

条斑紫菜细胞苗培养及总氮量、 氨基酸分析

何培民 王素娟

(上海水产大学)

提 要 我们用条斑紫菜体细胞进行室内育苗,并下海养殖。对细胞苗养成的紫菜的总氮量及氨基酸量进行了测定,并与传统法育苗养成的紫菜的总氮量及氨基酸量进行比较。结果表明,细胞苗紫菜与传统苗紫菜的总氮量及总氨基酸量相近,说明从群体上看,两者的主要营养成分无甚差异,营养价值相近。

关键词 条斑紫菜,细胞苗,总氮量,氨基酸

80年代前期,已从6种紫菜中分离出原生质体或细胞并再生成株^[3,4,7,11,13,14]。1984年,赵焕登^[6]最早用磨碎法获得条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)的体细胞,并附着在小筛绢上进行育苗研究。随后,方宗熙等(1986)、王素娟等(1987)、戴继勋等(1988)用酶法获得条斑紫菜或坛紫菜的大量细胞进行育苗及下海养殖试验。此后我们对条斑紫菜体细胞发育等基础工作进行了较详细的研究后,1988年秋天,我们对条斑紫菜体细胞育苗技术进行更深入的研究,并把苗网分2批下海养殖,其中第一批苗网下海后长势很好,其苗密度及产量都能达到养殖生产要求。由于在高等植物中,细胞或原生质体再生的植株产生变异几率较大,在紫菜中用细胞培养的藻体是否也会产生较大的变异而影响其风味及营养价值?为解决这一问题,我们分别测定了细胞苗紫菜和传统苗紫菜的总氮量和氨基酸,并进行比较。

材 料 与 方 法

1. 种藻来源 本实验用的条斑紫菜采集于江苏省启东县吕四海丰村养殖海区。经阴干后,用薄膜袋密封冷藏于零下20°C冰箱中待用。

2. 单细胞制备 取0.5克紫菜放在海水中复苏三天,用消毒海水洗刷三遍,除去杂藻。剪切成5mm²的小块放入酶液中,酶液是由5ml 2M葡萄糖液中加0.15克海螺酶配成(酶浓度为3%),pH调为6.5,酶是由青岛生化制药厂提供的。在20—25°C条件下保温酶解3小时,酶解结束后,用400目的镍丝筛网过滤,用手摇离心机离心5分钟,除去上层酶液,加入比重为1.030MES液冲洗离心三次,获得大量单个细胞。

3. 采苗方法 经离心洗涤后的大量细胞,用比重为1.030MES液配成一定浓度的细胞液(200×10³细胞/ml),滴洒在维尼纶绳上,放入兰色塑料箱中停一段时间注入1.030MES培养液培养,1天后,再换比重为1.025MES液培养,培养温度为17—22°C,光照强度为2000—3000Lux,光周期为12:12,

光源为荧光灯。

4. 海上养殖 单细胞苗经室内培养一定时间后,做成 $2 \times 2.5\text{m}^2$ 条形网,放入江苏吕四海丰村海区潮间带养殖。

5. 总氮量、氨基酸含量测定分析 每次采集的紫菜放入 50°C 烘箱中烘 24 小时,研磨成粉末后,经 100 号筛网筛过,其粉末装瓶待分析。

(1) 总氮量测定 用半微量 Kjeldahl 定氮仪测定总氮量。

(2) 氨基酸测定 称取 2.0mg 紫菜粉末装入 0.5cm 直径的玻璃管内,加入 6N HCl,放入烘箱,内置 105°C ,水解 24 小时,稀释定容,吸取 10 μl 样品液,注入 Waters 公司生产的高效液相色谱仪进行测定。

结果与讨论

(一) 室内细胞育苗及下海养殖情况

我们已经知道(1),条斑紫菜体细胞形成苗的途径主要有两种:(1)一些体细胞可直接分裂形成小苗,称之为单细胞苗;(2)大多数体细胞先分裂形成细胞团,再由细胞团释放孢子,孢子萌发成小苗,称之为孢子苗。两者总称为细胞苗。本实验利用这两种苗源进行条斑紫菜体细胞育苗。

用海螺酶酶解条斑紫菜体细胞,分离出来的细胞大多是 2—4 个细胞仍粘连在一起(图版-1),但各个细胞的发育是相互独立的。

在细胞培养过程中,我们观察到单细胞苗一般在培养的第 4—6 天开始出现,而孢子苗一般要在 9—16 天开始大量出现,且孢子的释放时间可持续达 20 天以上,这是由于细

表 1 苗网在海上江苏省海丰沿海水域养殖情况(1988 年)
Table 1 Cell seedlings on nets cultured in Hai Feng sea field
of Jiangsu province (1988)

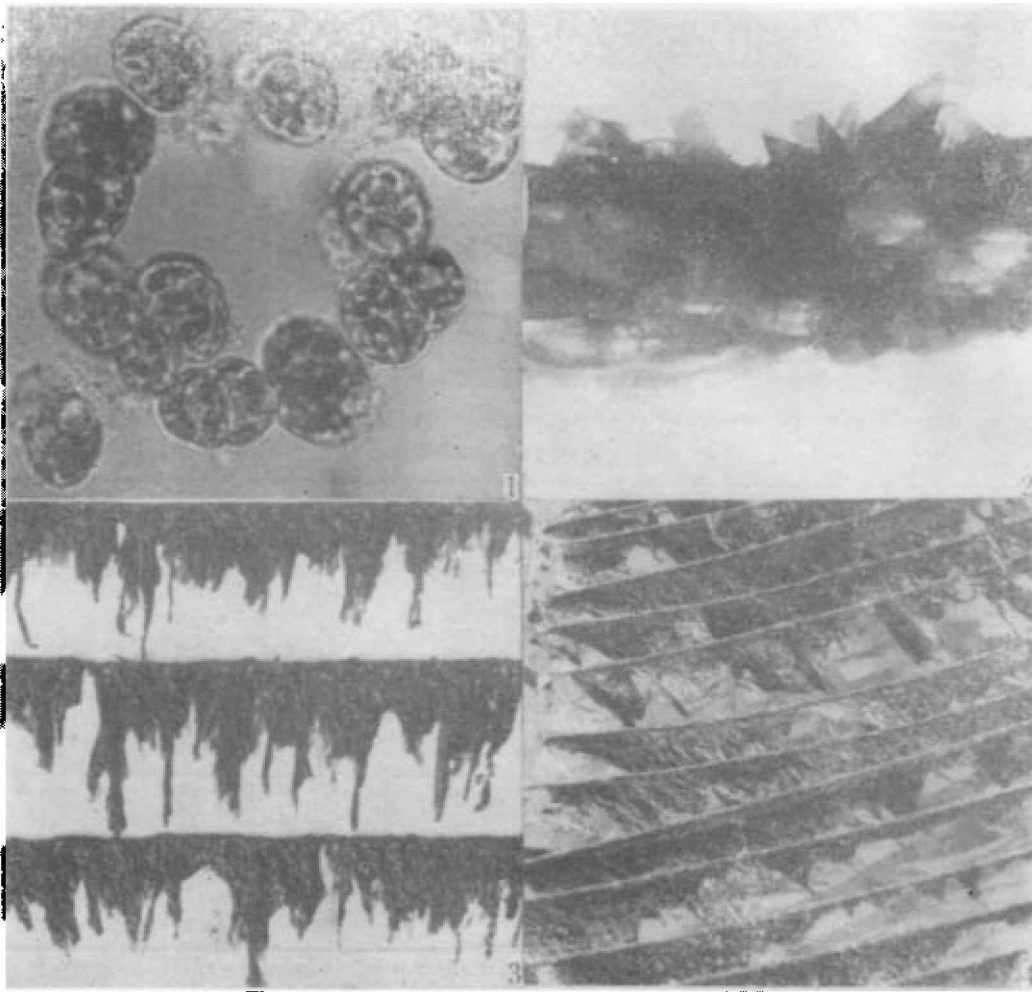
编 号	细胞团网 目 期 (月.日)	培养天数 (天)	下海日期 (月.日)	当时水温 ($^\circ\text{C}$)	下海前苗密度 (棵苗/cm)	下海后苗密度 (棵苗/cm)	苗长 30cm 所需天数(天)	
第 一 批	1	7.8	70	9.23	22	500	650	30
	2	7.8	46	9.23	22	500	350	30
	3	7.20	58	9.23	22	500	600	30
	4	8.4	43	9.23	22	500	648	30
	5	9.2	15	9.23	22	310	432	30
	6	9.2	15	9.23	22	290	400	35
第 二 批	7	7.20	87	10.17	19	600	25	60
	8	8.4	73	10.17	19	600	38	60
	9	8.4	73	10.17	19	600	36	60
	10	9.7	40	10.17	19	400	72	40
	11	9.7	40	10.17	19	450	80	40

注:第一批苗网下海后第三天计数,第二批苗网下海后第十五天计数。第一批的第 2 编号组冷冻苗网。冷冻日期 8 月 24 日,冷冻天数 30 天,冷冻温度 -20°C 。

(1) 何培民、王素娟,1990. 条斑紫菜体细胞分化发育的研究。

胞个体发育不同步所造成的。先成熟的细胞团则先释放孢子，晚成熟的细胞团则晚释放孢子。从我们多次实验的结果看，孢子苗平均要在第12天大量出现。一般一个细胞团能释放3—8个孢子，有的甚至达十几个，故随着培养时间的延续，孢子苗的数量越来越多，占总体苗的比例也就越来越大。我们从5次实验统计出，细胞在培养20天左右时，平均单细胞苗占总体苗数量的31.8%，而孢子苗为68.2%。可见孢子苗是细胞苗的主要来源。当然不同时间收集的种藻及培养条件均对单细胞苗和孢子苗的比例有一定的影响，由于篇幅关系暂不作讨论。

1988年7—9月间，我们分5批用条斑紫菜体细胞直接附网法进行细胞育苗，共11个小网。细胞附网后，经15—20天的室内培养便能肉眼见苗，其苗最长可达0.1mm长，苗密度可达300棵苗/cm以上。经室内培养一定时间的11个苗网，分2批下海养殖。第一批下海时间为1988年9月23日，共6个小苗网，合并为2个大网(见表1)。此时，当



图版说明

Explanation of plates

1. 从条斑紫菜叶状体酶解出来的体细胞($\times 300$)。 2. 示细胞苗附着在维尼仑网绳上($\times 6$)。 3. 细胞苗网下海养殖25天后，紫菜长达15cm。 4. 示养殖在海上的细胞苗网上的紫菜。

地渔民用传统采育的壳孢子苗网,刚开始陆续下海养殖,其苗只有几个细胞。而我们试验网的细胞苗,密度达 300—500 棵苗/cm,苗长 0.01—1cm(图版-2),下海 3 天后苗密度不但没有下降,且平均提高为 400—650 棵苗/cm。我们认为这可能是由于条斑紫菜体细胞团继续大量放散孢子以及条斑紫菜小苗具有释放单孢子能力的双重作用所造成的。这也给了我们一个启示,在不影响产量的前提下,适当降低附网的细胞数,充分利用小叶状体放散单孢子的特性,以达到生产上要求的苗密度,这样可降低体细胞育苗的成本。

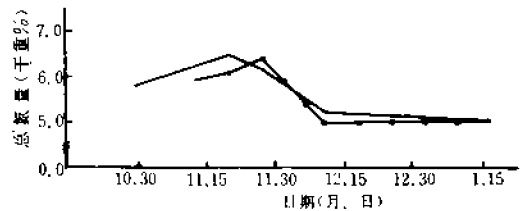
第一批苗网下海时的水温为 22°C 左右,很适合于小苗的生长,故细胞苗生长速度非常快。到 10 月 17 日即下海养殖 25 天后,细胞苗已长达 15cm 左右(图版-3),而传统苗只有 5cm 左右。第二批苗网共 5 只小网,另外一只小网为空白对照网,于 1988 年 10 月 17 日下海。当时日平均水温为 19°C。下海 15 天后掉苗严重,其平均密度只有 25—80 棵苗/cm,且苗分布不均匀,有许多地方出现大段空白,被绿藻浒苔所占据,其原因可能是细胞苗在室内培养时间过长,小苗发育不好;其次,下海时间过晚,水温下降不利于小苗生长。因此培养细胞苗应在水温合适时尽快放入海上养殖。

经过数个月的养殖,细胞苗已逐渐养成成菜(图版-4)。从 1988 年 10 月 17 日起到 1989 年 2 月 26 日期间,采样 4~5 次,用来进行总氮量及氨基酸测定及分析。

(二) 总氮量分析

我们从细胞苗网上采集紫菜进行总氮量测定及氨基酸分析,同时与传统苗紫菜进行比较。

附图显示细胞苗紫菜与传统苗紫菜总氮量的季节变化,由于细胞苗已在室内培养了一定时间,下海后,生长非常快,到 10 月底细胞苗紫菜已达 25—30cm 长,而传统苗到 11 月中下旬才达收割标准,故细胞苗紫菜的总氮量开始测定的时间比传统苗紫菜早 15 天左右。从图中可看出,初测定时,细胞苗紫菜和传统苗紫菜的总氮量分别为 5.76% 和 5.87%,随后,总氮量逐步升高,并至最高峰,细胞苗紫菜和传统苗紫菜最高峰值分别为 6.38% 和 6.35%,时



附图 细胞苗紫菜和传统苗紫菜总氮量的季节变化(1988—1989)

Attached fig. Changes of total nitrogen from cell seedlings and traditional sporelings in *Porphyra yezoensis* (1988 to 1989)

——细胞苗; - - -传统苗

间都是在 11 月中下旬,两峰值间相距大约 8 天时间,说明两者总氮量的时间差随着养殖时间的推移在逐步缩短。随后,总氮量从 11 月中下旬到 12 月中旬逐渐下降,到 12 月中旬,细胞苗紫菜和传统苗紫菜的总氮量分别下降为 5.15% 和 4.94%,此后,至 1 月中旬,胞细苗紫菜和传统苗紫菜此时的总氮量分别为 4.96% 和 4.93%,两者仅相差 0.03%。可见,随着养殖时间的延续,两种紫菜的总氮量在逐步接近。从总体上来说,细胞苗紫菜和传统苗紫菜总氮量相差不大,其总氮量平均值分别为 5.68% 和 5.61%,仅相差 0.07%。

(三) 氨基酸分析

我们用 1989 年 2 月 26 日采集的细胞苗紫菜及传统苗紫菜用来进行氨基酸分析, 其结果见表 2。从表中可知, 细胞苗紫菜和传统苗紫菜的总氨基酸量分别为 27.95% 和 27.88% (其中色氨酸用盐酸水解, 破坏未测)。可见, 两者的总氨基酸量也相差不大, 仅相差 0.07%, 即细胞苗紫菜的总氨基酸量是传统苗的 100.25%。

表 2 细胞苗和传统苗紫菜氨基酸量(干重%)

Table 2 The content of amino acids in thalli from cell seedlings and traditional sporplings of *P. Yezoensis* (Dry weight %)

氨基酸	细胞苗	传统苗	相对百分比	氨基酸	细胞苗	传统苗	相对百分比
赖氨酸	0.56	0.83	67.47	丙氨酸	3.49	4.05	86.17
组氨酸	1.09	0.82	132.93	胱氨酸	0.07	0.06	116.67
精氨酸	2.41	2.45	98.37	缬氨酸	2.30	2.41	95.44
天冬氨酸	2.65	2.28	116.23	甲硫氨酸	0.35	0.38	92.11
苏氨酸	1.54	1.00	154.00	异亮氨酸	1.22	1.36	89.71
丝氨酸	0.78	0.87	89.66	亮氨酸	1.97	2.42	81.40
谷氨酸	3.50	3.66	95.63	酪氨酸	0.69	0.71	97.18
脯氨酸	1.68	1.27	132.28	苯丙氨酸	1.03	1.05	89.86
甘氨酸	2.62	2.26	115.93	总氨基酸	27.95	27.88	100.25

从总氨基酸含量来看, 细胞苗紫菜和传统苗紫菜之间无明显差异, 但各氨基酸的含量在两者之间还有一定的差别。从表 2 中可看出, 赖氨酸、组氨酸、苏氨酸、丝氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸在两者之间有较大的差别, 其中赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸是必需氨基酸, 组氨酸为半必需氨基酸。相差最大的是苏氨酸, 其相对百分比为 154.00%。从表中还可看出, 细胞苗紫菜的赖氨酸、丝氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸要比传统苗紫菜低, 其含量分别是传统苗的 67.47%、89.66%、86.17%、89.71%、81.40% 和 89.86%。而细胞苗紫菜中的组氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、脯氨酸、甘氨酸和胱氨酸的含量比传统苗紫菜分别高出 32.93%、16.23%、54.00%、32.28%、15.93% 和 16.67%。可见在细胞苗紫菜和传统苗紫菜之间各氨基酸含量还是有一定差异, 但从总体上来说, 相差不大, 也即主要营养价值相似。

结 语

从细胞育苗实验可见, 条斑紫菜体细胞发育具有一个明显的特点, 一些体细胞能直接分裂形成小苗, 而大多数体细胞可先分裂成细胞团, 再由细胞团释放孢子萌发成苗。如能充分利用后一特性, 则可大大提高细胞的利用率, 降低细胞育苗的成本。

从本次实验育苗时间来看, 室内育苗最短时间为 15 天, 即可把苗网放入海上养殖。是

否还可缩短室内育苗时间,还可继续试验。

另外,把细胞直接滴洒在网板上进行平面育苗,则育苗室占地面积较大,难以在养殖生产上推广应用。因此,如何充分利用有限的空间,将是今后研究的方向。

从总氮量和氨基酸测定结果可以看出,用细胞苗育出的紫菜与传统方法育出的紫菜在总氮量和总氨基酸量含量上没有什么变化,也即主要营养价值不变。这进而说明了用体细胞育苗是可行的。但有若干氨基酸特别是一些必需氨基酸有较大的变化,尚不清楚这些变化是否是由于变异所致,还有待于作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 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。
- [2] 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。
- [3] ——,1987. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 II. 直接育苗下海养殖实验研究。海洋科学,11(1):1—7。
- [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,第一届中国藻类学术讨论会文集,45—49,科学出版社(京)。
- [5] 纪明候等,1981. 不同海区生长的条斑紫菜的氨基酸含量变化。海洋与湖沼,12:523—529。
- [6] 赵焕登、张学成,1984. 条斑紫菜营养细胞的分离培养和试验。水产学报,8(3):197—202。
- [7] 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。
- [8] 黄海水产研究所紫菜组,1979. 坛紫菜与条斑紫菜的养殖,农业出版社(京)。
- [9] 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。
- [10] 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。
- [11] Chen, L. C. M., 1986. Cell development of *Porphyra minitata*(Rhodophyceae) under axenic culture. *Botanica Marina*, 24: 435—439.
- [12] Fujita, Y. & S. Migita, 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. *Bulletin Faculty of Fisheries Nagasaki Univ.*, 57: 39—45.
- [13] Poine-Fuller, M. & G. Aharon, 1984. Developmental studies in *Porphyra* I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* 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—427.

CELL SEEDLING CULTURE AND TOTAL NITROGEN AND AMINO ACID ANALYSIS IN *PORPHYRA YEZOENSIS*

He Peiming and Wang Sujuan

(Shanghai Fisheries University)

ABSTRACT Seedlings from the culture of somatic cells of *Porphyra yezoensis* have been done in Hai Feng sea farm of JiangSu province. The isolated single somatic cells was cultured with enriched seawater in temperature-controlled room at 20°C and under 2000 lux illumination for 12-hour daily. After few days, some cells divided and formed seedlings and most cells firstly divided into cell aggregates, then the aggregates released spores that germinated into sporelings. The cell seedlings grew

0.1-1mm in length in 15-20 days. Cultured at room for 15-87 days, the cell seedlings on nets were moved into sea and cultivated with 2 batches. After 25 days later the cell seedlings of 1 st batch grew to about 10-15 cm in length.

The content of total nitrogen and amino acids of the thalli were analyzed from cell seedlings and traditional sporelings, and took to compare. The results showed there were no change in total nitrogen and total amino acids between cell seedlings and traditional sporelings, though there were some changes in the content of some amino acids, so there are no difference in nutrient value between the population of the cell seedlings and the traditional sporelings of *Porphyra yezoensis*.

KEYWORDS *Porphyra yezoensis*, cell seedling, total nitrogen, amino acid