

产之间的关系,研究细胞生长与产物积累的动力学规律,使植物细胞培养技术能更好地为人类社会服务。

#### 参考文献

- [1] 高书颖,郭嵩光,金伟波,等.利用转基因植物生产药用蛋白研究进展[J].西北植物学报,2003,23(6):1044-1048.  
 [2] 杨振泉,刘巧泉,焦新安.利用转基因植物表达药用蛋白[J].中国生物工程杂志,2004,24(3):22-24.  
 [3] 傅红,张凯.转基因植物药物的应用及研究进展[J].天津医科大学学报,2005,11(1):145-149.  
 [4] 崔堂兵,郭勇,林炜铁.提高植物细胞培养法生产次级代谢产物产量的方法[J].植物生理学通讯,2001,37(5):479-482.  
 [5] 孔祥海.植物次生代谢产物的细胞培养技术研究进展[J].龙岩学院学报,2005,23(6):60-63.  
 [6] 肖春桥,张华香,高洪等.促进植物细胞培养生产次生代谢产物的几种途径[J].武汉化工学院学报,2005,27(1):28-30.  
 [7] 马玉芳,许继宏.提高植物细胞培养中次生代谢产物产量的方法[J].云南大学学报:自然科学版,2003,25(增刊):142-145.  
 [8] 胡凯,谈锋.药用植物细胞的大规模培养技术[J].植物生理学通讯,2004,40(2):251-257.  
 [9] 许志茹,李玉花.'津田芜菁'花色苷生物合成相关基因的表达[J].植物生理与分子生物学报,2006,25(3):583-586.  
 [10] 张玲华,郭勇.药用植物细胞的选育与培养生产次级代谢产物[J].生物技术通讯,2006,17(1):105-108.  
 [11] 李永丽,周洲,李科友.细胞培养生产药用次生代谢产物研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(2):219-221.  
 [12] 罗建平.茉莉酸甲酯、水杨酸和一氧化氮诱导怀槐悬浮细胞合成异黄酮及细胞结构变化[J].分子细胞生物学报,2006,39(5):438-442.  
 [13] 李达旭.根瘤农杆菌介导转化川草二号老芒麦胚性愈伤组织[J].植物生理与分子生物学报,2006,32(1):45-51.

编辑:琳莉

## 植物组织培养中污染控制技术研究进展

刘 佳

(哈尔滨师范大学,黑龙江 哈尔滨 150025)

**摘 要:**分析了植物组织培养过程中造成污染的原因,提出了克服污染的具体措施:注意外植体的消毒,控制内生菌,在无菌环境中操作。

**关键词:**组织培养;污染;防治方法

[中图分类号]Q946-33

[文献标识码]A

[文章编号]1003-6180 (2008) 01-0027-02

污染是组织培养中普遍存在的问题,也是组织培养过程中首先面临的问题,污染对植物苗木的规模化生产、植物试管基因库的构建、生产成本和宝贵材料保全等方面都具有重大影响.本文对组织培养中污染的研究作简要概述,并提出笔者自己的见解,希望给组织培养的研究与应用提供理论的积累.

植物组织培养又称植物克隆,指通过无菌操作把植物的外植体接种于人工配制的培养基上,在人工控制环境下进行离体培养的一套技术.污染的原因主要是由于培养材料带菌、生产器具带菌、培养基污染、培养物生长环境污染、操作不规范等因素造成的,污染的防治主要从以下五个方面着手.

### 1 外植体的选取

尽量选取带菌少的材料.对室外栽培的材料采取一定措施有利于降低污染率,如将植物挖出,改为室内盆栽,喷洒杀虫剂和杀菌剂.不便捷栽的植物可套塑料袋,等长出新枝条后再采样接种,经

黄化处理的外植体污染率低,但分化明显较野外直接采用的外植体弱<sup>[1]</sup>.对材料进行低温预处理也有利于降低污染率.于福科等把刚采回的玫瑰枝置于冰箱7 d后,选取带芽茎段培养,发现低温处理后的材料,污染明显降低,带芽茎段的萌动明显提早,这可能与杂菌或某些酶的活性在低温下受抑制或被冻结有关<sup>[2]</sup>.使用化学药剂处理接种材料也有利于降低污染率.高成伟等在夏橙的组织培养中,用10 mg/L的培福朗溶液预处理56 h后接种枝条,也取得了较好的消毒效果<sup>[3]</sup>.

### 2 外植体的消毒

外植体消毒常用的药剂有:70%~75%的乙醇溶液,3~6 g/L的次氯酸钠溶液,1 g/L的升汞溶液.消毒剂的选择和消毒时间根据操作者的经验来掌握,既要使外植体表面的微生物彻底杀死,又要尽可能少伤害外植体组织和表层细胞.先用75%的酒精棉球擦拭外植体材料,再使用其他消毒药剂,常能取得较好的消毒效果(尤其对有毛的材料).周俊辉等对玛丽安万年青采用减压灭

菌,利用减压抽走植物组织中的气体,使消毒剂更易进入植物内部,可增强杀菌效果,使污染率从对照的93.3%降低到40%<sup>[4]</sup>。

### 3 内生菌的控制

由内源细菌引起的污染,可在培养基中加入杀菌剂控制。冯晓英在勿忘我的组织培养基中加入苯甲酸钠,对初代培养中的细菌和霉菌污染的控制效果很好,外植体的分化率也较高<sup>[5]</sup>。周俊辉等对细菌抑制的试验结果表明,3 g/L 丙酸钠有较好的抑菌效果,在美铁芋的快速繁殖上,5 g/L 的丙酸钠对外植体的生长影响不大<sup>[6]</sup>。

### 4 操作污染和环境污染

操作污染和环境污染指真菌污染和细菌污染。真菌污染主要来源于环境,细菌污染主要来源于接种材料及工具。此类污染可通过以下措施克服:

**改善环境条件** 接种室与培养室要定期消毒与净化,接种前工作台或接种箱要开紫外灯30 min以上。培养室的相对湿度应控制在70%左右。

**接种人员应严格执行无菌操作** 对接种中所需的工具,必须经严格灭菌后才能使用。在超净工作台的操作区内,不要放入过多的材料,避免气流被挡住。要定期检查超净工作台的工作质量<sup>[7]</sup>,淘汰被真菌和细菌污染的接种材料。

**检查消毒锅的灭菌质量** 消毒锅的压力表降到零后培养瓶不能马上出锅,因冷热空气作用产生的负压效应会使外界环境的冷空气倒吸入已灭菌的培养瓶内引起真菌污染。为避免该现象的发生,消毒后的培养瓶应等锅稍微冷却后再出锅<sup>[8]</sup>。

**检查培养容器是否存在问题** 培养容器封口多用塑料盖、胶塞、棉塞、薄膜等,塑料盖用久了易老化,密封性差,也会造成污染。林盛等配制了一种4号消毒液对培养瓶瓶口进行消毒处理,可以把培养基污染率控制在0.3%以下<sup>[9]</sup>。

### 5 继代培养中的污染

初始阶段所获得的无菌材料在后期或继代培养中也可能出现污染,原因一方面是由于操作不慎引起的,另一方面由于初代培养使用的是营养相对简单的培养基,可能使污染不易表现出来,继代材料在培养室则可能被螨传播的真菌污染。这类污染可从以下两个方面防治:

**扩大繁殖时应有合理的程序** 在获得最初无菌培养物后,应将其中一部分作为原种保存起来,分批繁殖和复检后再大规模生产。

**通过在培养基中加入抗菌剂来防治**<sup>[2]</sup> 许婉芳等将多菌灵用于金线兰组织培养,在含有多菌灵的培养基中生长的金线莲,不受微生物污染,灭菌率达100%,无白化苗,生长健壮<sup>[10]</sup>。

植物体中的内生细菌潜伏得较深,表面消毒无法将其消除。这种污染在外植体的初期培养中(前几代的继代培养),不易被肉眼察觉,随着继代次数增加,菌量逐渐累积发展,才在培养基上显现出来<sup>[11]</sup>。黄小荣等则认为,植物组培中细菌污染的原因是休眠细菌芽孢萌发的结果<sup>[12]</sup>,通过在培养基中添加抗菌素、茎尖培养、降低pH值等措施防治和减少内生菌的污染。王亦菲等在彩色海芋快速繁殖至4~5代时,添加200 mg/L的青霉素GK,能有效抑制内生菌的生长,且不影响繁殖系数。2种或2种以上的抗生素结合使用,可降低细菌的抗药性。翟建中等在长春蔓的组织培养中发现,链霉素抑制内生细菌的作用大于庆大霉素和头孢唑林钠。培养基中同时使用2种抗菌素,可降低细菌的抗药性,较长时期地控制细菌污染的发展。但链霉素剂量增高,会对植物产生毒害。抗生素和多菌灵等一般不耐高温,需采用过滤灭菌,在生产中添加起来很不方便。苯甲酸钠、山梨酸钾、丙酸钠等常用作食品中的防腐剂,能耐高温高压,在组培生产中使用比较方便。植物材料中的内生菌,也可以采用反复茎尖培养或分生组织培养的方法来脱除。病菌是通过维管束传播的,故茎尖分生组织是不带菌的。可通过反复的茎尖培养或分生组织培养,脱除内生菌和病毒。

#### 参考文献

- [1] 邢震,郑维列.多蕊金丝桃的组织培养[J].江苏农业研究,2000,21(1):45-47.
- [2] 于福科,张广军.玫瑰组织培养污染控制技术措施[J].陕西农业科学,2002(11):47-48.
- [3] 高成伟,梁清华.杀菌剂在夏橙外植体组织培养中的应用[J].广西师范大学学报,1998,16(2):76-78.
- [4] 周俊辉,刘花全,罗慧君,等.玛丽安万年青茎段培养的污染防治[J].仲恺农业技术学院学报,2002,15(4):43-48.
- [5] 冯晓英.勿忘我组织培养快速繁殖研究[J].贵州农业科学,2002,30(1):9-13.
- [6] 周俊辉,周厚高,刘花全.植物组织培养中的内生细菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47.
- [7] 熊丽,吴丽芳.观赏花卉的组织培养与大规模生产[M].北京:化学工业出版社,2003,80-81.
- [8] 李海鹰,王桂文,周兴,等.苦丁茶组培苗工厂化生产若干问题探讨[J].广西科学院学报,1998,14(1):32-34,39.
- [9] 林盛,马崇烈,胡东琼.组织培养中污染的控制[J].广西农业科学,1994(2):87-88.
- [10] 许婉芳,龚福生,萧华山.杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制作用[J].福建果树,1999(4):6-7.
- [11] Kritzinger E M, Vuuren R J, Woodward B, et al. Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52: 61-65.
- [12] 黄小荣,杨开太.香水白掌的组织培养[J].广西林业科学,2001,30(1):39-40.