

坛紫菜单个体细胞克隆的丝状体途径

曾庆国^{1,2}, 刘必谦³, 杨锐³, 骆其君³, 王亚军³

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 宁波大学 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:用海螺酶解挑选出的具有优良性状的坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)叶状体制备游离的营养细胞,在显微镜下选取单个细胞放入96孔板中进行隔离培养。一部分细胞通过2种发育途径形成了丝状体:一种途径是单细胞生长一段时间产生突起后发育形成丝状体;另一种途径是单细胞先形成愈伤组织,愈伤组织解体放散出类似“孢子”的细胞,“孢子”再发育形成丝状体。将获得的丝状体扩大培养作为纯系并下海养殖。同普通品系相比,选育的品系在产量和质量上表现出一定的优势。在纯系培育方面,由单倍的叶状体细胞发育形成的二倍丝状体,遗传物质一步纯合,后代叶状体个体遗传性状高度一致,可以保证优良经济性状不丢失。这种紫菜纯系培育方法大幅度缩短了纯系培育周期。

关键词:坛紫菜;纯系;单细胞;丝状体

中图分类号:Q942.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0549-05

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国浙闽两省最主要的栽培藻类,浙江栽培坛紫菜有30多年的历史,但一直没有较系统、全面地开展优良品种的遗传选育工作。所以近几年在浙闽两省都发生了大面积栽培坛紫菜烂菜、脱苗现象,其中种质退化是主要原因之一。研究发现,坛紫菜遗传变异十分丰富,多态位点高达96.97%^[1]。在遗传物质高度异质化情况下,群体中的优良基因因自然状态下的自由交配,很难得到纯合,生产上表现出经济性状不稳定。因此,培育具优良经济性状、又能稳定遗传的栽培坛紫菜纯系,有望成为解决栽培坛紫菜烂菜、脱苗的有效方法。

近十多年来国内外研究者进行了许多紫菜体细胞培养的工作,重点在培养方法和形态发生^[2-7],也有用体细胞进行直接育苗的^[8-10]。由于紫菜叶片是嵌合的,所以利用叶片组织进行纯系培育获得的纯系周期长^[11-12]。到目前为止,还没有利用单个营养细胞进行紫菜纯系培育的报道。本研究采用在96孔酶标板培养坛紫菜单个细胞,解决了培养过程中水分蒸发、培养基盐度升高使细胞的生长受到抑制的问题,对培养细胞的观察也很方便,在细胞水平上为紫菜纯合育种研究建立了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

坛紫菜叶状体2001年末和2002年初选采于浙江象山养殖网筏上。选取的叶片长度为15~20 cm,阴干后冷藏于-20℃冰箱中备用。酶解前将叶片浸于消毒海水中,室温复苏2~4 d。为了排除果孢子囊或受精细胞对实验结果的影响,实验中尽量选用雄叶片或没有成熟的小叶片,并切去边缘部分。

1.2 酶解

实验用海螺酶参照唐延林^[3]的方法制备。酶解时用2 mol/L葡萄糖加原酶配成酶解液。将刷洗干净的叶片剪成1 mm²碎片,加入适量酶解液,室温下酶解。出现一定数量的游离细胞后停止酶解。用添加N、P的营养海水(N 10 mg/L, P 0.4 mg/L)于350目纱绢上冲洗酶解液,滤液500 r/min离心5 min,沉淀用营养海水溶解。重复3次。

1.3 培养

Olympus IX70倒置显微镜下用毛细管挑选单细胞,置96孔板中,一个孔中放置一个细胞。加入一定量的N、P培养基,用封口膜盖住酶标板以减少水分蒸发。放入光照培养箱中20℃,光时12 L:

收稿日期:2003-08-22; 修订日期:2004-02-20。

基金项目:国家自然科学基金(49976030);宁波市重点基金(02J20101-15)。

作者简介:曾庆国(1977-),男,硕士研究生,研究方向:遗传育种。

通讯作者:刘必谦, E-mail: lbqhy@nbu.edu.cn

12 D, 光强 1 500 ~ 2 000 lx 培养。每 3 ~ 5 d 添加 1 次培养基, 并观察细胞发育情况。形成的丝状体, 在培养一定时间后, 移入三角烧瓶中扩大培养。

2 结果

刚酶解游离的细胞直径在 15 ~ 25 μm , 星状色素体不明显, 胞体呈现灰黑色。培养 3 ~ 4 d 后, 少部分细胞逐渐恢复各种生理机能, 在光镜下表现为细胞壁明显加厚, 色素体变浓, 胞质饱满充盈, 胞体颜色转变为红色(图版 I - 1), 有的细胞已分裂 1 次, 这样的细胞已进入了良好的生长发育途径。但大多数细胞已经或将死亡。存活细胞再经过 1 ~ 2 周的发育, 细胞壁中的细胞质更加浓厚, 并出现了层状结构, 颜色深红, 胞体也由最初的 15 ~ 25 μm 长大到 30 ~ 45 μm 。

存活细胞发育分化的途径有 3 种: 形成丝状体、形成叶状体和形成愈伤组织。本研究探讨发育成丝状体的情况。单细胞有 2 种发育形成丝状体的途径: 单细胞直接形成丝状体和单细胞先形成愈伤组织, 愈伤组织再发育形成丝状体。在第 1 种发育途径中, 又有 2 种情况。第 1 种类型细胞的胞质出现了分化: 一部分颜色变成黄色, 最终色素消失变白; 而另一部分的色素体颜色为深红, 细胞体在深红处向外发生突起丝状体(图版 I - 2)。最初突起的数目较少, 后来逐渐增多。单一线状丝状体随着长度的增长, 其上出现分支。1 个月, 在小孔底部就可观察到红色的丝状体团。第 2 种类型细胞的细胞质不产生分化, 从分布均匀的红色胞质中产生出突起。突起的数目较第 1 种类型多, 但其中也有差异, 一些

细胞发育形成的突起粗, 数目相对少些, 另一些细胞产生的突起细, 但数量多些。

本实验中还观察到极个别单细胞可以形成一种类似于膨大细胞的结构。这种结构有的与丝状体同步发生(图版 I - 3), 有的细胞仅形成这种结构。这些结构有的最终死亡解体, 有的是被长大的丝状体掩盖无法再观察到。

有的单细胞先分裂形成愈伤组织, 愈伤组织发育到一定阶段后, 其细胞全部破裂, 释放出比营养细胞个体还要小的细胞, 姑且称之为“类孢子”(图版 I - 4)。这些“类孢子”有的萌发成叶状体, 有些萌发成丝状体。不过这种丝状体, 在与单细胞形成的丝状体相同的条件下培养, 很容易死亡。也有的愈伤组织不发生破裂, 直接从细胞团内伸出突起。

作为对照, 进行了果孢子细胞培养。果孢子囊放散的果孢子为圆形, 直径在 14 ~ 16 μm , 其萌发方式为单极产生突起(图版 I - 5)。雌性叶状体边缘细胞在培养一段时间后, 细胞破裂放散出类似果孢子的圆形“孢子”, 萌发方式同果孢子相似。

培育出的纯合丝状体, 再经过几个月的扩大培养后, 直接接种于贝壳。然后采壳孢子苗的网帘进入海区试养。2002 年在宁波象山鹤浦镇进行了 5 个纯系的海区试养, 其中 4 个品系表现出一些优良性状。在同一海区养殖中, 未经选育的普通种, 因脱苗导致大量的“白网”, 而选育出的纯系, 在采苗时间和生长条件都相同的情况下, 附网密度高, 纯系采收 5 ~ 6 次后的叶片品质与普通种采收 1 ~ 2 次的品质相当。因此在产量和产值上, 选育的纯合品系表现出明显的优势(表 1)。

表 1 不同品系的叶状体产量比较

Table 1 Comparison of blade output among different lines

(kg/hm², DW)

收获顺序 Harvesting order	品系 Line					
	纯系 1 Line 1	纯系 2 Line 2	纯系 3 Line 3	纯系 4 Line 4	纯系 5 Line 5	对照品系 Control
第 1 次 First	297.0	337.0	337.0	363.0	432.0	312.0
第 2 次 Second	378.0	324.0	363.0	351.0	459.0	318.0
第 3 次 Third	337.0	445.0	432.0	350.0	432.0	351.0
第 4 次 Fourth	432.0	283.0	418.0	350.0	445.0	405.0
第 5 次 Fifth	189.0	351.0	337.0	391.0	472.0	262.0
合计 Total	1 633.0	1 740.0	1 887.0	1 805.0	2 240.0	1 648.0

3 讨论

自从20世纪80年代初,在紫菜上证明了细胞全能性以后,20多年来国内外学者进行了一些紫菜体细胞的培养研究。其中王素娟^[7-8]、戴继勋^[10]等进行了酶解紫菜体细胞直接附网养殖的相关研究,但主要研究体细胞培养发育形成叶状体,对丝状体的形态发生涉及的较少。汤晓荣等^[12]对条纹紫菜和半叶紫菜华北变种的组织培养实验表明,体细胞具有孤性生殖而完成世代交替的能力。

单细胞克隆培养在高等植物培养中已有许多成功的报道,但在大型海藻中报道较少^[13]。最初本实验曾用悬滴法培养,但由于水分蒸发而使培养基盐度升高,导致细胞死亡。采用96孔酶标板培养有几个方面的优点:相对于悬滴培养来说,培养液体积得到扩大,可以有效防止水分蒸发;酶标板孔具有较好的透光性,直接可以进行镜检;单个小孔很容易从整个板中被分离下来,而不会对孔中的丝状体或其他孔带来任何影响。

果孢子萌发方式为单极产生突起,这与营养细胞以多极萌发方式形成丝状体不同。培养的雌性叶状体边缘细胞放散出“孢子”的现象,推测这种细胞已受精,但尚未发育到果孢子囊阶段。体细胞培养过程中,愈伤组织可以放散,但没有观察到单个营养细胞放散。所以细胞大小、发育和萌发方式可以作为区分营养细胞和性细胞发育成丝状体的依据。

费修缙^[11]培育紫菜纯系的方法是首先从叶片上取一块未发育的小藻体,隔离培育出丝状体。由于紫菜叶片细胞是嵌合的,所以这种丝状体要再经过几年时间的进一步筛选,然后作为纯种保存。费修缙也认为,严格意义上的克隆培养,应该是从单个营养细胞开始,但需要时间长,工作量大和难度大。坛紫菜叶状体体细胞遗传物质是单倍的,由它们形成的丝状体是二倍的,加倍来的遗传物质只能是原

有遗传物质的拷贝,由这种丝状体再形成的新一代叶状体,保持了与原叶片遗传物质的高度一致。所以本研究采用单个体细胞(n)隔离培养,发育成丝状体(2n),一步培育出遗传物质高度纯合的坛紫菜无性纯合系。这种紫菜纯系培育方法,操作简单,不仅缩短了培育周期,而且纯合程度高,优良性状稳定可靠。

参考文献:

- [1] 杨锐,刘必谦,骆其君,等.利用扩增片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异[J].高技术通讯,2002(1):83-86.
- [2] 赵焕登,张学成.条纹紫菜 *Porphyra yezoensis* Ueda 营养细胞的分离和培养[J].山东海洋学院学报,1981,11(1):62-65.
- [3] 唐延林.紫菜营养细胞和原生质体的培养[J].山东海洋学院学报,1982,12(4):37-50.
- [4] Saga N Bot. Isolation of protoplasts from edible seaweeds[J]. Mag Tokyo, 1984, 97: 423-427.
- [5] Polne-Fuller M, Gibor A. Development studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion and protoplast regeneration [J]. J Phycol, 1984, 20: 609-619.
- [6] Chen L C-M. Botanica Marina, protoplast morphogenesis of *Porphyra Leucosticta* in culture [J]. Botanica Marina, 1987, 30: 399-403.
- [7] 王素娟.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J].海洋与湖泊,1986,17(3):217-224.
- [8] 王素娟.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 II.直接育苗下海养殖的研究[J].海洋科学,1987,11(1):61-65.
- [9] 方宗熙,戴继勋.紫菜细胞的酶法分离和在水产养殖中的应用[J].海洋科学,1986,10(3):46-47.
- [10] 戴继勋.紫菜叶状体细胞的酶法分离及其养殖研究[J].生物工程学报,1988,4(2):133-137.
- [11] 费修缙.经济海藻种质种苗生物学[M].济南:山东科学技术出版社,1999.50-90.
- [12] 汤晓荣,费修缙.海洋生物技术新进展[M].北京:海洋出版社,1999.344-353.
- [13] 严兴洪.坛紫菜体细胞的连续克隆培养和悬滴培养[J].水产学报,1990,14(4):336-339.

Morphogeny of conchocelis thalli from single somatic cell clone cultivation of *Porphyra haitanensis*

ZENG Qing-guo^{1,2}, LIU Bi-qian³, YANG Rui³, LUO Qi-jun³, WANG Ya-jun³

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Key Laboratory of Ocean Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The release of free-living vegetative cells were successfully achieved by enzymolysis of *Porphyra haitanensis* fronds. The fronds with good configuration, such as color and length, were selected from field net in Xiangshan, Zhejiang Province. The blades were dried in darkness at room temperature and stored at -20°C . Before experiment, the fronds were taken out and immersed into seawater for two or four days to make cell retrieve activity. After enzymolysis, single somatic cells were picked out into 96 well microplates under invert microscope, with the help of capillary tube. Then single cell was cultivated at 20°C , 12L:12D and light density 1 500–2 000 lx. The medium was refreshed after 3 to 5 d.

The development of somatic cells was observed continuously and described as follows: in the procedure of cultivation, majority of cells died only except a small portion of the somatic cell which can develop into conchocelis thallus, blade and calluse-like cell group.

Conchocelis thalli can be formed through two routes: in the first case, single somatic cell produced pustules from some parts of the cell, then these pustules elongated and produced forks, finally grew into conchocelis thalli. In this case, some cells only produced pustules from the parts where pigments concentrated, and the others produced pustules too, but cytoplasm color change couldn't be observed under microscope. In the second case, somatic cell formed callus-like cell group primarily. After cultivated for some time, the callus-like cell group disintegrated and released spore-like cells. These "spores" developed into conchocelis thalli, while a few spore-like cells germinated into small blades. But some cell groups didn't break, just formed conchocelis thalli from the live cells in the cell-group. In order to distinguish the development of somatic cell from sexual cell (carpogonium and carpospore), single marginal cells of female blade were cultivated as the method as somatic cell cultivation. The results showed that it was effective to differentiate somatic cell and carpospore by the size and germinating fashion. It was important for the establishment of pure line diploid conchocelis.

After three months or more, these conchocelis thalli produced from single cell, as pure lines, were cultivated largely through suspension cultivation method to multiplied, and further cultured the same as the traditional mariculture. Comparing with un-selected line, the pure lines showed some superior traits, including the output of blades and other economic characters.

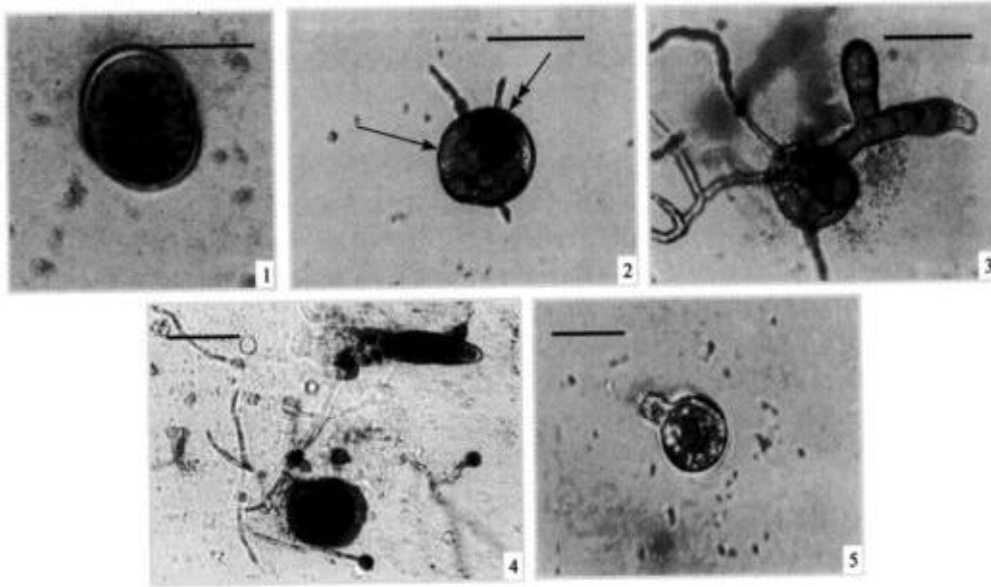
On the point of pure line establishment, from haploid blade cell to diploid conchocelis thallus, the origin genetic material was reduplicated directly. So this cultivation method gives a guarantee to descendant blades to possess high similarity in genetic background. This technique has two conceivable advantages which are preventing the loss of desired economic characteristics and shortening the cultivating time compared with traditional pure line establishment method.

Key words: *Porphyra haitanensis*; pure line; single cell; conchocelis thalli

Corresponding author: LIU Bi-qian. E-mail: lbqhy@nbu.edu.cn

曾庆国等:坛紫菜单个体细胞克隆的丝状体途径

ZENG Qing-guo et al: Morphogeny of conchocelis thalli from single somatic cell clone cultivation of *Porphyra haitanensis*



图版 I

1. 培养 3 天的细胞, 标尺 = 25 μm ;
2. 部分胞质成黄色(单箭头), 红色胞质(双箭头)处形成丝状体, 标尺 = 50 μm ;
3. 类膨大细胞结构, 标尺 = 50 μm ;
4. 愈伤组织放散细胞形成的叶状体和丝状体, 标尺 = 50 μm ;
5. 果孢子单极萌发形式形成丝状体, 标尺 = 20 μm .

Plate I

1. The cell cultivated for three days, bar = 25 μm .
2. Some cytoplasm became yellow(single arrow); conchocelis were generated at red cytoplasm(double arrow), bar = 50 μm .
3. Cystite-like cell. bar = 50 μm .
4. Cell callus are broken and released spores grew into conchocelis and blade. bar = 50 μm .
5. Carpospore formed conchocelia by monoploar germination. bar = 20 μm .