

^{60}Co - 辐照对坛紫菜原生质体诱变的研究

姚继承, 王 诚, 左正宏, 林 芳, 陈奕欣

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用 ^{60}Co - γ 射线对坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)原生质体进行辐照诱变,发现原生质体对 ^{60}Co - γ 射线有极强的耐受性。前期的培养结果表明,原生质体是一种理想的诱变材料。诱变结果表明, ^{60}Co - γ 射线对坛紫菜可诱变剂量范围很大,从 200~1 300 Gy 均有突变株生成。诱变后细胞的存活率不宜作为坛紫菜诱变最佳剂量的指标。

关键词: 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*); 原生质体; ^{60}Co - γ 射线; 诱变

中图分类号: Q345 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)11-0048-04

紫菜不仅具有很高的营养价值,而且是良好的保健品以及重要的工业原料^[1-4]。坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国最主要的紫菜栽培品种之一,年产量占全国紫菜年产量的八成左右,但它的产值却不及条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*),品种种质严重退化是主要原因之一。目前栽培使用的种质材料,多是采自自然海区的原种经多代人工培育繁殖的后代。随着时间的推移,普遍存在种质退化、对病害和不良环境的抵抗力都大大下降,大面积病烂也时有发生。且所产的藻体品质降低、藻体厚、蛋白质含量低、口感差。因此,培育藻体嫩薄、蛋白质含量高、抗病力强的坛紫菜新品系已成为当前坛紫菜生产上亟待解决的问题。

诱变育种是目前高等植物育种最常用且最有效的方法。其中物理诱变由于诱发突变率较高,染色体畸变较少,诱变范围广,对处理材料损伤比化学诱变剂轻,因而在植物育种中应用广泛。其中 γ 射线具有很强的穿透能力,对高等植物具有很强的生物学效应,在农业生产上成功的报道很多^[5-8]。匡梅等^[9]利用 γ 射线对条斑紫菜和坛紫菜原生质体诱变后对色素体变异株进行筛选,王素娟等^[10]也对坛紫菜自由丝状体作过诱变研究。

作者利用 γ 射线对坛紫菜原生质体进行诱变,目的在于获得具有优良性状的植株,用于坛紫菜品种改良。同时对其诱变效果进行分析比较,以期建立一种

针对坛紫菜的快速有效的诱变育种方法,在坛紫菜育种研究中应用。

1 材料与方法

1.1 材料

诱变用的坛紫菜取自福建平潭海区野生菜坛,藻体阴干后 20 ℃ 保存。海螺酶提取自朝鲜花冠小月螺内脏团。Tris 为 sigma 公司产品,其余化学试剂均购自上海生物工程公司。

1.2 原生质体的制备

原生质体的制备方法按匡梅等^[9]的方法进行。皿中原生质体的密度以在 10×40 倍显微镜下每个视野约有 50 个原生质体为宜。

1.3 原生质体辐照诱变

酶解后的原生质体培养 36 h 后用 ^{60}Co - γ 辐照。将培养皿中的培养液倒掉,用不同剂量 ^{60}Co - γ 射线辐照,辐照结束后添加培养液。

收稿日期: 2004-06-11; 修回日期: 2005-01-20

基金项目: 国家 863 计划项目(2002AA603023); 福建省重大农业科技项目(2001Z017)

作者简介: 姚继承(1976-), 山东文登人, 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学; 陈奕欣, 通讯作者, E-mail: chen yix@yanan.xmu.edu.cn

1.4 原生质体辐照诱变参数

参数见表 1。

辐照用原生质体共设 8 组，每组 3 个重复。辐照

表 1 原生质体的辐照参数

Tab.1 The irradiation parameters of the protoplast

参数	剂量 (Gy)								
	对照	100	200	300	500	700	900	1100	1300
辐照时间 (min)	0	19	38	57	95	133	171	209	249
剂量率 (Gy/min)	0	5.26	5.26	5.26	5.26	5.26	5.26	5.26	5.26
距钴源距离 (m)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1.5 辐照后诱变材料的培养及细胞原生质体计数

原生质体材料在辐照后第 3、9、15 天对原生质体计数(每培养皿 10 个视野), 计算死亡率及分裂率。其中死亡率=(1-活细胞个数)/细胞总数 × 100% ; 分裂率 = 分裂细胞个数/细胞总数 × 100%。

1.6 数据处理与分析

数据统计用 SPSS10.01 版进行。差异显著性用

turkey 氏 *t*-检验进行。

2 实验结果

2.1 不同剂量 γ -射线辐照对原生质体细胞的成活率的影响

原生质体经 0~1 300 Gy 射线辐照 , 在辐照后第 3、9、18 天时其细胞的死亡率及分裂情况见表 2。

表 2 辐照 3, 9, 18 d 后原生质体的死亡率和分裂率

Tab.2 The mortality and division rates of the protoplast 3, 9, 18 days after irradiation

参数	辐照剂量 (Gy)								
	0	100	200	300	500	700	900	1100	1300
辐照 3 d									
死亡率(%)	7.33	18.07	15.85	18.13	18.23	7.61	4.89	5.12	5.11
±SD	± 3.98	± 4.74	± 3.45	± 4.66	± 5.74	± 4.13	± 2.53	± 2.25	± 2.21
分裂率(%)	13.14	11.07	6.66	6.05	5.29	17.01	17.53	17.80	14.49
±SD	± 3.78	± 7.80	± 4.09	± 4.18	± 4.53	± 5.46	± 4.82	± 5.31	± 2.75
辐照 9 d									
死亡率(%)	12.26	15.77	13.94	17.02	15.92	15.27	15.71	35.61	37.25
±SD	± 3.70	± 3.33	± 2.84	± 2.82	± 5.73	± 2.87	± 3.50	± 8.27	± 6.68
分裂率(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
辐照 18 d									
死亡率(%)	13.20	15.79	17.73	17.02	16.12	14.14	15.85	42.89	63.59
±SD	± 2.53	± 1.99	± 2.88	± 2.18	± 3.41	± 2.55	± 7.09	± 7.35	± 8.86
分裂率(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

由表 1, 2 可见, γ 射线辐射剂量低于 900 Gy 对细胞的成活率以及分裂情况没有太大的影响。当

射线的辐照剂量达到的 1 100 Gy 以上时,虽然辐照 3 d 细胞的死亡率与低剂量处理的没有太大变化,但第 9 天时细胞的死亡率则显著上升。至第 18 天时,1 300 Gy 剂量组的细胞死亡率达到 60%以上。

2.2 辐照后获得的突变体

本实验在辐照后经培养筛选,不同剂量的辐照均可获得突变体,这些突变体在色素体、生长速度等方面均不同于正常培养的藻体。图 2 为其中的 2 株突变株。

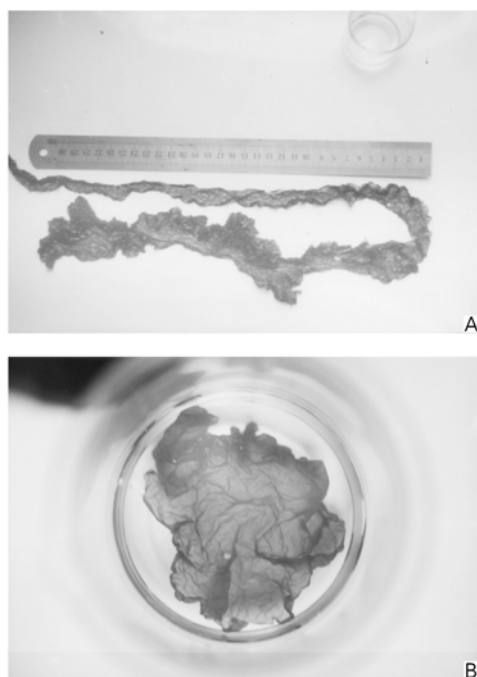


图 1 坛紫菜辐照后所得突变株

Fig.1 Mutants of the (*Porphyra haitanensis*) after ^{60}Co - γ ray irradiation.

A: 生长快的突变株; B: 藻体薄、色素体突变的突变株。

A: Mutant with high growth rate; B: Mutant with thin thallus and pigment mutation.

3 讨论

影响紫菜诱变效果的主要因素,一是诱变方法,二是紫菜诱变材料的选择。目前在紫菜诱变育种上用得最多的是化学诱变,但事实上化学诱变剂中仅亚硝基胍诱导色素突变体获得了成功,其他的诱变剂在实际育种中的应用仍然未见有重大进展。由于物理诱变在其他高等植物育种中具有快速有效的特点,因此本

实验选用具有单倍性的叶状体酶解后的单细胞为诱变材料,用 射线作为诱变剂对坛紫菜进行诱变,以期获得有经济价值的突变株,为坛紫菜生产提供新的优良品系,同时也可在理论上为紫菜遗传学研究提供证据,并对坛紫菜育种实践提供方法学上的指导。

在高等植物诱变育种中,通常认为辐照后细胞的死亡率在 70%左右时可以获得最好的诱变效果。也有根据辐照后细胞的半致死剂量来确定诱变的最佳剂量的。但是根据作者的实验结果,在紫菜育种上用这种方式来确定诱变的最佳剂量是不合适的。原因在于:(1) 射线对大多数高等植物的半致死剂量均在 200 Gy 左右,因此大多数高等植物诱变中的辐照剂量很少超过 600 Gy。作者的实验以及此前匡梅等^[9]的实验均表明紫菜对于 射线具有极强的耐受性。900 Gy 以下的辐照剂量对酶解后的原生质体的活性及发育均没有显著的影响。甚至在辐射剂量达到 1 300 Gy 时,只有个别的培养皿中的细胞死亡率达到 60%。(2) 不论是高剂量(1 100 Gy 以上)还是低剂量(200~500 Gy 之间)的 射线均可以诱导细胞的突变并产生较好的变异株。例如作者在 200 Gy 剂量组产生的一株突变株其生长速度在一段时期曾达到 3~4 cm/d。该株长度达 1.5 m 左右(图 1-A)。同时高剂量组也产生了一些生长明显快于对照组的植株,且具有明显耐受恶劣环境的特点。这说明对紫菜而言,突变株的出现更加随机,不论高剂量还是低剂量均可得到有益性状的突变株。

坛紫菜生活史包括叶状体、果孢子、丝状体、壳孢子 4 个阶段(可能有单孢子存在)。诱变果孢子和丝状体后需经过在贝壳中穿壳生长等过程来筛选,周期很长;以壳孢子为材料诱导,取材受到季节的限制。由于叶状体为单倍性,同时叶状体取材方便,原生质体酶解也很方便,酶解后的原生质体虽然抗辐照能力仍然很强,但由于没有细胞壁(尚未完全形成),细胞核因此能接受更强的射线辐照,当剂量高达 1 300 Gy 时细胞出现较强反应,并有诱变株出现(图 1-B)。

作者实验的结果显示,坛紫菜能抗高强度 射线辐照可能并不是由于其细胞壁中的多糖成分作用,其原因可能在于其特殊的胞内酶系统。尽管已有许多实验表明坛紫菜有很强的抗辐射能力,但对其抗辐射的原理至今没有合理的解释。大多数的研究者均倾向于细胞壁中的多糖可能是主要的抗辐射物质的观点。但是作者的实验材料为酶解后尚未完全形成细胞壁的原

生质体，其抗辐射作用也是普通高等植物的数倍。表明除普遍认为的细胞壁中多糖的作用外，坛紫菜特殊的胞内酶系统可能才是坛紫菜抗辐射的真正的原因。有关这方面问题的探讨，其意义可能远远超过紫菜育种研究本身。

由于 ^{60}Co - γ 射线是通过撞击到细胞的某些辐射敏感的部位后使其发生离子化，引起 DNA 链断裂，不能得到有效修复时就会出现突变。所以在同一培养皿中受同一剂量辐照的原生质体的个体的生长速度、色素体及叶状体形状等都有很大的差异。目前作者的实验室已通过 ^{60}Co - γ 诱变得得到一些具有优良性状的变异株。这些变异株生长周期延长，性分化阶段推迟，不断进行营养生长。有些藻体变宽变薄，藻体颜色改变，通体红褐色，估计与藻红蛋白含量增高有关，也有一部分表现出较强的抗逆性。

参考文献：

- [1] 许实波. 几种不饱和的内脂二萜类海洋天然产物的抗肿瘤作用[J]. 中国海洋药物, 1994, 13(1): 1-5.
 [2] 唐书明, 黄芳, 秦松, 等. 基因重组别藻蓝蛋白对小鼠 S₁₈₀

- 肉瘤的抑制作用[J]. 药物生物技术, 1999, 6(3): 168-170.
 [3] 俞丽君, 李永明. 钝顶螺旋藻藻胆蛋白的纯化及其清除氧自由基的作用[J]. 台湾海峡, 1999, 18(2): 172-177.
 [4] 范晓, 严小军, 韩丽君. 海藻化学分析方法[M]. 北京: 学苑出版社, 1995.
 [5] 黄宝才, 缪炳良, 张志明. 稻米品质诱变育种之我见[J]. 江苏农业科学, 1999, 3: 15-16.
 [6] imura H. Mutation breeding in sweet potato and tubercrops—a review[J]. *Gamma Field Symposia*, 1986, 25: 109-130.
 [7] 蔡凌. 辐射诱变在植物抗病育种中的应用[J]. 安徽农学通报, 2000, 6(6): 44-45.
 [8] 陈学珍, 李华, 金文林, 等. 菜豆、豇豆辐射诱变效应的研究—— ^{60}Co - γ 射线处理对菜豆生长发育的影响[J]. 北京农业科学, 2000, 18(4): 8-11.
 [9] 匡梅, 许璞, 王素娟. γ -射线对条斑紫菜和坛紫菜诱变作用的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 1997, 6(4): 241-245.
 [10] 王素娟, 马凌波, 许璞, 等. ^{60}Co - γ 射线诱变条斑紫菜丝状体的研究[J]. 海洋科学, 1998, 4: 43-47.

Mutagenesis on protoplast of *Porphyra haitanensis* by ^{60}Co - γ

YAO Ji-cheng, WANG Cheng, ZUO Zheng-hong, LIN Fang, CHEN Yi-xin

(School of life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Jun., 11, 2004

Key words: *Porphyra haitanensis*; protoplast; ^{60}Co - γ ray; mutagenesis

Abstract: ^{60}Co - γ ray was used to induce mutant on protoplast of *Porphyra haitanensis*. The results showed that the protoplasts of *P. haitanensis* could survive under a wide range of γ -rays. Primary culture showed that the protoplast was suitable for mutagenesis. Further results also showed that mutants could be induced in a very wide range of dosages of ^{60}Co - γ ray. The mortality was not a suitable parameter for the evaluation of the mutant-induction efficiency in *P. haitanensis*.

(本文编辑：张培新)