

## 长心卡帕藻四分孢子发育成配子体的形态建成观察

庞通<sup>1,2</sup>, 刘建国<sup>1\*</sup>, 林伟<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**2007年11月到2009年4月在海南黎安,以养殖多年的红褐色长心卡帕藻为材料,跟踪观察了四分孢子形成、释放、萌发以及配子体苗形态建成过程。结果表明,(1)该长心卡帕藻被确定为四分孢子体,四分孢子形成和释放主要发生在夏季和秋季(2008年4月到2008年10月)。(2)人工诱导可促使四分孢子萌发并形成胚苗,胚苗色泽出现明显分化,有红褐色、黄绿色、深绿色、黄绿—红嵌合等不同类型。(3)四分孢子萌发率达到 $87.1\% \pm 7.2\%$ ,培养皿内胚苗平均日生长率为 $(6.3 \pm 1.1)\%/d$ ,在四分孢子萌发10d左右假根出现并于培养30d左右消失。(4)胚苗经过约5个月实验室培养发育成的配子体苗达到了下海挂养程度大小,在海上培养初期配子体苗日生长率大多在 $10\%/d$ 以上,最高可达 $21.2\%/d$ ,但随着藻体长大生长速率逐渐下降。经过4个多月海上挂养栽培,获得了藻枝形态、粗细、疏密程度和生长速率等差异明显的多种配子体,部分配子体活力和抗逆性比其母本有显著增加。

**关键词:**长心卡帕藻;四分孢子;日生长率;配子体

**中图分类号:**Q 75;S 917

**文献标识码:**A

红藻门,真红藻纲,杉藻目,红翎菜科的长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)是国际上κ型卡拉胶原料的主要来源,从二十世纪七十年代开始在菲律宾、印度尼西亚等热带以及亚热带国家地区人工栽培,养殖面积逐年增加。目前该藻栽培采用简单易行的营养繁殖方式获得种苗,但是长期营养繁殖导致了该藻种品质下降,出现胶质量产量降低、可抗病力减弱<sup>[1]</sup>等问题。2008年夏季,中国海南省养殖的长心卡帕藻大规模爆发疾病而死亡<sup>[2]</sup>,因此,培育栽培性状优良的新苗种成为了该藻栽培过程中需要解决的关键问题。

在以往的研究中,分别利用愈伤组织方法获得麒麟菜属及卡帕藻属新种苗,但到目前该技术的生产应用难度依然较大<sup>[3-8]</sup>。Salvador等<sup>[9]</sup>利用内脏提取酶探讨了麒麟菜属及卡帕藻属植物原生质体分离的方法,但是受分解麒麟菜类及卡帕藻类细胞壁酶类较少的限制,获得大量麒麟菜属及卡帕藻属植物原生质体也存在较大困难,远没

有像江蓠属紫菜属藻类那样相对容易获得原生质体并进而培育出新植株<sup>[10-13]</sup>。

麒麟菜属及卡帕藻属热带产胶海藻都为同型世代交替,理论上生活史中存在四分孢子体(2N)、囊果(2N)和配子体(N)3种植物体形态,因此在掌握生活史规律的情况下有可能人工培育新苗种。Paula等<sup>[14]</sup>和Bulboa等<sup>[15]</sup>分别采集到*K. alvarezii*和*K. striatum*四分孢子,并成功培养出一些形态差异较大的配子体。Azanza-Corrales等<sup>[16-17]</sup>开展了长心卡帕藻果孢子释放和人工培养实验,并获得了四分孢子体苗。上述四分孢子及果孢子育苗研究报道预示了该藻存在有性繁殖方式复壮育苗的潜力。为培育藻胶质量含量高、抗病力强、生长速度快并能够抵御低温风浪的栽培株系,实验在海南黎安,细致地跟踪观察了四分孢子形成、释放、萌发以及配子体苗形态建成过程。

收稿日期:2009-10-20

修回日期:2010-01-04

资助项目:国家自然科学基金面上项目(30771638);国家海洋行业公益性科研重点专项资助(200705010)

通讯作者:刘建国, E-mail: jgliu@ms.qdio.ac.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 四分孢子的形成及释放

实验材料选取海南省陵水县黎安海湾人工栽培的长心卡帕藻,于2007年11月到2008年11月定期采取样品并显微观察主干的表皮组织纵切面和横切面,借助数码相机拍照记录实验期间四分孢子的形成及释放规律。

### 1.2 四分孢子收集及培养方法

在四分孢子成熟释放期,定期海中取健康成熟四分孢子体海藻,每棵约500 g,去其侧枝,在自来水下冲洗并用毛刷清除其表面污物,然后将清洗过的藻体用灭菌海水冲洗3次,再切成5 cm左右藻段,装入6个预先灭菌含有400 mL海水(盐度32)的500 mL锥形瓶中,每瓶50 g藻段,将锥形瓶封口后置于培养箱中,在26℃,200  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强,光照时间14 h/d条件下培养2 d,培养过程中每隔3小时摇晃1次。培养两天后的海水依次用50  $\mu\text{m}$ 和10  $\mu\text{m}$ 网孔筛绢过滤,过滤完后以约40 mL灭菌过的f/2培养基将四分孢子从10  $\mu\text{m}$ 网孔筛绢上冲洗到烧杯中,每瓶海藻得到20 mL左右孢子液。

选取直径6 cm培养皿,其内放置3个盖玻片(2 cm×2 cm),盖玻片连同培养皿灭菌处理。将收集的孢子液转入到灭菌培养皿中,每个培养皿中倒入10 mL孢子液,放入培养皿中的盖玻片用于后续孢子生长观察。在温度26℃,盐度32,100  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强,光照时间14 h/d条件下培养四分孢子,每5天更换一次灭菌的f/2培养液,观察孢子萌发情况。当孢子培养至42 d时,将已可用肉眼观察到的配子体苗全部移入到100 mL锥形瓶中,每瓶放入f/2培养液40 mL和孢子苗10株,每天摇晃3~4次,培养光强增加到400  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,其它培养条件同上。孢子苗培养至60 d移入500 mL锥形瓶(含300 mL f/4培养液),每瓶不超过20个孢子苗,在上述培养条件基础上增加光强至800  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 并每天通气0.5 h。孢子苗培养至160 d,取40株长势较好的孢苗随机分组,其中20株(每瓶2株)继续在实验室培养,另20株下海挂养(水深25 cm,株间距15 cm,绳间距15 cm)。

### 1.3 配子体苗生长速率及发芽率的检测方法

四分孢子培养第1周后,显微观察并记录发

生细胞分裂的数量,统计孢子萌发率,定期显微测量胚苗长度,测量时将预先置于培养皿内的盖玻片取出,随机测定20个胚苗。

日生长率计算公式: $SGR = [(D_t/D_0)^{1/t} - 1] \times 100\%$

式中,SGR为配子体苗日平均生长速率, $D_0$ 为上次测量时胚苗的直径, $D_t$ 为配子体苗上次测量后培养t天后的直径。

培养160 d后藻体生长改为称重方法,定期测量时先用吸水纸将藻体表面水分吸去,然后用电子天平称量,日生长率计算公式:

$$GR = [(W_t/W_0)^{1/t} - 1] \times 100\%$$

式中,GR为配子体苗的日生长率, $W_t$ 为培养t天后配子体苗的重量, $W_0$ 为配子体苗的初重。

## 2 结果

### 2.1 四分孢子的形成及释放

实验期间切片记录结果显示,我国海南省陵水县黎安海湾栽培的长心卡帕藻上只发现了四分孢子,但没有发现精囊和囊果等生殖细胞或器官,因此推测该养殖藻体为四分孢子体。四分孢子形成和释放具有一定季节性,从4月到10月为该藻四分孢子囊形成和释放的高峰,而11月到次年3月却很少有四分孢子囊存在。光学显微镜观察表明,四分孢子为棕红色,与周围细胞明显不同,不仅个体大而且颜色比周围细胞要深(图版I-1,2)。成熟的四分孢子近圆形,直径在15~25  $\mu\text{m}$ 左右,系表皮细胞特化形成(图版I-3)。刚形成的四分孢子囊呈梭形,两端细胞小而中间两个细胞大(图版I-4)。随着四分孢子囊的成熟,四分孢子囊逐渐向表皮上层移动,并且两端的细胞体积也逐渐增大。到四分孢子囊成熟释放时,两端的细胞大小与中间细胞基本一致(图版I-5),四分孢子囊在成熟过程中的这种形态变化,可减轻向表皮上层移动过程的阻力,使成熟的四分孢子囊更容易释放。无论主干上刚刚释放的四分孢子(图版I-5)还是培养皿内收集得到的四分孢子(图版I-6)都显示释放后四分孢子仍然联在一起,这表明四分孢子释放是以四分孢子囊的形式完成的,四分孢子囊释放后会在藻体表皮上留下伤口痕迹(图版I-7,8)。

### 2.2 四分孢子的萌发及配子体苗的建成

长心卡帕藻四分孢子在收集后培育3~5 d

就开始细胞分裂,经统计分析四分孢子的发芽率较高,为  $87.1\% \pm 7.2\%$  (图版 II-1,2)。在 10 ~ 30 d 培养时间内,四分孢子完成萌发到早期胚的形态建成过程,期间假根(图版 II-3,4,5 中基部浅色部分)在大约 10 d 左右培养时间出现,其后逐渐皱缩变粗,到 30 d 左右假根消失。某些生长较快的配子体苗在 40 d 左右时已经达到肉眼可见大小,除少数配子体苗在 29 d 出现明显分枝外,大部分配子体苗要在培养 40 d 后才会出现分枝,发育到 90 d 左右时部分配子体苗的分枝已经很长(图版 II-6),但是有些生长缓慢的配子体苗直到下海前仍为棒状或球状(图版 II-7)。配子体苗培养半年,较大株系已经长达 10 cm(图版 II-8),培养至 200 d 左右时,生长较快的株系完全达到生产苗种大小要求(图版 II-9)。

### 2.3 配子体苗的生长速率及成活率

在四分孢子萌发为胚苗的前期,胚苗体积相对较小(小于 0.1 mm),经过长度检测平均日生长率为  $(6.3 \pm 1.1)\% / d$ 。随着培养进行胚苗逐

渐长大,42 d 获得的 154 棵胚苗的平均长度达到约 1.5 mm。长大的胚苗从培养皿移入到 100 mL 锥形瓶中继续培养,到 160 d 后藻体平均达 4.0 cm 左右。

对比配子体苗在实验室和海上培养结果(表 1),可以发现海上挂养的配子体生长速度比实验室内的要快很多,前者日生长速率平均为  $(12.8 \pm 6.3)\% / d$ ,后者只有  $(2.4 \pm 1.4)\% / d$ 。该结果同时说明此期配子体完全能够适应海区的自然环境条件,反过来也表明此时实验室内人工培养条件已远远不能满足该藻生长需求,因此应陆续将幼苗移入海中进行培养。

在 154 棵胚苗中,43 株配子体苗在海中生存良好,其它配子体苗死亡或生长非常缓慢一直达不到下海大小要求,只能在实验室内培养保存。单细胞的四分孢子经过约 40 d 发育,生长为肉眼可见配子体苗的成活率约为 0.5%,即该实验条件下得到海中培养的配子体的比率约为 0.1%。

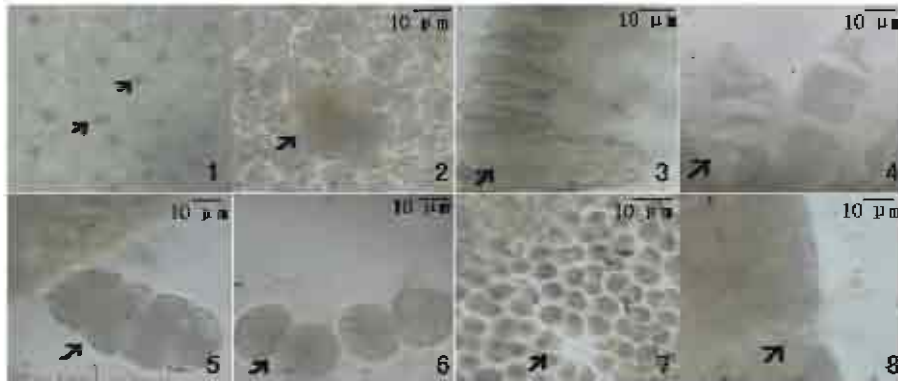
表 1 长心卡帕藻配子体苗在实验室内与海上培养的生长参数对比

Tab.1 Growth parameters of gametophyte of *K. alvarezii* cultured both indoor and in the sea

株系 strains	室内培养 cultured in the door			海上挂养 cultured in the sea		
	初重 initial weight	终重 final weight	日生长率 GR(%/d)	初重 initial weight	终重(g) final weight	日生长率 GR(%/d)
1	0.098	0.127	1.9	0.314	1.932	8.7
2	0.051	0.064	1.6	0.351	0.526	*
3	0.038	0.053	2.4	0.180	1.369	8.9
4	0.043	0.072	3.8	0.160	1.349	10.6
5	0.056	0.07	1.6	0.057	0.308	13
6	0.038	0.053	2.4	0.134	2.605	17.6
7	0.057	0.077	2.2	0.059	0.884	12.8
8	0.027	0.032	1.2	0.075	1.073	14.4
9	0.037	0.043	1.1	0.060	-	-
10	0.028	0.031	0.7	0.054	0.833	19.4
11	0.046	0.059	1.8	0.049	0.136	6
12	0.033	0.049	2.9	0.039	0.306	12.5
13	0.066	0.078	1.2	0.062	0.912	14.1
14	0.066	0.095	2.9	0.052	0.553	15.5
15	0.021	0.056	7.3	0.049	0.168	8.7
16	0.026	0.041	3.3	0.033	0.657	21.2
17	0.025	0.037	2.8	0.043	0.828	18.3
18	0.050	0.079	3.3	0.037	0.317	13.8
19	0.030	0.043	2.6	0.136	1.767	13
20	0.031	0.038	1.5	0.043	1.267	20.9
平均值 average	0.043	0.060	2.4	0.101	0.936	12.8
标准差 SD	0.018	0.024	1.4	0.090	0.640	6.3

注:“-”死亡或丢失,“\*”负数。

Notes:“-” indicates death or loss,“\*” indicates negative.



图版 I 长心卡帕藻四分孢子的形成及释放过程

1. 长心卡帕藻表皮细胞切片, 放大倍数 100 ×; 2. 表皮细胞和四分孢子局部外观, 放大倍数 400 ×; 3. 正在特化为四分孢子囊的表皮细胞; 4. 发育成的四分孢子囊; 5. 与母体表皮刚分离的四分孢子囊; 6. 收集得到的四分孢子; 7. 四分孢子囊释放后在表皮上留下的痕迹(表皮外观); 8. 四分孢子囊释放所留下的痕迹(横切面)。

**Plate I Formation and release of tetraspores of *K. alvarezii***

1. Tetraspores on the epidermis, 100 × magnification; 2. Epidermal cells and tetraspore, 400 × magnification; 3. A tetrasporangium evolved from a epidermal cell; 4. New developed tetrasporangium; 5. A tetrasporangium released from stem; 6. Tetraspores collected in petri dish; 7. An aperture left on the epidermis after tetrasporangium release (surface view of epidermis); 8. An aperture left on the epidermis after tetrasporangium release (transverse section).



图版 II 长心卡帕藻配子体苗的建成过程

1. 未萌发成熟(1 d)的四分孢子形态和大小; 2. 经过 12 d 发育的囊胚, 该期间细胞分裂多次, 但囊胚体积未显著增大; 3. 经过 18 天发育体积明显增大的胚苗, 胚苗假根细长; 4. 经 25 d 发育到 0.1 mm 的胚苗, 胚苗变长但假根已经皱缩; 5. 进一步生长分化 29 d 的胚苗, 假根未见发育; 6. 经 88 d 配子体苗已长出分枝, 假根完全消失; 7. 经 113 d 发育不同形态大小的配子体苗; 8. 经过 180 d 培养, 配子体苗生长到可下海挂养大小, 重量平均达到 0.94 g; 9. 配子体苗海上挂养 8 周达到苗种生产要求。

**Plate II The development of tetraspore to gametophyte of *K. alvarezii***

1. A mature ungerminated tetraspore; 2. A 12 days developed embryo with no significant increase in volume after several times of cell division; 3. A 18 days developed embryo with long rhizoids; 4. A 25 days developed embryo with shrank rhizoids, 0.1 mm in length; 5. Further developed embryo, the growth of rhizoids stopped; 6. Gametophyte about 2cm in length, the rhizoids disappeared; 7. Gametophytes with different morpha; 8. Gametophytes with 0.94 g in average are big enough to be cultured in the sea; 9. A gametophyte cultured in the sea for 8 weeks can be used for seedling.

在海中培养的第 1 个月,配子体苗的平均日生长率普遍达到了 10 %/d 以上(表 2),比同期母本长心卡帕藻 4%~6% 的日生长速率高很多。另外需要指出,16 和 20 号配子体苗的日生长率曾达到 20 %/d 以上,该生长速度比以往国内外报道的长心卡帕藻四分孢子体最大生长速率

10%<sup>[18]</sup>还要高很多。结合上面所述部分配子体生长速率很慢,藻体一直很小呈球状和棒状,可以认为利用四分孢子培育配子体,可以实现某些性状的有效分离,并为进一步育种育苗提供多样化选择,关于这点从配子体形态和色泽镶嵌性状还可得到进一步证明。

表 2 长心卡帕藻配子体苗在海上培养的生长参数  
Tab.2 Growth profiles of gametophyte of *K. alvarezii* cultured in the sea

株系 strains	初重(g) initial weight	比生长速率 GR(%/d)			
		1 个月 1st month	2 个月 2nd month	3 个月 3rd month	4 个月 4th month
1	0.314	8.7	-	-	-
2	0.351	*	8.8	-	-
3	0.180	8.9	3.2	13.2	4.1
4	0.160	10.6	-	-	-
5	0.057	13	3.2	*	-
6	0.134	17.6	6	7.2	3.1
7	0.059	12.8	3.7	10.6	*
8	0.075	14.4	4.2	9.3	2.3
9	0.060	-	-	-	-
10	0.054	19.4	7.5	4	*
11	0.049	6	7.3	6.4	15.1
12	0.039	12.5	5.8	6.3	2.5
13	0.062	14.1	-	-	-
14	0.052	15.5	-	-	-
15	0.049	8.7	5.5	-	-
16	0.033	21.2	8.7	4.1	2.8
17	0.043	18.3	4.7	6.1	*
18	0.037	13.8	7.1	37	*
19	0.136	13.0	7.5	6.7	*
20	0.043	20.9	7.9	7.1	*
平均 average	0.101	13.9	6.1	7.1	5.0
标准差 SD	0.090	4.4	1.9	2.8	5.0

注:“-”死亡或丢失,“\*”负数。

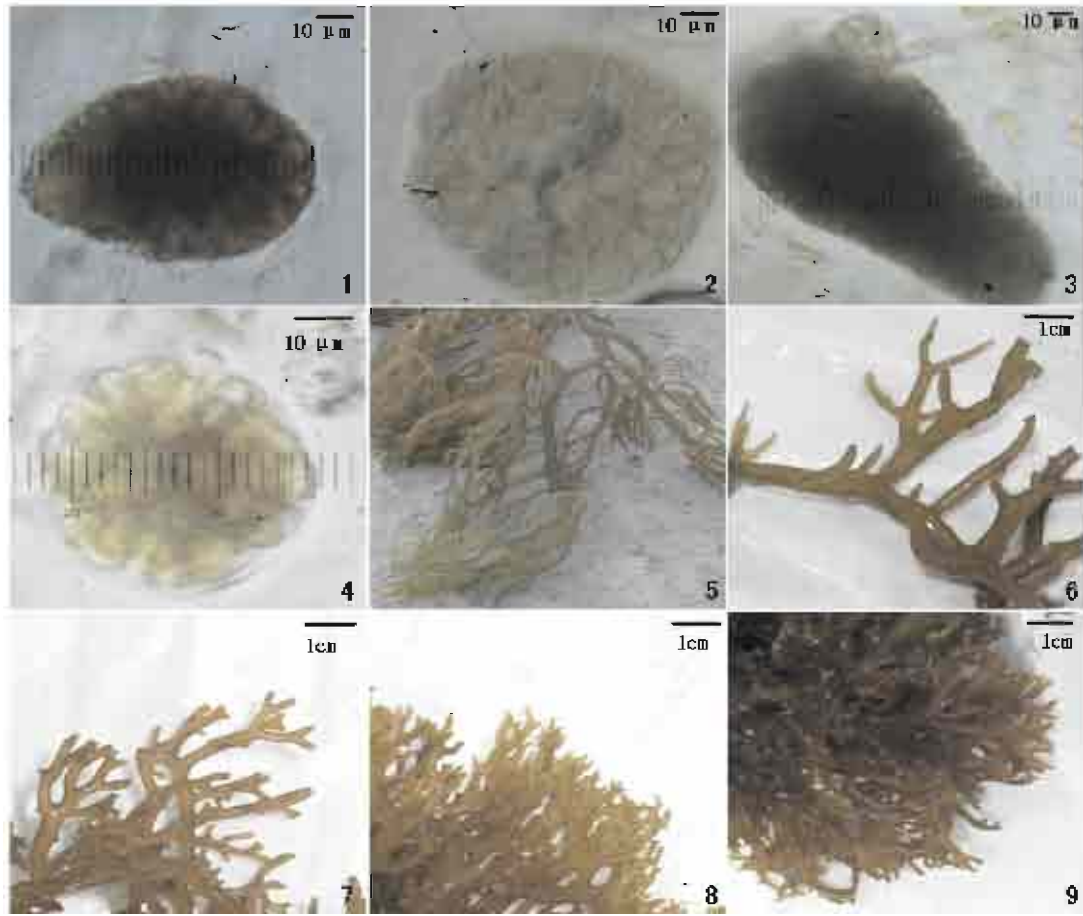
Notes:“-” indicates death or loss,“\*” indicates negative.

#### 2.4 配子体苗形态

长心卡帕藻具有多种形态和颜色变化,但以往对如何变化了解不多。中国栽培的四分孢子体主要是褐色和红色藻体,部分为绿色藻体,偶尔也发现存在褐色—绿色嵌合体。将此种嵌合体状态的褐色部分与绿色部分切开后放于海中分别培养,其颜色性状都可以稳定遗传。

以从红褐色长心卡帕藻获得的四分孢子为实验材料,从胚阶段就观察到不同颜色出现,其中大多数胚为红褐色(图版Ⅲ-1),部分为黄绿色(图版Ⅲ-2)和深绿色(图版Ⅲ-3),还有少数胚为黄绿色与红色的嵌合体(图版Ⅲ-4)。另外,偶尔有

褐色—绿色嵌合体(图版Ⅲ-5)进一步培养结果表明,能够成活 4 个月以上的配子体苗全部为红褐色。海中栽培的配子体苗在形态方面也表现了显著的差异性,从藻枝分枝情况上,大体可将配子体分为四类,Ⅰ型:芽明显粗于其它藻株,顶端较尖,分枝数目较少,主干均为圆柱型(图版Ⅲ-6)。Ⅱ型:芽较细,顶端呈钝顶状,分枝数目较少,主干均为圆柱型(图版Ⅲ-7)。Ⅲ型:芽较细,顶端较尖,分枝数目较多,主干均为圆柱型(图版Ⅲ-8)。Ⅳ型:芽最细,主枝主干为圆柱型,但顶端主干为扁状匍匐型,分枝稠密,易黏附污物(图版Ⅲ-9)。



图版Ⅲ 不同形态色泽的长心卡帕藻配子体胚、配子体苗及四分孢子体

1. 红褐色囊胚; 2. 黄绿色囊胚; 3. 绿色囊胚; 4. 黄绿—红褐色嵌合体囊胚; 5. 黄绿—红褐色嵌合体四分孢子体; 6. I型配子体; 7. II型配子体; 8. III型配子体; 9. IV型配子体。

**Plate III Embryo, gametophytes and tetrasporophyte of  
*K. alvarezii* with different morpha**

1. Brown embryo; 2. Olivaceous embryo; 3. Green embryo; 4. Olivaceous-brown cytochimera; 5. Olivaceous-brown tetrasporophyte; 6. Type I gametophyte; 7. Type II gametophyte; 8. Type III gametophyte; 9. Type IV gametophyte.

### 3 讨论

冰样白化疾病(ice-ice disease)是影响长心卡帕藻产业发展的主要病害,2008年在菲律宾、印尼和我国大规模爆发,导致该藻产量骤减<sup>[2]</sup>。Largo等<sup>[19]</sup>曾经报道低盐、高温等逆境条件下造成藻体受损伤后,藻体更易发生冰样白化疾病。刘建国等<sup>[2]</sup>报道集中降雨造成海水盐度过低是2008年长心卡帕藻大量死亡的主要原因。本结果显示长心卡帕藻四分孢子释放具有季节性,4月份到10月份为在我国海南省长心卡帕藻四分孢子囊形成释放的主要季节,该季节恰巧比疾病爆发期略早一些,在6-10月份发生重叠。长心

卡帕藻四分孢子释放造成表皮结构损伤,污物更容易附着在表皮上残存的伤口上,故增加了染菌和疾病发生率,因此推断四分孢子释放过程如同时遇到低盐、高温等胁迫因素存在,极有可能共同导致冰样白化疾病发生。此外四分孢子体的死亡也极有可能与生物生命周期存在某些相关性,不排除藻体在释放了大量四分孢子后部分死亡,为保障新生命体腾出生活空间的可能性。

长心卡帕藻配子体苗生长到10d左右在胚苗基部出现假根,该特征有利于早期发育的配子体苗附着于岩石、珊瑚礁等固着基上,进而形成一个固定的生存环境萌发生长。黎安海湾有很多的珊瑚礁等固着基,并且已经人工栽培长心卡帕藻

20 多年时间,但是到目前为止却未发现自然生长的配子体苗。造成该现象的原因之一就是四分孢子长成配子体苗的成活率很低,本实验所得成活率约为 0.1%,Paula 等<sup>[14]</sup>和 Bulboa 等<sup>[15]</sup>也报道长心卡帕藻四分孢子发育过程中死亡率较高。在对 *Mazzaella laminarioides* 的孢子培养中,Santelices 等<sup>[20]</sup>发现加入微量  $\text{Ca}^{2+}$  和提高孢子浓度都可以增加孢子间相互结合的程度,并且孢子结合在一起成活率更高。因此是否通过改进技术保持四分孢子的联合程度提高其成活率,是下一步麒麟菜属及卡帕藻属孢子育苗中需要探讨的问题。同时,导致新苗成活率低还可能与长心卡帕藻形成苗体时间过长有关,现有资料表明长心卡帕藻孢子萌发到幼苗下海需要人工培养 10 个月<sup>[14,17]</sup>,我们实验也表明培养配子体苗达到下海挂养大小需要 160 d(图 2)。在自然条件下很难存在如此长的时间供新苗体生长发育,在新苗体长大前(如在幼小配子体甚至胚苗阶段)大量栖息于港湾内的草食性动物(如兰子鱼)等就可能将其啃食了。

需要指出,长心卡帕藻生长速度存在很大变动。Azanza-Corrales 等<sup>[17]</sup>报道该藻从果孢子获得新苗实验室内培养的最高比生长速率 2.5 %/d,Dawes 等<sup>[21]</sup>在菲律宾获得该藻比生长速率在(4.4~8.9) %/d,Hayashi 等<sup>[22]</sup>在巴西报道该藻生长速率在(1.3~6.6) %/d,Hung 等<sup>[23]</sup>报道在越南该藻比生长速率为(1.6~4.6) %/d,Luxton 等<sup>[24]</sup>在斐济得到该藻比生长速率(2.3~5.3) %/d,Wakibia 等<sup>[25]</sup>报道的该藻在肯尼亚的比生长速率(3.1~6.0) %/d,Paula 等<sup>[14]</sup>报道该藻配子体苗海内培养的比生长速率为(0.2~4.5) %/d。而本研究配子体苗在海中挂养比生长速率相对较高,特别是下海后第 1 个月平均达到 10 %/d 以上的生长速率,这很可能与该实验中配子体苗下海时的初重很小,只有 0.033~0.351 g 有关系,随着藻体增加比生长速率逐渐下降(表 2)。

研究长心卡帕藻四分孢子形成、释放、萌发和配子体形态建成过程,不仅有利于了解该藻繁殖规律,而且有利于生产上人工培育新品种。实验期间黎安海湾大规模爆发冰样白化病,导致长心卡帕藻母本全部死亡,但是同一时期利用四分孢子培养的部分幼苗却能够存活下来,说明了新培

育的部分配子体苗抗病能力明显高于其母本。配子体苗海中挂养过程中,其比生长速率变化较大,从 2.5 %/d 到 21.2 %/d 不等,表明通过该方法极有可能获得生长较快的优良新株系。另外,藻枝的疏密程度对产卡拉胶红藻生长也将产生很大影响,藻枝疏密度直接影响体表面积,进而影响氮磷吸收和光合作用速率等,藻枝越密意味着相同体积其有更大的表面积,有可能生长更快,但是藻枝过密却很容易附着一些污染物和附生藻,从而降低藻体生长。

实验注意到通过四分孢子培育的配子体与母本四分孢子体而言不仅生长速率增加了,而且抗病性明显增强,主要体现在很多配子体能够经过 2008 年大规模疾病爆发的洗礼存活下来,而其母本在海南陵水地区却几乎全部死亡。上述结果表明,新配子体活力比母本有很大改善和提高。另外,通过诱导四分孢子萌发培育出的配子体苗表现出多样性,有多种不同色泽组合、生长速率、枝条疏密程度和分枝状况等,这些性状分离系孢子形成过程中减数分裂的结果,为丰富该藻种子资源,培育新种苗提供了多种选择,反过来也证明通过四分孢子培育不同新种苗的可行性。

试验过程中得到了海南省陵水县黎安豪天实业有限公司郑照亮、黄宏贤和李俊等先生的大力协助,谨致谢忱。

#### 参考文献:

- [1] Ask E, Azanza V. Advances in cultivation of commercial eucheumatoid species: a review with suggestions for future research[J]. *Aquaculture*, 2002, 206: 257-277.
- [2] 刘建国, 庞通, 王莉, 等. 导致热带产卡拉胶海藻大规模死亡原因分析与藻株抗病差异性比较[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(2): 235-241.
- [3] Dawes C J, Koch E W. Branch, micropropagule and tissue culture of the red algae *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* farmed in the Philippines[J]. *J Appl Phycol*, 1991, 3: 247-257.
- [4] Dawes C J, Trono G C, Lluisma A O. Clonal propagation of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* for Philippine seaweed farms[J]. *Hydrobiologia*, 1993, 260-261: 379-383.
- [5] Reddy C R K, Kumar G, Siddhanta A K, et al. In

- in vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales) [J]. *J Appl Phycol*, 2003, 39: 610 - 616.
- [6] Munoz J, Cahue-Lopez A C, Patino R, *et al.* Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors [J]. *J Appl Phycol*, 2006, 18: 209 - 218.
- [7] Hurtado A Q, Biter A B. Plantlet regeneration of *Kappaphycus alvarezii* var. *adik-adik* by tissue culture [J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19: 783 - 786.
- [8] Hayashi L, Yokoya N S, Kikuchi D M, *et al.* Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) [J]. *J Appl Phycol*, 2008, 20: 203 - 209.
- [9] Salvador R C, Serrano A E. Isolation of protoplasts from tissue fragments of Philippine cultivars of *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 2005, 17: 15 - 22.
- [10] Yan X H, Wang S J. Regeneration of whole plants from *Gracilaria asiatica* Chang et Xia protoplasts (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*) [J]. *Hydrobiologia*, 1993, 260 - 261: 429 - 436.
- [11] 唐延林. 紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养 [J]. *山东海洋学院学报*, 1982, 12(4): 37 - 50.
- [12] 王素娟, 张小萍, 徐志东, 等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J]. *海洋与湖沼*, 1986, 17(3): 217 - 221.
- [13] 严兴洪. 紫菜种内原生质体的融合和融合体再生 [J]. *上海水产大学学报*, 2001, 10(2): 109 - 117.
- [14] de Paula E J, Pereira R T L, Ohno M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae Rhodophyta) using tetraspore progeny [J]. *J Appl Phycol*, 1999, 11(1): 111 - 121.
- [15] Bulboa C R, de Paula, E J, Chow F. Laboratory germination and sea out-planting of tetraspore progeny from *Kappaphycus striatum* (Rhodophyta) in subtropical waters of Brazil [J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19: 357 - 363.
- [16] Azanza-Corrales R, Aliaza T T. *In vitro* carpospores release and germination of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty from Tawi-Tawi, Philippines [J]. *Bot Mar*, 1999, 42: 281 - 284.
- [17] Azanza-Corrales R, Ask E. *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty carposporeling growth and development in the laboratory [M] // Chapman A, Anderson R J, Vreeland V, Davison I, eds. *Proceedings of the XVII International seaweed symposium*. New York: Oxford University Press, 2003: 95 - 99.
- [18] 吴超元, 李家俊, 夏恩湛, 等. 异枝麒麟藻的移植和人工栽培 [J]. *海洋与湖沼*, 1988, 19(5): 410 - 418.
- [19] Largo D B, Fukami K, Nishijima T. Time-dependent attachment mechanism of bacterial pathogen during ice-ice infection in *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 1999, 11: 129 - 136.
- [20] Santelices B, Aedo D. Group recruitment and early survival of *Mazzaella laminarioides* [J]. *J Appl Phycol*, 2006, 18: 583 - 589.
- [21] Dawes C J, Lluisma A O, Trono G C. Laboratory and field growth studies of commercial strains of *Euclima denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* in the Philippines [J]. *J Appl Phycol*, 1994, 6: 21 - 24.
- [22] Hayashi L, de Paula E J, Chow F. Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of Sao Paulo State, Brazil [J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19: 393 - 399.
- [23] Hung L D, Hori K, Nang H Q, *et al.* Seasonal changes in growth rate, carrageenan yield and lectin content in the red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in Camranh Bay, Vietnam [J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21: 265 - 272.
- [24] Luxton D M, Robertson M, Kindley M J. Farming of *Euclima* in the south Pacific islands of Fiji [J]. *Hydrobiologia*, 1987, 151 - 152: 359 - 362.
- [25] Wakibia J G, Bolton J J, Keats D W, *et al.* Factors influencing the growth rates of three commercial euclimoids at coastal sites in southern Kenya [J]. *J Appl Phycol*, 2006, 18: 565 - 573.



## The morphogenesis of gametophyte of *Kappaphycus alvarezii*

PANG Tong<sup>1,2</sup>, LIU Jian-guo<sup>1\*</sup>, LIN Wei<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The formation, release and germination of tetraspores, together with the morphogenesis of gametophyte of *Kappaphycus alvarezii* were investigated in Lian Bay, Hainan Province, China from November, 2007 to April 2009. The results showed the brown *Kappaphycus alvarezii*, originally gained from Philippines in 1985, were tetrasporophytes and the tetraspores were mainly formed and released from April to October. Both tetraspore germination and embryogenesis could be induced artificially in the laboratory and great variations of embryos in color from brown red, yellow-green, olivine green to olivine-brown chimera were observed. Rhizoids were formed and then disappeared during the embryogenesis period. The germination rate of tetraspores was about  $87.1\% \pm 7.2\%$  and the mean specific growth rate of embryos was about  $6.3\% \pm 1.1\% / d$  for indoor dish culture. After 160 days indoor cultivation, the germinated tetraspores developed to young gametophytes. Then, 20 young gametophytes were cultured on the soften raft in the sea. The average specific growth rate measured was over  $10\% / d$  in the first month culture in the sea, and the highest specific growth rate for young gametophytes was over  $21.2\% / d$ . However, the specific growth rate gradually reduced accompanied with the frond increase in size in the following cultivation. Four types of gametophytes with different morphology, density of branches and growth rate were obtained as follows: Type I shows thick buds, cylinder-shaped trunk, taper terminal, and sparse branches. Type II shows thin buds, cylinder-shaped trunk, blunt terminal, sparse branches. Type III shows thin buds, cylinder-shaped trunk, taper terminal, and dense branches. Type IV shows thin buds, cylinder-shaped trunk, oblate terminal stem, taper terminal, and dense branches. During our experimental period, a large scale of ice-ice disease broke out, and the vitality and resistance to the ice-ice disease in some strains of the gametophytes improved significantly compared to their parent plants.

**Key words:** *Kappaphycus alvarezii*; tetraspore; mean growth rate; gametophyte

**Corresponding author:** LIU Jian-guo. E-mail: jgliu@ms.qdio.ac.cn