

不同消毒剂对海带成熟孢子体组织块培养的除菌效果

王萍, 钱旭, 李珠, 李信书

(淮海工学院海洋学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005)

摘要: 探讨了 1.5% KI、0.01% HgCl₂ 两种消毒剂和 400 mg/L 卡那霉素在海带成熟孢子体组织块培养中的除菌效果。结果表明: 0.01% HgCl₂ 的除菌效果好于 1.5% KI, 但对海带的组织块有一定的毒害作用。在培养基中加入 400 mg/L 卡那霉素对抑制海带组织块染菌有较好的作用。

关键词: 海带; 成熟孢子体; 组织培养; 消毒剂

中图分类号: S968.42+1

文献标识码: A

文章编号: 1003-1278(2007)02-0105-02

组织培养是利用转基因技术对生物进行遗传改良、培育优良品种(系)的基础, 褐藻的组织培养研究开始于 20 世纪 70 年代, 尽管对海带的组织培养已有幼孢子体液体培养和成熟孢子体固体培养方法^[1] 形成愈伤组织的报道, 但至今有关研究不多, 原因之一是无菌的海藻组织很难制备。海带的无菌处理技术尚不成熟, 主要是由于在海带藻体表面附着大量微生物, 这些微生物在丰富的培养基上茂盛生长使海带组织块缓慢生长, 抑制了海带的生长。同时在藻体的内部也存在细菌, 所以很难做到绝对无菌, 海带的组织处理方法只是停留在除菌而不是无菌阶段。由于海带的除菌方法不理想, 严重影响了海带组织培养研究的进展。本研究使用前人研究认为对海带除菌效果较好的 1.5% KI 方法, 并引入高等植物除菌常用的 HgCl₂^[2], 采用切块和整体除菌两种处理方式, 探讨不同处理方法在海带组织块培养中的除菌效果, 以期找出适合于海带组织培养时除菌的消毒剂和相应的方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

海带成熟孢子体采于江苏连云港某养殖场。

1.2 实验设计

采用 1.5% KI 和 0.01% HgCl₂ 对接种前表面消毒和在培养基中加入 400mg/L 卡那霉素 3 种方法。表面消毒又分为整体消毒后切块和先切块后消毒 2 种方式。1.5% KI 方法设 7 个处理时间, 分别为 0、5、10、15、20、25、30min; 0.01% HgCl₂ 方法设 7 个处理时间, 分别为 0、2、4、6、8、10、12 min, 每个处理设 3~4 次重复。海带成熟孢子体消毒处理后用无菌水和无菌海水各冲洗 3 次。

1.3 实验方法

取海带的成熟孢子体, 用不同的消毒方法处理后接种于含有 PESI 固体培养基的培养皿中, 卡那霉素实验设

4 种培养基: MS 固体培养基、MS 增富固体培养基、MS 添加物固体培养基和 PESI 培养基, 在温度 10.0 ± 0.5℃, 光照 10 h/d 的条件下培养, 每天观察海带生长情况、菌的有无、种类等, 计算 2 周和 4 周海带的染菌率和海带组织块的相对增长量。

2 结果与分析

2.1 KI 对海带成熟孢子体的除菌效果

用 1.5% KI 对海带成熟孢子体进行整体除菌, 接种后培养 1d 时, 各处理的海带均无菌。2 d 时对照和处理 5 min 开始出现菌落, 4d 时各处理时间均出现菌落。实验中还发现, 用此种方法除菌, 尽管在海带成熟孢子体周围有菌出现, 但组织块并不完全死亡。

将海带成熟孢子体先切成组织块后, 再用 1.5% KI 做除菌处理, 观察海带组织块的染菌情况发现, 用此种方法除菌, 处理时间大于 15 min, 在培养 3 d 以内时无菌落出现, 菌落出现时间比海带整体除菌处理晚, 前 2 d 各处理组都无组织死亡现象, 第 3 天开始出现死亡的组织块。1.5% KI 的处理方法是在海带组织培养中应用效果最好的一种消毒剂^[1], 但文献中未说明具体的处理方式。本实验中采用了整体和切块 2 种方式, 图 1 比较了用 1.5% KI 处理 15 min 培养 1 周和 2 周时的除菌效果。

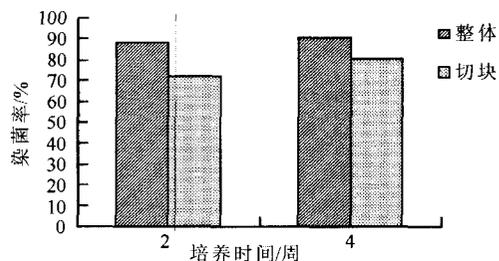


图 1 1.5% KI 整体和切块处理对除菌效果的影响

从图 1 可以看到, 用 1.5% KI 对海带成熟孢子体进行 2 种方式除菌处理时, 组织块在培养 2 周和 4 周时的染菌率是不同的。成熟孢子体先切块之后再用 KI 液的处理方式染菌率较低, 除菌效果较好。在实验中还发现, 在用 1.5% KI 作消毒处理时, 所采用的 2 种方法均有一定的菌出现, 海带组织块在染菌的情况下仍有部分存活。

2.2 HgCl₂ 对海带成熟孢子体的除菌效果

收稿日期: 2006-05-09

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题资助项目(2005HS011). 淮海工学院引进人才科研启动基金项目资助(KK01073)

作者简介: 王萍, 1957 年生, 女, 博士, 教授, 主要从事植物基因工程与分子生物学研究。

HgCl₂ 是高等植物组织培养常用的一种消毒剂,考虑海带藻体纤弱,可能对 HgCl₂ 的耐受性差于高等植物,将使用浓度由 0.1% 降至 0.01%。在实验中观察到,在培养 2 周时 0.01% HgCl₂ 处理海带成熟孢子体 2 min 和 4 min 的组织生长情况较好,只有个别组织块染菌,此时对照 100% 染菌。用 0.01% HgCl₂ 处理 2 min 培养 4 周时染菌率为 16.74%,表现出较好的除菌作用,处理 6 min 以上时则没有菌出现,但组织块生长减缓,甚至个别死亡,表现出 0.01% HgCl₂ 对海带组织块产生一定的毒害作用。

2.3 培养基中加入卡那霉素对海带生长的影响

由于 KI 和 HgCl₂ 对海带成熟孢子体做除菌处理后,或者不能很好的抑制细菌在组织块上的生长,或者在抑制菌的生长的同时影响海带的正常生长,本实验在接种前海带不做消毒处理,在培养基中加入卡那霉素抑制菌的生长,并对 4 种培养基加入卡那霉素的效果进行了比较,结果见图 2。

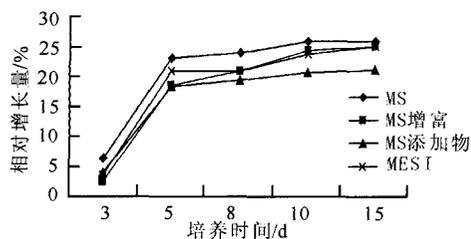


图 2 海带外植体在加卡那霉素 4 种培养基中的增长量

由图 2 可以看出,MS 固体培养基的相对增长量一直较高,在 15d 时 MS 固体培养基与 PESI 培养基和 MS 增富固体培养基的相对增长量相似,而 MS 添加物固体培养基的相对增长量明显小于前三者。从培养过程看,3~5 d 时 4 种培养基下海带组织块的相对增长量都较大,之后增长减慢。

调查了培养不同天数时 4 种培养基中组织块的染菌率(图 3),发现在培养前 3 d,4 种培养基中均没有菌出现,第 5 天时 MS 增富固体培养基和 MS 添加物固体培养基有菌出现,染菌率均为 11.11%,在培养 8d 时快速增加到 80% 和 44.44%,而 MS 固体培养基和 PESI 固体培养基在培养 10 d 时才有菌出现,染菌率为 31.11% 和 4.44%,低于另外 2 种培养基。

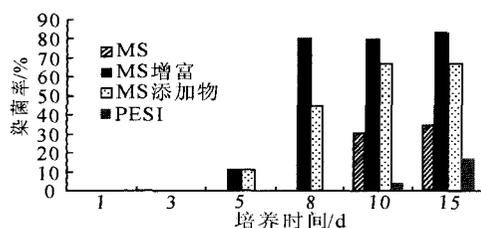


图 3 海带在 4 种含卡那霉素培养基中的染菌率

在加入卡那霉素的 4 种培养基中,海带组织块在 15d 时染菌率分别为 MS 固体培养基 33%、MS 增富固体培养基 83%、MS 添加物固体培养基 67% 和 PESI 固体培养基 18%,虽然该消毒方法不能完全控制污染微生物的生长,但它对海带分裂组织的细胞损害较小,且与未加入卡那

霉素的培养基中的组织块相比,染菌率有所降低。图 4 给出了 MS 添加物固体培养基在加入卡那霉素和未加卡那霉素时海带组织块的染菌率。

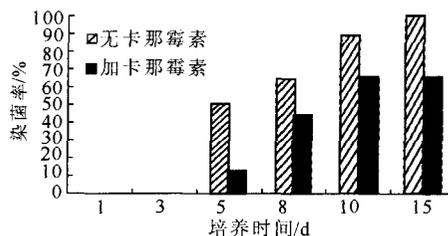


图 4 MS 添加物培养基中加入卡那霉素的抑菌效果

由图 4 可见,MS 添加物固体培养基中加入卡那霉素后对细菌的生长有一定的抑制作用。如培养 5d 时未加入卡那霉素的对照有 50% 染菌,而加入卡那霉素的培养基中海带的染菌率仅有 11%。在 15 d 时,对照组织块 100% 染菌,而加入卡那霉素的外植体染菌率为 66.67%,说明接种前不做除菌处理,在培养基加入卡那霉素对抑制海带成熟孢子体组织块培养过程中有一定的作用。

3 讨论

3.1 消毒剂对海带组织块的除菌与培养的影响

王希华等^[1]在对海带愈伤组织培养的研究中认为,1.5% KI 处理海带是较好的除菌方法。而在本实验中不论是整体消毒,还是切块消毒,组织块的染菌率都较高。HgCl₂ 是陆地植物组织培养常用的消毒剂,将 HgCl₂ 作为消毒剂应用于海带除菌尚未见报道。在本实验中尽管已考虑到海带孢子体比陆地植物纤弱得多的因素,将其使用浓度从 0.1% 降到 0.01%,HgCl₂ 在表现出较好的除菌效果的同时,对海带成熟孢子体有较大的毒害作用。因此,在对海带进行除菌处理时,需进一步调整 HgCl₂ 的使用浓度和处理时间。

3.2 培养基中加入抗生素的除菌效果

海带幼孢子体对卡那霉素不敏感^[3],在海带愈伤组织培养中,将 6~7 cm 整棵的海带幼孢子体分别放入含有硫酸卡那霉素(500 U/mL)的氮磷营养海水中培养,对抑制外植体染菌有较好的效果^[1],本实验在培养基中加入 400 mg/L 的卡那霉素,发现对海带成熟孢子体组织块的损伤较小,对组织块有一定的抑菌作用。同时还应注意到,在加入卡那霉素的培养基中培养海带成熟孢子体组织块时,不同培养基对抑制菌的生长是存在差异的,用 MS 固体培养基和 PESI 固体培养基有较低的染菌率。

参考文献:

- [1] 王希华,秦松,曾呈奎. 海带愈伤组织的高效率诱导[J]. 海洋与湖沼,1999,30(6):652~657.
- [2] 王萍,王军军,商德虎,等. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究[J]. 吉林农业科学,2001,26(6):20~23,29.
- [3] 武建秋,王希华,秦松,等. 海带基因工程选择标记的研究[J]. 海洋科学,1995,(5):42~45.

(责任编辑 万月华)