

条斑紫菜单孢子的研究*

梅俊学 费修绶[†] 王斌[‡]

(山东大学威海分校海洋生物工程系 威海 264200)

[†](中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[‡](中国科学院遗传研究所 北京 100101)

提要 研究了条斑紫菜不同栽培品系间在单孢子形成方面的差异,并采用 RAPD 方法研究了它们之间的遗传距离,还研究了温度、藻体不同发育时期、干出对单孢子形成的影响。结果表明,产生单孢子多的品系与单孢子少的品系间遗传距离较远,单孢子多的品系间、单孢子少的品系间遗传距离都较近;室内培养环境能够形成单孢子的最低水温高于自然海区;大于几十个细胞的藻体在合适的温度下可以持续形成单孢子,一直到藻体成熟;在成熟的藻体上仍有单孢子放散,但大量的果胞也可以以与单孢子相同的方式放散并萌成成苗。干出对单孢子的产生没有明显的影响。

关键词 条斑紫菜,单孢子,栽培品系,干出, RAPD

中图分类号 Q945

条斑紫菜是重要的栽培海藻,国内对其在各个不同方面的研究已有许多报道(郑宝福等, 1980; 程凌江等, 1990) 其无性繁殖方式——单孢子的产生对增加个体数量、延长栽培收获期和提高产量具有重要意义。早在 60 年代,王素娟(1964)曾利用条斑紫菜的这一特性在自然苗网上进行过“母子网”附苗试验;最近几年中国科学院海洋研究所也在单孢子直接成苗技术上有新的进展,并形成了专利,成为很有前途的一项育苗技术。尽管人们对条斑紫菜单孢子及其幼苗的生态特性和单孢子的亚显微结构有过许多研究报道(王素娟, 1964; 右田清治, 1972; 李世英等, 1980, 1989; 陈美琴等, 1985; 中国科学院海洋研究所藻类实验生态组、藻类分类形态组, 1978; Kito, 1978; 汤晓荣等, 1999), 但到目前为止,对于条斑紫菜产生单孢子的基础研究还不多,在一定程度上限制了这项技术的深入研究和应用,有些关键问题仍未得出明确结论。例如,在单孢子形成的性状上不同的栽培品系间遗传距离有多大;叶状体的各个发育时期是否都能形成单孢子;干出这一重要的生态因子是否能够促进单孢子的形成和放散;为什么对于单孢子形成和放散的温度下限问题,中国科学院海洋研究所和上海水产学院会得出不同的结果(曾呈奎等, 1985) 等等。本文报道条斑紫菜单孢子的研究结果,以期为解决以上问题提供资料。

* 国家自然科学基金农业倾斜项目资助, 39770593 号; 国家海洋 863 资助项目, 819-03-06 号。梅俊学, 女, 出生于 1963 年 6 月, 博士, E-mail: jxmei@wh-public.sd.cninfo.net

收稿日期: 2000-01-20, 收修改稿日期: 2000-07-14

1 材料与方法

1.1 材料

4 个品系的条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 丝状体, 由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室种质种苗组保存, 是在生产中广泛应用的、经济性状优良的栽培品系。1999 年 5 月份接种到文蛤壳上, 按一般的育苗生产规程管理, 9 月底壳孢子开始放散, 用维尼纶绳采孢子, 在 23—17℃ 的室温、50—60 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照强度、12L: 12D 的光周期下通气培养, 使其萌发并生长出幼苗。培养液为 F-1, 即海水中加 1mmol/L NaNO_3 , 0.1mmol/L NaH_2PO_4 , 2mmol/L $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1mmol/L Tris, 0.01m MH_3BO_3 , 0.25g VB₁, 0.5mgVB₁₂, 2mgGeO₂, pH= 8.2。

1.2 方法

以下除温度外, 均同“1.1”的培养条件。

1.2.1 4 个不同栽培品系在单孢子放散性状上的差异

将 4 个品系的 0.5—1.0mm 幼苗在 14—15℃ 培养, 其他条件同上, 10 天后数出各个品系中正在放散单孢子个体的数量。

1.2.2 4 个不同栽培品系的 RAPD 研究

1.2.2.1 基因组 DNA 的提取

丝状体用蒸馏水冲洗并吸干水分, 在研钵内加液氮研成粉末状, 立即置于 65℃ 预热的提取液 I (100mmol/L Tris-HCl, pH= 8.0, 50mmol/L EDTA, 500mmol/L NaCl, 1.5% SDS W/V) 中 20min。加提取液 III (60ml 5mol/L KAc, 11.5ml 冰醋酸, 28.5ml 蒸馏水) 冰浴 10min。再加等体积氯仿, 摇匀, 在 4℃ 下以 10000r/min 的速度离心 12min。取上层水相加等体积 -20℃ 异丙醇, 在 4℃ 下沉淀 1—2h, 弃去上清液, 吸干残余液滴, 加 70% 乙醇洗涤并吹干。沉淀后用 T.E 再溶解, 取 1 μl 电泳, 检验纯度。加 RNaseA 于 55℃ 消化 1h, 加等体积氯仿去除蛋白。取 1 μl 电泳、定量, 其余置 -20℃ 保存。

1.2.2.2 随机引物

实验共筛选 200 个随机引物, 即 OPF-01—20、OPG-01—20、OPI-01—20、OPJ-01—20、OPK-01—20、OPL-01—20、OPM-01—20、OPN-01—20、OPO-01—20、OPP-01—20、OPQ-01—20, 均购自 Operon 公司。

1.2.2.3 PCR 反应

RAPD 反应条件与 Williams 等 (1990) 基本相似。基因组 DNA 在 PCR 扩增仪上经 94℃ 预变性 4min 后进行 42 个扩增循环, 每一循环包括 94℃ 45s、37℃ 1min、72℃ 1.5min, 最后在 72℃ 延伸 5min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, E.B 染色, 紫外灯下观察, 拍照。

1.2.2.4 遗传距离 (D)

根据照片上条带的有无计算, $D = \sim \ln F$, 其中相似性 $F = 2X_{12}/(X_1 + X_2)$, X_{12} 是 2 个样品共有的条带数, X_1 和 X_2 分别代表 2 个样品各自具有的条带数, $F = 1.0$ 表明两个样品完全一致 (Yu *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1995)。用 STATISTICA 软件对多态性 DNA 片段进行处理得出聚类图。

1.2.3 不同温度下单孢子的形成和放散

将品系 4 的几十个细胞大小 (0.5—1.0mm) 的幼苗连同它们附着的苗绳放入不同的温度 (8℃、12℃、17℃、22℃) 下, 其他条件同上。每 5 天检查单孢子的放散情况。将在 12℃ 培养 15 天仍不形成单孢子的藻体移到 17℃, 另将在 17℃ 中正在放散单孢子的藻体

移到 12℃, 5 天后观察。同时在 10 月 2 月将附着品系 4 壳孢子的维尼纶绳缠在自然海区潮间带的礁石上, 观察不同时期单孢子的放散情况。

1.2.4 叶状体不同的发育时期对单孢子形成的影响

不同发育时期的叶状体(0.5—1.0mm, 0.5—1.0cm, 1.5—10.0cm)一直在 17℃培养。

1.2.5 干出对单孢子形成和放散的影响

将附着 0.5—1mm 品系 4 幼苗的苗绳(长为 12cm)放在 17℃水温下, 每天干出[即将苗绳取出置于 13—15℃的空气中, 光照强度 80—130 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]1h 和 3h, 7 天后将它与一空白苗绳绑在一起仍在原来的条件下培养, 再过 7 天后检查原苗绳正在放散单孢子的个体数和原空白苗绳上单孢子苗的数量。对照组(不干出)为一直未干出的苗绳。

2 结果

2.1 4 个品系间放散单孢子的差异

品系 1、品系 2、品系 3 和品系 4 放散单孢子个体占总数的百分率分别为 1%、51%、6%和 12%。由此可见不同的栽培品系间单孢子放散的差别较大, 品系 1 和品系 3 中能放散的个体比例较少, 而 2 和 4 较高。作者在多年的栽培生产实际中也观察到这种差别, 并注意到它可以稳定地遗传。

2.2 4 个栽培品系间的遗传距离

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M



图 1 条斑紫菜 4 个栽培品系丝状体的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of genomic DNA from

4 different cultivars of *Porphyra yezoensis*

M:ADNA/Hind III; 1—4 为引物 OPJ-6, 2—8 为 OPJ-19, 9—12 为 OPN-15, 13—16 为 OPK-1 的扩增结果。1、5、9、13 为品系 P.y1; 2、6、10、14 为 P.y2; 3、7、11、15 为 P.y3; 4、8、12、16 为 P.y4

2.2.1 4 个品系丝状体的 RAPD 扩增结果 在 200 个不同的随机引物中, 共筛选出 28 个可在 4 个样品中均扩增出清晰 DNA 片段。在 4 个栽培品系中共得到 215 条可统计的 DNA 扩增片段。图 1 示 4 个引物 OPJ-6、OPJ-19、OPN-15、OPK-1 的扩增结果。

2.2.2 遗传距离和聚类分析 为确定条斑紫菜 4 个不同栽培品系之间的遗传差异, 计算了它们之间的遗传距离和相似性, 见表 1。

如表 1 所示, 品系 1 和 2 产生单孢子的能力分别为最弱和最强, 它们之间的遗传距离最远; 相对于品系 2 和 4, 品系 3 的产单孢子能力较弱, 品系 1 和 3 之间的遗传距离较近。

表 1 4 个条斑紫菜栽培品系间的遗传距离

Tab. 1 Genetic distances of 4 cultivars of *Porphyra yezoensis*

品系	P.y1*	P.y2	P.y3	P.y4
P.y1				
P.y2	1.19			
P.y3	0.69	0.86		
P.y4	1.02	0.78	0.80	

* py1—py4 指品系 1—品系 4

2.3 不同温度下单孢子的形成

结果见表 2。22℃形成单孢子最早,放散单孢子的个体数也最多。但是如果在这—水温下继续培养,藻体会很快变绿,腐烂。所以 17℃是较适合的温度。12℃下少数个体有单孢子放散,但需要的时间较长。8℃的低温下培养 35 天仍未见单孢子形成。另外,12℃培养 15 天仍未形成单孢子的藻体移到 17℃中培养 5 天后,有 67% 的个体形成了单孢子;而把 17℃中正在放散单孢子的藻体移到 12℃中培养 5 天后,仅有 13% 的个体仍在放散单孢子。在自然海区中,当水温下降到 7—8℃时,仍可见到藻体上有单孢子在放散。

表 2 不同温度下条斑紫菜幼苗放散单孢子所需要的时间和放散单孢子个体的百分率

Tab. 2 Time needed for monospore production and the percentage of monospore producing thalli of *Porphyra yezoensis* in different temperature

温度(℃)	8	12	17	22
时间(d)	35	30	5	5
百分率(%)	0	10	42	61

2.4 叶状体不同的发育时期对单孢子形成的影响

一直在 17℃培养的藻体,自几十个细胞起就有单孢子开始形成和放散,一直持续到藻体成熟并且有果孢子形成时,藻体上仍有单孢子在放散。但这时单孢子形成的区域缩小,大大小于形成果孢子的区域。一般是果孢子在端部形成,单孢子在侧部边缘形成。值得注意的是,许多圆形的、未经分裂形成果孢子的果胞也能脱离母体,然后象单孢子那样萌发成小紫菜苗。

2.5 干出对单孢子形成的影响

每天干出 1h、3h 和 不干出处理 7 天后,形成单孢子藻体的百分率分别为 29%、36%、38%;放散单孢子苗的数量分别为 2398、1277、1765 个。由此可以看出,干出对单孢子的形成产生的影响并不明显,而且实验中还观察到经过干出后的藻体上较容易出现死细胞组成的斑点。

3 讨论

3.1 以上的实验结果表明,条斑紫菜产生单孢子这一性状在不同的栽培品系间差异明显,是受遗传因素制约的。细胞内具有形成单孢子的基因是藻体产生单孢子的生物学基础。

3.2 水温强烈地影响着单孢子的形成。产生单孢子最适合的水温是 17℃,这与以前的研究结果一致(曾呈奎等,1985)。22℃时虽然促使大量单孢子在短时期内放散出来,但母体上有很多细胞死亡,而且放散出的单孢子也不能正常萌发成苗。12℃只有极少量的个体和极少量的单孢子放散出来。藻体在经历了 12℃这样的不利单孢子形成的低水温后,再恢复到 17℃的正常水温下仍能形成正常的单孢子。在室内实验中,水温为 8℃时藻体边缘整齐,没有单孢子形成和放出,也未见果胞、果孢子和精子囊。但在自然海区中当海水温度下降到 7—8℃时,苗绳上仍可见到正在放散单孢子的藻体,也发现有些果胞象单孢子一样在母体的边缘萌发成苗。相同水温下在室内和室外得到的结果不同,说明除温度外,室内容器中加营养盐通气的培养环境与海区中自然流动的海水之间有明显差异,而且这种差异影响了单孢子和果胞等的形成。这也可以解释为什么上海水产学院与中国科

学院海洋研究所分别观察到的单孢子形成的温度下限有所不同,前者为 8—9℃,是在舟山的自然海区中得到的;而后者为 12.5℃,是在室内的培养条件下得到的(曾呈奎等,1985)。本实验用同一来源的藻体进一步验证了他们的不同结果。

3.3 藻体从几十个细胞大到产生有性生殖细胞,只要温度等条件合适,都能形成单孢子,叶状体的发育时期(指大于几十个细胞的藻体)并不是决定单孢子形成与否的重要因子。但在果胞和果孢子出现后,因为放散果胞的区域往往比放散单孢子的区域大得多,而且果胞也能萌发成苗,所以推测这时在网帘上得到的小苗有很大一部分是由果胞萌发成的。

3.4 虽然有报道说,反复的干燥—浸水处理能迫使部分细胞脱离母体(曾呈奎等,1954),但本实验证明,每天一次的模仿自然潮汐的干出处理并没有明显促进单孢子的形成。有些紫菜养殖技术员发现经过干出的苗帘上得到的单孢子苗多,这可能是由于干出去除了苗帘上的杂藻,使单孢子有较多的区域附着和生长。

3.5 在条斑紫菜的栽培中,一般是幼苗期生长慢,而大藻体生长快,单孢子的形成和放散是造成这种现象的原因之一。藻体处于幼苗期时,因为水温较高,适合单孢子的形成和放散,大量的边缘细胞脱离母体,肯定造成藻体生长缓慢。随着自然海水水温的不断降低,逐渐不利于单孢子的产生,当然生长就可加快。

3.6 条斑紫菜栽培实践中,最好将产单孢子多的和少的品系混合起来采苗。在栽培前期单孢子少的种类快速生长,可以早收割;而产单孢子多的品系可利用这一时期产生大量的单孢子苗,从而延长整个网帘的栽培期和收割次数。

参 考 文 献

- 王素娟,1964. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)自然附苗养殖的初步研究. 水产学报,1(1/2):85—94
- 中国科学院海洋研究所藻类实验生态组、藻类分类形态组,1978. 条斑紫菜的人工养殖. 北京:科学出版社,2
- 汤晓荣,费修缙,1999. 半叶紫菜华北变种的丝状体成苗研究. 海洋与湖沼,30(2):180—185
- 李世英,1989. 条斑紫菜单孢子及其幼苗的生态特性与应用研究. 海洋科学集刊,30:81—92
- 李世英,崔广发,1980. 条斑紫菜单孢子和壳孢子的幼苗生长发育的初步观察. 海洋与湖沼,11(4):370—374
- 陈美琴,郑宝福,任国忠,1985. 温度对条斑紫菜单孢子壳孢子和单孢子附着的影响. 海洋湖沼通报,3(3):66—69
- 郑宝福,陈美琴,费修缙,1980. 培养光强对条斑紫菜丝状体生长发育的影响. 海洋与湖沼,11(4):362—369
- 曾呈奎,张德瑞,1954. 紫菜的研究I. 甘紫菜的生活史. 植物学报,3(3):287—302
- 曾呈奎,王素娟,刘思俭等,1985. 海藻栽培学. 上海:上海科学技术出版社,156
- 程凌江,蒋丽金,马金石,1990. 条斑紫菜中R藻红蛋白的纯化及其 α 和 β 亚基的分离与发色团含量的测定. 海洋与湖沼,21(4):337—342
- 右田清治,1972,ト 壳孢子と单孢子の着生. 长崎大学水产学部研究报告,33:39—48
- Ho C L, Phang S M, Pang T, 1995. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. J Appl Phycol, 7(1):37—41
- Kito H, 1978. Cytological studies on genus *Porphyra*. Bull Tohoku Reg Fish Res Lab, 39:29—84
- Williams J G K, Kubelk A R, Livak K J *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 18:6531—6535
- Yu K F, Peter Pauls K, 1994. Optimization of DNA—extraction and PCR procedures for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in plants. In: Hugh G Griffin, Annette M Griffin ed. PCR Technology, Current Innovations. Florida: CRC Press, 193—200

STUDY ON MONOSPORE PRODUCTION OF *PORPHYRA YEZOENSIS*

MEI Jun-Xue, FEI Xi-Geng¹, WANG Bin²

(Marine Biotechnology Department of Shandong University Weihai Branch, Weihai, 264200)

¹ (Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

² (Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

Abstract The paper studied the difference in monospore production in 4 cultivated strains of *Porphyra yezoensis* and their genetic distance with RAPDs analysis. The results showed that the genetic distance between the strain that can produce few monospores and the strain that can produce a mass of monospores farther than both the distance between few-monospore strains and the distance between mass-monospore strains. The effects of temperature, the developmental phases of the thalli and out-drying on monospores production were also studied. The lowest temperature for monospore formation in laboratory was different from that in the sea (they are 12°C and 7—8°C, respectively). After the initiation of forming monospores when they were about 0.2mm long, the leafy thalli produced monospores all through their life in suitable temperature (17°C). Carpogonia on the edge of the mature leafy thallus could be discharged and geminate in the same way as monospores did. Out-drying did not appear to have notable effect on monospore production.

Key words *Porphyra yezoensis*, Monospores, Cultivated strains, Out-drying, RAPD