

自然条件下的坛紫菜四分体发育与性别表型观察

张 源, 严兴洪*

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为探明野生坛紫菜的性别真相以及野外的性别观察与室内遗传杂交实验所得性别结果相反的原因, 对可能影响天然坛紫菜性别的几个关键问题进行了研究。结果发现, 5.8S rDNA 保守区域的序列分析结果证实, 野生坛紫菜群体中的雌雄同体与雌雄异体个体均属同一物种。坛紫菜颜色突变体与野生型间的杂交品系在天然条件下栽培所产生的 F_1 叶状体出现了亲本色的分离与重组, 95.6% 的小叶状体 (约 5 mm) 为由 2~4 色块构成的颜色嵌合体, 它们长大后的每个色块只出现一种性别, 颜色嵌合体也是性别嵌合体, 该结果与室内杂交实验一致, 这表明在自然条件下, 坛紫菜的减数分裂位置与性别分离模式均未改变。但在随后的发育过程中, 近基部的 1~2 个色块严重滞育, 仅形成肉眼较难发现的小藻块, 构成假根和基部, 它们基本不成熟, 造成嵌合体的绝大部分藻体由梢部的 1~2 个色块发育而来, 嵌合体比例降至 42.1%。但即使是雌雄嵌合的个体, 由于梢部色块面积通常较大且成熟远早于中、基部色块, 在成熟期的初、中期, 成熟个体几乎均为梢部色块成熟, 表现为单性, 在成熟期的晚期, 中部色块开始成熟, 雌雄同体比例大幅度上升。本研究表明, 在天然条件下生长的坛紫菜仍以雌雄同体为主, 但减数分裂产物的四分体不均衡发育以及藻体的梢、中、基部的不同步成熟均极大地降低了叶状体真实性别被观察到的概率, 单凭肉眼一次性抽检, 其性别往往以雌雄异体为主, 少数为雌雄同体。

关键词: 坛紫菜; 四分子体; 叶状体; 雌雄同体; 性别表型

中图分类号: S 917

文献标志码: A

坛紫菜 [*Pyropia haitanensis* (T. J. Chang & B. F. Zheng) N. Kikuchi & M. Miyata]^[1] 是我国的特有物种, 也是我国最重要的紫菜栽培种之一。张德瑞等^[2] 根据该紫菜叶状体的大小、形态、边缘刺分布与数量、果孢子囊和精子囊的分裂式、性别等分类学特征, 将其命名为坛紫菜。他们发现在野生坛紫菜叶状体群体中, 大多数个体为雌雄异体, 仅少数为雌雄同体, 这一性别特征成为坛紫菜区别于长紫菜 (*Py. dentata*) 的一个重要分类学依据^[2]。但是, 紫菜学者后来对野生坛紫菜性别的观察结果却与此不尽相同。有的人发现, 在生长成熟早期, 野生坛紫菜叶状体以雌雄异体为主,

但在叶状体的成熟晚期, 雌雄同体个体逐渐增多^[3]; 有报道认为在晚期收集的野生坛紫菜中, 雌雄同体个体较多^[4]。因此, 对坛紫菜的真实性别学者们一直还存在着疑虑。近年来, 研究人员分别对来自坛紫菜单个叶状体的营养细胞或组织进行了离体培养^[5-9], 均发现少数营养细胞能分化出异性或类似异性的生殖细胞, 并认为坛紫菜的叶状体细胞可能存在性别分化或转化, 并推测野生坛紫菜群体中的雌雄同体个体很可能是由于性别分化的结果。然而, Yan 等^[10-12] 通过对坛紫菜的遗传杂交实验、生活史各阶段的染色体观察和分子标记分析等研究却发现, 坛紫菜的减数分

收稿日期: 2013-04-15 修回日期: 2013-05-22

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A411); 国家自然科学基金项目 (31072208); 公益性行业 (农业) 专项 (200903030); 国家农业科技成果转化资金项目 (2011GB2C000005); 上海市科委重点科技攻关项目 (10391901100); 国家海洋公益性行业科研专项 (201105008, 201105023)

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

裂发生在壳孢子的萌发初期,并且,杂交实验及分子标记分析的研究结果均证实,坛紫菜色素突变体与野生型杂交产生的 F_1 叶状体是颜色嵌合体也就是基因型嵌合体,亲本的颜色性状在减数分裂时发生了分离和重组,产生大量的颜色嵌合体;同时,还发现颜色嵌合体的叶状体早期发生和发育模式很类似于雌雄同体的紫菜 (*Porphyra purpurea*)^[13]。根据坛紫菜的减数分裂位置和生活史中不同世代的交替情况^[14],严兴洪等^[15]推测野生坛紫菜叶状体的性别也应当随着减数分裂的进行而发生分离,形成性别嵌合的叶状体,即:坛紫菜有性生殖产生的叶状体应该是雌雄同体,而不是雌雄异体,但这一推测与关于野生坛紫菜的性别观察结果^[15]完全相反。为了证实这一推测,Zhang等^[16]以坛紫菜色素突变体的颜色和性别作为遗传标记,通过室内杂交实验对坛紫菜的性别遗传进行了更深入地研究,结果发现,在杂合丝状体产生的 F_1 叶状体中,96%以上是由2~4色块组成的颜色嵌合体,并且嵌合体上的每个色块均为单性,即雄性或雌性,每个色块的颜色边界与性别边界完全吻合,证实绝大多数的颜色嵌合体也是性别嵌合体;此结果证实了坛紫菜的性别是由一对等位基因控制,在壳孢子的减数分裂过程中,雌雄性别决定基因发生了分离,由减数分裂产生的四细胞的性别已经被决定,其中2个细胞为雌性,2个为雄性,构成了一个线性排列的性别和颜色均呈块状嵌合的四分子体,简称四分体。随后,四分体的各细胞不断进行有丝分裂,最终形成一个由2~4个性别块(色块)构成的雌雄嵌合叶状体。上述结果说明坛紫菜的性别属于早期决定。此外,该研究还发现,坛紫菜四分体的各细胞的后续发育存在较严重的不均衡现象:位于四分体下位(将来长出假根的一端)的1~2个细胞分裂和发育比较慢,趋向于形成假根或发育成很小的藻体基部,并且它们的性别表型极少被表达出来;而四分体上位(将来长出叶片的一端)的1~2个细胞发育很好,形成叶片的绝大部分,各自的性别表型随着藻体的日龄增加而逐渐表现出来。此外, F_1 颜色嵌合叶状体上各色块的成熟不同步,只有在极少数色块间成熟时间接近的叶状体上才能观察到雌雄同体的性别表型。在缺乏颜色作为判断性别块区域辅助标记的情况下,四分体的生长发育模式和成年藻体的梢、中、基部的成熟

不同步这二个因素均大幅度降低了可观察到的雌雄同体比例,使绝大多数个体的性别表现为单性,少数为雌雄同体。这一研究结果暗示,过去对野生坛紫菜叶状体性别的观察结果可能是不全面的,也无法反映坛紫菜的真实性别。为了证实野生坛紫菜叶状体的性别与室内杂交实验结果的一致性,本实验对以下3个问题展开深入研究:(1)由于生长在自然岩礁上的紫菜往往并非单一物种,至今并没有确切的研究证据可以证明在坛紫菜野生群体中发现的少数雌雄同体的叶状体与所谓的单性别叶状体均为坛紫菜,而只有确认了这一点后方能再深入探讨坛紫菜的性别;(2)Burzycki等^[17]和 Guiry^[18]推测紫菜的减数分裂位置可能并不是固定的,很可能与生长环境或不同种类中的雌雄生殖细胞分布有关。如果在天然条件下,坛紫菜的减数分裂位置发生了改变,如减数分裂发生于壳孢子的形成时期^[19],则会造成性别基因在壳孢子放散前就分离,产生单性别的叶状体。因此,在天然条件下,坛紫菜的减数分裂发生位置是否会改变也需进一步确认;(3)在天然条件下,坛紫菜叶状体发育模式的改变是否可能也会影响到叶状体的性别表现。

1 材料与方法

1.1 天然坛紫菜种群中雌雄同体个体的分子学鉴定

从生长于福建省平潭县牛山岛自然岩礁上的天然坛紫菜种群中采集成熟的叶状体,从中挑出雌雄同体的个体,再切除雌性藻块中已受精的果孢子囊部分,并在显微镜下检查确认无果孢子囊后,提取剩余叶状体的DNA,DNA提取使用新型植物基因组提取试剂盒(Tiagen,北京),操作步骤同说明书。根据NCBI上已报道的坛紫菜5.8S rDNA-ITS区的保守序列^[20]设计引物(Primer Premier 5.0),扩增包含5.8S区的保守区域。上下游引物分别为:5'-TTTGTCTTATCCGCTTTGT-3'和5'-TCATCTGGTATGCCTCCTA-3'。在20 μL 的PCR反应体系中,含10 \times buffer 2 μL ,DNA模板50 ng,0.2 mmol/L的dNTP,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的引物,1 U的Taq聚合酶。PCR扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s,30个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,由上海美吉生物医药科技有限公司测序,并与已发表的坛紫菜 5.8S 保守区序列进行比对,以确认雌雄同体的叶状体是否为坛紫菜。

1.2 天然条件下坛紫菜的减数分裂位置与叶状体发育模式的观察

实验用的坛紫菜杂合丝状体(标记为 RZ-7)由红色突变纯系(*SPY-1, R, ♀*)与野生型纯系(*WT-PT, W, ♂*)在室内杂交产生^[16],以自由丝状体的形式被保存在实验室内。杂合丝状体的贝壳移植和贝壳丝状体的培育在福建省霞浦县三沙镇紫菜育苗室进行,杂合丝状体的 F_1 叶状体被栽培在福建省霞浦县三沙镇的古桶养殖海区。2009 年 3 月初,先将洗净的文蛤贝壳(壳高 4~6 cm)平铺于育苗池的底部,加入经过黑暗沉淀的海水,水深 25~30 cm。然后,将经粉碎机切碎的杂合自由丝状体(RZ-7)均匀喷洒到贝壳表面,经黑暗培养 3 天后,再在弱光条件[10 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]静置培养 15 d,使之钻入贝壳并长成贝壳丝状体。随后,洗去贝壳表面上未钻壳的自由丝状体,再加入 50 cm 深的沉淀海水继续培养,每 2 周更换一半的海水,光照密度为 20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。自 8 月下旬开始缩光,以促进贝壳丝状体发育,每天的光照时间为 10 h。至 9 月初,贝壳丝状体发育成熟。为了更多地获得壳孢子,用尼龙网兜把贝壳丝状体扎紧成包,挂在海上进行过夜活水刺激,次日早晨 6:00 前把贝壳取回,放入育苗池内放散壳孢子。待壳孢子大量放出后,将 4 m × 2 m 的竹帘网片(福建省漳浦县生产,竹帘的每根竹片长为 4 m,宽约 4 cm)浸入壳孢子水中,供壳孢子附着。随后,将采好壳孢子的竹帘挂在海上的紫菜栽培架上进行栽培。壳孢子下海栽培 20 d,取回部分竹片,用锋利的单面刀片将竹片上的紫菜叶状体连根完整地刮下,在显微镜(Olympus CK)下逐个镜检,观察叶状体的颜色分离与色块发育情况。栽培 43 d,取部分竹片,用刀片把附着的紫菜叶状体完整地刮下,带回实验室进行充气培养,直至藻体的上下部分成熟,以便统计每个叶状体的性别。室内的培养条件:温度(25 ± 1)℃,光照密度为 80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (10L:14D)。使用的培养液为用 MES 加富的海水^[21],每周更换一半培养液。

1.3 天然杂交产生的野生型坛紫菜叶状体的性别观察

天然杂交产生的野生型叶状体室内培养与性别观察 2009 年 2 月,从平潭县牛山岛的自然岩礁上采回已具有大量果孢子囊的天然坛紫菜叶状体,经阴干后运回实验室,恢复培养 3 d,置通风处经阴干处理后,再置于海水中放散果孢子,获得的果孢子被培养在培养皿($\Phi = 9 \text{ cm}$)中。当果孢子长成一定大小的萌发体后,用玻璃毛细管分离出单根丝状体进行单个培养,以获得由单个果孢子长成的丝状体(标记为 WT-S)。当丝状体藻落长到一定大小时,用粉碎机将其粉碎后喷洒到贝壳表面上,使之移植到贝壳内。培养温度为(24 ± 1)℃,光照密度 10 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (12L:12D)。10 d 后,清洗贝壳并换入新鲜培养液,光照密度为 20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,其它培养条件不变。培养数周后,贝壳内长满丝状体,把培养温度升至(29 ± 1)℃,光周期为 10L:14D,直至贝壳丝状体成熟,当贝壳表面长出大量的壳孢子囊枝后,进行充气培养以获得壳孢子。随后,将收集到的壳孢子放入培养皿内进行静置培养。培养 20 d 后,用刀片将小叶状体从培养皿底部完整地刮下,置于培养瓶内进行充气培养,直至每个叶状体充分成熟,统计其性别。培养条件:温度(25 ± 1)℃,光周期为 10L:14D,光照密度为 80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,使用的培养液同“1.2”,每周更换一半培养液。

天然杂交产生的野生型叶状体海上栽培与性别观察 2009 年 2 月,从平潭县牛山岛的自然岩礁上采回已具有大量果孢子囊的天然坛紫菜叶状体,阴干后带回三沙紫菜育苗室,加入海水并不断搅动,以获得果孢子。获得的果孢子水经 2~3 层纱布过滤后,均匀喷洒于平铺在育苗池底的贝壳上,让果孢子钻入贝壳并萌发成贝壳丝状体(标记为 WT-G)。每 2 周更换一半海水。经过约 6 个月的培养,至 9 月初,贝壳丝状体发育成熟,进行壳孢子放散,附苗和海上栽培。栽培 24 d 后,用刀片将小叶状体从竹片上完整地刮下,进行室内充气培养,直至每个叶状体充分成熟,统计其性别。

野生型坛紫菜栽培群体后代的性别观察与分子学鉴定 2008 年 2 月,从福建省漳浦县六鳌镇养殖海区的野生型坛紫菜栽培群体中收

集数片个体较大且含有大量果孢子囊的叶状体进行果孢子采苗,并培养成贝壳丝状体(标记为WT-ZP),采苗方法与贝壳丝状体的培养方法同上。待贝壳丝状体成熟后进行壳孢子采苗,方法同于“1.2”。经26天的海上栽培,把部分竹片上的叶状体用刀片完整刮下,进行室内充气培养,直至每个叶状体充分成熟,统计其性别。培养条件同“1.2”。此外,在叶状体成熟前,随机取部分叶状体对其5.8S rDNA区序列进行分析,方法同“1.1”。

2 结果

2.1 天然坛紫菜群体中雌雄同体和雌雄异体个体的 rDNA 5.8s 区片段序列分析结果

通过PCR扩增,从3株雌雄同体叶状体与3株单性叶状体中均扩增出了一条大小均一的DNA片段,约为500 bp(图1),与引物设计的目标片段大小相符。测序结果表明,单性叶状体与雌雄同体叶状体的扩增产物序列一致,扩增片段长度为479 bp,包含ITS1与ITS2的部分序列和

```

TTTGTCTTATCCGCTTTGTCTCGGGGACACCCCTCTTCCCTTTGGGGGGCGGG
GTTGGAACCTTTGAGAAAAAGCGCTTGTCTCGGTACAAGAAAAAAAAAAAAAAAA
AAGATACAACTCTTAGCGGTGGATATCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCTA
ACTGCGATAACTAATGTGAATTGCAGGACTTCGTGAATCATTGAGTCTTTGAACGCAAG
TTGCGCTCATGTCCGGGTGGATGTGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTCTTTTTTTTATACAAA
AAGAACACAACCATCGGCTCTCCAGACAAGAAAAACAACCGCTCCCCGCTGTGTCTT
CCACCTTGCCTGGGAGCACGGGGATGGTTTGTATGGTGCAAGCCGGAGATGGGCACGT
CGCTCCCCTGCAAAGGCGGGGGCGTCGCCGAAACAAGGAAAAAGTGCCCGCTAAT
AGGAGGCATACCAGATGA
  
```

图2 野生坛紫菜群体中雌雄同体与单性叶状体的5.8S rDNA区测序结果

下划线区域为引物序列,阴影部分为5.8S rDNA区序列。

Fig. 2 The sequence of the rDNA 5.8S region of monoecious blade and unisexual blade collected from the wild population of *Py. haitanensis*

the underlined nucleotides was the sequence of primer, and the shadowy area was the sequence of 5.8S rDNA region.

2.2 天然条件下坛紫菜减数分裂位置及叶状体的发育模式与性别观察结果

下海栽培20 d,人工杂交品系(RZ-7)的壳孢子已长成为体长约为5 mm的F₁叶状体。在显微镜下逐个检查后发现,在叶状体上出现了4种不同的色块:2种亲本色块(R,W)和2种重组色块(R',W'),R'色块比R色块颜色稍浅,其它性状如厚度、边缘刺等特征两者类似;W'色块比

完整的5.8S区序列。5.8S区长度为160 bp,两端分别有一段poly A和poly T序列(图2),此序列与NCBI上已公布的采自不同地区的坛紫菜5.8S区保守序列完全一致。

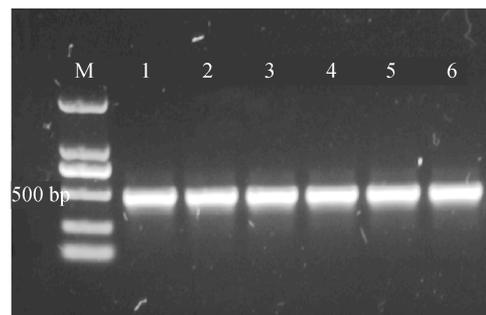


图1 野生坛紫菜群体中雌雄同体与雌雄异体个体的5.8S rDNA区PCR扩增产物电泳图

M. Marker, (DL 2000, TaKaRa); 泳道1~3. 单株雌雄同体叶状体; 4~5. 单株雄性叶状体; 6. 单株雌性叶状体。

Fig. 1 PCR profile of the 5.8S rDNA regions for monoecious and dioecious blades of *Py. haitanensis*, respectively

M. Marker, (DL 2000, Takara); Lane 1-3. single monoecious blade; 4-5. single male blade; 6. single female blade.

W色块颜色稍红,其它性状如厚度边缘刺等两者类似(图版I-1)。在随机抽检的751株叶状体中,经显微检查后发现,95.6%的叶状体为由2~4个色块呈线性排列构成的颜色嵌合体,但嵌合体上各色块的发育十分不均衡,位于叶状体基部的色块往往很小(图版I-2~9),一般难以用肉眼分辨它们,基部的色块存在较严重的滞育(表1)。

表 1 海区栽培的坛紫菜人工杂交品系 (*RZ-7*) F_1 叶状体 (日龄 20 d) 的发育情况
 Tab.1 Development of F_1 gametophytic blades of artificial hybridization strain (*RZ-7*) in *Py. haitanensis* after cultivated in the sea for 20 days

叶状体的显微观察表型 microscopic blade phenotype	叶状体的肉眼观察表型 blade phenotype identified by naked eye	叶状体基部的滞育色块数 numbers of arrested color-sector in blade	叶状体数目 blade numbers
单色叶状体 single-colored blade	单色叶状体 single-colored blade	0	33
2 色块嵌合体 2-color-sectored blade	2 色块嵌合体 2-color-sectored blade	0	200
	单色叶状体 single-colored blade	1	168
3 色块嵌合体 3-color-sectored blade	3 色块嵌合体 3-color-sectored blade	0	45
	2 色块嵌合体 2-color-sectored blade	1	144
	单色叶状体 single-colored blade	2	105
4 色块嵌合体 3-color-sectored blade	4 色块嵌合体 4-color-sectored blade	0	5
	3 色块嵌合体 3-color-sectored blade	1	12
	2 色块嵌合体 2-color-sectored blade	2	31
	单色叶状体 single-colored blade	3	8

如表 1 中所示,在抽检的 751 个叶状体中,颜色嵌合体占 95.6% (718/751),单色叶状体仅占 4.4% (33/751)。但是,由于 62.3% 的颜色嵌合体基部存在 1~3 个肉眼难以分辨的滞育色块,如果单凭肉眼观察,颜色嵌合体仅为 58.2%,其中,含 2 色块、3 色块和 4 色块的颜色嵌合体的百分数分别为 49.9%、7.6% 和 0.7%,而单色叶状体的百分数则升至 41.8%,从而导致 91.7% 的叶状体为单色叶状体和 2 色块嵌合体,而含 3~4 个色块的嵌合体很少,这也说明绝大多数的叶状体是由壳孢子减数分裂产生的四分体的 1~2 上位细胞发育而来。

在自然海区栽培 43 d, F_1 叶状体的体长达 5 cm 以上,对其发育状况再次检查后发现:在抽检的 1 368 株叶状体中,基部的滞育小色块面积仍然很小,如果单凭肉眼辨别,颜色嵌合体的百分数下降至 42.1%,并且几乎全是含 2 个色块的嵌合体,含 3~4 个色块的嵌合体极少;单色叶状体

超过 57%。但在显微镜下仔细检查后发现,在 78.7% 的单色叶状体和 43.8% 的嵌合体中,叶状体的基部存在 1~2 个面积很小的色块。

单株培养 163 棵颜色嵌合体直至肉眼可确认各色块所形成的生殖细胞为止,性别统计结果:73.1% 的颜色嵌合体为雌雄同体,26.9% 为单性叶状体;成熟的每个色块均只表现单一性别(雌性或雄性),基部滞育小色块的性别基本上不表现出来。

2.3 野生型坛紫菜间天然杂交产生的 F_1 叶状体的性别表型

在相同的温度、光照、光周期等条件下培养野生型品系 *WT-S* 与 *WT-G* 的 F_1 叶状体,55 d 后,这两个品系的叶状体均已成熟,在雄性叶状体的梢部或中部边缘形成浅黄绿色的精子囊;在雌性叶状体的梢部或中部出现了红色的果孢子囊,已经可以用肉眼区分雌雄性别,统计两个品系的 F_1 叶状体性别(表 2)。

表 2 坛紫菜野生型品系的 F_1 叶状体性别表型观察结果
 Tab.2 Sex and sex ratio of F_1 gametophytic blades of the wild-type strains (*WT-S* and *WT-G*) in *Py. haitanensis*

品系 strain	检查总个体数 total number of the checked blades	雌性个体数 number of female blades	雄性个体数 number of male blades	雌雄同体个体数 number of monoecious blades	雌雄分离比 segregation ratio of sex
<i>WT-S</i>	540	267	271	2	1:1 ($\chi^2 = 0.02, P > 0.05$)
<i>WT-G</i>	531	260	269	2	1:1 ($\chi^2 = 0.12, P > 0.05$)

从表2可看出,虽然这两个野生型品系的 F_1 叶状体分别是通过单个果孢子长成的自由丝状体移植贝壳育苗和用果孢子直接育苗获得的,但它们的雌雄分离比均为1:1,雌雄同体个体的百分数分别为0.37%和0.38%,两者也无显著性差异($t=0.7, P>0.01$)。

2.4 野生型栽培品系(WT-ZP)的 F_1 叶状体的分子生物学分析与性别发育观察

将栽培于自然海区的WT-ZP品系的 F_1 叶状体(日龄为26天)带回实验室进行培养,经显微检查意外发现,它们中的部分个体为颜色嵌合体,培养数周后,变成了颜色更加艳丽的颜色嵌合体(图版II)。在这些颜色嵌合体上,色块的颜色类型比较复杂,色块之间的颜色差异有的较大(图版II-1, A, B, F, H, J-L),有的较细微(图版II-1, C, D, E)。对不同叶状体上不同色块的5.8S rDNA区序列进行分析,发现它们的序列与采自平潭县牛山岛的野生坛紫菜5.8S区序列(图2)完全一致。因此,这些叶状体可能是坛紫菜天然色素突变体与野生型个体之间发生了自然杂交产生的后代叶状体。

显微抽查2503棵叶状体(日龄26天,体长5~10 mm)后发现,1807棵为颜色嵌合体,占72.2%,它们的绝大多数为含2个色块的颜色嵌合体,具有3个和4个色块的嵌合体较少。随后,继续培养其中的915棵颜色嵌合体,发现嵌合体上的各色块发育很不同步,几乎所有的嵌合体其藻体的绝大部分是由叶状体梢部的1~2个色块发育而来,梢部色块的生长远快于中部和基部色块(图版II-1, 2),基部色块的生长十分缓慢,形成的面积仅为整个藻体的1/30~1/10(图版II-1, 2)。当叶状体长度达2~10 cm时,如果单用肉眼分辨,高达55.8%(511/915)的个体为单色表型,颜色嵌合体仅剩44.2%(404/915株),并且几乎都是含2个色块的嵌合体,其中的29.2%的个体(118/404),其基部色块相对较大,可被肉眼清晰分辨出来(图版II-1),其余的70.8%(286/404)个体的基部色块面积很小(图版II-2)。

从可明显分辨出色块的118棵颜色嵌合体(图版II-1)中,随机取46棵再继续培养,直至成熟,对藻体成熟进度进行追踪观察,结果发现,与天然坛紫菜相类似,这些颜色嵌合体的成熟也先从梢部开始,随后,中、基部逐渐成熟。但是,即使

当梢部色块的大部分区域都出现了生殖细胞,绝大多数的中、基部色块仍未成熟,叶状体的性别表现为单性(图版III-1)。随着培养时间的延长,部分嵌合体的中部色块也开始成熟,雌雄同体的个体比例逐渐增加(图版III-2, G, H, I, K)。当颜色嵌合体上的两个相邻色块的大小相近时,较易观察到雌雄同体的性别表型(图版III-2, I, K;图版III-3);部分叶状体由于雄性色块成熟较早,色块全部成熟后,极易从雌雄色块的交界处断裂(图版III-3)。当颜色嵌合体的基部色块较小(图版III-2, J, L所示)时,则必须经过很长时间的培养,少部分基部色块才能成熟,但此时,有些叶状体的梢、中部色块由于完全成熟已全部解体或仅残留很少的细胞组织。在这46棵颜色嵌合体中,78.3%(36棵)的叶状体的性别表型为雌雄色块相嵌合,表现为雌雄同体的性别表型,21.7%(10棵)的叶状体为雄-雄或雌-雌色块相嵌合,表现为单性别表型。

3 讨论

赵玲敏等^[20]对10个来自不同海区的野生坛紫菜种质材料的5.8S rDNA-ITS区进行序列分析,证实它们的5.8S rDNA区序列完全一致,但与其它紫菜物种的5.8S rDNA区序列之间存在很大的差异,序列同源性为79.7%~95.0%,因此,认为5.8S rDNA区具有紫菜物种间的保守性,可作为种的系统分类依据之一。在本研究中,从坛紫菜雌雄同体与雌雄异体叶状体中扩增出了完整5.8S rDNA区序列,并且与NCBI中报道的坛紫菜5.8S rDNA区序列完全一致,这表明,在野生坛紫菜群体中,雌雄同体的叶状体与雌雄异体的叶状体同属于分类学意义上的坛紫菜。

本研究经模拟天然条件进行壳孢子采苗和海上栽培,获得了海区生长的坛紫菜人工杂交品系(RZ-7)的 F_1 叶状体,在它们中出现了2种亲本色与2种重组色,显微观察结果证实95.6%的 F_1 叶状体是由2~4色块呈线性排列构成的颜色嵌合体,此结果与该品系的室内培养结果^[16]一致,这表明在自然条件下,坛紫菜的减数分裂位置与叶状体的四分子体发育模式均未改变。对海区栽培的RZ-7品系与自然杂交品系(WT-ZP)的 F_1 颜色嵌合叶状体的性别观察证实,嵌合体的每个成熟色块的性别均为单性,嵌合体的性别以雌雄同体

为主,这暗示在自然条件下,坛紫菜的性别也在壳孢子发生减数分裂时产生了分离。在两个杂交品系的幼小 F_1 叶状体中,分别有 95.6% 和 72.2% 的个体为 2~4 色块组成的嵌合体,如果不是由于在随后的四分体发育中基部色块发生滞育导致性别表型不显示出来,它们应该也是包含了 2~4 个性别块的嵌合体,为雌雄同体。由此推断,天然坛紫菜叶状体也是以雌雄同体为主。

已有的研究阐明了紫菜叶状体是包含四个减数分裂产物的基因嵌合体^[10,13,22-23],同时也发现,坛紫菜壳孢子减数分裂产生的四个细胞在随后的叶片生长发育过程中,并非均衡的参与叶片部分的形态建成,位于基部的 1~2 个细胞所形成的藻块存在严重的滞育现象,主要参与假根的形成^[10,16,23]。本研究也证实了在自然条件下这一现象不仅存在,而且非常普遍和严重,并对坛紫菜真实性别的表型显示出来带来了很大的影响。在人工杂交品系(RZ-7)的 F_1 幼小叶状体中,95.6% 的个体为颜色嵌合体,但在自然杂交品系(WT-ZP)的 F_1 幼小叶状体中,只有 72.2% 的个体为颜色嵌合体,比例相对较低,其原因可能是由于果孢子采苗用的数片雌性叶状体中,部分果孢子可能是野生型之间的杂交产物,它们的 F_1 叶状体不会出现颜色分离,无法形成颜色嵌合体。但这两个品系的 F_1 颜色嵌合体几乎全都由近梢部的 1~2 个色块发育形成绝大部分的叶状藻体,颜色表型为单色或 2 色块嵌合。由于近叶状体基部的滞育小藻块的性别表型通常不表现出来,梢部的 1~2 个藻块成熟后,多数表现为单性,导致了 F_1 叶状体群体中可观察到的雌雄同体比例大幅度降低。本研究观察到只有 40% 左右的颜色嵌合体最终发育成 2 色块嵌合体,具 3~4 色块的嵌合体极少,其余的嵌合体因基部色块滞育最终发育成表型为单色的叶状体。由于坛紫菜性别基因发生第一次分裂分离的机率约为 30%^[16],产生了真正的 2 色块嵌合体,它们为性别嵌合体,也就是说,约 30% 的颜色嵌合体的二个色块其实分别是由性别相同的 2 个小色块所组成的^[16]。因此,嵌合体基部色块的滞育也将可能导致这 30% 左右的 2 色块嵌合体表现为单性别,进一步降低了 F_1 群体中可观察到的雌雄同体比例。

由于坛紫菜叶状体从基部到梢部,体细胞向生殖细胞分化的速度是逐渐加快的,造成了梢部

的细胞分化程度较高,而基部较低,叶状体的成熟也总是先从梢部开始并逐渐向基部延伸^[24]。本研究也发现,当杂交产生的 F_1 嵌合体梢部的藻块开始成熟并形成大量生殖细胞时,位于中、基部的藻块尚未成熟,几乎 100% 的叶状体仅梢部藻块的性别表现出来,如果观察此阶段的叶状体基本上是单性的,只有极少数上下两个藻块面积大小相当且同时成熟的叶状体,才表现为雌雄同体。WT-ZP 品系的 F_1 颜色嵌合体经较长时间的培养,基部色块也逐渐成熟,雌雄同体的比例越来越多,这与 20 世纪 70 年代对天然坛紫菜群体的性别观察结果^[3,4] 相吻合。所以,坛紫菜的线性四分体的不均衡发育及叶状体的成熟特性这两大因素是人们在观察野生坛紫菜群体时很难发现雌雄同体的重要原因。

尽管 WT-ZP 与 WT-S 和 WT-G 这 3 个野生型杂合品系均是自然杂交产生,但由于 WT-S 和 WT-G 这两个野生型杂合品系缺乏颜色作为性别区域标记,在它们的 F_1 叶状体成熟时,如果单凭肉眼观测藻体梢部出现的性细胞来判断个体的性别,雌雄同体的比例均不超过 1%。这个结果也与张德瑞等^[2],严兴洪等^[15] 对野生坛紫菜叶状体的性别观察结果相吻合,但根本无法反映出坛紫菜叶状体为性别嵌合的真相。因此,单凭肉眼观察野生坛紫菜的性别^[2,15] 所得出的性别结论是不正确的,这也暗示王娟^[5-6] 和潘光华^[7-8] 在进行的所谓野生型坛紫菜单性营养组织与单离体细胞培养时,之所以出现了少数异性生殖细胞,最大可能性是由于实验所取的叶状体组织包含了相当于二种性别基因的组织即相当于二个色块的组织所致。此外,王莉等^[9] 通过将单个野生型坛紫菜叶状体从梢部到基部进行分段酶解进行单离细胞培养发现,仅在来自根丝段的细胞再生后代中出现了异性细胞,这可能是反映了叶状体基部相邻两个小藻块或发生滞育的基部两个异性性别块的性别表型,也从另外一个角度佐证了天然坛紫菜叶状体为雌雄嵌合的性别特征。

研究表明,紫菜属存在两种不同的性别决定机制:性别的后期分化与性别的早期决定。条斑紫菜(*Py. yezoensis*) 是性别后期分化的典型代表。在条斑紫菜色素突变体与野生型或色素突变体之间杂交产生的 F_1 嵌合叶状体的每个色块上总是会出现两性的生殖细胞^[25],两性生殖细胞是营养

细胞随机分化而来的^[25]。这类紫菜物种通过有性生殖产生的叶状体为雌雄同体的性别表型。坛紫菜和 *P. purpurea* 是属于性别早期决定的典型代表。这两种紫菜色素突变体的杂交实验^[13,16]均表明,杂交产生的 F_1 颜色嵌合叶状体上的每个色块均为单性,色块的边界与其性别块边界完全吻合,颜色嵌合体同时也是性别嵌合体, F_1 叶状体上每个色块的性别均是由减数分裂时发生分离的等位基因决定。这类紫菜物种的有性生殖所产生的叶状体必然都是由雌雄同体的四分子体(2个雄性细胞与2个雌性细胞)共同发育而来,但受不同的四分子体排列模式^[23]及四分子体不均衡发育^[13,16,23]的影响,由它们发育而来的叶状体其性别表型观察难易不同。像坛紫菜这种具有线性四分子发育模式的紫菜物种,对它们的有性生殖后代叶状体的性别宏观表型如果不进行持续的观测,一次肉眼抽检的结果,往往是雌雄异体为多数,雌雄同体为少数。而对于像 *P. purpurea* 和半叶紫菜华北变种 (*Py. katadai* var. *hemiphylla*) 这种具有非线性四分子体发育模式的紫菜物种,由于它们的叶状体主要由非线性四分子体上部两个左右并排的细胞发育而来,形成左右性别嵌合的叶状体^[13,23]。因此,当叶状体成熟时可观察到叶状体左右两侧藻块的性别表型,其性别表现多为雌雄同体,少数为雌雄异体^[13]。但不管是属于哪种四分子排列模式,由于有性生殖产生的叶状体均由雌雄同体的四分子体发育而来,在叶状体群体中必然会或多或少的出现雌雄同体的个体。由此推测,紫菜属中似乎不应当存在如:刺边紫菜 (*P. dentimarginata*)^[26] 这种存在有性生殖同时又完全雌雄异体的紫菜。这究竟是性别表型观察产生的误差还是紫菜属中仍存在其它的性别决定机制还需进一步研究。根据目前的研究结果,过去一直被认为是雌雄异体的紫菜种^[27-29] 如: *Py. dentata*、*Py. pseudolinearis*、*Py. linearis* 和 *Py. lanceolata*,在它们的叶状体群体中也发现了少数雌雄同体的个体^[30-33],它们应当与坛紫菜具有相同的性别决定机制和四分子模式,其真实性别还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Sutherland J E, Lindstrom S C, Nelson W A, et al. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 2011, 47(5): 1131 - 1151.
- [2] 张德瑞, 郑宝福. 福建紫菜一新种: 坛紫菜 [J]. 植物学报, 1960, 9(1): 32 - 36.
- [3] 福建省水产局. 坛紫菜人工养殖 [M]. 福州: 福建人民出版社, 1979: 4 - 12.
- [4] 黄海水产研究所. 坛紫菜与条斑紫菜养殖 [M]. 北京: 农业出版社, 1979: 5 - 7.
- [5] 王娟. 紫菜减数分裂与单性生殖的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [6] 王娟, 戴继勋. 坛紫菜单性叶状体细胞的发育研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(3): 419 - 423.
- [7] 潘光华. 不同性别来源的半叶紫菜华北变种和坛紫菜的生长发育及生化特征比较 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [8] 潘光华, 姜红霞, 汤晓荣. 坛紫菜单性组织培养的性逆转研究 [J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(5): 1 - 4.
- [9] 王莉, 孔凡娜, 茅云翔, 等. 坛紫菜配子体离体细胞发育研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2010, 40(12): 81 - 88.
- [10] Yan X H, Li L, Aruga Y. Genetic analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17(6): 467 - 473.
- [11] Yan X H, He L H, Aruga Y. Karyological observations on the occurrence of meiosis in the life cycle of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Botanica Marina, 2007, 50(4): 257 - 263.
- [12] Yan X H, Huang M. Identification of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) meiosis by simple sequence repeat markers [J]. Journal of Phycology, 2010, 46(5): 982 - 986.
- [13] Mitman G G, van der Meer J P. Meiosis, blade development, and sex determination in *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 1994, 30(1): 147 - 159.
- [14] 曾呈奎, 王素娟, 刘思俭, 等. 海藻栽培学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 145 - 150.
- [15] 严兴洪, 李琳, 陈俊华. 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.
- [16] Zhang Y, Yan X H, Aruga Y. The sex and sex determination in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. 2013, (In press).
- [17] Burzycki G, Waaland J. On the position of meiosis in the life history of *Porphyra torta* (Rhodophyta) [J]. Botanica Marina, 1987, 30(1): 5 - 10.

- [18] Guiry M D. Sporangia and spores[M] // Cole K M, Sheath R G, editors. *Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 347 - 376.
- [19] Wang J, Dai J X, Zhang Y T. Nuclear division of the vegetative cells, conchosporangial cells and conchospores of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Phycological Research*, 2006, 54 (3): 201 - 207.
- [20] 赵玲敏, 谢潮添, 陈昌生, 等. 5.8S rDNA-ITS 区片段的序列分析在坛紫菜种质鉴定中的应用[J]. *水产学报*, 2009, 33(6): 940 - 948.
- [21] 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.
- [22] Ohme M, Miura A. Tetrad analysis in conchospore germlings of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta, Bangiales) [J]. *Plant Science*, 1988, 57 (2): 135 - 140.
- [23] Wang J F, Zhu J Y, Zhou W, *et al.* Early development patterns and morphogenesis of blades in four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22 (3): 297 - 303.
- [24] 严兴洪, 王素娟. 紫菜体细胞发育与分化的研究 [J]. *海洋科学*, 1989, 13(6): 28 - 33.
- [25] 张学成, 秦松, 马家海, 等. *海藻遗传学* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 175 - 195.
- [26] 郑宝福, 李钧. *中国海藻志* (第二卷, 红藻门, 第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 67 - 69.
- [27] Tanaka T. The systematic study of the Japanese Protofloridae [J]. *Memoirs of Faculty of Fisheries, Kagoshima University*, 1952, 2(2): 1 - 91.
- [28] Kito H. Cytological studies on genus *Porphyra* [J]. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory*, 1978, 39: 29 - 84.
- [29] Krishnamurthy V. A revision of the species of the algal genus *Porphyra* occurring on the Pacific coast of North America [J]. *Pacific Science*, 1972, 26: 24 - 49.
- [30] Kikuchi N. Study on the systematics and life history of Florideophycidae [D]. Tokyo: Tokyo University of Fisheries, 1992.
- [31] Hwang M S. Taxonomic studies of genus *Porphyra* of Korea [D]. Seoul: Seoul National University, 1994.
- [32] Lindstrom S C, Cole K M. A revision of the species of *Porphyra* (Rhodophyta: Bangiales) occurring in British Columbia and adjacent waters [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1992, 70(10): 2066 - 2075.
- [33] Lindstrom S C, Cole K M. The systematics of *Porphyra*: character evolution in closely related species [J]. *Hydrobiologia*, 1993, 260 (1): 151 - 157.

Observation on tetrad development and formation of sex phenotype of *Pyropia haitanensis* blades in natural conditions

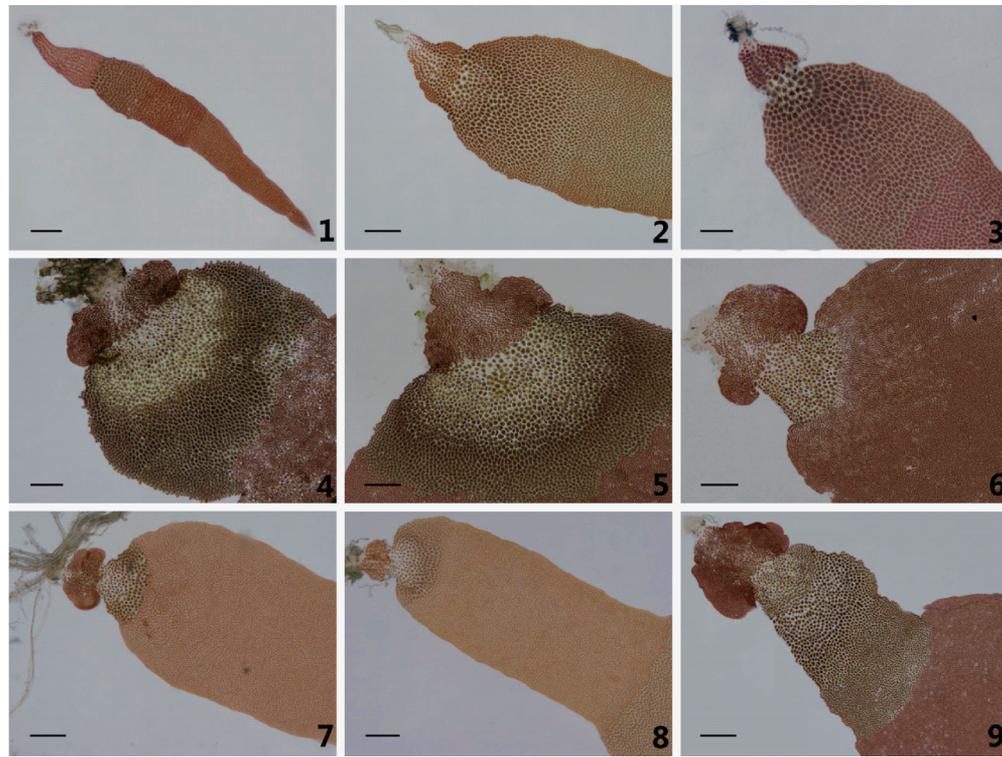
ZHANG Yuan, YAN Xinghong*

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The cross between a red-mutant (R, ♀) and a wild type (W, ♂) of *Pyropia haitanensis* in laboratory demonstrated that its gametophytic blades were mainly monoecious. However, sexual observations showed a contrary result in the wild populations of this species. In order to clarify the real sex of the wild blades, some of the key issues related to this discrepancy were studied in this paper. Sequencing analysis of 5.8S rDNA region demonstrated that the monoecious and dioecious blades in wild populations of *P. haitanensis* were the same species. In nature, the heterozygous conchocelis produced in the cross between a red mutant and the wild type was cultivated, and the conchospores released from mature conchocelis were cultivated into F₁ blades. Microscopic observation showed that two parental color sectors (W sector and R sector) and two recombinant color sectors (R' sector and W' sector) appeared in F₁ blades, and 95.6% of the young blades (about 5 mm in length) were linearly sectored with 2–4 color-sectors. Besides, when those young blades grow up, each mature color-sector in the sectored blade was unisexual (either male or female). Therefore, the color-sectored blades were also the sex-sectored blades. Those findings tallyied with those obtained in laboratory, indicating that neither the position of meiosis nor segregation mode of the parental sex was change in natural conditions. However, during subsequent development of the young blades, one or two basal color-sector(s) was arrested severely. As a result, they formed very small areas on the blade which were hardly discerned by naked eyes. The area composed the rhizoid or basal part of the adult blade which could hardly mature. Nearly entire blade was derived from one or two top color-sector(s), therefore color-sectored blades dropped to 42.1%. However, the uppermost sector took very large area of the blade and its maturity was much earlier than the middle and basal part. As a result, in the beginning and middle stages of the maturity, almost all the mature parts of the blades were in the upmost sector, and their phenotype showed unisexual even though they were monoecious actually. At the end of maturity of the blades, the middle sectors started to mature, so the percentage of monoecious blades increased significantly. The results above showed that the wild blades of *P. haitanensis* in nature were also mainly monoecious. However, the probability for observation of its real sex was greatly reduced because of the uneven development of the tetrad and the asynchronous maturity of the top, middle and base of the blades. Due to these factors, one-time sampled by naked eyes often revealed that the wild blades were dioecious phenotype, with a few exceptions of monoecious phenotype.

Key words: *Pyropia haitanensis*; tetrad; blade; monoecious; sex phenotype

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

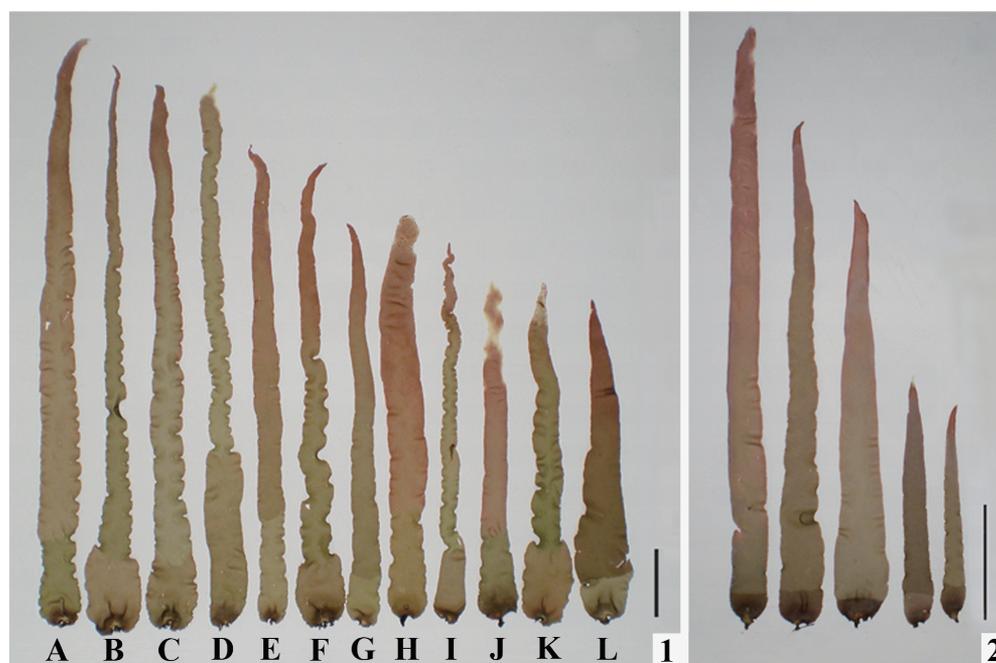


图版 I 海区栽培的坛紫菜人工杂交品系 (RZ-7) F_1 叶状体
(日龄为 20 d) 基部滞育色块的显微照片

1. 四分子体均衡发育形成的 4 色块嵌合叶状体 ($R + W + W' + R'$); 2~9. 四分子体不均衡发育形成的嵌合叶状体: 2. 两色块嵌合体 ($R + W$), 其基部色块发生滞育; 3. 三色块嵌合体 ($R + W' + R$), 其基部的一个色块发生滞育; 4~6. 三色块嵌合体 ($R + W + R$), 其近基部的两个色块发生滞育; 7. 三色块嵌合体 ($R + W + R'$), 其近基部的两个色块发生滞育; 8. 四色块嵌合体 ($R + W' + R' + W$), 其近基部的 2 个色块发生滞育; 9. 四色块嵌合体 ($R + W' + W + R$), 其近基部的三个色块发生滞育。标尺均为 100 μm 。

Plate I Photomicrographs of the arrested basal sectors in the color-sectored F_1 blades produced by the cross between a red mutant ($R, \text{♀}$) and the wild-type ($W, \text{♂}$) in *Py. haitanensis* after cultivated in the sea for 20 days

1. an evenly developed 4-color-sectored blade ($R + W + W' + R'$); 2. a 2-color-sectored blade ($R' + W'$) with an arrested basal color-sector; 3. a 3-color-sectored blade ($R + W' + R$) with an arrested basal color-sector; 4-6. the 3-color-sectored blades ($R + W + R$) with two arrested basal color-sectors; 7. a 3-color-sectored blade ($R + W + R'$) with two arrested basal color-sectors; 8. a 4-color-sectored blade ($R + W' + R' + W$) with two arrested basal color-sectors; 9. a 4-color-sectored blade ($R + W' + W + R$) with three arrested basal color-sectors. Scale bar = 100 μm .



图版 II 海区栽培 26 天后室内继续培养 20 d 的坛紫菜野生型与自然色素突变体杂交产生的 F_1 嵌合叶状体照片

1. 不同的 F_1 颜色嵌合体: A. 浅褐色 + 野生色, B. 野生色 + 浅褐色, C ~ D. 浅灰绿色 + 浅褐色, E. 浅褐色 + 浅灰绿色, F. 野生色 + 浅褐色, G. 浅褐色 + 浅灰绿色, H. 浅红色 + 浅褐色, I. 野生色 + 浅灰绿色, J. 浅红色 + 野生色, K. 野生色 + 浅褐色, L. 深褐色 + 浅灰绿色, 颜色表示顺序是从梢部到基部。2. 具有不均衡发育色块的 F_1 颜色嵌合体。标尺 = 1 cm。

Plate II Photomicrographs of the color-sectored F_1 blades produced by the cross between the wild-type (♀) and spontaneous pigmentation mutant (s) (♂) in *Py. haitanensis* after cultivated for 26 days in the sea and further culture for 20 days in the lab

1. different color-sectored F_1 blades. A. light brown + wild type, B. wild type + light brown, C - D. light greenish-gray + light brown, E. light brown + light greenish-gray, F. wild type + light brown, G. light brown + light greenish-gray, H. light red + light brown, I. wild type + light greenish-gray, J. light red + wild type, K. wild type + light brown, L. dark brown + light greenish-gray. The color-phenotype was showed from the tip to base of the blade. 2. unbalanced development of sectors in the color-sectored F_1 blades. Scale bar = 1 cm.



图版 III 海区栽培 26 天后再分别在室内培养 35 和 50 d 的坛紫菜野生型与自然色素突变体杂交产生的成熟 F_1 嵌合叶状体照片

1. 海区栽培 26 天后室内再培养 35 天的梢部已成熟但基部色块未成熟的颜色嵌合体,其性别表型为雌雄异体:A. ♀,B. ♀,C. ♂,D. ♂,E. ♀,F. ♀。2. 海区栽培 26 天后室内再培养 50 天的颜色嵌合体:G,H,I,K 的梢、中部均已成熟(箭头示中部色块成熟区),其性别表型为雌雄同体:G. ♀ + ♂,H. ♀ + ♂,I. ♂ + ♀,K. ♀ + ♂,但 J 和 L 颜色嵌合体的中部色块仍未成熟,其性别表型为单性。3. 成熟的三色块嵌合体:梢、中部两个大色块面积接近,均已成熟,但基部色块面积很小且未成熟,其性别表现为雌雄同体(♀ + ♂ + ?)。性别表示顺序是从梢部到基部。标尺 = 1 cm。

Plate III Photomicrographs of the mature color-sectored F_1 blades produced by the cross between the wild-type(♀) and spontaneous pigmentation mutant(s) (♂) in *Py. haitanensis* after cultivated for 26 days in the sea and further cultured in the lab for 35 days and 50 days, respectively

1. the color-sectored blades with mature tip sector and immature basal sector, showing unisexual phenotype: A. ♀, B. ♀, C. ♂, D. ♂, E. ♀, F. ♀, after cultured for 26 days in the sea and another 35 days in the lab. 2. the color-sectored blades with mature tip and middle sectors, showing monoecious phenotype: G. ♀ + ♂, H. ♀ + ♂, I. ♂ + ♀, K. ♀ + ♂ (arrowheads showing the mature region of the basal sector), but the color-sectored blades in J and L showed unisexual, having mature tip sector and immature basal sector, after cultured for 26 days in the sea and another 50 days in the lab. 3. a monoecious 3-sectored blade(♀ + ♂ + ?) with mature tip and middle sectors and an immature basal sector, after cultured for 26 days in the sea and another 50 days in the lab. The sex was showed from the tip to base of the blade. Scale bar = 1 cm.