

# 坛紫菜单性叶状体细胞的发育研究

王娟<sup>1</sup>, 戴继勋<sup>2\*\*</sup>

(1. 菏泽学院生命科学系, 山东 菏泽 274015; 2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 研究采用雌雄营养组织块和营养细胞进行培养, 以了解坛紫菜单性营养细胞的生长发育情况。结果表明, 坛紫菜雌性营养细胞无论在组织水平还是在细胞水平均以产生红色果胞或果孢子细胞为主, 有少量细胞发育成精子囊, 并散放精子。雄性营养组织和营养细胞以产生精子为主, 但不能再分化成丝状体; 产生的少量果孢子细胞能发育成丝状体。因此, 在室内培养条件下, 坛紫菜单性叶状体都能产生两性细胞, 它们的差异只是不同性细胞所占的优势不同, 并讨论了单性叶状体的产生。

**关键词:** 坛紫菜; 营养组织块; 营养细胞; 发育

**中图分类号:** Q2; Q178.53

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-5174(2008)03-419-05

紫菜是目前世界上人工栽培海藻中经济价值最高的种类。中国的紫菜栽培种有2个, 南方为坛紫菜(*Porphyra haitanensis* Chang et Zheng), 北方为条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)。坛紫菜盛产于我国闽、浙两省, 在两大栽培紫菜中产量最高, 生产面积最多, 已成为我国南方沿海地区的支柱产业。

自从成功用酶法分离获得紫菜体细胞和原生质体以来, 已有一些藻类学家采用液体培养法和固体培养法对紫菜营养细胞的生长发育进行了研究<sup>[1-6]</sup>。紫菜是否存在单性生殖仍是一个值得研究的问题<sup>[7]</sup>。最近有报道坛紫菜雌性和雄性叶状体的单克隆丝状体培育和单性生殖, 但是纯系丝状体产生的途径并不清楚, 仍有探讨的必要<sup>[8-11]</sup>。本文利用坛紫菜雌雄异体的特性, 将其雌雄叶状体的营养细胞从细胞水平和组织水平分别进行隔离培养, 探索其生长发育的规律和特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

坛紫菜叶状体采自浙江省象山县紫菜养殖场, 然后经阴干密封于封口袋中, 于-20℃冰箱中冻存备用。

### 1.2 试剂

海螺酶, 由中国海洋大学海藻遗传学实验室自制, 保存于-20℃冰箱中; 纤维素酶 R-10, 购自赛恩斯生物技术公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.3 培养基

试验中所用培养基均为加入 N, P 营养盐的消毒

海水(10 mg·L<sup>-1</sup>NaNO<sub>3</sub>和 1 mg·L<sup>-1</sup>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>[12]</sup>。

### 1.4 方法

试验前将坛紫菜叶状体在消毒海水中复苏 24 h, 然后挑选雌雄个体, 单裸在显微镜下切取营养组织(2~3 mm)分别放在培养皿中隔离培养。将去除生殖细胞的雌雄叶状体分别切成 2 mm×2 mm 左右的碎片, 加入 2% 的海螺酶、1% 的纤维素酶 R-10 和 1.5 mol·L<sup>-1</sup> 的葡萄糖, 20~25℃ 酶解 2~3 h 后, 紫菜细胞变得松动, 加入少许海水使细胞游离, 用筛绢(200 mesh)过滤。将滤液 180×g 离心, 用消毒海水多次洗涤离心, 以彻底去除残留的酶液。将收集到的雌雄叶状体营养细胞分别放入培养皿中置培养箱中进行隔离培养。

培养条件: 温度为 20℃ 和 25℃, 光照密度为 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光周期 12 L:12 D, 雌雄组织块和雌雄营养细胞的培养每 5 d 更换 1 次培养液, 每个培养皿为 50 mL 培养液。在 XD-101 倒置显微镜下进行观察和照相记录。

## 2 结果

### 2.1 雌性营养组织的发育

在培养的 1~2 周后, 组织块表现出明显的极性再生现象, 向梢部的切面细胞膨大并不断分裂生长, 形成新的各种形状、大小不一的叶状体尖端, 颜色较深(见图 1.1); 组织块向基部一端的切面细胞伸长成管状, 颜色很浅, 形成大量根丝细胞(假根)(见图 1.2)。另外一

• 基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2002AA6030); 科技部农业转化资金(02EFN213200216); “十五”国家科技攻关计划(2004BA526B08) 资助

收稿日期: 2007-11-23; 修订日期: 2008-03-17

作者简介: 王娟(1977-), 女, 博士。E-mail: Wangjuan310@163.com

\*\* 通讯作者: E-mail: daijx@ouc.edu.cn

些组织块的两侧形成叶状体尖端。而且还发现只有在切口的边缘细胞才能表现出极性,形成小叶状体或假根。

培养前期,根端细胞呈砖红色,苗端细胞变红,组织块中央细胞仍为绿色。经过一段时间培养,组织块细胞均呈现红褐色。随后,有些组织块多数细胞变为浅绿色,细胞间隙增大,色素弥散逐渐死亡,但胶质没有分解。有些深红色细胞团形成(见图 1.3),且壁较厚,有些组织块中有零散的红细胞分布,多数分布于切口边缘。25℃下组织块生长发育速度比20℃快,形成的红色细胞团比20℃要多。剩余少量存活的细胞除形成红色细胞团外,少数原位萌发成小叶状体或畸形苗(见图 1.4~1.5)。最后深红色细胞团逐渐向丝状体方向发展。此外,在组织块中还发现有些细胞经细胞分裂形成精子囊细胞(见图 1.6~1.7),最后成为精子而消失。有些营养细胞不形成细胞团,而是细胞体积增大逐渐变红(见图 1.8),直接形成丝状体,甚至有少数细胞经分裂直接形成孢子囊枝(见图 1.9)。

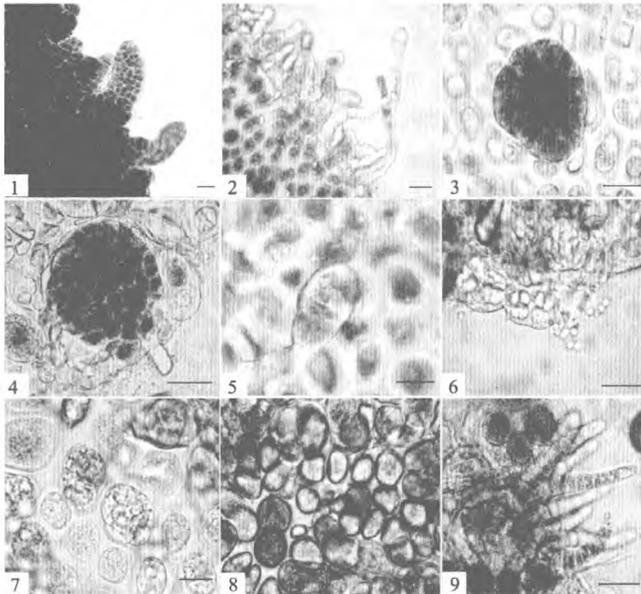


图1 雌性营养组织块的发育情况(比例尺=20 μm)

Fig. 1 The development of female vegetative tissue

All scale bars = 20 μm

(1. 再生的锯齿状叶状体尖端; 2. 再生的管状假根; 3~4. 畸形叶状体; 5. 小叶状体; 6~7. 类精子囊细胞; 8. 类果孢子细胞; 9. 细胞直接形成的孢子囊枝)

1. The regeneration of denticulate blade; 2. The regeneration of tubular rhizoid; 3~4. The abnormal thallus; 5. Small thallus; 6~7. Spermia-like cells; 8. Carpospore-like cells; 9. Conchosporangial branches from cell directly)

## 2.2 雄性营养组织的发育

培养前期与雌性营养组织块发育情况类似,同样表现出明显的极性再生现象,假根一侧细胞同样呈砖红色。培养过程中组织块细胞首先由绿色变为红褐

色,然后从苗端边缘细胞开始细胞不断分裂形成精子囊呈浅黄色(见图 2.1~2.2),然后放散大量精子细胞。在此发育过程中,观察到有类似原生质体的细胞形成(见图 2.3~2.4),但没有发育成小叶状体而是逐渐退化,同时伴随大量细胞死亡,细胞壁破裂内含物外流。

25℃下组织块的生长发育速度要快于20℃。组织块中有极少数红色细胞和红色细胞团,类似果胞及果孢子囊(见图 2.5)、丝状体(见图 2.6)及小叶状体的形成(见图 2.7~2.8)。红色细胞团部分颜色逐渐变浅,趋于死亡;部分形成丝状体。远离假根一端的组织块发育要快于近假根端的组织块。

放散的精子细胞经 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-苄基腺嘌呤(BA)和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  萘乙酸(NAA)处理后没有进一步的分化。

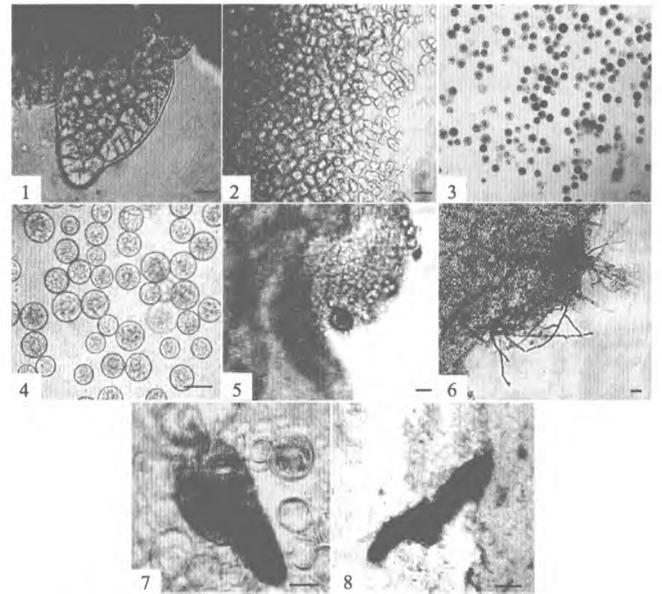


图2 雄性营养组织块的发育情况(比例尺=20 μm)

Fig. 2 The development of male vegetative tissue.

All scale bars = 20 μm

(1. 成熟呈浅黄色的苗端; 2. 精子细胞的放散; 3~4. 类似原生质体的细胞; 5. 红色细胞团; 6. 丝状体; 7~8. 紫菜小叶状体)

1. The yellowish and mature blades; 2. Releasing of sperm cell; 3~4. Protoplast-like cells; 5. Reddish cell masses; 6. Conchocelis filament; 7~8. Small thalli of Porphyra)

## 2.3 雌性营养细胞的发育

培养的第2~3 d原生质体形成细胞壁,部分细胞完成第一次分裂(见图 3.1),细胞色素体明显。但多数细胞仍处于原生质体或单细胞状态,部分细胞开始退化。经过一段时间培养,部分细胞分裂多次形成正常小叶状体,也有部分形成畸形苗,另有部分细胞经细胞分裂几次形成黄绿细胞团(见图 3.2),其中多数细胞体积增大,色素体弥散,颜色变红,类似果胞,细胞团外壁增厚,细胞排列较不紧密,多数原位萌发形成丝状体(见图 3.3~3.4)。另有一些细胞发育成类似果孢子囊

细胞,并逐渐释放分化发育成丝状体(图3.5~3.7),萌发方式有单极或多极。在细胞团中,另有少部分细胞进行细胞分裂,形成精子囊状细胞,细胞色素浅黄,逐渐形成精子细胞,随后放散精子(图3.8~3.9)。还有少数黄绿色细胞团中的细胞,色素变浅,最后退化死亡(见图3.10)。在细胞团中也有极少数细胞直接萌发形成小叶状体(见图3.11),少数细胞直接形成孢子囊枝(见图3.12),25℃明显多于20℃,经培养能正常放散壳孢子。

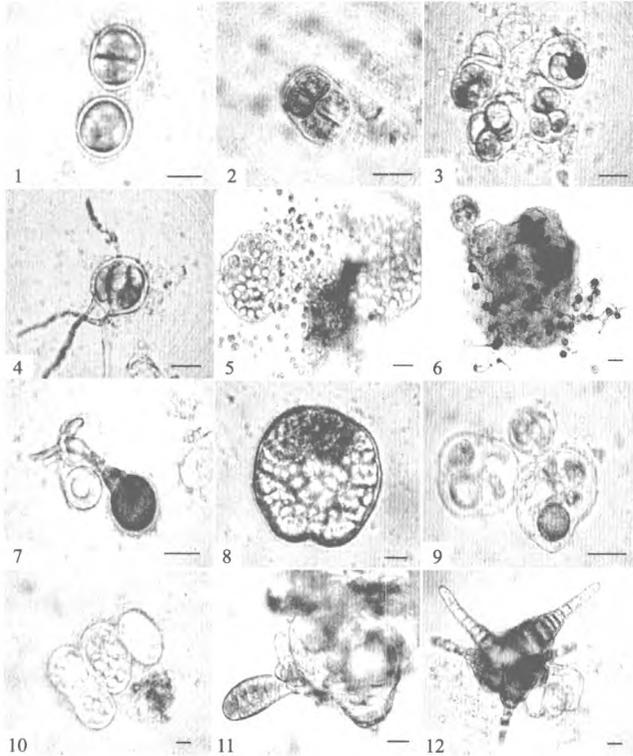


图3 雌性营养细胞的发育情况(比例尺=20 μm)

Fig.3 The development of female vegetative cells.

All scale bars = 20 μm

(1. 单细胞和分裂一次的细胞;2~3. 分裂2次的黄绿色细胞团;4. 黄绿细胞团中的细胞原位萌发形成丝状体;5~7. 红细胞团放散孢子且萌发成丝状体;8~9. 红色细胞团部分变浅黄色部分变红色;10. 精子囊细胞;11. 细胞团中细胞形成的紫菜小叶状体;12. 细胞直接形成的孢子囊枝

1. A single cell and a cell that has undergone one cell division; 2~3. Yellowish green cell masses that have undergone cell division twice; 4. Conchoecelis germinated from cells in yellowish green cell masses; 5~7. Releasing of carpospores from reddish cell masses and germinating into conchoecelis; 8~9. Some cells become yellowish and some become red in reddish cell masses; 10. Spermatangial cells; 11. Seedlings from cells of cell masses; 12. Conchosporangial branches developed directly from cells)

## 2.4 雄性营养细胞的发育

培养的第2~3 d,原生质体形成细胞壁。但有些细胞内部开始解体逐渐退化死亡。经过一段时间培养,部分细胞多次分裂形成正常或多种畸形小叶状体

(见图4.1~4.3)。这些小叶状体都能发育成熟,有精子囊和果孢子囊。其中畸形苗主要是细胞团状结构。黄色细胞团(见图4.4~4.5)放散精子细胞(见图4.6),分化为精子囊群,由于精子囊细胞的不断分裂,使一些培养皿中都是精子囊群或精子细胞(见图4.7),随后解体退化。另有少数细胞团呈红色细胞,分化为果胞,形成果孢子囊,并放散果孢子,发育成丝状体(见图4.8)。在不同的培养皿中细胞的生长发育速度存在一定差异。精子囊分化较果孢子囊细胞分化较早。有些细胞团形成分枝状的类似愈伤组织的结构(见图4.9)。2种温度中,以25℃较20℃培养的生长发育较快。

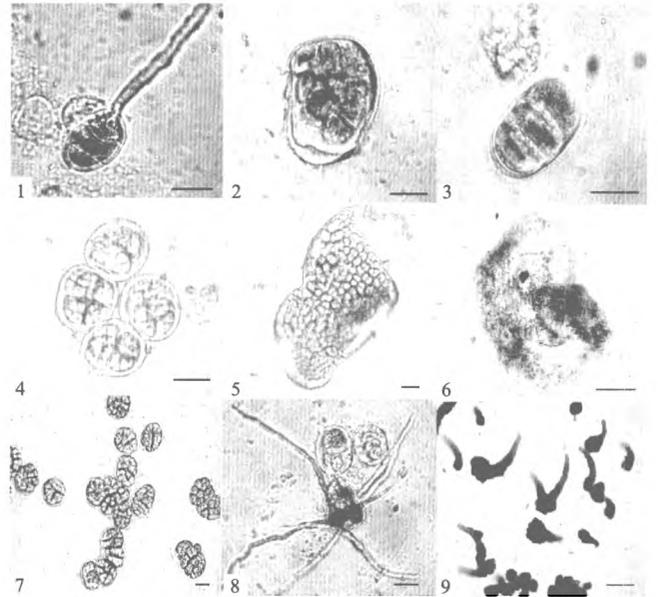


图4 雄性营养细胞的发育情况(比例尺=20 μm)

Fig.4 The development of male vegetative cells

All scale bars = 20 μm

(1. 具假根的紫菜小叶状体;2. 红色细胞团;3. 无假根的紫菜小叶状体;4. 细胞分裂形成的黄色细胞团;5. 畸形苗成熟变浅黄色;6. 细胞团放散精子细胞;7. 精子囊群;8. 丝状体;9. 不断分裂形成的类似愈伤组织的结构

1. Seedling with rhizoid; 2. Reddish cell masses; 3. Seedling with no rhizoid; 4. Yellowish cell masses; 5. Spermatangial cells released from cell masses; 6. Spermatangial cells released from cell masses; 7. Spermatangial groups; 8. Conchoecelis; 9. Callus-like structures developed from cells)

## 3 讨论

从雌雄营养组织的发育过程来看,在发育前期均表现出明显的极性再生现象,向叶尖的切面细胞膨大并不断分裂生长,形成新的各种形状、大小不一的叶状体尖端;组织块向基部一端的切面细胞伸长成管状,形成大量假根,不受温度条件的影响。极性是细胞分裂之前,因胞质组分不均匀分布,向某一方向局部聚集,聚集端和没有聚集的一端之间就形成了极性。这与

Notoya<sup>[13]</sup>的研究结果是一致的。而在梅俊学<sup>[14]</sup>的研究中坛紫菜未培养出再生植株,这大概是选择的材料较老,与再生叶状体的能力较差有关。

在高温和低温下雌雄组织块均形成红色细胞团,且红色细胞团的发育方向一致。但25℃下的生长发育速度要明显快于20℃。此外,25℃下形成的孢子囊枝明显多于20℃。在同样的温度条件下,雌性组织块的发育速度比雄性组织块慢,雄性组织块在大部分细胞死亡的部分细胞间的胶质膜完全分解,用镊子难以夹起,而雌性组织块在细胞死亡后一段时间内藻体胶质膜仍存在,呈透明状。雄性营养组织块形成的类似原生质体的游离细胞可能是具有分解细胞壁物质能力的细菌酶解或体细胞突变不能形成细胞壁的结果,而不是放散的单孢子,因为真正放散单孢子的种类其形成和放散单孢子是从藻体顶端和边缘开始,且放散过程中并不伴随大量细胞的死亡。且这些游离的细胞没有进一步发育形成叶状体或丝状体。

雌性营养细胞经酶解后多数能以不同方式形成丝状体,这与雌性组织块的发育途径是不同的。这可能是由于酶解后的细胞之间相互作用减少,独立性增强;而组织块的细胞没有分开,其间相互影响,相互限制,相互竞争,相互作用较显著,只有少数细胞存活进行发育,细胞的这种排列方式也决定了其发育方向的不同。而雄性的营养细胞和组织块的发育是基本相同的。说明细胞间的相互影响对雌性细胞的作用要明显大于雄性细胞。

培养过程中形成的精子细胞进行分离培养,采用激素处理后均不能去分化和再分化为叶状体或丝状体,这可能是精子囊已经不是完整的细胞或发育过程中特定基因表达的结果,且是不可逆的。这与Polne<sup>[15]</sup>和戴继勋<sup>[2]</sup>的研究结果是一致的。

最近刘必谦等报道,利用坛紫菜配子体(叶状体)单个细胞分离克隆培育出孢子体(丝状体)纯系<sup>[7]</sup>,并扩大培养转入传统育苗和海上养殖,其附着率、叶片质量和性成熟等经济性状均比未经选育的野生菜占有优势<sup>[8]</sup>。严兴洪等应用同样的技术,发表了坛紫菜的单性生殖(繁殖)与纯系的建立<sup>[9-11]</sup>。即由单雌或单雄生殖产生的丝状体其生长发育正常,由它们释放的壳孢子其性别全为单性,即单雌生殖产生的丝状体后代叶状体全为雌性,而由单雄生殖产生的丝状体后代叶状体全为雄性。关于海藻的单性生殖,在海带中雌配子体成熟后进行单性生殖,孢子体(叶状体)经染色体自然加倍,后代孢子体成熟后,全为配子体<sup>[16]</sup>。曾有报道某些紫菜孢子体的染色体为 $1n$ <sup>[17-22]</sup>,这暗示紫菜有单性生殖的可能性。即紫菜配子体细胞不经过受精,而直接发育成丝状体( $1n$ 孢子体)。最近作者的研究

表明,紫菜的减数分裂发生在孢子体双分孢子的形成到壳孢子的第一次细胞分裂<sup>[23-24]</sup>。因此,紫菜叶状体是1个不同基因分离重组细胞的嵌合体。

利用酶法分离紫菜配子体细胞获得纯系丝状体有2个途径:一是单性生殖或单性发育,另一个是 $1n$ 配子体细胞分化为雌雄两性生殖细胞,自体受精。因此,从单性叶状体的组织培养看,不能培育出纯系。用细胞培养单性叶状体酶法解离的单个细胞,避开了基因重组细胞嵌合体的干扰。本研究的细胞培养表明,坛紫菜雌性或雄性叶状体都能分化出2种性细胞,严兴洪在雄性叶状体的细胞培养中也观察到2种性细胞,其纯系丝状体更可能是两性配子自交的结果。单性叶状体的产生是否存在性别不育基因,是1个考虑的因素。关于坛紫菜纯系丝状体产生的途径以及性别决定和性别发育的问题就目前的资料尚缺乏有说服力的证据,还有待今后深入细致的研究去加以解决。

#### 参考文献:

- [1] 戴继勋,包振民.坛紫菜原生质体的发育研究[J].遗传学报,1988,15(4):299-302.
- [2] 顾勤英,沈颂东,项文钰,等.坛紫菜的细胞发育研究[J].苏州大学学报:自然科学版,2005,21(3):78-82.
- [3] 杨锐,徐红霞,徐丽宁.坛紫菜体细胞的几种发育途径[J].海洋湖沼通报,2006(3):60-66.
- [4] 沈颂东,杨震,戴继勋,等.F<sub>2</sub>对条斑紫菜细胞生长发育的影响[J].青岛海洋大学学报,2000,30(2)II:191-197.
- [5] 王素娟.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究I[J].海洋与湖沼,1986,17(3):217-224.
- [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):1-8.
- [7] 戴继勋,沈颂东.紫菜的细胞遗传学研究现状及展望[J].青岛海洋大学学报,1999,29(4):637-642.
- [8] 曾庆国,刘必谦,杨锐,等.坛紫菜单个体细胞克隆的丝状体途径[J].中国水产科学,2004,11(6):549-552.
- [9] 刘必谦,曾庆国,骆其君,等.坛紫菜体细胞单克隆叶状体途径及海上养殖[J].水产学报,2004,28(4):407-412.
- [10] 严兴洪,李琳,陈俊华,等.坛紫菜的单性生殖与遗传纯系分离[J].高技术通讯,2007,17(2):205-210.
- [11] 严兴洪,刘旭升.坛紫菜雌雄叶状体的细胞分化比较[J].水产学报,2007,31(2):184-192.
- [12] Dai J, Zhang Q, Bao Z. Genetic breeding and seedling raising experiments with *Porphyra* protoplasts [J]. Aquaculture, 1993, 111: 139-145.
- [13] Notoya M. Seed production of *Porphyra* spp. Bu tissue culture [J]. J Appl Phycol, 1999, 11: 105-110.
- [14] 梅俊学,费修缙.紫菜叶状体离体组织再生植株的研究[J].海洋学报,2003,25(supp.2):95-99.
- [15] Polne M, Biniaminov M, Gibor A. Vegetative propagation of *Porphyra perforate* [J]. Hydrobiologia, 1984, 116/117: 308-313.
- [16] 戴继勋,崔竞进,欧毓麟,等.海带孤雌生殖和自然加倍的研究[J].海洋学报,1992,14(1):105-107.

- [17] Krishnamurthy V. Cytological investigation of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. var. *laciniata* (Lightf.) [J]. *J Ag Ann Bot*, N S, 1959, 24: 157-176.
- [18] Yabu H. Cytology in two species of *Porphyra* from the stipes of *Nereocystis leutkeana* (Mert.) Post. Et Frpr [J]. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ*, 1970: 243-251.
- [19] Conway E, Cole K. Observations on an unusual form of reproduction in *Porphyra* (Phodophyceae, Bangiales) [J]. *Phycologia*, 1973, 12 (3/4): 213-225.
- [20] Mumford T F. Observations on the distribution and seasonal occurrence of *Porphyra Schizophytlla* Hollenberg, *Porphyra torta* Krishnamurthy, and *Porphyra brumalls* sp. nov. (Rhodophyta, Bangiales) [J]. *Syesia*, 1975, 8: 321-332.
- [21] Frehswater D W, Kapraun D F. Field, culture and cytological studies of *Porphyra carolinensis* Coll et Cox (Rhodophyta, Bangiales) from North Carolina [J]. *Jap J Phycol*, 1986, 34: 251-262.
- [22] Kapraun D F, Lemus A J. Field and culture studies of *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Oliveira Filho et Coll (Bangiales, Rhodophyta) from Isla de Margarita, Venezuela [J]. *Bot Mar*, 1987, 30: 483-490.
- [23] Wang J, Dai J, Zhang Y. Nuclear division of the vegetative cells, conchosporangial cells and conchospores of *Porphyra yezoensis* [J]. *Phycol. Res.*, 2006, 54: 204-210.
- [24] 王娟, 戴继勋, 张义昕, 等. 紫菜减数分裂的研究现状及展望 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2006, 36(3): 377-380.

## Study on the Development of Unisexual Thalloid Cells of *Porphyra haitanensis*

WANG Juan<sup>1</sup>, DAI Ji-Xun<sup>2</sup>

(1. Department of Life Sciences, Heze University, Heze 274015, China; 2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** In order to learn more about the growth and development of unisexual vegetative cells of *Porphyra haitanensis*, female and male vegetative tissues and cells of *P. haitanensis* were cultured separately in this study. The results showed that many reddish carpogonia or carpospores, few spermatangia and sperms were found in female vegetative tissue and cells. However, in male vegetative tissue and cells, many sperms were observed and they could not develop into conchocelis. Conchocelis could be found from few carpospores. Therefore, both of the thalli of *Porphyra haitanensis* with single sex could generate male and female cells. The difference was that the advantage of different sex cells was different. The generation of unisexual thalli was also discussed.

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; vegetative tissue; vegetative cell; development

责任编辑 于 卫