

鱼腥藻 7120 响应 NaCl 胁迫的光合特性

欧阳叶新^{1,2} 施定基³ 黄开耀⁴ 梁承邺² 胡鸿钧¹

(1. 中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074; 2. 中国科学院华南植物研究所, 广州 510650;

3. 中国科学院植物研究所, 北京 100093; 4. 武汉大学生命科学院遗传系, 武汉 430072)

摘要: NaCl 胁迫处理丝状蓝藻鱼腥藻 7120 后光合特性的变化表明: 鱼腥藻 7120 的净光合放氧速率和呼吸速率随 NaCl 浓度的升高而降低, 且浓度低于 0.4 mol/L NaCl 时的降幅比高于 0.4 mol/L NaCl 时的降幅小。加入 0.4% (W/V) 的蔗糖后可提高盐胁迫后的鱼腥藻 7120 的光合放氧速率。吸收光谱测定结果表明盐胁迫没有改变鱼腥藻 7120 的光合色素组成, 但导致藻胆蛋白的总含量降低、类胡萝卜素含量增加。低温荧光发射光谱测定表明盐胁迫后改变了光能在两个光系统之间的分配, 由藻胆蛋白吸收的光能向光系统 II 传递受阻。荧光动力学分析表明光系统 II 的光化学效率随盐浓度的增加而降低, 表现出与光合放氧速率的一致性。

关键词: 鱼腥藻 7120; NaCl 胁迫; 吸收光谱; 发射光谱; 叶绿素 a 荧光; 光合作用

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)01-0074-004

鱼腥藻 7120 是一种具异形胞的丝状蓝藻, 能进行放氧光合作用, 作为模式生物已被广泛应用于异形胞的发育、光合作用、固氮作用和外源基因的表达等方面的研究, 并且许多相关基因已被克隆^[1]。近年来已有一些利用鱼腥藻研究冷激胁迫^[2]、营养胁迫(Fe、N)^[3,4]和盐胁迫^[5,6]的报道。这些研究大多是对胁迫条件下的转录和翻译水平进行了分析^[3,4]和少数胁迫诱导基因的克隆^[4,6], 对其胁迫机理的研究认为是一种渗透胁迫^[5,8], 丙氨酸以及一些酶可能参与了胁迫反应^[2,5]。目前有关鱼腥藻盐胁迫的研究还不多^[5,6], 对盐胁迫下的光合特性的研究尚未见报道。本文报道了鱼腥藻 7120 响应盐胁迫的光合特性。

1 材料和方法

1.1 材料 丝状蓝藻鱼腥藻 7120 (*Anabaena* sp. PCC 7120) 来自法国巴斯德研究所。选用 BG-11。(无氮)液体培养基^[9], 置于 Gallenkamp 型光照恒温振荡培养箱中培养, 转速为 130 r/min, 温度为 28±2℃, 连续光照强度为 150 μE·m⁻²·s⁻¹。

1.2 NaCl 胁迫诱导 离心收集对数后期的鱼腥藻 7120 细胞, 用 BG-11 培养基洗涤数次, 然后置于 100 mL

三角锥瓶中液体振荡培养。培养液中加入 NaCl 的浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mol/L, 培养条件同上。24h 和 48h 后取样, 离心收集细胞, 用 BG-11 培养基洗涤, 随后测定光合特性。

1.3 光合放氧速率的测定 用英国产 HansTech DW/1 型氧电极测定, 以 BG-11 培养基作为光合特性测定的溶液介质, 光强 600 μE/m⁻²·s⁻¹, 温度 28℃, 每样品测定 6 次。

1.4 蔗糖对光合放氧速率的影响 离心收集 NaCl 胁迫诱导后的鱼腥藻 7120 细胞, 用 BG-11 培养基洗涤, 并在此培养液中加入蔗糖, 3min 后测定光合特性, 每个浓度测定 3 次。

1.5 吸收光谱测定 参照文献[10]在室温(20—25℃)下, 用岛津 UV-3000 型双波长双光束分光光度计测定, 扫描波长范围为 360—720nm。每样品测定 6 次。

1.6 低温(77K)荧光发射光谱测定 荧光发射光谱用日立 MPF-4 型荧光分光光度计测定。测定时, 将藻液与甘油按 1:1 混合后, 装入直径为 2mm 的硬质玻璃管内, 然后插入液氮杜瓦瓶中。采用的激发光波长为 436nm 和 580nm。每样品测定 6 次。

1.7 叶绿素 a 荧光诱导动力学 样品暗适应 15—

收稿日期: 2000-03-24; 修订日期: 2001-11-20

基金项目: 国家科技部海洋 863 项目资助(课题编号: 819-04-11)

作者简介: 欧阳叶新(1965—), 男, 湖北省公安县人; 博士, 助理研究员; 研究方向: 植物生理学及分子生物学

通讯作者: 施定基

30min 后测定完整细胞的叶绿素 a 荧光。用便携式叶绿素荧光计 PAM-2000 和数据采集软件 DA-2000 进行测量。样品浓缩后滴放在载玻片上, 置于测量处, 样品与光导纤维之间的距离为 1cm, 测量光强为 $2\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光化光强为 $20\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。测量时, 首先用测量光照射测量 F_0 , 而后饱和脉冲光照射 0.8s, 测量 F_{m0} 。每样品测定 6 次。

1.8 叶绿素 a 含量的测定 参照文献^[10], 利用甲醇抽提法进行测定。按下述公式计算的含量: $\text{Chl a} (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 13.9 \times \text{OD}_{665} \times \text{稀释倍数}$

2 结果和分析

2.1 NaCl 胁迫对光合放氧活性的影响

图 1 显示鱼腥藻 7120 在不同浓度的 NaCl 胁迫 24h (—■—) 和 48h (—●—) 的光合放氧速率。结果表明, 随着 NaCl 浓度的增加, 鱼腥藻 7120 的净光合放氧速率逐渐减低。放氧曲线的斜率表明: 当 NaCl 浓度介于 0—0.4mol/L 时, 净光合放氧速率和呼吸速率下降幅度(15%—20%) 较小; 而当 NaCl 浓度高于 0.4mol/L 时, 净光合放氧速率下降幅度(—85%) 增大, 呼吸速率下降幅度(25%—30%) 也增大, 其差异显著性 $P < 0.01$ 。这说明 NaCl 胁迫对光合作用和呼吸作用均有影响。

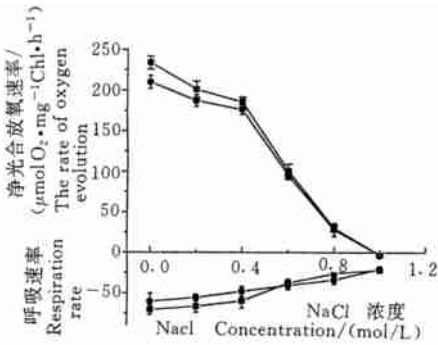


图 1 NaCl 胁迫对鱼腥藻 7120 的光合放氧速率的影响 (光强 $600\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Fig. 1 The effects of NaCl stress on net photosynthetic oxygen evolution rates of *Anabaena* sp. PCC 7120 at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Irradiance: $600\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

取 0.4mol/L NaCl 胁迫 24h 和 48h 的鱼腥藻 7120 与正常培养条件下的鱼腥藻 7120(对照), 在 BG-11 培养基介质中直接加入不同浓度的蔗糖进行光合放氧速率检测, 结果发现: NaCl 胁迫的鱼腥藻 7120 在加入蔗糖后, 净光合放氧速率增加。并且在随着时间进程累加的蔗糖浓度达到 4g/L 时, NaCl 胁迫 24h (—●—) 和 48h (—■—) 的鱼腥藻 7120 的净

光合放氧速率增加到最大值(图 2), 增幅为 20%—25%, 而对照则随加入的蔗糖浓度的增加, 其净光合放氧速率降低(差异显著性 $P < 0.05$)。说明适当浓度的蔗糖对于 NaCl 胁迫后的光合作用具有较好的恢复作用, 即蔗糖可能参与了胁迫抗性反应。

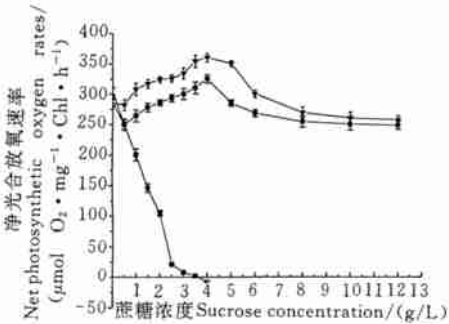


图 2 蔗糖对鱼腥藻 7120 响应 NaCl 胁迫后的光合放氧速率的影响(光强 $600\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Fig. 2 The effects of sucrose on net photosynthetic oxygen evolution rates of *Anabaena* sp. PCC 7120 under NaCl stress at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Irradiance: $600\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

2.2 NaCl 胁迫对鱼腥藻 7120 叶绿素 a 荧光的影响

图 3 显示了不同浓度 NaCl 胁迫对鱼腥藻 7120 的叶绿素 a 荧光的影响。从图中曲线的形状可以看出随着 NaCl 浓度增大, F_v/F_m 比值逐渐降低, 并且在低于 0.4mol/L NaCl 浓度下, F_v/F_m 比值降低缓慢, 高于 0.4 mol/L NaCl 浓度下, F_v/F_m 比值降低幅度明显增大。同时, 24h (—■—) 胁迫的 F_v/F_m 比值比 48h (—●—) 胁迫的大, 说明 NaCl 胁迫的时间延长和浓度加大, 光系统 II 的光化学效率降低幅度越大。当 NaCl 浓度达到 1mol/L 时, 叶绿素 a 荧光信号已降到很弱, 可能是高浓度的 NaCl 胁迫导致光合伤害加大的缘故。

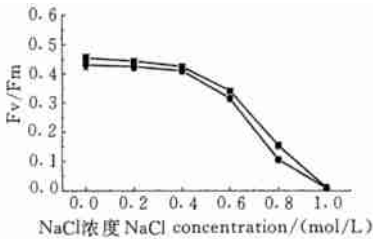


图 3 NaCl 胁迫对鱼腥藻 7120 的叶绿素 a 荧光 F_v/F_m 的影响 Fig. 3 The impact of NaCl (0.4 mol/L) stress on the chlorophyll a fluorescence F_v/F_m ratios in *Anabaena* sp. PCC 7120

2.3 NaCl 胁迫对光合色素组成的影响

为了比较 NaCl 胁迫与正常培养条件下的鱼腥藻 7120 的光合色素的变化测定了其完整细胞的室

温吸收光谱(图4)。从峰形来看,都明显表现为四个吸收主峰,分别为:叶绿素a(A_{680} 和 A_{441})、藻胆蛋白(A_{630})和类胡萝卜素(A_{494}),说明NaCl胁迫并没有改变鱼腥藻7120的色素组成。从吸收峰相对比值 A_{630}/A_{680} 来看,对照最高,NaCl胁迫48h(--)的最低;而 A_{494}/A_{680} 则对照的最低,NaCl胁迫24h(•••••)的最高,其差异显著性 $P < 0.025$ 。由此看来NaCl胁迫改变了鱼腥藻7120的藻胆蛋白相对含量(降低)和类胡萝卜素相对含量(增加)。

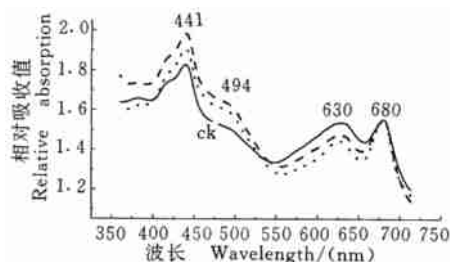


图4 NaCl胁迫下的鱼腥藻7120的室温吸收光谱

Fig. 4 The room temperature absorption spectra of *Anabaena* sp. PCC 7120 under 0.4 mol/L NaCl stress

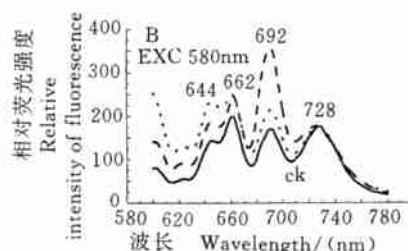
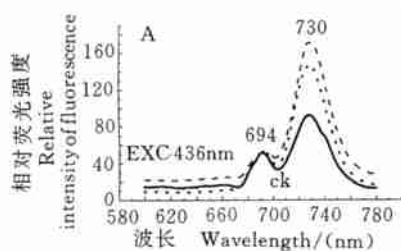


图5 NaCl胁迫后的鱼腥藻7120的低温荧光发射光谱(A: 436nm 激发, B: 580nm 激发)

Fig. 5 77K Fluorescence emission spectra of NaCl stressed *Anabaena* sp. PCC 7120 excited at 436nm(A) and 580nm(B)

3 讨论

淡水丝状蓝藻鱼腥藻7120响应NaCl胁迫的光合特性。净光合速率和呼吸速率均随盐浓度的升高而降低,叶绿素a荧光动力学分析表明光系统II光化学效率也表现出同样的变化趋势,并且都以0.4mol/L NaCl为降幅变化程度的临界点。这一结论与文献[11]报道的丝状蓝藻葛仙米盐胁迫引起的光合速率变化具有大致类似的变化趋势,所不同的是呼吸速率也随着变化。这表明丝状蓝藻光合作用特性对盐胁迫后的响应具有共同性。

目前多认为蓝藻盐胁迫的可能机制是由渗透伤害而引起^[5,7,8],本文报道的结果表明蔗糖使正常生长的鱼腥藻7120光合放氧速率降低,而适当浓度的蔗糖则能增加鱼腥藻7120的光合放氧速率,缓解盐

2.4 低温(77K)荧光发射光谱测定

图5显示0.4 mol/L NaCl胁迫24h(•••••)和48h(--)的完整细胞的低温荧光发射光谱。以436nm光激发(图5A)时,荧光发射峰分别来自PSII(F_{694} 和PSI(F_{730}))。从图中可看出相对荧光强度比值 $F_{694}:F_{730}$ 是对照最大,24h胁迫的其次,48h胁迫的鱼腥藻7120最小,其差异显著性 $P < 0.05$ 。表明正常生长条件下的鱼腥藻7120中光能在两个光系统中分配较均衡,而NaCl胁迫的程度影响了光能在两个光系统中分配均衡的程度,NaCl浓度越高,光能分配趋向于PSII的程度越大。

以580nm光激发(图5B)时,荧光发射峰分别来自藻胆体(F_{644} 和 F_{662})、PSII(F_{694})和PSI(F_{730})。从图5B中可以看出光系统中的能量分配在非胁迫条件下较为均衡,由藻胆蛋白吸收的光能较多的传递到PSI。而在胁迫条件下,分配在藻胆体的捕光色素天线(F_{644} 和 F_{662})和PSII(F_{694})的能量大于PSI(F_{730})中的能量。这说明NaCl胁迫明显阻碍了光能从光系统II向光系统I的传递。

胁迫造成的伤害,这一结论与渗透胁迫伤害机理相吻合,与文献[12]报道的蔗糖参与了盐胁迫的观点一致。此外,盐胁迫没有改变鱼腥藻7120的光合色素组成,但却改变了藻胆蛋白(降低)和类胡萝卜素(增加)的相对含量,导致光能在藻胆蛋白和光系统II的能量分配和光系统I的不平衡,光系统II向光系统I的能量传递受阻,从而降低了光系统II的光化学效率,这是否是鱼腥藻7120响应盐胁迫的一种光合作用调控机制需进一步证实。

将盐胁迫过程与光合作用调控联系起来考虑,有助于全面阐明鱼腥藻7120的盐胁迫调控机理,这可能和营养胁迫与光合作用的关系类似。正在进行的鱼腥藻7120的全序列测定,必将推动其盐胁迫调控的相关基因的克隆。

参考文献:

- [1] Bryant D A. Molecular Biology of Cyanobacteria[M]. The Netherlands: Kluwer Academic, 1994, 581—611
- [2] Chamot D, Owtrim G W. Regulation of cold shock-induced RNA helixase gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *J Bacteriol*, 2000 **182**: 1251—1256
- [3] Razquin P. Transcriptional and translational analysis of ferredoxin and flavodoxin under iron and nitrogen stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 7409—7411
- [4] Leonhardt K, Straus N A. Photosystem II genes *isiA*, *psbM* and *psbC* in *Anabaena* sp. PCC 7120: cloning, sequencing and the transcriptional regulation in iron stressed and iron-repleted cells[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, **24**(1): 63—73
- [5] Thomas S P, Shanmugasundaram S. Osmoregulatory role of alanine during salt stress in the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. 287[J]. *Biochem Int*, 1991, **23**(1): 93—102
- [6] Apte S K, Haselkorn R. Cloning of salinity stress induced genes from the salt-tolerant nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena torulosa* [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, **15**(5): 723—733
- [7] Schwartz S H, Black T A, Jager K, et al. Regulation of an osmoticum responsive gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *J Bacteriol*, 1998, **180**(23): 6332—6337
- [8] Iyer V, Fernandes T, Apte. A role for osmotic stress induced proteins in the osmotolerance of a nitrogen fixing cyanobacterium, *Anabaena* sp. strain E-31[J]. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 5868—5870
- [9] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria[J]. *J Gen Microbiol*, 1979, **111**: 1—61
- [10] Hall D O, Rao K K. Photosynthesis(5th ed.)[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, 42—43
- [11] Li D H, Song L R, Liu Y D. The effect of salt stress on some physiological and biochemical characteristics of *Nostoc sphaeroides* Kütz[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(5): 420—424
- [李敦海, 宋立荣, 刘永定. 葛仙米光合活性对盐胁迫的反应. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 420—424]
- [12] Page Sharp M, Behm C A, Smith G D. Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1472**(3): 519—528

CHANGES IN PHOTOSYNTHETIC PROPERTIES OF A FILAMENTOUS CYANOBACTERIUM *ANABAENA* SP. PCC 7120 IN RESPONSE TO NaCl STRESS

OUYANG Yexin^{1,2}, SHI Dingji³, HUANG Kaiyao⁴, LIANG Chengye² and HU Hongjun¹

(1 Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074; 2 South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650; 3 Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; 4. Department of Genetics, College of Life Sciences, Wuhan University, 430072)

Abstract: The changes in photosynthetic properties of filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120(A. 7120) in response to NaCl stress had been studied. It showed that both the net photosynthetic oxygen evolution rates and respiration rates were decreased more quickly with increasing NaCl concentrations when NaCl concentrations exceed 0.4 mol/L were. The absorption spectra had been shown that the photosynthetic pigments of A. 7120 under NaCl stress were unchanged, but the total contents of phycobiliproteins decreased and those of carotenoids increased. The low temperature fluorescence emission spectra suggested that the energy transfer from phycobiliprotein to photosystem I in A. 7120 under NaCl stress was depressed. And the chlorophyll a fluorescence induction kinetics analysis displayed that changes in Fv/Fm ratios of A. 7120 was consistent with those of the net photosynthetic oxygen evolution rates in response to NaCl stress.

Key words: *Anabaena* sp. PCC7120; NaCl stress; Absorption spectra; Emission spectra; Chlorophyll a fluorescence; Photosynthesis