

外界因素对条斑紫菜体细胞分化发育的影响

I. 温度、光强实验

何培民 王素娟

上海水产大学养殖系,200090)

(收稿日期 1990年3月5日)

关键词 条斑紫菜,体细胞,分化发育,温度,光强

提要 本实验利用酶解技术得到单个体细胞,较详细地研究了不同温度、光照强度对体细胞分化发育的影响,从而确定出体细胞培养的最佳条件,为进一步利用条斑紫菜体细胞育苗这一新技术打下了基础。

为能更清楚地了解条斑紫菜体细胞育苗的规律,使这一新技术更快应用到养殖生产上,我们于1987年~1988年进行了外界因素对条斑

紫菜体细胞分化发育影响的基础研究,以便掌握体细胞育苗的最佳培养条件。本文主要讨论温度和光强对体细胞分化发育的影响。

I. 材料与方法

I.1. 种藻来源

本实验用的条斑紫菜采集于江苏省吕四海丰村养殖海区。经阴干后,用薄膜袋密封冷藏于 -20°C 冰箱中存用。

I.2. 体细胞制备

取0.5g紫菜放在海水中复苏3d,用消毒海水洗刷3遍以除去杂藻。剪切成小块放入10mL海螺酶液中,酶由青岛生化制药厂提供。用2mol/L葡萄糖液配制成3%酶溶液,pH为6.5。在 25°C 恒温下酶解2.5h。酶解结束后,用400目的镍丝筛网过滤,其滤液用手摇离心机离心2min,除去上层酶液,加1.030比重的海水冲洗并离心3次。所得细胞再用1.030比重的MES于培养皿中培养;次日改用1.025比重MES液培养。

I.3. 培养条件

一般培养条件为温度 20°C 、荧光灯光强为2500lx,光周期为12:12h光暗,MES培养液。

I.4. 单因素实验

I.4.1. 温度实验 设有5,10,15,20, 25°C 5个梯度。

I.4.2. 光照实验 设有500,1500,2500,3500lx4个梯度。

II. 结果与讨论

经酶解所得的体细胞放入一般培养条件下

培养,次日改变某一单因素条件,置于该因素各个梯度下进行培养,在显微镜下观察其发育过程,统计细胞团数和出苗数分别占成活细胞总和的百分率。

条斑紫菜体细胞发育与坛紫菜体细胞发育有所不同,除体细胞直接形成小苗外,大部分体细胞先分裂为细胞团,再由细胞团释放出孢子而萌发成苗,这一发育途径是条斑紫菜体细胞发育的一大特点,也是苗源的主要来源。因此,本文把细胞团率和出苗率作为两个重要指标进行讨论。

II.1. 温度实验

II.1.1. 温度与细胞分裂速度的关系 条斑紫菜体细胞分裂与温度的关系较为密切,为清楚地观察细胞团和苗发育的情况,该组实验的藻体特经过单孢子处理。表1为不同温度下培养的细胞在第3天、第4天、第7天和第10天的分裂情况。

刚酶解出来的体细胞为墨绿色,经培养后,逐步变为橙红色至深红色。从表1可看出,随着温度的升高,细胞分裂加快。如在第3天, 20°C 温度组的细胞已分裂为2个细胞的细胞团,而其它温度组还未分裂。在第10天时, 20°C 组的细胞已分裂为8个细胞的细胞团,而15, $10,5^{\circ}\text{C}$ 组的细胞分别分裂为6个、4个、2个细胞的细胞团。但温度过高,达到 25°C 时,细胞则解体大量死亡。说明条斑紫菜体细胞培养不能忍受 25°C 高温,这与其藻体生长的生态习性相

表1 10d内温度对体细胞分裂的影响

Tab. 1 Effect of different temperatures on the division of somatic cells in 10d

温度($^{\circ}\text{C}$) 天数	5	10	15	20	25
第3天	墨绿色 未分裂	墨绿色 未分裂	墨绿色 开始分裂	转橙色 分裂为二	变橙色 开始分裂
第4天	墨绿色 未分裂	墨绿色 开始分裂	转橙色 分裂为二	转橙色 分裂为二	大量死亡
第7天	墨绿色 开始分裂	墨绿色 分裂为二	转橙色 分裂为四	橙红色 分裂为四	
第10天	墨绿色 开始分裂	转橙色 分裂为四	转橙色 分裂为六	橙红色 分裂为八	

表 2 第 13d 温度对各细胞团率分布的影响

Tab. 2 Effect of different temperatures on the distribution of cell aggregate ratio after 13d

项目(%) 温度(°C)	未分裂 细胞率	分裂为 2 细 胞细胞团率	分裂为 4 细 胞细胞团率	分裂为 8 细 胞细胞团率	苗率	总细胞团率
5	63.3	33.3	3.3			36.7
10	58.8	35.3	5.9			41.2
15	53.0	30.9	13.2	2.9	2.9	47.1
20	32.6	37.2	18.6	11.6	9.3	67.4

符。另外,我们还做过 23°C 温度实验,结果发现此温度下,体细胞分裂最快,10d 内有的细胞可分裂为 16 个细胞的细胞团,但在 23°C 条件下,细菌生长旺盛,细胞死亡率也较大,不宜采用。

II.1.2. 温度与细胞团率的关系 20°C 条件下,细胞分裂快,而且分裂的细胞数占细胞总数的比率(即细胞团率)也较大(如表 2)。

从表 2 可看出,20°C 时,总分裂细胞数占细胞总数(即总细胞团率)的 67.4%,比其它温度分裂细胞要高,说明温度越高,细胞不但分裂速度较快,而且细胞团率也高。同时也可看出,各温度下细胞分裂速度是极不同步的。细胞分裂的不同步性对细胞培养的管理及育苗工作有很大影响。如何提高细胞分裂的同步率,还有待于进一步的研究。

图 1a 显示 15°C 和 20°C 下细胞团率在培

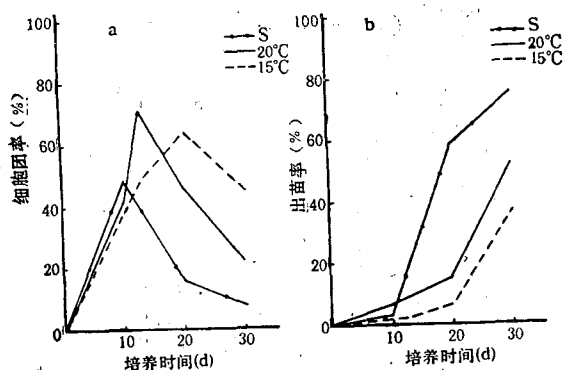


图 1 不同温度对细胞团率(a)及细胞苗率(b)的影响
Fig. 1 Effect of different temperatures on the change of cell aggregate ratio (a) cell seedling ratio (b)

养过程中的动态变化,进一步说明 20°C 温度下细胞不但分裂快,而且进行分裂的细胞数量也多。因此,我们认为 20°C 是条斑紫菜体细胞培养的最佳温度。图中曲线达到高峰后,便逐步下降,说明细胞团释放孢子而解体。

II.1.3. 温度与出苗率的关系 图 1a 中由细胞团释放的孢子与条斑紫菜的单孢子类似,能直接萌发成苗。而且曲线下降的幅度越大,说明释放孢子越多。由图 1a 可知,20°C 组的曲线下降幅度大,到第 30 天时细胞团率只为 22.0%,说明有 47.2% 的细胞团放散了孢子。

图 1b 则十分清楚地显示了 20°C 和 15°C 温度下出苗率情况。一般地说,前 10d 形成的苗多为细胞直接形成的苗,10d 后形成的苗则多为孢子萌发成苗,我们称之为孢子苗。由于实验的藻体经过特殊处理,故孢子放散时间推迟了 3 d (见图 1aS 线和 20°C 线)。因此在图 1b 中出苗率急增也相应地推迟到第 20 天后 (见图 1bS 线和 20°C 线)。

从图 1b 中可知,20°C 组在第 10 天、20 天和 30 天的出苗率分别是 6.7%, 15.7% 和 52.3%; 而 15°C 组分别是 2.0%, 6.7% 和 37.0%。可见在培养相同时间里,20°C 比 15°C 出苗率高,而且出苗时间也早。

从上述实验结果可看出,无论是细胞分裂速度和细胞团率还是出苗率,都是 20°C 较好,培养时间短,出苗快且出苗率高。因此,20°C 是细胞培养的最佳温度。

II. 2. 光强实验

II.2.1. 光强与细胞团率的关系 图 2a 显示了光强与细胞团率的时间变化,说明光强在

1 500lx 以上基本上能满足细胞团发育的要求,其中以 2 500lx 对细胞团形成最有利。

II.2.2. 光强与出苗率的关系 从图 2b 中可看出,前 10d 光强对苗的形成影响不大,出苗率都在 20%~26% 之间,第 20 天时,则 3 500lx 组的出苗率最高为 76.0%,2 500lx 组次之,为 70.0%,1 500lx,500lx 两组则依次为 59.4% 和 50.4%,这说明光强越强,出苗率越高。

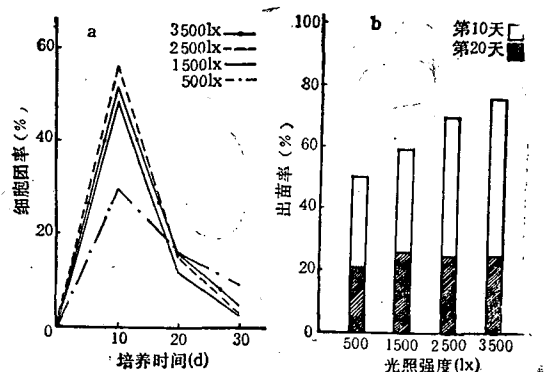


图 2 不同光强对细胞团率(a)及细胞苗率(b)变化的影响

Fig. 2 Effect of different intensities of light on the change of cell aggregate ratio

II.2.3. 光强与小苗生长速度的关系 从图 3 可知,培养的前 10d,苗长都在 25~35 μm 范围内,说明光强在 500~3 500lx 范围内对苗的生长速度影响不大。第 20 天时,3 500lx 组的苗生长最快,苗长平均为 207 μm ,2 500,1 500,500lx 组的苗长分别为 147,135,92.6 μm ,说明随着苗的长大,苗对光强的要求越来越强。

综上所述,光强越大,对细胞团的形成、出苗率及苗的生长越有利,前 10d 采用 2 500lx 光强,10d 后再改用 3 500lx,可加快出苗。李世英^[4]曾报道光照强度对单孢子苗和壳孢子苗生长的影响,她认为在 1 200~20 000lx 条件下,两种幼苗都表现为光线愈强,生长愈快,其中 20 000lx 条件下,21d 的单孢子苗可长到 247 μm 。由于我们条件有限,未能做这么高的光强实验。体细胞是否能耐受如此高的光强,还有待进一步研究。但从细胞苗生长情况看,光强

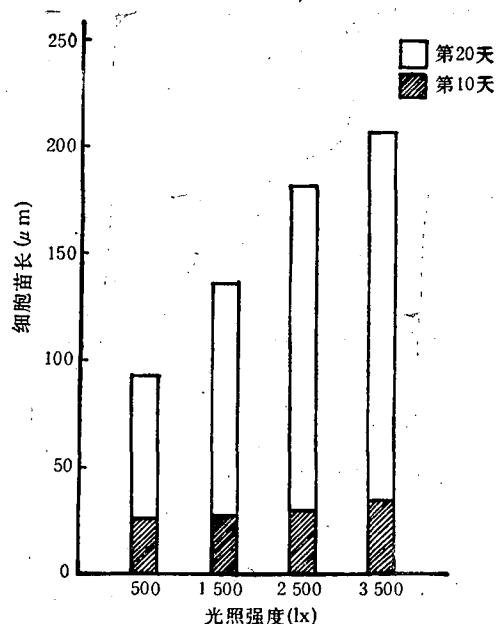


图 3 不同光强对细胞生长的影响

Fig. 3 Effect of different intensities of light on the growth of cell seedlings

越强,苗生长越快。另外,其它外界条件如充氧培养、海水比重、营养盐等以及不同季节收集的种藻都对条斑紫菜体细胞的分化发育具有一定的影响和作用,这里不加叙述。

参考文献

- [1] 戴继勋、包振民,1988。坛紫菜原生质体发育的研究。遗传学报 15(4): 299~302。
- [2] 戴继勋等,1988。紫菜叶状体细胞的酶法分离及其养殖研究。生物工程学报 4(2): 133~137。
- [3] 方宗熙等,1986。紫菜营养细胞的酶法分离和在水产养殖中的应用。海洋科学 10(3): 46~47。
- [4] 李世英、崔广法,1980。条斑紫菜单孢子和壳孢子幼苗生长发育的初步观察。海洋与湖沼 11(4): 371~373。
- [5] 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。第一届中国藻类学术讨论会文集。科学出版社,45~49页。
- [6] 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。
- [7] 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。
- [8] 王素娟等,1987。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。海洋科学 11(1): 1~7。
- [9] 赵焕登、张学成,1981。条斑紫菜营养细胞的分离与培养。山东海洋学院学报 11(1): 61~65。
- [10] 赵焕登、张学成,1984。条斑紫菜营养细胞的分离培养

- 和实验。水产学报 8(3): 197~202。
- [11] Chen, L. C. M., 1986. Cell development of *Porphyra minitata* (Rhodophyceae) under axenic culture. *Botanica Marina* 24: 435-9.
- [12] Fujita, Y. and Migita, S., 1985. Isolation and culture of protoplast from some seaweeds. *Bull. Faculty of Fisheries Nagasaki Univ.* 57:39-45.
- [13] Polne-Fuller, M. and Aharon, G., 1984. Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforta* as expressed by Morphology, Enzymatic Digestion, and Protoplasts, Regeneration, *J. Phycol.* 20:609-616.
- [14] Saga, N., 1984. Isolation of protoplasts from edible seaweeds. *Bot. Mag. Tokyo.* 97: 423-7.

EFFECTS OF EXTERNAL FACTORS ON DIFFERENTIATION AND DEVELOPMENT OF SOMATIC CELLS IN *PORPHYRA YEZOENSIS* I. TEMPERATURE AND ILLUMINATION

He Peimin and Wang Sujuan

(Laboratory of Seaweeds Cell Engineering, Shanghai Fisheries University, 200090)

Received: Mar., 5, 1990

Key Words: *Porphyra yezoensis*, Somatic cells, Differentiation and development, Temperature and illumination

Abstract

Study on the effects of different temperature and intensity of light on the differentiation and development of somatic cells in *Porphyra yezoensis* showed that there are two ways of the developments of the somatic cells: 1) forming directly single cell seedlings; 2) dividing firstly into cell aggregates and then releasing spores to germinate into sporelings. Changes of the ratio of cell aggregates and seedlings or sporelings as well as the growth of seedlings or sporelings are studied to find out the optimums temperature and intensity of light for cell culture and further more for breeding with somatic cells in *Porphyra yezoensis*.