

孔石莼外植体再生及发育途径的研究

邵魁双^{1,2}, 王金霞¹, 周百成¹

(1. 中国科学院海洋研究所 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 将孔石莼(*Ulva pertusa* Kjellm) 野生种和“不育株”突变体的叶状体切成 1 cm² 以下大小不同的片段培养, 发现再生情况和外植体大小存在密切关系。在 5 mm×5 mm 以下的片段中, 90% 以上的细胞都出现了再生, 表现为 3 种发育途径: 形成球形的原生质体, 经丝状体而成叶状体; 产生游动细胞, 也经过丝状体而成叶状体; 细胞原位分裂, 形成球状体或管状体, 呈现礁膜属和浒苔属的特征。5 mm×5 mm~10 mm×10 mm 的片段, 除边缘的 1~2 层中有极少量细胞形成游动细胞和球形原生质体外, 其它细胞没有变化。将由片段再生形成的小叶状体采到紫菜苗网上, 经过一年的海区养殖, 长成 1 m 长的叶状体。

中图分类号: Q813. 1, S968. 4 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3096(2004) 06- 0046- 05

关键词: 孔石莼(*Ulva pertusa* Kjellm); 外植体再生; 育苗

孔石莼(*Ulva pertusa* Kjellm) 是北太平洋西部特有种类, 也是黄渤海区最常见的海藻之一。这种温带性绿藻, 广泛分布于辽宁、河北、山东和江苏等省沿岸。长江以南的东海和南海沿岸也有生长, 但由北往南逐渐稀少^[1]。在中国, 孔石莼除食用和作饲料外, 《本草纲目》等早已有作药用的记载。《中国海洋药物辞典》记载了孔石莼等多种石莼的化学成分和药用功能, 认为孔石莼有软坚散结、利水消肿和降压之功效, 主治甲状腺肿大、水肿和高血压等症^[2]。近年来, 对孔石莼的药用价值仍在进行深入的研究。

孔石莼的生活史属于同型世代交替。孢子体和配子体都是由双层紧贴的细胞组成的形态相似的叶状体。在繁殖时, 叶状体细胞直接发育成孢子囊和配子囊, 孢子和合子萌发后直接形成配子体或孢子体, 均为具假根的双层细胞构成的叶状体, 无囊状体、管状体等藻体中空形态。Migita^[3]在日本长崎的大村湾发现和选育出孔石莼的一个株系, 将其叶状体切成 10 mm×10 mm 的片段, 可以营养繁殖, 而且耐高温。它与野生种不同, 经 10 a 的充气培养, 未发现产生孢子和配子, 只营营养繁殖。因此, 认为是一株“不育株”突变体。由于这种孔石莼易繁殖, 在高温期生长旺盛, 所以在鱼类养殖和轮虫培养中用于水处理, 以除去过量的营养盐类^[4,5]。同时, 它也适于在高温期大量养殖作为鲍等的饲料, 因此这种“不育株”也已被引入中国。在切段繁殖过程中也未见通过孢子或配子繁殖。

孔石莼在食品、药物、饲料和环境保护方面的应用价值使其可能发展成为新的人工栽培海藻。为此, 必须解决人工育苗问题。孔石莼人工育苗的最佳途径是建立无性系, 进行种质保存, 随时利用无性系的大量扩繁实现人工育苗。因此, 作者研究了孔石莼野生种和“不育株”外植体再生的条件和过程, 建立了孔石莼的无性系并在海上养成大型叶状体, 同时证明不但“不育株”在一定的条件下也是可育的, 而且孔石莼的叶状体细胞在全能性获得表达时具有 3 条不同的发育途径。

1 材料与方 法

野生孔石莼于 7 月份采自青岛太平角中潮带。用软毛刷刷洗藻体, 用消毒海水反复冲洗至无杂藻。用刀片从藻体中上部切取 2 cm×2 cm 的片段, 用消毒海水静止培养 3 d, 备用。所用材料经显微镜观察确定无繁殖细胞和杂藻。孔石莼突变株系 Migita^[3]选自日本长崎。在本实验室以 20 ℃弱光保存, 已保存和营养繁

收稿日期: 2003- 04- 24; 修回日期: 2003- 08- 20

基金项目: 国家九五攻关项目(96- C01- 05- 01)

作者简介: 邵魁双(1973-), 辽宁凤城人, 男, 博士, 研究方向: 藻类生物技术, E-mail: sksteven@sira.com

殖达 3 a。在单藻培养条件下未见孢子、配子释放和小苗的发生。

用刀片将叶状体先切成边长分别为 1~ 10 mm 的正方形, 用刀片将 1 mm² 片段切碎得到 1 mm² 以下的小片段。显微镜下测量确定小片段大小并分别在培养皿中培养。培养液为 PES^[6], 用消毒海水配制, 不加激素, 每 3 d 更换一次。培养温度除特别说明者外均为 23 ℃。以荧光灯为光源, 光强 1 000~ 2 000 lx, 光周期 L: D 为 12 h: 12 h。每天观察记录切段生长发育情况。

以紫菜苗网(维尼纶)作为附着基, 将孔石莼幼苗采到网上。于室内培养后移至海上养殖。每月测定藻体大小 1 次。养殖期为 1 a。

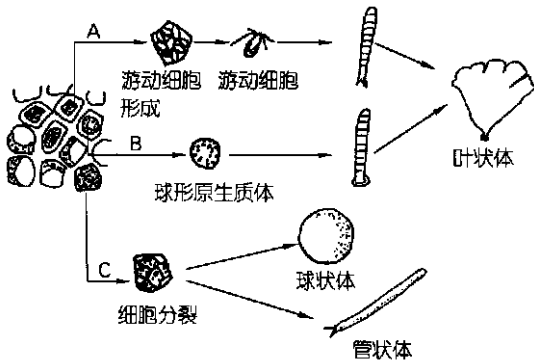


图 1 孔石莼外植体切片(5 mm× 5 mm 以下)体细胞再生示意

Fig. 1 The regeneration pattern of the somatic cells of the fragments from the sterile mutant of *Uva pertusa*

A: 体细胞形成游动细胞, 萌发形成单列丝状体, 最后长成叶状体; B: 体细胞, 形成球形原生质体, 萌发形成单列丝状体, 最后长成叶状体; C: 体细胞在原位分裂, 然后形成球状体或管状体

2 结果

孔石莼野生型和突变株的外植体的再生情况没有明显的差异。但一直认为这种突变株只能进行营养繁殖, 其外植体细胞全能性表达和再生情况更值得注意, 所以图版照片只表示这种突变体的研究结果。

2.1 外植体再生途径

在不加激素, 用消毒海水进行单藻培养的条件下, 孔石莼野生型和突变株外植体的再生都有 3 种发育途径。第 1 种发生在切片边缘的 1~ 2 层细胞内。其中的少量细胞在培养的 48 h 内发生质壁分离, 成为球形原生质体(图 2a, b)。它从细胞中释放出来在 36 h 内就可萌发。经过第一次分裂后(图 2c), 下面的

细胞萌发成盘状的假根细胞, 上面的细胞经几次分裂后形成单列的丝状体(图 2d)。当丝状体的细胞数达到 13~ 15 个时, 从丝状体的基部开始纵分裂, 最后成为叶状体。第 2 种途径为先是边缘细胞, 然后是片段内部体细胞原生质浓缩, 质壁分离(图 2e)。在以后的 6~ 7 d 内, 在这些细胞中形成游动细胞。每个细胞内这种游动细胞一般为 16 个, 先是在细胞内剧烈旋转, 在大约 3 d 内全部释放出来。游动细胞梨形, 长度为 9~ 11 μm, 附着后变圆, 直径约 7~ 9 μm。于 6~ 7 d 后细胞直径达到 10 μm 时开始分裂(图 2g)。细胞先一分为二(图 2h), 下面的细胞逐渐成为丝状或盘状的假根, 上面的细胞先分裂形成单列的丝状体(图 2i), 然后再从丝状体的基部开始纵分裂, 最后形成叶状体(图 2k)。有的游动细胞释放出来以后, 又附着在原来的片段上, 结果成为一簇丝状体(图 2j), 最后成为成簇的叶状体小苗。产生游动细胞的体细胞一般连接成片, 在叶状体片段上呈斑状分布。第 3 种途径是切片上的体细胞在原位直接分裂成不规则的细胞团(图 3a), 经过连续分裂发育成为囊状或管状的藻体。经 6 个月的培养, 囊状体的直径达到 1 cm 左右(图 3b), 管状体的长度达到 3~ 4 cm(图 3c)。在这批材料的重复实验中, 外植体再生的 3 种途径中, 以产生游动细胞的途径为主。外植体小片段形成游动细胞的体细胞最高可达到总细胞数的 90% 左右。

2.2 外植体再生的条件

在单藻培养条件下, 上述外植体再生均不需外加激素。但是必须从藻的整体上切下, 即与整体形成隔离, 同时再生的情况与外植体的大小密切相关。

在比较大的 5 mm× 5 mm~ 10 mm× 10 mm 的片段中, 只有边缘的 1~ 2 层细胞中的少数细胞发生质壁分离, 呈球状或形成游动细胞, 通过第 1 和第 2 种途径再生, 发育成新的叶状体。5 mm× 5 mm 以下的外植体除边缘细胞在 24 h 内形成游动细胞或呈球状外, 90% 以上的内部细胞在以后也形成游动细胞或原位分裂形成囊状体或管状体。大小为 1 mm× 1 mm~ 5 mm× 5 mm 的外植体, 形成游动细胞的细胞占体细胞总数的 60%~ 70%, 0.5 mm× 0.5 mm 以下的外植体中约占 30%~ 50%。同时, 随着外植体变小, 形成游动细胞的细胞数减少, 原位分裂产生囊状体或管状体的细胞数增加, 通过第 2 和第 3 条途径再生的细胞数仍占外植体细胞总数的 90% 以上。

2.3 幼苗的重新附着

在育苗过程中, 幼苗的附着能力是十分重要的。将已经附着的长度小于 5 mm 的再生小苗带假根刮下, 发现幼苗的重新附着速度同培养温度有关。在

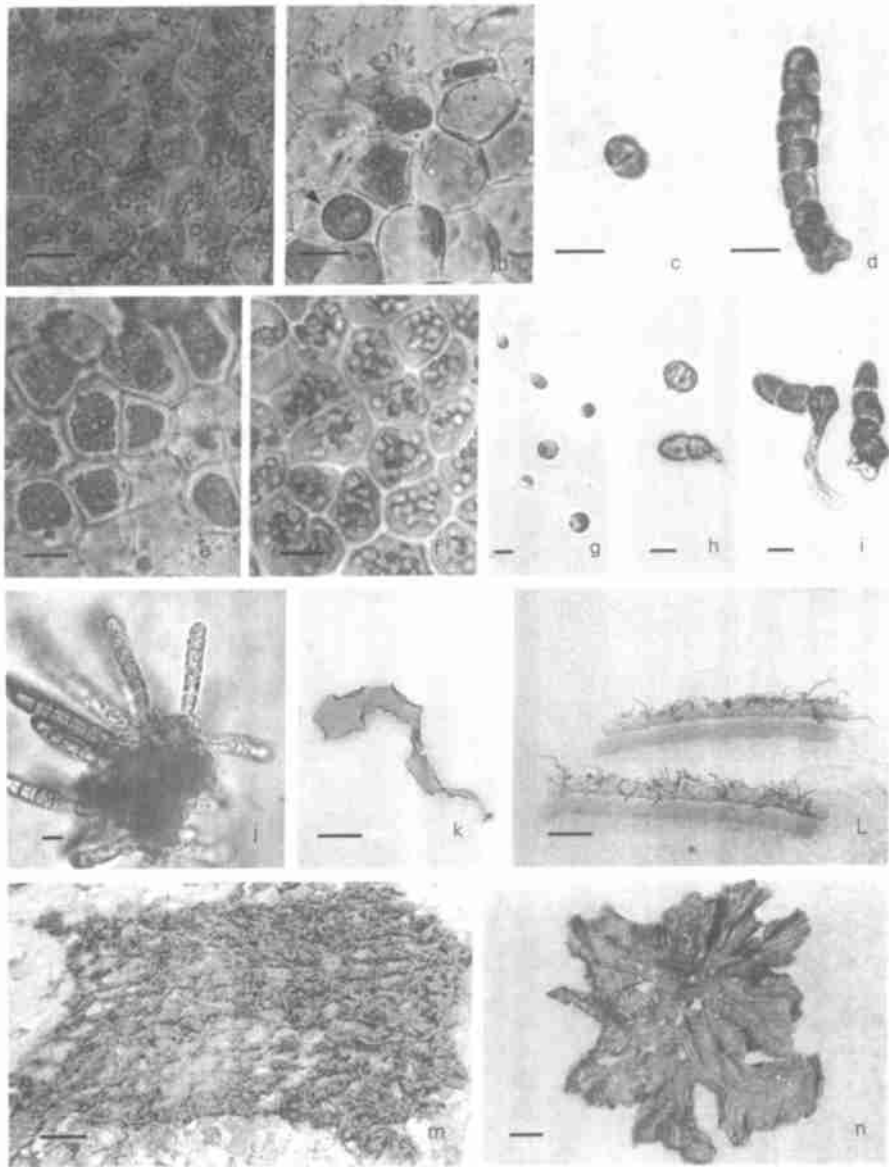


图2 孔石莼突变体外植体切片(5 mm×5 mm 以下)再生- I

Fig. 2 Regeneration of the fragments (less than 5 mm×5 mm) from the sterile mutant of *Uva pertusa* - I

标尺 a~ j= 10 μm; k= 1 cm; l= 0.5 cm; m, n= 10 cm

a: 开始培养时的体细胞; b: 边缘细胞形成的球形原生质体(箭头); c: 原生质体开始萌发; d: 由 c 形成的丝状体; e: 细胞原生质浓缩; f: 游动细胞形成; g: 刚释放和已变圆的游动细胞; h: 游动细胞开始萌发; i: 具有两种假根的单列丝状体; j: 簇生的丝状体; k: 由游动细胞发育形成的叶状体; l: 附着在苗绳上的幼苗; m: 在紫菜苗网上养殖的孔石莼突变株; n: 孔石莼突变株的成体(1 m 长)

23 °C 下培养, 48 h 后有 57% 的小苗已重新附着, 4 d 后全部小苗已牢固附着。但在 15 °C 下培养, 48 h 后还未见小苗附着。5 d 后只有 50% 附着。在 10 °C 下培养

的小苗需要 17 d 才能全部附着。

若将上述小苗切掉假根培养, 伤口处的细胞可以延伸形成新的假根丝, 仍可以附着在基质上。这种假



图3 孔石莼突变体外植体切片(5 mm× 5 mm 以下)再生- II

Fig. 3 Regeneration of the fragments(less than 5 mm× 5 mm) from the sterile mutant of *Uva pertusa*- II

标尺 a = 10 μm, b, c = 0.5 cm

a: 体细胞连续分裂形成不规则的细胞团; b: 由 a 进一步发育形成管状体; c: 由 a 进一步发育形成囊状体

根丝的形成也同培养温度有关。在 23 ℃, 全部小叶状体在 4 d 内都已重新长出假根并附着牢固, 而在 15 ℃和 10 ℃则分别需要 14 d 和 19 d。

2.4 再生苗的养成

附着到苗绳上的孔石莼再生小苗(图 2L)在室内通气培养半个月后长度达到 3~ 4 cm, 于 9 月中旬置海上养殖, 养殖深度为 1 m, 1 个月后, 孔石莼长度达到 15~ 20 cm。但是从 9 月到 10 月养殖海区敌害生物如麦杆虫、钩虾等较多, 对幼苗损害较大。从 11 月至第 2 年的 3 月份, 由于水温低, 孔石莼的生长也比较缓慢。4 月以后水温回升, 生长速度加快, 到 9 月收获时, 大部分藻体长度已达到 1 m 左右(图 2 m, n)。这一初步结果说明, 用孔石莼的再生苗可以作为种苗来源进行人工养殖, 但养殖季节和技术尚待进一步研究。

3 讨论

为了发展孔石莼的人工养殖, 首先需要解决种苗培育问题。直接利用孢子育苗, 不仅无法解决种质保存和纯种化养殖, 又因为孢子繁殖的季节性而受到季节的限制。海带、裙带菜和紫菜的研究结果表明, 细胞工程育苗技术可以克服这些困难。上述结果表明, 用孔石莼外植体再生的幼苗可以养成新的藻体。同时, 这种再生苗在低温、弱光、高密度、不换水的条件下培养, 保存已达 3 a 之久, 虽然幼苗的生长受到抑制, 但仍然保持再生假根、附着和继续生长的能力, 表明用其进行孔石莼的种质保存和苗种生产是完全可能的。

对于像孔石莼这样简单的叶状体海藻, 在不加激

素的单藻培养的条件下, 通过简单的切割就可以诱导外植体细胞全能性表达, 获得再生植株。除孔石莼外, 作者在绿藻礁膜 (*Monosroma nitidum*)、肠浒苔 (*Enteromorpha intestinalis*)、缘管浒苔 (*E. linza*)、和扁浒苔 (*E. compressa*) 中也观察到类似的现象(另文发表)。紫菜是单层细胞构成的叶状体。Notoya^[7]用甘紫菜 (*Porphyra tenera*)、圆紫菜 (*P. suborbiculata*)、条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 和冈村紫菜 (*P. okamurai*) 的小片状外植体获得再生植株。梅俊学等^[8,9]把条斑紫菜叶状体切成 10 mm× 10 mm 以下的切块培养, 切块上的体细胞可以形成“单孢子”并长成新的叶状体, 而且 5 mm× 5 mm 以下的切块出苗又早又多。说明再生能力也同外植体与整体隔离和切块的大小有关。这些事实说明外植体同藻体整体隔离是诱导体细胞全能性表达, 完成脱分化和再分化过程的先决条件。这种脱分化和再分化过程不必经过愈伤组织阶段。

孔石莼外植体再生植株可以通过 3 条不同的途径, 分别形成囊状体、管状体和叶状体。在孔石莼的生活史中只有叶状体和孢子、合子萌发初期的丝状体形态。囊状体是礁膜属早期发育过程中出现的特征, 管状结构是浒苔属的特征。这种现象在石莼属藻类的原生质体培养中也已观察到。其中, Reddy 等^[10]观察到裂片石莼 (*U. fasciata*)、蜆菜 (*U. conglobata*) 的原生质体再生后形成孢子囊、锥状体和叶状体, 孔石莼原生质体再生后形成孢子囊、囊状体和叶状体。Chen^[11]报道裂片石莼原生质体再生过程中也出现了孢子囊、微藻体、管状体和囊状体。但这些藻体形式只是过渡类型, 后来都发育成叶状体。虽然与孔石莼的囊状体和管状体经 6 个月的培养继续长大并保持原来形态不同, 但是其共同点是石莼属的体细胞在全能性表达时

其发育途径可以不局限于遵循通常个体发育的一种途径。这是值得注意并需要深入研究的问题。这一问题的研究将加深对植物细胞全能性的含义、基因组的结构和进化的理解。

参考文献:

- [1] 曾呈奎. 中国经济海藻志[M]. 北京: 科学出版社. 1962. 39- 40.
- [2] 姜凤吾等. 中国海洋药物辞典[M]. 北京: 海洋出版社. 1994. 81.
- [3] Migita S. The sterile mutant of *Ulva pertusa* Kjellman from Omura Bay[J]. **Nagasaki suisan**, 1985, 57: 33- 37.
- [4] Xu B T, Hirata H. Effects of feed additive *Ulva* reproduced in feedback culture system on the survival and growth rates of Japanese flounder[J]. **Suisanzoshoku**, 1992, 40(2): 207- 213.
- [5] Yamasaki S, Tanaka K. Possibility of utilizing sterile mutant *Ulva pertusa* as a bio- filter in a closed culture system of the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. **Fisheries Science**, 1996, 62(2): 323- 324.
- [6] Provasoli L. Media and products for the cultivation of marine algae[A]. Watanabe A, Hattori A. Culture and collections of algae[C]. Tokyo: Jap Soc Plant Physiology, Tokyo, 1968, 63- 75.
- [7] Notoya M. 'Seed' production of *Porphyra* spp. by tissue culture[J]. **Journal of Applied Phycology**, 1999, 11(1): 105- 110.
- [8] 梅俊学, 费修纆. 形成条斑紫菜离体组织再生苗的几种方式[J]. 海洋科学, 1999, 23(4): 66- 68.
- [9] 梅俊学, 费修纆. 条斑紫菜离体组织再生苗的研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(6): 39- 42.
- [10] Reddy C R K, Migita S, Fujita Y. Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture[J]. **Botanica Marina**, 1989, 32: 483- 490.
- [11] Chen Y C, Shih H C. Development of protoplasts of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) for algal seed stock[J]. **Journal of Phycology**, 2000, 36(3): 608- 615.

Study on the regeneration and development pattern of explants of *Ulva pertusa* Kjellm(Ulvales, Chlorophyta)

SHAO Kui- shuang^{1,2}, WANG Jin- xia¹, ZHOU Bai- cheng¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Apr. 24, 2003

Key words: *Ulva pertusa*; explants; regeneration; artificial breeding

Abstract: Tissues of sterile mutant and wild type *Ulva pertusa* Kjellm were cut into fragments of less than 1 cm². It was found that regeneration was relative to size of the explants. Among the fragments of size less than 0.25 mm², more than 90% of the cells of the fragments regenerated showing three development patterns. A few cells produced spherical protoplasts that germinated into filaments and later grew into fronds; most of the cells gave rise to mobile cells that also developed into fronds; other cells divided in situ and regenerated into tubular or saccate thalli. Among the fragments of size 5 mm × 5 mm ~ 10 mm × 10 mm, only a very small quantity of somatic cells around the margin produced mobile cells and spherical protoplasts. The non- nets with regenerated fronds were incubated indoors for half a month and transplanted into the field sea. The seedlings grew into 1 m long thalli after one year of marine cultivation.

(本文编辑: 张培新)