

龙须菜匍匐体类愈伤组织诱导及机制分析*

樊扬 李纫芷

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用在人工模拟潮间带生态环境中养殖多年的龙须菜藻体,经70%乙醇、1%NaClO或低光等逆境胁迫后,培养新生直立枝,研究匍匐体类愈伤组织的诱导及机制。结果表明,脱落2—4mm长的新生直立枝培养30d后,基部出现由丛生丝状体组成的类愈伤组织。丝状体能够固着、分化,不断分裂形成匍匐体。这是除孢子外,首次从江蓼体细胞获得有固着能力的再生苗。该再生苗弥补了营养枝繁殖中须人工固着的缺点。ELISA测定内源激素含量结果表明:在不同胁迫下,藻体的不同部位内源激素含量发生改变,尤其是ABA的积累与高等植物在逆境胁迫中表现相同,因而推测类愈伤组织产生及快速分化可能与海藻经逆境胁迫后内源激素含量变化、信息传递有关。

关键词 龙须菜 类愈伤组织 匍匐体 内源激素 逆境胁迫

学科分类号 S968.43

龙须菜属红藻门、衫藻目、江蓼属(张峻甫等,1976)。江蓼属的海藻是重要大型经济海藻,是提取琼胶的主要原料来源。龙须菜由于其分布广、生长快、产胶量高、胶质量好而被列为江蓼养殖的首选良种(Santelices *et al*, 1989; Craigie *et al*, 1984; Li *et al*, 1984)。人工养殖江蓼因种苗来源问题始终未获突破性进展。随着植物组织培养技术在高等植物中成功运用,利用江蓼类愈伤组织诱导成苗已成为研究热点,Cheney等(1986)、Grusev等(1987)、Yan等(1993)都作了相关的报道。但以上研究由于诱导率低、再生苗生长缓慢、诱导时间长等缺点,目前尚无法在生产上推广应用。作者在前期研究中发现:以往被称作“固着器”的龙须菜匍匐体具有很强的抗逆性和再生能力,但该部位并不是进行光合作用的主要部位(李纫芷,1999)。本文报道龙须菜匍匐体类愈伤组织诱导及机制分析的实验结果,以期海藻的组织培养研究提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

龙须菜为在人工模拟潮间带生态环境的养殖槽内养殖多年藻体;龙须菜成熟的四分孢子枝、囊果枝于1995年9—11月采自青岛湛山湾附近海区。

1.2 类愈伤组织的诱导

选取人工模拟潮间带生态环境养殖槽内养殖的健康完整藻体,经流动海水冲洗24h,

* 山东省自然科学基金资助项目, 2914号。樊扬,女,出生于1972年11月,硕士,现在美国Austin大学, E-mail: fanyang@mail.utexas.edu

收稿日期:1997-08-10,收修改稿日期:1998-08-26

剔除上部附生可见杂藻,消毒海水多次刷洗,于室温弱光处静置培养一周(除特别说明以外,本实验的培养均为 15.5℃ 液体培养)。

1.2.1 化学伤害诱导 取以上干净藻体,于 70% 乙醇浸泡 20s,经去离子水漂洗 10min,于 630 lx 光强培养;或经 1%NaClO 浸泡 15min,于同样光强下培养。待新生直立枝长至 2—4mm 时,从基部与匍匐体相连处刷落培养。

1.2.2 光诱导 取干净藻体,完全切除直立枝部分,保留匍匐体,于不同光强下培养。新生直立枝处理同上。

1.3 孢子苗的获得

选用成熟的四分孢子枝、囊果枝,经流动海水冲洗 24h,消毒海水反复清洗枝条,镜检至无杂藻及附生生物,阴干刺激 1h,滴加培养液,于显微镜下用毛细管挑取放散的单个孢子,确保无其它杂藻干扰,放入培养瓶培养,光强为 630 lx。

1.4 酶联免疫法(ELISA)测激素

人工模拟潮间带生态环境下培养的龙须菜藻枝,匍匐体,光诱导中 200 lx 光强以下培养 30d 的匍匐体和新生直立枝,乙醇淡水处理后培养 10d 的匍匐体各 1g,加入 3ml 80% 甲醇,分 3 次研磨提取、离心(10 000r/min, 4℃, 10min)。上清液经 Sep-pakC18 柱(Water 公司)纯化、脱色。在 40℃ 水浴条件下,注入 N₂吹干。再用 3ml 100% 甲醇溶解,取 0.6ml 用于 iPAs 和 GA_{1/3} 测定;另取 0.6ml 加入重氮甲烷进行甲基化反应后,用于 ABA 和 IAA 的测定。iPAs、GA_{1/3}、ABA 及 IAA 的测定由南京农业大学提供试剂盒完成,ELISA 测读仪检测。

2 结果与讨论

2.1 类愈伤组织的诱导和分化

经化学方法处理后的龙须菜藻体培养 10d 左右,直立枝全部衰退,仅保留匍匐体部分仍为红色,一个月后萌发新直立枝。培养新直立枝 2—3 周后,基部边界模糊,有的细胞膨大突出,不断分裂形成类愈伤组织(图版 I: 1、2)。该组织由单列细胞的丝状体丛生组成,丝状体尖端细胞色素体色泽较深,遇可附着基质就能固着、分化,不断分裂形成扇形的组织结构(图版 I: 3)。扇形的组织继续横向、纵向伸展,直至与另一些扇形的组织相遇,部分愈合,最终形成圆盘形的匍匐体(图版 I: 4)。当圆盘形的匍匐体直径达 4mm 时,开始萌发直立枝形成完整的再生苗。

于 200 lx 光强下培养的藻体再生直立小枝基部也出现了与化学诱导相一致的结果。即萌发由丝状体组成的类愈伤组织,丝状体固着后分化、分裂形成匍匐体。

本实验所用方法与以往的江蓠类愈伤组织诱导相比,具有操作简便、无须外加激素和多糖等物质、类愈伤组织诱导率高、分化后生长迅速等特点,尤其是获得的再生苗能够固着,在生产上有较大实用性。由于海藻的生活环境和组织结构与高等植物相差甚远,在进化史上又具有原始性和遗传上多样性等特征,也决定了海藻类愈伤组织培养与高等植物相比应有其独特的一面。

2.2 与孢子苗、营养枝繁殖比较

由图版 I: 5 可以看出:类愈伤组织分化的匍匐体生长速度远远超过在同样条件下生长的孢子苗的匍匐体。这是本实验获得再生苗的一个最为显著的特征。在 630 lx 光强下,从

丝状体开始到直径达 4mm 的盘状体仅需两个月时间, 而生长两个月的孢子苗的盘状体还不到 1mm。而且, 类愈伤组织再生苗生长快、代谢旺盛, 决定了它具有孢子苗无法相比的抗杂藻能力。冰冻切片结果表明: 类愈伤组织再生苗与孢子苗在直立枝细胞结构上没有太大差别, 但在匍匐体结构上相差较大。源自孢子的匍匐体较厚, 由多层细胞组成一个紧密的整体, 而类愈伤组织分化的匍匐体由 1—2 层细胞组成, 扇形组织之间并未完全愈合, 匍匐体上有空隙, 盖上玻片, 用手轻压, 两个扇形之间就会分开, 边界细胞突凹不平。这一结构差别决定了孢子苗脱落时是完全脱落, 脱落后不能再固着, 这也是孢子采苗一直未用于大面积养殖的诸多原因之一; 而类愈伤组织再生苗由于仅部分脱落, 余留部分还能继续生长, 脱落部分的边界细胞还具有固着能力, 能够再次固着生长。孢子采苗受季节和环境因子的控制, 而匍匐体在室内控制的培养条件下可以长年持续地提供新生直立枝, 为实现龙须菜种苗供给工业化生产提供了可能。

与营养枝繁殖相比, 类愈伤组织再生苗的一个显著特点就是能够固着。目前, 江蓠人工养殖最为常用的方法是将营养枝束于绳、网等物体上进行养殖, 费时、耗劳力, 而且保种需大量营养枝, 很不经济 (Santelices, 1989)。因此, 养殖时直立枝若象孢子苗那样自行附着, 收获时仅留匍匐体部分, 将大大提高实际产量。

因而, 类愈伤组织再生苗由于具有生长快、抗杂藻能力强、能够固着、不完全脱落等特征, 将会是一个非常好的解决江蓠种苗来源的待开发途径。利用此方法育苗, 在红藻门的蜈蚣藻中已有小规模养殖试验成功的报道 (Iima *et al*, 1995)。

2.3 类愈伤组织的形成和分化的机制分析

对高等植物的研究表明: 植物对逆境的适应是受遗传性和激素两种因素制约。一般认为, 植物激素使抗逆基因活化表达, 从而导致代谢途径发生变化 (潘瑞炽等, 1995)。在本实验中, 龙须菜藻体经外界逆境胁迫, 如化学伤害、光抑制等, 都获得了相同的结果: 类愈伤组织的产生。作者认为该结果是龙须菜对外界胁迫的一个自身代谢反应, 可能与内源激素改变有关。利用 ELISA 检测内源激素含量结果 (表 1) 发现: 龙须菜藻体不同部位激素含量不同, 相同部位胁迫处理前后激素含量的确发生改变。尤其是匍匐体内 ABA 含量经逆境胁迫后大幅度增加, 这结果与 Hirsch 等 (1989)、金苹等 (1995) 用 ELISA 检测藻内源 ABA 水平与胁迫条件以及抗逆性关系的结果一致。在高等植物中, 大量研究表明: 植物体内 ABA 含量在不同逆境条件下都会急剧上升, ABA 的积累与抗逆性的增强存在显著的正相关 (李宗霆等, 1996)。ABA 在海藻抗逆性中可能有着与高等植物相似的作用功能。

表1 ELISA检测结果

Tab. 1 The determined results of ELISA

项目	iPAs(pmol/g)	GA _{1/3} (pmol/g)	IAA(pmol/g)	ABA(fmol/g)
正常藻体直立枝	0.021 1	0.819	1.155	—
正常藻体匍匐组织	0.048 8	1.354	1.534	7.789
200 lx光强下再生直立枝	0.037 5	1.199	0.439	—
200 lx光强下培养30d匍匐体	0.319 0	0.871	0.286	61.520
乙醇淡水处理后培养10d匍匐体	0.023 8	0.497	0.638	36.389

注: “—”表示未测

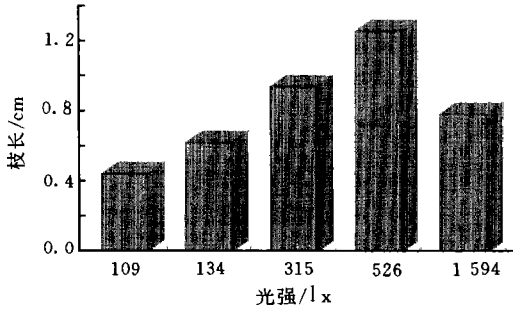


图1 枝条长度与光强的关系

Fig.1 The relationship between thalli length and light intensity

体的信息(如 iPAs)占优势,从而长出的类愈伤组织分化形成匍匐体。光强适宜时,直立枝生长代谢旺盛,加速顶端物质合成和运输,新生枝基部就不会分化成匍匐体而是萌发枝条。早在 70 年代,人们就已发现:光在海藻类愈伤组织诱导中具有很特殊的作用(张坤诚, 1979)。Chiang(1993)在低光下培养蜈蚣藻的固着器也获得与本实验相似的结果。但光对海藻的作用机制至今尚无有关方面的研究报道。

前期的研究表明:匍匐体为多年生,具有很强的抗逆能力(李纫芷, 1999)。在自然界,龙须菜的匍匐部分为沙覆盖,也就创造了低光条件。因此,作者认为野生龙须菜种群扩增除孢子繁殖外,可能还存在这种无性繁殖方式。由于直立枝体积、质量较孢子大,不会被海浪分散太广,就能有效地维持当地高种群密度,增加种间竞争能力。Cruz 等(1996)在红藻门凹顶藻属的 *Laurencia poiteani* 中已发现由直立枝经丝状体生成匍匐体的无性繁殖方式,相信龙须菜为沙覆盖部分的研究也应有所成果。

实验中发现:经化学伤害后培养一段时间获得的新生小枝,刷落时长度若超过 5mm,几乎不再生类愈伤组织,而是直接生枝。分析处理后培养 10d 的匍匐体内源激素发现 IAA、iPAs、 $GA_{1/3}$ 都有不同程度的下降。作者认为:在没有直立枝提供营养情况下,匍匐体只有依赖自身的光合作用维持代谢,组织内 CK 不断积累,新生枝基部细胞内来自匍匐体的“信息”占优势,短期内能分裂形成类愈伤组织;当直立枝长到相当长度后,逐渐取代匍匐体成为光合作用主体,枝端合成物质向下运输,基部细胞也就丧失了生长分化匍匐体的功能。Bradley 等(1990)在海藻 *Agaardhiella subulata* 中发现:高浓度的 CK 常常抑制藻枝的萌发,这一结果从另一方面支持了本文的观点。

3 结语

本研究发现,诱导龙须菜的新生直立枝产生类愈伤组织并分化形成匍匐体必须具备如下条件:第一,藻体要经过一个逆境胁迫阶段,促使内部代谢改变;第二,新生枝的基部细胞原先必须与匍匐体相连,这样该细胞既具有下部匍匐体的特性,又有上部直立枝提供营养,才能快速固着生长;第三,新生直立枝的长度不能过长,以 2—4mm 为宜。由于类愈伤组织分化的匍匐体具有生长迅速、抗杂藻能力强、不易脱落、脱落后能再固着、保种容易等特点,为解决龙须菜养殖的苗源问题提供了一条新的待开发途径。至于类愈伤组织诱导分化机制,可能与藻体经逆境胁迫后内源激素变化有关。由于海藻激素的研究较高等

在低光 (< 200 lx) 条件下,培养 30d 的匍匐体中 iPAs 含量增加了 6.5 倍,而 IAA 降低 5.4 倍。高等植物中一般认为:细胞激动素(CK)主要合成部位是根尖及成长中的果实、种子;IAA 合成以嫩叶茎端为主。作者认为在龙须菜中可能也有相似的情形:匍匐体合成 CK,直立枝合成 IAA。由图 1 可知,龙须菜直立枝生长与光强有很大关系。在 200 lx 光强以下,光明显抑制直立枝的生长,直立枝代谢缓慢,也就减慢了藻枝顶端物质(如 IAA)合成和运输,新生枝基部源自匍匐

植物起步晚,有关激素的功能尚未有定论(Evans *et al*, 1991),因此,对于这一机制有待进一步论证研究。本研究运用理化方法处理藻体,利用海藻对逆境胁迫的反应,诱导新生直立枝基部与匍匐体相连处细胞生长类愈伤组织并迅速分化成苗,再用酶联免疫(ELISA)的方法对其机制进行分析。这是除从孢子获得匍匐体外,国际上首次从江蓠体细胞获得有固着能力再生苗的报道。本文采用与以往海藻类愈伤组织诱导完全不同的方法,为海藻的组织培养研究提供了新思路。

参 考 文 献

- 李纫芷, 1999. 龙须菜藻体匍匐组织的生理特性与功能研究. 海洋与湖沼, 30(1): 41—44
- 李宗霆, 周 燮, 1996. 植物激素及其免疫检测技术. 南京: 江苏科技出版社, 194
- 金 苹, 祝未非, 方 铎等, 1995. 逆境胁迫下蓝藻内源 ABA 水平的变化与抗逆性的关系. 见: 中国藻类学会第四届会员大会暨第八次学术讨论会论文摘要集. 中国藻类学会, 53
- 张坤诚, 1979. 海藻组织和细胞培养研究进展. 海洋科学, 4: 41—46
- 张峻甫, 夏邦美, 1976. 中国江蓠属海藻的分类研究. 海洋科学集刊, 11: 91—163
- 潘瑞炽, 李 玲, 1995. 植物生长发育的化学控制. 广州: 广东高等教育出版社, 1
- Bradley P M, Cheney D P, 1990. Some effects of plant growth regulators on tissue cultures of the marine red alga *agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204/205: 353—360
- Cheney D P, Mar E, Saga N *et al*, 1986. Protoplast isolation and cell division in the agarproducing seaweed *Gracilaria* (Phrodophyta). *J Phycol*, 22: 238—243
- Chiang Y-M, 1993. The developmental sequence of the marine red alga *Grateloupia filicina* in culture. *Korean J Phycol*, 8: 231—237
- Craigie J S, Wen Z C, Van Der Meer J P, 1984. Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. *Bot Mar*, 27: 55—61
- Cruz V M, Ballantine D L, 1996. A sexual reproduction in *Laurencia poiteaui* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Bot Mar*, 29: 75—77
- Evans L V, Trewavas A J, 1991. Is algae development controlled by plant growth substances? *J Phycol*, 27: 322—326
- Grusev M V, Tambiev A H, Kirikova N N *et al*, 1987. Callus formation in seven species of agarophyte marine algae. *Mar Biol*, 95: 593—597
- Hirsch R, Hartung W, Gimmler H, 1989. Abscisic acid content of algae under stress. *Bot Acta*, 102: 326—334
- Iima M, Kinoshita T, Kawaguchi S *et al*, 1995. Cultivation of *Grateloupia acuminata* (Halymeniaceae, Rhodophyta) by regeneration from cut fragments of basal crusts and upright thalli. *J Appl Phycol*, 7: 583—588
- Li Renzhi, Chong Renyi, Meng Zhaocai, 1984. A preliminary study of *Gracilaria verrucosa* and *Gracilaria sjoestedtii*. *Hydrobiologia*, 116/117: 252—254
- Santelices B, Doty M S, 1989. A review of *Gracilaria* farming. *Aquaculture*, 78: 95—133
- Yan Xing-Hong, Wang Su-Juan, 1993. Regeneration of whole plant from *Gracilaria asiatica* Chang *et* Xia protoplasts (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 260/261: 429—436

INDUCTION OF CALLUS-LIKE TISSUE FROM CREEPING TISSUE OF *GRACILARIA LEMANIFORMIS* (RHODOPHYTA) AND MECHANISM ANALYSIS

FAN Yang, LI Ren-zhi

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

Abstract *Gracilaria lemaneiformis* has been cultured in a tank simulating the intertidal environment for three years. After the alga with erect thalli and creeping tissue was treated with three kinds of stress: 70% ethanol for 15s, 1% NaClO for 15min and low light intensity, regenerated erect thalli (2—4mm) were separated from creeping tissue and cultured for 30d. Callus-like tissue composed of tufted filaments appeared from the bottom of these thalli. These filaments were able to attach, differentiate, divide, and finally grow into creeping tissue. The obtained seedlings with creeping tissue from callus-like tissue of *G. lemaneiformis*, compared with sporeling, have characteristics of fast growth and anti-epiphyte. This is a new method to resolve seedling resource of *Gracilaria* culturation. The results of ELISA show that the in vivo hormone level of erect thalli and creeping tissue changed in response to stress. Especially, the increase of ABA was just the same as higher plants. In conclusion, it is possible that the forming of callus-like tissue and its differentiation are related to the in vivo hormone level.

Key words *Gracilaria lemaneiformis* Callus-like tissue Creeping tissue Hormone Stress

Subject classification number S968.43