

文章编号: 1674-5566(2013)06-0882-06

坛紫菜与 *Pyropia radi* 的种间杂交实验

刘海洋¹, 李琳¹, 严兴洪^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为探讨坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)种间杂交的可行性,进一步选育坛紫菜新品系,以野生型坛紫菜作为母本,以采自印度的*Pyropia radi*作为父本进行种间杂交,并以亲本叶状体细胞的液泡大小与色素体的大小和颜色作为遗传标记:母本的细胞内液泡较小,具一个较大的色素体,颜色偏红;父本的细胞内具有一个很大的液泡,但色素体较小,颜色偏褐带黄。杂交实验结果如下:依据液泡体积、色素体的大小和颜色区分,在F₁叶状体中出现了6种类型的细胞:2种亲本细胞类型,4种杂交重组细胞类型,它们分别为母本型(Ph),父本型(Pr),似母本型(Ph',液泡大小与Ph相同,但色素体偏黄),似父本I型(Pr',液泡比Pr小,且色素体偏红),似父本II型(Pr'',液泡大小介于Pr和Pr'之间,且色素体颜色比Pr'更浅),似父本III型(Pr''',液泡大小与Pr相同,但色素体稍黄)。这6种细胞在F₁叶状体上出现分离,并呈块状直线排列。在F₁叶状体中出现大量由2~4个色块构成的颜色嵌合体 and 少数单色的叶状体。上述结果证实这两种紫菜的种间杂交是成功的,并且F₁叶状体是成活和可育的,为今后选育种间杂交新品种奠定了基础。

研究亮点: 首次对坛紫菜进行了种间杂交试验,获得了坛紫菜与*P. radi*的杂合丝状体,在F₁叶状体中观察到嵌合叶状体,证明了这一杂交是成功且可育的。本研究为利用远缘种间杂交选育坛紫菜新品系奠定了基础。

关键词: 坛紫菜; *Pyropia radi*; 种间杂交; F₁叶状体; 颜色嵌合体

中图分类号: S 968.43

文献标志码: A

坛紫菜是我国的特有种,具有很高的经济价值。近年来,由于坛紫菜栽培规模扩大、全球温室效应加剧,海水高温时间延长使紫菜叶状体易受病害感染,影响产量^[1-2]。因此选育抗高温的坛紫菜新品系十分重要。

研究者曾利用人工诱变等技术成功筛选出了坛紫菜和条斑紫菜的耐高温品系^[3-6]。而杂交育种是以基因型不同的藻种进行杂交,通过培育杂交种获得新品种的方法^[7]。杂交改变了后代的基因组合,增加了基因杂合性,提高了杂种后代的抗逆性^[8]。许多藻类学家根据这一理论分别对坛紫菜进行过种内杂交^[1,9-13],并且对杂交子代进行了耐高温测试,证明杂交子代比亲本具

有更好的高温耐受性^[9-10]。KIM^[14]曾用温水种的拟线性紫菜(*Porphyra pseudolinearis*)和冷水种的长紫菜(*Porphyra dentata*)进行了种间杂交,成功获得了广温性的杂交后代。截至目前,没有见到关于坛紫菜与其它紫菜的种间杂交报道。

本文选取实验室已经分离建立的一株来自印度,处于热带水域的紫菜纯系(*Pyropia radi*),利用其具有典型大液泡的细胞特征与野生坛紫菜进行种间杂交试验,探讨这两种紫菜杂交的可能性和可育性,为通过种间远缘杂交改良坛紫菜的高温耐受性奠定技术基础。

收稿日期: 2013-04-17 修回日期: 2013-06-13

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2012AA100811);国家自然科学基金(31072208);农业部公益性专项(200903030);国家海洋局公益专项(201105023,201105008);国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2C000005);上海市科学技术委员会重点科技攻关项目(10391901100)

作者简介: 刘海洋(1987—),女,硕士研究生,研究方向为海藻遗传育种。E-mail: haiyangjiagood@163.com

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 亲本叶状体的室内培养

杂交试验使用的 *Pyropia radi* 采自印度半岛海域的自然岩礁上,采果孢子获得自由丝状体保存于实验室内。室内人工促熟 *P. radi* 的自由丝状体,从壳孢子长成的叶状体中分离得到一株具有特殊细胞特征的雄性叶状体;叶状体细胞内有一个大而透明的液泡,几乎充满整个细胞。利用单性生殖的方法^[15]获得丝状体纯系。野生型坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是实验室经单性生殖方式建立,仅产生雌性叶状体的丝状体纯系。

利用自由丝状体移植技术,将两亲本的自由丝状体纯系接种到文蛤壳上,经贝壳丝状体阶段培养并促熟、放散壳孢子,采集壳孢子进行叶状体培养^[16],叶状体培养条件:温度为 23 ℃;光密度为 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;明暗周期为 10L:14D;使用的培养液均为富含 MES 营养盐^[17]的灭菌海水,每隔 5 天更换一次培养液。

1.2 亲本叶状体的生长和生化特性分析

随机取室内培养至 30 d 的亲本叶状体 30 棵,置于相同条件下继续培养,每隔 5 d 测量一次叶状体的长度,绘制生长曲线。亲本叶状体在相同条件下培养至 40 d,分别测定 3 种主要光合色素和色素蛋白含量,其中叶绿素 a (Chl. a) 的测定方法同参考文献 [18],藻红蛋白 (Phycocerythrin, PE) 和藻蓝蛋白 (Phycocyanin, PC) 的测定方法同参考文献 [19]。

1.3 杂交试验

两种紫菜的叶状体生长至 50 d 左右,选择健康、成熟的叶状体作为亲本进行杂交试验。雌雄叶状体以 1:1 的比例混合培养。雌性叶状体充分受精后,除去雄性叶状体,保留雌性叶状体继续单株培养。待雌性叶状体上受精分裂的果孢子囊充分发育,阴干叶状体后置于培养皿中收集果孢子。将收集到的果孢子用毛细管单个转移至试管中培养。当果孢子萌发形成的丝状体的藻落长到一定大小时,将丝状体接种到文蛤壳上培养并释放壳孢子,培养方法和条件同参考文献 [16]。收集到的壳孢子置于培养皿中培养,以获得 F_1 叶状体。培养条件:温度为 23 ℃;光密度为 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;明暗周期为 10L:14D,每 5 天更换一次培养液。

1.4 F_1 叶状体的培养和观察

F_1 叶状体于培养皿中静置培养 2~3 周后,用毛细管挑出叶状体置于载玻片上用显微镜检查并拍照记录嵌合叶状体的类型。

2 结果

2.1 亲本叶状体的生长和色素蛋白含量

在相同条件培养大约 20 d 后,亲本叶状体的颜色可以明显区分,其中野生型坛紫菜的叶状体呈棕绿色(图版-1),而 *P. radi* 的叶状体呈褐色(图版-2)。显微镜下观察叶状体细胞,发现野生型坛紫菜叶状体上的细胞呈多边形紧密排列,细胞内星状色素体体积大,色均一(图版-3),*P. radi* 叶状体的细胞近乎呈圆形,细胞间排列松散,细胞内有一个大而透明的液泡,几乎充满整个细胞,色素体较小(图版-4)。在相同条件下培养,亲本叶状体生长速度不一致,野生型坛紫菜的生长速度远比 *P. radi* 快(图 1)。培养 40 d 后,测定 3 种主要光合色素和色素蛋白含量,结果如图 2 所示:野生型坛紫菜叶状体的藻红蛋白(PE)和藻蓝蛋白(PC)的含量明显高于 *P. radi*,但是,两种叶状体的 Chl. a 含量没有明显差异。

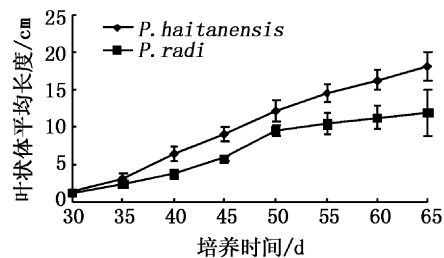


图 1 坛紫菜和 *P. radi* 叶状体的生长曲线
Fig. 1 Growth curve of blades of *P. haitanensis* and *P. radi*

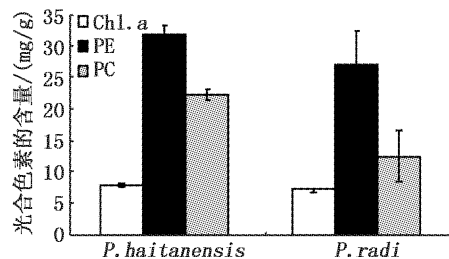


图 2 坛紫菜和 *P. radi* 叶状体的叶绿素 a、藻红蛋白和藻蓝蛋白的含量(培养 40 d)
Fig 2 Contents of chlorophyll a (Chl. a), phycocerythrin (PE) and phycocyanin (PC) in gametophytic blades developed from the conchosporos of *P. haitanensis* and *P. radi* after 40 days of culture

2.2 杂交结果和遗传学分析

以野生型坛紫菜作为母本, *P. radi* 作为父本, 叶状体按照 1:1 混合培养进行杂交试验。经过数日培养后, 显微镜下观察发现母本叶状体上的果胞已经受精并形成了果孢子囊, 而且未受精的果胞和营养细胞变圆、细胞颜色变淡(图版-5)。母本叶状体经阴干后, 释放出果孢子, 单个分离并培养成丝状体藻落, 成熟的丝状体释放壳孢子后长成 F_1 叶状体。在 F_1 叶状体中观察到 6 种细胞类型, 除母本型(*P. haitanensis* 型, Ph), 父本型(*P. radi* 型, Pr), 还出现了 4 种新的细胞类型: 似母本型(Ph', 液泡大小与 Ph 相同, 但色素体颜色稍黄), 似父本 I 型(Pr', 液泡比 Pr 小, 且色素体的颜色红), 似父本 II 型(Pr'', 液泡大小介于 Pr 和 Pr' 之间, 色素体的颜色比 Pr' 浅), 似父本 III 型(Pr''', 液泡大小与 Pr 相同, 但色素体 Pr 稍黄)。

6 种细胞在 F_1 叶状体上形成了不同颜色的细胞块, 不同的细胞块之间有明显且整齐的分界线, 在显微镜下很容易被观察。在同一个叶状体上, 不同的细胞块呈直线型块状排列, 从而形成了由 6 种细胞类型相嵌的叶状体(图版-8~12), 他们分别由 2~4 个细胞块构成, 单个嵌合体上细胞块数最多为 4 块。在 F_1 叶状体中, 除了嵌合体外, 还观察到少量单色叶状体(图版-6, 7), 细胞类型与嵌合体上细胞块上出现的细胞类型相同。

3 讨论

本文利用具有典型大液泡细胞特征的 *P. radi* 与野生型坛紫菜进行了种间杂交试验, 探讨了坛紫菜与其它紫菜种间杂交的可育性。两亲本叶状体在生长和生化特性方面所表现出的差异可能是因为培养条件的原因, *P. radi* 原产于热带水域, 因本实验以坛紫菜野生型作为母本, 故以坛紫菜的最适培养水温设定培养条件。因此, *P. radi* 与坛紫菜野生型培养于相同的水温, 可能无法体现出自身固有的生长优势。*P. radi* 生长缓慢还有另外一种可能: 在相同培养条件下, 坛紫菜雄性叶状体比雌性叶状体成熟早, 而且叶状体成熟越早, 生长期越短^[20]。因为本实验中 *P. radi* 的后代为雄性, 相同日龄和培养条件下, 比坛紫菜更早进入成熟期, 所以生长较慢。

亲本混合培养后在母本叶状体上出现了果孢子囊, 说明坛紫菜和 *P. radi* 是可以杂交的。而且在杂交后代 F_1 叶状体中, 除两种亲本型外, 还出现了 4 种新细胞型(似母本型, 似父本 I 型, 似父本 II 型和似父本 III 型), F_1 叶状体中不仅出现了颜色分离, 而且细胞内含物尤其是液泡和色素体分布也出现了差异, 不同的细胞块在叶状体上呈直线型相嵌排列, 形状非常规则而且细胞块之间的分界线明显而整齐, 1 棵叶状体上出现的细胞块最多为 4 块。类似的结果在坛紫菜和条斑紫菜的种内杂交试验中也出现过^[1, 21-23]。因此, 本试验的结果表明坛紫菜和 *P. radi* 的杂交实验是成功的, 而且, 产生的杂合丝状体也是可育的。在以 *P. radi* 作为母本, 野生型坛紫菜作为父本的反交实验中, 在母本叶状体上同样可以形成果孢子囊, 杂合丝状体的 F_1 叶状体中, 也出现了颜色嵌合叶状体。

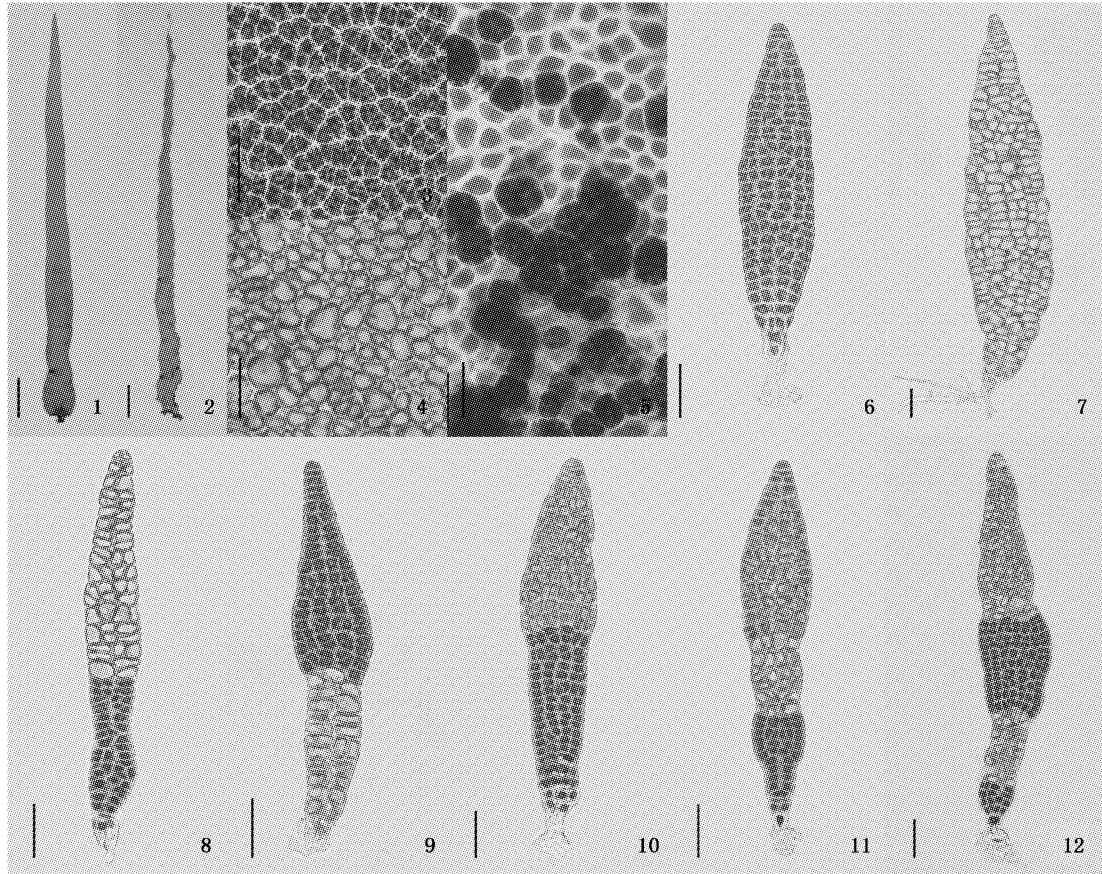
在试验的 F_1 叶状体中, 出现了父本型的大液泡细胞特征和 3 种与父本型相似的具有大液泡特征的细胞类型, 这些结果与高等植物液泡遗传受细胞质遗传物质控制的理论相悖, 如果 *P. radi* 细胞内液泡遗传方式与高等植物液泡遗传类似, 同为细胞质遗传^[24], 那么在以坛紫菜为母本, *P. radi* 为父本的杂交后代中理应不会出现父本 *P. radi* 所具有的大液泡的细胞特征。但实际统计(结果见另文发表)发现, 大液泡细胞类型与正常细胞类型几乎呈 1:1 的比例出现。控制 *P. radi* 液泡大小的相关基因可能是核基因; 还有另一种可能, 是这两种紫菜在杂交过程中出现了质体双亲遗传, 精子在转移至果胞受精时, 携带了父本的细胞质基因。约有 19% 的被子植物具有表现为质体双亲遗传或具有质体双亲遗传的潜能^[25], 但是藻类中类似现象仅在紫红紫菜的杂交试验中被报道^[26], 而且出现这种现象的频率小于 1%, 远远低于本次试验结果 F_1 叶状体中大液泡细胞出现的频率。上述关于紫菜细胞内液泡遗传的两种猜测还有待进一步去证实。

从坛紫菜野生型与 *P. radi* 杂交后产生果孢子这一结果, 可以推测坛紫菜与 *P. radi* 的杂交是成功的。杂交丝状体后代出现的嵌合叶状体证明这一种间杂交是可育的。根据杂交优势的相关理论和前人的研究结果^[9-10, 14], 来自我国温带海域的坛紫菜和来自印度热带海域的 *P. radi*

的种间杂交所得的后代,在一定程度上,其对高温的耐受性可能比母本坛紫菜更高,本次杂交试验的成功将为通过杂交育种改良坛紫菜耐高温性和选育新品系奠定基础。

参考文献:

- [1] 陈昌生,王凤霞,徐燕,等. 野生型与红色型坛紫菜杂交嵌合体及选育的研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(6): 101-109.
- [2] 李西林. 论坛紫菜壳孢子采苗时间[J]. 福建水产, 1992(2): 40-42.
- [3] 严兴洪,马少玉. 坛紫菜抗高温品系的筛选[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 112-119.
- [4] 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.
- [5] 付春辉,严兴洪,黄林彬,等. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)选育品系壳孢子的放散量与耐高温性研究[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(3): 460-466.
- [6] 王华芝,严兴洪,李琳. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)耐高温品系的筛选及特性分析[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 363-369.
- [7] 何培民,秦松,严晓军,等. 海藻生物技术及其应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2007:86-98.
- [8] COMINGS D E, MACMURRAY J P. Molecular heterosis: a review [J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2000, 71(1): 19-31.
- [9] 陈昌生,徐燕,纪德华,等. 坛紫菜品系间杂交藻体选育及经济性状的初步研究[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 97-104.
- [10] 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.
- [11] 徐燕,谢潮添,纪德华,等. 坛紫菜品系间杂交分离色素突变体及其特性的初步研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 466-472.
- [12] 徐燕,陈昌生,谢潮添,等. 坛紫菜杂交品系优势的初步评价[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(1): 62-69.
- [13] 纪德华,谢潮添,徐燕,等. 坛紫菜品系间杂交子代杂种优势的 ISSR 分析[J]. 海洋学报, 2008, 30(6): 147-153.
- [14] KIM N G. Culture study on the hybrid by interspecific crossing between *Porphyra pseudolinearis* and *P. dentata* (Bangiales, Rhodophyta), two dioecious species in culture [J]. Algae, 2011, 26(1): 79-86.
- [15] 严兴洪,李琳,陈俊华,等. 坛紫菜的单性生殖与遗传纯系分离[J]. 高技术通讯, 2007, 17(2): 205-210.
- [16] 梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究[D]. 上海:上海水产大学, 2004.
- [17] 王素娟,张小平,徐志东,等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J]. 海洋与湖沼, 1986, 17(3): 217-221.
- [18] YAN X H, ARUGA Y. Induction of pigmentation mutants by treatment of monospore germlings with with NNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Algae, 1997, 12(3): 39-52.
- [19] 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.
- [20] 严兴洪,刘旭升. 坛紫菜雌雄叶状体的细胞分化比较[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 184-192.
- [21] NIWA K, MIZUTA A, ARUGA Y. Genetic characterization of a spontaneous green-type pigmentation mutant of *Porphyra yezoensis* and the significance of using heterozygous conchocelis in nori farming [J]. Fisheries Science, 2002, 68(4): 729-735.
- [22] 严兴洪,田中次郎,有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 221-228.
- [23] 严兴洪,李琳,有贺佑胜. 坛紫菜减数分裂位置的杂交试验分析[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 1-8.
- [24] 崔彬彬,李云. 高等植物细胞质遗传的研究进展[J]. 河北林果研究, 2006, 21(1): 24-29.
- [25] 胡迎春. 传统忍冬科非孟德尔遗传方式及被子植物细胞质遗传起源与进化的究[D]. 北京:北京大学, 2010.
- [26] MITMAN G G, MEER J P V. Meiosis, blade development, and sex determination in *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 1994, 30: 147-159.



图版 亲本叶状体和叶状体上的营养细胞及杂交受精形成的果孢子囊、杂合丝状体产生的 F_1 叶状体

Plate Photographs of the parental blades and micrographs of somatic cells on the parental blades, the carposporangium on the female blades and F_1 blades in the cross of the *P. haitanensis* (♀) and the *P. radi* (♂)

1. 坛紫菜叶状体(♀,45 d); 2. *P. radi* 叶状体(♂,45 d); 3. 坛紫菜叶状体上的营养细胞; 4. *P. radi* 叶状体上的营养细胞;
5. 杂交后母本叶状体上的果孢子囊; 6-12. 杂合丝状体产生的 F_1 叶状体(20 d): 6, 7. 单色叶状体, 6. 母本型叶状体 (Ph),
7. 父本型叶状体 (Pr); 8-12. 颜色嵌合叶状体(从左到右为嵌合叶状体上基部到梢部的细胞块类型), 8. Ph + Pr, 9. Pr''' + Ph',
10. Ph + Pr', 11. Ph + Pr'' + Pr', 12. Ph + Pr'' + Ph + Pr'''; 图中 1 和 2 的标尺表示 1 cm, 3-12 标尺表示 50 μm。

Study on the interspecies cross between *Pyropia haitanensis* and *Pyropia radi*

LIU Hai-yang¹, LI Lin¹, YAN Xing-hong^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to verify the practicability of interspecies cross between *Pyropia haitanensis* and other *Pyropia*, cross experiment between *P. haitanensis* from the temperate-water of China and *P. radi* from the tropical-water of India was carried out in the laboratory, marked with the color and size of the vacuoles and the chloroplasts in cells of parental blades. *P. haitanensis* was used as female parent, and its blades show brown-green with an obvious pigment in cells of blades. *P. radi* was used as male parent, and its blades show brown in color and the cells of blades containing a large vacuole and small chloroplasts. Among the F₁ gametophytic blades from the cross of *P. haitanensis* (♀) × *P. radi* (♂), two parental colors (Ph and Pr) and four new colors (Ph', the size of the vacuole similar to Ph and the color of the chloroplasts slightly yellower than Ph; Pr', the size of the vacuole smaller than Pr and the color of the chloroplasts redder than Pr; Pr'', the size of the vacuole between Pr and Pr' and the color of the chloroplasts lighter than Pr'; Pr''', the size of the vacuole similar to Pr and the color of the chloroplasts slightly yellower than Pr) appeared. Linear segregation of colors occurred in the F₁ blades, and therefore, the color-sectored blades with 2 – 4 sectors were formed. There were a large number of color-sectored blades and a few of single-color blades. These results indicate that the interspecies cross between *P. haitanensis* and *P. radi* succeeded and the F₁ gametophytic blades could survive and be fertile, which laid the foundation for the further selection of the new strains.

Key words: *Pyropia haitanensis*; *Pyropia radi*; interspecies cross; F₁ gametophytic blade; color-sectored blade