

粗枝软骨藻 *Chondria crassicaulis* 组织培养初探

吴勋建, 贺丽虹, 宋毅, 沈颂东*

苏州大学生命科学学院, 苏州 215123

【摘要】 在固体培养基上研究了粗枝软骨藻 (*Chondria crassicaulis*) 再生的极性, 并利用三种不同的培养液和不同的温度对粗枝软骨藻进行切段培养, 探索了部分外界因素对粗枝软骨藻生长的影响。发现软骨藻在人工培养条件下的再生出芽过程并无明显极性。在 10℃、15℃ 和 22℃ 三个温度梯度和 PES、改良的 ASP₁ 和改良的 ES 三种培养液中, 15℃ 改良的 ES 培养液中较有利于再生芽的出现。同时我们还观察了粗枝软骨藻四分孢子的发育过程, 发现软骨藻具有十字型和四面锥型两种不同的四分孢子囊, 软骨藻在四分孢子萌发过程中可形成四种不同的孢子苗。

关键词: 粗枝软骨藻; 生长因子; 极性

中图分类号: Q944 文献标识码: A 文章编号: 1008-8873(2007)04-337-06

Primary study on tissue culture of *Chondria crassicaulis*

WU Xun-jian, HE Li-hong, SONG Yi, SHEN Song-dong

Life Science College, Soochow University, Suzhou City, 215123)

Abstract: Regeneration polarity of *Chondria crassicaulis* was studied in solid medium. We used three different liquid medium and three different temperatures to explore the effects of some external factors to the cultivation of chopped tissues of *Chondria crassicaulis*. We found that under artificial culture environment there was no obvious polarity in the regeneration of fragments. When cultured in PES, modified ASP₁, modified ES culture media and under 10℃, 15℃, 22℃, it was found that the formations of buds were abundant and best in the segments under 15℃ in modified ES liquid media. We also found that there were two kinds of sporangia, cruciform and four conical, in the cultivation, and tetraspore of *Chondria crassicaulis* could develop into four kinds of seedlings.

Key words: *Chondria crassicaulis*; growth factor; polarity

收稿日期: 2007-07-01 收稿, 2007-07-20 接受

基金项目: 江苏省海洋重点实验室开放课题(2006HS006)

作者简介: 吴勋建 (1985—), 男, 硕士研究生, 主要从事海藻的发育机制研究。

*通讯作者, 沈颂东, 男, 博士, 研究生导师, Email: shensongdong@suda.edu.cn

1 前言 (Introduction)

我国海洋生物资源丰富,有海洋生物两万多种,其中海藻2590种以上^[1]。我国很早就开始了海带、裙带菜和紫菜等经济价值较高的海藻的人工栽培。但还有很多具有潜在经济价值的海藻有待开发。

粗枝软骨藻为暖温带海藻,主要生长在低潮去和朝下带的岩石上。我国沿海均有分布,主要分布于浙江的海礁、嵎山、普陀山、中街山、渔山、洞头和南麂等岛屿。藻体暗绿至红褐色,软骨质,多肉,高8~15 cm,宽2~4 mm。主枝扁圆柱形,不规则向各方分枝,基部收缩,顶端有球芽,脱落后能发育成新个体,囊果生在分枝上。软骨藻可食用,本草纲目中记载软骨藻可用作驱蛔虫药。软骨藻在近年来也逐渐引起了学者们的重视,国内外对软骨藻进行了大量的研究。Edmonds等(1997)做了软骨藻内含物的研究^[2],Harada报道软骨藻(*Chondria crassicaulis*)的甲醇提取物都能选择性抑制L1210活性,因而有可能分离出抗肿瘤物质^[3],殷丽明等报道软骨藻(*Chondria. sp*)的水提物在体外具有对≥s-180肿瘤细胞的直接抑制作用^[4]。

由此可以看出,前人的研究多集中在软骨藻内含物及次生代谢物方面,软骨藻组织培养的基础研究在国内未见报道。本文从软骨藻的再生极性,温度和培养基,在人工培养条件下的出芽率和四分孢子的萌发几个方面进行了软骨藻研究组织培养的一些初步研究。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 材料

2.1.1 材料来源

软骨藻于2007年1月采集于浙江舟山朱家尖岛潮间带,选取色泽鲜艳的幼嫩藻体,去除表面附着杂藻后,用消毒海水反复洗刷后置于培养瓶中,加入添加了硝酸盐和磷酸盐的改良ES培养基(N:P=4:0.4)进行培养。

2.1.2 培养基配制

本实验所用海水来源于江苏东台,其盐度为39%,煮沸过滤制成消毒海水。实验中用到的培养基是改良的ES(mES)、PES和改良的ASP₁(mASP₁)。(ES培养基改良方法如下:不添加土壤抽提液;ASP₁培养基改良如下:不添加Vitamin混合液。)三种培养基的具体配方如表1所示^[5]。

表1 实验中所用的培养基配方

Table 1 The compounding of the media used in the experiments

成分 Content	mES	PES*	mASP ₁
Distill water	—	100mL	100mL
Seawater	100mL	—	—
NaCl	—	—	2.4g
NaNO ₃	10mg	350mg	10mg
Na-glyceroPO ₄	—	50mg	—
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2mg	—	—
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	—	—	2.5mg
KCl	—	—	0.06g
K ₂ HPO ₄	—	—	2mg
CaCl ₂	—	—	40mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	0.6g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	—	—	0.45g
Fe-EDTA	—	2.5mg	—
Tris	—	500mg	0.1g
P II metals**	—	25mL	1mL
Vitamin B ₁₂	—	10 μg	0.02μg
Thiamine	—	0.5mg	—
Biotin	—	5μg	—
pH	—	7.8	7.6

* 对于PES培养基:加2mL PES贮存液,用煮沸过滤后海水溶至100mL;** 1mL P II金属液中含:Na₂-EDTA 1mg, Fe(as Cl) 0.01mg, B(as H₃BO₃) 0.02mg, Mn(as Cl) 0.04mg, Zn(as Cl) 0.005mg, Co(as Cl) 0.001 mg

2.2 方法

2.2.1 保种培养

将藻体洗净后放入蒸馏水中浸泡30 min,再将其放入0.7% KI溶液中浸泡10 min,取出后用消毒海水冲洗数次放入盛有对应培养液的培养皿中。在超净工作台中用灭菌的解剖刀将藻体切成长度3~4 cm的小段(不含侧枝),放入六孔板中,用封口膜封口后置于15℃,光照强度为1500 lux,光周期12 h:12 h培养箱中进行培养。隔10 d换一次培养液。

2.2.2 固体培养

在超净台上在培养皿中加入4 mL含琼脂0.6%的mES、PES和mASP₁的培养基,做好标记待其凝固后,用解剖刀将藻体切成不含侧枝的3~4 cm的小段按照藻体的生态学位置放置在固体培养基上。在固体培养基上加入对应的培养液2 mL,用封口膜封口后

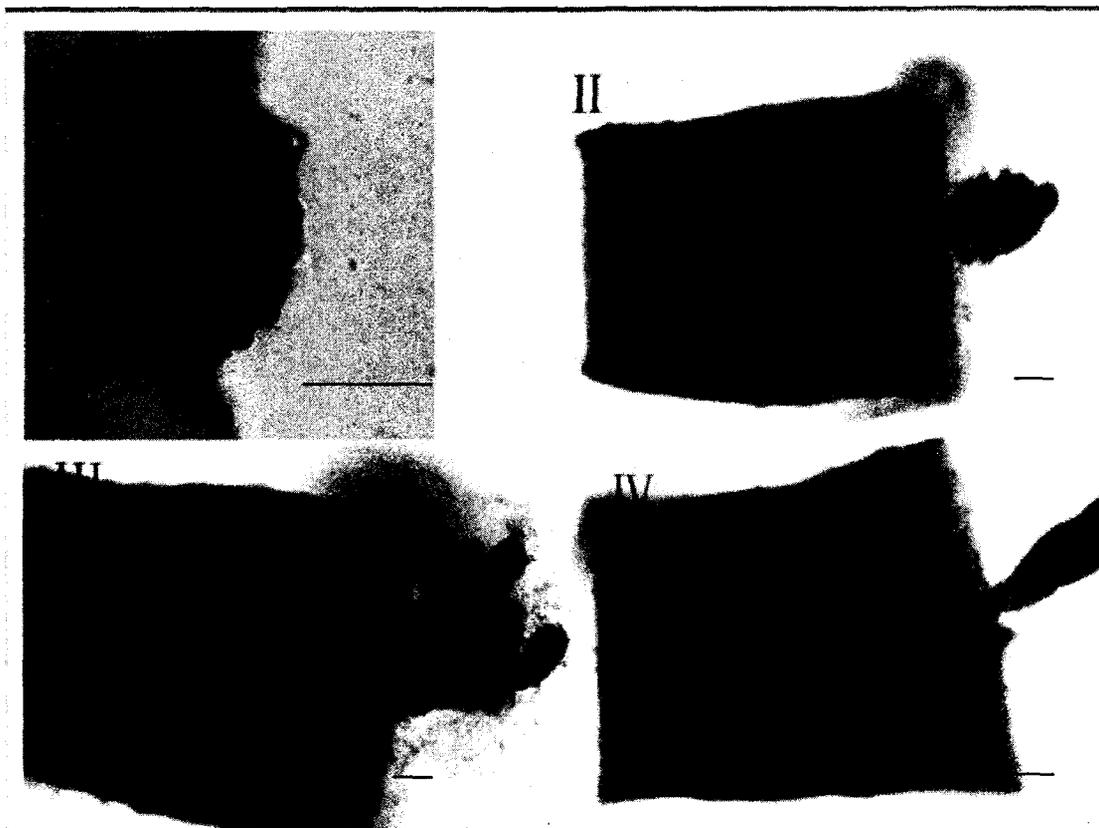


图1 藻段的两种出芽方式(bar=100 μ m) (切口处形成的细胞团(10 \times 40); II,III由细胞团形成的再生芽(10 \times 4); IV 同一切口处出现大小不同的再生芽)

Fig.1 Two kinds of the regeneration of the fragments (bar=100 μ m)

I The cluster of cell formed in the fragment (10 \times 40); II III The cluster of cell divide into the buds (10 \times 4); IV different large buds formation in the same fragment (10 \times 4).

置于15 $^{\circ}$ C, 光照强度为1500 lux, 光周期12 h: 12 h的培养箱中培养。每周换一次培养基。

2.2.3 液体培养出芽计数

在超净台中, 在每块24孔板中的A行加入PES, B行加入mASP₁, C行加入mES, 每孔加入对应的培养液2 mL。将藻体切段放入孔中, 每孔放三段。将24孔板用封口膜封口, 分别置于10、15、22 $^{\circ}$ C培养箱中培养(光照强度及光周期同上), 每周更换培养液。

3 结果 (Results)

3.1 切段培养

3.1.1 切段再生的极性问题

软骨藻切段后置于固体培养基上培养, 前期在倒置显微镜(Olympus IX71)下观察发现PES培养基上生长的藻体颜色较mES培养基上的藻体要差。一

个星期后, 发现两种培养基上的切段开始有新芽长出, 其出芽方式有两种, 一种是先形成细胞团(图1-I 10 \times 40), 由细胞团形成再生芽(图1-II 10 \times 4), 这种方式可同时形成较多的再生芽, 且各芽的生长状况接近(图1-III 10 \times 4); 另一种出芽方式是直接形成再生芽, 在同一藻段切口处也可出现一个以上的再生芽, 但芽的大小存在较大的差异, 如图1-IV (10 \times 4)所示。

试验中我们发现, 在藻体切段的上下端都可以形成再生芽, 藻体切段在固体培养基上培养30 d后我们统计上、下端的出芽数分别为25个和5个。且藻体顶端的切段和基部的切段的下端都会出现再生芽。

3.1.2 不同温度和培养基对出芽率的影响。

将切段后的藻体在不同温度及培养液进行培养, 每隔三天观察一次, 记录三次数据后换液培养, 持续观察后得到十次数据。数据处理后可以看见不同温度

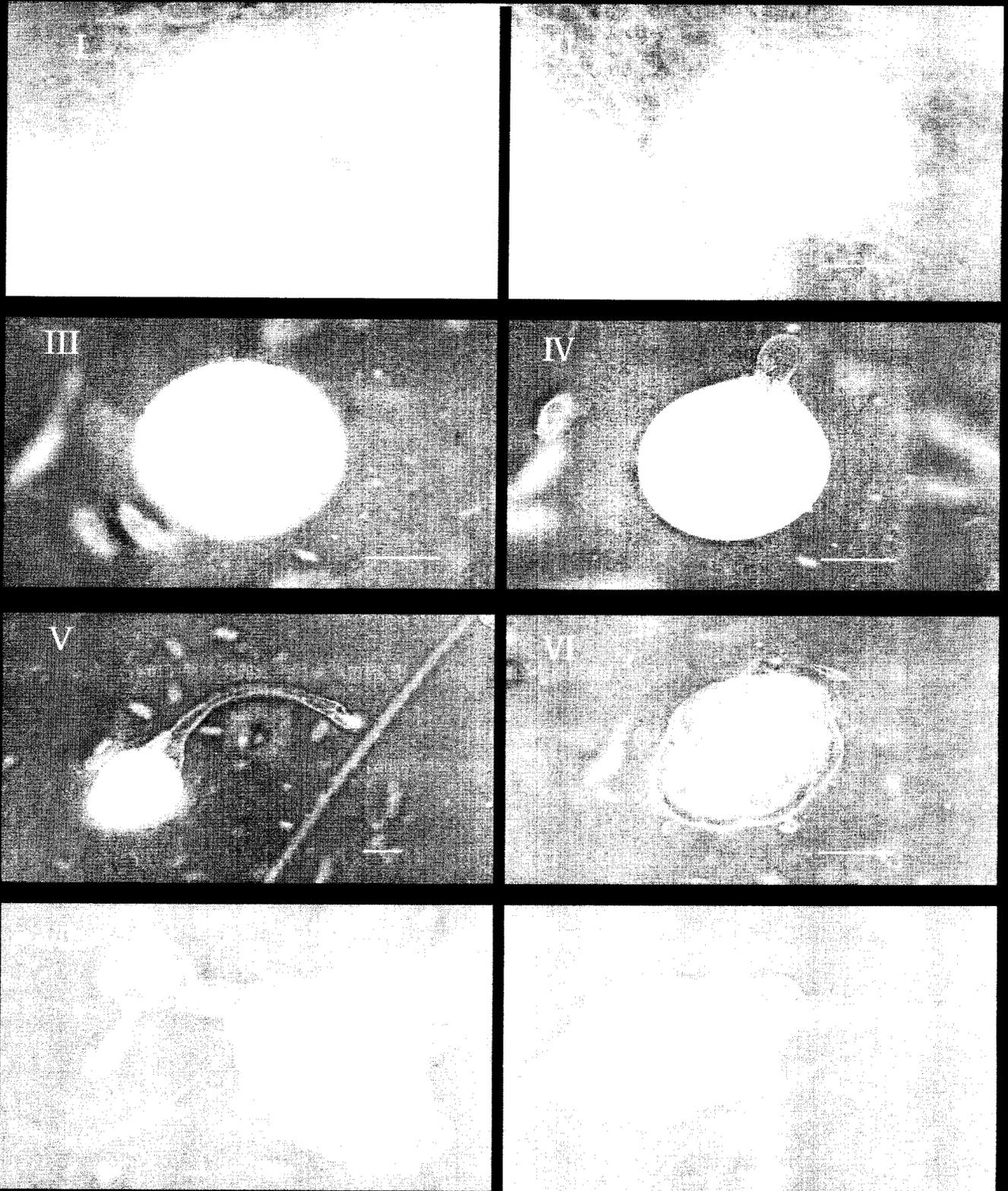


图2 两种孢子囊和孢子的萌发(bar=50 μ m) (I 十字型四分孢子囊(10 \times 40); II 锥面体型四分孢子囊(10 \times 40); III 四分孢子(10 \times 40); IV—VII 孢子萌发形成的苗(10 \times 40)。

Fig.2 Two kinds of sporangia and development of tetraspore (bar=50 μ m)

I Cruciform sporangia(10 \times 40); II Four conical sporangia(10 \times 40); III Tetraspore(10 \times 40); IV Tetraspore develop into four kinds of seedings(10 \times 40).

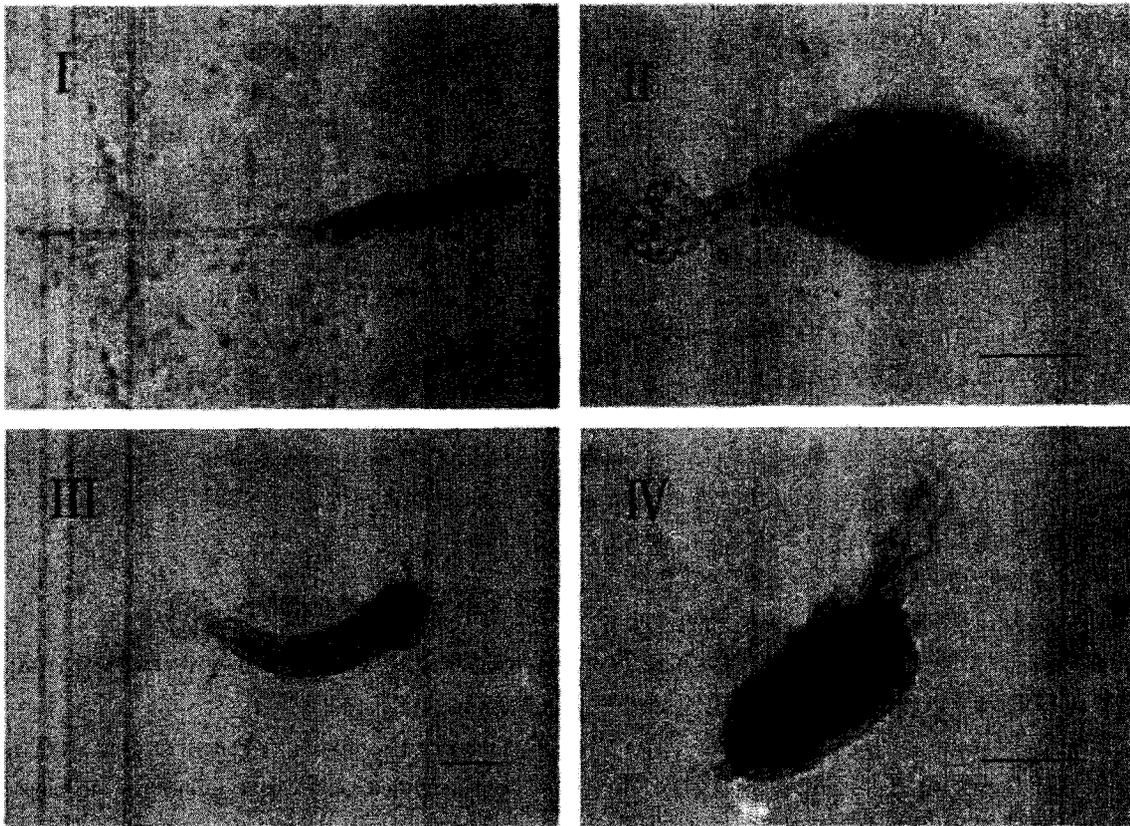


图3 孢子萌发成四种类型的孢子苗(bar=50 μ m)

Fig.3 Tetraspore developed into four kinds of seedlings (bar=50 μ m)

I 无盘状假根, 幼叶状体的长宽比较大的一型苗(10 \times 20); II 具盘状假根, 幼叶状体的长宽比较小的二型苗 (10 \times 40); III 具盘状假根, 幼叶状体的长宽比较大的三型苗(10 \times 20); IV 无盘状假根, 幼叶状体的长宽比较小的四型苗 (10 \times 40)。

I No discoid rhizoid, and the ratio of length and the wide of the young thallus is big(10 \times 40); II Have discoid rhizoid, and the ratio of length and the wide of the young thallus is small(10 \times 40); III Have discoid rhizoid, and the ratio of length and the wide of the young thallus is big(10 \times 40); IV No discoid rhizoid, and the ratio of length and the wide of the young thallus is small(10 \times 40).

条件下, 切段在 PES、mASP₁、mES 中的出芽情况是不同。在 10 $^{\circ}$ C 培养条件下, mES 培养液中切段的出芽数要略高于 mASP₁ 中的, 且两者明显的高于 PES 中的出芽数。在 15 $^{\circ}$ C 培养条件下, ES 培养液中切段的出芽数要远远高于其它两种培养液, 在 PES 中明显高于 mASP₁。在 22 $^{\circ}$ C 培养条件下, mASP₁ 培养液中切段的出芽数明显高于其它两种培养液, PES 也明显的高于 mES。PES 与 mES 培养液中的切段的出芽数在 15 $^{\circ}$ C 培养条件下达到最大值, 而 mASP₁ 却在 15 $^{\circ}$ C 培养条件下出现最小值。在 10 $^{\circ}$ C 下藻体呈深绿色, 15 $^{\circ}$ C 和 22 $^{\circ}$ C 藻体颜色依次变浅。

3.2 孢子的形态和萌发

3.2.1 孢子的形态

软骨藻切段在液体中培养一段时间后, 部分藻体顶端表面形成四分孢子囊, 四分孢子囊的形态有十字型和锥面体两种, 如图 2I,2II 所示。

3.2.2 孢子的萌发

在培养过程中, 我们观察到了软骨藻孢子的萌发形成小苗的过程。在萌发过程中, 四分孢子先在一端形成胶质的假根, 在假根伸长至一定长度后, 四分孢子分裂形成多细胞团, 进而形成四分孢子发育形成的多细胞团, 再发育成苗, 如图 2III- VIII 所示。

3.2.3 苗的形态

在孢子萌发的苗生长过程中我们发现, 在苗生长

20 d 内,由同一切段形成的孢子苗具有多种形态。依据假根是否有盘状固着基及幼叶状体的形态可将苗分为以下几种:一型苗,无盘状假根,幼叶状体的长宽比大于 5:1(图 3 I);二型苗,具盘状假根,幼叶状体的长宽比接近 2:1(图 3 II);三型苗,具盘状假根,幼叶状体的长宽比大于 5:1(图 3 III);四型苗,不具盘状假根,幼叶状体的长宽比接近 2:1(图 3 IV)。继续培养我们发现孢子较易萌发,孢子在 5-7 d 就可萌发成苗,但苗的生长较为缓慢,我们培养的孢子苗在培养 30d 后依然保持苗的状态。

4 讨论 (Discussion)

在软骨藻切段的再生培养过程中,发现较粗壮的主枝部分要比较幼嫩的侧枝部分更易产生新枝,这与尤丽莉发现的龙须菜切段再生的现象一致^[6],我们推测新芽是由切割面外皮层细胞产生的,较粗壮的主枝与较幼嫩的侧枝部分相比横切面积大,外皮层细胞数量多,则产生分枝的数量也较多。但具体结论还有待于进一步试验。

同时还发现软骨藻切段的再生并无明显极性,切段的上下端都可形成再生芽,但总体而言,上端的出芽数要远高于下端,这与顶群藻中部切段再生的出芽情况相似^[7],但不同的是软骨藻的顶端至基部切断的下端均有可能形成再生芽。细弱红翎菜的切段两端也都能长出再生芽,特别是幼嫩藻体^[8]。但顶群藻的顶端和基部的再生芽又具有极性^[7],而同属红藻门的龙须菜在培养过程中有着明显的极性^[6],这从一个方面说明了红藻门是一种进化上比较低等的门,红藻门的植物在再生极性方面存在不确定性。

红藻门的绝大多数种类在无性繁殖时产生四分孢子,其分裂形状有十字形、带型和四面锥形。部分藻类只有一种四分孢子囊,如鹧鸪菜为四面锥型四分孢子囊^[9],江蓠为十字型^[9];也有藻类具有两种类型的四分孢子囊,如石花菜有十字型和带型^[9];本实验中的软骨藻即具有四面锥型和十字型两种。综合本实验中所描述的孢子的四种不同形态可以发现,红藻不仅在再生方式上具有不确定性,在其四分孢子囊形态及孢子苗形态上也有着很大的多样性。

温度对软骨藻出芽率的影响的试验,本试验选取了 10℃、15℃和 22℃三个温度,发现除全人工的 ASP1 培养基外, PES 培养基和 ES 培养基中切段再

生的适宜温度都是 15℃,这与石花菜切段再生的适宜温度一致^[10],海藻在 20℃左右都能保持一定的生长^[9],这很好的解释了本试验中各软骨藻在三个温度条件下都有一定的出芽率。在 10℃条件下,软骨藻的藻体颜色较好,在一定程度上说明较低的温度有助于藻体的保存。在较低温度下藻体的代谢速率较慢,不易腐烂,但同时其生长也受到限制;而相对高的温度促进了藻体的生长但同时也加速了藻体的腐烂。可以根据保种或扩增的需要来改变培养的温度,本次试验的温度设置较为粗略,具体的各个时期的培养温度有待于进一步试验。

本试验只是对软骨藻再生及无性繁殖的初步探索,对于软骨藻具体的生态因子及发育模式还有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 黄宗国主编. 1994. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京, 海洋出版社: 15-233
- [2] Edmonds J S, Shibata Y, Yang F Q, *et al.* 1997. Isolation and synthesis of 1-Deoxy-1-dimethyl- larsinoylribitol-5-sulfate, a natural constituent of *Chondria crassicaulis* and other red algae [J]. *Tetrahedron Letters*, **38** (33), 5819-5820.
- [3] Harada H. 1997. Selective Cytotoxicity of Marine Algae Extracts of Several Human Leukemic Cell Lines [J]. *Cytotechnology*, **25**(1-3): 213-219.
- [4] 殷丽明, 魏云莉, 丁伟. 1988. 青岛沿海常见海藻抗肿瘤及抗菌活性初报[J]. 中国海洋药物, **7**(1/2): 39-41.
- [5] 王素娟主编. 1994. 海藻生物技术[M]. 上海:上海科学技术出版, 20-21.
- [6] 尤丽莉. 2005. 龙须菜切段再生、原生质体分离培养及果孢子与四分孢子的收集和培养的研究[D]. 青岛:中国科学院青岛海洋研究所.
- [7] 陈昌生, 章景荣. 1987. 顶群藻切断离体培养[J]. 福建水产, **1**: 44-49.
- [8] 王素娟, 徐志东, 陈昌生. 1985. 细弱红翎菜髓部组织培养与切段再生[J]. 海洋渔业, **4**: 155-159.
- [9] 李伟新, 朱仲嘉, 刘凤贤编. 1982. 海藻学概论[M]. 上海:上海科学技术出版社.
- [10] 骆其君, 裴鲁青, 费志清. 1993. 不同世代大石花菜切段育苗的生态试验[J]. 东海海洋, **11**(2): 62-66.