

高浓度 CO₂ 对莱茵衣藻光系统 ② 能量流和能量利用效率的影响

夏建荣

(汕头大学海洋生物研究所, 汕头 515063)

摘要: 研究了短期内高浓度 CO₂ 培养下莱茵衣藻光系统 ② 行为的变化, 结果表明高浓度 CO₂ 培养导致叶绿素 *a*、*b* 和类胡萝卜素含量明显增加, 同时随培养时间的延长叶绿素 *a* 荧光动力学(快相) 曲线中 O、J、I、P 期的荧光强度明显增加。与空气培养的细胞相比, 高浓度 CO₂ 在 J 期的相对可变荧光均维持在较高水平; 单位反应中心复合体吸收的能量在高浓度 CO₂ 培养 6 小时后有明显的增加, 但单位反应中心捕获和用于电子传递的能量并没有明显地增加。高浓度 CO₂ 培养使光系统 ② 最大光化学效率、传递的电子能引起的光化学反应效率和电子传递的量子效率均明显低于通空气培养的细胞。以上结果表明不同 CO₂ 浓度培养导致莱茵衣藻叶绿素 *a* 荧光动力学快相的变化与其光系统 ② 功能的变化密切相关, 也可能与 HCO₃⁻ 转运过程中能量需求的变化有关。

关键词: 莱茵衣藻; 光系统 ②; 能量流; JIP 测定

中图分类号: Q945.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)04-0450-06

藻类在不同 CO₂ 浓度培养过程中表现出不同的光合作用特性, 一些研究已经表明光合作用的变化与其无机碳的利用机制有关^[1, 2]。藻类与高等植物一样都是利用核酮糖二磷酸羧化氧化酶(RUBISCO)固定 CO₂, 但在 CO₂ 浓度限制的情况下, 藻类能利用 HCO₃⁻ 在 RUBISCO 周围提高 CO₂ 浓度以满足光合作用的需要^[3, 4]。高浓度 CO₂ 对藻类光合作用特性的影响主要体现在以下几个方面: 降低藻类对无机碳亲和力、提高 CO₂ 补偿点、降低碳酸酐酶活性等^[5, 6, 7]。而高浓度 CO₂ 对藻类光合作用光系统 ② 的影响报道很少^[8], 特别是利用叶绿素 *a* 荧光动力学上升相(快相)来进行这方面的研究还未见报道。

叶绿素 *a* 荧光技术在光合作用特别是光系统 ② 行为研究方面是一种已被广泛应用的、而又无损生物体的有效研究工具^[9, 10]。近来利用植物效率仪(Plant Efficiency Analyzer)可获得高时间分辨率的荧光快速上升的详细信息, 其测量时间分辨率可达到 10⁻⁴s^[10]。所有的光合放氧生物其荧光上升(快相)由一系列的不同时期组成, 分别为 O、J、I、P 期。而利用 O-J-I-P 曲线的形状变化和通过该曲线而获得

的特定参数(JIP-test)分析能正确反映光合作用样品的实际生理状态^[11-13]。莱茵衣藻是一种研究 CO₂ 变化对其生理学特性影响的模式植物, 其在 CO₂ 限制的环境中能快速诱导 CO₂ 浓缩机制的形成^[14]。本文通过将莱茵衣藻在不同 CO₂ 浓度下(0.035% 和 4%)培养, 利用叶绿素 *a* 荧光动力学(快相)及 JIP 测试参数, 分析高浓度 CO₂ 对光系统 ② 能量流和能量利用效率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* Dang)藻种(编号: 479)从中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB)购置。在温度 25℃, 光强 100 μ mol/m²/s 下, 将藻种在 Bristol's 培养液中扩大培养至对数期, 收获, 悬浮在新鲜培养液中, 分别通入过滤空气(0.035% CO₂)和含 4% CO₂ 的空气, 12h 后收获, 测定色素含量。在培养过程中, 不同时间间隔测定叶绿素 *a* 荧光动力学曲线(O-J-I-P), 实验测定重复 3—5 次。

1.2 叶绿素和类胡萝卜素含量测定 离心收获藻细胞, 加入 80% 丙酮, 在 4℃ 下抽提 24h, 分别测定在

收稿日期: 2005-01-11; 修订日期: 2005-04-13

基金项目: 广东省自然科学基金资助

作者简介: 夏建荣(1968—), 男, 浙江海宁, 博士, 副教授, 从事藻类生理生态学; E-mail: jxia@stu.edu.cn

662、645 和 470nm 处的 OD 值, 通过以下公式计算色素含量^[15]。

Chla= 11.75* OD₆₆₂- 2.35* OD₆₄₅

Chlb= 18.61* OD₆₄₅- 3.96* OD₆₆₂

Car= (1000*OD₄₇₀- 2.27* Chla- 81.4* Chlb)/ 227

细胞数目通过显微镜计数获得。

1.3 叶绿素 *a* 荧光动力学(快相)测定 在室温下利用植物效率仪获得叶绿素 *a* 荧光诱导曲线, 测定时的激发光为 650nm 红光, 光强为 3000μmol/(m²/s)。荧光信号由高效光电检测器检测, 持续 1s, 所有样品需暗适应 15min。通过叶绿素 *a* 荧光诱导曲线获得在 50μs (O), 2ms (J), 30ms (I) 荧光强度分别为 F₀, F_J 和 F_I, 按照光系统Ⅱ的能量流模型(图1), 计算各能量流和能量利用效率参数^[11, 13, 16, 17]。

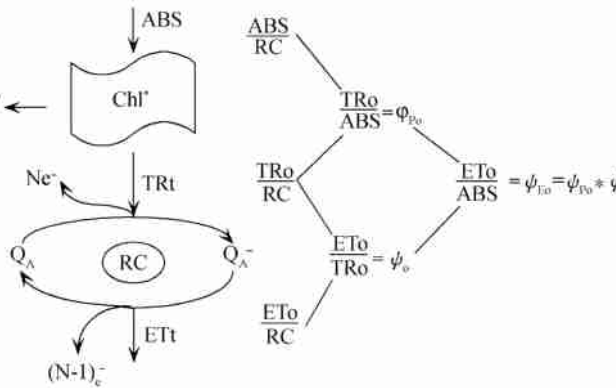


图1 光合作用光系统Ⅱ能量流模型

Fig 1 Schematic energy-flux model for PSII

ABS: 吸收的能量。TRt 和 TRo: 在 t 和 0 时刻捕获的能量; ETt 和 Eto: 在 t 和 0 时刻用于电子转移的能量; F: 荧光激发; TRo/ABS (φ₀): 光系统Ⅱ最大光化学效率; ETo/ TRo (φ₀) 传递的电子能引起的光化学效率; ETo/ ABS (φ_{EO}) 电子传递的量子效率

(1) 单位反应中心复合体吸收的能量(The energy fluxes for absorption per reaction center, ABS/ RC)、反应中心捕获的能量(The energy fluxes for trapping per reaction center, TRo/ RC)、反应中心用于电子传递的能量(The energy flux for electron transfer from Q_A to Q_A⁻ per reaction center, ETo/ RC)

ABS/ RC= (Mo/ V_J) / [1- (F₀/ F_M)]

TRo/ RC= Mo/ V_J

ETo/ RC= (Mo/ V_J) / (1- V_J)

(2) 光系统Ⅱ的最大光化学效率(Maximum efficiency of PSII photochemistry, φ₀)

φ₀= 1- (F₀/ F_M)

(3) 电子传递的量子效率(The quantum yield of electron transport, φ₀), 相当于吸收的光能能用于光化

学反应的效率

φ_{EO}= [1- (F₀/ F_M)] • (1- V_J)

(4) 捕获的激子能使电子进入电子传递链的效率, 相当于传递的电子能引起的光化学效率(The efficiency with which a trapped exciton can move an electron into electron transport chain further than Q_A, φ_{EO})

φ₀= 1- V_J

(5) 在 J 点的相对可变荧光(The relative variable fluorescence at phase J)

V_J= (F_J- F₀) / (F_M- F₀)

在公式中 F₀ 表示起始荧光, F_J 表示在 J 点的荧光, F_M 为最大荧光, Mo= 4* (F_{300μs}- F₀) / (F_M- F₀)

2 结果

高浓度 CO₂ 对莱茵衣藻色素含量的短期(12h) 影响如图 2 所示, 高浓度 CO₂ 对其色素含量有明显的影响, 与通空气培养相比, 在 12h 末, 通高浓度 CO₂ 的细胞叶绿素 *a*、*b* 和类胡萝卜素含量分别增加 16. 1%、13. 7% 和 13. 9%。

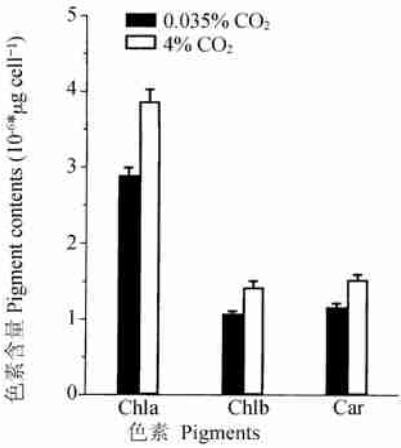


图2 高浓度 CO₂ 对莱茵衣藻叶绿素 *a*、*b* 和类胡萝卜素含量的影响

Fig 2 Effects of high CO₂ concentration on Chl *a*, *b* and Car contents in *C. reinhardtii* in the short time(12h). Data are means ± SD(n= 3—5)

莱茵衣藻细胞在饱和激发光下其荧光强度在 1s 内呈现明显的快速上升, 从图 3 可以看出叶绿素 *a* 荧光上升从 F₀ 一直到 F_M, 期间也可见明显的 J 点和 I 点, 分别约在 2ms 和 30ms 左右, 从随时间变化的荧光诱导曲线来看, 在培养 1 小时后曲线并没有明显的变化; 随时间的延长, 荧光诱导曲线中 O、I、J 和 P 点均明显升高。图 4 表明在高浓度 CO₂ 培养下与通空气培养相比, 尽管在 J 点相对可变荧光在同

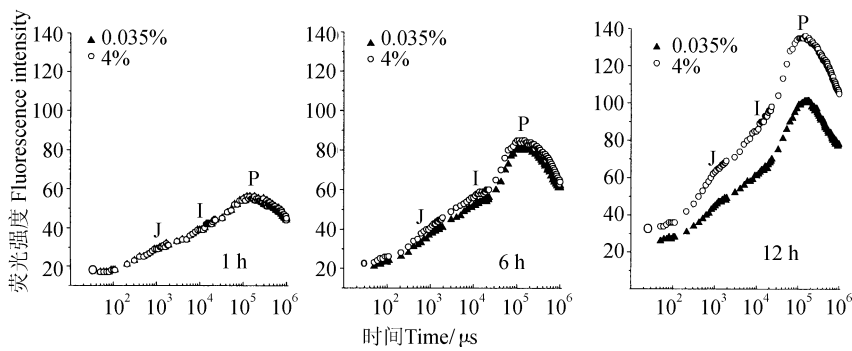


图 3 在不同 CO₂ 浓度培养下,叶绿素 *a* 瞬时荧光(O-J-I-P) 随时间变化

Fig. 3 Changes of the chlorophyll *a* fluorescence transients(O-J-I-P) with time in *C. reinhardtii* exposed to different CO₂ concentrations

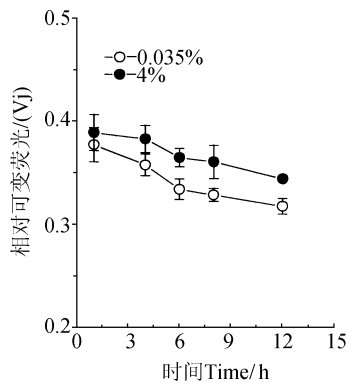


图 4 在不同 CO₂ 浓度培养下,莱茵衣藻在 J 点相对可变频光随时间的变化

Fig. 4 Changes in the relative Variable fluorescence at phase J(V_j) with time in *C. reinhardtii* exposed to different CO₂ concentrations. Data are means $\pm$ SD(*n* = 5)

一 CO₂ 浓度培养下有所下降,但在不同的时间间隔高浓度 CO₂ 培养莱茵衣藻细胞均维持一个较高的 V_j 值,到 12h 时,高浓度 CO₂ 培养细胞的 V_j 值约比通空气培养的高 10.8%。

为了评估高浓度 CO₂ 对能量流的影响,以单位反应中心为单位的特定能量流参数按 JIP 测试的公式进行计算,具体结果如图 5 所示,反应中心复合体吸收的能量在 6h 的处理后,高浓度 CO₂ 培养的明显比通空气培养的高,到 12h,高浓度 CO₂ 培养的 ABS/RC 值与空气培养相比增加 9.6%,但是反应中心捕获的能量和用于电子传递的能量并没有明显的增加。随培养时间的增加,高浓度 CO₂ 培养细胞的 φ_{P_0} 、 φ_{E_0} 和 ϕ_0 值随时间变化均明显低于通空气培养的细胞 (图 6)。

3 讨论

叶绿素 *a* 荧光诱导曲线可以分为快相(上升

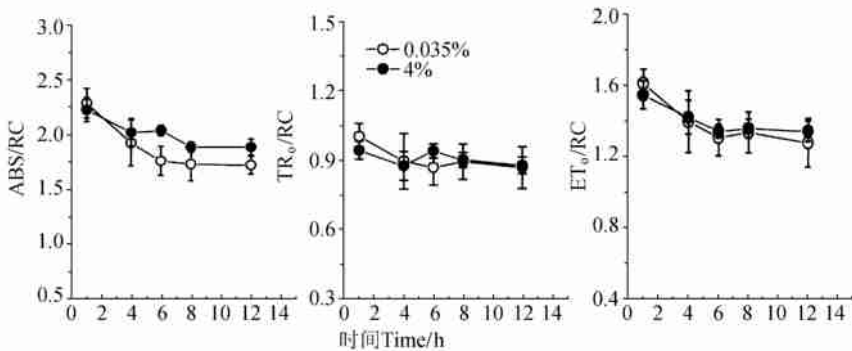


图 5 莱茵衣藻在不同 CO₂ 浓度培养下 ABS/RC、ET₀/RC 和 TR₀/RC 随时间变化

Fig. 5 Changes of ABS/RC、ET₀/RC 和 TR₀/RC with time in *C. reinhardtii* exposed to different CO₂ concentrations. Data are means $\pm$ SD(*n* = 5)

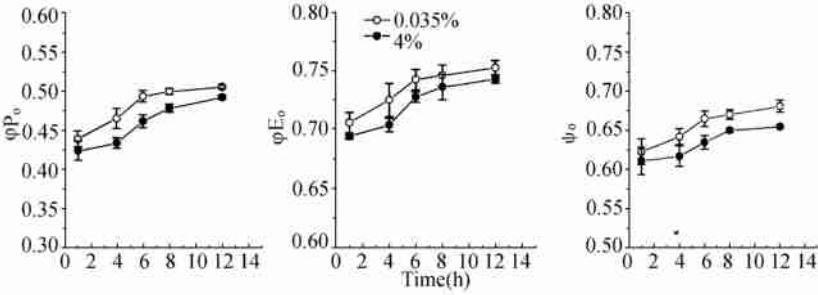


图 6 高浓度 CO₂ 对莱茵衣藻 F_v/F_m , F_v/F_o 和 ϕ_o 的影响

Fig 6 Influence of high CO₂ concentration on F_v/F_m , F_v/F_o and ϕ_o with time in *C. reinhardtii*. Data are means $\pm$ SD (n = 5)

相)和慢相(下降相),前者一般在 1 s 内完成,而后者可以持续几分钟。叶绿素 *a* 荧光诱导曲线的形状是由测定时刻光合机构的生理学状态决定的,但光合机构的生理学状态又受到外界环境的制约^[10],因此借助诱导曲线可推测外界环境条件变化所造成光合机构的影响。从目前的研究结果中可以看出,莱茵衣藻不管在高浓度 CO₂ 还是低浓度 CO₂ 培养,其叶绿素 *a* 荧光动力学曲线(快相)具有明显的 O-J-I-P 相,与以前报道的有关高等植物和蓝藻的叶绿素 *a* 荧光动力学曲线(快相)相似^[10, 12]。O-J-I-P 荧光的瞬时上升是光系统Ⅱ(PSⅡ)电子受体池的连续还原、PSII 反应中心的逐渐关闭过程^[18]。有关实验结果和理论模拟都证明 J 期代表了 Q_A⁻Q_B 的积累,而 i_v 期被认为是 Q_A⁻Q_B⁻ 积累, P 期反映了 Q_A⁻Q_B²⁻ 的积累^[10]。在目前的研究中,高浓度 CO₂ 导致细胞叶绿素 *a* 荧光释放明显增加,这与 Spalding 等报道的结果相一致,他们推测荧光强度的增加是因为高浓度 CO₂ 培养的莱茵衣藻细胞内具有较高的 Q_A⁻ 浓度^[19]。为了证明这一点,笔者计算了在 J 点的相对可变荧光,因为相对可变荧光(*V_J*)表示光系统Ⅱ原初电子受体[Q_A⁻/总 Q_A]的比率^[10],从研究结果看,高浓度 CO₂ 培养与空气 CO₂ 浓度培养相比具有较大的 *V_J* 值,这也证实了 Spalding 等的推测,表明高浓度 CO₂ 可能对 Q_A⁻ 向 Q_B 的电子传递有所抑制,而导致 Q_A⁻ 在细胞内的积累,这可能是高浓度 CO₂ 培养导致叶绿体内的酸化而造成的^[8]。高浓度 CO₂ 在短期内导致细胞色素含量如叶绿素 *a*、*b* 和类胡萝卜素含量的增加,色素含量的提高有利于细胞吸收更多的光能,因此 ABS/RC 值明显地增加。但是天线色素吸收的光能,有一部分通过荧光激发和热耗散散失,其余的才被捕获,而在本研究中,高浓度 CO₂ 培养使细胞叶绿素荧光强度明显增加,但 TRo/RC

并没有明显变化,这可能与不同 CO₂ 浓度培养下细胞的热耗散有关。Bozzo 和 Colman 已经报道莱茵衣藻在通空气 CO₂ 浓度培养过程中能很快地诱导其 CCM 机制^[12],而这种机制被证明是需要 HCO₃⁻ 主动转运和增加能量的输入^[11]。有关聚球藻 UTEX 625 的研究发现 HCO₃⁻ 转运是通过电子传递最终形成 ATP 来提供能量的^[20],而在莱茵衣藻中转移 1mol HCO₃⁻ 大致需要 1molATP^[21],因此在低 CO₂ 浓度培养下细胞需要有更多的 ATP,才能维持这种机制的运转,这样必然要求增加细胞的光合磷酸化。而光合电子传递总是与形成 ATP 的光合磷酸化相偶联的,而且非环式光合电子传递链又是以 NADP⁺ (辅酶Ⅱ)为最终电子受体。在本研究中,低浓度 CO₂ 培养下,尽管用于电子传递的能量并没有变化,而能量的利用效率包括 F_v/F_m , F_v/F_o 和 ϕ_o 均明显地提高,显然将有利于提高光合电子传递速率,有助于促进 ATP 的形成以满足细胞对增加的能量需求。目前的结果也表明不同 CO₂ 浓度培养导致莱茵衣藻叶绿素 *a* 荧光动力学快相的变化与其光系统Ⅱ功能的变化密切相关,也可能与 HCO₃⁻ 转运过程中能量需求的变化有关。在不同 CO₂ 浓度培养下莱茵衣藻细胞叶绿素 *a* 荧光快相的变化也反映了其对环境的适应。

参考文献:

[1] Badger M R, Kaplan A, Berry J A. Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for a carbon dioxide concentrating mechanism[J]. *Plant Physiol.* 1980, **66**: 407—413
[2] He P M, Wu W N, Zhao J H, *et al.* Studies on ultrastructure of pyrenoid from several algae[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**: 328—334 何培民, 吴维宁, 赵建华, 等. 几种藻类的蛋白核超微结构研究. *水生生物学报*. 2002, **26**: 328—334
[3] Song L R, Yu J W, Price D, *et al.* Isolation and analysis of a high CO₂ requiring mutant of cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942[J].

- Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**: 330—335 [宋立荣, 俞建伟, Price, 等. 蓝藻聚球藻高浓度 CO₂ 需求突变株的研究. 水生生物学报. 1998, **22**: 330—335]
- [4] Kaplan A, Reinhold L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms[J]. *Annu. Rev. Plant. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1999, **50**: 539—570
- [5] Raven J A. Physiology of inorganic C acquisition and implications for resource use efficiency by marine phytoplankton: relation to increased CO₂ and temperature[J]. *Plant Cell Environ.* 1991, **14**: 779—794
- [6] Sultemeyer D F, Fock H P, Calvin D T. Mass spectrometric measurement of intracellular carbonic anhydrase activity in high and low Ci cells of *Chlamydomonas* [J]. *Plant Physiol.* 1990, **94**: 1250—1257
- [7] Shiraiwa Y, Miyachi S. Effects of temperature and CO₂ concentration on induction of carbonic anhydrase and changes in efficiency of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* 11 h[J]. *Plant Cell Physiol.* 1985, **26**: 543—549
- [8] Satoh A, Kurano N, Miyachi S. Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentration of CO₂[J]. *Photosyn Res.* 2001, **68**: 215—224
- [9] Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence [J]. *Aust. J. Plant. Physiol.* 1995, **22**: 131—160
- [10] Strasser R J, Srivastava A, Govindjee. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria[J]. *Photochem. Photobiol.* 1995, **61**: 32—42
- [11] Appenroth K J, Scheckel J, Srivastava A et al. Multiple effects of divmamate on the photosynthetic apparatus of *Spiralela polyrhiza* as probe by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements[J]. *Environ. Pollut.* 2001, **115**: 49—64
- [12] Lu C M, Vonshak A. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells [J]. *Physiol. Plant.* 2002, **114**: 405—413
- [13] Srivastava A, Friedrich J, Strasser R J. Action of the allelochemical, fischerellin a, on photosystem II[J]. *Biochim Biophys Acta.* 1998, **1364**: 326—336
- [14] Bozzo G G, Colman B. The induction of inorganic carbonic transport and external carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* is regulated by external CO₂ concentration[J]. *Plant Cell Environ.* 2000, **23**: 1137—1144
- [15] Lichtenthaler H K, Wellburn A R. Determinations of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents[J]. *Biochem. Soc. Trans. (London)*. 1983, **63**: 591—592
- [16] Srivastava A, Govindjee, Strasser R J. Greening of peas: parallel measures on 77k emission spectra, OJIP chlorophyll a fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence levels, delayed light emission, and P700[J]. *Photosynthetica.* 1999, **37**: 365—392
- [17] Strasser R J, Stirbet A D. Estimation of the energetic connectivity of PSII centres in plants using the fluorescence rise OJIP fitting of experimental data to three different PSII models [J]. *Math. Comp. Sim.* 2001, **56**: 451—461
- [18] Lazar D. Chlorophyll a fluorescence induction[J]. *Biochim. Biophys Acta*, 1999, **1412**: 1—28
- [19] Spalding M H, Critchley C, Govindjee, et al. Influence of carbon dioxide concentration during growth on fluorescence induction characteristics of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiol.* 1984, **5**: 169—176
- [20] Li Q, Calvin D T. Energy sources for HCO₃⁻ and CO₂ transport in air-grown cells of *Synechococcus* UTEX 625[J]. *Plant Physiol.* 1998, **116**: 1125—1132
- [21] Raven J A, Lucas W J. The energetic of carbon acquisition. Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms[M]. The American Society of Plant Physiologists, Maryland: Rockville, 1985

INFLUENCES OF EXTERNAL HIGH CO₂ CONCENTRATION ON THE ENERGY FLUXES AND YIELD OF PSII IN THE GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

XIA Jian-Rong

(Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou, Guangdong 515063)

Abstract: Eukaryotic algae exhibit marked differences in photosynthetic carbon metabolism dependent on the CO₂ concentration during growth. The lower affinity for inorganic carbon, high CO₂ compensation and decreased carbonic anhydrase in high CO₂ concentration have been reported. However, little attention has been paid to the response of PSII to elevated CO₂ concentration in algae. Chlorophyll *a* fluorescence has been widely used to study the PSII behavior under different stress conditions which results in the establishment of different physiological states. A suitable cell model to study the CO₂ effects in algae is the protist *Chlamydomonas reinhardtii*. To investigate the influences of external high CO₂ concentration on the energy fluxes and yield of PSII, the changes of PSII behavior in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to high CO₂ concentration for 12h were studied by analyzing the chlorophyll *a* fluorescence transients. High CO₂ concentration resulted in significant increase by 16.1%, 13.7% and 13.9% in the content of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids, respectively. The polyphasic fluorescence transients(O-J-I-P) was measured by using Plant Efficiency Analyser(PEA) after the cells were dark-adapted, and showed that the level at O, J, I and P in high-CO₂-grown cells significantly raised with the increasing exposure time compared with air-grown ones. The relative variable fluorescence at the phase J (V_J) maintained a higher value in high-CO₂-grown cells in contrast to air-grown ones. The specific energy flux for absorption(ABS/RC) after cells were cultured in high CO₂ concentration(4% CO₂) for 6 h had a marked increase, whereas the specific energy fluxes for electron transport(ET₀/RC) and trapping (TR₀/RC) were not affected by high CO₂ concentration. The maximal quantum yield of primary photochemistry(Φ_{P₀}), the efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain further than Q_A⁻ (Φ₀), and the quantum yield of electron transport(Φ_{E₀}) were lower in high-CO₂-grown cells than in air-grown ones. These results in this study suggested that the difference of chlorophyll *a* fluorescence reported here reflected the changes of PSII function which may be associated with active transport of HCO₃⁻. The analysis of polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transients was a powerful tool to study the changes of the energy fluxes and yield of PSII in high CO₂ concentration.

Key words: Photosystem Ⅱ; JIP-test; Energy fluxes; *Chlamydomonas reinhardtii*