

影响龙须菜果孢子体形成内外因素的初步研究*

杨金鑫, 张赢月, 杨泽, 闫昊, 徐涤**, 张学成

(中国海洋大学海洋生命学院, 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 龙须菜是中国重要的人工栽培海藻, 主要用途是琼胶生产原料和鲍鱼饵料。目前龙须菜大规模栽培采用的是人工夹苗的方式, 而其孢子采苗的生产方式也得到越来越多的关注。本文将人工培育的由四分孢子萌发长成的一对龙须菜雌、雄配子体进行受精, 测试了雌雄配子体藻枝部位、温度、硝酸盐浓度等因素对果孢子体形成过程的影响, 结果表明: 龙须菜雌配子体藻枝的不同等级分枝表现出不同的生殖力, 一级分枝最尖端新生细胞的成熟速度快于其它等级; 温度对果孢子体形成有极显著影响($P < 0.01$), 20 °C 为最适温度; 硝酸盐浓度没有显著影响。

关键词: 龙须菜; 受精; 果孢子体; 影响因素

中图法分类号: S968.43

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2021)03-065-05

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20200251

引用格式: 杨金鑫, 张赢月, 杨泽, 等. 影响龙须菜果孢子体形成内外因素的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(3): 65-69.

YANG Jin-Xin, ZHANG Ying-Yue, YANG Ze, et al. A preliminary study on the internal and external factors affecting the formation of carposporophytes in *Gracilariopsis lemaneiformis*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 2021, 51(3): 65-69.

近二十年来,产琼胶江蓠科红藻龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)的产业化栽培在中国发展很快,截止2018年已达年产量30万t干品规模,取得了巨大的经济效益和净化栽培海区水质的生态效益^[1-2]。此外,在夏季缺乏其他新鲜饵料的情况下,龙须菜还作为养殖鲍鱼的辅助饵料得到很好的效果^[3],因此市场需求量逐年增加。

野生龙须菜分布于山东沿海潮间带,一年中有两次生长和繁殖季节,而在温度太高的夏季和温度太低的冬季基本不生长^[4]。为了延长其生长期从而扩大产量,人们选择了南移栽培方式,在福建首次获得了龙须菜栽培的成功,栽培时间可以从秋季一直延续到来年的春季形成一个完整的养殖周期。随着几个龙须菜优良新品种的研发^[5-7],其耐高温的性状得到提升,在北方海域也可以连续从晚春至秋季的生长,因此近年来逐渐形成了一个龙须菜南北轮栽的新栽培模式^[1]。这不仅可以提高龙须菜的产量,还满足了南北方相互间提供大量苗种的需求。

龙须菜栽培与其他江蓠科物种一样,采用的都是人工夹苗的方式^[8]。目前所有的龙须菜栽培品种都是

二倍体的四分孢子体世代,依赖营养生长进行培养。这种栽培方法简单易行,但也存在着一些明显的不足:首先,需要大量的藻体作为苗种,藻枝的保存是主要困难。尽管目前南北轮栽模式较好地解决了这一问题,但长途运输的成本和风险依然较高。第二,长期仅依靠营养生长会造成整个栽培海域藻种遗传多样性低,大规模病害发生几率大,同时藻体本身还会发生种质退化等问题^[9]。中国另外几个重要的海藻栽培物种,如海带、紫菜等早已实现了培育生活史中某一阶段的孢子来进行大规模生产,尽管育种过程会增加时间及成本,但从长远看不仅可以保证优良苗种的保存和供给,同时也便于对种质进行后续的改良,有利于栽培产业的长远发展。

鉴于以上原因,学者们早已开始探究利用孢子萌发实现江蓠物种的人工栽培方法,例如大量采集智利江蓠(*Gracilaria chilensis*)释放的四分孢子并附着在石片或网绳上进行萌发,证明了使用孢子对江蓠进行繁殖是可行的^[10-11];在夏威夷养殖的*Gracilaria parvispora*也进行了采集果孢子进行附着和扩大化栽培的成功试验^[12-13];Zhou等工作同样表明可以通过采

* 基金项目:现代农业产业技术体系专项(CARS-50);宁波市重大科技专项(2019B10009)资助

Supported by the China Agriculture Research System(CARS-50); the Key Program of Science and Technology Innovation Ningbo (2019B10009)

收稿日期:2020-08-31; 修订日期:2020-10-05

作者简介:杨金鑫(1997-),女,硕士生。E-mail:1085646602@qq.com

** 通讯作者:E-mail:dixu@ouc.edu.cn

集四分孢子或果孢子对龙须菜实行规模化繁殖^[14-15]。

如果要实现江蓠的孢子采苗生产方式,则必须能在实验室保存优良品系的藻株并建立起一套促进孢子形成和释放的方法和流程。但到目前,对孢子放散过程和存活率影响条件的研究较多^[12,14,16-17],而对孢子形成过程的影响因子研究较少。本实验将使用在实验室培育的由四分孢子萌发长成的龙须菜雌、雄配子体共培养进行受精,测试雌雄配子体藻枝部位、温度、硝酸盐浓度等因素对果孢子体形成过程的影响。

1 材料与方法

1.1 用于杂交实验的龙须菜雌、雄配子体

本研究采用的一对龙须菜雌、雄配子体来自于在本实验室采集和培育的由四分孢子发育的配子体。野生的成熟龙须菜四分孢子体采集自青岛浮山湾,在实验室内进行了四分孢子的采集,待孢子萌发后逐一进行培养。培养条件为:使用改良的 f/2 培养基进行培养^[18],光照 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度 20°C ,光周期 L:D=12 h:12 h。成熟的配子体通过两两杂交确定性别,最后确定使用一对雌、雄配子体进行扩培和实验以确保数据不会因为个体遗传差异而产生偏差。

如无特别说明,实验所用雌雄配子体藻段都是保留有尖部生长点且长度大约为 5 cm 的一级分枝藻段。

1.2 龙须菜雌雄配子体的受精

将上述龙须菜雄配子体和雌配子体藻段放在一个三角瓶中进行受精。如无特殊说明基本培养条件同 2.1,实验期间不更换培养基。约 10 d 后可以在雌配子体表面观察到果孢子体的形成,所有实验组在第 20 天进行计数。

1.3 雄配子体藻枝部位对果孢子体形成的影响

将一条长约 6 cm 的带有尖部生长点的雄性配子体藻段切开,分为上部和下部 2 个组,每段均在 3 cm 左右,然后分别与雌配子体进行杂交。每一个培养瓶中放入 2 条雄配子体藻段和 3 条雌配子体藻段,2 组各设置 3 个重复。

1.4 雌配子体藻枝部位对果孢子体形成的影响

事先将雌配子体通气培养,以促进分枝萌发,以确保每条雌配子体上至少有 2 个二级分枝^[19],此时的雌配子体藻段都大于 10 cm。每一个培养瓶中放入 1 条雄配子体和 1 条上述雌配子体,设置 3 个重复。实验结束后观察果孢子体形成的位置。

1.5 温度对果孢子体形成的影响

实验分别设置 10、15、20、25 和 30°C ,5 个不同温度条件对龙须菜雌雄配子体进行杂交。每个培养瓶中放入 1 条雄配子体藻段和 3 条雌配子体藻段,每组各设置 3 个重复。

1.6 硝酸盐浓度对果孢子体形成的影响

实验分别设置 0.5、1.5 和 10 mmol/L ,4 个硝酸盐浓度对龙须菜雌雄配子体进行杂交。进行该项实验时 f/2 培养基中原有的硝酸盐未加入,但海水中的硝酸盐(约为 0.2 mg/L)未计算在内^[20]。每个培养瓶中放入 1 条雄配子体藻段和 3 条雌配子体藻段,每组各设置 3 个重复。

1.7 统计学分析

各实验组在杂交的第 20 天记录雌配子体上果孢子体的总数,然后计算平均每厘米雌配子体上的果孢子体数量。

数据采用 ANOVA 分析及 t-检验来确定各实验组果孢子体数的差异, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为极显著。各图数据上都标明标准误差(SD)误差线。

2 结果

2.1 雄配子体藻枝部位对果孢子体形成的影响

图 1 为两种不同的雄配子体藻枝部位受精所形成的果孢子体数量的比较。统计分析表明 $P > 0.05$,说明两个实验组之间产生的果孢子体的数量无显著差异。

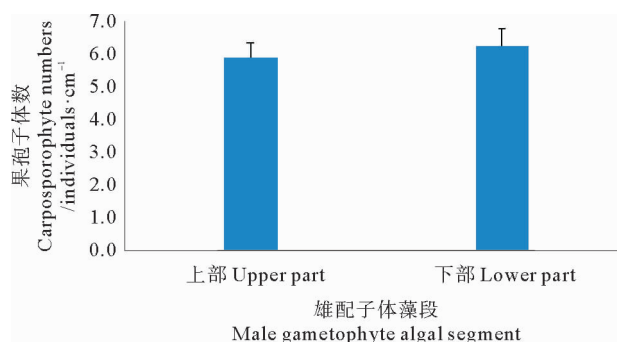


图 1 雄配子体的不同部位受精形成的果孢子体数量比较
Fig.1 Comparison of the number of carposporophyte formed by fertilization using different parts of the male gametophyte

2.2 雌配子体藻枝部位对果孢子体形成的影响

图 2 为雌配子体不同等级分枝上形成果孢子体数量的比较,从图中可以看出,雌配子体一级分枝上形成的果孢子体数量显著高于二级分枝上的果孢子体($P < 0.01$)。

根据多次实验的结果,龙须菜的果孢子体主要形成于一级分枝上。如图 3 所示,一级分枝上的果孢子体比在二级分枝上的分布密集,在本实验中每厘米藻枝上的果孢子体数量约为二级分枝上的 5 倍。而且在一级分枝上,果孢子体可以在接近最顶端的区域形成,而二次分枝的尖端区域没有果孢子体生长。据观察,一般小于 1.5 cm 的二级分枝上不会形成果孢子体,而较长的二级分枝距尖端约 1.5 cm 内也同样没有果孢子体形成。

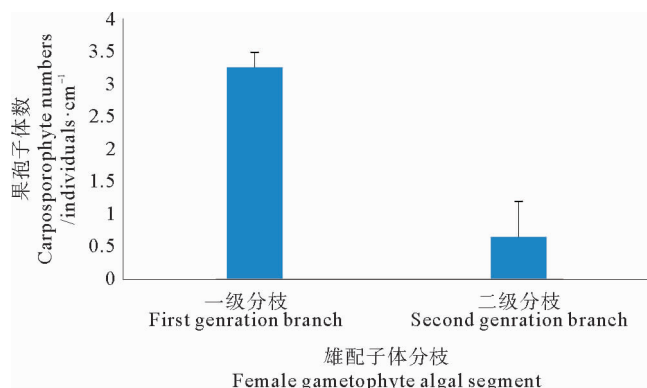


图2 雌配子体不同等级分枝上形成孢子体数量的比较

Fig.2 Comparison of the number of carposporophyte formed on branches of different grades of female gametophytes



图3 雌配子体不同分枝上的孢子体分布

Fig.3 Distribution of carposporophytes on different branches of female gametophyte

2.3 温度对果孢子体形成的影响

如图4所示,温度对果孢子体形成的影响极显著($P<0.001$)。在10~30℃所设置的5个组中,仅在20和25℃的条件下雌配子体上形成了果孢子体,而在较低或较高的温度下都没有形成。结果显示20℃是受精的最佳温度,形成果孢子体的数量最高,是25℃组的2倍以上。

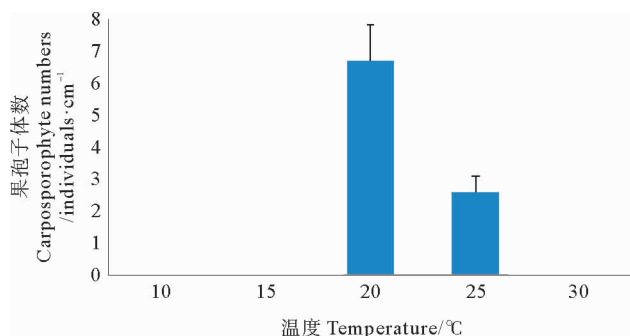


图4 温度对果孢子体形成的影响

Fig.4 Effect of temperature on the formation of carposporophyte

2.4 硝酸盐浓度对果孢子体形成的影响

如图5所示, NO_3^- 浓度对果孢子体形成的影响不显著($P>0.05$)。如果仅从数值上看两个高浓度组都略高于低浓度组,其中形成的果孢子体最多的实验组为浓度为5.0 mmol/L组,而该组数值与0.5和1.0 mmol/L组数值分别两两比较分析的 $P<0.05$,具有显著差异。鉴于平时培养所用培养基f/2中 NO_3^- 浓度仅在0.5~1.0 mmol/L之间,因此较高浓度的硝酸盐含量较有利于受精过程。

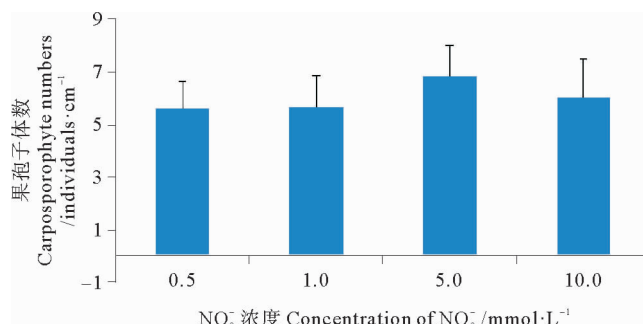
图5 NO_3^- 浓度对果孢子体形成的影响

Fig.5 Effect of NO_3^- concentration on the formation of carposporophyte

3 讨论

对江蓠果孢子采苗的研究往往针对其释放及附着等后期的条件优化,例如有报道温度和光照会直接影响*Gracilaria cornea*果孢子的释放,但改变渗透压和脱水处理的影响并不明显^[21-22]。Zhou等^[14]分别对龙须菜果孢子的释放和萌发过程进行了影响因素的分析,发现每个果孢子体在8~10 d内可以逐步释放0~5 653个果孢子;同时,在进行实验的影响因素中只有温度对果孢子的释放具有极显著的影响($P<0.01$),此外光强和盐度也有影响($P<0.05$)。但是这些报道都是采集野生的成熟藻体进行的相关实验,而如果要实现全人工采苗的龙须菜栽培技术就必须尝试建立全程可控的雌雄配子体杂交受精体系,以获得在数量上可满足大规模栽培产业所需的且同步成熟的果孢子。对于这个方面的研究很少,Zhou等^[14]曾对温度、盐度、光照等几个因素进行了测试,结果发现只有温度对龙须菜受精过程有显著影响($P<0.05$)。在本实验中,我们通过对龙须菜的雌雄配子体进行受精来进一步研究能够影响该过程的内外因素。由于红藻的卵细胞,即果胞不释放到环境中,受精过程是精子的细胞核通过果胞顶端的受精丝进入后与果胞的细胞核进行的。这个过程对龙须菜无法量化观察,因此我们用单位长度藻体上形成的合子数量,即寄生在雌配子体上的果孢子体数量来记录实验结果。

实验结果显示,龙须菜雌配子体藻枝的不同部位会对受精过程产生影响。首先,不同等级分枝的雌配子体表现出不同的生殖力。Ye等^[19]曾在野生龙须菜四分孢子体的研究中发现80%的四分孢子囊分布于一级分枝上。与此类似,本实验结果也表明一级分枝上的果孢子体比在二级分枝上分布的密集得多。其次,龙须菜为顶端生长,一般认为藻枝的尖端为新生部位,新生的营养细胞转化为成熟的生殖细胞应该需要一定的时间,因此成熟度可能不如中下部的藻枝。但实验结果却显示,无论是雄配子体还是雌配子体,成熟藻体一级分枝顶端部分的成熟度都并不是想象中那样低,即整个藻体进入成熟阶段后,其一级分枝顶端的新生细胞转化为生殖细胞的速度很快,这与藻体萌发后需要很长时间才能从未成熟状态进入成熟状态不同。实验表明,雄配子体上、下不同部位藻枝进行受精的两个实验组在形成果孢子体的数量上没有明显差别,一方面可能因为精子的数量远远超过果胞数量,尽管最尖端的少部分藻枝没有成熟,但上部藻枝余下的成熟部分已经能够提供足够的成熟精子用于受精;而另一方面也说明未成熟的顶端细胞比例应该很小。这点从图3中的雌配子体中同样可以看出,对于一级分枝的雌配子体来说,最尖端的未成熟部分应该仅在1~2 mm内,其它部位都能形成果孢子体,也就是说这些部位有成熟的果胞形成。第三,雌配子体不同等级分枝的发育模式不同。如图3所示,一级分枝上的果孢子体可以在接近最顶端的区域形成,说明雌配子体顶端新生的藻细胞快速发育成熟形成果胞;而与此同时,二级分枝距尖部约1.5 cm的区域内却没有果孢子体形成,说明二级分枝顶端新生的藻细胞的成熟速度较慢。Wang等^[17]对比了龙须菜四分孢子体一、二、三级分枝间的生长指标,发现尽管一级分枝的光合活性最高,但从生物量的增长速率来看反而不如二、三级分枝。综合这些结果可以推测,一级分枝可能积累更多的能量用于生殖过程。

本文结果与Zhou等^[14]都证实温度是影响龙须菜受精过程的最重要的环境因素之一,而最适温度的差异应该与实验材料的选择及其起始培养温度有关,我们选用的是实验室长期培养的藻株而Zhou等^[14]采用的是野生龙须菜。结果都显示太高或太低温度不利于龙须菜的受精过程,尤其是暂时的高温(30℃)下尽管可以存活,但无法完成受精。本实验显示受精结果在硝酸盐在不同实验组间无明显差异。

总之,要在龙须菜大规模生产上实现孢子采苗方式还有很多问题亟待解决,都需要有稳定的优良品种来源、简便实用的采苗育种方式以及同步化生产技术。使用四分孢子或果孢子采苗各有利弊:四分孢子采苗

的种源是四分孢子体,遗传性质比较稳定,但释放孢子数量不如果孢子,萌发的雌、雄配子体不仅生长状态有差别,还会将能量多用于有性生殖从而影响营养生长和收获;而每个果孢子体可释放大量遗传背景相同的果孢子,萌发形成的四分孢子体生长状态相似,但前期需要雌雄配子体进行受精来获得。这里我们对受精过程的影响因素开展了初步的工作,为龙须菜人工采苗技术的推进提供思路和数据。

参考文献:

- [1] 隋正红, 胡依依, 周伟, 等. 龙须菜栽培与遗传育种[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(9): 98-104.
Sui Z H, Hu Y Y, Zhou W, et al. Review on the cultivation and genetic breeding of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(9): 98-104.
- [2] 安鑫龙, 齐遵利, 李雪梅, 等. 大型海藻龙须菜的生态特征[J]. 水产科学, 2009, 28(2): 109-112.
An X L, Qi Z L, Li X M, et al. A review on ecological characteristics of sea weed *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Fisheries Science, 2009, 28(2): 109-112.
- [3] 余杰, 王欣, 陈美珍, 等. 潮汕沿海龙须菜的营养成分和多糖组成分析[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 93-97.
Yu J, Wang X, Chen M Z, et al. Analysis on nutritional components and polysaccharide composition of *Gracilaria lemaneiformis* from Chaoshan coast [J]. Food Science, 2006, 27(1): 93-97.
- [4] 孙雪, 蔡西栗, 徐年军. 海洋红藻龙须菜对2种逆境温度胁迫的应激生理响应[J]. 水生生物学报, 2013, 37(3): 535-540.
Sun X, Cai X L, Xu N J. Physiological response of marine red algae *Gracilaria lemaneiformis* to two kinds of adverse temperature stress [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(3): 535-540.
- [5] 张学成, 费修纛, 王广策, 等. 江蓠属海藻龙须菜的基础研究与大规模栽培[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(5): 947-954.
Zhang X C, Fei X G, Wang G C, et al. Genetic studies and large scale cultivation of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(5): 947-954.
- [6] 孟琳, 徐涤, 陈伟洲, 等. 龙须菜新品系07-2的筛选及性状分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(S1): 94-98.
Meng L, Xu D, Chen W Z, et al. Selection and characterization of a new strain of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009(S1): 94-98.
- [7] 周伟, 隋正红. 龙须菜“鲁龙1号”[J]. 中国水产, 2016(3): 56-57.
Zhou W, Sui Z H. *Gracilaria lemaneiformis* “LuLong 1” [J]. China Fisheries, 2016(3): 56-57.
- [8] 张敬宇, 周伟, 郭鹏, 等. 环境因素对胶州湾栽培龙须菜的影响及生长预测模型构建[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(8): 75-86.
Zhang J Y, Zhou W, Guo P, et al. Influence of environmental factors on cultivated *Gracilariopsis lemaneiformis* in Jiaozhou Bay and construction of growth prediction model [J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(8): 75-86.
- [9] Oliveira E C, Alveal K, Anderson R J. Mariculture of the agar-

- producing Gracilarioid red algae[J]. Reviews in Fisheries Science, 2000, 8: 345-377.
- [10] Alveal K, Romo H, Werlinger C, et al. Mass cultivation of the agar-producing alga *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) from spores[J]. Aquaculture, 1997, 148(2-3): 77-83.
- [11] Halling C, Aroca G, Cifuentes M, et al. Comparison of spore inoculated and vegetative propagated cultivation methods of *Gracilaria chilensis* in an integrated seaweed and fish cage culture [J]. Aquaculture International, 2005, 13(5): 409-422.
- [12] Glenn E P, Moore D, Fitzsimmons K, et al. Spore culture of the edible red seaweed, *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) [J]. Aquaculture, 1996, 142: 59-74.
- [13] Glenn E P, Moore D, Brown J J, et al. A sustainable culture system for *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) using sporelings, reef growout and floating cages in Hawaii[J]. Aquaculture, 1998, 165: 221-232.
- [14] Zhou W, Sui Z H, Wang J G, et al. An orthogonal design for optimization of growth conditions for all life history stages of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. Aquaculture, 2013, 392-395: 98-105.
- [15] Zhou W, Sui Z H, Wang J G, et al. Mass cultivation of economically important red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from tetraspores and carpospores[J]. Aquaculture, 2016, 460: 25-31.
- [16] Sukumaran S, Kaliaperumal N. Sporulation in *Gracilaria crassa* Harvey ex J. Agardh at different environmental factors[J]. Seaweed Res Utilisat, 2001, 23: 1-2.
- [17] Wang Z Y, Wang G C, Niu J F, et al. Optimization of conditions for tetraspore release and assessment of photosynthetic activities for different generation branches of *Gracilaria lemaneiformis* Bory[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010(4): 738-748.
- [18] 付峰, 隋正红, 李秉钧, 等. 热锻炼对龙须菜高温胁迫响应的影响[J]. 海洋科学, 2017, 41(4): 10-16.
- Fu F, Sui Z H, Li B J, et al. Effects of heat acclimation on high temperature stress response of *Gracilariopsis lemaneiformis* [J]. Marine Science, 2017, 41(4): 10-16.
- [19] Ye N H, Wang H X, Wang G C, et al. Formation and early development of tetraspores of *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariaceae, Gracilariaceae) under laboratory conditions[J]. Aquaculture, 2006, 254: 219-226.
- [20] 王军, 史云娣, 唐丽, 等. 钢渣-龙须菜系统处理富营养化海水的研究[J]. 中国环境科学, 2011, 31(3): 390-395.
- Wang J, Shi Y D, Tang L, et al. Study on treating eutrophic seawater with "steel slag-*Gracilaria lemaneiformis*" system [J]. China Environmental Science, 2011, 31(3): 390-395.
- [21] Orduna-Rojas J, Robledo D. Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) [J]. Botanica Marina, 1999, 42(4): 315-319.
- [22] Guzman-Uriostegui A, Robledo D. Factors affecting sporulation of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) carposporophytes from Yucatan, Mexico [J]. Hydrobiologia, 1999, 398-399: 285-290.

A Preliminary Study on the Internal and External Factors Affecting the Formation of Carposporophytes in *Gracilariopsis lemaneiformis*

YANG Jin-Xin, ZHANG Ying-Yue, YANG Ze, YAN Hao, XU Di, ZHANG Xue-Cheng

(The Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: *Gracilariopsis lemaneiformis* is an important cultivated seaweed in China, which is mainly used as the production of agar and abalone bait. At present the method for large-scale cultivation of *Gracilaria lemaneiformis* is attaching seedlings into the ropes by hands, and the spore seedling production mode has gotten more and more attention. In this article, the effects of several factors such as branches of female and male gametophyte algae, temperature and nitrate concentration on the formation of carposporophytes were tested by fertilization of a pair of female and male gametophytes grown from tetraspores released from one artificially cultivated tetrasporophyte. The results showed that: the different generations of branches of the female gametophyte showed different fertility and the new formed cells at the tip of the first generation branches may mature more rapidly than other generations; temperature had an extremely significant effect on the formation of carposporophyte ($P < 0.01$) and 20 °C was the optimal temperature; nitrate concentration had no significant affects.

Key words: *Gracilariopsis lemaneiformis*; fertilization; carposporophyte; effecting factors