

文章编号:1000-0615(2007)05-0682-05

· 研究简报 ·

宽礁膜孢子体阶段的研究

马家海, 梁泽锋, 谢恩义

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

关键词: 宽礁膜; 孢子体; 配子; 合子; 孢子囊; 游孢子

中图分类号: S 917.3

文献标识码: A

The study on the sporophyte stage of *Monostroma latissimum*

MA Jia-hai, LIANG Ze-feng, XIE En-yi

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Based on the observation and comparative analysis, overall and systematic development of *M. latissimum* in the stages from conjugation of gamete to discharge of zoospore, on the sporophyte stage during the life history of *M. latissimum* is entirely expatiated in this article. Meanwhile, on the basis of the results of the experiment, we divided the sporophyte stage of *M. latissimum* into five periods: conjugation of gametes (gamete $7.5 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$), zygocyte ($4-20 \mu\text{m}$), sporange ($18-40 \mu\text{m}$), zoospore formation (sporange $35-55 \mu\text{m}$) and discharge of zoospore (zoospore $9.4 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$). In this paper it may be in China to find the systemic acknowledgement on the division of the sporange stage during the life history of *Monostroma* as well as to the seedling cultivation in practice.

Key words: *Monostroma latissimum*; sporophyte; gamete; zygocyte; sporange; zoospore

宽礁膜 (*Monostroma latissimum*) 隶属于绿藻门、石莼目、礁膜科、礁膜属。礁膜属的海藻俗称塔膜菜, 绿苔, 全世界共有 40 多种, 我国有 6 种^[1], 即礁膜 (*M. nitidum* Witttr.)、囊礁膜 (*M. angicava* Kjellm)、宽礁膜 (*M. latissimum* Witttr.)、厚礁膜 (*M. crassifolia* Tseng et C. F. Chang)、北极礁膜 (*M. arcticum* Witttr.)、皱原礁膜 (*M. undulatum* Vinogradova)。宽礁膜属冷温性、沿岸性半咸水种类, 分布于太平洋中南部沿岸内湾, 我国、韩国、日本等均有分布, 我国见于台湾、香港、福建、浙江等沿海内湾。藻体绿色, 成熟后为黄绿色, 干后暗绿色, 个体有或无裂片, 稍粘滑, 有光

泽。叶边缘有壁褶, 个体较大 (最大体高可至 20 cm 以上), 营养丰富, 既可鲜食, 也可晒干作调味品, 是日本制作紫菜酱的主要原料。宽礁膜为一种重要的食物资源, 含有较多的糖类、脂肪酸、维生素、氨基酸、无机盐和微量元素^[2], 食用价值高, 是绿藻中食用价值最高的一种。且该属种类含有较多的硫酸多聚糖等药用活性物质^[3-5], 对多种疾病具有治疗和预防作用^[6], 是一种很有开发潜力的海洋药物资源。

从生产和经济性能看, 宽礁膜在该属中最具有栽培前景, 但我国目前对宽礁膜的研究资料很少^[1,2,7], 尚未进行人工栽培, 需要进行深入研究

收稿日期: 2006-09-06

资助项目: 浙江省科委资助项目 (2001300001); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 马家海 (1940-), 男, 博士生导师, 教授, 主要从事海洋植物种苗工程与增殖研究。Tel: 021-65710020, E-mail: jhma@shfu.edu.cn

和开发。本文通过对宽礁膜孢子体阶段的研究,为宽礁膜生活史中孢子体阶段的划分提供理论依据进行补充,这也对发展我国礁膜人工育苗栽培业具有现实的指导意义^[8]。

1 材料和方法

1.1 材料

4 月份采集浙江沿海的宽礁膜,藻体边缘乃至藻体大部分变成黄褐色或黄绿色的成熟配子体。

1.2 方法

将采集的藻体边缘乃至藻体大部分变成黄绿色的成熟配子体,清洗干净,阴干至含水量70%~75%,放入消毒过滤海水中,刺激其放散雌雄配子,并辅以强光照刺激,以达到集中放散的目的。雌、雄配子接合发育成合子,合子质膜外分泌一层胶质,使合子固着在附着基上。将固着有合子的附着基转移至消毒海水中进行培养,光强为 $18 \sim 24 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度为室温培养保存。合子培养至6月转变成孢子囊,9月上旬孢子囊成熟,10月初放散游孢子,萌发为宽礁膜配子体幼苗。采用石蜡切片 H.E 染色方法,并用配有 DPR 型的显微数码相机的 OLYMPUS BH-2 型光学显微镜对切片进行观察、摄影^[9-11]。

2 结果

2.1 镜检

配子结合 配子体在3月上旬即可成熟。由边缘部分开始成熟,成熟的边缘部分变成淡黄色,未成熟部分仍为绿色,充分成熟的雌、雄配子呈黄褐色。配子放散时,光强控制在 $30 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,在配子放散时需要强光刺激,使得配子放散达到最佳^[12-13]。放散出来的配子(图版 I-1)分为雌、雄配子,其配子形态相似,呈椭圆形,2根等长鞭毛位于配子前端。配子可分雌、雄,雌雄配子平均大小为 $7.5 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ 。配子多为推进式运动,也有原地快速旋转推进运动。雌、雄配子的运动方式也不尽相同,雌配子游动缓慢,运动方向改变频繁,雄配子游动迅速,方向变化不大。雌、雄配子混合放散后,可见到许多雌、雄配子形成配偶对,它们之间首先通过鞭毛的末端连结在一起,然后配偶对的前端互相靠近,形成“ \heartsuit ”形(图版 I-2),配子结合时需要避光,否

则结合成合子的机率会显著下降。

合子的形成 在雌、雄配子细胞质融合过程中,雌、雄配子的核也融合在一起,形成圆球形的合子,形成单细胞的受精卵(图版 I-3~4),此时的合子大小 $4.2 \sim 4.5 \mu\text{m}$,初期未形成细胞壁,可以运动,随后合子质膜外分泌一层胶质,使合子固着在附着基上,并在合子质膜外形成细胞壁,使合子保持圆球形状状态。

合子在培养前期(4~6月),水温较低时($17 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$),生长较快,从 $4 \mu\text{m}$ 增长至 $20 \mu\text{m}$ (图版 I-5~6),其间光照应较强,以 $32.1 \sim 80.1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 为宜;如果光强小于 $16 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,合子不仅生长慢,而且逐渐死亡^[14]。这一阶段合子的细胞核仍不分裂,甚至有可能保持到第2年。

孢子囊 6月上旬,合子的细胞核进行分裂,此后合子转为孢子囊。镜检观察此时的孢子囊已不是合子阶段内部有一个大而明显的细胞核,而是游孢子囊内部由于细胞核发生减数分裂,内部的细胞质也发生分化,因此,镜检观察孢子囊内部出现颗粒状结构(图版 I-7~8)。颜色淡绿或翠绿色,孢子囊生长较为缓慢,大小为 $18 \sim 40 \mu\text{m}$ 。7~8月水温较高,孢子囊内部的孢子开始显现(图版 I-9),但是还未发育成熟。到8~9月孢子囊内部的细胞质发生明显的分化,镜检下清晰可见一粒粒孢子(图版 I-10)。

游孢子形成 9月中旬,孢子囊大小为 $35 \sim 55 \mu\text{m}$,孢子囊壁厚 $2 \sim 4 \mu\text{m}$,较透明,日渐成熟的孢子囊其颜色逐渐由绿色变成黄绿色或黄褐色。高倍下镜检,孢子囊内游孢子形成($16 \sim 32$ 个)清晰可见,淡绿色或草绿色,球形,聚集在孢子囊内部,无法分辨鞭毛,在孢子囊壁有一处明显突出呈穹窿状(图版 I-11),这是游孢子形成的明显标志。

游孢子放散 10月中上旬,在光照刺激下,孢子囊内壁穹窿处打开,形成的圆形开口,游孢子由圆孔放散出来(图版 I-12)。游孢子从孢子囊的开口处涌出在开口外部聚成一个集合体,然后以极快的速度向四散游开,还有少数孢子囊放散不同于前一种,而是游孢子一个个游离出孢子囊(图版 I-13~20),在孢子囊内还会有个别未放散出的游孢子,在孢子囊内可以一直运动6h以上,且因活动空间加大,运动速度加快。游孢子完全放散后的孢子囊的囊壁或空壳在附着基上

长久不消失。刚放散出的游孢子呈瓜子形,平均大小为 $9.4 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$,位于游孢子中的块状叶绿体占据游孢子的大部分体积,游孢子具强向光性,大量游孢子在光亮处可集结成肉眼可见的云雾状。游孢子顶生鞭毛(图版 I-21),长度为体长的 $1.4 \sim 1.5$ 倍,游动速度较快,无确定的运动方向, $1 \sim 1.5$ h 后游动速度减慢, $2 \sim 3$ h 内大多固着。固着前,常旋转于一个地方达 2 min 或更久,静止前由摆动逐渐变为颤动。处于黑暗的个别游孢子,运动时间可超过 10 h。游孢子用其鞭毛将自身附着于固着基上,静止不动的游孢子渐渐变成球状,直径 $5 \sim 5.4 \mu\text{m}$,随后在游孢子的周围分泌胶质,使游孢子牢固地固着于基质上(图版 I-22)。固着后 $2 \sim 3$ d,游孢子即萌发分裂形成多细胞幼苗(图版 I-23), $9 \sim 10$ d 后发育成 $32 \sim 64$ 个细胞, 20 d 的苗肉眼可见,大小为 1 mm 左右,已有成百上千个细胞,为一层细胞构成的多细胞叶状体,其假根常有分枝(图版 I-24)。

2.2 H. E 染色切片观察

合子 当雌雄配子结合后形成圆球形的合子形成单细胞的受精卵,通过染色可以清晰的观察到合子质膜外分泌一层胶质,内部的细胞核与细胞质对比明显,清晰可见(图版 II-1~2)。

孢子囊 在经过单细胞的合子阶段后,细胞核发生减数分裂,形成孢子囊,经过染色观察可以清晰看到孢子囊内部出现多个细胞核(图版 II-3~4),色泽浅灰色。

游孢子形成 此时的孢子囊内部的细胞质已经发生明显的分化,已经发育成游孢子。9月上旬,孢子囊大小为 $35 \sim 55 \mu\text{m}$,孢子囊壁厚 $2 \sim 4 \mu\text{m}$,透明、成熟的孢子囊经过 H. E 染色,细胞核被苏木精染成紫黑色,多数细胞质及非细胞成分被伊红染成粉红色,孢子囊内部的游孢子清晰(图版 II-5)。

游孢子放散 孢子囊内壁穹窿处打开,形成的圆形开口,游孢子由圆孔放散出来,游孢子从孢子囊的开口处涌出(图版 II-6~7)留下空囊。刚放散出的游孢子呈瓜子形(图版 II-8)。

3 讨论

本文根据宽礁膜孢子体各个阶段的形态、构造和生长发育,系统地阐述了宽礁膜生活史中的孢子体阶段即从配子体放散雌雄配子,两者相互

结合成为合子,进一步发育成为孢子囊,直至形成、放散游孢子发育成为配子体幼期的全过程。

经过多年的观察研究与实践积累的经验,并参照条斑紫菜生活史中丝状体的生长发育阶段^[15],将宽礁膜生活史中的孢子体阶段分 5 个时期:配子结合(配子平均 $7.5 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$)、合子($4 \sim 20 \mu\text{m}$)、孢子囊($18 \sim 40 \mu\text{m}$)、游孢子形成(孢子囊 $35 \sim 55 \mu\text{m}$)、游孢子放散(游孢子平均 $9.4 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$)。陈昌生^[14]曾提出将礁膜合子阶段划分为 3 个时期:初期合子(合子刚附着,大小为 $5 \sim 10 \mu\text{m}$)、中期合子($30 \sim 40 \mu\text{m}$)、后期合子(大小为 $65 \sim 70 \mu\text{m}$),当合子大小达到 $65 \sim 70 \mu\text{m}$ 后,合子的生长不明显,开始转化形成游孢子囊。此阶段划分是以大小为依据,没有从形态和内部构造上加以区分。合子在绿藻中专指雌雄配子在结合后形成短暂的单个细胞的时期,随着礁膜合子进一步生长发育,合子内部已不是单个细胞,因此按照大小划分初期、中期、后期合子,并将孢子囊阶段也划入后期合子显然是不妥的。游孢子形成到游孢子成熟放散有一个成熟期,要历时 1 个月左右,游孢子形成与游孢子放散是有明显区分的。为此,作者对宽礁膜的孢子体阶段(每年 4-10 月)从形态结构和生长发育角度进行了上述划分。

Bold 和 Wynne^[16]以及其他学者认为,礁膜生活史中只有独立生活的配子体世代,二倍体的合子阶段时间很短暂,因而礁膜生活史是单倍体单世代型。但本实验观察结果表明孢子体阶段存在时间很长,每年 4 月至 10 月从配子体放散的配子结合为合子,进而发育成孢子囊以及成熟的孢子囊形成放散游孢子,再萌发为配子体,整个过程历时超过半年,同时就其栽培生活史而言,有约半年时间生长发育在海洋的宏观配子体世代,以及约半年多时间生长发育在育苗阶段的微观孢子体世代,证明了宽礁膜的生活史中是存在着明显的异形世代交替现象^[8,17]。而且从室内实验和育苗实践中发现有一部分孢子囊当年没有发育成熟,而是持续到第 2 年才成熟放散,形成二年生孢子囊,这种现象还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京:海洋出版社,1994:222-223.

- [2] 谢恩义,马家海,陈扬建. 宽礁膜营养成分分析及营养学评价[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(2):129-133.
- [3] Hiraoka A, Harada N, Uehara T, *et al.* Capillary isotachopheric analyses of algal acidic polysaccharides and their application to a survey [J]. Chem Pharm Bull Tokyo, 1992, 40(3):783-785.
- [4] Maeda M, Uehara T, Harada N, *et al.* Heparinoid-active sulphated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta [J]. Phytochemistry, 1991, 30(11):3611-3614.
- [5] Harada N, Maeda M. Chemical structure of antithrombin-active rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62(9):1647-1652.
- [6] 中国人民解放军海军后勤部卫生部,上海医药工业研究. 中国药用海洋生物[M]. 上海:上海人民出版社,1977:4.
- [7] Chen Y C, Chang Y M. Isolation and regeneration of protoplasts of *Monostroma latissimum* Wittrock (*Monostromataceae*, Chlorophyta) [J]. Bot Bull Acad Sin, 1994, 35:45-51.
- [8] Hua W H, Xie E Y, Ma J H. Life history of *Monostroma latissimum* [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(4):457-462.
- [9] 吴佩琴,吴春霖. 细针吸取物石蜡切片的制作[J]. 临床与实验病理学杂志, 2002, 18(3):343.
- [10] 苏庆,陈钢,陈华,等. 石蜡切片制作细胞株免疫组化检测的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2003, 12(3):335-337.
- [11] 郭群,张品南. H. E 染色切片质量欠佳的原因及处理[J]. 中华今日医学杂志, 2003, 3(24):52-53.
- [12] 陈昌生. 礁膜配子放散条件的研究[J]. 台湾海峡, 1996, 6:154-158.
- [13] 陈昌生. 盐度和营养盐对礁膜配子体发育的影响[J]. 水产学报, 1992, 16(4):388-391.
- [14] 陈昌生. 光照对礁膜合子生长发育的影响[J]. 水产学报, 1996, 20(1):30-35.
- [15] 马家海,蔡守清. 条斑紫菜的栽培与加工[M]. 北京:科学出版社,1996:18-20.
- [16] Bold H C, Wynne M J. Introduction to the algae [M]. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N J, 1978:244-246.
- [17] Kida W. Development and life-cycle of parthenogametes in *Monostroma latissimum* [J]. Fish Multipl, 1989, 37:83-86.

图版说明 Explanation of Plates

图版 I

1. 雌雄配子, ×400; 2. 配子结合, ×500; 3. 5 月份固着的合子, ×400; 4. 5 月份固着的合子, ×1000; 5. 6 月份固着的合子, ×800; 6. 6 月份固着的合子, ×800; 7. 6 月份孢子囊, ×800; 8. 7 月份孢子囊, ×500; 9. 开始形成游孢子的孢子囊, ×400; 10. 10 月份游孢子成熟的孢子囊, ×400; 11. 放散前的孢子囊, ×1000; 12. 已经开口的孢子囊, ×400; 13. 游孢子放散, ×400; 14. 游孢子放散, ×400; 15. 游孢子放散, ×400; 16. 游孢子放散, ×400; 17. 游孢子放散, ×400; 18. 游孢子放散, ×1000; 19. 游孢子放散, ×1000; 20. 游孢子放散, ×1000; 21. 游孢子, ×1000; 22. 游孢子固着, ×1000; 23. 多细胞苗, ×400; 24. 幼苗, ×200

图版 II

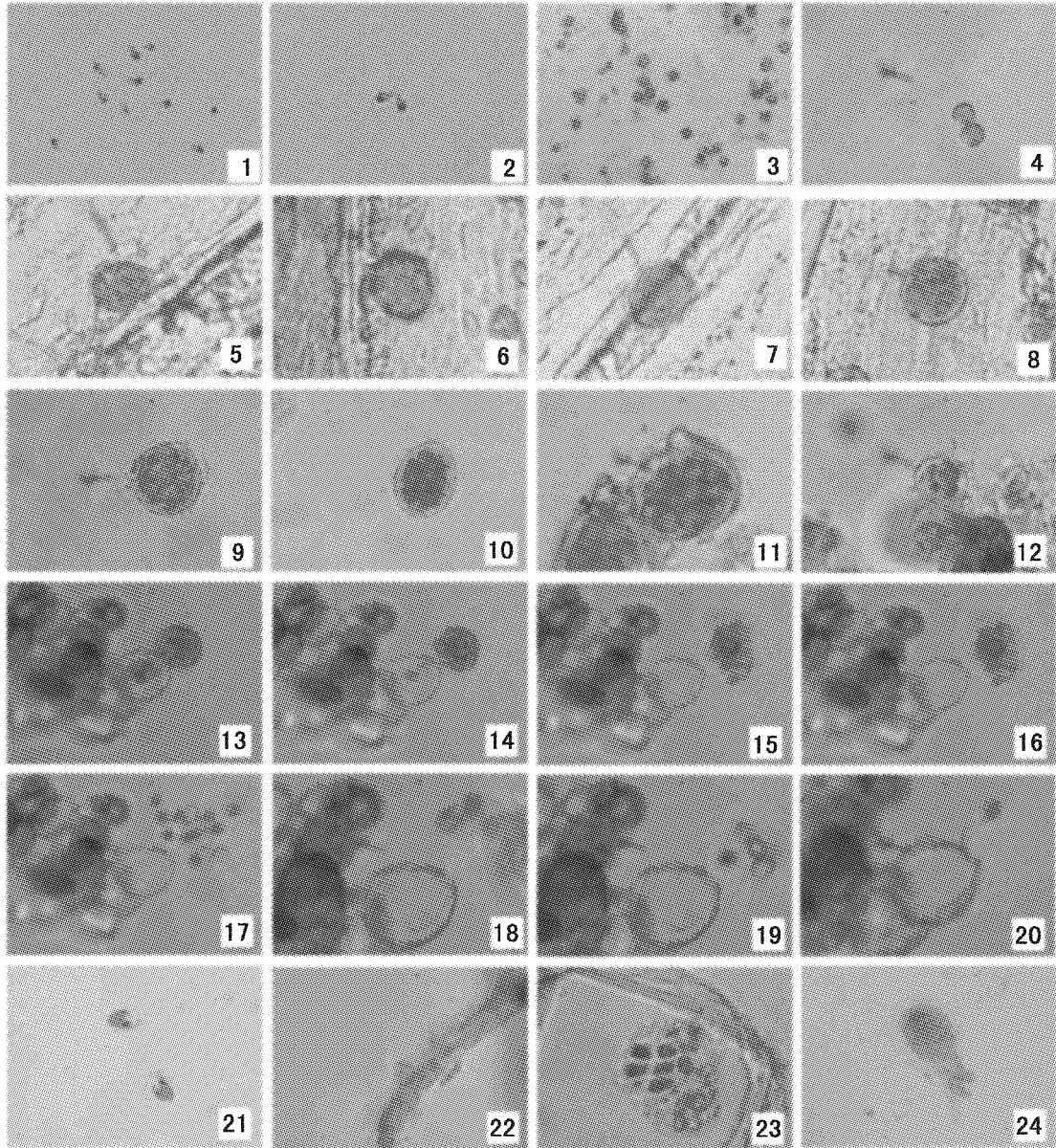
1. 5 月份合子, ×1000; 2. 6 月份合子, ×1000; 3. 7 月份孢子囊, ×500; 4. 8 月份孢子囊, 开始形成孢子; ×500; 5. 9 月份游孢子成熟的孢子囊, ×1000; 6. 10 月份即将放散游孢子的孢子囊, ×1000; 7. 孢子囊放散, ×400; 8. 放散的游孢子, ×1000

Plate I

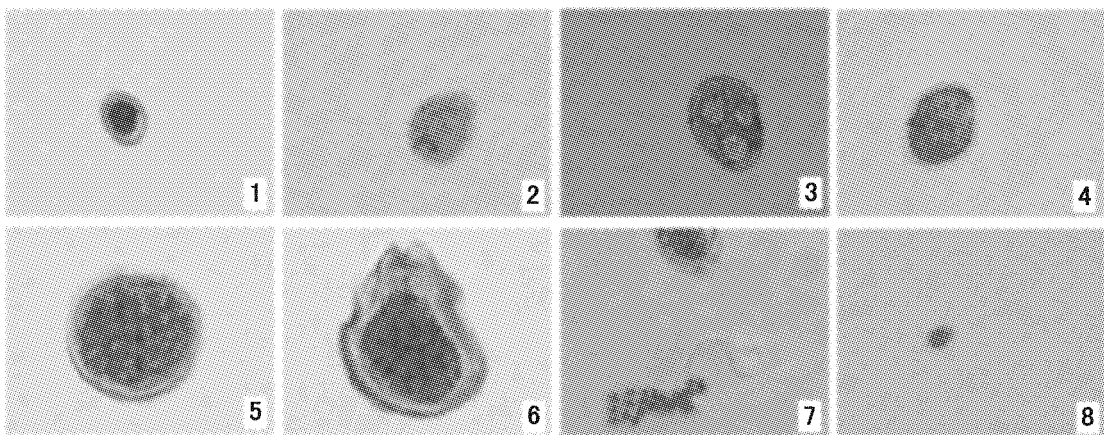
1. male and female gametes, ×400; 2. Conjugation of gametes, ×500; 3. settled zygotes in May, ×400; 4. settled zygotes in May, ×1000; 5. settled zygotes in June, ×800; 6. settled zygotes in June, ×800; 7. sporangium in June, ×800; 8. sporangium in July, ×500; 9. immature sporangium, ×400; 10. a mature sporangium in October, ×400; 11. the sporangium before liberate zoospores, ×1000; 12. ringent sporangium, ×400; 13. zoospores liberation, ×400; 14. zoospores liberation, ×400; 15. zoospores liberation, ×400; 16. zoospores liberation, ×400; 17. zoospores liberation, ×400; 18. zoospores liberation, ×1000; 19. zoospores liberation, ×1000; 20. zoospores liberation, ×1000; 21. zoospores, ×1000; 22. zoospores adhered to the net ×1000; 23. cellulous germling ×400; 24. sporeling ×200

Plate II

1. zygotes in May, ×1000; 2. zygotes in June, ×1000; 3. sporangium in July, ×500; 4. immature sporangium in August, ×500; 5. a mature sporangium in September, ×1000; 6. the sporangium before liberate zoospores in October, ×1000; 7. zoospores liberation, ×400; 8. zoospores, ×1000



图版 I Plate I



图版 II Plate II