

圆紫菜快速生长新品系的分离与特性分析

应家轩¹, 丁洪昌^{1,2}, 严兴洪^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 与中国南方紫菜栽培物种坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)相比,圆紫菜(*Pyropia suborbiculata*)具有更强的耐高温性,但其圆形藻体不适合生产栽培。为此研究者采用人工诱变技术,从圆紫菜野生型品系中分离出了数个长型突变体。本研究在此基础上,采用⁶⁰Co- γ 射线辐照圆紫菜长型突变体CCT-2的叶状体,以生长速度为主要选育指标,从其后代中筛选出了1个快速生长的新品系PS-M1。在23℃下培养60 d的叶状体,PS-M1的平均体长和长宽比分别为68.1 cm和26.3,分别是CCT-2的2.7和2.4倍。在23℃下培养30 d的叶状体再在30℃下培养30 d,PS-M1和CCT-2的体长分别增加了6.4和3.0倍。在30℃下培养14 d,PS-M1和CCT-2的壳孢子存活率分别为47.4%和42.2%,两者之间无显著性差异。在23℃下培养45 d的叶状体,PS-M1的叶绿素a和总藻胆蛋白含量分别为6.5和64.9 mg/g,分别比CCT-2增加了20.4%和22.9%;PS-M1的平均厚度为33.6 μ m,比CCT-2薄了15.8%。连续10 d的壳孢子放散总量,PS-M1高达223.3万个/贝壳,是CCT-2的4.8倍。综上所述,相比圆紫菜长型突变体CCT-2,新品系PS-M1的叶状体生长速度更快,且在叶状体耐高温性和色素蛋白含量,以及壳孢子放散量等方面也表现出明显优势,有望被应用于中国南方沿海生产栽培。

关键词: 圆紫菜; ⁶⁰Co- γ 射线; 新品系; 生长; 耐高温

中图分类号: S 968. 431

文献标志码: A

紫菜(*Pyropia*)在系统分类学上隶属于红藻门(Rhodophyta)红藻纲(Rhodophyceae)红毛菜目(Bangiales)红毛菜科(Bangiaceae),是当今世界人工栽培的8种主要经济海藻之一^[1]。目前,在我国被大规模栽培的紫菜物种为条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)和坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)。其中,条斑紫菜属冷水性海藻,被大规模栽培在长江以北的江苏和山东沿海。坛紫菜为我国特有种,属暖温性海藻,被大规模栽培在长江以南的浙江、福建和广东沿海^[2],其年产量占全国紫菜年总产量的75%左右。

近十几年来,随着栽培规模和密度的增加,群体内近交繁殖情况严重,导致坛紫菜野生种质退化,产量和品质均有明显的下降^[3]。此外,全球气候变暖加剧了温室效应,海水温度的升高使

紫菜叶片易于腐烂,甚至从栽培网绳上脱落^[4],对紫菜的采苗和生长造成了严重影响,菜农因此蒙受巨大的经济损失^[5]。为此,研究者利用杂交育种和诱变育种等技术,成功培育出多个耐高温的坛紫菜新品种(系),并在生产中取得了良好的增产增收效果^[5-6]。研究^[7]表明,到21世纪末,极端高温天气的出现频率和持续时间均会增加,海水平均温度也会逐渐上升。因此,持续开展紫菜耐高温良种培育,对产业发展至关重要。

圆紫菜(*Pyropia suborbiculata*)是一种暖温性海藻,在我国广泛分布于东海及南海区域^[8]。MONOTILLA等^[9]对采自菲律宾与中国广东等低纬度地区的圆紫菜研究后认为其具有耐高温的潜质。石佩峰等^[10]研究表明,相比坛紫菜传统栽培品系,圆紫菜野生品系的壳孢子萌发体和叶状

收稿日期: 2024-04-02 修回日期: 2024-05-03

基金项目: 国家重点研发计划“海洋农业与淡水渔业科技创新”重点专项(2023YFD2400103, 2023YFD2400102);国家自然科学基金青年基金(32102773);上海市青年科技英才扬帆计划(21YF1417100);上海海洋大学青年教师科研启动项目(A2-2006-23-200304)

作者简介: 应家轩(1997—),男,硕士研究生,研究方向为海藻遗传育种。E-mail: yjxlife@163.com

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

体的耐高温性均更强。然而,圆紫菜野生品系的叶状体呈圆形或肾脏形,通常宽 3~7 cm,长 2~5 cm,藻体较小,不适合生产栽培^[8,11]。

为此,赵爽^[12]和 SHI 等^[13]采用人工诱变育种技术,从圆紫菜野生品系中分离出了数个长型突变体,但后者的生长速度仍较慢。在此基础上,本研究拟采用⁶⁰Co- γ 射线辐照圆紫菜长型突变体 CCT-2 的叶状体,以生长速度为主要选育指标,从其后代中筛选出快速生长的新品系,以期将其应用于中国南方沿海生产栽培。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究使用的圆紫菜长型突变体(CCT-2)是圆紫菜野生品系叶状体经紫外线诱变后,从其后代中分离出来的^[12]。CCT-2 的叶状体呈长形,棕红褐色,可放散单孢子,生长速度较慢。该突变体以自由丝状体的形式被保存于实验室内。保存条件:温度(20.0±0.5)℃,光密度 2 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光周期 10L:14D,培养液为添加 MES 培养基的灭菌海水。

1.2 辐照处理及快速生长品系的筛选

将约 0.02 g 的 CCT-2 的自由丝状体粉碎后均匀地接种到文蛤(*Meretrix meretrix*)壳上,黑暗培养 3 d 后,再转移入温度(23.0±0.5)℃、光密度 10 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期 10L:14D 的条件下继续培养 10 d。随后,清除贝壳表面多余的丝状体,更换全部培养液,并将光密度提升至 20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。数周后,当丝状体长满贝壳时,将其移入(29.0±0.5)℃、光密度 20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期 8L:16D 的条件下培养,促进贝壳丝状体成熟。当观察到大量壳孢子囊枝形成后,取出 1 个贝壳,置于一次性塑料杯中在(23.0±0.5)℃下充气培养,并放入 4~6 根 3 cm 左右长度的尼龙线以供壳孢子附着。随后,将附着有壳孢子的尼龙线转移至 250 mL 的充气瓶中进行充气培养,培养条件:温度(23.0±0.5)℃,光密度 50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光周期 10L:14D。当壳孢子苗长至 1 cm 左右时,将其从尼龙绳上刮下并继续培养。每 5 天更换 1/2 的培养液。

采用⁶⁰Co- γ 射线对 CCT-2 叶状体(长 1~2 cm)进行辐照处理,辐照剂量为 1 200 Gy,方法同文献

[14]。经辐照后的叶状体在黑暗下静置 24 h 后,恢复充气培养,条件与前文培养壳孢子时相同。一段时间后,用尼龙线收集放散出的单孢子并对其进行培养。同时,对含有变异细胞块的叶状体进行酶解,分离出单离体细胞,进行体细胞再生体培养,方法同文献[15]。从单孢子与再生体细胞萌发而来的叶状体中分别挑选具有生长优势的叶状体进行单株培养,并利用酶解技术分别获得它们的纯合丝状体(品系)。随后,比较亲本品系和选育品系的生长速度、耐高温性、藻胆蛋白含量、壳孢子放散量等特性,最终筛选出 1 个生长快,且其他综合特性也具优势的新品系。

1.3 叶状体的生长特性测定与耐高温性测试

当壳孢子苗生长到 30 d 时,从每个品系中随机挑选 30 棵叶状体,平均分成 2 组,分别置于温度为(23.0±0.5)℃和(30.0±0.5)℃的充气瓶(1 000 mL)中进行培养,其他培养条件:光密度 50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光周期 10L:14D。每 3 天更换 1/2 的 MES 培养液。每 5 天测量 1 次叶状体的长度、宽度和鲜质量,拍照并记录叶状体的形态。再培养 30 d 时,用超便携式调制叶绿素荧光仪 Mini-PAM(Walz, Effeltrich)测定叶状体中部的 PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)值,方法同檀应华等^[16]。

1.4 壳孢子耐高温性测试

将各品系的壳孢子液分别倒入培养皿($\Phi=9$ cm)中,在(23.0±0.5)℃下静置培养 1 h 后,统计每个培养皿单个视野内的壳孢子萌发体平均数($\times 10$ 倍,20 个视野),再分别把壳孢子萌发体置于(23.0±0.5)、(28.0±0.5)、(30.0±0.5)和(32.0±0.5)℃下培养,其他培养条件:光密度 50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光周期 10L:14D,每 5 天更换 1/2 的 MES 培养液。培养至第 3、7 和 14 天时,统计不同温度下壳孢子萌发体的存活率,并置于光学显微镜(90i, Nikon)下拍照记录。

1.5 叶状体主要光合色素含量的测定

日龄 45 d 时,用紫外分光光度计(UV-2600, 日本岛津公司)测定叶状体的主要光合色素含量,包括叶绿素 a(Chlorophyll a, *Chl.a*)、藻红蛋白(Phycocerythrin, PE)、R-藻蓝蛋白(R-Phycocyanin, RPC)和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC),测定方法同文献[17-18]。

1.6 叶状体厚度的测定

日龄 45 d 时,从每个品系中分别随机挑选 3 棵叶状体,将其平铺在塑料板上,用双面刀片进行徒手切片,在光学显微镜(90i, Nikon)下测量藻体梢部、中部和基部的厚度,每个部位测量 30 个厚度值,取其平均值为该部位的厚度。

1.7 单孢子放散量统计

日龄 45 d 时,从每个品系叶状体的中部位置用打孔器(直径 $d=3$ mm)各取 9 个圆盘体。随后,将后者分别转移至含有 100 mL 培养液的一次性塑料杯中进行充气培养,培养条件:温度为 $(23.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光密度为 $50 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期 10L:14D。叶状体放散的单孢子将附着在杯壁与充气玻璃管上。每天将圆盘体移入新的塑料杯中继续培养,并将换下的塑料杯和玻璃管附着的单孢子继续充气培养,待附着的单孢子苗长成肉眼可见后,刮下并计数。统计周期为 8 d,每组实验设置 3 个平行组。

1.8 壳孢子放散量统计

待各品系的贝壳丝状体成熟后,每个品系各取 1 个贝壳置于含 50 mL 培养液的塑料杯中进行充气培养,培养条件:温度为 $(23.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光密度为 $50 \mu\text{mol photon}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期 10L:14D。每日下午 1 点把壳孢子水倒入培养皿($\Phi=9$ cm)中,静置 24 h 后,待壳孢子附着后再进行计数,壳孢子数的统计方法同文献[19],连续统计 21 d。最终得到单个贝壳的壳孢子日放散量和壳孢子放散总量。每个品系设置 3 个平行组。

1.9 数据分析

实验数据用 Excel 2019 进行常规计算,并使用 SPSS 26.0 软件进行独立样本 t 检验。统计值以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。当统计结果 $P<0.05$ 时认为其存在显著差异,当 $P<0.01$ 时认为其存在极显著差异。用 Origin 2019 软件绘制各统计图。

2 结果

2.1 快速生长新品系的筛选

叶状体经辐照处理后,根据生长速度指标,从其放散的单孢子苗中挑选出 3 个,从其体细胞

再生体中挑选出 8 个,再通过酶解技术,分别获得它们的纯合丝状体(品系)。通过比较选育品系与亲本品系的 F_1 叶状体在生长速度、耐高温性、主要色素蛋白含量和壳孢子放散量等方面的特性,最终筛选出 1 个圆紫菜快速生长新品系,命名为 *PS-M1*。

2.2 叶状体的生长特性

亲本 *CCT-2* 和新品系 *PS-M1* 的 F_1 叶状体均为细长形。其中,*CCT-2* 的基部和中部均呈褐绿色,梢部呈浅棕红色,而 *PS-M1* 的基部呈褐绿色,中部和梢部均呈浅棕红色。此外,*CCT-2* 叶状体的皱褶较多,肉眼看不到明显的边缘刺;而 *PS-M1* 叶状体的皱褶较少,叶片较平整,日龄 40 d 时,即可肉眼看到基部边缘生长出较多边缘刺(图版 I -1~8)。

与亲本 *CCT-2* 相比,新品系 *PS-M1* 叶状体的生长更快。日龄 30 d 时,*PS-M1* 的平均体长为 4.6 cm,是 *CCT-2* 的 1.8 倍;日龄 60 d 时,*PS-M1* 的平均体长达到 68.1 cm,是 *CCT-2* 的 2.7 倍(表 1)。此外,*PS-M1* 单棵叶状体的平均鲜重增加速度也更快。日龄 60 d 时,*PS-M1* 单棵叶状体的平均鲜重为 0.72 g,是 *CCT-2* 的 1.5 倍(图 1)。

在整个培养期间,两个品系的叶状体长宽比值均呈先升后降的趋势,但 *PS-M1* 的长宽比值远大于亲本 *CCT-2*,差异极显著($P<0.01$)。*PS-M1* 和 *CCT-2* 的长宽比值最大值分别为 32.2 和 14.1,分别出现在日龄的 50 和 45 d(表 1)。

2.3 叶状体的耐高温性

在 30°C 下培养,两个品系叶状体的颜色均逐渐变深变红。其中,再培养 20 d 时,*CCT-2* 叶状体出现卷曲的状况,至 30 d 时,卷曲程度进一步加深,受此影响,其生长几乎停滞。而 *PS-M1* 叶状体受高温影响相对较小,培养期间,其叶片保持了较好的平整度和生长速度(图版 I -9~16)。再培养 30 d 时,*PS-M1* 叶状体的体长达到了 32.1 cm,相比初始时增加了 6.4 倍,而 *CCT-2* 叶状体的体长仅为 9.8 cm,相比初始时增加了 3.0 倍(图 2)。然而,高温培养期间,相比常温 23°C 组,两个品系的 F_v/F_m 均没有显著性降低($P>0.05$)(图 3)。



1-4. 在 23 °C 下培养 30、40、50 和 60 d 的 *PS-M1* 叶状体; 5-8. 在 23 °C 下培养 30、40、50 和 60 d 的 *CCT-2* 叶状体; 9-12. 在 23 °C 下培养 30 d 后再在 30 °C 培养 0、10、20 和 30 d 的 *PS-M1* 叶状体; 13-16. 在 23 °C 下培养 30 d 后再在 30 °C 下培养 0、10、20 和 30 d 的 *CCT-2* 叶状体。图中比例尺均为 5 cm。

1-4. The 30, 40, 50 and 60-day-old blades of *PS-M1* cultured at 23 °C; 5-8. The 30, 40, 50 and 60-day-old blades of *CCT-2* cultured at 23 °C; 9-12. The 30-day-old (at 23 °C) *F₁* gametophytic blades of *PS-M1* after being cultured at 30 °C for another 0, 10, 20 and 30 days; 13-16. The 30-day-old (at 23 °C) *F₁* gametophytic blades of *CCT-2* after being cultured at 30 °C for another 0, 10, 20 and 30 days. Scale bars = 5 cm.

图版 I 日龄 30 d 的圆紫菜新品系 (*PS-M1*) 和亲本 (*CCT-2*) 的 *F₁* 叶状体再在 23 和 30 °C 下继续培养 30 d 的形态和生长
Plate I Morphology and growth of the 30-day-old (at 23 °C) *F₁* gametophytic blades of the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata* after being cultured at 23 and 30 °C for another 30 days

表 1 圆紫菜新品系 (*PS-M1*) 和亲本 (*CCT-2*) *F₁* 叶状体的平均体长及长宽比
Tab. 1 Mean length and length-width ratio of the *F₁* gametophytic blades of the new strain (*PS-M1*) and the parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata*

培养天数 Culture days/d	平均体长 Mean length/cm		长宽比 Length-width ratio	
	<i>PS-M1</i>	<i>CCT-2</i>	<i>PS-M1</i>	<i>CCT-2</i>
30	4.6±0.2	2.5±0.2**	14.1±1.7	10.4±1.7**
35	12.4±0.7	5.9±0.3**	18.9±3.1	13.8±2.2**
40	20.1±1.1	10.5±0.5**	21.2±3.2	13.5±2.1**
45	31.4±1.7	14.4±0.7**	26.0±4.9	14.1±2.0**
50	43.9±1.9	19.1±0.7**	32.2±5.9	12.3±2.3**
55	55.9±1.2	23.0±1.2**	25.4±2.7	12.2±1.9**
60	68.1±1.9	25.5±1.6**	26.3±4.2	10.9±1.5**

注:**表示差异极显著 ($P<0.01$)。

Notes: ** indicates highly significantly difference ($P<0.01$) between *PS-M1* and *CCT-2*.

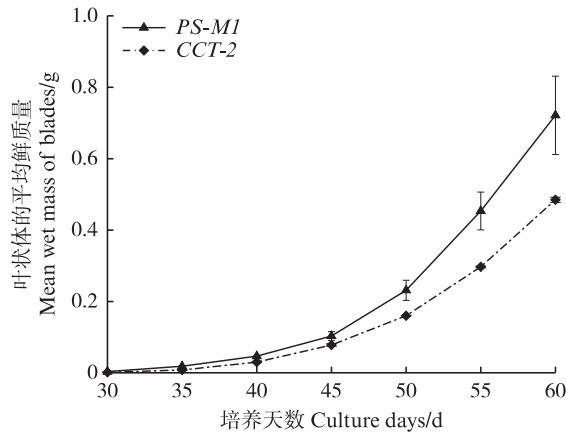


图1 圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*) F_1 叶状体的平均单棵鲜质量

Fig. 1 Wet mass per F_1 gametophytic blade of the new strain (*PS-M1*) and the parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata*

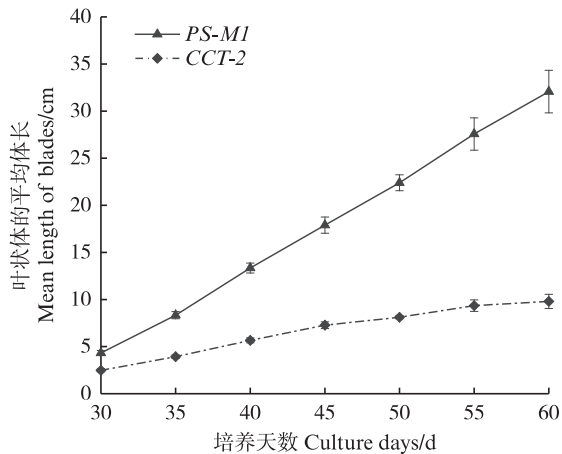


图2 日龄30 d的圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)的 F_1 叶状体再在30 °C下继续培养30 d的生长曲线
Fig. 2 Growth curves of the 30-day-old (at 23 °C) F_1 gametophytic blades of the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata* after being cultured at 30 °C for another 30 days

2.4 壳孢子耐高温性

在23、28和30 °C下培养7和14 d时,两个品系的壳孢子萌发体其细胞排列均较正常。只是随着培养温度的增加,它们的细胞分裂速度逐渐变慢,颜色变深变红(图版II)。对比两个品系,相同温度下,*PS-M1*壳孢子萌发体的细胞分裂速度均快于*CCT-2*。在32 °C下培养3 d,两个品系的壳孢子萌发体分裂速度极慢,一般仅为1~2个细胞,培养到7 d,它们的萌发体均完全死亡。

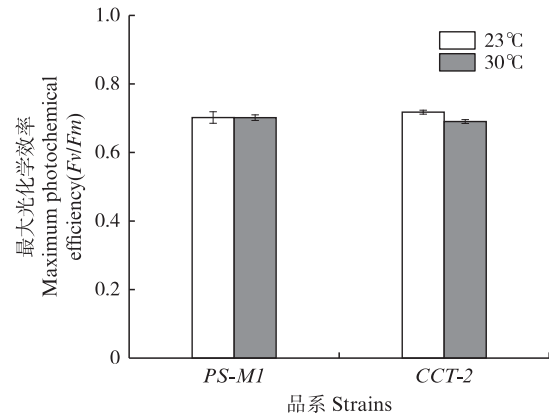


图3 日龄30 d的圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)的 F_1 叶状体再在23和30 °C下继续培养30 d的最大光化学效率(F_v/F_m)值

Fig. 3 Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) of the 30-day-old (at 23 °C) F_1 gametophytic blades of the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata* after being cultured at 23 and 30 °C for another 30 days

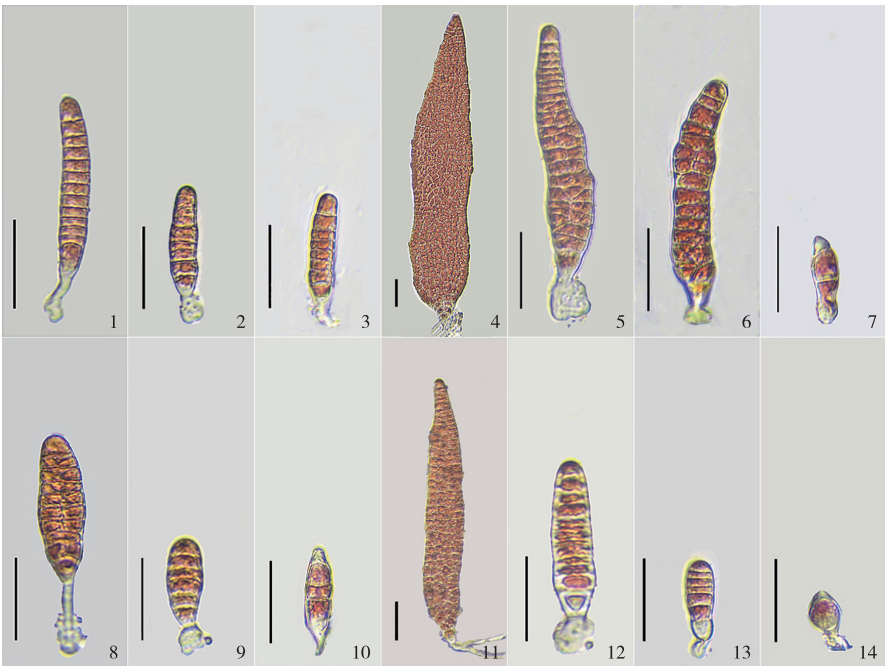
统计两个品系在不同温度下的壳孢子萌发体存活率,结果显示,在23、28和30 °C下培养3 d,*PS-M1*壳孢子萌发体的存活率分别为93.9%、88.4%和63.6%(表2)。随着培养时间的增加,不同温度组的存活率均逐渐下降,但下降幅度较小。在30 °C下培养14 d时,*PS-M1*壳孢子萌发体的存活率也达到了47.4%。相同培养情况下,*PS-M1*壳孢子萌发体的存活率均高于*CCT-2*,但均无显著性差异($P>0.05$)。

2.5 叶状体的主要光合色素含量

日龄45 d时,*PS-M1*叶状体的叶绿素a、藻红蛋白和R-藻蓝蛋白含量分别为6.5、37.2和15.7 mg/g,比*CCT-2*提高了20.4%、19.6%和44.0%,差异均极显著($P<0.01$)。*PS-M1*叶状体的别藻蓝蛋白含量为12.0 mg/g,与*CCT-2*相比无显著性差异($P>0.05$)(表3)。

2.6 叶状体的厚度

日龄45 d时,新品系*PS-M1*和亲本*CCT-2*叶状体各部位的厚度均为基部>中部>梢部(表4),且*PS-M1*各部位的厚度均显著薄于*CCT-2*($P<0.01$)。此外,*PS-M1*的叶状体平均厚度为33.6 μm ,比*CCT-2*降低了15.8%。



1-3. 在 23、28 和 30 °C 下培养 7 d 的 *PS-M1* 壳孢子萌发体;4-6. 在 23、28 和 30 °C 下培养 14 d 的 *PS-M1* 壳孢子萌发体;8-10. 在 23、28 和 30 °C 下培养 7 d 的 *CCT-2* 壳孢子萌发体;11-13. 在 23、28 和 30 °C 下培养 14 d 的 *CCT-2* 壳孢子萌发体;7 和 14: 分别为在 32 °C 下培养 3 d 的 *PS-M1* 和 *CCT-2* 壳孢子萌发体。图中比例尺均为 50 μm。

1-3. Conchospores germlings of *PS-M1* cultured at 23, 28 and 30 °C for 7 days; 4-6. Conchospores germlings of *PS-M1* cultured at 23, 28 and 30 °C for 14 days; 8-10. Conchospores germlings of *CCT-2* cultured at 23, 28 and 30 °C for 7 days; 11-13. Conchospores germlings of *CCT-2* cultured at 23, 28 and 30 °C for 14 days; 7, 14. Conchospores germlings of *PS-M1* and *CCT-2* cultured at 32 °C for 3 days. Scale bars = 50 μm.

图版 II 在 23、28 和 30 °C 下培养 7 和 14 d, 以及在 32 °C 下培养 3 d 的圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)的壳孢子萌发体
Plate II Conchospores germlings of the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata* after being cultured at 23, 28 and 30 °C for 7 and 14 days, and at 32 °C for 3 days

表 2 在 23、28、30 和 32 °C 下培养 3、7 和 14 d 的圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)的壳孢子萌发体存活率

Tab. 2 Survival rates of conchospore germlings of the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P.*

suborbiculata after being cultured at 23, 28, 30 and 32 °C for 3, 7 and 14 days, respectively %

培养天数 Culture days/d	<i>PS-M1</i>				<i>CCT-2</i>			
	23 °C	28 °C	30 °C	32 °C	23 °C	28 °C	30 °C	32 °C
3	93.9±2.1	88.4±4.4	63.6±4.5	6.2±0.8	92.6±1.5	82.9±4.0	56.7±6.2	6.4±0.5
7	90.3±3.5	85.8±5.2	54.4±1.9	0	89.0±4.6	80.4±4.5	50.0±2.7	0
14	89.9±3.9	81.7±4.0	47.4±2.4	0	87.4±4.0	76.7±4.6	42.2±3.0	0

表 3 日龄 45 d 的圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)F₁叶状体的主要色素蛋白含量

Tab. 3 Contents of main pigment proteins in the 45-day-old F₁ gametophytic blades of the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata* mg/g

品系 Strains	叶绿素 <i>a</i>	藻红蛋白	R-藻蓝蛋白	别藻蓝蛋白	总藻胆蛋白
	<i>Chl.a</i>	PE	RPC	APC	Phycobiliprotein ^a
<i>PS-M1</i>	6.5±0.2	37.2±0.4	15.7±0.1	12.0±0.3	64.9
<i>CCT-2</i>	5.4±0.02	31.1±0.6	10.9±0.6	10.7±0.6	52.8
	(+20.4 ^{**})	(+19.6 ^{**})	(+44.0 ^{**})	(+12.1)	(+22.9 ^{**})

注: a. 包括 PE, RPC 和 APC; 括号中数字表示新品系(*PS-M1*)与亲本(*CCT-2*)相比的变化量百分比; **表示差异极显著($P<0.01$)。

Notes: a. Phycobiliprotein concludes PE, RPC and APC; values in parentheses indicate the percentage of changes of the new strain *PS-M1* compared with *CCT-2*; ** indicates highly significantly different ($P<0.01$).

表4 日龄45 d的圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)*F*₁叶状体的不同部位厚度
Tab. 4 Thickness of different parts of the 45-day-old *F*₁ gametophytic blades of the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata*

品系 Strains	梢部 Apical	中部 Middle	基部 Basal	平均厚度 Mean thickness
<i>PS-M1</i>	30.4±0.3	34.6±0.6	35.6±0.2	33.6
<i>CCT-2</i>	33.6±0.3	41.6±1.7	44.7±1.8	39.9
	(-9.5%**)	(-16.8%**)	(-20.4%**)	(-15.8%)

注:括号中数字表示新品系(*PS-M1*)与亲本(*CCT-2*)相比的变化量百分比; **表示差异极显著($P<0.01$)。
Notes: Values in parentheses indicate the percentage of changes of the new strain *PS-M1* compared with *CCT-2*; ** indicates highly significantly different ($P<0.01$).

2.7 单孢子放散量

在培养圆盘体的第1天,即可观察到两个品系的藻体均开始放散单孢子。在随后的8 d内,两个品系均可持续放散,且放散量呈增大的趋势(图4)。但第3到第8天,*PS-M1*圆盘体的单孢子日放散量均显著高于*CCT-2*($P<0.01$)。统计8 d内圆盘体的单孢子放散总量,*PS-M1*为43.9万个,是*CCT-2*的8.3倍。

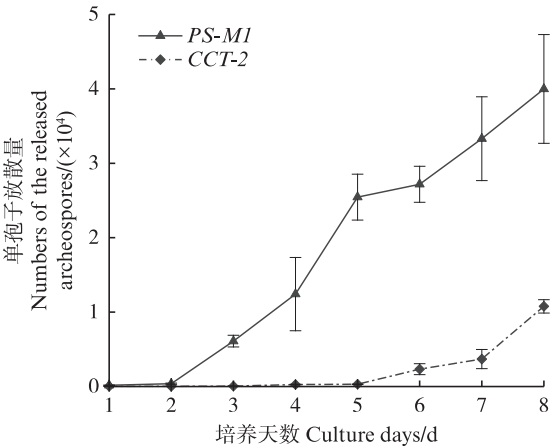


图4 圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)单个圆盘体连续8 d的单孢子放散量

Fig. 4 Numbers of the released archeospores daily from the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata* during 8 days

2.8 壳孢子放散量

两个品系的贝壳丝状体均较易放散壳孢子,在充气刺激过夜后,次日便可看到壳孢子的放散。两个品系大量放散壳孢子的时间,主要集中在开始放散的前3 d(图5)。其中,*PS-M1*的壳孢子放散高峰发生在第2和3天,放散量分别为114.4和101.2万个/贝壳;*CCT-2*发生在第2天,放散量为33.6万个/贝壳。统计10 d的壳孢子放散总量,*PS-M1*为223.3万个/贝壳,是*CCT-2*的4.8倍。

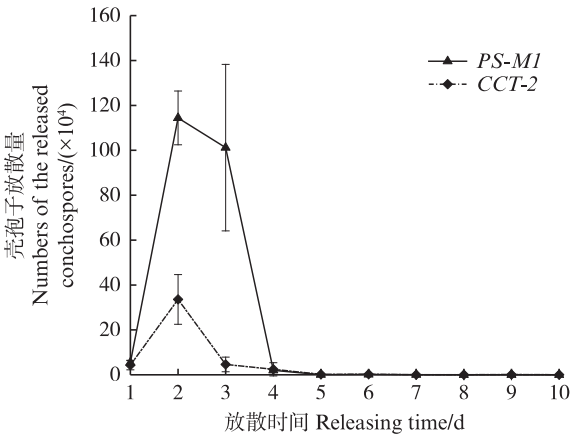


图5 圆紫菜新品系(*PS-M1*)和亲本(*CCT-2*)贝壳丝状体连续10 d的壳孢子放散量

Fig. 5 Numbers of the released conchospores daily from the new strain (*PS-M1*) and parental strain (*CCT-2*) in *P. suborbiculata* during 10 days

3 讨论

目前,常用的紫菜育种技术为杂交育种和诱变育种。杂交育种主要利用杂种优势,即利用优良性状不同的个体进行交配或结合产生的杂交子代,在生长、生化特性等方面优于亲本^[20-22]。而诱变育种是利用物理或化学等诱变因子,诱发紫菜组织细胞产生基因突变,再从突变体中筛选出具有生长、生化等优势个体的过程^[23-25]。截至目前,圆紫菜良种培育研究刚刚起步,在没有积累过多优良品系的基础上,不太适合开展圆紫菜的杂交育种研究。因此,本研究采用人工诱变技术选育圆紫菜新品系。

圆紫菜野生品系的叶状体形状为圆形或肾脏形,不适合进行栽培。近几年,赵爽^[12]和SHI等^[13]采用人工诱变技术,分离出多个圆紫菜长型突变体,但后者的生长速度仍较慢。而叶状体生长速度是影响紫菜产量的最主要因素,也是良种

选育中最重要的指标。本研究选育出了1个圆紫菜新品系 *PS-M1*, 其叶状体生长速度较快, 日龄 60 d 时, 它的叶状体体长可达 68.1 cm, 是亲本 *CCT-2* 的 2.7 倍。同时, *PS-M1* 在日龄 60 d 的叶状体长度也高于一般的坛紫菜和条斑紫菜野生型品系^[5, 16, 22], 表明该品系已具备被应用于生产的能力。

坛紫菜壳孢子采苗的适宜温度为 25~27 °C, 但近年来, 壳孢子采苗后高温天气频发, 严重影响了壳孢子萌发体的存活与生长^[5]。石佩峰等^[10]研究发现, 在 30 °C 下培养 14 d 后, 坛紫菜传统栽培品系的壳孢子萌发体存活率会降低至 16.8%。在 30 °C 高温下, 随着培养天数的增加, 圆紫菜新品系 *PS-M1* 和亲本 *CCT-2* 的壳孢子萌发体存活率也呈下降的趋势, 但在培养的第 14 天时, 存活率仍分别可达到 47.4% 和 42.2%, 是坛紫菜野生栽培品系的近 3 倍。此外, 在 30 °C 高温下, 坛紫菜传统栽培品系和耐高温品系的壳孢子萌发体其分裂能力严重下降, 个体含有的细胞个数一般仅为 1~3 个^[10, 26], 而圆紫菜 *PS-M1* 可保持一定的分裂速度, 一般细胞个数可超过 10 个, 显示出较强的高温耐受性。

近十年来, 受全球气候变暖的影响, 在坛紫菜栽培的第 1 个月左右, 海水温度回升现象时常发生, 这影响了坛紫菜叶状体的生长, 严重时会引起大规模的掉苗和烂苗, 给生产造成巨大的经济损失, 致使近些年福建省坛紫菜的栽培规模和产量呈逐年下降的趋势, 当地紫菜产业受到较大的冲击^[27]。因此, 培育耐高温的紫菜新品系对于该产业可持续发展有重大意义。此外, 在 30 °C 高温下, 圆紫菜 *PS-M1* 叶状体无烂洞发生, 且可保持较快的生长速度, 也快于一般的坛紫菜耐高温品系^[28], 可适于被栽培在福建、广东等南方沿海。植物光合系统的稳定性对于高温胁迫十分敏感, 而叶绿体作为感应热胁迫的感应器, 其受损伤的主要是光系统 II (PS II) 中的功能蛋白^[29]。最大光化学量子产量 (F_v/F_m) 是用来反映 PS II 最大光能转化效率的数值^[30]。黄林彬等^[31]和陈伟洲等^[32]分别发现条斑紫菜与坛紫菜在处于高温环境下时其 F_v/F_m 值明显降低, 暗示 F_v/F_m 值可作为紫菜高温耐受性的鉴定指标。本研究中, 在 30 °C 高温下培养 30 d 时, 圆紫菜新品系 *PS-M1* 和亲本 *CCT-2* 的叶状体 F_v/F_m 值均无显著下降,

也证明了圆紫菜叶状体具有较强的高温耐受性。

紫菜藻体中的光合色素主要包括叶绿素 a、藻红蛋白、R-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白, 后三者统称为藻胆蛋白^[33]。作为光合作用的主要参与者, 光合色素的含量直接影响藻体光合作用的效率^[34], 进而影响藻体的生长速度。在本研究中, 新品系 *PS-M1* 的叶绿素 a、藻红蛋白和 R-藻蓝蛋白含量均显著高于亲本 *CCT-2*, 这与它的生长速度较快呈正相关。紫菜叶状体的藻胆蛋白含量也直接决定着加工制品的品质, 也表明 *PS-M1* 的加工制品将会有较好的品质。

紫菜叶状体释放单孢子是一种无性繁殖方式, 若放散量太大, 会降低叶状体的生长速度, 并降低产量, 但如果放散量适量, 对增加栽培网帘上的苗种数、延长收获期、提高产量和品质等均有重要意义^[35]。本研究中, 相比亲本 *CCT-2*, 圆紫菜新品系 *PS-M1* 的叶状体在保持较快的生长速度下, 可放散出更多的单孢子, 有助于生产栽培。另外, 紫菜贝壳丝状体的壳孢子放散量大小, 会直接影响到采苗工作是否顺利进行, 因此, 它也是紫菜重要的性状指标之一。本研究中, 连续 10 d 的壳孢子放散总量, 新品系 *PS-M1* 为 223.3 万个/贝壳, 是亲本 *CCT-2* 的 4.8 倍, 比一般的坛紫菜传统栽培品系也更高, 完全可满足生产需求^[6]。

综上, 本研究采用人工诱变育种技术, 选育出一个生长较快、耐高温性强、品质较好、壳孢子放散量大的圆紫菜新品系 *PS-M1*, 有望被栽培在福建和广东等南方沿海, 解决当地坛紫菜产业受高温影响的问题。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] FAO. The state of world fisheries and aquaculture [R]. Rome: FAO, 2022: 45.
- [2] 朱建一, 严兴洪, 丁兰平, 等. 中国紫菜原色图集 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 22.
ZHU J Y, YAN X H, DING L P, et al. Color atlas of Chinese laver [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016: 22.
- [3] 李西林. 论坛紫菜壳孢子采苗时间 [J]. 福建水产, 1992 (2): 40-42.
LI X L. Time for collecting the conchospores of *Porphyra yezoensis* [J]. Journal of Fujian Fisheries, 1992 (2): 40-

- 42.
- [4] 陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究[J]. 海洋学报, 2008, 30(5): 100-106.
- CHEN C S, JI D H, XIE C T, et al. Preliminary study on selecting the high temperature resistance strains and economic traits of *Porphyra haitanensis* [J]. Haiyang Xuebao, 2008, 30(5): 100-106.
- [5] 吕峰, 严兴洪, 刘长军, 等. 坛紫菜耐高温品系的选育与海区中试[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(4): 457-462.
- LYU F, YAN X H, LIU C J, et al. Selection of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* and its cultivation in sea area [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(4): 457-462.
- [6] 王长青, 严兴洪, 黄林彬, 等. 坛紫菜优良品系“申福2号”的特性分析与海区中试[J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1658-1667.
- WANG C Q, YAN X H, HUANG L B, et al. Characterization of an improved strain (SF-2) of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and its pilot cultivation in mariculture farm [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1658-1667.
- [7] GUO X J, HUANG J B, LUO Y, et al. Projection of heat waves over China for eight different global warming targets using 12 CMIP5 models [J]. Theoretical and Applied Climatology, 2017, 128(3/4): 507-522.
- [8] 曾呈奎, 张峻甫. 我国的紫菜与紫菜养殖[J]. 生物学通报, 1956(3): 29-33.
- ZENG C K, ZHANG J F. Chinese *Porphyras* and its cultivation[J]. Bulletin of Biology, 1956(3): 29-33.
- [9] MONOTILLA W D, NOTOYA M. Morphological and physiological responses of *Porphyra suborbiculata* Kjellman (Bangiales, Rhodophyta) blades from five localities[J]. Botanica Marina, 2004, 47(4): 323-334.
- [10] 石佩峰, 丁洪昌, 严兴洪. 圆紫菜壳孢子萌发体和叶状体的耐高温性观察[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(1): 60-67.
- SHI P F, DING H C, YAN X H. Observation of high-temperature resistance of the conchospore germlings and blade in *Pyropia suborbiculata* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(1): 60-67.
- [11] 张德瑞, 郑宝福. 中国的紫菜及其地理分布[J]. 海洋与湖沼, 1962, 4(3/4): 183-188.
- ZHANG D R, ZHENG B F. The Chinese porphyras and their geographical distribution [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1962, 4(3/4): 183-188.
- [12] 赵爽. 紫外线对圆紫菜的诱变效果与突变体的分离[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- ZHAO S. Mutagenic effects of short-wavelength ultraviolet rays (UV-C) on *Pyropia suborbiculata* Kjellman and isolation of mutants [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [13] SHI P F, DING H C, ZHAO S, et al. Isolation and characterization of a long-type mutant in *Phycocalidia suborbiculata* [J]. Journal of Applied Phycology, 2022, 34(2): 1007-1015.
- [14] 严兴洪, 梁志强, 宋武林, 等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 166-172.
- YAN X H, LIANG Z Q, SONG W L, et al. Induction and isolation of artificial pigmentation mutants in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(2): 166-172.
- [15] 严兴洪, 王素娟. 紫菜体细胞发育与分化的研究[J]. 海洋科学, 1989(6): 28-32.
- YAN X H, WANG S J. Studies on the development and differentiation of somatic cell in *Porphyra* SPP. (Rhodophyta)[J]. Marine Sciences, 1989(6): 28-32.
- [16] 檀应华, 黄林彬, 严兴洪. 坛紫菜耐低盐品系的选育与特性分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(3): 504-512.
- TAN Y H, HUANG L B, YAN X H. Selection and characterization of a low-salinity tolerant strain in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(3): 504-512.
- [17] ARUGA Y, MIURA A. *In vivo* absorption spectra and pigment contents of the two types of color mutants of *Porphyra* [J]. Journal of Phycology of Japan, 1984, 32: 243-250.
- [18] 高洪峰. 不同生长期坛紫菜中藻胆蛋白的含量变化[J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(6): 645-648.
- GAO H F. The variation in the contents of phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* collected in different growing stages [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1993, 24(6): 645-648.
- [19] 李淑平, 严兴洪. ^{60}Co - γ 射线辐照对长紫菜的诱变效果及优良品系分离与特性分析[J]. 海洋学报, 2015, 37(10): 69-79.
- LI S P, YAN X H. Isolation and characterization of an improved strain of *Pyropia dentata* (Bangiales, Rhodophyta) after being irradiated by ^{60}Co - γ ray [J]. Haiyang Xuebao, 2015, 37(10): 69-79.
- [20] 吴宏肖, 严兴洪, 宋武林, 等. 坛紫菜与 *Pyropia radi* 种间杂交重组优良品系的选育与特性分析[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1079-1088.
- WU H X, YAN X H, SONG W L, et al. Selection and characterization of an improved strain produced by genetic recombinant of interspecific hybridization between *Pyropia haitanensis* and *Pyropia radi* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1079-1088.
- [21] 裴叶帆, 丁洪昌, 唐隆晨, 等. 坛紫菜叶状体颜色与长度、宽度和厚度的相关性分析[J]. 上海海洋大学学报,

- 2024, 33(2): 371-379.
- QIU Y F, DING H C, TANG L C, et al. Correlation analysis of blade color with length, width and thickness in *Pyropia haitanensis* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2024, 33(2): 371-379.
- [22] 刘美君, 黄林彬, 严兴洪. 条斑紫菜种内杂交优良品系的筛选与特性分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 33-43.
- LIU M J, HUANG L B, YAN X H. Isolation and characterization of the improved strain HW-4 by intraspecific hybridization in *Pyropia yezoensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(1): 33-43.
- [23] NIWA K, HAYASHI Y, ABE T, et al. Induction and isolation of pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) by heavy-ion beam irradiation [J]. Phycological Research, 2009, 57(3): 194-202.
- [24] 李勇斌, 左正宏, 李博文, 等. MNNG(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍)诱变坛紫菜原生质体的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(3): 400-403.
- LI Y B, ZUO Z H, LI B W, et al. Studies on protoplasts morphological change and growth of *Porphyra haitanensis* treated with mutagen MNNG [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(3): 400-403.
- [25] LEE H J, CHOI J I. Isolation and characterization of a high-growth-rate strain in *Pyropia yezoensis* induced by ethyl methane sulfonate [J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(4): 2513-2522.
- [26] 丁洪昌. 坛紫菜良种的培育[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- DING H C. Breeding of new varieties of *Pyropia haitanensis* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [27] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 21.
- Ministry of Agriculture and Rural Fisheries Administration, National Aquatic Technology Promotion Station, Chinese Fisheries Society. China fisheries statistic yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 21.
- [28] DING H C, FEI Q J, ZHANG P, et al. Isolation and characterization of a heat-resistant strain with high yield of *Pyropia haitanensis* induced by ultraviolet ray [J]. Aquaculture, 2020, 521: 735050.
- [29] ALLAKHVERDIEV S I, KRESLAVSKI V D, KLIMOV V V, et al. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis [J]. Photosynthesis Research, 2008, 98(1/3): 541-550.
- [30] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 444-448.
- ZHANG S R. A discussion on Chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1999, 16(4): 444-448.
- [31] 黄林彬, 黄文, 严兴洪. 条斑紫菜两个耐高温品系的耐低盐特性[J]. 水产学报, 2020, 44(2): 222-233.
- HUANG L B, HUANG W, YAN X H. Low-salinity tolerance of two high-temperature resistant strains in *Pyropia yezoensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(2): 222-233.
- [32] 陈伟洲, 许俊宾, 吴文婷, 等. 三种紫菜叶状体对高温胁迫的生理响应[J]. 热带海洋学报, 2015, 34(1): 49-55.
- CHEN W Z, XU J B, WU W T, et al. Physiological responses of three species of *Pyropia thallus* to high temperature stress [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2015, 34(1): 49-55.
- [33] KITADE Y, MIYABE Y, YAMAMOTO Y, et al. Structural characteristics of phycobiliproteins from red alga *Mazzaella japonica* [J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(1): e12436.
- [34] ZHANG T, LI J F, MA F, et al. Study of photosynthetic characteristics of the *Pyropia yezoensis* thallus during the cultivation process [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(2): 859-865.
- [35] 王素娟, 章景荣, 刘家驹, 等. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)自然附苗养殖的初步研究[J]. 水产学报, 1964, 1(1/2): 85-94.
- WANG S J, ZHANG J R, LIU J J, et al. Preliminary study on the natural cultivation of *Porphyra yezoensis* Ueda [J]. Journal of Fisheries of China, 1964, 1(1/2): 85-94.

Isolation and characterization of a new strain with fast growth in *Pyropia suborbiculata* (Bangiales, Rhodophyta)

YING Jiakuan¹, DING Hongchang^{1,2}, YAN Xinghong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Compared with *Pyropia haitanensis* cultivated in southern China, *Pyropia suborbiculata* has stronger high-temperature resistance, but its round algae are not suitable for production. Therefore, several long-type mutants were isolated from the wild-type strain of *P. suborbiculata* by artificial mutagenesis. In this study, the blades of the long-type mutant (*CCT-2*) of *P. suborbiculata* were induced by ⁶⁰Co-γ ray, and a new strain (*PS-M1*) with fast growth was screened from its progeny with growth rate as the main breeding index. The *PS-M1* blades cultured at 23 °C for 60 days had a mean length of 68.1 cm and a length-width ratio of 26.3, which were 2.7 and 2.4 times of *CCT-2*, respectively. The blades of *PS-M1* and *CCT-2* cultured at 23 °C for 30 days and then cultured at 30 °C for another 30 days, their mean length had increased by 6.4 and 3.0 times, respectively. The survival rates of conchospores of *PS-M1* and *CCT-2* were 47.4 and 42.2%, respectively, after 14 days of culture at 30 °C, with no significant difference between them. The blades cultured at 23 °C for 45 days had a mean chlorophyll *a* content of 6.5 mg/g and phycobiliprotein content of 64.9 mg/g in *PS-M1*, which were 20.4% and 22.9% higher than those of *CCT-2*, respectively. The thickness of *PS-M1* was 33.6 μm, which was 15.8% thinner than that of *CCT-2*. The total numbers of conchospores released by *PS-M1* was up to 2.223 million per shell for 10 consecutive days, which was 4.8 times that of *CCT-2*. In conclusion, compared with long-type mutant (*CCT-2*), the new strain (*PS-M1*) of *P. suborbiculata* has a higher growth rate, better resistance to high-temperature and also shows obvious advantages in main pigments protein contents, and number of conchospores releasing, which has potential to be applied in commercial cultivation.

Key words: *Pyropia suborbiculata*; ⁶⁰Co-γ ray; new strain; growth; high-temperature resistance