

汤雪燕,赵统利,邵小斌,等. 植物组织培养的污染防治[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):50-52.

植物组织培养的污染防治

汤雪燕,赵统利,邵小斌,朱朋波,刘兴满,孙明伟,徐燕

(江苏徐淮地区连云港农业科学研究所,江苏连云港 222006)

摘要:植物组织中普遍存在内生菌,当植物组织进行离体培养时,这些内生菌就会产生污染。污染是植物组织培养中经常遇到的问题,且很难控制。本文论述了植物组织的污染防治方法,并讨论了抗生素使用的效果、稳定性、注意事项以及对污染原因的判断、污染苗抢救,以减少组织培养中的工作量,从而提高经济效益。

关键词:组织培养;污染;防治;杀菌剂

中图分类号: Q945.52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0050-02

广义上植物组织培养是在人工控制条件下,把植物的单个器官、组织或细胞从植物体分离后置于适宜营养和环境条件下,使之继续生长、分化并发育成完整再生植株的培养技术。近年来,植物组织培养作为一种生物技术已渗透到与之相关的农业、林业、医药等领域的多个学科,为这些学科的发展提供了研究手段与理论基础,同时创造了丰厚的经济效益。虽然组织培养的操作并不难,但对一些技术环节的要求却十分严格,稍有疏忽便会延误试验进程,甚至导致整个试验失败。利用组织培养进行工厂化育苗时如发生污染,轻者影响繁殖计划,影响当季生产,重者造成珍贵品种丢失,组织培养体系瘫痪。本文分析了组织培养工作中的污染防治问题,以期减少组织培养中的工作量,从而提高经济效益。

1 植物组织培养中污染的来源

植物组织培养污染主要是由霉菌、细菌、酵母菌引起的污染。菌类传播途径有户外风传播、涡流传播、接种传播,不正确操作也会增加污染概率,如灭菌不够、操作过慢,另外还有内生菌造成的潜伏性污染^[1]。有些植物上昆虫、螨虫的体表带有霉菌的孢子、细菌,在9—10月份是重要污染源,此时大量昆虫造成的污染源最易造成组织培养污染的严重发生。

2 植物组织培养中污染的防治

2.1 细菌污染

2.1.1 细菌污染定义 细菌是处于生物和非生物之间的微生物。从形态上看,细菌可以分成球菌、杆菌、螺旋菌等3类。土壤、水、城市空气里都有细菌散布,种类达50种以上^[2]。

细菌污染是指在培养过程中,在培养基表面或材料表面出现黏液状物体、菌落或浑浊水迹状物质,有时甚至出现泡沫发酵状物质。细菌污染又以芽孢杆菌污染最普遍、最严重,这

种芽孢杆菌能耐一定高温、高压,对消毒剂和紫外线也有一定抗性,常由于高压灭菌不彻底造成污染。细菌性污染主要是工作人员使用了未经充分消毒的工具如剪刀、镊子、三角瓶等,或是由呼吸排出的细菌,有时操作人员用手接触材料或器具边缘,使微生物落入培养基中,有时也会因剪取带菌材料后没消毒,用具又未彻底灭菌,极易造成污染。另外,由于组织培养室面积大、易污染,室内温度高,空气湿度大,菌类繁殖旺盛也会加重污染^[3]。

2.1.2 细菌污染防治 为了实现低污染率,在组织培养中除采用常规技术措施之外,还针对性地在培养基中加入杀菌剂如抗生素。抗生素作用原理:庆大霉素、链霉素属于氨基糖苷类型,其与细菌中的30S核蛋白体亚单位结合,抑制细菌的脂肪酸甘油酯合成,通过阻断其代谢途径使微生物致死。但抗生素也可能抑制植物组织的叶绿体和线粒体蛋白质的合成,导致植物叶片变小或变黄^[4],而且高浓度抗生素会影响植物生长。在培养基中添加抗生素,选择合适浓度非常关键,浓度低时效果差,浓度高时又容易对植物产生毒害,影响增殖或使培养材料变黑,出现死苗、白化苗等。

将2种及其以上的抗生素结合使用,可以防治细菌的抗药性。韩美丽等在绿巨人组织培养研究中探讨了青霉素、先锋霉素、庆大霉素对继代培养中细菌污染的抑制效果,指出先锋霉素的抑菌效果最好,青霉素和庆大霉素次之^[5];翟建中等研究发现,链霉素能防治长春蔓芽继代培养中出现的细菌^[6]。但也有报道发现,多数情况下使用抗生素只能抑制细菌生长而不能将其杀死^[7],抗生素浓度太高对植物有一定毒害作用,而且抗生素一般不稳定,遇酸、碱或加热易分解而失去活性,这些问题使抗生素的使用受到限制^[8]。因此,寻找稳定、耐高温和高压的理想抗生素成为控制细菌污染的一个重要课题。

2.2 真菌污染

2.2.1 真菌污染定义 真菌是一类没有叶绿素、异养的真核微生物。室内真菌种类主要有芽枝孢霉属、曲霉属、铰链孢霉属、镰刀霉属、青霉属等。真菌以腐生、寄生或共生的形式进行营养性生活。真菌数量与温度、湿度有很大关系。春季、夏季尤其是南方的梅雨时节,温暖潮湿,非常适合真菌生长。冬季室内真菌浓度较高,如果长期使用空调而不注意通风,可引起室内真菌污染加重。真菌污染出现很快,一般接种后3~

收稿日期:2013-05-08

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(10)115、CX(13)3014];江苏省连云港市科技攻关项目(编号: CN1203);江苏省六大人才高峰项目。

作者简介:汤雪燕(1983—),女,江苏江阴人,硕士,助理研究员,主要从事植物营养及花卉研究与技术推广工作。Tel:(0518)85803250;E-mail:3202txy@163.com。

5 d 就发现菌丝,继而很快出现黑、白、黄、绿等孢子。真菌污染一般是由空气污染、瓶口边缘和取放封口纸扬起的灰尘、真菌孢子落入器皿中造成的。

2.2.2 真菌污染防治 常用的灭菌剂有 70% 乙醇、0.1% ~ 1% 氯化汞、3% ~ 10% 过氧化氢、1% ~ 10% 的漂白粉滤液、0.5% ~ 10% 次氯酸钠溶液、4 ~ 50 mg/L 抗生素。70% 乙醇杀菌效果好,有润湿作用,能排除外植体表层组织的空气,但穿透力强,应严格控制灭菌时间;氯化汞对外植体表面的灭菌效果最好,但残留的重金属汞难以去除,其毒害作用在培养一段时间后才能表现出来,因此灭菌后要将材料冲洗干净;过氧化氢分解后生成有杀菌作用的氧气,无毒害^[9];漂白粉杀菌效果很好,但须避光、干燥贮存;次氯酸钠可分解生成有杀菌作用的氯气而挥发;抗生素用来去除材料内部组织所带菌类,但抑菌类型单一、药效时间短、稳定性差,容易使菌类产生抗药性,浓度高时影响植物生长,使其应用受到限制^[10]。为使灭菌剂能润湿整个组织表面,可在灭菌剂中加入数滴润湿剂吐温-80 或吐温-20,可起到良好的灭菌效果^[11]。

严格执行无菌操作,定期用甲醛及高锰酸钾熏蒸对组织培养室消毒。每次使用组织培养室或超净工作台时,先用紫外灯杀菌 20 ~ 30 min,再用 75% 乙醇喷雾降尘。接种时用 75% 乙醇的棉球擦拭培养瓶外部,然后再放入超净工作台;接种时瓶子要放成 45° 角,放在火焰上方,利用气流上升原理,以防止空气中的孢子落入瓶内,取封口纸时动作要轻。另外,如发现霉菌污染应及时清除。对于外地引进的试管苗,运输过程中瓶口及封口纸往往积灰尘和孢子,应仔细用 75% 乙醇擦拭,接种时再烧瓶口,否则容易造成污染。为防止刚引进的材料、刚获得的无毒材料以及珍贵材料受到污染,用小培养瓶培养,每瓶转接 1 芽,虽然培养瓶数量增加,但这是防止稀缺材料污染损失的最有效途径^[12]。

有关抗生素消除细菌的研究较多,但目前对酵母菌污染的研究相对较少,Poulsen 等在苹果分裂组织微生物消除的研究中,测试了几种物质对酵母菌的毒性,虽然这些物质对植物材料都没有伤害,但没有一种物质能够消除酵母菌。胍类化合物是唯一对 2 种酵母菌有毒的复合物,但它对分裂组织有毒害作用。霉菌污染的一个重要特点是迅速、难控制。目前关于真菌污染的研究还很少,有人建议用防腐剂去除真菌污染,但有关研究尚未见报道。

另外,培养基中存在有机物是污染产生的重要原因,去除有机物也是减少污染的一条途径。宋锋惠等在阿月浑子组织培养的研究中,除去培养基中的 VB₁、VB₆、烟酸等有机成分(保留肌醇),经 2 ~ 3 代培养后,能抑制细菌生长,对丛生芽生长增殖没有影响。原因是这些有机成分是某些细菌生长的必需物质,除去这些有机物后,细菌无法生长发育而逐渐死亡^[13]。日本古在丰树首创的植物无糖组织培养快繁技术则完全除去了培养基中的有机成分,输入可控制量的 CO₂ 气体作为碳源,并通过控制环境因子,促进植株光合作用速率,使之由异养型转变为自养型,因而植株长势良好,污染率明显降低^[14]。由于去除了糖,组织培养苗由玻璃瓶内培养改为箱式大容器培养,也可将整个培养室作为培养容器,甚至不需要严格的无菌操作,也极少被污染,这项技术至少在许多植物组织培养苗的促根阶段应用比较成功。

3 植物组织培养中污染原因判断及污染苗抢救

3.1 污染原因判断

如果污染菌类是零星分散在培养基中,则可确定是人为引起的污染。如培养基、接种用具灭菌不彻底;接种室长期不灭菌,接种台摆放物品杂乱,菌类太多;超净工作台长期未换滤网,使净化能力降低;工作人员操作不正确,动作生硬缓慢,开瓶时间过长,操作中心在人体范围内。

如果污染菌类是从材料周围长起,则证明是植物材料带菌引起,可能是接种工具灭菌不彻底,接种时材料被污染;或是未及时发现污染苗,接种过程中交叉感染。

如果污染菌类是从培养基以上部分长起,而不是先从培养基长起,且发生在 5 d 以后,则说明是材料自带的内生菌。

如果污染菌类是从培养基以下开始长菌,发生时间较早,且有从里向外发展的趋势,则说明是切口引起的污染,原因是灭菌后未剪去 2 个切口或虽剪切口但器具带菌。

3.2 污染苗抢救

细菌被污染后,由于细菌繁殖靠芽孢,细菌不会弥散整个空间,因此只要及时发现,将材料上部未感菌部分去除转接,材料仍然可以用;但若真菌被污染,则必须经高温、高压灭菌后扔掉,即使仅形成菌丝,因为菌丝能到达材料内部,真菌污染是灭绝性的。

用抗生素等杀菌剂处理,虽有不少报道,但至今未发现有抗生素能对各种菌都有效,并且常会影响植物材料的正常生长分化。有的另一些药剂虽杀菌效果好,但往往容易引起盐害,无法利用。

对已污染的培养物,有时因植物材料难得或重新发生要花费很多时间,也可切取较大植株重新消毒接种。李春燕等分别用 400 万、600 万单位/L 青霉素无菌水溶液浸泡银白杨组织培养细菌污染苗 40 min 以上,可有效防治组织培养中的细菌污染。处理过的苗继代培养时,不再重复出现细菌污染现象,且苗分化能力强,生根培养时根系发达,移栽成活率高^[15]。李颖等研究证明,如果继代培养中只有真菌污染,采用 3% 多菌灵无菌液浸泡 0.5 h 以上即可,用无菌水冲洗后接种或不用无菌水冲洗直接接种都可消除真菌污染。如果在细菌污染和细菌、真菌同时污染的情况下,可采用 HgCl₂ 消毒法把污染培养苗切割成较长茎段作外植体,用自来水冲洗 0.5 h,再在超净工作台上用乙醇和 HgCl₂ 进行短时间处理,即可再度建立无菌苗培养体系^[16]。

4 结论

传统组织培养过程繁杂的技术环节都是围绕防止污染而制定,控制污染成为组织培养中的首要技术,而植物组织培养污染的控制取决于灭菌技术、灭菌设备、外植体年龄、环境条件等诸多方面。尽管在植物组织培养过程中尽量使无菌条件更完善,但污染还是经常发生,甚至有时整个实验室的组织培养苗突然被污染而全部死亡,造成巨大损失,因而人们对细菌污染研究较多。有些研究人员希望用抗生素防治细菌污染,抗生素可以被直接加入到培养基中,也可以用抗生素喷洒或浸泡外植体。总之,针对不同植物品种要想找到一种合适的抗生素处理组合比较困难,工作也较繁琐。一般认为,没有一

陆玉建, 刘俊华, 王书平, 等. 本生烟草愈伤组织的诱导和再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 52-54.

本生烟草愈伤组织的诱导和再生体系的建立

陆玉建¹, 刘俊华¹, 王书平¹, 高春明¹, 刘晓君², 任宇灵³

(1. 滨州学院生命科学系/山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心, 山东滨州 256603;

2. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610065; 3. 山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

摘要:以本生烟草为材料,研究了不同激素组合对本生烟草愈伤组织诱导和植株再生的影响。结果表明:当本生烟草叶片在 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L KT 培养基中培养时,其出愈率最高,愈伤组织生长状况最好;在 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中不定芽生长最快,但存在一定程度的玻璃化现象;MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中不定芽长势较慢,但玻璃化程度较轻;对于生根诱导,MS、1/2MS 培养基都可诱导不定根的产生,但 NAA 对根的生长更有效。

关键词:本生烟草;愈伤组织;不定芽;诱导;再生体系

中图分类号: S572.043;Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0052-03

烟草是重要的经济作物,常被作为基因工程和分子生物学研究中重要的模式植物^[1-5]。目前烟草遗传转化研究多用普通烟草 (*Nicotiana tabacum*) 作为受体,而对本生烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 的研究相对较少。本生烟草和普通烟草有密切的亲缘关系^[6-7],由于其植株矮小,生长速度快,生命周期短,对植物病毒非常敏感,所以是基因功能分析和植物病害研究的重要工具^[4-8]。有关本生烟草转基因的研究也

见诸报道,通过在本生烟草中瞬时表达促红细胞生成素基因,能够生产重组蛋白-促红细胞生成素^[9]。利用本生烟草建立的质体转化系统,可以用来研究质体和细胞核基因间的相互作用,以及检测质体中相关基因的表达情况^[7]。研究表明,不同烟草品种的组织培养条件有所区别,如果完全按照普通烟草的培养方法培养本生烟草,容易出现外植体褐化、不定芽玻璃化等现象,并且很难获得再生植株^[4-5]。激素是植物组织培养中的关键因素,在建立本生烟草再生体系的整个培养过程中,激素的使用起到了非常重要的作用^[4-5,10]。因此,如何获得最佳的激素组合,成为建立本生烟草高效再生体系的关键。本研究探索了本生烟草愈伤组织诱导和植株再生的最佳条件,旨在为建立高效的本生烟草悬浮细胞培养体系和遗传转化体系奠定基础。

收稿日期:2013-05-17

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2012CL14);滨州学院博士基金(编号:2010Y08)。

作者简介:陆玉建(1979—),男,河南南阳人,博士,讲师,研究方向为植物生物技术。Tel:(0543)3190096;E-mail:luyujian79@163.com。

种抗生素对所有细菌都有效,即使有效,抗生素消除植物组织培养污染的方法也是暂时解决方案,如果为消除污染而长期使用抗生素,必然对组织培养苗的生长、分化、生根产生一定影响。随着科学技术不断发展和进步,将会出现更高效、节能的新设备、新技术、新方法应用于组织培养技术,从而有效控制污染发生。

参考文献:

[1] 叶深谋. 植物组织培养过程中的常见技术难题研究进展[J]. 韶关学院学报, 2010, 31(3): 84-90.

[2] 吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技, 2005, 32(1): 130-134.

[3] 李云. 林果花菜组织培养快速育苗技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001.

[4] Reed B M, Mentzer J, Tanprasert P, et al. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment[J]. Plant Cell, 2004, 87(1): 171-176.

[5] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳, 等. 绿巨人组培苗继代培养过程中玻璃化苗及细菌污染的消除方法研究[J]. 广西林业科学, 1999, 28(1): 16-19.

[6] 翟建中, 顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染菌的防除[J]. 森林病

虫通讯, 1999(4): 30-32.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 王利民, 周毅, 陈龙友, 等. 植物组织培养中消毒剂的运用[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2002, 20(1): 15-17.

[10] 王黎波, 李晓燕. 抗生素在植物组织培养中控制污染的应用[J]. 辽宁农业科学, 2007(3): 69-70.

[11] 纪纯阳, 矫丽曼, 刘巍, 等. 植物组织培养中污染产生的原因及防止措施[J]. 辽宁林业科技, 2011(2): 40-44.

[12] 郝云凤, 李可伟, 张培宏, 等. 植物组织培养操作过程中常见的污染问题及解决办法[J]. 内蒙古农业科技, 2004(增刊): 156-158.

[13] 宋锋惠, 李康, 史彦江. 阿月浑子组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 新疆农业科学, 2002, 39(6): 343-345.

[14] 肖玉兰. 植物无糖组培快繁工厂化生产技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003: 1-4.

[15] 李春燕, 李颖. 组织培养中青霉素对细菌污染的抑制作用[J]. 东北林业大学学报, 2000, 28(5): 97-98.

[16] 李颖, 李春燕. 多菌灵和青霉素在组培污染中的应用[J]. 林业科技, 2002, 27(1): 6-8.