

温度对多肋藻小孢子体生长及抗氧化生理的影响

李国梁¹, 汪文俊^{1,2}, 李宝贤¹, 梁洲瑞¹, 鲁晓萍¹, 李晓捷³

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能试验室, 山东 青岛 266237;

3. 山东东方海洋科技股份有限公司, 山东省海藻遗传育种与栽培技术重点实验室, 山东 烟台 264003

摘要: 温度是影响藻类生长发育的关键因素之一。本研究探讨了 6~22 °C 下, 多肋藻(*Costaria costata*)小孢子体的生长情况及抗氧化生理特性, 以探明其适温机制, 为多肋藻海区栽培提供支撑。结果发现, 培养初期(5 d 内), 多肋藻小孢子体在 18 °C 下具有最大的相对生长速率(RGR), 22 °C 下藻体稍部严重穿孔溃烂; 随着培养时间延长(10 d), 10 °C 下藻体 RGR 最高。实验周期内, 不同温度组间 F_v/F_m 无显著差异, 6~14 °C 下藻体均具有较高的总光合速率(P_t)和最大表观光合速率(P_{nmax}), P_{nmax} 随着培养时间的延长在 10 °C 下最高。培养 3 d 时, 6 °C 下呼吸速率(R_d)最高; 22 °C 下, 藻体 R_d 随着培养时间延长显著上升, 表明增强呼吸作用是多肋藻小孢子体对低温和高温胁迫的共同响应。22 °C 高温胁迫下, 胡萝卜素(Car)和岩藻黄素(Fucox)、可溶性蛋白的含量升高; 6 °C 时, SOD 酶活高于其他温度组。在 6~18 °C 范围内, 灰分、碳水化合物和粗纤维的积累与温度具有一定的正相关性。综上, 多肋藻小孢子体可在 6~18 °C 生长, 其中以 10 °C 左右为佳。

关键词: 多肋藻; 温度; 相对生长速率; 光合作用; 抗氧化系统; 生化组成

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)09-1300-12

多肋藻(*Costaria costata*)隶属于褐藻门(Phaeophyta), 褐藻纲(Phaeosporae), 海带目(Laminariales), 海带科(Laminariaceae), 多肋藻属^[1], 自然分布于美国阿拉加斯加到加利福尼亚沿岸、俄罗斯远东的鄂霍次克海和大彼得湾、朝鲜半岛东北部、日本北部沿岸海域^[2-4]。多肋藻具有很高的营养价值与经济价值, 富含微量元素、褐藻多糖和其他活性物质, 在工业、医疗、食品、饲料等领域具有较大的开发利用潜力^[5-8]。多肋藻不含木质素, 作为提炼生物乙醇的原材料, 能使精炼工艺更加简单化, 有望成为生物能源的原料而代替化石燃料, 以延缓全球变暖等温室效应^[9]。同时, 多肋藻具有独特的形态结构以及较广的生态适应性, 可应用于海藻场的修复及海洋牧场的构建,

为海洋动物提供食物和庇护所。

发展多肋藻规模化养殖对我国海藻栽培产业的健康多样化发展具有重要意义, 但我国没有多肋藻自然资源记录^[10]。开发新兴养殖对象, 掌握其生活史不同阶段的生长发育调控规律是首要前提。为了建立多肋藻高效、精准调控的繁育和养殖技术体系, 必须结合室内生态学实验数据。目前, 国内外学者针对环境因子对多肋藻配子体生长发育影响^[11-14]、多肋藻营养成分组成^[15-17]以及自然资源调查^[18-20]开展了研究。对多肋藻孢子世代的研究主要集中在刚受精形成的幼孢子体^[21]及成熟孢子体^[22]阶段, 而多肋藻在不同生长发育阶段对温度的响应不同, 孢子体幼体与成体生长的适宜温度差异显著^[23]。多肋藻小孢子体对温度

收稿日期: 2021-04-29; 修订日期: 2021-09-04.

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”项目(2018YFD0901504); 国家藻类产业技术体系项目(CARS-50); 中国水产科学研究院基本科研业务费“创新团队”项目(2020TD27).

作者简介: 李国梁(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为藻类资源与利用. E-mail: 898587535@qq.com

通信作者: 汪文俊, 研究员, 研究方向为藻类资源与利用. E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

的适应性, 决定了苗种出库时间和海区暂养周期, 影响着多肋藻在海区的养殖时长和养殖效率。而目前未见该方面的研究报道。

本研究探讨了多肋藻小孢子体在不同温度下的生长、光合作用以及抗氧化生理特性, 以探究其适温机制, 为多肋藻的引种栽培及海藻场的建设奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

多肋藻孢子体幼苗(5~20 cm)采自山东荣成育苗场(由东方海洋科技股份有限公司提供)。暂养条件: 温度 10 °C, 光照强度 60 μmol/(m²·s), 光周期 12L : 12D, 营养盐(NO₃⁻-N: 1 mg/L, PO₄³⁻-P: 0.1 mg/L), 盐度 31。

1.2 实验方法

1.2.1 温度对多肋藻小孢子体生长的影响 每处理组挑选鲜重约 3 g 的健康完整藻体置于 2 L 锥形瓶, 在 GXZ 智能型光照培养箱中充气培养, 温度梯度设置为: 6 °C、10 °C、14 °C、18 °C、22 °C。其他培养条件: 光照强度 60 μmol/(m²·s), 光周期 12L : 12D, 营养盐(NO₃⁻-N: 1 mg/L, PO₄³⁻-P: 0.1 mg/L), 盐度 31。持续培养 10 d, 每隔 3 d 更换 1 次培养液, 第 3、5、10 天称量藻体鲜重, 每实验组设置 3 个平行。实验结束(10 d), 将藻体擦干表面水分, 用液氮快速冷冻, 然后储存于 -80 °C, 用于后续营养成分、光合色素及抗氧化指标的测定。

以相对生长速率(relative growth rate, RGR)为指标衡量温度因子对多肋藻幼苗生长的影响。计算公式为:

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

式中, W_0 为初始藻体的鲜重(g), W_t 为实验结束时藻体的鲜重(g), t 为实验持续的时间(d)。

1.2.2 温度对多肋藻小孢子体光合作用的影响

(1) 最大荧光产量(F_v/F_m)值的测定 温度设置及其他培养条件同 1.2.1, 培养 0 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 和 9 d 后, 测定藻体 F_v/F_m 值。测定方法: 取整棵藻体进行 20 min 的暗适应后, 采用 IMAGING-PAM (WALZ, 德国) 测定 PSII F_v/F_m 值,

每处理组随机挑选 9 个位点进行测定(22 °C 组挑选无溃烂组织进行 F_v/F_m 值的测定)。

(2) 表观光合速率、呼吸耗氧速率和总光合速率的测定 在 6 °C、10 °C、14 °C、18 °C、22 °C 温度下分别培养 1 d、3 d、5 d 和 10 d 后进行测定。测定方法: 取 0.02 g 藻体组织, 采用液相氧电极 (Hansatech Oxygraph, 英国) 进行测定, 温度由恒温箱(Julabo, 德国) 进行控制, 反应介质为 2 mL 新培养液, 每次测定更换新鲜反应介质。标定零刻度方法为饱和蒸馏水加入少量保险粉(Na₂S₂O₄·2H₂O)。通过移动光源 LED 调节光强来测定最大表观光合速率; 呼吸速率则通过黑盒子盖住反应杯, 形成暗环境后进行测定。并根据以下公式计算总光合速率:

$$\text{总光合速率}(P_t) = \text{最大表观光合速率}(P_{nmax}) + \text{呼吸速率}(R_d)$$

1.2.3 营养成分含量的测定 粗蛋白的测定采用凯氏定氮法^[24], 测定的含氮量乘以蛋白质换算系数 6.25 即可得到粗蛋白含量; 脂肪的测定采用索氏提取法^[25]; 灰分的测定采用灼烧法^[26]; 水分的测定采用卫生部 2010 年提出的食品中水含量的测定方法^[27]; 粗纤维的测定采用卫生部 2004 年提出的植物中粗纤维含量的测定方法^[28]。碳水化合物计算公式如下:

$$\text{碳水化合物} = 100 - \text{水分} - \text{灰分} - \text{蛋白} - \text{脂肪}$$

1.2.4 色素含量的测定 色素含量的测定方法参照 Wang 等^[29]的方法进行, 具体操作如下: (1) 称取 1 g 藻体置于 15 mL 离心管中, 用 4 mL 二甲基亚砜(DMSO) 在室温下黑暗中提取 60 min, 将提取液置于 4 °C 保存待测; (2) 将上述 DMSO 处理完的藻体用超纯水进行冲洗两遍, 置于 4 mL 丙酮(100%) 中, 在室温下黑暗中再提取 60 min, 将提取液置于 4 °C 保存待测; (3) 用紫外可见分光光度计分别测定上述两种提取液的吸光度, 根据以下公式计算叶绿素 a (Chl a)、胡萝卜素(Car)和岩藻黄素(Fucox)的浓度:

$$\text{A1 混合液: DMSO : 水 } (V : V) = 4 : 1$$

$$\text{Chl a} = A_{665}/72.8$$

$$\text{Fucox} = [A_{480} - 0.722(A_{631} + A_{582} - 0.297A_{665}) - 0.049A_{665}] / 130$$

A2 混合液: 丙酮 : 己烷 ($V: V$)=10 : 1

$$\text{Car}=(\text{A}_{480}-0.033\text{A}_{661})/193$$

A3 混合液: 丙酮 : 甲醇 : 水($V: V: V$)=3 : 1 : 1)

$$\text{Chl a}=\text{A}_{664}/73.6$$

$$\text{Fucox}=[\text{A}_{470}-1.239(\text{A}_{631}+\text{A}_{581}-0.300\text{A}_{664})-0.0275\text{A}_{664}]/141$$

Chl a 与 Fucox 总含量为 A1 和 A3 混合液测定值的总和; Car 总含量为 A2 提取液测定值与 Fucox 总含量之和。

1.2.5 其他生化指标的测定 可溶性蛋白、MDA、 H_2O_2 含量以及 SOD、CAT、APX、ASAFR 比活力分别使用对应的测试盒测定(南京建成生物公司)。

1.3 数据处理

采用 Excel 对数据进行处理和制图, SPSS 18.0 统计软件进行方差分析、多重比较分析, 若 $P<0.05$ 则认为数据间差异显著。

2 结果与分析

2.1 温度对多肋藻小孢子体生长及光合作用的影响

2.1.1 相对生长速率(RGR) 如图 1 所示, 培养 3 d 时, 多肋藻在温度 22 °C 时的 RGR 呈负增长, 显著低于其他温度组($P<0.05$)。培养初期(5 d), 18 °C 实验组的 RGR 最大, 显著高于 6 °C 和 22 °C 组($P<0.05$), 但与 10 °C 和 14 °C 组无显著性差异($P>0.05$); 22 °C 组藻体病烂情况严重, 藻体上出现大的白斑和穿孔, 整体颜色褪去呈浅褐色, 到后期顶部叶片溃烂脱落(图 2)。到第 10 天, 10 °C 组的 RGR 最大, 但与 6 °C、14 °C 和 18 °C 组无显著性差异($P>0.05$)。14 °C 和 18 °C 组 RGR 随着培养时间的延长显著线性下降($P<0.05$)。6 °C 组在不同时间段内的 RGR 没有显著性差异($P>0.05$)。

2.1.2 F_v/F_m 如图 3 显示, 所有温度组中的多肋藻小孢子体的 F_v/F_m 均在培养 12 h 后显著上升, 高于对照组(0 h, $P<0.05$), 在第 9 天时下降到与对照相当的水平。6 °C 组, 从 12 h 到 9 d, F_v/F_m 随培养时间的延长呈线性下降趋势。10~22 °C 组, 从 12 h 到 5 d, F_v/F_m 没有显著性变化($P>0.05$)。

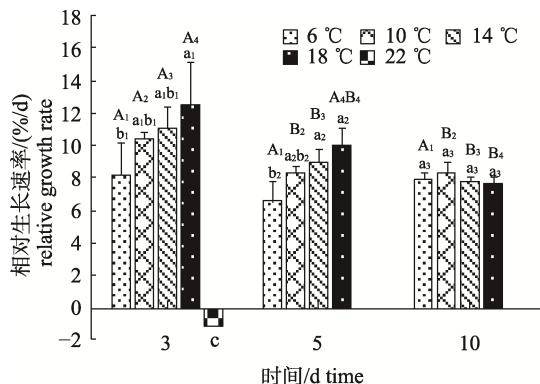


图 1 温度对多肋藻小孢子体相对生长速率的影响

柱状图上不同小写字母表示同一时间内不同实验组间差异显著($P<0.05$), 字母右下角数字表示不同时间段; 不同大写字母表示同一实验组在不同时间段间差异显著性($P<0.05$), 字母右下角数字表示不同温度处理组。

Fig. 1 Effects of temperature on the relative growth rate of young sporophyte of *Costaria costata*

Different small letters on the histogram indicate significant difference between different experimental groups at the same time ($P<0.05$), and the numbers at the lower right corner of the letters indicates different time periods. Different capital letters indicate significant difference between different time periods in the same experimental group ($P<0.05$), and the numbers at the lower right corner of the letters indicates different temperature treatment groups.

18 °C 组, 在 7 d 时 F_v/F_m 显著下降, 低于 12 h 和 5 d 时($P<0.05$), 在 9 d 时又有所上升。同一培养时间段内, 在 12 h、5 d 和 9 d 各温度组间 F_v/F_m 无显著性差异($P>0.05$); 在 1 d, 18 °C 组 F_v/F_m 显著低于 6 °C 和 14 °C 组($P<0.05$), 但与 10 °C 和 22 °C 组无显著性差异($P>0.05$); 在 3 d, 22 °C 组与 14 °C 组 F_v/F_m 无显著性差异($P>0.05$), 但显著高于其他组($P<0.05$)。22 °C 组在 7 d 的 F_v/F_m 显著高于 18 °C 组($P<0.05$), 而与其他实验组间无显著性差异($P>0.05$)。

2.1.3 光合速率 如图 4a 所示, 1 d 时, 多肋藻小孢子体在 10 °C 的 P_t 最高, 显著高于 6 °C、18 °C 和 22 °C 组($P<0.05$)。在第 3 天, 18 °C 组 P_t 显著低于其他组($P<0.05$), 其他温度组间无显著差异($P>0.05$)。在第 5 天和第 10 天, 18 °C 和 22 °C 组 P_t 低于其他 3 个温度组, 尤其 22 °C 组, 但差异不显著($P>0.05$)。相同温度下, 各温度组 P_t 都随着培养时间的延长出现不同程度的下降趋势。其中, 22 °C 组在培养 5 d 后 P_t 显著降低($P<0.05$)。1 d 和

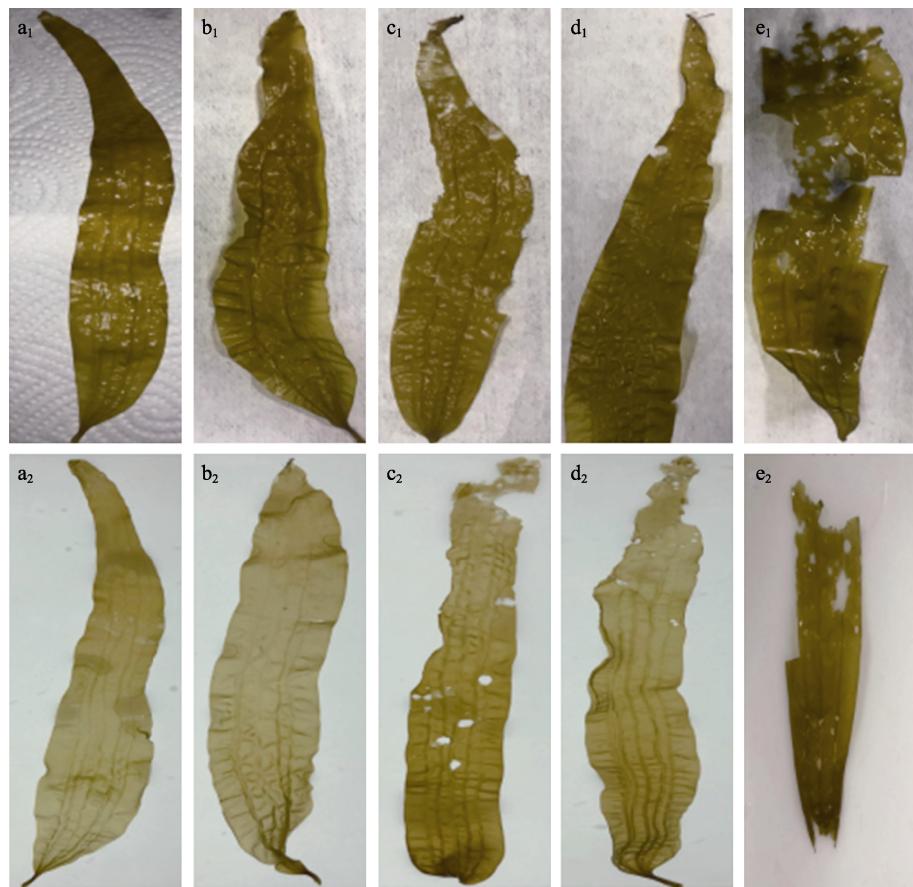
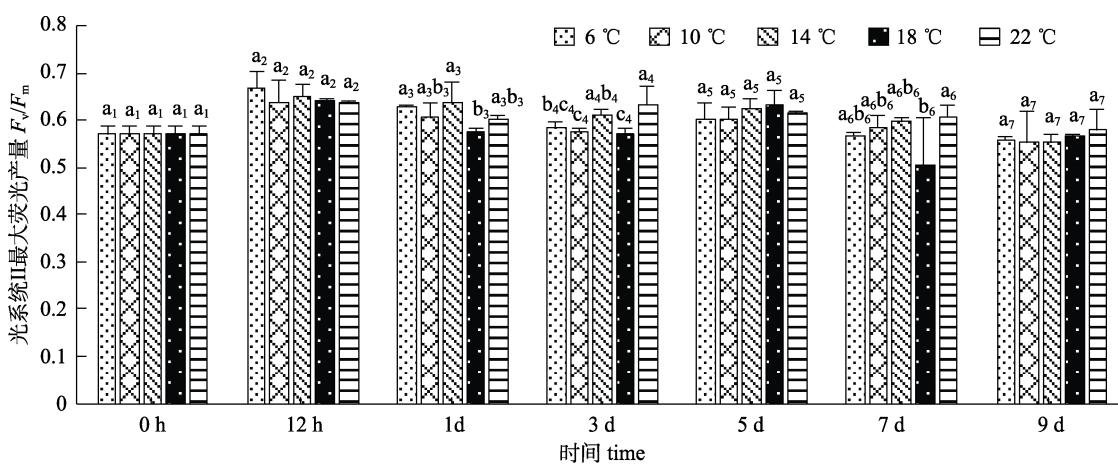


图2 第5天及第10天各温度组多肋藻小孢子体的生长情况

a. 6 °C组; b. 10 °C组; c. 14 °C组; d. 18 °C组; e. 22 °C组. 字母右下角数字1表示第5天, 2表示第10天.

Fig. 2 The growth of young sporophyte of *Costaria costata* under different temperature treatments on day 5 and day 10
a. 6 °C; b. 10 °C; c. 14 °C; d. 18 °C; e. 22 °C. The numbers at the lower right corner of
the letters indicate different time periods (1: 5 d; 2: 10 d).

图3 温度对多肋藻小孢子体 F_v/F_m 的影响

柱状图上不同小写字母表示同一时间内不同实验组间 F_v/F_m 差异显著($P<0.05$), 字母右下角数字表示不同时间段.

Fig. 3 Effects of temperature on F_v/F_m of young sporophyte of *Costaria costata*
Different small letters on the histogram indicate significant difference between different experimental groups at the same time
($P<0.05$), and different capital letters indicate significant difference between different time periods in the same experimental
group ($P<0.05$), the numbers at the lower right corner of the letters indicate different time periods.

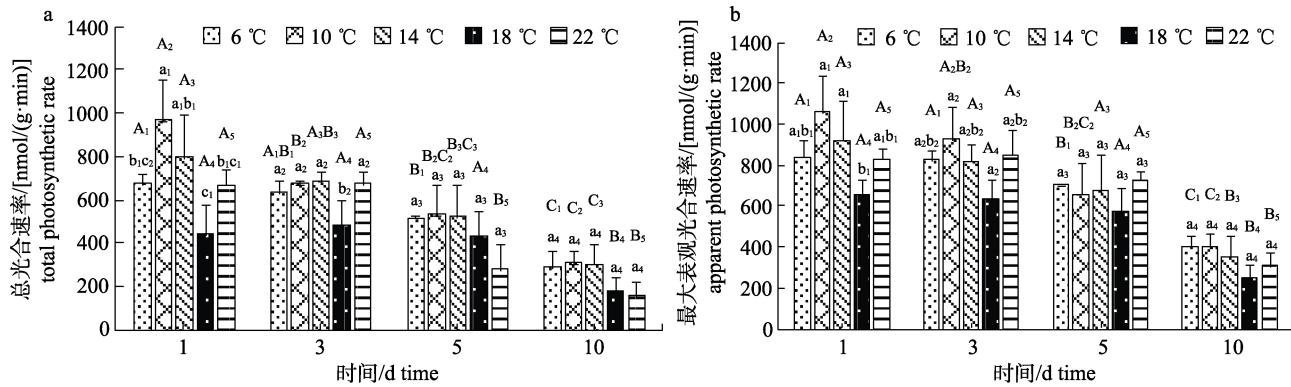


图4 温度对不同培养时间段多肋藻小孢子体光合速率的影响

柱状图上不同小写字母表示同一时间内不同温度组间差异显著($P<0.05$),字母右下角数字表示不同时间段;不同大写字母表示同一温度组在不同时段间差异显著($P<0.05$),字母右下角数字表示不同温度处理组。

Fig. 4 Effects of temperature on photosynthetic rate of young sporophyte of *Costaria costata* in different culture periods
Different small letters on the histogram indicate significant difference between different temperatures at the same time ($P<0.05$), and the numbers at the lower right corner of the letters indicates different time periods. Different capital letters indicate significant difference between different time periods in the same experimental group ($P<0.05$), and the numbers at the lower right corner of the letters indicate different temperature treatment groups.

3 d 时, 小孢子体在 10 ℃时的 P_{nmax} 最高, 但与 6 ℃、14 ℃和 22 ℃组间无显著差异($P>0.05$, 图 4b)。在第 5 天和第 10 天时, 各实验组间 P_{nmax} 无显著差异($P>0.05$), 而在第 10 天, 小孢子体 P_{nmax} 随温度升高呈下降趋势。同一培养时间段内, 所有温度组 P_{nmax} 在培养 5 d 后均显著降低($P<0.05$)。

2.1.4 光合色素含量 由图 5 可见, 温度对多肋藻小孢子体 Chl a、Fucox 和 Car 的含量具有显著影响($P<0.05$)。高温 22 ℃组的 Chl a 含量最高, 显著高于其他组($P<0.05$), 14 ℃组次之; 18 ℃组含量最低, 与 6 ℃、10 ℃组间无显著性差异($P>0.05$)。14 ℃组的 Fucox 含量最高, 显著高于 10 ℃和 18 ℃组($P<0.05$), 但与 6 ℃和 22 ℃组间无显著性差异($P>0.05$); 除 14 ℃组外, 其他实验组 Fucox 含量无显著性差异($P>0.05$)。18 ℃组 Car 含量最低, 但与 6 ℃、10 ℃组无显著差异($P>0.05$); 14 ℃组 Car 含量最高, 但与 22 ℃组无显著差异($P>0.05$)。

2.1.5 呼吸速率 温度显著影响多肋藻小孢子体 R_d ($P<0.05$)。如图 6 所示, 培养 1 d, 随温度的升高, R_d 呈下降、上升又下降趋势, 在 10 ℃时到达最低点, 但 10 ℃组与 6 ℃、14 ℃和 22 ℃组 R_d 无显著差异($P>0.05$)。18 ℃组显著高于 10 ℃和 14 ℃组($P<0.05$)。第 3 天时, 随着温度胁迫程度增加, R_d 呈下降趋势, 但各组间无显著差异

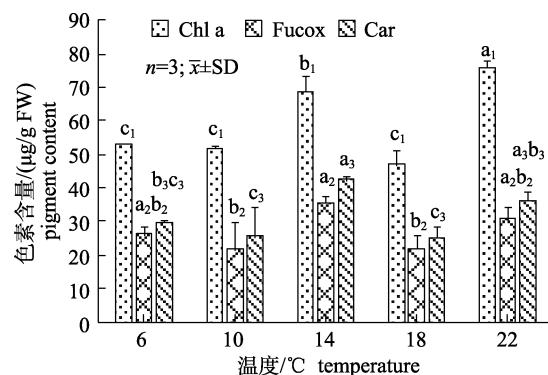


图5 温度对多肋藻小孢子体光合色素含量的影响
柱状图上不同小写字母表示某一色素在不同实验组间差异显著($P<0.05$),字母右下角数字表示不同色素(1-Chl a, 2-Fucox, 3-Car)。

Fig. 5 Effects of temperature on photosynthetic pigment content of young sporophyte of *Costaria costata*
Different small letters on the histogram indicate significant difference of a pigment content between different experimental groups ($P<0.05$), the numbers at the lower right corner of the letters indicate different pigments (1-Chl a, 2-Fucox, 3-Car).

($P>0.05$)。在第 5 天和第 10 天, 22 ℃组 R_d 显著高于其他组($P<0.05$)。随着培养时间的延长, 6~18 ℃组 R_d 有下降趋势, 而 22 ℃组在培养 5 d 后呈上升趋势。

2.2 不同温度下多肋藻小孢子体的生理响应

2.2.1 可溶性蛋白 由图 7 可知, 温度对小孢子体可溶性蛋白含量有显著影响($P<0.05$), 随着温度的升高而呈上升趋势。22 ℃组可溶性蛋白含量

最高, 18 ℃组次之, 且都显著高于低温 6 ℃组($P<0.05$), 但 10~22 ℃组间无显著差异($P>0.05$); 6 ℃组与 10~14 ℃组间无显著差异($P>0.05$)。

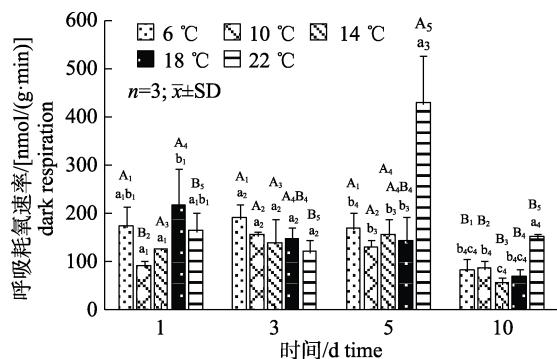


图 6 温度对不同培养时间段多肋藻小孢子体呼吸速率的影响

柱状图上不同小写字母表示同一时间内不同温度组间差异显著($P<0.05$), 字母右下角数字表示不同时间段; 不同大写字母表示同一温度组在不同时间段间差异显著($P<0.05$), 字母右下角数字表示不同温度处理组。

Fig. 6 Effects of temperature on the dark respiration rate of young sporophyte of *Costaria costata* in different culture periods

Different small letters on the histogram indicate significant difference between different temperatures at the same time ($P<0.05$), and the numbers at the lower right corner of the letters indicate different time periods. Different capital letters indicate significant difference between different time periods in the same experimental group ($P<0.05$), and the numbers at the lower right corner of the letters indicate different temperature treatment groups.

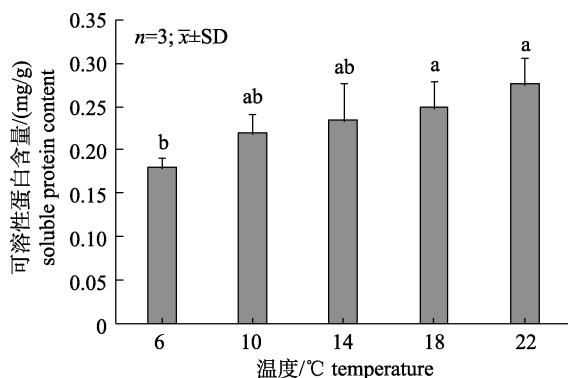


图 7 温度对多肋藻小孢子体可溶性蛋白含量的影响
不同小写字母表示不同温度处理组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 7 Effects of temperature on soluble protein content in the young sporophyte of *Costaria costata*
Different small letters indicate significant difference among different temperature treatment groups ($P<0.05$).

2.2.2 H₂O₂ 和 MDA 含量 在 6~22 ℃下, 多肋藻小孢子体中 H₂O₂ 含量随温度的上升显著下降($P<0.05$)(图 8)。在 6 和 10 ℃时, 小孢子体的 H₂O₂ 含量最高, 显著高于其他温度组($P<0.05$), 但这两组间 H₂O₂ 含量无显著性差异($P>0.05$); 18 ℃组的 H₂O₂ 含量最低, 显著低于低温组(6~14 ℃, $P<0.05$), 但与 22 ℃组无显著性差异($P>0.05$)。在 6~18 ℃下, 随温度的升高, 多肋藻小孢子体 MDA 含量呈现降低趋势。18 ℃组 MDA 含量最低, 显著低于 6 ℃和 10 ℃组($P<0.05$); 22 ℃组 MDA 含量最高, 显著高于 10 ℃、14 ℃和 18 ℃组($P<0.05$), 但与 6 ℃组间差异不显著($P>0.05$)。

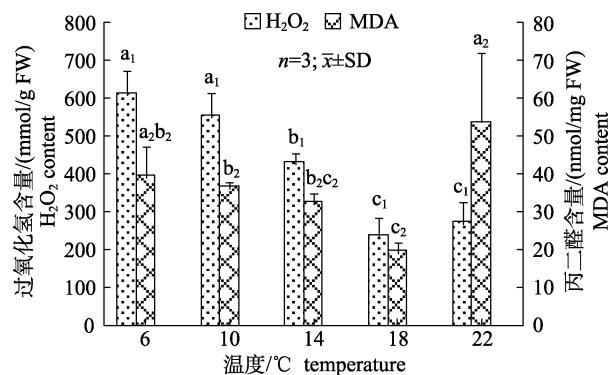


图 8 温度对多肋藻小孢子体过氧化氢及丙二醛含量的影响

不同小写字母表示相同处理时间不同温度

处理组间差异显著($P<0.05$),

字母右下角数字表示不同时间段。

Fig. 8 Effects of temperature on H₂O₂ and MDA content in the young sporophyte of *Costaria costata*

Different small letters indicate significant difference among different temperature treatment groups ($P<0.05$), the numbers at the lower right corner of the letters indicate different time periods.

2.2.3 ASAFR、SOD、CAT、APX 比活力 在 6~22 ℃下, 随着温度的上升, 抗超氧阴离子自由基比活力(ASAFR)呈下降趋势, 但各组间无显著性差异($P>0.05$, 图 9a)。6 ℃组 SOD 比活力最大, 显著高于其他温度组($P<0.05$)。在 10~22 ℃间, 各实验组的 SOD 比活力无显著性差异($P>0.05$), 其中, 10 ℃组的比活力最小(图 9b)。10 ℃组小孢子体 CAT 比活力最高, 显著高于 14 ℃和 18 ℃组($P<0.05$), 但与 6 ℃和 22 ℃组间差异不显著

($P>0.05$)。18 ℃的CAT比活力最低,显著低于6 ℃和10 ℃组($P<0.05$),但与14 ℃和22 ℃组差异不显著($P>0.05$,图9c)。10 ℃组APX比活力最大,14 ℃组最小,二者具有显著性差异($P<0.05$),但分别与其他实验组间无显著性差异($P>0.05$,图9d)。

2.3 温度对多肋藻小孢子体营养成分含量的影响

多肋藻小孢子体的基本营养成分如表1所示,

其中,碳水化合物含量最高,灰分次之,脂肪含量占比最小。粗蛋白、粗纤维和碳水化合物含量在各温度组间的差异不显著($P>0.05$)。其中14 ℃组的粗蛋白和粗纤维含量最大,但与其他温度组没有显著性差异($P>0.05$)。脂肪含量最大值与最小值分别在10 ℃组和14 ℃组,且二者有显著差异($P<0.05$)。灰分在18 ℃组中含量最高,显著高于6 ℃组($P<0.05$)。

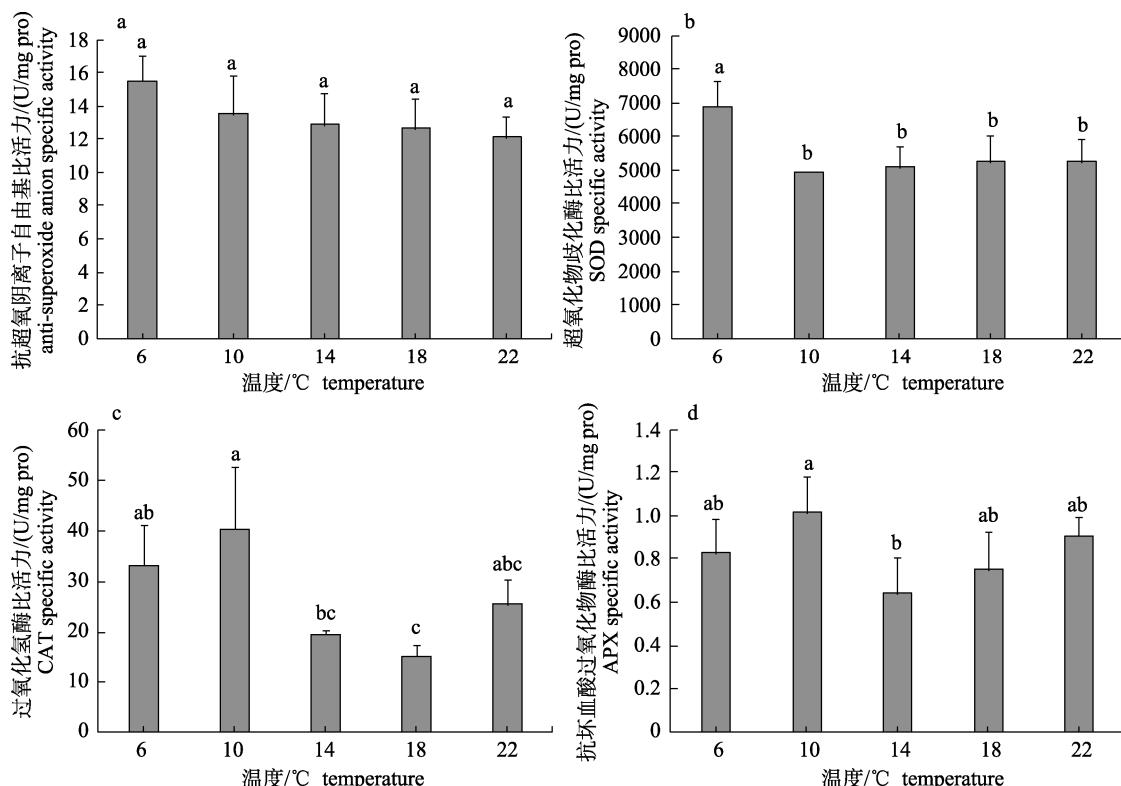


图9 温度对多肋藻小孢子体4种抗氧化酶活性的影响

不同小写字母表示不同温度处理组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 9 Effects of temperature on 4 kinds of antioxidant enzyme activity in the young sporophyte of *Costaria costata*. Different small letters indicate significant difference among different temperature treatment groups ($P<0.05$).

表1 温度对多肋藻小孢子体基本营养成分含量的影响

Tab. 1 Effects of temperature on the content of essential nutrients in the young sporophyte of *Costaria costata*

$n=3$; $\bar{x}\pm SD$; %

温度/℃ temperature	粗蛋白 crude protein	脂肪 fat	灰分 ash	碳水化合物 carbohydrate	粗纤维 crude fibre
6	1.17±0.13	0.25±0.07 ^{ab}	5.30±0.40 ^a	6.40±1.11	1.13±0.55
10	1.20±0.08	0.3±0.06 ^a	5.8±0.32 ^{ab}	6.83±0.78	1.10±0.17
14	1.25±0.01	0.23±0.06 ^b	5.90±0.66 ^{ab}	7.00±1.47	1.47±0.06
18	1.0±0.08	0.27±0.06 ^{ab}	6.37±0.23 ^b	8.20±1.22	1.43±0.21

注: 不同小写字母表示不同温度处理组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters indicate significant difference among different temperature treatment groups ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 温度对多肋藻小孢子体生长的影响

温度是调控海藻生长发育最重要的因素之一。本研究发现, 22 °C组叶片梢部在第3天即发生严重溃烂, RGR为负值。在18 °C时, 培养前期(5 d)多肋藻小孢子体的RGR最大, Park等^[21]的研究也表明多肋藻幼孢子体(体长4.8~5.9 mm)在17 °C下RGR最大。但本研究发现随着培养时间的延长, 18 °C组的RGR显著下降。推测其原因, 可能在一定温度范围内, 植物核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco)酶活性随着温度升高而增大^[30]。但随着藻体的长大, 对温度的适应性发生变化, 适宜温度有所降低。海区监测数据显示, 多肋藻藻体长到50 cm(体长)以上后, 在4 °C左右有较快的生长速率, 藻体长度在海区水温约10 °C时生长缓慢趋于停滞, 随后表现为负增长, 尤其当水温升到20 °C时, 藻体梢部明显腐烂脱落^[31]。

光合和呼吸代谢是衡量植物生长的重要指标。高温或低温都会导致机体酶活性降低或失活, 影响藻体的呼吸作用和光合作用。低温会降低植物对光能的利用, 阻碍光合作用中氧化侧的电子供应, 导致PSII功能受到抑制, 同时还会降低已经光抑制或受损的PSII的修复能力^[32]; 而高温则使光合作用的酶钝化, 破坏叶绿体和细胞质的结构, 降低光合色素含量, 最终导致PSII损伤^[33], 光合效率下降。 F_v/F_m 反映PSII的最大光能转化效率, 是植物响应胁迫的一个敏感指标。正常生理情况下 F_v/F_m 变化小, 当植物受到高温胁迫时, F_v/F_m 通常会下降。基于RGR和藻体外观可以明显看出, 22 °C对多肋藻造成了明显的高温胁迫和损伤。但 F_v/F_m 在6~22 °C温度组间未呈现显著差异, 甚至在高温(22 °C)组偶尔出现略高的 F_v/F_m 值, 即藻体仍然具备与对照相当的最大光合潜能。 F_v/F_m 及后续光合和呼吸速率等的测定都是基于留存完好的藻体, 这说明22 °C下虽然藻体梢部严重溃烂, 但生长点与基部仍然是完整的, 且 F_v/F_m 未有显著下降。 P_t 是衡量植物代谢水平与光合作用强弱的一个重要参数, 该数值高, 说明植物光合活性强, 合成的有机物量大; P_{nmax} 是衡量

植物积累有机物的一个重要指标; R_d 则是植物消耗自身存储的物质产生能量, 是用于研究其他生命活动包括抗逆响应的一个重要指标。其中 $P_t=P_{nmax}+R_d$ 。培养周期内, 6~14 °C下, 不同组均具有较高的 P_t 和 P_{nmax} , 尤其在培养后期(5 d, 10 d)10 °C下表现出最大的 P_t , 即该条件下的有效物质积累最多, 与RGR结果相对应。22 °C组在培养前期也具有较高的 P_t , 5 d时甚至高于所有其他温度组; 第3天时, 22 °C组的 P_{nmax} 仍维持较高的水平, 此时, R_d 比其他温度组低; 随着时间的延长, R_d 显著上升, 为其他温度组的2~3倍, P_t 下降, P_{nmax} 成为所有温度组最低值。说明短时22 °C高温胁迫对藻体光合系统的影响较小, 随着胁迫程度的增加, R_d 发挥了一定的保护作用, 在5 d的时间内, 胁迫尚未对光合系统造成损伤, 到第10天时, 光合放氧能力被抑制, 但PSII的潜在最大光合能力仍未被影响, 可见多肋藻小孢子体对高温具有一定的耐受能力。第3天时, 6 °C组 R_d 最高, 同时 P_t 和 P_{nmax} 为中间水平, 说明6 °C对多肋藻小孢子体也形成了一定的低温胁迫。 R_d 在多肋藻小孢子体响应温度胁迫过程发挥了积极的作用。

3.2 不同温度下多肋藻小孢子体营养成分组成

海藻的生化成分不仅受到物种的影响, 而且还受到环境条件、成熟度和季节的影响, 其中, 温度是造成海藻体内生化成分呈季节性变化的主要因素^[34]。叶片灰分是反映植物对矿物质元素的吸收、积累及植物光合作用效率的重要指标, 通常被用于研究植物的第一生产力^[35]。研究表明, 丛枝菌根类型植物的灰分含量与年均温度具有显著的二次回归关系, 即在最适温度具有最高值, 低于/高于该温度阈值其灰分含量降低^[36]。在本研究中, 多肋藻小孢子体的灰分含量随温度的升高显著增加, 这与小孢子体的光合作用和生长较为一致, 尤其在短期培养中, 18 °C组也具有最高的RGR。碳水化合物(如纤维素、蔗糖和淀粉等)是植物体的形态构建和能量代谢的重要物质^[37]。研究表明, 温度的变化可直接影响海草的新陈代谢和碳平衡的维持^[38]。芦薇薇等^[39]通过研究巨藻(*Macrocystis pyrifera*)幼孢子体在不同温度(5、10、15、20 °C)与光强[50、100、150、200 μmol/(m²·s)]

交叉试验下藻体的特定生长率和生化组成情况,发现在光强一定时,随温度的升高,碳水化合物含量呈先上升后下降趋势,并在15℃达到最大值。本研究也发现类似的规律,多肋藻小孢子体在6~18℃下,总碳水化合物和结构性碳水化合物粗纤维的含量均随着温度的升高呈上升趋势,这与藻体的呼吸速率结果一致,证明低呼吸消耗有利于碳水化合物的积累。蛋白质和脂肪并非多肋藻的主要营养组成,在本研究温度范围内,多肋藻小孢子体蛋白质和脂肪含量与温度间没有明显的线性关系。

3.3 多肋藻小孢子体对不同温度胁迫的抗氧化生理响应

在高温胁迫下,细胞内会发生氧化应激反应,产生大量的活性氧(ROS),如O₂⁻。过量的O₂⁻作用于细胞质膜,导致膜脂过氧化,从而破坏膜的结构。MDA是膜脂过氧化损伤程度的一个重要指标。在植物体内有一套酶促或非酶促防御系统用于维持ROS的水平。本研究发现多肋藻小孢子体在22℃下,与10~18℃组相比,SOD、CAT、ASAFR比活力差异不大,但APX的活性高于6℃、14℃和18℃组,尤其Fucox、Car和可溶性蛋白的含量较高。Fucox和Car不仅参与光合作用,还能捕获过量的活性氧,使机体免受ROS的毒害作用^[40];而机体内的热激蛋白等可溶性蛋白含量升高是应对高温胁迫的常规响应途径之一^[41]。尽管在22℃下藻体启动了一系列抗逆响应,藻体内H₂O₂含量甚至显著低于低温组(6~14℃),但MDA含量是其他温度组的1.4~2.8倍,仍然对细胞膜构成了损伤。因此,22℃下,H₂O₂的降低一方面与抗氧化物质的清除作用有关,一方面可能与其氧化细胞膜而被消耗有关。在6℃下,MDA和H₂O₂含量也高于10~18℃组,说明藻体受到胁迫。该条件下,SOD和ASAFR的比活力也最高,可见机体在积极消除O₂⁻的毒害作用,藻体能快速重建氧化还原平衡以维持生理代谢活动,因此仍获得较高的RGR。

综上,多肋藻小孢子体生长的适宜范围为6~18℃,短时间内,温度较高生长较快,但随着培养时间的延长,适宜生长的温度下降,以10℃

为佳。增强呼吸作用是多肋藻小孢子体对低温和高温胁迫的共同响应;此外,22℃下,还原性色素岩藻黄素和类胡萝卜素、可溶性蛋白发挥积极作用,使多肋藻小孢子体获得一定高温耐受性;SOD则在低温下发挥积极作用。

参考文献:

- [1] Bhattacharya D, Baillie D L, Druehl L D. Population analysis of the kelp *Costaria costata* (Phaeophyta) using a polymorphic ribosomal DNA probe[J]. Plant Systematics and Evolution, 1990, 170(3): 177-191.
- [2] Yoshida T. Marine Algae of Japan[M]. Tokyo: Uchida Rokakuho Publishing, 1998: 25-1222.
- [3] Lee Y, Kang S. A Catalogue of Seaweeds In Korea[M]. Jeju: Cheju National University Press, 2001: 660-662.
- [4] Selivanova O N, Zhigadlova G G, Hansen G I. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data[J]. Russian Journal of Marine Biology, 2007, 33(5): 278-289.
- [5] Imbs T I, Krasovskaya N P, Ermakova S P, et al. Comparative study of chemical composition and antitumor activity of aqueous-ethanol extracts of brown algae *Laminaria cichorioides*, *Costaria costata*, and *Fucus evanescens*[J]. Russian Journal of Marine Biology, 2009, 35(2): 164-170.
- [6] Fujihara M, Nagumo T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity[J]. Carbohydrate Research, 1992, 224: 343-347.
- [7] Wang H X. The purification of polymannuronic acids and polyguluronic acids as well as the research on the activity of the oligosaccharides of algin series[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [王浩贤. 聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸纯化及降解产物活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [8] Kawakami T, Tsushima M, Katabami Y, et al. Effect of β, β-carotene, β-echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1998, 226(2): 165-174.
- [9] Takagi T, Uchida M, Matsushima R, et al. Comparison of ethanol productivity among yeast strains using three different seaweeds[J]. Fisheries Science, 2015, 81(4): 763-770.
- [10] Editorial Board of Chinese Journal of Sporophytes, Chinese Academy of Sciences. Marine Algal Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 2013: 1-450. [中国科学院中国孢子

- 植物志编委会. 中国海藻志[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 1-450.]
- [11] Fu G, Liu J D, Wang G G, et al. Early development of *Costaria costata* (*C. agardh*) Saunders and cultivation trials [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(4): 731-737.
- [12] You X C, Cao S Q, Wang H R, et al. Artificial seeding of sea weed *Costaria costata* at ambient temperature[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2011, 26(1): 17-22. [由学策, 曹淑青, 王含茹, 等. *Costaria costata* 常温人工育苗的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(1): 17-22.]
- [13] Na Y J, Jeon D V, Han S J, et al. Crossed effects of light and temperature on the growth and maturation of gametophytes in *Costaria costata* and *Undaria pinnatifida*[J]. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2016, 49(2): 190-197.
- [14] Sun J, Pan J H, Zhang Z Z, et al. Effect of temperatures and illuminations on the growth of the gametophytes of *Costaria costata* (*C. agardh*) Saunders[J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(1): 11-17. [孙娟, 潘金华, 张壮志, 等. 温度和光照强度对多肋藻(*Costaria costata*)配子体生长影响研究[J]. 渔业研究, 2019, 41(1): 11-17.]
- [15] Hotimchenko S V. Fatty acid composition of algae from habitats with varying amounts of illumination[J]. Russian Journal of Marine Biology, 2002, 28(3): 218-220.
- [16] Imbs T I, Shevchenko N M, Sukhoverkhov S V, et al. Seasonal variations of the composition and structural characteristics of polysaccharides from the brown Alga *Costaria costata*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2009, 45(6): 786-791.
- [17] Tabakaeva O V, Tabakaev A V. Lipids and fatty acids from various parts of the brown kelp *Costaria costata*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2016, 52(5): 777-781.
- [18] Koh C H, Shin H C. Growth and size distribution of some large brown algae in Ohori, east coast of Korea[J]. Hydrobiologia, 1990, 204(1): 225-231.
- [19] Shaffer J A, Parks D S. Seasonal variations in and observations of landslide impacts on the algal composition of a puget sound nearshore kelp forest[J]. Botanica Marina, 1994, 37(4): 315-324.
- [20] Skriptsova A V, Levenets I R. Seasonal dynamics of subtidal macrophyte assemblages in Sobol Bay (Peter the Great Bay, Sea of Japan) in relation to depth[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2012, 92(3): 429-437.
- [21] Park S K, Heo J S, Kim B Y, et al. Comparison on the growth of *Costaria costata* and *Undaria pinnatifida* sporophytes in culture and their field populations[J]. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2011, 44(1): 71-77.
- [22] Borlongan I A, Matsumoto K, Nakazaki Y, et al. Photosynthetic activity of two life history stages of *Costaria costata* (Laminariales, Phaeophyceae) in response to PAR and temperature gradient[J]. Phycologia, 2018, 57(2): 159-168.
- [23] Morita T, Kurashima A, Maegawa M. Temperature requirements for the growth and maturation of the gametophytes of *Undaria pinnatifida* and *U. undariooides* (Laminariales, Phaeophyceae)[J]. Phycological Research, 2003, 51(3): 154-160.
- [24] Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. IRAM 15 707—1963 National standard for food safety--Determination of protein in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010. [中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. IRAM 15 707—1963 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.]
- [25] Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 5009.6—2003 Determination of fat in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004. [中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.6—2003 食品中脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.]
- [26] Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009.4—2010 National food safety standard Determination of ash in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010. [中华人民共和国卫生部. GB 5009.4—2010 食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.]
- [27] Ministry of health of the people's republic of China, Standardization administration of the people's republic of China. GB/T 5009.6-2010 National food safety standard determination of moisture in foods[S]. Beijing: China Standard Press, 2010. [中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 5009.3-2010 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.]
- [28] Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 5009.10—2003 Determination of crude fiber in vegetable foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004. [中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.10—2003 植物类食品中粗纤维的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.]

- [29] Wang W J, Wang G C, Zhang M, et al. Isolation of Fucoxanthin from the Rhizoid of *Laminaria japonica* aresch[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005(8): 1009-1015.
- [30] Zhang Z W, Lin L M, Yu H M, et al. Effects of temperature on chlorophyll fluorescence parameters and rubisco activity in cassava leaves[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2017, 29(1): 1-5. [张振文, 林立铭, 余厚美, 等. 温度对木薯叶片叶绿素荧光及 Rubisco 酶的影响[J]. 江西农业学报, 2017, 29(1): 1-5.]
- [31] Liang G J, Pan J H, Zhang Z Z, et al. Technique for summer seedling breeding and cultivation of *Costaria costata*[J]. Hebei Fisheries, 2017(6): 36-39, 43. [梁广津, 潘金华, 张壮志, 等. 多肋藻夏苗培育及养殖技术[J]. 河北渔业, 2017(6): 36-39, 43.]
- [32] Ottander C, Hundal T, Andersson B, et al. Photosystem II reaction centres stay intact during low temperature photo-inhibition[J]. Photosynthesis Research, 1993, 35(2): 191-200.
- [33] Wen X G, Gong H M, Lu C M. Heat stress induces an inhibition of excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but not to photosystem I in a Cyanobacterium *Spirulina platensis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(4): 389-395.
- [34] Lapointe B E, Tenore K R, Dawes C J. Interactions between light and temperature on the physiological ecology of *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales: Rhodophyta)[J]. Marine Biology, 1984, 80(2): 161-170.
- [35] Guan L L, Zhou X Y, Luo Y. A review on the study of plant caloric value in China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2005, 24(4): 452-457. [官丽莉, 周小勇, 罗艳. 我国植物热值研究综述[J]. 生态学杂志, 2005, 24(4): 452-457.]
- [36] Lu S C, Shi Z Y, Zhang M G, et al. Discrepancies of leaf ash concentration in arbuscular and ecto-mycorrhizal different plants associated arbuscular and ecto-mycorrhizas and their response to climate change[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2020, 29(1): 35-40. [卢世川, 石兆勇, 张梦歌, 等. 不同菌根类型植物叶片灰分含量及其对气候变化响应的差异[J]. 生态环境学报, 2020, 29(1): 35-40.]
- [37] Pan Q M, Han X G, Bai Y F, et al. Advances in physiology and ecology studies on stored non-structure carbohydrates in plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2002, 37(1): 30-38. [潘庆民, 韩兴国, 白永飞, 等. 植物非结构性贮藏碳水化合物的生理生态学研究进展[J]. 植物学通报, 2002, 37(1): 30-38.]
- [38] Zimmerman R C, Smith R D, Alberte R S. Thermal acclimation and whole-plant carbon balance in *Zostera marina* L. (eelgrass)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1989, 130(2): 93-109.
- [39] Lu W W, Wang Q H, Gong Q L. Effects of light and temperature on growth and biochemical composition of a marine macroalga (*Macrocystis pyrifera*) young sporophyte[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(1): 40-48. [芦薇薇, 王巧晗, 宫庆礼. 光照强度和温度对巨藻幼孢子体的生长和生化组成的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(1): 40-48.]
- [40] Cazalé A C, Rouet-Mayer M A, Barbier-Brygoo H, et al. Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions[J]. Plant Physiology, 1998, 116(2): 659-669.
- [41] Krishna P. Plant Responses to Heat Stress[M]//Topics in Current Genetics. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003: 73-101.

Effects of temperature on young sporophyte growth and antioxidant physiology of *Costaria costata*

LI Guoliang¹, WANG Wenjun^{1,2}, LI Baoxian¹, LIANG Zhourui¹, LU Xiaoping¹, LI Xiaojie³

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China;
3. Key Laboratory of Genetic Improvement and Efficient Culture of Marine Algae of Shandong Province, Shandong Oriental Ocean Science-Technology Co., Ltd., Yantai 264003, China

Abstract: *Costaria costata* is a new large economic brown alga with potential. Mastering the suitable conditions for its growth and development and its regulation mechanism is the premise of developing the cultivation industry. At present, reports have focused on the gametophyte stage, and temperature is one of the most critical factors affecting algal growth and development. In this study, we investigated the growth and antioxidant physiological characteristics of young sporophyte of *C. costata* at 6–22 °C in order to explore its temperature-adaptation mechanism and provide a theoretical basis for the cultivation of *C. costata* in sea areas. At the early stage of culture (within 5 days), the relative growth rate (RGR) of young sporophyte of *C. costata* was the largest at 18 °C, and the algae were severely perforated and rotted at 22 °C; with the extension of culture time (10 days), the RGR of algae was the highest at 10 °C. There was no significant difference in F_v/F_m at different temperatures. During the experimental period, the total photosynthetic rate (P_t) and net photosynthetic rate (P_{nmax}) of algae were higher at 6–14 °C. P_{nmax} was highest at 10 °C at 5–10 d. Respiration rate (R_d) was highest at 6 °C at 3 d. Algal R_d increased with culture time at 22 °C. Enhanced respiration is a common response of the young sporophytes of *C. costata* to low and high-temperature stresses. At 22 °C, the pigments Fucox and Car, soluble proteins play an active role. At 6 °C, SOD is the main antioxidant enzyme that scavenges reactive oxygen species. Temperature positively regulates the accumulation of ash, carbohydrate, and crude fiber in the range of 6–18 °C. In summary, the young sporophytes of *C. costata* can grow at 6–18 °C, of which 10 °C is preferable.

Key words: *Costaria costata*; temperature; relative growth rate; photosynthesis; antioxidant system; biochemical composition

Corresponding author: WANG Wenjun. E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn