

^{60}Co - γ 射线诱变条斑紫菜丝状体的研究*

王素娟¹ 马凌波² 许 璞³ 朱建一³ 郑元铸¹⁽¹⁾ 上海水产大学渔业学院 200090)⁽²⁾ 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)⁽³⁾ 江苏省海洋水产研究所 南通 226007)

提要 利用 ^{60}Co - γ 射线对条斑紫菜 *Porphyra yezoensis* 自由丝状体进行诱变。经照射后,丝状体受到严重损伤,但部分仍具钻入贝壳的能力。部分丝状体发生颜色变异,而且后代叶状体也表现为相同的颜色。部分未变异的丝状体在放散出壳孢子,并萌发成幼苗后也表达了颜色变异。低剂量的照射可以促进藻体的生长,并产生形态上的变异。对照射藻体的海上栽培实验也进行了观察和测量。

关键词 条斑紫菜, ^{60}Co - γ 射线, 丝状体, 诱变, 色素变异

由于红藻色素突变体在进行遗传分析后可作为其生活史中发生特殊生物事件的标记,有助于进一步了解红藻的基本遗传规律,并可以通过杂交育种获得栽培新品种,因而色素突变体的研究受到了许多学者的重视。利用 γ 射线等电离辐射对紫菜进行诱变育种的工作较少报道。赵成章等,1983年;程祝宽等,1991年;顾铭洪等,1991年;Helenz等1983年的研究表明,电离辐射诱变主要见于高等植物,并在高等植物的育种工作中被证明是一种有效的诱变手段。本实验利用 γ 射线对条斑紫菜自由丝状体进行诱变,对丝状体的辐射敏感性,丝状体在辐射后的色素变异情况进行了观察,以期获得良好的诱变效果并建立一种合适的诱变方法,使之在紫菜育种工作中得以应用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验采用条斑紫菜 *Porphyra yezoensis* 丝状体。条斑紫菜采自江苏省如东县海区半浮动筏上的藻体,现场阴干后带回实验室。藻体经反复洗净,切取成熟部分,撕成小片,置于三角烧瓶中,摇晃后静止培养直至丝状体藻落出现。两个月后挑选生长旺盛、纯净的藻球,分瓶培养、保存,供实验随时使用。

1.2 培 养

自由丝状体培养温度 18~22℃,光强 30~50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 12L:12D; 贝壳丝状体藻丝发育 25~26℃,光强 50~60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 12L:12D; 孢子

囊枝形成后期 23~24℃,光强约 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 10L:14D。

当贝壳丝状体大量形成孢子囊枝后,改静止培养为微流水培养,并降温至 17~18℃,7~8d 后开始放散壳孢子。取放散高峰时的壳孢子,使之附着于筛绢或玻片上,以便培养及观察。

壳孢子萌发生长时培养条件为:光强 70~80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 12L:12D, 18~20℃。在生长至 5mm 后,于三角烧瓶中静止或充气培养。光强约 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 12L:12D, 12~15℃。

1.3 γ 射线辐射实验

条斑紫菜自由丝状体在照射时按 0.02 g/ml(湿重)密度,装入 5 只 15 ml 试管中,每只试管 10 ml,辐射前保证管中材料均匀分布。

辐射后第 1 天黑暗培养,3d 后每日换水 1 次。丝状体在辐射后第 3 天接种于贝壳上,每组使用贝壳 3 枚。藻丝切段约 100~200 μm ,接种密度为 1 000 段/ cm^2 ,培养同 1.2。

1.4 丝状体大批辐射生产性实验

称取条斑紫菜自由丝状体(滤干后湿重)约 4 g 于 200 ml 三角烧瓶中。辐射参数为 500 Gy, 74 min, 距钴源 0.95 m。辐射后第 3 天接种于贝壳上,密度为 1 000 段/ cm^2 ,贝壳面积 18 m^2 。培养条件同大规模生产。培养 150 d 后,自然水温降至 18~20℃,开始采

* 国家“九五”攻关项目 96-c01-05-01 号。

收稿日期:1998-07-22;修回日期:1998-11-20

壳孢子于生产网上,共 60 个网,采壳孢子密度为 61 个孢子/cm 棉纱线。次日下海区进行栽培实验。

2 结果

2.1 γ 射线辐射对条斑紫菜丝状体的影响

实验表明,条斑紫菜自由丝状体经 γ 射线辐射后仍具有钻壳和萌发生长的能力,但是辐射较大地影响了丝状体的成活率,而且随剂量的增大,丝状体的成活率下降。到 1 000 Gy 以上时,丝状体基本很少成活(表 1)。丝状体在照射后出现了一些变异体,在贝壳上生长成不同颜色的藻落共 5 种颜色(红色、紫色、绿色、桔黄色以及野生型)(图 1-1),色素变异频率随剂量升高而增加,但由于处理后存活的藻落随剂量加大而急剧减少,而且色素变异的总量实际上也没有增加。因此 100~250 Gy 可以认为是合适的诱变剂量。

表 1 γ -射线对条斑紫菜丝状体成活率的影响*

Tab. 1 Effect of ^{60}Co - γ ray irradiation on survival of conchocelis of *Porphyra yezoensis*

照射剂量(Gy)	1 000	500	250	100	0
剂量率(Gy/min)	32.07	16.03	8.02	4.01	0
检查到藻落数	7	44	126	522	1 534
变异藻落数	1	4	8	10	0
成活率(%)	0.77	3.16	6.48	21.45	100
变异率(%)	14.29	9.09	6.35	1.90	0

* 丝状体经照射后 3 d 采于贝壳上,培养 30 d 后,在 4×10 倍数显微镜下检查 45 个视野的藻落数,成活率=各组检查到藻落数/对照组检查到藻落数 $\times 100\%$ 。

2.2 γ 射线辐射对丝状体后代的影响

2.2.1 色素变异在诱变丝状体后代的表达

实验显示,在一定条件下,经辐射后并接种于贝壳上的丝状体可以象正常的丝状体一样生长发育成熟并放散壳孢子。放散出的壳孢子大多为野生型,同时还产生了一定量的具有变异颜色的壳孢子。壳孢子萌发分裂后,长成的个体呈现出各种变异现象。其中具有变异颜色的孢子直接长成同颜色的叶状体,而野生型的孢子中有部分经分裂后形成具有不同色块的嵌合体(图 1-2~1-4)。

从表 2、表 3 可看出在叶状体后代中剂量 100 Gy 以上的各组均出现不同程度的色素变异体,并且随剂量增大其变异率上升。在变异个体中以单色型变异个体占最大比例,2 嵌合块个体也占有较大比例,而 3 嵌合块个体极少,没有发现 4 嵌合块个体。

2.2.2 γ 射线辐射对丝状体后代生长的影响

γ 射线对丝状体后代的作用不仅仅表现为色素变异的影响,还表现为后代生长上的差异。表 4 显示,从后代叶状体的生长情况看,辐射剂量在 500 Gy 以上时,辐射的影响表现为使后代的生长受到限制,而低剂量组 250 Gy,100 Gy 组的后代叶状体从其叶长和叶宽两方面看,大多数个体的生长优于对照组。

表 2 色素变异在诱变丝状体后代的表达 I

Tab. 2 Expression of pigment variance in haploid gametophytic progenies from conchocelis treated with γ -rays I

剂量(Gy)	1 000	500	250	100	0
剂量率(Gy/min)	32.07	16.03	8.02	4.01	0
总色块	—	168	166	165	150
色素变异型细胞块	—	51	38	31	0
野生型细胞块	—	117	128	134	150
变异率(%)	—	30.36	22.89	18.79	0

注:“—”表示 1 000 Gy 组因不放散或放散量极少无法计数。

表 3 色素变异在诱变丝状体后代的表达 II

Tab. 3 Expression of pigment variance in haploid gametophytic progenies from conchocelis treated with γ -rays II

剂量(Gy)	1 000	500	250	100	0
剂量率(Gy/min)	32.07	16.03	8.02	4.01	0
检查个体	150	150	150	150	150
野生型个体	—	106	113	126	150
单色型变异个体	—	26	22	15	0
2 嵌合型变异个体	—	17	14	9	0
3 嵌合型变异个体	—	1	1	0	0

注:“—”表示 1 000 Gy 组因不放散或放散量极少无法计数。

表 4 γ 射线对丝状体后代生长的影响¹⁾

Tab. 4 Effect of irradiation on growth of progenies of conchocelis treated with γ -rays

剂量(Gy)	500	250	100	0
剂量率(Gy/min)	16.03	8.02	4.01	0
平均叶长(μm)	122.9	151.5	167.3	140.4
平均叶宽(μm)	26.6	30.2	30.8	29.6
长宽比	4.63	5.02	5.43	4.83

1) 培养 30 d 后进行测量,每组随机检查 300 个个体。

2.3 丝状体的大批辐射实验

丝状体在接种于贝壳后经培养萌发出多种颜色变异的藻落,变异率为 9.46 %。成熟后的贝壳丝状体在气温下降至 20 $^{\circ}\text{C}$ 左右后开始放散壳孢子。在壳孢子中同样出现了许多颜色变异体。壳孢子以一定密度附着于生产性网绳后下海进行栽培实验,情况如表 5。

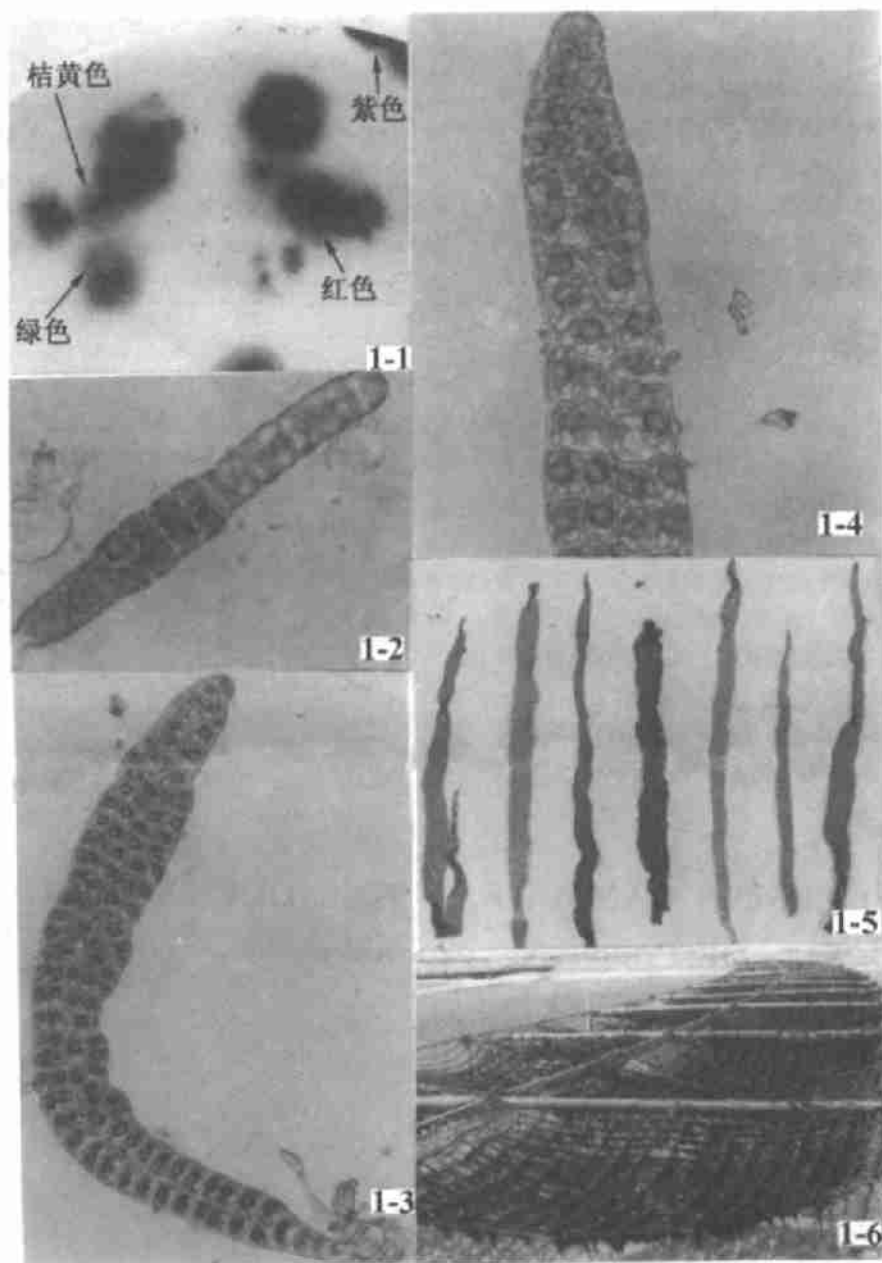


图1 γ 射线诱变条斑紫菜丝状体

Fig. 1 Pigment mutants of conchocells in shells conchocells and thalli of *Porphyra gezeensis* irradiated by γ -ray

1-1 贝壳丝状体色素变异体;1-2~1-4 野生型与突变型融合的色素变异体;1-5 海上栽培所获得的色素变异体;1-6 照射丝状体后海上栽培情况;图中除标准颜色外,余者均为野生型。

由于叶状体小苗不断放散单孢子,苗绳上的叶状体数量在开始阶段不断增加,50 d 后的苗量可达到20 d 时的近3倍。色素变异体的数目和所占比例逐渐减小,而且个体较小,这可能因为色素变异体大多不具有生长优势,所放散的单孢子量少于正常野生型个

体所至。但是在培养至3个月后仍可在苗绳上检查出一定量的色素变异体(图1-5~1-6)。

3 讨论

由结果可以看出, γ 射线辐射对条斑紫菜丝状体以及后代都具有一定的影响。它表现为:

丝状体经辐射后, 一部分个体直接发生色素变异, 产生各种颜色的色素变异体, 这些色素变异的丝状体产生的后代叶状体也表现为同丝状体一样的颜色而几乎没有发现色素嵌合体, 推测其中原因很可能是由于丝状体在经诱变后直接产生的色素变异大多为胞质变异, 因而使后代叶状体表现出同种颜色。而另外还有一部分丝状体经辐射后在丝状体阶段并不表现出颜色变异, 只有在放散出壳孢子, 而且在壳孢子分裂后才表现出色素变异, 这些色素变异体一般表现为野生型和变异型相嵌合的 2 嵌合体或 3 嵌合体, 这表明在诱变后发生的细胞核基因突变可能因被显性的野生型所掩盖所以只表现出野生型的丝状体和壳孢子, 只是在减数分裂后才表现出变异的颜色。实验间接地证实了条斑紫菜减数分裂发生在壳孢子萌发阶段这一结论。

低剂量的 γ 射线辐射对丝状体的后代叶状体生长表现为促进作用, 出现许多生长差异较大的个体,

这或许是因为诱变所造成 DNA 损伤后的应激反应导致部分细胞变异, 变异后的细胞或者生长分裂快速, 或者生长停滞。在高剂量组中也发现个别生长快速的个体, 但由于大多细胞受到的损伤难以修复或修复后个体分裂缓慢导致平均生长速度慢于低剂量组。

表 5 诱变丝状体后代下海实验情况

Tab. 5 Growth of gametophytic thalli derived from conchocelis in the sea irradiated by γ -rays

天数(d)	苗数 ¹⁾	色素变异体	变异率(%)
20	263	107	40.68
35	508	57	11.22
50	811	54	6.66

1) 为每 cm 苗绳上的小苗(包括色素变异体)的数量。

从实验结果看, 利用 γ 射线诱变条斑紫菜丝状体的结果与许璞 1997 年 NG 诱变的结果极为相似, 但还需进一步对所获得的色素变异体及形态变异体进行遗传分析才能真正地证实以上推测。总之, 利用 γ 射线辐射诱变育种具有快速有效的优点, 随着个体筛选技术的进一步改进, 完全可以作为一种新的育种手段。

STUDY ON USING GAMMA-RAY TO INDUCE MUTATION IN CONCHOCELIS OF *Porphyra yezoensis*

WANG Su-juan¹ MA Ling-bo² XU Pu³ ZHU Jian-yi³ ZHENG Yuan-zhu¹

(¹Shanghai Fisheries University 200090)

(²East Sea Fishery Research Institute, Shanghai 200090)

(³Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007)

Received: July 22, 1998

Key Words: *Porphyra yezoensis*, ⁶⁰Co- γ ray, Conchocelis, Pigment, Mutant

Abstract

Free-living conchocelis of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) was treated with ⁶⁰Co- γ rays of different doses (range from 100 Gy to 1 000 Gy) to induce mutation. Most of the conchocelis maintained the capability of entering shells and forming colonies in shells, but the vitality of the conchocelis was seriously impaired by the γ irradiation. A few conchocelis showed pigment mutants of several colors. The progeny blades from conchospores of the mutants showed the same colors. However, some irradiated conchocelis did not show the change in color at the conchocelis stage.

Only when conchospores of these conchocelis had germinated into young foliose thalli, could the pigment mutations be observed. Low dose (100Gy) irradiation promoted the growth of thalli of irradiated conchocelis, and many individuals with diverse morphologies were also observed. Conchospores of the irradiated conchocelis attached to the culture nets were cultured in the sea, and growth of these progenies was observed and measured.