

海带目中三种主要经济海藻 的组织培养初步研究

陈 家 鑫

藻类组织培养工作大约是从七十年代初开始的,但近十年来这方面的工作渐见增多。主要有三方面的研究目的:第一,利用经济海藻的组织进行纯培养,达到工业利用的目的。如 Misawa(1977)^[1]应用石花菜或江蓠的外植体诱导出愈伤组织,通过扩大培养,以此作为提取琼胶的原料。实验证实,在 20 天内藻体重量增加了 11 倍,由这些材料得到了高质量的琼胶;第二,用于遗传育种的研究, Giber(1980)^[2]等已经明确地提出了这一看法;第三是利用纯培养材料于藻类生理等项研究,正如 Fries(1980)^[3]等所提出的那样。

海带(*Laminaria*)、裙带菜(*Undaria*)、巨藻(*Macrocystis*)是海带目中经济价值最大的三类海藻。研究它们的组织培养技术,对进一步开展这些藻类的遗传育种、生理研究等工作有一定的现实意义。在这三类海藻中研究得较多的是海带。其中 Saga 等(1978 年)^[4]利用狭叶海带 *L. angustata* 的叶片外植体诱导出愈伤组织,并用机械办法分离出单个的愈伤组织细胞,且长成了完整的植株。Fries(1980 年)用 *L. digitata* 和 *L. hyperborea* 的叶片基部组织作材料得到愈伤组织,发现该类组织的细胞能产生减数分裂孢子(Meiospore),形成了雌、雄配子体。还有方宗熙等(1982 年)^[5]也报道了 *L. japonicus* 和 *U. pinnatifida* 组织培养的初步观察。巨藻(*M. pyrifera*)是该目中体制分化最复杂的一类海藻,至今尚未见到有关它的组织培养研究报道。

本文仅就这三类海藻的培养条件、取材季节、愈伤组织的形成等方面作了一些初步的观察比较,报道如下。

材 料 和 方 法

所用材料均系 3~6 月期间采自青岛太平角海区的未成熟藻体,或虽将近成熟,但未形成孢子囊的部位。

取材部位有假根、柄、叶片,以及巨藻的气囊。叶片材料用直径 3 毫米的打孔器打成圆片,其它材料切成 2~5 毫米厚的薄片。

所有材料在取样前先在消毒海水里用棉花擦洗,去掉附于藻体表面的杂藻或其他附着物,在实验室内暂养 2~3 天,防止新鲜切口外渗的粘液给消毒灭菌带来困难。取材

*₁ 本文曾蒙刘恬敬所长、索如瑛主任指导、审阅,特此致谢。

*₂ 黄海水产研究所调查研究报告第 261 号。

*₃ 本文于 1984 年 7 月 27 日收到。

时用70%酒精仔细地擦洗藻体,接着用消毒海水洗去沾在藻体上的酒精,立即切成或打成小块供培养用。操作的全过程均在无菌箱内进行。

选用了4种培养基,即NS—1(在天然消毒海水中加入 $\text{NO}_3\text{—N}$ 6ppm, $\text{PO}_4\text{—P}$ 0.6ppm); NS—2(在NS—1中再加入 10^{-5}M NAA和 $5\times 10^{-7}\text{M}$ 的激动素); MS培养基^[6]以及Asp6F2^[7]。

结果与讨论

(一)材料的预处理

组织培养材料的预处理,即清除杂藻和灭菌,是组织培养成功与否的关键之一。Fries等认为用70%酒精擦洗藻体易使伤口外渗的粘液凝聚,包被在材料外表,达不到无菌的要求,而改用饱和漂白粉溶液,或多种抗菌素混合溶液来处理。我们的实验结果表明,饱和漂白粉溶液灭菌虽彻底,但作用过于激烈,经此处理的材料成活率极低。多种抗菌素混合液经试用灭菌效果始终不甚理想。用70%酒精灭菌确实有如Fries所描述的现象发生,但按前述的预处理方法处理,在灭菌前先将材料暂养数日,就可解决这一问题。在本实验中,处理培养120份材料,无菌率达到98%。且由于对组织块的杀伤作用不甚激烈,当培养基合适时,可以得到极高的组织成活率和愈伤组织的诱导率。

(二)培养基的选择

培养基是组织培养研究中的主要研究项目之一。目前适合于不同组织的培养基配方很多。我们仅选择、设计了前述四种,作了极粗浅的对比试验。通过三种不同海藻的组织培养观察,得到了下述几点初步看法:

1. 能有效的诱导陆生高等植物外植体产生愈伤组织的MS培养基不适于培养海藻组织。在我们的数十例培养中无一成功。Fries也持这一观点,即培养种子植物组织的培养基不适合于培养海藻。在这一点上,国内有人^[5]持有不同的看法,认为“MS加维生素与激素C—751,则能诱导两种海藻的体细胞长出许多孢子体”。我们认为这一点尚待商榷。

2. Asp6F2适合于培养海藻组织。我们用于培养海带叶片、裙带菜的柄和巨藻的气囊,都得到了愈伤组织。

3. 最值得提出的是NS培养基。有人认为^[5],“一般培养基(即消毒海水加氮和磷的无机化合物,不能诱导出体细胞发育的全能性”。可是在本实验中,三个物种的不同组织都在NS培养基中长出了愈伤组织。我们认为成功与否的关键在于取材时间,说得更确切一点,在于取材部位的成熟情况。我们从3月份开始每月取样一次进行培养,其结果列于表1。

表1清楚地显示,海带叶片基部组织容易形成愈伤组织的时间是5~7月份,而裙带菜则在4~6月份。这一情况恰与这两种海藻的成熟季节相吻合。至于巨藻气囊,在水温适宜的月份里,可以不断地产生出来。我们在同一时间内既可得到幼嫩的气囊,也可得到老成的气囊。通过对比实验看到,在3~7月期间,都未能从幼嫩的气囊上诱导出愈伤组织,而老成的气囊几乎每月都可取得成功。这一事实说明,加入无机氮、磷营

表 1 愈伤组织的形成与取样时间的关系

材 料	月 份	3	4	5	6	7
海带叶片基部		-	-	+	+	+
裙带菜柄部		-	+	+	+	-
巨藻幼嫩气囊		-	-	-	-	-
巨藻老气囊		-	+	+	+	+

注：“-”无愈伤组织形成；“+”能形成愈伤组织

养盐的天然海水培养基也能获得愈伤组织。

至于为什么较为老成的材料容易得到愈伤组织，Fries 认为，老成的组织内贮藏有较多的营养物质；此外，它比幼嫩组织更能忍受强烈的灭菌处理。我们同意这一看法。至于老成组织中含有哪些活性物质有利于愈伤组织的形成，尚待深入研究。

(三)愈伤组织形成与分化的观察

在高等植物中，由外植体重新诱导产生一个新的完整植株要经历三个环节：组织细胞的脱分化、愈伤组织的形成和愈伤组织细胞的再分化。

作为低等植物——藻类，至少在我们实验观察的三种藻类中，其愈伤组织细胞与种子植物相比有两点差异：

1. 高等植物的愈伤组织几乎都是一团没有特异分化的薄壁组织细胞，而海带目中的这三种海藻，无论是来自哪一部分器官的组织都形成多细胞丝状体(图1~8)。所以，有些学者把它叫做类愈伤组织(Callus-like tissue)；

2. 高等植物的愈伤组织基本上保持其原来的染色体组成，而海藻组织上形成的多细胞丝状体愈伤组织，有自发地产生减数分裂的倾向，不经过游孢子阶段直接形成配子体，并在性成熟后生成正常的孢子体植物(图9、10)。Fries(1980年)也曾报道过这一现象。在我们的培养中，除巨藻以外，在海带和裙带菜的愈伤组织中都观察到。产生这一现象的原因尚不清楚，我们推断是藻类所特有的一种形成有性世代的低级形式。



图1 由愈伤组织发育成的海带叶状体的表皮细胞

Fig.1. Epidermal cells of the thallus of *Laminaria* developed from the callus

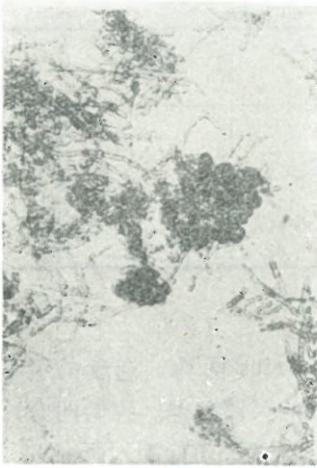


图2.3. 海带叶状体的愈伤组织未经过游孢子阶段发育成的雌、雄配子体

Fig.2.3. Female and male gametophytes developed the callus of *Laminaria* thallus without passing through the zoospore stage



图4 裙带菜茎部外植体发育成的表皮丝状体

Fig.4. Epidermal filaments developed the explant of *Undaria* stipe



图5 裙带菜髓部和表皮细胞发育成的多细胞丝状体

Fig.5. Multi-Cellular filaments developed from the medulla and epidermal cells of *Undaria*

此外,形成愈伤组织最活跃的部位是贴近髓部的内皮层细胞。在正常生长过程中,向内分化形成髓部细胞,向外生成皮层细胞,具有很强的分化能力。在培养过程中发现,无论是海带、裙带菜,还是巨藻都是这一部位的色素首先加深,细胞增生部位向外突出形成愈伤组织,继而形成密集的多细胞丝状体。

至于除去表皮层细胞的切块是否有长成愈伤组织和具有发育的全能性,我们与前人的结论^[6]也不同。他们认为切去表皮的外植体失去发育的全能性,而我们特意切去三种海藻表皮的一些组织,结果均取得成功。



图6 裙带菜茎的愈伤组织发育成的配子体

Fig.6. Gametophytes developed from the callus of the *Undaria* stipe

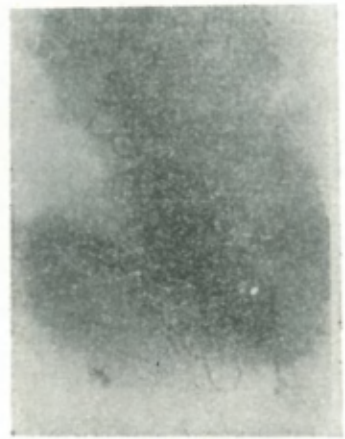


图7 由巨藻气囊组织发育成的愈伤组织

Fig.7. Callus developed from the pneumatozystal tissue of *macrocystis*



图8 由巨藻柄的愈伤组织发育成的多细胞丝状体

Fig.8. Multi-Cellular filaments developed from callus of *macrocystis* stipe



图9 与图2、3中同一起来源的外植体愈伤组织分化成的雌、雄配子体及其成熟后形成的孢子体

Fig.9. Female and male gametophytes of *Laminaria* differentiated from the callus of explant of the same origin as in Fig. 2.3. and the sporophytes formed after their maturation



图10 由裙带菜柄的愈伤组织分化成的雌、雄配子体生成的幼孢子体

Fig.10. Sporelings of *Undaria* formed from male and female gametophytes which were differentiated from the callus of the peduncle of the thallus

结 论

1. 在用70%的酒精对海藻组织培养材料进行灭菌处理前,先在室内暂养数日,减少外渗粘液,再行灭菌,可以得到理想的灭菌效果。
2. 藻类外植体的成活率和愈伤组织的诱导率同藻体的成熟程度有关。幼嫩的藻体成活率与诱导率均低,而老成组织均高。
3. 海带、裙带菜的二倍体愈伤组织可自发产生雌、雄配子体植物,不需经过游孢子这一阶段。
4. 只加氮、磷无机盐的天然消毒海水也可用于海带目海藻的组织培养。
5. 体制分化较复杂的巨藻气囊组织诱导出愈伤组织,但尚未能诱导再分化长出完整的植株。

参 考 文 献

- [1] Misawa, M., 1977. Plant tissue culture and its biotech., Springer.
- [2] Gibor, A. et al., 1978. Exploratory studies of vegetative propagation of marine algae: Procedure for obtaining axenic tissues. Proc. X ISS. 589—593.
- [3] Fries, L., 1980. Axenic tissue cultures from the sporophytes of *Laminaria digitata* and *Laminaria hypeborea*. J. phycology Vol. 16, No.3. 475—477.
- [4] Saga, N., et al., 1978. Clone. *Laminaria* from single isolated cell. Bulltin of Japanese Society of Scientific Fisheries. 44(1) P.87
- [5] 方宗熙等, 1982. 海带和裙带菜组织培养的初步观察. 科学通报. Vol.27, No.11. 690—691.
- [6] 中国科学院上海植物生理研究所, 1978. 植物组织和细胞培养, 科学出版社. P.24
- [7] Fries, L., 1977. Growth regulating effects of phenylacetic acid and p-hydroxyphenylacetic acid on *Fucus spiralis* L. in axenic culture. Phycologia 16:451—455.

TISSUE CULTURE FROM THE SPOROPHYTES OF

Laminaria japonica, *Undaria pinnatifida* AND *Macrocystis pyrifera**

Chen Jiabin

(Yellow Sea Fisheries Research Institute)

Abstract

1. Materials used for the tissue culture were the stipe, rhizome, blade of three species in the order of *Laminariales*: *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* and *Macrocystis pyrifera*, and pneumatocysts of *M. pyrifera*.

2. Before treating with 70% ethanol, these explants were cultured in flask for several days until no mucilage secreting out, thus, to prevent the mucilage which covered epidermis of the explants from coagulation of mucilage would cause an imperfact.

3. Four media: Asp 6 F₂, Ms, Ns-1 and Ns-2, were used in tissue culture of explant. Except for medium Ms, the others were able to induce the formation of callus.

4. The inducing rate of callus of the older explant was higher than that of the younger.

5. The callus of *L. japonica* and that of *U. pinnatifida* could be further differentiated, without passing through the zoospore stage, into male and female' but in the case of *M. pyrifera* this phenomenon was not observed.

* Received 27, July 1984.

