

NaCl与Cd对小球藻光系统II (PS II) 活性的影响*

王淑智^{1,3} 李利¹ 张道勇² 潘响亮^{1**}

(¹中国科学院新疆生态与地理研究所环境污染与生态修复实验室 乌鲁木齐 830011)

(²中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室 贵阳 550002)

(³中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 运用叶绿素荧光技术分析了盐胁迫和重金属镉(Cd)对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)光系统II(PS II)的影响机理。实验中小球藻培养基设置NaCl浓度梯度分别为0、25、100 mmol/L,然后在不同NaCl浓度的培养基中再加入CdCl₂溶液,使培养基中Cd²⁺的浓度分别为0、1、25、100 μmol/L。在处理后的1、3、6、12、24 h测定其快速上升荧光曲线和荧光参数。实验发现,高浓度的NaCl(≥25 mmol/L)和Cd(≥25 μmol/L)会降低PS II的活性,降低反应中心密度。NaCl主要抑制了依赖于光的反应,降低了光能捕获和用于电子传递的量子产额。Cd主要作用于反应中心,增加了单位反应中心吸收的光能和用于热耗散的能量。较低浓度(1 μmol/L)的Cd处理对小球藻PS II活性具有促进作用。NaCl和Cd的处理均体现了时间和浓度的依赖性。盐胁迫和Cd胁迫体现了随浓度增高加重彼此胁迫强度的协同作用的特点。图7表1参28

关键词 蛋白核小球藻;盐胁迫;镉胁迫;叶绿素荧光;光系统II(PS II)

CLC Q945.78

Effects of NaCl and Cd on Photosystem II (PS II) Activity of *Chlorella pyrenoidosa**

WANG Shuzhi^{1,3}, LI Li¹, ZHANG Daoyong² & PAN Xiangliang^{1**}

(¹Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)

(²State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

(³Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The effects of NaCl and cadmium (Cd) on photosystem II (PSII) activity of *Chlorella pyrenoidosa* were investigated by chlorophyll fluorescence test to detect the changes of PSII performance caused by environmental stress. NaCl concentrations in media were set as 0, 25 and 100 mmol/L and CdCl₂ concentrations in media were 0, 1, 25 and 100 μmol/L. The fluorescence parameters were detected after exposure for 1, 3, 6, 12 and 24 h, respectively. The results showed that the PSII efficiency and the number of reaction centers decreased under stresses of high levels of NaCl (≥25 mmol/L) and Cd (≥25 μmol/L). The inhibition of NaCl was more related to the light dependent reaction by decreasing the quantum yield for electron transport. The main target site of Cd was the PSII reaction center by increasing the absorbed energy and dissipation in each reaction center. The PSII activity was enhanced by low concentration Cd (1 μmol/L). The effects of NaCl and Cd depended on their concentrations and exposure time, which had synergistically inhibitory effects on PSII activity. Fig 7, Tab 1, Ref 28

Keywords *Chlorella pyrenoidosa*; salt stress; cadmium stress; chlorophyll fluorescence; photosystem II (PSII)

CLC Q945.78

我国沿海地区、华北和西北的部分地区盐碱化问题严重^[1],一些地区的局部土壤含盐量高达3%~6%,地表植被难以生长^[2]。受到盐碱化危害的土地面积不断扩大,土壤的盐碱化对生态系统健康构成了严重的威胁^[3]。关于盐碱条件对不同植物的胁迫研究很多,多数研究关注钠(Na)盐的作用^[3~4]。通常当植物受到盐胁迫或其他一些胁迫时,叶绿体中的光系统II(PS II)是首先而且也是主要损害的部位^[5~6]。研究表明

盐胁迫会降低植物的最大光合效率 F_v/F_m ,改变受体侧电子受体质体醌的结合状态,抑制电子在电子受体 Q_A 到 Q_B 之间的传递^[6]。

包括镉(Cd)在内的重金属日益对植物和人身健康造成严重危害。自然环境中土壤Cd的含量一般为0.01~2 mg/kg,在一些污染的土壤中可以高达0.15~8.23 mg/kg,一些受污染的水体中含量达0.57~3.88 mg/L,甚至更高^[7~8]。Cd由于其自身的理化特性,对环境的危害极大^[8~9]。在各种环境标准中对Cd的限制比其他重金属严格^[10~11]。Cd对植物的毒害作用也十分突出^[12~13],关于Cd对植物的生理毒害研究有很多,研究证明Cd离子会导致叶绿体基粒减少,类囊体减少,破坏叶绿体结构,损害植物的光合作用^[13]。在Cd对植物的胁迫中,PS II是受到严重损害的部位,同时Cd也会影响Rubisco酶的活性^[14]。由于Cd在植物体内的积累效应,对植物的生长和遗传也会造

收稿日期: 2010-11-21 接受日期: 2011-04-26

*中国科学院知识创新工程重要方向性项目(No. KZCX2-YW-335)、中国科学院“百人计划”项目和国家自然科学基金项目(No. 40673070)资助 Supported by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KZCX2-YW-335), the Program of 100 Distinguished Young Scientists of the Chinese Academy of Sciences and the National Natural Science Foundation of China (No. 40673070)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xiangliangpan@163.com)

成危害, Cd在生物体内的迁移, 会逐渐累积产生严重的毒害作用^[15]。

在许多地区, 土壤和水体发生盐碱化的同时, 还普遍受到重金属的污染^[1], 这意味着植物同时承受着盐碱和重金属的复合胁迫。但目前对盐碱背景下重金属对植物生长的影响, 尤其是对PS II功能和活性影响方面的研究还相对较少。因此, 我们以生态毒理实验中常用的蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 为实验材料, 应用叶绿素荧光技术研究了在NaCl和Cd复合胁迫对蛋白核小球藻光系统 II中电子传递和能量分配的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验材料蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 藻种 (FACHB 9) 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。小球藻用BG-11培养基在25 °C, 光照强度30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 下培养^[16]。在培养过程中, 每天取少量藻液使用紫外可见分光光度计 (UV2800型, 上海Unico公司) 测定 $D_{680 \text{ nm}}$ 来反映生物量, 以确定藻生长阶段^[17]。用处于指数生长阶段的小球藻进行实验处理。

1.2 叶绿素荧光测量仪器

试验中采取连续激发式荧光仪 (FL3500, PSI, 捷克) 进行快速上升荧光测量。短时间光照后荧光上升过程中的变化可以反应PS II的光化学变化。该荧光测试具有很高的时间分辨率, 初始记录速度为每秒10万次, 可以清晰地获得荧光值从O上升到P的过程中丰富的荧光变化信息, 可以捕捉到O-P

变化过程中的另外两个拐点, J点和I点。而在作图时, 为了更好的观察J点和I点, 将横坐标时间轴改为对数形式, 呈现出OJIP快速荧光诱导曲线^[18-19]。

1.3 方 法

1.3.1 盐处理与重金属Cd处理 分别将分析纯NaCl和CdCl₂·2.5H₂O溶解于去离子水中配置成不同浓度的NaCl溶液和CdCl₂溶液。将3 mL指数生长期的藻液移入用于测试荧光的比色皿中, 进行盐和Cd的胁迫处理。根据盐碱条件的盐度范围^[2, 20], 以及Cd的背景值、污染水平以及一些试验中的浓度范围设置处理浓度^[7-8, 12], 在比色皿内的藻液中加入不同浓度的NaCl溶液, 使培养基中的NaCl浓度分为0、25、100 mmol/L, 然后在不同NaCl浓度的培养基中再加入CdCl₂溶液, 使培养基中的Cd²⁺的浓度分为0、1、25、100 $\mu\text{mol/L}$ 。每个处理设置3个重复。没有加入NaCl和CdCl₂溶液的样品作为对照组。

1.3.2 荧光数据的测量 经NaCl和Cd处理的*C. pyrenoidosa*在光照强度30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和25 °C下培养, 在处理1、3、6、12、24 h测定其快速上升荧光曲线。进行叶绿素荧光测量之前的藻液暗适应5 min。

1.3.3 数据处理分析 将各种处理后测得的各时刻的荧光数据导入Microsoft Office Excel软件进行处理, 通过Strasser等人对叶绿素荧光诱导曲线 (OJIP) 的数据分析和处理方法——JIP-测定 (JIP-test)^[18, 21]计算出PS II中电子传递、能量流动、光合效率等参数值。经过计算推导出的参数及其含义见表1。

对每个处理浓度3个重复的数据进行平均, 不同处理组之间使用Origin软件进行 $P < 0.05$ 水平的 t 检验, 分析显著性差异。

表1 根据叶绿素荧光诱导曲线求得的参数

Table 1 The parameters calculated from the fluorescence transient

参数及公式 Parameter and formula	说明 Illustration
$M_0 = 4(F_{300\text{ns}} - F_0)/(F_m - F_0)$	荧光诱导曲线的初始斜率, 反映 Q_A 被还原的最大速率 Approximated initial slope of the fluorescence transient, reflecting the maximum speed of Q_A reduction
$V_j = (F_{2ms} - F_0)/(F_m - F_0)$	在荧光曲线上, J点处的可变荧光, 反映反应中心的开放程度 Relative variable fluorescence intensity at the J-step, reflecting the open state of reaction centers
$\phi_{p_0} = \text{TRo}/\text{ABS} = [1 - (F_0/F_m)] = F_v/F_m$	表示最大光化学效率 (在 $t = 0$ 时) Maximum quantum yield for primary photochemistry (at $t = 0$)
$\psi_0 = \text{ETo}/\text{TRo} = (1 - V_j)$	捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过 Q_A 的其它电子受体的概率 (在 $t = 0$ 时) Probability that a trapped excitation transfers an electron into the electron transport chain beyond Q_A (at $t = 0$)
$\phi_{e_0} = \text{ETo}/\text{ABS} = [1 - (F_0/F_m)] \cdot \psi_0$	用于电子传递的量子产额 (在 $t = 0$ 时) Quantum yield for electron transport (at $t = 0$)
$\phi_{d_0} = 1 - \phi_{p_0}$	用于热耗散的量子比率 (在 $t = 0$ 时) Quantum yield for dissipation (at $t = 0$)
$\text{ABS}/\text{RC} = M_0 \cdot (1/V_j) \cdot (1/\phi_{p_0})$	单位反应中心吸收的光能 Absorption flux per reaction center (RC)
$\text{TRo}/\text{RC} = M_0 \cdot (1/V_j)$	单位反应中心捕获的用于还原 Q_A 的能量 (在 $t = 0$ 时) Trapped energy flux per RC (at $t = 0$)
$\text{ETo}/\text{RC} = M_0 \cdot (1/V_j) \cdot \psi_0$	单位反应中心捕获的用于电子传递的能量 (在 $t = 0$ 时) Electron transport flux per RC (at $t = 0$)
$\text{DIo}/\text{RC} = \text{ABS}/\text{RC} - \text{TRo}/\text{RC}$	单位反应中心耗散掉的能量 (在 $t = 0$ 时) Dissipated energy flux per RC (at $t = 0$)
$\text{ABS}/\text{CSo} \approx F_0$	单位面积吸收的光能 (在 $t = 0$ 时) Absorption flux per cross section (CS) (at $t = 0$)
$\text{TRo}/\text{CSo} = \phi_{p_0} \cdot (\text{ABS}/\text{CSo})$	单位面积捕获的光能 (在 $t = 0$ 时) Trapped energy flux per CS (at $t = 0$)
$\text{ETo}/\text{CSo} = \phi_{e_0} \cdot (\text{ABS}/\text{CSo})$	单位面积的电子传递的量子产额 (在 $t = 0$ 时) Electron transport flux per CS (at $t = 0$)
$\text{DIo}/\text{CSo} = \text{ABS}/\text{CSo} - \text{TRo}/\text{CSo}$	单位面积热耗散掉的能量 (在 $t = 0$ 时) Dissipated energy flux per CS (at $t = 0$)
$\text{RC}/\text{CSo} = \phi_{p_0} \cdot (V_j/M_0) \cdot (\text{ABS}/\text{CSo})$	单位面积的反应中心的数量, 表示反应中心的密度 Number of RCs per CS, reflecting density of RCs
$\text{RC}/\text{ABS} = (1/M_0) \cdot \phi_{p_0} \cdot V_j$	基于吸收能量计算的反应中心的密度 Density of RCs based on absorbed energy
$\text{PI}_{\text{ABS}} = (\text{RC}/\text{ABS}) \cdot [\phi_{p_0}/(1 - \phi_{p_0})] \cdot [\psi_0/(1 - \psi_0)]$	以吸收光能为基础的性能指数 Performance index based on absorption of light energy

2 结果

2.1 NaCl对小球藻PSII的影响

图1所示为实验处理6 h后各处理组的荧光曲线. 处理6 h后, 与对照组相比较, 加入NaCl处理的处理组对初始荧光 F_0

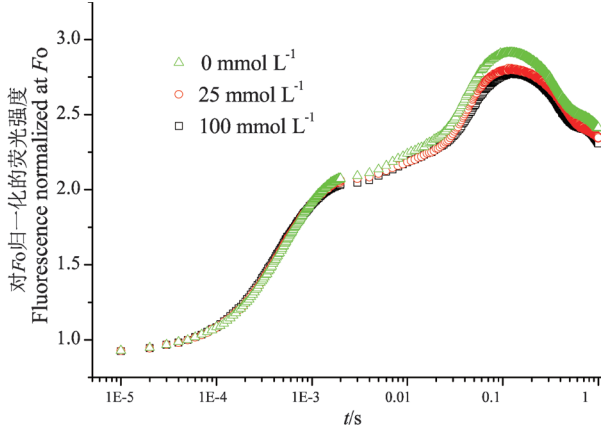


图1 不同浓度NaCl (0、25、100 mmol/L) 处理6 h后的*Chlorella pyrenoidosa*荧光动力学 (OJIP) 曲线

Fig. 1 OJIP fluorescence transients of *Chlorella pyrenoidosa* after exposure to different concentrations of NaCl (0, 25, 100 mmol/L) for 6 h

归一化后的荧光曲线随着NaCl浓度的升高而降低, 表明盐处理抑制了荧光产量及PSII中 Q_A 、 Q_B 和质体醌之间电子传递^[22].

在不同浓度的NaCl处理后, 各叶绿素荧光参数随着NaCl浓度变化和处理时间的延长呈现了不同的变化 (图2). 图2-A表明, M_0 在处理1 h和3 h后, 各NaCl浓度处理之间在 $P<0.05$ 水平的差异不显著. 随时间延长 M_0 有逐渐增大的趋势, 各处理组之间的差异也逐渐增大, 在处理6 h和12 h后, NaCl浓度为100 mmol/L的处理组与对照组之间差异显著, 分别增加了13%和10%. 25 mmol/L的处理组介于对照组和100 mmol/L的处理组之间, 与另外两组差异不显著.

图2-B表明, ϕ_{p_0} 在处理1 h后各处理组之间的差异不明显, 3 h后略有上升, 之后逐渐下降. 处理后的每个测量时刻, ϕ_{p_0} 随NaCl浓度的增加呈下降趋势. 在经过处理6 h和12 h之后, 虽然随着NaCl浓度的增加各处理之间 ϕ_{p_0} 有不显著的轻微差异, 但仍体现了盐的胁迫. 25 mmol/L和100 mmol/L的处理组在6 h和12 h后的 ϕ_{p_0} 比处理1 h显著降低 ($P<0.05$).

图2-C所示为 ϕ_{E_0} 的变化情况, 各处理组之间的差距不显著, 但随着处理时间的延长表现出随着NaCl浓度的增高呈下降的趋势. 与 ϕ_{p_0} 的变化相似, 同样在处理3 h的时候有略微的上升, 之后逐渐下降.

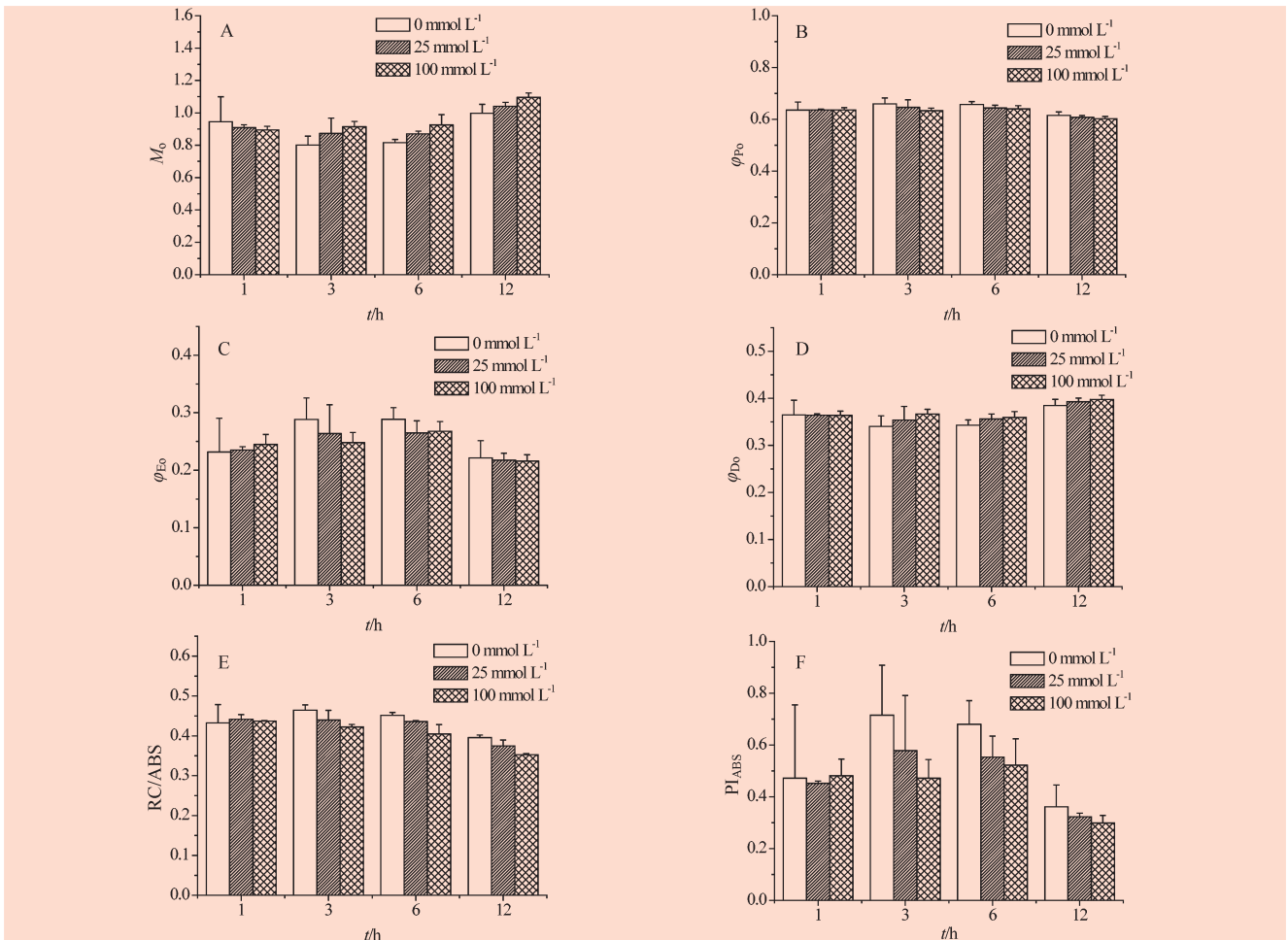


图2 不同浓度的NaCl (0、25、100 mmol/L) 处理后PSII功能参数随时间的变化

Fig. 2 Changes in PSII functional parameters after exposure to different concentrations of NaCl (0, 25, 100 mmol/L)

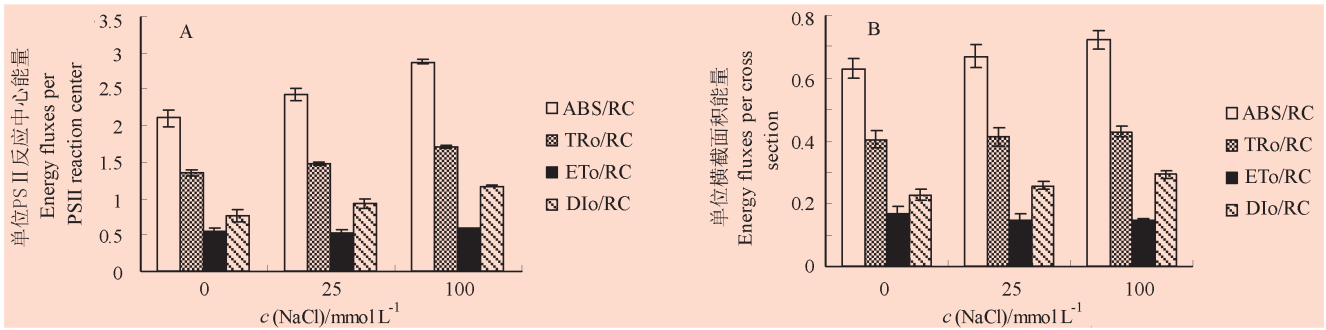


图3 不同浓度NaCl处理24 h后单位PSII反应中心能量(A)和单位横截面积能量(B)

图2-D所示 ϕ_{D_0} 的变化与 ϕ_{P_0} 的变化刚好相反,在分别经过处理6 h和12 h之后,虽然各处理的 ϕ_{D_0} 差异在 $P<0.05$ 水平上不显著,但在整体上仍然可以看出随浓度增大呈现上升趋势.25 mmol/L和100 mmol/L的处理组在6 h和12 h后的 ϕ_{D_0} 均比处理1 h有显著的增高($P<0.05$).

图2-E表明,吸收单位能量所需的反应中心的数量RC/ABS在处理3 h内会有略微上升.但在较长时间的NaCl胁迫下,随着NaCl浓度增加和处理时间延长RC/ABS明显降低,表明叶绿体尤其是PSII反应中心受到了破坏.处理6 h和12 h后,加入NaCl的处理组与对照组之间的差异达到显著水平($P<0.05$).经过NaCl处理12 h后,RC/ABS与处理1 h的数值差异显著,而且浓度为100 mmol/L的处理组在12 h后的RC/ABS比对照组1 h的数值降低了约20%.

如图2-F所示,基于能量的性能指数 PI_{ABS} 也随着处理体现短时间的1 h和3 h内短暂的升高,之后随着处理浓度的增加和处理时间的延长呈现降低趋势,对照组随时间变化的差异不显著. PI_{ABS} 在处理12 h后呈现出明显的降低,25 mmol/L和100 mmol/L的处理组相比对照组分别降低了10%和17%.而且处理组的 PI_{ABS} 与处理1 h的差异显著($P<0.05$),处理12 h后,两个处理组分别比处理1 h的数值降低了约30%和40%.

对于反映单位PSII反应中心活性的指标ABS/RC、TRo/RC、ETo/RC、DIo/RC,如图3-A所示,为不同浓度的NaCl处理24 h后的结果.ABS/RC和TRo/RC逐渐增大,各处理组之间差异显著,表明NaCl的处理使单位PSII反应中心吸收的光能和捕获的用来还原 Q_A 的能量均有所增加.而ETo/RC在各处理组之间差异较小,仅100 mmol/L的处理组与对照之间差异显著.这是由于反应中心虽然吸收和捕获了更多的能量的同时,用于热耗散的能量DIo/RC也增多了,DIo/RC随NaCl浓度的增加呈现增大趋势,组间差异显著.

对于照光的单位横截面积活性指标ABS/CSo、TRo/CSo、ETo/CSo、DIo/CSo的分析,如图3-B所示,同样以处理24 h后的数据为例,变化趋势与单位PSII反应中心的活性的指标类似.单位面积吸收的光能ABS/CSo和热耗散DIo/CSo随着NaCl浓度的升高而增多,仅100 mmol/L的处理组与对照之间差异显著($P<0.05$).而TRo/CSo、ETo/CSo变化不明显.

2.2 盐胁迫下Cd对小球藻PSII的影响

在NaCl处理下加入Cd后,PSII同样受到了依赖胁迫时间和浓度的影响.图4所示为NaCl浓度为25 mmol/L时加入不同浓度Cd处理的各参数的变化.处理后1 h的短时间内,指标值

如 ϕ_{P_0} 、 ϕ_{E_0} 、 PI_{ABS} 等会有一个短暂的上升,之后随着处理时间体现出受到胁迫.

如图4-A所示, ϕ_{P_0} 随处理时间延长而降低.在处理的1 h后,各处理组的 ϕ_{P_0} 高于对照组,其中Cd的浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组与对照组之间差异显著.在处理6 h后,1 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组显著高于其他组($P<0.05$).

图4-B和4-C所示, ψ_0 和 ϕ_{E_0} 随Cd处理时间的变化与 ϕ_{P_0} 的变化相似.在处理1 h后处理组均高于对照组,差异显著($P<0.05$).随处理时间延长, ψ_0 和 ϕ_{E_0} 降低.处理6 h后,Cd的浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组, ψ_0 和 ϕ_{E_0} 增加.同时由图4-D可以发现,在低浓度的Cd(1 $\mu\text{mol/L}$)存在时,用于热耗散的量子比率 ϕ_{D_0} 也小于不加Cd的对照组.

如图4-E所示,RC/ABS随Cd处理时间延长呈下降趋势,表明在吸收光能过程中活性反应中心减少.在处理1 h后,各处理组的RC/ABS高于对照组,其中浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组的值最高,随着Cd浓度继续升高和处理时间的延长,RC/ABS逐渐降低.

如图4-F所示,对照组的性能指数 PI_{ABS} 随处理时间变化不明显,而各处理组的 PI_{ABS} 随处理时间降低.低浓度(1 $\mu\text{mol/L}$)Cd处理组的 PI_{ABS} 高于对照组,在处理6 h后也高于其他处理组.

从图5-A和图5-B可以看出,处理24 h后,实验浓度的Cd对单位反应中心的能量的影响小于NaCl的影响(图3),不同处理之间的差异较小,整体上随Cd浓度的增加ABS/RC、DIo/RC、TRo/RC和ETo/RC增加.而处理24 h后,低浓度(1 $\mu\text{mol/L}$)Cd处理组的值显著低于其他组($P<0.05$).Cd对单位横截面积的能量ABS/CSo、TRo/CSo、ETo/CSo、DIo/CSo的影响在不同浓度之间差异不显著.

2.3 NaCl和Cd综合作用下小球藻PSII荧光响应特征

在NaCl和Cd综合处理24 h后,PSII的一些结构和功能发生了明显的变化,如图6所示,为用25 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd处理、25 mmol/L的NaCl处理以及这两种浓度的NaCl和Cd共同处理24 h后的指标值相对于对照组的变化情况.

如图6所示,单独加入25 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd进行处理,会使 ψ_0 、 ϕ_{E_0} 有略微的增高,单位反应中心的能量ABS/RC、TRo/RC、ETo/RC、DIo/RC增高超过10%,而反映单位横截面积能量变化的ABS/CSo、DIo/CSo、TRo/CSo、ETo/CSo等有略微的增高;性能指数 PI_{ABS} 和单位横截面积的反应中心数量RC/CSo下降约10%.

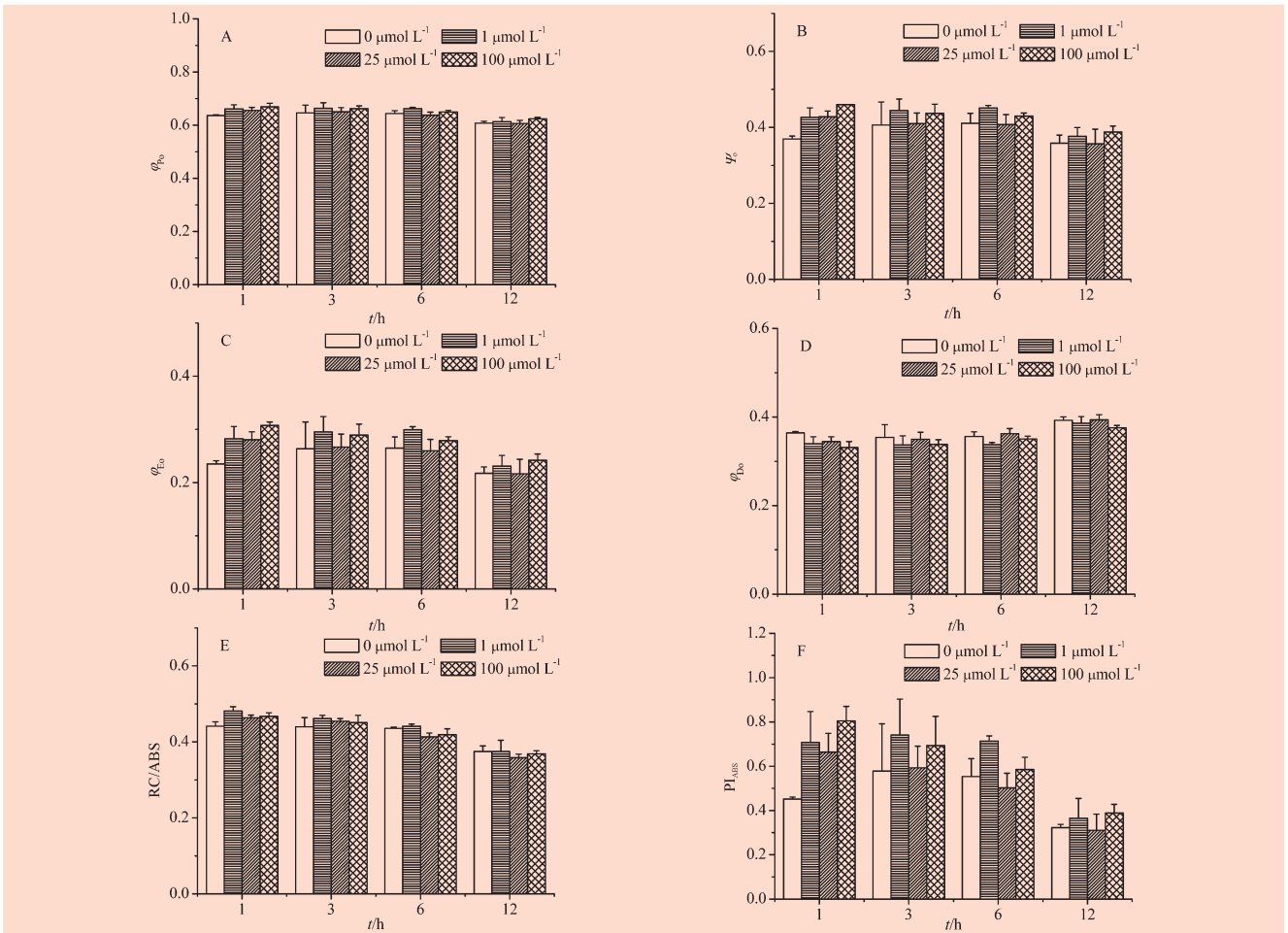


图4 不同浓度的Cd (0, 1, 25, 100 $\mu\text{mol/L}$) 处理后PSII功能参数随时间的变化: (A) ϕ_{p_o} 、(B) ψ_o 、(C) ϕ_{e_o} 、(D) ϕ_{D_o} 、(E) RC/ABS和 (F) $P_{I_{ABS}}$
 Fig. 4 Changes in PSII functional parameters after exposure to different concentrations of Cd (0, 1, 25, 100 $\mu\text{mol/L}$): (A) ϕ_{p_o} , (B) ψ_o , (C) ϕ_{e_o} , (D) ϕ_{D_o} , (E) RC/ABS, and (F) $P_{I_{ABS}}$

在加入25 mmol/L的NaCl处理时, ψ_o 、 ϕ_{E_o} 下降约10%, ϕ_{D_o} 增高, ABS/RC、TRo/RC、Dio/RC均增高; 在单位横截面积的能量变化中, ABS/CSo和TRo/CSo有略微的增高, 而ETo/CSo下降了约10%, Dio/CSo增高了约10%。变化最明显的参数有Dio/RC、Mo和 $P_{I_{ABS}}$, Dio/RC和Mo增高约20%, $P_{I_{ABS}}$ 下降了约40%。

同时用25 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd和25 mmol/L的NaCl处理24 h后, 综合胁迫下体现的影响与用25 mmol/L的NaCl单独处理时的效果较为接近。由单位反应中心的能量变化可以看出, NaCl

和Cd同时存在时, 比二者单独处理的情况下单位反应中心的各能量值要高, 变化最大的如ABS/RC和Dio/RC均增高了约30%。尤其从Dio/RC的变化可以发现, 当只加入25 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd处理时, 增高了约10%, 单独加入25 mmol/L的NaCl处理时, 增高了约20%, 同时加入NaCl和Cd时, 影响作用更加明显, 增高了30%。Mo的变化亦呈现同样的特点。NaCl和Cd同时处理时变化最显著的参数与NaCl处理时一样也是 $P_{I_{ABS}}$, 在只加入25 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd处理时下降了约10%, 而加入25 mmol/L的NaCl处理与NaCl和Cd同时处理的 $P_{I_{ABS}}$ 近似, 下降约40%。

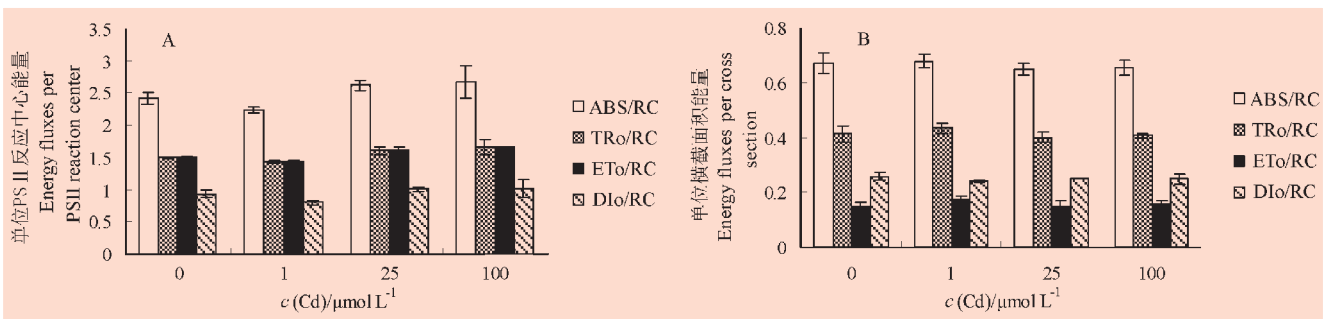


图5 不同浓度的Cd处理24 h后单位PSII反应中心能量参数(A)和单位横截面积能量参数(B)
 Fig. 5 Energy fluxes per PSII reaction center (A) and cross section (B) after exposure to different concentrations of Cd for 24 h

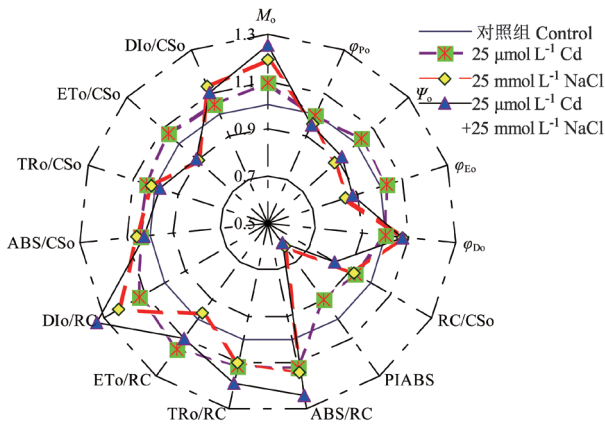


图6 处理24 h后各实验组参数值相对于对照组数值的百分比(P%)
Fig. 6 Percentage of various parameter values in the experiment compared to that in the control after 24 h operation

图7以处理24 h后的 φ_{p_0} 、ABS/RC、RC/CS0和 PI_{ABS} 等指标探讨了NaCl和Cd复合胁迫的作用。

如图7-A所示, φ_{p_0} 随着NaCl浓度的增加而降低, 除1 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd处理下 φ_{p_0} 高于其他组外, 随Cd的浓度增高呈现降低的趋势. 1 $\mu\text{mol/L}$ Cd的处理组在同样NaCl浓度的处理下, φ_{p_0} 高于其他组, 差异显著. 在NaCl浓度为100 mmol/L时, 各处理组的 φ_{p_0} 显著低于未加NaCl的各处理组, 而且1 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd处理下 φ_{p_0} 显著高于对照组, 25 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd处理组的 φ_{p_0} 显著低于对照组 ($P < 0.05$).

如图7-B所示, ABS/RC随着NaCl浓度的增加而增加, 除1 $\mu\text{mol/L}$ Cd处理组, 也随着Cd浓度的增加而增加. 不同浓度NaCl和Cd的处理组之间的差距也均达到显著水平 ($P < 0.05$), Cd处理的影响小于NaCl处理的影响。

如图7-C所示, 反应中心的密度RC/CS0随NaCl和Cd浓度的增加而降低, 但在低浓度Cd (1 $\mu\text{mol/L}$) 的处理下, 有略微的升高, 与 φ_{p_0} 的变化相似 (图7-A). 在NaCl浓度为25 mmol/L和100 mmol/L时, 如加入高浓度的Cd, RC/CS0下降显著, 与不加NaCl和Cd的对照组之间差异显著, 如加入的Cd为低浓度 (1 $\mu\text{mol/L}$), 可以使RC/CS0的降低得到一定的缓解, 与对照组之间的差异不显著 ($P < 0.05$).

如图7-D所示, 性能指数 PI_{ABS} 随NaCl浓度的增加下降趋势明显, 不同浓度Cd的处理之间随浓度变化的趋势比NaCl处理的效果小, 在100 mmol/L的NaCl处理时, 加入Cd进行复合胁迫, 高浓度的Cd相对于不加Cd的处理组的差异达到显著水平, 但随Cd浓度变化的降低幅度比随NaCl浓度变化的降低幅度小. 在相同NaCl浓度的各组之间, 低浓度的Cd (1 $\mu\text{mol/L}$) 的处理组, PI_{ABS} 均高于其他组。

3 讨论

通过研究发现, 在实验中NaCl浓度和Cd浓度处理下, NaCl的胁迫作用在各浓度梯度之间的差异比Cd各浓度之间的差异大, NaCl的胁迫作用比Cd大, NaCl与Cd对小球藻PSII具有协同毒害作用。

试验中在较低浓度的胁迫 (NaCl浓度为25 mmol/L、Cd浓度为1和25 $\mu\text{mol/L}$) 和处理短时期 (3 h) 内, 小球藻PSII的活性体现了一定程度的上升, 这可能与植物一定程度的应激性有关. PSII的活性之后随处理浓度的增加和处理时间的延长而降低, 处理的浓度越大, 降低越明显. 这种在低浓度下体现刺激作用, 而在高浓度下体现抑制作用的现象也存在于其他研究中. 如李建宏等在对 Cd^{2+} 胁迫下小球藻的生理研究中发现, 低浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理可以引起藻细胞叶绿素的增加, 而随着 Cd^{2+} 浓度增加, 叶绿素含量下降, 随之光合速率也相应降低^[23]. 本试验中PSII活性的抑制可以从荧光曲线和得出的参数看出, 如图1所示, 荧光曲线的下降, 表明处理组相对于对照组的荧光产量下降, 以及PSII中 Q_A 、 Q_B 和质体醌之间电子传递受到了抑制^[22].

盐和Cd的胁迫强度体现的时间和浓度的双重依赖性, 与大部分研究中的处理作用效果是一致的^[4-5], 表明在胁迫浓度逐渐增加到很大浓度时, 植物的生理结构和功能受到严重的损害, 而且在一定的处理时间后无法很好地恢复^[24].

在盐处理的3 h内, φ_{p_0} 、 φ_{E_0} 、RC/ABS和 PI_{ABS} 等均出现先增高然后随着处理时间的延长体现下降的趋势 (图2). φ_{p_0} 、 φ_{E_0} 和 φ_{D_0} 等是与光能利用效率有关的指标, 分别表征了最大光合效率、电子传递到电子传递链中 Q_A 之后电子受体的概率和用于电子传递的电子产额, 这些值的大小关系到植物光合作

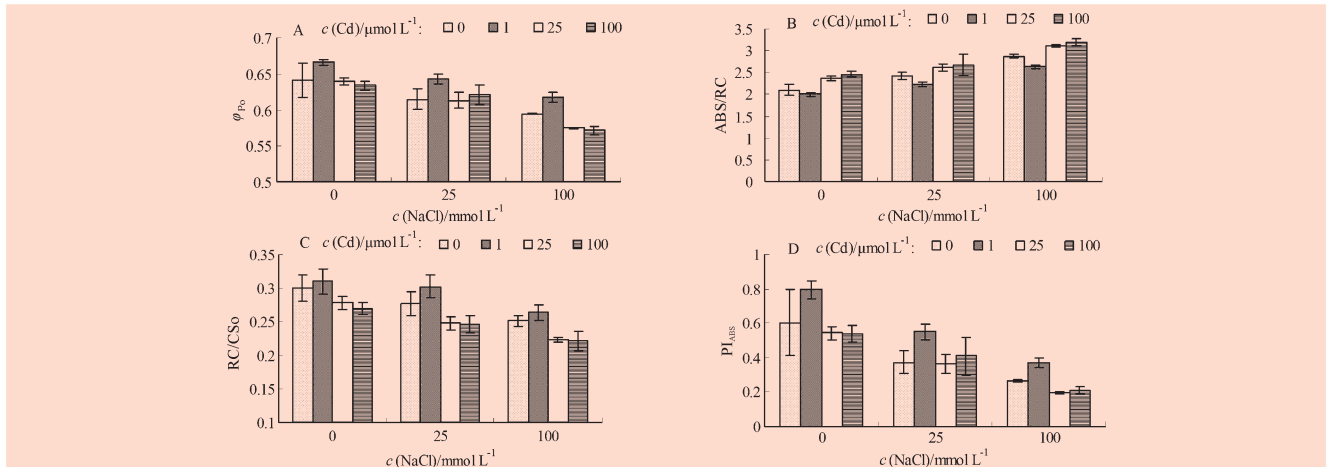


图7 NaCl-Cd复合处理24 h后的PSII功能参数: (A) φ_{p_0} , (B) ABS/RC, (C) RC/CS0和 (D) PI_{ABS}
Fig. 7 PSII functional parameters after exposure to different treatments for 24 h. (A) φ_{p_0} , (B) ABS/RC, (C) RC/CS0 and (D) PI_{ABS}

用的效率,与此相反的 ϕ_{D_0} 表示热耗散的量子比率,在胁迫中会体现出增高的现象,表明吸收的光量子用于热耗散的份额增多(图2-D, 4-D).这与一些研究中胁迫下光系统中能量耗散的现象一致^[25].

由图3和图5对于单位反应中心和单位横截面积的能量利用变化的分析同样可以发现,盐的处理对PSII起到的影响更大.能量分配的变化表现出单位反应中心能量吸收和捕获增多,而用于热耗散的能量也同时增多,甚至比前二者增加的比例更多,不同盐浓度处理24 h后,100 mmol/L NaCl处理组的ABS/RC相对于对照组增加约30%,而DIO/RC增加超过40%(图3-A).结果造成这些反应中心虽然吸收的能量增多,但更多的能量用于热耗散,实际的光合作用并没有得到促进.这些反应中心吸收周围无法正常进行光合作用的反应中心的能量,并以热能方式释放,使叶片中过量的激发能及时耗散,被认为是植物的一种防御机制^[5, 18].图3-A同时也表明,盐的处理对依赖于光的吸收和捕获的影响较大,而对于单位反应中心捕获的用于电子传递的能量(ETo/RC)的影响较小.

处理12 h后25 mmol/L和100 mmol/L NaCl处理组的 PI_{ABS} 相比对照组分别降低了10%和17%,而且分别比处理1 h的数值降低了约30%和40%,比其他的指标值的变化幅度要大,更能体现受到了胁迫(图2-F).而Cd的处理中,各处理组的性能指数 PI_{ABS} 也呈现比其他指标值明显的下降趋势(图4-F).各指标中,性能指数 PI_{ABS} 更能反映光系统的整体功能.一些研究亦指出性能指数由于包含反应中心密度、光能吸收效率和电子传递的比例等3种独立的指标因素,能更好地反映光合机构的状况,其降低可以表示光系统结构和功能受到损害^[5, 18].

同时受到盐和Cd的作用时,如图6所示,主要体现了盐的处理效果,Cd的作用在综合胁迫中体现的作用不如盐的胁迫作用大.由变化较明显的性能指数 PI_{ABS} 进行分析,Cd的处理使 PI_{ABS} 降低,但低于单独加入盐的处理效果,并且盐和Cd的综合作用与盐的单独作用效果接近.Cd的影响主要在于对反应中心的作用,如单位反应中心的能量变化.25 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd具有一定的增加单位反应中心的能量吸收和捕获的作用,以及增加用于电子传递的能量的作用,体现为单独加入Cd处理时ABS/RC、TRo/RC、ETo/RC的增加,但同时耗散的能量DIO/RC也增高了.可以理解为Cd的处理增加了这部分反应中心的功能,但是有活性的反应中心的密度降低,性能指数降低.

处理24 h后 ϕ_{P_0} 、ABS/RC、RC/CS₀和 PI_{ABS} 等指标的分析(图7)表明,盐和Cd浓度的增加使胁迫的强度逐渐增大.在NaCl的浓度为100 mmol/L的高浓度时,Cd的胁迫作用随着浓度增加更加明显.盐的处理梯度之间的差异较大,对各指标作用明显,其中 PI_{ABS} 随盐浓度的增加下降幅度最大,100 mmol/L NaCl处理的 PI_{ABS} 相对于对照组降低可达50%到60%左右(图7-D).而随着Cd浓度的增加,胁迫强度的变化较小,值得注意的是,当Cd的浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 时,指标反映的PS II的功能均比同样盐浓度的其他组要好.在盐浓度增高的情况下,1 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd可以缓解盐的胁迫,如反映中心密度和性能指数与对照组之间的差异不显著.

在实验所设置浓度的NaCl和Cd的处理下,整体表现出随浓度的增高,小球藻的PSII受到逐渐加剧的胁迫,胁迫会损害光合器官的结构和功能,这和一些研究结果^[5-6]一致,会降低光合速率,进而影响生物的生长和生物量的积累^[4, 23].盐和Cd均会对作物生产、生态环境造成严重的危害^[26-27],导致作物减产,生态系统生物组成结构变化,不耐盐,对重金属敏感物种消失,生态系统稳定性降低等^[2, 28].在本实验中表现出的盐和Cd对光系统结构和功能的损害,以及光合效率的降低,将会影响植物的光合作用和整体的生理状态,使用叶绿素荧光的方法研究盐和Cd对光系统的影响,有助于解释胁迫的机理和植物耐盐或耐重金属的机制,对保证盐碱背景和重金属污染复合作用下的作物生产和保护生态环境有着重要价值.

4 结论

试验中采用的各浓度的NaCl和Cd处理对PSII的结构和功能有不同程度的影响,具体可得出以下结论:

1) 实验中采用的各浓度NaCl对PSII的影响大于各浓度Cd造成的影响.NaCl和Cd的处理均体现了时间和浓度的依赖性.

2) 高浓度的NaCl(≥ 25 mmol/L)和Cd(≥ 25 $\mu\text{mol/L}$)会降低光系统对光能的吸收和捕获的效率,降低反应中心密度.NaCl的处理主要抑制了依赖于光的反应,降低了光能的吸收和用于还原 Q_A 的能量,而对用于电子传递的量子产额影响较小.Cd的处理主要作用于反应中心,增加了单位反应中心吸收和用于热耗散的能量.

3) NaCl和Cd胁迫整体上呈现出随着一种处理的浓度增加,另一种胁迫加重的协同作用的特点.

4) 在实验中,较低浓度的Cd(1 $\mu\text{mol/L}$)处理下,小球藻的最大光合效率、反应中心密度、性能指数等指标较不加Cd处理或其它浓度Cd处理的情况要好,对植物PSII的活性具有促进作用.在盐的胁迫中,这种低浓度Cd的处理可增高PSII的活性而表现出一定的缓解盐胁迫的作用.

References

- Gong SQ(龚绍琦), Wang X(王鑫), Shen RP(沈润平), Liu ZB(刘振波), Li YM(李云梅). Study on heavy metal element content in the coastal saline soil by hyperspectral remote sensing. *Remote Sensing Technol Appl* (遥感技术与应用), 2010, **25** (2): 169~177
- LIU YJ(刘延吉), Xu JQ(许建秋), Wang S(王嵩), Tian XY(田晓艳), Ren DM(任大明), Li GN(李冠男). Influence on soil salinity and physiological characteristic of 3 plants with integrative technique of soline-alkali improvement in Yingkou coastal industrial base. *J Shenyang Agric Univ* (沈阳农业大学学报), 2010, **41** (3): 354~356
- Shi DC(石德成), Li YM(李玉明), Yang GH(杨国会), Li YD(李毅丹), Zhao KF(赵可夫). A simulation of salt and alkali mixed ecological conditions and analysis of their stress factors in the seedlings of *Aneurolepidium chinense*. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2002, **22** (8): 1323~1332
- Li DH(李敦海), Liu YD(刘永定), Song LR(宋立荣). The effect of salt stress on some physiological and biochemical characteristics of *Nostoc*

- Sphaeroides* Kütz. (cyanobacterium). *Acta Hydrob Sin* (水生生物学报), 1999, **23** (10): 414~419
- 5 Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environ Pollut*, 2001, **115**: 49~64
 - 6 Gong HM, Tang YL, Wang J, Wen XG, Zhang LX, Lu CM. Characterization of photosystem II in salt-stressed cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1777**: 488~495
 - 7 Wang Y (王芸), Zhang JH (张建辉), Zhao XJ (赵晓军). The study of the pollution situation and distribution characteristics of cadmium in farmland soil irrigated by waste water. *Environ Monit Chin* (中国环境监测), 2007, **23** (5): 71~74
 - 8 Luo XQ (罗绪强), Wang SJ (王世杰), Zhang GL (张桂玲). Advances in the study of cadmium contaminated soil and its treatment. *J Mount Agric Biol* (山地农业生物学报), 2008, **27** (4): 357~361
 - 9 Ding YZ (丁永祯), Li ZA (李志安), Zou B (邹碧), Tan WN (谭万能), Gu W (顾伟), Cao YS (曹裕松). Effect of organic acids on cadmium desorption from paddy soil of the Pearl River Delta in China. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (3): 289~293
 - 10 Li DC (李大成). The technologies of removal of arsenic and cadmium and national drinking water standard. *Pollut Control Technol* (污染防治技术), 2009, **22** (2): 74~76
 - 11 Zhao ZJ (赵转军), Nan ZR (南忠仁), Wang ZW (王兆炜), Yang YM (杨一鸣), Wang SL (王胜利). Form distribution and phytoavailability of heavy metals (Cd, Zn) in vegetable soil. *J Lanzhou Univ Nat Sci* (兰州大学学报自然科学版), 2010, **46** (2): 1~6
 - 12 Yi YJ (衣艳君), Li FB (李芳柏), Liu JX (刘家尧). Physiological response of chlorophyll fluorescence in moss *Plagiomium cuspidatum* to mixture heavy metal solution. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2008, **28** (11): 5437~5444
 - 13 Su JW (苏金为), Wang XP (王湘平). Effect of cadmium ions on photosynthetic structure and its functions of tea leaves. *J Tea Sci* (茶叶科学), 2004, **24** (1): 65~69
 - 14 Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belimov AA, Gianinazzi S, Strasser RJ, Gianinazzi-Pearson V. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J Exp Bot*, 2002, **53**: 1177~1185
 - 15 Xu QS (徐勤松), Ji WD (计汪栋), Yang HY (杨海燕), Wang HX (王红霞), Xu Y (许晔), Zhao J (赵娟), Shi GX (施国新). Cadmium accumulation and phytotoxicity in an aquatic fern, *Salvinianatans* (Linn.). *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2009, **29** (6): 3019~3027
 - 16 Zhang XY (张晓玥), Wang Y (王艳), Zhang YZ (张玉柱), Su C (苏畅), Jiang ZB (蒋质波), Zhou YF (周亚峰). Competition experiment research of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *J Hydroecol* (水生态学杂志), 2009, **2** (6): 138~140
 - 17 Ji X (季祥), Zhang ZH (张智慧), Zhang XY (张雪艳), Cai L (蔡禄). Culture of *Chlorella* spp. and optimization of growth condition. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2009, **37** (34): 16763~16764, 16834
 - 18 Gao HY (高辉远), Strasser RJ. Application of the fast chlorophyll fluorescence induction dynamics analysis in photosynthesis study. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2005, **31** (6): 559~566
 - 19 Pan XL, Deng CN, Zhang DY, Wang JL, Mu GJ, Chen X. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of *in vivo* chlorophyll fluorescence tests. *Aquat Toxicol*, 2008, **89**: 207~213
 - 20 Guo HX (郭焕晓), Ma MY (马牧源), Sun HW (孙红文). Research on plants of constructed wetland in salty seashore area at the north of China. *J Railway Eng Soc* (铁道工程学报), 2006, **9**: 6~9
 - 21 Strasser RJ, Tsimill-Michael M, Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee eds. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht, Netherlands: KAP Press, 2004. 1~42
 - 22 Deweza D, Geoffroy L, Vernet G, Popovic R. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat Toxicol*, 2005, **74**: 150~159
 - 23 Li JH (李建宏), Hao YT (浩云涛), Weng YP (翁永萍). Physical response to Cd²⁺ stress in *Chlorella ellipsoidea*. *Acta Hydrob Sin* (水生生物学报), 2004, **28** (6): 659~663
 - 24 Liang Y (梁英), Wang S (王帅), Feng LX (冯力霞), Tian CY (田传远). Effects of heavy metals stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Environ Sci* (海洋环境科学), 2009, **28** (4): 374~382
 - 25 Ai JY (艾军勇), Zhang DY (张道勇), Mu SY (牟书勇), Pan XL (潘响亮). Effect of EDTA on accumulation and translocation of Hg in *Nephrolepis exaltata* and responses of photosystem II. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2011, **17** (2): 219~222
 - 26 Liu XG (刘晓光), Miao JL (缪锦来), Li GY (李光友), Ding DW (丁德文). Cumulation properties of heavy metals by *Suaeda heteroptera* on estuary banks of River Qingjinhuanghe in Tianjin. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (1): 25~29
 - 27 Liu P (刘萍), Wei XL (魏雪莲). Application of the salt tolerance arbor on saline and alkali soil. *Shandong For Sci Technol* (山东林业科技), 2005, **6**: 60~61
 - 28 Guo XY (郭晓燕), Yuan L (袁玲). Effect of Pb and Cd in calcareous brown soil on the growth and yield of Chinese mustard. *Shandong Agric Sci* (山东农业科学), 2006 (1): 43~45