

青海菜原生質體之分離及培養

陳衍昌、江永棉

臺灣大學海洋研究所

摘 要

為發展青海菜養殖之新技術, 本研究使用酵素分離了青海菜之原生質體。研究發現青海菜原生質體可以4% Cellulase 和2% Macerozyme 之山梨糖醇水溶液分離出來。原生質體之產率隨著山梨糖醇-酵素液之濃度, 由0.5M增加至1.2M而增加, 然後隨著前者之增加而減低。在1.9M山梨糖醇-酵素液中, 無原生質體產生。在1.2M山梨糖醇-酵素液中, 以50rpm速度旋轉六小時者產量最高(9×10^6 個原生質體/克新鮮藻體)。原生質體產量, 隨著橢圓旋轉式培養器旋轉速度之增加而增加, 但是若超過50rpm, 則不正常形狀原生質體數目, 將隨著旋轉速度之增加而增加。原生質體分離出後必須儘速移至含有甘露糖醇-PES培養液中, 否則將喪失其分生能力。在0.85M甘露糖醇-PES培養液中五天後移至純PES培養液繼續培養, 則可獲得最高比率(61.3%)之具分生能力之原生質體。早或晚於五天移置則會導致原生質體之死亡或喪失活力。原生質體分離出後五小時即開始形成細胞壁。在PES培養液中七至九天開始分裂, 十四至十八天則形成細胞群。細胞群在PES培養液中可大量繁殖並產生少數葉狀體。本研究結果似可做為青海菜養殖之另一方法。

一、前 言

青海菜是一種分佈極廣的海洋綠藻其葉片只有一個細胞之厚度。在日本已有青海菜之商業化大規模養殖(Shokita et al. 1991)。在台灣青海菜亦被利用並採收, 但未有人工養殖。傳統的青海菜養殖技術, 首先須在生長季節從做野外採集成熟的青海菜藻體, 將附著於其上的生物及其他雜質

去除之後，置於桶內以強光照射處理以促使藻體釋放配子，然後收集配子結合之結合子。將結合子培養於室內之桶中數個月使其發育釋出動孢子(zoo spores)並附著於網子上，最後將此網置於海中培養。如同上述，傳統的養殖方法是十分的繁雜及費時的工作，有時常很難收集到足夠的成熟藻體以及充足的配子或動孢子於網子上。因此，有必要發展出一套新的青海菜養殖技術。

由數種海藻所分離之原生質體已可直接發育成一般植株(Tang 1982, Zhang 1983, Polne-Fuller et al. 1986, Chen 1987)及培養成細胞懸浮液(Chen 1989)的報告，提供了水產農作物及其基因改良的技術的基礎。而這些技術或許可以應用來發展一種新的海藻養殖技術。基於此，本研究主要目的是擬發展台灣青海菜之大量養殖技術。在此報告中將描述青海菜原生質體的製備及其細胞懸浮液之培養，以提供此海藻另一種大量養殖之技術。

二、材料與方法

青海菜是於1990年4月4日於澎湖，講美採集。新鮮藻體立即以沾有海水之紙巾包裹裝入塑膠袋內封好，置於冰盒中運回台大海洋研究所藻類實驗室。

(一)、無菌藻體之準備：

本研究採用Reddy et al. (1989)之方法，但稍為加以修改。選取大約二公分平方的藻體以過濾之海水充分加以沖洗後置於含有1% KI-I₂ (2g KI and 1g I₂ dissolved in 300ml distill water)的滅菌海水的超音波洗滌器(Branson)中，洗滌兩次各五分鐘，以去除附著的生物。藻體再以滅菌海水沖洗數次，最後將其培養於含有10ml混合抗生素液(Polne-Fuller and Gibor, 1984)的100ml之滅菌Provasoli enriched seawater (PES)培養液中24小時，溫度為24°C，光度為20μ Em⁻²s⁻¹，每天照光12小時。

(二)、溶解細胞壁之酵素液之準備：

將0.4克(4%)纖維酶(Cellulase Onozuka R-10)及0.2克(2%)軟化酶溶於以磷酸緩衝溶液所配製的pH值為6.0的不同濃度(0.5-1.9M)的山梨糖醇(sorbitol)水溶液中。這些酵素液以10,000xg之轉速於0°C下離心十分鐘後取出上層澄清液，再以0.2μ m之可丟棄式薄膜過濾裝置過濾消毒。

(三)、原生質體之分離：

爲了要測定分離原生質體所須適當的滲透濃度，首先以健康的藻體培養於0.5-2M的山梨糖醇水溶液中6小時，然後把藻體移至含0.01% Evans Blue的海水中於20μ Em⁻²s⁻¹，24°C中培養1小時，再

以顯微鏡檢查藻體細胞是否被染成藍色。這個初期試驗發現青海菜細胞培養於1.3-1.75M (1337.5-1803.7 milliosmo/kg)的山梨糖醇水溶液中，於24°C下6小時仍可保持其質離能力(plasmolysis)。濃度若高於1.75M則細胞死亡，而濃度低於1.3M則使細胞膨脹而導致其喪失活性。

將消毒過之藻體以滅菌海水清洗後，在無菌操作箱中以乾淨刀片切成0.5-1厘米平方。根據先前之質離濃度的試驗，先稱取0.1克藻體切片分別培養於40個含有各種濃度(0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.2, 1.35, 1.55及1.9M)的10ml山梨糖醇-酵素液之培養瓶(40ml, Falcon)中，並置於40, 50, 60, 70及80rpm五個轉速之橢圓旋轉式培養器中培養六小時後，計數正常及不正常的原生質體數目。不正常原生質體和正常者之外表形狀有極大不同，前者常有向內凹或外凸之表面形狀，後者則為平滑圓形表面。原生質體之分離過程均在黑暗中，(Marchant and Fowke 1977, Cheney et al. 1986, Reddy and Fujita 1991) 24°C下進行，以促使原生質體沈降下來(Liu et al. 1992)。

(四)、原生質體的純化：

經過前述之分離過程後，將含有原生質體的酵素液以59 μ m的尼龍網過濾，分開原生質體及未被溶解的藻體。將此過濾液小心滴於含有35% (w/v)密度緩衝液的15ml離心管，於100xg轉速離心30分鐘後，利用Pasteur滴管吸取在離心管中形成中間界面層的原生質體。新鮮原生質體的產率是以血球計數器(hemocytometer)計數，此實驗共重複三次，平均值及標準偏差均加以記錄。

(五)、原生質體的培養：

將純化之原生質體立即培養於含有各種濃度(0.5, 0.7, 0.85及1M)甘露糖醇(mannitol)的PES培養液(甘露糖醇-PES)中，以便決定最適的培養原生質體之滲透濃度。這些甘露糖醇-PES培養液亦添加了0.01%的Evans-Blue，並於培養的1至10天中每天以倒立顯微鏡觀察具活性的原生質體。

原生質體均在光度為166 μ Em⁻²s⁻¹，照光12小時及24°C下培養。原生質體是先培養於0.85M甘露糖醇-PES培養瓶中五天，然後轉移至純PES培養液中培養，以獲得具再生能力的原生質體。

由原生質體再生而來之單細胞團(cell-clusters)，則是先將其噴撒在由合成纖維製成之細繩上，再培養於水族箱中大約30天，然後再將細繩置於海邊魚池中繼續培養。

(六)、原生質體細胞壁再生之螢光染色試驗：

螢光染劑(Calcofluor White ST, Sigma)可被利用來研究原生質體細胞壁再生之情形(Galbraith 1981, Roberts et al. 1982, Chen and Chen 1993)。在螢光染色過程中，發現有再生細胞壁的原生質體

呈現綠色之螢光，沒有再生細胞壁者則呈現紅色。將純化之原生質體培養於0.85M甘露糖醇-PES培養液中並於第0, 2, 4, 8, 12, 及24小時分別加入0.01% (w/v)之Calcofluor White，並在培養的前24小時是每小時以具螢光設備之倒立顯微鏡(Nikon, Diaphot-TMD, filter, BG-12 with wave length of UV=320-400nm)觀察計數具藍色及紅色螢光的原生質體數，培養一天後則改為每天觀察一次。每次觀察是隨意選取五個顯微鏡區域加以計數。

三、結果與討論

如表一所示，青海菜藻體在0.5-1.55M之山梨糖醇-酵素液(約相當於0.6-1.7M純山梨糖醇之滲透濃度)中在40-80rpm之轉速於24°C下6小時，可分離出原生質體。在50rpm時，當濃度由0.5增至1.2M時，原生質體產率亦增至最大(9×10^6 protoplasts/g)，但由1.2增至1.9M時，產率則逐漸下降，在1.9M則完全無原生質體的產生。Fujita and Migita (1985)以0.8M甘露糖醇及10%纖維酶在18-20°C處理石蓴(*Ulva pertusa*)四小時及青海菜(*Monostroma nitidum*)兩小時，二者均獲得 10^5 - 10^6 protoplasts/0.2g之產率。本研究之產率和Fujita and Migita所研究之青海菜及石蓴的產率

表一 在不同山梨糖醇濃度之酵素液及旋轉速度的原生質體產率

酵素液之 山梨糖醇 濃度(M)	原生質體產率				
	旋轉速度(rpm)				
	40	50	60	70	80
0.5	2.3±0.04	9±0.2	5.4±0.3	3.3±0.3	1.6±0.1
0.7	3.6±0.3	14.4±0.5	8.6±0.5	5.4±0.5	2.6±0.4
0.9	11.3±0.5	45±1.5	27±1.4	6.7±0.2	8.1±0.4
1.1	38.3±1.9	153±3.7	91.8±0.6	56.6±4.9	27.9±1.8
1.2	225±4	900±50	540±6	333±47	162±6.4
1.35	171±5	675±35	405±6	252±30	121.5±4.4
1.55	72±5.7	288±11	172.8±14	108±12	51.8±2.6
1.9	0	0	0	0	0

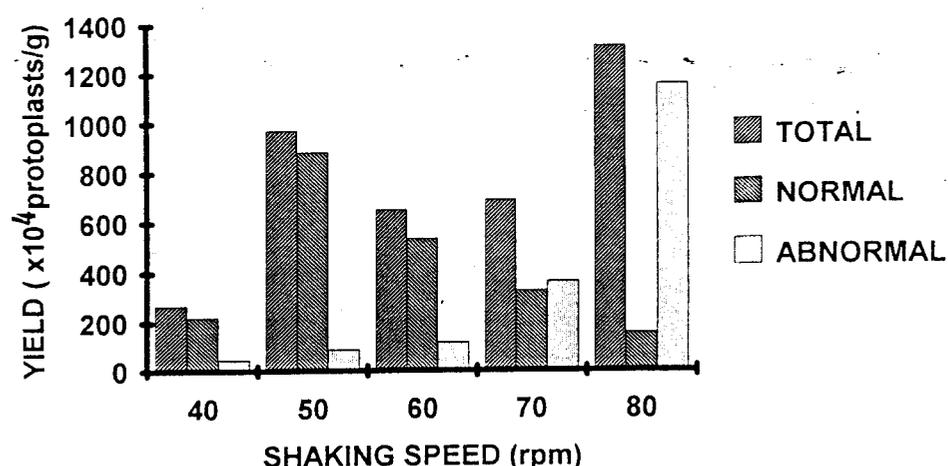
不同，可能是因為酵素，滲透壓，pH值或藻體生理活性及生長階段之不同而造成(Fujita and Migita 1985p, Reddy et al. 1989)。

剛分離之原生質體有必要加以純化，以便於後續之研究。因為，只以尼龍網來過濾原生質體—酵素液(Saga 1984, Reddy et al. 1989)常會有大量的細胞碎屑及破裂的原生質體之污染而影響其活性。為了避免這些污染，本研究曾嘗試各種純化的方式，結果發現使用一種具有低滲透潛能及高比重特性之比重緩衝液(Ficoll-400, Sigma)(Chen and Chen 1991)，可以達到最有效的純化原生質體之目的。

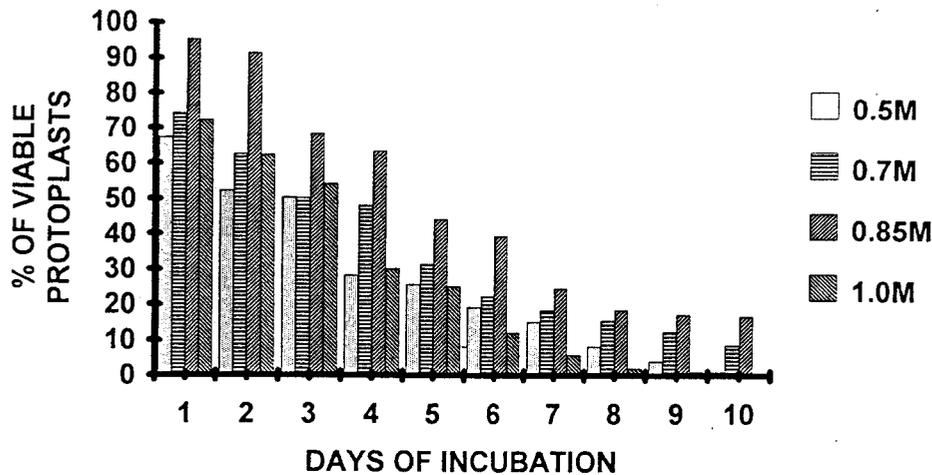
不論山梨糖醇—酵素液之濃度為何，橢圓式旋轉培養器之旋轉速度亦會影響原生質體之產率。如圖一所示，正常原生質體的數目隨旋轉速度之加快而增加，由 2.21×10^6 增至 8.86×10^6 個。但當轉速由60rpm加快至80rpm時，不正常(膨脹及萎縮)者則由 1.16×10^6 (17.8%)增至 11.57×10^6 (88.2%)。此結果在石蓴的原生質體之研究(Chen and Chen, 1991)中亦有發現。

在實驗期間發現山梨糖醇水溶液即使濃度高至1.2M也不會有再結晶之情形出現，但甘露糖醇在此濃度則極易有再結晶之產生。因此我們使用山梨糖醇做為分離原生質體酵素液中調節滲透壓之物質。在接下來之實驗中並發現原生質體在山梨糖醇—酵素液中不可超過6小時。因為過長的酶解時間可能對原生質體有不良影響而使其極易喪失活性。因此，原生質體必須儘快加以純化後移至添加有甘露糖醇之PES培養液中。

我們亦發現高濃度的甘露糖醇—PES培養液亦會影響原生質體之活性(圖二)。在各種甘露糖醇—PES濃度之培養實驗中，發現0.85M的甘露糖醇—PES培養液是較適合的原生質體培養液，因為在此濃度具活性的原



圖一 不同轉速下正常及不正常原生質體產率。藻體培養於1.2M山梨糖醇—酵素液，24°C黑暗中六小時

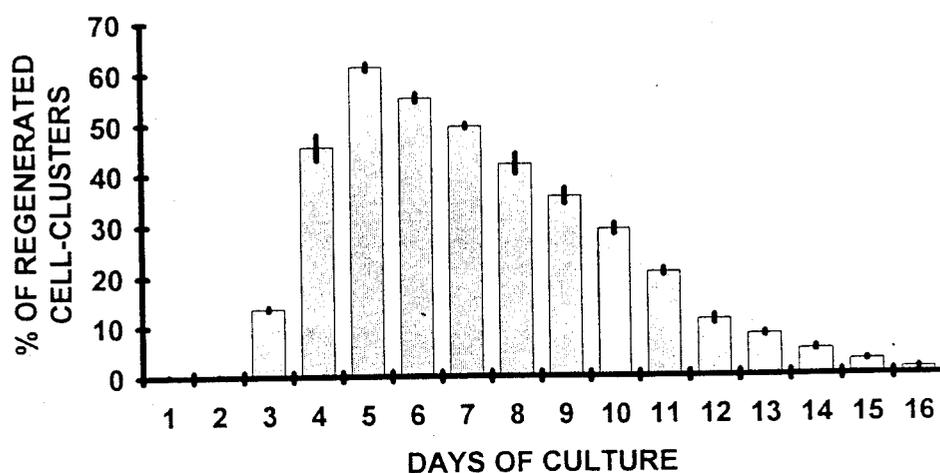


圖二 具活性原生質體比率。原生質體分別培養於 0.5、0.7、0.85及1.0M甘露糖醇—PES培養液於光度為 $166\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照每日12小時， 24°C 下十天。

生質體數目在任何培養時間（1至10天）中均比其它的濃度者高。因此，本實驗如同其他研究者(Saga and sakai 1984, Saga 1984, Cheney et al. 1986, Polne-Fuller and Gibor 1987, Ducreux and Kloreg 1986, Reddy et al. 1989 1992, Fujimura et al. 1989, Fujita and Saito 1990)，均採用甘露糖醇調節原生質體之滲透壓。

爲了獲得較高比率之具再生能力原生質體，將剛分離之原生質體分別培養於含0.85M甘露糖醇之PES培養液(ca. 1800 mOs/kg)中1至16天後，再將其分別轉移至純PES培養液(ca. 998 mOs/kg)中，結果發現（圖三）形成細胞團的數目隨著先前培養在甘露糖醇—PES培養液的1至5天中之天數的增加而逐漸增加至最高，然後再遞減，至第16天最少。此結果表示原生質體培養於0.85M甘露糖醇—PES培養液中五天再轉移至PES培養液，可以獲得最高數(61.3%)的細胞團。當原生質體分別培養於0.85M甘露糖醇—PES中1, 2, 3及4天者其細胞團再生率分別爲0.3%, 0.2%, 13.6%及45.5%，此結果表示這些1至4天大的原生質體可能細胞壁尚未再生完全（表二），突然將其移入低滲透壓的環境會使其喪失活性或死亡。

原生質體如果培養於0.85M甘露糖醇—PES中超過五天，細胞團之再生率亦下降，這可能是甘露糖醇對原生質體產生毒性(Chen and Chen 1991)。在Reddy et al. (1989)及Reddy and Fijita (1991)的報告亦有類似之結果，在他們的報告中指出，原生質體長期培養於高滲透壓之水溶液中，例如0.2-0.8M之甘露糖醇液中，會對原生質體之分裂造成影響，產生



圖三 細胞團再生率。原生質體分別培養於0.85M甘露糖醇-PES培養液中一至十六天後轉移至PES培養液培養十二天。培養環境為：光度， $166\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光照每日12小時， 24°C

表二：不同時期(0, 2, 4, 8, 12及24小時)之青海菜原生質體以螢光染劑(calcofluor white)染色的細胞壁再生率

	原生質體培養時間(小時)										
	4	5	6	7	8	12	24	48	72	96	120
	原生質體細胞壁再生率(%)										
1	0±0.01	0±0.01	0±0.01	5.1±0.5	10.8±0.6	20.4±2.3	34.9±7.1	48.1±6.8	51.8±3.8	53.7±4.6	56±2.9
2	0±0.01	0±0.01	6.6±1.1	10.4±1.4	12.8±1.8	28.2±2.0	51.8±3.7	53.9±4.2	55.3±3.3	60.5±4.6	64.2±5.2
3	2±0.4	11.2±2.3	21.5±1.4	23±3.2	23.6±3.1	40±4.8	57±3.9	58.2±5.0	61.3±5.8	67.1±6.1	75.1±5.5
4	-	-	-	-	29±2.6	49.5±3.2	58.4±4.2	59.2±4.6	65.3±4.1	70.7±4.1	75.5±3.8
5	-	-	-	-	-	51.9±4.4	60.9±5.1	63.1±3.2	65.4±4.2	71.5±4.2	76.1±5.7
6	-	-	-	-	-	-	63±4.9	65.9±6.0	66.2±3.6	72.7±2.6	85.3±5.2

- 1.原生質體於分離後立即染色(第零小時)。
- 2.原生質體於分離後第二小時染色。
- 3.原生質體於分離後第四小時染色。
- 4.原生質體於分離後第八小時染色。
- 5.原生質體於分離後第十二小時染色。
- 6.原生質體於分離後第二十四小時染色。

不正常構造之細胞。這種抑制細胞分裂的情形可能是由於在高滲透濃度環境中，使得細胞質中的無機離子鹽濃度變高，因此抑制了各種細胞的生長過程，例如光合及呼吸作用等。

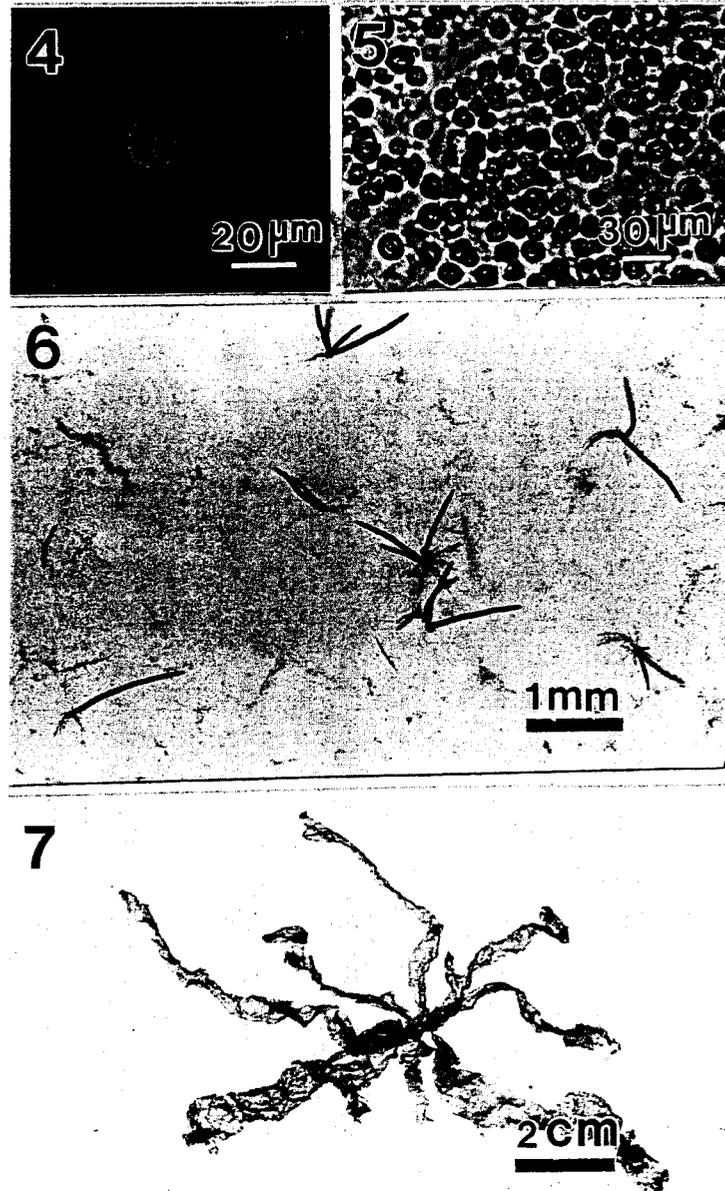
螢光染色試驗之結果指出原生質體是在分離五小時內開始再生細胞壁，而隨著培養時間之增加，細胞壁再生之比率亦增加（表二）。雖然在第4小時，約有2%的原生質體顯示出具細胞壁，不過它們可能是原先所殘存之細胞壁。螢光染色結果亦顯示過早染色的原生質體的細胞壁再生的比率較低，而Calcofluor white對細胞壁再生之負影響(negative effects)似乎是持續性的。如表二，剛分離之原生質體立即培養於含螢光染劑之培養液中，在培養五天後只有56%原生質體再生細胞壁。無論如何，在培養第24小時後染色的原生質體其細胞壁再生率最高(85.3%)（表二，圖四）。本結果比Fujita and Migita (1985)的報告中*Monostroma nitidum*原生質體細胞壁再生率(68.3)高。原生質體細胞壁再生率之差異可能是環境因子(environmental stress)例如，滲透壓及溫度，影響了原生質體之生理狀況所造成(Galun 1981)。

原生質體通常在培養第7-9天開始分裂，然後於14-18天形成細胞團（圖五），某些細胞團於25-30天長出管狀藻體（圖六），這些管狀藻體經繼續培養於PES中30天左右，則由管狀體發育成葉狀之藻體（圖七）。Saga and Kudo (1989)亦由*Monostroma angicava*原生質體再生出細胞團，但Fujita and Migita (1985)的研究中其*Monostroma nitidum*原生質體在細胞壁再生完成後只發育成配子。這種不同的發育形式，可能和原生質體原先在組織中的位置以及培養環境之不同所造成。此現象亦發生於紫菜(*Porphyra* spp.)原生質體的培養(Polne-Fuller et al. 1986)。

青海菜(*Monostroma latissium*)的單細胞團可以極易在PES培養液中大量增殖，將其噴撒在以合成纖維製成的細繩上，然後再培養於野外之海水魚池中，約在二個星期內少數之葉狀體由細繩上生長出來。這些葉狀藻體的產量深受魚池內之自然環境及季節的影響。因此，在能夠成功地發展出一套由原生質體經過細胞團，最後發育成植株的青海菜大量養殖技術前，有必要先深入地研究影響細胞團再生成植株的各種環境因子。

謝 辭

本研究承蒙行政院農業委員會經費補助（計劃編號：81-農建-12.1-糧-67 (57)及82-科技-1.1-糧-56 (68))謹此致謝。



圖四 具再生細胞壁之原生質呈明亮之螢光。

圖五 由原生質體所再生之細胞團。培養環境為：光度 $166\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光照每日12小時， 24°C 。

圖六及圖七由原生質體再生之植株。圖六：培養四十五天；圖七：培養六十天。原生質體於PES培養液中，在光度為 $166\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，每日照光12小時， 24°C 下培養。

參考文獻

- Chen LC-M. 1987. Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. *Bot. Mar.* 30: 399-403.
- Chen LC-M. 1989. Cell suspension culture form *Porphyra linearis* (Rhodophyta) a multicellular marine red alga. *J. Appl. Phycol.* 1: 153-159.
- Chen CS, YC Chen. 1991. Isolation and regeneration of protoplasts from the green alga *Ulva fasciata Delile*. *Proceedings of the National Science Council. ROC Part B: Life Science* 15 (4): 244-250.
- Chen YC, CS Chen. 1993. Use of fluorescent staining to monitor the temporal pattern of cell wall resynthesis in *Ulva fasciata* (Chlorophyta: Ulvales, Ulvaceae) protoplasts. *J.* 41: 237-242.
- Cheney DP, E Mar, N Saga, J. van der Meer. 1986. Protoplast isolation and cell division in the agar-producing seaweed *Gracilaria* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 22: 238-243.
- Ducreux GB Kloareg. 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). *Planta* 174: 25-29.
- Fujimura T, T Kawai, M Shiga, T Kajiwara, A Hatanaka. 1989. Regeneration of protoplasts into complete thalli in the marine green alga *Ulva pertusa*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(8): 1353-1359.
- Fujita YS Migita. 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ. No. 57.* pp. 39-45.
- Fujita YM Saito. 1990. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 161-166.
- Galun E. 1981. Plant protoplasts as physiological tools. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 237-266.
- Galbraith DW. 1981. Microfluorimetric quantization of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor White. *Physiol. Plant.* 53: 111-116.
- Liu QY, LC-M. Chen, ARA Taylor. 1992. Ultrastructure of cell wall regeneration by isolated protoplasts of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 35: 21-33.
- Marchant HJ, LC Fowke. 1977. Preparation, culture, and regeneration of protoplasts from filamentous green algae. *Can. J. Bot.* 55: 3080-3086.
- Millner PA, ME Callow, LV Evans. 1979. Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Planta* 147: 174-177.

- Provasoli L. 1968. Media and products for the cultivation of marine algae. p.63-75. *In*: A. Watarabe and A. Hattori (Eds.) Cultures and collections of algae. Jap. Soc. Plant Physiol., Tokyo.
- Polne-Fuller M, A Gibor. 1984. Developmental studies in *Porphyra* I. blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *J. Phycol.* 20: 609-616.
- Polne-Fuller M, N Saga, A Gibor. 1986. Algal cell, callus, and tissue cultures and selection of algal strains. *Beihefte Zur Nova Hedwigia.* 83: 30-36.
- Polne-Fuller M, A Gibor. 1987. Tissue culture of seaweeds. *In*: Seaweed cultivation for renewable resources. pp. 218-239. Bird KT, Benson PH. (Eds.). Elsevier.
- Roberts E, RW Seagull, CH Haigler, RM Brown, JR. 1982. Alteration of cellulose microfibril formation in eukaryotic cells: Calcofluor White interferes with microfibril assembly and orientation in *Oocystis apiculata*. *Protoplasma* 113: 1-9.
- Reddy CRK, S Migita, Y Fujita. 1989. Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture. *Bot. Mar.* 32: 483-490.
- Reddy CRK, Y Fujita. 1991. Regeneration of planlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. *J. Appli. Phycol* 3: 265-275.
- Reddy CRK, M Iima, Y Fujita. 1992. Induction of fast-growing and morphologically different strains through intergeneric protoplast fusion of *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta). *J. Appli. Phycol.* 4: 57-65.
- Saga N, Y Sakai. 1984. Isolation of protoplasts from *Laminaria* and *Porphyra*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50 (6). 1085.
- Saga N. 1984. Isolation of protoplasts from edible seaweeds. *Bot. Mag. Tokyo.* 97: 423-427.
- Saga N, Kudo T. 1989. Isolation and culture of protoplasts from the marine green alga *Monostroma angicava*. *J. Appl. Phycol.* 1: 25-30.
- Shokita S, K Kakazu, A Tomori, T Toma. 1991. Aquaculture in tropical areas. Midori Shobo Co. Ltd. Japan. iv. 360 pp. (English edition prepared by Yamachi, M.)
- Tang YL. 1982. Isolation and cultivation of the vegetative cells and

protoplasts of *Porphyra suborbiculata* Kjellm. J. Shandong College of Oceanog. 12: 37-50. (in Chinese with English abstract).

Zhang DL. 1983. Studies on the protoplast preparation, culture and fusion of somatic cells from two species of green algae *Ulva linza* and *Monostroma angicava* Kjellm. Journal of Shandong College of Oceanology 13 (1): 57-64.