

文章编号:1002-2724(2008)02-0022-02

安祖花组织培养污染研究

李志军¹, 刘志国², 徐强¹, 何睦³, 李明强^{4*}

(1. 青岛农业大学总务处, 青岛 266109; 2. 潍坊市农业科学院; 3. 山东大学后勤处; 4. 山东青岛国际旅游度假区)

摘要:针对当前植物组织培养中污染率过高,在科研和生产中造成人力、物力和财力巨大浪费的现状,对植物组织培养污染进行了系统的研究。试验结果表明:外植体各部位的菌类分布有一定的差异,新叶和芽带菌较少;培养瓶的瓶壁和封口纸都能携带污染菌,成为污染源之一。

关键词:安祖花;组织培养;污染

中图分类号:S722.3

文献标识码:A

Abstract: This article discusses the high pollution rate of plants in tissue culture, which has caused great loss in material and resources in scientific research and production. A systematic research has been made on the pollution of plants in tissue culture. The experimental results show that there are some differences in the various outer parts of bacterium with less on new leaves and buds. It also reveals that the bottle walls and sealing paper of culture bottles can carry germs that are one of the sources of pollutants.

Key words: *Anthurium andraeanum* Lind; tissue culture; contamination

安祖花 *Anthurium andraeanum* Lind 观赏价值、经济价值都非常高,但安祖花不易结实,且种子不易保存,常规的繁殖方法一般采用分株繁殖,但其肉质根系生长缓慢、分蘖力差,用这种方法难以满足市场的需求,组织培养被认为是商业生产中安祖花快速繁殖的最理想途径^[1]。但组织培养过程中的污染原因是妨碍其快速繁殖的主要原因之一。

针对此现状,本研究对安祖花组织培养过程中污染严重等问题,进行系统研究,分析产生污染的原因,希望找到一种适用于多种植物种类的方法,达到防治彻底、简单易行又不影响组织培养苗的生长分化的目标,以减轻组织培养过程中的污染率,为组织培养中控制污染的发生提供一定的理论参数和实践依据,促使组织培养技术得以普及推广。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料:安祖花2年生种苗‘火焰’。

1.2 试验方法

培养瓶各部位的菌类分布情况试验:在超净工作台上,对培养瓶的瓶壁(1)、瓶口(2)、扎线处(3)、内纸(4)、外纸(5)用无菌棉擦后,把无菌棉放在无菌水中冲洗,然后把PDA与处理后的无菌水混合制成平板放在35℃恒温箱中培养。每一个处理重复10次。培养4d后取出,计算菌落数。

植物体各部位菌类分布调查试验:将植物材料(幼嫩叶片、叶柄、成熟叶片、芽、根)用流水冲洗后,放在70%酒精中浸30s,再在0.1%升汞中浸7min。在超净工作台上常规接种^[2],接种后,放在培养室中培养,在5、10、15、20、25d后调查污染率和杀死率。污染率(%)=污染数/总接种数;成活率(%)=成活数/总接种数;死亡率(%)=死亡数/总接种数。

2 结果与分析

2.1 污染菌类的调查

对培室中的不同季节组织培养苗的污染菌类进行了系统的调查,调查结果如表1。

表1 不同季节组织培养苗污染情况

调查日期 (年·月)	细菌污染(瓶)		真菌污染(瓶)			污染率(%)
	红色	线黄色	青绿	黑	白	
2007.3	5	0	0	0	9	2.8
2007.6	0	0	5	30	53	49
2006.12	12	0	0	1	2	7.5

注:本表调查菌类为主要污染菌类,其他菌类不在统计范围内。每处理调查200瓶。

由表1看出,在一年四季中,细菌污染差别不大,主要为红色细菌的侵染,每个季节都受到了白色真菌的污染。二者的污染率以夏季最高,达到了49%。同时还看出,无论细菌污染还是真菌污染,大多数情况下都是单一菌种污染,混合污染瓶数较少。C. Leilert等通过对百合和飞燕草组织培养苗的微环境的调查,认为不同种类的组培苗形成了不同的微环境,这种微环境只能适于某种或某几种微生物的生长。大多数情况下是每次接种一种植物,如果有的培养瓶内存在了污染,接种时没有剔除,那就不可避免造成了单一菌种污染的扩散。造成组织培养污染的菌类很多,但在所调查的材料中常见的菌类主要为青绿色、黑色和白色的真菌以及红色和黄色的细菌,因此它们是重点防范对象。

2.2 污染源的分析及菌的分布

2.2.1 培养瓶各部位的菌类分布情况

收稿日期:2008-03-23

* 通讯作者

对灭菌后放在培养室中待接种的培养瓶分别进行瓶内壁、瓶口、扎线处、内纸、外纸等处菌类分布调查^[3],调查结果见图1:

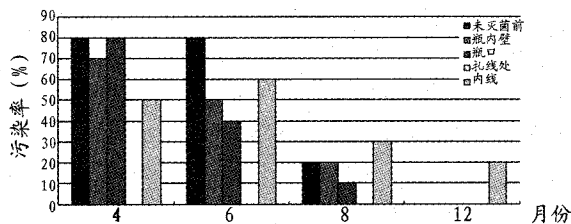


图1 培养瓶各部位菌类分布情况

从图1可以看出,经灭菌后的培养瓶在接种过程中产生的污染也是污染源之一。在4月份和6月份,瓶外壁的污染率都达到80%,带菌情况最严重,其次是外纸和扎线处;在8月份和12月份,外纸的平均污染率是25%,瓶外壁的带菌情况较轻,平均污染率为10%。封口膜的外纸带菌是因为培养瓶灭菌后在空气中重新污染造成的,当带菌的封口膜放在超净工作台上时,从超净工作台吹出的无菌风遇到封口膜容易形成涡流造成污染扩散^[4]。扎线处是阻止外界空气进入培养瓶的部位,此处气流交换非常缓慢,外界的菌类也相应地被聚集在此处。因此,在接种时,要尽量避免抖动封口膜以及接种材料和接种工具与培养瓶外壁的接触,小心操作,减少因培养瓶带菌而造成污染。

2.2.2 植物体各部位菌类的分布情况

本试验采嫩叶、叶柄、成熟叶片、根做外植体,每隔5d调查一次污染率和死亡率。

表2 不同植物体各部位做外植体的污染情况(2007年5月)

外植体部位	时间(天)									
	5		10		15		20		25	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
嫩叶	0	30	0	50	0	50	0	60	10	70
叶柄	10	10	10	15	10	20	20	20	20	20
成熟叶片	0	60	10	60	10	70	10	70	20	70
根	0	100								

注:表中A表示组织培养苗杀死率(%),B表示污染率(%)。——表示组织培养苗全部死亡。

由表2看出:用根作外植体,污染率最高,可达100%。原因可能是根在栽培基质中受低下害虫、病菌危害的机会较多,污染菌就容易通过这些伤口侵染到材料的内部,进行外植体表面消毒时不容易杀死材料内部的污染菌。

用幼嫩叶片和腋芽作外植体污染率相对较少。幼嫩叶片和芽在空气中暴露时间短,材料表面的污染菌还来不及侵入到外植体内部,外植体表面消毒时,容易将其彻底杀死。

根的杀死率是0,污染率却达到了100%。因此,在接种时,要根据试验条件,尽量选取所带污染菌少的新生叶和芽做外植体。

3 讨论

3.1 污染源的分析及菌的分布

通过对外植体各部位的菌类分布情况调查后发现,用嫩叶和芽做外植体时接种成活率高于用成熟叶片和根做外植体的接种成活率。因此,在接种时,应在条件允许的情况下,选用接种成活率高的部位做外植体。对培养瓶的瓶外壁、瓶口、内纸、外纸和扎线处的污染菌类进行了调查,经调查发现,培养瓶也是接种过程中的污染源之一。在4月和6月,瓶外壁的带菌情况最严重,其次是外纸和扎线处。因此,在接种过程中要尽量避免抖动封口膜和防止外植体接触瓶壁。培养瓶灭菌后,应尽快放入接种室备用。

3.2 植物组织培养苗污染的防治措施

植物组织培养苗的污染原因是多方面的,包括外植体本身带菌、环境灭菌不彻底、操作过程不严格等。因此,防止组织培养苗污染也应从多方面考虑,保证每个环节的正确进行。外植体材料一的表面或内部都有可能携带杂菌,这些杂菌与培养基接触后,就会很快的繁殖,致使组织培养生产造成重大的经济损失。影响无菌外植体建立的因素是多方面的,除了人为的因素以外,还与外植体的获取地点、季节和外植体的本身特性有关,所以选择合适的外植体对植物组织培养快繁是十分重要的。通常选取带菌较少的幼嫩的叶、叶柄、等材料做外植体。由于外植体材料本身的特性不同,有的外植体很难获得无菌组织培养苗。

对于少量试验材料的污染可以采用物理方法挽救污染组织培养苗。物理方法包括挖除污染培养基、转移未污染外植体和切除污染材料,这三种方法中切除污染材料的效果最差,造成这种结果的原因可能是在切除过程中容易产生操作污染。挖除污染培养基的方法比转移未污染外植体的方法更好一些。采用物理方法的关键是一定要彻底清除污染的部分,否则,就会前功尽弃。

4 结论

4.1 以叶、新芽、叶柄和根作外植体,接种成活率从高到低依次是叶、芽、叶柄和根。试验中所用的叶和叶柄都是新叶和新生叶柄,由此可见,外植体所带的污染菌类与外植体在空气中暴露的时间密切相关。

4.2 对培养瓶各部位的菌类分布情况调查发现,培养瓶的瓶外壁、外纸和扎线处是操作过程中重要的污染源。因此,培养瓶灭菌后,应尽快运送到接种室。在接种过程中,尽量避免抖动封口膜,动作要轻、快。

参考文献:

- [1]潘学峰,符式钦等.安祖花叶片愈伤组织的诱导与植株再生[J],海南大学学报(自然科学版),2000,18(2):144~149
- [2]肖显华,王顺珍等.植物材料表面消毒方法的改进[J],生物技术,1999,9(1):43~45
- [3]谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M],1997
- [4]潘瑞炽.植物组织培养[M].第2版.广州:广东高等教育出版社,2001