

文章编号:1000-0615(2009)01-0037-08

高温胁迫对球等鞭金藻 3011 和 8701 叶绿素 荧光特性的影响

梁英, 冯力霞, 田传远

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:以球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 3011 和 8701 为实验材料,研究了高温胁迫(35~50℃)对其叶绿素荧光特性的影响。结果表明,与对照组相比,高温胁迫下2株金藻的叶绿素荧光参数 F_v/F_m (PS II 的最大光能转化效率)、 F_v/F_o (PS II 的潜在活性)、 $\Phi_{PS II}$ (PS II 的实际光能转化效率)、 $rETR$ (相对光合电子传递效率)和 qP (光化学淬灭)均明显降低,并且随着胁迫温度的升高,胁迫时间的延长,下降幅度也逐步增大。 NPQ (非光化学淬灭)的变化趋势则与其他荧光参数不同,3011 的 NPQ 随着胁迫温度的升高和胁迫时间的延长先上升后下降;8701 的 NPQ 变化则与胁迫温度有关,35 和 40℃处理下 NPQ 随着胁迫时间的延长而逐渐上升,45℃处理下 NPQ 则先上升后下降。3011 与 8701 的耐热性存在一定差异。3011 在 40℃下处理 10 min 后,经过一定的时间后各荧光参数基本恢复,而在 45 和 50℃下处理 10 min 后,各参数均不能恢复。8701 在 35 和 40℃处理 10 min 后,经过一定时间后,荧光参数 F_v/F_m 和 F_v/F_o 基本恢复到对照水平,而在 45℃下处理 10 min 后,各参数均不能恢复。本文还对高温胁迫下2株金藻的响应机制以及叶绿素荧光技术在筛选耐高温微藻品系中的应用进行了初步探讨。

关键词:球等鞭金藻;高温胁迫;叶绿素荧光

中图分类号:Q 945.78

文献标识码:A

微藻是水产动物的优质饵料,广泛应用于水产动物人工育苗生产中,但由于耐高温品系较少,给夏季的育苗生产带来诸多不便,因此耐高温微藻品系的筛选具有十分重要的意义。研究表明,光合作用是微藻对高温最敏感的生理过程之一,高温主要破坏光系统 II,而高温对光系统 II 的破坏可以通过叶绿素荧光参数的变化反映出来^[1-3]。作者曾就高温胁迫对4种海洋微藻(三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornerutum*, 纤细角毛藻 *Chaetoceros gracilis*, 盐藻 *Dunaliella salina*、塔胞藻 *Pyramimonas* sp.) 叶绿素荧光动力学的影响作过一些探讨^[4-5],结果表明叶绿素荧光分析技术可以在对微藻细胞无损伤的情况下快速、灵敏地探测高温胁迫对微藻的作用并分析其作用机制,而且可以利用该技术研究微藻受高温胁迫后,在常温下的恢复情况,以确定高温对微藻的伤害是否

可逆。该技术与其它方法相比,有着不可比拟的优势,但目前利用该技术进行的研究工作还远远不够,仅对少量的微藻品种进行了初步研究^[4-7]。

球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 因具有个体小、繁殖快、营养丰富的优点,在水产动物种苗生产中占有重要的地位。球等鞭金藻 3011 和 8701 是2个不同的生态品系,其中 3011 是陈淑芬等^[8] 1982 年从山东海阳海水中分离出的高温品系,而 8701 是周汝伦等^[9] 1988 年从山东日照海水中分离出的低温品系。但近几年作者所在实验室在培养 8701 过程中发现,该品系已逐步演变为高温品系,生长繁殖的最适温度为 25~30℃。这2个品系对高温胁迫是否存在差异,目前还没有相关研究。本试验以中国海洋大学保存的球等鞭金藻 3011 品系和 8701 品系为材料,研究这2个品系在高温胁迫下,叶绿素荧光参数的变化,以及高温

收稿日期:2008-01-21 修回日期:2008-04-14

资助项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD09A03)

通讯作者:梁英, E-mail: yliang@ouc.edu.cn

胁迫停止后,叶绿素荧光参数在常温下的恢复情况,以期更好地了解2株金藻的高温适应性,为筛选耐高温微藻品系提供参考。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用球等鞭金藻 3011 (*Isochrysis galbana* MACC/H59) 及球等鞭金藻 8701 (*Isochrysis galbana* MACC/H60) 藻种取自中国海洋大学微藻种质库。

1.2 微藻培养

实验在 250 mL 的三角烧瓶中进行,均采用 f/2 培养基^[10],盐度为 31,光强强度为 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。培养过程中不充气,每日随机调换三角瓶并摇动 2~3 次。采用半连续培养法进行培养,定期加入新鲜培养液,使 2 株金藻的细胞密度维持在每毫升 $(3 \sim 5) \times 10^6$ 个。

1.3 高温胁迫处理

以 25 $^\circ\text{C}$ 水浴为对照,根据预备实验结果,将处于指数生长期的球等鞭金藻 3011 放入 40、45、50 $^\circ\text{C}$ 的水浴中进行高温胁迫处理;将球等鞭金藻 8701 放入 35、40、45 $^\circ\text{C}$ 的水浴中进行高温胁迫处理;每个温度 3 个平行组。定时取样,测量其叶绿素荧光参数的变化情况。

1.4 恢复实验

按照梁英等^[5]的方法进行。

1.5 叶绿素荧光参数的测定

按照梁英等^[5]的方法进行。

2 结果

2.1 高温胁迫对 2 株金藻叶绿素荧光参数的影响

高温(40, 45, 50 $^\circ\text{C}$)胁迫对球等鞭金藻 3011 叶绿素荧光参数的影响见图 1。由图 1 可以看出,与对照(25 $^\circ\text{C}$)相比,高温胁迫下荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、rETR 和 qP 均随处理时间的延长和处理温度的升高而下降,处理时间越长、处理温度越高,下降幅度越大。与对照相比,40 $^\circ\text{C}$ 下处理 60 min, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、rETR 和 qP 分别下降了 30%、59%、72%、73% 和 53%, NPQ 在处理 30 min 时上升至最大值 0.25,至 60 min 时又下降为 0.12;45 $^\circ\text{C}$ 下处理 40 min 后,上述值分别下降了 64%、85%、80%、81% 和 40%, NPQ

在处理 10 min 时上升至最大值 0.27,至 40 min 时下降为 0.03;50 $^\circ\text{C}$ 下处理 15 min 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、rETR 和 qP 均降为 0, NPQ 在处理 6 min 时上升至最大值 0.15,至 15 min 下降为 0.02。

图 2 给出了高温(35, 40, 45 $^\circ\text{C}$)胁迫下球等鞭金藻 8701 叶绿素荧光参数的变化情况。从图 2 可以看出,与对照(25 $^\circ\text{C}$)相比,高温胁迫下球等鞭金藻 8701 的叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 和 rETR 均明显降低,并且随着胁迫温度的升高,胁迫时间的延长,下降幅度也逐步增大。与对照相比,35 $^\circ\text{C}$ 下处理 60 min, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 和 rETR 分别下降了 13%、35%、7% 和 3%;40 $^\circ\text{C}$ 下处理 60 min,上述指标分别下降了 32%、61%、76% 和 76%, qP 随着处理时间的延长先上升后下降,至 60 min 时下降了 39%, NPQ 随着处理时间的延长逐步上升;45 $^\circ\text{C}$ 下处理 18 min, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 和 rETR 分别下降了 44%、72%、81% 和 88%, qP 随着处理时间的延长先上升后下降,至 18 min 时下降了 72%, NPQ 在处理 6 min 时上升至最大值 0.46,至 18 min 时又下降为 0.02。

2.2 高温胁迫停止后 2 株金藻叶绿素荧光参数的恢复情况

高温胁迫 10 min 后,球等鞭金藻 3011 叶绿素荧光参数变化及恢复情况见图 3。40 $^\circ\text{C}$ 下处理 10 min 恢复 45 min 后,各荧光参数基本恢复;45 $^\circ\text{C}$ 下处理 10 min 恢复 60 min 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、rETR 和 qP 分别恢复为对照的 41%、17%、21%、22% 和 97%;50 $^\circ\text{C}$ 下处理 10 min 后,各参数均不能恢复,恢复 120 min 后,各参数均下降为 0。

高温胁迫 10 min 后,球等鞭金藻 8701 叶绿素荧光参数变化及恢复情况见图 4。35 $^\circ\text{C}$ 下处理 10 min 恢复 45 min 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、rETR 和 qP 分别恢复为对照的 99%、98%、94%、76% 和 95%;40 $^\circ\text{C}$ 下处理 10 min 恢复 90 min 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、rETR 和 qP 分别恢复为对照的 99%、97%、80%、80% 和 98%;45 $^\circ\text{C}$ 处理 10 min 恢复 150 min 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、rETR 和 qP 分别恢复为对照的 49%、22%、19%、18% 和 56%。

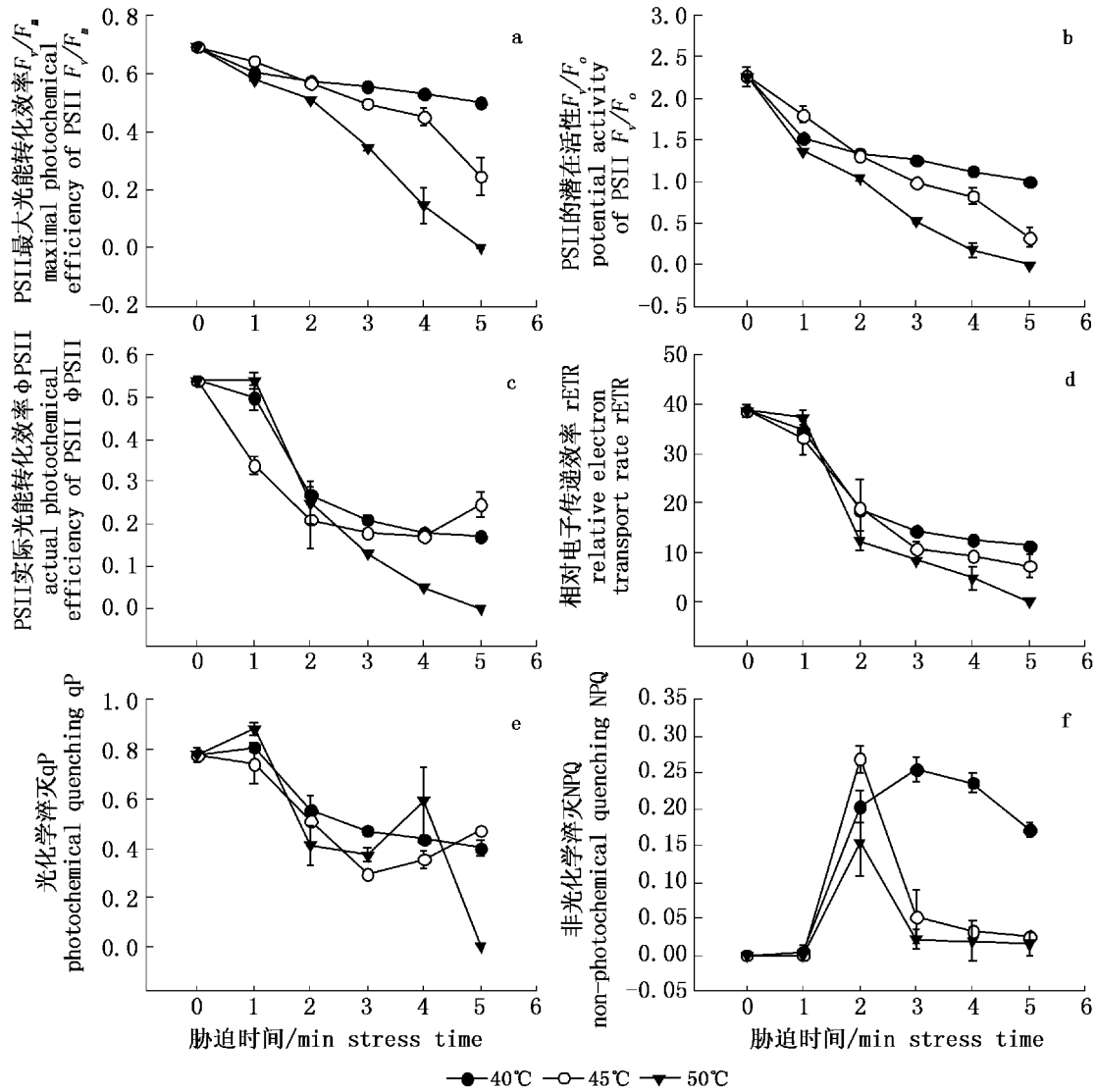


图 1 高温 (40,45,50 °C) 胁迫下球等鞭金藻 3011 叶绿素荧光参数随处理时间的变化情况

X 轴表示的胁迫时间(0,1,2,3,4 和 5)分别代表 40 °C 下的对照,胁迫 10,20,30,40 和 50 min;45 °C 下的对照,胁迫 5,10,20,30 和 40 min;50 °C 下的对照,胁迫 3,6,9,12 和 15 min

Fig. 1 Changes of fluorescence parameters of *Isochrysis galbana* 3011 with time under high temperatures (40,45,50 °C) exposure

On the X-axis, stress time (0, 1, 2, 3, 4 and 5) represent, respectively, control, stress 10, 20, 30, 40 min and 50 min for 40 °C; control, stress 5, 10, 20, 30 min and 40 min for 45 °C; control, stress 3, 6, 9, 12 min and 15 min for 50 °C

3 讨论

叶绿素荧光技术以植物体内叶绿素作为天然探针,包含丰富的光合作用信息,极易受逆境的影响,是快速、灵敏和无损伤地研究和测定逆境对植物光合作用的理想方法^[11-14]。本实验结果表明,2 株金藻的荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 Φ_{PSII} 、rETR 均随高温胁迫时间延长而呈下降趋势。 F_v/F_m 和 F_v/F_o 分别表示 PSII 的原初光能转化效率和 PSII

的潜在活性^[15-16]。 F_v/F_m 和 F_v/F_o 的下降表明,高温胁迫使 PSII 反应中心受损,抑制光合作用的原初反应,阻碍光合电子传递的过程。经高温胁迫后, F_v/F_o 的下降幅度明显高于 F_v/F_m 的下降幅度,说明高温胁迫对 2 株金藻传能效率的抑制比对其光能转化效率的抑制更为明显。梁英等^[4-5]在研究高温胁迫对 4 种海洋微藻(三角褐指藻,纤细角毛藻,盐藻、塔胞藻)叶绿素荧光动力学的影响时也得出该结论。 Φ_{PSII} 表示作用光存在

时 PSII 的实际光能转化效率^[15-16], Φ_{PSII} 的降低, 说明高温胁迫阻止藻细胞同化力 (NADPH, ATP) 的形成, 从而影响到碳的固定与同化。

rETR 表示 PSII 的相对电子传递速率^[15-16], rETR 的下降表明, 高温胁迫使 2 株金藻从 $QA^- \rightarrow QB$ 的电子传递受到抑制。

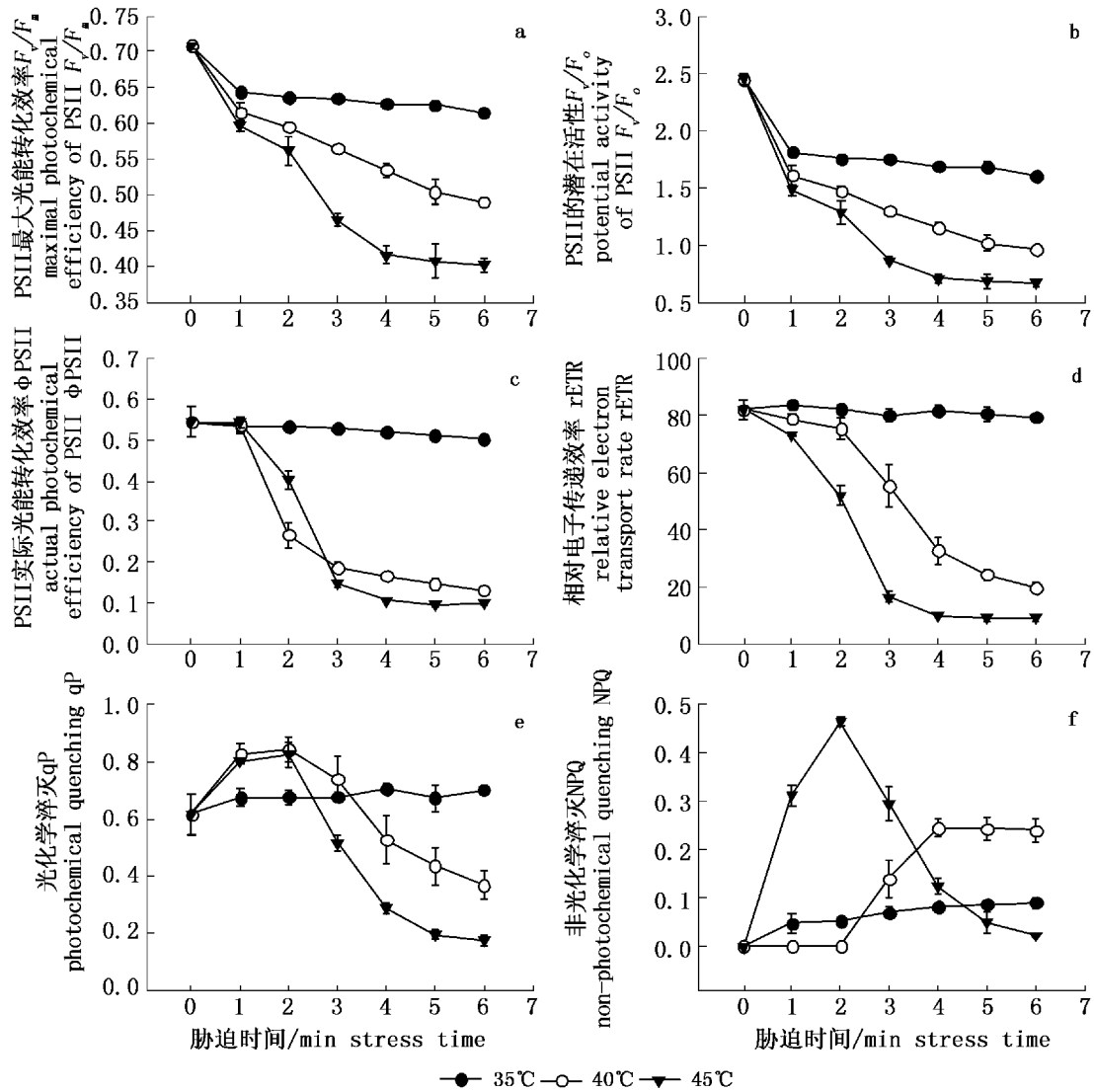


图2 高温(35,40,45 °C)胁迫下球等鞭金藻 8701 叶绿素荧光参数随处理时间的变化情况

X 轴表示的胁迫时间(0,1,2,3,4,5 和 6)分别代表 35 °C 和 40 °C 下的对照,胁迫 10,20,30,40,50 和 60 min;45 °C 下的对照,胁迫 3,6,9,12,15 和 18 min

Fig. 2 Changes of fluorescence parameters of *Isochrysis galbana* 8701 with time under high temperatures (35, 40, 45 °C) exposure

On the X-axis, stress time (0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6) represent, respectively, control, stress 10, 20, 30, 40, 50, 60 min for 35 °C and 40 °C; control, stress 3, 6, 9, 12, 15 min and 18 min for 45 °C

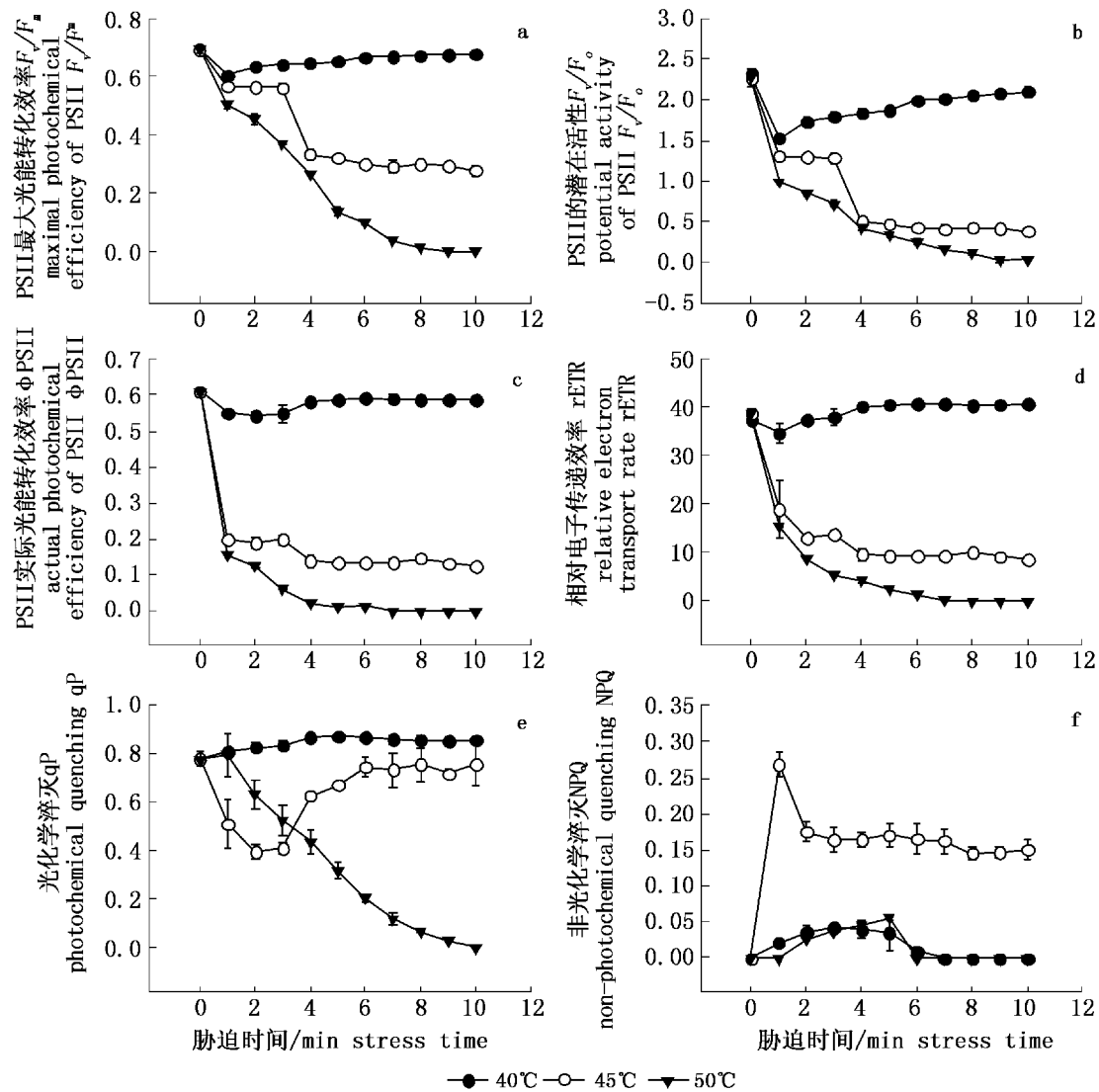


图3 高温(40,45,50 °C)胁迫10 min后,球等鞭金藻3011叶绿素荧光参数在常温(25 °C)下的恢复情况
X轴(0,1,2,3,4,5,6,7,8,9和10)分别代表40 °C的对照,处理10 min,恢复5,10,15,20,25,30,35,40和45 min;45 °C的对照,处理10 min,恢复5,10,15,20,25,30,40,50和60 min;50 °C的对照,处理10 min,恢复10,20,30,40,50,60,80,100和120 min

Fig.3 Fluorescence parameters of *Isochrysis galbana* 3011 during recovery under control conditions (25 °C) after high temperature (40, 45, 50 °C) exposure

On the X-axis, stress time (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10) represent, respectively, control, stress 10 min, recovery 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min and 45 min for 40 °C; control, stress 10 min, recovery 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 min and 60 min for 45 °C; control, stress 10 min, recovery 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 min and 120 min for 50 °C

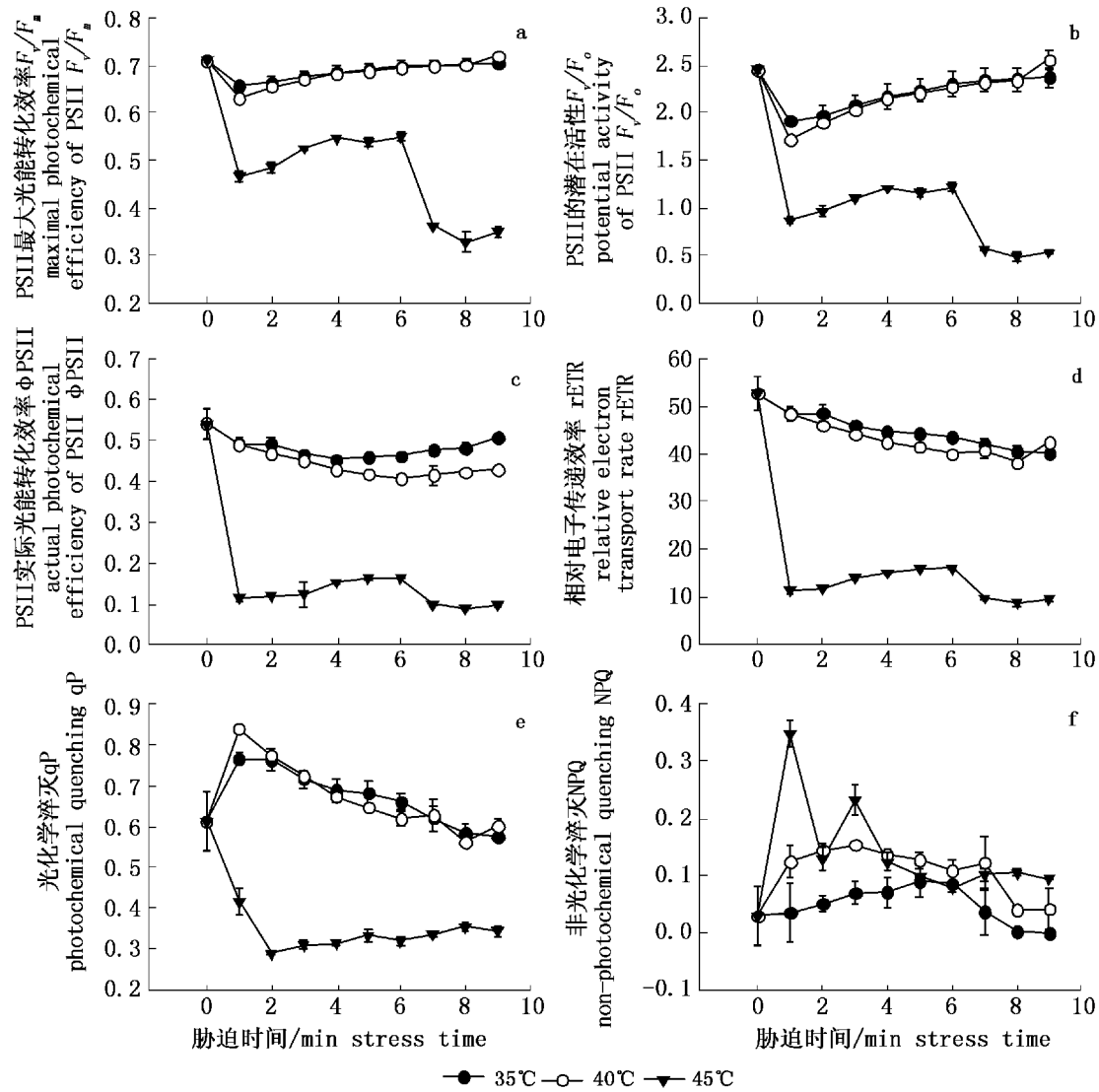


图4 高温(35,40,45 °C)胁迫10 min后,球等鞭金藻8701叶绿素荧光参数在常温下(25 °C)的恢复情况
X轴(0,1,2,3,4,5,6,7和8)分别代表35 °C下的对照,处理10 min,恢复3,9,15,21,27,33,39和45 min;40 °C下的对照,处理10 min,恢复10,20,30,40,50,60,70和90 min;45 °C下的对照,处理10 min,恢复10,20,40,60,80,100,120和150 min

Fig. 4 Fluorescence parameters of *Isochrysis galbana* 8701

during recovery under control conditions (25 °C) after high temperature (35, 40 45 °C) exposure

On the X-axis, stress time (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8) represent, respectively, control, stress 10min, recovery 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39 min and 45min for 35 °C; control, stress 10min, recovery 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 min and 90 min for 40 °C; control, stress 10 min, recovery 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min and 150 min for 45 °C

qP为光化学淬灭,反映了PSII天线色素吸收的光能用于光化学电子传递的份额,在一定程度上反映了PSII反应中心的开放程度。qP的下降表明,电子由PSII的氧化侧向PSII反应中心的传递受阻,用于进行光合作用的电子减少,以热或其他形式耗散的光能增加,这与 Φ_{PSII} 下降吻合。NPQ即非光化学淬灭,反映的是PSII吸收的光能不能用于光合电子传递而以热的形式耗散掉的光

能部分^[15-16]。高温胁迫后NPQ的上升表明其PSII的潜在热耗散能力增强,有效避免或减轻因PSII吸收过多光能对光和机构的损伤,对藻体是1种保护作用。随着胁迫时间继续延长,NPQ又开始下降,表明其正常生理功能受到严重伤害,对热能的耗散能力丧失。

高温胁迫导致的PSII反应中心失活分为可逆失活和遭到破坏两种^[17]。本实验结果表明,

3011 在 40 °C 下处理 10 min 后,经过一定的时间后各荧光参数基本恢复,而在 45 °C 和 50 °C 下处理 10 min 后,各参数均不能恢复。说明 40 °C 处理 10 min 后,3011 的 PS II 反应中心暂时失活,但光合器官并未受到不可逆损伤,经过一定的时间后即可恢复。而 45 °C 和 50 °C 下处理 10 min 后,3011 的 PS II 反应中心遭到破坏,光合器官受到不可逆损伤,不能恢复。8701 在 35 °C 和 40 °C 处理 10 min 后,经过一定时间后,荧光参数 F_v/F_m 和 F_v/F_o 基本恢复到对照水平,而在 45 °C 下处理 10 min 后,各参数均不能恢复。说明在 35 °C 和 40 °C 处理 10 min 后,8701 的 PS II 反应中心暂时失活,经过一定的时间后即可恢复,而 45 °C 下处理 10 min,其 PS II 反应中心遭到破坏,不能恢复。梁英等^[5-6]对 4 种海洋微藻的研究结果表明,三角褐指藻耐热性最差,在 35 °C 下处理 10 min 后对其生理状况已构成威胁。塔胞藻的耐热性较差,35 °C 和 40 °C 下处理 10 min,对它的生理状况无明显影响,而 45 °C 下处理 10 min 后,则使藻细胞受到致命伤害。纤细角毛藻和盐藻有较高的耐热性,在 40 °C 和 45 °C 下处理 10 min 后对它们的生理状况不构成威胁,50 °C 处理 10 min 后,藻细胞则受到致命伤害。黄仿等^[6-7]对球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 和角毛藻 (*Chaetoceros* sp.) 的研究结果表明,球等鞭金藻和角毛藻是耐热性较高的微藻品种,45 °C 以上的热处理才对其生理功能造成伤害。由此可见,不同的微藻品种,其耐热性差别较大。

球等鞭金藻 3011 和 8701 是 2 个不同的生态品系,3011 是高温品系,最适生长温度为 25 ~ 30 °C^[8],8701 是低温品系,最适生长温度为 13 ~ 18 °C^[9]。但近几年作者所在实验室在培养 8701 过程中发现,该品系已逐步演变为高温品系,生长繁殖的最适温度为 25 ~ 30 °C,甚至在 35 °C 左右也可正常生长繁殖(资料未发表)。本实验结果表明,在相同温度下,3011 品系叶绿素荧光参数的下降幅度较 8701 品系平缓,而且 3011 在常温下的恢复速度较 8701 略快,恢复幅度也较 8701 略大,说明虽然本实验所用 8701 品系已演变为高温品系,但其耐热性还是与 3011 存在一定差距。

实验结果表明,可以通过叶绿素荧光参数的变化情况,来评价不同微藻品种对高温逆境的适应性,并可作为筛选抗热微藻品种的参考指标,能

否直接用作抗热鉴定指标,还需要针对不同的微藻品种进行大量的实验研究,以确定该法的可靠性和适应性。

参考文献:

- [1] Morris E P, Kromkamp J C. Influence of temperature on the relationship between oxygen- and fluorescence-based estimates of photosynthetic parameters in a marine benthic diatom (*Cylindrotheca closterium*) [J]. *Eur J Phycol*, 2003, 38: 133 - 142.
- [2] Wen X G, Gong H M, Lu C M. Heat stress induces a reversible inhibition of electron transport at the acceptor side of photosystem II in a cyanobacterium *Spirulina platensis* [J]. *Plant Science*, 2005, 168: 1471 - 1476.
- [3] Sayed O H, El-shahed A M. Growth, Photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) in response to growth temperature [J]. *Algoi*, 2000, 21 (3): 283 - 290.
- [4] 梁 英,冯力霞,尹翠玲,等. 高温胁迫对三角褐指藻和纤细角毛藻叶绿素荧光动力学的影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36 (3): 427 - 433.
- [5] 梁 英,冯力霞,田传远,等. 高温胁迫对盐藻和塔胞藻叶绿素荧光动力学的影响[J]. *中国水产科学*, 2007, 14 (6): 961 - 968.
- [6] 黄 仿,武宝环. 热胁迫对球等鞭金藻作用机制的叶绿素荧光的研究[J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 1995, 13 (2): 72 - 76.
- [7] 黄 仿,武宝环,陈贻竹. 角毛藻热胁迫机理的活体调制叶绿素荧光研究[J]. *暨南大学学报(自然科学版)*, 1996, 17 (3): 80 - 85.
- [8] 陈椒芬,潘永尧. 等鞭藻的生长及其主要营养成分的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1987, 18 (1): 55 - 63.
- [9] 周汝伦,孙在仁,杨 震,等. 金藻 8701 的分离、培养和应用初报[J]. *青岛海洋大学学报*, 1990, 1: 34 - 40.
- [10] Guillard R R, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran [J]. *Can J Microbiol*, 1962, 8: 229 - 239.
- [11] 梁 英,冯力霞,尹翠玲. 叶绿素荧光技术在微藻环境胁迫研究中的应用现状及前景[J]. *海洋科学*, 2007, 31 (1): 71 - 76.
- [12] Beardall J, Young E, Roberts S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation [J].

- Aquat Science, 2001, 63: 44 – 69.
- [13] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide[J]. J Exp Bot, 2000, 51: 659 – 668.
- [14] 梁英,尹翠玲,冯力霞,等. 微藻营养盐限制的检测方法[J]. 中国水产科学,2005,12(5):661 – 667.
- [15] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学通报,1999,16(4):444 – 448.
- [16] Van Kooten O, Snel J F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology [J]. Photosynth Res, 1990, 25: 147 – 150.
- [17] 郭延平,周慧芬,曾光辉,等. 高温胁迫对柑橘光合速率和光系统活性的影响[J]. 应用生态学报, 2003,14(6):867 – 870.

Effects of high temperature stress on the chlorophyll fluorescence of *Isochrysis galbana* 3011 and 8701

LIANG Ying, FENG Li-xia, TIAN Chuan-yuan

(Key Laboratory of Mariculture of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In this paper, two microalgal strains (*Isochrysis galbana* 3011 and 8701) were used to study the difference of chlorophyll a fluorescence parameters under high temperature stress (35 – 50 °C). The results showed that the maximal photochemical efficiency of PS II (F_v/F_m), the potential activity of PSII (F_v/F_o), the relative electron transport rate (rETR), the actual photochemical efficiency of the PSII reaction centers of light-adapted cells (Φ PSII) and the photochemical quenching (qP) all decreased under high temperature stress in the two microalgal strains. The changed degree of the above parameters increased with the increase of temperature and the increasing exposure time. NPQ in the two microalgal strains exhibited different patterns of variation with high temperature stress, the values in 3011 first increased then decreased, while that in 8701 increased with stress time at 35 °C and 40 °C, but first increased then decreased at 45 °C. There are some heat-tolerance varieties between the two microalgal strains 3011 and 8701. For 3011, the parameters F_v/F_m , F_v/F_o , Φ PSII, rETR and qP could almost recover to the control values in the normal temperature after 10 min high temperature treatments at 40 °C, but could not recover when the stress temperature are at 45 °C and 50 °C. As to 8701, the parameters F_v/F_m and F_v/F_o could almost recover to the control values at 25 °C after 10 min high temperature stress at 35 °C and 40 °C, but all parameters could not recover to the control values when the temperature is above 45 °C. The responsive mechanism of *Isochrysis galbana* to high temperature stress as well as the possibility of determining the high temperature resistance in microalgae using chlorophyll fluorescence induction kinetics was also discussed in this paper.

Key words: *Isochrysis galbana*; high temperature stress; chlorophyll fluorescence kinetics