

坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I*

王素娟 张小平 徐志东 孙云龙

(上海水产学院)

提要 自1983年以来作者研究了酶介坛紫菜 (*P. haitanensis*) 成单细胞与原生质体的方法并培养成正常幼苗。室内幼苗可生长到5—6cm,在直径3cm的培养皿底部密者可出苗240余棵,可达到生产上的密度要求。分离的细胞在3天到1周内可以长出假根,快者三周可肉眼见苗,一般需一个月普遍见苗。如改善培养条件,见苗时间还可缩短。从这种可以长成幼苗、而且见苗比较快的结果来看,对今后生产上加以利用估计是可行的。本文还对不同时期种藻的出苗量以及具有单孢子的铁钉紫菜细胞培养进行了比较研究。

利用紫菜叶状体的营养细胞或原生质体培养成叶状体的研究,国内外已有报道,如卢澄清等^[4]用微生物分解法、赵焕登^[6]等用研磨法、唐延林用酶解法^[5]分离营养细胞经培养均获得小紫菜幼苗;国外仅见 M. polne-Fuller 等^[7]的报告。紫菜属是具有重要经济价值的海藻,进行细胞或原生质体的培养研究,无论从生产上解决苗种来源的途径或作为选种育种的手段来看都有一定的现实意义。坛紫菜盛产于我国闽、浙两省,又是两大栽培紫菜中产量高、生产面积最多的一种,从生物学特点看它不同于上述作者研究的条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda)、圆紫菜 (*P. suborbiculata* Kjellm)、(*P. perforata*)。为探索坛紫菜细胞的培养在生产上是否有利用的可能性,我们于1983—1984年2月进行了多次试验,其中还进行了一次铁钉紫菜细胞的分离与培养。现将实验情况报告如下。

一、材料与方 法

(一) 材料来源

本文对坛紫菜的营养细胞和培养共进行了12次,实验所用材料其日龄与低温保藏时间不完全相同,为便于说明列入表1。

(二) 实验用的酶及培养基

实验用酶系购自山东海洋学院制备的海螺酶粉,每次所用的浓度为0.5—1.0%,视材料而定。酶液是用2 mol/L葡萄糖溶液加酶粉混合配制而成。

培养基为MES¹⁾,在培养前期约1周左右选用3号MES,其主要成分就是在MES

* 本文曾于1984年7月在中国海洋湖沼学会第四届全国代表大会暨学术年会藻类分组讨论会上宣读过。参加本实验工作的还有路安民同志。

收稿日期: 1984年10月。

1) MES培养基为修改过的PES培养基,即在ES培养基中不加维生素^[1],另外在PII原液中按500ml溶液加300mg柠檬酸亚铁,这样我们简称为MES培养基。

表 1 实验材料的来源及保藏时间

实验序数	实验时间	实验种类	材料日龄	低温保藏天数
第 1 次	1983.3.26	坛紫菜	1982.12 采集日龄 75 天	110 天
第 2 次	5.21	坛紫菜	1982.12 采集日龄 75 天	170 天
第 3 次	6.16	坛紫菜	1982.12 采集日龄 75 天	195 天
第 4 次	11.4	坛紫菜	1983.10 采日龄 45 到 50 天	3 天
第 5 次	11.9	坛紫菜	1983.10 采日龄 45 到 50 天	8 天
第 6 次	11.11	坛紫菜	1983.10 采日龄 45 到 50 天	10 天
第 7 次	11.15	坛紫菜	1983.10 采日龄 45 到 50 天	14 天
第 8 次	11.21	坛紫菜	1983.10 采日龄 45 到 50 天	20 天
第 9 次	11.22	坛紫菜	1983.10 采日龄 45 到 50 天	21 天
第 10 次	1984.1.7	坛紫菜	1983.12 采日龄 45 天	67 天
第 11 次	1.25	坛紫菜	1983.12 采日龄 45 天	85 天
第 12 次	2.10	坛紫菜	1983.12 采日龄 90 天	60 天
	1983.5.5	铁钉紫菜	1983.12 采日龄 150 天	2 天

培养液中加 KT 与 2.4D, 后两者比例按 1.5ppm 比 0.5ppm 配制。酶解后冲洗用加盐培养基, 即在 100ml 的 MES 培养基中加 1.17g NaCl。

(三) 培养条件

温度 实验期温度变动在 15—21℃ 之间 (第一次试验有一段时间为 23℃), 每天保持恒定。

光照 光源为日光灯, 光时为 12L:12D 或 10L:14D, 光强为 1000—1500 lx。1984 年自 3 月 30 日开始将 1 月 7 日与 2 月 9 日实验组由恒温室内移到常温自然光照条件下通气培养叶状体。

(四) 材料处理

实验前两天先将材料从冰箱内取出浸泡于消毒海水中, 用刀片切除有果孢子囊的边缘部分, 镜检基本上为营养细胞部分。然后将藻体用毛笔反复洗刷多次, 用 1 mol/L 葡萄糖溶液洗去藻体的盐分, 剪成小碎片后, 再用 1 mol/L 葡萄糖溶液洗涤过滤后放入配制的酶液中, 置于摇床上、温度保持 27—30℃ 酶解 1.5—2.5h, 不断镜检决定酶解时间。解离完毕, 加 4 倍于酶液的 MES 培养基混合后用钢丝网过滤。滤液经离心机离心 (2000 转/min) 2 分钟后弃去上清液, 再加入加盐的 MES 培养基摇匀并离心, 这样反复洗涤三次, 最后收集离心管底的细胞或原生质体撒在直径 3cm 的小培养皿与缠有维尼龙绳的玻璃片上, 静止约 2 小时加入 3 号 MES 培养基培养。除第 1, 2, 3 次试验外, 其它各组均在培养后的第 7 天改成 MES 培养基, 于恒温室内培养, 每 7—10 天换培养液一次。出现小叶状体后改为氮磷培养液, 即氮为 4ppm, 磷为 0.4ppm。

二、结 果

1. 海螺酶对坛紫菜与铁钉紫菜叶状体酶解的效果

实验共进行坛紫菜 12 次、铁钉紫菜 1 次 (因材料关系未能再次试验), 加上坛紫菜的

日龄与保藏时间不同,因此解离效果和所需时间也不完全一样。但总的来看这种酶对坛紫菜还是有效的。酶解后获得有单细胞、原生质体、两个成对的双细胞和三、四个细胞团,几种情况中那一种占比例多与材料内在因素和酶解条件有关,一般在藻体正常情况下均以单离细胞数为最多(图版 I:1)。

2. 紫菜细胞培养后的分裂与幼苗形成

从解离的几种情况来看,细胞分裂的趋势有三种。一是由单一细胞的一端伸出突起,逐渐发展成假根,而另一端横分裂成两个细胞形成典型的两极分裂,并发展成典型的小紫菜。这种幼苗外形细长,以后长成等腰三角形的幼苗与壳孢子萌发成的幼苗形状相似(图版 I:2—3)。第二种是由分离的细胞不断分裂为二、四,最后成为多个的细胞团(图版 I:4),细胞直径大、色素体星状,最后由团块的一端分化成叶状体(图版 II:5)。这种团块长成的叶状体形状宽或圆形,不甚规则。团块的另一端由边缘细胞伸出较粗壮的凸起,内有较浅的色素体,再由它分裂成单列细胞,成为不正常的假根,附着力差,极易脱落(图版 II:5,6)。这种小苗的另一端细胞有时可以形成果孢子或精子囊(视种藻而定)。第三种是由单一的或团块的细胞仅分裂 1—2 次即形成果孢子,很快就在细胞内形成丝状体,这些原来的细胞或细胞团可能是由已受精的卵或正在分裂的果孢子囊分化而成(图版 II:7)。三种细胞分裂的方式与所成幼苗的数量与实验所用的材料日龄有着密切的关系。在我们的试验中,第 1—3 次比第 4—9 次长成的正常苗要少(第 9 次每个视野下最多就有 3—4 棵(10×10)),而以第 2 种苗占多数。第 10—11 次用的是当年冷藏的幼苗为材料,藻体长度为 3—10cm,第 12 次试验的材料是 1983 年 12 月 16 日的较嫩的紫菜,酶解后长成的正常苗较多最多的每平方厘米有 24 棵,第二种苗也不少,另外还有第三种情况即丝状体。从表 1 所列材料的日龄看,11 月 4 日—11 月 22 日(第 4—9 次)的材料日龄约 45 天,第 10—11 次实验材料是福建的幼苗冷藏网,日龄也在 45 天左右,第 1—3 次实验的材料是 1982 年 12 月上旬左右,从日龄来看与第 12 次实验的材料相近似。但第 1—3 次实验是在 1983 年 3 月 26 日、5 月 21 日、6 月 16 日进行的,这时材料已冷藏了近 4—6 个月,而第 12 次实验是在 2 月 10 日进行的,材料仅冷藏两个月左右,故表现结果好坏亦不相同。但总的来看,以 10 月中下旬到 11 月上中旬不冷藏或冷藏天数少的材料出苗多。按日龄计算 40—50 天日龄的为最好,如在 12 月以前晚出苗的坛紫菜效果也很好。

实验所长出的幼苗无论是第 1 种正常苗还是第 2 种不正常苗,在室内培养到一定大小后均开始性分化,这可能与细胞日龄与培养条件有关,如果在外界条件合适时,将第一种正常苗移入海区,估计可以长成大的叶状体。在实验过程中未见到有放散单孢子的现象。

铁钉紫菜虽因材料关系只进行一次,但结果却与坛紫菜完全不同,5 月 5 日分离的营养细胞,于 9 日已分裂为二细胞,11 日一半已分裂成 4 细胞,进一步分裂,颜色深红,原生质浓,到 16 日已形成单孢子,每个囊内有 8 个单孢子(图版 II:8)。放出的单孢子直径为 14 μm ,23 日已长成小叶状体(图版 II:9),27 日长成纵列为两行的小幼苗,并长出正常的假根,这些幼苗继续培养又形成单孢子,有的幼苗产生果孢子并长成丝状体。铁钉紫菜营养细胞培养的结果与卢澄清(1983)和唐延林(1982)实验的条斑紫菜和圆紫菜情况很相似,后两种都是有单孢子的种类,因此估计铁钉紫菜在叶状体阶段也产生单孢子。在坛紫

菜生活史中没有单孢子这一支环,故在营养细胞培养时也不出现单孢子的产生过程。

3. 坛紫菜幼苗的单株培养 坛紫菜幼苗从 1—2mm 就进行单株培养,最后都产生了果孢子,这些果孢子萌发成丝状体,将丝状体移植到贝壳上即正常长成贝壳丝状体。这一实验还在继续进行。

三、讨 论

从我们的实验结果看来,有几点讨论如下:

1. 海螺酶对坛紫菜和铁钉紫菜的酶解作用效果是明显的,但大多数是有壁的单细胞和两个细胞的细胞团。用荧光显微镜检查,也发现有少数原生质体或去壁不完全的细胞。如果需要酶解到原生质体时还需增加一定量的纤维素酶,实验认为果胶酶的作用不大,可不必加入。

2. 在坛紫菜的细胞发展趋势中,以第一种正常幼苗占的总数比较少,第二种苗占的比例较大,这可能与分离的细胞内在因素有关。但从生产角度考虑,如何提高这些正常苗的数量并抑制其性分化是今后应该解决的主要任务。从几次实验材料来考虑,日龄长的不如日龄短的获得正常幼苗多,因此以选择 10 月底前的自然苗或人工苗为宜,太大或老的都不合适,这方面的实验结果将有另文报告。培养条件也是重要因素之一,这方面尚有大量工作值得研究。就我们的实验在前期培养用 3 号 MES 培养基较为合适,但一周后即可停用,只用 MES 培养基或 NP 培养基即可。温度与光照没有进行更多的试验,故在此暂不讨论。

3. 紫菜叶状体上是否产生单孢子向来是分类学的重要标志之一。用海螺酶解以后的坛紫菜和铁钉紫菜的营养细胞,其发展趋势是完全不一样的。具有单孢子的种类,从单离的细胞经过一个阶段的培养,首先产生单孢子才再由单孢子萌发成叶状体。这些营养细胞重复着种藻原有的特性。而坛紫菜本身没有单孢子,其发展趋势只能是由叶状体经性分化产生果孢子。铁钉紫菜与条斑紫菜以及圆紫菜尽管种类不同,但发展趋势基本相同。

4. 试验中获得的正常幼苗虽然比较少,但仍证明坛紫菜的营养细胞可以直接长成幼苗的事实,这就表明在生产上是否有可能不经培养丝状体过程,只从冷冻网上的叶状体酶解获得幼苗,在海水温度适宜于幼苗生长时,放入海区培养就可达到商品紫菜。就坛紫菜营养细胞在试验时只培养一周就可长出假根,经三周培养就可肉眼见苗,如果改善培养还可以缩短一周,比壳孢子萌发的幼苗仅慢一周左右,这种生长速度在生产上是有利用价值的。另外,一些具有单孢子的种类,利用营养细胞增加形成单孢子苗的数量在生产上是很利。因此在紫菜栽培业中,通过单离细胞培养成幼苗,然后养殖利用是一项值得研究的课题。除此以外,利用细胞培养对研究细胞生理、育种等项研究也是一种很好的手段,对从事理论研究方面也是很有意义的。

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。上海科学技术出版社。
- [2] ——,1979。植物细胞培养和细胞杂交资料集。科学出版社。
- [3] 王素娟、章景荣,1983。海藻原生质体分离的初步研究 1979 年中国藻类学术讨论会论文集。
- [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

第一届中国藻类学术讨论会论文集 45—55 页。

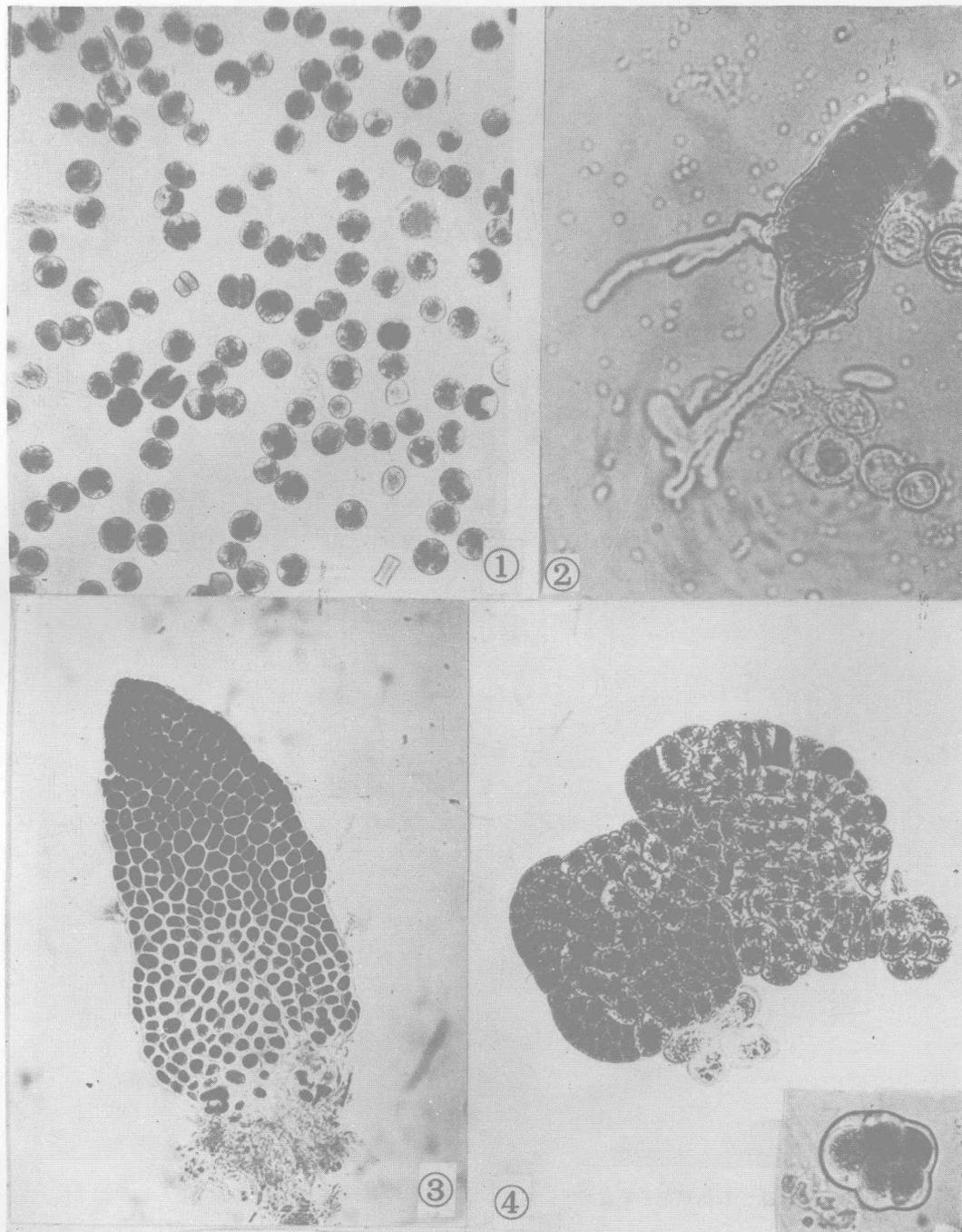
- [5] 唐延林, 1982。紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养。山东海洋学院学报 12(4): 37—50。
[6] 赵焕登等, 1981。条斑紫菜营养细胞的分离和培养。山东海洋学院学报 11(1): 61—66。
[7] Polne-fuller, M. et al., 1983. Vegetative Propagation of *Porphyra perforata*. 11th International Seaweed Symposium, pp. 308—313.

A STUDY ON THE CULTIVATION OF THE VEGETATIVE CELLS AND PROTOPLASTS OF *P. HAITANENSIS* I.

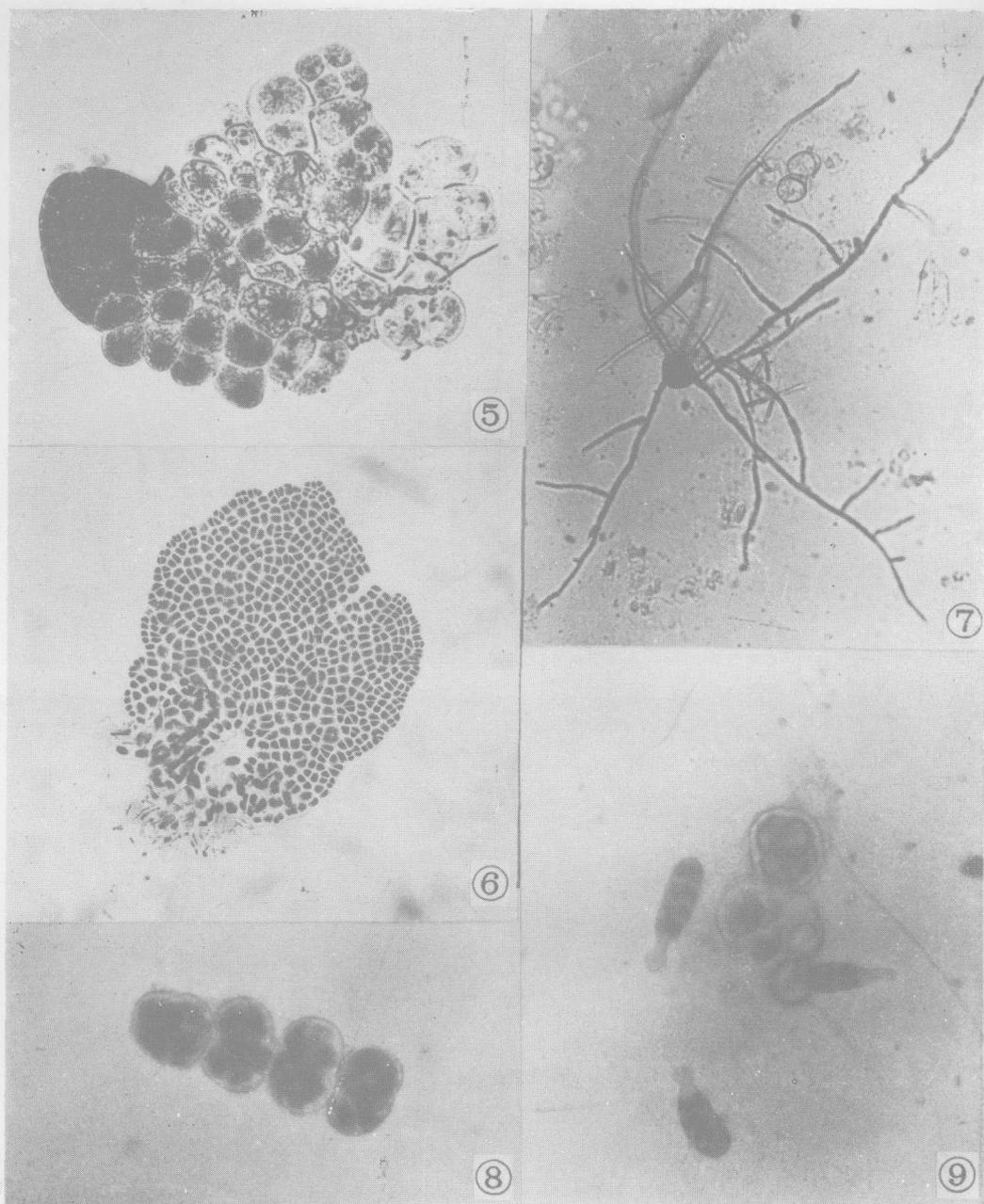
Wang Sujuan, Zhang Xiaoping, Xu Zhidong and Sun Yunlong
(Shanghai Fisheries College)

ABSTRACT

The separation of vegetative cells and protoplasts from the thallus of *P. haitanensis* by enzyme and the cultivation of them to become buds have been studied since 1983. The buds could grow to 5—6 cm in room, the densest could reach more than 240 buds at the bottom of a culture dish with a diameter of 3 cm, the desired density. The separated cells developed holdfasts in 3 to 7 days and the buds could be seen with the naked eye in 3 weeks. Generally, it took about a month to grow out buds. The time could be shortened if the cultivating conditions were improved. The vegetative cells and protoplasts can be cultured into buds directly and more quickly than usual in production. The paper also deals with the comparative studies of the number of buds of the thallus at various developmental stages and the cultivation of the cells of the *P. ishigeocola* which has monospores in its life cycle.



1. 单离的营养细胞；2. 由单离的细胞长成的幼苗；3. 正常形状的幼苗具有多数假根；4. 分离的细胞团长成多细胞团(右下角示 5 个细胞的细胞团)；



5—6. 不正常的叶状体；7. 由果孢子萌发的丝状体；8. 铁钉紫菜分离的细胞内形成单孢子；9. 由单孢子长成的铁钉紫菜幼苗。