



海藻组织和细胞培养研究进展*

中国科学院海洋研究所 张坤诚

一、前言

海藻组织和细胞培养是继陆生高等植物组织和细胞培养工作之后新兴起的一个分枝。它的历史并不长,但发展前途方兴未艾,可以说,它是植物组织和细胞培养工作的又一个“生长点”。迄今为止,据不完全统计,由藻体的某些器官、组织和单个细胞发生完整植株的,有10多种海藻,它们分属于褐藻、红藻和绿藻三个门。应用这一技术研究的问题也日渐广泛。本文就此领域的进展和研究的主要问题作一概述。

概念和意义 植物细胞的“全能性”学说由实验证实之后,使植物组织培养这一概念进一步扩充和发展,它不仅包括组织水平,而且包括从器官、组织、细胞、原生质体及融合细胞到细胞器的培养几个不同的水平,统称为植物组织和细胞培养。显然,就海藻而言,这一概念只适应于多细胞海藻,不包括单细胞海藻。

近年来,这一技术飞速发展,引起了国内外的广泛兴趣和重视,它在理论上和实践上的意义也日益明显,研究的领域也越来越大,已渗透到生物科学的许多学科,如生理生化学、遗传育种学、药理学、病理学、细胞生物学和分子生物学等。事实上,它已成为现代生物学研究的强有力工具之一。

历史和现状 高等植物组织和细胞培养的历史,虽然可以追溯到1902年Haberlandt培养植物叶肉细胞的工作,但真正建立和发展起来,还是三十年代的事。五十年代初,才将这一技术应用于海藻。

海藻组织和细胞培养的早期工作,大都局

限于器官水平的培养与观察,所用的培养基也都是早期用以培养单细胞海藻的外加营养的天然海水培养基,或者简单的人工海水培养基,如ES、PES和ASP培养基等(Erd-Schreiber, 1927; provosoli, 1957),而且培养条件也不是无菌的。真正的海藻组织和细胞培养工作,是近十年来才建立和发展起来的。

国内外的现状,可归纳为如下几点:

(1) 叶状体组织的培养 Moss(1963)和Russell(1970)分别用墨角藻(*Fucus*)和网地藻(*Dictyota*)的叶状体切段发生了假根; Duffield等(1972)和Pearlmutter(1978)分别由格里菲红藻(*Griffithsia pacifica*)和紫红薇草(*Rhodochorton purpureum*)的丝状体和叶状体切段,再生了假根和植株,由墨角藻、角叉菜(*Chondrus*)和海带(*Laminaria*)发生植株的研究,也有一些报导(Fulcher等, 1969年; Moss, 1974; Chen, 1977; Saga, 1977)。特别是Chen(1977)由角叉菜的髓部组织发生了完整的植株,使海藻叶状体组织和细胞的培养技术又推进了一步。

(2) 假根组织的培养 由假根切段形



*承蒙曾呈奎和吴超元两位老师审阅,特此致谢。

叶状体植株的研究,首先在羽藻(*Bryopsis*)获得成功(Jacobs, 1951),而后,又在圈扇藻(*Zonaria*)、网地藻(*Dietyopteris*)、蜈蚣藻(*Grateloupia*)和鹿角菜(*Pelvetia*)等相继获得成功(Kumagai等, 1964, 1972; Murami等1967; Saga, 1978)。此外, McLachlan等(1972)还由四种墨角藻的假根组织发生了类胚体。Saga, (1978)详细研究了由鹿角菜假根组织形成叶状体植株的条件和过程。

(3) 雌、雄配子体及卵细胞的培养 由单细胞的雌、雄配子体发生完整植株的有海带、翅藻(*Alaria clossifolia*)和海胞藻(*Nereocystis*)等(Yabu, 1964; Kemp, 1961; 宗熙, 1977); 由卵和单孢子囊发生植株的有墨角藻和萱藻(*Scytosiphon*)等(Saga, 1972; Tatewaki, 1966)。

(4) 单个藻体细胞的培养 由单个藻体细胞发生完整植株的有狭叶海带(*L. angustata*)和格里菲红藻(*Griffithsia pacifica*)等(Saga, 1977; Duffield, 1972); 由单个藻体细胞培养成配子体的有翅藻(NaKahara, 1973)。

(5) 原生质体及杂交细胞的培养 这方面的的工作还处于探索阶段,虽然已有报导,枝丝藻(*Derbesia*)的一滴原生质体诱导出完整叶状体植株(Rietema, 1972),但一直没有进展,据了解,由海带、紫菜叶状体分离原生质体的工作,已有人在进行,但未见成功的报导。还有人企图用动物、植物和藻类细胞进行细胞杂交,或进行细胞核的移植等工作。毫无疑问,这是一个值得注意的新动向。

二、技术和方法的进展

科学的发展往往取决于材料的选择和技术方法的突破,生物学的发展史充分证明了这一点。植物组织和细胞培养技术的出现,已显示了它的强大生命力,它的进一步发展与完善,必然给海藻学的研究和生物学的发展,带来巨大的突破和深远的影响。

技术和方法的改进 将植物组织和细

胞培养技术用于海藻时,在许多方面需要改进。

(1) 消毒灭菌 这是海藻组织和细胞培养中的一个重要问题,已知附生于海藻表面的细菌有300多个类群,通常用抗菌素处理藻体组织,可以做到无菌(Provasoli, 1957; Fries, 1960, 1963),但有些分枝多、生长缓慢的海藻,细菌常常牢固地附着在其表面上,甚至包埋在藻体表皮细胞间的粘液中。要做无菌,更加困难,高浓度的抗菌素往往对藻体组织和细胞有毒害,甚至致死;低浓度不能消除污染;而且,各种海藻对抗菌素的敏感度也不同;因此,要探索相应的消毒方法。首先,要选择生长健壮的海藻,取其新生的幼嫩部分;其次是选择适当的抗菌素浓度。为了使消毒后的藻体组织和细胞迅速恢复,通常在加适当浓度的萘乙酸和激动素的培养基上,令其恢复一段时间;然后,再在无菌条件下,进行其他分离与培养组织和细胞的手续,效果较好。但是,要最后确定是否无菌,必须由扫描电子显微镜的观察来证实(Chen等, 1977)。

(2) 通气 目前所采用的培养基,有固体的,也有液体的,而且,后者占多数。采用后者时,通气问题显得格外突出,通常用摇动的办法来改善培养物的氧气供应情况(Chen等, 1977)。

值得注意的趋势是,在技术上和方法上,正向着从小量到大量、从粗放到精细的方向发展;在操作上,正向着由手工到自动控制的方向发展。在这个过程中,必然会遇到一些新问题,需要不断加以解决,才能使其更加完善。

2. 培养基配方的改进与发展 培养基是培养物赖以生长发育的必要条件,其中各种成分在质和量上的差异,都会直接或间接对培养物产生影响。海藻组织和细胞培养所用的培养基,是在ES和ASP配方的基础上发展起来的。

培养基的成分包括N、P、K、Na、Ca、Mg和Zn、Cu、Co、Fe、Mo、B、Br及I等大量元素和微量元素;包括硫胺素、泛酸盐、

叶酸、烟酸和生物素等有机营养物质，有时要加一些生理活性物质，如萘乙酸和激动素等（通常不用吲哚乙酸，因为它在高压灭菌时易破坏）。一般不象高等植物那样，用蔗糖做为碳源，也不用加象水解蛋白、氨基酸、椰子乳等有机营养物质。

培养基的盐浓度可以影响某些海藻的生长发育和再生能力，甚至引起藻体形态的变化。多数红藻在28—35%的盐浓度中，生长发育良好，而有些红藻则需要较低的盐浓度，如紫红微草在17%时，生长最快(Pearlmutter, 1978; Rueness, 1973)。

总起来说，海藻材料不同，所用的培养基也不尽相同，在大量元素上差别不大，某些微量营养物质和生理活性物质，在质和量上，可能有所不同。此外，盐浓度、离子平衡和毒性问题，应予以注意。

常用的培养基有 PES、ASP(Provasoli, 1957)、PESI(Tatewaki, 1966)、ASP-M、SWM-3(McLachlan, 1973)、ASP₆-F₂(Fries, 1977)、SWMD-1 和 TC-1 (Chen, 1977) 等几十种。归为天然海水和人工海水培养基两大类（在形式上有固体和液体之分），可根据需要，选择使用。天然海水培养基，成分比较复杂，在研究营养生理和细胞分化机理时，最好采用人工海水培养基。为了适应大量而又迅速的工业化培养的需要，创造一些配方简单、使用方便、经济易得的培养基，将更有实际意义。

三、研究的几个中心问题

利用海藻组织和细胞培养这一技术，可以研究海藻学和生物学中许多重大理论和实践问题，这里概括为如下几个问题。

1. 形态发生 大型海藻形态发生的机理问题，已有一些研究。Saga等(1977)首先研究了海带的某些器官再生植株的问题；其后，又试图了解由海带孢子体单个细胞发生植株的问题。于是，他们先从诱导海带孢子体产生愈伤组织入手，结果在长期培养的条件下，狭叶海带 (*Laminaria angustata*) 的孢子

体，逐渐变成类愈伤组织的结构。从这些类愈伤组织上分离出单个体细胞，在新鲜培养基上，进行培养，并观察其分化情况。结果，首先看到一个单细胞产生一条假根状物，并继续进行单向细胞分裂，形成丝状的个体。几天之后，进行两个方向的细胞分裂，便形成孢子体植株。此结果表明，类愈伤组织的单个细胞，即体细胞，具有“全能性”。它的分化过程和单个配子体细胞的分化过程极相似。

类愈伤组织在人工培养基上生长缓慢，加入本种海带的提取物，生长速度可以恢复正常，这表明某些物质刺激了类愈伤组织细胞的生长和分化。这种提法，尚未肯定，因为培养不是在无菌条件下进行的。

Nakahara等(1973)曾用上述方法，研究过翅藻单个体细胞的分化机理问题，结果，他们得到的是配子体，而不是孢子体。什么原因？未做进一步研究，他认为这些结果对弄清褐藻门的世代交替系统，提供了一个有价值的线索。

方宗熙等(1977)在研究海带配子体的孤雌生殖与无配子生殖(Apogamy)时发现，多数单细胞的雌配子体，先进行营养生长，形成多细胞的丝状体结构，孤雌生殖通常发生在丝状体的末端细胞上，最后发育成孤雌的孢子体植株。多数孤雌孢子体植株不正常，少数却十分正常；无配子生殖是发生在雄配子体形成的丝状体的末端细胞上，而且，发生频率比孤雌的少得多，形成的孤雌孢子体植株形态也很不正常。后来，蒋本禹等(1978)用相似的方法，获得了无配子生殖的形态正常的雄孢子体植株。

关于海带配子体生长分化的条件，一般认为连续的光照和低温、或高温、或低温加维生素C，都可以促进配子体的营养生长(方宗熙等, 1974, 1977)；而弱光和低温可以使配子体保持在单细胞状态二年以上。

由墨角藻和鹿角菜叶状体组织发生植株的过程表明，先产生具有顶端细胞的顶端分生组织，顶端细胞是组织分化为植株的重要控制

，而且，植物生长物质对顶端细胞的分化有明显的作。用一定浓度的植物生长调节剂处理顶端组织，发现萘乙酸和萘氧乙酸，都能促不定枝的形成 (Moss, 1963, 1968, 1974; Usher, 1969)。然而紫红微草和格里菲红的组织和细胞分化及再生植株，却不受顶端细胞的影响 (Duffield, 1972; Pearlmutter, 1978)。

Saga (1978) 由鹿角菜的假根切段，经类体阶段，分化出象母体一样的叶状体植株。认为假根和叶状体具有同样的染色体。然，假根和卵的细胞分化机理则完全不同：用向光照射卵时，在背光面分化出假根；在向面分化出“苗”（即叶状体）。一旦这种极决定后，就不可逆转，即是再照射相反方向光，假根的极也不能再转化为幼苗的极 (Saga, 1974)。他认为离体的假根在分化过程，可能在原生质体的某一点上发生了变化，可以看作在分离假根组织时，原来的细胞受伤而造成的，因而丧失了原来的那种极性。Qeatrano (1968) 认为假根的分化与 RNA 合成有关，在假根分化前，卵中的 RNA 向正在发育的假根极的细胞质方面运动。

Russell (1970) 发现强光抑制网地藻叶状体组织形成假根，而红光（波长 600—690m μ ）促进假根的形成。

关于影响海藻组织和细胞分化的因素，上已提到藻体提取物、维生素 C、植物生长调节剂、温度和光照等。看来，光，特别是光、光量和光的方向，对细胞分化和形态发育起着重要作用，有时起决定性作用，这是一个发人深思的问题。光通过什么物质基础起作用？是否象高等植物那样，形态的发生与生长素和激动素的比例有关，至今没有任何证据。

2. 营养生理 营养问题是海藻研究中的一个中心问题，也是海藻组织和细胞培养研究中的一个中心问题。

众所周知，海洋是生命的摇篮，海水是一天然的、营养丰富的、理想的培养基，据报道，海水中含有 50 多种元素 (Goldberg, 1963)，

其中 10 多种是植物生长发育所必需的 (O'ke-lley, 1974)。因此，用天然海水来研究海藻的营养问题，相当困难。用人工海水培养基，即用组织和细胞培养的方法，则有它的独到之处，从大量元素、微量营养元素到有机营养物质的研究，已有不少论述 (Provasoli, 1963; O'kelley, 1974; McLachlan, 1971; Fries, 1970, 1973, 1975)。

McLachlan (1977) 用墨角藻的胚为材料，详细研究了其生长发育与培养基中 N、P、Fe、Si、B、Br 等元素的关系。他指出，胚的生长随 N、P、Fe 浓度的变化而变化，这三种元素在低浓度时，就可以促进胚的生长，如果缺乏，则严重影响其生长发育。Moss (1964) 用墨角藻的叶状体组织培养，也得到相似的结果。

B 是墨角藻胚生长发育的必要元素，缺 B，胚即很快死亡，刚缺乏时，加少许，即可恢复生长。海水中 B 的浓度比海藻所需要的浓度高得多，因此，在通常情况下，不会因缺 B 而影响海藻的生长发育。

Br 也是墨角藻胚生长发育的必需元素，缺 Br 前期生长缓慢，后期才恢复。墨角藻属的藻体中通常可以积累高达海水中 10 倍以上的 Br，但至今为止，Br 仍未被看作植物生长发育的必要元素。Fries (1975) 指出，Br 可能与 I 相互作用，从而间接地影响海藻。

I 是对海藻有特殊作用的另一种元素，它是红藻的必要元素，也是某些褐藻的必要元素，(Fries, 1966; Woolery, 1973)。奇怪的是，有些褐藻，如墨角藻属，藻体内可以累积高达藻体干重的 0.1% 的碘，但其生长发育似乎不需要碘。

Si 对大型海藻的作用，了解甚少，褐藻类似乎不需要 Si。Si 与 Ge 的相互作用，值得注意，Ge 是硅代谢的抑制剂，但加入过量的 Si 也不能解 Ge 中毒的问题 (McLachlan, 1963)。

Fries 和 Galum (1970) 曾指出，甘露醇可以使墨角藻的胚中毒，他们把这一点归结为

“溺死代谢过程” (“Swamped metabolic processes”)。

此外, Boney (1971) 发现Zn (以 $ZnSO_4$ 形式) 抑制某些红藻的生长。褐藻对所有植物都需要的Zn、Cu、Mg等元素的需求, 还未肯定。

3. 遗传与育种 近年来, 由于高等植物水稻和小麦等花药培养的成功, 并迅速地用于单倍体育种, 启发人们来考虑用相似于花药培养的方法, 来培育大型经济海藻的新品种问题。于是, 海藻配子体的培养工作, 在早期孤雌生殖研究的基础上, 相继展开, 首先在海带上获得成功 (Yabu, 1964; 方宗熙, 1977; 蒋本禹, 1978), 结果表明, 海带的单个雌、雄配子体, 都能形成单倍体的雌、雄孢子体植株, 用秋水仙素处理或自然加倍, 可得二倍体的植株, 孤雌生殖的植株能正常生长发育, 并形成下一代的正常孢子体, 而无配子生殖的植株的发育情况, 尚在观察之中。这样, 可以将雌雄孢子体分开, 减少了在配子体阶段人工分离雌、雄的麻烦。同时, 在适当的条件下, 雌、雄配子体可以进行营养生长, 形成具有多丝状体分枝的愈伤组织, 将其撕破, 即可得到一个或多个丝状体组织块, 由此可以建立起无性繁殖系。这些无性繁殖系在适当条件下, 又可以再分化为孢子体植株。而且, 这些无性繁殖系可以较长时的保存, 这样, 就为遗传和育种研究提供了及时、方便的材料, 以缩短育种周期。

令人感兴趣的是对这些孤雌和无配子生殖所形成的孢子体遗传学研究。众所周知, 通常海带的孢子体是无性的, 但方宗熙等 (1977) 发现孤雌生殖形成的孢子体, 全部是雌孢子体; 而无配子生殖形成的孢子体, 则生长发育不正常。分析它们的遗传原因时, 他们指出, 这是由于雌、雄配子体之间遗传物质基础的不同。Evans (1966) 曾报道, 在雌配子体的细胞中, 看到了一条大的染色体, 他把它看作性染色体, 但没有确凿证据来说明这一点。方宗熙等未观察到特别大的染色体, 他们认为, 如果有性染色体的话, 也不一定是一条大的染色

体, 很可能某些基因存在于某些染色体上。

然而, 蒋本禹等 (1978) 用同样的材料和方法, 获得了不同的结果, 由孤雌生殖形成的孢子体, 并不全是雌的, 而有一部分是无性的, 后者性成熟时, 产生雌、雄两种配子体。他们还首次成功地从雄配子体发生了正常生长的孢子体, 其性成熟及后代情况, 尚在继续观察之中。关于它们的遗传问题, 值得进一步探讨。

4. 激素的来源和作用 高等植物可以产生内源的、对其本身生长发育有重要作用的植物激素, 这是早已证明了的、确凿无疑的事实。而且, 现在人们可以人工合成许多能够促进或抑制植物生长发育的植物生长调节剂。

大型海藻的生长发育也需要植物激素或植物生长调节剂, 这也是许多藻类学家早已注意并且得到公认的事实 (Davidson, 1950, 1952; Benlter 等, 1958; Able 等, 1974)。近年来, 又从某些海藻中提取出植物激素, 如 Able 等 (1974) 从裙带菜 (*Undaria suringar*) 的藻体中, 分离鉴定了植物激素吲哚乙酸和苯乙酸的存在, 并认为这些植物激素是藻体产生的。

遗憾的是, 他们的实验是在有菌的条件下进行的, 就是说, 他们所用的藻体都是带菌的。自从证实海洋细菌可以产生和合成某些植物激素和植物生长调节剂之后 (Schiewer, 1967), 大型海藻可以自身产生植物激素的结论被怀疑了 (Buggeln 和 Graigie, 1971)。后来, Buggeln (1976) 用海带等九种褐藻做了进一步的研究, 未鉴定出内源植物激素的存在, 从而, 他甚至怀疑植物激素和生长调节剂在海藻中作为内源激素的作用。这些问题多年没有得到令人信服结论。

争论的焦点是, 这些植物激素是藻体自身产生的, 还是附生在藻体表面的细菌产生的, 或是细菌和海藻两者相互作用, 诱导藻体产生的。海藻组织和细胞无菌培养技术的应用, 对回答这些问题, 有它独特的优点。

Fries (1977) 用墨角藻叶状体的组织培养表明, 无菌不加植物激素的组, 生长缓慢, 四个月才 1 cm, 形态也不正常, 叶片纤细而

呈圆柱形,分枝也少,只有假根系统发育正常;而无菌加激素(苯乙酸和对羟基苯乙酸)的对照组,叶状体宽而扁平,稍呈波浪形,分枝也多,和有菌不加激素的对照组生长情况相似,表现了典型的墨角藻的特点。因此,他认为,植物激素对褐藻的生长发育有很大影响,苯乙酸和对羟基苯乙酸可以看作褐藻的生长调节剂,但它不是由藻体产生的,不属于褐藻的生源激素。它与其他植物激素的相互作用,值得研究。这对进一步弄清海藻植物激素的来源和作用,将有更大帮助。

5. 生物合成和胞外产物 利用植物组织和细胞培养技术,可以生产许多药物和生物制品,在高等植物方面,已经进入了工业化生产的规模;在海藻方面,报导不多。海藻的合成代谢产物的研究及利用,已成为海藻化学和海藻化学工业的重要内容。海藻的分泌产物也受到重视, Hellebust (1974) 详细评述了近年来的进展,他指出已研究过的海藻胞外产物包括:碳水化合物(如多糖、单糖和甘露醇等)、含氮化合物(如蛋白质、多肽、氨基酸和核酸等)、脂肪、有机酸(如柠檬酸、乳酸、酮酸等)、酚类化合物、维生素和酶等。除一般海藻外,大型经济海藻如海带、紫菜和角菜等,也有一些研究(Jones, 1961, 1962; Lieburth, 1969; Melachlan, 1964)。海藻的这些分泌物,不仅对海藻本身的生理活动有重要作用,而且对海洋食物链及生态系也有重要影响。用海藻组织和细胞培养技术来研究和利用这其中某些特殊的、有经济价值的产物的工作,应该说,还处于探索阶段,离生产应用还差很远。但它的意义很大,前途广阔,它很可能成为开发和利用海洋资源的一个重要方面。

四、后语和展望

从以上的概述可以看出,海藻组织和细胞培养工作,与高等植物相比,历史较短,但成就还是较显著的。由于它有高等植物方面的工作为基础和借鉴,再加上海藻本身具有遗传型的多样性和进化史上的原始性等特点,是进

行比较研究的好材料,它的发展前途是无可估量的。无疑,随着这一技术的引入和发展,海藻很可能成为研究许多重大生物学问题的好材料,从而促进生物科学的发展;反过来,生物科学的进一步发展,又丰富了海藻学研究的内容,提高了研究的水平。此外,海藻组织和细胞培养技术,在进一步开发和利用海洋资源及实现海洋农牧化方面,也一定会做出应有的贡献!

根据近年来发展的趋势,展望未来,可以预期下面几点会有迅速的发展和突破。

1. 广泛地应用海藻细胞的“全能性”,建立大型经济海藻的无性繁殖系,为遗传学和育种学的研究,提供遗传上稳定一致的、不受季节性限制的、方便理想的好材料;为大型经济海藻的养殖事业,提供了大量的试管苗。

2. 用以筛选人类所需要的、有经济价值的、有意义的突变体细胞或再生植株;用以繁殖常规法不易繁殖的海藻新品种。

3. 通过海藻的组织和细胞的大量工业化培养,生产海藻中所特有的许多化工原料和产品、药物和生物制品,如褐藻胶、柯拉胶、碘、藻类色素、蛋白质和酶类等。

4. 用以研究海藻分类学中、目前有争议或悬而未解的某些问题,如生活史和分类系统等。

5. 用于海藻原生质体和杂交细胞的培养,一旦从海藻组织和细胞游离出原生质体,就可以进行细胞杂交,创造新品种;或将某些生物大分子,如DNA和RNA等引入原生质体,以使细胞发生转化,这不仅对遗传育种学有实践意义,而且对研究生物科学中的某些重大理论问题,特别有远缘杂交和分子生物学问题,也会提供新的线索和启示。

当然,要做到这几点,尚需做大量艰苦的工作。满意结果的取得,要靠集体的智慧和各个学科的互相促进,要靠理论上的创造和技术上的改进。

让我们跟上世界各国对植物组织和细胞培养的理论 and 实践研究的步伐,并让这一技术在海藻学研究中迅速地生根、开花、结果!