

不同铁浓度对一种颗石藻 *Emiliania huxleyi* 的生长及光合作用的影响

任庆敏^{1,2}, 林燕妮⁴, 王寅初^{1,3,5}, 秦松^{1,3,5}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 国家基础学科公共科学数据中心, 北京 100190; 4. 烟台大学, 山东 烟台 264005; 5. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 为探讨铁对颗石藻生长及光合作用的影响, 以分离于秘鲁上升流区域的两株不同基因型的赫骨黎艾氏藻 *Emiliania huxleyi* RCC6660 与 RCC6666 为研究对象, 在调整 5 种铁浓度(0、50、100、500、1 000 nmol/L)的 Aquil 培养基中培养, 比较其生长率、色素含量、营养盐消耗、颗粒有机物含量及叶绿素荧光特性参数的差异。实验结果表明: 铁浓度未对两株藻的生长产生显著影响, 但 0 nmol/L 时 RCC6660 的比生长率显著高于 RCC6666($P<0.05$)。随着铁浓度的减少, 细胞粒径和体积减小, 最大电子传递速率($rETR_{max}$)和表观光能利用效率降低。我们推测 RCC6660 为了保护细胞在低铁时免受光损伤, 通过叶黄素循环以及高度钙化的外壳实现光保护, 而 RCC6666 通过更多其他形式的非光化学荧光淬灭的手段。由于钙化是个耗能过程, 低钙化的 RCC6666 的光能利用效率在低铁浓度下也更高。但 RCC6660 的 $rETR_{max}$ 更大, 拥有较高的光合潜力, 这可能与它拥有的更高含量的色素有关。本研究揭示了不同基因型、不同钙化程度的两株 *Emiliania huxleyi* 对不同铁浓度的差异响应, 及铁限制条件下光保护机制和光能利用的不同, 为进一步研究光合和钙化作用的偶联机制提供了参考。

关键词: 颗石藻; 铁限制; 光合; 叶绿素荧光

中图分类号: P735; P76 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)12-0050-13
DOI: 10.11759/hyxx20201109002

颗石藻是一种单细胞的光合自养钙化微藻, 属于定鞭藻, 是海洋初级生产力的重要组成部分^[1]。当今世界海洋中碳酸钙的年产量约为 50 亿吨, 从中生代开始, 颗石藻一直是世界海洋中主要的碳酸钙生产者, 如今约占海洋碳酸钙总产量的三分之一^[2-3]。光照、温度、pH、盐度以及氮、磷营养盐和铁等环境因子是影响颗石藻的种类、密度和分布的主要原因^[4]。铁是海洋生态体系中有机体所必需的微量元素, 其对于藻类的新陈代谢、光合作用和呼吸过程中电子的转移、硝酸盐的还原、叶绿素的合成以及活性氧自由基的解毒来说都是必需的元素^[5]。在寡营养大洋中, 铁的可用性限制了浮游生物的生长, 从而大大降低了生物碳泵的效率。

国内外在铁对浮游植物光合作用及其他生理生化特征的影响方面已经进行了较多的研究, 但多数实验都围绕蓝藻和硅藻, 对于颗石藻的研究很少。铁限制条件下, 硅藻的细胞体积会减小^[6]或增大^[7]。缺铁会部分阻断光系统 II(PSII)和光系统 I(PSI)之间的电子传递, 这是电子供体细胞色素 c_6 浓度较低所致。这种受

阻的电子传递可能导致质体醌池的过度减少, 引起 PSII 和 PSI 复合物的光化学效率显著降低^[8]。铁限制导致细胞叶绿素浓度降低^[9-10], 色素结合蛋白含量降低^[11], 但体内叶绿素特异性光吸收截面增加^[12]。

研究发现很多藻类在铁限制的条件下长期进化而存在一些适应机制。比如硅藻拥有一系列应对铁限制的策略, 使它们能够在低铁条件下存活, 并响应间歇性铁输入而迅速产生水华^[13-14]。这些机制包括通过减少富含铁的光合蛋白复合物的丰度来减少代谢铁需求^[15]; 用无铁蛋白替代含铁蛋白^[9, 16]; 利用高亲和力和铁摄取系统; 使用铁储存机制实现奢侈

收稿日期: 2020-11-09; 修回日期: 2020-12-18

基金项目: 国家基础学科公共科学数据中心“中国海岸带植物资源数据库”(NBSDC-DB-22); 内蒙古自治区关键技术攻关计划(2021GG0414)

[Foundation: National Basic Science Data Center “Database of Coastal Plant Bioresources in China”, No. NBSDC-DB-22; Key Technology Program of Inner Mongolia Autonomous Region, No. 2016YFE0106700]

作者简介: 任庆敏(1996—), 女, 山东济南人, 硕士, 主要从事海岸带分子藻类学及基因组学研究, E-mail: hitqmren@163.com; 王寅初(1986—), 通信作者, E-mail: ycwang@yic.ac.cn

的铁摄取量(即超过实现最大增长率所需的量);最高的 σ PSII 值和更大的细胞体积^[17]等等。

颗石藻相比于硅藻,似乎具有更少的铁需求量,但是铁对于赫胥黎艾氏藻 *Emiliania huxleyi* 的 DNA 修复、ROS 管理以及维持光合作用的最佳状态是必不可少的,间接影响碳循环和未来的生态系统功能。*E. huxleyi* 以时间和浓度依赖的方式摄取 Fe(III)形式的铁^[18],且其生长所需的铁含量很低,在含 5.4 nmol/L 铁的培养基中即可维持较好的生长速率^[19]。铁限制条件下活性 CO₂ 和 HCO₃⁻的摄取率显著降低,导致生长速率显著降低^[20]。与铁限制条件相比,在高铁条件下,色素和光合参数增加,活性氧(ROS)的积累减少,由过量辐照度引起的 DNA 损伤最小化^[21]。

秘鲁海流系统具有全年持续的沿海上升流,是最具生产力的海洋生态系统之一,秘鲁近海的缺氧和静海水中,沉积物来源的还原铁[Fe(II)]构成了溶解铁的主要组成,浓度高达 200 nmol/L^[22]。然而,高营养的秘鲁洋流系统中的浮游植物却可能受到缺铁的限制^[23-24],而且上升流的酸性环境可能加深了铁限制的影响^[25]。近岸上升流区域中的颗石藻在整个适应过程中可能同时经历了铁限制与富铁环境,其对铁的适应范围及对其光合作用的影响需要进一步探索。本文选取了秘鲁近岸分离的 *E. huxleyi* RCC6660 和 RCC6666 为研究对象,它们属于不同的基因型且有着不同的钙化能力。通过比较不同铁浓度对它们的生长及光合作用的影响,探究不同 *E. huxleyi* 藻株的差异响应表现及低铁适应机制,进一步揭示钙化外壳在低铁条件下可能对细胞的光保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种

本实验所用的颗石藻为赫胥黎艾氏藻 *Emiliania huxleyi* RCC6660 和 RCC6666,由法国 Roscoff 藻种中心(<http://roscoff-culture-collection.org/>)提供。原藻种分离于秘鲁上升流中心,当地的 pH 最低为 7.65。

1.1.2 铁的控制

本实验所用培养基是为研究微量元素对藻类生理影响而设计的 Aquil 培养基,培养基的配制及处理方法参照 Price 等^[26]。其中人工海水及营养盐(NaH₂PO₄·H₂O、NaNO₃ 和 Na₂SiO₃·9H₂O)分别使用 Chelex 100(Bio-Rad, US)阳离子交换树脂除去溶剂

和试剂中引入的铁污染。维生素及用 100 μmol/L EDTA 螯合的微量金属元素母液使用酸洗的针头过滤器过滤除菌。铁使用 EDTA 螯合后添加,培养基的铁浓度分别设置为 0、50、100、500、1 000 nmol/L。

实验中所用的水为超纯水(Millipore, >18 MΩ·cm⁻¹),所有容器都经过酸洗,然后用 Q-H₂O 重复洗涤五次以上^[27]。为防止高温灭菌引入的铁污染,培养基使用 0.22 μm 孔径的一次性无菌过滤器过滤除菌,弃掉前 200 mL 滤液。

1.1.3 培养条件

培养基在使用之前,将盐度调整为 35,通过添加 NaHCO₃ 将溶解无机碳(DIC)调整为 2 000 μmol·kg⁻¹。藻株使用密闭盖的 175 cm² 聚碳酸酯细胞培养瓶进行培养,光照条件为 100 μmol photons·m⁻²·s⁻¹(14L : 10D),温度为 20 °C。将封闭的培养物每天摇动 3 次并随机交换位置以确保细胞受光均匀。在正式实验之前,细胞在对应的铁浓度下进行两次适应性驯化,即让细胞从 10³ cells/mL 增殖至 5×10⁴ cells/mL(不大于 10⁵ cells/mL),以适应实验条件。在正式实验时,以 10³ cells/mL 的浓度接种,当细胞浓度到达 5×10⁴ cells/mL(不大于 10⁵ cells/mL)时测量光合生理并收样测定其他参数。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞生长率与粒径、体积

每天固定时间使用 0.1 mL 浮游生物计数框对细胞计数来确定细胞密度。比率生长速率(μ)如下测定: $\mu=(\ln C_2-\ln C_1)/(T_2-T_1)$,其中 C_2 和 C_1 分别代表 T_2 和 T_1 的细胞浓度。实验结束后取样,使用流式细胞摄像系统 FlowCAM(fluid imaging technologie, US)测量细胞粒径及体积。

1.2.2 细胞色素

在 GF/F 滤膜(Millipore, US)上过滤 100 mL 培养物,将膜折叠后放入离心管中,加入 4 mL 100% 甲醇并置于 4 °C 冰箱中提取过夜,然后在 4 °C 下离心 10 分钟(6 700 r/min)。使用扫描分光光度计扫描上清液在 200~800 nm 的吸收^[28]。使用下列公式计算叶绿素 $a(a)$ ^[29]、叶绿素 $c(c)$ ^[30]和类胡萝卜素(r)^[31]的浓度(μg·mL⁻¹):

$$a=16.29 \times (A_{665}-A_{750})-8.54 \times (A_{652}-A_{750}). \quad (1)$$

$$c=28.8191 \times (A_{632}-A_{750})-6.0138 \times (A_{665}-A_{750}). \quad (2)$$

$$r=7.6 \times (A_{480}-A_{750})-1.49 \times (A_{510}-A_{750}). \quad (3)$$

1.2.3 碳酸盐系统及营养分析

用玻璃纤维过滤器(Whatman GF/F)过滤所得的

滤液进行 DIC 和营养盐测定。DIC 使用总有机碳分析仪(Shimadzu TOC-VCPH)测量;使用连续流动分析仪(Seal-Branlubbe AA3, Seal Germany)测量硝酸盐和磷酸盐的浓度。

1.2.4 颗粒有机碳(POC)及颗粒有机氮(PON)含量测定

颗石藻细胞使用预燃烧(450 °C, 12 h 以上)的玻璃纤维滤膜通过抽滤收集, 每组收集 100 mL。测量前添加 230 μL 的 0.1 mol/L 盐酸以除去膜上的无机碳, 用以测量 POC 和 PON。滤膜在 60 °C 烘箱中烘干 2 h 之后, 使用锡纸包裹并在元素分析仪中进行测定。将细胞的 PON 和 POC 含量乘以生长速率(μ), 以计算 PON 生产速率(P_{PIN})和 POC 生产速率(P_{POC})。

1.2.5 叶绿素荧光

藻细胞暗适应 15 min 之后, 使用叶绿素荧光仪(AquaPen-C, 捷克 PSI)测量叶绿素荧光参数, 包括最大光化学效率(F_v/F_m)、有效光化学效率(Y_{PSII})和非光化学淬灭(NPQ)。

快速光响应曲线设置 6 个光强梯度(10, 20, 50, 100, 300, 500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 每个光强 60 s, 相对电子传递速率(rETR)的计算公式如下^[32]:

$$E=Y_{\text{PSII}}\times p\times 0.5, \quad (4)$$

式中, p 指代提供光化学光的光合有效辐射(PAR), E 为 rETR。将 rETR—PAR 数据导入到 SigmaPlot (v13.0)后, 使用双指数衰减(double exponential decay)方程进行回归拟合^[33-34], 并得到各项特征参数, 包括最大相对电子传递速率(rETR_{max})、饱和光强和表观光能利用率。

1.3 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 26.0 数据统计软件进行数据, 不同铁浓度处理间的差异用方差分析、多重比较, 两个藻种之间的差异用 t -检验分析, 以 $P<0.05$ 作为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 两株颗石藻的进化分析

按照 Bendif 根据核糖体系统发育定义三个分支^[35], 将 RCC6660 与 RCC6666 与其他藻株一起进行系统发育分析(图 1)。结果表明, RCC6660 属于 α 支, 而 RCC6666 属于 β 支(图 1)。因此本文中, 为了行文简洁, 赫胥黎艾氏藻 *Emiliania huxleyi* RCC6660 与 RCC6666 分别简称为 α 株与 β 株。

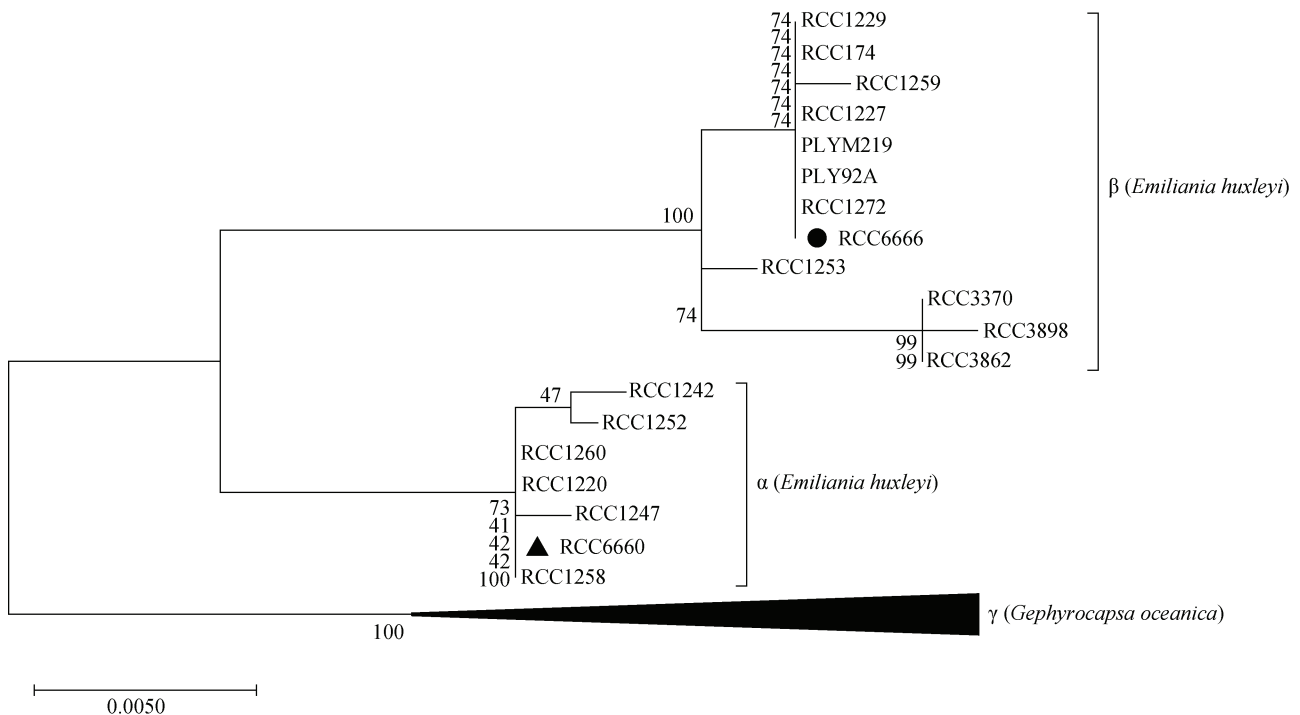


图 1 基于极大似然法利用线粒体 *cox3* 基因序列的艾氏藻系统发育树 66606666

Fig. 1 Maximum likelihood phylogeny of the coccolithophores using the mitochondrial *cox3* gene sequences 66606666

注: 进化枝显示 100 次重复的自展值支持。藻株 RCC6660 和 RCC6666 在赫胥黎艾氏藻两个基因型分支(α 和 β)中的位置分别用黑色三角和黑色圆标记。外群(即 γ 枝)由大洋桥石藻(*Gephyrocapsa oceanica*)RCC1281、RCC1316、RCC1307、RCC1839、RCC1320、RCC1319、RCC1318、RCC1317、RCC1306、RCC1305、RCC1300、RCC1286、RCC1284、RCC1282、RCC1562、RCC1292 组成

2.2 对颗石藻生长率的影响

如图 2 所示, α 株的比生长率随着培养基中铁浓度的增加表现出递增的趋势, 所以其在铁浓度为 1 000 nmol/L 时比生长率大于其他组($P>0.05$), 而对于 β 株, 50 nmol/L 才是其最适铁浓度($P>0.05$)。铁浓度为 0 nmol/L 时, α 株的比生长率显著高于 β 株($P<0.05$), 而在铁浓度为 50 nmol/L 时, α 株的比生长率显著低于 β 株($P<0.05$)。

2.3 对细胞粒径及体积的影响

如图 3 所示, 两藻株的细胞最小粒径在铁浓度较低时较小, 而在铁浓度大于 500 nmol/L 时趋于稳定。在铁浓度为 0 nmol/L 时细胞的细胞粒径最大($P>0.05$), 高铁浓度(>100 nmol/L)反而抑制了细胞的最大粒径, 使其表现为减小的趋势。在不同铁浓度培养中, α 株的最小粒径均小于 β 株, 且在 0 nmol/L 和 100 nmol/L 时具有显著性($P<0.05$), 而 α 株的最大粒径均大于 β 株($P>0.05$)。两藻株在铁浓度为 100 nmol/L 时, 细胞平均粒径和平均体积最大($P>0.05$)。且在各个铁浓度中, α 株的平均体积都更大($P>0.05$)。

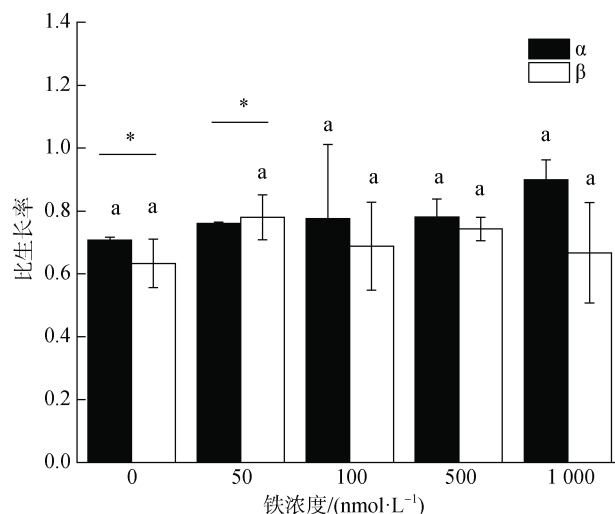


图 2 五种实验铁浓度对 RCC6660(α)和 RCC6666(β)的比生长率的影响

Fig. 2 Effects of five experimental iron concentrations on specific growth rates of RCC6660 (α) and RCC6666 (β)

注: 数值为平均值 $\pm$ 标准差, $n=3$ 。不同字母表示单一藻株不同铁浓度之间具有显著性差异($P<0.05$), 柱状图上的横线表示两个藻株之间有显著性差异($P<0.05$)

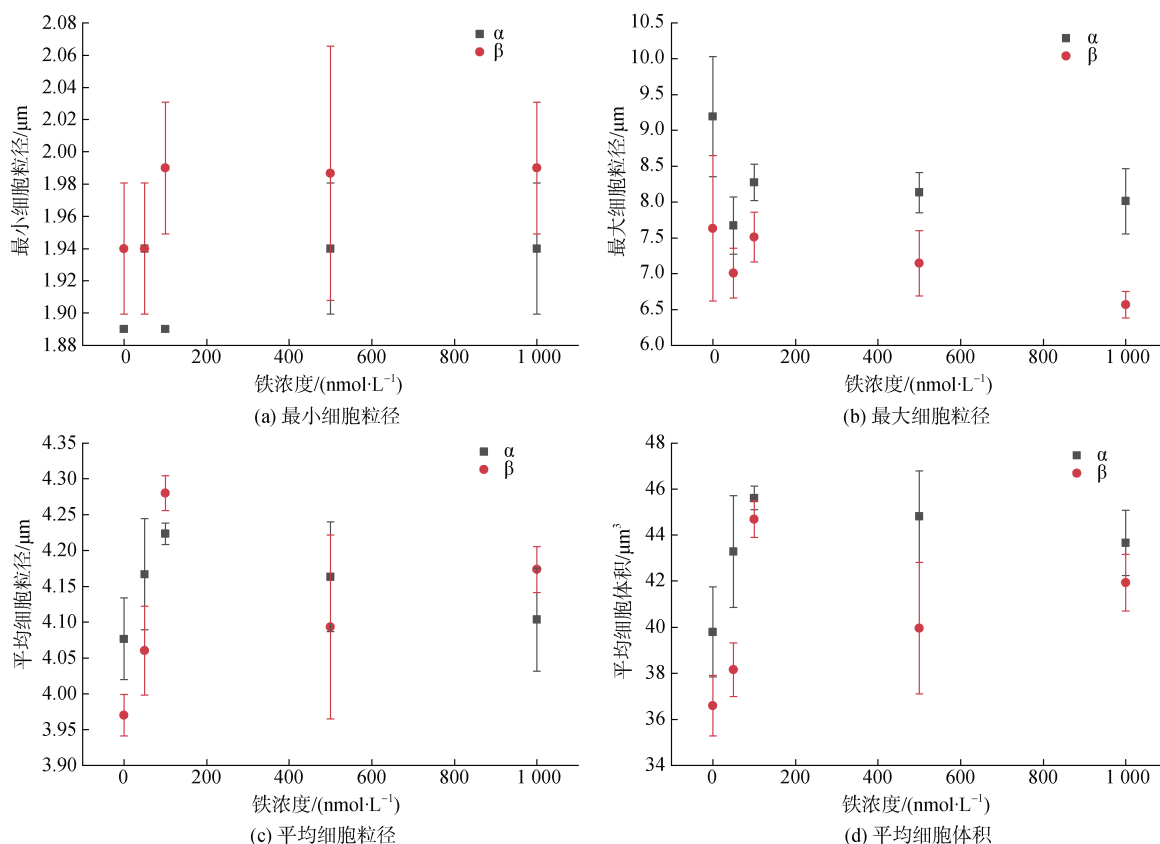


图 3 五种实验铁浓度对 RCC6660(α)和 RCC6666(β)的细胞粒径和细胞体积的影响

Fig. 3 Effects of five experimental iron concentrations on cell particle size and cell volume of RCC6660 (α) and RCC6666 (β)

注: 数值为平均值 $\pm$ 标准差, $n=3$

2.4 对颗石藻色素含量的影响

2.4.1 不同铁浓度对叶绿素 *a* 的影响

不同铁浓度对颗石藻叶绿素 *a* 的含量的影响不大, 各个实验组之间不具有显著性差异(见图 4a)。两者比较, 在较低铁浓度(0、50、100、500 nmol/L)下, α 株细胞中的含量更高, 而 β 株在 1 000 nmol/L 时的叶绿素 *a* 含量更高。

2.4.2 不同铁浓度对叶绿素 *c* 的影响

如图 4b 所示, 在 0、50 和 100 nmol/L 时, α 株的叶绿素 *c* 含量高于 β 株, 而在 500 和 1 000 nmol/L 时, α 株的叶绿素 *c* 含量显著低于 β 株($P<0.05$)。且 β 株在

1 000 nmol/L 时的叶绿素 *c* 含量显著高于 50 nmol/L ($P<0.05$)。

2.4.3 不同铁浓度对类胡萝卜素的影响

如图 4c 所示, 在 0、50 和 100 nmol/L 时, α 株的类胡萝卜素含量高于 β 株, 而在 500 和 1 000 nmol/L 时, α 株的类胡萝卜素含量低于 β 株, 与叶绿素 *c* 含量变化一致, 且在 1 000 nmol/L 时存在显著性差异($P<0.05$)。 α 株在 100 nmol/L 铁浓度时的类胡萝卜素含量显著高于 500 nmol/L 和 1 000 nmol/L ($P<0.05$)。 β 株在 0 和 50 nmol/L 时的类胡萝卜素含量显著低于其他浓度的含量($P<0.05$)。

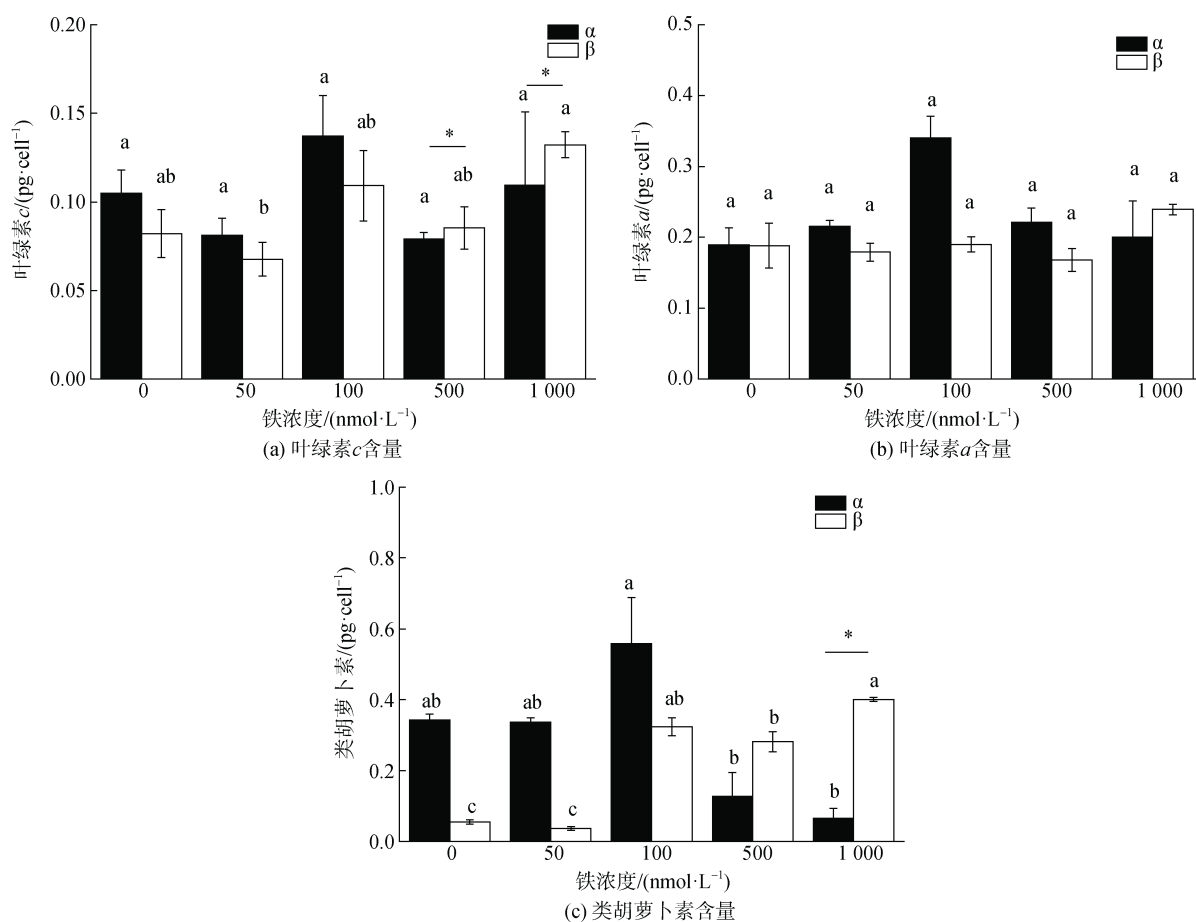


图 4 五种实验铁浓度对 RCC6660(α)和 RCC6666(β)中的叶绿素 *a*、叶绿素 *c* 及类胡萝卜素的影响

Fig. 4 Effects of five experimental iron concentrations on chlorophyll *a*, chlorophyll *c*, and carotenoids of RCC6660 (α) and RCC6666 (β)

注: 数值为平均值 $\pm$ 标准差, $n=3$ 。不同字母表示单一藻株不同铁浓度之间具有显著性差异($P<0.05$), 柱状图上的横线表示两个藻株之间有显著性差异($P<0.05$)

2.5 对颗石藻氮磷消耗的影响

如表 1 所示, 培养基中铁浓度为 50 nmol/L 时, 培养结束后培养基中剩余的磷含量最高, 之后随着铁浓度的增加磷消耗加剧($P>0.05$)。但是在铁浓度

0 nmol/L 的培养基中培养的细胞竟然消耗了比高浓度铁环境中更多的磷。 α 株比 β 株在同样的条件下消耗的磷多。根据氮盐的剩余浓度可知, 硝酸盐的消耗呈现先增后减再增的状态。

表 1 五种实验铁浓度对 RCC6660(α)和 RCC6666(β)的氮磷消耗的影响

Tab. 1 Effects of five experimental iron concentrations on nitrogen and phosphorus consumption by RCC6660 (α) and RCC6666 (β)

藻株	铁浓度/(nmol·L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ 浓度/(μg·L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ 浓度/(μg·L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ 浓度/(μg·L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ 浓度/(μg·L ⁻¹)
RCC6660	0	56.50±11.94	15.90±3.31	0.21±0.16	50.72±19.34
	50	76.81±21.47	23.73±24.53	0.18±0.14	46.33±12.91
	100	69.62±10.25	5.41±0.28	0.42±0.13	50.58±4.31
	500	68.43±26.60	6.36±0.76	0.14±0.12	39.67±21.75
	1 000	62.28±11.97	10.56±2.82	0.34±0.35	34.25±9.22
RCC6666	0	90.50±8.76	29.75±17.41	0.29±0.09	64.63±31.65
	50	104.01±10.19	10.76±7.02	0.39±0.21	55.92±19.72
	100	100.16±16.32	11.51±7.28	0.02±0.03	59.01±14.19
	500	92.15±8.63	13.00±9.97	0.58±0.16	53.71±6.27
	1 000	85.54±3.91	11.10±1.67	2.54±3.93	51.35±14.80

注: 数据为实验结束后培养基中的氮(稀释 50 倍)与磷(稀释 2 倍)含量, 起始值相同。表中数据为三次重复的平均值±标准差, $n=3$

2.6 对颗石藻光合作用的影响

不同铁浓度条件下培养的 α 株藻细胞 PSII 活性没有显著性差异, 但是 β 株在铁浓度为 100 nmol/L

时的活性显著低于 500 nmol/L 时($P<0.05$)。而且在铁限制条件(0 nmol/L)下, α 株的 F_v/F_m 显著低于 β 株($P<0.05$)(图 5a)。

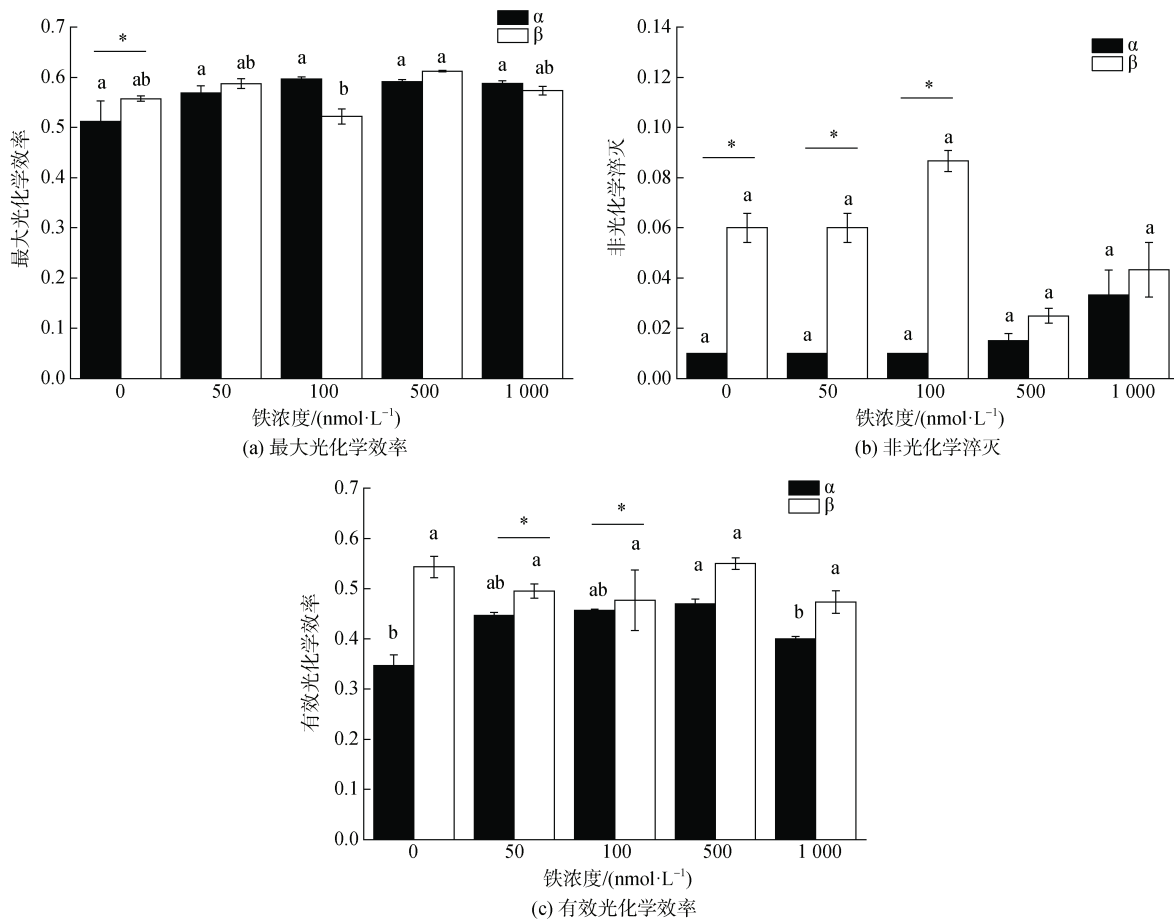


图 5 五种实验铁浓度对 RCC6660(α)和 RCC6666(β)的最大光化学效率、有效光化学效率和非光化学淬灭的影响

Fig. 5 Effects of five experimental iron concentrations on F_v/F_m , NPQ, and Q_Y of RCC6660 (α) and RCC6666 (β)

注: 数值为平均值±标准差, $n=3$ 。不同字母表示单一藻株不同铁浓度之间具有显著性差异($P<0.05$), 柱状图上的横线表示两个藻株之间有显著性差异($P<0.05$)

从图 5b 可以看出,在五种实验铁浓度下,β 株的 NPQ 都大于 α 株,且在铁浓度较低的培养条件(0、50 和 100 nmol/L)下,β 株的 NPQ 显著大于 α 株($P<0.05$)且呈较高水平。α 株的 NPQ 随铁浓度增加表现为递增趋势。

如图 5c 所示,两个藻株相比,β 株在实验铁浓度下的 PSII 有效光化学效率更大,且在 50 和 100 nmol/L 时是显著的($P<0.05$)。β 株在 500 nmol/L 时的有效光化

学效率显著高于在 0 nmol/L 和 1 000 nmol/L 的条件下的($P<0.05$)。

从图 6 可以看出,在 5 种实验铁浓度下,β 株的表观光合效率均高于 α 株,且最大电子传递速率在较高铁浓度(100、500 和 1 000 nmol/L)时也较高,但是低浓度时反之。两者表观光合效率和最大电子传递速率均无显著性差异。总体来讲,铁浓度高时,表观光合效率和最大电子传递速率也呈较高的水平。

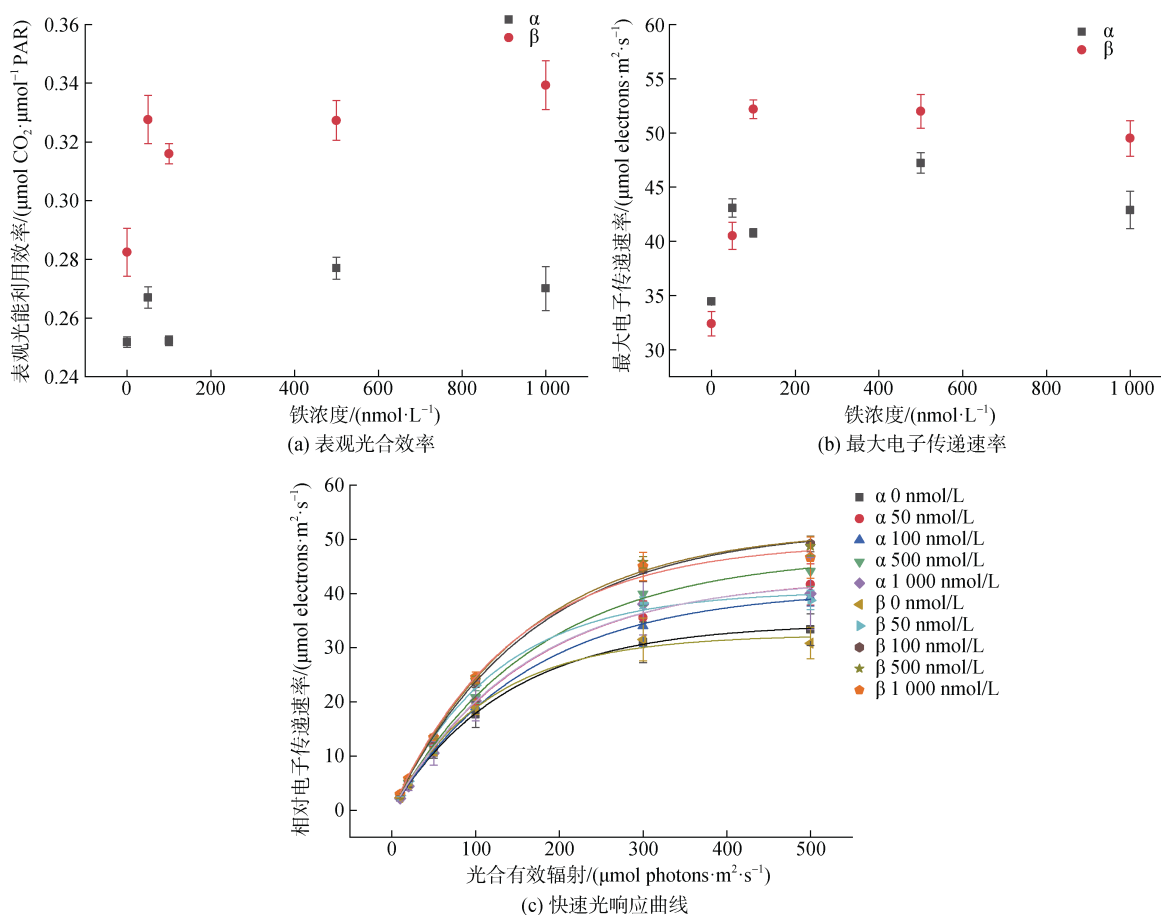


图 6 五种实验铁浓度对 RCC6660(α)和 RCC6666(β)的表观光合效率、最大电子传递速率的影响及快速光响应曲线
Fig. 6 Effects of five experimental iron concentrations on apparent photosynthetic efficiency, $rETR_{\max}$, and the rapid light curve of RCC6660 (α) and RCC6666 (β)

注: 数值为平均值±标准差, $n=3$

2.7 对颗石藻颗粒有机物生产的影响

如图 7 所示,α 株的 PON 含量以及 POC 与 PON 的生产率在五种实验铁浓度下均大于 β 株,且在 500 nmol/L 时 POC、PON 含量和产率达到最大值。在五种实验铁浓度下,β 株的 POC、PON 含量和产率都呈现先减后增再减的趋势。两株藻的 POC/PON 值也表现出这个趋势且在 50 nmol/L 和 500 nmol/L 时具有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 铁浓度与细胞粒径

南美洲秘鲁沿岸的近海洋流所经海域是一个广阔的、高硝酸盐的但铁有限的叶绿素区域,该地区底层水中有极高浓度的溶解铁(>50 nmol/L),在秘鲁南海岸沿岸上升流水域和秘鲁洋流近岸海域中,溶解铁浓度很低(<0.1 nmol/L)^[36]。颗石藻可能在这片水域

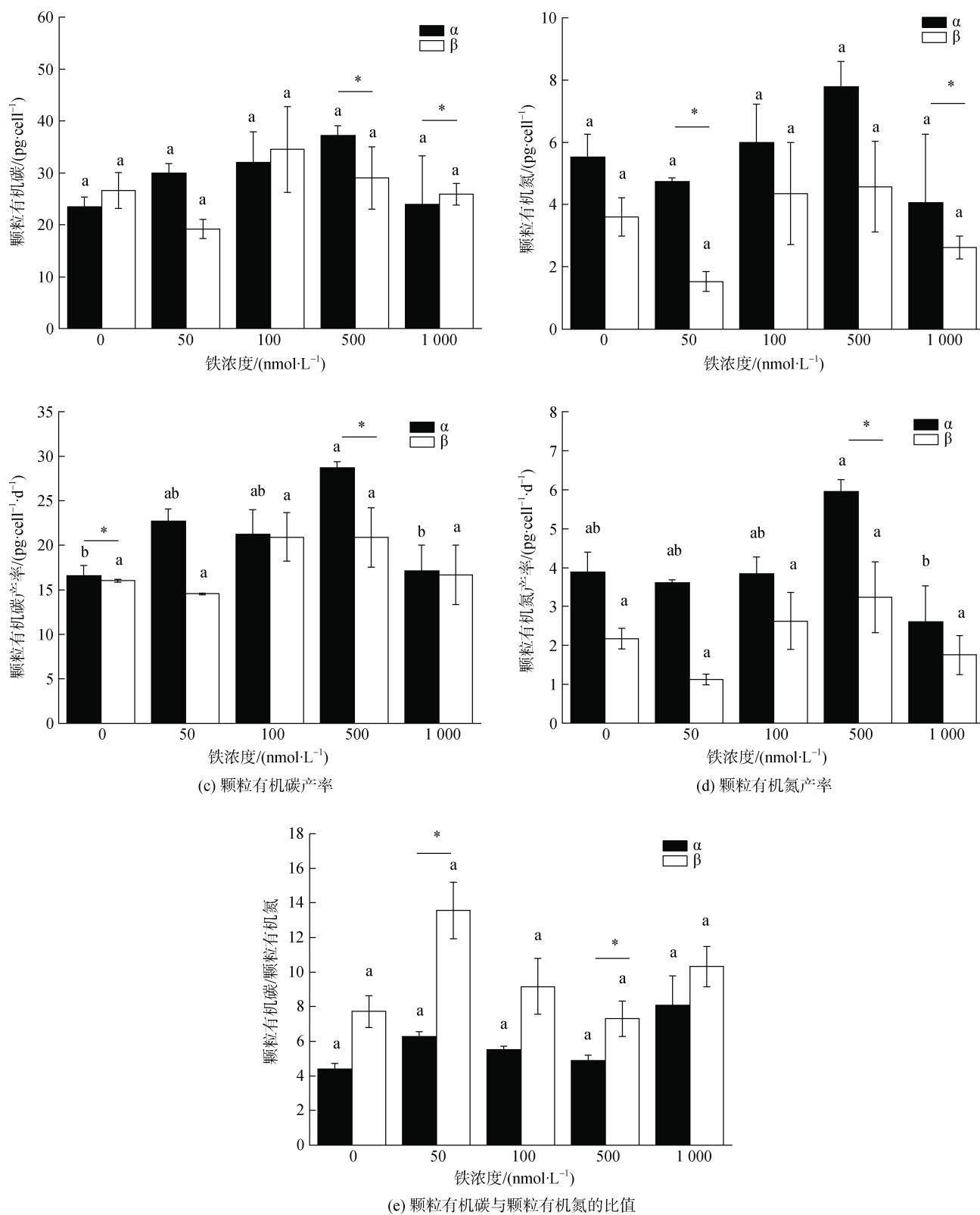


图 7 五种实验铁浓度对 RCC6660(α)和 RCC6666(β)的颗粒有机碳与颗粒有机氮含量及产率、两者比值的影响

Fig. 7 Effects of five experimental iron concentrations on specific growth rates of RCC6660 (α) and RCC6666 (β)

注: 数值为平均值±标准差, $n=3$ 。不同字母表示单一藻株不同铁浓度之间具有显著性差异($P<0.05$), 柱状图上的横线表示两个藻株之间有显著性差异($P<0.05$)

逐渐适应,因而在广范围的铁浓度下的生长率都趋于稳定。在铁浓度较低(0、50、100 nmol/L)时,两藻株的细胞粒径和体积随着铁浓度的降低而减小,细胞的比表面积增大,进而促进了细胞对铁的吸收。此外,细胞体积小对于生活在低铁环境中的细胞特别有利,因为它降低了细胞对于铁、氮和光合产物的需求^[37],而且降低了下沉率。总体来看,在所有铁浓度下, β 株的细胞粒径和体积低于 α 株,这暗示它可能对铁有更高的要求,或者对铁浓度的变化反应更敏感。后者也可以从其在色素和颗粒有机物等参数随铁浓度的增加呈现“波浪式”变化的表现可以看出。

3.2 氮磷营养的消耗

细胞减少铁需求的另一种方法是使用还原态的氮代替氧化态的氮,因为硝酸盐的还原需要含铁酶,如硝酸盐和亚硝酸盐还原酶^[14, 38]。本实验中采用硝酸盐作为氮源,所以铁需求量可能会相对增大^[39]。随着铁浓度变化,两株藻对于氮磷的消耗趋势一致。在0 nmol/L的铁限制环境中,细胞对于硝酸盐的消耗比1 000 nmol/L的富铁条件下低,但却消耗了与富铁条件下差不多的磷。在五种实验铁浓度下, α 株都比 β 株消耗的氮磷要多。这表明, α 株比 β 株对氮磷的需求更多,铁限制条件会降低细胞对于硝酸盐的利用但是不影响磷的利用。铁限制条件下,细胞可能是部分氮胁迫的。

50 nmol/L下两株藻细胞对硝酸盐的吸收表现出了一个小的峰值,而对磷的需求却达到了最小值,此时消耗的N:P较大。 β 株在50 nmol/L铁浓度下细胞的PON值显著降低,表明细胞不能维持其最佳的氮配额。而且尽管C:N比增加了,POC含量也减少了,这与之前在硝酸盐中生长的细胞在铁胁迫下表现得一致^[37, 40]。然而 α 株不具备此特征,其在铁浓度为500 nmol/L时细胞含有较高的POC及PON含量但是C:N仍显著小于 β 株。铁会促进碳和氮同化成叶绿素和储能化合物等成分^[9, 38, 41],其机制尚不清楚,净结果是促进了有机质的积累。

3.3 色素与光保护

受铁限制的硅藻降低了叶绿素含量、光合效率^[42-43],所有这些都导致了生长速度的降低。然而判断铁限制的重要指标 F_v/F_m ^[44]以及比生长率^[9, 45-46]都没有显著的变化,或许可以说明颗石藻对铁的极低需求度^[19]。两个藻株在不同铁浓度下的细胞色素含量呈

现一定的规律。 α 株在铁浓度为100 nmol/L时叶绿素a、叶绿素c和类胡萝卜素的总含量是最多的,而 β 株在铁浓度为1 000 nmol/L时总含量是最多的。这也在一定程度上证明了两株藻铁需求的不同。

细胞中光合色素含量下降似乎是铁胁迫下的普遍行为^[44, 47-49],但在我们的实验中,叶绿素含量并没有显著降低。色素浓度的这种相对不敏感是铁限制的谜团之一,尤其是在大量营养素水平较高时^[45-46]。但是类胡萝卜素含量变化很大。 β 株在铁限制条件下类胡萝卜素含量显著降低,然而 α 株正好相反,在富铁环境中细胞的类胡萝卜素含量较低。为什么会产生这样的差异?

铁限制条件下,真核藻类主要通过叶黄素循环相关的NPQ来耗散叶绿素吸收的过多的过剩光能,在高光低铁条件下,非光化学淬灭对光系统的保护作用更加明显且重要^[10, 47-49]。类胡萝卜素能通过叶黄素循环调节天线的能量传递,还在防御光合结构的光氧化破坏和捕光复合体的装配方面发挥重要作用。铁限制条件下, β 株的NPQ要显著大于 α 株。这可能是由于 α 株是一种高度钙化的细胞^[50],颗石粒组成的外骨骼可以抵挡一部分的紫外光^[51],在铁限制条件下,高含量的类胡萝卜素及厚的碳酸钙外壳都为细胞在高强度PAR/UVR下提供了多重保护。而 β 株可能更多地选择增强NPQ的能力以增加热耗散。而这种NPQ可能不是来自叶黄素,而是捕光天线复合体在PSI与PSII之间的移动或PSII反应中心的淬灭^[52]。 β 株在低铁时趋于生产更少量的类胡萝卜素,这似乎也是一种光保护手段,因为捕光色素的增加抑制PSII的修复速率,加剧光抑制^[53]。

3.4 光合电子传递

类囊体是铁主要存在的部位,类囊体电子传递的几乎每一个方面都依赖于铁。铁由于其高还原-氧化电位而在许多金属蛋白中作为电子载体^[39]。在浮游植物中,高比例的铁包含在光合作用装置和线粒体电子传递链的组件中^[54-55]。铁限制导致最大电子传递速率和表观光能利用效率都随铁浓度的降低而降低^[56-57]。本文的结果也表现出了这个趋势,但是铁浓度为1 000 nmol/L时颗石藻最大电子传递速率下降,可能是此浓度超过了光合作用的最适浓度甚至有抑制作用。铁胁迫下细胞捕获和利用光能的能力较弱,因此缺铁细胞可能比富铁细胞更容易受到光化学损伤^[5],这与本实验中光饱和参数也在低

铁时降低一致, 细胞在 0 nmol/L 下耐受强光的能力较弱。

β 株在任何铁浓度时都保持更高的光能的利用效率, 这可能也与其钙化作用弱于 α 株相关, 毕竟钙化是个耗能过程^[58]。在铁限制条件(0 nmol/L, 50 nmol/L)下, α 株的最大相对电子传递速率 $rETR_{max}$ 更大, 拥有较高的光合潜力, 当高铁浓度时 β 株才占据优势。这可能是由于其低铁时更高的叶绿素含量, α 株可能通过过度生产光合作用天线, 增加光子聚焦来克服短期的电子传输效率低下, 从而弥补对效率较低的无铁蛋白质的持续依赖。

4 结论

海洋浮游生物的铁供应变化会通过改变碳固存率对大气中二氧化碳的浓度产生重大影响^[59], 而颗石藻作为主要的钙化浮游生物, 了解铁限制对其的影响是很重要的。本研究通过比较不同铁浓度对两株不同钙化程度且不同基因型的颗石藻生长及光合作用的影响, 证明了颗石藻通过降低细胞粒径等策略来适应缺铁条件。同时缺铁影响了色素合成及电子传递, 颗石藻为了应对铁限制产生了一系列光保护机制。因为两株藻钙化程度的差异造成了铁限制条件下的差异响应, 因此在之后的研究中, 需要进一步证实是不是钙化作用的差异导致了光合方面的差异表现。

参考文献:

- [1] HAY W W, MOHLER H P, ROTH P H, et al. Calcareous nannoplankton zonation of the cenozoic of the gulf coast and caribbean-antillean area, and transoceanic correlation[J]. Protein Science A Publication of the Protein Society, 1967, 19(9): 1649-1661.
- [2] IGLESIAS-RODRIGUEZ M D, HALLORAN P R, RICKABY R E M, et al. Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world[J]. Science, 2008, 320(5874): 336-340.
- [3] MILLIMAN J D. Production and accumulation of calcium-carbonate in the ocean: budget of a nonsteady state[J]. Global Biogeochemical Cycles, 1993, 7(4): 927-957.
- [4] YANG T N, WEI K Y, GONG G C. Distribution of coccolithophorids and coccoliths in surface ocean off northeastern Taiwan[J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2001, 42(4): 287-302.
- [5] GEIDER R J, LAROCHE J. The role of iron in phytoplankton photosynthesis, and the potential for iron-limitation of primary productivity in the sea[J]. Photosynthesis Research, 1994, 39(3): 275-301.
- [6] LEYNAERT A, BUCCIARELLI E, CLAQUIN P, et al. Effect of iron deficiency on diatom cell size and silicic acid uptake kinetics[J]. Limnology and Oceanography, 2004, 49(4): 1134-1143.
- [7] TAKEDA S, OBATA H. Response of equatorial pacific phytoplankton to subnanomolar fe enrichment[J]. Marine Chemistry, 1995, 50(1/4): 219-227.
- [8] RONCEL M, GONZÁLEZ-RODRIGUEZ A A, NARANJO B, et al. Iron deficiency induces a partial inhibition of the photosynthetic electron transport and a high sensitivity to light in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1050.
- [9] ALLEN A E, LAROCHE J, MAHESWARI U, et al. Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(30): 10438-10443.
- [10] VAN DE POLL W H, VAN LEEUWE M A, ROGGEVELD J, et al. Nutrient limitation and high irradiance acclimation reduce PAR and UV-induced viability loss in the Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae)[J]. Journal of Phycology, 2005, 41(4): 840-850.
- [11] RUETER J G, UNSWORTH N L. Response of marine *synechococcus* (cyanophyceae) cultures to iron nutrition[J]. Journal of Phycology, 1991, 27(2): 173-178.
- [12] GREENE R M, GEIDER R J, KOLBER Z, et al. Iron-Induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes in eukaryotic marine algae[J]. Plant Physiology, 1992, 100(2): 565-575.
- [13] SUNDA W G, HUNTSMAN S A. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton[J]. Marine Chemistry, 1995, 50(1/4): 189-206.
- [14] MARCHETTI A, SCHRUTH D M, DURKIN C A, et al. Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(6): E317-E25.
- [15] STRZEPEK R F, HARRISON P J. Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms[J]. Nature, 2004, 431(7009): 689-692.
- [16] PEERS G, PRICE N M. Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom[J]. Nature, 2006, 441(7091): 341-344.
- [17] STRZEPEK R F, BOYD P W, SUNDA W G. Photosynthetic adaptation to low iron, light, and temperature in Southern Ocean phytoplankton[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(10): 4388-4393.

- [18] HARTNETT A, BOTTGER L H, MATZANKE B F, et al. Iron transport and storage in the coccolithophore: *Emiliania huxleyi*[J]. Metallomics, 2012, 4(11): 1160-1166.
- [19] BOYE M, VAN DEN BERG C M G. Iron availability and the release of iron-complexing ligands by *Emiliania huxleyi*[J]. Marine Chemistry, 2000, 70(4): 277-287.
- [20] SCHULZ K G, ROST B, BURKHARDT S, et al. The effect of iron availability on the regulation of inorganic carbon acquisition in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* and the significance of cellular compartmentation for stable carbon isotope fractionation[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2007, 71(22): 5301-5312.
- [21] SEGOVIA M, LORENZO M R, INIGUEZ C, et al. Physiological stress response associated with elevated CO₂ and dissolved iron in a phytoplankton community dominated by the coccolithophore *Emiliania huxleyi*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2018, 586: 73-89.
- [22] SCHLOSSER C, STREU P, FRANK M, et al. H₂S events in the Peruvian oxygen minimum zone facilitate enhanced dissolved Fe concentrations[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12642-12650.
- [23] HUTCHINS D A, HARE C E, WEAVER R S, et al. Phytoplankton iron limitation in the Humboldt current and Peru upwelling[J]. Limnology and Oceanography, 2002, 47(4): 997-1011.
- [24] MOORE J K, DONEY S C, GLOVER D M, et al. Iron cycling and nutrient-limitation patterns in surface waters of the world ocean[J]. Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography, 2001, 49(1/3): 463-507.
- [25] SHI D L, XU Y, HOPKINSON B M, et al. Effect of ocean acidification on iron availability to marine phytoplankton[J]. Science, 2010, 327(5966): 676-679.
- [26] PRICE N M, HARRISON G I, HERING J G, et al. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium aquil[J]. Biological Oceanography, 1989, 6(5/6): 443-461.
- [27] MALDONADO M T, PRICE N M. Influence of N substrate on Fe requirements of marine centric diatoms[J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 141(1/3): 161-172.
- [28] 缪杭斌. 钙化与非钙化颗石藻对海水酸化与UV辐射的生理学响应[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
MIAO Hangbin. Physiological responses of calcifying and non-calcifying coccolithophore strains to seawater acidification and UV radiation[D]. Xiamen: Xiamen University, 2017.
- [29] PORRA R J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b[J]. Photosynthesis Research, 2002, 73(1/3): 149-156.
- [30] RITCHIE R J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents[J]. Photosynthesis Research, 2006, 89(1): 27-41.
- [31] STRICKLAND J, PARSONS T. A practical handbook of seawater analysis[M]. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1972.
- [32] DUARTE B, SANTOS D, MARQUES J C, et al. Bio-physical probing of *Spartina maritima* photo-system II changes during prolonged tidal submersion periods[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 77: 122-132.
- [33] EILERS P H C, PEETERS J C H. A model for the relationship between light-intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton[J]. Ecological Modelling, 1988, 42(3/4): 199-215.
- [34] RALPH P J, GADEMANN R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity[J]. Aquatic Botany, 2005, 82(3): 222-237.
- [35] BENDIS E, PROBERT I, DIAZ-ROSAS F, et al. Recent reticulate evolution in the ecologically dominant lineage of coccolithophores[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 784.
- [36] BRULAND K W, RUE E L, SMITH G J, et al. Iron, macronutrients and diatom blooms in the Peru upwelling regime: brown and blue waters of Peru[J]. Marine Chemistry, 2005, 93(2/4): 81-103.
- [37] MUGGLI D L, HARRISON P J. Effects of nitrogen source on the physiology and metal nutrition of *Emiliania huxleyi* grown under different iron and light conditions[J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 130(1/3): 255-267.
- [38] MILLIGAN A J, HARRISON P J. Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae)[J]. Journal of Phycology, 2000, 36(1): 78-86.
- [39] RAVEN J A. The iron and molybdenum use efficiencies of plant-growth with different energy, carbon and nitrogen-sources[J]. New Phytologist, 1988, 109(3): 279-287.
- [40] MUGGLI D L, LECOURT M, HARRISON P J. Effects of iron and nitrogen source on the sinking rate, physiology and metal composition of an oceanic diatom from the subarctic Pacific[J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 132(1/3): 215-227.
- [41] TIMMERMANS K R, STOLTE W, DEBAAR H J W. Iron-mediated effects on nitrate reductase in marine-phytoplankton[J]. Marine Biology, 1994, 121(2): 389-396.

- [42] GREENE R M, GEIDER R J, FALKOWSKI P G. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom[J]. *Limnology and Oceanography*, 1991, 36(8): 1772-1782.
- [43] MARCHETTI A, HARRISON P J. Coupled changes in the cell morphology and the elemental (C, N, and Si) composition of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia* due to iron deficiency[J]. *Limnology and Oceanography*, 2007, 52(5): 2270-2284.
- [44] BEHRENFELD M J, MILLIGAN A J. Photophysiological expressions of iron stress in phytoplankton[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2013, 5(1): 217-246.
- [45] CARSLEY J E, FISHER A, MILLIGAN W W, et al. Mechanical behavior of a bulk nanostructured iron alloy[J]. *Metallurgical and Materials Transactions a-Physical Metallurgy and Materials Science*, 1998, 29(9): 2261-2271.
- [46] MOSELEY J L, PAGE M D, ALDER N P, et al. Reciprocal expression of two candidate di-iron enzymes affecting photosystem I and light-harvesting complex accumulation[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 673-688.
- [47] VAN LEEUWE M A, STEFELS J. Photosynthetic responses in *Phaeocystis antarctica* towards varying light and iron conditions[J]. *Biogeochemistry*, 2007, 83(1/3): 61-70.
- [48] ALDERKAMP A C, DE BAAR H J W, VISSER R J W, et al. Can photoinhibition control phytoplankton abundance in deeply mixed water columns of the Southern Ocean?[J]. *Limnology and Oceanography*, 2010, 55(3): 1248-1264.
- [49] WILSON A, BOULAY C, WILDE A, et al. Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: roles of OCP and IsiA proteins[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(2): 656-672.
- [50] BEAUFORT L, PROBERT I, DE GARIDEL-THORON T, et al. Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification[J]. *Nature*, 2011, 476(7358): 80-83.
- [51] MONTEIRO F M, BACH L T, BROWNLEE C, et al. Why marine phytoplankton calcify[J]. *Science Advances*, 2016, 2(7): e1501822.
- [52] BEHRENFELD M, MILLIGAN A. Photophysiological expressions of iron stress in phytoplankton[J]. *Annual review of Marine Science*, 2013, 5(1): 217-246.
- [53] NISHIYAMA Y, ALLAKHVERDIEV S I, MURATA N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2006, 1757(7): 742-749.
- [54] RAVEN J A, EVANS M C W, KORB R E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms[J]. *Photosynthesis Research*, 1999, 60(2/3): 111-149.
- [55] RAVEN J A. Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathway[J]. *New Phytologist*, 1990, 116(1): 1-18.
- [56] PIETSCH D, BERNAT G, KAHMANN U, et al. New insights into the function of the iron deficiency-induced protein C from *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *Photosynthesis Research*, 2011, 108(2/3): 121-132.
- [57] PANKOWSKI A, MCMINN A. Iron availability regulates growth, photosynthesis, and production of ferredoxin and flavodoxin in Antarctic sea ice diatoms[J]. *Aquatic Biology*, 2009, 4(3): 273-288.
- [58] JIN P, GAO K, BEARDALL J. Evolutionary responses of a coccolithophorid *gephyrocapsa oceanica* to ocean acidification[J]. *Evolution*, 2013, 67(7): 1869-1878.
- [59] MARTIN J H, FITZWATER S E. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic[J]. *Nature*, 1988, 331(6154): 341-343.

Effects of different iron concentrations on the growth and photosynthesis of *Emiliana huxleyi*

REN Qing-min^{1, 2}, LIN Yan-ni⁴, WANG Yin-chu^{1, 3, 5}, QIN Song^{1, 3, 5}

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. National Basic Science Data Center, Beijing 100190, China; 4. Yantai University, Yantai 264005, China; 5. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Nov. 9, 2020

Key words: coccolithophores; iron limitation; photosynthesis; chlorophyll fluorescence

Abstract: Two genotypes of *Emiliana huxleyi*, RCC6660 and RCC6666, isolated from a Peruvian upwelling, were cultured in Aquil medium at five different iron concentrations (0, 50, 100, 500, and 1,000 nmol/L) to study the effect of iron on the growth and photosynthesis of coccolithophores. The difference in growth, pigment content, nutrient consumption, particulate organic matter content, and chlorophyll fluorescence characteristics were compared. The results revealed that iron concentration had no significant effect on the growth of the two strains; however, the specific growth rate of RCC6660 in 0 nmol/L was significantly greater than that of RCC6666. As the iron concentration decreased, cell size, cell volume, the maximum relative electron transport rate ($rETR_{max}$), and apparent quantum efficiency (α) also decreased. We speculate that RCC6660 was photoprotected by the lutein cycle and a highly calcified exoskeleton that protected the cells from light damage at low iron levels; moreover, RCC6666 was more likely to be quenched by other forms of non-photochemical fluorescence. The light energy efficiency of RCC6666 was higher at low iron concentrations, as less energy was devoted to calcification. However, RCC6660 had a higher $rETR_{max}$ and photosynthetic potential, which may be related to its higher pigment content. This study revealed the responses of two *Emiliana huxleyi* strains with different genotypes and different calcification abilities to different iron concentrations and the differences in the photosynthetic protective mechanism and light energy utilization under an iron limitation, which provides a reference for further studies of the coupling mechanism between photosynthesis and calcification.

(本文编辑: 杨 悦)