

文章编号:1003-8701(2010)06-0011-03

植物组织培养中污染原因及其控制方法

赵春莉,李金英

(吉林农业大学园艺学院,长春 130118)

摘要: 本文针对植物组织培养当中污染的问题,主要从植物组织培养当中污染原因和控制措施等方面进行了论述,并讨论了当前采用植物组织培养这项技术,在污染控制方面存在的问题。

关键词: 组织培养;污染原因;污染控制

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

Reasons of Contamination in Plant Tissue Culture and Controlling Measures

ZHAO Chun-li, LI Jin-ying

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: According to problems of contamination in plant tissue culture, the causes of contamination, some effective approaches of controlling or reducing contamination were systematically pointed out in the paper. Some problems of contamination in current plant tissue culture were discussed.

Keywords: Plant tissue culture; Reasons of Contamination; Controlling of contamination

1 研究污染的意义

植物组织培养是20世纪初开始,以植物生理学为基础发展起来的一项植物繁殖技术。污染是组织培养过程中首先遇到的问题,且难以控制。不能把污染率降低到可以接受的范围,也就意味着这项工艺不能进行下去。因此,控制污染成了组培中的首要技术^[1]。

污染是组织培养中普遍存在的问题。在植物快速繁殖过程中,培养基、超净工作台、接种室消毒不严或无菌操作不规范等均可导致污染的发生^[2]。另外,对于植物本身,特别是对那些在热带、南亚热带生长的植物,由于常年高温多雨,空气湿度大,在植物茎叶表面容易滋生大量的微生物,甚至一些菌丝体侵入表皮内的薄壁组织,不能被一般的表面消毒方法所清除,随材料带入培养过程,引起内生菌的污染^[3]。这些都严重影响了组培苗的商业化生产。因此,研究微生物污染的种类、来源、

消毒方法以及一些抑制剂的筛选,对减轻微生物造成的污染,提高培养成功率和培养物的成活率,降低成本,提高经济效益等都有重要意义^[4]。

2 影响污染的关键因素

影响污染的因素有很多,概括起来主要有两方面:一是植物本身带菌(简称外生菌)所造成的污染。外植体带菌是不易清除的,特别是外植体内部所带的菌(简称内生菌),特别难消除。二是组织培养工艺过程中的各个环节操作不当或不严格而带菌^[5-6]所导致的污染。具体分析起来有以下几方面的污染因素。

2.1 外生细菌

外生细菌的症状是在初代培养中,表面细菌引起的污染通常在2~3 d就能在外植体周围或培养基表面形成明显的水污状、油污状、气泡或干缩的红、黄或乳白等颜色的菌落。

2.2 内生细菌

2.2.1 内生细菌污染的种类

在组培中,由于材料内部(细胞或细胞间)的内生菌不能被一般的表面消毒方法所清除,随材料带入培养过程引起污染称内生细菌污染或内源细

收稿日期:2010-08-16

作者简介:赵春莉(1973-),女,硕士,讲师,主要从事植物组织培养、园林植物栽培教学科研等。

菌污染^[7]。内部污染问题包括病毒、类病毒以及其他需要复杂营养的原核生物，后者包括与植物有关的细菌以及无细胞核的原核生物及寄生于维管组织中的细菌。它们可以是潜伏的，分布也比较广，木质部、韧皮部、局部或全身。

从以前的报道看，已经被鉴定的内生细菌的种类主要有：黄单胞菌属(*Xanthommonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等等，具体见表 1。

从表中可以看出，内生细菌的种类非常多，但

表 1 在组培中已经报道的部分内生细菌种类^[8]

植物属、种	内生菌属、种	文献
长春蔓	黄单胞菌属	瞿建中
野百合	土壤杆菌属	何云芳
大花天竺葵	天竺葵黄单胞菌属	Barrett
白鹤芋属	芽孢杆菌属	
萱草属	植物乳芽孢杆菌属	Leifert
墨西哥桔属	棒杆状菌属	
翠雀属	腐生葡萄球菌	
	假单胞菌属	
合果芋属	小麦拉氏杆菌	凝结芽孢杆菌
	深褐芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌
马铃薯	荧光假单胞菌	棒杆状菌属
薯蓣属	沙雷氏菌属	肠杆菌属
	黄单胞菌属	短小杆菌属
	假单胞菌属	
欧洲榛	放射型土壤杆菌	荧光假单胞菌
	黄单胞菌属	肠杆菌属
	乳黄杆菌属	产碱菌属
马蹄莲	欧文氏菌属	
美洲榆	浸麻芽孢杆菌	Ruiz Schreiber

引起内生细菌污染的内生细菌种类远不止上表所列。目前在各种农作物和果树等经济作物等大多数植物中发现的内生细菌已经超过 129 种 (隶属 54 个属)之多。

2.2.2 植物内生细菌污染的症状及其危害性

2.2.2.1 症状

内生细菌的症状是在外植体培养后 3~5 d 内未发生细菌污染，但以后会不断地出现明显或不明显的细菌菌落，这种情况就有可能是由内生细菌引起的污染。

2.2.2.2 危害性

内生细菌引起的危害较多，主要包括：导致早期培养的失败，引起增殖效率的降低，培养物生长减缓，玻璃苗增加等等。并在后期导致试管苗移栽的困难甚至死亡，有报道说有时污染也会引起培养物遗传变异，但也有报道说一些潜在污染并不影响培养物增殖^[9-10]，这有待于进行进一步的研究工作，从而得出结论。

2.3 接种用具

植物组织培养中的器具包括：镊子、剪刀、刀片、三角瓶、培养皿、封口膜等，污染的原因有时是这些器具灭菌不彻底，操作时要注意器具的灭菌要到位，另外超净工作台滤布不洁也会造成污染。

2.4 培养基

培养基的污染表现为接种前后培养基出现大

量污染^[11]。若菌落只存在于培养基表面且多为真菌时可能是由于瓶塞不严或扎瓶口的橡皮筋松弛，或放置培养基的空气环境中孢子过多；如果菌落存在于培养基内则很可能是由于各种贮存母液的污染而引起的；另外，培养瓶不洁净或灭菌不彻底也会导致培养基在未接种前即有大量污染。

2.5 培养环境

植物组织培养中的培养物的培养环境大体可以分为外部环境和内部环境两个大环境。

2.5.1 外部环境

组培室在公路边、工矿区、垃圾场和集市等附近，污染源多、杂，难以控制。

2.5.2 内部环境

组培室、接种室门窗封闭不严，给苍蝇、飞蛾、蜘蛛等的进入创造了条件，有利于杂菌传播，同时室内尘埃多，若不经常清洁消毒，将会使细菌增多。

2.6 无菌操作过程

在植物组织培养过程中，能够熟练掌握无菌接种操作的各个技术环节，是控制污染的重要措施。这就要求操作人员在进行操作之前，要认真学习有关无菌操作技术规程方面的知识。

3 控制污染的措施

针对上述不同的污染原因，在植物组培过程

中,应注意以下几点无菌操作环节,严格控制污染的发生。

3.1 培养材料的灭菌^[12]

培养材料的灭菌是植物组培工作中的重要环节,它既要求将外植体表面的微生物彻底杀死,又要求尽可能少伤害外植体组织和表面细胞。

3.1.1 材料的预培养

若用植物茎尖、叶片等作外植体时,为降低污染,可在室内或无菌条件下对枝条先进行预培养,即枝条用水冲洗后插入无糖营养液中,使其发枝,然后用新抽的嫩枝作外植体。

外植体灭菌通常分 4 大步骤:清洗外植体、70%乙醇灭菌、0.1%升汞灭菌、无菌水漂洗。若材料灭菌比较容易,则不需用乙醇灭菌。

经过以上的处理,在实验中污染率可控制在 10%以内,有时可达 5%以下,此杀菌过程具有一定的普遍性。

材料消毒措施的力度越大,灭菌就越彻底,污染率就越低,但要注意防止材料受伤害^[13]。

3.1.2 多次灭菌法

多次灭菌是指将培养几天的培养物进行重新灭菌,再进行培养,或利用多种药液多次浸泡法,尤其是木本植物等难以消毒的材料可以采用多次灭菌法,这样可以大大加强灭菌效果,减少污染率。

3.1.3 培养基中添加抗生素

植物组织培养中的灭菌只能消除材料表面的病菌,而其内部所带的细菌和霉菌等杂菌却难以对付,有关方面报道,解决此问题的有效办法是在培养基中添加抗生素。这样的抗生物质有链霉素、青霉素、地霉素、夹竹桃霉素和新霉素等物质,其应用浓度依不同培养物的不同而不同。

3.2 器具、器材与培养基的灭菌

这方面主要包括:器具清洗与灭菌、控制母液污染、控制母液污染、器具与培养基湿热灭菌、瓶塞松紧和大小要适中、掌握无菌操作的技术环节以及培养室的消毒与污染控制等等。

4 讨 论

4.1 在组培过程中不管采取哪种措施,都既要保证防止污染的效果良好,又要经济实用,同时还不能与外植体进一步增殖分化生长相矛盾,也就是一方面既要消灭材料上的病菌,同时又要保证材

料不受损或者只是轻微损伤组织材料,而不影响其生长,力求从各个环节控制致变因素^[14],但不同植物不同部位的组织,有其不同的特点,对消毒剂敏感反应也不同,因此开始要进行摸索试验,以达到最佳的灭菌效果。

4.2 在大规模微繁期间,即使外植体在一开始进行了严格消毒,某些慢速生长的病原菌可能依然存在,但只有在培养物经过多次继代之后,这些污染物才表现出来并被人们所发现。污染物的长期存在会引起试管苗生活力下降,叶片缺绿,甚至死亡。在培养基中加抗生素或杀菌剂有可能控制这些污染物的进一步扩展,但不可能杀灭这些污染物。所以最好的办法还是从未受病原菌侵染的或已经过脱毒检验的植株上切取外植体^[15],这样能大大降低污染率,从而达到相对令人满意的效果。

参考文献:

- [1] 吕校石,杨建民.椴树组织培养中污染控制技术初步研究[J].河北林果研究,2004,19(1):1-5.
- [2] 周俊辉.植物快速繁殖技术中存在的问题与对策[J].仲恺农业技术学院学报,1999,12(4):30-32.
- [3] 邱坚锋.热带地区植物组织培养中污染的控制[J].热带林业科技,1987,32(6):72-75.
- [4] 周俊辉,李宏彬.植物组织培养中污染的鉴定与防止初步研究[J].微生物学杂志,2002,22(2):53-55.
- [5] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [6] 王彭伟.肾蕨组培快速繁殖的研究[J].北京林业大学学报,1998,20(2):107-109.
- [7] Leifert C,wites WM.Contaminants of plant tissue cultures[J].Int. Assoc. Plant Tissue Culture News,1999,12(4):64-70.
- [8] 周俊辉,周厚高.植物组织中的内生细菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47.
- [9] Seyring M.Detection and identification of endophytic bacteria in plant tissue cultures of *Primula vulgaris* Huds[J].Gartenbauwissenschaft,1998,63(1):27-33.
- [10] Lozoya Saldana H,Picata L M,Borbor Ponce MM,et al.Biotic contamination of in vitro coffee (*Coffea arabica* L.)collections[J].Revista Mexicana de Fitopatologia,1991,9(2):76-80.
- [11] 赵佐敏,艾勇.植物组织培养过程中的污染原因及控制措施[J].贵州农业科学,2004,32(1):61-62.
- [12] 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):444-449.
- [13] 肖显华,王顺珍.植物材料表面消毒方法的改进[J].生物技术,1999,9(1):43-45.
- [14] 陈桂芳,娄利华.植物组织培养中几个常见的技术问题[J].重庆林业科技,2003(4):50-51.
- [15] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业出版社,2002:272.