

## 异种嫁接的水螅畸形体初步观察

吴小婷<sup>①</sup> 吴佩玲<sup>①</sup> 汪安泰<sup>①\*</sup> 吴程琛<sup>②</sup> 邓利<sup>①</sup>

① 深圳大学生命科学学院 深圳 518060; ② 浙江大学农业与生物技术学院 杭州 310029

**摘要:** 把强壮水螅(*Hydra robusta*)和普通水螅(*H. vulgaris*)除头后进行异种切口嫁接实验,共获得3例畸形体,对其进行280 d的培养,获得78只畸形子代。追踪观察发现:①畸形体及其无性生殖后代均具有2种钩刺丝囊(强壮水螅钩刺丝囊和普通水螅钩刺丝囊);②其身体伸展时最长达52 mm;③无性出芽生殖的平均生殖周期10 d以上;④个体无性生殖3~8代后凋亡;⑤触手数为4、5和6条的个体分别占80%、10%和10%;⑥不发生有性生殖;⑦切割再生时间长,再生后形态与发育特性同术前个体;⑧外胚层表面出现增生组织,这些增生组织在体柱上发生凋亡或脱离母体后1~2 d解体;内胚层上常有细胞团块脱离身体,进入消化腔。来源于异种水螅嫁接的畸形体上出现的组织增生、细胞脱落等现象揭示了水螅可能具备识别和排斥异种组织的原始免疫机制。

**关键词:** 水螅; 异种嫁接; 畸形体; 无性出芽生殖

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)05-102-06

## The Primary Observation of Monster Hydras from Heterograft

WU Xiao-Ting<sup>①</sup> WU Pei-Ling<sup>①</sup> WANG An-Tai<sup>①\*</sup> WU Cheng-Chen<sup>②</sup> DENG Li<sup>①</sup>

① College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060;

② College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

**Abstract:** *Hydra robusta* and *H. vulgaris* were cut transversely in the sub-hypostome region and the basal portion of two hydranth were grafted together. Three kinds of monster hydras, totally 78 individuals were found after 280 days continuous observation, it was shown that: ① monster and its asexual reproduction offspring contained 2 kinds of falcate nematocyst (*H. robusta*'s and *H. vulgaris*' falcate nematocyst); ② its length could reach 52 mm when it stretched its body; ③ the average period of asexual gemmation was more than 10 days; ④ individuals died after reproducing 3–8 generations; ⑤ those who had 4, 5 and 6 tentacles consisted of 80%, 10% and 10% the individuals respectively; ⑥ it had no sexual reproduction; ⑦ it needed a relatively long time to regenerate after being cut off. When completing regeneration, both its form and development were as the normal one; ⑧ hyperplastic tissue appeared on the surface of its ectoderm, and went to apoptosis on the scapus, or disintegrated 1–2 days after disengaging from matrix; endoderm's cellular conglomeration frequently disengaged from the body, entering digestive chambers. The phenomena of hyperplasia and apoptosis appeared on the monster hydra from heterograft showed that hydra might have primitive immune system that can identify and exclude heterogenetic tissues.

**Key words:** *Hydra*; Heterograft; Monster; Asexual gemmation

**基金项目** 深圳大学实验室开放基金项目,国家水体污染控制与治理科技重大专项(No. 2009ZX07101-001, 2009ZX07423-003),深圳大学教学研究B类项目(“专题研究型”课题);

\* 通讯作者, E-mail: wang118@szu.edu.cn;

**第一作者介绍** 吴小婷,女,本科生; E-mail: 740295786@qq.com。

收稿日期: 2011-03-18, 修回日期: 2011-06-26

水螅的嫁接实验有种间嫁接与同种嫁接 2 大类。把水螅横断后,将其体段交换嫁接或将多条同种水螅的同部位体段串联起来,以此研究嫁接体的发育模式,嫁接部位的细胞发育以及控制发育的位置信息等<sup>[1-2]</sup>。水螅种间嫁接实验常发生细胞凋亡,该现象是有机体对潜在危害、非机体自身或异常的细胞进行排斥,是有机体特性调节程序的一个组成部分<sup>[3]</sup>,类似于更复杂的动物,具有相同的形态特征<sup>[4-5]</sup>,包括在饥饿时排除额外细胞或产生卵巢与精子,其凋亡细胞的识别与吞噬由上皮细胞执行,类似吞噬细胞的作用<sup>[6]</sup>。研究水螅种间移植或嫁接有助于对其发育机理的深入了解。水螅嫁接体能否长期生活,长期生活的嫁接体能否形成新的水螅品系甚至新物种?尚不了解。中国已发现水螅的 7 个特有种和 2 个世界广布物种<sup>[7-9]</sup>。本文报道将强壮水螅(*Hydra robusta*)和普通水螅(*H. vulgaris*)分别切除头部,进行种间切口对接实验。实验获得 3 例畸形体,经 280 d 培养,共获得 78 个畸形子代。对这些畸形子代跟踪观察,取得一些有意义的生物学数据,以期阐明水螅的形态形成机理及动物学实验教学提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 水螅** 实验所用的强壮水螅和普通水螅均由单系无性繁殖而来。培养温度( $25 \pm 2$ )℃,自然光周期。每天饲以秀体蚤(*Diaphanosoma* sp.),每次喂食后换培养液。

**1.2 水螅培养液** 嫁接后的水螅使用无 EDTA 的培养液进行培养<sup>[10]</sup>。

**1.3 水螅嫁接前准备** 取无芽体强壮水螅和普通水螅各 40 条,饥饿 24 h。嫁接前用高纯水冲洗两遍,再用上述培养液冲洗两遍,清洁其体表。嫁接器具包括 1 号昆虫针、手术刀片、眼科镊、载玻片、培养皿和 0.5 cm × 0.5 cm 的塑料片,经超声波清洗机洗后烘干备用。

**1.4 水螅嫁接手术** 取已处理的上述 2 种水螅各一条,置于载玻片上,解剖镜下用刀片分别切除其头部。用眼科镊取一塑料片穿在昆虫针

中部,镜下将一水螅从基盘反口孔处穿入,在切口处穿出。再将另一水螅从切口处穿入,在基盘反口孔处穿出。将另一塑料片穿入针内。移动塑料片,使嫁接体紧密接触在一起。术后水螅体放入盛有培养液的培养皿,静置 24 h 后卸除嫁接装置,继续在培养液中静置,至个体长出垂唇和触手后,移到曝气 2 d 后的自来水中培养。切下的水螅头部,通过压片法鉴定其物种特有的钩刺丝囊(图版 I:1),以确保嫁接体为种间嫁接。共手术 40 对水螅。

**1.5 观察与图片处理** 连续 280 d 每日观察嫁接体水螅一次,记录触手、垂唇数目,捕食能力、无性生殖和形态的改变。Leica 体视显微镜下观察水螅个体。Olympus BX51 微分干涉装置显微镜下鉴定刺丝囊。切下畸形水螅 1 条触手,压片后 100 × 物镜下拍照,每条触手拍 11 幅照片,分别统计所有照片中强壮水螅与普通水螅的钩刺丝囊数量,共计数了 9 只畸形水螅。Photoshop 8.0 软件整理数码图片。

## 2 结果

**2.1 组织愈合** 手术 40 对,成功 31 对。刚收针及收针后 23 h,嫁接体无明显变化(图版 I:2,3);31 h 嫁接位置发生触手芽(图版 I:4);47 h 至 56 h 触手明显生长(图版 I:5,6);72 h 发生垂唇,饲以秀体蚤,可正常摄食(图版 I:7);5 d 后触手达正常长度,触手数 8 ~ 10 条;10 d 后嫁接体纵向愈合至胃区,左右组织呈人字形,同时发生芽体(图版 I:8);18 d 后 2 胃区愈合(图版 I:9);45 d 后嫁接体完全愈合,外形同正常水螅。

**2.2 畸形体的获得** 对 31 个嫁接体的出芽生殖子代的钩刺丝囊进行鉴定,发现其中一嫁接体在 1 000 ml 烧杯中始终匍匐于烧杯底部,未见直立,其以出芽方式产生 7 条子代后,出芽率急剧减少,之后开始绝食,身体逐渐萎缩后解体。这个嫁接体分别在第 45、63、88 天各发生 1 个芽体,对这 3 个芽体脱离母体后分别得到的 3 只水螅个体进行单独培养和观察。芽体脱离后第 3 天,体长约 13.0 mm,第 11 天的体长

约 16.0 mm, 35 d 后个体伸展时可达 50.0 mm 以上(图版 I:10)。经鉴定这 3 只水螅个体的触手上均具有 2 种水螅的钩刺丝囊(强壮水螅钩刺丝囊和普通水螅钩刺丝囊,图版 I:1)。分别检测其子代触手上的钩刺丝囊,结果同亲代。对 3 例畸形体及其 78 只子代的一些生物学特性归纳如下。

**2.2.1 无序的出芽生殖** 经连续 280 d 培养观察,未发现出现有性生殖。3 例畸形体共繁殖了 78 只子代。后代的平均繁殖周期为 10 d(3~14 d)。畸形体从体柱的前 1/4 至近基盘,均能发生芽体。发生芽体时,体柱明显呈近似直角的弯曲状,曲部外侧发生圆锥隆起,后发育成芽体。其曲部内侧,即发生芽体的对侧出现明显凹痕。芽体的触手数目同母体。芽体成熟后,基部发生收缩,形成基盘后脱离母体,而母体始终保持弯曲状态(图版 I:11,12)。钩刺丝囊是水螅鉴定的关键依据。畸形水螅触手上均具有强壮水螅和普通水螅的钩刺丝囊,其形态特征同两亲本。所有畸形体水螅无性生殖后代的触手上的钩刺丝囊具有相同的特征,即具有遗传特性。分别统计 11 个畸形水螅子代的一条触手上的钩刺丝囊,强壮水螅与普通水螅钩刺丝囊的比例接近 1:4,但标准误差已超过 1/3,故在子代触手上的分布比例无明显规律(表 1)。

表 1 9 只畸形水螅单触手上 2 种钩刺丝囊分布

Table 1 The distribution of 2 different falcate nematocysts in 9 monster hydra's single tentacle

触手编号 Number	钩刺丝囊数(个) Number of falcate nematocyst	
	强壮水螅 <i>Hydra robusta</i>	普通水螅 <i>H. vulgaris</i>
1	10	11
2	2	72
3	4	45
4	11	23
5	4	36
6	3	58
7	20	29
8	10	15
9	17	45
合计 Total	81	334
平均 Average Mean $\pm$ SD( $n=9$ )	9.0 $\pm$ 6.4	37.1 $\pm$ 20.0

**2.2.2 多芽体叠生与横断裂生殖** 个体发生第 1 个芽体后,在原头部与芽体间发生第 2 个芽体,在芽体上又发生多个芽体。分离时,在芽体茎部中间断裂(图版 I:12,13)。

**2.2.3 组织的免疫反应** 畸形体水螅的前 1/3~1/4 体区常有细胞增生,其表面发生块形、球形或褶皱形隆起(图版 I:14,15)。较小的增生组织在体柱上发生凋亡,相对较大的增生组织脱离后 1~2 d 解体(图版 I:15a)。解剖镜下常见到游离于消化腔内的内胚层细胞团块,大小不一,使其体柱显得很透明(图版 I:16)。腔内的细胞团最后经口和基盘中心的反口孔排出。排出物经亚甲基蓝染色,镜检发现含有水螅内胚层活的腺细胞和内皮肌细胞,最后均全部解体。

**2.2.4 额外基盘发生与横断裂生殖** 发现 11 例发生增生组织的位点上发生额外基盘(图版 I:14,15),发育中,在额外基盘中间发生横断裂(图版 I:17),形成 2 个体。断裂的前段(具水螅头的一段)演化为近似正常水螅的外部形态;其后段呈 2 端具基盘无头的畸形体,之后在两基盘的中间发生组织隆起,发育为头部,其 2 端的基盘逐渐合并为一个基盘。

**2.2.5 再生特性** 将畸形体水螅(图版 I:18)横向均切为前、中、后 3 段。前段具头部,中段的近中部有 1 个额外基盘,后端相当于正常水螅的茎区与基盘。前段术后 11 d,切口愈合后发生基盘,呈完整个体。中段术后 2~5 d,其前端体柱扩张呈气球形,腔内可见脱落的内胚层细胞团,外形透明,螅体逐渐缩小,至 14 d 形成头部,另一端逐渐萎缩消失,最后呈完整水螅形态。后段术后 7 d,前端膨胀呈球棒形,术后 11 d,侧面发生尖刺形组织,后发育为头部。原切口愈合后,随侧生头部的发育而逐渐消失。术后的 3 段组织完成再生后,均能进行无性生殖。

**2.2.6 衰老** 畸形体水螅生长极为缓慢,无性生殖周期长,有的个体培养 3 个月后衰老死亡。个体衰老时,停止捕食,即使把水蚤移至触手上,也无摄食反应。2 d 后身体与触手开始萎缩,体表形成皱褶,有细胞团从基盘反口孔处排

出。之后,触手、垂唇与茎部逐渐解体,外胚层细胞脱落,其体表留下一层透明的薄膜,最后全部解体。

### 3 讨 论

**3.1 水螅可能具备原始的免疫机制** 细胞凋亡在机体排除外来细胞或感染细胞的免疫性方面起到重要作用。细胞凋亡机制贯穿于整个动物界<sup>[11]</sup>,可追溯到从脊椎动物到淡水水螅的演变<sup>[10]</sup>。水螅具有分辨自身与外来组织的一种能遗传的系统<sup>[12]</sup>,单系培养的水螅也有这种系统<sup>[4]</sup>。异种水螅之间的嫁接,所呈现的可遗传的移植免疫性是一种原始的形式<sup>[13]</sup>。刺胞动物是最低等的后生动物,无专门的免疫细胞<sup>[2]</sup>。纤细水螅(*H. attenuata*)与寡水螅(*H. oligactis*)的异种嫁接,在嫁接部位聚集大量吞噬上皮细胞,能选择性地排除来自其他物种的细胞<sup>[2,4]</sup>。本实验的细胞凋亡与活细胞被排斥的现象,在其无性生殖的子代中仍不断发生,这种组织的排斥行为与细胞凋亡现象,是一种典型的组织间的免疫反应行为。来源于异种水螅嫁接的畸形体上出现的组织增生、细胞脱落等现象揭示了水螅可能具备识别和排斥异种组织的原始免疫机制,但这种原始免疫机制的细胞和分子基础尚待探索。

**3.2 水螅的嫁接方式是维持嫁接体生存时间的关键因素** 将异种水螅嫁接在一起要形成一个稳定的个体,取决于嫁接物种的组成,一般情况下,嫁接组织不能永久维持,但也有少数例外<sup>[13-14]</sup>。本实验异体体柱组织能纵向愈合为一(图版 I:2~6),成为能正常进行出芽生殖的混合体,其混合体子代能生存 280 d 以上。因此认为,异种水螅嫁接形成一个稳定的个体,不仅取决于嫁接物种的组成,其嫁接的方式也是值得重视的因素之一。异种嫁接的混合体水螅可以进行无性繁殖,但不会出现有性生殖,其生存时间一般不超过 1 年,其子代中的钩刺丝囊形态乃遗传母系的特征,没有出现变异,表明自然界中异种水螅组织的融合,不可能发生新的水螅物种。

**致谢** 哈尔滨师范大学生命科学学院范学铭教授多次邮寄赠送强壮水螅;深圳大学生命科学学院张宇与刘波老师协助采集标本,在此鸣谢!

### 参 考 文 献

- [1] Adams J A. Pattern regulation in autografts of *Hydra oligactis*: positional values and diffusible morphogens. *Biol Bull*, 1984, 166(2): 445–451.
- [2] Kuznetsov S G, Anton-Erxleben F, Bosch T C. Epithelial interactions in *Hydra*: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. *J Exp Biol*, 2002, 205(24): 3809–3817.
- [3] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 1997, 88(3): 347–354.
- [4] Bosch T C G, David C N. Immunocompetence in *Hydra*: epithelial cells recognize self-nonself and react against it. *J Exp Zool*, 1986, 238(2): 225–234.
- [5] Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, et al. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Curr Biol*, 1999, 9(17): 959–962.
- [6] Kuznetsov S G, Lyanguzova M, Bosch T C G. Role of epithelial cells and programmed cell death in *Hydra* spermatogenesis. *Zoology*, 2001, 104(1): 25–31.
- [7] Wang A T, Deng L, Lai J Q, et al. A new species of green hydra (Hydrozoa: Hydrida) from China. *Zoological Science*, 2009, 26(9): 664–668.
- [8] 陈仲钊, 汪安泰. 中国水螅属一新种(水螅纲, 水螅科). *动物分类学报*, 2008, 33(4): 737–741.
- [9] 刘洪涛, 汪安泰. 中国广东水螅属一新种(水螅纲, 无鞘螅目, 水螅科). *动物分类学报*, 2010, 35(4): 857–862.
- [10] 李佳, 汪安泰, 陈婧. 利用水螅检测  $\text{Cd}^{2+}$  毒性的研究方法比较. *水生生物学报*, 2010, 34(4): 754–761.
- [11] Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*, 2000, 407(6805): 796–801.
- [12] Mokady O, Buss L W. Transmission genetics of allorecognition in *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa). *Genetics*, 1996, 143(2): 823–827.
- [13] Campbell R D, Bibb C. Transplantation in coelenterates. *Trans Proc*, 1970, 2(2): 202–211.
- [14] Marcum B A, Campbell R D. Developmental roles of epithelial and interstitial cell lineages in hydra analysis of chimeras. *Cell Sci*, 1978, 32: 233–247.

## 图 版 说 明

1. 畸形水螅单触手上的钩刺丝囊; 2~9. 强壮水螅和普通水螅去头嫁接后的愈合过程(2:刚收针后的嫁接体; 3~9:分别为收针后 23 h、31 h、47 h、56 h、72 h、10 d 和 18 d 的形态; 4~6:触手发生,嫁接体开始纵向愈合; 7:开始正常摄食; 8~9:纵向愈合,且发生多个芽体); 10. 发育 35 d 的畸形水螅; 11~13. 分别为发育 58 d、65 d 和 69 d 的同一只畸形水螅(示芽体发生,发生点体柱折曲,出现多芽叠生); 14~15. 畸形水螅外胚层出现细胞排斥; 15a. 从外胚层脱落的细胞团; 16. 被排入体腔的内胚层细胞团; 17. 发育 52 d 的畸形水螅(示外胚层细胞团脱落后产生新的基盘); 18. 发育 18 d 的畸形水螅(示产生新的基盘)。

## Explanation of Plate

1. Falcate nematocyst of monster hydra's single tentacle; 2-9. the regeneration of *Hydra robusta* and *H. vulgaris* after being cut the head off and then grafted together (2: hydra of just grafted; 3-9. morphology of grafted after 23 h, 31 h, 47 h, 56 h, 72 h, 10 d and 18 d, respectively); 10. Monster hydra after 35 d development; 11-13. the same monster hydra after 58 d, 65 d and 69 d development respectively (showing budding, scapus flexed in budding loci, more buds storied and piling-up buds); 14-15. Cells rejection occurred on the ectodermal layer of monster hydra; 15a. Cell mess eliminated from ectodermal layer; 16. Cell mess eliminated into body cavity from endodermal layer; 17. Monster hydra after 52 d development (showing the appearance of new base plate after cell mess eliminating from ectodermal layer); 18. Monster hydra after 18 d development (showing the appearance of new base plate).

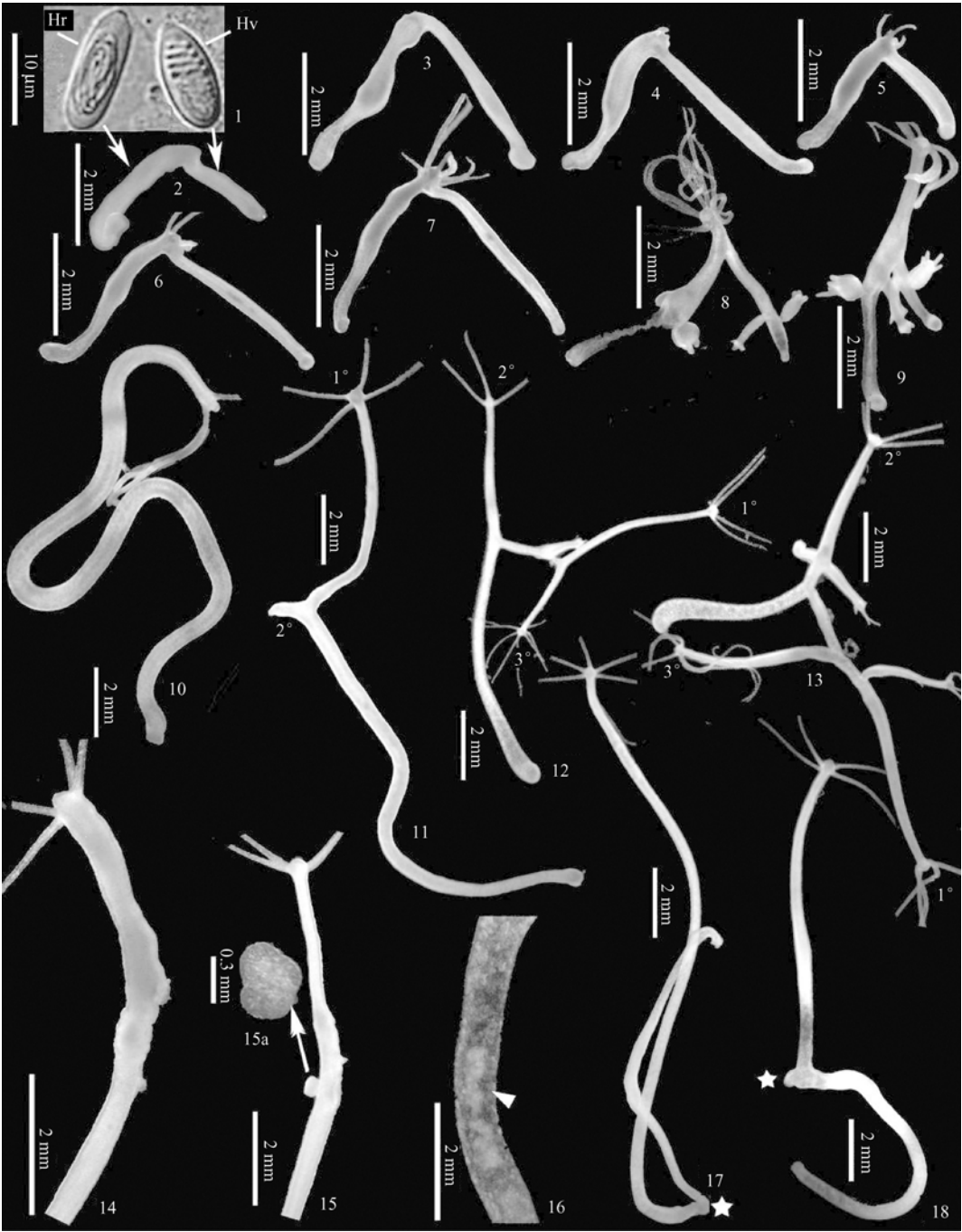
Hr: 强壮水螅; Hv: 普通水螅; 1°: 第一个芽体; 2°: 第二个芽体; 3°: 第三个芽体; ☆: 新的基盘发生位置。

Hr: *Hydra robusta*; Hv: *H. vulgaris*; 1°: The first bud; 2°: The second bud; 3°: The third bud; ☆: The position where new base plate was originated.

吴小婷等:异种嫁接的水螅畸形体初步观察

图版 I

WU Xiao-Ting *et al.* : The Primary Observation of Monster Hydras from Heterograft Plate I



图版说明见文后