

羊栖菜受精卵/胚胎低温保存后的成活和发育

张玉荣¹, 逢少军²

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:通过实验生物学方法, 探讨了采用 5℃ 条件保存的多细胞和两细胞状态羊栖菜(*Hizikia fusiformis*) 受精卵的成活和发育情况。结果表明, 相同保存和恢复培养条件下的羊栖菜受精卵, 两细胞状态的死亡率明显高于多细胞状态。5℃ 条件保存 60 h 多细胞状态羊栖菜受精卵的死亡率均在 10% 左右, 同样条件保存 48 h 两细胞状态受精卵死亡率高达 75%。在异地运输羊栖菜受精卵或者胚胎完成苗种培育的过程中, 应当同时考虑温度、运输时间以及受精卵的发育阶段等多个因素, 才能取得比较好的实际效果。

关键词:羊栖菜(*Hizikia fusiformis*); 受精卵; 低温保存; 成活和发育

中图分类号: Q178

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)12-0070-05

羊栖菜(*Hizikia fusiformis*) 隶属褐藻门, 墨角藻目, 马尾藻科, 是暖温带-亚热带性海藻, 在我国沿海北自辽东半岛南到广东雷州半岛以及在日本和朝鲜沿岸均有广泛分布^[1]。羊栖菜藻体肥厚多汁, 营养丰富、风味好, 既能食用又能药用, 是中国、日本、朝鲜和韩国沿海人民的传统美食和中草药, 被推崇为海洋蔬菜和健康长寿品^[2~4]。我国古代《神农本草经》和《本草纲目》中对羊栖菜药用价值都有记载。羊栖菜人工栽培所使用的苗种在早期基本来自潮间带, 随着羊栖菜全人工苗种技术的诞生和日益成熟, 利用雌雄异体亲本同步受精技术来生产种苗在生产中得到广泛应用^[5~8]。在实际生产过程中, 为规避由于高水温对幼苗的不利影响^[9], 有时需要异地运输种菜完成苗种培育或者通过低温保存的方式异地运输受精卵和胚胎。目前人们对羊栖菜受精卵或者胚胎在低温条件下的存活和发育规律所知甚少, 而低温保存海藻种质细胞已经在多数经济海藻中得到广泛的应用^[10]。本项研究的主要目的就是探讨羊栖菜在不同发育阶段, 经过不同时间的低温处理后的存活和生长发育情况, 旨在为改善羊栖菜全人工苗种工艺提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 羊栖菜亲本

羊栖菜为 2008 年 5 月初采自浙江省南麂岛, 利用保温盒空运至青岛, 雌雄各 20 枝, 每枝长约 20 cm, 置于中国科学院海洋研究所海洋生物种质库种质培

养室 80 L (65 cm×45 cm×35 cm) PP 水箱恢复培养, 水温 20℃, 培养的最高自然太阳光光强 400 μmol/(m²·s)^[11~13]。材料培养期间, 每天流水换水一遍, 并添加 NaNO₃ 和 KH₂PO₄, 添加的终浓度达到 10 g/m³ 和 1 g/m³ 水体。经过一段时间的培养, 卵子和精子排放后, 对不同时间段的受精卵进行低温 5℃ 保存。本实验共使用了两批多细胞和两细胞状态受精卵。

1.2 实验方法

羊栖菜卵子在受精后的 16 h 开始从生殖托自然脱落, 脱落的受精卵都处于多细胞的胚胎阶段。从实际操作角度, 运输脱落的胚胎比运输尚黏附在生殖托上的受精卵要容易得多。但是为了全面了解不同阶段的存活和生长情况, 采取了 2 个发育阶段的材料, 即受精后 8 h 和 24 h 的 2 细胞和多细胞材料。

1.2.1 多细胞状态 5℃ 保存

受精 24 h 的羊栖菜受精卵, 经镜检基本发育到多细胞的胚胎状态。待大部分自然脱落后, 取适量放入 200 mL 烧杯, 加适量消毒 PES(Provasli Enriched Water)^[14], 放入 5℃ 冰箱保存。放置 0, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 72, 78, 96 h 后, 分别取适量放入 9 cm 培养皿中, 在倒置显微镜下检查和统计假根发生率和

收稿日期: 2008-11-25; 修回日期: 2009-04-10

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10A412, 2006AA10A416); 国家自然科学基金项目 (30671596, 30471327); 国家科技基础条件平台工作项目 (2006DKA30470-017)

作者简介: 张玉荣(1984-), 女, 江苏徐州人, 硕士, 从事大型藻种质保存研究; 逢少军, 通信作者, E-mail: sjpang@ms.qdio.ac.cn, 电话: 0532-82898831

胚胎的死亡率。之后, 加入适量的 PES, 在 21 光照培养箱静置培养, 光强 $190 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。分别统计培养 48, 96, 144 h 后的死亡率。除特殊说明, 实验中均用光度计(SAMPO-LX1330A)记录光照强度, 每 48 h 更换培养基。

1.2.2 两细胞状态 5 保存

受精 8 h 的羊栖菜受精卵, 经镜检多数为两细胞状态。取适量放入 200 mL 烧杯, 加适量 PES, 5 冰箱保存。保存 0, 24, 48, 96 h 和 120 h 后, 分别取出并统计死亡率和假根产生率。之后加适量 PES, 21 光照培养箱静置培养, 光强 $190 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。统计培养 48 h 后的存活和死亡率。

2 结果

2.1 多细胞状态 5℃ 保存

2.1.1 多细胞状态 5 保存, 取出时假根发生的比例

5 条件保存多细胞状态羊栖菜胚胎(受精 24 h 后)在 48 h 以内, 随着时间的延长, 个体发生假根的比例从 10% 上升到 80%; 当保存的时间超过 50 h 后, 假根的发生便停止 (图 1)。意味着 50 h 是一个分界点。

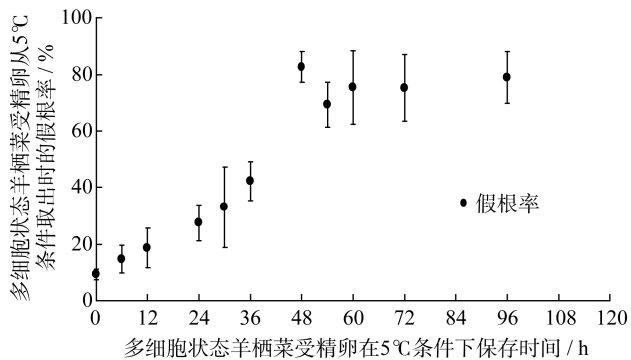


图 1 在 5 保存不同时间的多细胞状态羊栖菜胚胎(受精 24 h 后)产生假根的比率平均值变化($n=5$)

Fig. 1 Percentage of 24-h old multi-cellular embryos of *Hizikia fufiformis* that developed rhizoids after being stored at 5 for various hours. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$)

2.1.2 多细胞状态 5 保存, 取出放入培养箱培养时的死亡率

5 条件保存多细胞状态羊栖菜胚胎(受精 24 h 后)的死亡率, 96 h 内均低于 5%, 在保存了 120 h 后死亡率迅速增加, 但是在保存了 216 h 的死亡率仍然低于 45%(图 2)。

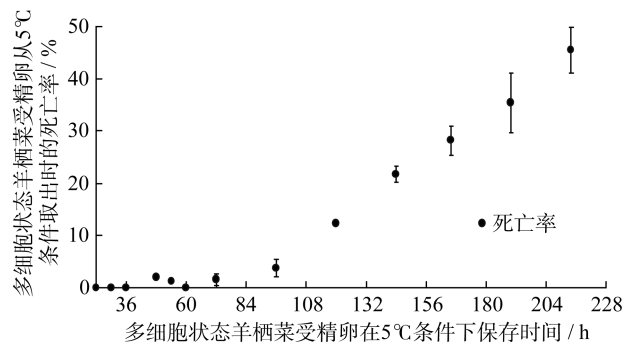


图 2 在 5 保存不同时间的多细胞状态羊栖菜受精卵(受精 24 h 后)的死亡率平均值($n=5$)

Fig. 2 Mortality of 24-h old multi-cellular embryos of *Hizikia fufiformis* that were stored at 5 for various hours. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$)

2.1.3 多细胞状态 5 保存, 恢复培养后的死亡率

5 条件保存多细胞状态的羊栖菜胚胎(受精 24 h 后), 经过 48 h 恢复培养后, 保存 60 h 以内的羊栖菜受精卵的死亡率均在 10% 左右(图 3), 而且细胞发育良好(图 4), 72 h 后死亡率迅速增加, 96 h 为 80%。当保存时间达到 120 h 时, 没有胚胎能够恢复, 死亡率达到 100%。

2.2 两细胞状态 5℃ 保存

2.2.1 两细胞状态 5 保存, 取出放入培养箱时的假根率和死亡率

5 条件保存两细胞状态羊栖菜受精卵(受精 8 h

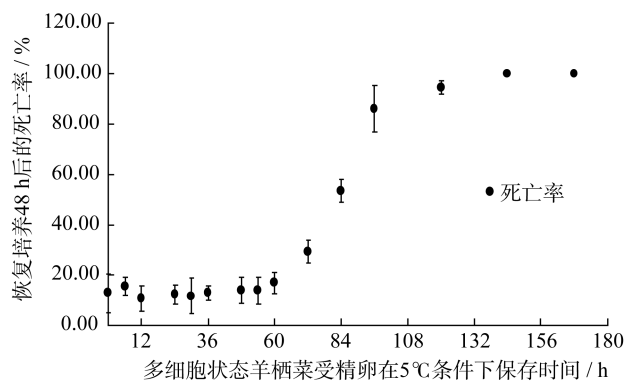


图 3 在 5 保存不同时间的多细胞状态羊栖菜胚胎(受精 24 h 后), 取出后恢复培养 48 h 后的死亡率平均值($n = 5$)

Fig. 3 Mortality of 24-h old multi-cellular embryos of *Hizikia fufiformis* that were stored at 5 for various hours followed by a 48-h recovery culture period at standard culture conditions. Values are means \pm standard deviations ($n = 5$)

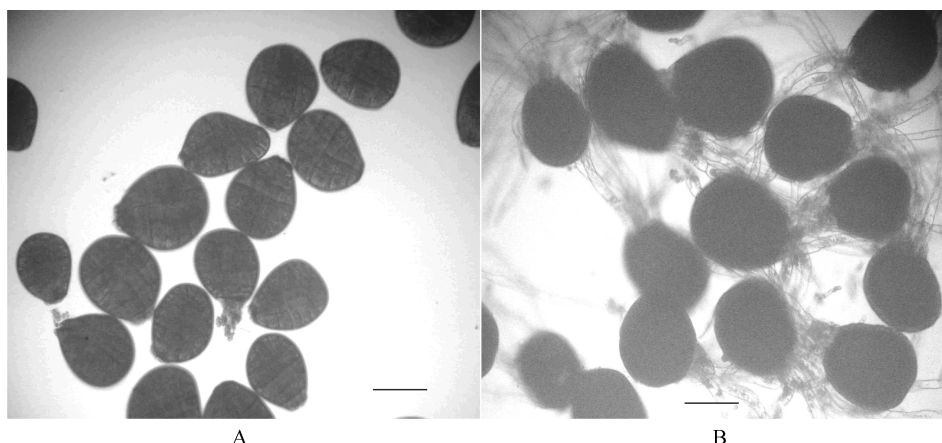


图4 受精24 h后多细胞状态羊栖菜胚胎(A)和在5℃保存24 h后再在标准条件下(21℃, 190 μmol/(m²·s))恢复培养48 h后(B), 其存活和形成生长的假根状况(标尺是100 μm)
 Fig. 4 Embryos of *Hizikia fusiformis* at 24 h post-fertilization (A), and the embryos stored at 5℃ for 24h followed by a 48 h recovery in standard culture conditions (B)

后0, 24, 48和72 h再经过48 h恢复培养后, 受精卵的死亡率如表1所示。从结果来看, 关键的时间在24~48 h之间。24 h保存在5℃, 存活并且产生假根的比例稍有下降。保存48 h后的死亡率达到了75%左右。值得注意的是5℃保存的2细胞受精卵部分出现单细胞、两细胞和三细胞长假根的现象(图5), 表明第一次细胞分裂后产生假根的细胞其发育进程受低温的影响比较小。

3 讨论

处在不同发育阶段的羊栖菜受精卵进行低温保存后的存活和生长迥然不同: 实验结果表明, 经过48 h恢复培养后, 5℃保存60 h的多细胞状态羊栖菜受精卵的死亡率只有10%, 而两细胞状态羊栖菜受

表1 在5℃条件下保存的两细胞受精卵分别在0, 24, 48, 72 h后取出, 再恢复性培养48 h的死亡率和产生假根的比率(n=6)

Tab. 1 Mortality and rates of rhizoid development of the 2-celled zygotes after 0, 24, 48 and 72-h storage at 5℃ and followed by a 48-h recovery under standard culture conditions (n = 6)

保存时间(h)	存活无假根(%)	存活有假根(%)	死亡率(%)
0	0	89.49±3.45	9.52±3.45
24	0	85.33±5.43	14.67±5.95
48	15.82±2.65	9.22±2.95	74.96±2.68
72	2.92±4.53	4.36±3.14	92.72±4.11

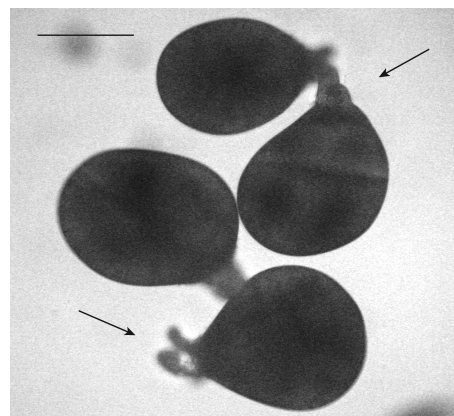


图5 5℃保存的2个细胞的受精卵在保存120 h后取出, 出现的单细胞、两细胞和三细胞受精卵产生假根的情况(箭头所示, 标尺为100 μm)
 Fig. 5 Rhizoid development (arrows) from one-, two-, or three-celled zygotes after stored at 5℃ for 120 h (bar equals to 100 μm)

精卵保存48 h后死亡率则为75%。因此在相同低温保存和常温恢复培养条件下, 羊栖菜多细胞状态的胚胎存活率明显高于两细胞受精卵阶段。在实际操作过程中, 受精卵的实际发育阶段是决定后期存活率的关键因素。

低温保存后产生假根的时间问题: 在羊栖菜苗种实际培育过程中, 产生假根的时间十分关键, 附苗时间必须根据产生假根时间确定。附苗过迟, 容易导致后期脱苗^[15,16]。采用低温保存受精卵也是如此。从本研究的实验结果来看, 无论是2细胞的受精卵还是多细胞胚胎采用低温保存都不能阻止假根的形成,

而只能延缓假根形成和生长速度。这个特点对异地运输受精卵或者胚胎完成采苗是个困难, 要求必须在假根形成之前完成运输和布苗。至于详细的假根发生和长度定量测定需要将来更加细致的研究阐释。对于异地运输受精卵或者胚胎而言, 掌握时间的长短和温度的控制同样重要。在动物水产养殖过程中, 利用充氧塑料袋运输鱼苗或者贝类幼体已经得到广泛应用, 而在藻类苗种培育过程中, 尚没有先例。作者在 2008 年, 利用低温运输受精卵的方法完成了大规模苗种采集, 并且获得了成功。本文的研究结果, 将对马尾藻属海藻的苗种培育技术革新提供重要的技术支持。

致谢: 作者感谢实验室技术员高素芹, 宋春华, 张京浦等同事的帮助。

参考文献:

- [1] 曾呈奎. 海带养殖学[M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [2] 张展, 刘建国, 刘吉东. 羊栖菜的研究综述[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(3): 68-74.
- [3] Hwang E K, Park C S, Baek J M. Artificial seed production and cultivation of the edible brown alga, *Sargassum fulvellum* (Turner) C. Agardh: developing a new species for seaweed cultivation in Korea[J]. *J App Phycol*, 2006, 18: 251-257.
- [4] Kirihiara S, Fujikawa Y, Notoya M. Axenic tissue culture of *Sargassum confusum* C., Agardh (Phaeophyta) as a source of seeds for artificial marine forests[J]. *J Mar Biotechno*, 2007, 5: 142-146.
- [5] 孙建璋, 方家仲, 朱植丰. 羊栖菜 *Sargassum fusiforme*(Harv.)Setch 繁殖生物学的初步研究[J]. 浙江水产学院学报, 15(4): 243-249.
- [6] 逢少军, 费修纆, 肖天, 等. 羊栖菜生殖托的离体培养的初步研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(3): 1-3.
- [7] 逢少军, 费修纆, 肖天, 等. 通过控制卵子和精子的排放实现羊栖菜人工种苗的规模化生产[J]. 海洋科学, 2001, 25(4): 53-54.
- [8] Pang S J, Shan T F, Zhang Z H, *et al.* Cultivation of the intertidal brown alga *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura: mass production of zygote-derived seedlings under commercial cultivation conditions, a case study experience[J]. *Aquac Res*. 2008, 39(13): 1408-1415.
- [9] Gillespie R D, Critchley A T. Assessment of spatial and temporal variability of three *Sargassum* species (Fucales, Phaeophyta) from KwaZulu-Natal, South Africa[J]. *Phycol Res*, 2001, 49: 241-249.
- [10] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 105-111.
- [11] Pang S J, Chen L T, Zhuang D G, *et al.* Cultivation of the brown alga *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura: enhanced seedling production in tumbled culture[J]. *Aquaculture*, 2005, 245: 321-329.
- [12] Pang S J, Gao S Q, Sun J Z. Cultivation of the brown alga *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura: controlled fertilization and early development of seedlings in raceway tanks in ambient light and temperature[J]. *J Appl Phycol*, 2006, 18: 723-731.
- [13] Pang S J, Zhang Z H, Zhao H J, *et al.* Cultivation of the brown alga *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura: stress resistance of artificially raised young seedlings revealed by chlorophyll fluorescence measurement [J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19: 557-565.
- [14] Starr R, Zeikus J A. ETEX-the culture collection of algae at the university of Texas at Austin[J]. *J Phycol*, 1987, 23(Suppl.): 41-47.
- [15] Zou D H, Gao K S, Run Z X. Seasonal pattern of reproduction of *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta) from Nanao Island, Shantou, China[J]. *J App Phycol*, 2006, 18: 195-201.
- [16] Hwang E K, Cho Y C, Sohn C H. Reuse of holdfasts in *Hizikia* cultivation[J]. *J Korean Fish Soc*, 1999, 32 (1): 112-116.

Survival and growth performance of zygotes/embryos of the brown alga *Hizikia fusiformis* after low temperature treatments

ZHANG Yu-rong¹, PANG Shao-jun²

(1. Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhoushan, 316100, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Nov., 25, 2008

Key words: *Hizikia fusiformis*; zygotes; low temperature; cultivation

Abstract: *Hizikia fusiformis* has been an important export-orientated brown alga in China. Large-scale cultivation relies on the supply of seedlings that are derived from sexual reproduction. With the development of the technique of synchronized fertilization, more and more seedlings are now produced via sexual reproduction. In this investigation, we performed a series of experiments to understand how zygotes of this alga develop and grow after short-term treatments at low temperature. Multi-celled embryos or two-cell zygotes of *H. fusiformis* were preserved at 5°C, for varied durations. The development of rhizoids, survivals of individuals, and growth performances were investigated. The results showed that the death rate of the two-cell zygote was conspicuously higher than that of the multi-cell zygote under the same conservation and recovering culture condition. The mortality of the multi-cell embryos was 10% after 60 h at 5°C, while that of the two-celled zygotes reached 75% after being preserved under the same condition. Discoveries in this investigation paved the way for transporting zygotes or embryos of this alga for completion of seedlings production over distance along the coast.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 69 页)

Preparation of polyclonal antibodies against domoic acid

LIU Yuan-yuan, CHENG Jin-ping, GAO Li-li, XU-Wei, WU Hao-dong

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Received: Feb., 22, 2010

Key words: domoic acid; polyclonal antibody; activation ester method

Abstract: To develop an immunoassay of domoic acid (DA), DA was coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) or bovine serum albumin (BSA) by the activation ester method. The conjugates were characterized by UV absorption. Polyclonal antibodies for domoic acid were generated from rabbits after the animals had been immunized by DA-KLH for 19 weeks. The titer of antiserum was 1:1600, detected by an indirect ELISA. After purification, the titer of antiserum became 1:800. DA-KLH was proved to be a suitable immunogen to prepare antibodies against DA.

(本文编辑: 梁德海)