

植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒

胡凯 张立军*, 白雪梅 崔玉娜 阮燕华 (沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳110161)

摘要 归纳了组织培养中污染原因及不同污染原因所造成的表现现象, 并概括了解决外植体引发污染的方法。

关键词 植物组织培养; 污染; 外植体; 灭菌

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00680-02

Analysis of the Cause of Contamination and Explant Sterilization in Plant Tissue Culture

HU Kai et al (College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract The main focus in this article was to summarize the reasons of contamination, the apparent phenomena of different causes of contamination, and the method how to prevent the contamination from the explant in plant tissue culture.

Key words Plant tissue culture; Contamination; Explant; Sterilization

从德国植物生理学家 Haberlandt 1902 年提出设想到现在, 植物组织培养的研究已有 100 多年的历史, 近几十年来植物组织培养技术发展最为迅速。然而植物组织培养一些技术环节仍然存在不少问题, 其中污染、褐化、玻璃化被认为是组织培养的三大杀手。与褐化、玻璃化相比污染更易发生, 给科研和生产实践带来巨大的危害。因此采取有效的防控措施, 降低污染发生的机率, 是组织培养成功的重要保障。在众多污染途径中, 外植体携带微生物污染组织培养是最常见且不易解决的问题。笔者通过对相关文献的分析, 并结合实践, 归纳了组织培养过程中引起污染的原因及各种污染的表现现象, 提出解决外植体引发污染的措施。

1 污染的原因及其表现现象

污染就是在组织培养过程中微生物进入培养体系, 在外植体上、外植体周围的培养基以及培养基的其他部位生长。由于植物组织培养过程中的温度、湿度、营养、pH 值等适宜微生物的生长, 因此一旦微生物进入培养容器中就将快速繁殖, 通过营养竞争、侵蚀植物材料、分泌有毒代谢产物等途径使植物材料发生病害或死亡, 造成组织培养的失败。造成污染最常见的微生物是细菌和霉菌, 有时也可以是酵母菌。主

要细菌有: 棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*); 主要霉菌有: 地霉属 (*Geotrichum*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、毛霉属 (*Aspergillus*)、根霉属 (*Rhizopus*) 等(周俊辉等, 2002)。

造成污染的原因很多, 从时间角度可以将污染发生原因归纳为 3 个阶段: 前期准备阶段。包括培养基灭菌不彻底、器皿的灭菌不完全, 外植体的选择不当与消毒不彻底; 无菌操作阶段。包括无菌操作室灭菌和超净工作台有问题, 操作不规范, 操作工具的消毒不彻底等; 培养阶段。培养环境不清洁和培养体系意外开放等。

组织培养中, 是否污染通常通过观察培养过程中培养基是否出现菌落来判断。不同成因造成的污染表现现象大多存在差异。通过对同批培养材料的菌落位置、菌落数、出现时间的观察, 即可初步判断出污染的原因。例如, 对于培养阶段中的污染, 虽然发生时间不确定, 但是组织培养周期一般在 30 d 左右, 因此在前 2~3 d 污染发生的概率比此后的概率低得多, 一般在培养较长时间后才观察到菌落的出现; 而超净工作台或操作人员导致的污染则在培养几天后即可观察到, 因此可以根据不同的污染表现现象寻找到污染的成因(表 1)。

表 1 不同污染原因的表现现象

污染原因	菌落位置	单个容器 菌落数	出现时间 d		同批培养污染情况	
			细菌	真菌	污染瓶数	发生时刻
培养基	培养基表面和内部	多个	1~2	3~5	几乎全部	同时
外植体外生菌	外植体周围	1 个或几个	1~2	3~5	多数	同时
外植体内生菌	外植体周围	1 个或几个	3~5 d 以后	5 d 以后	多数	零散
接种器具	外植体表面或近周	1 个或几个	1~2	3~5	少数	同时
超净工作台或操作人员	外植体以外	1 个	1~2	3~5	少数	同时
培养阶段	外植体以外	1 个	2 d 以后	3 d 以后	少数	零散

需要说明的是表 1 中的判断标准并不是绝对的。例如, 1 个外植体带入的污染可能不只是 1 个菌体而是多个菌体, 会形成多个菌落, 但最后菌落相连, 表现为 1 个菌苔; 有时污染是几个原因叠加的结果, 所以表现现象会比表中所列出的现象复杂得多。

2 外植体消毒

2.1 选择好外植体 外植体也就是组织培养的材料。外植

体表面和内部常携带一些微生物, 是组织培养过程的主要污染源, 外植体污染也是组织培养中众多污染途径中最难解决的一个。为了减少外植体导致的污染, 应该选取合适的材料, 尽可能选取带菌少以及不携带内生菌的外植体。选取胚和无病害的茎尖等, 减少携带内生菌的机率; 不同季节外植的带菌情况不同, 选择适合的季节采集外植体, 可以减少污染; 将有土栽培改为无土栽培, 减少植物携带微生物的机率; 将室外的植株在移栽入清洁的室内, 生长一段时间后, 再取外植体。

2.2 选择合适的消毒方法 对于大多数外植体只需要进行

作者简介 胡凯(1980-), 男, 辽宁丹东人, 硕士研究生, 研究方向: 植物细胞工程。* 通讯作者, 博士, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2006-10-26

表面消毒即可,而有些外植体由于具有内生菌,为达到较好的灭菌效果除需要进行表面消毒外还需要其他处理。

表2 常用消毒剂及其使用

消毒剂	使用浓度	灭菌时间 min	残液去除难易
氯化汞	0.1% ~1%	2 ~10	最难
次氯酸钙	9% ~10%	5 ~30	易
次氯酸钠	2% ~5%	5 ~30	易
乙醇	70% ~75%	1 ~3	易
过氧化氢	10% ~12%	5 ~15	最易
漂白粉	饱和溶液	5 ~30	易
抗生素	4 ~50 ng/L	30 ~60	较难

2.2.1 对外植体表面灭菌。外植体表面灭菌的关键是选择合适的消毒剂和消毒时间。因为消毒剂不仅杀灭微生物,也对外植体产生一定的伤害。例如氯化汞的杀菌能力最强,最为常用,但它对外植体的伤害也最大,不易去除。不同植物或同一植物不同外植体消毒的方法是不同的,为达到满意的灭菌效果,需要根据外植体的情况,选择合适的消毒剂,摸索出合理的消毒时间(表2)。消毒剂的种类和消毒时间的长短并不局限于表2所列,如焦立为等(2002)用臭氧对橡皮树带有顶芽的叶片进行消毒,结果表明,臭氧用于外植体消毒灭菌的效果很好,接种20 d后,污染率为0%,且顶芽有鳞叶包被接种后的成活率极高;Abdul Qayyum Rao等(2006)采用0.1% $HgCl_2$ 对棉花种子表面消毒时,采用较长的灭菌时间,种子在消毒液中浸泡20 min,超出表2中的时间范围,但不会对种子造成伤害。

外植体的表面灭菌中,常用的消毒剂使用方法有:单一消毒剂灭菌。即只用1种消毒剂对外植体进行消毒;联合消毒剂灭菌。使用1种消毒剂对外植体消毒一段时间后,再将外植体转入另一种消毒剂中进行消毒,最常见的联合消毒剂灭菌是使用酒精—升汞和酒精—次氯酸钠;混合消毒剂灭菌。就是将2种或几种消毒液混合后,对外植体进行消毒;联合与混合并用。刘香玲等(2005)在进行水稻组织时,使用混合消毒剂对水稻种子进行灭菌,将水稻种子去壳后,先用70%酒精消毒1 min,再用0.1%升汞和2%NaClO(1:1)的混合消毒液浸泡20 min。

2.2.2 对携带内生菌的外植体消毒。对于容易携带内生菌的外植体消毒要比表面消毒复杂得多。主要方法:在外植体表面消毒前,采用超声波、热击等物理方法处理后再进行表面消毒。例如,G.M.G.M.Hd等(1992)以水仙的鳞茎为外植体进行组培时发现,采用1%的次氯酸钠对其进行灭菌时,当灭菌时间为30 min时,污染率为40%~60%;将灭菌时间

延长为2 h甚至4 h后,仍然不能降低污染率;而在使用消毒剂前用热水浸泡,可以将污染率降低到5%。在消毒液中添加表面吸附剂吐温20。任敬民等(2004)在对台湾青枣组织培养的消毒方法的研究中发现,在0.1%升汞中加入3~5滴吐温20的消毒效果要优于不添加吐温20的消毒效果。

在培养基中添加抗生素来防止污染。郑永强等(2003)在生姜组织培养研究中发现,在初代培养时采用剥离至茎尖仅剩3~4叶原基进行表面消毒后,接种于含25~50 ng/L的硫酸链霉素和硫酸卡那霉素混合液防止污染效果较好,在继代培养过程中培养基中抗生素浓度达25~50 ng/L,污染的培养基基本表现无菌状态。在使用抗生素时要有针对性地选择抗生素的种类和使用浓度,一种抗生素可能只对1种或几种微生物有效;浓度低了效果差而浓度高又容易对植物产生毒害(周俊辉等,2003)。

对于污染严重的并且尚不能摸索出有效灭菌方法的外植体,在组织培养中,尽可能减少单位培养容器中外植体的个数,每个培养容器中可以只接入一个外植体,这样可以获得相对大的无污染几率。

3 结束语

组织培养中污染的发生是极其普遍的。如何有效的防治污染,成为组培工作的重点。笔者通过实践发现,大多数由不同成因造成的污染,其表现现象是有区别的,将污染后的表现现象与造成污染的原因对应起来,有利于快速找到导致污染的原因,然后采取针对性措施加以防治,就可以减少逐个环节排查的大量工作。特别是在一些组织培养生产中,培养程序化,一旦发生重复性污染,往往是某个固定环节的失误造成的,通过观察污染的表现现象,可以快速寻找到导致污染的原因,这样可以大大节省人力和成本。

参考文献

- [1] 周俊辉,李宏彬,杨耀强,等.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.
- [2] 焦立为,黄克梅,焦立群.植物组织培养前用臭氧对外植体进行消毒灭菌的效果初探[J].植物生理学通讯,2002,38(5):466.
- [3] ABDUL QAYYUMRAO,S SARFRAZ HUSSAIN,MSAQB SHAHZAD,et al. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton(*Gossypium* Spp.) [J]. J Zhejiang Univ Sci B,2006,7(4):291-298.
- [4] 刘香玲,王玉珍,罗景兰.水稻成熟胚愈伤组织的诱导和分化因素的研究[J].山东农业科学,2005(5):7-9.
- [5] G M G M H D, P C G VAN DER LINDE. Reduction of contamination in bulb explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 31(1):75-79.
- [6] 任敬民,陈跃进,郭丽明.台湾青枣组织培养的消毒方法[J].湖北农业科学,2004(1):65-68.
- [7] 郑永强,刘艳梅,徐坤.生姜组织培养污染率控制研究[J].生物技术,2003,13(6):38-39.
- [8] 周俊辉,周后高,刘花全.植物细胞培养中内生菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47.