

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230110002

http://www.yykxjz.cn/

陶伟丽, 钟晨辉, 张鹏, 郭辰涛, 王铁杆, 林琪. 短波紫外线辐照坛紫菜壳孢子制备色彩突变体的新途径. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 235-244

TAO W L, ZHONG C H, ZHANG P, GUO C T, WANG T G, LIN Q. A novel pathway to produce color mutants by short-wavelength ultraviolet ray irradiation on the germinating conchospore in *Pyropia haitanensis*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 235-244

短波紫外线辐照坛紫菜壳孢子 制备色彩突变体的新途径*

陶伟丽^{1,3} 钟晨辉¹ 张鹏² 郭辰涛¹ 王铁杆² 林琪^{1①}

(1. 福建省水产研究所 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室 海洋生物种业技术国家地方联合工程研究中心 福建 厦门 361013; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 浙江 温州 325005; 3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

摘要 壳孢子萌发时期是坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)减数分裂发生的时期,壳孢子萌发形成的最初4个细胞呈线性排列,形成减数分裂四分体,且发生遗传重组的四分体细胞可以决定叶状体的发育模式和性状分离。因此,诱变产生色彩突变的嵌合叶状体相比诱变叶状体产生的点状色块,将更易于获得突变细胞。本研究为获得坛紫菜人工色彩嵌合突变体,使用不同剂量(50、100、200、300、400、500和600 J/m²)的短波紫外线(UV-C, $\lambda=254$ nm)辐照坛紫菜壳孢子,培养数天后,在壳孢子苗中出现了色彩突变的嵌合叶状体。结果显示,低剂量(50 J/m²)的辐射促进壳孢子萌发,而辐照剂量高于100 J/m²则会抑制壳孢子萌发和分裂。辐照剂量在50~400 J/m²范围内,色彩突变体出现的频率随辐照剂量的增加而增加,辐照剂量分别为300和400 J/m²时,突变率分别达到15.22%和17.18%。其中,出现色彩突变的嵌合叶状体以2色块嵌合体 and 3色块嵌合体居多,4色块嵌合体最少,但辐照剂量增加至400 J/m²以上时,随着辐照剂量的增加,色彩突变体出现的频率反而下降,表明最适宜的诱变剂量为300或400 J/m²。同时,短波紫外线辐照也使色彩突变嵌合体的长宽比下降,采用生物酶解法从色彩嵌合体中分离出了单色的体细胞萌发体。本研究为坛紫菜人工色彩突变体的制备和诱变育种提供了新途径。

关键词 坛紫菜;壳孢子;短波紫外线;色彩突变体;分离

中图分类号 S968.43 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0235-10

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国特有的紫菜栽培品种,主要栽培于浙江、福建和广东沿海地区,其产量约占全国紫菜总产量的75%(曾呈奎等,1985)。至今大规模人工栽培的紫菜品种仍是以自留种为主,且出现了明显的种质退化、产量和质量下降等现象,培育紫菜新种质仍是产业发展的重要需求。

色彩突变是紫菜生活史中发生的一种特殊的生物学现象,对紫菜色彩突变体进行遗传学分析,不仅有助于掌握紫菜的基本遗传规律,还可以为紫菜良种培育提供重要的遗传资源。

目前,紫菜的色彩突变体主要通过诱变途径获得(Yan *et al.*, 2000),最广泛应用的诱变剂为化学诱变剂

* 财政部和农业农村部:现代农业产业技术体系(CARS-50)、浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2021C02069-9)、福建省科技计划(2023R1053)和温州市科技计划(S2020008)共同资助。陶伟丽, E-mail: 1490475261@qq.com

① 通信作者:林琪,研究员, E-mail: xmqlin@sina.com

收稿日期:2023-01-10,收修改稿日期:2023-02-14

甲基硝基亚硝基胍(MNNG)(Yan *et al.*, 2004)和物理诱变剂 γ 射线(Lee *et al.*, 2018a; Wang *et al.*, 2000)。利用 MNNG 对条斑紫菜(*P. yezonensis*)、坛紫菜等生活史中各阶段的藻体, 如丝状体(王金锋等, 2007; Li *et al.*, 2008)、壳孢子萌发体(李琳等, 2006)、叶状体(Lee *et al.*, 2018a; 严兴洪等, 2009)等进行诱变处理, 成功地获得了大量的色彩突变体。采用 ^{60}Co - γ 射线分别对条斑紫菜叶状体和长紫菜(*P. dentata*)壳孢子萌发体进行诱变、分离并获得了多个色彩突变体(Lee *et al.*, 2018b; 严兴洪等, 2009)。虽然, 以上诱变剂都具有良好的诱变效果, 但化学诱变剂对操作者有一定的污染风险, 操作安全性低, 存在二次污染的问题。物理诱变剂 ^{60}Co - γ 虽不存在化学诱变剂的实验操作问题, 但仅适用于具有一定生物量的实验材料(叶状体和丝状体), 不宜用于对微观孢子和原生质体等进行诱变。而紫外线辐射诱变具有无污染、设备简单、易于操作、成本低等优点(何培民等, 2007; Ding *et al.*, 2020; 潘雪等, 2020)。波长范围为 100~275 nm 的短波紫外线(UV-C)可以解除生命体 DNA 和蛋白质之间的交联, 使 DNA 链断裂形成嘧啶二聚体, 从而导致基因突变(Elliott *et al.*, 2001)。利用人工制备的 UV-C 光源不仅可以用于日常生活中的杀菌消毒, 且 UV-C 辐照对植物和微生物具有较好的诱变效果(Pfendler *et al.*, 2021; Slatinskaya *et al.*, 2018; Jeon *et al.*, 2018; Rezzan *et al.*, 2014)。戴继勋等(1990)和严兴洪(1992)研究表明, 利用紫外线辐照条斑紫菜和坛紫菜的原生质体, 可以获得形态变异体和红色变异体。过去藻类学主要对紫菜原生质体、丝状体和叶状体等进行诱变(严兴洪等, 2000; 张倩等, 2019; 赵爽等, 2019; 陈昌生等, 2008), 却鲜有对壳孢子进行诱变的研究报道。在坛紫菜世代交替的生活史中, 壳孢子萌发初期是双倍丝状体($2n$)转变成单倍叶状体(n)的关键发育阶段, 也是减数分裂的发生时期, 所产生的四分体是经过遗传重组后的产物, 因此, 这个发育转化过程产生的四分子细胞排列变化将决定后续叶状体的发育趋向(Ohme *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 2013)。基于此背景, 对萌发初期的坛紫菜壳孢子进行诱变处理, 极大地增加基因突变频率, 且易于获取更多的遗传重组表型, 这将不同于诱变叶状体产生的点状突变色块, 也容易获得诱变出来的突变细胞。本研究采用短波紫外线($\lambda=254$ nm)辐照坛紫菜壳孢子, 以期获得具有色彩变异的壳孢子萌发体, 并从色彩嵌合体分离出单色叶状体, 为丰富坛紫菜诱变育种技术途径提供科学基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本研究所用坛紫菜野生型品系采自福建省平潭岛自然岩礁上, 于 2017 年利用单性生殖技术建立遗传纯系, 以自由丝状体的形式保存在实验室内。保存条件: 温度为 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $4 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 10L : 14D, 每半年更换 1/2 的 MES 培养液。

采用小型粉碎机将一定生物量的自由丝状体切碎成约 100 μm 的藻丝, 将其接种到灭菌的贝壳表面。黑暗处理 3 d 后, 将接种的贝壳转移至温度为 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 $5 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期为 10L : 14D 的条件下培养。培养 10 d 后, 清洗贝壳表面上多余的自由丝状体, 及时更换新鲜培养液, 将光照强度提高到 $20 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 其他培养条件不变。培养数周后, 当整个贝壳表面呈红紫色时, 将培养温度提高到 (28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 同时, 把光照强度低降到 $10 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 10L : 14D。数周后, 当贝壳表面长出膨大藻丝时, 取 1~2 个成熟的贝壳丝状体放入含有 150 mL 培养液和数根尼龙绳单丝的烧杯(250 mL)中进行充气培养(Zhong *et al.*, 2019), 培养温度为 (24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $40 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。当镜检尼龙绳单丝上附着一定数目的壳孢子后, 将放散的壳孢子经过 100 目尼龙筛绢滤去杂质后, 利用细胞漏斗收集到 250 mL 烧杯内以供诱变实验。

1.2 紫外线诱变和色彩突变体的分离

将收集到的坛紫菜壳孢子悬浮液摇晃均匀, 悬浮液中壳孢子的密度在 10×20 倍显微镜下每个视野约有 20 个壳孢子为宜, 平均置于 24 个培养皿($\Phi=9$ cm)中, 培养皿内孢子液水层高度约为 2 mm。采用短波紫外灯管作为辐照源, 使用 LS126C 型紫外照度计测量 UV-C 辐射强度($425 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), 按照公式: 辐照剂量(J/m^2)=辐照时间(s) \times 辐照强度(W/m^2), 分别设置辐照剂量为 0 (对照组)、50、100、200、300、400、500 和 600 J/m^2 , 每个剂量组设置 3 个平行组。经辐照过的壳孢子在黑暗条件下静置培养 3 d, 再转移至白光下继续培养 7 d, 统计每组壳孢子存活数目和萌发数目。培养条件: 温度为 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 10L : 14D。在相同条件下, 将壳孢子萌发体继续培养 7 d, 再统计发生色彩变异的壳孢子萌发体数目。再继续培养 7 d, 随机抽取 30 个样本, 测定各实验组壳孢子萌发体的长度和宽度, 计算其长宽比值。使用 Leica DMi8 倒置显微镜(德国)观察壳孢子萌

发和生长过程中的细胞形态变化,整个培养期为35 d。将色彩突变嵌合叶状体进行酶解处理,制备体细胞单离细胞,经培养后发育成再生叶状体(Zhang *et al.*, 2011),且参照色名字典对色彩变异体分别命名(Wada, 1956)。

1.3 数据分析

壳孢子的存活率、萌发率、突变率的计算公式如下:

$$\text{存活率(survival rate, \% , SR)} = D_1/D_0 \times 100\%$$

$$\text{萌发率(germination rate, \% , GR)} = D_2/D_0 \times 100\%$$

$$\text{突变率(mutation rate, \% , MR)} = D_3/D_2 \times 100\%$$

式中, D_0 为实验开始时坛紫菜壳孢子的数目, D_1 为黑暗培养3 d后存活的壳孢子数目, D_2 为光照培养7 d后的壳孢子萌发体数目, D_3 为实验结束时发生色彩突变的壳孢子萌发体数目。

采用 Excel 2010 软件进行实验数据的统计,使用 IBM SPSS 20 软件对实验数据进行差异显著性分析,所有实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,设置差异水平为 $P < 0.05$,统计值采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,所有图表使用 Origin 9.0 软件制作。

2 结果

2.1 坛紫菜壳孢子的存活率(SR)与萌发率(GR)

UV-C 辐照对坛紫菜壳孢子有不同程度的致死效应。辐照后,各组壳孢子 SR 均低于对照组(图 1)。低剂量(50 和 100 J/m^2)的 UV-C 辐照对壳孢子萌发有一定的促进作用,当辐照剂量超过 100 J/m^2 时,GR 呈下降趋势,且随着辐照剂量增加,壳孢子的 SR 明显

下降,当辐照剂量达到 600 J/m^2 时,少有壳孢子萌发,且壳孢子 SR 最低(图 1)。UV-C 辐照剂量为 300 J/m^2 时,恢复正常光照培养 3 d 后,可以观察到部分壳孢子出现萎缩,色素减淡和细胞解体(图 2a),再经正常光照培养 7 d 后,少部分壳孢子则发育成双细胞的细胞团(图 2b),最后经正常光照培养 7 d 后,少部分壳孢子发育成正常的幼苗(图 2c)。

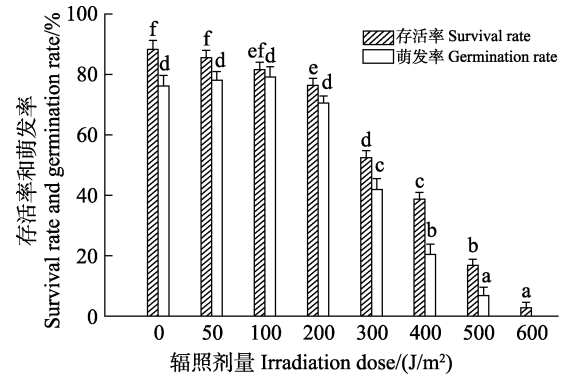


图 1 不同剂量 UV-C 辐照下壳孢子的存活率和萌发率
Fig.1 Survival rate and germination rate of conchospores under different doses of UV-C irradiation

柱形图上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Different letters on the top of the columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.2 壳孢子萌发体的死亡率与突变率(MR)

辐照剂量在 100~600 J/m^2 范围内,随着 UV-C 辐照剂量的增加,壳孢子萌发体死亡率(death rate, DR, %)呈上升趋势,辐照剂量为 600 J/m^2 时,壳孢子几乎全部死亡(DR 为 97.65%)。以色彩变异作为突变性状进行统计,在辐照剂量为 50~400 J/m^2 时,色彩嵌合的

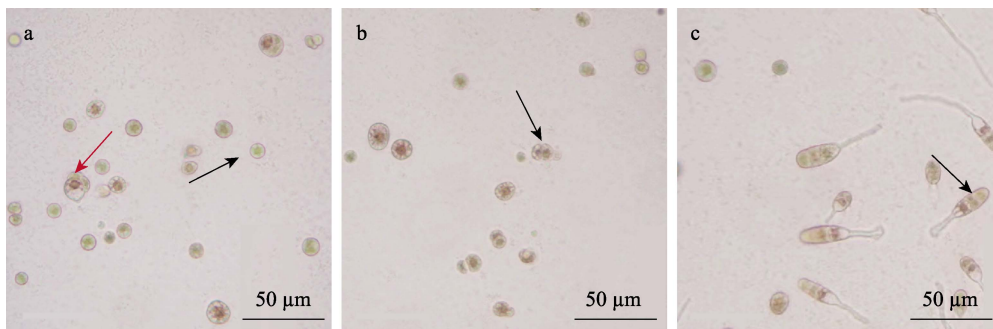


图 2 UV-C 辐照后坛紫菜壳孢子的萌发
Fig.2 Germination of conchospores of *P. haitanensis* after UV-C irradiation

- a: UV-C 辐照后,部分壳孢子呈现正常的色素体(红色箭头),但大量壳孢子色素体减淡、细胞萎缩或死亡(黑色箭头);
b: UV-C 辐照后,出现双细胞团(黑色箭头); c: 在 UV-C 辐照后,壳孢子发育成正常的幼苗(黑色箭头)。
a: After UV-C irradiation, a few conchospores with normal chromatophores (red arrow), but a large number of conchospores with light colored chromatophores shrunk in shape or died (black arrow); b: Two-celled clusters appeared after UV-C irradiation (black arrow); c: Conchospores developed into normal germlings after UV-C irradiation (black arrow).

壳孢子萌发体的频率(MR)随着 UV-C 辐照剂量的增加呈上升的趋势; UV-C 辐照剂量超过 400 J/m²时, MR 则呈下降趋势; UV-C 辐照剂量达到 500 J/m²时, MR 最低。当 UV-C 辐照剂量为 300 和 400 J/m²时, MR 达到较大值, 分别为 15.22%和 17.18%, 二者之间无显著差异($P>0.05$), 但与其他实验组相比差异显著($P<0.05$) (表 1)。

表 1 紫外线辐照对坛紫菜壳孢子的诱变效果

(平均值±标准差, $n=3$)

Tab.1 Mutagenic effect of UV-C irradiation on conchospores of *P. haitanensis* (Mean±SD, $n=3$)

辐照剂量 Irradiation dose/(J/m ²)	突变率 Mutation rate/%	萌发体死亡率 Germlings death rate/%	长宽比值 Length-to-width ratio
0	0	15.85±3.62 ^a	8.13±0.63 ^f
50	1.343±1.69 ^a	22.71±11.72 ^{ab}	7.06±0.77 ^{ef}
100	2.330±1.79 ^{ab}	19.48±3.35 ^{ab}	6.29±0.53 ^{cd}
200	5.140±3.29 ^c	32.19±22.36 ^b	5.01±0.68 ^{bc}
300	15.220±7.62 ^d	51.70±11.98 ^c	4.24±0.57 ^{ab}
400	17.180±10.2 ^d	61.00±5.8 ^d	3.80±0.89 ^{ab}
500	3.310±2.68 ^b	83.98±4.10 ^e	3.16±0.48 ^a
600	0	97.65±2.51 ^f	3.06±0.55 ^a

注: 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letter superscripts indicate significant differences ($P<0.05$).

2.3 壳孢子萌发体的长宽比与形态变化

经不同剂量 UV-C 照射后, 存活的壳孢子所产生的萌发体在恢复光照培养 21 d 后发育成叶状体。与对照组相比, 100~600 J/m² 剂量组叶状体的长宽比存在显著差异($P<0.05$), 且高剂量(300~600 J/m²)辐照组的叶状体长宽比显著下降(表 1)。与此同时, 观察了 UV-C 辐照对壳孢子所产生的壳孢子萌发体的形态变化。结果显示, 对照组壳孢子萌发体始终保持正常的披针形状(图 3a)。但在 UV-C 辐照后恢复光照正常培养 14 d, 壳孢子萌发体的颜色和形态明显发生变化(图 3b~f), 壳孢子萌发体的顶端细胞出现滞育现象(图 3g~l)。

2.4 色彩嵌合叶状体

不同剂量 UV-C 辐照密度为 10⁴ 个/mL 的壳孢子后产生的壳孢子萌发体中均出现嵌合色块, 而对照组未出现(图 4), 说明色彩突变体是由 UV-C 辐照诱导所产生的。出现色彩突变的嵌合叶状体以 2 色块嵌合体和 3 色块嵌合体居多, 4 色块嵌合体最少(图 5)。组成嵌合叶状体色块的颜色主要有紫褐色、红褐色、

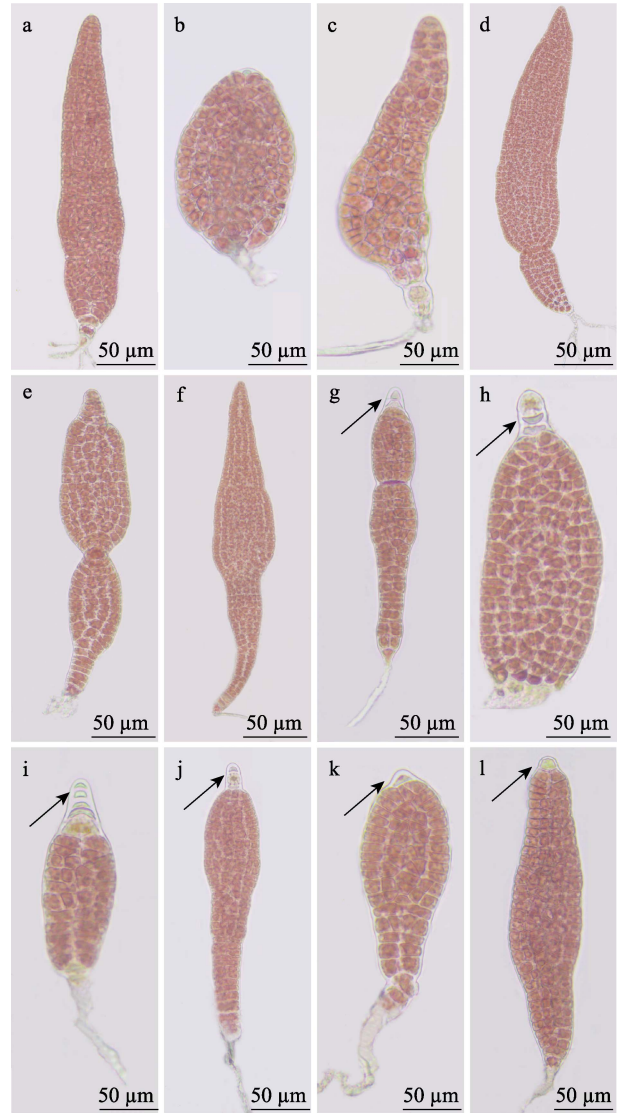


图 3 壳孢子萌发体形态和顶端细胞的滞育
Fig.3 Cell morphology and apical diapause of conchospore germlings

a: 发育正常的壳孢子萌发体; b~f: 形态异常的壳孢子萌发体; g~l: 顶端细胞滞育(箭头)的壳孢子萌发体。
a: Normally developed conchospore germlings; b~f: Abnormally shaped conchospore germlings; g~l: Apical diapaused cells (arrow) of conchospore germlings.

黄褐色、浅红色等, 其中, 除紫褐色为正常苗体的颜色外, 突变色块中以黄褐色出现的频率最高, 其次为灰棕色, 而紫红色和浅绿色则出现频率最低。在辐照强度为 50~500 J/m² 范围内, 随着辐照强度的增加, 叶状体上出现色素突变细胞块的数目呈先增高后降低的趋势, 辐照强度为 300 和 400 J/m² 时, 颜色突变的数量最多, 表明这 2 个诱变剂量是诱导坛紫菜壳孢子产生色彩突变的嵌合叶状体有效的辐照强度(表 1 和表 2)。在恢复光照培养 35 d 后, 大部分叶状体仍能正常发育, 呈现单一的紫褐色(图 6a)。然而, 各实验组发生色彩

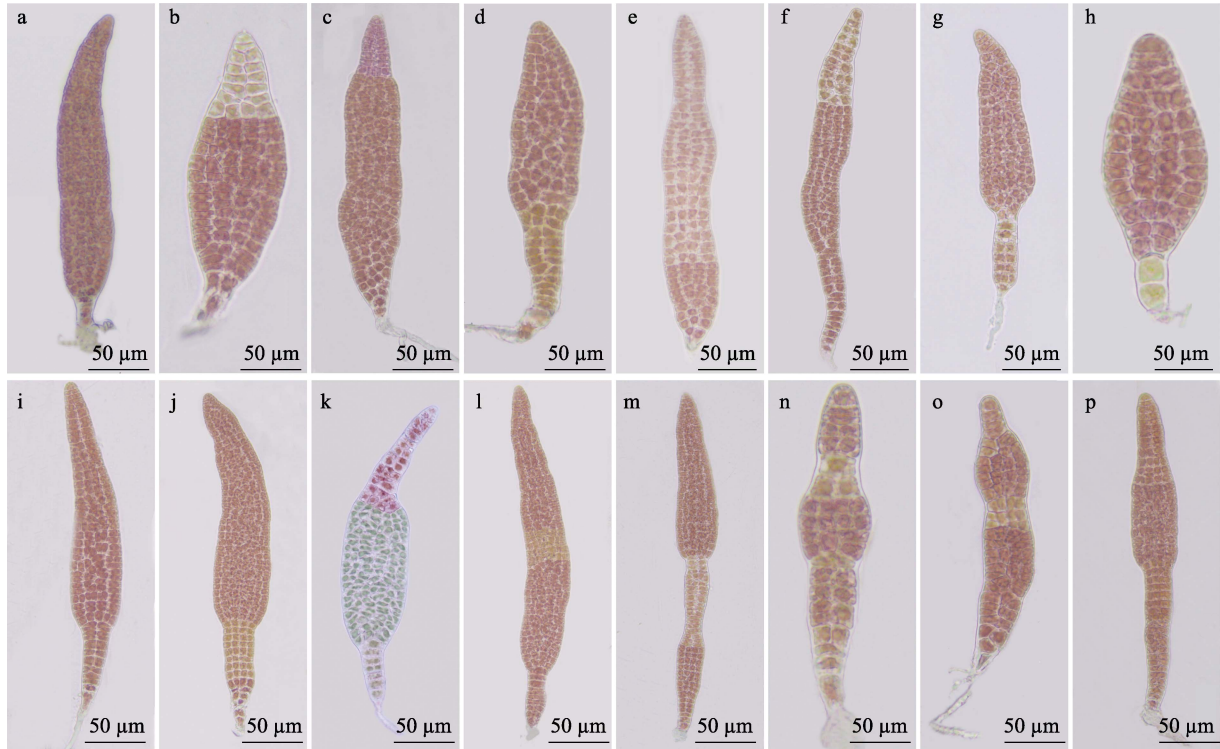


图 4 四分体发生色彩突变的壳孢子萌发体

Fig.4 Apparent pigmentation mutants of tetrads in conchospore germlings

a: 发育正常的壳孢子萌发体; b~p: 色彩突变色块线性排列于嵌合壳孢子萌发体。

a: Normally developed conchospore germlings; b~p: Apparent sectoried pigmentation mutants linearly arranged in conchospore germlings.

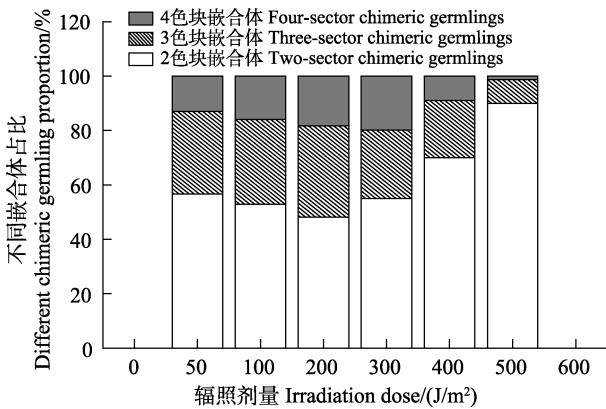


图 5 不同色彩嵌合体的比例

Fig.5 Proportions of different chimeric germlings

突变的嵌合叶状体中出现的 2 色块嵌合体占 50%以上(图 5、图 6b~d)。

2.5 色彩突变体分离

将含有 7 种不同色彩突变色块的嵌合叶状体各选取 1 株进行酶解, 获得了大量的单离体细胞, 经光照培养 60 d 后, 从体细胞再生体中挑选了黄褐、红褐、浅黄、浅绿和浅红等 5 种颜色的单色突变体各 10 株, 变异体的颜色与原有嵌合叶状体上观察到的

色素变异细胞颜色保持一致(图 7)。

3 讨论

在已有的紫菜诱变方法中, 报道最多的是使用诱变剂 MNNG 和 ⁶⁰Co-γ, 但 UV-C 辐照是一种操作简单、应用广泛、污染风险低的诱变方法, 更适合对孢子和原生质体进行诱变。虽然, UV-C 辐射诱变条斑紫菜原生质体的研究已有报道, 但由于实验条件的限制, 并未对诱变效率进行分析(严兴洪, 1992)。本研究以壳孢子为诱变材料, 相比于具有细胞壁结构的叶状体和丝状体细胞, 刚释放的壳孢子无细胞壁, 更易于 UV-C 的穿透。同时, 壳孢子发生减数分裂形成遗传重组的四分体, 对壳孢子进行诱变更利于获得突变细胞, 这完全不同于诱变叶状体和丝状体所产生的点状突变。

本研究使用 UV-C 辐照坛紫菜的壳孢子取得了较好的色彩突变体诱变效果。在辐照强度为 50 和 100 J/m² 时, 随着辐照强度的增加, 壳孢子死亡数量的增加并不明显, 只有少部分壳孢子细胞颜色变淡和内缩, 但壳孢子 GR 却呈上升趋势, 这与使用低剂量 UV-C 辐射对条斑紫菜原生质体的诱变结果相似(严兴洪,

表2 壳孢子经不同剂量 UV-C 辐照后培养 35 d 后产生的嵌合叶状体中出现颜色突变的类型和数量
Tab.2 Types and numbers of color mutations in chimeric blades produced by conchospores irradiated with different doses of UV-C for 35 days

辐照剂量 Irradiation dose/(J/m ²)	色彩嵌合体色块的种类与数目 Types and numbers of color mutations in chimeric blades									
	紫褐 Purple brown	红褐 Red brown	黄褐 Yellow brown	紫红 Purple red	浅红 Light red	浅黄 Light yellow	浅灰 Light gray	浅绿 Light green	灰棕 Gray brown	合计 Total number
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	4	1	1	0	0	0	0	0	1	7
100	13	2	9	0	1	2	0	0	5	32
200	17	3	13	0	1	0	1	0	5	40
300	19	9	12	2	2	1	4	2	6	57
400	20	11	13	3	3	3	4	1	8	66
500	6	2	6	0	2	3	3	0	6	28
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合计 Total number	79	28	54	5	9	9	12	3	31	230

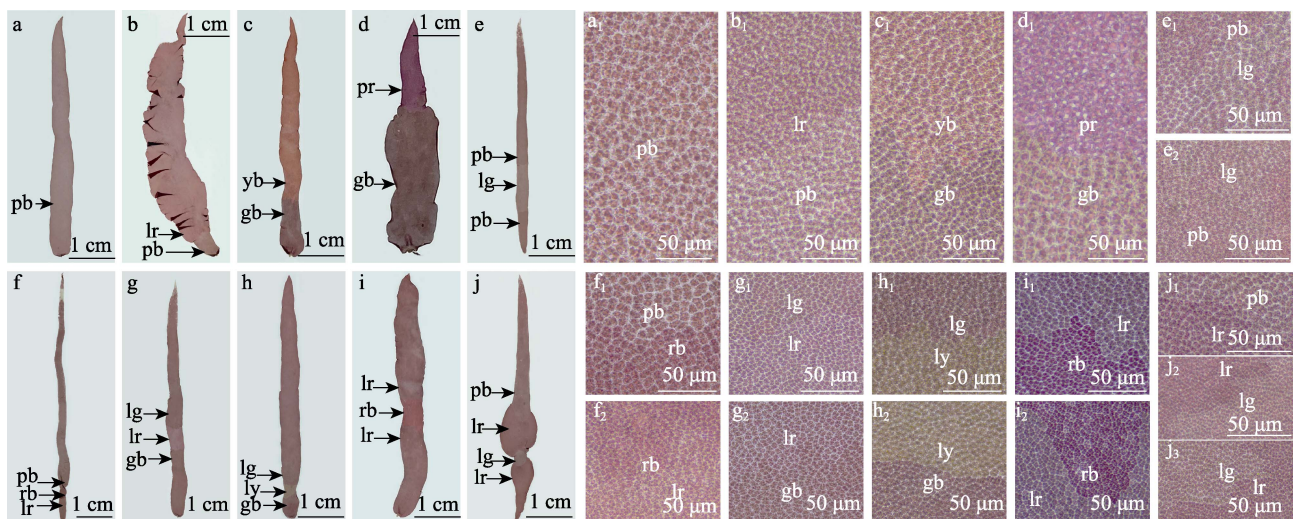


图6 UV-C 辐照壳孢子产生色彩突变的嵌合叶状体

Fig.6 Pigmentation mutations in chimeric thallus developed from conchospores irradiated with UV-C

a: 正常发育的单色叶状体; b~d: 两色块嵌合叶状体; e~i: 三色块嵌合叶状体; j: 四色块嵌合叶状体。
pb: 紫褐色; rb: 红褐色; yb: 黄褐色; pr: 紫红色; lr: 浅红色; ly: 浅黄色; lg: 浅灰色; lg: 浅绿色; gb: 灰棕。
a: Normally developed blades with single color; b~d: 2-color sectors; e~i: 3-color sectors; j: 4-color sectors.
pb: Purple brown; rb: Red brown; yb: Yellow brown; pr: Purple red; lr: light red;
ly: Light yellow; lg: Light gray; lg: Light green; gb: Gray brown.

1992), 这可能是因为低剂量的紫外诱变引起细胞在感受 DNA 损伤胁迫后产生了生理应激反应, 使细胞分裂加快。低剂量的 UV-C 辐照可以促进壳孢子的生长发育, 而高剂量的 UV-C 辐照则抑制其生长 (Anastasios *et al*, 2015), 因此, 在生产中使用低剂量的 UV-C 照射, 以促进壳孢子的萌发, 提高紫菜的生产效率。

在辐照剂量为 100~400 J/m² 范围内, 随着辐照剂量的增强, 突变壳孢子及其萌发体的死亡率随之上升,

突变率也随之增加, 辐照剂量为 300 和 400 J/m² 时, 突变率分别达到 15.22% 和 17.18%, 壳孢子萌发体的死亡率分别为 51.70% 和 61.00%。当辐照剂量达到 500 J/m² 时, 坛紫菜壳孢子细胞大部分死亡, 是死亡率达 83.98%, 且出现突变体的频率明显低于 300 和 400 J/m² 剂量组。说明 UV-C 辐照剂量为 300 和 400 J/m² 时, 能较好地诱导坛紫菜壳孢子发生突变, 便于获得丰富的遗传基因重组表型。本研究不同于采用 ⁶⁰Co-γ 射线辐照坛紫菜叶状体诱变突变体时, 是死亡率不超过

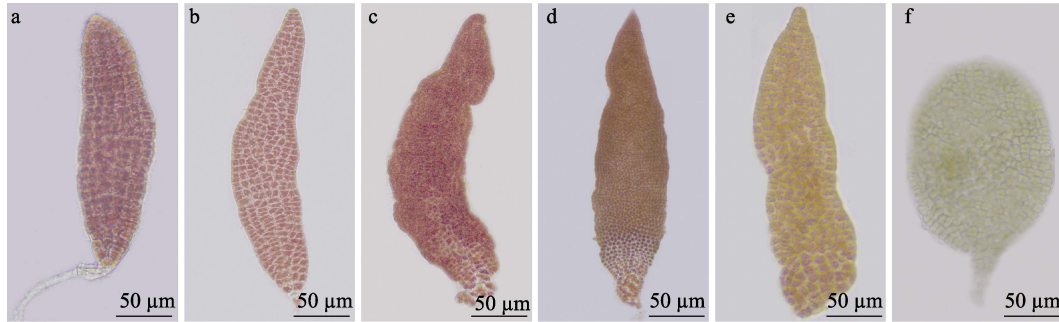


图 7 突变色块的体细胞再生体

Fig.7 Somatic cell germlings with color mutation isolated from chimeric thallus

a: 正常色泽; b: 浅红色; c: 红褐色; d: 黄褐色; e: 浅黄色; f: 浅绿色。

a: Normal color; b: Light red; c: Red brown; d: Yellow brown; e: Light yellow; f: Light green.

50%，即可获得最大突变率(严兴洪等, 2005)，最适使用剂量也略高于使用 UV-C 辐照诱变圆紫菜(*P. suborbiculata*)与皱紫菜(*P. crispata*)叶状体所获得的最佳剂量($80 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \times 5 \text{ min} = 240 \text{ J}/\text{m}^2$) (张倩等, 2019; 赵爽等, 2019)，这可能是刚刚从壳孢囊枝释放出来的壳孢子，其细胞壁尚未形成，抵御不利环境胁迫的能力相对较弱，水层高度也可能一定程度上影响了 UV-C 辐照的穿透效果。

本研究中，经 UV-C 照射后，恢复光照培养 7 d 时发现，壳孢子萌发体出现了不同于对照组壳孢子萌发体的色彩突变细胞块，随着培养时间的延长，色彩突变的壳孢子萌发体逐渐分裂并形成 2~4 个单色块嵌合的叶状体，单个变异色块的细胞大小和颜色等均完全相同。坛紫菜壳孢子萌发初期，减数分裂的 2 次细胞分裂所形成的产物为线性排列的四分子嵌合体，也是基因重组的产物(严兴洪等, 2000、2006)。本研究中，坛紫菜壳孢子萌发体上的嵌合色块起源于壳孢子萌发初期发生减数分裂的 4 个子细胞(四分子)，单个嵌合块仅与四分子中的 1 个细胞相对应。这种色泽分离现象是由于成熟丝状体释放的壳孢子在萌发初期产生的四分子发生了色彩变异，且变异细胞持续进行有丝分裂，最终发育成由 2~4 个色块构成的镶嵌叶状体。将含有色彩突变的嵌合叶状体酶解获得单离细胞，经过 60 d 的体外培养，所获得的 5 种单色突变体的颜色种类，基本上与母体嵌合叶状体上观察到的色素变异细胞种类一致，这说明获得的色彩突变体来自母体嵌合叶状体上的单个突变细胞。

本研究中，UV-C 引起了壳孢子的不可逆突变或死亡，对后期坛紫菜叶状体的形态形成有显著影响，主要表现为细胞形态发生变异和色彩突变嵌合叶状体的形成。坛紫菜叶状体的生长方式为散生长，当四分子细胞因受辐照影响而出现分裂停滞或分生速度

不同步时，出现了早期的表观形态形成的多样性(Pueschel *et al*, 1982; Pueschel, 2021)。如壳孢子辐照后产生的叶状体的长宽比显著降低($P < 0.05$)，其主要原因是由于辐照造成了壳孢子萌发体顶部细胞发育迟缓，中基部细胞向两极发育受到抑制而增加横向发育。这对于揭示紫菜壳孢子萌发体在不适环境条件下的形态形成具有一定的参考意义。

紫菜的质量主要取决于叶状体的色泽，而叶绿素 *a* (Chlorophyll *a*, Chl-*a*)、藻蓝蛋白(phycoerythrin, PE) 3 种光合色素的含量和组成比例决定了紫菜的色泽变化。研究表明，Chl-*a* 和藻胆素的含量和组成比例的变化可能是由于某种基因发生突变，可以直接或间接地干扰色素的合成和稳定性，从而通过各种合成途径调节色素的比例，引起色素的变异(张海波等, 2007)。坛紫菜色素突变的形成也可能是色素蛋白合成过程中一些相关调控基因发生突变所致(黄惠珍等, 2012; 曾高雄等, 2023)。本研究使用的诱变剂 UV-C 可以使细胞 DNA 链断裂形成嘧啶二聚体，从而导致基因突变，但如何影响坛紫菜色素合成途径的基因表达调控这一问题还有待研究。

4 结论

本研究利用不同剂量 UV-C 诱变坛紫菜处于萌发阶段的壳孢子以影响壳孢子四分体排列变化来获得色彩嵌合突变体，对壳孢子存活率、萌发率和壳孢子萌发体突变率等进行综合分析。结果显示，UV-C 能有效地诱变坛紫菜壳孢子，适当的辐照剂量(300 或 $400 \text{ J}/\text{m}^2$)可以获得一定数量的色彩嵌合叶状体，且可以从这些色彩嵌合叶状体中分离出单色突变体。本研究结果为利用 UV-C 诱变处理坛紫菜壳孢子进行突变株系筛选和新种质选育提供了新途径。

参 考 文 献

- ANASTASIOS I, DARRAS, *et al.* Disease resistance and growth responses in *Pelargonium* × *hortorum* plants to brief pulses of UV-C irradiation. *Scientia Horticulturae*, 2015, 181: 95–101
- CHEN C S, XU Y, XIE C T, *et al.* Preliminary study on mutation breeding of *Porphyra haitanensis* strains. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 327–334 [陈昌生, 徐燕, 谢潮添, 等. 坛紫菜诱变育种的初步研究. *水产学报*, 2008, 32(3): 327–334]
- DAI J X, ZHANG Q Q, BAO Z M, *et al.* Studies on the pure line culture, mutagenization and interspecific fusion of *Porphyra* protoplasts. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1990, 21(3): 293–296 [戴继勋, 张全启, 包振民, 等. 紫菜原生质体的纯系培育、诱变处理和种间细胞融合的研究. *海洋与湖沼*, 1990, 21(3): 293–296]
- DING H C, FEI Q J, ZHANG P, *et al.* Isolation and characterization of a heat-resistant strain with high yield of *Pyropia haitanensis* induced by ultraviolet ray. *Aquaculture*, 2020, 521: 3031–3041
- ELLIOTT M L, JARDIN E A D, BATSON W E, *et al.* Viability and stability of biological control agent son cotton and snap bean seed. *Pest Management Science* 2001, 57(8): 695–706
- HE P M, QIN S, YAN X J, *et al.* Seaweed biological technology and application. Beijing: Chemical Industry Press, 2007, 59–61 [何培民, 秦松, 严小军, 等. 海藻生物技术及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2007, 59–61]
- HUANG H Z, XIE C T, JI D H, *et al.* Quantitative analysis of pigment gene expression in pigment mutants of *Porphyra haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 884–892 [黄惠珍, 谢潮添, 纪德华, 等. 坛紫菜色素突变体色素基因的表达定量分析. *水产学报*, 2012, 36(6): 884–892]
- JEON Y M, SON K H, KIM S M, *et al.* Growth of dropwort plants and their accumulation of bioactive compounds after exposure to UV lamp or LED irradiation. *Horticulture Environment & Biotechnology*, 2018, 59(5): 659–670
- LEE H J, CHOI J I, KIM G H. Characterization of *Porphyra lucasii* pigment mutant induced by gamma irradiation. *Phycological Research*, 2018a, 66(3): 199–208
- LEE H J, CHOI J. Isolation and characterization of a high-growth-rate strain in *Pyropia yezoensis* induced by ethyl methane sulfonate. *Journal of Applied Phycology*, 2018b, 30: 2513–2522
- LI L, YAN X H. Isolation and characterization of a green type mutant in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2006, 15(1): 30–35 [李琳, 严兴洪. 坛紫菜绿色突变体的分离与特性分析. *上海海洋大学学报*, 2006, 15(1): 30–35]
- LI Y X, WANG G C, XU P, *et al.* Induction and characterization of green pigmentation mutant in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Aquaculture*, 2008, 282: 117–123
- OHME M, KUNIFUJI Y, MIURA A. Cross experiments of the color mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Japanese Journal of Phycology*, 1986, 34(2): 101–106
- PAN X, MAO Y X, WANG J H, *et al.* Effects of UV-B ultraviolet radiation on the physiology and biochemistry of *Pyropia yezoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 125–132 [潘雪, 茅云翔, 王俊皓, 等. UV-B 紫外辐射对条纹紫菜生理生化的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 125–132]
- PFENDLER S, EINHORN O, ALAOUI-SOSSÉ L, *et al.* Factors inducing bryophyte growth on prehistoric pigments and effect of UV-C treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(3): 2987–2994
- PUESCHEL C M, COLE K M. Rhodophycean pit plugs: An ultrastructural survey with taxonomic implications. *American Journal of Botany*, 1982, 69(5): 703–720
- PUESCHEL C M. Formation of secondary pit connections by conjuctor cells in a coralline red alga. *Phycologia*, 2021, 60(6): 644–652
- REZZAN K, MEHMET U K. Biochemical and color changes of fresh-cut melon (*Cucumis melo* L. cv. Galia) treated with UV-C. *Food Science and Technology*, 2014, 34(3): 547–551
- SLATINSKAYA O V, PROTOPOPOV F F, SEIFULLINA N K, *et al.* A study of the state of photosynthetic pigments of hybrid maize seeds exposed to ultraviolet and radiation. *Biophysics*, 2018, 63(4): 611–620
- WADA S. Dictionary of color names. *Journal of the Franklin Institute*, 1956, 261(4): 442–445
- WANG J F, XU P, ZHU J Y, *et al.* Studies on the pigment mutation in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Progress in Fishery Sciences*, 2007, 28(2): 28–35 [王金锋, 许璞, 朱建一, 等. 紫菜属海藻色素突变的研究. *渔业科学进展*, 2007, 28(2): 28–35]
- WANG S J, ZHENG Y Z, MA L B, *et al.* Gamma-rays induction of mutation in conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 18(1): 47–53
- YAN X H, FUJITA Y, ARUGA Y. High monospore-producing mutants obtained by treatment with MNNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 2004, 512(1/2/3): 133–140
- YAN X H, FUJITA Y, ARUGA Y. Induction and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(1): 69–81
- YAN X H, LI L, ARUGA Y. Cross experiments and analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 1–8 [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. *水产学报*, 2006, 30(1): 1–8]
- YAN X H, LIANG Z Q, SONG W L, *et al.* Induction and

- isolation of artificial pigmentation mutants in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 166–172 [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. *水产学报*, 2005, 29(2): 166–172]
- YAN X H, TANAKA J, ARUGA Y. Isolation and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(3): 221–228 [严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析. *水产学报*, 2000, 24(3): 221–228]
- YAN X H, ZHANG S J, HUANG L B. Induction and isolation of pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) by ^{60}Co - γ ray irradiation. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(1): 56–61 [严兴洪, 张淑娟, 黄林彬. ^{60}Co - γ 射线对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)的诱变效果与色素突变体分离. *海洋与湖沼*, 2009, 40(1): 56–61]
- YAN X H. Effects of UV irradiation on the development and variations of protoplast progenies in *Porphyra yezoensis*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 1992, 1(1/2): 71–78 [严兴洪. 紫外线辐射与条斑紫菜原生质体后代发育和变异. *上海海洋大学学报*, 1992, 1(1/2): 71–78]
- ZENG C K, WANG S J, LIU S J, et al. *Seaweed cultivation*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1985, 135–150 [曾呈奎, 王素娟, 刘思俭, 等. 海藻栽培学. 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 135–150]
- ZENG G X, XU K, XU Y, et al. cDNA cloning and functional verification of transcription factor *NhbZIP1* from *Neoporphyra haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 201–209 [曾高雄, 许凯, 徐燕, 等. 坛紫菜转录因子 *NhbZIP1* 克隆和功能验证. *渔业科学进展*, 2023, 44(1): 201–209]
- ZHANG B L, YAN X H, HUANG L B. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature tolerance. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(5): 841–847
- ZHANG H B, HOU H S. Research progress in pigment mutants of *Porphyra*. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(2): 4 [张海波, 侯和胜. 紫菜色素突变体研究进展. *生物技术通讯*, 2007, 18(2): 4]
- ZHANG Q, DING H C, YAN X H, et al. Isolation and characterization of pigmentation mutants of *Pyropia crispata* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 526–534 [张倩, 丁洪昌, 严兴洪, 等. 皱紫菜色素突变体的分离与特性分析. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 526–534]
- ZHANG Y, YAN X H. The sex and sex determination in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *The Public Library of Science*, 2013, 8: 1–8
- ZHAO S, YAN X H, DING H C, et al. Induction and isolation of pigmentation mutants in *Pyropia suborbiculata* Kjellman (Bangiales, Rhodophyta). *Acta Oceanologica Sinica*, 2019, 41(2): 114–122 [赵爽, 严兴洪, 丁洪昌, 等. 圆紫菜人工色素突变体的诱导与分离. *海洋学报*, 2019, 41(2): 114–122]
- ZHONG C H, ARUGA Y, YAN X H. Morphogenesis and spontaneous chromosome doubling during the parthenogenetic development of haploid female gametophytes in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(4): 2729–2741

(编辑 陈 严)

A Novel Pathway to Produce Color Mutants by Short-Wavelength Ultraviolet Ray Irradiation on the Germinating Conchospore in *Pyropia haitanensis*

TAO Weili^{1,3}, ZHONG Chenhui¹, ZHANG Peng², GUO Chentao¹, WANG Tiegan², LIN Qi^{1①}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, National and Local Joint Engineering Research Center of Marine Biological Seed Industry Technology, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China;

2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource, Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Ultraviolet mutagenesis is a safe and efficient method to induce mutations in laver. It has the advantages of non-pollution, high efficiency, easy operation, and low cost. It has been primarily used for mutagenesis of the filament, protoplast, or blade of cultivated *Pyropia* species, but is rarely used to

① Corresponding author: LIN Qi, E-mail: xmqlin@sina.com

induce genetic mutants from germinating conchospore. The germination period of conchospores is the period of meiosis in *Pyropia haitanensis*. The four progeny cells of germinating conchospores are linearly arranged forming a meiotic tetrad. The tetrad cells that undergo genetic recombination can determine the developmental pattern and segregation of traits in the thallus. In this study, short-wave ultraviolet (UV-C) irradiation with different doses (50, 100, 200, 300, 400, 500, and 600 J/m²) was used to induce color mutants during the germination of conchospores in *P. haitanensis*. The results showed that low-dose irradiation (50 J/m²) promoted the germination of conchospores, while irradiation doses above 100 J/m² inhibited the germination and growth of tetrad germlings. Therefore, low-doses of UV-C irradiation were used in the production to promote the germination of conchospores and improve the production efficiency of laver. In the dose range of 50–400 J/m², the frequency of color chimeras increased with increasing irradiation intensity. When the dose was 300 J/m² and 400 J/m², and the pigmentation mutation rate was 15.22% and 17.18%, respectively, and the death rate of conchospores was 51.70% and 61.00%, respectively. In the dose range of 50–500 J/m², with the increase in UV-C irradiation dose, the proportion of 2-color sectorized chimera showed a trend of first decreasing and then increasing, and the proportion of 3- and 4-color sectorized chimera showed a trend of first increasing and then decreasing. Among them, the regenerated color chimeras that appear were generally 2- and 3-color sectorized chimera, yet the proportion of 4-color sectorized chimera was the least. When the irradiation intensity reached 500 J/m², the majority of the conchospores died, and the death rate was 83.98%, and the frequency of color mutants was significantly lower than that of 300 J/m² and 400 J/m² dose groups. These results indicate that the mutagenesis effect was the best when the dose was 300 or 400 J/m², which was convenient to obtain abundant genetic recombination and genetic variation in progeny cells. In addition, UV-C irradiation also had a significant effect on the early development of conchospores and phenotypes of pigmentation mutant arranged in tetrad germlings, which was mainly manifested in the large number of color-sectorized blades developed from the irradiated conchospores. Simultaneously, UV-C irradiation retarded the development of cells at the top of conchospore germlings, inhibited the development of cells at the middle base toward the poles, and increased the lateral development, resulting in the decrease in blade aspect ratios. Somatic cell germlings with single colored pigmentation were also isolated from color sectorized chimeras by enzymatic hydrolysis. The color species of the five monochromatic mutants obtained were basically consistent with the pigment variant sectors observed on color-sectorized thallus, indicating that the obtained color mutants were derived from a single mutant cell on the maternal color-sectorized thallus. In conclusion, UV-C irradiations can effectively mutate the conchospores of *P. haitanensis*, and appropriate irradiation doses (300 or 400 J/m²) can obtain a certain number of color-sectorized thallus. This study provides a novel pathway for the preparation of artificial color mutants and mutation breeding in *P. haitanensis*.

Key words *Pyropia haitanensis*; Conchospores; Short-wavelength ultraviolet; Color mutants; Isolation