，如瓶塞不透气，培养物也不能生长，要选择通气性好的培养瓶盖，增加可利用的氧气，迅速除去释放出来的 CO_2 ，有利于外植体外层细胞开始分裂。

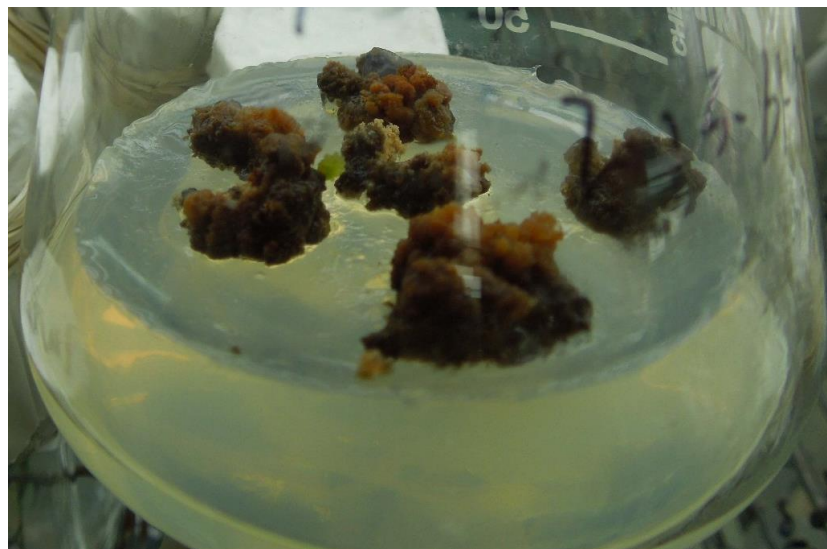
要注意保持培养容器内良好的通气性。维持适宜的氧气和二氧化碳浓度，防止有害气体的积累。

§ 3、 外植体的褐变及其防止措施（P56）

一、褐变的原因

褐变是指外植体在培养过程中体内的多酚氧化酶被激活，使细胞内的酚类物质氧化成棕褐色的醌类物质，这种褐变物向外扩散致使培养基逐渐变成褐色，抑制其它酶的活性，影响外植体的分化，最后变褐死亡的现象。

很多种类的植物体中含有大量多酚类化合物，切取芽时的创伤会激活组织中的多酚氧化酶，将多酚类物质氧化为棕褐色的醌类物质，使外植体的切口处发生褐变，产生可见的茶色、褐色或黑色，此即谓“酚污染”。醌类物质会渗透到培养基中，使培养基褐化，其结果是严重影响培养物的生长和分化，甚至造成培养物死亡。在木本植物，尤其是热带木本植物及少量草本植物中，此现象较为严重。



(1)基因型 某些植物酚类物质含量较多。木本植物的外植体比较容易产生褐变现象，在成年树尤其严重。

(2)外植体的生理状态 幼年的材料培养含醌类物质较少。

(3)培养基的成分

- 过高的无机盐浓度和肌醇**
- 生长调节物质使用不当，BA过多**
- 分生能力强的材料，氧化受抑制，褐变也被抑制**
- 培养条件不适宜，温度过高或光照过强，褐变加速。**

(4)材料转移时间 时间过长引起材料褐变。

二、褐变的防止措施

1 选择适宜的外植体

一般来说，最好选择生长处于旺盛、酚类化合物含量较低的外植体，这样可以使褐变现象明显减轻。

2 培养基成分

培养基成分中的无机盐、蔗糖浓度、激素水平等对褐变的程度的影响尤为重要。另外，其pH值也与褐变程度有较大关系

（1） 适当的无机盐浓度

低浓度的无机盐可促进外植体的生长与分化，减轻外植体褐变的程度。

(2) 适当和适量的激素

王异星在荔枝的组织培养过程中，培养基中添加**1 mg/L BA + 0.5mg/L 2,4-D**时，愈伤组织较坚硬，增殖缓慢，易产生褐变。培养基中添加**1mg/L BA+1mg/L 2,4-D** 时，愈伤组织浅黄疏松，增殖也快。

(3) 培养基的pH值 在水稻体细胞培养中，pH值为**4.5-5.0** 时**MS**液体培养基可保持愈伤组织处于良好的生长状态，其表面呈黄白色，而pH值为**5.5-6.0**时，愈伤组织严重褐变。一般来说，**酸性环境(pH值为4.5-5.0)**不利于褐变过程的发生。

3 培养条件 如温度过高或光照过强，光照会提高多酚氧化酶（**PPO**）的活性，促进多酚类物质的氧化，从而加速被培养的组织褐变。高浓度**CO₂**也会促进褐变，其原因是环境中的**CO₂**向细胞内扩散，细胞内**CO₂**-增多，导致内膜系统瓦解，酚类物质与多酚氧化酶（**PPO**）相互接触，产生褐变。因此，初期培养要在黑暗或弱光下进行。

4 连续转移。不断地（每隔1~2d）将培养物转移到新鲜的培养基上，以摆脱老培养基中褐色物质的不利影响。在使用液体培养基的情况下，这种方法相当有效。

5 添加褐变抑制剂和吸附剂

- 褐变抑制剂主要包括**抗氧化剂**和**PPO抑制剂**。
- 在培养基中加入有抗坏血酸（VC）、偏二亚硫酸钠、L-半胱氨酸、抗坏血酸、柠檬酸、二硫苏糖醇等抗氧化剂都可以与**氧化产物醌**发生作用，使其重新还原为酚。由于其作用过程均为消耗性的，在实际应用中应注意添加量，其中L-半胱氨酸和抗坏血酸均对外植体无毒副作用，在生产应用中可不受限制。在水稻细胞的培养基中，添加植酸（PA），可防止褐变，PA分子中众多的羟基产生抗氧化作用，使生色物质的含量下降或PA与PPO分子中的Cu²⁺结合，从而降低了其活力。具体方法如下：
 - （1）用经过滤灭菌的抗氧化剂溶液洗涤刚切割的外植体伤口表面；
 - （2）将抗氧化剂加入固体培养基的表层；
 - （3）将刚切割的外植体浸入其中一定时间，
 - （4）或者在抗氧化剂溶液中切割和剥离外植体。
 - （5）必要时还可以将几种抗氧化剂结合使用。

陈学森等在对植酸在银杏组织培养中应用的研究中也证实了植酸具有抑制多酚氧化酶活性的作用。

6 加活性炭

一般认为，活性炭主要吸附非极性物质及色素大分子，可以减少一些有害物质的影响，但是具体吸附的选择性很差，温度低时吸附力增强，温度高时吸附力减弱，甚至会解吸附。通常活性炭的使用浓度为0.5-10g/L。大量活性炭的加入会削弱琼脂的凝固能力，因此要多加些琼脂；很细的活性炭容易沉淀，因此通常在琼脂将要凝固时，需轻轻摇动培养瓶；应当注意的是：活性炭也能吸附培养基中的激素类物质，影响茎尖的分化和生长，因此在使用活性炭的场合，需要适当提高培养基中激素的浓度。

§ 4、玻璃化现象及其预防措施 (P60)

一、玻璃化现象及其产生原因

植物试管苗的叶、嫩梢呈水晶透明或半透时，水浸状；整株矮小肿胀、失绿；叶片皱缩成纵向卷曲、脆弱易碎；叶表缺少角质层蜡质，没有功能性气孔，不具有栅栏组织，仅有海绵组织等异常现象。这种试管苗生长异常现象就是“玻璃化”（**Vitrification**）。是植物组织培养过程中所特有的一种生理失调或生理病变。

玻璃苗中因其体内含水量高，干物质、叶绿素、蛋白质、纤维素和木质素含量低、角质层、栅栏组织等发育不全，表现为光合能力和酶活性降低，组织畸形，器官功能不全，分化能力降低，所以很难继续用作继代培养和扩大繁殖的材料；生根困难，移栽后也很难成活。



玻璃化现象产生原因

玻璃化是在细胞生长过程中的环境产生变化，试管苗为了适应变化了的环境而呈玻璃状。植物在芽分化的时候C、N代谢和水分发生生理性异常，细胞体积增大快于干物质的生成，所以用水分填充细胞，表现出玻璃化。

植物微体快速繁殖时玻璃苗的出现已成为一种很普遍的现象，该苗有时多达50%以上，严重影响繁殖率的提高，已成为茎尖脱毒、工厂化育苗和材料保存等方面的严重障碍，造成人、财、物的极大浪费，所以试管苗下斑化现象对植物组织培养的危害是相当严重的，也是亟待解决的问题。

导致玻璃化的主要因素：

1. 材料差异，在不同的种类、品种间，组培苗的玻璃化程度有所差异。
2. 细胞分裂素浓度过高或细胞分裂素与生长素相对含量高，易引起玻璃化现象。
3. 培养基水势，培养基中离子种类，比例不适。
4. 环境温度、光照强度和通气性。温度过低或过高，光照时间、强度不足及培养容器中空气湿度过高，透气性较差所造成的通气不良，易造成组培苗含水量高，从而发生玻璃化现象。湿度过高、光照不足。
5. 培养基的C、N比太低，琼脂浓度低等。

二、预防措施

- (1)控制无机营养成分，减少培养基中含氮化合物的用量（降低氮（铵态氮）和氯）。
- (2)增加培养基中的溶质水平，以降低培养基的水势（提高蔗糖和琼脂浓度）。
- (3)降低细胞分裂素和赤霉素浓度，增加生长素比例，可以考虑加入适量脱落酸。

- (4) 增加光照，包括自然光照1000-1800lx，控制光照时间8-12h(光照强度和光照时数)。**
- (5) 适温生长，热击处理防止玻璃化发生。**
- (6) 增加容器通风，使用透气性好的封口膜，最好进行CO₂施肥，这对减轻试管苗玻璃化的现象有明显的作用。**

(7) 培养基中加入间苯三酚、根皮苷或多效唑、矮壮素。

(8) 降低培养温度，进行变温培养，有助于减轻试管苗玻璃化现象的发生。

(9) 培养瓶容量小，气体交换不良，玻璃化。

(10) 离子水平：植物种类不同，离子形态比例量要求不同。

本章小结

- 1、外植体的选择和灭菌
- 2、外植体无菌接种
- 3、外植体的培养条件
- 4、外植体的褐变及其防止
- 5、培养物的玻璃化现象及其预防措施

问题：为什么不同外植体选用不同的灭菌方法？