

植物组织培养中的污染及防止措施

许红梅

(黑龙江农业职业技术学院园艺系, 佳木斯 154007)

摘要: 污染是植物组织培养中的三大难题之一, 普遍发生于不同的植物组织、器官的组织培养中。为了提高组织培养中无菌苗的成活率, 我们必须在组织培养研究中, 正确地认识污染带来的危害以及造成的原因, 并有效地采取相关措施使污染率降到最低限度。结合在矮牵牛、菊花、树莓等组织培养中的一些经验, 针对污染的原因、影响因素以及防止措施做了系统的总结, 为科研和生产提供了一定的参考价值。

关键词: 组织培养; 污染; 防止措施

中图分类号: S603.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)06-0148-02

植物组织培养是20世纪初发展起来的一门新兴技术, 随着这项技术的日益完善, 其应用也越来越广泛, 可用于种苗快繁、植物脱毒、植物育种、种质资源保存以及次生代谢物提取等方面。尤其植物快繁和脱毒是应用最多和最广的方面, 而且许多花卉苗木的试管育苗已进入了商品化生产。但是在组织培养过程中, 常常会出现一些困难使试验无法进行下去, 甚至导致整个试验失败, 给科研和工厂化生产带来损失。污染是组织培养中经常遇到的困难。污染是指在植物组织培养过程中, 培养基和培养材料滋生杂菌, 最终导致培养失败的现象。现在在矮牵牛、菊花、树莓等组织培养研究中的一些体会, 从污染的原因、影响因素和防止措施几方面进行浅析, 为科研和工厂化生产提供一定的参考价值。

1 污染的原因

在培养过程中污染是经常发生的。它会导致培养基和培养材料上滋生杂菌, 最终组培失败。在科研和商品化生产种苗中, 污染率是与经济效益紧密相关的一个重要指标, 控制污染率无疑是一项提高经济效益、节约材料的有效途径之一。因此, 探讨和重视污染在科研和生产中显得十分重要。

1.1 造成污染的病原菌

在矮牵牛、菊花、树莓等的组培过程中, 发现了不同程度的污染现象, 其污染物主要是真菌(木霉、青霉、曲霉、毛霉)和细菌。

1.2 污染的症状及原因

真菌性污染主要指霉菌引起的污染。一般接种后3~8 d可在培养基中发现各种颜色的菌斑。真菌性污染, 一般多由接种室内的空气不洁净、超净工作台的过滤效果不理想、操作不慎等原因引起。

细菌性污染的主要症状是材料附近出现黏液状和发酵泡

沫状物体, 或在材料附近的培养基中出现混浊和云雾状痕迹。一般在接种后1~2 d即可发现。细菌性污染除外植体带菌或培养基灭菌不彻底外, 主要是操作人员的不慎造成。除要求操作人员严格按照无菌操作程序操作外, 外植体带菌引起的污染与外植体的种类、取材季节、部位、预处理方法及消毒方法等密切相关。

2 影响污染的因素

2.1 外植体本身

植物组织培养的成败除与培养基的组分有关外, 另一个重要因素就是外植体本身, 即由活体植物上切取下来, 用以进行离体培养的那部分组织或器官。为了使外植体适于在离体条件下生长, 使组织培养工作顺利进行, 有必要对外植体进行选择与处理。

首先, 应该从田间或温室中生长健壮的无病虫害的植株上选取发育正常的器官或组织作为外植体。离体培养易于成功。对于大多数植物来说, 茎尖是较好的外植体, 由于茎形态已基本建成, 生长速度快, 遗传性稳定, 病毒含量低或无病毒, 所以是获取无病毒苗的良好途径。但是, 不同植物的不同部位, 由于其本身的生长特点, 在外植体培养中也存在着各种差异性。比如, 各部位的分化再生能力不同, 各部位接种后的污染率也不同, 各部位培养形成的再生植株的脱毒率也不同。所以选取外植体时应选择适当大小的、病毒含量低的、易于消毒和灭菌的外植体, 这样才能保证在组织培养中污染率低、脱毒率高、成活率高。如在芳香植物唇萼薄荷的组织培养中, 由于其组织非常柔嫩且表面密生绒毛, 在自然条件下, 表面常被霉菌和细菌污染。所以在培养时, 选取去掉叶片的带腋芽的幼嫩茎段进行繁殖, 这样既能降低污染率(因为去除了污染率较高的叶片), 又能提高成活率。还如在广佛手的组织培养中, 不同外植体的顶芽的污染率最低, 成活率最高, 叶片次之, 带节茎的污染率最高。

另外, 不同季节取材的外植体, 污染率也不同。如在广佛手的培养中, 春季取材与秋季取材差别不大, 夏季污染率就高, 明显高于冬季。因此, 适当的时候取材会降低污染率。

所以, 为了降低污染率, 提高成活率, 选取外植体应该从多方面考虑。

2.2 培养条件



作者简介: 许红梅, 女, 1982年生, 2004年毕业于甘肃农业大学生命科学院生物技术专业, 同年到黑龙江农业职业技术学院园艺系从事教学工作, 主讲《植物组织培养》, 同时从事矮牵牛、菊花、树莓、彩叶草等花卉组织培养的研究。

收稿日期: 2006-07-30

在培养室内的培养条件中, 温度和湿度与污染率密切相关。外植体在夏季培养时, 由于夏天高温高湿有利于杂菌滋生, 所以污染率就高; 冬季培养时, 污染率就相对低一些。如在广佛手、矮牵牛、菊花、树莓的组织培养中, 外植体在夏季污染率和死亡率就高; 在冬季就相对低一些。

此外, 一些用于组织培养的植物, 在自然条件下的生长环境也会影响污染率。有报道指出, 生长在高温多雨的热带、亚热带植物和多年生木本植物容易出现内生细菌的污染。内生细菌存在于植物材料内部, 不能被一般的表面消毒方法所清除, 随着材料带入培养过程引起污染。

3 防止措施

组织培养中降低污染率是不可忽视的技术环节。以下是在矮牵牛、菊花、树莓等的组织培养中总结出来的几点污染防治措施。

3.1 外植体的采集

为了防止材料带菌, 我们在采集外植体时, 应注意以下几点: 在生长健壮的无病虫害的植株上选取发育正常的组织或器官; 或将嫩梢采集回来, 放在洁净的空气中水培抽芽, 然后用这种新生组织培养, 也可以避免污染。在晴天中午采集外植体。采集易于消毒和灭菌的组织部位进行培养, 也可以降低污染率。

3.2 材料的表面消毒

外植体在接种之前, 须经严格的灭菌。由于灭菌剂的种类不同, 杀菌力不同, 因此选择消毒剂, 既要考虑具有良好的消毒、杀菌作用, 同时又易被蒸馏水冲洗掉或能自行分解的物质, 而且不会损伤或轻微损伤组织材料, 而不影响生长。植物种类不同, 外植体不同, 处理也不同。

为了获取无菌材料, 对室外采集来的外植体, 先用自来水冲洗干净, 然后根据材料的不同, 选用不同种类的灭菌剂, 进行不同时间的表面灭菌。选择适宜的消毒剂处理时, 为了使其消毒效果更为彻底, 有时还需与黏着剂或润湿剂如吐温及抽气减压方法、磁力搅拌、超生振动等方法配合使用, 使消毒剂能更好地渗入外植体内部, 达到理想的消毒效果。如在芳香植物唇萼薄荷组织培养中, 由于腋芽密生绒毛且部位通常较隐蔽, 似很难与消毒液彻底接触, 致使消毒效果不理想, 于是在饱和漂白粉溶液中加入 0.1% Tween-80 混合均匀, 并采用软毛刷轻轻刷洗材料, 尤其是腋芽部位, 这样可以使消毒液与材料充分接触, 使消毒效果明显提高。

此外, 如果在继代培养中发现污染, 我们可以采用抗生素(如青霉素、氨苄青霉素等)和杀菌剂(如多菌灵、代森锌等)处理结合常规消毒, 重新得到无菌苗。

再者, 在一些快繁体系连续多次继代后, 部分试管苗插入培养基的切口处会出现云雾状污染苗。对于这种污染, 我们也可以采取在继代培养基中加入适量抗生素(如青霉素、氨苄青霉素、四环素等)来替代抑菌。但是随着继代次数的增多, 抗生素对污染苗的抑菌作用可能会降低, 一方面是由于抗生素的消耗, 另一方面可能是由于菌类对抗生素产生了耐药性。

3.3 培养基的灭菌

分装后的培养基封口后应尽快进行高温高压灭菌。灭菌不及时, 会造成杂菌大量繁殖, 使培养基失去效用。为了保证

培养基灭菌彻底, 降低污染, 在灭菌过程中需注意以下几个环节: 灭菌加热过程中应使灭菌锅内的冷空气放尽, 以保证灭菌彻底; 锅内灭菌物不能堆放过满, 否则, 将阻碍蒸汽的流通和热交换, 使容器内升温减慢, 造成物体内部杀菌不完全; 灭菌后, 应切断电源, 使灭菌锅内的压力缓慢降下来, 接近“0”时, 才可打开放气阀, 排出剩余蒸汽后, 打开锅盖取出培养基。千万别急于取出培养基而打开放气阀, 这样会造成降压过快, 使容器内外压差过大, 液体溢出, 造成浪费、污染, 甚至危及人身安全。

3.4 接种中的注意事项

接种的基本技术环节是降低污染率的关键措施。在接种中, 为了降低污染, 应注意以下几项事宜: 接种室保持干净整洁, 应定期对接种室进行喷雾降尘和熏蒸灭菌, 并在每次接种前对接种室进行 20~30 min 的紫外灭菌。接种过程中操作人员应及时用 75% 酒精擦拭双手和超净工作台台面。接种器械应及时在酒精灯火焰上进行灼烧灭菌, 或在接种器械杀菌器中及时灭菌。在接种过程中, 尽量少说话或咳嗽, 避免呼吸污染。超净工作台上应保持气流畅通, 使操作区空气不断净化。当打开培养瓶接种时, 培养瓶应拿成斜角, 以免灰尘落入瓶中。

3.5 组培苗的生长环境的调控

对培养室进行定期的熏蒸灭菌或用 75% 酒精进行喷雾降尘, 杀死空气中的菌类。并且注意保持培养室内的温湿度。不能过高, 也不能过低。

3.6 组培苗多次继代中采取的措施

组培苗多次继代后, 一些内生细菌就会造成污染, 可以采取在培养基中加入抗生素和杀菌剂的方法抑菌或杀菌。

参考文献:

- [1] 李颖, 李春燕. 多菌灵和青霉素在组培污染中的应用[J]. 林业科技, 2002, 27(1): 6—8.
- [2] 张艳玲, 姚雷, 申晓辉. 芳香植物唇萼薄荷组织培养中污染控制[J]. 上海农业学报, 2005, 21(1): 4—6.
- [3] 刘庆昌, 吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002. 37.
- [4] 王清连. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 21—23.
- [5] 张桂芳, 贺红. 广佛手组织培养中污染及防治研究[J]. 中医药学刊, 2005, 23(2): 269.
- [6] 刘进平. 胡椒组织培养中污染问题的研究[J]. 热带农业科学, 2003, 23(6): 6—10.
- [7] 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.
- [8] 高建莉. 菊花组织培养中细菌污染的防止[J]. 云南农业科技, 2005, (3): 24—25.
- [9] 田永亮, 张文, 张国珍, 等. 两种抗生素对葡萄组培中污染菌的抑制作用[J]. 北方园艺, 2005, (5): 84—85.
- [10] 陈远达, 辛国斌. 马铃薯试管苗快繁过程中的污染及解决办法[J]. 中国马铃薯, 2003, (4): 239.
- [11] 由翠荣, 曲复宁, 龚雪琴, 等. 迷你玫瑰组织培养中细菌污染的防止[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 45—47.
- [12] 赵蓬晖, 张红涛, 马红卫. 植物组织培养中几个常见问题与对策[J]. 河南林业科技, 2001, 21(2): 27—28.