

文章编号:1000 - 0615(2001)01 - 0020 - 06

## 球等鞭金藻 8701 的耐低温机理

宫相忠, 唐学玺, 黄 健, 张学成, 杨 震, 张凯松

(青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**对耐低温品系球等鞭金藻 8701 在低温下与活性氧清除和伤害有关的几个生理生化指标进行了研究,探讨了其耐低温机理,并与该藻种的低温敏感品系球等鞭金藻 3011 进行了比较。结果表明,球等鞭金藻 8701 在低温下(8℃)培养一周,其超氧化物歧化酶(SOD)活性略有下降,但仍保持极高的酶活性,因此能够及时清除低温胁迫产生的过量活性氧,使其细胞内保持较低的膜脂过氧化水平和较低的电解质外渗率;球等鞭金藻 3011 在低温下胁迫一周,其细胞内的膜脂过氧化水平和电解质外渗率大大高于球等鞭金藻 8701,这与其 SOD 活性较低,并且在低温下其活性大幅度下降有关;与 SOD 相比,两种不同品系球等鞭金藻的过氧化物酶(POD)对减轻其低温伤害、提高其耐低温能力,不起主要作用。

**关键词:**球等鞭金藻 8701;耐低温机理;超氧化物歧化酶;过氧化物酶;膜脂过氧化作用;电解质外渗率

**中图分类号:**S963.21<sup>+</sup>3 **文献标识码:**A

## Mechanism of low temperature tolerance of *Isochrysis galbana* Parke 8701

GONG Xiang-zhong, TANG Xue-xi, HUANG Jian,  
ZHANG Xue-cheng, YANG Zhen, ZHANG Kai-song

(College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** This paper reports several physiological and biochemical changes related to active oxygen injure and scavenging effect in a low temperature resistant strain *Isochrysis galbana* Parke 8701 under low temperature stress and investigates its low temperature tolerant mechanism in comparison with a low temperature sensitive strain *I. galbana* Parke 3011. The experimental results showed that: the activity of superoxide dismutase (SOD) in *I. galbana* Parke 8701 decreased slightly when cultured at low temperature (8℃) for a week, but still kept extremely high enzymatic activity, so it could scavenge the extra active oxygen rapidly under low temperature stress and keep a membrane lipid peroxidation in relatively lower level as well as a relatively low electrolytic leakage; the membrane lipid peroxidation level and electrolytic leakage in *I. galbana* Parke 3011 were significantly higher than in *I. galbana* Parke 8701 when stressed under low temperature for a week. This was due to the relatively low SOD activity in the former and its activity rapidly declined; in comparison with SOD, peroxidase (POD) did not play an important role in relieving the low temperature injury and raising the capacity of low temperature tolerance in these two strains of *I. galbana* Parke.

**Key words:** *Isochrysis galbana* 8701; low temperature tolerance mechanism; superoxide dismutase; peroxidase;

收稿日期:2000-04-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870146);山东省自然科学基金资助项目(Y95D0144)

第一作者:宫相忠(1963-),男,山东青岛人,硕士,副教授,主要从事植物学及植物环境生态学研究。Tel:0532-2032952, E-mail:gljiangmail@ouqd.edu.cn

membrane lipid peroxidation; electrolytic leakage

球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana* Parke) 是贻贝、牡蛎等海洋经济动物幼虫的理想饵料, 本文选用该藻种的耐低温品系 - 球等鞭金藻 8701 (*I. galbana* 8701)<sup>[1]</sup> 研究了其耐低温机理和低温伤害, 并与该藻种的耐高温品系 - 球等鞭金藻 3011 (*I. galbana* 3011)<sup>[2]</sup> 进行了比较。本研究不仅对海洋单胞藻耐低温机理的研究有重要的理论意义, 而且对低温饵料单胞藻的选育及海水养殖业的持续发展和养殖生态环境的改善也具有很重要的现实意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种来源

球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 均由中国科学院海洋研究所微藻种质库提供。

### 1.2 培养方法及条件

球等鞭金藻 8701 培养液参照周汝伦等<sup>[3]</sup>的配方, 球等鞭金藻 3011 培养液参照陈椒芬和潘永尧<sup>[2]</sup>的配方。所用培养箱均为 LRH-250G 光照培养箱, 光照强度为 3 000 ~ 4 000 Lux, 光暗比为 12:12, 其低温条件均为 8 ℃, 最适温度分别设置为 18 ℃ 和 25 ℃。实验中低温组和适温组各设三个平行样, 实验结果为三次重复的平均值。

### 1.3 超氧化物歧化酶(SOD)酶液的制备和酶活性的测定

SOD 酶液的制备: 量取待测藻液 50 mL, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 分钟, 沉淀中加入 3 mL 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液, pH 7.8, 加少量石英砂于低温下研磨, 15 000 ×g 离心 15 分钟, 上清液用作 SOD 活性的测定。

SOD 活性的测定: 采用 Beauchamp 和 Fridovich 等<sup>[4]</sup>建立, Bewley<sup>[5]</sup>改进的光化学还原法, 具体步骤和计算参考唐学玺和李永祺<sup>[6]</sup>的方法。

### 1.4 过氧化物酶(POD)酶液的制备和酶活性的测定

POD 酶液的制备: 同 SOD, 但所用缓冲液为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 Tri-HCl 缓冲液, pH 8.5。

POD 酶活性的测定: 参照 Chance 和 Maehly<sup>[7]</sup>建立, Srivastava 和 van Huystee<sup>[8]</sup>改良的愈创木酚法。单位藻细胞 POD 活性的高低以 OD<sub>470</sub>·min<sup>-1</sup> 表示。

### 1.5 膜脂过氧化作用的测定

根据 Heath 和 Packer 等<sup>[9]</sup>及林植芳等<sup>[10]</sup>的方法测定过氧化产物丙二醛(MDA)的形成。1 克分子的丙二醛(MDA)可与 2 克分子的硫代巴比妥酸(TBA)形成红棕色的三甲川(trimethine)。将 1.5 mL 粗酶液加入 2.5 mL 含 0.5% 的硫代巴比妥酸的 20% 三氯乙酸溶液, 混合物于 100 ℃ 水浴上加热 30 min, 迅速冷却, 于 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 上清液分别于 532 nm 及 600 nm 测定。MDA 以 μmol·细胞数量<sup>-1</sup> 表示。MDA 含量按陈贵和张立军<sup>[11]</sup>的方法计算并略加修改。

$$\text{MDA 含量} [\mu\text{mol} \cdot 10^{-12}] = \frac{\text{OD}_{(532-600\text{nm})} \times V_1 \times \frac{S}{A}}{N_t \times V_2}$$

式中, MDA 为丙二醛,  $\frac{\text{OD}_{(532-600\text{nm})}}{155}$  表示 μmol·mL<sup>-1</sup> (MDA), V<sub>1</sub> 表示反应体积总量 (mL), V<sub>2</sub> 表示藻液总量 (mL), S 表示提取液总量 (mL), A 表示测定时用提取液总量 (mL), N<sub>t</sub> 表示 t 时刻单胞藻密度 (个·mL<sup>-1</sup>)。

## 1.6 电解质外渗率的测定

参照上海植物生理学会<sup>[12]</sup>的方法进行,电导度用 DDS - 11A 型电导率仪测定。

## 2 实验结果

### 2.1 低温胁迫下两个不同品系的球等鞭金藻超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化

低温(8℃)胁迫下球等鞭金藻 8071 和球等鞭金藻 3011 的 SOD 活性及其变化情况表现出明显的差异(图 1 和图 2)。球等鞭金藻 8071 在一周的培养时间内无论在低温(8℃)还是在适温(18℃)条件下始终保持着很高的活性,即在适温(18℃)下球等鞭金藻 8701 的 SOD 活性一直维持在(33.84 ± 0.94) ~ (35.36 ± 0.26)活性单位 · 10<sup>-9</sup>之间,而在低温(8℃)下,样品培养一天后,其 SOD 活性有所上升,即由实验初始的(34.36 ± 0.37)活性单位 · 10<sup>-9</sup>,提高到(35.18 ± 0.19)活性单位 · 10<sup>-9</sup>,与适温对照组比较差异显著(t 检验, P < 0.05),随后趋于下降,从实验的第 3 天开始,其 SOD 活性显著低于适温对照组 SOD 活性(P < 0.01),但至实验的第 7 天,其 SOD 活性仍可达(30.66 ± 0.28)活性单位 · 10<sup>-9</sup>,为对照的 88.09%,即低温不会使球等鞭金藻 8701 的 SOD 活性产生较大幅度的下降。与球等鞭金藻 8701 相比,球等鞭金藻 3011 细胞的 SOD 的活性要低得多,在适温(25℃)下培养一周,其 SOD 活性始终维持在(6.70 ± 0.24)活性单位 · 10<sup>-9</sup>左右,而在低温(8℃)条件下,其 SOD 活性在一周的培养时间内明显下降(P < 0.01),由实验初始的(6.70 ± 0.24)活性单位 · 10<sup>-9</sup>下降为(1.82 ± 0.07)活性单位 · 10<sup>-9</sup>,即其活性仅为实验初始的 27.16%。

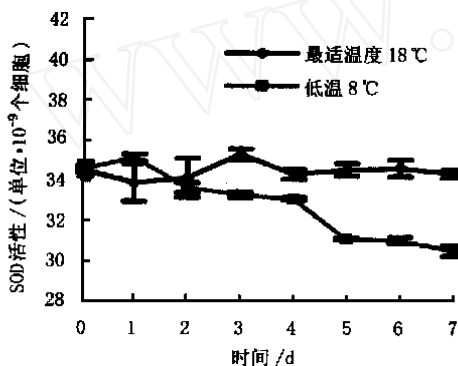


图 1 低温对球等鞭金藻 8701 超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Fig. 1 The effect of low temperature on SOD activity of *I. galbana* 8701

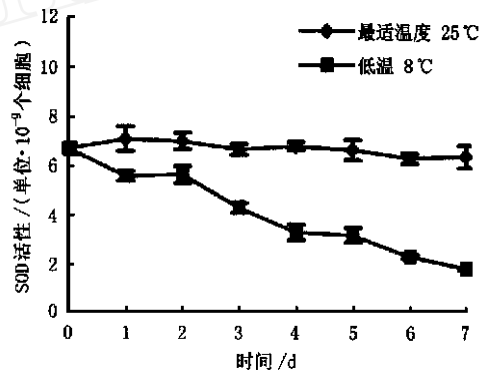


图 2 低温对球等鞭金藻 3011 超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Fig. 2 The effect of low temperature on SOD activity of *I. galbana* 3011

### 2.2 低温胁迫下两个不同品系的球等鞭金藻过氧化物酶(POD)活性的变化

两个不同品系的球等鞭金藻在低温及适温下的 POD 活性变化如图 3, 图 4 所示, 该结果显示, 在低温条件下球等鞭金藻 8701 的 POD 活性与其对照相比, 在实验后的第一天虽略有上升, 但差异不显著(P > 0.05), 随后其 POD 活性明显下降(P < 0.01), 由实验初始的(2.85 ± 0.20) OD<sub>470</sub> · min<sup>-1</sup> · 10<sup>-12</sup>下降为一周后的(1.84 ± 0.04) OD<sub>470</sub> · min<sup>-1</sup> · 10<sup>-12</sup>, 为对照的 64.56%; 与此同时, 球等鞭金藻 3011 的 POD 活性从实验后的第一天开始即与其适温对照组相比而明显下降(P < 0.01), 即由实验初始的(1.34 ± 0.10) OD<sub>470</sub> · min<sup>-1</sup> · 10<sup>-12</sup>下降为(0.56 ± 0.16) OD<sub>470</sub> · min<sup>-1</sup> · 10<sup>-12</sup>, 为其适温对照组 POD 活性的 41.79%。

### 2.3 低温胁迫下球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 膜脂过氧化程度的变化

图 5 结果显示,在低温(8℃)胁迫下,两种不同品系的球等鞭金藻的丙二醛(MDA)含量随胁迫时间均呈现增加趋势,但球等鞭金藻 8701 的丙二醛(MDA)的增加速度明显低于球等鞭金藻 3011 ( $P < 0.01$ ),其中球等鞭金藻 8701 细胞的 MDA 含量由实验初始的  $(0.94 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot 10^{-12}$ ,提高到一周后的  $(1.61 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot 10^{-12}$ ,与此同时,球等鞭金藻 3011 的 MDA 含量由实验初始的  $(1.10 \pm 0.09) \mu\text{mol} \cdot 10^{-12}$ ,提高到  $(2.94 \pm 0.17) \mu\text{mol} \cdot 10^{-12}$ ,即低温胁迫下球等鞭金藻 3011 丙二醛(MDA)含量的增加幅度大大高于球等鞭金藻 8701 的增加幅度,低温胁迫一周,球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 丙二醛(MDA)的相对含量分别为对照的 170.10%和 273.00%(图 6)。

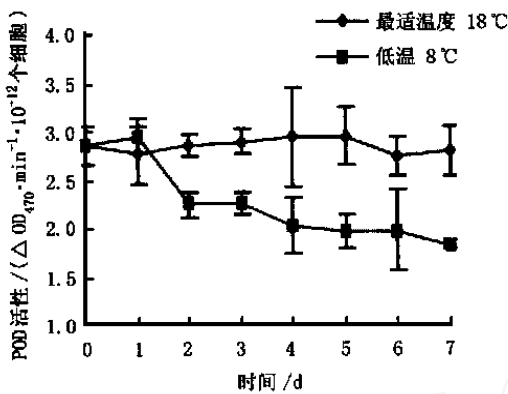


图 3 低温胁迫下球等鞭金藻 8701 POD 活性的变化

Fig. 3 The change of POD activity in *I. galbana* 8701 under low temperature stress

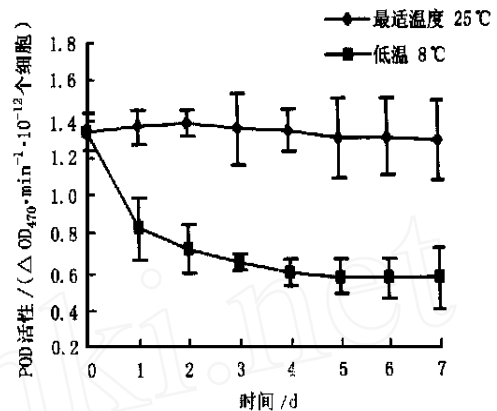


图 4 低温胁迫下球等鞭金藻 3011 POD 活性的变化

Fig. 4 The change of POD activity in *I. galbana* 3011 under low temperature stress

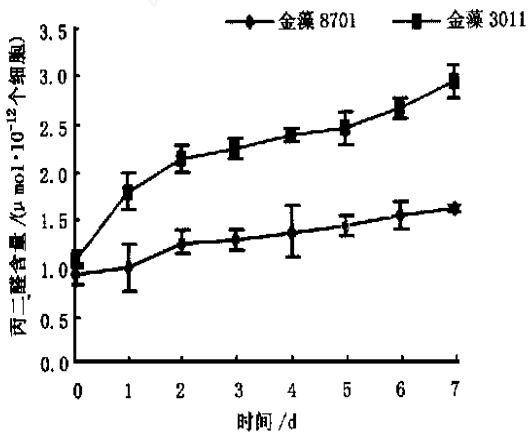


图 5 低温对球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 MDA 含量的影响

Fig. 5 The effect of low temperature on the content of MDA in *I. galbana* Parke 8701 and *I. galbana* Parke 3011

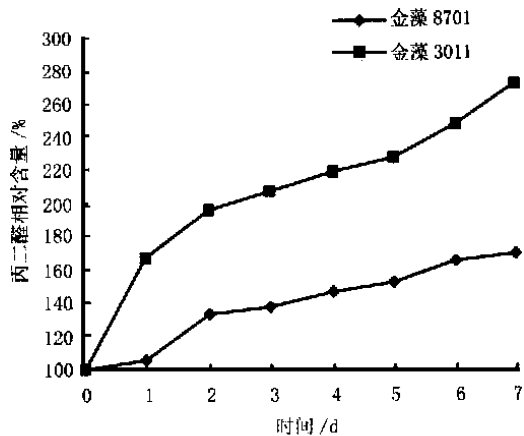


图 6 低温对球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 MDA 相对含量的影响

Fig. 6 The effect of low temperature on the relative content of MDA in *I. galbana* Parke 8701 and *I. galbana* Parke 3011

### 2.4 低温胁迫下球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 细胞膜透性变化的比较

植物细胞电解质大量泄漏,通常被认为是膜伤害或变性的一个重要指标。表 1 的结果表明,在低温胁迫下,球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 细胞的电解质外渗率与其最适温度下的对照相比均表现出上升的趋势,但其程度差异较大,其中球等鞭金藻 8701 的电解质外渗率由实验初始的 10.4%提高到一周

后的 35.7%。与此同时,球等鞭金藻 3011 的电解质外渗率由实验初始的 12.4% 提高到 75.5%。该结果表明,低温胁迫下球等鞭金藻 3011 电解质外渗程度和膜的伤害程度要比球等鞭金藻 8701 大得多。

表 1 低温(8℃)胁迫下球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 细胞膜电解质外渗率(%)变化的比较

Tab. 1 The comparison of electrolytic leakage(%) between *I. galbana* 8701 and *I. galbana* 3011 under low temperature(8℃) stress

		胁迫时间(d)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
金藻 8701	对照组	10.4 ±0.9	10.7 ±1.1	10.5 ±1.2	10.2 ±1.2	10.4 ±1.4	10.4 ±1.2	10.8 ±1.5	10.7 ±1.4
	处理组	10.4 ±0.9	13.8 ±1.6	18.6 ±1.5	22.5 ±2.2	26.7 ±2.4	30.2 ±3.5	34.1 ±3.9	35.7 ±4.2
金藻 3011	对照组	12.4 ±1.2	13.3 ±1.4	13.8 ±1.2	13.4 ±1.3	13.6 ±1.9	13.8 ±2.1	13.2 ±1.8	13.8 ±1.4
	处理组	12.4 ±1.2	29.8 ±3.1	33.7 ±2.2	45.3 ±3.0	50.9 ±2.9	58.7 ±4.4	65.7 ±4.4	75.5 ±3.5

### 3 讨论

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)是植物体内两种重要的保护性酶,它们具有清除植物细胞内的活性氧,保护植物体免受伤害的作用。研究证明,它们的活性与植物抗污染能力、耐低温能力和抗病性等逆境胁迫有关<sup>[13-15]</sup>。研究结果证明,球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 虽为同一藻种的两个不同品系,但其 SOD 活性差异很大,前者无论在适温还是低温胁迫下均表现出极高的 SOD 活性,同时低温对其 SOD 活性的影响较小,而后者在适温下 SOD 活性较低,并且在低温下其 SOD 活性大幅度下降,因此易受到低温胁迫产生的过量自由基的伤害。

一般认为 SOD 是一类含金属离子的酶,它由三种类型的同功酶组成,即 CuZn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD<sup>[16]</sup>,其中 Mn-SOD 比较稳定,而 CuZn-SOD 和 Fe-SOD 易受到逆境胁迫下所产生的过量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的钝化失去酶活性,由此推论球等鞭金藻 8701 SOD 同功酶的类型很可能以 Mn-SOD 为主,而球等鞭金藻 3011 在适温下的较低 SOD 活性和在低温下 SOD 活性急剧下降的研究结果又进一步说明,其 SOD 同功酶的类型不是以 Mn-SOD 为主,而很可能是以 CuZn-SOD 或 Fe-SOD 为主。这一点由 Clare<sup>[14]</sup>等对小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)的耐低温品系和低温敏感品系 SOD 同功酶的分析得到证实。

就两种不同品系球等鞭金藻的 POD 的活性而言,其活性差异不大,并且在低温下均表现出了明显的下降趋势,因此,可以认为球等鞭金藻 8701 的耐低温能力与其极高的 SOD 活性有关,POD 对其耐低温不起主要作用。

丙二醛(MDA)是植物细胞在逆境下发生膜脂过氧化作用的产物之一,通常将它作为膜脂过氧化作用强弱的一个重要指标<sup>[17]</sup>。我们的研究表明,低温胁迫下,球等鞭金藻 8701 的膜脂过氧化水平远远低于球等鞭金藻 3011 的膜脂过氧化水平,我们认为,这与前者 SOD 活性较后者的 SOD 活性高,因此清除自由基的能力较强有关。

许多逆境如低温<sup>[18]</sup>、疾病<sup>[19]</sup>、污染<sup>[15]</sup>等可导致植物 SOD 活性的降低和 MDA 含量的上升,使细胞的组成和结构受到破坏。研究结果进一步证明,低温胁迫下,球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 的 MDA 含量与其 SOD 活性呈显著的负相关,这一结果与曾绍西<sup>[18]</sup>等报导的水稻幼苗的低温伤害与膜脂过氧化的研究结果是一致的。

植物受到低温影响时,细胞的质膜透性会发生不同程度增大,导致电解质外渗,使电导率增加<sup>[20]</sup>,这种变化可作为抗寒性的生理指标。研究结果表明,低温胁迫一周,球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 的电解质外渗率的变化相差很大,前者的电解质外渗率大大低于后者,并且这一指标的变化情况与其 MDA 含量的变化是一致的。Halliwell<sup>[21]</sup>认为,MDA 是过氧化产物,又是一种能强烈地与细胞内各种成分发生反应的物质,因而引起对酶和膜的严重损伤和膜电阻及膜的流动性降低,最终导致膜的结构及生理完整性的破坏。我们认为,低温胁迫首先使球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 的酶活性产生更大差异,使后者细胞的 SOD 活性大幅度下降,从而导致其膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量的迅速

上升,造成膜结构与组成的破坏,使电解质外渗率大大增加,而前者在低温下表现出的较低电解质外渗率和膜脂过氧化水平恰恰是由于其 SOD 活性较高,并且受低温影响较小的缘故。

另外,我们认为低温胁迫下,与 SOD 相比,POD 对降低球等鞭金藻 8701 和球等鞭金藻 3011 的膜脂过氧化水平和电解质外渗率,以减轻低温对其伤害的过程中不起主要作用。

### 参考文献:

- [ 1 ] 周汝伦,孙在仁,杨 震,等.金藻 8701 的分离、培养和应用初报[J].海洋湖沼通报,1990,1:34 - 40.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] 周汝伦,孙爱淑,杨 震,等.鞭金藻 8701 培养液的营养组成研究[J].海洋湖沼通报,1994,1:17 - 24.
- [ 4 ] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel[J]. Anal Biochem, 1971, 44:276.
- [ 5 ] Bewley R D. Physiological aspects of desiccation tolerance[J]. Ann Rev Plant Physiol,1979, 20:195.
- [ 6 ] 唐学玺,李永祺.久效磷对海洋微藻毒性机理的初步研究.超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性的变化[J].环境科学学报,1998,18(2):204 - 207.
- [ 7 ] Chance B, Maehly A C. Method in enzymology[M]. New York: Academic Press Inc,1955.764 - 775.
- [ 8 ] Srivastava O P, van Huystee P B. Evidence forelose association of POD Polyphenol oxidase and IAA oxidase isoenzyme of peanut suspension culture medium[J]. Can J Bot,1973,51:2207.
- [ 9 ] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Arch Biochem Biophys,1968,125:189 - 198.
- [ 10 ] 林植芳,李双顺,林桂珠.水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J].植物学报,1984,26(6):605 - 615.
- [ 11 ] 陈 贵,张立军.植物体内 MDA 含量单位与计算方法的一些问题[J].植物生理学通讯,1991,27(3):203.
- [ 12 ] 上海植物生理学会.植物生理学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1985.66 - 67.
- [ 13 ] 王健华,刘鸿先,徐 同.超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老中的作用[J].植物生理学通讯,1989,(1):1 - 7.
- [ 14 ] Clare D C,Rabinowitch H D, Fridovich I. Superoxide dismutase and chilling injury in *Chlorella ellipsoidea* [J]. Rchives of Biochemistry and Biophysics,1984,231(1):158 - 163.
- [ 15 ] 唐学玺,李永祺.有机磷农药对海洋微藻毒性的生物学研究[J].海洋学报,1997,19(1):139 - 143.
- [ 16 ] 方允中,李文杰.自由基与酶——基础理论及其在生物学和医学中的应用[M].北京:科学出版社,1989.71 - 89.
- [ 17 ] Stewart R C,Bewley J D.Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol,1980,70:245 - 248.
- [ 18 ] 曾绍西,王以柔.水稻幼苗的低温伤害与膜脂过氧化[J].植物学报,1987,29(5):506 - 511.
- [ 19 ] 王雅平.小麦对赤霉病抗性不同品种的 SOD 活性[J].植物生理学报,1993,19(4):353 - 358.
- [ 20 ] 王荣富.植物抗害性指标的种类及其应用[J].植物生理学通讯,1987,(3):49 - 55.
- [ 21 ] Halliwell B. Chloroplast metabolism ,the structure and function of chloroplasts in green leaf cells[M]. Oxford:Charendon Press,1981.186.