

## 尿囊素对印度产紫菜*Pyropia chauhanii*单孢子放散和体细胞分化的影响

孙迪<sup>1</sup>, 丁洪昌<sup>1</sup>, 严兴洪<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为探讨尿囊素对印度产紫菜*Pyropia chauhanii*单孢子形成与放散的影响, 选用能释放单孢子的野生型品系(PC-WT)与不能释放单孢子的诱变品系(PC-Y1)为实验材料, 用含不同浓度尿囊素的培养液分别培养来自叶状体梢、中和基部的圆盘体。结果显示, 处理后6 d, 不同部位的叶状体圆盘体的单孢子放散量次序为中部>梢部>基部; 随着尿囊素浓度的增加, PC-WT品系叶状体圆盘体的单孢子放散总量呈先升后降的趋势, 其中10 mmol/L是促进单孢子放散的最适浓度; 但尿囊素并不能使原本不放散单孢子的PC-Y1品系释放单孢子。用含20 mmol/L尿囊素的培养液培养PC-Y1品系的叶状体圆盘体, 8 d后再用酶解法将其体细胞单离出来经体外培养后发现, 经尿囊素处理的单离细胞发育成丝状体的百分率为66.1%, 而不含尿囊素的对照组仅为15.2%, 说明尿囊素对紫菜叶状体的体细胞向生殖细胞分化具有一定的促进作用。

**关键词:** *Pyropia chauhanii*; 尿囊素; 单孢子放散; 体细胞分化; 丝状体

**中图分类号:** S 917.3

**文献标志码:** A

紫菜(*Pyropia* sp.)<sup>[1]</sup>分布于寒带至亚热带的潮间带, 是一种具有重要经济价值的红藻<sup>[2]</sup>。紫菜作为食品不仅味道鲜美、营养丰富, 而且紫菜多糖具有抗衰老、抗凝血和辅助降血压的功效<sup>[3-4]</sup>。另外, 紫菜具有较强的吸收氮磷和固定碳的能力, 其养殖对浅海富营养化的修复和改善也有重要作用<sup>[5]</sup>。

紫菜的生活史包括丝状体和叶状体两个世代, 对大多数种类而言, 叶状体是由丝状体成熟后所放散的壳孢子萌发长成, 但也有少数种类, 如条斑紫菜(*P. yezoensis*)和甘紫菜(*P. tenera*)等的叶状体可以释放单孢子, 后者直接长成叶状体。在生产上, 紫菜的单孢子对辅助采苗、延长收获期和提高产量等具有重要意义<sup>[6-9]</sup>。梅俊学等<sup>[10]</sup>发现条斑紫菜中产生不同数量单孢子的

品系间, 其遗传距离较远。徐蕾等<sup>[11]</sup>运用超微结构观察, 发现条斑紫菜叶状体的cDNA电泳图谱在单孢子形成过程时发生变化, 未释放的单孢子缺少1 kb条带。总体而言, 有关紫菜释放单孢子的机理尚不清楚, 有待深入研究。尿囊素是一种天然的嘌呤类化学物质, 也被认为是一种类细胞分裂素<sup>[12]</sup>, 在激活蛋白质的合成和糖类的降解等方面发挥作用<sup>[13]</sup>。Mizuta等<sup>[14]</sup>发现尿囊素能够促进条斑紫菜单孢子的形成和放散, 并认为10 mmol/L对条斑紫菜单孢子放散效果最佳。

印度产紫菜*P. chauhanii*属亚热带物种, 它的野生型品系叶状体能放散大量的单孢子, 导致藻体生长缓慢<sup>[15]</sup>。为此, 张聪等<sup>[15]</sup>通过人工诱变获得了该紫菜不放散单孢子的突变品系(PC-Y1)。本研究试图分析尿囊素对*P. chauhanii*野生型品系

收稿日期: 2017-03-25 修回日期: 2017-05-10

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); 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-6); 年产2000吨重要经济红藻规模化养殖及产业化(2014FJ19)

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

(*PC-WT*)和诱变品系(*PC-Y1*)的叶状体放散单孢子和叶状体体细胞分化的影响,为进一步揭示紫菜释放单孢子的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

本研究所用的*P. chauhanii*野生型品系(*PC-WT*)采自印度半岛(73°27'51"E, 16°4'13"N),新品系(*PC-Y1*)是*PC-WT*的单孢子苗经<sup>60</sup>Co-γ射线诱变后筛选获得的<sup>[15]</sup>。2个紫菜品系均以自由丝状体的形式被保存于本实验室内,保存方法见参考文献<sup>[9]</sup>。

### 1.2 培养液的配制

本研究使用的培养液由天然海水加MES培养基配制而成<sup>[16]</sup>。对照组为不添加尿囊素的培养液,并记为0 mmol/L,处理组为分别添加1、5、10、15和20 mmol/L尿囊素的培养液。培养液在使用前经过灭菌处理。

### 1.3 叶状体的培养

取适量的各品系自由丝状体,经粉碎机粉碎后均匀接种在文蛤(*Meretrix meretrix*)壳表面并培养成贝壳丝状体,贝壳丝状体的培养方法参照梁志强<sup>[17]</sup>。待贝壳丝状体成熟后,取1个贝壳于塑料杯内(250 mL)进行充气培养,并放入数根棉线供壳孢子附着,待棉线上附着一定数量的壳孢子后,将其移入250 mL充气瓶中充气培养,培养条件:温度(23±1) °C,光照密度60 μmol photons/(m<sup>2</sup>·s),光照周期10L:14D,每5 d更换1/2的培养液。3~4周后,将肉眼可见的壳孢子苗用灭菌后的毛笔从棉线上刮下,进一步充气培养成F<sub>1</sub>叶状体。

### 1.4 尿囊素处理对*PC-WT*和*PC-Y1*品系单孢子放散的影响

叶状体日龄为40 d时,用打孔器(Φ=2.5 mm)分别从*PC-WT*和*PC-Y1*叶状体梢、中和基部各取36个圆盘体,每6个为一组,分别置于含有200 mL培养液的塑料杯中充气培养,培养液中的尿囊素浓度分别为0、1、5、10、15和20 mmol/L,培养条件同“叶状体的培养”。每天更换1次塑料杯,每天拍摄1次*PC-WT*、每2天拍摄1次*PC-Y1*圆盘体的直观照片和显微照片,并记录圆盘体的

生长情况。在每天更换的新塑料杯中再分别倒入200 mL先前培养所用的培养液继续充气培养。待附着在塑料杯上的单孢子苗长成肉眼可见后,将其刮下并统计数量。每组实验设置3个平行。

### 1.5 尿囊素处理对*PC-Y1*品系体细胞发育的影响

用不添加尿囊素(对照组)和添加了20 mmol/L尿囊素(处理组)的培养液,分别培养*PC-Y1*品系叶状体(日龄40 d)的梢、中和基部的圆盘体,培养方法和条件同“尿囊素处理对*PC-WT*和*PC-Y1*品系单孢子放散的影响”。培养8 d后,用酶解法将对照和处理组的圆盘体细胞单离出来进行体外培养<sup>[18-19]</sup>,数天后,统计每组单离细胞发育成丝状体的百分率。每组实验设置3个平行。

### 1.6 数据处理

采用Excel 2010 软件对实验数据进行处理,统计值用平均值±标准差(mean±SD)描述;用SPSS 18.0 的独立样本*t*检验组间的差异,统计结果*P*<0.05为显著差异,*P*<0.01为极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 圆盘体的生长情况

随着培养天数的增加,*PC-WT*品系的圆盘体开始放散单孢子,边缘逐渐呈现不同程度的缺刻,有些开始解体。圆盘体边缘出现缺刻的时间,来自梢部的最早,中部次之,基部最晚。尿囊素浓度越高,圆盘体出现缺刻和解体的时间越早,其中经20 mmol/L尿囊素处理的梢部的圆盘体培养至第3天,就已经出现明显的缺刻;培养至第4天,10 mmol/L以上的尿囊素处理组的圆盘体均出现严重的解体;培养至第5天,10 mmol/L以上尿囊素处理组的梢部和中部圆盘体已经全部解体,只留下圆盘体的白色组织胶质和细胞壁骨架。未添加尿囊素的对照组,培养至第5天,梢部的部分圆盘体才开始出现缺刻;培养至第6天,中部的少量圆盘体出现解体,基部的少量圆盘体出现缺刻,但无解体现象;与处理组相比,对照组出现缺刻的时间较晚,解体程度较小。

*PC-Y1*品系的梢、中和基部圆盘体在培养过程中,无论是对照组还是处理组,其圆盘体边缘完整,无缺刻现象出现。与对照组相比,低浓度的尿囊素(1 mmol/L)对圆盘体的生长具有一

定的促进作用,随着浓度的升高,圆盘体的颜色越来越浅,藻体出现趋向成熟的迹象。

## 2.2 圆盘体放散单孢子的显微观察

通过显微观察发现,不同部位、不同浓度尿囊素处理的*PC-WT*品系的叶状体圆盘体,其放散单孢子的时间和数量存在较大的差异。梢部的圆盘体被培养至第3天,对照组的圆盘体边缘细胞没有明显的变化,而10、15和20 mmol/L尿囊素处理组的圆盘体边缘出现大量的单孢子放散现象;培养至第4天,20 mmol/L尿囊素处理组的圆盘体边缘只剩下细胞壁骨架和残留的少数单孢子;培养至第5天,10 mmol/L以上尿囊素处理组的圆盘体全部解体,而对对照组的圆盘体仅有少量单孢子放散。中部的圆盘体培养至第4天,对照组的圆盘体边缘单孢子仅有少量放散,而处理组的圆盘体边缘单孢子放散较为明显,且随着尿囊素浓度的升高,放散程度越明显;培养至第5天,5 mmol/L以上尿囊素处理组的圆盘体单孢子放散较多,边缘出现严重的解体现象,对照组仅有少量的放散。基部圆盘体培养至第5天,10 mmol/L以上尿囊素处理组的圆盘体单孢子放散比较明显,圆盘体边缘出现部分解体的现象。总之,与对照组相比,尿囊素处理对*PC-WT*叶状体圆盘体的单孢子放散有明显的促进作用(图版 I)。

*PC-Y1*品系的梢、中和基部圆盘体在培养过程中,无论是对照组还是处理组,均没有单孢子放散的现象。培养至第6天,对照组圆盘体的细胞色素体集中,液泡较大,藻体颜色较为鲜

艳,处于营养细胞的阶段;15和20 mmol/L尿囊素处理组的圆盘体细胞颜色变浅,色素体呈弥散状,液泡不明显,出现较多的类果胞细胞(类果胞),且圆盘体边缘出现较多的边缘刺。培养至第8天,高浓度尿囊素处理组(10、15和20 mmol/L)的圆盘体细胞变化更为明显,细胞颜色呈深黄色,出现大面积的类果胞,圆盘体边缘刺增多(图版 II)。

## 2.3 单孢子放散量的统计

*PC-WT*叶状体梢部的圆盘体均在第2天开始放散单孢子(表1)。随着培养天数的增加,对照组圆盘体的单孢子放散量呈缓慢上升的趋势,处理组圆盘体的单孢子放散量均呈先升后降的趋势。单孢子放散的高峰,低浓度尿囊素处理组(1和5 mmol/L)均出现在第5天,放散量分别为3 959和6 101个/圆盘体,而高浓度尿囊素处理组(10、15和20 mmol/L)均出现在第4天,放散量分别为7 797、5 709和5 408个/圆盘体。

*PC-WT*叶状体中部的圆盘体开始放散单孢子的时间,对照组在第3天,处理组均在第2天,但每组单孢子放散量的变化趋势与梢部几乎一致(表2)。单孢子放散的高峰,1 mmol/L尿囊素处理组出现在第5天,放散量为6 050个/圆盘体;5 mmol/L以上尿囊素处理组均出现在第4天,放散量分别为7 221、9 625、8 131和8 308个/圆盘体。

*PC-WT*叶状体基部的圆盘体均从第3天开始放散单孢子(表3)。随着培养天数的增加,对照组和低浓度尿囊素处理组(1和5 mmol/L)的圆盘体单孢子放散量均呈上升的趋势,高浓度处理组

表1 日龄40 d的*P. chauhani*野生型品系(*PC-WT*)叶状体梢部的圆盘体在含不同浓度尿囊素的培养液中再培养6 d的单孢子放散量

Tab. 1 Numbers of the released monospores of the discs from 40-day-old gametophytic blades apical section of *PC-WT* strain in *P. chauhani* after being cultured at different concentration of allantoin in medium for 6 days

培养天数/d culture days	单孢子放散量/(个/圆盘体) numbers of the released monospores per disc					
	0 mmol/L	1 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L	15 mmol/L	20 mmol/L
1	0	0	0	0	0	0
2	6±1	16±2	45±3	105±9	218±33	306±19
3	23±3	637±47	1 939±210	4 238±236	2 558±117	2 826±119
4	672±52	2 174±63	3 347±240	7 797±202	5 709±139	5 458±217
5	1 748±57	3 959±112	6 101±336	3 157±149	2 980±66	2 735±112
6	2 387±68	2 370±47	1 637±78	689±46	223±43	235±34

表 2 日龄 40 d 的 *P. chauhani* 野生型品系 (PC-WT) 叶状体中部的圆盘体在含不同浓度尿囊素的培养液中再培养 6 d 的单孢子放散量

Tab. 2 Numbers of the released monospores of the discs from 40-day-old gametophytic blades middle section of PC-WT strain in *P. chauhani* after being cultured at different concentration of allantoin in medium for 6 days

培养天数/d culture days	单孢子放散量/(个/圆盘体) numbers of the released monospores per disc					
	0 mmol/L	1 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L	15 mmol/L	20 mmol/L
1	0	0	0	0	0	0
2	0	2±1	2±1	2±1	2±1	1±1
3	237±55	1 033±77	4 327±134	4 761±214	3 068±170	2 904±104
4	1 378±39	3 587±166	7 221±138	9 625±287	8 131±212	8 308±182
5	2 549±203	6 050±194	2 317±165	2 188±108	1 809±91	1 200±60
6	3 378±184	2 251±130	1 315±145	771±43	267±54	207±55

表 3 日龄 40 d 的 *P. chauhani* 野生型品系 (PC-WT) 叶状体基部的圆盘体在含不同浓度尿囊素的培养液中再培养 6 d 的单孢子放散量

Tab. 3 Numbers of the released monospores of the discs from 40-day-old gametophytic blades basal section of PC-WT strain in *P. chauhani* after being cultured at different concentration of allantoin in medium for 6 days

培养天数/d culture days	单孢子放散量/(个/圆盘体) numbers of the released monospores per disc					
	0 mmol/L	1 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L	15 mmol/L	20 mmol/L
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	3±1	6±1	23±3	153±9	184±14	197±19
4	236±8	433±58	642±38	1 353±115	868±12	753±59
5	948±58	1 617±62	1 946±170	3 805±137	2 969±145	2 443±121
6	1 718±36	2 291±45	3 418±167	1 586±111	1 340±114	927±31

(10、15和20 mmol/L)的圆盘体单孢子放散量均呈先升后降的趋势,且它们均在第5天出现单孢子放散高峰,分别为3 805、2 969和2 443个/圆盘体。另外,对照组和处理组的PC-Y1叶状体的梢、中和基部圆盘体均没有单孢子放散。

统计6 d的圆盘体单孢子放散总量,发现不同部位和不同浓度尿囊素处理的PC-WT叶状体其圆盘体单孢子放散总量具有一定的差异(图1)。叶状体部位相同的圆盘体放散单孢子的总量,尿囊素处理组均显著高于对照组,且随着尿囊素浓度的升高,呈先升后降的趋势。梢、中和基部的圆盘体在10 mmol/L尿囊素下的单孢子放散总量均为最高,分别为15 985、17 346和6 898个/圆盘体,与对照组相比差异性均极显著( $P<0.01$ )。此外,相同浓度尿囊素处理的圆盘体其单孢子放散总量均依次为中部>梢部>基部。

## 2.4 PC-Y1单离体细胞发育成丝状体的百分率

PC-Y1叶状体梢、中和基部的圆盘体,其单离体细胞发育形成丝状体的百分率,在尿囊素处理组(20 mmol/L)中分别为66.1%、56.5%、41.0%,而对照组(0 mmol/L)分别仅有15.2%、13.9%、9.6%,差异性均极显著( $P<0.01$ )。

## 3 讨论

本研究中印度产紫菜 *P. chauhani* 的野生型品系(PC-WT)能放散单孢子,但其诱变品系(PC-Y1)失去了放散单孢子的能力,另外,本实验室对PC-Y1品系已进行了多代的培养,均没有观察到单孢子放散的现象,表明这种基因改变是可以遗传的。

尿囊素作为氮源对藻类的影响较大<sup>[20]</sup>。Kitade



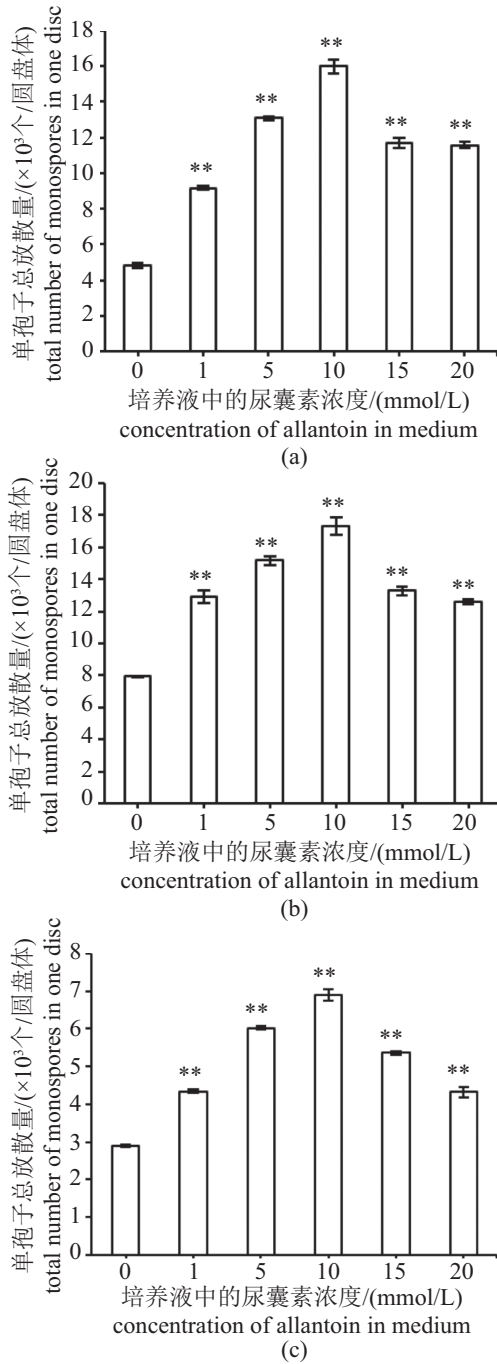


图1 日龄40 d的*P. chauhaniai*野生型品系(PC-WT)叶状体梢部、中部和基部的圆盘体在含不同浓度尿囊素的培养液中再培养6 d的单孢子放散总量

\*\*表示与对照组(0 mmol/L)差异极显著( $P < 0.01$ , *t*-test), 下同; (a) 梢部, (b) 中部, (c) 基部

**Fig. 1 Total number of the released monospores of the discs of the apical, middle and basal sections from 40-day-old gametophytic blades of PC-WT strain in *P. chauhaniai* after being cultured at different concentration of allantoin in medium for 6 days**

\*\* highly significant difference with control ( $P < 0.01$ , *t*-test), the same below; (a) apical, (b) middle, (c) basal

等<sup>[21]</sup>发现条斑紫菜叶状体在有单孢子形成过程与无单孢子形成的过程相比, 其与卡尔文循环的基因转录水平较高, 这与其利用氮能力强有关。实验采用低浓度(1 mmol/L)尿囊素处理印度产紫菜*P. chauhaniai*的诱变品系(PC-Y1), 发现其对圆盘体的生长具有促进作用, 而高浓度尿囊素对其生长影响不明显, 推测可能是由于高浓度尿囊素加快营养细胞到性细胞的分化所致。

林珠英<sup>[22]</sup>用不同浓度尿囊素处理条斑紫菜的叶状体, 发现10 mmol/L尿囊素可促使其产生大量单孢子。本研究结果也证实了外源尿囊素对印度产紫菜*P. chauhaniai*的野生型品系PC-WT叶状体圆盘体的单孢子放散具有促进作用, 且随着外源尿囊素浓度的升高, 圆盘体出现缺刻和解体的时间越早, 解体的程度越严重。但单孢子放散的总量随着尿囊素浓度的升高呈先升后降的趋势, 并且10 mmol/L尿囊素组的单孢子放散总量最高, 推测这与尿囊素促进圆盘体的成熟有关, 也暗示单孢子放散与藻体的成熟度相关。此外, 在相同尿囊素浓度下, 圆盘体的单孢子放散总量依次是中部最多、梢部次之、基部最少; 单孢子开始放散的时间是梢部和中部

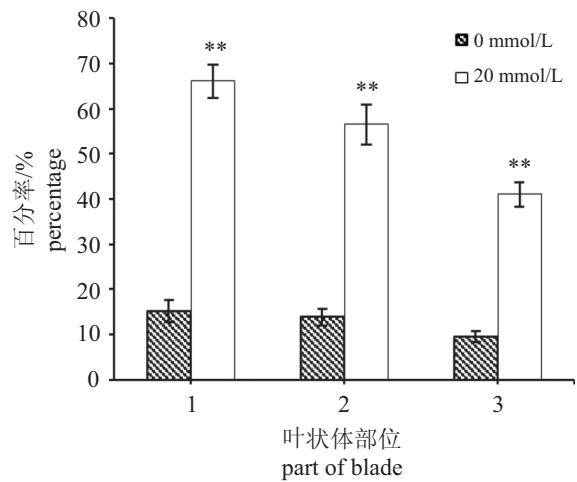


图2 日龄40 d的*P. chauhaniai*诱变品系(PC-Y1)叶状体不同部位的圆盘体在20 mmol/L尿囊素中再培养8 d后经酶解获得的单离体细胞发育形成丝状体的百分率

1. 梢部, 2. 中部, 3. 基部

**Fig. 2 Percentage of the conchocelies developed from single somatic cell obtained using enzymatic hydrolysis from the discs of different sections from 40-day-old gametophytic blades of PC-Y1 strain in *P. chauhaniai* after being cultured at 20 mmol/L allantoin for 8 days**

1. apical, 2. middle, 3. basal

较早,基部最晚,表明叶状体圆盘体放散单孢子的时间和数量与藻体发育和分化的程度可能存在某种关系。

Saito等<sup>[23]</sup>用玻璃匀浆器对拟线性紫菜(*P. pseudoliuearis*)进行匀质化研磨,将研磨液置于含10 mmol/L尿囊素的培养液中进行培养,获得了大量的再生自由细胞,尿囊素处理可能改变了该紫菜细胞壁的特性。实验用含有不同浓度尿囊素(1、5、10、15和20 mmol/L)的培养液对不放散单孢子的PC-Y1进行培养,发现无论尿囊素浓度高低,均不能促进其产生单孢子,推测单孢子放散可能涉及到多个代谢通路相互协调、相互影响,相关诱导机制需要深入研究。

另外,对PC-Y1圆盘体培养数天后,发现尿囊素处理组中的圆盘体藻体颜色明显变浅,显微观察其藻体出现较多类果胞,推测尿囊素可能对印度产紫菜叶状体的成熟有诱导作用。圆盘体经酶解后,处理组中分离的单离细胞发育成丝状体的比例高达66.1%,而对照组仅为15.2%,表明尿囊素对印度产紫菜叶状体营养细胞向生殖细胞的转化具有诱导效果,但相关机制有待深入研究。

#### 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] Yoshida T. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography[J]. *National History Research*, 1997, 3(S1): 5-18.
- [3] 周慧萍,陈琼华.紫菜多糖抗衰老作用的实验研究[J]. *中国药科大学学报*, 1989, 20(4): 231-234.  
Zhou H P, Chen Q H. Antiageing effect of the polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 1989, 20(4): 231-234(in Chinese).
- [4] 周慧萍,陈琼华.紫菜多糖的抗凝血和降血脂作用[J]. *中国药科大学学报*, 1990, 21(6): 358-360.  
Zhou H P, Chen Q H. Anticoagulative and antilipemic effect of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 1990, 21(6): 358-360(in Chinese).
- [5] 杨宇峰,费修纭.大型海藻对富营养化海水养殖区生物修复的研究与展望[J]. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(1): 53-57.  
Yang Y F, Fei X G. Prospects for bioremediation of cultivation of large-sized seaweed in eutrophic mariculture areas[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2003, 33(1): 53-57(in Chinese).
- [6] 陈莎莎,丁洪昌,严兴洪.印度产紫菜*Pyropia chauhanii*优良品系的选育与特性分析[J]. *水产学报*, 2016, 40(6): 933-945.  
Chen S S, Ding H C, Yan X H. Selection and characterization of an improved strain of *Pyropia chauhanii* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(6): 933-945(in Chinese).
- [7] 安全红,丁洪昌,严兴洪.印度产紫菜*Pyropia chauhanii*单孢子放散规律的研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(1): 38-47.  
An Q H, Ding H C, Yan X H. Study on the rules of releasing monospores of *Pyropia chauhanii* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(1): 38-47(in Chinese).
- [8] Ding H C, Zhang B L, Yan X H. Isolation and characterization of a heat-resistant strain with high yield of *Pyropia yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2016, 1(1): 24-33.
- [9] 王素娟,章景荣,刘家驹,等.条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)自然附苗养殖的初步研究[J]. *水产学报*, 1964, 1(1-2): 85-94.  
Wang S J, Zhang J R, Liu J J, et al. Preliminary study on the natural cultivation of *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1964, 1(1-2): 85-94(in Chinese).
- [10] 梅俊学,费修纭,王斌.条斑紫菜单孢子的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(4): 402-407.  
Mei J X, Fei X G, Wang B. Study on monospore production of *Porphyra yezoensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(4): 402-407(in Chinese).
- [11] 徐蕾,周一红,王素娟,等.条斑紫菜单孢子形成的超微结构及分子生物学证据[J]. *水产学报*, 2003, 27(6): 519-527.  
Xu L, Zhou Y H, Wang S J, et al. Ultrastructural and molecular evidence for monospore formation in the thallus of *Porphyra yezoensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(6): 519-527(in Chinese).
- [12] Ma P, Patching S G, Ivanova E, et al. Allantoin trans-

- port protein, Pucl, from *Bacillus subtilis*: evolutionary relationships, amplified expression, activity and specificity[J]. *Microbiology*, 2016, 162(5): 823-836.
- [13] Czerpak R, Krotke A, Mical A. Comparison of stimulatory effect of auxins and cytokinins on protein, saccharides and chlorophylls content in *Chlorella pyrenoidosa* Chick[J]. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 1999, 46(1): 71-82.
- [14] Mizuta H, Yasui H, Saga N. A simple method to mass produce monospores in the thallus of *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2003, 15(4): 351-353.
- [15] 张聪, 严兴洪. *Pyropia churharii*新品系的分离与特性分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1457-1465.
- Zhang C, Yan X H. Isolation and characterization of new strains of *Pyropia churharii* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1457-1465(in Chinese).
- [16] 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): 217-272.
- 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): 217-272(in Chinese).
- [17] 梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2004: 10-22.
- Liang Z Q. Primary study on genetics and breeding of *Porphyra haitanensis*[D]. Shanghai: Shanghai Fisheries University, 2004: 10-22 (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*, 2005, 29(2): 166-172.
- Yan X H, Liang Z J, 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*, 2005, 29(2): 166-172(in Chinese).
- [19] 李琳, 严兴洪. 坛紫菜绿色突变体的分离与特性分析[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(1): 30-35.
- Li L, Yan X H. Isolation and characterization of a green type mutant in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(1): 30-35(in Chinese).
- [20] Pineda M, Fernández E, Cárdenas J. Urate oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Physiologica Plantarum*, 1984, 62(3): 453-457.
- [21] Kitade Y, Asamizu E, Fukuda S, *et al.* Identification of genes preferentially expressed during asexual sporulation in *Porphyra yezoensis* gametophytes (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2008, 44(1): 113-123.
- [22] 林珠英. 一种从条斑紫菜的叶状体中大量获得单孢子的简便方法[J]. *科学养鱼*, 2005(3): 36-37.
- Lin Z Y. A simple method to mass produce monospores in the thallus of *Porphyra yezoensis* blade[J]. *Scientific Fish Farming*, 2005(3): 36-37(in Chinese).
- [23] Saito A, Mizuta H, Yasui H, *et al.* Artificial production of regenerable free cells in the gametophyte of *Porphyra pseudolinearis* (Bangiales, Rhodophyceae)[J]. *Aquaculture*, 2008, 281(1-4): 138-144.

## The influence of allantoin on monospores release and somatic cell differentiation in gametophytic blades of *Pyropia chauhaniai*

SUN Di<sup>1</sup>, DING Hongchang<sup>1</sup>, YAN Xinghong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

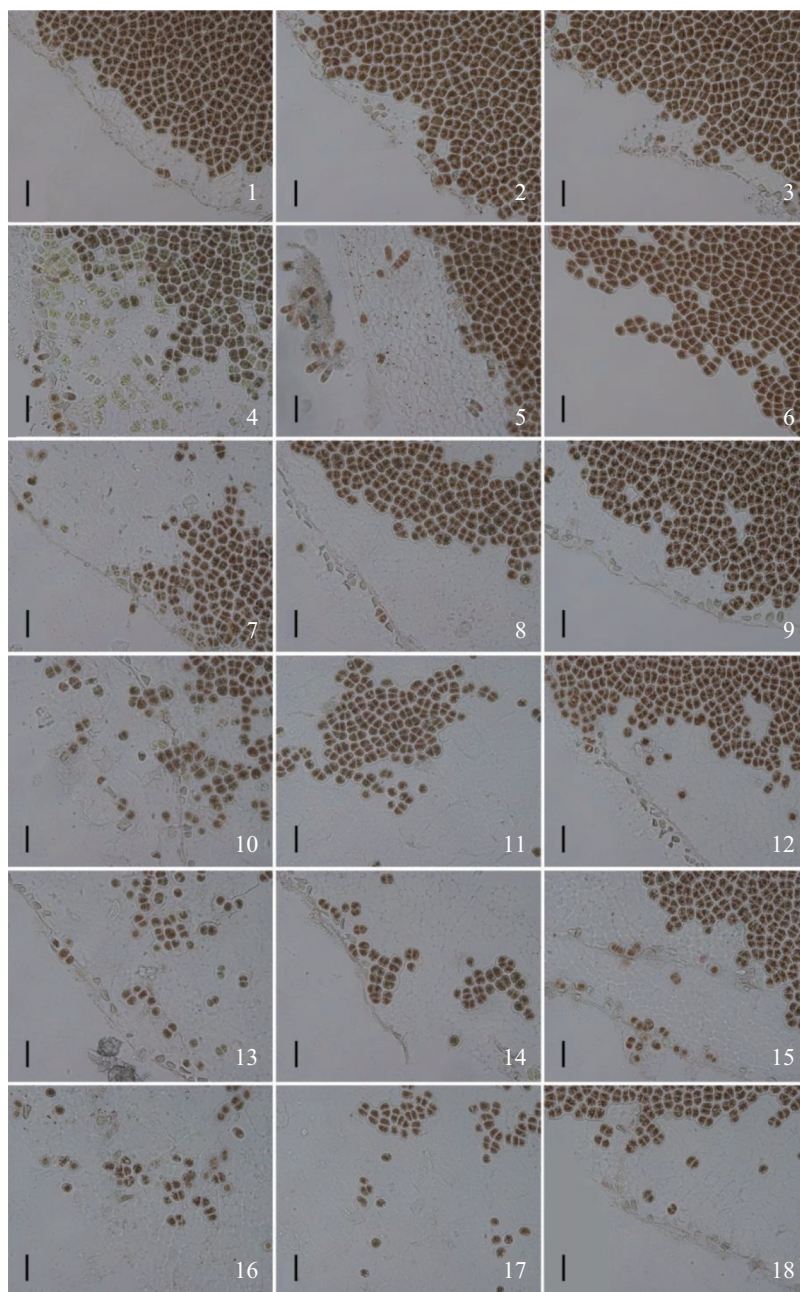
**Abstract:** In order to explore the influence of allantoin on monospores formation and release of *Pyropia chauhaniai*, we used the wild-type strain (*PC-WT*) which could release monospore and its induced strain (*PC-Y1*) which could not release monospore as materials, then different strains blade discs of apical, middle and basal sections were cultured in medium adjusted with different concentration of allantoin. The research results showed that, in 6 days after treatment, the order of the release number of the different parts of each disc was middle>apical>basal; With the increasing of allantoin concentration, the numbers of release monospores of *PC-WT* strain blade discs showed a trend of increasing first and then decreasing, and 10 mmol/L was the optimal allantoin concentration of promoting monospore release. But allantoin could not promote *PC-Y1* release monospore. We used 20 mmol/L allantoin of medium to culture the discs of *PC-Y1* blade for 8 days, and single somatic cell was obtained using enzymatic hydrolysis from the discs of different section, and continue culturing *in vitro*. We found that the percentage of single cells developed into conchocelis was 66.1% in treatment group; and the percentage of single cells developed into conchocelis was only 15.2% in control group. The result showed that allantoin could promote differentiation from somatic cell to germ cell of blade in *Pyropia*.

**Key words:** *Pyropia chauhaniai*; allantoin; monospores release; somatic cell differentiation; conchocelis

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

**Funding projects:** National High Technology Research & Development Program of China (2012AA10A411); National Natural Science Foundation of China (31072208); Major Science and Technology Special Fund of Agriculture (Fisheries) New Variety Breeding of Zhejiang Province, China (2016C02055-6); Large-scale Cultivation and Industrialization of Important Economic Red Algae with an Annual Output of 2000 Tons (2014FJ19)



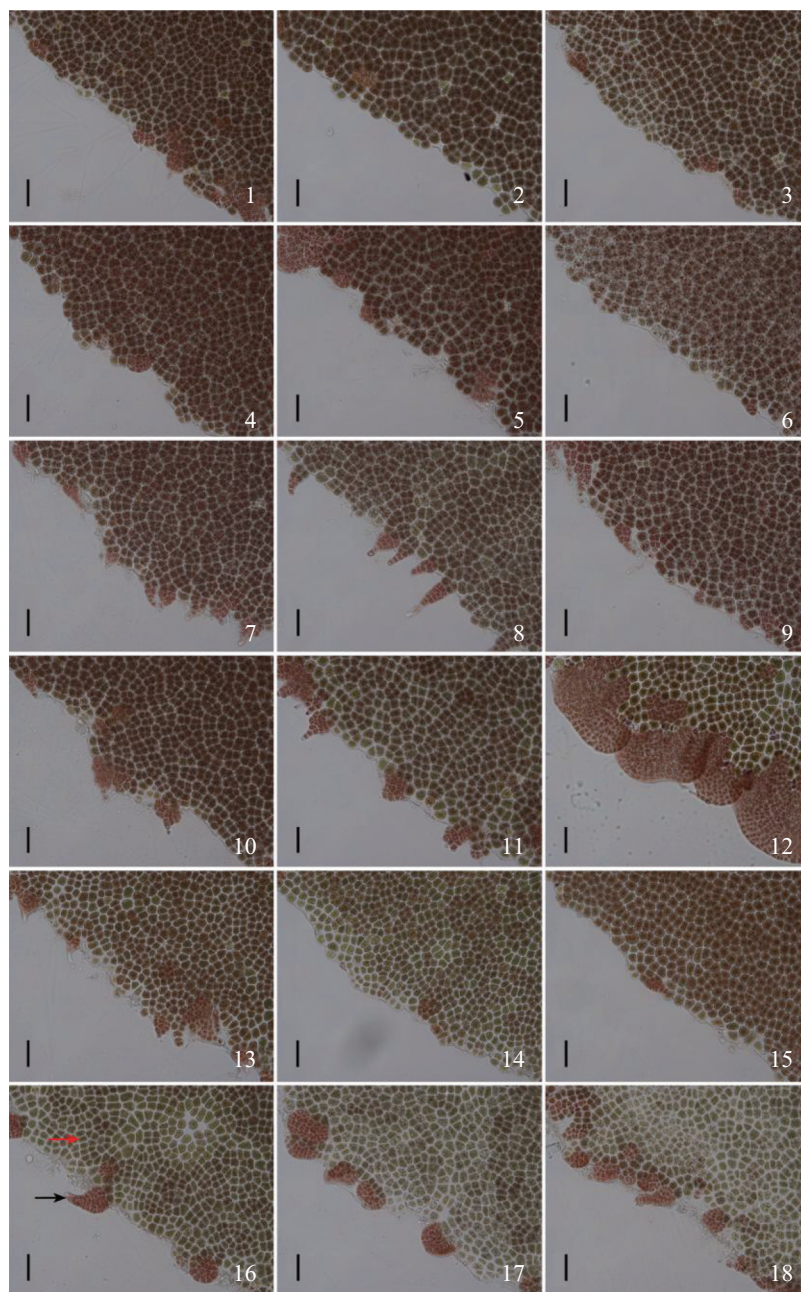


图版 I 日龄40 d的*P. chauhani*野生型品系(PC-WT)叶状体不同部位的圆盘体在含不同浓度尿囊素的培养液中再培养4 d的显微照片

1~3, 4~6, 7~9, 10~12, 13~15, 16~18. 尿囊素浓度分别为0、1、5、10、15和20 mmol/L; 1, 4, 7, 10, 13, 16. 叶状体梢部的圆盘体; 2, 5, 8, 11, 14, 17. 叶状体中部的圆盘体; 3, 6, 9, 12, 15, 18. 叶状体基部的圆盘体。图中标尺均代表50  $\mu\text{m}$ , 下同

**Plate I Micrograph of the discs of different sections from 40-day-old gametophytic blades of PC-WT strain in *P. chauhani* after being cultured at different concentration of allantoin in medium for 4 days**

1~3, 4~6, 7~9, 10~12, 13~15, 16~18. the allantoin concentration was 0, 1, 5, 10, 15 and 20 mmol/L, respectively; 1, 4, 7, 10, 13, 16. discs from apical blades; 2, 5, 8, 11, 14, 17. discs from middle blades; 3, 6, 9, 12, 15, 18. discs from basal blades. The bars=50  $\mu\text{m}$  in 1~18, the same below



图版 II 日龄40 d的 *P. chauhanii* 诱变品系(PC-Y1)叶状体不同部位的圆盘体在含不同浓度尿囊素的培养液中再培养8 d的显微照片

黑色箭头为边缘刺, 红色箭头为类果胞

**Plate II** Micrograph of the discs of different sections from 40-day-old gametophytic blades of PC-Y1 strain in *P. chauhanii* after being cultured at different concentration of allantoin in medium for 8 days

Marginal spine (black arrow), like-carpore (red arrow)