



条斑紫菜两个耐高温品系的耐低盐特性

黄林彬^{1,2,3}, 黄文⁴, 严兴洪^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;

4. 宁德海洋环境监测中心站, 福建 宁德 352100)

摘要: 以条斑紫菜两个耐高温品系(YZ-4和TM-18)为对象, 以野生型品系(WT)做对照, 分析其叶状体在高温、低盐胁迫下的生长和光系统II最大光量子产量(F_v/F_m)的数值, 为筛选既耐高温又耐低盐的条斑紫菜抗逆品系提供依据。结果显示, 在适宜培养条件(温度18℃和盐度26)下, YZ-4和TM-18叶状体在50~85 d的生长速率快于WT, F_v/F_m 和主要光合色素含量均高于WT, 各品系的绝对生长率和 F_v/F_m 之间均具有较高的正相关性。另外, WT叶状体在70 d左右开始形成精子囊时, 绝对生长率和 F_v/F_m 明显下降。在高温胁迫下培养, 各品系叶状体的 F_v/F_m 和绝对生长率均呈下降趋势, 且胁迫的温度越高或时间越长, 其降幅越大。在24℃高温胁迫35 d后, WT、YZ-4和TM-18的 F_v/F_m 分别下降了56.7%、43.2%和28.7%。在25℃高温胁迫15 d时, WT的生长完全停滞, 而YZ-4和TM-18则分别保持0.51和0.84 cm/d的绝对生长率, 说明二者确实是耐高温的。低盐胁迫对叶状体的影响与高温胁迫的类似, 在盐度为9的低盐下培养35 d后, WT、YZ-4和TM-18的 F_v/F_m 降幅分别为46.2%、42.0%和32.0%, 三者的绝对生长率分别为0.12、0.10和0.90 cm/d。另外, WT和YZ-4在盐度为5时生长受到明显影响, 叶状体在15 d时颜色加深、卷曲变硬并腐烂, 而TM-18在相同盐度下培养25 d也未腐烂, F_v/F_m 仍高达初始值的72.8%。这表明TM-18在高温或低盐胁迫下的耐受性比WT和YZ-4的都强, 其内在原因是叶状体 F_v/F_m 的降幅较小, 间接说明 F_v/F_m 可作为条斑紫菜抗逆品系选育的新指标。

关键词: 条斑紫菜; 叶状体; 叶绿素荧光; 耐高温; 耐低盐; 逆境胁迫

中图分类号: S 968.43^{†1}

文献标志码: A

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)被广泛地栽培于中国、日本和朝鲜半岛沿岸, 是世界上人工栽培历史最久、经济价值最高的海洋红藻之一, 目前全球年产值约13亿美元^[1]。我国条斑紫菜的栽培已有数十年, 栽培规模不断扩大、栽培密度不断增加, 而可用的海域资源则越来越少^[2]。当前, 随着全球气候变暖导致的极端天气的影响^[3], 条斑紫菜产业出现了种质退化和病害频发

等问题^[3-5]。这迫切需要获得可耐多重逆境胁迫的优良品种(系), 使其适应高温、低盐环境, 拓展紫菜栽培的新空间^[5]。目前通过诱变或杂交育种已选育出数个耐高温或耐低盐的抗逆紫菜品系^[4,6], 但尚未选育出能耐受多重逆境胁迫的新品系。

紫菜育种的目标性状一般都是针对叶状体的表型, 如长度、颜色和光合色素含量等^[4-5], 缺少一些“内在性”的指标, 比如叶绿素荧光特性^[7]。

收稿日期: 2019-03-12 修回日期: 2019-05-15

资助项目: 国家自然科学基金(31302185, 31072208); 国家重点研发计划(2018YFD0900606); 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02055-6); 江苏省科技计划(现代农业)(BE2018335)

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

研究发现, 低等藻类和高等植物的叶绿素荧光特性均与光合作用紧密相关, 可更好地反映出植物的生理特征^[7-8], 特别是能够反映逆境对植物光合作用的影响。因此, 叶绿素荧光特性开始逐渐成为高等植物抗逆品系选育的新指标^[9-11]。在坛紫菜的研究中也发现, 耐低盐品系在低盐胁迫条件下的光系统Ⅱ最大光量子产量(F_v/F_m)下降幅度明显小于不耐低盐的野生型品系^[5]。由于相关研究较少, 叶绿素荧光参数是否可以作为低等红藻抗逆性的评价指标还需更多的探索。

本研究以条斑紫菜2个耐高温的品系(YZ-4和TM-18)为研究对象, 以野生型品系(WT)作对照, 通过分析其叶状体在逆境胁迫时的生长和叶绿素荧光参数的变化, 筛选既耐高温又耐低盐的新品系, 为条斑紫菜的栽培提供优良种质, 并探讨叶绿素荧光参数作为紫菜抗逆品系筛选依据的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

条斑紫菜野生型品系(WT, LS-001)建立于2001年, 来自江苏吕泗海区紫菜栽培网帘上的一棵条斑紫菜叶状体所放散的一个果孢子所萌发的丝状体^[6]。条斑紫菜YZ-4和TM-18品系都是通过射线诱变后筛选的耐高温优良品系^[4]。3个品系均以自由丝状体的形式保存于实验室中, 方法同文献^[12], 所用培养液为盐卤海水加自来水和MES营养液^[13]。

1.2 叶状体的培养与特性分析

自由丝状体诱导放散壳孢子及叶状体的培养方法同文献^[14], 叶状体的适宜培养条件调整为温度18 °C、盐度26、光量子通量密度50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、明暗周期10L:14D。各品系叶状体在上述适宜培养条件下培养至50 d后用于胁迫实验: 高温胁迫时将温度从18 °C提高至22、24或25 °C^[6], 低盐胁迫时将盐度从26降低至15、9或5^[5], 其他培养条件不变, 并以上述适宜培养条件为对照。实验一共7个组, 每组5棵叶状体。每隔5天更换一半的培养液。每隔5天测定叶状体的叶绿素荧光参数和长度, 并拍照记录叶状体的形态。根据测定的叶状体长度, 按照公式: $K=(N-N_0)/t$, 计算绝对生长率(absolute growth rate, K), 其中N为某次测量的叶状体长度(cm), N_0 为前一次测量的叶状体长度(cm), t为培养天数

(d)^[15]。另外, 适宜条件下培养至65 d时, 测定一次叶绿素a(Chl.a)、藻红蛋白(PE)和藻蓝蛋白(PC)的含量, 具体方法同文献^[6]。叶绿素荧光参数用调制叶绿素荧光仪(mini-PAM, Walz Effectnich, 德国)测定, 先将样品暗适应15 min后测量最小荧光值(F_0), 然后提供饱和脉冲后测量最大荧光值(F_m)^[5]。根据公式: $F_v=F_m-F_0$, 得到可变荧光值(F_v), 最后求得光系统Ⅱ最大光量子产量(F_v/F_m)^[8], 每个叶状体重复测量3~5次后取平均值。所有实验数据均以平均值 \pm 标准差表示。通过Excel 2016软件中的单因素方差分析方法对3个品系之间的差异显著性进行分析, 并计算每个品系的绝对生长率和 F_v/F_m 之间的相关系数, 并用t检验对2个参数进行显著性分析。

2 结果

2.1 叶状体在适宜条件下的生长

3个品系的叶状体在50~55 d时的长度差异不大, 随着日龄继续增加, 叶状体长度差异明显变大(图1)。培养至85 d时, YZ-4和TM-18叶状体的平均体长分别为WT的2.12和3.91倍, 三者之间的差异极显著($P<0.01$)。

日龄50 d时, 3个品系的 F_v/F_m 值存在极显著差异($P<0.01$)。2个优良品系的 F_v/F_m 在50~85 d

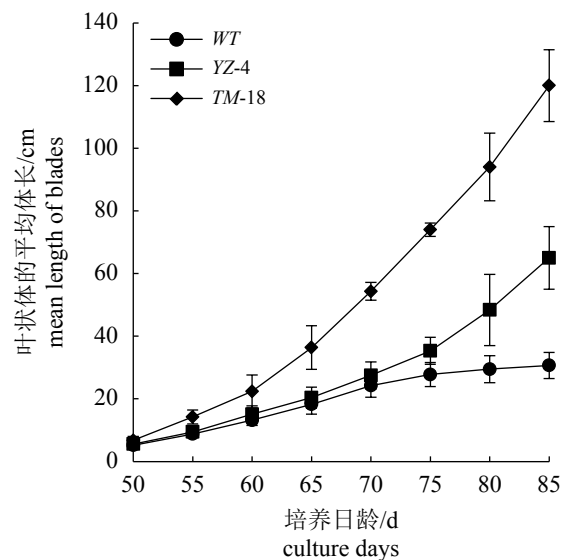


图1 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下先培养50 d后再继续培养35 d的生长情况

Fig. 1 Growth of gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured at optimal conditions of 18 °C and salinity of 26 for 50 d first and then for another 35 d

略微上升(增幅2.35%~2.56%), 而WT的 F_v/F_m 在70 d后出现明显下降, 至85 d时降幅达到8.08%(图2)。日龄85 d时, YZ-4和TM-18的 F_v/F_m 分别为 0.594 ± 0.014 和 0.609 ± 0.004 , 分别为WT的1.14和1.16倍。

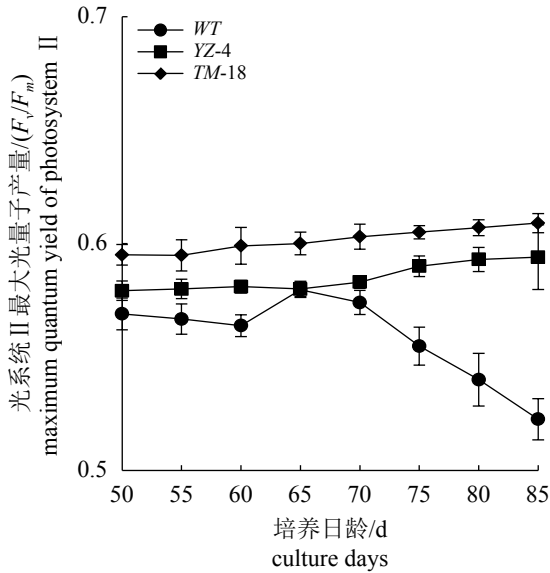


图2 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再继续培养35 d的系统II最大光量子产量

Fig. 2 Maximum quantum yield of photosystem II of the gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured at optimal conditions of 18°C and salinity of 26 for 50 d first and then for another 35 d

从图1和图2可以看出, WT在70 d左右的生长变缓且 F_v/F_m 明显降低, 显微观察发现此时WT叶状体上已形成精子囊。2个优良品系一直到85 d仍未见成熟迹象, 故生长迅速且 F_v/F_m 略微增加, 说明叶状体成熟会使 F_v/F_m 降低。另外, 日龄65 d的叶状体主要光合色素含量测定表明, Chl.a、PE和PC的含量均为TM-18>YZ-4>WT叶状体, 这和各品系 F_v/F_m 值的大小一致(图3), 另外, 3个品系间的3种主要光合色素含量均呈现极显著差异($P<0.01$)。上述结果表明, 叶状体生长速率最快的TM-18品系, 其主要光合色素的含量以及 F_v/F_m 的比值在3个品系中都是最高的。此外, 3个品系的叶状体在50~85 d的绝对生长率和 F_v/F_m 之间具有较高的正相关性, 相关性系数(r)为0.918~0.958(表1), 说明绝对生长率大的品系其 F_v/F_m 较高。另外, WT叶状体的绝对生长率和 F_v/F_m 虽然相关性较高, 但是却没有显著性差异($P>0.05$), 而另外2个品系均呈显著正相关($P<0.05$)(表1), 这可

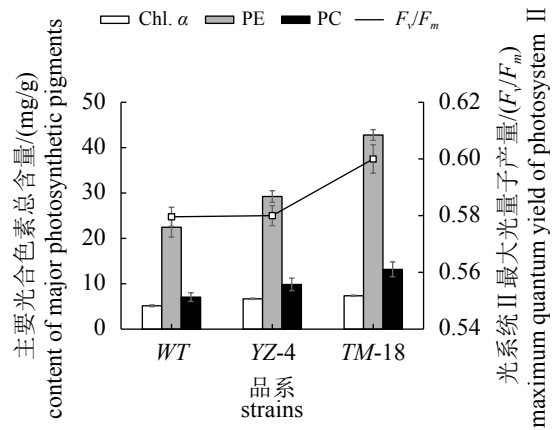


图3 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养65 d时叶绿素a(Chl. a)、藻红蛋白(PE)和藻蓝蛋白(PC)的含量以及光系统II最大光量子产量

Fig. 3 Contents of chlorophyll a (Chl. a), phycoerythrin (PE) and phycocyanin (PC), and the maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m) of the gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured at optimal conditions of 18°C and salinity of 26 for 65 d

表1 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再继续培养35 d的绝对生长率和光系统II最大光量子产量及二者之间的相关性系数

Tab. 1 Absolute growth rate and maximum quantum yield of photosystem II (and their correlation coefficient) of the gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured at optimal conditions of 18°C and salinity of 26 for 50 d first and then for another 35 d

培养天数/d culture days	WT		YZ-4		TM-18	
	AGR	F_v/F_m	AGR	F_v/F_m	AGR	F_v/F_m
50~55	0.72	0.567	0.77	0.580	1.50	0.595
55~60	0.88	0.564	1.13	0.581	1.63	0.599
60~65	1.01	0.580	1.06	0.580	2.80	0.600
65~70	1.20	0.574	1.42	0.583	3.59	0.603
70~75	0.70	0.555	1.57	0.590	3.94	0.605
75~80	0.35	0.540	2.61	0.593	4.00	0.607
80~85	0.23	0.523	3.32	0.594	5.20	0.609
<i>r</i>	0.935		0.918		0.958	
<i>P</i>	>0.05		<0.05		<0.05	

注: AGR代表叶状体长度在5 d内的绝对生长率/(cm/d), F_v/F_m 代表每5 d的最后一天测得的光系统II最大光量子产量, r 代表相关性系数, P 代表 t 检验结果

Notes: AGR denoted absolute growth rate of blade length between every 5 d, F_v/F_m denoted maximum quantum yield of photosystem II on the last day of every 5 d, r denoted correlation coefficient, P denoted the result of t -test

能和WT叶状体进入成熟期有关。

2.2 高温胁迫对叶状体生长的影响

各品系叶状体在高温胁迫下的生长均受到不同程度的抑制, 温度越高或胁迫时间越长则抑制越明显。WT的生长在25 °C基本停滞, 而2个耐高温品系受到的影响则明显小于WT品系

(图4)。在不同高温条件(22、24和25 °C)下胁迫培养15 d后, YZ-4的平均体长分别为WT的1.16、1.35和1.86倍, TM-18的平均体长分别为WT的2.18、2.54和3.08倍, 2个优良品系在高温下的生长均快于WT。

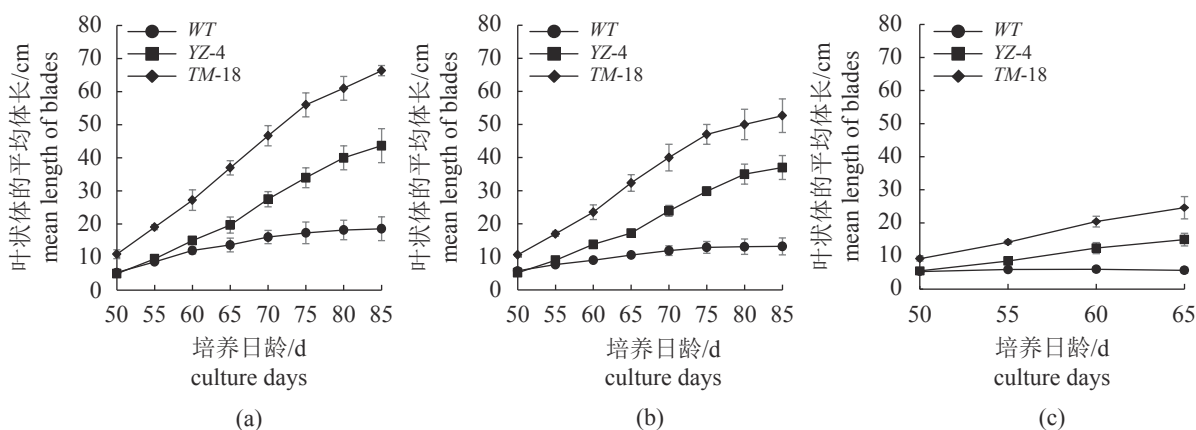


图4 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再在高温胁迫下继续培养15~35 d的生长情况

Fig. 4 Growth of gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured under high-temperature stress for 15-35 d, after being cultured at optimal conditions of 18 °C and salinity of 26 for 50 d

(a) 22 °C, (b) 24 °C, (c) 25 °C

另外, 高温导致3个品系的叶状体颜色均不同程度地加深(图版-1~4, 8~11, 15~18)。WT叶状体在24和25 °C胁迫下的生长严重受阻, 颜色变黑、卷曲变硬(图版-3~4); YZ-4叶状体在25 °C胁迫下的叶状体略有卷曲变硬、局部颜色变淡(图版-11); 而TM-18叶状体在高温胁迫下能保持良好的生长和形态(图版-18), 说明TM-18对高温有着明显的耐受能力。

WT叶状体在适宜温度下的绝对生长率先上升再下降, 而在高温胁迫下则处于下降趋势; YZ-4和TM-18叶状体在适宜温度下的绝对生长率不断上升, 而在高温胁迫下则呈现先上升后下降的趋势(表1, 表2), 说明高温导致了3个品系叶状体的绝对生长率的下降, 其中WT的降幅明显大于YZ-4和TM-18, 故各时期的绝对生长率均低于YZ-4和TM-18。WT叶状体在25 °C下只能耐受5 d, 而2个优良品系的叶状体在胁迫15 d后仍有0.51~0.84 cm/d的绝对生长率。22和24 °C高温胁迫培养35 d后, WT叶状体的绝对生长率为0.07~0.02 cm/d, 说明其生长已基本停滞, 而2个优良品系的绝对生长率为0.40~1.07 cm/d(表2)。

表2 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再在高温胁迫下继续培养15~35 d时长度的绝对生长率

Tab. 2 Absolute growth rates of gametophytic blades length of the three *P. yezoensis* strains cultured under high-temperature stress for 15-35 d, after being cultured at optimal conditions of 18 °C and salinity of 26 for 50 d

培养 天数/d culture days	绝对生长率/(cm/d) absolute growth rate								
	WT			YZ-4			TM-18		
	22 °C	24 °C	25 °C	22 °C	24 °C	25 °C	22 °C	24 °C	25 °C
50~55	0.64	0.37	0.12	0.9	0.76	0.6	1.63	1.27	1.00
55~60	0.69	0.27	0.02	1.1	0.96	0.78	1.64	1.31	1.24
60~65	0.33	0.31	-0.06 ^a	0.94	0.68	0.51	1.96	1.77	0.84
65~70	0.48	0.26	b	1.56	1.35	b	1.93	1.53	b
70~75	0.25	0.20	b	1.30	1.19	b	1.87	1.40	b
75~80	0.17	0.04	b	1.20	1.03	b	1.00	0.60	b
80~85	0.07	0.02	b	0.73	0.40	b	1.07	0.53	b

注: a. 叶状体腐烂后藻体变短, b. 叶状体完全腐烂, 下同

Notes: a. the blade began to decay and the length decreased, b. the blade decayed totally, the same below

25 °C下胁迫培养15 d后, *WT*、*YZ-4*和*TM-18*叶状体的平均体长增加了0.07、1.72、1.68倍, 说明2个优良品系在高温胁迫下仍保持一定的生长(图4), 具有明显的耐高温性。

3个品系的叶状体在高温胁迫时 F_v/F_m 的变化与绝对生长率的变化一致, 均随着胁迫温度的升高而明显下降, 但*YZ-4*和*TM-18*叶状体的

F_v/F_m 均始终明显高于*WT*叶状体(图5)。在22和24 °C下胁迫培养至85 d时, *WT*、*YZ-4*和*TM-18*的 F_v/F_m 分别下降至未胁迫时的69.0%和43.3%、76.5%和56.8%, 以及93.7%和71.3%, 说明2个优良品系在高温胁迫时能保持较快的生长是因为 F_v/F_m 下降幅度较小。

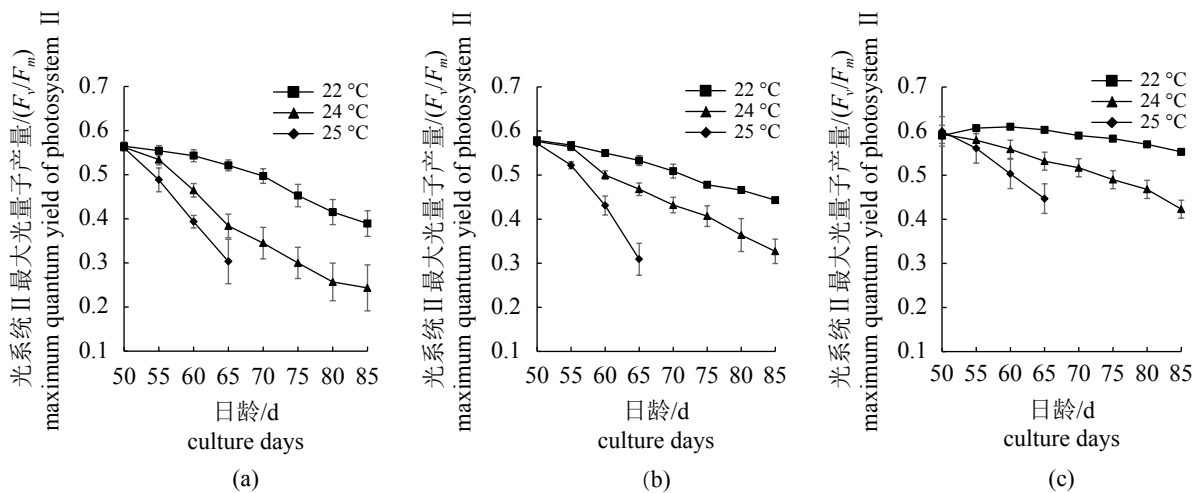


图5 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再在高温胁迫下培养35 d的光系统II最大光量子产量

Fig. 5 Maximum quantum yield of photosystem II of gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured under high-temperature stress for 35 d, after being cultured at optimal conditions of 18 °C and salinity of 26 for 50 d

(a) *WT*, (b) *YZ-4*, (c) *TM-18*

2.3 低盐胁迫对叶状体生长的影响

低盐胁迫对各品系叶状体生长造成的抑制情况和各参数的变化趋势同高温胁迫。在盐度为15、9和5的低盐胁迫下培养35 d后, 各品系叶状体的长度分别为胁迫之前的3.8、3.3和1.6倍(*WT*)、6.5、3.8和2.1倍(*YZ-4*)、8.6、5.3和3.9倍(*TM-18*), 说明*TM-18*在低盐下的生长优势明显大于*WT*和*YZ-4*(图6)。

在适宜盐度下, *WT*叶状体的绝对生长率呈现先上升后下降的趋势(表1), 在低盐胁迫下, 虽然绝对生长率有所下降, 但随着天数变化的趋势不变(表3), 这与高温条件下绝对生长率直接下降的情况不同(表2), 说明低盐胁迫初期对*WT*的影响小于高温胁迫的影响; *YZ-4*和*TM-18*叶状体在低盐下的生长也受到抑制, 其绝对生长率先升后降, 不同于适宜盐度下一直上升的趋势, 和高温胁迫造成的影响类似(表2)。总的来说, 低盐胁迫导致3个品系叶状体的绝对生长率

随盐度的降低而下降, 其中*TM-18*的下降幅度明显小于另外2个品系, 这和图6中*TM-18*的生长快于其他2个品系的情况一致。

在较低盐度(15和9)胁迫下培养15 d后, 与适宜条件下的情况相比(图版-1), *WT*叶状体生长减缓, 颜色稍加深, 光泽减少, 边缘稍卷曲(图版-5~6); *YZ-4*叶状体的情况与*WT*类似(图版-8, 12~13); *TM-18*叶状体除了生长稍减缓和颜色稍加深外, 其他的变化不大(图版-15, 19~20)。在盐度为5的极低盐度胁迫下, *WT*叶状体的生长明显受阻, 颜色进一步加深且明显卷曲变硬, 并有部分细胞死亡腐烂(图版-7); *YZ-4*叶状体的生长也明显受阻, 细胞发红后变白死亡(图版-14); *TM-18*叶状体仍保持明显的生长(图版-21)。

低盐胁迫时, F_v/F_m 的变化和叶状体的绝对生长率变化一致, 均随着盐度的下降而明显下降, *TM-18*叶状体的下降幅度较另外2个品系小(图7)。胁迫培养35 d后, *WT*、*YZ-4*和*TM-18*的叶状体在盐度15和9组中的 F_v/F_m 分别较初始值下降

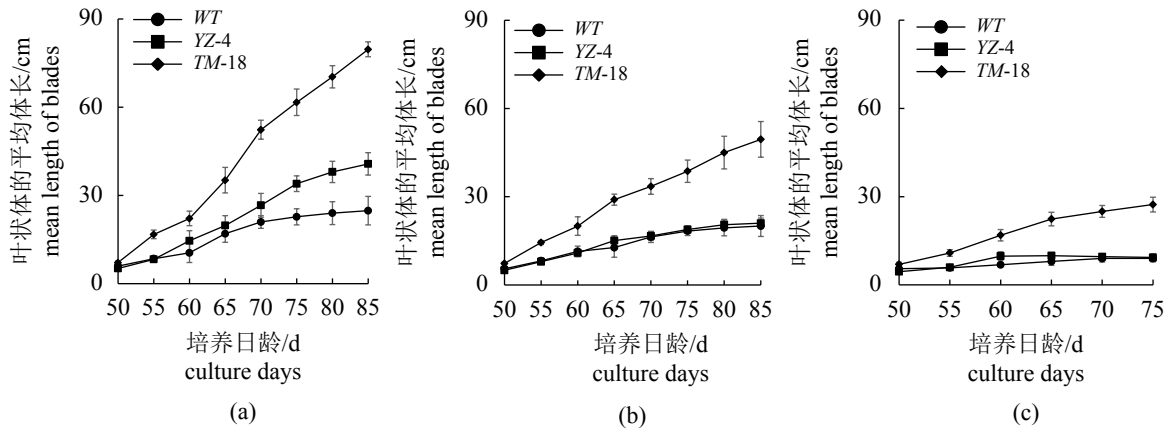


图 6 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后
再在低盐胁迫下培养25~35 d的生长情况

(a) 盐度15, (b) 盐度8, (c) 盐度5

Fig. 6 Growth of gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured under low-salinity stress for 25-35 d, after being cultured at optimal condition of 18 °C and salinity of 26 for 50 d

(a) salinity of 15, (b) salinity of 8, (c) salinity of 5

表 3 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再在低盐胁迫下培养25~35 d时长度的绝对生长率

Tab. 3 Absolute growth rate of gametophytic blade length of the three *P. yezoensis* strains cultured under low-salinity stress for 25-35 days, after being cultured at 18 °C and salinity of 26 for 50 d

培养天数/d culture days	绝对生长率/(cm/d) absolute growth rate								
	WT			YZ-4			TM-18		
	15	9	5	15	9	5	15	9	5
50~55	0.50	0.54	0.06	0.62	0.58	0.30	1.91	1.42	0.77
55~60	0.40	0.64	0.21	1.26	0.60	0.76	1.09	1.12	1.21
60~65	1.30	0.26	0.23	1.04	0.84	0.03	2.60	1.80	1.10
65~70	0.80	0.72	0.20	1.37	0.31	-0.07 ^a	3.43	0.90	0.52
70~75	0.35	0.41	0	1.47	0.43	-0.06 ^a	1.87	1.03	0.47
75~80	0.25	0.22	b	0.80	0.33	b	1.73	1.27	b
80~85	0.17	0.12	b	0.55	0.10	b	1.87	0.90	b

了19.5%和46.2%、30.7%和42.0%以及4.4%和32.0%，在极低盐度5时的降幅则更加明显(图7)。WT和YZ-4只能耐受盐度9以上的较低盐度胁迫5~10 d，无法耐受极低盐度5的胁迫(表3)。TM-18的 F_v/F_m 在极低盐度5时能保持25 d的小幅下降(27.2%)，与另外2个品系相比仍保持较明显的生长，70~75 d期间的绝对生长率为0.47 cm/d(图7, 表3)，说明TM-18不仅具有耐高温性，还具有耐

低盐性。

3 讨论

紫菜是一种生活在潮间带的红藻，随潮汐的变化而受到温度、盐度和光照等的影响，严重时生长受抑制^[16]。随着温室效应导致海水的温度逐年上升、大雨日数和台风次数增多^[3, 17]，紫菜的生长和养殖生产都受到影响，严重时可导致大幅减产或绝收^[18]，选育抗逆良种对于紫菜栽培来说意义重大^[4, 19]。条斑紫菜栽培时，其壳孢子的萌发以及幼苗的生长适温不高于20 °C，适合的海水盐度为21~29^[20-21]。多项研究将条斑紫菜叶状体在22~25 °C下的生长表现作为耐高温品系选育的依据^[4, 6, 22]。在坛紫菜育种时，盐度15~3是耐低盐品系选育的主要条件^[5, 23]。因此，本研究选择温度19 °C和盐度26作为适宜的培养条件，将22、24和25 °C作为高温胁迫的温度，将盐度15、9和5作为低盐胁迫的盐度。

本研究中，3种主要光合色素含量高的TM-18叶状体的生长速率、耐高温性和耐低盐性均优于其他2个品系。色素含量是紫菜良种选育的一个重要指标^[4, 22]，其决定了商品紫菜品质的高低^[24]。另外，色素含量高的条斑紫菜品系具有更高的光合效率，还更适应温度较高的海域^[7]。但色素含量的测定较繁琐，对操作人员的熟练程度要求较高^[6]。利用调制叶绿素荧光仪可一次性测得多个叶绿素荧光参数，根据参数可评估植物的

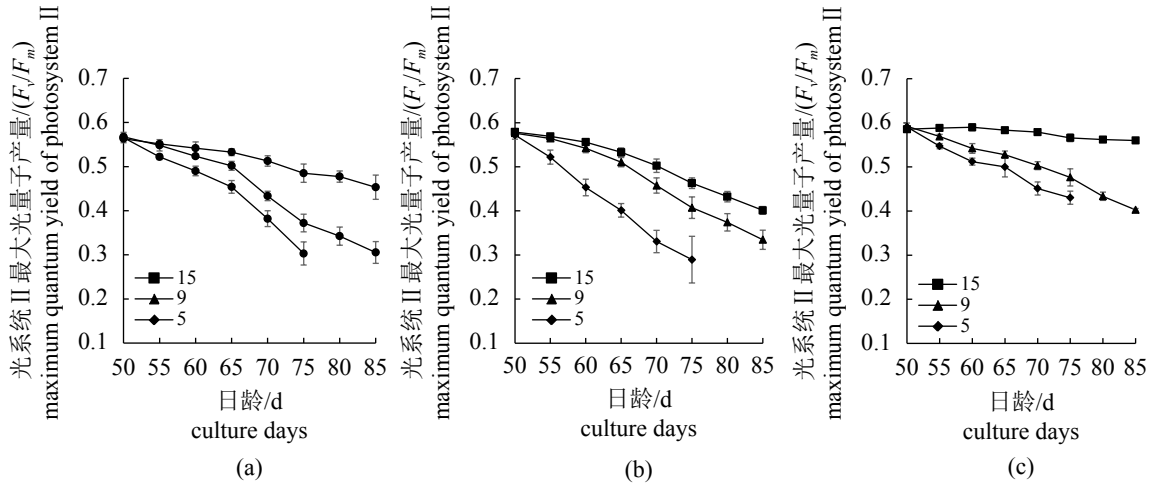


图7 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再在低盐胁迫下培养25~35 d的光系统II最大量子产量

Fig. 7 Maximum quantum yield of photosystem II of gametophytic blades of the three *P. yezoensis* strains cultured under low-salinity stress for 25-35 d, after being cultured at optimal conditions of 18 °C and salinity of 26 for 50 d

(a) WT, (b) YZ-4, (c) TM-18

光合效率, 具有快速、灵敏和无损等特征^[8]。相关性分析表明, 在适宜条件下培养的3个品系的叶状体在日龄50~85 d的绝对生长率和 F_v/F_m 之间具有较高的正相关性($r \geq 0.918$), 因此可通过测定 F_v/F_m 来评估条斑紫菜的生长情况。

F_v/F_m 反映光系统II反应中心最大的光能转换效率, 而光系统II在光合作用的光能吸收和转换过程中起着重要的作用^[25]。本研究中, 3个品系叶状体在适宜培养条件下的 F_v/F_m 为0.569~0.595, 明显低于高等维管植物和苔藓植物^[26-27], 这可能与紫菜的星状色素体属于低等类型有关^[7]。研究还发现不同地区的乔木和灌木的 F_v/F_m 差异显著, 推测与气候环境条件有关^[28], 这与不同海区条斑紫菜的7个品系的情况一致^[7]。本研究中的2个优良品系是通过⁶⁰Co- γ 射线诱变选育的, 它们的 F_v/F_m 均极显著地高于WT, 推测是诱变导致基因突变而表现出较高的光合效率。此外, WT叶状体在70 d左右形成精子囊时的 F_v/F_m 明显下降, 这种现象也存在于半叶紫菜华北变种(*P. katadai* var. *hemiphylla*)中^[29], 说明叶状体进入成熟期导致生长趋缓、碳同化能力下降, 这与 F_v/F_m 降低是相符的。2个优良品系在85 d时仍未见生殖细胞的形成, 因此能保持明显的生长和 F_v/F_m 的小幅增长。类似的现象也存在于高等植物中, 同一竹龄毛竹(*Phyllostachys edulis*)叶片在快速生长

期的前期、中期和后期的 F_v/F_m 不断增加, 并且同一生长期2年生毛竹的值大于1年生毛竹的值^[30], 说明 F_v/F_m 和植物的生长情况密切相关。

在非环境胁迫条件下, F_v/F_m 的变化极小, 但光系统II反应中心对高温等环境胁迫十分敏感^[31], 因此可通过该参数来快速检测植物是否处于胁迫状态、或者检测植物对于胁迫的耐受能力。当受到环境胁迫时, 光合作用机构接受的光能超过所能利用的数量, 使叶片遭受光抑制^[32]。光抑制以光合碳同化能力和 F_v/F_m 下降为特征, 导致植物的生长速率减缓^[33]。在本研究中, 各品系叶状体遭受高温或低盐胁迫时的生长也减缓, 这与其他紫菜属物种在高温胁迫时的生长趋势相同^[34]。因此, 有人认为叶绿素荧光参数可作为筛选抗逆品种的新指标^[9, 11]。WT叶状体的绝对生长率和 F_v/F_m 在22 °C高温下胁迫20 d时明显下降, 如果胁迫温度上升为24~25 °C, 则在15 d时便出现十分明显的下降, 此时叶状体的颜色发黑、卷曲发硬并出现细胞死亡腐烂, 说明高温胁迫可能对WT叶状体的光系统II反应中心造成不可逆的失活^[35]。在对大豆的研究中, 叶片经中等强度光和强光照3 h后, F_v/F_m 值分别下降了15%和50%; 暗处放置4 h后, 前者 F_v/F_m 值恢复到光照前的98%, 而后者只恢复到64%, 即使暗处放置7 h也不能完全恢复, 说明中等强度光造

成光系统 II 的可逆失活, 而强光胁迫引起了不可逆破坏^[36]。本研究中的 YZ-4 和 TM-18 是通过诱变育种筛选的耐高温品系, 在高温胁迫时叶状体的绝对生长率和 F_v/F_m 下降幅度均明显小于 WT 叶状体, 虽然颜色有所加深, 但没有腐烂, 并且还保持明显的生长, 说明耐高温品系应对高温胁迫的机制可能提高了光系统 II 反应中心的耐热性^[37]。

F_v/F_m 还能反映植物对盐度的耐受性, 因此可作为筛选耐盐品种的新指标^[9-11]。对于海藻来说, 当遇到台风或者洪水时, 表层海水盐度急剧降低, 就会受到低盐胁迫^[5]。即使是生活在河口附近的广盐性海藻种类, 其适宜的盐度也有一定的范围^[38]。耐盐性很强的盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 在盐度低于 20 或高于 100 时 F_v/F_m 开始显著下降^[39], 推测高盐和低盐胁迫对光合作用的影响有着类似的机制^[11]。在本研究中, 3 个品系叶状体在低盐胁迫下的 F_v/F_m 均下降, 生长也明显减缓, 特别是 YZ-4 和 WT, 其在极低盐度 5 时不能正常生长, 对于较低盐度的耐受也只有 5~10 d; 而 TM-18 在盐度 9 和 5 时分别能够耐受 25 和 35 d, 原因与其 F_v/F_m 降幅明显小于另外 2 个品系有关。YZ-4 具有一定的耐高温性, 但是对低盐的耐受性不高, 推测高温和低盐胁迫通过不同的途径影响光合作用的过程, 具体机制有待进一步研究。

综上所述, TM-18 同时具有耐高温性和耐低盐性, 有望被培育成一个生态适应性广的条斑紫菜良种, 且叶绿素荧光参数 F_v/F_m 可以作为筛选抗逆条斑紫菜品系的新标准。

参考文献:

- [1] Blouin N A, Brodie J A, Grossman A C, et al. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(1): 29-37.
- [2] 顾汉忠, 施锋. 南通市条斑紫菜产业发展的现状和途径[J]. *海洋开发与管理*, 2008, 25(z1): 84-86.
Gu H Z, Shi F. Current situation and approaches of industry development of *Pyropia yezoensis* in Nantong[J]. *Ocean Development and Management*, 2008, 25(z1): 84-86(in Chinese).
- [3] Jones P D, New M, Parker D E, et al. Surface air temperature and its changes over the past 150 years[J]. *Reviews of Geophysics*, 1999, 37(2): 173-199.
- [4] 王华芝, 严兴洪, 李琳. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 耐高温品系的筛选及特性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(2): 363-369.
Wang H Z, Yan X H, Li L. Selection and characterization of a high-temperature resistant strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2): 363-369(in Chinese).
- [5] 檀应华, 黄林彬, 严兴洪. 坛紫菜耐低盐品系的选育与特性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 504-512.
Tan Y H, Huang L B, Yan X H. Selection and characterization of a low-salinity tolerant strain in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 504-512(in Chinese).
- [6] Zhang B L, Yan X H, Huang L B. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature tolerance[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(5): 841-847.
- [7] 赵小波, 张学成, 许璞. 不同品系条斑紫菜光合效率比较研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(2): 57-62.
Zhao X B, Zhang X C, Xu P. Research on photosynthetic efficiency of seven strains of *Porphyra yezoensis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(2): 57-62(in Chinese).
- [8] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. *植物学通报*, 1999, 16(4): 444-448.
Zhang S R. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(4): 444-448(in Chinese).
- [9] 黄有总, 张国平. 叶绿素荧光测定技术在麦类作物耐盐性鉴定中的应用[J]. *麦类作物学报*, 2004, 24(3): 114-116.
Huang Y Z, Zhang G P. Application of measuring chlorophyll fluorescence in identification of salinity tolerance in *Triticeae* crops[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2004, 24(3): 114-116(in Chinese).
- [10] 惠红霞, 许兴, 李前荣. NaCl 胁迫对枸杞叶片甜菜碱、叶绿素荧光及叶绿素含量的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2004, 22(3): 109-114.
Hui H X, Xu X, Li Q R. Effects of NaCl stress on betaine, chlorophyll fluorescence and chloroplast pigment of leaves of *Lycium barbarum* L.[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2004, 22(3): 109-114(in Chinese).

- [11] 赵昕, 吴雨霞, 赵敏桂, 等. NaCl胁迫对盐芥和拟南芥光合作用的影响[J]. 植物学通报, 2007, 24(2): 154-160.
Zhao X, Wu Y X, Zhao M G, *et al.* Response of photosynthesis function of salt cress and *Arabidopsis* to NaCl salt stress[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2007, 24(2): 154-160(in Chinese).
- [12] 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(4): 333-347.
- [13] 王素娟, 张小平, 徐志东, 等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J]. 海洋与湖沼, 1986, 17(3): 217-221.
Wang S J, Zhang X P, Xu Z D, *et al.* A study on the cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *P. haitanensis* I[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1986, 17(3): 217-221(in Chinese).
- [14] Yan X H, Aruga Y. Induction of pigmentation mutants by treatment of monospore germlings with NNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. ALGAE, 1997, 12(1): 39-52.
- [15] Stein J R. Handbook of phycological methods - culture methods and growth measurements[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1973.
- [16] Zou D H, Gao K S. Effects of desiccation and CO₂ concentrations on emerged photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China[J]. European Journal of Phycology, 2002, 37(4): 587-592.
- [17] 高学杰, 赵宗慈, 丁一汇, 等. 温室效应引起的中国区域气候变化的数值模拟 II: 中国区域气候的可能变化[J]. 气象学报, 2003, 61(1): 29-38.
Gao X J, Zhao Z C, Ding Y H, *et al.* Climate change due to greenhouse effects in China as simulated by a regional climate model part II: climate change[J]. Acta Meteorologica Sinica, 2003, 61(1): 29-38(in Chinese).
- [18] 黄林彬, 严兴洪. 坛紫菜"申福1号"和"申福2号"的中试研究[C]//2011年全国海水养殖学术研讨会论文集. 上海: 中国水产学会, 2011: 292-296.
Huang L B, Yan X H. Pilot-scale study on 'Shenfu No. 1' and 'Shenfu No. 2' of *Pyropia haitanensis* [C] // Proceedings of the National Mariculture Symposium. Shanghai: China Society of Fisheries, CSF, 2011: 292-296(in Chinese).
- [19] 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.
Yan X H, Ma S Y. Selection of a high-temperature resistant strain of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1): 112-119(in Chinese).
- [20] 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.
Zeng C K, Wang S J, Liu S J, *et al.* Seaweed cultivation[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1985(in Chinese).
- [21] 朱建一, 严兴洪, 丁兰平, 等. 中国紫菜原色图集[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
Zhu J Y, Yan X H, Ding L P, *et al.* Color atlas of Chinese laver[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016(in Chinese).
- [22] 黄文, 吕峰, 严兴洪. 条斑紫菜耐高温品系的特性分析与海区中试[J]. 水产学报, 2014, 38(10): 1758-1769.
Huang W, Lü F, Yan X H. Characterization of a high-temperature resistant strain of *Pyropia yezoensis* and its pilot cultivation in mariculture farm[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1758-1769(in Chinese).
- [23] 陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐低盐品系的选育及经济性状的比较[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2009, 14(1): 1-7.
Chen C S, Ji D H, Xie C T, *et al.* Breeding selection and comparison of the economic traits on the low salinity resistant strains of *Porphyra haitanensis*[J]. Journal of Jimei University (Natural Science Edition), 2009, 14(1): 1-7(in Chinese).
- [24] 严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 221-228.
Yan X H, Tanaka J, Aruga Y. Isolation and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(3): 221-228(in Chinese).
- [25] Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis[M]//Schulze E D, Caldwell M M. Ecophysiology of Photosynthesis. Berlin, Heidelberg: Springer, 1995.
- [26] Björkman O, Demmig B. Photon yield of O₂ evolution 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins[J]. *Planta*, 1987, 170(4): 489-504.
- [27] 张光飞, 段仲昭, 罗晓娟, 等. 2种苔藓的叶绿素荧光特性及耐受性对 Pb^{2+} 浓度的响应[J]. *环境污染与防治*, 2011, 33(1): 36-40.
Zhang G F, Duan Z Z, Luo X J, *et al.* Response of tolerance and chlorophyll fluorescence characteristics of two bryophyte species to Pb^{2+} concentration[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2011, 33(1): 36-40(in Chinese).
- [28] 郑淑霞, 上官周平. 不同功能型植物光合特性及其与叶氮含量、比叶重的关系[J]. *生态学报*, 2007, 27(1): 171-181.
Zheng S X, Shangguan Z P. Photosynthetic characteristics and their relationships with leaf nitrogen content and leaf mass per area in different plant functional types[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(1): 171-181(in Chinese).
- [29] 王云霞, 王苗苗, 夏洞明, 等. 华北半叶紫菜繁殖组织形成期间的的光合特性研究[J]. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 34(3): 95-102.
Wang Y X, Wang M M, Xia D M, *et al.* Photosynthetic characteristics during the formation of reproductive tissues of *Porphyra katadai* var. *Hemiphylla*[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 34(3): 95-102(in Chinese).
- [30] 周哲宇, 徐超, 胡策, 等. 毛竹快速生长期的叶绿素荧光参数特征[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, 35(1): 75-80.
Zhou Z Y, Xu C, Hu C, *et al.* Chlorophyll fluorescence characteristics of *Phyllostachys edulis* during its fast growth period[J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2018, 35(1): 75-80(in Chinese).
- [31] Berry J, Bjorkman O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1980, 31: 491-543.
- [32] 许大全, 张玉忠, 张荣铤. 植物光合作用的光抑制[J]. *植物生理学通讯*, 1992, 28(4): 237-243.
Xu D Q, Zhang Y Z, Zhang R X. Photoinhibition of photosynthesis in plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 1992, 28(4): 237-243(in Chinese).
- [33] Pessarakli M. Handbook of plant and crop stress[M]. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1999.
- [34] 陈伟洲, 许俊宾, 吴文婷, 等. 三种紫菜叶状体对高温胁迫的生理响应[J]. *热带海洋学报*, 2015, 34(1): 49-55.
Chen W Z, Xu J B, Wu W T, *et al.* Physiological responses of three species of *Pyropia* thallus to high temperature stress[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2015, 34(1): 49-55(in Chinese).
- [35] Govindjee C J. Chlorophyll *a* fluorescence transient as an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1990, 1015(2): 180-188.
- [36] 蔡时青. 光系统 II 的可逆失活和不可逆破坏[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2002.
Cai S Q. Reversible inactivation and irreversible damage in photosystem II[D]. Shanghai: Graduate School of the Chinese Academy of Sciences (Shanghai Institutes for Biological Sciences), 2002(in Chinese).
- [37] 陈华新, 安沙舟, 李卫军, 等. NaCl胁迫增强杂交酸模(*Rumex K-1*)幼苗叶片光系统 II 的耐热性[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(3): 345-350.
Chen H X, An S Z, Li W J, *et al.* NaCl stress increases the heat tolerance of PS II in leaves of *Rumex K-1* seedlings[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(3): 345-350(in Chinese).
- [38] 李伟新, 朱仲嘉, 刘凤贤, 等. 海藻学概论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
Li W X, Zhu Z J, Liu F X, *et al.* Introduction to marine phycology[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1982(in Chinese).
- [39] 王帅, 梁英. 盐胁迫对盐生杜氏藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(3): 33-38.
Wang S, Liang Y. Effects of salt stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Dunaliella salina*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(3): 33-38(in Chinese).

Low-salinity tolerance of two high-temperature resistant strains in *Pyropia yezoensis*

HUANG Linbin^{1,2,3}, HUANG Wen⁴, YAN Xinghong^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. International Research Center for Marine Biosciences at Shanghai Ocean University, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China;

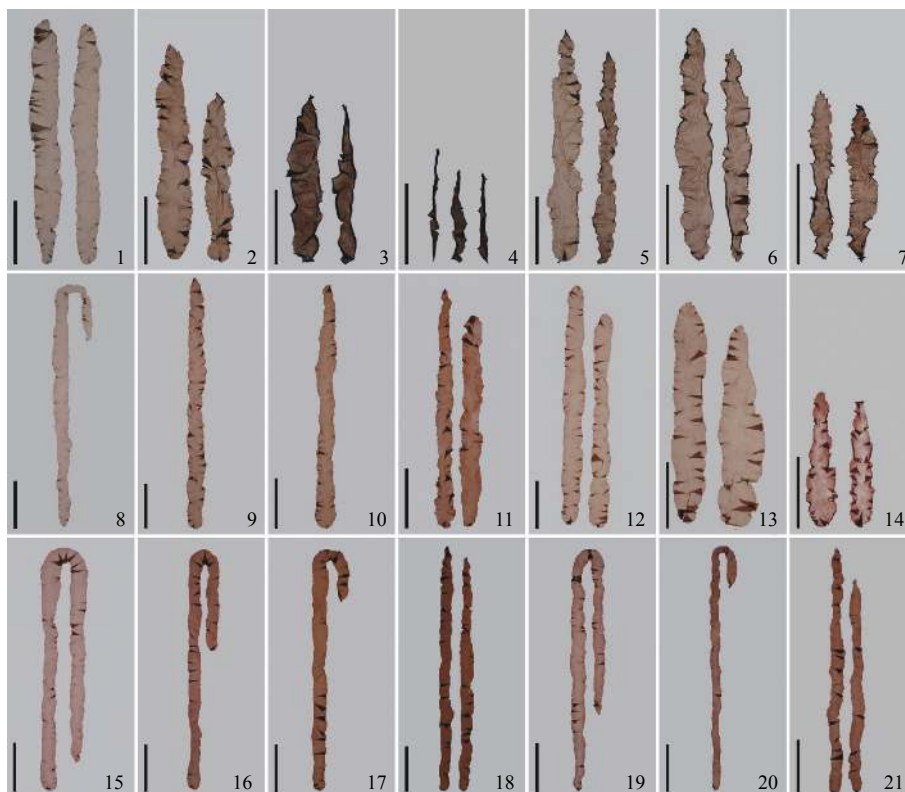
4. Ningde Marine Environmental Monitoring Center, Ningde 352100, China)

Abstract: The growth and maximum photon quantum yield of photosystem II (F_v/F_m) of the blades of two high-temperature resistant strains (YZ-4 and TM-18) and one wild-type strain (WT, used as control group) in *Pyropia yezoensis* were analyzed at high-temperatures or low-salinities, in order to screen out strains resistant to the two abiotic stresses. The results showed that YZ-4 and TM-18 blades grew faster than those of WT for 50-85 d under the optimal culture conditions (18 °C and salinity of 26). The ratios of F_v/F_m and contents of photosynthetic pigments were also higher than those of WT. The absolute growth rate and F_v/F_m of every strain showed high positive correlations. In addition, WT blades began to form spermatangia around 70 d, their absolute growth rate and F_v/F_m decreased significantly. When cultured at high-temperatures, F_v/F_m and absolute growth rates of the blades of every strain decreased. The higher the temperature or the longer the stress lasted, the greater the decline would be. F_v/F_m of WT, YZ-4 and TM-18 decreased by 56.7%, 43.2% and 28.7%, respectively, after 35 d of high-temperature stress at 24 °C. The growth of WT was completely stagnated after 15 d of high-temperature stress at 25 °C. Meantime, growth rates of YZ-4 and TM-18 were 0.51 and 0.84 cm/d, respectively, indicating that they were veritable high-temperature resistant strains. The effects of low-salinity stress on the blades were similar to those of high-temperature stress. After 35 d of low-salinity stress at salinity of 9, F_v/F_m of WT, YZ-4 and TM-18 decreased by 46.2%, 42.0% and 32.0%, respectively. The absolute growth rates of WT, YZ-4 and TM-18 were 0.12, 0.10 and 0.90 cm/d, respectively. Besides, growth of the blades of WT and YZ-4 cultured at salinity of 5 was greatly affected, in that the blades were deepened in color, curled and rotted after 15 d under stress, while TM-18 did not rot at the same salinity of 5 for 25 d. These results indicated that TM-18 was more tolerant to high-temperature and low-salinity stress than WT and YZ-4, and the internal reason was that the decrease of F_v/F_m of TM-18 blades was small. It indicated indirectly that F_v/F_m could be used as a new index for breeding of stress-resistant strains in *P. yezoensis*.

Key words: *Pyropia yezoensis*; blade; chlorophyll fluorescence; high-temperature resistance; low-salinity tolerance; abiotic stress

Corresponding author: YAN Xinghong. E-mail: xhyan@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31302185, 31072208); National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900606); Major Science and Technology Specific Program of Zhejiang Province (2016C02055-6); Science and Technology Planning Project of Jiangsu Province (BE2018335)



图版 条斑紫菜3个品系的叶状体在适宜条件(温度18 °C和盐度26)下培养50 d后再在不同的
高温或低盐度胁迫下培养15 d的形态

1~7、8~14和15~21分别为WT、YZ-4和TM-18的叶状体依次在1种适宜条件(温度18 °C和盐度26), 3种高温(22、24和25 °C)胁迫条件以及3种低盐度(15、9和5)的胁迫条件下培养的形态。图中标尺均为5 cm

Plate Morphology of the gametophytic blades of the three strains of *P. yezoensis* cultured under different high-temperature or low-salinity stress for 15 d, after being cultured at optimal conditions of 18 °C and salinity of 26 for 50 d
1-7, 8-14 and 15-21 were the gametophytic blades of WT, YZ-4 and TM-18 cultured at one optimal condition (18 °C and salinity of 26), three high-temperatures (22, 24 and 25 °C), and three low-salinities (15, 9 and 5), respectively. Scale bars represent 5 cm