

超氧阴离子诱导的叶绿素荧光猝灭*

徐志防** 罗广华 柯德森 陈金婷 陈贻竹 王爱国

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 分别通过黄嘌呤 (X) 与黄嘌呤氧化酶 (XO) 反应和甲基紫金 (MV) 的作用, 观察了 $O_2^{\cdot -}$ 诱导莴苣叶绿体的叶绿素荧光猝灭过程. 结果表明, $O_2^{\cdot -}$ 的产生明显使光化学猝灭 (qP) 和非光化学猝灭 (qN) 增加. 叶绿体内 SOD 被 DDC 抑制后, X+XO 诱导的叶绿素荧光猝灭过程中, qP 下降, qN 上升; MV 诱导的叶绿素荧光猝灭过程中, qP 上升幅度不大, qN 增加不明显. 当碳代谢被碘乙酰胺 (JAA) 抑制后, qP 下降, qN 上升. 解偶联剂 NH_4Cl 增加质子跨类囊体膜的通透性, 导致 qP 增加和 qN 降低, 加入 MV 后 qP 和 qN 增加不明显. 分析认为, $O_2^{\cdot -}$ 的产生和及时被清除对保持光合电子传递和增加跨膜 ΔpH 有很重要的作用, 有利于叶绿体吸收的光能得到转化和耗散, 在一定程度上减轻过量光能引起的光抑制损伤.

关键词 超氧阴离子, 叶绿素荧光猝灭, 光化学猝灭, 非光化学猝灭, 叶绿体

学科分类号 Q946

环境变化使植物不同程度地面临由超氧阴离子 ($O_2^{\cdot -}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、单线态氧 (1O_2) 和羟自由基 ($\cdot OH$) 等活性氧引发的氧化胁迫, 一方面叶绿素吸收过量光能后, 叶绿体内活性氧的增加对光合机构产生破坏作用, 成为植物发生光抑制的重要原因^[1], 另一方面光合机构又能够通过活性氧的产生和分解调节光能的利用^[2,3]. 植物对光能的利用主要包括光化学反应转化光能和非光化学热耗散以及叶绿素荧光形式耗散过剩光能, 光化学反应和热耗散的变化会引起叶绿素荧光猝灭过程的相应变化. 叶绿素荧光猝灭由光化学猝灭和非光化学猝灭两个过程构成, 光化学猝灭与从光系统 II (PS II) 电子传递和初始电子受体 Q_A 的氧化还原有关, Q_A 的氧化还原所涉及的电子传递和激发能的转移与活性氧的产生密切相关. 最近的研究主要集中于光系统 I (PS I) 电子传递中产生活性氧的 Mehler 反应, 此反应在减轻植物光损伤方面有不同的看法^[4]. 本文在研究了 H_2O_2 、 1O_2 对叶绿素荧光影响的基础上^[5,6], 继续探讨 $O_2^{\cdot -}$ 在光能利用中的作用, 结合相关的抑制剂观察 $O_2^{\cdot -}$ 诱导的叶绿素荧光猝灭过程.

1 材料与方法

1.1 材料制备

采用莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 叶片制备叶绿体, 制备方法参照文献 [7], 得到的叶绿体完整率

在 60%~70% 之间, 叶绿素荧光测定前冰浴保存.

1.2 实验仪器

台式离心机、脉冲调制叶绿素荧光仪、光量子计、751G 分光光度计、恒温循环水浴、石英卤灯等.

1.3 实验方法

1.3.1 叶绿素荧光测定: 使用脉冲调制叶绿素荧光仪 PAM 101/102/103 (H. Walz, Effeltrich, Germany) 在 25℃ 条件下测定叶绿体叶绿素荧光猝灭过程. 悬浮叶绿体 (20 mg/L) 置于测定室 (KS 101, Walz), 搅拌速度 150 r/min, 叶绿体先暗适应 3 min, 然后打开 1.6 kHz 的弱测量光 (PAM 101, $0.04 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) 测 F_o . 再加上饱和光脉冲 (Schott lamp KL1500 FL103, $7900 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 脉冲时间 2 s) 使荧光上升到 F_m , 当荧光从 F_m 快回落到 F_o 时, 立即加上连续的作用光 (石英卤灯, $100 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) 和 PAM 102 提供的 100 kHz 测量光 (提高信噪比稳定输出信号), 荧光上升到 F 同时每间隔 30 s 加上饱和光脉冲, 饱和光脉冲期间荧光上升到 F'_m , 作用光期间荧光 F 不断下降直到稳定, 然后关闭作用光和 PAM 102, 荧光下降到 F'_o . 光化学猝灭 (photochemical

* 广东省自然科学基金资助项目 (000990).

** 通讯联系人.

Tel: 020-85232626-405, E-mail: xuzf@scib.ac.cn

收稿日期: 2001-05-28, 接受日期: 2001-08-31

quenching, qP) 和非光化学猝灭 (non-photochemical quenching, qN) 系数计算公式如下:

$$qP = (F_m' - F) / (F_m' - F_o'),$$

$$qN = 1 - (F_m' - F_o') / (F_m - F_o).$$

1.3.2 叶绿素荧光猝灭过程中 O_2^- 的产生和抑制剂的加入: 黄嘌呤 (xanthine, X) + 黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 反应在一定条件下产生 O_2^- , 荧光测定前叶绿体悬浮液中含 0.2 mmol/L 黄嘌呤, 测定过程中加上作用光 1.5 min 后接着加入 XO (0.02 U/ml), 在荧光猝灭过程中产生 O_2^- , 观察光化学和非光化学猝灭的变化. 通过在荧光猝灭过程中加入 0.5 mmol/L 的甲基紫金 (methyl viologen, MV) 间接产生 O_2^- 以观察荧光猝灭的变化. 以下抑制剂在测定前加入到悬浮叶绿体中, 二乙基二硫代氨基甲酸钠 (sodium diethyldithiocarbamate, DDC) 抑制超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 碘乙酰胺 (iodoacetamide, JAA) 抑制碳代谢中的关键酶, NH_4Cl 使光合磷酸化反应与光合电子传递解除偶联, 抑制剂浓度为 1 mmol/L DDC; 5 mmol/L JAA; 2 mmol/L NH_4Cl , 以未加抑制剂的作对照.

2 结 果

2.1 X+ XO 反应诱导的叶绿素荧光猝灭过程

图 1 反映叶绿素荧光猝灭的详细过程. 打开弱测量光, 荧光上升到 F_o , PS II 反应中心全部开放,

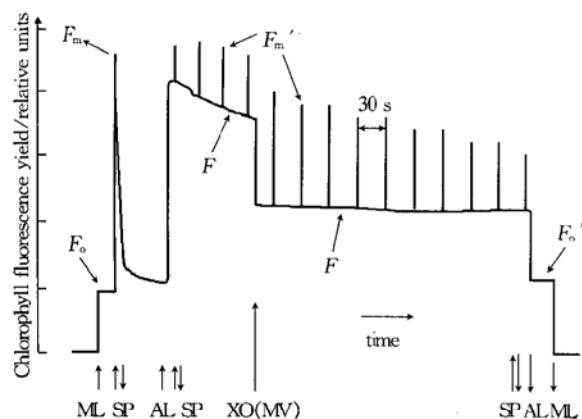


Fig. 1 Schematic representation of the course of chlorophyll fluorescence quenching

F_o : dark-adapted minimal fluorescence; F_o' : light-adapted minimal fluorescence; F_m : dark-adapted maximal fluorescence; F_m' : light-adapted maximal fluorescence; F : actual fluorescence under illumination at any time; ML: weak measuring light; SP: saturating light pulse; AL: continuous actinic light; XO: xanthine oxidase; MV: methyl viologen. For other conditions, see **Materials and Methods**.

Q_A 处于完全氧化状态, 随后加上饱和光脉冲, 荧光上升到 F_m , PS II 反应中心完全关闭, Q_A 全部被还原. 紧接着荧光快速下降, 当加上连续的作用光时, 荧光又迅速上升, 然后缓慢下降, 此过程持续一段时间将会稳定 (图 1 中未示), 这一现象称为 Kautsky 效应^[8]. 在荧光开始下降的同时间隔加上饱和光脉冲, 可以将猝灭过程中各时期的 qP 和 qN 区分, 饱和光脉冲期间荧光上升到 F_m' . 在荧光下降过程中加入 XO 或 MV, 立即引起荧光快速降低, 荧光降低主要由 qP 增加引起, 随着 O_2^- 的产生和分解, qP 和 qN 继续变化, 关闭饱和光脉冲和作用光后荧光下降到 F_o' .

通过计算将图 1 转换得到图 2a 或图 3a. 图 2a 中加入 XO 产生 O_2^- , O_2^- 参与 PS II 电子传递, 使类囊体腔酸化而产生较高的跨类囊体膜质子梯度 (ΔpH), 导致 qP 与 qN 均明显上升. 图 2b 表明叶绿体经 DDC 处理后, 体内 SOD 被抑制, O_2^- 的产生和清除失衡, 电子传递受阻, 加入 XO 引起 qP 下降、qN 上升. 图 2c 中 JAA 抑制了 CO_2 的固定, 电子传递受限制, 一旦产生 O_2^- , 导致 qP 下降, 此时吸收的光能相对变得过剩, 只能以提高 qN 的方式耗散过剩光能, 使叶绿体避免受到光损伤.

2.2 MV 诱导的叶绿素荧光猝灭过程

在光合作用研究中 MV 经常作为外加 O_2^- 的来源, 主要是由于它在 PS I 处接受 PS II 传来的大部分电子, 再将电子传递给 O_2 产生 O_2^- . 对比图 3a 和图 3b, DDC 对 MV 诱导叶绿素荧光猝灭过程产生较大影响, 在未加入 MV 之前, SOD 被 DDC 抑制导致 Mehler 反应中 O_2^- 的积累, 短时间内电子传递水平增高, 使得初期 qP 处于较高状态; 加入 MV 后, 对照中 qP 上升明显, 这里既有 MV 接受电子的原因, 又有分解 O_2^- 使电子传递加速的作用; 图 3b 中 qP 升高幅度不大, 只有 MV 接受电子的作用; 相比而言, 图 3a 和图 3b 中 qN 的变化不明显. 图 3c 中, 由于 NH_4Cl 解除光合磷酸化反应与光合电子传递的偶联, 使得电子传递加速, 因而 qP 始终较高, 即使加入 MV 产生 O_2^- , 电子传递也不能再明显加速, 并且由于 NH_4Cl 增大质子跨类囊体膜的通透性导致 ΔpH 降低, 使 qN 处于较低水平^[9].

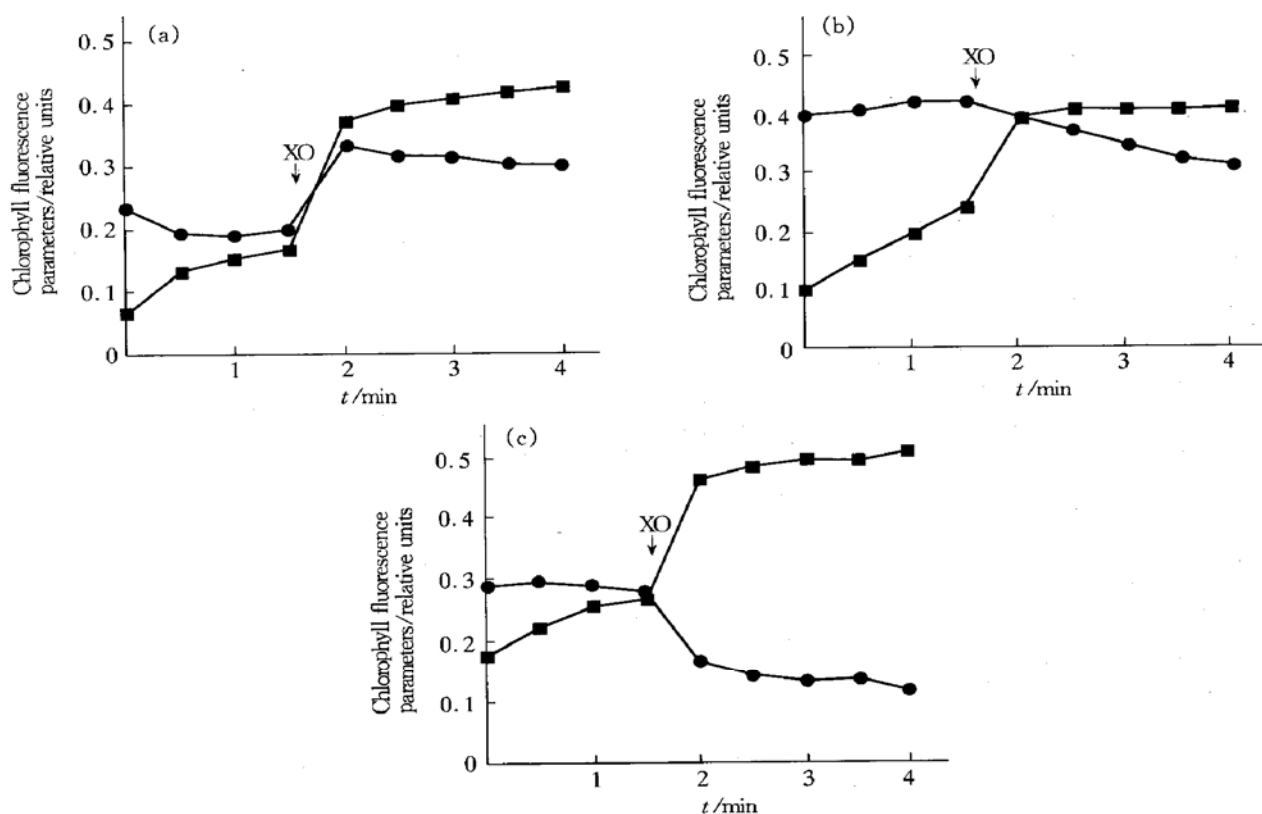


Fig 2 The quenching of chlorophyll fluorescence induced by X+ XO reaction in lettuce chloroplasts

(a) control; (b) 1 mmol/L DDC treatment; (c) 5 mmol/L JAA treatment. ●—●: qP; ■—■: qN.

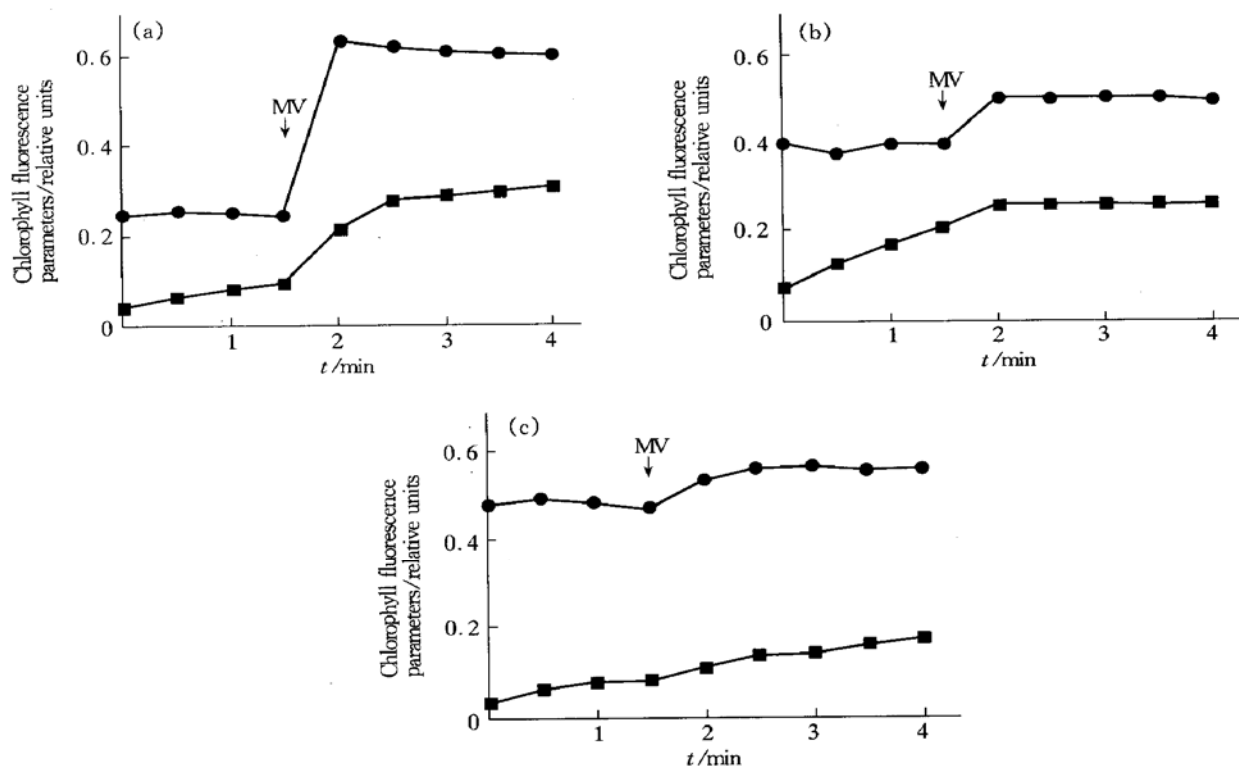


Fig 3 The quenching of chlorophyll fluorescence induced by MV in lettuce chloroplasts

(a) control; (b) 1 mmol/L DDC treatment; (c) 2 mmol/L NH_4Cl treatment. ●—●: qP; ■—■: qN.

3 讨 论

光照下叶绿体中活性氧的产生是光合电子传递链不可避免的结果^[1, 2, 10], PS II 中 H_2O 裂解产生 4 个电子, 传给 PS I 附近的 O_2 , 发生光还原反应产生 O_2^- , 这即通常所称的 Mehler 反应. O_2^- 在 SOD 的作用下发生歧化反应产生 H_2O_2 , 再经过抗坏血酸过氧化物酶清除系统的作用, H_2O_2 还原成 H_2O , 这一系列反应总称为水-水循环或假环式电子流, 它在光能转化和过剩光能耗散中起着重要作用^[10, 11]. 在本文结果中, 当加入 XO 或 MV 产生 O_2^- , 光化学猝灭明显增加, 表明光能转化作用增强, 这主要是由于 O_2^- 的产生和清除, 以及 H_2O_2 的产生和分解, 保持了光合电子流的顺利传递, H_2O_2 同 MV 一样起着希尔试剂的作用, 即在光合电子传递中接受电子^[5, 8], 在整个光合电子链中大约 10%~30% 的电子是通过这种方式传递的; 另一方面非光化学猝灭的增加, 说明光能耗散作用增强. 研究表明, 依赖能量的非光化学猝灭增强的一个重要原因是跨膜 ΔpH 的升高^[9, 12], O_2^- 的产生和随后的氧化还原反应具有增高 ΔpH 的作用^[13~15]. NH_4Cl 解除跨膜 ΔpH 作用也从另一方面说明, qP 的增加确实是由于 O_2^- 的产生促进了电子传递, qN 的上升是 ΔpH 增大所致.

当叶绿体中 SOD 活性被抑制, O_2^- 不能及时被清除, 即使初期还看不到破坏作用, 甚至还能保持相当高的光化学猝灭, 但经过长时间积累就会导致光抑制的发生^[16, 17]. 图 2b 和图 3b 之间的差异在于 MV 本身可以接受电子, 因而保持了一定的电子传递. 光合电子传递的最终结果是使光能转化为化学能, 通过 CO_2 碳代谢贮存起来, 当碳代谢中的关键酶被 JAA 抑制后, qP 必然降低, 与此相对应非光化学猝灭保护作用被迫增强.

叶绿素荧光猝灭是一个十分复杂的过程, 活性氧参与其中的作用机理还远未阐明. 就目前所知, 在光诱导的依赖氧和能量的荧光猝灭中, O_2 光还原为 O_2^- 起关键性作用, 它是整个水-水循环中的限速步骤^[11], O_2 接受 PS II 传来的电子, 不仅可以减轻 PS II 受到过量光能的激发压力^[15], 而且还可以通过 O_2^- 和 H_2O_2 的产生与分解降低活性氧的积累, 避免活性氧对叶绿体中各种酶的破坏作用, 同时减少它们转变为更具毒害作用的 $\cdot\text{OH}$ 和 $^1\text{O}_2$ 的机会^[18]. 更重要的是以 O_2^- 介导的电子传递增加跨膜

质子梯度, 促进过量光能的热耗散, 由此降低叶绿体发生光抑制损伤的风险, 光保护作用得到加强^[10].

参 考 文 献

- Asada K. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: Scandalios J G, ed. *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. New York: CSHL Press, 1992. 173~192
- Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant*, 1994, **92** (4): 696~717
- Foyer C H, Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol*, 2000, **146** (3): 359~388
- Wiese C, Shi L, Heber U. Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation. *Physiol Plant*, 1998, **102** (3): 437~446
- 徐志防, 罗广华, 王爱国, 等. 强光及外源活性氧对莴苣叶绿素荧光的影响. *植物生理学报*, 1998, **24** (3): 279~284
- Xu Z F, Luo G H, Wang A G, et al. *Acta Phytophysiol Sin*, 1998, **24** (3): 279~284
- 徐志防, 罗广华, 王爱国, 等. 强光及活性氧对大豆光合作用的影响. *植物学报*, 1999, **41** (8): 862~866
- Xu Z F, Luo G H, Wang A G, et al. *Acta Botanica Sinica*, 1999, **41** (8): 862~866
- 叶济宇, 赵海英. 完整叶绿体的快速制备及其完整率的测定. *植物生理学通讯*, 1982, **18** (1): 59~61
- Ye J Y, Zhao H Y. *Plant Physiol Commun*, 1982, **18** (1): 59~61
- Neubauer C, Schreiber U. Photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence induced by hydrogen peroxide. *Z Naturforsch*, 1989, **44c** (3/4): 262~270
- Walters R G, Horton P. Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res*, 1991, **27** (2): 121~133
- Niyogi K K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 333~359
- Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 601~639
- Quick W P, Stitt M. An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **977** (3): 287~296
- Schreiber U, Neubauer C. O_2^- dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res*, 1990, **25** (3): 279~293
- Schreiber U, Reising H, Neubauer C. Contrasting pH-optima of light drive O_2^- and H_2O_2 reduction in spinach chloroplasts as measured via chlorophyll fluorescence quenching. *Z Naturforsch*, 1991, **46c** (7/8): 635~643
- Ott T, Clarke J, Birks K, et al. Regulation of the photosynthetic electron transport chain. *Planta*, 1999, **209** (2): 250~258
- Richter M, Rühle W, Wild A. Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition. II. The involvement of toxic oxygen species. *Photosynth Res*, 1990, **24** (3): 237~243
- Tschiersch H, Ohmann E. Photoinhibition in *Euglena gracilis*: Involvement of reactive oxygen species. *Planta*, 1993, **191** (3): 316~323

- 18 王爱国. 植物的氧代谢. 见: 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学 (第二版). 北京: 科学出版社, 1998. 366~ 389

Wang A G. The metabolism of oxygen in plants. In: Yu S W eds. Plant Physiology and Molecular Biology, 2nd. Beijing: Science Press, 1998. 366~ 389

Chlorophyll Fluorescence Quenching Induced by Superoxide Anion^{*}

XU Zhi-Fang^{**}, LUO Guang-Hua, KE De-Sen, CHEN Jin-Ting, CHEN Yi-Zhu, WANG Ai-Guo

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract By the action of xanthine - xanthine oxidase reaction ($X+ XO$) as well as methyl viologen (MV) respectively, it was studied that chlorophyll fluorescence quenching induced by superoxide anion in lettuce (*Lactuca sativa* L.) chloroplasts. The results showed that the production of superoxide anion increased photochemical quenching (qP) and non-photochemical quenching (qN) evidently. As superoxide dismutase (SOD) was inhibited by sodium diethyldithiocarbamate (DDC) in chloroplasts, qP decreased and qN increased in the quenching of chlorophyll fluorescence induced by $X+ XO$, while the increasing extent of qP was not great and qN rose insignificantly in the quenching of chlorophyll fluorescence induced by MV. When iodoacetamide (IAA) inhibited carbon assimilation, qP decreased and qN increased. Uncoupler NH_4Cl promoted the permeability of across thylakoid membrane proton, which made qP rising and qN decreasing. Under uncoupling conditions, MV raised qP and qN insignificantly. It was analyzed that the producing and scavenging of superoxide anion in time was important to maintain photosynthetic electron transport and to improve transmembrane ΔpH . It contributed to the conversion and dissipation of photon energy absorbed in chloroplasts, and reduced the harm of photoinhibition to a certain extent led by excess photon energy.

Key words superoxide anion, chlorophyll fluorescence quenching, photochemical quenching, non-photochemical quenching, chloroplasts

^{*} This work was supported by a grant from the Natural Sciences Foundation of Guangdong Province (000990).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-20-85232626-405, E-mail: xuzf@scib.ac.cn

Received: May 28, 2001 Accepted: August 31, 2001