

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0709 - 06

坛紫菜自由丝状体移植育苗的初步研究

孙霖清¹, 李琳¹, 刘长军², 严兴洪¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 浙江象山县水产技术推广站, 浙江 象山 315700)

摘要: 为建立有效的坛紫菜自由丝状体移植育苗技术, 以坛紫菜的 2 个选用品系“申福 1 号”和“申福 2 号”及野生型品系为实验对象, 初步研究了自由丝状体的移植量、移植后培养的光密度和温度对贝壳丝状体的生长和壳孢子放散量的影响, 结果如下: 当自由丝状体移植量为 50 ~ 500 mg/m², 随着移植量的增加, 贝壳丝状体的藻落数显著增加, 但移植量如果超过 100 mg/m², 贝壳丝状体的壳孢子放散量反而减少。培养光密度在 10 ~ 50 μmol photons/(m² · s) 范围内, 随着光密度的增加, 贝壳丝状体的生长速度明显增快, 但壳孢子的放散量却随着光密度的提高而减少。培养温度在 15 ~ 25 °C 范围内, 随着温度的升高, 贝壳丝状体的生长明显加快; 在 15 ~ 20 °C 范围内, 壳孢子放散量随着培养温度的升高而增加, 在 20 ~ 25 °C 范围内, 壳孢子放散量反而随着培养温度的升高而减少。上述结果表明, 在坛紫菜自由丝状体移植育苗中, 过大的丝状体移植量、过高的培养温度和光密度均会导致贝壳丝状体的壳孢子放散量减少。

研究亮点: 本文首次报道了利用坛紫菜自由丝状体进行贝壳移植育苗的适宜方法和培养条件, 建立了较完整的坛紫菜自由丝状体移植育苗技术。

关键词: 坛紫菜; 优良品系; 自由丝状体; 移植量; 光密度; 温度
中图分类号: S 968.43
文献标志码: A

坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 是我国特有的物种, 已有数百年的食用历史, 被广泛栽培在福建、浙江和广东沿海, 其产量约占全国紫菜产量的 75%^[1-2]。传统的坛紫菜苗种培育主要是将叶状体放散的果孢子泼洒到贝壳表面, 果孢子钻壳后萌发成贝壳丝状体, 经数月的培育, 贝壳丝状体成熟形成壳孢子囊, 并释放出壳孢子, 后者附着于养殖网帘, 下海养成大叶状体。

研究发现, 紫菜的果孢子也可以在海水中直接萌发成丝状体, 称为自由丝状体^[3-5], 紫菜自由丝状体的切碎藻丝还能重新钻入贝壳长成一个完整的藻落^[6], 利用这一特性可以将自由丝状体移植到贝壳内, 进行紫菜苗种培育^[7], 此技术被称为自由丝状体移植育苗技术。该技术由日本学者创立, 于 20 世纪 70 年代中期被我国引进, 在

坛紫菜育苗中也进行了成功试验^[8-9]。

近年来, 在秋季坛紫菜壳孢子采苗后, 经常遭遇高水温, 导致壳孢子萌发和生长不良, 给生产带来严重影响^[10]。为解决以上问题, 国内学者利用诱变和杂交等育种方式, 进行坛紫菜良种选育, 以期培育出优良品种, 提高坛紫菜的产量和质量^[11-13]。本实验室已经培育出耐高温的良种“申福 1 号”^[14-15]和优良品系“申福 2 号”, 它们具有生长快、产量高、品质好、耐高温等优点, 深受养殖者的欢迎。但是, 由于上述优良品种(系)的叶状体在海区栽培时难成熟, 无法获取果孢子作为种子。所以, 大规模栽培“申福 1 号”和“申福 2 号”时只能利用自由丝状体作为种子, 通过移植育苗技术来培育贝壳丝状体。至今, 有关坛紫菜自由丝状体移植育苗的研究较少, 本文以

收稿日期: 2012-06-21 修回日期: 2012-07-29

基金项目: 国家高科技研究发展计划(2012AA100811); 国家自然科学基金(31072208); 农业部公益专项(200903030-C); 国家海洋局公益专项(201105008, 201105023); 国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2C000005); 上海市科学技术委员会重点科技攻关项目(10391901100); 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50701); 宁波市择优委托重大科技项目(2008C10018)

作者简介: 孙霖清(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海藻生理生态研究, E-mail: zhibeibaohu@hotmail.com

通讯作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

“申福1号”、“申福2号”和野生型等3个品系为材料,就自由丝状体移植量、移植后培养的光密度和温度对贝壳丝状体的生长和壳孢子放散量的影响进行了较深入研究,旨在建立自由丝状体移植育苗技术,促进上述坛紫菜优良品种(系)的大规模推广应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验使用的“申福1号”(SF-1)和“申福2号”(SF-2)两品系,均是通过诱变选育获得,并以自由丝状体的形式予以保存。野生型品系(WT)的分离方法及这3个品系的保存条件同文献[16]。

实验中使用的贝壳为文蛤壳。经洗刷和水煮处理后,每15个贝壳为一组放入规格为20.5 cm × 14 cm × 5 cm的长方形塑料盒中进行自由丝状体移植和培养。使用的培养液为自然海水加MES培养基^[17]。

1.2 实验方法

1.2.1 自由丝状体移植和初始藻落密度计算

因贝壳基本铺满容器底部,可根据容器底面积和单位面积内的移植量,计算出移植所需的自由丝状体重量。将丝状体用吸水纸吸干,用电子天平称取所需丝状体,放入小型家用粉碎机,加入少量海水搅碎后,均匀泼洒在贝壳上。移植后在18℃,6 μmol photons/(m²·s)(14L:10D)的暗光条件下培养4 d,然后将光密度提高至40 μmol photons/(m²·s)(14L:10D),以促进丝状体生长。

自由丝状体移植后第14天洗去贝壳表面的多余丝状体,并更换培养液。然后,每组随机选取8个贝壳,每个贝壳在解剖镜下计数5个视野(2.5 × 10)内的藻落个数,取其平均值,根据视野面积计算出单位面积内的藻落个数,即初始藻落密度。

1.2.2 贝壳丝状体的促熟与壳孢子放散量的计数

各组贝壳丝状体培养至50 d,将贝壳丝状体移至29℃,光密度升至30 μmol photons/(m²·s)(8L:16D),每7天更换一次氮:磷=1:10的灭菌海水,促进贝壳丝状体成熟。培养至85 d左右,贝壳丝状体已经成熟,将单个贝壳放入200

mL烧杯,加入50 mL培养液充气培养,温度降至(25 ± 1)℃,促进壳孢子放散。

将50 mL壳孢子水倒入直径为9 cm的培养皿内,在倒置显微镜下,统计40个视野(10 × 10)内的壳孢子数,取其平均值,根据视野面积与培养皿的底面积,计算出每个培养皿内的壳孢子数,即单个贝壳的壳孢子日放散量。每个贝壳在壳孢子开始放散后连续计数3 d,其总和为该贝壳的总壳孢子放散量。每组贝壳全部计数,取其平均值,为该组的平均放散量。

1.2.3 移植量实验

3个品系的自由丝状体分别以50,100,200,350和500 mg/m²的移植量移植到贝壳上,各组贝壳丝状体在移植后第14天统计初始藻落密度,而后转移至20℃,10 μmol photons/(m²·s)(14L:10D)条件下培养,每7天更换一次培养液,并分别于移植后第25天,35天,45天拍照和记录贝壳丝状体的生长状况。贝壳丝状体的促熟与壳孢子放散量的计数同于1.2.2。

1.2.4 光密度实验

各实验组的移植量均为100 mg/m²,培养至14天,洗去贝壳表面多余的自由丝状体后,分别置于10,30,50 μmol photons/(m²·s)(14L:10D)不同光密度条件下培养,培养温度均为20℃,每7天更换一次培养液并拍照,促熟和壳孢子放散量计数同于1.2.2。

1.2.5 温度实验

各实验组的移植量均为100 mg/m²,移植后第14天,洗去贝壳表面多余的自由丝状体后,分别置于15,20,25℃下培养,光密度均为10 μmol photons/(m²·s)(14L:10D),每7天更换一次培养液并拍照,促熟和壳孢子放散量计数同于1.2.2。

2 实验结果

2.1 初始藻落密度实验

如图1所示,随着移植量的增加3个品系的初始藻落密度均显著增加。随着初始藻落密度的提高,在相同条件下,贝壳丝状体能更快的布满贝壳表面,在相同时间内形成更密的藻丝层。当移植量为100 mg/m²时,3个品系贝壳丝状体的壳孢子放散量达到最高,更高或更低的移植量,都导致壳孢子放散量的减少(图2)。在自由

丝状体移植量相同的情况下,*SF-1*,*SF-2*和*WT*品系的贝壳丝状体的壳孢子放散量无显著性差异。

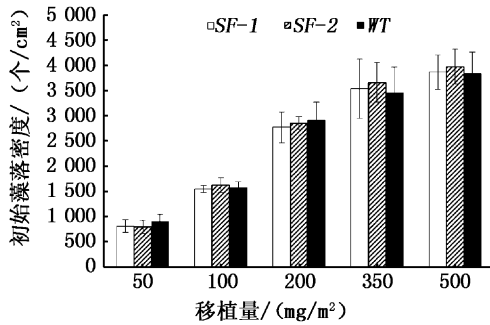


图1 坛紫菜自由丝状体移植量对3个品系(*SF-1*,*SF-2*和*WT*)在移植14 d后所形成的初始藻落密度的影响

Fig. 1 Effects of the transplanting quantity of free-living conchocelis on the density of initial conchocelis colony formed on the shell being transplanted, after 14 days of culture in three strains (*SF-1*, *SF-2* and *WT*) of *Porphyra haitanensis*

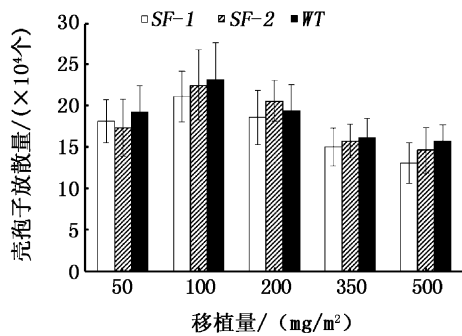


图2 坛紫菜自由丝状体移植量对3个品系(*SF-1*,*SF-2*和*WT*)贝壳丝状体放散壳孢子数量的影响

Fig. 2 Effects of the transplanting quantity of free-living conchocelis on conchospores number from conchocelis of three strains (*SF-1*, *SF-2* and *WT*) in *Porphyra haitanensis*

2.2 光密度实验

如果自由丝状体移植量相同,在10~50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 范围内,随着培养用的光密度增加,贝壳丝状体的生长明显加快。在较高的光密度下,贝壳丝状体虽然能更快地长满贝壳,与低光密度下培养的贝壳丝状体相比,藻落密度更大,但经相同促熟条件处理后,各光密度组的贝壳丝状体的壳孢子放散量却随着光密度的提高而降低(图3)。*SF-1*,*SF-2*和*WT*3个品系的贝壳丝状体在实验中生长趋势相同,在相同光密度下培养的不同品系贝壳丝状体,壳孢子的放散量差异不明显。

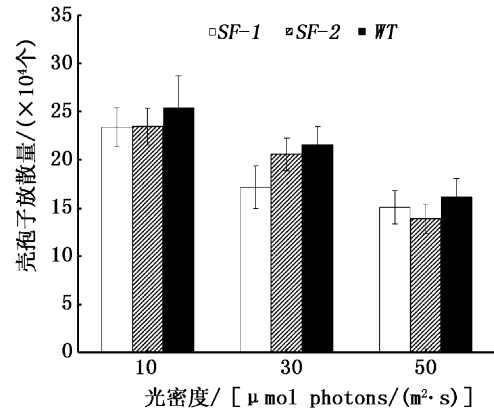


图3 营养生长阶段的不同光照密度对坛紫菜3个品系(*SF-1*,*SF-2*和*WT*)贝壳丝状体放散壳孢子数量的影响

Fig. 3 Effect of different illumination intensity at the vegetative growth phase of the conchocelis on conchospores number from three strains (*SF-1*, *SF-2* and *WT*) in *Porphyra haitanensis*

2.3 温度实验

当移植量恒定,在15~25 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,提高温度可以明显加快贝壳丝状体的生长。在较高的温度下,贝壳丝状体能更快地布满贝壳表面,与低温度下培养的贝壳丝状体相比,藻落密度更大。如图4所示,经相同促熟条件处理后,20 $^{\circ}\text{C}$ 下培养的贝壳丝状体获得了最高的壳孢子放散量,其次为15 $^{\circ}\text{C}$ 组,25 $^{\circ}\text{C}$ 组壳孢子放散量最低。*SF-1*,*SF-2*和*WT*3个品系的贝壳丝状体在实验中表现出了相同的生长趋势,相同温度下培养的不同品系贝壳丝状体壳孢子放散量差异不明显。

3 讨论

3.1 移植量,光密度和温度对壳孢子放散量的影响

比较各组实验中自由丝状体移植量,初始藻落密度和壳孢子放散量后发现,若移植后培养条件一致,自由丝状体钻入贝壳形成的初始藻落密度随着移植量的增加而明显增加。在相同条件下培养,提高初始藻落密度可使贝壳丝状体更快地布满贝壳表面,获得更高密度的贝壳丝状体。在移植量不高于100 mg/m^2 的情况下,壳孢子放散量随着移植量的提高而显著增加;当移植量高于100 mg/m^2 时,壳孢子的放散量反而会下降。这些结果表明,只有采用适宜的移植量,才能获得适宜的初始藻落密度,才能取得最大的壳孢子

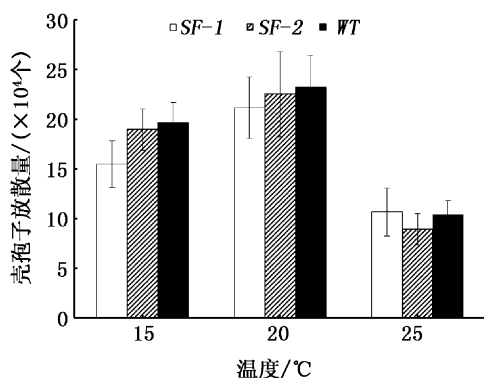


图4 营养生长阶段的不同培养温度对坛紫菜3个品系(SF-1, SF-2和WT)贝壳丝状体放散壳孢子数量的影响

Fig. 4 Effect of different temperatures at the vegetative growth phase of the conchocelis on conchospores number from three strains (SF-1, SF-2 and WT) in *Porphyra haitanensis*

放散量。可能因为在相同培养条件下,移植量过低会导致贝壳丝状体的量过少,而最终减少壳孢子放散量;当移植量超过一定限度(如 100 mg/m^2),初始藻落密度过高,贝壳丝状体的藻落层叠严重,造成中、下层藻丝对营养和光照的需求得不到满足,因此贝壳丝状体不能同步成熟,造成壳孢子不能大量集中放散。因此,在自由丝状体移植育苗时,合适的移植量对培育合理密植的贝壳丝状体,促进壳孢子的集中大量放散有重要影响。

大规模生产性育苗的时间一般是从每年的2-3月开始一直持续到当年的9月,在长达数月的培养中,培养贝壳丝状体的光密度和温度对贝壳丝状体的生长和壳孢子的放散量都有重要的影响。紫菜丝状体的光补偿点很低,因此在自然环境中贝壳丝状体在低光密度条件下生存,分布于更深的海底^[7]。由于光密度低于 $10 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时贝壳丝状体生长过于缓慢,而超过 $60 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 直射光可能引起丝状体的死亡(未发表数据的预实验结果),本实验中采用了 $10, 30$ 和 $50 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 3种光密度条件进行实验。结果表明,在 $10 \sim 50 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光密度条件下培养的贝壳丝状体均能正常生长并放散壳孢子,而且提高光密度对贝壳丝状体的生长速度有显著的促进作用,但最终光密度最低的 $10 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot$

$\text{s})$ 组获得了最高的壳孢子放散量;随着光密度的提高,壳孢子的放散量反而逐渐下降。因为在高光密度条件下,贝壳丝状体生长很快,贝壳内藻丝密集,相互层叠严重,与过高初始藻落密度造成的影响相类似,致使贝壳丝状体不能同步成熟,壳孢子不能大量集中放散。但在 $10 \sim 50 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 范围内,适当调整光密度,可作为控制贝壳丝状体适当生长的有效方法。

在 $15 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 的温度范围内,贝壳丝状体的生长速度随着温度的升高而明显加快。 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 组贝壳丝状体生长缓慢,在培养时间相同的条件下,最终获得的贝壳丝状体密度过低,总量较少,造成了壳孢子放散量的降低。而 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 组由于贝壳丝状体生长过快,藻丝过于密集,贝壳丝状体不能同步成熟,壳孢子不能大量集中放散,造成其壳孢子放散量明显低于 15 和 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 组。在大规模生产育苗中,贝壳丝状体的培养温度由所在地的气候决定,季节和天气是主要影响因素,但了解不同温度条件对贝壳丝状体生长及壳孢子放散的影响,可在不同的温度条件下采取适当的应对措施,对生产性育苗有重要的参考意义。

3.2 自由丝状体移植育苗技术在优良品系育苗中的应用

近年来,国内外学者先后建立了叶状体的体细胞育苗^[18-19]和自由丝状体无贝壳育苗技术^[9],研究也多集中在对自由丝状体生长和发育的调控方面^[20-21],希望能找到替代传统贝壳丝状体育苗的技术,提高紫菜生产效率,但这些新的育苗技术因其技术要求过高或技术欠成熟等原因,难以推广使用。与之相比,自由丝状体移植产生的贝壳丝状体,其培育和壳孢子放散规律与传统果孢子采苗的贝壳丝状体大致相同,易于推广,另外,由于移植用的自由丝状体是通过营养生长扩增获得,可以保证优良品种的优良特性不会出现退化。因此,贝壳丝状体阶段仍然是大规模生产育苗中不可缺少的组成部分,对贝壳丝状体培养条件的进一步研究仍有重要意义。

在相同培育条件下,“申福1号”、“申福2号”和野生型品系,在贝壳丝状体的生长趋势和壳孢子放散量上都没有明显差异。说明坛紫菜在自由丝状体移植育苗时,各品系对于培养条件的要求没有明显的区别。本实验得到的研究结果为坛紫菜“申福1号”和“申福2号”大规模自

由丝状体移植育苗提供了重要的技术依据。

参考文献:

- [1] 黄海水产研究所紫菜组. 坛紫菜与条斑紫菜的人工养殖[M]. 北京:农业出版社,1979:11-15.
- [2] 严兴洪,李琳,有贺佑胜. 坛紫菜减数分裂位置的杂交实验分析[J]. 水产学报,2006,30(1):1-7.
- [3] 曾呈奎,张德瑞. 紫菜的研究 I, 甘紫菜的生活史[J]. 植物学报,1954,3(3):287-302.
- [4] 黑木宗尚. アマノリ类的生活史の研究,第一報,果孢子发芽と生长. 日本東北海区水産研究所報告,第二号[R]. 1953,11:67-103.
- [5] DREW K M. Conchocelis-phase in the life-history of *Porphyra umbilicalis* (L). Kütz. [J]. Nature,1949,164:748-749.
- [6] HIDEO LWASAKI. The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro [J]. The Biological Bulletin, 1961, 121(1):173-187.
- [7] 曾呈奎,王素娟,刘恩俭,等. 海藻栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:154.
- [8] 林增善. 紫菜自由丝状体接种育苗[J]. 水产养殖,1996(2):20-21.
- [9] 陈国宜. 关于坛紫菜自由丝状体的培养和直接采苗的研究[J]. 水产学报,1980,4(1):19-29.
- [10] 严兴洪,马少玉. 坛紫菜抗高温品系的筛选[J]. 水产学报,2007,31(1):112-119.
- [11] YAN X H, LI L, ARUGA Y. Genetic analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17(6):467-473.
- [12] 陈昌生,徐燕,纪德华,等. 坛紫菜品系间杂交藻体选育及经济性状的初步研究[J]. 水产学报,2007,31(1):97-104.
- [13] YAN X H, LV F, LIU C J, et al. Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(4):511-516.
- [14] 谢松平,宋武林,黄健,等. 坛紫菜“申福1号”人工育苗技术[J]. 水产养殖,2006,27(5):39-44.
- [15] 宋武林. 坛紫菜优良品系“申福1号”苗种培育技术研究[J]. 南方水产,2006,2(4):19-23.
- [16] KATO M, ARUGA Y. Comparative studies on the growth and photosynthesis of the pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* in laboratory culture [J]. Japan Journal of Phycology, 1984, 32:334-347.
- [17] 王素娟,张小平,徐云龙,等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J]. 海洋与湖沼,1986,17(3):217-221.
- [18] 方宗熙. 紫菜细胞的酶法分离和在水产养殖中的应用[J]. 海洋科学,1986,10(3):46-47.
- [19] 王素娟,何培民. 条斑紫菜体细胞直接附网育苗及下海养殖[J]. 上海水产大学学报,1992,1(3/4):154-159.
- [20] 王素平,姜红如. 条斑紫菜游离丝状体生态的研究[J]. 海洋水产研究,1983(5):1-5.
- [21] 汤晓荣,费修缙. 光温与坛紫菜自由丝状体生长发育的关系[J]. 海洋与湖沼,1997,28(5):475-482.

Study on conchocelis seeding with transplanting free-living conchocelis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)

SUN Mu-qing¹, LI Lin¹, LIU Chang-jun², YAN Xing-hong¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Aquaculture Technical Popularization Station of Xiangshan County, Xiangshan 315700, Zhejiang, China)

Abstract: By using three strains (two improved strains (*SF-1* and *SF-2*) and the wild type (*WT*)) of free-living conchocelis of *Porphyra haitanensis*, the optimal transplanting quantity and the influence of the initial density of conchocelis colony, photon flux density and temperature for vegetative growth of conchocelis and the conchospore number of conchocelis were studied. The results indicated that the initial density of conchocelis colony significantly increased with the increase of transplanting quantity in range of 50 – 500 mg/m². However, when the transplanting quantity was higher than 100 mg/m², the conchospore number decreased. Increase of photon flux density within the range of 10 – 50 μmol photons/(m² · s) accelerated the vegetative growth of conchocelis, but decreased the conchospore number. Increasing temperature within the range of 15 – 25 °C accelerated the vegetative growth of conchocelis. However, the conchospore number increased with the increase of temperature from 15 to 20 °C, and decreased with the increase of temperature from 20 to 25 °C. The vegetative growth and conchospore number of *SF-1*, *SF-2* and *WT* strains showed no significant differences. The above results indicated that higher transplanting quantity, photon flux density and temperature in culture of conchocelis will reduce the conchospore number of conchocelis when seeding with free-living conchocelis in *P. haitanensis*.

Key words: *Porphyra haitanensis*; improved strains; free-living conchocelis; transplant; culture condition; temperature