



营养盐对泰来草光合无机碳利用方式的影响研究

林基桢^{1,4}, 江志坚^{1,2,3,4,5,6*}, 李玲兰^{1,4}, 方扬^{1,4}, 吴云超^{1,2,3,5,6}, 刘松林^{1,2,3,5,6}, 黄小平^{1,2,3,4,5,6}

1. 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301;
2. 中国科学院南海生态环境工程创新研究院, 广州 510301;
3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广州 511458;
4. 中国科学院大学, 北京 100049;
5. 三亚海洋生态环境工程研究院, 海南省热带海洋生物技术重点实验室, 三亚 572100;
6. 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广州 510301

* 联系人, E-mail: jiangzj1982@scsio.ac.cn

2022-08-31 收稿, 2022-10-07 修回, 2022-10-08 接受, 2022-10-09 网络版发表

国家自然科学基金(41976144, U1901221, 41730529, 42176158)、海南省科技专项(ZDYF2021SHFZ254)、中国科学院南海生态环境工程创新研究院自主部署项目(ISEE2021PY06, ISEE2021ZD03)和广东省应用海洋生物学重点实验室运行经费(2020B1212060058)资助

摘要 海草光合无机碳利用策略的研究有助于揭示其生态适应机理. 然而, 目前有关营养盐对海草光合无机碳利用策略的影响方式尚不清楚, 亟待开展研究. 本研究选取两个受不同程度人类活动影响且环境营养盐差异较大的热带典型海草床(海南岛潭门和西沙永兴岛海域), 结合氧电极技术、叶绿素荧光技术和非损伤微测技术, 对比探讨海草优势种泰来草(*Thalassia hemprichii*)光合无机碳利用方式的异同. 研究发现, 在添加碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺(acetazolamide, AZ)和乙氧苯噻唑胺(6-ethoxyzolamide, EZ)后, 潭门海域泰来草光合放氧速率显著降低, 但AZ和EZ的抑制差异不大, 表明其主要通过胞外碳酸酐酶的作用吸收 HCO_3^- ; 同时添加碱性缓冲液三氨基甲烷盐酸盐(hydroxymethyl, Tris), 对潭门泰来草光合放氧的抑制率高达100%, 且最大相对电子传递速率和 H^+ 内流速率降低, 表明其存在 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运方式. 然而, 在添加AZ和EZ后, 西沙永兴岛泰来草光合放氧速率和最大电子传递速率没有显著变化, 且Tris缓冲液对其光合放氧的抑制超过100%, 并显著降低最大电子传递速率, 这表明西沙永兴岛泰来草主要以 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运为主. 因此, 处于受人类活动影响较大、营养负荷较高且可利用光较弱的海南岛海域泰来草, 既可通过胞外碳酸酐酶催化 HCO_3^- 转化为 CO_2 后进入细胞, 也可通过 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运进入细胞; 而处于受人类活动影响较少、营养负荷较低且可利用光较强的西沙海域泰来草, 则主要依靠 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运进入细胞. 当泰来草面临比较不利的高营养盐与弱光生长环境, 需要增加光合无机碳利用策略(如胞外碳酸酐酶的作用), 以提高对无机碳的利用能力来满足抗逆和生长的需求, 这表明泰来草具有根据地域环境选择性表达无机碳利用方式的能力.

关键词 海草, 营养盐, 无机碳利用, 叶绿素荧光技术, 氧电极技术, 非损伤微测技术

海草(seagrass)是生活在海水中完成开花、结果和萌发的高等被子植物^[1]. 全球当前已知的海草共有6科13属74种^[2]. 海草床(seagrass bed)生态系统作为当今世

界上生产力最高的生态系统之一, 具有重要的生态系统服务功能^[3-5]. 近年来, 海草床的“蓝碳”功能愈来愈受到重视, 逐渐成为国内外研究的前沿与热点^[6-8]. 海

引用格式: 林基桢, 江志坚, 李玲兰, 等. 营养盐对泰来草光合无机碳利用方式的影响研究. 科学通报, 2023, 68

Lin J Z, Jiang Z J, Li L L, et al. Effects of nutrients on the utilization pattern of photosynthetic inorganic carbon of the tropical *Thalassia hemprichii* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68, doi: [10.1360/TB-2022-0796](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0796)

草床的面积虽不足海洋总面积的0.2%，但其每年的碳埋藏量可占据超过全球海洋碳埋藏量的10%，承担着全球碳储库的重要作用^[9,10]。

海水中的CO₂含量相比大气中的较低，且在海水中扩散速度是空气中的10⁻⁴^[11,12]。当前，海水平均pH为8.1~8.2，溶解态CO₂仅占溶解无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC)的1%，而HCO₃⁻和CO₃²⁻分别占90%和9%^[13]。故海洋植物需要进化出不同于陆地植物对无机碳的吸收利用方式，才能在海水中的低无机碳环境中生存和生长^[14]。海草作为光合自养生物，必须通过吸收充足的无机碳来进行光合作用，其无机碳的选择和利用方式决定了光合的速率。因此，需要深入研究海草对无机碳的选择及其利用方式。

对海洋植物的研究发现，在光合细胞外存在由H⁺向外转运的酸区(acid zones)，通过H⁺/HCO₃⁻协同向内转运以提高HCO₃⁻的利用效率^[15,16]；或通过借助酸区提高HCO₃⁻向CO₂的转化效率，以提高胞外CO₂分压进而增加其扩散进入细胞的速率^[17]。而且，碳酸酐酶也会催化HCO₃⁻向CO₂的转化来提高胞外CO₂分压^[12,15,18]。已有研究证明，海草可以依托细胞特定的碳浓缩机制(carbon dioxide concentrating mechanism, CCM)转运HCO₃⁻进入胞内供给光合作用^[19-21]。

泰来草(*Thalassia hemprichii*)是水鳖科(Hydrocharitaceae)泰来草属(*Thalassia*)海草，广泛分布于太平洋-印度洋和大西洋的热带沿海地区，具有较强的抗环境胁迫能力^[22,23]。尽管对泰来草无机碳利用方式已经进行了一些研究，但仍然存在争议。例如，泰来草不能利用HCO₃⁻，仅能吸收CO₂^[19,24]；或者泰来草可直接吸收HCO₃⁻，同时也部分依赖碳酸酐酶催化HCO₃⁻水解^[25]；泰来草也可通过质子泵与碳酸酐酶共同作用使HCO₃⁻脱水^[26]。这些不一致的研究结果，可能是由于泰来草的生长环境差异以及应用的研究测定方法不同而导致的。泰来草作为我国热带海域的重要海草优势种，主要分布在海南岛东部陆源沉积物或陆源沉积物与珊瑚礁碎屑混合底质，以及西沙珊瑚礁底质，且受到不同程度营养负荷的影响^[27]。营养负荷是否会改变泰来草的无机碳利用方式？目前尚不清楚，亟待开展研究。

因此，本研究选取生长在不同营养负荷环境(海南岛东部潭门和西沙永兴岛海域)下的热带典型海草——泰来草为研究对象，通过结合氧电极技术和叶绿素荧光技术，对比探讨添加碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺(acetazolamide, AZ)、乙氧苯噻唑胺(6-ethoxazolamide,

EZ)和碱性缓冲液三氨基甲烷盐酸盐(hydroxymethyl, Tris)后光合速率的变化，并利用非损伤微测技术(non-invasive micro-test technology, NMT)测定泰来草叶肉细胞H⁺流速的变化，阐释营养盐对泰来草光合无机碳利用策略的影响。本研究提出假说：泰来草面临比较不利的高营养负荷环境，需要增加光合无机碳利用策略，以提高对无机碳的利用能力来满足抗逆和生长的需求。本研究将有助于阐明我国热带海域泰来草的光合无机碳利用方式及其关键影响因素，为加深对海草的固碳机理和海草床生态系统“蓝碳”功能的认知提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

本研究主要采集海南省琼海市潭门海域(110.6075°E, 19.1822°N)和西沙永兴岛海域(112.3533°E, 16.8449°N)的泰来草。其中，潭门海域生长有多种类海草，主要优势种为泰来草和海菖蒲(*Enhalus acoroides*)。该海域海草生长的底质主要是陆源泥沙与珊瑚礁碎屑混合底质，其中砂质、粉砂和黏土的占比分别为95.40%±0.74%、4.40%±0.60%和0.20%±0.007%^[28]。近年来，随着人类活动的逐渐加剧，如岸边的虾塘养殖、石斑鱼养殖和港口建设，以及河流的营养盐输入，海草床生境逐年变差，生长水体浑浊度增加，海草床斑块化程度越来越高，面积逐年减少^[29]。相比潭门海域，西沙永兴岛海域终年高温，年阳光辐射量较大，海水透明度较高，且受人类活动影响较小^[30]。永兴岛海域海草优势种主要为泰来草和卵叶喜盐草(*Halophila ovalis*)，且生长底质多为珊瑚礁底质^[22]，其中砂质、粉砂和黏土的占比分别为97.60%±1.70%、2.40%±1.70%和0.00%±0.00%^[27]。西沙永兴岛海域的沉积物中砂质成分占比高于潭门海域，但粉砂和黏土相对较少。

1.2 实验方法

为更好地反映海南省琼海市潭门海域和西沙永兴岛海域的泰来草生境状态，在春(2021年5月)、夏(2020年7~8月，7月底8月初)、秋(2020年11月)、冬(2021年1月)进行4个季度的环境监测，所得数据取均值并进行方差分析。用营养盐分析仪(Seal AA3)测定海水和沉积物间隙水的无机氮营养盐(硝态氮+亚硝态氮+氨氮)浓度。使用S2-Meter和Seven2GO Pro分别测量水体pH和

溶解氧(dissolved oxygen, DO), 使用手持式温盐计(YSI Pro30)测量海水温度及盐度. 2020年夏季, 使用450°C灼烧4 h后冷却至室温并称重的Whaman GF/F滤膜(0.7 μm孔径)过滤500 mL原位海水, 在50°C烘箱内烘干至恒重并计算重量之差测得悬浮颗粒物(suspended solid)含量.

2020年夏季和秋季均分别在海南岛琼海潭门海域和西沙永兴岛海域海草床采集泰来草和海水, 进行光合无机碳利用方式的探讨实验. 并将泰来草叶片清洗干净, 去除附生藻类后置于原位海水中暂养1 d, 设置光源(AI Hydra 32HD)光照强度为150 μm photons m⁻² s⁻¹. 碳酸酐酶抑制剂AZ不能渗透细胞而只抑制胞外碳酸酐酶的活性, 而EZ能渗透细胞从而抑制细胞内外碳酸酐酶的活性, 可依此来判断泰来草胞内外碳酸酐酶对转运无机碳的协助作用; Tris作为碱性缓冲溶液可以吸收细胞释放的H⁺并维持环境中pH稳定, 从而判断H⁺转运对无机碳利用的作用^[31].

2020年秋季进行光合放氧速率实验. 实验采用透明的50 mL离心管, 选取规格一致的泰来草健康叶片, 添加30 mL原位海水, 同时分别添加AZ、EZ和Tris-HCl, 使AZ、EZ和Tris-HCl的浓度对应达到100、100 μmol/L和50 mmol/L(pH 8.0). 实验共设置4组, 其中1组为空白对照, 每组3个平行. 在反应温度24.2°C, 光照强度150 μmol photons m⁻² s⁻¹的环境中培养1 h后, 再次测量溶解氧含量, 并记录反应前后溶解氧含量之差. 在测量完毕后, 将海草叶片烘干并称重记录. 将测得的溶解氧差除以烘干后泰来草叶片干重(dry weight, DW), 得到每单位质量干重的光合放氧速率(O₂ μmol/(mg h)).

2020年夏季和秋季, 进行叶绿素荧光实验. 分别选取经同样预处理后的健康泰来草叶片放置于50 mL离心管内, 添加30 mL原位海水, 同时分别添加AZ、EZ和Tris-HCl, 使AZ、EZ和Tris-HCl的浓度对应达到100、100 μmol/L和50 mmol/L(pH 8.0). 实验共设置4组, 其中1组为空白对照, 每组4个平行. 在室内人工光照环境下(温度24.2°C, 光强150 μmol photons m⁻² s⁻¹)培养1 h. 使用MINI-PAM调制叶绿素荧光仪(德国WALZ公司)对叶片测定快速光曲线(rapid light curve, RLC), 设置8个光合有效辐射(photosynthetically active radiation, PAR)梯度(24、88、179、328、512、729、1121、1563 μmol photons m⁻² s⁻¹)分别测量量子产量. 在任一PAR强度下, 打开饱和脉冲前的荧光为*F*, 打开饱

和脉冲得到的最大荧光为*F*_m', 由此可以得出光适应状态下光系统II的实际量子产量Φ_{PSII}. 根据每一光强下实时荧光和最大荧光计算对应的相对电子传递速率(rETR). 快速光曲线(RLC)使用电子传递速率(rETR)^[32]的相对测量值(因为没有直接测量叶片吸光度), 计算公式如下:

$$rETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times 0.5 \times AF, \quad (1)$$

使用仪器默认的AF值(AF=0.84)来计算rETR.

RLC为电子传递速率随光强的变化曲线. 使用SPSS 26软件通过采用Levenberg-Marquardt非线性曲线拟合按Smith^[33]模型进行计算, 可以确定泰来草叶片的实际光化学效率. 为定量研究RLC, 需要确定RLC的几个重要参数, 如α、半饱和光强*E*_k及rETR_{max}:

$$rETR = \frac{(rETR_{max} \times \alpha \times PAR)}{\sqrt{(rETR_{max}^2 + (\alpha PAR)^2)}, \quad (2)$$

$$E_k = \frac{rETR_{max}}{\alpha}, \quad (3)$$

式中, rETR为光合速率, 即相对电子传递速率; rETR_{max}为最大光合速率, 即最大相对电子传递速率; α为初始斜率, 反映了光能的利用效率; *E*_k为半饱和光强, 反映了样品对强光的耐受能力.

1.3 海草叶肉细胞H⁺流速测定

由于西沙距离非损伤微测仪器所在的实验室路程较远, 无法保证非损伤微测仪器测定时泰来草叶片能够维持较为稳定的状态, 故只测定了潭门海域泰来草叶片的H⁺流速, 来反映Tris-HCl添加对H⁺的影响. 实验对象为潭门海域泰来草叶片, 采用非损伤微测技术(NMT Physiolzyer, MA01002, 美国扬格公司; 旭月(北京)科技有限公司), 测定H⁺进出泰来草叶肉细胞的实时速率, 即H⁺流速. 分别取经过原位海水和添加Tris缓冲液的原位海水处理后的待测叶片, 确定叶片中的一小块待测区域, 用手术刀从中切出3 mm×3 mm大小的叶片组织. 将叶片组织固定在培养皿中, 加入5 mL测试液(0.1 mmol/L CaCl₂, pH 6.0)后上样检测.

在显微镜下找到目标检测区域, 将H⁺流速传感器置于距离叶肉组织表面约30 μm处开始检测. 每个样品检测10 min, 每组检测4个重复. 通过imFluxes V2.0软件(YoungerUSA LLC, Amherst, MA 01002, 美国)直接读取H⁺流速数据, 流速单位为mol cm⁻² s⁻¹, 正值代表外排, 负值代表吸收.

1.4 统计分析

使用Excel 2016软件对数据进行统计和预处理, 使用SPSS 26对实验数据进行单因素方差分析的LSD (least significant difference)和多元t检验法比较组间差异、正态性检验, 对环境参数进行独立样本非参数检验(Mann-Whitney U test)对比组间差异. 使用Origin 2021进行图形绘制, 所得结果均为重复平均值±标准差 (mean±SD), 显著性水平设定为 $P<0.05$.

2 结果与分析

2.1 泰来草生长环境参数的差异

海南岛潭门和西沙永兴岛海域海草床的环境参数具有显著的差异(表1和2). 例如, 海水温度、盐度、pH和溶解氧浓度均呈现西沙永兴岛海域>潭门海域, 受人类活动影响而变化的海水和沉积物间隙水的溶解

无机氮浓度, 在4个季节均呈现潭门海域>西沙永兴岛海域.

2.2 营养负荷对泰来草光合放氧速率的影响

由图1可知, 泰来草叶片在经过AZ、EZ和Tris处理后叶片光合放氧速率出现不同程度的变化. 西沙海域泰来草叶片在CK、AZ和EZ组的光合放氧速率均高于潭门海域, 两地对照组泰来草的光合放氧相对速率分别为 94.529 ± 12.177 和 75.656 ± 7.076 O_2 $\mu\text{mol}/(\text{mg h})$. 根据图1, 潭门海域泰来草在添加AZ和EZ后光合放氧速率均显著下降($P<0.05$), 光合放氧抑制率可达29.2%和20.4%(AZ和EZ处理间无显著性差异); 而在西沙永兴岛海域, 对照组与AZ和EZ添加组的光合放氧速率则无显著性差异, 且抑制率仅为8.43%和-1.57%. 潭门和西沙永兴岛海域泰来草在添加Tris缓冲液后光合放氧抑制率甚至超过100%.

表1 海南岛潭门海域和西沙永兴岛海域海草床环境参数^{a)}

Table 1 The environmental parameters of seagrass beds in Tanmen sea areas of Hainan Island and Yongxing sea areas of Xisha Islands

间	位置	温度(°C)	盐度(Salinity)	pH	溶解氧DO(mg L ⁻¹)	悬浮颗粒物SS(mg L ⁻¹)
春季	潭门海域	29.6±0.20	31.86±1.15	8.17±0.03	8.84±0.08	
夏季		28.96±0.75	33.51±0.22	8.02±0.03	3.44±0.79	9.28±3.31
秋季		24.7±0.00	32.83±0.20	8.30±0.00	7.09±0.06	
冬季		18.43±0.15	33.26±0.05	8.25±0.04	8.70±0.36	
年均		25.43 ±4.67 ^a	32.87±0.83 ^a	8.19±0.11 ^a	7.02±0.11 ^a	9.28±3.31 ^a
春季	西沙海域	33.45±0.23	34.72±0.14	8.27±0.04	11.04±1.04	
夏季		31.07±0.74	33.61±0.11	8.07±0.39	5.69±3.67	7.71±0.92
秋季		30.47±1.88	33.57±0.05	8.91±0.06	12.72±1.87	
冬季		23.87±1.72	34.47±0.18	8.25±0.08	8.8±0.61	
年均		29.53±4.10 ^b	34.17±0.54 ^b	8.42±0.35 ^a	10.12±2.84 ^b	7.71±0.92 ^a

a) 同一列中不同的小写字母表示年均数值之间存在显著性差异($P<0.05$), mean±SD

表2 海南岛潭门海域和西沙永兴岛海域溶解无机氮浓度^{a)}

Table 2 The dissolved inorganic nitrogen concentration of seagrass beds in Tanmen sea areas of Hainan Island and Yongxing sea areas of Xisha Islands

时间	海水溶解无机氮($\mu\text{mol L}^{-1}$)		间隙水溶解无机氮($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	潭门海域	永兴海域	潭门海域	永兴海域
春季	3.65±0.87 ^a	3.63±0.86 ^a	85.71±9.6 ^a	52.47±7.92 ^b
夏季	4.63±1.09 ^a	3.99±1.65 ^a	142.61±28.58 ^a	137.53±8.8 ^a
秋季	10.33±2.4 ^a	7.14±2.63 ^b	98.69±6.55 ^a	27.82±5.56 ^b
冬季	1.7±0.31 ^a	1.36±0.44 ^b	72.04±6.48 ^a	40.71±5.38 ^b

a) 同一行同一指标不同的小写字母表示数值之间存在显著性差异($P<0.05$), mean±SD

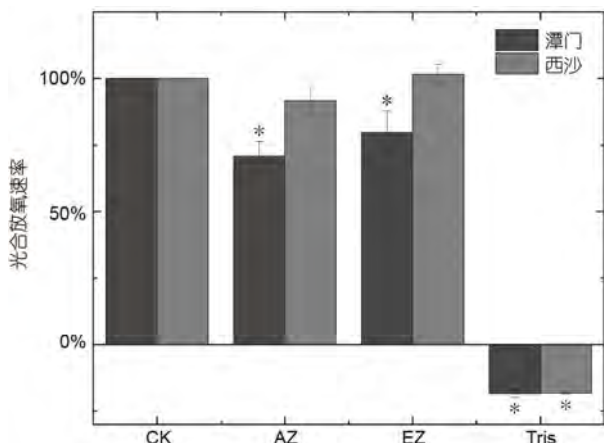


图1 添加不同抑制剂和缓冲液对海南岛潭门和西沙海域泰来草光合放氧速率的影响。以CK组作为参照，计算相对速率，*表示显著， $P < 0.05$

Figure 1 The effect of adding different inhibitors and buffers on the photosynthetic oxygen evolution rate of *Thalassia hemprichii* in Tanmen sea areas of Hainan Island and Yongxing sea areas of Xisha Islands. Using the CK group as a reference to calculate the relative rate, * significant, $P < 0.05$

2.3 营养负荷对海草电子传递速率的影响

叶绿素荧光技术可以在一定程度上揭示海草光合能力，反映海草对环境的适应能力，是研究海草环境适应的有效手段^[34]。根据图2和3可见，2020年夏季和秋季添加AZ和EZ抑制剂对RLC均无明显影响，而夏季和秋季添加缓冲剂Tris后，RLC曲线均明显下移，叶片电子传递速率能力明显减弱。

α 表示光能利用效率，代表植物光合的健康程度。潭门和西沙海域仅在添加Tris后出现下降，而仅有西沙海域下降显著($P < 0.05$)。最大电子传递速率 $rETR_{max}$ 代表光合作用的最大能力， E_k 半饱和光强表示其耐受强光的能力，二者具有较强的一致性。由图3可知，西沙永兴岛海域泰来草 $rETR_{max}$ 和 E_k 在夏季和秋季均比潭门同期的高。在夏季和秋季，添加AZ和EZ后，潭门泰来草的 $rETR_{max}$ 和 E_k 相比对照的，均没有降低，而添加Tris缓冲液后 $rETR_{max}$ 和 E_k 则有一定程度的降低。同样，在夏季和

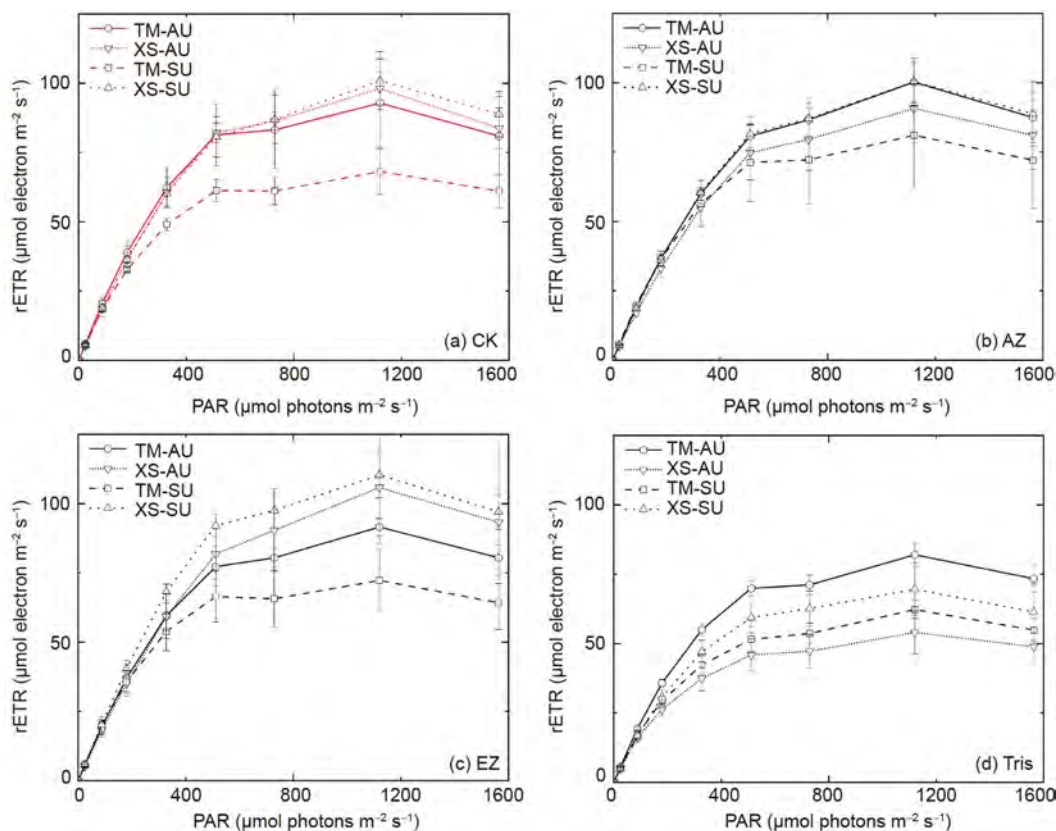


图2 (网络版彩色)添加不同抑制剂和缓冲液对海南岛潭门和西沙海域泰来草快速光曲线的影响。(a) 空白对照；(b) 添加AZ至100 $\mu\text{mol/L}$ ；(c) 添加EZ至100 $\mu\text{mol/L}$ ；(d) 添加Tris至50 mmol/L 。TM，潭门；XS，西沙；SU，夏季；AU，秋季

Figure 2 (Color online) The effects of adding different inhibitors and buffer on the RLC of seagrass in Tanmen sea areas of Hainan Island and Yongxing sea areas of Xisha Islands. (a) Blank control group; (b) add AZ to 100 $\mu\text{mol/L}$; (c) add EZ to 100 mmol/L ; (d) add Tris to 50 mmol/L . TM, Tanmen; XS, Xisha; SU, summer; AU, autumn

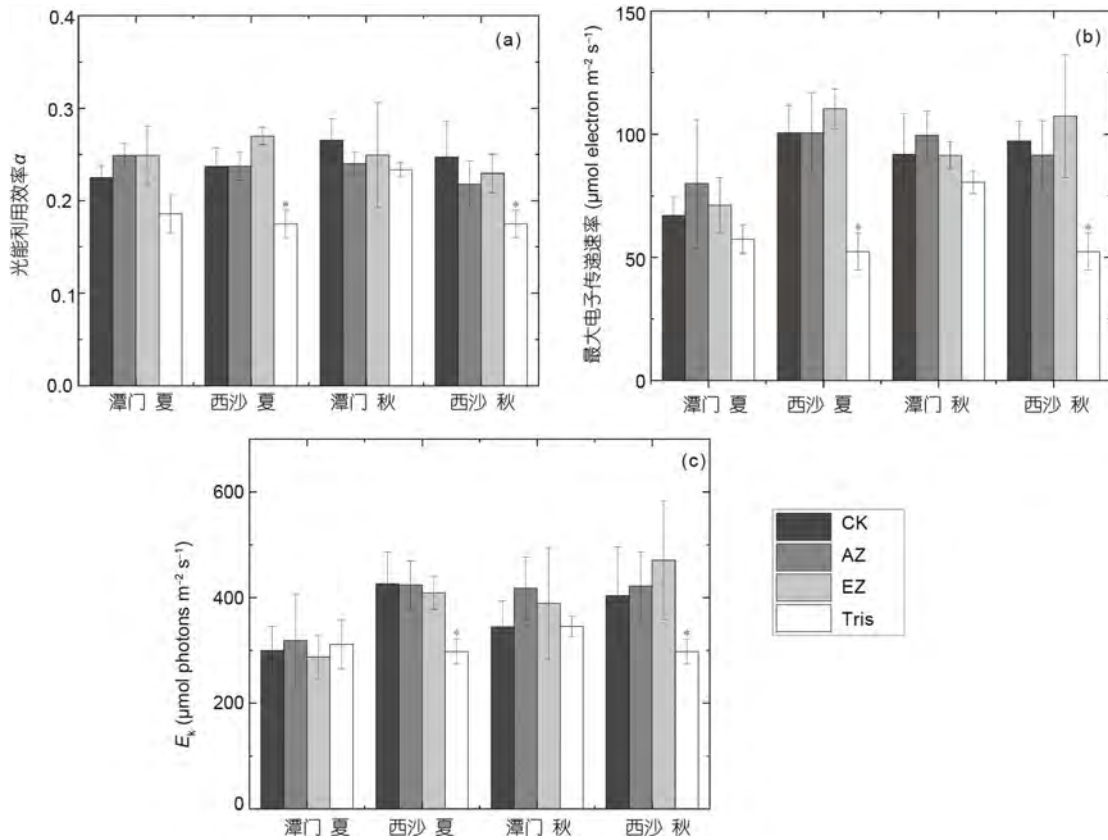


图3 添加不同抑制剂和缓冲液对海南岛潭门和西沙海域泰来草叶绿素荧光参数的影响。(a) 光能利用效率; (b) 最大电子传递速率; (c) 半饱和光强。*表示显著, $P < 0.05$

Figure 3 The effects of adding different inhibitors and buffer on chlorophyll fluorescence parameters of *T. hemprichii* in Tanmen sea areas of Hainan Island and Yongxing sea areas of Xisha Islands. (a) Light energy use efficiency; (b) maximum electron transfer rate; (c) half-saturation light intensity. * significant, $P < 0.05$

秋季, 添加AZ和EZ后, 西沙永兴岛泰来草的 $rETR_{max}$ 和 E_k 相对对照的, 均没有显著下降, 而添加Tris缓冲液后, $rETR_{max}$ 和 E_k 则有显著的降低。

2.4 营养负荷对泰来草叶肉细胞 H^+ 流速的影响

NMT测量结果的正值代表外排, 负值代表吸收。在添加呈弱碱性的Tris缓冲液后, 潭门海草叶肉表皮细胞(图4(a)) H^+ 内流速度显著下降, 从空白组的 $12 \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 降低至 $6 \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (图4(b))。这表明Tris碱性缓冲溶液中和 H^+ 外排形成的酸区, 抑制了 $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ 共转运的途径。

3 讨论

泰来草作为印度洋-太平洋和大西洋的广分布种, 可能需要进化出多种无机碳利用途径, 以适应不同地区的环境变化, 来满足自身生长发育和繁殖的需

求[19,24-26,35]。本研究中, 海南岛潭门和西沙永兴岛海域海草床由于受到不同程度人类活动的影响, 两个海草床的环境参数特别是海水和沉积物间隙水营养盐以及海水SS含量存在较大的差异。本研究通过结合氧电极技术、叶绿素荧光技术和非损伤微测技术(NMT), 发现不同营养负荷环境下泰来草对无机碳的利用方式存在差异。

本研究发现, 西沙永兴岛海域泰来草的光合放氧速率、最大相对电子传递速率及半饱和光强分别比潭门海域高24.95%、24.54%和28.73%, 表明西沙永兴岛海域泰来草的生长状态较好, 光合效率较高。这与西沙永兴岛海域较少的人类活动、较低的营养盐和较高的海水透明度一致。同样, 藻类所覆盖的泰来草受光照强度和无机碳吸收都会受到一定程度的影响, 其最大相对电子传递速率也比没有藻类覆盖的低[25]。而且, 光强降低或者营养盐增加, 都会降低海草的光合作用速

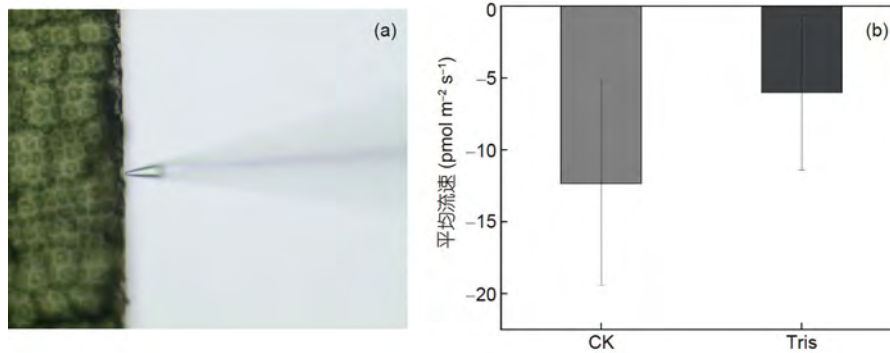


图 4 (网络版彩色)Tris缓冲液添加对泰来草叶肉细胞H⁺流速的影响。(a) NMT测量过程; (b) H⁺流速
 Figure 4 (Color online) The effect of adding Tris buffer on the H⁺ flow rate of mesophyll cell of the *Thalassia hemprichii* leaves. (a) NMT measurement process; (b) H⁺ flow rate

率^[36], 前期的研究也发现, 西沙永兴岛海域泰来草叶片的氮含量和 $\delta^{15}\text{N}$ 含量也比海南岛东南部海域的低^[27]. 因此, 泰来草的光合作用速率也可作为监测指标来指示海草床生态系统的健康状况^[37].

处于较高营养负荷环境的潭门海域泰来草叶片, 在添加AZ和EZ后其光合放氧速率显著下降, 高达29.2%和20.4%. AZ和EZ抑制剂可以对碳酸酐酶产生一定的抑制作用, 阻碍其水解 HCO_3^- ^[31]. 这表明潭门泰来草可以利用碳酸酐酶催化吸收利用 HCO_3^- . AZ不能渗透细胞而只抑制胞外碳酸酐酶的活性, 而EZ能渗透细胞并抑制细胞内外碳酸酐酶的活性^[38], 且AZ和EZ对潭门泰来草光合放氧的抑制并没有显著差异, 这表明泰来草主要通过胞外碳酸酐酶的作用吸收利用 HCO_3^- . 同时, 添加Tris缓冲液, 对潭门泰来草叶片光合放氧的抑制高达100%, 并且降低最大相对电子传递速率和H⁺内流速率. 这表明潭门泰来草叶片中存在质子泵转运H⁺形成酸区, 协助提升对 HCO_3^- 的吸收利用能力^[16,39]. 因此, 处于较高营养负荷环境潭门海域的泰来草叶片, 存在碳酸酐酶和质子泵协助吸收利用 HCO_3^- , 其利用方式包括: 碳酸酐酶催化 HCO_3^- 水解生成 CO_2 后通过扩散进入; 质子泵转运H⁺形成酸区并联合胞外碳酸酐酶水解生成 CO_2 后通过扩散进入; 质子泵外排H⁺形成酸区后H⁺/ HCO_3^- 协同转运^[20]. 这与Uku等人^[26]、Gavin和Durako^[39]以及江志坚^[40]的研究结果一致. 然而, 处于较低营养负荷环境的西沙永兴岛泰来草叶片, 在添加AZ和EZ后, 其光合放氧速率并没有显著变化, 且对应的最大光合电子传递速率也没有显著变化. 这表明西沙永兴岛泰来草可能不存在碳酸酐酶的作用来吸收利用 HCO_3^- . 添加Tris缓冲液, 对西沙永兴

岛泰来草叶片光合放氧的抑制也高达100%, 且显著降低最大电子传递速率, 表明其存在质子泵转运H⁺形成酸区. 因此, 处于较低营养负荷环境的西沙永兴岛泰来草叶片, 其无机碳摄取主要以H⁺/ HCO_3^- 协同转运为主(图5).

营养盐和光照是影响海草生长的主要环境因素^[41], 可能也是导致潭门和西沙永兴岛泰来草无机碳利用方式存在差异的主要原因^[42]. 相对西沙永兴岛海域, 海南岛潭门海域由于人口稠密受人类活动影响程度较剧烈, 营养负荷较大, 且海水悬浮颗粒物含量和浑浊度较高. 环境中营养盐含量升高会通过影响海草植株体内的氮、碳代谢来影响海草的生长, 此过程需要消耗植株体内碳库来形成氨基酸^[43], 海草对碳的需求量增加. 同时, 在悬浮物浓度较高的环境中, 光强衰减迅速, 导致海草冠层接收的光强减弱, 海草的可利用光较少. 泰来草需要通过增强叶绿素浓度和光合效率来降低光强减弱带来的压力^[44]. 并且, 在低光和富营养化等不利条件下, 海草不断代谢消耗自身所储存的碳水化合物^[45,46]. 因此, 潭门海域的泰来草相对西沙的, 面临比较不利的高营养盐与弱光生长环境, 需要更多的无机碳利用方式(如增加碳酸酐酶的作用), 以增加对无机碳的利用能力来满足抗逆和生长的需求. 另外, 潭门海草床的pH也相对西沙永兴岛的较低. 研究发现, 生长在较高光强和pH的海草更加依赖 HCO_3^- 的直接吸收^[39]. 这与西沙永兴岛海域的泰来草只存在H⁺/ HCO_3^- 协同转运方式一致. 光合无机碳利用方式的改变, 可能是泰来草适应生境的另外一种机制, 亟待利用海草蛋白组学进行深入研究.

海草多种无机碳利用方式仍在探索阶段, 需要一种方法初步判断其无机碳利用方式的异同. 而快速光

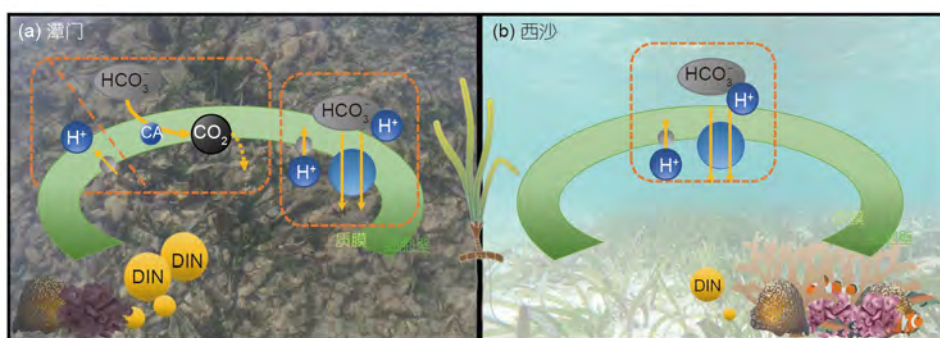


图5 (网络版彩色)营养盐对潭门和西沙海域泰来草光合无机碳利用机制的影响概念图。(a) 潭门泰来草无机碳利用方式; (b) 西沙泰来草无机碳利用方式

Figure 5 (Color online) Conceptual diagram of the effect of nutrients on the mechanism of photosynthetic inorganic carbon utilization in *T. hemprichii* in the Tanmen and Xisha areas. (a) *T. hemprichii* inorganic carbon utilization pattern in Tanmen; (b) *T. hemprichii* inorganic carbon utilization pattern in Xisha

曲线可以评估海草当前实际光合能力,从而体现海草光合作用活性及光合电子传递速率,同时准确反映叶片光合所受的胁迫^[47]。由于抑制剂和缓冲剂产生的限制减少了无机碳进入叶绿体,初级光化学过程减少,而为了避免损坏光反应中心,叶绿体会将捕获的光能部分转移到不同的光反应过程中^[34]。对于西沙永兴岛的泰来草,添加Tris缓冲液后用叶绿素荧光技术获得的最大相对电子传递速率显著下降(>50%),与氧电极的测定结果一致。然而,对于潭门的泰来草,添加Tris缓冲液后其最大相对电子传递速率下降的幅度不够显著,与氧电极的测定结果不一致。这可能是由于潭门泰来草的多种无机碳利用方式影响了叶绿素荧光技术的应用。例如,添加Tris缓冲液后,质子泵会受到抑制,影响 HCO_3^- 的利用,海草的光合电子传递会下降;但是由于潭门除了 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运外,还存在碳酸酐酶的作用方式,可能会弥补光合电子传递速率的下降幅度。这需要进一步深入研究。因此,叶绿素荧光技术可以快速用于判断仅存在 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同内转运的无机碳利用方

式,且需结合氧电极技术共同判断多种无机碳利用方式。

4 结论

本研究发现,处于受人类活动影响较大、营养负荷较高且可利用光较弱的海南岛海域泰来草,对无机碳的摄取主要通过胞外碳酸酐酶催化 HCO_3^- 水解和质子泵转运形成酸区协助 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运;而处于受人类活动影响较少,营养负荷较低且可利用光较强的西沙海域泰来草,对无机碳的摄取以 $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运为主。因此,泰来草面临比较不利的高营养盐与弱光生长环境,需要增加光合无机碳利用策略(如胞外碳酸酐酶的作用),以提高对无机碳的利用能力来满足抗逆和生长的需求。这表明泰来草具有根据地域环境选择性表达无机碳利用策略的能力。在技术不断发展的当下,亟需通过海草组学技术、稳定同位素示踪及酶活等联合研究海草对无机碳的利用机制^[12,48],加深认知和提高海草的碳汇功能。

参考文献

- 1 Larkum A, Orth R J, Duarte C M. Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Dordrecht: Springer, 2006
- 2 Huang X P, Jiang Z J, Zhang J P, et al. The Chinese nomenclature of the global seagrasses (in Chinese). Acta Oceanol Sin, 2018, 40: 127–133 [黄小平, 江志坚, 张景平, 等. 全球海草的中文命名. 海洋学报, 2018, 40: 127–133]
- 3 Duarte C M, Chiscano C L. Seagrass biomass and production: A reassessment. Aquat Bot, 1999, 65: 159–174
- 4 Duarte C M, Marbà N, Gacia E, et al. Seagrass community metabolism: Assessing the carbon sink capacity of seagrass meadows. Glob Biogeochem Cycle, 2010, 24: GB4032
- 5 Lee C L, Lin W J, Liu P J, et al. Highly productive tropical seagrass beds support diverse consumers and a large organic carbon pool in the sediments. Diversity, 2021, 13: 544

- 6 Jiang Z, Liu S, Zhang J, et al. Newly discovered seagrass beds and their potential for blue carbon in the coastal seas of Hainan Island, South China Sea. *Mar Pollut Bull*, 2017, 125: 513–521
- 7 Macreadie P I, Anton A, Raven J A, et al. The future of blue carbon science. *Nat Commun*, 2019, 10: 3998
- 8 Jiao N Z, Liu J H, Shi T, et al. Deploying ocean negative carbon emissions to implement the carbon neutrality strategy (in Chinese). *Sci Sin Terrae*, 2021, 51: 632–643 [焦念志, 刘纪化, 石拓, 等. 实施海洋负排放践行碳中和战略. 中国科学: 地球科学, 2021, 51: 632–643]
- 9 Duarte C M, Middelburg J J, Caraco N. Major role of marine vegetation on the oceanic carbon cycle. *Biogeosciences*, 2005, 2: 1–8
- 10 Fourqurean J W, Duarte C M, Kennedy H, et al. Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nat Geosci*, 2012, 5: 505–509
- 11 Maberly S C, Madsen T V. Affinity for CO₂ in relation to the ability of freshwater macrophytes to use HCO₃⁻. *Funct Ecol*, 1998, 12: 99–106
- 12 Larkum A W, Kendrick G A, Ralph P J. Seagrasses of Australia: Structure, Ecology and Conservation. Switzerland: Springer, 2018
- 13 Raven J, Caldeira K, Elderfield H, et al. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *Science*, 2005, 215: 1–80
- 14 Beer S. Photosynthesis and photorespiration of marine angiosperms. *Aquat Bot*, 1989, 34: 153–166
- 15 Price G D, Badger M R, Bassett M E, et al. Involvement of plasmalemmasomes and carbonic anhydrase in photosynthetic utilization of bicarbonate in *Chara corallina*. *Funct Plant Biol*, 1985, 12: 241–256
- 16 Hellblom F, Axelsson L. External HCO₃⁻ dehydration maintained by acid zones in the plasma membrane is an important component of the photosynthetic carbon uptake in *Ruppia cirrhosa*. *Photosynth Res*, 2003, 77: 173–181
- 17 Walker N A, Smith F A, Cathers I R. Bicarbonate assimilation by fresh-water charophytes and higher plants: I. Membrane transport of bicarbonate ions is not proven. *J Membr Biol*, 1980, 57: 51–58
- 18 Zou D H, Gao K S. Photosynthetic bicarbonate utilization in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Chin Sci Bull*, 2002, 47: 1629–1633 [邹定辉, 高坤山. 坛紫菜光合作用对重碳酸盐的利用. 科学通报, 2002, 47: 926–930]
- 19 Björk M, Weil A, Semesi S, et al. Photosynthetic utilisation of inorganic carbon by seagrasses from Zanzibar, East Africa. *Mar Biol*, 1997, 129: 363–366
- 20 Beer S, Björk M, Hellblom F, et al. Inorganic carbon utilization in marine angiosperms (seagrasses). *Funct Plant Biol*, 2002, 29: 349–354
- 21 Larkum A W D, Davey P A, Kuo J, et al. Carbon-concentrating mechanisms in seagrasses. *J Exp Bot*, 2017, 68: 3773–3784
- 22 Short F, Carruthers T, Dennison W, et al. Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2007, 350: 3–20
- 23 Kilminster K, McMahon K, Waycott M, et al. Unravelling complexity in seagrass systems for management: Australia as a microcosm. *Sci Total Environ*, 2015, 534: 97–109
- 24 Abel K M. Inorganic carbon source for photosynthesis in the seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers. *Plant Physiol*, 1984, 76: 776–781
- 25 Liu S L, Wang W L, Dy D, et al. The effect of ulvoid macroalgae on the inorganic carbon utilization by an intertidal seagrass *Thalassia hemprichii*. *Bot Bull Acad Sin*, 2005, 46: 197–203
- 26 Uku J, Beer S, Björk M. Buffer sensitivity of photosynthetic carbon utilisation in eight tropical seagrasses. *Mar Biol*, 2005, 147: 1085–1090
- 27 Jiang Z, Zhao C, Yu S, et al. Contrasting root length, nutrient content and carbon sequestration of seagrass growing in offshore carbonate and onshore terrigenous sediments in the South China Sea. *Sci Total Environ*, 2019, 662: 151–159
- 28 Zhang X, Zhao C, Yu S, et al. Rhizosphere microbial community structure is selected by habitat but not plant species in two tropical seagrass beds. *Front Microbiol*, 2020, 11: 161
- 29 Chen S Q, Wang D R, Wu Z J, et al. Discussion of the change trend of the seagrass beds in the east coast of Hainan Island in nearly a decade (in Chinese). *Mar Environ Res*, 2015, 34: 48–53 [陈石泉, 王道儒, 吴钟解, 等. 海南岛东海岸海草床近10 a变化趋势探讨. 海洋环境科学, 2015, 34: 48–53]
- 30 Li Y H, Huang X P, Yue W Z, et al. Ecological study on coral reef and intertidal benthos around Yongxing Island, South China Sea (in Chinese). *Oceanol Limnol Sin*, 2004, 35: 176–182 [李颖虹, 黄小平, 岳维忠, 等. 西沙永兴岛珊瑚礁与礁坪生物生态学研究. 海洋与湖沼, 2004, 35: 176–182]
- 31 Larsson C, Axelsson L. Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. *Eur J Phycol*, 1999, 34: 79–86
- 32 Beer S, Björk M, Gademann R, et al. Measurements of photosynthetic rates in seagrasses. In: Short F T, Coles R G, eds. *Global Seagrass Research Methods*. Amsterdam: Elsevier Science Press, 2001. 183–198
- 33 Smith E L. Photosynthesis in relation to light and carbon dioxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1936, 22: 504–511
- 34 de Sousa C A F, de Paiva D S, Casari R A C N, et al. A procedure for maize genotypes discrimination to drought by chlorophyll fluorescence imaging rapid light curves. *Plant Methods*, 2017, 13: 61
- 35 Ferrer-Gallego P P, Boisset F. Typification of the Indo-Pacific seagrass *Thalassia hemprichii* (Hydrocharitaceae). *Taxon*, 2015, 64: 350–354
- 36 Davey P A, Pernice M, Ashworth J, et al. A new mechanistic understanding of light-limitation in the seagrass *Zostera muelleri*. *Mar Environ Res*, 2018, 134: 55–67
- 37 Campbell S, Miller C, Steven A, et al. Photosynthetic responses of two temperate seagrasses across a water quality gradient using chlorophyll fluorescence. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2003, 291: 57–78

- 38 Moroney J V, Bartlett S G, Samuelsson G. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ*, 2001, 24: 141–153
- 39 Gavin N M, Durako M J. Carbon acquisition mechanisms in *Halophila johnsonii* and *Thalassia testudinum*. *Aquat Bot*, 2019, 152: 64–69
- 40 Jiang Z J. Photosynthetic responses of the seagrass *Thalassia hemprichii* to key environmental stress (in Chinese). Doctor Dissertation. Guangzhou: South China Sea Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, 2011 [江志坚. 泰来藻光合作用对关键环境因子胁迫的响应. 博士学位论文. 广州: 中国科学院南海海洋研究所, 2011]
- 41 Lee K S, Park S R, Kim Y K. Effects of irradiance, temperature, and nutrients on growth dynamics of seagrasses: A review. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2007, 350: 144–175
- 42 Jiang Z J, Huang X P, Zhang J P. Effect of environmental stress on non-structural carbohydrates reserves and transfer in seagrasses (in Chinese). *生态学报*, 2012, 32: 6242–6250 [江志坚, 黄小平, 张景平. 环境胁迫对海草非结构性碳水化合物储存和转移的影响. *生态学报*, 2012, 32: 6242–6250]
- 43 Touchette B W, Burkholder J M. Seasonal Variations in carbon and nitrogen constituents in Eelgrass (*Zostera marina* L.) as influenced by increased temperature and water-column nitrate. *Bot Marina*, 2002, 45: 23–34
- 44 Collier C J, Waycott M, Ospina A G. Responses of four Indo-West Pacific seagrass species to shading. *Mar Pollut Bull*, 2012, 65: 342–354
- 45 Lee K S, Dunton K H. Effect of *in situ* light reduction on the maintenance, growth and partitioning of carbon resources in *Thalassia testudinum* banks ex König. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1997, 210: 53–73
- 46 Kraemer G P, Hanisak M D. Physiological and growth responses of *Thalassia testudinum* to environmentally-relevant periods of low irradiance. *Aquat Bot*, 2000, 67: 287–300
- 47 Ralph P J, Gademann R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat Bot*, 2005, 82: 222–237
- 48 Li L L, Jiang Z J, Fang Y, et al. Advances in seagrass' omics research (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2020, 65: 4063–4072 [李玲兰, 江志坚, 方扬, 等. 海草组学研究进展. *科学通报*, 2020, 65: 4063–4072]

Summary for “营养盐对泰来草光合无机碳利用方式的影响研究”

Effects of nutrients on the utilization pattern of photosynthetic inorganic carbon of the tropical *Thalassia hemprichii*

Jizhen Lin^{1,4}, Zhijian Jiang^{1,2,3,4,5,6*}, Linglan Li^{1,4}, Yang Fang^{1,4}, Yunchao Wu^{1,2,3,5,6},
Songlin Liu^{1,2,3,5,6} & Xiaoping Huang^{1,2,3,4,5,6}

¹ Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

² Innovation Academy of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

³ Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China;

⁴ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

⁵ Key Laboratory of Tropical Marine Biotechnology of Hainan Province, Sanya Institute of Ocean Eco-Environmental Engineering, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572100, China;

⁶ Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biology Applications, Guangzhou 510301, China

* Corresponding author, E-mail: jiangzj1982@scsio.ac.cn

Studies on the utilization strategy of photosynthetic inorganic carbon of seagrass can reveal its ecological adaptation mechanism. *Thalassia hemprichii*, a widely distributed seagrass species in the Indo-Pacific and Atlantic coastal seas, needs to evolve several utilization patterns of inorganic carbon to adapt different environments and meet its growth, development and reproduction. However, the effect of nutrient on the photosynthetic inorganic carbon utilization strategy in seagrass is still unknown and further research is urgently needed. Therefore, using oxygen electrode technology, chlorophyll fluorescence technology, and non-invasive micro-test technology, this study examined the similarity and difference in the utilization patterns of photosynthetic inorganic carbon of *T. hemprichii* from two typical tropical seagrass beds (Tanmen, Hainan Island, and Yongxing Island, Xisha), that were affected by varying degrees of human activity. Experiments showed that the photosynthetic oxygen release rate, maximum relative electron transfer rate, and half-saturated light intensity of *T. hemprichii* in Yongxing Island waters were 24.95%, 24.54%, and 28.73% higher than the corresponding in Tanmen, Hainan Island. This indicated that the growth status of *T. hemprichii* in the waters of Yongxing Island was better with higher photosynthetic efficiency. The addition of acetazolamide (AZ) and ethoxzolamide (EZ) significantly reduced the photosynthetic oxygen release rate of *T. hemprichii*, with an insignificant difference in the inhibition between AZ and EZ. This indicated that it mainly absorbed HCO_3^- via extracellular carbonic anhydrase catalysis. Meanwhile, hydroxymethyl (Tris) inhibited the photosynthetic oxygen release of *T. hemprichii* in Tanmen by up to 100% and decreased the maximum relative electron transfer rate and the H^+ inward flow rate, implying a synergistic $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ transport mode. On the other hand, the rate of photosynthetic oxygen release and the maximum electron transfer rate of *T. hemprichii* in Xisha did not change significantly with the addition of AZ and EZ, while Tris buffer inhibited photosynthetic oxygen release by up to 100% and significantly reduced the maximum electron transfer rate. This suggested *T. hemprichii* in Xisha mainly relied on the $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ synergistic transport. Therefore, *T. hemprichii* could uptake inorganic carbon in an environment with greater anthropogenic activity, larger nutrient load and lower light availability on Hainan Island by catalyzing HCO_3^- into CO_2 with extracellular carbonic anhydrase and the $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ synergistic transport. In contrast, *T. hemprichii* in an environment with less anthropogenic activity, lower nutrient loading, and greater light availability, relied chiefly on $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ synergistic transport. Facing a relatively unfavorable high-nutrient and low-light growth environment, *T. hemprichii* could increase the photosynthetic inorganic carbon utilization strategy (such as the activity of extracellular carbonic anhydrase) to improve its utilization ability of inorganic carbon to overcome stress and growth limitation. This suggested that *T. hemprichii* could adjust its inorganic carbon utilization patterns according to its geographical environment. With the continuous development of technology, it is urgent to study the utilization mechanism of inorganic carbon of seagrass by applying seagrass omics technology and stable isotope tracing to deepen the understanding of the carbon sink function of seagrass.

seagrass, nutrients, inorganic carbon utilization, chlorophyll fluorescence technology, oxygen electrode technology, non-invasive micro-test technology

doi: [10.1360/TB-2022-0796](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0796)