

细基江蓠繁枝变型对水体硝态氮变化的生理响应

黄鹤忠^{1,2}, 孙菊燕², 贺丽虹², 申 华²

(1. 扬州大学 生命科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 2. 苏州大学 生命科学学院, 水产研究所, 江苏 苏州 215321)

摘要:通过静态模拟实验, 比较研究了6个硝态氮(NO_3^- -N)摩尔浓度水平(0, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$)下培养的细基江蓠繁枝变型(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia)的丙二醛(MDA)、游离脯氨酸含量以及硝酸还原酶(NR)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性的变化。结果表明, 随着水体 NO_3^- -N 摩尔浓度的逐渐增加, 细基江蓠繁枝变型 NR、SOD 和 POD 的活性均呈现先增加后下降的显著变化($P<0.05$)。膜脂过氧化产物 MDA 含量随水体 NO_3^- -N 摩尔浓度的变化则呈相反的趋势($P<0.05$)。游离脯氨酸含量则与水体 NO_3^- -N 摩尔浓度呈正相关($r=0.916$)。综合分析结果认为, 单独以硝态氮为氮源时, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的供氮水平能使细基江蓠繁枝变型处于相对最佳的生理状态。

关键词: 硝态氮(NO_3^- -N); 生理响应; 细基江蓠繁枝变型(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia)

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)11-0032-05

细基江蓠繁枝变型(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia)是中国热带、亚热带海区的重要大型经济海藻, 它不但具有巨大的经济利用价值, 而且还具有适应广、生长快、营养储存库大等特点。其在海藻生物修复富营养化水域、防止海区赤潮等方面具有独特的应用价值。因而, 近年来该藻的栽培区域和规模正在不断地扩大。研究表明, 硝酸盐是许多海区藻类生长的主要原料, 藻类可利用周围环境中的硝酸盐作为氮源, 经过一系列酶的还原作用, 将硝酸盐一步步地转化成为氨氮后, 成为合成有机物质的原料^[1,2], 而以往对江蓠该方面的研究主要集中在对水体氮盐的吸收方面^[3-5], 至今尚未见到氮营养对江蓠生理影响的有关报道。因此, 开展水体硝态氮摩尔浓度对江蓠生理影响方面的研究十分必要。本实验以细基江蓠繁枝变型为材料, 在实验室条件下, 比较研究了不同硝酸盐摩尔浓度对江蓠硝酸还原酶活力、膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响。旨在更好地为江蓠的栽培和环境修复与监测提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用细基江蓠繁枝变型(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia)取自南通市某海水养殖池塘, 选择健康藻体, 用镊子仔细除去表面附着的杂藻, 最后用大量消毒海水冲洗以后, 放在室内水族箱扩大培养, 海水经煮沸消毒后添加 PES 加富培养基。培养条件为 $22\pm1^\circ\text{C}$, 光照强度 4 000 lx, 光周期 12L:12D, 盐度 21(自然海水经蒸馏水稀释), pH 为 8.0。在正式开始分组实验前, 将江蓠在煮沸消毒后的天然海水中(不加 PES)培养 10 d 至培养液中 N 消耗尽后, 用于正式实验用水; 同时, 藻体色泽逐渐变淡黄色, 使藻体呈饥饿状态。

收稿日期: 2005-10-20; 修回日期: 2006-03-10

基金项目: 江苏省社会发展基金资助项目(BS2002016)

作者简介: 黄鹤忠(1962-), 男, 江苏海门人, 副教授, 在读博士, 从事水生生物生理生态研究, 电话: 0512-62276802, E-mail: suda-shui@163.com, huanghz@suda.edu.cn

1.2 实验的设计与分组

实验设置了 6 个硝态氮(NO_3^- -N)摩尔浓度组($0, 10, 20, 40, 60, 80 \mu\text{mol/L}$)，每组分别设 3 个平行，氮以外的其它营养盐成分一律采用 f/2 营养盐。实验环境条件同扩大培养条件，采用 250 mL 烧杯(200 mL 培养液)，每个烧杯中加入相同部位的江蓠 0.5 g。分组后的各组江蓠在各自硝态氮摩尔浓度下先预培养 4 h，更换培养液后再光照培养 4 h 即进行江蓠相关生理指标的测定，每组的 3 个平行样品分别测定并计算其平均值和标准差，按单因子方差分析法检验各组间的差异显著性。

1.3 生理指标与测定方法

硝酸还原酶(NR)，其活性的测定按常规方法^[6]。样品中 NR 的活性($\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$)= $X \times V_1/V_2 \times W \times t$ ，其中 X 为反应液酶催化产生的亚硝态氮的质量(μg)； V_1 为提取酶时加入的缓冲液体积(mL)； V_2 为酶反应时加入的粗酶液体积(mL)； W 为藻体样品鲜质量(g)； t 为反应时间(h)。

游离脯氨酸含量，采用茚三酮显色法测定^[6]。脯氨酸的含量单位为 1 g 鲜藻体中所含脯氨酸的质量(μg)，即 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

丙二醛(MDA)含量，采用硫代巴比妥酸比色法测定^[6]。MDA 含量的单位是 1 g 鲜藻体中所含 MDA 的量(μmol)，即 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

超氧化物歧化酶(SOD)活性，采用氮蓝四唑(NBT)光化学还原法测定^[6]。SOD 以 1 g 鲜藻体中抑制 NBT 光化还原 50% 的酶量为一个酶活力单位，即 U/g。

过氧化物酶(POD)的活性，用愈创木酚法进行测定^[6]。POD 的酶活力单位为 1 g 鲜质量藻体 1 min 内 A_{470} 的变化，即 $\text{OD}_{470}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。

2 结果

2.1 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 MDA 含量的影响

MDA 含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度。由图 1 可以看出，江蓠 MDA 含量随着硝态氮摩尔浓度的变化而发生变化，当硝态氮摩尔浓度由 0 $\mu\text{mol/L}$ 上升到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时，江蓠 MDA 的含量逐渐下降至最低至 4.38 $\mu\text{mol/g}$ ；而当再提高硝态氮摩尔浓度至 40-60 $\mu\text{mol/L}$ 时，江蓠 MDA 的含量出现显著上升($P<0.05$)；硝态氮摩尔浓度再从 60 $\mu\text{mol/L}$ 上升到 80 $\mu\text{mol/L}$ 时，MDA 的含量上升不显著($P>0.05$)。

$\mu\text{mol/L}$ 时，MDA 的含量上升不显著($P>0.05$)。

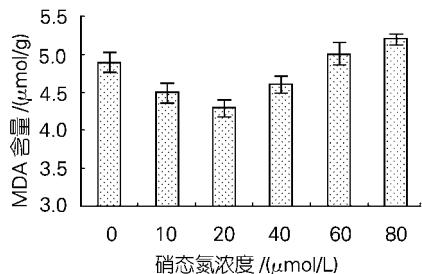


图 1 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 MDA 含量的影响

Fig.1 MDA contents of the *Gracilaria* at different levels of NO_3^- -N

2.2 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 NR 活性的影响

将各组江蓠在不同硝态氮摩尔浓度下光照培养 0 h 和 4 h 后，分别测定其硝酸还原酶活性，结果见图 2。

由图 2 可看出，在 0 h 时，各组江蓠 NR 活性都维持在一较低水平，此时不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 NR 活性的影响不明显($P>0.05$)；但在各梯度硝态氮溶液中光照培养 4 h 后，江蓠 NR 活性都有显著提高，而且在不同硝态氮摩尔浓度影响下呈现出显著性差异($P<0.05$)，其中硝态氮摩尔浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时的 NR 活性最高，为 40 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ，而当继续增加硝态氮摩尔浓度至 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$ 时的 NR 活性均有显著下降($P<0.05$)，但均显著高于无硝氮组($P<0.05$)。

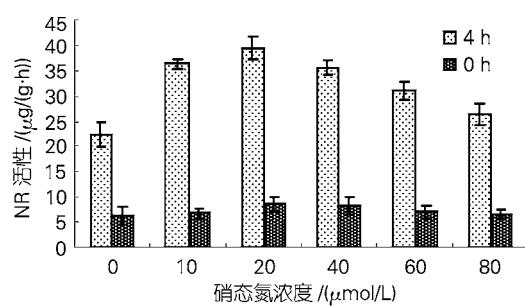


图 2 不同硝态氮摩尔浓度在不同时间对江蓠 NR 活性的影响

Fig.2 NR activities of the *Gracilaria* at different levels of NO_3^- -N and at different times

2.3 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 SOD 活性影响

SOD 可催化活性氧发生歧化反应，从而避免活性氧对细胞的毒性伤害。由图 3 可知，硝态氮摩尔浓度从 0 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐上升到 40 $\mu\text{mol/L}$ 时，江蓠 SOD 活性也随之逐渐显著提高($P<0.05$)；但当硝态氮摩尔浓度继续上升至 60 $\mu\text{mol/L}$ 时，江蓠 SOD 活性出现极显著下降($P<0.01$)，再继续增加硝态氮的摩尔浓度至 80 $\mu\text{mol/L}$ 时，江蓠 SOD 趋于平稳($P>0.05$)。

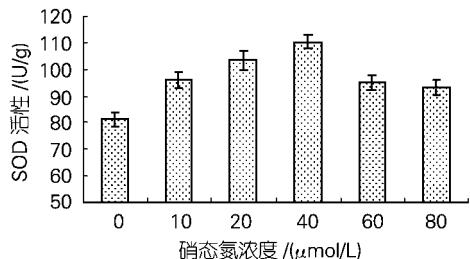


图 3 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 SOD 活性的影响

Fig.3 SOD activities of the *Gracilaria* at different levels of NO_3^- -N

2.4 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 POD 活性的影响

POD 是植物体内清除 H_2O_2 的活性酶。由图 4 可看出，硝态氮摩尔浓度从 0 $\mu\text{mol/L}$ 上升到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时，江蓠 POD 活性缓慢上升($P>0.05$)，后随着硝态氮摩尔浓度的继续上升江蓠 POD 活性呈显著下降的趋势($P<0.05$)。

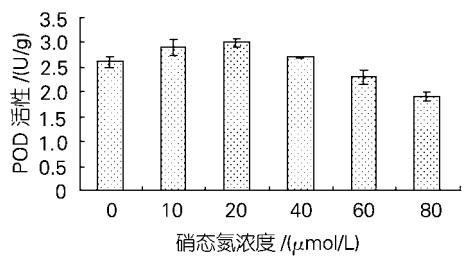


图 4 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠 POD 活性的影响

Fig.4 POD activities of the *Gracilaria* at different levels of NO_3^- -N

2.5 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠脯氨酸含量的影响

脯氨酸是植物抗逆性的生化指标之一。由图 5 可以看出，随着硝态氮摩尔浓度从 0 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐提高到 80 $\mu\text{mol/L}$ 时，江蓠脯氨酸的含量也随着上升($r=0.9161$)。在硝态氮摩尔浓度大于 40 $\mu\text{mol/L}$ 时，

江蓠脯氨酸含量呈现极显著地上升($P<0.01$)。

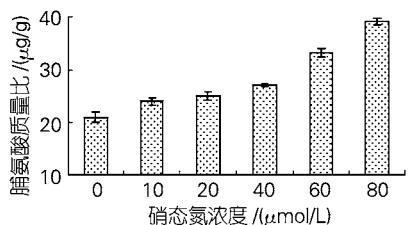


图 5 不同硝态氮摩尔浓度对江蓠脯氨酸质量比的影响

Fig.5 The proline contents of the *Gracilaria* at different levels of NO_3^- -N

3 讨论

本实验结果表明，各组江蓠硝酸还原酶活力都在光照培养 4 h 左右时达到最大值，这一结果与 Fungyi Chow^[7] 进行不同光照时间对 *Gracilaria chilensis* 硝酸还原酶活性影响的研究结果相同。实验结果显示，江蓠硝酸还原酶活性在水体硝态氮摩尔浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最高值，之后并非随着环境中硝酸盐摩尔浓度的继续上升而出现同步提高，而是呈现逐渐下降的趋势。这与海洋浮游植物的硝酸还原酶活力与细胞内硝酸盐摩尔浓度呈正相关^[8]的研究结果不完全相同，Leanne 等在研究以硝酸盐作为主要氮源的藻类中也发现其硝酸还原酶活性具有高活性的和多变的特性^[2]。作者认为，任何藻类其细胞内的硝酸还原酶活力有一阈值，它对应于某一硝酸盐摩尔浓度，但当外界硝酸盐摩尔浓度超过其阈值时，硝酸还原酶活力不会再增加反而有所下降。因为硝酸还原酶是植物体内控制碳代谢和氮代谢的关键酶与限速酶^[9]，它又是一种诱导酶可在光线和 NAD(P)H 的作用下催化硝酸盐还原生成亚硝酸盐^[1]，其活力与细胞内的硝酸盐和亚硝酸盐摩尔浓度有关，在硝酸盐被大量吸收到江蓠的体细胞内后，可诱导细胞内硝酸还原酶的产生并激活其酶的活性，使硝酸还原酶活力呈现高值，但由于江蓠具有快速而大量地吸收环境中氮盐并以无机或代谢产物的形式储存氮于体内的特点^[3,10]，因此必然存在着一种氮代谢的调节机制。藻体内大量硝酸盐的累积和亚硝酸盐的形成可能在一定程度上抑制了硝酸还原酶的活力，导致其活力并非随硝酸盐摩尔浓度的继续增加而提高，而是维持在一个相对低的水平，以便将细胞内储备的硝酸盐逐渐转化和同化，以便维持其

较长时间的生长及其它生命活动所需。

SOD 和 POD 是防御植物过氧化系统的重要保护酶，能有效地消除氧自由基。由图 3 和图 5 可知，在低硝氮和高硝氮摩尔浓度条件下，江蓠体内 SOD 和 POD 活性水平显著低于中等硝氮摩尔浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)条件下的水平；同时，江蓠过氧化产物 MDA 的积累水平恰好与上述酶活性水平的变化规律相反(图 1)，即在低硝氮和高硝氮摩尔浓度条件下江蓠体内 MDA 含量水平显著高于中等硝氮摩尔浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)条件下的水平。这表明 MDA 含量与植物细胞内清除活性氧的保护系统之间呈负相关^[11]。显示出环境中适宜的硝态氮摩尔浓度供应可较好地提高江蓠机体 SOD 和 POD 等清除活性氧的保护酶活性，从而阻止自由基启动膜脂过氧化作用，进而使 MDA 等膜脂过氧化产物的积累减少，保护了蛋白质、核酸和酶等生物功能分子以及生物膜的结构与功能；相反，过高或过低的硝态氮摩尔浓度供应均会对江蓠的生理和生长产生不利影响。

从图 5 可看出，环境中大于 40 $\mu\text{mol/L}$ 的硝态氮摩尔浓度会引起江蓠脯氨酸含量的极显著上升($P<0.01$)，说明过高摩尔浓度的硝态氮供应对江蓠脯氨酸含量的积累有显著作用。这一方面是由于在逆境条件下脯氨酸的合成受刺激加强而氧化受阻，蛋白质的合成受阻而水解加强^[12]，导致植物在许多环境胁迫条件下体内均会产生脯氨酸的积累^[13]。这可从我们在本实验条件下培养 4 d 后 20 $\mu\text{mol/L}$ 硝态氮组江蓠蛋白质含量显著高于 40 $\mu\text{mol/L}$ 以上硝态氮组且随硝态氮摩尔浓度越高越显著的结果中得到支持。另一方面，在高氮条件下江蓠体内脯氨酸积累的生理作用可能是用脯氨酸作为氮的贮藏化合物以消除体内氨的毒害，而在缺氮时脯氨酸积累减少是由于体内脯氨酸被降解后作为氮源的补充来维持江蓠体内的正常代谢。本试验的结果表明，硝态氮供应水平与江蓠体内的游离脯氨酸含量之间呈极显著的正相关($r=0.9161$)，暗示脯氨酸是作为江蓠的氮“奢侈”储存物质而存在于有机氮储存库内的。由此可见，江蓠体内的脯氨酸含量可以较好地反映硝态氮的供应状况，也可以作为江蓠体内硝态氮素营养状况的一种生化指标。

4 结论

研究表明，不同硝态氮摩尔浓度对江蓠的硝酸

还原酶活力、SOD 和 POD 等抗氧化酶活性、膜脂过氧化产物和脯氨酸含量均产生显著影响。20 $\mu\text{mol/L}$ 的单独硝态氮供氮水平能使硝酸还原酶和抗氧化酶的活性均处于较高水平，同时膜脂过氧化产物的含量处于较低水平，因而是江蓠相对最佳的单独硝态氮供应水平；而过高或过低摩尔浓度的硝态氮环境均对江蓠的生理状况产生一定程度的不利影响。

低硝态氮条件下，江蓠体色慢慢变浅、生长也几乎停滞，藻体内藻红素(PE)、蛋白质含量低。而氮营养盐丰富的组藻体颜色深红色、生长快速。藻体内藻红素(PE)、蛋白质高。但硝态氮摩尔浓度太高时又进一步限制了江蓠的生长，因此，对人工养殖江蓠可适量施肥提高产量。

江蓠膜脂过氧化产物 MDA 的含量随营养液中的硝态氮摩尔浓度由 0 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时显著降低；再提高硝态氮水平，MDA 含量则显著增加，可见在高氮条件下江蓠膜脂过氧化程度较高。

江蓠硝酸还原酶的活性都在光照 4 h 时达到最大，在光照条件下硝酸还原酶的活性高于在光暗条件下其活性，同时在光照 4 h，硝态氮摩尔浓度在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时，硝酸还原酶的活性最高为 40 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 左右。

江蓠抗氧化酶 SOD 和 POD 的活性随供硝态氮水平由 0 $\mu\text{mol/L}$ 提高到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时明显增加，再提高供硝态氮水平，酶活性则显著下降。而 CAT 活性随供氮水平的增加而明显下降。

游离脯氨酸含量随着供硝态氮水平的提高而增加，与供硝态氮水平呈极显著的正相关($r=0.9161$)，因此脯氨酸含量可以作为水体氮素营养状况的一种生化指标。

在适宜的供硝态氮水平条件下(20 $\mu\text{mol/L}$)，江蓠具有较高抗氧化酶活性和较低的 MDA 和游离脯氨酸含量，并且有较高的生物量；而在低氮和高氮条件下江蓠则遭受到较严重的氧化胁迫。

参考文献：

- [1] Berges J A, Hageman R H. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton[J]. *Limnology & Oceanography*, 1997, 40(1): 82-93.

- [2] Leanne J, Tracy A, Villareal, et al. A high sensitivity nitrate reductase assay and its application to vertically migrating Rhizosoleniamats[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1997,12: 95-104.
- [3] 许忠能, 黄长江, 林小涛, 等. 环境因子对细基江蓠变型繁枝变型氮、磷吸收速率的影响[J]. 应用生态学报, 2001,12(3):417-421.
- [4] 刘静雯, 董双林, 马牲. 温度和盐度对几种大型海藻生长率和 NH_4^+ -N 吸收的影响 [J]. 海洋学报, 2001,23(2):109-116.
- [5] 徐永健, 钱鲁闽. 水动力条件对龙须菜 N 吸收的影响[J]. 海洋环境科学, 2004,23(2):32-35.
- [6] 邹崎编. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 2000,56-59.
- [7] Fungyi Chow, Mariana C. de Oliveira, Marianne Pedersen. In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*[J]. *Journal of plant physiology*, 2004,161:769-776.
- [8] Collos Y, Slawyk G. Significance of cellular nitrate content in natural population of marine phytoplankton growing in shipboard cultures[J]. *Mar Biol*, 1976, 34 : 27-32.
- [9] Kaiser W M, Weiner H, Wink D. Nitrate reductase in higher plants: a casestudy for transduction of environmental stimuli into control catalytic activity[J]. *Physiologia Plantarum*, 1999,105:385-390.
- [10] Ryther J H, Corwin N, DeBusk T A et al. Nitrogen uptake by the red algae *Gracilaria tikvahiae*[J]. *Aquaculture*, 1981,26:107-115.
- [11] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. 生物工程学报, 2001,17(2):121-125.
- [12] 刘宁, 高玉保. 渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性[J]. 植物生理学通讯, 2000,36(1):11-14
- [13] Zaifejad M, Clark R B, Sullivan C Y. Aluminum and water stress effects on growth and proline of sorghum[J]. *J Plant Physiol*, 1997, 150: 338-344.

Physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under different levels of NO_3^- -N

HUANG He-zhong^{1,2}, SUN Ju-yan², HE Li-hong², SHEN Hua²

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Institute of Life Science, Suzhou University, Fisheries Research Institute of Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Received: Oct., 20, 2006

Key Words: NO_3^- -N, Physiological response, *Gracilaria tenuistipitata* var. liui Zhang et Xia

Abstract: With static experiments, this paper investigated the malondialdehyde(MDA) and proline contents, and the nitrate reductase (NR), superoxide dismutase(SOD) and peroxidase(POD) activities of *Gracilaria tenuistipitata* var. liui Zhang et Xia cultured in different levels of NO_3^- -N (0, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$) of water. The results showed that the NR, SOD, and POD activities increased firstly and then decreased gradually with the increase of NO_3^- -N concentration of water($P<0.05$), but the MDA content decreased firstly and then increased gradually with the increase of it($P<0.05$). The proline contents were positively correlated with NO_3^- -N concentration of water ($r=0.9161$). A conclusion could be made that 20 $\mu\text{mol/L}$ NO_3^- -N was able to maintain an excellent physiological condition of *Gracilaria tenuistipitata* when NO_3^- -N is an only one nitrogen source.

(本文编辑:梁德海)