

# 不同氮、磷配比人工海水对海带胚孢子早期发育的影响<sup>\*</sup>

鞠青 王悠 刘素 唐学玺<sup>\*\*</sup>

(中国海洋大学海洋生命学院生态学实验室, 山东青岛 266003)

**摘要** 利用不同氮、磷配比的人工海水培养海带胚孢子, 观察其对海带早期发育的影响。结果表明, 培养于人工海水中的海带胚孢子 80% 能够正常发育, 但与培养于天然海水中的对照组仍存在显著差异, 且人工海水中海带胚孢子的萌发和配子体的形成时间滞后, 人工海水培养所形成的海带雌配子体数量显著高于雄配子体 ( $P < 0.001$ ); 不同氮、磷配比的人工海水对海带胚孢子萌发率的影响不同, N:P > 15:1 的氮磷比会降低海带胚孢子的萌发率, 而缺乏氮或磷营养盐的人工海水则极显著抑制海带胚孢子的萌发 ( $P < 0.001$ ); 海带胚孢子能够在人工海水中进行早期发育, 但人工海水中的氮、磷营养盐浓度以及氮/磷比均会对海带发育初期胚孢子的萌发率产生影响; 人工海水中氮、磷营养盐的缺乏会导致海带配子体形成时间的滞后, 并对其雌雄分化产生一定影响。

**关键词** 人工海水 氮磷比 胚孢子 早期发育 海带

文章编号 1001-9332(2009)08-1947-05 中图分类号 S555+.6 文献标识码 A

**Effects of artificial seawater with different N/P ratio on early development of *Laminaria japonica* embryo spore.** JU Qing, WANG You, LIU Su, TANG Xue-xi (Laboratory of Ecology, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China). -Chin. J. Appl. Ecol. 2009 20(8): 1947-1951.

**Abstract:** The embryo spores of *Laminaria japonica* were cultured in artificial seawater with different N/P ratio to observe their early development. 80 percent of the spores cultivated in whole-ingredient artificial seawater developed normally, but the time of spore germination and gametophyte formation was lagged significantly and the amount of female gametes was significantly higher than that of male gametes ( $P < 0.001$ ), as compared to the control cultivated in natural seawater. Artificial seawater with different N/P ratio showed different effects on the spore germination rate. The artificial seawater with N/P > 15 decreased the spore germination rate, while that without N or P inhibited the spore germination significantly ( $P < 0.001$ ). It was concluded that *L. japonica* spores could develop normally in artificial seawater, but their germination rate was affected by the seawater N/P. The deficiency of N or P in artificial seawater would lag the time of gametophyte formation and affect the differentiation ratio of female-male gametes.

**Key words:** artificial seawater; N/P ratio; embryo spore; early development; *Laminaria japonica*.

人工海水是人工配制的盐类混合溶液, 其性质近似于天然海水的离子组成、渗透压和 pH, 通常用于饲养海产动物或保存海产动物的器官、组织等。目前, 许多学者利用人工海水已成功进行了养殖海洋生物的研究<sup>[1-4]</sup>, 但关于人工海水进行海带 (*Lami-*

*naria japonica*) 养殖的研究尚鲜见报道。

海水中的营养盐不仅可影响藻类生长速率, 还能影响藻体的生化组成或某些生化性质<sup>[5-8]</sup>。氮 (N)、磷 (P) 营养盐是海藻细胞生长的重要限制性营养元素, 尤其是 N/P 对海藻生长具有较大影响<sup>[9-13]</sup>。本文研究了不同 N/P 的人工海水对海带胚孢子早期发育的影响, 并探讨了利用人工海水养殖海带的可行性, 旨在为内陆地区进行海带养殖提供依据。

<sup>\*</sup> 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-05-0597) 资助。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者。E-mail: tangxx@ouc.edu.cn

2008-12-24 收稿, 2009-06-03 接受。

1 材料与方法

1.1 海带采集及预处理

本研究所用试验材料为成熟期海带,2007 年 6 月采自青岛崂山区王哥庄海带养殖场.实验室内选取两面具有孢子囊的成熟海带孢子体进行孢子放散,将两面具有孢子囊的部分切割成 5 cm×5 cm 大小,在灭菌海水中用纱布反复擦洗海带表面 3~4 次,以去除海带表面附着的藻类和杂质.然后将洗净的海带叶片在避光通风处阴干 2 h,室内温度保持在 18 ℃左右,阴干处理后的叶片置于预冷(10 ℃)的灭菌天然海水中 1 h,使其充分放散孢子;之后将含有放散孢子的海水倒入插有载玻片的染色缸中,附着 1.5 h 后每隔 10 min 镜检 1 次,直到载玻片上附着的孢子密度达到每视野 30~40 个(物镜 10×,Φ=2 mm);最后将载玻片转移到培养皿(半径 100 mm)中培养,每个培养皿中放置 12 片载玻片<sup>[14-15]</sup>.

1.2 试验方法

1.2.1 天然灭菌海水的制备 天然海水取自青岛太平角,以 200 目 4 层筛绢过滤至三角瓶中,煮沸 10 min,以除去大部分细菌和杂藻,折光仪测定海水盐度约 30‰.

1.2.2 人工海水的配制 本试验所用的人工海水按照 ESAW 配方<sup>[16]</sup>配置,其中 NaNO<sub>3</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度分别为 0.55 mmol·L<sup>-1</sup>和 0.035 mmol·L<sup>-1</sup>.在此基础上保持其他成分不变,只改变相应的氮、磷营养盐浓度,配制不同 N/P 的人工海水,共设 9 个试验组(表 1),每个试验组 3 次重复,以培养于天然海水中的一组为对照.

表 1 试验分组情况  
Tab.1 Status of experimental groups

处 理 Treatment	N、P 浓度 N、P concentration		N/P
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	
	(mmol·L <sup>-1</sup> )	(mmol·L <sup>-1</sup> )	
N <sub>0</sub> +P <sub>0</sub> <sup>a)</sup>	0	0	0/0
N <sub>1</sub> +P <sub>0</sub>	0.55	0	0.55/0
N <sub>2</sub> +P <sub>0</sub>	1.1	0	1.1/0
N <sub>0</sub> +P <sub>1</sub>	0	0.035	0/0.035
N <sub>1</sub> +P <sub>1</sub> <sup>b)</sup>	0.55	0.035	16/1
N <sub>2</sub> +P <sub>1</sub>	1.1	0.035	31/1
N <sub>0</sub> +P <sub>2</sub>	0	0.071	0/0.071
N <sub>1</sub> +P <sub>2</sub>	0.55	0.071	8/1
N <sub>2</sub> +P <sub>2</sub>	1.1	0.071	15/1

a) 不含 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 的人工海水 Artificial seawater without NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; b) 完全配方的人工海水 Whole-ingredient artificial seawater.

1.2.3 培养条件 利用不同 N/P 的人工海水培养胚孢子.静水培养,培养温度(10±1)℃、光强 20 μmol photons·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、光暗比 L:D=10:14,直至形成雌雄配子体.雄配子体是由十几个至几十个细胞组成分枝的丝状体,雌配子体是由 1 个或几个较大的细胞组成,少有分枝.各培养皿中的培养液每 2 d 更换一次.

1.2.4 指标检测 胚孢子附着后 24 h 时,在物镜(10×,Φ=2 mm)显微镜下统计试验组的胚孢子萌发率,12 h 后再统计 1 次,观察胚孢子萌发的形态以及是否滞后,以第 2 次的统计数据为最终数据:

胚孢子萌发率 =  $\frac{\text{胚孢子萌发数}}{\text{检查的胚孢子总数}} \times 100\%$

胚孢子附着 72 h 后,在物镜(10×,Φ=2 mm)显微镜下统计配子体发生率,每隔 24 h 统计 1 次,记录配子体形成时间,观察是否有滞后的现象以及配子体形成的外形是否正常,共统计 3 次,以最后一次的数据作为最终数据:

配子体形成率 =  $\frac{\text{形成配子体个数}}{\text{检查细胞总数}} \times 100\%$

胚孢子附着 168 h 后,在物镜(40×,Φ=0.5 mm)显微镜下统计海带雌、雄配子体的比率,每隔 24 h 统计 1 次,记录每 1 试验组完全形成的时间,共统计 3 次,取最后 1 次的试验数据:

雌配子体形成率 =  $\frac{\text{雌配子体个数}}{\text{形成的全部配子体个数}} \times 100\%$

雄配子体形成率 =  $\frac{\text{雄配子体个数}}{\text{形成的全部配子体个数}} \times 100\%$

1.3 数据处理

使用 SPSS 13.0 统计软件对胚孢子萌发率、配子体形成率和雌雄配子体比率进行单因素方差分析(one-way ANOVA),对差异显著的结果进行多重比较分析(LSD 法).

2 结果与分析

2.1 不同氮、磷配比人工海水对海带胚孢子萌发率的影响

由图 1 可以看出,附着 24 h 时,海带胚孢子能够在不同营养水平的人工海水中萌发,但萌发率存在显著的组间差异.在不含氮、磷营养盐的人工海水中(N<sub>0</sub>+P<sub>0</sub>),海带胚孢子的萌发率明显高于人工海水处理(N<sub>1</sub>+P<sub>1</sub>),且两处理的萌发率均显著低于培

养于天然海水中的对照组(  $P < 0.001$  ).

在缺乏氮营养盐的条件下(  $N_0$  组,  $\mu\text{NO}_3^-$  浓度为  $0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ), 海带胚孢子的萌发率随介质中  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  浓度的增加呈逐渐降低的趋势; 同样, 在缺乏 P 营养盐的条件下(  $P_0$  组,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  浓度为  $0$  ), 海带胚孢子萌发率随  $\text{NO}_3^-$  浓度的升高呈降低趋势( 图 2 ).

在  $N_1$  处理组(  $\text{NO}_3^-$  浓度为  $0.55\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ), 当  $N/P = 8/1$  时, 海带胚孢子萌发率达最高(  $94\%$  ), 与对照组无显著差异(  $P = 0.356 > 0.05$  ); 当  $N/P = 0.55/0$  时, 海带胚孢子萌发率明显受到抑制, 与对照组的差异达极显著水平(  $P < 0.001$  ).

$N_0 + P_2$  和  $N_2 + P_0$  处理均与对照组的海带胚孢子萌发率存在显著差异(  $P < 0.001$  ). 在不添加  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  的人工海水(  $N_0 + P_0$  )中, 海带胚孢子的萌发率与对照组无显著差异(  $P = 0.140 > 0.05$  ), 说明  $N_0 + P_0$  处理下海带胚孢子仍可以正常萌发.

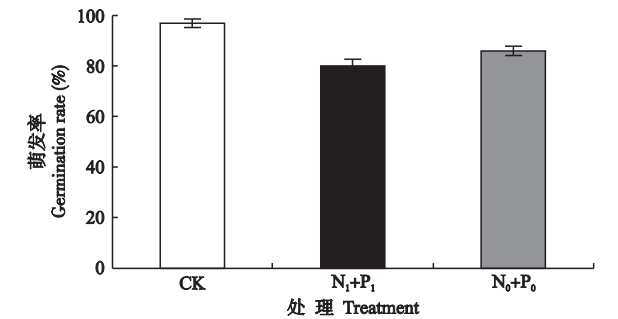


图 1 人工海水对海带胚孢子萌发率的影响  
Fig.1 Effect of artificial seawater on the spores germination rate of *Laminaria japonica*.

不同字母表示不同处理间存在显著差异(  $P < 0.001$  ) Different letters indicated significant difference among different treatments at 0.001 level. 下同 The same below.

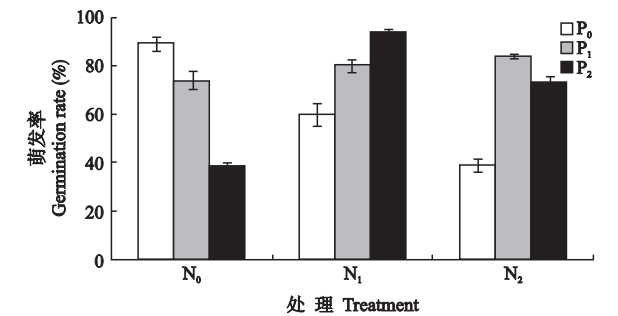


图 2 不同氮、磷配比的人工海水对海带胚孢子萌发率的影响  
Fig.2 Effect of artificial seawater with different concentrations of nitrogen and phosphorus on the spores germination rate of *Laminaria japonica*.

2.2 不同氮、磷配比人工海水对海带配子体发生率的影响

海带在游孢子附着 72 h 后开始由胚孢子向配子体转化( 此时为图 3 中的 0 h ), 海带配子体的发生率在 3 种不同培养介质中(  $N_0 + P_0$ 、 $N_1 + P_1$  和对照组 )存在显著的组间差异(  $P < 0.001$  ,图 3 ). 胚孢子附着 24 h 时, 培养于人工海水(  $N_1 + P_1$  )中的海带配子体发生率极显著低于培养于天然海水中的对照组(  $P < 0.001$  ), 却极显著高于不含  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  的人工海水(  $N_0 + P_0$  )中的发生率(  $P < 0.001$  ). 胚孢子附着 48 h 时,  $N_0 + P_0$  处理的海带配子体发生率极显著低于人工海水(  $N_1 + P_1$  )和对照组(  $P < 0.001$  ), 配子体萌发率在人工海水(  $N_1 + P_1$  )与对照组中均较高, 两组间的差异不显著. 结果表明, 海带游孢子附着 72 h 后开始由胚孢子向配子体转化, 虽然人工海水中海带配子体的发生率明显滞后, 但这种转化在人工海水中同样能够完成.

2.3 不同氮、磷配比人工海水对海带雌雄配子体比率的影响

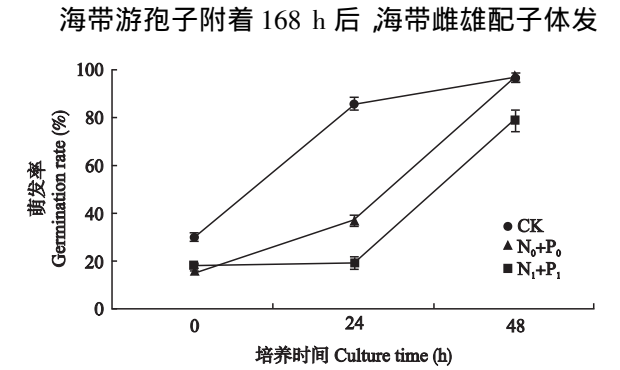


图 3 人工海水对海带配子体发生率的影响  
Fig.3 Effect of artificial seawater on the development rate of gametophyte of *Laminaria japonica*.

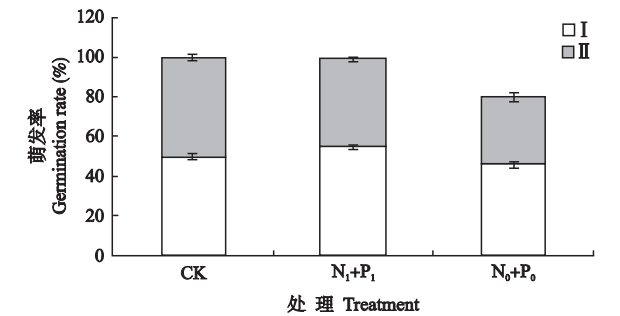


图 4 人工海水对海带雌( I )、雄( II )配子体比例的影响  
Fig.4 Effect of the artificial seawater on the ratio of female ( I ) to male gametophytes ( II ) of *Laminaria japonica* ( mean  $\pm$  SD ).

生比例在对照组、人工海水( $N_1 + P_1$ )和不含  $NO_3^-$ 、 $H_2PO_4^-$  人工海水( $N_0 + P_0$ )的培养下存在极显著的组间差异( $P < 0.001$ )。胚孢子附着 168 h 时,人工海水( $N_1 + P_1$ )和不添加  $NO_3^-$ 、 $H_2PO_4^-$  人工海水( $N_0 + P_0$ )中的海带配子体有小部分裂解死亡,未能分化形成雌雄配子体,且  $N_0 + P_0$  处理中没有分化为雌雄配子体的配子体比率极显著高于  $N_1 + P_1$  处理( $P < 0.001$ )。

### 3 讨 论

#### 3.1 不同氮、磷配比人工海水对海带胚孢子萌发率的影响

在自然条件下,氮、磷营养盐常成为植物生长的限制因素<sup>[17]</sup>。Ichikiz 等<sup>[18]</sup>在对海藻的研究中也发现了类似结果。Björk 等<sup>[19]</sup>研究表明,高浓度的磷酸盐会抑制藻类生长, $N/P = 0/0.071$  和  $N/P = 1.1/0$  处理对海带胚孢子萌发有明显的抑制作用。Berges 等<sup>[16]</sup>研究表明,氮、磷营养盐比例偏高或偏低均将导致浮游植物出现磷限制的现象,而当人工海水中的  $NO_3^-$  浓度为  $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $H_2PO_4^-$  为  $0.071 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $N/P = 8/1$ )时胚孢子萌发率最高,达 94%,与培养于天然海水中的对照组相近,因此可以推测, $N/P = 8/1$  可能是海带胚孢子萌发的最适人工海水比例。另外,海带胚孢子也可能在不含氮、磷营养盐的人工海水中正常萌发,并有少部分可形成配子体。在高等植物的种子中,有胚乳或子叶这样的营养储存器官可以保证种子的正常萌发和早期生长,直到能够通过自身的营养器官获取营养<sup>[20]</sup>。因此推断,在海带胚孢子中可能存在营养储存以保证其萌发的现象。本研究结果表明,虽然人工海水能促使海带胚孢子的萌发以及配子体的发生,但却具有一定的滞后性,原因可能是人工海水中的氮、磷营养盐主要源于  $NO_3^-$ 、 $H_2PO_4^-$ ,而海藻更易于吸收以  $NH_4^+$  和  $HPO_4^{2-}$  形式存在的氮、磷营养盐<sup>[21-23]</sup>,这种形态上的差异可能导致海带胚孢子不能充分吸收环境中的营养盐,致使发育滞后。

#### 3.2 不同氮、磷配比人工海水对海带配子体形成及雌雄分化的影响

在角叉菜(*Chondrus ocellatus*)配子体的早期发育阶段,首要影响因素是培养液中  $NO_3^-$ 、 $H_2PO_4^-$  的含量及比例,并且决定着海藻将来的生长发育<sup>[24]</sup>。本研究中海带雌雄配子体形成阶段,不含  $NO_3^-$ 、 $H_2PO_4^-$  的人工海水试验组有一半左右的配子体没有进行分化,并逐渐出现裂解、死亡的现象,说明氮、

磷营养盐是海带配子体分化以及继续生长的必需因素。本试验应用的人工海水培养液使海带雌、雄配子体发生的比例存在显著差异,组内雌配子体的发生率高于雄配子体,其原因可能是人工海水中缺乏某些海带雄配子体发生所需的微量元素,造成部分海带雄配子体因不适应外界环境而死亡,从而可以推断出海带雌配子体的抗逆性优于雄配子体。Druehl 等<sup>[25]</sup>发现,相对于海带雌配子而言,雄配子体细胞内的 DNA 更紧实,且含有更多的核内蛋白,因此海带雄配子体的形成需要更多的氮、磷元素,以确保 DNA 及核内蛋白的形成。培养液中氮、磷营养盐的缺乏以及  $N/P$  比例的变化可使海带胚孢子的萌发和配子体的形成滞后,同时影响雌雄胚子体的形成比例。

人工海水的配方含有各种无机元素,因此在不易获得天然海水的地区,用合适的人工海水替代天然海水来养殖大型藻类,对开展相关的研究具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Li L (李琳), Wu Z-N (吴仲南), Yan X-H (严兴洪). A study on culture of *Porphyra haitanensis* in artificial seawater. *Journal of Shanghai Fisheries University* (上海水产大学学报), 2006, **15**(2): 186-189 (in Chinese)
- [2] Wang Y (王嫣), Zhao P-S (赵平孙), Wang J (王珺). The comparison of the growth and development of the Lancelets *Branchiostoma belcheri tsingtaunense* reared with natural and artificial seawater. *Natural Science Journal of Hainan University* (海南大学学报·自然科学版), 2002, **20**(1): 62-66 (in Chinese)
- [3] Xu Z (徐镇), Jiang J-P (江锦坡). Study on culture of *Penaeus vannamei* Boone in artificial seawater. *Journal of Aquaculture* (水产养殖), 2003, **24**(1): 42-43 (in Chinese)
- [4] Li X (李霞), Guo G-L (郭贵良), Xu Y-B (徐彦兵). A study on culture of cobia *Rachycentron canadum* in artificial seawater. *Hebei Fisheries* (河北渔业), 2007(6): 22-24 (in Chinese)
- [5] Sun L-Y (孙灵毅), Wang L-Y (王力勇), Xu H-Z (徐惠章). Unicellular algae and the absorption of nutrient salts. *Fisheries Science & Technology Information* (水产科技情报), 2003, **30**(3): 119-120 (in Chinese)
- [6] Xu Q-J (许秋瑾), Jin X-C (金相灿), Wang X-M (王兴民), et al. Effects of different concentration ammonium-N on *Hydrilla verticillata* antioxidant enzymes under Cd stress. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2007, **18**(2): 420-424 (in Chinese)
- [7] Sun L (孙凌), Jin X-C (金相灿), Zhong Y (钟远), et al. Changes of algal communities in water body with different proportions of nitrogen and phosphorus.

- Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(7): 1218–1223 (in Chinese)
- [ 8 ] Liu D-Y (刘东艳), Sun J (孙 军), Gong J (巩 晶). The effects of different N/P ratios on the growth of *Isochrysis galbana*. *Marine Fisheries Research* (海洋水产研究), 2002, **23**(1): 29–32 (in Chinese)
- [ 9 ] Liu D-H (刘德厚), Yu B (于 波), Tian S-M (田素敏). Effect of different nutrient elements on efficiency of kelp seedling rearing and the disease incidence of *Laminaria japonica* at early stage. *Shandong Fisheries* (齐鲁渔业), 1997, **14**(4): 11–12 (in Chinese)
- [ 10 ] Mizuta H, Ogawa S, Yasui H. Phosphorus requirement of the sporophyte of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Aquatic Botany*, 2003, **76**: 117–126
- [ 11 ] Oyama H, Kitadai Y, Kadowaki S. Production of cultured *Laminaria japonica* and its nitrogen and phosphate uptake in a coastal fish farm, Yatsushiro Sea. *Memoirs of Faculty of Fisheries*, 2005, **54**: 29–34
- [ 12 ] Guo XK, Jiang SM, Chen BZ, et al. Study on sori formation in *Laminaria japonica* aresch. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1989, **7**: 178–182
- [ 13 ] Nimura K, Mizuta H, Yamamoto H. Critical contents of nitrogen and phosphorus for sorus formation in four *Laminaria* Species. *Botanica Marina*, 2002, **45**: 184–188
- [ 14 ] Liu S (刘 素), Zhang Q-S (张全胜), Li W (李 伟), et al. The effect of UV-B radiation on the growth and physiological of the young sporophytes of *Laminaria japonica*. *Periodical of Ocean University of China* (中国海洋大学学报), 2008, **38**(6): 937–942 (in Chinese)
- [ 15 ] Liu S, Zhang QS, Wang Y, et al. The response of the early developmental stages of *Laminaria japonica* to enhanced ultraviolet-B radiation. *Science in China Series C: Life Science*, 2008, **51**: 1129–1136
- [ 16 ] Berges JA, Franklin DJ, Harrison PJ. Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *Journal of Phycology*, 2001, **37**: 1138–1145
- [ 17 ] Harrison PJ, Hurd CL. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Les Cahiers de Biologie Marine*, 2001, **42**: 71–82
- [ 18 ] Ichiki S, Mizuta H, Yamamoto H. Effects of irradiance, water temperature and nutrients on the growth of the sporelings of the crustose coralline alga *Lithophyllum yesoense* Foslie (Corallinales, Rhodophyceae). *Phycological Research*, 2000, **48**: 115–120
- [ 19 ] Björk M, Mohammed SM, Björklund M, et al. Coralline algae, important coral-reef builders threatened by pollution. *Royal Swedish Academy of Sciences*, 1995, **24**: 502–505
- [ 20 ] Lu S-W (陆时万), Xu X-S (徐祥生), Shen M-J (沈敏健). Botany. 2nd Ed. Beijing: Higher Education Press, 1991 (in Chinese)
- [ 21 ] Lobban CS, Wynne MJ. The Biology of Seaweeds. 4th Ed. Berkeley: University of California Press, 1981
- [ 22 ] Haglund K, Lindstrom J. The potential use of macroalgae for removal of nutrients from sewage water in East Africa. *Ambio*, 1995, **24**: 510–512
- [ 23 ] Shen G-Y (沈国英), Shi B-Z (施并章). Marine Ecology. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)
- [ 24 ] Mansilla A, Palacios M, Navarro NP, et al. Growth and survival performance of the gametophyte of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) under defined nutrient conditions in laboratory culture. *Journal of Applied Phycology*, 2008, **20**: 889–896
- [ 25 ] Druehl LD, Robertson BR, Button DK. Characterizing and sexing *Laminarialean* meiospores by flow cytometry. *Marine Biology*, 1989, **101**: 451–456

---

作者简介 鞠 青,女,1985 年生,博士研究生.主要从事生态毒理学研究. E-mail: juqing@ouc.edu.cn

责任编辑 杨 弘

---