

裙带菜幼孢子体营养细胞多倍体育种

张泽宇

(大连水产学院, 大连 116023)

摘要 本文报道了裙带菜幼孢子体的营养细胞 $2n$ 配子体的产生过程及其发育特点、性分化、发育成熟时间,进行了 $2n$ 配子体间及与正常配子体的杂交,培育出 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体。测定了不同倍性幼孢子体的生长。观察到 $3n$ 幼孢子体的染色体数为90。

关键词 裙带菜, $2n$ 配子体, 雌雄同株, $3n$ 孢子体

裙带菜 [*Undaria pinnatifida* (Harv.) Suringar] 是我国北方进行大规模栽培生产的大型经济褐藻, 目前国内外通常采用引种和定向选择方法培育良种^[1,2]。在生物技术育种方面, 张建中^[3]直接从裙带菜的愈伤组织和体细胞培育出幼孢子体; 方宗熙^[4]等报道了从海带雌配子体直接培育出单倍孢子体; 日本的能登谷^[5]采用切段培养的方法从海带幼孢子体培育出海带幼苗, 从海带组织细胞培育出雌雄配子体, 成熟受精后萌发出幼孢子体, 但对配子体及孢子体的倍性未做报道。戴熙^[6]等报道了裙带菜的染色体数为 $n=30$ 。作者于1988~1989年和1993~1996年, 从幼孢子体的体细胞培育出雌雄配子体, 进而对配子体的培养条件、倍性、性分化及发育成熟时间、不同倍性配子体交配等进行了系列观察研究, 培育出 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体, 并对不同倍性孢子体的染色体数目和生长速度进行了观察。

1 材料与方法

试验材料系恒温培养箱培育的藻体长度为1.0~3.0 cm 裙带菜幼孢子体。方法是将切除固着器的幼孢子体叶片在200 ml 三角烧瓶内添加培养液静置培养。试验组的温度为10℃、15℃和20℃, 其余藻体培养温度为15℃。培养液用过滤自然海水配制, 1 000 ml 中添加100 mg NaNO_3 , 20 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和1 ml 的微量元素PI溶液。培养液经80℃杀菌, 每月全量更换1次。培养是在恒温培养箱内进行。光源为日光灯, 光照时间为12 h/d, 光照强度为2 000 lx。

幼孢子体染色体计数: 试验材料用醋酸酒精固定液固定后, 用Wittmann^[7]法检查染色体数目。

2 结果

2.1 $2n$ 配子体的形成

切掉固着器的幼孢子体叶片在培养30 d时观察, 叶片已失去原来的形态, 其边缘细胞向多方向生长使叶片呈多角形, 部分细胞明显增大并突出于叶片表面使叶片表面凹凸不平。培养45 d后的藻体大部分细胞变绿死亡, 少数细胞的体积仍继续增大, 色素体消失, 原生质充满整个细胞呈浓褐色, 随后在细胞的一端或两端产生小的棒状突起, 并逐渐增长形成丝状体(图版I-1, 2)。培养60 d后, 丝状体产生多次分枝形成分枝丝状体, 直径平均 $7.5 \mu\text{m}$ ($5.0 \sim 9.0 \mu\text{m}$), 长度平均 $12 \mu\text{m}$ ($7 \sim 18 \mu\text{m}$) (图版I-3, 4)。将分枝丝状体连同叶片用刀片切碎, 移至培养皿内培养15 d, 丝状体的细胞直径开始分化, 部分细胞逐渐变粗达 $10 \mu\text{m}$ 左右, 形成粗大的分枝丝状体; 部分细胞则变细($3 \sim 4 \mu\text{m}$), 形成细长的分枝丝状体; 还有部分丝状体细胞直径处于二者之间($5.0 \sim 7.5 \mu\text{m}$, 图版I-5)。增加培养液的交换量继续培养10 d后, 细长分枝丝状体在细胞表面产生

收稿日期: 1999-01-25

锯齿状精子囊并放出精子(图版 I-6),粗大分枝丝状体的枝端细胞逐渐膨大,原生质体向膨大细胞移动形成卵囊并排出卵(图版 I-8),卵受精后萌发成幼孢子体(图版 I-9)。试验结果表明:裙带菜幼孢子体体细胞所产生的分枝丝状体为 $2n$ 雌雄配子体。

不同温度对 $2n$ 配子体形成有很大影响。试验结果表明: $2n$ 配子体形成在 15°C 下需培养 30 d, 10°C 下需培养 45 d, 而 20°C 下培养 60 d 后才开始形成,而且随培养时间的增长其形成的数量不再增加。

2.2 $2n$ 配子体的性分化

$2n$ 配子体的性分化比较复杂,雄性占 50% 以上,雌性不足 10%、雌雄难辨的为 40% 左右。用刀片将这些雌雄难以分辨的配子体切碎移至培养皿中培养 20 d 后,出现了雌配子体、雄配子体和雌雄同株 3 种 $2n$ 配子体,其中雄配子体的比例最高,约占总数的 95%,雌配子体为 5% 左右,极少数为雌雄同株(图版 I-7)。另外,将分离后的 $2n$ 雌配子体用刀片切碎培养 20 d 后却也出现了上述 3 种 $2n$ 配子体,具体比例为:雌配子体占 80%,雄配子体占 17%,雌雄同株占 3%。同样,将分离后的雄配子体切碎培养 20 d 后观察,几乎全部都为雄配子体,雌配子体为罕见,未发现雌雄同株配子体。

2.3 $2n$ 配子体的成熟

$2n$ 雄配子体在切碎培养 10 d 开始成熟,形成精子囊并排出精子,15 d 成熟率达到 47%,20 d 达 100%。 $2n$ 雌配子体在切碎培养 12 d 开始成熟,形成卵囊并排出卵,15 d 成熟率为 15%,20 d 达 58%,培养 25 d 成熟率达 80%。与 n 雌雄配子体相比, $2n$ 配子体也同样表现出雄性先熟,但 $2n$ 配子体成熟时间要长 3~5 d。在成熟率方面, $2n$ 雄配子体与 n 配子体几乎无差异,都能 100% 成熟。但 $2n$ 雌配子体培养 25 d 成熟率只有 80%,而 n 配子体在培养 20 d 成熟率已达 100%。

2.4 $2n$ 配子体的受精率

$2n$ 雌雄配子体间及其与 n 雌雄配子体正逆杂交,均显示出较高的受精率。在切碎混合后培养 20 d 时, $\text{♀} \times 2n\text{♂}$ 的受精率为 93%, $2n\text{♀} \times \text{♂}$ 的受精率为 88%,与 $2n$ 配子体自交(95%)和 n 配子体自交(100%)的受精率差异不明显。

2.5 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体生长

将受精 5 d,藻体长度约 $100\text{ }\mu\text{m}$ 的 $2n$ 、 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体分别移入培养皿内(9.0 cm),静置在

15°C 、2 000 lx 条件下培养,幼孢子体的生长情况如图 1 所示。培养 10 d, $2n$ 、 $3n$ 幼孢子体长度分别为 $350\text{ }\mu\text{m}$ 和 $400\text{ }\mu\text{m}$, $4n$ 幼孢子体藻体长度为 $250\text{ }\mu\text{m}$ 。培养 30 d, $2n$ 、 $3n$ 幼孢子体的长度分别为 3.3 mm 和 3.8 mm。 $4n$ 幼孢子体的长度仅为 2.8 mm。培养 40 d, $2n$ 、 $3n$ 幼孢子体长度分别为 5.1 mm 和 5.7 mm,而 $4n$ 幼孢子体长度仅为 3.8 mm。从幼孢子体生长速度看, $3n$ 幼孢子体略快于 $2n$,但差异不大。而 $4n$ 幼孢子体的生长速度明显慢于 $2n$ 和 $3n$ 幼孢子体。

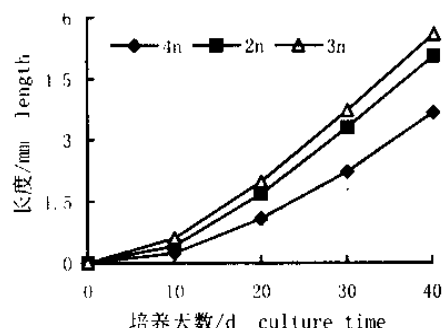


图 1 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体生长比较

Fig. 1 Growth comparison of $3n$ and $4n$ young sporophytes

2.6 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体染色体数检查

将藻体长度约 1.0 cm 裙带菜 $3n$ 幼孢子体经醋酸酒精固定液固定,用 Wittmann 法染色,在显微镜下检查藻体细胞内的染色体数目,采用调节显微镜微调旋钮分 4 层观察累计记数的方法确定细胞内染色体的数目约 90 条(图版 II)。 $4n$ 孢子体细胞内染色体数目较多,记数比较困难,但从粗略计算的染色体数目可以断定为 $4n$ 孢子体。

3 讨论

(1)本研究从裙带菜幼孢子体的营养细胞获得 $2n$ 雌雄配子体,并进行了不同倍性配子体的正逆杂交,培育出 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体。通过对 $3n$ 孢子体细胞染色体数目的检查,可以确认参与杂交的一方为 $2n$ 配子体,从而验证了从幼孢子体体细胞获得的配子体为 $2n$ 配子体。试验结果表明这是一种制备和获得裙带菜 $2n$ 配子体的好方法,也为开展裙带菜多倍体育种工作开辟了一条新的途径。但是,如果采用同样的方法从 $3n$ 、 $4n$ 孢子体的营养细胞获得 $3n$ 、 $4n$

配子体经自交形成 $6n$ 、 $8n$ 孢子体,这种无限的多倍体制备从生物学的角度来看是难以想象的。同时,在试验中也发现 $2n$ 配子体的群体内也存在个别 n 配子体。因此,有关 $3n$ 、 $4n$ 孢子体细胞内染色体数目是否有自然减倍现象,尚需进一步的研究。

(2)裙带菜营养细胞所形成的 $2n$ 配子体在性分化方面表现出极大的不稳定性。 $2n$ 雌配子体在切碎培养过程中能衍生出 $2n$ 雄配子体和雌雄同株的 $2n$ 配子体。同样 $2n$ 雄配子体偶尔也会产生 $2n$ 雌配子体,雌雄同株的 $2n$ 配子体也能形成 $2n$ 雌雄配子体。特别是 $2n$ 雌配子体衍生的 $2n$ 雄配子体和 $2n$ 雌雄同株配子体的比例较高,表现出 $2n$ 雌配子体性分化的不稳定性,产生这种现象的原因尚需详细研究。

(3) $3n$ 幼孢子体的生长速度在室内培养条件下略快于 $2n$ 孢子体,但 $4n$ 孢子体的生长速度却明显慢于 $2n$ 孢子体和 $3n$ 孢子体。由于室内培育的 $3n$ 、 $4n$ 藻体较小,其生长优势可能未充分发挥出来。因

此, $3n$ 、 $4n$ 孢子体的长度、宽度和重量等经济性状的生长性能尚需进行海区栽培试验工作。

致谢:本研究得到了日本长崎大学右田清治的精心指导,特此感谢。

参 考 文 献

- 1 曾呈奎,等.海藻栽培学.上海:上海科学技术出版社.1985.123~134
- 2 德田广,等.海藻资源养殖学.东京:绿书房.1987.133~142.
- 3 张建中.裙带菜组织和细胞培养.山东海洋学院学报.1982,12(3):29~38
- 4 方宗熙,等.海带单倍体遗传育种的实验.中国科学,1978(2):226~231
- 5 能登谷正浩.有用海藻のバイオテクノロジー.东京:恒星社厚生阁.1997.9~20
- 6 戴熙、安井肇、能登谷正浩.ナンブワカメの染色体数.北海海大学水产学部研究简报.1988,39(1):6~13
- 7 Wittmann W. Aceto - iron - haematoxylin - chloral hydrate for chromosome staining. Stain Tech. 1965,40:161~164

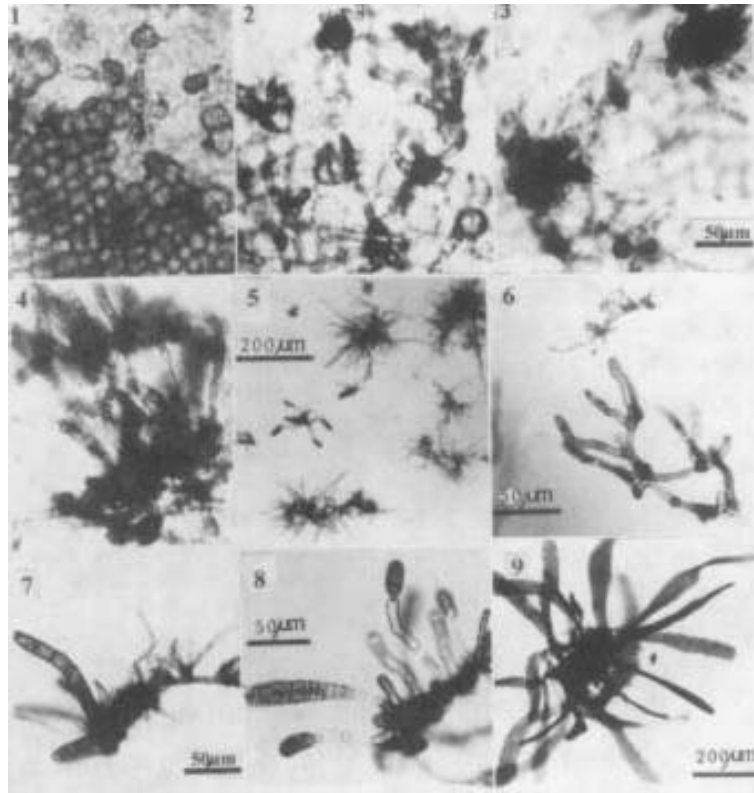
Polyploid breeding on vegetative cell of young sporophyte in *Undaria pinnatifida*

Zhang Zeyu

(Dalian Fisheries College, Dalian 116023)

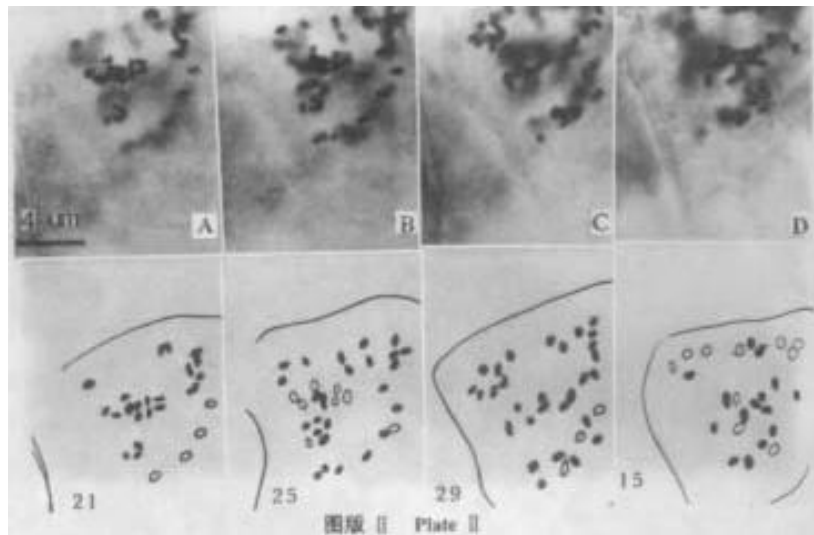
Abstract The formation process of $2n$ gametophyte induced from the vegetative cells of young sporophytes in *Undaria pinnatifida* was reported. The sex differentiation of $2n$ gametophyte and its characteristics and the required developing time were studied. The hybrid from $2n$ gametophyte and normal gametophyte was conducted, and $3n$ and $4n$ young sporophytes were produced. The chromosome number of $3n$ young sporophyte was 90.

Key words *Undaria pinnatifida*, $2n$ gametophyte, monoecism, $3n$ sporophyte



图版 I Plate I

1, 2 从营养细胞形成丝状体 filaments induced from vegetative cells. 3, 4 生长中的丝状体 growing filaments. 5 分化为 2n 雌雄配子体的丝状体 filaments differentiating into 2n female and male gametophytes. 6 2n 雌雄配子体 2n female and male gametophytes. 7 雌雄同株配子体 monoecious gametophytes. 8 受精后萌发的 4n 孢子体 4n sporophyte germinated after fertilization. 9 4n 孢子体生长 growing 4n sporophytes.



裙带菜 3n 孢子体 ($\text{♀} \times 2n \text{♂}$) 的染色体(90 条) number of chromosomes of 3n sporophyte ($\text{♀} \times 2n \text{♂}$) of *Undaria pinnatifida* (about 90).