

## 红藻育种研究进展\*

## PROGRESS IN BREEDING OF RED ALGAE

姜红霞 汤晓荣\*\*

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

中图分类号 S969.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)06-0025-06

据统计<sup>[1]</sup>, 1993年大型海藻产值约 $3.7 \times 10^9$ 美元, 其中紫菜(*Porphyra*)就有 $1.8 \times 10^9$ 美元, 接近一半, 江蓠、石花菜等经济红藻也占有相当大的产值比例。栽培种最初都来源于野生种群, 栽培中由于种质来源不稳定、优良性状的分离、遗传结构的不稳定、抵抗病害和适应外界条件变化的能力不强等原因, 使得栽培产量和质量得不到保障; 而海藻工业在国民经济收入中占较大比重, 尤其是沿海地带, 因此开展育种研究是非常有必要的。育种的目的: (1) 育成品种产生具有新品质或品质改良的产品; (2) 育成品种能以更低成本、更好的质量或更强的稳定性生产具经济价值的产品。

## 1 常规技术育种

海藻的常规技术育种是建立在对野生或栽培种群中发现的数量性状的测量, 以及对所测得的表型差异进行遗传分析的基础上的, 主要包括选择育种和杂交育种。

## 1.1 选择育种

选择育种是杂交育种的基础, 包括对表型如: 生长、繁殖、品质、抗病抗逆性、稳定性、适应力等的选择, 以及对基因型的选择, 如: 家系选择、后裔选择、同胞选择等来比较确定育种值。

从野生种群或栽培种群中人工挑选出快速生长的植株, 进而得到有活力克隆的方法广泛见于多种经济红藻的培育<sup>[2,3]</sup>: 角叉藻(*Chondrus*), 麒麟藻(*Eucheuma*), 江蓠(*Gracilaria*)。就甘紫菜(*Porphyra tenera*)和条斑紫菜(*P. yezoensis*)而言, 在日本, 养殖人员选择大的藻体, 用果孢子接种贝壳, 培养丝状体获得壳孢子栽培网帘并下海培养, 从后代中选出较大的藻体作为果孢子的亲本; 经过几代的选择, 他们获得了两个改良的栽培品系: *P. tenera* var. *tamatsuensis*

和 *P. yezoensis* f. *narawaensis*<sup>[2]</sup>, 它们具有更好的农学特征; 未经选择的条斑紫菜通常仅10~15 cm长, 而选择品系的藻体长达60 cm, 有的甘紫菜长达1 m; 且后代具有大小和形状的变异减少、生长快、性成熟延迟等特点, 已成为日本的主要栽培品种。在中国, Zhang等通过同系繁殖和后代选择, 已建成三个具长藻体的条斑紫菜新品种: No. 122, No. 127, No. 128, 它们的日生长率比自然种群的高出31.5%~131.5%; 且No. 127还有更长的生长期, 从而在华北的大规模栽培中产量增加了16%<sup>[2]</sup>。Kraemer和Yarish<sup>[4]</sup>对*P. purpurea*和*P. umbilicalis*的栽培潜力进行了初步比较, 在5~20℃的温度范围内, 饱和与亚饱和辐照度(289和37  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )下, *P. umbilicalis*的光合率比*P. purpurea*要高出80%; 而且在低辐照度下前者对光的利用更有效, 加之其有更高的最大光合率(23.0比15.6  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ); 由此可见, *P. umbilicalis*可能具有更好的栽培前景。对于江蓠(*Gracilaria*), Levy和Friedlander在室外和实验室内种植了*G. conferta*的四个当地品系和*G. verrucosa*的一个国外品系, 观察其生长、形态、叶绿素a含量、产糖等特征, 筛选实验中得到*G. conferta*的一个配子体品系(SGY-2), 有更高的

\* 国家自然科学基金资助项目 39800109号, 40276043号; 国家863计划资助项目 2002AA6030号。

第一作者: 姜红霞, 出生于1977年, 硕士生, 目前在研课题: 紫菜性别多样性的发育机理研究(国家自然科学基金项目); 坛紫菜良种选育技术(863计划项目)。E-mail: jhxia10@hotmail.com

\*\* 通讯作者: tangxr@hotmail.com

收稿日期: 2002-07-23; 修回日期: 2002-09-10

产量,能抗附着,碱处理后琼脂凝胶的强度高(超过 $900\text{ g/cm}^2$ )<sup>[2]</sup>。Levy等还通过不同的温度反应挑选出*G. verrucosa*的两个配子体品系:A-18和C-2分别在 $18\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $27\text{ }^\circ\text{C}$ ,它们在各自选出的温度下生长良好并显示出其野生型品系所不具有的生长优势<sup>[2]</sup>。

Rucess和Fredriksen<sup>[5]</sup>对从挪威、法国、英国等地获得的石花菜*Gelidium pusillum*分离个体的体外育性进行了测试,发现繁殖行为也存在种内差别,这一点在石花菜的选种中具有重要意义。Kapraun和Lopez-Bautista指出,现今产角叉藻胶或糖的植物品系的优化,依赖于更有活力克隆的表型选择;但单一克隆进行的营养繁殖,则可能造成不同品种的*Eucheuma*和*Kappaphycus*产量、质量降低,出现抗病力降低等问题<sup>[6]</sup>。Paula等<sup>[6]</sup>利用四分孢子研究了红藻中*Kappaphycus alvarezii*的品系选择,在夏、秋季收集四分孢子并在实验室内培养,仅有20个从四分孢子长出的植株成功地生长了一年多,而且这些植株表现出形态、颜色、大小、生长率方面有很大差异。10个月后,将在实验室长得最好的植株转移下海,经过一段时间的培育,证明活力和生长力方面的差异仍然存在。这一结果表明实验中所用到的四分孢子是杂种起源的,即由减数分裂产生的四分孢子可用于品系选择,从而有望缩短选择过程。

由于遗传结构的不尽相同以及受环境的影响,个体间存在差异,选择变得可能;选择育种是一切育种实践的基础,在红藻的遗传育种中占很重要地位。

## 1.2 杂交育种

杂交育种的关键是正确选择杂交亲本,是以选择育种为基础的。杂交后代在生长势、生活力、抗逆性、产量和品质等方面比双亲优异或是得到理想的有价值的组合,才是育种的目的。

与陆地植物相比,海藻中有性杂交对品系改良的贡献是相当有限的,尤其是红藻,这主要是因为红藻的种间不亲和性;已有几类红藻的种间不亲和被报道过<sup>[2-3]</sup>,包括角叉藻(*Chondrus*),杉藻(*Gigartina*),江蓠(*Gracilaria*)。另外就是遇到一些实际困难,如麒麟菜*Eucheuma*的杂交工作,因为叶状体较大而受到限制,要求有很大体积的水,对设备的要求也较高<sup>[6]</sup>。

Miura用条斑紫菜的突变体分别与野生型和突变型杂交,通过四分子分析,认为条斑紫菜的减数分裂是在壳孢子萌发过程中发生的<sup>[2]</sup>。Suto成功地进行了几种紫菜的种内和种间杂交,其中一些种内杂种的后代有优良的生长特性,但种间杂种的壳孢子减数分裂后产生异常的后代<sup>[2]</sup>。Miura和Shin在进行条斑紫菜

栽培品种的杂交育种研究中,用条斑紫菜颜色等位基因作为遗传标记,获得杂种丝状体,壳孢子萌发过程中进行减数分裂并发生遗传重组,通过从叶状体的重组野生型区选择组织块并使其自体受精,得到遗传上纯合的丝状体,作为新的栽培品种<sup>[2]</sup>。Niwa等用条斑紫菜的紫色突变体分别与野生型和绿色突变体杂交,探讨了突变产生的控制机理<sup>[7]</sup>。这些研究结果为紫菜遗传育种打下了理论基础。

Patwary和van der Meer将从不同种群中得到的有形态差别的江蓠*Gracilaria tikvahiae*克隆进行4~6代的近交后,用各种组合来杂交,F1子代与双亲进行生长率、繁殖力等方面的比较,表明F1子代毫无杂交优势<sup>[2]</sup>。Zhang和van der Meer将*Gracilaria tikvahiae*的纯合二倍配子体的生长率与杂合二倍配子体相比,也无杂交优势<sup>[2]</sup>。Zhang和Fei对*G. tenuistipitata*不同的两类间杂交是成功的,而形态相似、不同地区的*G. lemaneiformis*间的杂交则是失败的<sup>[2]</sup>。不同地区的*G. verrucosa*间杂交也是不成功的<sup>[2]</sup>。种间杂交,如英格兰的*G. foliifera*和加拿大的*G. tikvahiae*间,*G. tikvahiae*和*G. bursapastoris*间,及*G. cericornis*、*G. mammillaris*、*G. verrucosa*间也都是不成功的<sup>[2]</sup>。杂交育种在江蓠属中尚未发挥作用。

Patwary和van der Meer<sup>[8]</sup>将雌雄同体的石花菜*Gelidium rugum*的4个有形态差异的分离系进行相互杂交和近交,并用RAPD分子标记检测出杂种后代在生长上比近交后代更有优势。角叉藻(*Chondrus*)的T4克隆是雄性植株,用于与欧洲获得的几种雌性分离系杂交,以研究角叉藻种群的种间育性<sup>[2]</sup>。Guiry和Cunningham对角叉藻进行种间和种内杂交,*C. pinulatus*的种内杂交是成功的;而*C. nipponicus*与*C. ocellatus*的种间杂交则表现出不育性,只有一个韩国的*C. ocellatus*雌株与几个*C. nipponicus*的雄株分离物间杂交是可育的<sup>[2]</sup>。而Brodie和Guiry却发现*C. ocellatus forma crispoides*可以自由地与*C. nipponicus*进行杂交<sup>[2]</sup>。Brodie等<sup>[9]</sup>对采自中国、日本、韩国的两类*C. ocellatus f. ocellatus*和*C. ocellatus f. crispoides*进行了杂交研究,发现*C. ocellatus f. ocellatus*与来自日本的形态相似的*C. nipponicus*是杂交不育的,而*C. ocellatus f. crispoides*则与这两类都是部分可杂交的;这些研究为育成新的品种提供可能。

在筛选到一些具优良生产性状的品种后,如何使这些形状最大程度的集中并稳定遗传,是杂交育种的目的。常规育种是目前以至今后相当长一段时间内红藻育种的主要途径,同时为新技术育种提供材料。

## 2 现代生物技术育种

### 2.1 原生质体融合

藻类原生质体的研究工作始于 20 世纪 60 年代, 原生质体的遗传操作将为海藻育种提供新方法; 且原生质体融合后能产生更多遗传多样性, 为育种提供更多材料。

来自紫菜(*Porphyra*)叶状体营养细胞的原生质体是单倍体, 其表现型与基因型相同, 这是紫菜原生质体成为紫菜杂交育种和基因工程育种重要材料的原因。原生质体的再生能力是其融合是否成功的基础, 而产生能存活的原生质体并再生为完整植株已经在 *P. cristata*, *P. yezoensis*, *P. subcorticata*, *P. miniata*, *P. leucosticta*, *P. linearis*, *P. perforata* 中获得成功<sup>[2,10]</sup>。Fujita 和 Migita 用条斑紫菜野生型和绿色突变型叶状体酶解, 分离得到原生质体后, 用 PEG 介导融合, 但核融合并没有发生<sup>[2]</sup>。Fujita 和 Saito 用 PEG 或电融合法也得到了几种紫菜的原生质体融合物; 并对 *P. yezoensis* 和 *P. pseudolinearis* 进行了种间融合, 表明电融合法比 PEG 法有更高融合率<sup>[2]</sup>。野生型 *P. yezoensis* 与绿色 *P. tenera* 叶状体获得的原生质体经 PEG 介导融合后, 培养也发现有嵌合叶状体形成, 但并不知是否由融合细胞发育成<sup>[11]</sup>。戴继勋、张全启等<sup>[12]</sup>利用条斑紫菜呈紫色和坛紫菜呈褐黄色的自然色泽不同进行了 PEG 介导的原生质体融合, 杂种细胞为紫褐色, 分离培养后长出新细胞壁, 并进行细胞分裂, 4 周后形成愈伤组织状的多细胞团。Chen 等<sup>[8]</sup>对 *P. linearis* 和 *P. miniata* 的原生质体进行了电融合, 杂合细胞单独培养 4 周后产生多细胞的小植物体; 这将有利于把前者的良好品质、质地和后者藻体较大的特点相结合。尽管紫菜中原生质体融合还没有获得有栽培价值的品系, 但这种遗传操作作为研究和培育抗病力强、产量高、色鲜味美的优质紫菜新品种开辟了途径。Kito 等研究了 PEG 介导绿藻门的 *Monostroma nitidum* 和红藻 *P. yezoensis* 原生质体融合, 杂合细胞的颜色可以很容易地鉴别出异源融合物, 转入 ES 培养基中培养, 再生的植株中有 2 个与亲本相比, 具有杂合 DNA 片段, 且这 2 个以及另 1 个植株都具有双亲的特征脂肪酸组成; 说明属间的遗传重组是可能的, 从而使原生质体融合育种扩展到更广的范围。

Cheney 观察到江蓠(*Gracilaria*)的原生质体自发融合, 但融合细胞没能再生<sup>[3]</sup>。Cheney 等报道了产琼脂的 *G. tikvahiae* 和 *G. lemaneiformis* 的原生质体分离和细胞分裂, 但也未能再生, 且观察到有原生质体自发融合; Chou 和 Lu 从 *G. tenuistipitata* var. *liui* 中分离

出原生质体, 但分离培养和再生没有成功; Cheney 报道了江蓠种间原生质体的成功融合, 由正常时杂交不育的红色 *G. chilensis* 和绿色 *G. tikvahiae* 间融合形成双色的异核体, 产生的有胞质杂种, 也有发生了核融合的; Yan 和 Wang 分离出 *G. asiatica* 原生质体, 5~7 d 内形成愈伤组织, 3 个月后再生成完整植株<sup>[2]</sup>。Chen 和 Chiang<sup>[13]</sup>分离了蜈蚣藻 *Grateloupia sparsa* 和 *G. filicina* 的原生质体并各自分离培养, 最终再生出叶状体或丝状体。

Araki 等<sup>[14]</sup>研究了红毛菜 *Bangia atropurpurea* 的单倍原生质体, 并再生成规则或不规则形状的藻体。Sivan 等<sup>[15]</sup>将两个含低水平藻红蛋白的紫球藻绿色突变品系的原生质体进行融合, 融合后代的藻胆蛋白和叶绿素含量都高于亲本, 表明发生了功能互补。由 PEG 介导仅对除草剂 SMM 有抗性和仅对 DCMU 有抗性的两种紫球藻突变体的原生质体融合, 杂合细胞长成的稳定子代对 SMM 和 DCMU 都有抗性; 为抗性育种提供新思路<sup>[16]</sup>。

总之, 原生质体育种杂交研究已经有很多尝试, 但到目前为止, 尚未获得具有栽培价值的品种, 所以, 还不是一条有效的育种途径。

### 2.2 突变育种

在过去的 20 多年中, 突变特征尤其是色素突变体的应用, 为红藻的遗传研究作出了巨大贡献<sup>[2]</sup>; 江蓠的有丝分裂重组及其与世代交替的关系, 紫菜 *P. yezoensis* 减数分裂在生活史中的位置, 江蓠的基本遗传规律, 紫菜 *P. purpurea* 的减数分裂与性决定间的关系<sup>[7]</sup>都是在应用色素突变体的前提下完成的。

紫菜叶状体中各色素含量对商业干制品的品质很重要, 因此对紫菜色素突变体的遗传研究为紫菜工业所需的良种培育提供了重要背景。东京海湾种群中发现的条斑紫菜杂色叶状体激励了 Miura 和其他人去分离鉴定紫菜的突变体, 并带动了相关的质量遗传和生理研究, 发现红、绿突变表型是由隐性核等位基因控制的, 双基因突变时则产生黄色藻体; Ohme 和 Miura 分析了淡红、淡绿色突变体, 也得到同样的结论; Migita 和 Fujita 分离了条斑紫菜红、绿、黄色突变体, 且由红黄杂交得到了橙色突变体后代, 除红色突变体与野生型的生长相当外, 其余的都比野生型差; Kato 和 Aruga 发现条斑紫菜色素突变体对腐霉 *Pythium* 感染的抗性没有变化, 而对拟油壶菌 *Olpidiopsis* 感染则有更强的抗性。所有这些研究<sup>[2]</sup>都为诱变育种研究打下了基础。

用甲基磺酸乙脂 (EMS) 处理紫菜比处理江蓠更难得到突变体, 而 EMS 在诱导江蓠和其它红藻的色

素和形态突变体中是很有效的<sup>[2]</sup>。Katayama 研究了四种化学药品对甘紫菜和条斑紫菜丝状体和壳孢子的影响,尽管他得到一些可能的色素突变体,但生长很慢且大多在小叶状体阶段死掉了<sup>[7]</sup>。Yan 用秋水仙素和紫外线作诱变剂,成功获得了我国两个主要栽培种类:坛紫菜和条斑紫菜的原生质体突变株,并再生为遗传上稳定的幼苗;不同颜色突变体中,红色株比野生型叶状体生长更快,可见它有可能成为紫菜品系改良的材料<sup>[7]</sup>。Xu 等报道了经化学诱变剂处理后,得到了条斑紫菜和坛紫菜的几个色素突变体<sup>[7]</sup>。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)被证明在诱导石花菜和紫菜 *P. purpurea* 突变中是最有效的<sup>[2,7]</sup>。Yan 和 Aruga<sup>[7]</sup>用 MNNG 处理条斑紫菜单孢子幼体,诱导产生了带不同色斑的杂色叶状体,经酶解得到不同颜色的单细胞和原生质体,之后培养再生成单色幼叶状体,幼叶状体单独培养产生的单孢子又长成杂色叶状体,由该叶状体产生的果孢子各自生成自由生活的丝状体,建立了不同颜色的 7 个突变品系,并进行了突变品系间以及突变体和野生型叶状体间的活体吸收光谱和主要光合色素含量的比较,加以鉴定。Yan 等<sup>[17]</sup>用 MNNG 处理条斑紫菜壳孢子幼苗(1~4 细胞期),产生了 3 类颜色突变叶状体,酶解分离后再生成 4 个不同的色素突变品系,突变在叶状体和丝状体阶段都相对稳定;通过与野生型以及突变品系间的比较,不同品系在活体吸收光谱和主要光合色素含量方面都表现出特征性差异,且叶状体在同一培养条件下还表现出生长和光合率的重要差别。对野生型坛紫菜幼叶状体进行 MNNG 处理,也得到带不同色斑的杂色叶状体,并进行类似的酶解和再生等,也获得几个突变品系,研究其稳定性、吸收光谱和光合色素含量差异,得到与上述相似的结论<sup>[18]</sup>。

对于江蓠 *Gracilaria tikvahiae*, 相当多的色素和形态突变体已被分离鉴定;一些是自发突变产生的,但大多是用化学诱变剂 EMS 处理而产生的,且大多是隐性突变,少数是显性突变;建立了几个连锁核基因的遗传图谱;而且除了核基因突变外,还有相当多的颜色突变体表现出严格的母性遗传,是由叶绿体 DNA 编码的<sup>[2]</sup>。Ramus 和 van der Meer<sup>[19]</sup>将 *G. tikvahiae* 的藻红蛋白不足的绿色突变体与野生型进行比较,研究了其生理活动,发现突变体和野生型后代的光合表现一致,只与光强有关,并不依赖于其颜色。Kursar 等用生化方法鉴定了一些 *G. tikvahiae* 色素突变体,并估计了几种形态突变体(主要是枝条多少的变化)的生长能力,比较了它们产的琼胶的物理特性,发现至少有 2 个突变品系比野生亲本生长更快,其中 1 个产的琼

胶更硬、熔点更高,且对一般的附生植物有更强的抗性<sup>[2]</sup>。江蓠 *G. sjoestedtii* 的色素突变体也被分离和鉴定了;在 *G. tikvahiae*, *G. foliifera* 和 *G. sjoestedtii* 中发现了不稳定的绿色突变体,这些突变在营养生长和发生类似有性繁殖中基因转化的情况下会回复成野生型,认为是转位因子的参与导致的不稳定性;*G. chilensis* 的形态变异种也被鉴定了,它们尽管来源于一个克隆,但琼胶组成各不相同<sup>[2]</sup>。

为便于研究雌雄同株、自交不育的杂交,迫切需要分离出石花菜 *Gelidium ragum* 的有用突变体;用 EMS 和 MNNG 已获得了大量的色素突变体和不育性突变体,其中一些已被遗传鉴定<sup>[2]</sup>;色素突变体中大多是非孟德尔遗传方式传递的,是叶绿体 DNA 缺陷造成,少数是孟德尔遗传方式的核内隐性突变,其中一个已被用作标记基因,来区分交配中的杂种和自交后代;几个不育突变体中,一些表现出简单的孟德尔遗传方式,且分析表明雄性不育是产生不动精子或产生无功能精子,雌性不育是产生了败育的果胞。

van der Meer 收集并鉴定了一些角叉藻 (*Chondrus*) 的绿色自发突变体,其中有 6 个是母性遗传方式的,表明是细胞质的定位突变,且极可能是质体 DNA 突变;其余 3 个显示出孟德尔遗传的核内基因隐性突变,其中有 1 个是温度敏感型的,它的绿色突变表型在 5℃ 时比在 20℃ 时更为明显<sup>[2]</sup>。环节藻 (*Champia*) 在栽培中出现自发突变也早有报道<sup>[3]</sup>,且已鉴定出 *C. parvula* 的一些形态和色素突变体是孟德尔方式遗传的,源自核内基因隐性突变;*C. parvula* 有许多遗传研究所需的特点,特别是有周期很短的有性世代,被认为极可能成为将来红藻遗传研究的模式生物<sup>[20]</sup>;Kehoe 和 van der Meer<sup>[21]</sup>用 EMS 和 MMS(甲基磺酸甲脂)都有效地诱变得到 *C. parvula* 色素突变体,之后进行互补和重组分析,定义了几个新的顺反子,并对它们的连锁关系进行了分析。

尽管目前还没有从红藻突变育种中获得可用于栽培的品种,但相关的遗传突变研究为遗传育种奠定了理论基础。

### 2.3 多倍体育种

曾经有一些报道是关于海藻多倍体的,而江蓠是目前进行多倍体育种研究的最好材料,因为通过体细胞重组产生二倍的配子体或是突变产生的两性配子体的适宜杂交,能较容易且精确地得到多倍体。通过体细胞重组产生的二倍配子体来构建同源多倍体,以期提高 *G. tikvahiae* 的生长;最初这些多倍体植株看起来很有希望,但经过更逼真的生长实验后,很清楚的事实是:多倍体的方法并没有产生任何比野生型

生长得更好的克隆<sup>[1]</sup>。

## 2.4 基因工程育种

### 2.4.1 基因重组技术的应用

通过重组 DNA 技术来研究有机体的单个基因或是在基因组中引入外源基因, 在提高海藻产品产量和改良品种中有巨大的开发潜力。真核藻类遗传转化研究开始于 20 世纪 80 年代, Rochaix 和 Dillewijn 报道了首例淡水单细胞绿藻——莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 的遗传转化, 选用壁缺失突变和精氨酸依赖突变株, 使来自酵母的精氨酸基因获得了整合表达<sup>[22]</sup>。而莱茵衣藻的成功对其它藻类的转化体系研究起了催化作用。

外源基因的导入和稳定表达涉及到许多具体步骤: 1) 有机体的无菌、克隆化培养, 并建立保存和生长的条件; 2) 研究出单细胞再生出有机体的技术; 3) 建立外源基因导入细胞的方法; 4) 寻找真正被转化的细胞的选择标记<sup>[22]</sup>。对于前 2 点, 相关技术在红藻中已有较大发展。而外源基因导入细胞的方法, 目前的电击穿孔、基因枪轰击、微量注射等是大型海藻基因工程主要的转化手段; 载体大多是来自高等植物基因工程, 如: PBI121, PBI221 等, 研究表明, CaMV35S、SV40 和 NOS 启动子在大型海藻中具有通用性, 可被其转录系统识别<sup>[23]</sup>。而选择标记可以是: 1) 使突变藻品系回复为野生型的同源基因, 要求获得营养缺陷型突变体, 并预先分离出对应的野生型基因; 2) 带有对抑制性药物有抗性的显性突变的同源基因; 3) 编码对抗生素或除草剂有抗性的蛋白的异源基因<sup>[22]</sup>。

质粒 PVW426, 包含有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 GUS 基因和启动子 CaMV35S, 通过粒子轰击法导入 *Kappaphycus alvarezii* 组织切片中; 尽管没有得到稳定的转化, 但却检测到 GUS 基因的瞬时表达, 这是红藻中第一次报道外源基因的表达<sup>[2]</sup>。Kübler 等报道了类似的研究, 消化 *P. miniata* 营养组织制备原生质体后由电穿孔法导入质粒 PBI121/221(CaMV35S-GUS 基因), 转化的原生质体可以再生, 并检测到 GUS 基因的瞬时表达, 但适合于红藻的阳性选择标记基因的缺乏阻碍了稳定转化的获得<sup>[22]</sup>。

最近对紫菜 *P. purpurea* 整个叶绿体基因组的测序, 对开发紫菜的转化体系起到了推动作用; 而对转化体系的操作能产生具经济价值的改良品种。通过在几种红藻中发现的质粒上的 DNA 元素的使用, 红藻的遗传转化研究必将有进一步发展<sup>[2,22]</sup>。这些 DNA 元素包括选择标记、外源基因表达的启动子、DNA 复制起点等以构建穿梭载体, 同时红藻的病毒基因组也是一种有开发潜力的载体。Cheney 等<sup>[24]</sup>在对条斑紫菜

的遗传转化中, 使用的是土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*, 而不是常用的将 GUS 和 GFP 表达基因与异源的 CaMV35S 启动子或同源的表达基因 (RPB1 或 GAPDH) 偶联的方法, 且已观察到在转化体及 TIT2 子代中转基因的表达。Lin 等<sup>[25]</sup>通过电穿孔法将带有选择标记的质粒 DNA 转入 *P. leucosticta* 孢子, 在培养的不同时期采样提取完全 DNA, PCR 分析表明在所有样品中都有质粒 DNA 存在, 说明基因转移成功; 并且转化的孢子发育出的幼体在持续的选择压力下生长良好, 使得转基因紫菜的培育更有希望了。

### 2.4.2 遗传标记的应用

通过遗传标记进行良种选择: 遗传标记是指生物体所特有的性状或物质, 能够稳定遗传, 可以反映生物的个体和群体特征, 是生物个体或群体间遗传差异的客观表征。

传统上用的是形态学标记, 如: 颜色突变, 尤其是绿色, 是很有用的形态学标记, 因为它们容易区分且大多对藻体的生活力或生长不产生重要影响<sup>[2]</sup>; 但形态学标记是基因表达加工后的产物, 由于环境效应较易掩盖基因效应, 因而育种者对目标性状的选择是耗时费力的。

现在则多用分子标记技术, 是以生物的某些大分子物质的多态性为基础的, 目前广泛应用的有: 同工酶谱和 DNA 分子标记。Mitura 等通过电泳来研究条斑紫菜种群的遗传结构, 发现种群中存在不同的同工酶谱, 表明种内由于自然隔离和近交已形成了几个地方性亚种群<sup>[2]</sup>; 但同工酶标记所能检测到的差异性座位较少, 且受作物种类、酶的种类和生长发育阶段的影响, 难以有效地应用于育种实践。DNA 分子标记如: RFLP, RAPD, AFLP, SSR 等在 20 世纪 70 年代出现, 可大大增加育种强度和方向, 加快育种进程, 提高效率和精度; 这一点在高等植物中是很明显的, 但在藻类中的研究应用还很不成熟, 相关报道较少。使用 RAPD 技术测得石花菜 *Gelidium vagum* 的 DNA 指纹图谱, 已被用于证实 *G. vagum* 自然种群的遗传多样性, 并提供了在杂种和近交后代中鉴定杂种的标记<sup>[2]</sup>。Meneses 和 Santelices<sup>[26]</sup>报道了在江蓠 *Gracilaria chilensis* 品系选择中使用 RAPDs-PCR, 发现其并不象通常海藻品系选择过程中那样——不育克隆在不同环境中长期保存而不会发生重要遗传改变, 而是在其营养克隆中发生了遗传改变, 且这种动态变化是较快的, 受外部环境影响是较大的。

新技术育种是相对较主动的, 但目前所能提供的具优良遗传变异的后代的群体很小, 选择余地不大, 还没有成为真正有生产价值的良种, 所以在创造出具

优良性状的育种材料后, 还需再借助常规方法来完成育种过程, 为生产提供良种。

### 3 结束语

常规技术育种是通过遗传表型性状、遗传相关性来间接进行育种的, 在早期的驯化和选育优良性状品种中发挥了很大作用, 且为现代生物技术育种提供了材料、指明方向; 虽然优良品种需要经过几代的生长和选择才能确定, 时间长、工作量大, 但对环境、生物种群和人类不会造成大的威胁。现代生物技术育种是直接对遗传物质进行主动操作, 能快速培育良种、稳定遗传、节省人力, 能克服红藻不同种间杂交育性不强的问题, 为培育具广泛适应性、高抗性、高产优质的优良品种提供了更快而有效的途径。目前, 应根据已有经验综合考虑, 把两类育种方法结合使用, 为红藻产业提供稳产高产的优良品种。目前的研究尚在技术探索阶段, 离真正将这些技术应用到育种过程并获得优良品种, 还有很长的路要走。

#### 参考文献

- 1 Radmer R J. Algal diversity and commercial algal products. *Bio Science*, 1996, 46(4): 263-270
- 2 Patwary M U, van der Meer J P. Genetics and breeding of cultivated seaweeds. *The Korean Journal of Phycology*, 1992, 7(2): 281-318
- 3 van der Meer J P. Genetics contributions to research on seaweeds. *Progress in Phycological Research*, 1986, 4: 1-38
- 4 Kraemer G P, Yarish C. A preliminary comparison of the mariculture potential of *Porphyra purpurea* and *P. umbilicatis*. *J Applied Phycol*, 1999, 11: 473-477
- 5 Rueness J, Fredriksen S. Intraspecific reproductive variation in *Gelidium pusillum* (Stackh.) Le Jol. (Gelidiales, Rhodophyta) from Europe. *J Applied Phycol*, 1998, 10: 253-260
- 6 de Paula E J, Pereira R T L, Ohno M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *J Applied Phycol*, 1999, 11: 111-121
- 7 Yan X H, Aruga Y. Induction of pigmentation mutants by treatment of monospore germings with NNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Algae (The Korean J of Phycol)*, 1997, 12(1): 39-52
- 8 Patwary M U, van der Meer J P. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium wuian* (Rhodophyta). *J Phycol*, 1994, 30: 91-97
- 9 Brodie J, Guiry M D, Masuda M. Life history, morphology and crossability of *Chondrus ocellatus* forma *ocellatus* and *C. ocellatus* f. *crispoides* (Gigartinales, Rhodophyta) from the north-western Pacific. *Eur J Phycol*, 1993, 28: 183-196
- 10 Ar Gall E (Le Gall Y), Chiang Y M, Kloareg B. Isolation and regeneration of protoplasts from *Porphyra dentate* and *P. cristate*. *Eur J Phycol*, 1993, 28: 277-283
- 11 Araki T, Morishita T. Fusion of protoplasts from wild type *Porphyra yezoensis* and green type *P. tenera* Thalli (Rhodophyta). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56(7): 1 161
- 12 戴继勋, 张全启, 包振民, 等. 紫菜原生质体的纯系培育、诱变处理和种间细胞融合的研究, *海洋与湖沼*, 1990, 21(3): 293-296
- 13 Chen Y C, Chiang Y M. Development of protoplasts from *Grateloupia sparsa* and *G. filicina* (Haly-meniaceae, Rhodophyta). *Bot Mar*, 1994, 37: 361-366
- 14 Araki T, Hayakawa M, Tamaru Y, et al. Isolation and regeneration of haploid protoplasts from *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) with marine bacterial enzymes. *J Phycol*, 1994, 30: 1 040-1 046
- 15 Sivan A, Thomas J C, Dubacq J-P, et al. Protoplast fusion and genetic complementation of pigment mutations in the red microalga *Porphyridium* sp.. *J Phycol*, 1995, 31: 167-172
- 16 Sivan A, (Malis) Arad S. Intraspecific transfer of herbicide resistance in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyceae) via protoplast fusion. *J Phycol*, 1998, 34: 706-711
- 17 Yan X H, Fujita Y, Aruga Y. Induction and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J of Applied Phycol*, 2000, 12: 69-81
- 18 Yan X H, Tanaka J, Fujita Y, et al. Isolation of pigmentation mutants in *Porphyra haitanensis* Chang & Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 2001, 40(4): 9
- 19 Ramus J, van der Meer J P. A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation I. Color mutants of a red seaweed. *J Phycol*, 1983, 19: 86-91
- 20 Steele R L, Thursby G B, van der Meer J P. Genetics of *Champia parvula* (Rhodymeniales, Rhodophyta): Mendelian inheritance of spontaneous mutants. *J Phycol*, 1986, 22: 538-542
- 21 Kehoe D M, van der Meer J P. Genetics of *Champia parvula* (Rhodymeniales Rhodophyta): Induction, characterization and mapping of mutants. *Bot Mar*, 1990, 33: 393-399
- 22 Stevens D R, Purton S. Genetic engineering of Eukaryotic algae: progress and prospects. *J Phycol*, 1997, 33: 713-722
- 23 姜鹏, 秦松, 曾呈奎. 海藻基因工程进展(II). *海洋科学*, 1998, 6: 23-25
- 24 Cheney D, Metz B, Stiller J. Agrobacterium-mediated genetic transformation in the macroscopic marine red alga *Porphyra yezoensis*. *J Phycol*, 2001, 37(3): 11
- 25 Lin C M, Larsen J, Yarish C, et al. A novel gene transfer in *Porphyra*. *J Phycol*, 2001, 37(3): 31
- 26 Meneses I, Santelices B. Strain selection and genetic variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Applied Phycol*, 1999, 11: 241-246

(本文编辑: 刘珊珊)