

6-11

第28卷 第6期
2000年12月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 28 No. 6
Dec. 2000

[文章编号]1000-2782(2000)06-0006-06

低温弱光对黄瓜类囊体膜耦联状态的影响

陈启林¹, 山 谷², 程智慧¹, 沈允钢³

(1 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨陵 西农校区 712100; 2 西北农林科技大学 水土保持研究所, 陕西 杨陵 水保所校区 712100; 3 中国科学院 上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

[摘 要] 与低温黑暗处理相比, 低温弱光处理使黄瓜叶片的放氧活性显著降低, 2 ℃ 黑暗处理 6.5 h 后黄瓜叶片的放氧活性降低到处理前的 66%, 2 ℃ 35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 处理 6.5 h 后则降低到处理前的一 50%。研究结果显示, 在 5 ℃ 低温条件下 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照使黄瓜发生下列变化: 叶片毫秒延迟发光的慢相强度显著降低; 从叶片中提取的叶绿体的 PS I 及 PS I + PS II 的电子传递速率显著升高; 加 NH_4Cl 和加 $\text{ADP} + \text{P}_i$ 的 Hill 反应活性与基础 Hill 反应活性相差不大; 从叶片中提取的叶绿体 9-AA 荧光猝灭能力消失。以上结果证明低温下光照处理使黄瓜类囊体膜解耦联。

[关键词] 黄瓜; 低温; 弱光; 类囊体膜; 解耦联

光合器官

[中图分类号] S642.201**[文献标识码]** A

黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 是一种典型的冷敏性蔬菜作物, 10 ℃ 以下低温即可使其遭受伤害。当黄瓜叶片处于低温时, 有或无光照均可使黄瓜的光合器官受到影响。低温黑暗可使放氧系统受害^[1], 与类囊体结合的锰的数量减少^[2], 因此低温黑暗使锰从放氧系统中解离, 从而抑制放氧系统。然而这种变化只有在冰点温度附近 1~2 d 时才会发生^[3]。相比较而言, 低温弱光对光合器官的危害接近现实环境, 具有研究意义, 因为 0 ℃ 以上的低温(如 4~8 ℃) 和较弱的光照在目前发展的设施栽培中是存在的。目前有关低温弱光对冷敏性作物光合器官功能的影响的研究报道不多, Sonoike^[4]进行了较深入的研究, 认为低温弱光下 PS I 发生光抑制。Terashima 等^[5]认为黄瓜叶片在低温弱光下类囊体是解耦联的, 但仍有争议^[3]。本研究利用毫秒延迟发光等手段对低温弱光下黄瓜类囊体膜的耦联状态进行了测定研究, 证明在低温弱光下, 黄瓜类囊体膜解耦联。

1 材料与方法

1.1 材 料

材料为津春 3 号黄瓜。黄瓜经温汤浸种后播于塑料培养钵中, 两叶或三叶一心期取真叶为材料, 沿叶脉将叶片一分为二, 一半于低温弱光下, 另一半于低温黑暗下进行处理。

1.2 方 法

1.2.1 叶片放氧活性的测定 用打孔器(0.5 cm × 0.5 cm) 在处理和对照叶片的对称位

[收稿日期] 1999-12-14

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目资助(G1999011708)

[作者简介] 陈启林(1968—), 男, 助理研究员、博士。

置各取4小片圆片,放入盛有0.1 mol/L NaHCO₃的玻璃反应杯中,用极谱阳电极(Clark电极)法测定放氧速率,计算出光合强度。

1.2.2 叶绿体的提取 取两叶或三叶一心期新鲜的黄瓜叶片,加4 mL冰冷的STN(组成:0.4 mol/L蔗糖,50 mmol/L Tris, pH 7.8, 10 mmol/L NaCl),研磨,用冰冷的4层纱布过滤后,4℃下300×g离心3 min去除粗物,上清液2 000×g离心8 min,沉淀用STN悬浮,测定叶绿素含量。

1.2.3 电子传递速率的测定 用极谱阳电极法测定PS I、PS II和PS I+PS II的电子传递速率。各段电子传递速率测定反应液组成为,PS II(H₂O→pBQ):0.2 mol/L蔗糖,5 mmol/L NaCl,25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6),5 mmol/L MgCl₂,0.5 mmol/L pBQ,和相当于含有叶绿素质量浓度为30 mg/L的叶绿体;PS I(DCPIP→MV):0.2 mol/L蔗糖,5 mmol/L NaCl,25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6),5 mmol/L MgCl₂,5 mmol/L VC,150 μmol/L MV,10 μmol/L DCMU,0.2 mmol/L DCPIP,2 mmol/L NaN₃,和相当于含有叶绿素质量浓度为30 mg/L的叶绿体;全链电子传递(H₂O→MV)为0.2 mol/L蔗糖,5 mmol/L NaCl,25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6),5 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L K₄Fe(CN)₆,1 mmol/L NaN₃,和相当于含有叶绿素质量浓度为30 mg/L的叶绿体。

1.2.4 毫秒延迟发光的测定 用转盘磷光机(上海植物生理研究所研制)测定黄瓜叶片的毫秒延迟发光。

1.2.5 9-AA荧光的测定 参考杜子云、李有则的方法^[6]进行。

1.2.6 Hill反应活性的测定 参考叶济宇、钱月琴的方法进行^[7]。

2 结果与分析

2.1 低温下弱光对黄瓜叶圆片放氧活性的影响

2和8℃低温黑暗处理6.5 h使黄瓜叶片放氧活性分别下降到处理前的66%和73%,与此相比,2和8℃低温与35 μmol/(m²·s)(以光量子密度表示的光强)共同作用下,黄瓜叶片放氧活性分别下降到处处理前的21.4%和-50%(图1)。在相同的弱光强度下,温度越低,处理后期叶片放氧活性下降的程度越大。在试验中还发现,黑暗条件、低温处理过程中在叶片周围水分结冰的情况下,处理4 h后叶圆片放氧活性依然较高。可见,低温下弱光对黄瓜的光合作用有明显不利的影响。以CO₂为底物的黄瓜叶圆片的放氧过程与电子传递、光合磷酸化以及CO₂固定过程有关。由于类囊体膜内外H⁺动力势是电子传递和光合磷酸化的联系纽带,本试验主要对类囊体膜的耦联状态进行了研究。

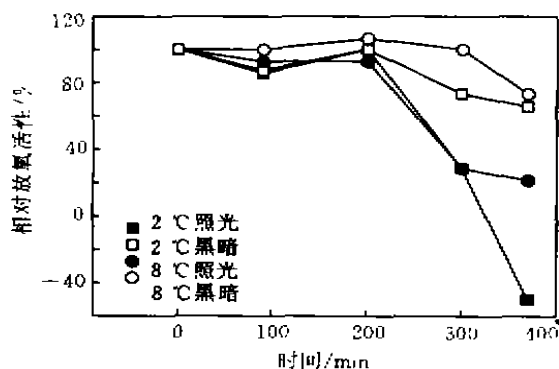


图1 低温弱光(35 μmol/(m²·s)对黄瓜叶片放氧活性的影响

2.2 低温下弱光对黄瓜电子传递速率的影响

由图 2 可以看出,低温弱光和低温黑暗均使黄瓜由 DCPIPH₂→MV 的 PS I 电子传递速率表现为相似的直线下降趋势,说明 PS I 对低温比较敏感。但处理 3 h 后,低温弱光使 PS I (H₂O→pBQ)和 PS I + PS I (H₂O→MV)的电子传递速率明显高于低温黑暗下的电子传递速率(图 2)。在未加电子传递解耦联剂的情况下电子传递速率的增加可能由两方面的原因引起,一是电子传递被真实促进,一是类囊体跨膜质子梯度降低或消失。由于低温对于黄瓜来说是一种逆境,推测电子传递速率的增加可能是弱光使低温下黄瓜跨类囊体膜 H⁺ 梯度降低或消失引起的,因此,进行了下列测定。

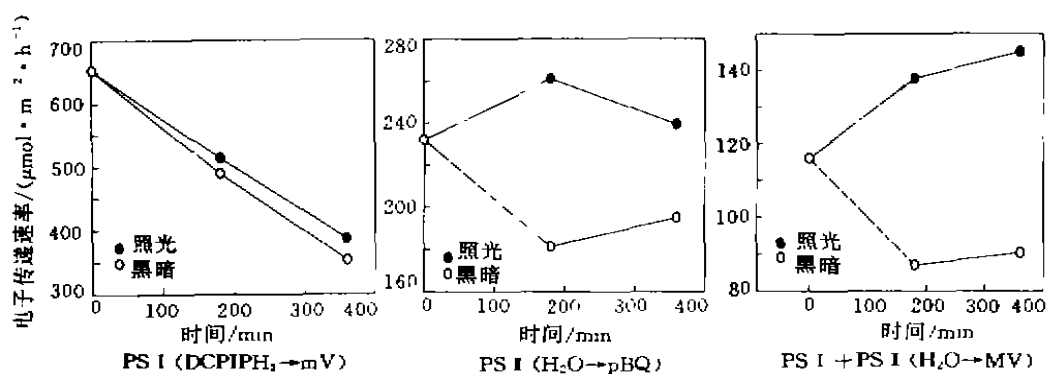


图 2 5 °C, 100 μmol/(m² · s) 低温弱光对黄瓜电子传递速率的影响

2.3 低温弱光对叶片毫秒延迟发光的影响

在毫秒范围内叶绿体的延迟发光主要是质子动力势提供能量使光系统 II 的原初反应逆转而发出的。一般认为毫秒延迟发光的快相强度主要受类囊体膜电位和水氧化时所释放的质子所影响,慢相强度主要受类囊体跨膜质子梯度所影响,因此,毫秒延迟发光的快相强度与慢相强度反映了质子动力势的变化。为了检验低温弱光条件下黄瓜类囊体膜的耦联状态,测定了 28 °C 黑暗,28 °C 100 μmol/(m² · s),5 °C 黑暗和 5 °C 100 μmol/(m² · s) 处理 5 h 后的黄瓜叶片的毫秒延迟发光强度。结果(图 3)表明,所有处理后的叶片的快相强度差异很小,但是,慢相强度在处理间差异很大。在 28 °C 下,黑暗和弱光处理的黄瓜叶片的慢相强度差异不大,分别为 9.2 和 8.9。5 °C 黑暗条件下,慢相强度降低为 28 °C 黑暗处理叶片的 60% 左右,但 5 °C, 100 μmol/(m² · s) 则使慢相强度显著降低为 1.1,为 28 °C 100 μmol/(m² · s) 处理的黄瓜叶片的 12.4%。研究还表明,7 °C 下 13 μmol/(m² · s) 处理 1 h 即可使毫秒延迟发光的慢相强度比 7 °C 黑暗条件处理 7 h 的黄瓜叶片的慢相强度降低 1/3,可见,较高温度(28 °C)下有无弱光对黄瓜叶片毫秒延迟发光的慢相强度影响不大,

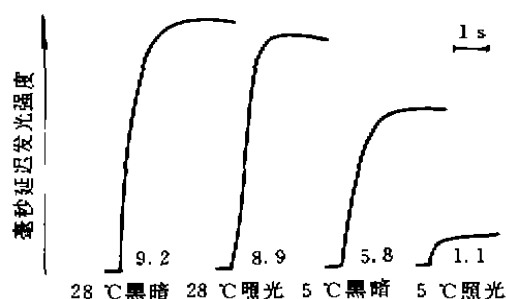


图 3 低温(5 °C)和室温(28 °C)弱光(100 μmol/(m² · s))对黄瓜叶片毫秒延迟发光的影响

但是,低温下有或无弱光对黄瓜叶片毫秒延迟发光的慢相强度影响很大。低温下单纯的低温并不造成跨类囊体膜质子梯度的降低,但弱光的存在使黄瓜类囊体跨膜质子梯度显著降低。

2.4 低温弱光对黄瓜叶绿体 Hill 反应速率的影响

光合电子传递速率与类囊体腔内的质子累积有关。消除或降低类囊体腔内部质子梯度,常常促进电子传递速率。在不加 ADP 和 P_i 时为无磷酸化的基础电子传递速率;外加 ADP 和 P_i 时可促进电子流,为耦联状态电子传递速率; NH_4Cl 可以消除跨类囊体 H^+ 梯度,加快电子传递,为解耦联的电子传递。为检验低温弱光处理对黄瓜类囊体膜内外 H^+ 梯度的影响,对从处理的黄瓜叶片中提取的叶绿体制剂的上述 3 种状态下的电子传递速率进行了测定,结果表明(图 4),从 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗下处理 5 h 的黄瓜叶片提取的破碎叶绿体解耦联后 Hill 反应速率(157.26)和耦联 Hill 反应速率(142.11)分别为基础 Hill 反应速率(82.96)的 189.57%和 171.36%,显著高于基础 Hill 反应速率,说明 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗处理的黄瓜叶片中提取的类囊体膜仍然处于耦联状态,而 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $100\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的低温弱光下叶绿体解耦联 Hill 反应和耦联 Hill 反应速率与基础 Hill 反应速率相差不大(图 4),说明类囊体膜 H^+ 梯度已经降低或消失,证明类囊体膜已解耦联。

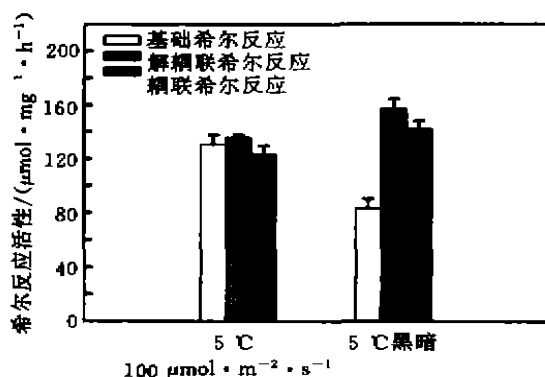


图4 $5\text{ }^\circ\text{C}$ $100\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 对黄瓜叶绿体希尔反应速率的影响

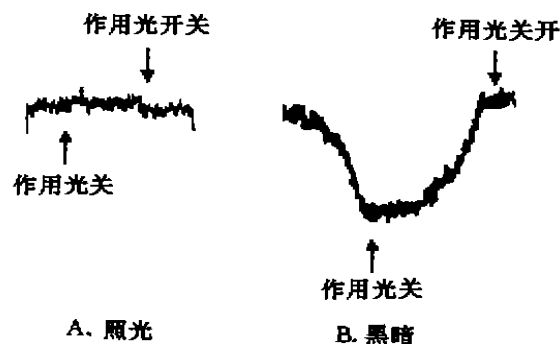


图5 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $100\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 对黄瓜类囊体光下形成的膜内外质子梯度的影响(利用 9-AA 测定)

2.5 低温弱光对黄瓜叶绿体 9-AA 荧光的影响

不带电荷的 9-AA 可以自由地通过类囊体膜。在照光下伴随着电子传递的进行,类囊体内部水相的质子浓度升高,呈酸性,进入类囊体中的 9-AA 的荧光被猝灭。因此,可以用 9-AA 光下荧光猝灭能力作为类囊体跨膜质子梯度的指标^[6]。测定黄瓜类囊体 9-AA 荧光猝灭程度的结果显示,低温黑暗处理的黄瓜叶片类囊体对 9-AA 荧光仍有较大程度的猝灭(图 5B),而低温弱光处理的叶片的类囊体对 9-AA 几乎无猝灭作用(图 5A)。说明低温黑暗处理后的黄瓜叶片类囊体在光下仍然具有质子吸收而形成跨膜质子梯度的能力,而低温弱光处理的黄瓜叶片类囊体在相同的照光条件下不能形成质子梯度,或者形成的质子梯度非常小,以致利用 9-AA 荧光猝灭难以测定。

3 讨 论

李美茹等^[8]认为黑暗条件下不同低温水平(1~7℃)均使黄瓜幼苗叶绿体全链光合电子传递活性下降,处理时间越长,电子传递活性受抑制程度越重。低温(5℃)弱光(80, 160 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)下全链电子传递活性受抑制程度大于黑暗低温处理,抑制部位主要在 PS II 的氧化侧,160 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光强加重低温对电子传递活性的抑制,光强越高,则加重的程度越高,抑制部位从 PS II 的氧化侧发展到 PS II 反应中心,在有光照参与时,PS I 的电子传递活性也受到抑制^[8]。本研究则认为,与低温黑暗相比,5℃下 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 弱光处理 3 h 和 5 h 后 PS II 与 PS I + PS II 电子传递速率是升高的,PS I 电子传递速率迅速下降,这个结果与 Terashima 等^[3]的结果相似。

与低温黑暗处理的黄瓜叶片相比,低温弱光处理后黄瓜叶片的叶圆片放氧活性丧失明显加快。可能的原因是低温弱光使黄瓜类囊体膜解耦联,因为电子传递速率测定结果表明低温弱光处理后电子传递活性并未丧失。关于低温弱光下体内的类囊体膜是否解耦联问题一直很有争议。Terashima 等^[3]通过测定黄瓜叶片体内由非光化学荧光猝灭(qN)表示的类囊体膜的能化很大程度的下降、加入 DCCD 后使荧光猝灭得到恢复,认为低温弱光处理以后体内的类囊体膜处于解耦联状态。Oxborough 等^[5]则认为非光化学荧光猝灭不是衡量类囊体膜质子梯度的好方法,因为除质子梯度外,还有其他因素诱导非光化学荧光猝灭^[9],尤其是在低光强下^[10]。Oxborough 等^[5]认为电色谱法可直接测量类囊体膜质子梯度,并用电色谱法证明低温照光处理并不导致光合磷酸化的解耦联,但对电色谱的解释比较复杂,因为类囊体膜上存在 K^+ 和 Cl^- 离子通道,对电色谱的解释应当反映这些因素^[9]。在毫秒范围内叶绿体的延迟发光主要是质子动力势提供能量使光系统 II 的原初光化学反应逆转而发出的,一般认为毫秒延迟发光的快相强度受质子动力势的膜电位所影响,慢相强度主要受质子动力势的质子梯度所影响^[11]。用毫秒延迟发光的方法研究表明,黄瓜叶片在低温弱光下慢相显著低于低温黑暗处理的叶片;9-AA 荧光猝灭的试验结果表明低温弱光处理使跨类囊体膜的质子吸收能力缺乏,证明低温弱光使跨类囊体膜质子梯度降低。至于活体条件下类囊体膜 H^+ 梯度降低的原因,有学者认为可能是 CF_1 脱落造成的^[3],但仍有待于检验。如果低温弱光下类囊体解耦联的原因是 CF_1 脱落,那么引起 CF_1 脱落的因素又是什么? 尚待进一步研究。

致谢:本研究一些实验在中国科学院上海植物生理生态研究所光合作用开放实验室进行,特此致谢。

[参考文献]

- [1] Terashima I. Effects of leaf chilling on thylakoid functions, measured at room temperature, in *Cucumis sativus* L. and *Oryza sativa* L. [J]. Plant Cell Physiology, 1989, 30: 841—850.
- [2] Margulies M M. Effect of cold-storage of bean leaves on photosynthesis reactions of isolated chloroplasts. Inability to donate electrons to photosystem I and relation to manganese content [J]. Biochim Biophys Acta, 1972, 267: 96—103.
- [3] Terashima I, Kashino Y, Katoh S. Exposure of leaves of *Cucumis sativus* L. to low temperatures in the light

- causes uncoupling of thylakoid. 1. Studies with isolated thylakoid[J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32: 1267—1274.
- [4] Sonoike K. Selective photoinhibition of Photosystem I in isolated thylakoid membranes from cucumber and spinach[J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 825—830.
- [5] Oxborough K, Ort D R. In situ evidence that chilling in the light does not cause uncoupling of photophosphorylation or detachment of coupling factor in chilling-sensitive plants[J]. *Photosynthesis Research*, 1995, 43: 95—105.
- [6] 杜子云, 李有则. 对用 9-AA 测定类囊体膜内外质子梯度之可行性分析[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1985, 17: 363—369.
- [7] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 104—106.
- [8] 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 低温光照对黄瓜叶绿体电子传递速率的影响[J]. *植物生理学报*, 1993, 19(1): 23—30.
- [9] Schonknecht G, Hedrich R, Junge W, et al. A voltage-dependent chloride channel in the photosynthetic membrane of a higher plant[J]. *Nature*, 1992, 356: 589—592.
- [10] Quick W P, Stitt M. An examination of factors contributing to nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 977: 287—296.
- [11] 沈允钢, 施教耐, 许大全. 动态光合作用[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 71—72.

Effect of low temperature and low light treatment on the coupling state of cucumber thylakoid membrane

CHEN Qi-lin¹, SHAN Lun², CHENG Zhi-hui¹, SHEN Yun-gang³

(1 College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100, China; 2 Institute of Soil and Water Conservation, Yangling, Shaanxi, 712100, China; 3 Shanghai Institute of Plant Physiology, Shanghai, 200032, China)

Abstract: In contrast to treatment with low temperature and darkness, treatment of cucumber leaves with low temperature and low light reduced oxygen evolution activity dramatically. While 2 °C & darkness for 6.5 h reduced cucumber leaf oxygen evolution activity to 66% of pre-treatment, 2 °C treatment in 35 μmol/(m² · s) reduced to —50% of that of the control. The results indicated that illumination with 100 μmol/(m² · s) superimposed on 5 °C low temperature made millisecond delayed emission (ms-DLE) from cucumber leaf decrease significantly, that the chloroplasts isolated from such treated leaves showed electron transport rate of PS I and PS I + PS II increased. Their uncoupled Hill reaction activity with NH₄Cl was nearly equal to basic Hill reaction activity without NH₄Cl and coupled Hill reaction activity with addition of ADP + Pi. In addition, chloroplasts from thus treated leaves almost lost the ability to quench 9-AA fluorescence. It is concluded that thylakoids from cucumber leaves treated with low temperature and low light were in uncoupled state.

Key words: cucumber (*Cucumis sativus* L.); low temperature; low light; thylakoid membrane; uncoupling