

宽礁膜原生质体的分化与发育

谢恩义¹, 花卫华², 马家海^{3*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 江苏省水产技术推广站, 江苏 南京 210036;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:为缩短传统育苗时间,开发室内种质保存技术,满足大规模栽培苗种需求,实验用4%的果胶酶和2%纤维素酶混合,将来自于不同月份和不同藻体部位的宽礁膜切段,分别在相同条件下解离成原生质体,详细研究了这些不同部位和不同生长时期细胞的再生、分化和发育途径。根据体细胞后代的外形、有无假根、有无公共膜、细胞大小和排列方式,以及它们最终的发育分化趋势,将宽礁膜原生质体发育方式分为8种结果,既可形成体细胞,也可形成生殖细胞。形成体细胞的发育途径又分3种类型7种结果,即细胞团、畸形苗和正常苗3种类型,其中发育成细胞团的类型又分为规则细胞团和不规则细胞团2种结果,发育成畸形苗的类型又分为假根为主的畸形苗、有类假根的畸形苗、无假根的畸形苗和管状畸形苗4种结果。各种发育类型与藻体的日龄、大小及部位有关,其原生质体直接发育形成正常形态藻体的发育方式只是8种发育结果的一种。

关键词:宽礁膜;酶制剂;原生质体分离;分化;发育

中图分类号:Q 942.5; S 917

文献标识码:A

据作者不完全数据统计,到目前为止,全世界至少已经报道了89种海藻原生质体的分离和培养工作,包括海带(*Laminaria japonica*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)、巨藻(*Macrocystis pyrifera*)和江蓠(*Gracilaria lemaneiformis*)等,其中绿藻不少于16种,部分种类已经再生出完整植株^[1-9]。对石莼目藻类原生质体分离与培养已有不少种类,如裂片石莼(*Ulva fasciata*)、缘管浒苔(*Enteromorpha linza*)、浒苔(*E. prolifera*)、肠浒苔(*E. intestinalis*)、扁浒苔(*E. compressa*)等^[1-2,5-9]。有关礁膜属原生质体的研究多集中在原生质体的培养与再生成株,而对其分化发育途径的系统观察研究较少,如张大力^[2]分离出袋礁膜(*Monostroma angicava*)的原生质体,经培养只形成管状幼苗,而不形成正常植株;SAGA等^[10]分离培养了袋礁膜的原生质体,但不进一步分化;CHEN^[11-12]分离到宽礁膜(*M. latissimum*)

的原生质体,并对来自不同藻体部位的原生质体进行了发育途径的初步研究,得到细胞团、管状体和丝状体3种发育类型,原生质体没有直接发育成正常形态的植株。KITO等^[13]研究了礁膜(*M. nitidum*)与条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)的细胞质融合及杂种的生长。KRISHNA等^[14]用3%纤维素酶解离尖种礁膜(*M. oxyspermum*),并对所得原生质体的发育分化进行了培养观察,发现有两种发育类型:一种是先形成孢子囊,孢子囊成熟后放散具有两鞭毛的游孢子,游孢子固着并发育形成正常藻体;另一种是原生质体经多次细胞分裂,形成不具假根的叶状体。UPPALAPATI^[8]对礁膜和尖种礁膜进行了酶解实验,发现原生质体产率达 $9.6 \times 10^6 \sim 10.2 \times 10^6$ ind/g鲜藻,再生率为90%,但实验中未提出是否能再生成苗。谢恩义等^[15]对礁膜原生质体的分离及培养进行了报道,观察到原生质体的3种发育方式。

收稿日期:2010-12-02 修回日期:2011-02-01

资助项目:广东省科技计划项目(2008B022900012)

通讯作者:马家海, E-mail: mjh25@sh163.net

宽礁膜隶属于绿藻门(Chlorophyta)、石莼目(Ulvales)、礁膜科(Monostromaceae)、礁膜属(*Monostroma*)。在绿藻中宽礁膜是食用价值较高的一种,具有较大栽培前景^[16-17]。谢恩义等^[17]报道了宽礁膜的人工育苗与栽培,但传统的采苗方法耗时长,苗种培育受杂藻影响较大,难以在室内保存,且易发生病害。近年来发展起来的海藻原生质体分离与培养技术有助于这些问题的解决。国内学者已对紫菜体细胞育苗技术进行了生产性应用试验,结果表明,将细胞技术运用于紫菜生产,完全可行,其前景十分广阔^[18-19]。本文旨在为宽礁膜的快速育苗提供一个新的途径,利用无性繁殖,缩短传统育苗周期,并使宽礁膜人工栽培种子化,为大规模栽培宽礁膜随时提供栽培种苗。另外,研究宽礁膜原生质体的发育分化,对开展原生质体培养、融合、基因转化等具有一定的理论意义,也为绿藻门其它种类原生质体研究提供借鉴。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用宽礁膜酶解材料是2008年10月、11月和2009年1月采自广东省碇洲岛大浪海区的1~3 cm的幼嫩藻体,用内放冰袋的保温瓶或泡沫箱当日带回实验室。

1.2 方 法

藻体的预处理 挑选正常健康的藻体,在过滤海水中用毛笔轻轻地反复洗刷藻体正反面多次,去除其表面的杂藻和附泥,清洗干净后培养瓶中充气培养,培养液为盐度22.2~26.1且内含氮磷比为 $10 \times 10^{-6}:1 \times 10^{-6}$ 营养盐的无菌海水,培养瓶置于光照培养箱内,设定光照强度 $16 \sim 48 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期12L:12D,温度 $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右,充气培养4~5 d。4~5 d后挑选长势较好的藻体放入含有10 mL混合抗生素液(1 g 氨基青霉素,1 g 卡那霉素,25 mg 制霉菌素和0.2 g 新霉素溶于100 mL双蒸水中)的100 mL的灭菌海水培养液中相同条件下继续培养24 h,然后进行酶解实验。酶解前培养藻体黑暗一昼夜,以减少细胞壁物质的合成积累,使酶解更加容易,获得更多的酶解细胞。

酶液的制备 酶液制备基于谢恩义等^[15]的方法并稍加改进,具体为4%果胶酶,2%纤维

素酶,40 mmol/L CaCl_2 ,0.7 mol/L 甘露醇,pH 6.0。首先量取30 mL盐度为22.2的消毒海水,加入重蒸水20 mL,称取2 g果胶酶、1 g纤维素酶、0.222 g CaCl_2 、10.930 2 g甘露醇溶解其中,用1%稀盐酸调节pH到6.0(温度 $12 \text{ }^\circ\text{C}$)。随后酶液用冷冻离心机($0 \sim 3 \text{ }^\circ\text{C}$)6 000 r/min离心10 min,取上清液装在棕色试剂瓶中,保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱内待用。

原生质体的分离 取生长较好并预处理过的无菌藻体投入紫外光消毒过的组织捣碎机中捣碎。消毒无菌海水清洗捣碎组织数次后,用消毒60网目筛绢过滤去除切碎的细胞质。将所滤得的组织块收集,放入离心管中,加入酶液,放入摇床中 $80 \sim 100 \text{ r/min}$ 酶解3 h,酶解温度为 $24 \text{ }^\circ\text{C}$,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。酶解结束后,将含有原生质体的酶液用消毒60网目筛绢过滤以去除未酶解的组织块。将所得过滤液以 $800 \sim 1\,000 \text{ r/min}$ 离心5 min后,倒去3/4上悬液,以盐度为39.2相同体积的过滤消毒海水补充,此过程重复3次,以消弱酶液中酶和酶溶剂的影响。

原生质体的鉴定 把原生质体放入低渗溶液中,显微镜下观察原生质体在低渗溶液中吸水涨破的过程,如果是真正的原生质体,在胀破后,其残迹消失。有活力的原生质体的鉴定可由室内培养原生质体时实际的分裂再生情况决定。

原生质体的培养 将纯化的原生质体少许悬浮液,约含 8.0×10^4 个原生质体,直接加入含10 mL盐度为39.2的消毒过滤海水的培养皿中,或先滴于培养皿中的载玻片上,静置2~4 h,原生质体即可附着,然后向培养皿中加入10 mL盐度为39.2的高渗海水。先进行24 h的黑暗或弱光培养,初期培养置于散光灯下,光照强度控制在 $6.4 \sim 24 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,形成细胞壁后增强为 $32 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 以上,并将培养液盐度逐步调整至22.2~26.1。培养箱的温度设置为 $10 \text{ }^\circ\text{C}$,光周期为12L:12D。每隔7天更换培养液一次。在整个静置培养过程中,每天以光学显微镜观察记录具活性的原生质体生长发育情况,并拍摄照片,在培养后的第3天和第7天随机取10个显微视野统计原生质体的存活率。

2 结果

2.1 宽礁膜原生质体的发育类型

宽礁膜藻体绿色,细胞表面观多角形、方形或椭圆形(图版-1)。1.0 g 湿重宽礁膜可获原生质体 $(12.3 \sim 25.8) \times 10^6$ 个,而刚酶解所得的原生质体(图版-2)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。将这些原生质体放入低渗溶液中,由于渗透压失衡,大部分胀破,并且其痕迹消失。大部分原生质体高渗溶液中培养 24 h 后,长出新的细胞壁。统计培养的原生质体第 3 天的存活率为 92.7%,第 7 天为 87.6%。根据体细胞后代的外形、有无假根、有无公共膜、细胞大小和排列方式,以及它们最终的发育分化趋势,可将原生质体发育方式分为 8 种结果,既可形成体细胞,也可形成生殖细胞。形成体细胞的发育途径又分 3 种类型 7 种结果,即细胞团、畸形苗和正常苗 3 种类型,其中发育成细胞团的类型又分为规则细胞团和不规则细胞团 2 种结果,发育成畸形苗的类型又分为假根为主的畸形苗(假根丝细胞)、类假根畸形苗、无假根畸形苗和管状畸形苗 4 种结果。

第一种发育结果是形成生殖细胞(图版-3~8)。经过 12 d 培养,一部分原生质体经过规则有序分裂后,先出现颗粒化,并逐步形成细胞壁,发育成配子囊(图版-3)。配子囊成熟放散时,囊壁变薄,透明状,囊内配子不停运动,当透明囊壁溶解破裂后,配子(梨形,体前端具 2 根等长鞭毛)即放散出来(图版-4)。放散后,配子囊消失,没有留下空壳的痕迹。刚放散的配子活力强,3~4 h 后,大部分直接或接合为合子固着于培养皿底,不久即变为圆球形(图版-5)。20 d 后,固着的圆形配子或合子进一步发育成孢子囊(图版-6)。孢子囊直径为 35~55 μm ,囊内呈明显的颗粒状,具有较厚的细胞壁。孢子囊能以二分裂进行增殖,使孢子囊密度加大。孢子囊成熟后可放散出 16~32 个四鞭毛的游孢子(图版-7),把游孢子附于筛绢上充气培养,则可发育成正常形态的叶状体(图版-8)。这种发育途径在室内短期完成了宽礁膜生活史中从孢子体发育至配子体的异型世代交替的生活史过程,所得原生质体又来源于培养的单株藻体,在遗传育种上有应用价值。

第二种发育成不规则细胞团(图版-9)。经过 22 d 培养,原生质体细胞形成表面凹凸不平的单层组织块。细胞大小与正常苗的细胞相同,但排列不紧密,形状一般为圆形或椭圆形,细胞有两两成对现象,无公共膜,无假根。组织块继续发育到 2~3 mm 肉眼可见后,就不再继续生长发育。将其转入充气瓶内继续充气培养 10 d 后,其生长状况与静置培养结果一样,无明显改变。

第三种发育成规则细胞团(图版-10)。细胞团成圆形或卵圆形,一般分裂至 8~32 个细胞就停止分裂。单个细胞较大,约 1.5 倍于正常叶状体,呈多边形、长卵圆形或长方形,有两两成对现象,单层,排列紧密,有明显的公共膜。这类细胞团继续培养不再分化成正常幼苗。

第四种发育成假根为主的畸形苗(图版-11)。这种细胞刚萌发时,多数呈蝌蚪形,通过培养发现,较细的一端会不断拉长,形成细长的根丝,其中一部分出现分叉现象。这种假根丝细胞的假根丝部分具有较厚的细胞壁,内含物的颜色呈淡绿色;较粗的单细胞一端大部分不会进一步分裂,始终处在一个单细胞状态,即根丝细胞状态,其中少部分有一分为二的迹象,并进一步分裂分化,形成畸形苗,具多细胞的叶片和一个假根。这些畸形苗继续培养,不形成肉眼可见的正常形态,也不成熟。

第五种发育成无假根畸形苗(图版-12)。培养的原生质体第 4~6 天进行第一次分裂,为均等分裂。继续培养,细胞进一步分裂分化,20 d 左右形成 8~16 个细胞,这些个体边缘较光滑,内部细胞排列规则,呈平面分布,60 d 时发育成 40 个细胞左右的叶状体。这种叶状体与自然生长状态下的宽礁膜藻体叶片特征相似,细胞排列紧密,有公共胶质膜,但无固着器,也无细胞分化出固着器的迹象。部分叶状体有多个叶片现象,这些叶状体的营养细胞是否能发育成配子囊,并放散配子,乃至形成孢子囊,放散游孢子,发育成正常配子体,还需以后实验观察验证。

第六种发育成类假根畸形苗(图版-13)。原生质体先发育成有公共胶质膜的组织块,组织块的外形、颜色、细胞大小和排列方式及色素体的形状与正常叶状体相同,然后组织块基部个别含色素体的细胞呈乳头状突起,构成类假根,这种类假根大部分较短,不分枝,继续培养,不会再分化出

真正的假根。类假根畸形苗继续培养,一直保持原状,不会转化成正常叶状体。

第七种发育成管状畸形苗(图版-14~15)。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细胞发育成由许多根丝细胞组成的假根(图版-14),另一部分则发育成管状体(图版-15)。部分管状体分叉形成多个分枝,每个分枝由多列细胞形成,细胞排列紧密,边缘凹凸不平。

第八种发育成正常的叶状体(图版-16~20)。在这个发育结果中,原生质体的第一次分裂出现在开始培养后的第7~10天,从一端以出芽方式开始萌发,为不均等分裂(图版-16),且分裂前,细胞中的色素体会由块状变为环状,并紧贴细胞膜。分裂形成的两个细胞,表现出极性(图版-17),即一子细胞拉长变细,形成较短的根丝,将来发育为假根,另一子细胞也拉长,但不变细,继续分裂分化,最终发育成叶状体(图版-18~19)。经过将近3个月的培养,形成肉眼可见的具有成体植株特征的正常叶状体(图版-20)。

2.2 宽礁膜原生质体发育分化与藻体采集时间、大小和不同部位的关系

藻体中去分化细胞的多少主要取决于藻体的日龄、大小以及取材部位等因素,一般认为日龄小、尺寸小的藻体所含的去分化细胞较多,用酶法制作原生质体所用的藻体材料生长日龄较小为好。在相同的酶解和培养条件下,宽礁膜原生质体发育分化结果与藻体采集时间、大小和不同部

位的关系如表1。从表1可知:采自1月较大藻体(长>3 cm)顶端正在发育成配子囊的藻体细胞制得的原生质体多发育成生殖细胞,即配子囊。采自11月的宽礁膜藻体个体较小(长1~3 cm),藻体中所含的去分化细胞较少,细胞的分化也在迅速进行,导致酶解所得的原生质体发育成细胞团和畸形苗的较多。而采自于10月的藻体(1 cm左右),经酶解而来的原生质体直接发育成具有成体植株特征的个体较多。

采用1月采集的3 cm左右的藻体,从基部依次取0~1 cm,1~3 cm的两组切段,分开酶解并培养。两个月后观察发现,0~1 cm切段组酶解出的原生质体发育方式较多,8种结果都有观察到,以假根为主的畸形苗较多;而1~3 cm切段组酶解出的原生质体多发育形成配子囊,成熟的配子囊放散配子。配子固着后,最终形成孢子囊,成熟并放散游孢子,游孢子再发育成苗,即第一种发育方式。

同一培养条件下,来自1月同一藻体的不同部位的原生质体表现出不同的发育方式。基部固着器的假根丝细胞酶解的原生质体只能发育成假根丝细胞。处于藻体边缘部位的叶状体营养细胞酶解的原生质体大多发育成配子囊,并可成熟放散配子,以后经孢子囊的发育途径进行分化发育。处于藻体中心部位的叶状体营养细胞酶解的原生质体发育方式较多,细胞团、类假根的畸形苗、无假根的畸形苗、管状畸形苗、管状苗和正常苗等都可观察到。

表1 宽礁膜原生质体发育分化与藻体采集时间、大小和不同部位的关系
Tab. 1 Developmental patterns of protoplasts related to the growth period, size and original location of the thalli from which the protoplasts were isolated

发育方式 developmental pathway	采集时间 sampling time			藻体大小(cm) size			藻体切段部位 location of the tissue	
	Oct.	Nov.	Jan.	0~1	1~3	>3	0~1 cm(基部)	1~3 cm(末端)
配子囊		+	++		+	++	+	++
规则细胞团 regular cell mass	+	++	+	+	++	+	+	+
不规则细胞团 irregular cell mass	+	++	+	+	++	+	+	+
假根为主的畸形苗 rhizoidal abnormal seedling	+	+	+	+	+	+	++	
无假根畸形苗 rhizoid-deficient abnormal seedling	+	+	+	+	+	+	+	+
类假根畸形苗 rhizoid-like abnormal seedling	+	+	+	+	+	+	+	+
管状畸形苗 tubular abnormal seedling	+	++	+	+	++	+	+	+
正常苗 normal seedling	++	+	+	++	+	+	+	+

注:++代表所占比例较大,+代表观察到,但比例较小。

Notes: ++ indicated a certain developmental pattern of protoplasts occupied greater proportion, + meant this pattern could be observed, but occupied smaller proportion.

3 讨论

3.1 原生质体的发育方式

本实验已初步得出,宽礁膜原生质体发育具有 8 种方式。原生质体这种多样化的发育方式,主要与酶解材料采集的时间、大小、部位等发育状态不同引起的生理、生化和细胞分化调控物质不同有关,另外受酶解和培养条件的影响,如光照、营养盐和温度等^[20-22]。原生质体的发育调控机理复杂,未知的内因和外因影响因子多,调控原生质体发育的研究具有理论和应用价值,是今后需要深入研究的课题。宽礁膜叶状体中细胞具有二大类分化类型,即体细胞和生殖细胞,体细胞又可分为营养细胞和根丝细胞。本实验 11 月份藻体酶解所得的原生质体培养多发育为细胞团,这可能与藻体细胞处于旺盛的分裂生长期有关。1 月份材料酶解所得的原生质体多发育形成配子囊,这可能与藻体细胞正在发育为配子囊,酶解的原生质体就朝着配子囊发育。同时发现原生质体培养中加大光照强度、提高培养温度和营养盐充足的条件下,多发育为配子囊,这与高温和高光照强度等条件下叶片细胞易成熟有关。宽礁膜的不同发育形式,可能和酶解的体细胞原先在组织中的位置(假根丝细胞或营养细胞等)、发育阶段(营养细胞或生殖细胞等)、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。

在已知的宽礁膜生活史中,并不包含管状体这一阶段,本实验发现宽礁膜原生质体发育成管状苗,CHEN 等^[12]报道宽礁膜原生质体形成的管状苗继续培养可发育成叶状体,这种发育方式是否说明浒苔、石莼、礁膜 3 个属之间存在一定的进化演化关系,HILLARY 等^[23]也用充分的证据证明石莼属和浒苔属不是截然不同的属。

戴继勋等^[24]、严兴洪等^[20]、何培民等^[25]对紫菜体细胞的发育方式进行的研究结果与本实验所得宽礁膜原生质体发育方式有许多相似之处。虽然紫菜与宽礁膜分属不同的门,在遗传学上差距甚大,但是细胞全能性分化发育为何如此相似,这还有待于进一步研究。

3.2 原生质体培养应用

体细胞发育方式的系统研究,是经济海藻体细胞育苗的前提条件,在基础理论研究和应用研究中都有价值,目前紫菜离体单细胞育苗在生产

上已有应用。因为大型海藻的传统育苗时间长,幼苗培育中受杂藻和病害影响大,如果发展获得大量有活性和高再生率的原生质体附于尼龙绳等附着基上培育成苗,有望取代传统的采孢子育苗。利用植物细胞全能性的原理,将植物体细胞解离后,直接发育成幼苗,以此作为苗种的来源,这在一些高等植物、大部分单细胞藻类和少数大型海藻中已成为现实^[8,19,21,26-27]。国内外学者在大型海藻方面做了多次尝试,并有所积累^[2,8,10-15]。KRISHNA 等^[9]和 REDDY 等^[14]先后报道了尖种礁膜原生质体的培养成苗,后者还获得了原生质体粘附于尼龙绳发育成高密度的幼苗,CHEN 等^[12]报道宽礁膜原生质体首先发育形成细胞团,部分细胞团再继续长出管状藻体,再由管状体发育出叶状体。就本实验而言,主要是探明了宽礁膜原生质体的发育方式,为利用原生质体育苗应用于生产奠定理论基础。形成正常幼苗的发育形式对生产育苗最为直接、有利,形成配子囊再经配子或游孢子发育成正常叶状体的发育方式,在单性生殖和育种研究上有一定价值;形成细胞团和畸形苗的发育方式应加以抑制或诱导转化。只有对体细胞的发育方式进行全面的认识后,我们才能从中筛选出体细胞育苗的最佳生产条件,趋利避害,有效地指导实际生产。本实验以后要着重完善材料日龄、温度和营养盐等内外因素对原生质体发育影响的研究,特别是原生质体发育机制的研究,为以后生产应用打下理论基础。因为还有许多基础理论问题没有解决,原生质体育苗迟迟不能在生产上应用推广,因而受到有些学者质疑,但要实现海藻种苗“种子化”,原生质体的研究仍是今后需要深入研究的课题,有较大研究空间,并具有较好的应用发展前景。

参考文献:

- [1] MILLNER P A, CALLOW M E, EVANS L V. Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link [J]. *Planta*, 1979, 147: 174-177.
- [2] 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] SAGA N, SAKAI Y. Isolation of protoplasts from *Laminaria* and *Porphyra* [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1984, 50(6): 1085.

- [4] FUJITA Y, MIGITA S. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds [J]. Bull Fac Fish Nagasaki Univ, 1985, 57: 39-45.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] RUSIG A M, COSSON J. Plant regeneration from protoplasts of *Ulva intestinalis* (Chlorophyta, Ulvophyceae) as seedstock for macroalgal culture [J]. Phycol, 2001, 13(2): 103-108.
- [8] UPPALAPATI S R, FUJITA Y. A simple method for mass isolation of protoplasts from species of *Monostroma*, *Enteromorpha* and *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales) [J]. J Appl Phycol, 2002, 14: 165-168.
- [9] REDDY C R K, Dipakkore S, Rajakrishna K G. An improved enzyme preparation for rapid mass production of protoplasts as seed stock for aquaculture of macrophytic marine green algae [J]. Aquaculture, 2006, 260: 290-297.
- [10] SAGA N, KUDO T. Isolation and culture of protoplasts from the marine green alga *Monostroma angicava* [J]. J Appl Phycol, 1989, 1: 25-30.
- [11] CHEN Y C, CHIANG Y M. Isolation and regeneration of protoplasts of *Monostroma latissimum* Wittrock (Monostromataceae, Chlorophyta) [J]. Bot Bull Acad Sin, 1994, 35: 45-51.
- [12] CHEN Y C. Development of protoplasts from holdfasts and vegetative thalli of *Monostroma latissimum* (Chlorophyta, Monostromataceae) for algal seed stock [J]. J Phycol, 1998, 34: 1075-1081.
- [13] KITO H, KUNIMOTO M, KAMANISHI Y, et al. Protoplast fusion between *Monostroma nitidum* and *Porphyra yezoensis* and subsequent growth of hybrid plants [J]. J Appl Phycol, 1998, 10(1): 15-21.
- [14] KRISHNA K 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.
- [15] 谢恩义, 马家海. 礁膜原生质体的分离及培养 [J]. 水产学报, 2004, 28(1): 62-67.
- [16] 谢恩义, 马家海, 陈扬建. 宽礁膜营养成分分析及营养学评价 [J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(2): 129-133.
- [17] 谢恩义, 马家海. 宽礁膜的人工育苗及栽培 [J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(6): 17-21.
- [18] 王素娟, 孙云龙, 路安明等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养研究 II [J]. 海洋科学, 1987, 1: 1-7.
- [19] 戴继勋, 包振民, 唐延林, 等. 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.
- [20] 严兴洪, 王素娟. 紫菜体细胞发育与分化的研究 [J]. 海洋科学, 1989, 6: 28-32.
- [21] 王素娟. 海藻生物技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 56-59.
- [22] 何培民, 秦松, 严小军, 等. 海藻生物技术及其应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 86-98.
- [23] HILLARY S H, JAANIKA B, CHRISTINE A M, et al. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera [J]. Eur J Phycol, 2003, 38: 277-294.
- [24] 戴继勋, 包振民. 坛紫菜原生质体的发育研究 [J]. 遗传学报, 1988, 14(4): 299-302.
- [25] 何培民, 王素娟. 条斑紫菜离体细胞分化发育的研究 [J]. 植物学报, 1992, 34(11): 874-877.
- [26] PUIITE K J. Progress in plant protoplast research [J]. Physiol Plant, 1992, 85: 403-410.
- [27] 马家海, 张天夫, 王金辉, 等. 对有分枝长石莼(缘管浒苔)的研究 [J]. 水产学报, 2010, 34(9): 1371-1378.

Differentiation and development of protoplasts of *Monostroma latissimum*

XIE En-yi¹, HUA Wei-hua², MA Jia-hai^{3*}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

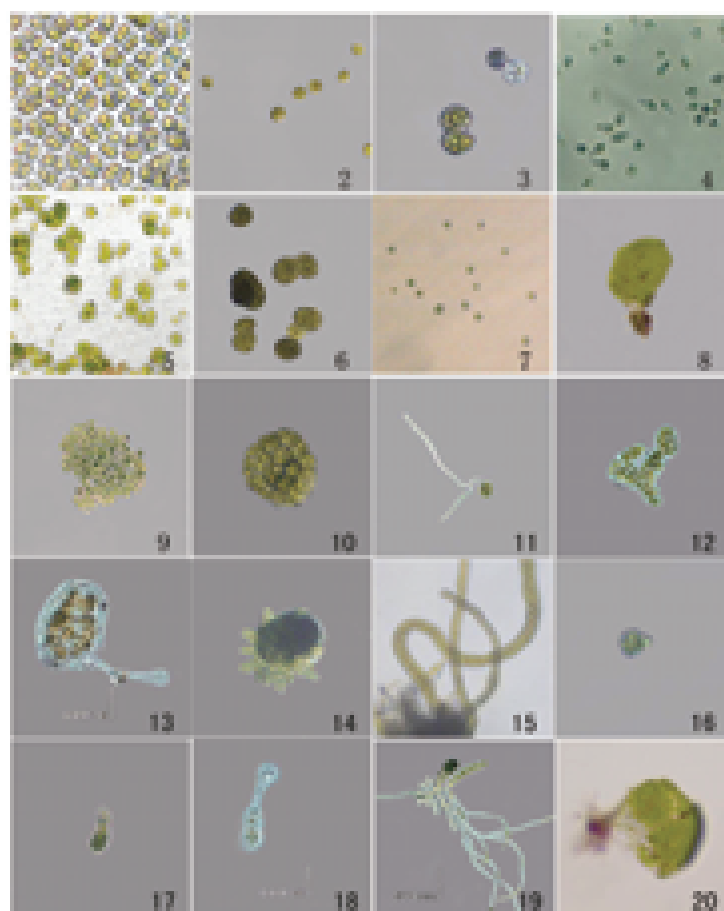
2. Jiangsu Provincial Aquatic Technology Extension Station, Nanjing 210036, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Monostroma latissimum* is one edible Chlorophyta species, and is a potential new species for economic seaweed cultivation by fishermen in China, for viable protoplasts could be potentially used as a source for seed material of macrophytic marine algae cultivation and for other applied phycological research, so the aim of this study was to develop a new breeding method by culturing the protoplasts of *M. latissimum*, to form seedlings quickly, to shorten the traditional period of germlings cultivation, to maintain a stock of seedlings in the laboratory for longer periods, and to provide abundant germlings for large-scale commercial cultivation. Protoplasts were isolated respectively from different parts of the thalli of *M. latissimum* which are collected at different time by enzymatic method (optimal enzyme composition consisted of 4% pectinase and 2% cellulase). And the regeneration, differentiation and development pathway of different derived protoplasts are studied under uniform conditions of isolation and incubation. According to the cell morphology, such as the formation of rhizoids, whether having hyaline sheath, or the size and arrangement ways of the cell, and the eventual development and differentiation trend, the protoplast development can be divided into eight results, include forming somatic cells and reproductive cells. The somatic cells formation can be classified into cell mass which includes regular or irregular cell mass; abnormal seedlings which include rhizoidal, rhizoidal-like, no rhizoidal and tubular abnormal seedlings; normal seedlings, 3 types, 7 results. The reproductive cells formation developed into gametangia firstly, and then developed into sporangia. Each development pathway is associated with age, size and location of algae. This is the first time to report that some protoplasts underwent repeated cell divisions and developed directly into thalli similar to the parent thalli, and the application and expectations of protoplast culture were also discussed.

Key words: *Monostroma latissimum*; enzyme preparation; protoplast isolation; differentiation; development

Corresponding author: MA Jia-hai. E-mail: mjh25@sh163.net



图版 宽礁膜原生质体的发育方式

1. 宽礁膜配子体中部细胞表面观, $\times 500$; 2. 刚分离的原生质体, $\times 400$; 3. 配子囊, $\times 200$; 4. 配子, $\times 400$; 5. 固着的合子, $\times 200$; 6. 孢子囊, $\times 200$; 7. 游孢子, $\times 100$; 8. 幼苗, $\times 40$; 9. 不规则细胞团, $\times 100$; 10. 规则细胞团, $\times 400$; 11. 假根丝细胞, $\times 200$; 12. 无假根畸形苗, $\times 400$; 13. 类假根畸形苗, $\times 400$ (标尺 $600 \mu\text{m}$); 14. 管状苗的假根, $\times 400$; 15. 管状苗, $\times 200$; 16. 原生质体萌发, $\times 400$; 17. 酶解原生质体萌发出假根, $\times 200$; 18. 分裂中的细胞苗, $\times 400$ (标尺 $600 \mu\text{m}$); 19. 具发达假根的细胞苗, $\times 200$ (标尺 $600 \mu\text{m}$); 20. 带假根的幼苗, $\times 20$ 。

Plate Development of protoplasts of *M. latissimum*

1. Surface view of the middle part of gametophyte of *Monostroma latissimum*, $\times 500$; 2. Protoplasts just isolated, $\times 400$; 3. Gametangia, $\times 200$; 4. Gametes, $\times 400$; 5. Settled zygotes, $\times 200$; 6. Zoosporangia, $\times 200$; 7. Zoospores, $\times 100$; 8. A juvenile thallus, $\times 40$; 9. A kind of tissue, $\times 100$; 10. Cell clusters, $\times 400$; 11. Rhizoidal cells, $\times 200$; 12. A thallus with leaves, $\times 400$; 13. Abnormal germlings, $\times 400$ (scale bar $600 \mu\text{m}$); 14. Rhizoids of a tubular thallus, $\times 400$; 15. A tubular thallus, $\times 200$; 16. Germination of somatic cell developed from protoplast, $\times 400$; 17. A rhizoidal cell germinating from a somatic cell, $\times 200$; 18. Cellular germling dividing, $\times 400$ (scale bar $600 \mu\text{m}$); 19. Cellular germling with rhizoids, $\times 200$ (scale bar $600 \mu\text{m}$); 20. A juvenile thallus with rhizoids, $\times 20$.