

# 盐胁迫对葛仙米生理生化特性的影响\*

李敦海 刘永定 宋立荣

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

**摘要** 受盐胁迫的葛仙米其光系统 II(PSII)反应中心的激发捕获效率( $F_v/F_m$ )随着盐度的升高而降低, 盐度高时, 藻体  $F_v/F_m$  随处理时间延长而迅速下降。外源脯氨酸对  $F_v/F_m$  由于盐胁迫而降低的缓解作用并不十分明显, 内源脯氨酸含量并不因为盐度的上升而增加。受胁迫藻体的膜脂过氧化产物丙二醛则由于胁迫加重而上升。另外, 随着外界盐度的上升, 葛仙米 SOD 的活性却呈现出典型的“V”形变化, 这可能与藻体在不同盐度时所承受的实际胁迫有关。

**关键词** 葛仙米, 叶绿素荧光盐胁迫,  $F_v/F_m$ , 丙二醛, 脯氨酸, 过氧化物歧化酶。

念珠藻属是已知的分布最广的蓝藻属之一, 在淡水、陆地系统、热带土壤和南北极区域均有发现, 甚至在江河的入海口处的蓝藻垫中也有念珠藻的存在<sup>[1]</sup>。一些淡水生藻类也可称之为“耐盐者”, 因为它们在外界  $K^+$  浓度保持低水平时, 也能适应一定浓度范围的  $Na^+$  作为渗透压剂的胁迫<sup>[2]</sup>。前人对水分、盐分胁迫的研究主要集中在受胁迫藻体的固氮酶活性<sup>[3]</sup>、厚壁孢子的形成和萌发以及关于光合的碳同化等方面<sup>[4]</sup>。葛仙米 (*Nostoc sphaeroides* Kütz.) 属于蓝藻门的念珠藻属, 是一种可食用的固氮蓝藻。本文研究了盐胁迫与葛仙米生理特性和生化特性之间的关系, 旨在评价盐胁迫对葛仙米的影响及葛仙米对盐胁迫的应答方式。

## 1 材料与方法

**1.1 藻种、培养基与培养** 念珠藻属的葛仙米藻种由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB-Collection)提供。培养采用 BG-11<sup>[5]</sup> 培养基, 置锥形瓶中适量通气培养, 荧光灯照光, 光照强度  $60\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ , 循环水浴保持 30℃ 水温。

**1.2 盐处理** 收集对数生长期的球形群体, 用蒸馏水洗涤数次, 转移到含有不同氯化钠浓度的 BG-11(即 BG-11<sub>0</sub> +  $NaNO_3$ ) 培养基中, 置于 30℃ 光照培养箱继续静置培养。为了评价脯氨酸在葛仙米胁迫反应中的作用, 将收集后的藻体用含 0, 5, 50 和  $500\mu g/mL$  脯氨酸的 BG-11 培养基预处理 56h 后, 再转移到含不同浓度氯化钠、无脯氨酸的培养液中, 一定时间的处理后, 取藻体进行生理、生化指标测定。

**1.3 叶绿素荧光测定** 叶绿素荧光用便携式植物效率分析仪(PEA, Hansatech<sup>®</sup>, U.K.) 测定。激发光强为最大光强的 50% (约  $1500\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ), 暗适应时间不少于 15min, 记

\* 国家自然科学基金项目资助(39670071); 中国科学院重点项目资助(kz-952-J1-104)  
1999-08-02 收到; 1999-09-07 修回

录时间 5s, 测定均在室温下进行. 所有数据重复次数不少于三次. 用可变荧光( $F_v$ )与最大荧光( $F_m$ )的比值  $F_v/F_m$  表示光合效能的大小.

**1.4 脯氨酸(Pro)和丙二醛(MDA)的测定** 脯氨酸含量的测定参照张殿忠等<sup>[6]</sup>的方法. 测定丙二醛时, 标准 MDA 的制备方法和测定方法见王爱国等<sup>[7]</sup>略加修改. 藻体以 50mmol/L Na-PO<sub>4</sub> 缓冲液(pH7.8)匀浆, 离心, 取等体积的上清液和硫代巴比妥酸溶液(TBA)(5%三氯乙酸, 0.6% 硫代巴比妥酸混合), 沸水浴 10–15min, 流水冷却. 正丁醇萃取后于 534nm 下比色. 同时作一 MDA 标准曲线.

**1.5 SOD 活性的测定** 过氧化物岐化酶的测定方法依文献<sup>[8]</sup>, 略加修改. 即在反应液中用次黄嘌呤取代黄嘌呤, 将黄嘌呤氧化酶(XO)调至 0.006 个单位. 1 个 SOD 酶活性单位定义为使 NBT(氮蓝四唑)还原抑制 50% 所需酶提取液的体积, 并由此换算出每克鲜重或每毫克蛋白质的酶活. 蛋白质含量以考马斯亮蓝 G-250 法测定<sup>[9]</sup>.

## 2 实验结果

### 2.1 盐胁迫对葛仙米叶绿素荧光的影响

不同浓度 NaCl 对葛仙米球形体叶绿素荧光  $F_v/F_m$  随时间的变化如图 1A:

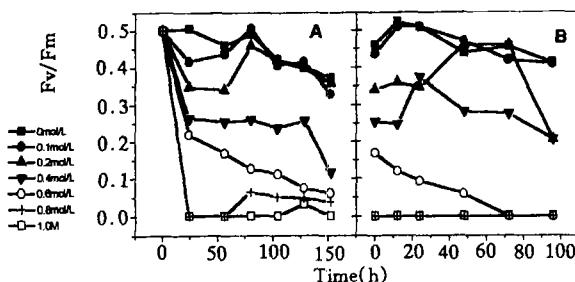


图 1 受 NaCl 溶液处理(A)和处理 56h 后转移到无外加 NaCl 培养基(B)中葛仙米叶绿素荧光变化.

Fig. 1 The changes of  $F_v/F_m$  of *N. sphaeroides* treated with NaCl solution and the NaCl pretreated colonies after transferring to the basal medium.

由图 1A 看出, 在 NaCl 浓度比较低时,  $F_v/F_m$  比值随时间变化不大且甚为接近. 但随着 NaCl 浓度的升高, 处理藻体的  $F_v/F_m$  开始出现抑制, 并逐渐减小至零. NaCl 溶液处理 56h 后的藻体再重悬于无外加 NaCl 的 BG-11 培养基, 藻体叶绿素荧光的变化如图 1B.  $F_v/F_m$  比值的恢复与重悬前的 NaCl 浓度有关. 高 NaCl 处理的藻体在重新悬浮后由于胞外水势的上升, 细胞迅速吸水而破裂, 向培养基中释放出蛋白色素物质, 不能检测到  $F_v/F_m$  比值.

### 2.2 脯氨酸预处理, NaCl 对葛仙米叶绿素荧光的影响.

由图 2 可以看出, 转入含不同浓度脯氨酸的新鲜培养基后, 500μg/ml 脯氨酸对藻体的  $F_v/F_m$  比值负面影响较大. 5 和 50μg/ml 脯氨酸处理的藻体的荧光比值变化趋势与对照藻体(无外源脯氨酸处理者)相似, 总体来说随时间变化幅度不大. 这说明 500μg/ml 脯氨酸对葛仙米来说是具有毒性的.

脯氨酸预处理对葛仙米  $F_v/F_m$  比值受盐胁迫的反应如图 3 所示。转入  $0.2 \text{ mol/L NaCl}$  后(图 3A),各个处理藻体的  $F_v/F_m$  均有所上升,72h 后又开始下降。转入含  $0.6 \text{ mol/L NaCl}$  的培养基后(图 3B),可以看出,无脯氨酸预处理的藻体的  $F_v/F_m$  比值最低,5 $\mu\text{g/ml}$  脯氨酸预处理的藻体的  $F_v/F_m$  比值最高,说明在这种浓度的盐胁迫下,脯氨酸预处理对缓解盐胁迫有一定的作用,以 5 $\mu\text{g/ml}$  脯氨酸较好。转入含  $0.8 \text{ mol/L NaCl}$  的培养基后(图 3C)发现,预处理时脯氨酸的浓度越高,藻体随后受盐胁迫的程度越严重,这表现在  $F_v/F_m$  的比值越低。

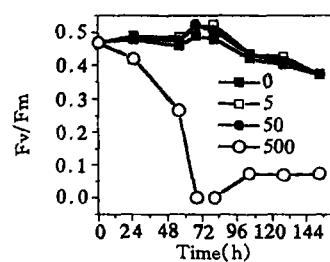


图 2 不同浓度脯氨酸处理对葛仙米叶绿素荧光的影响。

Fig. 2 The effect of proline on the  $F_v/F_m$  of the *N. sphaeroides*.

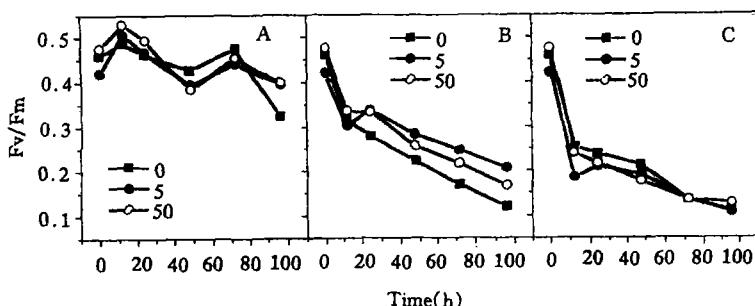


图 3 脯氨酸预处理后转入不同浓度(A, B, C)  $\text{NaCl}$  培养基中, 藻体  $F_v/F_m$  的值随时间的变化。

Fig. 3 The time course of  $F_v/F_m$  changing after transferring the proline pretreated *N. sphaeroides* colonies to the medium containing  $\text{NaCl}$ .

### 2.3 盐胁迫对葛仙米内源丙二醛和脯氨酸含量的影响

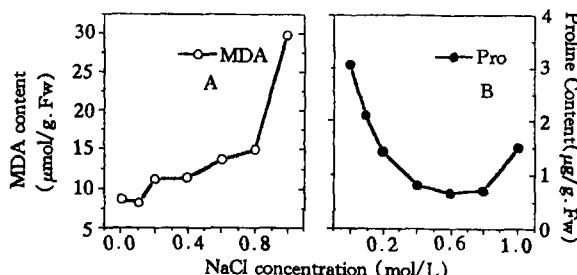


图 4 盐胁迫对葛仙米内源丙二醛含量(A)和脯氨酸含量(B)的影响。

Fig. 4 The influence of salt stress on the endogenous MDA content (A) and proline content (B) of *N. sphaeroides*.

从图 4A 看出, 0~0.8 mol/L NaCl 在 24h 内对葛仙米藻体的膜脂影响较小, 而 1.0 mol/L NaCl 的胁迫却是较为严重的。NaCl 对葛仙米内源游离脯氨酸含量的影响与对 MDA 的影响不同(图 4B), 在 0~0.4 mol/L 的浓度范围内, 葛仙米游离脯氨酸的含量随着 NaCl 浓度的升高而降低, 随后趋于平稳, 大于 0.8 mol/L 后, 脯氨酸的含量开始略有上升, 但仍明显低于对照藻体。这表明, 在所测定的盐度范围内, 当葛仙米受到外界的盐胁迫时, 非但没有积累反而减少了游离脯氨酸。

#### 2.4 盐胁迫对葛仙米过氧化物歧化酶活性的影响

无论是在盐胁迫 24h 还是 48h 后, 葛仙米 SOD 的活性随 NaCl 浓度的变化曲线都呈“V”形(图 5)。NaCl 浓度在 1.0 mol/L 之前, 葛仙米 SOD 的活性随着 NaCl 浓度的升高而降低, 在 1.0 mol/L NaCl 培养基中处理的藻体 SOD 活性最低; 1.0 mol/L 之后, 藻体的 SOD 活性随着盐浓度的升高而升高。除在对照培养基和含 1.0 mol/L NaCl 培养基中处理的样品外, 处理 48h 的藻体相对于处理 24h 的藻体, SOD 活性均有所上升。

### 3 讨论

Genty 等<sup>[10]</sup>发现, 在不同的 CO<sub>2</sub> 浓度和光强下, 植物的非环式电子传递的量子产率与光化学荧光产率(qQ)和开放光系统 II(PSII)反应中心的激发捕获效率(Fv/Fm)成正比。使 PSII 结构改变的环境胁迫可影响叶绿素荧光的初始值 F<sub>0</sub>(参看<sup>[11]</sup>)。如 PSII 受热损伤时 F<sub>0</sub> 值显著上升; 破碎叶绿体受光抑制时, F<sub>0</sub> 轻微上升, 而类囊体受冰冻损伤时 F<sub>0</sub> 的变化却很小。相反, 上述的环境胁迫导致的类囊体损伤则使叶绿素荧光的可变部分 F<sub>v</sub> 降低。由于开放光系统 II(PSII)反应中心的激发捕获效率 = F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> = F<sub>v</sub>/(F<sub>0</sub> + F<sub>v</sub>) = 1/(F<sub>0</sub>/F<sub>v</sub> + 1), 式中 F<sub>0</sub> 上升或不变, F<sub>v</sub> 降低, 因此 F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> 的值在类囊体受损伤时降低。因而, 快捷非损伤性获得的 F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> 比值可以很好地反映植物体受胁迫的程度。我们的实验表明, 葛仙米受盐胁迫严重时, 其光系统 II 的活性(F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>)显著降低, 但它也表现出了对盐胁迫一定范围内的忍耐能力。胁迫严重时 F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> 的恢复也比较困难, 这与重新悬浮后胞外水势突然升高、细胞迅速吸水而使细胞破裂有关。

植物在受到严重的盐胁迫时不仅仅表现在类囊体膜受损(反映在 F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> 比值降低上), 而且生长速度或存活率、呼吸作用及精细结构也受到了影响<sup>[8]</sup>。细胞膜系统受损还表现在胞内丙二醛的含量变化上, 因为人们认为丙二醛是细胞膜脂过氧化的产物<sup>[7]</sup>。葛仙米在受盐胁迫时, 内源丙二醛含量也上升, 但显然只有当外界 NaCl 浓度高于 0.8 mol/L 时, 葛仙米的膜脂过氧化才比较严重。

植物体对渗透胁迫的适应往往是通过积累胞内的有机或(和)无机溶质来进行渗透调节<sup>[2]</sup>。在渗透调节物中, 脯氨酸是比较普遍发生的。但在葛仙米的渗透调节中脯氨酸的作用不大。外界盐浓度升高时, 葛仙米并不能积累脯氨酸(图 3B), 且在高浓度时对细胞 PSII

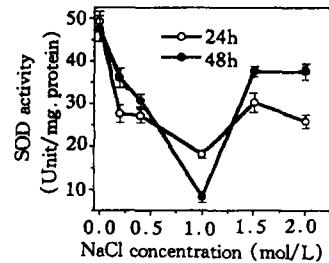


图 5 盐胁迫对葛仙米过氧化物歧化酶的影响作用。

Fig. 5 The effect of salt stress on the SOD activity of *N. sphaerooides*.

反应中心的激发捕获效率( $F_v/F_m$ )有严重影响(即降低近乎零).脯氨酸预处理对随后的盐胁迫的缓解作用也不明显.

另外, SOD 被认为可防御活性氧或其它过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害<sup>[12]</sup>. 研究多集中环境胁迫如光抑制、低温、高温、渍水和干旱以及除草剂、大气污染和病原体等对 SOD 的影响上<sup>[12]</sup>. 我们的研究显示, 葛仙米受盐胁迫时 SOD 活性随盐浓度的变化成典型的“V”形: 在  $\text{NaCl}$  浓度小于  $1.0\text{ mol/L}$  之前 SOD 活性随盐度升高而降低, 大于  $1.0\text{ mol/L}$  后随盐度升高而上升. 这可能是由于在  $\text{NaCl}$  浓度小于  $1.0\text{ mol/L}$  之前, 葛仙米球形群体失水和收缩缓慢, 盐离子得以快速进入胞内, 使 SOD 活性降低. 这种情况在一些高等植物的冷害中也有发生<sup>[13]</sup>, 作者认为 SOD 活性受冷害后的降低与细胞渗漏增加有关. 盐度大于  $1.0\text{ mol/L}$  后葛仙米群体收缩迅速, 细胞快速失水而盐离子进入细胞的速度由于群体和细胞的收缩而受阻, 因此更确切地说此时细胞受到最主要的是“干旱”胁迫, SOD 活性的变化就呈现出受干旱胁迫植物的模式<sup>[14]</sup>.

### 参 考 文 献

- [1] Tracy E J, South G R. Composition and seasonality of micro-algal mats on salt marsh in New Brunswick, Canada. *Brit Phycol J*, 1989, **24**: 285 - 91.
- [2] Kirst G O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 1989, **40**: 21 - 53.
- [3] Whitton B A, Donaldson A, Potts M. Nitrogen fixation by *Nostoc* colonies in terrestrial environments of Aladabra Atoll, Indian Ocean. *Phycologia*, 1979, **18**: 278 - 287.
- [4] Potts M, Friedmann E E. Effects of water stress on cryptoendolithic cyanobacteria from hot desert rocks. *Arch Microbiol*, 1981, **130**: 267 - 271.
- [5] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 1979, **111**: 1 - 61.
- [6] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学通讯, 1990, **4**: 62 - 65.
- [7] 王爱国, 邵从本, 罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. 植物生理学通讯, 1986, (2): 55 - 57.
- [8] Droillard M J, Paulin A, Massot J C. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol Plant*, 1987, **71**: 197 - 202.
- [9] 李琳, 焦新之. 应用蛋白染色剂考马斯亮蓝 G - 250 测定蛋白质的方法. 植物生理学通讯, 1980, **6**: 152 - 155.
- [10] Genty B, Briantais J - M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem Biophys Acta*, 1989, **990**: 87 - 92.
- [11] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth Res*, 1984, **5**: 139 - 157.
- [12] Bowler C, Montagu M V, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, **43**: 83 - 116.
- [13] 刘鸿先, 曾昭西, 王以柔等. 低温对不同耐寒力的黄瓜 (*Cucumis sativus*) 幼苗子叶各细胞器中超氧化物岐化酶 (SOD) 的影响. 植物生理学报, 1985, **11**(1): 48 - 57.
- [14] Monk L S, Fagerstedt K V, Crawford R M M. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide. A key factor in recovery from oxygen deprivation in *Iris pseudacorus*? *Plant Physiol* 1987, **85**: 1016 - 1020.

## THE EFFECT OF SALT STRESS ON SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *NOSTOC SPHAEROIDES* Kütz. (CYANOBACTERIUM)

Li Dunhai, Liu Yongding and Song Lirong

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**Abstract** In the colonies of *Nostoc sphaeroides* kütz. which suffered salt stress, the efficiency of excitation capture by open photosystem II (PSII) reaction centers (expressed as Fv/Fm) decreased with increased salinity. When treated with high salinities, the algal colonies lowered the Fv/Fm after prolonged treatment. The exogenous proline had little function in preventing the lowering of Fv/Fm on the salt stressed colonies. Meanwhile, the endogenous proline contents of the colonies didn't increase with the increased salinities, whereas malondialdehyde (MDA) increased when the salt stress became more serious. In addition, the graphs of the SOD activities in the colonies have a typical "V" shape with treating salinities, presumably the changing was related to the real stresses that the colonies experienced.

**Key words** *Nostoc sphaeroides* Kütz, Salt stress, Chlorophyll fluorescence Fv/Fm, Malondialdehyde, Proline, Superoxide dismutase.