

# 海带配子体克隆细胞附着的初步研究

刘 涛<sup>1</sup>, 王晓梅<sup>1</sup>, 宋洪泽<sup>2</sup>, 崔竞进<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学 海洋生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2 荣成海兴水产有限公司, 山东 荣成 264317)

关键词: 海带; 配子体克隆; 育苗; 附着

中图分类号: Q813.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-4193(2005)05-0177-03

## 1 引言

海带是我国海水养殖主要品种之一, 其综合应用价值较高<sup>[1]</sup>. 20 世纪 90 年代末期, 海带配子体克隆在海带苗种繁育中的应用, 为海带育苗生产开辟了新途径<sup>[2]</sup>. 主要运用生长发育调控技术实现海带配子体克隆细胞大量扩增和同步成熟来繁育海带优良苗种, 这样可大幅度降低育苗成本, 缩短育苗周期, 该项技术具有良好的应用前景.

目前海带配子体克隆育苗技术尚未在海带育苗生产中得到规模化应用, 其作为一项高新技术, 部分关键技术仍有待进一步解决. 在与有关生产单位进行海带配子体克隆育苗实验的工作中, 笔者认为克隆细胞的附着是影响海带商品苗质量(出苗密度及出苗均匀程度)的关键问题之一. 在紫菜等大型海藻的体细胞苗种繁育生产技术研究中, 也存在着这一问题. 韩宝芹等<sup>[3]</sup>就激素对海带配子体克隆细胞附着的影响进行研究, 但有关海带配子体克隆附着时间及附着基质状态对细胞附着密度的影响尚未见报道. 笔者就海带配子体克隆苗种繁育工作中的克隆附着时间、附着基质条件进行了初步实验, 为海带配子体克隆苗种繁育技术的生产应用提供实验依据.

## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料

本实验所用海带配子体克隆为中国海洋大学海带种质库提供.

### 2.2 克隆细胞粉碎方法

用超声波粉碎法<sup>[1]</sup>将配子体克隆簇粉碎, 用筛绢过滤为每个体 1~3 个细胞, 雌雄配子按照 1:1 进行混合制成细胞悬液<sup>[4]</sup>.

### 2.3 培养条件

温度为 8~12℃; 光强为 3 000 lx; 光周期为 12L:12D; 培养液: 消毒海水; 营养盐( $\text{NO}_3 - \text{N}$  16 mg/dm<sup>3</sup>,  $\text{PO}_4 - \text{P}$  1 mg/dm<sup>3</sup>).

### 2.4 实验用具

将筛绢(400 目)裁成小块(规格为 2 cm × 2 cm), 用橡皮筋缚在载玻片上, 用于克隆附着时间实验.

对于固定化基质采用自然基质和藻胶帘, 其中自然基质按处理条件分为干燥帘、湿润帘和浸水帘三种. 藻胶帘是将棕帘浸于 3% 的褐藻酸钠溶液 2 h 后取出晾干制成.

### 2.5 实验方法

#### 2.5.1 海带配子体克隆细胞附着时间实验

用喷雾器将海带配子体克隆细胞悬液(细胞密度为  $1.2 \times 10^5$  个/cm<sup>3</sup>)喷洒在缚筛绢的载玻片上, 经过 0.25, 0.5, 1, 3, 5 h 后放入消毒海水中用力涮洗, 然后镜检细胞附着数量. 实验重复三次取平均值.

#### 2.5.2 海带配子体克隆细胞附着基质实验

用喷雾器将海带配子体克隆细胞悬液(细胞密度为  $1.2 \times 10^5$  个/cm<sup>3</sup>)均匀喷洒在附着基质上, 细胞溶液用量约为 12 cm<sup>3</sup>. 完成喷苗后需在放置苗帘的托盘中加入少量海水, 并用保鲜膜包裹托盘, 以防

收稿日期: 2004-07-17; 修订日期: 2004-11-07

基金项目: 国家“863”计划; 山东省科技兴海资助项目; 福建省科技攻关资助项目; 中国海洋大学理科基金资助项目.

作者简介: 刘 涛(1975—), 男, 黑龙江省牡丹江市人, 工程师, 从事大型海藻遗传育种研究. E-mail: liutao@ouc.edu.cn

止水分蒸发. 将托盘放置于低温室中培养, 24h 后取少量棕丝置于显微镜下镜检, 对每一根棕丝累计观察 5 个视野(显微镜放大倍数为  $15 \times 20$ ), 共统计 5 根棕丝. 观察后在托盘中加入  $300 \text{ cm}^3$  海水培养液进行培养, 实验数据均为三次重复实验的平均值.

### 3 实验结果和讨论

由图 1 所示, 海带配子体克隆细胞的附着效果在 3 h 时达到最大, 平均达到了每视野 16.6 个体, 考虑到不同实验中的细胞浓度略有差异, 可认为该实验结果是比较稳定的. 细胞附着时间在 0.25~1.00 h, 细胞附着有可能不充分, 因此在涮洗后, 附着细胞数量明显减少. 附着 5 h 后, 克隆细胞附着量下降的情况可能与克隆细胞自身生理活动有关, 这尚有待于进一步探索.

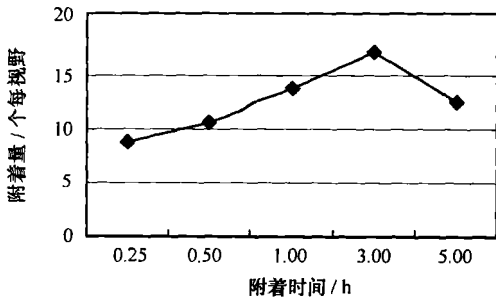


图 1 海带配子体克隆细胞附着时间实验

四种附着基质的海带配子体克隆细胞附着量由大到小的顺序依次是藻胶帘、干燥帘、湿润帘、浸水帘(图 2), 其中在藻胶帘 3 次实验中克隆细胞平均附着数量为每视野 77.9 个细胞, 高于浸水帘、湿润帘和干燥帘的细胞附着量 1 倍以上, 其细胞附着密度与所制成克隆细胞悬液的细胞浓度有关. 褐藻酸钠本身就是海带等褐藻类细胞壁的主要成分之一, 本实验结果显示, 其对海带配子体克隆细胞的附着有明显的促进作用. 利用褐藻酸钠作为固载体在生物固定化研究中已得到了广泛的应用<sup>[5,6]</sup>, 将其应用于海带配子体克隆育苗中是一次有益的尝试, 且取得了较好的实验效果, 但在实际生产中, 有两个问题值得注意: 首先是育苗成本问题, 应用褐藻酸钠作为固化剂势必造成育苗成本增加; 其次, 海带育苗循环水体中存在褐藻酸钠

的情况下, 给褐藻酸降解菌大量繁殖提供有利条件, 有可能导致病害发生<sup>[7]</sup>. 从本实验来看, 干燥苗帘上克隆细胞平均附着量为每视野 36.9 个细胞(显微镜放大倍数为  $15 \times 20$ ), 已完全达到了常规海带孢子体育苗生产的采苗要求, 可以应用于育苗生产.

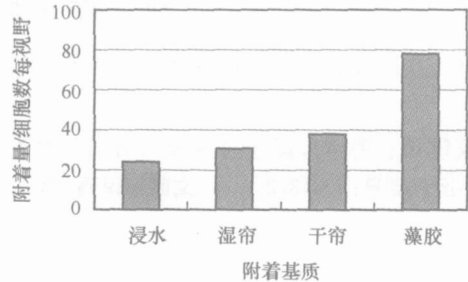


图 2 附着基质实验

目前在海带人工育苗生产中, 配子体附着主要是通过游孢子附着实现的. 海带游孢子自孢子囊释放后, 在育苗水体中进行自由游动, 当遇到育苗基质时, 通过游孢子细胞表面的纤维蛋白或细胞外产物发生一系列的复杂反应, 从而附着到基质上. 另外, 在海带育苗生产中也可遇到由海带孢子囊放散不动孢子的情况, 不动孢子主要是靠重力作用自然沉降并附着到育苗基质上, 附着机理与细胞外物质的分泌有关. 笔者认为这种情况应与海带配子体克隆细胞附着机理相同, 即主要是通过细胞外产物与育苗基质的粘连使细胞附着.

海带配子体克隆细胞附着效果与附着细胞密度也有一定的关系, 为提高育苗效率, 最好是采用高密度细胞悬液喷洒附着的方式, 尽量减少重复附着次数, 以减少育苗生产操作. 另外, 海带配子体克隆一般是多细胞的分枝体, 在进行附着时, 通常需要将克隆细胞分枝体粉碎, 其分枝体大小(即细胞数)对附着效果也有较大的影响. 实验发现, 多细胞分枝体通常只有 1~2 个细胞附着在育苗基质上, 而其余细胞仍悬浮在培养液中, 在附着基质搬运及清洗过程中, 分枝体很容易从基质上脱落. 在本实验中, 采用了超声波法进行海带配子体克隆分枝体的粉碎, 使其分枝体细胞数量为 1~3 个(单细胞数量 60% 以上), 取得了较好的附着效果.

#### 参考文献:

- [1] 刘涛, 崔竞进, 戴继勋, 等. 海带配子体克隆的培养与应用[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 203—206.
- [2] 方宗熙, 欧毓麟, 崔竞进, 等. 海带配子体无性繁殖系培育成功[J]. 科学通报, 1978, 30(2): 115—116.

- [3] 韩宝芹, 崔竞进, 刘 涛, 等. 植物激素对海带配子体克隆附着的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(4): 627—630.
- [4] 刘 涛, 朱明壮, 包振民, 等. 超声波对海带配子体克隆的作用[J]. 海洋湖沼通报, 2000, (4): 37—40.
- [5] 张克旭, 张永志. 用海藻酸钙固定化赖氨酸菌增殖细胞的初步研究[J]. 生物工程学报, 1986, 2(3): 66—69.
- [6] 张学成, 仵小南, 李永红. 固定化培养对亚心形扁藻生理功能及超微结构的影响[J]. 海洋学报, 1994, 16(4): 97—101.
- [7] 丁美丽. 环境因子对褐藻酸降解菌引起的海带病烂影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1990, 12(2): 225—230.

## The pilot study of adhesion gametophyte clonal cell in *Laminaria*

LIU Tao<sup>1</sup>, WANG Xiaomei<sup>1</sup>, SONG Hongze<sup>2</sup>, CUI Jingjin<sup>1</sup>

(1 *Ocean University of China*, Qingdao 266003, China; 2 *Rongcheng Haixing Aquatic Products Co, Ltd*, Rongcheng 264317, China)

**Key words:** *Laminaria*; gametophyte clone; seedling; adhesion