

坛紫菜营养细胞和原生质体培养研究

II. 直接育苗下海养殖的实验研究

王素娟 孙云龙 路安明

(上海水产大学)

王光远

(上海植物生理研究所)

提要 本文报道了王素娟等用坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 营养细胞在苗绳上代替壳孢子采苗, 并将幼苗下海养殖的实验。实验中, 作者先酶解种藻成单离细胞, 使附着于网绳上, 在室内培养成0.2—0.5mm的幼苗, 然后下海养殖, 1个月后, 幼苗长成了20—40cm的紫菜, 藻体最长者可达58cm。结果表明: 冷藏一年的2—5cm的幼苗解离细胞可以长成正常的商品紫菜。坛紫菜营养细胞可用作新苗源, 它可以改革传统的生产程序, 这在紫菜生产领域内具有重要意义。

我们培养坛紫菜营养细胞的目的之一, 就是利用它进行直接采苗, 经下海养殖后, 能长成商品性紫菜。如果可能的话, 就为改革目前传统的采苗育苗工序^(3,8)提供依据。在研究 I⁽¹⁾中, 我们已成功地在实验室内培养成长达6cm的幼苗, 这些幼苗如不下海养殖, 就会很快成熟衰老。如果下海养殖, 能否长成商品规格的紫菜, 因而有必要进行海区养殖实验去证实。国内外虽已有人进行过室内培养, 或小型下海实验^(4-7,9-12), 但对坛紫菜来说, 国内外尚无报道过有关下海养殖与室内育苗的经验。加之坛紫菜的生活史中不产生无性繁殖的单孢子, 在生产上除了常规的育苗技术外, 如不用细胞技术, 就没有别的办法; 不能采用李世英(1984, 未刊)用条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 的单孢子进行采苗的办法代替传统采苗的技术。坛紫菜是我国重要的养殖对象, 占全国养殖面积的95%以上, 地位重要, 因此对其进行技术改革无论在生产上还是在理论上都具有重要意义。于是我们在研究 I 的基础上, 于1984年9月—1985年1月期间, 重

点实验有关营养细胞直接采苗育苗的方法技术。仿照坛紫菜人工养殖的某些经验, 待室内见苗后运到海区养殖于浮架上, 经过一定时间的养殖, 细胞苗迅速长成了体长为58cm (一般体长为20—40cm) 的紫菜。实验取得了满意的结果。虽然试验是小型生产性的, 但它证明了我们原来的预测是可行的。本文将这次实验结果报告如下。

一、材料与方法

(一) 种藻选择与处理

种藻材料主要是福建晋江养殖场1983年10月冷藏幼苗 (长2—5cm), 另外还采用了当年(1984年9月)采壳孢子长成的新鲜苗, 或者加以冷藏进行实验用。如果用冷藏苗, 均在试验前两天用消毒海水浸泡恢复 (一般水温保持20℃)。恢复后充分洗涤藻体并培养于有营养盐的海水中 (光强1000Lux左右)。再培养两天即可使用。经这样处理的种藻颜色如新鲜

※ 本论文摘要曾在1985年第二届世界藻类学大会上作为墙报, 全文安排为宣读论文。

种菜一样才可用作酶解, 否则不宜用作实验材料。

不同部位酶解细胞的实验是用中苗(藻体10—30cm), 自基部3cm左右处切下为基部; 3cm以上再切取3—4cm为中段, 另外, 将固着器即假根单独切下作为根部一组(见图1)。

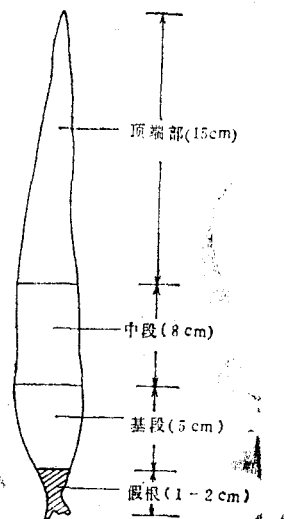


图1 坛紫菜中苗不同部位细胞发生实验示意

Fig. 1 The figure of the large thallus were cut into four portion

幼苗组藻体一般为3—5cm, 不切除任何部分直接进行实验。

酶解方法与研究I相同, 在此省略。最后离心所获得的细胞加入(3)号MES培养基冲稀计数, 然后取一定体积的细胞撒滴在预先制备的采苗器上。

细胞活力的检查, 最简单的方法是在显微镜下观察。如果细胞呈球形, 色素体浓棕绿色充实于整个细胞, 折光性强, 说明细胞具有活力。如果色素体模糊不清, 颜色淡绿, 说明细胞多数死亡。正确判断细胞成活的多少, 然后才能决定采苗与否。

(二) 营养细胞直接采苗

1. 采苗器: 实验用的苗绳与生产所用的相同, 可将苗绳缠在长方形框内(见图版I: 3), 苗绳缠好后再使共同位于一平面上。到

下海时可以作成网状, 也可以作成条帘状, 直接养殖(见图版II: 7)。

2. 采苗方法与采苗次数: 分离的细胞在结构上不同于果孢子与壳孢子^[2], 因此不能用采壳孢子的方法采苗^[3, 8]; 对细胞的附着时间进行过多次试验, 多采用滴细胞悬浮液到苗绳上, 干燥并静止3小时, 然后缓慢地从育苗箱的边缘加入(3)号MES培养液, 在3天内使细胞静止不动。我们从1984年9月采用冷冻幼苗做种藻, 共采8批。10月份用的种藻是新鲜种苗的中苗中段, 共采11批。11月又采用冷冻两个月的中苗中段, 共采2批。1985年1月所用种苗是冷冻中苗中段, 共采5批。在不同批数中曾进行了细胞附着时间、附着与比重、种藻与出苗的关系的实验。

3. 营养细胞培养条件: 9月, 将室内采好的苗培养在光强1000Lux、光时为12L:12D、恒温室温度为 $20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下; 培养基仍用研究I的配方。如果实验内容不同, 可改变培养条件中的某一条件。我们还做了不同温度对细胞分裂、分化等影响的实验。

(三) 下海养殖试验

除11月份以后采的几批苗外, 9月份的苗是以幼苗为种藻采的网, 肉眼在20多天就可见苗。我们因为客观条件所限, 只好在11月11日才下海养殖于浮架表层, 每3—4天晒网一次, 以除去杂藻危害, 同时观察其生长情况。到12月11日幼苗体长最长者可达58cm, 一般为20—40cm。在观察生长过程的同时, 进行了水温测量。当养殖期进入12月11日后, 海水温度逐渐下降到 17°C , 此时, 长达58cm的苗顶端有变白现象, 产生这种现象的原因主要是因水层浅、光照强所致, 而与细胞苗本身的性质无关。为了利用这些由营养细胞长成的藻体作种藻, 进行以后的试验, 我们将网帘拍照后晒干、冷藏。现将实验观察结果列于表1、图版I—II及图2中。

二、主要结果

(一) 种藻来源与出苗的关系

在研究 I 中我们已提出过这个问题, 认为日龄在 40—50 天的幼苗出苗多, 新鲜的或冷藏天数少的种藻好。本次实验再次证实了这一点。结果见表 1—2, 图版 I: 1—4。

从表 1—2 可以看出, 几批采苗后的出苗

情况是不同的, 其中以 1984 年 9 月直接采苗的出苗最好, 密度为 28 棵/cm, 稀者为 7—15 棵/cm。下海后长成了符合商品规格的紫菜。其它日龄的种藻中段出苗率低。从表 2 还可以看出幼苗虽经冷藏一年, 但出苗率仍很高, 且叶状

表 1 坛紫菜营养细胞直接采苗培养情况 (1984.1—1985.1)

Table 1 The cultural condition of young buds from vegetative cells of *Porphyra haitanensis* in the sea (1984—1985)

批数	种藻来源	采苗日期 (年.月.日)	见苗日期 与苗大小	出苗密度	下海日期与 海水温度	幼苗生长
1—8 批	1983 年冷藏当年 10 月幼苗 (长 3—5 cm)	1984.9.7— —9.17	10 月中旬约 1 个月 1 mm 以下	密度: 7—15 棵/cm 密者为 28 棵/cm	1984.11.11 日 21℃	生长一个月, 体 长可达 50 cm, 一 般体长为 30—40 cm
9—19 批	1984 年 9 月 8 日 采壳孢子长成幼 苗 15—30 cm 的 中段 (新鲜)	1984.10.7 —10.15	约 1 个月 1 mm 以下	密度: 稀, 每 cm 不到一棵	1984.10.27—11. 15 日分批下海 22—20℃	到 12 月 15 日幼苗 长出, 但比较稀, 最长者为 10 cm, 一般为 4—5 cm
20—21 批	1984 年 9 月 8 日 采壳孢子长成的 幼苗 15—30 cm 的 中段 (新鲜)	1984.11.15	1984.12.15 日 点状幼苗	密度: 密	1984.12.15 日 17℃ 以下	因水温低, 幼苗 生长很慢
20—26 批	1984 年 9 月 8 日 壳孢子苗长 20— 30 cm, 冷冻 3 个 月 (中段)	1985.1.17	1985.2.18 日肉眼可见	密度: 中等	尚未下海	

表 2 种藻日龄、部位与幼苗的关系 (显微镜下检查)¹⁾

Table 2 The relation of young bud's numbers with the day age and portion of thallus. The numbers are average value of 10 field vision observed using microscope (10×10)

种藻类别	果孢子丝状体数 (个)	叶状体 (个)	假根生长情况	叶状体性质	出苗率 (%)
冷冻一年幼苗 3—5 cm	55	125	发 达	正常苗多, 具有再分 化能力	70
中苗—中段	183	43	1 个月有假根的占少数, 大多为不规则细胞体		19
中苗—基部	12	44	培养 1 个月有假根的占 20%		80
中苗—根	54	200	不 发 达	正常苗少, 不具有再 分化能力	78

1) 果孢子数与叶状体数为 10 个视野下的平均值。(10×10); 出苗率为占存活的细胞的百分数, 死亡不计。

体多于丝状体,其中叶状体正常形状者多,假根发达。中苗中段组出苗数是丝状体的1/4,说明生殖细胞多于能够长成幼苗的细胞,在长成的叶状体中能长成正常幼苗(即有真正假根)的数量也较少。中苗根丝一段看起来叶状体数量多于冷藏的幼苗组,但这些叶状体形状多是假根粗壮,而分裂叶状体的上端细胞分裂能力降低,仅分裂数次即停止,表现出衰退现象。这种细胞在生产上利用价值不大。中苗基部段细胞分化成正常苗最多,说明这一段在生产上有利用价值。但是该段若与幼苗比较,其出苗率还是低的多(未刊稿)。从上述情况看,在用种藻分离营养细胞时,以冷藏幼苗2—5cm的最有效,其次是中苗基部3—4cm的一段,中段与根丝一段不宜用作种藻。

从理论上讲,一般紫菜属散生型,各细胞之间是独立的,细胞之间又不具胞间联丝“pit connection”,但经过细胞培养以后,反映了紫菜虽然结构仅为一个简单的叶状体,但在不同部位的细胞却是有顺序的向前分化,细胞的全能性在各部位表现强弱不同,在大、中、小苗间也表现不一样,因此,对紫菜生长发育的认识较前深化了。有关该项工作的研究现仍正在进行。

(二) 营养细胞附着条件

用营养细胞直接采苗,需要多长时间才能附着?附着与海水的比重及温度的关系如何?这在生产技术上首先是应了解和回答的问题。经过实验,现将结果列于表3—4。

表3 营养细胞附着时间与温度的关系
(10×10)

Table 3 The relation of fixed time and fixed temperature of vegetative cells of *Porphyra haitanensis*

温度 \ 时间	0.5h	1.0h	1.5h	3.0h
25℃	2	6	42	37
20℃	12	97	235	332
15℃	21	107	97	

表4 海水比重与细胞附着数量的关系¹⁾

Table 4 The relation of fixed number of cells and specific gravity of sea water. Numbers are calculated after fixed 1 hour under every field vision of microscope(10×10)

温度 \ 比重	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
20℃	39	62	104	250	61
25℃	12	31	21	34	68
15℃	0.6	2.2	9.5	26.2	16.8

1) 10×10 0.1ml记数,附着1h。

从表3可以看出,营养细胞在3种不同温度条件下附着1.5h,其附着量以20℃组为最高。在同一温度组内附着时间延长附着量渐增,附着时间在1.5h时,附着量达最高,因而细胞的附着时间至少在1.5h以上。我们在10月份采苗(用新鲜种藻中苗中段)之所以会出现出苗量不多,其主要原因除了与种藻本身有关外,附着时间较短(仅在1h之内就加入培养液并移动苗网),这也是原因之一,因而附苗量偏低。

从表4可以看出,海水的比重和温度对附着量也有影响。在3组不同的温度中,以温度为20℃比重为1.025组附着量最多;若比重高于或低于此值(1.025)则附着量减少,这与壳孢子和果孢子附着所需要的比重相同。这种情况可能是因为三者都缺少细胞壁,比重的低高会影响到它们的渗透压。由上述实验结果可以看出,在采苗时,应该对培养液的比重进行测定,在直接采苗时以选择比重为1.020—1.025的海水比较合适。

(三) 直接采苗后育苗的情况

从表1所列的几批苗中可以看出,我们对9月份所采的几批苗进行了较详细的观察,无论那一批采的苗,约在采苗后的30天肉眼均可见苗,其中有正常的叶状体(见图版I:2),有畸形苗,还有由果孢子长成的丝状体。第1种正常的叶状体有假根,叶片顶端尖细,最顶端只有一个细胞;畸形叶状体形状呈多样性,但均没有真正的假根,其中有些经过一定的时

间就转变成正常的叶状体 (见图版 I: 4); 但另一些不能转变成正常的叶状体者, 就开始性分化产生了精子囊或成为丝状体。还有的一直呈畸形直到最终死亡。没有长出假根的叶状体无固着能力, 在换培养液时容易随水流失。如出现丝状体数量多时, 可以采取阴干 1—2 h 去除, 而对幼苗无损害作用。

关于幼苗发生的类型与初期、晚期发生, 我们作了比较详细的观察, 将有另文报道。本文仅将主要照片列入图版 I。

我们对出苗与温度的关系只作了小型观察 (在本实验以后我们又专门进行了专题研究, 内容将另文报道), 没有用网帘采苗的实验, 实验结果见表 5。

从表 5 可以看出: 培养 1 周后平均每视野存活的细胞数, 20℃组远远超过 25℃组与 15℃组, 从形成的叶状体与细胞团的百分率看, 也以 20℃组为最高, 因此可以认为 20℃对坛紫菜营养细胞的存活、分裂、分化是比较合适的温度。再从表 5 可以看出, 营养细胞长成幼苗后

表 5 培养 1 周细胞存活、分化以及叶状体平均增长情况 (倍数)

Table 5 The condition of the survival and differentiation of vegetative cells and their average growth fold through one week culture in the laboratory.

组 别	平均每视野 存活细胞数	叶状体和细 胞团占%	体长增长的情况 (倍数)		
			第 2—3 周	第 3—4 周	第 4—5 周
25℃	5.6	8.4	1.7	2.0	2.4
20℃	60.0	29.5	2.1	2.0	2.3
15℃	14.4	5.2	1.4	2.2	1.9

在 3 组温度下的体长增长情况, 在第 2 周到第 3 周以 20℃最好, 后者是前者的 2.1 倍, 比 25℃组与 15℃组高, 第 4 周比第 3 周的增长在 3 组中趋向一致, 这一点, 也说明了在两周时 25℃组与 15℃组不适于细胞分裂、分化成叶状体, 因而影响了叶状体的生长; 而 20℃组适合于细胞发育成叶状体和叶状体的生长, 所以在培养 2 周时就呈现出生长优势。到第 4—5 周, 25℃与 20℃组都比 15℃组增长快, 而且在以后的试验中, 25℃组有比 20℃增长快的趋势。从室内育苗考虑, 既要缩短育苗时间又要控制杂藻的繁生, 25℃对硅藻来说比 20℃容易繁生, 所以我们认为在现在的条件下培育营养细胞以 20℃±2℃较为合适。关于温度条件的实验, 我们现正在进一步进行研究, 以探索它与分化幼苗类型的关系。

(四) 下海养殖后幼苗的生长观察

将表 1 各批下海, 其中重点观察 I—Ⅷ。在下海前先在室内动荡海水 3 天以锻炼幼苗, 于 11 月 11 日下海观察 (在福建水温进入比较稳定的时期) 结果如图 2 及图版 II: 5—7。由

图中可以看出, 在 11 月 15 日测量时, 幼苗体长一般为 2—5 mm; 20 日测量已达 30 mm; 23 日为 50 mm; 28 日为 70 mm; 12 月 7 日为 300 mm; 甚至更长; 到 12 月 11 日最长可达 580 mm。叶状体的颜色正常, 形状与壳孢子长成的紫菜相同, 还表现出紫菜雌雄异株的特征 (见图版 II: 8)。在用冷藏幼苗做种藻时, 因为幼苗小, 无法分辨雌雄藻体, 在采单细胞时, 雌雄藻体的营养细胞是混杂在一起的, 故长出幼苗

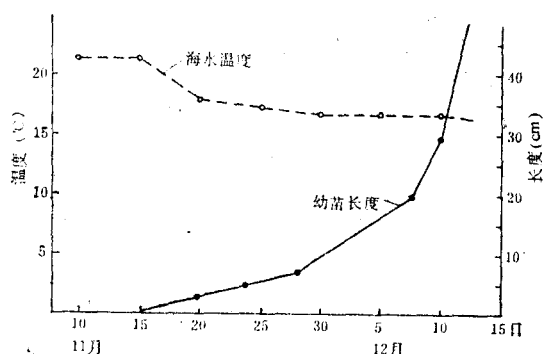


图 2 海区温度与幼苗生长的关系
Fig. 2 Relationship between temperature change and thallus growth.

后仍显示出性别特征。从1个月的生长与水温变化来看,水温高时幼苗生长快(见图2)。幼苗下海时的海水温度已下降到21℃左右,到12月11日海水温度已下降到17℃,随着水温不断下降,幼苗也已由小逐渐长大。藻体由数mm增长到580mm。这一生长与水温曲线的关系与壳孢子苗的情况也很相似。但从具体的温度来看,营养细胞长成的幼苗的生长速度比同一温度下壳孢子长成的幼苗的生长速度有增快的趋势。紫菜养殖中采壳孢子的时间一般在9月中旬前后,10天以后可以见苗,如果11月初见苗,下海养殖于21℃条件下生长很慢,一般不能长成商品紫菜,所以生产上要不误农时地采壳孢子(阴历秋分前后)是保证生产的关键。现从细胞苗下海的水温比壳孢子苗有忍耐水温低的趋势看,我们可以利用这一点于生产上,在那些已经超过采壳孢子的时间的情况下可利用细胞苗生产,甚至可以代替冷藏网生产。

三、讨 论

从上述细胞苗下海养殖实验来看,我们认为本实验有以下几方面的意义。

1、高等藻类由单离的细胞直接采苗下海养殖成大紫菜的例子还不多,但仅从我们的实验来看,出苗后下海一个月,在合适条件下就长成商品紫菜,说明细胞苗不仅出苗快,下海生长也快,这些特点对生产是非常有利的。

2. 从选种育种考虑,也有现实意义。利用单株种藻分离培养取得纯系,既有取材方便又有随时可以进行的优点,而且比培养丝状体采壳孢子简单的多。还为探索细胞杂交与遗传工程提供良好的实验材料。

3. 实验证明,将冷藏过一年的幼苗在8—9月初进行直接采苗,经培养1个月后再下海养殖1个月,就可以长成商品规格的紫菜。如果酶的来源解决,酶的价格可降低的话,我

们改革传统的育苗方式采用细胞苗就完全有可能,这样不但节省了人力、物力,而且社会效益也会显著提高。为此,我们认为,将细胞技术运用于紫菜生产,其前景是十分广阔的。

参 考 文 献

- [1] 王素娟、张小平、徐志东、孙云龙,1986. 坛紫菜(*Porphyra haitanesis* Chang et Zheng)营养细胞和原生质体培养的研究I. 海洋与湖沼 17(3): 217—221.
- [2] 王素娟、徐志东、王光远、夏镇澳,1986. 坛紫菜原生质体超微结构的观察. 海洋科学 10(4): 21—23.
- [3] 中国科学院海洋研究所,藻类生态组. 1978. 条斑紫菜人工养殖. 科学出版社,第55—104页.
- [4] 卢澄清等,1983. 紫菜叶状体营养细胞的研究I. 条斑紫菜营养细胞的分离、培养和长成小紫菜的观察. 1979年第I届中国藻类学术讨论会论文集,第45—55页.
- [5] 朱仁华,1983. 海螺酶介壁的研究. 山东海洋学院学报 13(4): 47—57.
- [6] 赵焕登等,1984. 条斑紫菜营养细胞的分离与培养试验. 水产学报 8(3): 197—201.
- [7] 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.
- [8] 福建省水产局,1979. 坛紫菜人工养殖. 福建人民出版社,第24—76页.
- [9] Fujita, Y. and S. Migita, 1985. Isolation and culture of some seaweeds. Bull. Fac. Fish Nagasaki Univ. 57: 39—45.
- [10] Poline - fuller, M. et als., 1983. Vegetative propagation of porphyra perforata. IIth International Seaweed Symposium. pp. 308—313.
- [11] Saga, N., 1984. Isolation of protoplasts from edible seaweeds. Bot Mag Tikyo 97: 423—427.
- [12] Saga, N. and Sakai, Y. Sakai, 1984. Isolation of protoplasts from Laminaria and Porphyra. Bull. Jap. Soc. Sci, Fish, 50: 108,

A STUDY ON THE CULTIVATION OF THE VEGETATIVE CELLS AND
PROTOPLASTS OF *PORPHYRA HAITANENSIS* II. THE
CULTIVATION OF THE YOUNG BUDS ISOLATED
VEGETATIVE CELLS IN SEA

Wang Sujuan Sun Yunlong Lu Anming

(Shanghai fisheries University)

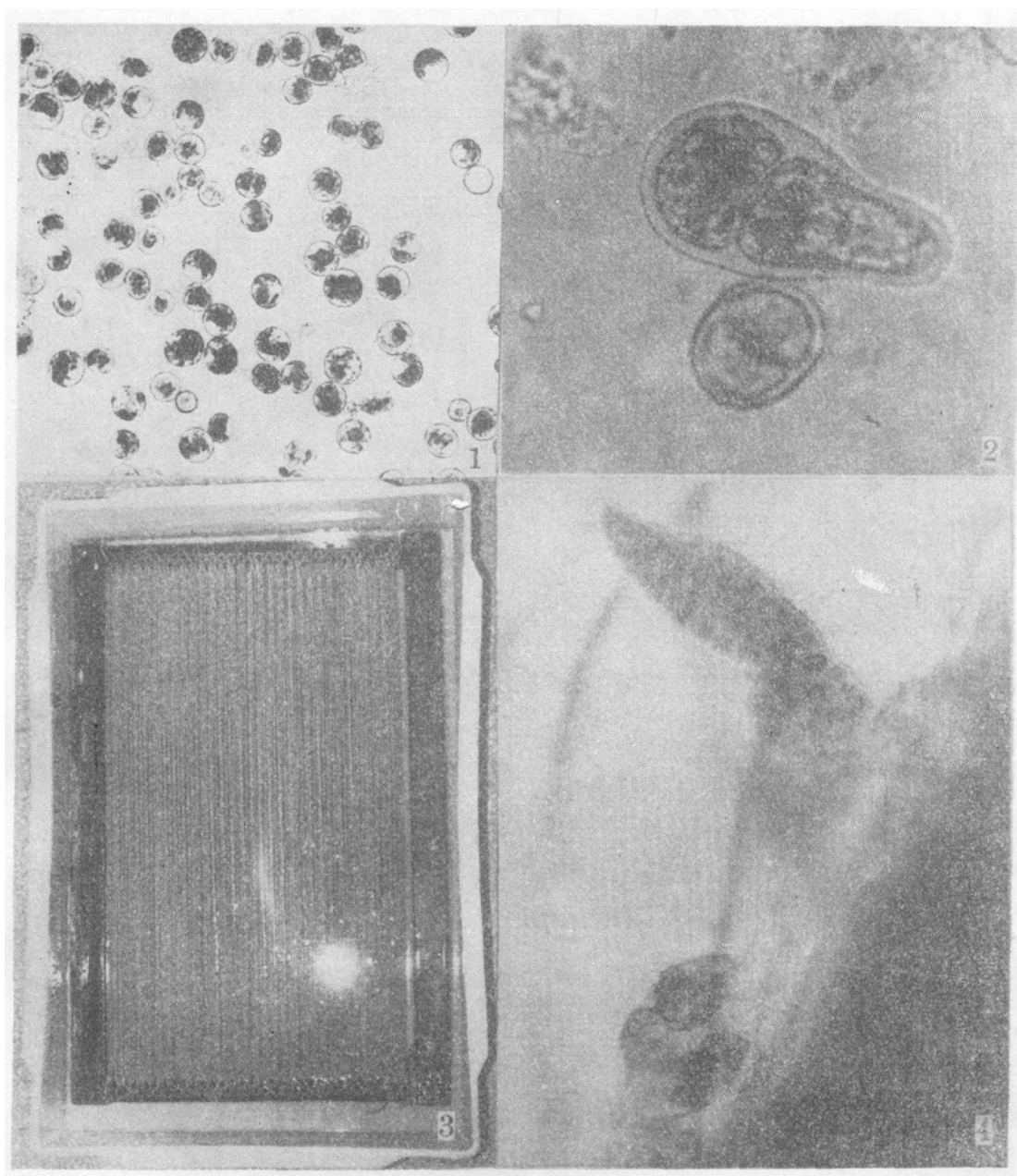
Wang Guangyuan

(Shanghai Institute of Plant Physiology)

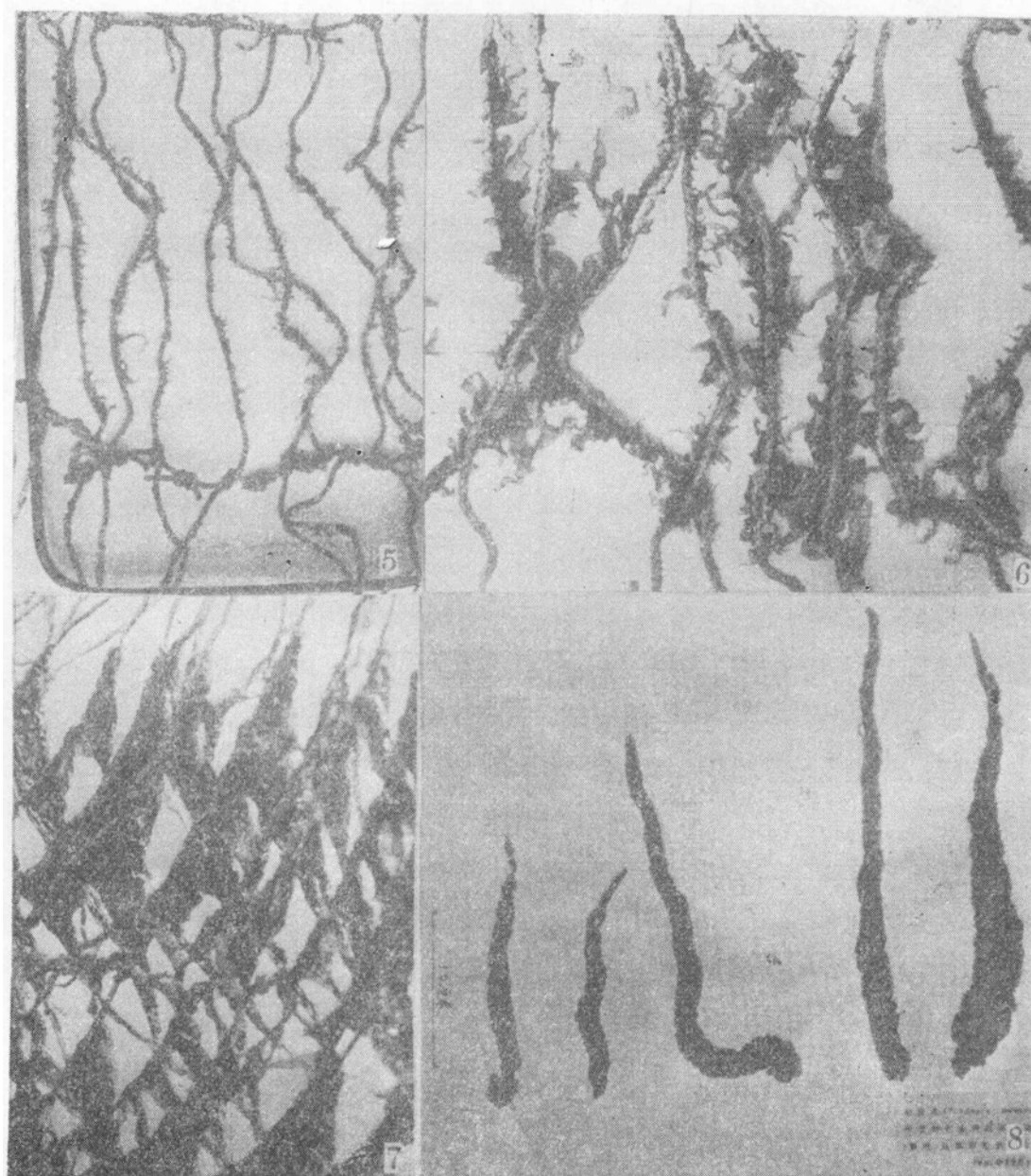
Abstract

The conventional cultivation of *Porphyra* is accomplished by growing filaments in clam shells. This is followed by production of conchospores after culturing in pools of sea water in the laboratory for five to six months. When the conchospores are fully mature, they are released and are collected onto the rope nets which are then cultured in the sea. This is not only a complex procedure but also a time consuming, economically unfeasible process. Many attempts have been made in order to improve this process. Wang et al., first isolated and culture the vegetative cells from the thalli of *P. haitanensis* and cultured them into young thalli with the length of 6cm in the laboratory. Trying to collect the vegetative cells directly, instead of conchospores, and culture them in the sea, the authors carried out the experiment from September, 1984 through January, 1985.

This research deals mainly with the use of the vegetative cells of *P. haitanensis* as seeds and their culture in the sea. The experiment process is as follows. The vegetative cells, enzymatically isolated, were attached to the rope nets and cultured in the laboratory for a month until they become buds of about 0.2—0.5 cm in length. Then the seedlings were moved to the open sea for culturing. One month after culturing, the thalli could reach a maximum length of 50 cm while the average size was 20—30 cm. Their attachment density was 7—15 buds per cm of the rope. The thallus tended to grow faster as the water temperature dropped from 21—27 °C. It was proven that the vegetative cells, separated from a small thallus about 5cm long, could grow up into a normal thallus, after being kept frozen for a year. The present study also deals with factors effecting the attachment and germination of the vegetative cells. The result of this study shows that the vegetative cells can be used as a new seed resource, simplifying the production process of the laver seedling. The culture of *P. haitanensis* by this cell technique is a significant advancement in the field of maricultural science.



1. 酶解的单细胞
1. Isolated vegetative cells from the thallus of *P. haitanensis*
2. 细胞分裂
2. vegetative cells division
3. 采苗器
3. rope net as a substrate to which the isolated vegetative cells attach
4. 畸形苗长成正常苗
4. abnormal buds grow up to normal buds



5. 幼苗下海后9天

5. young buds cultured in the sea for 9 days

6. 下海后17天幼苗

6. young buds cultured in the sea for 17 days

7. 下海30天的大紫菜

7. the large thallus grown on the rope for 30 days

8. 大的紫菜标本采自实验网上 (30天)

8. large specimens collected from the rope nets after cultured in the sea filed for 30 days