

条斑紫菜营养细胞的分离培养试验*

赵焕登 张学成

(山东海洋学院生物系)

提 要

本文介绍了用条斑紫菜的单个营养细胞培养成叶状体的试验。试验表明,单个营养细胞,在适宜的培养液中有可能经过20天培养成小紫菜叶状体;其成活率为33%左右。此外,还介绍了冷冻度夏后的叶状体单个营养细胞的培养试验和不同含水量的叶状体营养细胞的培养试验。

紫菜是一种营养价值很高的海藻。目前世界上进行人工养殖的有我国、日本和朝鲜等国。条斑紫菜(*Porphyra gezoensis* Ueda)是主要养殖品种之一。

紫菜生活史中有叶状体阶段和丝状体阶段。目前是用贝壳来培养丝状体,由丝状体放散壳孢子,采苗并养成食用紫菜。培养贝壳丝状体需要很多人力物力,培养时间也长(约五个月),而且易受病害。为了解决这一问题,日本的岩崎英雄进行了游离丝状体的研究^[4],我国于1975年也开展了这一工作,在坛紫菜方面,培养游离丝状体已取得成功,并投入了生产^[1]。在条斑紫菜方面则取得了一定的进展^[2]。但是,条斑紫菜现在仍需要将游离丝状体采到贝壳上,以产生壳孢子。

能不能不经丝状体而培养出条斑紫菜呢?即能不能将叶状体的营养细胞分离培养,成为新的叶状体呢?如果可能用于生产,将会大大简化紫菜养殖的过程,降低生产成本,而且有利于选育和保持优良品种,提高产量。为此,进行了一系列的实验:春季采集叶状体,进行适当处理后,置于冰箱内冷冻度夏,到十月份将叶状体取出,将其营养细胞分离,然后采到筛绢上,经过一段时间室内培养,置海上养殖。

材 料 与 方 法

实验材料采自青岛海滨,为自然生长的条斑紫菜。采集时间是二月至五月。

选择健康的叶状体,在室内晾干,至藻体表面析出一层白末,且藻体富有弹性时,用塑料袋包扎密封,置于-20°C冰箱内度夏。

到十月份紫菜采苗时,将材料从冰箱内取出,先在室温下置于海水中恢复24小时,然后进行营养细胞的分离。

营养细胞分离的方法如下:先将材料进行再一次选择,挑选形状细长,表面较干净的

* 本文在方宗熙和郑柏林教授指导下进行的,特表衷心谢意。

(1) 王素平、姜红如, 1979. 条斑紫菜游离丝状体生态的研究。中国海洋湖沼学会第三次代表大会暨学术年会论文汇编, 401—402。

藻体,用毛笔充分洗刷,以除去表面的杂藻和污物,然后用剪刀剪成5—10平方毫米的碎块,放入研钵内,磨成浆液,用SP₆₆号筛绢过滤,滤去未研细的藻体块,滤液中即得到分离的营养细胞。如进行实验观察,可用吸管将营养细胞液滴在载玻片上,数小时后,待营养细胞沉落在玻片上,再缓缓加入培养液,进行培养。如要采苗,可将筛绢浸入含有营养细胞的培养液中,让营养细胞附着在筛绢上,进行采苗。

为了搞清紫菜营养细胞的适当的培养条件,将它们在不同的光照时间、培养液及温度下进行培养。

1. 在不同的光照时间和培养液中培养。

分成4组进行比较试验:

(1) 室温短日照培养(A-1):每日光照10小时,光强1500Lux。培养液为加有氮(4.0ppm)、磷(0.4ppm)的消毒海水。

(2) 室温连续光照培养(A-2):每日光照24小时,其他条件与A-1相同。

(3) 室温短日照混合营养液培养(A-3):混合营养液除加氮、磷外,在1000毫升培养液中添加EDTA-Na 4毫克,FeSO₄·7H₂O 5毫克,维生素B₁ 0.25毫克,维生素B₁₂ 0.6微克,其他条件与A-1组相同。

(4) 室温连续光照,混合营养液培养(A-4):每日光照24小时,其他条件与A-3组相同。

以上各组的培养温度均为15—22°C。

2. 在不同温度条件下培养。

共分三组,培养温度分别为15—22°C,12—13°C和4—6°C。培养液为添加氮和磷的消毒海水,每日光照10小时,光强1500Lux。

每周在显微镜下观察两次。观察营养细胞发育成小紫菜的情况,统计小紫菜的细胞数目。各组都观察到营养细胞发育成10个细胞以上的小紫菜叶状体为止。

为了进一步观察分离的营养细胞的成活率和发育情况,分离出单个营养细胞129个,每块玻片上只放置一个细胞,在同一条件下进行培养。温度8—18°C,光照时间每日10小时,光强1500Lux。培养液为添加氮和磷的消毒海水。观察营养细胞的发育情况,死亡数目和发育成10个细胞以上的小紫菜的数目。

实 验 结 果

1. 用机械磨碎、过滤的方法,可以从条斑紫菜叶状体分离出完整的单个营养细胞(图3-1),而且在不同实验条件下都能发育成小紫菜叶状体。但由于培养条件不同,发育的速度也不相同(图1,图2)。

(1) 连续光照有加速营养细胞发育成小紫菜叶状体的作用。A-1组每日光照10小时,41天后营养细胞全部发育成10个细胞以上的小紫菜叶状体,而A-2组只要20天就全部发育成10个细胞以上的小紫菜叶状体。

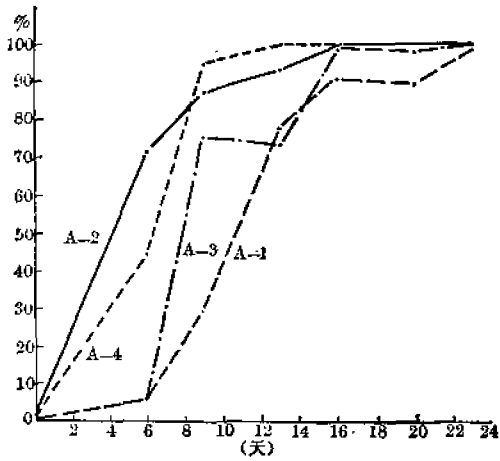


图1 小紫菜的发育速度(%)
(A-1, ..., A-4 为不同光照和培养液组)

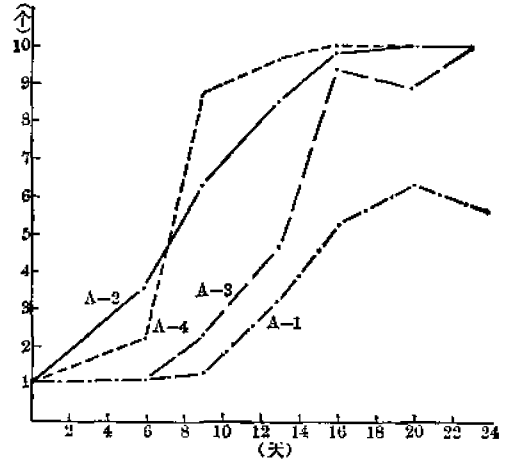


图2 各组不同培养天数的平均细胞数
(A-1, ..., A-4, 同图1注)

(2) 本实验采用的混合营养液有加快营养细胞发育成小紫菜叶状体的作用。培养液中只加氮、磷的 A-1 组全部营养细胞发育成 10 个细胞以上的小紫菜叶状体需 41 天, 而混合培养液的 A-3 组只需 23 天。

(3) 在不同温度下营养细胞发育成小紫菜叶状体的平均细胞数如表 1 所示:

表 1 在不同温度下营养细胞发育成小紫菜叶状体的平均细胞数

| 平均细胞数(个) \ 培养温度(°C) | 培养天数 | 0 | 7 | 10 | 14 | 17 | 20 |
|---------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 15—22 | | 1.0 | 1.1 | 1.3 | 3.3 | 5.3 | 6.3 |
| 12—13 | | 1.0 | 2.8 | 7.7 | 7.7 | 8.4 | 8.7 |
| 4—10 | | 1.0 | 1.3 | 4.8 | 5.7 | 3.4 | 7.0 |

从表 1 可以看出, 在温度为 4—22°C 的培养条件下, 营养细胞都可以发育成小紫菜叶状体, 以在 12—13°C 下发育较快。培养 20 天后, 平均细胞数为 8.7 个。

2. 分离的营养细胞的发育过程和成活率。

用机械磨碎方法得到的单个营养细胞, 色素正常, 细胞呈圆形或椭圆形(图 3-1)。个别细胞因受机械损伤严重, 在 24 小时内颜色变绿, 然后整个细胞解体。

完整的单个营养细胞, 培养 2 天后, 细胞壁明显增厚(图 3-2), 培养 6 天后, 细胞进行分裂, 发育成两个细胞(图 3-3), 其中一个细胞长出假根丝, 另一个细胞进行细胞分裂, 形成多细胞的小紫菜叶状体(图 3-4)。

单个营养细胞的总数为 129 个, 经过 34 天培养后, 有 43 个营养细胞发育成 10 个细胞以上的小紫菜, 而其余 86 个先后死亡, 其成活率为 33%。

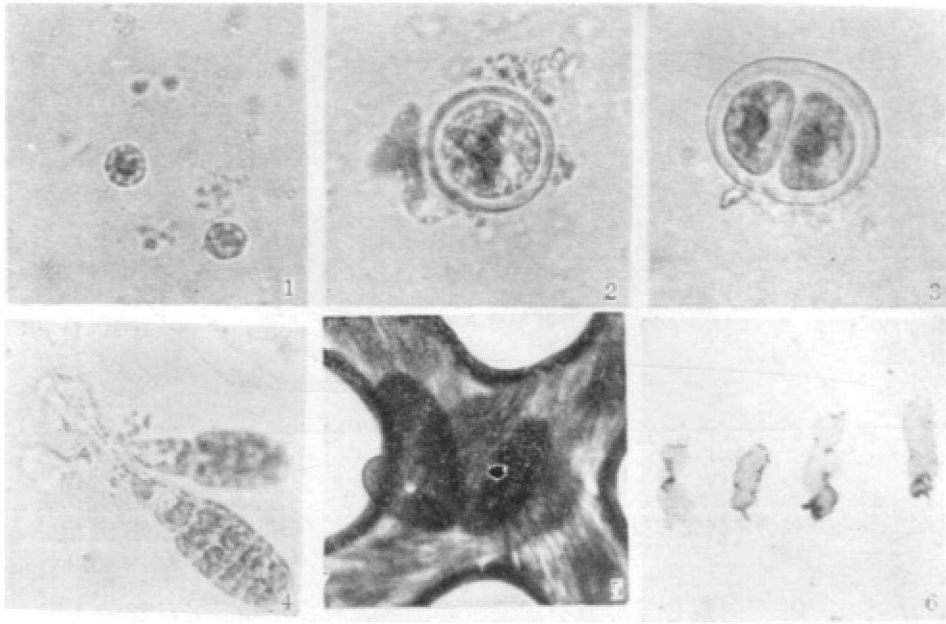


图3 分离营养细胞的发育过程

1. 刚分离出来的营养细胞(×100); 2. 培养2天的营养细胞细胞壁增厚(×320);
 3. 营养细胞发育成2个细胞(×320); 4. 营养细胞发育成小紫菜(×100);
 5. 筛绢上采苗生长的小紫菜(×100); 6. 海上培养出的紫菜叶状体

3. 紫菜叶状体冷冻度夏及采苗养殖。

从经过冷冻的叶状体,用机械磨碎的方法取得的营养细胞,用筛绢采苗。半月后,检查藻体密度为每平方厘米20—25棵小紫菜(图3-5)。在室内培养到肉眼可以见到时,置海上养殖。三个月后长成3—5厘米长的叶状体(图3-6)。

在冷冻过程中,藻体的含水量是一个重要问题。含水量不同的藻体分离的营养细胞的成活率差别很大(如表2)。测定藻体含水量的方法是,凉干的藻体在冷冻前,取出一部分样品称重为 W_1 ,然后置于 120°C 的烘箱中烘至恒重,然后称重为 W_2 ,藻体含水量(%)为 $\frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$ 。

表2 冷冻前紫菜叶状体含水量与营养细胞成活率的关系

| 组别 | 藻体含水量(%) | 营养细胞成活率(%) |
|----|----------|------------|
| 1 | 50 | 25.2 |
| 2 | 60 | 11.4 |
| 3 | 70 | 2.9 |

由表2可以看出,藻体含水量为50%,在 -20°C 的低温下冷冻6个月,分离的营养细胞的成活率与未冷冻以前基本相同。

讨 论

目前, 已有许多种高等植物的营养细胞在适当的条件下能再生植株^[9]。在藻类方面, 海带(*Laminaria japonica*)^[6]、洞毛藻(*Griffithsia pacifica*)^[7]、尾丝藻(*Uronema gigae*)^[8]、石莼(*Ulva linz* L.)、袋藻膜(*Monostroma angicava* Kjellm)^[2]、水棉(*Spirogyra*)、双星藻(*Zygnema*)^[9]等从分离的营养细胞诱导出新的藻体。为验证条斑紫菜的营养细胞有无发育能力, 我们从 1979 年 3 月以来反复实验, 结果表明, 条斑紫菜营养细胞发育的能力是存在的。

目前在条斑紫菜养殖生产中, 主要靠培养贝壳丝状体来解决苗源^[6]。为了简化养殖过程, 降低成本, 提高产量, 进行了一系列实验。实验证明了紫菜叶状体可以冷冻度夏, 然后用机械磨碎法把紫菜营养细胞分离出来, 采苗并在海上养殖。采苗密度达每平方米 20—25 棵小紫菜。但能否用紫菜营养细胞进行大规模的生产, 尚需进一步实验。

参 考 文 献

- [1] 陈国宣, 1980。关于坛紫菜自由丝状体的培养和直接采苗的研究。水产学报, 4(1): 19—30。
- [2] 张大力, 1983。两种绿藻——长石莼和袋藻膜原生质体的制备、培养和融合的研究。山东海洋学院学报, 13(1): 57—64。
- [3] 中国科学院海洋研究所藻类实验生态组, 藻类分类形态组, 1978。条斑紫菜人工养殖。科学出版社。
- [4] 岩崎英雄, 1972。フリー系状体、培養と采苗の手引キ。全海苔连, 东京版。
- [5] 嵯峨直恒等, 1978。カウのケロン、エンブの形成。日本水産学会誌, 44(1): 87。
- [6] Core, D. J., 1979. The use of isolated protoplasts in plant genetics. *Heredity*, 43(3): 295—314
- [7] Duffield, E. C. S., Waaland, S. D. & Cleland, R. 1972. Morphogenesis in the red alga *Griffithsia pacifica*: regeneration from single cells. *Plant*, 105: 185—195.
- [8] Moroslav Gabriel, 1979. Formation, growth and regeneration of protoplasts of green alga, *Uronema gigae*. *Protoplasma*, 70: 135—138.
- [9] Ohiwa, T., 1977. Preparation and culture of *Spisogysa* and *Zygnema* protoplasts. *Cell Struct. Funct.* 2: 249—255.

ON THE CULTIVATION OF THE ISOLATED VEGETATIVE CELLS OF *PORPHYRA YEZOENSIS* UEDA

Zhao Huandeng and Zhang Xuecheng

(Shandong College of Oceanology)

Abstract

Individual vegetative cells of *Porphyra yezoensis* were obtained by mechanical smashing. The isolated cells were cultured in enriched seawater and developed into new fronds in 20 days. The survival rate was about 33%.

In attempting to make use of the totipotency of the vegetative cells of this alga to meet the ever increasing demand for seedlings in commercial culture. A series of

experiments were carried out involving the freezing of the seaweed and keeping it at -20°C for six months from June till December. Then the fronds were smashed to obtain the isolated vegetative cells, which could grow into normal frond seither in the laboratory or in natural sea waters.

Results of the experiments revealed that the survival rats of isolated cells is directly related to the water content of the fronds before freezing. When the water content 50% the survival rate was highest in this experiment.

It seems possible by applying this principle to produce great amount of seedlings to meet commercial need.