

## 条斑紫菜离体组织再生苗的研究\*

梅俊学 费修夔

(中国科学院海洋研究所 青岛 264071)

**提要** 条斑紫菜叶状体离体组织(切块)在一定培养条件下,其营养细胞经过一系列的变化可产生出幼苗。本研究发现切块越小出苗越早,单位面积离体组织出苗量越多。成熟叶状体上靠近雌雄性细胞的区域与其他部位的营养细胞相比形成幼苗较早,离这一区域越远的细胞成苗越晚。离体组织细胞成苗的适宜水温为 15~17℃,在 20~25℃下部分细胞进行不规则分裂形成深紫红色的细胞团,当降温至 17℃时,它们仍可转化为幼苗。

**关键词** 条斑紫菜,离体组织,再生苗

最近不少研究者证实紫菜叶状体离体组织可以直接产生叶状体苗,这种生苗方式与传统方式完全不同,有可能成为获取苗源的新途径。本文研究了条斑紫菜叶状体离体组织切块在叶状体上的位置、切块大小和培养温度等几个因素对再生苗的影响,以求进一步了

\* 国家重点科技项目攻关计划资助项目 96-C01-05 号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3616 号;中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室的连绍兴工程师提供实验材料,在此谨表谢意。

收稿日期:1999-08-25;修回日期:1999-12-21

解紫菜叶状体细胞的发育规律和离体组织再生苗的机制,为将来更深入的研究打下基础。

## 1 材料和方法

条斑紫菜叶状体 1998 年 3 月 30 日取自青岛汇龙湾礁石上,体长 15~30 cm, 均已具有精子囊群和果孢子囊群生成。采回后用清洁海水洗去附着的杂物,放在阴凉通风处使其失去大部分水分,装入塑料袋中封口放入 -20 °C 保存。2 个月后取出在 15 °C 海水中解冻、复原,平铺于纸上剪成小块(除试验 2 外均为 2 mm × 2 mm),在直径 7 cm 的培养皿中进行培养,每一培养皿中放 9 块,每组设 3 个重复。培养液为 PES,另加  $2 \times 10^{-6}$  GeO<sub>2</sub> 以及  $2 \times 10^{-7}$  的青霉素和链霉素抑制硅藻和抑制细菌的生长。除试验 3 外,培养条件均为水温 15 ± 2 °C、光照 5 000 lx,光周期 12 h:12 h(L:D)。每隔 3~5 d 观察一次,7~10 d 更换一次培养液。

## 2 试验结果

作者发现,条斑紫菜叶状体被切成小块培养时通常以 3 种形式形成幼苗,与通常叶状体幼苗产生单孢子并成苗的方式不同<sup>[1]</sup>。为叙述方便,本文仍沿用单孢子一词。

### 2.1 营养组织切块在叶状体中的位置对出苗的影响

如图 1 所示,成熟叶状体根据位置和细胞形状的不同可以分为 5 个区域。藻体基部(区域 I)由蝌蚪形的细胞组成,细胞基部向下延伸形成假根丝。区域 II 位于区域 I 上部,细胞形状多样,细胞间基质较厚(图 2a)。区域 III 占叶状体的绝大部分,细胞呈不规则的多边形,排列较紧密(图 2b)。区域 IV 细胞近圆形,排列较疏松,胞间基质多(图 2c)。在区域 V 中精子囊群和果孢子群相间分布。在上述 5 个部位分别剪取 15 mm × 15 mm 的组织块,再各自剪成 2 mm × 2 mm 小块按上述条件培养,每组实验中所有切块均来自同一藻体。结果如表 1 所示,培养 40 d 后除了区域 I 的组织未见有苗外,其余组织都产生了健康的幼苗,而且在区域 II~IV 中,距离基部越近的营养组织出苗越晚,出苗量越少;越远的则出苗越早,越多。区域 V 出现大量丝状体。作者用另外的藻体又重复做了 3 次试验,虽然各株间出苗所需的绝对时间和绝对出苗量

有差异,但同一株紫菜叶状体上不同部位的营养组织再生苗都存在上述规律。

表 1 紫菜叶状体不同部位切块的出苗情况

Tab.1 Seedling regeneration of excised fragments from different positions of *Porphyra yezoensis* thalli

切块位置	平均出苗* 时间(d)	平均出苗* 量 (株/ m m <sup>2</sup> 藻片)
I	未出苗	0
II	40	19
III	26	49
IV	13	60
V	13	3

\* 这里指体长 >1 mm 的幼苗。

### 2.2 切块的大小对出苗时间和出苗量的影响

在距离叶状体基部 1 cm 处(区域 III)剪取全由营养细胞组成的 15 mm × 15 mm 的组织片,再将它剪成 1 mm × 1 mm, 2 mm × 2 mm, 3 mm × 3 mm, 5 mm × 5 mm 和 10 mm × 10 mm 的切块,所有切块均来自同一株藻体。将它们分别放入培养皿中加培养液按上述条件培养。结果如表 2 所示,小于 5 mm × 5 mm 的切块出苗早,出苗多;大于或等于 5 mm × 5 mm 的出苗所需时间长且出苗量少。以后又用多株藻体进行了反复的试验,都得出了类似的结果。

表 2 不同大小的切块的出苗情况

Tab.2 Seedling regeneration from different size of excised fragments of *Porphyra yezoensis* thalli

切块大小 (mm × mm)	出苗* 时间 (d)	出苗* 量 (株/ m m <sup>2</sup> 藻片)
1 × 1	30	41
2 × 2	33	42
3 × 3	33	26
5 × 5	42	9
10 × 10	49	3

\* 指体长 >1 mm 的幼苗。

### 2.3 切块在培养液中的位置对出苗的影响

切块取自同一藻体部位 III,剪成同样大小 2 mm × 2 mm,在上述条件下培养后发现,始终漂浮于培养液表面上的组织块放散单孢子,出苗均比完全浸没在培养液中的早 7~14 d,但出苗量没有明显差异。

### 2.4 培养温度对切块出苗的影响

将 2 mm × 2 mm 的切块分别放在 10,12,15,17,

20, 23 和 25 °C 下培养 26 d 后, 将后 3 组各分成两部分, 一部分仍在原条件下培养, 另一部分放入 17 °C。结果如表 3 所示。最初培养 26 d 后, 各组均未出苗, 10, 12 和 15 °C 3 组的切块仍为营养细胞, 17 和 20 °C 组有单孢子形成, 20 和 23 °C 和 25 °C 组的切块上出现鲜红的细胞团, 是细胞发生不规则分裂形成的, 由大小不等的细胞组成, 较大细胞中有大的液泡, 肉眼观组织块变厚、颜色变深、不平滑。原条件下培养 46 d 后, 15, 17 °C 两组生出大量正常苗, 20 °C 和 23 °C 两组

出现少量正常苗和大量畸形苗, 25 °C 组没有任何苗长出, 原组织块变绿。将后 3 种温度条件下 26 d 后形成的带有鲜红色细胞团的切块转入 17 °C, 17 d 后出现大量正常苗。20 °C 和 23 °C 下产生的畸形苗长到十几至几十个细胞期, 就不断散放单孢子, 单孢子萌发后又在同样大小时产生新一代单孢子苗, 结果幼苗总长不大。将这些畸形苗和它们产生的单孢子及单孢子苗放入 15 °C 30 d 后, 出现大量 1 cm 以上的叶状体苗。

表 3 不同温度下切块的出苗情况

Tab.3 Seedling regeneration from excised fragments of *Porphyra yezoensis* thalli in deferent demperation

培养水温 (°C)	出苗情况		
	26	43	原温度下培养 26 d 后转入 17 °C 再培养 17 d
10	仍为营养细胞	仍为营养细胞	
12	仍为营养细胞	仍为营养细胞	
15	仍为营养细胞	正常苗	
17	有单孢子形成	正常苗	
20	有单孢子和细胞团	正常苗、畸形苗, 原切块有细胞团	正常苗
23	有细胞团	正常苗、畸形苗, 原切块有细胞团	正常苗
25	有细胞团	切块变绿, 未见细胞结构	正常苗

以上 4 个试验中, 都出现这样的情况, 即切块的四周形成孢子和出苗早, 中部晚; 切块再生苗的同时, 都伴随有丝状体出现, 丝状体的数量, 依个体和培养条件的不同而有差异。据观察, 有些丝状体明显是由果孢子萌发形成的, 如试验 1 区域 V 中的切块。但也发现, 有些切块在培养一段时间后, 大部分细胞变白, 剩余的少数仍具色素的细胞有的萌发成叶状体苗, 有的萌发成丝状体。

### 3 讨论

如 2.2 的结果所示, 大小切块均处于相同的光照、温度和营养条件下, 为什么切块越小越易成苗呢? 对于任意一个细胞来说, 切块越小, 周围的细胞越少, 与原先在完整叶状体上相比, 受环境的影响越大, 这可能是促使细胞向幼苗方向转化的重要原因。切块四周的细胞与中部细胞相比, 与外界环境直接接触的面积大, 有利于接受光照和对营养物质的吸收以及代谢物的排出, 最终表现在有较多的细胞较早地转化成苗。同样道理, 面积相同的两片叶状体分别切成大小两种切块, 前者获得的切块数少, 切块边沿总长度也较后者少, 所以得到的总苗数少于后者。单细胞是最小的“切块”, 赵焕登等 1981 年、Polne-Fuller 等

1984 年和 1990 年、Chen 1986 年和 1987 年、严兴洪等



图 1 条斑紫菜叶状体简图, 示不同的区域

Fig.1 Diagram of the *Porphyra yezoensis* thalli indicating location of tissue areas excised for seedling regeneration

1989 年和王素娟等 1990 年、Gall 等 1993 年用机械或酶解方法获得单细胞或原生质体后, 在一定条件下培养, 得到了与本实验相似的结果, 即经过形成无性孢子或细胞直接萌发的方式产生叶状体苗。这可以看成是细胞全能性在紫菜叶状体上的表现。

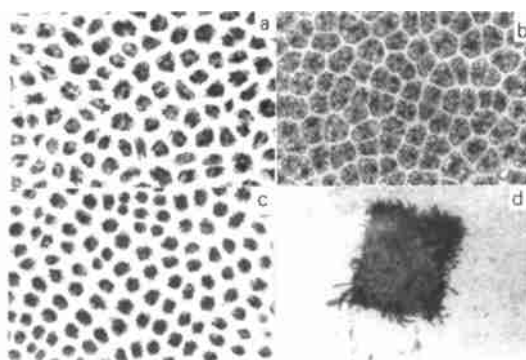


图2 条斑紫菜叶状体上不同区域的细胞和它们生成的苗  
Fig.2 Cells in different parts of *Porphyra yezoensis* thalli and the seedlings they generated

- a 区域 II 中的不规则型细胞,胞基质较厚;
- b 区域 III 中的细胞排列较紧密;
- c 区域 IV 中的圆型细胞,胞间基质较厚;
- d 切块上生出的苗。

一般认为,与高等植物相比,紫菜等藻类植物没有真正的组织分化,所有细胞都具有营养和生殖等整个植株的所有功能。但周百成等 1966 年发现在同一条斑紫菜藻体中,不同部位不仅色素含量不同,组成不一样,光合作用性能上也有差异。最近的研究也表明,紫菜叶状体上不同部位的营养细胞不仅在形态上不同,分化和发育水平也有差异。Kaska, Polne-Fuller 和 Gabor 在 1984 年证实了紫菜叶状体不同部位的细胞在形态、对分解细胞壁酶的敏感性、原生质体再生苗的比率上的差别。Polne-Fuller 和 Gabor 1988 年还报道了不同部位营养组织细胞外多糖的差异,并认为可用胞外多糖的特异性来区别不同区域细胞。本实验也证明同一藻体不同部位的离体组织出苗情况不同。根

据 2.2 的结果,区域 IV 中的近圆形细胞较易形成叶状体苗。在自然条件下,紫菜叶状体的有性生殖细胞区域(即孢子囊群和精子囊群)不断由上向下、由外向内延伸,因此推测区域 II 和 III 中的营养细胞也会逐渐变成区域 IV 中的那种近圆形细胞,最后转化成果孢子或精子囊。在过去的试验中作者也观察到区域 II 和 III 切块中的营养细胞也是先变圆再成苗,说明营养细胞无论是形成有性生殖细胞还是无性生殖细胞都要经历变圆这一阶段,圆细胞期是决定细胞分化方向的关键时期。如果在这时将组织或细胞甚至原生质体离体培养,则其中会有许多细胞经过一系列变化形成叶状体苗;如果这些组织或细胞的空间位置没有变化和变化达不到一定程度(如在大于 5 mm×5 mm 的切块中),则不会出现这种情况。相对位置的变化肯定不是影响近圆形细胞分化方向的唯一因素,其他因素是什么以及如何产生影响还需要进一步研究。

2.4 表明温度对细胞的生长发育具有非常大的影响,条斑紫菜叶状体对于 20~25℃ 的较高温度的具有一定的忍受力,在这样的高温下,虽然细胞进行非常规分裂,但仍不丧失活性,待温度降到合适的水平仍会正常出苗生长,这可以认为是一种忍耐高温的形式。

从以上的试验结果看,用离体组织切块法采苗时,应取圆细胞较多的个体,切块应尽量小,适度的干出或是使组织块漂浮于水面利于早出苗、多出苗,出苗的适宜温度是 15~17℃。

#### 主要参考文献

- 1 梅俊学、费修缙。海洋科学,1999,4: 66~68

## STUDY ON SEEDLINGS RE-

## GENERATION OF *Porphyra yezoensis* FROM EXCISED FRAGMENT

MEI Jun-xue FEI Xiurong

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Aug. 25, 1999

Key Words: *Porphyra yezoensis*, Excised fragment, Seedlings regeneration

### Abstract

Seedlings regenerated from excised tissue of *Porphyra yezoensis* is a potential resources for the seaweed production.

Several factors affecting the seedlings production were studied, that is, temperature, position of the fragments in the thalli, and size of the fragments. The result showed that the fragments regenerated seedlings at 15-22 °C. At 25 °C the tissue cells divided irregularly and produced red cell-clumps which did not regenerate seedlings until they were cultured at lower temperature (17 °C) for 2 weeks. The time needed for seedlings production varied depending on the size and original position of the fragments in the blade. Small fragments (1 mm×1 mm, 2 mm×2 mm and 3 mm×3 mm) regenerated sooner than big ones (5 mm×5 mm and 10 mm×10 mm). The tissue from near the reproductive area needed less time for seedlings regenerating than that from just above the holdfast.

(本文编辑:张培新)