

鹧鸪菜再生苗育苗养成技术的研究*

刘凤贤

(上海水产大学)

提 要 本文研究鹧鸪菜微小组织块再生特性及其组织块再生苗附绳育苗养成技术。在组织块的切口处几乎每个细胞都具有分生能力。组织块的大小以50~100个细胞左右为宜,这样大小的组织块再生植株数和再生率均表现出最高值。培养液的最适比重是1.015。培养液中添加5~50ppm壳多糖均能不同程度地促进组织块的再生能力。组织块的附绳固着率以100ppm壳多糖浸泡网绳培养结果最佳。组织块附绳后,在培养箱内平面静止培养15~20天,再生苗肉眼可见,再移养到较大水体水簾箱内冲气培养一个月左右,可成长为自然大小的成体。

关键词 鹧鸪菜,微小组织块,比重,再生力,壳多糖

我国海藻资源十分丰富,人们在长期的生活实践中,已逐渐认识海藻的食用和药用价值。鹧鸪菜(*Caloglossa*)含有丰富的海人草酸(Kainic acid),除了具有驱虫效果外,并对家蝇和蟑螂等昆虫类有良好的毒杀作用^[7]。近年来神经药理学家注意到海人草酸可作工具药,广泛地应用于中枢神经系统的研究,其药用价值有广阔的远景。鉴于上述情况,早在60年代初,我国藻类学工作者已注意到鹧鸪菜这一海藻资源,曾用常规的栽培技术试养过,但因苗种和产量问题未获进展。

近年来随着生物科学技术的进步,藻类组织和体细胞培养的研究,在国内外迅速发展起来,已从藻类切段培养发展到了藻类细胞(包括原生质体)分离培养。王志勇(1989年)^[9]对鹧鸪菜的切段培养和再生,证明其叶状体不同部位的切段培育均能获得再生植株。另外,我国藻类学工作者对海带^[4]、裙带菜^[1]、山东马尾藻^[4]、石花菜^[11]、江蓠^[9]、蜈蚣藻^[6]、红翎菜^[5]、多管藻^[9,10]和仙菜^[10]等藻类作了切段培养也获得完整植株。在细胞培养中,特别是紫菜(*Porphyra*)体细胞分离培养为紫菜栽培业苗种生产提供了新途径。在上述工作的基础上,继作者对鹧鸪菜繁殖生物学基础研究之后,对其营养叶体微小组织块的再生特性和再生苗培育及养成技术进行了系统的探索性实验,获得了可喜的进展。该项育苗养成技术,方法简便易行,效果稳定,成本低廉是一种海藻苗种生产的新方法。现将实验结果报道如下:

材 料 与 方 法

1. 材料来源 1989年3月5日,4月5日,5月25日,采自上海金山县海区防浪堤上自然生长的

* 本校海水养殖专业85级学生孙惠存、张松林同志参加本项研究的部分工作;张敏、周平凡同志协助摄照片在此一并致谢。

收稿年月:1989年10月;1990年3月修改。

鹧鸪菜叶状体。将采来的材料洗去污泥、杂藻,然后一部分放在大培养缸中冲气培养;另一部分阴干后冷藏待用。

2. 培养液 将过滤海水煮至80℃左右,取1000毫升消毒海水配成含 $\text{NO}_3\text{-N}$ 8ppm; $\text{pO}_4\text{-p}$ 0.8 ppm 培养液,再添加 EDTa-Na 4毫克 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5毫克。这种培养液^[13]称之为氮、磷、铁培养液。

3. 实验方法 首先将缸内冲气培养的鹧鸪菜叶状体,选取健康未成熟的藻体,用毛笔充分洗刷干净,再用消毒海水冲洗2~3次,挤去大部分水分称重,然后粗切成0.5~1厘米的藻段,放入组织捣碎机中,调节转速约12000~15000转/分,5~6分钟即可制成一般50个细胞左右,小者在10个细胞以下,大者约100个细胞的微小组织块。所谓微小组织块是以细胞数为标准,其大小要借助显微镜才能分辨,它有别于切段,故称之。按实验要求将制成的微小组织块,加适量的培养液,用滴管均匀地滴洒在预先准备好的玻璃片和苗绳上,分别在不同比重,不同浓度亮多糖培养液中培养和以不同浓度亮多糖液浸泡网绳,进行微小组织块再生苗附绳育苗实验。在培养过程中,一般每星期更换培养液一次,并进行显微检查记数和拍摄照片。整个实验过程是在常温和自然光条件下进行的。

结果与讨论

一、不同比重培养液对鹧鸪菜微小组织块再生力的影响

探讨鹧鸪菜微小组织块再生力与海水比重的关系,目的在于找出其再生苗生长各阶段最适比重的培养液,首先将消毒海水分别配成比重1.005;1.010;1.015;1.020;1.025及1.000(蒸馏水)等六个比重梯度,然后分别加入营养盐,配成氮、磷、铁培养液。在直径9厘米六个培养皿中,各放一个载玻片,用滴管将制成的微小组织块均匀地滴洒在载玻片上,两小时后,分别加入30毫升上述不同比重的培养液,置于常温自然光条件下培养,培养期间的水温变化为14~22.6℃,自然光强(漫射光)500~2000米烛。一星期至十天检查,并更换培养液一次。检查方法,将每种比重的培养皿内的载片取出置于显微镜下,以组织块的大小任选10个细胞以下;11~20个细胞;21~30个细胞及50个细胞左右四种规格各10块组织块,分别进行记数再生芽体数和再生率(表1)。

从表1可以看出:不同比重培养液内的组织块,随着组织块的增大而再生芽数增多;在不同比重的培养液中,不同大小组织块再生芽体的总数和再生率则有明显的差异。如表1中,经过几天培养的检查结果,比重1.000与1.005培养液的再生芽体总数和再生率都显著低于其他比重的培养液。随着培养时间的延长,在培养18天和28天后两次检查结果,其再生芽体总数和再生率的差异在逐渐缩小,特别28天培养的检查结果,比重1.000,1.005,1.010,1.015,1.020,1.025的再生芽体总数分别为112,114,153,161,154,155;再生率分别为82.5%,87.5%,100%,97.5%,100%,97.5%。这个结果与王志勇(1989)再生叶和假根形成与生长速度都以低比重1.005最好的结果不同,从我们实验结果可以看出:组织块在低比重条件下再生芽分化较迟,生长速度也慢。但值得注意的是,在比重1.000即蒸馏水培养液,在培养第9天和第18天两次检查结果,其再生芽体数都比1.005培养液高20%左右,这与另外一个实验微小组织块悬浮液培养结果相似。在消毒自来水培养液中,组织块的增重率甚至比最适比重培养液的增重率还要高,这当然还有其他条件,如与密度、光照和通气等因子有关。这都说明鹧鸪菜微小组织块具有较强的再生力和很强

表1 培养液的比重与组织块的再生力的关系

Table 1 The relationship between the specific gravity of the culture solution and the regeneration capacity

比重组别	组织块的 细胞数	4月1日(培养9天)			4月10日(培养10天)			4月20日(培养38天)					4月31日 (培养39天) 再生苗的 平均长度 (mm)
		再生芽数	再总 生芽数	再生率 (%)	再生芽数	再总 生芽数	再生率 (%)	再生芽数	再总 生芽数	再生率 (%)	再平 均芽 数值	再平 生率 值 (%)	
1.000 (蒸馏水 培养液)	1—10	4	55	30	2	87	60	9	112	82.5	85	57.5	1.0
	11—20	2			10			22					
	21—40	15			18			26					
	50个细胞左右	34			57			55					
1.005	1—10	6	39	37.5	4	68	75	13	114	87.5	74	66.7	2.8
	11—20	12			11			20					
	21—40	7			25			37					
	50个细胞左右	14			32			44					
1.010	1—10	8	108	72.5	7	111	80	27	153	100	134	84.2	5.5
	11—20	20			11			29					
	21—40	39			23			38					
	50个左右	41			64			58					
1.015	1—10	8	109	77.5	15	120	87.5	24	161	97.5	130	87.5	7.0
	11—20	20			26			39					
	21—40	34			29			41					
	50个左右	47			50			67					
1.020	1—10	6	102	70	14	103	80	21	154	100	130	83.5	4.3
	11—20	17			16			18					
	21—40	34			25			31					
	50个左右	55			48			84					
1.025	1—10	2	139	57.5	11	110	72.5	21	155	97.5	135	75.3	4.1
	11—20	13			17			22					
	21—40	23			19			32					
	50个左右	101			63			70					

注:1989年3月28日开始培养; 再生率 = 已开始再生的组织块数 / 组织块总数 · 100%。

的适应能力,它属于广盐性的海藻,不仅在海水中甚至在淡水中也能再生和存活。但在后期,蒸馏水培养液中再生芽体的生长速度就远不如海水甚至低比重组,如表1培养39天的检查结果,在蒸馏水培养液中,再生苗的平均长度仅为1毫米,而在比重1.015培养液组其再生苗的平均长度则达7毫米,这一结果可能与其营养机制和生理状况有关。三次检查同一比重培养液中,再生芽体数和再生率的平均值,比重1.015比1.010,1.020,1.025培养液中的高,但1.025培养液中的再生芽体数略高于1.015培养液,而它的再生率却远低于1.015培养液。如果用肉眼观察再生苗的长势,则1.010,1.015,1.020三个比重梯度的培养液中的再生苗的长势,显著地比其他比重培养液好,其中以1.015培养液中再生苗长势最佳。上述的结果清楚表明,鹧鸪菜微小组织块培养液的适宜比重范围是1.010~

1.025,而最适比重是1.015培养液。同时还表明,鹧鸪菜是广盐性藻类,具有较强的再生力。这为开展鹧鸪菜的增养殖提供了十分有利的条件。

二、鹧鸪菜微小组织块再生苗附绳育苗和养成技术

首要的一个问题是鹧鸪菜组织块大小与再生力的关系,包括组织块再生植株数、假根数、生长速度及再生苗能否牢固地附着在苗绳上等问题,除了鹧鸪菜组织块自身再生特性分化假根以外,还需要采用人工技术措施促进其再生假根的分化和植株的生长。为此,作者研究了下面两个问题。

1. 组织块的大小与再生力 实验证明鹧鸪菜营养叶体具有较强的再生能力,在组织块的切口处几乎每个细胞都具有分生能力(图版—1),在无切口的原藻体的叶缘细胞常常也能分生出大量的再生小叶体(图版—2)。组织块的大小与再生力的关系,由表2结果及上述的比重实验均说明了以50~100个细胞左右的组织块的再生效果最佳,这包括再生叶体数、假根数及再生叶体的生长长度等(见表2)。

表2 组织块大小与再生力

Table 2 The relationship between the size of the tissue pellets and the regeneration capacity

日期	4月20日				4月27日				备注
组织块的大小 (细胞数)	再生叶体 平均数	再生叶体 平均长 (mm)	再生叶体 最长 (mm)	再生假 根数	再生叶 体数	再生叶体 平均长 (mm)	再生叶 体最长 (mm)	再生假 根数	每个组织块再生叶 体、再生假根的平均 数及平均长度
15—20	2	0.11	0.12	0	2	0.28	0.33	2.9	
30—40	4	0.11	0.15	2	9	0.35	0.50	5.9	
50—60	4.3	0.25	0.30	4	3.5	0.50	0.90	3.6	
100个左右	5	0.13	0.17	6	4.6	0.68	0.89	5.4	

注:实验是由1939年4月12日开始;培养期间的水温变化(常温)是15~22.5℃;光照强度(自然光照)1500~3000米烛。

2. 利用壳多糖提高组织块再生苗的附绳力 在比重1.015培养液中添加不同浓度壳多糖,观察鹧鸪菜微小组织块再生苗附绳力。实验结果如表3。表3的结果说明5~50ppm壳多糖培养液,对其组织块再生力均有不同程度的促进作用,其再生植株数及长度的增长都较对照组高,特别再生假根数,在上述浓度范围内,随着培养液中壳多糖浓度提高而增加。据初步观察,鹧鸪菜微小组织块再生假根有三种类型:第一种是微小组织块极端再生假根,它是出现最早的假根,组织块位于原叶体上端切口,一般再生叶体,其下端切口再生假根,表现组织块的再生极性^[14,15](图版—3);第二种多在原叶体边缘部分的组织块上再生,常常与再生叶体间生称之为间生假根(图版—4);第三种是在再生叶体基部生出,称为基根(图版,5)。前两者是在再生初期组织块上的假根,后者则是再生植株出现后,在再生叶体基部产生,随着再生植株的生长,再生假根逐渐发达起来(图版—6)。因此,其附绳力也逐渐提高,同时还发现一定浓度的壳多糖对蓝藻有防治作用,有关这方面研究,有待于进一步验证。抑制蓝藻的繁生,这在组织培养中是很重要的,它是培养成败

表3 不同浓度壳多糖培养液与其组织块的再生

Table 3 The influence of various concentrations of chitin on tissue regeneration

日期	5月17日				5月31日				6月13日		蓝藻污染情况
	再生叶体		再生假根		再生叶体		再生假根		再生苗长度	再生苗颜色	
浓度 (ppm)	数	长度(mm)	数	长度(mm)	数	长度(mm)	数	长度(mm)	(mm)		
对照组	2.1	0.19	1.7	0.39	2.1	1.9	6.4	7.8	4.5	深	很多
5	5.6	0.22	4.7	0.38	2.3	2.7	6.4	5.0	6.6	深	少量
10	3.1	0.18	3.0	0.37	3.0	2.8	7.1	7.2	5.5	深	少量
50	5.3	0.16	2.9	0.30	2.1	2.4	8.7	6.1	6.8	淡	无
100	第二天变红死亡										

注: 实验是由1989年5月10日开始;以每块组织块平均再生叶体数和长度来计算,5月17日,5月31日两次显微检查结果是取10块组织块的平均值;6月13日,检查是将再生苗取下尺子测量10块组织块再生苗长度的平均值。

关键之一。

另外,我们还采用不同浓度壳多糖浸泡附苗绳,进行组织块的固着和再生苗的生长实验。其结果如表4。实验表明壳多糖对鹧鸪菜微小组织块有明显的固着作用,其固着率明显地比对照组高,特别是100ppm壳多糖液浸泡过的苗绳组,组织块附绳效果最佳,再生苗的密度和长势皆在其他组之首。壳多糖实验的详细内容将在另文阐述。

表4 壳多糖浸绳浓度与组织块的固着率

Table 4 The adhesion ratio of the pellets to the ropes which have been soaked in various chitin solutions

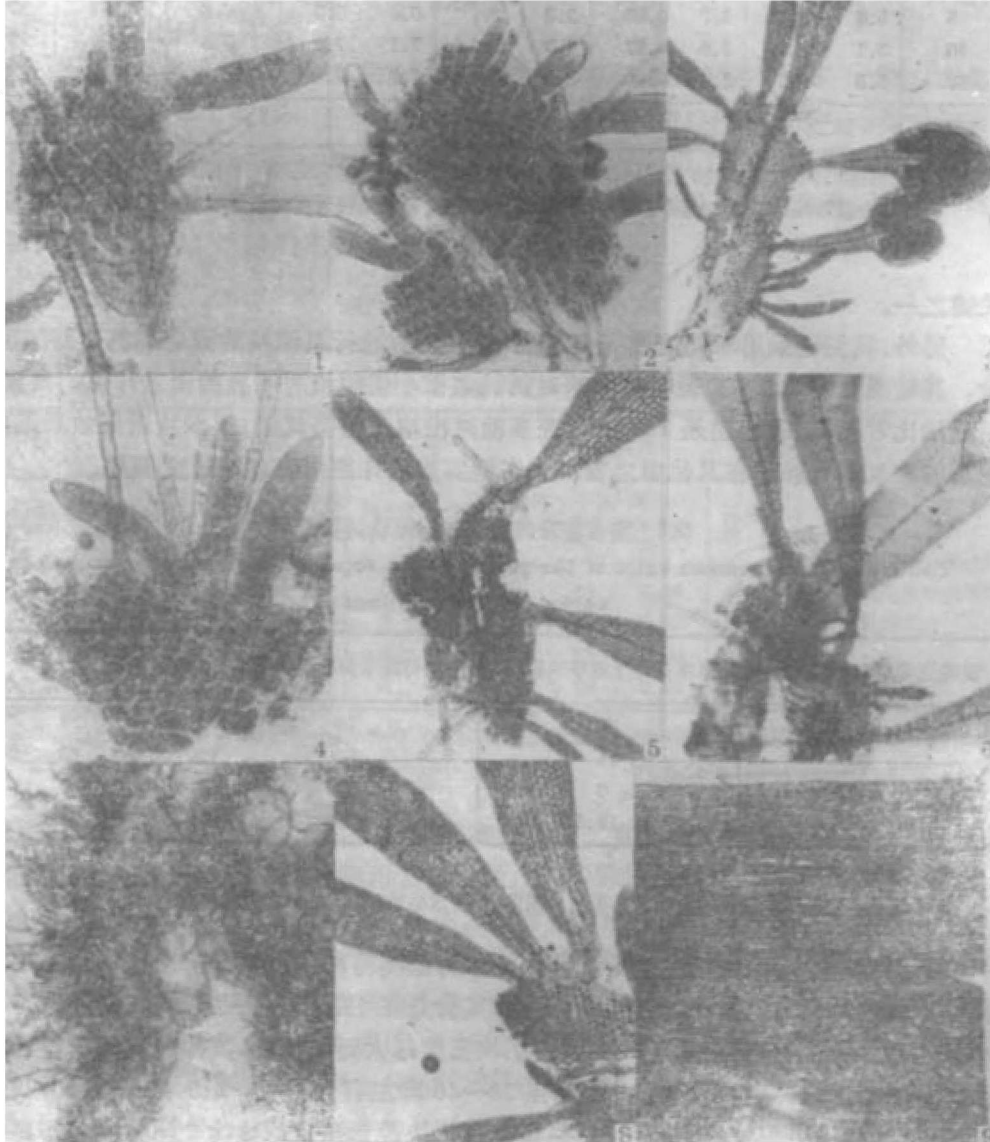
浸绳壳多糖浓度(ppm)	每厘米苗绳上组织块脱落数	平均每厘米苗绳组织块数	固着率
10	9	35	74
50	11	30	63
100	6	37	83
对照	13.5	28	52

注: 培养两周后检查结果;

固着率 = 每厘米苗绳组织块数 - 组织块脱落数 / 厘米苗绳组织块数 × 100%。

鹧鸪菜微小组织块再生苗附绳育苗技术为藻类苗种生产提供了一条新途径,本项育苗技术国内外尚未见报导,属于首次运用,实验是在1989年3~6月间,先后进行了八批小型生产性的试验,其中除了一批因组织块密度过大而失败外,其他各批均获得较好的结果。每厘米苗绳再生植株数,一般都在30~40株左右(图版—7)。如按表4中100ppm壳多糖泡绳组,组织块的附着密度,以每个组织块最低再生株数为2米计算,每厘米苗绳计有再生苗62株,况且组织块的大小与再生植株数差异很大,一百个细胞左右的组织块,一般都在5株以上,有的甚至近十株(图版—8)。根据上海地区的气候条件,可在3~5月间,在常温(在这期间水温变化范围为13~25°C)和自然光条件下,进行鹧鸪菜组织块再生苗附绳育苗养成生产。如果具有控温条件,可以全年生产。其技术要点:1)在组织块附

绳之前,用 100ppm 壳多糖液浸泡苗绳,取出凉干后制条网待用;2),将鹧鸪菜下部基部较老的组织 and 固着器部分切除,减少杂藻的污染和繁殖,取其上部再生力强的营养叶体制成微小组织块。关于鹧鸪菜叶体不同部位切段的再生力,由王志勇(1989年)的实验也说明了中上部叶体切段的再生力强于下部。组织块的大小以 50~100 个细胞为宜,因为组织块过小在 10 个细胞以下再生率低;成株晚、生长速度慢;而组织块过大,在 200 个细胞以上,虽然再生率高,成株快生长也快,但固着率低,很容易从附苗绳脱落下来。3)将制成



图版 Plate

1. 鹧鸪菜组织切口每个细胞都具有分生能力,培养 15 天。 $\times 33$ 2. 具有原叶体边缘细胞组织块上的再生苗。 $\times 33$ 3. 组织块的再生极性示: 极端再生假根和四分孢子叶。 4. 组织块上的再生叶体与间生假根。 $\times 33$ 5. 再生叶状体的基根。 $\times 10$ 6. 成长中的基根。 $\times 10$ 7. 附绳的组织块示: 再生苗的密度。 8. 组织块上的再生苗,培养 31 天。 $\times 10$ 9. 组织块附着在绳网上,培养 15 天。

的微小组织块,用适量的培养液冲稀滴洒在预先准备好的附苗绳上。4) 保持湿润状态两小时后添加氮、磷、铁培养液,刚没过苗绳即可。5) 在室内平面静止培养两周左右,再生植株一般可达 1 毫米左右(图版—9),最大可达 2 毫米,再生苗已较牢固地附着在苗绳上。6) 再将其移养到较大水体培养箱(槽)里冲气培养^[13]一个月左右,可长成自然界大小的成体。我们可以设想,将室内培养 15~20 天鹧鸪菜再生苗,移养到海区或放养在养对虾池内进行生产,或许能够得到较好的生产效果。这有待于今后进一步验证。

本研究所提供的技术和方法具有如下的特点:(1)微小组织块制作方法简便易行。(2)施用一定浓度壳多糖培养液或浸泡附苗绳,它不仅对微小组织块具有营养和固着作用,还可防治兰藻的增生。(3)微小组织块的培养可在常温和自然光条件下进行,室内只要求空气通畅和充足的漫射光。(4)微小组织块从附着分化形成再生苗到养成自然大小的成体均使用一种氮、磷、铁培养液。培养液的配方简单,成本低廉。(5)微小组织块成株速度快。一星期普遍成株,两周肉眼可见小植株,除了吸收培养液的营养外,它还比离体细胞具有得天独厚的组织块自身营养供给的优点,可大大缩短对培养液水环境的适应时间。从鹧鸪菜微小组织块附绳育苗到养成成体,仅化费一个半月的时间就能完成生产的全过程。

总之,鹧鸪菜营养叶体微小组织块附绳育苗养成技术,为开发海藻养殖业,提供了苗种生产的新途径。

参 考 文 献

- [1] 方宗熙等,1982. 海带和裙带菜组织培养的初步观察. 科学通报, 27(11):690~691.
- [2] 王志勇, 1989. 鹧鸪菜组织和细胞培养研究—I(叶状体切段培养和再生). 厦门水产学院学报, (1):10~19.
- [3] 王素娟、章景荣,1981. 多管藻切段再生的研究. 厦门水产学院学报, (1):90~99.
- [4] 王素娟、黄伟,1984. 海藻细胞和组织培养的研究II—山东马藻(*Sargassum shantungensis* Tseng et Zhang) 叶片再生的研究. 海洋湖沼通报, (3):40~47.
- [5] 王素娟等,1985. 细弱红翎菜髓部组织培养与切段再生. 海洋渔业, (4):155~159.
- [6] 房历生、肖培华,1985. 蜈蚣藻离体再生的初步观察. 海洋科学, 9(1):52~54.
- [7] 陈志康,1985. 驱蛔红藻及其药理作用. 海洋药物, 14(2):53~56.
- [8] 陈昌生、章景荣,1987. 顶群藻切段离体培养的研究. 福建水产, (1):44~49.
- [9] 陈昌生等,1987. 五种江蓠切段离体培养的研究. 福建水产, (2):19~24.
- [10] 章景荣等,1982. 仙菜和日本多管藻切段再生的研究. 厦门水产学院学报, (1):1~5.
- [11] 裴鲁青等,1988. 大石花菜切段再生育苗的初步研究. 浙江水产学院学报, 7(2):99~105.
- [12] 赵焕登、张学成, 条斑紫菜营养细胞的分离培养试验. 水产学报, 8(8)197~202.
- [13] 难波武雄,1985. アワビ餌料としてのアオサ人工増殖法. 养殖, (5):102~107.
- [14] Cesira Perrone et Gian Piero Felicini, 1972. Sur les bourgeons adventifs de *Petroglossum nicaeense* (Duby) Schotter (Rhodophycees, Gigartinales) en culture. *Phycologia*, 11(1). 87-95.
- [15] Perrone-Pesola P. C. et G. P. Felicini, 1981. Polarite dans la fronde de *Schottera nicaeensis* (Phylloporaceae). *Ibid*, 20(2): 142-146.

**THE TECHNIQUE OF ROPE-ADHERING SEEDLINGS OF
CALOGLOSSA LEPRIEURII THALLUS
REGENERATED FROM
ITS TISSUE FRAGMENTS**

Liu Fengxian

(Shanghai Fisheries University)

ABSTRACT The regeneration characteristics of the tissue fragments from *Caloglossa leprieurii* thallus were studied and the method of rope-adhering seedlings regenerated from tissue fragments was developed. The results are as follows:

1. The tissue fragments from vegetative leaves possess great capacity of regeneration.

2. The suitable size of the fragment is 50 to 100 cells.

3. The specific gravity of the culture medium is 1.010-1.025, the optimum value is 1.015.

4. The proper amount of chitin added in the culture medium can enhance the regeneration and raise the adhesion ratio of the pellets. Under ordinary temperature and light for 15-20 days of culture, the regeneration buds became visible, after another 30 days of culture in a larger water body with aeration, the algae could grow to normal adult size. The method is easy to operate, and it will probably become a useful technique for seaweed production.

KEYWORDS *Caloglossa leprieurii*, tissue fragments, specific gravity, regeneration capacity, chitin