

Cu²⁺ 对鼠尾藻幼孢子体生长的影响

梁洲瑞^{1,2} 王飞久^{2*} 孙修涛² 汪文俊² 丁昌玲² 李 涛²

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 以鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 幼孢子体为材料, 研究了 Cu²⁺ 对不同生长时期的鼠尾藻幼孢子体生长的影响。不同生长时期的鼠尾藻幼孢子体对微量 Cu²⁺ 都是敏感的。对于早期的鼠尾藻幼孢子体, 5 μg/L 以上浓度的 Cu²⁺ 对其正常生长不利; 当 Cu²⁺ 浓度达到或超过 250 μg/L 时, 该时期幼孢子体基本停止生长。对于后期的鼠尾藻幼孢子体, 10 μg/L 以上浓度的 Cu²⁺ 对其正常生长不利; 1 μg/L 浓度的 Cu²⁺ 对其生长有促进作用; 当 Cu²⁺ 浓度达到或超过 50 μg/L 时, 该时期幼孢子体增长缓慢或基本停止生长。鼠尾藻幼孢子体的假根由于结构和功能特性, 对 Cu²⁺ 的敏感程度不大, Cu²⁺ 处理初期依然表现出快速增长。

关键词 鼠尾藻 Cu²⁺ 孢子体

中图分类号 S968.42+9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)06-0116-06

Effect of Cu²⁺ on growth of *Sargassum thunbergii* young sporophyte

LIANG Zhou-ru^{1,2} WANG Fei-jiu^{2*} SUN Xiu-tao²

WANG Wen-jun² DING Chang-ling² LI Tao²

(¹Aquatic and Life School, Shanghai Ocean University, 201306)

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

ABSTRACT The effect of Cu²⁺ on the growth of *Sargassum thunbergii* young sporophyte at different growth stage was investigated. It was found that during both the early and late stages the young sporophyte were very sensitive to Cu²⁺ treatment. Growth of *S. thunbergii* young sporophyte during the early stage was seriously inhibited by Cu²⁺ at concentrations of 5 μg/L and above, and the growth was almost terminated by Cu²⁺ at 250 μg/L and above. For *S. thunbergii* young sporophyte at the late stage, the growth was seriously inhibited by Cu²⁺ at 10 μg/L and above. The growth of young sporophytes was accelerated by 1 μg/L Cu²⁺, but slower or even ceased growth was observed at more than 50 μg/L Cu²⁺ treatments. Due to the special characteristics of structure and function, rhizoid of *S. thunbergii* young sporophyte was found to be insensitive to Cu²⁺. At the beginning of Cu²⁺ treatment, rhizoid still presented fast growth.

国家“863”项目(2006AA10A416)资助

* 通讯作者。E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2010-08-03; 接受日期: 2010-11-10

作者简介: 梁洲瑞(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事海藻生物学研究。E-mail: liangzhou Rui@163.com; Tel: 15553208252

KEY WORDS *Sargassum thunbergii* Copper Sporophyte

鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 在分类学上隶属于褐藻门 Phaephyta、圆子纲 Cyclosporeae、墨角藻目 Fucales、马尾藻科 Sargassaceae、马尾藻属 *Sargassum*。鼠尾藻具有很高的经济、生态价值:如作为海参、鲍鱼的饲料;可提取琼胶、褐藻胶、甘露醇、碘等工业原料;降低海区富营养化、净化重金属污染海区等(郑怡 1994;张尔贤等 1995;魏玉西等 2002;韩晓弟等 2005;刘朝阳等 2006;包杰等 2008)。对鼠尾藻幼孢子体的研究集中在人工育苗技术、形态学观察等方面(王飞久等 2006;詹冬梅等 2006;王增福等 2007;潘金华等 2007),而环境因子对鼠尾藻幼孢子体生长发育影响的研究,仅见少数研究者对盐度、温度、营养盐(N、P)等如何影响鼠尾藻幼孢子体生长作了初步探讨(王飞久等 2006;詹冬梅等 2006)。环境因子对植物生长发育有很大的作用,有些因子是植物生存所不可或缺的(如光、温、水等),有些因子对植物起着促进或抑制生长的作用(如重金属离子、透明度、水流等)。重金属离子对鼠尾藻幼孢子体生长的影响还未见报道。

Cu 是植物的必需微量元素,在植物体内可以作为很多氧化酶(如多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶、细胞色素氧化酶)的辅基,可以影响氧化还原过程。Cu²⁺ 又是光合电子传递链体系中 PC(质体蓝素)的成分,参与光合作用的电子传递(潘瑞炽 2001)。虽然 Cu 是一种必需元素,但其浓度过高会使细胞代谢发生混乱,对植物产生严重的毒害作用(杨世勇等 2004)。水生植物对污水中的重金属元素有一定的富集能力,而其受毒害后的症状表现,可以作为环境污染监测的指标,因此具有监测水体污染的作用。由于当前工业的发展,海洋环境中有很大的工业污染,研究 Cu²⁺ 及其他重金属离子对鼠尾藻幼孢子体生长发育的影响,可为实践中用鼠尾藻监测 Cu²⁺ 及其他重金属离子污染提供有益的参考依据。另外,研究一定剂量的 Cu²⁺ 对鼠尾藻幼孢子体的生长有促进还是抑制效应,以及研究不同生长时期的鼠尾藻幼孢子体对于 Cu²⁺ 胁迫的反应是否表现一致,都有着理论和实践意义。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的幼孢子体材料有大、小两种。一种于 2010 年 6 月底,在山东即墨市鼠尾藻实验海区采集成熟的雌、雄藻体,在低温室(11~13 °C)进行采苗和培养,培养至幼孢子体长 750~1 000 μm,将其作为大幼孢子体。另一种于 2010 年 7 月中旬在青岛太平角潮间带礁石区采集成熟的雌、雄藻体,在低温室(12~14 °C)进行采苗并培养幼孢子体 10 d,幼孢子体平均长度约 170 μm,将其作为小幼孢子体。采苗和培养方法参照王飞久等(2006)的方法,附着基均为载玻片。

1.2 方法

实验所用的 Cu²⁺ 为硫酸铜(CuSO₄ · 5H₂O)。培养液采用灭菌海水,添加营养盐(NO₃⁻-N:3 mg/L;PO₄³⁻-P:0.3 mg/L)。为了抑制硅藻的繁殖,培养液中添加二氧化锗,浓度为 10 mg/L。

实验分 8 个浓度(1、5、10、50、100、250、500、1 000 μg/L),组成各处理组。另有一组不加 Cu²⁺,作为对照。小幼孢子体实验组,每组都有两个载玻片,每个载玻片都放在装有培养液的直径为 9cm 的培养皿中。大幼孢子体实验组,采用分层随机抽样方法,在 750~1 000 μm 范围内,按长度分为 3 个区层(750~850、850~950、950~1 000 μm),从各区层挑选出 10~15 个健康的幼孢子体,直接放在装有培养液的培养皿中培养,每组都有两个培养皿。培养皿置于 GXZ 智能型光照培养箱中,培养条件为:白色日光灯,光照度 3 000lx,光周期 12L : 12D,温度 18°C。实验开始后,每 2 d 换水 1 次。每次换水时都进行 Cu²⁺ 处理。隔一段时间相互调换一下培养皿的位置以减小光照误差。每隔一定天数(3、5、7、14 d)统计 1 次幼孢子体的长度,并采用 Nikon E200 显微镜拍照记录。对小幼孢子体的 1 000 μg/L 处理组,隔一定天数统计幼孢子体假根(n=60)的长度。数据分析与作图采用 Excel 软件,用 T 检验进行显著性差异分析(n=60,以 P<0.01 作为极显著性差异,以 P<0.05 作为显著性差异)。

2 结果

2.1 Cu^{2+} 对鼠尾藻幼孢子体生长的影响

鼠尾藻幼孢子体(长度约为 $170\mu\text{m}$)对 Cu^{2+} 的反应是敏感的。图 1 显示, $100\mu\text{g/L}$ 以上的各处理组的幼孢子体平均长度与对照组相比, 在 3 d 后都达到差异极显著的程度 ($P < 0.01$)。 $10\mu\text{g/L}$ 与 $50\mu\text{g/L}$ 的处理组在 5 d 后也都达到了差异极显著的程度 ($P < 0.01$)。 $5\mu\text{g/L}$ 处理组与对照组相比, 5 d 后呈显著性差异 ($P < 0.05$), 在第 7 天呈极显著性差异 ($P < 0.01$)。对于 $1\mu\text{g/L}$ 处理组, 14 d 后与对照组相比, 仍未呈显著性差异。据此可以推断, 对于早期的鼠尾藻幼孢子体, $5\mu\text{g/L}$ 以上浓度的 Cu^{2+} 对其正常生长是不利的。当 Cu^{2+} 浓度达到或超过 $250\mu\text{g/L}$ 时, 小幼孢子体基本停止生长。

鼠尾藻小幼孢子体在高浓度 Cu^{2+} 处理后短期内就发生大量成群死亡。5 d 后, $250\mu\text{g/L}$ 以上浓度处理组的幼孢子体死亡率达到 50% 以上。其死亡症状是: 细胞质等内容物混乱, 色素凝集成团或块状, 并逐步聚集在细胞壁周围, 接着, 细胞壁、细胞膜破裂, 细胞最后瓦解。根部在最后才被分解死亡(图 2)。

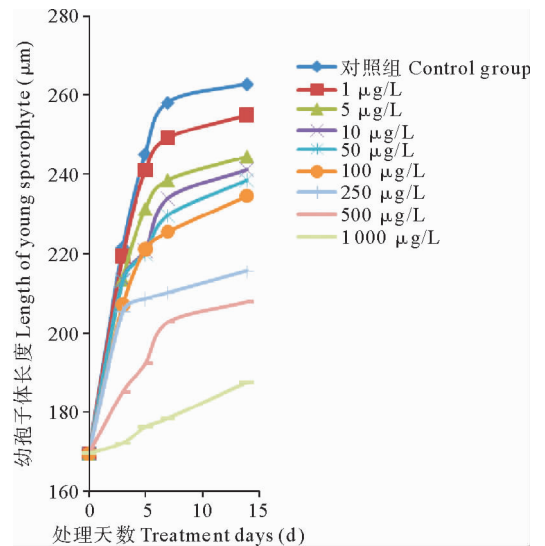


图 1 鼠尾藻幼孢子体(小)在不同浓度 Cu^{2+} 处理下的生长
Fig. 1 Growth of *S. thunbergii* young sporophyte (small) cultured at different concentrations of Cu^{2+}

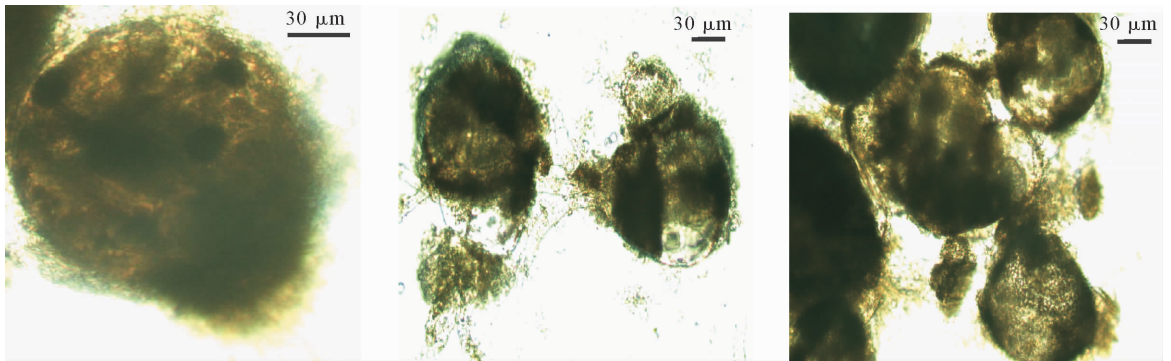


图 2 高浓度 Cu^{2+} 处理 5 d 后腐烂的鼠尾藻幼孢子体

Fig. 2 The dead *S. thunbergii* young sporophyte after being treated with high concentrations of Cu^{2+} for 5 d

鼠尾藻大幼孢子体(长 $750\sim 1\,000\mu\text{m}$)对 Cu^{2+} 的反应也是敏感的(图 3)。但其敏感程度小于早期的幼孢子体。 500 和 $1\,000\mu\text{g/L}$ 这两个处理组的幼孢子体平均长度与对照组相比, 在 3 d 后都达到差异极显著的程度 ($P < 0.01$)。 $50\sim 250\mu\text{g/L}$ 的 3 个处理组在 5 d 后也都呈显著性差异 ($P < 0.05$)。 $10\mu\text{g/L}$ 处理组与对照组相比, 14 d 后呈显著性差异 ($P < 0.05$)。对于 $1, 5\mu\text{g/L}$ 处理组, 14 d 后与对照组相比, 均未呈显著性差异, 而且 $1\mu\text{g/L}$ 的处理组在 14 d 后表现出比对照组增长更快的趋势。为了验证该趋势, 在原设计处理天数的基础上, 作者在第 21 天对 $1, 5\mu\text{g/L}$ 这两个处理组及对照组又统计了 1 次幼孢子体的长度, 结果表明 $1\mu\text{g/L}$ 处理组确实表现出了生长加快效应。

综上所述, 对于鼠尾藻大幼孢子体, $10\mu\text{g/L}$ 以上浓度的 Cu^{2+} 对其正常生长是不利的, $1\mu\text{g/L}$ 浓度的 Cu^{2+} 对其生长有促进作用。当 Cu^{2+} 浓度达到或超过 $50\mu\text{g/L}$ 时, 幼孢子体增长缓慢或基本停止生长。

鼠尾藻大幼孢子体在高浓度 Cu²⁺ 的处理下能在短期内维持生命,第 7 天后,就有幼孢子体开始发生死亡,其症状是:色素凝集成团或块状,并逐步聚集于藻体顶端或侧枝端(图 4a、b,箭头所指),藻体中部由浅褐色逐步变淡、变白,接着,藻体壁破裂,藻体可见很多黑色斑点,最后瓦解。

2.2 高浓度 Cu²⁺ 对鼠尾藻幼孢子体假根生长的影响

1 000 μg/L 浓度 Cu²⁺ 处理后,鼠尾藻幼孢子体的假根在 7 d 内依然快速生长,7 d 后增速变慢(图 5)。

第 20 天时,1 000 μg/L 处理组的假根与藻体的长度比值约是第 3 天的 10 倍,而对照组的长度比值并没有明显增大(图 6)。

据此可推断,高浓度 Cu²⁺ 处理后,幼孢子体假根对 Cu²⁺ 的敏感程度没有藻体那么大。

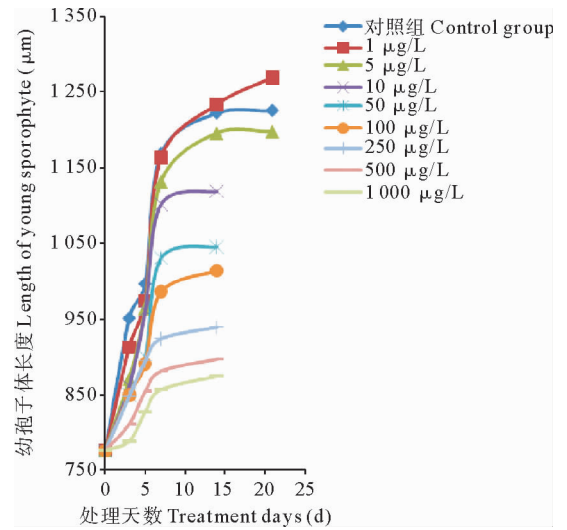


图 3 鼠尾藻幼孢子体(大)在不同浓度 Cu²⁺ 处理下的生长
Fig. 3 Growth of *S. thunbergii* young sporophyte (big) cultured at different concentrations of Cu²⁺

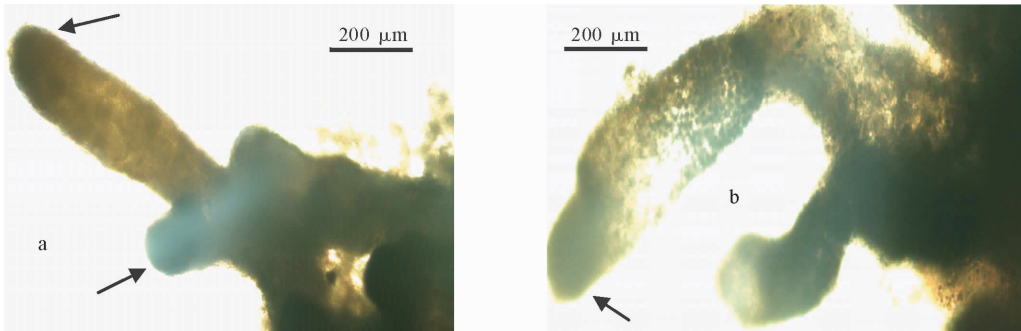


图 4 高浓度 Cu²⁺ 处理后趋于死亡及糜烂的鼠尾藻大幼孢子体

Fig. 4 The dying or dead *S. thunbergii* young sporophyte after being treated with high concentrations of Cu²⁺

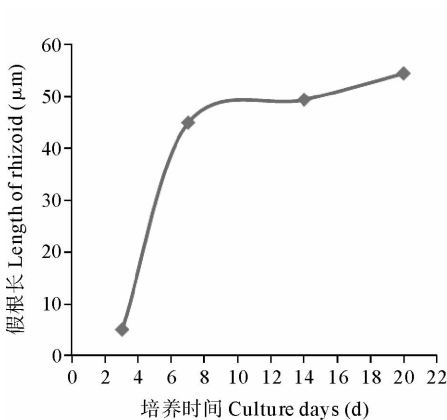


图 5 1 000 μg/L 浓度 Cu²⁺ 处理下藻体假根的长度

Fig. 5 The length of rhizoid of *S. thunbergii* young sporophyte cultured at 1 000 μg/L of Cu²⁺

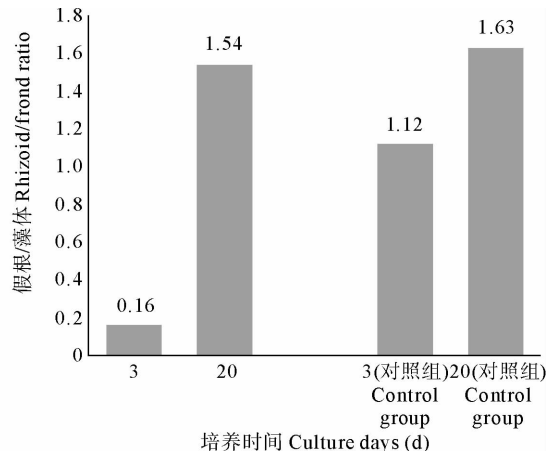


图 6 1 000 μg/L 浓度 Cu²⁺ 处理下幼孢子体假根与藻体长度的比值

Fig. 6 The ratio of rhizoid to frond of *S. thunbergii* young sporophyte cultured at 1 000 μg/L of Cu²⁺

3 讨论

Cu^{2+} 兼具营养和毒害。青岛附近海域海水的 Cu^{2+} 平均含量为 $0.811 \mu\text{g}/\text{kg}$, 约为 $0.8 \mu\text{g}/\text{L}$ (刘刚等 2007)。藻类对 Cu^{2+} 的需要是微量的, 自然海水中的 Cu^{2+} 可以满足藻类生长发育的需要。本实验中所用培养液均为天然海水所配, 其所含 Cu^{2+} 的量对鼠尾藻幼孢子体的生长已经足够。 Cu^{2+} 胁迫则会使细胞代谢发生混乱。有文献报道, 当过量的 Cu^{2+} 进入细胞体内后会发生诸如氧化、引入甲醛等变化, 这些变化都会破坏叶绿体等胞内器官, 直接影响藻类细胞的光合作用、呼吸作用、酶的活性, 并抑制藻类的生长 (Gupta *et al.* 1995; Baron *et al.* 1995)。况琪军等 (1996) 研究发现, Cu^{2+} 主要抑制藻类的生长和光合作用, 影响原生质膜的渗透性, 使 K 从细胞内丧失。

金属硫蛋白 (MT) 是一种金属结合蛋白, 通过半胱氨酸残基的硫氢基和重金属结合形成无毒或低毒的络合物, 从而消除重金属的毒害作用。植物体内也有类似的金属硫蛋白, 称为植物络合素 (PC) (杨世勇等 2004)。但是植物络合素在植物的整个生活周期中并不是一个很可靠的金属毒害的指示物, 它只在营养生长期出现 (Ernst *et al.* 2000)。植物络合素广泛分布于单子叶植物、双子叶植物、藻类及真菌中 (Rauser 1999), 其对于络合 Cu 和 Cd 最有效 (Steffens *et al.* 1990)。近年来, 关于藻类中的重金属-PC 复合物的研究已引起了一些研究者的兴趣 (周文彬等 2004)。不同生长时期的鼠尾藻幼孢子体对于 Cu^{2+} 胁迫的反应表现不一致。后期的鼠尾藻幼孢子体比前期的所能耐受的 Cu^{2+} 浓度更高一点。这可能是因为后期的幼孢子体正处于营养生长的相对旺盛期, 在重金属诱导下能产生比早期更多的植物络合素, 从而有更强的解毒能力。

在重金属胁迫下, 植物保护酶系统 POD、SOD、CAT 会受到影响。曾晓敏等 (2002) 在研究 Hg、Cu 复合污染对茶菱保护性酶活性影响时发现, Hg、Cu 胁迫下, 保护性酶活性增强。据此, 幼孢子体后期是不是比前期的保护酶系统有了进一步完善, 这有待进一步研究。

假根不具有色素母细胞 (Harold *et al.* 1910), 光合色素的含量很低 (Wang *et al.* 2005), 这也许可以解释为何幼孢子体假根对 Cu^{2+} 有较小敏感度, 因为 Cu^{2+} 对植物光合作用的影响主要是发生在细胞色素及其生化过程等不同层次上, 而对细胞色素的影响主要表现为抑制叶绿素的合成或引起叶绿素破坏 (Ouzounidou 1994; Mocquot *et al.* 1996)。这对鼠尾藻的营固着生活非常重要, 因为幼孢子体在外界恶劣的环境下依然能分化出发达的假根以附着牢固, 等到环境条件有所好转, 其又可以恢复正常生长。

有文献报道, 在培养液中添加过量的营养盐可以缓解重金属的毒性, 即营养盐与重金属离子之间可能存在拮抗作用 (Olguin *et al.* 2000)。本实验中, 培养液中添加了营养盐, 这可能在一定程度上影响了 Cu^{2+} 对幼孢子体的作用, 但毕竟本实验的营养盐并未过量, 所以是否有影响还有待进一步考证。

根据 Calabrese (1999) 的研究, 有些生物体受到低剂量污染物胁迫后, 出现一个先抑制后补偿的过程, 随着生物体对污染物的适应补偿行为逐渐超过其抑制行为, 从而导致一个净刺激效应。这种低剂量刺激、高剂量抑制作用被称为 Hormesis 效应。本实验中, 发现培养液中是有少量杂藻的, 因为采苗时并不能保证没有杂藻的污染。所以, 在 $1 \mu\text{g}/\text{L}$ 浓度的 Cu^{2+} 处理后期, 鼠尾藻大幼孢子体表现出的生长促进作用, 是因为低剂量的 Cu^{2+} 一定程度上抑制了杂藻的繁殖, 还是一种 Hormesis 效应, 抑或是二者皆有, 这有待进一步探究。

生物监测是现代生态毒理学的主要评估手段, 利用生物监测水体的重金属污染, 克服了理化分析的局限性, 避免了连续取样的繁琐, 受到了广泛关注 (黄先玉等 1999; 李江平等 2001)。有文献报道, 海带配子体和幼孢子体在监测 Cu^{2+} 污染中可能有用, 海带雌配子体在高于 $50 \mu\text{g}/\text{L}$ 、幼孢子体在高于 $5 \mu\text{g}/\text{L}$ Cu^{2+} 处理下, 正常的生长发育都受到了严重的干扰 (王清印等 1981)。本实验研究了 Cu^{2+} 对鼠尾藻幼孢子体生长的影响, 可以为利用鼠尾藻监测海洋 Cu^{2+} 污染提供一些有用的参考资料。

参 考 文 献

- 王飞久, 孙修涛, 李 锋. 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
王清印, 方宗熙. 1981. Cu^{2+} 对海带雌配子体和幼孢子体生长发育的影响. 山东海洋学院学报, 11(1): 53~60

- 王增福,刘建国. 2007. 鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* 有性生殖过程与育苗. 海洋与湖沼,38(5): 453~457
- 包杰,田相利,董双林,姜宏波. 2008. 温度、盐度和光照强度对鼠尾藻氮、磷吸收的影响. 中国水产科学,2(15): 293~299
- 刘刚,钟少军,瞿成利,刘飞,徐丽君. 2007. 青岛市奥帆赛区海域表层海水中微量元素的研究. 海洋科学,(8): 65~70
- 刘朝阳,孙晓庆,范士亮. 2006. 当前刺参养殖面临的主要困境及发展策略. 饲料工业,27(22): 28~30
- 况琪军,夏宜静,惠阳. 1996. 重金属对藻类的致毒效应. 水生生物学报,20(3): 277~283
- 张尔贤,俞丽君,肖湘. 1995. 多糖类物质对 O₂⁻ 和 OH⁻ 的清除作用. 中国生化药物杂志,16(1): 9~11
- 李江平,李雯. 2001. 指示生物及其在环境保护中的应用. 云南环境科学,20(1): 51~54
- 杨世勇,王方,谢建春. 2004. 重金属对植物的毒害及植物的耐性机制. 安徽师范大学学报(自然科学版), 27(1): 71~74
- 周文彬,邱保胜. 2004. 藻类对重金属的耐性与解毒机理. 湖泊科学,16(3): 265~272
- 郑怡. 1994. 福建部分海藻凝集素的检测. 福建师范大学学报(自然科学版),10(1): 101~105
- 黄先玉,刘沛然. 1999. 水体污染生物检测的研究进展. 环境科学进展,7(4): 14~18
- 曾晓敏,施国新,徐勤松,谷巍,徐楠,张小兰,周红卫. 2002. Hg²⁺、Cu²⁺ 胁迫下茶菱保护酶系统的防御作用. 应用与环境生物学报,8(3): 250~254
- 詹冬梅,李美真,丁刚,宋爱环,于波,黄礼娟. 2006. 鼠尾藻有性繁育及人工育苗技术的初步研究. 海洋水产研究,27(6): 55~59
- 潘金华,张全胜,许博. 2007. 鼠尾藻有性繁殖和幼孢子体发育的形态学观察. 水产科学,26(11): 589~592
- 潘瑞焯. 2001. 植物生理学. 第四版. 北京: 高等教育出版社,29~33
- 魏玉西,于曙光. 2002. 两种褐藻乙醇提取物的抗氧化活性研究. 海洋科学,26(9): 49~51
- Baron, M., Arellano, J. B., and Gorge, J. L. 1995. Copper and photosystem II: A controversial relationship. *Physiol. Plant*, 94: 174~180
- Calabrese, E. J. 1999. Evidence that hormesis represents an "overcompensation" response to a disruption in homeostasis. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 42(2): 135~137
- Ernst, W. H. O., Nelissen, H. J. M., and Ten Bookum, W. M. 2000. Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environ. Exp. Bot.* 43(1): 55~71
- Gupta, A., and Singhal, G. 1995. Inhibition of PS II activity by copper and its effect on spectral properties on intact cells in *Anacystis nidulans*. *Environ. Exp. Bot.* 35(4): 435~439
- Harold, G., and Drew, B. A. 1910. The reproduction and early development of *Laminaria digitata* and *Laminaria saccharina*. *Annals of Botany*, 24:177~190
- Mocquot, B., Vangronsveld, J., Clijsters, H. *et al.* 1996. Copper toxicity in young maize plants (*Zea mays* L.): effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzymes activities. *Plant and Soil*, 18(2): 287~300
- Olguin, H. F., Salibian, A., and Puig, A. 2000. Comparative sensitivity of *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa* as sentinel organisms for aquatic ecotoxicity assessment: Studies on a highly polluted urban river. *Environ. Toxicol.* 15(1): 14~22
- Ouzounidou, G. 1994. Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environ. Exp. Bot.* 34(2): 165~172
- Rausser, W. E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: The case for organic acids, amino acids, phytin and metallo-thioneins. *Cell Biochem. Biophys.* 31(1): 19~48
- Steffens, J. C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 533~575
- Wang, W. J., Wang, G. C., Zhang, M., and Tseng, C. K. 2005. Isolation of Fucoxanthin from the Rhizoid of *Laminaria japonica* Aresch. *Journal of Integrative Plant Biology*,47:1 009~1 015