

坛紫菜与长紫菜种间杂交后代的细胞崩溃现象与成活后代的表现型观察比较

谷灵芝^{1,2,3}, 丁洪昌^{1,2,3}, 严兴洪^{1,2,3*}

(1. 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;

2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 坛紫菜壳孢子萌发的第一次和第二次分裂为减数分裂, 结束后形成了一个基因型不同的四分体, 随后由这个四分体发育成一个基因型嵌合的叶状体。由坛紫菜与长紫菜种间杂交所产生的杂合丝状体成熟后释放出壳孢子, 后者在分裂初期出现了大量的细胞崩溃死亡, 通过对单个的壳孢子萌发体进行定点跟踪观察后发现, 细胞崩溃死亡不仅会发生在减数分裂的直接产物即处于二细胞期、三细胞期、四细胞期的萌发体, 当细胞数大于4个的萌发体在进行有丝分裂时也会出现细胞崩溃死亡。绝大部分的壳孢子能进行第一次减数分裂, 形成处于二细胞期的萌发体, 随后进行第二次减数分裂, 形成处于三细胞期或四细胞期的萌发体。培养4 d, 78.6%的壳孢子已发育成含2~4个细胞的萌发体, 其余为未分裂的壳孢子萌发体; 在含2~4个细胞的萌发体中未出现细胞崩溃死亡的萌发体的百分率为99.7%, 0.3%的个体出现了细胞崩溃死亡。随着培养时间的延长, 大多数处于二细胞期的萌发体发育成处于三细胞期和四细胞期的萌发体, 而大规模的细胞崩溃死亡也出现在处于三细胞期和四细胞期的萌发体中。培养14 d, 处于三细胞期和四细胞期的萌发体的百分率分别为38.6%和37.2%, 它们当中含有崩溃死亡细胞的个体百分率分别为99.5%和99.2%。此外, 8.9%的萌发体能够发育成含4个以上细胞的个体, 但在随后的有丝分裂中也出现了细胞崩溃死亡现象。培养35 d, 大部分的萌发体其体细胞已全部崩溃死亡, 但仍有约1%的萌发体能成活下来, 可它们并非是由一个完整的四分体发育而来, 而是由四分体中的1~2个成活细胞发育而来。培养45 d, 可把成活体的形态和颜色分成类亲本型和重组型两大类。研究表明, 利用紫菜种间杂交的后代在壳孢子萌发初期会出现细胞崩溃死亡的现象, 不仅可以用于辅助更精确地鉴别物种, 而且可以从其成活后代中筛选出具有重组优势的新品系。

关键词: 坛紫菜; 长紫菜; 种间杂交; 杂合丝状体; 壳孢子萌发体; 细胞崩溃; 成活体
中图分类号: S 917.3 **文献标志码:** A

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国的特有种, 主要被大规模栽培在长江以南沿海, 其年产量约占我国紫菜年总产量的75%, 具有重要的经济价值^[1]。近年来, 种质资源退化、全球变暖

导致海水温度逐步上升, 已严重影响了坛紫菜的产量和品质, 所以开展坛紫菜良种选育, 为产业提供新品种显得十分迫切^[2]。

至今, 利用人工诱变育种技术已选育出了

收稿日期: 2017-03-10 修回日期: 2017-05-02

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A411); 国家自然科学基金(31072208); 福建省省长专项基金(2014S1477-10); 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-6)

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

一些优质高产的坛紫菜新品种(系)^[3-6]。虽然人工诱变紫菜的突变率较高, 但诱变方向无法控制, 相比而言, 杂交育种能有目的地将亲本的优良性状集中到杂交后代中, 同时可积累双亲中控制同一性状的不同微效基因, 发挥杂交重组优势, 产生在性状上超过亲本的类型^[3]。徐燕等^[7]利用坛紫菜的种内杂交, 选育出经济性状优于亲本的新品系。在一定范围内, 双亲之间的遗传距离越大, 杂种优势越明显^[8], 为此, 刘海洋等^[9]对坛紫菜开展了种间杂交实验, 获得了坛紫菜与印度产紫菜 *Pyropia radi* 的杂合丝状体, 后者产生的壳孢子萌发正常, 且在F₁叶状体中观察到嵌合叶状体, 证明了坛紫菜种间杂交的可行性。随后, 吴宏肖等^[10]利用这一种间杂交, 分离出的子代品系在生长、生化特性等方面均明显优于亲本。

为更多地选育出可用于坛紫菜良种培育的种质资源, 李淑平^[11]利用坛紫菜与长紫菜 (*P. dentata*) 进行种间杂交, 获得了它们的杂合丝状体, 但发现其F₁壳孢子在萌发初期出现了严重的细胞崩溃死亡现象。坛紫菜壳孢子萌发的第一次和第二次分裂为减数分裂, 结束后形成了一个基因型不同的四分体, 随后由这个四分体发育成一个基因型嵌合的叶状体^[12-13]。Shin等^[14]首次报道了条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 与甘紫菜 (*P. tenera*) 的种间杂交崩溃现象, Niwa等^[15]也得出了上述相同的结论, 且发现有少量的F₁壳孢子萌发体能成活下来, 同时利用分子标记技术证明了成活个体是以单倍配子体形式存在的杂合二倍体, 但至今为止, 紫菜种间杂交崩溃死亡的发生规律还没有相关详细的报道。

本实验通过坛紫菜与长紫菜的种间杂交, 试图对紫菜种间杂交崩溃死亡的发生规律和成活后代的表现型进行深入研究, 为进一步开展紫菜种间杂交育种提供基础知识。

1 材料与方法

1.1 亲本品系

本杂交实验的父本是长紫菜野生型品系 (*PD-WT*), 于2012年2月采自广东省汕头市南澳岛; 母本是坛紫菜重组选育品系 (*HR-5*)^[9]。2个品系均以自由丝状体的形式被保存于实验室内^[16]。

本实验所用培养液为MES培养液^[17]。

1.2 杂交实验与杂合丝状体的获得

丝状体促熟、壳孢子采苗及叶状体的培养方法参照文献^[18]。待父、母本的叶状体接近成熟时, 分别选取稍部长约2 cm的藻体按1:1的比例置于充气瓶(250 mL)中混合培养。当母本藻体上形成较多果孢子囊时, 将父本叶状体取出, 继续培养。再培养3~4 d后, 母本藻体经阴干后置于培养皿($\Phi=9$ cm)中待果孢子放散, 获得的果孢子萌发长成一定大小的丝状体藻落后, 被逐个挑出置于试管中进行单藻落培养。

1.3 F₁壳孢子萌发体的定点跟踪拍照

将壳孢子液搅匀后倒入事先已铺满盖玻片的培养皿($\Phi=9$ cm)内, 使壳孢子附着在盖玻片上, 培养条件: 温度(23±1) °C, 光照密度20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照周期10L:14D, 每5 d更换一半的培养液。于壳孢子附着后的次日开始, 每日上午8点和下午5点, 将附有壳孢子的盖玻片置于光学显微镜(Eclipse 90i, Nikon)下进行定点跟踪拍照记录。

1.4 F₁壳孢子萌发体的细胞崩溃死亡发生规律的统计

将收集的壳孢子置于培养皿($\Phi=9$ cm)内, 壳孢子密度为30个/视野(10 \times), 培养条件同1.3。从第4 d开始, 每2 d统计一次壳孢子萌发体的分裂率即壳孢子、处于二细胞期、三细胞期等的萌发体的百分率, 以及它们当中发生了细胞崩溃死亡的百分率。统计3个培养皿, 每个皿内统计的壳孢子总量为600~700个, 合计数为1800~2100个。

1.5 F₁壳孢子萌发体的存活率统计

将壳孢子液搅匀后倒入已铺有盖玻片的培养皿($\Phi=9$ cm)内, 静置培养3 d, 使壳孢子充分附着在盖玻片上, 在光学显微镜(TS100, Nikon)下统计单个盖玻片上的壳孢子总量, 要求数量不少于2000个, 随后将该盖玻片单独放入一个培养皿($\Phi=9$ cm)内继续培养40 d, 通过统计单个培养皿内存活叶状体的数量, 计算出F₁壳孢子萌发体的存活率。培养条件: 温度(23±1) °C, 光照密度40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照周期10L:14D, 每5 d更换一半的培养液。实验设置4个平行组。

1.6 F₁成活后代的表现型观察

将收集的壳孢子置于培养皿($\Phi=9$ cm)内静止培养20 d后,在光学显微镜(Eclipse 90i, Nikon)下观察成活个体形态并拍照记录,培养条件同1.5。将成活体继续培养至日龄40~45 d时,根据叶状体的颜色和形态将它们进行分型。随后将成活后代分别酶解获得它们的体细胞进行培养,获取体细胞再生体^[17],从每株成活后代产生的体细胞再生体中分别选取30株进行性别统计。最后利用叶状体的单性生殖分别获得成活后代的纯合丝状体^[16],随后再观察后者产生的壳孢子萌发情况和成体的颜色和体型等。

2 结果

2.1 杂交实验与F₁壳孢子萌发体的细胞崩溃现象

父、母本叶状叶混合培养5 d后,在母本叶片上出现了许多红色的果孢子囊(图版 I -1)。由果孢子囊释放的果孢子放散后萌发成杂合丝状体,后者经促熟后释放出大量的F₁壳孢子。F₁壳孢子在萌发初期发生了非常严重的细胞崩溃和死亡现象(图版 I -2)。

2.2 发生崩溃死亡的F₁壳孢子体时期与特征

通过对单个壳孢子萌发体进行定点跟踪观察后发现,细胞崩溃死亡不仅会发生在减数分裂的直接产物即处于二细胞期、三细胞期和四细胞期的萌发体中,在细胞数大于4个的萌发体进行有丝分裂时也会出现细胞崩溃死亡,最终形成含不同细胞数的萌发体(图版 II)。

崩溃死亡的细胞具有以下几个特点:液泡逐渐变小至消失;光泽变差,颜色由鲜红色逐渐变浅呈橘黄色,最后变成浅黄色;星状色素体逐渐收缩,最终成弥散后消失。但也有一些细胞比较特殊,在死亡过程中其颜色由鲜红色逐渐变成橘红色,然后变成浅黄色(图版 II)。

2.3 F₁壳孢子萌发体的细胞崩溃死亡发生规律

在培养中,绝大部分的壳孢子可进行第一次减数分裂,形成处于二细胞期的萌发体,随后进行第二次减数分裂,形成处于三细胞期和四细胞期的萌发体。培养4 d时,78.6%的壳孢子已发育成含2~4个细胞的的萌发体,其中绝大部

分是处于二细胞期的萌发体;在含2~4个细胞的萌发体中未出现崩溃死亡细胞的萌发体的百分率为99.7%,但有0.3%的个体出现了细胞崩溃死亡。随着培养时间的延长,处于二细胞期的萌发体的存活个体百分率逐渐降低,其含崩溃死亡细胞的个体百分率逐渐增加;处于三细胞期、四细胞期和细胞数>4细胞的存活个体百分率均呈先增加后降低的趋势,而出现崩溃死亡细胞的个体的百分率不断增加,其中大规模的崩溃死亡细胞是出现在处于三细胞期和四细胞期的萌发体中。此外,少量萌发体能够发育成含4个以上细胞的个体,但在随后的有丝分裂中也出现了细胞崩溃死亡现象(图1,图2)。

培养至14 d时,2.9%的壳孢子未进行分裂,97.1%的壳孢子分裂形成含不同细胞数的萌发体,其中处于二细胞期、三细胞期、四细胞期的萌发体和细胞数>4细胞个体的百分率分别为12.2%、38.6%、37.2%和8.9%,它们当中含有崩溃死亡细胞的个体百分率分别为96.7%、99.5%、99.2%和97.8%。此外,含有崩溃死亡细胞的处于二细胞期、三细胞期、四细胞期的萌发体具有一个共同的特点,即含有崩溃死亡的细胞数目越多,此类型个体所占的比例越大(图3)。在细胞数>4的萌发体中,因萌发体的细胞数不同,只统计了未含死亡细胞的个体、含死亡细胞但细胞未完全死亡的个体以及细胞全部死亡的个体,且它们的百分率分别为0.1%、5.7%和3.1%。

2.4 F₁壳孢子萌发体的存活率

培养35 d,4个培养皿内均有少量的壳孢子萌发体存活下来,长成叶状体,但存活率极低,分别只有1.3%、0.7%、0.9%和0.9%,平均存活率为1.0%左右(表1)。

2.5 F₁成活叶状体的表现型观察

培养20 d,在显微镜下可以观察到有少量的F₁壳孢子萌发体成活下来,但成活个体均含有死细胞,且成活个体之间的细胞形态差异较大(图版 I -3~5)。再继续培养至45 d,根据叶状体的颜色、形态特征,可把成活个体分成类亲本型和重组型两大类(图版 I -6~8)。随机挑选它们当中的24个叶状体进行酶解,再分别从它们的体细胞再生体中随机选取30株进行性别鉴定。结果发现,在23个成活叶状体的体细胞再生体中全部呈现单一性别,即全雌或全雄,仅有1个成活叶

□ 未含死亡细胞的个体 individuals containing no dead cells ■ 含死亡细胞的个体 individuals containing dead cells

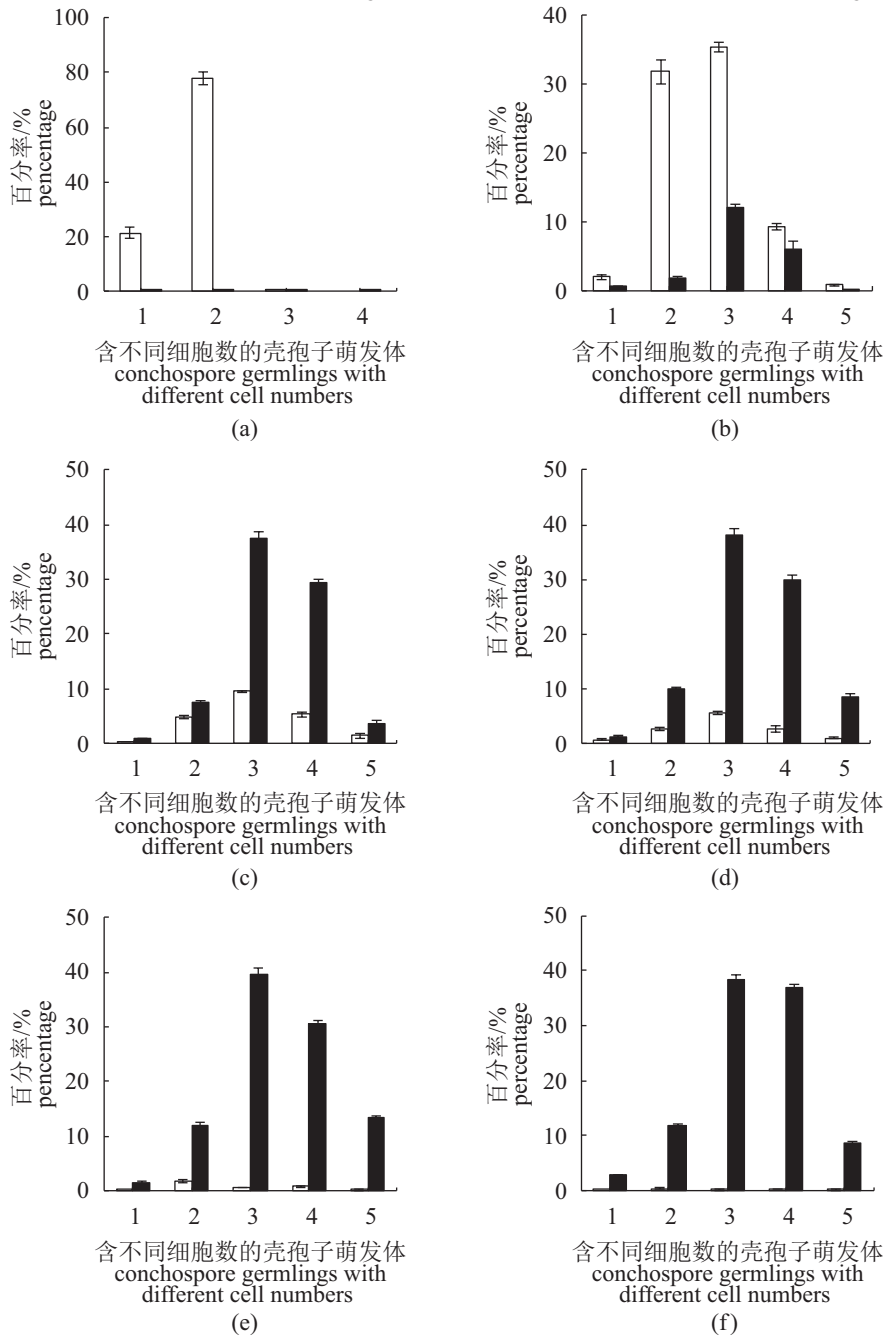


图 1 坛紫菜与长紫菜种间杂交产生的F₁壳孢子萌发体在不同生长阶段的存活和含出现崩溃死亡细胞的个体百分率
1. 壳孢子, 2. 处于二细胞期的萌发体, 3. 处于三细胞期的萌发体, 4. 处于四细胞期的萌发体, 5. 细胞数>4的萌发体。(a)-(f). 培养时间分别为4、6、8、10、12和14 d

Fig. 1 The percentages of surviving and containing breaking-down cells of F₁ conchospore germlings at different development stages produced by interspecific hybridization between *P. haitanensis* and *P. dentata*

1. conchospore, 2. individual contains two cells, 3. individual contains three cells, 4. individual contains four cells, 5. individual of cell numbers more than four. (a)-(f). The culture time was 4, 6, 8, 10, 12 and 14 days, respectively

状体的体细胞再生体出现了两种性别, 但雌雄比为29 : 1。随后利用再生体的单性生殖, 分别获得这些体细胞再生体的丝状体, 即成活个体

的F₂丝状体, 后者经促熟后释放F₂壳孢子, 结果发现, F₂壳孢子在萌发初期阶段均可正常萌发, 没有再出现细胞崩溃死亡现象(图版 I -9~11)。

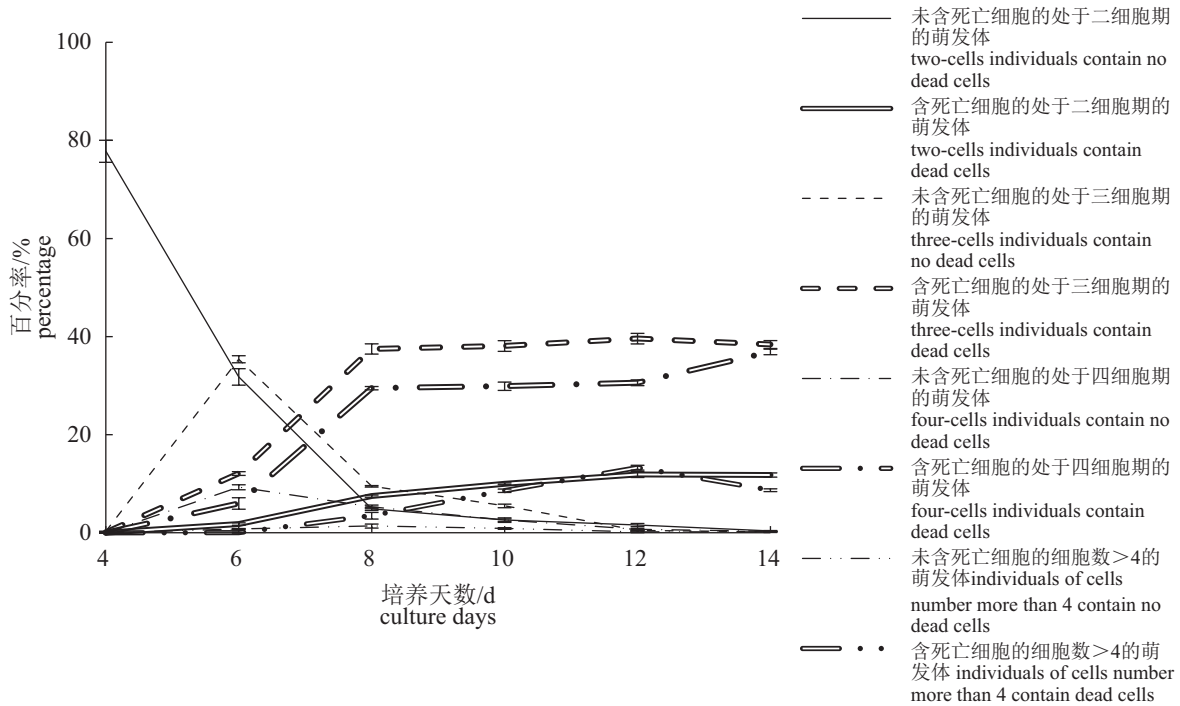


图 2 坛紫菜与长紫菜种间杂交产生的F₁壳孢子萌发体在不同培养时间段出现的含不同细胞数的个体百分率以及含崩溃死亡细胞的个体百分率

Fig. 2 The percentages of individuals with different cell numbers and breaking-down cells at different culture days in F₁ conchospore germlings produced by interspecific hybridization between *P. haitanensis* and *P. dentata*

3 讨论

迄今为止，许多藻类学家尝试过紫菜的种间杂交^[9, 14-15, 19]，其中坛紫菜与印度产紫菜 *Pyropia radi*、长紫菜与拟线形紫菜(*P. pseudolinearis*)的种间杂交被证明是成功且可育的^[9, 19]，为更好的发掘杂交重组优势，培育出紫菜新品系奠定了基础。Shin等^[14]和Niwa等^[15]利用条斑紫菜与甘紫菜进行种间杂交时发现，杂合丝状体产生的壳孢子在萌发初期出现细胞崩溃死亡现象，且崩溃主要发生在四分体时期，但他们对该现象的发生规律没有进一步的探讨。在本研究中，坛紫菜与长紫菜的种间杂交，能正常形成杂合丝状体，后者经促熟后放散出大量的壳孢子，但壳孢子在萌发初期出现了细胞崩溃死亡现象，大部分壳孢子萌发体发生细胞崩溃后基本上停留在三细胞期和四细胞期阶段就死亡，但少量的萌发体能够发育成含4个以上细胞的个体，但在随后的有丝分裂中也会出现细胞崩溃死亡。

坛紫菜和长紫菜均分布于我国浙江至广东沿海的潮间带海域，它们均属于刺缘紫菜，藻

体形态均呈披针形或卵圆形，此外，它们的染色体数目均为5条，理论上它们之间的杂交是可行的^[20-23]，但本研究结果表明，虽然坛紫菜与长紫菜在生态位、形态学及染色体数目等方面上高度相似，但它们的杂交后代仍出现细胞崩溃死亡现象，说明它们之间存在生殖隔离，更进一步证明它们为不同种。即使壳孢子萌发体中有少量个体成活下来，也被认为是紫菜种间杂交的突破^[14-15]。

在适宜的条件下，紫菜的纯合丝状体释放的壳孢子中，一般有3%~10%的个体无法进行第一次分裂而死亡^[24]，在本研究中，杂合丝状体释放的壳孢子中，也有2.9%的个体(日龄14 d)出现这种现象，猜测是这些壳孢子活力不足或受到损伤而导致的死亡；97.1%的壳孢子能进行第一次减数分裂形成处于二细胞期的萌发体，但从二细胞期开始，细胞开始出现崩溃死亡现象，并随着处于二细胞期的萌发体进行第二次减数分裂形成处于三细胞期和四细胞期的萌发体，细胞崩溃死亡的发生达到峰值，这些现象表明杂合丝状体壳孢子的减数分裂发生异常。减数分裂异常一般是由基因控制或染色体结构变异

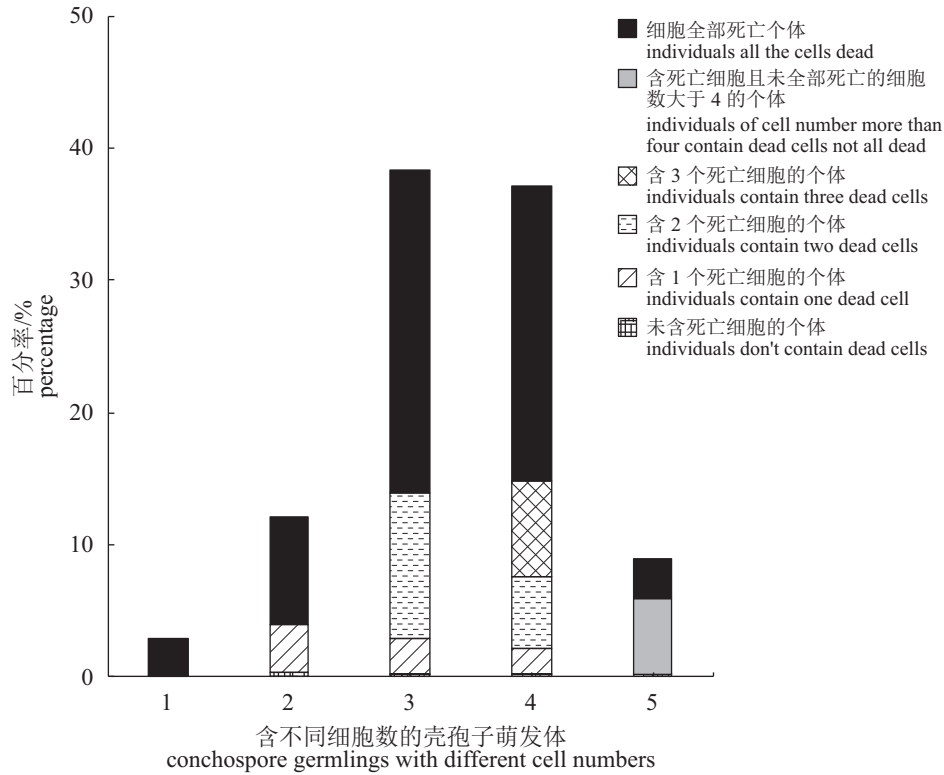


图 3 培养 14 d 的坛紫菜与长紫菜种间杂交产生的 F₁ 壳孢子萌发体在不同生长阶段的存活和含崩溃死亡细胞的个体百分率分布图

1. 壳孢子, 2. 处于二细胞期的萌发体, 3. 处于三细胞期的萌发体, 4. 处于四细胞期的萌发体, 5. 细胞数>4 的萌发体

Fig. 3 The percentages distribution of surviving and containing breaking-down cells of F₁ conchospore germlings at different development stage produced by interspecific hybridization between *P. haitanensis* and *P. dentata* after being cultured for 14 days

1. conchospore, 2. individual contains two cells, 3. individual contains three cells, 4. individual contains four cells, 5. individual of cell numbers more than four

表 1 培养 35 d 的坛紫菜与长紫菜种间杂交产生的 F₁ 壳孢子萌发体的存活率

Tab. 1 The survival rate of F₁ conchospore germlings produced by interspecific hybridization between *P. haitanensis* and *P. dentate* after being cultured for 35 days

实验组 test groups	F ₁ 壳孢子萌发体 F ₁ conchospore germlings			
	总数/个 total numbers	存活数/个 survival numbers	存活率/% survival rate	平均存活率/% average survival rate
1	3249	42	1.3	1.0
2	5864	41	0.7	
3	3565	32	0.9	
4	6733	58	0.9	

引起的, 普遍存在于多个物种当中, 尤其是在一些远缘杂种中, 异常出现更为普遍^[25]。至今关于紫菜减数分裂异常的报道几乎没有, 但是在高等植物例如小麦(*Triticum*)^[26]、菊花(*Dendran-*

thema)^[25]和柑橘(*Citrus*)^[27]等物种中, 通过对处于减数分裂过程中的细胞或组织进行染色进而观察染色体的行为, 发现导致众多的物种发生减数分裂异常的原因大致相同, 都与减数分裂过程中染色体的行为有关。减数第一次分裂间期染色体完成加倍过程, 进入前期 I, 由于亲缘关系远的物种其同源染色体之间遗传差异较大, 不能进行同源染色体正常配对, 极易形成不等二价体^[26]; 在中期 I, 部分染色体没有排列到赤道板上, 而是位于细胞两极或者赤道板附近, 这些染色体称之为滞后染色体, 滞后染色体随机分布, 或丢失或游离于主核之外形成微核导致遗传物质的减少或增加^[27-29]; 在后期 I 以及末期 I, 染色体桥与滞后染色体的存在使得染色体分布不均匀或部分染色体的缺失^[29]。减数第二次分裂除了没有同源染色体的行为异常外, 其它染色体的异常行为都有可能发生, 而这些染色体

的异常行为都有可能会导致细胞的死亡。此外,壳孢子完成减数分裂进行有丝分裂的过程中,细胞也会发生崩溃死亡,猜测是与第二次减数分裂中染色体的不规则分离和异常的胞质分离有关^[26-29]。

虽然绝大部分壳孢子萌发体崩溃死亡,但仍有1%的壳孢子能够成活下来,经过一定时间的培养长成叶状体。通过对成活下来的叶状体进行性别确定和形态学分析,我们发现成活下来的叶状体基本上为单性别即单雄或单雌,说明成活下来的叶状体是从四分体的一个或两个细胞发育而来;其形态上既有类亲本个体又有重组个体,说明在减数分裂过程中存在染色体的交叉互换^[30-31]。有报道称通过分子标记的方法证明成活下来的叶状体是以单倍配子体形式存在的杂合丝状体,并且其可能是由杂合丝状体阶段发生的染色体位点的快速消除和重排所造成的^[15]。

本结果证实,利用紫菜的种间杂交后代在壳孢子萌发初期会出现细胞崩溃死亡现象,可以用于辅助更精确地鉴别物种,同时也可从其成活后代中筛选出新的品系(种),对于探究物种的形成和进化具有一定的意义。

参考文献:

- [1] 王长青,严兴洪,黄林彬,等.坛紫菜优良品系“申福2号”的特性分析与海区中试[J].水产学报,2011,35(11):1658-1667.
Wang C Q, Yan X H, Huang L B, et al. Characterization of an improved strain (SF-2) of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and its pilot cultivation in mariculture farm[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1658-1667(in Chinese).
- [2] 吴航航,丁洪昌,严兴洪.条斑紫菜耐高温杂交重组品系的筛选与特性分析[J].水产学报,2017,41(5):711-722.
Wu H H, Ding H C, Yan X H. Selection and characterization of a high-temperature resistant strain by hybridization in *Pyropia yezoensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 711-722(in Chinese).
- [3] 何培民,秦松,严小军,等.海藻生物技术及其应用[M].北京:化学工业出版社,2007:86-98.
He P M, Qin S, Yan X J, et al. Seaweed biotechnology and its application[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 86-98 (in Chinese).
- [4] 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.
Yan X H, Ma S Y. Selection of a high-temperature resistant strain of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1): 112-119(in Chinese).
- [5] Yan X H, Lv F, Liu C J, et al. Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(4): 511-516.
- [6] 严兴洪,陈敏.坛紫菜耐低盐优良品系的筛选[J].上海水产大学学报,2008,17(3):316-320.
Yan X H, Chen M. Selection of low-salinity resistant improved varieties in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(3): 316-320(in Chinese).
- [7] 徐燕,陈昌生,谢潮添,等.坛紫菜杂交品系优势的初步评价[J].海洋水产研究,2008,29(1):62-69.
Xu Y, Chen C S, Xie C T, et al. Preliminary evaluation of hybridized strains of *Porphyra haitanensis*[J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(1): 62-69(in Chinese).
- [8] 纪德华,谢潮添,徐燕,等.坛紫菜品系间杂交子代杂种优势的ISSR分析[J].海洋学报,2008,30(6):147-153.
Ji D H, Xie C T, Xu Y, et al. ISSR analysis on the heterosis in hybrids of *Porphyra haitanensis*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30(6): 147-153(in Chinese).
- [9] 刘海洋,李琳,严兴洪.坛紫菜与*Pyropia radii*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 L, Yan X H. Study on the interspecies cross between *Pyropia haitanensis* and *Pyropia radii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(6): 882-887(in Chinese).
- [10] 吴宏肖,严兴洪,宋武林,等.坛紫菜与*Pyropia radii*种间杂交重组优良品系的选育与特性分析[J].水产学报,2014,38(8):1079-1088.
Wu H X, Yan X H, Song W L, et al. Selection and characterization of an improved strain produced by genetic recombinant of interspecific hybridization between *Pyropia haitanensis* and *Pyropia radii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1079-1088(in Chinese).
- [11] 李淑平.长紫菜的人工诱变育种及与坛紫菜的种间杂交试验[D].上海:上海海洋大学,2015:33-37.
Li S P. The artificial mutation breeding and the interspe-

- cific hybridization with *Pyropia haitanensis* of *Pyropia dentata*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015: 33-37 (in Chinese).
- [12] Zhang Y, Yan X H, Aruga Y. The sex and sex determination in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73414.
- [13] 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): 1-8.
Yan X H, Li L, Aruga Y. Cross experiments and analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 1-8(in Chinese).
- [14] Shin J A, Miura A, Fu P F. Hybrid breakdown and breakthrough in interspecific crosses between *Porphyra yezoensis* and *P. tenera*[J]. *National History Research*, 1997, 3: 65-70.
- [15] Niwa K, Kobiyama A, Sakamoto T. Interspecific hybridization in the haploid blade-forming marine crop *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta): Occurrence of allodiploidy in surviving F1 gametophytic blades[J]. *Journal of Phycology*, 2010, 46(4): 693-702.
- [16] 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.
Yan X H, Li L, Chen J H, et al. Parthenogenesis and isolation of genetic pure strains in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *High Technology Letters*, 2007, 17(2): 205-210(in Chinese).
- [17] 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.
Wang S J, Zhang X P, Xu Z D, et al. A study on the cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *P. haitanensis* I.[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1986, 17(3): 217-221(in Chinese).
- [18] 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, 2006, 29(2): 166-172.
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)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 29(2): 166-172(in Chinese).
- [19] Kim N G. Culture study on the hybrid by interspecific crossing between *Porphyra pseudolinearis* and *P. dentata* (Bangiales, Rhodophyta), two dioecious species in culture[J]. *ALAGE*, 2011, 16(1): 79-86.
- [20] 曾呈奎, 张峻甫. 我国的紫菜与紫菜养殖[J]. 生物学通报, 1956, 3: 29-33.
Tseng C K, Zhang J F. Study on *Porphyra* and *Porphyra* culture of China[J]. *Bulletin of Biology*, 1956, 3: 29-33(in Chinese).
- [21] 张德瑞, 郑宝福. 中国的紫菜及其地理分布[J]. 海洋与湖沼, 1962, 4(3-4): 183-188.
Zhang D R, Zheng B F. The Chinese Porphyras and their geographical distribution[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1962, 4(3-4): 183-188(in Chinese).
- [22] 邓银银, 陆勤勤, 陈伟洲, 等. 广东部分岛屿紫菜物种研究[J]. 南方水产科学, 2014, 10(2): 11-17.
Deng Y Y, Lu Q Q, Chen W Z, et al. Study of *Porphyra* species from some islands of Guangdong Province[J]. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(2): 11-17(in Chinese).
- [23] 曾呈奎, 孙爱淑. 紫菜属(*Porphyra*)的细胞学研究——中国产的七种紫菜叶状体染色体数目的研究[J]. 科学通报, 1986, 31(1): 67-70.
Tseng C K, Sun A S. Cytological studies on *Porphyra* study on the chromosome numbers of seven kinds of *Porphyra* in China[J]. *Science Bulletin*, 1986, 31(1): 67-70(in Chinese).
- [24] 薛兆亮, 严兴洪. 条斑紫菜壳孢子的抗生素敏感性研究[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(6): 982-988.
Xue Z L, Yan X H. Studies on antibiotic sensitivity of conchospores in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(6): 982-988(in Chinese).
- [25] 崔娜欣, 陈发棣, 赵宏波. 部分菊属植物及其种间杂种减数分裂异常现象观察[J]. 广西植物, 2007, 27(5): 676-681.
Cui N X, Chen F D, Zhao H B. Primary study on abnormalities of meiosis in some species of *Dendranthema* and their hybrids[J]. *Guihaia*, 2007, 27(5): 676-681(in Chinese).
- [26] 沈光华. 普通小麦×黑麦杂种F1~F5代的减数分裂行为与育性研究[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 1994, 23(3): 82-88.
Shen G H. Study on meiosis and fertility of F1~F5 hybrids from common wheat×rye[J]. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 1994, 23(3): 82-88(in Chinese).

- [27] 高娟, 伊华林, 胡志勇. 柑橘体细胞杂种有性后代花粉母细胞减数分裂的观察[J]. 果树学报, 2010, 27(1): 8-12.
Gao J, Yi H L, Hu Z Y. Meiotic observations on pollen mother cells of sexual progenies of citrus somatic hybrid[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(1): 8-12(in Chinese).
- [28] 雷家军, 梁印. 百合三倍体种间杂种花粉母细胞减数分裂行为观察[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 162-165.
Lei J J, Liang Y. Meiosis observation of pollen mother cells of triploid interspecific hybrids in Lily[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2012, 34(2): 162-165(in Chinese).
- [29] 唐宇, 吕淑霞, 王桂香, 等. 黑芥与花椰菜体细胞杂种花粉母细胞的减数分裂不同步及染色体行为异常[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(6): 1111-1116.
Tang Y, Lv S X, Wang G X, *et al.* Asynchronous meiotic and chromosomal abnormalities in pollen mother cells of cauliflower-black mustard somatic hybrids[J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(6): 1111-1116(in Chinese).
- [30] 郭军洋, 陈劲枫, 钱春桃, 等. 植物减数分裂染色体配对与染色体组分析的研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 513-520.
Guo J Y, Chen J F, Qian C T, *et al.* Meiotic chromosome pairing research and genome analysis in plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2004, 21(5): 513-520(in Chinese).
- [31] 刘春霞, 何群燕, 金危危. 植物减数分裂中的染色体配对、联会和重组研究进展[J]. 遗传, 2010, 32(12): 1223-1231.
Liu C X, He Q Y, Jin W W. The pairing, synapsis and recombination of meiosis in plant[J]. Hereditas (Beijing), 2010, 32(12): 1223-1231(in Chinese).

Phenomenon of cell breakdown and phenotypic observation on surviving blades in interspecific hybridization progeny between *Pyropia haitanensis* and *Pyropia dentata*

GU Lingzhi^{1,2,3}, DING Hongchang^{1,2,3}, YAN Xinghong^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

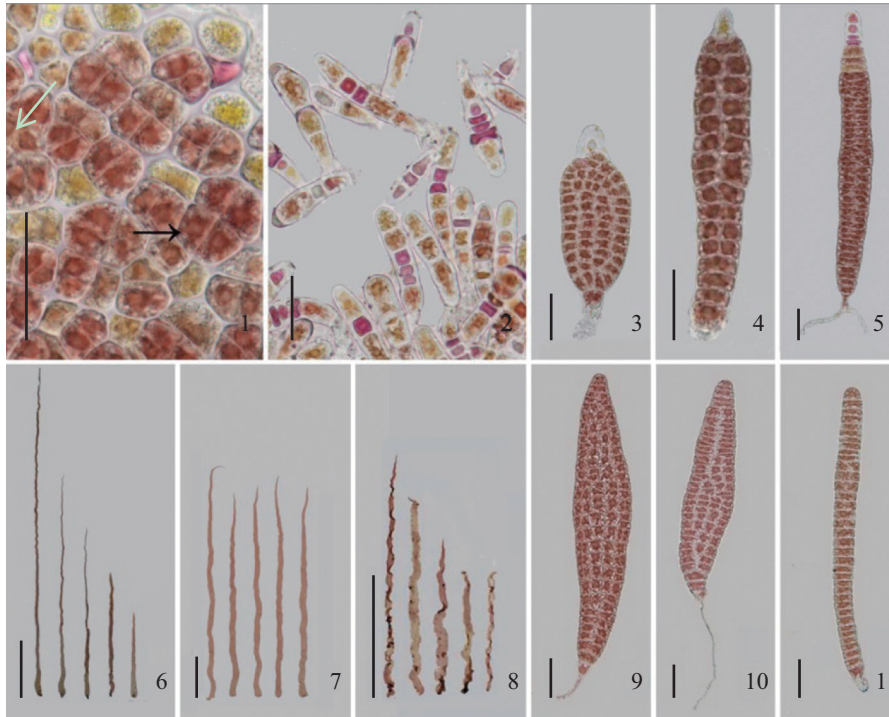
3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In *Pyropia haitanensis*, meiosis occurs during the first two divisions of germinating conchospores, and then the latter formed a tetrad with different genotype, finally the tetrad developed into a genotype chimeric blade. The heterozygous conchocelies was formed in the interspecific hybridization between *Pyropia haitanensis* and *Pyropia dentata*, which could produce conchospores after maturation, but the conchospores had serious cell breakdown at the early development stage of germination. Through the tracking observation of single conchospore germling, we found that cell breakdown occurred not only in the direct products of meiosis (dyad, triad and tetrad), but also in the mitosis when the number of germling cell was more than 4. In culture, most of the conchospores could form dyad after the first meiotic division, and then form triad or tetrad through the second meiotic division. When cultured for 4 days, 78.6% of the conchospores had developed into germlings containing 2–4 cells, and the rest were undivided conchospores; The percentage of germlings containing 2–4 cells that did not have dead cells was 99.7%, and 0.3% of individuals had dead cells. With the prolongation of culture time, most of the dyads developed into the triads and tetrads, while large-scale cells breakdown appeared in the triad and tetrad. After culture for 14 days, the percentages of triad and tetrad were 38.6% and 37.2%, respectively, in which 99.5% and 99.2% contained dead cells, respectively. In addition, 8.9% of the germlings could develop into individuals with more than 4 cells, but cell death also appeared in the subsequent mitosis. When cultured for 35 days, most of the cells of germlings had all died, still, about 1% of the germlings survived, but they did not develop from the complete tetrads, just developed from 1-2 surviving tetrad cells. After 45 days of culture, the surviving individuals could be divided into parental and recombinational type based on their morphology and color. The results confirmed that the hybrid breakdown occurred in the early development stage of conchospores in interspecific hybridization of *Pyropia*, which could not only be used to assist in the more accurate identification of species, but also we could select new strains with recombination advantage from the surviving offspring.

Key words: *Pyropia haitanensis*; *Pyropia dentata*; interspecific hybridization; heterozygous conchocelies; cell breakdown; surviving individual;

Corresponding author: YAN Xinghong. E-mail: xhyan@shou.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research & Development Program of China (“863” Program) (2012AA10A411); National Natural Science Foundation of China (31072208); Special Fund of Fujian Provincial Governor (2014S1477-10); Major Science and Technology Special Fund of Agriculture (Fisheries) New Variety Breeding of Zhejiang (2016C02055-6)



图版 I 坛紫菜与长紫菜种间杂交产生的杂合果孢子囊、发生细胞崩溃的 F_1 壳孢子萌发体、成活的 F_1 后代和 F_2 壳孢子萌发体

1. 杂合果孢子囊(箭头所示); 2. 培养10 d的 F_1 壳孢子萌发体; 3~5. 培养20 d的 F_1 壳孢子萌发体成活个体; 6~8. 培养40 d的 F_1 成活后代; 6~7. 类亲本型; 8. 重组型; 9~11. F_1 成活后代经单性生殖形成的丝状体所产生的壳孢子萌发体(F_2 壳孢子苗). 1~5, 9~11标尺为40 μm ; 6~8标尺为5 cm

Plate I Zygotosporangia, F_1 conchospore germlings with cell breakdown, F_1 surviving offspring and F_2 conchospore germlings developed from interspecific hybridization between *P. haitanensis* and *P. dentata*

1. Zygotosporangia (arrow); 2. The F_1 conchospore germlings were cultured for 10 days; 3~5. The surviving F_1 conchospore germlings were cultured for 20 days; 6~8. The F_1 surviving offspring were cultured for 40 days; 6~7. Parental type; 8. Recombinational type. 9~11. The F_2 conchospore germlings. The bar=40 μm in 1~5 and 9~11; The bar=5 cm in 6~8



图版 II 坛紫菜与长紫菜种间杂交产生的的 F_1 壳孢子萌发体早期发育阶段定点跟踪观察

1~4. 壳孢子最终萌发形成二分体, 三分体, 四分体和5细胞个体. 图中标尺均为 $20\ \mu\text{m}$

Plate II Fixed point tracking observation on the early developmental stage of F_1 conchospore germlings produced by interspecific hybridization between *P. haitanensis* and *P. dentata*

1~4. The dyad, triad, tetrad and five-cell individual developed from F_1 conchospores, respectively. Scale bar in all figures is $20\ \mu\text{m}$