

# 植物组织培养中污染问题及其控制措施

李红梅<sup>①</sup>, 王义强<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>徽县林业局, 甘肃 徽县 742300; <sup>②</sup>中南林业科技大学生命科学院, 湖南 长沙 410000)

**摘要:** 本文阐述了组织培养中常见的污染问题以及造成污染的原因, 针对并提出了有正对性的预防控制措施。

**关键词:** 植物组织培养; 污染及控制; 措施

植物组织培养技术作为现代生物技术的一个重要手段现已在工厂化育苗、种苗脱毒复壮、遗传育种、种质资源的保存与交换等领域得到了广泛的应用。然而, 不论是在植物组织培养的试验研究中还是在工厂化生产中, 污染问题一直是阻碍工作进展的一大难题, 有时会严重影响工作效率和生产进展, 甚至降低了组培快繁中应有的经济效益。

## 一、污染

污染是植物组织培养过程中的一大技术难题, 也是组培快繁过程中常遇到的问题, 根据发生的对象和不同阶段的出现可分以下几种。

(一) 外植体污染 从大田或温室采集回来的植物外植体材料, 均带有病菌。

(二) 初代培养污染 外植体表面消毒处理后, 接种到培养基上, 3d~7d 后外植体周围出现的白色晕圈或有色菌落。白色晕圈或脓状物多数为芽孢杆菌或细菌污染, 是外植体本身所带病菌, 也是在杀菌过程中比较顽固的污染; 所谓菌落, 是指在操作过程中不慎掉入的病菌孢子或者是瓶口不严进入了病菌孢子, 这类大多是真菌污染, 较易清除。

(三) 继代培养污染 初代培养中生长健壮且无任何污染的苗子, 经过一次或数次继代转接后, 苗子周围出现如白色云雾状物或有色菌落或脓状物质。

## 二、污染产生的原因

(一) 培养材料污染 外植体材料带菌多, 在表面消毒过程中还是药用价值都非常大。过去由于我们认识和理解的狭隘, 常常使得一些很有价值的人参果没有得到很好的利用, 致使很多资源浪费。随着科技的日新月异, 人们已经从过去的维持生存提高到了诗意的生活, 从昔日的小葱小葱拌豆腐到今天的艺术的时尚, 人们对于健康和长寿变得极为关切。无论是人们健康质量的提高、生活水平的改善, 还是从节约资源、降低损耗、充分利用现有资源的角度来看, 普及人参果及其他果品的知识很有必要。

## 参考文献

- [1] 谢碧霞, 文亚峰, 何钢, 等. 我国人心果的品种资源、生产现状及发展对策[J]. 经济林研究, 2005, 23, (1).
- [2] 林栖风, 曾驰, 潘济文, 等. 海南野生猕猴桃、子京、人心果的生化分析研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1994, (2).
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1989.

处理不到位, 即杀菌剂使用不当或处理时间不适, 未能将所带病菌全部杀死而导致接种后病菌在培养基中扩大繁衍。

(二) 操作器具带菌 操作器械, 器皿, 包括镊子、剪子、刀片、三角瓶, 培养皿、瓶塞、超净工作台、酒精灯等凡接种时可能用到的一切器具未经过严格的高温灭菌或灭菌过程有问题时, 则会出现污染, 另外就是器械在灭菌后取放过程中不慎带菌也会造成污染。

(三) 培养基污染 灭菌好的空白培养基有时也会出现污染。若是菌落且只存在于培养基表面, 则有可能是瓶塞不严或扎口不紧和放置培养基的地方空气环境中病菌孢子过多所致。若是白色云雾状物且出现在培养基内部, 则表明培养基在灭菌过程中时间不够或气压不够所致的灭菌不彻底。另外, 母液放置过久而内部出现污染, 也会造成培养基的污染。

(四) 培养物生长环境不洁 外部环境是指组培室所建的地方靠近工路边、工矿区或垃圾场、集市等地方, 环境不洁、污染多、难控制。内部环境是指组培室、接种室的门窗封闭不严, 蚊蝇、飞蛾、虫子易进出, 有利于杂菌传播。同时, 室内尘埃多, 经常不清扫消毒, 会使细菌增多造成污染。

(五) 接种人员带菌 接种人员对自身消毒不严或未熟练掌握无菌操作的各个技术环节, 造成组培苗污染。

## 三、预防与控制措施

针对上述种种污染原因, 在组织培养过程中应严格注意以下几点无菌操作环节, 才能严格控制污染的发生。

(一) 组培材料的无菌化 组织培养中外植体材料的初代培养无菌化体系的建立是组织培养工作顺利进行的關鍵, 要获得无菌培养材料, 可采取以下几个程序。

- [4] 高楠, 陈维佳, 邹黎明. 微量元素硒与人类健康最新研究进展[J]. 沈阳医学院学报, 2003, (5).
- [5] 王秋霞. 微量元素钼与人体健康[J]. 微量元素与健康研究, 2003, (4).
- [6] 范甲朋. 人参果简介[J]. 生物学通报, 2006, (7).
- [7] 黄飞英, 黄建东. 话说“人参果”[J]. 发明与创新, 2003, (1).
- [8] 卢隆杰, 卢毓星, 岳森. 揭开人参果的神秘面纱[J]. 养生月刊, 2005, (9).

(编辑 赵鹏飞)

1. 外植体材料的预培养。若选用植物的茎尖、茎段或叶片作外植体时,可于枝条未萌发或未抽枝前采回来进行预培养,即在污染较少的室内或无菌条件下,将枝条用水冲洗后插入无糖营养液中,使其发枝、抽芽以备。

2. 接种前表面杀菌消毒。外植体表面用5%的次氯酸钠或0.1%~0.2%的升汞溶液处理,处理时间视植物种类、外植体部位而定。对耐受力强的植物用升汞处理较好,10min内即可有效杀死附着在植物体表的细菌,但要注意彻底除去升汞的残留,需用无菌水冲洗至少5到7次或更多。用5%~10%的次氯酸钠处理时,不留残毒,效果也好,是常用的表面杀菌剂。也可以对外植体材料在杀菌前进行药液浸泡,以加强灭菌效果。另外对于较为名贵的外植体材料一次很难清除污染的在培养10d~20d中可用适宜的杀菌剂进行二次处理。

3. 培养基中添加抗生素及杀菌药物。对材料内部所带的细菌和霉菌等杂质,可以在培养基中添加不同浓度的抗生素或杀菌剂减轻或防止污染的出现。(如:青霉素、链霉素、甲基托布津、多菌灵等)。

(二)器具、器材及培养基的灭菌 定期清洗接种用具、培养瓶、培养皿等,对于长久未用的接种用具及培养瓶等要用强酸、强碱消毒,清洁剂擦洗,必要时进行高温灭菌。接种器械接种前必须进行严格的高温灭菌。

及时定期检查母液及未接种的空白培养基,看是否有污染发生。注意母液要存放与冰箱中以免出现芽孢杆菌污染。芽孢杆菌是一种耐热力很强,高温很难杀死的菌类,一般存在于培养瓶壁和各种母液中,确保母液不被污染至关重要。

培养基灭菌时一定要注意不能堆放过满,以免阻碍蒸汽流通和热交换,造成物体内部杀菌不完全,另外,待锅内压力升到0.5kg/cm<sup>2</sup>时打开放气阀,将锅内冷气彻底排放干净,然后再关闭放气阀进行灭菌,在稳定压力1.1kg/cm<sup>2</sup>,温度120℃下持续灭菌15min~20min。培养瓶的棉塞要大小适中,瓶口要包扎严密,防止病菌孢子从口而入。

#### (三)无菌接种操作的技术环节保持无菌

1. 确保接种室内清洁无菌。定期用70%的酒精喷雾消毒,用消毒水擦拭地面、工作台等,定期用甲醛加少量高锰酸钾熏蒸进行空间灭菌。每次接种前用紫光灯照射接种室、缓冲间及超净台20min,对紫光灯不能照到的死角要用流动紫光灯进行杀菌。关掉紫光灯后,应提前开启超净台通风机10min~15min。另外要定期检查,清洗超净台的滤布。

2. 确保接种人员在接种前不带菌。操作人员要勤梳洗勤剪

指甲,接种前先用肥皂洗手,并用0.1%的新洁尔灭溶液洗手3min~5min,在缓冲间穿带已消毒后的衣、帽、鞋并戴上口罩,方可进入操作室。接种时避免说话、咳嗽。

3. 接种时要保持接种台整洁。双手用75%的酒精擦洗方可开始接种工作,台面放接种时必备的器械,不要堆放过多物品,造成空气不畅,使操作间得不到完全净化。

4. 严把接种操作无污染关。初代接种时除严格按规程操作外,接种时培养基瓶口要转动在火焰上烧烤,继代转接时,对选用的扩繁材料在进接种室前,要用75%的酒精进行外部消毒,打开瓶口后应倾斜向着火焰,动作要轻,幅度应适中,每次接种后器械需在95%的酒精中浸泡,然后在火焰上灼烧灭菌。接种期间要不断用70%的酒精擦手及工作台。

5. 确保接种器械在接种过程中无菌。整个接种过程中要多次用75%的酒精擦洗灭菌,避免手触碰培养物和器械伸入培养瓶内的部分。

6. 做好接种后清洁预消毒。每次接种完后应彻底清洁接种室,并用0.5%的新洁尔灭溶液擦洗超净台及架搁等。

(四)培养室内污染的控制 培养室是培养物生长的外部环境,除保持生长物体适宜的光、温、湿外,组培室的清洁、卫生对于防止污染杂物生长是不可忽视的问题。因此对组培室要定期用75%的酒精喷雾降尘处理,并用0.5%的新洁尔灭溶液洗培养架、窗户和地板。同时,及时清除组培室中的污染菌源和污染苗,并集中进行高温灭菌,另外,若进行长期大量培养,则有必要定期对培养室进行熏蒸消毒,其甲醛与高锰酸钾为2:1。

总而言之,控制或降低污染率是植物组织培养的关键技术之一,同时也是组织培养工作效率高低的重要指标之一。从组织培养的全过程来看,每一环节都可能出现污染,为了实现低污染率在组织培养中除了加强无菌意识,提高无菌操作各环节的技术规程外,还要注重无菌操作训练,提高操作水平,同时在培养基中针对性的加入抑菌剂、抗菌素。

#### 参考文献

- [1] 李骏明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.
- [2] 翟建中, 顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染的防治[J]. 森林病虫害通讯, 1999, (4).
- [3] 毛秀红, 毛加法, 刘翠兰, 等. 植物组培快繁技术常见问题及解决对策[J]. 山东林业科技, 2004, (4).

(编辑 田庆林)

