

# 孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性\*

吴 韵 邹立红 姜 鹏 孙国琼 秦 松 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**摘要** 于 1999 年 4—7 月,以孤雌生殖海带为材料,运用统计学方法研究其对草丁膦的敏感性,以期得到一定剂量和时间范围内草丁膦对不同长度孤雌生殖海带的半数致死剂量( $LD_{50}$ )。结果表明,孤雌海带在 0.5—1.6cm 长度范围内,草丁膦的半数致死剂量与海带的长度不相关,而与草丁膦的剂量和作用时间相关。孤雌生殖海带对草丁膦比对氯霉素和潮霉素更为敏感,提示 *bar* 基因有可能成为海带基因工程更为理想的选择标记基因。

**关键词** 海带,草丁膦,选择标记

**中图分类号** Q789

将外源基因导入藻类细胞并得到稳定表达的必备条件之一是要有合适的 DNA 标记,以便使少数的转化细胞能被筛选出来(David *et al*, 1997)。高等植物目前的选择标记主要是编码抗生素或除草剂蛋白的异源基因(Old *et al*, 1994)。已证实海带对氯霉素和潮霉素具有一定的敏感性(武建秋等, 1995; 李新萍等, 1999)。Qin 等(1998)在此基础上以氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因为选择标记基因转化海带雌配子体,得到了抗氯霉素的孤雌生殖海带,但筛选方法和选择标记都还有待进一步优化。本文报道孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性研究结果,以为海带基因工程提供更敏感的选择压力和更有效的选择标记基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 孤雌生殖海带及其培养方法

孤雌生殖海带(*Laminaria japonica*)于 1999 年 1 月按方宗熙等(1978)的方法培养而得。孤雌孢子体全长(从柄基部至叶片梢尖)为 0.5—1.6cm,培养用海水经过滤、煮沸、冷却后加营养盐,使 N 和 P 元素的终浓度分别为 0.43mmol/L 和 0.019mmol/L,光暗周期比为 10h:14h,光强为  $50\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,温度为  $(10.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,每周更换一次培养液。

### 1.2 孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性实验

将孤雌生殖海带分为全长  $(5.00\pm 0.06)\text{mm}$ 、 $(9.50\pm 0.10)\text{mm}$  和  $(16.10\pm 0.13)\text{mm}$  三个(即 a、b、c)实验组,每个实验组均设置 13 种草丁膦剂量,分别为:0.0、1.1、1.5、2.0、2.6、3.4、4.4、5.7、7.4、9.6、12.5、16.3 和  $21.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 。取直径为 3.0cm 的无菌培养皿,加入营养海水和所需的草丁膦母液,每个平皿放入 10 株一定长度范围内的孤雌生殖海带,

\* 中国科学院生物科学与技术研究特别支持费资助项目,STZ97-3-09 号,吴 韵,女,出生于 1976 年 5 月,硕士生, E-mail: sqin@ms. qdio. ac. cn

收稿日期: 1999-12-29, 收修改稿日期: 2000-06-02

每天观察其生长和死亡情况。

### 1.3 $LD_{50}$ 及其 95%可信限的计算

利用寇氏法(Karber 氏法)计算草丁膦对海带的  $LD_{50}$  及其 95%可信限(张毓琪等, 1993)。 $LD_{50}$ 的计算公式为: $\lg LD_{50} = X_m - i(\Sigma p - 0.5)$ , 式中,  $X_m$  为最大剂量的对数值,  $i$  为相邻剂量比值的对数,  $\Sigma p$  为各实验组死亡率的总和(以小数表示)。95%可信限的计算公式为:

$$\lg(LD_{50} \text{ 的 } 95\% \text{ 可信限}) = \lg LD_{50} \pm 1.96 S_{\lg LD_{50}}$$

式中

$$S_{\lg LD_{50}} = i \sqrt{\sum \frac{pq}{n}}$$

$p$  为一个组的死亡率,  $q$  为一个组的存活率,  $i$  为相邻量比值的对数,  $n$  为各组海带数。

### 1.4 不同长度孤雌生殖海带 $LD_{50}$ 差异的显著性检验

按两个一组分别检验相同处理时间、不同长度孤雌生殖海带  $LD_{50}$  的 95%可信限的重叠情况。若无重叠, 表明差异显著; 若有重叠, 仍可能有所差异。可用  $f_{i,j}$  及  $K_{i,j}$  二者值的大小比较检验差异是否显著, 按公式:

$$f_{i,j} = \text{antilog} \sqrt{(\lg f_i)^2 + (\lg f_j)^2}$$

式中,  $f_{i,j}$  为  $LD_{50}$  的 95%可信限因子(可信限两端分别为  $LD_{50} \times f$  及  $LD_{50}/f$ ),  $K_{i,j}$  为较大的  $LD_{50}$  值/较小的  $LD_{50}$  值。如  $K_{i,j} > f_{i,j}$ , 则两个  $LD_{50}$  有明显的差异。

## 2 结果

### 2.1 孤雌生殖海带在不同剂量草丁膦作用下的死亡现象

以草丁膦剂量、处理时间和孤雌生殖海带[全长为  $(5.00 \pm 0.06)$  mm]死亡率为坐标

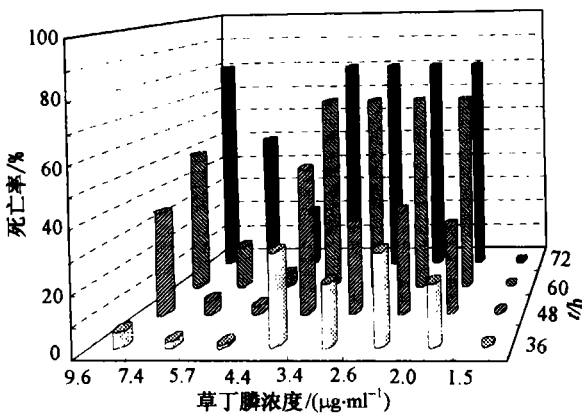


图1 孤雌生殖海带对不同浓度草丁膦毒性反应

Fig.1 The sensitivity of sporophytes of parthenogenetic *L. japonica* to different concentration of basta

轴作图, 结果见图1。结果表明, 剂量为  $2\mu\text{g}/\text{ml}$  以下的草丁膦对孤雌生殖海带无明显致死作用; 海带对于剂量为  $2-5\mu\text{g}/\text{ml}$  的草丁膦反应敏感: 首先藻体局部出现白斑, 随后白斑扩大, 80% 面积的藻体在 60h 内迅速变为浅绿色; 当草丁膦浓度超过  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 毒性反应变缓, 并且反应现象也有所变化: 海带由叶片尖部向柄部色素逐渐减少, 随后藻体变绿, 直至整体变为浅绿色; 随着草丁膦浓度的逐渐增加, 藻体的死亡速度逐渐加快, 当浓度接近  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 60h 内 80% 面积藻体死亡。

### 2.2 孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性的统计分析

选择 a、b、c 三组海带, 草丁膦剂量在  $0-21.2\mu\text{g}/\text{ml}$  范围, 计算  $LD_{50}$ , 结果见表1。统

计结果表明,不同长度的孤雌生殖海带,经相同的处理时间,对应的  $LD_{50}$  大部分重叠。分别计算相同处理时间三组孤雌生殖海带之间的  $f_{i,j}$  和  $K_{i,j}$ ,结果见表 2。由表 2 可知, $K_{i,j}$  均小于  $f_{i,j}$ ,说明草丁膦对不同长度的三组孤雌生殖海带的  $LD_{50}$  没有显著差异。

表 1 孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性实验结果

Tab. 1 The result of basta sensitivity of sporophytes of parthenogenetic *L. japonica*

时间(h)	组别	不同剂量草丁膦( $\mu\text{g/ml}$ )中海带的死亡率(%)							$LD_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	95%可信限 ( $\mu\text{g/ml}$ )
		0	5.7	7.4	9.6	12.5	16.3	21.2		
36	a	0	1	2	5	30	40	50	17.3	15.0—20.0
	b	0	3	5	10	40	40	50	16.4	14.1—19.1
	c	0	0	1	2	40	45	50	16.8	14.6—19.4
48	a	0	3	5	35	60	70	80	12.4	10.6—14.5
	b	0	5	10	10	65	65	80	13.0	11.2—15.1
	c	0	3	5	10	60	75	85	12.9	11.2—14.8
60	a	0	5	15	50	80	90	95	10.0	8.7—11.5
	b	0	15	30	35	80	95	95	9.6	8.3—11.1
	c	0	10	25	30	85	90	90	10.2	8.8—11.8
72	a	0	20	50	80	95	95	100	7.6	6.7—8.7
	b	0	15	80	80	90	100	100	7.1	6.3—8.0
	c	0	20	40	80	95	95	100	7.8	6.8—8.9

表 2 草丁膦对不同长度孤雌生殖海带的  $LD_{50}$  差异显著性检验结果

Tab. 2 The result of basta  $LD_{50}$  difference between different length sporophytes of parthenogenetic *L. japonica*

时间(h)	$f_a$	$f_b$	$f_c$	$f_{a,b}$	$K_{a,b}$	$f_{a,c}$	$K_{a,c}$	$f_{b,c}$	$K_{b,c}$
36	1.15	1.16	1.15	1.23	1.05	1.22	1.03	1.23	1.02
48	1.17	1.16	1.15	1.24	1.05	1.23	1.04	1.23	1.01
60	1.15	1.16	1.16	1.23	1.04	1.23	1.02	1.23	1.06
72	1.14	1.13	1.14	1.20	1.07	1.20	1.03	1.20	1.10

### 3 讨论与结语

除草剂草丁膦为一种谷胺酰氨合成酶(GS)的竞争性抑制剂,GS是调节氮代谢的一种关键酶,当GS被草丁膦竞争性抑制时,细胞中的  $\text{NH}_4^+$  积累,从而导致细胞死亡。*bar* 基因编码的乙酰辅酶 A 转移酶具有使草丁膦代谢失活的作用,此酶催化乙酰辅酶 A 与草丁膦的游离氨基结合,从而使草丁膦失活。*bar* 基因作为选择标记基因已被成功地应用于多种高等植物中。本文得出了草丁膦对全长为 0.5—1.6cm 孤雌生殖海带 36h、48h、60h、72h 处理时间的半致死剂量,发现草丁膦比已知的海带基因工程选择压力氯霉素和潮霉素(Qin *et al.*, 1999)都更为敏感,因而以草丁膦为选择压力有利于缩短转基因海带的筛选时间,优化筛选方法。本实验还得出孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性在全长为 0.5—1.6cm 范围内与海带长度不相关,这便于孤雌生殖海带的筛选。综上所述,除草剂草丁膦可被作为海带基因工程的更为理想选择压力,*bar* 基因可能成为更为有效的选择标记基因。

本实验还发现孤雌生殖海带对剂量在 2—5 $\mu\text{g/ml}$  之间的草丁膦比高浓度下更为敏

感,这可能与海带对草丁腈的吸收方式以及草丁腈与 GS 同工酶结合的速度有关,其机理还有待进一步研究,但这一现象的发现,提示转基因海带可在低剂量下被迅速筛选出来,从而尽量减少海带损伤。

### 参 考 文 献

- 方宗熙,戴继勋,崔竞进等,1978. 海带单倍体遗传育种的实验. 中国科学,2:226—311
- 李新萍,秦 松,曾呈奎等,1999. 孤雌生殖海带对氯霉素和潮霉素的敏感性研究. 海洋与湖沼,30(2):186—190
- 张毓琪,陈叙龙,1993. 环境生物毒理学. 天津:天津大学出版社,257—258
- 武建秋,王希华,秦 松等,1995. 海带基因工程选择标记的研究. 海洋科学,5:42—45
- David R Stevens, Saul Purton, 1997. Genetic Engineering of Eukaryotic Algae: Progress and Prospect. J Phycol, 33:713—722
- Old R W, Primrose S B, 1994. Principles of Gene Manipulation, 5th ed. Blackwell, Oxford, 474
- Qin S, Wu J, Wang X *et al*, 1998. Expression of Foreign Genes in *Laminaria japonica*. In: Morton B ed. The Marine Biology of the South China Sea. Hong Kong: Hong Kong University Press, 209—221

## SENSITIVITY OF PARTHENOGENETIC SPOROPHYTES OF *LAMINARIA JAPONICA* PHAEOPHYTA TO BASTA

WU Yun, ZOU Li-Hong, JIANG Peng,  
SUN Guo-Qiong, QIN Song, ZENG Cheng-Kui

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** In the experiment, young sporophytes of parthenogenetic *Laminaria japonica* were divided into three groups according to their total lengths: a. ( $5.00 \pm 0.06$ )mm, b. ( $9.50 \pm 0.10$ )mm and c. ( $16.10 \pm 0.13$ )mm, and were treated with 13 concentrations of basta solution in each group respectively. Basta dose are 0—21.2 $\mu$ g/ml.  $LD_{50}$  at 36, 48, 60 and 72 hours were calculated. Results showed that  $LD_{50}$  of sporophytes of parthenogenetic *L. japonica* (0.5—1.6)cm to basta is not correlated with its length. The sporophytes of parthenogenetic *L. japonica* are more sensitive to basta than to chloramphenicol and hygromycin that have been used as selection pressure in genetic engineering of *L. japonica*. Our observation suggests that bar gene which encodes phosphinothricin-N-acetyltransferase can be a more efficient selectable marker gene.

**Key words** *Laminaria japonica*, Basta, Selectable marker