



不同盐度低渗胁迫处理对龙须菜切段再生能力及光合生理的影响

余婷婷^{1,2}, 钟晨辉¹, 林琪^{1*}, 唐隆晨¹, 宦忠艳¹, 周文发³

(1. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 莆田市正洋水产发展有限公司, 福建 莆田 351100)

摘要: 为探究龙须菜对低渗胁迫的生理性适应, 分析了龙须菜主枝切段在不同盐度低渗培养液 (盐度 19.500、13.000、6.500、0.000) 下耐受不同胁迫时间 (1、3、6、12 和 20 h) 后, 继续恢复正常盐度 (盐度 26.000) 培养过程中的形态发生、光合生理指标和细胞器亚显微结构变化。结果显示, 短于 12 h 的低渗 (盐度 0~19.500) 胁迫可以促进龙须菜切段的出芽, 其总出芽数均高于对照组 (盐度 26.000)。3 h 的淡水胁迫后恢复至正常盐度培养, 藻段再生过程的出芽数目较多, 鲜重增加最多, 表现出了明显的生长优势。龙须菜藻段经淡水胁迫 3 h 后恢复至正常盐度培养 28 d, 藻段的相对生长率 (RGR) 为 0.91 %/d, 较对照组 RGR 提高了 61.27%。1 和 3 h 淡水胁迫对龙须菜藻段的光合生理指标无明显的负面效应, 且恢复至正常盐度培养后藻段的光合生理活性增强, 提示低渗胁迫可能增强了藻段的细胞代谢活力。透射电镜观察表明, 经淡水胁迫 3 h 后, 表皮细胞内的红藻淀粉颗粒、质体小球及脂质体等为藻体生长发育提供能量的物质和质体再生所需中性脂原料明显增加, 适应于藻段再生过程的新生芽形成。相反, 长时间的淡水胁迫对色素体和类囊体等亚细胞器结构造成了不可逆的损伤。研究表明, 龙须菜主枝切段经淡水 3 h 的浸泡有助于其再生过程的出芽, 这将为龙须菜无性系苗种快速扩繁提供技术参考。本研究可为建立龙须菜无性系苗种快速扩繁技术提供参考数据。

关键词: 龙须菜; 低渗胁迫; 切段再生; 光合生理; 超微结构

中图分类号: S 968.43

文献标志码: A

盐度是调控海藻生长发育的重要生态因子之一, 也决定着海藻的自然分布^[1]。相关研究发现, 河海交汇区盐度变化对肠浒苔 (*Enteromorpha intestinalis*) 的分布和生长速率产生了显著影响^[2]。高盐胁迫下鼠尾藻 (*Sargassum thunbergii*) 的 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 显著降低, 但转移至正常盐度海水中培养后又可迅速恢复至正常水平^[3]。一定范围内盐度的增加可以促进条斑紫菜 (*Pyropia*

yezoensis) 叶状体的甘露醇积累^[4]。低渗处理羊栖菜 (*Sargassum fusiforme*) 不会降低其光合生理指标, 且经过短时淡水处理后不仅可以清除养殖网帘上的杂藻, 还将增强羊栖菜的光合活性^[5]。值得注意的是, 一些潮间带的产胶藻类时常经历陆源径流的淡水汇入、退潮干出后的突发降雨及涨潮后的复水等盐度变化过程, 表现出了对短时低渗胁迫的适应性。相关研究表明, 坛紫菜 (*P. haitanensis*)

收稿日期: 2021-10-20 修回日期: 2021-11-28

资助项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-50); 福建省海洋与渔业结构调整专项 (2021HYJG03); 福建省科技计划 (2019NJ009)

第一作者: 余婷婷 (照片), 从事藻类繁殖生物学研究, E-mail: 306245949@qq.com

通信作者: 林琪, 从事水产育种与增殖技术研究, E-mail: xmqlin@sina.com



sis) 在盐度 5 的低渗胁迫下可以维持较高的 K^+ 水平, 进而维持较高的 K^+/Na^+ , 保证了光合作用的正常进行^[6]。过低的盐度也可维持细基江蓠繁枝变型 (*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*) 的琼胶合成^[7]。在正常盐度 26 和低盐 16 的环境下栽培提克江蓠 (*G. tikvahiae*), 二者的生长速率也不存在差异^[8]。其次, 由于河水的注入, 生长在河口区的真江蓠 (*G. vermiculophylla*) 经常遭遇低渗胁迫, 虽然其最适生长盐度为 15~30, 但是在盐度 0.5 条件下仍可以存活数周^[9-10]。

龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*) 是一种生长在潮间带的产胶红藻, 也是在我国南北方海区被广泛栽培的一种重要的大型经济藻类。目前龙须菜的人工栽培主要依靠营养繁殖的方式来进行。营养体繁殖虽然生长快, 栽培过程操作简单, 但是我国南方夏季高温期漫长, 适宜的藻体生长期偏短, 难以进行龙须菜的周年化栽培。如何在有限的适养时间里, 通过优化苗种扩繁方式, 加快龙须菜的营养生长, 提高龙须菜产量具有重要的产业发展意义。在生产实践中发现, 利用淡水冲洗或短时间浸泡龙须菜可以加快藻体的生长, 缩短单茬养殖时间, 提高经济效益^[11]。然而这一操作过程中低渗胁迫处理对藻体的促生长效应和生理适应策略仍不清楚。鉴于此, 本研究以福建海区主要栽培的龙须菜新品种“鲁龙 1 号”(品种登记号: GS-04-001-2014) 作为实验材料^[12], 在室内培养条件下, 探究了龙须菜藻体切段在不同盐度和不同处理时间下的出芽生长和光合生理指标的变化情况, 以期筛选出最适的低渗处理方式, 为建立龙须菜苗种的快速扩繁技术提供新参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用龙须菜为“鲁龙 1 号”新品种, 采自福建省莆田市南日岛的人工栽培海域, 在低温避光条件下运回实验室。将新鲜的龙须菜置于灭菌海水中, 用软毛刷反复刷洗以清除表面附着杂藻, 清理完毕后置于灭菌海水中培养 2 周。培养条件: 温度 $(22.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$, 光照强度 $15\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照周期 12 L : 12 D, 盐度 26.000, 培养液为 Provasoli's Enriched Seawater (PES)^[13], 每 3 天更换 1 次。

1.2 实验方法

藻段制备 选择完整、健康的龙须菜藻体, 再次用灭菌海水清洗以去除附生杂藻。用消毒刀

片切取藻体的主枝部分, 且剔除侧枝, 切成长度为 1.5 cm 的藻段。

低渗培养液配置 以龙须菜养殖海区的海水盐度 26.000 作为正常盐度, 取用 PES 培养基 (对照, 盐度 26.000) 加入无菌蒸馏水 (盐度 0.000), 二者分别按 3 : 1、1 : 1 和 1 : 3 的比例, 将培养液盐度稀释至 19.500、13.000 和 6.500。盐度 0.000 的淡水为灭菌超纯水。

胁迫设计 将预先制备的藻段按同等数量和重量 [20 根, 总重量 $(0.465\pm 0.010)\ \text{g}$] 分别转入含有 150 mL PES 培养液的烧杯中, 依次进行低盐胁迫 (盐度 0.000、6.500、13.000 和 19.500) 处理, 处理时间分别设置为 1、3、6、12 和 20 h, 胁迫结束后立即转移至正常盐度培养液中培养 (盐度 26.000)。未进行盐度胁迫的实验组为对照组 (盐度 26.000), 每个处理组设置 3 个生物学重复。后续培养期间的培养条件: 温度 $(22\pm 0.5)^\circ\text{C}$, 光照强度 $30\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光照周期 12 L : 12 D, 每 3 天更换 1 次 PES 培养液。

生长指标测定 低渗胁迫处理后恢复正常盐度培养, 每隔 3 天测定 1 次藻段的生长指标, 包括总出芽数 (TB) 和鲜重 (FW), 并记录藻段的生长情况, 培养周期为 28 d。测定龙须菜藻段在恢复正常盐度培养过程中的生物量变化, 以评估其生长。相对生长速率 (RGR) 的计算公式:

$$\text{RGR} = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$$

式中, W_0 为实验开始时藻段的鲜重 (g); W_t 为实验结束时藻段的鲜重 (g); t 为实验天数 (d)。

光系统 PS II 最大光化学效率测定 分别测定了淡水 (盐度 0.000) 胁迫 1、3 和 20 h 后恢复正常盐度 (盐度 26.000) 培养的实验组和对对照组 (盐度 26.000) 的 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m), 各组均随机测量 7 根藻段。利用超便携式调制叶绿素荧光仪 MINI-PAM-II (德国 WALZ 公司) 测定藻段未胁迫前 (OS)、胁迫结束时 (ST)、恢复至正常盐度培养液中培养 2 d (R2)、恢复至正常盐度培养液中培养 6 d (R6)、恢复至正常盐度培养液中培养 11 d (R11)、恢复至正常盐度培养液中培养 16 d (R16) 以及恢复至正常盐度培养液中培养 21 d (R21) 时的 F_v/F_m 。

主要光合色素含量测定 分别对淡水 (盐度 0.000) 胁迫 3 和 20 h 和对对照组 (盐度 26.000) 的藻段进行取样, 测定 ST、R2、R6 和 R11 组藻段的光合色素含量。具体操作流程参考 Sampath-Wiley 等^[14]的方法。精确称取 0.1 g 藻段放入研钵

中, 在液氮下充分研磨至细粉状。用 1.5 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 6.8) 分 3 次冲洗细粉状样本, 将冲洗液充分收集后装入 2.0 mL 聚丙烯离心管中, 在 4 °C 下, 以 11 000 r/min 转速离心 30 min。离心结束, 将上清液转移到新的离心管中, 然后吸取 1 mL 上清液稀释 3 倍, 使用紫外分光光度计 (UV-3200) 分别测量在波长 564、618 和 730 nm 处的吸光度值, 以 PBS 作为空白组, 剩余藻胆蛋白上清液置于 4 °C 保存。另外, 将离心沉淀物取出, 加入 5 mL DMF (N,N-二甲基甲酰胺), 在 4 °C 下萃取 24 h。萃取结束后 6 000 r/min 冷冻离心 10 min, 将含有叶绿素的上清液转移至新的离心管中, 使用分光光度计分别读取 625、647、664 和 750 nm 处的吸光度值, 且以 DMF 作为参照。藻红蛋白 (PE) 含量 (mg/g)、叶绿素 *a* (Chl. *a*) 含量 (mg/g) 计算公式:

$$PE = 0.1247 \times [(A_{564} - A_{730}) - 0.4583 \times (A_{618} - A_{730})] \times N$$

$$Chl. a = [12.65(A_{664} - A_{750}) - 2.99(A_{647} - A_{750}) - 0.04(A_{625} - A_{750})] \times V_e / (I \times W \times 1000)$$

式中, *N* 为稀释倍数, *V_e* 为萃取液 (DMF) 的体积 (5 mL), *I* 为比色皿的光径 (3.5 cm), *W* 为所取藻体的鲜重 (g)。

细胞超微结构的观察 分别切取淡水 (盐度 0.000) 胁迫 3 和 20 h 以及对照组 (盐度 26.000) 藻段在 ST 和 R2 时藻段两端处的薄片 (1~2 mm³)。将切取的离体样本取下, 采用 2.5% 戊二醛 (pH 7.5) 冷固定, 抽气至样本沉入 2.5 mL EP 管底, 室温放置 2 h 固定后置于 4 °C 保存。再用 PBS (pH 7.4) 漂洗样本 3 次, 每次 15 min。之后用 1% 锇酸 (pH 7.4) 在室温下暗固定 7 h, 同样用 PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次。再经系列脱水、渗透包埋、聚合和超薄切片, 最后用醋酸铀-枸橼酸铅双重染色法进行染色。在日立 HT7800 型透射电镜 (TEM) 下观察, 采集图像并进行分析。

统计分析 使用 Excel 2007 软件进行数据处理, 采用 SPSS 19.0 软件对各组数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), *P* < 0.05 作为差异显著性水平, 数据以平均值 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 最适低渗浓度与时间组合的选择及其对龙须菜切段再生的影响

观察了实验周期 (28 d) 内龙须菜藻段的生长情况。结果显示, 短于 12 h 的低渗胁迫均可以促

进龙须菜切段在恢复正常盐度培养后的出芽, 藻段的出芽数增加明显, 总出芽数均高于对照组。其中, 淡水 (盐度 0.000) 胁迫 3 和 6 h 后藻段的出芽数最多。而淡水胁迫超过 20 h, 藻体恢复正常盐度培养后第 3 天开始发白、碎裂, 全部消亡 (图 1, 图版 I)。

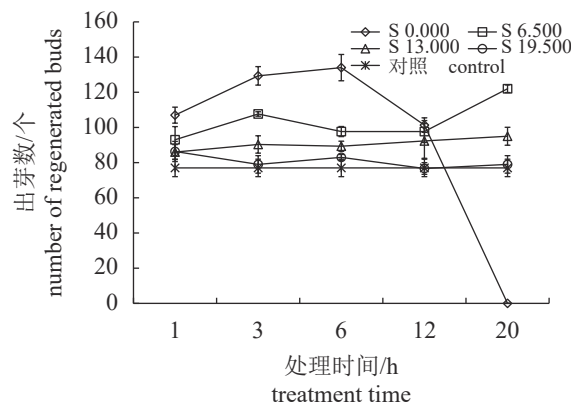


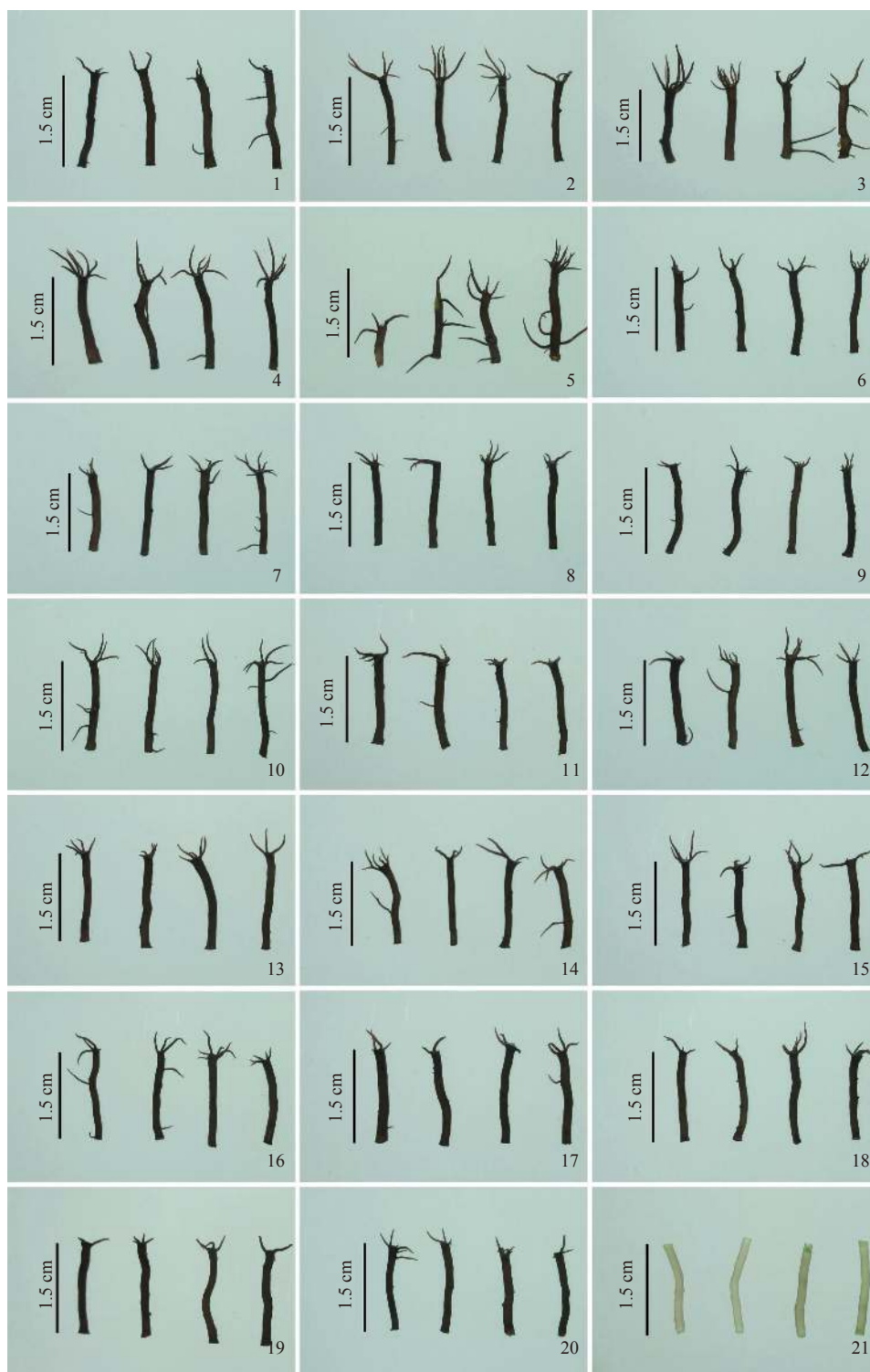
图 1 龙须菜藻段经不同低渗胁迫处理后恢复至正常盐度培养 28 d 时的出芽数

Fig. 1 Number of regenerated buds of the algal fragments during 28 days of normal salinity culture after different treatments of hypo-osmotic stress in *G. lemaneiformis*

龙须菜藻段在低渗胁迫后恢复至正常盐度培养液中培养 28 d 后, 藻段 FW 的增加情况存在差异 (表 1)。淡水胁迫时间小于 6 h 的藻段增重较多, 其对应的 RGR 较高, 与对照组相比差异显著 (*P* < 0.05)。培养 28 d 时, 淡水胁迫 3 h 的藻段 FW 增加最多, 生长速率最快, RGR 高达 0.91%/d, 较对照组提高了 61.27% (图 2)。淡水胁迫时间超过 12 h 的藻段 FW 则出现负增长, 藻体颜色逐渐褪去、溃烂, 最终消亡。淡水胁迫 20 h 藻段受胁迫最严重, 相对生长速率为 -8.62 %/d, 藻段短时间内全部死亡, 仅剩有部分残渣。表明小于 6 h 的低渗胁迫对恢复正常盐度培养过程的龙须菜切段再生具有促进作用, 以淡水胁迫 3 h 的效果最佳。

2.2 淡水胁迫对龙须菜藻段 *Fv/Fm* 的影响

比较了龙须菜藻段在耐受不同时间的淡水 (盐度 0.000) 胁迫后恢复至正常盐度 (盐度 26.000) 培养过程中 *Fv/Fm* 的变化趋势。结果显示, 经 1 h 和 3 h 淡水胁迫, 藻段 *Fv/Fm* 出现略微下降, 但仍与对照组相接近, 转移至正常盐度培养后能迅速恢复至对照组水平, 甚至高于对照组 (图 3-a)。这表明龙须菜可以适应短时的极限低渗胁迫, 短



图版 I 低渗胁迫后恢复正常盐度培养 28 d 的龙须菜藻段的形态

1. 对照组; 2~5. 淡水(盐度 0.000) 分别处理 1、3、6 和 12 h; 6~10. 盐度 6.500 海水分别处理 1、3、6、12 和 20 h; 11~15. 盐度 13.000 海水分别处理 1、3、6、12 和 20 h; 16~20. 盐度 19.500 海水分别处理 1、3、6、12 和 20 h; 21. 藻段淡水胁迫 20 h, 藻体在 4 d 内全部死亡。

Plate I Morphology of 28 days old algal fragments cultured at normal salinity after different treatments with hypo-osmotic stress in *G. lemaneiformis*

1. control group; 2-5. freshwater (S 0.000) treatment for 1, 3, 6 and 12 h, respectively; 6-10. seawater (S 6.500) treatment for 1, 3, 6, 12 and 20 h, respectively; 11-15. seawater (S 13.000) treatment for 1, 3, 6, 12 and 20 h, respectively; 16-20. seawater (S 19.500) treatment for 1, 3, 6, 12 and 20 h, respectively; 21. the algal fragments under freshwater for 20 h, all of them died within 4 days.

表 1 龙须菜藻段低盐胁迫后再恢复至正常盐度培养 28 d 时的鲜重变化

Tab. 1 Changes of fresh weight in the fragments of *G. lemaneiformis* cultured at normal salinity after different treatments of hypo-osmotic stress

处理时间/h treatment time	盐度 salinity				
	0.000	6.500	13.000	19.500	26.000
1	0.121 1±0.000 9**	0.081 9±0.011 1	0.085 3±0.000 8	0.084 0±0.002 1	0.081 4±0.002 1
3	0.136 7±0.000 1**	0.089 6±0.003 4*	0.082 2±0.002 0	0.078 5±0.001 3	
6	0.124 9±0.004 5**	0.084 9±0.007 4	0.074 3±0.009 5	0.076 7±0.000 2	
12	-0.034 2±0.020 6**	0.082 9±0.000 8	0.086 2±0.004 3	0.085 7±0.000 7	
20	-0.418 2±0.001 5**	0.102 4±0.002 9**	0.085 1±0.000 3	0.088 7±0.002 2*	

注: “*”表示与对照组差异显著($P<0.05$), “**”表示与对照组(26.000)差异极显著($P<0.01$)。

Notes: “*” indicates significant difference from the control group ($P<0.05$); “**” indicates extremely significant difference from the control group (26.000) ($P<0.01$).

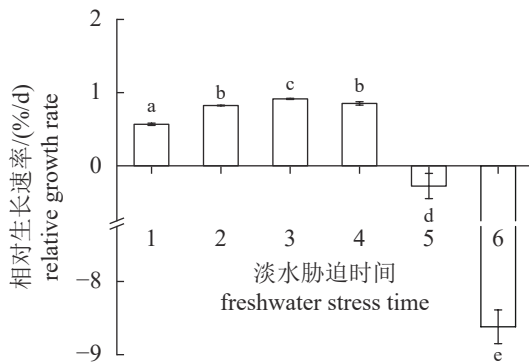


图 2 龙须菜藻段淡水胁迫后再恢复至正常盐度培养 28 d 内的相对生长率

1-6. 分别为淡水处理 0、1、3、6、12 和 20 h。不同小写字母表示不同处理组间差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 2 Relative growth rate of *G. lemaneiformis* fragments cultured in normal salinity medium for 28 days after treatment of hypo-osmotic stress with freshwater

1-6. freshwater treatment time within 0, 1, 3, 6, 12 and 20 h, respectively. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

时低盐胁迫对龙须菜的光合生理活性无明显的负面影响。然而淡水胁迫 20 h 时, 藻段 Fv/Fm 值迅速下降至接近 0, 转入正常盐度培养后不能恢复生长 (图 3-b), 说明龙须菜藻段在长时间的淡水胁迫下受到了不可逆的损伤。

2.3 光合色素含量检测

单因素方差分析显示, 与对照组相比较, 经淡水 (盐度 0.000) 胁迫后恢复至正常盐度 (盐度 26.000) 培养的龙须菜藻段在同一取样时间点的 PE 含量差异显著 ($P<0.05$), Chl. *a* 含量差异显著 ($P<0.05$) (图 4)。与对照组相比较, 淡水处理后龙须菜体内 PE、Chl. *a* 含量下降明显 ($P<0.05$)。然而恢复至正常盐度海水培养后, 经淡水胁迫 3 h

的藻段的 PE、Chl. *a* 含量升高, 且随着恢复培养时间的增加而持续升高。藻段 PE 含量在 R6 组超过对照组水平, 较对照组提高 2.33%。Chl. *a* 累积相对较慢, 在 R11 组才检测到其含量超过对照组水平, 超过对照组 2.78%。然而, 经淡水胁迫 20 h 的藻段 PE、Chl. *a* 含量极速下降, 且在第 6 天取样时藻体全部死亡, 未能测定其含量。

2.4 细胞超微结构观察

通过透射电镜观察, 对照组 (盐度 26.000) 龙须菜藻段的表皮层细胞内细胞器排列整齐, 清晰可见, 呈现典型的红藻内部结构。细胞内充满丰富的色素体, 色素体内包含的类囊体片层结构清晰, 排列有序、间隔均匀, 且少量的质体小球嵌合在类囊体内, 一些红藻淀粉颗粒和少量的脂质体分布于胞浆内 (图版 II -1, 2)。细胞壁结构完整, 层次分明 (图版 II -3)。

与对照组相比, 受淡水 (盐度 0.000) 胁迫的龙须菜藻段两端切口处的表皮细胞的亚细胞器结构发生了明显的变化, 主要涉及色素体、红藻淀粉颗粒、质体小球以及脂质体等 (图版 II -4~5, 7~8)。经 3 h 淡水胁迫后, 藻段表皮细胞的细胞壁仍然保持结构完整, 胞内色素体结构正常, 但红藻淀粉颗粒密度增加, 质体小球增多, 脂质体体积增大 (图版 II -4~5)。胁迫结束恢复至正常盐度培养液中培养 2 d, 胞内色素体内嵌合的类囊体的片层结构排列紧密, 脂质体逐渐消失, 且色泽由暗淡变成透亮的红藻淀粉颗粒和质体小球数量略有减少, 但仍较对照组多 (图版 II -6, 9)。然而, 淡水胁迫 20 h 后, 藻段表皮细胞的超微结构发生了明显改变, 呈现出细胞膜破损, 红藻淀粉粒破

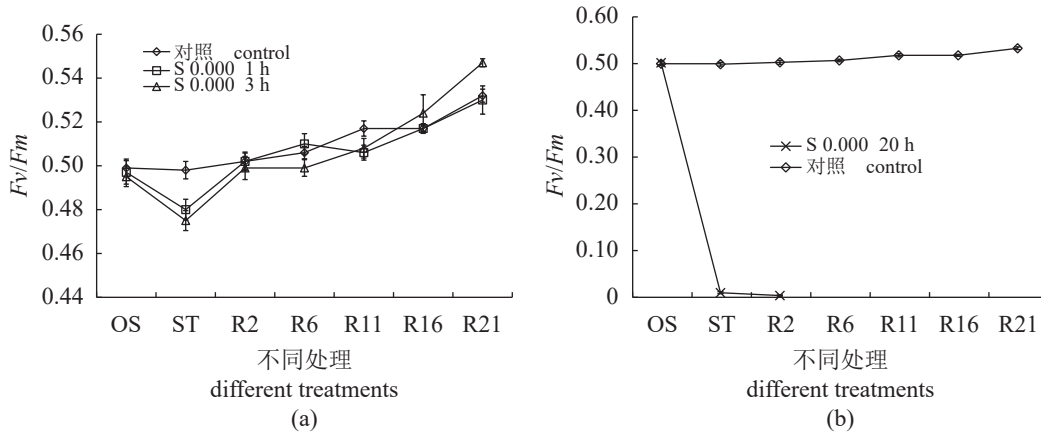


图3 淡水胁迫对龙须菜切段再生过程中 F_v/F_m 的影响

(a) 淡水胁迫1和3 h后的 F_v/F_m 变化; (b) 淡水胁迫20 h后的 F_v/F_m 变化。OS.未胁迫前, ST.胁迫结束时, R2、R6、R11、R16、R21 分别为藻段恢复至正常盐度培养2、6、11、16和21 d, 下同。

Fig. 3 Effects of hypo-osmotic stress with freshwater on F_v/F_m during the regeneration of algal fragments in *G. lemaneiformis*

(a) changes of F_v/F_m after treatments of hypo-osmotic freshwater stress within 1 h and 3 h, respectively; (b) changes of F_v/F_m after treatment of hypo-osmotic freshwater stress within 20 h. OS. before hypo-osmotic stress; ST. after hypo-osmotic stress; R2, R6, R11, R16, R21. sampling at the fragments restored to culture at normal salinity for 2, 6, 11, 16 and 21 days, respectively. The same below.

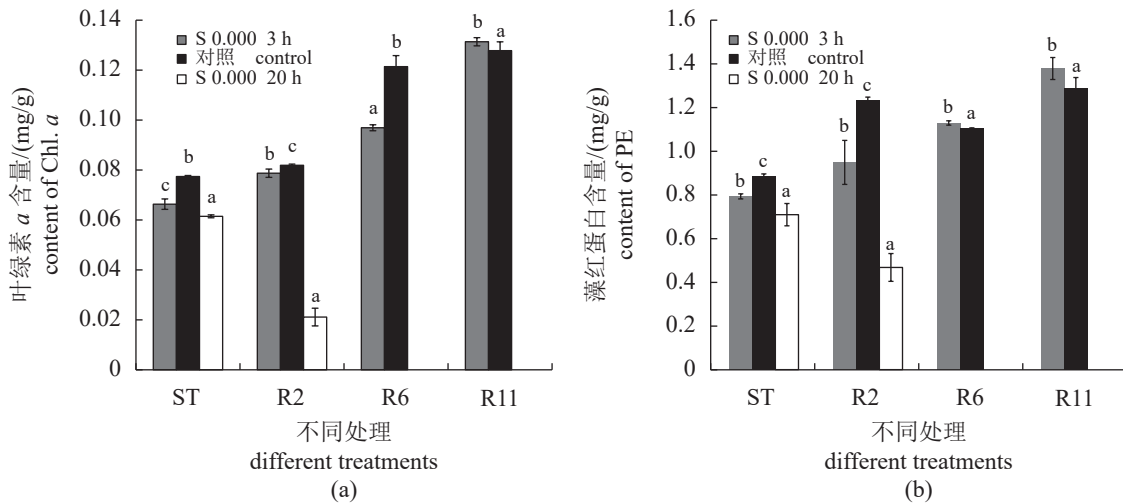


图4 3和20 h淡水胁迫后恢复正常盐度培养的龙须菜切段的藻红蛋白和叶绿素 a 含量变化

(a) 叶绿素 a 含量变化; (b) 藻红蛋白含量变化。不同小写字母表示同一取样时间点下不同时间处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Changes of contents of phycoerythrin and chlorophyll a during the regeneration of algal fragments of *G. lemaneiformis* cultured at normal salinity after 3 h and 20 h treatments with hypo-osmotic freshwater stress

(a) changes of contents of Chl. a; (b) changes of contents of phycoerythrin. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

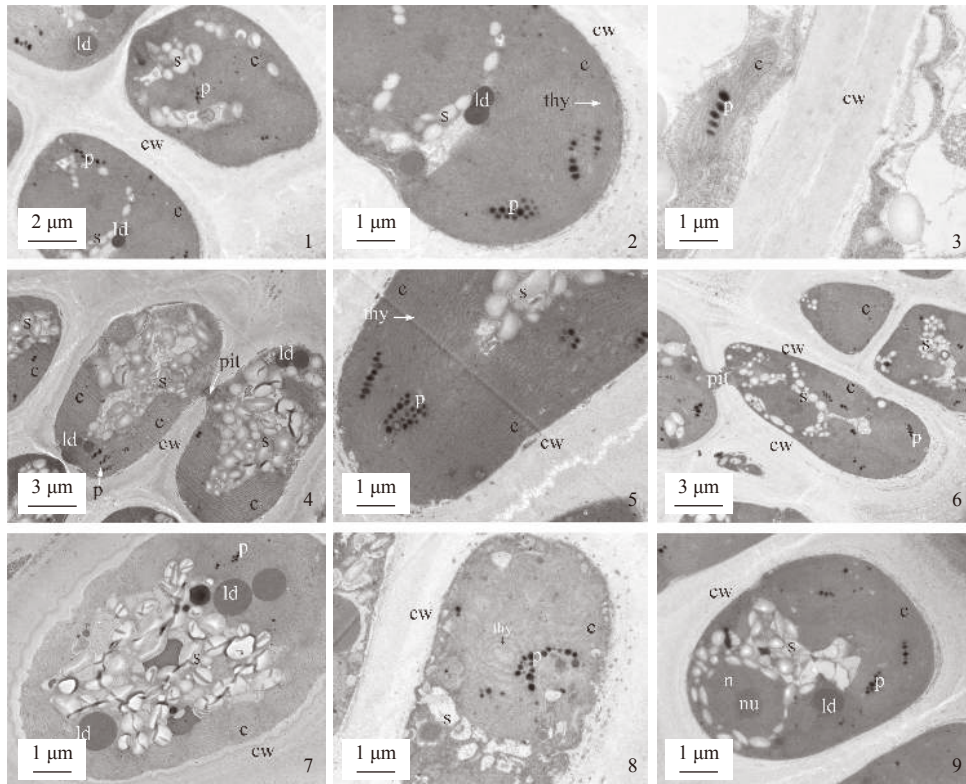
裂, 色素体形态不规则, 类囊体被破坏, 质体小球和脂质体数量减少 (图版 II -7~8)。

3 讨论

3.1 最佳胁迫时间与胁迫盐度组合的确定

本研究中, 经淡水 (盐度 0.000) 胁迫 3 h 的藻段未出现死亡, 转移至正常盐度培养液中培养

28 d 后表现出较多的出芽数和鲜重增加, 藻段再生效果明显, 这说明淡水 3 h 胁迫是龙须菜藻段的最佳胁迫盐度和时间组合。相关研究表明, 自然条件下栖息在潮间带区域的江蓠属海藻由于潮水的涨落, 藻体长期经历着低潮失水与高潮复水的盐度变化。在低潮时, 干露地带会遭受太阳暴晒, 藻体周围海水蒸发, 盐度升高, 藻体受到高盐胁迫。此时, 若恰遇暴雨, 藻体将受淡水冲刷,



图版 II 淡水胁迫 3 和 20 h 后及经过胁迫后恢复正常盐度培养的龙须菜藻段表皮细胞的超微结构

1~2. 培养第 1 天的对照组藻段表皮细胞, 含有完整的细胞壁、少量的红藻淀粉颗粒和质体小球、零星的脂质体、丰富的色素体; 3. 对照组藻段的细胞壁; 4~5. 淡水处理 3 h 藻段细胞内聚集着丰富的红藻淀粉、质体小球以及体积增大的脂质体; 6. 龙须菜藻段淡水处理 3 h 后再经过 2 d 的恢复培养, 细胞含有的红藻淀粉颗粒、质体小球减少, 脂质体逐渐消失; 7~8. 淡水胁迫 20 h 藻段细胞变形, 细胞膜受损、胞内细胞器排列混乱、有明显的肿胀现象; 9. 对照组藻段培养至第 3 天的细胞超微结构。cw. 细胞壁, c. 色素体, s. 红藻淀粉粒, p. 质体小球, ld. 脂质体, thy. 类囊体, n. 细胞核, nu. 核仁。

Plate II Ultrastructure of epidermal cell of algal fragments in *G. lemaneiformis* after 3 and 20 h treatments with hypo-osmotic freshwater and during rehydration with normal salinity culture medium

1-2. the epidermal cell of the first day cultured algal fragments in the control group contains complete cell walls, a small amount of floridean starch grains and plastoglobuli, sporadic lipid droplets and abundant chloroplasts; 3. enlarged view of the cell wall of epidermal cell in the control group; 4-5. abundant floridean starch grains, plastoglobuli and lipid droplets with increased volume are accumulated in the epidermal cells of algal fragments after freshwater stress for 3 h; 6. the freshwater treatment of algal fragments for 3 h, and then it undergoes two days of normal culture, floridean starch grains and plastoglobuli are reduced and lipid droplets in cytosol gradually disappeared; 7-8. after hypo-osmotic stress with freshwater for 20 hours, the epidermal cell is deformed, and its cell membrane is damaged, organelles are disordered and involve obvious swelling; 9. the ultrastructures of algal fragments in the control group until being cultured for three days. cw. cell wall, c. chloroplast, s. floridean starch grains, p. plastoglobuli, ld. lipid droplets, thy. thylakoid, n. nuclei, nu. nucleolus.

甚至会完全浸泡在淡水之中, 藻体又需耐受低渗胁迫。高潮复水后, 这些海藻又能在正常盐度下迅速恢复生长^[9-10]。这暗示着潮间带的海藻在一定时间范围内可能具有对低渗胁迫的适应能力, 且在这一时间内盐度改变并不会对这些藻类的生长产生不利的影响, 甚至有助于藻体的生长发育^[8-10]。但是淡水胁迫超过 20 h 的龙须菜藻段则全部死亡, 推测超长时间的低渗胁迫则会破坏藻体的渗透势平衡, 进而影响细胞的代谢反应和光合生理, 由此阻碍藻体的生长发育^[15]。另外, 由于本研究中使用的实验材料龙须菜主枝藻段在实验前已经去

除细小侧芽, 因此本实验结论不能代表藻体的整体情况。如果保留藻体侧芽, 推测藻段的耐受性将有所下降, 最适淡水胁迫时间可能小于 3 h, 具体处理时间仍需进一步验证。

3.2 短时淡水胁迫对龙须菜藻段切段再生过程中光合生理的影响

在植物中, 光合作用不仅是将光能转化为化学能的必要过程, 且光合反应中心还是一种环境传感器, 当植物受到胁迫时最先表现在光合性能上^[16-17]。藻类光系统 PS II 的最大光化学产量 (F_v/F_m)

Fm) 是植物光合性能的敏感指标, 当植物受到胁迫时会显著下降^[18]。本研究中, 虽然淡水 (盐度 0.000) 胁迫不超过 3 h 的龙须菜藻段的 *Fv/Fm* 降低, 但与对照组相差不大, 转移至正常盐度培养液培养 2 d 内就可以迅速恢复至对照组水平, 这表明短时低渗胁迫对 *Fv/Fm* 的影响较小, 藻体对低渗的耐受能力较强。在培养后期藻段的 *Fv/Fm* 甚至高于对照组, 可能是前期的低渗胁迫并没有对龙须菜藻段产生不可逆的损伤, 藻段细胞为快速适应低盐环境而提高了细胞的代谢水平, 光合性能增强。光合色素作为红藻进行光合作用的物质基础, 能够吸收、传递和转换光能, 其光能传递途径依次为藻胆蛋白→类胡萝卜素→叶绿素。在光合作用过程中叶绿素 *a*、类胡萝卜素及藻胆蛋白都直接或间接参与光反应, 因此其含量和组成均会影响藻体的光合速率^[19]。本研究中, 龙须菜藻段经 3 h 淡水胁迫后, 与光系统 PS II 紧密相关的 PE^[20] 含量下降, 但恢复至正常盐度培养后持续升高, 最终高于对照组。这提示着龙须菜切段再生过程中藻段细胞一直保持较高的光子捕获效率, 且经过短时淡水胁迫的龙须菜藻段较未作处理的藻段具有更高的光子捕获效率。Chl.*a* 与光系统 PS I 紧密相关^[20], 其含量在龙须菜切段再生过程中表现出与 PE 相类似的变化趋势, 可能是淡水胁迫在短时间内限制了藻段的光合效率, 但是藻段被转移至正常盐度下培养后加速了 Chl.*a* 的合成, 使藻体各项机能逐渐恢复正常。另外, 色素蛋白合成量的增加在提高藻体光合反应速率的同时也可能有助于清除胞内产生的氧自由基, 以减少细胞的损伤^[21]。

相关研究表明, 短时间的盐度胁迫不会对大型海藻的光合作用产生不利影响。徐涵等^[22] 研究认为, 短期的高盐胁迫会显著影响脆江蓠 (*G. chouae*) 的各项光合生理指标, 但继续经过 24 h 正常盐度培养后基本可恢复至对照组水平。Gao 等^[5] 研究表明, 短时低渗处理不会抑制羊栖菜的光合活性, 经过淡水处理的藻体的光合活性甚至获得增强。Wang 等^[6] 研究表明, 坛紫菜叶状体能够适应盐度 5 的低盐环境, 且藻株的 *Fv/Fm* 无明显变化, 而经淡水胁迫再复水后藻株的 *Fv/Fm* 随胁迫时间显著下降, 叶片受到不可逆的功能损伤。类似的, 本研究中淡水胁迫 20 h 后龙须菜藻段的 *Fv/Fm* 迅速降低至 0, PE、Chl.*a* 含量明显低于对照组, 且在后期的恢复培养中不断下降。推测长

时间的淡水胁迫会对龙须菜藻段的光合电子传递产生影响, 可能是长时间的淡水胁迫破坏了藻体的光合色素合成途径, 光系统 PS II 反应中心受到不可逆的损伤, 光合作用原初化学反应被抑制^[23]。

3.3 淡水胁迫复水前后细胞超微结构的变化

生命体细胞的细胞器结构与功能是相适应的。色素体是大型海藻进行光合作用的主要场所, 色素体被膜之内存在着由膜层形成的类囊体, 用于执行光能的吸收与转化^[24]。本研究中, 龙须菜表皮层细胞充满色素体, 推断龙须菜具有较强的光合能力。红藻淀粉颗粒是储存光合产物碳水化合物的细胞器^[25], 质体小球具有储存脂类物质、类胡萝卜素、维生素 K₁ 和 E 的功能^[26], 脂质体则可提供质体再生所需质膜或为代谢活动提供能量^[27]。此外, 藻类色素体内嵌合的蛋白核发挥了光合功能和 CO₂ 浓缩机制 (CCM)^[28]。细胞超微结构的变化是一个复杂的动态过程, 其根本原因是藻体为了适应环境, 以维持逆境下的生理平衡。盐度胁迫主要是通过浓度差影响渗透势, 导致细胞内外离子失衡, 从而对细胞器产生破坏^[29]。本研究中, 经淡水 3 h 胁迫的藻段细胞内的红藻淀粉颗粒密度显著增加, 质体小球数量增多, 脂质体体积增大。这说明短时间淡水胁迫后龙须菜胞内大量的红藻淀粉颗粒、质体小球等细胞器可能参与了应对不利的胁迫环境^[30]。且当胁迫停止后转移至正常盐度培养, 细胞内堆积的红藻淀粉和质体小球可为藻段的生长发育提供丰富的能量物质, 体积增大的脂质体可以作为切段再生过程中胞内的质体再生所需的中性脂, 并维持质体氧化还原状态的稳态^[27, 31]。因此短时淡水胁迫后的藻段再生较对照组表现出明显的生长优势。短时淡水胁迫后转移至正常盐度培养 2 d, 胞内的红藻淀粉颗粒密度降低、质体小球减少、脂质体逐渐消失, 这提示着能量物质的分解或动员有利于促进龙须菜藻段的出芽生长。而淡水胁迫 20 h, 藻段细胞长时间过度吸水, 细胞结构和膜完整性被破坏, 细胞器遭受永久性损伤。这说明过度的低渗胁迫则会抑制藻类细胞的代谢反应和光合生理, 这与对提克江蓠和坛紫菜等的研究结果相似^[6, 8]。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Kirst G O. Salinity tolerance of eukaryotic marine

- algae[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1990, 41: 21-53.
- [2] Martins I, Oliveira J M, Flindt M R, *et al.* The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal)[J]. *Acta Oecologica*, 1999, 20(4): 259-265.
- [3] 马兴宇, 刘福利, 梁洲瑞, 等. pH与盐度胁迫对鼠尾藻光合作用及抗氧化系统的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(2): 208-214.
- Ma X Y, Liu F L, Liang Z R, *et al.* Effects of pH and salinity stress on photosynthesis and antioxidant system of *Sargassum thunbergii*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(2): 208-214 (in Chinese).
- [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.
- Feng C, Lu X Z, Yu W G. Biochemical and physiological effects of adversity stress on *Porphyra yezoensis* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004(3): 22-26 (in Chinese).
- [5] Gao S, Huan L, Lu X P, *et al.* Photosynthetic responses of the low intertidal macroalga *Sargassum fusiforme* (Sargassaceae) to saline stress[J]. *Photosynthetica*, 2016, 54(3): 430-437.
- [6] Wang W L, Chen T X, Xu Y, *et al.* Investigating the mechanisms underlying the hyposaline tolerance of intertidal seaweed, *Pyropia haitanensis*[J]. *Algal Research*, 2020, 47: 101886.
- [7] He L H, Wu M, Qain P Y, *et al.* Effects of co-culture and salinity on the growth and agar yield of *Gracilaria tenuistipitata* var *liui* Zhang *et* Xia[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2002, 20(4): 365-370.
- [8] Lapointe B E, Rice D L, Lawrence J M. Responses of photosynthesis, respiration, growth and cellular constituents to hypo-osmotic shock in the red alga *Gracilaria tikvahiae*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1984, 77(1): 127-132.
- [9] Weinberger F, Buchholz B, Karez R, *et al.* The invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla* in the Baltic Sea: adaptation to brackish water may compensate for light limitation[J]. *Aquatic Biology*, 2008, 3(3): 251-264.
- [10] Kim J K, Yarish C, Pereira R. Tolerances to hypo-osmotic and temperature stresses in native and invasive species of *Gracilaria* (Rhodophyta)[J]. *Phycologia*, 2016, 55(3): 257-264.
- [11] 周文发. 一种龙须菜的养殖方法: 中国, 105210843A [P]. 2016-01-06.
- Zhou W F. Method for cultivating *Gracilariopsis lemaneiformis* : CN, 105210843A[P]. 2016-01-06 (in Chinese).
- [12] 全国水产技术推广总站. 2015 水产新品种推广指南 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 320-331.
- National Fisheries Technology Extension Center. Promotion of new varieties of aquatic guide in 2015[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 320-331 (in Chinese).
- [13] Provasoli L. Media and prospects for the cultivation of marine algae[M]//Watanabe H, Hattori A. Cultures and collections of algae. Hakone: Japanese Society of Plant Physiology, 1968: 63-75.
- [14] Sampath-Wiley P, Neefus C D. An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phycoyanin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2007, 19(2): 123-129.
- [15] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2002, 25(2): 239-250.
- [16] Pfannschmidt T. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(1): 33-41.
- [17] Bräutigam K, Dietzel L, Kleine T, *et al.* Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(9): 2715-2732.
- [18] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(345): 659-668.
- [19] Kato M, Aruga Y. Comparative studies on the growth and photosynthesis of the pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* in laboratory culture[J]. *Japanese Journal of Phycology*, 1984, 32: 333-347.
- [20] Gantt E. Pigmentation and photoacclimation[M]//Cole K M, Sheath R G. Biology of the red algae. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 203-219.

- [21] 周站平, 陈秀兰, 陈超, 等. 藻胆蛋白脱辅基蛋白对其抗氧化活性的影响[J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 77-81.
Zhou Z P, Chen X L, Chen C, *et al.* Effect of apoprotein on antioxidant activity of phycobiliproteins[J]. Marine Sciences, 2003, 27(5): 77-81 (in Chinese).
- [22] 徐涵, 李加琦, 薛素燕, 等. 短时间高盐处理对脆江蕨光合生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2019, 26(4): 722-728.
Xu H, Li J Q, Xue S Y, *et al.* Effects of a short period of high-salinity stress on photosynthetic characteristics of *Gracilaria chouae*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(4): 722-728 (in Chinese).
- [23] Masojídek J, Torzillo G, Kopecký J, *et al.* Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress[J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12(3-5): 417-426.
- [24] Poeschel C M. Cell structure[M]//Cole K M, Sheath R G. Biology of the red algae. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 7-42.
- [25] Fournet I, Zinoun M, Deslandes E, *et al.* Floridean starch and carrageenan contents as responses of the red alga *Solieria chordalis* to culture conditions[J]. European Journal of Phycology, 1999, 34(2): 125-130.
- [26] Staehelin L A. Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes[M]//Staehelin L A, Arntzen G J. Photosynthetic membranes and light harvesting systems. Berlin, Heidelberg: Springer, 1986: 1-84.
- [27] Walther T C, Farese Jr R V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism[J]. Annual Review of Biochemistry, 2012, 81: 687-714.
- [28] Ramazanov Z, Rawat M, Henk M C, *et al.* The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Planta, 1994, 195(2): 210-216.
- [29] 苏芳莉, 李海福, 陈曦, 等. 盐胁迫对芦苇细胞超微结构的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(11): 2216-2221.
Su F L, Li H F, Chen X, *et al.* Effect of salt stress on the ultrastructure of reed cell[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(11): 2216-2221 (in Chinese).
- [30] dos Santos R W, Schmidt É C, Bouzon Z L. Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium[J]. Protoplasma, 2013, 250(1): 297-305.
- [31] van Wijk K J, Kessler F. Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation[J]. Annual Review of Plant Biology, 2017, 68: 253-289.

Effects of different hypo-osmotic stress treatments on budding regeneration and photosynthetic physiology of algal fragments in *Gracilariopsis lemaneiformis*

SHE Tingting^{1,2}, ZHONG Chenhui¹, LIN Qi^{1*}, TANG Longchen¹,
HUAN Zhongyan¹, ZHOU Wenfa³

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province,
Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Putian Zhengyang Fisheries Development Co., Ltd., Putian 351100, China)

Abstract: In order to explore the physiological acclimation of *Gracilariopsis lemaneiformis* to hypo-osmotic stress, in this study, the morphogenesis, photosynthetic physiological responses and ultrastructure changes of algal fragments from the main branches after being cultivated at combinations of four different low salinities (S 19.500, S 13.000, S 6.500 and S 0.000) and for five different periods (1, 3, 6, 12 and 20 h) and then cultured at normal salinity for 28 days were analysed. The results showed that less than 12 h hypo-osmotic stress treatment could promote the regeneration of buds in algal fragments of *G. lemaneiformis*. After 3 hours of hypo-osmotic stress with freshwater, increased fresh weight and number of regenerated buds obviously emerged in these fragments during normal salinity of culture. The relative growth rate (RGR) of algal fragments treated with freshwater for 3 hours was 0.91%/d, which was 61.27% higher than that of the control group. Furthermore, 1 h or 3 h hypo-osmotic stress with freshwater had no significant negative effects on the photosynthetic physiological responses of algal fragments, manifesting their photosynthetic activity was stimulated after restoration to seawater at normal salinity. It suggested that the cell metabolic activity of algal fragments might be enhanced after hypo-osmotic stress with freshwater. Ultrastructural observations showed that abundant floridean starch grains and plastoglobuli, sporadic lipid droplets emerged in the epidermal cell after 3 hours of hypo-osmotic stress with freshwater which would provide metabolic energy and membrane components for the algal fragments upon budding regeneration. On the contrary, long-term hypo-osmotic stress with freshwater caused irreversible structural damages to the organelles such as chloroplasts and thylakoids. These results indicated that the 3-hour treatment of hypo-osmotic stress with freshwater for algal fragments from main branches would stimulate their budding regeneration. This study would provide technical reference for rapid asexual propagations of *G. lemaneiformis* seedlings.

Key words: *Gracilariopsis lemaneiformis*; hypo-osmotic stress; fragment regeneration; photosynthetic physiology; ultrastructure

Corresponding author: LIN Qi. E-mail: xmqlin@sina.com

Funding projects: China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-50); Special Funds for Marine and Fishery Structure Adjustment of Fujian Province (2021HYJG03); Science and Technology Program of Fujian Province (2019NJJ009)