



坛紫菜单性组织培养的性逆转研究

潘光华¹, 姜红霞², 汤晓荣³

(1. 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457;
2. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 常熟 215500; 3. 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要: 为了进一步研究坛紫菜的单性组织发育特征并验证其可能存在的单性生殖途径, 本文对坛紫菜雌、雄营养细胞、组织发育过程中两性生殖组织的形成和繁殖特征以及两种单性遗传来源的子代叶状体的性别发育特征进行观察研究。结果表明, 单性营养细胞和组织能够通过性逆转产生两性生殖组织并形成丝状体, 该繁殖方式不属于单性生殖。单性遗传来源的子代叶状体群体由于性逆转产生了雌性、雄性以及雌雄同体三种性别表现。这种性逆转现象在紫菜属植物中尚未见报道。坛紫菜性逆转现象的发现为育种过程中丝状体纯系的分离以及性别发生机制的研究提供了新的理论借鉴。

关键词: 坛紫菜; 组织培养; 性逆转

中图分类号: Q178.53

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2011)05-0001-04

Sex Reversal of *Porphyra haitanensis* Starting from the Unisexual Thalloid Tissue Culture

PAN Guang-hua¹, JIANG Hong-xia², TANG Xiao-rong³

(1. Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Department of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China;
3. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to ascertain more about development of *Porphyra haitanensis* and investigate whether *P. haitanensis* can reproduce by parthenogenesis under the unisexual culture condition. Some developmental features were observed during the development of the male and female vegetative cells and tissues, including the formation of reproductive tissues and their reproductive patterns. The results show that the unisexual cells and tissues can generate reproductive cells of both sex by sex reversal and form conchocelis. That is different from parthenogenesis in which the ovum develops into a new individual without fertilization. Two F1 young blade populations derived from the two conchocelis were investigated for their sexual expression, the results show that both F1 blade populations have male, female and hermaphrodite individuals because of sex reversal in some individuals. It is not found to be reported on the existing of sex reversal in life history of porphyra. The findings have important significance to isolation of genetic pure strains in breeding and study on sexual development mechanism.

Keywords: *Porphyra haitanensis*; tissue culture; sex reversal

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国主要的紫菜栽培种类之一, 盛产于南方的闽、浙沿海。近年来, 针对栽培业对优良种质的迫切需要, 不少研究者从遗传育种的角度出发, 进行了许多坛紫菜的组织培养研

究。其中大部分研究表明, 坛紫菜叶状体的离体营养细胞或单性组织能够独立发育形成丝状体^[1-3]。对于这些丝状体后代的产生, 部分研究者认为是配子体细胞通过自身染色体加倍后形成的, 属于单性生殖^[4]。

收稿日期: 2011-05-03; 修回日期: 2011-06-21

基金项目: 天津科技大学研究基金资助项目(20100219)

作者简介: 潘光华(1982—), 男, 内蒙古人, 助理实验师; 通信作者: 汤晓荣, 副教授, tangxr@ouc.edu.cn.

然而,也有研究者对该观点提出质疑,认为丝状体并非完全由单性生殖途径产生,这一问题还有待于更加深入的研究^[2].紫菜的繁殖方式与性别表现紧密相关,已有研究表明紫菜的性别表现在某个种中并非固定不变,并且性别表现的改变往往伴随着繁殖方式的改变^[5].绝大多数情况下野生坛紫菜为雌雄异体,其繁殖方式为典型的有性生殖,人为进行的单性培养是否会引起坛紫菜性别表现的改变及其对繁殖方式的影响,是进行单性生殖研究时应该深入思考的一个问题.它不仅关系到坛紫菜育种的应用研究,还涉及到遗传学的基础理论研究.为此,本研究以坛紫菜雌雄配子体细胞和组织的单性发育为起始点进行追踪观察,探寻丝状体的产生途径,并对单性遗传来源的丝状体所产生的配子体后代进行发育观察研究,在探索坛紫菜单性发育特征和规律的同时,对坛紫菜可能存在的单性生殖途径进行验证.

1 材料与方法

1.1 材料的获取及准备

坛紫菜叶状体采自福建连江沿海,阴干后分装并于-20℃冰箱中冻存,实验前将藻体于消毒海水(用脱脂棉过滤后再经煮沸、冷却的自然海水)中复苏48 h.

1.2 单性组织培养

单细胞培养:挑选雌雄个体后各自切取营养组织,切块为边长2~3 mm的碎片,分别用超声波处理20~30 s后进行酶解,酶解液采用含2 mol/L葡萄糖的粗海螺酶液,25℃酶解3 h后筛绢过滤,滤液再经1 000 r/min离心以收集单细胞.将获得的雌雄营养细胞分别转入培养皿中,培养液为添加营养盐的消毒海水,培养温度共设3个梯度,分别为19、23、27℃,光照强度为40 μmol/(m²·s),日光照时间为12 h,每7 d更换一次培养液.

营养组织培养:边长为2~3 mm的雌雄营养组织切块分别经超声波处理20~30 s后再用消毒海水反复冲洗以去除表面附着的杂质.组织块培养条件与单细胞培养完全相同.

1.3 叶状体后代的获得及培养

将来源于雌雄单性营养组织的两种丝状体转移到27℃条件下进行培养,光照强度为40 μmol/(m²·s),日光照时间为12 h,培养5周后,当两种丝状体形成大量孢子囊枝时进行降温以获得壳孢子.将

收集到的两种壳孢子于20℃、60 μmol/(m²·s)、日光照时间为12 h的条件下静置培养,2~3周后再将壳孢子萌发形成的幼苗转移至2 000 mL的三角瓶中充气培养,培养温度为(25±1)℃,80 μmol/(m²·s)日光照12 h,每隔3 d更换一次培养液.

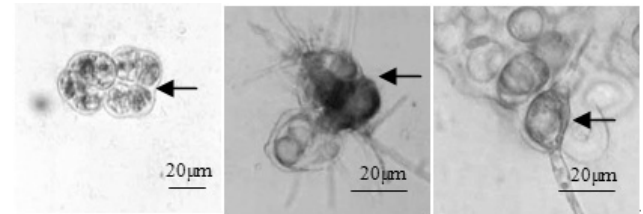
在单细胞、营养组织以及叶状体的培养过程中定期进行跟踪观察和显微拍照记录,所使用的设备为尼康E400生物显微镜(日本尼康公司)和XD-101倒置显微镜(南京江南永新光学有限公司).

2 实验结果

2.1 单性组织发育

2.1.1 营养细胞发育

雌性个体营养细胞的发育:游离细胞在2~3 d后再生细胞壁并开始发生分裂,除了形成不规则细胞团和叶状体,还能够形成浅绿色的精子囊器(图1(a))和深红色的果孢子囊(图1(b)),果孢子能够萌发形成丝状体(图1(c)).温度对细胞发育速度具有一定影响,而对细胞的发育方式和趋向无明显影响,体现在19℃条件下细胞分裂速度较慢,而在温度较高的23℃和27℃条件下,细胞分裂速度更快,并且丝状体出现的时间也更早(表1).



(a) 精子囊器 (b) 果孢子囊 (c) 果孢子萌发丝状体

图1 雌性营养细胞的发育

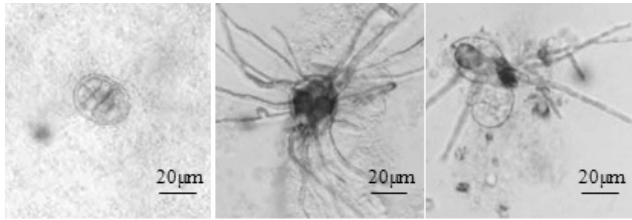
Fig.1 Development of female vegetative cells

雄性个体营养细胞的发育:温度对细胞的发育方向无明显影响.19、23、27℃条件下细胞均很快发生分裂,1周内绝大多数细胞分裂形成精子囊器(图2(a)),极少数形成果孢子囊(图2(b)),3~4周后、各种温度条件下均观察到由果孢子萌发形成的丝状体(图2(c)).

2.1.2 营养组织发育

雌性营养组织的发育:19℃和23℃条件下,组织块上的营养细胞在1周后外形变圆,胞内色素体呈弥散状,颜色深浅不一,其中一些呈深红色,外观与

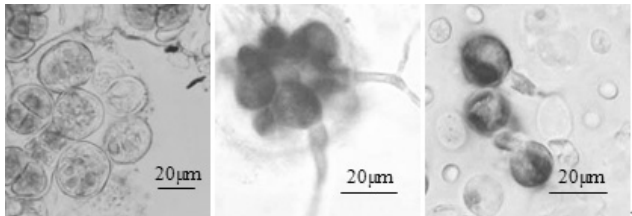
受精前的果胞极其相近, 这些细胞在后期逐渐凋亡, 在凋亡的细胞中间有少量果孢子囊形成(图 3(b)), 囊内的果孢子萌发形成丝状体(图 3(c)). 27 °C 条件下, 营养组织分化产生果孢子囊的速度更快(表 1), 此外, 还分化产生出明显的精子囊器结构(图 3(a))



(a) 精子囊器 (b) 果孢子囊 (c) 果孢子萌发丝状体

图 2 雄性营养细胞的发育

Fig.2 Development of male vegetative cells

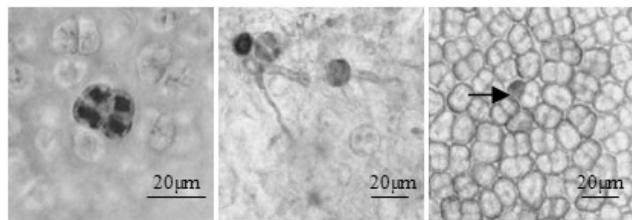


(a) 精子囊器 (b) 果孢子囊 (c) 果孢子萌发丝状体

图 3 雌性营养组织的发育

Fig.3 Development of female vegetative tissue

雄性营养组织的发育: 组织块上绝大部分细胞分裂形成精子囊器, 极少数细胞分裂形成红色的果孢子囊(图 4(a))并最终形成丝状体(图 4(b)). 我们还观察到果孢子囊和精子囊处于同一细胞团中的现象(图 4(c)).



(a) 绿色精子囊器和深红色果孢子囊 (b) 果孢子萌发 (c) 果孢子囊和精子囊处于同一细胞团中

图 4 雄性营养组织的发育

Fig.4 Development of male vegetative tissue

各温度下组织发育结果相同, 高温下发育速度较快(表 1).

表 1 不同温度下丝状体出现的时间

Tab.1 Development time of conchocelis under different temperature

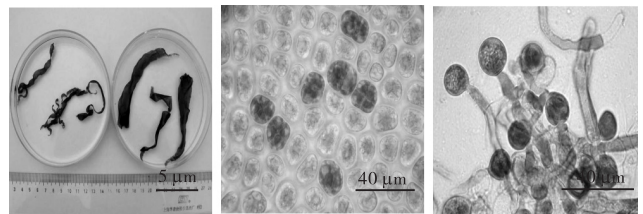
培养组织	出现时间/d		
	19 °C	23 °C	27 °C
雌性营养细胞	15	10	8
雄性营养细胞	28	22	15
雌性营养组织	15	9	7
雄性营养组织	23	17	15

2.2 雌雄单性营养组织的叶状体后代的发育

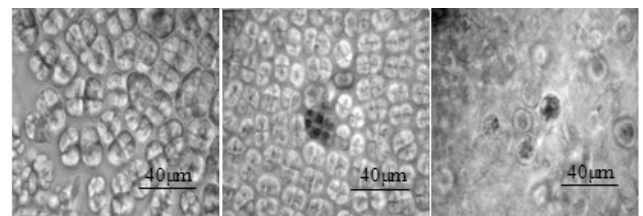
根据两种叶状体后代的不同性别遗传来源, 将源于雌性组织培养的丝状体定义为雌性丝状体, 由其释放并萌发形成的叶状体为雌性叶状体. 雄性同理.

2.2.1 雌性叶状体后代的发育

雌性叶状体幼苗经过 50 d 的培养后逐渐发育为成熟的叶状体(图 5(a)), 镜检发现成熟叶状体中除了较多的雌性个体, 还出现少量雄性个体和雌雄同体个体. 成熟的雌性个体边缘凋亡的果胞之间分布有少量的果孢子囊(图 5(b)), 果孢子经放散后萌发形成丝状体(图 5(c)); 雄性个体具有与野生雄性个体完全相同的特征, 其端部和边缘区域全部为精子囊器, 其中一些已开始放散精子(图 5(d)); 雌雄同体个体端部和边缘能够形成大量精子囊器, 果孢子囊散布于精子囊器之间(图 5(e)), 果孢子能够随精子一同放散并萌发丝状体(图 5(f)).



(a) 成熟的雌性(左) (b) 果孢子囊 (c) 果孢子萌发丝状体和雄性叶状体(右)



(d) 精子囊器正在放散精子 (e) 精子囊器间的果孢子囊 (f) 游离的果孢子萌发丝状体

图 5 雌性叶状体的发育

Fig.5 Development of F1 blades originated from female tissue culture

2.2.2 雄性叶状体后代的发育

雄性叶状体中同样发现雌、雄以及雌雄同体,其中雌性个体和雌雄同体只占极少数. 观察表明,雌性个体边缘全部为排列整齐的果孢子囊并大量放散果孢子(图 6(a)和(b)),放散后的果孢子进一步萌发丝状体(图 6(c));雄性个体及雌雄同体的发育状况与雌性后代群体中的对应性别个体完全相同.

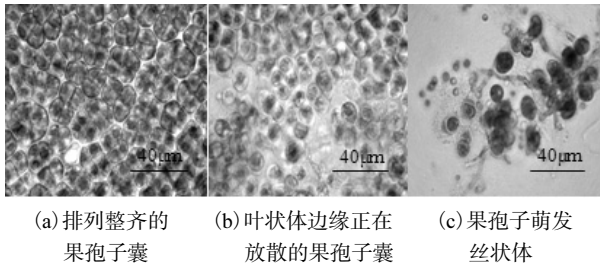


图 6 雄性叶状体的发育

Fig.6 Development of F1 blades originated from male tissue culture

3 讨论

据报道^[4],通过坛紫菜叶状体的单性生殖获得了纯合的单雌和单雄丝状体品系,并且由两种丝状体品系产生的叶状体后代也全部为同种单一性别的个体. 然而,本文的研究结果却表明,坛紫菜单性组织形成丝状体的过程不属于单性生殖,因为在丝状体形成前单性组织已经通过性逆转同时分化出两性生殖细胞. 其次,由丝状体产生的雌性或雄性叶状体后代中,由于部分个体发生性逆转而产生雌性、雄性以及雌雄同体性别表现,并非全部为单一性别个体. 性逆转现象在一些鱼类和高等植物的繁殖过程中较为常见,且被看作是物种生存和繁衍的一种策略^[6-8],但在包括紫菜属在内的大型藻类植物中几乎未见报道.

坛紫菜营养细胞和组织发育过程中性逆转的发生极有可能将单性生活史变为“有性”生活史,所以,之前报道中提到的由单性生殖获得的丝状体纯系很可能为两性生殖细胞自交的产物. 考虑到减数分裂过程中遗传重组的影响,紫菜的单株配子体亦可能是包含不同基因型细胞或组织的嵌合体^[2]. 因此,营养组织会由于性逆转和可能的“自交”过程产生携带不同等位基因的杂合丝状体,因此想要获得具有育种价值的丝状体纯系,必须以单细胞培养进行分离.

紫菜的性别发生机制一直是藻类学家争论的焦点之一,目前主要分为性决定^[9]和性分化^[5]两种观点. 关于坛紫菜的性别发生,目前较为认同的一种观

点是坛紫菜的减数分裂发生在壳孢子形成时期,决定别的等位基因发生分离,进而产生雌雄两种性别的单倍体壳孢子,属于性决定过程^[10]. 然而,本实验中坛紫菜的性逆转现象表明,其单个细胞能够分化产生雌雄两性生殖细胞或组织,这一发育现象是上述性决定观点无法解释的,相反,用性别分化进行解释更为合理. Tang 等^[5]对另一种雌雄同体的紫菜种类——半叶紫菜华北变种的研究同样表明了性别分化对紫菜性别发生的重要性. 坛紫菜的性逆转现象的发现为紫菜性别发生机制的研究提供了新的思路和方向,它表明仅用性决定来解释紫菜的性别发生还远远不够,研究者也不应该过分地关注减数分裂的发生时期,发育过程中的性细胞分化研究同样十分必要.

参考文献:

- [1] 顾勤英,沈颂东,项文钰,等. 坛紫菜的细胞发育研究[J]. 苏州大学学报:自然科学版,2005,21(3):78-82.
- [2] 王娟,戴继勋. 坛紫菜单性叶状体细胞的发育研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2008,38(3):419-423.
- [3] 王莉,孔凡娜,茅云翔,等. 坛紫菜配子体离体细胞发育研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2010,40(12):81-88.
- [4] 严兴洪,李琳,陈俊华,等. 坛紫菜的单性生殖与遗传纯系分离[J]. 高技术通讯,2007,17(2):205-210.
- [5] Tang Xiaorong, Jiang Hongxia, Fei Xiugeng, et al. New life cycles of *Porphyra katadae* var. *hemiphylla* in culture[J]. Journal of Applied Phycology, 2004, 16(6): 505-511.
- [6] Voeller B R. Gibberellins: Their effect on antheridium formation in fern gametophytes[J]. Science, 1964, 143(3604):373-375.
- [7] Ross R M. The evolution of sex-change mechanisms in fishes[J]. Environmental Biology of Fishes, 1990, 29(2):81-93.
- [8] Freeman D C, Harper K T, Charnov E L. Sex change in plants: Old and new observations and new hypotheses[J]. Oecologia, 1980, 47: 222-232.
- [9] Mitman G G, Van der Meer J P. Meiosis, blade development, and sex determination in *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 1994, 30(1):147-159.
- [10] 能登谷 正浩. 海苔の生物学[M]. 日本:成山堂书店, 2000:15-35.