

高温胁迫下坛紫菜(*Pyropia haitanensis*) 对无机碳的利用*

王淑刚^{1,2} 杨锐^{1,2} 周新倩^{1,2} 宋丹丹^{1,2}
孙雪^{1,2} 骆其君^{1,2}

(1. 宁波大学海洋学院 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211;
2. 宁波大学海洋生物工程重点实验室 宁波 315211)

摘要 采用藻类二氧化碳浓缩机制(CO₂ Concentrating Mechanism, CCM)关键酶胞外碳酸酐酶(periplasmic Carbonic Anhydrase, pCA)的抑制剂 AZ (acetazolamide)、DIDS (4'4'-diisothiocyanato-silbene-2, 2-disulfonic acid)和 SITS (4-acetamido-4'-isothiocyano-2, 2'-stibene-disulfonate)等对不同生长阶段的坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)叶状体进行处理, 利用 pH-drift 技术研究了高温胁迫下坛紫菜利用无机碳的特点。结果表明: (1) 坛紫菜主要依赖 pCA 利用 HCO₃⁻, 且能力较强; (2) 高温抑制坛紫菜吸收利用无机碳, 温度越高影响越严重; (3) 坛紫菜未性成熟组叶片对无机碳的利用能力远大于成熟组, 但对高温胁迫的抗性低于成熟组。高温造成藻体细胞膜系统损伤和脂肪酸成分变化或许是高温抑制藻类 CCM 的原因之一。

关键词 坛紫菜; 高温胁迫; 二氧化碳浓缩机制(CCM)

中图分类号 Q946

大部分海藻, 尤其是处于光照比较充分的上层浮游藻类, 具有利用 HCO₃⁻ 的能力, 以增强光合作用并缓解由于 CO₂ 供应不足而带来的压力, 逐渐进化形成碳浓缩机制(CO₂ Concentrating Mechanism, CCM)(Raven *et al.*, 2008)。Larsson 等(1999)报道 HCO₃⁻ 的利用有两种机制: 一是通过膜阴离子交换蛋白直接将 HCO₃⁻ 转运到胞内, 在胞内经碳酸酐酶(CA)水解成 CO₂ 被固定; 另一种是在胞外碳酸酐酶(periplasmic Carbonic Anhydrase, pCA)催化下, HCO₃⁻ 水解成 CO₂ 通过扩散作用进入细胞。pCA 催化的 HCO₃⁻ 利用方式是大型海藻无机碳利用的最普遍和最基本的方式(Mercado *et al.*, 1999)。在绿藻石莼属、红藻紫菜属、江蓠属、褐藻墨角藻属及海带属藻类中均发现 CCM (Johnston *et al.*, 1992; Axelsson *et al.*, 1995; Zou *et al.*,

2004)。研究表明海藻一方面主要依赖 pCA 对海水中的 HCO₃⁻ 进行水解, 无机碳以游离 CO₂ 形式扩散进入胞内, 通过 RUBP 羧化/加氧酶加以固定; 另一方面也具有依赖于膜上 Na⁺/HCO₃⁻ 协同转运系统直接吸收 HCO₃⁻ 的能力(岳国峰等, 2000)。胞内 CA 一般分布在胞质及叶绿体中(Nimer *et al.*, 1998), 叶绿体内的 CA 主要将 HCO₃⁻ 转化成 CO₂ 以供 Rubisco 催化 1, 5-二磷酸核酮糖结合生成两个 3-磷酸甘油酸分子(Wang *et al.*, 2011), 胞质中存在大量 CA, 由核糖体合成后, 聚集在一起, 形成 CA 库, 不断向外运输补充代谢的胞外 CA。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)隶属红藻门(Rhodophyta)、红藻纲(Bangiophyceae)、红毛菜亚纲(Bangiophycidae)、红毛菜目(Bangiales)、红毛菜科

* 国家自然科学基金项目, 40776077 号; 浙江省自然科学基金项目, LY12D06003 号; 宁波市海洋藻类资源高效开发利用创新团队项目, 2011B81007 号; 浙江省海水养殖科技创新团队项目, 2010R50025 号; 浙江省海洋生物技术产业科技创新团队项目, 2010R50029 号。王淑刚, 硕士, E-mail: 780846342@qq.com

通讯作者: 杨锐, 博士, 副研究员, E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

收稿日期: 2013-02-17, 收修改稿日期: 2013-05-25

(Bangiaceae)、紫菜属(*Pyropia*)。坛紫菜海区养殖自每年9月份开始,生长盛期在12月到翌年1月,最长生产期可延至翌年4月。近年来受到海水养殖无节制扩大和工业发展造成海水污染以及气候变化等自然和人为因素的影响,海区环境日益恶化,成为逆境。此外,在浙闽海区,每年10—11月期间会出现高温回暖天气,俗称“小阳春”,此时养殖坛紫菜经常会出现大量烂菜现象,造成巨大损失。了解紫菜对高温的应激生理反应和代谢机理,尤其是与生长代谢密切相关的CCM机制,是研究藻类生长规律,并指导紫菜栽培生产及减灾防病的当务之急。虽然已有一些关于紫菜无机碳吸收利用机制(岳国峰等,2000;骆其君等,2002)的报道,但关于高温对坛紫菜光合无机碳利用的影响尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料与药品

本实验采集了浙江省宁波象山南田塘海域养殖的坛紫菜 ME-05 不同年龄组的 2 组叶状体。其中组采集于 2004 年 11 月,叶片细、薄,未发现果孢子囊群或精子囊群等性组织,为未成熟组;组采集于 2005 年 3 月,叶片宽、后,叶片边缘有大量成熟的果孢子囊群或精子囊群,为性成熟组。坛紫菜采集后,清洗阴干,于 -20°C 冰箱保存。实验前用消毒海水复苏 24h。培养用的海水是经脱脂棉过滤后,煮沸消毒,按 1:1000 添加营养母液(10mg/L KNO_3 和 0.4mg/L KH_2PO_4)的营养海水,盐度为 27。

所用的抑制剂 AZ、DIDS 和 SITS 均购自 Sigma 公司;药品硫代巴比妥酸(TBA)购自国药集团化学试剂有限公司;分析纯三氯乙酸(TCA)购自上海凌峰化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 材料预处理 将冷冻保存的坛紫菜于室温经海水复苏,挑选状态良好的叶状体,在消毒海水中擦洗 3 次。用 0.7% KI 浸泡 10min,再用消毒海水多次清洗,选择多个个体,按叶片不同部位打成直径约为 0.6cm 的圆片,混合备用。

1.2.2 抑制剂处理和热激处理 抑制剂处理组:随机称取上述处理的藻样(0.3 ± 0.01)g(鲜重)放置于含有 100mL 营养海水(pH 8.2)的三角烧瓶(容量为 100mL)中,加入抑制剂,作用浓度分别为:AZ (100 μmol/L)、DIDS (500 μmol/L)、SITS (1mmol/L),用封口膜密封。

热激处理:称取上述处理的藻样(0.3 ± 0.01)g(鲜重)放置于含有 100mL 营养海水(pH 8.2)的三角烧瓶(容量为 100mL)中,密封后把瓶子放在温度分别为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 的热水中预先水浴处理 2h。

抑制剂和热激双重作用:称取上述处理的藻样(0.3 ± 0.01)g(鲜重)放置于含有 100mL 营养海水(pH 8.2)的三角烧瓶(容量为 100mL)中,先把装有紫菜的密封瓶子放在温度分别为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中处理 2h,再加入抑制剂 AZ,用封口膜密封。

对照组:称取(0.3 ± 0.01)g(鲜重)藻样放置于含有 100mL 营养海水(pH 8.2)的三角烧瓶(容量为 100mL)中,用封口膜密封。

将经上述处理的紫菜三角烧瓶放置于温度为 20 $^{\circ}\text{C}$,光照强度为 15—18 μmol/(m² · s)的光照培养箱中,持续光照培养。每隔 2h 用梅特勒 SevenEasy pH 计检测小瓶中 pH 的变化,进行无机碳浓度变化的测定参考(邹定辉等,2001)。

1.2.3 碱度(ALK)的测定 本实验采用酸滴定法测定碱度(ALK):用吸量管准确吸取营养海水 50mL 于三角瓶中,加入甲基红—亚甲基蓝指示剂 10 滴。以 0.023mol/L HCl (经标准 Na_2CO_3 溶液标定)溶液滴定至溶液由浅绿色变成浅紫红色后,将溶液加热到 60—70 $^{\circ}\text{C}$ 并不断摇动,当溶液又变成淡绿色后,冷却到室温再继续滴入 HCl 溶液(边滴定边剧烈摇动),直至溶液呈浅紫红色后,并在 3min 内稳定不变为滴定终点。记录消耗的 HCl 溶液体积。

1.2.4 坛紫菜超微结构观察 将对照组与 35 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 30min 后的适量坛紫菜样品及正常生长的适量坛紫菜样品,固定、超薄切片,经透射电子显微镜观察拍照。

1.2.5 无机碳的浓度计算 pH 计经标定后测 pH 值,碳酸碱度(Calk)和无机碳浓度参考岳国峰等(2000)。

本实验采用酸滴定法测定碱度(ALK),测得和计算所得的数据采用 SPSS 软件进行统计分析(Setimela *et al*, 2005)。

1.2.6 脂肪酸 GC-MC 检测 Bligh-Dyer 法提取总脂:取 0.5g 左右藻片,20mL 离心管加入 2.0mL CHCl_3 、4.0mL CH_3OH 和 1.1mL 左右水,使 CHCl_3 : CH_3OH : H_2O = 1 : 2 : 0.8,超声波提取 2min,剧烈振荡 5min; 3500r/min 离心;上层液加入 125mL 分液漏斗,下层加入 7.6mL CHCl_3 : CH_3OH : H_2O = 1 : 2 : 0.8 混合液,剧烈振荡 5min,超声提取 2min,重复

抽提 3 次, 向分液漏斗中加 6mL CHCl_3 , 使 CHCl_3 CH_3OH $\text{H}_2\text{O} = 2:2:0.8$, 振荡 30s; 加 6mL 饱和盐水, 使 CHCl_3 CH_3OH $\text{H}_2\text{O} = 2:2:1.8$, 振荡 30s 分层, 下层氯仿层旋转蒸发到恒重, 充氮气冷冻保存。如样品数量少, 可按比例降低用量。

皂化: 总脂加 2mL 5%—6% KOH, 甲醇水(V/V = 4:1), 冲氮气 1min, 80℃皂化 2h。皂化液转移到 15mL 离心管中, 用盐酸调 pH<1, 加饱和氯化钠溶液 1mL, 用 2mL 氯仿:正己烷(V/V = 1:4)洗样品瓶合并到离心管中, 涡旋振荡, 3000r/min 离心, 用吸管把上层液吸到另一个离心管中, 再重复两次, 合并提取液, 得到脂肪酸。

脂肪酸甲酯化: 提取液 2mL 重蒸水洗一次, 准确移取上层液蒸干, 加入 0.5mL BF₃ 甲醇液, 冲氮气 1min, 60℃水浴甲酯化 1h。冷却, 移到 15mL 离心管中, 加入 1mL 饱和 NaCl, 原样品瓶用 2mL 正己烷洗到离心管中, 涡旋振荡, 3000r/min 离心, 到吸管把上层液吸到另一个尖头离心管中, 再重复两次, 合并提取液, 加入 1g 无水 Na₂SO₄, 过夜, 准确移取上层液, 蒸干, 1mL 正己烷定容到 1.5mL 样品瓶, 经气相色谱质谱(GC-MS)分析仪(SHIMADZU 公司, QP2010), 30m × 0.25mm × 0.25μm SPB-50 色谱柱(美国 SUPELCO 公司)检测。

2 实验结果

2.1 各种抑制剂对坛紫菜吸收无机碳的影响

本实验所用材料为 1 组坛紫菜。从图 1 可见, 各组别的 pH 在前 10h 内变化较大, 22h 到 24h 基本达到平缓, 直至 pH 补偿点。较其它抑制组而言, 对照组 pH 值上升速度最快, 其利用无机碳的量最大。图 2 显示, 各组别利用无机碳的能力差异极显著($P < 0.01$)。添加 SITS 组虽比添加 DIDS 组的受抑制程度高些, 但二者均比 AZ 组低得多。AZ 是三种抑制剂中对坛紫菜无机碳吸收抑制效果最强的。四个试验组利用无机碳的能力从大到小依次为: 对照>DIDS>SITS>AZ 抑制组。图 3 描述了三种抑制剂抑制率的变化情况。三者的抑制效果随着作用时间的延长而明显减弱。AZ 在 4h 时有 86% 的抑制率, 到了 24h 仅有 39% 的抑制率; SITS 在 4h 时的抑制率是 55%, 到 24h 时降至 21%; DIDS 开始有 27% 的抑制率, 到最后几乎无抑制作用。

2.2 不同组别坛紫菜在不同温度下吸收无机碳能力的比较

2.2.1 同一温度下不同组别坛紫菜对无机碳的吸收

20℃培养条件下, 不同年龄组坛紫菜叶状体吸收无机碳的能力差异高度显著($F > F_{0.05}$, $P < 0.05$)。图 4 显示了前 10h 及 27h 两组的 pH 的变化趋势。27h 后二者

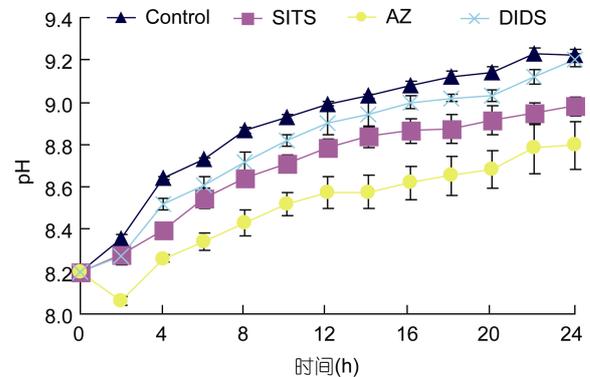


图 1 SITS、AZ 及 DIDS 等抑制剂对坛紫菜培养体系 pH 的影响

Fig.1 pH variation of *P. haitanensis* culture systems inhibited by SITS, AZ and DIDS

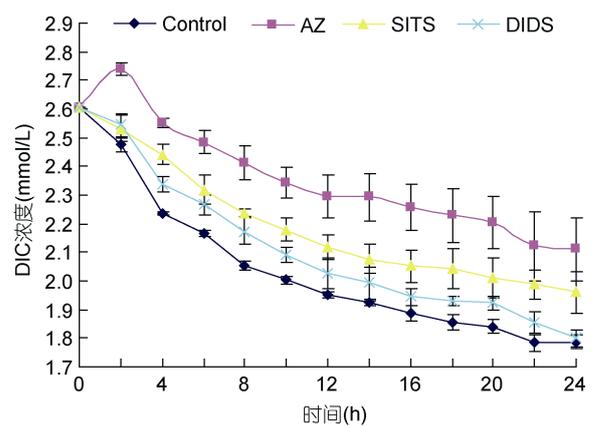


图 2 SITS、AZ 及 DIDS 等抑制剂对坛紫菜培养体系 DIC 浓度的影响

Fig.2 DIC concentration of *P. haitanensis* culture systems inhibited by SITS, AZ and DIDS

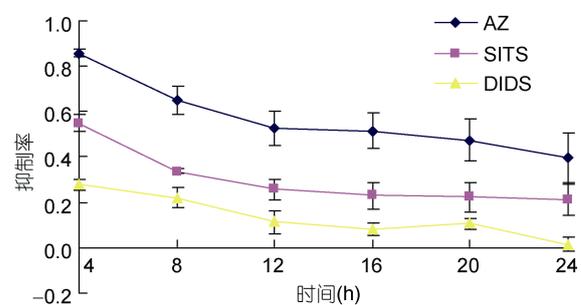


图 3 在 AZ、SITS 和 DIDS 处理下, 坛紫菜对无机碳利用的抑制率

Fig.3 The inhibition ratio of inorganic carbon utilization in *P. haitanensis* treated by AZ, SITS and DIDS

达到无机碳补偿点: 组达 9.65, 而 组仅为 9.3 左右, 说明未性成熟的 组利用无机碳的能力远远大于性成熟的 组。

2.2.2 不同温度下不同组别坛紫菜对无机碳的吸收
不同温度处理对两组坛紫菜 DIC 吸收的影响不同(图 5、图 6)。 组坛紫菜经 35℃处理后未能存活, 故未能得到其 pH 值及 DIC 浓度变化曲线。除 35℃处理组外, 其余各组的 DIC 吸收高峰期集中在前 4h。25℃和

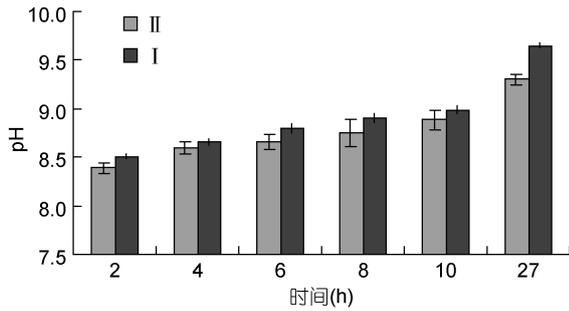


图 4 20℃下两组坛紫菜培养体系中 pH 变化

Fig.4 pH variation in two *P. haitanensis* groups culture systems under 20°C

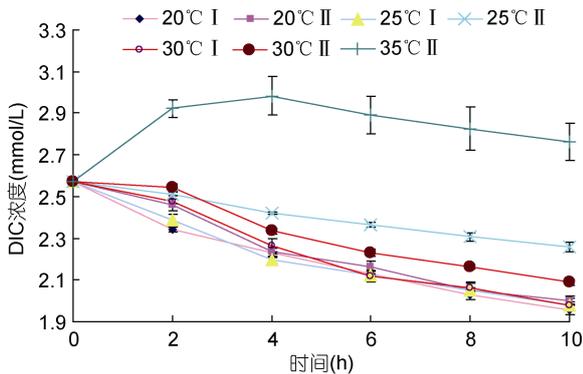


图 5 两组坛紫菜在高温处理下 DIC 浓度变化

Fig.5 DIC concentrations of two *P. haitanensis* groups under heat treatments

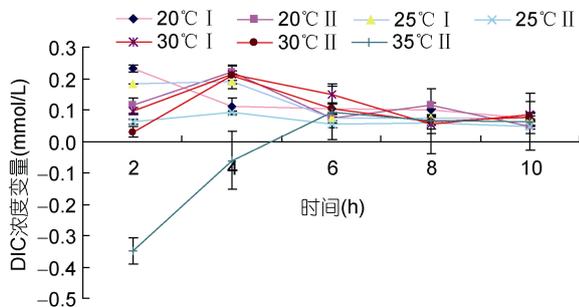


图 6 高温处理下两组坛紫菜每 2h 吸收 DIC 的浓度变量

Fig.6 The variation of DIC concentration of two *P. haitanensis* groups under heat treatments in every two hours

30℃处理均显著抑制 组坛紫菜对 DIC 的吸收 ($P<0.05$), 温度越高抑制作用越强。对 组而言, 仅 35℃处理对 DIC 浓度的影响较对照显著($P<0.05$); 尽管 30℃处理组在前 2h 内吸收 DIC 能力较差, 但至 4h 时达到高峰, 这表明该组坛紫菜抗高温范围与能力均高于 组。然而, 在 35℃处理下 组的环境无机碳浓度不降反升, 提示 35℃高温有可能破坏了坛紫菜的碳浓缩机制。

2.3 热激对胞外碳酸酐酶(CA)的影响

组坛紫菜对 DIC 的利用从 20℃对照、30℃、30℃+AZ、20℃+AZ 到 35℃依次降低, 差异显著($P<0.05$), 说明高温抑制坛紫菜无机碳的吸收利用。从图 7 中可见 30℃培养时的无机碳浓度一直高于 20℃培养的体系, 说明高温会降低坛紫菜对无机碳的利用效率, 温度越高, 影响越严重。当热激温度高达 35℃, 其 DIC 利用大幅度下降, 而且环境中的 DIC 浓度则在短时间内升高, 继而才呈现下降的趋势。参照其它试验结果发现, 35℃对于坛紫菜是一个极端高温, 细胞膜结构破损导致胞内无机碳等内容物外泄, 可能是造成这一现象的原因。在 30℃内 AZ 对坛紫菜利用 DIC 依然具有一定的抑制作用, 这种抑制作用随温度升高而减弱。

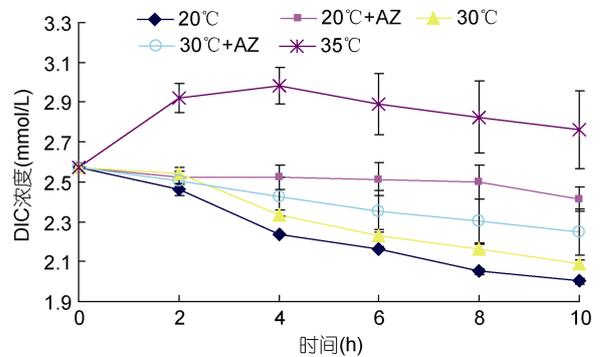


图 7 高温胁迫与 AZ 抑制对坛紫菜 DIC 利用的影响

Fig.7 Utilization of DIC of *P. haitanensis* under heat treatment and AZ inhibition

AZ 是胞外碳酸酐酶的特异性抑制剂, 本研究利用 AZ 研究热激对 组坛紫菜叶状体无机碳利用的影响。结果显示(图 8): 随着处理温度的升高, AZ 对坛紫菜的抑制作用明显下降。20℃培养组受 AZ 抑制率达 73%, 而经过 25℃和 30℃处理的试验组的抑制率分别为 39%和 32%。

2.4 热激处理损伤坛紫菜的膜系统

热激处理前坛紫菜细胞结构完整, 各细胞器轮

廓清晰, 细胞质均匀、内无大的空泡, 线粒体和色素体膜层结构排列紧密规则(图 9a、c)。35℃热激处理 30min 后坛紫菜细胞内出现较大空泡, 线粒体结构弥散, 数量变少(图 9b); 色素体边界模糊, 膜片层结构松散, 内现大量膨泡(图 9d)。这表明 35℃热激对坛紫菜细胞结构, 尤其是膜系统的损伤非常明显, 对色素体及线粒体等细胞器伤害尤为严重。

2.5 膜脂变化

紫菜总脂经皂化甲脂化, 经 GC-MS 检测, 利用 LabSolutions 的 GC/MS Solution 软件分析其主要脂肪酸组成结果(表 1)。室温培养时, 坛紫菜叶状体脂肪酸主要由棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(C18:2)、花生四烯酸(C20:4)、C20:5 脂肪酸组成。当 30℃处理 1.5h 时, 棕榈酸(16:0)含量明显上升, 从 20.01% 增加到 30.07%, 油酸(18:1)、花生四烯酸(C20:4)、C20:5 含量也有增加的趋势。当 35℃处理

1.5h 时, 棕榈酸(16:0)、C20:5 含量比室温时高, 比 30℃处理 1.5h 时略低, 油酸(18:1)、亚油酸(C18:2)、花生

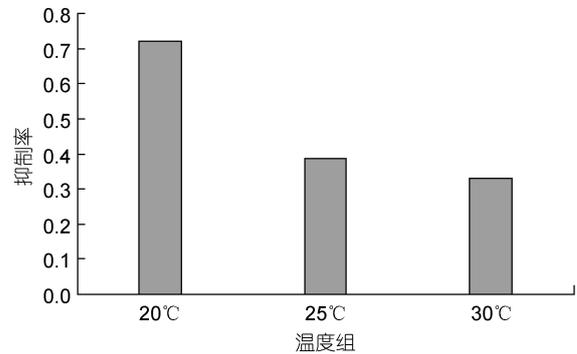


图 8 在 20℃、25℃、30℃ 6h 后 AZ 对坛紫菜 DIC 利用抑制率比较

Fig.8 Inhibition ratios of inorganic carbon utilization caused by AZ in *P. haitanensis* group cultured under 20℃, 25℃, 30℃ for 6h

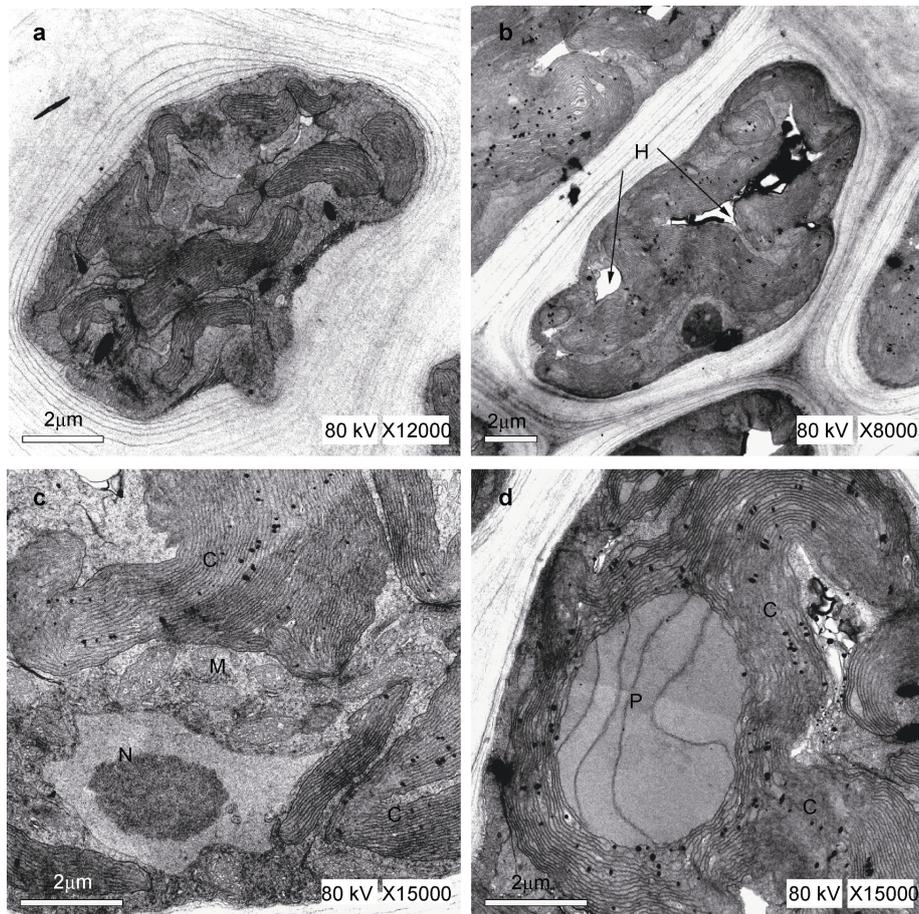


图 9 热激处理前后坛紫菜细胞超微结构

Fig.9 Ultrastructure of *P. haitanensis* thalli before and after heat treatment

a、c 显示对照组坛紫菜细胞正常的超微结构, 细胞内膜、色素体和线粒体等细胞器结构完整, 边界明显。b、d 显示热激处理后坛紫菜细胞内出现大量空洞, 细胞线粒体以及色素体边界模糊, 膜结构松散, 内现大量膨泡。M. 线粒体; N. 细胞核; C. 色素体; P. 蛋白核; H. 细胞内空泡

表 1 高温胁迫处理后坛紫菜的主要脂肪酸组成
Tab.1 Major aliphatic acids composition of *P. haitanensis* after heat stress

主要脂肪酸占 总脂含量(%)	处理方法			
	室温	30°C 1.5h	35°C 1.5h	40°C 1.5h
C16	20.01	30.70	28.56	27.79
C18	4.25	3.31	0.96	0.92
C18:1	4.15	4.37	5.11	4.76
C18:2	2.81	2.99	3.39	3.57
C20:1	—	—	3.35	3.29
C20:4	10.21	11.78	12.66	10.26
C20:5	34.35	35.26	34.72	36.65
饱和脂肪酸	24.26	34.01	29.62	28.71
单不饱和脂肪酸	4.15	4.37	8.46	8.05

四烯酸(C20:4)含量比 30°C 处理 1.5h 高, 而硬脂酸(18:0)含量较低, 出现了 C20:1。40°C 处理 1.5h, 亚油酸(C18:2)、C20:5 含量高于其它处理, 棕榈酸(16:0)、油酸(18:1)、花生四烯酸(C20:4)含量比室温下有所上升, 而比 30°C 和 35°C 处理略低。总的来说, 随温度上升, 饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸含量有增加的趋势。30°C 处理 1.5h, 饱和脂肪酸含量最大; 35°C 处理 1.5h 时, 单不饱和脂肪酸含量最高。

3 讨论

3.1 坛紫菜叶状体 CCM 的主要特点

3.1.1 坛紫菜叶状体具有利用 HCO_3^- 的能力 许多研究表明, 大多数海产红藻仅具有很弱甚至没有利用 HCO_3^- 的能力。当 pH=9 时, 海水中的 CO_2 浓度接近于零, 那些只能以 CO_2 为碳源的藻类无法通过利用 HCO_3^- 来进一步提高 pH 值, 因此如果藻类 pH 补偿点低于 9, 说明该藻只能利用 CO_2 ; 若 pH 补偿的高于 9, 则该藻有利用 HCO_3^- 的能力(韩博平等, 2003)。本研究中, 坛紫菜的 pH 补偿点为 9.65, 较邹定辉等(2001)、骆其君等(2002)对坛紫菜和条斑紫菜测得数据 9.83—9.95 稍低, 这种差异可能由于不同的实验材料造成的。所有研究均表明紫菜具有较强地利用海水中的 HCO_3^- 进行光合作用的能力, 即存在 CCM。

本实验结果显示: 在封闭体系中, 坛紫菜利用无机碳的效率随时间延长而降低, 直至补偿点。无机碳浓度在最初的几小时内锐减(图 5), 原因有可能有以下两点: (1) 海水中 HCO_3^- 是无机碳的主要存在形式, pH=8.2 时, HCO_3^- 浓度为 2000 $\mu\text{mol/L}$, 此时 pCA 工作效率较高, DIC 被大量消耗, pH 升高。 HCO_3^- - CO_2 转化

反应随底物浓度下降, 渐趋饱和, 至补偿点。(2) pH 值持续升高, 会影响光合磷酸化。光合磷酸化过程(依赖光的 ATP 合成)中 ATP 的合成需要类囊体膜两侧形成质子动力势(包括质子梯度差 ΔpH 和电势差 $\Delta\psi$), 合成的 ATP 提供给 Calvin 循环, 作为固定 CO_2 的能量(王镜岩等, 2004)。当外界水环境中的 pH 值很高时, 水中 H^+ 缺少, 细胞有可能更加不易吸收到足够多的 H^+ 来维持细胞内的酸碱平衡, 进而影响到对无机碳的持续吸收和其它生理活动。

3.1.2 坛紫菜主要依赖胞外碳酸酐酶 pCA 利用 HCO_3^- 本研究中 pCA 抑制剂 AZ 强烈抑制坛紫菜对无机碳的吸收, 抑制率最高达 86%(图 3), 与邹定辉等(2001)研究得出的坛紫胞外 CA 活性约占总 CA 活性的 13.4%, 却催化坛紫菜利用全部无机碳的 81% 结果相似。该结果提示坛紫菜主要依赖胞外碳酸酐酶 pCA 利用 HCO_3^- 。Mercado 等(1998)的研究表明质膜外的抑制剂几乎全部抑制大型红藻和褐藻(墨角藻属除外)对无机碳的吸收, 而部分抑制绿藻及墨角藻属对无机碳的吸收。

3.1.3 不同生长阶段的坛紫菜 CCM 效率存在差异 生物对无机碳的利用具有多样性。同一属的不同物种利用无机碳的机理可以完全不同(Ghoshal *et al.*, 2002), 同一物种不同品系间对 HCO_3^- 的利用机理不完全相似; 同一品系、不同年龄和生长状态的藻体对 HCO_3^- 的利用能力也不尽一致。本研究中, 组紫菜, 未发现成熟的组织, 处于旺盛的营养生长期, 利用无机碳的能力强; 而 组坛紫菜, 叶片边缘出现大量果孢子囊群和精子囊群, 属于相对缓慢的生殖生长后期, 利用无机碳的能力弱。此现象与高等植物的光合作用特点相似。据报道植物叶片在叶片初展时, 净光合速率很低, 随着叶片生长, 净光合速率提高, 叶片完全成熟时, 光合速率最高, 维持一段时间后, 随着叶片的衰老, 净光合速率逐渐降低(孙猛等, 2009)。

3.2 高温影响坛紫菜叶状体 CCM

3.2.1 高温抑制叶状体 CCM 温度通过多种途径影响藻类生长, 而目前尚未有温度特异地作用于 CCM 的直接证据(Finkel *et al.*, 2010)。本实验中, 在 35°C 下, 无机碳的浓度不降反升, 且经长时间高温处理的坛紫菜对 AZ 抑制的敏感度下降(图 5, 图 8)。分析其原因如下: 藻类可于一定的温度范围内生长, 若温度太高并伴随强辐照, 则藻类生长会受到抑制甚至死亡(Stephens *et al.*, 2010)。大量研究表明, 温度在调控微藻细胞生理活动中起重要作用, 如环境温度

过高, 会加速藻体新陈代谢速率, 降低生物质积累速率; 而若温度太低, 则会抑制微藻的生长(Munoz *et al.*, 2006)。

此外, 潮间带海藻在低潮干出条件下以大气 CO₂ 作为光合作用的唯一碳源, 海藻叶状体表面水膜 pH 由于光合作用无机碳的吸收而急剧升高, 这成为在干出条件下大气 CO₂ 溶入海藻表面水膜的动力(邹定辉等, 2001)。Gao 等(1999)报道潮间带海藻在干出条件下的光合作用受大气 CO₂ 浓度(15.6 μmol/L)的限制, 并且对 CO₂ 的亲合力随脱水作用而下降。但对于干出情况下胞外 CA 是否还有活性存在有待证实。本研究中组坛紫菜对高温胁迫抗性较差, 甚至在 35℃ 处理后死亡, 而组坛紫菜叶状体对高温的耐受范围和抗性明显优于代谢旺盛的未成熟组, 可能与高温下不同生长阶段坛紫菜 CCM 承受抑制的能力相关。何培民等(2002)研究莱茵衣藻 pCA 时发现 pH 升高, 可提高该酶活性, 且 pH 变化越大酶活性越高。温度是否也会引起此类现象有待进一步研究。

3.2.2 高温损伤膜系统的结构和功能导致 CCM 受抑
众所周知, 植物的抗逆性与生物质膜结构和功能的完整性密切相关; 植物抗热性也与生物膜脂的不饱和脂肪酸含量和饱和程度有关, 脂肪酸的碳链长度和化学键数不同, 在高温条件下的固化温度不同, 生物体表现的抗热性就不同(张宗申等, 2001)。本研究中, 经高温处理后, 坛紫菜细胞膜系统受损, 线粒体、叶绿体等细胞器的膜结构丧失完整性; 随温度升高, 坛紫菜中的棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)等饱和脂肪酸(SFA)含量有上升趋势, 油酸(18:1)、C20:1 等单不饱和脂肪酸(MUFA)含量也呈上升趋势。膜脂饱和脂肪酸含量升高, 有助于增加细胞膜脂的变相温度, 通过提高细胞膜系统的稳定性来提高耐热能力(Aminaka *et al.*, 2006)。膜系统受损, 可能导致原先通过主动运输出入细胞并达到胞内浓度大于胞外浓度的各种离子及小分子外逸。本研究中, 在坛紫菜经 35℃ 处理 2h 后, 环境溶液中的 pH 恢复到最初状态(pH=8.2)甚至更低, 是否是由于坛紫菜通过 CCM 存储在胞内的大量无机碳, 在细胞膜受损后重回外界水环境中, 并达到新的平衡而造成的有待进一步实验证明。本研究中坛紫菜色素体在高温处理后, 出现大量膨泡, 膜结构松散、甚至出现解体, 膜损伤在线粒体中也非常普遍。这验证了 Gao 等(1999)的结果: 与其它细胞器相比, 叶绿体对热敏感得多。此外, 高温热激会导致坛紫菜的热激蛋白 *hsp70*、抗坏血酸氧化酶

capx、过氧化物歧化酶 *Mn-sod* 等抗逆基因表达量异常升高(张小龙等, 2010; Yang *et al.*, 2013)。因此, 植物的抗逆性并非单一机制在起作用, 而是一个十分复杂的过程(Mittler *et al.*, 2004), 细胞质、细胞器以及细胞核都会对热激做出反应, 引起基因、蛋白质和代谢组水平一系列的连锁反应(Díaz-Almeyda *et al.*, 2011)。以高温为代表的非生物胁迫对紫菜的影响, 以及藻体在逆境条件下的适应机理, 值得进行更深入的探讨。

参 考 文 献

- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 2004. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 214
- 孙 猛, 吕德国, 刘威生, 2009. 杏属植物光合作用研究进展. 果树学报, 26(6): 878—885
- 何培民, 徐 春, 於新建等, 2002. 莱茵藻胞外碳酸酐酶分子定位与活性诱导. 植物学通报, 19(3): 317—321
- 邹定辉, 高坤山, 2001. 大型海藻类光合无机碳利用研究进展. 海洋通报, 20(5): 83—90
- 张小龙, 杨 锐, 仪茜茜等, 2010. 坛紫菜胞质型抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆及特征分析. 海洋学报, 32(5): 165—174
- 张宗申, 利容千, 王建波, 2001. Ca 预处理对热胁迫下辣椒叶内细胞中 Ca-ATP 酶活性的影响. 植物生理学报, 27(6): 451—454
- 岳国峰, 周百成, 2000. 条斑紫菜对无机碳的利用. 海洋与湖沼, 31(3): 246—251
- 骆其君, 裴鲁青, 潘双叶等, 2002. 坛紫菜自由丝状体对无机碳的利用. 水产学报, 26(5): 477—480
- 韩博平, 韩志国, 付 翔, 2003. 藻类光合作用机理与模型. 北京: 科学出版社, 217—252
- Aminaka R, Taira Y, Kashino Y *et al.*, 2006. Acclimation to the growth temperature and thermosensitivity of Photosystem II in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol*, 47: 1612—1621
- Axelsson L, Ryberg H, Beer S, 1995. Two modes of bicarbonate utilization in the marine green macroalga *Ulva lactuca*. *Plant Cell Environ*, 18: 439—445
- Díaz-Almeyda E, Thomé M P E, Hafid Eli *et al.*, 2011. Differential stability of photosynthetic membranes and fatty acid composition at elevated temperature in *Symbiodinium*. *Coral Reefs*, 30: 217—225
- Finkel Z V, Beardall J, Flynn K J *et al.*, 2010. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *J Plankt Res*, 32: 119—137
- Gao K, Ji Y, Aruga Y, 1999. Relationship of CO₂ concentrations to photosynthesis of intertidal macroalgae during emersion. *Hydrobiologia*, 355—359
- Ghoshal D, Husic H D, Goyal A, 2002. Dissolved inorganic carbon concentration mechanism in *Chlamydomonas moewusii*. *Plant Physiol Biochem*, 40(4): 299—305

- Johnston A M, Maberly S, Raven J A, 1992. The acquisition of inorganic carbon by four red macroalgae from different habitats. *Oecologia*, 92: 317—326
- Larsson C, Axelsson L, 1999. Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. *European Journal of Phycology*, 34(1): 79—86
- Mercado J M, Gordillo F J L, Figueroa F L *et al*, 1998. External carbonic anhydrase and affinity for inorganic carbon in intertidal macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 221: 209—220
- Mercado J M, Niell F X, 1999. Carbonic anhydrase activity and use of HCO_3^- in *Bostrychia scorpioides* (Ceramiiales, Rhodophyceae). *European Journal of Phycology*, 34: 13—19
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M *et al*, 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 10: 490—496
- Munoz R, Guieysse B, 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, 40: 2799—2815
- Nimer N A, Wsrren M, Merrett M J, 1998. The regulation of photosynthetic rate and activation of extracellular carbonic anhydrase under CO_2 limiting conditions in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Cell Environ*, 21: 805—812
- Raven J A, Cockell C S, De La Rocha C L, 2008. The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. *Philos Trans R Soc B*, 363: 2641—2650
- Setimela P S, Chitalu Z, Jonazi J *et al*, 2005. Environmental classification of maize testing sites in the SADC region and its implication for collaborative maize breeding strategies in the subcontinent. *Euphytica*, 145: 123—132
- Stephens E, Ian L Ross, Jan H Mussgnug *et al*, 2010. Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in Plant Science*, 15: 554—564
- Wang Y J, Duanmu D Q, Martin H S, 2011. Carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: inorganic carbon transport and CO_2 recapture. *Photosynth Res*, 109: 115—122
- Yang R, Liu W, Zhang X L *et al*, 2013. Sequences of Mn-sod gene from *Pyropia haitanensis* and its expression under heat shock. *Botanica Marina*, 56(3): 249—259
- Zou D H, Xia J R, Yang Y F, 2004. Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Aquaculture*, 237(1—4): 421—431

UTILIZATION OF INORGANIC CARBON IN *PYROPIA HAITANENSIS* (RHODOPHYTA) UNDER HEAT STRESS

WANG Shu-Gang^{1,2}, YANG Rui^{1,2}, ZHOU Xin-Qian^{1,2}, SONG Dan-Dan^{1,2},
SUN Xue^{1,2}, LUO Qi-Jun^{1,2}

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo, 315211; 2. Marine Biotechnology Laboratory, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract Mechanisms of inorganic carbon utilization by red seaweed *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) were studied by pH-drift technique in a closed system. Inhibitors of periplasmic Carbonic Anhydrase (pCA), the key enzyme in CO_2 Concentrating Mechanism (CCM), such as AZ, (acetazolamide), DIDS (4'4'-diisothiocyanatosilbene-2, 2'-disulfonic acid) and SITS (4-acetamido-4'-isothiocyano-2, 2'-stibene-disulfonate) were applied to detect the CCM in *P. haitanensis* under heat stress. The results indicate that: (1) *P. haitanensis* had a strong ability to utilize HCO_3^- , which was mainly conducted by pCA; (2) Heat stress inhibited the utilization of inorganic carbon (Ci) of *P. haitanensis*, and the higher the temperature, the lower utilization; (3) The thalli of the immature group had higher CCM efficiency and lower heat tolerance than the mature groups. The breakdown of membrane systems and the changes in the components of aliphatic acid in algae cells might be the reason of the CCM inhibition under heat stress.

Key words *Pyropia haitanensis*; heat stress; CO_2 Concentrating Mechanism (CCM)