

紫外线辐射与条斑紫菜原生质体后代 发育和变异

严兴洪

(上海水产大学水产养殖系, 200090)

提 要 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)原生质体被紫外线照射后,其后代的发育、形态和色彩均发生较大的变异。低剂量辐射对原生质体后代的发育和生长有促进作用,高剂量辐射对原生质体后代发育有抑制作用。原生质体经秋水仙碱和紫外线混合处理后,后代生长加快更加显著。同时产生较多的形态和色彩变异体。经秋水仙碱处理后的原生质体及其后代对紫外线辐射有较强的抗性,这种抗性随着秋水仙碱的浓度增高而增加。

关键词 紫外线,原生质体,发育,变异

近十年来,紫菜原生质体分离和培养的基础和应用研究取得长足的进展^[1,2,3,7,9,11]。Polne-Fuller等(1986)曾提出对紫菜等海藻单离细胞和原生质体进行遗传改良,筛选优良品种^[10]。严兴洪,王素娟(1990)对坛紫菜、条斑紫菜体细胞和原生质体进行诱变处理,获得了一些形态和色彩的变异体。戴继勋等(1990)对条斑紫菜原生质体进行了诱变处理。紫外线辐射对高等植物具强烈的生物学效应,在农业上运用紫外线辐射促进植物生长,进行育种等方面的研究已报道很多^[6]。本文用紫外线诱变处理条斑紫菜原生质体,旨在筛选有用的突变体。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

材料 I 条斑紫菜叶状体采自江苏吕泗海边。种藻采集阴干后,用塑料袋密封包装好,藏于-20℃的冰箱内备用。酶解前种藻处理同文献[3]。

材料 II 酶离出的原生质体用不同浓度的秋水仙碱处理,或先以秋水仙碱处理,再经紫外线辐射(4min),培养 95 天,原生质体苗长度达 0.5-1.5cm,从中选出个体较大的苗,再用于酶离原生质体。

1.2 酶、培养基、原生质体分离

1.2.1 酶液

自制细菌酶液中加 0.8M 甘露醇和 2.0%的纤维素酶(R-10)。

1.2.2 培养基

用 MES 培养基^[1],比重为 1.025。

1.2.3 原生质体分离和培养

每 10ml 酶液加 0.6g 鲜重的紫菜叶片, 黑暗酶解, 在 26℃ 保温 2.5–3.0h 后, 用 200 目尼龙筛绢将原生质体过滤出来, 离心(500rpm, 5min), 除去上清酶液, 在沉淀原生质体中加入比重为 1.034 的培养液悬浮原生质体, 再离心(500rpm, 5min)。依此法再洗涤原生质体 2 次, 制成原生质体悬浮液。培养原生质体的第一天加比重为 1.034 的 MES 培养液, 第二天加入适量的比重为 1.025 的 MES 培养液。第四天全部换成比重为 1.025 的培养液。以后每隔 5 天换一次培养液, 培养 20 天后每隔 2–3 天换一次培养液。

1.3 试验方法

1.3.1 不同剂量的紫外线辐射试验

培养的第 4 天照射紫外线。辐射剂量分 1/6, 1/2, 1, 2, 4min 五个级别, 紫外光源用 30W、220V 的紫外灯, 照距 5cm。照射前吸干培养液, 照射后, 加入新培养液。黑暗培养 24h 后, 恢复正常光照培养。培养温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 光强 2000–2200lx, 光周期 12:12 LD。

1.3.2 秋水仙碱和紫外线混合处理试验

A 组原生质体单经秋水仙碱处理。6 个处理组分别加含 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 和 0.8% 的秋水仙碱和 1.5% 二甲亚砜(DMSO)混合液, 处理 24h。B 组 6 个处理组的原生质体先分别被与 A 组相同浓度的秋水仙碱处理 24h, 培养 2 天后照射紫外线(2min)。培养条件同上。

1.3.3 原生质体对紫外线的抗性试验

单经秋水仙碱或经秋水仙碱和紫外线混合处理的原生质体所长成的苗, 再次被酶解出原生质体。所得各组原生质体, 取一部分培养后观察原生质体发育, 另一部分用于第二次紫外照射, 观察它们对紫外线的抗性, 照射 3min。

2 结果与分析

2.1 不同剂量的紫外线照射对原生质体后代生长发育和变异的影响

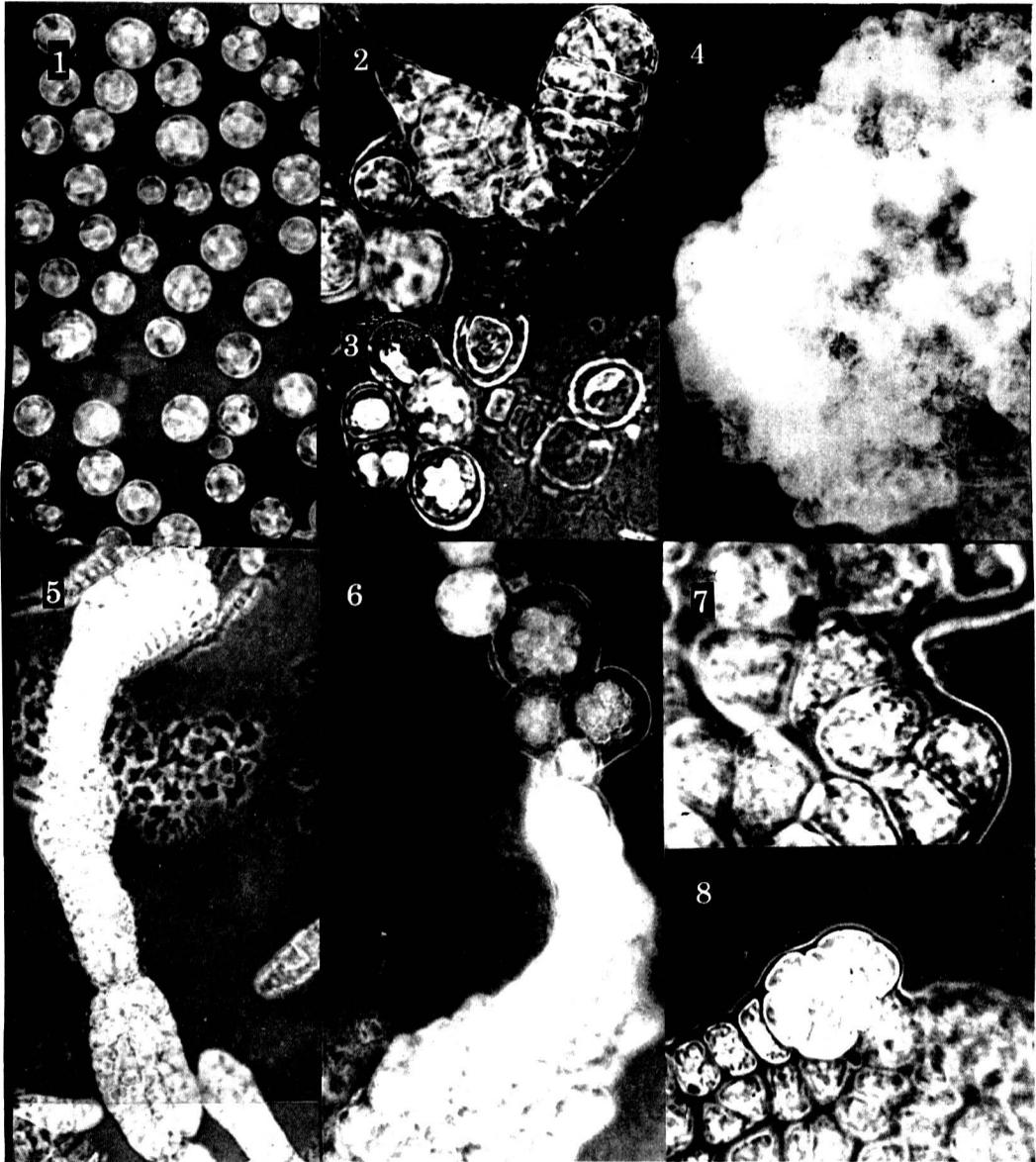
2.1.1 不同剂量的紫外线照射与原生质体的存活和分裂

辐射培养 6 天, 原生质体的存活和分裂情况如表 1。照射 1/6 和 1/2min 对细胞分裂和发育有一定的促进作用; 照射 1min 以上则会抑制细胞分裂和发育, 同时使成活率急

表 1 不同剂量的紫外线照射与原生质体的存活和分裂

Table 1 The survival and cell division of protoplast progenies irradiated by UV in different doses

| 照射剂量 (min) | 个 体(%) | | | | 检查个体 总数(个) | 成活率(%) | 相对成活率 (与对照组) (%) | t 值 (与对照组) |
|---------------|--------|-------|-------|-------|---------------|--------|------------------------|---------------|
| | 单细胞 | 双细胞 | 多细胞团 | 幼苗 | | | | |
| 对照组 | 38.23 | 33.62 | 20.21 | 8.14 | 3073 | 37.55 | 100.00 | |
| 1/6 | 38.80 | 26.89 | 23.31 | 11.00 | 1982 | 24.80 | 66.01 | 12.27 |
| 1/2 | 31.05 | 22.07 | 41.50 | 5.27 | 1024 | 12.79 | 34.06 | 20.66 |
| 1 | 46.38 | 39.16 | 11.45 | 3.01 | 166 | 1.90 | 5.05 | 29.34 |
| 2 | 55.54 | 22.73 | 22.72 | 0.00 | 22 | 0.26 | 0.69 | 30.51 |
| 4 | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 2 | 0.012 | 0.03 | 30.28 |



图版 紫外线辐射对条斑紫菜原生质体后代发育和变异的影响

Plate The effect of UV-irradiation on the development and variation of protoplast progenies in *P. yezoensis*.

1 刚分裂的原生质体 2 辐射10秒钟的原生质体后代 3 辐射4分钟的原生质体后代 4 团扇状畸形苗 5 结节状的苗 6 具特大细胞的苗 7 具重叠细胞的苗(箭头所示) 8 具“肿瘤”的苗

剧下降。用 t 检验法^[5]检验各照射组和对照组间成活率差异的显著性(表 1), 其差异均达到很显著的水平(显著性水平都小于 0.001), 并且随着辐射剂量增加, 成活率急剧下降。

2.1.2 紫外线照射与原生质体后代的发育和变异

经辐射后, 原生质体大量死亡。高剂量(4min)照射后, 原生质体再生细胞和发育至多个细胞的细胞团或幼苗, 均出现色素体收缩, 细胞质变薄, 呈浅黄紫色(图版-1, 2, 3), 10 天后, 细胞解体。高剂量的紫外辐射使细胞质呈不可逆性凝固, 这与高等植物中的情况是一致的^[6]。

照射后的原生质体所长成的苗, 细胞排列不规则, 畸形苗明显增多, 其百分率与辐射剂量呈正相关关系。有的畸畸形苗呈团块状(图版-4); 有的中间缢缩成结节状(图版-5), 有的出现异常大的细胞, 最大的直径达 50 μm , 而正常细胞直径为 10-20 μm (图版-6); 还有的呈三叶状, 有的苗中有双层细胞重叠的现象出现(图版-7)。

经照射后, 原生质体后代的色彩产生较大差异。辐射后的 10 天内, 细胞颜色变浅, 以后颜色逐渐变深, 呈红紫色, 比对照组苗色明显偏红。出现一些纯红色变异体, 它们整个叶片呈浅红色, 由它们释放的单孢子所长成的苗仍呈红色。

2.1.3 紫外线辐射对原生质体苗生长的影响

辐射后培养 17 天, 苗生长情况如表 2。低剂量辐射对苗生长有促进作用, 高剂量辐射抑制苗生长。

表 2 紫外线辐射对原生质体苗生长的影响

Table 2 The effect of UV-irradiation on the growth of buds regenerated from protoplasts

| 辐射剂量 (min) | 测定幼苗数 (株) | 幼苗平均体长 \pm 标准差 (μm) | 体长范围 (μm) | 平均每个视 野幼苗数(株) (10X) |
|---------------|--------------|--|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 50 | 232.80 \pm 46.11 | 200-386 | 43.95 |
| 1/6 | 50 | 282.22 \pm 90.15 | 210-581 | 34.85 |
| 1/2 | 50 | 208.24 \pm 35.81 | 163-294 | 31.70 |
| 1 | 50 | 200.76 \pm 33.70 | 159-298 | 5.44 |
| 2 | 50 | 129.98 \pm 39.30 | 71-239 | 0.45 |
| 4 | 50 | 142.34 \pm 53.74 | 71-294 | 0.40 |

2.1.4 紫外线辐射对原生质体苗长宽比值的影响

照射后的原生质体苗, 培养 35 天, 其长宽比值如表 3。随着辐射剂量增加, 长宽比值变小。方差分析检验显示不同剂量的紫外线辐射对苗长宽比值的影响达到非常显著的水平。

2.2 秋水仙碱和紫外线混合处理对条斑紫菜原生质体生长发育的影响

2.2.1 秋水仙碱和紫外线混合处理对原生质体后代存活和生长的影响

经秋水仙碱和紫外线混合处理后培养 10 天的存活情况见表 4。在单纯经秋水仙碱处理的 A₁-A₈ 组中, 随秋水仙碱浓度升高, 个体成活率下降。在经秋水仙碱和紫外线混合处理的 B₁-B₈ 组中, 各组成活率均比对应的 A₁-A₈ 各组要低, 但随秋水仙碱浓度增加, 成活率逐步升高。秋水仙碱处理提高了原生质体后代对紫外线的抗性。从相对成活率倍数上看,

表 3 紫外线辐射对原生质体苗长宽比值的影响

Table 3 The effect of UV-irradiation on the length-width ratio of buds regenerated from protoplasts

| 辐射剂量 (min) | 测定幼苗数 (株) | 长宽比值 | |
|---------------|--------------|-----------|-----------|
| | | 平均值±标准差 | 范围 |
| 对照组 | 50 | 4.68±1.34 | 1.97-9.17 |
| 1/6 | 50 | 3.92±1.32 | 1.72-6.69 |
| 1/2 | 50 | 2.90±1.07 | 1.71-6.68 |
| 1 | 50 | 2.35±1.02 | 0.90-5.18 |
| 2 | 50 | 1.81±0.73 | 1.01-4.48 |
| 4 | 50 | 1.82±0.70 | 0.97-3.95 |

B₃ 组比 A₃ 组, B₇ 组比 A₇ 组, B₈ 组比 A₈ 组分别提高了 4.3、33 和 53.5 倍; 方差分析表明, 降低成活率的主要因素是紫外线, 而不是秋水仙碱。t 检验法检验表明, B 组中各处理组与对照组间成活率差异均达到显著性水平(表 4), 其中经 0.1-0.8% 的秋水仙碱处理过的各组达到非常显著的水平。这说明紫外线和秋水仙碱混合处理后, 由于秋水仙碱增强了原生质体对紫外线的抗性而提高了成活率。

表 4 秋水仙碱紫外线混合处理对原生质体成活的影响

Table 4 The effects of colchicine and UV on the survival of protoplasts

| 秋水仙碱 浓度 (%) | 未经 UV 照射 | | | 经 UV 照射(2 min) | | | | |
|-------------------|----------------|------------|--------------|----------------|------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 组别 | 成活率 (%) | 相对成活率 (%) | 组别 | 成活率 (%) | 相对成活率 (%) | t 值 (与 B ₁ 组 对比) | t 值 (与 B ₂ 组 对比) |
| MES | A ₁ | 53.50 | 100.00 | B ₁ | 0.55 | 100.00 | | |
| MESD | A ₂ | 44.18 | 82.25 | B ₂ | 0.43 | 78.18 | 0.45 | |
| 0.025 | A ₃ | 26.21 | 48.92 | B ₃ | 1.10 | 200.00 | 1.85 | 1.89 |
| 0.05 | A ₄ | 33.07 | 61.72 | B ₄ | 1.57 | 285.45 | 2.98 | 2.85 |
| 0.1 | A ₅ | 34.91 | 65.52 | B ₅ | 3.16 | 629.09 | 6.36 | 5.64 |
| 0.2 | A ₆ | 33.16 | 61.89 | B ₆ | 4.14 | 752.73 | 7.05 | 6.39 |
| 0.4 | A ₇ | 24.58 | 45.88 | B ₇ | 8.43 | 1516.36 | 10.22 | 9.94 |
| 0.8 | A ₈ | 29.10 | 54.31 | B ₈ | 15.99 | 2907.07 | 16.16 | 14.99 |

单纯经秋水仙碱处理或经秋水仙碱和紫外线混合处理的原生质体所长成的苗称 R₁ 代苗, 用 R₁ 代苗再次酶离出的原生质体所长成的苗称 R₂ 代苗。R₂ 代苗培养至第 19 天和 33 天, 生长情况列入表 5。R₁ 代经秋水仙碱和紫外线双因子处理的 D₁₂-D₁₆ 组中, 培养 33 天 R₂ 代苗的平均体长比 C₀₂-C₀₆ 各对应组和 D₁₁ 对应组均大。方差分析表明, 紫外线对 R₂ 代苗的促生长作用达到很显著水平, 而秋水仙碱的促生长作用相比之下就不明显, 说明促进 R₂ 代苗生长的主要因素是紫外线, 而不是秋水仙碱。但秋水仙碱和紫外线混合处理, 对 R₂

代苗的生长存在交互、协同、相加的促进效应。在 R_1 代和 R_2 代苗中发现生长速度明显快于野生型的细长变异体。培养 33 天, 变异体平均体长达 $1076.6\mu\text{m}$, 而野生型只有 $696.5\mu\text{m}$, 两者差 $380\mu\text{m}$; 最大个体间差 $1450\mu\text{m}$ 。

2.2.2 紫外线辐射对二次分离的原生质体存活的影响

从 R_1 代苗中再酶离出原生质体(P_2), 培养 5 天后紫外线辐射 3min, 再培养 9 天, 其存活情况见表 6。原生质体(p_1)经过紫外线和秋水仙碱混合处理过的 D_{21} – D_{26} 各组中, R_2 代成

表 5 秋水仙碱和紫外线混合处理对 R_2 代苗生长的影响

Table 5 The effects of UV and colchicine on the growth of R_2 progenies

| 秋水仙碱处理 浓度(%) and 紫 外线(4min) | 组别 | 19 天体长平 均值±标准差 (μm) | 33 天体长平 均值±标准差 (μm) | 体长增长 (μm) | 培养天数 (天) | 生长速度 ($\mu\text{m}/\text{天}$) | 每个视野 幼苗数 |
|-----------------------------------|----------|--|--|---------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|
| MES | C_{01} | 416.52 ± 42.73 | 582.84 ± 90.14 | 166.32 | 14 | 11.88 | 42.95 |
| 0.025 | C_{02} | 430.60 ± 76.05 | 649.18 ± 98.34 | 218.58 | 14 | 15.61 | 24.20 |
| 0.05 | C_{03} | 442.58 ± 70.63 | 734.13 ± 87.97 | 271.26 | 15 | 18.08 | 35.00 |
| 0.1 | C_{04} | 460.54 ± 69.03 | 729.53 ± 87.21 | 273.59 | 15 | 18.24 | 31.30 |
| 0.2 | C_{05} | 289.46 ± 27.99 | 572.58 ± 92.89 | 283.12 | 14 | 20.22 | 33.65 |
| 0.4 | C_{06} | 293.42 ± 79.91 | | | | | |
| MES+UV | D_{11} | 266.28 ± 53.10 | 519.98 ± 80.91 | 253.70 | 14 | 18.12 | 24.15 |
| 0.025+UV | D_{12} | 329.86 ± 78.06 | 1023.38 ± 162.6 | 693.52 | 14 | 49.54 | 21.25 |
| 0.05+UV | D_{13} | 272.30 ± 87.64 | 843.00 ± 150.96 | 570.70 | 14 | 40.76 | 26.45 |
| 0.1+UV | D_{14} | 294.42 ± 49.21 | 961.78 ± 237.75 | 667.36 | 14 | 47.67 | 23.30 |
| 0.2+UV | D_{15} | 310.50 ± 53.16 | 936.72 ± 195.69 | 626.22 | 14 | 41.75 | 32.60 |
| 0.4+UV | D_{16} | 308.98 ± 67.56 | 1160.62 ± 158.37 | 851.64 | 15 | 56.78 | 33.80 |

活率比原生质体(P_1)单经秋水仙碱处理的 C_{11} – C_{16} 各对应组高出 2–6 倍。方差分析结果显示, 原生质体(P_1)经紫外线辐射后, 对于提高其后代原生质体(P_2)对紫外辐射的抗性有显著的影响; 秋水仙碱处理原生质体(P_1), 对提高后代原生质体(P_2)对紫外线的抗性作用不太显著。

表 6 原生质体(P_2)对紫外线辐射的抗性

Table 6 The resistance of protoplasts (P_2) to UV-irradiation

| 秋水仙碱 处理浓度 (%) | P_1 代原生质体未经 UV 辐射 | | | | P_1 代原生质体经过 UV 辐射(2min) | | | |
|---------------------|---------------------|------------|--------------|---------------------------|---------------------------|------------|--------------|---------------------------|
| | 组别 | 成活率 (%) | 检查视野数 (个) | t 值 (与 C_{11} 对比) | 组别 | 成活率 (%) | 检查视野数 (个) | t 值 (与 D_{21} 对比) |
| MES | C_{11} | 4.63 | 100 | | D_{21} | 16.46 | 100 | |
| 0.025 | C_{12} | 4.40 | 100 | 0.26 | D_{22} | 18.75 | 100 | 0.91 |
| 0.05 | C_{13} | 5.18 | 100 | 0.66 | D_{23} | 17.80 | 100 | 0.82 |
| 0.1 | C_{14} | 4.02 | 100 | 0.71 | D_{24} | 18.02 | 100 | 0.87 |
| 0.2 | C_{15} | 5.36 | 100 | 0.85 | D_{25} | 12.04 | 100 | 2.96 |
| 0.4 | C_{16} | 8.90 | 100 | 4.90 | D_{26} | 34.31 | 100 | 6.45 |

3 讨论

条斑紫菜原生质体对紫外线辐射较敏感。高剂量辐射会抑制原生质体后代发育, 而低剂量辐射对其有促进作用。秋水仙碱对原生质体具毒害作用, 但它与紫外线混合作用于原生质体, 成活率反而随秋水仙碱浓度的提高而增高, 说明秋水仙碱提高了原生质体对紫外线辐射的抗性。经秋水仙碱处理的原生质体(P_1)及其长成的 R_1 代苗所酶离出的原生质体(P_2), 对紫外线辐射的抗性表现出一定的差异。只需经较低浓度的秋水仙碱(0.05%)处理, 就能使原生质体(P_1)对紫外线的抗性达到显著性水平, 而原生质体(P_2)只有在 P_1 代原生质体经高浓度秋水仙碱(0.4%)处理后, 才能达到显著性水平。经秋水仙碱处理后, 原生质体后代对紫外线的抗性随培养时间的延长而减弱。先经秋水仙碱处理, 再照射紫外线, 秋水仙碱可以提高原生质体对紫外线的抗性; 但如果原生质体先被紫外线辐射, 再加秋水仙碱处理, 其成活率不仅未增高, 反而全部死亡。这说明秋水仙碱提高原生质体对紫外线辐射抗性的作用, 需在紫外线辐射之前处理才能显现出来。秋水仙碱处理后, 可能使染色体加倍, 而多倍体对紫外线辐射有较强的抗性^[6], 具体机理有待进一步研究。秋水仙碱对紫外线具有抗性, 在高等植物研究中尚未见报道。

经紫外线辐射后, 使原生质体后代的细胞变小, 分裂和排列不规则, 苗形状多样化。有的苗出现细胞“肿瘤”, 在它们的单孢子苗中也有存在(图版-8)。另外, 还出现较高频率的红色变异体, 它们是否属突变体, 还需继续研究。

经紫外线辐射或经秋水仙碱处理后, 所长成的幼苗再被酶离原生质体, 其分离率降低许多, 这可能与细胞壁增厚有关, 也许这是再次分离的原生质体(P_2)对紫外线有较大抗性的原因之一。低剂量紫外线辐射可促进原生质体后代生长发育, 而高剂量辐射会抑制其生长, 这与紫外线辐射对高等植物生长发育的影响是一致的^[6]。经低剂量紫外线辐射的原生质体(P_1), 其 R_1 代苗生长远快于 P_1 代原生质体未经紫外线辐射的 R_2 代苗。经辐射后的原生质体后代, 苗平均长宽比值变小, 但也发现一些个体细长型, 生长特快的变异体。紫外线和秋水仙碱共同作用于原生质体, 其变异率更高。

本研究由亚洲水产学会(AFS)和加拿大国际发展研究中心(IDRC)资助。本校1991届海水养殖专业同学张善霖参加了部分工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 王素娟等, 1986. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究I. 海洋与湖沼, 17(3): 217-221.
- [2] ——, 1987. 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实验研究. 海洋科学, 11(1):1-7.
- [3] 严兴洪、王素娟, 1989. 紫菜体细胞发育与分化的研究. 海洋科学, (6):28-32.
- [4] ——, 1990. 秋水仙碱对坛紫菜体细胞苗生长发育的影响. 海洋科学, (1):24-28.
- [5] 范福仁, 1966. 生物统计学, 10-250. 江苏科学技术出版社(宁).
- [6] 杜布罗夫, A. П.(韩锦峰等译), 1964. 紫外辐射植物的作用, 56-136. 科学出版社(京).
- [7] 唐延林, 1982. 紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养. 山东海洋学院学报, 12(4):37-50.
- [8] 戴继勋等, 1990. 紫菜原生质体的纯系培养, 诱变处理及种间细胞融合的研究. 海洋与湖沼, 21(3): 293-296.

- [9] Fujita, Y. and S. Migita, 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. *Bull. Fac. Nagasaki University*, 57:39-45.
- [10] Polne-Fuller, M. and A. Gibor, 1984. Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. *Hydrobiologia*, 116/ 117: 308-313.
- [11] ——— 1986. Calluses, cells, and protoplasts in studies towards genetic improvement of seaweeds. *Aquaculture*, 57(1-4): 117-123.

EFFECTS OF UV IRRADIATION ON THE DEVELOPMENT AND VARIATIONS OF PROTOPLAST PROGENIES IN *PORPHYRA YEZOENSIS**

Yan Xing-hong

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

ABSTRACT The inflict casualties of UV-irradiation to the isolated protoplasts from thalli of *Porphyra yezoensis* were very serious, and UV-irradiation brought some variations in the morphogenetic patterns, developments and color of protoplast-progenies. The material treated with low doses, the development and growth of their progenies were promoted, but the higher doses, the results were opposite. If the protoplasts were treated by colchicine and UV-irradiation together, the growth rates of their progenies increased significantly. The higher frequency of pure red variants and the abnormal buds in the progenies were obtained. The UV-irradiation resistance were obvious in the protoplasts and progenies which was treated by colchicine, and the higher concentration of colchicine is, the resistance higher is

KEYWORDS Ultraviolet (UV), protoplast, development, variation

* This work was supported by Asian Fisheries Society and International Development and Research Centre of Canada. Many thanks to Mr Zhang Shan-pi for his laboratory works.