

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19386

## 铁离子对海带配子体克隆系生长发育的影响

王潇<sup>1,2</sup>, 刘福利<sup>2,3</sup>, 梁洲瑞<sup>2,3</sup>, 袁艳敏<sup>2</sup>, 张朋艳<sup>2,3</sup>, 汪文俊<sup>2,3</sup>, 孙修涛<sup>2,3</sup>

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

**摘要:** 为了探究  $\text{Fe}^{3+}$  在不同氮、磷条件下对海带 (*Saccharina japonica*) 配子体生长发育的影响, 以海带‘黄官 1 号’雌、雄配子体克隆系为材料, 以含有不同浓度的氮(N)、磷(P)营养盐的灭菌海水为培养液, 添加不同浓度(0  $\mu\text{mol/L}$ 、0.36  $\mu\text{mol/L}$ 、3.60  $\mu\text{mol/L}$ 、8.90  $\mu\text{mol/L}$ 、17.80  $\mu\text{mol/L}$ )的铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ ), 通过测定光系统 II 的最大荧光产量( $F_v/F_m$ )观察配子体营养生长状况, 通过计算发育率(包括卵囊形成率、排卵率、幼苗形成率)观测配子体发育与生殖状况。结果显示, N、P 浓度分别为 0.825 mmol/L、0.0336 mmol/L 的条件下, 浓度为 3.60  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{3+}$  对海带配子体营养生长阶段的促进作用最大; 在不同 N、P 浓度条件下,  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 3.60~17.80  $\mu\text{mol/L}$  时能够提高海带配子体的最大荧光产量, 且各浓度组之间没有显著性差异( $P>0.05$ ); N、P 浓度达到 0.275 mmol/L、0.0112 mmol/L 时, 0.36~17.80  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{3+}$  能够促进海带配子体由营养生长转向生殖生长,  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 3.60~17.80  $\mu\text{mol/L}$  时可显著促进海带配子体的生殖生长, 且各浓度组之间没有显著性差异( $P>0.05$ ); 即使 N、P 浓度达到 0.825 mmol/L、0.0336 mmol/L, 在无铁条件下所有的海带配子体维持在营养生长状态; 即使  $\text{Fe}^{3+}$  浓度达到 3.60  $\mu\text{mol/L}$ , 在 N、P 浓度 0.007 mmol/L、0.0003 mmol/L 条件下, 大部分海带配子体(65%)维持在营养生长状态, 虽然小部分海带配子体 (35%) 进入了生殖生长状态, 但生殖生长明显滞后于实验中的其他各个 N、P 浓度组。本研究表明, 铁和 N、P 营养盐对海带配子体的营养生长和生殖生长具有协同促进作用, 铁是海带配子体由营养生长到发育成熟再到有性生殖过程中的关键因素; 在添加适宜浓度的氮(0.275 mmol/L)、磷营养盐(0.0112 mmol/L)条件下, 浓度为 3.60  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{3+}$  对海带配子体的生长发育促进作用最大。该结果可为提高海带育苗效率提供理论依据。

**关键词:** 海带; 配子体; 铁; 营养生长; 配子体生殖生长

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)09-1052-10

海带配子体克隆系也称海带无性生殖系或无性繁殖系, 是由海带配子体单细胞在一定条件诱导下通过无性繁殖(细胞有丝分裂)形成的多细胞克隆系, 具有发育全能性、遗传纯合等特点<sup>[1]</sup>。海带配子体克隆系是当前最常见的海带种质保存对象, 是海带种质库建设的主体材料, 为海带种质改良和新品种培育提供了丰富的遗传资源。利用海带配子体克隆系进行育苗, 是海带生物技术

生产上的具体应用, 被称为海带细胞工程技术<sup>[2-3]</sup>。目前, 海带配子体克隆系育苗技术在实验研究中已普遍应用, 但在生产上应用有限<sup>[4]</sup>。由于对配子体克隆系从营养生长到生殖生长转变过程的认识不够, 导致无法精确调控海带配子体克隆系生长与生殖过程。此外, 配子体克隆系育苗生产中还存在雌雄配子体发育不同步、受精率不高、幼苗附着不牢固等问题, 限制了配子体克隆系育苗技

收稿日期: 2020-01-19; 修订日期: 2020-03-17.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900305, 2018YFD0901500); 现代农业产业技术体系藻类体系项目(CARS-50); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室渔业科技青年人才计划项目(2018-MFS-T12).

作者简介: 王潇(1995-), 女, 硕士研究生, 从事海藻繁育与增养殖. E-mail: wangxhard@163.com

通信作者: 刘福利, 副研究员, 研究生导师. E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

术在实际育苗生产中的规模化应用。

对配子体营养生长和生殖生长的调控是大型经济褐藻, 包括海带科(*Laminaria*)、巨藻科(*Lessoniaceae*)、翅藻科(*Alariaceae*)等育苗和育种研究的热点, 温度、营养盐、光质、光强和光周期等环境因子被认为是调控褐藻配子体生长发育的重要外因。对于温度, 一般较低温度有利于褐藻配子体进入生殖生长状态, 如 Martins 等<sup>[5]</sup>研究发现掌状海带(*Laminaria digitata*)配子体营养生长的最适温度范围为 10~18 °C, 而发育的最适温度范围为 5~15 °C; 6 °C 时可促进糖海带(*Saccharina latissima*)配子体生殖生长, 而 13~18 °C 则使糖海带配子体维持营养生长状态<sup>[6]</sup>。对于营养盐, 通常认为添加适量的氮、磷是大型褐藻配子体生殖生长的必需条件, 如对巨藻(*Macrocystis pyrifera*)和裙带菜(*Undaria pinnatifida*)配子体的研究表明, 配子体在低营养盐条件下停止发育, 在氮营养盐浓度较高时重新启动生长发育<sup>[7-8]</sup>; 研究发现适宜的 N、P 营养盐有利于配子体生长发育的整个过程<sup>[9]</sup>, 鞠青等<sup>[10]</sup>研究了不同氮、磷比对海带配子体形成的影响, 认为 N:P>15:1 时会降低海带配子体的形成。对于光强因素, 通常条件下大型褐藻配子体在充足光照下会进入生殖生长阶段, 在低光下则维持营养生长状态<sup>[11]</sup>, 如 Bolton 等<sup>[12]</sup>发现光强小于 20  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  时昆布(*Ecklonia maxima*)配子体进行营养生长, 而 20~60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  光强则促进配子体的生殖生长。在光质方面, 一般认为蓝光对配子体的营养生长和生殖生长均有促进作用, 红光抑制配子体的生殖生长<sup>[13-14]</sup>。

上述环境因子对大型褐藻配子体发育的影响一般存在着交互作用, 主导因子可能因褐藻种类不同而有所差异, 但营养盐在其中均发挥重要作用, 多数研究者重点关注的只有氮和磷元素, 而对微量元素的研究较少。在藻类生长过程中, 铁(Fe)是一种必不可少的营养元素。目前, 国内外有关铁对藻类影响的研究主要侧重于海水中的铁对藻类生长和水体环境的影响<sup>[15-16]</sup>, 如唐代军等<sup>[17]</sup>研究发现铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ )浓度对四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)和水华鱼腥藻(*Anabaena aquae*)的生长影响显著。雷玉新等<sup>[18]</sup>研究发现, 在缺铁

条件下藻类基本不生长。铁浓度对藻类的生长、光合作用和叶绿素 a 含量均有显著影响<sup>[19-20]</sup>。海带育苗生产中, 添加适量的  $\text{Fe}^{3+}$ , 有利于海带幼苗的培育。研究发现 Fe 能诱导海带雌配子体的发育<sup>[21]</sup>, Fe 的供应是海带卵子发生过程中重要且不可缺少的条件<sup>[22]</sup>, 巨藻(*Macrocystis pyrifera*)在有螯合 Fe 的条件下进行配子体生殖生长, 在无螯合 Fe 的条件下进行营养生长<sup>[23]</sup>。但是, 有关 Fe 对海带配子体生长发育影响的研究较少<sup>[21]</sup>,  $\text{Fe}^{3+}$  浓度对配子体由营养生长向生殖发育转变的促进作用及其机制尚未明确。本研究以海带(*Saccharina japonica*)‘黄官 1 号’雌、雄配子体克隆系为材料, 通过显微观察配子体生长发育状态, 测定光系统 II 的最大荧光产量( $F_v/F_m$ ), 计算配子体发育率(卵囊形成率、排卵率、幼苗形成率)等, 探究 Fe 与氮、磷的交互作用对海带配子体克隆系生长发育的影响, 旨在为海带无性繁殖系育苗技术提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

以本实验室保存的生长状态良好的海带‘黄官 1 号’雌、雄配子体克隆系为实验材料。‘黄官 1 号’是全国水产原种和良种审定委员会审定的海带新品种, 品种登记号为 GS-01-006-2011, 该新品种具有产量高、出菜率高、成熟晚、耐高温等特征, 是我国南(福建)、北(辽宁)方海带主养区重要的养殖品种之一<sup>[24]</sup>。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 培养液的配制** (1)人工海水按照 ESAW 配方<sup>[25]</sup>进行配制(不添加含 Fe 的试剂), 配方中 N ( $\text{NaNO}_3$ )、P ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )浓度分别为 0.55 mmol/L、0.0224 mmol/L, 在此基础上保持其他成分不变, 只改变 N、P 和 Fe 相应营养盐的浓度。设不添加 N、P 组(N1+P1)为人工海水原配方中含有的 N、P 营养盐浓度, N、P 添加组(N1.5+P1.5)的 N、P 浓度为试验组(N1+P1)的 1.5 倍。即 N、P 浓度分别为 0.825 mmol/L、0.0336 mmol/L。N1+P1 和 N1.5+P1.5 组中各设置 5 个  $\text{Fe}^{3+}$  (单元素标准溶液, 成都海光)浓度梯度, 分别为 0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.36  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、3.60  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、8.90  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、17.80  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。每个试

验组分别设置 3 个平行。

(2)天然海水经过滤、高温煮沸灭菌后使用,测定天然海水自身含有的 N、P 浓度分别约为 0.007 mmol/L、0.0003 mmol/L。设试验组(N0+P0)为天然海水自身含有 N、P 的浓度,试验组(N0.5+P0.5)中的 N、P 浓度为实验组(N1+P1)浓度的 1/2,即 N、P 浓度分别为 0.275 mmol/L、0.0112 mmol/L。每个 N、P 浓度组各设置 5 个  $\text{Fe}^{3+}$  浓度梯度,分别为 0  $\mu\text{mol/L}$ 、0.36  $\mu\text{mol/L}$ 、3.60  $\mu\text{mol/L}$ 、8.90  $\mu\text{mol/L}$ 、17.80  $\mu\text{mol/L}$ 。每个试验组分别设置 3 个平行。

**1.2.2 配子体克隆系的培养** 雌、雄配子体以 2:1 的比例混合,用匀浆仪(江苏天翎仪器有限公司)将混合后的配子体克隆系打碎,10 s/次,打碎 10 次,然后用 400 目过滤筛过滤,取滤液在显微镜下观察,细胞段长度为 100  $\mu\text{m}$  左右。将滤液倒在铺满载玻片的培养皿中,附着 24 h 后载玻片上配子体密度为显微镜 100 $\times$ 视野中有 10~15 个细胞段。将附着配子体的载玻片分别放到直径 9 cm 的培养皿中培养,培养条件为:光照 50~60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,温度 10  $^{\circ}\text{C}$ ,光暗比 10:14,培养液分别为添加不同浓度铁的天然海水和人工海水,每 7 d 换水 1 次。

**1.2.3 光系统 II 最大荧光产量( $F_v/F_m$ )的测定** 将雌、雄配子体克隆系分别用载玻片压碎,放入六孔培养皿中培养,培养条件为:光照 50~60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,温度 10  $^{\circ}\text{C}$ ,光暗比 10:14,培养液分别为添加不同浓度铁的天然海水和人工海水。采用调制叶绿素荧光成像系统(IMAGING-PAM, WALZ, 德国)测定培养 0 d、4 d 的光系统 II 最大荧光产量( $F_v/F_m$ ),取少量藻体于暗盒中,暗适应 20 min 后测定  $F_v/F_m$ 。

### 1.3 配子体生长、发育指标的测定

在显微镜下观察配子体的生长发育状态,每 3 d 拍照 1 次,实验周期 21 d。

配子体宽度的测量:每个培养皿中随机观察 10 个 100 $\times$ 视野,用 DLC Performance 软件拍照,Image-Pro Plus 5.1 软件测量雌配子体宽度。

配子体发育率的计算:每个培养皿随机观察 10 个 100 $\times$ 视野,分别统计卵囊形成、排卵、幼孢子体和总细胞数,配子体卵囊形成率为卵囊形成

数占总细胞数的百分比;排卵率为排卵数占总细胞数的百分比;幼苗形成率为长成孢子体的数量占总细胞数的百分比;发育率为卵囊形成数、排卵数和孢子体数之和占总细胞数的百分比。

### 1.4 数据处理

使用 SPSS 19.0 对雌配子体的卵囊形成率、排卵率、幼苗形成率和发育率进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较, $P<0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 $\text{Fe}^{3+}$ 浓度对海带配子体克隆系生长的影响

**2.1.1 不同  $\text{Fe}^{3+}$  浓度对海带配子体细胞形态的影响** 当培养液中  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0  $\mu\text{mol/L}$  时,即使 N、P 营养元素充足,海带配子体克隆系仅进行缓慢的营养生长,而不进行发育,整个实验观察期内均无卵囊形成,外观形态变化如图 1a、1b、1c 所示,6 d 内配子体细胞段中部或顶部的细胞产生凸起和分支,颜色加深,细胞质分布均匀,细胞段数目增多,雄配子体细胞段平均宽度由打碎后的 5.6  $\mu\text{m}$  增长到 7.9  $\mu\text{m}$ ,雌配子体细胞段平均宽度由打碎后的 9.5  $\mu\text{m}$  增长到 14.5  $\mu\text{m}$ 。6~18 d 时,配子体由细胞宽度的生长转为细胞长度的生长。当  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0.36  $\mu\text{mol/L}$ ,培养液为低 N、P 营养盐即天然海水(N0+P0)时,海带配子体克隆系进行缓慢的营养生长,表现为丝状体细胞数目增多,但无卵囊形成。

在  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 3.60~17.80  $\mu\text{mol/L}$  条件下,无论是否添加额外的 N、P 营养盐,海带雌配子体均表现出快速的生长发育状态(图 1d, 图 1e, 图 1f):6 d 内细胞段中部或顶部的细胞产生凸起和分支,颜色加深,细胞质分布均匀,细胞段数目增多;6 d 后,雌配子体细胞段平均宽度由打碎后的 9.5  $\mu\text{m}$  增长到 12.4  $\mu\text{m}$ ,雌配子体细胞表面出现的卵囊开始突起、伸长、加粗,色素体向突起集中,突起膨大成球形,15%~20%的雌配子体最终发育为成熟卵囊(图 1d),10%~15%的雌配子体释放出圆形卵(图 1e);6~18 d 内大部分雌配子体萌发为成熟卵囊、排卵并形成幼苗(图 f),18 d 时雌配子体的发育率在 85%~95%,其中 50%左右为多细胞幼苗。

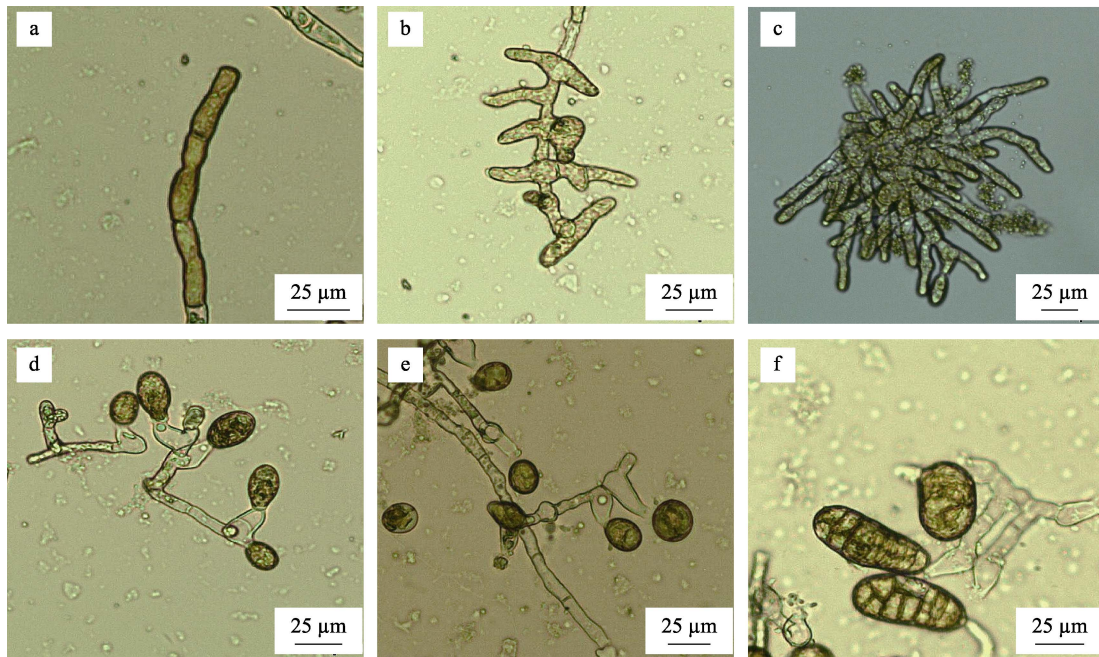


图 1 海带‘黄官 1 号’雌配子体生长发育过程

a. 打碎后的雌配子体; b. 雌配子体营养生长初期; c. 雌配子体营养生长后期; d. 雌配子体卵囊形成;  
e. 雌配子体排卵; f. 幼孢子体早期形态。

Fig. 1 Early development of female gametophyte of *Saccharina japonica* ‘Huangguan No.1’

a. Fragment of female gametophyte; b. Early stage of vegetative growth of female gametophyte; c. Late vegetative growth stage of female gametophyte; d. Oogonium development of female gametophyte; e. Ovulation of female gametophyte; f. Early morphology of young sporophyte.

**2.1.2 不同  $Fe^{3+}$  浓度对海带雌配子体克隆系营养生长的影响** 在本实验条件下, 大部分海带配子体从第 6 天开始出现明显的发育特征, 前 6 d 主要是营养生长, 以细胞宽度作为衡量配子体营养生长的指标。由图 2 可知, 在本实验 N、P 浓度范围内, 不论 N、P 营养水平高低, 当  $Fe^{3+}$  浓度由  $0 \mu\text{mol/L}$  增加到  $3.60 \mu\text{mol/L}$  时, 铁对海带配子体营养生长速度的促进作用明显,  $Fe^{3+}$  浓度  $3.60 \mu\text{mol/L}$  组营养生长速度显著大于  $Fe^{3+}$  浓度  $0 \mu\text{mol/L}$  和  $0.36 \mu\text{mol/L}$  组 ( $P < 0.05$ )。但  $Fe^{3+}$  浓度的进一步增加对海带配子体营养生长的促进作用减慢,  $Fe^{3+}$  浓度由  $8.90 \mu\text{mol/L}$  提高至  $17.80 \text{mmol/L}$  时, 配子体宽度没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。低 N、P 条件下, 当  $Fe^{3+}$  由  $0 \mu\text{mol/L}$  增加到  $0.36 \mu\text{mol/L}$  时, (N0+P0) 组的生长速度显著提高, 而其他 N、P 营养组的生长速度提高不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明是当 N、P 营养不足时, 铁可以缓解 N、P 缺乏对海带配子体营养生长的不利影响。而在低 N、P 营养盐浓度下, 高浓度的  $Fe^{3+}$  对海带配子体的营养生长具有负面作用,

如在低 N、P 营养盐组(N0+P0), 当  $Fe^{3+}$  浓度达到  $8.90 \sim 17.80 \mu\text{mol/L}$  时, 海带配子体的宽度显著低于  $Fe^{3+}$  为  $3.60 \mu\text{mol/L}$  条件下的宽度 ( $P < 0.05$ )。在海带配子体培养过程中,  $Fe^{3+}$  与 N、P 营养盐具有协同性, 即当  $Fe^{3+}$  和 N、P 都处于最佳浓度 [ $Fe^{3+}$  为  $3.60 \mu\text{mol/L}$ , N、P 为 (N1.5+P1.5)] 时, 海带配子体表现出最佳的生长速度。

## 2.2 不同 $Fe^{3+}$ 浓度对海带配子体克隆系光合生理的影响

本研究用配子体光系统 II 最大荧光产量 ( $F_v/F_m$ ) 作为衡量配子体生理状态的指标。在本实验条件下, 海带雌、雄配子体克隆系初始(第 0 天)时的  $F_v/F_m$  值分别为 0.232、0.189。培养 4 d 后, 不同条件下配子体的营养生长状态较好,  $F_v/F_m$  值差异如图 3、图 4 所示。不同氮磷营养盐条件下, 不同浓度的  $Fe^{3+}$  对雌配子体的促进作用与雄配子体基本一致。 $Fe^{3+}$  浓度增加时, 雌、雄配子体的  $F_v/F_m$  均呈上升趋势,  $Fe^{3+}$  浓度由  $0 \mu\text{mol/L}$  上升到  $3.60 \mu\text{mol/L}$  时,  $F_v/F_m$  值显著升高,  $Fe^{3+}$  浓度



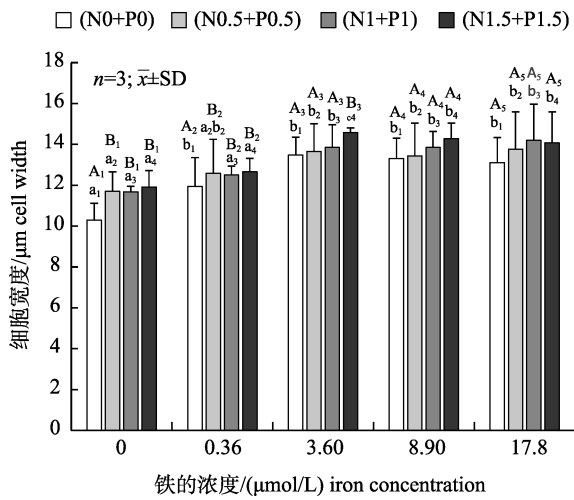


图 2 海带‘黄官 1 号’雌配子体不同 Fe<sup>3+</sup>浓度下培养 6 d 的细胞宽度

柱状图上大写、小写字母下标为相同数字的为同一组多重比较, 同一组中字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 2 Cell width of female gametophyte of *Saccharina japonica* ‘Huangguan No.1’ on the 6th day in different Fe<sup>3+</sup> concentrations

The uppercase and lowercase letters on the histogram with the same number are compared as the same group. The different letters in the same group represent significant differences ( $P < 0.05$ ).

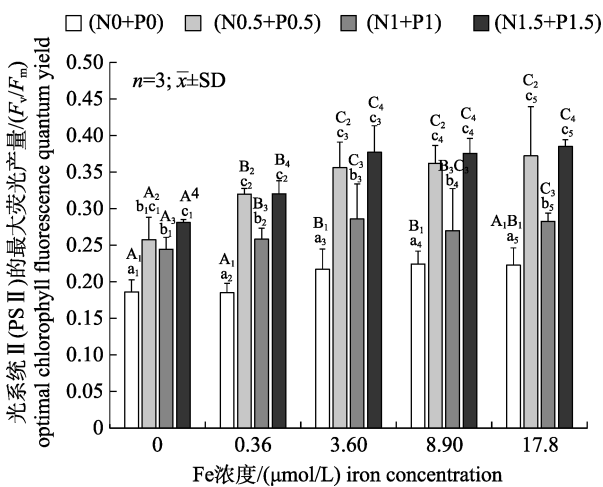


图 3 海带‘黄官 1 号’雄配子体在不同铁浓度条件下培养第 4 天的光系统 II 最大荧光产量 ( $F_v/F_m$ )

柱状图上大写、小写字母下标为相同数字的为同一组多重比较, 同一组的不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 3 The optimal chlorophyll fluorescence quantum yields ( $F_v/F_m$ ) of male gametophyte of *Saccharina japonica* ‘Huangguan No.1’ on the 4th day cultured in seawater with different Fe<sup>3+</sup> concentrations

The uppercase and lowercase letters on the histogram with the same number are compared as the same group. The different letters in the same group represent significant differences ( $P < 0.05$ ).

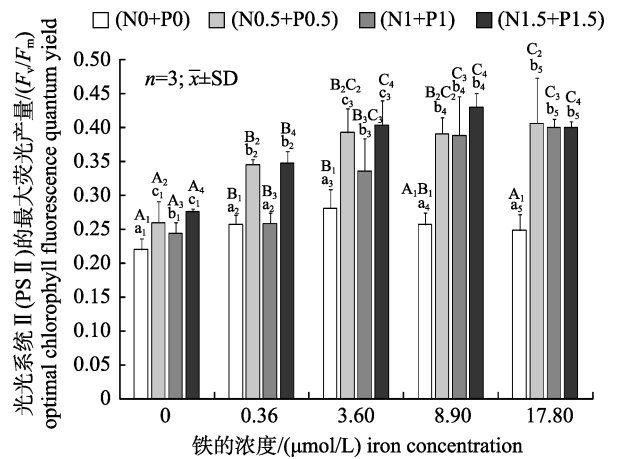


图 4 海带‘黄官 1 号’雌配子体在不同铁浓度条件下培养第 4 天的光系统 II 最大荧光产量 ( $F_v/F_m$ )

柱状图上大写、小写字母下标为相同数字的为同一组多重比较, 同一组的不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 The optimal chlorophyll fluorescence quantum yields ( $F_v/F_m$ ) of female gametophyte of *Saccharina japonica* ‘Huangguan No.1’ on the 4th day cultured in seawater with different Fe<sup>3+</sup> concentrations

The uppercase and lowercase letters on the histogram with the same number are compared as the same group. The different letters in the same group represent significant differences ( $P < 0.05$ ).

3.60 μmol/L 组显著高于 Fe<sup>3+</sup>浓度 0 mmol/L 和 0.36 μmol/L 组 ( $P < 0.05$ ); 但 Fe<sup>3+</sup>浓度过高时, Fe<sup>3+</sup>浓度增加对雄配子体  $F_v/F_m$  升高的促进作用有限, 即 Fe<sup>3+</sup>浓度为 8.90 μmol/L 和 17.8 μmol/L 时, 海带雄配子体的  $F_v/F_m$  与 3.60 μmol/L 时无显著性差异 ( $P > 0.05$ ).

### 2.3 不同 Fe<sup>3+</sup>浓度对海带配子体由营养生长转向发育生殖的影响

在海带配子体经丝状体营养生长、生殖生长进而发育成幼苗的过程中, 雌配子体卵囊形成、排卵及受精和幼苗出现时的形态变化明显, 易于观察和统计, 因此选择卵囊形成率、排卵率和幼苗形成率作为衡量海带配子体生殖生长的指标。如表 1 所示, 不同 N、P 营养盐条件下, Fe<sup>3+</sup>浓度越高, 海带雌配子体卵囊形成的时间越短, 即 Fe<sup>3+</sup>浓度为 0 mmol/L 时, 配子体均未出现生殖生长状态; Fe<sup>3+</sup>浓度为 0.36 μmol/L 时, 第 12 天出现卵囊的形成和排卵; Fe<sup>3+</sup>浓度为 3.60 μmol/L、8.90 μmol/L、17.80 μmol/L 时, 第 6 天配子体就形成卵囊并排卵。低浓度的 N、P 抑制了 Fe<sup>3+</sup>对海

表 1 海带‘黄官 1 号’配子体在不同铁浓度条件下的发育情况

Tab. 1 The development of *Saccharina japonica* ‘Huangguan No.1’ gametophyte in seawater with different Fe<sup>3+</sup> concentrations n=3;  $\bar{x}\pm SD$ ; %

铁浓度/ ( $\mu\text{mol/L}$ ) iron concent- ration	N、P 浓度组 nitrogen and phosphorus concentration group	第 6 天 day 6			第 12 天 day 12			第 18 天 day 18		
		卵囊形成率 oogonium formation rate	排卵率 ovulation rate	幼苗形 成率 seedling forma- tion rate	卵囊形成率 oogonium formation rate	排卵率 ovulation rate	幼苗形成率 seedling formation rate	卵囊形成率 oogonium formation rate	排卵率 ovulation rate	幼苗形成率 seedling formation rate
0	(N0+P0)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(N0.5+P0.5)	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(N1+P1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(N1.5+P1.5)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.36	(N0+P0)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	(N0.5+P0.5)	0.00	0.00	0.00	8.30±0.05	13.80±0.06	0.00	11.20±0.04	18.40±0.04	7.20±0.04
	(N1+P1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.50±0.05	11.00±0.05	5.50±0.05
	(N1.5+P1.5)	0.00	0.00	0.00	6.70±0.06	7.60±0.11	0.00	10.5±0.03	23.70±0.04	7.90±0.04
3.60	(N0+P0)	0.00	0.00	0.00	5.50±0.03	15.50±0.11	0.00	8.50±0.02	16.90±0.03	6.80±0.02
	(N0.5+P0.5)	14.70±0.13	21.60±0.18	0.00	14.90±0.14	28.60±0.19	22.00±0.11	3.10±0.022	39.80±0.02	48.00±0.02
	(N1+P1)	14.00±0.12	6.40±0.08	0.00	24.90±0.15	18.70±0.10	7.00±0.10	4.80±0.036	26.30±0.05	47.90±0.05
	(N1.5+P1.5)	20.10±0.15	10.70±0.10	0.00	17.80±0.11	31.40±0.18	18.90±0.12	1.10±0.028	35.30±0.03	57.40±0.04
8.90	(N0+P0)	0.00	0.00	0.00	7.70±0.09	12.20±0.09	4.50±0.044	9.30±0.033	14.70±0.04	11.60±0.03
	(N0.5+P0.5)	26.00±0.15	13.50±0.17	0.00	15.10±0.02	25.80±0.03	29.00±0.04	1.30±0.02	26.20±0.02	63.80±0.08
	(N1+P1)	14.30±0.13	7.60±0.07	0.00	18.80±0.19	34.70±0.12	12.70±0.14	4.30±0.02	33.10±0.03	52.50±0.09
	(N1.5+P1.5)	22.20±0.18	11.10±0.11	0.00	16.30±0.12	33.50±0.15	20.10±0.08	1.80±0.01	39.30±0.02	53.60±0.04
17.80	(N0+P0)	0.00	0.00	0.00	6.60±0.03	12.40±0.03	1.70±0.03	8.30±0.03	12.80±0.03	10.10±0.03
	(N0.5+P0.5)	20.60±0.19	12.40±0.12	0.00	14.40±0.09	28.20±0.13	23.30±0.07	1.30±0.02	33.80±0.13	59.10±0.03
	(N1+P1)	13.40±0.13	17.30±0.11	0.00	24.70±0.02	29.70±0.04	17.60±0.03	5.50±0.02	39.60±0.02	40.90±0.03
	(N1.5+P1.5)	19.50±0.10	15.40±0.08	0.00	17.20±0.03	17.00±0.03	23.40±0.04	1.40±0.08	33.80±0.12	51.10±0.10

注: N、P 浓度在 N0+P0 组为 0.007 mmol/L、0.0003 mmol/L; 在 N0.5+P0.5 组为 0.275 mmol/L、0.0112 mmol/L; 在 N1+P1 组为 0.55 mmol/L、0.0224 mmol/L, 在(N1.5+P1.5)组为 0.825 mmol/L、0.0336 mmol/L。

Note: The concentrations of N and P in (N0+P0) group are 0.007 mmol/L and 0.0003 mmol/L; in (N0.5+P0.5) group are 0.275 mmol/L and 0.0112 mmol/L; in (N1+P1) group are 0.55 mmol/L and 0.0224 mmol/L; in (N1.5+P1.5) group are 0.825 mmol/L and 0.0336 mmol/L.

带配子体的生殖生长的促进作用, (N0+P0)条件下, 第 6 天不同 Fe<sup>3+</sup>浓度条件下均未出现卵囊的形成和排卵, 随着 Fe<sup>3+</sup>浓度的升高, 弥补了低 N、P 营养盐对海带配子体生殖生长的抑制作用, 如 Fe<sup>3+</sup>浓度为 3.60  $\mu\text{mol/L}$ 、8.90  $\mu\text{mol/L}$ 、17.80  $\mu\text{mol/L}$ , 在第 12 天配子体出现了生殖生长; 而 Fe<sup>3+</sup>浓度为 0 mmol/L、0.36  $\mu\text{mol/L}$  时, 低 N、P(N0+P0)处理组最终也没有出现配子体生殖生长。如图 5 所示, Fe<sup>3+</sup>浓度为 3.60~17.80  $\mu\text{mol/L}$  时, 海带配子体的最终发育率显著高于其他 Fe<sup>3+</sup>浓度(P<0.05), 且

低 N、P(N0+P0)处理组的海带配子体最终发育率也显著低于其他 N、P 组(P<0.05), Fe<sup>3+</sup>浓度高于 3.60  $\mu\text{mol/L}$  时, Fe<sup>3+</sup>浓度升高对海带配子体的发育无明显促进作用, Fe<sup>3+</sup>浓度为 3.60  $\mu\text{mol/L}$ 、8.90  $\mu\text{mol/L}$ 、17.80  $\mu\text{mol/L}$  的最终发育率无显著性差异(P>0.05)。综上所述, 铁有利于海带配子体生殖生长, 可能是海带配子体由营养生长向生殖生长转变的必需元素, 当 Fe<sup>3+</sup>浓度为 3.60~17.80  $\mu\text{mol/L}$  时, 铁对配子体生殖生长的促进效果最佳。

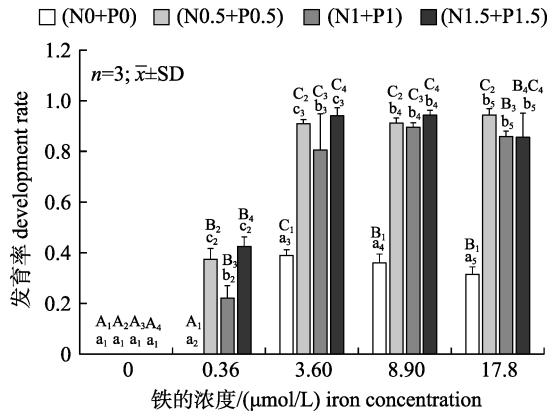


图 5 海带‘黄官 1 号’配子体在不同  $\text{Fe}^{3+}$  浓度条件下培养第 18 天的发育率

柱状图上大写、小写字母下标为相同数字的为同一组多重比较,同一组的不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 5 The final development rate of *Saccharina japonica* ‘Huangguan No.1’ gametophyte for 18 days under different  $\text{Fe}^{3+}$  concentrations

The uppercase and lowercase letters on the histogram with the same number are compared as the same group. The different letters in the same group represent significant differences ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

无论是使用孢子体采孢子,还是基于配子体克隆系的海带育苗,都需要优化海带配子体世代的生长发育条件,尤其是配子体由营养生长向生殖生长的转变阶段,受到精细的外界环境因子调控。本研究通过配子体细胞宽度、叶绿素荧光参数来衡量配子体的营养生长和生理状况,利用卵囊形成率、排卵率、幼孢子体形成率来衡量配子体生殖生长的过程,进而探究  $\text{Fe}^{3+}$  对配子体生长发育的促进作用,相关结果将对海带育苗生产提供重要的参考价值。

比较不同培养时间后海带配子体质量变化来计算配子体的生长速度是目前最常见的方法<sup>[26]</sup>,也有测定配子体细胞长度和面积变化来衡量配子体生长速度的报道<sup>[5, 27]</sup>。本研究发现,由于配子体克隆系的生物量不高,滤去培养液称重的误差较大,而配子体细胞宽度的变化能反映出配子体克隆系的营养生长情况。光系统 II 最大荧光产量 ( $F_v/F_m$ ) 是衡量植物生理状态的重要指标,也能准确反映大型海藻在不同条件下的生理状态<sup>[28-29]</sup>。因此,本研究采用细胞宽度和  $F_v/F_m$  值来反映配

子体在不同铁浓度条件下的生长和生理状况,结果表明适量的铁对海带配子体的生长发育具有显著的促进作用,3.60~17.80  $\mu\text{mol/L}$  的铁浓度可显著提高海带配子体的  $F_v/F_m$ 。雷玉新等<sup>[18]</sup>发现  $\text{Fe}^{3+}$  浓度增高导致藻体内叶绿素 a 的含量升高,进而促进配子体的光合作用, $\text{Fe}^{3+}$  浓度高于 21.40  $\mu\text{mol/L}$ ,对蓝藻生长的促进作用会受到抑制。郑太辉等<sup>[30]</sup>研究发现,适宜的  $\text{Fe}^{3+}$  浓度有利于铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 生长及叶绿素合成,过高  $\text{Fe}^{3+}$  浓度在培养前期能促进藻类叶绿素的合成,有利于藻体生长,在培养后期会抑制藻类叶绿素的合成,不利于藻体生长。Kuwabara<sup>[31]</sup>研究认为加铁(0.34  $\mu\text{mol/L}$ )能够促进巨藻的生长。本研究发现, $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 8.90~17.80  $\mu\text{mol/L}$  时的雌配子体细胞宽度与  $\text{Fe}^{3+}$  为 3.60  $\mu\text{mol/L}$  浓度下的雌配子体宽度并没有显著差异性,在 N、P 营养盐充足时, $\text{Fe}^{3+}$  为 3.60  $\mu\text{mol/L}$  时对海带配子体生长的促进最显著。这与雷玉新等<sup>[18]</sup>证实的适宜铁浓度有利于藻类生长的结果相一致。

本研究表明培养液中的铁是海带配子体的发育重要和必不可少的因素。Lüning 等<sup>[32]</sup>研究认为改变铁供应可能是控制糖海带 (*Laminaria saccharina*) 配子生殖生长的有效方法。一定浓度范围内, $\text{Fe}^{3+}$  浓度越高,配子体发育成熟的时间越短。在  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 3.60  $\mu\text{mol/L}$ 、8.90  $\mu\text{mol/L}$  和 17.80  $\mu\text{mol/L}$  条件下,配子体在 6 d 内首先出现由营养生长转变为生殖生长; $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0  $\mu\text{mol/L}$  时,任何 N、P 浓度条件下配子体均不会发育,而是一直进行营养生长,这说明  $\text{Fe}^{3+}$  促进海带配子体由营养生长转向生殖生长,这与 Lewis 等<sup>[22]</sup>的研究结果相一致,即在添加铁的情况下海带配子体不会生殖生长,铁是促进海带配子体生殖生长的重要因素。郑太辉等<sup>[30]</sup>研究也发现缺铁(0 mmol/L)使叶绿素合成受到显著抑制,表现为藻液呈黄色且藻体偏小。本研究发现, $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 8.90  $\mu\text{mol/L}$ 、17.80  $\mu\text{mol/L}$  时配子体的发育率并没有比  $\text{Fe}^{3+}$  为 3.60  $\mu\text{mol/L}$  时的配子体发育率高,且在氮磷浓度较低的条件,显著低于  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 3.60  $\mu\text{mol/L}$  时的发育率( $P<0.05$ ),表明铁浓度过高会抑制海带配子体的生殖生长,这与 Pivokonsky 等<sup>[33]</sup>的结

果一致, 即过高  $\text{Fe}^{3+}$  浓度导致藻体内富集大量铁, 从而诱使藻类产生毒素而发生自溶反应, 导致藻类生长发育受到抑制。

此外, 铁和 N、P 对海带配子体发育的促进作用具有协同性。氮、磷营养盐充足, 在无铁条件下海带配子体维持在营养生长状态; 在铁营养充足, 在低氮、磷浓度条件下, 大部分海带配子体(65%)维持在营养生长状态, 虽然小部分海带配子体(35%)进入了生殖生长状态, 但发育明显滞后于较高 N、P 浓度组, 说明铁和氮磷对配子体生殖生长具有协同的促进作用; 在 N、P 需求满足的条件下, 适宜的  $\text{Fe}^{3+}$  浓度(3.60~17.80  $\mu\text{mol/L}$ )可以显著提高配子体的发育率。黄振芳等<sup>[34]</sup>发现铁能极大地促进藻类对 N、P 的吸收, 使藻类发育增殖, 因此, 在海带配子体发育过程中, 不仅要添加适宜浓度的  $\text{Fe}^{3+}$ , 还要添加一定浓度的 N、P 营养盐, 使海带配子体处于最佳的发育状态。

#### 参考文献:

- [1] Fang Z X, Ou Y L, Cui J J, et al. Successful cultivation of kelp gametophytic asexual reproduction[J]. Chinese Science Bulletin, 1978, 23(2): 115-116. [方宗熙, 欧毓麟, 崔竞进, 等. 海带配子体无性生殖系培育成功[J]. 科学通报, 1978, 23(2): 115-116.]
- [2] Zhang Q S. Production and application research of kelp cell engineering seedlings[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005. [张全胜. 海带细胞工程育苗的生产应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.]
- [3] Li D P, Lu Y H, Wu C Y. The past and present status of *Laminaria* genetic breeding and sporophyte culture technology[J]. Bulletin of Biology, 2002, 37(8): 1-3. [李大鹏, 芦永红, 吴超元. 海带遗传育种及育苗生物技术历史及现状[J]. 生物学通报, 2002, 37(8): 1-3.]
- [4] Liu S L. Aquaculture Seedling Technical Manual[M]. China Agricultural Press, 2000: 177-198. [刘世禄. 水产养殖苗种培育技术手册[M]. 中国农业出版社, 2000: 177-198.]
- [5] Martins N, Tantt H, Pearson G A, et al. Interactions of daylength, temperature and nutrients affect thresholds for life stage transitions in the kelp *Laminaria digitata* (Phaeophyceae)[J]. Botanica Marina, 2017, 60(2): 109-121.
- [6] Schreiber E. Untersuchungen über parthenogenesis, geschlechtsbestimmung und bastardierungsvermögen bei laminarien [J]. Planta, 1930, 12(3): 331-353.
- [7] Carney L T, Edwards M S. Role of nutrient fluctuations and delayed development in gametophyte reproduction by *Macrocystis pyrifera* (phaeophyceae) in southern California[J]. Journal of Phycology, 2010, 46(5): 987-996.
- [8] Morelissen B, Dudley B D, Geange S W, et al. Gametophyte reproduction and development of *Undaria pinnatifida* under varied nutrient and irradiance conditions[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2013, 448: 197-206.
- [9] Hsiao S I C, Druhl L D. Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. II. Correlation of nitrate and phosphate concentrations with gametogenesis and selected metabolites[J]. Canadian Journal of Botany, 1973, 51(5): 829-839.
- [10] Ju Q, Wang Y, Liu S, et al. Effects of artificial seawater with different N/P ratio on early development of *Laminaria japonica* embryo spore[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(8): 1947-1951. [鞠青, 王悠, 刘素, 等. 不同氮、磷配比人工海水对海带胚孢子早期发育的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(8): 1947-1951.]
- [11] Lüning K, Neushul M. Light and temperature demands for growth and reproduction of *Laminaria gametophytes* in southern and central California[J]. Marine Biology, 1978, 45(4): 297-309.
- [12] Bolton J J, Levitt G J. Light and temperature requirements for growth and reproduction in gametophytes of *Ecklonia maxima* (Alariaceae: *Laminariales*)[J]. Marine Biology, 1985, 87(2): 131-135.
- [13] Sui X W, Ren W, Yan W H, et al. Effects of light wavelength on growth and reproduction of the gametophytes of *Laminaria japonica* Aresch[J]. Marine Sciences, 2011, 35(4): 33-36. [隋晓伟, 任伟, 闫文华, 等. 光质对海带配子体生长发育影响的研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(4): 33-36.]
- [14] Lüning K, Dring M J. Reproduction induced by blue light in female gametophytes of *Laminaria saccharina*[J]. Planta, 1972, 104(3): 252-256.
- [15] Li R X, Zhu M Y. Impact of iron on the growth of natural phytoplankton community[J]. Advances in Marine Science, 2004, 22(1): 50-54. [李瑞香, 朱明远. 铁对自然群落浮游植物生长的影响[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(1): 50-54.]
- [16] Cao Y, Li D J, Zhang J. Progress in the research of iron limitation to marine phytoplankton[J]. Marine Science Bulletin, 2002, 21(6): 83-90. [曹勇, 李道季, 张经. 海洋浮游植物铁限制的研究进展[J]. 海洋通报, 2002, 21(6): 83-90.]
- [17] Tang D J, Wang Z H, Zou X J, et al. Effect and comparative analysis of complex iron form and concentration on the growth of two species of freshwater algae[J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2018, 35(1): 67-72. [唐代军, 王志红, 邹祥俊, 等. 络合铁形态和浓度对两种典型淡水藻增殖的影响及对比分析[J]. 广东工业大学学报, 2018,



- 35(1): 67-72.]
- [18] Lei Y X, Liu Y X, Xi Y, et al. Study on effects of iron ion and nitrogen-phosphorus ratio on the growth of algae[J]. *Ecological Science*, 2016, 35(1):75-78. [雷玉新, 刘耀兴, 席银, 等. 水体中铁离子和氮磷比对藻类生长影响研究[J]. *生态科学*, 2016, 35(1): 75-78.]
- [19] Liu X H, Gao Y T, Du G, et al. Experimental study on effects of iron ion on algae growth of in Dianchi Lake[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2006, 28(5): 324-326. [刘晓海, 高云涛, 杜刚, 等. 铁离子对滇池藻类生长的影响[J]. *环境污染与防治*, 2006, 28(5): 324-326.]
- [20] Ma J M, Wang J Y, Zhang C, et al. Effects of trace element iron on the growth of three kinds of bloom-forming algae[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(5): 108-114. [马剑敏, 王洁玉, 张婵, 等. 微量元素铁对 3 种水华藻类生长的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(5): 108-114.]
- [21] Wai H, Fukushima M, Motomura T, et al. Effect of iron complexes with seawater extractable organic matter on oogenesis in gametophytes of a brown macroalga (*Saccharina japonica*)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(4): 1583-1591.
- [22] Lewis R J, Green M K, Afzal M E. Effects of chelated iron on oogenesis and vegetative growth of kelp gametophytes (Phaeophyceae)[J]. *Phycological Research*, 2013, 61(1): 46-51.
- [23] Lewis R J, Neushul M. Northern and southern hemisphere hybrids of *Macrocystis* (Phaeophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 1994, 30(2): 346-353.
- [24] Liu F L, Sun X T, Wang F J, et al. Breeding, economic traits evaluation, and commercial cultivation of a new *Saccharina* variety "Huangguan No. 1"[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(5): 1665-1675.
- [25] Berges J A, Franklin D J, Harrison P J. Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades[J]. *Journal of Phycology*, 2001, 37(6): 1138-1145.
- [26] Dai H L, Luo S J, Li X J, et al. The effect on the development of the gametophyte clone with disinfectant seawater in different methods[J]. *Shandong Fisheries*, 2010, 27(8): 11-14, 7. [戴宏亮, 罗世菊, 李晓捷, 等. 海水不同消毒方式对海带配子体克隆生长发育的影响[J]. *齐鲁渔业*, 2010, 27(8): 11-14, 7.]
- [27] Ratcliff J J, Soler-Vila A, Hanniffy D, et al. Optimisation of kelp (*Laminaria digitata*) gametophyte growth and gametogenesis: Effects of photoperiod and culture media[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(4): 1957-1966.
- [28] Gómez I, Figueroa F L. Effects of solar UV stress on chlorophyll fluorescence kinetics of intertidal macroalgae from southern Spain: A case study in *Gelidium* species[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1998, 10(3): 285-294.
- [29] Serôdio J, da Silva J M, Catarino F. Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence[J]. *Journal of Phycology*, 1997, 33(3): 542-553.
- [30] Zheng T H, Shi Y, Chi G Y, et al. Effects of Fe(III) on the growth and spectral characteristics of algae[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(12): 2471-2476. [郑太辉, 史奕, 迟光宇, 等. Fe(III)对藻类生长及光谱特征的影响[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(12): 2471-2476.]
- [31] Kuwabara J S. Gametophytic growth by *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta) in response to various iron and zinc concentrations[J]. *Journal of Phycology*, 1981, 17(4): 417-419.
- [32] Lüning K, Dring M J. Reproduction induced by blue light in female gametophytes of *Laminaria saccharina*[J]. *Planta*, 1972, 104(3): 252-256.
- [33] Pivokonsky M, Kloucek O, Pivokonska L. Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algal organic matter[J]. *Water Research*, 2006, 40(16): 3045-3052.
- [34] Huang Z F, Liu C M, Liu B, et al. Impact of trace elements iron and manganese on algae growth[J]. *Journal of Beijing Normal University (Natural Sciences)*, 2009, 45(Z1): 607-611. [黄振芳, 刘昌明, 刘波, 等. 铁锰微量元素对淡水藻类的生长影响研究[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 45(Z1): 607-611.]

## Effects of iron on the growth and development of gametophyte clones in *Saccharina japonica*

WANG Xiao<sup>1,2</sup>, LIU Fuli<sup>2,3</sup>, LIANG Zhouhui<sup>2,3</sup>, YUAN Yanmin<sup>2</sup>, ZHANG Pengyan<sup>2,3</sup>, WANG Wenjun<sup>2,3</sup>, SUN Xiutao<sup>2,3</sup>

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China

**Abstract:** *Saccharina japonica* ‘Huangguan No. 1’ female and male gametophyte clones were cultured in sterilized seawater with different concentrations of nitrogen (N) and phosphorus (P). The effects of different iron ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ) concentrations on the growth and development of the gametophytes were studied via observation of the morphological changes, the maximum fluorescence yield of photosystem II ( $F_v/F_m$ ), and calculation of the gametogenesis rate (including the oogonium formation rate, ovulation rate, and seedling formation rate). The results showed that 3.60  $\mu\text{mol/L}$  of  $\text{Fe}^{3+}$  was the most effective at promoting vegetative growth in *S. japonica* gametophytes in seawater with N and P concentrations of 0.825 mmol/L and 0.0336 mmol/L, respectively. Under different N and P concentration conditions, the maximum fluorescence yield of kelp gametophyte could be increased when the  $\text{Fe}^{3+}$  concentration was 3.60–17.80  $\mu\text{mol/L}$ , and there was no significant difference between each concentration group ( $P>0.05$ ). Under different nitrogen and phosphorus concentrations, the oogonium formation rate, ovulation rate, and seedling formation rate were significantly improved at  $\text{Fe}^{3+}$  concentrations of 3.60  $\mu\text{mol/L}$ , 8.90  $\mu\text{mol/L}$ , and 17.80  $\mu\text{mol/L}$ . So the iron could increase the developmental process. When the nutrient concentration of N and P reached 0.275 mmol/L and 0.0112 mmol/L, 0.36–17.80  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{3+}$  could promote the *S. japonica* gametophyte from vegetative growth to reproductive growth. At  $\text{Fe}^{3+}$  concentrations of 3.60–17.80  $\mu\text{mol/L}$ , the gametophyte development indicators did not differ ( $P>0.05$ ) among different nitrogen and phosphorus groups. Even if the N and P concentrations reach 0.825 mmol/L and 0.0336 mmol/L, all of the *S. japonica* gametes remained in vegetative growth without development under the iron-free conditions. If iron was sufficiently available, most of the *S. japonica* gametes (65%) remained in vegetative growth under low nitrogen and phosphorus conditions. A small proportion of *S. japonica* gametophytes (35%) entered the developmental state, but the development lagged behind the other N and P concentration groups in the experiment. These results indicated that iron, nitrogen, and phosphorus have synergistic effects on the growth and development of *S. japonica* gametophytes and that iron is the key factor in the transition from vegetative growth to gametogenesis. Under appropriate concentrations of nitrogen (0.275 mmol/L) and phosphorus (0.0112 mmol/L), additional  $\text{Fe}^{3+}$  (3.60  $\mu\text{mol/L}$ ) had the greatest effect on the transition process. This study provided a theoretical basis for iron, nitrogen, and phosphorus use during the culture process of gametophytes seedlings and promotes the development of its seedling industry.

**Key words:** *Saccharina japonica*; gametophyte; iron; vegetative growth; gametogenesis

**Corresponding author:** LIU Fuli. E-mail: liufl@ysfri.ac.cn