

中華民國第 55 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

最佳(鄉土)教材獎

040719

揭開礁膜分身之謎-簡化青海菜細胞團形成及再生之條件

學校名稱：國立馬公高級中學

作者： 高二 徐瑋雅	指導老師： 洪立菊
---------------	--------------

關鍵詞：青海菜、細胞團、二次原生質體

摘要

本研究的目的是簡化青海菜細胞團形成條件。取細胞團再生發育的葉狀體，再次進行原生質體酶解，獲得二次原生質體，再誘發形成細胞團，利用此細胞團具有生生不息的增殖能力，做為藻類種苗來源之用。本試驗以酶解液-1，分離出青海菜(*Monostroma nitidum*)原生質體之產量最高，觀察其再生形態，藉此找尋合適之發育路徑，研究青海菜人工“種子化”之可行性。實驗結果確立三種原生質體再生路徑，其中厚壁囊孢型佔 53.7 % 為最高，其次為細胞團型 29.6%，原始型佔 16.7% 最低；原始型培育 30 天後可長成 0.5mm 之葉狀體；由青海菜二次原生質體發育而來的細胞團，有 90±6% 發育為葉狀體，可當作青海菜大量培養之種苗。應用細胞團型的原生質體將是一套簡單、便利且可大量獲得青海菜種苗之生產流程。

壹、研究動機

海洋生態系中，海藻扮演著初級生產者之重要角色，透過光合作用吸收二氧化碳，生產氧氣，改善水質；它們更是許多海洋動物之食物，同時又是棲息、產卵和避難的處所，對沿岸漁業資源之保育有極大貢獻(江永棉、黃檀溪，1986)。海藻本身也具有極高之經濟價值，如食用、藥用、飼料、肥料、提煉海藻膠、替代能源等(黃淑芳，2003)，且含有相當量的蛋白質、維他命和人體所需的礦物質，是極具開發潛力之資源。

由於沿岸環境遭受人為破壞非常嚴重，加上大量開發海藻做為人類生活中各種用途的結果，澎湖水域之天然海藻資源有漸趨萎縮的現象。以青海菜為例，根據漁業年報獲知青海菜產量，在 1983 年盛產期產量大約 300 多噸(乾重)，1991 年減為約 125 噸，至 1999 年僅有 47 噸。2003~2007 年產量稍有提昇，維持在 115~150 噸上下。2008 年寒潮來襲，產量也僅有 73 噸，之後青海菜產量維持在 65 噸左右(行政院農業委員會漁業署，2010)，2011 年更是下降到 16 噸，青海菜產量不穩且逐年下降，可略知海藻資源日趨枯竭。

青海菜(*Monostroma nitidum*)是一種分布極廣的海洋綠藻，屬於綠藻植物門、似松藻目、孢根藻科，礁膜屬。別稱為礁膜、綠紫菜、青菜和鵝仔菜等。藻體外觀呈不規則的薄膜狀，

常見於風浪小或靜水區之潮間帶中，在台灣青海菜的分布以澎湖為主，東北角、恆春半島等則有少量分布。生產季節在冬天 12 月至翌年的 3-4 月(黃和莊，2000)。青海菜可烹煮食用，也做為釣魚餌料、畜產飼料、農業肥料及藥用等。此外，青海菜具有特殊之海藻香，亦含有高量之碳水化合物與礦物質及低量之蛋白質與脂肪，再加上含有多量之硫酸多醣及氨基甜菜鹼 (β -alaninebetaine) 且證實有降低血漿中膽固醇之作用(Maeda, 1991；蔡等，1994)，可當作健康食品銷售，是台灣重要的經濟海藻之一(江等，1990；徐等，2011；黃，2000)。

近年來，海藻的應用與價值，漸漸受到重視，利用範圍也不斷擴大。海藻用於食材、醫療、美容與健康養生的風氣日趨盛行，但天然海藻資源卻有限，並非取之不盡。目前具經濟價值的海藻通常是由野外採集而來，由於野生海藻生長速率和被採集量的不平衡，造成了藻類族群的大量衰減(Polne-Fuller and Gibor,1987)，因此有必要用養殖的方式以提供人類食用或商業用途。在日本青海菜已被成功地商業化大量的養殖以供食用(Shokita et al., 1991)。在台灣人們仍然在探索青海菜商業性的水產養殖技術。傳統的青海菜養殖技術，首先須在生長季節從野外採集成熟藻體，陰乾刺激並以強光照射處理促使藻體釋放配子，收集配子結合成的接合子(zygotes)。再將接合子培養數個月，發育成孢子囊，使其釋出動孢子(zospores)並附著於網繩上，最後將此網移植於海中養殖(Ohno & Triet, 1997；Ohno, 1995；德田 廣、川嶋昭二、大野正夫、小河久朗，1991)。這樣的養殖方式不但會受到季節變化的影響所限制，而且費力耗時，更需要佔用廣大的基礎設施。因此，極需要發展出一套能夠生產藻苗、保存優良品種進而能運用於人工大量養殖的方法，以符合實際所需(Dai et al., 2004; Wang and Chiang, 1997)。

而如何取得大量且具有再生葉狀體能力的細胞團(callus)培育藻苗，是青海菜成功養殖的先決條件。若要使種苗來源穩定供應，必須要不斷的培養細胞團並維持其相同形態與附苗能力，過去與青海菜養殖相關的文獻均為培養接合子，利用網繩採集動孢子並附著於上，再移至海上養殖(李曉麗、張澤宇、柴宇、韓余香、曹淑青，2006；馬家海、劉澤峰、謝恩義，2007；蔡萬生等，1994；謝恩義，2003)，卻未提及接合子保存及擴大培育的方法，因此，如能在研究如何養殖青海菜的過程中，一併尋找細胞團不斷增生的培育條件以替代接合子，同時也能此品系種苗長久保存，未來將能於任何時刻供應大量的種源。

貳、研究目的

為了克服傳統生產青海菜種苗的缺點，Saga and Kudo (1989)和 Chen (1998)分別從青海菜之葉狀體與固著器，分離出原生質體，進而培養發育生成細胞團(callus)或絲狀體(filaments)。這些細胞團或絲狀體有如高等植物的種子一樣，可做為海藻大量養殖的藻苗來源。原生質體(Protoplast)，是指植物細胞去除細胞壁後，仍然保持完整活性之細胞(陳衍昌，1988)。當細胞壁去除後，原生質體具有以下特徵：(1)無細胞壁障礙，可對細胞膜、胞器進行基礎研究。(2)具有全能性，能在人工條件控制下，大量快速繁殖。(3)原生質體可誘導融合，形成雜交細胞(Kito, Kunimoto, Kamanishi, & Mizukami, 1998；王素娟，1994)。基於以上之特性，可運用於基因轉化方面的研究(Reddy, Gupta, Mantri, & Jha, 2008)。強化原生質體的再生能力及控制其發育形態是應用原生質體做為藻類種苗成功與否的主要關鍵。大量分離藻類原生質體的技術業已確立，亦證實海藻原生質體有再生成細胞團的能力(Ducruex and Kloareg, 1988；Chen and Shyu, 1994)。其中包括兩種青海菜袋礁膜 *M. angicava* (Saga and Kudo, 1989)和寬礁膜 *M. latissimum* (Chen and Chiang, 1994)，皆可被誘發形成細胞團者。

海藻原生質體再生之細胞團不像一般的藻類孢子受限於環境因素影響，它可以經由藻類體細胞分離獲得。由於細胞團距離幼芽階段較短，若能夠有效繁殖它，即可直接經由細胞團附苗以進行人工養殖，應用這個新的方法，可以縮短藻類生活史進而節省人力與空間的限制並確立保種技術(Chen and Chiang, 1994)。然徐等人(2008)發現礁膜(*M. nitidium*)具有三種發育形態：(1)原始型(Original type)：原生質體直接再生成配子體佔 16.7%；(2)厚壁囊孢型(Apogamic type)：不會繼續生長發育佔 53.7%；(3)細胞團型(Callus type)：再生為細胞團佔 29.6%。其中可作為青海菜種苗來源的細胞團比例稍偏低。因此本實驗為了提高細胞團之產率，試著測試不同酶解液、光照強度等條件對青海菜原生質體產量與再生率的影響。且進一步比較“二次原生質體”(再次酶解分離由原生質體發育之葉狀體所獲得之原生質體)的形態發育變化，同時探討細胞團之培育條件。

參、研究設備及器材



倒立位相差顯微鏡(NIKON ECLIPSE Ti) 解剖顯微鏡(NIKON SMZ745T)



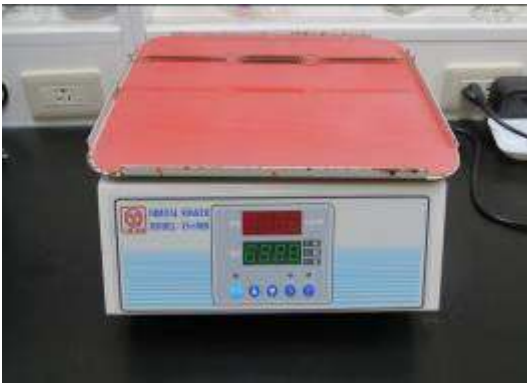
植物細胞生長箱(Plant cell growth chamber) 梯溫培養箱(Multi thermo incubator)



電磁加熱攪拌器(CORNING ; PC-620D) 垂直式無菌無塵操作台(Vertical Laminar Flow)



高溫高壓滅菌器(型號 ALP CL-32) (Autoclave) 光度計



迴轉式震盪器(HITACHI TS-520)

植物細胞生長箱(雙門)



冷凍離心機(HITACHI hitmac CR21G)

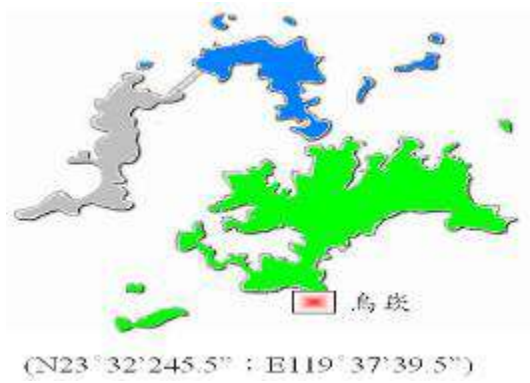
六孔培養皿(Falcon Multiwell , 6 well)

肆、研究方法

一、實驗用材料準備：

(一)藻體採集

實驗用之青海菜(*M. nitidum*)是在 2014 年 1 月至 6 月間，每月於澎湖烏坎(23°32'28.197"N；119°37'14.923"E)潮間帶所採集【照片 1、2】，選擇幼生及顏色較鮮綠之藻體，儘量避免選取潮上帶未浸泡於海水的青海菜【照片 3、4】，並在採集地點就地以海水沖洗數次，以新鮮的海水維持潤濕，再放入裝有海水的塑膠袋中，儘速攜回國立澎湖科技大學藻類研究室進行清洗與蓄養。



照片 1、*Monostroma nitidum* 採集地點



照片 2、青海菜生長於潮間帶



照片 3、岩礁上之青海菜

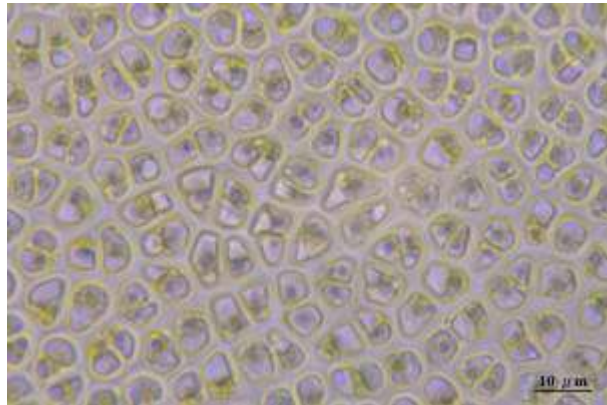


照片 4、青海菜幼生藻體

(二)藻體之挑選與消毒

於倒立顯微鏡(Nikon ECLIPSE TE2000-S)下鏡檢青海菜葉狀體，挑選藻體細胞排列緊密之藻體【照片 5】做為實驗用材料，將其移入無菌操作臺內，先以過濾海水沖洗，利用軟刷清洗藻體表面，去除附生藻類、寄生生物及雜質後，以 1% 的 Betadine 溶液浸泡 30 秒除去原生動物，最後經高壓滅菌海水(Autoclaved seawater)沖洗 3~5 次洗淨殘留的 Betadine，即可馬

上進行原生質體之酶解。

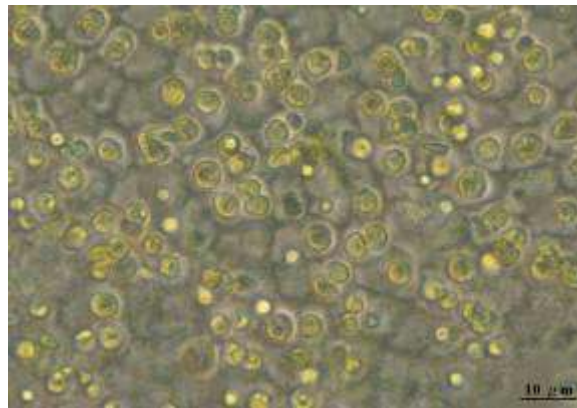


照片 5、倒立顯微鏡(Nikon ECLIPSE TE2000-S)下，藻體細胞呈緊密排列

二、青海菜細胞團之培育試驗

(一)藻體之酶解

處理後的藻體以滅菌紙巾吸乾水分，置於無菌玻璃培養皿內，利用刀片將藻體切碎至大小約 1-2 mm²，取 0.05 g 放入含有 1.5 ml 酶解液之六孔培養皿 (Falcon Multiwell, 6 well)中，以鋁箔紙包裹 (關閉燈源)，置於迴轉式震盪器 (HITACHI TS-520) 上，設定溫度 20±1℃，轉速 50 rpm/min (Chen and Chiang, 1994) 進行藻體酶解。試驗期間每隔 30 分鐘在加裝照相設備的倒立顯微鏡 (Nikon ECLIPSE TE2000-S) 下觀察及拍照原生質體釋放情形【照片 6】。

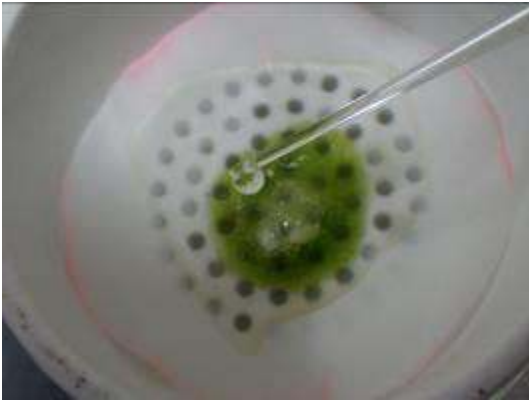


照片 6、青海菜酶解 30 分鐘，倒立顯微鏡下原生質體之釋放情形

(二)原生質體之收集

將含有原生質體的酶解液以尼龍網【照片 7】過濾 (孔徑 25 μm)，去除藻體碎片，再用 0.8 M 的海水甘露醇溶液輕輕沖洗過濾網上的原生質體，將此過濾液小心倒入離心管【照片 8】中，以離心機轉速 1500 rpm、溫度 4 °C 離心 5 min，使原生質體與酶解液分離，離心後倒掉

上清液，並以 0.8 M 的海水甘露醇沖洗離心管中殘留的酶解液數次，即可將收集之原生質體加入含有 10 ml 之 0.8 M 海水甘露醇-PES 之培養瓶中(Flask-T25)遮光培養 4 天後，更換為 0.6M 海水甘露醇-PES，而後每隔 2 天以梯度(0.4、0.2M)方式降滲透壓，最後移至完全海水 PES 培養液。



照片 7、酶解液透過孔徑 25 μm 之尼龍濾網過濾較大之藻體碎片及雜質



照片 8、離心管上的原生質體

(三)原生質體之培養

1.不同酶解液對原生質體產量之測試

利用 Chen and Shyu, 1994 及 Reddy et al., 2006 之酶解配方加以修改，調製成兩種不同混合酶解液【表、一】進行原生質體之分離。利用去離子水混合纖維酶(Cellulose Onozuka R-10)、軟化酶(Macerozyme Onozuka R-10)，及 0.4%胎牛血清蛋白(BSA:Bovine Serum Albumin)、1.2M 山梨醇(sorbitol)、0.8M 甘露醇(mannitol)或 NaCl，且以磷酸緩衝溶液($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$)調整 pH 值為 6.0。進行實驗前，先將酶解液以冷凍離心機(HITACHI hitmac CR 21G)離心，設置條件為 500 g、溫度 4 $^{\circ}\text{C}$ 、時間 10 分鐘，離心後取上層液，再以 0.45 μm 拋棄式薄膜(Acrodisc Syringe Filters)過濾。

表一、利用兩種不同成份酶解液分離原生質體

*Composition	Mixture-1	Mixture-2
Cellulase Oozuka R-10	4.0%	2.0%
Macerozyme R-10	2.0%	NA
Dextran sulfate	NA	0.5%
NaCl	NA	1.0%
BSA	0.4%	NA
Mannitol	NA	0.8M
Sorbitol	1.2M	NA
MES	NA	25mM
pH	6.0	6.0

2.不同光照強度對原生質體再生率之影響

剛分離之原生質體(使用配方 6)於黑暗環境下，溫度 20 °C 進行培養，當滲透壓降至純海水培養時設定為培養第 0 天，於倒立顯微鏡 200 倍率下，隨機挑取 5 個視野計算原生質體之數目，並分別培養在光照強度 30、100 及 166 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，溫度控制 20 °C、光照週期 12L : 12D。培養第 14 天時，再於倒立顯微鏡 200 倍率下，隨機挑取 5 個視野以血球計數器計算原生質體再生的數量(觀察原生質體是否完整，有無破損)。

3.原生質體之發育路徑

在倒立顯微鏡下，進行原生質體發育路徑的觀察。

(四)青海菜細胞團之純化

1.細胞團型之挑選與培養

利用細胞刮杓從培養瓶中挑選青海菜 (*M. nitidum*) 原生質體再生路徑中之細胞團型，單

獨培養於 500 ml 之三角錐形瓶懸浮培養。溫度 20°C，光照週期 12L : 12D，光照強度 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，每週更換 PES 乙次。

2.二次原生質體之分離與培養(60-90 天後，成熟之葉狀體)

將收集之細胞團型，再次以酶解液分離出原生質體，分離步驟與方法同研究方法二所述。

3.二次原生質體產量計算

酶解細胞團型葉狀體，並利用血球計數器 (hemacytometer) 於 200 倍率的倒立顯微鏡下計算第 3 小時原生質體產量，實驗進行三重複，求取平均值，加以記錄。

4.二次原生質體再生率計算

培養第 14 天時，於倒立顯微鏡 200 倍率下，隨機挑取 5 個視野以血球計數器計算原生質體再生的數量(觀察原生質體是否完整，有無破損)。

5.發育路徑觀察

於培養後 21 天於倒立顯微鏡 (Nikon ECLIPSE TE2000-S) 下觀察與計算各實驗組原生質體形態發育比例 (n=100)，每組三重複，拍攝記錄之。(方法同研究方法二所述)。

三、資料分析

實驗數據之分析是採用 SPSS 18.0 套裝軟體中的單因子變異數分析，測定各處理組間是否有差異性，若 F 值顯著時，則做鄧肯多變因測定，分析各影響變因之差異性，顯著水準為 0.05。

伍、研究結果

一、不同酶解配方、酶解時間對原生質體產量之影響

兩種混合酶解配方均可分離出原生質體，酶解 30 分鐘，就可觀察到青海菜原生質體從藻體切口處開始釋出。兩種配方在酶解作用 1 至 3 小時內，原生質體產量隨著酶解時間拉長而增加。酶解第 4 小時產量開始下降。將兩種配方以不同時間之酶解產量進行統計分析，酶解時間在第 2 小時，沒有顯著差異外，其餘酶解時間均有顯著差異($p < 0.05$)。酶解配方-1 和 2，在本實驗酶解第 3 小時的產量均是最高，分別為 $110.70 \pm 12.04 \times 10^6$ cells g^{-1} f. wt. 及 $86.67 \pm 4.63 \times 10^6$ cells g^{-1} f. wt.。酶解過程中，以 4% 纖維酶、2% 軟化酶、0.04% 胎牛血清蛋白(BSA)及 1.2M 山梨醇(Sorbitol)作為滲透溶質之酶解配方-1 所分離出原生質體之產量皆高於酶解配方-2【圖 1】。

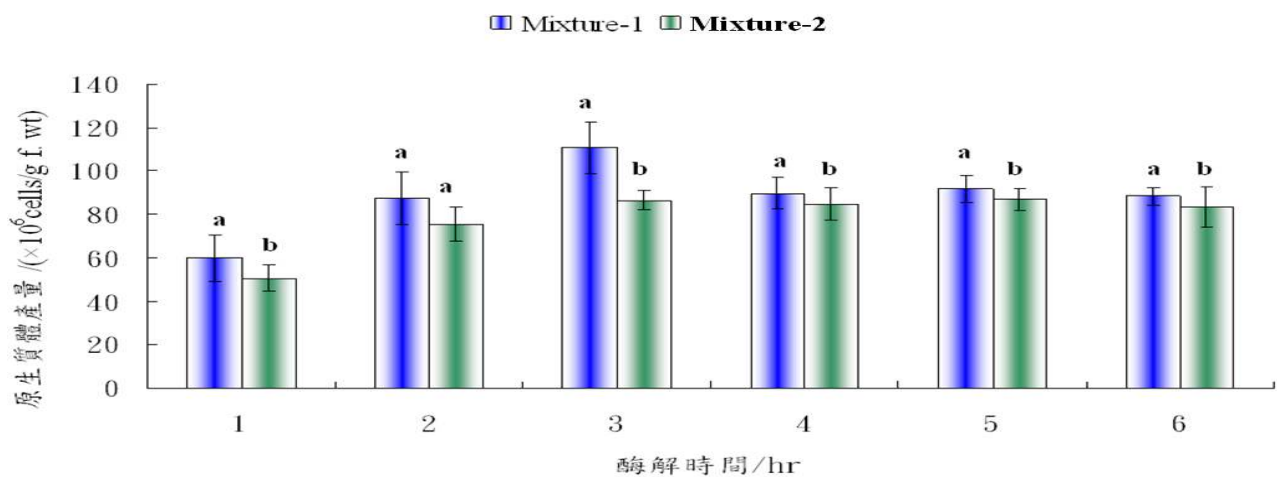


圖 1、二種酶解配方在 1-6 小時原生質體產量比較。不同字母表示顯著差異 $p < 0.05$

將兩種酶解配方-1、2，進行酶解 1-6 小時獲得之原生質體產量各別進行單因子變異數分析，結果顯示酶解配方-1，在第 1、2、3 小時之間的產量有顯著差異，第 3 小時產量最高，而在第 4 小時產量開始降低，第 2、4、5、6 小時組間沒有顯著差異；酶解配方-2 的原生質體產量在第 1 小時最低，僅有 $50.50 \pm 6.06 \times 10^6$ cells g^{-1} f. wt.，與第 2、3 小時有顯著差異，第 3 小時為產量最佳，第 3 至 6 小時組間沒有顯著差異；綜合上述結果分析，得知兩種酶解配方皆於酶解第 3 小時即可達到最佳產量【圖 2】。根據以上說明結果得知酶解配方-1 為本次分離青海菜原生質體之最佳配方。

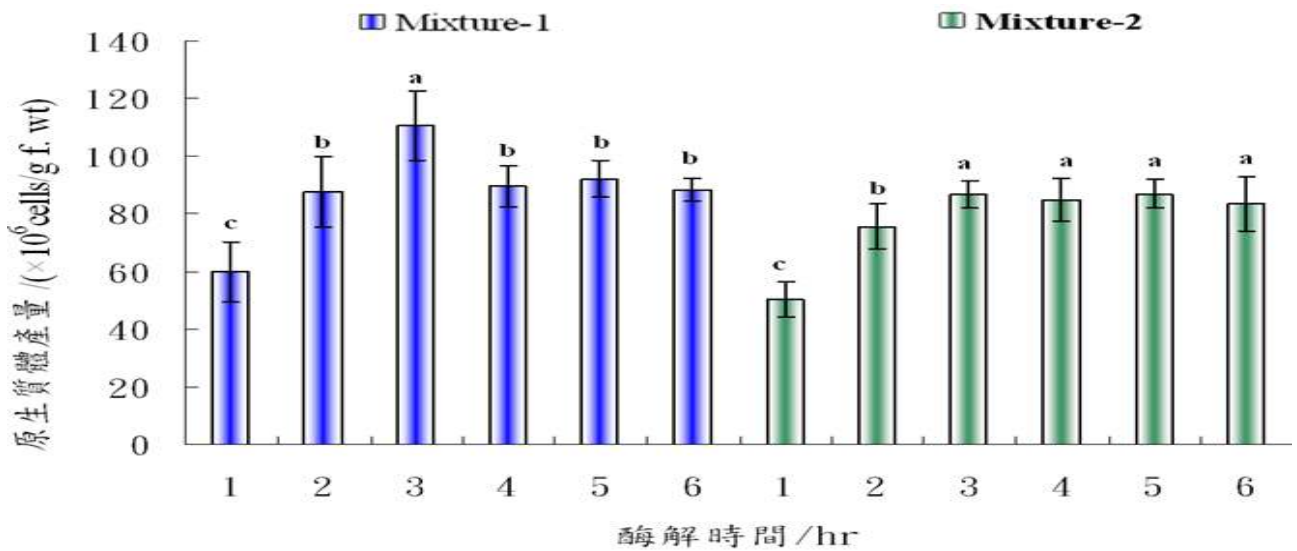


圖 2、二種酶解配方在 1-6 小時酶解時間產量比。不同字母表示顯著差異 $p < 0.05$

二、不同光照強度對原生質體再生與發育路徑之影響

利用三種不同光照強度培養原生質體發現，光照強度 $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 再生率最高 $98.12 \pm 3.25 \%$ ； $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 次之 $70.95 \pm 30.34 \%$ ，置於光照 $166 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 最低，所得的再生率為 $57.09 \pm 20.72 \%$ 【圖 3】。

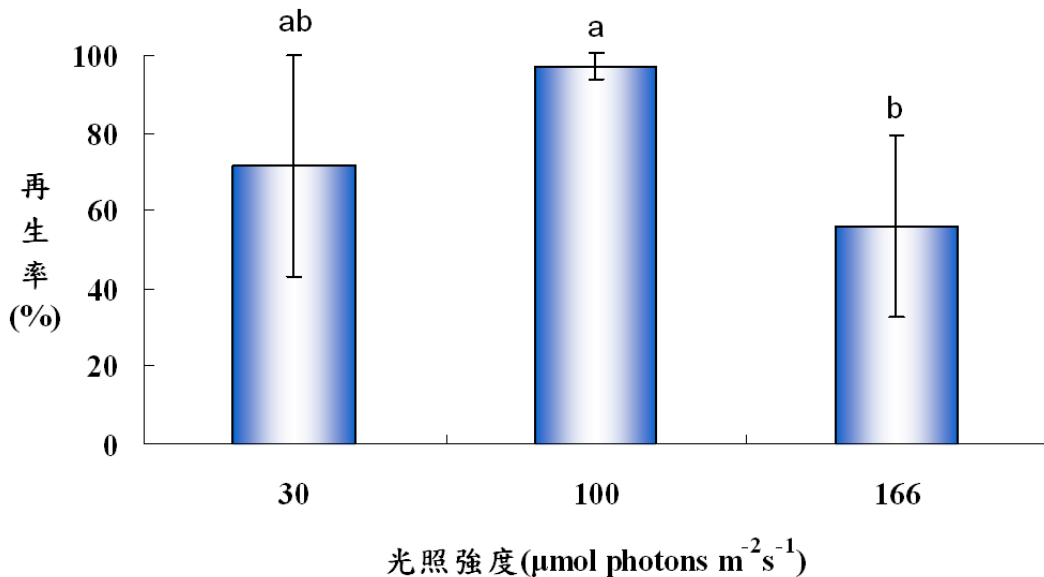
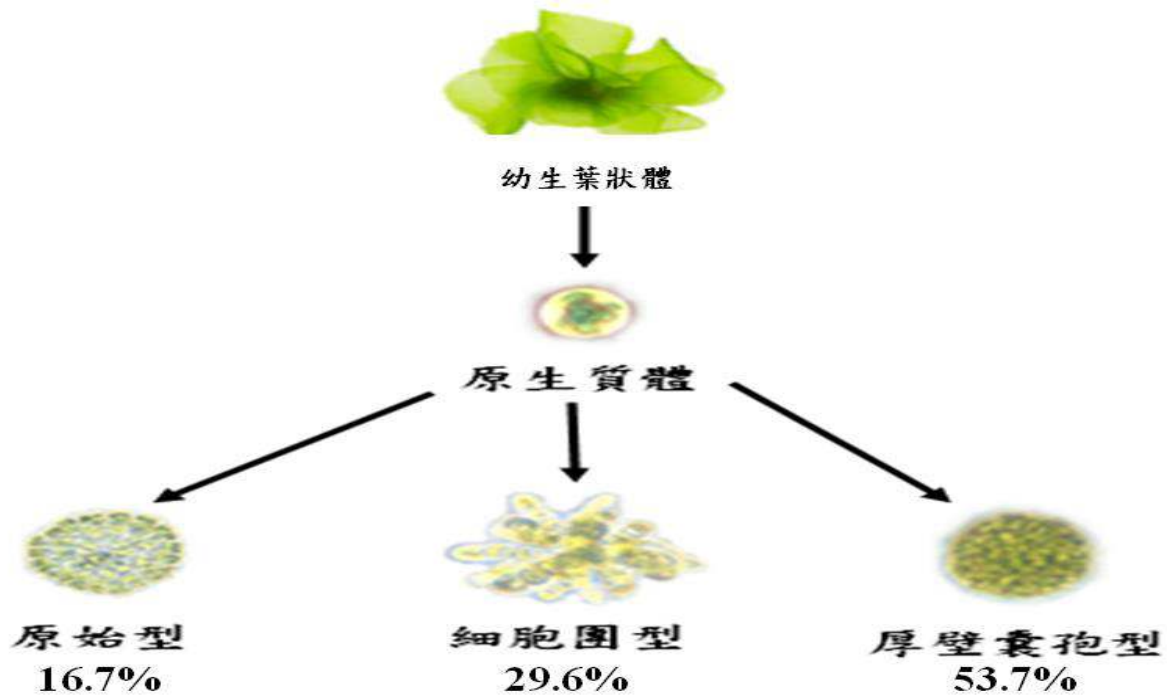


圖 3、不同光照強度對原生質體再生率之影響。不同字母表示顯著差異 $p < 0.05$

剛分離之原生質體($100\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)大小約 $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ 呈綠色圓球形，觀察其再生型態有三種分別為：厚壁囊孢、原始型和細胞團型。培養第 30 天厚壁囊孢是出現比率最高的路徑，為 53.7%，其細胞壁會比其它細胞厚，體型也較大，可達到 $50\pm 4.32\ \mu\text{m}$ 。其次為細胞團型 29.6%；原始型佔 16.7% 最低，培養期間會逐漸生長成幼生葉狀體，在培養 35 天出現葉狀體的機率为 15.4%，至 60 天時，已發育為成葉體【照片 9】。



照片 9、青海菜再生型態有三種分別為：原始型、細胞團型和厚壁囊孢型

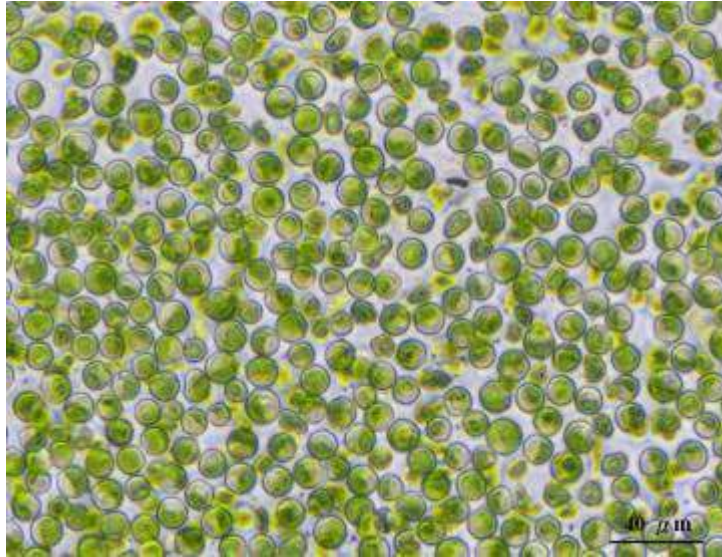
三、青海菜細胞團之培養與純化

二次原生質體呈球形，微具有綠色光澤，直徑約 $9.61\pm 0.97\ \mu\text{m}$ 【照片 10】。以混合酶解液酶解 3 小時，產量为 $25.24\pm 1.94\times 10^6\ \text{cells/g f. wt.}$ 。二次原生質體約 4~5 天開始固著在培養瓶底部，再生率高達 $90\pm 6.0\%$ 。

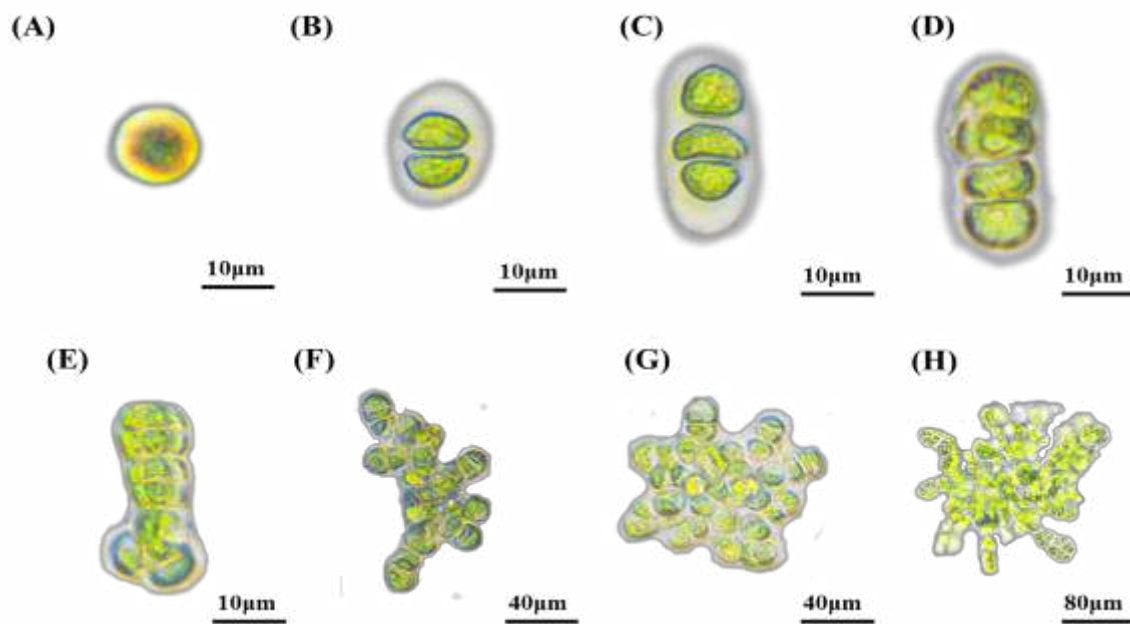
二次原生質體均可直接長成完整植株，同時也因發育過程的形態上差異可細分為葉狀體-1 與葉狀體-2，以下做詳細介紹：

葉狀體-1【照片 11】：培養第 7~10 天原生質體固著【照片 11-A】，單細胞陸續分裂成 4 顆細胞，長徑約 $20\text{-}40\ \mu\text{m}$ 【照片 11-B~E】，第 20 天細胞不規則向四方分裂成許多分支，直徑約 $80\text{-}100\ \mu\text{m}$ 【照片 11-F】，第 30 天各分支縱向分裂【照片 11-G】，發育成葉狀體，第 40 天葉狀體直徑約 $120\text{-}150\ \mu\text{m}$ 【照片 11-H】。

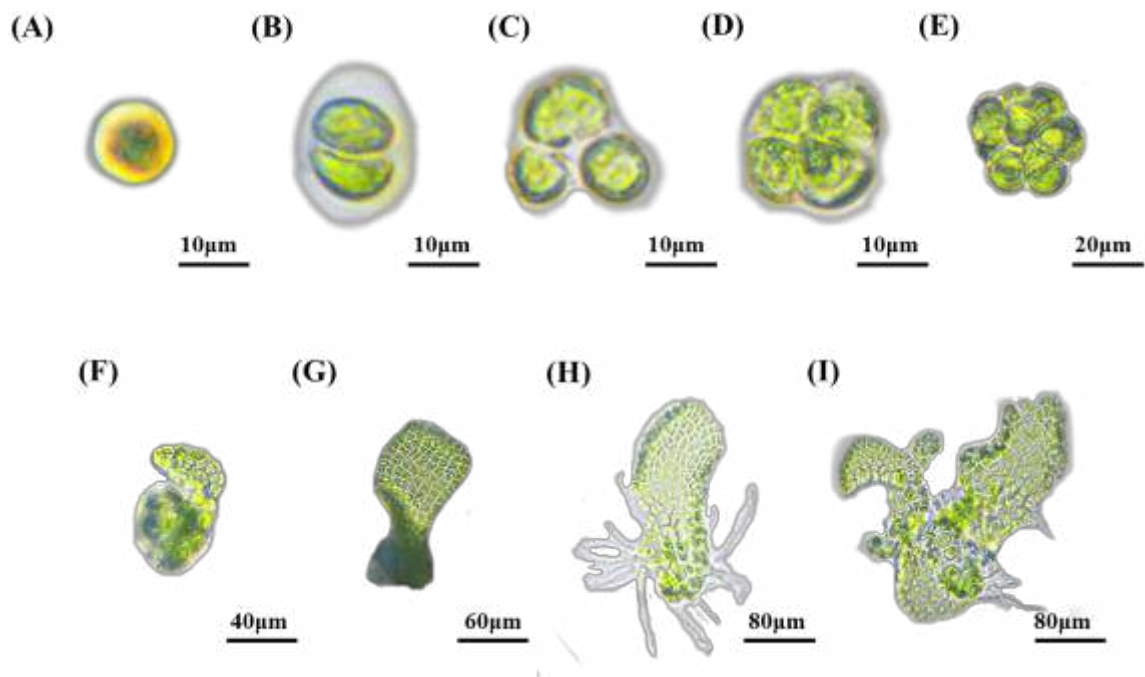
葉狀體-2【照片 12】：培養第 7~10 天原生質體固著【照片 12-A】，單細胞持續分裂成多顆【照片 12-B~E】，20 天後多細胞開始長出直立葉狀體【照片 12-F~G】，第 30~40 天葉狀體持續增生【照片 12-H】，固著器一端伸出固著絲依附在培養瓶底部，此後漸漸發育成完整植株，大小約 160 μm 【照片 12-I】。



照片 10、二次原生質體



照片 11、葉狀體-1 發育路徑觀察(A~H)



照片 12、葉狀體-2 發育路徑觀察(A~I)

陸、討論

一、不同酶解配方、酶解時間對原生質產量之影響

不同組合的酵素配方、酶解時間會影響原生質體的產率及再生能力(Reddy et al.,2006)。比較兩種配方成分與試驗結果之關係，發現同時添加軟化酶和胎牛血清蛋白之產能較佳。酶解配方中少量添加胎牛血清蛋白，具有抑制蛋白酶毒性及保護藻體細胞的功能，可提高原生質體的產能(Chen and Shyu, 1994)。酶解作用時間越長，原生質體存活率越差(徐等人, 2008)。依據此論點再加上比較產量後得知，若欲分離青海菜原生質體應選擇配方 1，時間設定為三小時效果較佳。Chen(1999)指出在青海菜酶解過程中，藻體細胞壁纖維質會受 Cellulase Onozuka R-10 酵素作用而軟化、 Macerozyme R-10 則軟化細胞與細胞之間質，進而造成細胞壁於短期內無法自行癒合。挑選只使用 2%纖維素酶的配方 2，亦是考量原生質體尚未再生細胞壁較為合適的酶解液。原生質體一旦脫離細胞壁很容易遭受滲透壓、溫度及機械性損傷等

外加之緊迫，尤其是以滲透壓緊迫影響最大（Chen, 1988），也就是對滲透壓極為敏感。酶解過程中的溫度，酶解液的酵素組成、pH 值、滲透容質以及濃度均會影響原生質體的產量和存活率(Saga, 1984；Saga and Kudo, 1989)。如以材料成本效益來探討，建議對於分離原生質體酵素之添加量可以做進一步的研究。楊(2013)碩士論文以及 Reddy et al. (2006)研究中使用之酶解配方及酶解條件與本實驗類似，比較其結果得知本實驗原生質體的產量，微幅降低了，但仍顯示具有極高的再生能力(90±6%)。再與其實驗方法比較後得知，楊(2013)的實驗藻體是利用當日採集野外天然藻體進行酶解，獲得原生質體產量高於本實驗室內蓄養數日之藻體。室內養殖環境難以達到天然環境的光照、溫度、潮汐及營養鹽等需求，導致藻體生理狀況降低。原生質體分離之產量會因藻類的品種、生態、生理以及實驗方法不同受到影響（石，1999；Uppalapati and Fujita, 2002），推測藻類的生理狀況可能是主要影響原生質體產量多寡之因素。

二、原生質體再生與發育路徑之影響

本實驗採集澎湖烏坎區之青海菜藻體，其原生質體之再生型態有三種，分別為原始型、厚壁囊孢(無配子)型、細胞團(類癒傷組織)型。雖然厚壁囊孢的出現比率在三種發育路徑是最高(53.7%)，但厚壁囊孢(無配子)型之細胞通常進行二到三次分裂後就不會進一步的發育，後續生長停滯，難以發育成葉狀體。原始型會再生成葉狀體，是出現比率最低的路徑，但原始型的二次原生質體仍有三種發育路徑(厚壁囊孢型、原始型及細胞團型)，所以並未達到簡化的目的；細胞團(類癒傷組織)型會逐漸生長成幼生葉狀體，在培養 35 天出現葉狀體的機率為 17.7%，至 60 天時，已發育為成熟葉狀體。然而，細胞團型出現比率(29.6%)低於厚壁囊孢，但在培養過程中會釋放出單孢子，單孢子可持續培養長成葉狀體，因此可以選擇細胞團作為人工大量養殖之種苗來源。在 1989 年 Saga and Kudo 成功培育袋礁膜之原生質體，出現三種型態：1.原始型態一再生成直立配子體；2.厚壁囊孢(無配子)型一發育為厚壁囊孢；3. 細胞團(類癒傷組織)型，以上三種型態在本實驗中均有發現，但以原始型比率較高。

許多礁膜屬的原生質體發育路徑多具有此上述發育類型(Saga and Kudo, 1989；Krishna Kumar et al., 1999)，其中 Saga and Kudo (1989)提出袋礁膜膜(*M. angicava*)有癒傷組織型：原生質體再成類癒傷組織後，即不再繼續分化；Chen (1998)則認為寬礁膜(*M. latissimum*)有細胞團型與絲狀體型，其中細胞團會釋放單孢子(Monosporer)，釋放的單孢子又可長成細胞團，將

細胞團型從原來培養在 18°C 提高到 30°C 可誘發細胞團長成管狀藻體，此細胞團可像“種子”一般長期儲存。由此可知，礁膜屬之原生質體有各種不同再生形態，並且可從不同發育路徑中找尋合適的生活史階段作為種苗來源，但仍不知影響原生質體發育形態的因子，如何控制與界定各種發育路徑有待更多商榷。

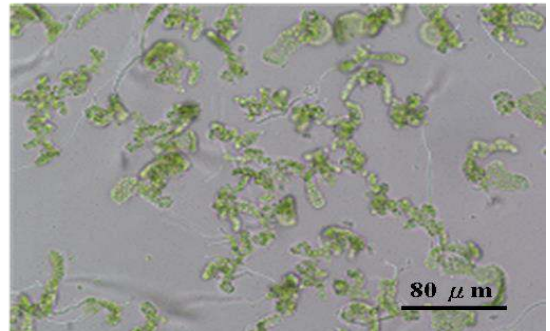
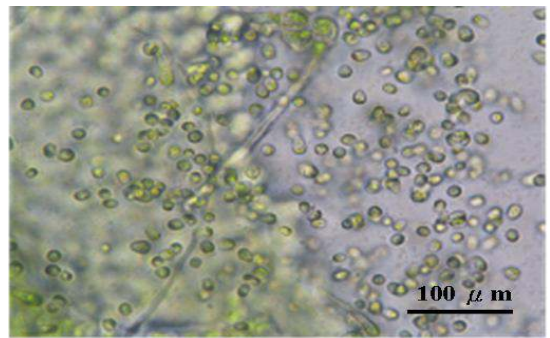
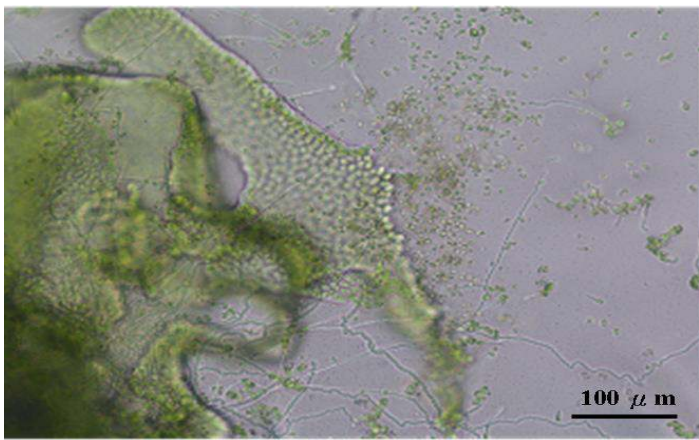
青海菜之生活史是屬於異型世代交替，通常以孢子、配子及接合子繁殖或利用斷裂生殖等傳統方法來進行養殖。現可突破此傳統方式以原生質體再生型態中的細胞團階段做為藻苗來源，應用於種苗生產，開啓一個海藻種子化之新研究方向。

三、青海菜細胞團的培養及作為種苗來源

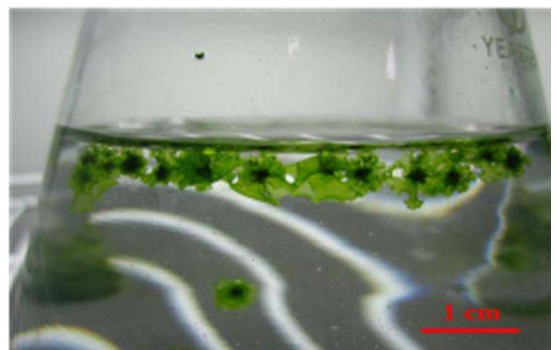
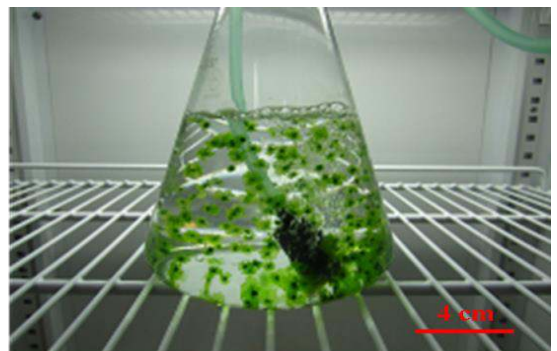
本研究培養青海菜原生質體(細胞團型)再生成的葉狀體，利用混合酶解液將其再次分離，獲得的“二次原生質體”，原生質體的產量雖然較低但同樣展現良好之再生率(90±6%)，再生路徑皆為細胞團型，研究發現當葉狀體培養至大小 1mm 時，藻體邊緣會釋放單孢子，每一顆單孢子皆可長成完整植株，藉此建立種源【照片 13】。後續把小植株移至 1000 ml 三角錐形瓶，懸浮培養，約兩個月後可長成約 1.5 cm 的球狀藻體【照片 14】，也可以將種苗灑附於棉繩上，約一週可使種苗附著。但如何誘發葉狀體釋放單孢子的培養條件尚不明確，未來也不排除可製備“三次原生質體”，再度將現有種源純化提升品質。石秀娟 (1999)也曾將由原生質體發育而來的裂片石蓴(*Ulva fasciata*)葉狀體，再將其作為分離原生質體的材料，結果這些“二次原生質體”，均直接再生成一般葉狀藻體。目前這些“二次原生質體”再生的葉狀體已在溫度 20°C，光週期 12L：12D，光照強度 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，保存 3 個月並且持續釋放單孢子。

Hiraoka 與 Oka (2008)直接將切碎滄苔葉狀體(1-2 mm)，3 天後碎片開始釋放動孢子(zoid)，將懸浮的動孢子濃縮成密度超過每毫升 10^4 個，萌發之動孢子開始互相依附並形成聚集體(aggregations)，此時利用電動攪拌機，分離成大量之小型萌芽細胞團。一旦萌芽之細胞團培養到直徑達 5mm 以上，即移植到室外 500 升培養池，使用海洋深層水懸浮培養，一部分在室內培養至 20 cm 再切碎藻體刺激釋放動孢子，當成種源。本研究目前也以類似的模式，將原生質體衍生而來的種苗，保存在 Flask-T25 中，使葉狀體釋放單孢子；另一部分移至 1000 ml 的三角錐形瓶，懸浮培養，未來若需大量青海菜作為各種用途，即可培養在更佳環境，使

青海菜成長快速，如何有效使青海菜快速增殖還有待後續更詳盡研究。



照片 13、葉狀體邊緣釋放的單孢子與幼苗



照片 14、培養兩個月後的球狀藻體

柒、未來展望

以原生質體再生成的細胞團做為獲取藻苗之方法已確立可行，本方法突破過去傳統養殖受季節限制之缺點，未來可針對保種及原生質體細胞團進行探討讓此方法更接近於現場養殖，而此方法培養的青海菜藻苗具有同於市面上寵物藻之特性，證明青海菜為適合作為寵物藻的種類之一，也讓藻類原生質體成為寵物藻生產的管道之一。



照片 15、寵物藻

捌、結論

- 一、利用原生質體再生簡化青海菜細胞團形成方法，成功運用其再生路徑中之細胞團培育種苗。
- 二、開發應用細胞團當作種源，突破傳統海藻養殖受季節限制無法取得足夠生殖細胞的缺點。
- 三、二次原生質體皆可再生成完整植株。當葉狀體生長到 1mm 時，藻體邊緣會釋放單孢子，每一顆單孢子皆可長成完整個體，藉此建立種源。
- 四、確立細胞團能穩定培養並持續增殖的最佳條件，提供研究經濟海藻生活史另一條管道，有助於青海菜種苗量化生產技術及基礎生態研究。
- 五、突破此傳統方式以原生質體再生型態中的細胞團階段做為藻苗來源，應用於種苗生產，開啓一個海藻種子化之新研究方向。

玖、參考資料及其他

- 王素娟(1994)。海藻生物技術(頁 49-60)。上海：上海科學技術出版社。
- 石秀娟(1999)。裂片石蓴(*Ulva fasciata*)原生質體之種子化及其發育型態超微構造之研究。國立臺灣海洋大學，基隆市。
- 行政院農業委員會漁業署(1994-2010)。中華民國臺灣地區漁業統計年報。高雄：行政院農委會漁業署。
- 江永棉、王瑋龍、黃淑芳(1990)。臺灣海藻簡介(頁 22)。台北：臺灣省立博物館。
- 江永棉、黃檀溪(1986)。藻類之研究及應用。行政院國家科學委員會生物學研究中心主辦，藻類之研究及應用研討會論文集專刊第 15 號(頁 45-55)。台北：國立台灣大學。
- 李曉麗，張澤宇，柴宇，韓余香，曹淑青(2006)。北極礁膜室內人工育苗的研究。*Journal of Dalian Fisheries University*, 21, 242-246。
- 徐振豐(1992)。四種褐藻原生質體之製備、分離及再生。國立臺灣海洋大學水產養殖研究所碩士論文，基隆市。
- 徐振豐(2008) 澎湖縣青海菜種苗大量生產技術開發案。九十七年度澎湖縣政府農漁局委託研究報告，澎湖縣政府農漁局。
- 徐振豐、張睿昇、周立進、吳烈慶(2011)。澎湖的海藻與生活利用(頁 44)。澎湖：澎湖縣政府文化局。
- 陳衍昌(1988)。裂片石蓴原生質體之製備及再生-滲透壓、溫度、震盪速率及時間對於產率。國立臺灣海洋大學水產養殖研究所碩士論文，基隆市。
- 張崑雄、楊海寧、陳春暉、詹榮桂、戴昌鳳、鄭明修(1993)。澎湖內海海域海洋生態資源調查研究。澎湖：交通部觀光局澎湖風景特定區管理籌備處。
- 黃淑芳(2003)。台灣東北角海藻圖錄(頁 49)。台北：國立臺灣博物館。
- 德田 廣、川嶋昭二、大野正夫、小河久朗(1991)。海藻の生態と藻礁(頁 55)。日本：株式會社 綠書房。
- 蔡萬生、林綉美、黃金峰、陳仁偉(1994)。青海菜之養殖、人工育苗及採苗。農委會漁業特刊，44，137-145。
- Chen, C. S., & Shyu, J. F. (1994). Regeneration of protoplasts from the brown alga, *Endarachne binghamiae* (Phaeophyta; unctariales, Scytosiphonaceae). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 35, 189-193.
- Chen, Y. C., & Chiang, Y. M. (1994). Isolation and regeneration of protoplasts of *Monostroma latissimum* Wittrock (*Monostromataceae*, *Chlorophyta*). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 35, 45-51.

- Chen, Y. C. (1998). Development of protoplasts from holdfasts and vegetative thalli of *Monostroma latissimum* (Chlorophyta, monostromatacae) for algal seed stock. *Journal Phycology*, 34, 1075-1081.
- Ducreux, G. and B. Kloareg (1988). Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria* (Phaeophyceae), *Planta*, 174:25-29.
- Krishna Kumar, G. R., Addepalli, M. K., & Reddy, C. R. K. (1999). Regeneration of the thallus of *Monostroma oxyspermum* (Chlorophyta) from protoplast in axenic culture. *Phycologia*, 38, 503-507.
- Kito, H., Kunimoto, M., Kamanishi Y., & Mizukami Y. (1998). Protoplast fusion between *Monostroma nitidum* and *Porephrya yezoensis* and subsequent growth of hybrid plants. *Journal of Applied Phycology*, 10, 15-21.
- Ohno, M. (1995) Cultivation of *Monostroma nitidum* (Chlorophyta) in a river estuary, southern Japan. *Journal of Applied Phycology*, 7, 207-213.
- Ohno, M., & Triet, V. D. (1997) Artificial seeding of the green seaweed *Monostroma* for cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 9, 417-423.
- Provasoli, L. (1968). Media and products for the cultivation of marine algae. In: A. Watarabe and A. Hattori (Eds.) *Cultures and collections of algae* (pp. 63-75). Tokyo. Japanese Society Plant Physiology.
- Polne-Fuller, M., and A. Gibor (1987). Tissue culture of seaweeds. In *Seaweed cultivation for renewable resources*, pp. 218-239.
- Rusig, A. M. & Cosson J. (2001). Plant regeneration from protoplasts of *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta, Ulvophyceae) as seedstock for macroalgal culture. *Journal of Applied Phycology*, 13, 103-108.
- Reddy, C. R. K., Migita, S., & Fugita, T. (1989). Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture. *Botanica marina*, 32, 483-490.
- Reddy, C. R. K., Dipakkore, S., Kumar, R., Jha, B., & Cheney, D. P. (2006). An improved enzyme preparation for rapid mass production of protoplast as seed stock for aquaculture of macrophytic marine green algae. *Aquaculture*, 260, 290-297.
- Reddy, C. R. K., Gupta, M. K., Mantri, V. A., & Jha, B. (2008). Seaweed protoplast : status, biotechnological perspectives and needs. *Journal of Applied Phycology*, 20, 619-632.
- Saga, N., & Kudo, T. (1989). Isolation and culture of protoplasts from the marine green alga *Monostroma angicava*. *Journal of Applied Phycology*, 1, 25-30.
- Uppalapati, S. R. & Fujita, Y. (2002). A simple method for mass isolation of protoplasts from species of *Monostroma*, *Enteromorpha* and *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales). *Journal of Applied Phycology*, 14, 165-168.

附錄一

PES 培養液(含氮鹽)配方(Provasoli, 1968)

H₂O → 100 ml

NaNO₃ → 350 mg

Na₂ glycerophosphate → 50 mg

EDTA-Fe-Na → 18.85 mg

P II mater → 25 ml

Vitamin B₁₂ → 10μg

Thiamine → 0.5 mg

Biotin → 5μg

Tris buffer (Sigma Co.) → 500 mg

pH 7.8

【P II Metal mix】 (Directions for making 100 ml of metal mix)

H₃BO₃ → 0.114 g

FeCl₃ · 6H₂O → 4.9 mg

MnSO₄ · 4H₂O → 16.4 mg

ZnSO₄ · 7H₂O → 2.2 mg

CoSO₄ · 7H₂O → 0.48 mg

Na₂EDTA → 100 mg

【評語】 040719

利用極具區域鄉土性的材料－青海菜為研究材料，有助於發展區域特色產業，期盼在深度及廣度上再作加強。