

## 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应

张元, 谢潮添, 陈昌生\*, 纪德华, 周巍巍  
(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:**以坛紫菜耐高温品系 Z-61 F<sub>4</sub> 代叶状体为试验材料、野生型坛紫菜叶状体为对照,研究了高温胁迫(30 ℃、26 ℃)与正常培养温度(21 ℃)下,处理不同天数(0、2、4、6、8、10 d)后坛紫菜叶状体中自由基含量、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和游离脯氨酸(Pro)含量的动态变化过程。结果发现耐高温型坛紫菜对高温胁迫的生理响应过程:高温胁迫→活性氧含量上升→细胞膜氧化受损,产生过量膜脂过氧化物→细胞感受到过量的活性氧信号→抗氧化系统和渗透压调节系统共同响应,清除活性氧→自由基含量下降。同时比较两种紫菜对高温胁迫的生理响应过程,发现耐高温型坛紫菜在高温胁迫下能同时启动抗氧化系统和渗透压调节系统,而野生型坛紫菜则只能启动渗透压调节系统,并且两种紫菜抗氧化系统的本底含量也存在着显著差别。由此说明不同品系坛紫菜耐高温性状差异的可能原因是细胞内抗氧化系统的应激性和本底含量存在差异。

**关键词:**坛紫菜; 高温胁迫; 生理响应; 抗逆性

**中图分类号:** Q 945.78; S 917

**文献标识码:** A

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国暖温带特有的种类,也是福建、浙江沿海地区主要养殖的经济海藻<sup>[1]</sup>。坛紫菜的自然生长期在每年的9月至次年的3月,生长的适宜温度为16~24 ℃<sup>[2]</sup>。近年来,随着全球气候变暖,白露节气过后的持续高温尤其是福建、浙江海域9月下旬至10月的持续高温天气严重影响了坛紫菜壳孢子的采苗和幼苗的附着生长。水温过高致使坛紫菜幼苗烂苗或成菜烂菜、减产,严重威胁着坛紫菜养殖业的持续发展。因此,系统地研究坛紫菜对高温胁迫的应答机制,以指导耐高温品种的选育,对于保证坛紫菜养殖业的可持续健康发展具有重要的意义。

国内外对植物尤其是重要经济作物对高温胁迫的应答机制研究已有大量报道,在高温胁迫下植物的代谢生理生化、遗传特性、细胞结构、信号传导与基因表达调控等方面已积累了大量资料,也培育出了不少植物的耐高温新品种<sup>[3]</sup>。如

SACHHIN等<sup>[4]</sup>根据大量植物的研究结果对植物应答高温胁迫的复杂机理进行了评述;梁英等<sup>[5]</sup>研究了高温胁迫对球等鞭金藻3011和8701叶绿素荧光特性的影响。目前关于紫菜应答高温胁迫的研究主要集中在丝状体上<sup>[6-9]</sup>,如侯和胜等<sup>[9]</sup>研究了高温胁迫下条斑紫菜丝状体中的叶绿素含量等生理指标随胁迫时间的动态变化规律。而对于与生产紧密相关的紫菜叶状体对高温胁迫的应答机制研究,则只有杨锐等<sup>[10]</sup>提出了坛紫菜在热胁迫下的耐高温应答的可能机制,但未见后续详细报导。尽管国内在紫菜的耐高温品种选育方面已经做了很多工作,选育出了多个具有明显耐高温特性的新品系<sup>[11-13]</sup>,但目前对这些耐高温新品系的抗逆机理仍然一无所知。

因此,本研究以本课题组选育的坛紫菜耐高温新品系 Z-61 F<sub>4</sub> 代叶状体为材料,以野生型纯系为对照,研究了高温胁迫不同时间水平下,坛紫菜

收稿日期:2010-10-27 修回日期:2010-12-30

资助项目:国家自然科学基金项目(40806065);国家“八六三”计划项目(2006AA10A413);公益性行业(农业)科研专项(200903030);福建省杰出青年基金项目(2010J06016);福建省教育厅新世纪优秀人才项目(JA10186)

通讯作者:陈昌生, E-mail: cschen@jmu.edu.cn

叶状体中超氧化物歧化酶(SOD)等生理指标的变化规律,旨在深入了解坛紫菜对高温胁迫的响应机制,为全面认识坛紫菜的抗逆性机理奠定基础,同时也为后续坛紫菜抗逆新品种的选育提供理论指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

供试材料取自福建省坛紫菜种质资源库通过人工杂交选育获得的耐高温品系 Z-61 F<sub>4</sub>代叶状体<sup>[11]</sup>,而以选自平潭牛山岛的野生型坛紫菜纯系作为对照。实验中所用材料均为培养至(10±2)cm的坛紫菜叶状体。

### 1.2 主要药品及仪器

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、丙酮、硫酸、磷酸、磺基水杨酸及亚硝酸钠购自国药集团化学试剂有限公司,氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、硫代巴比妥酸(TBA)、愈创木酚、对氨基苯磺酸、盐酸羟胺、α-萘胺、硫酸钛、核黄素、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250 与蛋氨酸产自 Generay Biotech 公司,冰醋酸、甲苯、三氯乙酸、浓氨水、过氧化氢与茚三酮购自汕头西陇化工股份有限公司,所有药品均为分析纯或色谱纯。

高速低温离心机型号为 Sigma 3K18 购自德国 Sigma 公司,光照培养箱 PYX-250G-A 购自广东科力实验仪器有限公司,紫外分光光度仪 Cary 50 购自美国瓦里安有限公司,电子天平 BS323S 购自北京赛多利斯有限公司,磁力搅拌器 85-1 购自国华电器有限公司。

### 1.3 实验方法

**叶状体培养** 将 Z-61 F<sub>4</sub>代与野生型坛紫菜纯系丝状体分别进行促熟、壳孢子放散,幼苗充气培养。培养温度为 21℃、光照为 2 000~3 000 lx、昼夜光周期为 12 h:12 h,且每 3 天更换一次培养液。

**高温处理** 实验组坛紫菜藻体在 21℃ 正常温度下培养至(10±2)cm 时,选取叶面平滑、色深有光泽、无斑点烂洞的优质完整藻体分别放置于 26℃ 和 30℃ 的恒温光照培养箱中进行高温胁迫处理(温度误差为±0.5℃,昼夜光周期为 12 h:12 h)。高温胁迫处理分别设 0、2、4、6、8 和 10 d 6 个不同处理时间,每个处理组设置 3 个平行,且每 3 天更换一次培养液。

由于野生型对照在 26℃ 和 30℃ 高温胁迫下只能正常生长 8 d 和 4 d,因此在对野生型对照进行高温胁迫处理时,26℃ 条件下只设 0、2、4、6 和 8 d 5 个处理时间,而 30℃ 条件下则只设 0、2、4 d 3 个处理时间。其余处理方法均与实验组相同。

**酶液制备及生理指标测定方法** 实验组和对照组坛紫菜叶状体在处理结束后分别取 2 g 新鲜藻体,加入 10 mL 50 mmol/L pH 7.8 PBS 缓冲液,研磨后于 4℃ 下浸提 30 min,并不断振荡,然后在 4℃ 下 10 000×g 离心 40 min,取上清液测定以下指标:可溶性蛋白含量测定参考 BRADFORD 的方法<sup>[14]</sup>,以牛血清白蛋白为标准样测定;超氧化物歧化酶(SOD)活性按照文献<sup>[15]</sup>的方法测定,以抑制光还原 NBT 50% 作为一个酶单位;过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚氧化显色法<sup>[16]</sup>测定;过氧化氢酶(CAT)活性参考文献<sup>[17]</sup>的方法测定;丙二醛(MDA)含量参考文献<sup>[18]</sup>硫代巴比妥酸(TBA)比色法进行测定,但根据实际情况做了修改,以 A<sub>532nm</sub>-1/2(A<sub>510nm</sub>-A<sub>560nm</sub>)的值来代表丙二醛与 TBA 反应液的吸光值;自由基含量根据亚硝酸根标准曲线方法测定<sup>[16]</sup>。各样品测定结果均按照所含可溶性蛋白含量进行折算后再进行比较。

过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量采用紫外分光光度法<sup>[16]</sup>测定,分别取 2 g 新鲜藻体,加入 5 mL 预冷的丙酮,研磨后于 4℃ 下 6 000×g 离心 20 min,取上清液测定。

游离脯氨酸(Pro)含量采用茚三酮方法测定<sup>[16]</sup>,分别取新鲜藻体 0.5 g,置于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 3% 磺基水杨酸溶液,于沸水浴中浸提 10 min,6 000×g 下离心 10 min,取上清液测定。

**数据统计分析** 应用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对试验数据进行统计分析,并采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 高温胁迫不同时间水平下自由基含量的变化

当植物遭受逆境胁迫时,细胞内活性氧正常产生与消除间的平衡被破坏而有利于活性氧的产生,使得细胞中的自由基含量迅速增加<sup>[19]</sup>。由图

1 可知,在正常生长温度(21 °C)条件下,实验组和对照组自由基含量没有发生显著变化( $P > 0.05$ ),但实验组在各温度及不同处理时间水平下自由基含量均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。实验组自由基含量在 26 °C 和 30 °C 高温胁迫初期(0~4 d)变化不显著( $P > 0.05$ ),只在高温胁迫 4 d 后,才极显著上升( $P < 0.01$ ),但在 26 °C 胁迫 6 d 和 30 °C 胁迫 8 d 后又开始极显著下降( $P < 0.01$ )。对照组在 26 °C 胁迫初期(0~4 d),自由基含量变化不显著( $P > 0.05$ ),但在胁迫 4 d 后即开始显著上升( $P < 0.05$ );而在 30 °C 胁迫条件下,从一开始自由基含量即显著增加( $P < 0.05$ )。

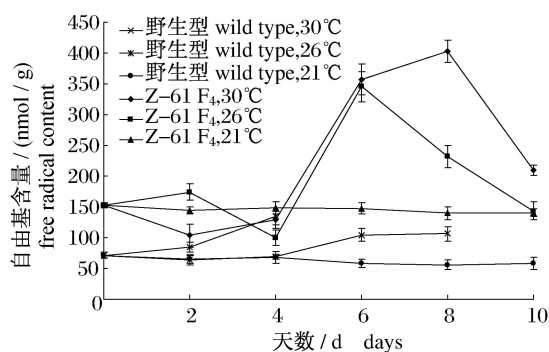


图1 坛紫菜叶状体在高温 30、26 与 21 °C 下自由基含量的变化

Fig. 1 Changes of free radical content in gametophytic blades of *P. haitanensis* at 30, 26 and 21 °C

## 2.2 高温胁迫不同时间水平下过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量的变化

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以直接或间接地氧化细胞内核酸、蛋白质等生物大分子,并使细胞膜遭受损害,从而加速细胞的衰老和解体<sup>[19]</sup>。如图 2 所示,在正常生长温度(21 °C)条件下,实验组和对照组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量没有发生显著变化( $P > 0.05$ ),但实验组在各温度及不同处理时间水平下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量均要显著高于对照组( $P < 0.05$ )。实验组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量在 26 °C 和 30 °C 高温胁迫初期(0~2 d)极显著增加( $P < 0.01$ ),随后极显著下降( $P < 0.01$ ),4 d 后又极显著增加( $P < 0.01$ ),在 6 d 时达到顶峰,后再次极显著下降( $P < 0.01$ ),这一变化趋势正好与图 6 所示的 CAT 活性变化趋势相反,当 CAT 活性增强时,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量就下降,反则亦然。而对照组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量在 26 °C 和 30 °C 胁迫下均没有发生显著变化( $P > 0.05$ ),这与 CAT 活性的变化趋势也是基本一致的。

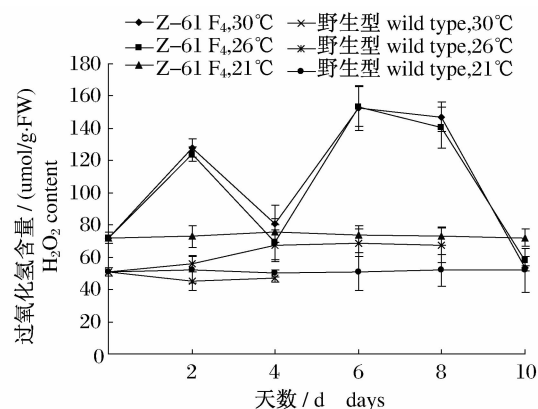


图2 坛紫菜叶状体在高温 30、26 与 21 °C 下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的变化

Fig. 2 Changes of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in gametophytic blades of *P. haitanensis* at 30, 26 and 21 °C

## 2.3 高温胁迫不同时间水平下丙二醛(MDA)含量的变化

MDA 是膜脂过氧化作用的产物,其含量是衡量细胞膜损伤程度的一个重要指标<sup>[19]</sup>。从图 3 可以看出,在正常生长温度(21 °C)条件下,实验组和对照组 MDA 含量没有发生显著变化( $P > 0.05$ ),但实验组在各温度及不同处理时间水平下 MDA 含量均显著低于对照组( $P < 0.05$ )。实验组 MDA 含量在 26 °C 和 30 °C 高温胁迫初期(0~4 d)变化不显著( $P > 0.05$ ),只在高温胁迫 4 d 后才开始极显著增加( $P < 0.01$ ),同时 30 °C 高温胁迫条件下 MDA 含量的增加速度要高于 26 °C 条件下 MDA 含量的增加速度。而对照组 MDA 含量在高温胁迫一开始就极显著增加( $P < 0.01$ )。

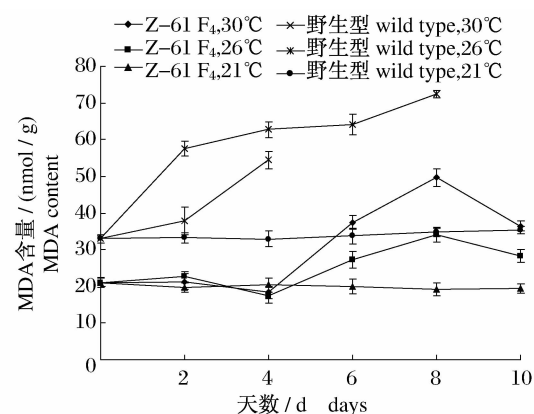


图3 坛紫菜叶状体在高温 30、26 与 21 °C 下 MDA 含量的变化

Fig. 3 Changes of MDA content in gametophytic blades of *P. haitanensis* at 30, 26 and 21 °C

#### 2.4 高温胁迫不同时间水平下超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的变化

SOD 是细胞内清除自由基的专一性酶,其活性的变化可以反应出植物的抗逆性高低<sup>[19]</sup>。由图 4 可知,在正常生长温度(21 °C)条件下,实验组和对照组 SOD 活性变化不显著( $P > 0.05$ ),但实验组在各温度及不同处理时间水平下 SOD 活性均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。实验组 SOD 活性在 26 °C 和 30 °C 高温胁迫初期(0~4 d)变化不显著( $P > 0.05$ ),但在高温胁迫 4 d 后开始显著增加( $P < 0.05$ ),且在整个实验周期内,30 °C 高温胁迫条件下藻体的 SOD 活性均要显著高于 26 °C 条件下的 SOD 活性( $P < 0.05$ )。而对照组 SOD 活性在 26 °C 和 30 °C 高温胁迫的整个实验周期内均没有发生显著变化( $P > 0.05$ )。

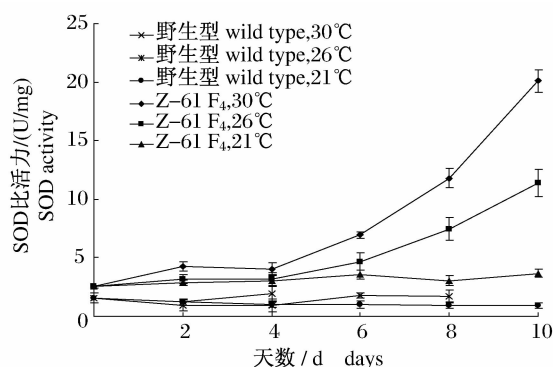


图 4 坛紫菜叶状体在高温 26、30 与 21 °C 下 SOD 活性的变化

Fig. 4 Changes of SOD activity in gametophytic blades of *P. haitanensis* at 30, 26 and 21 °C

#### 2.5 高温胁迫不同时间水平下过氧化物酶 (POD) 活性的变化

POD 具有催化细胞中有害过氧化物氧化分解的功能,其活性的变化可以反映某一时期、某一环境下植物体内代谢的变化情况<sup>[19]</sup>。由图 5 可知,在正常生长温度(21 °C)条件下,实验组和对照组 POD 活性没有发生显著变化( $P > 0.05$ ),但实验组在各温度及不同处理时间水平下 POD 活性均要极显著高于对照组( $P < 0.01$ )。实验组 POD 活性在 26 °C 和 30 °C 高温胁迫初期(0~2 d)显著增加( $P < 0.05$ ),但 2 d 后就极显著下降( $P < 0.01$ ),其中 30 °C 高温胁迫下 POD 活性下降的速度要显著快于 26 °C ( $P < 0.05$ )。而对照组 POD 活性在两个高温胁迫条件下均处于持续

下降状态,但变化不显著( $P > 0.05$ )。

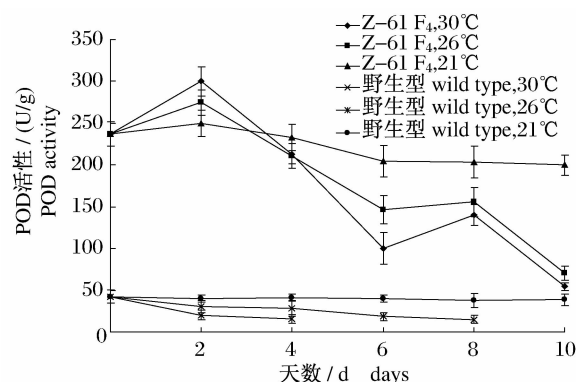


图 5 坛紫菜叶状体在高温 30、26 与 21 °C 下 POD 活性的变化

Fig. 5 Changes of POD activity in gametophytic blades of *P. haitanensis* at 30, 26 and 21 °C

#### 2.6 高温胁迫不同时间水平下过氧化物酶 (CAT) 活性的变化

CAT 是体内抗氧化酶之一,能分解体内有毒性作用的  $H_2O_2$ ,对维持体内的活性氧水平,防止细胞老化有着重要的作用<sup>[19]</sup>。由图 6 可知,在正常生长温度(21 °C)条件下,实验组和对照组 CAT 活性没有发生显著变化( $P > 0.05$ ),但实验组在各温度及不同处理时间水平下 CAT 活性均要显著高于对照组( $P < 0.05$ )。实验组 CAT 活性在 26 °C 和 30 °C 高温胁迫初期(0~2 d)变化不显著( $P > 0.05$ ),2 d 后开始极显著增加( $P < 0.01$ ),在 4~6 d 期间达到顶峰,6 d 后又极显著降低( $P < 0.01$ ),但在 10 d 时其活性仍极显著高于正常温度条件下培养藻体的 CAT 活性( $P < 0.01$ ),是正常温度条件下的 1.76~2.21 倍。而对照组 CAT 活性在两个高温胁迫条件下均没有显著变化( $P > 0.05$ )。

#### 2.7 高温胁迫不同时间水平下游离脯氨酸 (Pro) 含量的变化

正常生长条件下植物体内的脯氨酸含量很低,但当其处于逆境胁迫时含量可迅速增加,通常脯氨酸积累量与植物的抗逆性呈正相关关系<sup>[20]</sup>。由图 4 可知,在正常生长温度(21 °C)条件下,实验组和对照组游离脯氨酸含量没有发生显著变化( $P > 0.05$ ),且二者间差异也不显著( $P > 0.05$ )。但当藻体遭遇高温逆境胁迫时,无论实验组还是对照组,其游离脯氨酸含量均极显著增加( $P < 0.01$ ),其中实验组在高温胁迫后期(>6 d),游离

脯氨酸含量又表现为极显著下降 ( $P < 0.01$ ), 这可能与细胞中自由基含量下降有关 (图 1)。同时, 在整个实验周期内, 26 °C 高温胁迫下, 对照组的游离脯氨酸含量均要显著高于实验组 ( $P < 0.05$ ), 而在 30 °C 高温胁迫下则差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

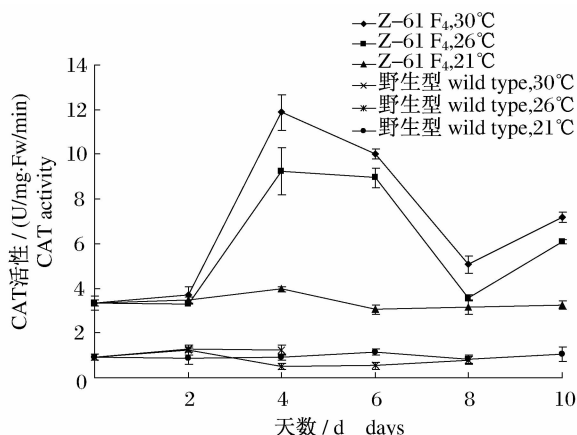


图 6 坛紫菜叶状体在高温 30、26 与 21 °C 下 CAT 活性的变化

Fig. 6 Changes of CAT activity in gametophytic blades of *P. haitanensis* at 30, 26 and 21 °C

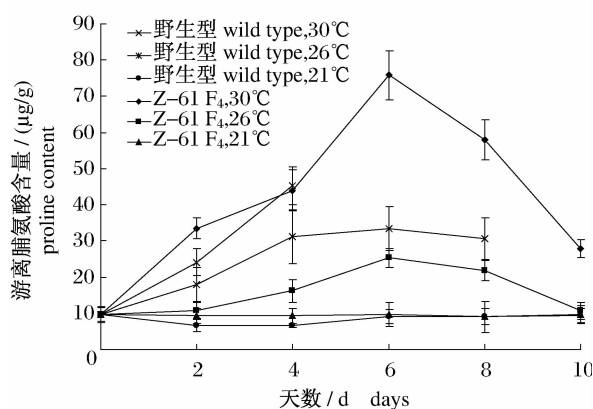


图 7 坛紫菜叶状体在高温 30、26 与 21 °C 下游离 Pro 含量的变化

Fig. 7 Changes of proline content in gametophytic blades of *P. haitanensis* at 30, 26 and 21 °C

### 3 讨论

#### 3.1 耐高温型坛紫菜对高温胁迫的生理响应

氧气是植物细胞生命活动中必不可少的物质之一, 但在参与新陈代谢的过程中会被活化成为超氧化物阴离子自由基 ( $O_2^- \cdot$ )、羟基自由基 ( $\cdot OH$ )、 $H_2O_2$ 、脂质过氧化物和单线态氧等活性

氧物质, 这些活性氧物质对细胞质膜具有极强的氧化性, 易引起膜系统的严重损伤, 造成代谢功能不可修复的丧失和细胞死亡<sup>[21]</sup>。在正常条件下, 细胞内存在着一套精细而又复杂的抗氧化系统负责抵御和清除活性氧, 使植物体内的活性氧产生和清除处于一种动态平衡状态。但当植物处于逆境条件下, 这种动态平衡就会遭到破坏, 使得活性氧大量积累, 对细胞造成伤害<sup>[3]</sup>。在本研究中, 耐高温型坛紫菜叶状体在遭受高温胁迫初期, 细胞内自由基含量没有发生显著变化, 但当胁迫达到一定时间时, 自由基含量即显著增加, 且温度越高自由基含量增加越快 (图 1)。而活性氧的另一主要成分  $H_2O_2$  含量在高温胁迫一开始即发生极显著增加 (图 2)。与此同时, 作为衡量细胞膜脂损伤程度重要指标的 MDA 含量在高温胁迫初期即极显著增加, 胁迫温度越高, 增加速度越快 (图 3)。冯琛等<sup>[22]</sup>在研究盐胁迫、 $Cu^{2+}$  离子胁迫对条斑紫菜的生理生化效应时也观察到了活性氧和 MDA 含量在胁迫初期迅速增加, 且含量随胁迫程度增大而增多的现象。这些实验结果说明高温胁迫等逆境条件打破了紫菜细胞中活性氧产生和清除的动态平衡, 使活性氧含量大量增加, 并引起细胞膜氧化损伤, 温度越高, 持续时间越长, 细胞膜损伤越严重。

但是, 植物在遭受逆境胁迫后, 活性氧的大量产生, 也会诱导有关保护酶类表达量和活性的迅速提高, 以清除过多的活性氧, 减轻高温对其的伤害作用。SOD、POD、CAT 是细胞内清除活性氧的主要抗氧化酶系统, SOD 是生物体内特异清除  $O_2^- \cdot$  的酶, 它可以催化两个  $O_2^- \cdot$  发生歧化反应, 生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ 。过量产生的  $H_2O_2$  又会诱导 CAT 和 POD 活性提高, 并将  $H_2O_2$  迅速分解为  $H_2O$  和  $O_2$ , 以避免植株体内积累的  $H_2O_2$  形成氧化能力极强的  $\cdot OH$ , 从而造成对细胞的毒害作用<sup>[19]</sup>。在本研究中, 耐高温型坛紫菜叶状体在遭受高温胁迫初期, 细胞内的自由基含量与 SOD 活性之间处于相对平衡状态, 二者均没有发生显著变化, 但随着胁迫时间的延长, 动态平衡遭到破坏, 细胞内的自由基含量开始极显著增加, SOD 活性也随之受  $O_2^- \cdot$  诱导极显著提高, 并且胁迫温度越高、胁迫时间越长, SOD 活性越强, 甚至在高温胁迫后期 SOD 活性的显著提高还使得细胞内的自由基含量出现了显著下降的现象 (图 1, 图

4)。以此同时,细胞内的CAT活性也随着细胞内 $H_2O_2$ 含量的变化出现动态变化,二者表现为正相关关系,当 $H_2O_2$ 含量增加时,CAT活性也就显著增强,反之亦然(图2,图6)。而POD活性在高温胁迫初期,伴随着 $H_2O_2$ 含量的增加,活性迅速增强,但在胁迫后期由于POD活性中心遭受高温破坏,活性又开始下降(图5)。这与前人在陆生作物和园艺植物中的研究结果是一致的<sup>[23]</sup>。由此说明SOD和CAT在坛紫菜叶状体应答高温胁迫中发挥着重要的作用,尤其是SOD在防止坛紫菜叶状体细胞受高温伤害中发挥着第一道防线的作用。

此外,非酶促系统如脯氨酸等在植物细胞抵御逆境胁迫伤害中也发挥着重要作用。正常状态下,植物体内脯氨酸含量很低,但当遭受逆境胁迫时,脯氨酸就会大量积累,通过改善渗透调节能力,起到淬灭活性氧和减轻细胞膜氧化损伤的作用<sup>[20]</sup>。在本研究中,耐高温型坛紫菜叶状体在正常培养条件下,脯氨酸含量很低,且不发生显著变化,但当遭受高温胁迫时,脯氨酸含量随即显著上升,而到了胁迫后期,随着细胞内自由基含量的下降,脯氨酸含量也开始显著下降(图7),说明脯氨酸在坛紫菜响应高温胁迫,清除自由基以避免细胞损伤中也发挥了重要作用。

由此,总结耐高温型坛紫菜对高温胁迫的生理响应过程:高温胁迫→活性氧含量上升→细胞膜氧化受损,产生大量膜脂过氧化物→细胞感受到过量的活性氧信号→抗氧化系统和渗透压调节系统共同响应,清除活性氧→自由基含量下降。

### 3.2 不同坛紫菜品系耐高温性状差异原因分析

本研究中,野生型坛紫菜在26℃水温下培养8d即发生腐烂死亡,在30℃水温下则只能培养4d。而耐高温型坛紫菜Z-61在30℃水温下培养10d,虽然藻体变白,但没有死亡,将其移至21℃下恢复培养3~4d,藻体仍能恢复为原有的色泽,表现出了明显的耐高温性状。比较二者在高温胁迫条件下的生理指标可以看出:野生型坛紫菜和耐高温型坛紫菜在高温胁迫下都出现了自由基和 $H_2O_2$ 含量显著上升,细胞膜氧化受损的过程,但在随后的生理响应过程,耐高温型坛紫菜的抗氧化系统和渗透压调节系统迅速共同响应(图4~图7),而野生型坛紫菜的抗氧化系统却没有发生显著变化(图4~图6),只有渗透压调节系

统脯氨酸含量显著上升(图7),说明两种紫菜的抗氧化系统在胁迫下的应激性存在差异。杨锐等<sup>[10]</sup>在对坛紫菜耐高温胁迫机理进行研究时认为高温胁迫会钝化坛紫菜的抗氧化酶系统的活性,但会启动非酶促系统(如游离Pro)作出应答,这与本研究中对野生型坛紫菜的实验结果是一致的。

此外,由本研究的实验结果还可以看出,坛紫菜耐高温品系Z-61抗氧化系统的SOD、POD和CAT活性在正常生长条件下显著高于野生型品系( $P < 0.05$ )(图4~图6),说明坛紫菜在正常生长条件下抗氧化系统成分的本底含量与坛紫菜各品系的耐高温性状之间具有明显的正相关关系。但王悠等<sup>[24]</sup>在比较两个海带品系(耐高温海带901和热敏感海带荣成1号)的抗氧化系统与耐热性的关系时却发现海带在正常生长条件下的抗氧化系统成分的本底含量与海带的耐高温性状之间没有明显的一致性关系,这可能与海藻种类不同有关。

综上所述,坛紫菜不同品系耐高温性状差异的可能原因是坛紫菜叶状体细胞内的抗氧化系统的应激性和本底含量存在差异。

### 参考文献:

- [1] 严兴洪. 坛紫菜的遗传与育种[M]//王清印. 海水养殖生物的细胞工程育种. 北京:海洋出版社, 2007:314.
- [2] 曾呈奎,王素娟,刘思俭,等. 海藻栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:154-158.
- [3] SHAO H B, JIANG S Y, LI F M, *et al.* Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, 54:33-36.
- [4] SACHIN K, JANE L, UNG L, *et al.* Complexity of the heat stress response in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10:310-316.
- [5] 梁英,冯力霞,田传远. 高温胁迫对球等鞭金藻3011和8701叶绿素荧光特性的影响[J]. *水产学报*, 2009, 33(1):37-44.
- [6] 任国忠,崔广法,费修缙,等. 温度对条斑紫菜丝状体生长发育的影响[J]. *海洋与湖沼*, 1979, 10(1):28-38.
- [7] 汤晓荣,费修缙. 光温与坛紫菜自由丝状体生长发育的关系[J]. *海洋与湖沼*, 1997, 28(5):475-482.

- [8] 陈昌生,纪德华,姚惠,等.不同品系坛紫菜自由丝状体在异常条件下生长发育的比较[J].台湾海峡,2004,23(4):489-495.
- [9] 侯和胜,何文君,李洪艳,等.高温胁迫对条斑紫菜丝状体的生长和生理影响[J].辽宁师范大学学报,2008,31(4):487-490.
- [10] 杨锐,张晓龙,徐丽宁,等.坛紫菜耐高温胁迫机理之初步研究[C].中国海洋湖沼学会藻类学分会第七届会员大会暨第十四次学术讨论会论文摘要集,2007.
- [11] 何培民,吴维宁.条斑紫菜抗高温和快速生长细胞系 HB 的建立及栽培[J].实验生物学报,2003,36(3):191-196.
- [12] 严兴洪,马少玉.坛紫菜抗高温品系的筛选[J].水产学报,2007,31(1):112-119.
- [13] 陈昌生,纪德华,谢潮添,等.坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究[J].海洋学报,2008,30(5):100-106.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem,1976,72:248-254.
- [15] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutase purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings [J]. Plant Physiology,1977,59:315-318.
- [16] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:164-169.
- [17] AEBI H. Catalase *in vitro* [J]. Methods Enzymology,1984,105:121-126.
- [18] HEATH R L, PARKER. Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. Arch Biophys,1968,25:189-198.
- [19] 简令成,王红.逆境植物细胞生物学[M].北京:科学出版社,2009.
- [20] 赵福庚,何龙飞,罗庆云.植物逆境生理生态学[M].北京:化学工业出版社,2004:209-216.
- [21] 尹永强,胡建斌,邓明军.植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J].中国农学通报,2007,23(1):105-110.
- [22] 冯琛,路新枝,于文功.逆境胁迫对条斑紫菜生理生化指标的影响[J].海洋湖沼通报,2004,3:22-26.
- [23] 张哲,闵红梅,夏关均,等.高温胁迫对植物生理影响研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(16):8338-8339.
- [24] 王悠,唐学玺.不同海带品系抗氧化系统活性与耐热性的相关性研究[J].应用生态学报,2005,16(8):1507-1510.

## Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses

ZHANG Yuan, XIE Chao-tian, CHEN Chang-sheng\*, JI De-hua, ZHOU Wei-wei  
(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** *Porphyra haitanensis* is an economically important marine crop in southern China. Due to global warming it is highly desirable to select or breed new lines of *P. haitanensis* that can tolerate higher water temperatures; and to use these for cultivation. We observed the physiological responses of gametophytic blades of an F<sub>4</sub> high temperature tolerance line (Z-61) and a wild-type line. These were grown at normal temperature (21 °C), and at high temperatures (26 °C and 30 °C), for 0, 2, 4, 6, 8, and 10 days. Changes in physiology were measured, including free radical content, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehyde (MDA) and proline levels, and also the activities of superoxide dismutase, peroxidase, and catalase. Physiological changes within the Z-61 gametophytic blades were as follows: high temperature stress → levels of reactive oxygen species (ROS) increased → cell membranes were damaged by oxidation and MDA levels increased → cells received signals of excessive ROS → antioxidation and osmoregulation systems began to clean out excessive ROS → free radical levels declined. We compared the responses of Z-61 and wild-type lines to high temperatures. The Z-61 line is able to initiate both antioxidation and osmoregulation. The wild-type line, however, can only initiate osmoregulation when under high temperature stress. The background activities of the antioxidation systems also show notable differences between the two types. These differences may be the cause that the wild-type is not able to tolerate high temperatures. Our results may lay a foundation for understanding the principles of high temperature tolerance in *P. haitanensis*, and may suggest some directions for future breeding.

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; high temperature stress; physiological response; stress tolerance

**Corresponding author:** CHEN Chang-sheng. E-mail: cschen@jmu.edu.cn