

盐藻的室温光抑制*

夏丽 陈贻竹

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

摘要 实验用盐藻取自天津塘沽轻工业部制盐研究所,采用 ASP2 培养液为培养基,研究了盐藻的室温光抑制现象,并探讨了盐藻的光保护反应机理。结果表明,盐藻对高辐照有很强的忍耐力,且光合能力的恢复也很强,氯霉素(CAP)或二硫苏糖醇(DTT)在高光下强烈地加深了对 PSII 光化学效率(F_v/F_m)和光合量子效率(Φ)的抑制,但 CAP 或 DTT 单独作用并不抑制盐藻的光化学系统在低光下的可逆恢复;盐藻在 CAP + DTT 共同作用下抑制的程度最深,且光抑制撤除后在低光下的恢复明显减慢,但也不能完全阻止它的恢复。经 DTT、CAP + DTT 处理的盐藻在高光下,非光化学荧光猝灭缓慢增加,PSII 还原态降低。讨论了低温和光对盐藻光化学效率恢复的影响。

关键词 盐藻 光抑制 PSII 光化学效率 非光化学荧光猝灭 PSII 还原态

学科分类号 Q945.11

光抑制研究是目前光合作用研究领域中的热点之一,越来越引起人们的关注(彭长连等,1994a)。光抑制是当光合器官吸收的光能超过它所能利用的限度时,引起 PSII 过量激发,造成光合能力的下降,即光能转化效率降低。植物体内可能存在多种机制,以防御过量光对光合机构的破坏,其中与玉米黄质相关的非辐射能量耗散在光抑制的防御过程中起着重要的作用(Demmig-Adams, 1990)。盐藻是一种单细胞绿藻,具有极强的耐盐性和渗透调节能力。人们对盐藻的渗透调节机制已进行过详细的研究(Ben-Amotz, 1973, 1975),但关于盐藻对强光是否也具有很强耐受力的研究却很少(彭长连等,1994b; Ben-Amotz *et al.*, 1989),本文对盐藻的室温光抑制研究结果予以报道。

1 材料和方法

1.1 实验材料

盐藻(*Dunaliella salina* 1009)取自天津塘沽轻工业部制盐研究所,培养基为 ASP2 培养液,介质浓度为 2mol/L,在 80—100 μ E/($m^2 \cdot s$)光强下培养 1 个月。叶绿素含量的测定按 Arnon(1949),叶绿素浓度为 9.72—10.13 μ g/ml,使用前离心浓缩,至终浓度为开始时的 6 倍。

1.2 光合作用的测定

使用带有恒温槽的氧电极测定系统(Hasantech, England),测定程序见彭长连等

* 中国科学院院长基金特别资助项目。夏丽,女,出生于1971年1月,硕士,现在美国Bowling Green State University, E-mail: xiali@bgnet.bgsu.edu

收稿日期:1998-08-20,收修改稿日期:1998-07-08

(1994a)。在 $50\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强、 25°C 下测定。反应杯中叶绿素浓度为 $55.3\text{—}57.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用在光强为 $50\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 下测得的放氧速率与此光强之比来代表盐藻的光合量子效率。

1.3 叶绿素荧光的测定

1.3.1 PSII 光化学效率 (F_v/F_m) 用脉冲调制荧光仪 (Pulse modulation fluorometer, PAM, Walz Germany) 测定盐藻的特征性荧光参数。原初荧光 (F_0) 是黑暗适应的盐藻在弱调制测量光 [$0.05\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 诱导下产生的, 最大荧光 (F_m) 则是在 F_0 之后用强饱和和脉冲光 [$4\ 300\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 激发测得, 最大可变荧光 (F_v) = $F_m - F_0$ (Chen *et al.*, 1993)。

1.3.2 盐藻非光化学荧光猝灭及 PSII 还原态的测定 按 Schreiber 等 (1986) 的方法。 $F_m/F_m' - 1$ 表示非光化学荧光猝灭的变化, 其中 F_m' 是任何一种光适应状态下的荧光强度。PSII 还原态为 $(F - F_0)/(F_m' - F_0)$, F_0 是 PSII 反应中心开放时的最小荧光产量, F 是光诱导期间实际的荧光发射量, 诱导光化光强度为 $150\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.4 光抑制处理及恢复

1.4.1 光抑制处理条件 将盐藻分为 4 组: (1) 对照组; (2) 加入氯霉素 (CAP) (终浓度为 $99\mu\text{mol}/\text{L}$); (3) 加入二硫苏糖醇 (DTT) (终浓度为 $64.9\mu\text{mol}/\text{L}$); (4) 加入 CAP + DTT (浓度同前)。各组均在 $36\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 下预照射 30min, 然后在 $1\ 890\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 下处理 60min, 整个处理过程都在室温 (25°C) 下进行。

1.4.2 光抑制撤除后的恢复条件 在以下 4 组不同条件下, 2h 内进行恢复: (1) 25°C 、 $40\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; (2) 25°C 、黑暗; (3) 10°C 、 $40\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; (4) 10°C 、黑暗。

2 结果

2.1 盐藻的光合作用光曲线及不同盐浓度处理对光化效率和光抑制恢复的影响

本实验室培养盐藻的光强约为 $100\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 但光饱和点仍可达到 $400\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

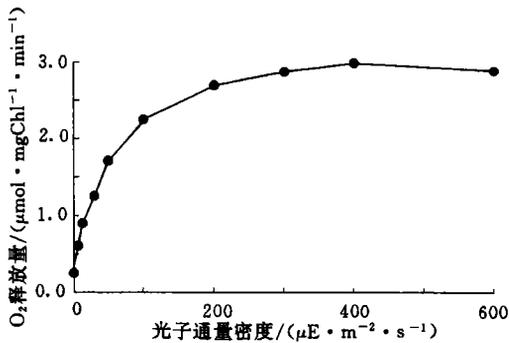


图1 25°C 下盐藻的光反应曲线

Fig.1 The light response curve of *Dunaliella salina* 1009 at 25°C

(图 1), 叶绿素 a 与叶绿素 b 之比为 2.45—3.89, 与高等植物的阳生类型相似。盐藻的 F_v/F_m 约为 0.7。将在 $2\text{mol}/\text{L}$ NaCl 下生长的盐藻在不同盐浓度中适应 24h 后发现, 虽然其光合能力有所下降, 但 F_v/F_m 比值变化不大 (数据未列出), 表明盐藻能够通过合成或转化甘油来调节渗透压, 从而保持一定的光合能力和光化效率。对在不同盐浓度下适应的盐藻进行光抑制处理后发现, $1\text{—}3\text{mol}/\text{L}$ NaCl 为盐藻的介质盐度。光抑制后, 光化学效率有很快且相近的恢复速率, 本文选择 $2\text{mol}/\text{L}$ NaCl 为盐藻的介质盐

度。由图 2 可知, 在高盐浓度 ($4\text{mol}/\text{L}$ NaCl) 下的盐藻虽仍有恢复但速度明显减慢, 在低盐浓度 ($0.5\text{mol}/\text{L}$ NaCl) 下的盐藻则恢复停止。这说明在低渗透压下细胞受伤害的程度比在高渗透压下大。

2.2 CAP、DTT 适宜浓度的选择

CAP 是叶绿体编码的蛋白质合成抑制剂 (Okada *et al.*, 1991), DTT 是与叶绿素循环

相关的能量耗散的抑制剂,它们可以分别抑制 D_1 蛋白的周转和玉米黄质的形成 (Greer *et al.*, 1991)。CAP 在高浓度下能直接抑制光合作用,为了选择适宜浓度的 CAP,作者检测了一系列 CAP 浓度对盐藻光合作用和 F_v/F_m 的影响(数据未列出)。结果表明,当 CAP 的浓度超过 $124\mu\text{mol/L}$ 时,对限制或饱和光下的光合作用无直接影响,因此我们选择 CAP 的浓度为 $99\mu\text{mol/L}$ 。DTT 对光合量子效率、饱和光合速率、 F_v/F_m 都无明显影响。表 1 显示对照、用 CAP、DTT 和 CAP + DTT 预处理的盐藻低光照射 30min 后测定其光合量子效率和 PSII 光化学效率,并未发现明显的差异。

表 1 四组盐藻在光抑制处理前预光照 30min 测得抑制剂对光合量子效率 (Φ_i) 与光化学效率 (F_v/F_m) 的影响

Tab.1 The effect of inhibitors on quantum efficiency (Φ_i) of photosynthetic oxygen evolution and photochemical efficiency (F_v/F_m) of four group *Dunaliella salina* before photoinhibition treatment

组别	Φ_i (mol $\text{O}_2/\text{E m}^2 \text{gchl}$)	F_v/F_m
对照组	0.120 ± 0.050	0.705 ± 0.037
CAP	0.100 ± 0.028	0.698 ± 0.037
DTT	0.108 ± 0.015	0.728 ± 0.024
CAP+DTT	0.109 ± 0.021	0.730 ± 0.029

注:表中数据来自3次独立的实验,为平均值±标准差

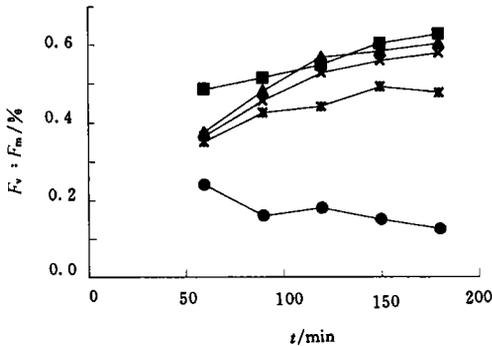


图 2 不同盐浓度对 F_v/F_m 值的影响

Fig.2 The effect of different NaCl concentration on F_v/F_m

NaCl 浓度分别为:—●— 0.5mol/L, —■— 1.0mol/L, —▲— 2.0mol/L, —×— 3.0mol/L, —*— 4.0mol/L.

图中,60min 之前为光抑制处理,之后为恢复,

图 3、图 5 同

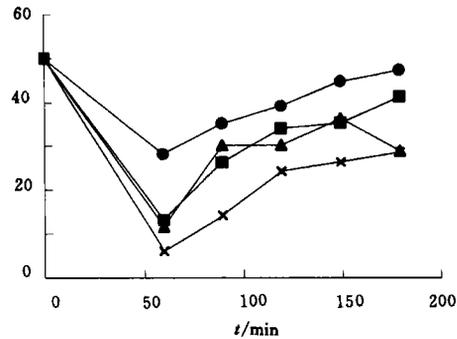


图 3 抑制剂对光抑制处理和恢复时 F_v/F_m 值的影响

Fig.3 The effect of inhibitors on F_v/F_m during the phase of photoinhibition treatment and recovery

—●— 对照, —■— CAP, —▲— DTT, —×— CAP + DTT; 将未暴露于高光前的数据设定为 100%

2.3 CAP、DTT 或 CAP + DTT 对 F_v/F_m 及其恢复的影响

将盐藻暴露于 $1890\mu\text{mol/L}$ 的高光下 60min, F_v/F_m 出现明显降低 (20%—25%), 但在随后的低光恢复中, F_v/F_m 几乎呈线性回升, 120min 后已接近抑制前的水平 (图 3)。在单独使用 CAP 或 DTT 预处理的盐藻中, F_v/F_m 的下降增加了 1 倍 (约为 40%), 显然, CAP 或 DTT 加剧了对光化学效率的抑制。如果 CAP 和 DTT 组合使用, 则这种抑制将会更加明显, F_v/F_m 下

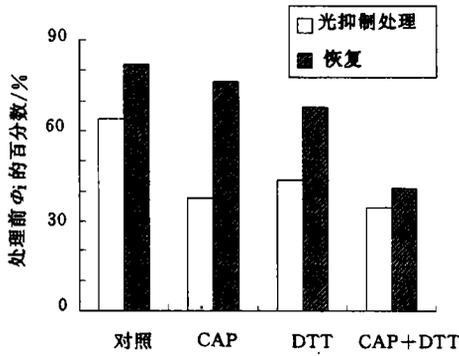


图4 四组盐藻经光抑制处理和恢复时的 Φ_i 值

Fig.4 The effect of inhibitors on Φ_i during the phase of photoinhibition treatment and recovery

注:将未暴露于高光前的数据设定为100%

并不抑制随后的恢复。但是CAP + DTT组合处理则阻止了光抑制后 Φ_i 的恢复(图4)。

2.5 不同恢复条件对 F_v/F_m 恢复的影响

由图5可知,低温或黑暗都明显降低 F_v/F_m 的恢复速率,但只有黑暗和低温两个因素

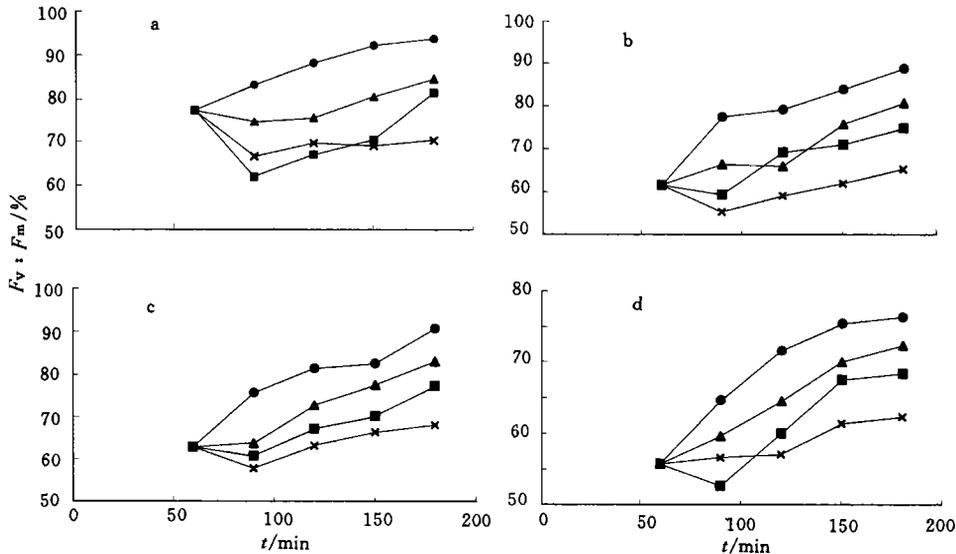


图5 光抑制撤除后,不同条件下24h内盐藻的 F_v/F_m 的恢复情况

Fig.5 The effect of different conditions in 24 hours on the recovery of F_v/F_m after photoinhibition treatment

a. 对照, b. CAP, c. DTT, d. CAP + DTT;

—●— $40\mu E/(m^2 \cdot s)$, $25^\circ C$; —■— 黑暗, $25^\circ C$; —▲— $40\mu E/(m^2 \cdot s)$, $10^\circ C$; —×— 黑暗, $10^\circ C$

共同用才能完全阻止它的恢复,在低温下 40mol/L 的光强可能仍会产生部分抑制。经抑制剂处理的盐藻,黑暗或低温可使其 F_v/F_m 的恢复速率更加明显减缓,但不能完全阻止其恢复,除非黑暗和低温两个因子共同作用。值得注意的是,在3组抑制剂预处理的盐藻中,单独使用低温或黑暗这两种因子之一,能使 F_v/F_m 保持一定的恢复能力,甚至还高于对照组,

降可达45%。

在光抑制后的120min低光恢复期间,单独使用DTT或CAP并不阻止光化学效率的可逆恢复。前30min恢复是快速的(第1相),然后以与对照相近的恢复速率回到原来处理前的大约90%的水平(第2相)。然而,在CAP + DTT组合处理中,第1相与第2相的恢复都明显减慢。

2.4 CAP, DTT 或 CAP + DTT 对光合量子效率(Φ_i)的影响

将盐藻置于与上述相同的条件下,在对照中光合量子效率受到近40%的抑制,随后在低光下 Φ_i 也能恢复到处理前80%的水平。CAP或DTT单独作用同样明显加剧 Φ_i 的抑制程度,但

其机理有待进一步研究。

2.6 盐藻非光化学荧光猝灭及 PSII 还原态的变化

非光化学荧光猝灭 (NPQ) 用 $F_m/F_m' - 1$ 表示 (Schreiber *et al.*, 1986)。由表 2 可知, 4 组处理 (包括对照组) 的盐藻经 10min 高光处理后, NPQ 都略有增加 (从 0.0 提高到 0.5 左右)。DTT 和 CAP + DTT 并没有阻止在开始强光暴露下的 NPQ 的提高。60min 后, 对照组和 CAP 组的 NPQ 明显上升 (约为 10' HL 时的 4 倍), 而 DTT 组和 CAP + DTT 组的 NPQ 仅约为 10' HL 时的 2 倍。在 120' LL 的恢复期间, NPQ 均有下降, 其中 CAP 组的降幅最

表2 光抑制处理及恢复过程中非光化学荧光猝灭和PSII还原态的变化

Tab.2 The variation of non-photochemical fluorescence quenching and PSII reducing state during the phase of photoinhibition and recovery

组别	$F_m/F_m' - 1$			PSII还原态	
	10' HL	60' HL	120' LL	10' HL	60' HL
对照	0.55	2.15	0.44	0.56	0.54
CAP	0.48	2.02	0.59	0.58	0.55
DTT	0.55	1.27	0.23	0.67	0.60
CAP+DTT	0.62	1.33	0.58	0.71	0.60

注: 四组盐藻分别暴露于 $1890\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 10min (10' HL)、60min (60' HL) 及在随后的低光 [$40\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 120min (120' LL) 内进行恢复

小。在 10min 强光下, 对照组和 CAP-处理的盐藻的还原态已完全发展并固定在 50% 左右的水平上。相反, 经 DTT 或 CAP + DTT 处理的盐藻中则导致产生高的还原态 (约为 70%); 然而, 再经 60min 强光处理后, 这种还原态有所下降。

3 讨论与结论

由实验结果可知, 盐藻在强光下其光化效率、光合能力、光合电子传递、PSII 还原态都受到明显影响。与其它许多研究报道一样, CAP、DTT 有明显加重光抑制和光抑制撤除后恢复的效应。但是单独使用 CAP 或 DTT 并不能完全阻止盐藻高光 60min 后其光化学效率和光合量子效率从抑制状态下的恢复 (图 3, 图 4)。也就是说, 在盐藻的光合器中, 不论是对 CAP-或是对 DTT-敏感的过程被抑制后都不能阻止系统很快地恢复到高的光化学效率状态 (图 3)。这种现象说明盐藻像阳生类型植物那样具有对 CAP-或 DTT-敏感的过程, 同时又类似阴生植物那样存在对 CAP-或 DTT-不敏感的过程; 再者 CAP + DTT 组合基本上阻止 F_v/F_m 的恢复, 这说明蛋白质快速周转和玉米黄质形成在耗散多余激发能的作用上是相互联系的, 即 D_1 蛋白的快速周转参与了能量耗散过程, 玉米黄质的形成又与蛋白质周转相关联 (Demmig-Adams *et al.*, 1993)。Demmig-Adams 等 (1993) 报道了在菠菜中也有类似现象, 说明盐藻在光抑制和光保护的运作上与高等植物的光合机构是相似的。因此, 即使盐藻在实验室较低的光强下驯化、生长, 然后用大于生长 20 倍的高光处理, 它仍表现出类似阳生植物对光抑制的响应, 因为蛋白质周转和玉米黄质形成的参与正是阳生植物光保护机制的特点。从这个角度来看盐藻作为研究光抑制的材料是十分适合的。

经 CAP + DTT 预处理的盐藻暴露于 $1890\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 强光下 60min 后, 光化学效率的恢复十分缓慢, 在 120min 的低光恢复期间最多只能从 CAP + DTT 加深抑制的水平恢复到相同条件下对照被抑制的水平。也就是说, 被抑制剂加深抑制的那一部分, 在恢复期

间基本上被消除了。在本实验中 CAP + DTT 组合并不能完全抑制 F_v/F_m 的恢复,这说明在盐藻中存在对 CAP + DTT 敏感和对 CAP + DTT 不敏感的两个过程。这同时暗示着在盐藻中存在另一种与 DTT-和 CAP-敏感无关的其它耗散多余激发能的过程。这个结论还可以从 $F_m/F_{m'}$ - 1 和 PSII 还原态的变化中(表 2)看出。盐藻在暴露于高光的头 10min 内,经抑制剂预处理的各组盐藻中非光化学荧光猝灭的启动都具有相同的水平,但由于直接与非光化学荧光猝灭相关的玉米黄质形成被 DTT 抑制,因此 60' HL 时 DTT 组、DTT + CAP 组的 $F_m/F_{m'}$ - 1 增加幅度小。在光抑制处理过程中,除了 CAP 或 DTT 预处理的盐藻由于蛋白质周转和玉米黄质的形成相互关联而保护一定的非光化学耗散能力外,CAP + DTT 仍具有相当水平的 $F_m/F_{m'}$ - 1 值。由于 CAP 抑制了叶绿体编码蛋白的合成,在低光恢复中 F_m 仍保持着部分抑制。同样,在 DTT、CAP + DTT 处理的盐藻中,可能由于阻止了与叶黄素循环相关的能量耗散,在 10' HL 下导致产生高的还原态。然而在 60' HL 时还原态却降低了,这种降低和 CAP、DTT 和 CAP + DTT 处理组合中的 $F_m/F_{m'}$ - 1 仍可以在 10min 和 60min 强光处理之间有一定提高有关,说明系统可能存在:(a)在受光抑制的反应中心中,有部分反应中心虽然不具光化学活性但仍能起耗散多余激发能的作用,从而保护具有活性的中心回到较高的光化学效率水平上,使 PSII 还原态降低(表 2);(b)或者存在另一个与叶黄素循环无关的过程,它在高光暴露一开始就形成了,并且也能起能量耗散的作用($F_m/F_{m'}$ - 1 提高)。

盐藻光系统中存在另外一个与叶黄素循环无关的能量耗散过程对低温和光敏感(Greer *et al.*, 1991)。实验结果表明(图 5),低温或黑暗都明显降低 F_v/F_m 的恢复速率,但只有黑暗和低温两个因素共同作用才能完全阻止它的恢复,说明大部分 PSII 中心光化学的修复是温度和光敏感的过程,即修复与光合活性相关。结果还表明,在黑暗、25℃ 一组中 F_v/F_m 仍有部分恢复,这一现象很可能表明系统存在一种可逆的自动弛豫过程,而低温能不同程度地加深了这两种抑制剂的抑制作用,从而使 $F_m/F_{m'}$ 的恢复速率更加明显减缓,但也不能完全阻止它的恢复。除非黑暗和低温两个因子共同作用。以上说明,在盐藻的光合系统中存在的对 CAP-或 DTT-敏感和不敏感的过程都对黑暗或低温敏感,且有部分可逆的自动过程。

参 考 文 献

- 彭长连,林植芳,孙谷畴等,1994a.两个盐藻品系耐盐性的比较.中国科学院华南植物研究所集刊,9:89—94
- 彭长连,林植芳,孙谷畴等,1994b.两种盐藻光合作用特性的比较.海洋与湖沼,25(6):606—611
- Amon D J, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol*, 24:1—15
- Ben-Amotz A, Avron M, 1989. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: *Alga and Cyano* New York, 32—114
- Ben-Amotz A, Avron M, 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol*, 51:875—878
- Ben-Amotz A, 1975. Adaptation of the unicellular alga *Dunaliella parva* to a saline environment. *J Phycol*, 11:50—54
- Chen Y Z, Wu B G, Huang F, 1993. High Temperature Effects on the Photosynthesis of the Marine Green Alga *Ulva pertusa*, Analyzed by Chlorophyll Fluorescence. In: Morton B *et al* ed, *The Marine Biology of the South China Sea II*. Proceedings of the Second International Conference, Guangzhou, China. World Publishing

Corporation, 132—135

Demmig-Adams B, 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the Xanthophyll Zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta*, 1 020:1—24

Demmig-Adams B, Adams W W, 1993. The Xanthophyll cycle, protein turnover and the high light tolerance of sun-acclimated leaves. *Plant Physiol*, 103:1 413—1 420

Greer D H, Ottander C, Oquist G, 1991. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in intact barley leaves at 5°C and 20°C. *Physiol Planta*, 81:203—210

Okada K, Satoh K, Katoh S, 1991. Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. *FEBS Lett*, 295:155—158

Schreiber U, Schliwa U, Bigger W, 1986. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosyn Res*, 10:51—62

PHOTOINHIBITION AT ROOM TEMPERATURE IN *DUNALIELLA SALINA* 1009

XIA Li, CHEN Yi-zhu

(*Institute of South China Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510650*)

Abstract *Dunaliella salina* 1009 possesses a greater tolerance to high irradiance and has a much high rate of recovery of photosynthesis after photoinhibition. Changes in photosynthesis rate and photochemical characteristics in response to high irradiance, followed by recovery at low irradiance, were determined in four groups of *Dunaliella salina* 1009. They were untreated algae, algae treated with either an inhibition of energy dissipation associated with the Xanthophyll cycle (DTT) or an inhibition of encoded protein synthesis (CAP), as well as algae treated with a combination of CAP + DTT. Treatment of algae with either CAP or DTT resulted in a more pronounced decrease in the rate of photosynthesis subsequent to the treatment at high PFD, but the depression of photochemical efficiency and photo efficiency of photosynthetic oxygen evolution was reversible, i.e., CAP- or DTT-sensitive process didn't prevent the rapid recovery of photochemical system. However, subsequent to the same exposure, the highest level of depression and a low recovery was observed when these algae were treated with a combination of CAP + DTT. This means that CAP- or DTT-sensitive process is not completely related in *Dunaliella salina* 1009. Meanwhile, in algae treated with CAP + DTT, DTT, further decrease in the PSII reduction state, as well as the slow decrease in F_m' (the slow increase in non-photochemical quenching), would be consistent with the development of an additional Xanthophyll cycle-independent process that dissipates excess energy in PSII. This apparently develops during high PFD and persists upon return to low PFD. It may cause the photochemical system to reversibly return to a high functional photosynthetic state.

Key words *Dunaliella salina* 1009 Photoinhibition PSII photochemical efficiency Non-photochemical quenching PSII reduction state

Subject classification number Q945.11