

doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2019.06.096

一种基于微电极的珊瑚共生体光补偿点测定方法探讨

杨清松^{1,2}, 张燕英^{1,3}, 张颖^{1,2}, 周卫国^{1,2}, 凌娟¹, 林显程^{1,2}, 盛华夏⁴, 董俊德^{1,3}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院海南热带海洋生物实验站, 三亚 572000;

4. 厦门大学 海洋与地球学院 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361102)

摘要 珊瑚虫与虫黄藻互利共生形成共生体, 虫黄藻通过光合作用为珊瑚虫提供重要的能量来源。珊瑚共生体的光补偿点可以较好地指示珊瑚的光适应性, 是重要光合特性指标, 但其测定方法鲜有报道。利用溶氧微电极结合光强可调节光源, 以鹿角杯形珊瑚为实验材料, 依据扩散平衡理论, 建立了一种造礁石珊瑚的光补偿点的测定方法。实验结果表明珊瑚的扩散边界层溶氧浓度会快速响应光强变化。珊瑚扩散边界层溶氧浓度与光合有效辐射具有较好的相关性, 且光强由高降低过程测得的相关系数更高。实验测得鹿角杯形珊瑚的光补偿点较低, 为 $1.52 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 与喜阴植物的光补偿点相当。相对较低的光补偿点利于珊瑚栖居于水深范围更广的区域, 有助于扩展珊瑚的生态位。溶氧微电极相关技术和方法在珊瑚光合作用研究中具有广泛的应用前景。

关键词 微电极; 鹿角杯形珊瑚; 扩散边界层; 溶氧扩散平衡; 光补偿点

中图分类号 Q331

文献标识码 B

文章编号 2095-1736(2019)06-0096-04

An exploration on the method of measuring light compensation point of coral holobiont with microelectrode

YANG Qing-song^{1,2}, ZHANG Yan-ying^{1,3}, ZHANG Ying^{1,2}, ZHOU Wei-guo^{1,2},LING Juan¹, LIN Xian-cheng^{1,2}, SHENG Hua-xia⁴, DONG Jun-de^{1,3}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;

3. Tropical Marine Biological Research Station in Hainan, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000;

4. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract The coral holobiont is a complex system containing the coral polyp and its symbiotic zooxanthellae. Zooxanthellae provides an important source of energy for coral polyps through photosynthesis. The light compensation point of coral holobiont can indicate the light adaptability of coral, and it is an important photosynthetic characteristic index. However, the measurement of light compensation points of the coral holobiont was little reported. Here we reported a method for determining the light compensation point of coral holobiont. According to the theory of diffusion equilibrium, the light compensation point of coral *Pocillopora damicornis* was determined by using dissolved oxygen microelectrode combined with light intensity adjustable light source. Our results showed that the concentration of dissolved oxygen in coral diffusion boundary layer responded rapidly to the change of photosynthetically active radiation (PAR). The concentration of dissolved oxygen in coral diffusion boundary layer was highly correlated with the PAR, and higher correlation coefficient was achieved in the process of PAR decreasing. The light compensation point of the coral *P. damicornis* was $1.52 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, which

收稿日期: 2019-01-23; 修回日期: 2019-02-11

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 A (XDA13020300); 国家自然科学基金 (41676163; 41406191; 41276113; 41276114); 国家重点研发计划 (2017YFC0506301, 2018YFC1406500); 广州市珠江科技新星 (201806010017)

作者简介: 杨清松, 博士研究生, 专业为海洋生物学, E-mail: qsyang@scsio.ac.cn

通信作者: 董俊德, 博士, 研究员, 主要从事海洋生态学研究, E-mail: dongjunde@vip.163.com

was equivalent to those of shade-tolerant plants. A relatively low light compensation point allowed coral *P. damicornis* to inhabit a wider range of water depths, which expanded the habitat of coral. The dissolved oxygen microelectrode related techniques and methods had a wide application prospect in the research of coral holobiont photosynthesis.

Key words microelectrode; *Pocillopora damicornis*; diffusive boundary layer; dissolved oxygen diffusive equilibrium; light compensation point

造礁石珊瑚(Reef-building Coral)是珊瑚礁生态系统中主要的造礁生物,是珊瑚礁立体框架结构的基础。造礁石珊瑚是由珊瑚虫和其中共生的虫黄藻(zooxanthellae)、原生动、真菌、细菌、古菌、病毒等组成的共生体^[1]。虫黄藻通过光合作用可以为珊瑚宿主提供有机碳源,是珊瑚重要的能量来源^[2]。研究揭示珊瑚共生的虫黄藻可以将其光合产能的87%~95%传递给珊瑚宿主,而来自虫黄藻的能量占造礁石珊瑚宿主的能量可达90%^[3]。

珊瑚共生体的光合相关参数可以反映珊瑚的生存状态及能量平衡。光补偿点(Light compensation point)指示的是光合生物在其光合速率与呼吸速率一致时的光合有效辐射(Photosynthetically active radiation, PAR)。理论上,珊瑚的光补偿点的差异可以决定珊瑚生长对PAR的需求,影响珊瑚在珊瑚礁中栖居的水深范围^[4]。对于不同珊瑚物种,光补偿点较高的珊瑚物种其需要维持呼吸代谢的PAR更高,不能生存在光照较弱的深水区域,反之,光补偿点较低的珊瑚物种更能够适应深水区域较低的PAR。对于同种珊瑚,其光补偿点较低时说明珊瑚共生体的呼吸代谢较弱,生存状态较差;反之,如果珊瑚共生体的光补偿点较高,则表明珊瑚的呼吸代谢旺盛,生存状态良好。

由于珊瑚共生体中参与光合作用的虫黄藻与珊瑚宿主及其他共生生物的复杂关系,珊瑚的光补偿点可能会受多种因素的影响。影响和调节珊瑚共生体光补偿点的机制有待深入研究。然而由于珊瑚共生体组成复杂,且栖居于水中,测定其光合参数的方法更为复杂,故而测定珊瑚共生体的光补偿点的方法鲜有报道。微电极是可以用于精确测量珊瑚组织内包括pH值、溶氧、碳酸根、钙离子等参数的强大工具^[5-6]。本研究提出了一种使用溶氧微电极,依据扩散平衡理论^[7],对珊瑚共生体的光补偿点进行直接测定的方法。

1 材料和方法

1.1 测定原理

珊瑚的组织黏液表面与海水之间存在着溶氧浓度梯度层,称之为扩散边界层(Diffusive boundary layer)^[8]。当珊瑚在光照充足的条件下时,珊瑚共生体内产生的氧气大于自身呼吸所需的量,氧气由珊瑚体内

向外周海水扩散;反之,当光合作用产氧不足以支持呼吸耗氧时,氧气由外周海水向珊瑚体内扩散,在扩散边界层形成相反方向的氧气扩散浓度梯度^[9]。珊瑚的扩散边界层的氧气扩散符合Fick第一扩散定律^[7]:

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x}$$

其中 J 为扩散流量, D 为扩散常数, C 为气体浓度, x 为扩散距离。

基于光补偿点的定义,当施加的PAR等于光补偿点时,珊瑚共生体达到光合产氧量与呼吸耗氧量平衡,与环境无氧交换。此时,对于珊瑚的扩散边界层上任意位置 x 上的氧气浓度 C 应与水体本底氧浓度相等,其氧气扩散流量的净值 J 应为0。因此,珊瑚扩散边界层溶氧浓度与海水本底溶氧浓度相等时的PAR即为珊瑚的光补偿点。通过调节PAR并监测扩散边界层溶氧浓度变化,建立PAR与溶氧浓度的关系式,将海水本底溶氧值代入关系式解出对应的PAR值即为珊瑚的光补偿点。

1.2 珊瑚样品准备

实验采用的鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)样品采集自三亚鹿回头。潜水采集一株鹿角杯形珊瑚,珊瑚出水后将整株珊瑚分为多个珊瑚断枝,并将珊瑚断枝用阿隆发胶水粘结于陶瓷基座上,并置于实验养殖棚下 1 m^3 水族缸内暂养备用。

1.3 PAR和溶解氧测定

在实验室内小水族缸周围组合溶氧微电极(Unisense)、照度计(Biospherical)、可调节光源(Nikon)搭建珊瑚溶氧测定平台(如图1所示)。分别用氮气和空气曝气的海水做参考品,通过零溶氧和饱和溶氧两点绘制工作曲线以校正溶氧微电极。先将微电极置于远离珊瑚的位置测定海水中的溶氧浓度。然后调整溶氧微电极尖至珊瑚杯口表面(在体视镜下进行)并观测到溶氧浓度值的明显变化,确认电极进入了珊瑚扩散边界层。调整照度计至与电极水深相当的深度,并固定光源位置。将实验平台严格遮光,以防止外来光的影响。

首先观测珊瑚扩散边界层溶氧浓度对光照有无变化的响应,待溶氧微电极读数稳定后,关闭光源,待溶氧读数降至最低点并稳定时再打开光源,记录溶氧变

化。然后观测扩散边界层溶氧浓度与 PAR 之间的关系,调节 PAR 由高级级降低,在每级光强停留 1~2 min,待溶氧数值稳定后调低 PAR 至下一级,将光照调至最低稳定后,再逐渐调大 PAR。电脑记录整个过程的 PAR 与溶氧数据序列。

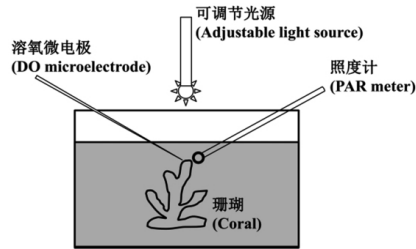


图 1 珊瑚光补偿点测定平台示意图

Figure 1 The diagram of the measurement system of coral light compensation point

1.4 光补偿点计算

导出 PAR 与溶氧数据序列并对齐时间轴,得到光强与珊瑚扩散边界层溶氧浓度的对应关系,确定珊瑚扩散边界层在不同 PAR 下对应的稳定溶氧浓度。分别计算在 PAR 增加与减弱过程中扩散边界层溶氧浓度与 PAR 的相关性,得到 PAR 与溶氧的关系式。根据扩散边界层溶氧浓度与 PAR 的关系式,计算出珊瑚的扩散边界层溶氧浓度与水体溶氧浓度相等时的 PAR 即为珊瑚共生体光补偿点。

2 结果

在测试珊瑚对光照有无变化的响应实验中,关闭光源后,珊瑚的扩散边界层的溶氧浓度急剧下降,并在 60 s 左右溶氧稳定在接近 0 $\mu\text{mol/L}$ 的水平(图 2)。结果表明,扩散边界层的溶解氧浓度会快速响应辐照强度的变化,建立新的溶氧浓度梯度平衡。因此在调节辐照强度过程中,每个辐照强度持续时间 1~2 min 左右足以建立新的浓度梯度平衡。而从黑暗到恢复光照后,珊瑚扩散边界层的溶解氧浓度升高,并在约 120 s 后达到新的平衡。光照从暗到明比从明到暗这一过程要花费更长的时间达到新的溶氧浓度梯度平衡。

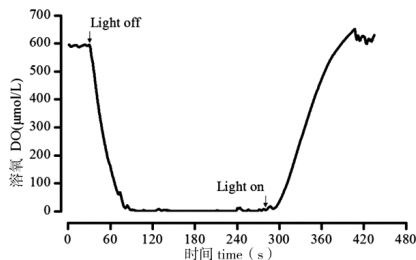


图 2 扩散边界层溶氧浓度对光源有无的响应

Figure 2 The response of dissolved oxygen concentration in diffusive boundary layer to the on-off shift of light

在逐级调低 PAR 的过程中,珊瑚扩散边界层溶氧

浓度也随之降低,且在每档 PAR 下较快达到稳定值(图 3)。在 PAR 由低升高的过程中观测到的扩散边界层溶氧浓度数值也随之上升,但反应较为滞后,存在较大波动,难以进入稳定状态(图 3)。

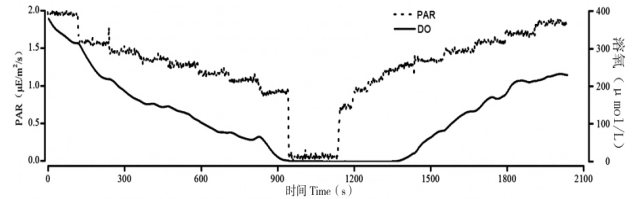


图 3 珊瑚扩散边界层溶氧浓度随光照逐级调整而变化

Figure 3 The variation of dissolved oxygen concentration in diffusive boundary layer of coral in response to the PAR adjustment

为进一步分析扩散边界层溶氧浓度与 PAR 之间的关系,分别对光照强度由高降低和由低升高两个过程中的珊瑚扩散边界层溶氧浓度与 PAR 进行相关性分析。结果表明,光照由强变弱过程的溶氧浓度与 PAR 值的相关性($R = 0.996$)高于光照由弱变强过程的溶氧浓度与 PAR 值的相关性($R = 0.989$)。根据两种情况下溶氧浓度与 PAR 值的关系,计算珊瑚扩散边界层溶氧浓度与海水中溶氧浓度($192.5 \mu\text{mol/L}$)相等时的 PAR 值,得到鹿角杯形珊瑚的光补偿点分别为 $1.52 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 和 $1.67 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ 。鹿角杯形珊瑚的光补偿点与三白草科喜阴植物的光补偿点相当^[10]。

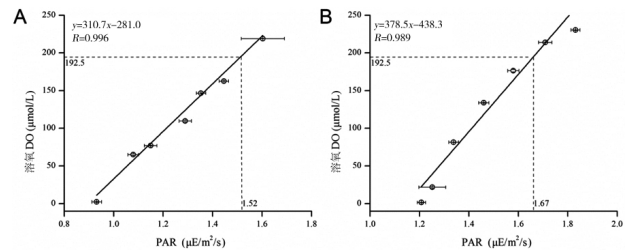


图 4 光照由强变弱(A)和由弱变强(B)过程中珊瑚扩散边界层溶氧浓度与 PAR 的关系

Figure 4 The relationship between PAR and dissolved oxygen concentration in diffusive boundary layer of coral during the process of PAR decreasing (A) and increasing (B)

本实验中 PAR 由弱变强的过程测得的光补偿点($1.67 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$)略高于 PAR 由强变弱的过程中测得的光补偿点($1.52 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$)。这可能与珊瑚的触手对光的响应有关。鹿角杯形珊瑚的触手上充满了虫黄藻。在 PAR 由弱变强的过程中,其触手尚未完全舒展,因而其光照接受率低,达到同等的光合强度需要更高的 PAR,从而测得的光补偿点偏高。等待珊瑚的触手舒展可能减少这一偏差,但会耗费更多的测定时间。加之 PAR 由强变弱过程中测得的珊瑚边界层溶氧值与 PAR 的相关性更高。综合分析,将 PAR 由强到弱调

节过程中测得的光补偿点数值可信度更高。

3 讨论与结论

目前测定珊瑚光合参数的主要方法有密闭容器内的氧浓度变化监测法、氧同位素膜进样质谱法、溶氧微电极法、调制叶绿素荧光仪法(PAM)等^[4]。因为PAM操作简便,在野外和实验室中的适用性强,目前在珊瑚光合参数测定中应用最为广泛^[11-13]。然而PAM测定的指标反映的是叶绿素的光合特性,而不能直接测定珊瑚的实时光合速率。实时光合速率测定方法的基本原理主要是对光合作用的底物与产物进行测定,即通过测定二氧化碳与氧气的浓度变化来推测光合作用与呼吸作用的速率^[14]。由于水体的缓冲作用,珊瑚共生体与周围水体形成独特的扩散梯度,使得珊瑚体内与周围水体中的溶解氧浓度存在较大差异。且在密闭测量空间内消弥这一差异所花费的时间较长,使得测量具有一定的滞后性。利用微电极探针在珊瑚的表面直接测定溶解氧浓度,使得测定的实时性更高,可以更好地反映其瞬时光合呼吸状态^[15]。

本研究以鹿角杯形珊瑚为试验对象,通过溶氧微电极探针测定珊瑚外周扩散边界层的溶氧浓度对PAR变化的响应,进而测定珊瑚的光补偿点。本方法适用于珊瑚等水生生物的光补偿点的测定,由于其不受测定的水体缓冲效应的影响,能大大提高光补偿点测定的准确性。鹿角杯形珊瑚为多水螅体珊瑚,各个水螅体之间的光合呼吸等生理过程可能存在细微差异,进一步的实验分析评估这一潜在的差异十分必要。由于在开放空间进行测定,加之微电极的超高空间分辨率,使得本方法对单水螅体的珊瑚幼体等微小个体的单独测定具有较好的适用性。这对研究造礁石珊瑚幼虫幼体的光合特性具有重要价值。微电极溶解氧探头具有体积小、测定区域精准、测定实时、精确度高的特点,在水生生物光合作用测定中具有很大的潜力和较高的应用价值^[7,16]。将来,在更多的珊瑚物种上进行的更多的重复实验,可以进一步完善本方法。本研究提出了一种测定珊瑚共生体光合参数(光补偿点)的新思路,但溶氧微电极法在珊瑚光合参数测定中的更多的应用有待进一步研究。

参考文献

[1] AINSWORTH T D, THURBER R V, GATES R D. The future of coral reefs: a microbial perspective [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2010, 25(4): 233-240.
[2] FURLA P, ALLEMAND D, SHICK J M, et al. The symbiotic antho-

zoan: a physiological chimera between alga and animal [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, 45: 595-604.
[3] TRENCH R K. The cell biology of plant-animal symbiosis [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1979, 30: 485-531.
[4] OSINGA R, IGLESIAS-PRieto R, ENRIÍQUEZ S. Measuring photosynthesis in symbiotic invertebrates: a review of methodologies, rates and processes [J]. In *Applied Photosynthesis*. Croatia: Intech, 2012, 11: 229-256.
[5] CAI W J, MA Y, HOPKINSON B M, et al. Microelectrode characterization of coral daytime interior pH and carbonate chemistry [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11144.
[6] YUAN X, CAI W J, MEILE C, et al. Quantitative interpretation of vertical profiles of calcium and pH in the coral coelenteron [J]. *Marine Chemistry*, 2018, 204: 62-69.
[7] PATTERSON M R, SEBENS K P, OLSON R R. In situ measurements of flow effects on primary production and dark respiration in reef corals [J]. *Limnology and Oceanography*, 1991, 36(5): 936-948.
[8] VOGEL S. Life in moving fluids: the physical biology of flow, 2nd edn [M]. Princeton: Princeton University Press, 1994: 235-237.
[9] SHASHAR N, COHEN Y, LOYA Y. Extreme diel fluctuations of oxygen in diffusive boundary layers surrounding stony coral [J]. *The Biological Bulletin*, 1993, 185: 455-461.
[10] 陈翠琴, 吕洪飞, 黄四娣, 等. 三白草科几种植物光合作用和叶绿素荧光特性的比较研 [J]. *浙江农业学报*, 2011, 23(4): 725-30.
[11] SCHREIBER U, SCHLIWA U, BILGER W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer [J]. *Photosynthesis Research*, 1986, 10(1): 51-62.
[12] 黄玲英, 余克服, 施 祺, 等. 三亚造礁石珊瑚虫黄藻光合作用效率的日变化规律 [J]. *热带海洋学报*, 2011, 30(2): 46-50.
[13] 周 洁, 施 祺, 余克服. 三亚造礁石珊瑚虫黄藻光合作用效率的日周期及其调控因素 [J]. *热带海洋学报*, 2014, 33(1): 81-89.
[14] COMEAU S, CARPENTER R C, EDMUNDS P J. Effects of pCO₂ on photosynthesis and respiration of tropical scleractinian corals and calcified algae [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2017, 74(4): 1092-1102.
[15] KUHL M, COHEN Y, DALSGAARD T, et al. Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied with microsensors for O₂, pH and light [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1995, 117: 159-172.
[16] WANGPRASEURT D, HOLM J B, LARKUM A W, et al. In vivo microscale measurements of light and photosynthesis during coral bleaching: evidence for the optical feedback loop? [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 59.