

克隆裙带菜配子体育苗技术研究

李秉钧⁽¹⁾ 姜文法⁽²⁾ 许修明⁽¹⁾ 宋淑莲⁽¹⁾ 宋鸿泽⁽²⁾

(1)烟台大学海洋学院 (2)荣成市海带育苗场

目前,裙带菜 *Undaria pinnatifida* (Harvey) suringar 生产性人工育苗多采用常温育苗法。这种方法育苗周期长,杂草多,配子体渡夏期间死亡率高,尤其是渡夏后,在水温还没有稳定下降之前,幼孢子体往往过早形成,水温再度回升后,不耐高温的幼孢子体容易大量死亡(配子体耐高温)。因此,裙带菜常温育苗不但成本高,而且育苗生产很不稳定,苗种质量差,出苗率低,育苗生产全面失败的情况也时有发生。裙带菜克隆配子体育苗,就是将裙带菜的雌、雄配子体分离并克隆扩大培养,然后在适当的时间捣碎混合,并采苗、育苗。这种全新的育苗方法,可以提高育苗的成功率,缩短培育周期(缩短近2个月),节省成本,并使年内多次采苗、育苗成为可能。为育种和新品种的快速推广找到了一条有效途径。

国内逢少军曾进行裙带菜单倍体无性繁殖系的培育和育苗研究;日本秋山和夫等报道了裙带菜配子体采苗的技术概要。我们于1996、1997、1998、1999连续四年对裙带菜克隆配子体采苗、育苗及相关技术进行了系统、详细的研究,分别用38d、40d、31d、32d培育出裙带菜苗,平均长度分别为4mm、5mm、2~3mm和2~3mm,平均密度分别为58株/cm、170株/cm、152株/cm和136株/cm,裙带菜苗绳总长分别为17×62.5m、679×62.

5m、1200×62.5m和2745×62.5m。

一、材料和方法

(一)材料

种藻选自荣成市近海养殖筏上,于1995年7月3日和1996年6月25日两次采选,获得附着的雌、雄配子体后,在倒置显微镜下,用毛细吸管进行分离并培养。当藻落长至直径3~4mm时,用组织捣碎机切割扩大培养。用日光灯作光源,光照2500lx,光暗周期12h/12h,培养温度为22℃;培养液用海水全部为煮沸消毒海水, $S=31$, $\text{NaNO}_3=100 \times 10^{-6}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4=11 \times 10^{-6}$, $\text{GeO}_2=0.5 \times 10^{-6}$,自配P₁金属混和溶液 $=10000 \times 10^{-6}$;培养过程中,每10d换水100%。

(二)方法

1. 配子体扩大培养的切割时间(长度)

各取每份1g(用滤纸吸水后重量)的雌、雄配子体9份,分别用组织捣碎机切割10s、20s、40s、60s、80s、100s、120s、140s、160s,检查配子体的切割长度后,放入2000ml的培养瓶中培养,培养条件同(一)。20d后分别称量配子体的重量。

2. 分离的雌、雄配子体生长与温度的关系

各取6g的雌、雄配子体,分别用组织捣碎机切割20s和60s,然后分4份放入2000ml的培养瓶中培养。培养温度分别为10℃、15℃、20℃、25℃,培养条件除温度外,其余同

于(二)。20d后分别称量配子体的重量。

3. GeO_2 对分离的雌、雄配子体性发育的影响 各取 1g 雌、雄配子体, 分别用组织捣碎机切割 20s 和 60s, 然后分别取 1ml 放入添加了 GeO_2 含量为 $0, 0.05 \times 10^{-6}, 0.10 \times 10^{-6}, 0.20 \times 10^{-6}, 0.30 \times 10^{-6}, 0.40 \times 10^{-6}, 0.50 \times 10^{-6}, 0.60 \times 10^{-6}, 0.70 \times 10^{-6}, 0.80 \times 10^{-6}, 0.90 \times 10^{-6}, 1.00 \times 10^{-6}, 2.00 \times 10^{-6}, 3.00 \times 10^{-6}$ 的培养液的直径 9cm 培养皿中。培养条件除 GeO_2 含量不同外, 其余同于(一)。15d 后分别检查配子体的性发育状况。

4. 配子体的切割时间(长度)与附着的关系 各取每份 1g 左右的雌、雄配子体 9 份, 分别用组织捣碎机切割 10s、20s、40s、60s、80s、100s、120s、140s、160s, 检查配子体的切割长度后, 用移液管取 1ml 放入直径为 9cm 的培养皿中培养。培养条件同于(一)。5d 后检查配子体的附着率。

5. 配子体采苗密度 将雌、雄配子体分别切割 60s 和 100s, 然后按 1:1 的重量比混合, 按每 m^2 投放 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0g 混合后的配子体进行采苗, 设一组重复, 附苗器为 $20 \times 20\text{cm}$ 的红棕绳附苗器(用直径 0.5cm 的红棕绳编制而成), 采苗后 3d 内不动帘不换水, 3d 后移入玻璃水槽中流水培育。培育水温 $18 \sim 20^\circ\text{C}$, 每天换水 30%~80%, 其他条件同于(一)。40d 后检测出苗密度。

6. 雌雄配子体切割混合采苗 当水温

表 1 配子体的切断长度与生长的关系

重量(g) \ 切割时间(s) \ 切断长度(μm)	10	20	40	60	80	100	120	140	160
配子体	217	172	136	104	81	71	67	62	59
♀配子体(g)	15.3	22.3	23.7	27.9	20.2	11.3	6.9	4.6	4.6
♂配子体(g)	19.5	21.9	16.4	10.4	9.7	7.2	6.5	5.8	5.5

2. 分离的雌、雄配子体生长与温度的关系

表 2 为不同温度对分离配子体生长的影

响。稳定地下降到 23°C 以下时, 进行采苗。用标准海带红棕绳育苗帘(苗绳长度 62.5m), 分别于 1996. 9. 15、1997. 9. 15、1998. 9. 13、1999. 9. 15 采苗, 采苗苗帘数分别为 17、679、1200、2745 个, 将苗帘放于 $12 \times 1.6 \times 0.6\text{m}$ 的水泥池池底, 加水后采苗。采苗时雌、雄配子体的捣碎时间分别为 60s 和 100s, 雌雄配子体的混合比为重量比 1:1, 配子体的投放量为 $1\text{g}/\text{m}^2$ 左右。然后把捣碎的配子体均匀地泼洒到采苗池中, 为使配子体能均匀分布, 用搅水耙轻轻搅拌池水。采苗后 3d 内不换水, 苗帘静置不动。期间光线强度为 1000lx 左右。

7. 幼苗培育 采苗 4~5d 后, 用托绳将苗帘托在 $12 \times 1.6 \times 0.6\text{m}$ 的育苗池内培育。整个育苗期间水温为 $23.2 \sim 18.0^\circ\text{C}$, 光照为 $1500 \sim 7000\text{x}$ 。施肥为氮、磷两种肥料, $\text{NO}_3 - \text{N} = 3 \sim 5 \times 10^{-6}$, $\text{PO}_4 - \text{P} = 0.3 \sim 0.5 \times 10^{-6}$ 。换水每天一次, 每次 $1/5 \sim 1/3 \sim 1/2$, 后期流水培育。每周苗帘洗刷一次。

二、结果

1. 配子体扩大培养的切割时间(长度)

表 1 是配子体的切段长度与生长的关系。从表中可以看出雄配子体的最适宜切割时间是 60s(平均长度 $104\mu\text{m}$), 而雌配子体最适宜的切段时间是 20s(平均长度 $172\mu\text{m}$)。随着切割时间的增长, 切断配子体的受伤情况越来越严重, 尤其是雌配子体, 显微镜下可以见到许多破碎的细胞。

从表 2 可以看出, 雌、雄配子体在设定的四个温度条件下都能生长, 其中雄配子体生长最快的温度是 20°C ; 雌配子体生长最快的

温度是 25℃。

表 2 不同温度对分离的配子体生长的影响

重量(g) 配子体	温度℃	10	15	20	25
♀配子体		10.2	16.8	38.3	23.1
♂配子体		7.6	11.9	23.7	32.4

3. 对分离的雌、雄配子体性发育的影响

表 3 为 GeO₂ 对雌、雄配子体性发育的影响

表 3 GeO₂ 对分离的雌、雄配子体性发育的影响

GeO ₂ 浓度 (10 ⁻⁴)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	2.0	3.0
♀配子体	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
♂配子体	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(表中“+”号越多表示性发育的程度越高,“-”表示没有性发育的情况)

4. 配子体的切割时间(长度)与附着率及死亡率的关系

表 4 是配子体的切割时间与附着率及死亡率的关系。从表中可以看出,随着雌、雄配子体切割时间的延长,其附着率稳步提高,同时死亡率也明显增大。尤其是当雌配子体切

响。从表中可以看出,在适宜配子体发育的条件下,GeO₂ 对雌、雄配子体的性发育有明显的抑制。在 GeO₂ 浓度为 0.4×10⁻⁴ 的培养液中,雌、雄配子体的性发育都受到了抑制,没有形成卵囊、精囊及排卵、排精现象,而浓度越低性发育就越明显,浓度较高的 3.0×10⁻⁴ 一组也没对雌、雄配子体的生长有不良影响。

割时间大于 60s(长度小于 104μm),雄配子体切割时间大于 100s(长度小于 71μm)时,其死亡率大幅增加。显微镜下观察,可看到许多受伤的个体和破碎的配子体细胞。所以,我们认为:采苗时雌、雄配子体适宜的切割长度分别是 104μm 和 71μm。

表 4 配子体的切割时间与附着率及死亡率的关系

结果 配子体	切割时间(s) 切割长度(μm)	10	20	40	60	80	100	120	140	160
		217	172	136	104	81	71	67	62	59
♀配子体	附着率%	60.3	64.0	71.4	82.0	85.6	85.2	88.7	89.9	89.8
	死亡率%	2.3	4.1	6.9	10.8	14.3	17.5	25.4	28.7	33.4
♂配子体	附着率%	56.5	54.2	58.6	67.2	76.9	86.8	89.3	91.7	91.5
	死亡率%	低	2.6	6.0	5.5	8.6	9.8	13.1	13.8	18.5

5. 配子体采苗密度

表 5 是不同采苗密度下,幼苗的平均出苗密度及平均大小。从表中可以看出,随着采苗密度的加大,出苗密度也同时加大,但当采苗密度大于 1.0g/m² 后,出苗密度的增大并不明显,而且有掉苗率增大的倾向。对于商品苗的密度要求,1.0g/m² 组的出苗率已绰绰有余,即使 0.5g/m² 组也完全能满足生产上

的要求,只不过底苗略少而已。据此,我们认为,适宜的采苗密度以 1.0g/m² 为宜。

表 5 不同采苗密度下幼苗的出苗密度

采苗密度(g/m ²)	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
出苗密度(株/m)	37	72	124	141	156	157	198
幼苗大小(mm)	5.6	5.5	4.8	4.1	4.0	3.6	3.1

6. 雌雄配子体切割混合采苗

配子体采苗 3~4d 后,就能附着。这段时

间由于配子体附着不牢,原则上要求不换水,不洗刷,不动帘。采苗密度对于育苗效果的影响至关重要,密度小,则苗绳上有间隙,给蓝藻和硅藻的繁生提供了空间,出苗率低。密度过大,则出苗后幼苗附着不牢,下海后掉苗率高。配子体采苗密度的检查与控制,用传统的显微镜检查法检查每个低倍镜视野中配子体的个数,在生产上并不适用,检查与控制的难度很大。用单位面积配子体的投放重量来调控采苗密度就非常简单。经过几年的试验和实践,我们认为,雌雄配子体的重量性别比为1:1,混合投放量为 $1\text{g}/\text{m}^2$ 左右,完全可以满足生产上的要求,因而,也是较为合理的采苗密度。附苗期间光线不能过强,强光必然使配子体的光合作用强度增大,产生附着于配子体上的微细气泡,使配于体上浮影响附着,以 $1000\times$ 较为适宜。采苗后,雌、雄配子体的附着、生长、发育都很正常。

7. 幼苗培育

采苗一周后,雌、雄配子体经过发育首先从配子体的枝端细胞分别形成卵囊和精子囊,其他细胞也可以陆续形成卵囊和精子囊。雌、雄配于体排卵排精后,经受精形成合子,再形成幼孢子体,以后的生长过程与孢子采苗的孢子体没什么两样。

表6为1996、1997、1998、1999四年的育苗结果。从表中可以看出,育苗规模每年都有所扩大,由于苗全苗齐,育苗帘干净,幼苗固着牢固,下海后掉苗率也比较低,受到了用苗单位的欢迎。

表6 1996~1999年育苗结果

结果	1996.	1997.	1998.	1999.	
时间	9.15~10.23	9.15~10.25	9.13~10.16	9.15~10.17	
项目					
苗帘数	17	679	1200	2745	规格 62.5
培育天数	38	40	33	32	
平均密度(株/cm)	58	170	152	136	
平均大小(cm)	0.4	0.5	2~3	2~3	
数据来源	验收报告	验收报告	自测	自测	

三、讨论

1. 雌雄配子体的分离时间

雌雄配子体的分离过早,由于性征不明显,很难区分分离;分离过晚,虽然容易区分分离,但往往有大量的配于体形成卵囊和精子囊,排精排卵,甚至形成幼孢子体。令人费解的是这种现象不仅仅在分离后能持续一段时间,其性发育强度较高(与分离较早的相比)的状况一直持续在整个培养过程中,使配子体的生长速度大为变慢,我们把这种现象称之为“发育记忆”。根据我们的经验,采孢子6~7d后是比较合适的分离时间。试验还表明,分离越早,出现性发育的程度就越轻,克隆配子体的生长速度就越快,培养效果就越好。为此,我们把分离时间提前到采孢子1d后,这时还处在萌发期,分离时不分辨雌、雄,只是随机分离,单个培养,待其长成一个藻落后再鉴定性别分别培养。实践表明,这是一种便于操作、效果明显的方法。尽管在我们发现用 GeO_2 可以抑制配子体的性发育后,它已经失去了原有的意义。

2. 用 GeO_2 杀除硅藻,控制配子体时性发育

在单性配子体的培养过程中,经常会有杂藻特别是硅藻的污染,如果不采取有效措施杀除,会影响培育效果。我们根据国外的相关报道,采用 0.5×10^{-6} 的 GeO_2 杀灭硅藻,效果相当明显。更为重要的是,在培养过程中我们偶然发现,一定浓度的 GeO_2 具有明显的抑制配于体性发育的作用。众所周知,克隆配子体培养过程中出现性发育及进一步的单性生殖,会给培养工作带来相当负面的影响,使配子体的生长速度大大降低。为了搞清楚 GeO_2 的具体作用,我们安排了专门的试验,结果表明,浓度 0.1×10^{-6} 以上的 GeO_2 对配子体的性发育都有抑制作用,尤其是浓度 0.5×10^{-6} 以上抑制效果相当明显,没有发现有性发育和单性生殖现象,即使 3.0×10^{-6} 的较高浓度也没发现对配子体的生长有什么不

良影响。综上所述,我们认为有效抑制单性配子体性发育的 GeO_2 经济浓度为 0.5×10^{-4} , 非常巧合的是这与我们杀除硅藻所用的 GeO_2 浓度是基本吻合的。那么, GeO_2 对没有分离的配子体的性发育有没有影响呢? 试验结果是, GeO_2 对其性发育的抑制作用与分离条件下相比并没有什么两样。我们认为这一发现对于目前广泛采用的裙带菜常温育苗意义重大。众所周知, 目前裙带菜的常温育苗生产不稳定的主要原因来自于干扰生产的两大因素, 一是杂藻(特别是硅藻)的大量繁殖问题; 二是渡夏后不耐高温的幼孢子体(配子体耐高温)在水温还没有稳定下降到 23°C 以下就过早形成, 当水温再度回升导致幼孢子体的死亡问题。这一发现的重要意义就在于一定浓度的 GeO_2 既能杀除杂藻, 又能有效抑制配子体的性成熟, 而解除抑制后, 幼孢子体就可以正常形成, 从而使控制幼孢子体适时形成成为可能, 从而大大提高了常温育苗的成功率。

3. 配子体的切割扩大培养

在分离培养条件下, 配子体将生长成球状(游离的)、片状(附着在容器壁上)的多分枝丝状体, 随着丝状体的长大, 其生长速度将逐渐变慢, 为了保持其生长速度, 就要进行切割扩大培养。切割时间和切割长度对配子体生长速度的影响很大, 多年的实践和试验表明, 在丝状体长到直径 $3 \sim 4\text{mm}$ 时切割扩大培养比较合适; 上述试验表明, 雌配子体的适

宜切割长度为 $172\mu\text{m}$, 雄配子体的适宜切割长度为 $104\mu\text{m}$ 。如果太短就要影响丝状体的生长速度, 太长则不利于扩大培养。

4. 时间与采苗方式

采苗时间对育苗结果有着至关重要的影响。时间过早, 水温还比较高, 水温并没有稳定下降, 不耐高温的幼孢子体形成过早, 水温短时间回升容易引起幼孢子体的死亡; 采苗过晚, 裙带菜的养殖期短, 不利于提高产量, 幼苗销售困难。几年的试验和生产实践表明, 自然水温稳定下降到 23°C 以下采苗比较合适。如果在培育过程中出现水温过高的情况, 应采取应急措施进行应急降温处理。

我们共试验了三种采苗方式, 有干喷式(将浸湿的苗帘喷上配子体液后放入培育池中)、直喷式(将苗帘排放于采苗池底, 然后往采苗池内喷洒配子体液采苗)、泼洒搅拌式(将苗帘排放于池底, 把配子体液泼洒于池中用搅水耙轻轻搅动采苗)。试验和经验表明, 效果最好的是泼洒搅拌式, 干喷式由于喷上配子体液后在往育苗池中摆放的过程中, 大量的配子体容易在入水时脱落, 导致出苗不均, 有空白点, 而且操作麻烦, 采苗时间长; 直喷式尽管解决了大量配子体脱落的问题, 但也容易出现附苗不太均匀的问题, 而且采苗比较麻烦, 时间较长; 泼洒搅拌式最大的优点在于附苗均匀没有死角, 采苗时间短, 十几分钟甚至几分钟即可完成采苗。