

盐度对条斑紫菜体细胞生长发育的影响 及耐低盐度变异体的初步观察

严兴洪

江海波

(上海水产大学水产养殖系, 200090) (江苏省如皋市渔业捕捞公司, 226537)

提 要 盐度对条斑紫菜体细胞的生长发育有明显的影晌。盐度在 19.6—32.8‰ 之间, 体细胞生长发育正常; 但超过 32.8 或低于 19.6‰, 体细胞成活率均下降, 发育速度明显减慢。适当剂量的紫外线能促进体细胞苗生长, 且可提高体细胞后代对高盐度和低盐度的忍耐力, 同时获得少量能在低盐度下生长的变异体。刚酶解出的体细胞在高盐度下培养 1 天, 然后逐渐降低盐度, 可获得较高的成活率。

关键词 条斑紫菜, 体细胞, 紫外线, 盐度, 变异体

近几年来, 由于海藻生物技术的发展, 把海藻的原生质体和体细胞克隆成新植株已成为可能^[2,3,6,7]。利用筛选紫菜细胞突变体来选育优良品种已成为一条新的育种途径。Yan X. H. 和 Wang S. J. (1990) 对坛紫菜、条斑紫菜体细胞和原生质体进行诱变处理获得细长型和多种色彩变异体。戴继勋等(1990)对条斑紫菜原生质体进行诱变处理, 获得不同叶型的后代。本文利用紫外线对条斑紫菜体细胞进行诱变辐射, 再经不同盐度加压筛选。旨在筛选出能适应低盐度的突变体, 同时进一步探讨盐度对体细胞生长发育的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料来源及处理

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)叶状体采自江苏启东紫菜养殖架上。种藻采集阴干后, 用塑料袋包扎好, 冷藏于-20℃的冰箱中备用。试验前种藻处理方法同文献[2]。

1.2 酶、培养基、体细胞分离

方法同文献[2]。

1.3 试验方法

1.3.1 高盐度培养时间长短对体细胞成活、生长和发育的影响

酶解单离的体细胞被各别培养在高盐度(45.8‰)的培养液中 0, 1, 2, 3 和 7 天。再移入正常盐度(32.8‰)的培养液内。另一组在高盐度培养液中培养 1 天后, 逐渐降低盐度至正常。培养条件: 温度 20±1℃, 光强 2300—2400 lx, 光周期 12:12 LD。

1.3.2 紫外线辐射与体细胞后代抗低盐和高盐的试验

按体细胞是否经紫外线照射分成两大组。A组: 体细胞培养至第4天被紫外线照射, 紫外光源用30W、220V的紫外灯, 照距5cm, 照射时间1min。照射前吸干培养液, 照射后, 马上加入培养液, 暗培养24h后恢复正常光照培养。48h后, 再加入不同盐度的培养液培养。B组: 体细胞未经照射, 分组与A组相同。A、B两大组盐度分组见表1。培养条件同上。不同盐度的培养液用加盐卤和蒸馏水调配。先用精密海水密度计(规格1.000—1.036), 刻度0.001, 测量其比重, 再换算成盐度。

表1 紫外线辐射和体细胞对不同盐度的抗性试验

Table 1 Resistant experiment of UV-irradiation and different salinity on the isolated somatic cells

经 UV 辐射		未经 UV 辐射	
组别	盐度(%)	组别	盐度(%)
A1	45.8	B1	45.8
A2	39.3	B2	39.3
A3	32.8	B3	32.8
A4	26.2	B4	26.2
A5	19.6	B5	19.6
A6	13.1	B6	13.1
A7	10.5	B7	10.5
A8	6.5	B8	6.5

2 结果与分析

2.1 高盐度对体细胞存活, 生长和发育的影响

2.1.1 成活率

体细胞在高盐度下培养不同天数, 其成活率有很大的差异(图1)。培养12天, 又经高盐培养一天后, 随后逐渐降低盐度至正常盐度下培养的成活率最高, 其次是高盐培养2天组。而经高盐培养3天以上和未经高盐培养的几组成活率都大幅度下降。刚酶离出的体细胞对高盐的忍耐力有一定的时间限制。在3天内, 高盐培养时间越长, 成活率越高; 但3天后, 长时间高盐度培养组的成活率迅速下降。培养9天, 高盐度下培养7天组, 成活率由56.5%降至15.4%。由高盐度转入正常盐度培养, 一般经过3天, 成活率才稳定。

2.1.2 体细胞的生长和发育

高盐度下培养时间长短, 对细胞分裂有较大的影响。培养6天和12天的体细胞个体发育情况见表2。随着高盐培养天数的增加, 细胞分裂速度减慢; 未经高盐培养的细胞分裂明显快于其它各组。经高盐培养7天的个体发育与其它各组有明显差异。12天后, 该组的

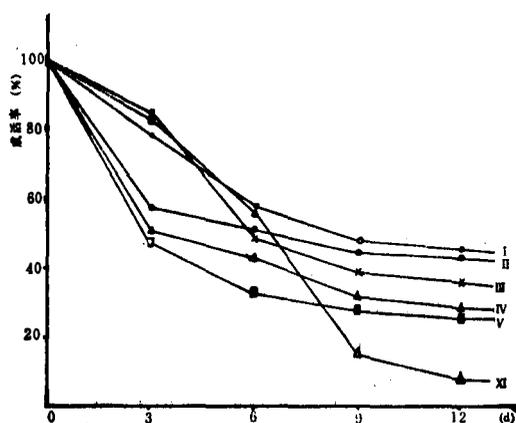


图1 高盐度培养时间长短对体细胞成活率的影响
Fig.1 The treating time of higher salinity and the survival rate of somatic cells

多列细胞苗比例只有未经高盐培养组的 28.5%。可见高盐培养抑制了细胞发育。

表 2 高盐培养时间对体细胞分裂的影响

Table 2 The effects of treating time of higher salinity on the cell division of somatic cells

培养时间 (天)	高盐培养时间 (天)	发 育 情 况 (%)			
		单细胞	多细胞	单列细胞小苗	多列细胞小苗
培 养 0 天	0	24.8	75.1	0.6	0.0
	1	30.4	69.4	0.2	0.0
	2	40.6	59.2	0.2	0.0
	3	42.4	58.6	0.0	0.0
	7	51.9	48.1	0.0	0.0
培 养 12 天	0	0.8	7.5	20.7	62.0
	1	2.4	9.0	38.0	58.6
	2	2.9	8.8	44.6	43.7
	3	5.1	12.2	44.6	38.1
	7	12.5	28.2	41.6	17.1

经高盐培养后,体细胞苗生长情况见图 2。不同天数的高盐培养,对 10 天后苗的生长影响

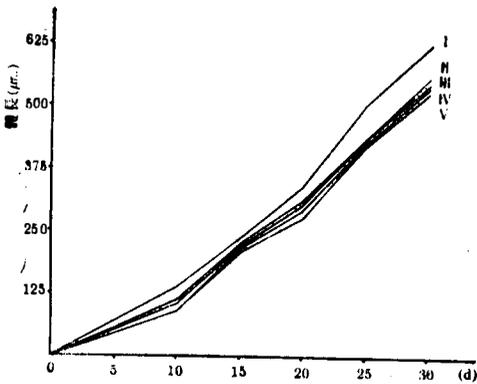


图 2 高盐度处理时间长短对体细胞苗生长的影响

Fig.2 The effect of treating time of higher salinity on the growth of buds regenerated from the somatic cells

不明显。方差分析^[1]表明,各组苗的生长差异不显著。可见体细胞经一段时间的高盐培养后转入正常盐度培养,苗的生长马上恢复。

2.2 紫外线辐射和不同盐度处理对体细胞后代生长发育的影响

2.2.1 对体细胞成活率的影响

紫外线照射后的第 3 和第 10 天检查成活率,结果如图 3 和图 4 所示。

由图 3 可见:未经照射组中,盐度在 26.2—45.8‰ 各组的成活率相差不大,但盐度低于 19.6‰,成活率就显著降低。相反在

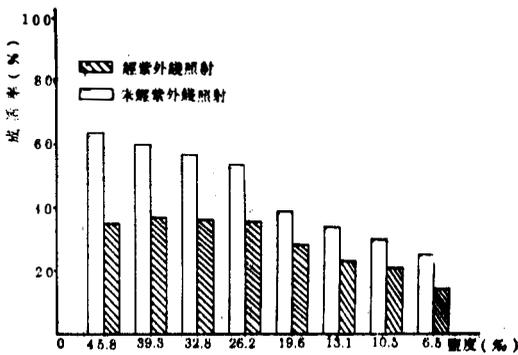


图 3 经紫外线辐射和不同盐度处理的体细胞第 3 天成活率

Fig.3 The survival rate of somatic cells irradiated by UV and cultured at different salinity at third days in culture

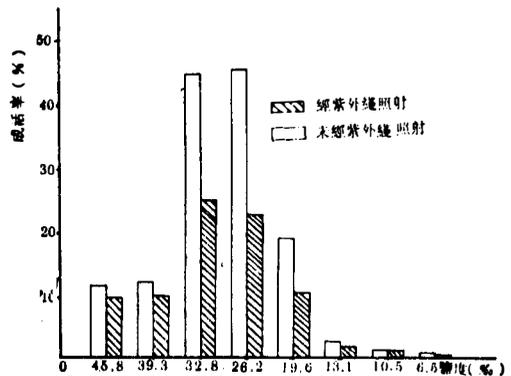


图 4 经紫外线辐射和不同盐度处理的体细胞第 10 天成活率

Fig.4 The survival rate of somatic cells irradiated by UV and cultured at different salinity at tenth days in culture

照射组中, 各组的成活率均较接近, 差异不如未经照射各组明显。经紫外线照射后在刚开始的三天内, 紫外线的杀伤力是成活率下降的主要因素。随着培养天数增加, 盐度的作用逐渐明显(图 4)。第 10 天, 在 26.2 和 32.8‰ 两组中成活率明显比其余盐度组高。另外, 在这两个盐度组中, 照射组和未照射组的成活率相差很明显。在 45.8、39.3、13.1、10.5 和 6.5‰ 五组中, 照射组与未照射组成活率相当接近。另外, 从两次统计得出的成活率, 由公式^[1]:

$$\log(1-x) = \frac{1}{n}(\log \alpha_2 - \log \alpha_1)$$

x 成活率的下降率; α_1 第一次统计成活率; α_2 第二次统计成活率; n 天数。

得出各组相应的成活率的下降率如图 5 所示。在 45.8、39.3、13.1、10.5 和 6.5‰ 各组中未照射组成活率的下降率比照射组相应组大; 相反, 在 32.8、26.2 和 19.6‰ 三组中未照射组的下降率比照射组低。可见, 紫外线照射后的体细胞耐高盐和低盐能力有所增强。在盐度低于 19.6‰ 各组中, 不论是否经过紫外线照射, 成活率的下降率都随盐度的降低而增大。盐度高于 39.3‰ 随着盐度的升高成活率的下降率增大。条斑紫菜体细胞存活的适宜盐度为 19.6—32.8‰, 以 26.2‰ 最适宜。

2.2.2 对体细胞后代生长发育的影响

培养 7 天和 14 天, 在不同盐度下培养及经紫外线照射后再在不同盐度下培养的体细胞发育情况分别列表 3 和表 4。培养 7 天

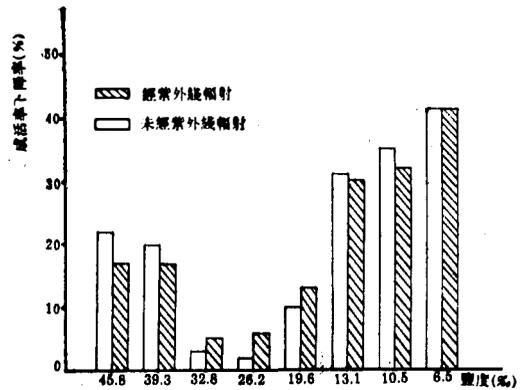


图 5 各试验组成活率的下降率

Fig.5 The decreasing rate of survival somatic calls of test groups

表 3 紫外线辐射和不同盐度下培养 7 天体细胞的个体发育
Table 3 The development of somatic cells UV-irradiated and cultured at different salinity in 7 days of culture

处理方法	组别	盐度 (%)	细 胞 个 体 发 育 (%)				
			单细胞	两细胞团	多细胞团	单列细胞小苗	多列细胞小苗
经紫外线辐射	A1	45.8	9.0	68.2	22.8	0.0	0.0
	A2	39.3	8.6	67.1	24.3	0.0	0.0
	A3	32.8	5.8	65.3	28.8	0.1	0.0
	A4	26.2	4.7	68.0	27.1	0.2	0.0
	A5	19.6	5.4	72.4	22.2	0.0	0.0
	A6	13.1	5.3	69.5	25.2	0.0	0.0
	A7	10.5	5.5	72.3	22.2	0.0	0.0
	A8	6.5	5.2	72.9	21.9	0.0	0.0
未经紫外线辐射	B1	45.8	14.5	56.3	29.2	0.02	0.0
	B2	39.3	12.0	58.7	29.3	0.02	0.0
	B3	32.8	6.8	47.0	45.1	1.1	0.0
	B4	26.2	9.1	46.5	43.0	1.4	0.0
	B5	19.6	15.6	26.6	58.1	0.0	0.0
	B6	13.1	5.0	66.4	28.6	0.0	0.0
	B7	10.5	5.0	65.4	29.6	0.0	0.0
	B8	6.5	4.7	64.2	31.1	0.0	0.0

表4 紫外线辐射和不同盐度下培养14天体细胞的个体发育
Table 4 The development of somatic cells UV-irradiated and cultured
at different salinity after 14 days in culture

处理方法	组别 (%)	盐度 (%)	细胞个体发育 (%)				
			单细胞	两细胞团	多细胞团	单列细胞小苗	多列细胞小苗
经紫外线辐射	A1	45.8	11.3	56.2	30.7	1.7	0.0
	A2	39.2	7.6	23.8	45.1	10.0	2.6
	A3	32.8	4.3	8.4	25.6	44.3	17.5
	A4	26.2	3.8	6.0	23.9	38.7	26.6
	A5	19.6	4.5	12.4	23.6	48.5	12.0
	A6	13.1	10.7	82.3	38.8	16.5	1.7
	A7	10.5	8.7	32.6	46.7	12.0	0.0
	A8	6.5	2.9	32.4	64.7	0.0	0.0
未经紫外线辐射	B1	45.8	16.8	51.8	29.5	1.9	0.0
	B2	39.2	13.2	20.5	39.6	24.4	2.3
	B3	32.8	4.0	7.2	15.8	39.0	34.0
	B4	26.2	2.3	5.5	13.0	37.2	42.0
	B5	19.6	5.2	9.3	24.2	47.6	23.7
	B6	13.1	13.2	14.3	30.2	39.0	3.3
	B7	10.5	9.0	23.6	40.4	27.0	0.0
	B8	6.5	5.4	27.0	67.6	0.0	0.0

后(表3),未分裂的单细胞百分率在26.2和32.8%两组中低于其余各组;而在高盐度39.3和45.8%两组中则偏高。26.2和32.8%两组的细胞团的百分率是其余各组的2倍。照射各组的细胞团百分率比相应的盐度组低。培养至14天(表4),32.8和26.2%两组小苗比例明显增高,未照射的32.8和26.2%两组中小苗百分率分别达73%和79.3%,而45.8%组仅为1.9%;盐度低于13.1%,小苗百分率的增长明显低于19.6—32.8%间各组。相反,盐度在19.6—32.8%间在第14天,照射组的细胞团百分率均高于未照射的各对应组,紫外线辐射对细胞的分裂有一定的促进作用。当盐度高于32.8%或低于13.1%,该作用不明显。

紫外线和盐度对体细胞苗生长有较大的影响,见图6和图7。从图6可见,未照射各组中,19.6—32.8%三组的苗生长均比其余组快,这与上述的体细胞发育情况相一致。从苗生长曲线的趋势看出,刚开始时各组的曲线较平缓,差异不太明显。随着时间的延长,尤其在20天后,19.6—32.8%三组生长曲线的坡度明显大于其余各组,差距更加明显。方差分析表明,各组生长存在着显著性差异。同时利用Q表^[1]检验盐度在19.3—32.8%三组间生长差异不显著,但它们与其余组的差异达到显著水平。19.6—32.8%是体细胞苗生长的适宜盐度,过高或过低的盐度均对生长有一定的抑制作用。报道的条斑紫菜孢子苗生长情况相一致^[4]。

在照射组中,也有类似情况(图7)。盐度在19.6—32.8%三组的生长比其余各组快。用方差分析检验苗生长差异,结果表明各组间的差异极显著。将照射和未照射组各相应组的苗生长作比较,刚开始时照射各组均落后于未照射各组;但20天后,各照射组生长逐步超过相应的未照射组。可见紫外线对体细胞苗的生长具有一定的促进作用。

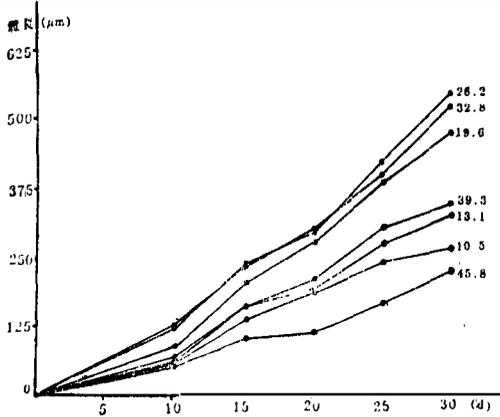


图6 体细胞苗在不同盐度下的生长

Fig.6 The growth of buds cultured at different salinity

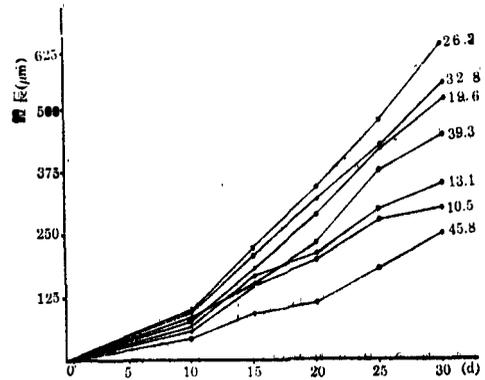


图7 紫外线辐射后体细胞苗在不同盐度下的生长

Fig.7 The growth of buds UV-irradiated and cultured at different salinity

3 讨论

刚酶离的条斑紫菜体细胞和原生质体经适当时间的高盐培养可以明显提高成活率, 其中以高盐培养 1 天后, 再逐渐降低盐度至正常盐度 (26.2%) 下培养成活率最高。体细胞后代生长发育的适宜盐度为 19.6—32.8%, 最适为 26.2%。体细胞在高盐度下培养, 色素体收缩, 其颜色加深, 细胞壁变厚, 且长出的苗颜色也比正常盐度下偏深。相反, 在低盐度下, 第 3 天起细胞的死亡现象明显增加, 因吸水膨胀, 细胞内色素体以外的空隙明显增大, 几天后, 色素体呈不正常的粉红色, 并逐渐变成浅黄绿紫色, 最终色素体解体, 细胞死亡。即使是已发育成 4 个细胞以上的小苗, 在低盐度中仍为死亡。一般是小苗顶部的细胞先吸水膨大死亡。以后其它细胞陆续死去, 最终整个小苗解体。条斑紫菜体细胞苗存活要求较高的盐度。

经紫外线照射后, 体细胞在正常盐度中 (26.2—32.8%) 成活率明显低于未照射组。但是, 高于 32.8% 或低于 19.6% 盐度下, 照射组体细胞成活率的下降率比未照射组小, 说明紫外线辐射提高了体细胞对高盐和低盐的忍耐力。另外, 经紫外线辐射后, 在低于 13.1% 盐度组中, 发现少量颜色正常, 正常生长的变异苗。把这些变异体培养大, 从中再筛选能耐更低盐度的变异体还在进行。用多次诱变, 逐级筛选耐低盐的突变体是可能的。体细胞经紫外线照射后, 发育成细胞团的比例明显升高。同样, 在高盐度下培养体细胞也可促使大量细胞团的形成, 由高盐度转入低盐度培养, 会促使细胞团放散孢子, 孢子再可萌发成苗。所以, 条斑紫菜体细胞采苗中, 先用较高的盐度培养, 提高成活率, 同时促使大量细胞团形成, 然后再降低盐度, 促使细胞团大量放散孢子, 这时集中采孢子, 采苗效果更好。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院数学研究所统计组编, 1964. 常用数理统计方法. 40—45. 科学出版社(京).
- [2] 王素娟等, 1986. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I. 海洋与湖泊, 17(3):217—221.
- [3] 唐延林, 1982. 紫菜营养细胞和原生质体的分离与培养. 山东海洋学院学报, 12(4):37—50.
- [4] 曾呈奎等, 1985. 海藻栽培学: 169—173. 上海科学技术出版社.
- [5] 戴继勋等, 1990. 紫菜原生质体的纯系培养、诱变处理和种间细胞融合的研究. 海洋与湖泊, 21(3):293—296.

- [6] Fujita, Y. & S. Migita, 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. *Bull. Fac. Nagasaki Univ.*, 57:39-45.
- [7] Polne-Fuller, M. & A. Gibor, 1984. Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. *Hydrobiologia*, 118/117: 308-313.
- [8] Yan X. H. & S. J. Wang, 1990. The effect of colchicine on the growth and development of the somatic cells from *Porphyra haitanensis*. *Marine Sciences*, 2:283-289.

EFFECTS OF SALINITY ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF SOMATIC CELLS AND PRELIMINARY OBSERVATION OF LOWER SALINITY RESISTANT IN *PORPHYRA YEZOENSIS*

Yan Xing-hon

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

Jiang Hai-bo

(Fisheries Company of Rugao of Jiangsu province, 226537)

ABSTRACT The growth and development of somatic cells isolated from thalli of *Porphyra yezoensis* Ueda were affected greatly by salinity. The growth and development of offspring were fast, culturing between the salinity from 19.6 to 32.8‰, but their growth rate and development speed became slower, culturing at higher over 32.8‰ or lower to 19.6‰. The higher survival rate of somatic cells was obtained when they were cultured at 45.8‰ for one day. A few of variants which grow fast and having normal color were obtained when they were cultured at lower salinity after being irradiated by UV.

KEYWORDS *Porphyra yezoensis*, somatic cells, UV, salinity, variant