

坛紫菜幼苗无性繁殖的再研究

王素娟 马凌波

(上海水产大学水产养殖系, 200090)

提 要 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)幼苗能否形成单孢子是我国多年来悬而未决的理论问题。本文对这一问题进行了反复、多方面的研究,特别是对于幼苗释放细胞的条件,细胞的发育分化趋势及超微结构作了重点研究,并将研究结果与真正放散单孢子的条斑紫菜(*P. yezoensis*)作了比较,发现在一定条件下坛紫菜幼苗能释放一种以前曾被认为是单孢子的细胞,它们的光学及超微结构、释放规律和发育趋势与坛紫菜酶解的营养细胞相同,而与条斑紫菜单孢子有明显差异。试验结果证明坛紫菜幼苗阶段不能产生单孢子。

关键词 坛紫菜,单孢子,游离细胞的培养

坛紫菜盛产于我国闽浙两省,是两大栽培紫菜中产量最高,生产面积最多的一种。坛紫菜生活史中是否存在单孢子,多年来意见不一。持肯定的理由是养殖紫菜浮筒上长有不少坛紫菜,因而认为这是人工采苗后的坛紫菜放散单孢子长成的。近年来有的科学工作者报道在坛紫菜上发现“单孢子”存在,并可培养成苗[李世英,1988],但未能说明“单孢子”生成的条件。早在60年代,作者针对这个问题曾进行详细的试验与观察,由于当时条件限制仅进行了培养与光学研究,得出了坛紫菜(刺边紫菜)没有单孢子的结论[王素娟、章景荣,1980]。搞清楚坛紫菜生活史的叶状体阶段有无单孢子,不仅在理论研究上有价值,而且对于生产应用也是非常必要的。因此现在作者认为有必要在过去研究的基础上进行再研究。试验主要根据以下几方面进行:首先是显微观察幼苗边缘是否完整来推测是否在释放单孢子;其次进行幼苗切段再生观察以证实细胞属营养型还是单孢子繁殖型;第三是将这些1~30mm边缘完整的幼苗加以不同方法处理后培养观察;最后对释放的游离细胞进行电镜观察,与单孢子结构进行比较,同时观察其发育分化趋势。

1 材料与方 法

试验采用1993年10月17日浙江苍南县人工养殖约45 d,并于-20℃冰箱中冷藏1~2个月的坛紫菜幼苗为材料。试验前2 d将材料从冰箱中取出浸泡于海水中复苏,挑选1~30mm的健康藻体进行研究。

1.1 材料处理

根据藻体不同长度分组在显微镜下观察其顶端、边缘及基部细胞情况,发现这些幼苗的顶端及边缘都是完整的,与王素娟、章景荣[1980]的观察基本相同。我们对藻体进行了以下几种不同方法的处理和观察。

1.1.1 切段再生的观察

将藻体洗刷干净,在含2%抗生素的消毒海水中浸泡24h后分别对藻体顶端、中部及下端进行切段培养,观察各段再生情况。

1.1.2 幼苗及游离细胞的培养

完整幼苗分3组处理后进行培养。不消毒组只将藻体用消毒海水充分洗刷数次,去除杂藻及污物,并不灭菌。消毒组将藻体充分用消毒海水洗刷多次后再放入含2%抗生素的消毒海水中浸泡24h。接种细菌感染组为消毒处理后的藻体接种细菌,进行液体培养。细菌来源是由不消毒组中出现游离细胞的培养液中分离并接种于 Zobell 2216海水琼脂培养基上得到的。

细胞培养是待检查试验组藻体产生游离细胞后,用100目尼龙筛绢网过滤培养液分离细胞并用含1%抗生素的消毒海水离心(1000转/min)2min后弃去上清液,如此冲洗数次后收集细胞进行培养。将上述游离细胞按一般电镜操作程序进行固定并制作超薄切片,观察其超微结构。

1.2 培养条件

藻体切段及完整培养组藻体按大小分数组分别放入直径3cm培养皿中培养。接种细菌感染组按数量放入250ml三角烧瓶中振荡培养。收集的游离细胞按一定密度放于直径3cm或6cm培养皿中培养。培养液为MES培养液[王素娟等,1986a]。实验期温度18~20℃,每天保持恒定。光源为日光灯,光时为12L:12D或10L:14D,光强为1000~1500 lx。

2 试验结果

2.1 坛紫菜幼苗切段再生

切段再生进行了3次共35组的培养。1~30mm不同长度的藻体切段都出现再生现象。再生具有明显的极性,藻体向顶端的切面向上先伸出半圆形或圆形的细胞,并不断分裂生长,最终形成新的叶状体尖端(图版I-1,4)。而切段向基部一端的切面细胞则先延伸成长管状,最后整个切面都遍生假根(图版I-2,3)。

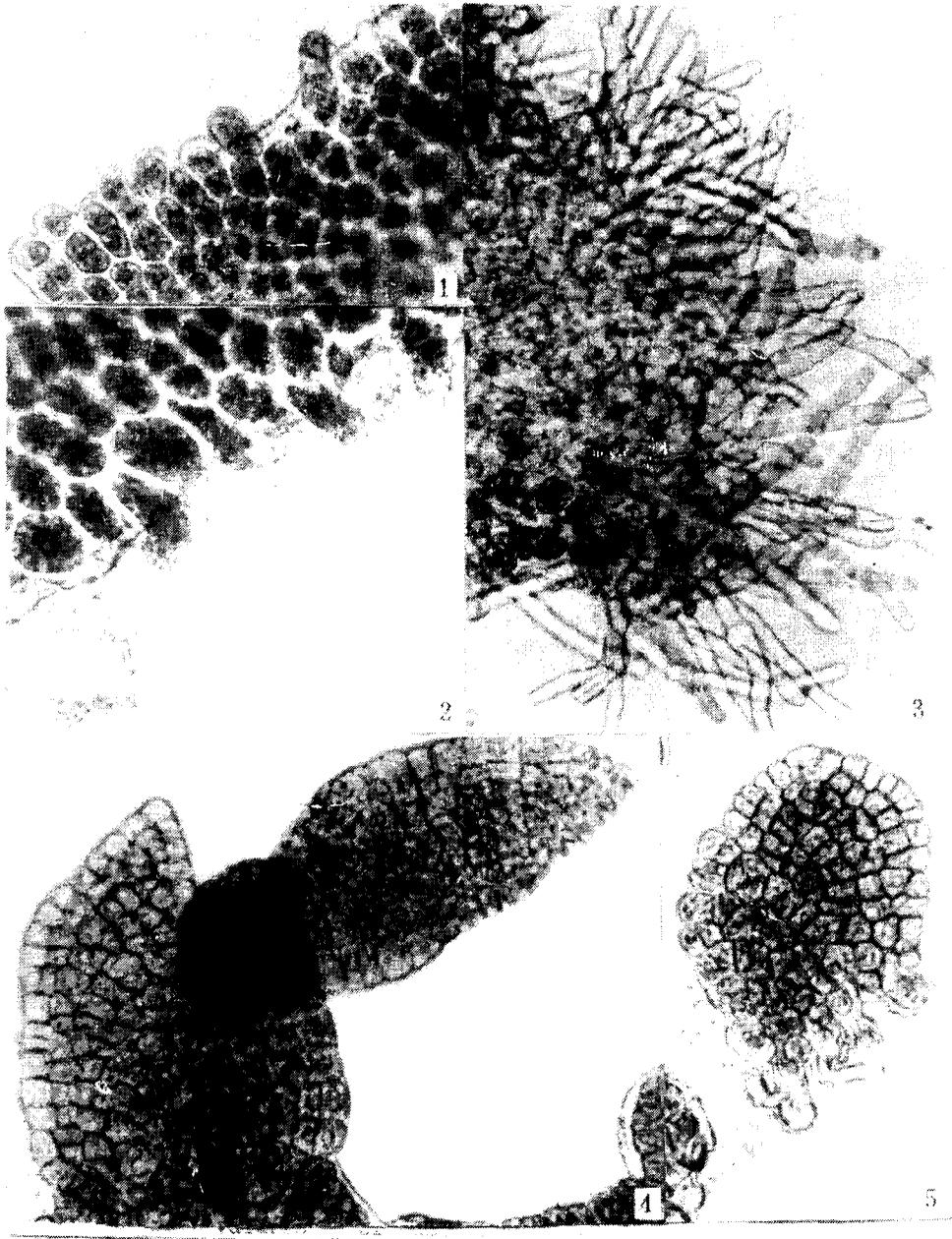
2.2 坛紫菜幼苗及游离细胞的培养结果

幼苗的培养试验未消毒组进行了3次,消毒组2次,细菌感染组3次。结果列入表1。

不消毒组经2~3d培养后,部分藻体在顶端、边缘及中部等不同部位由一处至数处细胞相互之间排列疏松,与酶解坛紫菜的情况很相似,细胞间的胶质已溶解,间隙明显,细胞呈圆形或椭圆形,颜色较黑亮,但仍未脱离藻体。另有部分藻体在中部及边缘形成烂斑,有的细胞颜色变绿,色素体模糊不清,近于死亡状。在死亡细胞区内还存在一些活细胞,这些细胞色泽黑亮,星状色素体清晰明显(图版I-3)。培养至7~8d后发现不同长度的大部分幼苗都出现以上现象,并有少量的游离细胞被释放出来(图版I-2)。

消毒组经消毒灭菌后在含1%抗生素的MES培养液中培养7~8d,藻体顶端及边缘依然完整。20d后藻体依旧正常生长,整个过程中均未发现有细胞分离及藻体胶质膜分解的现象。

细菌感染组在接种细菌后2d内即出现大量游离细胞,培养液呈浅绿色,悬浮有许多变绿



图版 I 坛紫菜幼苗的切段再生情况

Plate I Fragment regeneration of *P. haitanensis* thallus

1,4 新芽尖端的形成; 2-3 假根的形成; 5 尖端切下后又形成幼苗。

的细胞和大量的残余细胞壁,胶质膜等物质,溶液较粘稠,所释放的健康正常的游离细胞星状色素体明显,色泽黑绿明亮,边缘清晰。残余的藻体小叶片边缘破裂,数量较多的细胞排列松散,与中部结合紧密的细胞已明显分离。在振荡培养1周后,叶片大部分被分解,培养液呈深绿色且更加粘稠,游离细胞数量进一步增多。

表1 坛紫菜幼苗经不同处理后培养结果

Table 1 Culture results of the young buds of *P. haitanensis* with different treatments

组别	次数	日期 (月.日)	组数	出现游离细胞组数					备注
				3日	5日	7日	13日	20日	
未消毒组	1	11.9	14	3	9	11	11	12	于直径3cm 培养
	2	11.24	10	6	6	8	8	10	皿静置培养。
	3	12.25	7	3	7	7	7	7	
消毒组	1	11.19	11	0	0	0	0	0	于直径3cm 培养
	2	12.25	7	0	0	0	0	0	皿静置培养。
细菌感染组	1	11.24	1	均在第2日即出现大量游离细胞,4~5日后分解完毕。					于250ml 三角烧
	2	11.25	1	均在第2日即出现大量游离细胞,4~5日后分解完毕。					瓶中振荡培养。
	3	12.12	1	均在第2日即出现大量游离细胞,4~5日后分解完毕。					

游离细胞在分离集中加以培养3~4d后细胞开始分裂。部分细胞由一端伸出突起,逐渐发展成假根,另一端横分裂成2个细胞呈典型两极分裂,最终形成外形规则的正常苗(图版Ⅱ-1,2)。这种发育分化趋势与壳孢子、单孢子萌发的情况相似。另外有较大数量的细胞不断分裂,最后形成细胞团(图版Ⅱ-3,4,5),细胞直径较大,色素体星状,团块形状不甚规则,团块另一端边缘伸出粗壮的凸起,成为带较浅的色素体的单列细胞。这些苗的形状与王素娟等[1986a]所描述的畸形苗基本相同。

2.3 游离细胞的超微结构观察

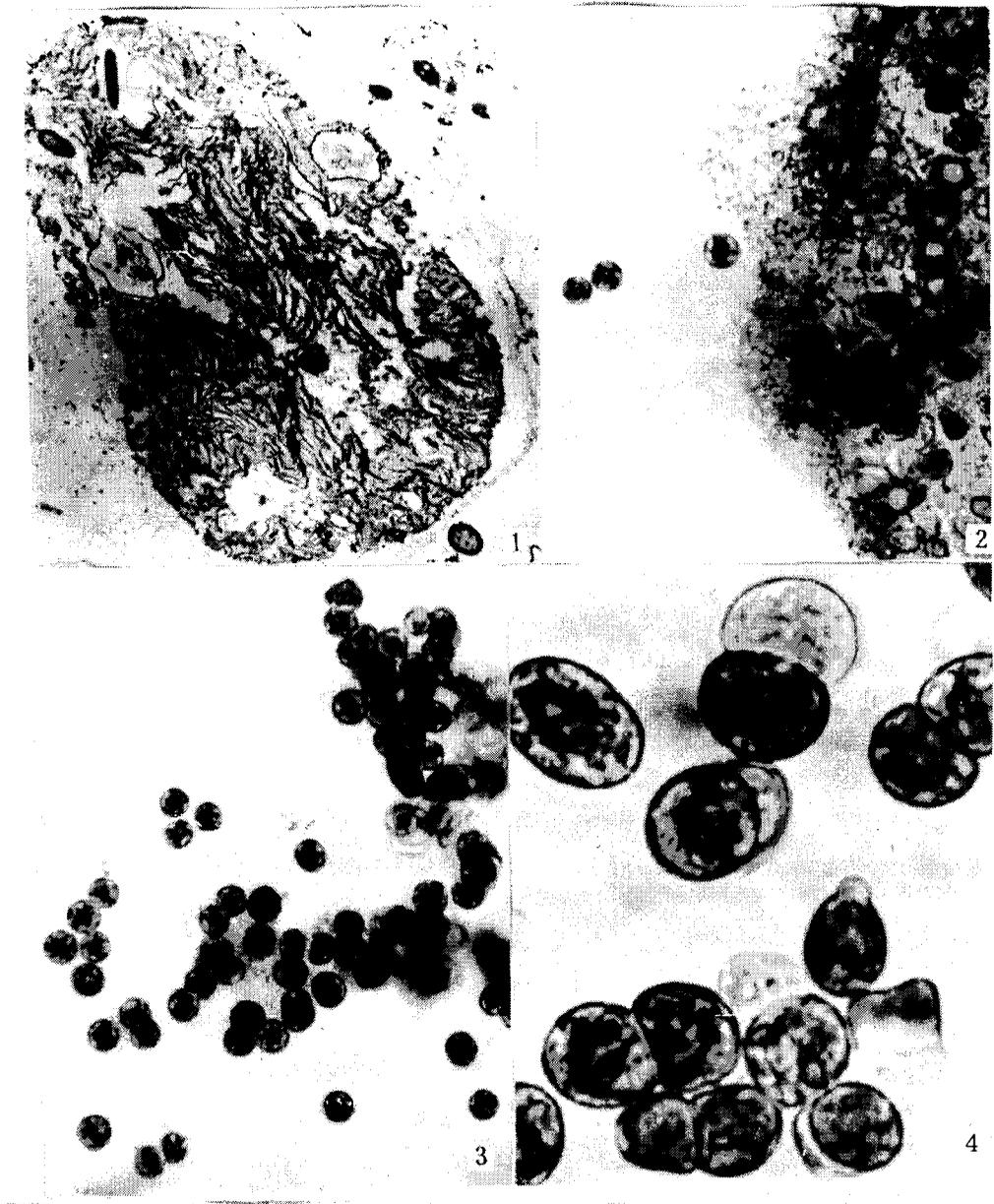
经测量这些游离细胞直径从12~25 μm 不等,比单孢子和果孢子都大。电镜下观察仅见不规则类囊体,无明显的大小囊泡(图版Ⅱ-1),与王素娟等[1986,1991]所述坛紫菜营养细胞结构基本一致。

3 讨论

(1)坛紫菜幼苗切段具有较强的再生能力,并具有明显的极性。能形成单孢子的种类(如条斑紫菜)的幼苗在切段或受伤后伤口边缘的细胞很容易分化成单孢子并进行放散,最后使边缘破裂不整齐[曾呈奎等,1985]。而坛紫菜切段经培养试验均未出现这种现象,它只能向顶端长出新的芽尖端而向下再生假根,而且从切口切下的芽尖端仍然能够再生出假根而成为完整的幼苗(图版Ⅰ-5)。因而坛紫菜幼苗切段不能产生单孢子。

(2)在王素娟,章景荣[1980]过去的试验中,作者观察了从几十 μm 到1000 μm 左右的自然生长的幼苗外部形态,其边缘都是完整的,不可能产生单孢子。同时在对1~10cm左右大小的藻体分株培养中也未发现单孢子的形成(表2)。而在坛紫菜营养细胞和原生质体培养的试验中也没有发现放散单孢子的现象[王素娟等,1986a]。因此,坛紫菜叶状体组织经酶解后的营养细胞能再生成苗是细胞全能性的表达,并不是因为形成或转化成单孢子所致。

(3)从对藻体不同处理的培养结果得出,坛紫菜放散游离细胞是具有分解细胞壁物质能力的细菌酶解的结果。在无菌条件下,坛紫菜不形成和放散细胞,更不会在藻体上形成单孢子。从藻体放散游离细胞的部位来看,真正放散单孢子的种类其形成及放散单孢子首先是在藻体顶

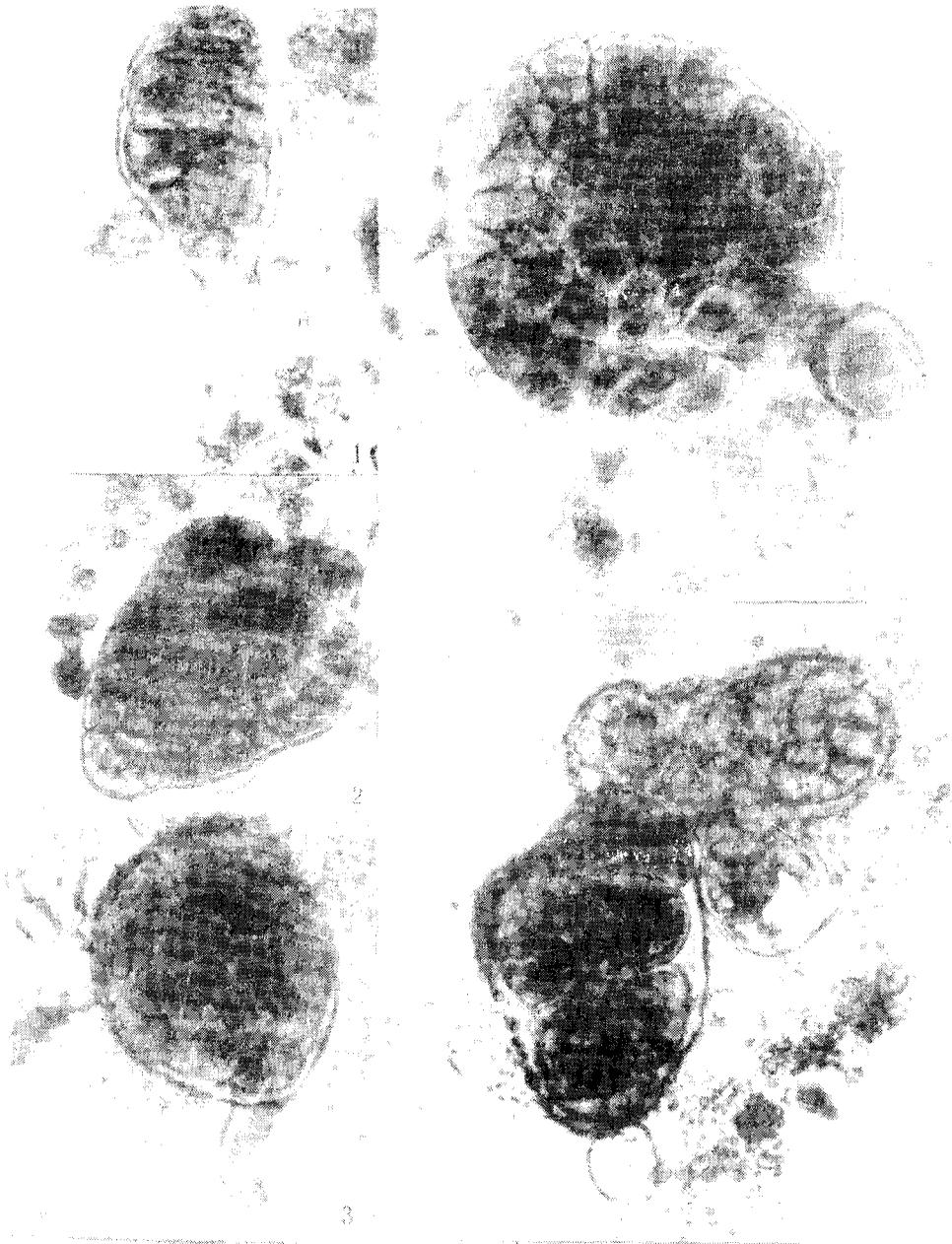


图版 II 坛紫菜叶状体放散的游离细胞

Plate II Isolated somatic cells of *P. haitanensis* thallus

1 未消毒组游离细胞的超微结构； 2-3 未消毒组释放游离细胞； 4 酶离的体细胞。

端及边缘,在顶端及边缘未形成单孢子的情况下,藻体中部不可能形成和放散单孢子,且形成单孢子的同时并不伴随大量死亡细胞的出现。只有在细菌持续酶解的作用下才出现这种现象。因此,人工栽培的坛紫菜浮动架或浮筒上发现的坛紫菜叶状体很可能是由自然界的壳孢子或细菌作用下幼苗放散的游离细胞附着后萌发而成的。



图版 III 未消毒组幼苗释放的游离细胞的萌发

Plate III Gemination of isolated cells from unsterilized *P. haitanensis* thallus

1-2 正常苗； 3-4 畸形苗。

(4)游离细胞经培养,结果发现除正常苗外,还形成大量形状不规则和没有正常假根的畸形苗。这一现象与王素娟等[1986a]中所描述的酶解细胞发育分化的情况很相似。因此,这些游离细胞很可能就是营养型细胞。因为单孢子在发育成小叶状体时,绝大多数只生成具正常假根,苗型一定的正常苗,而不可能生成上述畸形苗。另外从这种细胞的超微结构也证实了这一

表2 坛紫菜形态观察

Table 2 Morphological observation of *P. haitamensis* thallus

标本号	1	2	3	4	5	6	7	8
长度(μm)	85	90	136	153	697	816	1062	1445
顶端边缘完整否	+	+	+	+	+	+	+	+
有无单孢子	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”代表是或有；“-”代表否或无。

点。任何种类的紫菜单孢子超微结构的特点都是原生质浓厚,充满大小囊泡[王素娟等,1986; Hawkes, 1980; 鬼头钩, 1978]。而色素体占主要地位,没有大小囊泡的出现是营养型细胞和孢子的根本区别。我们收集的细胞其超微结构与王素娟等[1991]所描述的坛紫菜原生质体结构相同,可见藻类所释放的是营养细胞。游离细胞的放散是没有规律的,只要细菌数量足够酶解细胞壁,细胞就随时可游离而出。而条斑紫菜单孢子放散在一日之间就有一定放散高峰,而且在整个季节受水温影响还表现出季节周期性。培养的体细胞团形成单孢子除日周期外还有放散高峰在培养第10~13 d之间的大周期(周一红、王素娟,1990)。

综上所述,坛紫菜幼苗的切段只有营养生长而无转为放单孢子的迹象,而在有菌及一定条件下释放出来的游离细胞光学及超微结构的情况和细胞释放规律、发育趋势等方面又与条斑紫菜单孢子有本质区别。因此可以认为坛紫菜幼苗只是在有菌酶解或受伤作用下才形成和释放一些营养型细胞,并由于细胞的全能性才一部分形成正常苗,坛紫菜生活史中并不形成单孢子。

参 考 文 献

- [1] 王素娟,章景荣,1980.刺边紫菜进一步研究.中国水产学会水产科技论文集,75-84.农业出版社(京)。
- [2] 王素娟等,1986.坛紫菜原生质体超微结构的观察.海洋科学,10(4):21-24.
- [3] ——,1986a.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I.海洋与湖沼,17(3):217-224.
- [4] ——,1991.中国经济海藻超微结构的研究,1,12,146-148.浙江科学技术出版社(杭州)。
- [5] 李世英,1988.坛紫菜叶状体形成及放散单孢子的初步研究.海洋与湖沼,19(6):594-597.
- [6] 曾呈奎等,1985.海藻栽培学,144-145.上海科学技术出版社。
- [7] 鬼头钩,1978.アブノリ属植物细胞学的研究.东北水研研究报告,(39):70-71.
- [8] Hawkes, M. W., 1980. Ultrastructure characteristics of monospores formation in *Porphyra gardneri* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 16(2), 192-196.

(1) 周一红、王素娟,1990.条斑紫菜体细胞团放散单孢子的周期性研究。

RE – EXAMINATION ON THE ASEXUAL REPRODUCTION OF YOUNG BUDS OF *PORPHYRA HAITANENSIS*

Wang Su – juan and Ma Ling – bo

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

ABSTRACT It has been discussed for many years in China whether the young buds of *Porphyra haitanensis* can release monospores. The problem was studied in many aspects, especially for the condition of cells releasing, for the tendency of cells development and differentiation, and for the ultrastructure. After a comparison between *P. haitanensis* and *P. yezoensis*, the young buds of *P. haitanensis* were found releasing some cells under special culture conditions, which had been regarded as monospores. However, they are the same as vegetative cells of *P. haitanensis* and different from the monospores of *P. yezoensis* in the microstructure, ultrastructure, releasing rules and the developmental results of cells. The above results of experiments indicate that the buds of *P. haitanensis* can not release the real monospores.

KEYWORDS *Porphyra haitanensis*, monospore, culture of isolated cells