

植物组织培养中的污染成因及其预防分析

张清凤

云南省昭通市农业科学院 65700

摘要：随着生物技术的快速发展，植物组培生产技术在我国的农业中得到广泛应用，虽然植物组织培养技术的操作过程比较简单，但是对其中的某些环节有着严格的要求，一旦稍有疏忽，便非常容易发生污染问题，甚至可能造成实验失败。因此，在植物组织培养过程中应注意污染所带来的危害，并了解污染的原因，通过有采取相应的预防措施，及时防止污染问题的出现。本文阐述了植物组织培养污染预防的意义，分析了植物组织培养中的污染成因，然后从不同的方面对植物组织培养中污染的预防措施展开探究。

关键字：植物组织培养；污染成因；预防

前言：植物组织培养主要指的是在无菌的环境下对植物组织、细胞等进行人工控制，使其和植物体发生分离，然后借助培养基进行培养，并生长为完成的植株。通过利用植物组织培养技术有助于降低成产成本、缩减生长周期，并且为植物的生长提供良好的环境，在很大程度上防止了外部因素对植生长造成的影响。植物组织培养技术虽然具有较多的优势，但是在培养过程中很容易由于人为、材料带菌等产生污染，只有加强对污染成因的预防，严格按照相关规定进行操作，才能够更好地保证植物的正常生长。

1 植物组织培养污染预防的意义

在植物组织培养中，污染带来的危害非常大，在一定程度上阻碍了植物组织培养，比如降低生长速度和增殖速度，甚至造成植物死亡，导致实验失败，增加培养的成本，从而严重影响企业的经济效益。植物组织培养中污染的预防能够在很大程度上加快培养技术的进展，构建完整的植物基因库，有效地保护宝贵的实验样本数据。同时，在植物组织培养过程中会有很多比较珍贵的物种，它们不仅价值高，而且获取的难度较大，通过预防组织培养中的污染，能够有效地保护稀有物种。由此可见，植物组织培养污染的预防意义非常大，科研人员一定要提高对污染预防的重视度，加强植物组织培养过程中的污染防控工作，科学地进行植物组织培养工作。

2 植物组织培养中的污染成因

2.1 外植体带菌

外植体培养主要是把植物的组织与植物体分离开，然后在植物体外进行培养，外植体对植物组织培养非常重要，其自身携带的病原菌很难清除干净，且空气中的大量微生物通过只植物的孔口进入植物内部，或者是一些兼性腐生菌由外植体入侵至植物的内部，从而对材料的内部造成一定的污染。如果在实际操作之前没有充分了解这些问题，对于外植体没有严格进消毒，则会很容易发生污染问题。

2.2 培养基和操作工具灭菌不彻底

在培养基的灭菌过程中很可能出现灭菌不彻底的情况，比如灭菌时间不足、灭菌温度没有达到一定要求、灭菌锅的压力计数不准确等，从而导致培养基中残留许多病原微生物，当接种之后便会造成污染。同时，接种工具没有彻底进行灭菌，或者是接种工具在灭菌之后存放的时间过长，从而在植物组织培养中出现污染的情况 [1]。

2.3 培养室、操作室消毒不合格

培养室的环境和污染有着密切的关系，在植物组织培养的过程中，大多数污染都和培养操作室有很大的关系，如果培养室中的温度和湿度比较适宜，那么就会助长病原菌的生长，且空气中的微生物也会与操作人员或者植株接触，从而发生污染，增加污染的概率。所以说，操作室或培养室没有进行严格消毒的话，则很容易导致污染的发生。

2.4 人为污染

在植物组织培养过程中，操作人员是最大的带菌者，其毛发、衣物等都存在非常多的微生物，如果操作人员没有严格按照相关的标准流程进行操作，就会导致污染现象的发生。人为因素造成的污染主要表现在以下几个方面：一，操作人员在进入培养室之后，没有严格按照规定管理好自己的行为，比如，没有及时对自己的衣物进行清洗和消毒，把细菌携带进培养室，从而导致污染的发生；二，工具灭菌不到位，存放不合理，在植物组织培养过程中会使用到许多工具，例如器皿、镊子、培养皿等等，在使用完之后，操作人员没有严格进行清理和存放，且在使用之前灭菌不充分，那么在下次使用的时候就会使植株产生污染。

3 植物组织培养中污染的预防措施

3.1 外植体的选择

对于植物组织培养污染的预防工作一定要从源头开始，在不同的环境下，外植体携带病原菌的程度也有所不

同,通过选择合适的外植体,有效地防止采集病原菌较多的植株,从而减少植物组织培养中的污染概率。优良的外植体大多在光照比较充足的环境中,采集的时间可以在晴天的中午进行,枝条都暴露在阳光下,高温的环境能够杀死很多病原菌和微生物,在取材之前还可以使用杀虫剂喷洒,避免寄生虫带菌而造成污染。对于枝条类的外植体,通常采集中上部的茎段,或者是新生的芽条、枝条、茎尖等,从而在最大程度减少因外植体自身携带的病原菌污染。

3.2 外植体的灭菌消毒

在植物组织培养中,对于外植体的灭菌处理方法通常有消毒液杀菌、低温处理法、抗生素处理法以及减压灭菌处理法等,低温处理法主要是将培养对象放置在低温的环境下,不给部分病原菌提供存活的条件,但是这种方法并不是对所有的植物体都适用;抗生素处理法主要是使用抗生素对污染严重的植物组织进行喷洒,从起到杀菌消毒的作用;减压灭菌处理法主要是利用减压操作对植物组织中的气体进行吸取,将消毒剂置于组织的内部,从而进行灭菌消毒[2]。目前,实验室外植体的灭菌方法主要采用的是消毒液杀菌,杀菌前先将外植体用清水清洗干净,再选择合适的消毒液杀菌,需要注意的是在杀菌过程中,要把握好消毒的时间,如果消毒时间不够的话,就达不到消毒的效果,消毒时间过长的话,则会将外植体杀死,无法达到培养的目的。

3.3 培养基的消毒处理

培养基的消毒处理通常采取高压蒸汽灭菌法,在具体操作的时候一定要确保灭菌锅内部清洁,灭菌物不要堆放过满,否则不易将内部冷气排出,使灭菌锅的温度保持在121℃,时间为二十分钟,在灭菌之后抽样进行培养,保证培养基没有污染的情况出现。同时,在培养基中添加抑菌剂,这种方法也能够有效地降低污染。比如,在香水白掌的组织培养中,培养基中连续添加青霉素能够有效地防止细菌污染,促进培养体的健康生长。但是,由于有些材料中的内生菌潜伏比较深,通过表面的消毒很难将其完全清除,在初次培养的时候可能没有污染的现象,但是在继代培养中,菌量也会慢慢增加,污染情况也会开始出现。在使用抗生素的过程中,一定要了解抑菌剂的种类,明确抗生素的浓度和使用时间,了解所使用的抗生素是否会对植物组织产生不良的影响,需要注意的一点是,浓度过高的抗菌素对材料有一定的伤害,甚至导致生长畸形,并且抗生素一般只具有抑菌的作用,无法完全灭菌。

3.4 操作工具的消毒处理

对于操作工具的消毒处理通常是使用高压蒸汽灭菌法,或者使用烘箱干热灭菌法,经过高压蒸汽灭菌的接种纸,最好在水分烘干后的两天内使用完,对于剪子、镊子、

手术刀等一些金属类工具,在使用之前,刀口部位用75%乙醇进行浸泡后,并在酒精灯火焰上进行灼烧杀菌,时间保持在三至五分钟,然后在完全冷却之后再开始使用[3]。同时,在接种期间,接完一瓶母瓶材料之后将操作器具消毒一次,在切割完之后需要及时更换无菌纸。

3.5 培养室、操作室的消毒处理

一般情况下要避免在温度和湿度较高的天气进行接种,并做好培养室、操作室的消毒工作,无菌室是比较封闭的空间,一定要做好环境的管理。通常半个月左右开窗换气,然后每个月使用高锰酸钾进行室内消毒,并使用臭氧发生器进行灭菌消毒,防止细菌周期性发生。同时,要及时处理掉污染的材料,对继代材料进行转移,使用消毒液对受到污染的材料瓶子进行消毒,必要时通过高温高压灭菌后再进行使用。

3.6 严格规范人员操作流程

操作人员应严格规范自己的行为,了解标准操作的重要性,最大程度减少人为因素造成的污染。首先,在进入操作室之前,操作人员应提前更换好干净的衣服,并且在每次穿过之后进行消毒和清洗。在接种之前先使用肥皂洗手,然后再使用75%乙醇进行擦拭,在接种过程中双手不能触碰到材料或者器皿,操作过要快。其次,在操作过程中要防止出现交叉污染,每接种一瓶母瓶后,要用75%乙醇的就擦拭手和操作台面,使用过的工具要消毒之后再切割其他健康的材料。定期更换滤板以及紫外灯,检查培养的容器和材料。最后,在接种期间,操作人员应佩戴好口罩,禁止随意交谈,避免因咳嗽和说话而产生污染。

结语:

植物组织培养中的污染问题不仅在一定程度上制约着种苗的培育,也是当前组组织培养领域中急需解决的一大难题,通过合理选择外植体、外植体的灭菌消毒、培养基的消毒处理、操作工具的消毒处理、操作室的消毒处理、严格规范人员操作流程等,有效地预防组培中的污染问题。

参考文献:

- [1] 梁明骅,曾雯雯,陆耀.植物组织培养污染成因分析及防控措施[J].农业与技术,2020(16):46-47.
- [2] 张朕,马艳丽.植物组织培养中污染防控方法研究[J].山西农经,2018(01):66-67.
- [3] 温璐华,武瑞娜.植物组培内生菌污染的防治措施[J].防护林科技,2020(02):83-85.