

日光照时数对裙带菜配子体发育的影响*

逢少军

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1992年4月在青岛前海栈桥湾采集野生的裙带菜,并在室内分离和培养雌、雄配子体克隆,利用营养生长的配子体材料研究日光照时数(DH)对配子体发育的影响。结果表明,连续光照可以有效地阻止配子体发育,配子体只进行营养生长(VG),形成卵囊的配子体细胞所占的比例为零,雌配子体细胞呈不规则圆形,多个细胞聚集成簇状,雄配子体则长成丝状体;随着DH的减少,发育的配子体细胞数比例逐渐上升,至DH为12时达最高,为63%,之后随着DH的减少,发育的比例又继续下降;当DH为8,15,22时,配子体细胞发育的比例分别为35%,42%和3.8%;不同的DH除了影响配子体细胞发育比例以外,还对配子体的细胞形态以及幼孢子体的形态也有不同的影响。

关键词 裙带菜 配子体 光周期 生长节奏

许多海藻表现出明显的季节生长节奏。大多数褐藻一般在冬季生长速度最快,夏季生长滞缓,表现出显著的年生长节奏(Circannual rhythmicity, Lüning, 1993)。迄今为止,几种大型海藻,包括 *Pterygophora californica* (Lüning, 1991), *Laminaria setchellii* (Tom Dieck 1991), *L. hyperborea* (Lüning, 1986), *L. digitata* (Schaffelke, 1992)¹⁾等,均在实验条件下被证实保持明显的年生长节奏。温度、营养盐水平和日光照时数(daylength hours, DH)均被认为有使海藻年生长节奏同一年的季节变化相一致的作用,它们被称为 Zeitgeber, 简称为 Z 因子。这其中, DH 被证实是一种作用最为明显的 Z 因子(Lüning et al., 1993)。

海藻的生殖期是其整个生活史中的一个重要时期,既然 DH 变化影响着整个周期,也应无例外地影响到其生殖过程。那么 DH 的变化究竟以什么方式,在多大程度上影响海藻的生殖过程?这方面的研究作为数尚少,这是这项研究的目的之一。以往有关裙带菜配子体发育条件的研究多致力于阐述温度、光强和营养的作用,对 DH 变化所造成的影响有所忽略。为此,探明 DH 变化对裙带菜配子发育的影响,搞清楚在其生活史的4—6月份期间,裙带菜配子体在自然海水中的发展方向成为这项研究的另一个目的。另外,裙带菜是一种经济价值较高的经济海藻,形成一定规模的人工养殖必须有一种稳定、可靠的人工育苗技术做基础。全面了解和掌握配子体发育规律对于完善现有的人工育苗技术亦有一定的借鉴作用。

* “博士论文”逢少军,男出生于1965年4月,博士,副研究员。

收稿日期:1995年7月14日,接受日期:1996年1月30日。

1) Schaffelke, B., 1992, Dissertation, Universität Hamburg, 109pp.

1 材料和方法

1.1 裙带菜配子体培养

于1992年4月在青岛前海栈桥湾的养殖浮筏上采集野生裙带菜(*U. pinnatifida*), 将成熟的孢子囊叶消毒处理后, 采集游孢子, 待其萌发成配子体后, 培养在 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光强为 $20\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, DH为12的环境条件下, 这样配子体便保持营养生长状态, 并且生长缓慢。实验时, 提高光强至 $40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 根据需要控制温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, DH为8, 12, 15, 22或24。Q92W: 为雌、雄配子体混合培养物。P11: 为单克隆的雌配子体。P3: 为单克隆的雄配子体。

1.2 培养液

沙滤海水用 $8\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 后添加 N-NO_3^- 和 P-PO_4^- , 使其终浓度分别达 10×10^{-6} 和 5×10^{-6} 。配子体丰富培养的培养液需煮沸消毒处理, 以免杂藻污染。用作发育培养实验的海水, 不需消毒处理。

1.3 培养条件

采用恒温水浴控制温度, 上下波动幅度为 $\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$; 光源采用日光灯, 配子体的丰富培养和后期实验所采用的光强均为 $40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 用自动控制时钟来控制光照时数; 采用压缩空气充气, 经棉花和水过滤后使用。

1.4 方法

配子体附着、生长和发育实验在容积为500ml的烧杯中进行, 用光面载玻片附着(面积为 $17\times 13\text{cm}^2$)。将不同处理的实验组在不同条件下培养, 这些实验组包括DH为8, 12, 15, 22, 24的实验组, 以及同一DH条件下改变温度的实验组。定期取出载玻片在Opton显微镜下检查配子体的生长和发育情况, 以A值来反映雌配子体完成发育的程度, A值为形成卵囊的雌配子体细胞数占雌配子体细胞总数的比例(%)。每次在镜下随机检查100个雌配子体细胞, 计算出其中已发育形成卵囊的细胞数所占的比例。以B值来反映形态不规整的幼孢子体(细胞数在8—20个之间)。B值为每次随机检查50棵幼孢子体, 计算其中叶片弯曲, 细胞排列不规整或死亡的幼孢子体所占的比例(%)。

2 研究结果

2.1 显微镜观察结果

2.1.1 DH为12时配子体的生长发育特点 Q92W, P11和P3在温度为 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光强为 $20\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的培养条件下, 裙带菜雌雄配子体均呈有分枝的长丝状体, 细胞分裂速度缓慢, 细胞壁加厚, 色素体均匀地分布在长方形的细胞四周。由于光强低, 配子体只呈营养生长(VG), 不发育形成卵囊和精囊。将培养条件改为温度 $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光强为 $40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 雌雄配子体便开始发育: 雌配子体需3—4d形成初级卵囊, 需6d形成成熟的三级卵囊, 其长度和宽度分别可达 $50\mu\text{m}$ 和 $20\mu\text{m}$ 。雄配子体同步开始发育, 全部的丝状体末端细胞和部分中间细胞形成1—6个不等的喙状突起, 即精子囊, 这一过程亦需要6d; 培养至第7d时便有单细胞孢子体出现, 但数量不多, 约占10%; 至第8, 9d时, 大部分孢子体形成, 此后幼孢子体细胞进行不断的分裂并逐渐长大; 至15d时, 幼孢子体长度可达0.1mm。

从实际观察结果来看, 雌配子体丝状体细胞中只有63%的细胞在7d左右的时间里

形成卵囊(包括初级、次级卵囊),其它细胞仍保持 VG 状态。随着时间的延长,余下的丝状体细胞也逐渐开始发育。需要特别指出的一点是,单独培养 P11,形成卵囊的比例和 Q92W 基本相同(图 1),这表明,裙带菜雌配子体发育形成卵囊可以独立进行。P11 在形成三级卵囊后能完成排卵,但由于没有精子参与受精过程,所以排出的卵在稍许膨大之后,经过 1—2d 便死亡,有极少数卵进行 1—2 次细胞横裂后死亡。

2.1.2 DH 为 15 时配子体的生长发育特点 当将 DH 调整为 15 时,配子体的生长发育情形变得较为复杂。

雌配子体 同 DH 为 12 时基本相似,约有 40% 的雌配子体细胞在 6—7d 时形成成熟的卵囊,但仅有少部分受精卵形成并生长成为幼孢子体,一部分卵在排出后死亡,另一部分已形成的三级棒状卵囊并不排卵而是在细胞充分拉长之后继续进行细胞横分裂,横分裂后最顶端的细胞继续拉长,这种过程在 DH 不变的条件下会重复进行下去。从细胞形态上来看,这种卵囊的横分裂不同于雌配子体的 VG 时的横裂。

雄配子体 雄配子体并不像在 DH 为 12 时所表现出来的同雌配子体全面保持同步发育,而是继续保持较旺盛的 VG,培养到 18d 时,一段有分枝的丝状体长成一个小球。只是在少数丝状体末端观察到有喙状精子囊形成,并且每个细胞一般只形成一个,而不像 DH 为 12 时形成多个。即在 DH 为 15 时,雄配子体以 VG 为主,少数细胞形成精子囊。

孢子体 单细胞孢子体出现的时间同 DH 为 12 时相同,为第 7d。但孢子体的形成和生长有以下两个特点,其一是由于精子囊形成数量少,所以只有少量孢子体形成;其二是幼孢子体细胞排列不规整,经常能观察到叶片形态不规整、细胞排列不整齐的幼孢子体。较大的幼孢子体出现叶片卷曲,少量则形成类似愈伤组织的葡萄状。这种现象表明,较长的 DH 不仅影响到雌雄配子体的发育,而且对幼孢子体的形态构成也产生一定的影响。值得注意的是,即使在 DH 为 15 的条件下部分幼孢子体出现形态不规整,但仍有幼孢子体(长度在 0.1mm 左右)从形态、细胞排列和色泽各方面来看均正常。

2.1.3 DH 为 22 时配子体的生长发育特点 DH 为 22 时,裙带菜配子体的营养生长和发育均受到明显的影响。尽管其它环境条件均适宜,在培养到第三天时,仍没有检查到有初级卵囊的形成,雌雄配子体细胞仍保持营养生长,但细胞的长度减小,颜色从原来的快速分裂时的浅褐色变为深褐色。雌配子体丝状体由于细胞分裂方式的改变也从原来舒展的分枝丝状体变成不规则的簇状,细胞呈不规则圆形,直接镜检难以相互区分。培养至第 6 天时,能检查到有个别卵囊形成,其比例仅为 3%,没有孢子体形成。至第 8 天时, A 值上升为 3.8%,有少量 1—10 细胞幼孢子体形成。但形态不规整或内部细胞分裂方式紊乱的幼孢子体,所占的比例高达 21.4%(B) 值。

2.1.4 DH 为 8 时配子体的生长发育特点 从镜检结果来看, DH 为 8 时,雌雄配子体形态和 DH 为 12 时没有明显区别,仍呈舒展的有分枝的丝状体。培养至第 4d 时,大部分初级卵囊形成。至第 6d 时,可检查到 1—4 细胞幼孢子体。同 DH 为 12 时相比, DH 为 8 时,配子体发育有二个特点需指出: 其一是, A 值上升到最高的时间滞后 1d (8d, 43.2%), 其二是, B 值高于 DH 为 12 时的 B 值,而远低于 DH 为 22 时的 B 值。从这样的结果不难看出,虽然短光照使卵囊形成的时间滞后,但配子体的 VG 形态和 DH

为12时相同, 因而DH为8优于DH为15。

2.1.5 DH为24时配子体生长特点 连续24h光照有效地阻止了配子体的发育, 配子体仅保持营养生长, 没有卵囊形成, 细胞分裂速度降低, 配子体细胞呈不规整球形, 相互成簇而不呈有分枝的舒展的丝状体; 同DH为22时类似, 雄配子体也聚集成团状, 配子体的共同点是生长速度均下降。很明显, 连续光照对配子体发育是一种极端的限制因子。

2.2 统计结果

从统计结果来看(图2), *A*值在DH为12时最高, 达60%左右, 而且实际观察表明这一峰值可维持2d。这表明在首批卵囊成熟排卵并形成孢子体后, 仍有超过半数的雌配子体细胞持续不断地形成卵囊, 只有10%左右的细胞保持营养生长状态。DH高于或低于12时, *A*值均大幅度下降, 在DH为8, 15和22时, *A*值分别是35%, 42%和3.8%。这表明, 光照时数高于或者低于12均能有效地降低雌配子体发育细胞的比例, 但有程度不同的差异。DH的变化亦影响到孢子体的形态(图1)。在所进行的5组育苗实验中, DH为22时, 不规整幼孢子体所占的比例为最高, 达22%; DH为8和15时则基本相同, 在10%—12%之间。

从这些结果可以看出, DH对裙带菜配子体发育的影响具有量变的特点, 对幼孢子体形态构成的影响亦是如此。值得指出的是当温度和DH共同变化时, 温度的影响更加明显(图2)。尤其是发育的临界温度更加重要。即使DH为12, 在25℃时, *A*值也远低于17℃时的*A*值。这表明, 在影响裙带菜配子体发育的环境因子中, 处于临界状态的因子起主导作用。这一点也可以从以下事实看出: 17℃时, 当DH为24时, *A*值为零。

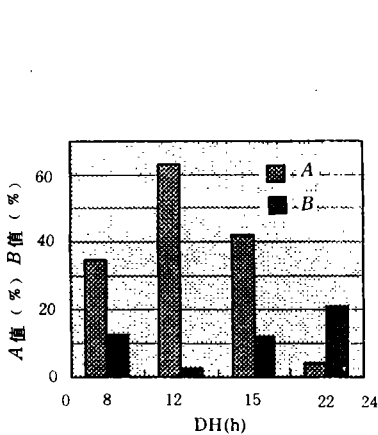


图1 不同雌配子体在不同条件下*A*值变化情况

Fig.1 Variations of *A* value of different female gametophyte under different conditions

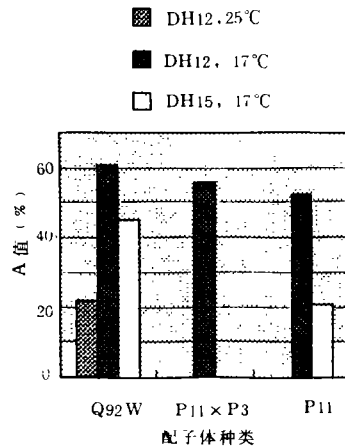


图2 不同DH条件下配子体*A*值及*B*值的变化情况

Fig.2 Variations of *A* and *B* values of gametophyte under different DH

3 讨论与结语

3.1 DH 在影响裙带菜配子体发育的环境因子中所起的作用

温度、光强、日光照时数和营养盐水平均影响着裙带菜配子体的发育,但其中任何一种因子均不是单独地起作用,换句话说,只提供一种或某几种适宜条件而不是全部条件,配子体仍不能完成发育过程。在这点上,DH 的影响和其它三个因子相同,但在这三个因子中,起作用的程度不同,例如当温度或光强条件适宜时,配子体仅保持 VG 状态,卵囊和精子囊形成比率为零。DH 的影响则不然,不同 DH 条件下,卵囊形成率仅存在程度差异,仍有部分配子体能完成正常的发育过程,而且形成的孢子体能正常生长。只有在极端的 DH 条件下(DH 为 24),配子体的发育才被完全阻止。另外,不同的裙带菜配子体对不同 DH 的感受能力似乎存在个体间的差异。对于温度和光强而言,当温度高于 25 °C 或光强低于 $4\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,发育不可能实现,这是在影响裙带菜配子体发育方面 DH 所起的作用区别于其它三种主要环境因子的地方。

3.2 裙带菜配子体在自然海水环境中的发育受 DH 的影响

就山东青岛地区的沿岸海区而言,自 3 月 22 日春分起(此时 DH 为 12),DH 逐渐拉长,同时水温也逐渐升高,至夏至(6 月 22 日),DH 最长可达 15,这期间平均海水温度自 5 °C 左右渐升至 20 °C 左右。很明显可以看出,虽然在春分过后的一段时间里,DH 适宜于配子体发育,但由于温度低,裙带菜生殖器官孢子囊叶还没有成熟,所以没有游孢子释放。随着水温的升高孢子囊叶开始成熟并放散游孢子(4 月中旬至 6 月下旬),而与此同时,DH 的变长使得大多数配子体仍保持 VG 状态,仅有少部分配子体发育并形成孢子体,这样保持 VG 的配子体有效地增加了海水环境中配子体细胞的总数量,使得变成孢子体的那部分配子体所造成的数量亏空得到填补。形成的少量孢子体在随后到来的高水温夏季而死亡。大量的配子体以 VG 状态渡过夏季高水温期后,在 DH 接近 12,同时水温适宜时发育并形成孢子体,此时海水温度在 23 — 25 °C 之间。

裙带菜配子体发育受 DH 调节,一方面体现环境条件对其生殖过程的影响,同时也反映了生物对环境条件变化的良好适应。在这里一个有意义的现象是,既然在晚春早夏发育的配子体其最终命运是并不能完成整个生活史,即最终要在夏季高水温期而死亡,那么裙带菜在长期的进化过程中为什么仍保留了这样一些个体呢?一种推测是裙带菜配子体发育并不局限于狭窄的 DH 范围内正是其生存能力强和分布范围广的原因(Floc'h et al., 1991; Brown et al., 1994),否则其分布将会受温度和 DH 的影响而分布在一个有限的纬度范围之内,这也就不能解释现在所了解的裙带菜广布在东亚,欧洲和澳大利亚等地的现象。

参 考 文 献

- Brown, M. T. et al., 1994, *Sur. Jpn. Phycol.*, **42**: 63 — 70.
Floc'h, J. Y. et al., 1991, *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **47**: 379 — 390.
Lüning, K. et al., 1986, *Br. Phycol. J.*, **32**: 389 — 397.
Lüning, K., 1991, *Bot. Acta.*, **104**: 157 — 162.
Lüning, K., 1993, *Hydrobiologia*, **260/126**: 1 — 14.

Liining, K. et al., 1993, *Phycologia*, **32** (5): 379—387.

Tom, Dieck (Bartsch), I., 1991, *J. Phycol.*, **27**: 341—350.

INFLUENCE OF DAYLENGTH HOURS ON GAMETOGENESIS OF *U. PINNATIFIDA* (HAR.) SUR.

Pang Shaojun

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

Abstract Wild sporophytes of *U. pinnatifida* were sampled at Zhanqiao bay, Qingdao in April 1992. Male and female gametophyte clones were isolated and cultured in lab. Vegetative gametophytes were used to study the effects of different daylength hours (DH) on gametogenesis. The results indicated that continuous light can effectively inhibit gametogenesis. Gametophytes grew vegetatively. The percentage of oogonium was zero. Optimum DH was 12, when the percentage of oogonium reached highest level—63%. DH higher or lower than 12 resulted in decreased gametogenesis percentage. Gametogenesis percentages were 35%, 42% and 3.8%, when DH were 8, 15 and 22 respectively. Observation results in sporophyte culturing experiments under different DH showed that DH also influences the structure of sporophyte morphology. Some aspects related to different responses of gametophyte of *U. pinnatifida* to daylength hours are also discussed in this paper.

Key words *Undaria pinnatifida* Gametophyte Photoperiods Growth rhythms