

长石莼(缘管浒苔)(*Ulva linza*)原生质体再生 与分化发育初步研究*

陈群芳^{1,2} 汤文仲^{1,2} 冯子慧^{1,2} 霍元子^{1,2} 何培民^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 上海海洋大学海洋科学研究院 上海 201306)

提要 采用细胞酶解技术获得长石莼(缘管浒苔)原生质体, 再通过细胞培养观察原生质体再生以及各种分化发育途径。结果表明, 长石莼(缘管浒苔)主要存在 3 种分化发育途径: 1) 部分原生质体可直接分裂形成有假根或无假根得单细胞苗。2) 部分原生质体分裂成规则细胞团或不规则细胞团, 最后形成苗簇。3) 部分原生质体可发育为孢子囊/配子囊, 其中部分孢子囊/配子囊成熟后释放出孢子/配子, 可直接形成小苗。雌雄配子以正面结合(大部分)也可以首尾交错结合(少部分)形成合子并萌发形成小苗。研究表明, 1 个叶片营养细胞可形成 1 棵细胞苗, 也可以通过孢子囊或配子囊途径形成 8—32 棵孢子/配子苗, 说明长石莼(缘管浒苔)叶片细胞具有很强的繁殖力, 这为绿潮藻暴发起因及生活史深入研究奠定了一定基础。

关键词 长石莼(缘管浒苔), 细胞酶解分离, 原生质体培养, 细胞再生, 分化发育途径

中图分类号 Q953

长石莼(缘管浒苔)(*Ulva linza*)隶属绿藻门(Chlorophycophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae)、石莼目(Ulvales)、石莼科(Ulvaceae), 至于将 *Ulva linza* 列入石莼属(*Ulva*)还是浒苔属(*Enteromorpha*), 目前尚存较大的争议。研究发现, 石莼的双层结构与浒苔的管状结构界限不明显, 并且可以发生互相转换(王晓坤等, 2007; Bonneau, 1977); 通过运用分子生物学方法分析两个属间亲缘关系, 近年来更多学者倾向或接受把这两个属合并划归石莼属(应成琦等, 2010; 何培民等, 2007; 林文庭, 2007; 杨君等, 2000; Shimada *et al.*, 2009; Hayden *et al.*, 2003), 本文暂同时沿用中文学名长石莼(缘管浒苔), 并用拉丁学名 *Ulva linza* 称谓。

长石莼(缘管浒苔)是黄、渤海区最常见的大型经济绿藻之一(丁兰平等, 2009; 张大力, 1983), 也是 2007—2008 年绿潮藻漂浮种类之一(丁兰平等,

2009)。绿潮是大型海洋绿藻大量增殖的现象(梁宗英等, 2008)。自 20 世纪 80 年代绿潮在美洲、欧洲、亚洲等地不断暴发以来, 其暴发的频率和范围呈现不断上升的趋势(梁宗英等, 2008; 张晓雯等, 2008)。2008 年黄海沿海海域持续发生大规模绿潮藻漂浮灾害(丁兰平等, 2009), 最严重时在青岛海域形成“绿色草原”。研究发现, 绿潮的暴发会带来一系列次生的环境危害, 比如藻类堆积可能引起有害昆虫的暴发、藻体腐败后会产生的难闻气味; 同时当腐烂的藻体沉积海底后, 引起水体缺氧, 对底栖生态系统产生重要影响(张晓雯等, 2008; Hiraoka *et al.*, 2004)。

迄今为止, 对绿潮藻暴发的机理和过程研究相对较少。已有的研究主要集中在绿潮藻的生活史方面(王晓坤等, 2007; 丁怀宇等, 2006); 对石莼类原生质体的研究集中在对原生质体培养再生成株, 目前已

* 国家海洋局绿潮灾害专项, LZ-03-01 号; 国家海洋局公益性行业科研专项, 2012418010 号; 海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室开放研究基金项目, MATHAB200912 号; 国家自然科学基金项目, 30371101 号; 教育部博士点基金资助项目, 2007—2008; 上海市浦江人才计划项目, 05PJ14086 号; 上海市水生生物学重点学科资助项目, S30701 号; 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金, SSC08002 号。陈群芳, E-mail: qunfang_chen@yahoo.com

通讯作者: 何培民, 教授, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

收稿日期: 2010-04-29, 收修改稿日期: 2010-06-28

有裂片石莼(*U. fasciata*)、长石莼(缘管浒苔)(*U. linza*)、浒苔(*U. prolifera*)、肠浒苔(*U. intestinalis*)、扁浒苔(*U. compressa*)等获得成功(张大力, 1983; Chen *et al.*, 2000; Saga, 1984; Rusig *et al.*, 2001; Uppalapati *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 1991)。而对其原生质体分化发育途径还缺乏系统观察研究。本文以 *Ulva linza* 为材料, 对其原生质体的发育进行了研究, 旨在为绿潮大规模快速暴发的机理提供理论支持, 并首次系统完整地观察到其原生质体存在三种发育方式。

1 材料与方法

1.1 藻类来源

本实验所采用的藻类为长石莼(缘管浒苔)(*Ulva linza*)，采自江苏如东海区。长石莼(缘管浒苔)的培养方法参见何培民等(2004)。藻体培养条件为：密度为 1.015 的 VSE 培养液，光照强度 54—72 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，温度 20 $^{\circ}\text{C}$ ，光照周期为 12D:12L，充气培养，每隔 4—5d 更新藻体培养液。

1.2 株系建立

从长石莼(缘管浒苔)藻体中挑选 30 株进行单株分离和纯化培养。叶片洗净后，经过一定特殊培养使其放散孢子并形成小苗，然后在显微镜下分离单个小苗进行单独培养，并作为株系进行保存，编号为 UL01—UL30，选取株系 UL12 进行扩大培养。

1.3 长石莼(缘管浒苔)原生质体制备方法

长石莼(缘管浒苔)原生质体制备采用 2% Cellulase Onozuk R-10 和 2% Macrozyme R-10 配制的酶液进行酶解的方法，具体过程与步骤参见何培民等(2007)及 Srinivasa 等(2002)描述的方法。

1.4 长石莼(缘管浒苔)原生质体鉴定

用低渗刺激法对原生质体进行鉴定(何培民等, 2007)。将原生质体放入低渗溶液蒸馏水中，显微镜下观察其吸水涨破后的残留形态。

1.5 长石莼(缘管浒苔)原生质体培养与观察

将盛有原生质体的培养皿置于 18 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中，进行散光培养，逐步增加光照强度。3 天之后转为 65—70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照培养，光周期为 12D:12L。在培养 72h 后，培养基密度逐步降至 1.015—1.020(何培民等, 2004; 叶静, 2006¹⁾)。之后每隔 3 天

一次换培养基。在原生质体培养过程中，每天在显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 细胞培养与成活率

刚酶解分离出来的原生质体直径一般为 6—20 μm (图 1a)。经低渗刺激法鉴定为原生质体(图 1b)。原生质体一般在 24—72h 后开始第一次分裂，观察发现细胞培养第 4 天的存活率可达到为 93%，第 7 天为 90%。并发现长石莼(缘管浒苔)细胞分化发育方式主要有单细胞苗、细胞团、孢子囊/配子囊等 3 种不同发育方式。

2.2 单细胞苗发育方式

多数原生质体培养 4—5 天后能够直接形成小苗，即 1 个细胞形成 1 棵苗，称之为单细胞苗。且观察到单细胞苗的形成具有 2 种方式，一部分原生质体先以出芽方式形成透明突出部分(图 2a)，且透明突出部分逐渐延伸，并充满细胞质，随后在延伸的基部形成细胞壁而隔为 2 个细胞，延伸部分不断伸长发育为细长的假根(图 2b、c)，而原细胞则以二等横分裂方式形成单列细胞(图 2b、c)，即发育形成具有假根的单列细胞小苗(图 2c)。另一部分原生质体首先分裂形成 2 个细胞(图 2d)，其中新形成的细胞不再延伸形成细长假根，而原细胞则以二等横分裂方式形成单列细胞(图 2d、e)，即发育形成无假根单列细胞小苗(图 2f)。

2.3 细胞团发育方式

有的原生质体经过分裂后形成细胞团。观察发现到细胞团存在 2 种类型，其中一部分细胞团为原生质体不规则分裂而形成片状组织块，细胞排列紧密不重叠，细胞数量可多达 60 多个(图 3a、b)，细胞质多，

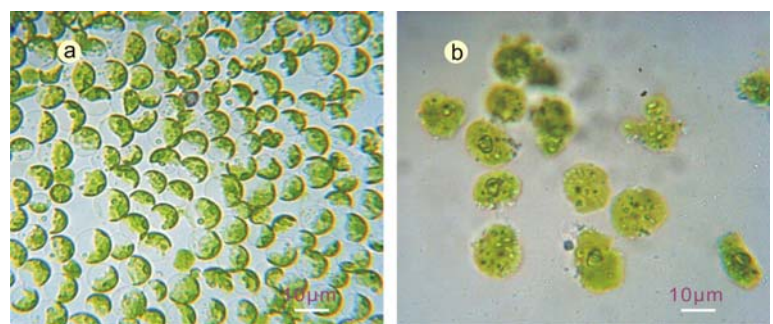


图 1 酶解分离并纯化获得的原生质体

Fig.1 Pure protoplasts enzymatically isolated from blades
a. 原生质体; b. 低渗涨破后原生质体

1) 叶 静, 2006. 条浒苔转化表达系统的构建. 上海: 上海水产大学生命学院硕士学位论文, 20—30



图 2 单细胞苗形成过程

Fig.2 Single-cell seedling formation

- a. 原生质体先拉长; b. 拉长后分裂形成的 2 细胞苗; c. 其小苗假根发达; d. 原生质体先分裂为 2 细胞; e. 其小苗假根不发达; f. 多细胞苗假根仍不发达

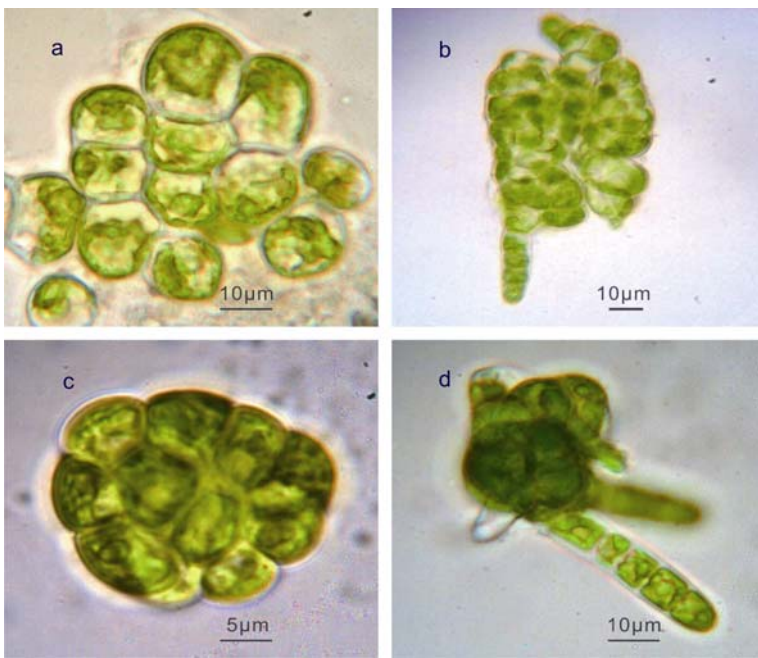


图 3 细胞团与小苗形成

Fig.3 Cells aggregate and seedling formation

- a. 不规则分裂形成的细胞团; b. 不规则细胞团中的细胞直接形成的小苗;
- c. 规则分裂形成的细胞团(即孢子/配子团, 但不放散孢子/配子); d. 孢子/配子团中的细胞直接形成的小苗

无液泡, 无公共细胞壁, 经过一段时间的培养, 外侧细胞可直接发育形成单列细胞小苗(图 3b)。另一部分

细胞团为原生质体规则分裂而形成的球状细胞团, 类似孢子囊/配子囊, 但不放散孢子/配子, 其囊壁较薄(图 3c), 且逐步消失, 且细胞团中的子细胞均可发育为小苗, 并形成小苗簇(图 3d)。

2.4 孢子/配子囊发育方式

许多原生质体经过规则有序分裂后可发育形成孢子囊/配子囊, 这些细胞多来自叶片中正在发育的孢子囊/配子囊的成熟细胞。其原生质体先出现颗粒化, 并逐步形成细胞壁。一般孢子囊直径为 15—25 μ m(图 4a), 配子囊直径为 15—35 μ m(图 4b)。孢子囊内的孢子数目一般为 4—8 个, 配子囊中的配子数目可多达 32 个(图 4a、b)。成熟后孢子囊/配子囊中的孢子和配子均具有一个橘红色眼点, 在强光刺激下孢子或配子可从囊内释放出来(图 4c、d), 分别形成四鞭毛游孢子(图 4e)和二鞭毛配子(图 4f)。刚释放出的游孢子和配子均有一个橘红色的眼点, 鞭毛在两侧快速划动。雌雄配子相遇后可正面结合或首尾接合(图 4g、h), 合子含两个眼点(图 4i), 可萌发形成正常小苗(图 4j)。观察发现某些配子也可直接固着(图 4j), 固着后鞭毛消失, 细胞变圆成为球形(图 4k), 且发育方式与

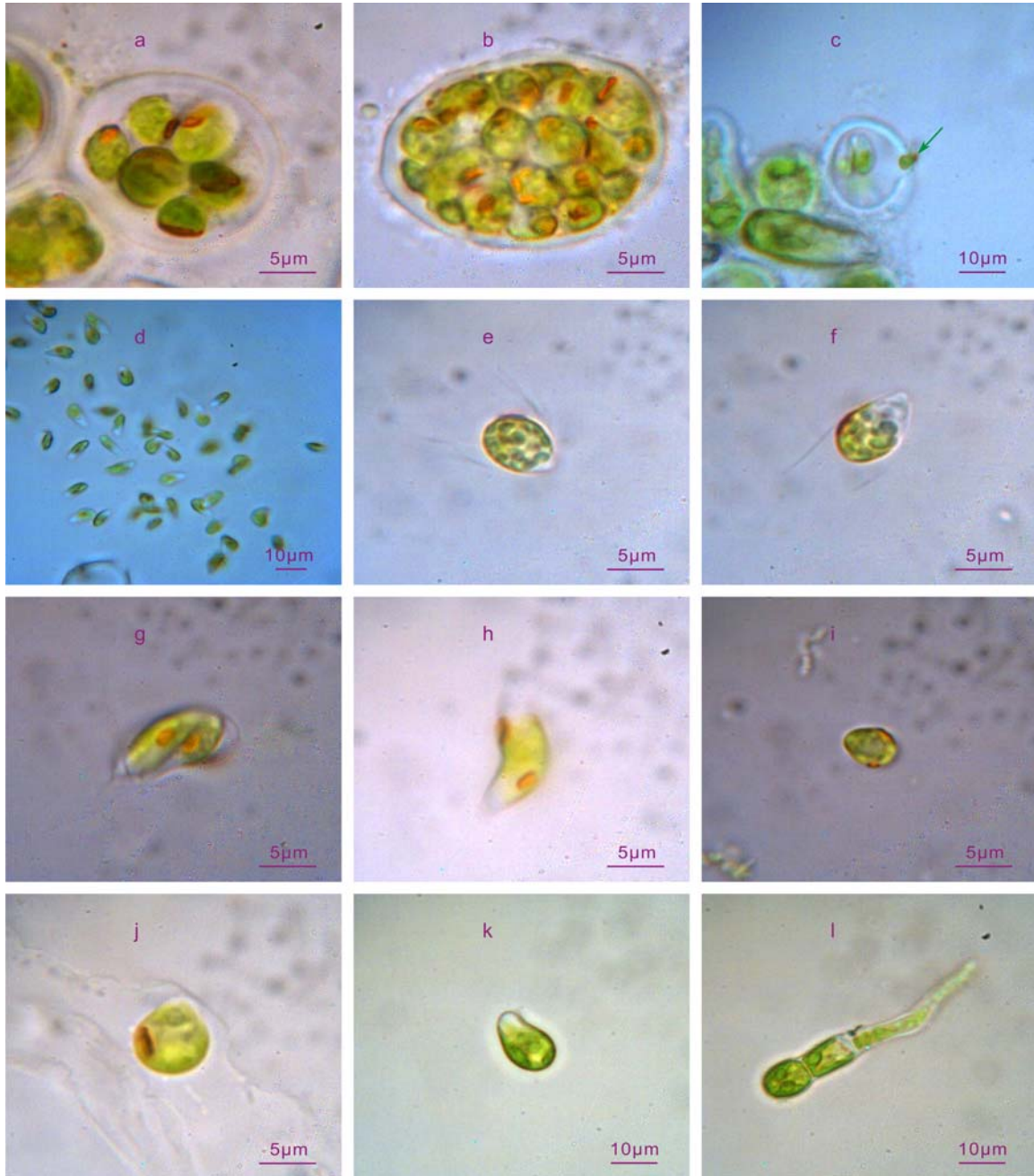


图4 孢子/配子囊与小苗形成

Fig.4 Zoosporangium/gametangium and seedling formation

- a. 分裂形成的孢子囊; b. 分裂形成的配子囊; c. 孢子囊正在放散孢子(箭头所示); d. 放散出的孢子/配子群;
 e. 示4鞭毛的游孢子; f. 示2鞭毛的配子; g. 2配子尾-尾接合方式; h. 2配子头-尾接合方式;
 i. 2配子接合后形成的合子; j. 未结合并固着后的配子; k. 未结合的配子开始萌芽; l. 配子苗

合子相似, 萌发后以二等横分裂方式发育为小苗(图4k)。

3 讨论

3.1 长石莼(缘管浒苔)细胞酶解条件与细胞培养

细胞酶解条件对细胞培养存活率具有重要影响。

首先酶类的选择对细胞酶解效果影响最大。长石莼(缘管浒苔)细胞壁组成成分与高等植物类似, 外层主要为果胶质, 内层主要为纤维素(王素娟, 1994; 何培民等, 2007)。

因此一般使用纤维素酶即可分离出原生质体, 添加一定量的离析酶, 酶解效果更佳(Srinivasa *et al*,

2002; 叶静, 2006¹⁾; 林学政, 2000)。本实验也证实这一点, 纤维素酶与离析酶组合酶解效果最好。其次, 酶解温度特别重要, 张大力(1983)对长石莼细胞酶解温度为 33℃, 本实验发现, 酶解温度控制在 23—25℃ 范围, 酶解效果最佳且细胞培养存活率高(90%), 酶解温度高于 28℃, 酶活性易降低, 高于 33℃ 所获得的原生质体数目明显下降, 且存活率只有 30% 左右。另外, 酶液的酸碱度对细胞酶解效果很好。Uppalapati 等(2002)认为酶液 pH 6.5 对扁浒苔和浒苔酶解效果最佳, 但本实验发现, 酶液 pH 5.7 对长石莼(缘管浒苔)细胞酶解效果最好, 获得的原生质体数目最多, 且细胞培养的存活率最高。当酶液 pH 值上升至 6.5, 酶解几乎无法获得原生质体; 当酶液 pH 值降低至 5.2, 则原生质体大量死亡。

原生质体的活力状态直接影响细胞培养的存活率。刚酶解出的原生质体直径多为 6—20μm 范围内, 部分为 20—25μm, 少量为 25μm 以上。直径为 6—20μm 的原生质体活力较好, 细胞质浓密, 培养一段时间后, 便开始分裂发育形成单细胞苗。直径在 6—20μm 左右的原生质体含有少量液泡, 一般发育为细胞团。而体积较大的原生质体, 常常含有较多的液泡, 在培养一定时间后逐渐消失。但也有部分细胞体积持续增大, 并可形成外壁, 直径可达 20—35μm, 发育过程中细胞质会出现颗粒化现象。这种颗粒化细胞主要有 3 种发育方式, 一种是可继续发育为成熟的孢子囊/配子囊; 另一种是发育为囊壁较薄细胞团, 形态类似孢子囊/配子囊, 但不能放散孢子或配子; 第 3 种是囊壁特别厚, 细胞颗粒化后停止发育, 但在外界刺激下可释放出颗粒化的细胞质, 随后消亡。

3.2 长石莼(缘管浒苔)原生质体发育方式

关于紫菜原生质体分化发育方式研究已比较清楚, 而大型绿藻浒苔、石莼以及礁膜细胞分化发育方式还不是十分清楚(何培民等, 2007), 但关于大型绿藻浒苔、石莼以及礁膜原生质体再生的研究已有不少报道(张大力, 1983; 王晓坤等, 2007; Rusig *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 1991; Millner *et al.*, 1979; Chen, 1998; Krishnakumar *et al.*, 1999; 谢恩义等, 2004; Hua *et al.*, 2004)。Millner 等(1979)最早获得了肠浒苔(*U. intestinalis*)原生质体。Saga(1984)、Yamaguchi 等(1989)也分别获得了浒苔原生质体。Rusig 等(2001)和 Uppalapati 等(2002)分别酶解获得肠浒苔(*U. intesti-*

nalis)、扁浒苔(*U. compressa*)和浒苔(*U. prolifera*)原生质体。Chen(1998)、Hua 等(2004)酶解获得了宽礁膜原生质体并再生成株, 并对宽礁膜原生质体分化发育方式进行了观察。张大力(1983)、Chen 等(2000)分别获得了获得长石莼(*U. linza*)、裂片石莼(*U. fasciata*)原生质体并培养成株, Chen 等(2000)发现裂片石莼原生质体发育方式与藻体采集时间以及培养基成分、光照培养条件等有关。

本实验观察长石莼(缘管浒苔)原生质体可表现出 3 种不同的发育方式, 包括单细胞苗、细胞团和孢子/配子囊 3 种发育方式 6 种类型, 并注意到浒苔、石莼、礁膜之间存在一定进化演化关系(Tanner, 1980)。张大力(1983)曾观察到了长石莼原生质体单细胞苗和不规则细胞团 2 种发育类型, 并发现原生质体可通过质壁分离直接形成游孢子现象, 这种原生质体可能为藻体叶片中正在发育为成熟孢子而被酶解出来, 在细胞培养过程中仍然朝着游孢子方向发育。这与原生质体处于叶片中的部位和发育状态具有密切关系(何培民等, 2007; 王素娟, 1994), 所以 Chen 等(2000)用不同时期采集的藻体进行酶解和培养, 其原生质体可表现出不同分化发育方式。本实验所用的藻体是在实验室条件下长期培养的, 其细胞状态基本已包含了比较全的发育类型, 故能够观察到各种细胞发育类型。同时, 也发现原生质体在 72 μmol/(m²·s) 光照强度和培养基营养充足条件下, 多以单细胞苗、孢子/配子囊发育类型为主, 而在低于 18 μmol/(m²·s) 光照强度、高细胞密度和培养基营养不足条件下, 常以细胞团发育为主, 这主要与高光照强度下叶片细胞易成熟有关。

3.3 长石莼(缘管浒苔)出苗率

无论是单细胞苗、孢子囊/配子囊发育方式, 还是细胞团发育方式, *U. linza* 原生质体均能在 4—20d 左右时间内大量形成小苗。通常情况下, 1g *U. linza* 叶片经过酶解后可获得大约 5 × 10⁶ 个原生质体。原生质体培养 1 周后存活率为 90% 左右, 存活的细胞大约为 4.5 × 10⁶ 单细胞。原生质体培养 1 周后, 一般仅细胞质浓密的健康原生质体能够形成细胞苗, 或先形成孢子囊/配子囊, 在适合条件下释放出孢子/配子。根据观察, 1 个原生质体可形成 1 棵细胞苗, 叶片细胞按照 90% 存活率并以 60%—70% 比例形成细胞苗计算, 1g 叶片的细胞大约可以形成(2.7—3.2) × 10⁶ 棵苗,

1) 叶 静, 2006. 条浒苔转化表达系统的构建. 上海: 上海水产大学生命学院硕士学位论文, 20—30

则 1kg 叶片大约可以形成大约 30 亿细胞苗。1 个原生质体可形成 1 个孢子囊/配子囊, 叶片细胞按照 90% 存活率并以 80%—85% 比例形成孢子囊/配子囊, 则 1g 叶片的细胞大约可以形成 $(3.6—3.8) \times 10^6$ 个孢子囊/配子囊, 再按照 1 个孢子囊/配子囊可放散 8—32 个孢子/配子计算, 1g 叶片的细胞则大约可以形成 $(28.8—121.6) \times 10^6$ 棵苗, 也即 1kg 叶片在全部存活条件下大约可以形成 300 亿—1200 亿棵苗。可见即使是营养细胞, 也具有超强繁殖能力。

在自然条件下, *U. linza* 叶片中有大量营养细胞从藻体脱落下来, 这些脱落下来的细胞可以直接形成大量细胞苗。特别是当温度和光照强度提高后, 叶片细胞将大片形成大量孢子囊/配子囊, 在适宜条件下可释放出巨量的孢子/配子。这种超强繁殖能力, 或许正是浒苔类暴发形成绿潮的原因之一。

参 考 文 献

- 丁兰平, 栾日孝, 2009. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)的分类鉴定、生境习性及其分布. 海洋与湖沼, 40(1): 68—71
- 丁怀宇, 马家海, 王晓坤, 2006. 缘管浒苔的单体生殖. 上海水产大学学报, 15(4): 493—496
- 王素娟, 1994. 海藻生物技术. 上海: 上海科学技术出版社, 56—59
- 王晓坤, 马家海, 叶道才等, 2007. 浒苔生活史的初步研究. 海洋通报, 10(5): 112—116
- 杨 君, 安利佳, 王 茜等, 2000. 石莼属(*Ulva*)和浒苔属(*Enteromorpha*)绿藻的 RAPD 分析. 海洋与湖沼, 31(4): 408—413
- 何培民, 吴庆磊, 2004. 条浒苔蛋白核超微结构核 Rubisco 及其活化酶分子定位. 水产学报, 28(3): 255—260
- 何培民, 秦 松, 严小军等, 2007. 海藻生物技术及其应用. 北京: 化学工业出版社, 86—98
- 应成琦, 蔡春尔, 尹顺吉等, 2010. 长石莼(缘管浒苔)(*Ulva linza*)rbcL 全长基因的克隆与序列分析. 海洋与湖沼, 41(4): 555—562
- 张大力, 1983. 两种绿藻——长石莼和袋礁膜原生质体的制备、培养和融合的研究. 山东海洋学院学报, 13(1): 57—65
- 张晓雯, 毛玉泽, 庄志猛, 2008. 黄海绿潮浒苔的形态学观察及分子鉴定. 中国水产科学, 15(5): 822—829
- 林文庭, 2007. 浅论浒苔的开发与利用. 中国食物与营养, 9: 23—25
- 林学政, 沈继红, 李光友, 2000. 复合酶对卡德藻溶壁效果的研究. 海洋科学, 24(7): 1—4
- 梁宗英, 林祥志, 马 牧, 2008. 浒苔漂流聚集绿潮现象的初步分析. 中国海洋大学学报, 38(4): 601—604
- Bonneau E R, 1977. Polymorphic behavior of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in axenic culture. Phycology, 13: 133—140
- Chen Y C, 1998. Development of protoplasts from holdfasts and vegetative thalli of *Monostroma latissirman* (Chlorophyta, Monostromaceae) for algal seed stock. Phycology, 34: 1075—1081
- Chen Y C, Shih H C, 2000. Development of protoplasts of *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta) for algal seed stock. Phycology, 36(2): 608—615
- Hayden H S, Blomster J, Maggs C A *et al*, 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. Phycology, 38(8): 277—294
- Hiraoka M, Ohno M, Kawaguchi S *et al*, 2004. Crossing test among floating *Ulva thalli* forming 'green tide' in Japan. Hydrobiologia, 512: 239—245
- Hua W H, Xie E Y, Ma J H, 2004. Life history of *Monostroma latissimum*. Acta Botanica Sinica, 46(4): 457—462
- Krishnakumar G R, Addepam M K, Reddy C R K, 1999. Regeneration of the thallus of *Monostroma oxyspermum* (Chlorophyta) from protoplasts in axenic culture. Phycologia, 38: 503—507
- Millner P A, Callow M E, Evans L X, 1979. Preparation of protoplasts from the green alga *Ulva intestinalis*. Planta, 147: 174—177
- Reddy C R K, Fujita Y, 1991. Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. Phycology, 3: 265—275
- Rusig A M, Cosson J, 2001. Plant regeneration from protoplasts of *Ulva intestinalis* (Chlorophyta, Ulvophyceae) as seed-stock for macroalgal culture. Phycology, 13(2): 103—108
- Saga N, 1984. Isolation of protoplasts from edible seaweeds. Bot Mag Tokyo, 97: 423—427
- Shimada S, Yokoyama N, Arai S *et al*, 2009. Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa. Applied Phycology, 2: 529—539
- Tanner C E, 1980. *Chloropelta* gen nov, an ulvaceous green alga with a different type of development. Phycology, 16: 128—137
- Uppalapati S R, Fujita Y, 2002. A simple method for mass isolation of protoplasts from species of *Monostroma*, *Enteromorpha* and *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales). Phycology, 14: 165—168

PILOT STUDIES OF REGENERATION AND DEVELOPMENT OF PROTOPLASTS FROM *ULVA LINZA*

CHEN Qun-Fang^{1,2}, TANG Wen-Zhong^{1,2}, FENG Zi-Hui^{1,2}, HUO Yuan-Zi^{1,2}, HE Pei-Min^{1,2}

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

Abstract In this paper, cell regeneration, differentiation and development of *Ulva linza* protoplasts were studied. Individual cells were enzymatically isolated from *Ulva linza* blades, and the cells and protoplasts were cultured and regenerated into young plants. The results showed there were three main differentiations and development pathways for isolated cells: 1) Partial protoplasts directly divided and formed the single cell seedlings with or without a rhizoid; 2) Partial protoplast divided into cell aggregates including irregular and regular cell aggregates; both could form seedlings directly. 3) Partial protoplasts divided and developed into zoosporangia or gametangia. Zoosporangia could release zoospores and then germinated into young sporelings. Gametangia could release gametes, and male and female gametes conjugated with head-tail style or tail-tail style into one zygote, which could germinate into seedling. Usually, one somatic cell in blade could form into one single-cell seedling or 8—32 sporelings through zoosporangium or gametangium development way. It was found that the cells in *Ulva linza* had a great reproductive capacity. This study has laid a foundation for further research on green tide blooming and the life history of *Ulva linza*.

Key words *Ulva linza*, Isolated cells by enzymes, Cell culture, Cell regeneration, Differentiation and development