

文章编号: 1000-0615(2004)04-0407-06

## 坛紫菜体细胞单克隆叶状体途径及海上养殖

刘必谦<sup>1</sup>, 曾庆国<sup>1,2,3</sup>, 骆其君<sup>1</sup>, 杨锐<sup>1</sup>, 王亚军<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋生物工程浙江省重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**用海螺酶解坛紫菜叶状体制备游离的营养细胞,在显微镜下挑选出单个细胞放入 96 孔板,在 20℃, 1500~2000 lx, 12D:12L 条件下进行隔离培养。一部分细胞直接发育形成了叶状体;一种途径是单个细胞通过典型的两级分裂发育成叶状体,也有一些单细胞先形成叶片状的细胞团,然后在细胞团一端形成假根;另一种途径是部分单细胞先形成“愈伤组织”,经过一段时间培养后放散出类似“孢子”的细胞,其中部分“孢子”发育成叶状体。由单细胞克隆培养获得的叶状体经组织培养形成纯合丝状体,这种纯系丝状体扩大培养后转入传统的育苗途径下海养殖。纯系在苗网附着率、叶片质量和性成熟时间等经济性状方面比未经选育的普通种有优势。

**关键词:**坛紫菜;体细胞;叶状体;纯系

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A

## Cultivation of *Porphyra haitanensis* of pure lineage: thallus formation using somatic cell cloning approach and field mariculture

LIU Bi-qian<sup>1</sup>, ZENG Qing-guo<sup>1,2,3</sup>, LUO Qi-jun<sup>1</sup>, YANG Rui<sup>1</sup>, WANG Ya-jun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The release of free-living vegetative cells were successfully achieved by enzymolysis of *Porphyra haitanensis* thallus. The enzyme were extracted from snail, and the fronds were collected from field net in Xiangshan, Zhejiang Province. After enzymolysis, single somatic cells were picked out under inverted microscope and incubated in 96 microplate with L:D (12:12), light intensity of 1500-2000 lx at 20℃, the medium was refreshed after 3-5 days. The development of somatic cells was observed continuously and described as follows: the majority of the cells died except a small portion of the somatic cells which can develop into conchocelis, blade and callus. Thallus can be formed through three different ways: in the first case, the single cell can develop into thallus directly through a classical dipolar division, similar to the germination of conchospores; in the second case, blade-like cell aggregate was formed firstly and rhizoid was developed at one side of the cell aggregate, and gradually became crooked blade; in the third case, the callus-like cell group was

收稿日期: 2003-07-24

资助项目: 国家自然科学基金(49976030)和宁波市重点基金(02J20101-15)

作者简介: 刘必谦(1960-),男,湖南邵阳人,博士,副研究员,主要从事海洋生物遗传及分子生物学研究。Tel: 86-0574-87600556;

E-mail: lbqhy@nbu.edu.cn

formed and spores were released after the disintegration of the cell aggregate, some spores can germinate into blade with low survival because most of them died during the two-cell stage, while some spores can develop into conchocelis, which accords with the literature reported. The blades obtained through the single somatic cell have been further developed into conchocelis of pure lineage using tissue culture techniques. The quantity of conchocelis was multiplied using suspension culture, and further cultured just as the traditional mariculture. Comparison of *Porphyra haitanensis* thallus of pure lineage with the control group has revealed some superior qualities. In conclusion, the diploid conchocelis developed directly from the haploid blade somatic cells have genetic materials of pure lineage, and this method can guarantee the very similar genetic background for the post-generation thallus. This technology has two conceivable advantages including prevention of loss of desired economic characteristics, as well as the shortening of time compared with traditional pure lineage establishment method.

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; somatic cell; thallus; pure lineage

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国浙闽两省最主要的栽培藻类,浙江栽培坛紫菜已有30多年的历史,但一直没有较系统、全面地开展优良品种的遗传选育工作,所以近几年在浙闽两省都发生了大面积栽培坛紫菜烂菜、脱苗。其中种质退化是主要原因之一。2002年仅浙江宁波象山县,烂菜、脱苗导致栽培农户损失就达1000万元以上。研究发现坛紫菜遗传变异十分丰富,多态位点高达96.97%<sup>[1]</sup>。群体中等位基因的高度丰富,加上自然状态下的自由交配,使得群体中优良基因很难得到纯合,生产上表现为经济性状不稳定。培育具优良经济性状、又能稳定遗传的栽培坛紫菜纯系,不失为解决栽培坛紫菜烂菜、脱苗的有效方法。

近10多年来国内外研究者进行了许多紫菜体细胞培养的工作,重点在培养方法和形态发生<sup>[2-9]</sup>,也有用体细胞进行直接育苗的<sup>[7-11]</sup>。利用叶片组织可以进行纯系培育<sup>[12,13]</sup>,由于紫菜叶片是嵌合的,所以用这种方法获得纯系的周期长<sup>[13]</sup>。到目前为止,还没有利用单个营养细胞进行紫菜纯系培育的报道。本实验采用在96孔酶标板培养坛紫菜单个细胞,解决了培养过程中水份蒸发、培养基盐度升高使细胞的生长受到抑制等问题,成功地一步培育出坛紫菜纯系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

坛紫菜叶状体于2001年10月到12月采自

浙江象山养殖网筏。以叶片长度、质量作为选择的标准。叶片阴干后冷藏于-20℃冰箱中备用。酶解前将叶片浸于消毒海水中,室温复苏2~4d。为了排除果孢子囊或受精细胞对实验结果的影响,实验中尽量选用雄叶片或没有成熟的小叶片,并切去边缘部分。

### 1.2 酶 解

实验用海螺酶参照唐延林<sup>[3]</sup>的方法制备。酶解时用2mol·L<sup>-1</sup>葡萄糖加原酶配成酶解液。将刷洗干净的叶片剪成1mm<sup>2</sup>碎片,加入适量酶解液,室温下酶解,出现一定数量的游离细胞后停止酶解。用添加N、P的营养海水(N:10mg·L<sup>-1</sup>,P:0.4mg·L<sup>-1</sup>)于350目纱绢上冲洗酶解液,滤液经500r·min<sup>-1</sup>离心5min,沉淀用营养海水溶解。重复3次。

### 1.3 培 养

在Olympus IX70倒置显微镜下用毛细管挑选单细胞,置96孔酶标板板孔中,1个孔中放置1个细胞。加入一定量的N、P培养基,用封口膜盖住培养板以减少水分蒸发。放入光照培养箱中于20℃,光时12L:12D,光强1500~2000lx条件下培养。每3~5d添加一次培养基,并观察细胞发育情况。

### 1.4 附网育苗及海区培养

由体细胞单克隆培养获得的叶片在三角烧瓶中培养产生了丝状体,通过悬浮培养后接种贝壳。接种的贝壳在实验室培养到肉眼可见微红色后转到象山县鹤浦镇紫菜育苗场继续培养,经过采苗、

附网后于2002年9月初以支柱式下海养殖。

## 2 结果

### 2.1 发育途径

刚酶解游离的细胞直径15~25 $\mu\text{m}$ ,色素体不明显,胞体呈灰黑色。培养3~4d后,少部分细胞逐渐恢复各种生理机能,在光镜下表现为细胞壁明显加厚,色素体变浓,胞质饱满充盈,胞体颜色转变为红色,有的细胞已分裂一次。这样的细胞已进入了良好的生长发育途径。但大多数细胞已经或将死亡。存活细胞再经过1~2周的发育,细胞壁中的细胞质更加浓厚,并出现了层状结构,颜色深红,胞体由最初15~25 $\mu\text{m}$ 长至30~45 $\mu\text{m}$ 。

存活细胞发育分化的途径有3种:形成丝状体,形成叶状体和形成规则或不规则细胞团,本文探讨发育成叶状体的情况。单细胞形成叶片也有3种发育途径,一种是单个细胞经过一次分裂形成两细胞(图版-1),其中一个细胞从游离端发生突起,后者逐渐发育成假根;另一个细胞则进行规则的横向分裂,形成多个细胞的单列细胞苗。到5~6个细胞后开始纵向分裂,并最终发育成小叶片。该类型呈典型的两极分裂,形成的叶片外型细长,类似壳孢子萌发形成的小叶片(图版-2)。以这种途径形成的叶片,假根发育最正常,附网的成功率也最高。

第2种形成叶片的方式是单个营养细胞在经过3~4次分裂后,形成4~5个细胞的单列细胞团(图版-3)。随着细胞数目增多,位于细胞团纵轴基部的一个细胞伸出较粗的突起(图版-4)。

也有的单细胞经过多次纵横分裂后,形成形状不规则的细胞团,再由边缘一个细胞产生突起(图版-5)。突起最后发育成假根。

有的单细胞先分裂形成不规则的细胞团,细胞团发育到一定阶段后(50d左右),细胞出现分化。一些细胞死亡,存活细胞则发生了分化。后期细胞团破裂,释放出比营养细胞个体要小的细胞,笔者称之为“类孢子”。这些“类孢子”有的萌发成叶状体,有些萌发成丝状体(图版-6)。这种途径下发育成的叶状体也是单列细胞苗,其假根有很强的附着性,在酶标板中培养3个月后,长成肉眼可见的小叶片。

通过单细胞克隆培养出的叶片,如果在酶标板孔中继续培养,最终叶片的上部破裂,释放出体积大小不等的细胞,或许是培养的条件不适应,这些释放的细胞都死亡了。而转入三角烧瓶中继续培养的叶状体,长到一定大小后叶片上大部分细胞色素丢失,颜色变白,小部分细胞产生丝状体,并长成红色的丝状体团。这种结果同紫菜叶片组织培养相同。

### 2.2 海上养殖

2002年9月在宁波象山对培育出的5个纯系进行了海区试养。在同一海区养殖中,未经选育的普通种,因脱苗导致大量的“白网”,而选育出的纯系,在采苗时间和生长条件都相同的情况下,附网密度高(图版-7,8),纯系采收5~6次后的叶片品质与普通种采收1~2次的品质相当。因此在产量和产值上,选育的纯合品系表现出明显的优势(表1和表2)。

表1 不同品系的叶状体产量比较

干重 dry weight	品系 lines					收获次数 harvest	
	纯系1 pure line 1	纯系2 pure line 2	纯系3 pure line 3	纯系4 pure line 4	纯系5 pure line 5		对照品系 control
	29.7	33.7	33.7	36.3	43.2	31.2	第1次
	37.8	32.4	36.3	35.1	45.9	31.8	第2次
	33.7	44.5	43.2	35.0	43.2	35.1	第3次
	43.2	28.3	41.8	35.0	44.5	40.5	第4次
	18.9	35.1	33.7	39.1	47.2	26.2	第5次
合计 total	163.3	174.0	188.7	180.5	224.0	164.8	

表2 不同品系的叶状体产值比较

Tab.2 The comparison of blade value of different lines

yuan·km<sup>-2</sup>

产值 value	品系 lines					对照品系 control	收获次数 harvest
	纯系 1 pure line 1	纯系 2 pure line 2	纯系 3 pure line 3	纯系 4 pure line 4	纯系 5 pure line 5		
	1187	1349	1349	1451	1727	1241	第 1 次
	1359	1166	1305	1262	1650	1144	第 2 次
	1079	1424	1382	1117	1382	1116	第 3 次
	1036	682	1004	842	1067	971	第 4 次
	527	701	674	782	944	524	第 5 次
合计 total	5188	5322	5714	5454	6770	4996	

### 3 讨论

20世纪80年代以来国内外学者进行了大量紫菜体细胞的培养研究<sup>[2-11]</sup>,其中王素娟等<sup>[8-9]</sup>、戴继勋等<sup>[11]</sup>进行了酶解紫菜体细胞直接附网养殖的相关研究。但已进行的研究主要集中在体细胞培养形态发生和体细胞直接育苗方面。在发表的资料中只见到对条斑紫菜和半叶紫菜华北变种进行组织培养获得纯系丝状体的报道<sup>[12]</sup>。

单细胞克隆培养在高等植物培养中已有许多成功的报道,但在大型海藻中报道较少<sup>[14]</sup>。最初实验中用悬滴法进行单个细胞培养,但由于水分蒸发而使培养基盐度升高,导致细胞死亡。采用96孔酶标板培养有几个方面的优点:相对于悬滴培养来说,培养液体积得到扩大;可以有效防止水分蒸发;酶标板孔具有较好的透光性,可以直接进行镜检;单个小孔很容易从整个板中被分离下来,转入三角烧瓶中继续培养。

另外一种紫菜纯系培育的方法是首先从叶片上取一块未分化的小藻体,隔离培育出丝状体。由于叶片细胞是嵌合的,所以这种丝状体要再经过几年时间的进一步筛选,然后作为纯种保存<sup>[12]</sup>。但作者认为严格意义上的克隆培养,应该是从单个营养细胞开始,不过单个细胞培养需要时间长,工作量大和难度大<sup>[12]</sup>。

在进行的培养中,由单个细胞形成叶片的数目少,而朝丝状体方向发育的占大多数,这可能与所选用的藻体的年龄和培养条件有关。目前正在做定向发育的实验,希望获得控制单细胞发育方向的培养或诱导条件。

坛紫菜叶状体营养细胞遗传物质是单倍体的,由它们形成的丝状体是二倍体的,加倍的遗传

物质只能是原有遗传物质的拷贝。实验中获得的由单个体细胞克隆形成的叶片转入三角烧瓶培养一段时间后,再采用组织培养的方法,让叶片细胞发育出丝状体。由于叶状体是由单个单倍体细胞发育而成的,构成叶片的所有细胞的基因型是一致的,所以通过这种方式可以间接培育出遗传物质高度纯合的无性系丝状体坛紫菜。

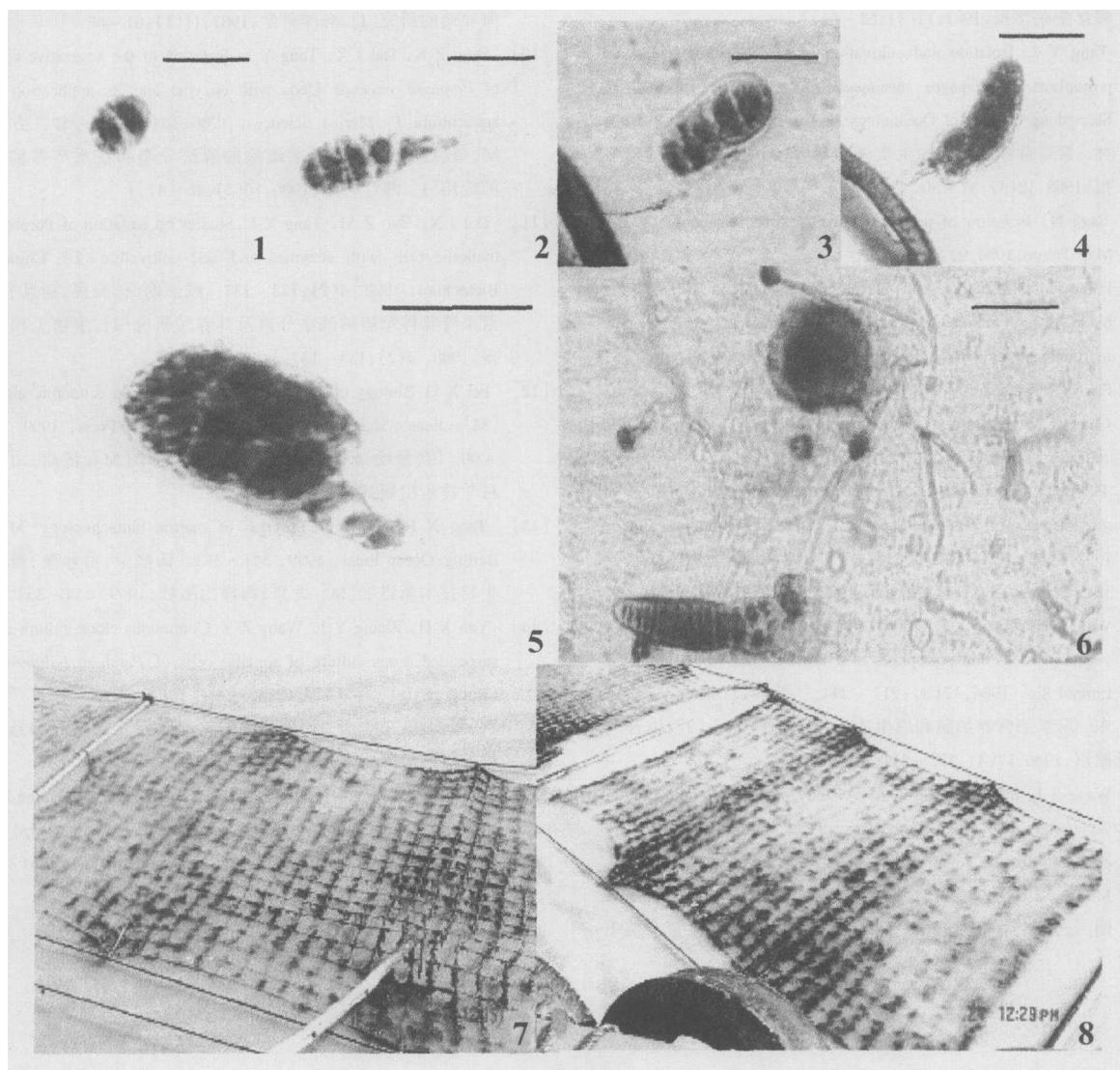
2002年因台风和其它自然现象的影响,宁波地区栽培坛紫菜遭受前所未有的重创,农户经济损失巨大。作者用培育出的5个纯系在同一海区试养,其中4个表现出很强的优良性状,主要体现在:1)未经选育的普通种,因脱苗导致大量的“白网”,而选育出的纯系,在采苗时间和生长海区都相同的情况下,不发生脱苗;2)纯系采收5~6次后的叶片品质与普通种采收1~2次的品质相当;3)纯系的性成熟要比普通种晚。

本文报道的这种紫菜纯系培育方法,不仅操作简单,大大缩短了培育周期,而且纯合程度高,优良性状得以稳定遗传。同体细胞选育优良株系<sup>[15]</sup>相结合,可使优良性状的选育和遗传稳定同步进行,对紫菜优良栽培品种的建立具有实际生产意义。

### 参考文献:

- [1] Yang R, Liu B Q, Luo Q J, et al. Genetic variation of *Porphyra haitanensis* by applying AFLP[J]. High Technology Letters, 2002 (1): 83-86. [杨锐, 刘必谦, 骆其君, 等. 利用扩增片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异[J]. 高技术通讯, 2002(1): 83-86.]
- [2] Zhao H D, Zhang X C. Isolation and cultivatin of vegetative cell of *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. Journal of Shangdong College of Oceanology, 1981, 11(1): 62-65. [赵焕登, 张学成. 条斑紫菜 *Porphyra yezoensis* Ueda 营养细胞的分离和培养[J]. 山东

- 海洋学院学报,1981,11(1):62-65.]
- [3] Tang Y L. Isolation and cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *Porphyra suborbiculata* Kjellm [J]. Journal of Shangdong College of Oceanology, 1982,12(4):37-50. [唐延林. 紫菜营养细胞和原生质体的培养[J]. 山东海洋学院学报,1982,12(4):37-50.]
- [4] Saga N. Isolation of protoplasts from edible seaweeds [J]. Bot Mag Tokyo, 1984, 97:423-427.
- [5] Polne-Fuller M, Gibor A J. Development studies in *Porphyra* I. blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion and protoplast regeneration [J]. Phycol, 1984, 20:609-619.
- [6] Chen C M. Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture [J]. Bot Mag, 1987, 30:399-403.
- [7] He P M, Wang S J. Study of difference and development of somatic cells in *Porphyra yezoensis* [J]. Acta Botanica Sinica, 1992, 34(2):874-877. [何培民, 王素娟. 条斑紫菜体细胞分化发育的研究[J]. 植物学报, 1992, 34(2):874-877.]
- [8] Wang S J, Zhang X P, Xu Z D. A study on the cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *P. haitanensis* [J]. Oceanol et Limnol Sin, 1986, 17(3):217-244. [王素娟, 张小平, 徐志东. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J]. 海洋与湖沼, 1986, 17(3):217-244.]
- [9] Wang S J, Sun Y L, Lu A M. A study on the cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *P. haitanensis* II. the cultivation of the young buds isolated vegetative cells in sea [J]. Marine Science, 1987, 11(1):61-65. [王素娟, 孙云龙, 路安明. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 II. 直接育苗下海养殖的研究[J]. 海洋科学, 1987, 11(1):61-65.]
- [10] Fang Z X, Dai J X, Tang Y L. Isolation of the vegetative cells of *Porphyra yezoensis* Ueda with enzyme and its application in aquaculture [J]. Marine Sciences, 1986, 10(3):46-47. [方宗熙, 戴继勋, 唐延林. 紫菜细胞的酶法分离和在水产养殖中的应用[J]. 海洋科学, 1986, 10(3):46-47.]
- [11] Dai J X, Bao Z M, Tang Y L. Studies on isolation of *Porphyra* thallic cells with enzymes and cell cultivation [J]. Chinese Biotechnol, 1988, 4(2):133-137. [戴继勋, 包振民, 唐延林. 紫菜叶状体细胞的酶法分离及其养殖研究[J]. 生物工程学报, 1988, 4(2):133-137.]
- [12] Fei X G. Biology of germ plasm and seeding on economic algae [M]. Jinan: Shangdong Science & Technology Press, 1999. 50-90. [费修缙. 经济海藻种质种苗生物学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 50-90.]
- [13] Tang X R, Fei X G. Progress of marine biotechnology [M]. Beijing: Ocean Press, 1999. 344-353. [汤晓荣, 费修缙. 海洋生物技术新进展[M]. 北京: 海洋出版社, 1999. 344-353.]
- [14] Yan X H, Zhang Y J, Wang Z Y. Continuous clone culture and suspended drops culture of somatic cells of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) [J]. J Fish China, 1990, 14(4): 336-339. [严兴洪, 张饮江, 王志勇. 坛紫菜体细胞的联系克隆培养和悬滴培养[J]. 水产学报, 1990, 14(4): 336-339.]
- [15] He P M, Wu W N. Establishment and cultivation of cell line HB with high temperature resistance and fast growth in *Porphyra yezoensis* [J]. Acta Biologic Experimentalis Sinica, 2003, 36(3): 191-196.



### 图版说明 Explanation of Plate

1. 细胞分裂一次; 2. 细胞两极分裂所形成的小叶片; 3. 叶片状的细胞团; 4. 细胞团的一端产生突起; 5. 畸形叶状体; 6. 细胞团破裂后释放的“孢子”(标尺都为 50  $\mu\text{m}$ ); 7. 未经选育紫菜的“白网”现象; 8. 纯合品系 3 号海区生长情况

1. cell had divided once ; 2. the small blade formed by dipolar division; 3. thallus-like cell group; 4. bulge appeared at a end of the cell group; 5. irregular thallus; 6. cell group broken and released spores; 7. the “blank net” phenomena in unselected porphyra line; 8. cultivation of no. 3 pure line in the sea, all bar = 50  $\mu\text{m}$