

# 紫菜叶状体细胞的酶法分离及其养殖研究

戴继勋 包振民 唐廷林 刘万顺

(山东海洋学院, 青岛)

本文应用生物技术方法, 进行紫菜细胞的采苗和海上养殖已获得成功。用海螺酶将紫菜叶状体细胞分离成单细胞和原生质体, 研究了叶状体的不同细胞类型的再生和发育。不同海水比重、不同温度对细胞的分离和培养的影响, 并研究了单细胞和原生质体的附着及其海上的养殖。紫菜酶法采苗的成功, 将会对传统的紫菜养殖产生根本的变革。

**关键词** 紫菜; 酶; 细胞; 原生质体; 养殖

高等植物细胞用酶法制备原生质体的研究已有26年的历史, 这为植物生物技术的基础研究和应用研究开辟了一条广阔的道路。但是由于高等植物的构造复杂和操作培养技术等各种原因, 目前从原生质体再生成植株, 还不广泛。

近年来, 用酶法分离大型海藻的细胞, 进行细胞和原生质体的培养, 发展很快。这包括绿藻、红藻和褐藻等20余种海藻, 获得了细胞分裂和再生植株。其中紫菜属已有圆紫菜 (*Porphyra suboriculta*)<sup>[1,2]</sup>、条斑紫菜 (*P. yezoensis*)<sup>[3-7]</sup>、坛紫菜 (*P. haitanensis*)<sup>[8-10]</sup>、铁钉紫菜 (*P. ishigeocola*)<sup>[8]</sup>、孔紫菜 (*P. perforata*)<sup>[11,12]</sup>和朱红紫菜 (*P. miniata*)<sup>[13]</sup>等。对紫菜叶状体的单细胞和原生质体的制备, 目前所用的工具酶是从海螺<sup>[1-4,13,14]</sup>、鲍<sup>[4,11,12]</sup>、海胆<sup>[7]</sup>和假单胞菌 (*Pseudomonas*)<sup>[6,15]</sup>中提取的酶。

紫菜是国内外养殖较多的经济海藻之一。它的养殖包括果孢子采苗、丝状体培养、壳孢子采苗和叶状体养殖等过程。这种育苗方法养殖周期长, 操作管理复杂, 不但耗费工时, 而且也易感染疾病<sup>[16,17]</sup>。

目前国内已开始了用酶法采苗, 进行养殖实验<sup>[3,9]</sup>。

近年来, 我们利用生物技术, 分离和培养紫菜单细胞和原生质体, 并获得再生植株。为了使这一新技术能在紫菜养殖中应用, 我们又进行了一系列基础研究和海上试验。现将我们的主要结果报道如下。

## 材料和 方法

### (一) 材料的来源和保存

条斑紫菜 (*P. yezoensis* Ueda) 采集于青岛和江苏省启东县。坛紫菜 (*P. haitanensis* T.J.Chang et B.F.Zheng) 采集于浙江省鄞县和福建省同安县。紫菜经阴干以后, 用尼龙袋密封冷藏于-20℃的冰箱中。

### (二) 单细胞和原生质体的制备

取海螺酶粉 (山东海洋学院产品) 1g, 加0.05mol/L的磷酸缓冲液少许 (pH6.5), 待酶粉溶解后用蒸馏水稀释为1%的浓度。将紫菜消毒处理, 切成约5mm<sup>2</sup>的小块, 部分材料用叶状体的不

本文于1987年4月7日收到。

同细胞类型取材。把紫菜碎片放入含有2 mol/L葡萄糖的酶液中,在25℃的温度下酶解3h左右,酶解结束后,用400目筛绢过滤,滤液用500rpm的速度离心5min,沉淀细胞。再用比重为1.025的海水洗涤离心细胞3次,以彻底除去酶液,将制备的单细胞和原生质体用于维尼纶绳或玻璃片的附苗。

### (三) 温度条件和海水的比重调制

酶解温度是利用恒温培养箱调节,培养温度是在低温培养室内,用电热棒加热由控温仪控制。不同海水比重的调制是在海水中加NaCl或蒸馏水。

### (四) 培养条件

培养液是利用煮沸海水,加入 $\text{KNO}_3$ -N:10ppm和 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -P:1ppm。每天光照12h,光强为2500 lx左右。

### (五) 海上养殖

养殖地点在青岛市太平角海区的潮间带。我们应用支架式养殖方法,将竹杆固定在水泥坨上,维尼纶网绳按水平方向张挂在两根竹杆之间。

## 结果和讨论

### (一) 叶状体不同细胞类型的发育和再生

紫菜的酶解过程是由叶状体损伤的切口开始,逐渐延伸,随着时间的延长,其中较早分离的细胞已脱壁成原生质体,而较晚分离的细胞仍具有细胞壁,还有极少部分是几个细胞在一起。

分离的单细胞和原生质体(图版I-1),由于细胞类型的不同,它们的发育途径也存在差异。由固着器上部的根丝细胞分离的单细胞和原生质体,经过细胞分裂能再生成叶状体。由营养细胞分离的单细胞和原生质体绝大多数也再生成叶状

体。但有少数转化为生殖细胞,即精子细胞和果胞。受精果胞发育成果孢子细胞。这些营养细胞的发育表明,虽然在形态上看不出差异,但细胞内的物质已有明显的分化。由精子囊分离的单细胞和原生质体,它们发育成精子囊,最后放散精子。由果孢子囊分离的单细胞和原生质体,它们发育成新的果孢子囊,放散果孢子和萌发成丝状体。由此可见,要最大量获得细胞的再生叶状体,应尽量选用营养细胞或不具生殖细胞的叶状体。

根据我们的试验,紫菜随着日龄的增加,其营养细胞逐渐减少,而生殖细胞则大大增多<sup>[10]</sup>。同时坛紫菜和条斑紫菜的显著区别,在于坛紫菜的叶状体不能放散单孢子,其营养细胞随生长日龄的增加逐渐分化为生殖细胞。因此,坛紫菜的再生叶状体是严格受到生长时间的限制。条斑紫菜的叶状体能产生单孢子,并由单孢子萌发成叶状体。这样就使分化为生殖细胞的时间大大的推迟。因此,用酶法分离细胞,条斑紫菜再生叶状体相对地比坛紫菜容易得多。

不同的酶和它们的不同浓度,分离的单细胞,所长成的幼叶状体,对紫菜的形态没有明显的影响。它们的畸形率都低于5%<sup>[4]</sup>,这有利于养殖利用。

### (二) 不同比重的海水影响

利用不同比重的海水对条斑紫菜和坛紫菜分离的单细胞和原生质体进行培养,实验结果基本上是一致的,它们对细胞的生长发育有着明显的影响。以条斑紫菜为例,其结果见表1。比重低于1.015,很多细胞和原生质体膨胀破裂而解体。仅有极少数能存活,但细胞不分裂。比重超过1.035,细胞的色素体不清晰,色素分布均匀,单细胞数量多,细胞分裂大大降低。比重在1.020—1.030之间,细胞生长

较为适宜，其中比重为1.025时，则生长最好。

表1 条斑紫菜分离细胞的生长与海水比重的关系  
Table 1 The relation of specific gravity of sea water and growth of isolated cells of *P. yezoensis*

海水比重 sp. gr. of sea water	细胞数 Num. of cells	单细胞 single cells	二细胞 double cells	多细胞 multi- cells
1.010		11		
1.015		34	6	
1.020		21	14	
1.025		105	46	27
1.030		146	33	11
1.035		341	17	9
1.040		965	2	

注：经过8天培养（随机取样5个视野）  
Note: After 8 days of cultivation  
(5 random samples)

### (三) 不同温度的影响

利用不同温度分离叶状体细胞的结果表明，温度高于30℃以上时，细胞分离较快，但死亡率也高。温度低于15℃时，酶解的速度较慢。一般酶解温度在20—25℃较为适宜，细胞的死亡率较少，细胞的分离速度也较快。

在不同的温度条件下，培养分离的营养细胞的实验结果表明，条斑紫菜和坛紫菜个体的生长都是随温度的升高而加快。从表2看出，坛紫菜的幼叶状体生长最快的温度大约高于20℃，在23℃时生长仍很好。根据几次试验情况来看，条斑紫菜幼叶状体的生长适温比坛紫菜低，在20℃时生长最快，在23℃时生长情况比坛紫菜差。

壳孢子采苗常受丝状体的成熟度和气温变化的影响，对温度的要求比较严格。

表2 坛紫菜分离细胞的生长与培养温度的关系  
Table 2 The relation of cultural temperature and growth of isolated cells of *P. haitanensis*

温度 Temp. (°C)	细胞数 Num. of cells						个体总数 Total	
	1	2	3	4	5   10	11以上 Over 11		
12		7	42	22	25	22	118	
15		5	17	12	19	63	5	121
20				4	9	60	48	121
23			11	10	3	47	33	104

注：培养9天的生长情况（随机取样5个视野）  
Note: After 9 days of cultivation (5 random samples)

酶法采苗对温度的适应范围较广，它可在10—35℃的条件下分离叶状体细胞，用于采苗。

### (四) 细胞的附着

在适宜比重的海水和温度条件下，我们进行了两种紫菜的不同细胞密度和不同时间的附着实验。结果表明，细胞密度大，附着的细胞多。例如，条斑紫菜在光气条件下，细胞密度为 $10.6 \times 10^6$ 个/ml，用筛绢附着48h，附着量为31个/mm<sup>2</sup>。密度为 $2.6 \times 10^5$ 个/ml，附着量为15.5个/mm<sup>2</sup>。同时发现，细胞的附着量也随时间的延长而增加。但是，在24h后，细胞附着量的增加变得缓慢，并逐渐趋于平衡。两种紫菜的实验还表明，在17℃条件下，条斑紫菜的附着量比坛紫菜大约增加1倍。

我们利用维尼纶网帘附着分离细胞（图版I-2），剪取网帘的一段网绳，进行计数，细胞的附着量可高达300—500个/cm，甚至更高的密度。像这样的密度，已大大超过目前生产上壳孢子采苗的密度。附着细胞经过5—7天的培养，细胞已开始分裂成为幼叶状体（图版I-3）。两周后，叶状体可达10—20个细胞（图

版 I - 4)。

细胞的附着密度与养殖生产有密切关系,附着密度过稀不能保证全苗,过密又会影响生长。从酶法采苗的附着密度看,完全可以满足生产的要求。

### (五) 海上养殖

我们利用1983年秋天冷藏的条斑紫菜,于1984年11—12月用酶法采苗,共计采苗19个网帘,每个网帘面积为 $2\text{ m}^2$ ,采苗后在室内培养了1周时间,然后在海上养殖。1985年1月检查最大的叶状体已有数千个细胞(图版 I - 5)。到4月中旬,大的叶状体长5—6 cm,网绳的藻体密度平均为47.4个/cm。5月上旬长度达到10—20 cm(图版 I - 6),这时紫菜已达到采收要求,而且藻体鲜嫩。

## 展 望

酶法分离紫菜细胞及其养殖的成功是

生物技术在紫菜养殖中的应用。这种方法优点在于,避开了紫菜复杂的生活史及若干丝状体培育病害,大大缩短了紫菜的养殖周期,从而节省大量的人力物力,能人工控制采苗时间,从而摆脱了采苗的季节限制;能保持品种的优良特性,有利于良种的推广应用;能克服不同品种生长的地理障碍,为南方品种在北方养殖和北方品种在南方养殖提供了可能;同时也为我国南方有效地利用海区,开展不同品种的二茬养殖提供了可能。这种技术方法简单,易于掌握。

我们相信随着分离紫菜细胞多种酶源的开辟,酶制剂生产量的增加和成本的降低,将会使这一技术普遍应用,使紫菜养殖的面貌彻底改观。

## 参 考 文 献

- [1] 唐延林: 山东海洋学院学报, 12(4):38—49, 1982.
- [2] 唐延林、方宗熙: 海洋通报, 1(5):94—96, 1982.
- [3] 方宗熙等: 海洋科学, 10(3):46—47, 1986.
- [4] 戴继勋: 海洋湖沼通报, (1):84—88, 1987.
- [5] Fujita, Y. and Migita, S.: *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 57: 39—45, 1985.
- [6] Saga, N.: *Bot. Mag. Tokyo*, 97:423—427, 1984.
- [7] Saga, N. and Sakai, Y.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50(6):1085, 1984.
- [8] 王素娟等: 海洋与湖沼, 17(3):217—221, 1986.
- [9] 王素娟等: 海洋科学, 11(1):1—7, 1987.
- [10] 中国遗传学会编: 中国的遗传学研究, 湖南科学技术出版社, pp.88—89, 1987.
- [11] Polne, M. and Gibor, A.: *J. Phycol.*, 20: 609—616, 1984.
- [12] Polne, M. et al. *Hydrobiologia*, 308—313, 1984.
- [13] Chen, L.C.M. *Botanica Marina*, 29(5): 435—439, 1986.
- [14] Liu Wanshun et al. *Hydrobiologia*, 319—320, 1984.
- [15] 鬼头均: 国外水产, 2: 3—5, 1985.
- [16] 中国科学院海洋研究所藻类实验生态组, 藻类分类形态组编: 条斑紫菜的人工养殖, 科学出版社, 1978.
- [17] 黄海水产研究所紫菜组编著: 坛紫菜与条斑紫菜养殖, 农业出版社, 1979.

# STUDIES ON ISOLATION OF THE THALLODIC CELLS OF *PORPHYRA* WITH ENZYMES AND CULTIVATION OF THESE CELLS

Dai Jixun Bao Zenmin Tang Yanlin Liu Wanshun  
(Shandong College of Oceanology, Qingdao)

The vegetative cells of thalli of *Porphyra yezoensis* and *P. haitanensis* were isolated into single cells and protoplasts with enzymes. Most of them regenerated into normal thalli. Gells isolated from spermatangia developed into spermatia, and those from carposporangia developed into new carposporangia, carpospores and filaments. The optimal temperature for thalli dissociation and cell isolation is 25°C. For the collection of cells and their attachments, optimal specific gravity of sea water is about 1.025. Cell density attached to vinylon rope nets outstripped that of conchospores. These attached cells had been successfully used to produce seedlings for small scaled cultivation experiments in the sea. With cotinued progress, this technique might replace conventional cultivation of *Porphyra* in the near future.

## Key words

*Porphyra*; enzyme; cell; protoplast; cultivation

## 图 版 说 明

1. 海螺酶分离的条斑紫菜的单细胞和原生质体  
Single cells and protoplasts of *P. yezoensis* isolated with sea snail enzymes
2. 坛紫菜分离的单细胞和原生质体, 经过12h的附着情况  
Isolated single cells and protoplasts of *P. haitanensis*. After 12 hours' adhesion
3. 条斑紫菜分离细胞, 经过7天培养的小叶状体  
Isolated cells of *P. yezoensis* grew into young thalli. After 7 days' cultivation
4. 坛紫菜分离细胞经过14天培养的小叶状体  
Isolated cells of *P. haitanensis*. After 14 days' cultivation
5. 在海里养殖了75天的条斑紫菜  
Thalli of *P. yezoensis* cultivated in the sea for 75 days
6. 在海里养殖了大约6个月的条斑紫菜  
Thalli of *P. yezoensis* cultivated in the sea for about 6 months

