

研究简报

# 坛紫菜体细胞的连续克隆 培养和悬滴培养\*

## CONTINUOUS CLONE CULTURE AND SUSPENDED DROPS CULTURE OF SOMATIC CELLS OF *PORPHYRA* *HAITANENSIS* (RHODOPHYTA)

严兴洪 张饮江

(上海水产大学)

Yan Xinghong and Zhang Yinjiang

(Shanghai Fisheries University)

王志勇

(厦门水产学院)

Wang Zhiyong

(Xiamen Fisheries College)

关键词 连续克隆培养,悬滴培养,体细胞

KEYWORDS Continuous clone culture, suspended drops culture, somatic cell

随着用于分离海藻体细胞和原生质体工具酶的增多,近几年来,海藻单离细胞和原生质体的培养取得了较大进展,特别是对一些经济海藻如海带、紫菜的原生质体培养,国内外均进行了大量研究<sup>[2,4-10]</sup>。严兴洪等把坛紫菜叶状体体细胞的复杂发育分化趋势初步归结成八类,并且建立了坛紫菜叶状体体细胞的分化模型。阐明坛紫菜叶状体体细胞的发育分化规律,不仅能为利用坛紫菜体细胞直接快速采苗,改进传统采苗工艺的新技术提供科学的理论依据,而且对于开展坛紫菜体细胞与其它紫菜间的细胞融合的正确选材以及细胞融合以后的杂种筛选等研究均具较大意义。为此,我们对坛紫菜叶状体体细胞进行了连续数代克隆培养。单个细胞培养在高等植物中已获成功<sup>[1]</sup>,但在海藻细胞培养中还未见报道。探讨单个细胞培养途径,对开展海藻细胞工程研究具有重要价值。结果报告如下:

## 材料与方 法

### 一、材料来源与处理

试验材料用坛紫菜(*Porphyra haitanensis*),于1986年采自福建省连江县水产综合场的养殖架上。藻体体长为1~7厘米。材料采集后经阴干一段时间后,再冷藏于-20℃的冰箱中。做本文试验时,提前一周将材料解冻,浸泡于加N、P元素的自然海水(加N-NO<sub>3</sub>为10ppm, P-HPO<sub>4</sub>为1ppm),在20℃,2000Lx下培养,使藻体恢复至正常颜色。用毛笔洗刷种藻数次,直至显微镜下检查无污物和杂藻为止;先用吸水纸吸干藻体上的海水,然后用1.5mol/L的葡萄糖液洗两次,再用2mol/L的葡萄糖液

\*本试验承王素娟教授热心指导,特表谢忱。

收稿年月:1989年11月;1990年8月修改。

洗一次。最后用小剪刀将材料剪成细小的碎片,投入酶液中酶解。

## 二、酶、培养基、细胞分离方法同文献[2]

### 三、试验方法

1. 体细胞连续克隆培养 取适量的体细胞投放到直径为 6cm 的培养皿内,每皿加入 10ml 比重为 1.032 的 MES 培养液,培养 24 小时后,再换入比重为 1.025 的 MES 培养液。以后每隔 7 天换一次培养液,换取量为 70~80%。各试验组的体细胞发育分化类型的百分数均在培养的第 21~22 天计算。培养条件:温度为  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照强度为 2000~2500Lx,光时 12D: 12L。

连续克隆培养。先用由壳孢子长成的小苗分离出单离体细胞,并培养成第 1 代叶状体 ( $C_1$  代)。当  $C_1$  代叶状体生长 45 天,体长达 0.3~0.6cm 时,在显微镜下(100 倍)逐个挑选出有假根的正常叶状体和无假根的畸形叶状体,再把它们分别酶解出单离体细胞,培养出 2 组第 2 代叶状体 ( $C_2$  代)。把  $C_1$  代培养 44 天,叶状体体长达 0.2~0.4cm,每一组  $C_2$  代中又分别挑选出正常和畸形叶状体,分别酶解出单离细胞并培养成 4 组第 3 代叶状体 ( $C_3$  代)。

2. 细胞悬滴培养 用酶解法得到单离体细胞悬浮液后,再用培养基将细胞液逐级稀释成密度极低的细胞液,用毛细吸管分离出单个的细胞:在直径为 3 cm 的塑料培养皿盖上滴上一排排极小的细胞水滴,在显微镜下逐滴检查每个水滴所含的细胞数,去除含多个细胞的水滴,保留只含一个细胞的水滴。一个培养皿盖上培养 20~30 个小水滴,然后给每个水滴加进适量的培养液,再把培养皿的上盖扣在下盖上面(下盖事先加进适量的培养液,以减少细胞水滴的水分蒸发),用透明胶带把塑料培养皿密封好,这样就可以把细胞水滴悬挂在皿盖上进行培养。最后把整个培养皿放进较大的玻璃培养皿内培养。其它培养条件同于体细胞连续克隆培养。

## 结 果

一、体细胞连续克隆培养 继代培养如表 1 所示。孢子苗的体细胞所长成的  $C_1$  代中,有具发达假

表 1 正常叶状体和畸形叶状体的体细胞连续克隆培养  
Table 1 The results of continuous clone culture of somatic cells  
from the normal buds and abnormal buds

培养代数	细胞后代中正常苗和畸形苗的百分数							
	壳孢子长成的叶状体(体长为 1—7cm)							
P								
$C_1$	2.4% 正常苗				26.8% 畸形苗			
$C_2$	74.4% 正常苗		22.8% 畸形苗		23.0% 正常苗		76.5% 畸形苗	
$C_3$	正常苗 74.2%	畸形苗 23.0%	正常苗 22.3%	畸形苗 75.2%	正常苗 92.0%	畸形苗 7.8%	正常苗 7.1%	畸形苗 90.5%

根的正常叶状体和不具假根的畸形叶状体,见图版-1, 2。正常叶状体的形状多数呈披针形,细胞大小均匀具排列整齐,具透明多分叉的假根,牢固地固着在培养皿底上;畸形叶状体的叶片结构虽然与正常叶状体相似,但不具透明的真正假根,故叶片不能固着在皿底,而是漂浮在水中,微呈卷曲状态。另外,在  $C_1$  代中还有由多细胞组成的细胞团和果孢子囊以及精子囊,见图版-3~6。

在  $C_2$  代中,如果亲代( $C_1$ 代)是正常叶状体,那么  $C_2$  代中有2/3左右的个体仍然是正常叶状体,1/3左右为畸形叶状体。用  $C_2$  代的正常叶状体再进行克隆培养, $C_3$  代中则得到74%左右的正常叶状体和23%左右的畸形叶状体。在  $C_3$  代和  $C_4$  代中,正常叶状体和畸形叶状体的比例均接近3:1。另外,还有极少量的细胞团和果孢子囊以及精子囊。用  $C_1$  代中的畸形叶状体做类似克隆培养,在  $C_2$  代中,畸形叶状体和正常叶状体的个体数比例接近3:1,而  $C_3$  代中,畸形叶状体和正常叶状体的个体数比例为11:1。所以,畸形叶状体的连续克隆培养,在正常叶状体和畸形叶状体的个体数比例上恰好与正常叶状体的连续克隆培养相反。如果用来自  $C_1$  代正常叶状体的体细胞所长成的畸形叶状体( $C_2$ 代个体),再做  $C_3$  代培养,畸形叶状体和正常叶状体的个体数比例为3:1左右;而用  $C_1$  代的畸形叶状体的体细胞所长成的正常叶状体( $C_2$ 代个体)再做  $C_3$  代培养,正常叶状体和畸形叶状体的个体数比例为1:12左右。正常叶状体和畸形叶状体的  $C_2$  代和  $C_3$  代培养结果都说明:后代中有2/3左右的个体仍长成在外形和结构上与亲代相同的叶状体。

用不同生长日龄、不同体长的孢子苗所分离出来的体细胞做  $C_1$  代培养,其结果如表2所示。在相同的日龄中,随着种藻体长的增加,  $C_1$  代中正常叶状体和畸形叶状体的百分数下降,细胞团百分数上升,精子囊和果孢子囊也上升。在体长相同而日龄不同的各试验组中,随着日龄的增加,  $C_1$  代中正常叶状体和畸形叶状的百分数下降,第 I 类细胞团百分数也下降,而第 II、第 III 类细胞团的百分数却大量增加,精子囊百分数也有所增加,而果孢子囊百分数无太明显的变化。

二、体细胞悬滴培养 用悬滴法进行坛紫菜叶状体的单个细胞培养(见图版—7),其结果如表3所示。单个细胞培养5~6天,部分细胞开始第一次分裂。从表3可以看出:用不同的培养基培养单个细胞,细胞的成活率和分裂率是不同的。培养到第7天,加自然海水和加加有 N、P 元素的自然海水培养的3号、4号培养皿其细胞分裂率明显比1号、2号培养皿低,细胞成活率也低。这说明富含营养的MES和3号MES培养基对细胞的成活和分率是有好处的;培养至第14天,检查结果相同,另外,在1~4号培养皿的单个细胞培养中,存活水滴率为33.3~50%,而一水滴中含2~5个细胞的5号培养皿,成活水滴率高达87.5%,由此可见多个细胞培养其成活率明显高于单个细胞培养。培养至第35天,培养的水滴中长出肉眼可见的叶状体、细胞团和丝状体等。在单个细胞悬滴培养的体细胞后代中,也观察到3种不同的发育分化类型,这与文献[3]中论述的大量体细胞混合培养结果相同。

表2 不同生长日龄不同体长的叶状体的体细胞发育分化情况  
Table 2 The development and differentiation of somatic cells from different growth days and length of thallia

组别		体细胞各种发育类型的百分数(%)							检查个数
日龄(天)	长度(cm)	正常叶状体	畸形叶状体	第 I 类细胞团	第 II III 类细胞团	精子囊	果孢子囊	根丝细胞苗	
21	0.4—0.6	90.4	6.7	1.23	0.14	0.55	0.0	0.92	727
26	0.5—1.0	21.4	54.0	13.6	7.3	2.1	0.3	0.7	1068
	1.1—3.0	5.4	37.0	21.8	28.4	3.1	3.1	1.0	1159
	3.1—5.0	1.9	25.0	21.6	41.2	4.0	5.4	0.7	1119
	5.1—7.0	1.3	16.5	15.4	54.6	4.8	6.7	0.8	1188
30	0.5—1.0	7.5	47.7	20.6	16.7	5.5	0.6	0.7	1638
	1.1—3.0	2.4	26.3	20.1	40.9	7.1	4.5	0.3	1348
	3.1—5.0	0.9	9.5	18.8	57.5	8.2	4.8	0.3	1533
	5.1—7.0	0.8	9.0	7.6	62.3	12.3	7.4	0.4	1367

注:体细胞发育分化类型的划分见文献[3]。

表 3 体细胞悬滴培养情况  
 Table 3 The results of suspended drops culture of somatic cells from thallia of *P. haitanensis*

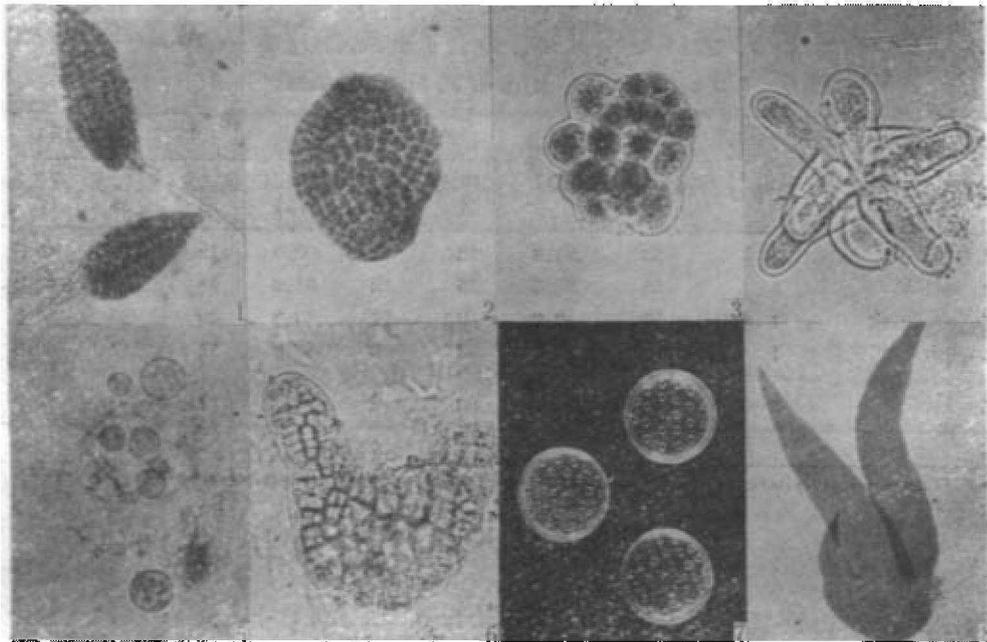
四号	培养基	一滴水里的细胞个数	每皿培养的细胞水滴数	分裂率 (%)	第 7 天			第 14 天		
					成活水滴	死亡水滴	成活率 (%)	成活水滴	死亡水滴	成活率 (%)
1	MES	1	26	23.6	13	12	50.0	12	14	46.2
2	3号 MES	1	28	25.5	15	13	55.6	14	14	50.0
3	自然海水	1	30	13.8	13	17	43.3	10	20	33.3
4	加 N、P 元素的自然海水	1	28	15.2	13	15	46.2	11	17	39.3
5	MES	2—5	24		22	2	91.8	21	3	87.5

## 讨 论

连续克隆培养中,畸形叶状体的体细胞后代中有少量的正常叶状体,这说明长成畸形叶状体的体细胞并没有丧失细胞的全能性,只是由于这类体细胞处于一个比长成正常叶状体的体细胞更晚的分化时期,细胞的某些基因(如假根基因)因细胞发生分化被阻遏而不能被表达出来,致使该类体细胞在离体培养条件下发育成无假根的畸形叶状体。我们曾对坛紫菜体细胞中这类长畸形叶状体的体细胞以及它们的后代畸形叶状体在 400~950 $\mu\text{m}$  大小时,用促进根系分化的植物激素如 IAA, 2, 4-D 等进行数次 30 多个样本正交试验处理,结果都证明,外源植物激素对坛紫菜体细胞发育分化无明显的作用。正常叶状体上的部分体细胞可以分化成长畸形叶状体的细胞,反过来,畸形叶状体上的少部分细胞可以脱分化成长正常叶状体的细胞。这种细胞分化的可逆性说明低等植物的紫菜其细胞分化也表现出明显的低级性。

体细胞连续克隆培养结果和表 2 都说明坛紫菜叶状体上的细胞从原始的营养细胞向性原细胞—精子囊母细胞和果孢子母细胞分化,存着一个逐步分化的过程。处于不同分化阶段的体细胞被单离出来,在离体条件下培养,它们后代的发育趋势是不同的。这为文献 3 中论述的坛紫菜体细胞分化发育模型提供了又一个有力的证据。此外,坛紫菜体细胞的克隆培养结果也为利用坛紫菜体细胞直接快速采苗工艺提供了选材的科学依据。即必须选择日龄和体长较短的叶状体作为分离体细胞的种藻。否则,种藻日龄太长,藻体过大,体细胞后代中正常叶状体百分率很低,采苗就不易成功。在进行坛紫菜和其它紫菜体细胞融合时,也可选择个体较小,后代中正常叶状体比例较高的藻体作为分离原生质体的材料,否则由于藻体过大,所得到的原生质体中能发育成正常叶状体的比例极低,而长成畸形叶状体和细胞团的原生质体比例较高。融合杂种后代中长出正常叶状体的可能性极低,这样对准确而快速地筛选杂种优势是不利的。在体细胞连续克隆培养的第 2 代中发现少量叶片呈双分叉或三分叉的正常叶状体,见图版—8。这类苗叶片大,生长比单叶苗快,假根极发达。所以体细胞连续克隆培养有可能成为坛紫菜无性繁殖育种的一个新途径,对此,我们正在进一步研究。

坛紫菜的单个体细胞虽然可以在不加任何营养成份的自然海水中生长,但细胞的存活率和分裂速度比在 MES 培养基中培养的低,所以,单个细胞培养最好在含各种营养成分的培养基中培养。单个体细胞培养的后代中所观察到的 8 种发育分化类型与大量体细胞混合培养中出现的 8 种发育分化类型相一致,这也证明坛紫菜体细胞不同的发育类型主要是由于叶状体上的细胞本身分化阶段不同造成的。这也是建立坛紫菜体细胞发育分化模型的一个重要依据。由于坛紫菜单个细胞培养成株比高等植物容易,这一点对今后开展细胞融合时,分离杂种后代以及进行细胞遗传操作等均具有一定的意义。



图版 坛紫菜体细胞发育类型和体细胞悬滴培养

Plate The development types and the suspended drops culture of somatic cells from *Porphyra haitanensis*

- 1.正常叶状体, 2.畸形叶状体, 3,4.细胞团, 5.精子囊, 6.精孢子囊,  
7.体细胞悬滴培养, 8.三分叉的正常叶状体

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译, 1978. 植物组织和细胞培养, 100—300. 上海科学技术出版社。
- [2] 王素娟等, 1986. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I. 海洋与湖沼, 17(3): 217—221.
- [3] 严兴洪, 王素娟, 1989. 紫菜体细胞发育和分化的研究. 海洋科学, 66(6): 28—32.
- [4] 唐延林, 1982. 紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养. 山东海洋学院学报, 12(4): 37—50.
- [6] 鬼头钩, 1985. ノリのプロトプラストの作出と固体の再生. 农林水产技术研究ジャーナル, 8(9): 20—34.
- [7] 嵯峨直恒, 1985. 海藻类の组织培养と水产育种: 現状と展望. 水产育种, 12: 25—44.
- [8] Chen, L. C. M., 1986 Cell development of *Porphyra miniata* (Rhodophyceae) under axenic culture. *Botanica Marina*, 29: 435—439.
- [9] Fujita, Y. and Migita, S., 1985. Isolation and culture of protoplasts from seaweeds. *Bull. Fac. Nagasaki Univ.*, 57: 39—45.
- [10] Polne-Fuller, M. and A. Giber, 1986 Developmental study on *Porphyra*. 1. Differentiation and protoplast regeneration in *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 20: 609—616.