

细基江蓠繁枝变型 (*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*) 铁限制的生理生态学反应*

刘静雯 董双林^{†1)} 冯丽洁^{††}

(中国海洋大学 教育部水产养殖重点实验室 青岛 266003; 集美大学生物工程学院 厦门 361021)

[†](中国海洋大学 教育部水产养殖重点实验室 青岛 266003)

^{††}(中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室 北京 100093)

提要 将细基江蓠繁枝变型在铁限制条件下连续培养 60 天, 分析海藻体内铁、色素、各种元素(N、P、C 等)及总氨基酸水平的变化特征、铁限制对细基江蓠繁枝变型光反应系统的影响以及铁限制的细基江蓠繁枝变型对 N、P 和 Fe^{3+} 的吸收动力学特征。结果表明, 在铁限制培养 60 天过程中(海水中铁的总浓度为 451 nmol/L), 细基江蓠组织中铁的含量和色素水平均随着铁限制时间的延长极显著地呈现指数下降。组织铁含量仅为对照组的 5.26%, 叶绿素和藻红素含量分别为对照组的 7.9% 和 33.8%。在铁限制培养过程中, 组织中的 N:P 比由起始的 29.53 降低到 23.68, 而 C:N 比值几乎保持恒定。比生长率与组织中铁含量呈显著的正相关, 铁限制使完整组织低温下的荧光发射强度受到不同程度的影响, 荧光发射峰位蓝移, 光系统 I 与光系统 II 的荧光发射强度之比 PSI:PSII 降低。在适度铁限制条件下(铁限制培养 30 天), 细基江蓠对 Fe^{3+} 的还原和吸收能力都明显增强, 铁限制海藻铁吸收速率的大小与铁限制的培养过程中以及铁吸收实验过程中介质的氮源种类有关, 即在以 NO_3^- -N 为惟一氮源进行铁限制培养后, 在以 NH_4^+ -N 为氮源的介质中铁的吸收速率远大于在以 NO_3^- -N 为氮源的介质中铁的吸收速率。铁限制在不同程度上影响了细基江蓠对氮、磷的吸收能力, 尤其对 NO_3^- -N 的吸收影响较大, 其最大吸收速率(V_{\max})降低为对照组的 33.4%。

关键词 细基江蓠繁枝变型, 铁限制, 生理生态学反应

中图分类号 Q945

在制约海洋植物(浮游植物和大型海藻)生物量和初级生产力的诸多营养元素中, 人们研究较多的是氮、磷和硅等大量元素。Martin 等(1988)首次提出部分海域浮游植物生长中铁的限制作用。铁是藻类代谢过程中一种重要的微量营养元素, 是有机体进行光合作用和许多生化反应中的必需元素, 在叶绿素的合成过程中铁是必不可少的, 缺铁已被认为对海洋浮游植物的氮代谢有着严重影响(Raven, 1988; Milligan *et al.*, 2000)。铁对海藻细胞生长的重要性还在于它对氮和碳的同化过程起调节作用。

根据海藻对铁的需求及铁在海水中的存在形式, 铁的含量可能限制一些海藻的生长(Martin *et al.*, 1988; Boyd *et al.*, 1996; Timmermans *et al.*, 1998)。Evans 等(1997)对滩涂养殖池塘、港湾和盐湖系统的研究表明, 可利用的氮含量限制浮游植物的生物量。更重要的是, 很可能在地球史中, 铁的有效性在全球的生产力和随之而来的大气 CO_2 浓度变化中起关键作用(Martin, 1990)。有研究表明, 海洋铁含量与赤潮形成有着密切关系(霍文毅等, 2001), 可能赤潮浮游植物对海洋铁水平的变化更为敏感。有关浮游植

* 国家重点基础研究发展规划项目, G1999012011 号; 国家杰出青年科学基金资助项目, 397250239 号; 福建省青年科技人才创新项目, 2001J049 号。刘静雯, 副教授, E-mail: ljwsbch@163.com

1) 通讯作者, 董双林, 教授, E-mail: dongsl@ouc.edu.cn

收稿日期: 2002-10-22, 收修改稿日期: 2003-08-25

物和蓝细菌对铁限制的生理反应已有了广泛研究 (Doucette *et al.*, 1991; Sunda *et al.*, 1997; Marquaret *et al.*, 1999), 结果表明, 铁限制降低了浮游植物的生长和对氮的利用能力, 使其光合作用能力下降并伴随着体内生化组分的变化。迄今, 有关大型海藻的铁营养及其代谢研究甚少 (Manley, 1981; Suzuki *et al.*, 1995)。本研究以大型海藻细基江蓠繁枝变型 (*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*) 为材料, 探讨它们对铁限制的生理生态学反应特征。

1 材料与方 法

1.1 培养液的配制、实验材料的准备及海藻的培养

1.1.1 培养介质 所有实验均在人工海水 Aquil 培养液 (Morel *et al.*, 1979) 中进行, 并略作修改 (其中 NaNO_3 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的浓度分别调整到 $250 \mu\text{mol/L}$ 和 $15 \mu\text{mol/L}$, 并以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 作为惟一氮源, 略去硅酸盐)。Aquil 培养液的所有试剂均用经微孔滤膜纯化的超纯去离子水 (Millipore-Water) 配置成储备液, 在配置过程中要特别注意防止产生沉淀。在使用前, 先将每一组试剂 (除微量元素外) 分别过离子交换柱 (chelex-100), 以尽量降低基准液中微量元素的本底, 再经抽滤后将储备液置于酸洗的聚乙烯瓶中 (磷酸盐保存于酸洗的玻璃瓶中) 于黑暗洁净处低温保存备用。使用前加入微量元素和 EDTA (基准培养液的本底铁含量小于 $5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 盐度约为 30)。

1.1.2 材料来源及其培养 细基江蓠繁枝变型采自海南省, 由中国海洋大学海洋生命学院实验室纯培养保种。实验前于光照培养箱中, 在温度为 25°C 、盐度为 21、 $\text{pH} = 7.8$ 、光照强度 $120 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期 11L:13D 的条件下适应培养 2 周。

1.1.3 适应期培养 在解剖镜下仔细除去藻体表面的附着物, 用稀释后经紫外线灭菌的人工海水充分冲洗藻体, 然后培养在 3L 的培养瓶中。培养条件: 温度为 25°C 、盐度为 21、 $\text{pH} = 7.8$ 、光照强度为 $120 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期为 11L:13D, 以下所有实验的环境条件均与此相同。海藻于实验前在人工海水中预培养 10 天 [参考青岛海域总铁浓度, 将人工海水中 Fe-EDTA (总铁) 的浓度调整为 $9.02 \mu\text{mol/L}$]。

1.1.4 铁限制海藻的培养 所有的实验用具均经过严格酸处理于 50% HCl、50% HNO_3 中分别浸泡 3 天, 用超纯水 (Millipore-Water) 淋洗 1 天随后再在 25% 的 HNO_3 中浸泡 3 天, 淋洗 1 天, 并置于超净室备用。将预培养后的实验用海藻在解剖镜下用洁

净的毛笔轻轻除去表面附着物, 然后用人工海水冲洗干净, 再经超纯水冲洗后置于干净的含人工海水培养液的聚乙烯烧杯中, 人工海水培养液中加入 0.02 mol/L 的柠檬酸-EDTA- Ti^{3+} 试剂 (0.02 mol/L TiCl_3 , $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Hudson *et al.*, 1989) 以还原除去藻体表面吸附的 Fe(III)。将处理过的海藻 (5g 鲜重) 置于含 3L 铁限制的人工海水培养液的聚乙烯培养瓶中 (原子吸收法测定人工海水中 Fe-EDTA 浓度为 451 nmol/L , 用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调 pH 值)。海藻在铁限制的培养液中连续培养 60 天, 每周更换一次培养液。每组设 4 个平行培养。

1.2 海藻的生长率及组织中 N、P、C 和 Fe 含量的测定

在 60 天铁限制培养过程中, 从最初开始, 每隔 10 天测定海藻的生长和组织中各种元素水平的变化 (取样时间均为上午 9 点)。计算细基江蓠繁枝变型的比生长率。藻体用超纯水冲洗后, 经冷冻干燥、研磨并过 20 目的筛绢。称取 0.2 g 干重的藻粉在浓缩的试剂纯硝酸中湿热灰化后采用无火焰原子吸收法测定铁的含量。用去离子水冲洗藻体后在 60°C 下干燥至恒重 (24—48h), 用元素分析仪 (PE-240C) 测定组织中 N、P 和 C 元素的含量。

1.3 组织中叶绿素及总氨基酸含量的测定

分别于铁限制培养的起始与结束后 (60 天), 取新鲜藻体用去离子水冲洗后, 于 -20°C 保存备用。称取约 0.3 g 海藻, 于 8 ml 6 mol/L 的 HCl 中加热, 105°C 下水解 48h, 反复蒸干后溶于水, 用日立 853-50 型氨基酸自动分析仪测定。分别用 N'-N-二甲基甲酰胺和磷酸缓冲液提取细基江蓠繁枝变型组织中叶绿素 (Chl) 和藻红素 (phycoerythrin, PE), 并测定其含量 (Liu *et al.*, 2001)。取部分样品干燥 (60°C 恒温 24—48h), 求出干/湿比。

1.4 室温吸收光谱和低温荧光光谱的测定

分别于铁限制起始和 2 周后对细基江蓠繁枝变型的吸收光谱和荧光光谱进行测定。室温吸收光谱的测定采用 UVIKON-943 紫外-可见双光束分光光度计, 叶绿素用 90% 的丙酮在液氮中研磨提取, 每个样品重复测定 5 次。扫描波长范围为 $360\text{--}720 \text{ nm}$ 。低温荧光发射光谱用日立 F4500 荧光分光光度计测定。低温测试时, 将藻体尽量均匀铺在直径为 2 mm 的硬质玻璃管内壁, 然后插入液氮杜瓦瓶中。采用的激发波长为 436 nm 和 560 nm , 每组海藻重复取样 3

次,每个样品重复测定 6 次,结果用 Origin 软件进行分析。

1.5 铁限制对氮、磷吸收利用的影响

分别于铁限制的起始和第 30 天测定细基江蓠繁枝变型对 NO_3^- 、 NH_4^+ 和 PO_4^{3-} 的吸收动力。吸收在 Aquil 人工海水培养液中进行(Fe-EDTA 的浓度为 451nmol/L), 三种营养盐的浓度分别为: NO_3^- (NaNO_3) 的浓度范围 $6\text{--}65\mu\text{mol/L}$, NH_4^+ (NH_4Cl) 的浓度范围 $4\text{--}65\mu\text{mol/L}$, PO_4^{3-} (NaH_2PO_4) 的浓度范围 $1.5\text{--}20\mu\text{mol/L}$ 。每一浓度梯度设三个重复,并设一组不放海藻的对照。在测 NO_3^- 吸收的同时测定 NO_2^- 的释放。取 $(2 \pm 0.005)\text{g}$ 的新鲜藻,于 500ml 三角培养瓶中(含 400ml 培养液)进行吸收实验。实验温度、盐度和光照强度分别为 25°C 、21 和 $120\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,于光照培养箱中持续吸收 24h。非线性回归求吸收动力学参数并进行显著性分析。

1.6 铁限制的细基江蓠繁枝变型对 Fe(III) 的还原能力及 ^{55}Fe 的吸收动力学特征

分别于铁限制的起始、第 30 天和第 60 天测定细基江蓠繁枝变型对 Fe(III) 的还原能力,铁限制的初始和第 30 天测定对 ^{55}Fe 的吸收动力。

1.6.1 Fe(III) 还原能力的测定 $\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}$ 的还原通过分光光度法测定 Fe^{2+} 与 BPDS(邻二氮杂菲)形成的红色化合物 $\text{Fe}^{2+}(\text{BPDS})_3$ 的量来计算(Anderson *et al.*, 1984)。将铁限制和非限制的细基江蓠繁枝变型于测定前 3—5 天分别在不含铁或含铁的人工海水培养液中进行 N、P 丰富的培养($100\mu\text{mol/L}$ NH_4NO_3 和 $12\mu\text{mol/L}$ PO_4^{3-}),为测定 $\text{Fe}^{2+}(\text{BPDS})_3$ 的形成提供充足的藻量。分别取铁限制与非限制的海藻约 5g (鲜重),置于 500ml 酸洗过的含人工海水介质的培养瓶中($\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}$ 的浓度为 $2\mu\text{mol/L}$),然后加入 $5\mu\text{mol}$ 的 BPDS,每组 3 个平行,在光照培养箱中培养 24h[温度为 25°C ,光强为 $160\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]后取培养液用 751 分光光度计于 535nm 下比色(人工海水做参比)。

1.6.2 ^{55}Fe 吸收动力的测定 分别于铁限制的起始(+Fe)和第 30 天(-Fe)测定细基江蓠繁枝变型对铁的吸收动力。铁吸收实验包括两部分内容:(1)在以 NO_3^- -N 为惟一氮源的人工海水介质中进行吸收(+Fe、-Fe/ NO_3^-);(2)在以 NH_4^+ -N 为惟一氮源的人工海水介质中进行吸收(+Fe、-Fe/ NH_4^+)

(其中 N 的浓度为 $60\mu\text{mol/L}$, P 的浓度为 $3.6\mu\text{mol/L}$)。铁吸收率采用 ^{55}Fe 同位素法测定。 $^{55}\text{FeCl}_3$ 系美国同位素公司产品(放射性活度为 10mCi/ml , ^{55}Fe 放射性核素的纯度为 99%,溶解在 0.05mol/L 的 HCl 中。用 0.01mol/L 的 HCl 对放射源进行逐步稀释,最后用超纯水稀释 50 倍。将海藻反复洗净处理后,放入 100ml 聚乙烯培养瓶中(含 50ml 铁限制培养的人工海水),于吸收实验前适应培养 24h 以减少组织愈伤反应的影响。细基江蓠繁枝变型切取中间部位(长约 2cm),于 50ml 透明的聚乙烯培养瓶中(含 25ml 吸收介质)进行吸收实验。采用同位素稀释法,在每一培养瓶中准确加入 $250\mu\text{l}$ 使用放射源,然后加入浓度为 $250\mu\text{mol/L}$ 的非标记载体 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,使其形成以下系列的起始总 Fe-EDTA 浓度: 0.05 、 0.1 、 0.5 、 2.0 、 5.0 、 10.0 、 $20.0\mu\text{mol/L}$,每个浓度梯度设 3 个平行,旋紧瓶塞,于光照培养箱内放置在小型摇床上轻轻震荡吸收 24h(培养箱须充分清洁后使用,温度和光照强度同 Fe 还原实验)。吸收结束后,取出藻体放入 50ml 含有 0.02mol/L 的 $\text{Ti}^{3+}\text{-citrate EDTA}$ 的人工海水介质中将藻体表面吸附的铁洗脱分离,再将藻体置于 20ml 的液闪瓶中,加入 30% 的 H_2O_2 和组织助溶剂 NCS 逐步完全溶解藻体组织,并使溶解液达到充分均匀。加入 10ml 的 OCS 闪烁液并于 $35\text{--}40^\circ\text{C}$ 水浴中黑暗下适应 24h 以减小磷光和化学发光的淬灭作用,重复计数 5—7 天以确保样品溶液的稳定性,最后取平均值。用外标准源道比法进行淬灭校正。平均计数效率为 $38\% \pm 1.2\%$,所有样品的计数效率误差不超过 5%。吸收动力学参数采用非线性最小二乘法进行回归计算。

2 实验结果

2.1 铁限制细基江蓠繁枝变型体内 Fe 含量的变化及与生长率之间的关系

细基江蓠繁枝变型组织中 Fe 的含量与铁限制培养时间之间呈指数递减,由起始的 $578\mu\text{g/gDW}$ 降至 $30.4\mu\text{g/gDW}$ (图 1, $P < 0.01$),这可能是由于生物量的增加使组织中仅存的铁库被稀释的原因,这与大量元素 N 饥饿的代谢过程类似。铁限制期间,细基江蓠繁枝变型的比生长率迅速下降,与组织中 Fe 的含量呈显著的正相关。铁限制约 6 周后,细基江蓠繁枝变型生长停止并出现不同程度的黄化甚至死亡,导致铁限制后期生长为负值。

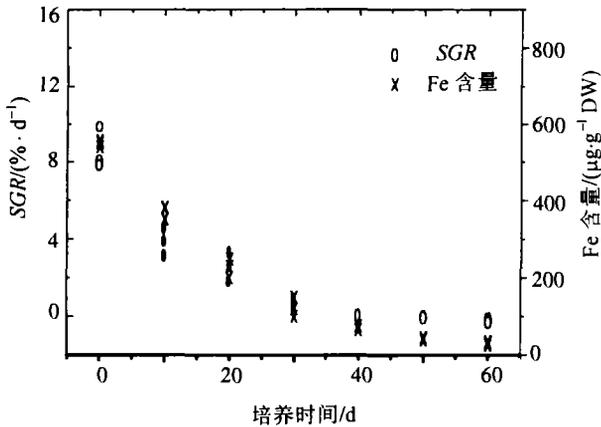


图 1 细基江蓠繁枝变型的比生长率 (SGR) 及组织中铁含量在铁限制期间的变化

Fig. 1 Changes of Specific Growth Rate (SGR) and tissue iron content in *G. tenuistipitata* var. *liui* during Fe-limitation $n = 3$, $SGR = 0.0162Fe^{-1.1565}$ ($r^2 = 0.9486$)

2.2 铁限制海藻体内 N、P、C 含量及其之间比值的变化

在铁限制过程中细基江蓠繁枝变型组织中总氮 (TN)、总碳 (TC) 和总磷 (TP) 水平均有不同程度的降低, TC 变化与对照组相比达到极显著水平, TN 由 3.28% 降至 2.02%; TC 由 28.21% 降至 18.30%, TP 由 0.25% 降至 0.20%。在 60 天的铁限制过程中, 细基江蓠繁枝变型组织中 N:P 下降, 而 C:N 几乎保持恒定, N:Fe 及 C:Fe 均有不同程度的上升 (表 1, $P < 0.05$)。

2.3 铁限制过程中细基江蓠繁枝变型体内色素及总氨基酸含量的变化

细基江蓠繁枝变型体内的叶绿素及藻红素含量均随着组织铁含量的降低呈指数递减, 尤其在铁限制的前 10 天更为明显, 随后继续降低, 约 5 周后保持在较低水平, 藻红素降低到对照组的 33.8%, 叶绿素含量只为对照组的 7.9% (图 2)。

表 1 铁限制对细基江蓠繁枝变型组织中各元素含量的影响

Tab. 1 Effect of Fe-limitation on elements level in *G. tenuistipitata* var. *liui*

项目	对照组	铁限制	项目	对照组	铁限制
SGR (%/d)	8.54 ± 1.09	-0.05 ± 0.03 ^{**}	N:P	29.53	23.68 [*]
Fe (μg/g DW)	578.2 ± 52.6	30.4 ± 10.2 ^{**}	C:N	10.06	10.55
TN (% DW)	3.28 ± 0.41	2.02 ± 0.32 [*]	N:Fe (× 10 ³)	0.22	2.65 ^{**}
TC (% DW)	28.21 ± 1.53	18.30 ± 0.56 ^{**}	C:Fe (× 10 ³) (摩尔比)	2.24	28.03 ^{**}
TP (% DW)	0.25 ± 0.03	0.20 ± 0.02			

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 表 4 同; 表中数据为平均值 ± 标准差, $n = 3$, 表 4、表 5 同

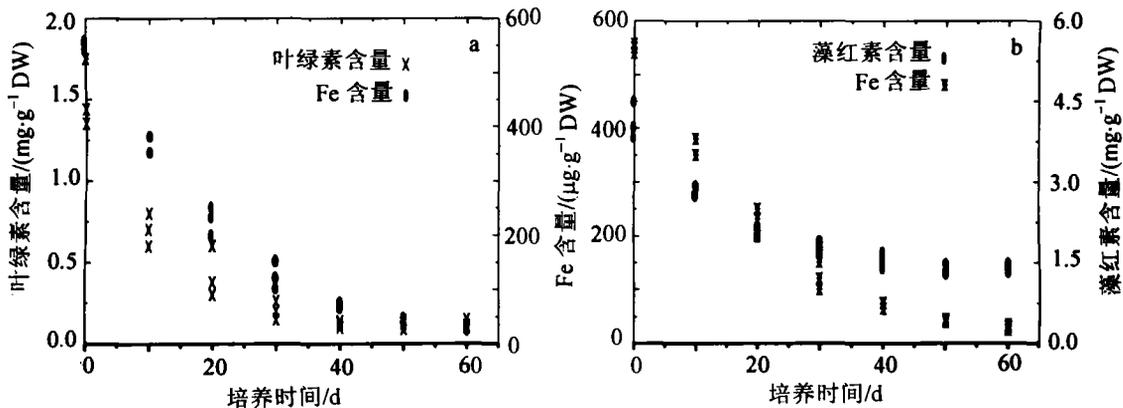


图 2 铁限制过程中细基江蓠繁枝变型叶绿素、藻红素及与组织铁含量的变化

Fig. 2 Changes of Chl, PE and tissue Fe content during Fe-limitation in *G. tenuistipitata* var. *liui*

a. 叶绿素含量及与铁含量随时间的变化; b. 藻红素含量及与铁含量随时间的变化

$n = 3$; $Chl = 0.0883e^{0.0054Fe}$ ($r^2 = 0.9411$), $PE = 1.3116e^{0.0021Fe}$ ($r^2 = 0.9691$)

表 2 的结果表明,铁限制培养 60 天后,细基江菼繁枝变型组织中 18 种氨基酸含量均有不同程度

的降低,总氨基酸含量占对照组的 83.7%。

表 2 铁限制对细基江菼繁枝变型组织中总氨基酸含量的影响(%干重)

Tab.2 Effect of Fe-limitation on total amino acid content in *G. tenuistipitata* var. *liui* (% DW)

氨基酸	对照组	铁限制	氨基酸	对照组	铁限制
天门冬氨酸(ASP)	2.63	2.13	蛋氨酸(MET)	0.56	0.19
苏氨酸(THR)	1.00	0.88	异亮氨酸(ILE)	1.38	1.19
丝氨酸(SER)	0.69	0.63	亮氨酸(LEU)	2.00	1.69
谷氨酸(GLU)	3.13	2.75	酪氨酸(TYR)	0.50	0.31
脯氨酸(PRO)	1.06	0.75	苯丙氨酸(PHE)	1.44	1.13
甘氨酸(GLY)	1.44	1.19	赖氨酸(LYS)	1.44	1.19
丙氨酸(ALA)	1.69	1.44	氨(NH ₄)	0.81	0.75
胱氨酸(CYS)	1.06	0.69	组氨酸(HIS)	0.25	0.25
缬氨酸(VAL)	1.88	1.81	精氨酸(ARG)	1.64	1.63
			总氨基酸	24.58	20.57

2.4 铁限制条件下两组海藻的色素光谱分析结果

细基江菼繁枝变型在铁限制条件下培养 2 周后的光谱分析结果表明,铁限制使细基江菼繁枝变型叶绿素和藻红素的吸收减少。以两种波长的光激发时,细基江菼繁枝变型组织的低温荧光光谱都具有光系统 II 和光系统 I 的荧光发射峰(F684-F694 和 F718-F722),但铁限制对其荧光发射强度产生了不同程度

的影响。当以 436nm 光激发时,光系统 I 的发射峰蓝移 0.61nm(图 3),对光系统 II 的荧光发射峰没有影响。当以 560nm 光激发时,铁限制的细基江菼繁枝变型光系统 I 的发射峰蓝移 1.23nm,并出现了来自藻胆蛋白的 F642 和 F658,铁限制使 F658 减弱。铁限制使光系统 I 与光系统 II 荧光发射强度的相对比值 PSI:PSII 降低(表 3)。

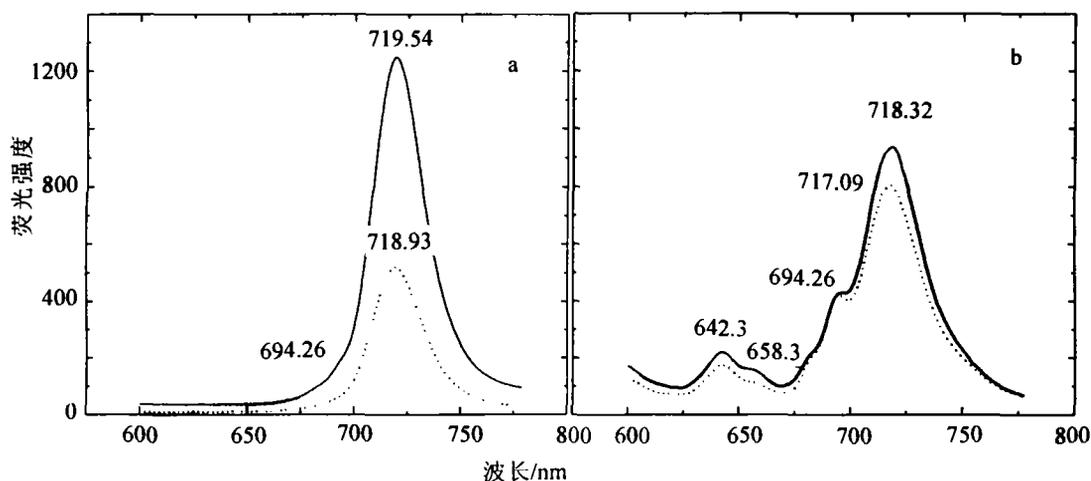


图 3 铁限制对细基江菼繁枝变型 436nm(a)和 560nm(b)低温荧光发射光谱的影响

Fig.3 Effects of Fe-limitation on the fluorescence emission spectra [excited at 436nm

(a) or 560nm (b)] of *G. tenuistipitata* var. *liui* at low temperature

实线表示对照组;虚线表示铁限制

表 3 铁限制组与对照组细基江蓠繁枝变型光系统 PSI:PSII 荧光强度的比值

Tab.3 Ratios of photosystem fluorescence intensity (PSI:PSII) of *G. tenuistipitata* var. *liui* under Fe-limitation and control

项 目	436nm		560nm	
	对照组	铁限制	对照组	铁限制
PSI:PSII 比值	6.53	6.49	2.21	1.89

2.5 铁限制与细基江蓠繁枝变型氮、磷吸收动力学参数之间的关系

细基江蓠繁枝变型 NO_3^- 和 NH_4^+ 吸收动力学参数见表 4。铁限制细基江蓠繁枝变型对 NO_3^- 的最大吸收速率 V_{\max} 由 30.5 降低到 $10.2 \mu\text{molN}/(\text{gDW} \cdot \text{h})$ ($P < 0.01$)。对 NH_4^+ 吸收的 V_{\max} 则由 39.6 降为 $36.1 \mu\text{molN}/(\text{gDW} \cdot \text{h})$ ($P < 0.05$)，铁限制下两种形

态 N 吸收的半饱和常数 K_s 及低浓度下的亲和力 a 也都明显低于对照组。铁限制细基江蓠繁枝变型对 NO_3^- 吸收的影响大于对 NH_4^+ 吸收的影响。细基江蓠繁枝变型对 PO_4^{3-} 的吸收利用均低于对照组，其最大吸收速率 V_{\max} 由正常条件下的 $1.56 \mu\text{molN}/(\text{gDW} \cdot \text{h})$ 降低到 $1.43 \mu\text{mol}/(\text{gDW} \cdot \text{h})$ 。

表 4 铁限制组与对照组细基江蓠繁枝变型 N、P 吸收动力学参数

Tab.4 N and P uptake kinetics parameters of *G. tenuistipitata* var. *liui* under Fe-limitation and control

组 别	项 目	$V_{\max} [\mu\text{molN}/(\text{gDW} \cdot \text{h})]$	$K_s (\mu\text{mol/L})$	a	r^2
对照组	NH_4^+	39.6 ± 1.50	5.45 ± 0.58	7.27	0.93
	NO_3^-	30.5 ± 1.09	4.27 ± 0.39	6.98	0.89
	PO_4^{3-}	1.56 ± 0.06	1.03 ± 0.03	1.51	0.90
铁限制组	NH_4^+	$36.1 \pm 1.03^*$	5.24 ± 0.44	6.89	0.90
	NO_3^-	$10.2 \pm 0.45^{**}$	2.93 ± 0.12	3.48	0.87
	PO_4^{3-}	1.43 ± 0.04	0.99 ± 0.02	1.44	0.93

2.6 铁限制条件下细基江蓠繁枝变型对 Fe^{3+} 的还原能力及 ^{55}Fe 的吸收动力学特征

与对照组相比，铁限制培养 30 天的细基江蓠繁枝变型对 Fe^{3+} 的还原能力显著增强，当铁限制培养 60 天后，其还原能力显著降低。

铁限制 (-Fe) 与非限制 (+Fe) 的细基江蓠繁枝

变型在以 NO_3^- (-Fe, +Fe/ NO_3^-) 和 NH_4^+ (-Fe, +Fe/ NH_4^+) 为氮源介质中的吸收均出现饱和现象。铁限制下的最大吸收率均大于对照组。就在 NO_3^- 介质中的最大吸收率而言，铁限制细基江蓠繁枝变型的 V_{\max} 是对照组的 1.76 倍，而在 NH_4^+ 介质中铁限制组则是对照组的 2.93 倍(表 5)。

表 5 细基江蓠繁枝变型在 NH_4^+ 或 NO_3^- 介质中 ^{55}Fe 吸收动力学参数Tab.5 Kinetic parameters for ^{55}Fe uptake by *G. tenuistipitata* var. *liui* resuspended in NH_4^+ or NO_3^- medium

动力学参数	- Fe/ NH_4^+	- Fe/ NO_3^-	+ Fe/ NH_4^+	+ Fe/ NO_3^-
$V_{\max} [\text{pmol}/(\text{mgDW} \cdot \text{h})]$	45.7 ± 6.12	21.6 ± 2.69	15.6 ± 1.92	12.3 ± 0.64
$K_s (\mu\text{mol/L})$	0.66 ± 0.12	0.49 ± 0.16	0.52 ± 0.11	0.37 ± 0.13

3 讨论

3.1 铁限制对细基江蓠繁枝变型的生长、组织中各种元素和氨基酸水平的影响

铁限制培养条件下，细基江蓠繁枝变型组织中

铁的随着铁限制时间的延长呈指数递减。在整个铁限制培养过程中，细基江蓠繁枝变型体内 TC、TN 和 TP 均有所减少。相对 TN 而言，TC 减少达到极显著水平，从而导致 C:N 比值下降。Greene 等 (1991) 对浮游植物 *Phaeodactylum tricornutum* 的研究及 Doucette 等 (1991) 在对浮游植物 *Gymnodinium sanguineum* 的研究中得出类似的结果。这可能是光合

碳固定对铁限制的一种生理学反应。铁限制使得细基江蓠繁枝变型组织中 N:Fe 和 C:Fe 比值显著增大。对铁限制浮游植物的研究表明,铁限制使其组织中 Fe:N 和 Fe:C 比值降低(Doucette *et al.*, 1991)。这是由于相对组织碳、氮而言,铁限制使组织中 Fe 的含量下降更为迅速。组织中 N:P 比值的下降表明,铁限制对氮吸收利用的影响大于磷。

铁限制严重抑制了大型海藻的正常生长,最终导致海藻出现不同程度的黄化现象,并使海藻组织中各种元素的含量不能满足正常新陈代谢的需要,大量营养元素 N、P、C 的不足导致整个代谢过程紊乱,而直接受铁限制影响最严重的则可能是光合作用(Liu *et al.*, 2000)。

3.2 铁限制对细基江蓠繁枝变型体内色素水平和光反应系统的影响

铁限制导致细基江蓠繁枝变型体内色素含量的下降,从而降低了叶绿素和藻红素对光的吸收。可能在铁限制两周左右由于海藻处于轻度铁限制,色素含量减少但组成变化不明显,故吸收光谱的峰位未出现漂移。本实验结果表明,铁限制影响光系统的功能,因为 PSI 中叶绿素的含量较高,而且对铁的需求量也较大,可能在铁限制的早期对 PSI 和细胞色素 b_6 的影响较大,从而导致 PSI 与 PSII 荧光强度相对比值降低。这些结果表明,铁限制早期对光系统 I 活性的抑制大于对光系统 II 活性的抑制。Marquart 等(1999)在研究缺铁对单细胞红藻 *Rhodella violacea* 光合作用细胞器的影响结果发现,PSI 比 PSII 对缺铁更为敏感,表现为 PSI:PSII 浓度比值的下降。这些结果表明,在适度缺铁条件下,对整个传递链的电子流动起限制作用的是催化剂而不是 PSII。本研究表明,生长在铁限制条件下的大型海藻的叶绿体结构与生长在铁限制条件下的浮游植物(*Rhodella violacea*)具有类似的特征(Marquart *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000),这反映了大型海藻与微藻铁限制代谢的相似性。

3.3 铁限制对氮、磷吸收利用的影响

铁限制抑制细基江蓠繁枝变型对氮、磷的吸收和利用能力。海藻生长在以 NO_3^- -N 为 N 源的介质中,铁限制将影响海藻细胞对 NO_3^- 、 NH_4^+ 和 PO_4^{3-} 营养盐离子的吸收,尤其对 NO_3^- 传递和还原能力影响极显著。Milligan 等(2000)对浮游植物 *Thalassiosira weissflogii* 铁限制的生理学反应研究表明,铁限制使亚硝酸还原酶(NiR)的活性大大降低,而且对

NiR 的抑制作用远远大于硝酸还原酶(NR)。作者曾就铁限制导致细基江蓠繁枝变型光合作用能力显著下降的研究结果也进一步证实了这一点(Liu *et al.*, 2000)。

铁限制对细基江蓠繁枝变型 NH_4^+ 的吸收影响相对较小,这可能是因为培养在以 NO_3^- 为惟一氮源的铁限制介质中,海藻本身同时处于氮限制状态。将处于氮限制状态的藻体置于 NH_4^+ 介质中,海藻将加快吸收可利用的 NH_4^+ -N,同时,海藻对 NH_4^+ -N 的吸收消耗的能量相对较少。另外,对浮游植物的研究表明,处于铁限制状态的藻体同时也处于光合作用的光限制下(Greene *et al.*, 1991),处于光、氮双限制下的海藻对 NH_4^+ -N 的吸收利用远远大于对 NO_3^- -N 的吸收利用。

至于铁限制对海藻 P 吸收利用的影响相对较复杂,因为 PO_4^{3-} 也主要是通过膜载体的主动传递进入细胞的,主要原因可能是铁限制导致光合作用能量供应不足。铁限制对两种海藻氮吸收的影响大于磷这一结果与它们在铁限制下组织中 N:P 的变化是相一致的。详细的机制有待进一步研究。

3.4 铁限制对细基江蓠繁枝变型 Fe^{3+} 还原能力及 ^{55}Fe 吸收动力的影响

从实验结果可以看出,在铁限制中期(铁限制 30 天),细基江蓠繁枝变型对 Fe^{3+} 还原能力增强,但严重的铁限制(铁限制 60 天)将导致其还原能力的显著下降。 Fe^{3+} 的吸收和利用与 Fe^{3+} -EDTA 还原酶密切相关,该酶的活性受铁胁迫的诱导,当海藻处于铁限制早期时,缺铁刺激该酶活性升高并促进对 Fe^{3+} 的还原和吸收,但当藻体内过度缺铁时,整个细胞生命活动严重受阻,该酶活性也迅速下降,从而失去对 Fe^{3+} 的还原。

无论在以 NO_3^- -N 为氮源的介质中还是以 NH_4^+ -N 为氮源的介质中,铁限制海藻细胞对 ^{55}Fe 的吸收率明显高于对照组,这一趋势遵循了典型的饱和和吸收动力学方程的原则,表明处于铁限制状态的大型海藻能够加强对铁的吸收,这一现象在对浮游植物的研究中也得到了证实(Doucette *et al.*, 1990)。对浮游植物的研究表明,铁限制能够刺激浮游植物细胞产生一些特殊的铁载体(Gledhill *et al.*, 1988)或许多有机化合物(如在蓝细菌中)(Boyer *et al.*, 1987),通过还原或整合 Fe^{3+} 来加强对 Fe^{3+} 的传递作用。在缺铁条件下威氏海链藻细胞表面转运铁的配体浓度比铁充足时增大了 30 倍(Hudson *et al.*,

1993)。这些结果表明海藻对体内微量营养代谢的生理调节机制与大量元素类似。

本文的实验结果还表明,铁限制的细基江蓠繁枝变型海藻在 NH_4^+ 介质中对铁的最大吸收率均大于在 NO_3^- 介质中的最大吸收率,这表明海藻对铁的吸收与铁限制培养过程中介质的氮源以及吸收实验过程中介质中的氮源种类密切相关。Doucette 等(1990)和 Harrison 等(1986)研究了处于铁限制状态的浮游植物 *Gymnodinium sanguinum* 和 *Thalassiosira weissflogii* 对 Fe^{3+} 的吸收特点,也得出类似的结果,而且发现在铁限制后的恢复期 72h 内对铁的吸收处于波动状态,以后逐渐趋于平稳。在本实验铁限制的整个培养过程中, NO_3^- -N 是惟一的氮源。铁限制抑制了海藻对 NO_3^- -N 的吸收利用,这是由于 NR 和 NiR 都是含铁的蛋白质,同时硝酸还原过程中所必需的还原剂间接来源于光合作用,而光合作用电子传递链中铁是关键的成员,铁限制使得酶含量减少、活性降低、光合作用受阻,从而导致了铁和氮的双限制,后者甚至更严重。所以当将同时处于氮和铁限制下的海藻从以 NO_3^- -N 为氮源的介质中转入到以 NH_4^+ -N 为氮源的介质中后,海藻对 NH_4^+ -N 的吸收远大于 NO_3^- -N,对氮的快吸收促进藻体对铁的吸收以尽可能缓冲组织中 Fe:N 比值的变化,可能正是由于以上原因导致了铁限制状态下,细基江蓠繁枝变型在以 NH_4^+ -N 为氮源的介质中其铁的吸收速率较高。

综上所述,铁限制使大型海藻细胞中色素含量减少、光合作用细胞器受损、光系统活性受阻、光合作用能力下降;抑制海藻细胞对氮、磷的吸收利用等,最终导致生长缓慢、停止甚至黄化死亡。对细基江蓠繁枝变型而言,损伤发生的顺序是藻体顶端先于中部和底部。

参 考 文 献

- 霍文毅,俞志明,邹景忠等,2001. 胶州湾中肋骨条藻赤潮与环境因子的关系. 海洋与湖沼,32(3): 311—318
- Anderson L M, Keck W M, 1984. Iron reduction by juvenile *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh. Hydrobiologia, 116/117: 493—497
- Boyd P W, Muggli D L, Varela D E et al., 1996. In vitro iron enrichment experiments in the NE Subarctic Pacific. Mar Ecol Prog Ser, 136: 179—193
- Boyer G L, Gilliam A H, Trick C, 1987. Iron chelation and uptake. In: Fay P, Van Baalen C ed. The Cyanobacteria. Amsterdam: Elsevier[5.5.6], 415—436
- Doucette D J, Harrison P J, 1990. Some effects of iron and nitrogen stress on the red tide dinoflagellate. Mar Ecol Prog Ser, 62: 293—306
- Doucette D J, Harrison P J, 1991. Aspects of iron and nitrogen nutrition in the red tide dinoflagellate *Gymnodinium sanguineum*. Mar Biol, 110: 175—182
- Evans J C, Prepas E E, 1997. Relative importance of iron and molybdenum in restricting phytoplankton biomass in high phosphorus saline lakes. Limnol Oceanogr, 42: 461—472
- Gledhill M, Van den Berg C M G, Nolting R F et al., 1998. Variability in the speciation of iron in the northern North Sea. Mar Chem, 59: 283—300
- Greene R M, Geider R J, Falkowski P G, 1991. Effect of iron deficiency on photosynthesis in a marine diatom. Limnol Oceanogr, 36(8): 1772—1782
- Harrison P J, Druehl K E, Lloyd K E et al., 1986. Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groenlandica* (Laminariales: Phaeophyt). Mar Biol, 93: 29—35
- Hudson R J M, Morel F M M, 1989. Distinguishing between extra- and intracellular iron in marine phytoplankton. Limnol Oceanogr, 34(6): 1113—1120
- Hudson R J M, Morel F M M, 1993. Trace metal transport by marine microorganisms: implications of metal coordination kinetics. Deep-Sea Res, 40: 129—150
- Liu J W, Dong S L, Liu X Y, 2000. Photosynthesis responses of the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* (Rhodophyta) to iron stress. J Appl Phycol, 12(6): 605—612
- Liu J W, Dong S L, 2001. Comparative studies on utilizing nitrogen capacity between two macroalga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* (Rhodophyta) and *Ulva pertusa* (Chlorophyta) I. Nitrogen storage under nitrogen enrichment and starvation. J Environ Sci, 13(3): 318—322
- Manley S L, 1981. Iron uptake and translocation by *Macrocystis pyrifera*. Plant Physiol, 68: 914—918
- Marquardt J, Schultze A, Rosenkranz V et al., 1999. Ultrastructure and photosynthetic apparatus of *Rhodella violacea* (Porphyridiales, Rhodophyta) grown under iron-deficiency conditions. Phycologia, 38(5): 418—427
- Martin J H, Fitzwater S E, 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. Nature (London), 331: 341—343
- Martin J H, 1990. Glacial-interglacial CO_2 change: the iron hypothesis. Paleoceanography, 5: 1—13
- Milligan A J, Harrison P J, 2000. Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzyme in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). J Phycol, 36: 78—86
- Morel F M M, Rueter J G, 1979. Aquil: A chemically defined phyto-

- plankton culture medium for trace metal studies. *J Phycol*, 15: 135—141
- Raven J A, 1988. The iron and molybdenum use efficiencies of plant-growth with different energy, carbon and nitrogen-sources. *New Phyto*, 109: 279—287
- Sunda W G, Huntsman S A, 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature*, 390: 389—392
- Suzuki Y, Kuma K, Kudo I, Matsunaga K, 1995. Iron requirement of the brown macroalgae *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta) and the crustose coralline alga *Lithophyllum yessoense* (Rhodophyta), and their competition in the northern Japan Sea. *Phycologia*, 34(3): 201—205
- Timmermans K R, Van Leeuwe M A, De Jong J T M *et al*, 1998. Iron stress in the Pacific region of the Southern Ocean: evidence from enrichment bioassays. *Mar Ecol Prog Ser*, 166: 27—41

PHYSIOLOGICAL AND ECOLOGICAL RESPONSE OF *GRACILARIA TENUISTIPITATA* VAR. *LIUI* TO IRON STRESS

LIU Jing-Wen, DONG Shuang-Lin[†], FENG Li-Jie^{††}

(*Aquaculture Research Laboratory, Ocean University of China, Qingdao, 266003;*

College of Bio-engineering, Jimei University, Xiamen, 361021)

[†](*Aquaculture Research Laboratory, Ocean University of China, Qingdao, 266003)*

^{††}(*Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093)*

Abstract The total nitrogen (TN), total carbon (TC), total phosphorus (TP) (% DW), pigment, total amino acid and Fe in tissues of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*. were measured during a 60-day period in Fe-stressed condition. Iron content decreased exponentially during Fe-stress to only 5.26% of its original level. TN, TC, TP also decreased, especially the content of TC. The C:N ratio remained constant while N:Fe and C:Fe ratios increased. Total amino acid content decreased after 60 days to 83.7% of its original level. Chl and phycoerythrin (PE) content both declined with decreasing tissue iron content. The absorption spectrum of Chl and PE both reduced, while Fe-stressed cultures induced a blue shift at the fluorescence emission peak (at 436nm and 560nm) and also caused a decreased fluorescence intensity ratio of PSI:PSII. These results suggested that during the early period of Fe-stressed cultures, PSI may be more sensitive to iron stress than PSII. All the biological uptake kinetics parameters (V_{max} , K_s and a) of NO_3^- , NH_4^+ and PO_4^{3-} by *G. tenuistipitata* var. *liui* decreased under Fe-stressed condition (especially NO_3^- , $P < 0.01$). The effects of Fe-stress on nutrient uptake rates were in the order of $\text{NO}_3^- > \text{NH}_4^+ > \text{PO}_4^{3-}$. The Fe^{3+} reduction was conducted using BPDS method and the ^{55}Fe uptake rate for cultures grown on NO_3^- were measured after re-suspension in either N source NH_4^+ or NO_3^- (- Fe, + Fe/ NH_4^+ ; - Fe, + Fe/ NO_3^-). Compared with the control, Fe^{3+} 's reduction after Fe-stressed culture for 30 days was faster and, after 60 days of Fe-stress, only a small reduction of Fe^{3+} was detectable. Enhanced ^{55}Fe uptake developed under Fe-stress. During Fe-stress, the highest V_{max} appeared in - Fe/ NH_4^+ 45.7 pmol/(mg·h) and the lowest in + Fe/ NO_3^- 12.3 pmol/(mg·h). The requirement for N accelerates further Fe uptake. The growth rate of the algae continued to decline. After 40 days of iron deficiency no further growth was detectable. Chlorosis resulted at the end of the iron stress period. The lower growth rates, chlorosis and even death of the macroalgae under iron stress were caused by reduced nitrogen utilization, pigment content and photosynthetic capacity.

Key words *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*, Iron stress, Physiological and ecological response