

不同强度光强胁迫对海带(*Saccharina japonica*) 幼苗光合生理的影响*

牛建峰^{1, 2, 6} 冯泽中^{1, 4} 孙振杰^{1, 4} 王伟伟³ 张晓雯⁵ 梁广津³
王立军^{1, 2, 6} 李晓捷^{3①} 王广策^{1, 2, 6①}

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 山东青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 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; 4. 青岛农业大学 山东青岛 266109; 5. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东青岛 266071; 6. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071)

摘要 海带(*Saccharina japonica*)是我国藻类生产的主要品种之一, 其栽培面积和产量均居世界首位。2021~2022 年产季, 山东荣成海带主产区先后暴发了大规模病烂灾害, 给当地水产经济造成了巨大损失。引起病烂的原因可能来自多方面, 其中藻体所受光照过强及水体营养盐水平较低可能起到了一定作用, 为此, 基于海带幼苗的最小饱和光强、烟台高新区牟平自然海区海水氮磷浓度及不同海水深度下的光照强度测定结果, 研究了梯度强光在不同海水营养盐水平下对海带生理的影响, 以期对“烂菜”现象的病因分析提供一定的线索。结果显示, 海带幼苗在 700~900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 强光胁迫 3 d 后, F_v/F_m 可恢复至对照水平, 光合色素合成活跃, 营养盐含量较高的海水更有助于 PSII 的修复, 但 1300~1500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 的强光辐射导致 PSII 不能恢复, 岩藻黄素、叶绿素 *a* 及 β -胡萝卜素含量显著降低。整个胁迫实验中, 藻体总抗氧化能力(T-AOC)及其他抗氧化酶比活力大体上在强光胁迫的起始至第 3 天上调, 而在胁迫第 5 天时又出现下降趋势, 且在营养盐含量较高的处理组中, 各样本活性均高于天然海水处理组样本。抗氧化酶基因的表达也呈现类似的变化趋势。在低于 900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 的光照条件下, 抗氧化酶活性可以得到较好的维持, 而海水中相对较为丰富的营养盐则有利于藻体抗氧化能力的维持。研究结果为荣成海带病烂暴发的原因分析提供了一定的借鉴。

关键词 强光胁迫; 活性氧清除; 光系统修复; 海带幼苗; 抗氧化酶; 岩藻黄素; β -胡萝卜素

中图分类号 Q539; Q51 **doi:** 10.11693/hyh20220500127

海带(*Saccharina japonica*)属褐藻门(Phaeophyta), 褐藻纲(Phaeophyceae), 海带目(Laminariales), 海带科(Laminariaceae), 糖藻属(*Saccharina*) (水产辞典编辑委员会, 2007), 由假根状固着器、柄和叶片组成, 通过固着器附着于岩石、养殖筏架上生长。海带是我国渔业生产的主要藻类之一, 栽培规模和产量均居世界首位, 据国家藻类产业技术体系监测调查情况及相关统计数据显示, 2008~2018年, 全国海带栽培

面积呈上升趋势, 2018年栽培面积相比于10年前增加了约34.63%, 占全国藻类栽培面积的31.29%。目前我国海带主要分布在东南沿海和渤海湾地区, 其中福建省占总栽培面积的45.23%, 山东省占比约为38.04%, 辽宁省占比13.47%; 浙江省、江苏省和广东省也有零星栽培, 占比不到4% (国家藻类产业技术体系, 2021)。海带不仅是海藻化工和农业肥料等行业的重要原料, 也是一种营养丰富的海洋食蔬。我国已形成

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项项目, 2018YFD0901500 号; 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助, CARS-50 号。牛建峰, E-mail: jf_niu@qdio.ac.cn

通信作者: 李晓捷, 硕士生导师, 研究员, E-mail: yeslxj@sina.com; 王广策, 博士生导师, 研究员, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2022-05-11, 收修改稿日期: 2022-07-04

带育种、育苗、栽培、加工、藻类化工为一体的产业链条, 海带产业在促进就业、渔民增收, 为社会提供健康食品, 改善生态环境, 缓解水体富营养化等方面作出了重要贡献(国家藻类产业技术体系, 2021)。

在海带的生长发育过程中, 不可避免地会受到众多环境因子的影响, 光照就是其中一个重要因子。海水透明度可影响自然海区海带的垂直分布, 随海水透明度的提高, 其分布的深度会相应增加。在海带的人工栽培中, 水体透明度也是被考虑的重要环境因子, 在受江河入海口影响而水质较浑浊的海区, 海带一般栽培于海水表层, 在海水透明度高的区域, 海带则被栽培在较深层海水中(苏丽, 2018)。有研究表明, 海带对光照强度的需求存在一个适宜范围(即光补偿点与光饱和点之间), 在此范围内, 随光照强度增加海带光合作用加快, 而当光照强度超过饱和点后, 光合作用则减弱甚至受到抑制(陈书秀等, 2021)。

长期生产实践积累的经验表明, 过强或过弱的光照条件均可能抑制海带的生长, 甚至引起海带病变发生。在光强范围 300~10 000 lx 内, 不同大小海带的光合活性均随光照强度增强而升高(姚南瑜等, 1981)。张起信(1994)通过总结经验数据提出海带光补偿点大约为 345 lx, 在养殖前期(幼苗期和凹凸期), 光照强度不宜超过 800 lx, 正常栽培时期比较合理的光照范围为 14 000~22 000 lx, 此光照条件下海带生长正常, 且不易发病。这个光照强度所对应的水层深度基本与透明度相当, 被称为海带的合理受光水层。程晓鹏等(2020)在测定养殖海域海带孢子体生长参数的基础上, 设置暂养实验, 测定了在不同光合有效辐射(PAR)梯度下海带的光合活性变化, 发现快速光曲线随着光合有效辐射的增强呈先升后降的趋势, 海域养殖海带孢子体干重生长率变化与快速光曲线变化一致。

目前, 关于光照条件对海带生长的影响, 主要集中在生长速率、形态变化及产量方面, 而从藻类生理生化角度的探讨相对较少。在低于 1 200 lx 的不同光照条件下, 培养 3 d 后的海带幼苗多酚、可溶性糖及可总溶性蛋白含量随光强降低而降低, 而叶绿素 a 和 β -胡萝卜素含量则呈相反趋势(黄健等, 2002)。程晓鹏等(2020)通过模拟实验, 综合分析了海带孢子体对温度和光照的生理响应。梁洲瑞等(2019)研究了极北海带(*Laminaria hyperborea*)幼苗在不同光照条件下的抗氧化酶活性, 认为这些酶在响应强光胁迫的过程中发挥作用。本文则通过设置营养盐与光照强度组合的

不同培养条件, 研究了强光对海带幼苗光合作用及抗氧化酶的影响, 以期对海带人工栽培提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用海带(*Saccharina japonica*)幼苗藻体长度为 20~30 cm, 2022 年 2 月 17 日从福建移栽青岛即墨海区暂养 3 d, 期间水温 5 °C, 苗绳捆坠石沉入水下 2 m。后转运至(山东东方海洋科技股份有限公司高新区分公司)暂养 1 d 后进行不同胁迫条件下的处理。暂养条件为: 温度 4 °C; 光照强度 50 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$; 光周期 12L:12D。

1.2 方 法

1.2.1 光响应曲线测定 取暂养后的藻体, 暗适应 10 min 后, 通过双通道调制叶绿素荧光仪 Dual-PAM-100 (Heinz Walz, Effeltrich, 德国)原位测定海带光响应曲线。光化光(PAR)强度设定为 16、26、75、131、353、795、1 701 和 3 444 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$, 每一 PAR 梯度下的照射时间为 10 s, 2 次光化光间隔为 20 s, 记录至少 3 组不同光化光下的 ETR(II)值, 取平均值后通过软件 Origin 9.0, 利用 Eilers 等(1988)建立的方程进行光响应曲线的耦合, 方程公式为: $\text{ETR}=\text{PAR}/(a \times \text{PAR}^2+b \times \text{PAR}+c)$, 计算得出 PSII 最大量子得率 α , 最大电子传递速率 ETR_{max} , 以及半饱和光强或最小饱和光强 I_k 。

1.2.2 海区光照强度与海水深度关系测定 于 2022 年 2 月 24 日正午, 在烟台高新区海区(37°28'N, 121°47'E)进行了不同深度水体中光照强度的测定。测定以水下光温探头(Pendant, HOBO, 美国)与透明度盘结合进行, 将探头固定于透明度盘表面, 随透明度盘逐渐下沉水下, 从水体表面开始至水下 5 m, 每下降 1 m 保持 1 min, 进行数据采集, 采集频率设定为 10 次/min, 同时, 对海区透明度对应的水体深度也进行 1 min 的光强数据采集。

1.2.3 不同光照强度及不同营养盐浓度处理 以烟台高新区自然海区抽取的海水, 经沉淀、砂滤后作为本实验低营养盐培养用海水。同时, 在海水中添加硝酸盐和磷酸盐, 配制营养海水(氮终浓度 10 mg/L, 磷终浓度 1 mg/L)。分别在营养海水及自然海水中设置高强度[1 300~1 500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$]、中等强度[700~900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$]和低强度[约 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$]胁迫光照条件, 对海带幼苗进行处理, 不同强度的光照条件基于正午水面光照强度, 水下 1 m 处光照强度及水体透明度

条件下对应的光照强度设定。连续进行 5 d 胁迫处理, 每日处理时间为 6 h。在强光处理的第 1、3 和 5 天, 光照处理结束后, 测定藻体光合作用参数, 收集材料, 吸水纸吸干, 液氮速冻, -80°C 保存备用。同时, 在胁迫处理的第 2 天和第 4 天, 强光处理前对藻体光合参数进行测定。

本实验以高亮度 Led 灯提供光照条件, 温度监测显示整个实验期间温度维持在 $4\sim 6^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.4 光合参数测定 藻体在不同营养盐浓度、胁迫光照条件处理后暗适应 10 min, 使用调制叶绿素荧光仪 Dual-PAM-100 (Heinz Walz, Effeltrich) 测定其光合作用参数。具体测定程序: 初始荧光(F_0), 以 $12\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$ 的测量光测定获得; 最大荧光参数(F_m), 使用饱和脉冲[SP, 强度 $6\ 000\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$, 持续时间 300 ms]测定; 可变荧光(F_v)由 F_m 和 F_0 的差值获得。测定过程中光化光强度设定为 $57\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$, 通过系统自带程序, 测得光合作用各参数, 利用 Origin 9.0 软件进行数据处理并作图。

1.2.5 色素提取和含量测定 参考 Thayer 和 Enriquez 等人建立的方法(Thayer *et al.*, 1990; Enriquez *et al.*, 2010), 将 -80°C 储存的藻体约 100 mg, 置研磨管, 液氮预冻, 于研磨仪(JX-FSTPRP-24, 净信科技, 中国上海) 60 Hz 震荡破碎 50 s, 暂停 10 s, 连续破碎三次, 悬浮于甲醇/丙酮(1/1, *V/V*)中, 冰浴 30 min, 3 000 g 离心 5 min (4°C), 沉淀再次加入一定体积甲醇/丙酮提取液, 离心、收集合并上清。色谱测定前, 上清液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 所有步骤在黑暗低温状态下进行。

色素测定采用高压液相色谱系统(Agilent 1200, 美国)进行, 色谱柱为 C18 反相柱($4.6\times 250\ \text{mm}$), 流动相包括 A (水)、B (甲醇)、C (乙腈)和 D (乙酸乙酯), 具体色谱程序为: 0~15 min, I (15% A, 30% B, 55% C, 0% D)到 II (0% A, 15% B, 85% C, 0% D)线性梯度; 15~17 min, II 到 III (15% A, 15% B, 35% C, 35% D)线性梯度; 17~40 min, III 到 IV (0% A, 30% B, 0% C, 70% D)线性梯度。柱温 50°C , 流速 $0.75\ \text{mL}/\text{min}$, 检测波长 443 nm。色素定量标准品岩藻黄素、叶绿素 *a* 及 β -胡萝卜素购于 Sigma (Sigma-Aldrich, 美国)。色素标准曲线通过不同浓度标准品的峰面积绘制, 样本中色素浓度根据标准曲线计算获得。

1.2.6 过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(MDA)含量测定

取适量 -80°C 冻存样品, 按上述方法磨碎, 加适量过氧化氢测定试剂盒(南京建成)提取液, 再次震荡后, $12\ 000\ \text{g}$, 4°C 离心 10 min, 收集上清。按试剂盒操作步骤加样, 酶标仪(M1000Pro, Tecan Infinite, 瑞士)测定吸光值, 计算各样本中 H_2O_2 含量。

采用植物 MDA 试剂盒(南京建成), 材料研磨及样本制备方法同前。按照说明书步骤, 以无水乙醇为空白对照, 以 $10\ \text{nmol}/\text{mL}$ 的 MDA 标准品作为标准管, 使用酶标仪(M1000Pro, Tecan Infinite, 瑞士), 测定波长 340 nm, 对样本中 MDA 含量进行测定。

1.2.7 总抗氧化能力及抗氧化酶比活性测定 样本研磨及酶提取液的制备方法同 1.2.6。使用 T-AOC 试剂盒(南京建成)测定不同条件下样本总抗氧化能力的强弱, 测定波长 593 nm, 吸光度的大小反应样本中所含抗氧化物质的总体的抗氧化能力。

样本研磨及酶提取液的制备方法同前。各抗氧化酶测定试剂盒均购自南京建成。超氧化物歧化酶(SOD)的测定基于 WST-8 的显色反应, 通过比色法对样本中相应的酶活进行测定; 过氧化氢酶(CAT)活性通过单位时间内 A_{405} 吸光度的变化计算获得; 过氧化物酶(POD)活性通过单位时间内 A_{420} 吸光度的变化量测定获得; 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性根据单位时间内 A_{290} 吸光度的减少值计算。

1.2.8 抗氧化酶的实时荧光定量(qRT-PCR)检测

(1) RNA 提取 不同处理样本的总 RNA 使用 RNAPrep Pure Plant Kit (中国北京天根)提取, 得到的 RNA 浓度通过 Nanodrop Photometer 分光光度计(IMPLEN, CA, 美国)测定。

(2) 反转录 依据 TaKaRa 反转录试剂盒操作说明书进行, 每个反应含总 RNA 200 ng, 用量据前述 RNA 浓度测定确定。具体操作步骤包括: 1) 基因组 DNA 去除。5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μL , gDNA Eraser 1 μL , Total RNA (200 ng), 添加 RNase Free dH_2O 至 10 μL ; 42°C 2 min; 2) 反转录反应。向步骤 1) 的反应液中加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL , RT Primer Mix 1 μL , 5 \times Primescript Buffer 4 μL , RNase Free dH_2O 4 μL ; 37°C 15 min, 85°C 5 s, 4°C 维持。cDNA 模板置 -20°C 备用。

(3) 引物设计 以海带胁迫条件下转录组数据为基础, 筛选每种抗氧化酶基因中表达上调最明显的基因序列为转录研究对象, Tublin (*Tub*)为内参, 通过海带基因组数据获得目标分子核酸序列, Primer Premier 5.0 设计引物。基因名称及引物序列见表 1。

表 1 目标基因引物序列及 PCR 产物长度
Tab.1 Primer sequences and PCR product size of target genes

基因名称	基因描述	引物序列 5'→3'	产物长度/bp
<i>Tub</i>	β -Tublin	AGGTGGACGAGCAGATGC GAGGCCCTTAGGAGGTACG	110
<i>SOD</i>	Superoxide dismutase	GTCATTGTCACCCAGAAC ATCGCCACAGCGTATTT	338
<i>POD</i>	Peroxidase	AACCCCTCGCAAGCCTCT CCGCCATCTTCTCCACC	326
<i>GR</i>	Glutathione reductase	AACCTTGGGAAGCTCTGGG AAAAGCGTCGTGTCTGTC	284
<i>GPX</i>	Glutathione peroxidase	ACTGAGTGATTTTCCG TAGTTGCTGTCCGTGTA	123

(4) qRT-PCR 条件优化及基因表达量测定 通过调整 PCR 反应参数, 对各引物扩增条件进行优化。扩增的片段连接 PMD19-T 载体, 转化 *E. coli* 感受态细胞, 测序验证。EZNA™ plasmid mini kit 质粒提取试剂盒提取质粒, 10 倍梯度稀释, 进行引物扩增效率检测。选择扩增效率在 90%~110% 的引物进行 qRT-PCR 实验。

使用 StepOne Plus Real-Time (ABI, Foster, 加州, 美国) 多色实时荧光定量 PCR 仪, 2×SYBR Green Master Mix (Roche, 德国), 每个样本设 3 个重复, 进行抗氧化酶基因转录水平的测定。qRT-PCR 反应体系 20 μ L, 包括 1 μ L cDNA 模板, 10 μ L 2×SYBR Green Master Mix, 上下游引物各 0.5 μ L (浓度为 10 μ mol/L), 8 μ L RNase-free 水。反应程序: 预变性: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 变性: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 退火: 根据不同引物设定, 退火时间 15 s, 延伸: 72 $^{\circ}$ C 25 s, 40 个循环; 65 $^{\circ}$ C 30 s, 61 个循环。反应结束后, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目标基因相对表达强度(Livak *et al*, 2001)。

2 结果

2.1 海带幼苗快速光响应曲线

如图 1 所示, 随光合有效辐射的增强, 海带幼苗 PSII 电子传递速率[rETR(II)]呈先快速上升后缓慢下降的趋势, 在光饱和点处达到最大相对电子传递速率。根据快速光曲线拟合结果, 计算得到 PSII 的最大量子得率 α 为 0.394, 光饱和点下 ETR_{max} 约为 64 μ E/(m^2 s), 最小饱和光强 I_k 为 163 μ E/(m^2 s)。

2.2 海区光照强度与海水深度的对应关系

光照强度监测数据显示(图 2), 2 月 24 日正午水面光照强度可达到 1 500 μ E/(m^2 s), 而在水下 1 m 时迅速下降到约 600 μ E/(m^2 s), 此时, 受表层海水流动及波动的影响, 监测数据呈现锯齿状波动, 至水下 2

m 的区域, 光强下降到 350 μ E/(m^2 s), 随着深度的增加, 光照强度的降低呈现减少的趋势, 但在水下 5 m 的区域, 光强也可以达到约 80 μ E/(m^2 s)的水平。经测定, 本次测量水体透明度约为 2.8 m, 此条件下光照强度约为 200 μ E/(m^2 s)。

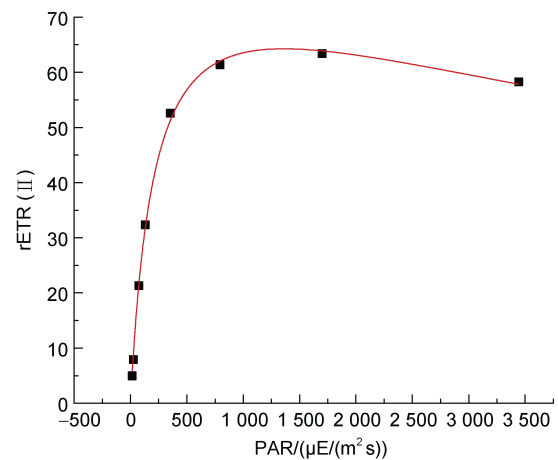


图 1 海带幼苗饱和光强曲线

Fig.1 Variation in rETR(II) under different light intensities for *S. japonica* seedlings

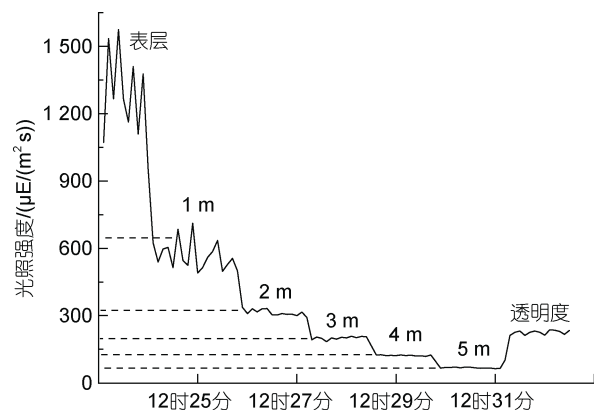


图 2 不同海水深度对应的光照强度

Fig.2 Changes in light intensity at different seawater depths

2.3 强光胁迫对海带幼苗光合作用参数的影响

如图 3 所示, 在光照强度约 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 条件下, 室内连续培养过程中, 样本 F_v/F_m 均呈现持续降低的趋势, 其中自然海水条件下下降更为迅速, 至第 5 天时降为初始值的三分之一; 而营养海水条件下, 虽然 F_v/F_m 也逐渐降低, 但下降速率和程度均显著低于自然海水条件, 至第 5 天时, 仍达到了实验开始时一半的水平。在经历中等强光[700~900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$]胁迫后, 与低强光[200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$]培养条件相比, 藻体 F_v/F_m 呈现显著降低的趋势。在营养海水培养条件下, 样本 F_v/F_m 在胁迫的第 3~5 天一直维持在 0.3 上下, 而自然海水培养条件下的藻体 F_v/F_m 持续降低, 直至第 5 天的 0.2。高强度[1 300~1 500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$]胁迫的藻体中, 无论营养海水还是自然海水培养条件下, F_v/F_m 在胁迫的第 1 天就出现较强烈的下降, 而在后续高强度处理下, 虽然光合能力同样持续下降, 但营养盐条件对其影响不显著, F_v/F_m 基本均维持在 0.1。

强光胁迫前, 海带藻体 F_v/F_m 为 0.72, 在不同强光胁迫 1 d 后, 高强度组及中等强光组, 无论在营养海水还是自然海水培养条件下, 藻体 F_v/F_m 均无法恢复至原初状态(图 4); 而在低强光[200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$]营养海水胁迫处理第 4 天后依旧可以恢复至原初水平, 低强光自然海水组在前 3 d 的强光处理下无明显变化, 仅在第 4 天后降低至约 0.6 (图 4)。另一方面, 在营养海水条件下, 中等强度高光处理 1 d 及 3 d 后, F_v/F_m 恢复程度明显高于自然海水条件下的样本。

2.4 不同条件下海带幼苗光合色素含量测定

如图 5 所示, 除高强度导致的 β -胡萝卜素含量降低外, 其他强光处理各时间点 β -胡萝卜素含量均高于

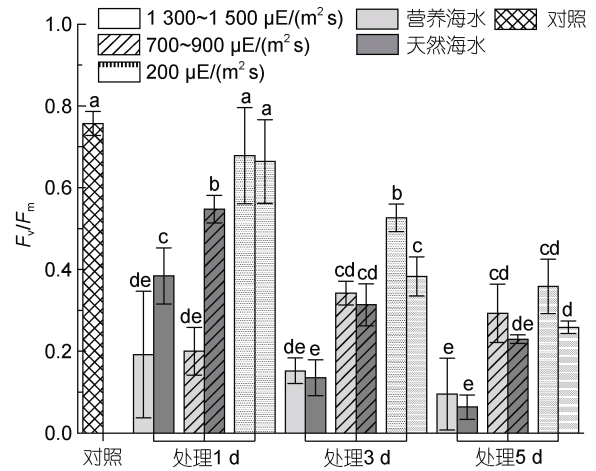


图 3 不同光照强度、营养盐条件下海带幼苗 F_v/F_m 的变化
Fig.3 Changes in F_v/F_m of *S. japonica* seedlings under different light intensities and nutrient conditions

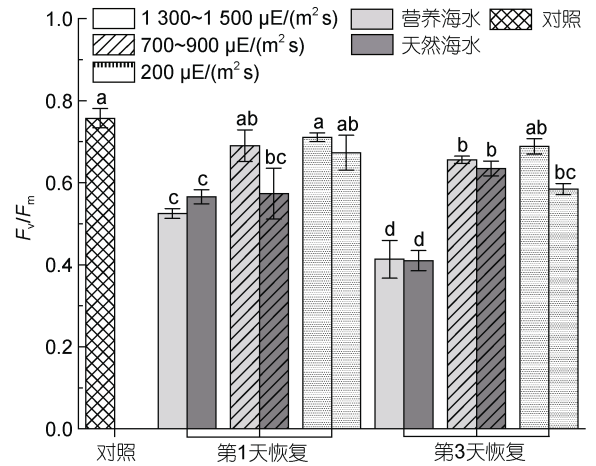


图 4 胁迫处理不同时间海带幼苗 F_v/F_m 的恢复
Fig.4 Recovery in F_v/F_m of *S. japonica* seedlings after different stress treatment times

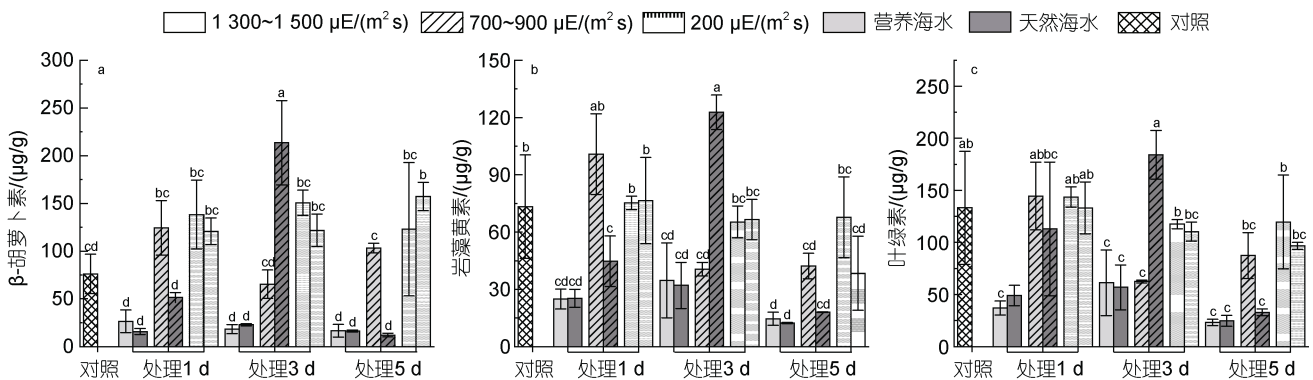


图 5 不同光照强度、营养盐条件下海带幼苗光合色素含量的变化

Fig.5 Changes in photosynthetic pigment content of *S. japonica* seedlings under different light intensity and nutrient conditions

注: a. β -胡萝卜素; b. 岩藻黄素; c. 叶绿素

对照,且在胁迫的第3天, β -胡萝卜素含量相对较高。1 300~1 500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 高强度处理下,所有样本中岩藻黄素含量均低于对照。同时发现,在胁迫的第5天,无论哪种程度的强光胁迫下,岩藻黄素含量亦均低于对照,且随光强的减弱而含量有所升高,营养海水培养下的藻体岩藻黄素含量高于自然海水。叶绿素含量与岩藻黄素的变化趋势一致,1 300~1 500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 强光处理下明显降低,而在胁迫的第5天,所有样本中叶绿素含量均低于对照,且在营养海水培养下的藻体叶绿素含量明显高于自然海水(图5)。

2.5 不同条件下海带幼苗过氧化氢及丙二醛含量测定

如图6所示,自然海水培养条件下,强光胁迫过程中,过氧化氢(H_2O_2)含量在不同强度胁迫光下均表现出先升后降的趋势;营养海水培养条件下, H_2O_2 含量变化趋势大致相同,且随胁迫时间的延长,各样本 H_2O_2 含量上调程度变得更加明显。在胁迫的第5天,营养海水培养条件下 H_2O_2 含量显著高于同条件下自然海水中培养的藻体。

无论在自然海水还是营养海水培养条件下,高强度强光下MDA含量随胁迫时间呈现逐渐下降的趋势,中等及低等强光胁迫下,MDA含量呈现先上调再下降的趋势,但直至实验结束,藻体MDA含量均高于对照,且营养海水培养条件下MDA含量高于自然海水培养下的含量(图7)。

2.6 不同条件下海带幼苗抗氧化酶比活力测定

整个强光胁迫实验过程中,各样本总抗氧化能力(T-AOC)均高于对照,且呈现随胁迫时间延长先升高后降低的趋势,至实验结束时,藻体T-AOC已经出现明显降低。此外,在营养海水培养条件下,藻体T-AOC显著高于自然海水培养条件下的总抗氧化能力(图8)。

与T-AOC相比,整个光强胁迫实验过程中,SOD仅在个别样本中出现上调,如在中等强光或低强光胁迫处理的中后期(图8)。自然海水培养条件下,SOD比活性随胁迫时间延长基本维持不变或略有下降;营养海水培养条件下,藻体SOD在中等强光胁迫下先上升再下降,在低等强光照条件下,SOD比活性持续增加。自然海水条件下,POD比活性在强光胁迫下随胁迫时间延长,大体上呈现先上调再下降的趋势;而在营养海水条件下,POD活性在胁迫的起始和中间时段均略低于对照,但在胁迫实验结束时,其活性出现显著上调,且上调程度随光照强度增加而增强。GR

活性因藻体不同差异较大,大体上在营养海水培养条件下活性较高。在胁迫至第5天时,低强光下藻体GR酶活高于中等强光处理藻体,中等强光下藻体GR酶活又高于高强度处理藻体。

2.7 不同条件下海带幼苗抗氧化酶基因的表达变化

实时荧光定量结果显示,强光胁迫条件下,SOD表达除个别样本外,在大多数样本中均上调,且高强度组SOD表达随胁迫时间延长而逐渐降低,中等强度与低强度强光组表达大体上呈现先升高后降低的趋势。同时,营养海水培养条件下SOD表达量一般高于同光照下自然海水培养条件。在胁迫处理的中后期,SOD的表达呈现随胁迫强光增加而其表达下调的趋势。

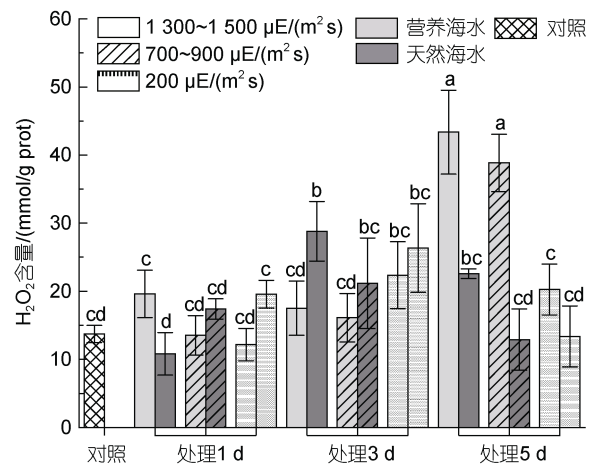


图6 不同光照强度、营养盐条件下海带幼苗 H_2O_2 的含量
Fig.6 H_2O_2 content of *S. japonica* seedlings under different light intensities and nutrient conditions

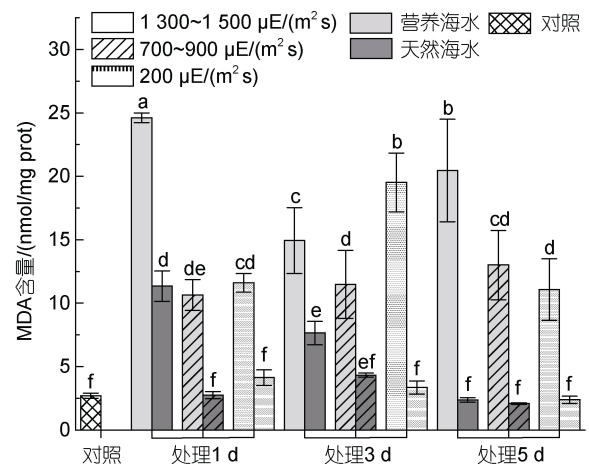


图7 不同光照强度、营养盐条件下海带幼苗MDA含量
Fig.7 MDA content of *S. japonica* seedlings under different light intensities and nutrient conditions

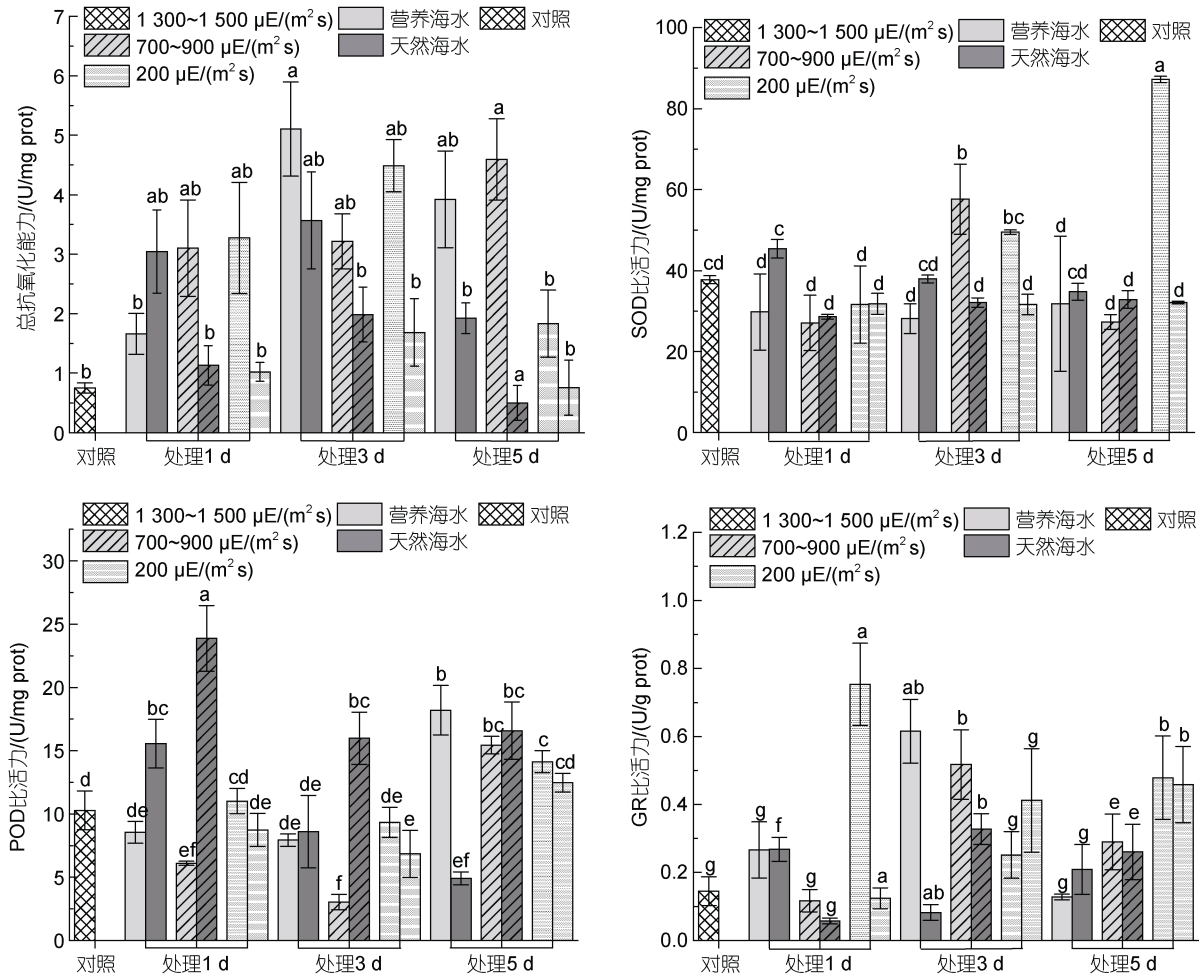


图 8 海带幼苗不同处理条件下抗氧化活性变化

Fig.8 Changes in antioxidant activity of *S. japonica* seedlings under different light intensities and nutrient conditions

注: a. 总抗氧化能力; b. SOD 比活力; c. POD 比活力; d. GR 比活力

POD 的表达变化较为剧烈, 自然海水培养条件下, 其表达在高强光下几乎被抑制, 中等程度强光下, 其表达呈现先升后降的趋势, 但上调程度基本与对照无明显差别, 低强光下, 其表达在胁迫的起始阶段明显上调, 后持续降低, 至实验末期不能检测到其 mRNA 的表达。营养海水条件下, 除低强光胁迫下 POD 呈现先上调再下降的趋势外, 其他条件下 POD 表达变化趋势与自然海水培养的类似, 且表达水平高于自然海水培养的 POD 表达。

不同营养盐条件下, GR 的表达均出现显著上调, 且在高强光条件下随胁迫时间延长其表达持续降低, 而在低强度高光条件下, 自然海水培养藻体中, GR 表达持续降低, 而营养海水培养下藻体 GR 表达呈现先升后降的趋势。与未经胁迫的对照相比, 高强光胁迫下, GPX 表达呈逐渐下调趋势, 只有低强度高光胁迫

时, 藻体 GPX 表达明显上调, 且上调趋势随胁迫时间延长而逐渐降低, 同时发现, 大多数情况下, 营养海水培养条件下 GPX 表达量高于自然海水培养条件下 GPX 的表达。

3 讨论

3.1 海带饱和光强与藻体大小及生长环境密切相关
植物对光照强度的适应或需求存在一定的适宜范围, 在合适的光照范围内, 随光照强度的增加, 光合效率增加, 但当超过饱和光强后, 光合作用反而会受到影响, 严重时还可能导致光合作用元件遭受损伤。关于海带的饱和光强, 本实验测定结果显示其最小饱和光强(半饱和光强)为 163 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$, 明显高于程晓鹏等(2020)的测定结果。研究表明, 海带耐受的光照强度随孢子体的变大而减弱(段德麟等, 2015),

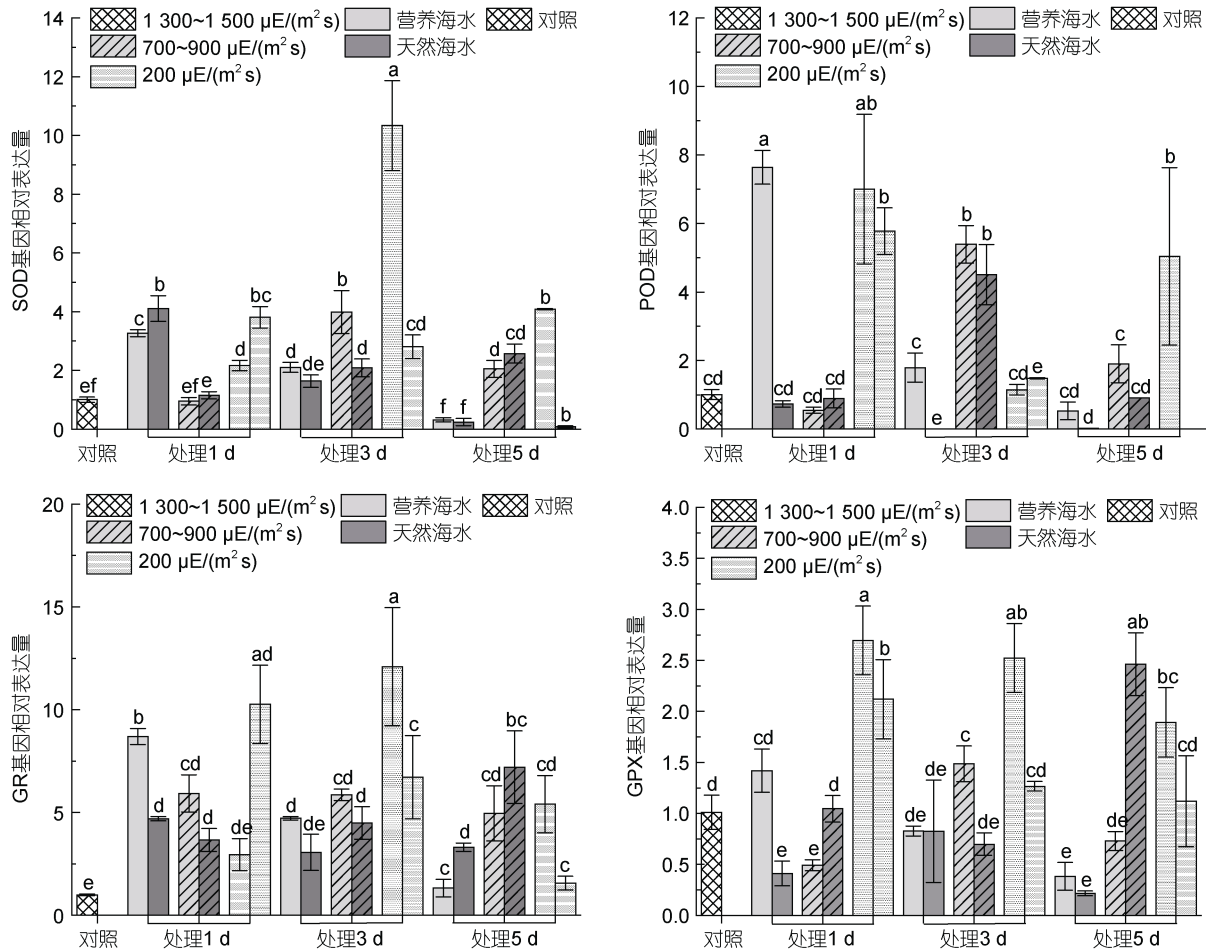


图 9 海带幼苗不同处理条件下抗氧化酶基因的表达变化

Fig.9 Variations of antioxidant enzyme genes under different treatment conditions for *S. japonica* seedlings

注: a. SOD 基因相对表达量; b. POD 基因相对表达量; c. GR 基因相对表达量; d. GPX 基因相对表达量

我们使用的实验材料为海带幼苗, 长度在 20~30 cm 之间, 而程晓鹏等(2020)测定的海带孢子体样品叶长为(71.8±11.2) cm, 这可能是造成明显差异的直接原因。而另据报道, 在海区分苗后的正常栽培时期, 海带比较合理的光照范围为 14 000~22 000 lx, 约 280~440 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ (张起信, 1994)。综上, 关于海带的饱和光强, 因藻体大小、生理状态或测定方法, 抑或测定环境不同, 导致具体结果存在较大差异。但可以肯定的是, 其饱和光强相对较低。

3.2 强光对海带幼孢子体光合作用的影响

F_v/F_m 是光系统 II (PS II) 最大光化学效率, 代表了 PS II 反应中心原初光能转化效率, 是光化学反应的重要参数, 在正常环境条件下, 植物 F_v/F_m 极少变化, 而当 F_v/F_m 明显下降时, 就表示植物受到了强烈胁迫(卢从明等, 1995)。本实验中无论是较低的 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 强光处理组, 还是中等或 1 300~

1 500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 的高强光处理组, F_v/F_m 值均出现逐渐下降的趋势。在不同光照强度处理组间, 相同处理条件下, 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 组 F_v/F_m 高于 700~900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 处理组, 又明显高于 1 300~1 500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 处理组。说明实验中使用的光照强度确实对测试的海带藻体产生了胁迫伤害, 导致其 F_v/F_m 随处理时间增加而降低。另外, 导致藻体 F_v/F_m 值逐渐降低的可能原因还包括实验材料较大, 水体体积相对较小, 无流水刺激等。

PSII 对环境的变化非常敏感, 在不利或者胁迫环境条件下 PSII 的活性比其他生理活性下降更快 (Demmig-Adams *et al*, 1992; Aro *et al*, 1993; Andersson *et al*, 1997)。PSII 的修复循环是叶绿体适应胁迫环境的重要机制之一, 但当 PSII 的损伤速率超过修复速率时, 就会导致藻体 PSII 无法被修复而降低 (Tikkanen *et al*, 2014)。条斑紫菜中, Kang 等(2022)认为酸处理后, 如果藻体 $F_v/F_m > 0.183$, 则复苏后光

合作用可以得到恢复,但当胁迫后 F_v/F_m 低于 0.183 时,藻体 PSII 就可能已经遭受到了不可逆的损伤,藻体光合作用会随时间推移而持续下降。造成光合作用持续下降的原因可能是 PSII 的修复受到了影响。本研究中,海带在 $1\ 300\sim 1\ 500\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$ 强光下胁迫 6 h 后,自然海水培养下的藻体 F_v/F_m 降至 0.2 以下,营养海水培养下的 F_v/F_m 降至约 0.4,但即使过夜复苏,也不能恢复至正常对照水平。但在 $700\sim 900\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$ 光照强度下,即使连续胁迫 3 d, F_v/F_m 已降至 0.3,过夜后也可恢复。由此可见,海带 PSII 能够较长时间耐受 $700\sim 900\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$ 的强光胁迫,而且营养盐含量较高的海水可能有助于 PSII 的修复。

对 PSII 造成破坏的最主要环境因素是强光,强光导致的光抑制最显著的结果是 PSII 光化学效率和光合碳同化量子效率的降低,显著特征之一是 PSII 的结构和功能的破坏。而在强光条件下,低温胁迫又明显地促进了 PSII 光抑制的发生(Öquist *et al.*, 1993) 和 PSII 蛋白合成的抑制(Allahverdiev *et al.*, 2004)。因此,低温与强光共同作用下,藻体光合作用更容易受到影响。植物光合作用是温度、光照、营养盐水平等诸多因素共同作用的结果(刘露等, 2013), PSII 复合体中被破坏的蛋白质的周转对维持其功能状态非常重要,即高效的蛋白合成系统及营养盐供应可能也是影响植物适应能力的重要因素。正如本研究所示,在实验进行的第 3 天开始,营养海水培养条件下,在强光处理及复苏后的 F_v/F_m 值均高于天然海水培养的藻体,这种差别在实验进行的后期更为明显(图 3 和图 4)。据此推测,水体营养盐水平对海带响应逆境胁迫具有积极意义,即在营养盐相对较丰富的水体中,藻体具有更高的逆境耐受能力。

3.3 海带幼孢子体对波动光的适应

本研究中,我们采用了恒定强光对海带进行了胁迫处理。虽然我们的研究表明, $200\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$ 的光照强度已经构成了海带幼苗的胁迫光强,但自然界中光合生物总是处在不断变化的光照条件下的,海水表面的饱和太阳光强可以达到 $2\ 000\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$,有时甚至更强(Long *et al.*, 1994)。此外,海洋因具有规律且连续的波浪、棱镜效应,从而产生亮带或斑块的水平波(Schubert *et al.*, 2001),导致海洋藻类频繁地暴露在不断波动的光环境中。由于海带藻体在波浪作用下的相互遮挡造成的光强变化,也导致海带处在一种光照条件剧烈波动的环境中。据报道,在翻滚培养(tumbled culture)模式下, $50\ 000\ \text{lx}$ 可见光及 $400\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$

紫外光共同作用 $10\sim 20\ \text{s}$ 的条件下,海带最大荧光得率未表现出明显下降,而且在此光照条件下,对海带处理 $50\sim 60\ \text{s}$,低温复苏 24 h 后,其光合作用可以得到完全恢复(Pang *et al.*, 2008)。这很好地解释了为什么不同研究人员测定得到的海区栽培海带饱和光强显著低于海区实际光照强度,而海带仍可以正常生长的原因。即自然栽培的海带在海浪的作用下,藻体间通常会出现彼此的遮挡,从而使得藻体不至于长时间处于胁迫强光照下,同时,也可能因为海带因具有适应这种波动光照条件的能力,故可正常生长发育。

海带之所以能够适应波动光,是因为其光能捕获系统由叶绿素 *a/c*-岩藻黄素-叶绿素蛋白复合物 FCP (fucoxanthin-chlorophyll proteins) 构成。这种捕光色素系统不仅在弱光条件下能有效捕获光能,最大限度地吸收蓝光和绿光,在强光条件下还能耗散多余能量(Wang *et al.*, 2019)。在此领域研究较多的是具有极高生理“柔性”,可适应复杂和动态环境的海洋硅藻(Kooistra *et al.*, 2007)。研究证明,硅藻中 FCP 复合物可通过岩藻黄素及其相关蛋白的相互作用的改变或修饰,实现向光系统转移多余能量(Tanabe *et al.*, 2020),从而发挥能量耗散的作用,这种机制在藻类应对光胁迫时至关重要(Derks *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019)。

这种机制可能包括两个过程,分别为短期(S/min)的质子梯度和光系统活性调节,以及长期(h/d)的光合色素和 Rubisco 等碳代谢酶(Long *et al.*, 1994)的合成。质体 MEP 途径中的 DXS (一种光诱导的酶,通过促进类胡萝卜素合成实现光保护)在剧烈的波动光下增加(Athanasakoglou *et al.*, 2019),光照条件的剧烈波动还可能会严重刺激这些依赖光的基因表达。本研究中,我们虽仅使用了恒定强光开展了胁迫实验,结果显示海带中 β -胡萝卜素含量除在 $1\ 300\sim 1\ 500\ \mu\text{E}/(\text{m}^2\ \text{s})$ 强光处理降低外,其他条件下均上调,说明 β -胡萝卜素的合成对海带响应强光胁迫具有重要作用,而岩藻黄素与叶绿素的合成随胁迫时间的延长出现明显的降低,尤其在实验末期,说明强光降低了叶绿体中类囊体的数量,并对叶绿素及岩藻黄素的合成产生负面影响(Lichtenthal *et al.*, 1983),这也暗示藻体状态可能受到了较严重的影响,导致各色素含量降低。同时发现,在胁迫的第 3 天,虽然在自然海水培养条件下具有相对较高的色素含量,但在胁迫实验的末期,营养海水中培养的藻体具有更强的强光耐受能力。

3.4 强光胁迫导致的抗氧化酶活性降低影响了海带幼孢子体光合生理活性

光抑制条件下, PSII 的原初电子受体被过度还原 (Vass *et al.*, 1992), 或者 PSII 的受体侧及供体侧之间的电荷发生重组而产生活性氧自由基(ROS) (Keren *et al.*, 1997)。这些 ROS 如不能被及时清除, 就可能直接攻击 PSII 的光化学反应中心。研究发现, 在外源 H_2O_2 添加或 H_2O_2 清除酶被抑制的条件下, PSII 的修复受到了抑制(Nishiyama *et al.*, 2001)。因此, 叶绿素吸收的过多的光能可能导致 PSII 光化学反应中心失活 (Ohnishi *et al.*, 2005), 而胞间 H_2O_2 和 1O_2 的水平增加可明显抑制 PSII 修复, 增加光抑制的程度(Nishiyama *et al.*, 2001, 2004; Allakhverdiev *et al.*, 2004)。

逆境中藻体产生的 ROS 主要通过抗氧化系统被清除, 这包括酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统, 而总抗氧化能力是用来衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标, 反映了机体对外来刺激的代偿能力及机体自由基代谢的状态。本文结果显示, T-AOC 在强光胁迫的第 3 天上调, 而在胁迫第 5 天时又呈下降趋势。同时发现, 在营养盐含量较高的处理组中, 各样本 T-AOC 均高于天然海水处理组样本(图 8), 说明在整个强光胁迫处理过程中, 海带总抗氧化能力在一定程度上得到了诱导, 尤其在营养盐相对丰富的条件下。然而强光胁迫或实验中培养条件的限制, 最终影响了海带正常生理过程, 导致末期 T-AOC 下调。

生物体酶促抗氧化系统包括 SOD、POD、CAT 及 GR 等多种抗氧化酶, 其中, SOD 存在于所有需氧生物, 通过歧化作用将 $O^{\cdot-}$ 转化为 O_2 和 H_2O_2 , 形成了植物在逆境中清除 ROS 的第一道防线。本研究结果显示, 在强光胁迫 6 h 的条件下, 藻体内 SOD 活性均受到了抑制, 而在胁迫处理的第 3 天, SOD 比活性的微弱上调(图 8), 说明海带细胞内 SOD 在对强光胁迫的适应过程中发挥重要作用, 而胁迫培养的末期, 高营养盐条件下 SOD 活性相对较高, 也证明水体营养盐含量对抗逆机制的维持确实具有一定意义。与酶活测定结果不同的是, SOD 的表达除在 $1\ 300\sim 1\ 500\ \mu E/(m^2\ s)$ 高强度胁迫的第 5 天外, 其他营养海水培养条件下的表达均上调, 且在胁迫的第 3 天, SOD 表达最为活跃(图 9), 同样证明海带在强光胁迫的第 3 天具有最强的抗氧化响应能力。而在处理的第 5 天, SOD 的表达已受到抑制, 受影响程度随光照强度增加而增加。

梁洲瑞等(2019)报道, 极北海带幼苗中, SOD 和

POD 可协同作用清除细胞内由高光导致的 ROS 累积, 对高光逆境发生积极响应。本研究也发现在天然海水处理组, 各强光处理的第 3 天, POD 活性最高, 而营养盐含量较高的海水中, POD 活性上调时间出现后移, 因此, POD 的活性与藻体的营养状态存在较强的关联。从 POD 基因的表达方面, 也得到类似结果。因此, 强光胁迫与营养缺乏的叠加, 最终会导致细胞受到越来越严重的氧化损伤, POD 表达及比活下降。叶绿体中的 H_2O_2 主要是通过 Halliwell-Asada 途径被清除, 极北海带幼苗产生的 H_2O_2 主要通过抗坏血酸过氧化物酶(APX)和 GR 进行了清除(梁洲瑞等, 2019)。本研究发现 GR 比活性在胁迫处理的第 5 天, 强度大于 $700\sim 900\ \mu E/(m^2\ s)$ 的光照条件下, GR 活性显著降低, 因此, 在光照强度大于 $700\sim 900\ \mu E/(m^2\ s)$ 的条件下, 无论是天然海水还是营养盐含量较高的海水中, 海带幼体均受到了较为严重的氧化损伤。GR 的转录结果也显示, 在胁迫处理的第 3 天具有相对较强的胁迫响应能力, 而在胁迫的第 5 天藻体表达 GR 的能力均受到了一定程度的抑制。

在胁迫条件下, 植物细胞中酶促和非酶促过程均会导致 ROS 产生的增强, 各种形式的 ROS 在抗氧化酶的作用下最终转化成毒性较小的 H_2O_2 而被代谢。细胞内 H_2O_2 的水平不仅与其清除有关, 而且与其产生密切相关。本实验起始阶段, 强光下 H_2O_2 的累积说明藻体可能已经受到较为严重的损伤, 导致积累的 H_2O_2 不能被及时清除。这种累积效应在低营养盐培养的样本中更为明显, 因此导致 H_2O_2 在强光胁迫的第 3 天出现明显的累积。相比较而言, 在高营养盐处理组中, H_2O_2 的积累在胁迫的第 5 天发生, 因此, 高营养盐培养下的藻体具有更强的抗氧化能力。而此时海水处理组 H_2O_2 水平下调, 说明藻体中合成 H_2O_2 的代谢可能已经受到了抑制。形成的过氧化氢, 即使在低浓度下, 也会通过氧化酶蛋白的巯基来抑制酶的活性(Noctor *et al.*, 1998)。通过 Haber-Weiss 反应, H_2O_2 可以转化为羟自由基而引起脂质过氧化, 从而导致细胞膜的氧化损伤(Kehrer, 2000)。本实验中, 不同强光胁迫下, 营养海水培养组中海带藻体均具有较高的 MDA 含量, 但其光合活性及抗氧化能力均高于天然海水处理组, 其原因有待进一步研究。

4 结论

海带光合捕光色素蛋白复合体由叶绿素 *a/c*-岩藻黄素-叶绿素蛋白复合物(FCP)构成, 这使得其对自

然海区剧烈波动的光照条件具有较高的生理适应“柔性”。在弱光条件下,可以最大限度地吸收蓝光和绿光,而在瞬时强光条件下,又可对过剩的能量吸收进行有效耗散。然而,岩藻黄素属于还原性分子,容易被氧化失活,持续强光照射对海带捕光色素复合体可能造成较严重伤害。本研究证明海带幼苗可较长时间耐受 700~900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ 的强光胁迫,而在海区栽培的现场条件下,波浪引起的藻体摆动及藻体间相互遮挡等效应,可较大幅度地提升藻体可耐受强光的能力。另一方面,海带抗氧化酶活性在强光胁迫时上调,抗氧化酶基因表达上调, β -胡萝卜素合成增加,这也是海带应对强光胁迫的重要生理机制之一。同时,海水营养盐水平对光系统的修复及抗氧化能力的维持均具有重要意义。因此,在水流和波浪较大的栽培海区,海水交换充分,营养供应充足,海带接受的光照强度处于剧烈变动状态,生长通常较好;但当栽培海区长时间水流不畅,波浪较小,水质太过清澈的时候,海带遭受持续的强光胁迫,就可能导致其光系统损伤的发生,并最终引发病烂发生。

致谢 特别感谢福建省国家级学会创新驱动服务站(中国海洋湖沼学会-福建一嘉海带苗业有限公司)董志安提供实验用海带幼苗;江苏省启东市连涛水产养殖专业合作社李平在山东青岛即墨海区对材料的适应性暂养。谨致谢忱。

参 考 文 献

水产辞典编辑委员会, 2007. 水产辞典[M]. 上海: 上海辞书出版社.

卢从明, 张其德, 匡廷云, 1995. 水分胁迫对小麦叶绿体激发能分配和光系统 原初光能转换效率的影响[J]. 生物物理学报, 11(1): 82-86.

刘露, 丁柳丽, 陈伟洲, 等, 2013. 不同温度下 CO_2 浓度增高对坛紫菜生长和叶绿素荧光特性的影响[J]. 生态学报, 33(13): 3916-3924.

苏丽, 2018. 与海带品种培育相关的繁殖与栽培问题的研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所).

张起信, 1994. 海带生长与光照的关系[J]. 中国水产(6): 34-35.

陈书秀, 孙娟, 李霞, 等, 2021. 光照强度和光照周期对笼目海带配子体发育的影响[J]. 渔业研究, 43(2): 153-159.

国家藻类产业技术体系, 2021. 海带产业发展报告[J]. 中国水产(8): 23-41.

段德麟, 缪国荣, 王秀良, 等, 2015. 海带养殖生物学[M]. 北京: 科学出版社.

姚南瑜, 李建之, 1981. 海带光合特性研究[J]. 植物生理学通讯, 27(4): 18-20, 34.

黄健, 唐学玺, 段德麟, 等, 2002. 不同光照条件下海带体内各种化合物的含量及光合作用和呼吸作用的变化[J]. 海洋科学, 26(4): 55-58.

梁洲瑞, 刘福利, 杜欣欣, 等, 2019. 光强对极北海带幼苗生长和生化特性的影响[J]. 渔业科学进展, 40(4): 115-122.

程晓鹏, 章宇宇, 林军, 等, 2020. 海带孢子体光合活性对不同温度和光照的响应[J]. 水产学报, 44(2): 234-244.

ALLAKHVERDIEV S I, MURATA N, 2004. Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1657(1): 23-32.

ANDERSSON B, ARO E M, 1997. Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts [J]. Physiologia Plantarum, 100(4): 780-793.

ARO E M, VIRGIN I, ANDERSSON B, 1993. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1143(2): 113-134.

ATHANASAKOGLU A, KAMPRANIS S C, 2019. Diatom isoprenoids: advances and biotechnological potential [J]. Biotechnology Advances, 37(8): 107417.

DEMMIG-ADAMS B, ADAMS W W, 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 599-626.

DERKS A, SCHAVEN K, BRUCE D, 2015. Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1847(4/5): 468-485.

EILERS P, PEETERS J, 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton [J]. Ecological Modelling, 42: 199-215.

ENRIQUEZ M M, LAFOUNTAIN A M, BUDARZ J, et al, 2010. Direct determination of the excited state energies of the xanthophylls diadinoxanthin and diatoxanthin from *Phaeodactylum tricorutum* [J]. Chemical Physics Letters, 493(4/5/6): 353-357.

KANG E J, KIM J H, 2022. Development of an efficiency criterion for the removal of pest organisms (ulvoid green algae and diatoms) from *Neopyropia* aquaculture using the acid wash (pH shock) method [J]. Aquaculture, 548: 737677.

KEHRER J P, 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity [J]. Toxicology, 149(1): 43-50.

KEREN N, BERG A, VAN KAN P J M, et al, 1997. Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(4): 1579-1584.

KOOISTRA W H C F, GERSONDE R, MEDLIN L K, et al, 2007. The origin and evolution of the diatoms: their adaptation to a planktonic existence [M] // FALKOWSKI P G, KNOLL A H. Evolution of Primary Producers in the Sea. Boston: Academic Press: 207-249.

LICHTENTHALE H K, BURGSTALLER R, BUSCHMANN C, et al, 1983. Effect of high light and high light stress on composition, function and structure of the photosynthetic apparatus [M] // MARCELLE R, CLIJSTERS H, POUCKE

- M. Effects of Stress on Photosynthesis. Dordrecht: Springer: 353-370.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 25(4): 402-408.
- LONG S P, HUMPHRIES S, FALKOWSKI P G, 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 633-662.
- NISHIYAMA Y, ALLAKHVERDIEV S I, YAMAMOTO H, *et al*, 2004. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Biochemistry*, 43(35): 11321-11330.
- NISHIYAMA Y, YAMAMOTO H, ALLAKHVERDIEV S I, *et al*, 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery [J]. *The EMBO Journal*, 20(20): 5587-5594.
- NOCTOR G, ARISI A C M, JOUANIN L, *et al*, 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 49(321): 623-647.
- OHNISHI N, ALLAKHVERDIEV S I, TAKAHASHI S, *et al*, 2005. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center [J]. *Biochemistry*, 44(23): 8494-8499.
- ÖQUIST G, HURRY V M, HUNER N P A, 1993. Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye [J]. *Plant Physiology*, 101(1): 245-250.
- PANG S J, SHAN T F, 2008. Temperature and light tolerance of representative brown, green and red algae in tumble culture revealed by chlorophyll fluorescence measurements [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 27(4): 137-146.
- SCHUBERT H, SAGERT S, FORSTER R M, 2001. Evaluation of the different levels of variability in the underwater light field of a shallow estuary [J]. *Helgoland Marine Research*, 55(1): 12-22.
- TANABE M, UENO Y, YOKONO M, *et al*, 2020. Changes in excitation relaxation of diatoms in response to fluctuating light, probed by fluorescence spectroscopies [J]. *Photosynthesis Research*, 146(1/2/3): 143-150.
- THAYER S S, BJÖRKMAN O, 1990. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC [J]. *Photosynthesis Research*, 23(3): 331-343.
- TIKKANEN M, MEKALA N R, ARO E M, 2014. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(1): 210-215.
- VASS I, STYRING S, HUNDAL T, *et al*, 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4): 1408-1412.
- WANG W D, YU L J, XU C Z, *et al*, 2019. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms [J]. *Science*, 363(6427): eaav0365.

EFFECTS OF STRONG LIGHT STRESS ON PHOTOSYNTHESIS AND PHYSIOLOGY OF *SACCHARINA JAPONICA* SEEDLINGS

NIU Jian-Feng^{1,2,6}, FENG Ze-Zhong^{1,4}, SUN Zhen-Jie^{1,4}, WANG Wei-Wei³, ZHANG Xiao-Wen⁵,
LIANG Guang-Jin³, WANG Li-Jun^{1,2,6}, LI Xiao-Jie³, WANG Guang-Ce^{1,2,6}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. Provincial Key Laboratory of Algae Genetic Breeding and Cultivation Techniques of Shandong, Shandong Oriental Ocean Sci-tech Co. Ltd., Yantai 264003, China; 4. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 5. 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; 6. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071, China)

Abstract *Saccharina japonica* is one of the main species of algae cultivated in China, and its cultivation scale and yield rank first in the world. In the production season of 2021~2022, a large-scale disease disaster outbreak occurred in the area of Rongcheng, Shandong, causing huge losses to the local aquatic economy. The causes of the disease may come from many aspects. Among them, the excessive strong solar irradiance and the low nutrient level in the seawater could be accounted. Based on the results of the minimum saturated light intensity of *S. japonica*, the concentrations of nitrogen and phosphorus in natural seawater, the effects of different strong light on the physiology of *S. japonica* at different seawater nutrient levels were studied. Results showed that the PSII of seedlings of *S. japonica* could be well maintained under 700~900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{ s})$ for a long time and the relatively high nutrient level of seawater contributed to the repairment of PSII under high light stress conditions. However, under the light condition of 1 300~1 500 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{ s})$, the recovery of PSII was damaged and the contents of fucoxanthin, chlorophyll *a* and β -carotene decreased significantly. Through the whole experiment of light stress, the total antioxidant capacity (T-AOC) and specific activities of antioxidant enzymes of the algae were generally up-regulated from the beginning of treatment to the third day, but decreased on the fifth day of experiment. Moreover, the enzyme activities of the algae incubated with nutrient seawater were higher than those incubated with the natural seawater. The expression of antioxidant enzyme genes also showed a similar trend. In summary, the antioxidant enzyme system was active for several days below 900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{ s})$ and the addition of exogenous nutrients could extend the activity maintenance period. This provided some clues to understanding of outbreak of disease disaster in Rongcheng.

Key words high light stress; scavenging of reactive oxygen species; repairment of photosystem; *Saccharina japonica* seedlings; antioxidant enzymes; fucoxanthin; β -carotene