

马茜, 王玉珏, 孙西艳, 等. 光和温度对两种绿潮藻光合途径及抗氧化功能的影响[J]. 海洋学报, 2020, 42(8): 21–29, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2020.08.003

Ma Qian, Wang Yujue, Sun Xiyan, et al. Effects of light and temperature on the photosynthetic pathway and antioxidant function of two green tide species[J]. Haiyang Xuebao, 2020, 42(8): 21–29, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2020.08.003

光和温度对两种绿潮藻光合途径及抗氧化功能的影响

马茜¹, 王玉珏¹, 孙西艳², 刘东艳^{1*}

(1. 华东师范大学 河口海岸学国家重点实验室, 上海 200241; 2. 中国科学院牟平海岸带环境综合试验站, 山东 烟台 264003)

摘要: 绿潮是潮间带绿藻大量增殖形成的高生物量生态灾害, 其暴发不仅受到温度、营养盐等环境因素的驱动, 而且与自身光合能力的强弱密切相关。本研究以绿潮物种——肠浒苔 (*Ulva intestinalis*) 和 *Ulva expansa* 为研究对象, 通过室外培养实验, 检测了它们在夏季高温、高光强条件下的光合途径与抗氧化生理特征, 并分析了与光合产物的对应关系。研究表明, 肠浒苔与 *U. expansa* 的光合途径与抗氧化能力存在显著差异。前者的 C₄ 光合途径关键酶活性在光合作用过程中出现高表达特征, 与光、温度存在显著相关性, C₃ 光合途径关键酶活性在中午受到强光抑制; 组织 δ¹³C 的变化范围为 -17.1‰ ~ -15.7‰, 表明其光合作用可能由 C₃ 和 C₄ 途径共同参与。后者的 C₄ 光合途径关键酶活性表达较弱, 且与光、温度不存在显著相关性, C₃ 光合途径关键酶活性没有出现明显的光抑制现象; 组织 δ¹³C 的范围为 -23.5‰ ~ -21.9‰, 表明其光合作用主要依靠 C₃ 途径进行。此外, 肠浒苔在培养过程中表现出了较强的抗氧化能力, 可能与其在高温、高光强条件下启动 C₄ 光合途径密切相关。肠浒苔与 *U. expansa* 的比较研究说明, 藻类 C₄ 光合途径存在显著种间差异性。

关键词: 肠浒苔; *Ulva expansa*; 卡尔文循环; Hatch-Slack 光合途径; 光合固碳

中图分类号: P714⁺.5; Q949.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2020)08-0021-09

1 引言

绿潮是指潮间带大型绿藻在特定环境条件下大量增殖, 形成的高生物量生态灾害^[1-2]。该现象多发生在富营养化的潮间带区域, 以石莼属 (*Ulva*) 物种为主, 如: 以肠浒苔 (*Ulva intestinalis*) 为原因种的绿潮在世界多个海域的潮间带都有过报道^[3-5]。个别绿潮物种能够脱离固着基, 进入海域漂浮生长, 并形成大规模高生物量灾害, 给社会经济造成巨大损失, 如: 我国黄海浒苔 (*Ulva prolifera*) 绿潮的暴发^[6-7]。绿潮的暴发不仅受到温度、营养盐等多个环境因素的诱导, 而且与自身的繁殖能力、生理生化功能密切相关, 其中,

高效的光合速率与营养盐吸收能力往往是物种在短时间内大量增殖的重要生物学基础^[8-9]。

多数藻类植物的光合作用以卡尔文循环 (C₃) 为主^[10-11], 利用 CO₂ 合成有机碳。然而, Hatch-Slack 光合途径 (C₄) 或者类似 C₄ 途径参与的藻类光合作用在 20 世纪 70 年代已有报道, 例如, 硅藻门中的三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricoratum*) 和威氏海链藻 (*Thalassiosira weissflogii*), 以及褐藻门中的四叠团扇藻 (*Padina tetrastratica*), 均可以利用 HCO₃⁻ 将其固定在 C₄ 双羧酸中, 经过一系列反应转化成 CO₂ 进入 C₃ 途径, 形成固碳效应^[12-14]。近年来的研究发现, 在有些绿潮物种的光合固碳中, 可能也存在 C₄ 或者类似

收稿日期: 2020-02-01; 修订日期: 2020-05-02。

基金项目: 科技部国家重点研发计划 (2016YFC1402106)。

作者简介: 马茜 (1992—), 女, 四川省广元市人, 主要从事海洋藻类生物学研究。E-mail: 635714594@qq.com

* 通信作者: 刘东艳, 女, 研究员, 主要从事海洋生态学研究。E-mail: dyliu@sklec.ecnu.edu.cn

C₄途径的参与过程,并成为提高其光合效率、快速增殖的重要生理生化机制^[15],如:黄海浒苔中就存在与C₄途径相关的基因以及光合产物^[15-16]。一般来说,C₄植物的光合效率能高于C₃植物的50%^[17],其最大的日生长率是C₃植物的2~8倍^[18-20]。因此,有必要对绿潮物种是否存在C₄途径以及在固碳中的重要性做进一步探讨,这对于理解其生态灾害暴发的生物学机制具有重要意义。

C₃和C₄植物对环境的适应能力不同,C₃植物最适生长温度一般为20~25℃,其饱和光强为全日照的一半,而C₄植物最适生长温度为30~35℃,其净光合作用随着光强的增加而增加,没有饱和光强^[21-22]。因此,高光强与温度通常是诱导植物启动C₄循环机制的关键环境因子。藻类光合作用过程中产生大量的氧气,在强光下发生光抑制时,碳同化能力的下降会改变细胞内的氧化还原环境,产生对细胞有害的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)^[23]。若此反应过程与清除ROS的酶系相偶联,如:超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和抗坏血酸(Ascorbic Acid)等,则能清除细胞内多余的ROS^[23]。这些酶相互之间起到协同作用,其中SOD是抗氧化系统中最重要酶类,因其催化超氧自由基形成过氧化氢(H₂O₂),由此启动下游反应,H₂O₂又继续被POD和CAT清除。因此,C₄植物相对于C₃植物能更好地应对氧化胁迫,具体表现在抗氧化酶(SOD、CAT等)活性增加以及非酶抗氧化剂(抗坏血酸)的增加^[24]。

基于上述研究基础,本研究选取烟台潮间带的两个绿潮原因物种肠浒苔和 *Ulva expansa* 作为研究对象。其中, *U. expansa* 的夏季绿潮在美国加利福尼亚州的蒙特利(Monterey)海湾多次被报道^[5, 25],在我国烟台牟平海域连续5年暴发小规模绿潮,对当地海域环境造成一定的影响,具有研究的必要性。本研究利用夏季高温、高光强条件,通过室外培养实验比较了肠浒苔和 *U. expansa* 的C₃关键酶(二磷酸核酮糖羧化酶, Ribulose Bisphosphate Carboxylase Oxygenase, Rubisco)和C₄关键酶(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, Phosphoenolpyruvate Carboxylase, PEPCase; 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, PEPCKase)的活性变化特征,分析了它们与光强、温度的响应关系,同时测定了主要的抗氧化酶(SOD、POD)及其产物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的变化,MDA是生物体自由基发生过氧化反应的终产物,可以作为脂膜过氧化程度以及植物的抗逆性的指标,进

一步解答两种绿藻的抗氧化能力。实验还分析了藻体对应光合产物 $\delta^{13}\text{C}$ 的变化,探讨了C₄途径在两个物种光合固碳中发生作用的可能性。

2 材料与方法

2.1 样品采集与预处理

于2018年7月在山东省烟台市牟平区潮间带(37.46°N, 121.71°E)采集肠浒苔和 *U. expansa* 样品,装于冰盒带回实验室。挑选出健康藻体,用消毒海水清洗,除去泥沙和其他杂物后,将样品置于40 L透明塑料箱内,加入经GF/F膜过滤的自然海水。将培养箱置于室外通风处,每隔1天换1次过滤海水,预培养1周。

2.2 室外培养实验

室外培养实验于2018年7月26-29日期间,在中国科学院烟台海岸带研究所牟平野外台站开展。两种绿藻分别培养,各用3个培养箱作为平行样,每个培养箱放入40 g(湿重)绿藻样品,加入40 L过滤海水,再将培养箱放置于室外海水池(60 m×100 m)中(图1)。培养海水的初始溶解无机氮和磷酸盐浓度分别为34.6 $\mu\text{mol/L}$ 和0.67 $\mu\text{mol/L}$ 。培养时间从8时开始到18时结束,每隔2 h进行一次取样,每个培养箱每次取样1.2 g(湿重)。样品保存到-80℃超低温冰箱,用于测定酶活和组织 $\delta^{13}\text{C}$ 。现场测定日光照强度(TE-1339R, TES)、培养海水温度(PT3003, Anymeter)以及培养海水盐度(S3-Standard kit, Mettler-Toledo)的变化情况。

2.3 酶活的测定

每种酶活测定需0.1 g(湿重)冷冻藻体,称取好的样品在液氮中研磨后进行测定。其中, Rubisco、PEPCase活性测定分别采用Solarbio公司的二磷酸核酮

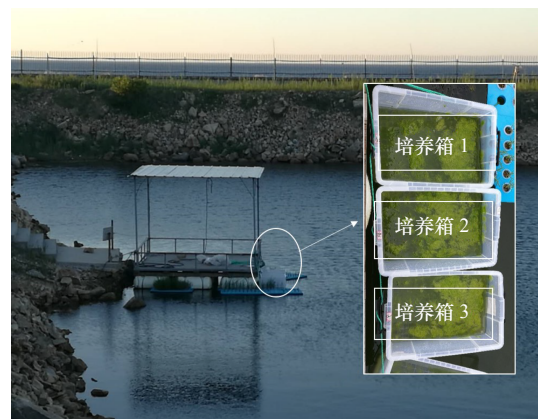


图1 室外培养实验场景

Fig. 1 The outdoor culture experiment

糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)试剂盒、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)试剂盒; PEPCase的活性测定采用南京建成生物工程研究所的磷酸烯醇丙酮酸羧激酶试剂盒。3种酶的活力单位均定义为在25℃条件下,每克新鲜组织每分钟消耗1 nmol还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH)所需的酶量(单位: nmol/(min·g))。

SOD、POD活性和MDA含量的测定分别采用南京建成超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化物酶(POD)测试盒以及植物丙二醛(MDA)测试盒。SOD的活力单位定义为37℃条件下,在本反应体系中SOD抑制率达50%时所对应的酶量(单位: U/g); POD的活力单位定义为37℃条件下,每毫克组织蛋白每分钟转化1 μg底物所需的酶量(单位: U/mg(Protein))。

2.4 藻体组织 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定

用0.1 mol/L盐酸冲洗藻体后,再用Milli-Q水将酸清洗干净。清洗后的样品冷冻干燥48 h,进行研磨。取0.5~1 mg研磨样品用4 mm×6 mm锡箔包样后,以美国南卡罗来纳的石灰岩制品(PDB)的同位素比值为标准,在中国科学院烟台海岸带研究所的稳定同位素质谱仪(MAT 253, Thermo Scientific)上测定藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 值。实验室重复测定的分析误差小于0.2‰。

利用端元模型计算了藻体对 CO_2 和 HCO_3^- 的相对利用率^[26]。若藻类单独利用 CO_2 ,所得的藻体组织 $\delta^{13}\text{C}$ 最大值为-30‰,若藻类单独利用 HCO_3^- ,所得的藻体组织 $\delta^{13}\text{C}$ 最小值为-10‰^[27];因此,在公式中纯利用 CO_2 的端元值设定为-30‰,纯利用 HCO_3^- 的端元值设定为-10‰,藻类利用 HCO_3^- 合成光合产物的贡献率($f_{\text{HCO}_3^-}$)表达式为

$$f_{\text{HCO}_3^-} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{sample}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{HCO}_3^-} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}} \times 100\% \quad (1)$$

2.5 数据处理与分析

运用SPSS 22对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、 t 检验(t -test)以及Pearson相关性分析,显著性水平设为 $p < 0.05$ 。数据先采用Shapiro-Wilkstest进行正态性检验,再用Levene检验进行方差齐性检验;若存在方差不齐的情况,采用Welch检验。所得数据以平均值±标准偏差表示。

3 结果

3.1 C_3 与 C_4 关键酶的日变化特征

实验过程中,海水温度变化范围为27.4~32.6℃,光照强度的变化范围为57.5~1857.6 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,最

高值均出现在12:00(图2)。海水盐度的变化范围较小(31.2~32.1),受水分蒸发的影响,最高值出现在实验结束时。

C_3 关键酶Rubisco活性的日变化在肠浒苔与*U. expansa*中存在显著差异(图2A);肠浒苔的Rubisco活性在10:00和16:00分别出现了高峰值(27.7 nmol/(min·g))

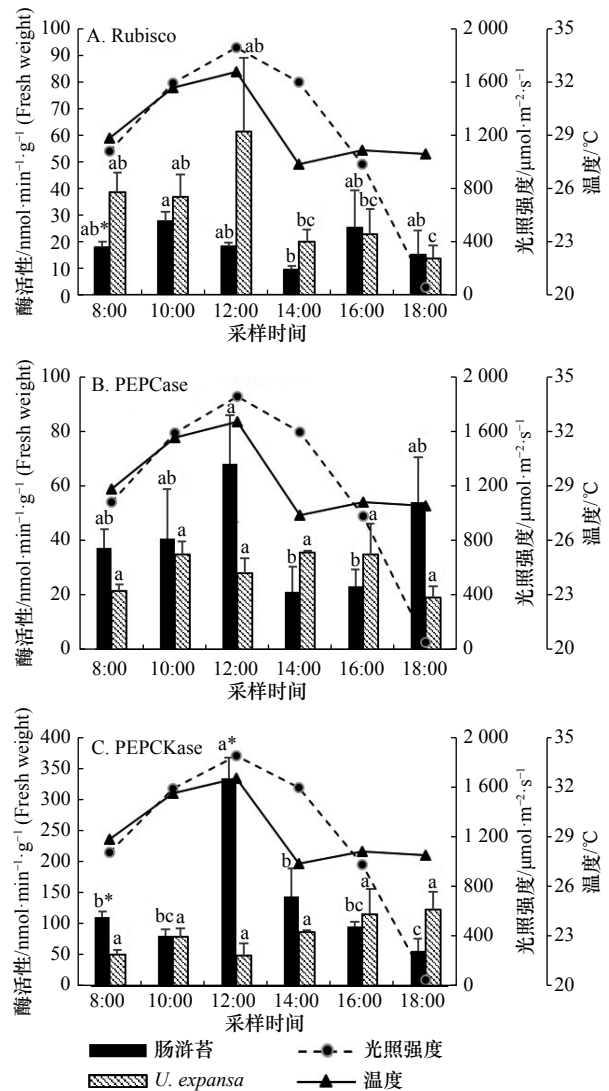


图2 两种绿藻 C_3 关键酶(Rubisco)与 C_4 关键酶(PEPCase、PEPCase)活性的日变化特征比较

Fig. 2 The comparison of diurnal variations of C_3 key enzyme (Rubisco) and C_4 key enzyme (PEPCase and PEPCase) activities between *U. intestinalis* and *U. expansa*

*表示两个物种之间酶活性具有显著性差异,误差棒上的不同小写字母(a, b, c)表示同一物种在不同时间下酶活性有显著性差异($p < 0.05$)

*represents there is a significant difference in enzyme activity between the two species. Different lowercase letters (a, b, c) on the error bars indicate that the same species has a significant difference ($p < 0.05$) in enzyme activity at different times

和 25.4 nmol/(min·g)), 活性峰值 (10:00) 相比初始时间 (8:00) 增加 53.0%, 但在中午 (12:00–14:00) 显著下降 (图 2A)。 *U. expansa* 的 Rubisco 活性峰值出在 12:00 (61.5 nmol/(min·g)), 高光、高温条件 (12:00) 并没有抑制 *U. expansa* 的 Rubisco 活性 (图 2A); 根据相关性分析, *U. expansa* 的 Rubisco 活性与环境因素 (温度、光强) 呈正相关关系, 与温度的相关性极显著 ($p < 0.01$), 而肠浒苔没有表现出显著相关 (表 1)。

表 1 两种绿藻光合作用酶活性与温度、光强的相关性

Table 1 Correlations between photosynthetic enzyme activities of *U. intestinalis* and *U. expansa* vs. temperature and light intensity

参数	肠浒苔		<i>U. expansa</i>	
	温度	光强	温度	光强
Rubisco	0.080	0.118	0.700**	0.396
PEPCase	0.429	-0.048	0.068	0.458
PEPCKase	0.688**	0.590*	-0.648**	-0.515*

注: **表示在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关; *表示在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关。

C_4 关键酶 PEPCase 和 PEPCKase 活性在肠浒苔中的显著峰值出现在 12:00, 分别为 68.4 nmol/(min·g) 和 334.9 nmol/(min·g), 比初始时间 (8:00) 分别增加了 82.8% 和 199.9%, 与光强变化一致 (图 2B, 图 2C); 根据相关性分析, PEPCKase 活性与温度、光强呈显著正相关关系 ($p < 0.05$) (表 1)。比较而言, C_4 关键酶 PEPCase 和 PEPCKase 活性在 *U. expansa* 中的变化不显著 (图 2B, 图 2C), 而且 PEPCKase 活性与温度、光强呈显著负相关关系 ($p < 0.05$) (表 1), 说明高光、高温 (12:00) 没有能够诱导 *U. expansa* C_4 光合作用途径的高表达。

3.2 两种绿藻光合产物的 $\delta^{13}C$ 变化特征

已有文献资料表明, C_3 和 C_4 植物的 $\delta^{13}C$ 数值范围分别为 $-35\text{‰} \sim -22\text{‰}$ 与 $-17\text{‰} \sim -11\text{‰}$ 之间^[28], 这是因为 Rubisco 同化 CO_2 , 而 PEPCase 同化 HCO_3^- , 即两种途径优先利用的碳源不同, 故导致光合产物 $\delta^{13}C$ 值存在差异^[29-30]。培养期间, 肠浒苔的组织 $\delta^{13}C$ 变化范围为 $-17.1\text{‰} \sim -15.7\text{‰}$, $f_{HCO_3^-}$ 的变化范围为 64.5%~71.3% (图 3), 这表明其同化 HCO_3^- 的比例较高。此外, 肠浒苔组织 $\delta^{13}C$ 在 14:00 出现明显偏正的现象, 尽管略滞后于 C_4 关键酶 PEPCase 和 PEPCKase 活性的最高值 (图 2B, 图 2C), 但基本能够指示酶活与产物的对应关系, 说明存在 C_3 与 C_4 途径混合的特征。比较

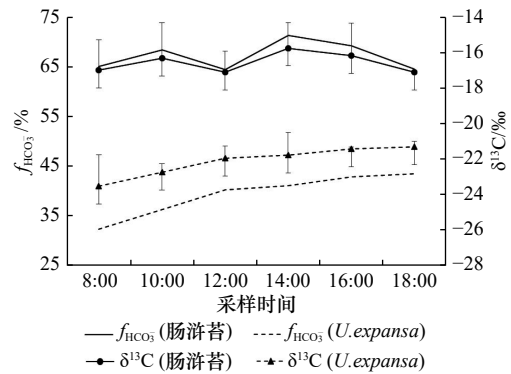


图 3 两种绿藻组织 $\delta^{13}C$ 和 $f_{HCO_3^-}$ 的日变化特征

Fig. 3 The diurnal variations of $\delta^{13}C$ and $f_{HCO_3^-}$ in the tissue of *U. intestinalis* and *U. expansa*

而言, *U. expansa* 的 $\delta^{13}C$ 范围为 $-23.5\text{‰} \sim -21.9\text{‰}$, $f_{HCO_3^-}$ 的变化范围为 32.4%~40.3% (图 3), 表明该物种以 C_3 途径为主, 这与酶活测定的结果相对应 (图 2B, 图 2C)。

3.3 两种绿藻抗氧化能力的比较

实验过程中, 肠浒苔表现出了较强的抗氧化能力, SOD 活性一直保持一个较高的水平, 18:00 活性下降 (图 4A); POD 活性的峰值出现在早上 8:00–10:00 (图 4B); MDA 含量的峰值出现在 12:00 (图 4C)。相关性分析表明, 肠浒苔的 SOD 活性和 MDA 含量与温度、光强呈显著正相关 ($p < 0.05$), POD 活性与温度、光强的相关性则不显著 ($p > 0.05$) (表 2)。 *U. expansa* 的 SOD 与 POD 活性峰值出现在 12:00–14:00; MDA 含量的峰值出现在 12:00 (图 4); 相关性分析表明, *U. expansa* 的 SOD、POD 活性以及 MDA 含量与温度、光强的相关性不显著 ($p > 0.05$) (表 2)。

比较而言, 肠浒苔 SOD 的活性在低光、低温 (18:00) 条件下比高光、高温 (12:00) 条件下降了 33.3%; 而 *U. expansa* 的 SOD 的活性在低光、低温 (18:00) 条件下比高光、高温 (12:00) 条件下降了 27.6%。肠浒苔 MDA 的含量在低光、低温 (18:00) 条件下比高光、高温 (12:00) 条件下降了 36.9%; 而 *U. expansa* 的 MDA 的含量在低光、低温 (18:00) 条件下比高光、高温 (12:00) 条件下降了 10.6%。

4 讨论

大多数海洋藻类植物的光合作用途径以 C_3 循环为主, Rubisco 是 C_3 途径中的重要羧化酶, 固定 CO_2 并形成碳水化合物^[21]。然而, Rubisco 只能利用 CO_2 形式的无机碳, 但海水中溶解态 CO_2 浓度较低, 不能完全满足其合成需求, 因此, 藻类植物在进化中形成

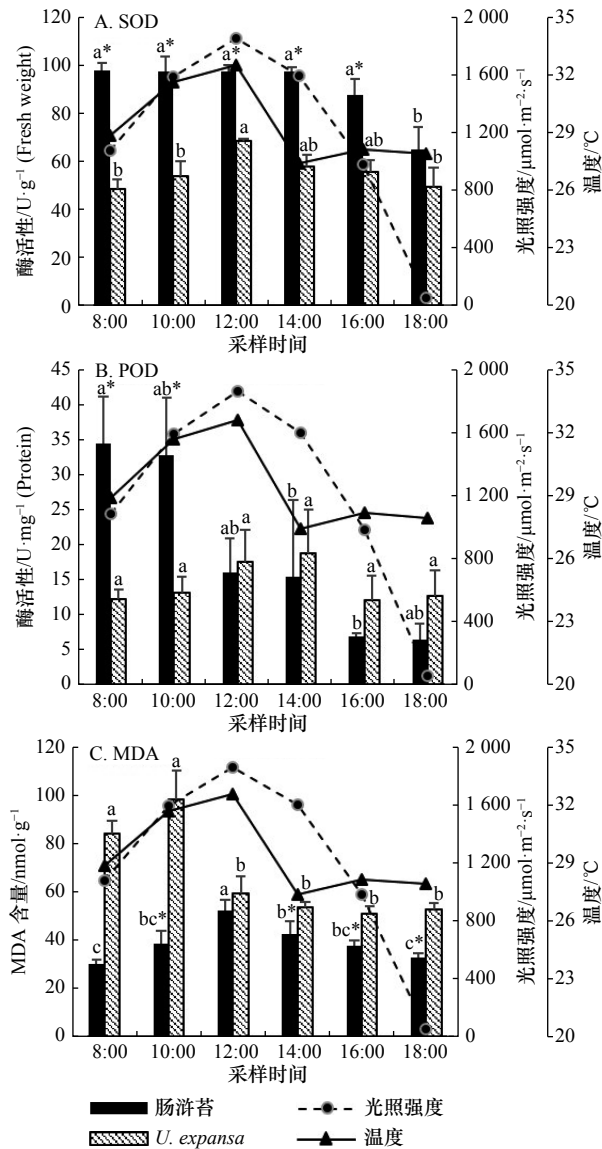


图4 两种绿藻抗氧化酶(SOD、POD)活性和MDA含量的日变化特征比较

Fig. 4 The comparison of antioxidant enzymes (SOD, POD) activities and MDA content between *U. intestinalis* and *U. expansa*, corresponding to diurnal variations

*表示两个物种之间酶活性具有显著性差异, 误差棒上的不同小写字母(a, b, c)表示同一物种在不同时间下酶活性有显著性差异 ($p < 0.05$)

*represents there is a significant difference in enzyme activity between the two species. Different lowercase letters (a, b, c) on the error bars indicate that the same species has a significant difference ($p < 0.05$) in enzyme activity at different times

了二氧化碳浓缩机制(CO₂ Concentrating Mechanisms, CCMs), 促进细胞内CO₂浓度的积累。CCMs能够在Rubisco周围催化HCO₃⁻脱羟基释放CO₂, 完成相应的浓缩反应^[31-32]。C₄循环则可以直接利用HCO₃⁻, 通过PEPCase、PEPCKase等酶的催化作用, 在细胞内完成

表2 两种绿藻的抗氧化酶(SOD, POD)活性以及MDA含量与温度、光强的相关性

Table 2 Correlation between antioxidant activities, MDA content of *U. intestinalis* and *U. expansa* vs. temperature and light intensity

参数	肠浒苔		<i>U. expansa</i>	
	温度	光强	温度	光强
SOD	0.578*	0.825**	0.277	0.432
POD	0.171	-0.210	0.296	0.368
MDA	0.561*	0.627**	0.390	0.145

注: **表示在0.01水平(双侧)上显著相关; *表示在0.05水平(双侧)上显著相关。

对CO₂的收集、浓缩和转运等系列过程^[14, 33-35]。海洋藻类C₄循环功能的机制与重要性目前仍存在科学争议, 例如, 有研究认为C₄循环途径在藻类植物的固碳中扮演重要角色^[35], 但也有研究表明C₄循环的主要功能是参与能量代谢, 驱散细胞内多余的光能, 对固碳作用的贡献不大^[36]。本研究中发现肠浒苔与*U. expansa*的光合途径存在显著差异, 前者的光合固碳可能由C₃和C₄途径共同参与, 而后者则主要通过C₃途径进行。

藻类植物的光合途径变化受到多种环境因子的诱导, 如温度、光强、CO₂浓度、营养盐、盐度等^[12, 15, 37-38]。多数研究表明, C₄循环过程中需要合成相应的酶蛋白, 是一个高耗能过程, 因此, 充足的营养盐浓度、温度与光强是诱发C₄途径活跃的重要环境条件^[12, 39], 本研究的藻类培养液中设置了较高的营养盐浓度, 充分保证了C₄途径的物质合成需求。由于C₄途径没有饱和和光强限制, 故其净光合作用随着光强的增加而增加, 在白天最高光强时的光合潜力最大。研究表明, 90%的碳同化率的变动是由光强变化导致的^[40-42], 晴天中午的高光条件往往是激发酶活力变化的主导因素。在本研究中, C₄关键酶PEPCase和PEPCKase活性在肠浒苔中的峰值出现在中午(图2B, 图2C), 对应了最高光强, 且同时形成了偏正的δ¹³C值(-17.1‰~-15.7‰)与高的f_{HCO₃⁻}值(64.5%~71.3%), 指示了C₄循环极可能参与了该物种的光合固碳。相比之下, C₃光合作用途径的重要羧化酶Rubisco的活性容易受到强光照(1200~1500 μmol/(m²·s))的抑制作用^[43-44], 在培养过程中, 肠浒苔的Rubisco活性在中午(12:00-14:00)强光照条件下(大于1600 μmol/(m²·s))明显受到抑制。因此, 推测C₄循环参与补充了该物种的光合固碳能力。

比较而言, *U. expansa* 在培养过程中表现出的光合作用特征与肠浒苔存在显著差异。该物种遵循了大多数海洋藻类的光合特征, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 范围(-23.5% ~ -20.9%)与 $f_{\text{HCO}_3^-}$ 的比例(32.4% ~ 40.3%)均表明该物种是以 C_3 途径为主要固碳方式(图 3)。 C_4 关键酶 PEPCase 和 PEPCkase 活性的变化在培养过程中不显著, 且 Rubisco 活性峰值出现在中午最高光强, 没有出现光抑制现象, 可能由于上午 *U. expansa* 的 Rubisco 活性较高, 光合能力较强, 释放出大量的 O_2 , 使得中午的藻体处于高 O_2 分压低 CO_2 的状态, 则促进 Rubisco 的加氧反应, 即光呼吸过程^[45]。这些特征也表现在两个物种的抗氧化能力上。光合作用的不同导致放氧量不同, 细胞内部积累大量的 ROS, 使得抗氧化和氧化的平衡状态被破坏, 而 SOD、POD 等多种抗氧化酶不仅能清除多余的 ROS 来维持胞内的代谢平衡, 还能维持一定的光合电子流, 来减缓多余光能对光合系统造成的损害^[23, 46]。本研究的结果表明, 在相同条件下, 肠浒苔 SOD 的活性明显高于 *U. expansa*, 活性变化没有 *U. expansa* 剧烈, 所以受到的胁迫损伤也相应较小; 作为脂膜过氧化程度的指示物, *U. expansa* 的 MDA 含量均高于肠浒苔。由此推测, 高温、高光强对 *U. expansa* 的影响高于肠浒苔, 部分原因是抗氧化能力不如肠浒苔。实验后期 *U. expansa* 的 POD 活性略高于肠浒苔, 可能是其本身反应相对滞后或者与其他抗氧化酶起协同作用。有研究表明, C_4 光合作用酶(特别是 PEPCase)的基因高表达能诱导 SOD 和 POD 的活性增强, 并且随着光抑制(强光)的加剧, SOD 和 POD 的活性也逐步增强, ROS 产生速率较低, MDA 积累较少, 维持较稳定的光合能力, 从而表现出较强的耐光抑制能力^[47-49]。由此推测, 肠浒苔较强的

抗氧化能力可能与 PEPCase 的高表达有关。

此外, 有研究发现较高的温度有助于诱导植物形成类似 C_4 循环的光合途径, 处于高温环境下的时间越长, C_4 途径的 PEPCase 的活性越大^[50-51]。例如, C_3 途径在 $15\sim 30^\circ\text{C}$ 范围内, 净光合速率与温度正相关; 而 C_4 途径在 $30\sim 40^\circ\text{C}$ 范围内的净光合速率与温度正相关, 且大于 C_3 途径的净光合速率^[52-53]。这些研究结果有助于解释绿潮物种的季节演替现象, 例如, 1997 年夏季美国加利福尼亚州的纽波特河口暴发的绿潮主要组成物种是肠浒苔和 *U. expansa*, 到了秋季, 随着温度降低, 逐渐演变成 *U. expansa* 和 *Ceramium* sp.^[9]; 烟台牟平海域 *U. expansa* 通常是在 7 月暴发, 7 月底至 8 月初, 随着海水温度升高而迅速消亡。*U. expansa* 的演替与消亡现象, 表明该物种暴发的温度上限低于肠浒苔, 与本研究的实验结果相吻合。

5 结论

通过对肠浒苔和 *U. expansa* 的光合作用酶及其藻体光合产物的关联性分析, 发现肠浒苔与 *U. expansa* 的光合途径存在显著种间差异性。在高温、高光条件下, C_4 关键酶活性在肠浒苔中表达活跃, 与光合产物形成对应关系指示了其光合作用可能由 C_3 与 C_4 途径共同参与; 而 *U. expansa* 的 C_4 关键酶活性表达不活跃, 与光合产物形成对应关系指示了其光合作用主要依靠 C_3 途径进行。然而, C_4 循环在藻类植物中的功能表达存在不确定性, 未来还需要探索进一步其他环境因素的诱导作用以及藻类的基因表达特征。

致谢: 感谢华东师范大学孙赛赛、周鹏、周豪对样品采集和培养实验的帮助, 以及烟台海岸带研究所谭扬对碳同位素测定的帮助。

参考文献:

- [1] Fletcher R L. The occurrence of "green tides" — a review[M]//Schramm W, Nienhuis P H. Marine Benthic Vegetation. Berlin: Springer, 1996: 7-43.
- [2] Blomster J, Bäck S, Fewer D P, et al. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides[J]. *American Journal of Botany*, 2002, 89(11): 1756-1763.
- [3] Bäck S, Lehvo A, Blomster J. Mass occurrence of unattached *Enteromorpha intestinalis* on the Finnish Baltic Sea coast[J]. *Annales Botanici Fennici*, 2000, 37: 155-161.
- [4] Cohen R A, Fong P. Physiological responses of a bloom-forming green macroalga to short-term change in salinity, nutrients, and light help explain its ecological success[J]. *Estuaries*, 2004, 27(2): 209-216.
- [5] Kamer K, Boyle K A, Fong P. Macroalgal bloom dynamics in a highly eutrophic southern California estuary[J]. *Estuaries*, 2001, 24(4): 623-635.
- [6] Liu Dongyan, Keesing J K, Xing Qianguo, et al. World's largest macroalgal bloom caused by expansion of seaweed aquaculture in China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, 58(6): 888-895.
- [7] Wang Chao, Yu Rencheng, Zhou Mingjiang. Effects of the decomposing green macroalga *Ulva* (*Enteromorpha*) *prolifera* on the growth

- of four red-tide species[J]. *Harmful Algae*, 2012, 16: 12–19.
- [8] Rosenberg C, Ramus J. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates[J]. *Marine Biology*, 1982, 66(3): 251–259.
- [9] Kim J H, Kang E J, Park M G, et al. Effects of temperature and irradiance on photosynthesis and growth of a green-tide-forming species (*Ulva linza*) in the Yellow Sea[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(3): 421–432.
- [10] Bassham J A. Kinetic studies of the photosynthetic carbon reduction cycle[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1964, 15(1): 101–120.
- [11] Raven J A. Carbon dioxide fixation[M]//Stewart W D P. *Algal Physiology and Biochemistry*. Berkeley: University of California Press, 1974: 434–455.
- [12] Cassar N, Laws E A. Potential contribution of β -carboxylases to photosynthetic carbon isotope fractionation in a marine diatom[J]. *Phycologia*, 2007, 46(3): 307–314.
- [13] Karekar M D, Joshi G V. Photosynthetic carbon metabolism in marine algae[J]. *Botanica Marina*, 1973, 16(4): 216–220.
- [14] Reinfelder J R, Kraepiel A M L, Morel F M M. Unicellular C_4 photosynthesis in a marine diatom[J]. *Nature*, 2000, 407(6807): 996–999.
- [15] Xu Jianfang, Fan Xiao, Zhang Xiaowen, et al. Evidence of coexistence of C_3 and C_4 photosynthetic pathways in a green-tide-forming alga, *Ulva prolifera*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37438.
- [16] Valiela I, Liu Dongyan, Lloret J, et al. Stable isotopic evidence of nitrogen sources and C_4 metabolism driving the world's largest macroalgal green tides in the Yellow Sea[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 17437.
- [17] Reiskind J B, Beer S, Bowes G. Photosynthesis, photorespiration and ecophysiological interactions in marine macroalgae[J]. *Aquatic Botany*, 1989, 34(1/3): 131–152.
- [18] Cooper J P. Potential production and energy conversion in temperate and tropical grasses[J]. *Herbage Abstracts*, 1970, 40: 1–13.
- [19] Cooper J P, Tainton N M. Light and temperature requirements for the growth of tropical and temperate grasses[J]. *Herbage Abstract*, 1968, 38(3): 167–177.
- [20] Joshi M C, Boyer J S, Kramer P J. Growth, carbon dioxide exchange, transpiration, and transpiration ratio of pineapple[J]. *Botanical Gazette*, 1965, 126(3): 174–179.
- [21] Black C C Jr. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO_2 uptake[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1973, 24(1): 253–286.
- [22] Bjorkman O, Boardman N K, Anderson J M, et al. Effect of light intensity during growth of *Atriplex patula* on the capacity of photosynthetic reactions, chloroplast components and structure[J]. *Yearbook Carnegie Institution Washington*, 1972, 71: 115–135.
- [23] Scandalios J G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, 38(7): 995–1014.
- [24] Uzilday B, Turkan I, Ozgur R, et al. Strategies of ROS regulation and antioxidant defense during transition from C_3 to C_4 photosynthesis in the genus *Flaveria* under PEG-induced osmotic stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(1): 65–75.
- [25] Hughey J R, Miller K A, Gabrielson P W. Mitogenome analysis of a green tide forming *Ulva* from California, USA confirms its identity as *Ulva expansa* (Ulvaceae, Chlorophyta)[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2018, 3(2): 1302–1303.
- [26] Shultz D J, Calder J A. Organic carbon $^{13}C/^{12}C$ variations in estuarine sediments[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1976, 40(4): 381–385.
- [27] Cornwall C E, Revill A T, Hall-Spencer J M, et al. Inorganic carbon physiology underpins macroalgal responses to elevated CO_2 [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46297.
- [28] Tiunov A V. Stable isotopes of carbon and nitrogen in soil ecological studies[J]. *Biology Bulletin*, 2007, 34(4): 395–407.
- [29] Faganeli J, Vukovič A, Saleh F I, et al. C: N: P ratios and stable carbon and hydrogen isotopes in the benthic marine algae, *Ulva rigida* C. Ag. and *Fucus virsoides* J. Ag[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1986, 102(2/3): 153–166.
- [30] Guy R D, Vanlerberghe G C, Turpin D H. Significance of phosphoenolpyruvate carboxylase during ammonium assimilation: carbon isotope discrimination in photosynthesis and respiration by the N-limited green alga *Selenastrum minutum*[J]. *Plant Physiology*, 1989, 89(4): 1150–1157.
- [31] Sültemeyer D. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characterization, regulation, and possible function during photosynthesis[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76(6): 962–972.
- [32] Badger M R, Andrews T J, Whitney S M, et al. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO_2 -concentrating mechanisms in algae[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76(6): 1052–1071.
- [33] McGinn P J, Morel F M M. Expression and inhibition of the carboxylating and decarboxylating enzymes in the photosynthetic C_4 pathway of marine diatoms[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(1): 300–309.
- [34] Johnston A M, Raven J A, Beardall J, et al. Photosynthesis in a marine diatom[J]. *Nature*, 2001, 412(6842): 40–41.
- [35] Granum E, Raven J A, Leegood R C. How do marine diatoms fix 10 billion tonnes of inorganic carbon per year?[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2005, 83(7): 898–908.
- [36] Haimovich-Dayana M, Garfinkel N, Ewe D, et al. The role of C_4 metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *New Phytologist*, 2013, 197(1): 177–185.
- [37] Gowik U, Westhoff P. The path from C_3 to C_4 photosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(1): 56–63.
- [38] Roberts K, Granum E, Leegood R C, et al. C_3 and C_4 pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic,

- not environmental, control[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 230–235.
- [39] Rao S, Reiskind J, Bowes G. Light regulation of the photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in *Hydrilla verticillata*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(9): 1206–1216.
- [40] Edwards G E, Nakamoto H, Burnell J N, et al. Pyruvate, Pi Dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C₄ photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1985, 36(1): 255–286.
- [41] Moss D N, Musgrave R B, Lemon E R. Photosynthesis under field conditions. III. Some effects of light, carbon dioxide, temperature, and soil moisture on photosynthesis, respiration, and transpiration of corn[J]. *Crop Science*, 1961, 1(2): 83–87.
- [42] Kalt-Torres W, Kerr P S, Usuda H, et al. Diurnal changes in maize leaf photosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 1987, 83(2): 283–288.
- [43] 姜振升, 刘培培, 王美玲, 等. 黄瓜幼苗Rubisco与Rubisco活化酶对光强的响应[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(9): 95–99.
Jiang Zhensheng, Liu Peipei, Wang Meiling, et al. Response of Rubisco and Rubisco activase in cucumber seedlings to light intensity[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2011, 20(9): 95–99.
- [44] 翁晓燕, 陆庆, 蒋德安. 水稻Rubisco活化酶在调节Rubisco活性和光合日变化中的作用[J]. *中国水稻科学*, 2001, 15(1): 35–40.
Weng Xiaoyan, Lu Qing, Jiang Dean. Rubisco activase and its regulation on diurnal changes of photosynthetic rate and the activity of Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxyase/oxygenase (Rubisco)[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2001, 15(1): 35–40.
- [45] Muraoka H, Tang Yanhong, Terashima I, et al. Contributions of diffusional limitation, photoinhibition and photorespiration to midday depression of photosynthesis in *Arisaema heterophyllum* in natural high light[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2000, 23(3): 235–250.
- [46] Demmig-Adams B. Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39(5): 474–482.
- [47] 黄雪清, 焦德茂. 转C₄光合酶基因水稻株系的抗光氧化特性[J]. *植物生理学报*, 2001, 27(5): 393–400.
Huang Xueqing, Jiao Demao. The characteristics of resistance to photooxidation of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants with maize genes coding for C₄ photosynthesis enzyme[J]. *Acta Phytobiologica Sinica*, 2001, 27(5): 393–400.
- [48] 李霞, 焦德茂, 戴传超. 转PEPC基因水稻对光氧化逆境的响应[J]. *作物学报*, 2005, 31(4): 408–413.
Li Xia, Jiao Demao, Dai Chuanchao. The response to photooxidation in leaves of PEPC transgenic rice plant (*Oryza sativa* L.)[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(4): 408–413.
- [49] 周宝元. PEPC对水稻抗旱性的调节效果及其机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
Zhou Baoyuan. Effect of PEPC on rice drought resistance[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011.
- [50] Casati P, Lara M V, Andreo C S. Induction of a C₄-like mechanism of CO₂ fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(4): 1611–1622.
- [51] Rao S K, Magnin N C, Reiskind J B, et al. Photosynthetic and other phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in the single-cell, facultative C₄ system of *Hydrilla verticillata*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(2): 876–886.
- [52] 张忠梁. 不同作物光合特性比较及籽粒苋C₄途径关键酶基因的原核表达[D]. 太原: 山西大学, 2013.
Zhang Zhongliang. Study on photosynthetic characteristics of different plants and prokaryotic expression of C₄ key enzyme genes in *Amaranthus hypochondriacus* L.[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2013.
- [53] 王超, 李霞, 蔡庆生. 不同测定环境条件下转PEPC基因水稻及杂交后代光合特性的比较[J]. *江苏农业学报*, 2008, 24(3): 232–236.
Wang Chao, Li Xia, Cai Qingsheng. Comparison of photosynthetic characteristics of PEPC transgenic rice and its hybrid rice lines under field and lab conditions[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 24(3): 232–236.

Effects of light and temperature on the photosynthetic pathway and antioxidant function of two green tide species

Ma Qian¹, Wang Yujue¹, Sun Xiyan², Liu Dongyan¹

(1. State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2. Muping Coastal Environmental Research Station, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: Green tide is a high biomass ecological disaster caused by the proliferation of green algae in intertidal zone. Its outbreak is not only driven by environmental factors such as temperature and nutrients, but also closely related to its own photosynthetic capacity. In this study, *Ulva intestinalis* and *Ulva expansa*, the two green tide species, were selected for the outdoor culture experiment. The photosynthetic pathway, antioxidant physiological characteristics and their corresponding relationship with photosynthetic products of the two species were detected and

compared under the conditions of high temperature and high light intensity in summer. The results showed that there were significant differences in photosynthetic pathway and antioxidant capacity between *U. intestinalis* and *U. expansa*. The key enzyme activity of C₄ photosynthetic pathway was highly expressed in the process of photosynthesis of the former, which was significantly correlated with light and temperature. The key enzyme activity of C₃ photosynthetic pathway of *U. intestinalis* was inhibited by strong light at noon, and the change range of $\delta^{13}\text{C}$ in tissue ranged from -17.1‰ to -15.7‰ , which indicated that C₃ and C₄ pathway might be involved in its photosynthetic cooperation. For *U. expansa*, the expression of key enzymes in C₄ photosynthetic pathway was weak and there was no significant correlation with light and temperature. Also, there was no obvious photoinhibition in C₃ photosynthetic pathway and the range of $\delta^{13}\text{C}$ in tissue is from -23.5‰ to -21.9‰ , indicating that the photosynthesis mainly depends on C₃ pathway. In addition, *U. intestinalis* showed a strong antioxidant capacity in the process of culture, which may be closely related to its C₄ photosynthetic pathway under high temperature and high light conditions. The comparative study between *U. intestinalis* and *U. expansa* showed that there were significant differences in the initiation of C₄ photosynthetic pathway between algal species, and the comparative study on the photosynthetic mechanism of different green algal species needs further exploration.

Key words: *Ulva intestinalis*; *Ulva expansa*; C₃ photosynthetic pathway; C₄ photosynthetic pathway; carbon fixation