

◆海洋科学◆

梯度升温降温条件下球形棕囊藻生长和生理生化响应^{*}

梁思柔^{1,2}, 李杰^{2,3}, 蓝彩碧^{2,3}, 许铭本^{2,3}, 陆家昌^{2,3}, 谢芳^{1,2}, 韦维^{1,2}, 赖俊翔^{2,3**},
王英辉^{4**}

(1. 广西大学资源环境与材料学院, 广西南宁 530006; 2. 广西科学院, 广西北部湾海洋研究中心, 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 3. 北部湾海洋产业研究院, 广西防城港 538000; 4. 广西大学海洋学院, 广西南宁 530006)

摘要:球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)藻华频繁暴发, 不仅会危害海洋生态系统和渔业生产安全, 还会堵塞核电站冷源取水系统产生严重安全隐患。球形棕囊藻藻华的暴发有明显的季节性特征, 本研究采用梯度升温降温实验, 研究不同温度(高温、低温)条件下球形棕囊藻的生理生化响应及温度胁迫诱导的细胞程序性死亡(Programmed Cell Death, PCD)过程。结果显示: 低温胁迫抑制球形棕囊藻细胞的正常生长繁殖, 但不会激活其进入 PCD 响应; 高温胁迫使球形棕囊藻出现氧化应激, 从而导致其发生 PCD 响应, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性显著提高, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)被激活后球形棕囊藻细胞出现 Annexin V-FITC 阳性反应。环境胁迫使球形棕囊藻细胞产生氧化应激, 抗氧化酶活性快速升高, 并激活 Caspase-3 使藻细胞发生 PCD 响应, 表现出细胞磷脂酰丝氨酸(PS)外翻、细胞收缩和质膜从细胞壁分离等特征。本研究可为深入探讨球形棕囊藻藻华的生消机制与防治赤潮灾害提供一定的理论基础。

关键词:球形棕囊藻; 温度胁迫; 细胞程序性死亡; SOD; Caspase-3

中图分类号: Q89, X43 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2023)04-0643-10

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20230512.001

球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)是一种在全球海域范围内广泛分布的、可引发有害藻华的藻类, 其生命周期主要由游离单细胞和胶质囊体交替完成^[1]。从游离单细胞到胶质囊体的转变是球形棕囊藻藻华暴发的关键。胶质囊体对于恶劣环境的抵御

能力更强。囊体独有的结构特点如体积较大和多糖外被能够使其不易遭受浮游动物的摄食, 以及防御病毒的感染和细菌侵蚀, 从而保护囊体表面众多的单细胞继续生长繁殖^[2]。自 2011 年以来, 中国北部湾沿海水域频繁暴发球形棕囊藻藻华, 严重破坏了海洋生

收稿日期: 2022-12-15

修回日期: 2023-01-22

* 国家自然科学基金项目(42266007)和中央引导地方科技发展资金项目(ZY21195027)资助。

【第一作者简介】

梁思柔(1998-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事海洋环境科学研究, E-mail: sirouliang@163.com。

【**通信作者】

赖俊翔(1984-), 男, 研究员, 主要从事海洋环境科学研究, E-mail: jxlai@gxas.cn。

王英辉(1970-), 女, 教授, 主要从事海洋环境科学研究, E-mail: wyh@gxu.edu.cn。

【引用本文】

梁思柔, 李杰, 蓝彩碧, 等. 梯度升温降温条件下球形棕囊藻生长和生理生化响应[J]. 广西科学, 2023, 30(4): 643-652.

LIANG S R, LI J, LAN C B, et al. Growth and Physiological and Biochemical Responses of *Phaeocystis globosa* under Gradient Temperature Rise and Temperature Drop [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(4): 643-652.

态系统的平衡^[3]。因其囊体体积巨大及含溶血性毒素的特点,球形棕囊藻形成的藻华对渔业、旅游业等经济产业产生严重打击,核电站冷源取水系统也因此受到安全威胁^[4,5]。因此,球形棕囊藻藻华发生、维持和消亡机制受到国内外学者的广泛关注,许多科学问题亟待解决。

海水温度对于浮游植物正常的生长繁殖有着重要的影响。球形棕囊藻藻华主要在水温相对低的季节暴发,一般为冬季和春季,在一定程度上受到沿海季风的影响,具有明显的季节性特征^[6]。相较于高温环境条件,低温条件下球形棕囊藻和南极棕囊藻(*P. antarctica*)更多以囊体细胞形态存在。球形棕囊藻的囊体直径随温度的升高而减小,而南极棕囊藻的囊体直径对温度无明显的响应^[7]。Xu等^[8]在研究42种不同温度和盐度组合条件对球形棕囊藻生长的影响时发现,海水温度低于15℃时球形棕囊藻南海株失去活力并停止生长。Wang等^[7]的研究表明,在20℃时球形棕囊藻主要以囊体形态存在,当海水温度高于24℃时,游离单细胞形态在藻液中占主体地位。此外,李波等^[9]对2014年北部湾近岸海域的两次球形棕囊藻藻华进行分析,发现在藻华消亡过程中伴随着明显的海水温度下降。球形棕囊藻从单细胞形态到囊体形态的转变需要达到一定的密度条件,寒冷季节更有利于其完成形态的转变,继续繁殖从而形成棕囊藻藻华^[10]。

细胞程序性死亡(Programmed Cell Death, PCD)^[11]是受到外界环境的胁迫刺激时发生的受基因调控的自发性细胞死亡,外界胁迫包括营养盐、光照、温度、有毒物质胁迫等。目前在蓝藻、绿藻、硅藻、甲藻及铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)等浮游植物中广泛开展了PCD的研究。Dingman等^[12]发现在37℃和40℃时,赤潮异湾藻(*Heterosigma akashiwo*)会出现热诱导PCD的生理响应,而温度上升到50℃之后细胞坏死。热应激诱导嗜糖小球藻(*Chlorella saccharophila*)细胞出现PCD,具体表现为染色质浓缩、DNA碎片化、细胞收缩和质膜分离,以及Caspase-3的激活^[13]。在环境相关的热应激剂量下,海葵与其共生藻虫黄藻(*Zooxanthellae*)同时发生PCD和坏死^[14]。可见,热胁迫能够诱导一些藻类发生PCD及其相关的生理响应过程,而温度因素在球形棕囊藻生活史的全过程中能够产生一定的影响。基于此,本研究通过梯度升温降温实验,研究不同培养温度以及温度变化下球形棕囊藻的生理生化

响应及PCD过程,为探究球形棕囊藻藻华的生消机制及其防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 藻种培养

本实验球形棕囊藻藻株采自钦州湾近岸赤潮发生海域,纯种培养,保存于广西北部湾海洋研究中心微藻种质资源库,编号BBW-PG02。采用盐度为30的f/2培养基^[15],培养温度为20℃,光照强度为100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比为12 h:12 h。实验开始前,将处于对数生长期的球形棕囊藻通过20 μm 的筛绢滤除囊体,收集游离单细胞用于梯度升温降温实验。

1.2 仪器设备

全波长多功能酶标仪(Thermo Scientific Multiskan GO,赛默飞世尔科技公司),倒置荧光显微镜[Nikon TS-100,尼康仪器(上海)有限公司],紫外分光光度计(T6,北京普析通用仪器有限责任公司),人工气候箱(ZRG-450B,上海丙林电子科技有限公司),高速冷冻离心机(Sigma 3-18K,德国Sigma公司)。

1.3 梯度升温降温实验

基于球形棕囊藻藻华季节性暴发的特征,设置梯度升温降温实验。球形棕囊藻藻华频繁暴发的钦州湾海域的海水温度年均变化范围为14–30℃,因此设置梯度降温最低降至12℃,梯度升温最高升至32℃。对照组在实验周期内保持初始培养温度不变。梯度升温降温实验的温度设置如图1所示。采用f/2培养基,初始培养温度为20℃,湿度为50%RH,光照强度为100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比为12 h:12 h。将球形棕囊藻单细胞接种至玻璃锥形瓶中,初始密度为 1×10^4 cells/mL,培养液总体积为2 L,实验周期为20 d。每组各设3个平行。隔天定时采样进行相关指标测定。

1.4 取样与测定

1.4.1 细胞密度测定

取2 mL藻液,经20 μm 的筛绢过滤获得球形棕囊藻游离单细胞,加入1.5%鲁哥-碘溶液固定,于25℃室温下避光保存。使用100 μL 浮游植物计数板在显微镜下进行球形棕囊藻游离单细胞密度的测定。再取1 mL藻液置于24孔细胞培养板中,在显微镜下随机选取视野中30个囊体,进行囊体密度、囊体直径、囊体表面单细胞数量的测定。所有显微镜计数都使用倒置荧光显微镜进行观察。

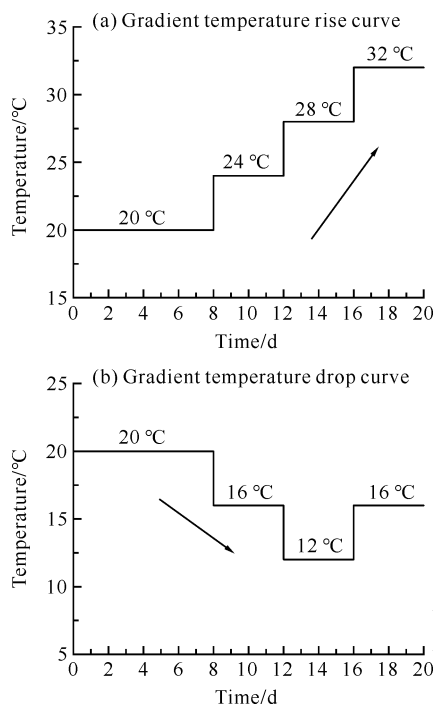


图1 梯度升温降温实验中温度的变化

Fig. 1 Temperature change in gradient heating and cooling experiments

1.4.2 细胞生长率测定

细胞生长率(μ)按照式(1)进行计算:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}, \quad (1)$$

式中, t 为球形棕囊藻细胞的培养时间; t_0 为计算生长率时球形棕囊藻细胞的初始培养时间; N_t 为 t 时球形棕囊藻的细胞数; N_0 为 t_0 时球形棕囊藻的细胞数。

1.4.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

取10 mL藻液,4 °C、4 000 r/min离心10 min收集藻细胞。用0.1 mol/L、pH值为7.4的PBS缓冲液洗涤并重悬细胞,在冰浴条件下超声破碎细胞(250 W,5 min,工作3 s,间歇3 s)。4 °C、4 000 r/min离心10 min收集上清液用于测定。利用SOD试剂盒(WST-1法,南京建成生物工程研究所)进行酶活性的测定,具体方法参照SOD试剂盒说明书。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质的含量。

1.4.4 过氧化氢酶(CAT)活性测定

获得粗酶液的方法同1.4.3节中获取SOD的处理。按照CAT试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行酶活性的测定。

1.4.5 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性测定

获得粗酶液的方法同1.4.3节中获取SOD的处理。按照Caspase-3试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)说明书进行酶活性的测定。

1.4.6 细胞凋亡检测

先取10 mL藻液,4 °C、4 000 r/min离心10 min收集藻细胞并用0.1 mol/L、pH值为7.4的PBS缓冲液洗涤,加入500 μ L通透液,混匀,室温处理20 min;再离心去上清液并用0.1 mol/L、pH值为7.4的PBS缓冲液洗涤一次;最后加入500 μ L固定液固定10 min,离心去上清液并洗涤后完成预处理。根据Annexin V-FITC试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行标记反应后在荧光显微镜下观察并计数200个细胞的阳性率。

1.5 数据处理

对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异(LSD)检验分析。使用软件为SPSS 26.0,显著水平设置为5%。

2 结果与分析

2.1 梯度升温降温对球形棕囊藻生长的影响

球形棕囊藻的游离单细胞生长曲线[图2(a)]显示,相比于对照组,在首次降温至16 °C(第8天)时,游离单细胞的生长开始受到抑制,游离单细胞密度明显降低,在第12天温度继续下降至12 °C时,低温对游离单细胞生长的抑制作用减小;首次升温至24 °C(第8天)时,游离单细胞密度开始显著增加,当温度继续上升至28 °C(第12天),升温组的游离单细胞密度开始显著下降,游离单细胞的生长受到抑制,且在第14天后升温组和降温组的游离单细胞密度接近。在第10天和第14天升温组的囊体密度分别达到两个峰值,在第12天囊体密度处于两个峰值间的低谷,此时游离单细胞密度最高;降温组的囊体密度变化总体上与对照组没有显著差异[图2(b)]。随着温度升高,囊体单位表面积的细胞数量呈增加趋势,在第16天升温组球形棕囊藻出现PCD现象,囊体破碎、消亡[图2:(b)、(c)]。除升温组球形棕囊藻在第14天囊体直径出现一个峰值随后逐渐减小外,对照组和降温组的囊体直径整体都呈增大的趋势,且两组的球形棕囊藻囊体直径均显著大于升温组[图2(d)]。

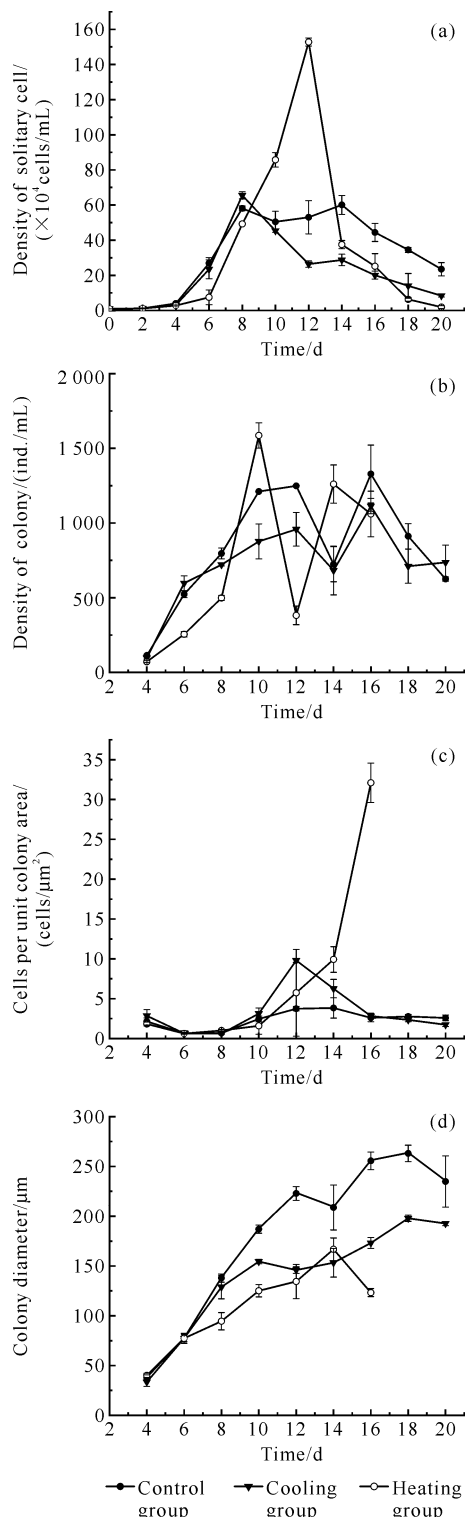


图2 梯度升温降温条件下球形棕囊藻的生长变化趋势

Fig. 2 Growth trend of *P. globosa* under gradient heating and cooling conditions

实验周期内不同温度处理组的球形棕囊藻的细胞生长率见表1。由表1可知,第10天升温组的球形棕囊藻的细胞生长率达到最大,为 $(0.65 \pm 0.39) \text{ d}^{-1}$,远高于其他两组,此时温度升高促进细胞生长。

随后升温组的球形棕囊藻的细胞生长速率放缓,在第14天率先进入负增长阶段。从第16天开始,3组球形棕囊藻都进入了负增长阶段。在第18天,升温组的球形棕囊藻的负生长率达到最大,为 $(-0.68 \pm 0.16) \text{ d}^{-1}$,远高于其他两组。

表1 不同温度处理组的球形棕囊藻在不同时间的细胞生长率

Table 1 Cell growth rates of *P. globosa* at different treatments and times

天数/d Days/d	细胞生长率 Cell growth rate/ d^{-1}		
	控制组 Control group	降温组 Cooling group	升温组 Heating group
2	0.13 ± 0.07^a	0.10 ± 0.11^a	0.12 ± 0.06^a
4	0.59 ± 0.08^a	0.48 ± 0.13^a	0.44 ± 0.10^a
6	0.96 ± 0.09^a	1.00 ± 0.11^a	0.43 ± 0.32^b
8	0.39 ± 0.07^b	0.52 ± 0.11^{ab}	0.63 ± 0.07^a
10	-0.07 ± 0.06^b	-0.18 ± 0.01^b	0.65 ± 0.39^a
12	0.22 ± 0.12^b	-0.27 ± 0.03^c	0.29 ± 0.02^a
14	0.07 ± 0.08^a	0.04 ± 0.03^a	-0.70 ± 0.04^b
16	-0.15 ± 0.06^a	-0.18 ± 0.11^a	-0.21 ± 0.13^c
18	-0.12 ± 0.05^a	-0.23 ± 0.35^{ab}	-0.68 ± 0.16^b
20	-0.20 ± 0.06^a	-0.20 ± 0.30^a	-0.62 ± 0.21^a

Note: letters are labeled as multiple comparison of LSD, the same letter indicates no significant difference between different treatment groups, and different letters indicate significant difference between different treatment groups, and the difference level is $P < 0.05$.

2.2 梯度升温降温对球形棕囊藻氧化系统的影响

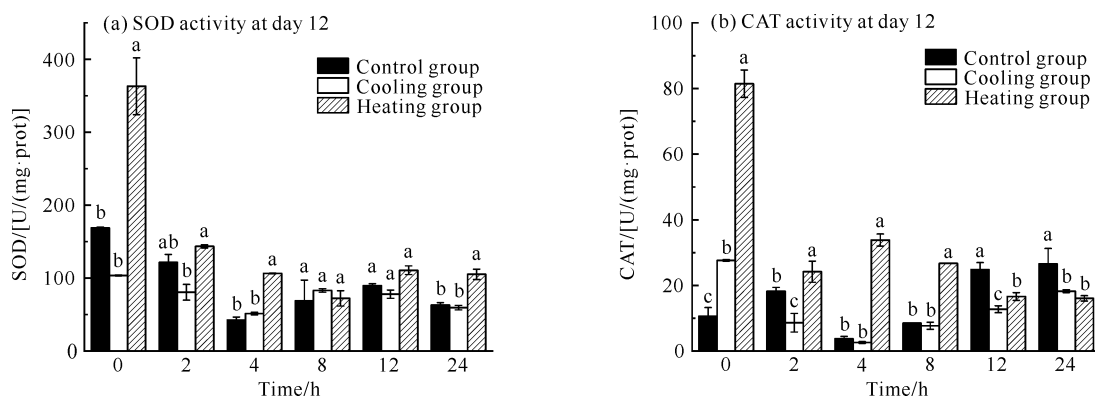
在由 24°C 升温至 28°C 的前 4 h 内,升温组的 SOD 活性和 CAT 活性明显高于其他两组,且在 0 h 时达到 24 h 内的一个峰值。4 h 后,升温组的 SOD 活性和 CAT 活性逐渐降低,但总体略高于其他两组(图 3)。在 0-2 h,降温组的 SOD 活性低于对照组,之后两组的 SOD 活性水平逐渐下降并趋于稳定,且两组 SOD 的活性水平大体相当[图 3(a)]。在 0 h,降温组的 CAT 活性水平显著高于对照组,2 h 后降温组的 CAT 活性水平开始下降并逐渐表现出低于对照组的现象,对照组和降温组的 CAT 活性水平变化呈现先降后升的趋势[图 3(b)]。

2.3 梯度升温降温条件下 Caspase-3 活性的变化

在第 8 天首次出现温度变化的前 2 h 内,降温组和升温组的 Caspase-3 活性水平都明显高于对照组,其中降温组的 Caspase-3 活性提高幅度略大于升温组,表明升温和降温均使球形棕囊藻出现相应的应激响应特征;随后(24 h 内)升温组的 Caspase-3 活性保

持在较高水平,而降温组和对照组的活性水平都稳定低于升温组,没有比较明显的波动[图 4(a)]. 在第 12 天升温组和降温组的培养温度继续发生改变,0 h 时升温组的 Caspase-3 活性达到最高,其数值约是对照组和降温组的 20.2 倍;随后(24 h 内)升温组的

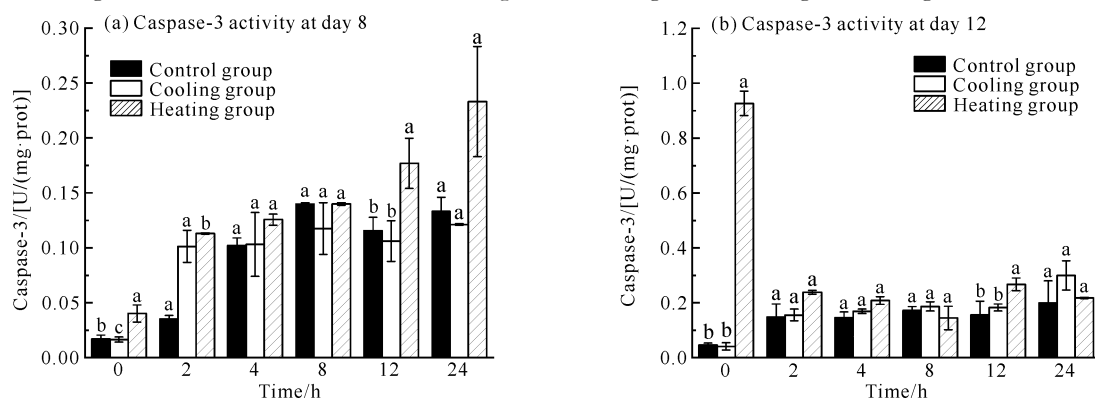
Caspase-3 水平相较于 0 h 有所下降,3 个处理组的 Caspase-3 活性水平没有较大的差异[图 4(b)]. 由图 4 可知,在第 8-12 天内升温组的 Caspase-3 活性持续升高。



Letters are labeled as multiple comparison of LSD, the same letter indicates no significant difference between different treatment groups, and different letters indicate significant difference between different treatment groups, and the difference level is $P < 0.05$.

图 3 梯度升温降温条件下球形棕囊藻抗氧化水平的变化

Fig. 3 Trends of antioxidant levels in *P. globosa* under gradient heating and cooling conditions



Letters are labeled as multiple comparison of LSD, the same letter indicates no significant difference between different treatment groups, and different letters indicate significant difference between different treatment groups, and the difference level is $P < 0.05$.

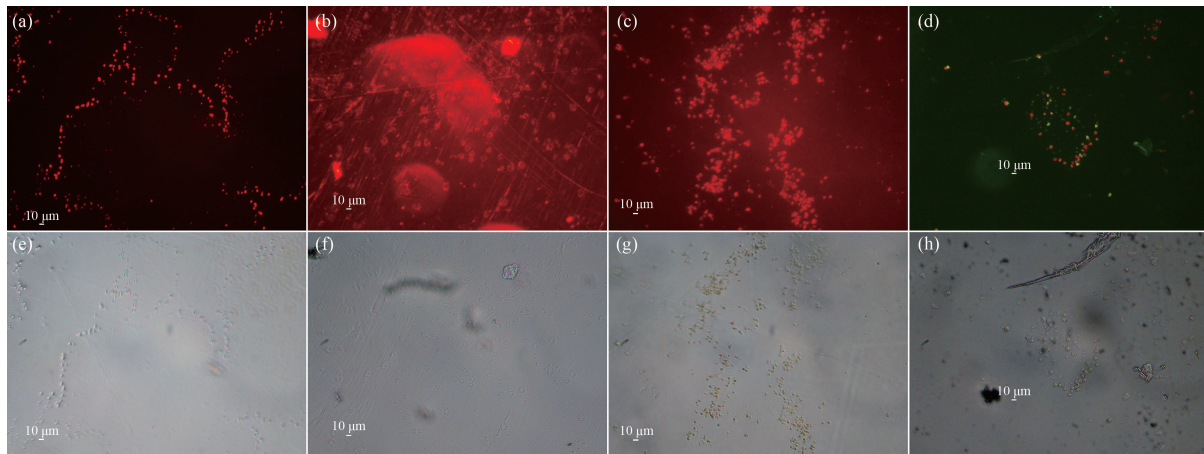
图 4 梯度升温降温条件下球形棕囊藻 Caspase-3 活性的变化

Fig. 4 Trends of the Caspase-3 activity in *P. globosa* under gradient heating and cooling conditions

2.4 梯度升温降温对球形棕囊藻细胞凋亡的影响

早期细胞凋亡的特征之一就是细胞膜通透性增加,从而导致细胞出现磷脂酰丝氨酸(PS)外翻现象,可通过 Annexin V-FITC 染色进行特异性检测。在第 6、10、14、18 天对 3 组藻细胞依次进行 Annexin V-FITC 染色(图 5-7),升温组在第 14 天最先出现绿色荧光阳性反应,异硫氰酸荧光素(FITC)阳性率为 33.8%[图 6(c)],此时降温组和对照组均未出现绿色荧光阳性现象,即尚未检测到细胞凋亡现象。在第 18 天 3 组藻细胞都出现了绿色荧光阳性反应

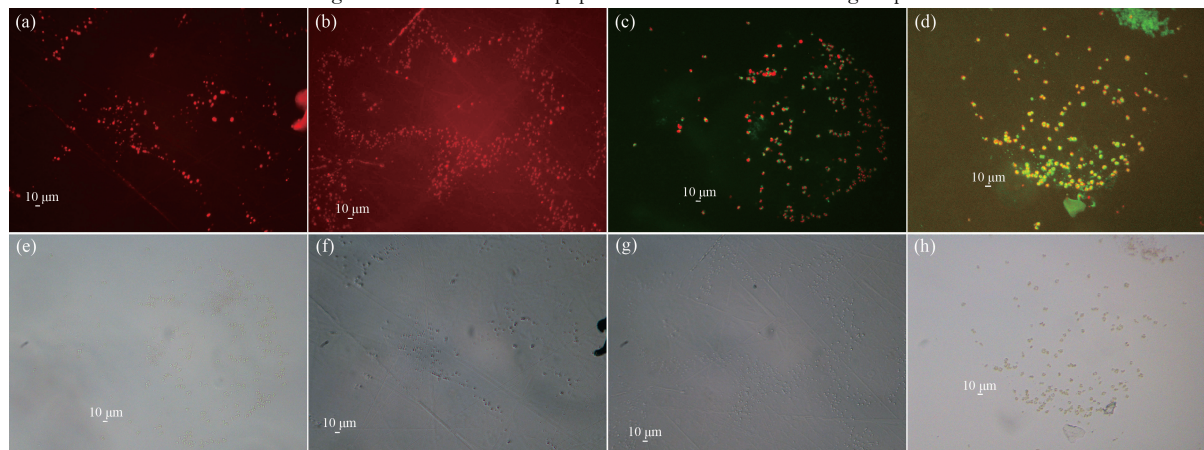
[图 5(d)、图 6(d)、图 7(d)],此时对照组、升温组、降温组的 FITC 阳性率分别为 30.77%、60.54%、38.14%。由图 5-7 可以看出,虽然 3 组藻细胞都出现了细胞 PS 外翻现象,但是各组首次出现外翻现象的时间不同,外翻程度不同。升温组的细胞 PS 外翻比例显著高于其他两组,该组出现细胞 PS 外翻的时间也早于其他两组。降温组与对照组出现细胞 PS 外翻的时间相同,均晚于升温组,但降温组细胞 PS 外翻比例略高于对照组。



(a), (b), (c) and (d) are Annexin V-FITC staining results of *P. globosa* control group at day 6, 10, 14 and 18, respectively; (e), (f), (g) and (h) are the control group cells of *P. globosa* at day 6, 10, 14 and 18 under ordinary light microscope, respectively.

图 5 对照组细胞凋亡检测结果

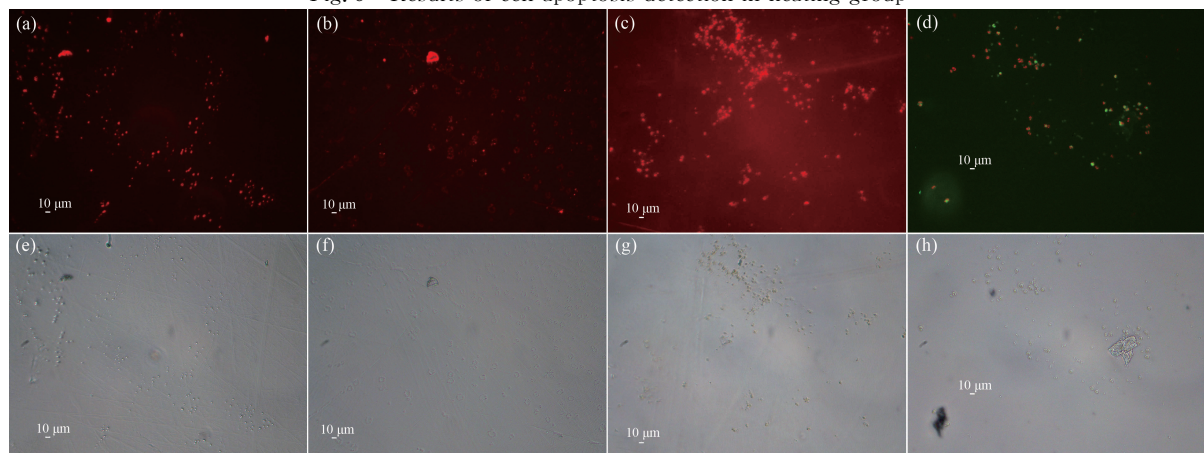
Fig. 5 Results of cell apoptosis detection in control group



(a), (b), (c) and (d) are Annexin V-FITC staining results of *P. globosa* heating group at day 6, 10, 14 and 18, respectively; (e), (f), (g) and (h) are the heating group cells of *P. globosa* at day 6, 10, 14 and 18 under ordinary light microscope, respectively.

图 6 升温组细胞凋亡检测结果

Fig. 6 Results of cell apoptosis detection in heating group



(a), (b), (c) and (d) are Annexin V-FITC staining results of *P. globosa* cooling group at day 6, 10, 14 and 18, respectively; (e), (f), (g) and (h) are the cooling group cells of *P. globosa* at day 6, 10, 14 and 18 under ordinary light microscope, respectively.

图 7 降温组细胞凋亡检测结果

Fig. 7 Results of cell apoptosis detection in cooling group

3 讨论

3.1 水温变化与球形棕囊藻藻华生消的关系

海水温度是浮游植物生长的重要控制因子,从赤潮生物的细胞代谢到爆发性增殖均需要适宜的水温条件,海水温度是球形棕囊藻藻华生消过程中重要的影响因子之一。以北部湾近海为例,根据海洋监测部门的文献记录,北部湾近岸海域球形棕囊藻藻华的暴发具有明显的季节特征,近 10 年来北部湾近海球形棕囊藻藻华发生记录均在气温相对较低的季节(10 月至次年 4 月)^[16]。王小冬^[17]研究了温度对球形棕囊藻囊体形成的影响,近 10 年钦州湾球形棕囊藻藻华期的水温变化情况与其研究结果相符合。张栋^[18]对 2008-2018 年钦州湾球形棕囊藻藻华的调查显示,11 月、12 月发生藻华时的平均水温主要为 18.5-22.1 °C;1 月、2 月发生藻华时的平均水温相对较低,主要为 15.6-18.5 °C。球形棕囊藻藻华的暴发与季节变化密切相关,而季节性变化不仅是温度的变化,不同季节的干湿程度也各有不同。1 月、2 月降水量低于 11 月、12 月,湿度较高时,藻华暴发时的平均水温也相应较高;反之,湿度偏低时,藻华暴发时的平均水温也处于一个偏低的水平。虽然夏秋两季降水量明显提高,但平均水温在 24 °C 以上,不利于球形棕囊藻藻华暴发。

在梯度升温降温的实验中,湿度设置为 50% RH,实验结果表明,在一个相对湿润的环境中,温度升高到 24 °C 时球形棕囊藻藻华暴发,继续升温的过程中,过高的温度胁迫压力使得球形棕囊藻无法正常生长,发生大量消亡。在升温到 24、28 °C 时,升温组的球形棕囊藻细胞持续大量繁殖,在第 16 天其囊体表面细胞密度达到最高,远高于对照组与降温组;随后过高的温度胁迫压力使得球形棕囊藻囊体破裂,藻细胞开始衰亡;在 32 °C 时球形棕囊藻以游离单细胞形态存在,且数量较少,远低于相同培养周期的对照组细胞数量。至此,升温组的球形棕囊藻先于其他两组出现藻细胞衰亡。在梯度降温过程中,球形棕囊藻的生长没有出现暴发式增殖过程,且与对照组相比其生长明显受到抑制,藻细胞密度峰值明显较低。低温对球形棕囊藻生长的抑制作用不可逆。在第 16 天,培养温度由 12 °C 回升到 16 °C 后,降温组的球形棕囊藻的生长仍然受到抑制,但受抑制程度减小。

总体来看,温度会影响球形棕囊藻的囊体大小。在本研究中,对照组的球形棕囊藻在培养周期中并没

有受到温度变化带来的压力,其囊体直径最大;低温对藻细胞正常生长的抑制使得降温组的球形棕囊藻的囊体直径较小;高温胁迫压力虽然能够促使球形棕囊藻迅速生长繁殖达到较高的细胞密度,但是也使其囊体的生长受到限制,因此升温组球形棕囊藻的囊体直径最小。

3.2 梯度升温降温对球形棕囊藻生长的影响

根据张栋^[18]现场观测结果,短期气温升高导致球形棕囊藻出现暴发式增长后,表层水体和底层水体的球形棕囊藻囊体密度均达到峰值,底层水体的球形棕囊藻囊体密度远高于表层水体。这是由于表层水体易获得太阳光照,水面获得的太阳辐射能量多,水温相比底层水体略高,在较小差异范围内,温度越高,球形棕囊藻受到的温度胁迫压力也随之增大,所以球形棕囊藻的生长开始受到限制。

本研究结果显示,在 16 °C 和 12 °C 时球形棕囊藻的生长会受到抑制。在 24 °C 时,球形棕囊藻细胞出现爆发性增殖;在温度继续上升到 28、32 °C 时,球形棕囊藻的生长受到明显抑制甚至出现 PCD 现象。低温胁迫会使浮游植物的光合作用速率下降,干扰其新陈代谢和正常的营养吸收^[19],与光合作用、呼吸作用等生理活动有关的多种酶活性下降,严重影响生物体正常生长发育^[20]。与对照组相比,降温组的球形棕囊藻生长趋势没有明显差异,但其培养液中的藻细胞密度显著低于对照组,同时低温胁迫并未引发藻细胞 PCD 过程。

温度的升高能够逐渐诱导球形棕囊藻细胞的应激响应。囊体不仅能够抵御外界侵蚀和摄食,且其独特的中空结构还能够调节自身浮力,单位囊体表面积细胞越多,保持浮力的能力就越强,使其能够在浅层海水表面漂浮以获得更多的光照,促进光合作用^[21]。海水温度升高过程中球形棕囊藻藻华暴发,24 °C 时温度升高加快了藻细胞的新陈代谢,细胞生长出现爆发性增殖的趋势,升温组的囊体数量明显高于其他两组。短期升温的过程中,浮游植物为了适应高温需要快速合成有机物质,细胞生长率会明显降低^[22]。环境中的营养物质相对有限,球形棕囊藻的快速增殖会加速消耗营养物质,随后其生长开始受到抑制。由于囊体具有更好的营养竞争策略,囊体形态可以对抗高温胁迫以及随之而来的营养胁迫。而球形棕囊藻游离单细胞需要达到一定密度才能形成囊体^[10]。本研究升温组在第 8-12 天游离单细胞数量激增,与第 10 天囊体密度达到第一个峰值是相对应

的。随后在持续升温胁迫下,因为前一次的爆发性增殖加速消耗了营养物质,使得此时升温组细胞受到了更大的高温和营养限制压力,细胞数量开始骤降,导致第12天时囊体数量出现骤减。升温组囊体表面细胞密度一直呈上升趋势,在第16天达到最大,显著高于其他两组,随后在高温胁迫下囊体破裂,球形棕囊藻细胞开始大量凋亡,无法再形成新的囊体。在第14-16天,升温组囊体表面细胞密度增长比第10-14天更加剧烈,这也说明此时球形棕囊藻受到的高温胁迫压力越来越大。

3.3 梯度升温降温条件下球形棕囊藻 PCD 过程的响应

非生物胁迫会打破生物体细胞内活性氧(ROS)的动态平衡,ROS的过量积累会导致氧化应激,损伤氧化系统,ROS还可作为信号分子激活PCD。植物中清除ROS的抗氧化酶包括SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)。SOD是清除ROS的第一道防线,它将超氧化物歧化为 H_2O_2 ,随后CAT、GPX和APX将 H_2O_2 降解成无害物质^[23]。已有研究表明,提高SOD和CAT等抗氧化酶的活性,能够有效清除ROS,从而减少温度胁迫对藻类膜的氧化损伤^[24]。本研究中,升温到28℃的前4h内升温组的SOD活性和CAT活性明显高于其他两组,此时高温胁迫使得球形棕囊藻细胞内产生比较强烈的氧化应激,从而诱导相关抗氧化酶活性增加以维持藻细胞自身生理稳定。在之后(24h内),升温组的抗氧化酶活性水平逐渐下降并稳定在一个略高于对照组的水平,这说明藻细胞对高温胁迫产生的氧化应激只能被调节而不能完全消除,高温胁迫还是在一定程度上破坏氧化系统的平衡。在降温过程中,除0h时降温组的球形棕囊藻的CAT活性明显高于对照组,总体上呈现出降温组的CAT活性水平低于对照组的趋势,在正常的生理水平波动范围内,有时与对照组CAT活性水平相当。这表明低温胁迫对球形棕囊藻的氧化系统的影响不大,低温使得其酶活性水平下降,影响其正常生理响应。

高温胁迫能够触发PCD通路,PCD的生理特征包括染色质凝结、DNA碎片化、细胞收缩、质膜从细胞壁分离和Caspase家族激活^[12-14,25]。植物细胞的PCD过程中,细胞内ROS的过度积累会改变线粒体结构和功能,如线粒体形态改变、膜通透性增加、膜电位下降^[26]。同时线粒体内的细胞色素c释放到细胞质中与dATP结合触发Caspase家族的级联反应,被

激活的Caspase-9依次裂解并激活Caspase-3,这种级联反应会放大凋亡信号,导致快速且不可逆的PCD过程^[27,28]。浮游植物PCD的关键特征就是Caspase样蛋白酶的激活^[29]。在本研究中,高温胁迫使得球形棕囊藻的Caspase-3活性显著提高,表明高温胁迫使得PCD通路被激活,细胞开始进入PCD过程。膜通透性增加的表现就是PS外翻,这是细胞凋亡早期的显著特征之一^[30],其靶点是质膜不对称性的丧失,细胞质膜通透性增加导致外质膜小叶PS残基暴露,可以通过与PS有特异性结合作用的Annexin V来检测出膜不对称性丧失的凋亡细胞^[31,32]。在本研究中也发现类似的现象,在第14天升温组的球形棕囊藻细胞先于对照组和降温组检测出细胞凋亡。在第18天3组球形棕囊藻细胞均检测出细胞凋亡,但升温组球形棕囊藻细胞的FITC阳性率显著高于其他两组,细胞凋亡程度更大,这说明高温胁迫使得升温组藻细胞进入了早期PCD阶段,随后升温组先于对照组发生大规模的细胞凋亡。低温胁迫只能限制球形棕囊藻的正常生长繁殖,但未诱导其出现PCD过程。

4 结论

梯度降温条件下,球形棕囊藻的生长受到抑制;梯度升温条件下,球形棕囊藻出现爆发性增殖后发生PCD过程并大量消亡。低温抑制了球形棕囊藻细胞内与光合作用、呼吸作用等生理活动有关的SOD和CAT的活性,影响其正常的生长发育。球形棕囊藻可以通过大量形成囊体来抵抗高温不利环境,但是囊体自身调节能力有限,最终高温胁迫压力和有限的营养不仅限制球形棕囊藻的生长,而且诱导其进入PCD过程。

梯度升温过程中,球形棕囊藻出现氧化应激,SOD和CAT的活性显著升高。过量积累的ROS不能完全被球形棕囊藻自身清除,反而对其造成氧化损伤,且以此为信号激活PCD。梯度降温抑制了球形棕囊藻抗氧化系统的正常生理响应,SOD和CAT的活性相对对照组略低。

高温胁迫触发PCD后,球形棕囊藻的Caspase-3活性显著升高,部分藻细胞出现膜内PS外翻的早期细胞凋亡现象,最后球形棕囊藻通过PCD过程大量消亡。低温条件下球形棕囊藻的生长受到抑制,但不会出现PCD响应。

本研究进一步探究了球形棕囊藻对于环境温度

的生态适应机制,可以将高温热胁迫引发的PCD响应与球形棕囊藻藻华季节性暴发的特点相结合,从而为制定有效的有害藻华防治措施提供新的思路和理论依据。

参考文献

- [1] SCHOEMANN V, BECQUEVORT S, STEFELS J, et al. *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review [J]. *Journal of Sea Research*, 2005, 53(1/2): 43-66.
- [2] WHIPPLE S J, PATTEN B C, VERITY P G. Life cycle of the marine alga *Phaeocystis*: a conceptual model to summarize literature and guide research [J]. *Journal of Marine Systems*, 2005, 57(1/2): 83-110.
- [3] XU Y, ZHANG T, ZHOU J. Historical occurrence of algal blooms in the northern Beibu Gulf of China and implications for future trends [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 451
- [4] 沈萍萍, 齐雨藻, 欧林坚. 中国沿海球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 的分类、分布及其藻华 [J]. *海洋科学*, 2018, 42(10): 146-162.
- [5] KANG Z, YANG B, LAI J, et al. *Phaeocystis globosa* bloom monitoring: based on *P. globosa* induced seawater viscosity modification adjacent to a nuclear power plant in Qinzhou Bay, China [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2020, 19(5): 1207-1220.
- [6] VERITY P G, BRUSSAARD C P, NEJSTGAARD J C, et al. Current understanding of *Phaeocystis* ecology and biogeochemistry, and perspectives for future research [J]. *Biogeochemistry*, 2007, 83: 311-330.
- [7] WANG X, TANG K W, WANG Y, et al. Temperature effects on growth, colony development and carbon partitioning in three *Phaeocystis* species [J]. *Aquatic Biology*, 2010, 9(3): 239-249.
- [8] XU N, HUANG B, HU Z, et al. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa* Scherffel (Prymnesiophyceae) isolated from the South China Sea [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 35(3): 557-565.
- [9] 李波, 蓝文陆, 李天深, 等. 球形棕囊藻赤潮消亡过程环境因子变化及其消亡原因 [J]. *生态学杂志*, 2015, 34(5): 1351-1358.
- [10] 李杰, 陆家昌, 赖俊翔, 等. 球形棕囊藻游离单细胞的密度与囊体形成的关系研究 [J]. *植物科学学报*, 2022, 40(1): 84-95.
- [11] BIDLE K D, HARAMATY L, RAMOS J B E, et al. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliana huxleyi* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(14): 6049-6054.
- [12] DINGMAN J E, LAWRENCE J E. Heat-stress-induced programmed cell death in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [J]. *Harmful Algae*, 2012, 16: 108-116.
- [13] ZUPPINI A, ANDREOLI C, BALDAN B. Heat stress: an inducer of programmed cell death in *Chlorella saccharophila* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, 48(7): 1000-1009.
- [14] DUNN S R, THOMASON J C, LE TISSIER M D A, et al. Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2004, 11(11): 1213-1222.
- [15] GUILLARD R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [M]//SMITH W L, CHANLEY M H. Culture of marine invertebrate animals. New York: Plenum Press, 1975: 29-60.
- [16] 贺立燕, 宋秀贤, 於凡, 等. 潜在影响防城港核电冷源系统的藻类暴发特点及其监测防控技术 [J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(3): 700-706.
- [17] 王小冬. 棕囊藻囊体形成及对环境压力的响应 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [18] 张栋. 钦州湾营养盐时空变化的影响因素与陆源TDN的量化减排研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- [19] 李青叶. 螺旋藻低温响应与锌离子提高其低温耐受性机制的蛋白质组学研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2018.
- [20] 张文洪, 陈明壤, 叶锦培, 等. 植物低温胁迫响应及研究方法探析 [J]. *绿色科技*, 2021, 23(17): 126-129.
- [21] WANG X, TANG K W. Buoyancy regulation in *Phaeocystis globosa* Scherffel colonies [J]. *The Open Marine Biology Journal*, 2010, 4: 115.
- [22] RAVEN J A, HURD C L. Ecophysiology of photosynthesis in macroalgae [J]. *Photosynthesis Research*, 2012, 113: 105-125.
- [23] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399.
- [24] LIU S X, ZHANG J, HU C Y, et al. Physiological and transcriptome analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) in improving *Gracilariopsis lemaneiformis* stress tolerance at high temperatures [J]. *Algal Research*, 2021, 60: 102532.
- [25] BIDLE K D. The molecular ecophysiology of programmed cell death in marine phytoplankton [J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7: 341-375.
- [26] WANG H, ZHANG D, FERNÁNDEZ-LORENZO J L, et al. Reactive oxygen species, nitric oxide and plant cell death associated with caspase-like protease activity during somatic embryogenesis in *Fraxinus mandshurica* [J]. *Journal of Forestry Research*, 2022, 33: 1005-1017.
- [27] LI P, NIJHAWAN D, BUDIHardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/

- caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade [J]. *Cell*, 1997, 91(4):479-489.
- [28] LIU X S, KIM C N, POHL J, et al. Purification and characterization of an interleukin-1 beta-converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(23):13371-13376.
- [29] LU Z Y, SHA J, TIAN Y, et al. Polyphenolic allelochemical pyrogallol acid induces caspase-3 (like)-dependent programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Algal Research*, 2017, 21: 148-155.
- [30] WANG H, MI T, ZHEN Y, et al. Metacaspases and programmed cell death in *Skeletonema marinoi* in response to silicate limitation [J]. *Journal of Plankton Research*, 2017, 39(4):729-743.
- [31] CHEN Y T, WENG Y Y, ZHOU M, et al. Linalool- and α -terpineol-induced programmed cell death in *chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 167:435-440.
- [32] VAN ENGELAND M, NIELAND L J W, RAMAEKERS F C S, et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure [J]. *Cytometry*, 1998, 31(1):1-9.

Growth and Physiological and Biochemical Responses of *Phaeocystis globosa* under Gradient Temperature Rise and Temperature Drop

LIANG Sirou^{1,2}, LI Jie^{2,3}, LAN Caibi^{2,3}, XU Mingben^{2,3}, LU Jiachang^{2,3}, XIE Fang^{1,2}, WEI Wei^{1,2}, LAI Junxiang^{2,3**}, WANG Yinghui^{4**}

(1. School of Resources, Environment and Materials, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530006, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. Beibu Gulf Marine Industry Research Institute, Fangchenggang, Guangxi, 538000, China; 4. School of Marine Sciences, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530006, China)

Abstract: The frequent outbreak of *Phaeocystis globosa* blooms endangers the safety of marine ecosystems and fishery production, and will block the cold source water intake system of nuclear power plants and cause serious safety hazards. The outbreak of *P. globosa* has obvious seasonal characteristics. In this study, the physiological and biochemical responses of *P. globosa* under different temperatures (high temperature and low temperature) and the process of the Programmed Cell Death (PCD) induced by temperature stress were studied by gradient heating and cooling experiments. The results showed that the low-temperature stress inhibited the normal growth and reproduction of *P. globosa* cells and did not activate them to enter the PCD response process. High-temperature stress caused oxidative stress in *P. globosa*, which led to the occurrence of PCD response process. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were significantly increased, and Annexin V-FITC positive reaction occurred in *P. globosa* cells after the activation of cysteine aspartic protease 3 (Caspase-3). Environmental stress caused oxidative stress in *P. globosa* cells, the activity of antioxidant enzymes increased rapidly, and Caspase-3 was activated to induce PCD response in *P. globosa* cells, showing the characteristics of phosphatidylserine (PS) eversion, cell contraction and plasma membrane separation from the cell wall. This study can provide a theoretical basis for further exploring the mechanism of the generation and elimination mechanism of *P. globosa* blooms and the prevention and control of red tide disasters.

Key words: *Phaeocystis globosa*; temperature impress; programmed cell death; SOD; Caspase-3

责任编辑:梁 晓