

葛仙米光合活性对盐胁迫的反应*

李敦海 宋立荣 刘永定

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要 收集人工条件下培养的葛仙米球形群体, 以不同浓度的 NaCl 溶液处理, 当浓度超过 0.2mol/L 后, 叶绿素 a 荧光的可变部分(F_v)与最大荧光(F_m)之比值(F_v/F_m)与 NaCl 浓度呈负相关, 光合放氧速率也随着 NaCl 浓度升高而降低。这两者随氯化钠浓度升高而降低的趋势均呈现出两个阶段性: 低 NaCl 浓度时的缓慢降低阶段和高 NaCl 浓度时的快速降低阶段。 F_v/F_m 比值的转折点在 0.2mol/L, 而光合放氧速率的在 0.4mol/L, 后者与海水的浓度接近。呼吸作用几乎不受 NaCl 的影响。光系统 I(PSI)和光系统 II(PSII)活性随着 NaCl 浓度的提高均有降低。

关键词 葛仙米, 盐胁迫, 光系统 I 与光系统 II 活性, 光合作用, 叶绿素 a 荧光

葛仙米是分布在我国一些山区的一种丝状群体蓝藻, 属念珠藻属, 是一种食用蓝藻, 具有食疗保健的药用价值。由于环境的变化, 葛仙米的野生资源锐减。作者所在实验室通过培养可获得葛仙米的球状群体。迄今的研究以区系和生态为主, 对葛仙米进行深入的实验生物学研究还不多。已知一些念珠藻对环境胁迫具有很强的抗性, 能够忍受数月或数年的脱水干旱, 在重新吸水的几小时或几天后, 能完全恢复其代谢活性^[1-3]。它们能忍受反复冻融, 因而是南北极陆地生境群落的重要组成部分^[4]。除了光照、温度和营养外, 盐度是各种生态系统中影响藻类生长的重要非生物因子之一。在念珠藻经受反复干旱时, 不断富集的盐分必使藻体承受盐胁迫。本文报道了盐胁迫对葛仙米光合活性的影响和葛仙米抗盐生理过程中各光合指标间的相互关系。

1 材料与方法

1.1 念珠藻培养 球形念珠藻葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kutz.)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。培养基为 BG-11^[5], 置锥形瓶中通气培养。以南京国营华东电子管厂生产的 YZ20RR 型灯管提供光照, 光照强度 $60\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 循环水浴保持 30℃ 水温。

1.2 盐胁迫 取培养 10-15d 的群体(直径 2-4mm), 用含氮 BG-11 培养基洗涤两次, 置于容积 50ml 盛有含氮 BG-11 培养基的血清瓶中, 培养液所含 NaCl 浓度分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mol/L, 血清瓶放光照培养箱中, 在 30℃ 下继续培养, 间歇振荡, 24h

* 中国科学院重点项目资助(kz-952-J1-104)
国家自然科学基金项目资助(39670071)
1998-09-15 收到; 1999-09-06 修回

和 48h 后分别取样进行实验.

1.3 叶绿素荧光的测定 叶绿素荧光的初始值 F_0 、最大值 F_m 和荧光的可变部分 F_v ($F_v = F_m - F_0$) 用植物效率分析仪 (PEA, Hansatech[®], U. K.) 测定. 测定在室温下进行. 暗适应时间不少于 15min, 激发光强为最大光强的 50 %, 记录时间为 5s.

1.4 光合放氧与呼吸的测定 取培养物 2ml, 以 Clark 型 DW1 (Hansatech[®], U. K.) 氧电极测定放氧速率, 光照强度为 $700 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 水浴温度为 30°C. 放氧稳定后记录时间不少于 6min. 放氧速率测定完毕, 用不透明铝箔纸包住反应槽, 测定呼吸速率. 测定完毕将反应槽内藻体完全取出, 弃去液体部分, 以 95 % 乙醇提取叶绿素.

1.5 光系统 I(PSI)和光系统 II(PSII)活性测定 PSI 和 PSII 活性测定按 Tan^[6] 等的方法略加修改. 收集处理过的藻体, 以 50mmol/L Na-PO_4 缓冲液 (pH7.0) 清洗两次, 去掉缓冲液后将藻体保存在液氮中. 取出后放入 -20°C 冰箱. 将玻璃研钵和玻璃纤维置于 -20°C 冰箱预冷, 加少量 4°C 的 50mol/L Na-PO_4 缓冲液 (pH7.0) 于研钵中在冰面上匀浆. PSI 活性以氧吸收的速率 ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl. h}^{-1}$) 表示. PSII 活性测定时, 在原反应液中加入了 5mmol/L 的 KCN 以抑制其它氧化酶活性. 用 Tan^[6] 等给出的消光系数 20.6mmol/L·cm 计算电子受体 DCPIP 的光还原速率, 单位为 $\mu\text{mol DCPIP} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl. h}^{-1}$.

1.6 叶绿素含量测定 以 95 % 乙醇提取, 置 4°C 冰箱 24h. 用 752 分光光度计, 在 665nm, 649nm 波长下测定光吸收值 A_{665} 和 A_{649} , 以公式 $C = 13.7 \times A_{665} - 5.76 \times A_{649}$ 计算叶绿素含量, 单位为 $\mu\text{g chl. mL}^{-1}$.

所有实验至少有三个重复; 本实验所用药品多为 Sigma 公司产品.

2 实验结果

2.1 NaCl 对葛仙米叶绿素 a 荧光的影响.

NaCl 对葛仙米叶绿素荧光 F_v/F_m 比值的影响如图 1 所示: 在 NaCl 浓度低于 0.2mol/L 时, F_v/F_m 比值随着盐浓度的升高下降缓慢. 盐浓度高于 0.2mol/L 后, F_v/F_m 的比值与盐浓度呈明显的线性关系. NaCl 处理 48h 藻体的 F_v/F_m 比值与 24h 的相比普遍下降, 可见, 以 0.8mol/L NaCl 处理的葛仙米群体的叶绿素 a 荧光已经很弱, 仪器给出的信号表明藻体仍然存活, 只是处于低活性状态. 这种降低可能是由于藻体本身的生理变化和 NaCl 处理延长的共同结果.

2.2 NaCl 对光合放氧和呼吸作用的影响

以光合放氧速率表示的光合作用活性, 随着 NaCl 浓度的提高而降低的趋势表现出两个阶段. 其一是 NaCl 浓度小于 0.4mol/L 时, 光合放氧速率随 NaCl 浓度的升高较缓慢

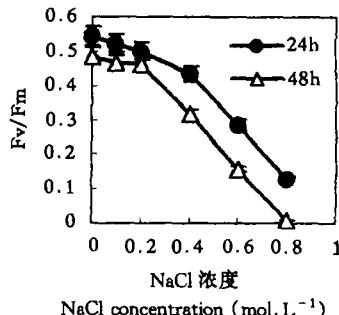


图 1 NaCl 对葛仙米叶绿素 a 荧光 F_v/F_m 比值的影响.

Fig. 1 The effect of NaCl on the chlorophyll a fluorescence F_v/F_m in *N. sphaeroides*.

地降低的阶段;第二个阶段是 NaCl 浓度高于 0.4 mol/L 后的快速降低阶段,在这个阶段,光合放氧速率随着盐度的提高迅速降低,当 NaCl 为 0.8 mol/L 时,藻体在光下的净光合速率(即表观光合速率,净光合速率=真正的光合速率-呼吸速率)为负值(图 2),呼吸速率受盐的影响很小,且呼吸速率相对于放氧速率来说是很小的。

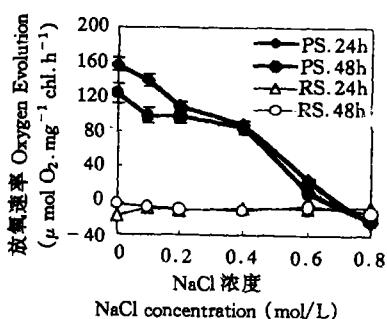


图 2 NaCl 对葛仙米光合放氧和呼吸作用的影响. PS. 24 和 PS. 48 分别表示盐处理 24 和 48h 后的光合作用; RS. 24 和 RS. 48 分别表示盐处理 24 和 48h 后的呼吸作用.

Fig. 2 The effect of NaCl on the photosynthetic oxygen evolution and respiration of *N. sphaeroides*.

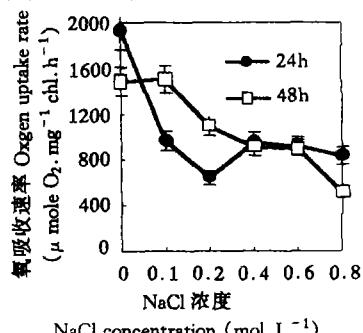


图 3 NaCl 对葛仙米光系统 I(PSI)活性的影响.

Fig. 3 The effect of NaCl on the photosystem I activity of *N. sphaeroides*

2.3 NaCl 对 PSI 活性的影响

在本实验中,以抗坏血酸还原的 DCPIP 提供的电子,经过 PSI 电子传递链传递给 MV 和 O_2 . PSI 活力越高,则其电子传递的速度越快,进而表现在 O_2 的吸收速率上. 盐处理 24h 后,低于 0.2 mol/L NaCl 浓度处理的藻体,其 PSI 活力随着盐浓度的升高迅速下降,高于 0.2 mol/L NaCl 浓度处理藻体的 PSI 活力随盐浓度的提高而上升并趋于稳定. 高于 0.2 mol/L NaCl 处理 48h 后,藻体的 PSI 活力随着盐浓度的升高缓慢下降(图 3).

2.4 NaCl 对 PSII 活性的影响

PSII 利用光能将水分解,产生 H^+ 和 O_2 并将电子最终传递给光 PSI. 在这一反应中水是电子供体,PSI 是电子受体. 利用二苯卡巴肼为电子供体,染料二氯酚吲哚酚为电子受体,就能测定 PSII 对染料的还原速率(见方法)(二氯酚吲哚酚的还原速率取决于 PSII 电子传递链对由二苯卡巴肼提供的电子的传递速率). 以染料还原速率表示的葛仙米破碎细胞的 PSII 活力,均随着 NaCl 浓度的升高而降低,且受 NaCl 处理 48h 的藻体,其 PSII 活力比处理 24h 藻体的低. NaCl 处理 48h 藻体的 PSII 活力与 24h 的相比普遍下降,这种降低的情况与 Fv/Fm 的相似,亦

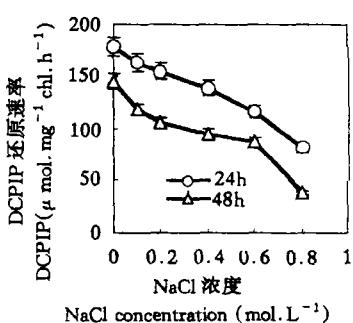


图 4 NaCl 对葛仙米光系统 II(PSII)活性的影响.

Fig. 4 The effect of NaCl on the photosystem II activity of *Nostoc sphaeroides*.

有可能是由于藻体本身的生理变化和 NaCl 处理时间延长的共同结果。

3 讨论

念珠藻对不良环境条件的反应有三种方式:1)代谢活性降低,外界条件变好时活性仍不能恢复直至藻体死亡;2)代谢活性降低,藻体仍然存活,条件一旦变好时能恢复活性和3)代谢活性在外界条件极端时仍受影响极小。地木耳(*Nostoc commune* Vauch.)、发菜(*N. flagelliforme* Berk. et Curt.)和 *N. sp* 的干藻体在回复吸水数小时后光合作用与固氮酶活性就能完全恢复^[2]。作者实验也表明,实验室培养并干燥数月的葛仙米在回复吸水后 Fv/Fm 的比值能缓慢恢复(待发表)。其抗性属于上述的第二种类型。

PSI 的活性随盐浓度的变化情况与 PSII 的变化很不一致(图 3,4),这势必会引起光系统中电子传递的不平衡,PSII 氧化端产生的电子将部分地最终传给氧而产生超氧化物,并不是由 PSI 传递给 NADP^+ ^[7]。 NaCl 处理 48h 的藻体其 PSI 活性随盐浓度的升高缓慢降低,这可能与藻本身的抵抗性有关。受到胁迫后的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性升高以及一些保护性物质(如抗坏血酸和谷胱甘肽等)的产生等,均可缓解盐对光系统的破坏作用。PSII 活性的变化与 Fv/Fm 比值和光合放氧速率的变化也较为一致。所不同的是,0.8mol/L NaCl 处理的藻体的净光合速率为负值,而 PSII 仍有较高的活性,这表明此时藻体仍在放氧(因为 PSII 活性与光合作用呈正相关)。葛仙米的呼吸作用受 NaCl 的影响很小,且相对于光合放氧速率来说也是很小的,这就保证了藻体无论是在条件合适,还是在逆境中均能最大地贮藏产物,以备不时之需。

同光合放氧和呼吸一样,植物叶绿素荧光在许多研究中也被用作评价光合作用过程和不同环境因子对光合能力影响的指标^[8~10]。叶绿素 a 荧光的可变部分(Fv)与最大荧光(Fm)的比值可显示光系统 II(PSII)活性的大小^[11]。 Fv/Fm 比值主要反映光系统 II 的光化学效率;光合作用则是原初反应、同化力形成和碳同化的综合结果。 NaCl 的浓度在 0.2mol/L 以上时,葛仙米的 Fv/Fm 比值急剧下降;光合放氧速率则在 0.4mol/L NaCl 以上时急剧下降。缓慢的降低阶段说明藻体受盐的影响较小,在一定的时间内仍是藻体忍受的范围。快速的降低则表明外界的胁迫已超过了藻体忍受的极限。本研究表明,葛仙米的 Fv/Fm 比值,光合放氧速率与 PSII 活性的变化比较一致。光合放氧与叶绿素荧光比值的相对一致性,叶绿素荧光测定的快速、简便与对藻体的非破坏性就为我们今后利用植物效率分析仪(PEA)快速监测藻体的光合活性提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Potts M, Bowman M. Sensitivity of *Nostoc commune* UTEX 584 (Cyanobacteria) to water stress. *Arch Microbiol*, 1985, **141**: 51~56.
- [2] Scherer S, Ting-Wei Chen, Böger P. Recovery of adenine-nucleotide pools in terrestrial blue-green algae after prolonged drought periods. *Oecologia*, 1986, **68**: 585~588.
- [3] Scherer S, Ernst A, Ting-Wei Chen, et al. Rewetting of drought-resistant blue-green algae: Time course of water uptake and reappearance of respiration, photosynthesis, and nitrogen fixation. *Oecologia*, 1984, **62**: 418~423.
- [4] Dodds W K, Gunder D A, Mollenhauer D. The ecology of *Nostoc*. *J Phycol*, 1995, **31**: 2~18.

- [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] Tan S, Cunningham F X, Youmans M Jr, et al. Cytochrome f loss in astaxanthin-accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): Comparison of photosynthetic activity, photosynthetic enzymes, and thylakoid membrane polypeptides in red and green cells. *J Phycol*, 1995, **31**: 897–905.
- [7] Allen J F, Hall D O. The relationship of oxygen uptake to electron transport in photosystem I of isolated chloroplasts: The role of superoxide and ascorbate. *Biochem and Biophys Res Commun*, 1974, **58**: 579–585.
- [8] Janssen L H J, Hasselt P R V. Temperature-induced alterations of in vivo chlorophyll a fluorescence in cucumber as affected by DCMU. *Photosynth Res*, 1988, **15**: 153–162.
- [9] Peterson R B. Effects of O₂ and CO₂ concentrations on Quantum yields of photosystems I and II in tobacco leaf tissue. *Plant Physiol*, 1991, **97**: 1388–1394.
- [10] Vonshak A, Torzillo G, Tomaselli L. Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis*. *J Appl Phycol*, 1994, **6**: 31–34.
- [11] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Annu Rev Plant Physiol plant Mol Biol*, 1991, **42**: 313–349.

RESPONSE OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVITIES OF *NOSTOC SPHAEROIDES* KÜTZ. (CYANOBACTERIUM) TO THE SALT STRESS

Li Dunhai, Song Lirong and Liu Yongding

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

Abstract The photosynthetic activities under salt stress of cyanobacterium *Nostoc sphaeroides* Kütz., an edible organism mainly located in some mountainous regions of China, were studied. The colonies were obtained in laboratory by cultivation. Harvested colonies (2–4mm in diameter) were treated with sodium chloride solution in order to reveal the effect of salt on the photosynthetic activities and the correlation among several photosynthetic parameters of the organism. The ratio of variable chlorophyll fluorescence (F_v) to maximum fluorescence (F_m) decreasing sharply when NaCl concentrations were over 0.2mol/L. The photosynthetic oxygen evolution rates (POERs) were negatively related with NaCl concentrations, especially when NaCl concentrations exceed 0.4mol/L, the rates decreasing more quickly with increasing NaCl concentrations, whereas the respiration rates were affected slightly by NaCl. The situations of PSI and PSII were similar to those of POERs. The result shows that changes of F_v/F_m values are coincided with POERs and PSII activities and there is relative low respiration rate in *N. sphaeroides* Kütz.

Key words *Nostoc sphaeroides* Kütz., Salt stress, PSI and PSII activity, Photosynthesis, Chlorophyll a fluorescence.