

海带愈伤组织的高效率诱导*

王希华 秦松 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于1994年1月和11月在青岛太平角和荣成海带育苗场分别采集海带成熟孢子体和幼孢子体,采用培养基诱导方法,对4种培养基诱导海带愈伤组织的效果,成熟海带孢子体的不同部位在MS固体增富培养基中形成愈伤组织的能力进行了比较;研究了添加不同成分的MS固体增富培养基对海带愈伤组织形成的影响,并比较了4种除菌方法的效果。结果表明,PESI固体培养基和MS固体增富培养基是诱导海带愈伤组织的理想培养基,其诱导率分别为75.5%(24d)和67.3%(90d)。在MS固体增富培养基中培养120d后,生长部、假根和柄部的愈伤组织诱导率分别为80%、78%和67%。在MS固体增富培养基中同时添加6种成分,诱导率为12.5%;而当不添加任何成分时,诱导率为3.2%。1.5%KI结合无菌水的处理方法,对海带组织块的除菌效果比较理想。

关键词 海带 愈伤组织 组织培养

学科分类号 Q945.51

褐藻愈伤组织研究始于70年代(Saga *et al*, 1978),至90年代初,海带目中已有17种诱导愈伤组织获得成功(Notoya *et al*, 1992)。虽然有一些利用液体培养基成功诱导海带幼孢子体形成愈伤组织的报道(Fang *et al*, 1983; Notoya *et al*, 1992),但目前的研究仅观察到了愈伤形成的现象,至今未见对褐藻愈伤组织诱导率的报道。本文报告不同培养基、海带的各种组织、不同添加物对海带愈伤组织诱导效果,以及不同除菌方法的除菌效果的研究结果,以期获得较高的诱导率和较好的除菌效果提供资料,并为海带基因工程操作提供一种有效的植株再生途径。

1 材料与方方法

1.1 材料

成熟(头年生)海带(*Laminaria japonica*)孢子体于1994年1月采于青岛太平角,海带幼孢子体(全长6—7cm)于1994年11月由荣成海带育苗场提供。除去材料上的杂藻污泥,用海水清洗干净,再用煮沸过的海水清洗3次。放入含有氮和磷的营养海水(0.570mol/L NaNO₃, 0.025mol/L KH₂PO₄)中,在光照培养箱中培养(10.0 ± 0.5℃,光暗周期为10h/14h)。

* 国家自然科学基金资助项目,39400076号;国家攀登计划B资助项目,PD B-6-4-1号。王希华,女,出生于1967年3月,助理研究员, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1997-10-10,收修改稿日期:1998-04-12

1.2 方法

1.2.1 培养基的比较 试验了 4 种培养基: MS 液体培养基 (Murashige *et al*, 1962)、MS 固体增富培养基 (MS 液体培养基添加 0.030g/ml 甘露醇、0.001g/ml 酵母提取物、0.5mg/ml V_{B_2} 、0.5mg/ml $V_{B_{12}}$ 、0.1076 μ g/ml 激动素、1.86 μ g/ml NAA)、ASP-C-I 固体培养基 (Saga *et al*, 1982) 和 PESI 固体培养基 (Tatewaki, 1966), 固体培养基为液体培养基添加 1.5% (W/V) 琼脂配成。采用成熟孢子体生长部叶片, 切成 2—3mm \times 2—3mm 的组织块。

1.2.2 海带不同组织的比较 将海带成熟孢子体先用经高压蒸汽灭菌过的海水洗 3—4 次, 再用灭菌手术刀片将生长部叶片、柄、假根切成 2—3mm \times 2—3mm 的组织块, 用下文“1.2.4”中“(3)”的方法进行除菌, 在 MS 固体增富培养基中诱导。

1.2.3 添加物的效果比较 在 MS 固体培养基中分别添加甘露醇 (0.030g/ml) + 酵母提取物 (0.001g/ml)、 V_{B_2} (0.5mg/ml) + $V_{B_{12}}$ (0.5mg/ml)、激动素 (0.1076 μ g/ml) + NAA (1.86 μ g/ml)、甘露醇 + 酵母提取物 + V_{B_2} + $V_{B_{12}}$ + 激动素 + NAA (剂量同上)。另设一对照组 (无任何添加物)。

1.2.4 组织的除菌 除抗生素法处理采用海带幼孢子体作为实验材料以外, 其余均采用海带成熟孢子体。

(1) 1.5%KI + 70% 乙醇处理 (Yan, 1984) 将切好的组织切块在 1.5%KI 溶液中浸泡 10min, 用含 70% 乙醇的棉球擦 3 次, 再用高压蒸汽灭菌海水冲洗 4 遍, 放入 MS 固体增富培养基中培养。

(2) 1.5%KI + 0.01g/ml NaClO 处理 (Yan, 1984; Lee, 1985) 将组织切块在 1.5%KI 溶液中浸泡 10min, 用高压蒸汽灭菌海水洗 2 次, 放入 0.01g/ml NaClO 溶液中处理 30—60s, 再用高压蒸汽灭菌海水洗 2 次, 放入 MS 固体增富培养基中培养。

(3) 1.5%KI + 灭菌海水处理 把组织切块放入 1.5%KI 溶液中浸泡 20min, 再放入无菌水中浸泡 20min, 然后放入高压蒸汽灭菌海水中恢复 20min, 再放入 MS 固体增富培养基中培养。

(4) 抗生素法处理 采用 6—7cm 的海带幼孢子体作为实验材料。将整棵孢子体放入分别含有硫酸链霉素 (500U/ml)、硫酸链霉素 (500U/ml) + 盐酸洁霉素 (1mg/ml)、青霉素钠 (100 μ g/ml) 和硫酸卡那霉素 (500U/ml) 的氮磷营养海水 (0.570mol/L $NaNO_3$, 0.025mol/L KH_2PO_4) 中培养 2—4d, 取出切成小块 (3 \times 3mm), 用高压蒸汽灭菌海水反复冲洗数次, 分别放入含有相应抗生素的 MS 固体增富培养基中培养。培养条件均为: 光暗周期 10h/14h, 光强 1500 lx, 温度 $10.0 \pm 0.5^\circ C$ 。每 15d 更换一次培养基。

诱导率 = (形成愈伤组织的组织切块数/总组织切块数) \times 100%

2 结果

2.1 4 种培养基的诱导效果 (表 1)

用 MS 液体培养基, 经 7d 培养后, 出现大量白色粘稠沉淀, 需经常更换培养基。经过 75d 的培养, 组织切块无明显变化, 也无愈伤组织形成。用 MS 固体培养基经过 35d 培养, 表皮处开始形成愈伤组织, 每个组织切块形成一块愈伤组织, 其表面光滑, 为深褐色或浅褐色; 用 PESI 固体培养基, 经过 20d 培养, 表皮、皮层、髓部均能形成愈伤组织, 愈伤组织块

也出现不同的颜色(黄色、白色)。用 ASP-C-I 固体培养基,前后经过 150d 的实验,无愈伤组织形成。海带不同组织经 120d 的培养,其愈伤组织的诱导率差异不显著。

2.2 海带各种组织的诱导结果(表 1)

海带不同组织经 120d 的培养,愈伤组织的诱导率见表 1,诱导率稍有差异:生长部叶片 > 假根 > 柄部,但差异不显著。

表1 不同培养基和海带各种组织的愈伤组织诱导率

Tab.1 Callus induction rate by using different media and from different tissues of *Laminaria japonica*

项目	培养基				海带组织部位(120d)		
	MS液体(75d)	MS固体(90d)	PESI固体(24d)	ASP-C-I(150d)	生长部叶片	柄部	假根
组织块数	98	104	110	185	30	34	46
愈伤块数	0	70	83	0	24	23	36
诱导率(%)	0	67.3	75.5	0	80	67	78

2.3 添加物对海带愈伤组织形成的影响

MS 固体培养基中添加不同成分经 30d 培养,添加甘露醇 + 酵母提取物愈伤组织诱导率为 11.6%;添加 $V_{B_2} + V_{B_{12}}$ 诱导率为 6.9%;添加激动素 + NAA 诱导率为 6.6%;同时添加以上 6 种成分,诱导率为 12.5%;不添加任何成分诱导率为 3.2%。提示添加物对愈伤组织的形成有促进作用,而甘露醇和酵母提取物的促进作用最显著,尽管 V_{B_2} 、 $V_{B_{12}}$ 、激动素和 NAA 能促进海带愈伤组织的形成,但它们与甘露醇、酵母提取物的协同作用并不十分明显。

2.4 4 种除菌方法的除菌效果(表 2)

本实验使用的 4 种除菌方法中,用 1.5%KI + 70% 乙醇处理的组织块全部染菌;用 1.5%KI + 0.01g/ml NaClO 和 1.5%KI + 无菌蒸馏水处理的组织块的染菌率分别为 58.7% 和 0%;用硫酸链霉素处理 5d 后有 87% 组织块染菌;用硫酸链霉素加盐酸洁霉素处理 5d 后有 50% 组织块染菌;用青霉素钠处理 3d 后有 88% 组织块染菌;用硫酸卡那霉素处理 6d 后无菌落出现,但有些组织块已变绿。由结果可知,1.5%KI + 无菌水处理海带组织块的方法的抑菌效果比较理想,用硫酸卡那霉素处理海带小孢子体除菌效果尽管明显,但处理时间不宜过长。

表2 不同方法处理组织块其除菌效果(2—10d)

Tab.2 Inhibitory results of different methods on bacteria (5—10days)

处理方法	1.5%KI+70%乙醇	1.5%KI+NaClO	1.5%KI+无菌水	抗生素 ¹⁾			
				Str	Str+Lm	Amp	Km
组织块数	185	109	120	62	30	57	55
染菌组织块数	185	64	0	54	15	50	0
污染率(%)	100	58.7	0	87	50	88	0

1) Str为硫酸链霉素; Lm为盐酸洁霉素; Amp为青霉素钠; Km为硫酸卡那霉素

3 讨论

3.1 培养基和添加物

诱导褐藻愈伤组织使用的培养基有 11 种(王希华等, 1995), 常用的有 PESI(Saga *et*

al, 1978)、ASP-C-I (Saga *et al*, 1982)、ASP12-NTA (Saga *et al*, 1983)和人工海水加 PESI 母液(Notoya *et al*, 1992)等。Yan(1984)曾采用 MS 液体培养基诱导海带愈伤成功,但作者在使用这种培养基时出现大量白色粘稠沉淀,而且培养基的 pH 值也显著下降,改变了愈伤组织形成所需要的条件,对愈伤组织的形成不利。出现这种现象的原因可能是海带上的粘液与 MS 中的某种沉淀所致。使用 MS 固体培养基避免了这种现象。本实验发现 PESI 固体培养基在诱导海带成熟孢子体生成愈伤组织最理想,它不仅具有 MS 固体培养基的优点,而且其愈伤组织出现的速度比 MS 固体培养基快。

3.2 海带不同部位的愈伤组织诱导率

愈伤组织的诱导是诱导处于分化状态的细胞去分化,成为分裂状态,从而形成愈伤组织。海带的分化程度很低,应易于诱导去分化。Yan(1984)报道只在皮层和髓部形成愈伤组织,并且叶片的基部和中部形成愈伤组织的能力高于茎部和假根。本实验结果表明,利用 PESI 固体培养基,组织切块的表皮、皮层、髓部均可形成愈伤组织;利用 MS 固体培养基,在同样条件下,海带生长部叶片的愈伤组织诱导率和柄部、假根的诱导率无显著差异。

3.3 不同除菌方法的效果

海藻的无菌处理尚不成熟,一方面由于藻体纤弱,从高等植物发展而来的无菌处理方法并不适用,另一方面由于藻体表面附有大量微生物,而且藻体内部也存在细菌,所以很难做到绝对无菌。海藻的组织处理方法只是停留在除菌而不是无菌阶段(王素娟,1994)。作者认为,海藻组织的无菌程度可根据研究目的而定,如果带菌,第一不能影响实验材料的培养,第二不能因为带菌而引入假阳性结果。本文实验以培养基中有无菌落形成为标准,有菌落形成的即认为染菌,无菌落形成即认为不染菌。经 KI 和乙醇处理的海带,全部染菌。采用 KI 和 NaClO 处理的海带有 58.7% 染菌,但 NaClO 氧化性很强,6—7cm 的幼孢子体放入其中马上脱色。采用 KI 和无菌海水处理的海带无一染菌,效果较好。

3.4 添加物对海带愈伤组织形成的影响

关于植物激素对褐藻愈伤组织形成的影响结果不一。Saga 等(1982)报告 IAA、NAA、2,4-D 和激动素对网管藻(*Dictyosiphon foeniculaceus*)愈伤组织的形成没有作用;Polne-Fuller 等(1987)也报道说在海藻中不存在植物生长因子和细胞分裂素;而 Yan(1984)报道使用合成植物激素 C-751 对海带和裙带菜愈伤组织的形成有明显促进作用。关于其它添加物,Saga 等(1982)在研究网管藻的愈伤组织诱导时发现一定量的甘露醇和酵母提取物有利于网管藻愈伤的形成。从本文的实验结果看,激动素和 NAA 对海带的愈伤形成有促进作用,但甘露醇和酵母提取物的促进作用更显著。甘露醇是海带光合作用的主要产物,所以它可能是海带愈伤组织形成过程中的所需因子。

致谢 青岛海洋大学徐斌老师提供海带材料,中国科学院海洋研究所蒋本禹、高月华二位老师给予指导,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王素娟,1994. 海藻生物技术. 上海:上海科学出版社,19
王希华,秦 松,1995. 褐藻愈伤组织研究. 海洋科学,3:17—20

- Fang Zongxi, Yan Zuomei, Wang Zongcheng, 1983. Some preliminary observations on tissue culture in *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Kexue Tongbao*, 28(2):247—249
- Lee T F, 1985. Aposporous gametophyte formation in stipe explantes from *Laminaria soccharina*. *Bot Mar*, 28:179—185
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Plant Physiol*, 15:473—479
- Notoya M, Nagashima M, Aruga Y, 1992. Influence of light intensity & temperature on callus development in young sporophytes of four species of Laminariales (Phaeophyta). *Kor J Phycol*, 7(1):101—107
- Polne-Fuller M, Gibor A, 1987. Calluses and callus-like growth in seaweeds: induction and culture. *Hydrobiologia*, 151/152:131—138
- Saga N, Uchida T, Sakai Y, 1978. Clone *Laminaria* from single isolated cell. *Bull Jap Fish*, 44(1):87
- Saga N, Motomura T, Sakai Y, 1982. Induction of callus from the marine alga *Dictyosiphon foeniculaceus*. *Plant Cell Physiol*, 23(4):727—730
- Saga N, Sakai Y, 1983. Axenic tissue culture and callus formation of the marine brown alga *Laminaria angustata*. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 49(10):1 561—1 563
- Tatewaki M, 1966. Formation of a crustaceous sporophyte with unilocular sporangia in scytosiphon lomenlaria. *Phylogia*, 6:62—66
- Yan Zuo-mei, 1984. Studies on tissue culture of *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Hydrobiology*, 116/117:314—316

HIGHLY EFFICIENT CALLUS INDUCTION OF *LAMINARIA JAPONICA*

WANG Xi-hua, QIN Song, ZENG Cheng-kui (C.K. Tseng)

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract To obtain a large amount of callus and to look for an effective method for bacteria eliminating, experiments were undertaken from January, 1994 to July, 1996. The materials used were mature sporophytes and young sporophytes of *Laminaria japonica*. Mature sporophytes were collected from Taipingjiao Bay, Qingdao in January, 1994, and young sporophytes were provided by Rongcheng Feeding Farm in November, 1994.

MS liquid medium; enriched MS solid medium [with mannitol (0.030g/ml), yeast extract (0.001g/ml), kinetin (0.107 6 μ g/ml), NAA (1.86 μ g/ml), V_{B2} and V_{B12} (0.5mg/ml each)]; ASP-C-I solid medium and PESI solid medium were used. Solid medium was made from liquid medium by solidification with 1.5% agar. Meristematic zone, stipe and rhizoid were cut off from the mature sporophytes. They were cut into (2—3)mm \times (2—3)mm pieces. Mannitol + yeast extract, V_{B2} + V_{B12}, Kinetin + NAA and all above mentioned additives were added into MS solid medium respectively to compare their effects. Four techniques for eliminating bacteria were tested: (1) 1.5%KI (W/V) + 70%(V/V) alcohol; (2) 1.5% KI + NaClO (0.01g/ml); (3) 1.5% KI + autoclaved water; (4) antibiotics: Str., Str. + Lm., Amp. and Km. Young sporophytes were used in this test.

Tissue pieces were cultured at 10.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C, about 1 500 lx (10h light/14h darkness) light. All

media were renewed every 15 days. Large amount of precipitates occurred in MS liquid medium after 7 days and pH decreased during the culture, which affected the test. No callus formed after five months of induction. No positive result was obtained using ASP-C-I solid medium, either. But in enriched MS solid medium (modified by all the additives mentioned above) and PESI solid medium, inductive efficiency were 67.3% (90d) and 75.5% (24d), respectively.

By using different tissues in enriched MS solid medium, inductive efficiency was: meristematic zones > rhizoids > stipes (120d). By using sterilization method (3), none of the tissues was contaminated, but all tissues were contaminated by using method (1). Most tissues were contaminated by using method (2); by using Str., Str. + Lm., Amp. and Km., the contaminated rate was 87%, 50%, 88%, 0% respectively. The inductive efficiency was 12.5%, 11.6%, 6.9%, 6.6% and 3.2% by using enriched MS solid medium, MS enriched only with mannitol + yeast extract, MS enriched only with $V_{B2} + V_{B12}$, MS enriched only with kinetin + NAA, and MS without any additive, respectively.

The results show that PESI solid and MS modified solid media are ideal media for callus induction of *Laminaria japonica*.

Key words *Laminaria japonica* Callus Tissue culture

Subject classification number Q945.51