

研究简报

## 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

戴继勋 张全启 包振民 于波<sup>1)</sup> 周浩朗<sup>2)</sup>

(青岛海洋大学)

紫菜是国内外养殖最多的重要经济海藻之一。1982年唐延林首次用酶法分离出紫菜体细胞和原生质体,并培养获得再生植株<sup>[1]</sup>,随后在国内外相继开展了紫菜单细胞和原生质体的分离工作<sup>[2,8,11,13,17]</sup>。在短短的几年里,紫菜的基础和应用研究均取得明显的进展<sup>[1,3,4,10,12,15]</sup>。在紫菜的遗传育种研究方面,Polne-Fuller等提出了紫菜等海藻的单细胞和原生质体的遗传改良,并正在进行紫菜抗病突变体的筛选工作<sup>[16]</sup>。在藻类细胞融合方面,张大力利用两种绿藻的原生质体,获得了大型海藻的细胞融合<sup>[5]</sup>。最近,Fujita等进行了不同色型的条斑紫菜细胞融合的研究<sup>[14]</sup>。但利用紫菜原生质体进行诱变育种,以及紫菜异种间的细胞融合研究,尚未见报道。本文主要报告紫菜原生质体的纯系培育、突变体的诱发和种间细胞融合的初步研究。

### 一、材料和方法

#### 1. 材料及其保存

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 于1985年4月和1986年1—4月采集于青岛太平角人工养殖和自然生长的紫菜,坛紫菜 (*P. haitanensis* T. J. Chang et B. F. Zheng) 为人工养殖的紫菜,于1985年10月26日和1986年11月初分别采集于浙江省鄞县和福建省同安县。将紫菜阴干,密封于尼龙袋内,速冻保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下。

#### 2. 原生质体的制备

在制备原生质体前,将冷藏紫菜进行恢复培养。从中选择健康幼嫩的个体,切成碎块。用含2%的海螺酶(青岛海洋大学产品)和1%的纤维素酶(Onozuka R-10)的混合酶液5ml,加入2mol/L葡萄糖,调pH至6.0,进行紫菜酶解。在 $25^{\circ}\text{C}$ 左右,酶解约3h。用孔径大约 $50\mu\text{m}$ 的尼龙筛绢过滤后,以500r/min转速离心5min;再用比重为1.025的消毒海水洗涤离心3次,收集原生质体。

#### 3. 纯系培育

对条斑紫菜不同色型和不同叶型的个体,分别单棵酶解,将分离的原生质体,进行隔

1) 现在山东省海水养殖研究所工作。

2) 现在广西壮族自治区海洋研究所工作。

收稿日期: 1988年10月17日。

离培养。

#### 4. 诱变处理

(1) 紫外线照射 条斑紫菜原生质体在培养皿中经过两天正常培养,然后倒出培养液,用 30W 紫外灯,波长为  $2537 \text{ \AA}$ ,电压为 220V,照射距离为 10cm,照射时间分别为 10s, 20s, 30s, 1min, 2min 和 4min。照射后,先在黑暗中培养一天,再转入正常培养。

(2) 秋水仙素处理 条斑紫菜原生质体,经两天培养后,分别用 0.1‰, 0.5‰, 1.0‰ 和 5.0‰ 的秋水仙素消毒海水溶液处理 7d,然后转入正常培养液中培养。

#### 5. 细胞融合

原生质体的标记是用 1.5mol/L 的葡萄糖溶液配成 0.1‰ 的中性红染液。融合剂是用聚乙二醇 (PEG),分子量为 6000,溶液浓度为 45%,并含 1.0mol/L 蔗糖。先将条斑紫菜原生质体在中性红标记液中染色,然后与未染色的坛紫菜原生质体按大约 1:1 混合于直径为 5cm 的培养皿内,原生质体的密度约盖满培养皿底部。加入少量 PEG 融合液,轻微振荡,15min 后用比重为 1.025 的消毒海水洗涤 3 次,然后挑取单个融合细胞进行培养。

#### 6. 培养条件和观察手段

培养液是用煮沸消毒的海水。每 1ml 培养液,加营养盐  $\text{KNO}_3$ -N $10 \mu\text{g}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -P $1 \mu\text{g}$ ,融合细胞用 PES 培养液培养。光强为 2500 lx,每天光照 12h。原生质体和幼小紫菜用显微镜摄影,放大倍数分别为 20, 80, 132 和 200 倍。较大的紫菜用像机摄影,照片用硬性 3 号放大纸。

## 二、结果和讨论

### 1. 纯系的培育

应用条斑紫菜不同色型和不同叶型的个体所分离的原生质体(图版 I:1),分别培养并获得了不同的纯系。在同一纯系内,其形状基本上趋于一致(图版 I:2)。不同的纯系,其色泽、叶形等性状彼此有所差异。绿色的紫菜细胞产生绿色的叶状体,紫红色的细胞产生紫红色的叶状体;长叶型产生的后代是长形叶个体,宽叶型产生的后代是宽形叶个体。试验表明,不同的纯系具有不同的遗传特性。

应用常规育种方法培育紫菜纯系,需进行自交、单株采孢子、隔离培养丝状体等措施,技术操作十分繁杂<sup>[6]</sup>。利用酶法分离原生质体培育纯系,是一种简便快速和有效的育种方法。同时紫菜叶状体的营养细胞是单倍体<sup>[9]</sup>,其显性基因和隐性基因都可直接表现出来,这有助于有害基因的消除和有利基因的保存。

### 2. 营养细胞的诱变

(1) 紫外线照射 原生质体经过两天培养后,它已形成具有完整细胞壁的单细胞。利用这样的营养细胞处理的结果表明,紫外线照射在 10s—1min 钟之间,对条斑紫菜营养细胞无诱变作用,它们的畸形叶状体跟对照组相似,大约 5%。但是在照射 30s 的一组,处理后第 3 天细胞分裂较快,经过两个月培养的叶状体,明显地大于对照组,表明这个剂量对细胞生长有促进作用,这有利于养殖利用。当照射 2min 后,约有 20% 的幼叶状体是畸形(图版 I:3);照射 4min 后,约有 39% 的叶状体是畸形,同时随着剂量的增加,细胞的

死亡率也增大。这表明,较高剂量的紫外线照射,对条斑紫菜的营养细胞可能具有诱变作用。利用同一纯系进行紫外线照射,已得到了不同形态变异的紫菜(图版 I:4)。

(2) 秋水仙素处理 条斑紫菜营养细胞,用不同浓度的秋水仙素处理,结果表明,随着处理浓度的增加,死亡率增高,存活细胞分裂的速度降低,畸形率也增多。这表明,秋水仙素有抑制细胞分裂的作用和毒害作用,并随浓度的增加而加强。处理组和对照组经过两个月的培养,结果表明,对照组所长成的叶状体较细长,细胞排列规则(图版 I:5);而处理组的藻体,细胞的长、宽、高一般都大于对照组,且排列不规则(图版 I:6)。长成的叶状体,变得短、宽和厚,并呈现出各种形状。用秋水仙素处理紫菜单个营养细胞,所获得的变异,是否属于遗传的变异有待进一步研究。

应用紫菜叶状体营养细胞解离成原生质体,在细胞水平上进行诱变和筛选突变体,这种方法十分类似微生物的诱变和筛选技术。用紫菜离体细胞获得诱变紫菜,这为紫菜的诱变研究和品种改良,开辟了一个新途径。

### 3. 细胞融合

我们利用条斑紫菜呈紫色和坛紫菜呈褐黄色的自然色泽的不同,进行细胞融合。同时为了增强杂种融合细胞的选择效果,又用中性红标记条斑紫菜,标记细胞呈紫红色。两种原生质体,在 PEG 融合液的作用下,大约 5min,可以看到两个原生质体质膜的接触处发生粘连,形成一个 8 字形的融合体(图版 I:7),随着质膜的进一步溶解,最后形成一个完整的融合体。融合的杂种细胞,其颜色为紫褐。这个过程大约在 30min-1h 之间完成。其融合率约为 5—10%,融合细胞进行单个分离培养,其中有两个杂种融合细胞经过一星期后,长成新的细胞壁,并进行细胞分裂。4 星期后,融合细胞形成一个愈伤组织状的多细胞团(图版 I:8)。这与张大力在两种多细胞绿藻的细胞融合情况基本上相似。

几年来,利用酶法分离条斑紫菜和坛紫菜的单细胞和原生质体,进行遗传与育种研究,在纯系培育、诱变研究和细胞融合等方面已获得了初步结果。我们认为,利用紫菜原生质体进行细胞水平上的遗传操作,在遗传学的基础研究和培育抗病力强、产量高、色鲜和味美的优质紫菜新品种上是很有希望的。

### 参 考 文 献

- [1] 方宗熙、戴继勋、唐延林等,1986。紫菜营养细胞的酶法分离和在水产养殖中的应用。海洋科学 10(3): 46—47。
- [2] 王素娟、张小平、徐志东等,1986。坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I。海洋与湖沼 17(3): 217—221。
- [3] 王素娟、徐志东、王光远等,1986。坛紫菜原生质体超微结构的观察。海洋科学 10(4): 21—23。
- [4] 王素娟、孙云龙、路安明等,1987。坛紫菜营养细胞和原生质体培养研究 II。直接育苗下海养殖的实验研究。海洋科学 11(1): 1—7。
- [5] 张大力,1983。两种绿藻——长石莼和袋藻膜原生质体的制备、培养和融合的研究。山东海洋学院学报 13(1): 57—65。
- [6] 张祐基、杨以勋、王清印等,1985。条斑紫菜遗传和育种的研究。海洋湖沼通报 26(4): 44—52。
- [7] 唐延林,1982。紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养。山东海洋学院学报 12(4): 37—50。
- [8] 戴继勋,1987。五种海产贝类消化酶对紫菜细胞的分离。海洋湖沼通报 31(1): 84—88。
- [9] 戴继勋、方宗熙,1985。甘紫菜的染色体观察。武汉植物学研究 3(4): 471—472。
- [10] 戴继勋、包振民、唐延林等,1988。紫菜叶状体细胞的酶法分离及其养殖研究。生物工程学报 4(2): 133—137。
- [11] Chen, L. C. M., 1987. Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. Bot. Marina 30(5):

- 399—403.
- [12] Dai Jixun and Bao Zhenmin, 1988. Developmental studies of protoplasts of *Porphyra haitanensis*. *Chinese Journal of Genetics* 15(3): 253—258.
- [13] Fujita, Y. and S. Migita, 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 57: 39—45.
- [14] Fujita, Y. and S. Migita, 1987. Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda and development of fusion products. *Jap. J. Phycol.* 35: 201—208.
- [15] Polne-Fuller, M. and A. Gibor, 1984. Developmental studies in *Porphyra* I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion and protoplast regeneration. *J. Phycol.* 20: 609—616.
- [16] Polne-Fuller, M. and A. Gibor, 1986. Calluses, cells and protoplasts in studies towards genetic improvement of seaweeds. *Aquaculture* 57: 117—123.
- [17] Saga, N., 1984. Isolation of protoplasts from edible seaweeds. *Bot. Mag. Tokyo* 97: 423—427.

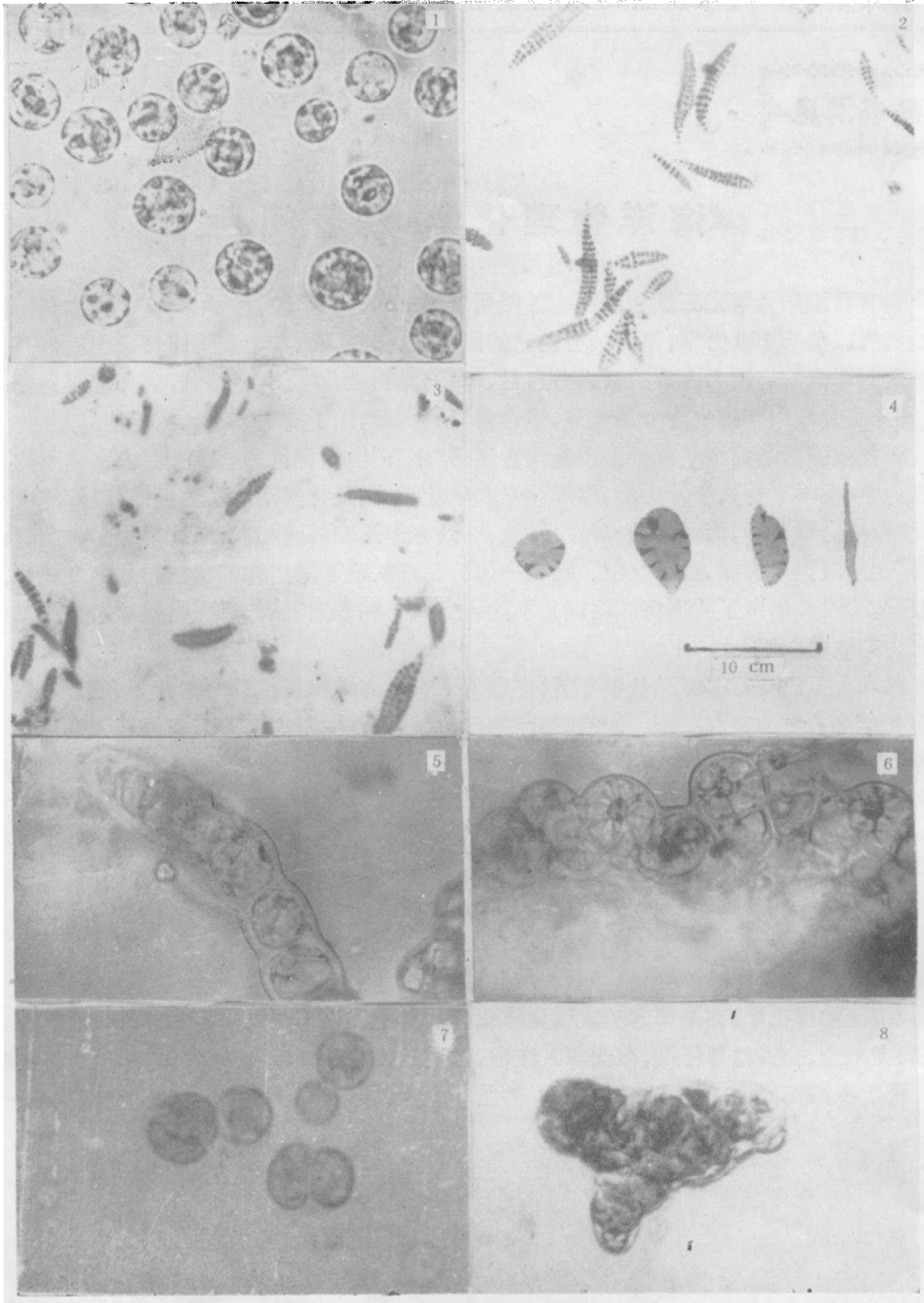
## STUDIES ON THE PURE LINE CULTURE, MUTAGENIZATION AND INTERSPECIFIC FUSION OF *PORPHYRA* PROTOPLASTS

Dai Jixun Zhang Quanqi Bao Zhenmin Yu Bo and Zhou Haolang

(Ocean University of Qingdao)

### ABSTRACT

Using an enzyme mixture of 2% sea snail enzymes and 1% cellulase we success fully isolated protoplasts from vegetative cells of *Porphyra haitanensis* and *P. yezoensis*, and studied their genetics and breeding techniques. Many pure lines of *P. yezoensis*, in which the characteristics of every single blade were essentially identical, were obtained after individual blades of different color and different morphology were isolated and cultured seperately. Low dosages of UV irradiation increased cell division, while higher dosages increased variation rate. When treated with colchicine, the death rate rose and cell division were apparently inhibited as the colchicine concentration increased. Thalli regenerated from the treated groups showed a variety of shapes. Their cells were obviously larger than those from the control group and were irregularly organized. PEG-induced interspecific protoplast fusion was observed and distinguished either by the natural color difference between these two species or by the neutral red labeled *P. yezoensis* protoplasts. The hybrid cells could be divided and form callus-like cell masses, but could not differentiate into thallus.



紫菜的原生质体、纯系、诱变和细胞融合

Protoplasts, pure line, mutagenesis and cell fusion of *Porphyra*

1. 条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 叶状体分离的原生质体( $\times 200$ ); 2. 同一叶状体细胞得到的纯系( $\times 20$ ); 3. 紫外光处理后, 部分细胞长成畸形叶状体( $\times 20$ ); 4. 紫外光处理后, 得到的不同类型的叶状体; 5. 对照组叶状体细胞 (侧面观,  $\times 200$ ); 6. 秋水仙素处理后长成的畸形叶状体叶状体细胞( $\times 200$ ); 7. 细胞的融合 ( $\times 132$ ); 8. 条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 和坛紫菜 (*P. haitanensis*) 融合细胞长成的多细胞团( $\times 80$ )。