

文章编号: 1000-0615(2004)01-0062-06

礁膜原生质体的分离及培养

谢恩义, 马家海

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 为了开发礁膜人工育苗的新技术, 以4%果胶酶和2%纤维素酶的甘露醇溶液, 分离酶解经无菌处理的礁膜叶状体, 在 $40\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$, $0.7\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, pH 5.5, 温度 28°C , 摇床速度 $50\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 旋转振荡3h的条件下, 1.0g湿重礁膜可获原生质体约 2×10^6 个。原生质体分离后依次用比重为1.030、1.026、1.022的消毒海水(添加N、P、 Fe^{2+} 、IAA、KB、Vit C)培养, 2d后已形成明显的再生细胞壁, 3~4d后细胞开始分裂, 8d后形成由4~8个细胞组成的细胞团, 以后原生质有不同的发育形态, 较常见的是形成由一共同胶质膜包被的类似亲本的叶状体组织块, 另一种是原生质体形成孢子囊, 成熟后, 可产生许多游动孢子, 再由游动孢子发育成正常形态的膜状配子体, 第三种发育形态为偏离亲本正常形态的管状体。

关键词: 礁膜; 原生质体; 酶解; 分离; 培养

中图分类号: Q942.5 **文献标识码:** A

Isolation and cultivation of protoplasts of *Monostroma nitidum* (Chlorophyta, Monostromaceae)

XIE En-yi, MA Jia-hai

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In order to develop a new cultivation technology of *Monostroma nitidum* Witttr, this study was to isolate and cultivate the protoplasts of this green alga. Protoplasts of the alga were isolated by enzymatic degradation from the thallus. The optimization of isolation conditions was carried out in this experiment. The result showed that the optimized parameters were 4% pectinase, 2% cellulase, $0.7\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mannitol, $40\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$, pH 5.5, 28°C and $50\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ shaker speed for 3 hours, with a yield of 2×10^6 spherical, green viable protoplasts per gram of fresh thallus. Purified protoplasts were cultured in autoclaved seawater medium supplemented with N, P, Fe^{2+} , IAA, KB, and Vit C, and the specific gravity of the medium gradually decreased from 1.030 to 1.026 and 1.022 in turn in early culture. Protoplasts usually began to form new cell wall within two days after isolation and began to divide from day 3 to day 4 in medium. 4 to 8 cell clusters were formed after 8 days. Even when regeneration under uniform conditions, protoplasts followed three different developmental patterns. Usually, protoplasts underwent repeated cell divisions and developed directly to a monostromatic thallus cell clusters where the cell number was different and all cells wrap by a common gelatine. Some protoplasts formed a cell wall and then developed into sporangia. After sporangia matured, they liberated

收稿日期: 2003-01-20

资助项目: 浙江省科委科技兴海专项项目(200204)

作者简介: 谢恩义(1966-), 男, 湖南邵阳人, 副教授, 在职博士生, 从事水产增殖及生物技术研究。E-mail: xienyi@sohu.com

通讯作者: 马家海(1940-), 男, 教授, 博导, 从事水产植物种苗工程及增殖研究。E-mail: mjh25@sh163.net

zoospores that settled and grew into thallus similar to the parent thallus in successive cultures. The third developmental patterns was to form tubular thallus which is different from the parent thallus.

Key words: *Monostroma nitidum*; protoplast; enzymolysis; isolation; cultivation

礁膜 (*Monostroma nitidum* Wittr.) 是一种分布很广的海洋经济绿藻。在日本礁膜已进行商业化栽培以供食用, 在我国的浙江、福建、台湾早有食用礁膜的习惯, 但迄今为止, 我国仍没有进行礁膜栽培。作者在探索礁膜人工育苗栽培技术的同时, 为了缩短育苗周期, 保证有足够的栽培种苗供应, 有必要开发出一套新的礁膜育苗技术。据此, 本文进行了礁膜的原生质体的分离与培养, 以期利用无性繁殖这一新的快速育苗技术, 为大规模栽培礁膜随时提供种苗。

迄今为止, 许多大型底栖海藻的原生质体的分离与培养已进行了研究, 但只有少数几种能再生成完整的植株, 对礁膜属 (*Monostroma*) 进行过原生质体的分离与培养的种类有宽礁膜 (*M. latissimum* Wittr.)^[1]、袋礁膜 (*M. angicava* Kjellm)^[2]、尖种礁膜 (*M. oxyspermum* Doty)^[3]、礁膜 (*M. nitidum* Wittr.)^[4] 等, 但这些种类的原生质体都没有直接发育成在生产育苗上有一般植株, 本研究旨在探索一种新的育苗技术。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 1~3 cm 的幼嫩藻体作为酶解材料, 采集时间是 2001 年 12 月 30 日, 材料采集后, 阴干至含水量为 30% 左右, 用放有冰袋的保温箱带回实验室, 保存于 -20℃ 的冰箱内待用。

1.2 方法

无菌藻体的获得 从 -20℃ 的冰箱内取出藻体, 用毛笔在消毒海水中洗刷藻体 2 次, 置于过滤的消毒海水中培养 4~5d, 使藻体复苏。取一定量的藻体放入 1% KI-I₂ 溶液中洗涤 5min, 再用过滤消毒海水漂洗 2~3 次, 以去除原生动物和附生生物。最后转移于 100mL 添加了 N 和 P (硝酸钠: 甘油磷酸钠 = 10 × 10⁻⁶: 3 × 10⁻⁶) 以及 6mL 的广谱抗生素混合液 (1g 氨基青霉素, 1g 硫酸卡那霉素, 25mg 制霉菌素, 0.2g 硫酸新霉素, 混合溶于 100mL 双蒸水中) 的消毒海水 (比重 1.027) 中, 在 17℃、光强 64.10 μmol·m⁻²·s⁻¹、光时 12L:12D 的条件下培养 6h。

酶液的配制 通过比较不同配比的酶液的酶解效果 (表 1), 最佳酶解液的配制为 4% 果胶酶, 2% 纤维素酶, 40mmol·L⁻¹CaCl₂, 0.7mol·L⁻¹甘露醇, pH 5.5。首先把酶粉溶解在 pH 为 5.5 的 Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄ 缓冲液 (4℃) 配制的 10mL 0.7mol·L⁻¹甘露醇溶液中 (内含 40mmol·L⁻¹CaCl₂)。随后酶液用冷冻离心机 (0~5℃) 10 000 × g 离心 10min, 以便去除不溶物。酶液分装在 5 mL 小瓶中, 保存于 -20℃ 的冰箱内待用。

原生质体的分离 将消毒过的藻体以过滤消毒海水清洗 3 次后, 在超净工作台上用干净的刀片把叶片部分切成 0.5~1 mm², 或把无菌藻体投入消毒过的组织捣碎机中捣碎, 用 60 网目筛绢过滤, 并用过滤消毒海水冲洗数次, 由此得到许多大小不一的微细组织块。称取 0.1g 藻体碎片放入内有 5mL 消毒酶解液的培养瓶 (25mL) 或培养皿 (直径 6cm) 中, 置于 50r·min⁻¹ 摇床中酶解 3h, 此原生质体的分离过程在黑暗中进行, 以促使藻体细胞壁易于破裂, 使原生质体酶解出来, 酶解温度为 28℃。经过酶解后, 将含有原生质体的酶解液过滤。将所得过滤液离心后, 倒去 3/4 上悬液, 以相同体积的过滤消毒海水补充, 此过程重复 2 次。镜检 (20 × 10) 时取 5 个视野计数, 取平均值。

原生质体的培养 将纯化的原生质体依次培养于不同比重 (1.030、1.026、1.022) 的过滤消毒海水中 (添加 N:P = 10 × 10⁻⁶: 3 × 10⁻⁶, Fe²⁺ 10 × 10⁻⁶, IAA 0.01 × 10⁻⁶, KBO 0.05 × 10⁻⁶, Vit C100 × 10⁻⁶, pH 7.9), 静止或冲气培养。原生质体在 128.21 μmol·m⁻²·s⁻¹、12L:12D 和 17℃ 下培养, 每个培养瓶或培养皿内装 5mL 培养液, 培养的原生质体密度为 4 × 10³ ~ 24 × 10³·cm⁻²。培养液每 10d 更换一次。培养第 4d 随机计数再生率。

2 结果

2.1 原生质体的酶解

礁膜配子体细胞表面观为多角形或椭圆形, 有两两成对现象, 细胞大小为 7.5~10 μm × 8.75~17.5 μm (图版 -1)。酶解后的原生质体呈圆形

或椭圆形,大小为 $10 \sim 10.5 \mu\text{m} \times 10 \sim 12.5 \mu\text{m}$, 黄绿色块状的叶绿体位于原生质体一侧, 占据整个

原生质体的大部分体积(图版-2)。原生质体酶解条件的优化实验如表1所示。

表1 不同酶解条件下对礁膜原生质体的酶解效果

Tab.1 Effect of different conditions of enzymatic degradation on protoplast yield

编号 number	果胶酶 (%) pectinase	纤维素酶 (%) cellulase	CaCl ₂ (mmol·L ⁻¹)	酶溶剂 (mol·L ⁻¹) enzyme solvent	pH	酶解温度 (℃) temperature	酶解时间 (h) incubation period	原生质体数 (个/视野) protoplast yield
0	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	112
0	4	2	40	0.7山梨醇 0.7sorbitol	5.5	28	3	92
0	4	2	40	1.4蔗糖 1.4sucrose	5.5	28	3	85
0	4	2	40	1.4葡萄糖 1.4glucose	5.5	28	3	83
I	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	112
I	2	4	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	46
I	3	3	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	60
I	4		40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	37
I		4	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	2
II	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5	28	3	103
II	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	112
II	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	6	28	3	83
II	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	6.5	28	3	75
III	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	24	3	78
III	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	26	3	85
III	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	112
III	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	32	3	120
IV	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	1	9
IV	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	2	43
IV	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	3	112
IV	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	4	110
V	4	2	40	0.5甘露醇 0.5mannitol	5.5	28	4	87
V	4	2	40	0.7甘露醇 0.7mannitol	5.5	28	4	112
V	4	2	40	0.9甘露醇 0.9mannitol	5.5	28	4	100
V	4	2	40	1.1甘露醇 1.1mannitol	5.5	28	4	92

由上表可以得出礁膜的原生质体的最佳酶解条件为:4%果胶酶,2%纤维素酶,40mmol·L⁻¹CaCl₂,0.7mol·L⁻¹甘露醇,pH 5.5。0组表明,不同的酶溶剂对原生质体的得率不一样,0.7mol·L⁻¹的甘露醇作酶溶剂酶解效果最佳,0.7mol·L⁻¹的山梨醇和1.4mol·L⁻¹的蔗糖酶解效果相近。I组表明,单用一种酶的酶解效果不及两种酶混合使用的效果好,最佳酶液配置为4%果胶酶和2%纤维素酶。II组表明,礁膜原生质体酶解时的pH值以偏酸性为好,因在酸性条件下组织块易于软化,同时纤维素酶和果胶酶在pH 5.5左右时活性较高。III组表明,酶解温度以28℃为佳,虽然28℃和32℃酶解条件下所获原生质体数目相近,但28℃原生质体再生率为90%,32℃

原生质体再生率只有32%。IV组说明酶解时间以3h为好,在3h内,所获得的原生质体数量与酶解时间成正比,酶解4h与酶解3h所获原生质体数量差不多。如果酶解时间超过6h,则不能获得有活性的原生质体。V组表明,0.5~1.1mol·L⁻¹甘露醇作酶溶剂,均能获得较多的原生质体,以0.7mol·L⁻¹甘露醇所获原生质体数量最多。

2.2 原生质体的培养与发育

原生质体培养初期光照强度 $6.41 \sim 24.03 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 细胞分裂后光照强度增至 $32.05 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上。培养后的第2天已有明显的再生细胞壁(图版-3),第3~4天进行第一次分裂(图版-4),第6天,原生质体形成的细胞已分裂为4细胞(图版-5),第8天,有的已分裂为8

细胞(图版-6),以后静止培养和充气培养均有3种发育方式,一种方式是少部分原生质体再生细胞壁后进行重复的有丝分裂,形成有一公共胶质膜包被的类似亲本的叶状体组织块(图版-7)。第二种发育方式是大部分原生质体再生细胞壁后发育成孢子囊(图版-8~10),孢子囊能以二分裂进行增殖,使孢子囊密度加大。孢子囊在8月份移出培养箱,在常温下进行变温培养,10月份孢子囊成熟(图版-11),可放散出16~32个四鞭毛的游孢子(图版-12),把游孢子附于筛绢上冲气培养,则可发育成正常形态的叶状体(图版-13~14)。第3种发育方式是原生质体形成的细胞先行有丝分裂,形成细胞排列紧密的细胞团,然后细胞团里的一部分发育成假根,另一部分则发育成管状体(图版-15~16)。

3 讨论

3.1 酶解材料的无菌处理

对大型海藻无菌酶解材料的获得有许多方法^[5-7],本实验利用1% KI-I₂液和广谱抗生素混合液先后处理藻体也取得很好的效果。在原生质培养的初期,无菌条件对原生质的快速再生是必不可少的,因抑制微生物生长的抗生素也能抑制原生质体的再生分裂,因此准备好酶解用的无菌材料是本实验非常重要的一个环节。

3.2 酶液的配制

绿藻的细胞壁组份中,外层为一层果胶质,内层纤维素占很大比例。礁膜叶状体组织细胞的上下表面有一层胶质公共膜,使两两成对的细胞粘连成一个整体。原生质酶解时,果胶酶首先需要对公共胶质膜溶解碎裂,然后才对组织细胞的细胞壁果胶层进行酶促溶化,纤维素酶的作用是使细胞壁的纤维层酶解掉。两种酶混合使用的酶解效果比单一酶的酶解效果要好,故选择纤维素酶和果胶酶的混合酶液进行礁膜原生质体的酶解。陈衍昌等^[1]、张大力^[2]对宽礁膜、袋礁膜以及G. R. Krishnakumar等^[3]对尖峰礁膜的酶溶剂配制分别为2%果胶酶混合4%纤维素酶和单用3%纤维素酶,作者对礁膜酶解条件进行优化时,得出最佳酶液配制为:4%果胶酶混合2%纤维素酶。另外采用组织捣碎机可以将酶解用的组织块彻底打碎,使酶解更为容易,在酶解前对培养的礁膜材料黑暗处理一昼夜,可使细胞壁软化,更易于细胞壁

的酶解。

3.3 酶解温度

关于酶解温度,张大力^[2]对袋礁膜得出的最佳酶解温度为33℃,在33℃以下原生质体成活率随着温度的升高而升高。作者得出的最佳酶解温度为28℃,在24~32℃下,温度高,酶的活性大,分离出的原生质体数目多,但在32℃,原生质体再生率只有32%,说明32℃的高温对原生质体有一定的损害,28℃和32℃酶解条件下所获取原生质体数目相近,但28℃原生质体再生率为90%,原生质体质量好,故酶解温度以28℃为佳,作者认为33℃的高温已超过了原生质体的耐受范围。

3.4 原生质体的发育方式

本文首次报道在同一培养条件下礁膜原生质体可表现出3种不同的发育方式,已有文献^[1-4,8-10]只报道过1种或2种发育方式。原生质体直接发育成叶状体组织块,或形成孢子囊,或形成管状体的发育方式在石莼属^[4,8-9]、浒苔属^[10]、礁膜属^[1-3]中也有报导,这在一定程度上反映了这3个属在进化过程中的演化关系^[11],也在一定程度上体现了生物的重演律。礁膜的这种不同的发育方式,可能和原生质体原先在组织中的位置、培养条件(温度、光照等)以及培养环境中的某些未知因素有关。第一种发育方式对生产育苗最为直接、有利;第二种发育方式与传统的发育方式同样繁琐,但这种发育方式形成的孢子囊,在育种上有一定价值。另外这种发育方式可以用来保存种苗,这也是区别于传统育苗方式的一种新的方法;第三种发育方式偏离了亲本的正常形态,应加以抑制或诱导转化。今后应加强影响原生质体分化、发育方向因子的研究,使原生质体培养朝着选定的方向发育。

参考文献:

- [1] Chen Y C. Development of protoplasts from holdfasts and vegetative thalli of *Monostroma latissimum* (Chlorophyta, Monostromaceae) for algal seed stock [J]. *J Phycol*, 1998, 34: 1075 - 1081.
- [2] Zhang D L. Formation, cultivation and fusion of protoplasts of two green alga (*Ulva linza* L and *Monostroma angicava* Kjellm) [J]. *Journal of Shangdong College of Oceanology*, 1983, 13 (1): 57 - 65. [张大力. 两种绿藻——长石莼和袋礁膜原生质体的制备、培养和融合的研究 [J]. *山东海洋学院学报*, 1983, 13(1): 57 - 65.]
- [3] Krishnakumar G R, Addepalli M K, Reddy C R K. Regeneration

- of the thallus of *Monostroma oxyspermum* (Chlorophyta) from protoplasts in axenic culture[J]. *Phycologia*, 1999, 38: 503 - 507.
- [4] Fujita Y, Migita S. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds[J]. *Bulletin of Faculty of Fisheries, Nagasaki University*, 1985, 57: 39 - 45.
- [5] Gibor A, Polne - fuller M, Biniaminov M, et al. Exploratory studies of vegetative propagation of marine algae: procedure for obtaining axenic tissue [A]. *Proceedings of the International Seaweed Symposium*[C]. 1980, 10. 587 - 593.
- [6] Polne-Fuller M, Gibor A. Tissue culture of seaweeds [A]. *Seaweed cultivation for renewable resources* [M]. Elsevier, 1987. 219 - 239.
- [7] Bradley P M, Cheney D P, Saga N. One step antibiotic discmethod for obtaining axenic cultures of multicellular marine algae [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1988, 12: 55 - 60.
- [8] Reddy C R K, Migita S, Fujita Y. Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture[J]. *Bot Mar*, 1989, 32: 483 - 490.
- [9] Chen Y C, Shih H C. Development of protoplasts of *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta) for algal seed stock[J]. *J Phycol*, 2000, 36: 1 - 7.
- [10] Reddy C R K, Fujita Y. Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture[J]. *J Appl Phycol*, 1991, 3: 265 - 275.
- [11] Christopher E T. *Chloropelta* gen nov, an ulvaceous green alga with a different type of development[J]. *J Phycol*, 1980, 16: 128 - 137.

图版说明 Explanation of Plate

1. 礁膜配子体中部细胞表面观, × 500; 2. 刚分离的原生质体, × 400; 3. 培养 2d 的细胞, × 200; 4. 2 细胞期, × 400; 5. 4 细胞期, × 400; 6. 8 细胞期, × 400; 7. 类似亲本的叶状体组织块, × 200; 8. 早期孢子囊, × 400; 9. 中期孢子囊, × 200; 10. 晚期孢子囊, × 500; 11. 成熟孢子囊, × 400; 12. 游孢子, × 400; 13. 附于筛绢上的多细胞苗, × 200; 14. 幼苗, × 40; 15. 16. 管状苗, × 200
1. Surface view of the middle part of gametophyte of *Monostroma nitidum*, × 500; 2. Protoplasts just isolated, × 400; 3. A cell with cell wall, cultured two days, × 200; 4. Two cell stage cultured four days, × 400; 5. Four cell stage cultured six days, × 400; 6. Eight cell stage cultured ten days, × 400; 7. Cell clusters similar to the parent thallus tissue, × 200; 8. Sporangia of early stage, × 400; 9. Sporangia of middle stage, × 200; 10. Sporangia of latter stage, × 500; 11. Mature sporangia, × 400; 12. Zoospores, × 400; 13. Multicellular germling adhered to the silk-bolting cloth, × 200; 14. A juvenile thallus, × 40; 15. 16. Tubular thallus, × 200

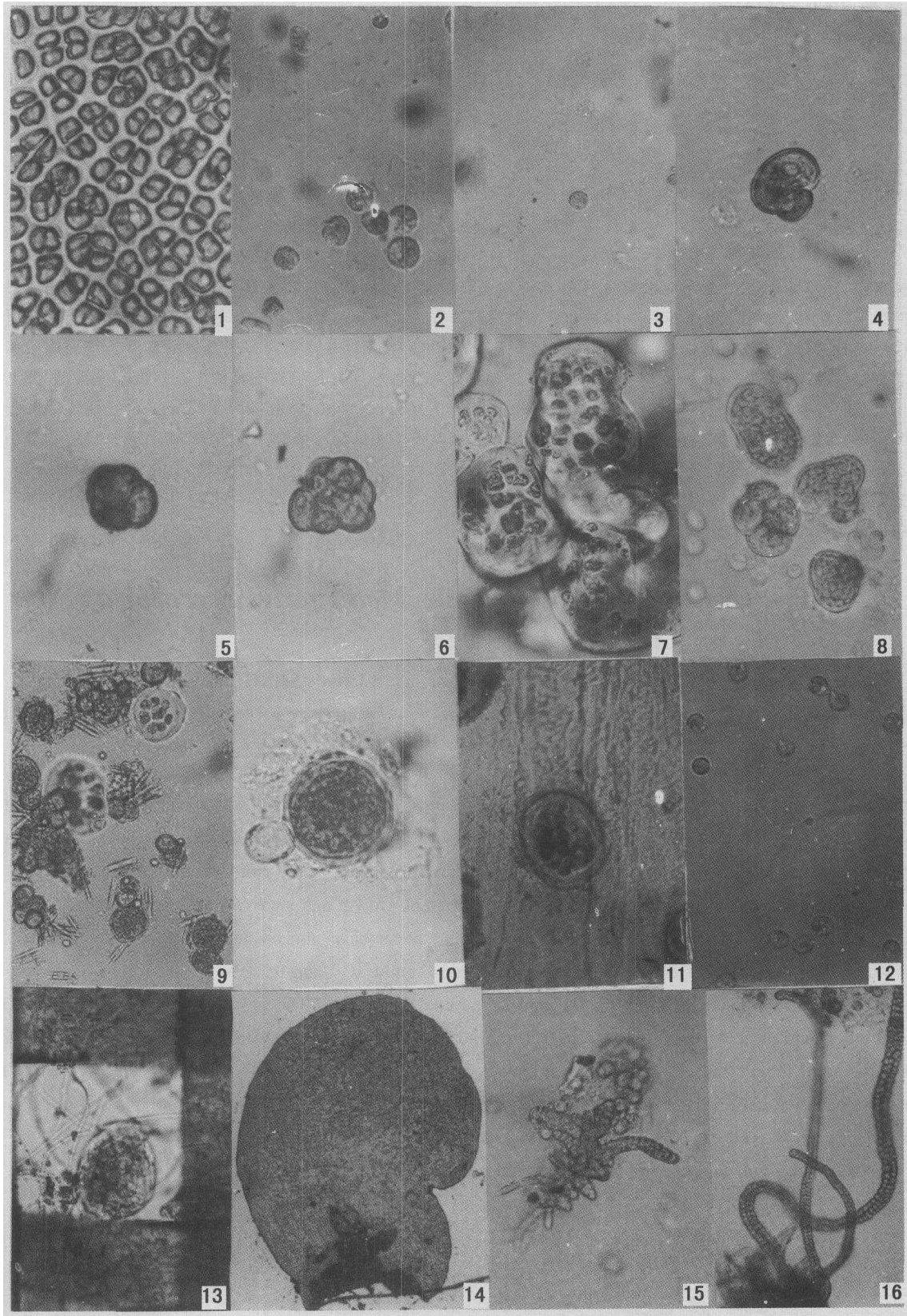


图 版 Plate