

海带单倍体遗传育种的实验

方宗熙 欧毓麟 崔竞进 戴继勋 陈登勤

(山东海洋学院生物系)

摘 要

通过一系列的实验,包括对海带雌雄配子体的分离培养,促进其细胞分裂和单性生殖以及对由此长成的孢子体的海上培养,取得了三方面的成果:(1)探索出用海带单个配子体进行单倍体育种的一套方法,可以加快育种的进度;(2)首次获得了海带雌性孢子体,由此推知海带孢子体的雌雄性各有遗传基础,而且可以分开,这为杂种优势的利用提供了条件;(3)首次培育出若干雌雄配子体的无性生殖系,把短命的配子体转化为长寿的配子体,使利用海带配子体进行遗传育种和生理生态的研究,摆脱了季节性的限制,开辟了海带基础研究的新途径。

近几年来,在我国海带养殖事业蓬勃发展^[1]和海带遗传育种研究^[2]的基础上,我们开展了海带单倍体的遗传育种实验工作。目的在通过一些有关的基础研究,来寻找一些多快好省的方法,以培养海带优良品种,为生产服务。

农作物如烟草、水稻、小麦等的单倍体育种在国内外都已取得了成绩^[3]。这对我们的海藻遗传育种工作启发很大。海藻单倍体的生长发育,在国际上只有在配子体时期进行过一些观察^[4]。利用单倍体的单个配子体进行育种工作在海藻中则还未见有报道。我们于 1973 年开始了海带单倍体的一些探索工作,获得了海带孤雌生殖的材料^[5]。从 1975 年起到现在,我们又进行了比较系统的工作,进一步取得了一些有意义的结果。

一、材料、方法和观察

1. 材料

我们选择海带孢子体作为种海带的主要指标是:(1)孢子体的经济性状良好,如叶片中带部较宽、较厚,藻体健壮;(2)成熟度较好,孢子囊面积较大;(3)具有高度的杂种性。

我国目前养殖的海带大部分都不是遗传性比较纯一的品种,杂种性较高,它所产生的孢子在遗传性上是彼此有所差异的。这种遗传的多样性是单倍体育种的良好材料。

2. 方法和观察

海带单倍体育种是一项新工作,过去没有人做过。我们需要进行一些基础研究,在方法上进行一些探索。

1. 孢子的采集和培养

将成熟的种海带阴干刺激几小时,即可采集孢子。这是通常所

用的海带采孢子的方法。孢子采集在玻片上。要注意所采集的孢子密度应适宜, 便于以后分离配子体。

采集的孢子在实验室里培养, 培养温度一般为 8°C — 12°C , 光强大约为 1500 烛光, 光照时间每天 10 小时。培养液采用消毒海水加入适量的营养盐(即 N ——4 ppm, P ——0.4 ppm)。

II. 配子体的分离 孢子附着在玻片后, 经过 7—10 天的培养, 即长成雌雄可以明显区分的配子体。雌配子体细胞较大, 并大都是单细胞的, 色素较深。雄配子体则长成多细胞, 细胞较小, 色素较淡。这时对雌雄配子体进行分离是比较方便的。分离工作在显微镜下进行。用微细吸管吸取配子体稀释液, 滴一滴在小玻片上, 置显微镜下检查, 里面如果只含有一个配子体, 又无杂藻, 即分离成功。这时, 立即在玻片上加一滴培养液, 将玻片平放在培养皿中, 加入少量消毒海水, 使玻片底部浸在水里, 然后加上培养皿的盖子, 以保持一定的湿度, 让配子体重新附着。经过 3—4 天的培养, 配子体会重新附着于玻片上。然后移入正常的培养液中培养。以后每两星期更换培养液。培养期间, 定期检查其生长发育的情况。

III. 促进细胞分裂 在低温正常条件下, 雌雄混合培养的雌配子体, 一般在单细胞状态下就能达到成熟, 形成卵囊, 进行排卵。

分离培养的海带配子体一般会推迟成熟。就雌配子体讲, 经过分离培养, 有一部分能在一个或几个细胞的情况下成熟排卵, 进行孤雌生殖。有一部分则能不断地进行细胞分裂, 长成多细胞的丝状体或分枝体(图 1), 甚至是簇生丝状体(簇生丝状体是细胞非常多的分枝体)。如果用一些适宜的理化条件处理雌配子体, 它们更能长期地进行细胞分裂, 长成复杂的分枝体或簇生丝状体。有若干理化条件可以促进海带雌配子体的细胞分裂, 延长其营养生长, 使长成含有更多细胞的配子体。维生素 C 对促进细胞分裂是一个有效的化学因子^[6]。连续光照和较高温度(18°C — 22°C)等物理条件也很有效^[7]。根据我们目前的观察, 低温下的连续光照这种条件, 既有较大效应, 也便于进行。

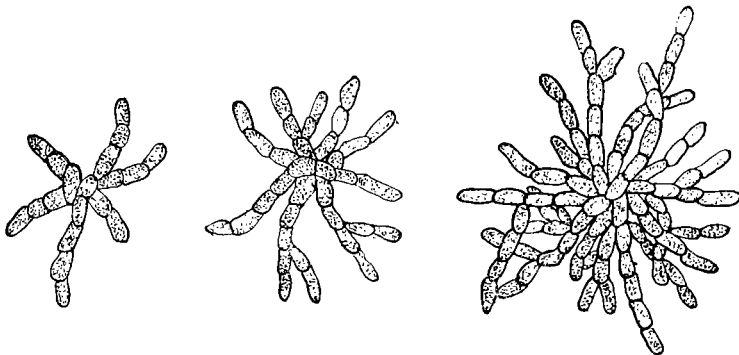


图 1 海带三个雌配子体经过分离培养的生长情况
(不同个体生长速度不一致)

IV. 促进孢子体的形成 有些雌配子体在分离条件下经过两三星期或较长时间的培养, 即能发育成熟, 大量形成卵囊, 进行孤雌生殖, 长出孢子体(照片 1)。有一部分雌配子体则长成复杂的分枝体, 特别在较高温度和低温的连续光照下, 能比较长期地进行营养生长。

要使已经长期进行营养生长的雌配子体较快地成熟, 形成卵囊, 进行孤雌生殖, 一般需要

改变培养条件。例如,我们从多次的实验知道,在低温连续光照下的雌配子体,要促使其成熟,需要缩短光照时间,它才更容易形成卵囊,进行孤雌生殖。在较高温度下的雌配子体,需要降低温度,例如降到 16℃ 以下,它才容易形成卵囊,进行孤雌生殖。

长期进行营养生长的雄配子体也能在上述适于成熟的条件下长出孢子体。但其过程另有特点:(1)多数是雄配子体的顶端细胞膨大,由此经过细胞分裂,长成孢子体;少数是非顶端细胞膨大,长成孢子体;(2)雄配子体不经过配子阶段,由膨大细胞直接长成孢子体,这是无配子生殖;(3)雄配子体要进行无配子生殖,长出孢子体,所需要的时间要长得多,据目前观察,至少推迟一个月以上。

V. 染色体加倍 海带细胞学材料用卡诺固定液固定,用醋酸洋红或地衣红染色,即可观察。从细胞学观察知道,海带染色体很小。其单倍体大约是 $n = 22$, 二倍体大约是 $2n = 44$ 。这跟 Abe^[8] 的观察一致(照片 2—3)。

为了促使单倍体细胞转化成二倍体,我们曾用千分之一的秋水仙素处理雌配子体 3—4 天,这对染色体加倍有显著效果(表 1)。

表 1 海带雌配子体经过千分之一秋水仙素处理 3—4 天,染色体加倍情况

	单倍体分裂相	二倍体分裂相	染色体加倍%
处 理 组	151	24	13.7
对 照 组	136	2	1.5

从表 1 可以看出,雌配子体在细胞分裂中有少数(1.5%)能自然加倍。

由孤雌生殖所产生的孢子体,成熟后所产生的雌配子体如果由孤雌生殖长成幼孢子体,其自然加倍的情况如何呢? 我们初步观察发现这种幼孢子体(其细胞数目不超过十个)的染色体自然加倍(照片 4)数量很大(表 2),可以达到 45%。

表 2 海带由孤雌生殖所产生的幼孢子体染色体自然加倍的比率

个体总数	单 倍 体	二 倍 体	四 倍 体	嵌 合 体
129	63	59	4	3
100%	48.8%	45.7%	3.1%	2.4%

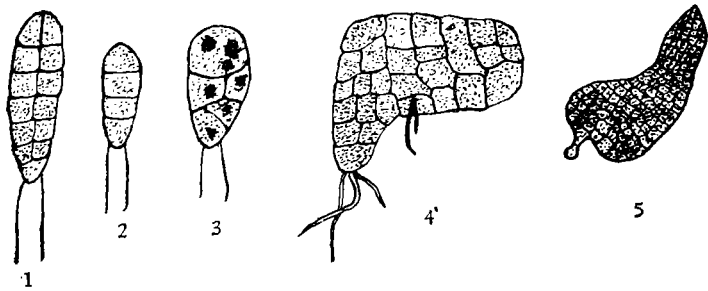


图 2 海带由孤雌生殖所长成的幼孢子体
(1—2 正常, 3—5 畸形, 3 有多核的细胞, 4 有不规则的假根, 5 不长出假根)

VI. 孢子体在海上的生长发育 由上述单倍体育种方法所长成的孢子体, 在形态上变异很大。就孤雌生殖的材料讲, 孢子体大部分是畸形的, 约占 70% 以上。例如叶片卷曲, 假根不发达, 甚至不长出假根等。但有一部分孢子体形态正常(图 2)。孢子体畸形很多, 这可能跟单倍体和嵌合体有关(表 2)。

1976 年 11 月 2 日把上述生长正常的孢子体移至海上培养, 它们大多生长正常(照片 5)。特别是经过秋水仙素处理的孢子体较为正常(照片 6), 有少数个体比对照组海带长得大些、长些。到 1977 年 6 月大部分孢子体都按时成熟。对成熟的孢子体分别采了孢子。孢子的生活力大都正常, 能按时萌发长成配子体。

二、结果和讨论

1. 探索出海带单倍体育种的基本方法

上述关于海带单倍体遗传育种实验, 大部分已重复多次, 实验结果一致, 表明单倍体育种方法已经基本过关, 在海带养殖中可以应用。根据我们的实验观察, 为了保证海带单倍体育种成功, 要注意以下几个环节。第一, 要注意分离出来的配子体是单个的, 而且不要混有杂藻。第二, 要根据配子体生长的具体情况, 提供条件, 促进营养生长, 使长成多细胞的个体, 增加孤雌生殖的机率, 这样就可以得到较多的孢子体。第三, 要根据实际的生长情形及时改变培养条件, 以促进尽可能多的配子体细胞长出孢子体。

2. 获得了海带雌性孢子体

海带雌配子体由孤雌生殖所长成的孢子体成熟时, 它所产生的孢子, 全部萌发成雌配子体, 没有发现一个雄配子体。这表明由孤雌生殖所长成的孢子体是雌性的。这种雌性孢子体产生的孢子所长成的雌配子体在生长发育中表现以下特点。第一, 这种雌配子体成熟比较慢。比方说, 一般雌雄混合的雌配子体在低温培养条件下, 大约经过两星期即大都成熟, 进行排卵和发育成孢子体。而这种雌配子体经过 20 天的培养却还大部分不成熟。第二, 它们的成熟虽然推迟了, 但仍能成熟, 形成卵囊, 排出卵子, 进行孤雌生殖。第三, 它们在低温正常条件下, 大部分长成多细胞丝状体。

值得指出, 海带雌配子体由孤雌生殖所长成的孢子体全部是雌性的, 这是科学上的新发现。过去, 我们所知道的海带孢子体是无性的, 也可以说是一种雌雄同体, 它所产生的孢子大约有一半长成雄配子体, 有一半长成雌配子体(表 3)。我们现在获得了雌性孢子体, 有理由推测由雄配子体所长成的孢子体将是雄性的, 它可能只产生雄配子体。

这里有一个学术问题值得讨论。在小麦和水稻等作物的单倍体花粉育种中, 所产生的孢子体能够产生雌蕊和雄蕊。从遗传学研究知道, 它们没有性染色体。至于雌雄异体的生物大都有性染色体。例如女人的性染色体是 XX, 男人的性染色体是 XY。海藻学者 Evans^[9] 曾看到欧洲产的几种海带雌配子体有一个较大的染色体, 并推测这是性染色体, 可是他并没有作过遗传实验, 未能解决这个问题。现在我们从海带遗传育种的系统实验中发现了海带孢子体的性别可以分开, 因此有理由推测海带可能有性染色体或性别基因的存在。但我们的细胞学观察尚未发现性染色体。这可能由于性染色体

表 3 海带雌雄配子体的比例

	个体数	%
雌配子体	325	51.7
雄配子体	304	48.3

在形态上不一定有明显差异。

3. 培育出海带配子体的无性生殖系

无性生殖系或无性繁殖系也叫克隆(clone), 这是由一个亲本通过无性生殖方式所产生的遗传性一致的群体。目前栽培的地瓜和土豆各品种都属于无性生殖系。产生抗菌素的青霉、链霉各品系也是无性生殖系。

我们是由于偶然的发现而培育出海带无性生殖系的。我们在分离培养单个海带配子体的过程中, 由于延长了配子体的营养生长, 得到了含有成千上万个细胞的复杂分枝体或簇生丝状体。我们猜想它会继续进行营养生长。于是我们把每一个复杂的分枝体或簇状体在显微镜下撕开, 分成数以千计的丝状体或分枝体, 进行培养。在培养中注意促进其营养生长。低温下的连续光照是促进其营养生长的一种有效条件, 可以在一定程度上抑制其发育。这样, 每一个分开的丝状体或分枝体就又可能长成复杂的分枝体或簇生丝状体(照片 7)。这就是海带配子体的无性生殖系。

海带配子体无性生殖系也是科学上的新鲜事物。我们已建立了若干雌配子体和雄配子体的无性生殖系(照片 8)。

海带配子体无性生殖系有这样的特点: (1) 每一个无性生殖系都起源于一个细胞, 即一个配子体, 同一无性生殖系的遗传性是一致的, 而且其主要遗传基础是单倍体; (2) 它们能长期进行营养生长, 这就把短命的配子体转化成长寿的配子体。这样, 利用配子体所进行的科学研究, 就摆脱了季节性的限制, 海带遗传育种的科学实验可以随时进行; (3) 无性生殖系保留了原来的性别, 这便于杂种优势的研究和利用; (4) 它们都是未分化的细胞, 而且细胞数量很大, 可以应用微生物学方法进行研究。

这种无性生殖系有广阔的利用前途。比方说, (1) 可以利用它进行单倍体育种。这方面的工作我们已经进行, 并取得了初步成果。现在已有二棵由雌性无性生殖系通过孤雌生殖所长成的孢子体在海上生长, 按时成熟, 产生出正常的孢子, (2) 可以利用它进行诱变育种, 如辐射育种和激光育种等。由于这类材料是单倍体, 诱变育种较易收效。我们已在这方面开始做些探索性工作。(3) 可以利用它进行其他遗传实验和生理生态实验。

这里有一个问题值得讨论: 为什么不是所有的配子体都能形成无性生殖系? 我们的实验结果表明, 就雌配子体讲, 只有一部分雌配子体在我们的实验条件下(例如, 低温的连续光照或维生素 C 处理), 能比较容易形成无性生殖系, 其他雌配子体则较易成熟。这暗示不同的配子体其遗传性是有差异的, 因此对外界条件的反应也有所不同, 就是说, 能否比较容易地形成无性生殖系跟遗传有关, 这种情况是容易理解的。因为“**外因是变化的条件, 内因是变化的根据, 外因通过内因而起作用**”。因此, 在培育无性生殖系的工作中, 既要注意做好筛选工作, 由此得到具有适宜遗传性的配子体, 又要控制培养条件, 使遗传可能性转化成现实。

三、展 望

这里仅从两方面对本实验结果可能导致的前景, 进行讨论。

1. 国外有人指出, 象厚叶翅藻^[4]、海带^[11]等由孤雌生殖或由无配子生殖所长成的孢子体基本上都是畸形的, 不久即死亡, 这意味着单倍体育种在海带育种中没有前途。我们的实验结果推翻了这个论点。上面指出, 海带单倍体孢子体虽然大部分是畸形的, 但有一部分是正常的。

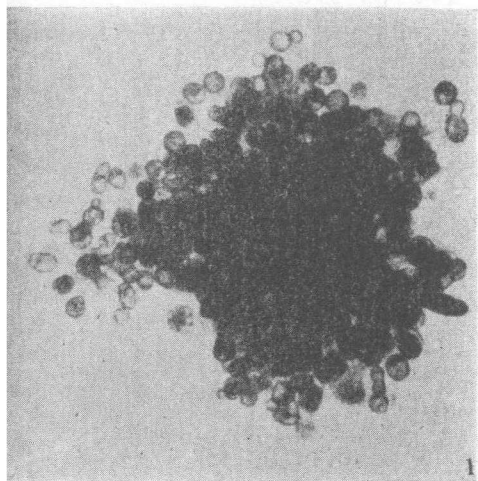
只要进行较大量的单倍体育种工作, 仍然可以得到数量可观的正常的孢子体, 这是第一。第二、只要注意提供适宜的条件, 延长配子体的营养生长期, 可以大量长出孢子体。第三, 海带由孤雌生殖所长成的孢子体, 染色体自然加倍的比率较高。

海带单倍体育种方法的过关, 孢子体性别可以人工分开和配子体无性生殖系的培育成功, 为海带杂种优势的利用开辟了广阔的前途。现代育种学有两方面的基本任务^[10]: 一是选育出优良品种, 一是选育出适宜的自交系以产生杂种优势。在海带育种中, 过去我们只能用常规育种方法, 这主要是通过自交, 在后代中选择优良个体的办法, 进行育种。对于杂种优势的研究和利用未能开展工作。现在情况不同了, 我们已经得到了“纯种”的雌性孢子体, 有了它, 杂种优势的研究和利用可以开始了。其次, 有理由相信我们可能得到“纯种”的雄性孢子体, 如果这样, 这对海带杂种优势的研究和利用就更加方便了, 这方面的工作我们已着手进行。

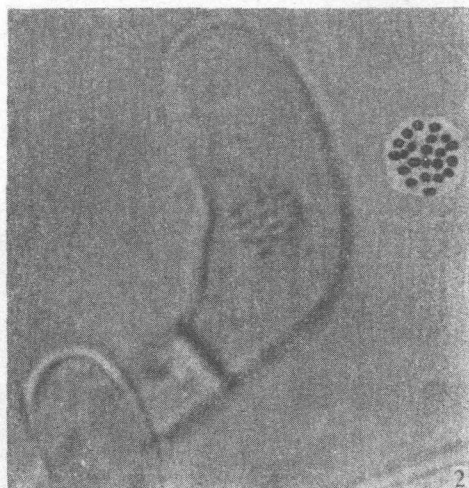
2. 海带配子体无性生殖系的出现, 可能为育苗工作提供技术革新的好条件。现在存在的问题是雄性无性生殖系较难成熟并排出精子。这可能是促进精子成熟的基因受到了抑制。如果能解除这种抑制, 促使它们同步成熟, 排出大量精子, 那末育苗工作可能简化得多。同时优良品种的保种工作也方便得多。但这需要进行一系列的科学研究。

参 考 文 献

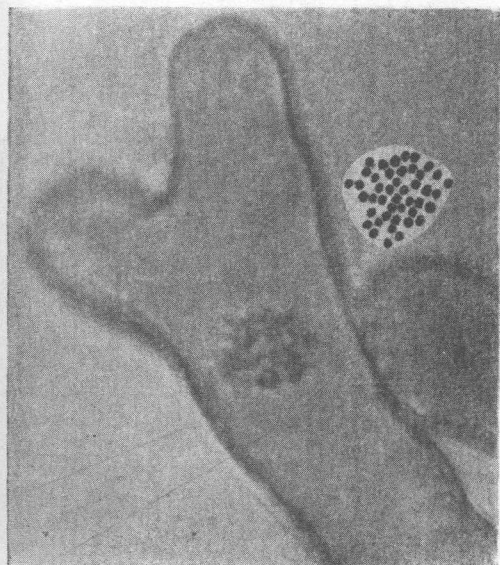
- [1] 曾呈奎、吴超元, 海带养殖学, 科学出版社, 1962.
- [2] 方宗熙、蒋本禹、李家俊, 高等学校自然科学学报(生物学版), 1965年, 4期.
- [3] 中国科学院植物研究所, 单倍体育种资料集, 第一集, 科学出版社, 1972.
- [4] Nakahara, H. & Nakamura, Y., *Marine Biology*, 18(1973), 4.
- [5] 戴继勋、方宗熙, 遗传学报, 3 (1976), 1.
- [6] 方宗熙、江乃萼, 植物学报, 16 (1974), 4.
- [7] 任国忠, 配子体, 见曾呈奎等著, 海带养殖学, 科学出版社.
- [8] Abe, K., in *Growth* (ed. Attman, P. L. & Dittmer, D. S.), Fed. Amer. Soc. Exp Bio, USA, 1962, p. 28—29.
- [9] Evans, L. V., The Phaeophyceae: Part I, in *The Chromosomes of the Algae* (ed. Godward, M. B.) Edward Arnold (Publishers) LTD, London.
- [10] Brewbaker, J. L., *Agricultural Genetics*, Prentice-Hall, Inc., USA, 1964.
- [11] Yabu, H., *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Uni.*, 12(1964), 1—72.



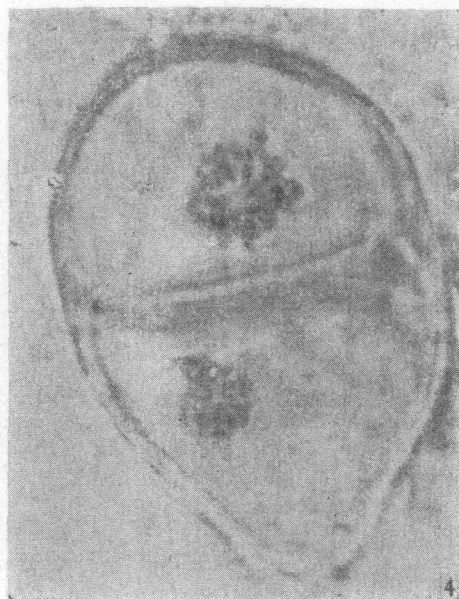
照片 1 一个多细胞的海带雌配子体
(其外圈细胞几乎同时成熟排卵进行孤雌生殖)
(240×)



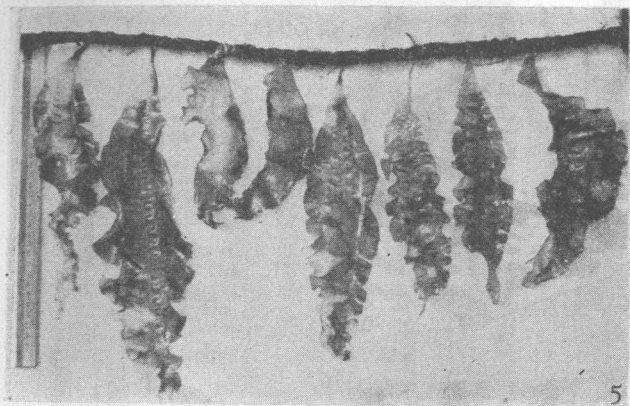
照片 2 海带雌配子体的单倍体
染色体 ($n = 22$) (1500×)



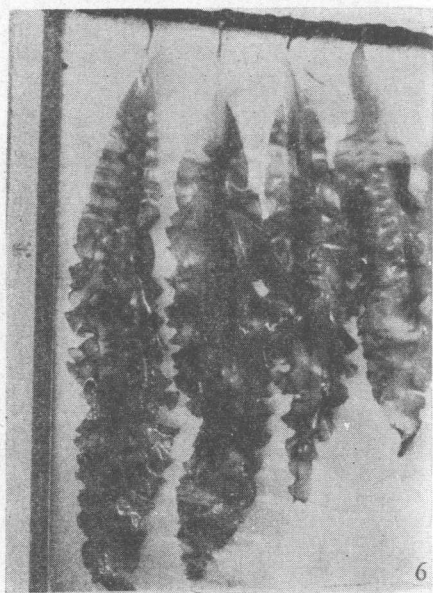
照片 3 海带雌配子体经秋水仙素处理，
由单倍体转化为二倍体 ($2n = 44$)
(1500×)



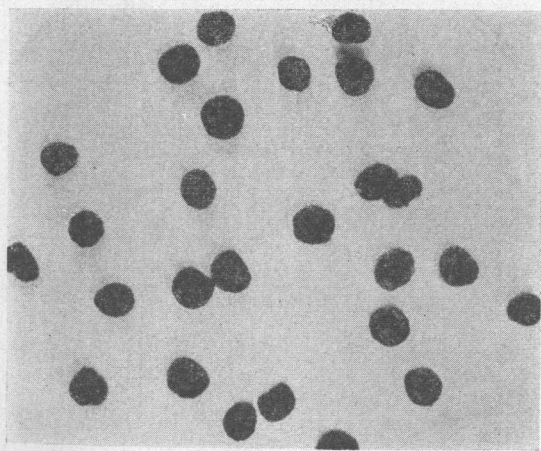
照片 4 海带幼孢子体
(两个细胞的染色体已经过自然加倍) (1500×)



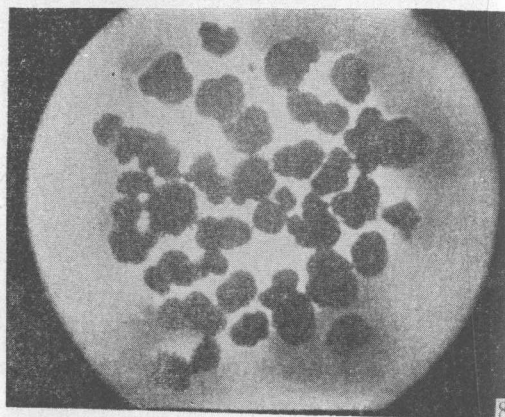
照片 5 从单倍体育种方法由孤雌生殖所长成的海带孢子体在海上生长的情况
(一个半月,形态变异较大)



照片 6 由单倍体育种培育的海带雌配子体经过秋水仙素处理,由孤雌生殖所长成的海带孢子体在海上生长的情况
(一个半月)



照片 7 经过一年半培养的海带雌配子体的无性生殖系
(每一个簇状体含有无数细胞)



照片 8 经过一年半培养的海带雄配子体的无性生殖系
(每一个簇状体含有无数细胞) (12.5×)