

鹧鸪菜原生质体分离与培养的研究

周一红* 王素娟

(上海水产大学, 上海)

用生物技术手段分离鹧鸪菜 (*Caloglossa leprieurii*) 原生质体, 筛选出成功的分离条件。原生质体的活性用伊文斯蓝确定, 原生质体及其去壁情况用荧光增白剂、低渗、自融和电镜4种方法观察、确定。原生质体成活率主要受种藻健康状况、酶解时间和培养液组成影响。细胞分裂频率与激素相关。在合适培养条件下获得较高的再生频率, 并培养成正常植株, 并且产生了无性生殖器官——四分孢子囊。

关键词 鹧鸪菜; 酶; 原生质体; 培养成株

自Cocking 1960年^[1]首先用酶解法获得蕃茄原生质体以来, 原生质体分离与培养的研究在高等植物领域已获得广泛成功。藻类的原生质体分离与培养起步较晚, 而且开始时局限于9种单细胞藻和单列细胞的丝状体藻类。其中除了紫球藻属红藻门外, 其他均属绿藻门^[2]。随后有3个属的大型绿藻也获成功^[3-5]。

红藻和褐藻的原生质体分离一开始就受到工具酶的限制。因为这两类藻的细胞壁含有较多的多糖类藻胶, 这使得多年来仅用纤维素酶和果胶酶对红藻和褐藻的原生质体分离试验失败^[6,7]。直到本世纪70年代末, 随着海藻细胞壁水解酶陆续问世, 红藻和褐藻的原生质体分离才成为可能。迄今为止, 大型海藻原生质体分离成功的种类褐藻门已占了四个属^[6,8-10], 而种类最多的红藻门仅紫菜属六个种^[8,11-14]和江蓠属四个种^[15,16], 且分别处于门内分类地位低等或中等水平, 其中仅紫菜属的原生质体获得再生植株。

本实验材料鹧鸪菜隶属红藻门分类地位最高的仙菜目, 藻体细胞较大, 多核, 具有药用价值^[17], 并且耐低盐, 在比重1.005的海水中仍能正常生长。对今后开展海藻的细胞融合, 遗传操作等领域的工

作是一个较有前途的实验材料。而其原生质体的分离与培养则是上述研究的前提性工作。

材料与方 法

(一) 材料的采集与处理

鹧鸪菜采自上海市金山卫。采回的藻体一部分暂养在比重为1.008, 含4 ppm N-NaNO₃, 0.4 ppm P-KH₂PO₄的消毒海水(简称NP海水)中, 20℃, 光照1000 lx (12:12hLD)。另一部分阴干后低温保存。

(二) 原生质体的分离

1. 酶液配制: 最初用一系列浓度的5种水解酶单独与混合进行酶解。酶粉溶解于酶溶剂(0.9或1.0 mol/L甘露醇, 5 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 1.008比重海水, 调pH至5.8), 酶液经0.45 μm微孔滤膜过滤灭菌。

2. 酶解条件: 藻体经表面清洁, 抗菌液^[18]消毒处理后, 切碎, 用清洗液(0.3 mol/L甘露醇 5 mmol/L CaCl₂·2H₂O,

本文于1988年10月6日收到。

* 现在在水科院东海水产研究所工作。

1.008比重海水, pH调为5.8)漂洗干净后, 加入酶液, 在30℃黑暗条件下, 100r/min水平摇动解离。

3. 原生质体的收集、去壁及活性检查: 酶解2—2.5h后, 既用50 μ m不锈钢筛网过滤, 手摇离心机收集沉淀, 用1.032比重的高渗MES培养液(HS-MES, 文中高渗培养液均在原培养液名称前加HS, 高渗条件通过蒸发海水得到)洗涤原生质体三遍。留在筛网上的藻块用酶溶剂浸洗后过滤, 滤液中的原生质体仍按上法收集, 而藻块投入原酶液中进行第二次酶解。2h后再收集原生质体(称第二批原生质体)。每次酶解可连续收集3—4次。

原生质体的去壁与否通过4种检查方法均可确定, 分别为: 荧光增白剂染色[按文献(19)]、蒸馏水低渗刺激、原生质体自融和透射电镜制片观察。原生质体的电镜固定用含4%戊二醛的高渗过滤海水, 以后的制片过程按文献(20)进行。

原生质体的活性用加入等体积的含2.5%伊文斯兰、1mol/L甘露醇的水溶液染色确定。有活性的细胞及原生质体能够排出染料而不被着色, 死亡的细胞及原生质体被染成蓝色。

(三) 原生质体培养

刚分离出的原生质体在高渗的不同海水培养液中, 250 lx白炽灯漫射光(12:12hLD), 20℃条件下液体浅层培养3天, 以后每隔一周换一次培养液。培养液比重逐渐降低到1.015, 光强逐渐增强到1000 lx。倒置显微镜下直接观察培养过程。再生植株长到肉眼可见时, 改用1.008比重的NP海水, 移入较大水体中进行成株培养。

结果与讨论

(一) 原生质体的分离

1. 原生质体分离的内外在条件: 主要为藻体生理状况、酶液组成和温度。

种藻的生理状况影响原生质体分离的数量和质量, 甚至分离的成败。当年11月至次年1月上海地区自然生长的鹧鸪菜处于旺盛生长阶段, 不含生殖细胞, 较其他时期的种藻分离效果明显好。

酶液的组成及浓度是分离成败的关键。在所试验的组合中(表1), 最佳组合为3%海螺酶(山东海洋学院产), 3%纤维素酶, 1%离析酶, 0.5%果胶酶(均日本产)(文中以后简称SCMP)。由表1的A组和B组可见, 海螺酶与纤维素酶的配合是必须的, 离析酶和果胶酶有一定协同效果。这4种酶单独使用时均不能分离出原生质体。蜗牛酶对海藻毒性太大(表1的D组), 不宜使用。海螺酶, 纤维素

表1 各种因素对鹧鸪菜原生质体分离的影响

Table 1. Effects of various factors on protoplasts isolation from *C. lepreurii*

实验组 Experiment	海螺酶 Sea Snail enzyme(%)	纤维素酶 Cellulase (%)	离析酶 Macrozyme (%)	果胶酶 Pectinase (%)	蜗牛酶 Snail enzyme (%)	原生质体数量 Number of protoplast (%)
A ₁	3	3				±
A ₂	3		3			-①
A ₃	3			0.5		-①
B ₁	3	3	1	0.5		++
B ₂	3	4	1	0.5		+
B ₃	4	4	1	0.5		±
B ₄	4	3	1	0.5		+
C ₁	1.5	1.5	0.5	0.25		+
C ₂	1	4	3			±
D ₁	3	3		0.5	1	-②
D ₂	1.5	1.5	0.5	0.25	0.25	-②

每克鲜重藻体原生质体分离数量 Number of protoplasts derived from 1g fresh thalli - ①无细胞及原生质体 No cell and protoplasts - ②仅细胞, 且无活性 Only cells but out of viability
± < 10² + > 10³ ++ > 10⁴

酶的量超过3%均对藻细胞有明显毒害, 表现为藻块边缘细胞多死亡, 酶液中死亡的原生质体明显增多。

上述条件均合适时, 酶解温度也很重要。其他条件相同情况下, 酶解2.5h后, 30℃时的原生质体分离率比28℃时分离率高出近一倍, 而在32℃的酶液中出现较多的死亡的细胞和原生质体。可见温度太高对原生质体活性有害。故最适合酶解的温度为30℃。

2. 原生质体的释放: 通过对酶解4h的藻块作电镜观察, 可见原生质体酶解过程中, 内层纤维质壁首先被分解, 而外层的胶质壁较难完全酶解(图版 I-2)。因此, 不同于紫菜、江蓠等的原生质体释放方式, 其细胞壁在原生质体释放后完全被分解掉^[11,15], 鹧鸪菜的原生质体显然是突破胶质壁上局部区域而释放出的, 藻块边缘残留着释放后的细胞空壳(图版 I-4)。因此, 其原生质体产量受到限制, 一般 $10^4/g$ 鲜重左右。类似鹧鸪菜原生质体的这种释放方式在一些丝状体绿藻的原生质体分离中也出现过^[2]。

鉴于水解酶的这种作用方式, 酶解中采用多次收集原生质体, 收集时用渗透压比酶液低 0.1—0.2 mol/L 酶溶剂漂洗藻块, 显然有助于细胞残壁中原生质体吸水膨大而游离出。并且, 酶解前切碎藻体, 酶解中施于适当的振荡对于原生质体产量的提高均有利。

3. 原生质体的观察与鉴定: 鹧鸪菜原生质体(图版 I-3)在显微镜下观察, 原生质体呈圆形, 质浓厚。根据个体大小可分为两类: 直径为10—20 μ m较小的和直径为25—30 μ m较大的。显然前者来自叶片近边缘部位, 后者来自近中轴部位。

原生质体经荧光增白剂染色后于荧光显微镜下观察, 视野中的细胞均显红色, 无丝毫白色荧光。蒸馏水低渗刺激后, 细胞立即涨破(图版 I-2), 电镜下, 清楚可见细胞壁完全消失的鹧鸪菜原生质

体, 其内细胞器基本完好(图版 I-5)。同时, 观察到原生质体自融现象(图版 II-2)。

(二) 原生质体的培养

1. 影响原生质体成活和诱导分裂的几个因素: 在培养初期, 原生质体对激素和维生素的要求明显, 见表2。培养在 HS-MES 培养液中的原生质体成活率显然低于培养在加有激素和维生素的 No.5 培养液(MES 培养液^[11]无机盐、MS 培养液维生素、1ppm 吲哚乙酸 IAA, 1.5ppm 激动素 KT) 中的。表 2-A, B 组显示冷藏前的干燥和冷藏时的低温对种藻的生理状况的损伤直接影响原生质体成活率。另外, 不同酶解时间收集的原生质体, 其成活率不同。第一次收集的原生质体, 其成活率总是不如之后的第二、第三次收集的高(表 2-C 组)。紫菜的酶解过程中也出现这种现象, 这两种海藻都具有耐干露特性, 是否酶液的高渗条件筛选出了膜功能强的原生质体有待探讨。

原生质体在仅含 MES 无机盐的海水中培养一段时间也有分裂出现, 但激素对于促进其分裂有明显效果(表 3)。

2. 原生质体培养的观察:

本实验条件得到的鹧鸪菜原生质体活性较高, 能在较低密度下成活、分裂, 而且密度对其培养影响不明显。起始培养密度为 10^2 — $10^3/ml$ 的原生质体在 HS-5 号培养液中培养 48h, 荧光增白剂染色观察, 约有 50% 再生了细胞壁。3 天时, 个别原生质体开始变形(图版 II-3), 原生质体成活率为 50%, 有一定形状的细胞均分解消失。这时的原生质体细胞壁已再生完全。培养 9 天, 即可见第一次分裂(图版 II-4), 10 天时细胞分裂频率(已分裂细胞数/总成活细胞数)为 17% 左右, 并可见二次分裂而形成的三细胞苗。培养 23

表2 各种因素对原生质体成活率的影响

Table 2 Effect of various factors on survival rate of protoplasts

实验组 Experiment	种藻来源 Source material	培养液 Medium	收集时间(批) Collection time	培养天数 Days after culture	原生质体成活率 Survival protoplasts (%)
A ₁	1988年1月冷藏 Jan.1988,frozen stored	HS-MES	第二批 2nd	3	1
A ₂	1988年1月冷藏 Jan.1988,frozen stored	HS-No.5	第二批 2nd	3	40
B ₁	1988年1月新鲜 Jan.1988,fresh	HS-MES	第一批 1st	6	17
B ₂	1988年1月新鲜 Jan.1988,fresh	HS-No.5	第二批 2nd	6	42
C ₁	1987年11月冷藏 Nov.1987,frozen stored	HS-No.3	第一批 1st	6	0
C ₂	1987年11月冷藏 Nov.1987,frozen stored	HS-No.3	第二批 2nd	6	14
C ₃	1987年11月冷藏 Nov.1987,frozen stored	HS-No.3	第三批 3rd	6	30

HS-No.3 was HS-MES supplemented with 1ppm 2,4-D,1.5ppm KT

表3 激素对细胞分裂的诱导

Table 3 Induction of plant growth regulation substances on cell division

培养液 Medium	第一次分裂 (天) 1st cell division (day)	培养天数 Days after culture (day)	细胞分裂 (%) Cell division (%)	培养天数 Days after culture (day)	细胞分裂 (%) Cell division (%)
MES	10	10	0.7	15	14.3
No.5	8	10	16.7	15	32.4

种藻为1988年1月新鲜

Source material was fresh in Jan,1988.

天细胞分裂频率已达56%左右。随着培养的继续,培养皿中成活的细胞大多都能分裂并且持续下去。但许多由于蓝藻污染而

中途死亡。

鹧鸪菜原生质体的再生过程与其孢子的发生过程基本一致。假根出现较早,最早2细胞时就分化出(图版II-5)。培养一个多月后开始出现叶片分化。培养3个月左右,再生苗已具备成体植株的特征(图版II-1),以后生长很快。4个月时,最大的高1.8cm,与自然生长状态成熟藻体相近(图版II-7),同时叶片上出现了四分孢子囊群(图版II-6),可见鹧鸪菜的原生质体在较低密度下经过培养可以再生正常植株。

参考文献

- [1] Cocking, E.C.: *Nature*, 187: 962-963, 1960.
- [2] Berliner, M.D.: *Int.Rev.Cyto.*, 73: 1-19, 1981.
- [3] Millner, P.et al.: *Planta*, 14: 174-177, 1979.
- [4] 张大力: 山东海洋学院学报, 13: 57-66, 1983.
- [5] Saga, N.: *Bot.Mag.Tokyo*, 97: 423-427, 1984.
- [6] Fujita, Y. & Migita, S.: *Bull.Fac.Fish.Nagasaki Univ.*, 57: 39-45, 1985.
- [7] Adamich, M. & Hemmingsen, B.B.: In: E. Grantt, ed. *Handbook of Phycological Methods-Developmental and Cytological Methods*. PP.153-169. Cambridge Univ. Press, 1980.
- [8] Saga, N. & Sakai, Y.: *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, 50(6): 1085, 1984.
- [9] Saga, N. et al.: *Beih.Nova Hedwegia*, 83: 37-43, 1986.
- [10] Fisher, D.D. & Gibor, A.: *Phycol.*, 26: 488-495, 1987.
- [11] 王素娟等: 海洋与湖沼, 17(3): 217-221, 1986.

- [12] 唐延林: 山东海洋学院学报, 12(4): 37—50, 1982.
 [13] Chen, L.C.M.: *Botanica Marina*, 29(5): 435—439, 1986.
 [14] Polne-Fuller, M. & Gibor, A.: *J. Phycol.*, 20: 609—616, 1984.
 [15] 王素娟, 周一红: 上海水产大学科技简报, 3: 1, 1988.
 [16] Cheney, D.P. et al.: *J. Phycol.*, 22: 238—243, 1986.
 [17] 芮和恺等: 海洋药物杂志, 16(4): 31—32, 1985.
 [18] Robert W.H. & James R.R.: In: Stem J.R. ed. *Handbook of Phycolological Methods-Culture Methods and Growth Measurements*, P.62, Cambridge Univ. Press, 1973.
 [19] 上海植物生理学会编: 植物生理实验手册, 上海科学技术出版社, 1985.
 [20] 上海第一医学院电镜室等: 中华医学杂志, 56(10): 655, 1976.

ISOLATION AND CULTIVATION OF PROTOPLASTS OF *CALOGLOSSA LEPRIEURII*

Zhou Yihong Wang Sujuan

(Shanghai Fisheries University, Shanghai)

Protoplast, as an important medium in genetic engineering, have been isolated from some genera of seaweeds in the near decade. Using the combinative enzyme of 3% Sea snail enzyme, 3% Cellulase Onozuka R-10, 1% Macerozyme and 0.5% Pectinase, viable protoplasts were isolated from *Caloglossa leprieurii* (Mont.) J. Ag. (Ceramiales, Rhodophyta). The protoplast viability was confirmed by exclusion of Evans Blue stain. The protoplasts and its absence of cell wall were observed and confirmed by Calofluor White, reduced osmolarity, electron microscopic examination and self-fusion. About half number of protoplasts survived and divided with high ratio when cultivated in thin liquid layer of modified medium No.5 (MES as basic medium, supplemented with MS medium vitamins and 1ppm IAA, 1.5ppm KT). Regenerated plantlet appeared after 45 days. Tetrasporangia appeared in the blade of some regenerated plants after 4 months.

Being big, polynuclear and regenerative, protoplasts of *C. leprieurii* show prospect in the field of cell fusion and genetic operation of seaweeds.

Key words

Caloglossa; enzyme; protoplast culture; plant regeneration

图 版 说 明

Explanation of Plate

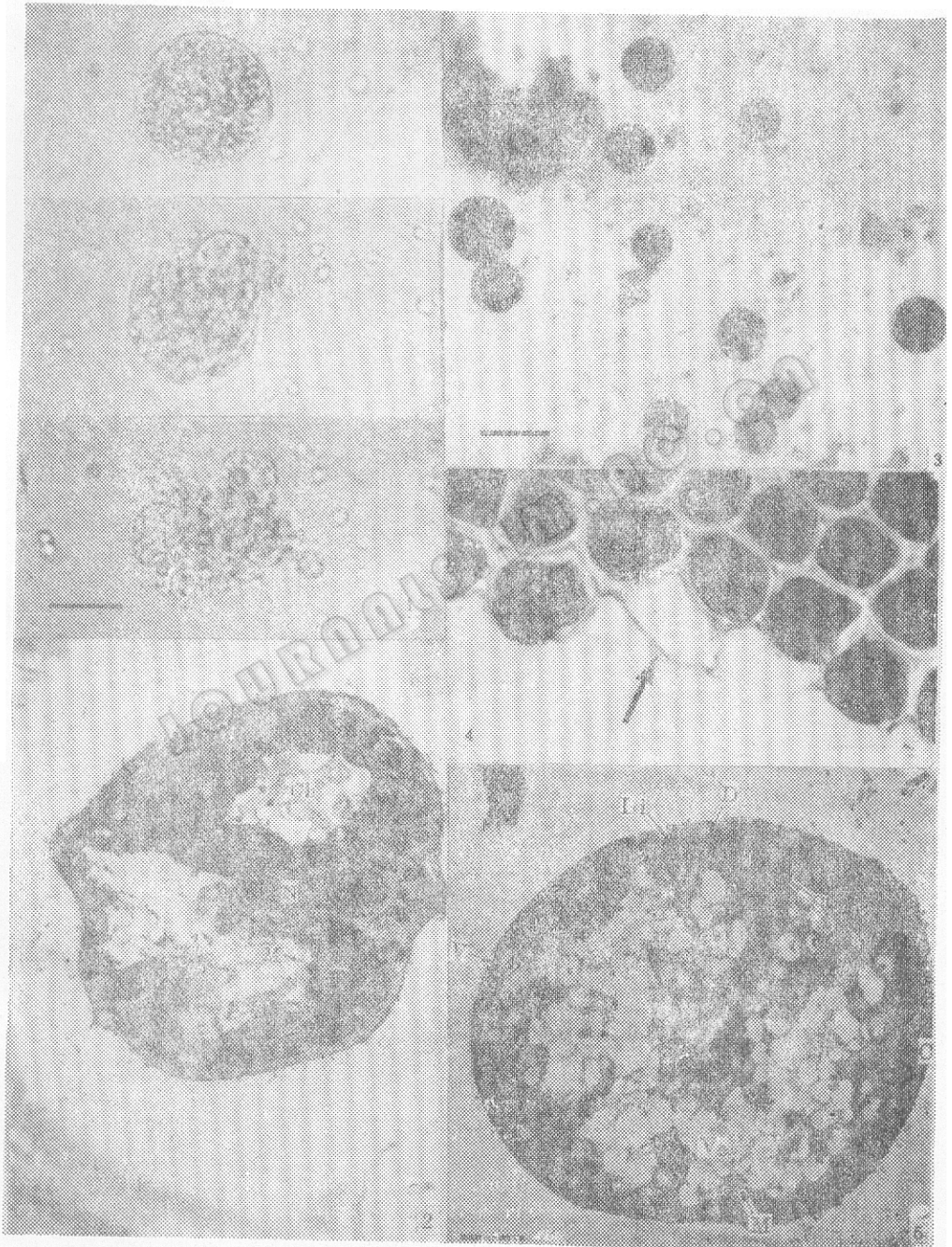
图版 I Plate I

1. 原生质体在低渗下涨破的过程, 下标 = $20\mu\text{m}$
Protoplast broke in reduced osmolarity. bar = $20\mu\text{m}$
2. 酶解4h的藻块细胞电镜图片, 下标 = $0.5\mu\text{m}$
Electron micrograph of a piece of thalli after 4h enzyme incubation. bar = $0.5\mu\text{m}$
3. 由鹧鸪菜叶片游离出的原生质体, 下标 = $40\mu\text{m}$
Isolated protoplasts from thalli of *C. lepreurii*. bar = $40\mu\text{m}$
4. 酶解1h的藻块, 箭头示细胞空壳
Pieces of thalli after 1h enzyme incubation, showing intact septa in the tissue
5. 电镜下新制备的原生质体, 示完整的质膜(Pm)、核(N)和其他细胞器, 下标 = $2\mu\text{m}$
Electron micrograph of newly produced protoplast showing absence of any wall, intact plasma (Pm), nucleus(N) and other cell organs. bar = $2\mu\text{m}$

图版 II Plate II

1. 培养80天的再生植株, 下标 = $200\mu\text{m}$
Regenerated plantlet after 80 days. bar = $200\mu\text{m}$
2. 原生质体的自融, 下标 = $20\mu\text{m}$
Self fusion of protoplasts
3. 培养3天后原生质体变形, 下标 = $20\mu\text{m}$
Protoplast changed its shape after 3 days culture. bar = $20\mu\text{m}$
4. 培养9天后原生质体一次分裂, 下标 = $20\mu\text{m}$
First cell division after 9 days culture. bar = $20\mu\text{m}$
5. 培养15天后分生假根, 下标 = $20\mu\text{m}$
Regenerated rhizoid after 15 days culture. bar = $20\mu\text{m}$
6. 具四分孢子囊的再生植株(培养4个月), 下标 = $80\mu\text{m}$
Tetrasporangia formed after 4 months culture. bar = $80\mu\text{m}$
7. 由原生质体再生的成体植株(培养4个月), 下标 = 1cm
Regenerated mature plants after 4 months culture. bar = 1cm

Zhou Yihong et al.: Isolation and cultivation of protoplasts of *Caloglossa leprieurii*



Zhou Yihong et al.: Isolation and cultivation of protoplasts of *Caloglossa leprieurii*

