

高温胁迫对盐藻和塔胞藻叶绿素荧光动力学的影响

梁英, 冯力霞, 田传远, 王帅

(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: 利用调制式叶绿素荧光仪 (Water-PAM) 测定了高温胁迫 (35~50 ℃) 下盐藻 (*Dunaliella salina*) 和塔胞藻 (*Pyramimonas* sp.) 叶绿素荧光动力学特性的变化。测定的主要参数有: 光系统II (PSII) 的最大光能转化效率 (F_v/F_m), PSII 的潜在活性 (F_v/F_o), PSII 的实际光能转化效率 ($\Phi_{PSII} = \text{yield}$), 光合电子传递效率 (ETR), 光化学淬灭 (qP) 和非光化学淬灭 (NPQ)。结果表明, 与对照组 (25 ℃) 相比, 高温胁迫下 2 种绿藻的叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 Φ_{PSII} 、ETR 和 qP 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; 高温胁迫下盐藻的 NPQ 先升高后下降。塔胞藻的 NPQ 随时间的变化趋势与温度有关, 35 ℃ 和 45 ℃ 处理下, 塔胞藻的 NPQ 随着处理时间的延长而逐渐下降; 40 ℃ 处理下 NPQ 则先下降后上升。盐藻的耐热性较好, 在 40 ℃ 和 45 ℃ 下处理 10 min 后, 经过一定的时间各荧光参数可恢复到接近对照水平, 在 50 ℃ 下处理 10 min 后各荧光参数则不能恢复。塔胞藻的耐热性较差, 在 35 ℃ 和 40 ℃ 处理 10 min 后, 经过一定的时间后各荧光参数可基本恢复, 而在 45 ℃ 下处理 10 min 后则不能恢复。本研究还对高温胁迫下 2 种绿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。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 961-968]

关键词: 高温胁迫; 盐藻; 塔胞藻; 叶绿素荧光动力学

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)06-0961-08

海洋微藻计有 3 万余种, 是海洋主要初级生产力的提供者。某些微藻种类可大规模培养, 是水产动物的优质饵料。微藻的生长和光合作用受到许多因子的影响, 其中温度是重要的影响因素之一^[1-6]。微藻对温度的变化很敏感, 在一定范围内温度的上升, 可促进微藻的生长, 超过这一界限, 微藻的生长和光合作用就会受到抑制。高温可导致生长率下降, 藻细胞直径增加, 光合作用受到抑制, 细胞分裂延迟等^[1,4]。研究温度变化对微藻的影响有着重要的理论和实际意义。

目前有关温度对微藻影响的报道较多, 但大多集中在温度对微藻生长、生化组成的影响方面, 有关温度对微藻光合作用影响的报道较少^[1-3,7]。研究结果表明, 高温主要破坏光系统 II (PSII), 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]。利用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^[1]。该技术与其他方法相比, 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

微藻品种进行过初步研究^[1-3,7]。

盐藻 (*Dunaliella salina*) 是不具细胞壁的单细胞海洋微藻, 抗逆能力强, 因其细胞内胡萝卜素和甘油含量丰富而受到人们重视^[8]。塔胞藻 (*Pyramimonas* sp.) 是水产动物的优质饵料, 自从张福绥等^[9]采集分离出塔胞藻后, 该藻一直广泛应用于水产动物人工育苗特别是贝类育苗中。到目前为止, 还未见高温胁迫对盐藻和塔胞藻叶绿素荧光动力学影响的报道。本实验利用调制式叶绿素荧光仪 (Water-PAM) 研究了高温胁迫对盐藻和塔胞藻叶绿素荧光动力学的影响, 以期对 2 种绿藻的培养和光合作用研究提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用盐藻 (*Dunaliella salina*, MACC/C43) 和塔胞藻 (*Pyramimonas* sp., MACC/C98) 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, 培养温度为 (25 ± 1) ℃, 光照强度为 100 μmol/(m²·s)。培养过程中不充气, 每日

收稿日期: 2007-01-25. 修订日期: 2007-06-25.

基金项目: 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题资助 (200603).

作者简介: 梁英 (1967-), 女, 博士, 教授, 主要从事微藻生理生化研究. E-mail: yiliang@ouc.edu.cn

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,使盐藻和塔胞藻的细胞密度维持在 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ ind/mL。

1.3 高温胁迫处理

以25℃水浴条件为对照,根据预实验结果,将处于指数生长期的盐藻放入40℃、45℃、50℃的水浴中进行高温胁迫处理;将塔胞藻放入35℃、40℃、45℃的水浴中进行高温胁迫处理。每个温度设3个平行组。定时取样,测量其叶绿素荧光参数的变化情况。光照强度为 $20 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.4 恢复实验

将处于指数生长期的藻细胞分别置于上述温度的水浴中处理10 min后,停止高温胁迫,将其置于常温25℃弱光下恢复,定时取样,测量其叶绿素荧光参数,观察其恢复情况,每个温度3个平行组,对照组藻细胞未经胁迫处理。

1.5 叶绿素荧光参数的测定

用德国Walz公司产Water-PAM水样叶绿素荧光仪(Walz, Effeltrich, Germany)进行叶绿素荧光各参数的测定。测量前将微藻样品暗适应15 min。叶绿素荧光参数PSII的最大光能转化效率(F_v/F_m)、PSII的实际光能转化效率(ΦPSII)、光合电子传递

效率(ETR)、光化学淬灭(qP)和非光化学淬灭(NPQ)可在荧光仪上直接读出,PSII的潜在活性(F_v/F_o)则用公式 $(F_m - F_o)/F_o$ 计算出,其中基础荧光 F_o 用弱测量光 $[0.01 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})]$ 测量可得,用饱和脉冲($4000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),持续时间为0.8 s)激发可得最大荧光 F_m 。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫对叶绿素荧光参数的影响

高温(40℃、45℃、50℃)胁迫对盐藻叶绿素荧光参数的影响见表1。从表1可见,与对照相比,高温胁迫下盐藻的叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、ETR和qP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。40℃下处理60 min, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 、ETR和qP与对照组相比分别下降了10%、31%、27%、27%和15%;NPQ则上升了31%。45℃下处理60 min, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ΦPSII 和ETR与对照组相比分别下降了79%、93%、96%和96%,qP在处理20 min时已下降为0;NPQ在处理30 min时上升至最大值0.86,至60 min时又下降为0.32。50℃下处理18 min后,各荧光参数均下降为0。

表1 高温(40℃、45℃、50℃)胁迫下盐藻叶绿素荧光参数随处理时间的变化情况

Tab.1 Changes of fluorescence parameters of *Dunaliella salina* with time under high temperatures (40℃, 45℃, 50℃) exposure

$n=3; \bar{X} \pm \text{SD}$

胁迫温度/℃ Stress temperature	胁迫时间/min Stress time	叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameter					
		PSII的最大光能转化效率 F_v/F_m	PSII的潜在活性 F_v/F_o	PSII的实际光能转化效率 ΦPSII	光合电子传递效率 ETR	光化学淬灭 qP	非光化学淬灭 NPQ
40℃	0	0.74 ± 0.00	2.87 ± 0.02	0.52 ± 0.01	35.93 ± 0.72	0.73 ± 0.01	0.12 ± 0.03
	10	0.69 ± 0.01	2.46 ± 0.17	0.44 ± 0.00	30.23 ± 0.21	0.67 ± 0.00	0.11 ± 0.02
	20	0.67 ± 0.01	2.01 ± 0.06	0.41 ± 0.00	28.00 ± 0.30	0.65 ± 0.01	0.13 ± 0.02
	30	0.66 ± 0.01	1.97 ± 0.06	0.40 ± 0.00	27.43 ± 0.32	0.64 ± 0.01	0.14 ± 0.01
	40	0.66 ± 0.00	1.93 ± 0.04	0.39 ± 0.00	26.67 ± 0.15	0.63 ± 0.00	0.14 ± 0.04
	50	0.66 ± 0.01	1.98 ± 0.06	0.39 ± 0.00	27.00 ± 0.26	0.64 ± 0.01	0.15 ± 0.02
	60	0.66 ± 0.01	1.98 ± 0.06	0.38 ± 0.00	26.37 ± 0.06	0.63 ± 0.00	0.16 ± 0.02
45℃	0	0.74 ± 0.00	2.87 ± 0.02	0.52 ± 0.01	35.93 ± 0.72	0.73 ± 0.01	0.12 ± 0.03
	10	0.65 ± 0.01	1.88 ± 0.08	0.38 ± 0.01	26.33 ± 0.45	0.64 ± 0.00	0.15 ± 0.01
	20	0.54 ± 0.03	1.19 ± 0.15	0.16 ± 0.04	10.70 ± 2.76	0.00 ± 0.00	0.71 ± 0.02
	30	0.40 ± 0.07	0.68 ± 0.21	0.12 ± 0.00	8.27 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.86 ± 0.01
	40	0.28 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.11 ± 0.00	7.80 ± 0.30	0.00 ± 0.00	0.84 ± 0.03
	50	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.06 ± 0.00	4.05 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.71 ± 0.01
	60	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.02 ± 0.00	1.45 ± 0.35	0.00 ± 0.00	0.32 ± 0.00
50℃	0	0.74 ± 0.00	2.87 ± 0.02	0.52 ± 0.01	35.93 ± 0.72	0.73 ± 0.01	0.12 ± 0.03
	3	0.66 ± 0.01	2.04 ± 0.02	0.40 ± 0.04	24.34 ± 2.39	0.65 ± 0.00	0.18 ± 0.04
	6	0.40 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.25 ± 0.02	9.99 ± 0.69	0.50 ± 0.01	0.54 ± 0.05
	9	0.27 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.12 ± 0.00	5.34 ± 0.04	0.31 ± 0.01	0.12 ± 0.04
	12	0.09 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	1.02 ± 0.02	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.01
	15	0.04 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	18	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

表 2 表示高温 (35 ℃, 40 ℃, 45 ℃) 胁迫对塔胞藻叶绿素荧光参数的影响。从表 2 可以看出, 除 NPQ 外, 高温胁迫下塔胞藻其他荧光参数的变化趋势与盐藻相同, 荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $\Phi PS II$ 、ETR 和 qP 均随着处理温度的升高, 处理时间的延长而下降, 处理时间越长、处理温度越高, 下降幅度越大。与对照相比, 35 ℃ 下处理 60 min, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $\Phi PS II$ 、ETR 和 qP 与 0 时间点比较分别下

降了 20%、45%、16%、16% 和 14%; NPQ 随着胁迫时间的延长逐渐下降, 至 20 min 时已降至 0。40 ℃ 下处理 60 min 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $\Phi PS II$ 、ETR 和 qP 与 0 时间点比较分别下降了 60%、83%、51%、84% 和 53%, 处理 10 min 时 NPQ 下降至接近 0, 至 60 min 时又上升为 0.48; 45 ℃ 下处理 18 min 后, 各荧光参数均降为 0。

表 2 高温 (35 ℃, 40 ℃, 45 ℃) 胁迫下塔胞藻叶绿素荧光参数随处理时间的变化情况

Tab. 2 Changes of fluorescence parameters of *Pyramimonas* sp. with time under high temperatures (35 ℃, 40 ℃, 45 ℃) exposure
n = 3; $\bar{X} \pm SD$

胁迫 温度 /℃ Stress temperature	胁迫 时间 /min Stress time	叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameter					
		PSII 的最大 光能转化效 率 F_v/F_m	PSII 的潜在 活性 F_v/F_o	PSII 的实际 光能转化效 率 $\Phi PS II$	光合电子传 递效率 ETR	光化学淬灭 qP	非光化学 淬灭 NPQ
35 ℃	0	0.69 ± 0.01	2.21 ± 0.07	0.44 ± 0.01	30.20 ± 0.44	0.75 ± 0.02	0.34 ± 0.03
	10	0.63 ± 0.00	1.68 ± 0.02	0.38 ± 0.01	26.40 ± 0.79	0.64 ± 0.02	0.07 ± 0.02
	20	0.60 ± 0.01	1.53 ± 0.06	0.36 ± 0.01	24.83 ± 0.65	0.59 ± 0.01	0.00 ± 0.00
	30	0.58 ± 0.02	1.39 ± 0.10	0.35 ± 0.01	24.30 ± 0.75	0.59 ± 0.04	0.00 ± 0.00
	40	0.57 ± 0.02	1.34 ± 0.08	0.37 ± 0.01	25.60 ± 0.66	0.63 ± 0.02	0.00 ± 0.00
	50	0.56 ± 0.02	1.27 ± 0.09	0.36 ± 0.01	24.80 ± 0.36	0.63 ± 0.03	0.00 ± 0.00
	60	0.55 ± 0.02	1.22 ± 0.11	0.37 ± 0.00	25.33 ± 0.23	0.65 ± 0.02	0.00 ± 0.00
40 ℃	0	0.69 ± 0.01	2.21 ± 0.07	0.44 ± 0.01	30.20 ± 0.44	0.75 ± 0.02	0.34 ± 0.03
	10	0.40 ± 0.01	0.68 ± 0.04	0.21 ± 0.00	14.50 ± 0.28	0.53 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	20	0.28 ± 0.05	0.39 ± 0.10	0.13 ± 0.01	8.90 ± 0.71	0.45 ± 0.03	0.24 ± 0.04
	30	0.36 ± 0.01	0.57 ± 0.03	0.13 ± 0.00	8.10 ± 0.99	0.31 ± 0.13	0.40 ± 0.01
	40	0.35 ± 0.01	0.55 ± 0.03	0.12 ± 0.00	8.25 ± 0.07	0.29 ± 0.03	0.33 ± 0.04
	50	0.35 ± 0.06	0.55 ± 0.14	0.10 ± 0.01	6.55 ± 1.06	0.36 ± 0.07	0.35 ± 0.08
	60	0.28 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.08 ± 0.02	4.90 ± 0.28	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.06
45 ℃	0	0.69 ± 0.01	2.21 ± 0.07	0.44 ± 0.01	30.20 ± 0.44	0.75 ± 0.02	0.34 ± 0.03
	3	0.42 ± 0.00	1.77 ± 0.04	0.35 ± 0.01	23.65 ± 0.69	0.62 ± 0.02	0.30 ± 0.05
	6	0.20 ± 0.00	0.82 ± 0.03	0.13 ± 0.04	10.32 ± 0.37	0.39 ± 0.02	0.12 ± 0.03
	9	0.10 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	3.27 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
	12	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	15	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	18	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

2.2 高温胁迫停止后叶绿素荧光参数的恢复情况

高温胁迫 10 min 后, 盐藻叶绿素荧光参数恢复情况如表 3 所示。40 ℃ 处理 10 min 并于常温 (25 ℃) 弱光下培养 30 min 后, 各荧光参数基本恢复。 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $\Phi PS II$ 、ETR 和 qP 分别恢复为对照的 99%、96%、98%、98% 和 99%; 45 ℃ 下处理 10 min 并于常温 (25 ℃) 弱光下恢复 300 min 后, 各参数分别恢复为对照的 95%、82%、94%、93% 和

100%; 50 ℃ 下处理 10 min 恢复 60 min 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 恢复为对照的 2% 和 0.4%, $\Phi PS II$ 、ETR 和 qP 均已降为 0, 表明上述荧光参数不能恢复。NPQ 的变化趋势则与其他参数相反。40 ℃ 和 45 ℃ 下处理 10 min 后, 此值增大, 随恢复时间的延长而逐渐下降, 并恢复到对照水平; 50 ℃ 下处理 10 min 后, NPQ 稍有增大, 随恢复时间的延长而降低, 恢复至 60 min 时 NPQ 接近 0。

表3 高温(40℃, 45℃, 50℃)胁迫10 min后, 盐藻叶绿素荧光参数在常温(25℃)下的恢复情况

Tab.3 Fluorescence parameters of *Dunaliella salina* during recovery under control conditions (25℃)

after high temperature (40℃, 45℃, 50℃) exposure

 $n=3; \bar{X} \pm SD$

处理组 Treatment group	时间 /min Time	叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameter					
		PSⅡ的最大 光能转化效率 F_v/F_m	PSⅡ的潜在 活性 F_v/F_o	PSⅡ的实际 光能转化效率 $\Phi PSⅡ$	光合电子传 递效率 ETR	光化学淬灭 qP	非光化学 淬灭 NPQ
对照 Control		0.74±0.00	2.87±0.02	0.52±0.01	35.93±0.72	0.73±0.01	0.12±0.01
40℃胁迫 40℃ Stress	10	0.71±0.01	2.35±0.15	0.45±0.01	31.70±0.20	0.69±0.00	0.16±0.00
25℃恢复 Recovery	3	0.71±0.00	2.45±0.06	0.46±0.00	31.60±0.10	0.70±0.01	0.18±0.01
	9	0.72±0.00	2.55±0.03	0.48±0.01	32.97±0.35	0.71±0.01	0.15±0.01
	15	0.72±0.00	2.64±0.02	0.49±0.01	34.07±0.50	0.71±0.01	0.12±0.01
	21	0.73±0.00	2.70±0.04	0.50±0.00	34.57±0.32	0.72±0.01	0.12±0.01
	24	0.73±0.00	2.69±0.05	0.50±0.01	34.80±0.36	0.72±0.01	0.11±0.01
	27	0.73±0.00	2.72±0.05	0.51±0.00	35.10±0.26	0.72±0.01	0.09±0.01
	30	0.73±0.00	2.75±0.01	0.51±0.00	35.07±0.25	0.72±0.00	0.09±0.00
45℃胁迫 45℃ Stress	10	0.61±0.01	1.60±0.05	0.24±0.01	16.25±0.92	0.85±0.05	0.87±0.05
25℃恢复 Recovery	10	0.47±0.01	0.89±0.04	0.22±0.02	14.90±1.13	0.67±0.06	0.27±0.06
	30	0.52±0.08	1.10±0.27	0.31±0.01	21.20±0.99	0.67±0.00	0.14±0.00
	60	0.60±0.00	1.53±0.03	0.40±0.01	27.30±0.85	0.70±0.01	0.09±0.01
	120	0.65±0.00	1.87±0.02	0.43±0.00	29.55±0.07	0.70±0.02	0.11±0.02
	180	0.67±0.00	1.99±0.02	0.45±0.00	31.15±0.07	0.71±0.00	0.08±0.00
	240	0.68±0.00	2.16±0.03	0.46±0.00	31.95±0.35	0.71±0.01	0.12±0.01
	300	0.70±0.01	2.34±0.08	0.49±0.00	33.55±0.35	0.73±0.00	0.13±0.00
50℃胁迫 50℃ Stress	7	0.31±0.06	0.45±0.13	0.11±0.07	4.93±2.63	0.29±0.12	0.14±0.12
25℃恢复 Recovery	10	0.21±0.00	0.26±0.01	0.02±0.01	1.35±0.49	0.19±0.07	0.11±0.07
	10	0.18±0.00	0.23±0.00	0.01±0.00	0.50±0.14	0.09±0.03	0.11±0.03
	20	0.18±0.01	0.22±0.01	0.00±0.00	0.05±0.07	0.02±0.03	0.11±0.03
	30	0.17±0.01	0.21±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.11±0.00
	40	0.17±0.01	0.21±0.02	0.00±0.00	0.10±0.14	0.00±0.00	0.09±0.00
	50	0.03±0.00	0.04±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.02±0.00
	60	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00

高温胁迫10 min后, 塔胞藻叶绿素荧光参数恢复情况如表4所示。塔胞藻于35℃下处理10 min并于常温弱光下恢复30 min后, 各荧光参数基本恢复, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $\Phi PSⅡ$ 、ETR和qP分别恢复为对照的99%、98%、87%、87%和83%。40℃下处理10 min恢复150 min后上述各荧光参数分别恢复为对照的96%、88%、85%、84%和95%; 45℃下处理10 min恢复90 min后, F_v/F_m 和 F_v/F_o 分别恢复

为对照的6%和2%, $\Phi PSⅡ$ 、ETR和qP均已下降为0。35℃下处理10 min后NPQ随恢复时间的延长而逐渐上升, 至30 min时恢复为对照的61%; 40℃处理10 min后, NPQ降为0, 随着恢复时间的延长而逐渐上升, 并恢复到对照水平; 45℃下处理10 min后, NPQ有所下降, 恢复20 min内有所上升, 随后又逐渐下降, 至90 min时下降为0。

表 4 高温 (35 ℃, 40 ℃, 45 ℃) 胁迫 10 min 后, 塔胞藻叶绿素荧光参数在常温下 (25 ℃) 的恢复情况

Tab.4 Fluorescence parameters of *Pyramimonas* sp. during recovery under control conditions (25 ℃)

after high temperature (35 ℃, 40 ℃, 45 ℃) exposure

 $n = 3; \bar{X} \pm SD$

温度 /℃ Temperature	时间 /min Time	叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameters					
		PSⅡ 的最大 光能转化效率 F_v/F_m	PSⅡ 的潜在 活性 F_v/F_o	PSⅡ 的实际 光能转化效率 $\Phi PSⅡ$	光合电子传 递效率 ETR	光化学淬灭 qP	非光化学 淬灭 NPQ
对照 Control		0.73±0.01	2.73±0.09	0.47±0.01	32.50±0.44	0.73±0.02	0.31±0.07
35 ℃ 胁迫 35 ℃ Stress	10	0.69±0.01	2.22±0.13	0.45±0.01	31.20±0.95	0.67±0.02	0.06±0.02
25 ℃ 恢复 Recovery	3	0.69±0.01	2.24±0.10	0.42±0.00	28.63±0.15	0.63±0.00	0.10±0.04
	6	0.70±0.01	2.33±0.10	0.40±0.01	27.67±0.35	0.61±0.00	0.14±0.04
	9	0.70±0.01	2.39±0.10	0.39±0.00	27.27±0.35	0.60±0.01	0.16±0.03
	12	0.71±0.01	2.41±0.12	0.40±0.00	27.53±0.15	0.60±0.00	0.15±0.03
	15	0.71±0.01	2.49±0.06	0.40±0.00	27.80±0.10	0.61±0.01	0.17±0.02
	18	0.72±0.00	2.51±0.02	0.40±0.00	27.77±0.15	0.60±0.00	0.18±0.01
	21	0.72±0.01	2.61±0.08	0.41±0.01	28.27±0.81	0.61±0.01	0.18±0.02
	24	0.73±0.01	2.65±0.07	0.41±0.01	28.27±0.81	0.60±0.01	0.17±0.02
	30	0.73±0.01	2.68±0.10	0.41±0.00	28.23±0.31	0.61±0.01	0.19±0.01
40 ℃ 胁迫 40 ℃ Stress	10	0.47±0.01	0.89±0.05	0.23±0.03	16.07±1.99	0.50±0.04	0.00±0.00
25 ℃ 恢复 Recovery	10	0.54±0.02	1.18±0.10	0.24±0.04	16.50±2.46	0.43±0.05	0.00±0.00
	20	0.57±0.04	1.37±0.25	0.24±0.07	16.65±4.86	0.45±0.11	0.09±0.08
	30	0.60±0.04	1.53±0.25	0.27±0.05	18.60±3.47	0.51±0.07	0.20±0.05
	50	0.64±0.05	1.78±0.36	0.30±0.06	20.70±4.35	0.57±0.08	0.33±0.06
	70	0.67±0.05	2.04±0.47	0.33±0.06	22.87±4.22	0.63±0.05	0.42±0.05
	90	0.68±0.04	2.12±0.34	0.35±0.05	24.07±3.53	0.65±0.03	0.43±0.04
	110	0.70±0.02	2.30±0.24	0.36±0.03	25.07±2.06	0.66±0.01	0.48±0.06
	130	0.70±0.02	2.35±0.18	0.39±0.02	26.77±1.38	0.69±0.01	0.45±0.05
	150	0.71±0.01	2.40±0.11	0.40±0.02	27.43±1.40	0.69±0.01	0.44±0.08
45 ℃ 胁迫 45 ℃ Stress	10	0.08±0.01	0.03±0.06	0.03±0.00	2.87±0.85	0.00±0.00	0.25±0.04
25 ℃ 恢复 Recovery	10	0.14±0.08	0.17±0.11	0.05±0.02	3.87±0.72	0.26±0.26	0.18±0.01
	20	0.31±0.04	0.47±0.06	0.06±0.01	4.40±0.44	0.37±0.02	0.20±0.03
	30	0.32±0.03	0.45±0.08	0.03±0.02	3.00±0.87	0.27±0.05	0.23±0.03
	40	0.29±0.00	0.30±0.09	0.00±0.00	1.63±0.42	0.19±0.05	0.22±0.02
	50	0.18±0.04	0.17±0.03	0.00±0.00	0.03±0.06	0.02±0.04	0.15±0.04
	60	0.14±0.03	0.10±0.02	0.00±0.00	0.03±0.06	0.03±0.05	0.10±0.03
	70	0.08±0.01	0.07±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.03±0.01
	80	0.06±0.01	0.04±0.01	0.00±0.00	0.07±0.12	0.03±0.06	0.01±0.01
	90	0.04±0.01	0.04±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

3 讨论

有关高温胁迫对微藻叶绿素荧光动力学的影响,目前的报道较少^[1-3,7]。这些学者的研究结果表明,高温胁迫下微藻的光合活性降低。本实验结果表明,经高温胁迫后,盐藻和塔胞藻的荧光参数

F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $\Phi PSⅡ$ 、ETR 和 qP 均明显下降。并且随着胁迫温度的升高,胁迫时间的延长,上述参数下降的幅度增大。 F_v/F_m 表示 PSⅡ 的最大光化学量子产量,即 PSⅡ 的原初光能转换效率。 F_v/F_o 表示 PSⅡ 的潜在活性^[11-12]。 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,并抑制光合

作用的原初反应,阻碍光合电子传递的过程。 $\Phi PS II$ 表示 $PS II$ 的实际光能转化效率, $\Phi PS II$ 的降低,说明高温胁迫阻止藻细胞同化力(NADPH, ATP)的形成,从而影响对碳的固定与同化。 qP 为光化学淬灭,反映了 $PS II$ 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 $PS II$ 反应中心的开放程度。 qP 的下降表明,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 $\Phi PS II$ 的下降是吻合的。 NPQ 即非光化学淬灭,反映的是 $PS II$ 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部分^[11-12]。盐藻 NPQ 的变化趋势与其他荧光参数相反,随着胁迫温度的升高和胁迫时间的延长, NPQ 逐渐增加,表明其卡尔文循环的活性受抑制的程度增大, $PS II$ 潜在的热耗散能力增强,有效避免或减轻因 $PS II$ 吸收过多光能而对光合作用器官的损伤,对藻体本身是一种保护作用。随着胁迫时间继续延长, NPQ 又开始下降,表明盐藻的正常生理功能受到严重伤害,对热能的耗散能力丧失。而塔胞藻的 NPQ 则随着胁迫时间的延长而降低,表明高温胁迫可导致该藻 $PS II$ 的潜在热耗散能力降低。研究表明,高等植物中的 NPQ 变化与叶黄素循环有关^[13-14],高温胁迫下盐藻和塔胞藻 NPQ 变化趋势的差异可能是由2种绿藻叶黄素循环过程不同而引起的,这有待于进一步实验证明。

在荧光分析中最常用的参数是 F_v/F_m ,在非胁迫条件下此参数变化很小,但在胁迫条件下,此参数变化较大。因此它是反映微藻生长环境良好与否的一个非常重要的参数^[15-18]。本实验结果表明,经高温胁迫后盐藻和塔胞藻的 F_v/F_m 明显下降,说明 $PS II$ 已受到损害。 $PS II$ 反应中心失活分为可逆失活和永久失活两种^[19]。盐藻在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 后,经过一定时间后 F_v/F_m 可恢复到接近对照水平;在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 后, F_v/F_m 则不能恢复。说明 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 后,盐藻的 $PS II$ 反应中心暂时失活,经过一定的时间后即可恢复。而 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 后,盐藻的 $PS II$ 反应中心遭到破坏,不能恢复。塔胞藻在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 后,经过一定的时间后 F_v/F_m 可基本恢复,而在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 后则不能恢复。说明在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 后,塔胞藻的 $PS II$ 反应中心暂时失活,经过一定的时间后即可恢复,而 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min ,塔胞藻的 $PS II$ 反应中心遭到破坏,不能恢复。

本实验结果表明,盐藻的耐热性较好,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 对它的生理状况不构成威胁, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 后,盐藻则受到伤害。塔胞藻的耐热性较差, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 对它的生理状况无明显影响,而 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min ,则使藻细胞受到致命伤害。梁英等^[1]对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)和纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)的高温胁迫研究结果表明,三角褐指藻耐热性较差,在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 对其生理状况已构成威胁。纤细角毛藻有较高的耐热性, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min ,对其生理状况有一定影响,但在常温弱光下可基本恢复,而 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 可使藻细胞受到致命伤害,3 h后死亡。黄仿等^[2-3]对等鞭藻(*Isochrysis galbana*)和角毛藻(*Chaetoceros sp.*)的研究结果表明,等鞭藻和角毛藻是耐热性较高的微藻品种, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

在高等植物和大型藻类中,有关高温胁迫机制的研究较多^[19-22]。研究结果表明, $PS II$ 是对高温最敏感的色素蛋白复合体之一,其活性在高温时受到抑制。类囊体膜对高温也非常敏感,高温可导致类囊体膜结构的改变,这种改变是由于D1蛋白结构的改变所引起的,高温使LHCII(捕光色素蛋白复合体II)与 $PS II$ 反应中心脱离^[19]。高等植物在受到高温胁迫时,其体内会产生1种或几种热应激蛋白(HSPs),这种蛋白质可减轻高温胁迫对植物体的不良影响^[20]。与高等植物不同的是,大型藻类中含有藻体蛋白,最复杂的藻体蛋白位于类囊体膜的表面。高温导致这些大型藻类 $PS II$ 失活,并且使藻胆蛋白降解^[22]。在较低等的藻类中,对蓝藻的高温胁迫研究较多^[5-6],但对其高温胁迫响应机制的研究远不及高等植物那样广泛。而其他微藻对高温胁迫的响应机制是否与高等植物和蓝藻相似还有待于进一步研究。

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植物光合作用的理想方法。本实验结果表明,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。这些荧光参数能否直接用作抗热品种鉴定指标,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。

4 结论

盐藻的耐热性较好,在 40 ℃ 和 45 ℃ 下处理 10 min 后对其生理状况不构成威胁,50 ℃ 处理 10 min 后,盐藻则受到不可逆伤害。塔胞藻的耐热性较差,35 ℃ 和 40 ℃ 下处理 10 min,对其生理状况无明显影响,而 45 ℃ 下处理 10 min 后,则使藻细胞受到不可逆伤害。本实验结果表明,某些叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $\Phi PS II$ 、ETR 可以作为筛选抗热微藻品种的参考指标。

参考文献:

- [1] 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,2006,36(3):427-433.
- [2] 黄仿,武宝环.热胁迫对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.
- [3] 黄仿,武宝环,陈贻竹.角毛藻热胁迫机理的活体制制叶绿素荧光研究[J].暨南大学学报:自然科学版,1996,17(3):80-85.
- [4] Sayed O H, El-shahed A M. Growth, Photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) in response to growth temperature[J]. Algologie, 2000, 21(3):283-290.
- [5] Wen X G, Gong H M, Lu C M. Heat stress induces an inhibition of excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but not to photosystem I in a cyanobacterium *Spirulina platensis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2005, 43:389-395.
- [6] 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 Sci, 2005, 168:1471-1476.
- [7] 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 (*Cyclindrotheca closterium*) [J]. Eur J Phycol, 2003, 38:133-142.
- [8] 柴玉荣,王天云,薛乐勋.新型生物反应器——杜氏盐藻研究进展[J].中国生物工程杂志,2004,24(2):30-33.
- [9] 张福绥,李淑英.塔胞藻在中国海的发现与应用[J].海洋科学,1983,6:49-50.
- [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] 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.
- [12] Van Kooten O, Snel J F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology [J]. Photosynth Res, 1990, 25:147-150.
- [13] 冯志立,冯玉龙,曹坤芳.光强对砂仁叶片光合作用光抑制及热耗散的影响[J].植物生态学报,26(1):77-82.
- [14] 彭长连,林桂珠.拟南芥叶黄素缺失突变体叶绿素荧光淬灭的特性[J].生物化学与生物物理进展,2003,30(2):251-256.
- [15] 赵会杰,邹奇,余振文.叶绿素荧光分析技术及其在植物光合机理研究中的应用[J].河南农业大学学报,2000,34(3):248-251.
- [16] Beardall J, Young E, Roberts S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation [J]. Aquat Sci, 2001, 63:44-69.
- [17] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide [J]. J Exp Bot, 2000, 51:659-668.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 利容千,王建波.植物逆境细胞及生理学[M].武汉:武汉大学出版社,2002:307-311.
- [21] Morgan-Kiss R, Ivanov A G, Williams J, et al. Differential thermal effects on the energy distribution between photosystem II and photosystem I in thylakoid membranes of a psychrophilic and mesophilic alga [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2002, 1561(2):251-265.
- [22] 武保环,韩志国,藏汝波.热胁迫对海洋红藻及绿藻叶绿素荧光的影响[J].暨南大学学报:自然科学版,2002,23(1):108-112.

Effects of high temperature stress on chlorophyll fluorescence kinetics of *Dunaliella salina* and *Pyramimonas* sp.

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

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

Abstract: Chlorophyll fluorescence can be readily measured by a range of fluorometers, which provides a quick, non-invasive, non-destructive assessment of the efficiency of photochemical conversion by PS II, thus it has become an increasingly powerful tool and widely used techniques in studies of photosynthesis in ma-

rine algae, particularly for investigations of stress physiology of microalgae. There are several chlorophyll fluorescence parameters that have been correlated to photosynthetic processes. One of the most commonly used parameters is the ratio of variable to maximal chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), the maximal photochemical efficiency of PS II or the maximal quantum yield of PS II, which has been shown to be a sensitive indicator of photosynthetic performance and photoinhibition. Moreover, other fluorescence parameters, such as actual photochemical efficiency of PS II in the light ($\Phi_{PSII} = \text{yield}$), the relative electron transport rate (rETR), the photochemical quenching (qP) and the non-photochemical quenching (NPQ) are also used in investigating photosynthesis by many plant physiologists. Microalgae plays an important role in aquatic primary productivity. Some microalgal species, which have high nutritional value and can grow well in large-scale cultures, are commonly used in many mariculture systems as food for certain aquatic animals. The growth and photosynthesis of microalgae are dependent on light, salinity, temperature and nutrient. Among the different culture conditions, temperature is one of the most important environmental factors limiting algae production. In this paper, the modulated chlorophyll fluorescence kinetics of *Dunaliella salina* and *Pyramimonas* sp. under high temperature stress (35–50 °C) were investigated with Water-PAM chlorophyll fluorometer. The results showed that the parameters F_v/F_m , F_v/F_o , Φ_{PSII} , ETR and qP decreased under high temperature stress in the two microalgae. The changing degree of the above parameters increased with the increase of temperature and exposure time. NPQ in the two microalgae exhibited different pattern of variation under high temperature stress. NPQ value in *D. salina* first increased then decreased, while that in *Pyramimonas* sp. first decreased then increased at 40 °C and only decreased at 35 °C and 45 °C during stress. The decrease of F_v/F_m and F_v/F_o indicated that high temperature stress resulted in major impairment of photochemical efficiency as well as inhibition of potential activity of PS II. Φ_{PSII} represents the actual photochemical efficiency of PS II reaction centers of light-adapted cells. The decline in Φ_{PSII} indicated that high temperature affected PS II electron transport and equivalented (NADPH and ATP) generation, leading to inhibition of carbon fixation and assimilation by the primary photochemical reactions. High temperature stress also resulted in decrease in ETR, which indicated inhibition and/or downregulation of photosynthesis. qP showing the proportion of light excitation energy converted to photochemical act by the active PS II reaction centers, representing the proportion of open PS II reaction centers. The decreased qP in high temperature-stressed cells might indicate a reduced photochemical utilization of the absorbed light energy and an increased proportion of closed/inactive reaction centers, which was in accordance with the decrease in Φ_{PSII} . Non-photochemical quenching (NPQ) is used to describe all quenching processes of PS II chlorophyll fluorescence that are not related to photochemistry. The first increases in NPQ might indicate increase of thermal dissipation of electron transport, thus protecting microalgal cells against damage from excess radiant energy absorption. The subsequent decline of NPQ might be related to the serious damage of physiological function resulting in lose of the ability to dissipate excess excitation energy by energy-dependent quenching mechanisms. Several previous studies have reported that chlorophyll fluorescence could be potentially used as a tool for temperature tolerance screening in some microalgal species. However, only limited microalgal species have been studied and a lot of further works with different microalgal species need to be done to confirm whether chlorophyll fluorescence could be used as a tool for temperature tolerance screening in microalgae. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 961–968]

Key words: high temperature stress; *Dunaliella salina*; *Pyramimonas* sp.; chlorophyll fluorescence kinetics

Corresponding author: LIANG Ying. E-mail: yliang@ouc.edu.cn