

海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导

周志刚 吴超元

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海带(*Laminaria*)是具异型世代交替的大型经济褐藻,在生活史中出现一至数个细胞组成的雌、雄配子体阶段,再由雌配子体的卵囊受精长成孢子体^[1]。现行的育苗法是在初夏采集成熟海带的游动孢子,通过其鞭毛附着育苗器上形成雌雄配子体,在低温自然光的育苗室内发育成幼孢子体度夏,待秋天温度下降后出海养殖^[2,3]。

海带的配子体在适宜的条件下被诱导可进行营养生长,形成无性繁殖系^[4]。据此设想如果能将营养生长的配子体经过诱导形成卵囊和精子囊,并且能正常受精形成孢子体,把这种方法叫做“无性繁殖系育苗法”^[5]。它的优点是免去传统育苗法的长时间度夏,节约育苗室面积,减少病害的侵染机会,降低成本,提高生产效率。为此,我们设计了海带无性繁殖系的培养和孢子体诱导实验,通过海面养殖初步证实无性繁殖系育苗法是可行的,为进一步的推广应用研究奠定良好的理论基础。

1 材料和方法

1.1 海带无性繁殖系的建立和培养

1.1.1 种海带及游孢子采集:种海带(*Laminaria japonica* Aresch)是一高产高碘 860 品系^[6]。于初夏海带成熟时,选择孢子囊群大、深褐色、具有光泽、宽、长而健壮的藻体,用灭菌的海水清洗干净,于 17 ± 1℃ 房间阴干,使之能在 PES 培养基^[7]中释放大量游孢子。

1.1.2 无性繁殖系的建立和培养:将具有大量游孢子的 PES 培养基即时倒入备有载玻片的染色缸中,使游孢子附着玻片上形成胚孢子,以日光灯作光源,在 17 ± 1℃ 和 50 μmol/m²·s 的光温条件下培养 15d 形成无性繁殖系(即克隆),显微镜下分离雌、雄性克隆分别于 PES 培养基中,在上述同样的光温条件下,连续通入过滤空气培养,每天光照 16h,每星期换培养基一次。

1.2 海带孢子体的诱导

将分别进行营养生长的雌、雄性克隆于组织匀浆机中打碎后,按雌:雄 = 1:5 的比例接种到育苗器上,于过滤灭菌海水中培养,其中含 40 μmol/L NO₃⁻ 和 4 μmol/L PO₄³⁻^[8],温度 15 ± 0.5℃,光强 80 μmol/m²·s,每天光照 10h;接种后 5d 静止培养,然后连续通入过滤空气,每星期换两次培养基,同时镜检观察孢子体的发育情况。

1.3 海面养殖

待实验室培养的幼孢子体长到 1mm,将育苗器移到海面进行培养,深度为海面下 1m,时间是 1996 年 5 月 22 日,当时水温约 15℃,每天清洗除去浮泥、杂藻等,并观察孢子体的附着及生长情况。

2 结果与讨论

2.1 海带无性繁殖系的建立与培养

海带的雌、雄配子体在适宜的条件下只进行营养生长,形成无性繁殖系^[4],不能发育成卵囊或精子

中国科学院院长基金特别支持项目,中国博士后科学基金支持项目。

收稿时间:1996-10-10;修回时间:1997-06-06。

囊,但是不同种或来自不同地方的海带,其最佳营养生长的条件不一样。曾呈奎等认为 15~20℃ 是海带配子体生长相对适宜的温度^[9],而来自加利福尼亚州中部和南部的海带,最适宜温度分别为 12℃ 和 17℃^[10]。配子体生长的适宜光强在 $10\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 以上, $60\sim 80\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 的光强下配子体长势良好^[11]。对来自加州南部的海带配子体来说, $160\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 的光强开始抑制其生长,但中部的种已不能生存^[10]。同时根据雌配子体在连续光照条件下不能形成卵囊的结果^[11],选择 17℃、 $50\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 的光温条件,以日光灯作光源 16h 的长日照来培养海带配子体,结果(见图版 I-1~4)完全可以诱导配子体只进行营养生长,形成无性繁殖系。

通过镜检观察,雌雄性无性繁殖系细胞的大小及颜色均有差别,雌性细胞大约 $10\sim 20\mu$,颜色深褐色,而雄性细胞大约只有 $5\sim 10\mu$,且颜色较淡。雄配子体形成的无性繁殖系一般都是分支丝状体(图版 I-2),与正常生活中的雄配子体在形态及细胞大小等方面无差别^[1];雌配子体形成的无性繁殖系有的是丝状体(图版 I-3),有的近似球状体(图版 I-4),而正常生活中的雌配子体只有 1~2 个细胞组成^[1],从形态上来看差别很大。

2.2 海带孢子体的诱导

曾呈奎等认为配子体发育的适宜温度在 $10\pm 5\text{C}$ ^[9]; $80\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 以上的光强及连续光照对配子体发育不利^[11]。为此,采用短光照、中等光强及低温来诱导孢子体的形成。

在孢子体的诱导实验中,雌雄配子体在第 5d 开始发育,第 8d 开始形成孢子体,33d 后的孢子体如图版 I-5~8。图版 I-5 示幼孢子体和不育的雌配子体,在幼孢子体的基部可见一非细胞结构的丝状假根,从而使孢子体附着于育苗器的棕丝上(图版 I-6 同样示假根),而不育的雌配子体不能长成这样的假根。据此认为,无性繁殖系先是以重力及自身分泌的化学物质粘附到育苗器上,发育条件适宜时,分裂初期受精卵的基部细胞就开始分化形成假根,代替了常规情况下游动孢子的鞭毛^[1]从而真正地附着到育苗器上。这时开始微通气,既补充了孢子体正常生长必要的营养成分,又及时除去育苗器上的杂物,使其均匀地接受光照,加快生长。在良好的培养条件下,孢子体细胞排列整齐(图版 I-7),丛生于育苗器上(图版 I-8)。

2.3 海面养殖

为了检验无性繁殖系形成的孢子体附着育苗器的牢固程度,我们于 1996 年 5 月 22 日,将室内培养了 33d 的海带幼苗移入青岛栈桥湾开始养殖。幼孢子体不足 1mm,下海时水温已达 15℃,尽管超过孢子体生长的高适温($10\sim 13\text{C}$)^[12],但它们忍受高温的能力较强,长势尚好,日生长 1mm 左右(图版 I-9~13)。传统养殖是夏苗低温度夏,秋季出海时水温渐渐下降至生长的最适宜温度($5\sim 10\text{C}$)^[12],生长速度很快。而我们实验的环境条件恰恰相反,水温渐渐升高,因此其生长速度慢于传统养殖情况下日生长 3cm 左右的速度^[12]。然而实验的结果证明利用无性繁殖系进行细胞工程育的苗,在海面养殖时与正常情况下的孢子体一样,可以牢固地附着育苗器,经受住海浪的冲击(图版 I-9~13)。

参 考 文 献

- 1 吴超元,索如瑛.见:曾呈奎等著,海带养殖学,北京:科学出版社,1962,pp.14~33
- 2 曾呈奎,孙国玉,吴超元.植物学报,1955,4:255~264
- 3 刘恬敬,蒋本禹.见:曾呈奎等著,海带养殖学,北京:科学出版社,1962,pp.146~155
- 4 方宗熙,耿毓麟,崔竞进等.科学通报,1978,23:115~116
- 5 王素娟主编,海藻生物技术,上海:上海科学技术出版社,1994,pp.104~111
- 6 中国科学院海洋研究所海藻遗传育种组,青岛海洋水产研究所藻类养殖组.中国科学,1976,(5):512~517
- 7 Starr R C, Zeikus J A. J Phycol, 1993, 29(Suppl):1~106
- 8 Tom D I. J Phycol, 1991, 27: 341~350

- 9 曾呈奎, 吴超元, 任国忠. 海洋与湖沼, 1962, 45: 22~28
- 10 Luning K, Neushul M. Mar Biol, 1978, 45:297~304
- 11 任国忠. 见:曾呈奎等著, 海带养殖学, 北京:科学出版社, 1962, pp.72~95
- 12 曾呈奎, 吴超元, 孙国玉. 植物学报, 1957, 6:103~130

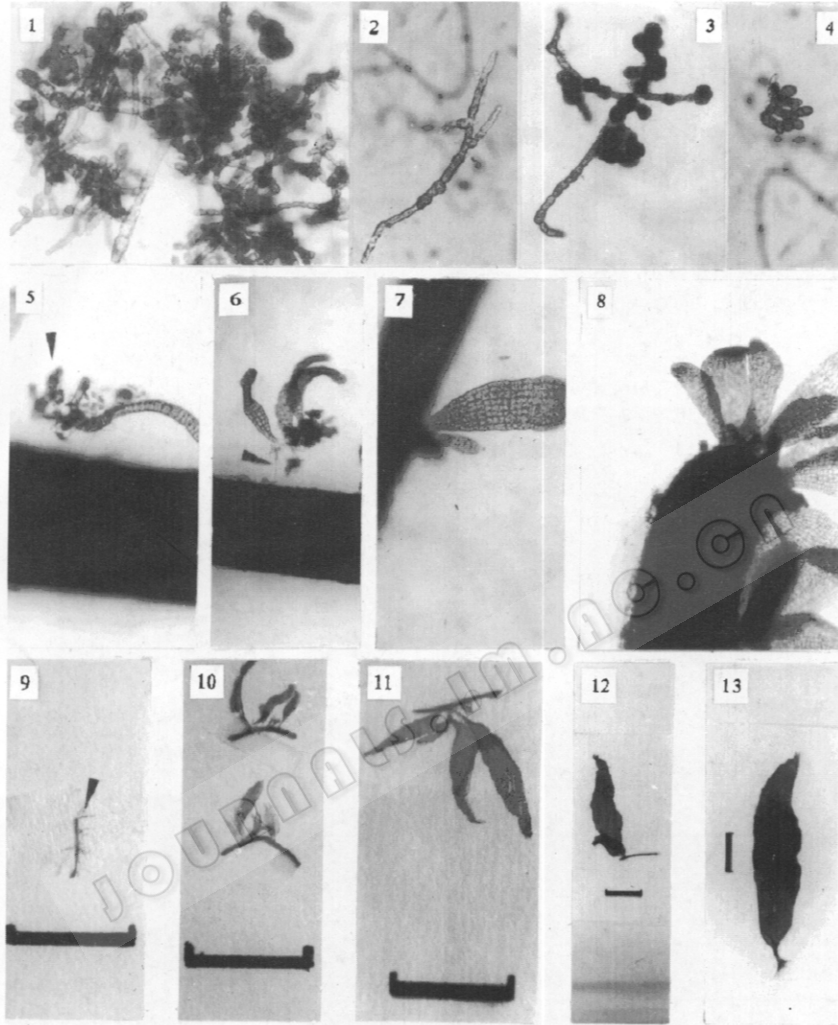
Clone Culture of *Laminaria japonica* and Induction of Its Sporophytes

Zhou Zhigang Wu Chaoyuan

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Clone formation from zoospores of *Laminaria japonica* was conducted under the conditions of 16 hours long-day photoperiod, 17°C and 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ light intensity. Reproduction and young sporophytes were induced successfully by culturing this clone at 15°C and 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ with 10h photoperiod. The result of culture at sea confirmed that the young sporophytes induced from this clone grew as well as the routine method of raising seedlings and they also could be fastened to the palm ropes by rhizoid.

Key words *Laminaria japonica*, clone, gametophytes, sporophytes



1. Clone of male and female gametophytes (80×)

2. Clone of male gametophyte (80×)

3. Filamentous clone of female gametophyte (50×)

4. Globular clone of female gametophyte (50×)

5. Developmental stage of young sporophyte (Arrow shows sterile clone of female gametophyte) (50×)

6. Arrow shows the non-cellular structure rhizoid growing from the base of young sporophyte (35×)

7. Regular cells of young sporophyte (59×)

8. Young sporophytes growing thickly on the palm rope before cultivating at sea (50×)

9-13. Young sporophytes cultivated at sea after 6, 13, 19, 29, 38 days, respectively (Bars of 9 to 13 stand for 1 cm)