

条斑紫菜细胞直接附网育苗和下海养殖试验

ON THE BREEDING WITH CELLS ATTACHING NETS DIRECTLY IN *PORPHYRA YEZOENSIS* AND CULTURING THEM IN SEA FIELD

王素娟 何培民

(上海水产大学水产养殖系, 200090)

Wang Su-juan and He Pei-ming

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

关键词 条斑紫菜, 细胞, 育苗, 海上养殖

KEYWORDS *Porphyra yezoensis*, cells, breeding, cultured in sea field

到目前为止, 已从紫菜属中的条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)^[4,8,14,16]、坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)、圆紫菜(*Porphyra suborbiculata*)^[10]、铁钉紫菜(*Porphyra ishigeocola*)^[2]、玫瑰紫菜(*Porphyra perforata*)^[15]和朱红紫菜(*Porphyra miniata*)^[13]等六种紫菜分离到原生质体或体细胞, 并再生成株, 说明紫菜的体细胞有着极强的再生能力。

随着海藻生物工程的研究与发展, 我国藻类工作者力求应用生物技术来改革周期长而又十分繁杂的紫菜传统育苗方法, 利用紫菜体细胞再生能力强的特点, 建立起紫菜体细胞育苗技术。赵焕登(1984)^[9]最早开始这项技术的研究, 通过机械磨碎法获得条斑紫菜单细胞, 并用筛绢附着进行育苗。随后, 方宗熙等(1986)^[11]、王素娟等(1987)^[13]和戴继勋等(1988)^[12]应用酶解技术对条斑紫菜及坛紫菜进行了体细胞育苗的尝试, 但未曾进行过深入的研究。我们在较详细地研究了条斑紫菜体细胞的发育途径及各种外界条件对其体细胞发育的影响后, 重新认识到用条斑紫菜进行体细胞育苗是大有潜力可挖的。条斑紫菜大多数体细胞先分裂为细胞团, 再由细胞团释放孢子萌发成苗。因此, 只要能充分利用条斑紫菜体细胞形成细胞团而放散出大量孢子, 则可弥补苗下海时由海浪冲击掉苗的损失, 从而可使苗的密度及紫菜产量达到养殖生产的要求。本实验就是在上述研究的基础上, 进一步探讨了条斑紫菜体细胞育苗技术, 力求使这项技术向实用化迈进一步。

1 材料与方法

1.1 种藻来源

本实验用的条斑紫菜为1988年4月采集于江苏启东, 经阴干后, 用薄膜袋密封冷藏于-20℃冰箱中存用。

1.2 单细胞制备

取0.5g紫菜放在海水中复苏三天, 除去叶状体的边缘, 并用消毒海水洗刷三遍, 以除去杂藻, 然后切成约2mm²的小块, 放入5ml 3%海螺酶液。酶由青岛生化制药厂提供, 其酶溶剂为2M葡萄糖液, 酶液的pH为6.5, 在24-26℃下保温酶解3小时。酶解结束后, 过400目镍丝网筛, 滤液以500转/分离心5分钟, 除去上层酶液, 用1.030比重海水洗涤离心3次, 最后收集细胞于烧杯中。

1.3 细胞附网

1992-09-03收到

收集的细胞,加比重为1.030海水至一定量,计数并配制浓度为 4×10^6 细胞/ml的细胞液,用100ml细胞液均匀地滴洒在30m长的网绳板上。网绳板是由维尼仑绳单层缠绕在 $25 \times 30\text{cm}^2$ 有机玻璃方框上做成的。滴洒完后把网绳板放入兰色塑料箱中,并加1.025比重的MES液进行培养。

1.4 室内培养条件

温度 $20^\circ\text{C} \pm 2$,光照周期为12:12小时光暗比,光源为荧光灯,光强2500-3000 lux。

1.5 海上养殖。

细胞网绳板经一定时间培养,可肉眼见苗,把网绳做成 $2 \times 2.5\text{m}$ 条形网帘,放入江苏吕泗海丰村海区的紫菜养殖架上进行养殖。

2 结果与讨论

2.1 室内育苗

用条斑紫菜体细胞进行育苗,其苗源来自体细胞发育的主要两种途径。其一,一些体细胞可直接分裂形成小苗,这类苗称为单细胞苗。其二,大多数体细胞先分裂成细胞团,再由细胞团释放孢子,孢子萌发成小苗,这种苗称为孢子苗。这两种苗总称为细胞苗(图版1-5)。

单细胞苗一般在培养的第4—6天开始出现,而孢子苗一般要在第9—16天开始出现,孢子苗出现的早与迟,与细胞从酶液出来时的状态以及培养条件有关系。表1显示了单细胞苗和孢子苗开始出现的时间,从表中可看出单细胞苗平均是在培养的第5.4天始出苗,而孢子苗平均要在12.6天出苗。

表1 单细胞苗和孢子苗开始出现的时间

Table 1 Times of single cell seedlings and sporelings starting to form

实验组	I	II	III	IV	V	平均天数
单细胞苗	第5天	第4天	第6天	第6天	第6天	5.4
孢子苗	第11天	第9天	第16天	第15天	第12天	12.6

单细胞苗和孢子苗出苗时间都不同步,从开始到结束,一般都要延续10—30天左右时间,而且两者的苗量比例差别较大。表2显示了单细胞苗和孢子苗在培养一定时间后的苗率情况。从表2可看出,单细胞苗平均占总苗量的31.8%。孢子苗平均占总苗量的68.2%。

表2 培养20天左右的单细胞苗和孢子苗的苗率情况

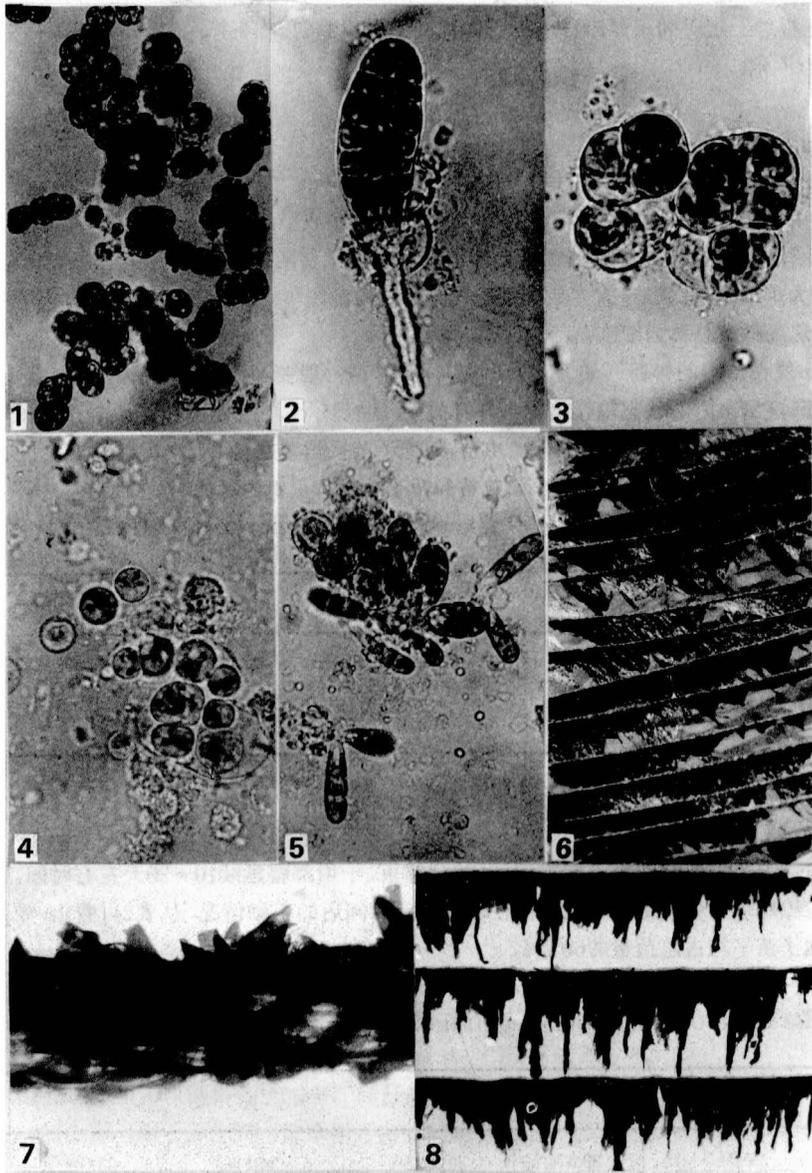
Table 2 The ratio of single cell seedlings and sporelings cultured after about 20 days

实验组	I	II	III	IV	V	平均
单细胞苗	29.2%	29.5%	42.3%	24.1%	33.8%	31.8%
孢子苗	70.8%	70.5%	57.7%	75.9%	66.2%	68.2%

从上述结果可得知,孢子苗是细胞苗的主要来源,其开始出苗时间平均为12天左右,因此,只要育苗时间长于这天数,则可利用到孢子苗,大大提高苗的密度,而且,随着时间的延长细胞团不断放散大量孢子,苗的密度越来越大,图1说明了这一点。

2.2 育苗时间与苗密度关系

我们于1988年分五批进行了用条斑紫菜细胞直接附网育苗试验,共育苗14只网(见表3),平均培养20天左右,便能肉眼见苗(其苗最长达0.1 mm),其中最快能在第15天见苗,苗密度都在250-320棵苗/cm范围内,这远超过了养殖生产上的密度要求,说明条斑紫菜细胞育苗这一技术确实可行。



图版 Plate

1 从叶状体酶解出来的细胞($\times 200$) 2 由单细胞形成的单细胞苗($\times 400$) 3 细胞分裂为细胞团($\times 400$) 4 细胞团释放孢子($\times 400$) 5 孢子萌发形成孢子苗($\times 200$) 6 在海上养殖的细胞苗网 7 附着在维尼仑绳上的细胞苗 8 细胞苗在海上养殖15天后可生长达10-15cm

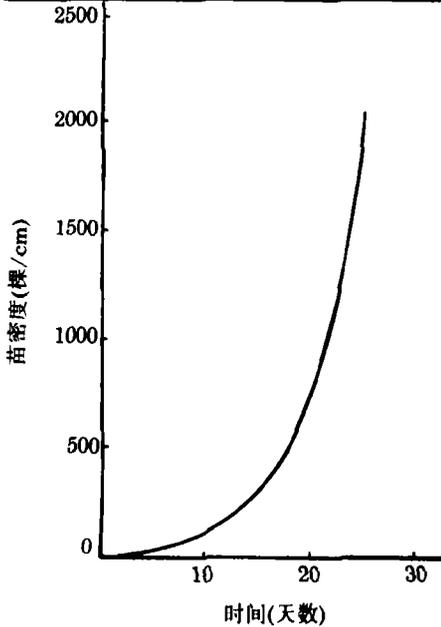


图1 细胞苗网在室内培养下苗密度的变化。

Fig.1 Changes of the density of seedlings on net cultured indoor within 1—25 days

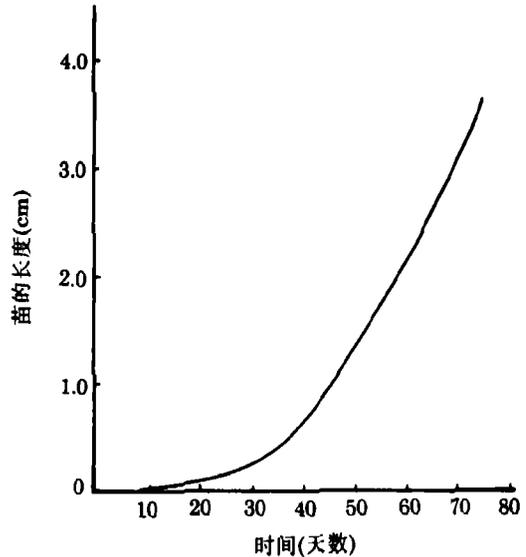


图2 细胞苗网在室内培养下苗生长情况

Fig.2 Growth of Seedlings on net cultured indoor

表3 室内细胞直接附网育苗

Table 3 Breeding with cells attaching nets directly indoor

	附网日期	育苗网数 (只)	每网细胞量 (万)	肉眼见苗天数 (天)	最大苗长 (mm)	苗密度 (棵苗/cm)
第一批	7月5日	2	3000	25	0.1	280
第二批	7月8日	4	3500	21	0.1	310
第三批	7月20日	3	4000	22	0.1	250
第四批	8月4日	3	3500	16	0.1	320
第五批	9月2日	2	3500	15	0.1	300
平均				19.8		292

从图1可看出,随着培养时间的延长,细胞苗网的平均密度成指数增加。前10天内,苗的密度为160多棵苗/cm,这些苗多数是由单细胞直接形成的细胞苗;第20天时,苗的密度提高到850多棵苗/cm,为前10天的5.4倍;第25天,苗密度则高达2000多棵苗/cm;说明第10天后,细胞团开始逐步大量放散孢子以及小苗本身具有放散单孢子的特点,众多的孢子苗及单孢子苗出现,使得苗的密度大幅度提高,且随着育苗的时间增长,苗的密度越来越高。这充分说明,用条斑紫菜细胞育苗,其苗密度是完全可达到生产要求的,即使当苗网放下海养殖时,由于海浪的冲击会损失掉一部分苗,但我们认为,由于细胞团陆续地放散的大量孢子形成众多的孢子苗以及幼苗大量放散单孢子形成的单孢子苗^[6,7]是足以弥补掉这部分苗损失的,而且孢子苗及单孢子苗比单细胞苗的附着能力强,不易被海浪冲击掉,其苗密度还是能够达到生产要求的。

图2示细胞苗在室内培养的生长曲线,从图中可看出生长曲线为抛物线状。细胞苗在培养的前30天内,生长

较慢,第30天,其苗长仅为0.25cm,此后,苗的生长速度逐渐加快,

2.3 海上养殖

经室内培养一定时间后的11个苗网,分2批放下海进行养殖(见表4)。第一批下海时间为1988年9月23日,共6个苗网,其时日平均海水温度为22℃,下海时苗长为0.1—1cm。而当地养殖生产单位用传统式青菜的苗网刚开始下海,其苗最多也只有几个细胞,故这一批我们没有放空白对照网。第二批苗网有4个网,于1988年10月17日下海,当时日平均水温为19℃。

表4 苗网在海上养殖情况

Table 4 Seedlings on nets cultured in sea field

编号	采苗日期	培养天数	下海日期	当时水温 (℃)	当时密度 (棵苗/cm)	下海后密度 (棵苗/cm)	长30cm 天数	
第 一 批	1	7月8日	70	9月23日	22	500	650	30
	2	7月8日	46	9月23日	22	500	350	30
	3	7月20日	58	9月23日	22	500	600	30
	4	8月4日	43	9月23日	22	500	648	30
	5	9月2日	15	9月23日	22	310	432	30
	6	9月2日	15	9月23日	22	290	400	35
第 二 批	7	7月20日	87	10月17日	19	600	25	60
	8	8月4日	73	10月17日	19	600	36	60
	9	8月4日	73	10月17日	19	600	36	60
	10	9月7日	40	10月17日	19	400	72	40

从表4可看出,第一批苗网下海4天后,每网进行抽样检查计数,除2号冷冻苗网外,其它苗网的苗密度都有所增加,其增加幅度为80—150棵苗/cm,特别值得一提的是5、6号网,室内育苗天数最短,只有15天,且苗密度分别由310、290棵苗/cm,提高到432、400棵苗/cm。这说明室内育苗只需15天便可放入海上养殖。2号网是冷冻网(冷冻日期8月24日),在46天育苗后,经30天的-20℃低温冷冻处理,下海后,其苗密度由500棵苗/cm降为350棵苗/cm,但这密度并不影响紫菜的长势和产量。第二批苗网下海15天后,掉苗严重,其苗密度平均只为25-72棵苗/cm,平均苗密度十分不均匀,有许多地方出现大段的空白,随后被绿藻浒苔所占据,其空白对照网也被浒苔所占领,原因可能是天气寒冷,当时水温已不大适宜细胞苗网下海养殖。从表4中还可看出,7号网育苗87天,由600多棵苗/cm下降到25棵苗/cm,掉苗率达95.7%。8号网掉苗率为94.0%。10号网育苗40天,下海掉苗率为82.0%。这说明掉苗与苗网下海时温度室内育苗时间过长有一定的关系。从表4还可看出,第一批苗下海养殖30-35天,细胞苗便可长到30cm长,第二批苗则需要60天才能长到30cm长,平均每天可生长0.5-1.0cm。而如果在室内培养,最多只能每天生长0.1cm,苗在海上养殖的生长速度是室内培养的5-10倍,可见海上的自然环境适宜紫菜的生长。因此,细胞苗网下海越早,其苗生长越好。另外,从第一批苗下海的生长结果也说明了这一点。不论是1号网其苗最长达1cm,还是刚肉眼见苗的5、6号网,下海25天后,两者的苗长度都为15cm左右;第30天时最长的苗都可达30cm左右(见图版6-8)。可见只要在室内育苗时间达15天以上,下海后其苗生长速度都相差不大。从育苗的实用化角度来看,在室内培养的时间越短,成本越低,因此,在保证苗密度达生产要求的前提下,条斑紫菜细胞育苗在室内培养15天左右效果最佳。

第一批苗网下海25天左右即10月17日,其紫菜长度已达15cm左右,已达收割要求,当地的传统苗只有2-4cm,一般要在12月初开始收割。由于当时气温反常升高,为16-20℃,紫菜生长极为旺盛,也正是大量放散孢子的时候,藻体结构松散,极易被海浪打断。据不完全统计,在近一个月的时间里(1988年10月17日-11月13日)曾发生断苗现象5-6次。

3 结 语

从我们这次用条斑紫菜单细胞直接附网育苗及下海养殖试验的结果看,第一批苗网的苗密度及产量(评估)都能达到养殖生产上的要求,说明利用条斑紫菜体细胞苗及形成细胞团释放孢子的孢子苗进行体细胞水平育苗是可行的。但此法育苗占地面积较大,这有待于进一步研究和完善这一新技术。

参 考 文 献

- [1] 方宗熙等,1986.紫菜营养细胞的酶法分离和在水产养殖中的应用,海洋科学,10(3):46-47.
- [2] 王素娟等,1986.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究, I.海洋与湖沼,17(3):217-221.
- [3] ——,1987.坛紫菜营养细胞和原生质体培养研究, II.直接育苗下海养殖实验研究,海洋科学,11(1):1-7.
- [4] 卢澄清等,1983.紫菜叶状体营养细胞的研究. I. 条斑紫菜营养细胞的分离,培养和长成小紫菜的观察.第一届中国藻类学术讨论会论文集,45-49.科学出版社.
- [5] 严兴洪,王素娟,1989.坛紫菜体细胞的分化发育研究,海洋科学,(6):28-32.
- [6] 李世英,崔广法,1980.条斑紫菜单孢子和壳孢子幼苗生长发育的初前观察,海洋与湖沼,11(4):370-374
- [7] 李伟新等,1982.海藻学概论,30-35,上海科学技术出版社.
- [8] 赵焕登,张学成,1981.条斑紫菜 *Porphyra yezoensis* 营养细胞的分离和培养,山东海洋学院学报,11(1):61-65.
- [9] ——,1984.条斑紫菜营养细胞的分离培养试验,水产学报,8(3):197-202.
- [10] 唐延林,1982.紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养,山东海洋学院学报,12(4):37-50.
- [11] 戴继勋,包振民,1987.坛紫菜原生质体的发育研究.遗传学报,15(4):299-302.
- [12] 戴继勋等,1988.紫菜叶状体细胞的酶法分离及其养殖研究,生物工程学报,4(2):133-137.
- [13] Chen, L. C. M., 1986. Cell development of *Porphyra minitata* (Rhodophyceae) under axenic culture. *Botanica Marina* 24:435-9.
- [14] Fujita, Y. S., and Migita, 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. *Bull. Faculty of Fisheries Nagasaki Univ.* 57:39-45.
- [15] Polne-Fuller, M. and Aharon, G., 1984. Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplasts, Regeneration. *J. Phycol.* 20:609-616.
- [16] Saga, N., 1984. Isolation of protoplasts from edible seaweeds. *Bot. Mag. Tokyo*, 97(1047):432-427.