

鼠尾藻幼孢子体培育条件探究

马兴宇^{1,2} 梁洲瑞² 刘福利² 王飞久^{2*} 孙修涛² 汪文俊² 刘坤^{1,2}

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(²农业部海洋渔业可持续发展利用重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 为探究鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 幼孢子体早期生长发育适宜的培养条件, 设置了光照度、温度、盐度3个影响因素3个水平的正交实验, 以及氮磷营养盐水平实验。研究表明, 温度对鼠尾藻幼孢子体的生长影响最显著 ($P < 0.05$), 25 °C 时幼孢子体比生长速率 (SGR) 获得最大值, 为 10.78%, 随着温度的降低 SGR 逐渐降低; 盐度对幼孢子体的 SGR 影响显著 ($P < 0.05$), 盐度 30 时幼孢子体生长较快, 盐度降低 SGR 也降低; 光照度 2 000~8 000 lx 对幼孢子体的生长影响不显著, SGR 极差接近误差水平。氮磷营养盐水平对鼠尾藻幼孢子体的生长影响较大, 实验用自然海水中氮素基本可以满足幼孢子体的需求, 而磷元素相对缺乏。氮素加富条件下, 氮磷比大于 15:1 时不利于幼孢子体的生长, 适宜的氮磷比为 10:1~2:1。结果表明, 温度 25 °C、盐度 30、光照度 2 000 lx 是鼠尾藻幼孢子体早期生长发育适宜的条件。培养液氮素含量保持在 0.45~1 mg/L, 磷含量保持在 0.3 mg/L 左右有利于幼孢子体快速生长。

关键词 鼠尾藻 幼孢子体 正交实验 营养盐水平 比生长速率

中图分类号 Q953 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0133-05

Cultural conditions for *Sargassum thunbergii* germlings

MA Xing-yu^{1,2} LIANG Zhou-ru² LIU Fu-li² WANG Fei-jiu^{2*}
SUN Xiu-tao² WANG Wen-jun² LIU Kun^{1,2}

(¹College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(²Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT To determine the suitable cultural conditions for the growth and development of *Sargassum thunbergii* germlings, orthogonal experiments on three factors (illumination, temperature, and salinity, each with three levels) and the nutrients level experiments were carried out. The results showed that the effect of temperature on the special growth rate (SGR) of *S. thunbergii* germlings was highly significant ($P < 0.05$). The maximum value of SGR of germlings was 10.78% when the temperature was 25 °C. The SGR decreased gradually as the temperature dropped. Effect of salinity on the SGR of germlings was significant ($P < 0.05$). The germlings grew faster when salinity was 30, whereas the SGR decreased as salinity reduced. Effect of illumination (2 000-8 000 lx) on the SGR was not significant and the range of SGR was

国家“863”项目(2012AA10A413)、公益性行业(农业)专项(200903030)和中国科学院实验海洋生物学重点实验室开放基金共同资助

* 通讯作者。E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85838673

收稿日期: 2013-05-08; 接受日期: 2013-09-23

作者简介: 马兴宇(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事海藻生物学研究。E-mail: maxingyugood@163.com, Tel: 18366215712

close to the error. Nitrogen and phosphorus nutrients levels had a great influence on the SGR of *S. thunbergii* germlings. The nitrogen concentration of the natural seawater in the experiments basically met the requirements of the germlings growth; however, the phosphorus was relatively insufficient. When N/P was over 15 : 1, it was adverse to germlings growth. The suitable N/P ratio was about 10 : 1-2 : 1. In conclusion, temperature 25 °C, salinity 30 and illumination 2 000 lx were the suitable culture conditions for *S. thunbergii* germlings. Culture medium with nitrogen concentration of 0.45-1 mg/L and phosphorus concentration of 0.3 mg/L was beneficial to the germlings growth.

KEY WORDS *Sargassum thunbergii* Germlings Orthogonal experiment
Nutrient level Special growth rate

鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 隶属于褐藻门 Phaephyta、马尾藻科 Sargassaceae、马尾藻属 *Sargassum*, 分布广泛, 是潮间带的优势种之一(杨震等 2009; 刘剑华等 1994; 王伟定 2003)。鼠尾藻作为优势种对潮间带生物种群的维护起重要作用, 也对解决海水富营养化问题起到一定的作用(邹定辉等 2011; 吴海一等 2010)。鼠尾藻可用于提取褐藻多糖(杨方美等 2005), 也可用于海参饲料添加剂(孙侦龙等 2012)、海洋药物提取(魏玉西等 2006; 张尔贤等 1994)等领域。

鼠尾藻繁殖方式分为有性繁殖与营养繁殖。野生鼠尾藻主要以营养繁殖方式为主, 从假根处生成新的直立枝, 人工育苗则采用有性繁殖方式。幼孢子体培育是育苗早期重要的环节, 而对于鼠尾藻幼孢子体发育的报道还较少(梁洲瑞等 2010、2012; Zhao *et al.* 2008)。目前, 在山东、浙江已开展了鼠尾藻的人工繁育及养殖, 由于受苗种的限制, 养殖规模仍然较小。虽然鼠尾藻人工育苗技术已初步建立(王飞久等 2006), 但其关键技术还有待进一步优化, 如苗种的暂养、杂藻去除等依然是亟待攻克的难题。作者研究了光照、温度、盐度、氮、磷对幼孢子体生长的影响, 进一步优化了鼠尾藻苗种早期培育条件, 为规模化繁育幼苗提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

于 2012 年 6 月下旬, 青岛太平角采集野生鼠尾藻雌、雄亲本, 洗去藻体上的泥沙与杂物后, 立即带回实验室, 用消毒灭菌海水清洗数遍, 置于培养箱中暂养。每天早、晚各镜检 1 次, 待雌性亲本生殖托的生殖窝内出现卵细胞时, 立即将雌、雄亲本阴干刺激, 20 min 后开始采苗。将两个实验用塑料水槽(内径 38.5 cm×25.5 cm×9 cm)底部铺满已消毒灭菌的载玻片(7.7 cm×2.6 cm), 加入 3/4 消毒灭菌海水, 然后放入 RXZ 型智能培养箱中。将雌、雄鼠尾藻亲本按藻株 6 : 1 比例均匀铺满两个水槽。采苗光照为 5 000 lx, 温度为 21 °C。采苗期间经常抖动鼠尾藻亲本, 促进受精卵脱离生殖托而附着在载玻片上, 抖动鼠尾藻时不要触碰到下面的载玻片。采苗 2 d 后撤去亲本藻体, 用消毒灭菌海水轻轻地清洗掉载玻片上脱落的生殖托、气囊、叶片等杂物, 获得的附着鼠尾藻幼孢子体用于后续试验。每组实验均将两片附着有鼠尾藻幼孢子体的载玻片放入盛有 1 L 培养液的烧杯中, 放在 RXZ 型智能培养箱中进行培养。

1.2 实验方法

1.2.1 环境因子正交实验设计

选取光照度、温度、盐度 3 个因子作为交叉试验因子, 以幼孢子体前 6 d 的比生长速率为指标, 进行三因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交实验, 以确定幼孢子体生长适宜的生态参数, 正交实验设计因素与水平见表 1 所示。按照 $L_9(3^4)$ 正交表的组合共安排 9 组培养实验。培养液为灭菌消毒后的自然海水, 以蒸馏水调节培养液的盐度, 每 3d 换 1 次水, 培养周期为 6 d。培养前及培养后, 对鼠尾藻幼孢子体进行光学显微镜(Nikon E200)检测。

1.2.2 氮磷营养盐水平设置

表 1 正交实验的因素水平设计

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

用 PhotoLab 多参数水质分析仪(德国 WTW 公司)测定实验用自然海水中的氮元素质量浓度为 0.45 mg/L,磷元素质量浓度为 0.06 mg/L。以等物质的量浓度的 NH₄Cl 与 NaNO₃ 混合溶液为氮源, KH₂PO₄ 溶液为磷源进行添加。设置了 3

水平 Level	光照度 Illuminance(lx)	温度 Temperature(℃)	盐度 Salinity
1	8 000	25	30
2	4 000	20	25
3	2 000	15	20

个水平的实验:1)氮浓度均为 0.45 mg/L,分别设置磷元素浓度 0.06、0.15、0.3、0.45 mg/L 4 组,培养周期为 6d;2)磷浓度均为 0.06 mg/L,分别设置氮元素浓度 0.45、1、3、6 mg/L 4 组,培养周期为 6 d;3)氮浓度均为 3 mg/L,按氮磷元素质量浓度比 50 : 1、15 : 1、10 : 1、5 : 1、2 : 1、1 : 1 添加磷元素,设置 6 组,培养周期为 12d。各组每 3 d 观测 1 次,更换培养液,其他条件为光照度 2 000 lx,温度 20 ℃。

用 Image-Pro Plus 5.1 图像分析软件对实验所拍照片进行分析,测量鼠尾藻幼孢子体的长度。幼孢子体比生长速率计算公式为:

$$SGR=100 \times (\ln L_2 - \ln L_1) / t$$

式中, L₁、L₂ 分别表示培养前后幼孢子体的长度, t 表示培养的时间。

1.2.3 数据分析

用 Excel 整理数据及绘制图形,用正交设计助手 II V3.1 对正交实验的结果进行极差与方差分析。

2 结果

2.1 环境因子正交实验对鼠尾藻幼孢子体生长的影响

如表 2 所示,由正交实验结果极差表明,在鼠尾藻幼孢子体前 6d 培养实验中,温度对鼠尾藻幼孢子体生长的影响最大,其次为盐度,光照度最小。温度 25℃下,SGR 最高为 10.78%,随着温度的降低,SGR 也呈减小的趋势,极差为 3.320%。盐度因子对幼孢子体 SGR 影响也较大,随着盐度的降低,SGR 也呈减小的趋势,极差为 2.603%。3 个光照度水平对鼠尾藻幼孢子体 SGR 的影响较小,极差只有 0.517%,接近误差值,高光照下硅藻繁殖旺盛。由表 3 正交实验结果方差分析表明,温度和盐度对幼孢子体 SGR 有显著影响(P<0.05),光照度影响不显著。因此较优的培养条件为温度 25℃、盐度 30 和光照 2 000 lx。

表 2 正交实验结果极差分析

Table 2 Range analysis of orthogonal experimental results

实验号 Experimental number	因素 Factor				误差 Error	指标 Index 比生长速率 Specific growth rate(%)
	光照度 Illuminance(lx)	温度 Temperature(℃)	盐度 Salinity			
1	1	1	1	1	1	12.45
2	1	2	2	2	2	10.19
3	1	3	3	3	3	6.09
4	2	1	2	3	3	10.80
5	2	2	3	1	1	8.21
6	2	3	1	2	2	8.17
7	3	1	3	2	2	9.09
8	3	2	1	3	3	10.58
9	3	3	2	1	1	8.12
均值 1 Average 1(%)	9.577	10.780	10.400	9.593		
均值 2 Average 2(%)	9.060	9.660	9.703	9.150		
均值 3 Average 3(%)	9.263	7.460	7.797	9.157		
极差 Range (%)	0.517	3.320	2.603	0.443		

表3 正交实验结果方差分析

Table 3 Orthogonal experimental results analysis of variance

指标 Index	方差来源 Variance source	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degree of freedom	F比 F ratio	F临界值 F critical-value	显著性水平 Significance level
比生长速率 Specific growth rate(%)	光照 Illuminance(lx)	0.406	2	1.049	19.000	
	温度 Temperature(°C)	17.117	2	44.230	19.000	0.05
	盐度 Salinity	10.898	2	28.160	19.000	0.05
	误差 Error	0.390	2			

2.2 氮磷营养盐水平对鼠尾藻幼孢子体生长的影响

如图1所示,在实验用自然海水中氮浓度0.45 mg/L保持不变的条件下,磷元素加富培养6d,幼孢子体SGR呈先增大、后减小的趋势。不添加磷元素时,此时SGR最小,为9.8%;磷浓度加富到0.3 mg/L时,SGR最大,为15.48%,此时磷浓度为原海水中的5倍。如图2所示,以实验用自然海水中磷浓度0.06 mg/L保持不变,当氮元素加富到1 mg/L时,SGR即达最大值12.03%,此时氮浓度为实验海水中的2.22倍。随着氮元素继续增加,SGR呈减小趋势。当氮浓度超过3 mg/L时,SGR小于不添加时的值,说明当磷浓度较低时,氮浓度超过3 mg/L,不利于幼孢子体的生长。研究发现鼠尾藻幼孢子体对磷的需求量较高。

如图3所示,氮浓度为3 mg/L保持不变时,不同氮磷浓度比对鼠尾藻幼孢子体SGR影响较大。第1~3天幼孢子体均具有较高的SGR,而4~6d的SGR急剧减小,随着培养时间的增加,SGR呈减小趋势,说明培养的前3d是幼孢子体的快速生长期,随着时间的推移生长速度变缓。氮磷比为50:1组,1~3d的SGR高达17.76%,但是4~6d就降到了0.98%,幼孢子体生长受到了抑制。氮磷比为1:1组,1~3d的SGR较高,达17.77%,而4~12d的SGR相对较低。氮磷比15:1组,4~6d SGR有较高值,为7.26%,但7~9d、10~12d SGR却较小。氮磷比为10:1、5:1和2:1 3组,4~12d均有较高的SGR,说明适宜的氮磷比能够促进幼孢子体的快速生长,尤其是5:1组,10~12d仍保持5.61%的生长速率。

3 讨论

3.1 环境因子对鼠尾藻幼孢子体生长的影响

光照度、温度、盐度等因子对鼠尾藻幼孢子体的生长与发育极其重要。梁洲瑞等(2012)分析了光照度和温度对鼠尾藻幼孢子体生长的影响,发现3 000~6 000 lx对受精后至第7天的幼孢子体长度影响不显著,温度对幼孢子体生长影响较大。本研究发现,光照度在2 000~8 000 lx,对受精后至第6天鼠尾藻幼孢子体的SGR影响也不显著,高光照反而易引起硅藻的大量繁殖,因此2 000 lx是适宜的光照度。Zhao等(2008)认为,前7d在88 μmol photons/m²·s(约4 400 lx)条件下培养的鼠尾藻幼孢子体长度显著高于44 μmol photons/m²·s(约2 200 lx),但其比生长速率是否有显著差异并未指出。

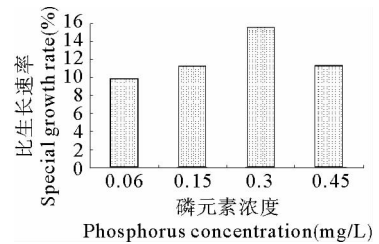


图1 不同磷浓度对鼠尾藻幼孢子体比生长速率的影响

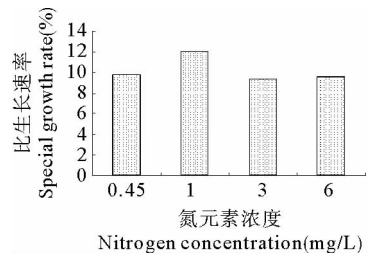
Fig. 1 Effect of phosphorus concentration on specific growth rate of *S. thunbergii* germlings

图2 不同氮浓度对鼠尾藻幼孢子体比生长速率的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen concentration on specific growth rate of *S. thunbergii* germlings

温度是影响鼠尾藻幼孢子体生长的重要因素。本研究中 25℃ 条件下,幼孢子体的 SGR 较大,随着温度降低,SGR 显著减小,温度组的极差最大,这与梁洲瑞等(2012)的研究结果一致。盐度对幼孢子体生长影响也显著,随着盐度的降低,幼孢子体生长速度变小,Chu 等(2012)也发现,低盐度不利于鼠尾藻幼孢子体的生长。而鼠尾藻成体对盐度有较大的耐受范围,可见幼孢子体阶段调节渗透压的能力较低。综上所述,鼠尾藻幼孢子体前 6d 培养的适宜条件为温度 25℃、盐度 30 和光照度 2 000 lx。而随着幼孢子体的长大,适宜的条件也会发生变化,还需进一步的研究。

3.2 氮磷营养盐水平对鼠尾藻幼孢子体生长的影响

氮磷比对海藻孢子体的生长影响较大(Nimura *et al.* 2002; Mizuta *et al.* 2003)。本研究发现,以实验用自然海水中氮元素浓度 0.45 mg/L 保持不变时,随着磷元素加富,幼孢子体生长速度不断提高,当磷浓度添加到原海水的 5 倍时,SGR 达到最大值 15.48%。而以实验海水中磷元素 0.06 mg/L 保持不变时,氮元素加富到 1 mg/L 时,SGR 即达最大值,且只有 12.03%,说明培养鼠尾藻幼孢子体的实验用自然海水中磷是限制因素,适当添加磷可以促进幼孢子体的快速生长。氮、磷元素均加富条件下,氮磷比对幼孢子体生长影响显著。氮浓度 3 mg/L 时,氮磷比 50:1 组培养的幼孢子体,在 4~6d 的 SGR 急剧减小,氮磷比 10:1、5:1、2:1 组 SGR 在培养周期内均较高。另外研究发现,1~3d 氮磷比过大或者过小均会刺激幼孢子体的生长,4~9d 较大的生长速率出现在氮磷比 2:1~5:1,而 10~12d 较高的生长速率推移到了 5:1~10:1,随着幼孢子体的成长,适宜的氮磷比也在不断地变化,而生长前期对磷有较多的需求。鞠青等(2009)认为,氮磷比大于 15:1 时,会降低海带胚孢子的萌发率,说明较大的氮磷比可能不适宜海藻幼孢子体的生长与发育。本研究证明,在流水条件下,自然海水中的氮元素基本可满足鼠尾藻幼孢子体的需求,而适当添加磷可促进幼孢子体的快速生长。氮磷均加富条件下,氮磷比为 10:1~2:1,对鼠尾藻幼孢子体的生长有促进作用。

参 考 文 献

- 王飞久,孙修涛,李 峰. 2006. 鼠尾藻的有性繁殖过程和幼苗培育技术研究. 海洋水产研究, 27(5):1-6
- 王伟定. 2003. 浙江省马尾藻属和羊栖菜属的调查研究. 上海水产大学学报, 12(3):227-232
- 孙侦龙,高勤峰,董双林,王 芳. 2012. 不同配比饲料对刺参 C、N、P 营养盐收支的影响. 中国海洋大学学报, 42(增刊):067-074
- 刘剑华,张耀红. 1994. 山东半岛东部海域诸岛潮间带底栖海藻的研究. 青岛海洋大学学报, 24(3):384-392
- 杨方美,王 林,胡秋辉. 2005. 鼠尾藻多糖的制备及其抗氧化活性. 食品科学, 26(2):224-227
- 杨 震,王 悠,董开升,唐学玺,赵 星. 2009. 青岛潮间带大型底栖海藻群落的研究. 中国海洋大学学报, 39(4):647-651
- 张尔贤,俞丽君,范益华,王学琦. 1994. 鼠尾藻醇提取物的生理活性和若干生化性质研究. 药物生物技术, 1(1):30-34
- 邹定辉,夏建荣. 2011. 大型海藻的营养盐代谢及其与近岸海域富营养化的关系. 生态学杂志, 30(3):589-595
- 吴海一,詹冬梅,刘洪军,丁 刚,刘 玮,李美真. 2010. 鼠尾藻对重金属锌、镉富集及排放作用的研究. 海洋科学, 34(1):69-74
- 梁洲瑞,王飞久,孙修涛,汪文俊,丁昌玲,李 涛. 2010. Cu²⁺ 对鼠尾藻幼孢子体生长的影响. 渔业科学进展, 31(6):116-121
- 梁洲瑞,孙修涛,王飞久,汪文俊,丁昌玲,李 涛,刘 坤. 2012. 光、温对鼠尾藻孢子体排放和幼孢子体生长的影响. 渔业科学进展, 33(1):109-113
- 鞠 青,王 悠,刘 素,唐学玺. 2009. 不同氮、磷配比人工海水对海带胚孢子早期发育的影响. 应用生态学报, 20(8):1947-1951
- 魏玉西,李 敬,赵爱云,王长云,于曙光,丛培江. 2006. 鼠尾藻多糖的制备及其抗凝血活性的初步研究. 中国海洋药物杂志, 25(2):41-44
- Chu SH, Zhang QS, Liu SK and 4 others. 2012. Tolerance of *Sargassum thunbergii* germlings to thermal, osmotic and desiccation stress. Aquat Bot 96(1):1-6
- Mizuta H, Ogawa S, Yasui H. 2003. Phosphorus requirement of the sporophyte of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). Aquat Bot 76(2):117-126
- Nimura K, Mizuta H, Yamamoto H. 2002. Critical contents of nitrogen and phosphorus for sorus formation in four *Laminaria* species. Botanica Marina 45(2):184-188
- Zhao ZG, Zhao FJ, Yao JT and 3 others. 2008. Early development of germlings of *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyta) under laboratory conditions. J Appl Phycol 20:925-931

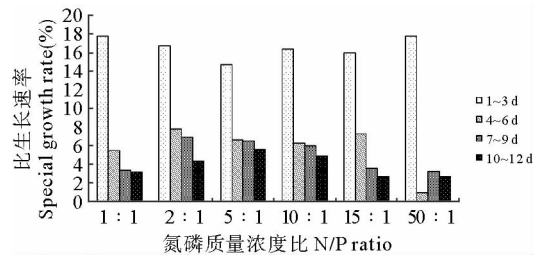


图3 不同氮磷比对鼠尾藻幼孢子体比生长速率的影响
Fig. 3 Effect of N/P ratio on specific growth rate of *S. thunbergii* germlings