

# 坛紫菜叶状体营养细胞与生殖细胞叶绿素荧光特性比较

李家富<sup>1,2</sup>, 张 涛<sup>2</sup>, 陆勤勤<sup>3</sup>, 朱建一<sup>2</sup>, 沈宗根<sup>2</sup>, 刘兆普<sup>1</sup>, 王长海<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 常熟理工学院 应用技术研究院, 江苏 常熟 215500; 3. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

**摘要:** 利用叶绿素荧光技术对坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)叶状体营养细胞和生殖细胞的光能利用特性进行了比较。结果表明: 坛紫菜叶状体营养细胞和雌性生殖细胞的实际量子效率( $\Delta F/F_m$ )差异不明显, 但显著高于雄性生殖细胞; 快速光曲线测定表明雌、雄藻体营养细胞的最大相对电子传递速率( $rETR_{max}$ )相近, 但显著高于雄性生殖细胞; 不同生殖细胞半饱和光强( $I_k$ )无显著差异; 在生长光强下, 营养细胞和雌性生殖细胞  $rETR$ 、光化学猝灭( $qP$ )和非光化学猝灭( $NPQ$ )差异不明显, 而雄性生殖细胞  $rETR$ 、 $qP$  等荧光参数均显著低于营养细胞和雌性生殖细胞。本文表明坛紫菜叶状体营养细胞和雌性生殖细胞具有较高的光能利用能力, 能够将吸收的光能多数用于电子传递, 而雄性生殖细胞对光能的利用能力较低。

**关键词:** 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*); 生殖细胞; 营养细胞; 叶绿素荧光

中图分类号: S917.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)03-00821-05

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国特有的暖温带物种, 也是我国东南沿海广泛栽培的重要经济红藻。坛紫菜藻体由壳孢子萌发生长而成, 藻体属单倍体, 具配子体性质。坛紫菜藻体营养细胞生长分布均匀, 有性生殖器官分为果胞和精子囊器, 一般由藻体的末梢边缘部分营养细胞转化而来, 精子囊器细胞在形成时, 颜色逐渐淡化呈现白色或黄白色; 果胞及受精分裂形成的果孢子囊中细胞颜色较营养细胞深, 呈深紫红色<sup>[1]</sup>。紫菜叶状体生长在潮间带, 前人对叶状体营养细胞和生殖细胞的生长特性进行了研究<sup>[2-3]</sup>, 对生殖细胞的生理特征主要是对条斑紫菜和半叶紫菜进行了研究<sup>[4]</sup>。

叶绿素荧光技术在研究 PSII 对光能的吸收、分配、耗散等方面具有独特优势, 能够快速、准确、无损伤地检测植物光合电子传递能力等“内在性”特征, 是光合作用尤其是 PSII 功能研究的天然探针<sup>[5]</sup>。调制荧光技术首先应用在高等植物 PSII 原初反应和猝灭分析中, 是研究光合生理特性的重要方法<sup>[6-7]</sup>, 在大型藻类中的应用则较晚, 但已有研究表明该技术也能客观反映藻类光合特性<sup>[8-13]</sup>。

本文以坛紫菜叶状体为材料, 对不同生殖细胞及营养细胞叶绿素荧光特性进行了研究, 以求进一步了解紫菜叶状体发育过程中的光合特性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

用于测试的坛紫菜(图 1)于 11 月采自江苏省南通紫菜栽培海区, 2 h 内带回实验室, 挑选健康完整藻体进行预培养, 海水暗沉淀, 培养温度为 15℃, 光照强度为 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。预培养 1 d 后进行叶绿素荧光等指标的测定, 实验进行 3 次重复测定, 测定区域如图 1 序号标示。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 实际量子效率的测定

样品 PSII 实际量子效率采用 Water-PAM(Walz, Effeltrich, Germany)进行测定。将探头垂直对准藻体不同生殖细胞或营养细胞部位, 首先利用

收稿日期: 2012-02-22; 修回日期: 2012-10-12

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD13B00); 国家海洋局公益性行业专项(201105023); 农业部公益性专项(2009030 国家自然科学基金项目(40906085)

作者简介: 李家富(1989-), 男, 江苏泰州人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物学研究, E-mail: jjiafuli1987@126.com; 王长海, 通信作者, 教授, 博士生导师, 主要从事海洋生化工程研究, E-mail: chwang2001@sina.com; 张涛, 通信作者, 助理研究员, 博士, 主要从事海藻生物学研究, E-mail: zhangtofuy@126.com.



图 1 坛紫菜

Fig. 1 *Porphyra haitanensis*

1. 雄性生殖细胞测定区域; 2. 雌性生殖细胞测定区域; 3. 营养细胞测定区域

1. Determination area of male germ cells; 2. Determination area of female germ cells; 3. Determination area of vegetative cells

0.3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  调制红光和 64  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光化光, 测得该光照条件下荧光值( $F_t$ ); 随后提供 0.8 s 约 4 000  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  饱和脉冲光, 测得此光化光条件下最大荧光值( $F_m$ )。按以下公式计算 PSII 实际量子效率( $\Delta F/F_m$ ):

$$F/F_m = (F_m - F_t) / F_m$$

### 1.2.2 快速光曲线的测定

对样品依次提供 0 至 1 020  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  共 8 个光强梯度, 待不同光强下荧光值( $F_t$ )达到稳定后(约 20 s), 提供 0.8 s 约 4 000  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的饱和脉冲光以测得该光强下最大荧光( $F_m$ ), 按以下公式计算相对电子传递速率(rETR):

$$\text{rETR} = (F_m - F_t) / F_m I A \times 0.5$$

式中,  $I$  表示光照强度;  $A$  表示样品的吸光系数, 本文中设定为 0.85; 0.5 表示光能由两个光系统平均分配。

以光照强度作为  $X$  轴, rETR 为  $Y$  轴制作曲线即快速光曲线。参照 Platt 等的方法, 对快速光曲线进行拟合, 分别获得初始斜率、最大相对电子传递速率、半饱和光强等参数:

$$P = P_m (1 - e^{-\alpha \text{PAR}/P_m}) e^{-\beta \text{PAR}/P_m}$$

式中,  $P$  表示给定光强下的相对电子传递速率(rETR);  $\alpha$  表示快速光曲线初始斜率;  $P_m$  表示最大相对电子传递速率(rETR<sub>max</sub>)。

按以下公式计算半饱和光强( $I_k$ ):

$$I_k = P_m / \alpha$$

### 1.2.3 qP 和 NPQ 的测定

样品暗适应 20 min 后, 经远红光照射 20 s, 然后打开测量光, 测得最小荧光值( $F_0$ ); 然后提供 0.8 s 饱和脉冲光, 测定最大荧光值( $F_m$ ); 随后关闭光源, 40 s 后打开活化光(64  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ), 之后每隔 20 s 照射一次饱和脉冲光, 直至该活化光下最大荧光值( $F_m'$ )达到稳定。由以下公式计算光化学猝灭(qP)和非光化学猝灭(NPQ):

$$\begin{aligned} \text{qP} &= (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0) \\ \text{NPQ} &= (F_m - F_m') / F_m' \end{aligned}$$

## 1.3 统计分析

实验数据采用  $t$ -检验分析, 显著水平设为  $P < 0.05$ 。

## 2 实验结果

### 2.1 营养细胞与生殖细胞实际量子效率差异

在给定的光强下, 坛紫菜雌雄藻体营养细胞的  $F/F_m$  值非常接近, 均维持在 0.45 左右(图 2)。雌藻体营养细胞与雌性生殖细胞的  $F/F_m$  值无显著差异, 但雄藻体营养细胞  $F/F_m$  值显著高于雄性生殖细胞 ( $P < 0.05$ )。雌、雄生殖细胞间  $F/F_m$  值存在差异, 雌性生殖细胞  $F/F_m$  值显著高于雄性生殖细胞 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 营养细胞与生殖细胞快速光曲线比较

快速光曲线(RLC)的测定结果表明, 随着光照强度的提高, 样品相对电子传递速率(rETR)逐步上升, 随后达到一个相对平稳的阶段(图 3)。雌、雄藻体营养细胞的 RLC 没有明显差异, rETR 在光照强度为 400  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  左右均达到稳定阶段, 并维持在 11 至 15 之间。雌性生殖细胞与营养细胞 RLC 存在一定差异, 营养细胞的 rETR 略高于生殖细胞, 但差异

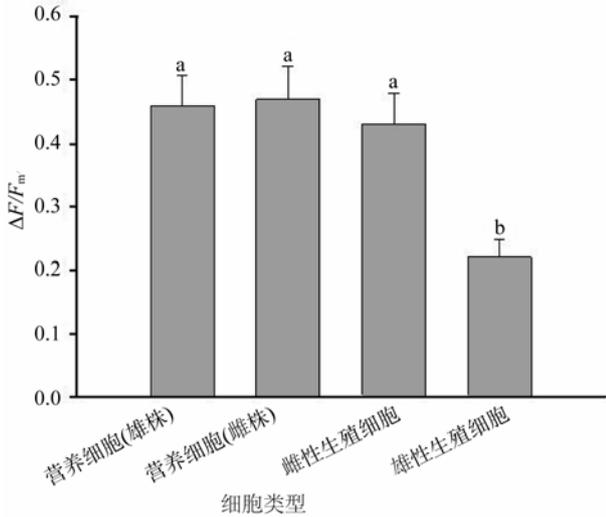


图2 营养细胞与生殖细胞实际量子效率比较

Fig. 2 Compare of yield between vegetative and germ cells of *P. haitanensis*

a, b 表示差异达到显著水平  
a, b means significant difference

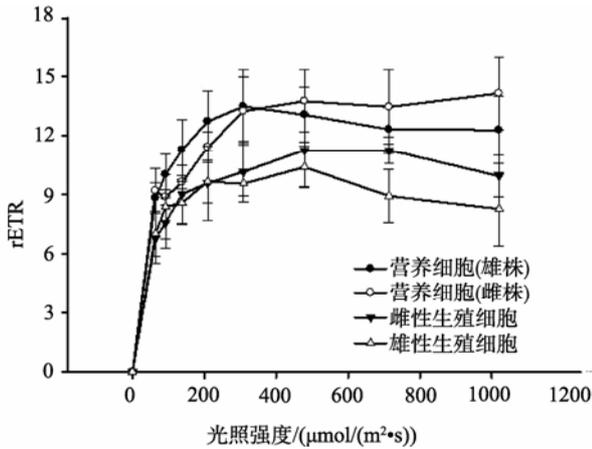


图3 营养细胞与生殖细胞快速光照曲线比较

Fig. 3 Compare of rapid light curves between vegetative and germ cells of *P. haitanensis*

不显著。雄藻体营养细胞的 rETR 明显高于雄性生殖细胞, 当光强超过  $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 营养细胞的

rETR 显著高于雄性生殖细胞( $P < 0.05$ )。由生殖细胞 RLC 的比较可知, 雌性生殖细胞 RLC 略高于雄性生殖细胞, 但差异不显著。

通过对 RLC 拟合, 获得了初始斜率( $\alpha$ )、相对最大电子传递速率( $r\text{ETR}_{\text{max}}$ )和半饱和光强( $I_k$ )等能够反映样品光合作用实际状态的重要参数。从表 1 可见, 雌藻体营养细胞与生殖细胞  $\alpha$ 、 $r\text{ETR}_{\text{max}}$  和  $I_k$  等参数比较均无显著差异; 雄藻体营养细胞  $\alpha$  和  $r\text{ETR}_{\text{max}}$  均显著高于雄性生殖细胞( $P < 0.05$ ),  $I_k$  无显著差异; 雌性生殖细胞  $\alpha$  显著高于雄性生殖细胞( $P < 0.05$ ), 但  $r\text{ETR}_{\text{max}}$  和  $I_k$  无显著差异。

### 2.3 营养细胞与生殖细胞 qP 和 NPQ 比较

诱导曲线的测定是通过对样品反应中心吸收的光能分配进行测定分析, 计算光化学猝灭(qP)和非光化学猝灭(NPQ 或 qN)<sup>[14]</sup>。qP 反映 PSII 原初电子受体  $Q_A$  的还原状态, qP 值越大则 PSII 电子传递活性越高<sup>[15]</sup>。考虑到测定的简便性, 本试验使用 NPQ 作为反映非光化学猝灭的指标。从表 2 可见, 在  $64 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  活化光条件下, 雌藻体营养细胞与雌性生殖细胞 rETR、qP 和 NPQ 均无显著差异, 但雌藻体营养细胞、雌性生殖细胞和雄藻体营养细胞 rETR 和 qP 均显著高于雄性生殖细胞, NPQ 则无显著差异。

### 3 讨论

叶绿素荧光技术在植物光合生理研究中已有广泛的应用, 能够客观反映光合生物自身的光合特性及环境适应能力<sup>[16-18]</sup>。通过叶绿素荧光测定方法中的快速光曲线(RLC)和诱导曲线的测定, 可从多个角度研究样品对光能的利用能力及对吸收光能的分配特征。本研究表明, 坛紫菜雌、雄藻体营养细胞叶绿素荧光参数间均无显著差异, 说明无论是雌藻体还是雄藻体, 其营养细胞的光能实际利用效率、光合电子传递能力及对光强的适应能力等较为一致。

表1 营养细胞与生殖细胞快速光曲线参数比较

Tab. 1 Compare of rapid light curve parameters between vegetative and germ cells of *P. haitanensis*

样品	初始斜率	相对最大电子传递速率	半饱和光强 $I_k (\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}))$
营养细胞(♂)	0.22±0.01 a	15.60±1.84 a	70.27±8.76 a
营养细胞(♀)	0.22±0.01 a	14.90±0.85 a	69.30±7.82 a
♀生殖细胞	0.18±0.02 a	11.30±0.80 a,b	62.78±8.49 a
♂生殖细胞	0.13±0.01 b	10.31±1.23 b	74.64±7.61 a

注: a, b 表示差异达到显著水平

表 2 营养细胞与生殖细胞 qP 和 NPQ 比较

Tab. 2 Compare of induction curve parameters between vegetative and germ cells of *P. haitanensis*

样品	相对电子传递速率 rETR	光化学猝灭 qP	非光化学猝灭 NPQ
营养细胞(♂)	11.63±0.66 a	0.44±0.03 a	0.82±0.18 a
营养细胞(♀)	12.53±0.71 a	0.46±0.05 a	0.75±0.15 a
♀生殖细胞	10.96±0.59 a	0.45±0.05 a	0.77±0.09 a
♂生殖细胞	9.75±0.58 b	0.38±0.02 b	0.73±0.17 a

注: a,b 表示差异显著

尽管雌性生殖细胞结构形态和藻体颜色上与营养细胞存在差异, 我们的试验结果表明二者的叶绿素荧光特征并无明显不同, 雌藻体营养细胞  $\Delta F/F_m$  和  $\alpha$ 、rETRmax 和  $I_k$  等参数仅略高于雌性生殖细胞, 但差别并没有达到显著水平, 雄藻体营养细胞与雌性生殖细胞的光合荧光参数同样差异不显著, 这说明雌性生殖细胞与雌、雄藻体营养细胞光能利用能力相似。

光合色素的含量与细胞光合活性密切相关, 光合色素含量较高通常会使得细胞光能利用能力提高<sup>[19-21]</sup>, 这种联系可能也是导致雄性生殖细胞叶绿素荧光参数与营养细胞间显著差异的重要原因, 雄性生殖细胞对光能的利用能力明显低于营养细胞, 且在给定光照条件下, 雄性生殖细胞的实际量子效率也低于营养细胞。雄性生殖细胞 rETRmax 显著低于营养细胞, 而  $I_k$  没有明显区别, 这说明在给定光照条件下, 雄性生殖细胞相对电子传递速率较营养细胞低, 但二者对光照强度的适应能力相似。上述结果与光合色素含量的研究相一致, 即雄性生殖细胞色素较营养细胞和雌性生殖细胞明显浅淡, 稍带黄、白色, 这种颜色的差异是因为细胞间光合色素含量和比例的不同所引起的<sup>[22]</sup>。诱导曲线的测定结果表明, 在给定活化光条件下, 营养细胞 rETR 和 qP 均显著高于雄性生殖细胞, 即雄性生殖细胞电子传递速率和光化学猝灭均处较低水平, 其吸收的光能用于光合电子传递部分明显低于营养细胞。雄性生殖细胞 NPQ 与营养细胞相似, 该参数与光适应能力相关。结合  $\Delta F/F_m$ 、RLC 和诱导曲线的测定结果, 推知在不同光照强度下, 雄性生殖细胞所吸收的光能用于光合电子传递所占比例明显低于营养细胞, 而用于热耗散的比例明显高于营养细胞, 雄性生殖细胞的这种高热耗散比例可能是其光适应能力与营养细胞相似的主要原因, 通过提高将吸收的光能以热耗散的形式消耗, 从而适应环境光照强度。

#### 参考文献:

- [1] 王素娟, 裴鲁青, 段德麟. 中国常见海藻超微结构 [M]. 宁波: 宁波出版社, 2004.
- [2] Lin A P, Wang G C, Yang F, et al. Photosynthetic parameters of sexually different parts of *Porphyra katadai* var. *hemiphylla* (Bangiales, Rhodophyta) during dehydration and rehydration[J]. *Planta*, 2009, 229: 803-810.
- [3] Yang R L, Zhou W, Shen S D, et al. Morphological and photosynthetic variations in the process of spermatia formation from vegetative cells in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) and their responses to desiccation [J]. *Planta*, 2012, 135(5): 885-893.
- [4] 杨睿灵, 乔洪金, 周伟, 等. 条斑紫菜叶状体不同区域光合活性的研究[J]. *海洋科学*, 2011, 8: 63-66.
- [5] Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis[C]// Schulze E D, Caldwell M M. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, 1995: 49-70.
- [6] 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: 444-448.
- [7] Henley W J, Levavasseur G, Franklin L A, et al. Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability [J]. *Planta*, 1991, 184: 235-243.
- [8] Hanelt D. Photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the South Chinese Sea [J]. *Mar Ecol Progr Ser*, 1992, 82: 199-206.
- [9] Herbert S K. Fluorescence characteristics of photoinhibition and recovery in a sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*[J]. *Plant Physiol*, 1988, 86: 946-951.
- [10] Zhang T, Shen Z, Xu P, et al. Analysis of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence characteristics of different strains of *Porphyra yezoensis*[J]. *J Appl Phycol*,

- 2011, DOI 10.1007/s10811-011-9708-x.
- [11] 张涛, 沈宗根, 姚春燕, 等. 基于叶绿素荧光技术的紫菜光适应特征研究[J]. 海洋学报, 2011, 33: 140-147.
- [12] 姚春燕, 张涛, 姜红霞, 等. 条斑紫菜不同品系藻体光合色素及叶绿素荧光参数比较[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2010, 33(2): 81-86.
- [13] 赵小波, 张学成, 许璞. 不同品系条斑紫菜光合效率比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版). 2010, 40(2): 57-62.
- [14] Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis[C]//Schulze E-D, Caldwell M M . Ecophysiology of Photosynthesis. Springer-Verlag, Berlin, 1995: 49-70.
- [15] 韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 59.
- [16] 张其德, 卢从明, 张启峰, 张世平. 几组杂交组合的杂交稻及其亲本光合特性的比较研究[J]. 生物物理学报, 1996, 12 (3): 511-516.
- [17] Schreiber U. Pulse-amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method[C]//Papageorgiou G G. Chlorophyll fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2004: 100-125.
- [18] White A J, Critchley C. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus [J]. Photosynth Res, 1999, 59: 63-72.
- [19] 周百成, 武宝轩, 曾呈奎, 等. 条斑紫菜的色素系统和光合作用的差异性[J]. 植物生物学, 1966, 9: 427-429.
- [20] Li Y, Wang G, Xu P, et al. Induction and characterization of green pigmentation mutant in *Porphyra yezoensis* Ueda [J]. Aquacult, 2008, 282: 117-123.
- [21] 潘光华. 不同性别来源的半叶紫菜华北变种和坛紫菜的生长发育以及生化特征比较[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [22] 张学成, 秦松, 马家海, 等. 海藻遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 184-225.

## Compare of chlorophyll fluorescence characteristics between vegetative and germ cells of *Porphyra haitanensis*

LI Jia-fu<sup>1,2</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>, LU Qin-qin<sup>3</sup>, ZHU Jian-yi<sup>2</sup>, SHEN Zong-gen<sup>2</sup>, LIU Zhao-pu<sup>1</sup>, WANG Chang-hai<sup>1</sup>

(1 .College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 . Department of Biology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China; 3. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China)

Received: Feb., 22, 2012

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; germ cell; vegetative cells; chlorophyll fluorescence

**Abstract:** Light utilization characteristics of vegetative and germ cells of *Porphyra haitanensis* were compared by technique of chlorophyll fluorescence. The results showed that the actual photochemical efficiency of PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) of the vegetative cells and female cells exhibited only a little difference, but they were both significantly higher than that of the male cells. The maximum relative electron transport rate ( $rETR_{max}$ ) of the vegetative cells and female cells were both significantly higher than that of the male cells. There was no significant difference in half saturating irradiance ( $I_k$ ) between the vegetative and germ cells. The vegetative cells and female cells had similar  $rETR$ , photochemical quenching (qP) and non-photochemical quenching (NPQ) under the growing light intensity, which were higher than those of the male cells. These results suggested that the vegetative cells and female cells of *P. haitanensis* could use light efficiently and most of absorbed light energy was used for photosynthetic electron transport, but the male cells had much lower light energy use efficiency.

(本文编辑: 梁德海)