

发状念珠藻对盐胁迫的响应

毕永红^{1,2} 邓中洋^{1,2} 胡征宇¹ 徐 敏^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 探讨了发状念珠藻(*Nostoc flagelliforme* Born. et Flah.) 对盐胁迫的耐受适应机制, 采用含不同浓度 NaCl(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mol/L) 的 BG11₀ 培养液处理具有正常生理活性的丝状体, 25±0.5℃, 40μmol/m²/s 下照光培养 12h, 测定藻体光合作用、呼吸作用等生理活性以及体内一些物质的含量, 结果表明: 随培养液中 NaCl 浓度的升高藻体光合作用、呼吸作用以及 PSII 活性(Fv/Fm) 降低; 质膜透性不断增大, 丙二醛含量升高, 自由水含量、自由水/束缚水比值下降, 类胡萝卜素、可溶性糖含量增加, 脯氨酸含量变化不大。由此可知, 盐胁迫下发状念珠藻正常生理活性受到抑制而表现出一定的抗逆能力; 该藻对盐胁迫具有一定的耐受能力, 类胡萝卜素的增加有助于清除藻体内的氧自由基, 可溶性糖可能是其主要渗透调节物质之一, 脯氨酸在盐胁迫中的渗透调节作用不大。

关键词: 盐胁迫; 发状念珠藻; 生理响应

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3207(2005)02-0125-05

土壤淹渍化是一个全球性的问题, 盐胁迫是生活在高盐环境中(如沿海滩涂、干旱盐碱地等)的生物所面临的主要环境压力之一, 因此对盐胁迫的应激机制和作物耐盐性的研究成为近年来植物研究中的一个热点^[1]。高盐度胁迫主要是通过降低外界环境水势并打破细胞内环境中的离子平衡, 从而引起膜结构、细胞器及某些酶结构的破坏, 对生物的正常生命活动造成不同程度的危害^[2]。研究盐胁迫问题有助于人们认识生物对环境的应激与适应机制, 探索高盐环境中的作物改良、遗传育种的方法。近年来关于藻类盐胁迫的研究越来越多, 国内外对蓝藻、绿藻、红藻等的盐胁迫研究得比较多^[3-11]; 一般而言藻类可以通过降低光合活性、积累无机离子(主要是 Na⁺) 和某些小分子有机物如岩藻糖、脯氨酸和甘油等来减小、缓解和避免高盐毒害。但不同藻类对盐胁迫的响应不尽相同, 如 NaCl 胁迫处理丝状蓝藻鱼腥藻 7120, 其净光合放氧速率和呼吸速率随 NaCl 浓度的升高而降低, 盐胁迫不改变其光合色素组成, 但导致藻胆蛋白的总含量降低和类胡萝卜素含量增加, 同时也改变了光能在两个光系统之间的分配^[3]; 对于念珠藻属的葛仙米(*Nostoc sphaeroides*) 和地木耳(*Nostoc commune*), 高盐度胁迫下光合活性均降低,

质膜透性随盐度增加而增加^[4,5]; 此外高盐胁迫可能抑制螺旋藻的生长及其酶的活性^[6], 促进柱胞鱼腥藻异形胞的分化并影响其固氮活性^[7]。国外的研究主要集中于盐胁迫对藻类叶绿素荧光、光合作用、碳氮代谢等的显著性影响上^[8-11], 关于盐胁迫下藻类的分子生物学应激机理研究也有一定的报道^[12]。

发状念珠藻(*Nostoc flagelliforme*, 俗名“发菜”, 以下简称) 是一种分布和生长在我国西北干旱半干旱地区的陆生藻类, 该藻适应陆生环境并存活于蒸发量十几倍于降水量的环境中, 盐胁迫是其生命活动过程中可能遇到的生存压力之一。有报道认为其不能适应高盐度环境^[13], 但笔者在野外调查中发现某些高盐度环境中也有其分布; 高盐环境中其生理状态以及对盐胁迫的抗性机理目前还不为人知, 为了解其在极端环境下的生长存活特性, 认识其对高盐度的生理调节能力, 为资源保护和人工培养提供理论依据和积累技术参数, 特进行本研究。

1 材料与方法

1.1 材料 采自内蒙古发菜产地, 为干燥丝状体, 在剔除杂草枯枝后蒸馏水清洗 3—4 次去掉污垢, 25±0.5℃, 40μmol/m²/s 使用 BG11₀ 培养液浸润 8—

收稿日期: 2003-12-11; 修订日期: 2004-10-30

基金项目: 中国科学院重点项目(No: 201504); 内蒙古科技厅项目(No: 20010206)资助

作者简介: 毕永红(1974—), 男, 湖北赤壁市人; 博士研究生; 主要从事藻类生理生态学研究

通讯作者: 胡征宇, huzy@ihb.ac.cn

11h 使其恢复生理活性^[14]备用。

1.2 方法 恢复生理活性后的发菜丝状体浸润在含不同浓度 NaCl(0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L)的修正 BG11₀ 培养液中, 25±0.5℃, 40μmol/m²/s 下光照培养 12h, 取样测定藻体内各指标的含量。每一盐度处理设置平行实验组 3 个。

质膜透性使用电导率仪法测定; 自由水含量采用阿贝氏折射仪测定; 类胡萝卜素含量参照文献^[15]方法测定。

丙二醛含量测定方法: 称量培养物 1g, 加入 10% TCA 2mL 和少量石英砂, 匀浆, 加入 8mLTCA 洗净匀浆液, 匀浆以 4000r/min 离心 10min, 上清液为样品提取液。吸取上清液 2mL(对照为 2mL 蒸馏水), 加入 2mL 0.6% TBA(硫代巴比妥酸, 用 10% TCA 配制), 混匀, 沸水水浴反应 15min, 迅速冷却后离心, 取上清液测定 532nm、600nm、450nm 波长的吸光度, $C(\mu\text{mol/L}) = 6.45 \times (A_{532\text{nm}} - A_{600\text{nm}}) - 0.56A_{450\text{nm}}$ 。

呼吸作用与光合作用测定采用远红外气体分析仪(CGT-7000, Shimadzu)在 25℃、40μmol/m²/s 下的封闭系统中进行, 具体参照高坤山等报道的方法^[16]。PS II 活性(Fv/Fm)的测定使用植物效率分析仪, 参照李敦海等的方法^[17]进行。

可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法, 取一定量的样品采用热水抽提法提取粗多糖, 5000r/min 离心 15min, 取上清液 1.0mL 加入蒽酮溶液 5mL, 100℃水浴 10min, 取出冷却, 紫外可见分光光度计测定波长 625nm 的吸光度, 通过标准曲线计算培养物分泌

的胞外多糖。

脯氨酸含量测定: 取样品 0.5g 左右, 加入 5mL 3% 的磺基水杨酸, 匀浆, 沸水浴 10min(不断振荡摇动), 冷却后 4000r/min 离心 10min, 上清液为提取的脯氨酸溶液。取 2mL 提取液加入 2mL 冰乙酸和 2mL 酸性茚三酮, 100℃水浴 30min, 溶液为红色。冷却后加入 4mL 甲苯, 振荡 30s, 静止片刻, 吸管吸取上层红色甲苯溶液于比色杯中, 以甲苯为空白, 在 520nm 波长比色。根据标准曲线计算出 2mL 测定液中的含量并计算单位鲜重样品脯氨酸含量。

2 结果

2.1 不同盐度对质膜稳定性的作用

在试验盐度范围内, 培养液中盐度越高, 质膜受到的伤害越大, 膜选择透性的破坏程度逐渐加剧, 质膜脂质氧化的程度会不断加深。表 1 显示随着培养液中的盐度增加, 质膜透性增大, 藻细胞内的电解质外渗比率增加, 电解质外渗量明显增多。此外还可以发现大于 0.4mol/L 浓度的 NaCl 胁迫对质膜的伤害比低浓度 NaCl 胁迫要大得多, 其电解质外渗率是低浓度胁迫下的数倍以上。而且从丙二醛(MDA)含量(表 1)的变化可看出在盐胁迫下膜脂发生了过氧化, 且脂质过氧化产物 MDA 的含量随盐度增加而几乎呈直线趋势增加, 这同时也说明在盐胁迫下膜脂中的氧自由基的积累增强, 膜结构和功能的损伤程度加剧。

表 1 不同 NaCl 盐胁迫下发菜藻体质膜透性(外渗率)及丙二醛含量

NaCl 浓度 NaCl Concentration (mol/L)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
外渗率 Relative permeability (%)	18.83	23.92	24.34	25.34	37.65	46.72	54.62
丙二醛含量 Content of MDA (μmol/g)	0.51	0.57	0.57	0.58	0.81	0.89	0.96

2.2 藻体中的自由水含量

盐胁迫下发菜水分含量发生明显的变化(图 1), 总含水量随盐度胁迫程度的增加不断下降, 而自由水和束缚水的变化情况不尽相同, 自由水含量随培养液中的盐度增加而逐渐减少, 且在 NaCl 浓度高于 0.4mol/L 时降幅显著加大; 束缚水的含量有一定程度的增加, 但其增加量小于自由水的减少量, 因而总含水量仍呈现下降趋势。

2.3 藻体中类胡萝卜素含量的变化

盐胁迫下发菜丝状体的外观颜色有一定的变化, 这种变化在高浓度的 NaCl 培养液中(0.8—1.0mol/L 试验组中)表现更为明显, 藻体在培养 12h

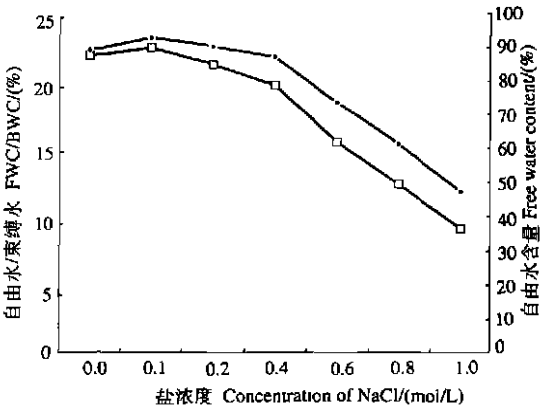


图 1 不同盐胁迫下藻丝体自由水含量及自由水/束缚水比值的变化
Fig. 1 Relation between free water content (FWC), ratio of FWC/BWC (bound water content) and salt concentration

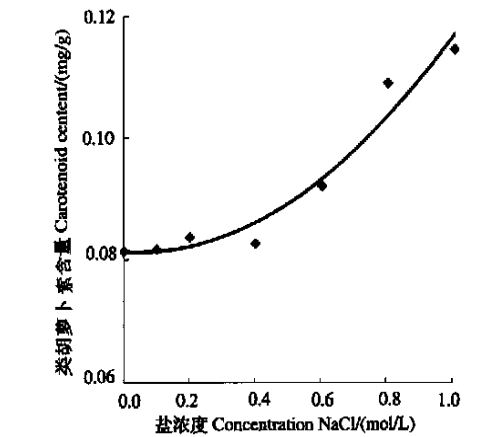


图 2 类胡萝卜素含量与盐胁迫的关系

Fig 2 Relationship between carotenoid content and NaCl concentration

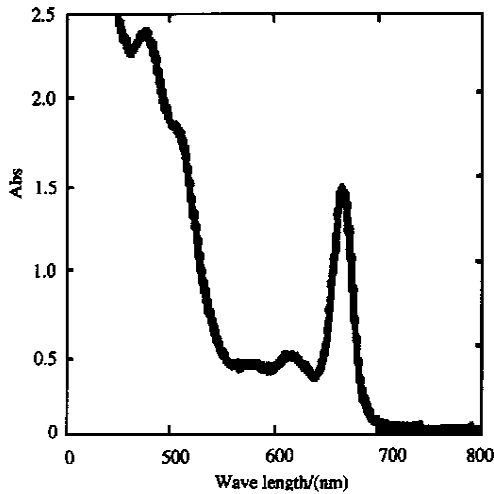


图 3 1.0 mol/L 盐胁迫下发菜色素的吸收光谱

Fig 3 Spectrum of *Nostoc flagelliforme* under salt stress

后开始出现微黄色,图 2 中的数据说明这种微黄色可能主要是类胡萝卜素含量升高引起的。图 3 为盐度 1.0 mol/L 培养液中藻体的色素吸收光谱(对照组的扫描图谱与其类似,图略),从扫描图可以发现盐胁迫下藻体色素种类没有发生变化,叶绿素依然存在(其特征吸收峰没有消失,但叶绿素可能受到高盐度的伤害而有一定数量的降解,从其光合作用强度的下降及 PS II 活性的降低可以推断),即高盐度胁迫对藻体色素组分没有影响,它只是导致藻体内的不同色素含量发生变化,某些色素含量增加导致藻体颜色有一定程度的改变。

2.4 盐胁迫下渗透调节物质含量的变化

试验测定了藻类渗透调节物质——多糖和脯氨酸含量随培养液盐度变化的基本情况,从图 4 中可以看出多糖含量随培养液中的盐度增加呈直线增加

趋势,生物统计相关分析证明二者具有显著的相关关系($P < 0.01$);即盐度对水溶性多糖的分泌具有重要作用。图 5 是不同盐度下的藻体脯氨酸含量,脯氨酸含量与盐胁迫之间没有直接的关系,盐度对藻体脯氨酸含量的影响不明显。

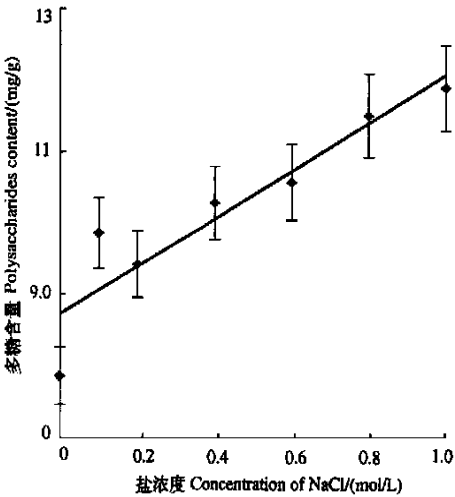


图 4 多糖含量与培养液 NaCl 浓度之间的关系

Fig 4 Relationship of polysaccharides content and NaCl concentration

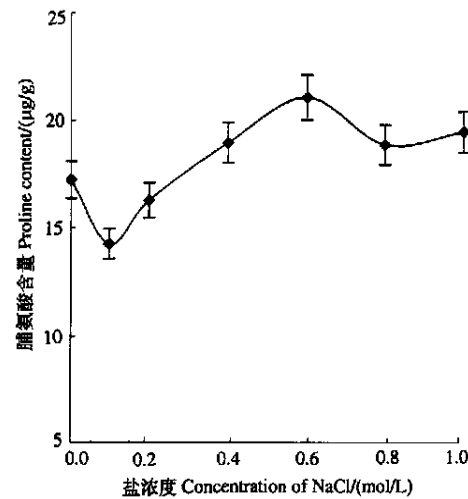


图 5 不同盐胁迫下藻体的脯氨酸含量

Fig 5 Proline content under NaCl stress

2.5 盐胁迫下发菜的生理活性

盐度胁迫下发菜丝状体的生理活性发生很大改变(表 2),随培养液中 NaCl 浓度的增加,发菜所承受的环境压力增大,光合色素系统 PS II 的活性逐渐下降,且当 NaCl 浓度改变时,其下降的幅度也明显改变。试验测定的丝状体光合作用与 PS II 活性的变化基本一致,净光合作用强度也随盐度增加而逐渐减弱,在盐度大于 0.6 mol/L 以后光照下已经测不到光合作用。呼吸作用强度也随盐度的增加而减小,

表 2 盐度胁迫下发菜丝状体的生理活性
Tab. 2 Effect of NaCl stress on net photosynthesis, PSII activity and respiration

NaCl 浓度 NaCl Concentration(mol/L)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
光合作用强度 Photosynthesis($\mu\text{mol/g/h}$)	32.16	28.76	24.41	7.16	0.45	-2.42	-2.70
呼吸速率 Respiration rate($\mu\text{mol/g/h}$)	3.57	3.60	2.44	1.43	1.80	1.62	1.43
最大光化学效率 Fv/ Fm	0.528	0.361	0.34	0.25	0.178	0.132	0.107

但当盐度大于 0.8mol/L 呼吸作用有一定程度增强的趋势。

3 讨论

从结果可以发现随培养液中 NaCl 浓度的升高发菜藻体发生了明显的生理改变, 首先是丝状体质膜结构和功能的变化, 质膜透性不断增大, 从而导致细胞内的电解质不断外渗, 改变了细胞的内环境平衡^[15], 这种平衡的破坏引起氧自由基在膜脂中的积累, 直接导致丙二醛(MDA) 含量升高, 膜脂过氧化不断加剧, 这加速了盐度对膜结构和功能的伤害。这种伤害引起生理活性的下降和抗性的增强, 表现为藻体内自由水含量的降低(意味着生理活性的下降)和自由水/ 束缚水比值的下降(意味着机体抗性的增强)。生理活性的下降从测定的光合作用、呼吸作用以及 PS II 活性(Fv/ Fm) 的结果可以证实, 而类胡萝卜素和可溶性糖的含量增加则是藻体抗性增强的体现, 类胡萝卜素不仅是光合作用的辅助色素, 更是生命有机体内的一种抗氧化保护剂, 其含量的增加可能与体内清除氧自由基的需要密切相关; 而水溶性多糖的增加主要是发菜为了适应高渗透压力的一种自我调节, 水溶性多糖含量的增加可以增加发菜的渗透势, 减弱高盐度胁迫下水分的丧失程度; 同时某些糖可以与膜磷脂和膜蛋白的亲水端结合, 形成一个似水环境, 维持膜的稳定性; 这些糖类既可以调节渗透压又不至于对酶的活性产生很大抑制, 是盐胁迫下发菜渗透调节的必然选择。

作为另外一种重要的渗透调节物质——脯氨酸, 其含量在盐度胁迫下却没有太大变化, 这一结果与李运广^[4]、李敦海^[5]以及 Blumwald^[18]等的结果是一致的, 可能是念珠藻在面对盐胁迫时具有共同的调控机制^[19]。比较多糖和脯氨酸在盐胁迫下含量的不同变化, 不难推断在盐度所产生的渗透胁迫中, 多糖是发菜体内的重要渗透调节物质, 而脯氨酸对这种胁迫没有明显的调节作用。

综上所述, 发状念珠藻对盐胁迫具有一定的耐受和抵抗能力, 能够适应一定的盐度环境, 多糖是盐

胁迫的主要渗透调节物质, 但高盐度对发菜细胞的伤害作用是显著的。

参考文献:

[1] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 66—71

[2] Yu S W, Tang Z C. Plant physiology and molecular biology[M]. Beijing: Science Press. 1999, 252—269[余叔文, 汤章城, 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社. 1999, 252—269]

[3] Ouyan Y X, Shi D J. Changes in photosynthetic properties of a filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 in response to NaCl stress[J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2003, 27(1): 74—77[欧阳叶新, 施定基. 鱼腥藻 7120 响应 NaCl 胁迫的光合特性. 水生生物学报, 2003, 27(1): 74—77]

[4] Li Y G, Gao K S. Effects of hyperhaline stress on the physiological and biochemical characteristics of *Nostoc commune* and *Nostoc sphaeroides*[J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2003, 27(3): 227—231 [李运广, 高坤山. 盐胁迫对地木耳和葛仙米生理生化特性的影响. 水生生物学报, 2003, 27(3): 227—231]

[5] Li D H, Liu Y D, Song L R. The effects of salt stress on some physiological and biochemical characteristics of *Nostoc phaeroides*[J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 1999, 23(5): 414—419[李敦海, 宋立荣, 刘永定. 盐胁迫对葛仙米生理生化特性的影响. 水生生物学报, 1999, 23(5): 414—419]

[6] Liu Z L, Li P Y. The effect of NaCl stress on the antioxidase activity and growth of *Spirulina maxima* [J]. *Chinese bulletin of botany*, 1998, 15(3): 43—47[刘志礼, 李鹏云. NaCl 胁迫对螺旋藻生长及抗氧化酶活性的影响. 植物学通报, 1998, 15(3): 43—47]

[7] Huang K Y, Guo H L. The effect of salt stress on cell structure and N₂ fixation in blue green alga *Anabaena cylindrica*[J]. *Chinese bulletin of botany*, 1998, 15(3): 54—56[黄开耀, 郭厚良. 盐胁迫对柱胞鱼腥藻细胞结构和固氮作用的影响[J]. 植物学通报. 1998, 15(3): 54—56]

[8] Macler, B A. Salinity effects on photosynthesis, carbon allocation, and nitrogen assimilation in the red alga, *Gelidium coulteri*[J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(3): 690—694

[9] Masojidek J, Torzillo, G, Kopecky 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]. *J. Appl. Phycol.* 2000, 12(3): 417—426

[10] Jacob A, Kirst, G O, Wiendke C. Physiological responses of the Antarctic green alga *Prasiola crista* sp. antarctica to salinity stress [J]. *J. Plant Physiol.*, 1991, 1: 57—62

- [11] Reed R H, Stewart W D P. The responses of cyanobacteria to salt stress. In: Rogers L J, Gallan J R, (eds), *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*. Clarendon Press, 1988, 217—231
- [12] Zhang X N, Chen H Y, Qu Z C. *et al.* Clone and prokaryotic expression of the fructose diphosphate aldolase full length cDNA of *Dunaliella salina* induced by NaCl [J]. *Journal of Fudan University (Nature Science)*, 2002, **41**(5): 593—595 张晓宁, 陈火英, 曲志才等. NaCl 诱导表达的盐藻果糖 1, 6 二磷酸醛缩酶基因克隆及原核表达. 复旦学报(自然科学版), 2002, **41**(5): 593—595]
- [13] Qiu M X, Liu J Q. Endangered resource of *Nostoc flagelliforme* [J]. *Progress of Resources and Environments*. 1992, (3): 39—40 [邱明新, 刘家琼. 发菜资源面临枯竭. 资源生态环境网络研究动态. 1992, (3): 39—40]
- [14] Zhang Z L, Plant physiological experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990, 88—91 [张志良, 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990, 88—91]
- [15] Gao K S, Qiu B S, Xia J R. *et al.* Light dependency of the photosynthetic recovery of *Nostoc flagelliforme* [J]. *J. Appl. Phycol.* 1998, **10**: 51—53
- [16] Li D H, Liu Y D. The relationship between water stress and the chlorophyll fluorescence of *Nostoc sphaeroides* (Cyanobacterium) [J]. *Plant Physiology Communications*, 2000, **36**(3): 205—208 [李敦海, 刘永定. 念珠藻葛仙米叶绿素荧光与水分胁迫的关系. 植物生理学通讯, 2000, **36**(3): 205—208]
- [17] Wiggins M P. Role of water in some biological process [J]. *Microbiol Rev.*, 1990, **54**: 432—449
- [18] Blumwald E, Tetlow Osmoregulation and cell composition in salt adaptation of *Nostoc muscorum* [J]. *Arch Microbiol.*, 1982, **132**: 168—172
- [19] Iyer V, Fernandes T A, Apte S K. A role for osmotic stress induced proteins in the osmotolerance of a nitrogen fixing cyanobacterium, *Anabaena* sp. Strain Ir 31 [J]. *J. Bacteriol.* 1994, **176**(18): 5868—5870

RESPONSE OF *NOSTOC FLAGELLIFORME* TO SALT STRESS

BI Yong-Hong^{1,2}, DENG Zhong-Yang^{1,2}, HU Zheng-Yu¹ and XU Min^{1,2}

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: *Nostoc flagelliforme* (Berk. & Curtis) Born. et Flah. is a terrestrial filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium that is distributed in Algeria, China, France, Czech, Slovakia, Mexico, Mongolia, Morocco, Russia, Somalia and USA. It is distributed on northern and northwestern parts of China and has been used as a health food and herbal medicine by Chinese and other Asian populations over centuries. Mass culture of *N. flagelliforme* in an engineered system is sought but has not been available, due to the lack of understanding the resistance mechanism and growth physiology of the organism under extreme variable environments. Arid and semiarid steppe is the habitat of this alga in China and alkaline soil is the main growth substrate. It is interesting that the alga can survive and grow in such atrocious soil. This paper was conducted to study the effect of salt stress on this terrestrial alga. The modified BG11₀ culture medium containing different NaCl concentration: 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.0 mol/L, were used to culture algal mats. Algal mats were kept in BG11 8—11h before experiment for physiological recovery. The algal physiological activity and some special substance, such as MDA, polysaccharides, carotenoid and proline, were tested after 12h treatment under 25 ± 0.5 °C, 40 μmol/m²/s. The results indicated that NaCl stress reduced net photosynthesis, respiration and PS II activity. When NaCl in medium is beyond 0.2 mol/L, there were marked decrease in net photosynthesis, respiration and photochemical efficiency. Due to salt stress, permeability of plasma membrane, MDA contents (the production of lipid peroxidation), carotenoid content and polysaccharides content increased, free water content (FWC) and FWC/BWC (bound water content) decreased, while proline content did not change, it meant there is no significant effect of proline in this alga to response to high salt stress. It could be concluded that algal physiological activity was inhibited under salt stress, high salt concentration can lead to increase in the lipid peroxidation and relative permeability, alter the pigments and influence algal physiological function. On the other hand, this alga also had a certain extent resistance ability to salt stress. Content of carotenoid and polysaccharides were increased to eliminate free radical and regulate osmotic pressure, respectively.

Key words: Salt stress; *Nostoc flagelliforme*; Physiological response