

温度对“901”海带配子体克隆生长的影响

李晓捷 王国文 张全胜 张壮志 罗世菊
(山东省烟台市水产技术推广中心,烟台 264003)

摘 要 温度是影响“901”海带配子体克隆生长最重要的环境因子之一。试验结果表明,在 15℃ 条件下,配子体克隆的生长速度最快,其致死温度为 25℃。在相同的环境条件下,细胞数基本相同的雌、雄配子体克隆的生长速度相近。

关键词 海带 配子体克隆 温度 生长

我国的海带配子体克隆,即无性繁殖系的技术形成于上世纪 70 年代末。由于海带配子体克隆具有遗传一致性、发育全能性以及适宜条件下可以长期进行营养生长和保存的特点^[1],因此,海带配子体克隆在种质资源的保存、生理生化及遗传学研究、育种、苗种生产中都具有重要意义^[2]。

海带夏苗培育法自上世纪 50 年代创立至今,其弊端越来越突出。随着海藻生物技术的发展,进行海带配子体克隆育苗技术研究,改变现有的育苗工艺,是实现海带良种化生产的关键。海带配子体克隆大规模培养是克隆育苗的前提,探讨其适宜的培养条件相当必要。温度是影响海带配子体克隆生长最重要的环境因子之一,本试验通

过五个温度组比较在其它条件相同的情况下雌(雄)配子体克隆的生长速度,探讨海带配子体克隆的最适生长温度,为克隆生产性培养提供依据。

材料和方法

1. 材料

所用材料为长期保种于光照培养箱中的“901”海带雌、雄配子体克隆。该材料保种条件:温度 8~10℃,光照强度 1000 lx;培养液为煮沸消毒海水,营养盐含量:NaNO₃-N 10 mg/L, KH₂PO₄-P 1 mg/L。培养液一般每 2 周更换一次。

2. 设备

组织捣碎机 DS-1 型高速组织捣碎机,功率 200 W,转速 10000~12000 r/s,上海标本模

为各类张网、缙网、阿网、密眼溜刺网作业禁渔期的规定,笔者认为在这个条款中应加入“特制的贝类底拖网”。

3. 发展扇贝养殖业 要提高象山港扇贝的产量,应采取增殖与养殖相结合的方针。即在加强保护扇贝原有资源的基础上,积极开展人工增殖。要搞好人工增殖,必须培育出适宜于象山港水环境的新品种。栉孔扇贝、虾夷扇贝、华贵栉孔扇贝、海湾扇贝等不适宜在象山港区养殖,是否可以采取与本地扇贝杂交的育种方法,培育出适宜于象山港水环境的新品种,这是值得研究的

一个科研项目。

参考文献

1. 李多云,薛学朗,冯 坚等.象山港黄墩支港菲律宾蛤仔的种群动态及其繁殖保护措施探讨.生态学报,1989,9(4):297~303.
2. 王祯瑞.软体动物门双壳纲珍珠贝亚目.中国动物志第三十一卷.227~230.北京:中国科学出版社,2002.
3. 王如才,俞开康,姚善成等.海水养殖技术手册.288~305.上海:上海科学技术出版社,2001.

发稿编辑 汤惠明

校对 朱大白

型厂生产。

光照培养箱 LRH - 250 G 型光照培养箱,广东省医疗器械厂生产。

生物显微照相 XSP - 8 CZ 型生物显微镜,上海光学仪器厂生产。

3. 方法

(1)细胞段制备 雌雄克隆分别粉碎、培养。分别称取雌、雄克隆各 2 g(经 300 目筛绢过滤至无水珠滴落)放入组织捣碎机中,加消毒海水培养液 300 ml,雌克隆粉碎 90 s,雄克隆粉碎 120 s。粉碎后分别经双层 300 目筛绢过滤,即得到 2~3 个细胞的细胞段(图 1)。

(2)细胞段培养 将粉碎、过滤后的细胞悬浮液摇匀,用移液管分别向每个直径为 9 cm 的消毒培养皿中加入 30 ml,然后分别加入等量培养液。

实验在恒温光照培养箱中进行,光照强度 2000 lx,光周期 24 h,营养盐含量:NaNO₃-N 10 mg/L, KH₂PO₄-P 1 mg/L。实验设 5℃、10℃、15℃、20℃、25℃五个温度组,每组雌、雄配子体克隆各设 3 个重复,每周更换培养液 1 次。

(3)生长情况观察 每个培养皿随机观察 100 个细胞段,统计每个细胞段的细胞数,计算出

平均值;每 3 天统计 1 次,连续统计 6 次。统计时,重复组也参与计数。

结果与分析

1. 温度对海带雌配子体克隆生长的影响

在相同光照和营养盐条件下,经过 12 d 培养,统计结果见表 1。

表 1 不同温度下海带雌配子体克隆的生长情况

温度 (℃)	细胞数(个/段)				
	第 1 d	第 4 d	第 7 d	第 10 d	第 13 d
5	2.47	2.78	3.01	3.75	5.92
10	2.47	3.02	4.43	6.00	10.18
15	2.47	3.07	4.60	7.88	13.41
20	2.47	2.89	4.36	5.54	9.63
25	2.47	极个别存活	全部死亡		

从表 1 可以看出,不同温度下雌配子体克隆的生长速度不同,在其它条件相同的情况下,5~25℃范围内,雌配子体克隆的生长以 5℃时为最慢(图 2),15℃时为最快(图 3)。

2. 温度对海带雄配子体克隆生长的影响

在相同光照和营养盐条件下,经过 12 d 培养,统计结果见表 2。

从表 2 可以看出,在不同温度下雄配子体克

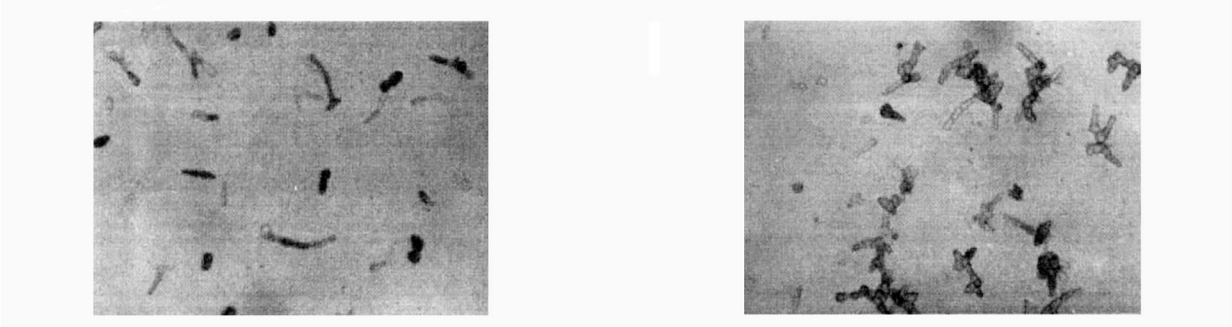


图 1 粉碎后的状态(2~3 个细胞的细胞段),160 X;

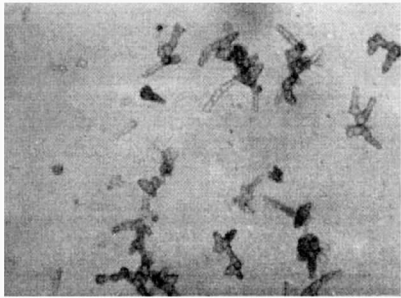


图 2 2000 lx 条件下培养 12 d 的状态,160 X;

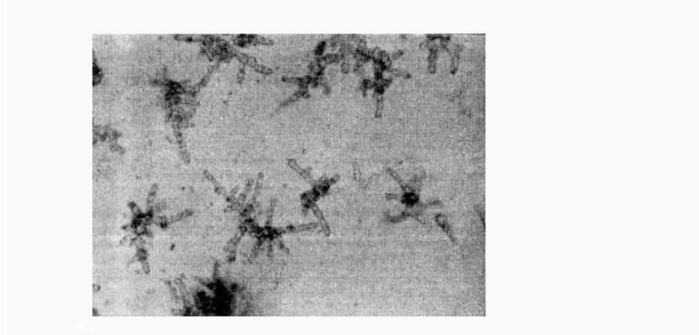


图 3 15℃、2000 lx 条件下培养 12 d 的状态,160X;



图 4 25℃、2000 lx 条件下培养 3 d 的状态,160X;

表2 不同温度下海带雄配子体克隆的生长情况

温度 (℃)	细胞数(个/段)				
	第1 d	第4 d	第7 d	第10 d	第13 d
5	2.90	3.44	3.89	4.30	6.19
10	2.90	3.82	4.56	6.67	10.61
15	2.90	3.91	4.70	8.04	13.44
20	2.90	3.58	4.32	5.81	8.94
25	2.90	极个别存活 全部死亡			

隆的生长速度不同,在其它条件相同情况下,5~25℃的范围内,雄配子体克隆的生长速度也是5℃时最慢,15℃时最快。

上述结果表明:温度是影响海带配子体克隆生长的重要环境因子。在5~15℃范围内,克隆的生长速度随着温度的升高而加快;当温度超过15℃时,雌、雄配子体克隆的生长速度都减慢。因此,15℃应为海带配子体克隆的最适生长温度。而在25℃时,雌、雄配子体克隆经一段时间培养后全部死亡(图4),这说明本海带品种配子体克隆不能耐受25℃的高温。此外,通过比较表1和表2雌雄配子体克隆的生长速度,可以看出在相同条件下,初始细胞数基本相同的雌、雄配子体克隆在正常生长状态下,其生长速度相近。

讨 论

1. 海带配子体克隆在生产性培养中的温度控制

据方宗熙(1965)等^[3]报道,在5~18℃条件下,海带配子体可正常生长发育。本试验也证明,15℃是配子体克隆的最适生长温度。但笔者在多年的生产实践中发现,长期在15℃条件下培养的克隆极易被杂藻和细菌污染,而15℃以下一般不会出现此问题。由于海带克隆育苗前期不能大力度洗刷,所以污染的克隆极易导致病害的发生,直接影响育苗生产,而纯种、无污染的克隆是保证育苗成功的前提。因此,在克隆的大规模培养中,温度以控制在10~15℃为宜。

2. 不同种海带配子体克隆对高温的适应力

在25℃条件下,本试验中的海带雌、雄配子体克隆经一段时间培养后全部死亡,这说明

“901”海带的配子体克隆不能耐受25℃高温。据王梅林^[4](1987)研究表明,海带雌配子体克隆的致死温度在22℃~28℃之间,且因其种类而不同,真海带(*Laminaria japonica*)克隆在26℃条件下仍可正常存活,而大西洋种糖海带(*Laminaria saccharina*),极北海带(*Laminaria hyperborea*)克隆在22℃下培养5 d即开始严重死亡,比其它种明显地不耐高温。这说明海带不同种的克隆对高温的适应力不同,这与其分布的地域有关,是自然界长期选择的结果^[4]。

3. 海带雄配子体克隆大规模培养的起始时间

本试验结果表明:在相同条件下,初始细胞数基本相同的雌、雄配子体克隆生长速度相近。而王军等^[5]对利尻海带的研究表明:在同一培养条件下,雄配子体的生长速度明显大于雌配子体的。这是否与不同海带品种的特性不同有关,尚需进一步研究。雌、雄配子体克隆在育苗生产中的需要量为2:1,因此,在克隆的生产性培养中,为节省培养空间和降低成本,可适当推迟雄配子体克隆的起始培养时间。

参考文献

1. 方宗熙,欧毓麟,崔竞进等. 海带配子体无性繁殖系培育成功. 科学通报,1978(2):115~116.
2. 刘涛,崔竞进,戴继勋等. 海带配子体克隆的培养及应用. 青岛海洋大学学报,2000,30(2):203~206.
3. 方宗熙,李家俊. 海带雌配子体对温度的反应规范. 山东海洋学院学报,1965(1):334~345.
4. 王梅林. 海带几种不同物种的雌性克隆对高温的适应力. 山东海洋学院学报,1987,17(2):72~76.
5. 王军,张泽宇,张晓东. 温度与光照对利尻海带配子体及幼孢子体的影响. 中国水产,1999(2):39~41.

收稿日期:2004-07-06; 修回日期:2004-08-02

作者简介:李晓捷(1970-),女,工程师,从事海带遗传育种工作。

发稿编辑 汤惠明

校对 朱大白