

DOI: 10.3724/S.P.J.1118.2011.00400

裙带菜孤雌生殖幼孢子体体细胞诱导 $2n$ ♀ 配子体

李晓丽^{1,2}, 张泽宇², 曹淑青², 由学策²

1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 以实验室内保存培养的裙带菜(*Undaria pinnatifida*) $2n$ ♀ 配子体为实验材料, 经切碎培养, 促进 $2n$ ♀ 配子体成熟, 排出卵进行孤雌生殖, 形成幼孢子体。将 0.5~1.0 cm 的孤雌生殖幼孢子体的假根切除, 从其体细胞中诱导产生 $2n$ ♀ 配子体。实验结果表明, 在 10~20℃ 范围内, 培养 20 d 后, 在 15℃ 和 20℃ 下的 $2n$ ♀ 配子体排出的卵的孤雌生殖率分别为 8.4% 和 7.4%, 明显高于 10℃ 下的 1%。20℃ 下诱导培养 15 d 后就出现了 $2n$ ♀ 配子体, 培养 60 d 后, $2n$ ♀ 配子体的诱导率达到 100%; 15℃ 下培养 30 d 后才出现 $2n$ ♀ 配子体, 60 d 后的诱导率为 38%; 而 10℃ 下诱导培养 45 d 后才开始出现 $2n$ ♀ 配子体, 60 d 后的诱导率仅为 12%。将诱导产生的 $2n$ ♀ 配子体切碎, 在 20℃ 下培养 10 d 后的成熟率为 34%, 60 d 的成熟率达到 100%。通过孤雌生殖幼孢子体诱导产生的 $2n$ ♀ 配子体与正常 ♂ 配子体杂交形成了 $3n$ 裙带菜幼孢子体。本研究发现了获得大量 $2n$ ♀ 配子体的新方法, 旨在为裙带菜三倍体幼苗规模化培育奠定基础。[中国水产科学, 2011, 18(2): 400–406]

关键词: 裙带菜; 孤雌生殖; 幼孢子体; $2n$ ♀ 配子体

中图分类号: S968

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0400-07

利用三倍体不育和低育的特性延长经济动植物的生长周期, 进而提高产量和质量的研究已经有许多报道^[1-10]。在裙带菜(*Undaria pinnatifida*) 多倍体育种的研究中, 作者曾采用切除假根的方法从幼孢子体的体细胞诱导产生了 $2n$ ♀ ♂ 配子体^[11], 通过自交或与正常 ♀ ♂ 配子体杂交, 培育出 $3n$ 、 $4n$ 幼孢子体, 并在海区浮筏上栽培为成体, 发现裙带菜 $3n$ 孢子体具有明显的不育性和生长优势, 产业应用前景广泛^[12]。

目前在裙带菜苗种生产中通常使用 ♀ × $2n$ ♂、 $2n$ ♀ × ♂ 两个杂交组合制作三倍体。从海区栽培实验结果看, $2n$ ♀ × ♂ 组合在藻体长度和重量生长方面明显地优于 ♀ × $2n$ ♂ 组合, 表现出明显的生长优势^[8], 但目前在 $3n$ 幼孢子体培育中, ♀ × $2n$ ♂ 组合

的使用率约达 90%, $2n$ ♀ × ♂ 组合的使用率仅为 10% 左右, 其原因是从幼孢子体体细胞诱导产生的 $2n$ ♀ ♂ 配子体中, $2n$ ♂ 配子体占 95% 以上, $2n$ ♀ 配子体仅占 5% 左右^[11]。虽然通过室内增殖培养可以使其数量有所增加, 但仍难以达到产业化苗种生产的要求。因此, 在裙带菜三倍体及其产业化技术研究中, 探讨 $2n$ ♀ 配子体新的诱导技术势在必行。作者在 $2n$ ♀ 配子体切碎增殖培养中发现部分未受精卵孤雌生殖形成幼孢子体, 本研究以此幼孢子体为材料, 采用切除假根的方法诱导其体细胞产生 $2n$ ♀ 配子体, 探讨不同温度和藻体长度与 $2n$ ♀ 配子体诱导率的关系, 使用增殖后的 $2n$ ♀ 配子体与正常 ♂ 配子体杂交, 培育出 $3n$ 幼孢子体。本研究旨在为裙带菜三倍体幼苗规模化培育

收稿日期: 2010-04-03; 修订日期: 2010-07-20.

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA10A412).

作者简介: 李晓莉(1980-), 女, 博士, 主要从事海藻生物学及遗传育种研究. E-mail: lixiaoli@dlou.edu.cn

通讯作者: 张泽宇, 教授, 主要从事海藻生物学的研究. E-mail: zyz@dlou.edu.cn

提供基础参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为室内保存培养的裙带菜 2n♀配子体(图版 I-A)。获得方法是将室内保存培养的裙带菜雌雄配子体混合切碎培养后,♀配子体排出的卵与♂配子体放出的精子受精形成幼孢子体,采用切除假根的方法从幼孢子体体细胞诱导产生 2n♀配子体^[1],将 2n♀配子体分离经增殖培养后供实验使用。

2n♀配子体培养温度为 20℃,光照强度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光源为日光灯,光照时间为 12 h/d。培养用水为经沉淀过滤的自然海水加热 80℃冷却后供实验使用。营养盐的添加量为:NaNO₃ 10 g/m³、NaH₂PO₄·12H₂O 20 g/m³、微量元素 PI 溶液 1 L/m³。培养液每 3 天全量更换 1 次。

1.2 方法

1.2.1 温度对 2n♀配子体孤雌生殖率的影响 取室内保存培养 2n♀配子体约 10 mg(湿重),添加 200 mL 灭菌海水后移到组织捣碎机中切碎为 120~200 μm 的藻段,各取约 1 mL 配子体液移到数个培养皿($D=12\text{ cm}$)中,添加培养液后置于 20℃下培养,当 50%左右的 2n♀配子体成熟并排出卵后,将培养皿移到不同温度下培养。孤雌生殖率每 5 天检查 1 次,按 2n♀配子体排出的未受精卵孤雌生殖形成幼孢子体数与排出卵总数的百分比计算。

1.2.2 温度对 2n♀配子体诱导率的影响 将孤雌生殖幼孢子体(长度 0.5~1.0 cm)从培养皿底面剥下,切去假根,每 20 棵藻体为 1 组移至 300 mL 烧瓶中置于不同温度下培养,每 15 天检查 1 次 2n♀配子体形成率,按形成 2n♀配子体的幼孢子体数与培养幼孢子体总数的百分比计算,各测定 50 个个体,取平均值。

1.2.3 藻体长度对 2n♀配子体诱导率的影响 各取藻体长度 0.2~0.5 cm(平均 0.36 cm)、0.5~1.0 cm(平均 0.78 cm)、1.0~2.0 cm(平均 1.52 cm)幼孢子体 20 棵为 1 组,移至 300 mL 烧瓶中置于 20℃

下培养,藻体处理和 2n♀配子体的检查方法同 1.2.2。

1.2.4 2n♀配子体成熟与受精 将生长在幼苗藻体上的 2n♀配子体藻团用镊子剥下,取等量室内保存培养的正常♂配子体混合,在载玻片上用双面刀片切碎后,将配子体液洒在培养皿中(同上),添加培养液后置于 20℃下培养,同时取室内保存培养的正常♀配子体混合切碎作为对照组(下同)。培养 1 周后每 3 天测定 1 次 2n♀配子体的成熟率和卵受精率,成熟率按形成卵囊并排出卵的 2n♀配子体数与 2n♀配子体总数的百分比计算,卵受精率按受精卵数与卵总数的百分比计算,各测定 50 个个体取平均值。

1.2.5 3n 幼孢子体生长 实验组(2n♀×♂)和对照组的切碎和培养温度、方法同 1.2.4,附着基除培养皿外,实验组还使用直径 3 mm 维尼纶绳附着基。卵受精后每 3 天测定 1 次幼孢子体长度,各测定 20 个藻体取平均值。

1.2.6 2n 配子体染色体观察 取孤雌诱导产生的 2n♀配子体和对照组正常♀配子体,经酒精醋酸固定液固定后,采用 Wittman's (1965)方法染色,经压片后,在显微镜下观察配子体细胞染色体数目。

培养是在生物培养箱内进行,根据裙带菜为广温型藻类的特点^[1],不同温度设定为 10℃、15℃、20℃;光照强度、光源、光照时间、培养液的制作与配方同 1.1,培养液每 3 天全量更换 1 次。

1.3 数据处理方法

以上数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,利用 SPSS15.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 温度对 2n♀配子体孤雌生殖率的影响

切碎后的 2n♀配子体在 20℃下培养 1 周后开始发育成熟,逐渐形成卵囊并有少数卵囊成熟排出卵。培养 15 d 后,大部分 2n♀配子体形成卵囊并排出卵。刚排出的卵圆形,内含一个盘状色素体呈褐色,挂在卵囊袋上等待受精。培养 20 d 后,可见大部分卵色素体收缩呈透明状,并逐渐从卵

囊袋上脱落至培养皿底面上,少数卵开始拉长为长圆形,经 2~3 次细胞横分裂孤雌生殖为幼孢子体(图版 I-B);脱落在培养皿底面上的卵绝大部分死亡分解,极少数的卵萌发形成畸形藻体,但在后续培养中陆续死亡。

孤雌生殖幼孢子体在 20℃下生长很快,形成 10 d 后藻体长度为 200 μm 左右,培养 1 个月 after 达到 1 mm 以上(图版 I-C),藻体形态与正常幼孢子体无明显差异。培养 2 个月后,藻体长度达到 0.5 cm 以上,在培养皿内已肉眼可见。

不同温度对 2n♀配子体孤雌生殖率的影响如表 1。可以看出,在设定的 3 个温度条件下 2n♀配子体均可孤雌生殖,其中,15℃下卵排出 5 d 后的孤雌生殖率为 3.2%,10 d 后为 5.2%,20 d 后达到 8.4%;20℃下 5 d 后的孤雌生殖率为 2.6%,15 d 后为 6.0%,20 d 达到 7.4%;10℃下培养 5 d 后 2n♀配子体的孤雌生殖率为 0.8%,10 d 后为 1.0%,20 d

后仍为 1.0%,而且在随后的培养中孤雌生殖率几乎不增加。

2.2 温度对 2n♀配子体诱导率的影响

孤雌生殖形成的幼孢子体经切根培养(图版 I-D),藻体失去极性,解除束缚的叶片细胞开始自由生长,细胞形态由长方形变为椭圆形,显微镜下可见排列整齐的叶片细胞变得杂乱无章。随后,可见自叶片梢部开始部分细胞体积增大并向外凸出,细胞内原生质浓度增加形成圆形黑褐色大细胞并逐渐向叶片的中部蔓延,在叶片表面形成大量黑褐色斑点。在切根培养半个月后,可见大细胞表面产生棒状突起并向外延长,经细胞分裂后形成 2~3 个细胞的丝状体(图版 I-E),随后经多次细胞分裂成为十余个细胞的单列细胞丝状体。丝状体在 20℃条件下生长很快,培养 1 个月 after,形成分枝丝状体(图版 I-F),培养 2 个月 after,丝状体藻团已经布满孤雌生殖幼孢子体表面(图版 I-G)。

表 1 温度对裙带菜 2n♀配子体孤雌生殖率的影响
Tab.1 Effects of temperature on the parthenogenesis rate of 2n female gametophytes

n=50; $\bar{x} \pm SD$; %

温度/℃ temperature	培养时间/d culture time			
	5	10	15	20
10	0.8±0.1**	1.0±0.2**	1.0±0.1**	1.0±0.3**
15	3.2±0.3**	5.2±0.4**	7.2±0.3**	8.4±0.5**
20	2.6±0.2**	4.2±0.3**	6.0±0.4**	7.4±0.2**

注:同列数据中‘***’表示 3 组之间差异极显著($P<0.01$).
Note: ‘***’show very significant difference compared among the three groups in one column($P<0.01$).

丝状体细胞平均长度 15 μm(12~18 μm),平均直径 11 μm(9~12 μm),内含 2~3 个盘状色素体呈黄褐色。用镊子将丝状体藻团从叶片上剥下,用双面刀片切碎后移到培养皿中置于 20℃下培养 10 d 后,可见丝状体枝端细胞形成卵囊并排出卵(图版 I-H),表明从 2n♀配子体孤雌生殖形成的幼孢子体细胞诱导产生的丝状体是 2n♀配子体。

不同温度对 2n♀配子体诱导率的影响如表 2 所示。20℃下培养 15 d 后便有 4%的藻体形成了 2n♀配子体,30 d 后增加到 46%,60d 后 100%的藻体上都形成了 2n♀配子体,而且藻体上形成的数量普遍较多,有的藻体其形成数量达到细胞总数的 10%以上;15℃下培养 30 d 后形成 2n♀配子体

藻体为 12%,60 d 后增加至 38%,但藻体上形成 2n♀配子体数量明显少于 20℃;10℃下培养 45 d 后只有 5%藻体形成 2n♀配子体,60 d 后形成率仅

表 2 温度对裙带菜 2n♀配子体诱导率的影响
Tab.2 Effects of temperature on the formation rate of 2n female gametophytes

n=50; $\bar{x} \pm SD$; %

温度/℃ temperature	培养时间/d culture time			
	15	30	45	60
10	0	0**	5±1.0**	12±1.5**
15	0	12±0.8**	20±2.0**	38±3.0**
20	4	46±2.0**	72±4.0**	100**

注:同列数据中‘***’表示 3 组之间差异极显著($P<0.01$).
Note: ‘***’show significant difference among the three groups in one column($P<0.01$).

为 12%, 形成时间明显晚于 20℃ 和 15℃, 且藻体上 2n♀配子体形成数量也较少。

2.3 不同藻体长度对诱导率的影响

不同长度藻体对 2n♀配子体的诱导率有明显的影响。从表 3 可以看出, 在相同的培养条件下, 藻体长度 0.5~1.0 cm 组幼孢子体上 2n♀配子体形成最早, 在培养 15 d 后达到 12%, 30 d 后达到 74%, 60 d 后达到 100%; 1.0~2.0 cm 组幼孢子体在培养 15 d 后 2n♀配子体的形成率为 6%, 30 d 后为 45%, 60 d 后达到 72%; 0.2~0.5 cm 组幼孢子体在培养 15 d 后 2n♀配子体形成率为 2%, 30 d 后为 18%, 60d 后仅为 38%, 且集中于较大的个体。结果表明, 0.5~1.0 cm 是诱导产生 2n♀配子体的适宜藻体长度, 大于或小于这个长度, 2n♀配子体的诱导率均降低。

表 3 裙带菜藻体长度对 2n♀配子体诱导率的影响
Tab.3 Effects of sporophytes' length on the formation rate of 2n female gametophytes

藻体长度/cm sporophytes length	培养时间/d culture time			
	15	30	45	60
0.2-0.5	2±0.3**	18±2.0**	26±2.4**	38±2.0**
0.5-1.0	12±2.0**	74±4.0**	88±4.2**	100
1.0-2.0	6±1.5**	45±3.5**	58±3.0**	72±5.0**

注: 同列数据中 ‘**’表示 3 组之间差异极显著(P<0.01).
Note: ‘**’show significant difference among the three groups in one column(P<0.01).

2.4 2n♀配子体成熟与受精

2n♀配子体在切碎 1 周后开始陆续成熟, 显微镜下可见枝端细胞拉长且前端逐渐膨大, 细胞内的原生质向前端膨大处移动后, 细胞基部逐渐出现空腔, 当细胞内的原生质全部移动到细胞前端后成为褐色椭圆形的卵囊, 卵囊成熟后排出卵。经观察, 2n♀配子体的枝端细胞均能发育成卵囊并排出卵, 部分分枝 2n♀配子体上可以形成 4~5 个卵, 卵受精后形成幼孢子体。

2n♀配子体与正常♀配子体的成熟率比较如表 4。切碎培养 10 d 后测定, 2n♀配子体的成熟率为 34%, 15d 后为 84%, 20 d 后达到 100%, 成熟所需时间略长于正常♀配子体。

表 4 裙带菜 2n♀配子体与正常雌配子体成熟率比较
Tab.4 Comparison in maturation rate between 2n and n female gametophyte

组别 group	培养时间/d culture time		
	10	15	20
正常♀配子体 normal female gametophytes	48±2.8	92±3.0	100
2n♀配子体 2n female gametophytes	34±3.6	84±2.2	100

2n♀配子体排出的卵与正常♂配子体放出的精子受精后形成 3n 幼孢子体。经测定, 2n♀配子体排出的卵大多数能够受精, 受精率达 90%以上。

2.5 幼孢子体生长

2n♀配子体排出的卵受精后开始第一次横分裂形成 2 个细胞, 再进行 2 次横分裂形成 5~6 细胞的单列细胞的 3n 幼孢子体, 随后再经过数次细胞的纵横分裂形成多细胞的 3n 幼孢子体(图版 I-I)。刚形成的幼孢子体基部窄, 上部宽呈长圆形, 依靠卵囊袋与 2n♀配子体连接。当幼孢子体长度达到 200 μm 左右时, 可见叶片基部细胞生出数条透明的假根丝向下延伸, 替代卵囊附着在培养皿底面上。

3n 幼孢子体与对照组的生长比较如表 5 所示, 受精 10 d 后 3n 幼孢子体的平均长度为 220 μm, 20 d 后为 840 μm, 培养 30 d 后达到 1.46 mm(图版 I-J), 其藻体形态和生长速度与对照组无明显差异。

生长在维尼纶绳上的 3n 幼孢子体在 20℃ 下生长很快, 培养 1 个月后藻体长度达到 1 mm 以上, 大的藻体长度达到 2 mm。培养 1 个半月后, 藻体平均长度为 3.8 mm, 最大长度达到了 6 mm, 藻体假根、茎、叶片肉眼区分明显, 可分苗进入海区栽培阶段。

表 5 裙带菜 3n 幼孢子体与对照组(2n)藻体长度比较
Tab.5 Comparison in length between 3n and 2n juvenile sporophytes

组别 group	培养时间/d culture time		
	10	20	30
对照 control	0.21±0.03	0.82±0.14	1.40±0.21
3n 幼孢子体 3n juvenile sporophytes	0.22±0.05	0.84±0.12	1.46±0.18

2.6 染色体数目检查

染色后的配子体经显微镜观察,可见到 $2n$ ♀配子体体细胞内的染色体数约为 60 条(图版 I-K),明显多于对照组 n ♀配子体的 30 条(图版 I-L)。

3 讨论

3.1 $2n$ ♀配子体诱导

裙带菜 $3n$ 孢子体的不育特性可使其生长周期延长 1 个半月左右,与正常裙带菜相比藻体大、生长速度快,栽培产量可提高一倍以上,在叶片厚度、光泽和弹性等质量指标方面也均优于正常裙带菜,显示出良好的产业化应用前景^[12]。要使裙带菜三倍体技术达到产业化应用水平,必须解决 $3n$ 孢子体幼苗的大量培育技术,在目前裙带菜配子体采苗和育苗技术已经达到规模化生产水平的情况下,关键是 $2n$ ♀♂配子体的大量获得技术问题,由于目前采用的正常裙带菜幼孢子体切除假根诱导技术可以获得大量的 $2n$ ♂配子体,因此, $2n$ ♀配子体大量获得技术成为制约裙带菜三倍体技术产业化应用的瓶颈问题。

有关裙带菜、海带等经济褐藻类孤雌生殖的研究已有许多报道^[13-16],本研究利用裙带菜♀配子体易孤雌生殖的特点,以室内保存培养的 $2n$ ♀配子体为材料,采用切碎培养的方法,使 $2n$ ♀配子体排出的卵孤雌生殖形成幼孢子体,再通过切除假根的方法从孤雌生殖幼孢子体细胞诱导产生 $2n$ ♀配子体。实验结果表明,该方法诱导产生的 $2n$ ♀配子体切碎培养后成熟率高,与正常♂配子体成熟放出的精子受精后能萌发形成 $3n$ 幼孢子体。与使用正常裙带菜幼孢子体诱导相比,此方法诱导产生的全部是 $2n$ ♀配子体,且形成数量多,表现出明显的易诱导的特点。将 $2n$ ♀配子体连同叶片一起切碎增殖培养,可以在较短的时间内获得大量的 $2n$ ♀配子体,进而从根本上解决 $2n$ ♀配子体难获得的问题,为 $2n$ ♀配子体的大量获得开辟了一条新路。关于孤雌生殖幼孢子体易诱导产生 $2n$ ♀配子体的原因,是否因其藻体本身是孤雌生殖产生的,与正常幼孢子体相比其体细胞更容易诱导产生 $2n$ ♀配子体尚需进行形成机理方面的

研究。

3.2 诱导条件

有关培养温度对 $2n$ ♀♂配子体诱导率的影响已有报道^[7]。本研究发现,从孤雌生殖幼孢子体诱导产生 $2n$ ♀配子体的适温范围较广,在 $10\sim 20^{\circ}\text{C}$ 范围内均能诱导产生,且诱导率和各藻体上形成 $2n$ ♀配子体的数量明显地高于正常裙带菜幼孢子体和其形成的 $2n$ ♀♂配子体,特别是在 20°C 下 $2n$ ♀配子体形成时间早、数量多和诱导率高,显示出适宜偏高温度易培养的特点。本研究也尝试不同光照强度对诱导率的影响实验,其结果发现 $2n$ ♀配子体诱导对光照强度有广泛的适应性,在 $20\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、 $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、 $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 条件下均可形成 $2n$ ♀配子体,不同光照强度对诱导率影响不明显。 $2n$ ♀配子体诱导对温度、光照适应性广的特性为其大量获得提供了便利条件,只要培育出一定数量的孤雌生殖藻体,通过诱导和增殖,在室内培养条件下获得大量 $2n$ ♀配子体是完全可能的。

从诱导效果看,叶片不同部位 $2n$ ♀配子体形成时间和数量有较大差异。通过观察发现,一般老的细胞往往容易形成 $2n$ ♀配子体,通常叶片梢部细胞形成的时间早,数量多;叶片中部 $2n$ ♀配子体的形成时间延后,形成数量也明显少于叶片梢部;叶片基部的新生细胞几乎不形成 $2n$ ♀配子体。表 3 中 $0.2\sim 0.5\text{ cm}$ 组 $2n$ ♀配子体诱导率低可能是新生细胞较多的缘故,至于 $1.0\sim 2.0\text{ cm}$ 组诱导率降低的原因目前尚不清楚,是否因室内培养条件满足不了幼孢子体的生长需求,细胞活力下降,导致 $2n$ ♀配子体诱导率降低还需做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 刘焕亮. 水产养殖学概论[M]. 青岛: 青岛出版社, 2000: 22-33.
- [2] 王昭萍, 王如才, 于瑞海, 等. 多倍体贝类的生物学特性[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(3): 399-404.
- [3] Allen S K Jr, Downing S G L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1986, 102: 197-208.

- [4] 常亚青, 王子臣, 杨旦光. 贝类多倍体育种研究现状[J]. 水产科学, 21(1): 31–36.
- [5] 朱传忠, 邹桂伟. 鱼类多倍体育种技术及其在水产养殖中的应用[J]. 淡水渔业, 2004, 34(3): 53–56.
- [6] Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan [J]. Aquaculture, 2001 (197): 205–228.
- [7] Tiwary B K, Kirubakaranand R, Ray A K. The biology of triploid fish [J]. Rev Fish Biol Fish, 2004 (14): 391–402.
- [8] Negri V, Lemmi G. Effect of selection and temperature stress on the production of 2n gametes in *Lotus tenuis* [J]. Plant Breeding, 1998, 117 (4): 345–349.
- [9] Ollitrault P, Dambier D, Luro F, et al. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus [J]. Plant Breed Rev, 2008(20): 323–354.
- [10] Wendel JF. Genome evolution in polyploids[J]. Plant Mol Biol, 2000(42): 225–249.
- [11] 张泽宇. 裙带菜幼孢子体营养细胞多倍体育种的初步研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 46–48.
- [12] 张泽宇, 李晓丽, 柴宇, 等. 裙带菜 3n、4n 孢子体的人工育苗和海区栽培[J]. 水产学报, 2007, 31 (3): 350–354.
- [13] 方宗熙, 戴继勋, 陈登勤. 裙带菜的孤雌生殖及其后代的遗传特点[J]. 海洋学报, 1979(1): 112–119.
- [14] 戴继勋, 方宗熙. 海带孤雌生殖的初步观察[J]. 遗传学报, 1976, 3 (1): 32–38.
- [15] 戴继勋, 崔竞进, 欧毓麟, 等. 海带孤雌生殖和染色体自然加倍的研究[J]. 海洋学报, 1992, 14 (1): 105–108.
- [16] 白逢伟, 秦松, 李永祺. 海带丝状雌配子体孤雌生殖的初步研究[J]. 海洋科学, 1998, 5: 32–35.

Induction of diploid female gametophytes from the vegetative cells of parthenogenetic juvenile sporophytes in *Undaria pinnatifida*

LI Xiaoli^{1,2}, ZHANG Zeyu², CAO Shuqing², YOU Xuece²

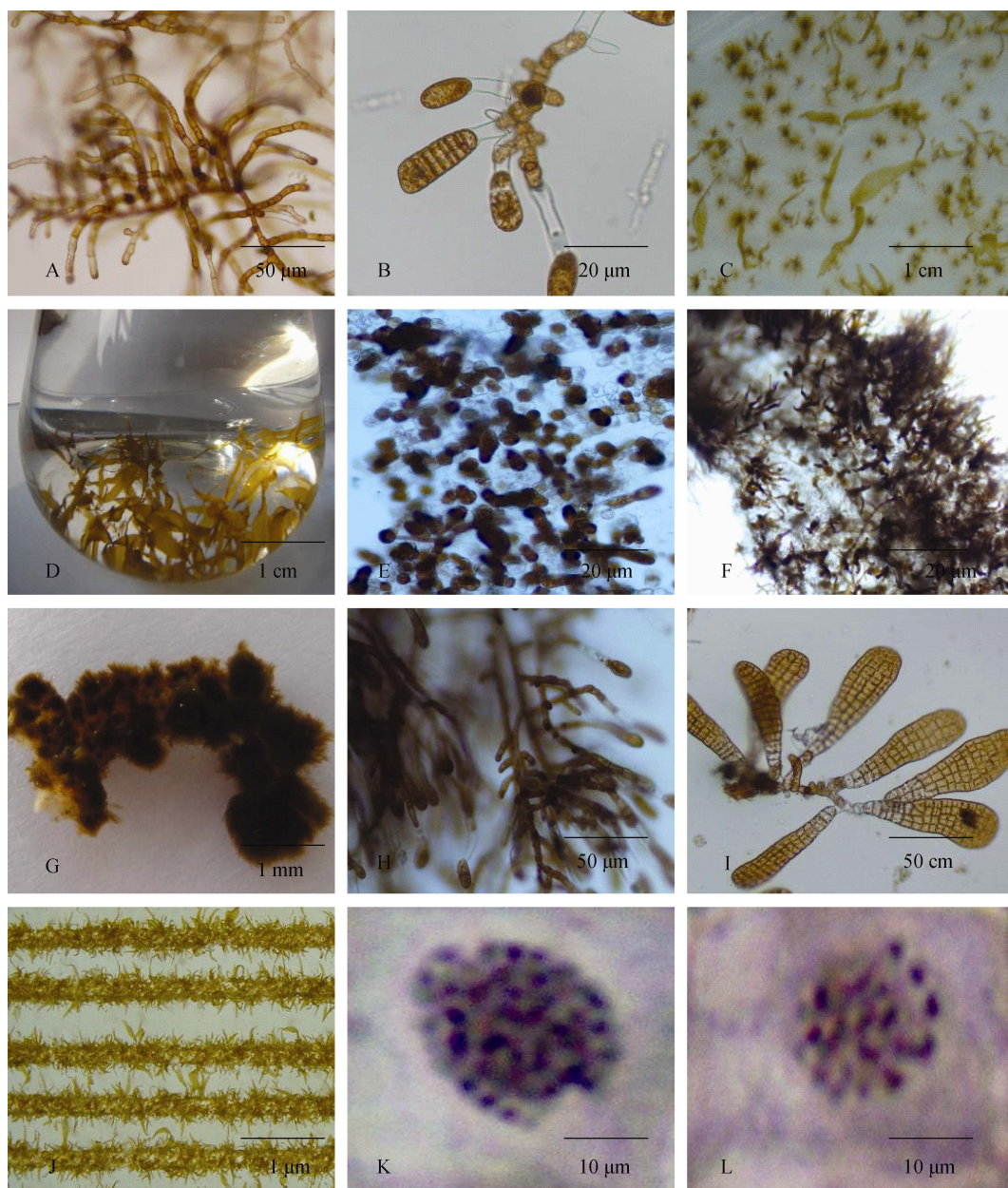
1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Mariculture & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: After being excised into several cells of fragments, the indoor incubated 2n female gametophytes of *Undaria pinnatifida* matured and produced some juvenile sporophytes without fertilization. Then, the 2n female gametophytes were induced from the vegetative cells of the obtained parthenogenetic 2n juvenile sporophytes, which were removed rhizoids and in a 0.5–1.0 cm length. The parthenogenesis rate of the matured 2n female gametophytes reached 8.4% and 7.4% after 20 days of incubation at 20°C and 15°C, respectively, which were both higher than 1% at 10°C. The 2n female gametophytes were induced after incubation for 15 days at 20°C, but for 30 days at 15°C and for 45 days at 10°C. The induction rate of the 2n female gametophytes was 100% at 20°C, but was 38% at 15°C and 12% at 10°C after 60 days of incubation, respectively. The maturation rate of the induced 2n female gametophytes, after being excised into fragments, reached 34% after incubation for 10 days and 100% for 20 days at 20°C, respectively. The 3n juvenile sporophytes were produced by the cross between the induced 2n female gametophyte and the n male gametophyte. In present study a new method of mass production of 2n female gametophytes was founded, which laid a foundation for the scale production of triploid seedlings of *Undaria pinnatifida*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 400–406]

Key words: *Undaria pinnatifida*; parthnogenesis; juvenile sporophytes; 2n female gametophytes

Corresponding author: ZHANG Zeyu. E-mail : zyz@dlou.edu.cn



图版 I 裙带菜孤雌生殖藻体 $2n$ 配子体诱导

A. 室内保存培养的 $2n$ 配子体; B. 未受精卵及 $2n$ 孤雌生殖幼孢子体; C. 培养 30 d 的 $2n$ 孤雌生殖幼孢子体; D. 切根诱导的 $2n$ 孤雌生殖幼孢子体; E. $2n$ 孤雌生殖藻体营养细胞诱导产生 $2n$ 配子体; F. 培养 30 d 后 $2n$ 孤雌生殖藻体表面观; G. 培养 60 d 后形成 $2n$ 配子体藻团的孤雌生殖藻体表面观; H. 诱导产生的 $2n$ 配子体成熟; I. 培养 3 d 后的 $3n$ 幼孢子体; J. 培养 30 d 后的 $3n$ 幼苗; K. $2n$ 配子体染色体; L. n 配子体染色体。

Plate I Induction of $2n$ female gametophytes from the parthenogenetic sporophytes of *Undaria pinnatifida*

A. Indoor cultured $2n$ female gametophytes; B. Unfertilized eggs and $2n$ parthenogenesis juvenile sporophytes; C. 30-day-old $2n$ parthenogenesis juvenile sporophytes; D. $2n$ parthenogenesis juvenile sporophytes with the rhizoids removed; E. Germination of $2n$ female sporophytes from the vegetative cells of $2n$ parthenogenesis juvenile sporophytes; F. Surface view of 30-day-old $2n$ female gametophytes on the frond; G. Surface view of clustered 60-day-old $2n$ female gametophytes on the frond; H. Maturation of induced $2n$ female gametophytes; I. 3-day-old $3n$ juvenile sporophytes; J. 30-day-old $3n$ young seedlings; K. Chromosome of $2n$ female gametophyte; L. Chromosome of n female gametophyte.