

低温弱光保存的海带 (*Saccharina japonica*) 雌配子体细胞结构变化

王翔宇, 于晓清, 丁 刚, 宋爱环, 刘洪军

(山东省海洋生物研究院, 山东 青岛 266104)

[摘要] 低温弱光保存的部分海带配子体会出现颜色变为浅褐色和白色的现象。以海带雌配子体为对象, 采用显微和透射电镜观察的方法, 研究不同状态的细胞显微和超微结构。结果发现: 颜色变浅的配子体细胞内部分布变得不均匀, 出现质壁分离现象, 色素体、细胞核和线粒体等细胞器形状变得不规则, 色素体片层结构变得模糊; 变白的配子体细胞内部空泡化, 细胞器完全溶解, 或者只残存少量色素体, 细胞壁边缘变得粗糙。

[关键词] 海带; 雌配子体; 显微结构; 超微结构

[中图分类号] S 917

Study on Changes in Cell Structure of *Saccharina japonica* Female Gametophyte Under Low Temperature and Weak Light

WANG Xiangyu, YU Xiaqing, DING Gang, SONG Aihuan, LIU Hongjun

(Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China)

Abstract: The study is on the cell microstructure and ultrastructure of color changed *Saccharina japonica* female gametophyte which is preserved under low temperature and weak light. The micro observation and transmission electron microscope observation techniques were applied. The results show that the cell interior of light color female gametophyte becomes uneven, and plasmolysis occurs. The shape of organelles such as mitochondria, chromatophores, and nucleus is irregular, while the chromatophor lamellae become obscure. There are a little chromatophores exist in the cell of white gametophyte, or the internal organelles disappear totally, while the edge of the cell wall becomes rough.

Keywords: *Saccharina japonica*; female gametophyte; microstructure; ultrastructure

0 引言

海带是一种具有异型世代交替的大型褐藻, 具有微小的配子体世代和大型的孢子体世代, 自然分布于朝鲜北部沿海, 日本本州北部、北海道, 以及俄罗斯南部沿海^[1]。我国以前没有自然生长的海带, 20世纪50年代以来, 经过我国科研人员的不懈努力, 建立了海带的规模化育苗和养殖技术, 并创制了一系列优良种质^[2]。在海带种质的保存方式上, 低温弱光保存配子体是公认的长期保存海带

[收稿日期] 2018-04-08

[基金项目] 山东省重点研发计划项目(2016GSF115007); “十三五”海洋经济创新发展示范项目: 青岛市海洋生物种质资源发掘与利用公共服务平台; 山东省农业良种工程课题(2014LZ004)

[作者简介] 王翔宇(1979—), 男, 助理研究员, 主要从事褐藻繁育研究。通信作者: 刘洪军(1964—), 男, 研究员, 主要从事海洋生物繁育研究。E-mail: hongjunl@126.com

种质的最佳方式^[3], 且目前我国的海带种质绝大多数是以这种方式保存的。通过这种保存方式, 有的海带种质可保存长达二十几年^[4]。作者在长期从事海带种质保存的过程中发现, 有些保存的海带配子体的颜色会变浅或者呈现白色, 推测引起颜色变化的原因是细胞结构发生变化, 但还未见此类研究的报道。基于此, 作者观察了不同颜色的海带雌配子体细胞的显微和超微结构, 以为海带种质长期健康保存提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

海带雌配子克隆体取自山东省海洋生物研究院藻类种质库。采集时间是2002年8月。保存条件: 4℃, 光源是荧光灯管, 光照强度为6~9 μmol/(m²·s), 光照时间为8 h, 每3个月更换1/3的培养液。培养液是经过过滤后煮沸消毒的海水, 添加有285.7 μmol/L N-NaNO₃ (AR, 国药集团化学试剂有限公司), 12.9 μmol/L P-KH₂PO₄ (AR, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验方法

取少量肉眼可见已变浅褐色和完全发白的海带配子体克隆丝状体, 用匀浆机(FSH-2A, 金坛市医疗仪器厂)2000 r/min 粉碎30 s, 然后置于1.5 mL离心管中, 用离心机(MIKRO-120, Hettich, Germany)2000 r/min 离心30 s, 去掉上清液便得到长度较短的配子体片段浓缩液。

1.2.1 显微观察

取少量配子体置于玻片上, 滴1滴低温灭菌海水。用生物显微镜(YS100, Nikon, Japan)40×目镜观察, 并对配子体细胞的结构进行拍照。

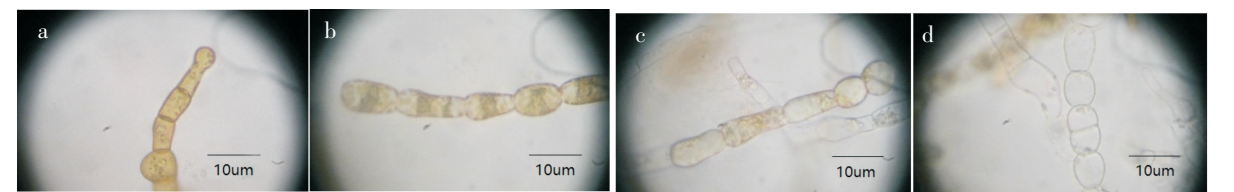
1.2.2 超微观察

取各种状态的配子体, 用4%戊二醛和1%锇酸(体积分数)进行双固定, 置于梯度乙醇中脱水, 用Epon 812树脂渗透包埋, 切取厚60~80 nm的切片, 用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染, 于透射电镜(JEM-1200EX, JEOL, Japan)下观察和拍照。

2 结果

2.1 显微结构

结果显示: 颜色正常的海带配子体细胞呈褐色且分布均匀(见图1a); 颜色变浅的配子体细胞内容物向细胞中间聚集, 细胞两端颜色变浅, 细胞色素分布不均匀(见图1b、1c); 白色的配子体细胞出现空泡化(见图1d)。另外, 各种颜色的雌配子体细胞的外形保持完整。



说明: a—颜色正常的雌配子体; b、c—颜色变浅的雌配子体; d—完全变白的雌配子体
Notes: a—Normal female gametophyte; b, c—Lighter color female gametophyte; d—White female gametophyte

图1 不同颜色的海带配子体的显微照片

Fig.1 Microphotographs of different colors of the female gametophyte

2.2 超微结构

颜色正常的配子体细胞内外层之间有染色较深的颗粒带, 细胞色素体沿着细胞壁的内侧排列, 每条色素体带由3个清晰的类囊体组成, 在色素体上类囊体之间散生或聚集有质体小球, 在细胞的中央有1个形状不规则的细胞核(见图2a)。颜色变浅的雌配子体细胞产生质壁分离现象, 色素体片层变

得不明显，并且产生空泡，细胞核分布的颗粒变得模糊，蛋白核形状不规则（见图 2b），细胞壁变厚，颗粒带消失（见图 2c）。白色的雌配子体细胞中，有的内部只剩下少量色素体（见图 2d），其他细胞器消失；有的内部完全空腔化，细胞壁边缘变得粗糙（见图 2e）。

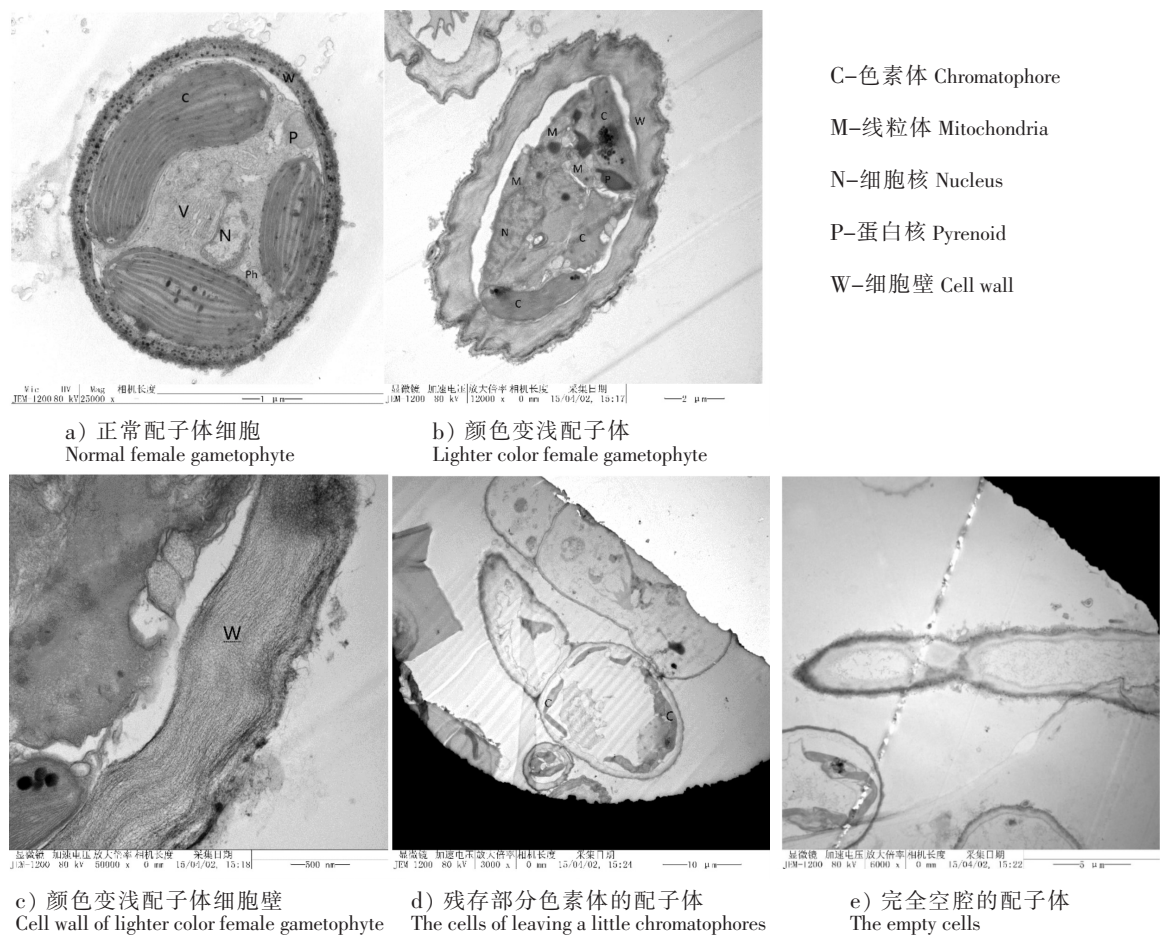


图 2 海带配子体的超微结构
Fig.2 Ultrastructure of female gametophytes

3 讨论

3.1 种质细胞死亡过程

正常海带的雌配子体呈现均匀的褐色，细胞壁外层色淡，在内外层之间常有染色较深的颗粒带；色素体为长椭圆形至长带形，沿着细胞壁的内侧分布，片层清晰；在色素体上类囊体之间散生或聚集有质体小球，在细胞中央有 1 个不规则形的细胞核；线粒体多数分布于色素体的周边，多为长椭圆形；蛋白核一般呈梨形，窄端如柄，与色素体相连^[5]。这与本研究的正常雌配子体细胞一致。但是本研究发现颜色变浅褐色的雌配子体细胞会出现内容物分布不均匀，质壁分离，细胞器形状发生变化的现象，而颜色变白的配子体细胞出现空腔化的现象，并且还发现这两种海带种质细胞显微和超微结构最明显的变化是细胞内容物变得不均匀和色素体片层变得模糊。

在长期保存的条件下，部分配子体细胞出现了变化，最直观的表现就是颜色变化。对于变白色的较好判断，说明种质细胞内容物消失，种质已经死亡，但是，对于种质还是褐色的则较难判断其健康状态。原因有两个方面，一是根据作者长期观察，不同的海带种类其种质颜色有所区别；二是长期保存的配子体细胞变化的过程是不明显的，一旦出现肉眼能够识别的颜色变化时种质细胞基本处于不健

康的状态。因此,需要进一步研究各类雌、雄配子体细胞的死亡过程,以确定低温弱光保存的海带种质细胞死亡的特异性指标,为海带种质长期健康保存提供参考。

3.2 种质细胞死亡原因

海带细胞死亡的原因和过程多种多样。如:在高浓度(0.67 mg/L)的丙溴磷^[6]、褐藻酸降解菌^[7]和紫外照射^[8]作用下,海带孢子体的色素体最敏感;UV-B对于发育期的配子体影响也较明显,连续照射72 h的游孢子发育成的配子体,其细胞壁较厚,有破损,色素体的片层结构不易区分^[9]。本研究中的海带雌配子体处于低温弱光慢速的营养生长阶段,保存时间达十多年,部分雌配子体细胞发生颜色变浅现象,细胞内出现较大空腔,其他细胞器消失时色素体仍然少量存在,且其细胞死亡不是受到强烈的理化或生物因素作用,而是在长期保存过程中发生的,其死亡的类型^[10]及其死亡机制,还需要有更多的不同保存时间的数据和分子结构方面的实验来进一步研究。

4 结论

在低温弱光条件下保存的海带雌配子体细胞会部分出现颜色变浅或者变白。对颜色变浅的细胞在显微镜下观察可发现其细胞内容物出现分布不均匀,且向中央聚集的现象;超微结构研究显示其细胞器出现不规则或者降解的现象。白化细胞的内容物中色素体仅残存少量或已完全降解。

致谢:感谢中国海洋大学王高歌教授对细胞结构的专业指导。

[参 考 文 献]

- [1] 段德麟, 缪国荣, 王秀良, 等. 海带养殖生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 3-4.
- [2] 李言, 刘延岭, 崔翠菊, 等. 海带种质资源遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物技术通讯, 2016, 32(4): 151-158.
- [3] 缪国荣. 海带配子体的室内保存方法 [J]. 海洋渔业, 1982(1): 19-20.
- [4] 王翔宇, 吕芳, 詹冬梅, 等. 养殖海藻种质资源保存研究进展 [J]. 水产科学, 2013, 32(6): 368-372.
- [5] 王素娟. 中国经济海藻超微结构研究 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1991: 190-191.
- [6] 白逢伟, 刘宗进, 李永祺. 丙溴磷对孤雌生殖海带细胞超微结构的影响 [J]. 环境科学学报, 2000, 20(2): 248-250.
- [7] 黄健, 唐学玺, 刘涛, 等. 褐藻酸降解菌侵染过程中海带超微结构及多酚和多酚氧化酶的变化 [J]. 高技术通讯, 2002(9): 73-77.
- [8] HOLZINGER A, PIAZZA L D, LÜTZ C, et al. Sporogenic and vegetative tissues of *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae) exhibit distinctive sensitivity to experimentally enhanced ultraviolet radiation; photosynthetically active radiation ratio [J]. Phycological Research, 2011, 59(4): 221-235.
- [9] 刘素. 海带早期发育对 UV-B 辐射增强及其与其它环境因子交互作用的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 56-59.
- [10] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝, 等. 细胞生物学 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 341.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)