

维生素 B₁₂ 对坛紫菜响应高温胁迫的影响

吴磊, 许凯, 徐燕, 纪德华, 王文磊, 陈昌生, 谢潮添

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 研究了维生素 B₁₂ 对坛紫菜的生理生化影响, 分析了外源添加维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸后坛紫菜的生理指标和光合参数。结果表明: 高温胁迫下坛紫菜生长几乎停止; 31 ℃ 高温处理 3 d 后, 维生素 B₁₂ 处理组的 F_v/F_m 显著高于对照组; 处理 5 d 后, 对照组发生明显溃烂, 而添加了不同浓度维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸后坛紫菜叶状体未见明显溃烂。本研究揭示维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸可以增强坛紫菜耐受高温胁迫的能力, 但是其作用机制还有待进一步验证。

[关键词] 坛紫菜; 维生素 B₁₂; 甲硫氨酸; 高温胁迫; 生理生化指标

[中图分类号] S 968.43⁺1

Effects of Vitamin B₁₂ on the Responses of *Pyropia haitanensis* to High Temperature

WU Lei, XU Kai, XU Yan, JI Dehua, WANG Wenlei, CHEN Changsheng, XIE Chaotian

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Vitamin B₁₂ could regulate genes expression of algae, improve the heat tolerance, and participate in the interactions between bacteria and eukaryotic algae. However, knowledge is limited on the physiological effects of vitamin B₁₂ on heat responses of *Pyropia haitanensis*. The physiological indexes and photosynthesis parameters of *P. haitanensis* were measured after addition of exogenous vitamin B₁₂ and methionine. The results showed that the growth of *P. haitanensis* was stopped under high temperature stress; vitamin B₁₂ decreased the inhibition of 3 days of high temperature treatment on F_v/F_m ; the control group had obvious rots after 5 days of heat treatment, but no obvious rots were found on the thalli with addition of vitamin B₁₂ and methionine. This study indicated that vitamin B₁₂ and methionine could strengthen the heat tolerance ability of *P. haitanensis*, but the mechanism remains to be further verified.

Keywords: *Pyropia haitanensis*; vitamin B₁₂; methionine; high temperature stress; physiological and biochemical indexes

0 引言

维生素是人类和其他生物所必须的微量营养成分之一, 在维持生物的新陈代谢平衡中起着至关重要的作用, 是生物多种代谢通路中关键酶的辅因子, 维生素缺乏时会诱发一系列疾病的发生^[1]。已

[收稿日期] 2018-01-03

[修回日期] 2018-02-27

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-50); 福建省科技计划项目 (2017N3016); 福建省自然科学基金项目 (2016J01165); 福建省中青年教师教育科研项目 (JAT160263); 集美大学李尚大学学科建设基金项目

[作者简介] 吴磊 (1993—), 男, 硕士生, 主要从事坛紫菜光合作用研究。通信作者: 谢潮添 (1977—), 教授, 从事海藻生物技术研究, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn。

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

有大量研究发现, B 族维生素在藻类的生长发育中起着重要作用。许多藻类属 B 族维生素的营养缺陷型, 其中 22% 的藻类属维生素 B₁ (thiamine) 的营养缺陷型, 5% 属维生素 B₇ (biotin) 的营养缺陷型, 超过 50% 的藻类属维生素 B₁₂ (cobalamin) 的营养缺陷型^[2]。由于藻类的维生素 B₁₂ 可能来源于其共生细菌, 因此维生素 B₁₂ 在细菌与藻类相互作用的研究中越发受到重视^[3]。

维生素 B₁₂ 在自然界中只能由细菌合成, 真核生物不能合成 B₁₂, 该合成过程需要 20 多种酶的参与。维生素 B₁₂ 是一种水溶性的咕啉类化合物, 又称钴胺素, 在生物体内有多种存在方式, 具有重要辅酶功能。目前已知的维生素 B₁₂ 依赖型酶有 20 多种, 如甲基丙二酰辅酶 A 变位酶 (methylmalonyl-coA mutase, MCM)、谷氨酸变位酶 (glutamate mutase, GM)、甲硫氨酸合成酶 (methionine synthase H, METH), 其中最为重要的就是甲硫氨酸合成酶^[4]。甲硫氨酸是 20 种必须氨基酸之一, 在生物的蛋白合成和甲基化中发挥关键作用。有研究^[5]发现, 甲硫氨酸能够显著提高莱茵衣藻在 25 ℃ 下的耐热能力。需要指出的是, 一些藻类还存在另一种 B₁₂ 非依赖型甲硫氨酸合成酶 METE (B₁₂-independent methionine synthase), 在没有 B₁₂ 条件下也可合成甲硫氨酸。

坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 是我国福建省、浙江省和广东省广泛栽培的大型经济海藻, 具有极高的经济价值和基础研究价值^[6]。近年来, 坛紫菜筏式培养初期的高温回暖天气造成“高温烂菜”频繁发生, 给坛紫菜养殖户造成严重的经济损失^[7]。谢波等^[5]研究发现, 某些 B₁₂ 产生菌在与莱茵衣藻共培养时, 能够显著提高衣藻的耐热能力。紫菜等大型海藻中含有较高浓度的维生素 B₁₂, 与动物肝脏中的浓度相当^[8]。而坛紫菜作为真核藻类, 自身并不能合成维生素 B₁₂, 维生素 B₁₂ 的来源至今仍未确认。对坛紫菜的 B₁₂ 是否来源于其共生原核细菌还存有疑问, 而维生素 B₁₂ 在坛紫菜应对高温胁迫时是否发挥作用仍不清楚。为了评估维生素 B₁₂ 在坛紫菜应对高温胁迫时的影响和可能发挥作用的机制, 本研究考察了高温下维生素 B₁₂ 对坛紫菜的生理影响。

1 材料与方法

1.1 藻株来源和高温处理

实验选用的坛紫菜品系为 Z-61, 由集美大学选育。坛紫菜叶状体的最适培养温度为 21 ℃, 光照强度 50 ~ 60 μmol/(m² · s), 光照周期 12 L: 12 D, 每 2 天更换一次培养基。培养基为营养盐加富的天然海水, 营养盐浓度参考 Provasoli's enrichment solution (PES)^[9]。

取长度为 10 ~ 15 cm 的健康藻体, 分别在 21 ℃ 和 31 ℃ 下培养 5 d。为了研究维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸对高温胁迫的响应, 往培养基中分别添加维生素 B₁₂ 至终质量浓度为 10 μg/L 和 100 μg/L, 添加甲硫氨酸至终浓度为 1 mmol/L 和 10 mmol/L。每个处理设置 3 个生物学重复。

1.2 藻体长度和鲜重

分别在高温处理的第 0 天及第 5 天进行坛紫菜 Z-61 叶状体长度测量。用纱布吸干藻体表面水分, 测量藻体鲜重。藻体长度和鲜重日生长速率的计算公式与数据处理方式同参考文献 [10]。

1.3 形态观察

为评估高温胁迫以及维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸的作用, 对坛紫菜 Z-61 叶状体进行形态观察。将叶状体平铺在标本纸上, 对 Z-61 叶状体进行拍照。

1.4 最大量子产量

用 DIVING-PAM 仪 (德国, Walz) 测量坛紫菜的光化学效率及快速光曲线。叶片经过 15 min 暗处理后, 用微弱的检测光 (0.15 μmol/(m² · s)) 测量藻体的最小荧光值 F₀, 此时光系统 II 的所有反应中心均处于开放状态。然后, 给一个 0.8 s 的饱和脉冲, 获得最大荧光值 F_m, 此时光系统 II 的所有反应中心均处于关闭状态。最大量子产量 (F_v/F_m) 的计算公式是: (F_m - F₀)/F_m。使用 8 个不同强度 (166, 607, 1267, 1795, 2724, 3395, 4934, 6578 μmol/(m² · s)), 持续时间为 10 s 的光化光来测定快速光响应曲线。相对电子传递速率 (rETR) 计算公式为 rETR = yield × 0.84 × 0.5 × PAR, 其

中: yield 为光系统 II 的有效光化学效率, 0.84 代表大约有 84% 的入射光被植物/藻体所吸收, 0.5 代表约 50% 被吸收的光能分配到光系统 II, PAR 则为光化光的强度。快速光响应曲线用公式 (Jasby and Platt, 1976) $ETR = ETR_{max} \times \tanh(\alpha \times PAR/P_{max})$ 拟合, 其中: ETR_{max} 为 ETR 的最大值, PAR 则为光化光的强度, α 为光限制部分的初始斜率。

1.5 数据分析

采用单因素方差 (one-way ANOVA, LSD) 分析不同 pH 处理的差异, $P > 0.05$ 代表差异不显著, 具统计意义; $P < 0.05$ 代表差异显著, 具统计意义。

2 结果

2.1 藻体长度和鲜重

21℃ 常温下, 坛紫菜叶状体长度日增加速率 ΔL 达到 (2.77 ± 0.326) cm/d, 鲜重平均日增长速率 ΔW 达到 (0.045 ± 0.0052) g/d (见表 1)。而 31℃ 高温胁迫下, 叶状体几乎停止生长, 其长度和鲜重日增加速率分别约为常温的 7% 和 9%。维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸在高温胁迫下并未促进坛紫菜的生长。

表 1 坛紫菜叶状体高温胁迫下长度和鲜重平均日增长速率

Tab.1 The length-growth rates and weight-growth rates of *P. haitanensis* under high temperature stress

试验组 Test group	长度平均日增长速率 $\Delta L / (\text{cm} \cdot \text{d}^{-1})$	鲜重平均日增长速率 $\Delta W / (\text{g} \cdot \text{d}^{-1})$
21℃	2.770 ± 0.326^a	0.0450 ± 0.0052^a
31℃ 对照组 control	0.070 ± 0.026^b	-0.0018 ± 0.0011^b
31℃ + 10 μg/L B12	0.190 ± 0.062^b	-0.0008 ± 0.0005^b
31℃ + 100 μg/L B12	0.190 ± 0.084^b	0.0003 ± 0.0002^b
31℃ + 1 mmol/L Met	0.085 ± 0.057^b	0.0001 ± 0.0003^b
31℃ + 10 mmol/L Met	0.125 ± 0.070^b	0.0004 ± 0.0005^b

说明: 上标无相同字母表示差异显著。
Note: Different letters of superscripts represent significant difference among treatments.

2.2 形态学观察

在高温处理第 5 天时, 31℃ 高温空白对照组已明显发生大面积溃烂 (见图 1), 而在外源添加维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸下的坛紫菜叶状体并未出现明显溃烂, 但是在维生素 B₁₂ 100 μg/L 处理组和甲硫氨酸 1 mmol/L 处理组已经出现点状溃烂 (见图 1 红色箭头标注处)。说明维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸能够显著提高坛紫菜叶状体的耐热性。

2.3 光合参数

通过快速光曲线的测定发现 (见图 2), 在高温胁迫处理下, 各组 F_v/F_m 均呈下降趋势; 维生素 B₁₂ 处理 0~2 d 时与对照组相比 F_v/F_m 并未有明显变化, 在处理 3 d 时, 处理组相较于对照组 F_v/F_m 显著下降, 10 μg/L 组与 100 μg/L 组 F_v/F_m 在整个高温胁迫处理过程中都无显著差异; 甲硫氨酸处理组与维生素 B₁₂ 处理组 F_v/F_m 变化趋

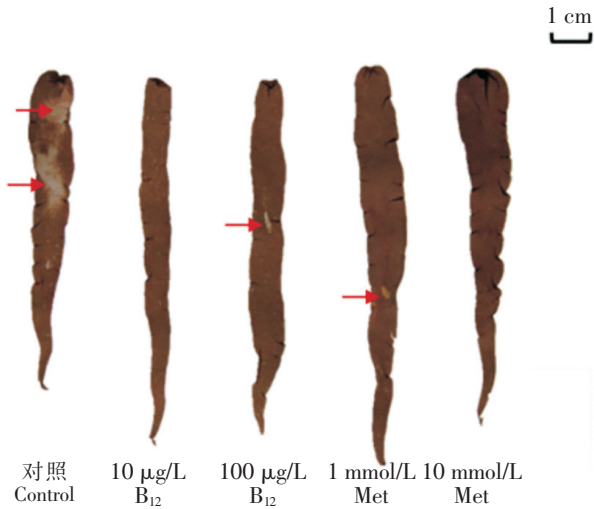
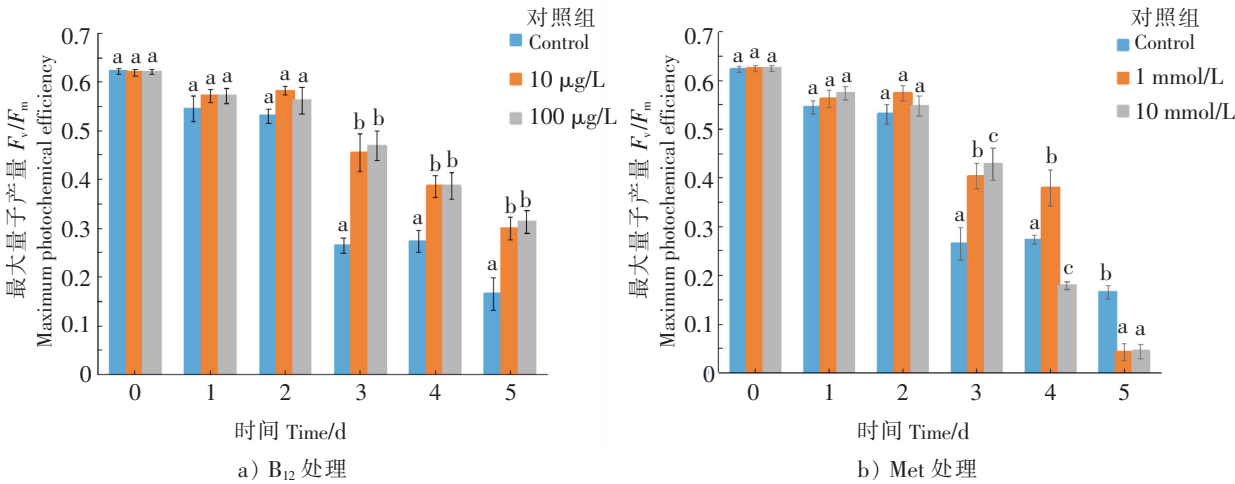


图 1 高温胁迫下坛紫菜外观形态观察
Fig.1 Phenotypes of *P.haitanensis* under high temperature stress

势整体较为相似，在高温处理 0~2 d 时与对照组相比 F_v/F_m 并未有显著差异，处理 3 d 时 1 mmol/L 组与 10 mmol/L 组 F_v/F_m 均显著高于对照组，但处理 4 d 时 10 mmol/L 组 F_v/F_m 却显著低于对照组，处理 5 d 时 1 mmol/L 组与 10 mmol/L 组 F_v/F_m 却显著低于对照组。提示维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸在提高坛紫菜耐高温能力中都发挥了重要作用，但作用方式可能存在不同。



说明:上标无相同字母表示差异显著
Note:Different letters of Superscripts represent significant difference among treatments

图 2 坛紫菜叶状体高温胁迫下 F_v/F_m 变化情况

Fig.2 Changes of the maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) in *P. haitanensis* under high temperature stress

通过快速光曲线的测定发现（见图 3），在第 0 天，维生素 B₁₂ 组、甲硫氨酸组和对照组的曲线几乎重合，对 rETR_{max}、Ik 和 α 的影响较小，变化幅度 < 30%。而高温胁迫处理 3 d 后，维生素 B₁₂ 显著增强了 rETR_{max}，10 $\mu\text{g/L}$ 组上升约 60%，100 $\mu\text{g/L}$ 组上升约 30%。而甲硫氨酸显著降低了 rETR_{max}、Ik 和 α ，rETR_{max} 降幅在 80 左右，Ik 和 α 下降约 40%。高温处理 5 d 后，所有藻体的 rETR_{max}、Ik 和 α 都大幅度降低。（见表 2）。

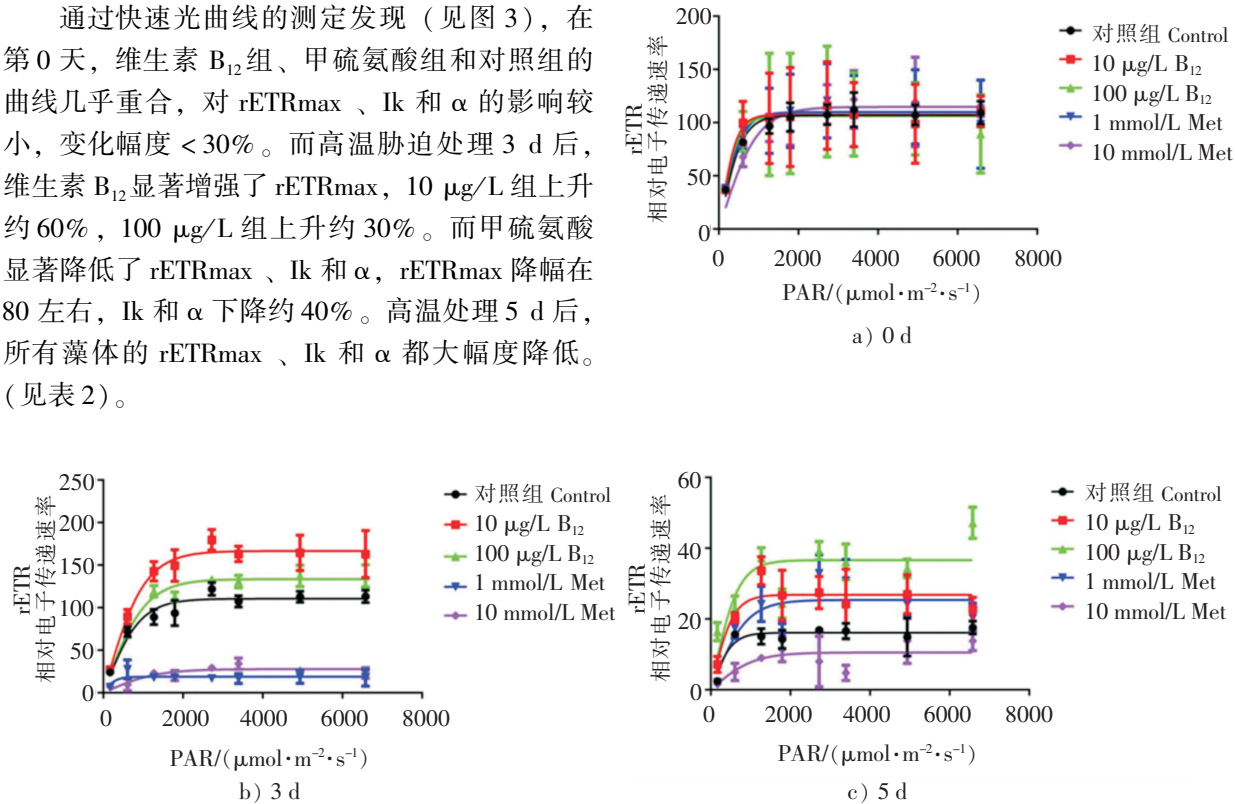


图 3 不同处理下的快速光曲线

Fig.3 The rapid light curve of thalli treated with 4 different treatment

表2 快速光曲线的3个拟合参数
Tab. 2 Three parameters fitted from the rapid light curves

时间 Time/d	处理 Treatment	最大电子传递速率	光饱和点	表观类化学
		rETR _{max}	I _k	速率 α
0	31 ℃ 对照组 Control	106.8 ± 2.08 ^a	570.8 ± 54.7 ^a	0.19 ± 0.02 ^a
	31 ℃ + 10 μg/L B ₁₂	107.5 ± 2.32 ^a	425.1 ± 42.8 ^b	0.25 ± 0.03 ^b
	31 ℃ + 100 μg/L B ₁₂	106.2 ± 3.71 ^a	454.4 ± 41.8 ^b	0.23 ± 0.04 ^b
	31 ℃ + 1 mmol/L Met	109.8 ± 3.23 ^a	545.9 ± 66.7 ^a	0.20 ± 0.03 ^b
	31 ℃ + 10 mmol/L Met	114.7 ± 5.25 ^a	521.1 ± 32.5 ^a	0.22 ± 0.02 ^b
3	31 ℃ 对照组 Control	110.5 ± 4.20 ^a	913.2 ± 66.7 ^a	0.12 ± 0.02 ^a
	31 ℃ + 10 μg/L B ₁₂	166.6 ± 3.48 ^b	1017.7 ± 32.8 ^a	0.16 ± 0.01 ^a
	31 ℃ + 100 μg/L B ₁₂	133.5 ± 3.46 ^b	1032.5 ± 91.8 ^a	0.13 ± 0.01 ^a
	31 ℃ + 1 mmol/L Met	18.8 ± 1.68 ^c	297.6 ± 36.7 ^b	0.06 ± 0.03 ^b
	31 ℃ + 10 mmol/L Met	27.9 ± 2.43 ^c	543.2 ± 44.5 ^c	0.05 ± 0.01 ^b
5	31 ℃ 对照组 Control	26.1 ± 0.77 ^a	512.7 ± 56.9 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
	31 ℃ + 10 μg/L B ₁₂	26.8 ± 1.53 ^a	550.0 ± 72.4 ^a	0.05 ± 0.01 ^b
	31 ℃ + 100 μg/L B ₁₂	36.6 ± 3.28 ^b	662.6 ± 81.3 ^a	0.05 ± 0.02 ^b
	31 ℃ + 1 mmol/L Met	25.4 ± 2.84 ^a	888.9 ± 73.6 ^b	0.03 ± 0.01 ^a
	31 ℃ + 10 mmol/L Met	10.5 ± 1.61 ^c	1056.7 ± 93.7 ^b	0.01 ± 0.00 ^c

说明: 上标无相同字母表示差异显著
Note: Different letters of superscripts represent significant difference among treatments

3 讨论

高温是坛紫菜养殖过程中最常见的胁迫之一, 高温胁迫会对坛紫菜的各项生理指标造成影响。在持续的高温胁迫下, 坛紫菜基本停止生长, 长度日平均生长速率在 0.1 ~ 0.2 cm/d 左右, 部分溃烂藻体鲜重甚至呈负增长 (见表 1)。李兵等^[11]研究表明, 坛紫菜在高温 30 ℃ 静水胁迫下的品质会显著降低, 生长缓慢, 光合色素含量、粗蛋白含量、总氨基酸含量会显著降低。坛紫菜在高温胁迫下生长受到抑制, 随着高温胁迫时间的延长, 藻体会发生溃烂。但是在外源添加维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸后, 藻体并未发生明显溃烂 (见图 1), 说明维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸能够提高坛紫菜的耐热性。谢波等^[5]研究发现, 在高温胁迫下莱茵衣藻 METE 基因的表达量会显著下调, METH 基因部分表达; 在添加维生素 B₁₂ 后, 只有 METH 基因能够发挥作用继续合成甲硫氨酸, 从而提高衣藻的耐热能力。

光合作用是植物最重要的生理反应之一, 也是对高温响应最为敏感的生理反应。高温会对坛紫菜光反应中心造成影响, 导致光合色素的含量下降。光合参数能够直接反应植物的光合作用。坛紫菜叶状体在高温胁迫下各项光合参数都受到影响 (见图 2)。所有藻体 F_v/F_m 在高温处理前 2 d 时未见明显下降, 2 d 后开始下降 (见图 2)。Xu 等^[12]研究发现, 坛紫菜 Z-61 在 29 ℃ 高温下培养 2 d 未见显著下降, 这与本研究结果保持一致。本研究在添加了维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸处理 2 d 后, rETR_{max}、I_k 和 α 下降速率会减慢 (见图 3), 这提示添加了维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸的藻体光合保护能力更强; 随着处理时间的延长 (3 ~ 5 d), 维生素 B₁₂ 能够继续保护坛紫菜的光合系统, 维生素 B₁₂ 处理组的 ETR 和 F_v/F_m 的一致性很高, 但是添加了甲硫氨酸的藻体在胁迫后期光合参数下降较快, 高浓度甲硫氨酸处理组降低了 ETR 和 F_v/F_m , 而低浓度组仅降低了 F_v/F_m , 且对 ETR_{max} 没有显著影响。

外源添加维生素 B₁₂, 一方面可以促进坛紫菜合成甲硫氨酸。甲硫氨酸可参与有关抗逆蛋白的合成或者作为甲基供体参与甲基化来协助坛紫菜应对胁迫。Giovanelli 等^[13]研究发现植物体内的甲硫氨酸有两种去向, 大约 20% 的甲硫氨酸将用于合成蛋白质参与各种生理活动, 剩下 80% 的甲硫氨酸用于合成生物体内主要的甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸, 用于 DNA、RNA 和蛋白质等分子的甲基化反应。

甲基化在植物应对非生物胁迫时发挥着重要作用。另一方面, 维生素 B₁₂ 也可以调节某些相关基因的表达来共同应对胁迫。在只添加甲硫氨酸的条件下, 通过相关蛋白的合成和甲基化调控可以维持坛紫菜的存活, 但是对坛紫菜 PS II 反应中心的保护不及外源添加维生素 B₁₂, 维生素 B₁₂ 可能激活了某些抗逆相关基因的表达, 保证了光系统的正常运行。在原核生物中, 维生素 B₁₂ 可以通过控制核糖开关 (Riboswitch) 对目标基因的表达进行调节^[14], 但是, 藻类中目前仍未发现与维生素 B₁₂ 相关的核糖开关。综上所述, 维生素 B₁₂ 和甲硫氨酸在坛紫菜应对高温胁迫时发挥了重要作用, 但作用机理还需要进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] MARTIN C, BUTELLI E, PETRONI K, et al. How can research on plants contribute to promoting human health? [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(5): 1685.
- [2] CROFT M T, WARREN M J, SMITH A G. Algae need their vitamins [J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(8): 1175.
- [3] SA UDO-WILHELMY S A, CUTTER L S, DURAZO R, et al. Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(35): 14041.
- [4] GRUBER K, PUFFER B, KRAEUTLER B. ChemInform abstract: vitamin B₁₂-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids [J]. *Cheminform*, 2011, 42(45): 4346-4363.
- [5] XIE B, BISHOP S, STESSMAN D, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B₁₂-producing bacteria [J]. *ISME J*, 2013, 7(8): 1544-1555.
- [6] 周巍巍. 坛紫菜对低氮磷胁迫应答机制的初步研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- [7] 刘瑞棠. 福建坛紫菜养殖烂苗原因分析与几项预防措施 [J]. *渔业信息与战略*, 2011, 26(4): 18-19.
- [8] CROFT M T, LAWRENCE A D, RAUX-DEERY E, et al. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 146(4): 90.
- [9] STARR R C. The culture collection of algae at the university of Texas at Austin [J]. *J Phycol*, 2010, 29(s2): 1-106.
- [10] 徐燕, 谢潮添, 纪德华, 等. 坛紫菜品系间杂交分离色素突变体及其特性的初步研究 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 466-472.
- [11] 李兵, 徐燕, 纪德华, 等. 高温静水胁迫培养对坛紫菜品质的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 104-110.
- [12] XU Y, CHEN C, JI D, et al. Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress [J]. *J Appl Phycol*, 2014, 26(1): 607-618.
- [13] GIOVANELLI J, MUDD S H, DATKO A H. Quantitative analysis of pathways of methionine metabolism and their regulation in *lemna* [J]. *Plant Physiol*, 1985, 78(3): 555.
- [14] NAHVI A, BARRICK J E, BREAKER R R. Coenzyme B₁₂ riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(1): 143.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)