

文章编号: 1674-5566(2019)05-0755-10

DOI:10.12024/jsou.20180902394

## 浒苔与缘管浒苔人工杂交遗传育种技术

施锦婷<sup>1,2</sup>, 张建恒<sup>1,2</sup>, 崔建军<sup>3</sup>, 赵晓惠<sup>1,2</sup>, 康新宇<sup>1,2</sup>, 刘金林<sup>1,2</sup>, 文钦琳<sup>1</sup>,  
杨晓倩<sup>1</sup>, 何培民<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 海洋生态与环境学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 海洋科学研究院海洋生态环境与修复研究所, 上海 201306; 3. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524094)

**摘要:** 报道浒苔与缘管浒苔的人工种间杂交技术。利用浒苔属藻类生殖细胞配子与孢子的趋光性差异性, 结合其同型世代交替生活史特性, 从绿藻群落中分别筛选出浒苔与缘管浒苔的雌雄配子体母本藻体。通过对浒苔雌配子体和缘管浒苔雄配子体进行生殖细胞诱导试验, 分别同时获得纯化的雌雄配子液, 经均匀混合与显微观察, 发现浒苔雌配子和缘管浒苔雄配子快速向彼此游动, 接合形成具有负趋光性的合子; 接合过程中, 雌雄配子鞭毛逐渐消失, 运动力逐渐下降, 由梭形逐渐转变成为圆形。将纯化合子进行室内培养, 获得杂交后代藻体, 经凝胶电泳及分子生物学检测, 发现杂交种在 5S rDNA 间隔区序列上同时具有浒苔和缘管浒苔的特异性序列, 确认两种浒苔属绿藻成功实现种间杂交。此项技术在国内尚未报道, 可为未来开发多种优质性状浒苔品系提供技术示范, 为开展浒苔规模化养殖和获得稳定高产浒苔资源提供科学支撑。

**关键词:** 浒苔; 缘管浒苔; 杂交; 育种

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

我国是海藻养殖大国, 年总产量 1 100 万 t, 占世界海藻年总产量的近 60%, 但我国海藻养殖仍以褐藻(海带、裙带菜等)和红藻(紫菜、江蓠等)为主要养殖对象, 绿藻养殖品种不仅少, 仅以浒苔、礁膜等为主, 而且产量也仅占全国海藻养殖总产量的 0.2%<sup>[1]</sup>。

浒苔(*Ulva prolifera*), 江浙一带称其为“苔条”, 是一种可食用及药用海藻<sup>[2]</sup>。浒苔营养价值高, 富含蛋白质、碳水化合物、脂肪酸、维生素和 P、Ca、Fe 等多种矿物质<sup>[3-5]</sup>。我国在传统食用浒苔的基础上, 开发了如浒苔挂面、浒苔酱、浒苔汤剂和浒苔功能食品等<sup>[6-7]</sup>。然而目前, 用于食品的浒苔原材料主要来源于野生滩涂和海区绳索自然纳苗。由于这两种传统采集方式局限于自然环境条件, 且天然采集的浒苔是野生种, 其产品质量均不可控, 品种混杂, 口感较差。据相关数据统计, 宁波象山海域浒苔主要生长季节为

每年 12 月底至次年 3 月底, 具有很强的季节性, 野生浒苔产量已经不能满足市场需求<sup>[8-9]</sup>。

杂种优势是自然界中普遍存在的一种现象。其后代在产量、抗逆性、适应力等方面表现出较强的优势, 筛选优质“高生长率”“长成成熟期”的浒苔品种成为攻克其产业发展瓶颈的关键手段, 并且受到人们的广泛重视, 也产生了巨大的经济效益<sup>[10]</sup>。在海藻养殖中, 杂交育种多应用于紫菜和海带<sup>[11-12]</sup>。针对绿藻杂交方面, 国内外研究较少。笔者通过对浒苔进行生活史判定, 筛选雌雄配子体世代浒苔, 以期解决浒苔人工杂交技术瓶颈, 为未来获取优质浒苔品种, 并进行规模化养殖, 为浒苔绿藻市场供不应求的现状提供技术支撑。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 样品采集与培养

浒苔属绿藻采集自我国黄海沿海和日本海

收稿日期: 2018-09-05      修回日期: 2019-01-03

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0901500); 上海市科技英才扬帆计划(17YF1407900); 国家自然科学基金(41576163); 国家海洋局公益性科研专项(201205010)

作者简介: 施锦婷(1994—), 女, 硕士生, 研究方向为海藻繁育生物学。E-mail: jtshi0716@163.com

通信作者: 张建恒, E-mail: jh-zhang@shou.edu.cn

域,其中日本浒苔为高知大学藻类实验室保藏的藻种,样品信息见表1。海藻样品运回实验室后挑选藻体完整、健康的新鲜个体,用灭菌海水和软刷去除表面附生生物。通过形态学特征和分子方法对采集的样品进行种类鉴定,确定其为浒

苔(*U. prolifera*)和缘管浒苔(*U. linza*)种。在光周期 12L: 12D, 20 °C 和 50 ~ 60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的条件下,将其放在 VSE 培养基中充气培养,每 3 天更换 1 次培养基<sup>[13]</sup>。

表 1 浒苔属绿藻样品采集信息

Tab. 1 Sampling information of collected *Ulva* thalli

样品编号 Sample code	采样地点 Sampling locations	藻体状态 Sample state	经纬度 Longitude and latitude	采样日期 Sampling time
1	青岛 Qingdao	漂浮 floating	N36°2'55.65", E121°21'58.94"	2008. 7. 15
2	如东 Rudong	漂浮 floating	N32°31'19.42", E121°15'29.36"	2018. 4. 27
3	日本北海道 Hokkaido, Japan	漂浮 floating	N43°12'33.4", E140°51'30.7"	1994. 3. 1
4	射阳 Sheyang	漂浮 floating	N33°49'9.21", E120°30'53.6"	2018. 5. 18
5	大丰 Dafeng	漂浮 floating	N33°19'12", E120°50'24"	2018. 4. 25
6	如东 Rudong	固着 Attached	N32°39'29.28", E121°31'34.38"	2018. 5. 28
7	日本北海道 Hokkaido, Japan	漂浮 floating	N43°56'50.6", E141°38'16.8"	2004. 8. 19
8	青岛 Qingdao	漂浮 floating	N36°05'26.8", E121°29'37"	2017. 7. 26

## 1.2 浒苔属藻类生活史和性别判定方法

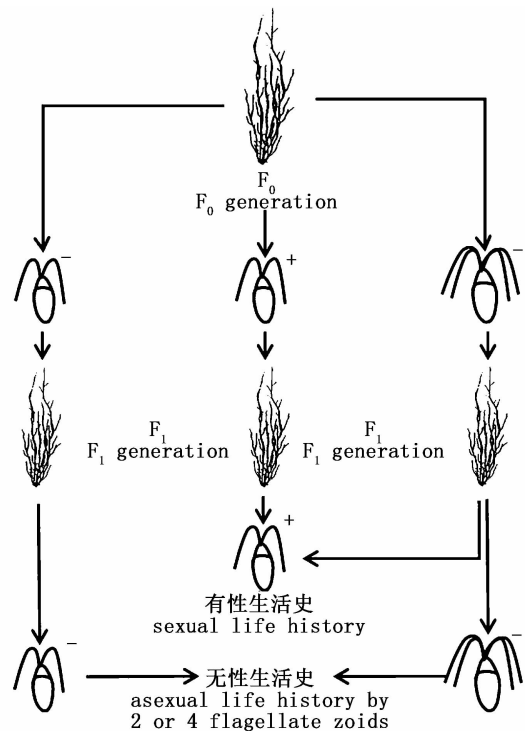
将藻体分别剪成 3 mm 片段,无菌淡水冲洗 1 min,按照密度为 0.8 g/L 培养于烧杯中,在光周期 12L: 12D, 20 °C 和 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下通气培养 2 ~ 3 d,每天显微观察藻体孢子/配子放散情况<sup>[14]</sup>,并记录孢子/配子的大小及鞭毛数。

取高密度孢子/配子液滴在盛有 12 mL 无菌海水玻璃培养皿(直径 90 mm)的中心,用白色荧光管对培养皿进行单侧光照射,观察孢子/配子的游动方向<sup>[15]</sup>。根据藻体两个连续世代放散的孢子/配子的鞭毛数量、大小和趋光性现象来判断藻体的生活史类型<sup>[16]</sup>。若藻体放散具有正趋光性的两鞭毛配子,则母体藻为配子体世代;若藻体放散具有负趋光性的两鞭毛或四鞭毛游动孢子,则母体藻为孢子体世代。

由浒苔两个连续世代的类型来判断该株浒苔的生活史类型。无性生殖表现为两个连续世代均放散带有负趋光性且大小相同的游动孢子。有性生殖则表现为两个连续世代产生具有正负趋光性的配子/孢子或者均产生具有正趋光性的配子<sup>[17]</sup>。见图 1。

趋光性可检验生殖细胞为孢子还是配子,但无法区分浒苔的雌雄。用无菌吸管吸取不同浒苔藻体释放的配子液放置在载玻片上进行混合镜检。若观察到两种配子各自游动、打圈,则表明

这两种配子为同性,若发现两种配子成堆聚集,呈现块状分布,则表明两种配子为异性,可以用于进一步杂交实验。



+ : 正趋光现象; - : 负趋光现象

+ : Positive phototaxis; - : negative phototaxis

图 1 浒苔的无性及有性世代判定示意图

Fig. 1 Determination of asexual and sexual life history for *Ulva*

### 1.3 浒苔与缘管浒苔雌雄配子体杂交实验

将纯化的雌雄配子液滴在装有 2 mL 灭菌海水的玻璃表面皿的向光一侧,雌雄配子会聚集接合形成合子,由于合子具有负趋光性,因此杂交成功的合子会游向背光一侧<sup>[18]</sup>,用滴管将合子吸取到载玻片上进行显微观察,最后转移至新的无菌烧杯中萌发培养,生长出的幼苗即为杂交后代。

### 1.4 杂交浒苔后代分子生物学检测

杂交后代萌发生长过程中,每 2 天更换 1 次培养液,待藻体生长至 1 cm 后,可转移至新的烧杯进行单株充气培养。选取健康母本浒苔、缘管浒苔及杂交后代进行 DNA 提取。5S rDNA 间隔序列引物设计及扩增程序参照 SHIMADA 等<sup>[19]</sup>的方法。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,用天根普通琼脂糖凝胶回收试剂盒(DP209)进行切胶回收,合格的扩增产物送至生工生物有限公司测序<sup>[20]</sup>。用 Clustal X2 软件对测序合格的序列进行多重比对分析,通过 Mega 7.0.26 构建序列对比图<sup>[21]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 浒苔生活史的判定

浒苔藻体切成 3 mm 左右的片段,培养于 8 孔板内,约 3~4 天后藻体释放生殖细胞。结果显示 8 株样品中有 7 株浒苔(编号分别是 1,2,4~8),1 株为缘管浒苔(编号是 3)。这 8 株藻的  $F_0$  均释放具有负趋光性的四鞭毛孢子(图版 I-1,2),经传代培养获得  $F_1$ ,其中 2 号和 4 号藻的  $F_1$  仍然释放负趋光性的四鞭毛孢子,从而确定其为无性生殖;剩余 6 株藻的  $F_1$  释放的生殖细胞为正趋光性的两鞭毛配子(图版 I-3,4),确定其为有性生殖。

### 2.2 浒苔雌雄配子体的判定

对浒苔配子体世代释放的配子液进行镜检,根据配子大小区分雌雄。镜检结果显示雌配子长和宽均比雄配子大。雌性配子平均大小为 6.7  $\mu\text{m}$  长,4.1  $\mu\text{m}$  宽;雄性配子平均大小为 6  $\mu\text{m}$  长,3.4  $\mu\text{m}$  宽。见图 2。

### 2.3 浒苔雌配子与缘管浒苔雄配子杂交过程

从配子囊中释放的雌雄配子呈梨形,具有一个橘红色眼点,两条等长的鞭毛(图版 I-4)。雌雄配子相遇后接合,其顶端先进行融合,雌雄配

子的鞭毛逐渐消失,运动力逐渐下降,由梨形逐渐转变成为圆形,形成合子并开始固着,合子具有两个眼点(图版 II-1~3)。将合子暗处理 24 h,5~7 d 后固着的合子开始萌发生长成为杂交后代幼苗(图版 II-4)。

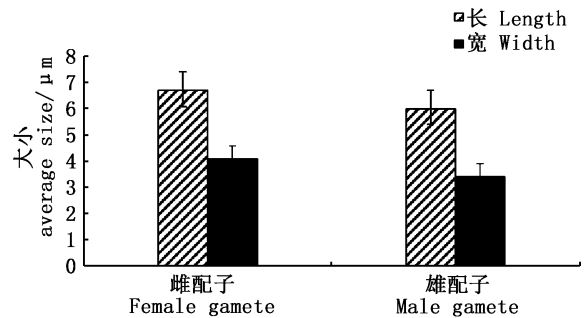


图 2 浒苔雌雄配子的大小( $n=20$ )

Fig. 2 The average size of female and male gametes of the targeted *Ulva prolifera* strain. the error bars indicate the standard deviations( $n=20$ )

### 2.4 浒苔与缘管浒苔杂交成功的判定

从缘管浒苔、浒苔及杂交后代 PCR 扩增产物电泳图中得出,5S rDNA 间隔区序列的电泳条带有显著区别,缘管浒苔特异性条带位于 350 bp 左右,浒苔孢子体的条带在 450 bp 左右,杂交后代条带较多,在 350 bp 和 450 bp 处可以看到明亮条带,见图 3。用割胶回收的方法对杂交种的 350 bp 和 450 bp 条带进行测序,测序结果分别与亲本浒苔与缘管浒苔的序列进行比较。从序列对比图中得出,杂交后代与缘管浒苔有 4 个碱基差异(图 4),与浒苔的序列有 15 个碱基差异(图 5),由此进一步推断杂交成功。

## 3 讨论

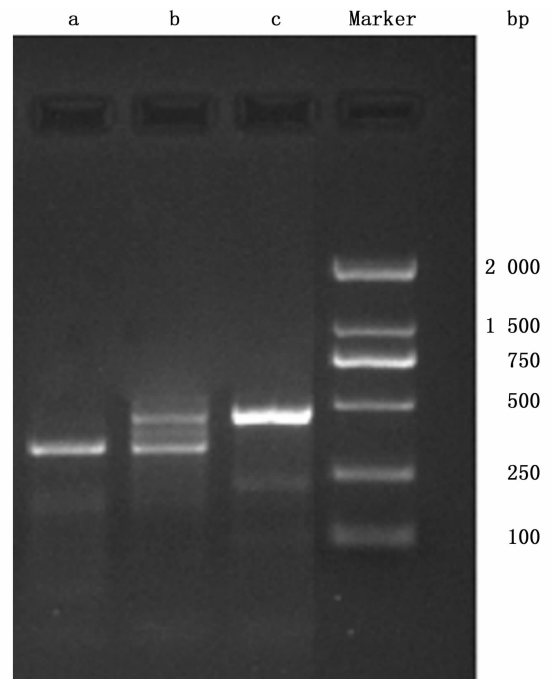
### 3.1 浒苔生活史研究及其应用

浒苔的生活史为配子单倍体与孢子二倍体同形世代交替。它的繁殖方式多样化,兼具有性繁殖、无性繁殖、单性繁殖和营养繁殖<sup>[22]</sup>。海区晴天时光照强度高于 300  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,浒苔的雌雄配子具有正趋光性,经单侧光照射后,雌雄配子在海平面聚集,利于其进行有性繁殖<sup>[13, 23]</sup>。有性繁殖可以使得亲本的序列发生重组,能够促进有利突变的形成,增强子代适应自然选择的能力<sup>[24]</sup>。在过去的十几年中,黄海绿潮优势种浒苔在基因序列上的演变可能与其进行有性生殖有关。

此外,有报道<sup>[25]</sup>显示海区自然环境复杂多变,浒苔雌雄配子也可不通过接合直接附着萌发发育成为配子体,甚至不放散出来直接附生在老藻体上,从而通过单性生殖完成生活史。

对于无性生殖浒苔,因为这种生殖方式释放的孢子附着后即可萌发生长成为新藻体,无须经过雌雄配子的杂交过程,大大缩短了繁殖周期,节省了生命周转过程中的能量损耗,为藻体在短时间内的快速生物量聚集提供基础<sup>[15]</sup>;此外,在浒苔经典养殖过程中,也往往采用藻种的无性生殖进行海上养殖,这种生殖方式既可以为浒苔人工栽培提供丰富的苗源,更重要的是可以保障优质基因稳定的遗传给后代,极大地降低养殖成本<sup>[14]</sup>。

截至目前,黄海绿潮灾害已连续 12 年大规模暴发,对沿海生态环境和生态服务功能均造成重大破坏<sup>[26]</sup>。绿潮平均每年覆盖面积可达 500 km<sup>2</sup> 左右,生物量可达 34.6 万 t<sup>[27-28]</sup>。虽然绿潮优势种浒苔能够竞争性快速吸收海水中的营养物质,但浒苔的生活史策略在其中扮演着重要作用<sup>[29-30]</sup>。有研究<sup>[31]</sup>表明,1 株浒苔在环境胁迫下,如果全部释放生殖细胞,经过 1 个生命周期,可形成数以万计的新生藻体。此外,浒苔生活史



a. 浒苔孢子体; b. 杂交种孢子体; c. 浒苔孢子体  
a. Sporophyte of *U. linza*; b. Sporophyte of hybrids; c. Sporophyte of *U. prolifera*

图 3 基于 5S rDNA 间隔区序列的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 Electrophoretic map of PCR amplified products based on 5S rDNA spacer sequences



图 4 杂交后代与亲本缘管浒苔 (350 p) 的序列对比图

Fig. 4 Sequence comparison between hybrid and parent *U. linza* (350 p)

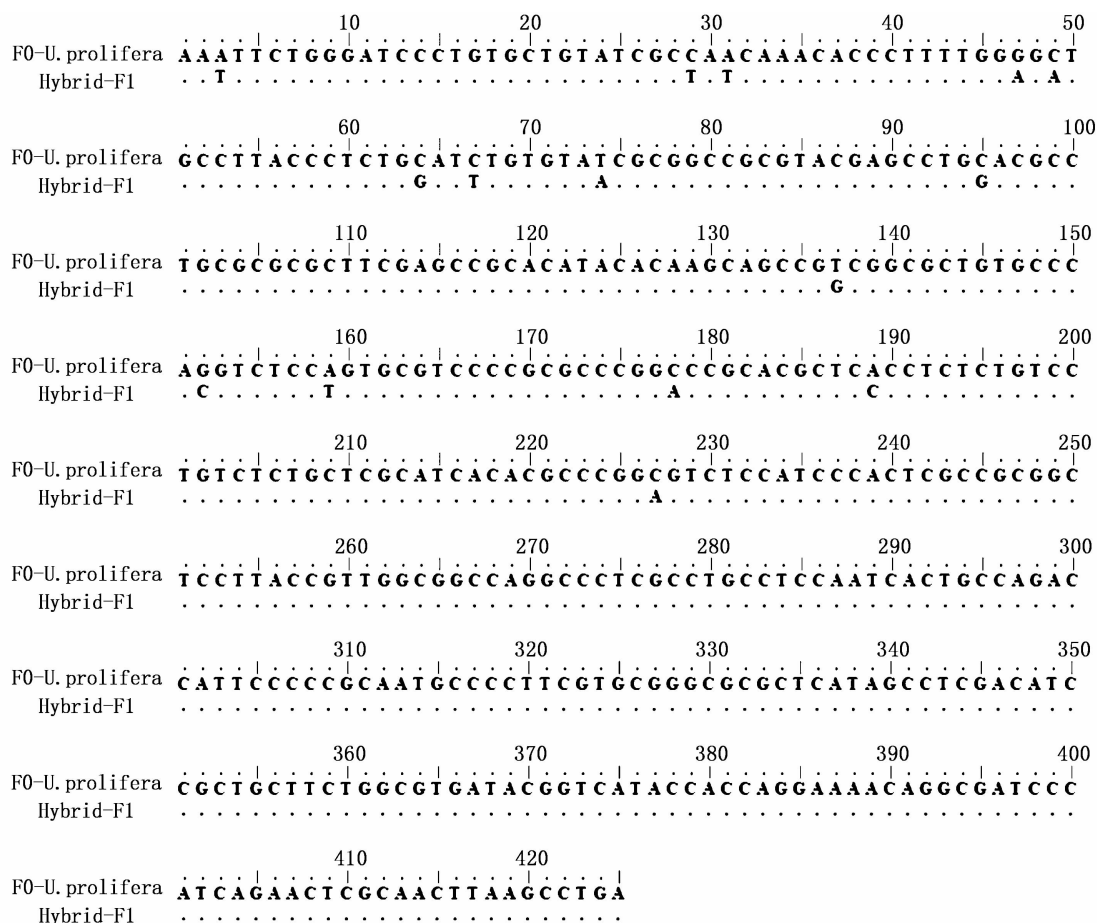


图5 杂交后代与亲本浒苔(450 p)的序列对比图

Fig.5 Sequence comparison between hybrid and parent *U. prolifera* (450 p)

策略多样化,单性生殖、无性生殖和有性生殖可以同时进行,可以根据环境条件的变化,通过自身调控改变生殖方式,以期获得最大生物量,成为绿潮快速暴发的原因之一<sup>[32]</sup>。

### 3.2 绿藻浒苔杂交技术研发与应用

浒苔是一种重要的经济海藻,其营养价值高,在食品、能源及生态修复方面应用广泛。由于传统浒苔优质品种的退化与海区环境因子的改变,可以利用杂交技术进行优质品种筛选,获得高生长率、高蛋白和低繁殖期的浒苔后代,有利于浒苔的人工规模化养殖。

藻类杂交育种是以基因型不同的品系进行交配产生具有一定优势的杂交种,再经过反复选育获得新品种的方法,其优势是可以有目的地将双亲的优良性状重组到杂交子代中杂交育种在农业上已应用得非常成功,杂交水稻是利用杂种优势的成功典范之一<sup>[33]</sup>。笔者通过筛选有性生活史的浒苔藻体,根据雌雄配子大小进行雌雄配

子区分,分别获得雌雄配子体,再经过同时诱导雌雄配子体放散,获得雌雄配子纯化溶液,混合均匀后,雌雄配子便可自由杂交,后代进行独立纯化培养,通过分子检测确定成功杂交的浒苔后代。

浒苔藻类杂交有两个关键难点。第一,在杂交进行之前,要了解该浒苔的生活史以及藻体切段后的放散时间,确保雌雄配子体浒苔能够在同一时刻或相近时刻进行放散,从而获得活性高的雌雄配子,提高接合率。第二,雌雄配子结合形成合子后,两次以上的负趋光性纯化必不可少,因为培养皿中仍然存在未杂交的浒苔雌雄配子。趋光性纯化的目的是除去合子培养液里配子的污染,使得合子聚集在背光一侧,获得高度纯化的合子液。杂种优势已有很多研究,在藻类领域中,紫菜和海带的杂交研究较多,紫菜的耐高温、耐低盐和高蛋白的优质品种已进行了海区规模化养殖<sup>[34]</sup>,已获得产量高、根系发达、色泽深褐的

优质品种<sup>[35]</sup>,未来优质的浒苔品种也将会通过杂交技术的进一步成熟而产业化应用。

### 参考文献:

- [1] 权伟, 应苗苗, 康华靖, 等. 中国近海海藻养殖及碳汇强度估算[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 509-514.  
QUAN W, YING M M, KANG H J, et al. Marine algae culture and the estimation of carbon sink capacity in the coastal areas of China [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 509-514.
- [2] 魏鉴腾, 裴栋, 刘永峰, 等. 浒苔多糖的研究进展[J]. 海洋科学, 2014, 38(1): 91-95.  
WEI J T, PEI D, LIU Y F, et al. Research progress of polysaccharides from *Enteromorpha* [J]. Marine Science, 2014, 38(1): 91-95.
- [3] 吴闯, 马家海, 高嵩, 等. 2010年绿潮藻营养成分分析及其食用安全性评价[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 141-150.  
WU C, MA J H, GAO S, et al. Nutrition analysis and food safety evaluation of green tide algae in 2010 [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 141-150.
- [4] 林英庭, 朱风华, 王利华, 等. 浒苔的营养成分及安全性评价[J]. 饲料工业, 2015, 36(16): 1-6.  
LIN Y T, ZHU F H, WANG L H, et al. Nutritional components and safety evaluation of *Enteromorpha prolifera* [J]. Feed industry, 2015, 36(16): 1-6.
- [5] 杨欢, 黎中宝, 李元跃, 等. 厦门海域浒苔种类鉴定及其营养成分分析[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 70-75.  
YANG H, LI Z B, LI Y Y, et al. Species identification and nutritional composition analysis of *Enteromorpha* in Xiamen coastal waters [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2013, 3(4): 70-75.
- [6] 张璇, 胡玲萍, 禹海文, 等. 浒苔玉米面条双螺杆挤压工艺研究[J]. 核农学报, 2016, 30(2): 304-312.  
ZHANG X, XU L P, YU H W, et al. Study on the twin-screw extrusion process of *Enteromorpha prolifera* corn noodles [J]. Journal of Nuclear Agriculture Science, 2016, 30(2): 304-312.
- [7] 姚东瑞. 浒苔资源化利用研究进展及其发展战略思考[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 473-475.  
YAO D R. Research progress and development strategy of resource utilization of *Ulva prolifera* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(2): 473-475.
- [8] 邬坤富. 象山港浒苔初步调查报告[J]. 浙江农业科学, 1961(12): 587-588.  
WU K F. Preliminary report on *Ulva prolifera* in Xiangshan harbor [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 1961(12): 587-588.
- [9] 张兰婷, 韩立民. 我国海藻产业发展面临的问题及政策建议[J]. 中国渔业经济, 2017, 35(6): 89-95.  
ZHANG L T, HAN L M. The problems and policy recommendations on the development of Chinese seaweed industry [J]. Fishery Economy in China, 2017, 35(6): 89-95.
- [10] 张跃环, 王昭萍, 喻子牛, 等. 养殖牡蛎种间杂交的研究概况与最新进展[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 613-623.  
ZHANG Y H, WANG Z P, YU Z N, et al. A recent review of interspecific hybridization among cultivated oysters [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 613-623.
- [11] 刘海洋, 李琳, 严兴洪. 坛紫菜与 *Pyropia radi* 的种间杂交实验[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(6): 882-887.  
LIU H Y, LI LIN, YAN X H. Study on the interspecies cross between *Porphyra haitanensis* and *Pyropia radi* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(6): 882-887.
- [12] 李晓捷. 杂交海带培育与应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.  
LI X J. Breeding and application of hybrid *Laminaria* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [13] CUI J J, SHI J T, ZHANG J H, et al. Rapid expansion of *Ulva* blooms in the Yellow Sea, China through sexual reproduction and vegetative growth [J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 130: 223-228.
- [14] 赵明林, 于克锋, 朱文荣, 等. 三种浒苔品系的人工室外养殖技术研究[J]. 海洋湖沼通报, 2018(5): 50-56.  
ZHAO M L, YU K F, Z W R, et al. Technology of outdoor cultivation of three strains of *Ulva prolifera* [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2018(5): 50-56.
- [15] 王晓坤, 马家海, 叶道才, 等. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生活史的初步研究[J]. 海洋通报, 2007, 26(5): 112-116.  
WANG X K, MA J H, YE D C, et al. Preliminary study on the life history of *Enteromorpha prolifera* [J]. Marine Science Bulletin, 2007, 26(5): 112-116.
- [16] HIRAOKA M. Different life histories of *Enteromorpha prolifera* (Ulvales, Chlorophyta) from four rivers on Shikoku Island, Japan [J]. Phycologia, 2003, 42(3): 275-284.
- [17] 马家海, 嵇嘉民, 徐韧, 等. 长石莼(缘管浒苔)生活史的初步研究[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 45-52.  
MA J H, JI J M, XU R, et al. Preliminary study on life history of *Ulva linza* Linnaeus [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(1): 45-52.
- [18] 赵明林. 浒苔繁育及加工工艺的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.  
ZHAO M L. The preliminary research on the *Ulva prolifera* breeding and processing technology [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University.
- [19] SHIMADA S, YOKOYAMA N, ARAI S, et al. Phylogeography of the genus *Ulva*, (Ulvaophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(5): 979-989.
- [20] 田晓玲, 霍元子, 陈丽平, 等. 江苏如东近海绿潮藻分子检测与类群演替分析[J]. 科学通报, 2011, 56(4/5): 309-

317.  
TIAN X L, HUO Y Z, CHEN L P, et al. Molecular detection and analysis of green seaweeds from Rudong coasts in Jiangsu Province [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(4/5): 309-317.
- [21] THOMPSON J D, GBSON T J, PLEWNIAC F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25:4876-4882.
- [22] LIU Q, YU R C, YAN T, et al. Laboratory study on the life history of bloom-forming *Ulva prolifera* in the Yellow Sea [J]. Estuarine Coastal & Shelf Science, 2015, 163: 82-88.
- [23] CUI J J, ZHANG J H, HUO Y Z, et al. Adaptability of free-floating green tide algae in the Yellow Sea to variable temperature and light intensity [J]. Marine pollution bulletin, 2015, 101(2): 660-6.
- [24] 商连光, 高振宇, 钱前. 作物杂种优势遗传基础的研究进展[J]. 植物学报, 2017, 52(1): 10-18.  
SHANG L G, GAO Z Y, QIAN Q. Progress in Understanding the Genetic Basis of Heterosis in Crops[J]. Chinese Bulletin of Botany, 52(1): 10-18.
- [25] SHAN G, CHEN X Y, YI Q Q, et al. A strategy for the proliferation of *Ulva prolifera*, main causative species of green tides, with formation of sporangia by fragmentation [J]. Plos One. 2010, 5(1): 199-208.
- [26] 刘佳, 张洪香, 张俊飞, 等. 浒苔绿潮灾害对青岛滨海旅游业影响研究[J]. 海洋湖沼通报, 2017(3): 130-136.  
LIU J, ZHANG H X, ZHANG J F, et al. Study on the effect of Green Tide disaster in Qingdao coastal tourism [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2017(3): 130-136.
- [27] 刘湘庆. 黄海绿潮形成过程中漂浮绿藻及微观繁殖体时空分布研究[D]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 2014.  
LIU X Q. Distributions of floating green algae and micro-propagules in the formatting and developing processes in the Yellow Sea in 2012 [D]. Qingdao: The First Institute of Oceanography, 2014.
- [28] 王艺, 张建恒, 霍元子, 等. 黄海绿潮发生过程监测[J]. 海洋湖沼通报, 2019(1): 135-145.  
WANG Y, ZHANG J H, HUO Y Z, et al. Monitoring the development of Green tides in Yellow Sea [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2019(1): 135-145.
- [29] 江海英, 罗鹏, 于宗赫, 等. 大亚湾浒苔分子鉴定及其对养殖废水中营养盐的吸收特性研究[J]. 热带海洋学报, 2013, 32(5): 93-98.  
JIANG H Y, LUO P, YU Z H, et al. Identification of *Enteromorpha* sp. from Daya Bay and its capacity of absorbing nutrients from aquaculture wastewater [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2013, 32(5): 93-98.
- [30] WANG S Y, HUO Y Z, ZHANG J H, et al. Variations of dominant free-floating *Ulva* species in the source area for the world's largest macroalgal blooms, China: Differences of ecological tolerance [J]. Harmful Algae, 2018, 74: 58-66.
- [31] ZHANG J H, HUO Y Z, YU K F, et al. Growth characteristics and reproductive capability of green tide algae in Rudong coast, China [J]. Journal of applied phycology, 2013, 25(3): 795-803.
- [32] 陈群芳, 何培民, 冯子慧, 等. 漂浮绿潮藻浒苔孢子/配子的繁殖过程[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1069-1076.  
CHEN Q F, HE P M, FENG Z H, et al. Reproduction of spores/gametes of floating green tide algae *Ulva prolifera* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(5): 1069-1076.
- [33] 陈立云, 雷东阳, 唐文帮, 等. 论杂交水稻的育种方法[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(1): 1-6.  
CHEN L Y, LEI D Y, TANG W B, et al. Review on the methods of hybrid rice breeding [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science), 2015, 41(1): 1-6.
- [34] 史修周. 坛紫菜品质测定条件的优化及新品系品质分析[D]. 福建: 集美大学, 2010.  
SHI X Z. Optimization of key factors in the measurement of quality of *Porphyra haitanensis* and quality analysis of its new lines [D]. Fujian: Jimei University, 2010.
- [35] 王国文. 我国主要海带栽培品种的性状评价与遗传学分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.  
WANG G W. Traits evaluation and genetic analysis of main cultivars of *Laminaria* in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.

## Artificial hybridization and cross-breeding of *Ulva*

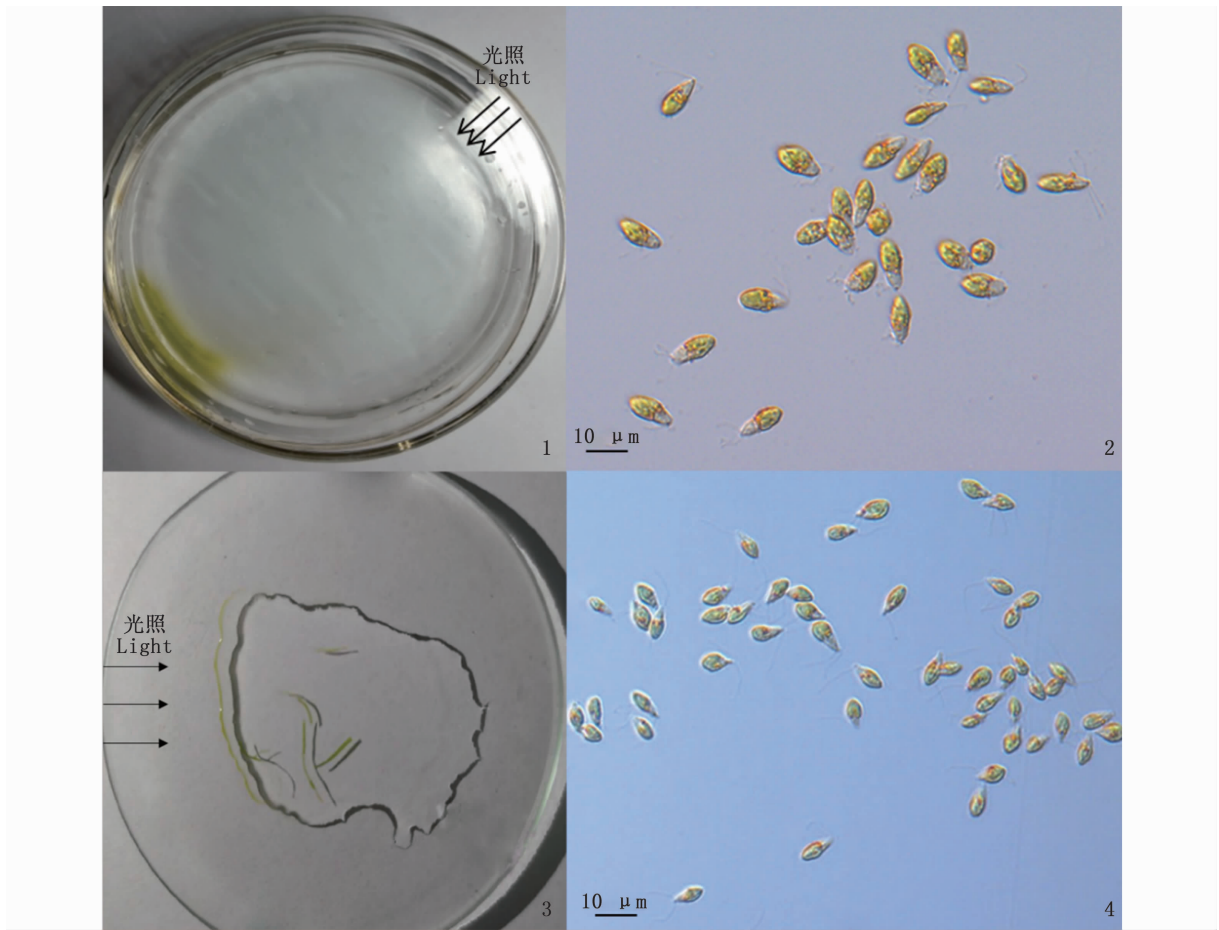
SHI Jinting<sup>1,2</sup>, ZHANG Jianheng<sup>1,2</sup>, CUI Jianjun<sup>3</sup>, ZHAO Xiaohui<sup>1,2</sup>, KANG Xinyu<sup>1,2</sup>, LIU Jinlin<sup>1,2</sup>, WEN Qinlin<sup>1</sup>, YANG Xiaoqian<sup>1</sup>, HE Peimin<sup>1,2</sup>

(1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute of Marine Ecological Environment and Rehabilitation, Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524094, Guangdong, China)

**Abstract:** The technique of interspecific hybridization between *Ulva prolifera* and *Ulva linza* was reported. Based on the phototactic response of zooids and the characteristics of life cycle, female gametophyte of *U. prolifera* and male gametophyte of *U. linza* was selected from the *Ulva* population. Mature thalli were induced to release gametes in a Petri dish under a unilateral light source. Gametes were purified at least twice according to their respective phototaxis. By homogeneous mixing and microscopic observation, we can find that female and male gametes swam rapidly to each other and joined to form zygotes. During the process of conjugation, the flagella of female and male gametes gradually disappeared, the motility decreased, and the shuttle-shaped gametes changed into round zygotes. After twice purification, the zygote can grow into the offspring of *Ulva*. The progeny of *Ulva* was examined by gel electrophoresis and molecular biology. Result showed that the hybrids had specific sequences of *U. prolifera* and *U. linza* on 5S rDNA spacer sequence. The successful hybridization of *U. prolifera* and *U. linza* was confirmed and the artificial hybridization technology of *Ulva* was established. This technology has not yet been reported in China before, and it can provide a technical demonstration for the future development of a variety of high-quality traits of *Ulva* strains. It can also provide scientific support for carrying out large-scale facility culture and obtaining stable and high-yield biomass of *Ulva*.

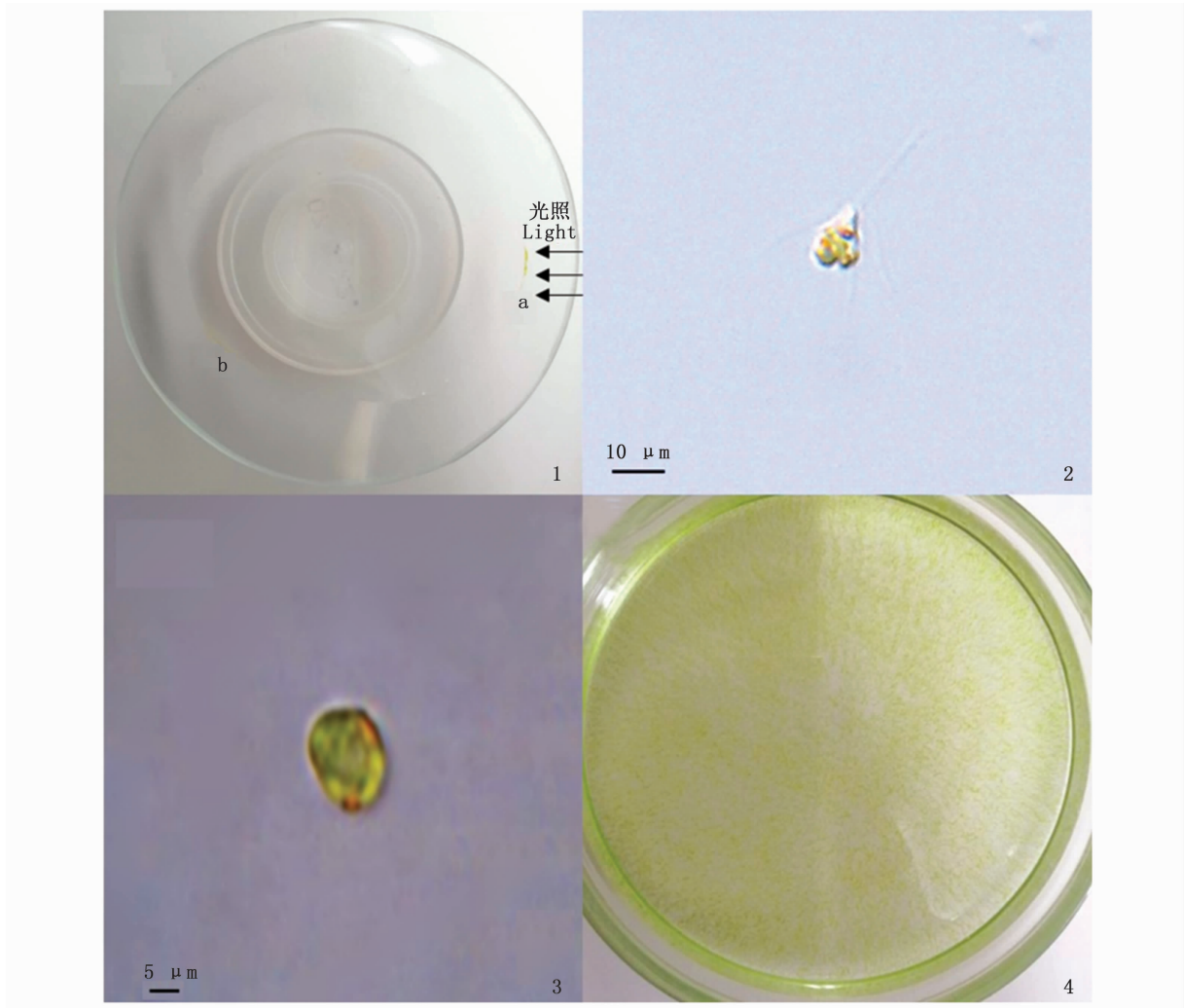
**Key words:** *Ulva prolifera*; *Ulva linza*; hybridization; breeding





1. 浒苔孢子的负趋光性现象; 2. 四鞭毛的浒苔孢子; 3. 浒苔配子的正趋光性现象; 4. 两鞭毛的浒苔配子  
1. Negative phototaxis of *U. prolifera* spores; 2. Spores with four flagellates; 3. Positive phototaxis of *U. prolifera* gametes; 4. Male gametes with two flagellates

图版 I 配子和孢子的趋光性现象  
Plate I Phototaxis of gametes and spores



1. 雌雄配子形成合子的过程(a:未接合的雌雄配子;b:合子); 2. 雌雄配子接合; 3. 合子具两个眼点; 4. 合子萌发

1. The process of zygote formation by male and female gametes (a: Unjointed male and female gametes; b: Zygotes); 2. Conjugation of female and male gametes; 3. Zygote with two eyespots; 4. Zygotes germination

图版 II 雌雄配子杂交及合子萌发过程

Plate II Male-female gamete hybridization and zygote germination