

文章编号: 1004-7271(2008)03-0316-05

坛紫菜耐低盐优良品系的筛选

严兴洪, 陈敏

(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)

摘要:从已获得的3种坛紫菜优质高产品系中,筛选出耐低盐的优良品系 YZ-7。各品系的壳孢子在正常盐度(26‰)下培养35 d后长成较大的苗,然后用取孔器分别获得叶片的圆盘体,把后者培养在不同盐度下进行叶片生长试验。在26‰、15‰、8‰、5‰和3‰五种不同盐度下培养15 d, YZ-7品系的圆盘体平均直径分别增加了18、14.3、3.9、2.8和0.6倍,而野生型(WT)品系的圆盘体平均直径分别只增加了1.7、1.5、0.4、0.25和0倍。由此可见,无论是在高盐还是在低盐条件下, YZ-7品系的叶片生长均远快于WT品系。把各品系的壳孢子在正常盐度下长成的大叶状体用海螺酶分解,获得大量的单离体细胞,再将后者分别培养在不同的盐度下进行耐低盐实验。在3‰的盐度下培养15 d,优良品系 YZ-7的细胞成活率高达58%,而WT品系在此盐度下培养12 d就全部死亡。在8‰和5‰下培养15 d, YZ-7品系的细胞成活率分别高达78.6%和77.1%,细胞分裂率分别为100%和98.9%;而WT品系的细胞成活率分别只有36.4%和8.4%,细胞分裂率分别为88.6%和81.8%, YZ-7品系的细胞成活率和分裂率均远高于WT品系。上述实验结果初步证实优良品系 YZ-7品系是耐低盐的。

关键词:坛紫菜;优良品系;叶状体;低盐;成活率

中图分类号:S 968.4 **文献标识码:**A

Selection of low-salinity resistant improved varieties in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)

YAN Xing-hong, CHEN Min

(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)

Abstract: In this paper, it was verified that the improved variety (YZ-7) obtained previously in our lab is a low-salinity-resistant strain. The blade discs, which were cut out with a borer from the gametophytic blades developed from the conchospores of the wild type strain (WT) and three improved strains (YZ-2, YZ-6 and YZ-7) after being cultured at the salinity of 26‰ for 35 days, were cultured in the culture medium containing of different salinity to test their growth. After being cultured at the salinity of 26, 15, 8, 5 and 3‰ for 15 days, respectively, the mean diametric size of the blade discs of YZ-7 strain increased by 18, 14.3, 3.9, 2.8

收稿日期: 2007-04-23

基金项目: 国家高科技研究发展计划(863计划)资助项目(2006AA10A413, 2002AA603023); 国家自然科学基金资助项目(30571443, 30170734); 上海市自然科学基金资助项目(05RZ14110); 上海市重点学科建设项目(Y1101); 上海市优秀学科带头人计划项目(07XD14028)

作者简介: 严兴洪(1958-), 男, 浙江义乌人, 教授, 博士生导师, 主要从事海藻遗传育种、藻类生物技术方面的研究。E-mail: xhyan@shfu.edu.cn

and 0.6 times, while the mean diametric size of the blade discs of *WT* strain only increased by 1.7, 1.5, 0.4, 0.25 and 0 times compared with the original diameter, respectively. This result indicated that the *YZ-7* strain grew much faster than the *WT* strain at either high salinity or low salinity. A large number of single somatic cells were enzymatically isolated from the big blades developed from the conchospores of the above strains, and were cultured at different salinity to test their resistance to low-salinity. After 15 days of culture at 3‰, the cell survival rate of *YZ-7* strain was 58%, while the cells of *WT* strain died off after 12 days of culture at 3‰. After culture of 15 days at 8‰ and 5‰, the cell survival rate of *YZ-7* strain was 78.6% and 77.1%, and the cell division rate was 100% and 98.9%, respectively, while the cell survival rate of *WT* strain was only 36.4% and 8.4%, and the cell division rate was 88.6% and 81.8%, respectively. Both of the survival and division rates of cells of *YZ-7* strain were much higher than those of *WT* strain. These results verified that *YZ-7* strain is resistant to low-salinity.

Key words: *Porphyra haitanensis*; improved variety; gametophytic blade; low-salinity; survival rate

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国最主要的紫菜栽培品种之一,其年产量占全国紫菜年产量的75%左右。虽然在上世纪六七十年代,对坛紫菜的基本生物学、生活史、全人工采苗、自由丝状体采苗以及人工栽培技术开展了大量的研究^[1],但坛紫菜的遗传育种工作几乎没有开展过,至今大规模人工栽培所使用的品种仍然是野生种,栽培四十多年的坛紫菜野生种出现了严重的种质退化,产量和质量明显下降^[2]。所以,开展遗传育种研究,培育出适合大规模生产栽培的坛紫菜优良品种已日趋重要。近几年来,国内紫菜学者开展了较为系统的坛紫菜遗传学和育种学研究^[2-8],已得到较多的坛紫菜色素突变体、优质高产品系和抗高温品系^[9-11],有的优良品系已进行了较大规模的生产中试推广。坛紫菜是一种广盐性的海藻,适合在离河口较近,营养盐丰富的海区养殖,但由于在栽培期间,特别是采好的壳孢子刚下海展网栽培时和幼苗期,如果遇到大规模暴雨,会引起表层海水盐度的急剧下降,造成一定量的孢子和幼苗死亡,对生产造成较严重的影响。因此,培育出耐低盐的坛紫菜优良品种对保证大规模栽培的顺利进行有重要意义。有关筛选紫菜耐低盐品系的研究报道很少,只有严兴洪等对条斑紫菜的耐低盐突变体作了初步探讨^[12]。本文的目的是通过对已获得的坛紫菜优良品系进行耐低盐筛选,选育出既优质高产又耐低盐的优良品系。

1 材料与方 法

1.1 不同坛紫菜品系的来源和它们的叶状体室内培养

试验所用的坛紫菜野生型品系(*WT*),是从采自福建平潭岛岩礁上的野生坛紫菜叶状体分离出来的,以自由丝状体的形式被保存在实验室内。用于筛选耐低盐品系的坛紫菜优良品系为 *YZ-2*、*YZ-6* 和 *YZ-7*,它们是实验室利用人工诱变分离出来的^[13]。坛紫菜叶状体的室内培养方法见文献^[13]。

1.2 耐低盐坛紫菜优良品系的筛选

取日龄为 35 d 的野生品系(*WT*)和 3 种优良品系(*YZ-2*、*YZ-6* 和 *YZ-7*)的叶状体,用打孔器各取 50 个圆盘体($d=2\text{ mm}$),每 10 个一组分别置于冲气瓶内进行冲气培养,培养液的盐度分别为 26‰、15‰、8‰、5‰和 3‰,培养温度为 24 ℃,光照密度为 93 $\mu\text{mol photos}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,明暗周期 10L:14D,不同盐度的培养液由海水中加自来水和 MES 培养基^[14]配成,先用精密海水密度计[(规格 1.000-1.036),刻度 0.001]测量其比重,再换算成盐度。每 3 d 换一次培养液,并测量一次圆盘体的生长情况。

将 4 个品系的叶状体酶解单离体细胞分别置入小号培养皿($d=6\text{ cm}$),静止 48 h 后,计数每个培养皿内的细胞数(20 个视野,10 \times),获得单个视野的平均细胞数,然后将盛有细胞的培养皿分别换入 26‰、15‰、8‰、5‰和 3‰不同盐度的培养液培养,并将盛有细胞的小号培养皿放入直径为 9 cm 的中号培养皿内,再将两者放入直径为 12 cm 已盛有一定量的蒸馏水的大号培养皿内,以减少由于培养液的

水分蒸发引起的盐度增加,其它培养条件同上。每3 d换一次培养液,每隔3 d观察一次细胞的成活及分裂情况。

2 结果

2.1 不同品系的叶状体耐低盐比较

在26‰和15‰组中,野生品系和优良品系的叶片生长正常,没有出现卷曲现象。在8‰组中,WT品系的叶片生长缓慢,培养到第3天,圆盘体的边缘就出现了卷曲,到第15天全部皱缩;YZ-2和YZ-6品系的叶片生长比野生品系快,但培养到第6天,圆盘体的边缘也出现卷曲、起皱,第15天全部皱缩;YZ-7品系生长比其它2个优良品系快,到第10天叶片才出现卷曲,培养至第15天时叶片也几乎全部皱缩。不同品系的圆盘体在不同盐度下的生长情况如表1所示。比较几个盐度组中的各优良品系的圆盘体生长情况发现,同一品系内,26‰和15‰两组的生长情况差距不大,低盐组(8‰和5‰)的生长与26‰和15‰组的差异均极显著($P < 0.01$)。另外,在不同盐度下培养的各优良品系的生长均快于野生品系,其差异极显著($P < 0.01$)。在26‰、15‰、8‰、5‰和3‰中培养15 d, YZ-7品系的圆盘体平均直径分别增加了18、14.3、3.9、2.8和0.6,而WT品系的苗圆盘体平均直径分别只增加了1.7、1.5、0.4、0.25和0倍。无论是高盐还是在低盐条件下, YZ-7品系的叶片生长均远快于WT品系。

表1 不同盐度培养下的坛紫菜野生品系(WT)和优良品系(YZ-2, YZ-6和YZ-7)圆盘体的平均直径增加情况

Tab.1 Growth of blade discs of the wild type(WT) and the improved strains(YZ-2, YZ-6 and YZ-7) of *Porphyra haitanensis* in culture at different salinities

培养 天数(d)	盐度		圆盘体平均直径(mm)											
	WT					YZ-2								
	26	15	8	5	3	26	15	8	5	3				
0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3.0±0.3	3.0±0.4	2.5±0.2	2.3±0.2	2.0±0.3	4.0±0.2**	3.8±0.1**	3.4±0.3**	3.0±0.4**	2.8±0.2**				
6	3.8±0.2	3.2±0.3	2.7±0.1	2.5±0.2	-	8.5±0.5**	7.4±0.3**	4.1±0.6**	4.2±0.8**	3.0±0.3**				
9	4.5±0.4	4.0±0.5	2.8±0.1	2.5±0.3	-	14.9±0.3**	11.4±0.4**	4.7±0.3**	4.7±0.6**	3.0±0.3**				
12	4.9±0.3	4.4±0.2	2.8±0.2	2.5±0.1	-	20.7±0.4**	18.4±0.5**	6.1±0.8**	5.1±0.9**	3.0±0.2**				
15	5.4±0.2	5.0±0.3	2.8±0.1	2.5±0.2	-	28.3±0.5**	25.8±0.2**	6.7±0.8**	5.4±0.9**	3.0±0.3**				

培养 天数(d)	盐度		圆盘体平均直径(mm)										
	YZ-6					YZ-7							
	26	15	8	5	3	26	15	8	5	3			
0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	4.0±0.2**	3.9±0.3**	3.5±0.8**	3.0±0.4**	2.9±0.1**	4.1±0.3**	4.1±0.3**	3.1±0.6**	3.0±0.3**	2.9±0.3**			
6	8.8±0.4**	8.0±0.1**	4.5±0.7**	4.5±0.8**	3.0±0.2**	10.4±0.2**	9.8±0.3**	5.6±0.5**	5.0±0.4**	3.0±0.3**			
9	14.7±0.4**	13.5±0.3**	5.2±0.6**	5.0±0.6**	3.0±0.3**	18.5±0.3**	16.1±0.6**	6.1±0.7**	6.1±0.6**	3.3±0.6**			
12	23.7±0.2**	20.2±0.5**	6.5±0.8**	5.5±0.5**	3.0±0.1**	24.8±0.2**	21.5±0.4**	7.6±0.6**	7.0±0.5**	3.3±0.5**			
15	31.6±0.4**	27.4±0.2**	7.1±0.8**	6.0±0.5**	3.0±0.2**	37.1±0.2**	30.5±0.4**	9.7±0.5**	7.5±0.6**	3.3±0.5**			

**表示t检验差异极显著($P < 0.01$); -表示圆盘体烂光

2.2 不同品系的叶状体体细胞的耐低盐情况比较

根据叶状体的圆盘体耐低盐试验结果,初步认为YZ-7品系是较耐低盐的。为进一步证实各品系的耐低盐程度,把它们的叶状体体细胞分别酶解出来进行耐低盐实验,结果如表2所示。从表2可以看出,随着盐度的下降,WT品系的细胞成活率急剧下降,8‰以下的盐度组中,细胞成活率非常低,培养12 d,3‰组的细胞就全部死亡。三个优良品系在各盐度组中的细胞成活率明显比野生品系高。即使在5‰组中,细胞成活率仍然相当高,特别是YZ-7品系的成活率又明显比其余2个优良品系高,培养15 d,3‰组的成活率还高达58.4%,分别是YZ-2和YZ-6品系的3.5倍和2.7倍,这说明YZ-7品系是相当耐低盐的。在相同的盐度下,各品系的体细胞成活率均随着培养时间的增加而下降,但各优良品系的下降幅度明显比野生品系少。在两个低盐度(5‰和3‰)组中,野生品系的成活率很低,而3个优良品系仍

维持相当高的水平,特别是 YZ-7 品系的细胞成活率在培养 15 d 时,在 5‰和 3‰组中分别高达 77.1%和 58.4%,而野生品系分别为 8.4%和 0,这说明 YZ-7 品系远比野生品系耐低盐度。

表 2 培养在不同盐度下的坛紫菜野生品系(WT)和优良品系(YZ-2, YZ-6 和 YZ-7)叶状体的单离体细胞成活率

Tab.2 The survival rates of the single somatic cells isolated from the blades of the wild type strain(WT) and the improved strains(YZ-2, YZ-6 and YZ-7) of *Porphyra haitanensis* in culture at different salinities

培养 天数(d)	盐度		细胞成活率(%)								
	WT					YZ-2					
	26	15	8	5	3	26	15	8	5	3	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
3	82.1	71.8	52.6	38.7	30.5	93.5**	91.7**	84.7**	73.9**	62.2**	
6	80.6	68.2	44.7	14.6	10.2	92.1**	87.9**	80.2**	68.2**	45.3**	
9	78.3	64.8	38.9	11.3	3.8	91.7**	84.4**	69.3**	53.1**	33.1**	
12	73.5	60.3	36.6	8.9	-	90.1**	84.0**	65.1**	47.5**	25.7**	
15	71.3	56.7	36.4	8.4	-	90.2**	83.4**	62.9**	42.2**	18.2**	

培养 天数(d)	盐度		细胞成活率(%)								
	YZ-6					YZ-7					
	26	15	8	5	3	26	15	8	5	3	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
3	94.7**	94.4**	85.2**	75.3**	63.9**	95.8**	86.2**	82.4**	82.2**	71.2**	
6	93.6**	89.3**	81.5**	68.9**	49.9**	94.1**	82.8**	81.9**	81.4**	68.2**	
9	93.4**	88.4**	72.1**	52.2**	40.1**	92.7**	81.2**	80.6**	81.1**	63.5**	
12	92.8**	87.8**	69.2**	50.4**	31.5**	91.8**	80.9**	80.1**	80.3**	60.3**	
15	90.0**	85.6**	66.5**	48.5**	20.2**	91.5**	80.2**	78.6**	77.1**	58.4**	

**表示 *t* 检验差异极显著($P < 0.01$) ; - :表示细胞全部死亡

2.3 不同品系的叶状体单离细胞在不同盐度下的分裂情况比较

在不同盐度下各品系的细胞分裂情况如表 3 所示。三个优良品系在不同盐度下的细胞分裂率均比 WT 品系高。培养 15 d,在 26‰和 15‰二组中,3 个优良品系和 WT 品系的细胞分裂率均达 100%,但在 8‰以下的盐度组中,各优良品系的细胞分裂率均远高于 WT 品系。在 8‰组中,3 个优良品系的细胞分裂率达到 95%以上,而 WT 品系只有 88.6%;在 5‰组中,3 个优良品系的细胞分裂率高达 90%以上,而 WT 品系只有 81.8%。3 个优良品系的细胞即使在 3‰的盐度下,培养 15 d 的细胞分裂率仍高达 85.4%~95.8%,而 WT 品系的细胞培养 12 d,已全部死亡。比较 3 个优良品系的细胞成活率发现,在不同盐度组中 YZ-7 品系的细胞分裂率均高于另外 2 个优良品系,这说明 YZ-7 品系的单离体细胞在 3‰盐度下,不仅能成活,而且还能较快地分裂,是较耐低盐的。

3 讨论

本研究发现,在 26‰下培养 35 d 的坛紫菜野生品系的壳孢子苗圆盘体转入 5‰的盐度下培养 6 d 就出现卷曲,到第 12 天时,叶片的颜色变浅,第 15 天开始发白死亡;而 3 个优良品系(YZ-2、YZ-6 和 YZ-7)对低盐的耐受力均比野生品系强,具体表现在 5‰组中培养 15 d 后的叶片颜色并不变淡,但是叶片边缘也出现卷曲和变硬的现象,叶片表面粗糙不平,其中 YZ-7 品系的生长速度要略快于 YZ-2 和 YZ-6 品系;在 3‰盐度中培养,WT 品系的叶片第 3 天就发白死亡,而 YZ-2 和 YZ-6 品系在第 9 d 开始发白,YZ-7 在 15 d 后才有发白迹象出现。

WT 品系的体细胞在 8‰下培养 6 d 后,其成活率分别是正常盐度(26‰)组的 55.5%,说明存活的体细胞较少,且表现为细胞吸水膨胀,细胞内色素体以外的空隙明显增大,而 YZ-7 品系的体细胞培养 6 d,成活率是正常盐度组的 88%,存活的细胞色素体也有不同程度的收缩,但比 WT 品系好,说明该品系的体细胞较 WT 品系更耐低盐。随着盐度的降低,这个结论进一步得到了证实。在 5‰组中,培养 6 d,WT 品系的细胞成活率只有 16.4%,而 YZ-2、YZ-6 和 YZ-7 品系的成活率分别是 68.2%、68.9%和

81.4%, YZ-7 品系的细胞成活率是 WT 品系的 6 倍, 比其它 2 个优良品系高出约 10%, 其差别不十分明显。但是, 随着培养时间的增加, 每个品系的成活率都有不同幅度的下降: 培养 15 d 后 WT 品系的细胞已全部死亡, YZ-2 和 YZ-6 品系的细胞成活率也下降至 42.2% 和 48.5%, 而 YZ-7 品系的细胞成活率下降幅度则较小, 仍高达 77.1%, 比 YZ-2 和 YZ-6 品系高出 30%~40%。当培养液的盐度降到 3‰, 培养 3 d, WT 品系的细胞成活率为 30.5%, 培养 12 d 后就全部死亡; 而 YZ-2 和 YZ-6 品系在 6 d 后的成活率也只有 45.3% 和 49.9%, 到第 15 天的成活率降至 20% 左右, 而 YZ-7 品系培养 15 d 成活率依然高达 58.4%, 比其它 2 个优良品系仍高出约 30%, 这说明 3‰ 的盐度已超出了这四个品系的耐受范围。8‰ 是野生品系细胞存活的极限盐度, 5‰ 可能是三个优良品系的生存极限盐度, 但 YZ-7 品系的存活情况明显要好于 YZ-2 和 YZ-6 品系。

表 3 培养在不同盐度下的坛紫菜野生品系 (WT) 和优良品系 (YZ-2, YZ-6, YZ-7) 叶状体的单离体细胞分裂率
Tab.3 The division rates of the single somatic cells isolated from the blades of the wild type strain (WT) and the improved strains (YZ-2, YZ-6 and YZ-7) of *Porphyra haitanensis* in culture at different salinities

培养 天数 (d)	盐度		细胞分裂率 (%)					细胞分裂率 (%)				
			WT					YZ-2				
	26	15	8	5	3	26	15	8	5	3		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	95.7	87.2	61.3	60.4	60	96.3	96.2**	89.3**	84.3**	70.3**		
6	96.8	92.2	69.9	64.5	66.2	97.8	97.5*	91.8**	87.8**	79.8**		
9	97.1	95.8	78.2	70.8	72.4	99.3	98.2**	94.9**	90.9**	82.9**		
12	99.3	97.3	82.6	77.5	-	100	99.8	5.3**	92.3**	89.3**		
15	100	100	88.6	81.8	-	100	100	96.3**	92.5**	91.2**		

培养 天数 (d)	盐度		细胞分裂率 (%)					细胞分裂率 (%)				
			WT					YZ-2				
	26	15	8	5	3	26	15	8	5	3		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3	95.8	95.5**	88.5**	78.6**	68.1**	98.7	96.2**	91.6**	93.2**	91.5**		
6	96.5	96.3*	90.9**	84.1**	70.1**	99.2*	98.7*	93.2**	95.0**	92.8**		
9	98.3	97.0**	92.1**	88.7**	78.5*	100*	99.4**	95.6**	96.6**	93.6**		
12	100	98.7	94.1**	90.1**	80.9**	100	100*	97.9**	97.0**	94.2**		
15	100	100	95.2**	91.2**	85.4**	100	100	100	98.9**	95.8**		

* 表示 t 检验差异极显著 ($P < 0.05$); ** 表示 t 检验差异极显著 ($P < 0.01$); - 表示细胞全部死亡

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 左正宏, 邓元告, 陈奔欣, 等. 坛紫菜别藻蓝蛋白 α, β 亚基基因的克隆和序列分析 [J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 148-153.
- [4] 陈骁, 左正宏, 姚继承, 等. 几种紫菜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 海洋科学, 2005, 29(4): 76-80.
- [5] 纪德华, 陈昌生, 郑伟刚, 等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照坛紫菜叶状体及单克隆培养的研究 [J]. 台湾海峡, 2005, 24(2): 171-177.
- [6] Yan X H, Lin L, Yusho A. Genetic analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Applied Phycology, 2005, 17(6): 467-473.
- [7] 严兴洪, 李琳, 有贺祐胜. 坛紫菜减数分裂位置的杂交试验分析 [J]. 水产学报, 2006, 30(1): 1-9.
- [8] 严兴洪, 李琳, 陈俊华, 等. 坛紫菜的单性生殖与遗传纯系分离 [J]. 高技术通讯, 2007, 17(2): 205-210.
- [9] 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): 166-176.
- [10] 李琳, 严兴洪. 坛紫菜绿色突变体的诱变与特性分析 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 30-35.
- [11] 严兴洪, 马少玉. 坛紫菜抗高温品系的筛选 [J]. 水产学报, 2007, 31(1): 112-119.
- [12] 严兴洪, 江海波. 盐度对条纹紫菜体细胞生长发育的影响及耐低盐度变异体的初步观察 [J]. 上海水产大学学报, 1993, 2(1): 34-39.
- [13] 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, 2004.
- [14] 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 [J]. 海洋与湖沼, 1986, 17(3): 217-221.