

褐藻配子体培养的应用研究及意义

RESEARCH TREND AND APPLICATIONS ON GAMETOPHYTIC CULTURE OF PHAEOPHYTA

胡晓燕

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

褐藻纲(Phaeophyceae)中的海藻除墨角藻目(Fucales)外,都具有典型的世代生活交替史,即单倍体的配子体与二倍体的孢子体相交替出现,尤其是在具有异相世代交替的褐藻中,配子体与孢子体形态差别显著,孢子体巨大而配子体一般需借助显微镜才能观察清楚,并且配子体可以独立于孢子体存活。早在30年代,Harris就对影响海带目的掌状海带(*Laminaria digitata*),糖海带(*L. saccharina*),克氏海带(*L. cloustoni*)的配子体及幼孢子体生长和发育的环境因子进行了详细的研究,发现在蓝光条件下配子体可以发育,而在红光条件下发育延迟。此后又有许多学者对影响各种褐藻配子体生长发育的环境因素进行了研究,如Saito 1956年,曾呈奎等1962年,任国忠1962年,Kain 1964年,Hsiao 1971年,Luning 1975年。研究表明,在高温、贫营养或在红光条件下配子体保持营养生长状态,发育延迟;而通过降温或改变营养盐抑或改为蓝光培养时,营养生长的配子体进入发育状态。1978年Sanbonsuga成功地分离了巨藻(*Macrocystis*)的单细胞配子体,通过控制环境条件使配子体只进行有丝分裂(营养生长)。这

种培养方式,Neushul 1979年称之为配子体培养(gametophytic culture),因为这种培养方式类似于陆地植物的组织培养或花药培养。几乎与Sanbonsuga同时,我国的学者方宗熙先生成功地培养出了日本海带(*L. japonica*)和裙带菜(*Undaria pinnatifida*)的无性繁殖系,它在本质上与Neushul所称的配子体培养是一致的。80年代,法国的Perez等人成功地进行了裙带菜配子体的悬浮培养(free-living culture),此时单倍的、微小的配子体在人为控制条件下已具有了可长期保存又能大量扩增的特性,这一特性使其成为一种非常理想的研究材料。

由于配子体细小,其培养方法类似于微藻的培养。培养的主要步骤如下:首先采集成熟的孢子体放散的游动孢子,控制条件使它发育为配子体,由于某些研究的需要,可在游孢子阶段或几个细胞的配子体阶段将雌、雄配子体分离,分别培养;通过控制光、温度及营养盐等培养条件,可使配子体进行营养生长而不发育。

配子体作为一种理想的实验材料,已被应用于很多方面的研究中。本文将就配子体培养的应用做一小结。

1 种质保存

褐藻纲中的大部分种类为大型海藻,因此在实验室内保存它们很困难,而形态细小的配子体能够解决这一难题。在实验室内控制条件,可以将营养生长的配子体长期保存。实验证明只要保存方法适当,不仅配子体的特性不会发生改变,而且由配子体发育产生的孢子体的形态特征也非常的稳定^①。已有报道表明在实验室内已保存了掌状海带、日本海带、长海带(*L. longissima*)、裙带菜以及巨藻等种类的配子体。

2 杂交和遗传学研究

为了检验各种属之间的亲缘关系,最传统的方法是杂交。雌雄分离培养的配子体使得种内、种间、属间的杂交实验变得易操作且可重复。目前已在巨藻^[1]、海带和裙

作者:胡晓燕,出生于1971年,在读博士,助理研究员。E-mail: xyhu@ms.qdio.ac.cn

①胡晓燕,硕士论文,裙带菜的种内杂交及孢子体的形态变异研究。

收稿日期:2000-12-19

修回日期:2001-04-20

带菜中进行了种内和种间杂交研究。由于配子体的培养不受季节限制,因此极适宜做遗传学研究。方宗熙 1978 年在雌性的海带配子体中发现了孢子体叶片表面呈现棕黑色斑点的突变体,这是在海带目中发现的第一个质量遗传性状。在裙带菜的育种研究中,采用配子体克隆进行种内杂交实验,由于配子体克隆来自于单个游孢子并由营养生长获得,因而具有相同的遗传背景,它们产生的孢子体的形态特征具有很高的统一性^[2]。

3 细胞工程化育苗研究

用于种质保存的配子体在一定的培养条件下,可以进行快速的营养生长从而获得大量的配子体,可用于细胞工程化育苗,如海带、裙带菜、巨藻。采用此方法育苗,具有出苗快、出苗齐的特点,并能节省人力和物力。以海带为例,传统的育苗方法从采集游孢子到游孢子附着并发育为配子体,再萌发为幼苗,需要 3 个月的时间,并且在此过程中必须采用低温低光条件使幼苗缓慢生长以度过夏季的高水温时期,仅降温这一项就需耗费大量的物力和财力。而采用细胞工程化育苗,从游孢子获得配子体后,可在实验室内利用生物反应器使配子体快速生长扩增,在条件适宜时可附着配子体获得幼苗。此方法不仅可以使传统的育苗时间缩短,又能节省大量的人力和物力。

4 发育生物学研究

营养生长的配子体在适宜的条件下可以发育为孢子体,因此是藻类发育生物学研究的良好实验材料。

4.1 海藻信息素的研究

1978 年 Luning 等人的一个巧妙的实验,揭开了褐藻信息素研究的

序幕。实验中雌雄配子体分别培养,然后诱导雌、雄配子体发育,雌配子体形成卵囊并排除卵子,雄配子体形成精囊但无精子排出。以一硅胶珠吸附排出卵子上的物质,后将硅胶珠放入雄配子体中时,观察到了精子从精囊中大量释放。由此证明卵子分泌的某些物质能够诱导精子的排出,这类物质称为信息素(phormone)。Maier 等 1986 年总结了在藻类中发现的性别信息素,分析其结构,多为具挥发性的萜类物质。但随后的研究工作表明此类物质的产生可能是培养中存在微生物的结果,因此对藻类本身能否产生信息素或激素仍有争议。无疑此方面的研究仍值得深入,其中无菌培养的配子体是获得突破的关键。

4.2 发育分子生物学

发育过程中基因的开启早已引起人们的重视,而藻类发育中基因变化的研究只是刚刚开始。候和胜等 1997 年指出,在裙带菜配子体的发育研究中发现存在有某些特异表达的 mRNA,通过克隆并分析这些 mRNA 的 cDNA 片段,发现其中一个基因片段与烟草的生长激素(IAA)结合蛋白有部分同源性,由此推测该特异表达基因可能与生长素结合蛋白有关,其功能可能与配子体发育时生长素的调节作用密切相关。

5 转基因研究

常规的海藻转基因方法为首先分离出游离的原生质体,转入外源基因后诱导再生为植株。由于海藻的细胞壁再生困难,此方法的成功率极低。最新采用海带的配子体做为转基因的材料取得了成功。由于海带具有较高的孤雌生殖率,采用其雌配子体,转入外源基因后,某些细胞可萌发为幼孢子体并最终发育为成体^[3]。

Neushul 1987 年认为海藻的配子体培养技术与陆地植物的组织培养相比具有两个优点:(1)以花药或花粉粒进行单倍体组织培养费时费力,且这种组织培养的寿命有限;而在实验室内只要保存方法得当,配子体几乎具有永生性。(2)陆地植物的组织如果连续地继代培养,极易产生体细胞克隆变异(somaclonal variation),基因漂流(genetic drift)和突变(mutation),配子体在培养过程中出现上述现象的几率很小。

由此不难看出,褐藻的配子体是研究大型藻类的适宜研究材料,其研究结果也会对陆地植物的研究提供极有价值的信息。同时我们可以预测配子体培养技术在海藻的基础研究和应用研究中的前景:(1)发育过程中基因的调控,发育的机理,细胞间的相互通讯;(2)细胞融合研究;(3)诱导配子体突变产生新的品系;(4)通过转基因或诱变,使配子体生产有用的次生代谢物,利用生物反应器培养。

参考文献

- 1 Lewis R.J., Neushul M., Intergenic hybridization among five genera of the family lessoniaceae (Phaeophyceae) and evidence for polyploidy in a fertile *pelagophycus mucocystis* hybrid, *J. Phycol.*, 1995, 32, 1: 012 ~ 1: 017
- 2 Pang Shaorjun, Hu Xiaoyan *et al.* . Intraspecific crossings of *Lindania pinnatifida* (Harv) Sur - A possible time-saving way of train selection, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1997, 15(3): 227 ~ 235
- 3 Wang Xihua, Qin Song, Li Xirping *et al.* . Effects of ultrasonic treatment on female gametophyte of *Laminaria japonica* (Phaeophyta), *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1998, 16(Suppl): 62 ~ 66

(本文编辑:张培新)