

低氮、磷胁迫对坛紫菜叶状体生理生化特征的影响

周巍巍, 谢潮添, 陈昌生*, 纪德华, 张元

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:以坛紫菜耐低氮(N)、磷(P)品系9号IV叶状体为材料,研究了低N、P胁迫不同时间水平对坛紫菜品质及自由基含量、过氧化氢(H₂O₂)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)含量等生理指标的影响。结果表明,在低N、P胁迫条件下,作为坛紫菜品质重要指标的光合色素、粗蛋白和游离氨基酸含量均显著下降,而其余各项生理指标均随胁迫时间增加表现为动态变化的过程,由此推测耐低N、P型坛紫菜叶状体应答低N、P胁迫的生理过程为:低N、P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。该实验结果为全面了解坛紫菜应答低N、P胁迫的生理机制奠定了基础,同时也为后续坛紫菜抗逆新品种的选育提供了理论指导。

关键词:坛紫菜;胁迫;生理响应;抗逆性

中图分类号:Q 945.12; S 917

文献标识码:A

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国特有的暖温带品种,具有生长快、产量高、风味好等特点。自从坛紫菜人工育苗和养殖技术得到解决以来,坛紫菜养殖取得了突飞猛进的发展,其产量占全国紫菜总产量的75%以上,成为我国南方沿海的水产养殖重要项目^[1]。但近年来,由于盲目扩大坛紫菜栽培面积,生产上出现了“三密一早”现象,即台密、帘密、苗密和早采苗^[2]。高密度的栽培造成海区氮(N)、磷(P)缺乏,而营养盐尤其是N、P元素是紫菜生长所必需的,它们的缺乏会导致坛紫菜营养失调,直接影响藻体的健康生长和发育^[2-3]。如果遇到小潮汛期、刮南风或西南风、海面风平浪静、海水透明度大、光照增强、水温回升等海况条件较差的情况,坛紫菜就会因N、P缺乏而大面积发生“绿变病”,轻者减产,重者绝收,严重影响沿海渔民的经济收入和坛紫菜栽培业的可持续健康发展。为此,研究坛紫菜在低N、P胁迫下生理生化指标的动态变化特征,探索坛紫菜对低N、P胁迫的生理响应机制,对指导耐低N、P

品种的选育,保证坛紫菜(*Porphyra yezoensis*)养殖业的可持续健康发展具有重要的意义。

当前,国内外对紫菜在逆境胁迫下的生理响应机制研究已有较多报导,如冯琛等^[4]研究了盐胁迫、Cu²⁺胁迫下条斑紫菜甘露醇、丙二醛(MDA)含量变化,指出自由基清除系统在紫菜的抗逆反应中发挥了重要作用;侯和胜等^[5]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;PRIYA等^[6]探讨了脐形紫菜在周期性干露条件下,抗氧化物含量、光合色素以及光合效率的动态变化情况;杨锐等^[7]研究了坛紫菜在热胁迫下的耐高温应答机制,并提出了坛紫菜应答高温胁迫的可能生理过程。但迄今为止,未见有紫菜耐低N、P的相关机制报导。柳佩娟等^[2]将人工选育的坛紫菜新品系置于N、P含量仅为正常海水1/100和1/15的低N、P环境下进行耐受性比较,从中筛选出了2个对低N、P环境具有较强耐受力的坛紫菜新品系,但目前对这两个新品系的耐低N、P机制也尚不清楚。

收稿日期:2010-11-04 修回日期:2011-02-01

资助项目:国家自然科学基金项目(40806065);国家“八六三”高技术研究发展计划(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

为此,本试验以本课题组选育的坛紫菜耐低 N、P 品系 9 号 IV 为材料,研究了其在低 N、P 环境胁迫下的生理生化指标的动态变化情况,旨在初步了解坛紫菜对低 N、P 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

供试材料取自集美大学坛紫菜种质改良与应用实验室已选育出的耐低 N、P 品系 9 号 IV^[1]。将其纯系丝状体在实验室内进行促熟、促放即壳孢子培养获得叶状体。

1.2 低 N、P 培养液的制备与测定

利用浒苔或石莼等绿藻吸收天然海水中 N、P 的方法来制备低 N、P 培养液。首先采集生长良好、健康的浒苔或石莼,用海水洗净后放入藻类培养系统中培养 3 d 后过滤获得干净海水备用^[8]。通过上述方法得到的海水 N、P 含量分别仅为天然海水 N、P 含量的 1/100 和 1/15^[9]。

1.3 实验材料处理

将获得的 9 号 IV 坛紫菜叶状体在正常海水培养液中进行充气培养温度(20 ± 1) °C,光照强度 2 000 ~ 3 000 lx,光照周期 12L: 12D,每 3 天更换新鲜培养液一次。待藻体长到(15 ± 2) cm 时,随机挑选叶面平滑、色深有光泽、无斑点烂洞的优质完整藻体 6 株,置于装有 1 000 mL 低 N、P 培养液的锥形瓶中进行胁迫培养(其它培养条件与正常培养相同)0、2、4、6、8 和 10 d 时取样,制备酶液并测定各项生理生化指标。以上每个处理组分别设 3 个平行。

1.4 酶液制备即生理生化指标测定方法

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 °C 下浸提 30 min,并不断振荡,然后在 4 °C 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^[10]的方法,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 GIANNOPOLITIS 等^[11]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^[12]测定,以每分钟 OD₄₇₀增加 0.01 为一个活性单位,酶活性以 U/mg 表示;过氧化氢酶(CAT)活性参考

AEBI^[13]的方法测定,以 1 min 内 A_{240nm}减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位(U);丙二醛(MDA)含量参考 HEATH 等^[14]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_{532nm} - 1/2(A_{510nm} - A_{560nm}) 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^[12]。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(H₂O₂)含量采用紫外分光光度法^[12]测定,取 2 g 新鲜藻体,加入 5 mL 预冷的丙酮,研磨后于 4 °C 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^[12],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。

游离氨基酸(FAA)含量参考范晓等^[15]的方法提取,同样采用日立 L-8900 型高速氨基酸自动分析仪进行测定。

藻胆蛋白(Phy)含量测定参考高洪峰^[16]的方法,略有改动。精确称取 0.010 g 藻体 3 份,放在研磨管中,加入适量的 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液浸泡 3 min,研磨至充分,将提取液放入 -20 °C 条件下反复冻融 6 次,过滤离心取上清液定容至 50 mL,摇匀后静置至室温,分别于 565、615、650 nm 波长下测定其 OD 值。计算公式为:

$$C_{RPE} = 0.123A_{565} - 0.068A_{615} + 0.015A_{650} \quad (1)$$

$$C_{RPC} = 0.162A_{615} - 0.001A_{565} - 0.098A_{650} \quad (2)$$

$$C_{APC} = 0.171A_{650} - 0.006A_{565} - 0.004A_{615} \quad (3)$$

式中, C_{RPE}、C_{RPC}、C_{APC} 分别为 R-藻红蛋白、R-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的含量。

叶绿素 a(Chl. a)含量参考 JENSEN^[17]的方法,精确称取 0.010 g 藻体 3 份,加入适量 90% 的丙酮水溶液充分研磨,提取液避光放置 24 h 提取叶绿素,过滤离心取上清液定容到 40 mL,分别于 666 和 730 nm 波长下测定其 OD 值。计算公式:

$$C = (OD_{666} - OD_{730}) \times 10V/890 \quad (4)$$

式中, V 表示提取液的体积(mL), C 表示体积 V 中的叶绿素 a 总含量(mg)。

粗蛋白含量采用传统凯氏定氮法进行测定。每次测定重复 3 次。

1.5 数据统计分析

应用 Excel 和 SPSS 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

2.1 低 N、P 胁迫下,坛紫菜叶状体品质特征的变化

紫菜叶状体光合色素、粗蛋白及游离氨基酸含量是鉴定紫菜品质的主要指标^[18],其中藻胆蛋白和叶绿素 a 是坛紫菜的主要光合色素,其含量高决定着商品紫菜饼的色泽和质量^[19]。由表 1

可知,坛紫菜叶状体在遭受低 N、P 胁迫时,藻胆蛋白和叶绿素 a 含量显著下降($P < 0.05$),直到胁迫后期,下降速度才逐渐变缓。在低 N、P 胁迫 10 d 后,藻胆蛋白含量下降到了胁迫前 32.50%,叶绿素 a 含量下降到了胁迫前 24.79%。

粗蛋白含量是衡量紫菜营养价值的重要指标^[19]。由表 2 可知,坛紫菜叶状体在遭受低 N、P 胁迫时,粗蛋白含量显著下降($P < 0.05$),在胁迫培养 10 d 后,叶状体粗蛋白含量只剩下(159.58 ± 5.06) mg/g,为胁迫培养前的 37.72%。

表 1 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下色素含量的变化
Tab.1 Changes of pigment content in gametophytic blades of *P. haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress

胁迫天数(d) stress days	<i>X</i> ± SD, mg/g				
	藻红蛋白 PE	藻蓝蛋白 PC	别藻蓝蛋白 APC	藻胆蛋白 Phyco.	叶绿素 a Chl. a
0	16.14 ± 0.63 ^a	25.46 ± 3.04 ^a	17.66 ± 1.16 ^a	59.26 ± 4.08 ^a	9.44 ± 0.40 ^a
2	7.37 ± 1.69 ^b	20.77 ± 1.72 ^b	16.36 ± 1.87 ^a	44.50 ± 4.90 ^b	5.29 ± 0.36 ^b
4	4.06 ± 0.44 ^c	16.46 ± 2.98 ^c	11.57 ± 1.78 ^b	32.09 ± 4.93 ^c	4.00 ± 0.69 ^c
6	2.31 ± 0.26 ^d	10.79 ± 2.29 ^d	8.25 ± 0.75 ^d	21.34 ± 2.79 ^d	3.72 ± 0.15 ^c
8	2.70 ± 0.41 ^d	11.32 ± 0.43 ^d	8.15 ± 0.66 ^d	22.18 ± 1.18 ^d	2.71 ± 0.05 ^d
10	2.40 ± 0.98 ^d	9.54 ± 1.12 ^d	7.32 ± 1.86 ^d	19.26 ± 3.85 ^d	2.34 ± 0.48 ^d

注:在同一列中,不具有相同字母上标的均值差异显著($P < 0.05$)。

Notes: The values with different letters in the same column were significantly different ($P < 0.05$).

表 2 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下粗蛋白含量的变化
Tab.2 Changes of crude protein content in gametophytic blades of *P. haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress

胁迫天数(d) stress days	<i>X</i> ± SD, mg/g					
	0	2	4	6	8	10
粗蛋白 crude protein	423.08 ± 7.06 ^a	293.01 ± 6.15 ^b	246.74 ± 7.06 ^c	209.87 ± 1.16 ^d	181.03 ± 6.03 ^e	159.58 ± 5.06 ^f

注:不具有相同字母上标的均值差异显著($P < 0.05$)。

Notes: The values with different letters were significantly different ($P < 0.05$).

紫菜成分中的游离氨基酸含量越高,味道也就越鲜美^[20]。由表 3 可知,坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下,13 种游离氨基酸(有 5 种氨基酸未检测到)除缬氨酸(Val),酪氨酸(Tyr),赖氨酸(Lys)在整个胁迫周期内含量没有发生显著变化外,其余 10 种游离氨基酸在胁迫早期含量均显著下降($P < 0.05$),但到胁迫后期,又都趋于稳定($P > 0.05$)。在胁迫培养 10 d 后,叶状体总游离氨基酸含量只剩下(10.06 ± 1.53) mg/g,为胁迫培养前的 26.28%。

由以上光合色素、粗蛋白和游离氨基酸含量的变化可以看出,在低 N、P 胁迫下,坛紫菜叶状体的品质显著变差。

2.2 低 N、P 胁迫下,坛紫菜叶状体活性氧主要成分的变化

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 、脂质过氧化物等活性氧成分含量迅速增加^[21]。由图 1 可以看出,当坛紫菜叶状体遭受低 N、P 胁迫时,自由基含量极显著上升($P < 0.01$),但随着胁迫时间的延长,藻体适应了低 N、P 环境并启动了相应的防御系统,使得自由基被分解,含量又发生极显著下降($P < 0.01$)。而从图 2 可以看出,在低 N、P 胁迫的初期(0~4 d), H_2O_2 含量显著下降($P < 0.05$),但在

胁迫 6 d 后,随着自由基的大量被分解, H_2O_2 含量 H_2O_2 含量变化的转折点。
开始极显著上升,其中低 N、P 胁迫 4 ~ 6 d 是

表 3 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下游离氨基酸含量的变化
Tab. 3 Changes of free amino acids content in gametophytic blades of *P. haitanensis*
under low nitrogen and phosphorus stress $X \pm SD, mg/g$

氨基酸 amino acids	胁迫天数(d) stress days					
	0	2	4	6	8	10
天冬氨酸 Asp	4.59 ± 0.23 ^a	1.25 ± 0.06 ^b	0.69 ± 0.10 ^c	0.61 ± 0.04 ^c	0.63 ± 0.05 ^c	0.43 ± 0.10 ^d
苏氨酸 Thr	1.41 ± 0.09 ^a	0.66 ± 0.02 ^b	0.44 ± 0.04 ^c	0.37 ± 0.00 ^c	0.44 ± 0.04 ^c	0.34 ± 0.08 ^d
丝氨酸 Ser	1.66 ± 0.09 ^a	0.39 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.04 ^b	0.54 ± 0.04 ^c	0.49 ± 0.03 ^c	0.43 ± 0.12 ^c
谷氨酸 Glu	8.64 ± 0.41 ^a	5.27 ± 0.18 ^b	4.66 ± 0.40 ^b	3.33 ± 0.05 ^c	3.55 ± 0.38 ^c	3.45 ± 0.93 ^c
甘氨酸 Gly	0.43 ± 0.03 ^a	0.31 ± 0.05 ^b	0.22 ± 0.08 ^c	0.22 ± 0.03 ^c	0.25 ± 0.04 ^c	0.26 ± 0.04 ^c
丙氨酸 Ala	15.97 ± 0.65 ^a	2.35 ± 0.01 ^b	1.73 ± 0.16 ^c	1.38 ± 0.05 ^c	1.75 ± 0.15 ^c	1.43 ± 0.16 ^c
半胱氨酸 Cys	3.28 ± 1.49 ^a	1.72 ± 0.02 ^b	1.87 ± 0.05 ^b	1.76 ± 0.04 ^b	1.83 ± 0.02 ^b	1.78 ± 0.02 ^b
缬氨酸 Val	0.16 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.05 ^a	0.02 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.04 ^a	0.06 ± 0.05 ^a
异亮氨酸 Ile	0.07 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.02 ^b	0.02 ± 0.04 ^c	0 ^c	0.02 ± 0.04 ^c	0.03 ± 0.05 ^c
亮氨酸 Leu	0.06 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.02 ^b	0.02 ± 0.01 ^c	0.01 ± 0.01 ^c	0.02 ± 0.00 ^c	0.02 ± 0.02 ^c
酪氨酸 Tyr	1.66 ± 0.04 ^a	1.70 ± 0.01 ^a	1.75 ± 0.05 ^a	1.72 ± 0.02 ^a	1.68 ± 0.03 ^a	1.73 ± 0.02 ^a
赖氨酸 Lys	0.11 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.04 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.07 ^a
精氨酸 Arg	0.18 ± 0.06 ^a	0.13 ± 0.02 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.00 ^b
合计 total	38.28 ± 1.97 ^a	14.54 ± 0.23 ^b	11.85 ± 0.97 ^c	10.11 ± 0.20 ^c	10.81 ± 0.78 ^c	10.06 ± 1.53 ^c

注:同一行中,不具有相同字母上标的均值差异显著($P < 0.05$)。

Notes: The values with different letters in the same line were significantly different ($P < 0.05$).

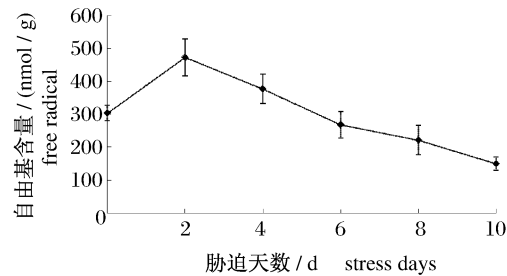


图 1 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下
自由基含量的变化

Fig. 1 Changes of free radical content in gametophytic
blades of *P. haitanensis* under low nitrogen
and phosphorus stress

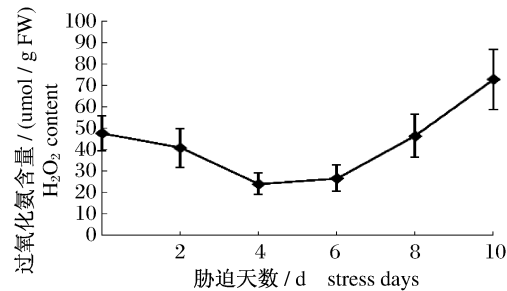


图 2 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下
 H_2O_2 含量的变化

Fig. 2 Changes of H_2O_2 content in
gametophytic blades of *P. haitanensis* under low
nitrogen and phosphorus stress

MDA 是植物细胞膜脂过氧化产物之一,能与细胞内各种物质发生强烈反应而引起酶和膜系统的严重损伤,其含量是衡量细胞膜脂损伤程度的一个重要指标^[21]。如图 3 所示,在低 N、P 胁迫下,坛紫菜叶状体中 MDA 含量显著上升($P < 0.05$),在胁迫 6 d 时达到峰值,随后 MDA 含量又开始显著下降($P < 0.05$)。说明坛紫菜耐低 N、P 品系叶状体对低 N、P 胁迫有一段不适应期,在不适应期内膜系统被氧化受损,MDA 含量上升,随着对低 N、P 环境的逐渐适应及相关防御系统的启动,膜系统又逐渐被修复,MDA 含量下降。

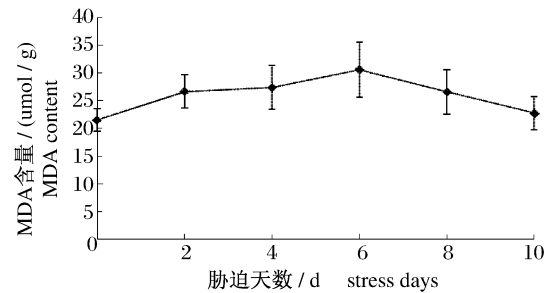


图 3 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下
MDA 含量的变化

Fig. 3 Changes of MDA content in gametophytic
blades of *P. haitanensis* under low nitrogen
and phosphorus stress

2.3 低 N、P 胁迫下,坛紫菜叶状体抗氧化酶系统活性的变化

SOD、POD 和 CAT 是植物细胞内清除活性氧的主要抗氧化酶系统,其中 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 ,其活性被认为是植物抗逆性的重要指标^[22]。由图 4 可以看出,在低 N、P 胁迫条件下,坛紫菜叶状体 SOD 活性极显著提高 ($P < 0.01$),且随着胁迫天数增加,提高幅度越大,胁迫 10 d 后的 SOD 活性达到了起始 SOD 活性的 5.4 倍。

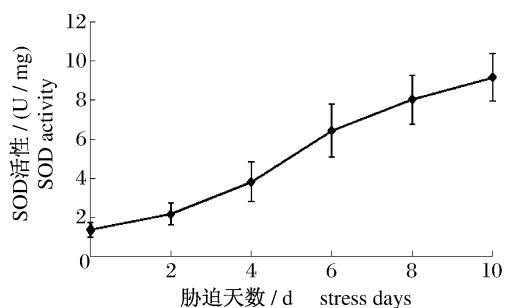


图 4 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下 SOD 活性的变化

Fig. 4 Changes of SOD activity in gametophytic blades of *P. haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress

CAT 是植物体内清除过量 H_2O_2 的主要酶系统,它可将 H_2O_2 迅速分解为 H_2O 和 O_2 ,从而最大限度减少 $\cdot OH$ 的形成^[21]。如图 5 所示,坛紫菜叶状体的 CAT 活性在低 N、P 胁迫一开始即发生

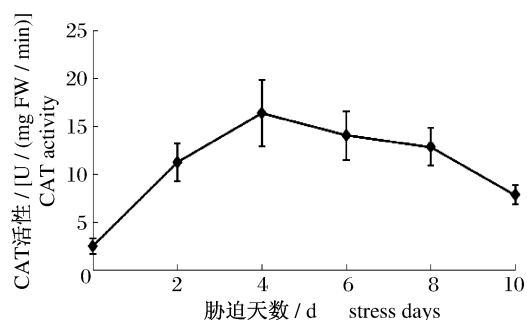


图 5 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下 CAT 活性的变化

Fig. 5 Changes of CAT activity in gametophytic blades of *P. haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress

极显著提高 ($P < 0.01$),低 N、P 胁迫 4 d 后,CAT 活性达到峰值,为起始 CAT 活性的 5.6 倍,随后随着低 N、P 胁迫的继续,CAT 活性开始极显著下降 ($P < 0.01$),从而使得 CAT 活性在整个低 N、P 胁迫周期内表现为先提高后下降的特征,这一变化趋势正好与图 2 所示的 H_2O_2 含量变化趋势相反。

POD 在植物体内的主要作用也是清除 H_2O_2 ,从而有效保护细胞免受活性氧的损伤^[21]。由图 6 可知,在低 N、P 胁迫初期(0~4 d),坛紫菜叶状体内的 POD 活性没有发生显著变化 ($P > 0.05$),但在胁迫 4 d 后,POD 活性开始极显著上升 ($P < 0.01$),6 d 时达到峰值,随后又开始极显著下降 ($P < 0.01$)。

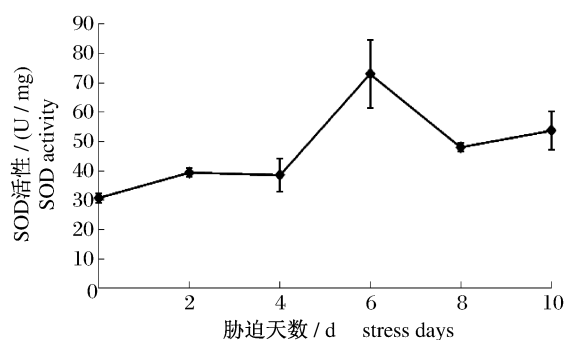


图 6 坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫条件下 POD 活性的变化

Fig. 6 Changes of POD activity in gametophytic blades of *P. haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress

2.4 低 N、P 胁迫下,坛紫菜叶状体渗透压调节系统的变化

Pro 是重要的有机渗透调节物质,正常生长条件下植物体内的 Pro 含量很低,但当其处于逆境胁迫时含量可迅速增加,通过调节渗透压保持原生质与环境的渗透平衡,并与胞内的一些化合物形成亲水聚合物,以保持膜结构的完整性,避免逆境胁迫对膜系统的伤害^[23]。因此,测量植物体内游离 Pro 的含量,在一定程度上可以判断逆境对植物的危害程度和植物对逆境的抵抗力。如图 7 所示,在低 N、P 胁迫下,坛紫菜叶状体中的 Pro 含量显著上升 ($P < 0.05$),直到胁迫后期,叶状体已经逐渐适应低 N、P 环境后才开始下降。

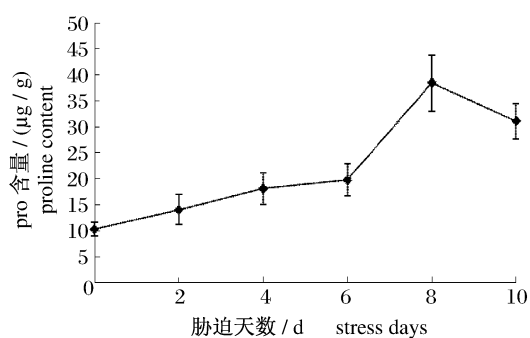


图7 低 N、P 胁迫不同天数对坛紫菜 Pro 含量的影响

Fig. 7 Changes of proline content in gametophytic blades of *P. haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress

3 讨论

3.1 低 N、P 胁迫对坛紫菜叶状体品质指标的影响

氮、磷是养殖海藻中继光照和碳源后最重要的营养元素之一,是有机体的蛋白质与核酸的重要组成成分,氮的缺乏将影响启动生物化学反应的酶、色素体的形成;缺磷时,代谢过程不能正常进行,生长发育受阻^[2]。因此海区出现 N、P 缺乏时,将对紫菜栽培造成严重的胁迫效应。光合色素、粗蛋白和游离氨基酸含量是衡量坛紫菜品质的主要指标^[18],本研究结果表明在低 N、P 胁迫条件下,这三个指标均表现出了显著的下落趋势,在胁迫培养 10 d 后,藻体中各光合色素、粗蛋白和游离氨基酸含量均下降到了原有水平的 1/3 以下(表 1,表 2,表 3),由此说明低 N、P 胁迫造成了坛紫菜品质的显著下降。

坛紫菜的光合色素主要包括藻胆蛋白和叶绿素 a。藻胆蛋白被认为是藻类细胞中的主要 N 贮藏库,在正常的光照、温度培养条件下,丰富的 N 源有利于藻胆蛋白的合成,相反,在 N 饥饿状态下,藻胆蛋白的合成明显降低甚至停止^[24]。本实验结果与之相符,在低 N、P 胁迫下,藻胆蛋白的合成停止,为了维持藻体的正常生长开始消耗藻胆蛋白储存的 N,藻胆蛋白也随之解体。叶绿素作为植物进行光合作用的主要色素,其含量的多少对光合速率有直接的影响,是反映植物叶片光合能力的一个重要指标。本研究中当藻体遭受低 N、P 胁迫时,叶绿素含量显著下降,出现这种状

况的原因可能有两点:一是低 N、P 胁迫抑制了叶绿素合成酶的活性,从而阻碍了叶绿素的合成,导致植株叶绿素含量急剧下降;二是叶绿素蛋白中心离子组成发生了变化,从而使藻体出现了短期的失绿现象。无论哪种情况都将直接影响坛紫菜的光合作用水平,从而间接影响坛紫菜的品质和产量。粗蛋白含量是衡量紫菜营养价值的重要指标^[19],而紫菜成分中的游离氨基酸含量则决定着紫菜的风味^[20],低 N、P 胁迫下,由于原料的缺乏,使得坛紫菜藻体中的粗蛋白和游离氨基酸合成受阻,由此只能以牺牲品质为代价,消耗原有粗蛋白和游离氨基酸的“库存”以维持生存。

3.2 低 N、P 胁迫对坛紫菜叶状体生理指标的影响及其响应机制

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类(ROS)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^[21]。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^[25]。本实验中,耐低 N、P 型坛紫菜叶状体在低 N、P 胁迫初期,细胞中的自由基含量即显著上升(图 1),并且作为衡量细胞膜脂损伤程度重要指标的 MDA 含量也显著增加(图 3),说明低 N、P 等逆境胁迫打破了紫菜细胞中 ROS 产生和清除的动态平衡,使得自由基含量大量增加,并开始引起细胞膜的氧化损伤。

随着细胞中 ROS 物质的显著增加,膜系统受损,坛紫菜叶状体中的保护系统(抗氧化酶系统和渗透压调节系统)也迅速响应。细胞中的 SOD 活性和 CAT 活性在胁迫刚开始即显著增强(图 4 和图 5),SOD 不断催化过量产生的自由基发生歧化反应,生成 H_2O_2 和 O_2 ,CAT 再将 H_2O_2 迅速分解为 H_2O 和 O_2 ,从而不断减少自由基对细胞的氧化损害作用;POD 活性对逆境的响应较慢,直到胁迫 4 d 后活性才显著增强(图 6),并参与 H_2O_2 的分解;此外,为减少低 N、P 胁迫对坛紫菜

细胞膜系统的伤害,作为细胞中渗透压调节系统主要组分的 Pro 含量也显著增加,通过调节渗透压保持原生质与环境的渗透平衡,以保持膜系统的结构完整。在保护系统和 ROS 产生系统的相互拮抗中,保护系统逐渐占据上风,在胁迫后期使得细胞中的自由基含量显著下降,膜脂过氧化程度也随之减弱(MDA 含量显著下降),而保护系统随着自由基含量的下降,CAT、POD 活性和 Pro 含量也开始下降,但 SOD 仍然持续增强,说明在低 N、P 胁迫下,SOD 起着最为主要的保护作用,是抵抗低 N、P 胁迫损害的第一道防线。

由此推测,耐低 N、P 型坛紫菜叶状体应答低 N、P 胁迫的生理过程为低 N、P 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。杨锐等^[7]在研究坛紫菜应答高温胁迫的生理机制时认为坛紫菜在高温胁迫条件下只启动了渗透压调节系统,而抗氧化系统则被高温所钝化,这可能与其所采用的材料为不抗逆品系及逆境胁迫类型不同有关。

参考文献:

- [1] 谢潮添,陈昌生,纪德华,等.坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱构建[J].水产学报,2010,34(6):733-740.
- [2] 柳佩娟,纪德华,谢潮添,等.坛紫菜耐低氮磷品系选育的研究[J].集美大学学报,2009,14(2):16-19.
- [3] KAKINUMA M, COURY D A, NAKAMITO C, et al. Molecular analysis of physiological responses to changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. Cell Biol Toxicol, 2008, 24(6):629-639.
- [4] 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.
- [5] 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:自然科学版,2008,31(4):487-490.
- [6] PRIYA S W, CHRISTOPHER D N, LELAND S J. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kutzing (Rhodophyta, Bangiales) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2008, 361:83-91.
- [7] 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.
- [8] 况琪军,马沛明,刘国祥.大型丝状绿藻对 N、P 去除效果研究[J].水生生物学报,2004,28(3):323-326.
- [9] 张勇,程祥圣,吴月英.锌-镉还原-分光光度法测定地表水中硝酸盐[J].理化检测-化学分册,2008,4(2):139-141.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] AEBI H. Catalase *in vitro* [J]. Methods Enzymology, 1984, 105:121-126.
- [14] HEATH R L, PARK E R. Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. Arch Biochem, 1968, 25:189-198.
- [15] 范晓,严小军,韩丽君.海藻化学分析方法[M].北京:学苑出版社,1995.
- [16] 高洪峰.不同生长期坛紫菜中藻胆蛋白的含量变化[J].海洋与湖沼,1993,24(6):645-648.
- [17] JENSEN A. Physiological and biochemical methods. Chlorophylls and Carotenoids [M]. London: Cambridge Univ Press, 1978:59-70.
- [18] 陈昌生,徐燕,纪德华,等.坛紫菜品系间杂交藻体选育及经济性状的初步研究[J].水产学报,2007,31(1):97-104.
- [19] 陈昌生,徐燕,谢潮添,等.坛紫菜诱变育种的初步研究[J].水产学报,2008,32(3):327-334.
- [20] HARAD K, OSUMI Y, FUKUDA N, et al. Changes of amino acid compositions of 'Nori', *Porphyra* spp. during storage [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1990, 56(4):607-612.
- [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] NEILL S J, DESIKAN R, CLARKE A, et al.

- Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1237–1247.
- [23] 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能的意义[J]. *植物生理学通讯*, 1984(1):15–21.
- [24] 马圣媛, 王广策, 孙海宝. 藻胆蛋白的研究概况 [J]. *海洋科学*, 2002, 26(8):40–43.
- [25] 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.

Effects on physiological and biochemical indexes of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress

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

Abstract: In this study, effects on physiological and biochemical indexes of gametophytic blades of an low nitrogen and phosphorus tolerance line (9-IV) of *Porphyra haitanensis* under low nitrogen and phosphorus stress were observed. They were grown in medium with low content of nitrogen and phosphorus for 0, 2, 4, 6, 8 and 10 days. Changes in three quality indexes were measured, including the contents of pigment, crude protein and free amino acids. Results showed that all the three quality indexes of *P. haitanensis* were significantly declined under low nitrogen and phosphorus stress. Furthermore, changes in physiology also were measured, including free radical content, H_2O_2 , malondialdehyde (MDA) and proline levels, and the activities of superoxide dismutase, peroxidase, and catalase. These physiological indexes were all presented as dynamic changes in the stress days. Based on these data, the physiological changes within the 9-IV blades were as follows: low nitrogen and phosphorus stress → 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. Our results laid a foundation for understanding the principle of low nitrogen and phosphorus tolerance in *P. haitanensis*, and provided some directions for future breeding.

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

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