

植物生长调节剂对冈村枝管藻盘状体生长发育的影响

时艳侠¹, 张学成¹, 孟 振², 朱清华¹

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 研究了 6 苜基腺嘌呤(6 BA)、激动素(KT)、奈乙酸(NAA)和甲壳素 4 种植物生长调节剂对枝管藻(*Cladosiphon okamuranus* Tokida) 盘状体的影响。结果表明: 在试验范围内 6 BA 对盘状体的生长具有较明显的促进作用, 其质量浓度为 0.5 mg/L 时的促进效应最强; 不同质量浓度 KT 下生长的盘状体直径均大于对照, 其最有效质量浓度为 1 mg/L; NAA 可以延长枝管藻盘状体的生长时间, 促进盘状体生长, 其质量浓度为 5 mg/L 时, 盘状体的生长时间被延长 7 d 左右, 直径可达 780 μm, 比对照(540 μm)高出 240 μm; 甲壳素对盘状体生长有明显的抑制作用。

关键词: 冈村枝管藻(*Cladosiphon okamuranus* Tokida); 盘状体; 植物生长调节剂

中图分类号: Q949.28*84

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)04-0001-04

冈村枝管藻(*Cladosiphon okamuranus* Tokida) 是一种丝状褐藻, 属索藻目(Chordariales), 索藻科(Chordariaceae)。枝管藻是暖温-亚热带性海藻, 主要生长在日本冲绳列岛和汤加沿海^[1]。枝管藻的生活史已研究得很透彻: 成熟的孢子体长出同化丝, 同化丝的前端部形成多室的孢子囊, 释放二倍体的中性游孢子, 附着在基质上, 就会发育成盘状体, 盘状体上长出直立藻丝, 继而发育为孢子体; 盘状体也可直接释放出中性游孢子, 再经盘状体发育成孢子体, 重复循环, 形成二倍体的繁殖环。在孢子体同化丝基部形成单室的单倍体孢子囊, 经过减数分裂释放单倍体的游孢子, 发育为盘状体。在生长条件适合的情况下, 形成单倍体配子囊释放出雌雄配子, 配子结合为合子, 合子先发育为盘状体, 再发育为孢子体; 也可能释放出的配子不结合再发育成盘状体, 重复循环。

枝管藻富含褐藻酸和岩藻多糖等生物活性物质^[2], 因而具有很高的经济价值^[3-6]。除了作为美味健康食品外, 还被用来研制和开发保健食品和药品, 其药用价值深受人们的重视, 是一种很理想的引进栽培藻种^[7]。

枝管藻的栽培大致分为保种, 采苗, 下海栽培, 成体采收几个阶段^[8], 它以盘状体的形式保种, 采苗时将保种的枝管藻盘状体倒入灭菌的海水培养液, 盘状体长出直立藻丝后, 可下海栽培。由于采苗时间较长, 所以生产费用开支很大, 而且容易污染。因此优化枝管藻采苗条件, 降低生产成本, 是枝管藻采苗中的一个现实问题。

植物生长调节剂是外源的调节植物生长发育的物质, 它们具有植物激素的活性, 对植物的生长发育起着非常重要的调节作用。本研究从植物生长调节剂入手, 研究其对枝管藻盘状体生长发育的影响, 优化枝管藻的采苗条件。

1 材料和方法

1.1 枝管藻盘状体

采用本室保存的枝管藻盘状体。冲绳枝管藻的同化丝端部有膨大的二倍体孢子囊, 在显微镜下用毛细管将孢子囊挑出, 置于盛有灭菌海水的营养液的试管中, 将试管放在温度为 23℃左右, 光照强度 8 500 lx, 光周期 L:D 为 12 h: 12 h 的条件下培养。当试管壁上出现盘状体时, 将盘状体吸出, 转移到盛有灭菌海水的数个三角瓶中, 在与前相同的条件下培养。两个星期之后, 三角瓶壁上便出现大量的盘状体, 培养液中含有大量的游动孢子, 可作保种之用。

1.2 植物生长调节剂浓度

6 苜基腺嘌呤(6 BA) 是一种人工合成的细胞分裂素, 有促进细胞分裂, 延缓衰老等作用。激动素(KT) 是一种细胞分裂素类植物生长调节剂, 可促进

收稿日期: 2006-02-26; 修回日期: 2006-08-19

基金项目: 国家 948 计划资助项目(2003 Z104)

作者简介: 时艳侠(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 藻类生理和分子遗传学; 张学成, 通讯作者, 教授, 博士生导师, 电话: 0532-82032789, E-mail: xczhang@ouc.edu.cn

细胞分裂和调节细胞分化。萘乙酸(NAA)系萘类具有生长素类活性的植物生长调节剂,广泛分布于各种植物体内,具有促进生长点细胞的分裂和非生长点细胞的伸长等功能。

先将4种植物生长调节剂用蒸馏水配制成母液^[9],它们的质量浓度(表1)以在培养基中的最终浓度计算。

表1 实验用植物生长调节剂的质量浓度

Tab.1 The concentration of plant growth regulators

| 植物生长调节剂 | 质量浓度(mg/L) | | | | |
|---------|------------|-----|-----|-----|------|
| 6-苄氨基嘌呤 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 |
| 激动素 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 |
| 萘乙酸 | 0.1 | 1.0 | 2.5 | 5.0 | 10.0 |
| 甲壳素 | 15 | 30 | 60 | 120 | 240 |

1.3 方法

取无菌保存的已长出褐色直立藻丝的枝管藻盘状体一个,放入含有10 mL Provasoli 培养基的培养皿中,用 parafilm 膜封住培养皿边缘,在光照培养箱中放置24 h,温度23℃,光照强度为8 500 lx,光周期L:D为12 h:12 h。盘状体放散游动孢子,部分游动孢子在24 h内会附着在培养皿底部^[2]。24 h后将盘状体取出,倒掉培养皿中的培养基,并用新的培养基冲洗培养皿3次,将残留藻丝和未附着的游动孢子冲洗掉,只留下附着结实的孢子。之后加入含有植物生长调节剂的 Provasoli 培养基。每种生长调节剂每个浓度进行3个平行培养。另设3个平行对照,只加 Provasoli 培养基。用 parafilm 膜封住培养皿边缘,在培养箱中培养,条件同上。培养到第4天时,在显微镜下观察,每个培养皿选10个盘状体测量其直径,也即每个浓度选30个盘状体,并记录它们在培养皿中所处位置,此后每天定时对所选定的盘状体进行跟踪观察测量。

此过程中所有操作(除观察测量外)均在无菌操作台内完成,观察测量时将用 parafilm 膜密封的培养皿放置在显微镜下进行,不会被细菌污染。所用培养基(维生素和植物生长调节剂经过孔径为0.22 μm 滤膜过滤除菌),保证试验在无菌条件下进行,以排除能释放植物激素的细菌对实验结果造成的影响^[10,11]。

2 结果

2.1 6-苄氨基嘌呤的影响

实验结果见图1。由图1可以看出,细胞分裂素对盘状体的生长具有明显的促进效果,其中以在0.5 mg/L时,6-BA的促进效应最强。在0.5 mg/L下,

盘状体直径可达680 μm左右,比对照(540 μm)超出约140 μm。6-BA在0.1,1,2 mg/L时也可不同程度地促进盘状体的生长。但当在4 mg/L时,如图1所示,6-BA在早期和中期均可促进盘状体生长,在培养到第14天时盘状体停止生长,直径为535 μm,稍低于对照。可见6-BA在4 mg/L时会对盘状体后期的生长表现出轻度抑制。

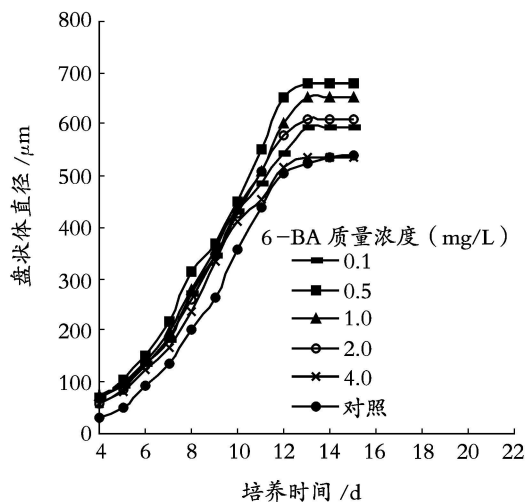


图1 6-BA对盘状体生长的影响

Fig.1 Effect of 6-BA on growth of discoid

2.2 激动素的影响

实验结果见图2。不同浓度的KT均可促进盘状体的生长,其中以1 mg/L时效果最显著。1 mg/LKT下的盘状体生长速度一直遥遥领先,直径可达710 μm,比对照(540 μm)高出170 μm。KT在0.1,0.5,2,4 mg/L时,对盘状体的促进作用差异不显著,盘状体的最终直径在640 μm左右,比对照约大100 μm。

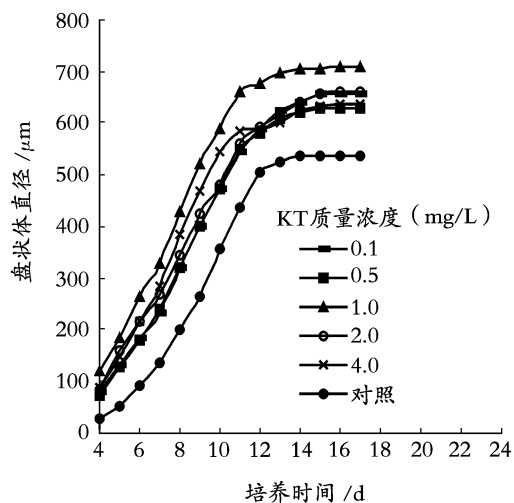


图2 KT对盘状体生长的影响

Fig.2 Effect of KT on growth of discoid

2.3 萘乙酸的影响

实验结果见图 3。萘乙酸对盘状体生长的影响较复杂。在早期, NAA 基本上对盘状体的生长速度不造成影响, 在培养 10 d 时对照生长加速, 并逐渐超过实验组, 在第 14 天时, 对照停止生长, 直径为 540 μm , 而实验组仍继续生长, 在第 15 天时, 实验组盘状体直径均超过对照, 此后, 在含有 0.1 mg/L 和 1 mg/L 的培养基中生长的盘状体逐渐停止生长, 而 2.5, 5, 10 mg/L 的生长势头依然旺盛。在培养 20 d 时, 才趋于平缓, 逐渐不再生长, 可见 NAA 可以延长盘状体的生长时间, 在本实验中, 以 NAA 在 5 mg/L 时效果最佳, 可比对照多生长 7 d, 盘状体直径可达 780 μm 。

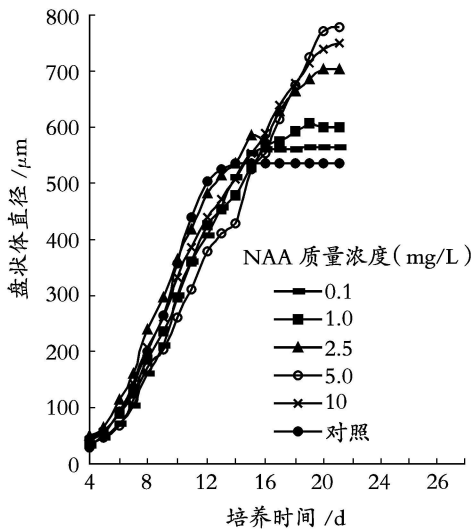


图 3 NAA 对盘状体生长的影响

Fig. 3 Effect of NAA on the growth of discoid

2.4 甲壳素的影响

实验结果见图 4。虽然甲壳素在 0.5, 1, 2 mg/L 下对盘状体早期的生长有促进作用, 但盘状体在第 6 天即停止生长, 直径只有 160 μm 左右, 所以总体上来说, 甲壳素对盘状体生长有较强的抑制效应。

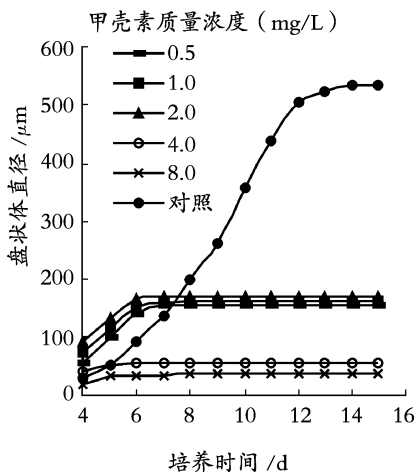


图 4 甲壳素对盘状体生长的影响

Fig. 4 Effect of chitin on growth of discoid

3 讨论

盘状体犹若枝管藻之根, 附着与他物上, 如玻璃、苗绳^[12]等, 使枝管藻在其上生长。在不加激素的条件下, 盘状体直径在 70 μm 左右时, 同化丝长出, 在 300 μm 左右时, 褐色直立藻丝长出, 540 μm 时, 盘状体停止生长, 此后培养基中养分主要用来供给藻丝生长。因此, 盘状体的发育状况在很大程度上决定藻的生长发育状况。

在实验以前, 先确定适合本试验的盘状体浓度。取 3 个培养皿, 分别加入 10 mL Provasoli 培养基, 之后, 在 1 号培养皿中放入 1 个已长直立藻丝的盘状体, 2 号培养皿放 2 个, 3 号放 3 个。24 h 后, 将放入的盘状体洗去, 加入新的 Provasoli 培养基, 4 日后镜检, 发现 2 号、3 号培养皿中小盘状体很拥挤, 有些甚至重叠在一起, 而 1 号培养皿中的小盘状体密度适中, 且分散均匀, 很适合本试验。

植物生长调节剂在高等植物中广泛用于组织或细胞培养^[13], 借鉴高等植物组培中的经验, 经过一系列的预选试验后选定 6-BA、NAA、KT、甲壳素 4 种植物生长调节剂, 来研究它们对枝管藻盘状体生长的影响, 从试验结果来看, 6-BA 和 KT 两种激素的效果是相当显著的。

6-BA 是人工合成的细胞分裂素, 主要是通过对生物体在转录和翻译水平上的控制促进细胞分裂。6-BA 与其受体蛋白结合后, 增强 RNA 聚合酶的活性, 促进 RNA 合成, 由于细胞分裂素存在于核糖体上, 促进核糖体与 mRNA 结合, 形成多核糖体, 加快翻译速度, 形成新的蛋白质^[14]。在本实验中, 6-BA 在 0.5 mg/L 时促进效应最强, 盘装体长势最好。KT 是第一种被提纯鉴定的具有明显促进植物细胞分裂的物质, 但植物体中并不存在。它的功效与 6-BA 相似, 它与染色质结合, 调节基因活性, 促进 RNA 的合成, 从而促进了细胞分裂^[14]。在本试验中, 不同浓度 KT 下生长的盘状体直径均大于对照, 从经济价值考虑, 以 1 mg/L 的效价比最高。而 NAA 的试验结果则更是令人鼓舞的, NAA 是人工合成的生长素, 可以活化质膜上的 ATP 酶, 促进细胞壁环境酸化, 增加可塑性, 从而增强细胞渗透吸水的能力, 同时促进 RNA 和蛋白质的合成, 为原生质体和细胞壁的合成提供原料, 保持持久性增长^[15], 本实验的试验结果与 NAA 的作用机理是相一致的, 盘状体的生长时间被延长了 7 d 左右。不同浓度下生长的盘状体直径也都高于对照, 尤其以 5 mg/L 的为佳。

综上所述, 枝管藻采苗时加入 0.5 mg/L 的 6-BA 或 5 mg/L 的 NAA 或者 1 mg/L 的 KT, 来优

化枝管藻采苗条件, 可以作为枝管藻育种的辅助手段, 提高产量。

参考文献:

[1] Shimamura I, Yamanaka K. Studies on the cultivation of an edible brown alga, *Cladosiphon okamuranus* I, the season for seeding of zoospore and its growth[J]. **Bull Jap Soc Sci Fish**, 1974, **40**(9): 895-902.

[2] Shimamura I, Yamanaka K. Studies on the cultivation of an edible brown alga, *Cladosiphon okamuranus* III, development of zoospores from plurilocular sporangium [J]. **Bull Jap Soc Sci Fish**, 1974, **40**(12): 1213-1222.

[3] 王静凤, 田树川, 邴欣, 等. 枝管藻多糖对久效磷暴露水体中鱼类保护作用的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, **34**(1): 65-68.

[4] 王静凤, 张学成, 田树川, 等. 枝管藻多糖对实验性高脂血症大鼠血脂和过氧化水平的影响[J]. 中国海洋药物, 2003, **3**: 28-32.

[5] 王静凤, 张学成, 姜国良, 等. 枝管藻多糖的提取及其抗凝血活性的初步研究[J]. 中国海洋大学学报, 2003, **33**(1): 75-79.

[6] 王静凤, 张学成. 枝管藻多糖对荷 S180 小鼠的作用[J]. 中国海洋药物, 2002, **6**: 16-19.

[7] 张学成, 郑兰红, 刘素文, 等. 一种新型经济海藻——冈村枝管藻[J]. 中国海洋大学学报, 2004, **34**(5): 807-

810.

[8] Shimamura I. Life history of *Cladosiphon okamuranus* Tokida from southern Japan[J]. **Bull Jap Soc Phycol**, 1977, **25**(Suppl): 333-340.

[9] 韩宝芹, 崔竞进, 刘涛, 等. 植物激素对海带配子体克隆附着的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, **30**(4): 627-630.

[10] Bradley P M. Plants hormones do have a role in controlling growth and development of algae[J]. **J Phycol**, 1991, **27**(2): 317-321.

[11] Evans LV, Trewavas A J. Is algal development controlled by plant growth substance? [J]. **J Phycol**, 1991, **27**(2): 322-326.

[12] Shimamura I, Yamanaka K. Studies on the cultivation of an edible brown alga, *Cladosiphon okamuranus* II. Field culture experiments with a culture net[J]. **Bull Jap Soc Sci Fish**, 1974, **40**(11): 1133-1138.

[13] 侯和胜, 吴超元. 藻类中植物激素的研究进展[A]. 中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊(40)[C]. 北京: 科学出版社, 1998. 167-176.

[14] 潘瑞焱, 董愚得. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 190-203.

[15] 张亚萍, 于文功, 戴继勋, 等. 植物激素在条斑紫菜原生质体固体培养中的作用[J]. 海洋湖沼通报, 2002, **4**: 56-62.

The effect of plant growth regulator on the growth of discoid of *Cladosiphon okamuranus* Tokida

SHI Yan-xia¹, ZHANG Xue-cheng¹, MENG Zhen², ZHU Qing-hua¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Received: Feb., 24, 2006

Key words: *Cladosiphon okamuranus* Tokida; discoid; plant growth regulator

Abstract: The effect of four kinds of plant growth regulators. The effects 6-BA, KT, NAA and chitin on the growth of discoid of *Cladosiphon okamuranus* Tokida were studied. 6-BA had a strong effect of helping the discoid grow bigger. The optimal concentration was 0.5 mg/L. KT of different concentrations stimulated the growth of discoid to a degree. The diameters of discoid growing in different concentrations of KT were all bigger than that of control. KT of 1 mg/L had the maximum stimulating effect. NAA can prolong the growth time of discoid. The growth time of discoid was prolonged for about 7 days by the treatment of 5 mg/L NAA. Meanwhile, the diameter of discoid was 780 μm, bigger than that of control (540 μm). The chitin inhibited the growth of discoid strongly.

(本文编辑:张培新)