

磷对条斑紫菜单细胞固体培养的影响

沈颂东¹, 贺丽虹², 黄鹤忠²

(1. 苏州大学 生命科学学院, 江苏 苏州 215006; 2. 苏州大学 农业科技学院, 江苏 苏州 215006)

摘要: 酶解条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)得到单细胞, 培养于添加不同浓度 $H_2PO_4^-$ 的 0.7% 琼胶培养基上。观察磷浓度变化对细胞分化发育速度、细胞团和幼苗的比例、幼苗生长和单孢子放散等的影响, 探讨条斑紫菜单细胞固体培养的适宜磷浓度。结果显示, 在磷质量浓度 10 mg/L、20 mg/L 时, 细胞的发育速度和幼苗的生长速度都较快, 能够形成正常大苗。培育 14 d 幼苗即大量放散单孢子。在添加 4 mg/L 磷营养盐的培养基上, 幼苗生长慢, 培育 22 d 能够形成少量大苗, 未见放散单孢子。当磷质量浓度低于 2 mg/L 或高于 40 mg/L 均不能形成正常大苗。

关键词: 条斑紫菜; 固体培养; 磷

中图分类号: S968.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)05-0602-06

20 世纪 70 年代末, 紫菜单细胞和原生质体的分离、培养技术日趋成熟, 氮、磷营养盐、温度、光强、盐度等因素对液体培养紫菜细胞分化发育的影响已有报道^[1-4]。与液体培养相比, 固体培养^[5]能够实现对单细胞的定点观察, 因此在细胞变异体筛选和其他遗传育种研究中具有许多优点。

紫菜单细胞固体培养的研究起步较晚。王志勇等^[6]报道了在不同浓度的琼胶培养基上以及培养基中 Ca^{2+} 浓度变化对坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)细胞分化、发育和生长的影响, 沈颂东等^[7]报道了在固体培养基上条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)单细胞的存活率及分化发育途径, 张亚萍等^[8]报道了固体培养基中添加植物激素对条斑紫菜细胞生长发育的影响。上述研究显示, 在固体培养基上细胞的发育途径与在液体中一样, 可形成幼苗、细胞团、丝状体和精子囊器等。大部分营养细胞的发育途径主要有 2 种: 形成幼苗和细胞团。而培养基成分的变化对营养细胞的分化和发育会产生一定的影响。本研究主要探讨培养基中添加不同浓度的磷对条斑紫菜营养细胞形成细胞团和幼苗的比例, 以及细胞团对幼苗生长和发育的影响, 以期建立和完善紫菜细胞的固定化培养方法提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

条斑紫菜采自江苏省如东县养殖网帘。干燥到一定程度后保存于冰柜中。实验前 3 天取出, 在室温(15℃)、自然光下复苏。酶解前挑选健康完整的叶片, 用毛笔在消毒海水中反复洗刷 2 遍, 然后在 0.7% KI 溶液中浸泡 10 min, 再用消毒海水漂洗 2 遍, 放入青霉素小瓶中, 剪碎, 备用。

1.2 培养基制备

实验用海水取自江苏省南通海域。培养基的琼胶浓度为 0.7%, 以添加不同浓度 KH_2PO_4 营养盐的消毒海水配制, 在 120℃ 高压灭菌 30 min。P 营养盐设 2 mg/L、4 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L 共 10 个梯度, 另设 1 个不添加 P 营养盐的对照组。为保证 N 营养盐供应, 各组均添加 40 mg/L N 营养盐($NaNO_3$)。实验在无菌 6 孔板上进行。每种处理设 3 个重复。

1.3 单细胞制备

实验室自制粗海螺酶经 0.22 μm 滤膜过滤后, 加入一定量葡萄糖即为酶解液。酶解在室温(15℃)下进行。4 h 后以 300 目尼龙筛过滤, 3 000 r/min 离心 5 min, 除去上层酶液。所得细胞

收稿日期: 2004-02-10; 修订日期: 2004-11-05。

基金项目: 国家自然科学基金(40206019)。

作者简介: 沈颂东(1968-), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为藻类生物学。E-mail: shensongdong@hotmail.com

以消毒海水稀释后接种。

1.4 培养方法

细胞接种后以涂布棒涂布均匀,6孔板以Parafilm膜封口。在20℃,30~50 $\mu\text{mol (P)}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,12 L:12D的恒温培养箱中培养。整个培养过程中不再更换培养基。

1.5 数据统计

接种后第2天细胞即附着下来。每个培养皿随机选取5个视野,在培养皿底部作标记,进行定点观察。从第2天开始每天观察记录细胞的分化发育情况。在接种后第4、10、14天分别记录每个视野中单个营养细胞(不包括各种孢子)、细胞团、细胞苗的个数,统计营养细胞分化形成细胞团和细胞苗的比例。同时记录细胞团和细胞苗的发育速度、放散孢子的早晚及孢子的发育情况等。

2 结果与分析

2.1 营养细胞的分化发育情况

刚酶解出来的紫菜细胞呈墨绿色,培育3~4 d后颜色逐渐泛黄、转红,再生出细胞壁并开始分裂和发育。除少数在实验期间保持单细胞状态外,大部分营养细胞能够分化形成细胞团和幼苗。

图1和图2分别显示了在14 d内,营养细胞分化形成细胞团和细胞苗的比例随磷浓度的变化曲线。比较图1和图2可以发现,在培育的早期阶段,细胞团的形成比例明显高于细胞苗。不论营养盐的浓度高低,营养细胞都先进行二等分裂,2个子细胞无极性分裂形成细胞团。细胞的分裂速度在10 mg/L组最快,平均有23%的细胞团分裂到2~4细胞期,其中三细胞的有2.4%,四细胞的有5.9%。在80~150 mg/L的高磷浓度组,细胞的分裂比例较低。150 mg/L组只有7%的细胞开始分裂,且细胞液泡明显增大,色素体萎缩,表现出发育受抑制的现象。如果添加的磷质量浓度达到200 mg/L以上,接种后24 h液泡就增大到几乎占据整个细胞,色素体分散到细胞边缘成一薄层(图版I-1),并逐渐解体,3 d后细胞全部解体死亡。在低于80 mg/L的浓度下培养,未见细胞液泡明显增大的情况。可见磷浓度过高对紫菜细胞的培养是不利的。

随着培育时间的推移,营养细胞形成细胞团的比例继续增加。培育10 d的记数结果显示,各浓度组细胞团的的比例仍高于细胞苗的比例,表明营养细胞的发育途径以分裂形成细胞团为主。除对照组

和150 mg/L组外,细胞团比例均在40%以上。随后发育成熟的细胞团逐渐开始破壁释放孢子。这种孢子的一端延伸出突起并分化成假根,另一端则进行横分裂,进而发育成单列至多列细胞的幼苗(图版1-2),萌发率为100%。在10 mg/L、20 mg/L两组细胞团的发育最快,因此第14天的记数结果显示,10 mg/L、20 mg/L两个浓度组细胞团的比例显著下降。而对照组和150 mg/L组细胞团的比例显著上升,显示过高或过低浓度的磷可导致营养细胞发育迟缓,营养细胞能够大量形成细胞团。

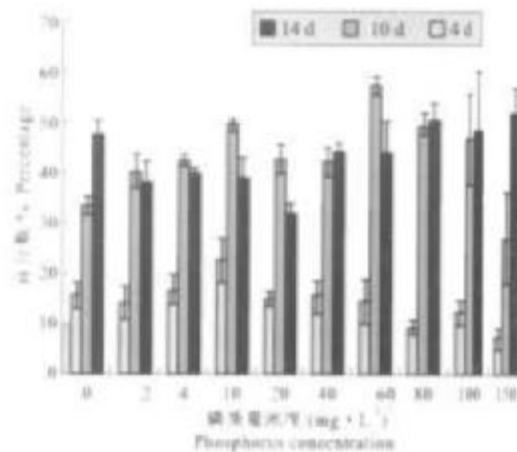


图1 不同磷浓度组分化形成细胞团的营养细胞比例
Fig.1 Percentage of vegetative cells developed into cell aggregates at different phosphorus concentration

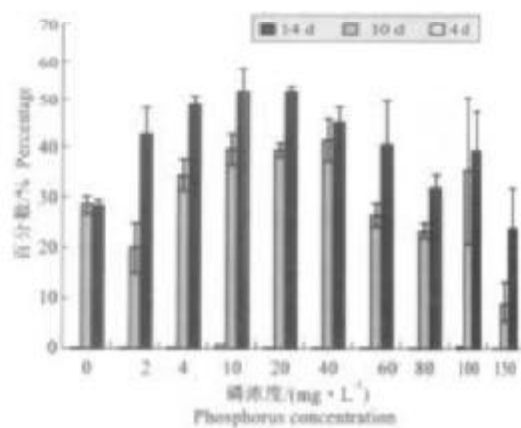


图2 不同磷浓度组发育形成细胞苗的营养细胞比例
Fig.2 Percentage of vegetative cells developed into cell seedlings at different phosphorus concentration

2.2 幼苗的形成与生长情况

在固体培养基上紫菜幼苗主要有3个来源,分别称为细胞苗、孢子苗和单孢子苗。细胞苗是指由酶解得到的营养细胞直接发育形成的幼苗。孢子苗是指由细胞团放散孢子形成的幼苗。单孢子苗是指由大苗放散单孢子形成的幼苗。其中细胞苗发育早,生长快,苗体大。孢子苗和单孢子苗的发育平均比细胞苗迟10 d左右,因此苗体小。

由图1和图2可以看出,培育的早期(前4天)进行无极性分裂产生细胞团的营养细胞的比例较高,而进行极性分裂形成细胞苗的营养细胞比例接近为0,只在添加了10 mg/L 磷盐的固体培养基上平均约有0.6% ($n=9$) 的细胞进行极性分裂,向形成细胞苗的方向发育。这可能是由于极性分裂必须在细胞内某些特殊物质浓度达到一定程度后才能进行,而这些物质的产生需要时间,因此细胞苗在接种后5天才开始大量出现。

如图2所示,培育10 d后在10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L 3组中2细胞以上的细胞苗比例达到39%~41%,几乎与细胞团的比例相等。而细胞苗的生长速度在10 mg/L、20 mg/L组最快。培育10 d,部分已发育至12~15细胞的单列细胞苗。在20 mg/L组许多10细胞左右的单列细胞苗已开始纵分裂,发育成为多列细胞的幼苗。培育14 d时,10 mg/L、20 mg/L组幼苗比例都达到52%,大部分为2~3列细胞的大苗,部分细胞苗开始从边缘游离放散单孢子,单孢子可发育形成正常有假根的幼苗(图版I-3)。培育至22 d,10 mg/L、20 mg/L两个浓度组的细胞苗都发育成大苗,大量放散单孢子,有的单孢子苗已发育至2~3列细胞(图版I-4)。但苗体颜色发灰,这可能是由于幼苗生长发育快,对营养盐的需求较高,特别是氮盐,而本实验中添加的氮浓度为40 mg/L,随着培育时间的延长,难以满足幼苗的生长需求,因而表现出缺氮症状。

在添加磷质量浓度为4 mg/L时,培育22 d也能形成少量大苗(图版I-5),但大部分为宽卵形的小苗,小苗颜色深红,细胞圆,体积较大,液泡明显,有多分枝的发达假根(图版I-6)。培育期间未见放散单孢子。

在2 mg/L、40 mg/L、60 mg/L 3个浓度组,细胞苗的形成比例也较高(图2)。但细胞苗生长发育缓慢。如图版II-1~3所示,培育22 d,大部分细胞苗为细长的单列或2列细胞的小苗,少数为宽短

的畸形多列细胞苗,实验期间未见放散单孢子。在80 mg/L、100 mg/L 2个高磷浓度组细胞苗生长发育更加迟缓(图版II-4、5),苗体小,绝大部分为单列细胞,同时成活率显著下降,显示磷浓度偏高对细胞和幼苗有一定的毒性。在150 mg/L组,细胞苗多为单列细胞,假根发育不明显(图版II-6)。在未添加磷营养盐的对照组,细胞苗能够分化出假根,但细胞分裂受到抑制,不能形成正常的单列或多列细胞的幼苗(图版II-7),这说明一定浓度的磷对于细胞和幼苗的正常生长发育是必需的。

综上所述,在添加不同浓度磷营养盐的固体培养基上营养细胞的分化与发育情况差异很大。在添加的磷质量浓度为10~20 mg/L时细胞发育最快,细胞团开始放散孢子和细胞苗开始放散单孢子的时间最早,同时营养细胞直接形成细胞苗的比例高。在10 mg/L组细胞苗最早开始形成和发育。

3 讨论

本实验结果显示,如果固体培养基中只加氮不加磷(对照组),早期虽然细胞能够正常进行极性或非极性分裂,但所形成的细胞团不能继续发育并放散孢子;细胞苗也不能继续发育为单列或多列细胞的正常幼苗。磷浓度越低,细胞苗生长发育越迟缓。如果添加的磷浓度偏低(2 mg/L),不能满足幼苗正常生长发育的需要,也不能培育出正常大苗。如果磷浓度过高(>40 mg/L),则会抑制细胞和幼苗的生长发育,甚至影响细胞的存活率,也不适宜。在本实验中,从细胞的分裂速度、细胞团和细胞苗的形成比例、幼苗的生长发育速度等方面综合比较,固体培养条斑紫菜单细胞时,适宜添加的磷质量浓度为4~20 mg/L。

近年来,利用植物细胞的全能性,国内外的藻类学家纷纷开展了酶解紫菜体细胞和离体叶状体小切块培养成苗的研究。王素娟等^[8]通过体细胞育苗的海上小型栽培实验也取得了较好的成果。在体细胞成苗的3种主要方式中,由于细胞苗的形成比孢子苗(细胞团放散孢子成苗)早,生长快,且能够大量放散单孢子成苗,因此紫菜叶状体细胞育苗应尽可能提高营养细胞直接分化形成细胞苗的比例,而降低通过细胞团成苗的比例。本实验的结果显示,通过控制磷营养盐的浓度,能够影响细胞苗的形成比例和发育速度。在固体培养条件下,培养基中添加10~20 mg/L 磷盐所形成的细胞苗比例及其发育速

度都是最快的。而生产条件下应用的一般都是液体培养基,营养盐的扩散速度比固体培养基快,因此适宜的营养盐浓度可能不同于固体培养条件,这有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 何培民,王家娟. 外界因素对条斑紫菜体细胞分化发育的影响[J]. 海洋科学,1991,4:61-65.
- [2] 何培民,王家娟. 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.
- [3] 何培民,王家娟. 氮磷浓度对条斑紫菜细胞培养的影响[J]. 上海水产大学学报,1996,5(3):153-162.
- [4] 严兴洪,王家娟. 温度、光强和盐度对坛紫菜体细胞发育的影响[J]. 热带海洋,1993,12(1):94-99.
- [5] 张亚萍,于文功,戴雄彪,等. 植物激素在条斑紫菜原生质体固体培养中的作用[J]. 海洋湖沼通报,2002,4:56-62.
- [6] 王志勇,黄世玉,陈 为,等. 坛紫菜叶状体营养细胞的固体培养[J]. 厦门水产学院学报,1996,18(1):1-5.
- [7] Shen Songdong, Dai Jixun. Isolated cells of porphyra yezoensis cultured on solid medium[J]. Mar Sci Bull, 2001, 3(1):45-50.
- [8] 王家娟,孙云龙,路安明,等. 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):1-7.

Effects of phosphorus on cell development of *Porphyra yezoensis* in solid culture

SHEN Song-dong¹, HE Li-hong², HUANG He-zhong²

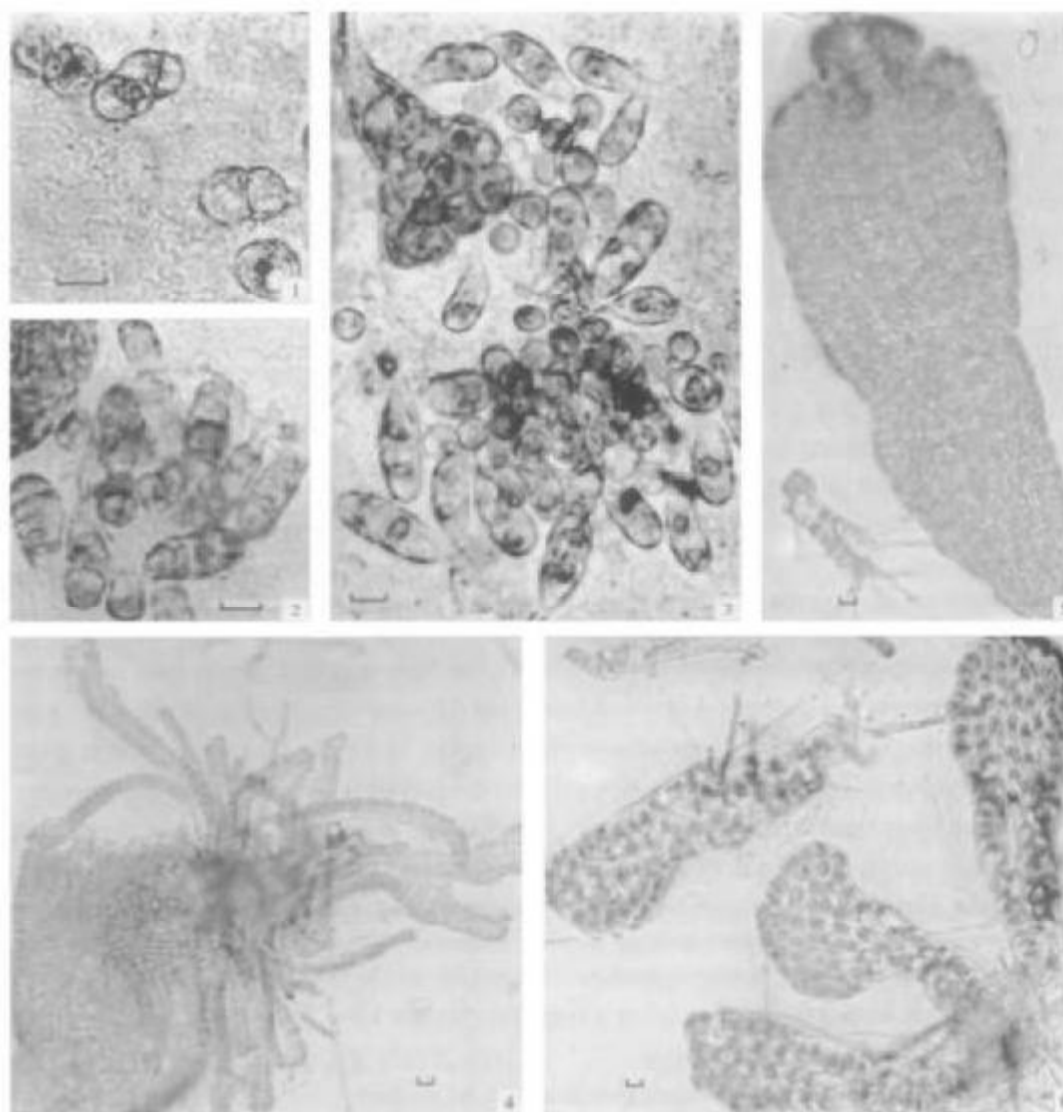
(1. Life Science School, Suzhou University, Suzhou 215006, China; 2. Agriculture School of Science and Technology, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract: To culture cells and tissues on medium with certain percentage of agar is called solid culture. Since cultivars on solid medium can be located in fixed position, the development process of a certain cell can be easily investigated and the interference between cells can be highly decreased. Therefore solid culture is applied in the present study to understand the development and differentiation pathways of vegetative cells of *Porphyra yezoensis*. Vegetative cells were cultured on solid media (0.7% agar) enriched with varied concentration of phosphorus (all enriched with 40 mg/L nitrogen). Division and development of vegetative cells, growth and development of cell seedlings were studied. The results show that: 1) At the concentrations of 10 mg/L and 20 mg/L, cells divide and develop faster, and a lot of large and normal cell seedlings are formed after 22 days of culture. Cell seedlings can release monospores after 2 weeks of culture. 2) At the concentration of 4 mg/L, cell seedlings grow slowly. Smaller quantities of large normal seedlings can be formed after 22 days of culture. No monospores are released during the experimental period. 3) No large and normal seedling formed when phosphorus concentrations were lower than 2 mg/L or higher than 40 mg/L.

Key words: *Porphyra yezoensis*; cell culture; phosphorus; solid medium

沈颂东等:磷对条斑紫菜单细胞固体培养的影响

SHEN Song-dong et al: Effects of phosphorus on cell development of *Porphyra yezoensis* in solid culture



bar = 10 μ m

图版 I

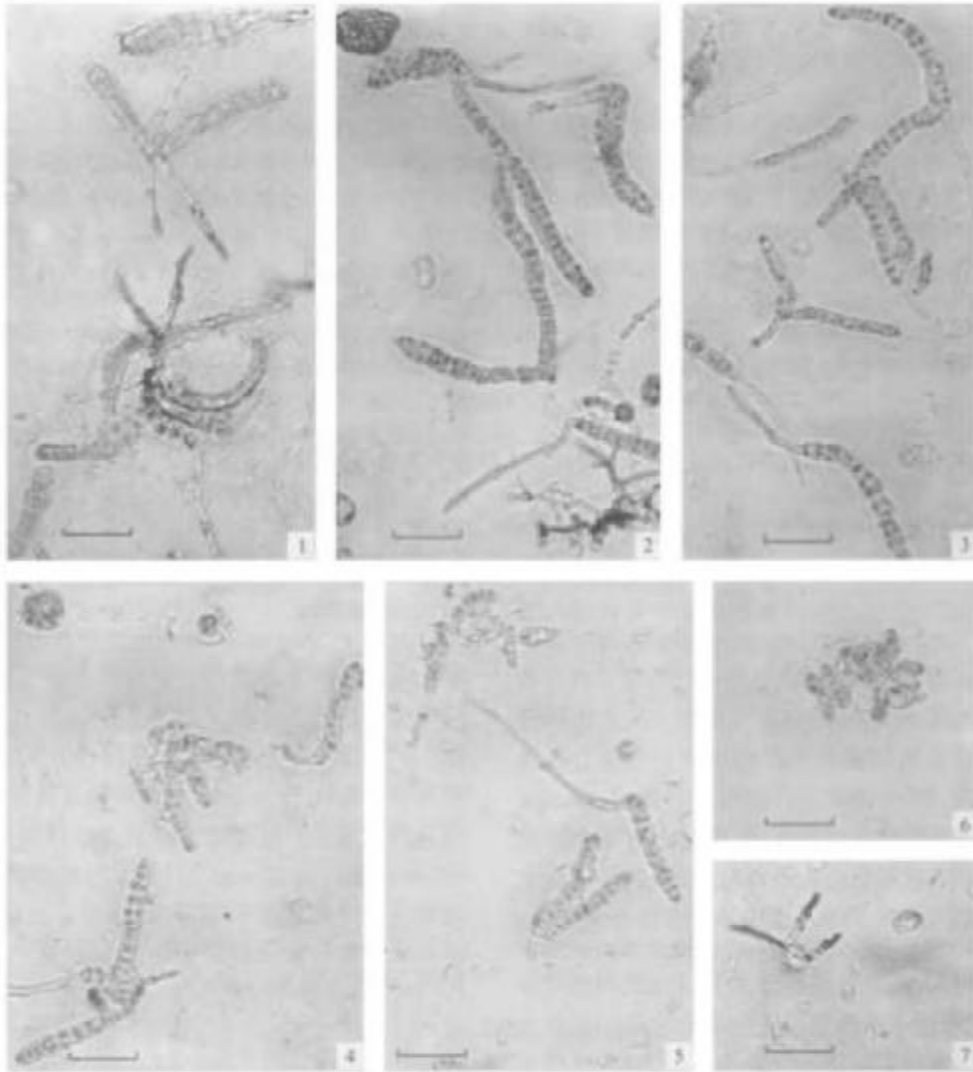
1:接种 24 h 200 mg/L 组的细胞; 2:细胞团放散孢子及孢子萌发; 3:细胞苗放散单孢子及单孢子萌发 (4-6:在添加不同质量浓度磷的固体培养基上培育 22 d 细胞苗的发育情况); 4:10 mg/L、20 mg/L 组; 5:4 mg/L 组大苗; 6:4 mg/L 组小苗。

Plate I

1:Vegetative cells of 200 mg/L phosphorus cultured for 24 h; 2:Spores releasing from cell aggregates and the spore germings; 3:Monospores releasing from cell seedlings and the monospore germings. (4-6:Development of cell seedlings cultured for 22 days at different phosphorus concentrations). 4:10 mg/L, 20 mg/L; 5:Larger cell seedlings at 4 mg/L phosphorus group; 6:Smaller cell seedlings at 4 mg/L phosphorus group.

沈颂东等:磷对条斑紫菜单细胞固体培养的影响

SHEN Song-dong et al: Effects of phosphorus on cell development of *Porphyra yezoensis* in solid culture



bar = 10 μ m

图版 II

1: 2 mg/L 组; 2: 40 mg/L 组; 3: 60 mg/L 组; 4: 80 mg/L 组; 5: 100 mg/L 组; 6: 150 mg/L 组; 7: 对照组 (不添加磷)

Plate II

1: 2 mg/L; 2: 40 mg/L; 3: 60 mg/L; 4: 80 mg/L; 5: 100 mg/L; 6: 150 mg/L; 7: Control (no phosphorus enrichment)