

拟南芥叶黄素缺失突变体叶绿素荧光猝灭的特性*

彭长连** 林桂珠

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 研究了3个叶黄素组分缺失的拟南芥核基因突变体, npq1 (缺乏玉米黄质 Z 和单环氧玉米黄质 A)、lut₂ (缺乏 lutein) 和 lut₂npq1 (双突变体, 同时缺 Z 和 lutein), 及其对照野生型 (WT) 在强光诱导下叶绿素荧光猝灭的特性. 与 WT 相比, 3个突变体的叶绿素 a/b 没有明显的差异, F_v/F_m 则有不同幅度的增加, 缺乏 lutein 的突变体 lut₂ 和 lut₂npq1 的叶黄素循环库 (V+ A+ Z) 显著增大. 缺乏 Z 的突变体 npq1 和 lut₂npq1 在强光下, 荧光的非光化学猝灭 (NPQ) 的诱导受到明显抑制, lut₂ 的 NPQ 形成也受到部分抑制. 强光处理 9 min 后, 3个突变体和 WT 的 NPQ 大小顺序为 WT > lut₂ > npq1 > npq1-lut₂. 强光诱导过程中突变体的光化学猝灭 (qP) 都小于 WT. 强光下突变体显示较弱的抗光抑制能力, 其抗光抑制能力的强弱顺序为: WT > lut₂ > npq1 > lut₂npq1. 结果表明叶黄素循环不但与 NPQ 的形成直接相关也与 qP 有关.

关键词 拟南芥, 突变体, 叶黄素循环, qP, 非光化学猝灭 (NPQ)

学科分类号 Q946

植物叶片吸收的光能常常会超过其光合器本身所能利用的量, 而干旱、盐渍、温度胁迫、营养亏缺等逆境条件又会进一步限制植物利用光能^[1]. 吸收过剩的光能可以导致光合效率的持续下降 (光抑制), 光合器已发展了多种防御机制防止过量光的伤害, 其中依赖叶黄素循环的无害热耗散过剩光能途径, 被认为是一种重要的保护机制^[2].

叶黄素是 α 或 β 胡萝卜素的氧化产物, 叶黄素循环是指由玉米黄质 (zeaxanthin, Z)、单环氧玉米黄质 (antheraxanthin, A) 和双环氧的紫黄质 (violaxanthin, V), 在强光条件下由紫黄质脱环氧化酶 (VDE) 催化的 V \rightarrow A \rightarrow Z 脱环氧化反应过程, 以及在黑暗或弱光下由玉米黄质环氧化酶 (ZE) 催化的 Z \rightarrow A \rightarrow V 环氧化反应相互转化的作用机制^[3,4]. 大量的研究表明, 叶黄素循环与非光化学猝灭 (NPQ) 形成密切相关, 如 NPQ 与 Z 的含量有很好的线性相关^[5], 但叶黄素循环调节能量耗散的机制仍不甚清楚. 近年来, 应用分子生物学手段构建了几个缺失叶黄素循环组分的拟南芥突变体, 这些突变体的应用, 使人们有可能更加深入和系统地研究高等植物叶黄素循环及其不同组分的光破坏防御机制及其生理功能^[6]. 本文研究了缺乏叶黄素组分 Z 和 A 的拟南芥突变体 npq1、缺乏另一种叶黄素组分 lutein 的突变体 lut₂, 以及 Z 和

lutein 都缺乏的双突变体 lut₂npq1, 在强光下叶绿素荧光的猝灭以及光抑制特性, 为进一步深入探讨植物光破坏的防御机制奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟南芥核基因突变体 npq1: 缺失 VDE 基因, V 不能脱环氧化为 A 和 Z; lut₂: 不能合成类囊体中含量最高的叶黄素组分 lutein; lut₂npq1: 双突变体, Z 和 lutein 都不能形成; WT: 未经过分子改造的野生型对照. 图 1 是拟南芥类胡萝卜素的合成途径^[7], 从图 1 中可以看出, 叶黄素不同组分的相互转换过程以及不同突变体在叶黄素合成中的抑制位点.

拟南芥突变体及 WT 种子由 Pogson 和 Niyogi 两位博士提供, 种子发芽后种植于培养箱, 光强 230 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光周期 16 h (光) / 8 h (暗), 日夜温度为 22 $^{\circ}\text{C}$ (日) / 17 $^{\circ}\text{C}$ (夜), 生长 4~5 周后用于实验.

* 国家自然科学基金资助项目 (30270125), 中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (中国科学院华南植物研究所所长基金) 和国家重点基础研究规划资助项目 (973) (G1998010100).

** 通讯联系人.

Tel: 020-85232940, E-mail: pengchl@scib.ac.cn

收稿日期: 2002-10-08, 接受日期: 2002-11-29

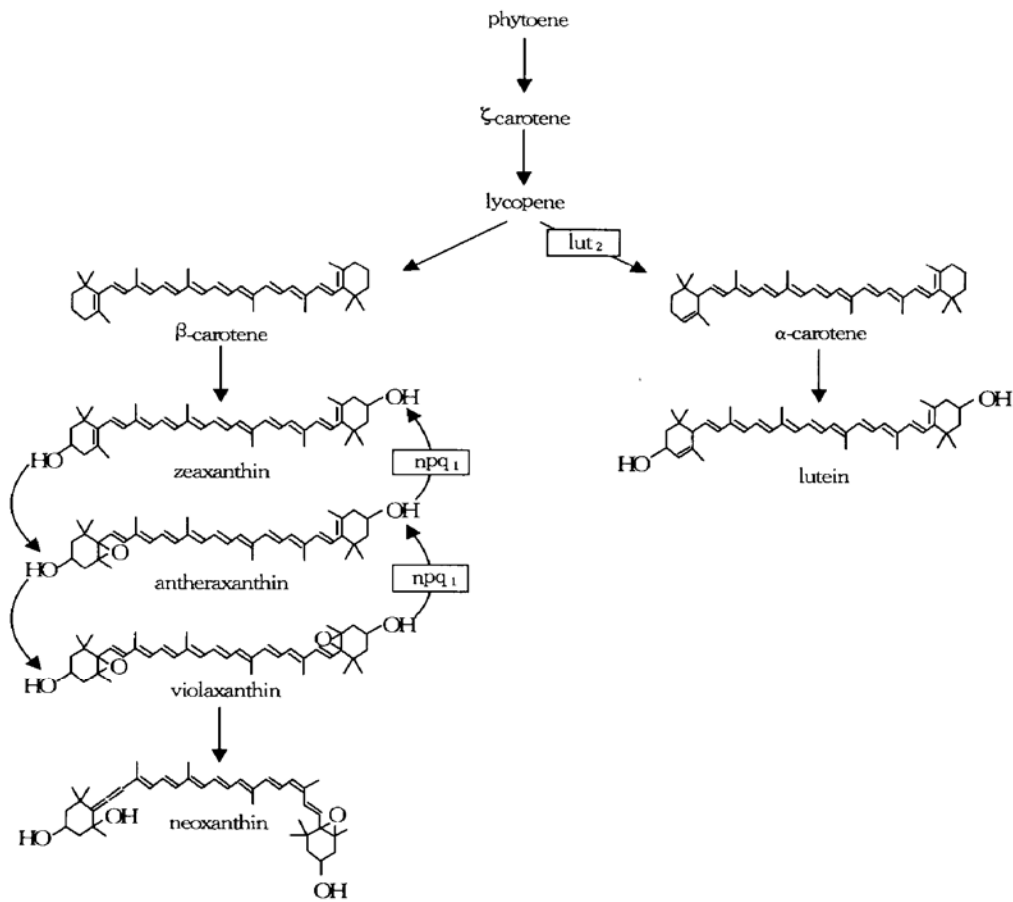


Fig. 1 Carotenoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. The defects in xanthophyll metabolism in the npq1 and lut2 are indicated^[7].

1.2 方法

1.2.1 叶绿素荧光的测定: 使用脉冲调制叶绿素荧光仪 PAM 101/100/103 (H. Walz, Effeltrich, Germany) 在 25 °C 条件下测定叶绿素荧光猝灭过程, 叶片先暗适应 10 min, 以 1.6 kHz 的弱测量光 (PAM 101, 光强 $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 测定 F_0 , 再加上饱和光脉冲 (Schott lamp KL 1500 FL 103, 光强 $8\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 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_0 时, 立即加上连续的作用光 (Schott lamp KL 1500, 光强 $2\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 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 加上饱和脉冲, 饱和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 (F_s), 然后关闭作用光和 PAM 102, 荧光下降到 F'_0 . 光化学猝灭 (qP) 和非光化学猝灭 (NPQ) 系数计算公式如下:

$$\text{qP} = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$$

$$\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m$$

1.2.2 光合色素的分析: 色素的提取和高效液相层析 (HPLC) 参照 Gilmore 和 Yamamoto 的方法^[8], 使用 Waters HPLC 仪 (Waters Milford USA).

1.2.3 强光处理: 取完全展开的成熟叶片 (3~4 位叶) 悬浮于 25 °C 的水浴中由 HMI Universal Spotlight (Model HMI 575 W/GS Osram) 光源提供 $2\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光强, 叶片与光源之间放置一块滤光片 (Schott 115, Tempax) 以隔热, 检测经不同时间强光处理叶片的 F_v / F_m 以及在弱光 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下恢复 2 h 的 F_v / F_m .

2 结 果

2.1 强光诱导的拟南芥突变体叶绿素荧光猝灭过程

图 2 是拟南芥 WT 和不同叶黄素组分缺失的突变体叶绿素荧光猝灭的详细过程, 打开弱测量光, 荧光上升到 F_0 , 光系统 II (PS II) 反应中心全部开放, 质体醌 (QA) 处于完全氧化状态, 随后加上饱和脉冲光, 荧光上升到 F_m , PS II 反应中

心完全关闭, Q_A 全部被还原. 随后荧光快速下降, 当加上连续的作用光时, 荧光又马上上升, 然后缓慢下降, 直到稳定, 这个缓慢下降的过程叫做叶绿素荧光猝灭过程. 由图 2 可见, 与 WT 相比, 拟南芥双突变体 $lut_2 npq_1$ 的猝灭几乎完全被抑制, 而另外两个突变体 npq_1 和 lut_2 的猝灭被部分抑制, npq_1 的猝灭被抑制程度较 lut_2 大.

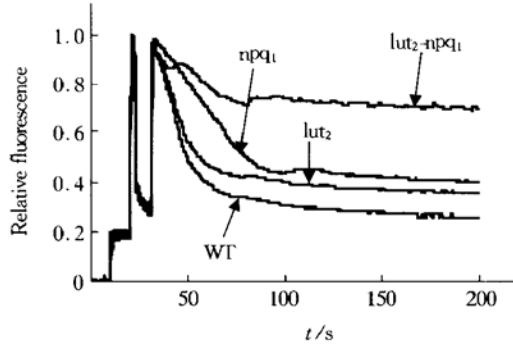


Fig. 2 Schematic representation of the course of chlorophyll fluorescence quenching induced by high light ($2\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in leaves of *Arabidopsis thaliana* mutants and wildtype

2.2 强光诱导下叶绿素荧光猝灭组分的变化

当加上连续光化光的同时再加上饱和脉冲光, 这时的叶绿素荧光猝灭可分为光化学猝灭 (qP) 和非光化学猝灭 (NPQ) 两部分, qP 反映了 PS II 受体 Q_A 的快速还原, 然后重新氧化, 并活化暗反应酶系统的过程^[9], 而 NPQ 则表示植物无害化热耗散过剩激发能的能力^[2]. 图 3 是强光下拟南芥突变体及 WT 的 qP 、 NPQ 变化过程. 随着照光时间的延长, 所有突变体及 WT 的 qP 都下降 (图 3a), 强光下照光 9 min 后, WT 的 qP 与照光前相比下降了 70%, 而突变体 lut_2 、 npq_1 和 $lut_2 npq_1$ 的 qP 则分别下降了 77.7%、88.6% 和 81.1%. 除开始照光的 2 min 外, 其他照光时间 qP 的大小顺序都为 $WT > lut_2 > npq_1$, 强光下 NPQ 的变化趋势则与 qP 相反, 都呈上升的趋势 (图 3b). 3 个突变体和 WT 的 NPQ 都是在开始照光的 1 min 内有一个快速上升的过程, 然后则缓慢上升. 其中 WT 上升最快, 其次为 lut_2 , $lut_2 npq_1$ 上升最慢. 强光诱导 9 min 后, WT、 lut_2 、 npq_1 和 $lut_2 npq_1$ 的 NPQ 值从照光前的 0 分别上升至 2.44、2.18、1.33 和 1.07. 其 NPQ 大小顺序为 $WT > lut_2 > npq_1 > npq_1 lut_2$.

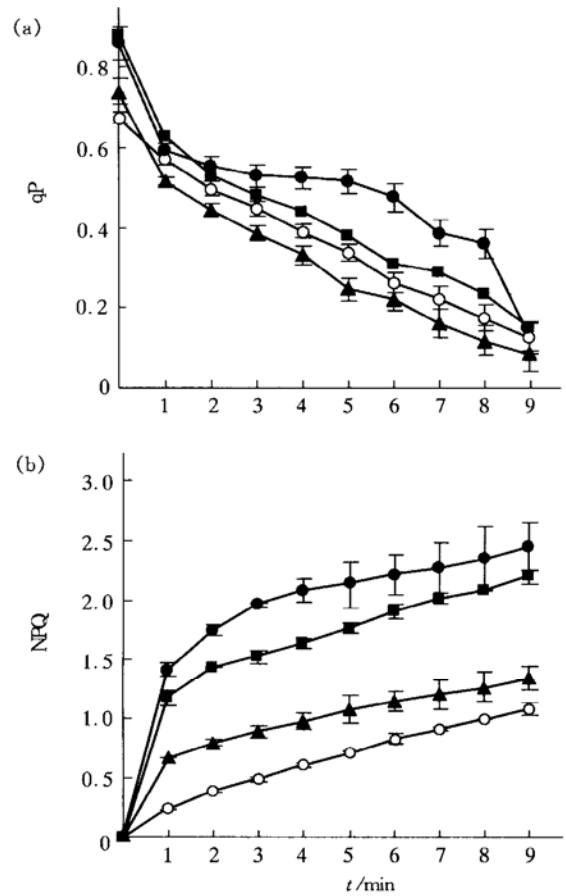


Fig. 3 Changes in qP (a) and NPQ (b) induced by high light ($2\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in leaves of *Arabidopsis thaliana* mutants and wildtype

Each data point is the average of three separate samples. \circ — \circ : $lut_2 npq_1$; \square — \square : lut_2 ; \bullet — \bullet : WT; \triangle — \triangle : npq_1 .

2.3 突变体及 WT 的 F_v/F_m 变化

PS II 原初光化学效率 F_v/F_m 是 PS II 天线色素捕获光能效率的指标, 与 WT 相比, 无论是不能合成玉米黄素的突变体 npq_1 或不能合成 lutein 的突变体 lut_2 , 还是玉米黄素和 lutein 都不能合成的双突变体 $lut_2 npq_1$, 其 F_v/F_m 都稍微有些升高 (图 4), 其中 lut_2 、 npq_1 和 $lut_2 npq_1$ 的 F_v/F_m 与 WT 相比,

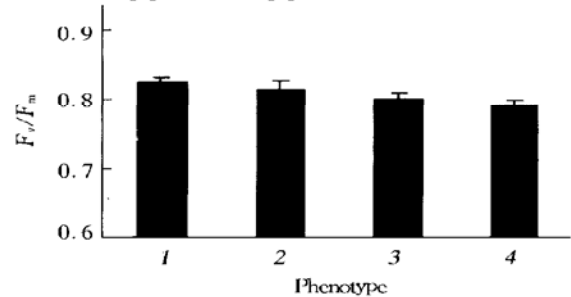


Fig. 4 Changes in F_v/F_m in leaves of *Arabidopsis thaliana* mutants and wildtype

Each data point is the average of three separate samples. The bars are the standard deviations. 1: $lut_2 npq_1$; 2: lut_2 ; 3: npq_1 ; 4: WT.

分别上升了 2.9%、1.1% 和 4.17%。缺乏 lutein 的突变体 F_v/F_m 上升幅度大些，以双突变体上升最大。说明缺失类胡萝卜素组分不同突变体其 PSII 天线色素捕获光能的能力都有相应的提高。

2.4 突变体色素组分的变化

与 WT 相比，突变体中叶绿素 a/b 没有明显的

差异 (表 1)，npq1 在强光下不能形成 Z 和 A，而 lut2 没有 lutein，双突变体 lut2 npq1 没有 lutein，强光下也不能形成 Z，但有部分 A，缺乏 lutein 的突变体 lut2 和 lut2 npq1 中，叶黄素库 (V + Z + A) 相对 WT 有较大幅度的增加。

Table 1 Photosynthetic pigments in wildtype and mutants of *Arabidopsis thaliana* before (Dark) and after 1.5 h at $2\,000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (1.5 HL)

Pigment	mmol/mol							
	WT		lut ₂		npq ₁		lut ₂ npq ₁	
	Dark	1.5 HL	Dark	1.5 HL	Dark	1.5 HL	Dark	1.5 HL
Chl a/b	3.21 ± 0.78	3.17 ± 0.10	3.56 ± 0.23	3.35 ± 0.20	3.26 ± 0.13	3.19 ± 0.21	3.46 ± 0.30	3.36 ± 0.26
Z	0	11.42 ± 1.20	0	25.10 ± 2.60	0	0	0	0
A	0	18.41 ± 2.00	0	19.70 ± 1.40	0	0	0	20.63 ± 1.70
V + Z + A	43.50 ± 2.80	46.50 ± 3.80	110.10 ± 5.20	107.70 ± 4.60	23.50 ± 1.90	26.20 ± 3.00	122.80 ± 6.40	136.40 ± 8.50
Lutein	112.90 ± 4.10	124.70 ± 6.70	0	0	103.3 ± 7.10	116.39 ± 4.80	0	0

Dark: untreated; 1.5 HL: Treated by $2000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity for 1.5 h.

2.5 突变体对强光胁迫的响应

为了进一步研究类胡萝卜素组分在光抑制中的保护机制，我们用 $2\,000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强光分别处理不同突变体及 WT 叶片 30 min、60 min、90 min、120 min、180 min 和 240 min。并测定了其 F_v/F_m 的变化，而 F_v/F_m 的下降是光抑制的主要指标之一。结果表明不同突变体及 WT 对强光的响应不同 (图 5a)。双突变体 lut2 npq1 对强光的抑制最敏感，强光处理 2 h 后，其 F_v/F_m 就下降了 75%。WT 抗强光的抑制能力最强，强光处理 4 h 后， F_v/F_m 只下降了 53%。突变体及 WT 抗强光的抑制顺序为：WT > lut2 > npq1 > npq1-lut2。

当强光处理后的材料置于 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 弱光下恢复 2 h，所有的突变体及 WT 的 F_v/F_m 都有不同程度的恢复 (图 5b)，强光处理 90 min 前的恢复程度高些，几个突变体及 WT 恢复程度由高至低顺序为：WT > lut2 > npq1 > lut2 npq1。

3 讨论

叶黄素类是 α 或 β 胡萝卜素氧化衍生物 (图 1)，存在于所有的光合机构中，参与光能捕获、光合机构破坏的防御 (photoprotection) 和捕光天线色素复合体 (LHC) 的组装^[10]。然而叶黄素各个组分的功能仍不清楚，只有间接的证据表明 Z 的含量与 NPQ 呈线性正相关^[5]。本文以缺乏相应叶黄素组分的拟南芥突变体，研究了不同叶黄素组分缺失对叶绿素荧光猝灭的影响。结果表明 npq1 在

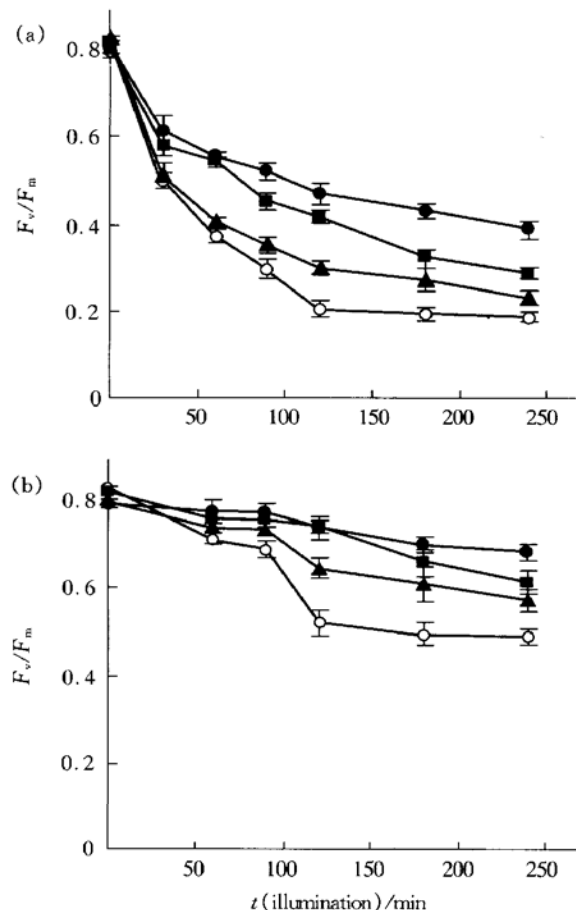


Fig 5 Effect of high light intensity ($2\,000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) on F_v/F_m (a) in leaves of *Arabidopsis thaliana* mutants and wildtype and its recovery (b)

After high light treatment for different time, the leaves were submitted to a 2 h recovery in PPFD of $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The time scale in Fig 5b refers to the exposed time of high light in Fig 5a. Each data point is the average of three separate samples. ○—○: lut₂ npq₁; ■—■: lut₂; ●—●: WT; ▲—▲: npq₁.

强光下不能形成 Z 和 A, *lut₂* 则没有 lutein, 强光下能正常诱导 Z 和 A 的生成, 而双突变体 *lut₂-npq₁* 除了缺乏 lutein 外, 强光下不能诱导形成 Z (表 1). lutein 是类胡萝卜素中含量最多的一种色素, 占总的类胡萝卜素近 50%, 缺乏 lutein 的突变体叶黄素库 (V+ Z+ A) 明显增高, A 的含量也升高, 这可能是对缺乏 lutein 的一种补偿^[11]. 无论是缺乏 Z 或 lutein 的突变体, 还是两者都缺乏的双突变体, 其叶绿素 a/b 与 WT 没有明显的差别, 暗示这些突变体的天线色素受影响较小, 然而强光诱导的叶绿素荧光猝灭都受到明显的影响 (图 2). 强光下缺 Z 突变体 *npq₁* 和 *lut₂-npq₁* 的非光化学猝灭 (NPQ) 的形成被显著抑制 (图 3b), 其通过非辐射耗散过剩激发能的能力因缺乏 Z 而明显下降, 结果与 Niyogi 等^[12] 发现缺乏 Z 的 *Chlamydomonas reinhartii* 突变体在强光下其 NPQ 的形成受到抑制一致, 结果直接证明了叶黄素循环与 NPQ 的形成有关. 有意思的是, 缺 lutein 的突变体 *lut₂* 在强光诱导下, NPQ 的形成也部分被抑制, 表明 lutein 也可能以某种方式参与了 NPQ 的形成.

缺乏 Z 或 lutein 的突变体, 其强光下 NPQ 诱导不但被抑制, 而且光化学猝灭 qP 的水平也较对照都下降了, 以缺乏 Z 的两个突变体 *npq₁* 和 *lut₂-npq₁* 下降的幅度较大 (图 2a), 低的 qP 反映突变体中 PS II 开放的反应中心比例和参与 CO₂ 固定的电子减少, 然而外周天线色素捕获光能的能力 (F_v/F_m) 并不因缺乏 Z 或 lutein 而下降, 反而较对照稍有增加 (图 3). 我们推测强光下突变体捕获光能的能力变化不大而用于 CO₂ 固定的电子减少, 故剩余的激发能增加, 由于缺乏与 NPQ 形成有关的 Z 或 lutein, NPQ 的诱导受到抑制, 因而其叶绿体在强光下会有更多的过剩激发能不能被及时清除而容易发生光抑制现象, 用强光光抑制处理的结果, 强光下抗光抑制的能力为 WT > *lut₂* > *npq₁* > *lut₂-npq₁*, 则证实了我们的推测 (图 4).

综上所述, 我们认为叶黄素循环不但与高光下 NPQ 的诱导有关, 也与 qP 有一定的关系.

参 考 文 献

- 1 Demmig-Adams B, Adams III W W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, **43**: 599~ 626
- 2 Muller P, Li X P, Niyogi K K. Non-Photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol*, 2001, **125** (4): 1558~ 1566
- 3 Gilmore A M. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant*, 1997, **99** (1): 197~ 209
- 4 Frank H A, Bautista J A, Josue J S, *et al.* Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry*, 2000, **39** (11): 2831~ 2837
- 5 Demmig-Adams B, Adams III W W. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci*, 1996, **1** (1): 21~ 26
- 6 Niyogi K K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 333~ 359
- 7 Niyogi K K, Shih C, Chow W S, *et al.* Photoprotection in a zeaxanthin and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynth Res*, 2001, **67** (1~ 2): 139~ 145
- 8 Gilmore A M, Yamamoto H Y. Resolution of lutein and zeaxanthin using a nonendcapped, lightly carbon loaded C₁₈ high performance liquid chromatographic column. *J Chromatogr*, 1991, **543**: 137~ 145
- 9 Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res*, 1986, **10** (1): 51~ 62
- 10 Gilmore A M, Govindjee. How higher plants respond to excess light: Energy dissipation in photosystem II. In: Singhal G S, eds. *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*. New Delhi: Narosa Publishing House, 1999. 513~ 548
- 11 Pogson B, Niyogi K K, Björkman O, *et al.* Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (22): 13324~ 13329
- 12 Niyogi K K, Björkman O, Grossman A R. The role of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (25): 14162~ 14167
- 13 Hartel H, Lokstein H. Relationship between quenching of maximum and dark-level chlorophyll fluorescence *in vivo*: dependence on photosystem II antenna size. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1228** (1): 91~ 94

The Feature of Chlorophyll Fluorescence Quenching in Xanthophyll-deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana**

PENG Chang-Lian**, LIN Gu-Zhu

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

Abstract The chlorophyll fluorescence quenching in leaves of wildtype (WT) and three nuclear mutants of *Arabidopsis thaliana* including npq1 (lutein-replete and violaxanthin deepoxidase-deficient), lut2 (lutein-deficient) and lut2 npq1 (double mutant) under high light condition was characterized. There was no obvious difference in ratio of Chl a/b between mutants and wildtype, while F_v/F_m in mutants increased to some extents. The total xanthophyll pool (V + A + Z) increased significantly in lutein-deficient mutants (lut2 and lut2 npq1). The NPQ induction by high light was markedly inhibited in lut2 npq1 and npq1, but showed less inhibition in lut2. The trend of NPQ value in mutants and WT exposed to PPF during high light illumination of $2\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 1~9 min was WT > lut2 > npq1 > lut2 npq1. qP in all three mutants decreased in comparison with wildtype. Three xanthophyll-deficient mutants exhibited less resistance to photoinhibition than the WT. The sequence of tolerance to photoinhibition was the same as the changes in NPQ among WT and mutants (WT > lut2 > npq1 > lut2 npq1). The results indicated that xanthophyll cycle was related not only directly to NPQ formation, but also to qP.

Key words *Arabidopsis thaliana*, mutant, xanthophyll cycle, qP, NPQ

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30270125), Field Frontiers Project of The Chinese Academy of Sciences Knowledge Innovation Program (Director Foundation of South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998010100).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85232940, E-mail: pengchl@scib.ac.cn

Received: October 8, 2002 Accepted: November 29, 2002