

文章编号: 1004-7271(2006)01-0030-06

坛紫菜绿色突变体的分离与特性分析

李琳^{1,2}, 严兴洪¹

(1. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 200090; 2. 温州医学院, 浙江 温州 325035)

摘要 野生型坛紫菜壳孢子苗经 MNNG 处理后, 在它们的叶状体中, 出现了许多色彩发生变异的细胞, 大部分的变异细胞随后分裂形成块状的细胞块。用酶解法分离含绿色变异细胞块的叶状体的单离细胞, 从细胞再生体中分离出一株绿色突变体。在叶状体活体吸收光谱特性方面, 绿色突变体与野生型相比存在着明显的差异, $3\lambda_{\max}$ 和 $4\lambda_{\max}$ 的峰顶分别向短波方向移动了约 12 nm 和 3 nm。另外, 绿色突变体的藻红蛋白和叶绿素 a 的含量下降, 藻蓝蛋白的含量上升, 表现出较低的 PE/Chl. a 和 PE/PC 比值, 较高的 PC/Chl. a 比值。绿色突变体的生长和成熟均比野生型慢。

关键词 坛紫菜, 绿色突变体, 诱变处理, N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍

中图分类号 S 917 文献标识码: A

Isolation and characterization of a green type mutant in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta)

LI Lin^{1,2}, YAN Xing-hong¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem, Certificated by the Ministry of Agriculture, E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 2. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract The young gametophytic blades of *Porphyra haitanensis*, developed from conchospores of the wild type, were treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) for inducing mutations. The color-mutated blades, which consisted of purplish red, red orange, orange, yellow green, light yellow and other color-mutated cells, were obtained after the treatment. The single cells were isolated enzymatically from the mutated blades, and were regenerated into whole plants among where appeared single-colored mutant blades and variegated blades that spottedly consisted of color-mutated cells and the wild-type cells. A green mutant strain was obtained from a green single-colored mutant by parthenogenesis. The green mutant was relatively stable in color in both gametophytic blade and conchocelis phases. The blade of the green mutant showed characteristic difference in the *in vivo* absorption spectra, by showing quite lower $3\lambda_{\max}$ and quite higher $4\lambda_{\max}$ as compared with the wild type, where phycoerythrin (PE) and phycocyanin (PC) mostly contributes to the absorptions, respectively. And its $3\lambda_{\max}$ and $4\lambda_{\max}$ were shifted

收稿日期 2005-07-14

基金项目 国家“863”计划(2002AA603023), 国家自然科学基金(30170734, 30571443), 上海市自然科学基金(05RZ14110), 上海市 E-研究院水产养殖学科特聘研究员项目(E030090), 上海市重点学科建设项目(Y1101), 上海水产大学校长基金(2001-01)

作者简介 李琳(1979-), 女, 陕西渭南人, 硕士研究生, 专业方向为海洋生物生理、生态研究。

通讯作者 严兴洪(1958-), 男, 浙江义乌人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事海洋生物技术研究。Tel: 021-65710026; E-mail: xhyan@shfu.edu.cn

towards shorter wavelength by 12 nm and 3 nm , respectively . The green mutant showed differences in contents of chlorophyll *a* (Chl. *a*) , phycoerythrin (PE) and phycocyanin (PC) as compared with the wild type . The green mutant is characterized with lower PE/Chl. *a* and PE/PC ratios , and higher PC/Chl. *a* ratio . The growth and maturation of the green mutant were relatively slower than the wild type .

Key words : *Porphyra haitanensis* ; green mutant ; mutagenic treatment ; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

紫菜含三种主要光合色素和色素蛋白,即叶绿素 *a* (chlorophyll *a*, Chl. *a*),藻红蛋白(phycoerythrin, PE),藻蓝蛋白(phycocyanin, PC),叶状体的颜色主要由这三种色素的含量和它们之间的比例来决定,商品紫菜饼的质量好坏也主要取决于这三种色素的含量高低^[1-3]。所以,紫菜色素突变体对开展紫菜的生理学、遗传学以及育种等研究十分重要^[4-14]。坛紫菜是我国最主要的海水养殖品种之一,有关它的基础生物学、生活史、人工采苗、养殖技术等进行了大量的研究^[15,16];但对它的基本遗传规律认识极少,坛紫菜的遗传育种工作几乎没有开展过。本实验室在取得条斑紫菜人工色素突变体和育种研究成功的基础上,通过人工诱变获得了数种坛紫菜人工色素突变体^[17],但绿色突变体作为遗传标记,在紫菜遗传与育种研究中有更大的价值^[4]。本文将报道坛紫菜绿色突变体的诱导与分离、生理和生化特性变异等。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验使用的野生型坛紫菜(*Porphyra haitanensis* Chang et Zheng)采自福建平潭岛自然岩礁上,1991年建立纯系,株名为PT-001,以自由丝状体形式被保存在实验室内。培养液为MES培养基^[18]。

1.2 诱变处理和突变体分离

贝壳丝状体采壳孢子和叶状体的室内培养方法同参考文献^[19]。野生型坛紫菜壳孢子苗培养30~40 d后,选择健康的叶状体(长约5 cm)作为诱变的材料。采用化学诱变剂N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)。诱变处理方法参照参考文献^[12],分别用含5, 10, 15, 20, 25和 30×10^{-6} MNNG的培养液处理野生型坛紫菜叶状体,吸干MNNG液后,用新鲜培养液洗涤叶状体5次以上,再次加入新鲜培养液进行冲气培养。培养温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,光照密度 $80 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,明暗周期10L:14D。培养2~3周后,每组随机取3棵叶状体进行色素变异细胞块统计,随机检查30个视野($\times 20$)内的色素变异细胞块数。诱变处理后,再培养15天左右,挑出含色素体发生变异的叶状体,用酶解法分出单个变异细胞,进行再生培养^[20]。培养3周后,从细胞再生体中挑选出单色突变体进行单株培养。培养温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,光照密度 $80 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。当叶状体长到一定大小时,利用单性生殖,获得纯种丝状体^[21]。培养温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,光照密度 $40 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,明暗周期10L:14D。培养3个月后,光照密度降至 $10 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,以长期保存突变体的丝状体。

1.3 突变体叶状体的生物学特性分析

用酶解法把野生型坛紫菜和绿色突变体叶状体的细胞单个分离出来^[18],进行同步培养,培养方法同文献^[20]。培养50 d左右,分别测定野生型和绿色再生体的活体吸收光谱,三种主要光合色素和色素蛋白含量,具体测定方法同参考文献^[3]。

2 结果

2.1 诱变处理和色素变异

野生型叶状体经MNNG诱变处理后再培养2周左右,出现了少量的色彩变异细胞。变异细胞的颜色呈紫红、桔红、桔黄、黄绿、浅黄和灰褐等颜色。大部分变异细胞形成后不断分裂形成变异细胞块状,但有的变异细胞呈点状不规则地与野生色细胞或其它变异细胞相嵌在一起。如图1所示,经MNNG处

理后,含变异细胞的叶状体数随着 MNNG 浓度的增加而增加,在浓度 $0 \sim 25 \times 10^{-6}$ 范围内,随着 MNNG 浓度的增加,变异细胞数增加,但 MNNG 的浓度高于 25×10^{-6} 后,死亡细胞数大量增加而变异细胞数反而下降。这说明 MNNG 的最佳处理浓度为 25×10^{-6} 。

2.2 绿色突变体的分离

从经 25×10^{-6} MNNG 处理的叶状体中挑出含绿色细胞块的叶状体(图版-1),利用酶解法获得大量的单离细胞,后者经过 60 d 左右的培养,单个绿色变异细胞就再生成绿色变异体(图版-3,5),而未发生变异的细胞再生成野生型叶状体(图版-2,4)。把单色的野生型和绿色突变体叶状体再次酶解,分别获得了大量单离细胞(图版-6,7)野生型的单离细胞再生成野生型叶状体(图版-8)。而来自绿色突变体的单离细胞再生成绿色叶状体(图版-9),与母体叶状体一样。利用单性生殖,分别获得了野生型和绿色突变体的丝状体纯系。图版-10,11 展示了野生型和绿色突变体的丝状体纯系。

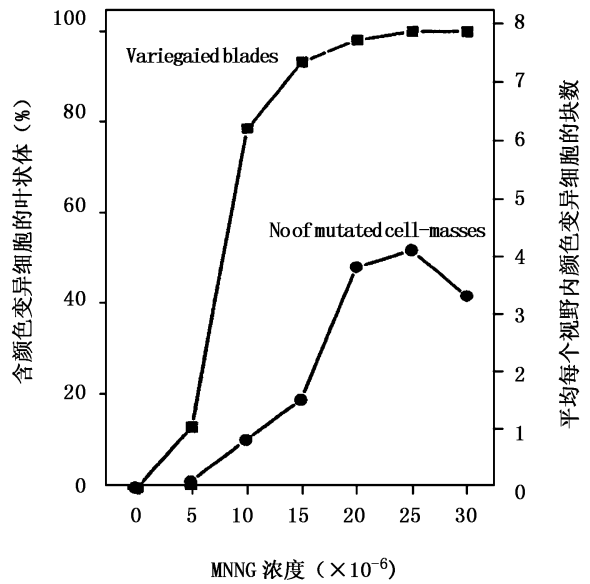
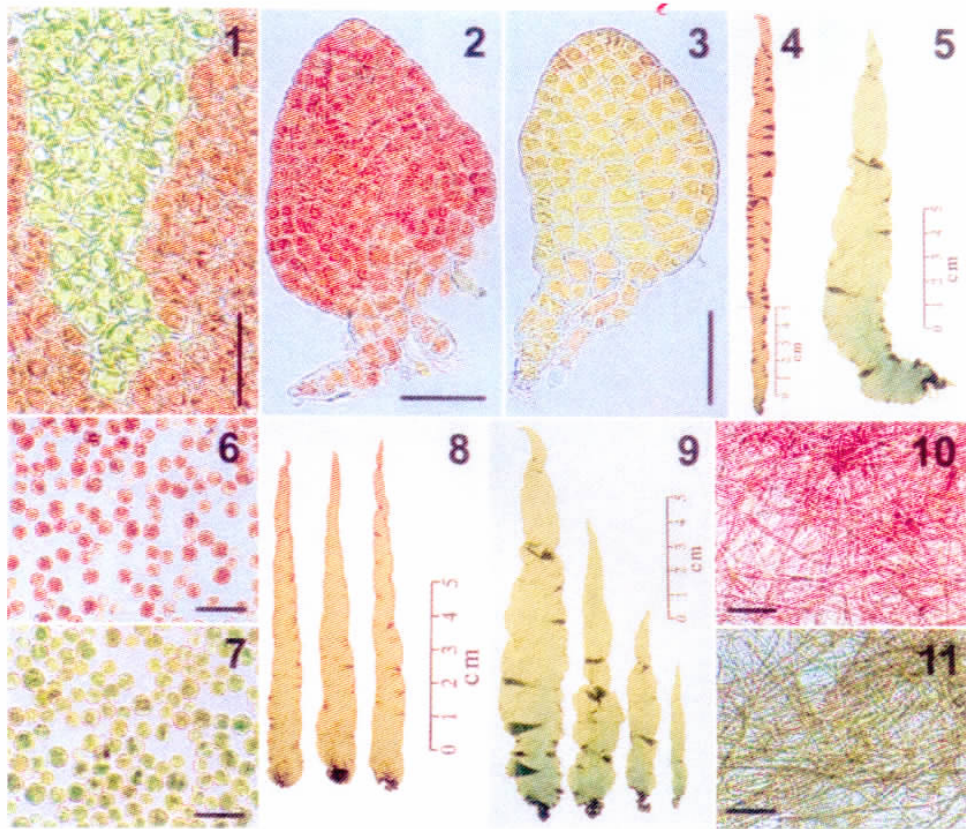


图1 坛紫菜叶状体经 MNNG 处理后出现的变异叶状体和变异细胞块数

Fig.1 Frequency of variegated blades and number of the color mutated cell-masses in the blades of *Porphyra haitanensis* after treatment with MNNG



图版 坛紫菜绿色型突变体的诱变和分离

Plate Isolation of the green mutant strain and compare with the wild type in *Porphyra haitanensis*

1. MNNG 处理所产生的绿色细胞块; 2. 野生型细胞的再生叶状体; 3. 绿色变异细胞的再生叶状体; 4. 野生型再生叶状体; 5. 绿色再生叶状; 6. 野生型叶状体的单离细胞; 7. 绿色变异叶状体的单离细胞; 8. 野生型再生叶状体; 9. 绿色突变体再生叶状体; 10. 野生型的纯系丝状体; 11. 绿色突变体的纯系丝状体. 图中标尺均代表 $50\mu\text{m}$

2.3 绿色突变体的活体吸收光谱和主要光合色素含量变化

图 2-4 分别是同时培养的绿色突变体与野生型坛紫菜再生叶状体的基部、中部和稍部的活体吸收光谱。绿色突变体与野生型坛紫菜一样,在 350 ~ 750 nm 波长范围内也有 5 个吸收高峰($1\lambda_{\max}$ 、 $2\lambda_{\max}$ 、 $3\lambda_{\max}$ 、 $4\lambda_{\max}$ 和 $5\lambda_{\max}$) ,但绿色突变体显示出与野生型坛紫菜不同的光谱吸收特性,图 2 和图 3 分别表示绿色突变体与野生型坛紫菜叶状体基部、中部的活体吸收光谱。绿色突变体除 $4\lambda_{\max}$ 的峰值高于野生型,其余各峰值均低于野生型坛紫菜,而且 $3\lambda_{\max}$ 和 $4\lambda_{\max}$ 的峰顶分别向短波方向移动了约 12 nm 和 3 nm。图 4 表示了绿色突变体与野生型坛紫菜叶状体稍部的活体吸收光谱,绿色突变体除 $4\lambda_{\max}$ 的峰值高于野生型, $5\lambda_{\max}$ 也比野生型要高,可能是因为野生型坛紫菜稍部较偏红, $3\lambda_{\max}$ 和 $4\lambda_{\max}$ 的峰顶也分别向短波方向发生了移动(12 nm, 3 nm)。图 5 表示同期培养 50 d 后的绿色突变体与野生型坛紫菜 3 种主要光合色素和色素蛋白的含量比较,绿色突变体的 PC 含量明显上升,而 Chl. *a* 和 PE 的含量则明显下降,其中 PE 的含量相比野生型下降了约 54%。比较三种色素和色素蛋白的含量比值发现,PE/Chl. *a* 和 PE/PC 的比值均比野生型低,而 PC/Chl. *a* 的比值则较野生型上升(图 6)。

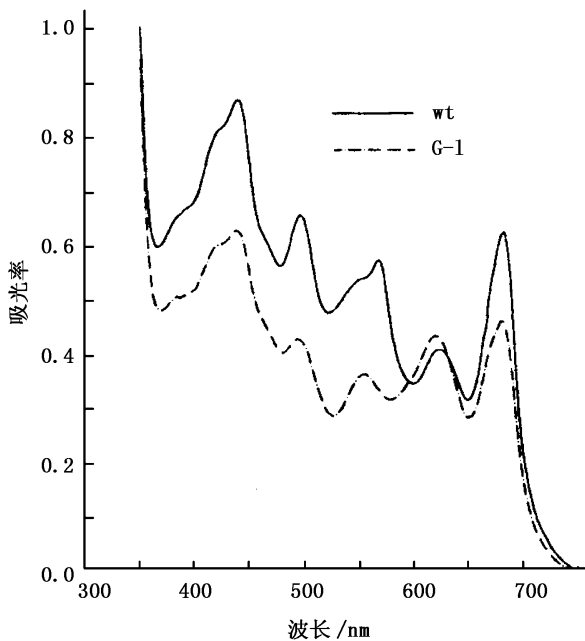


图 2 坛紫菜绿色突变体和野生型叶状体基部的活体吸收光谱比较

Fig.2 Comparison of *in vivo* absorption spectra of the basal portion of the blades between the green mutant (G-1) and the wild type (wt) in *Porphyra haitanensis* after culture of 55 days

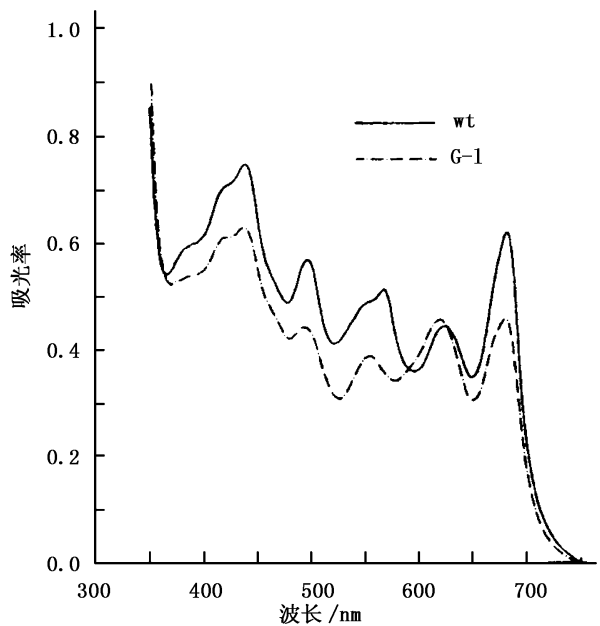


图 3 坛紫菜绿色突变体和野生型叶状体中部的活体吸收光谱比较

Fig.3 Comparison of *in vivo* absorption spectra of the middle portion of the blades between the green mutant (G-1) and the wild type (wt) in *Porphyra haitanensis* after culture of 55 days

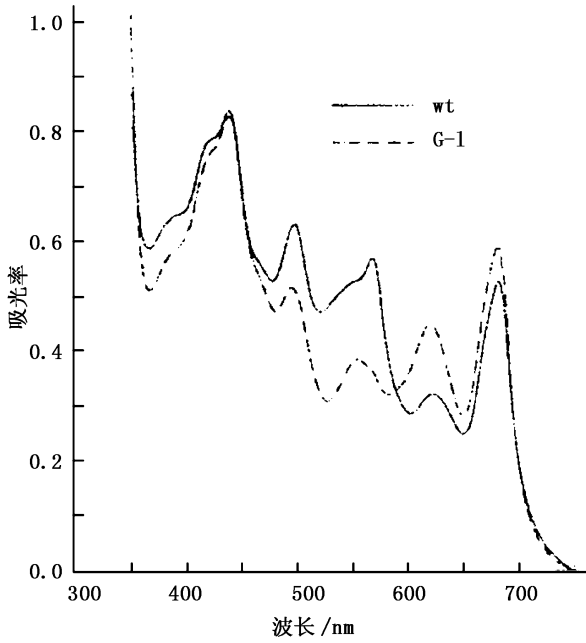


图4 坛紫菜绿色突变体和野生型叶状体稍部的活体吸收光谱比较

Fig.4 Comparison of in vivo absorption spectra of the upper portion of the blades between the green mutant (G-1) and the wild type (wt) in *Porphyra haitanensis* after culture of 55 days

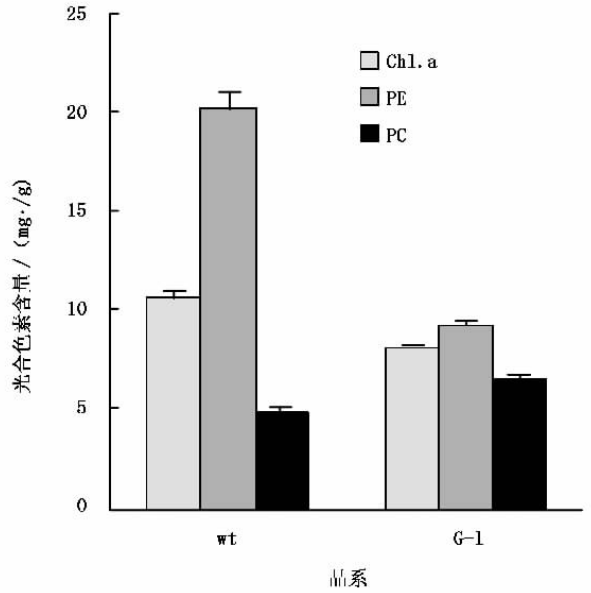


图5 坛紫菜绿色突变体和野生叶状体中的叶绿素 α (Chl. α)、藻红蛋白(PE)和藻蓝蛋白(PC)含量

Fig.5 Contents of chlorophyll α (Chl. α), phycoerythrin (PE) and phycocyanin (PC) in the green type mutant (G-1) and the wild type (wt) in *Porphyra haitanensis* after culture of 55 days

3 讨论

从上世纪70年代日本获得条斑紫菜自然色素突变体开始,各国研究者亦相继利用各种诱变剂试图获得紫菜人工色素突变体。至今,在紫菜人工色素突变体研究中,被证明有效可行的化学诱变剂主要是 MNNG^[9,11-13],而物理诱变剂主要是⁶⁰Co- γ 射线^[14,19]。本文用 MNNG 处理野生型坛紫菜叶状体诱导产生突变,获得的色素变异细胞,在种类和数量上,与⁶⁰Co- γ 对坛紫菜叶状体的诱变相比,效果差不多^[19]。并且,从变异细胞的再生体中分离出了稳定的绿色突变体。

本实验分离得到的坛紫菜绿色突变体与野生型相比,在活体吸收光谱特性方面,存在较大的差异,如表现出较低的 $2\lambda_{max}$ 和 $3\lambda_{max}$ 吸收峰。这些现象与条斑紫菜绿色型突变体的叶状体活体吸收特性相似^[3],但条斑紫菜绿色型突变体的叶状体仅表现出较低的 $2\lambda_{max}$ 、 $3\lambda_{max}$ 吸收峰,没有发生峰顶波长的移动,从而被认为绿色突变体的颜色主要是由于藻红蛋白含量下降所致。而本文报导的坛紫菜绿色突变体,除表现出较低的 $2\lambda_{max}$ 、 $3\lambda_{max}$ 吸收峰外, $4\lambda_{max}$ 峰显示

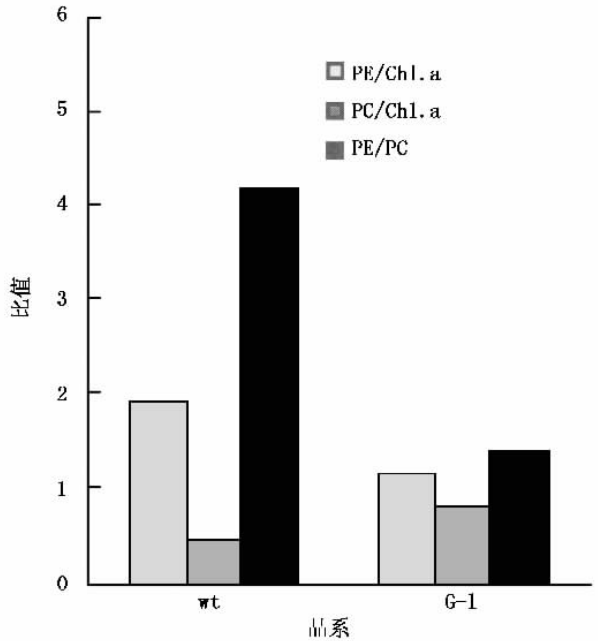


图6 坛紫菜绿色突变体与野生型叶状体的叶绿素 α 、藻红蛋白(PE)和藻蓝蛋白(PC)三者含量的比值

Fig.6 PE/Chl. α , PC/Chl. α and PE/PC ratios in the blades of the green type mutant (G-1) and the wild type (wt) in *Porphyra haitanensis*

了较高的吸收,同时 $\lambda_{3\max}$ 和 $\lambda_{4\max}$ 的峰顶分别向短波方向移动了约 12 nm 和 3 nm,因此认为该绿色突变体的颜色变异有可能是由于藻胆蛋白的质和量共同变化的结果。测定三种主要光合色素和色素蛋白的含量,结果发现绿色突变体的藻红蛋白和叶绿素 a 的含量下降,藻蓝蛋白的含量上升,与光谱吸收特征相符。

另外,该株绿色突变体的生长明显比野生型慢,成熟也较晚,推测可能与 PE 含量大量降低相关。由于该绿色突变体具有稳定的颜色,独特的光谱吸收特性和色素含量变化,是很好的遗传学和生理学研究材料,其基因变异有待进行遗传学分析。

参考文献：

- [1] 齊藤宗勝,荒木 繁,櫻井武磨,大房 剛. 乾海苔における光合成色素含有量および全窒素,全游離アミノ酸,全游離糖含有量の時期的變動と産地間の相違[J]. 日本水産学会誌,1975,4(3):365-370.
- [2] 有賀祐勝.スサビノリの色彩と色素[J]. 遺伝,1980,34(9):8-13.
- [3] Aruga Y, Miura A. *In vivo* absorption spectra and pigment contents of the two types of color mutants of *Porphyra* [J]. Jap J Phycol, 1984, 32 : 243 - 250.
- [4] 高原隆明,三浦昭雄,有賀祐勝.スサビノリの綠色突然變異體の培養實驗[J].うみ,1976,14:101-117.
- [5] 片山勝介.養殖ノリの變異種に関する研究——I.化学變異體の施使について[J].岡山水試事報,1983,57:51-56.
- [6] Mitman G G, van der Meer J P. Meiosis, blade development and sex determination in *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) [J]. J Phycol, 1994, 30 :147 - 159.
- [7] Yan X H. Studies on color type variants from mutagenized protoplasts of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng & *P. yezoensis* Ueda (Rhodophyceae) [J]. Chin J Oceanal Limnol, 1993, 11 :235 - 244.
- [8] Yan X H, Aruga Y. Induction of pigmentation mutants by treatment of monospore germlings with NNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Algae, 1997, 12 :39 - 54.
- [9] Yan X H, Aruga Y. Genetic analysis of artificial pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Phycological Research, 2000, 48 :177 - 187.
- [10] Yan X H, Fujita Y, Aruga Y. Induction and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J Applied Phycology, 2000, 12 :69 - 81.
- [11] Yan X H, Fujita Y, Aruga Y. High monospore-releasing pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Hydrobiologia, 2004, 512 :133 - 140.
- [12] 严兴洪,田中次郎,有賀祐勝.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.
- [13] 许 璞.紫菜色素突变体诱导与遗传特征[D].中国科学院海洋所博士论文,1997,14-81.
- [14] Wang S J, Zheng Y Z, Ma L B, et al. Gamma-Rays induction of mutation in conchocelis of *Porphyra yezoensis* [J]. Chin J Oceanal Limnol, 2000, 18(1):47-53.
- [15] 福建省水产局.坛紫菜人工养殖[M].福州:福建人民出版社,1979.1-101.
- [16] 陈国宜.关于坛紫菜自由丝状体的培养和直接采苗研究[J].水产学报,1980,4(1):19-29.
- [17] 梁志强.坛紫菜遗传育种的初步研究[D].上海水产大学硕士学位论文,上海,2004.1-40.
- [18] 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.
- [19] 严兴洪,梁志强,宋武林,等.坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离[J].水产学报,2005,29(2):166-172.
- [20] Yan X H, Wang S J. Studies on the development and differentiation of the somatic cells from *Porphyra* spp. (Rhodophyta) [J]. Marine Sciences, 1990, 3(2):195-208.
- [21] 严兴洪,李 琳,陈俊华,等.坛紫菜的遗传与育种[C].国家863计划资源环境技术领域第一届海洋生物高技术论坛论文集,2003,107-113.