

# 羊栖菜生殖托的离体培养的初步研究\*

## SUSPENDED CULTURE OF THE RECEPTACLES OF *Hizikia fusiformis*

逢少军 费修绠 肖天 王继成

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

关键词 羊栖菜, 生殖托, 人工育苗

羊栖菜是一种重要的经济褐藻, 在我国的北方和南方广有分布<sup>[1]</sup>。羊栖菜既可食用, 又可药用。所含有的褐藻多糖具有明显的抑制肿瘤细胞生长的作用。受到种苗培养的限制, 目前羊栖菜的人工栽培的规模还比较小, 所以对羊栖菜繁殖生物学的研究一直为海藻学工作者所关注, 希望能够在种苗生产技术上有所突破, 解决种苗生产的不足。朱家彦等人 1973 年报道了利用有性繁殖规律进行采苗的实验结果; 石岛海带育苗场 1988 年报道了利用生产条件下完成的采苗实验。朱仲嘉 1992 年报道了利用组织培养方法进行假根再生苗的研究。韩国釜山大学 Sohn 教授所领导的研究小组详细地报道了羊栖菜幼孢子体在不同环境条件下的生长发育规律<sup>[2, 3]</sup>。目前种苗的生产基本采用 3 种方式, 一种是利用有性繁殖的规律进行, 将自然成熟的雌雄种菜阴干处理以实现卵和精子的集中排放; 一种是根据羊栖菜假根可以再生植株的特点, 收割成熟的藻体时保留假根, 次年进行养殖; 另外一种是从潮间带采集自然生长的海藻来补充苗源。目前, 3 种方式都存在相当的局限性, 都不能令人满意地解决羊栖菜的种苗问题。笔者认为, 由于羊栖菜独特的生殖方式, 譬如雌雄异株, 异托, 排出的卵挂托等特点, 使得高效率地采集受精卵遇到一定的困难。同时, 对于如何使雌雄生殖托能够在生产条件下达到同步成熟并集中放散, 目前在生产上并没有一个成型的技术体系来解决, 实际的采苗效率并不高。这反映了我们在利用羊栖菜的繁殖生物学规律进行种苗生产方面仍然有许多认识不足, 需要做进一步的研究。这篇文章报道了作者在对生殖托进行离体培养条件下

的生殖托的成熟规律, 并对利用生殖托离体培养技术进行种苗生产的可能性进行了讨论。

### 1 材料和方法

羊栖菜是 1999 年 5 月 8 日取自广东汕头市南澳县低潮带的自然种群, 采集时当地水温是 21 °C, 5 月 12 日运回青岛时只有少量藻体挂托(少于 1% 的藻体挂托)。藻体运输到青岛后于 5 月 14 日垂养在栈桥湾, 养殖水层 0.5 ~ 1 m, 水温是 18 °C, 藻体已经适应了栈桥湾的水文条件, 开始生长和生殖器官的发育, 6 月 14 日观察藻体挂托的比例增高取回挂托的雌雄藻体分枝, 并在实验室完成生殖托的剥离和室内培养试验。

剥离的雌雄生殖托和挂托的分枝(长 15 cm) 分别被培养在不同的容器中, 在光照培养箱中进行控制培养。培养的条件是温度 22 °C, 光强 2 300 lx, 光暗周期为 8/16 (L/D), 培养基采用加富的消毒海水, 每天更换培养基, 并做活体切片观察, 切片厚度在 0.5 ~ 1 mm。

\* 国家 863 项目 819 主题资助项目 819-03-01 号; 中国科学院

院院长基金资助项目 2000602 号。

感谢韩国釜山大学的 Chul Hyun Sohn 教授对该项研究的支持和富有建设性的讨论。本研究得到中国科学院实验海洋生物学开放实验室的支持。

## 2 结果和讨论

### 2.1 离体雌生殖托的排卵规律

剥离的雌生殖托在高倍的解剖镜下可以明显地看到生殖窝孔内的卵子,能够观察到的数量一般在5~6个之间,切片观察窝孔内的卵子呈单核,排列精密。挤压生殖托可以将卵子压出。离体培养的雌生殖托在培养1周后,观察到首批卵子的排放,这些卵子是从生殖托的基部到中部的生殖窝孔中排放的,而位于生殖托顶端的约有1/3的生殖窝中的卵子没有排放。单个生殖托的首批卵子排放量取决于生殖托的大小,托大则排放量大。一个长度在1 cm的雌生殖托上分布有50~70个生殖窝孔,根据观察结果,每个生殖窝孔可以排放10~15个成熟卵子,这样每个生殖托的最终排卵数量在500~1 000个。挂托的卵子呈单核或者多核,依靠透明的黏液和生殖托表面相联系。初排的卵和生殖托结合牢固,很难将卵子剥离,但是挂托2 d后的卵子在剧烈震摇之后,约有30%~50%自然脱落,未受精的卵子在排出3~5 d后腐烂流失。完成首次排卵的生殖托在培养到15 d后,又进行了第二次排卵,排放的卵主要悬挂在托顶,排卵量较少,只有总量的约30%左右。完成全部排卵的生殖托在培养到第20天时开始腐烂,流失。因此单独离体培养的雌生殖托可以完成性成熟,并完成排卵的全过程。

### 2.2 离体雄生殖托的精子排放

发育成熟的雄生殖托排放精子的时间和卵子的时间基本一致。生殖窝内分泌的富含精子的黏液。精子的排放是一个逐渐的过程,可以持续多天。精子很小,长度在5~8 μm之间,带两根侧生鞭毛,可以快速游动。从黏液中不断地释放。活体切片表明,雄生殖窝内有大量的发育成熟的精子囊母细胞,呈梨形。每一个生殖窝内有大量的这种梨型细胞,呈放射状自窝孔壁向窝孔中心排列,梨型细胞没有明显的色素体,细胞质浓厚,呈簇状,一般2~4个为一簇,压片过程中,有许多细胞自囊鞘中滑落,只留下一个空鞘。

### 2.3 卵子的受精是一个逐渐的过程

当将雌雄生殖托混合培养的时候,在培养的第6天,雌生殖托位于中基部的生殖窝孔卵子大量排放,镜检卵子呈多核,尚未受精,至第7~8天,镜检震摇脱落的卵子,大部分已经完成了受精过程,开始了细胞分裂,幼体细胞数目不等,个别的受精卵已经发育

成小的胚胎,有的开始生长假根。在震摇之后检查挂托的生殖托,发现所挂的卵处于从未受精到已经有假根的胚胎等不同发育阶段。进一步的统计结果见图1和图2。

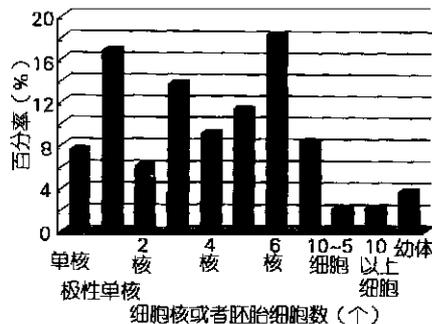


图1 受精后1 d的卵和受精卵的分布格式  
(数字表示细胞核或者胚胎细胞数)

从统计结果来看,同步排出的挂托卵子在受精之后的发育阶段有很大的差别。图1是排卵当天一个生殖托上所有的挂托的卵子的发育阶段分布图。从这个分布图来看,多核卵子所占的比例最高,而多细胞的幼孢子体则相对较少,这和图2中所显示的结果是不一样的。因此从挂托受精卵核相分布可以分析出排卵的时间和受精的规律。在图2中,单细胞的卵或合子所占的比例仅为不足10%,余者皆为多细胞的幼体;而在图1中,多细胞幼体所占的比例不足16%。因此这两个生殖托上所挂的卵子代表了不同受精阶段。这些结果都从一个侧面证明了卵子的受精是一个逐渐的过程。

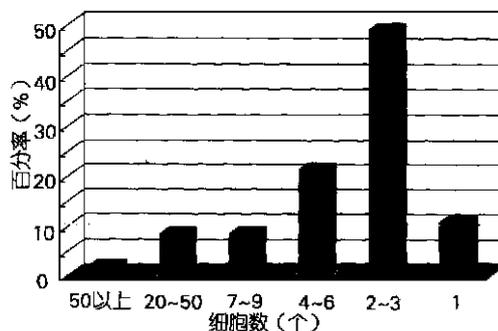


图2 受精后3 d的胚胎分布格式

### 2.4 利用离体培养技术可以实现精卵同步

## 排放的控制

1988年石岛海带育苗场曾经报道过在实际的采苗过程中,遇到了排卵不排精的实际困难,他们观察到精子和卵子的排放有一定的周期性。作者的室内培养实验结果表明,常用的阴干的方法对于这种海藻并不是促进卵子和精子排放的必须手段。即使培养在水中,也可以实现高效率的卵精排放和受精。多次的室内实验观察结果表明,卵子和精子的排放有一定的周期性,生殖托需要一定的培养周期才能完成排卵,其中的生物学机制现在还不完全清楚。大体上来看,有两个阶段是必定无疑的,第一个阶段是卵子和精子的同步成熟,第二个阶段是一定环境条件诱导卵子和精子的排放,根据已经有的资料和这项研究的结果所推测的可能生物学过程是,在同一批成熟的雌生殖托当中,部分前期排放卵子,引发其他生殖托的排放(正反馈过程)。排放的卵子和同时分泌的黏液中含有某种能够促进精子的排放或者激化精子的化学物质,使得精子能够和卵子结合完成受精过程,这个假设需要进一步的实验证实。

无论具体的过程如何,离体的生殖托可以在控制

的条件下完成性成熟,并完成多次排卵和受精表明,利用离体培养的生殖托来实现高效率的受精和种苗生产是可能的。同直接使用种菜藻体进行采苗相比,使用离体培养的生殖托的最大优点是可以很容易的实现卵子和精子的性成熟诱导以及同步排放,从而可以有效地利用有限的种菜采集幼体,实现高效率的种苗培育;其次,受精卵的采收技术可以保证每一个受精卵都能发育生长成正常的植株;最后,生殖托离体培养在技术上使得不同品系之间的杂交变的容易实现,提高了可操作性。

## 参考文献

- 1 王素娟。海藻生物技术。上海:上海科技出版社, 1994。125~133
- 2 Hwang Eun Kyoung, Chan Sun Park and Chul Hyun Sohn. *Journal of Aquaculture*, 1997, 10(2): 199~211
- 3 Park Chan Sun, Eun Kyoung Hwang et al. *The Korean Journal of Phycology*, 1995, 10(1): 45~49

(本文编辑:张培新)