

植物组织培养污染防治措施

陈玉生, 梁秋月, 洪向平

(广东省农垦科技中心, 广东 广州 510507)

摘要:在分析植物组织培养过程中产生污染的原因及其污染性状的基础上, 从外植体处理及外部环境控制两个方面阐述了防治污染的有效措施。

关键词:植物组织培养; 污染原因; 防治措施

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-874X(2008)01-0028-02

植物组织培养始于20世纪初, 是以植物生理学为基础发展起来的植物种苗繁殖技术。经过近1个世纪的发展, 植物组织培养技术已在科学研究和生产实践上得到了广泛应用, 特别是在植物的工厂化育苗方面。但是, 在组织培养过程中, 污染问题难以回避; 在生产中, 污染率的增加必然提高组培苗成本, 从而影响企业的经济效益, 因此防治污染是工厂化育苗中不可忽视的技术环节。本文在分析植物组织培养过程中产生污染的原因及其性状的基础上, 提出了防治污染的措施, 以期植物的工厂化育苗提供技术参考。

1 污染原因及其特性

1.1 内因污染

内因污染, 又称内源性污染, 是指由于外植体的表面或内部带菌(内生菌)而引起的污染^[1]。这些病菌主要为内源性细菌或真菌, 如黄单胞菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、土壤杆菌属、棒状杆菌属、欧文氏菌属、霉菌属等。

在初代培养中, 表面细菌引起的污染通常在2~3 d内即能在外植体周围或培养基表面形成明显的水污状、油污状、气泡状或干缩状菌落, 颜色有红色、黄色、乳白色等。若在外植体接种后3~5 d内仍未发现细菌污染, 但是以后不断出现明显或不明显的菌落, 这就可能是由内生细菌引起的污染^[2]。在某些植物的初代培养或前几代的继代培养中, 污染可能并不形成明显的菌落, 而只在培养基内部形成不易被肉眼发现的丝状物或晕状物, 随着继代培养次数的增加, 细菌数量不断增加, 一段时间后即会在培养基上表现出来, 这种情况一般可以利用背光检查法进行观察。

1.2 外因污染

外因污染主要是由环境污染和操作不当引起, 是

指在接种或培养过程中病菌入侵而造成的污染, 如培养基、接种工具和接种室消毒不严格以及操作不规范等^[1]。造成外因污染的病菌主要是霉菌、细菌和酵母菌等。

若培养材料附近经常出现黏液或混浊水迹并伴有发酵状泡沫, 这大多是细菌性污染, 可能是由于使用了未消毒完全的工具引起的, 也可能是由于操作人员呼吸排出细菌或接触了培养材料或器皿所致。如培养基上出现黄、白、黑等不同颜色的霉菌, 则大多为真菌性污染, 主要是由于接种室的空气受到污染造成的。

2 污染防治措施

针对植物组织培养中污染产生的原因, 应从以下两个方面着手来控制污染。一是控制外植体自身带菌, 外植体的表面带菌可以经过一系列的杀菌处理来减少; 而外植体的内部带菌是不容易清除的, 但也可以通过对外植体的预培养来加以控制; 二是降低环境污染和操作污染, 这类污染可通过规范操作程序加以控制。

2.1 内因污染的防治

2.1.1 外植体的选取和预处理 首先应控制外植体采摘的季节、时间和部位。外植体一般在材料休眠末期或萌动前期取材较为有利, 因为此时材料积累了较丰富的营养和内源激素, 其抵抗病菌的能力较强、同时病菌也还未活跃起来。其次应选取无病毒的外植体, 如外植体带有病毒, 则应采取预栽管理、促发新枝、黄化处理、热击处理、添加抗生素等措施进行处理, 以培养出无病毒的外植体。

2.1.2 外植体的灭菌处理 外植体采摘后, 通过表面灭菌、深灭菌或其他处理去除所带病菌, 这也是接种前的重要工作。(1)表面灭菌。先将采摘外植体洗去泥土, 用洗洁剂浸泡、冲洗, 必要时用软刷或脱脂棉球擦洗材料表面, 然后将其剪成适宜大小, 再进行深灭菌。(2)深灭菌。经过表面灭菌后, 仍有杂菌存在于外植体表面或内部, 必须经过深灭菌处理才能获得不带菌的外植体,

收稿日期: 2007-10-22

作者简介: 陈玉生(1979-), 男, 硕士, E-mail: yusheng7074@

sina.com

如添加消毒剂或抗生素、使用混合消毒液、水浴、灼烧、真空减压灭菌、磁力搅拌灭菌、超声波振动灭菌以及多次消毒等^[3]。

2.1.3 外植体的无菌培养 近年来,培育无菌苗为外植体被公认为是一种行之有效的方法。该法利用种子在无菌条件下培育成无菌苗,然后再将无菌苗的胚轴、胚根、子叶等作为外植体,这样可减少污染,提高成活率。

2.2 外因污染的防治

2.2.1 改善环境条件 接种室应该密封、洁净,每次接种前应清洁接种室的地面,用75%酒精喷雾以沉降灰尘,并打开紫外灯在黑暗中灭菌20~30 min;用新洁尔灭或75%酒精擦洗工作台面,使用超净工作台对控制污染更为有效;定期清洗过滤膜;此外,培养室的空气相对湿度应控制在70%左右,湿度太高时可用抽湿机除湿。在接种结束时,也应清洁接种室的地面,并定期用甲醛熏蒸。

2.2.2 严格执行无菌操作 操作人员应严格执行实验操作,穿戴专用的无菌鞋、工作服、工作帽、口罩及发罩,用消毒液洗手;接种过程中不应频繁开启接种室门窗;定期打扫或用甲醛熏蒸培养室和接种室,检查超净工作台的卫生质量;及时处理被污染的培养瓶,而不应随意弃置,以防病菌传播。

2.2.3 严查培养器材 对接种材料要严格把关,淘汰被污染的接种材料;检查灭菌锅的质量,如严格执行实验操作后仍有污染现象,则应及时检查灭菌锅的性能;检查培养容器是否存在污染问题,培养容器大多用塑料盖、胶塞、棉塞或薄膜等封口,其中塑料盖使用太久后易老化、密封性较差,也会造成污染。培养瓶要充分洗净并消毒,灭菌后不应放在空气中太长时间,一般于灭菌后1~2 d接种为宜,以减少污染。

2.2.4 控制培养基成分 除了欧文氏菌属外,大多数细菌在介质pH值小于4.5时不能生长,因此可以通过酸化培养基来减少污染。例如在蔷薇属植物的组织培养中,将培养基的pH值从5.8降至3.9~4.3,可有效防止细菌污染。此外,也可以通过减少培养基中的有机成分来防止污染,因为培养基中有机成分的存在是产生污染的重要原因。例如在阿月浑子的组织培养中,去除培养基中的维生素B₁、B₆和烟酸等有机成分,经2~3代培养后即能抑制细菌生长,而对丛生芽的生长增殖不产生影响,这是因为维生素B₁、B₆和烟酸等是某些细菌生长的必需物质,去除这些有机成分后细菌因无法生长发育而慢慢减少或死亡。日本古在丰树教授首

创的无糖组织快繁技术则是去除培养基中的全部有机成分,输入CO₂作为碳源,并通过控制环境因子,促进植株光合作用,使之由异养型转变成自养型,经过这样处理的植株长势良好,污染率明显降低。

2.2.5 添加抗生素 在理论上来说,已经获得的无菌材料应该是无菌的,但在继代培养中也会被污染。除了操作不慎外,内生菌的活动也是导致污染的一个重要原因。此外,继代材料放在培养架上也可能被螨类等传播的病菌污染。上述污染可通过在培养基中添加抗生素来防止,一旦发现培养基被污染应立即剔除,并对接种室和培养室进行紫外灯照射或药液熏蒸。

抗生素抑菌在动物细胞培养中早已被广泛应用,但在植物组织培养中尚处于初始阶段^[4]。近年来,随着植物基因工程的开展,转基因过程中的除菌和抑菌越来越离不开抗生素,因此抗生素的使用已逐渐成为植物组织培养的灭菌技术之一。但是,在使用抗生素时必须弄清抑制的病菌种类、使用的抗生素是否对培养的植物组织有不良影响以及抗生素的使用浓度和处理时间。由于能对所有微生物都有效的抗生素是不存在的,因此抗生素也不能完全代替灭菌技术,而最好的方法就是将其添加在培养基中作为防止污染的辅助措施。

3 展望

随着组织培养技术的发展,植物的快繁技术呈现日新月异的变化。但是,在植物组培苗的工厂化生产过程中,由于污染造成生产成本偏高或产品不合格的情况时有发生,严重影响了组培苗的工厂化生产进程,因此开展污染防治的研究显得非常迫切。

通过对组培外植体的处理和严格无菌操作等措施均能够有效降低污染率,但在防治污染方面还有很多问题需进一步研究。目前,组织培养的工作不仅集中在无菌操作空间、无菌培养空间及高效抗生素的获得上,开创新的组织培养方法及培养条件也是研究的重点领域之一,例如开放式组织培养、无糖组织培养的研究等。

参考文献:

- [1] 邓小梅,奚如春,符树根,等.植物组织培养过程中污染现象的研究进展[J].江西林业科技,2004(6):33-36.
- [2] 周俊辉,周厚高,刘花全.植物组织培养中内生细菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47.
- [3] 朱广廉.植物组织培养中的外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6):444-446.
- [4] 崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京:北京工业出版社,2003:42-45.