

用于坛紫菜光合效率的 DIVING - PAM 参数优化研究

滕 飞, 陈玉婷, 徐 燕, 陈昌生, 谢潮添

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 采用 DIVING - PAM 叶绿素荧光测定仪比较了坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 藻体在不同光合有效辐射强度 (photosynthetically active radiation, PAR)、暗处理时间和不同测量时间间隔下光合效率值的变化。结果表明, 为了在最短的测量时间内获得准确的坛紫菜藻体叶绿素荧光指标测量结果, 叶绿素荧光测定仪的最佳参数应设定为: PAR $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 最佳测量时间间隔 30 s, 最适暗处理时间 15 min。同时发现坛紫菜藻体光合效率的日变化在每天的 10:30 ~ 18:30 时间段内最为稳定, 可以作为测量叶绿素荧光指标的最适时间段。

[关键词] 坛紫菜; 叶绿素荧光; 光合效率; 光合有效辐射强度; 参数优化

[中图分类号] S 917.3

Parameter Optimization of DIVING - PAM in *Porphyra haitanensis* Photosynthesis Analysis

TENG Fei, CHEN Yu-ting, XU Yan, CHEN Chang-sheng, XIE Chao-tian

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The modulated chlorophyll fluorometer (DIVING - PAM) was used to measure the photosynthesis efficiency of *Porphyra haitanensis* thallus under different dark-adaption time, different photosynthetically active radiation (PAR) and different time interval of photosynthetic induction curve. The results showed that the measurement of photosynthetic efficiency was most accurate when the parameters were set as: 15 min of dark-adaptation time, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of PAR and 30 s of time interval. The results also showed that the photosynthesis efficiency is the most stable between 10:30 and 18:30 in daytime, thus this period is appropriate for measuring photosynthesis efficiency of *P. haitanensis* thallus.

Keywords: *Porphyra haitanensis*; chlorophyll fluorescence; photosynthetic efficiency; photosynthetically active radiation; parameter optimization

0 引言

光合作用是绿色植物和藻类最重要和最基本的生理代谢过程, 是地球上几乎所有生命活动的能量来源, 因此光合作用效率的快速、灵敏、无损和实地测量, 是植物学、农学、林学、生态学、水生生物学和环境生物学等领域的重要研究内容。自发现叶绿素荧光诱导现象并将其与光合作用联系起来以

[收稿日期] 2015-10-09

[修回日期] 2015-12-17

[基金项目] 国家“八六三”计划项目 (2012AA10A411); 国家自然科学基金项目 (41176151, 41276177); 福建省种业创新与产业化工程资助项目 (2014S1477-10)

[作者简介] 滕飞 (1988—), 男, 硕士生, 研究方向为坛紫菜遗传育种。通信作者: 谢潮添 (1977—), 教授, 研究方向为坛紫菜遗传育种。E-mail: ctxie@jmu.edu.cn。

后,人们^[1-3]对叶绿素荧光诱导现象进行了广泛研究,并逐步形成了光合作用的荧光诱导理论,即光合作用几乎所有过程的变化均可通过叶绿素荧光反映出来,通过测定光合作用过程中叶绿素荧光各参数的变化即可间接研究植物光合作用的变化。目前,叶绿素荧光动力学技术作为无损检测光合作用能量转化探测技术,已被广泛应用于绿色植物和藻类的光合作用研究中^[3]。

目前,在诸多叶绿素荧光测定仪中,德国 Walz 公司生产的脉冲振幅调制 (Pulse Amplitude Modulation, PAM) 叶绿素荧光测定仪已成为国内外光合作用研究中使用最广泛的仪器设备。如梁洲瑞等^[4]采用 DIVING - PAM 研究了各环境因子对鼠尾藻幼苗叶绿素荧光参数的影响;杨睿灵等^[5]采用 IMAGING - PAM 对条斑紫菜叶状体不同区域的光合活性进行了研究;Zhang 等^[6]采用 WATER - PAM 研究了栽培过程不同月份条斑紫菜的光合作用特征。但到目前为止,在大型海藻光合作用研究中如何正确使用此类仪器以使测定的结果更为准确和高效,国内外尚无系统的研究和报道。

应用调制叶绿素荧光测定仪研究大型海藻时,经常需要分析大型海藻的光能利用效率和光合特征,其中包括最大量子产量 (F_v/F_m)、有效量子产量 ($Y(II)$)、基于电子传递速率 (ETR) 以及光化学荧光淬灭 (Q_p) 的快速光响应曲线等。 F_v/F_m 反映 PS II 反应中心内光能的转换效率,是植物潜在最大光合能力的反映,是研究光合生理状态最为重要的参数; $Y(II)$ 表示在实际光照强度下光系统 II (PS II) 的实际光化学效率,是衡量植物光合能力的重要指标; Q_p 反映 PS II 天线色素吸收光能用于光化学反应电子传递的份额,也在一定程度上反映了 PS II 反应中心的开放程度。而基于 ETR 的快速光响应曲线则可用于分析植物最大的电子传递速率及饱和光照强度点等^[1-3]。在这些指标的实际测量过程中,其结果容易受到光合有效辐射强度 (photosynthetically active radiation, PAR)、测量时间间隔、暗处理时间长短和植物本身的日变化影响。

因此,为了正确有效地使用调制叶绿素荧光测定仪进行坛紫菜光合作用效率的研究,获得在不同实验批次中可比较的可靠的实验数据,本研究对这些参数的设定进行了优化,以期建立一套坛紫菜叶绿素荧光测量时参数设定的最优方案。

1 材料与方法

1.1 实验材料及其培养方法

坛紫菜 Z-61 品系,取自福建省坛紫菜种质资源库。将坛紫菜 Z-61 纯系丝状体进行促熟、促壳孢子放散和幼苗充气培养,培养条件为:温度 (21 ± 1) °C,光照强度 2000 ~ 3000 lx,昼夜光周期为 12 h:12 h,每 3 天更换 1 次新鲜培养液。待藻体长至 (20 ± 2) cm 时选取健康藻体并采用 DIVING - PAM 叶绿素荧光测定仪 (德国 WALZ 公司) 测量相关指标。健康藻体的标准为叶片平滑、呈披针状、颜色鲜艳且富有光泽、无扭曲、无破损、无烂点。

1.2 实验方法

1.2.1 最适 PAR 的选择

诱导曲线是通过对藻体进行 14 次测量而形成的曲线,除了第 1 次和第 2 次测量是分别用微弱的调制荧光和饱和脉冲光测量藻体的最大以及最小荧光外,其余的 12 次测量都是用稳定的 PAR 测定藻体的 $Y(II)$ 值。为获得稳定、可比较的结果,必须选择合适的 PAR。本研究分别测定 PAR 为 50, 100, 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时藻体诱导曲线的变化情况,以确定坛紫菜叶绿素荧光参数测定时的最佳 PAR。

1.2.2 最佳测量时间间隔

标准的诱导曲线变化趋势是下降—上升—平稳,叶绿素荧光测定仪通过控制每次测量的时间间隔长度来调制整条曲线的完成时间,在诱导曲线达到平稳时结束测量得到的数据是最为准确的。如果测量时间间隔太短,就会使曲线尚处于上升期,而数值尚未到达平稳状态时结束测量,从而得到不准确的数据。因此在进行诱导曲线测定时,必须选择合适的时间间隔长度。本研究分别测定时间间隔为 10, 30, 50, 70 s 时的诱导曲线变化情况,从中选择最佳的时间间隔长度。

1.2.3 暗处理时间的确定

叶绿素荧光测定仪通过暗处理可以测定植物的最小和最大荧光参数, 从而通过计算可以得到植物的 F_v/F_m 值。只有经过充分暗处理 (暗处理时间足够长), PS II 电子门的电子才能完全释放, 才能使获得的 F_v/F_m 数值最大, 从而获得某一状态下藻体最准确的 F_v/F_m 值, 但暗处理时间过长又会增加测量过程所耗费的时间。本研究分别测定暗处理时间分别为 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 时坛紫菜藻体的 F_v/F_m 值, 选择恰好可以获得最大 F_v/F_m 值时的暗处理时间作为坛紫菜叶绿素荧光指标测定时的最佳暗处理时间。

1.2.4 坛紫菜藻体光合效率的日变化

一天之中, 坛紫菜藻体的光合效率随时间段的不同也会发生显著变化, 为了去除光合效率日变化这一因素对实验本身的干扰, 应对坛紫菜藻体一天不同时段的光合作用效率进行比较, 以获得光合效率最稳定的时间段作为坛紫菜叶绿素荧光指标测定时的最佳时间段。本研究分别测定并比较坛紫菜藻体在一天中的 8:30、10:30、12:30、14:30、16:30、18:30 和 20:30 的叶绿素荧光指标 ($Y(II)$ 、ETR 和 Q_p) 的变化情况, 以确定一天中坛紫菜藻体光合效率最稳定的时间段。

1.2.5 诱导曲线的测定方法及数据分析方法

诱导曲线的测定过程为: 藻体经过暗处理后, 打开暗处理夹, 接着开启微弱检测光 ($0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 测量获得藻体的最小荧光 F_0 , 40 s 后再用饱和光照射检测获得最大荧光 F_m , 之后便由事先设定的 PAR 对藻体进行同一时间间隔重复测量 12 次, 获得光适应过程中的饱和荧光值 F'_m 和实时荧光值 F_t , 然后通过 wincontrol 软件分别计算 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、ETR 和 Q_p 值, 计算公式分别为:

$$\begin{aligned} F_v/F_m &= (F_m - F_0)/F_m, \\ Y(II) &= (F'_m - F_t)/F'_m, \\ \text{ETR} &= Y(II) \times \text{PAR} \times 0.5 \times 0.84, \\ Q_p &= (F'_m - F_t)(F'_m - F_0) \end{aligned}$$

以上实验分别进行 6 个生物学重复和 3 个技术重复, 采用 Excel 2010 和 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计分析, 并采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 实验结果

2.1 最适 PAR 的选择

坛紫菜藻体在 50, 100, 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 三种不同 PAR 条件下的 $Y(II)$ 变化曲线如图 1 所示。从图 1 可以看出, 坛紫菜藻体在 PAR 为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时 $Y(II)$ 最高, PAR 为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时 $Y(II)$ 次之, 而 PAR 为 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时 $Y(II)$ 最低。三种不同 PAR 条件下, 只有当 PAR 为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, $Y(II)$ 的变化曲线才会逐渐趋于平稳, 而另外两种 PAR 条件下, $Y(II)$ 均不稳定。因此, 坛紫菜藻体叶绿素荧光参数测定时的最适 PAR 应为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

2.2 最佳测量时间间隔

选取 10, 30, 50, 70 s 作为坛紫菜藻体诱导曲线测量时的间隔梯度, 4 种不同时间间隔下

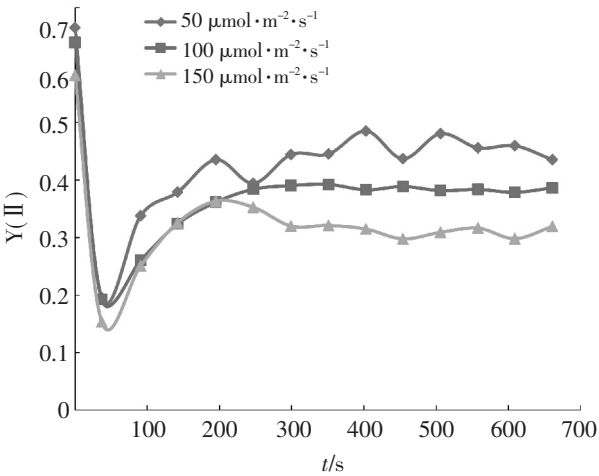


图 1 不同 PAR 条件下坛紫菜藻体的 $Y(II)$ 值变化曲线

Fig.1 The $Y(II)$ curves of *P.haitanensis* thallus under different PAR conditions

Y(Ⅱ)的诱导曲线如图2所示。从图2中可以看出：坛紫菜藻体的诱导曲线变化趋势均呈现为下降—上升—平稳的变化过程。在测量开始5 min后Y(Ⅱ)就已趋于稳定。当测量的时间间隔为10 s时，诱导曲线最后的Y(Ⅱ)数值仍处于上升变化趋势，并未到达平稳；而当时间间隔为30 s或30 s以上时，诱导曲线的Y(Ⅱ)均可逐渐趋于稳定。因此，在保证获得准确数据和节省测量时间的前提下，坛紫菜藻体诱导曲线测量时的最佳时间间隔应为30 s。

2.3 暗处理时间的确定

进行叶绿素荧光参数测定，当暗处理时间分别为5, 10, 15, 20, 25, 30 min时，坛紫菜藻体的 F_v/F_m 如图3所示。从图3中可以看出，暗处理时间为5 min或10 min时测定的 F_v/F_m 要显著小于其他暗处理时间下测定的 F_v/F_m ($P < 0.05$)。而暗处理时间分别为15, 20, 25, 30 min时，所测得的 F_v/F_m 没有显著差异($P > 0.05$)。因此，在保证获得准确数据和节省测量时间的前提下，坛紫菜藻体叶绿素荧光参数测定时的最佳暗处理时间为15 min。

2.4 坛紫菜藻体光合效率的日变化

坛紫菜藻体Y(Ⅱ)的日变化趋势如图4所示。从图4中可以看出坛紫菜藻体从8:30到20:30，Y(Ⅱ)呈现为逐渐下降的趋势，但在10:30~18:30时间内Y(Ⅱ)差异均不显著($P > 0.05$)。

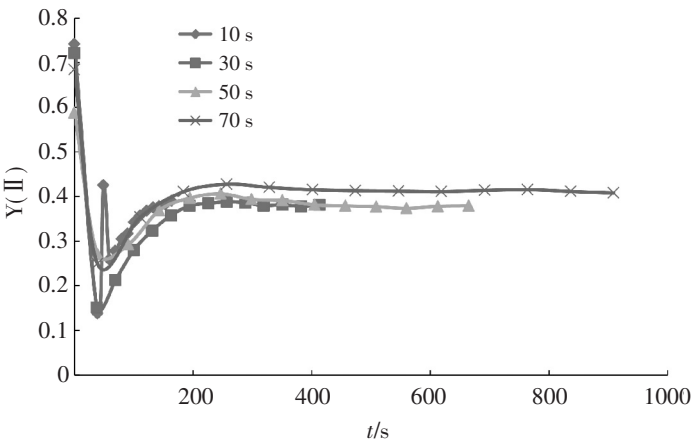
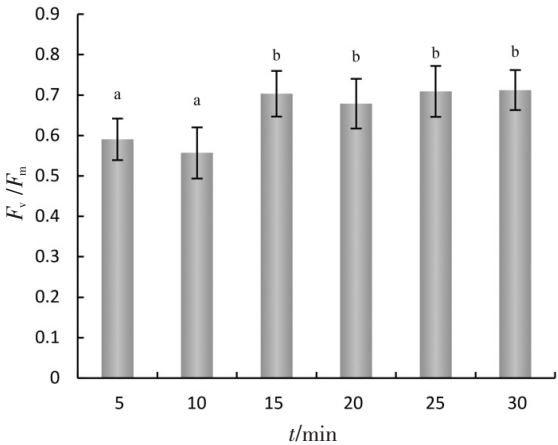


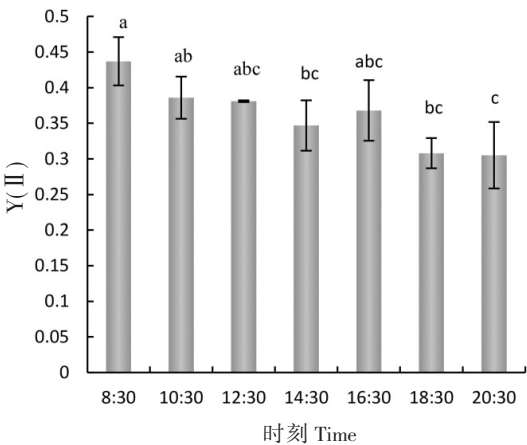
图 2 不同时间间隔下坛紫菜藻体的 Y(Ⅱ)值变化曲线

Fig.2 The Y(Ⅱ) curves of *P. haitanensis* thallus under different time intervals



说明:不具有相同字母上标的数值间差异显著($P<0.05$)。
Note: Different small letters above the bars indicate significant differences($P<0.05$).

图 3 不同暗处理时间下坛紫菜藻体的 F_v/F_m
Fig.3 The F_v/F_m values of *P. haitanensis* thallus under different dark-adaption times



说明:不具有相同字母上标的数值间差异显著($P<0.05$)。
Note: Different small letters above the bars indicate significant differences($P<0.05$).

图 4 坛紫菜藻体 Y(Ⅱ)的日变化
Fig.4 The Y(Ⅱ) of *P. haitanensis* thallus at regular time intervals in daytime

坛紫菜藻体ETR日变化趋势如图5所示。从图5中可以看出坛紫菜藻体从8:30到20:30，ETR呈现为逐渐下降的趋势，但在10:30~18:30时间内ETR差异均不显著($P > 0.05$)。

Q_p 是PSⅡ天线色素吸收的光能用于光化学电子传递的份额，反应的是植物光合活性的高低。坛紫菜藻体 Q_p 的日变化趋势如图6所示。从图6中可以看出坛紫菜藻体从8:30到20:30， Q_p 的变化趋

势与 $Y(II)$ 和 ETR 的变化趋势一致, 同样呈现为逐渐下降的趋势, 但在 10:30 ~ 18:30 时间内 Q_p 差异均不显著 ($P > 0.05$)。

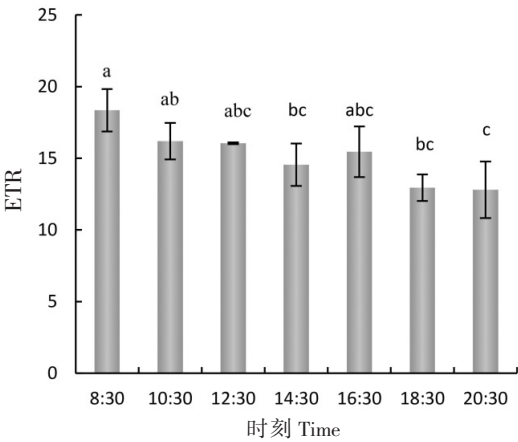


图5 坛紫菜藻体 ETR 的日变化

Fig.5 The ETR values of *P. haitanensis* thallus at regular time intervals in daytime

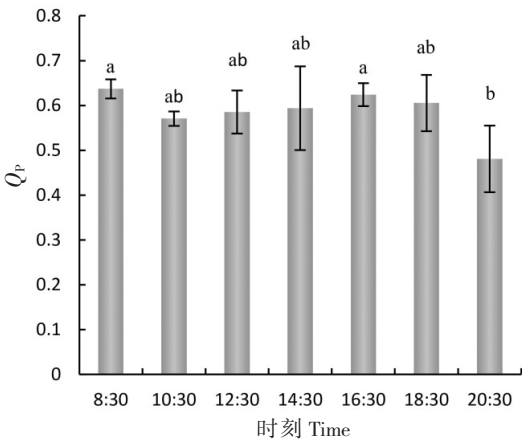


图6 坛紫菜藻体 Q_p 的日变化

Fig.6 The Q_p values of *P. haitanensis* thallus at regular time intervals in daytime

3 讨论

3.1 坛紫菜藻体叶绿素荧光指标测定时的最佳参数

叶绿素荧光测量技术作为“植物生理生态无损研究的微探针”, 使人们能够从更微观的层次了解植物光合系统的光能吸收、转换和利用效率, 在实际研究中必须对测量过程的 PAR、暗处理时间和测量间隔进行优化, 以保证测量结果的可靠性。

Osmond^[7]和 Aguirre 等^[8]的研究结果均表明 PAR 如果超过植物光合作用所需的范围, 将对植物的代谢过程造成威胁, 因此在利用诱导曲线测量植物的光合效率时, 选择最合适的 PAR 是至关重要的。从本研究的实验结果中可以看出 PAR 过低或过高, 坛紫菜藻体的 $Y(II)$ 诱导曲线都很难趋于平稳, 而只有在 PAR 设定为 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时才能获得稳定的和准确的 $Y(II)$ 值。

在光合效率 $Y(II)$ 诱导曲线的测量过程中, 每一次测量的时间间隔都是一样的。已有的研究中大多没有对多个测量点的时间间隔做严格的规定, 而从本实验的结果可以看出, 过短的时间间隔下 (10 s) 测量所形成的诱导曲线, 藻体的 $Y(II)$ 仍处于上升状态, 尚未趋于稳定; 只有在足够的时间间隔下 ($\geq 30\ \text{s}$), 才能使测量的 $Y(II)$ 趋于稳定。

对藻体进行充分暗处理的目的是要让 PS II 电子门的电子完全被释放, 从而测量到某一条件下的 F_v/F_m 。Durako 等^[10]采用调制荧光技术测量了 *Thalassia testudium* 的光合效率水平, 为了得到最准确可靠的 F_v/F_m , 对正常组以及变异组 *T. testudium* 分别设置了 5 min 和 10 min 的暗处理时间, 结果发现在两种暗处理时间下正常组以及变异组 *T. testudium* 的 F_v/F_m 数值并无显著差异 ($P > 0.05$)。但 Papageorgiou 等^[9]的研究结果却认为暗处理时间长短对测量结果有显著影响, 在进行某种植物的叶绿素荧光参数测定时, 最好先在不同的暗处理时间下测定 F_v/F_m , 然后确定最佳的暗处理时间。本研究中发现, 暗处理时间为 5 min 或 10 min 时测量获得的 F_v/F_m 要显著低于暗处理时间 $\geq 15\ \text{min}$ 时测量获得的 F_v/F_m ($P < 0.05$), 这说明暗处理时间过短, PS II 电子门的电子尚未被完全释放, 测量获得的 F_v/F_m 偏小, 只有在足够的暗处理时间下 ($\geq 15\ \text{min}$) 才能获得 F_v/F_m 的最大值。

综上所述, 进行坛紫菜藻体叶绿素荧光指标测定时, 为了在最短的测量时间内获得准确的测量结果, 叶绿素荧光测定仪的最佳参数应设定为: PAR $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 最佳测量时间间隔 30 s; 最适暗处理时间 15 min。

3.2 坛紫菜藻体光合效率的日变化

Winters 等^[10]在研究自然状态下 *Stylophora pistillata* 的光合效率日变化时,发现“慢性光抑制”现象(植物因长时间处于黑暗条件下所受到的光抑制现象称为“慢性光抑制”现象)会导致植物的 $Y(II)$ 提高,使得早晨的 $Y(II)$ 会显著高于其他时间段的 $Y(II)$ 。本研究的实验结果与此一致,从一天中的 8:30 到 20:30,坛紫菜藻体的 $Y(II)$ 、ETR 和 Q_p 均呈现为逐渐下降的趋势,但在 10:30 ~ 18:30 时间内 $Y(II)$ 、ETR 和 Q_p 差异均不显著,由此说明坛紫菜藻体光合效率的日变化在每天的 10:30 ~ 18:30 时间段内最为稳定,可以作为测量叶绿素荧光指标的最适时间段。

[参 考 文 献]

- [1] SCHREIBER U, BILGER W, NEUBAUER C. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis// SCHULZE E-D, CALDWELL M M. Ecophysiology of Photosynthesis. Berlin: Springer-Verlag, 1994: 49-70. DOI:10.1007/978-3-642-79354-7_3.
- [2] RALPH P J, GADEMANN R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat Bot*, 2005, 82: 222-237. DOI:10.1016/j.aquabot.2005.02.006.
- [3] BAKER N R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 89-113. DOI:10.1039/a902018g.
- [4] 梁洲瑞,王飞久,孙修涛,等. 环境因子对鼠尾藻幼苗叶绿素荧光参数的影响. *水产学报*, 2011, 35(8): 1225-1332. DOI:10.3724/SP.J.1231.2011.17470.
- [5] 杨睿灵,乔洪金,周伟,等. 条斑紫菜叶状体不同区域光合活性的研究. *海洋科学*, 2011, 35(8): 63-66.
- [6] ZHANG T, LI J F, MA F. Study of photosynthetic characteristics of the *Pyropia yezoensis* thallus during the cultivation process. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26: 859-865. DOI:10.1007/s10811-013-0157-6.
- [7] OSMOND C B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field*, 1994, 15(3): 23-34.
- [8] AGUIRRE-VON-WOBESER E, FIGUEROA F L, CABELLO-PASINI A. Effect of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(2): 159-168. DOI: 10.1023/A:1008198404529.
- [9] PAPAGEORGIOU G C, TISMILLI M M S. The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a view point. *Photosynthesis Res*, 2007, 94: 275-290. DOI:10.1007/s11120-007-9193-x.
- [10] DURAKO M J, KUNZELMAN J I. Photosynthetic characteristics of *Thalassia testudinum* measured *in situ* by pulse-amplitude modulated (PAM) fluorometry: methodological and scale-based considerations. *Aquatic Botany*, 2002, 73(2): 173-185. DOI:10.1016/S0304-3770(02)00020-7.
- [11] WINTERS G, LOYA Y, RÖTTGERS R, et al. Photoinhibition in shallow-water colonies of the coral *Stylophora pistillata* as measured *in situ*. *Limnology & Oceanography*, 2003, 48(4): 1388-1393. DOI:10.4319/lo.2003.48.4.1388.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)