

海带单倍体无性繁殖系育苗技术的研究

李大鹏¹, 吴超元¹, 刘晚昌², 戚克太², 夏俊壮²

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 威海水产开发公司, 山东 威海 264201)

关键词: 海带; 单克隆无性繁殖系; 育苗

中图分类号: Q945.51

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2003)05-0141-06

1 引言

海带(*Laminaria japonica*)是一种经济褐藻,它的用途很广,在医药、食品、化工等方面都有广泛的应用。它是海洋生物中含碘量最高的一种,食用海带可以补碘,治疗甲状腺肿大。我国是一个拥有十几亿人口的大国,当前约 4 亿多人口严重缺碘,因此海带养殖是关系到国计民生的大事。多年来在国内外人工养殖的藻类中,海带的产量一直居于首位。我国海带的年产量现已达 30 万 t 多干品^[1],是海水养殖的支柱产业之一。养殖业的发展必须有充足、优质的苗源做保障,因此先进稳定的人工育苗技术至关重要。我国现在普遍采用的海带人工育苗技术创建于 20 世纪 50 年代,即“夏苗培育法”。这种方法是在 6、7 月间采孢子,室内低温(5~10℃)度夏,到 10 月下旬左右,待自然海水水温降到适宜时(低于 20℃)幼苗出库进行海上养殖^[2]。该方法创立以来,为我国的海带养殖事业作出了巨大的贡献,但随着时代的发展,这种方法存在的不足显得尤为突出。主要体现在两个方面,(1)培育时间长,成本高,风险大。从采孢子到幼苗出库,幼苗需在室内低温培养 3 个半月左右,期间降低培育海水的温度(从 28℃左右降到 10℃以下)消耗大量的电力,成本较高^[3]。由于室内培育时间长,常常发生病害,造成减产,甚至绝产。(2)难以实现稳定和高度一致的良好化养殖。该方法是混合采孢子,成千上万棵种菜集中放散孢子,游孢子作为减数分裂的产物,广泛杂交的结果必然使后代孢子体变异很大,因此难于保持优良品系的纯度。因此,急需一种良好的育苗技术来改善当前的现状。

分离培养的海带雌(♀)、雄(♂)配子体(单倍体),在适宜的条件下只进行营养生长,不发育,形成无性繁殖系,也称克隆(clone)。海带单克隆无性繁殖系的主要生物学特点是:(1)起源于一个细胞(配子体),其遗传性是一致的,而且主要遗传基础都是单倍体;(2)在适宜于成

收稿日期: 2000-08-02; 修订日期: 2002-11-29.

基金项目: 中国科学院知识创新资助项目(ZK CXZ-211).

作者简介: 李大鹏(1968-),男,黑龙江省通河县人,研究员,博士,从事海藻生理与生物技术研究. E-mail: dpli@ms.

qdio.ac.cn

熟的条件下能发育,长成孢子体^[4]。为了克服上述传统育苗方法的不足,我们根据海带单克隆无性系的生物学特点,设计了利用海带单克隆无性繁殖系育苗的新方法。在实验室的多次实验的基础上^[5],于1998年7月30日至10月12日,在威海水产开发公司育苗基地进行了生产性育种和育苗实验。现将实验结果做简要的介绍。

2 材料和方法

2.1 海带单克隆无性繁殖系的建立和培养

选择体长、叶宽的健康藻体作为种菜,用过滤、煮沸消毒过的海水清洗干净,在 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ 房间阴干,使其在 PES^[6]培养液释放孢子,稀释孢子溶液,使在显微镜下有3~4个孢子每视野,以利于下一步的分离。将含有孢子的 PES 培养液倒入有载玻片的染色缸中。为了抑制和消除硅藻,前4d的培养液中加入 GeO_2 ,每升 PES 培养液中加 1 cm^3 GeO_2 饱和溶液^[7],第4天更换培养液,以后每周更换一次培养液。

以日光灯为光源,染色缸放在 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光强 $15\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期 12:12 的条件下,4d后在显微镜下用消毒过的玻璃毛细管将单个的雌、雄配子体分离出来,置于多孔培养板中培养,每两星期换一次培养液。1个月后光强改为 $40\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,日照为16h,使其进行快速的营养生长而不发育^[8]。每星期更换一次培养液,并通入过滤空气进行培养。更换培养液时,把复杂的分枝体撕开或用组织捣碎机打碎,分成许多小的分枝进行培养。

2.2 克隆附苗前的处理

计算附苗所需的克隆的量。根据我们的前期实验,每个生产苗帘需克隆量约3.5g,雌:雄为1:1.5时孢子体的转化率最高。培育9个生产苗帘($1\text{ m} \times 0.5\text{ m}$)共需克隆量为31.5g,即雌克隆12.6g,雄克隆量为18.9g。将雌、雄混合的克隆用组织捣碎机打碎,用400号筛绢滤洗后,通气悬浮培养备用^[9]。

2.3 附苗

1998年7月30日进行附苗。将混合均匀的克隆悬浮液均匀地喷洒在附苗器上,将附苗器慢慢地放入水温为6~10 $^\circ\text{C}$ 的海带育苗池中静养8d。每天进行镜检。

2.4 幼苗的培育

从第9天开始,流水培养,每天轻摆洗苗帘,以清除杂藻,减轻杂藻对幼苗生长的危害。生产培育条件如下:水温为6~10 $^\circ\text{C}$;光强为20~100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (自然光);海水中含 NO_3^- 40 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, PO_4^{3-} 4 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 。培育过程中,我们以大生产常规方法培育的海带幼苗(7月26日采苗)为对照,进行了比较。

2.5 成熟孢子体经济性状的遗传性分析

10月26日将培育幼苗移到威海内湾进行海上养殖,以同一海区的养殖品系为对照,尽量保证养殖条件的一致性。1999年4月20日对其中的一个组合和对照组的成熟孢子体的经济性状(叶长、叶宽)进行了测量,每一组合取30棵,并根据公式: $t = |x_1 - x_2| / \sqrt{s_1/n_1 + s_2/n_2}$, 变异系数等于标准差除以平均数,其中 t 为显著度。对配子体克隆培育的种苗和对照海带的成熟孢子体的叶长及叶宽的遗传性进行了统计分析。

3 结果和讨论

3.1 海带单克隆无性繁殖系的建立和培养

游孢子附着后, 3 d 即形成配子体, 在显微镜下根据细胞的大小能分辨出雌、雄配子体. 雌配子体细胞较大, 颜色较深; 雄配子体细胞较小, 颜色较浅. GeO_2 能够有效地抑制硅藻的数量, 确保成功地分离无硅藻污染的单细胞配子体. 1 个月后, 配子体形成肉眼可见的小球, 即形成单克隆无性繁殖系(见图版 iv). 分离培养的海带雌、雄配子体在一定条件下, 能够比较长时间地进行营养生长而不发育, 在某些物理化学条件, 如维生素 C 的处理, 低温、连续光照和较高温度(18~ 22 °C)等可促进营养生长^[4]. 根据反复实验, 我们采用 PES 培养液、较高温度(18 °C)、长日照(16 h)和中等光强[60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]的培养条件, 使克隆无性系较快地营养生长, 以获得进行生产性育苗所需的生物量. 在每次更换培养液时将复杂分枝体撕开, 分成小的分枝, 能够使细胞获得充足的营养和光照, 加速其生长.

3.2 幼苗的培育

育苗 10 d 后即发现幼孢子体(见图版 ㉔), 培养的光强和生产一样逐渐增强, 以满足幼孢子体的生长. 30 d 后幼苗的长度为 0.5~ 1.0 cm(图版 ㉕). 1998 年 10 月 12 日, 利用海带配子体克隆培育的 9 个生产苗帘通过了专家组的验收, 得出了以下结论: (1) 应用单克隆无性繁殖系培育海带幼苗是可行的; 在合适的条件下幼苗只需 40~ 50 d 即可快速生长到长度为 1.5~ 2.0 cm, 达到出库标准, 可使育苗时间减少至常规育苗的 50%; (2) 应用不同的单克隆无性繁殖系进行品系间交配是可能的, 交配后所产生的子代幼孢子体在生长速度上已表现出不同, 这将是筛选优良个体的基础, 应用无性繁殖系育种, 只需 2 a 时间即可筛选出优良个体, 在时间上远比经典育种法所需的 5 a 时间短.

在生产条件下幼苗培育的结果如表 1, 从表 1 中可以看到, 利用海带配子体克隆育苗是可行的, 这项技术可以缩短幼苗的培育时间, 幼苗只需要 45 d 即可长到长度为 2.0~ 2.5 cm, 达到出库标准, 而利用常规的采孢子的方法幼苗达到出库标准则需要 80~ 120 d.

表 1 海带配子体克隆育苗和常规方法育苗比较

培育时间/d	常规方法育苗	单克隆育苗	培育时间/d	常规方法育苗	单克隆育苗
8	配子体	配子体及 1~ 2 个细胞的孢子体	25	0.5~ 1.0 mm 的幼孢子体	1.0~ 2.0 mm 的幼孢子体
10	配子体	2~ 30 个细胞的孢子体	45	0.5~ 0.8 cm 的幼孢子体	2.0~ 2.5 cm 的幼孢子体
15	2~ 8 个细胞孢子体	50~ 100 个细胞的孢子体			

我国目前海带夏苗培育方法的主要特点是低温、自然光和流水培育. 降低培育海水的温度, 是夏苗生产的最大一项开支, 以 8 亿生产量的海带育苗场来说, 每天的制冷费用是 7 000 元左右, 一个生产季节制冷费用高达 70~ 80 万元(个人交流). 如果像南方一些育苗场采用大水量、大流量法育苗, 降温费更高^[3]. 因此, 如何缩短室内低温培育时间或适当提高培育水温, 一直是改进海带夏苗生产工艺的一个重要课题. 海带夏苗的培育时间是处于采孢子和幼苗出库(下海)之间的室内培育时间, 可以说这段时间决定于自然海水的温度. 因为人工筏养的海带

从 4~7 月都有可能成熟,在这期间要得到足够的种海带并不困难.为了缩短室内低温育苗时间,生产上尽量推迟采孢子,但当海水温度上升到 21℃左右时,必须采孢子了,在北方大约在 7 月中下旬,否则当自然海水温度上升至 23℃时^[2],不仅游孢子的活力减弱,而且放散量显著减少,孢子的附着量达不到生产要求,严重影响育苗效果.室内培育的幼苗必须待到秋季,在北方大约是 10 月中下旬,自然海水温度降到 20℃以下才能出库.高于 20℃下海,幼苗脱落严重,死亡率高.因此,海带夏苗的培育时间北方一般在 3 个月左右,在南方时间更长.

海带夏苗的室内培育是一种集约式的生物培养方式,其生产的关键是低温条件.低温加上较弱的光照,可以抑制杂藻的繁生,防止某些病害的发生,并控制海带幼体的生长,以待自然水温的下降,所以在育苗生产中给予幼体的低温光照并不是其生长发育所需要的最适温度和光照.因为需要控制幼体的生长,实际生产所给予的温度和光照比海带幼体生长发育所需要的最适温度和光照要低得多.如果生产上能给予幼苗最适培养条件,那么从采孢子到幼苗长到 1 cm 需要约 40 d 左右.如果在 7 月中下旬采苗后,就可给予最适培养条件,那么到 8 月底至 9 月中,幼苗就能长到出库标准^[3].但是这时正是自然水温的高温期自然水温要下降到 20℃以下幼苗才能出库.在北方的海区要到 10 月中旬,在南方的海区则要到 11 月下旬至 12 月上旬.不能出库下海养殖的幼苗,只能用低温和低光照来控制幼体的生长.室内培育条件满足不了幼苗生长的需要,长时间的培养使得一些微生物(如褐藻酸降解菌等)大量繁生,就可能发生病害.目前海带幼苗培育中危害最大的脱苗、烂苗病多发生在育苗后期,这可能就是这种原因造成的.我们在实验中培育幼苗的光强一直比对照高,因而促进了幼苗的生长,这是培育时间缩短的真正原因.

利用配子体克隆育苗时前期克隆在实验室集约培养,附苗时间不受限制,可以在 9 月初附苗,给予幼苗适合的培养条件(温度和光强),到 10 月底即可达到出库标准.培育时间可缩减到原来的 50%,培育温度也可以提高到幼孢子体生长的合适温度 10℃左右,这样可以大幅度地降低成本.以北方 8 亿生产量的育苗场为例,采用配子体克隆育苗,制冷费用可由原来的 70~80 万元降到 40 万元左右.培育时间的缩短又能在一定程度上防止病害的发生.因此,这项技术的成功无疑对海带种苗生产工艺的改革具有重要的意义.

3.3 单克隆培育的孢子体的遗传性分析

从理论上说,单克隆无性繁殖系来自一个细胞,具有一致的遗传性,用其培育的孢子体应具有性状分离度低的优点^[5],从表 2 中的数据可以看出,利用单克隆培育出的孢子体叶长和叶宽的分布更加集中,其变异系数远小于对照组,其子代孢子体形态非常均一、相似(见图版 ⑤).因此,将育苗技术与育种结合起来,能够确保遗传相对稳定,加速良种的推广进程.利用不同的品系进行交配育种,海上养殖后测量成熟孢子体各项生长指标证实了这种育种技术也是行之有效的,此项结果将在另外的报告中阐述.

表 2 配子体克隆培育品系和对照品系叶长和叶宽的遗传性

品系	棵数	平均叶长正或负标准差/cm		平均叶宽正或负标准差/cm			
		t	变异系数(%)	t	变异系数(%)		
Wh860(♀ × ♂)	30	352 ± 23	4.2	7.1	37 ± 3.12	15.5	8.4
Wh860♀ × Lid ♂	30	397 ± 26	30.5	7.3	41 ± 3.36	30.8	8.2
对照组(荣海)	30	345 ± 44		14.3	34 ± 4.88		14.4

参考文献:

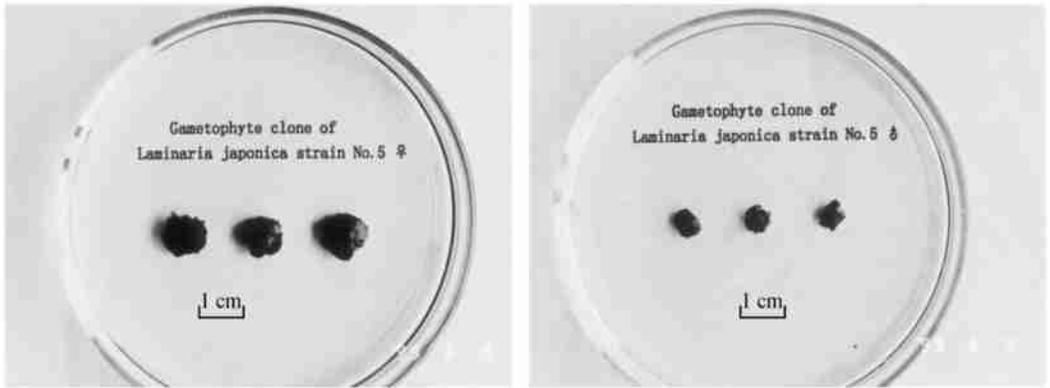
- [1] WU Chao-yuan. The seaweed resources of China[A]. ALAN T Critchley, MASAO Ohno. Seaweed Resources of the World [M]. Japan: International Cooperation Agency (JICA). 1998.
- [2] 索如瑛, 刘德厚, 田铸平. 海带养殖[M]. 北京: 农业出版社, 1988. 1—46.
- [3] 缪国荣, 陈家鑫, 刘启顺. 4-碘苯氧乙酸在海带夏苗培育中的应用[J]. 山东海洋学院学报, 1986, 16(4): 194—198.
- [4] 方宗熙, 欧琉麟, 崔竞进, 等. 海带单倍体遗传育种的实验[J]. 中国科学, 1978, 2: 226—231.
- [5] LI Da-peng, ZHOU Zhi-Gang, LIU Hai-hang, et al. A new method of *Laminaria japonica* strain selection and sporeling raising by the use of gametophyte clones[J]. Hydrobiologia, 1999, 398/399: 473—476.
- [6] PROVASOLI L. Media and prospects for cultivation of marine algae[A]. WATANABE A, HATTORI A. Cultures and Collections of Algae[M]. Tokyo: Japanese Society of Plant Physiology, 1968. 47—49.
- [7] LÜNING K, NEUSHUL M. Light and temperature demands for growth and reproduction of *Laminaria* gametophyte in southern and central California[J]. Mar Biol, 1978, 45: 297—309.
- [8] 李大鹏, 刘海航, 彭光, 等. 日本品系裙带菜无性繁殖系生产性育苗技术[J]. 海洋科学, 1998, (5): 4—5.
- [9] ZHOU Zhi-gang, LI Da-peng, Wu Chao-yuan, et al. *Laminaria* gametophyte clone culture and its application in sporeling cultivation[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2000, 19(2): 89—95.

A new technology of *Laminaria japonica* sporeling culture by the use of gametophyte clones

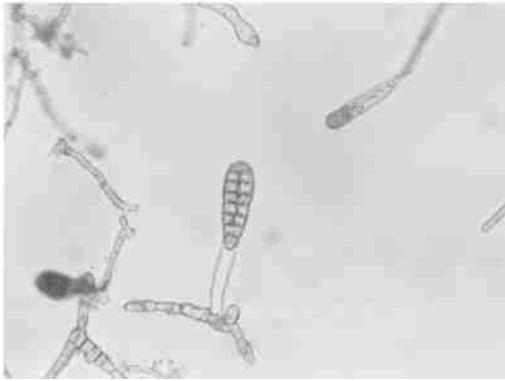
LI Da-peng¹, WU Chao-yuan¹, LIU Wan-cang², QI Ke-tai², XIA Jun-zhuang²

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Weihai Aquaculture Development Corporation, Weihai 264201, China)

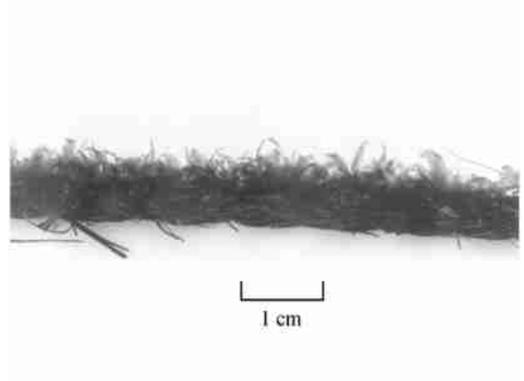
Key words: *Laminaria japonica*; gametophyte clone sporeling raising; subject classification number



图版 iv 海带雌、雄单倍体克隆



图版 ㉔ 培育第 10 天显微镜下的幼孢子体



图版 ㉕ 培育 30 d 的海带幼苗



图版 ㉖ 单克隆无性繁殖系产生的 2 个子代孢子体(高度相似)