

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* 原生质体的 分离和培养

王素娟 孙云龙¹ 马凌波 何培民

(上海水产大学, 200090); (中国极地研究所, 上海 200129)¹

摘 要 本研究多次获得原生质体, 明确了酶解原生质体的内在因素与外在条件, 诸如酶溶剂的种类及浓度, 酶及组成, 酶解温度及 pH, 采种藻时间及取用部位。分离的原生质体经初步培养, 发现少数 2 分裂, 最好的有成 6 分裂的细胞团, 但尚未成株。研究结果为扩大培养打下了良好的基础。此外, 还报道了用海洋细菌酶解的试验及意义。

关键词 羊栖菜, 原生质体, 分离, 培养

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch 属褐藻门马尾藻科马尾藻属一种, 为暖温性多年生海藻, 在我国沿海广泛分布, 是最早见于我国药物文献的种类之一。医学证明羊栖菜对防治甲状腺肿、高血压病和大肠癌有疗效。因含有丰富的褐藻酸、甘露醇和碘等物质, 羊栖菜还是海藻工业的优良原料。此外, 对儿童发育、消除人体疲劳均有良好的食疗价值[曾呈奎, 1962]。由于国外的需要, 致使沿海群众掀起了养殖羊栖菜的热潮, 国内有的单位进行了叶状体假根再生成苗或采收受精卵培养成苗的研究[孙建璋, 1994; 荣城县石岛育苗场, 1988]。本研究的目的是利用细胞的全能性, 从藻体上获得细胞或原生质体, 探索其成苗的可能性。

最早对大型褐藻进行酶法分离原生质体的 Saga 和 Sakai[1984] 利用粗制海螺酶对海带 *Laminaria japonica* 进行分离, 获得了原生质体。此后又有 *L. saccharina* 和 *L. digitata* [Butler 等, 1993]; *Ecklonia radiata* 和 *Macrocystis angusrifolia* [Kevekordes 等, 1993] 以及 *M. pyrifera* [Kloareg 等, 1989]; *Fucus distichus* [Kloareg and Quatrano, 1987] 和 *Underia pinnatifida* [Wu, 1988] 以及 *Pilagella littoralis* [Mejjad 等, 1992] 的原生质体被成功地分离。Saga 等[1986] 首先对酶法分离马尾藻类原生质体进行了研究, 对 *S. muticum* 进行酶解获得了少量原生质体; Fisher 和 Gibor [1987] 用 10% Limpet Acetone Power Type I (Sigma) 和 2% 的 Celluase Onozuka RS 在 0.6 mol/L 山梨醇中对同种藻体及 *S. polyphyllum*、*S. echinocarpum* 进行酶解, 获得了大量的原生质体。但是这些原生质体均未能继续培养成株, 国内尚未见到有关报道。本文对羊栖菜原生质体分离进行了不同批海螺酶酶解效果的比较和原生质体的培养, 并研究了种藻不同部位的酶解效果, 酶解与温度、酶、pH 的关系, 以及海洋细菌酶解藻体的试验。

1 材料与方法

1.1 种藻的培养与处理

羊栖菜藻体于每年 3 月到 6 月采自浙江普陀山。藻体大小 5~20cm, 用海水湿运至实验

室,用毛笔刷去附着的杂藻和附生动物后,于 1% KI- I_2 溶液中浸泡 10 分钟,再用消毒海水冲洗干净后置于含 1% 柠檬酸的消毒海水中浸泡 10 分钟,再用消毒海水冲洗后培养于塑料箱中,光照 1 500~ 2 000lx,光照周期 12L: 12D,培养液采用 PESI 培养液,另加 3×10^{-6} GeO_2 ,早期加入抗生素溶液(每升海水中加入 5 万单位的青霉素和硫酸链霉素)。培养液每周更换一次。每日充气数次,每次 1~ 2 小时。试验时将种藻按不同部位切下,经消毒海水洗刷干净后再切成 0.5mm 大小的小块,每 0.2g 湿重藻体放入 2mL 酶液进行酶解。

1.2 酶解

1.2.1 酶液的组成

先后用三批不同时间制备的海螺酶进行试验,在第 I 批酶和第 II 批酶中加入纤维素酶 Cellulase R- 10(日本产)。第 III 批酶中除了以上两种酶外还用了果胶酶(Pectinase 日本产)和离析酶(Macerozyme R- 10)等进行不同组份和含量的配比。第 I、II 批酶溶剂基本为 0.7mol/L NaCl,第 III 批用不同浓度的 NaCl、山梨醇和甘露醇等进行了试验。

此外,试验从海水中分离了具有酶解褐藻能力的海洋细菌,在 Zobell 2216E 培养基上扩培后,再接种于羊栖菜藻体上,观察它对藻体的酶解效果。

1.2.2 酶解条件

酶解因海螺酶不同批数而分成三批,第 I、II 批酶解条件基本相同,温度在 22~ 26℃,第 III 批则为 24~ 28℃。试验采用 0.07 mol/L 的磷酸缓冲液或 1N 的 HCl 和 NaOH 调整酶液 pH 为 5.0~ 6.98。在摇床上黑暗酶解。

1.3 原生质体的酶解、收集和培养

材料经酶解约 2 小时后,取出一滴酶液经镜检,如有一定量细胞或原生质体游离出来,则将酶液用 200 目尼龙筛绢网过滤,弃残渣,滤液在 1 000r/min 离心 3 分钟,然后弃去上清液,用 0.7mol/L NaCl 或比重为 1.030 的消毒海水冲洗,再离心,反复冲洗 3~ 4 次后收集。

细胞培养于直径 6cm 的培养皿中,培养基为 PESI 培养液,有时加入 GeO_2 和抗生素溶液。光照 1 000~ 2 000lx,光照周期为 12L: 12D,每 3~ 7 天更换培养液一次。

1.4 细胞或原生质体的检查

采用低渗法,加入蒸馏水于样品上,立即在光学显微镜下观察。带有细胞壁的细胞,其内容物模糊不清而细胞壁仍完整。若是原生质体,则细胞膜涨破后消失。

2 结果

2.1 酶解效果

从表 1、2、3 中看出,即使其它条件如酶溶剂、酶浓度、酶解温度、pH 相同(纤维素酶也是同一时间购买保存的),仅因为海螺酶是不同批量生产的,其酶效就差别很大。第 I 批酶所做的试验中,只有(6)和(7)无原生质体,但经研磨后仍获得一定量原生质体(图版 I- 1, 2, 3)或大的髓部细胞。经培养后在(4)、(5)、(13)、(14)组还发生细胞 2、4、6 分裂(图版 I- 4, 5)。而第 II 批酶和第 III 批酶的分选结果均不如第 I 批酶的各组,但第 II 批酶比第 III 批酶质量好,所以

尽管用的材料已是6月底采集的,但仍取得一定效果(图版II-1,2)。如果用第II批酶酶解2月或3月份的藻体,估计会取得和第I批酶试验相近似的结果。第III批酶酶解出的原生质体极少,多为形状不规则的单细胞(图版II-3)。因此海螺酶是关键酶,其质量又更为关键。

表1 第I批酶的酶解试验

Table 1 Isolation results of enzyme group I

组别	种藻培养 天数(天)	酶液浓度	酶解 温度(°C)	pH	酶解时间 (小时)	酶溶剂	酶解及培养结果
1	4	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	24	6.50	3.00	0.7mol/L NaCl 2mL	有很多原生质体直径 5~ 16u
2	5	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	26	6.50	1) 3.50 2) 1.60	0.7mol/L NaCl 2mL 第2次酶解	原生质体较多,直径 5~ 20u,质量好 有很多原生质体,质量很好
3	8	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	26		3.50	0.8mol/L NaCl	有少量原生质体直径 5~ 26u
4	11	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	22		3.80	0.7mol/L NaCl	有原生质体,个别 7 日后 2 分裂
5	12	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	22	6.98	3.50	0.7mol/L NaCl	许多原生质体,7 日后仍有活细胞, 2 个成愈伤组织
6	15	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	22		4.00	0.7mol/L NaCl	无原生质体,经研磨后有少量
7	16	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	22		2.50	0.7mol/L NaCl	无原生质体,经研磨后有少量大 而无色的薄壁细胞
8	21	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	24		4.25	0.7mol/L NaCl	经研磨后得原生质体
9	22	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	24		6.00	0.7mol/L NaCl	获得原生质体
10	4	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	24	6.98	4.50	0.7mol/L NaCl	获原生质体,5 日后仍有存活
11	5	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	24		8.30	0.7mol/L NaCl	获原生质体直径 7~ 13u
12	4	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	24	6.98	3.50	0.7mol/L NaCl	获原生质体
13	4	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	20		4.30	0.7mol/L NaCl	原生质体 3 日后 2 分裂
14	5	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	26		3.00	0.7mol/L NaCl	获原生质体,3 日后有 6 个细胞的细胞团
15	3	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	26	6.50	2.50	0.7mol/L NaCl	获原生质体 3 日后 2 分裂
16	7	0.7% 海螺酶 + 1% 纤维素酶	26		4.50	0.7mol/L NaCl	不同部位均获得原生质体,3 日后均分裂

注: No. 1~ 9 为 3 月 9 日采集的种藻; No. 10~ 11 为 4 月 4 日采集; No. 12~ 14 为 5 月 7 日采集; No. 15~ 16 为 2 月 26 日采集。酶液 pH 用 0.07 mol/L 磷酸缓冲液配制。

2.2 种藻采集季节及其处理

表 1 的种藻是 2 月至 5 月采集的,表 2 的种藻是在 6 月 29 日采集的,试验在 7 月和 8 月进行,因为种藻在自然界经过低温逐渐转向高温过程,利用这样的材料酶解,即使酶效好,估计也会有不同的结果。材料内在因素对酶解原生质体获得率以及原生质体质量是重要因素,这在高等植物的研究中已有定论,表 3 中(2)的材料与表 2 中的是同一来源,加之在 6 月 29

日采集种藻经室内培养到 8 月 20 日进行, 在海螺酶、纤维素酶加大浓度后才获得一定量的原生质体, 其原因与表 2 是一样的。

表 2 第 II 批酶酶解试验

Table 2 Isolation results of enzyme group II

次数	材料培养 天数(天)	组别	酶液组成及浓度(%)			pH	酶解时间 (小时)	酶解结果	备注
			海螺酶	纤维素酶	蜗牛酶				
1	4	1	0.7	1.0	0.5	6.20	4.0	碎片多, 有 7~8 个细胞	酶解材料均为
		2	0.7	1.0		6.20		碎片多, 有 7~8 个细胞	6 月 29 日采集,
		3	0.7	1.0	0.5	6.50		碎片多, 有 7~8 个细胞	No. 6 酶溶剂为
		4	0.7	1.0		6.70		碎片多, 有 7~8 个细胞	0.7 mol/L 甘露醇,
		5	0.7	1.0		5.70		碎片多, 有 7~8 个细胞	其余为 0.8 mol/L
		6	3.0	0.5		5.80		碎片多, 有 7~8 个细胞	NaCl
2	8	1	1.0	1.0		5.80	4.1	有细胞	酶溶剂为
		2	1.0	1.0		6.20		有少量皮层和髓部细胞	0.8 mol/L NaCl,
		3	1.0	1.0		5.70		大量髓部和皮层细胞	酶解温度为
		4	1.0	1.0		6.20		有少量皮层及髓部细胞	26℃
		5	3.0	1.0		6.20		无细胞	
3	13	1	1.0	1.0		5.70	6.0	有少量髓部和表皮细胞	酶溶剂为
		2	1.0	1.0		5.30		有髓部和皮层细胞	0.8 mol/L NaCl,
		3	1.0	1.0		5.50		有较多髓部和表皮细胞	酶解温度为
		4	1.0	1.0		5.70		有少量髓部和皮层细胞	26℃
		5	1.0	1.0		5.90		有少量细胞出现	
		6	1.0	1.0		6.10		偶尔见单个细胞	
		7	1.0	1.0		6.25		偶尔见数个细胞	
4	25	1	1.0	1.0		6.24	5.5	有少量原生质体出现	
		2	1.0	1.0		6.10		有少量细胞或原生质体	
		3	2.0	1.5		6.24		有单个髓部和表皮层细胞	No. 1~6 为黑暗
		4	3.0	1.5		6.47		有单个髓部和表皮层细胞	48 小时后酶解
		5	3.0	2.5		6.24		有单个髓部和表皮层细胞	No. 7 为冷冻材料
		6	3.0	1.5		6.47		有单个髓部和表皮层细胞	
		7	1.0	1.0		6.47		有单个髓部和表皮层细胞	

表 3 第 III 批酶酶解试验

Table 3 Isolation results of enzyme group III

组别	酶液组成及浓度(%)					pH	酶解情况	备注
	海螺酶	鲍鱼酶	纤维素酶	果胶酶	离析酶			
(1)	1	2	4	2		6.0	酶解 5 小时后藻体	酶解温度为 28℃,
	2	2	6	2		6.0	组织未软化, 未见	酶溶剂为 0.8 mol/L
	3		4	2		6.0	细胞或原生质体	NaCl; 种藻为 3. 31
	4		2	6	2	6.0	出现	采集, 4. 22 试验
(2)	1	1	1	1	1	6.0	酶解 4 小时后, No. 4 和	种藻为 6. 29 采集,
	2	2	2	1	1	6.0	No. 5 出现较多细胞或原	8. 20 试验; 其余
	3	2	4	1	1	6.0	生质体, No. 2 和 No. 3 有	条件同上
	4	2	2	1	1	5.4	少量, 而 No. 1 只有数个	
	5	2	4	1	1	5.4		

2.3 酶解温度

在 20、22、24 和 26℃ 4 种温度下酶解, 选用质量好的海螺酶为主要酶, 酶解羊栖菜顶端部分需要的温度为 20~ 26℃, 时间从 2 小时到 6 小时, 以 3~ 4 小时为最适时间, 表中仅一次是 8.3 小时, 这是人为的延长, 不应计算在内, 从温度看, 我们认为 22℃ 是最适温度。

表 4 酶解温度与酶解时间的关系

Table 4 Relationship between temperature and time of enzymolysis

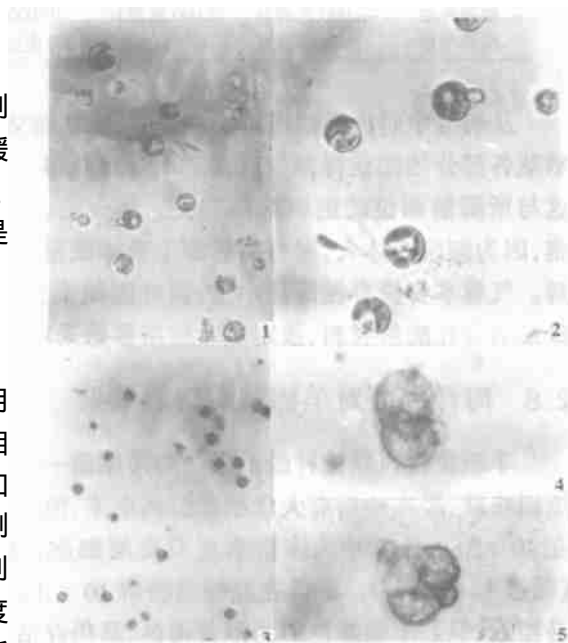
序号	酶解温度(℃)	起 止 时 间	所需时间(小时)	取材部位
1	20	10:30~ 13:30	3.0	顶端
2	22	9:30~ 13:20	3.3	顶端
3	22	8:35~ 12:05	3.5	顶端
4	22	8:55~ 12:45	3.8	顶端
5	22	9:00~ 12:30	3.5	顶端
6	24	9:00~ 13:00	4.0	顶端
7	24	8:45~ 14:45	5.0	顶端
8	24	8:45~ 13:45	4.0	顶端
9	24	8:55~ 13:10	4.3	顶端
10	24	9:15~ 15:25	6.0	顶端
11	24	8:40~ 13:10	4.5	顶端
12	26	22:40~ 次日 7:00	8.3	顶端
13	26	10:20~ 12:50	2.5	顶端
14	26	10:25~ 13:45	3.0	顶端
15	26	9:40~ 12:10	2.5	顶端
16	26	11:40~ 15:10	3.5	顶端

2.4 酶溶剂

由表 1、2、3 所列, 所用的最适酶溶剂为 0.7 或 0.8mol/L NaCl, 用 pH 6.5 的缓冲液配成, 经过多次试验都获得原生质体, 在表 1 中有的还能够分裂, 说明酶溶剂是合适的(图版 1~ 1, 2, 3, 4, 5)。

2.5 酶的配比

从表 1 和表 2 可以看出, 多数组是用 0.7%~ 1% 的海螺酶和 1% 的纤维素酶相配比进行酶解的, 其效果较为明显, 但是如果海螺酶质量比较差就需要增加浓度, 例如表 3 中的(2)组, 海螺酶就需要增加到 2%, 而表 3 中的(1)组, 因纤维素酶的浓度太高, 加上 No. 3 和 No. 4 缺少海螺酶, 所以酶解失败。而在第(2)组中 No. 1~ 5 中都有海螺酶, 情况就要好得多。从三个表来看, 只要海螺酶有酶效, 只需 0.7%~ 1% 的



图版 1 Plate 1

1~ 3: 第 I 批酶解所得的羊栖菜原生质体;

4: 细胞 2 分裂; 5: 6 个细胞的细胞团。

海螺酶和 1% 纤维素酶即可达到酶解的效果,果胶酶和离析酶基本上可以不用。

2.6 pH 与酶解的关系

pH 值的合适与否对酶解的作用很大,酶液在配制时一般是偏酸性的,至于酸性的程度则根据藻体而异。表 1 所示的各组 pH 基本保持在 5.7~ 5.8。表 2 中各组 pH 基本保持在 5.7~ 5.8。表 3 中的各组 pH 值基本保持在 5.8~ 6.5 之间,酶解效果不如表 1 所列,其主要原因是海螺酶的质量不如第 1 批,及种藻的内在因素(2.1 中已述及)。

2.7 种藻不同部位与酶解的关系

本试验材料基本采用藻体顶端 0.5cm 幼嫩部分,经过适当的条件酶解均能获得原生质体,但在表 1 的(6)中用叶片基部进行酶解,结果没有获得原生质体,在(7)中材料是 6~ 13cm 处的茎经酶解 5 小时,原生质体很少。根据第 1 批海螺酶酶解不同部位藻体的结果列入表 5。

表 5 羊栖菜不同部位酶解情况

Table 5 Isolation results of different parts of thalli

部 位	假 根	茎	气 囊	基 叶	顶 叶	备 注
酶溶剂	0.8mol/LNaCl	0.8mol/LNaCl	0.8mol/LNaCl	0.8mol/LNaCl	0.8mol/LNaCl	各取 0.2 克材料
酶液	0.7% 海螺酶 1% 纤维素酶	0.7% 海螺酶 1% 纤维素酶				酶液 2mL
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	
酶解时间	3.5 小时	3.5 小时	3.5 小时	3.5 小时	3.5 小时	
酶解温度	26℃	26℃	26℃	26℃	26℃	
检查原生质体个数	5 000 大部分为髓部细胞	2 000 髓部和皮层细胞	10 000 表皮与皮层细胞	2 500 皮层和髓部细胞	4 000 表皮和皮层细胞	

从表 5 中看出只要海螺酶质量好、酶液浓度合适以及其它条件如温度、pH 等都恰当时,羊栖菜各部分均能获得原生质体。不过所获得的原生质体在数量和细胞层次上有很大的区别,这与所酶解部位的组织结构有关。如假根、茎、基叶三部分酶解后大多为髓部细胞和表皮细胞,因为细胞个体大,材料出的原生质体数量就少,另外,还说明这三部分的表皮细胞特别难酶解。气囊本身没有髓部且中空,顶叶因幼嫩,酶解比较容易,所获得的细胞最多,说明这两部分最适合作酶解材料,故本试验材料多数采用藻体顶端幼嫩部分。

2.8 海洋细菌对羊栖菜酶解的结果

羊栖菜材料在接种经扩培的海洋细菌一周后,材料开始软化,颜色略变黑褐色,镜检发现组织松软,经压片后有大量细胞游离出来,游离细胞颜色为淡黄或黄褐色,个体有大有小,直径在 10~ 20 μm ,其中大多数表皮及皮层细胞,具有明显的卵圆形色素体,分布在细胞膜周围(图版 II- 4, 5, 6)。藻体在经细菌酶解 10~ 14 天后,细胞间的间质已大多被分解,组织块很容易松散,但是细胞颜色多为深黄褐色,虽仍存活,活力已下降,经培养一段时间后即枯萎死亡。

笔者还将已被细菌分解了 4~ 5 天的藻体切碎,加入一定量的商品酶进行酶解,结果各组藻体在酶解 2~ 3 小时后,除出现多数的细胞外,还有少量原生质体,其中以第(4)组最多(表 6)。

表 6 经细菌酶解后的藻体再经海螺酶等酶解的结果

Table 6 Isolation results of thalli affected by bacteria and sea snail enzyme

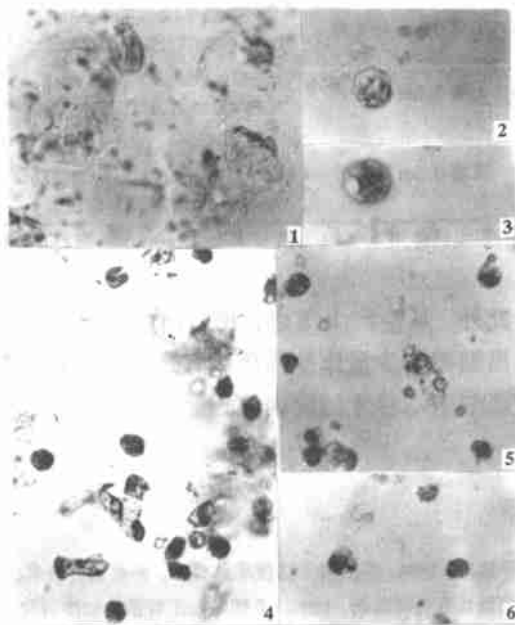
组别	1	2	3	4
海螺酶含量	1%	2%	2%	2%
纤维素酶含量	1%	2%	4%	2%
果胶酶含量	1%	1%	1%	1%
离析酶含量	1%	1%	1%	1%
pH	6.0	6.0	6.0	5.4
酶解结果	+++	+++	+++	++++

注: +++ 表示具有较多细胞和原生质体; ++++ 表示有大量的细胞和原生质体。

2.9 原生质体和细胞的培养

在原生质体培养时,成活与否或以后能否分化发育成株涉及的条件比原生质体分离更加复杂。现将培养后较好的例子列入表 7。其余各组虽都获得原生质体,但均未分裂即死亡。

从表 7 中看出,分离的原生质体在只用 PESI 培养液,温度为 20℃ 的条件下细胞很快死亡。No. 2 将培养剂增加 1% NaCl+ 4mmol/L NaHCO₃,光照改为 800lx,温度为 20℃,培养 20 天有活细胞,但是没有分裂, No. 3 和 No. 4 两组均在培养 6 天后即发现有分裂成 6 个细胞的。最快的几组为 No. 6 和 No. 7,在第 3 天后即 2 分裂(图版 I-4)。事实说明培养基的影响很大,而且与原材料等内在因素也有关系。表 7 中除 No. 1 外, No. 2~ No. 7 所用的培养基都适用于培养羊栖菜原生质体。



图版 II Plate II

- 1: 第 II 批酶酶解所得的髓部原生质体;
2: 第 II 批酶酶解所得的皮层原生质体;
3~ 6: 由细菌分离得到的原生质体或细胞。

3 讨论

虽然试验获得了原生质体,并且进行了小型培养,但因纯化条件掌握不够,导致原生质体获得量还不多。另外,对原生质体培养的条件还没有完全了解,这就影响了原生质体的分化发育。虽然如此,我们在羊栖菜原生质体分离上所作的关键性基础工作对原生质体培养是十分重要的,它们主要是:(1)海螺酶质量的作用及效果(见 2.1);(2)种藻的问题(见 2.2);(3)酶解的温度条件(见 2.3)、酶溶剂(见 2.4)、酶和酶配比(见 2.5)、pH 值(见 2.6);(4)藻体部位与酶解的关系;(5)原生质体培养的条件等几个方面。

表 7 羊栖菜原生质体培养试验

Table 7 Culture results of *Sargassum fusiforme* protoplasts

组别	材料(部位)	培养条件	培养情况
1	顶端 0.5m 处叶片	PESI、20℃、12L 12D、2 000lx	第三天未发现活细胞
2	顶端 0.5m 处叶片	PESI+ 1% NaCl+ 4m mol/L NaHCO ₃ 20℃、12L 12D、800lx	3. 20~ 3. 23(3 天) 大部分细胞死亡, 少数活的 颜色正常未分裂; 4. 10 有未分裂的活细胞
3	顶端 0.5m 处叶片	PESI+ 1% NaCl+ 4m mol/L NaHCO ₃ 20℃、12L 12D、800lx	3. 23 检查大部分死亡, 少数成活但未分裂; 3. 27 有的出芽, 有的形成 3 或 4 个细胞愈伤组织
4	顶端 0.5m 处叶片	PESI+ 1% NaCl+ 4m mol/L NaHCO ₃ 20℃、12L 12D、800lx	3 天后有的长出突出或呈出芽状, 4. 1 有的已分裂成 2 或 4 细胞
5	顶端 0.5m 处叶片	PESI+ 1% NaCl+ 4m mol/L NaHCO ₃ 20℃、12L 12D、800lx	4. 14 有大量的活细胞单未分裂
6	顶端 0.5m 处叶片	PESI+ 1% NaCl+ 4m mol/L NaHCO ₃ 20℃、12L 12D、800lx	5. 15 发现分裂成 6 个细胞有细胞团; 5. 25 细胞死亡
7	顶端 0.5m 处叶片	0. 2 mol/L NaCl+ PESI, 有的还加 羊栖菜提取液(2g 藻体加 20mL 加盐 PESI 研磨后分离得到)	3. 4 大量细胞存活 3. 8 多数为单细胞亦有少量 2 分裂

注: 原生质体用 0. 9m ol/L 蔗糖离心, 1 000r/ min, 离心 3 分钟, 清洗三次后进行培养。

此外, 从生产上考虑, 我们还用自己培养的海洋细菌酶解羊栖菜, 也取得了一定的效果, 分离出细胞和少量原生质体, 海螺酶不仅价格昂贵而且来源日渐短缺, 只有解决了酶的问题, 羊栖菜细胞培养才能面向生产。

参 考 文 献

- [1] 孙建璋, 1994. 羊栖菜生物技术及养殖. 海藻生物技术(王素娟主编), 125~ 132. 上海科技出版社.
- [2] 荣城县石岛育苗场, 1988. 羊栖菜人工育苗的初步研究. 海洋湖沼通报, 2: 82~ 85.
- [3] 曾呈奎等, 1962. 中国经济海藻志, 84~ 86. 科学出版社(京).
- [4] Butler D. M., et al., 1989. Isolation conditions for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). *Journal of Experimental Botany*, 40: 1237~ 1246.
- [5] Fisher D. D., & A. Gibor, 1987. Production of protoplasts from the brown alga, *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phaeophyta). *Phycologia*, 26: 488~ 495.
- [6] Kloareg K., J. et al., 1993. A novel method for extracting protoplasts from large brown algae. *Journal of Experimental Botany*, 44: 1587~ 1593.
- [7] Kloareg B., & R. S. Quatrano, 1987. Isolation of protoplasts from zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell (Phaeophyta). *Plant science*, 50: 189~ 194.
- [8] Kloareg B., et al., 1989. Mass production of viable protoplasts from *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. (Phaeophyta). *Plant Science*, 62: 105~ 112.
- [9] Mejjad M., et al., 1992. Protoplast isolation, development, and regeneration in different strains of *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm. (Phaeophyceae). *Protoplasma*, 169: 42~ 48.
- [10] Saga N., et al., 1986. Protoplasts from seaweeds: Production and fusion. *Böh. Nova Hedwegia*, 83: 37~ 43.
- [11] Saga N., & Y. Sakai, 1984. Isolation of protoplasts from *Laminaria* and *Porphyra*. *Bulletin of the Japanese Scientific Fisheries*, 50: 1085.
- [12] Wu. S., 1988. Isolation and culture of protoplasts from *Undaria pinnatifida* (Harv.) Suringar. *Jour. Ocean. Univ. Qingdao*, 18: 57~ 65.

THE ISOLATION AND CULTURE OF PROTOPLASTS FROM *SARGASSUM FUSIFORME* (PHAEOPHYTA, SARGASSACEAE)

Wang Sujuan, Sun Y unlong¹, Ma Lingbo and He Peimin

(Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

(China Polar Region Institute, Shanghai 200129)¹

ABSTRACT Protoplasts from one species of brown alga *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setchell had been obtained with the application of wall degrading enzymes. The internal factors and external conditions of the isolation of protoplasts, such as kinds and concentrations of osmoregulated reagent, kinds and combinations of enzymes, isolated temperature and pH, time of material collections and part of thallus, are defined now. Having been cultured for 3 days, some protoplasts regenerated cell-walls and divided into two cells. Six-cell callus-like cell-mass was also obtained after being cultured for 6 days. These results are good basis for further culture in large scale. The application of marine bacteria on isolating vegetative cells of these alga is reported in this paper.

KEYWORDS *Sargassum fusiforme*, Protoplast, Isolation, Culture

1997 年度《中国水产文摘》征订启事

本刊系我国水产系统唯一的一本全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊,由中国水产科学研究院渔业综合信息研究中心主办。其宗旨是全面、及时地报道全国以各种形式出版的水产科技文献,为读者快速、方便地检索国内水产科技文献服务。本刊为全国优秀水产刊物,并获得全国科技文献检索期刊二等奖一次,全国科技文献检索期刊三等奖两次。

本刊所收录的文献类型有期刊、专著、汇编、会议记录、技术报告、技术标准等。按以下类目编排:(1)水产总论;(2)水产基础科学;(3)水产资源和环境保护;(4)水产捕捞;(5)海水养殖;(6)淡水养殖;(7)水产生物病害及防治;(8)饲料和肥料;(9)水产品保鲜及加工;(10)渔业机械仪器和渔船;(11)渔业经济。年报道量约 3 000 条。每年第一期刊登本刊引用主要期刊一览表,年终编辑出版本年度主题索引、著者索引。

本刊为双月刊,逢双月底出版,国内外公开发行。每期定价 8.00 元,全年 6 期共 48.00 元,邮发代号:18-126。请广大老订户和新读者及时到当地邮局办理订阅手续。如在当地邮局订阅不方便,也可向本刊办理邮购。

编辑部地址:北京市永定路南青塔村 150 号;邮编:100039;联系电话:68214442-260。