

褐藻愈伤组织研究*

AN OVERVIEW ON STUDIES OF BROWN ALGAL CALLUS

王希华 秦松

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海藻愈伤组织培养,是继 50 年代的切段或器官培养,到 70~80 年代发展起来的,是海藻组织培养的一个分支。它的兴起,使海藻组织培养的概念得以扩充和发展,也为理论研究和实践应用开辟了一条崭新的道路。

1 研究渊源

根据植物细胞的全能性,植物的任何组织、器官和细胞,在离体培养时,先经历一个脱分化过程,形成一团在形态、生理上有别于正常细胞的一团细胞,即愈伤组织。褐藻的愈伤组织概念符合高等植物。这种愈伤组织,给予合适条件,就能重新分化,发育成正常的孢子体;还可以长期保存;还能通过悬浮培养而迅速增殖,以用作无性系;也可以用作原生质体的来源;还可以用作提供有用化合物的材料之一^[1]。因此,褐藻愈伤组织,为理论研究和生产实践都提供了简捷、方便的材料。

海藻的组织培养于 50 年代初开展起来,当时主要局限于器官水平的观察与培养,所用的培养基也都是以往培养单细胞海藻的外加营养的天然海水培养基或简单的人工海水培养基。如 ES, PES, ASP 等,而且培养条件也不是无菌的^[2]。到 70 年代发展起了海藻愈伤组织培养技术,使海藻组织培养研究达到较高水平,如对组织的无菌处理有了较高要求,并利用愈伤组织进行了海藻的营养生理、遗传育种、形态发生机制等研究。

褐藻愈伤组织研究始于 1978 年 Saga 研究海带。他在获得愈伤组织后,从愈伤组织中分离到单个细胞,并诱导成孢子体,首次证明了愈伤组织细胞的全能性。此后热点主要集中于愈伤形成的条件,影响愈伤形成的因素以及愈伤组织的应用。表 1 列出了迄今已成功获得愈伤组织的褐藻种类。

2 诱导愈伤组织的技术方法

决定褐藻愈伤形成与分化的因素有两种,即内因和外因。内因即材料本身的因素,主要由材料的健康情况、

所取材料的部位及生理状况所决定;外因即培养条件,包括培养基、温度、光照时间及光照强度等。下面就几个关键问题作一下综述。

2.1 取材

愈伤组织的形成、分化与所选材料关系很大,不仅仅在于其健康状况,而且即使同一种的不同部位、不同取材时间,对愈伤形成和分化影响也很大。如羊栖菜(*Sargassum fusiformis*)的假根可以形成愈伤组织^[10],而糖海带(*Laminaria saccharina*)的茎能形成愈伤组织并再分化成孢子体^[5]。闫祚美(1984)曾对海带(*L. japonica*)和裙带菜(*undaria pinnatifida*)的不同组织作比较,发现叶片基部(生长点)和中带部形成愈伤和再分化的概率最大,柄部次之,假根部最差,且后两部分很难再分化成孢子体^[14];Fries(1980)在研究掌状海带(*Laminaria digitata*)和海带(*L. hyperborea*)的无菌组织培养时,曾对取材时间作了研究,证明秋天和晚秋时采集的材料最容易诱导愈伤,五月份采集的能形成愈伤,而 3 月份的不能形成愈伤,对这种现象的原因 Fries 没有作进一步的解释^[14]。因此,在研究褐藻愈伤组织的形成与分化时,应注意取材规律。

2.2 无菌处理

得到高等植物的无菌组织已不是什么难题,但海藻无菌组织的获得却比较困难。这是因为海藻藻体比较纤弱,渗透性又强,用高等植物灭菌的方法和药物一般不合适,表 2 列举了常用的几种方法。综合这些方法,在我们的褐藻组织培养中,采用灭菌海水、NaClO 等处理,收到比较理想的效果。海藻组织无菌处理的技术虽然有了较大进步,但总的来说还不够成熟,要达到绝对无菌还需要做进一步的工作。现在的海藻组织处理只是停留在少菌而不是无菌阶段^[1]。作者认为,褐藻愈伤组织培养

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2563 号。
实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 107 号。
收稿日期:1994 年 11 月 16 日

中材料的无菌处理程度,也要视培养目的而定,如果只单纯地为了得到愈伤组织而不是研究影响愈伤组织形成的因素或代谢机制,有少量细菌也无妨,而且细菌的

某些代谢产物还可能刺激愈伤的形成^[2]。在我们的实验中,曾发现愈伤组织在菌落中长出,而且比无菌状态的组织形成得快的现象。

表 1 褐藻愈伤组织培养情况

种类	部位	情况	培养基	激素	文献
<i>Laminaria angustata</i>	幼叶	愈伤→孢子体	PESI	—	[11]
<i>L. digitata</i> , <i>L. hyperborea</i>	叶	愈伤→孢子体	ASP6F ₂ EA1	NAA Kinetin	[4]
<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i>	原枝体	愈伤	ASP-C-I	—	[12]
<i>L. japonica</i> , <i>V. Pinnatifida</i>	叶、茎、假根	愈伤→孢子体	MS	-751	[5]
<i>L. angustata</i>	茎	愈伤	ASP12-NTA, PESI	—	[13]
<i>L. japonica</i> , <i>V. Pinnatifida</i>	叶、茎、假根	愈伤→孢子体	MS	C-751	[14]
<i>L. Saccharina</i>	茎	愈伤→孢子体	PESI, SWA, ASP6F ₂	—	[6]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	叶、茎、假根	愈伤	PES, PESI, PESI-JS, MG-JS	—	[8]
<i>E. cava</i>	叶	愈伤→孢子体	Jamarin S	—	[9]
	茎	愈伤	PES	—	[9]
	假根	愈伤	PES	—	[9]

表 2 褐藻组织处理的方法

种类	方法	文献
<i>Fucus spiralis</i>	70%酒精浸泡	Fries, 1977
<i>Laminaria digitata</i> , <i>L. hyperborea</i>	NaClO 浸泡 30~60 秒	[4]
<i>L. angustata</i>	打孔法	[13]
<i>L. japonica</i> , <i>Undaria pinnatifida</i>	1.5%KI 浸泡 10 分钟和 70%酒精处理	[14]
<i>L. saccharina</i>	1%或 1%NaClO 浸泡 1~12 分钟	[6]
<i>Ecklonia stolonifera</i>	无水酒精处理	[8]

表 3 褐藻愈伤组织培养使用的培养基

种类	培养基	文献
<i>L. digitata</i> , <i>L. hyperborea</i>	ASP6F ₂	[4]
<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i>	ASP-C-I	[12]
<i>L. angustata</i>	ASP12-NTA	[13]
<i>L. angustata</i>	PESI	[13]
<i>L. japonica</i> , <i>V. pinnatifida</i>	MS	[14]
<i>Sargassum muticum</i>	PES	
<i>Pelvetia fastigilata</i>	ASP-C-I	
<i>Cystoseira osmundacea</i>	ASP12-NTA	[10]
<i>L. sinclairii</i>	ASP6F ₂	
<i>S. fluitans</i>	MS	
<i>Egregia menziesii</i>		
<i>Macrocystis pyrifera</i>		
<i>Ecklonia</i>	PESI	[8]

2.3 培养基

具体应用在海藻组织培养的培养基大致分两类:一类是加营养盐及附加成分的海水培养基;另一类是完全人工配制的人工海水培养基^[1]。培养基的选择很重要,

不同藻类愈伤组织的形成与分化,对营养的要求也不尽相同,表 3 列出了不同种类的褐藻愈伤组织培养常用的培养基。

表 4 激素在褐藻愈伤诱导中的使用情况

激素种类	浓度	藻种类	文献
NAA	10 ⁻⁵ mol/L	<i>L. digitata</i>	[4]
Kinetin	5×10 ⁻⁷ mol/L	<i>L. hyperborea</i>	[4]
IAA	10 ⁻⁸ mol/L	<i>Fucus spirul</i>	Fries, 1983
C-751	5mg/L	<i>L. japonica</i> , <i>V. pinnatifida</i>	[14]

2.4 激素及其他生长因子

褐藻愈伤组织的形成与分化机理比较复杂,除了必要的营养条件外,象高等植物那样,还需要外界因素刺激诱导,使原来处于静止状态的细胞活动加强,从而引起细胞的不断分裂。常用的诱导剂有 IAA, NAA, 2, 4-D, kinetin, GA₃ 等,见表 4。另外,据 Saga(1982)报道,在研究网管藻(*Dictyosiphon foeniculaceus*)的愈伤时,加入酵母提取物(0.1%, W/V)和甘露醇 3%(W/V)很有效;还有人

表 5 利用愈伤组织研究形态发生机制

类型	种类	文献
愈伤组织→雌雄配子体→排卵或雄配子 ^{受精} →孢子体	<i>L. digitata</i> , <i>L. hyperborea</i>	[4]
愈伤组织→外层细胞变大、颜色变浅→丝状体 ^{3~4次横向分裂、纵向分裂} →孢子体	<i>L. japonica</i> , <i>U. pinnatifida</i>	[14]
类愈伤组织→丝状体(带色素的、分枝的)→雌雄配子体→小孢子体→叶片表面长出小孢子体并有类假根 ↓ 末端长出假根	<i>L. saccharina</i>	[6]
配子体碎块→短的念珠状的类愈伤克隆→丝状体 →丝状体→单性生殖的孢子体	<i>Macrocystis</i> , <i>Laminaria</i>	[10]
透明愈伤组织 →七个细胞的假根 →新愈伤组织	<i>Laminariales</i> <i>Sargassum muticum</i> <i>S. stultans laminariales</i>	[10]
深褐色愈伤组织→原生质体→愈伤→孢子体	<i>Sargassum muticum</i>	[10]
类愈伤组织→圆形丝状体、组织块或1~2层类叶状体组织 纵向或不规则分裂→类孢子体(无根)	<i>Ecklonia cava</i>	[1]

用活性炭处理培养基^[4],也得到比较好的效果。据分析,活性炭能够吸附培养基中阻碍愈伤形成的因子^[5],从而达到促进愈伤形成的效果。

3 利用愈伤组织研究的几个方面

3.1 形态发生的机制

利用愈伤组织研究褐藻的形态发生机制始于1978年 Saga 研究海带属。他利用狭叶海带 (*Laminaria angustata*) 的孢子体诱导愈伤成功,然后从愈伤组织中分离到单个细胞,经过培养,单细胞长出一条假根,并继续沿单向分裂,长成丝状体。3~4d后,沿两个方向分裂,形成了孢子体。这个结果证明了愈伤组织单个细胞的全能性。Nakahara 等^[7](1973)研究了翅藻单个细胞的分化机理,结果得到了配子体,而没有得到孢子体。这些结果对弄清褐藻的世代交替提供了一个有价值的线索。

利用愈伤组织研究形态发生机制的文献见表 5。

3.2 世代交替研究

Lee 在研究糖海带 (*L. saccharina*) 时对从愈伤组织而来的配子体的形成及配子体的倍性做了研究。从孢子体茎部形成的类愈伤组织发展形成了雌雄配子体。Lee 认为这些配子体是通过无配子生殖形成的,是二倍体^[6]。Fries 在研究海带 (*L. hyperborea*) 时发现了从愈伤组织而来的雌雄分开的配子体。她认为这是由减数分裂形成,

配子体是单倍体^[4]。Lee 还推测,在糖海带的配子体当初形成孢子体时,就发生了无配子生殖或孤雌生殖。Lee 还发现了一个很有趣的现象:从糖海带的配子体形成的孢子体进一步发展,在其叶片表面形成大量的细胞块和类幼孢子体^[6]。

3.3 育种

利用高等植物组织培养快速繁殖在1960年就已应用,这种方法速度快,取材方便,不受时间、季节限制,能够节省人力物力,在褐藻中应用潜力也很大。例如海带,其愈伤组织含有数亿个细胞,每个细胞都能进一步发展成一个孢子体细胞克隆,这种孢子体细胞克隆生长快、耐高温,且能长期保存,在海上培养都能长成孢子体。因为每个克隆都源于一个细胞,便于遗传操作,对固定杂种优势、保存好的基因型提供了理想的材料。所以,愈伤组织的培养,不仅为遗传育种提供了方便的材料,也为海藻的遗传、生理及生化研究开辟了一条崭新道路。

4 前景与意义

海洋是生命的摇篮,其丰富的海藻资源正越来越受人们的重视,应用海藻生物技术开发和利用海藻资源方兴未艾。60年代初,我国生物学家利用海带自交、诱变等一系列育种技术,培育出许多高产、早熟、耐高温的海带新品种,使我国的海带产量从1952年的62t鲜品提高到

现在每年 25t 干品,跃居世界首位^①。70 年代发展起来的愈伤组织培养,又为研究藻类的形态发生机制以及遗传育种等提供了极为方便的材料,也为我们利用基因工程这种最直接、最有利的手段培育优质高产的海藻新品种提供了材料。我们可以利用基因枪将外源基因打入带壁的海藻组织块,通过诱导愈伤得到转基因的植株^[3]。目前从愈伤组织再生孢子体的研究正在进行中。

褐藻愈伤组织的研究将为海藻生物技术发展做出重大贡献。

参考文献

- [1] 王素娟,1994. 海藻生物技术. 上海科学出版社,第 19, 20,35 页。
- [2] 张坤诚,1979. 海洋科学 4:41~46。
- [3] 秦松等,1994. 海洋与湖沼 25(4):353~356。

- [4] Fries, L., 1980. *J. Phycol.* 16: 475-477.
- [5] Fang Zongxi *et al.*, 1983. *Kexue Tongbao* 28(2): 247-249.
- [6] Lee, 1985. *Botanica Marina* XXV II: 179-185.
- [7] H. Nakahara and Y. Nakamura, 1973. *Mar. Biol.* 18: 327-332.
- [8] Notoya, M., 1988. *Jap. J. Phycol.* 36: 175-177.
- [9] Notoya, M. and Y. Aruga, 1989. *Jap. J. Phycol.* 37: 302-304.
- [10] Polne-Fuller, M. and A. Gibor, 1987. *Hydrobiologia* 151/152: 131-138.
- [11] Saga, N. *et al.*, 1978. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44(1): 87.
- [12] Saga, N. *et al.*, 1982. *Plant Cell Physiol.* 23(4): 727-730.
- [13] Saga, N. and Y. Sakai, 1983. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49(10): 1561-1563.
- [14] Yan Zuo-mei, 1984. *Hydrobiologia* 116/117: 314-316.