

doi: 10.3788/gzxb20124101.0102

光照强度对蛇足石杉共生蓝藻细胞悬浮培养的影响

郭斌, 张向达, 尉亚辉

(西北大学 生命科学学院; 西部资源与现代生物技术省部共建教育部实验室, 陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069)

摘 要:以蛇足石杉孢子囊为材料, 分离出蛇足石杉共生蓝藻细胞, 研究光照强度对液体培养的共生蓝藻细胞生长的影响. 研究表明, 在光强 500 Lx 下, 共生蓝藻的生长速率最大; 增加光照强度 (> 2000 Lx) 将抑制共生蓝藻的生长, 菌体褪绿变白; 在共生蓝藻生长过程中, 蓝藻细胞内叶绿素 a 的含量随着光强的增加而显著减少, 这与其在强光照下生物量的降低呈正相关. 不同光质实验结果表明, 绿光和蓝光条件下蛇足石杉内生藻生长快而红光条件下藻体增殖最慢, 这与在绿光和蓝光条件下藻体细胞合成的色素含量增高有密切的关系. 实验结论: 蛇足石杉共生蓝藻细胞适宜的光照条件是弱光光照, 适宜的光质是绿光或蓝光.

关键词:蛇足石杉; 共生蓝藻; 光强; 光质

中图分类号: TN92

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2012)01-0102-5

0 引言

蛇足石杉为石杉科 (*Huperziaceae*) 石杉属 (*Huperzia Bernh.*) 植物 (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, *H. serrata*) 的全草. 具有散瘀消肿、解毒和止痛的功效^[1]. 1972 年我国科技工作者报道了从该植物中分离的石杉碱甲具有横纹肌松弛作用^[2], 研究发现石杉碱甲是一种高效、低毒、可逆和高选择性的乙酰胆碱酯酶抑制剂^[3]. 蛇足石杉多生于山地密林下或沟谷阴湿土中, 常伴生有金发藓及暖地大叶藓等藓类. 蛇足石杉是一种低等的蕨类植物, 现存的该类植物大多生长缓慢, 繁殖能力差, 极大地限制了人们对其资源的利用^[4]. 实验室从蛇足石杉的孢子囊、茎尖等部位分离出了其共生的蓝藻细胞, 希望能通过内生藻和蛇足石杉之间的关系研究, 从而促进蛇足石杉的生长速度和增加其有效成分石杉碱甲的生物合成量.

蓝藻又名蓝细菌, 是一类自养的原核光合生物, 它结构简单、生长迅速、适应性强、易于进行遗传操作, 已成为研究光合作用和基因工程的模式生物^[5,6]. 蓝藻与低等植物共生的关系在自然界中普遍存在. 苏铁-蓝细菌共生体因其特殊的代表性很早就引起人们的注意^[7]. 近年来, 许多研究者运用分子生物学方法就苏铁及其共生兰细菌间的相互关系进

行了多方面研究^[8]. 此外有些菌藻共生体如地衣、葛仙米、地耳及石耳等均由真菌和光合固氮蓝藻结合形成, 产生代谢物质如地衣多糖等有利于人体增强免疫及防癌抗癌^[9].

本文在前人研究基础上从蛇足石杉中分离出其内生蓝藻细胞, 分析了光照强度对蛇足石杉共生蓝藻细胞悬浮培养的影响, 建立了蓝藻细胞的悬浮培养体系, 在对其培养过程中发现光照强度显著影响藻体的生长和繁殖, 为进一步在离体条件下研究蛇足石杉与其共生蓝藻之间的生物学关系建立技术平台.

1 材料和方法

1.1 材料

蛇足石杉采自湖北省恩施州建始县. 摘取成熟的孢子囊, 流水 30 m 冲洗, 然后在超净工作台上先用 70% 的乙醇漂洗 10 s, 再用 0.1% 升汞浸泡 10 min, 然后用无菌水冲洗 5 次, 用无菌滤纸吸干多余水分.

第 5 次冲洗完的无菌水收集, 作为检验孢子囊表面是否完全灭菌的对照. 将消毒过孢子囊均匀的接种于盛有 MS 基本培养基的培养皿中, 将第 5 次冲洗完的无菌水涂布与相同的培养皿中, 放于培养室中培养, 培养条件是光照 1000 Lx, 每天光照

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31000144) 和陕西省教育厅基金 (09JK746) 资助

第一作者: 郭斌 (1975—), 男, 博士, 主要研究方向为植物生理与植物细胞工程. Email: guobin@nwwu.edu.cn

通讯作者: 尉亚辉 (1960—), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为植物生理与植物细胞工程. Email: weiyahui@nwwu.edu.cn

收稿日期: 2010-01-01; **修回日期:** 2010-05-09

16 h, 温度(25±0.5)℃.

1.2 方法

1.2.1 蛇足石杉共生蓝藻的悬浮培养

孢子囊在 MS 基本培养基上培养 30cd 左右,在孢子囊的表面长出深绿色的细胞团即蛇足石杉共生蓝藻,见图 1. 在超净工作中挑取少量蓝藻细胞,用液体 MS 基本培养基稀释,然后按照 5% 的接种量转接到盛有 25 mL 的 100 mL 三角瓶中,放于培养室中静置培养,培养条件是光照 1000 Lx, 每天光照 16 h, 温度(25±0.5)℃. 培养 40 d 后,再转移到新的培养液中继续培养,这样继代培养三次后的蓝藻细胞悬浮培养体系作为本实验的研究对象.

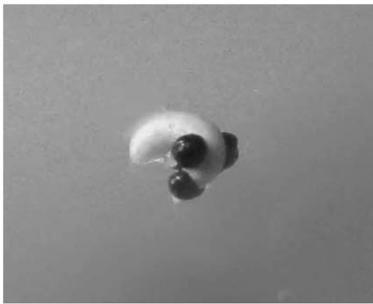


图 1 从蛇足石杉孢子囊表面长出的共生蓝藻
Fig. 1 Symbiotic cyanobacteria growth from the sporangium of *H. serrata*

将共生蓝藻细胞按照 1:20 的比例转接于不同 pH 的 MS 液体培养基中, 然后将其分别放置于光照强度为 0, 100 Lx, 500 Lx, 1000 Lx, 2000 Lx 的环境下培养, 每天光照 16 h, 光周期为 16 h/d, 温度(25±0.5)℃. 每个处理 5 个重复. 培养 42 d 后, 收集细胞培养物, 并分别测定细胞密度、细胞叶绿素含量. 细胞密度采用细胞计数法进行测定, 所用血球计数板为(25×16 型), 根据式(1)计算细胞密度

细胞密度(个/mL) = 实测数 × 5 × 10⁵ × 稀释倍数 (1)

研究不同光质对共生蓝藻生长和色素含量影响时, 用透明玻璃纸得到蓝(约 400 nm)、绿(约 500 nm)、红(约 650 nm) 3 种光质, 以白光为对照组, 不同光质的强度均为重复 500 Lx, 每天光照 16 h, 温度(25±0.5)℃, 培养 42 d 后, 收集细胞培养物, 并分别测定细胞密度、细胞叶绿素含量. 每个处理 5 个重复, 取平均值.

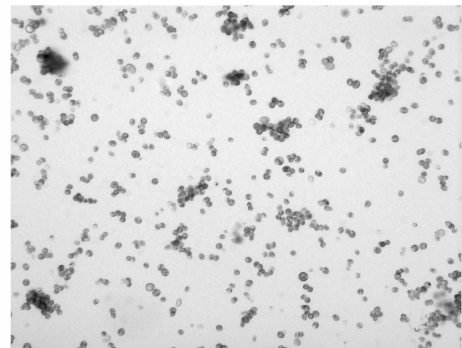
1.2.2 细胞叶绿素 a 的测定

参照文献[16]的方法, 在不同光强及 pH 值处理组合条件下, 利用 Perkin-Elmer Lamda25 分光光度计, 测定藻细胞叶绿素 a 的含量变化. 每个处理三个重复.

2 实验结果和分析

2.1 蛇足石杉共生蓝藻的形态观察

为了获得蛇足石杉共生蓝藻, 将蛇足石杉孢子囊经过表面灭菌后, 放置到 MS 基本培养基上培养, 等到 30 d 后在孢子囊的表面长出绿色的小点, 以后这些小点体积不断的增大, 形成肉眼可见的深绿色细胞团(图 1). 将这些绿色的细胞团用 MS 液体培养基稀释, 然后在光学显微镜下观察, 营养体呈单细胞状态, 缺乏内生孢子和外生孢子, 无段殖体, 没有假分枝, 细胞大多呈椭圆至条, 没有共同胶被, 颜色从绿色到深绿色, 见图 2(a); 从电子显微镜照片可知, 这些绿色的细胞有明显的细胞壁, 分为内外两层, 在原生质体中存在大量的光合膜即内囊体, 没有典型的细胞核, 见图 2(b). 将这些绿色的细胞培养 35 d 的, 藻落为圆形, 边缘光滑, 呈墨绿色, 藻落之间较少成片粘连. 从这些形态和结构特征观察可初步确认这些绿色的细胞属蓝藻.



(a) Symbiotic cyanobacteria form under optical microscope



标签 显微镜 加速电压 放大倍数
XJTUYXK-EM H-600 75kV 35000x 1μm

(b) Symbiotic cyanobacteria structure under electronic microscope

图 2 蛇足石杉共生蓝藻细胞的形态结构

Fig. 2 *H. serrata*. symbiotic cyanobacteria

2.2 光照强度对蛇足石杉共生蓝藻细胞生长的影响

在进行培养蛇足石杉共生蓝藻细胞时发现, 光照对蓝藻细胞的生长有显著的影响, 见图 3、图 4. 光照强度从 100 Lx 到 2000 Lx 下, 蓝藻细胞的生物量有明显的差异. 在光照强度 500 Lx 下, 共生蓝藻细

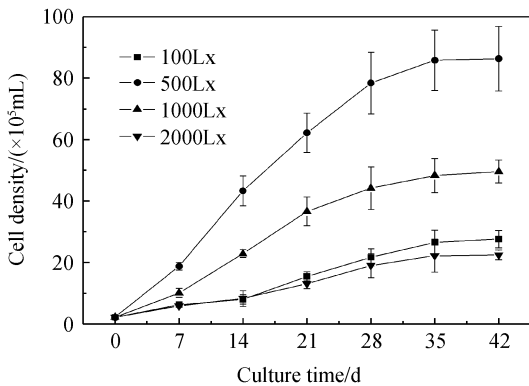


图3 不同光照强度对蛇足石杉共生蓝藻细胞悬浮培养的影响

Fig. 3 Effect of light intensity on the cellular growth of the isolated cyanobacteria from *H. serrata* in liquid medium

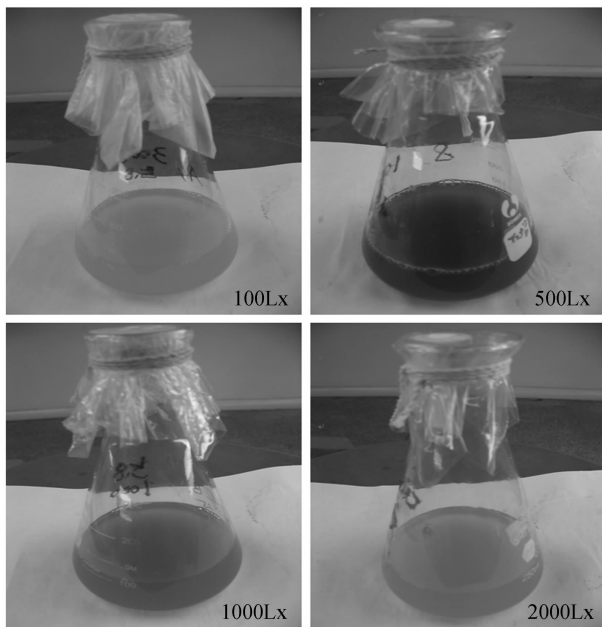


图4 在不同光照强度下蛇足石杉共生蓝藻细胞悬浮培养(培养42d)

Fig. 4 Effect of light intensity on the cellular growth of the isolated cyanobacteria from *H. serrata* in liquid medium

胞的生长最快,细胞密度最大;随着光照强度的增加,共生蓝藻细胞的生物量逐渐减少。从图3可知共生蓝藻细胞在生长至35d时其生物量基本稳定,如果再继续培养菌体的生物量将不再增加,菌体的颜色将逐渐变白。

光强是自然条件下影响藻类生长的重要生态因子^[10]。野生蛇足石杉常年生长在林下阴郁的环境中,主要依赖散射或折射光生长,与其共生的蓝藻细胞在长期的进化过程中也适应这种暗光照生存的特点。研究表明,蛇足石杉共生蓝藻细胞比较适合的光照强度为500Lx,光照太强将抑制蓝藻细胞的生长。送东辉等从野生石耳中分离出共生蓝藻细胞,改藻能够在较高的光照强度下保持良好的生活能力,而蛇足石杉共生蓝藻只能在较低的光照强度下生存,这与其宿主蛇足石杉生存的环境相关^[11]。

2.3 不同光照强度对蛇足石杉共生藻叶绿素a含量的影响

蓝藻光合色素中叶绿素a是光合作用中最重要色素,与代谢产物的积累和藻体生长有密切的关系^[12-13]。研究发现,共生藻的颜色随着光照强度的变化而改变(表1)。对蓝藻叶绿素a含量的测定结果表明,在不同的光照强度下蓝藻叶绿素a的含量不同。叶绿素a含量最高的是在光照强度500Lx下培养的蓝藻细胞,最低的是在2000Lx的光强下的蓝藻细胞。和图3进行对比发现,叶绿素a的含量高低与共生蓝藻的生物量大小呈正相关。当光强大于2000Lx,蓝藻叶绿素a的含量显著降低,藻体颜色变白。同时,藻体生物量降低,这与蓝藻的光合作用下降而导致代谢产物积累降低相关。这与冯宪栋等人^[14]的研究结果相类似,他们发现原绿球藻生长越好,其相对应的叶绿素含量也越高。

表1 不同光照强度对蛇足石杉共生蓝藻叶绿素a含量的影响

Table 1 The chlorophyll a content of the isolated cyanobacteria from *H. serrata* under different light intensity

Light intensity/Lx	100	500	1000	2000
Chlorophyll content/(mg · g ⁻¹ FW ⁻¹)	4.38±0.55	8.03±1.53	6.20±0.89	3.20±0.65

2.4 不同光质对蛇足石杉共生藻叶绿素a含量和细胞活力的影响

光质是调节控制植物代谢的基本因素之一,它对植物的生长、形态结构、光合作用和物质代谢都具有一定的调控作用^[15,16]。大多数的生长和生物合成过程能通过改变光质进行调节。为进一步了解它对光质的反应特征,本研究在不同光质条件下观察了蛇足石杉内生藻的生理生化特征。研究结果表明绿光和蓝光条件下蛇足石杉内生藻生长快而红光条件

下藻体增殖最慢(表2),这与在绿光和蓝光条件下藻体细胞合成的色素含量增高有密切的关系。刘洪艳等^[17]研究了在白光、蓝光、绿光和红光下紫球藻(*Porphyridium cruentum*)的生长和藻胆素含量,发现在绿光培养条件下紫球藻的生物产量和色素含量最高,蓝光次之,而在红光培养条件的紫球藻生长最缓慢。早在1983年Humphrey等也发现了类似的现象^[18]。

表 2 不同光质对蛇足石杉共生蓝藻生长和色素含量的影响

Table 2 The growth and chlorophyll a content of the isolated cyanobacteria from *H. serrata* under different light quality

Light quality	Blue	Green	Red	White
Cell density $\times 10^5$ /mL	89.46 \pm 6.85	108.2 \pm 8.58	42.2 \pm 5.83	80.3 \pm 6.85
Chlorophyll content/(mg \cdot g ⁻¹ FW ⁻¹)	10.38 \pm 1.55	12.06 \pm 1.73	3.00 \pm 0.88	8.95 \pm 1.21

3 结论

本研究通过对蛇足石杉共生蓝藻细胞的分离和液体悬浮培养,发现光照强度是影响蛇足石杉共生蓝藻细胞生长的重要环境因素.光照强度太高则抑制蛇足石杉共生蓝藻细胞的生长.同时,在高光强下蛇足石杉共生蓝藻细胞中叶绿素 a 的合成受到抑制,菌体颜色变白,菌体的繁殖能力降低.蛇足石杉共生蓝藻细胞适宜的光照条件是弱光照.另外,不同光质实验结果表明,蛇足石杉共生蓝藻细胞生长最适宜的光质是绿光和蓝光.

参考文献

- [1] 浙江省药用植物志编写组. 浙江药用植物志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1980.
- [2] ZHANG Jun-cheng, XING Jian-hong, SONG Yu-hong, *et al.* Recent advances in studies on herb biological of *huperzia serrata* (Thunb.) Treb[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2008, **27**(2): 1.
张君成, 邢建宏, 宋育红, 等. 药用植物蛇足石杉研究新进展[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(2):1.
- [3] CHENG Dong-dong, REN Hua, TANG Xin-can. Huperzine A: a novel promising acetylcholinesterase inhibitor[J]. *Drug Future*, 1996, **8**(1): 97-101.
- [4] GUO Bin, XU ling-ling, WEI Ya-hui. Research advances of *huperzia serrata* (Thunb.) Trev. [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, **34**(16): 2018-2023.
郭斌, 徐玲玲, 尉亚辉, 等. 千层塔的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16):2018-2023.
- [5] XI Chao, WANG Chun-mei, SHI Ding-ji. Advances on cyanobacteria genetic engineering applications [J]. *China Biotechnology*, 2010, **30**(3): 105-111.
席超, 王春梅, 施定基. 蓝藻基因工程应用研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(3):105-111.
- [6] SINGH S P, MANFRED K, SINHA R P, *et al.* Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study [J]. *Genomics*, 2010, **95**(2): 120-128.
- [7] LINDBLAD P, BIRGITTA B, AMAR N R, *et al.* The Cyanobacterium-zamia symbiosis an ultrastructural study[J]. *The new phytologist*, 1986, **101**: 707-716.
- [8] BAO Xiao-dong, SONG Tie-ying, ZHENG Wei-wen. Optimization of PCR conditions for symbiosis of cyanobacteria in cycads[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences Edition)*, 2002, **24**(6): 824-828.
包晓东, 宋铁英, 郑伟文. 苏铁共生蓝藻细菌 PCR 条件的优化[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2002, 24(6):824-828.
- [9] CAROLIN P, TIM B, BARBARA S, *et al.* Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine [J]. *Food Chemistry*, 2011, **129**: 1766-1769.
- [10] ZHONG Ze-pu, WU Yu-huan, XU Jie, *et al.* Differentiation of hormogonia and photosynthetic characterization of nostoc flagelliforme [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(6): 570-575.
钟泽璞, 吴毓环, 徐洁, 等. 发状念珠藻藻殖段的分化及其光合特性的研究[J]. 植物学报, 2000, 42(6):570-575.
- [11] SONG Dong-hui, FU Jing-juan, SONG Hai-yan. Isolation, purification and physiological response of a new strain of symbiotic cyanobacterium under nitrogen stress [J]. *Biotechnology*, 2010, **20**(4): 27-30.
宋东辉, 付静娟, 宋海燕. 氮胁迫下共生蓝藻的分离纯化及生理响应机制[J]. 生物技术, 2010, 20(4):27-30.
- [12] KARI E, MARKUS MEIER H E, ELIN A. On the dynamics of oxygen, phosphorus and cyanobacteria in the Baltic Sea; A model study[J]. *Journal of Marine Systems*, 2009, **75**: 163-184.
- [13] SONDERGAARD M, LARSEN S E, JORGENSEN T B, *et al.* Using chlorophyll a and cyanobacteria in the ecological classification of lakes[J]. *Ecological indicators*, 2011, **11**(5):1403-1412.
- [14] FENG Xian-dong, JANG Xia-min, FU Fang-yao. Effects of physical-chemical factors on growth and pigment content in alga prochlorococcus sp [J]. *Fisheries Science*, 2007, **26**(12): 643-647.
冯宪栋, 蒋霞敏, 符方尧. 理化因子对原绿球藻生长及其色素含量的影响[J]. 水产科学, 2007, 26(12):643-647.
- [15] WU Chao-yang, NIU Zheng, ANG Quan, *et al.* Relationship between photochemical reflectance index and light use efficiency in growth duration of wheat [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2009, **38**(1): 138-141.
吴朝阳, 牛铮, 汤泉, 等. 小麦生长过程中光能利用率和光化学反射指数的相关性研究[J]. 光子学报, 2009, 38(1): 138-141.
- [16] LIU Xiao, HE Jun-fang, JI Qian-ru, *et al.* Effects of ultraviolet-B radiation on plant light energy transfer process [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(9): 1582-1587.
刘晓, 贺俊芳, 姬倩茹, 等. 增强 UV-B 辐射对植物光能传递过程的影响[J]. 光子学报, 2010, 39(9):1582-1587.
- [17] LIU Hong-yan, PAN Ling-li, SHI Ding-ji. Effect of different light quality on growth and phycobilin of porphyridium cruentum[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2007, **22**(1): 26-28.
刘洪艳, 潘伶俐, 施定基. 不同光质对紫球藻生长及藻胆素含量的影响[J]. 天津科技大学学报, 2007, 22(1):26-28.
- [18] HUMPHREY G F. The effect of the spectral composition of light on the growth, pigments and photosynthetic rate of unicellularmarine algae[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1983, **66**: 49-67.

Effects of Light Intensity on the Growth of Cyanobacteria Isolated from *Huperzia. Serrata* (Thunb.) Trevis in Liquid Medium

GUO Bin, ZHANG Xiang-da, WEI Ya-hui

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The symbiotic cyanobacteria were isolated from the sporangium of *Huperzia. Serrata* (Thunb.) Trevis (*H. Serrata*). And the effects of light intensity on the growth of cyanobacteria were studied. The results showed that the optimal biomass of cyanobacteria cell was obtained under 500 Lx light intensity. The higher light intensity (> 2000 Lx) repressed the cyanobacteria cell growth which would be faded and turned white. During the growth of symbiotic cyanobacteria, the chlorophyll a content was significantly reduced with the light intensity increased, which were positively correlated with the biomass reduction under higher light intensity. In addition, we found that the biomass and the chlorophyll a content of symbiotic cyanobacteria were higher under green light or blue light than those under red light. In conclusion, the weak light was suitable for the growth of symbiotic cyanobacteria isolated from the sporangium of *H. Serrata*. And the optimal light quality on the growth of symbiotic cyanobacteria was green light or blue light.

Key words: *Huperzia. Serrata*; Symbiotic cyanobacteria; Light intensity; Light quality