

学校编码：10384

分类号____密级____

学号：200126015

UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

福建省栽培及野生坛紫菜重要品质性状
的研究

Research of main quality traits of cultured and
wild *Porphyra hai tanensis* in Fujian

董宏坡

指导教师姓名：陈奕欣 教 授

王重刚 副教授

专 业 名 称：动物学

论文提交日期：2004 年 8 月 15 日

论文答辩时间：2004 年 8 月 4 日

学位授予日期：2004 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2004 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要.....	1
Abstract.....	5
一、 前言	6
1 坛紫菜的主要生物学特性	6
1.1 坛紫菜的分类学地位和生活环境.....	6
1.2 坛紫菜的形态、构造.....	6
1.3 坛紫菜的生活史.....	7
2 坛紫菜在栽培中所存在的问题及解决的思路	8
2.1 坛紫菜在栽培中所存在的问题.....	8
2.2 解决的思路.....	9
3 藻胆蛋白的研究	14
3.1 藻胆蛋白的结构和生物学功能.....	14
3.2 别藻蓝蛋白的亚基结构和功能.....	17
3.3 藻胆蛋白的应用研究.....	18
4 本研究的意义	19
二 材料与方法	21
1 实验材料	21
2 实验仪器	21
3 常用试剂	22
4 实验方法	23
三 结果与分析	29
1 福建平潭县野生坛紫菜和主要栽培坛紫菜品质性状的分析 ..	29
1.1 蛋白质和光合色素的含量.....	29
1.2 蛋白质、光合色素含量之间的相关性分析.....	30

1.3 坛紫菜叶状体的活体吸收光谱特征	31
2 坛紫菜突变体的品质性状分析	32
2.1 坛紫菜突变体的粗蛋白质和光合色素的含量	32
2.2 突变体中游离氨基酸种类和含量	32
2.3 主要光合色素含量变化和其细胞可溶性蛋白光谱特征	33
3 坛紫菜中别藻蓝蛋白的纯化	37
3.1 藻胆蛋白初始纯化组分的组成和纯度	37
3.2 DEAE-Sephadex-A-50 柱层析	39
3.3 羟基磷灰石柱层析	48
3.4 不同纯化方案的比较	48
3.5 别藻蓝蛋白的稳定性研究	49
四 讨论	53
1 福建平潭县野生坛紫菜和主要栽培坛紫菜品质性状的分析 ..	53
2 坛紫菜突变体品质性状的分析	54
3 坛紫菜中别藻蓝蛋白的纯化	59
五 结论	66
参考文献	67
攻读硕士阶段发表的论文和参加的课题	77
致 谢	78

Content

Abstract.....	1
Introduction	6
1 Main biological characteristic of <i>Porphyra hai tanensis</i>	6
1.1 The taxonomy position and living environment of <i>Porphyra hai tanensis</i>	6
1.2 Morphology of <i>porphyra hai tanensis</i>	6
1.3 Life cycle of <i>porphyra hai tanensis</i>	7
2 Problems in culture of <i>Porphyra hai tanensis</i> and the solution methods	8
2.1 Problems existing in culture of <i>Porphyra hai tanensis</i>	8
2.2 Methods for solution.....	9
3 Study advances on phycobilli protein	14
3.1 Molecular structure and biological function of phycobilli protein	14
3.2 Subunit structure and function of allophycocyanin	17
3.3 Application study of phycobilli protein.....	18
4 Meaning of this research	19
Materials and methods	21
1 Materials	21
2 Experiment instruments	21
3 common reagents	22
4 methods	23
Results and analysis	29
1 Analysis of quality traits of cultured and wild <i>P. hai tanensis</i> in Pingtan county	29
1.1 Content of protein and pigmentation.....	29

1.2	Analysis of correlation between protein and pigmentation	30
1.3	Absorption spectrum of <i>P. hai tanensis in vivo</i>	31
2	Analysis of quality traits of mutants in <i>P. hai tanensis</i>	32
2.1	Content of protein and pigmentation of the mutants	32
2.2	Content and category of free amino acid of the mutants . .	32
2.3	Variety of main pigmentation and spectrum Characteristic of soluble protein	33
3	Purification of allophycocyanin	37
3.1	Composition and purity of the crude extract of phycobiliprotein	37
3.2	Column chromatography of DEAE-Sephadex-A-50	39
3.3	Column chromatography of hydroxyapatite.	48
3.4	Comparison of the purification protocols.	48
3.5	The stability of allophycocyanin.	49
	Discussion	53
1	Analysis of quality traits of cultured and wild <i>P.</i> <i>hai tanensis</i> in Pingtan county	53
2	Analysis of quality traits of the mutants of <i>P. hai tanensis</i>	54
3	Purification of allophycocyanin	59
	Conclusion	66
	References	67
	The papers published and the subjects attended in the period of study of master.	77
	Acknowledgements.	78

中文摘要

坛紫菜是福建省优良的栽培海藻之一，它营养价值高，是人类理想的保健食品。当前由于坛紫菜育种和育苗技术落后，导致其种质退化、抗病力减弱、产量和质量下降，因此培育出种质优良的坛紫菜品系是非常必要的。对坛紫菜种质资源的品质性状进行鉴定和评价是坛紫菜育种研究的前提，因为没有优良的种质资源，就不可能育成优良的坛紫菜品系。

本研究以福建省平潭县的栽培、野生坛紫菜和经⁶⁰Co-射线辐照的突变体为材料，分析了它们的蛋白质、叶绿素、藻胆蛋白、游离氨基酸含量之间的差异，同时通过硫酸铵分级分离和柱层析法纯化出别藻蓝蛋白，为藻胆蛋白的进一步研究建立了稳定的基本方法。

品质性状的分析结果表明平潭县的栽培、野生坛紫菜样品中，4个野生坛紫菜样品蛋白质含量高于栽培坛紫菜。在相同的海况条件下，突变体与栽培坛紫菜之间的蛋白质含量也存在很大差异，其中突变品系NY3显著高于当地的栽培品系GL1和LPZ。从叶绿素、藻胆蛋白含量来看，所有的野生坛紫菜、突变体样品的叶绿素含量低于栽培坛紫菜GL1。5个野生坛紫菜样品、3个突变体样品的总藻胆蛋白含量高于栽培坛紫菜。2个突变体样品的游离氨基酸含量高于栽培坛紫菜。研究结果说明坛紫菜样品之间种质的差异是很大的，这种种质之间的差异为坛紫菜优良品种选育提供了丰富的资源。

对坛紫菜的活体吸收光谱研究的结果表明坛紫菜的活体吸收光谱有五个特征吸收峰。叶绿素a有两个主要吸收峰，一个在红光区的675nm附近，另一个在蓝光区的440nm附近。类胡萝卜素、藻红蛋白、藻蓝蛋白的主要吸收峰分别在502 nm、565 nm和615 nm附近。样品之间吸收峰的高低反映了它们光合色素含量的差异。

对别藻蓝蛋白的纯化研究结果表明：采用30% ~ 35%饱和硫酸铵沉淀、Tris-HCl (pH=8.0) 作为洗脱缓冲液、DEAE-Sephadex-A-50作为层析介质，所获得的APC的纯度和回收率最高，分别达到3.50和70.2%。与国内外纯化别藻蓝蛋白的方法相比，具有简单、快速、回收率高等优点。

对APC的稳定性研究的结果显示：APC对pH和离子强度的变化很敏感；随着离子强度的增加，APC三聚体在不断地发生解离；当pH值在6.5 ~ 8.5之间，APC三聚体比较稳定，超过这个范围，APC三聚体都会发生不同程度的解离。这些结果说明APC的单体之间、和亚基之间的非共价键作用力是很微弱的。

关键词：坛紫菜；品质性状；别藻蓝蛋白

Abstract

Porphyra hai tanensis is one of important economic cultured seaweeds in Fujian province. It has high nutritive value and is an ideal health food for mankind. Because breeding and cultivation in *P. hai tanensis* drop behind in technique at present, it leads to the fact that germplasm degrades, disease resistance weakens, output and quality drop, so it is necessary to breed high quality strains of *P. hai tanensis*. Main quality traits of *P. hai tanensis* need to be identified and evaluated before breeding research

In this thesis, the amount content of proteins, chlorophyll, phycobiliprotein and free amino acids were analyzed from cultured and wild *P. hai tanensis* in Pingtan county of Fujian province, as well as the mutants by ^{60}Co -ray. Meanwhile, the allophycocyanin was obtained by ammonium sulfate precipitation and column chromatography which was expected to offer an extraction method for phycobiliprotein.

The analysis results of the quality traits showed that the protein content of 4 of the wild samples was higher than the cultured ones. Furthermore, there was significant difference in the protein content between mutant and cultured samples under the same growth conditions, in which the mutant NY3 was notably higher than the local cultured strains GL1 and LPZ. From content of chlorophyll and phycobiliprotein aspect, the content of chlorophyll of all of the wild and mutant samples were lower than the cultured strain GL1. The total phycobiliprotein content of 5 of the wild samples and 3

of the mutant samples were higher than the cultured samples. The content of free amino acids of 2 of mutant samples were higher than the cultured samples. The results indicated that there were greatly difference among the *P. haitanensis* samples in quality, which could offered abundant resources for strain breeding.

The results of absorption spectrum of *P. haitanensis* from Pingtan county indicated that the absorption spectrum *in vivo* had 5 characteristic absorption peaks. Chlorophylla had two mainly absorption peaks, one close to red light district 675 nm, another close to 440nm. Main absorption peaks of carotenoid, phycoerythrin and phycocyanin were near 502 nm , 565 nm and 615 nm respectively. The level of absorption peaks among the samples had reflected the difference of the content of the pigmentation.

The results of purification for allophycocyanin indicated that precipitates with 30% ~ 35% of the saturation ammonium sulfate, Tris-HCl (pH=8.0) as eluting buffering, DEAE-Sephadex-A-50 as chromatographic adsorbent; the purity and rate of recovery of allophycocyanin obtained were the highest, up to 3.5% and 70.2% respectively. The purification protocol had advantage of simpleness, speediness and high rate of recovery compared with the purification protocols reported.

The results of the stability of allophycocyanin showed that allophycocyanin was very sensitive to pH and ionic intensity. As increasing of ionic intensity, the trimeric structure of allophycocyanin dissociates constantly. While between pH 6.5 ~ 8.5, the tri-

meric structure of allophycocyanin was more steady, when exceeding the pH range, the trimetric structure of allophycocyanin dissociated to some extent. These results indicated non-covalent bond was very weak between monomers of allophycocyanin and between subunits of allophycocyanin.

Keyword: *Porphyra hai tanensis*; Quality character; Allophycocyanin

一 前言

1 坛紫菜的主要生物学特性

1.1 坛紫菜的分类学地位和生活环境

坛紫菜 (*Porphyra hai tanensis*) 属红藻门 (Rhodophyta) 红藻纲 (Rhodophyceae) 红毛菜亚纲 (Bangi ophyci dae) 红毛菜目 (Bangi al es) 红毛菜科 (Bangi acea) 紫菜属。据不完全统计, 现在世界上紫菜属约有 70 多种, 中国有 19 种。在日本、韩国和中国栽培利用的主要种类为坛紫菜和条斑紫菜 (*P. yezoensis*)。圆紫菜 (*P. suborbiculata*)、皱紫菜 (*P. crispata*)、长紫菜 (*P. dentata*)、甘紫菜 (*P. tenera*)、边紫菜 (*P. marginata*) 等只有少量的栽培或仍处于实验阶段。在我国, 条斑紫菜主要在辽宁、山东、江苏等北方省份栽培, 坛紫菜主要在福建和浙江沿海栽培, 尤其盛产于福建的平潭、莆田、惠安等县。野生坛紫菜多生长在风浪大的潮间带的岩礁上。栽培坛紫菜的海区底质应为沙质, 滩面平坦, 比降小。对于早期苗网的培育, 宜选择大潮讯干露 2.5h ~ 4.5h 的海区; 对于成菜的栽培潮位, 宜选择大潮讯干露 3.0h ~ 4.5h, 小潮讯最长 2 天不干露的海区。坛紫菜的叶状体生长期一般为 9 月至次年 3 月, 其生长适宜的海水温度在 20 ~ 25 , 海水比重在 1.010 ~ 1.025 之间^[1-2]。

1.2 坛紫菜的形态、构造

1.2.1 坛紫菜叶状体的形态构造

坛紫菜的生活史有两个明显的生长发育阶段, 即配子体世代- 叶状体和孢子体世代- 丝状体。叶状体是由丝状体放散出来的壳孢子萌发形成的一层或二层细胞组成的膜状体, 叶状体基部不明显, 但大体上仍可分为固着器、柄、叶片三部分。叶状体是坛紫菜的宏观配子体世代, 也是栽培生产的主要对象。坛紫菜的叶状体呈披针形, 亚卵形或长卵形, 颜色一般为紫褐色。野生坛紫菜叶状体的长度一般多为 12 ~ 18cm, 有时能达 28cm 以

上，而栽培坛紫菜的叶状体长度通常能达 1~2m。根据叶状体的生长发育情况，可将其分为 5 个时期^[3]：萌发期、苗期、成菜期、成熟期、衰老期。

1.2.2 坛紫菜丝状体的形态构造

坛紫菜叶状体发育成熟后，其边缘的营养细胞转化为雌雄生殖细胞，雌性生殖细胞称果胞，为鲜红色。雄性生殖细胞称为精子囊，为淡黄色或灰白色。果胞受精之后，分裂成一定数量的果孢子，此时果孢子为球形，一般 10~13 μm ，具有星状或弥散状色素体，无细胞壁而能做变形运动，具有溶解碳酸钙的特殊能力。果孢子散落到贝壳后，钻入贝壳便纵横生长，形成丝状体。根据丝状体的生长发育情况，从形态上大体可分为：丝状藻丝、孢子囊枝形成、壳孢子囊形成、壳孢子放散四个不同时期^[3]。

1.3 坛紫菜的生活史研究

英国藻类学家 Drew (1949) 首次证明紫菜果孢子萌发的结果并非成为紫菜的叶状体，而是成为一种微小丝状的、生长在软体动物贝壳里的壳斑藻，即通常所说的丝状体^[4]。曾呈奎等 (1954) 论证紫菜在其生活史中具有叶状体和丝状体两个阶段，同时发现壳斑藻可以放散出鲜红的孢子，这种孢子萌发成为紫菜叶状体的幼苗，并将这种孢子命名为壳孢子，从而完全揭开了紫菜生活史的奥秘^[4]。坛紫菜的生活史中只有有性生殖而无无性生殖，而条斑紫菜有性生殖和无性生殖同时存在。坛紫菜的生活史由叶状体和丝状体两个阶段组成，叶状体成熟后产生雌雄生殖细胞：果胞和精子囊器。两性细胞结合后形成受精果胞，经有丝分裂形成果孢子。果孢子脱离藻体钻入石灰质基质中，萌发形成丝状体。丝状体发育一段时间形成壳孢子囊，产生壳孢子。秋季气温下降，壳孢子放散，附着于自然或人工基质上萌发成幼苗，长大成为叶状体^[3]。条斑紫菜除了具有与坛紫菜相同的有性生殖以外，还可以放散出单孢子，直接萌发成紫菜叶状体。关于坛紫菜幼苗能否形成单孢子一直是多年来悬而

未决的理论问题。王素娟等（1994）对这一问题进行了反复、多方面的研究，特别是对于幼苗释放细胞的条件，细胞的发育分化趋势及超微结构作了重点研究，并将研究结果与真正放散单孢子的条斑紫菜作了比较，实验结果证明坛紫菜生活史中不产生单孢子^[5]。

2 坛紫菜在栽培中所存在的问题及解决的思路

2.1 坛紫菜在栽培中所存在的问题

大约在元朝时，福建平潭县的居民就发明了撒石灰水清理岩礁杂藻来增殖坛紫菜的技术，使坛紫菜的产量显著提高，这个技术一直到 20 世纪 50 年代还在使用。1959 年藻类学家曾呈奎到平潭考察，认定这里产的坛紫菜可作为人工栽培的推广品种。1964 年国家水产部门组织国内的科研人员在福建成立了坛紫菜的攻关小组，就坛紫菜叶状体、丝状体的生活习性，人工培育贝壳丝状体和全人工栽培技术等进行了深入的研究，解决了以前在坛紫菜人工育苗和栽培中存在的问题，使坛紫菜的人工栽培迅速发展起来^[6]。随着福建和浙江两省坛紫菜栽培面积的不断扩大，在坛紫菜栽培中产生了两个主要的问题。

2.1.1 种质退化严重

在 70 年代福建和浙江两省坛紫菜养殖所需要的种菜一般采自岛屿岩礁上生长的野生坛紫菜；80 年代~90 年代，福建坛紫菜养殖面积比 70 年代翻了 10~14 倍，造成种菜供不应求；现在只能用人工养殖网帘上的坛紫菜作为种菜，没有经过严格的挑选和育种，造成近亲繁殖，种质退化，抗病力减弱，病害频发，产量和质量下降^[6]。

2.1.2 育苗技术落后

目前，福建省的坛紫菜育苗还是采用传统的育苗技术，即从种藻中获得果孢子后接种贝壳，大量培养贝壳丝状体，进入晚秋贝壳丝状体发育成熟并放出壳孢子，再将壳孢子采集到网帘上，最后放到海里养殖长成紫菜

叶状体。这种传统的贝壳育苗技术费时，费力，时间长达 5 个月。同时由于坛紫菜的减数分裂是发生在壳孢子萌发到长成 4 细胞幼叶状体这个时期^[7]，因此利用这种传统的育苗技术即便使用了良种原藻接种贝壳，原有的优良性状也会由于杂交后代出现性状分离而很快退化消失。

2.2 解决的思路

针对坛紫菜育种和育苗上所存在的问题，藻类学家主要从坛紫菜的丝状体和叶状体两个阶段入手，利用各种传统的和现代生物技术的育种手段，对坛紫菜育种和育苗的方法展开研究。在坛紫菜育种方面，主要有传统的选择育种和现代生物技术育种。选择育种就是从野生种群或栽培种群中挑选出性状优良的个体作为种藻，再经过生产检验确认良种；现代生物技术育种包括丝状体细胞工程育种、原生质融合及细胞杂交育种、诱变育种和基因工程育种。在坛紫菜育苗方面，藻类学家主要建立了丝状体细胞工程育苗技术和叶状体细胞工程育苗技术，这两项育苗技术体系使优良的坛紫菜品系有效地导入生产成为可能。

2.2.1 坛紫菜丝状体细胞工程育种

坛紫菜丝状体细胞工程育种的规范化操作程序为：从自然生长的群体中或栽培群体中选择具有优良性状的单株叶状体，首先进行表面消毒，然后切下没有生殖细胞的体细胞组织块，经过反复清洗和消毒，在海水培养液中进行组织培养，在实验室内人工诱导形成丝状体，从而得到初步纯化的丝状体细胞。将这种初步纯化的丝状体经过微增殖培养接种到贝壳上，再由贝壳丝状体大量生产壳孢子，得到子一代叶状体，如果这些叶状体的性状基本上与亲本相同，在生产上经检验确认为良种，并在不同年度和不同地区不出现明显的性状分离和变异，那么这个丝状体就可以作为纯系加以保存。采用丝状体接种贝壳是一条简便、快速地实现紫菜良种化栽培的有效途径。这方面的工作中科院实验海洋生物学开放研究室做的比较多，

自 1987 年到 1998 年期间, 这个研究小组从自然种群和栽培群体中一共分离保存了 5 个种 60 个品系的紫菜丝状体细胞, 其中的部分条斑紫菜栽培品系已进入生产性应用多年, 成为比较稳定的优良品系^[8]。

2.2.2 坛紫菜原生质体融合育种

红藻原生质体的融合是近 10 年才开始发展起来的, 已研究的红藻主要有紫菜属和江篱属。紫菜属已有 10 种左右做过细胞融合研究^[7]。对坛紫菜的原生质体融合研究包括两个方面: 种间融合, 如 Dai 等 (1990) 用 PEG 融合法进行坛紫菜和条斑紫菜原生质体的融合研究, 结果表明两种紫菜的原生质体可以少量融合, 但融合体未能再生成植株^[9]。陈昌生 (1993) 将坛紫菜和拟线形紫菜 (*Porphyra pseudolinearis*) 的原生质体融合后, 融合细胞经诱导长成多细胞团的愈伤组织, 然后从愈伤组织上长出紫红色和紫绿色相嵌的小紫菜^[10], 这是有关坛紫菜种间融合成功的例子, 但这种杂合紫菜很快就死亡, 似乎并没有发生真正的核融合; 种内融合, 如 Yan (2001)^[11]报道坛紫菜色素突变体之间也能发生原生质体融合并发育成杂色的叶状体。除了坛紫菜外, 有关主要栽培种条斑紫菜的原生质体融合研究的报道也很多, 如 Fujita 等 (1987) 曾进行过条斑紫菜野生型和绿色突变体的原生质体融合, Fujita 等 (1990) 用电场融合获得了条斑紫菜和 *Porphyra pseudolineris* 的杂种植物^[7], Araki 等 (1994) 进行条斑紫菜和 *P. tenera* 的融合, 得到杂种植株^[12]。从以上研究报道的结果来看, 紫菜种间原生质的融合主要是发生了细胞质融合, 并没有发生核融合。最初人们希望通过细胞融合得到远缘物种间的细胞杂种, 使杂种具有双亲的性状和优点, 但经过近年来的研究发现远缘物种间的原生质体融合仍存在着不亲和性及排斥性, 即使发生了核融合, 亲本的性状也很快分离。所以目前已将研究重点放在培育胞质杂种的方法研究方面以及其他的育种方法上^[7]。

2.2.3 坛紫菜的诱变育种

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库