

# 大叶藻生殖枝的室内离体培养及种子早期发育研究

刘坤<sup>1,2</sup> 孙修涛<sup>1</sup> 刘福利<sup>1</sup> 王飞久<sup>1\*</sup> 汪文俊<sup>1</sup> 梁洲瑞<sup>1</sup> 马兴宇<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

**摘要** 对大叶藻不同生长状态的生殖枝进行离体培养, 探究室内暂养大叶藻离体生殖枝获取成熟种子的可行性, 观察并描述了大叶藻离体生殖枝的开花、传粉、种子成熟、种子萌发、幼苗发育的动态过程以及大叶藻生殖枝、成熟种子、胚的解剖结构。实验结果表明, 大叶藻生殖枝的结构对海水环境是高度适应的; 花柱的形态变化是大叶藻开花过程的显著特点; 大叶藻种子胚的结构较特殊, “U”型子叶包裹胚根、胚芽、胚轴, 这导致了其特有的萌发过程; 为了不错失种子收集良机, 在不了解某地区大叶藻物候特性时, 提前采收生殖枝并进行室内培养, 是一种获取大叶藻种子的有效方法。

**关键词** 大叶藻 生殖枝 种子 幼苗 离体培养

**中图分类号** Q949; S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)02-0103-06

## Studies on reproductive shoots cultivated *in vitro* and the early development of seeds of *Zostera marina* L.

LIU Kun<sup>1,2</sup> SUN Xiu-tao<sup>1</sup> LIU Fu-li<sup>1</sup> WANG Fei-jiu<sup>1\*</sup>

WANG Wen-jun<sup>1</sup> LIANG Zhou-rui<sup>1</sup> MA Xing-yu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup>Aquatic and Life School, Shanghai Ocean University, 201306)

**ABSTRACT** The reproductive shoots of *Zostera marina* L. in different growth state was cultivated *in vitro* to study the feasibility of harvesting seeds by temporary cultivation of reproductive shoots. The process of flowering, pollination, fruiting, seed germination, seedling development and the anatomical structure of reproductive shoot, mature seed, seed embryo were observed and described. It was found that the structure of reproductive shoots were highly adaptive to the water environment. Their morphological changes were the outstanding feature during flowering. The seeds of *Z. marina* has special embryo structure with the radicle, plumule and hypocotyl wrapped by the U-shaped cotyledon, which led to a characteristic germination process. These results indicated the feasibility of collecting seeds by cultivating *in vitro* the reproductive shoots, where no data on phenological characteristics of *Z. marina* are available.

国家公益性行业(农业)科研专项(201003068)和科技部对欧盟科技合作专项经费项目(0914)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-09-25; 接受日期: 2013-01-02

作者简介: 刘坤(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事海藻生物学研究。E-mail: hiyard@126.com; Tel: 18253276101

**KEY WORDS** *Zostera marina* L. Flowering shoots Seed Seeding  
Cultivation *in vitro*

大叶藻隶属于沼生目 Helobiae、大叶藻科 Zosteraceae、大叶藻属 *Zostera*。作为海草 (Seagrass) 的典型代表,大叶藻在浅海地区以形成广阔海草床的方式对世界范围内近海海洋生态系统做出贡献,其不仅具有重要的经济和生态价值(叶春江等 2002),在生态养殖领域也得到了广泛的应用。有研究发现,在养殖池中移植大叶藻有利于对虾以及海参产量的提高(任国忠等 1991;刘元刚等 2006),并且大叶藻的种子和附生在其叶面上的多种生物可以作为海洋经济物种的饵料(Phillips 1984)。目前,包括我国在内,世界范围内的大叶藻资源正在严重退化(Orth *et al.* 2006;李文涛等 2009;Campanella *et al.* 2010)。相对营养繁殖而言,利用种子进行大叶藻种群的修复,不仅具有成本低、操作简单的优点,而且最大限度地保持了种群的遗传多样性,目前正在成为研究的热点。由于不同地理种群大叶藻的物候特性不同,很容易错失种子收集良机;且种子批量采收易加剧自然资源的进一步破坏等问题,致使种子的收集工作存在较大难度。本研究对大叶藻生殖枝进行离体培养,探究室内暂养大叶藻离体生殖枝获取成熟种子的可行性,观察并描述大叶藻离体生殖枝的开花、传粉、种子成熟、种子萌发、幼苗发育的过程,以期为大叶藻种子的收集提供参考方法,为大叶藻的研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 生殖枝的采集与室内培养

2012年5月下旬,课题组研究人员于山东青岛汇泉湾近海(36°03'N,120°19'E),随机采集100株健康生殖枝,并根据生殖枝的发育情况分为两个实验组。A组:自然状态下未完成受精,雌、雄蕊发育完整,肉穗花序占整个佛焰苞3/4以上,且佛焰苞大小一致。B组:自然状态下已经完成受精,幼嫩种子清晰可见,种子发育状态一致。

利用室内循环海水培养箱,保持水温20℃,自然光,培养大叶藻离体生殖枝,每隔2d更换灭菌海水,并跟踪观察离体生殖枝生长发育情况。花粉放散期间,模拟海浪抖动海水,以促进花粉的扩散。

### 1.2 种子的收集与种子萌发

每2d收集成熟散落的种子。种子收集完毕分别统计A、B组所收集种子的总数以及总湿重,并计算单粒种子的平均重量。解剖种子,制作石蜡切片,拍照(佳能,NIKON-D80I)观察。挑选饱满健康的大叶藻种子,放入盛有灭菌海水的三角瓶中,低盐度刺激种子萌发(Conacher *et al.* 1994),密封瓶口,15℃,光强2000lx条件下无底质培养并定期观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 大叶藻生殖枝的结构

大叶藻的生殖枝在形态上明显区别于其营养枝。生殖枝通常由大叶藻地下茎分化而来,并向上直立生长,常有一个顶端分枝和数个侧生分枝,各分枝于轴上交互排列。每个分枝着生数个佛焰苞,佛焰苞于各自的分枝上交互排列。佛焰苞外包两片透明的苞鞘,苞鞘由两片薄膜相互叠压,形成一个闭合的空间,内为扁平肉穗花序,雌、雄蕊在轴上呈两列间隔排列,轴两侧每2个雄蕊与1个雌蕊交替排列。雄蕊1花药,花药1室,无柄、纵裂。雌蕊1胚珠,柱头具2个分叉。

### 2.2 离体生殖枝的发育情况

A、B组生殖枝在离体条件下均能正常生长,从实验开始到生殖枝完全衰败腐烂,共持续了56d左右。A组:生殖枝能够正常完成受精过程,实验开始后第3天,生殖枝开花,花期持续4d,第17天幼嫩种子清晰可见,

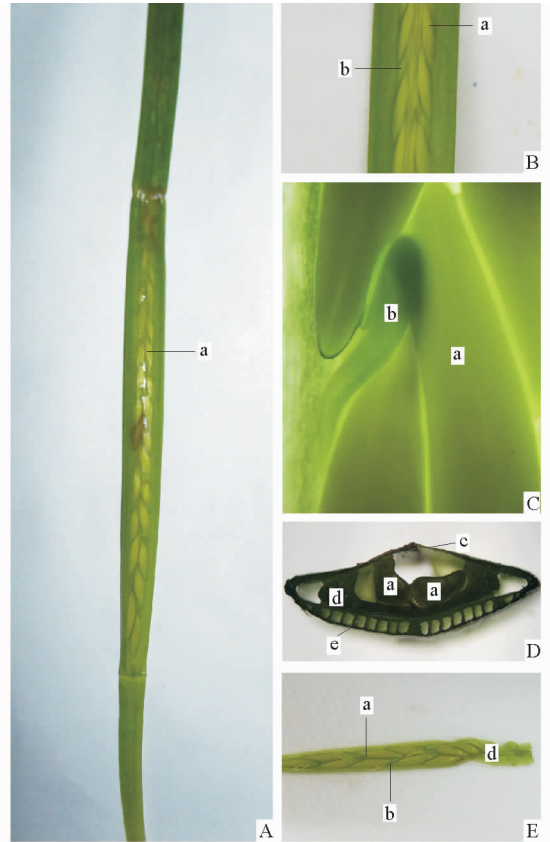
第 40 天种子发育成熟并开始散落,并持续 16 d。B 组:幼嫩种子能继续发育为成熟种子,实验开始第 21 天种子发育成熟并开始散落,经过 20 d,种子几乎散落完毕,生殖枝随之衰败腐烂。A 组种子与 B 组相比,个头不均匀,部分种子的种皮光滑,颜色较淡,多数种子干瘪,质地较软。经过统计,A 组共收集到 1 973 粒成熟种子,总湿重 16.04 g,平均每粒种子的质量为 8.13 mg;B 组共收集到 2 397 粒种子,总湿重为 27.37 g,平均每粒种子的质量为 11.42 mg。



a. 叶; b. 地下茎; c. 须根; d. 佛焰苞;  
 a. Leaf; b. Underground stem; c. Root; d. Spathe  
 A: 大叶藻的营养枝; B: 大叶藻的生殖枝  
 A: Vegetative shoot; B: Reproductive shoot

图 1 大叶藻的生殖枝与营养枝比较

Fig. 1 Comparison of vegetative shoot and reproductive shoot of *Z. marina* L.



a. 雄蕊; b. 雌蕊; c. 苞鞘; d. 花序轴; e. 气室  
 a. Stamen; b. Pistil; c. Coat of spathe; d. Spadix; e. Air chamber  
 A:佛焰苞; B-C:大叶藻的雌蕊与雄蕊; D:佛焰苞横切面; E:扁平肉穗花序  
 A:Spathe; B~C:Stamen and pistil; D:Cross section of spathe; E:Spadix

图 2 大叶藻的花

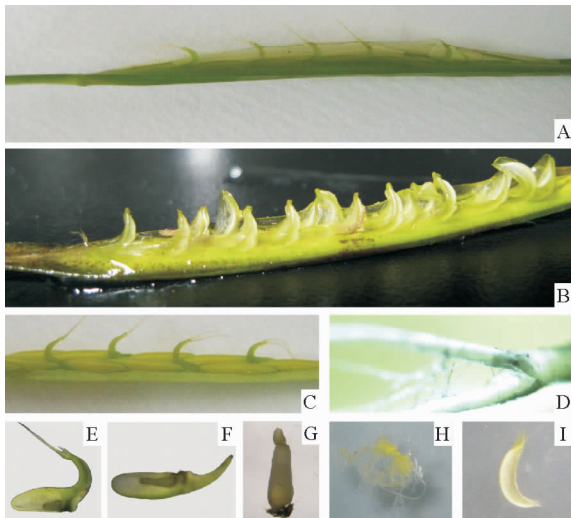
Fig. 2 Flower of *Z. marina* L.

### 2.3 大叶藻的开花过程

大叶藻是高等显花植物,根据雌、雄蕊的形态变化,本研究将大叶藻的“开花”过程分成 4 个阶段:1)成熟雌蕊的花柱由平直状态逐渐直立,翘起的花柱突破佛焰苞的透明包鞘,此时柱头的两个分叉张开。雌蕊比雄蕊较早成熟,柱头的直立状态大约持续 2~3 d。2)之后,雄蕊发育成熟,花药开裂,纤维状花粉释放。花药的开裂一般持续 24 h,待花粉释放完成,开裂的花药从花序轴上脱落。3)花粉粘附在雌柱头分叉上,花粉萌发,受精开始。4)胚珠完成受精,柱头顶端断裂,花柱由直立状态再次恢复到平直状态,佛焰苞的透明包鞘随之闭合。

## 2.4 种子的发育与散落

在花序轴上,处在下端的种子先成熟。受精后,花柱并未脱落但似乎停止生长,而子房逐渐发育膨大,子房壁发育成果皮,果皮较薄,半透明状。胚珠发育成种子,从种子开始膨大到发育成熟大约持续 21 d 左右。成熟的种子呈深褐色,椭圆形。种子成熟时,果皮开裂,种子散落,但果皮并不脱落,而是和花序一起衰败腐烂。



A: 花柱直立突破佛焰苞透明包鞘; B: 成熟开裂的花药;  
C: 扁平肉穗花序; D: 柱头的2个分叉, 上有丝状突起;  
E: 花柱直立的雌蕊; F: 受精后柱头断裂的雌蕊; G: 胚珠;  
H: 花粉丝, 成絮团漂浮于水面; I: 脱落开裂的花药  
A: Erect styles break through the transparent coat of spathe;  
B: Dehiscence of anthers; C: Spadix;  
D: Stigma with two branches; E: Pistil with erect style;  
F: Abscission of stigmata after fertilization; G: Ovule;  
H: Floc of flower fans floating on water;  
I: Deciduous and dehiscent anthers

图3 开花期间大叶藻花的形态变化

Fig. 3 Morphologic changes of *Z. marina* L. during flowering



A: 受精结束后的雌蕊, 从下向上发育成熟;  
B: 幼嫩的种子, 淡绿色, 果皮半透明状;  
C: 种子发育成熟, 呈深褐色;  
D: 果皮开裂, 种子散落, 果皮留在花序上  
A: Pistils mature from the bottom to top after fertilization;  
B: Young seeds are pea green, the coats are translucent;  
C: Mature seeds are dark brown; D: Seeds scattering after the dehiscence of coats, but the coats still stay on the spadix

图4 大叶藻种子的成熟过程

Fig. 4 Fruiting of *Z. marina* L.

大叶藻种子由种皮、胚乳、胚组成,胚包括子叶、胚根、胚芽、胚轴。种皮革质,有条状纹理;胚乳占种子的大部分,包被着胚,呈乳白色,深灰色斑纹清晰可见;大叶藻胚的形态较特殊,子叶呈“U”型棒状,“U”型的弯曲部有一裂缝,胚芽位于其中,胚轴较短,其下是两个对生的胚根。

## 2.5 种子的萌发与幼苗的发育

大叶藻种子的萌发和幼苗发育过程较少见,从种皮破裂到胚开始发育大约持续 28 d 左右。萌发初期,胚乳吸水膨胀,种皮破裂,从种皮破裂到子叶开始生长持续时间较长,大约占整个萌发时间的 2/3 左右;子叶最先生长,萌发第 20 天,子叶生长停止,此时子叶伸长了近 2 cm;萌发第 22 天由胚芽发育成的第一片幼叶可见,幼叶从子叶的缝隙伸出,淡绿色,新出的幼叶由一层透明薄膜包被;幼叶形成后,胚轴开始伸长;第 28 天由两个对生的胚根发育成的 1 对须根可见,并不断伸长变细;第 42 天,茎部向地匍匐生长,幼叶 1 对,第一个茎节出现,分节处生出 1 对须根,此时子叶与胚乳仍未脱落。



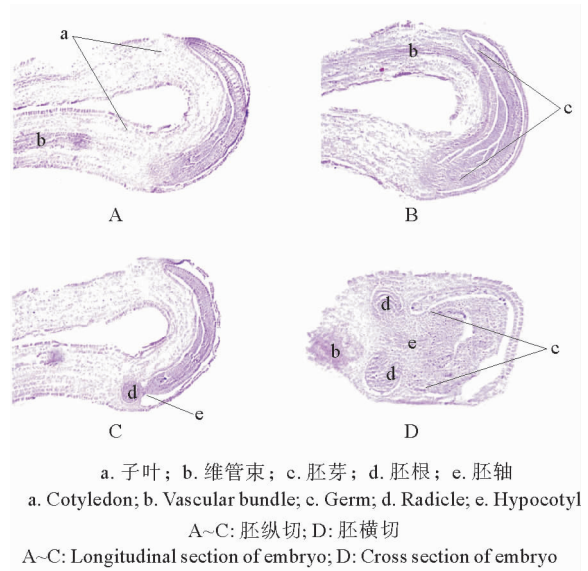


a. 种皮; b. 胚; c. 胚乳  
a. Testa; b. Embryo; c. Endosperm

A: 种子种皮有条状纹理;  
B: 去掉种皮的种子,胚乳包被着胚; C: 种子纵切面  
A: The testa has ribbed marks; B: Seed without testa,  
the embryo is surrounded by endosperm; C: Longitudinal section of seed

图 5 大叶藻种子的结构

Fig. 5 Anatomical structures of the *Z. marina* L. seeds

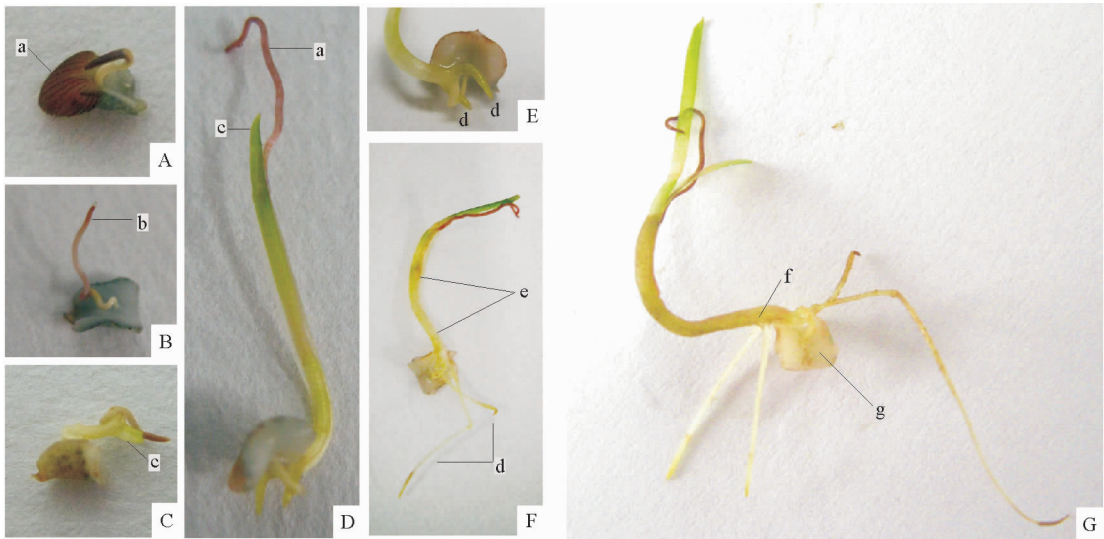


a. 子叶; b. 维管束; c. 胚芽; d. 胚根; e. 胚轴  
a. Cotyledon; b. Vascular bundle; c. Germ; d. Radicle; e. Hypocotyl

A~C: 胚纵切; D: 胚横切  
A~C: Longitudinal section of embryo; D: Cross section of embryo

图 6 大叶藻种子胚的结构

Fig. 6 Anatomical structure of the *Z. marina* L. embryo



a. 种皮; b. 子叶; c. 幼叶; d. 根; e. 地下茎; f. 分节; g. 胚乳

a. Testa; b. Cotyledon; c. Spire; d. Root; e. Underground stem; f. Basistipes; g. Endosperm

A: 种子吸水膨胀, 种皮破裂; B: 子叶伸长; C: 幼叶从子叶缝隙中伸出; D: 大叶藻幼苗; E: 开始发育的须根;  
F: 须根不断伸长; G: 茎部开始向地匍匐生长, 第一个分节出现, 分节处生出须根, 此时胚乳仍未脱落  
A: Swelling of soaked seed, fracture of testa; B: Elongation of cotyledon; C: Young leaves stretching out from cotyledons' gap;  
D: Seedling; E: Acrospire; F: Root kept growing; G: Creeping growth of the stem, the first basistipes with root appeared,  
when the endosperm still attached

图 7 大叶藻种子的萌发与幼苗发育过程

Fig. 7 Seed germination and seedling development of *Z. marina* L.

### 3 讨论

作为典型的海洋沉水植物,大叶藻的形态结构和繁殖过程是对生活环境的高度适应。大叶藻的生殖枝明显高出营养枝,且本研究观察到佛焰苞壁存在大量的气室,这显然更有利于生殖枝漂浮于水面接受更多的光照和传粉机会。大叶藻因长期适应水环境而导致其花部结构的极度简化(Cronquist 1988),细长分叉的柱头和大量的丝状花粉提高了传粉的有效性。高亚平等(2010)对桑沟湾自然状态下大叶藻的研究认为生殖枝的各分支向心发育,而本研究中大叶藻的离体生殖枝和花序都是从底部向上渐次成熟。同一个花序中花的成熟不同步,雌蕊先熟,花粉在48 h后释放,这与 Reusch(2001)在自然状态下观察到的结果相同。离体状态对大叶藻生殖枝的发育是否产生影响有待于进一步研究。

大叶藻种子结构较特殊,具有硕大的胚乳,棒状“U”型子叶,胚芽、胚轴、胚根被包裹在子叶中,萌发时子叶出土,胚乳留土,且胚乳长时间不脱落。大叶藻特殊的种子结构以及萌发过程是对环境的高度适应。本实验中,大叶藻种子是在无底质光照状态下萌发,底质的存在对大叶藻种子的萌发是否具有影响还有待于进一步研究。自然环境下,大叶藻的有性繁殖,其种子产量在时间和空间上都是不可预知的(Van *et al.* 1995; Meling-lopez *et al.* 1999),有研究表明,其种子和幼苗的死亡率可以超过90%(Fishman *et al.* 1995; Orth R *et al.* 2000),室内离体培养条件能否提高大叶藻的结实率以及种子萌发率具有一定的研究价值。

本研究中,A、B实验组大叶藻离体生殖枝最终均能结出成熟的种子,然而A组大叶藻种子的质量显然要低于B组,且A组培养时间较长,成本较高。因此,B组生殖枝(幼嫩种子清晰可见)较适合进行室内培养获取种子。为了节约成本也可以考虑将结出幼嫩种子的生殖枝放到网箱中,海上悬浮暂养。不同地区、不同种类的大叶藻物候特性并不完全一致,为了不错失种子收集良机,在不了解某地区大叶藻物候特性时,提前采收生殖枝并进行室内培养获取种子是个有效的方法。

### 参 考 文 献

- 高亚平,方建光,张继红,毛玉泽,杜美荣,刘顶海. 2010. 桑沟湾大叶藻有性繁殖特性的观察研究. 渔业科学进展,31(4):53-58
- 李文涛,张秀梅. 2009. 海草场的生态功能. 中国海洋大学学报,39(5):933-939
- 刘元刚,王光辉. 2006. 大叶藻移植在海参养殖中的应用. 齐鲁渔业,23(4):12
- 任国忠,张起信,王继成,王大建. 1991. 移植大叶藻提高池养对虾产量的研究. 海洋科学,1:52-57
- 叶春江,赵可夫. 2002. 高等植物大叶藻研究进展及其对海洋沉水生活的适应. 植物学通报,19(2):184-193
- Campanella JJ, Bologna PAX, Smith SM and 2 others. 2010a. *Zostera marina* population genetics in Barnegat Bay, New Jersey, and implications for grass bed restoration. Population Ecology 52(1):181-190
- Conacher CA, Poiner IR, Butler J and 2 others. 1994. Germination, storage and viability testing of seeds of *Zostera capricorni* Aschers from a tropical bay in Australia. Aquatic Botany 49(1):47-58
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, 2:1039-1072
- Fishman JR, Orth RJ. 1996. Effects of predation on *Zostera marina* L. seed abundance. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 198(1):11-26
- Meling-lopez AE, Ibarra-Obando SE. 1999. Annual life cycles of two *Zostera marina* L. populations in the Gulf of California: contrasts in seasonality and reproductive effort. Aquatic Botany 65:59-69
- Orth RJ, Harwell MC, Bailey EM and 6 others. 2000. A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: implications for conservation and restoration. Marine Ecology Progress Series 200:277-288
- Orth RJ, Luckenbach ML, Marion SR and 2 others. 2006. Seagrass recovery in the Delmarva Coastal Bays. USA Aquatic Botany 84(1):26-36
- Phillips RC. 1984. The ecology of eelgrass meadows in the Pacific Northwest: a community profile. US Fish Wild Serv, FWS/OBS 84/24, 85
- Reusch TBH. 2001. Fitness-consequences of geitonogamous selfing in a clonal marine angiosperm (*Zostera marina*). Journal of Evolutionary Biology 14:129-138
- Van LF, Verschuure JM. 1995. Comparative study on populations of *Zostera marina* L. (eelgrass): experimental germination and growth. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 185:77-91