

GeO₂ 对海带幼孢子体培育过程中 硅藻污染的抑制效应

李 涛^{1,2} 王飞久^{2*} 孙修涛² 汪文俊² 刘福利²
丁昌玲² 梁洲瑞² 刘 坤²

(¹青岛农业大学动物科技学院, 266109)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 采用叶绿素荧光技术,以光系统II最大荧光产量(Fv/Fm)为指标,结合形态显微观察,研究了 GeO₂ 在海带幼孢子体培育过程中菱形藻污染的抑制效应。结果表明,1)对于菱形藻,当 GeO₂ 浓度在 5 mg/L 以上时,对其 Fv/Fm 值有显著影响,达到或超过 15 mg/L 时菱形藻趋于死亡。2)对于海带幼孢子体,GeO₂ 浓度在 20 mg/L 以上时,对其 Fv/Fm 值有显著影响,达到或超过 30 mg/L 时其趋于死亡。3)对于受到菱形藻污染的海带幼孢子体,GeO₂ 浓度在 15 mg/L 以上时对其 Fv/Fm 值有显著影响,达到或超过 20 mg/L 时其趋于死亡。综合来看,当 GeO₂ 浓度为 5~15 mg/L 时,菱形藻光合作用受到较强的抑制,而对海带幼孢子体影响不大。

关键词 GeO₂ 海带幼孢子体 菱形藻 叶绿素荧光技术

中图分类号 S968.41⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0083-05

Suppressive effect of germanium dioxide on diatom contamination during cultivation of *Saccharina japonica* young sporophytes

LI Tao^{1,2} WANG Fei-jiu^{2*} SUN Xiu-tao² WANG Wen-jun²
LIU Fu-li² DING Chang-ling² LIANG Zhou-rui² LIU Kun²

(¹ College of Animal Science, Qingdao Agricultural University, 266109)

(² Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In the present study, using the chlorophyll fluorescence technique, the suppressive effect of germanium dioxide (GeO₂) on *Nitzschia* sp. contamination during the cultivation of *Saccharina japonica* seedling was investigated with the photosystem II maximum fluorescence yield (Fv/Fm) as the index. The results showed that: 1) When the concentration was above 5mg/L, GeO₂ affected Fv/Fm value of *Nitzschia* sp. significantly, whereas when the concentration was 15mg/L or above, GeO₂ had lethal effect on *Nitzschia* sp.; 2) To the young sporophytes of *S. japonica*, GeO₂ at concentrations of 20mg/L or above affected the Fv/Fm value significantly, whereas GeO₂ at concentrations of 30mg/L or above had lethal effect on young sporophytes; 3) To the young sporophytes contaminated by *Nitzschia* sp., the Fv/Fm

国家“863”项目(2012AA10A406)和海带行业专项(B22201002)共同资助

* 通讯作者。E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn, Tel: 13376488877

收稿日期:2012-02-21;接受日期:2012-04-06

作者简介:李 涛(1985-),男,硕士研究生,主要从事海藻生物学研究。E-mail: litaodemail@163.com

value was affected significantly by GeO_2 at concentrations of 15 mg/L or above, while the contaminated young sporophytes died when GeO_2 concentration was 20 mg/L or above. Comparatively, GeO_2 at concentrations of 5~15 mg/L could suppress the photosynthesis of *Nitzschia* sp. significantly, but only had a minor effect on photosynthesis of *S. japonica* young sporophytes. Therefore, GeO_2 at concentrations of 5~15 mg/L could prevent the *Nitzschia* sp. contamination during the cultivation of *S. japonica* young sporophytes. The results obtained from the present study could provide the basis for preventing the *Nitzschia* sp. contamination during the cultivation of *S. japonica* young sporophytes.

KEY WORDS Germanium dioxide *Saccharina japonica* sporophytes *Nitzschia* sp. Chlorophyll fluorescence technique

海带 *Saccharina japonica* 是我国重要的经济海藻之一,可作为海洋食品,亦可作为提取碘、褐藻胶和甘露醇等的工业原料,并可改善近海海洋环境,具有重要的社会经济与生态环境价值,其栽培规模和产量多年来一直位居海藻栽培的首位。海带栽培相关技术已相对成熟和完善,但是在海带种质(配子体克隆)保存和幼苗培育过程,还存在杂藻污染的问题。杂藻与海带配子体或幼孢子体共存,阻碍海带配子体或幼孢子体正常生长,严重时还会造成海带配子体或幼孢子体的死亡。硅藻是最常见的杂藻之一,由于其生长温度范围广、适应力强、繁殖迅速,且其与海带配子体的生长条件较为一致,一旦海带配子体或幼孢子体受到硅藻污染,采用限制光照、降低温度等处理方法难以达到去除效果(于波等 2004)。因此,研究海带种质保存和幼苗培育过程中硅藻污染的防治技术具有重要的应用价值。

锗是一种痕量元素,在高等植物中,锗可作为植物生长的调节剂,不仅能促进谷物、蔬菜和水果的生长,也可改进其品质(杨宁生等 1994)。研究表明,在微藻中低浓度锗常具有促进生长的作用,而高浓度锗则有抑制作用,严重时还会产生毒害作用(王大志等 2000)。马家海等(1989)发现经锗处理的蛋白核小球藻色素变淡或只留下空壁;高亚辉等(1997)观察到高浓度锗使得钝顶螺旋藻的丝状体变黄。这些研究说明藻类的光合色素可能会受到高浓度锗的影响。叶绿素荧光分析技术(Chlorophyll fluorescence measurements)是以光合作用理论为基础、利用叶绿素荧光作为天然探针、进行探测和研究植物光合作用生理状况以及各种外界环境因子对其细微影响的新型活体测定和诊断技术,具有快速、灵敏、对细胞无损伤的特点,是研究光合作用的良好探针(Heinrich *et al.* 1984;赵会杰等 2000)。该技术可以在不破损活体样品的情况下用来了解植物光合生理状态,判断其转化光能的效率,测定电子传递的速率,估计其受环境条件胁迫(如温度、光照等)的程度。目前国内利用叶绿素荧光技术对高等植物生理胁迫的研究报道较多,对微藻的研究也有相应的报道(梁英等 2007),但对大型海藻的研究较少(Baker *et al.* 2004; Larkindale *et al.* 2005)。对于褐藻门藻类,张玉荣(2009)通过叶绿素荧光技术研究了不同温度、光照强度和盐度条件下铜藻幼苗光合作用的变化。

目前利用 GeO_2 对海带配子体或孢子体培育中污染硅藻影响的研究,仅有于波等(2004)采用目测和镜检等实验方法观察 GeO_2 对日本真海带配子体中硅藻的影响;而本研究则采用叶绿素荧光技术,以光系统 II 最大荧光产量(F_v/F_m)为指标,分别研究了 GeO_2 对菱形藻、海带幼孢子体、感染了菱形藻的海带幼孢子体光合生理的影响,以期筛选出对海带幼孢子体生长影响最小而又能抑制污染菱形藻的最佳 GeO_2 使用浓度,为海带人工育苗过程中菱形藻污染防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菱形藻 *Nitzschia* sp.

取未灭菌的自然海水,加入 N、P 营养盐,放入载玻片,培养一段时间后,显微镜下分理出菱形藻,然后转入

灭菌的海水中继续培养至颜色肉眼可见。

1.1.2 海带幼孢子体

2010年8月,从福建连江海域采集成熟的“连杂2号”海带孢子体,在11~13℃低温室内进行采苗和培养,直至海带配子体转为小孢子体(4~8列细胞),大约16d;

1.1.3 感染了菱形藻的海带幼孢子体

从培养的材料1中取1/3菱形藻,材料2中取1/3海带配子体,混合培养至配子体转为小孢子体。附着基均为载玻片。

1.2 方法

本研究共设计3组独立实验:1)不同浓度GeO₂对菱形藻的影响;2)不同浓度GeO₂对海带幼孢子体的影响;3)不同浓度GeO₂对感染了菱形藻的海带幼孢子体生长的影响。每组独立实验中设置6个GeO₂浓度组(5、10、15、20、30、50 mg/L)与1个对照组(0 mg/L),每个组4个平行。培养条件为:温度11~13℃;光照强度30 μmol/m²·s;光照周期12L:12D;营养盐:NO₃-N:3 mg/L,PO₄-P:0.3 mg/L;每2d换1次培养液。菱形藻与海带幼孢子体的培养前,海水、营养盐母液、培养皿等必须用高压灭菌锅进行严格灭菌,不能感染其他杂藻。每天18:00采用水下饱和脉冲叶绿素荧光仪DIVING-PAM(WALZ CO., LTD. 德国)测定最大荧光产量(F_v/F_m),作为衡量实验材料的光合生理状况的指标,持续时间7d。用显微镜(Nikon E200)观察并记录实验对象的形态特征变化。

1.3 数据处理

数据分析采用SPSS软件16.0(用One-Way ANOVA单因素比较和Duncan's多重比较进行显著性差异分析), $P < 0.05$ 表示显著差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异。作图采用Excel软件。

2 结果

2.1 GeO₂对菱形藻的影响

经过7d不同浓度的GeO₂处理,菱形藻的F_v/F_m值变化如图1。单因素比较结果表明,5、10、15、20、30、50 mg/L浓度组从第3天开始,其F_v/F_m值呈现显著性差异($P < 0.05$);其中20、30、50 mg/L浓度组于第5天达到极显著程度($P < 0.01$)。多重比较结果表明,第1天开始,5、10、15、20、30、50 mg/L浓度组与对照组相比其F_v/F_m值就呈现显著性差异($P < 0.05$),第2天就达到极显著差异程度($P < 0.01$)。由此可知,在5 mg/L或5 mg/L浓度以上的GeO₂处理菱形藻时,其光合作用受到抑制。

显微观察发现,菱形藻受高浓度GeO₂的不利影响(图2)。未经GeO₂处理的菱形藻,活力正常,运动迅速,色素正常,无死亡(图2A);经过GeO₂(5 mg/L以上)处理一段时间后的菱形藻,表现为运动活力下降,运动缓慢,随着处理时间的加长,细胞停止分裂,细胞色素变浅、变淡,出现质壁分离,产生空壳死亡,最后细胞壁分解消亡(图2B)。

2.2 GeO₂对海带幼孢子体影响

经过7d不同浓度的GeO₂处理,海带幼孢子体的F_v/F_m值变化如图3。单因素比较结果表明,5、10、15 mg/L浓度组,其F_v/F_m值均在第7天呈现显著性差异($P < 0.05$);20 mg/L浓度组,其F_v/F_m值在第6天呈现显著性差异($P < 0.05$);30 mg/L浓度组的F_v/F_m值差异性不显著,但F_v/F_m值从第1天开始就一直维持在

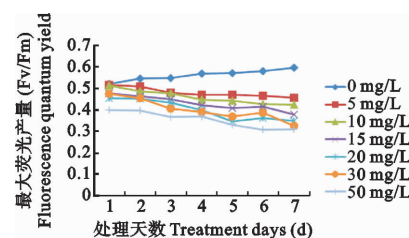


图1 GeO₂对菱形藻F_v/F_m值的影响

Fig. 1 Effect of GeO₂ on F_v/F_m of *Nitzschia* sp.

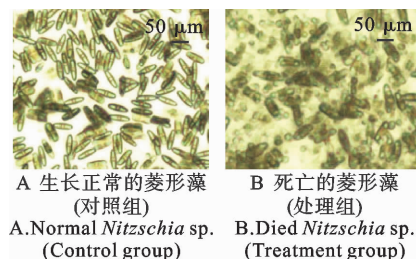


图2 GeO₂对菱形藻的影响

Fig. 2 Effect of GeO₂ on *Nitzschia* sp.

较低水平;50 mg/L 浓度组中,第 2 天就呈现差异显著($P < 0.05$),第 3 天达到极显著性差异($P < 0.01$),且 F_v/F_m 值非常低。多重比较结果表明,与对照组(0 mg/L)相比,5、10、15 mg/L 浓度组,其 F_v/F_m 值均差异性不显著;20 mg/L 浓度组的 F_v/F_m 值,则在第 6 天呈现显著性差异($P < 0.05$);30、50 mg/L 浓度组与对照组相比,其 F_v/F_m 值在第 1 天就呈现显著性差异($P < 0.05$),第 3 天开始达到极显著性差异程度($P < 0.01$)。因此,当 GeO_2 在 20 或 20 mg/L 及以下浓度处理海带幼孢子体时,短时间(7d)内其光合作用影响不大,但是超过了 20 mg/L 的浓度时,海带幼孢子体光合作用开始受到抑制。

通过显微观察发现,海带幼孢子体受 GeO_2 影响的生理变化如图 4。未经 GeO_2 处理的海带幼孢子体,活力正常,色素正常,无死亡(图 4 A);而经过 GeO_2 (20mg/L 浓度以上)处理一段时间后的海带幼孢子体,表现为活力下降,细胞停止分裂,细胞色素变浅、变淡,出现质壁分离,细胞壁分解死亡(图 4 B)。

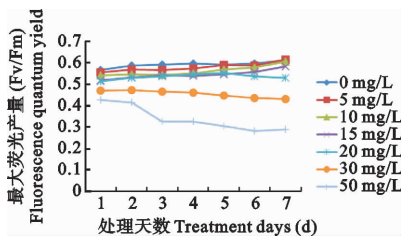


图 3 GeO_2 对海带幼孢子体 F_v/F_m 值的影响

Fig. 3 Effect of GeO_2 on F_v/F_m of *S. japonica* young sporophyte

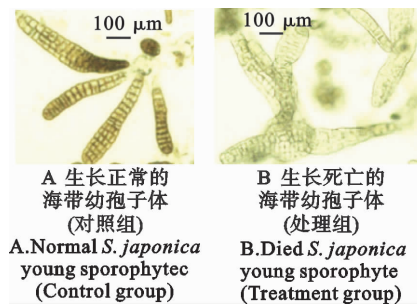


图 4 GeO_2 对海带幼孢子体生理的影响
Fig. 4 Effect of GeO_2 on *S. japonica* young sporophytes

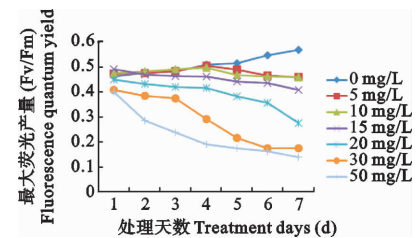


图 5 GeO_2 对感染了菱形藻的海带幼孢子体 F_v/F_m 值的影响

Fig. 5 Effect of GeO_2 on F_v/F_m of *S. japonica* young sporophyte infected by *Nitzschia* sp.

2.3 GeO_2 对感染了菱形藻的海带幼孢子体影响

经过 7 d 不同浓度的 GeO_2 处理,感染了菱形藻的海带幼孢子体的 F_v/F_m 值变化如图 5。单因素比较结果表明,5、10 mg/L 浓度组,其 F_v/F_m 值在 7 d 内均差异不显著;15mg/L 浓度组,其 F_v/F_m 值在第 7 天呈现显著性差异($P < 0.05$);20 mg/L 浓度组,其 F_v/F_m 值在第 5 天达到极显著差异程度($P < 0.01$);30、50 mg/L GeO_2 浓度组中,第 2 天就达到了极显著差异程度($P < 0.01$),其 F_v/F_m 值很低。多重比较结果表明,与对照组(0 mg/L)相比,5、10、15mg/L 浓度组的 F_v/F_m 值,于第 6 天呈现显著性差异($P < 0.05$);20mg/L 浓度组则从第 2 天时开始就呈现显著性差异($P < 0.05$),第 5 天达到极显著差异程度($P < 0.01$);30、50 mg/L 浓度组与对照组相比,第 1 天开始,其 F_v/F_m 值就呈现显著性差异($P < 0.05$),第 2 天则达到极显著差异程度($P < 0.01$)。由此可知,在 15 mg/L 及以上浓度的 GeO_2 处理感染了菱形藻的海带幼孢子体时,其光合作用受到抑制。显微观察发现,当达到或超过了 20 mg/L 的浓度时,感染了菱形藻的海带幼孢子体开始出现死亡。

3 讨论

叶绿素荧光作为光合作用的探针,能够灵敏、快速地探测出藻类光合作用的变化情况。其中使用最广、使用频率最高的一个参数是 F_v/F_m 。经过充足暗适应后测出的 F_v/F_m 反映了当时所有的 PSII 反应中心均处于开放态时的量子产量,即植物的潜在最大光合能力,是衡量 PSII 完整性的指标(张守仁 1999)。在正常生理状态下, F_v/F_m 是一个很稳定的值,藻类约为 0.65(Kolber *et al.* 1988),当受到胁迫时,其值显著下降(许大全等 1992)。在本研究中,菱形藻、海带幼孢子体受到 GeO_2 胁迫下,其 F_v/F_m 值发生了不同程度的变化,随着 GeO_2 浓度的不断加大和处理时间的加长, F_v/F_m 值也不断下降,可知高浓度的 GeO_2 抑制了藻类的光合作用。

GeO_2 对藻类生长产生抑制的生理生化及分子水平的机制尚不清楚,Markham 等(1982)认为,锗的特殊作用是阻碍硅的新陈代谢,阻碍细胞壁的形成,从而阻碍硅藻细胞分裂。马家海等(1989)认为, GeO_2 对硅藻的影响主要是对原有硅藻细胞壁的破坏,并阻碍硅藻细胞壁的形成,影响硅藻的蛋白质和叶绿素的合成,从而

抑制细胞的生长。Kohata 等(1989)研究表明,当环境条件(如光照强度、营养盐等)改变时,会影响到藻类光合色素和色素前体的周转和转化(比如类胡萝卜素循环),从而引起藻类光合色素的变化。王大志等(2000)研究发现,锗的介入可能影响了细胞内的抗氧化防御体系,而引起藻类光合色素的变化。此外,不同硅藻不同生理条件下受到锗的影响也不同。本研究通过镜检观察,发现菱形藻随着 GeO₂ 浓度的加大和处理时间的加长,其表现为运动活力下降,运动缓慢。随着处理时间的加长,细胞停止分裂,细胞色素变浅、变淡,出现质壁分离,产生空壳死亡,最后细胞壁分解消亡,这说明 GeO₂ 对菱形藻产生了较强的抑制作用。

Shea 等(2007)认为,GeO₂ 处理污染的硅藻不仅对海带配子体的发育起关键作用,而且对早期幼孢子体的生长具有重要的影响。他们研究发现,0.5 mg/L 的 GeO₂ 处理污染的硅藻,经过 40d 处理后,硅藻基本上被抑制,但海带幼孢子体还能正常生长。马家海等(1989)研究表明,经过 11d 处理,0.5 mg/L 浓度的 GeO₂ 能杀死大多数硅藻,但是坛紫菜自由丝状体即使是在 40 mg/L 的 GeO₂ 浓度中,也没有发现明显的毒理效应。而张伟等(2006)研究发现,45 mg/L 浓度的 GeO₂ 能够抑制裙带菜配子体培养中污染硅藻的生长,但是未涉及 GeO₂ 对裙带菜配子体生长的影响。然而李世国等(2009)研究发现,1~2 mg/L 的 GeO₂ 为最适浓度,能够显著除去硅藻,但对裙带菜配子体无多大影响。而于波等(2004)研究发现,0.1mg/L 的 GeO₂ 可以有效杀灭硅藻,但是未说明对海带配子体的影响。通过本实验结果,得出当 GeO₂ 浓度为 5~15 mg/L 左右时,短时间(7d)内,对菱形藻的抑制影响最大,而对海带幼孢子体的影响却很小。但是,由于 GeO₂ 的市场价格比较高,因此,我们建议在生产实践中使用 GeO₂ 的浓度为 5 mg/L。至于其他的硅藻影响以及最优的 GeO₂ 浓度,将在以后的试验中继续研究。

参 考 文 献

- 于波,李美真,丁刚,宋爱环. 2004. GeO₂ 对底栖硅藻及海带配子体的影响. 中国水产, 21(1): 36~41
- 马家海,刘青. 1989. GeO₂ 对坛紫菜自由丝状体生长发育的影响. 水产学报, 13(1): 36~41
- 王大志,王海黎,李少菁,程兆第,金德祥. 2000. 微量元素锗对四种微藻光合色素的影响. 生态学报, 20(3): 482~484
- 李世国,刘爽,佟少明,侯和胜. 2009. 不同浓度硅藻生长抑制剂 GeO₂ 对裙带菜配子体生长的影响. 中国海洋湖沼学会
- 许大全,张玉忠,张荣铨. 1992. 植物光合作用的光抑制. 植物生理学通讯, 28(4): 237~243
- 张守仁. 1999. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. 植物学通报, 16(4): 444~448
- 张伟,张壮志,罗世菊,钱瑞. 2006. GeO₂ 对裙带菜细胞系中硅藻的杀灭作用. 齐鲁渔业, 23(6): 39
- 张玉荣,刘峰,单体锋,逢少军. 2009. 利用叶绿素荧光技术揭示人工培育的铜藻幼苗对胁迫温度、光照和盐度的反应. 南方水产, 5(2): 1~9
- 杨宁生,张馥,钟青萍,张发根. 1994. 有机锗对纹胶蓝愈伤组织生长及皂苷含量的影响. 植物生理学通讯, 30(4): 313~316
- 赵会杰,邹琦,于振文. 2000. 叶绿素荧光分析技术及其在植物光合机理研究中的应用. 河南农业大学学报, 34(3): 248~251
- 高亚辉,王大志,程兆第. 1997. 锗对几种微藻生长的影响. 台湾海峡, 16(1): 63~66
- 梁英,冯力霞,尹翠玲,曹春晖. 2006. 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. 中国海洋大学学报, 36(3): 427~433
- Baker, N. R., and Rosenqvist E. 2004. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies; an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany, 55(403): 1607~1621
- Heinrich, K. G., and Engellbert, W. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II, interpretation of fluorescence signal. Photosynthesis Research, 5(2): 139~157
- Kohata, K., and Watanabe, M. 1989. Diel changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular carbon and nitrogen in *Pyramimonas parkeae* (Prasinophyceae). J. Phycol. 25: 377~385
- Kolber, Z., Zehr, J., and Falkowski, P. 1988. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. Plant Physiol. 88(3): 72~79
- Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R., et al. 2005. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. Plant Physiol. 138(3): 882~897
- Shea, R., and Chopin, T. 2007. Effects of germanium dioxide, an inhibitor of *Nitzschia* sp. growth, on the microscopic laboratory cultivation stage of the kelp, *Laminaria saccharina*. J. Appl. Phycol. 19: 27~32