

实验室条件下紫菜生活史多样性的观察

中 文 摘 要

目的: 试图寻找可能存在的紫菜单性生殖途径及其他发育方式,为紫菜生活史的完善、种质的保存以及育苗工艺的改进和创新提供新的方法和充分的依据。 **方法:** 根据紫菜叶片的特性对其进行分区培养,同时针对不同生长阶段运用固-液交替培养,观察记录紫菜完整生活史,并利用显微操作挑取单性丝状体。 **成果:** 在对条斑紫菜、半叶紫菜和坛紫菜培养过程中,获得了新的紫菜研究材料:类愈伤组织和膨胀细胞;首次得到了半叶紫菜精子细胞发育成的丝状体;条斑紫菜营养细胞再生植株普遍发生性别分化,且性细胞成熟、放散,受精后发育成果孢子。 **结论:** 实验室条件下,紫菜发育途径是多方向的,不同生殖模式决定了不同发育模式,而同一生殖模式也有多种发育途径;利用半叶紫菜叶状体的特殊形态进行雌雄细胞分开培养,证实了单性生殖的存在;条斑紫菜营养细胞发育行性别分化的机制。

关键词: 紫菜, 生活史, 多样性, 单性生殖

作 者: 项文钰

指导教师: 沈颂东

Life history Diversity of *Porphyra* Under Laboratory Conditions Abstract

The experiment was in search of the apomixis approach and other developmental ways of *Porphyra*, and to consummate its life history. So as to innovate and improve on idioplasmatic conservation and seedling culture technics.

Subarea culture of the *Porphyra* basing on the characteristic of thalli. I have used solid-liquid alternated method to cultivate different stages of *Porphyra* life history, from single cells to thalli and conchocelis. Observed the cellular developmental methods and got the photos of them. Pick up special growers and apomixis conchocelis depending on microoperation.

Finally I got plentiful callus-like tissue and bulgy cells as preferable materials for *Porphyra* research during the culture of *P. yezoensis*, *P. haitanensis* and *P. katadai* var. *hemiphylla*. In fact, I have obtained conchocelis developed from sperms of *P. katadai* var. *hemiphylla*. It was found that sex-differentiation was largely occurred during the culture of foliar cells of *P. yezoensis*.

Development approaches of *Porphyra* are diversified under laboratory conditions. Different procreating patterns determine different developmental methods, while several growth approaches come from one procreating pattern. Separate the male and female cells of *P. katadai* and culture separately according to the characteristic of the thalli. The results confirmed we that apomixis existed in *Porphyra* indeed. Meanwhile the foliar cells of *P. yezoensis* developed with sex-differentiation mechanism.

Key words: *Porphyra*, Life history, Diversity, Apomixis

Written by Wenyu Xiang

Supervised by Songdong Shen

苏州大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

研究生签名：项文钰 日期：2006.5.7

学位论文使用授权声明

苏州大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆、清华大学论文合作部、中国社科院文献信息情报中心有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。除在保密期内的保密论文外，允许论文被查阅和借阅，可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。论文的公布（包括刊登）授权苏州大学学位办办理。

研究生签名：项文钰 日期：2006.5.7
导师签名：沈敏东 日期：2006.5.7

序 言

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda)、半叶紫菜 (*Porphyra katadai* var. *hemiphylla*)、坛紫菜 (*Porphyra haitanensis* Chang et Zheng) 同属红藻门 (Rhodophyta) 红毛菜科 (Bangiaceae) 紫菜属 (*Porphyra*) 植物。

条斑紫菜主要在北方养殖, 呈紫红微带绿色, 其最显著的特点是白色或淡黄色精子囊群呈长条或长块状, 混杂在深紫红色的果孢子囊区域中, 而成花条斑纹状, 故而得名。自然条件下生长的长 30-40 厘米, 宽 3-5 厘米, 养殖好的叶长可达 1-2 米, 最长可达 3-4 米。实验室条件下条斑紫菜的生长发育途径以王素娟描述的最为详细, 总共可概括为 6 条: 正常苗、单孢子脱离原细胞壁成苗、单孢子在原细胞壁里直接成苗、细胞团释放单孢子成苗、果孢子放散发育成丝状体、精子放散。由于培养条件的不同, 其他发育途径和生长模式逐渐被发现。

半叶紫菜主要分布在北方沿海地区, 以其特有的叶状体形态而出名, 在成熟的雌雄同体株里, 精子囊区域和果胞囊区域被一条明显的分界线, 从假根部到顶端分成两个不等的部分 (Tseng, 1983)。另外半叶紫菜胶质层较薄, 叶面平整, 因此, 成为最近紫菜发育研究中常用的实验材料 (Yan 1987, 汤晓荣 1997, 汤晓荣 费修缙 1999, 姜红霞 2004)。

坛紫菜是我国南方主要的栽培品种, 主要分布于浙江、福建等地区, 属暖温性海藻。坛紫菜叶片较厚实, 细胞间藻胶含量高, 具有极高的食用价值和药用价值。

由于三种紫菜在形态、色泽、质地和化学组成上都有很大的差异, 因此本实验将这三种具有代表性的植物作为紫菜生活史多样性研究的主要对象。实验采取最接近自然状态和适合条斑紫菜生活史各阶段细胞生长的培养条件, 探求这三种紫菜特殊发育模式, 完善其生活史的多样性, 同时试图探究紫菜性别发育机制, 获得较纯的由单性细胞发育而成的丝状体, 为下一步染色体鉴定、基因对比提供材料, 进而解决紫菜研究史上悬而未决的难题。

第一章 文献综述

紫菜生殖的多样性

紫菜属红藻门 (Rhodophyta)、原红藻纲 (Protofloridaeophyceae)、红毛藻目 (Bangiales), 红毛藻科 (Bangiaceae)、紫菜属 (*Porphyra*)。关于紫菜的生活史及其多种生殖方式的观察从十九世纪后期就开始了, 通过对紫菜属不同种、不同时期的研究发现, 绝大多数紫菜种具有大型叶状体和微型丝状体两个世代 (Conway *et al.* 1975, Conway and Cole 1977), 而对这两个世代的研究又是建立在三种重要孢子的基础上的, 即: 与有性生殖相关的果孢子、壳孢子以及与无性生殖相关的单孢子。

一、有性生殖

紫菜营养细胞分化形成果胞囊细胞和精子囊细胞, 经过不断分裂分别形成大而色深的果胞以及小而无色的精子 (Conway and Cole 1977, Cole and Conway 1980)。然而由于刚开始有性生殖的证据并不充分, 所以对这些细胞的作用及其命名都有很多不同的看法。

1、紫菜两性细胞的发现

紫菜果胞细胞和精子细胞都发现得比较早, 但是 Hawkes (1978a) 提到当时 Janczewski (1873) 认为果胞细胞和精子都是从相同的孢子囊中产生, 使得一些学者就对这两种细胞在有性生殖里所起的作用表示怀疑 (Drew 1954, Conway *et al.* 1975), 并提出用 α -孢子替代果胞细胞, β -孢子替代精子细胞 (Conway 1964, 1977), 甚至有人提出 β -孢子的说法也不正确, 因为它没有紫菜细胞中普遍存在的色素体, 且没有看到其受精过程 (McDonald 1972)。同时由于果胞和精子的形成方式不明, 所以认为“果胞囊”和“精子囊”的命名也是不确切的 (Conway 1964), 建议改用果孢子母细胞 (Dixon 1973) 和 α -孢子母细胞 (Conway *et al.* 1975, Hawkes 1977a)。不过自从 1882 年, 首次报道了 Berthold 在 *Porphyra leucosticta* Thuret 里发现了有性生殖, 并指出果胞两极有微微突起以后, 大量有关紫菜有性生殖的研究就开始集中到受精过程中“果胞”与“精子”发生的变化上, 在得到大量关于雌雄孢子形成模式及其受精的证据以后, “精子囊”、“果胞囊”、“精子”、“果胞”的命名被确定 (Hawkes 1978a) 并沿

用至今。

2、紫菜两性细胞的受精过程

而对于有性生殖的研究思想基本分为两大类：1. 如果精子确实存在且发挥作用，就应该可以观察到其受精过程；2. 如果存在受精与核融合，那么合子就应该是二倍体细胞。首先藻类学家从光学显微镜和各种电镜照片上，看到了部分种紫菜精子细胞与果胞细胞受精时果胞萌发出的原受精丝(Tseng and Chang 1955, Drew 1956, Conway and Cole 1973, Hawkes 1977a, Cole and Conway 1980, Marilyn 1989)。然而不是所有的紫菜受精时都会萌发受精丝，根据果胞产生原受精丝的有无，Drew (1956) 提出受精可分为2种形式，有原受精丝的就靠其吸附精子，若没有受精丝的就出现管道状联系。接着 Hawkes (1978a)统计出了19种有原受精丝的紫菜和3种没有发现原受精丝的紫菜。但是对几种紫菜原受精丝的研究发现，其在形态上有很大变异，这可能意味着所有的紫菜都能产生原受精丝，只是有些被厚的、硬的细胞壁或者外力作用抑制了(Tseng & Chang 1955)，而单层细胞紫菜种在果胞两极都萌发出原受精丝，双层细胞紫菜种的果胞只在贴近表面的一极长成原受精丝 (Hawkes 1977a)也证明了这一点。由于原受精丝的发育并不如受精丝那么完全，因此其作用也一直受到大家的怀疑(Conway & Cole 1973), Hawkes (1978a)通过一系列电镜照片观察到附着在原受精丝上的小细胞有叶绿体的存在，证明了是精子在受精丝的一侧释放其内容物，而不是Kunieda (1939)所提出的菌的寄生，从而也证实了原受精丝确实起到了受精通道的作用。

此外 Hawkes (1978a)曾提到 Dangeard (1927) 发现了一个果胞细胞里2个靠的很近的正在融合的核，同时还发现其旁边有巨大核的细胞，在以后对于其他紫菜的研究中也发现了这一现象(Hawkes 1978a, Conway 1980, Wang and Xu 1984)。这些融合后的细胞经过24小时分裂形成果孢囊，受精后第三天放出果孢子 (Marilyn 1989)。

3、紫菜有性生殖完整过程的发现

在 Batters(1892)所报道的壳斑藻(*Conchoceles rosea* Batters)的本质没有被发现之前，大家对紫菜果孢子在自然界的发育途径的猜测可以分为四类(马家海和蔡守清, 1996)：1、Berthold(1881, 1882)、Kunieda(1939)、须藤(1948, 1950)等人提出的休眠说，即：果孢子以休眠状态度过夏季，秋天萌发后成为紫菜的幼芽，果孢子的丝状体

萌发是一种异常萌发；2、殖田(1929、1937)、日下部(1929)、和田(1941)、木下(1943、1949)、涉谷(1941、1942)提出夏季小紫菜说，即：果孢子不经过休眠，马上萌发成小紫菜，以幼小的夏季紫菜状态渡夏，果孢子的丝状体萌发是异常的；3、Kylin(1922)、Rees(1940, 1940a)等认为：果孢子的萌发丝状体进一步产生孢子；4、Dangeard(1931)等提出：果孢子的萌发丝状体上产生紫菜的幼苗。直到 Drew (1949) 发现胶形紫菜(*P. umbilicalis*)的果孢子的萌发丝状体钻入贝壳内层，成为一种穿贝藻类，而它和壳斑藻同是一物。最终提出在红毛菜科里普遍存在着异型世代交替的现象(黑木宗尚 1953, 曾呈奎 1954)。不过也有例外，在自然界 *Porphyra linearis* (Bird 1973) 和 *Porphyra carolinensis* (Freshwater and Donald, 1989) 的生活史里不存在丝状体。

成熟的果孢子发育成丝状体，与叶状体不同，丝状体营养细胞之间存在孔状联系 (Cole and Conway, 1975, 朱家彦等, 1984, 沈颂东等, 2000)。在固体培养基上有两种形态的丝状体(Conway and Cole, 1977)：松散的丛状丝状体、紧密的团状丝状体，而在液体中培养则形成大量自由丝状体 (Dixon & Richardson, 1969)。不论何种形态的丝状体，都会从营养细胞分化出一些具有星状色素体的矩形细胞，这些细胞经过分裂成熟，最终释放出壳孢子 (黑木宗尚 1953, 曾呈奎 张德瑞 1954)。壳孢子的放散和发育条件在不同种间具有特异性(Chen *et al.* 1970, Waaland 1987, Sidirelli-Wolff 1992, 汤晓荣 费修纓 1998, 1999)，但都会长成小叶状体，且量大，因而成为目前经济紫菜育苗的“种子”。

果孢子染色体数目

这样，从形态学角度证实了有性细胞的存在及果孢子产生和发育的过程，完成紫菜生活史最基本的循环(Polne-Fuller and Gibor, 1984)。然而仅仅这样并不能解决有性生殖的本质问题，即果孢子的染色体是否加倍，其发育产物的染色体数目有无减半。

4、紫菜有性生殖的本质

自从 Magne (1952) 和 Kito (1967) 分别发现了 *P. linearis* 的二倍体果孢子和 *P. yezoensis* 的二倍体丝状体营养细胞以后，一些藻类学家又陆续发现有 22 种紫菜的果孢子为二倍体，而其中有 9 种紫菜的丝状体营养细胞也是二倍体(Hawkes 1978a)。可见，精子与果胞细胞确实发生了融合，有性生殖确实存在。

然而为何大部分紫菜种里的果孢子是二倍体，而其发育而成的丝状体营养细胞是单倍体呢？首先想到的就是发生了减数分裂。

通过形态学研究和染色体数目的观察, 有性生殖在紫菜属绝大多数种内都存在, 那么减数分裂的发生也自然应伴随存在, 但是, 由于紫菜染色体较小, 且在染色过程中不易分散, 同时细胞质也能被染上很深的颜色, 影响观察(Mitman and Meer, 1994), 因此无法通过常规手段观察到减数分裂发生的过程, 而对减数分裂发生的时期也出现了各种猜测, 基本认为可以分为三类(Hawkes 1978a, Mitman and Meer 1994): Ishikawa (1921)、Dangeard (1927)、Magne (1952) 和曾呈奎、张德瑞 (1955) 早期认为受精果细胞的第 1、2 次细胞分类是减数分类, 果孢子是单倍体。Migita (1967)、Kito (1968, 1974, 1978) 提出了减数分类在丝状体上的孢子囊枝产生壳孢子时期。而马家海等 (1984) 通过对条斑紫菜壳孢子核相的观察, 发现其具双相核, 认为紫菜减数分裂发生在壳孢子萌发时最初的两次分裂, 而 Ohme & Miura (1988)、Tseng & Sun (1989) 等对条斑紫菜的观察也都印证了这一点, 所有的实验都表明了由丝状体产生的壳孢子仍具双相核。

Ohme 等 (1986) 首先对条斑紫菜开展紫菜遗传学方面的研究, 通过对色素突变体的观察, 发现不同色块藻体存在于同一株藻体且不同色块产生的比例符合孟德尔遗传规律, 而推断减数分裂发生在壳孢子萌发时期。此后通过色素突变体的研究也间接证明了壳孢子萌发的最初两次分裂是减数分裂: *P. purpurea* (Mitman and Meer 1994), *P. yezoensis* (严兴洪等 2000), 许璞等 2002, 2003), 甚至提出如果在紫菜中存在性等位基因, 那么减数分裂过程中一对决定颜色的等位基因可能与这个性等位基因是相关联的(Miura and Kunifuji 1980, Mitman 1992, Mitman and Meer 1994)。壳孢子减数分裂为四分子体的萌发模式也有了初步研究(Ohme *et al.* 1986, Ohme and Miura 1988, Mitman and Meer 1994)。然而减数分裂发生的位点究竟在哪还需要更多更深入的研究和更充分的直接证据。

二、无性生殖

1、最普遍的单性生殖模式——单孢子

在紫菜属中, 单孢子被认为是与无性生殖相联系的 (Dixon 1973)。Conway *et al.* (1975) 根据单孢子的来源和发育途径来看, 将其分为两大类: 一类是从丝状体上的单孢子囊中放散出的单孢子, 行单极发育模式而长成丝状体(Conway and Cole 1977, Wada 1941)。另一类是从幼嫩的叶状体上自然崩解放散出的或成熟叶状体酶解后得到的单孢子, 行两极发育模式而长成小的叶状体 (Conway 1975, Hawkes 1978b, 1980,

李世英、崔广法 1980, Zhao & Zhan 1981, 马家海、申宗岩 1996,)。

对于第一类型的单孢子的研究比较少, 单孢子囊从形态上可以与壳孢子囊区分开, 其中壳孢子囊细胞是矩形的, 而单孢子囊细胞是球形的, 某些单孢子会发生原位萌发, 形成原丝状体的分枝 (Conway and Cole 1977)。

而关于第二类型的单孢子, 以前所谓的“变形孢子”(Cole & Conway, 1980)、类孢子细胞(Chen, 1986), 很多研究认为这种孢子的发育是自然界紫菜大量存在的原因, 且能作为新的育苗“种子”和优良品系筛选的研究材料 (Hawkes 1978b, 1980, Hafting 1999)。因此如何促使单孢子放散 (李世英等 1988, 侯旭光 梅俊学 1999, 汤晓荣 费修缙 1998, 1999), 如何酶解得到大量单细胞和原生质体 (Dai *et al.* 1993, 戴继勋等 1988, Packer 1994), 如何保存这些单细胞 (严兴洪等, 1990), 成为研究的热点。有些种的紫菜在整个生活史中都没有出现丝状体, 它们的主要繁殖方式就是直接通过叶状体释放单孢子的无性生殖 (e.g. *P. carolinensis* Freshwater and Kapraun 1986, Freshwater and Donald 1989), 还有些虽然有丝状体, 但是自然界中仍然以单孢子形式繁殖 (eg. *P. monosporangia* 王素娟和章景荣 1980), 这些没有发生世代交替全年都是叶状体阶段的紫菜, 在自然条件下可以长足 6—8 个月 (Freshwater and Kapraun 1989), 而其他有丝状体阶段的紫菜一般只能长 4—6 个月, 这样为紫菜育苗提供更充裕的时间。

2、无性繁殖的几种特殊途径

对于一些特殊的细胞和孢子的发育也正在进行研究, 例如紫菜愈伤组织和类愈伤组织, 在紫菜发育途径里也被认为属于无性生殖 (Polne-Fuller *et al.* 1984)。

紫菜叶状体剪碎后得到的单孢子以及酶解下的紫菜单细胞在合适的条件下, 在固体培养基上能长成愈伤组织和类愈伤组织 (eg. *P. perforata*, *P. lanceolata*, *P. yezoensis* Polne-Fuller & Gibor 1984, *P. carolinensis* Freshwater and Kapraun 1989), Polne-Fuller and Gibor (1987) 认为酶解下的紫菜单细胞只在固体培养基上长成愈伤组织和类愈伤组织, 在液体里并不出现, 因此紫菜愈伤组织和类愈伤组织是一种非正常生长形式。然而 Liu & Kloareg (1991) 在液体培养基里得到了 *P. umbilicalis* 的愈伤组织, 同样 Chen (1987) 也获得了 *P. leucosticta* 的类愈伤组织。虽然紫菜愈伤组织和类愈伤组织的发生机理还不清楚, 但是有一点是肯定的, 都是酶解或者剪碎后受到一定程度刺激才会形成的。

对于愈伤组织和类愈伤组织的培养研究有两种不同的结果(表 1): 一是无法获得任何分化形式的生长, 只是通过不断分裂、扩增保存两年以上(Polne-Fuller and Gibor 1990); 二是通过培养条件的变化长成叶状体或者丝状体 (eg. *P. perforata* Polne-Fuller & Gibor 1984, 1986, *P. leucosticta* Chen 1987, *P. haitanensis* 王志勇等 1996)。

表 1: 几种紫菜的愈伤组织和类愈伤组织在不同培养基上的生长结果

Species	Medium	Results	Reference
<i>P. perforata</i>	PES(l)	Thallus	Polne-Fuller et al. 1984
<i>P. lanceolata</i> , <i>P. yezoensis</i> , <i>P. perforata</i>	PES(l)	Thallus	Polne-Fuller et al. 1986
Hybrid cells of <i>P. yezoensis</i> (wild type and green type)	PEG(l)	Thallus	Fujita and Migita 1987
<i>P. leucosticta</i>	TC-11(l)	Release "spore-like" cells and grow into thallus	Chen 1987
<i>P. linearis</i>	TC-11(l)	Thallus	Chen et al. 1987
<i>P. carolinensis</i>	VSE(l)	No diferetation	Freshwater and Donald 1989
<i>P. perforata</i>	PES(s)	No diferetation	Polne-Fuller and Gibor 1990
<i>P. lanceolata</i> , <i>P. nereocystis</i> , <i>P. schizophylla</i>	PES(s)	No diferetation	Polne-Fuller and Gibor 1990
<i>P. umbilicalis</i> *	La(l)	Thallus and conchocelis	Liu and Kloareg 1991
Hybrid cells of <i>P. yezoensis</i> and <i>P. haitanensis</i>	PES(l)	No diferetation	Dai J X et al 1993
<i>P. haitanensis</i>	PES(s)	No diferetation	Wang et al 1996
	PES(l)	Thallus	

注: *只有在该种紫菜愈伤组织的培养基中加入了 NAA 或者低浓度的 KT 时, 才长出丝状体, 如果加入一定浓度比例的 2, 4-D 和 KT 时则长出叶状体。

Polne-Fuller & Gibor (1986, 1987) 提出这些细胞团可以作为将来紫菜栽培的种质而储存, 并开始了进一步的研究, 即用植物激素来刺激诱导其分化发育, 然而实验也出现了两种结果。首先 Polne-Fuller & Gibor (1987) 认为高等植物愈伤组织培养常用的生长素和植物激动素并不能刺激海藻愈伤组织和类愈伤组织的发育, 也不会影响其形态。而 Liu & Kloareg (1991)、Aguirre-lipperheide *et al.* (1995) 却用常规植物激素诱导出了叶状体或者丝状体。总之, 由于不清楚海藻生长因子及其机制, 因此目前还无法促进大量愈伤组织有目的地分化和生长。

由于愈伤组织和类愈伤组织有无限分裂增殖的能力, 且细胞间是完全独立的, 所以对其诱导分化的研究还是非常有必要, 如果诱导成功的话, 那这些细胞就是非常好的种质保存对象。根据前人研究孢子和单细胞发育的经验和依据, 今后对愈伤组织和类愈伤组织的研究应该放在两个方面:

1、通过超微结构的观察, 并和其他三种孢子以及叶状体、丝状体两种形态营养细胞超微结构的比较, 判断愈伤组织、类愈伤组织功能和可能发育的方向。在对一些紫菜几种孢子的超微结构比较(Hawkes 1980, 朱家彦等 1980, Puschel and Cole 1985) 发现, 无论是发育为叶状体的单孢子、壳孢子, 还是发育为丝状体的果孢子, 都含有大、小两种液泡, 这些液泡都与细胞的附着能力有关。这三种单细胞被释放以后, 这些液泡驱动着细胞做变性运动以找到合适的附着点。另外这些单细胞都有显著的星状色素体和中央淀粉核, 而细胞核则被压至边缘。如果愈伤组织和类愈伤组织也具有相似的液泡和完整的细胞器, 那么它们就有发育为叶状体和丝状体的潜力。

2、由于愈伤组织和类愈伤组织的细胞要比其他细胞小得多, 且在固体培养基上的生长情况与菌落相似, 因此可以将激素的范围扩大, 而不局限在植物激素, 对细胞进行刺激和诱导, 同时通过改变各种环境条件, 设法使之分化发育, 为今后紫菜的栽培和育苗提供新的材料。

另外为了能获得更优良的品种, 人们在原有无性生殖途径培养的基础上开始了新的研究, 即通过酶解得到的同种紫菜不同突变体之间、不同种紫菜之间甚至紫菜跟其他不同属之间的原生质体细胞融合的技术 (Fujita and Migita 1987, 戴继勋等 1990, Dai *et al.* 1993, Mizukami 1995), 创造出更加适合生产、营养价值更高的紫菜新品种, 提高经济效益, 同时作为典型的大型海藻, 紫菜的发展将为我国其他大型海藻的发展奠定基础, 充分利用我国丰富的海藻资源。

至此, 经过不断的修正和补充, 紫菜的生活史已经趋于完善。

第二章 条斑紫菜生活史多样性的观察

一、实验材料与方法

1、材料、试剂与仪器

条斑紫菜，采自连云港海域，风干后带回实验室-20℃冷冻保藏；

海水从东台紫菜育苗基地运来实验室；

消毒海水是天然海水煮沸后冷却；

营养海水（消毒海水+50ppm NaH_2PO_4 + 5ppm NaNO_3 ）；

无水葡萄糖（分析纯）；

琼脂糖（BIOWEST AGAROSE REGULAR）；

固体培养基（营养海水+0.8%琼脂糖煮沸后铺在6孔培养皿上）；

海螺消化腺粗提的海螺酶混合液，加入2mol/L 葡萄糖混合而成。

光照培养箱（Zhu Jiang LRH-250-G2）；

冷冻离心机（SIGMA 3K30）；

显微镜（OLYMPUS IX71）；

数码相机（OLYMPUS Z5050）；

拉针器（NIKON MF-900）及毛细管；

显微操作仪（NIKON NARISHIGE NT-88NF-N2）；

移液器（Finnpipette Digital 200-1000 μl , 40-200 μl , 1-10 μl ）及枪头；

筛绢（200目、300目、400目各1块）；

高温灭菌：毛笔、镊子、手术剪、青霉素小瓶、刮子；

其他：6孔培养皿（辐照灭菌）；锡纸；1.5ml Eppendorf管。

2、条斑紫菜叶状体原生质体的获得和培养

取出冷藏的条斑紫菜叶状体放入消毒海水中，15℃，2500-3000Lux，12h·D⁻¹，复苏24小时，挑取状态良好的条斑紫菜叶状体在消毒海水中漂洗一次，去除泥沙，放入0.7% KI消毒10分钟，再转移至消毒海水中，用沸水消毒的毛笔刷洗3遍，无菌的吸水纸吸干后放入青霉素小瓶中剪碎，加入海螺酶混合液，15℃，锡纸包裹后酶解2-4小时，其中每过一个小时显微镜下观察一次，当酶液中有单细胞，且紫菜碎片

边缘细胞疏松时酶解结束。

用 200 目的筛绢包裹混有紫菜细胞的酶液，用机械的方法过滤，滤液再依次通过 300 目和 400 目的筛绢，最终得到只含有单细胞和双细胞（细胞正处于有丝分裂后期或末期，酶液无法分离）的混合液，用移液枪转移至 Eppendorf 管，10℃，8000rpm 离心 5min，弃上清后加入消毒海水，摇匀，10℃，8000rpm 离心 5min，再重复 2 次至酶液基本洗去，加入适量营养海水，调节细胞浓度至 10^5-10^6 个细胞/mL，平铺到预先准备好的固体培养基上。放至光照培养箱，15℃，2500-3000Lux，12h·D⁻¹，培养第一周，每天观察一次，以后每 3 天观察一次。

3、成熟条斑紫菜分块培养的观察

挑取状态较好的 10 株紫菜叶状体，分剪成顶端、中部、假根部 3 段，同样分别处理得到细胞悬液后铺板培养，由于假根区胶质厚，因此得到的是碎片悬液铺板培养。每株每个部位的细胞铺 6 个孔，每个孔随机挑取 2 个视野，每 3 天显微镜下观察一次，15 天的时候对细胞进行计数和统计分析。

当条斑紫菜的果孢子萌发出细丝，离体营养单细胞和单孢子发育成 2~4 个细胞以上的小苗时，在显微镜下用拉好的 10~12μm 的毛细管将其一一挑出分别移入装有液体营养海水的 96 孔培养皿中，其中丝状体转到 25℃，2500-3000Lux，12h·D⁻¹ 的光照培养箱中培养，叶状体放在原培养箱中培养。

4、冷冻保存一年的壳孢子存活能力的观察

2003 年 10 月份取新鲜壳孢子加入 20% 甘油-20℃ 冷冻保存，2004 年 10 月份取出，用移液枪转移至 Eppendorf 管，10℃，8000rpm 离心 5min，弃上清后加入消毒海水，摇匀，10℃，8000rpm 离心 5min，再重复 2 次至甘油基本洗去，加入适量营养海水，调节细胞浓度至 10^5-10^6 个细胞/mL，平铺到预先准备好的固体培养基上。放至光照培养箱，15℃，2500-3000Lux，12h·D⁻¹。

二、结果与分析

1、成熟条斑紫菜单细胞发育途径

在固体培养基上条斑紫菜各类细胞原生质体的发育途径有 10 种，其中营养细胞 5 种，果孢子 3 种，精子囊细胞 1 种，假根细胞 1 种。

(1) 直接成苗型:

营养细胞原生质体首先长出细胞壁, 经 2~4 天的培养后, 单细胞的一端先横分裂为 2 个子细胞形成原始叶状体; 另一端伸出突起逐渐发展成假根 (图 1)。然后上端子细胞先横分裂 (图 2), 再经过 8-12 次横分裂后就会发生纵分裂 (图 3), 然后成为叶状体; 原始假根也进一步分裂长成粗壮发达的假根 (图 4)。它的发生基本上同孢子萌发而形成的小紫菜一样。最终形成的苗有正常苗和畸形苗之分 (图 5-7), 通过计数统计, 其中正常苗量占总苗量的 85% 以上。在小苗阶段, 苗的顶端或者整体会自发裂开, 放散出单孢子, 形成苗簇 (图 8、9)。

(2) 单孢子囊型:

营养细胞原生质体长出细胞壁, 4-6 天培养后, 内部进行数次分裂后 (也有少数不分裂), 放出单孢子, 单孢子再长出细胞壁, 然后生根成苗, 成苗过程与营养细胞直接成苗相同 (图 10-11)。

(3) 分裂成苗型:

与单孢子囊型不同, 营养细胞原生质体 48 小时以内进行 1-2 次完整的细胞分裂, 因此没有放散现象, 分裂后的细胞再各自成苗 (图 13-15)。

(4) 细胞团型:

营养细胞培养 6-8 天, 经多次分裂成细胞团, 细胞排列紧密, 几乎看不到细胞之间的界限, 形状有椭圆形、不规则的片形等, 颜色呈较深的黄褐色 (图 16、17), 其中有些细胞团在培养 15-18 天以后崩裂, 全部以单孢子的形式放散, 形成苗簇 (图 18)。

(5) 类愈伤组织型:

营养细胞原生质体经过不断分裂去分化形成类愈伤组织, 颜色为黄褐色 (图 19), 当细胞越聚越多, 成为类愈伤组织团, 颜色加深为黑色 (图 20)。当转移至液体培养基, 用移液枪吹打后, 细胞间会互相分离, 形成单个愈伤组织细胞 (图 21), 细胞不断分裂, 有些分裂后的细胞会长成跟原来细胞大小、颜色一致 (图 22), 且有紫菜特有的荧光效应 (图 23、24)。但有些细胞会越分裂越小, 且颜色越来越淡, 最终变为无色 (图 25), 但是细胞并不死亡, 仍然继续分裂, 可能是类愈伤组织进一步退分化形成真正的愈伤组织。

(6) 丝状体型:

果孢子从果孢子囊中放散出来 (图 26), 本体从不同方向分裂出 1-3 条细丝状的营养细胞 (图 27), 本体并不象叶状体营养细胞那样分裂, 即所谓的单极萌发。随着

营养细胞的不断分裂，细丝开始分叉，其中有些可能是丝状体营养细胞发育成单孢子后的原位萌发（图 28）。1-2 个月后即可长成丝状体团，且有壳孢子囊枝的形成（图 29）。

（7）壳孢子囊枝型：

果孢子没有长出明显的细丝结构，而是直接分裂为 1 列细胞的长条形组织（图 30），分裂到一定程度后，细胞一分为二，变为 2 列细胞的长条形组织，并成团（图 31）。因为在合适条件下这些细胞不分散，而是在原位萌发出假根，长成小苗（图 32），因此这些长条形细胞可能就是壳孢子囊枝。

（8）膨胀细胞型：

果孢子不长细胞壁，而是在内部发生细胞质分裂，细胞体积不断膨胀，达到正常单细胞的 5—100 倍，因此我们称为膨胀细胞（图 33—37），它们中有些发生不规则分裂后就无变化（图 38—44），而其他则裂解、死亡（图 45、46）

（9）精子细胞的发育：

精子囊细胞在培养 24-48 小时后就放散出精子，跟踪观察的精子细胞全部消亡（图 47—50）。

（10）假根细胞的发育：

来自基部的细胞原生质体在培养的 3-4 天后一端产生突起逐渐长成非常细长的假根，以后不会产生较大的变化（图 51）。

2、成熟条斑紫菜分块培养的观察

经过 15 天的培养，细胞发育方向已基本定形。经过对各类细胞发育产物的计数统计，条斑紫菜顶端细胞有 92% 以上发育成丝状体，5~7% 发育成叶状体，2~5% 为其他发育途径，中部细胞有 80~85% 发育成叶状体，10~12% 发育成丝状体，4~6% 为其他发育途径，而假根细胞只是在细胞本体长出细长的假根，没有其他途径的发育。但是在假根区细胞的培养过程中出现了很多绿藻，而顶端和中部的细胞在培养过程中没有出现（图 52—54）。

3、冷冻壳孢子的培养观察

壳孢子经培养一周，显微镜下观察，已经基本都死亡，继续放置光照培养箱。3 个月后发现固体培养基表面出现一些黄褐色斑点，直径约 2mm，解剖针挑出放至液体

培养基中，打匀后观察，发现为类愈伤组织，且细胞个体要比营养细胞退分化形成的类愈伤组织细胞大，颜色偏桔黄（图 55）。

4、实验室条件下条斑紫菜的完整生活史

通过固液交替培养，即叶状体酶解后的单细胞在固体培养基上培养，15℃，2500-3000Lux，12h·D⁻¹；发育成的苗和丝状体都单个挑至 96 孔培养皿液体环境培养，丝状体培养条件改为 25℃，2500-3000Lux，12h·D⁻¹，苗培养条件不变。结果发现，当苗长到叶径长约 1mm 左右时，分化出了性细胞，并有已经受精的果胞细胞(图 56-58)，再经过 2 个星期的培养，发现培养液中有放散出的果孢子，随后发育成丝状体（图 59-63）。固体培养基中的苗没有发生性细胞分化。

丝状体改变培养条件后，壳孢子囊发育成熟，1 个星期后放散出壳孢子，壳孢子有的粘附在培养皿底部，发育成苗，有的直接悬浮在液体培养基中成苗（图 64）。此时固体培养基中的丝状体没有壳孢子放出。

至此，在实验室条件下，完成了条斑紫菜的整个生活史的循环（图 65）。

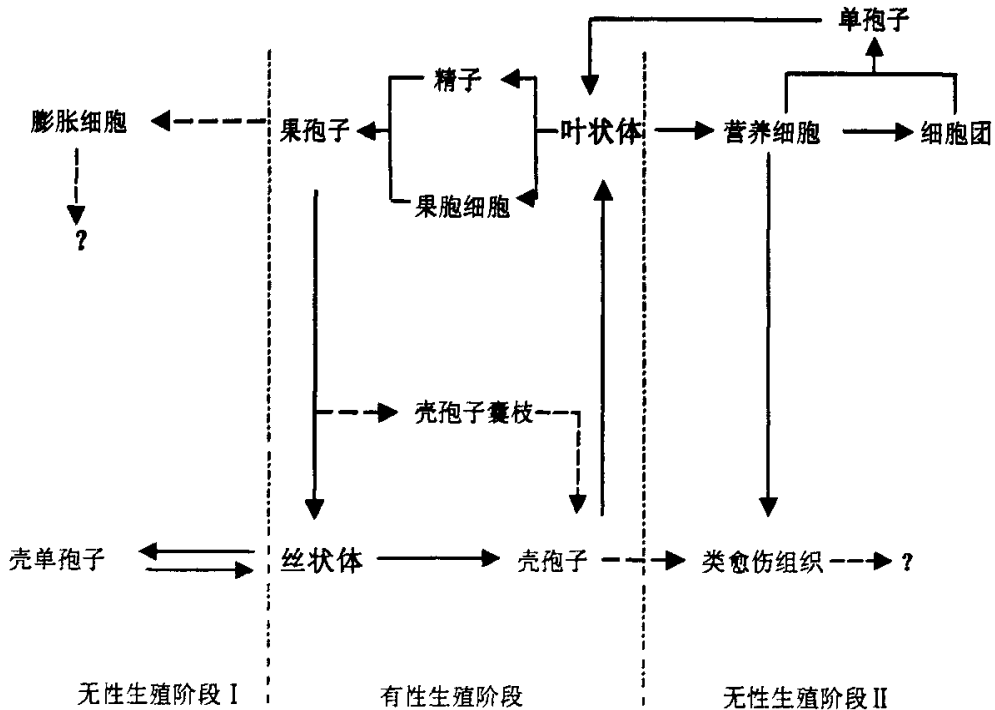
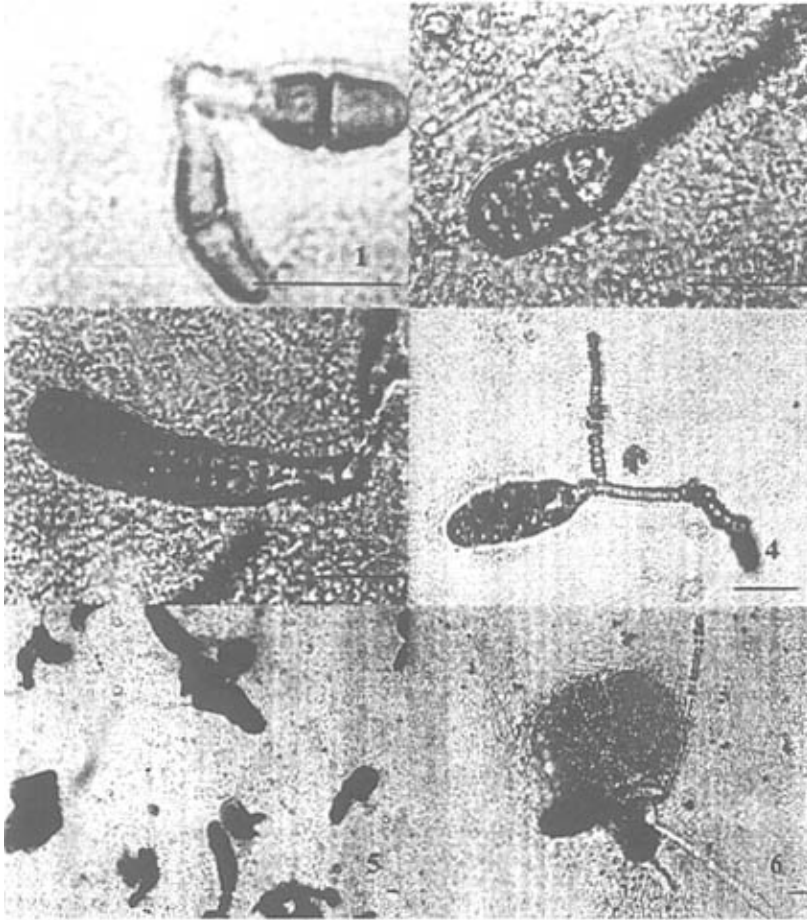


图 65 条斑紫菜生活史

注：实线箭头表示的是常规的发育途径；虚线箭头表示的是本次实验中发现的新发育途径。



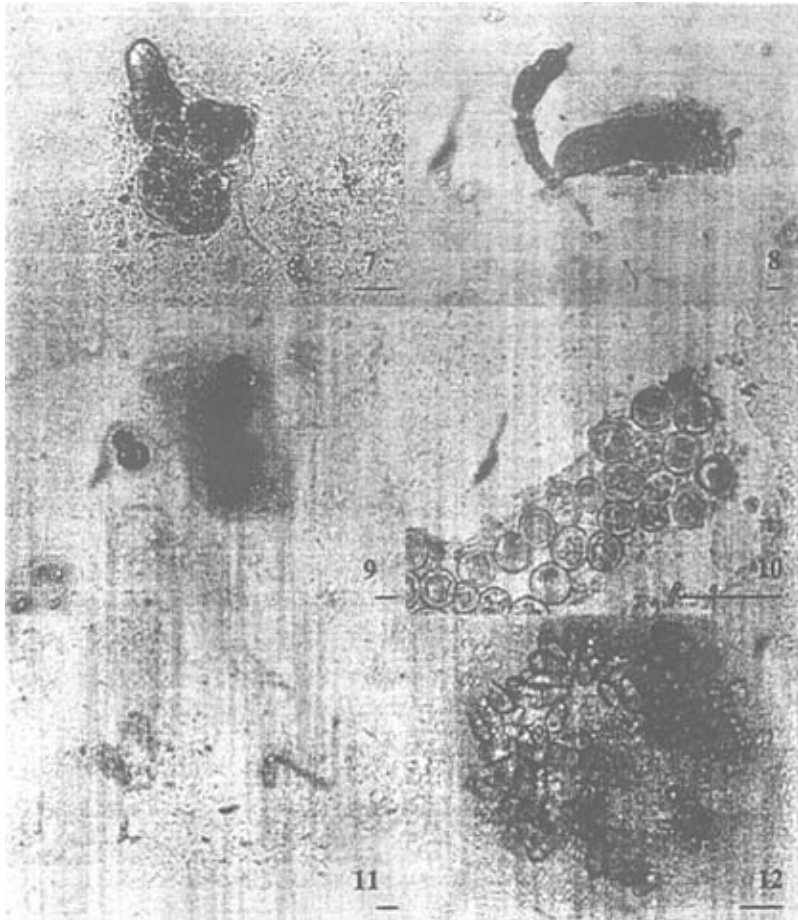
(比例尺=20 μ m)

图 1: 条斑紫菜单细胞的两极发育形态;

图 2~3: 细胞发育成小苗的模式, 顶端细胞先横分裂, 分裂至 8—12 细胞后纵分裂;

图 4: 紫菜细胞假根的发育;

图 5~6: 单细胞发育成的正常苗。



(比例尺=20 μ m)

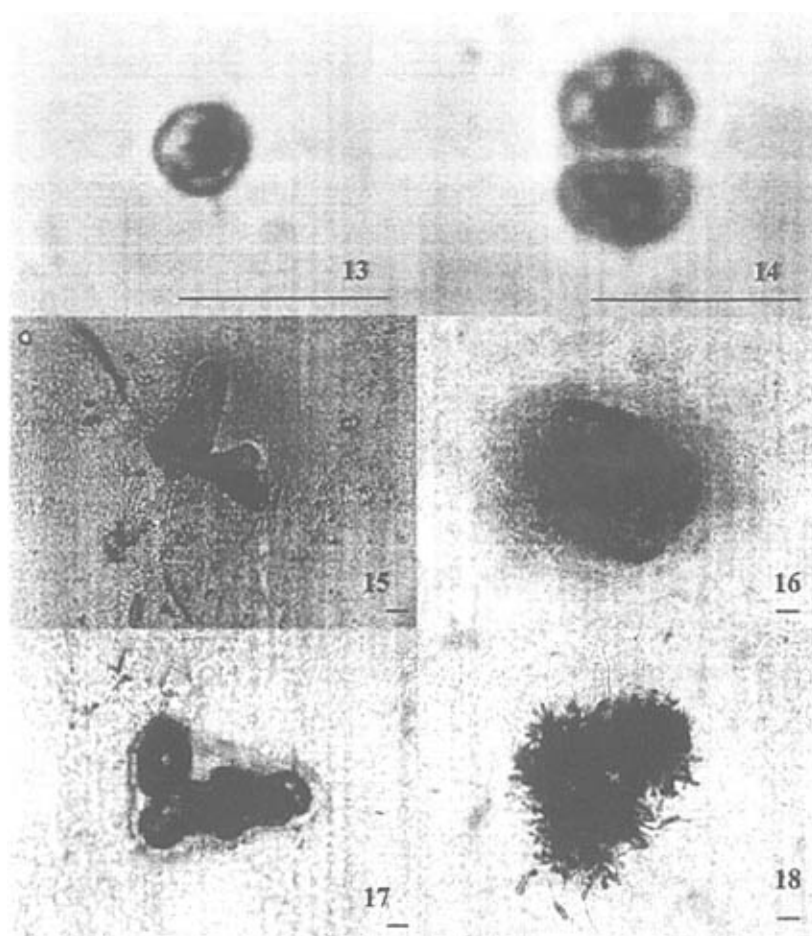
图 7: 单细胞发育成的畸形苗;

图 8: 苗生长到一定程度后停止发育, 而在顶端释放单孢子, 形成苗簇;

图 9: 苗整体崩解释放单孢子, 形成苗簇;

图 10~11: 单孢子囊的形成和单孢子放散;

图 12: 单孢子囊放散单孢子形成苗簇。

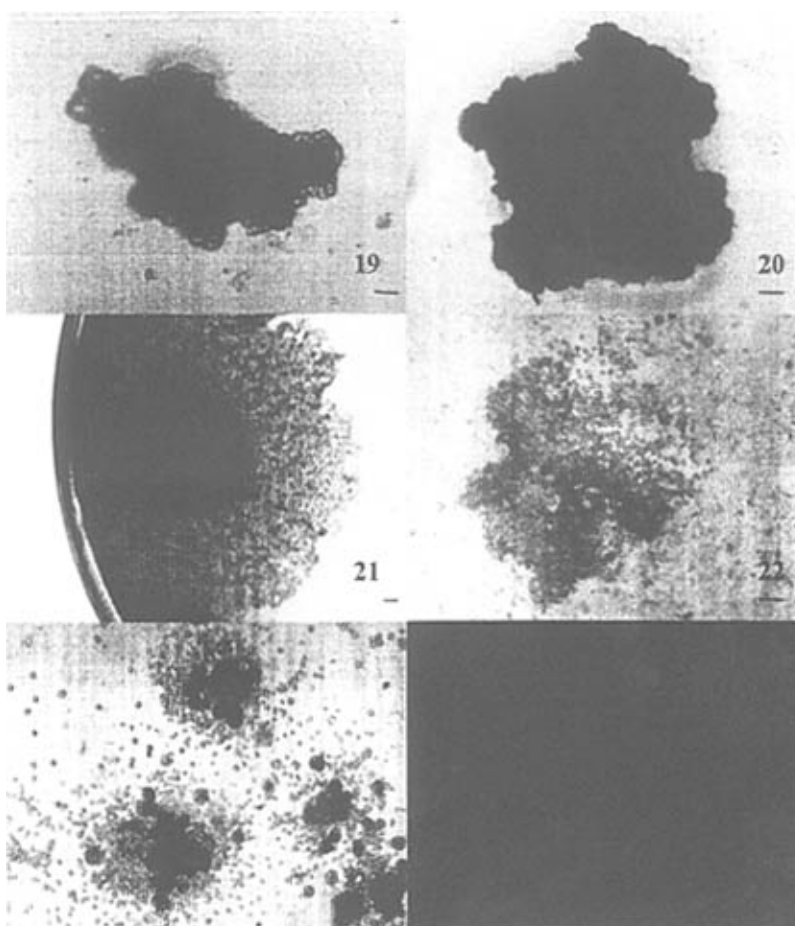


(比例尺=20 μ m)

图 13~15: 营养细胞原生质体分裂后成苗的发育过程;

图 16~17: 单细胞分裂生成细胞团;

图 18: 细胞团裂解, 放散出单孢子, 成苗簇。

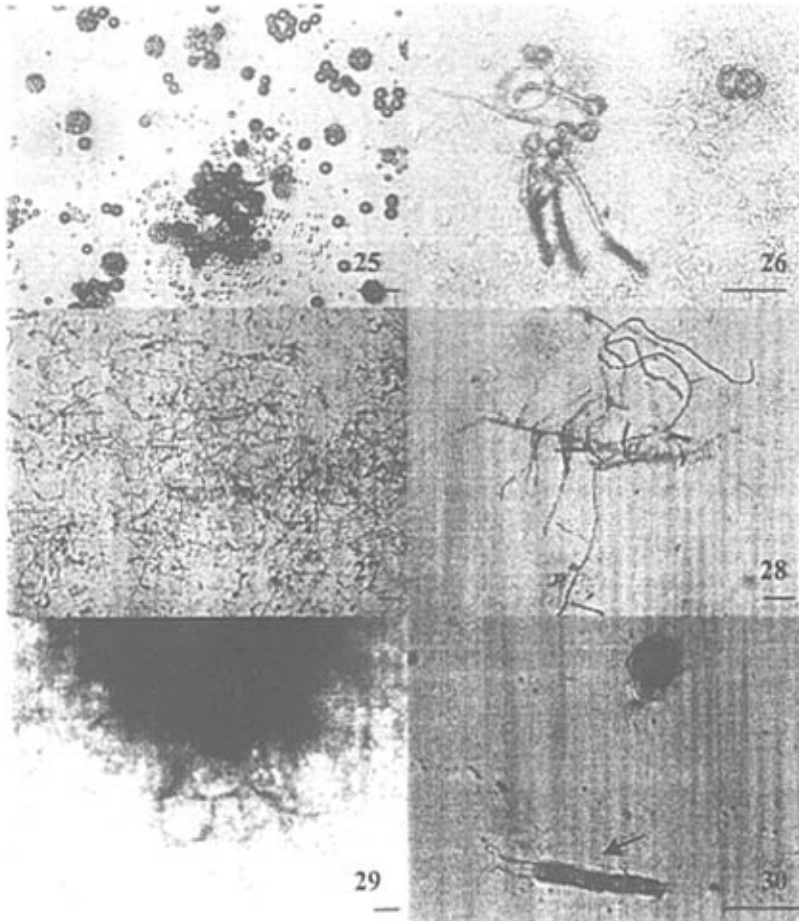


(比例尺=20 μ m)

图 19~20: 固体培养基上类愈伤组织团的形成;

图 21~22: 类愈伤组织从固体培养基转移至营养液中吹打后, 细胞之间互相分开, 有些细胞分裂次数越多, 细胞越小, 有些则不变;

图 23~24: 类愈伤组织具有荧光效应。



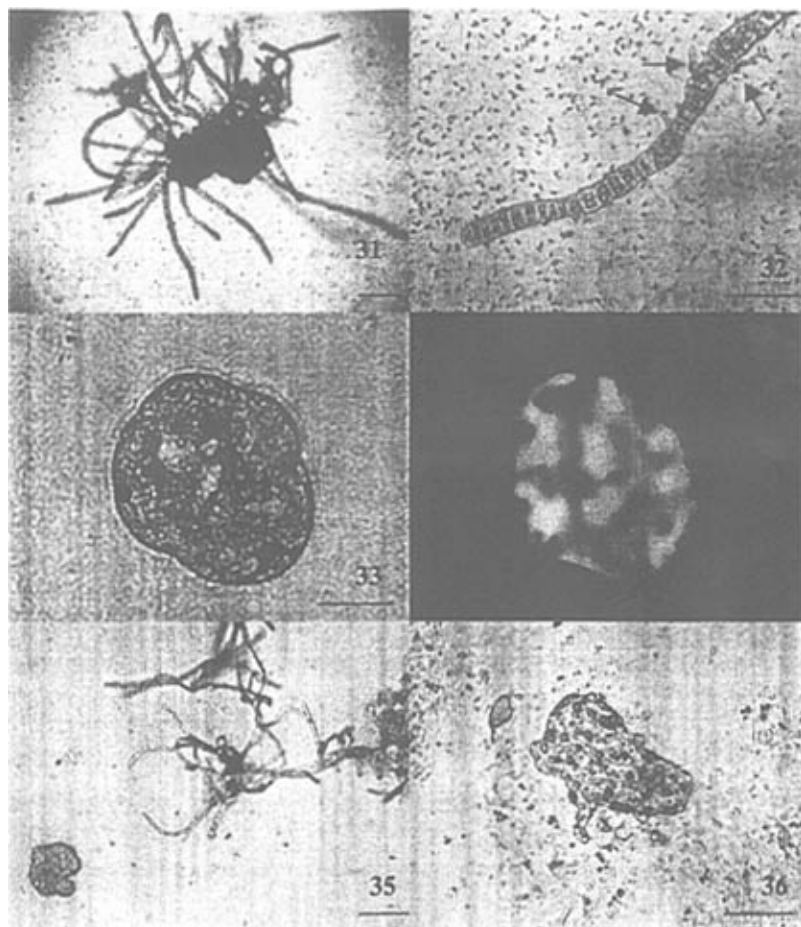
(比例尺=20 μ m)

图 25: 类愈伤组织细胞会越分裂越小, 且颜色越来越淡, 最终变为无色;

图 26~27: 果孢子从果孢子囊中放散出来, 发育成丝状体;

图 28~29: 丝状体营养细胞发育成单孢子后发生原位萌发, 细丝互相缠绕成丝状体团;

图 30: 果孢子没有长出明显的细丝结构, 而是直接分裂为 1 列细胞的长条形组织。

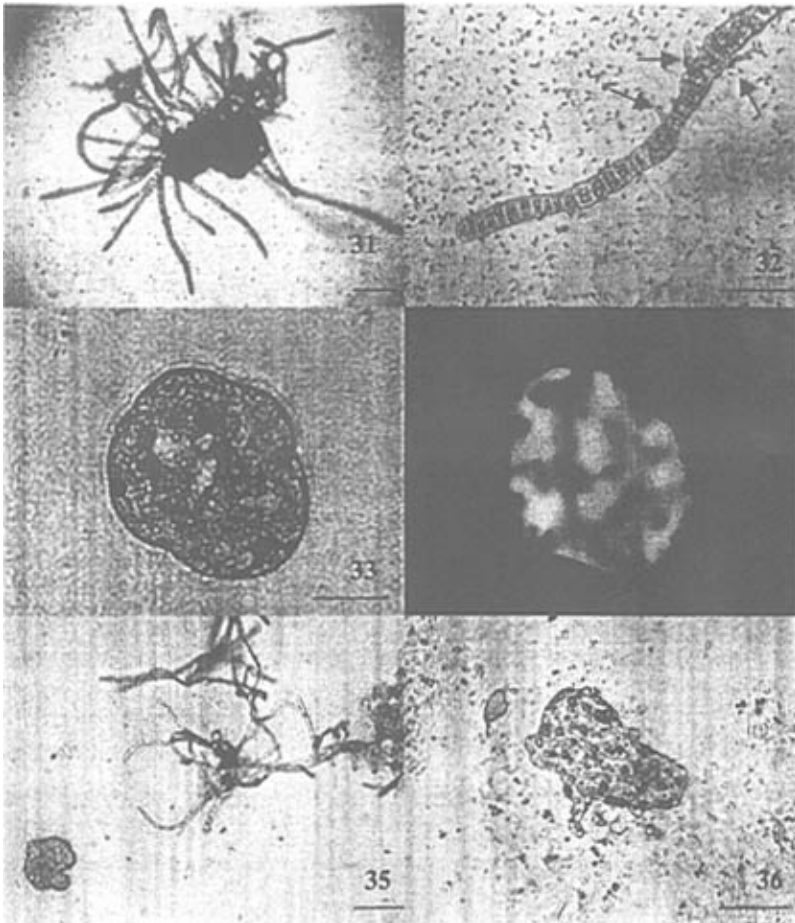


(比例尺=20 μ m)

图 31: 许多果孢子萌发出的长条形组织聚成团;

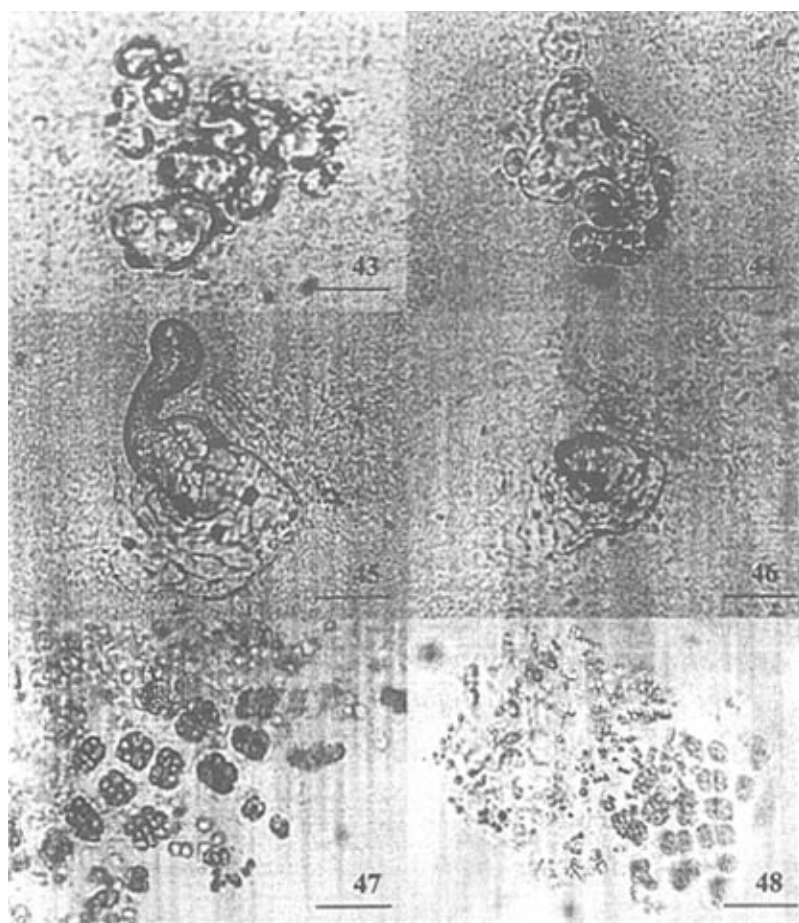
图 32: 营养液中, 这些长条形组织中的细胞不放散, 而是直接原位萌发出假根;

图 33~36: 果孢子发育成不规则的膨胀细胞, 这些细胞具有荧光效应。



(比例尺=20 μ m)

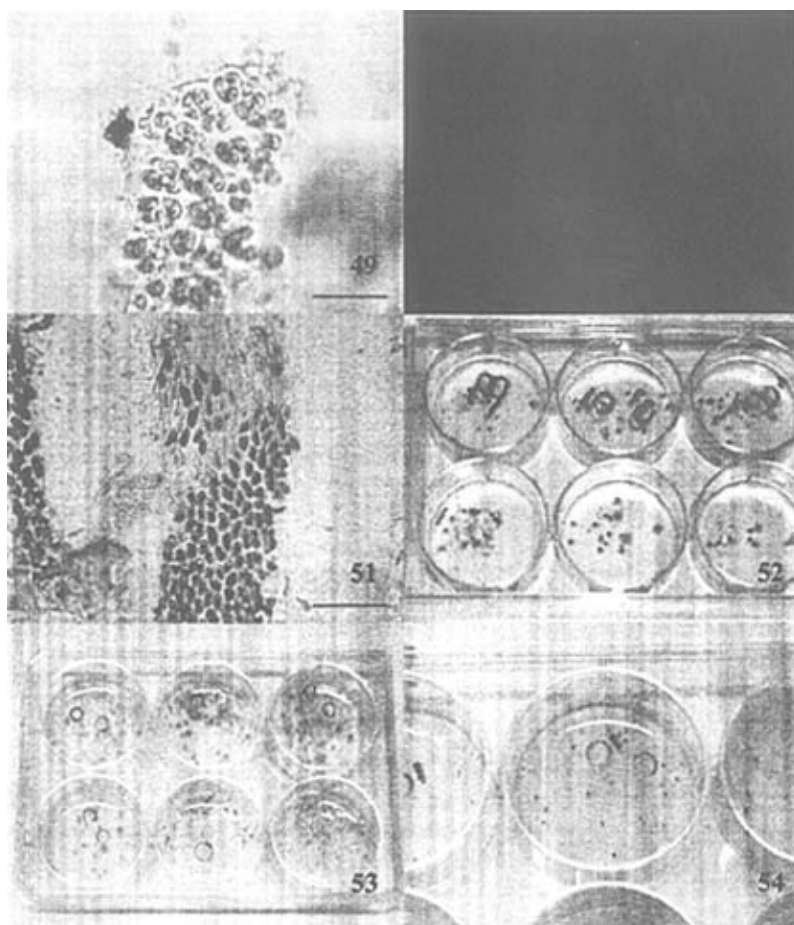
图 37~42: 膨胀细胞在条斑紫菜细胞培养过程中普遍存在, 行不规则分裂。



(比例尺=20 μ m)

图 43~46: 不规则的膨胀细胞经裂解后, 消亡;

图 47~48: 精子囊细胞在营养液中放散出精子。



(比例尺=20 μ m, 培养皿孔径 2cm)

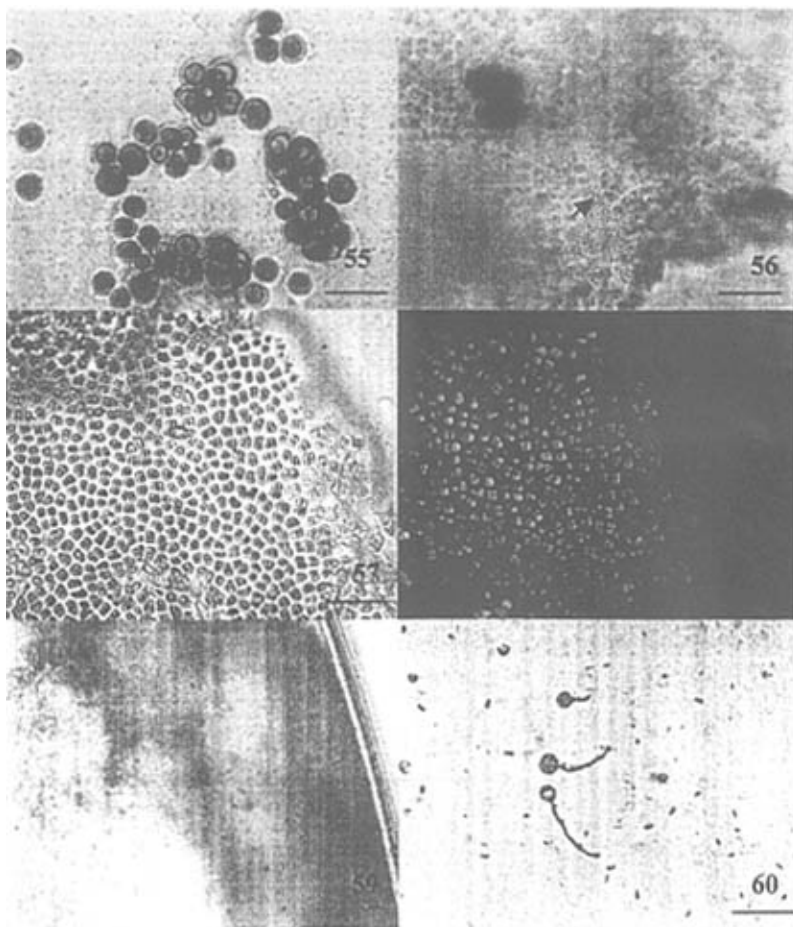
图 49~50: 在精子囊中的精子细胞也具有很强的荧光效应;

图 51: 假根细胞只长出长长的细丝, 并无其他变化;

图 52: 条斑紫菜顶端组织的细胞发育以丝状体为主;

图 53: 中部组织的细胞发育以叶状体为主;

图 54: 假根部细胞没有明显发育的迹象, 而是生长了很多绿藻。

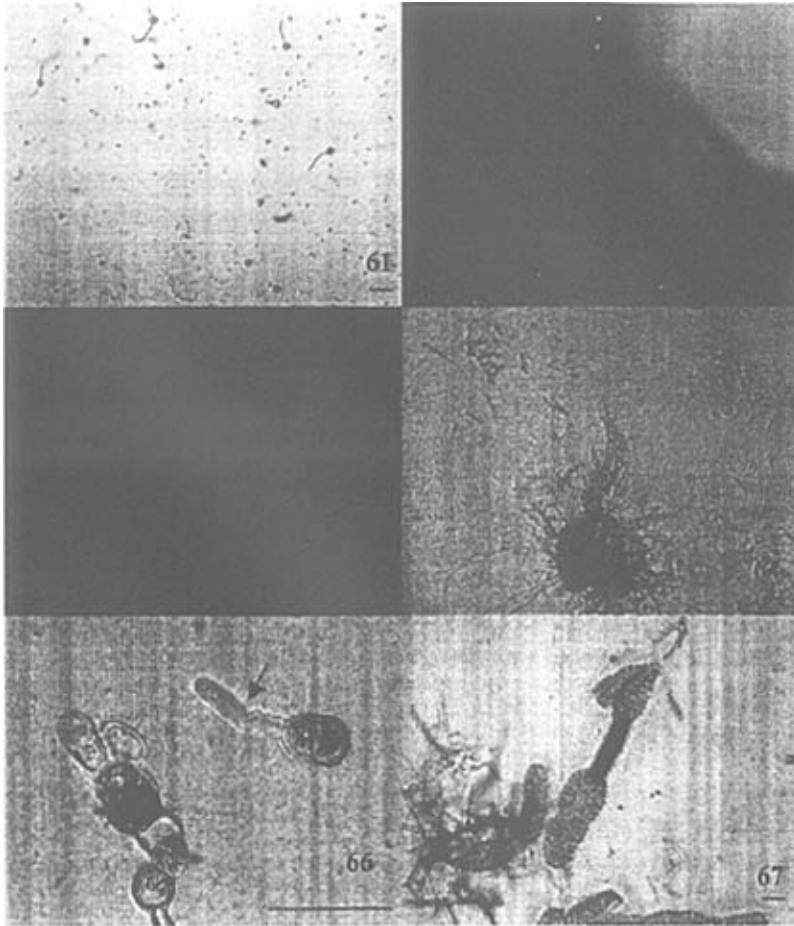


(比例尺=20 μ m)

图 55: 冷冻后的壳孢子发育成的类愈伤组织;

图 56~58: 营养细胞发育成的叶状体转移至营养液中培养后, 两性细胞发生分化, 并且有成熟果胞的出现;

图 59~60: 成熟果胞受精后, 放散到营养液中, 发育成果孢子。



(比例尺=20 μ m)

图 61~63: 放散出的果孢子活性很强, 具有明显的荧光效应;

图 64: 丝状体转移到营养液中后, 壳孢子发育成熟, 并释放出来, 黏附在培养皿底部, 发育成小苗;

图 66~67: 条斑紫菜离体细胞在第一次分裂的时候出现了两个子细胞颜色不同的现象; 并且在今后的发育过程中出现了形状上的差异。

三、问题及讨论

- 1、单孢子育苗将成为今后紫菜育苗的一个重要方法，而单孢子细胞壁形成的时间对育苗的具体操作过程有很重要的意义，它将决定紫菜育苗时孢子附网的时间，因此有进一步研究的价值。从细胞团中脱离出来的单孢子并不是团聚在一起，而是分散开来，虽然距离不远，但相互间基本都不接触，推测可能是单孢子脱离原来的细胞壁后，在重新长出细胞壁的过程中，细胞边缘发生形态变化而推动细胞滚动至合适的部位，即能摄取足够营养的地方，然后粘附生根。如果假设正确，那么单孢子从细胞团中脱离开始到固定生根之间这段时间可能就是细胞壁形成的时间。
- 2、在培养过程中发现有部分条斑紫菜离体细胞在第一次分裂的时候出现了两个子细胞颜色不同的现象（图 66），并且在今后的发育过程中出现了形状上的差异（图 67）。可能是由于条斑紫菜离体细胞在第一次分裂时发生的色素体自发突变，而表现出来的在某些性状上的差异。不过为何只发生在第一次分裂，而且靠近假根区的细胞颜色几乎都为黄色，而上面的细胞为砖红色，其机理尚不清楚。
- 3、果孢子在条件适宜的情况下，不长出丝状营养细胞，而是发育成 1—2 列细胞的特殊组织，这些细胞排列疏松、整齐，与以往任何发育模式都不同。细胞不放散，也没有明显的颜色变化，但是却在原位发生了萌发，长出假根，细胞本身发生横列，发育途径类似壳孢子。因此该组织可能就是由果孢子直接发育成壳孢子囊枝。出现的原因可能是培养条件特别适合壳孢子囊的发育，而抑制了丝状营养细胞的发育，但是壳孢子为何没有放散出来还需要经过进一步实验去研究。
- 4、紫菜叶状体营养细胞在细胞全能性的基础上发育成的再生植株在液体环境下分化出两性细胞。营养细胞在“亲本”条斑紫菜的时候没有分化成性细胞，而在再生出的 F1 代植株里却出现了两性细胞的分化，且这个现象在营养细胞里非常普遍。因为所有的性细胞都是由营养细胞分化而成，如果要用性别决定来解释条斑紫菜的性别机制，那么至少有一部分营养细胞是有性别基因的，那么这部分营养细胞就已经肯定是雌性的或者是雄性的了，在再生培养过程中，分化出两性细胞的概

率就非常低（考虑到基因遗传的重组等因素，出现再次性别分化不是不可能的），但是在培养过程中却发现普遍存在着性细胞的分化，因此本实验结果更倾向于条斑紫菜性别机制是环境影响的性别分化过程。

在固体环境下再生植株没有发现有性细胞分化，可能是由于性细胞的分化需要足够的营养以及一些固体培养不具备的条件支持，这些支持条件极有可能就是影响性细胞分化的重要因素，因此有必要对条件因素进行进一步研究。

第三章 半叶紫菜生殖方式多样性的观察

一、实验材料与方法

1、材料、试剂与仪器

半叶紫菜，采自青岛的新鲜半叶紫菜，海水保存运回实验室；

海水从东台紫菜育苗基地运来实验室；

消毒海水是天然海水煮沸后冷却；

营养海水（消毒海水+50ppm NaH_2PO_4 +5ppm NaNO_3 ）；

无水葡萄糖（分析纯）；

琼脂糖（BIOWEST AGAROSE REGULAR）；

固体培养基（营养海水+0.8%琼脂糖煮沸后铺在6孔培养皿上）；

海螺消化腺粗提的海螺酶混合液，加入2mol/L 葡萄糖混合而成。

光照培养箱（Zhu Jiang LRH-250-G2）；

冷冻离心机（SIGMA 3K30）；

显微镜（OLYMPUS IX71）；

数码相机（OLYMPUS Z5050）；

拉针器（NIKON MF-900）及毛细管；

显微操作仪（NIKON NARISHIGE NT-88NF-N2）；

移液器（Finnpipette Digital 200-1000 μl , 40-200 μl , 1-10 μl ）及枪头；

筛绢（200目、300目、400目各1块）；

高温灭菌：毛笔、镊子、手术剪、青霉素小瓶、刮子；

其他：6孔培养皿（辐照灭菌）；锡纸；1.5ml Eppendorf管。

2、半叶紫菜叶状体的清洗与分类

挑取状态良好的条斑紫菜叶状体在消毒海水中漂洗一次，去除泥沙，用煮沸冷却的淡水冲洗半分钟（除去原生动植物），再转移至消毒海水中，用沸水消毒的毛笔刷洗3遍。由于半叶紫菜叶状体有全雌、全雄和雌雄同体三种类型，雌雄同体的植株也分为成熟和幼嫩两种。成熟的雌雄同体就是指已经分化出性细胞，即同时具有成熟精子囊和果胞囊的植株；而幼嫩的半叶紫菜没有出现明显的性细胞分化，但是有颜色上的

深浅之分，叶长 2—3cm。因此对不同类型我们采取不同的处理方法。

3、半叶紫菜全雌、全雄株的培养观察

全雌、全雄的个体各取 10 株，分剪成顶端、中部、假根部 3 段，用无菌的吸水纸吸干后放入青霉素小瓶中剪碎，加入海螺酶混合液，15℃，锡纸包裹后酶解 2—4 小时，其中每过一个小时显微镜下观察一次，当酶液中有单细胞，且紫菜碎片边缘细胞疏松时酶解结束。

为了有足够量的细胞，我们没有过滤酶解下的细胞和组织块的混合液，而是直接用移液枪转移至 Eppendorf 管，10℃，8000rpm 离心 5min，弃上清后加入消毒海水，摇匀，10℃，8000rpm 离心 5min，再重复 2 次至酶液基本洗去，加入适量营养海水。取其中雌雄各 5 株共 30 管细胞、组织块混合悬液采用固体培养，平铺到 6 孔培养皿中，每株铺一块板，每个部位铺 2 个孔，其余各 5 株采用液体培养，放入加有液体营养海水的 96 孔培养皿中，每个部位 2 个孔。放至光照培养箱，15℃，2500—3000Lux，12h·D⁻¹，每天观察一次，

4、半叶紫菜雌雄同体成熟株的培养观察

成熟的雌雄同体株：取 5 株，先用显微镜观察确定各细胞区域，用手术剪剪下顶端、雌性区域外缘、雌性区域中部、雄性区域外缘和雄性区域中部 5 个部分 0.5cm×1cm 长条，分别放入 Eppendorf 管酶解，酶解结束后用同样的方法获得细胞、组织块悬液，一半放入加有固体营养基的 96 孔培养皿中，另一半则用液体营养海水在 96 孔培养皿中培养，放至光照培养箱，15℃，2500—3000Lux，12h·D⁻¹，每天观察一次。

5、半叶紫菜雌雄同体幼嫩株的培养观察

幼嫩的雌雄同体：取 5 株，由于此时雌雄细胞并未分化成熟，因此这里用颜色深浅来区分，即整个叶状体分为深色区域和浅色区域两大块，由于叶片小，且幼嫩，所以不采用酶解，而是剪下深色区域外缘、深色区域中部、浅色区域外缘和浅色区域中部 4 个部分 0.1cm×0.1cm 的组织块，放入加有液体营养海水的 96 孔培养皿中，放至光照培养箱培养，15℃，2500—3000Lux，12h·D⁻¹，每天观察一次。

6、丝状体的培养

上述实验得到丝状体在显微镜下用 12~15 μm 的毛细管选择挑出健康的, 分别放入灭过菌的青霉素小瓶中, 放置于 20 $^{\circ}\text{C}$, 2500—3000Lux, 12h $\cdot\text{D}^{-1}$ 光照培养箱, 用营养海水进行扩培。

二、结果与分析

1、半叶紫菜离体单细胞的发育途径

在固体和液体培养基里观察到的成熟半叶紫菜各类细胞原生质体的发育途径都有 9 种, 其中营养细胞 4 种, 果孢子 2 种, 精子细胞 2 种, 假根细胞 1 种。以下细胞发育的时间是以固体培养为例。

(1) 直接成苗型:

雌性、雄性的营养细胞原生质体长出细胞壁, 经过 10—15 天培养, 细胞一端先突起逐渐萌发成假根, 另一段横分裂为 2 个细胞, 两极发育成小苗。某些苗在顶端或者整体会发生裂解, 放散出小孢子, 即单孢子, 这些单孢子又通过同样的方式发育成小苗 (图 68)。

(2) 单孢子囊型:

营养细胞原生质体长出细胞壁, 10—16 天培养后, 内部进行数次分裂后 (也有少数不分裂), 18—20 天后放出单孢子, 单孢子再长出细胞壁, 然后生根成苗, 成苗过程与营养细胞直接成苗相同 (图 69、70)。

(3) 细胞团型:

营养细胞培养 12—14 天, 经多次分裂成三种类型的细胞团, 一种细胞排列紧密, 呈离体圆形, 几乎看不到细胞之间的界限, 颜色呈较深的黄褐色, 观察期间没有放散出孢子 (图 71); 第二种细胞排列较松散, 呈不规则片形, 颜色为红褐色, 会放散单孢子, 长成苗簇 (图 72、73); (4) 壳孢子囊枝型:

离体单细胞进行不断横分裂, 长成 1—2 列细胞的长条形的细胞分枝, 这些分枝互相缠绕成团 (图 74), 同时也有从丝状体团向外萌发出该类型细胞组织 (图 75), 虽然没有观察到壳孢子的萌发, 但是形状上与条斑紫菜壳孢子枝极为相似, 因此初步判断其也为壳孢子囊枝。

(5) 类愈伤组织型:

某些营养细胞的固体培养基上进行不断分裂, 最终成一黄褐色或接近黑色的细胞团块 (图 76), 这些团块挑至液体海水中可打散成单个细胞, 这些细胞具有不断分裂

的特性,且有些个体越来越下,有些颜色越来越淡,具有类似条斑紫菜类愈伤组织的细胞特性,因此,半叶紫菜营养细胞也会退分化成类愈伤组织。另外,在雌雄同体幼嫩株的雌雄区域的内侧组织块培养中都发现有大量类愈伤组织形成,且在液体培养基条件下,为分散的单个细胞(图 77)。

(6) 丝状体型:

果孢子从果孢子囊中放散出来,培养 15—20 天后本体从不同方向分裂出 1-3 条细丝状的营养细胞,本体并不象叶状体营养细胞那样分裂(图 78)。在转移至 20℃时,丝状体萌发出壳孢子囊(图 79)。

(7) 精子细胞的消亡:

精子囊细胞在培养 8—10 天开始放散精子(图 80),液体培养下在 14—16 天的时候精子大量放散,形成一个高峰期(图 81、82)。放散的精子经过 5—7 天培养大多数消亡。

(8) 精子细胞的发育:

放散的精子经过大多数会消亡,但是其中有极少数精子发育成丝状体(图 83)。且液体营养液中精子发育成的丝状体比固体培养基上培养的状态好。

(9) 假根细胞的发育:

来自基部的细胞原生质体在培养的 3-4 天后一端产生突起,液泡变大(图 84),20 天的时候就已经长成非常细长的假根(图 85),以后不会产生较大的变化。

2、果孢子与精子细胞、果胞细胞发育成丝状体的比较

果孢子发育的开始阶段是先萌发出一粗短、无色的突起,而果孢子本体呈红色(图 86),在随后的发育过程中,本体中的内容物转移到分裂形成的丝状营养细胞中(图 87),随着营养细胞不断分裂,丝状体开始分叉(图 88),最终形成健康壮硕的丝状体团。

放散出的精子细胞大多数都会消亡,但是在跟踪观察的大量精子细胞中发现有少数几个精子细胞能发育成丝状体,而这类丝状体与常见的果孢子发育成的丝状体不同,它萌发出的突起很细,发育成的细丝只为果孢子细丝直径的 1/6-1/4(图 89),本体为无色,所以显微镜下无法看到其内容物是否转移。

由于果胞细胞本身呈红色,与果孢子颜色相近因此无法判断是否果胞也能发育成丝状体,但是在全雌株和雌雄同体雌性区域中我们都发现了果胞细胞放散(图 90),

以及一些相对健康果孢子而言较“瘦弱”的丝状体（图 91），其细丝直径与精子形成的细丝差不多，而在雌雄同体幼嫩株深色区域细胞成熟成果胞，本体也为红色，与果孢子的颜色很接近（图 92），这些细胞也会发育成丝状体，萌发的细丝也与前面提到的“瘦弱”丝状体类似（图 93）。因此在全雌株和雌雄同体雌性区域中出现的这些丝状体可能就是果胞发育而成的，只是由于数量少，颜色相似，且零散混在大量果孢子发育的丝状体中，所以无法区分出来。目前这些丝状体已一一挑出放入灭过菌的青霉素小瓶中用营养海水进行扩培，等待更仔细的实验观察和进行下一步鉴定。

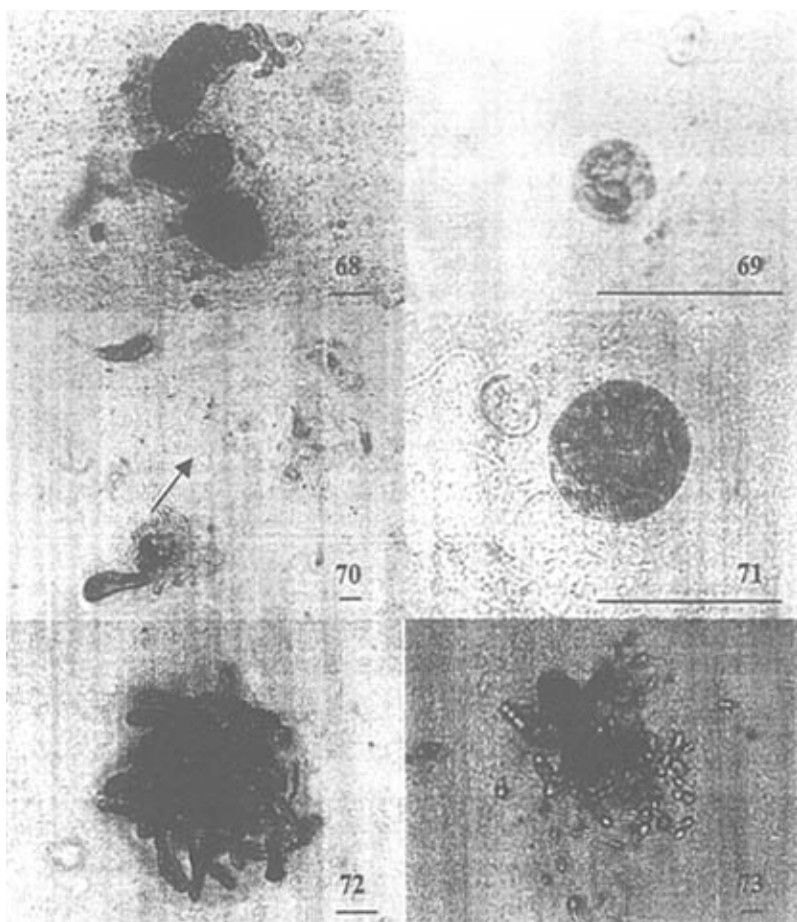
3、幼嫩雌雄同体株的培养观察

为了能确定单性生殖确实存在，实验中特别安排了用幼嫩的雌雄同体株半叶紫菜做材料。因为此时两性细胞都没有成熟，也不存在受精，通过两性细胞隔离培养分别成熟，保证有大量较纯的精子 and 果胞细胞。

幼嫩雌雄同体株的深色区域外缘、深色区域中部、浅色区域外缘和浅色区域中部 4 个部分在液体环境下发育情况很好。在培养的第 13 天，浅色区域外缘和中部组织块都有类似精子的细胞大量放散出，且其中有个别细胞萌发出细丝结构，发育为丝状体（图 94、95）。整个过程与全雄个体顶端精子放散过程一样，因此可以初步判定浅色区域为雄性区域。同样，在培养的第 13 天，深色区域的外缘和中部组织块细胞变为砖红色（图 96），20 天的时候这些砖红色细胞放散出，也萌发出细丝结构，发育为丝状体（图 97）。因为其变化过程与果胞细胞成熟过程类似，因此也初步判定深色区域为雌性区域。得到的所有生长状况良好的丝状体按照方法 5 已在显微镜下一一挑出，进行扩培。

4、苗的观察

所有观察到的苗可依颜色分为三类：全部深色型（图 98）、全部浅色型（图 99）、深浅分色型（图 100、101），其中深浅分色的又可分为上下分色和左右分色。



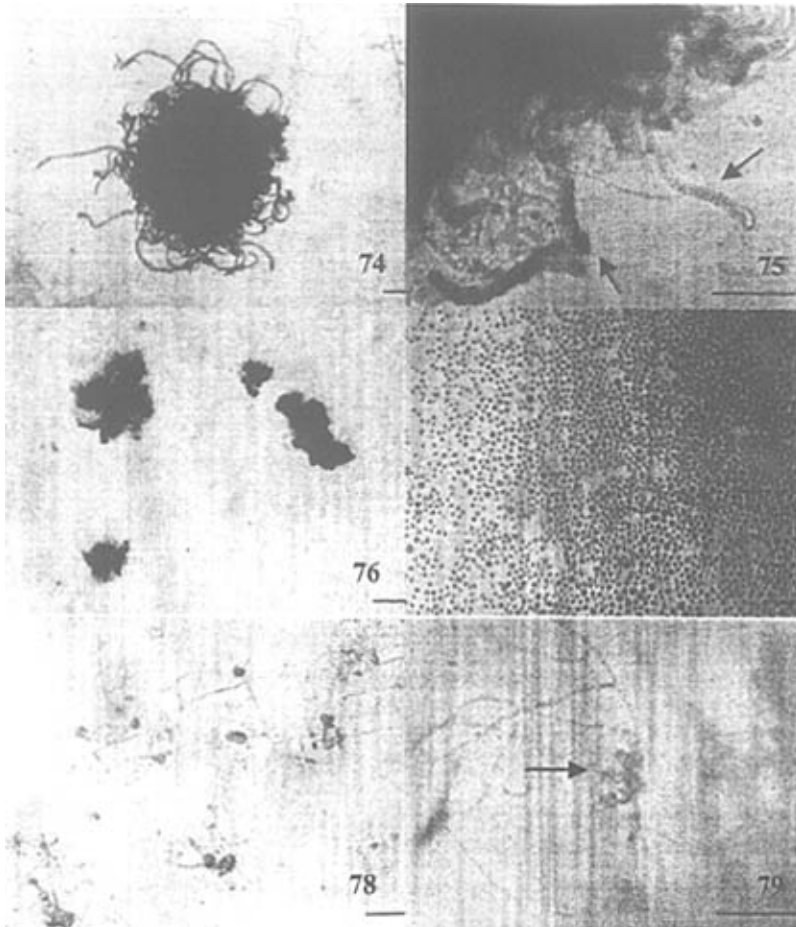
(比例尺=20 μ m)

图 68: 离体细胞直接发育成健康的小苗, 一部分小苗顶端放散出单孢子;

图 69~70: 离体细胞分裂成单孢子囊, 放散单孢子, 单孢子再发育成小苗;

图 71: 离体单细胞发育成细胞团, 细胞团只发生体积上的增加, 并不裂解开;

图 72~73: 细胞团内细胞分裂完全, 整个细胞团裂解开, 放散出的孢子发育成小苗。



(比例尺=20 μm)

图 74: 壳孢子囊枝发育情况很好, 互相缠绕成团;

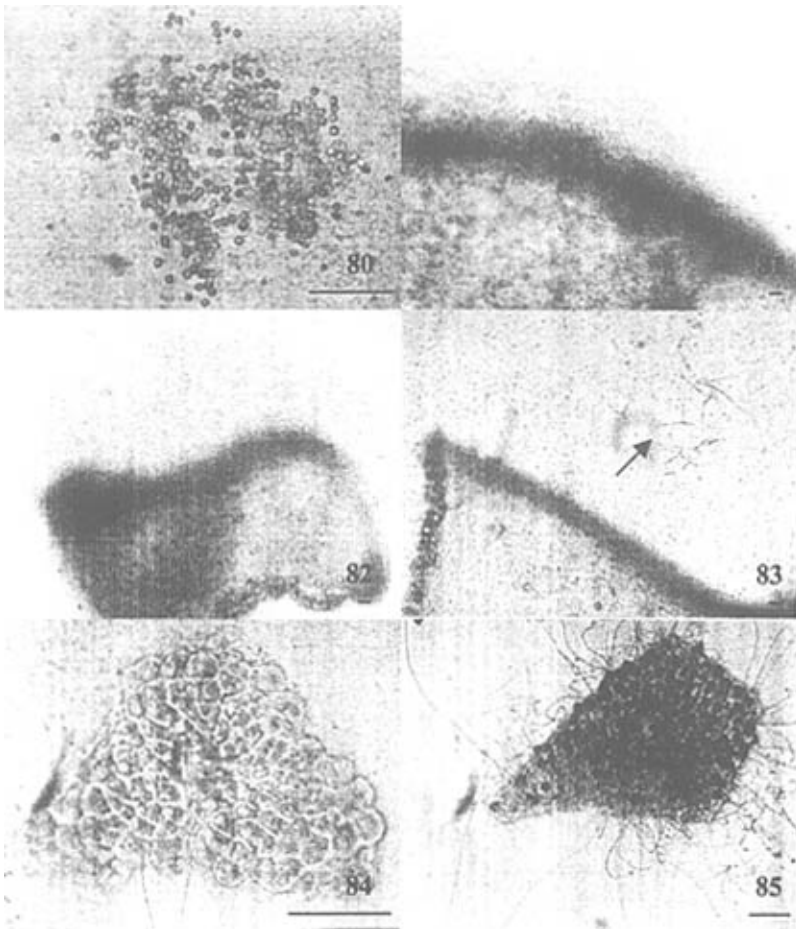
图 75: 从丝状体中向外萌发出壳孢子囊枝;

图 76: 成熟半叶紫菜营养细胞在固体培养基上发育成的类愈伤组织;

图 77: 幼嫩半叶紫菜在营养液中也分化出大量类愈伤组织, 且细胞间相互分离;

图 78: 半叶紫菜果孢子的发育;

图 79: 丝状体上壳孢子囊的发育。

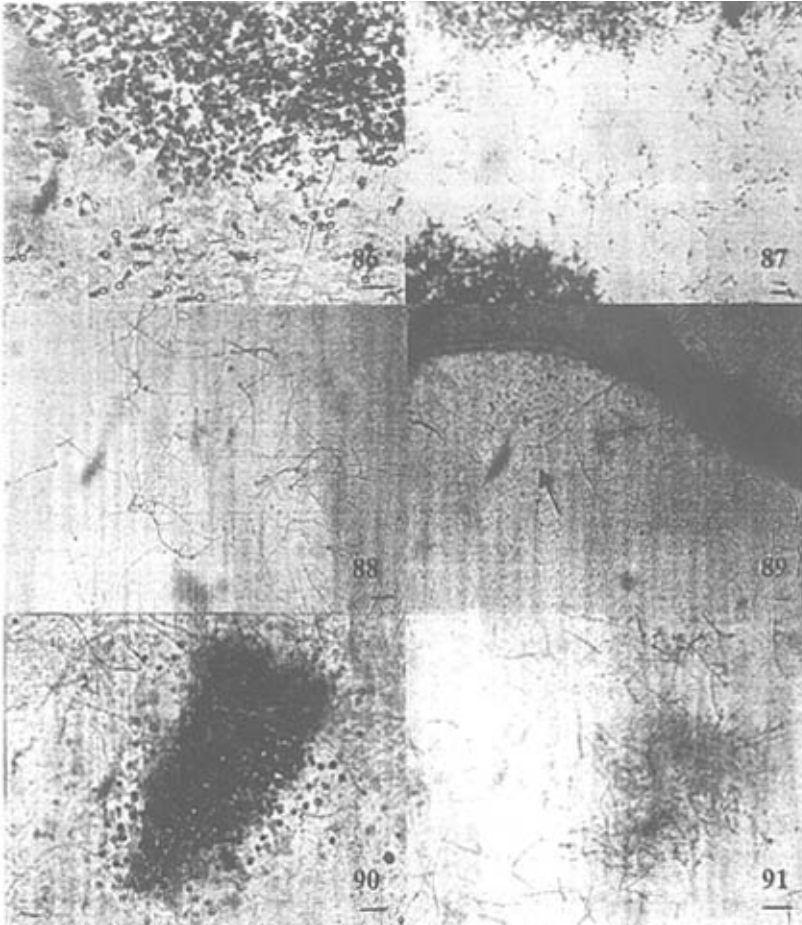


(比例尺=20 μm)

图 80~82: 半叶紫菜精子细胞的大量放散;

图 83: 放散出的精子绝大部分都消亡了, 但是有部分精子细胞长出细丝, 发育成单性丝状体;

图 84~85: 半叶紫菜假根细胞的发育。

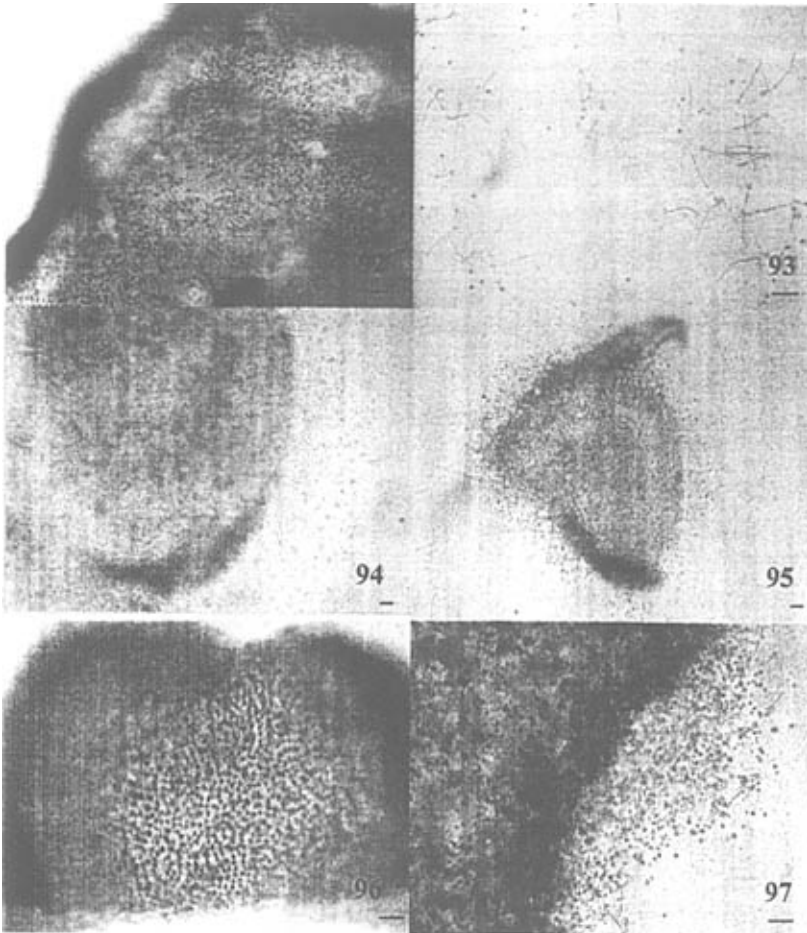


(比例尺=20 μ m)

图 86~88: 果孢子发育先萌发出一粗短、无色的突起, 而果孢子本体呈红色, 丝状体发生分叉, 最终形成健康壮硕的丝状体团;

图 89: 精子细胞也能发育成丝状体, 这类丝状体萌发出的突起很细, 只为果孢子细丝直径的 1/6-1/4, 本体为无色;

图 90~91: 在全雌株和雌雄同体雌性区域中我们都发现了果胞细胞放散, 以及一些相对较“瘦弱”的丝状体, 其细丝直径与精子形成的细丝差不多。



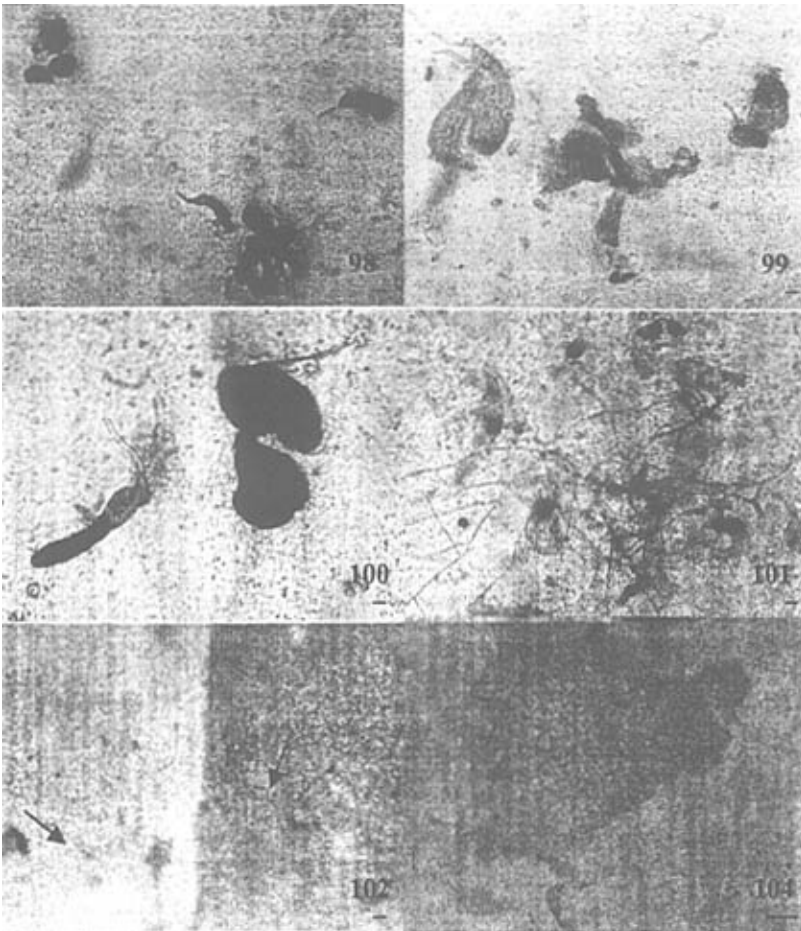
(比例尺=20 μ m)

图 92: 在雌雄同体幼嫩株深色区域细胞成熟成果胞, 本体也为红色, 与果孢子的颜色很接近;

图 93: 幼嫩株深色区域细胞发育成的成熟果胞, 放散后这些细胞也会发育成丝状体, 萌发的细丝也与前面提到的“瘦弱”丝状体类似;

图 94~95: 幼嫩雌雄同体株的浅色区域放散出大量类似精子的细胞, 且有部分也同样会发育成丝状体;

图 96~97: 幼嫩雌雄同体株的深色区域细胞转变成砖红色, 放散后同样也能发育成丝状体。



(比例尺=20 μ m)

图 98: 全部深色型;

图 99: 全部浅色型;

图 100~101: 深浅分色型, 其中深浅分色的又可分为上下分色和左右分色;

图 102: 对成熟的雌雄同体株半叶紫菜进行分部位酶解之前, 对其进行镜检查, 结果发现在雌雄细胞那条笔直的分界线两侧, 雄性细胞区域有深色细胞, 而雌性细胞区域内也有浅色细胞;

图 104: 精子放散后留下的精子囊空壳。

三、问题与讨论

1、在对成熟的雌雄同体株半叶紫菜进行分部位酶解之前，对其进行镜检查，结果发现在雌雄细胞那条笔直的分界线两侧，雄性细胞区域有深色细胞，而雌性细胞区域内也有浅色细胞（图 102），这些突出的细胞有些分散零星存在，有些则成小片镶嵌于与之形成色差的细胞区域中，而这些细胞并没有剔除，而是与其周围的细胞一起剪下，放入液体营养海水中进行对照培养，结果雄性细胞区域的深色细胞发育成表面观 2 排 2 列的四细胞，颜色为砖红色，随后以鲜红色的孢子形式放散，发育成健康的丝状体，与其旁边精子发育成的丝状体相比，其颜色、粗细更接近于果孢子发育而成的丝状体（图 89）；同样，雌性细胞区域内的浅色细胞在发育成熟后放散出无色、个体较周围果胞细胞和果孢子都小的细胞，这些细胞最终都消亡。由于这些深色细胞和浅色细胞在颜色、大小、性状以及发育过程上分别与果胞囊细胞和精子囊细胞相似，因此有理由相信，这些细胞其实就是分别镶嵌于雄性细胞区域的果胞囊细胞和雌性细胞区域的精子囊细胞，半叶紫菜虽然存在着明显的雌雄区域分界线，但是这个分界并不是绝对的，在大片的雄性区域和雌性区域里都零星存在着与其性别相对的细胞，由于这些细胞数量相对极少，而且不是象条斑紫菜那样大面积存在，因此肉眼无法分辨出。所以在以后的培养中，如果要做到绝对的性细胞分开培养，就必须通过镜检，将这些镶嵌的细胞挑出，不然会影响到实验的结果。

2、半叶紫菜生殖方式的多样性：

在实验室条件培养下能观察到前人所提到的在紫菜发育途径中发现的三种生殖方式，即：有性生殖、单性生殖和无性生殖（图 103）。

这三种生殖方式中有性生殖和无性生殖在紫菜属植物的发育过程中是普遍存在的，并且已经有百年的研究历史，而对单性生殖则才研究了十多年，由于这种生殖方式比较隐蔽，且数量少，因此不易发现，Korrmann（1994）曾提出，在 *P. leucosticta* 和 *P. carolinensis* 的培养研究中发现在本应形成性细胞的区域里放散了这类孢子，并指出该孢子可以不通过受精而直接发育成单倍的丝状体。目前这类孢子是否存在也正成为大家争论的焦点，而本实验从一个侧面可以证明，至少在半叶紫菜中，确实存在着这类不经过受精而直接发育成丝状体的性细胞。然而

这些丝状体是否是单倍体呢？如果假设成立，那么就可以初步解释为什么在 22 种紫菜的果孢子是二倍体，而其中只有 9 种发育成的丝状体是二倍体，因为那时候都是挑取个别丝状体经染色观察其染色体个数得到的答案，一些紫菜的染色体数目过多或者个体较小，所以无法观察得知，而某些种可能恰好挑取的是由单性生殖形成的丝状体，因此为单倍体。另外这些紫菜减数分裂发生时期的问题也可以简化，也可能就是与目前较流行的说法一致，即都发生在壳孢子萌发的最初两次分裂的时候。所以当染色体数目鉴定出来以后，以前这些令人困惑的问题都将全部迎刃而解。

因此下一步工作就是将运用一些现有的技术对挑出培养的单性细胞发育成的丝状体进行染色体鉴定，看它们到底是单倍体还是自发加倍后的二倍体。

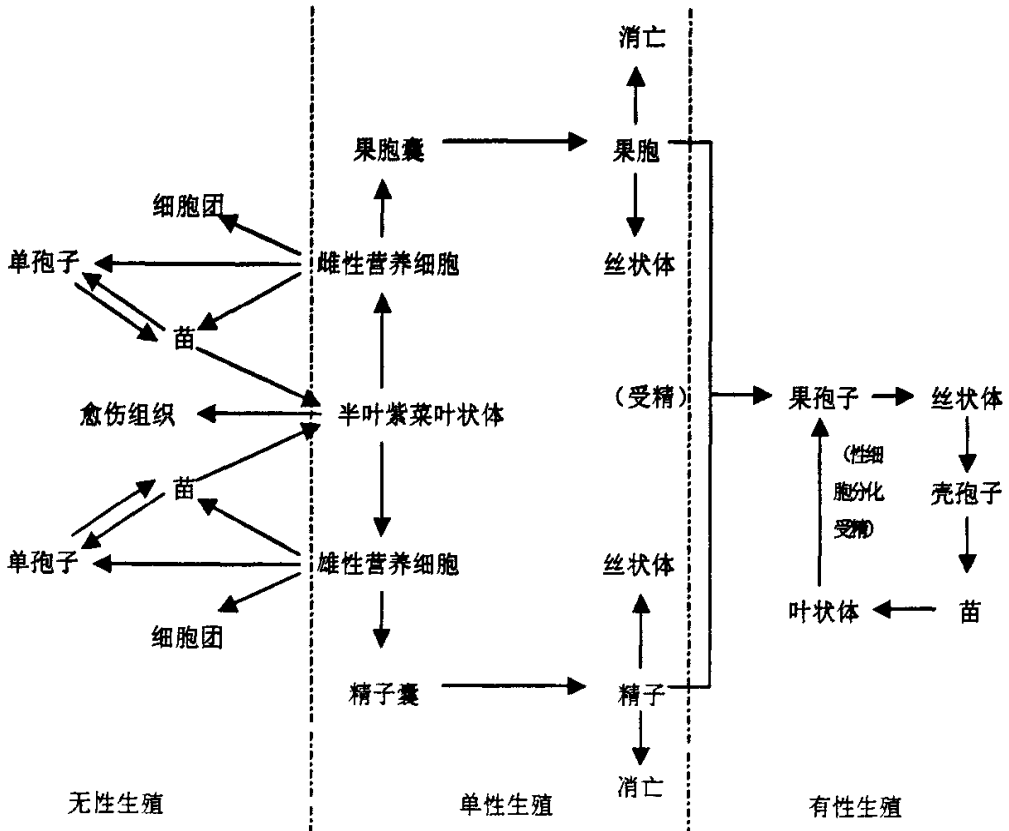


图 103 半叶紫菜生活史的多样性

3、全雌、全雄株与雌雄同体株的比较

全雌株的上端与雌雄同体株的顶端、雌性区域外缘细胞的发育情况相似，放散出大量鲜红色果孢子发育成丝状体，同时也有少量上面提到的较“瘦弱”的丝状体；

全雌株的中间部分与雌雄同体株雌性区域内部细胞相似，以放散果孢子和果胞为主，随后发育途径为丝状体，同时也有部分营养细胞发育成小苗；

全雄株的上端与雌雄同体株雄性区域外缘部分相似，绝大部分为精子囊细胞，放散出的精子95%以上消亡，极少数精子存活下来，发育成丝状体，而在没有酶解完全的组织块中我们还发现有零星散布的砖红色细胞，这些细胞在内部也会进行数次分裂，然后放散出鲜红色的孢子发育成丝状体，与全雄株相比，这些孢子在雌雄同体株的雄性外缘区域里存在更多；

全雄株的中间部分与雌雄同体株雄性区域内部细胞发育情况相似。精子细胞放散后情况与上相同，不过还有一些营养细胞可以发育成小苗；

同样，全雌株的中间部分也与雌雄同体株雌性区域内部细胞发育情况类似，大部分细胞放散果孢子和果胞，发育成大量的丝状体，而其余的营养细胞则发育成健康的小苗。

全雌株、全雄株和雌雄同体株三者的假根部分情况都一样，由于细胞之间的胶质层较厚，细胞壁较硬，因此酶解后只得到组织碎片，通过培养，其细胞液泡逐渐变大，长出细丝，发育为假根，培养时间长了细胞色素会逐渐变淡，且细胞壁加厚，细胞会变模糊。

液体与固体培养时都会有上述情况，只是液体培养下的细胞平均发育速度比固体培养快5-8天，而且只有液体培养条件下精子、果胞和果孢子才会有大量放散的现象，固体条件下，这些细胞不会全部放散，大部分精子和果胞在精子囊和果胞囊细胞阶段就逐渐死亡消失，只留下细胞壁的空壳（图104），放散出的也基本消亡，只有极少数可以发育成丝状体。而果孢子则能较健康的生长发育，但是有些没有放散，而是在原来的细胞壁里面直接发育。

4、在对小苗进行观察的时候发现有部分苗已经有了颜色的差异，有的左右分开，深浅分隔，情况与实验材料里幼嫩的雌雄同体株类似；但也有的上下分开，上端为

深色细胞，下端为浅色细胞，或者相反，这是非常特殊的现象，因为在自然界中并没有发现过上下分隔的半叶紫菜。如果按照实验结果，那么前者下端应该会发育成精子囊细胞，然后较快放散出精子，此时上端发育成的果胞细胞应该留下果胞囊内，与放散出的精子受精后发育为果孢子才放散出来，但如果这样的话，上端组织块就会在精子放散后脱离原植株而随海水漂走，这样当我们发现成熟全雄个体的时候，也许就是原来处于上端的雌性区域从原植株脱落的产物，同样，后者的上端细胞如果先放散出精子，那么就可能得到全雌个体。这样就对半叶紫菜具有全雌或全雄个体提出了新的问题。而三类苗如果真能对应三种半叶紫菜类型的话，那么今后半叶紫菜的发育类型和方向就可以在百个细胞左右的小苗期间识别出来，对于以后的育苗工作就提供了依据。然而由于小苗的数量比较少，而且在固体培养基上一般都很难长大，因此很可惜没能观察到以后的发育情况，所以今后还需要做更仔细的观察和探寻更适合的培养条件。

第四章 坛紫菜生殖方式多样性的观察

一、实验材料与方法

1、材料、试剂与仪器

坛紫菜：采自浙江宁波，洗净后晾干， -20°C 保存；

海水从东台紫菜育苗基地运来实验室；

消毒海水是天然海水煮沸后冷却；

营养海水（消毒海水+50ppm NaH_2PO_4 + 5ppm NaNO_3 ）；

无水葡萄糖（分析纯）；

琼脂糖（BIOWEST AGAROSE REGULAR）；

固体培养基（营养海水+0.8%琼脂糖煮沸后铺在6孔培养皿上）；

海螺消化腺粗提的海螺酶混合液，加入2mol/L葡萄糖混合而成。

光照培养箱（Zhu Jiang LRH-250-G2）；

冷冻离心机（SIGMA 3K30）；

显微镜（OLYMPUS IX71）；

数码相机（OLYMPUS Z5050）；

拉针器（NIKON MF-900）及毛细管；

显微操作仪（NIKON NARISHIGE NT-88NF-N2）；

移液器（Finnpipette Digital 200-1000 μl , 40-200 μl , 1-10 μl ）及枪头；

筛绢（200目、300目、400目各1块）；

高温灭菌：毛笔、镊子、手术剪、青霉素小瓶、刮子；

其他：6孔培养皿（辐照灭菌）；锡纸；1.5ml Eppendorf管。

2、成熟坛紫菜原生质体的获得和培养

取出冷藏的坛紫菜叶状体放入消毒海水中， 15°C ，2000Lux， $12\text{h}\cdot\text{D}^{-1}$ ，复苏24小时，挑取成熟紫菜10株，成熟紫菜是指叶长10cm以上，有成熟果胞囊的个体。采用条斑紫菜方法（一）处理，考虑到坛紫菜胶质层较厚，适当延长酶解时间至6~8小时。得到细胞悬液后各自铺板培养，每株紫菜细胞铺6个孔，每个孔随机挑取2个视野，每3天显微镜观察一次。

二、结果与分析

1、在固体培养基上成熟坛紫菜原生质体的发育途径

(1) 直接成苗型:

营养细胞原生质体长出细胞壁,直接成苗,其中有正常苗和畸形苗之分。开始的发育过程与条斑紫菜类似,也是呈两极发育变成小苗(图 105, 106),不过时间较条斑紫菜晚,4-6 天才完成第一分裂和假根突起。有些细胞发育成的小苗顶端分裂旺盛(图 107),这类小苗发育到一定程度后就会在顶端放散单孢子。

(2) 细胞团型:

单细胞培养 9~10 天,经多次分裂成立体网状细胞团,形状有椭圆形、不规则的片形等,颜色呈浅褐色或红棕色(图 108, 109)。

(3) 放散孢子型:

单细胞胶质层变厚(图 110),且细胞变无色,经过数次分裂后(图 111),细胞壁破裂,放散出无色的小孢子(图 112)。另外,有少数的细胞团在顶端游离出一些棕黄色的小孢子(图 113),培养 2 周后颜色褪去。最终这些小孢子都消亡,没有进一步发育。

(4) 类愈伤组织型:

营养细胞原生质体经过不断分裂去分化形成类愈伤组织。类愈伤组织团的颜色较深,几乎成黑褐色(图 114)。多方向分裂成多层细胞的不规则团状结构。细胞间紧密结合,当转移至液体培养基后,细胞间会互相分离(图 115),细胞直径为 4~10 μm 。

(5) 丝状体型:

果孢子从果孢子囊中释放出来,本体为鲜红色,长出 1-2 根细丝(图 116),细丝分叉,果孢子的营养细胞又原位萌发出细丝,1 个月后即可形成浓密的丝状体团(图 117)。

(6) 精子细胞的消亡

精子囊细胞放散出精子,跟踪观察的精子细胞全部消亡(图 118)。

(7) 膨胀细胞型

果孢子不长细胞壁,在内部发生细胞质分裂,细胞体积不断膨胀,颜色变浅至粉红色(图 119),它们中有些发生不规则分裂,而其他则裂解、死亡(图 120)。

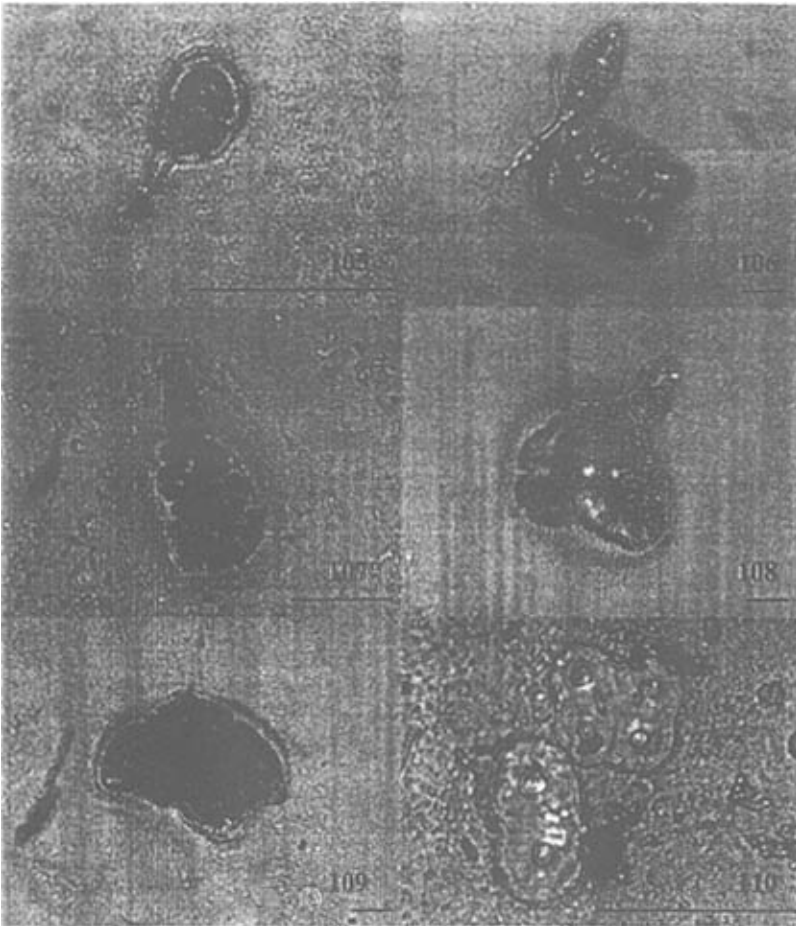
(8) 假根细胞的发育

来自基部的细胞原生质体在培养的 1-2 天后细胞壁变厚，且一端产生突起逐渐长成非常细长的假根，以后不会产生较大的变化（图 121，122）。

2、实验室条件下坛紫菜的生活史

通过叶状体与丝状体两个阶段的固液交替培养，即叶状体酶解后的单细胞在固体培养基上培养， 15°C ， $2500\sim 3000\text{Lux}$ ， $12\text{h}\cdot\text{D}^{-1}$ ，发育成苗和丝状体；在显微镜下用 $12\sim 15\mu\text{m}$ 毛细管将发育情况良好的丝状体单个挑至 96 孔培养皿液体环境培养。丝状体改变培养条件后，壳孢子囊发育成熟，随后放散出壳孢子，发育成苗。

在坛紫菜细胞发育的整个过程中，出现有果孢子为代表的有性生殖，类愈伤组织为代表的无性，以及某些特殊的发育模式，例如膨胀细胞、放散小孢子等，这些特殊发育途径在以往的资料中没有明确提到过，而这些发育产物能否进入坛紫菜生活史的循环中，能否代替单孢子成为坛紫菜大量产生的原因，尚需进一步跟踪研究。



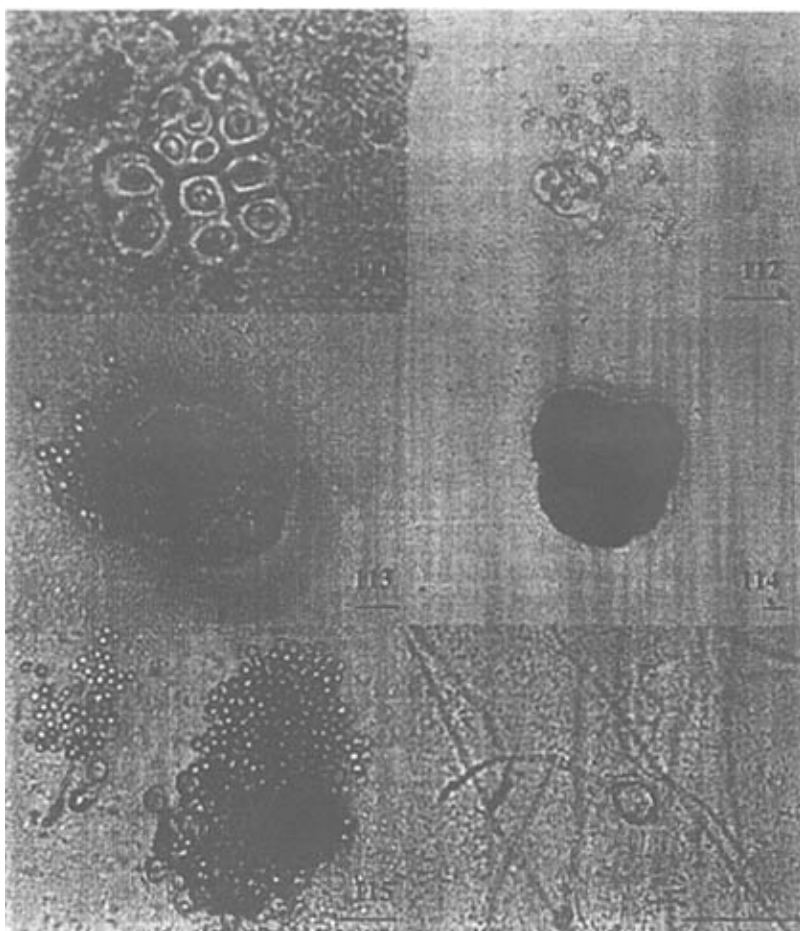
(比例尺=20 μ m)

图 105~106: 坛紫菜离体单细胞发育成正常小苗;

图 107: 离体单细胞顶部细胞分裂旺盛, 最终裂解放散出单孢子;

图 108~109: 营养细胞发育成浅褐色和红棕色的不规则细胞团;

图 110: 单细胞的胶质层加厚, 原生质体紧缩;



(比例尺=20 μm)

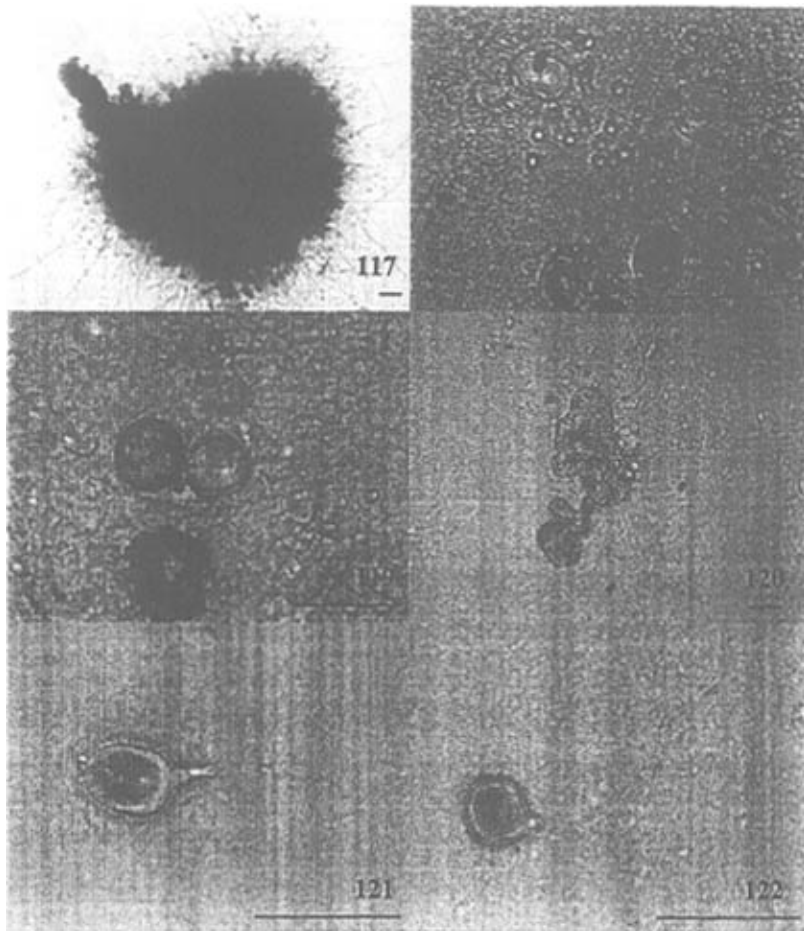
图 111: 胶质层加厚的细胞原生质体在内部进行分裂;

图 112: 细胞胶质层破裂, 放散出无色小孢子;

图 113: 细胞分裂成巨型细胞团, 细胞排列紧密, 随后一端破裂, 放散出小孢子;

图 114~115: 营养细胞退化发育成类愈伤组织, 固体培养基上呈黑褐色团块, 液体培养基中呈细胞分散的状态;

图 116: 果孢子萌发出细长的营养细胞, 发育成丝状体。



(比例尺=20 μ m)

图 117: 果孢子萌发出的细丝不断分叉, 最终形成浓密的丝状体团;

图 118: 精子囊细胞放散出精子, 跟踪观察的精子最终消亡;

图 119~120: 果孢子开始膨胀, 最终形成不规则的膨胀细胞;

图 121~122: 假根细胞壁层加厚, 萌发出细长的假根, 没有进一步生长。

三、问题与讨论

1、根据以往的资料记载，坛紫菜在实验室培养过程中没有释放出单孢子，即没有单孢子无性生殖的途径（王素娟，1994）。但是现实中相对于大量放散单孢子成苗的条斑紫菜而言，坛紫菜的产量并不算少。针对这个问题，藻类学家也从各个方面着手调查，但是却一直没有观察到单孢子成苗的现象。是实验室条件与自然条件有差异而造成单孢子无法成熟释放？还是坛紫菜还具有其他不为人知的发育途径？从本次实验结果来看，在最接近自然海水成分的条件下，坛紫菜单细胞发育成的小苗确实没有放散出单孢子，但是在部分胶质层加厚的细胞团中，却有放散小孢子的迹象，有些小孢子无色、透明，与条斑紫菜单孢子大小、形态相似，但是却似没有活力，在固体培养基上没有进一步发育，而是消亡了。所以实验结果表明，并不能断定坛紫菜是没有单孢子无性生殖途径的，至少发现有类似单孢子形态的细胞出现，虽然没有发生实质性发育。今后的实验要用显微操作将这些单孢子挑出，置于营养海水中，跟踪观察。

2、与条斑紫菜、半叶紫菜相比，坛紫菜离体单细胞的成苗率较低，细胞多以细胞团的发育途径为主。但是从实验室的结果来看，坛紫菜无法达到那么高的产量。因此，现有的实验室条件可能并不适合坛紫菜的生长。我们必须继续探究坛紫菜实验室培养的最佳状态，只有这样，才有可能找到坛紫菜大规模繁殖的真正原因，找到其他存在的生殖方式，为今后的坛紫菜养殖业开辟新的途径。

3、成熟坛紫菜中精子囊细胞数量相当少，且很少能发现有成块聚集生长的组织碎片，因此在对坛紫菜叶状体进行酶解和物理处理后，所剩精子细胞数目就更为稀少。在培养皿中观察到的个别精子囊细胞虽然能够成熟放散出精子，但是这些精子活性都很低，且都消亡而没有发现有发育成单性丝状体。因此在以后的实验中，我们要从坛紫菜的采摘时间着手，尽量在精子大规模放散之前就取回实验室培养，增加观察到精子细胞发育的几率，以证实坛紫菜中是否也有单性生殖的模式。

参考文献

- [1]. 戴继勋, 张全启, 包振民, 于波, 周浩朗. 紫菜原生质体的纯系培育、诱变处理和种间细胞融合的研究. 海洋与湖沼, 1990, 21(3): 293-296.
- [2]. 黒木宗尚. アマノリ類の生活史の研究、第I報、果孢子的 鬚芽と生長. 東北區水産研究所研究報告, 1953, 2: 67-103.
- [3]. 侯旭光, 梅俊学. 温度和干出对条斑紫菜单孢子放散的影响. 齐鲁渔业, 1998, 16(4): 4-5.
- [4]. 姜红霞. 华北半叶紫菜和坛紫菜的生活史多样性研究. 中国海洋大学, 研究生学位论文, 2004.
- [5]. 李世英, 崔广法. 条斑紫菜单孢子和壳孢子幼苗生长发育的初步观察. 海洋与湖沼, 1980, 11(4): 370-374.
- [6]. 李世英, 许璞, 王敏. 光照时间对条斑紫菜叶状体生长和单孢子的形成、放散和附着的影响. 海洋科学, 1988, 4: 58-61.
- [7]. 马家海, 蔡守清. 紫菜的生殖与生活史. 条斑紫菜的栽培与加工, 科学出版社, 1996, 22-28.
- [8]. 马家海, 申宗岩. 贝壳紫菜单孢子和叶状体的研究. 水产学报, 1996, 20(2):132-137.
- [9]. 沈颂东, 戴继勋, 周立冉. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 丝状体的超微结构观察. 海洋通报, 2000, 19(3): 38-44.
- [10]. 沈颂东, 项文钰, 顾勤英, 袁昭岚. 四种紫菜的6种同工酶研究. 海洋与湖沼, 2006, (已录用).
- [11]. 沈颂东, 项文钰. 条斑紫菜生殖方式多样性的观察, 生物多样性, 2006, 已投稿.
- [12]. 汤晓荣. 紫菜叶状体的发育研究. 中国科学院海洋研究所博士论文, 1997, 29-94.
- [13]. 汤晓荣, 费修绶. 温度和光照对条斑紫菜壳孢子苗生长和单孢子形成放散的影响. 水产学报, 1998, 22(4): 378-381.
- [14]. 汤晓荣, 费修绶. 半叶紫菜华北变种的丝状体成苗研究. 海洋与湖沼, 1999,

- 30(2): 180-185.
- [15]. 王素娟, 章景荣. 紫菜一新种——单孢紫菜的研究. 海洋与湖沼, 1980, 11(2): 141-147.
- [16]. 王素娟等, 坛紫菜营养细胞和原生质体的研究(I). 海洋与湖沼, 1986, 17(3):217-221
- [17]. 王素娟, 《海藻生物技术》, 第一版. 上海科学技术出版社, 1994.
- [18]. 项文钰, 沈颂东. 华北变种半叶紫菜生殖方式多样性的观察. 苏州大学学报, 2006, 已投稿.
- [19]. 许璞, 费修缙, 张学成, 朱建一, 沈颂东. 紫菜色素突变体诱导的研究——I. NG对紫菜壳孢子诱变的效果及遗传分析. 海洋通报, 2002, 21(5): 19-25.
- [20]. 许璞, 费修缙, 张学成, 朱建一, 沈颂东. 紫菜色素突变体诱导的研究——II. NG对紫菜壳孢子诱变的效果及遗传分析. 海洋通报, 2002, 22(1): 24-29.
- [21]. 严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析. 水产学报, 2000, 24(3): 221-228.
- [22]. 严兴洪, 张饮江, 王志勇. 坛紫菜细胞的连续克隆培养和悬滴培养. 水产学报, 1990, 14(4): 336-340.
- [23]. 曾呈奎, 张德瑞. 紫菜的研究I. 甘紫菜生活史. 植物学报, 1954, 3(1): 287-302.
- [24]. 曾呈奎, 张德瑞. 紫菜的研究III. 紫菜的有性生殖. 植物学报, 1955, 4(2): 153-166.
- [25]. 朱家彦, 马家海, 蒋虎祥. 坛紫菜壳孢子超微结构的研究. 水产学报, 1980, 4(2): 135-140.
- [26]. 朱家彦, 马家海, 蒋虎祥. 坛紫菜自由丝状体细胞超微结构的初步研究. 水产学报, 1984, 8(3): 235-242.
- [27]. Aguirre-Lipperheide M., Estrada-Rodriguez & Evans L.V.. Facts, problems, and needs in seaweed tissue culture: An appraisal. J. Phycol, 1995, 31: 677-688.
- [28]. Bird C.J.. Aspects of the life-history and ecology of *Porphyra linearis* (Bangiales, Rhodophyceae). *Can. J. Bot.*, 1973, 51: 2371-2379.
- [29]. Cannon M.I.. Cell division patterns and diurnal cycle of *Porphyra abbottae* (Rhodophyta, Bangiales) carpogonial and carpospore development. *J Phycol*, 1989, 25, 612-615.
- [30]. Chen L.C.M., Edelstein T., Ogata E. & Mclachlan J.. Life-history of *Porphyra*

- miniata*. *Can. J. Bot.* , 1970, 48: 385-389.
- [31]. Chen L.C.M.. Cell development of *Porphyra miniata* (Rhodophyta) under axenic culture. *Botanica Marina*, 1986, 29: 435-439.
- [32]. Chen L.C.M.. Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. *Botanica Marina*, 1987, 30: 399-403.
- [33]. Chen L.C.M., Hong M.F. & Craigie J.S.. Protoplast development from *Porphyra linearis*-an edible marine red alga. *Proc. Int. Proto. Symp.* , 1987, 7: 123-124.
- [34]. Cole K. & Conway E.. Phenetic implications of structural features of the perennating phase in the life history of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophyceae, Rhodophyta). *Phycologia*, 1975, 14(4): 239-245.
- [35]. Cole K. & Conway E.. Studies in the Bangiaceae: Reproductive modes. *Botanica Marina*, 1980, 23: 545-553.
- [36]. Conway E.. Autecological studies of the genus *Porphyra*: I. The species found in Britain. *Brit. Phycol. Bull.* , 1964, 2: 342-348.
- [37]. Conway E. & Cole K.. Observations on an unusual form of reproduction in *Porphyra* (Rhodophyceae, Bangiales). *Phycologia*, 1973, 12, 213-225.
- [38]. Conway E. & Cole K.. Studies in the Bangiaceae: struture and reproduction of the conchocelis of *Porphyra* and *Bangia* in culture (Bangiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 1977, 16: 205-216.
- [39]. Conway E., Mumford T.F., & Scagel R.F.. The genus *Porphyra* in British Columbia and Washington. *Syesis*, 1975, 8: 185-244.
- [40]. Dai J.X., Quan Q.Z. & Zhen M.B.. Genetic breeding and seedling raising experiments with *Porphyra* protoplasts. *Aquaculture*, 1993, 111: 139-145.
- [41]. Dixon P.S.. Biology of Rhodophyta. *Oliver & Boyd*, 1973, xiii + 285.
- [42]. Drew K.M. Conchocelis-phase in the life-history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz *Nature*, 1949, 164 748-751.
- [43]. Drew K.M.. Studies in the Bangioideae. III The life-history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. Var *laciniata* (Lightf.) J. Ag. *Ann Bot., N S* , 1954, 18: 183-211.
- [44]. Drew K.M.. Reproduction in the Bangiophyceidae. *Bot. Rev.* , 1956, 22: 553-611
- [45]. Freshwater D.W. & Donald F.K.. Spheroplasts isolation and propagation of *Porphyra*

- carolinensis* Coll et Cox for mariculture. *Aquaculture*, 1989, 81: 101-110.
- [46]. Freshwater D.W. & Kapraun D.F.. Field, culture and cytological studies of *Porphyra carolinensis* Coll et Cox (Bangiales, Rhodophyta) from North Carolina. *Jpn. J. Phycol.*, 1986, 43: 251-262.
- [47]. Hafting J.T.. A novel technique for propagation of *Porphyra yezoensis* Ueda blades in suspension culture via monospores. *J. Applied Phycology*, 1999, 11: 361-367.
- [48]. Hawkes M.W.. A field, culture and cytological study of *Porphyra gardneri* (Smith & Hollenberg) comb. Nov., (= *Porphyrella gardneri* Smith & Hollenberg), (Bangiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 1977, 16: 457-469.
- [49]. Hawkes M.W.. Sexual reproduction in *Porphyra gardneri* (Smith et Hollenberg) Hawkes (Bangiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 1978a, 17(3): 329-353.
- [50]. Hawkes M.W.. A field, culture and cytological study of *Porphyra gardneri*, *Pirphyra nereocystis* and *Porphyra thuretii* (Rhodophyta, Bangiophycidae). *Ph. D. Thesis, University of British Columbia, Vancouver*, 1978b, 27 + 239.
- [51]. Hawkes M.W.. Ultrastructure characteristics of monospores formation in *Porphyra gardneri* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 1980, 16: 192-196.
- [52]. Kapraun D. F. & Lemus A. J.. Field and culture studies of *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Oliveira Filho et Coll (Bangiales, Rhodophyta) from Isla de Margarita, Venezuela. *Botanica Marina*, 1987, 30: 483-490.
- [53]. Kito H.. Cytological studies of several species of *Porphyra*. II. Mitosis in carpospore-germlings of *Porphyra yezoensis*. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 1967, 18: 201-202.
- [54]. Kito H.. Cytological studies of species of *Porphyra* II. Chromosome number of *Porphyra tenera* Kjellm. *Bull Tohoku Reg Fish Res Lab*, 1968, 28:137-140.
- [55]. Kito H.. Cytological observation on the conchocelis-phase in three species of *Porphyra*. *Bull Tohoku Reg Fish Res. Lab*, 1974, 33: 101-117.
- [56]. Kito H. Cytological studies on genus *Porphyra* *Bull Tohoku. Reg Fish Res Lab*, 1978, 39: 29-84
- [57]. Kornmann P. Life histories of monostromatic *Porphyra* species as a basis for taxonomy and classification. *Eur. J. Phycol.*, 1994, 29: 69-71.

- [58]. Liu X.W. & Kloareg B.. Tissue culture of *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). I. The effects of plant hormones on callus induction from tissue explants. *C.R. Acad. Sci. Paris Ser. III*, 1991, 312: 517-522.
- [59]. Magne F.. La structure du noyau et le cycle nucléaire chez le *Porphyra linearis* Greville. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 1952, 234: 986-988.
- [60]. Migita S.. Cytological studies on *Porphyra yezoensis* Ueda. *Bull. Fac. Fish., Nagasaki Univ.*, 1967, 24: 55-64.
- [61]. Mitman G.G.. Meiosis, blade development and sex determination in *Porphyra umbilicalis* (L.) J. Agardh from Avonport, Nova Scotia, Canada. *Ph. D. thesis, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada*, 1992, 142.
- [62]. Mitman G.G. & van der Meer J.P.. Meiosis, blade development, and sex determination in *Porphyra purpurea* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 1994, 30:147-159.
- [63]. Miura A. & Kunifuji Y.. Genetics analysis of the pigmentation types in the seaweed susabi-nori (*Porphyra yezoensis*). *Iden*, 1980, 34: 14-20.
- [64]. Mizukami Y., Okauchi M., Kito H., Ishimoto S.I., Ishida T. & Fuseya M.. Culture and development of electrically fused protoplasts from red marine algae, *Porphyra yezoensis* and *P. suborbiculata*. *Aquaculture*, 1995, 132: 361-367.
- [65]. Nelson W. A., Brodie J. & Guiry M. D.. Terminology used to describe reproduction and life history stages in the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 1999, 11: 407-410.
- [66]. Ohme M., Kunifuji Y. & Miura A.. Cross experiments of the color mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Jap. J. Phycol.*, 1986, 34: 101-106.
- [67]. Ohme M. & Miura A.. Tetrad analysis in conchospore germlings of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta, Bangiales). *Plant Sci.*, 1988, 57: 135-140.
- [68]. Packer M.A.. Protoplast formation from single cells and small tissue fragments of wild *Porphyra* fronds (Rhodophyta). *Botanica Marina*, 1994, 37: 101-108.
- [69]. Polne-Fuller M., Biniaminov M. & Gibor A.. Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. *Hydrobiologia*, 1984, 116/117. 308-313
- [70]. Polne-Fuller M. & Gibor A.. Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic

- degestion, and protoplast regeneration. *J. Phycol.*, 1984, 20: 609-616.
- [71]. Polne-Fuller M. & Gibor A.. Calluses, cells, and proplasts in studies towards genetic improvement of seaweeds. *Aquaculture*, 1986, 57: 117-123.
- [72]. Polne-Fuller M. & Gibor A.. Calluses and callus-like growth in seaweeds: Induction and culture. *Hydrobiologia*, 1987, 151/152: 131-138.
- [73]. Polne-Fuller M. & Gibor A.. Developmental studies in *Porphyra*. III. Effect of culture conditions on wall regeneration and defferentiation of protoplasts. *J. Phycol*, 1990, 26: 674-682.
- [74]. Pueschel C.M. & Cole K.M.. Ultrastruture of germination carpospores of *Porphyra variegata* (Kjellm.) Hus (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol*, 1985, 21: 146-154.
- [75]. Shen S.D., Dai J.X.. Isolated cells of *Porphyra yezoensis* cultured on solid medium. *Marine Science Bulletin*, 2001, 20(1): 45~50.
- [76]. Sidirelli-Wolff M.. The influence of temperature, irradiance and photoperiod on the reproduction life history of *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta) in laboratory culture. *Botanica Marine*, 1992, 35: 251-257.
- [77]. Tseng C.K. & Chang T.J.. Studies on the life history of *Porphyra tenera* Kjellm. *Scientia Sinica*, 1955, 4: 375-398.
- [78]. Tseng, C.K.. Common seaweeds of China. Science press, Beijing, China, 1983, 44.
- [79]. Tseng C.K. & Sun A.S.. Studies on the alternation of the nuclear phase and chromosome numbers in the life history of some species of *Porphyra* from China. *Bot. Mar.*, 1989, 32:1-8.
- [80]. Waaland J.R., Dickson L.G., Carrier J.E.. Conchocelis growth and photoperiodic control of conchospore release in *Porphyra torta* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 1987, 23: 399-406.
- [81]. Wada H. Experimental studies on the life history of *Phorphyra tenera* Kylin. *Bull. Jap Soc Scient Fish.*, 1941, 10:47-59.
- [82]. Wang S & Xu Z.. Ultrastructural studies on the reproductive organs of *Porphyra hautanensis* T J. Chang et B F Zheng. *Hydrobiologia*, 1984, 116/117: 213-217.
- [83]. Yan Zuomei. A study on the cultivation of the isolated reproductive cell of *Porphyra katadae* Miura var *Hemiphylla* Tseng et T. J. Chang. *Collected Oceanic Works*, 1987,

10: 135-138.

- [84]. Zhao H.D. & Zhan X.C.. Isolation and cultivation of the vegetative cells of *Porphyra yezoensis* Ueda. *J. Shandong Coll. Oceanol.*,1981, 11:66.

攻读学位期间公开发表的论文

- 1、项文钰, 沈颂东, 吴玉良, 微藻冷冻保藏研究。水利渔业, 2004, 24 (3), 23-24。
- 2、顾勤英, 沈颂东, 项文钰, 陈焕, 坛紫菜的细胞发育研究。苏州大学学报 (自然科学版), 2005, 21 (3), 78-82。
- 3、Songdong Shen, Wenyu Xiang, Chunlin Shi. Detection of the genetic diversity between green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* with ISSR PCR. The 10th International Conference on Applied Phycology, 130-131.
- 4、沈颂东, 项文钰, 顾勤英, 袁昭岚。四种紫菜的 6 种同工酶研究。海洋与湖沼, 2006, 已录用。
- 5、项文钰, 沈颂东。华北变种半叶紫菜生殖方式多样性的观察。苏州大学学报, 2006, 已投稿。
- 6、沈颂东, 项文钰。条斑紫菜生殖方式多样性的观察。生物多样性, 2006, 已投稿。

致 谢

本研究得到国家自然科学基金课题《紫菜单性生殖的研究》(NSFC-40206019)的资助。

是在导师沈颂东教授的悉心指导和亲切关怀下完成的。沈颂东教授以渊博的专业知识和孜孜不倦的敬业精神,引导我走入了全新的藻类学领域,并在课题的完成过程中给予了我最大的支持、鼓励和帮助。他敏锐的思维、严谨的治学态度、诚恳谦和的为人处事的原则都将会对我以后的学习和工作产生深远的影响,使我受益终生。在此我谨向我的导师沈颂东教授表示最衷心的感谢和敬意。

在学期间,得到了苏州大学多位教授的帮助指导,他们渊博的知识、平易近人的态度、无私的帮助指导,都使我内心充满深切的敬意和谢意。感谢朱江教授、李新平博士、许璞博士、朱建一教授等老师。感谢戴英、沈爱英等老师在研究生学习方面给予的极大帮助!

本论文是在苏州大学生命科学院细胞生物实验室完成的,实验室的诸位老师和同学认真克己的工作学习精神和团结协作的工作氛围给了我极大的影响。感谢研究生胡兆丽、郑峰丰、盛晔、朱艳、李静、王建伟、林阿朋、王丽等在学习和实验中给予我的大力支持和热情帮助,感谢细胞生物实验室工作人员的支持和照顾。

向多年来给予我无限理解和关心的父母、朋友道声:谢谢你们!

我还要感谢我的丈夫顾维华先生,我所取得的成绩离不开他的理解和支持!