

环境因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体孢子放散的影响*

高伟¹ 宫相忠¹ 张必达²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 长岛爱华海藻食品有限公司 烟台 265800)

提要 在实验室条件下,以本实验室保存的萱藻丝状体为材料,研究了温度(7—27℃),光照强度[18—126 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]和丝状体生物量(0.1—1.6mg/ml)对萱藻孢子放散的影响。结果显示:(1)温度为12℃最适宜萱藻孢子的放散,在此温度下,孢子放散量大,放散速度快;(2)光照强度对孢子的放散具有重要影响,72 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 为刺激萱藻孢子放散的最佳光照条件;(3)萱藻丝状体生物量过低,则孢子放散量较小无法达到采苗要求,而过高亦会抑制孢子的放散,生物量为0.8mg/ml时最适宜孢子的放散。

关键词 萱藻,丝状体,温度,光强,孢子放散
中图分类号 S945.51

我国在海藻养殖技术领域已处于世界领先地位,是世界第一海藻养殖大国,但主要栽培海藻的种类目前仅有10余种。随着人们生活品质的提升,现有种类的栽培海藻已不能满足市场的需求,而一些具经济价值的野生海藻资源由于可观的市场需求,自然资源被过度采收,面临资源枯竭的危险。在此前提下,开发具有较高经济价值的新型海藻势在必行。

萱藻 *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye.) Link 隶属于褐藻门(Phaeophyta),在我国北起辽东半岛,南至广东省海陵岛之间的广大沿海地区均有分布,系泛温带性海藻。萱藻常被沿海居民采集食用,因其口味鲜美、营养价值高而在沿海地区备受推崇,被视为海洋蔬菜珍品。此外,在日本和韩国,当地居民也有食用萱藻的习惯,萱藻的市场价格甚至超过了紫菜。综合考察各方面因素,萱藻是一种极具养殖潜力和经济价值的新型海藻。

到目前为止,关于萱藻的研究主要集中在萱藻的生活史(Clayton, 1976, 1978)及其各种存在形式在生活史中地位上(Fletcher, 2003; 邢永泽等, 2010),关于萱藻提取物的药用、保健价值也多有报道,主要集

中在其抗氧化性(Kuda *et al*, 2005)、抗病毒(Hudson *et al*, 1999)及抗肿瘤(Hiroyuki *et al*, 1990; 徐年军等, 2001; Kim *et al*, 2004)等生物活性方面,但关于萱藻丝状体孢子放散的研究,国内外尚未见报道。

萱藻具有异形世代交替的生活史,是由大型的配子体(即叶状体,亦即栽培对象)世代与微观的孢子体(主要以丝状体、垫状体、类垫状体三种形式存在)世代组成。配子体是作者研究的栽培对象,孢子体(尤以能产生单室孢子囊的丝状体为主)是作者进行人工育苗的种质来源。关于萱藻孢子体生长发育与环境因子的关系,作者已进行过研究(邢永泽等, 2011),在已取得的研究成果基础上,本文主要研究了温度,光照强度,丝状体生物量对萱藻孢子放散的影响,以期掌握萱藻丝状体孢子放散的规律及适宜条件,为萱藻苗种生产和规模化栽培技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 种质与预实验

实验所用萱藻自由丝状体种质取自本实验室萱藻种质库。为获取足量丝状体用于实验,先将丝状体

* 国家 863 计划项目资助,2012AA10A413 号。高伟, E-mail: santa_william@sina.com

通讯作者: 宫相忠, 教授, E-mail: gxzhw@163.com

收稿日期: 2011-09-12, 收修改稿日期: 2011-12-17

扩增培养。培养液使用自然海水, 经黑暗沉淀 7 天、5 层纱布过滤及 121℃ 高温消毒 30min 后, 按 1:1000 比例添加 F₁ 母液(表 1), 培养条件为 22℃, L:D=14:10, 光强为 86.4—97.2 μmol/(m²·s)。

取生长情况良好的萱藻自由丝状体, 诱导产生单室孢子囊。诱导条件为 17℃, L:D=10:14, 光强(28.2±4.0)μmol/(m²·s)。收集成熟丝状体用于实验。

表 1 F₁ 培养液母液成分
Tab.1 Components of F₁ Medium

成分	含量(g)	成分	含量(g)
NaNO ₃	21.25	KI	0.42
NaH ₂ PO ₄	3.00	FeC ₆ H ₅ O ₇	0.13
Tris	30.28	V _{B1}	2.5 × 10 ⁻⁴
HBO ₃	15.46	V _{B2}	5.0 × 10 ⁻⁴

注: 所有成分以蒸馏水定容至 500ml 即为母液

1.2 实验方法

1.2.1 温度实验 取经过预实验的丝状体藻液 100ml 于 250ml 烧杯中, 藻液密度为 0.25—0.30mg/ml。温度设置 7、12、17、22、27℃ 五个梯度, 每个梯度设置三个平行样。其它培养条件为光周期 L:D=10:14, 光照强度(64.8±2.0)μmol/(m²·s)。

实验周期为 7 天, 每 24h 以血球计数板分别计算三个平行样中孢子放散量, 取平均值, 以减小误差。

1.2.2 光照强度实验 取经过预实验的丝状体藻液 100ml 于 250ml 烧杯中, 藻液密度为 0.25—0.30mg/ml。光照强度设置 18、45、72、99、126 μmol/(m²·s) 五个梯度, 每个梯度设置三个平行样。其它培养条件为光周期 L:D=10:14, 温度 17℃。

实验周期及检测方法同 1.2.1。

1.2.3 孢子囊枝密度实验 将经过预处理的丝状体藻液以定性滤纸抽滤, 称取丝状体鲜重, 配成不同密度的藻液, 丝状体生物量设置为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6mg/ml, 每个梯度设置三个平行样。其它培养条件为温度 17℃, L:D=10:14, 光照强度(64.8±2.0)μmol/(m²·s)。

实验周期及检测方法同 1.2.1。

2 结果

2.1 温度对萱藻孢子放散的影响

在所设置的温度条件下(7—27℃)孢子均可以放散, 但所放散的孢子总量和孢子游动能力不同。温度

过低(7℃)或过高(27℃), 不仅影响孢子放散总量, 且会抑制孢子的游动能力。在适宜温度条件下, 温度越低越有利于刺激孢子快速放散, 孢子放散的最佳温度为 12℃。

根据实验结果(图 1), 7℃ 条件下, 第 1 天的孢子放散量处于较高水平, 达到了 37.14×10⁴ind/ml, 但在第 1 天之后的孢子放散量显著下降, 第 2—7 天孢子放散量均小于 15.00×10⁴ind/ml, 较第 1 天减少比例超过 60%。作者认为, 在孢子囊枝成熟的条件下, 低温对孢子放散的影响主要是物理刺激, 促使孢子囊壁破裂, 导致孢子大量放散。当萱藻丝状体适应了这种低温条件时, 放散量反而减少, 说明 7℃ 并不是刺激萱藻孢子放散的最佳条件。

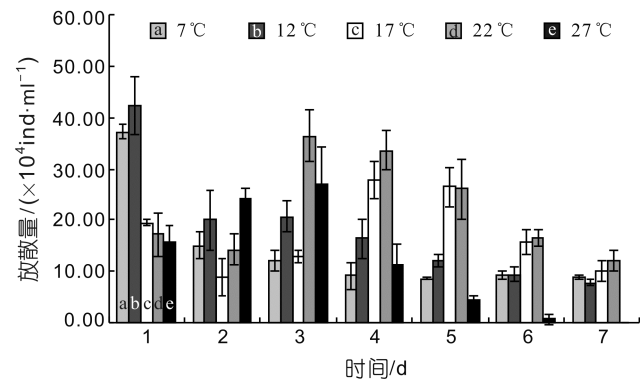


图 1 温度对萱藻孢子放散的影响

Fig.1 Effects of temperature on spore releasing of *S. lomentaria*

12℃ 条件下, 第 1 天的孢子放散量即处于较为理想的水平, 达到 42.50×10⁴ind/ml; 2—3 天, 平稳放散, 孢子放散量分别为 20.00×10⁴ind/ml、20.71×10⁴ind/ml, 均可满足采苗需要, 3 天后逐渐降低。

17℃ 条件下, 孢子放散不够集中, 前 3 天的孢子放散量较小(分别为 19.50、9.00、13.00×10⁴ind/ml), 仅在第 4、5 天存在一个小的放散高峰(分别为 27.86、26.43×10⁴ind/ml), 仍不及 7℃、12℃、22℃ 的放散峰值。由表 2 可知, 在 7 天的放散周期后, 17℃ 条件下, 仍有 28% 孢子囊未放散, 即在此条件下, 孢子的放散效率是较低的。

22℃ 条件下, 实验前两天的放散量均小于 20.00×10⁴ind/ml(分别为 17.14、14.29×10⁴ind/ml), 第 3、4 天的放散量相对较多, 分别达到了 36.43、33.57×10⁴ind/ml, 但一次性放散量的峰值不及 7℃、12℃。在实验进行 7 天后, 仍有 27.50% 的孢子囊未放散, 即孢子囊的放散效率较低。在所设的温度条件下, 22℃

孢子放散的峰值是较大的(仅次于 12℃), 但放散峰值出现的较晚, 不利于采苗。

27℃条件下, 孢子放散量始终处于较低水平, 放散峰值出现在第 3 天, 为 $27.14 \times 10^4 \text{ ind/ml}$, 随后逐日降低, 在实验进行 3 天后丝状体即出现向垫状体、类垫状体转化, 甚至胞质缢缩的现象, 实验进行到第 5、6 天时, 孢子放散量已非常小(分别为 4.29 、 $0.71 \times 10^4 \text{ ind/ml}$), 至第 7 天时, 已完全观察不到放散的孢子, 故此温度不适宜孢子放散。

在保证孢子健康程度的前提下, 孢子的放散量越大、放散时间越集中, 越有利于实际生产的应用, 综合比较, 12℃是萱藻孢子放散的最佳温度。

表 2 温度实验前后萱藻丝状体孢子囊枝比例(%)
Tab.2 Percentages of sporangia branchlets of *S. lomentaria* before and after temperature experiment

温度(℃)	实验前	实验后
7	72.15	10.71
12	72.15	12.50
17	72.15	28.00
22	72.15	27.50
27	72.15	0.00

注: 孢子囊枝比例 = 具有成熟孢子囊的丝状体 / 丝状体总数, 100 倍镜下随机观察 30 视野, 计算平均数

2.2 光照强度对萱藻孢子放散的影响

光强实验结果表明(图 2), 光照强度对孢子的放散具有重要影响。在所设的光强条件下, 孢子均能放散, 各梯度放散的峰值均出现在第 1 天, 其值分别为: 24.29 、 26.43 、 47.14 、 42.29 、 $23.57 \times 10^4 \text{ ind/ml}$ 。

在 7 天的放散周期内, 孢子放散量峰值在 $18—72 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 范围内随光强的加强而增大, 在 $72—126$

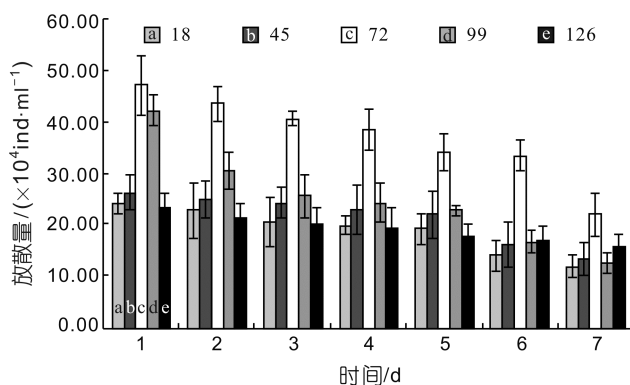


图 2 光强对萱藻孢子放散的影响

Fig.2 Effects of light intensity on spore releasing of *S. lomentaria*
注: 图例数据单位为 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 范围内随光强增大而减小; 而表 3 表明, 实验周期内, 光强过高 [$126 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 或过低 [$18 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 均有较高比例的孢子囊未放散(分别达到 20.21% 和 26.12%), 萱藻单室孢子囊的放散孢子的效率较低。 $72 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下, 萱藻孢子的放散量均高于同期的其它梯度, 7 天的实验周期内, 前 6 天的放散量均高于 $30 \times 10^4 \text{ ind/ml}$ (分别为 47.14 、 43.57 、 40.71 、 38.57 、 34.29 、 $33.57 \times 10^4 \text{ ind/ml}$)。因此, 在所设的实验条件下, $72 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 是最适宜放散的光照强度。

表 3 光强实验前后萱藻孢子囊枝比例(%)
Tab.3 Percentages of sporangia branchlets of *S. lomentaria* before and after light intensity experiment

光强 [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	实验前	实验后
18.0	71.81	20.21
45.0	71.81	18.09
72.0	71.81	12.28
99.0	71.81	17.43
126.0	71.81	26.12

注: 孢子囊枝比例 = 具有成熟孢子囊的丝状体 / 丝状体总数, 100 倍镜下随机观察 30 视野, 计算平均数

2.3 丝状体生物量对萱藻孢子放散的影响

在适宜条件下, 单位水体内生有孢子囊枝的丝状体生物量是决定孢子放散的直接因素。生物量过小, 孢子放散量达不到采苗的要求, 而过大则会影响孢子囊枝的放散效率。丝状体生物量对孢子放散的影响如图 3。实验周期内, 各梯度孢子放散的峰值分别为 21.43 、 27.17 、 31.43 、 71.43 、 $36.43 \times 10^4 \text{ ind/ml}$, 峰值分别出现在第 5、3、4、2、1 天。实验结果表明, 在一定范围内 ($0.1—0.8 \text{ mg/ml}$) 孢子放散量随丝状体生

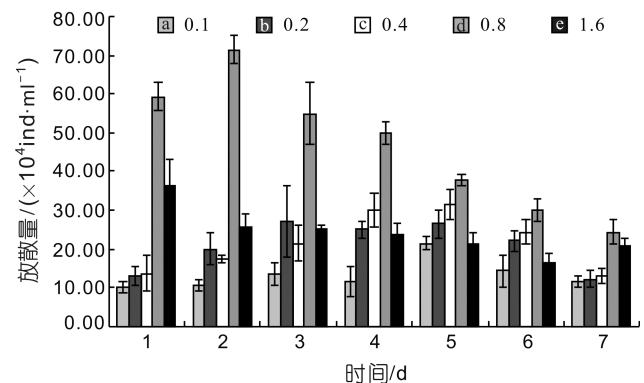


图 3 萱藻丝状体生物量对萱藻孢子放散的影响

Fig.3 Effects of filaments biomass on spore releasing of *S. lomentaria*
注: 图例数据单位为 mg/ml

物量的增大而增加, 而丝状体生物量过大(1.6mg/ml) 不仅会抑制孢子的放散量, 也会降低萱藻丝状体单室孢子囊的放散效率; 增大丝状体生物量, 有加快孢子放散的趋势。

提高单位水体内萱藻丝状体的生物量固然可以相应的增加孢子放散量, 但表 4 表明, 随着丝状体生物量的增加, 实验周期内未放散孢子囊的比例也在增加。当生物量增大到 1.6mg/ml 时, 孢子放散量的峰值远低于生物量为 0.8mg/ml 时的孢子放散量峰值, 因此, 在所设的实验条件下, 0.8mg/ml 是最适宜孢子的放散的丝状体生物量。

表 4 萱藻丝状体生物量实验前后孢子囊枝比例(%)
Tab.4 Percentages of sporangia branchlets of *S. lomentaria* before and after filaments biomass experiment

生物量(mg/ml)	实验前	实验后
0.1	72.36	9.45
0.2	72.36	11.65
0.4	72.36	15.69
0.8	72.36	25.00
1.6	72.36	33.03

注: 孢子囊枝比例 = 具有成熟孢子囊的丝状体 / 丝状体总数, 100 倍镜下随机观察 30 视野, 计算平均数

3 讨论

本实验以充气悬浮培养扩增自由丝状体为基础, 经过诱导形成孢子囊枝, 并以此作为实验材料。作者观察到, 萱藻的孢子体对温度具有较好适应性, 在 7—30℃ 范围内均能存活, 且当温度不高于 23℃ 时, 萱藻孢子体以丝状体、垫状体、类垫状体的形式存在, 其中以自由丝状体的形式存在的孢子体占优势。在 7—23℃ 条件下, 均能观察到具有单室孢子囊枝的丝状体, 单室孢子囊在发育成熟后自然放散。但不同条件下, 具有单室孢子囊枝丝状体的比例、孢子囊枝发育成熟时间和孢子放散情况(放散量、放散时间等)差异很大。

作者曾于 2009 年 6 月—2010 年 4 月在山东长岛县爱华海藻食品有限公司蓬莱育苗厂进行“萱藻工厂化育苗与规模化栽培技术”的试验。试验表明, 孢子的放散量直接决定了采苗的效果, 进而决定了人工育苗的成败, 是萱藻人工养殖的重要环节。

温度在萱藻自由丝状体生长的各个阶段都具有重要的调控作用。实验中发现, 以发育成熟的丝状体为材料, 当设置的放散温度低于丝状体诱导成熟的温度时, 往往具有较好的放散效果; 而温度高于诱导温度, 则刺激放散的效果不明显; 温度相同, 孢子囊

枝趋于自然成熟放散。这一点与紫菜壳斑藻壳孢子放散的规律具有相似性(汤晓荣等, 1998)。就萱藻而言, 温度过低(<12℃), 观察到孢子游动能力减弱、孢子颜色较浅, 健康程度难以保证。温度是否会影响孢子的附着效率及其正常发育有待于进一步研究。温度过高(>22℃ 且 >27℃)不利于孢子的放散, 且在实验进行到 3 天之后, 观察到胞质缢缩、变绿的孢子囊枝, 说明发育形成具有单室孢子囊枝的丝状体对高温的耐受能力较营养生长阶段丝状体差, 这一点在生产应用中应加以重视。

关于光强与萱藻孢子放散的关系, 首先, 在萱藻生活史的研究中, 国内外至今未见光强对萱藻生理代谢影响的明确阐述; 其次, 作者在对萱藻自由丝状体的研究中, 尤其在对其游动孢子的观察中, 亦未发现游动孢子具有明显的趋光性或负趋光性(邢永泽等, 2011); 再者, 在生产应用中, 对光照的调整不当有造成杂藻大量生长的风险。藉此三点, 在规模化育苗试验的初期, 作者并未将光强作为一项重要的因素予以调控。但在本项研究中, 作者发现光强对萱藻孢子的放散具有显著影响, 认为应在实际生产中加以控制。光强影响萱藻丝状体孢子放散的机理仍有待于进一步的研究。

在对藻类生殖结构发育、诱导成熟的研究中, 温度和光照强度是应用较多的诱导因子(汤晓荣等, 1997), 而往往忽略密度的作用, 尤其在孢子放散的环节中, 关于丝状体生物量的研究较少。通过研究作者发现, 萱藻孢子放散量与其丝状体生物量并不是简单的线性关系。这一现象与紫菜壳孢子放散(杨玲等, 2004)及海带配子体克隆育苗(张全胜等, 2005)在生产中的应用有相近之处。在萱藻孢子放散过程中, 将丝状体生物量加倍未必就可获得双倍的游动孢子释放量, 其中必然存在着丝状体孢子囊枝之间的相互影响。关于萱藻丝状体、孢子囊枝间物理和生理方面等方面的相互作用, 需要继续探索。除此之外, 确定孢子囊枝生物量和游动孢子放散量的关系, 可以在保证采苗所需的孢子密度前提下, 充分利用萱藻种质, 提高生产效率。

在对萱藻生活史研究的基础上, 国内学者(张泽宇等, 2010)曾用丝状体直接切碎的方法进行采苗, 类似的技术在海带配子体克隆育苗中已有过应用(方宗熙等, 1978; 刘涛等, 2000)。作者认为, 首先, 由于萱藻丝状体并不具备附着结构, 被切碎的丝状体要靠“细胞粘性”粘附在附着基上, 丝状体细胞与附着基

之间的这种物理结合很难抵御海水的冲刷;其次,中外学者在对萱藻生活史的研究中,均未发现其可以由丝状体(孢子体)直接发育形成幼叶状体(配子体),粘附于附着基上的丝状体细胞须经过发育形成单室孢子囊、孢子囊放散孢子、再由孢子萌发形成幼叶状体。因此,笔者认为这种方法并不适宜在生产上大规模推广。作者希望通过研究建立一个集约、高效、可控的萱藻规模化育苗体系,本文旨在为早日完成这一目标做出有益的探索,并提供一些科学数据。

参 考 文 献

- 方宗熙, 欧毓麟, 崔竞进等, 1978. 海带配子体无性繁殖系培育成功. 科学通报, (2): 115—116
- 邢永泽, 宫相忠, 尹宝树, 2010. 萱藻不同发育阶段形态学及生活史的研究. 中国海洋大学学报, 40(8): 98—102
- 邢永泽, 宫相忠, 高伟等, 2011. 生态因子对萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 孢子体生长发育的影响. 海洋与湖沼, 42(1): 101—106
- 刘涛, 崔竞进, 戴继勋等, 2000. 海带配子体克隆的培养及应用. 青岛海洋大学学报, 30(2): 203—206
- 汤晓荣, 费修缙, 1997. 光温与坛紫菜自由丝状体生长发育的关系. 海洋与湖沼, 28(5): 475—481
- 汤晓荣, 费修缙, 1998. 温度和光照对条斑紫菜壳孢子苗生长和单孢子形成放散的影响. 水产学报, 22(4): 378—381
- 杨玲, 何培民, 2004. 温度、光强和密度对条斑紫菜壳孢子放散的影响. 海洋渔业, 26(3): 205—209
- 张全胜, 唐学玺, 张培玉等, 2005. 海带配子体克隆育苗生产中采苗技术的研究. 高技术通讯, 15(1): 89—92
- 张泽宇, 李晓丽, 刘宏宇等, 2010. 萱藻丝状体诱导培养及采苗研究. 大连水产学院学报, 25(1): 14—18
- 徐年军, 范晓, 韩丽君等, 2001. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选. 海洋与湖沼, 32(4): 408—413
- Clayton M N, 1976. The Morphology, anatomy and life history of a complanate form of *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyta) from South Australia. Marine Biology, 38: 201—208
- Clayton M N, 1978. Morphological variation and life history in cylindrical forms of *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae: Phaeophyta) from South Australia. Marine Biology, 47: 349—357
- Fletcher R L, 2003. Morphology and life history of *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) from the Azores. J Phycol, 39: 353—359
- Hiroyuki Noda, Hideomi Amano, Koichi Arashima *et al*, 1990. Antitumor activity of marine algae. Hydrobiologia, 204/205: 577—584
- Hudson J B, Kim J H, Lee M K *et al*, 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence in multiple activities. Journal of Applied Phycology, 10(5): 427—434
- Kim S, Park S, Hyoun J *et al*, 2004. The cytotoxicity of *Scytosiphon lomentaria* against HL-60 Promyelocytic Leukemia. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 19: 641—648
- Kuda T, Tsunekawa M, Goto H *et al*, 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. Journal of Food Composition and Analysis, 18(7): 625—633

EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON SPORE RELEASING OF FILAMENTS OF *SCYTOSIPHON LOMENTARIA*

GAO Wei¹, GONG Xiang-Zhong¹, ZHANG Bi-Da²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, 266003;
2. Changdao Aihua Seaweed Foodstuff Co., Ltd., Yantai, 265800)

Abstract In this paper, under the condition of the laboratory, using the filaments of *Scytosiphon lomentaria* preserved in our laboratory as the experimental material, the effect of temperature (7—27°C), light intensity [18—126 μmol/(m²·s)] and filaments biomass (0.1—1.6 mg/ml) on spore releasing from unilocular sporangial branchlets of *S. lomentaria* were studied. Results were shown as follows: (1) 12°C was the optimal temperature for spore releasing, at which the peak of releasing was especially high and the releasing speed was faster. (2) The light intensity had great significant influence on spore releasing, and 72 μmol/(m²·s) was the best stimulating light intensity for spore releasing. (3) 0.8 mg/ml was the optimal filaments biomass for spore releasing of *S. lomentaria*. A smaller quantity of filaments biomass could not meet the requirements of spore-collection, while the excessive quantity of filaments biomass could restrain the releasing of the spores.

Key words *Scytosiphon lomentaria*, Filament, Temperature, Light intensity, Spore releasing