

# 细胞的氧化还原状态对浒苔孢子囊形成的影响

王 菁<sup>1</sup>, 牛从从<sup>1</sup>, 王 辉<sup>2</sup>, 郇 丽<sup>2</sup>

(1. 山东省青岛第五十八中学, 山东 青岛 266100; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛, 266071)

**摘要:** 浒苔(*Ulva prolifera*)是我国黄海海域绿潮暴发的主要成因种, 其孢子囊的形成和孢子的释放是浒苔大量、快速增殖的基础。本文以浒苔为研究材料, 比较分析了还原剂(DTT)和氧化剂(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)对直径为 1 mm 的圆形藻片从营养细胞形成孢子囊过程的影响。研究表明, DTT 对浒苔孢子囊的形成具有明显的抑制作用, 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的浒苔藻片与对照组相比没有显著性的差异, 因此浒苔细胞处于还原状态时不利于孢子囊的形成。研究结果为探究浒苔孢子形成的调控机制提供了科学依据。

**关键词:** 浒苔; 孢子囊; DTT; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

中图分类号: Q418 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2016)01-0064-04

doi: 10.11759/hyxx20151227002

自 2007 年至今, 由浒苔引发的绿潮在我国黄海海域连续多年周期性爆发, 造成了严重的经济损失, 恶化了海洋环境和旅游景观, 引起了社会的广泛关注。2008 年在青岛近海海域形成的大面积漂浮浒苔严重影响了青岛奥运会帆船、帆板比赛的顺利进行。据报道, 2008 年绿潮爆发时其生物量超过 1000 万 t, 在青岛至少打捞了 150 万 t 的浒苔藻体<sup>[1-2]</sup>。为此, 当地政府耗费了大量的人力、物力和财力对其进行清除。在 2007 年以前, 青岛近海乃至国内其他海域很少发生绿潮现象, 因此相关报道较少。尽管近年来政府和研究者对绿潮高度关注, 但主要集中在绿潮原因种浒苔的溯源研究、生物活性物质分析上<sup>[3-4]</sup>, 对浒苔的生物学特性, 尤其是孢子囊形成过程的研究相对较少。

浒苔的繁殖方式主要分为 3 种类型: (1) 单性生殖, 即雌雄配子体释放的配子附着后, 分别发育成新的配子体, 无需相互结合形成合子, 甚至有的配子不放散出来原位生长发育; (2) 有性生殖, 即放散的雌雄配子结合形成合子, 合子附着后发育成孢子体, 成熟后释放的孢子再发育成配子体, 孢子体世代与配子体世代在形态上无显著差异, 其生活史为同型世代交替; (3) 无性生殖, 即孢子体释放的孢子附着后直接进行生长发育<sup>[5]</sup>。当绿潮爆发时, 浒苔的主要繁殖方式为无性生殖, 即营养细胞首先形成孢子囊, 然后释放孢子, 进而发育形成新的藻体。因此, 研究浒苔的增殖过程应聚焦在孢子囊的形成过程及其孢子的释放和萌发。

据报道, 细胞光合电子传递链的氧化还原状态影响孢子的形成和发育过程, 如蓝藻藻殖段的形成

受光合电子传递链上质体醌氧化还原状态的调控<sup>[6]</sup>, 质体醌的氧化还原状态与细胞的氧化还原状态密切相关。在高等植物中, 细胞的氧化还原状态影响其生长发育过程<sup>[7]</sup>。浒苔是孢子植物, 其营养细胞极易形成孢子囊, 那么浒苔细胞的氧化还原状态是否会调控其孢子囊的形成过程?

为此, 本文以黄海绿潮主要成因种浒苔为材料, 使用还原剂和氧化剂改变细胞的氧化还原状态, 观察其对浒苔孢子囊形成的影响, 研究结果为探究浒苔孢子囊形成的调控机制提供了科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料的采集与培养

浒苔藻体采集于青岛市沿岸潮间带(36°03'14"N, 120°22'17"E)。采集后快速转入实验室培养。藻体用灭菌海水反复清洗以去除杂质、小的浮游动物以及其他杂藻, 然后培养在灭菌海水中。

### 1.2 实验材料的处理

选择生理状态健康、藻体生长发育基本同步的浒苔作为实验材料。用打孔器将藻体打成直径为 1 mm 的圆形藻片, 在灭菌海水中进行培养。前期实验发现

收稿日期: 2015-10-10; 修回日期: 2015-11-20

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA11020404); 国家自然科学基金面上项目(41176137)

[Foundation: Strategic Leading Science and Technology Projects of China, Academy of Sciences(XDA11020404); National Natural Science Foundation of China (41176137)]

作者简介: 王菁(1997-), 女, 山东青岛人, E-mail: jzgily@126.com; 郇丽, 通信作者, 电话: 0532-82898575, E-mail: huanli2014@163.com

1 mm 藻片在光照强度为  $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ (L: D=12:12), 温度为  $20^\circ\text{C}$  的条件下培养 60 h 后营养细胞即形成孢子囊并释放孢子, 且同步性良好, 故选取此培养条件进行本实验。

### 1.3 显微镜观察

藻片培养期间在显微镜(Leica DM 2500, 德国)下观察其孢子囊形成情况, 并依据藻片内有无孢子囊形成为标准, 计算孢子囊形成率。

### 1.4 还原剂对浒苔孢子囊形成的影响

选用常见的强还原剂二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)作为还原剂, 使细胞处于还原状态。1 mm 圆形藻片用正常灭菌海水培养 36 h 后, 在培养基中添加 DTT 至终浓度为  $2 \text{ mmol/L}$ 。继续培养 24 h 后进行显微观察, 并计算形成孢子囊藻片的比例。

另外, 藻片用 DTT 处理 24 h 后, 用灭菌海水反复冲洗去除 DTT, 然后在正常的海水中继续培养 48 h 后再次观察其孢子囊形成状况, 计算形成孢子囊藻

片的比例, 并与以上结果进行对比分析。

### 1.5 氧化剂对浒苔孢子囊形成的影响

以合适浓度的过氧化氢(Hydrogen Peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )作为氧化剂, 使细胞处于氧化状态。1 mm 圆形藻片用正常灭菌海水培养 36 h 后, 在培养基中添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  至终浓度为  $0.2 \text{ mmol/L}$ 。继续培养 24 h 后对藻片进行显微观察, 并计算形成孢子囊藻片的比率。

## 2 结果

### 2.1 正常培养藻片的孢子囊形成与孢子释放情况

藻片在培养起始时(0 h)全部为营养细胞(图 1A), 培养 48 h 后, 藻片依然为营养细胞, 与起始时相同, 细胞结构基本没有发生显著变化(图 1B)。继续培养 12 h(总培养时间 60 h), 期间大部分圆形藻片开始形成孢子囊, 部分孢子囊开始释放孢子(图 1C)。培养 60 h 后, 形成孢子囊的藻片比率约为 84%(表 1)。

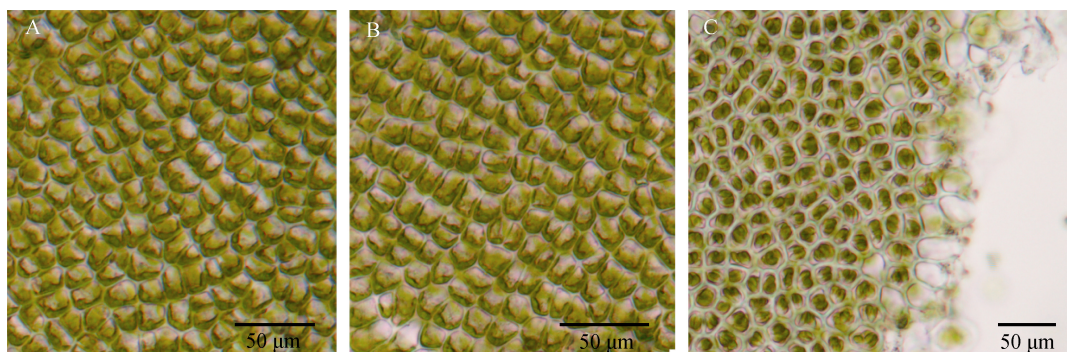


图 1 正常培养条件下不同时间段浒苔藻片孢子囊的形成情况

Fig. 1 The formation of *Ulva prolifera* sporangia after various lengths of time under normal culture conditions

A. 培养起始(0 h); B. 培养 48 h; C. 培养 60 h

A. culture initiation (0 h); B. cultured for 48 h; C. cultured for 60 h

表 1 不同处理条件下浒苔藻片形成孢子囊的藻片比率  
Tab. 1 The percentage of sporangia that formed on *Ulva prolifera* disks under different treatments

处理组	形成孢子囊的藻片比率(%)
对照组	$84.0 \pm 5.1$
添加 DTT 实验组	$11.3 \pm 4.8$
添加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 实验组	$78.9 \pm 7.3$

### 2.2 DTT 对浒苔孢子囊形成的影响

正常培养 36 h 后的藻片置于终浓度为  $2 \text{ mmol/L}$  DTT 的培养液中继续培养, 12 h 后(总培养时间为 48 h)进行显微观察。从图 2A 可以看出, 藻片与正常条件下培养的藻片无显著差别。在  $2 \text{ mmol/L}$  DTT 的培

养液中培养 24 h 后(总培养时间为 60 h), 大部分藻片仍然处于营养细胞状态, 很少有藻片形成孢子囊(图 2B), 形成孢子囊的藻片比率仅约为 11.3%(表 1)。

将在  $2 \text{ mmol/L}$  DTT 的培养液培养 24 h 后的藻片挑选出来, 去除 DTT 后继续培养, 发现在去除 DTT 培养 48 h(总培养时间为 108 h)后大部分藻片又形成了孢子囊, 形成孢子囊的藻片比率约为 80.5%。

### 2.3 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对浒苔孢子囊形成的影响

选取正常培养 36 h 后的藻片添加终浓度为  $0.2 \text{ mmol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 继续培养 12 h 后进行显微观察, 发现藻片细胞与同期正常培养的圆形藻片无显著差

别(图 3A)。再继续培养 12 h(总培养时间为 60 h)后,同正常培养组类似,表现为大部分藻片形成孢子囊

并伴随孢子释放(图 3B),形成孢子囊的藻片比率为 78.9%(表 1)。

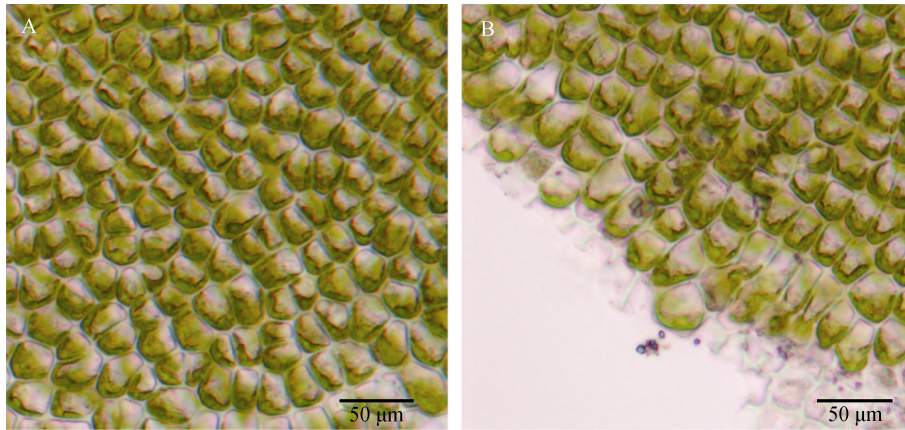


图 2 在培养液中添加终浓度为 2 mmol/L DTT 时,不同时间段浒苔藻片孢子囊的形成情况  
Fig. 2 The formation of *Ulva prolifera* sporangia following various lengths of exposure to dithiothreitol (DTT)  
A. 加 DTT 培养 12 h(藻片总培养 48 h); B. 加 DTT 培养 24 h(总培养 60 h)  
A. after 12 h; B. after 24 h

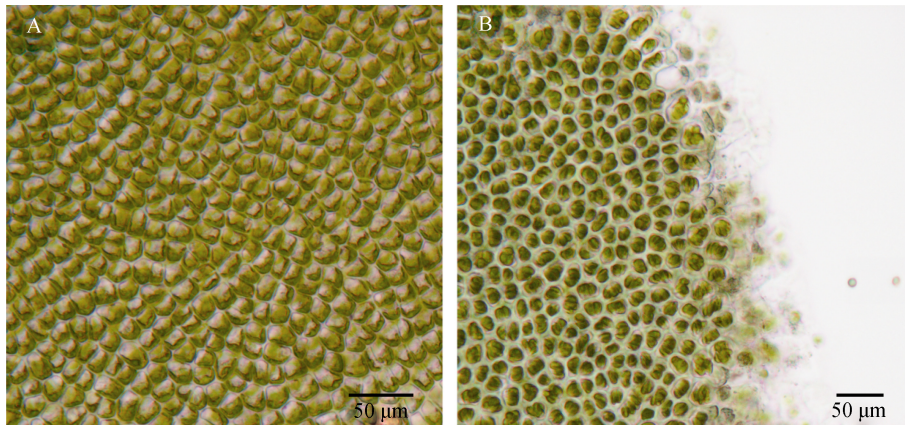


图 3 在培养液中添加终浓度为 0.2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时,不同时间段浒苔藻片孢子囊的形成情况  
Fig. 3 The formation of *Ulva prolifera* sporangia following various lengths of exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
A. 加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养 12 h(藻片总培养 48 h); B. 加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养 24 h(总培养 60 h)  
A. after 12 h; B. after 24 h

### 3 讨论

多种因素可以促进浒苔孢子囊的形成和孢子的释放。Wang 等<sup>[8]</sup>研究发现高盐和高光等胁迫因子可以促进浒苔孢子囊的形成。Gao 等<sup>[9]</sup>将浒苔藻体分成不同孔径大小的圆形藻片,观察其孢子囊的形成和孢子的放散情况,发现直径小于 1 mm 的藻片最适合于孢子囊的形成,释放的孢子可正常发育成新的藻体。在自然条件下,丝状的浒苔藻体可能由海浪冲击和螺旋桨等机械作用产生不同大小的碎片,动物滤食也会产生碎片,尤其食藻动物排出的粪便中含有大量的未完全消化的藻片<sup>[10]</sup>。这些藻片在合适的条

件下都会形成孢子(配子)囊。正因如此,作者选择了 1 mm 的藻片作为实验材料,研究孢子囊的形成和孢子的释放过程。

通过对比分析含有 DTT 的培养液中的藻片和不含 DTT 的正常培养液中的藻片,发现 DTT 可以明显抑制藻片孢子囊的形成。DTT 可以使细胞处于还原状态,我们推测光合电子传递链上的质体醌也因此处于还原状态,由此影响了光合电子的传递,进而影响了孢子囊的形成;当去除 DTT 时,圆形藻片可以继续形成孢子囊,表明这种抑制作用是暂时性的。以上结果与以蓝藻作为材料的结果基本一致<sup>[6]</sup>。

含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的培养液中的藻片与不含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的

正常培养液中的藻片进行比较分析,发现两者均可形成孢子囊并伴随着孢子的释放,没有显著性差异。究其原因,作者认为与完整藻体相比,直径为1 mm的藻片由于机械损伤也是处于逆境状态。一般认为,处于逆境状态的组织可以产生活性氧<sup>[11-13]</sup>,营养细胞因此处于氧化状态,所以极易形成孢子囊。与添加有DTT的培养液中的藻片相比,培养在含有H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的藻片极易形成孢子囊,可能与细胞的氧化状态有关。

## 参考文献:

- [1] Sun S, Wang F, Li C, et al. Emerging challenges: Massive green algae blooms in the Yellow Sea [J]. *Nature Precedings*, 2008, 2266: 1-5.
- [2] Gao S, Shen S, Wang G, et al. PSI-driven cyclic electron flow allows intertidal macro-algae *Ulva* sp. (Chlorophyta) to survive in desiccated conditions [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52: 885-893.
- [3] 卢健, 张启龙, 李安春. 苏北沿岸流对浒苔暴发及漂移过程的影响[J]. *海洋科学*, 2014, 10: 83-89.  
Lu Jian, Zhang Qilong, Li Anchun. The influence of Subei coastal current on the outbreak and drift of *Enteromorpha prolifera* [J]. *Marine Sciences*, 2014, 10: 83-89.
- [4] 金浩良, 徐年军, 严小军. 浒苔中生物活性物质的研究进展[J]. *海洋科学*, 2011, 35: 100-106.  
Jin Haoliang, Xu Nianjun, Yan Xiaojun. Research progress on the bioactive compounds of seaweed *Enteromorpha* [J]. *Marine Sciences*, 2011, 35: 100-106.
- [5] 张华伟, 马家海, 胡翔, 等. 绿潮漂浮浒苔繁殖特性的研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20: 600-606.  
Zhang Huawei, Ma Jiahai, Hu Xiang, et al. Reproductive characteristics of the floating algae in green tide [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20: 600-606.
- [6] Campbell D, Houmard J, De Marsac N T D. Electron transport regulates cellular differentiation in the filamentous cyanobacterium *Calothrix*[J]. *The Plant Cell*, 1993, 5: 451-463.
- [7] Sánchez-Fernández R, Fricker M, Corben L B, et al. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 2745-2750.
- [8] Wang J, Yan B, Lin A, et al. Ecological factor research on the growth and induction of spores release in *Enteromorpha prolifera* (Chlorophyta) [J]. *Marine Science Bulletin*, 2007, 26: 60-65.
- [9] Gao S, Chen X, Yi Q, et al. A strategy for the proliferation of *Ulva prolifera*, main causative species of green tides, with formation of sporangia by fragmentation [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5: e8571.
- [10] Santelices B, Paya I. Digestion survival of algae: some ecological comparisons between free spores and propagules in fecal pellets [J]. *Journal of Phycology*, 1989, 25: 693-699.
- [11] Scharte J, Schon H, Tjaden Z, et al. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106: 8061-8066.
- [12] Asai S, Yoshioka M, Nomura H, et al. A plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase is responsible for hypersensitive response cell death and reactive oxygen species production [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2011, 77: 152-162.
- [13] 于定群, 汤浩茹, 张勇, 等. 高等植物葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2012, 28: 800-812.  
Yu Dingqun, Tang Haoru, Zhang Yong, et al. Research progress in glucose-6-phosphate dehydrogenase in higher plants [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28: 800-812.

## The effect of cellular redox state on the formation of *Ulva prolifera* sporangia

WANG Jing<sup>1</sup>, NIU Cong-cong<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, HUAN Li<sup>2</sup>

(1. Qingdao No.58 High School Shandong Province, Qingdao 266100, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Oct., 10, 2015

Key words: *Ulva prolifera*; sporangia; DTT; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Abstract:** Outbreaks of *Ulva prolifera* cause green tides in the Yellow Sea of China. The rapid mass reproduction that is associated with these outbreaks is dependent on the formation of sporangia and the release of spores. In this study, the effect of oxidizing (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and reducing (dithiothreitol; DTT) agents on sporulation was investigated using 1-mm-diameter disks of *U. prolifera*. The results suggested that the application of DTT significantly inhibits the sporulation of this species, while there was no significant difference between the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and the control. Therefore, the creation of a reduced environment inhibits sporulation from vegetative cells. This information will be useful for further research into the regulation of sporulation in *U. prolifera*.

(本文编辑: 张培新)