

光和暗条件下低温对黄瓜和水稻叶绿素蛋白质复合体的影响*

刘鸿先 王以柔[√]李晓萍 郭俊彦 S311
(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 本试验以黄瓜和水稻幼苗为材料, 研究了光照和黑暗条件下低温对植物叶绿素蛋白质复合体的影响。SDS-PAGE电泳结果表明: 5℃及12h 280 μmol m⁻²s⁻¹ 处理2d, Chl-蛋白质复合体的降解明显大于5℃暗低温处理; 低温与光照对 P700-CPa₁ 的影响大于LHCP。叶绿素荧光测定表明: 5℃及12h 280 μmol m⁻²s⁻¹ 的处理对PS II 的影响亦大于暗低温处理, 由此认为: 低温与光对植物叶绿体的PS I 和PS II 都有明显的影响, 其机理可能与常温下高光强引起的光抑制相类似; 不同的是低温下中等光强就能引起光抑制。因此, 在光照低温下往往加剧植物冷害的发生。

关键词 叶绿素蛋白质复合体; 低温胁迫; 光; 黄瓜和水稻
黄瓜, 水稻, 叶绿素, 蛋白
低温

THE EFFECT OF CHILLING STRESS ON CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEXES OF RICE AND CUCUMBER SEEDLINGS IN THE LIGHT AND DARK

Liu Hongxian, Wang Yirou, Li Xiaoping and Guo Junyan
(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract In this work we used cucumber and rice seedlings as experimental materials to study the changes of chlorophyll-protein complexes in leaves after chilling treatment under dark and light. Result indicated that the chlorophyll-protein complexes were decreased in the seedlings exposed to 5℃ for 2 days. The leaves treated with 5℃ and 280 μmol m⁻²s⁻¹ was decreased more than that of the leaves under dark at same temperature. Effect of chilling and light interaction on P700-CPa₁ was great, while it was less on LHCP. PS II activity was monitored by chlorophyll fluorescence emission. It declined rapidly at 280 μmol m⁻²s⁻¹ PFD, but it decreased slowly at dark under same temperature.

Therefore, we conclude that this injury mechanism was similar to photoinhibition by strong light intensity, while photoinhibition induced by chilling temperature could carry out even in a moderate photon irradiance. The interaction of low temperature and light did, however, result an increase at chilling injury.

Key words: Chlorophyll-protein complexes; chilling stress; light; cucumber and rice

* 国家自然科学基金资助课题

植物低温伤害在光下比暗下更加严重, 很明显这与叶绿体的低温敏感性有关, 也就是说在光反应运转时更易受损伤。我们对低温下植物光合作用(何洁等1987)和膜脂过氧化作用(王以柔等1990)的研究亦证明: 低温期一定的光强有促进光合作用的下降和加剧膜脂过氧化作用。

叶绿体类囊体膜上Chl-蛋白质复合体的种类直接影响光能的吸收、传递、分配和转化。Öquist等(1978)研究发现, 杉树叶片的Chl-蛋白质复合体在自然条件下有季节性变化, 当秋冬季叶绿素发生破坏时P700-CPa₁减少大于LHCP, 而且这种破坏往往在光下大于阴处, -2℃人工低温下在空气中光漂白时LHCP/P700-CPa₁的比率增加, 在氮中变化少, 由此他们认为低温下光漂白引起P700的破坏是在需氧下的光氧化作用引起的。至于冷敏感植物在发生冷害时, 叶绿体中Chl-蛋白质复合体的变化, 以及低温期间光照对Chl-蛋白质复合体的作用报道尚少, 为此, 本试验着重研究低温对冷敏感植物叶绿体中Chl-蛋白质复合体各组分的影响, 并比较了光照和黑暗条件下产生伤害的差异。

材料和方法

材料 供试黄瓜品种为津研4号, 水稻品种为桂朝2号, 种子浸泡0.5d后, 用湿纱布包裹置恒温箱(28℃±1℃)中催芽1d, 萌发的种子播于装有蛭石的培养皿中, 在25℃, 每天10h 30 μmol m⁻²s⁻¹光照的培养架上培养, 黄瓜幼苗生长至子叶全展开, 水稻幼苗为2叶期时进行处理。

低温处理 黄瓜和水稻幼苗各分成三组, 一组继续放在培养架上作为对照, 一组置5℃, 每天12h 280 μmol m⁻²s⁻¹光照, 另一组为5℃无光照, 各处理2d, 分别刈取叶片供测定用。

叶绿体类囊体膜的制备 主要用张志良和吴光耀(1986)方法, 取叶片鲜重10g预冷后, 加20ml介质(0.4M山梨醇, 0.1M Tricine pH7.8缓冲液), 在高速分散器上匀浆, 4层纱布过滤, 滤液200×g离心5分钟, 上清液1000×g离心10分钟, 沉淀为叶绿体, 加12ml无离子水胀破, 10000×g离心10分钟, 沉淀用5ml 50mM Tricine (pH8.0)缓冲液匀浆, 10000×g离心10分钟, 沉淀用1ml 50mM Tricine缓冲液匀浆, 置冰箱备用。

叶绿素含量测定 按Arnon法。

样品增溶 上述制备的类囊体膜制剂加含有10%甘油、2% SDS的0.3M Tris-HCl pH8.8溶液, SDS: Chl=10:1, 增溶8分钟立即点样电泳。

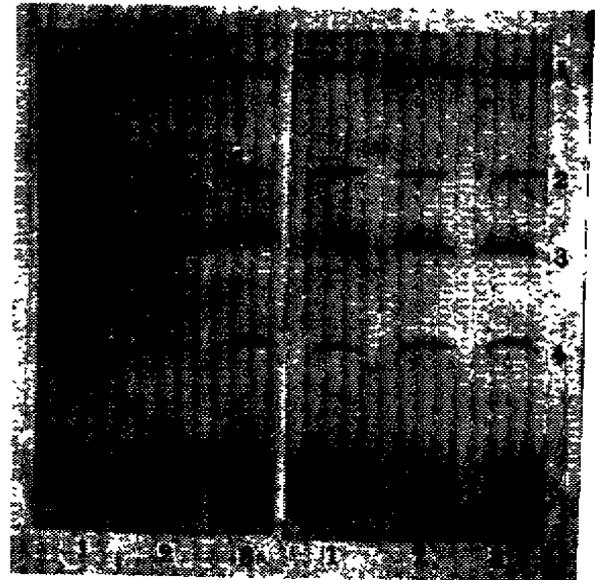
电泳 基本按李桐柱和匡廷云法(1988), 垂直平板, 分离胶组成, 11%丙烯酰胺 Arc: Bis=30:0.8, 0.43M Tris-HCl pH9.18缓冲液, 0.1%过硫酸铵, 0.05% TEMED。浓缩胶组成, 4%丙烯酰胺, 56mM Tris-H₂SO₄ pH6.14, 0.1%过硫酸铵, 0.05% TEMED。上槽电极缓冲液为0.01% SDS, 20mM Tris-硼酸 pH 8.64。下槽电极缓冲液: 0.043M Tris-0.065M甘氨酸 pH 9.5。电泳在4℃进行, 每板保持电流30mA。电泳后, 胶板在CS-910型日本岛津双波长薄层扫描仪上进行光密度扫描, 波长为675nm和650nm。另外胶板上各条色素带用刀片切下, 分别提取后, 在Beckman DU-7HS型分光光度计上测定340—740nm波长的吸收光谱。

叶绿素荧光检测 用量子产量—荧光测定系统检测(库姆斯, 丁·等主编1986)。

结 果

黄瓜幼苗子叶和水稻幼苗叶片提取叶绿体类囊体膜，经增溶后，立即进行不连续的SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳分离Chl-蛋白质复合体，在凝胶上可明显的分离出5条谱带(图1)，按照其电泳迁移速率，从慢到快定为1、2、3、4及5带。为了鉴别Chl a与Chl b的吸收，分别用675nm和650nm两种波长扫描，光密度扫描图也相应地显示出五个吸收峰(图2、3)。其中第一个峰为迁移率最慢的谱带，在675nm吸收峰明显高于650nm波长的吸收峰，表明其Chl a的相对含量较高，此带为P700叶绿素a蛋白质复合体，包含有PS I反应中心P700。第2、3、4条带在两种波长下扫描，其吸收峰差异较小，表明Chl a与Chl b含量大致相等，为捕光叶绿素a/b蛋白质复合体LHCP，迁移率最快的5带为游离色素带。为进一步检验各带性质，切下各带在360—740nm波长测定吸收光谱(图5)。第一条带的吸收峰，蓝光区为434nm，红光区为671nm，为明显的Chla的特异吸收峰。第2、3、4带的吸收光谱图明显不同于第1条带，在蓝光区有两个峰，分别为437nm和470nm，红光区为672nm和653nm两个峰，从吸收光谱特征亦证明是LHCP。在本实验条件下分离的Chl-蛋白质复合体，黄瓜幼苗子叶和水稻幼苗叶片的叶绿体是相同的。

从图1、2、3及4均可看出，低温明显地引起了冷敏感植物叶绿体中Chl-蛋白质复合体受损，从各个组分看，则P700-CPa₁的变化大于LHCP。本试验中亦证明：低温期间每天给予12h 280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光照，无论是黄瓜幼苗还是水稻幼苗，其Chl-蛋白质复合体的减少大于暗低温处理，尤其是P700-CPa₁蛋白质复合体更加显著，这个现象与Öquist等(1978)的研究结果相一致。他们在杉树的试验中，也观察到在自然低温或人工低温影响下P700-CPa₁的变化大于LHCP，这种变化在阳光暴露的地方大于阴处，嫩叶的变化大于老叶。本试验条件下，电泳谱上未能分清楚PS I色素蛋白质复合体，为此，进行了叶绿素荧光的测定，从黄瓜叶圆片的室温荧光动力学曲线可看出(图4)，低温亦明显的引起荧光发射峰的下降，且低温期间供给12 h 280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光照，促进了荧光发射峰的下降。由此我们认为，在5℃作用下，仅280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光照就能促进PS I及PS II的受损，这是光照下的低温引起植物冷害加剧的原因。



Treatment
Cucumbar Rice

图1 黄瓜和水稻幼苗叶绿体类囊体膜叶绿素蛋白质复合体SDS—PAGE

Fig. 1 Chlorophyll-protein complexes of chloroplast thylakoid membrane of cucumber and rice seedlings

Treatment: 1. 28°C + 12h 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
2. 5°C + dark
3. 5°C + 12h 280 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

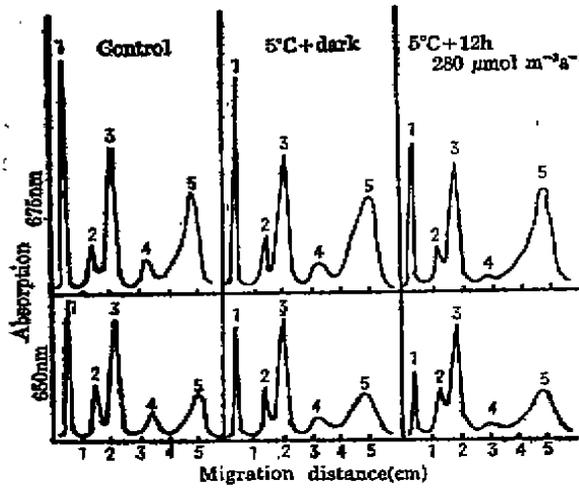


图2 黄瓜幼苗叶绿素蛋白质复合体的 SDS-PAGE 凝胶的光密度扫描 (波长 675nm 及 650nm)

Fig. 2 Photodensitometer scan of SDS-PAGE gel of chlorophyll-protein complexes in cucumber seedling at 675nm and 650 nm.

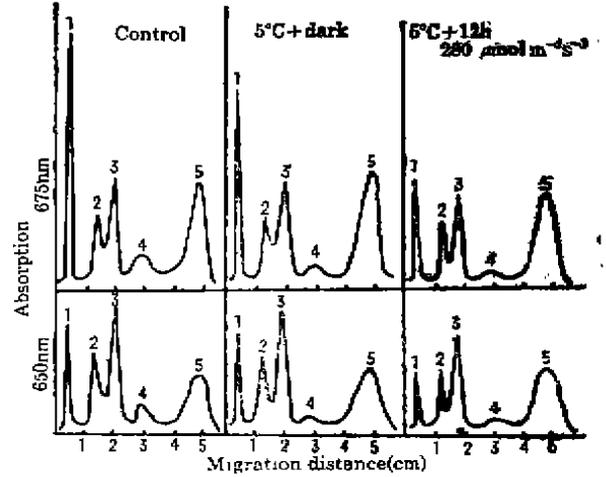


图3 水稻幼苗叶绿素蛋白质复合体的 SDS-PAGE 凝胶的光密度扫描 (波长 675nm 及 650nm)

Fig. 3 Photodensitometer scan of SDS-PAGE gel of chlorophyll-protein complexes in rice seedling at 675 nm and 650 nm.

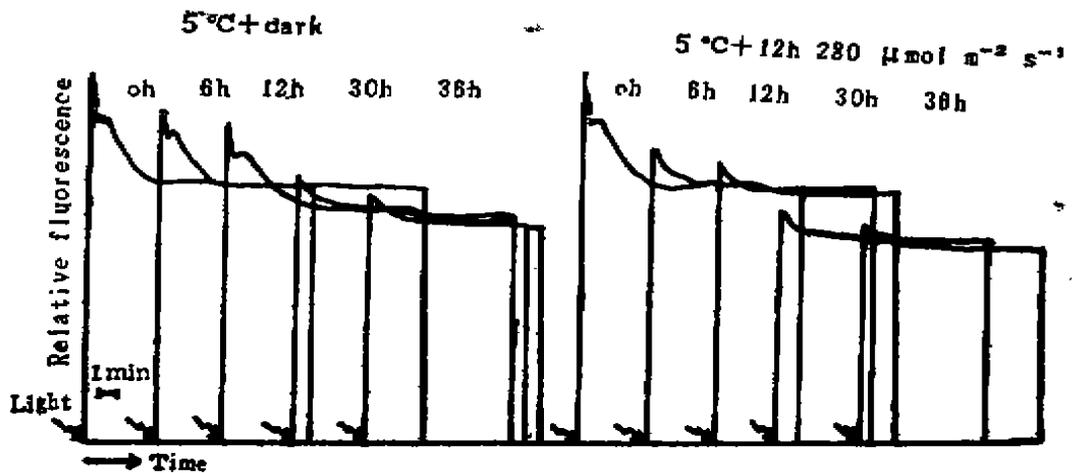


图4 低温与光对黄瓜幼苗子叶叶绿素荧光动力学曲线的影响

Fig. 4 Effect of chilling and light on fluorescence induction curves of detached cotyledon of cucumber seedlings.

讨 论

近年来,许多关于强光引起植物光合作用抑制的报道(Powles CB 1984),一般认为在无氧条件下光抑制部位在PSI反应中心(巫继拓和沈允钢1990, Cleland RE and Crichtley C 1985, Cleland RE, Melis A and Neale PJ 1986)或 Q_B 蛋白,且两者受损程度比较接近,而在有氧条件下光抑制不仅引起PSI活性降低(Powles CB 1984, Harvey GW 1978),PSI反应中心及其氧化侧和还原侧以及类囊体膜透性均发生不同程度的破坏(巫继拓和沈允钢1990),PSI的失活是由于它的反应中心生色团的丢失或色素蛋白复合体的分解,漂白的结果(Harvey GW 1978)。目前,在低温与光相互作用引起植物光抑制的现象亦有研究,Greer(1988)研究了猕猴桃的完整叶子,发现当生长在 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下的植物转入 $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下的植物,在 5°C - 35°C 的温度范围内均发生了光抑制现象,但是在低温下抑制最大,光抑制的程度亦影响到恢复速率。实验证明(Greer 1986),光抑制的恢复在 15°C 以下速率减慢, 30°C 最合适,光是光抑制最大恢复所必须,但恢复过程的光饱和是在 $\text{PPFD } 20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,恢复过程包括了一个或较多的叶绿体编码的蛋白质的合成。Yaker等(1986)研究指出,光抑制随光强的增加和温度的降低而加强。我们在研究低温诱导植物叶片光氧化作用时亦发现有同样的规律(王以柔等1990)。本试验通过低温与光对植物Chl-蛋白质复合体组分影响的研究,进一步证实了低温期间 $280 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光照强度就明显的促进了Chl-蛋白质复合体的降解,尤其是P700-CPa₁的下降十分明显。从叶绿素荧光测定亦证明,PSI活性的下降也是光照下低温的影响大于暗低温处理,说明低温与光相互作用,无论是PSI还是PSII都加剧了抑制作用,这种伤害机理与常温下高光强引起的光抑制相一致,而在低温下中等光强就能诱导光抑制的产生,因此,在有光照的低温下植物发生冷害往往更为严重。

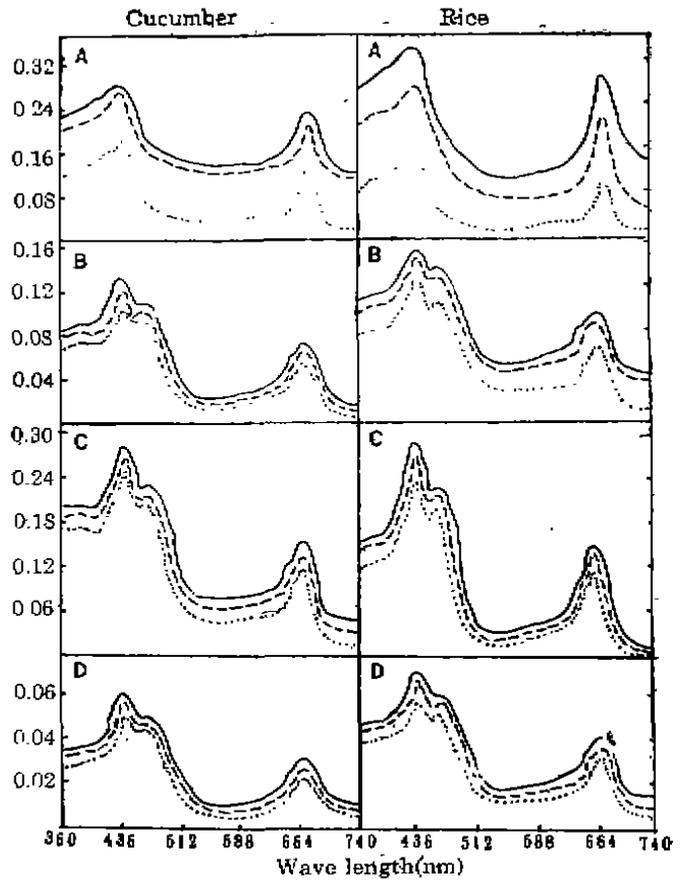


图5 黄瓜和水稻幼苗P700-CPa₁和LHCP的吸收光谱
Fig. 5 Absorption spectra of P700-CPa₁ and LHCP of cucumber and rice seedlings.

A. P700-CPa₁ B. C and D LHCP
Treatment: 1. Control (—) 2. 5°C + dark (---) 3. 5°C + 12h $280 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (.....)

参 考 文 献

- [1] 何 洁、王以柔、刘鸿先、郭俊彦, 1987: 低温和光照对水稻灌浆期叶片光合作用的影响。植物生理学报, 13 (4): 371—377。
- [2] 王以柔、曾韶西、李晓萍、刘鸿先, 1990: 低温诱导水稻叶片的光过氧化作用。植物生理学报, 16 (2): 12—18。
- [3] 李桐柱、匡廷云, 1989: 一种聚球藻属蓝藻类囊体膜上的光系统 II 叶绿体蛋白复合体。海洋与湖泊, 19 (3): 232—237。
- [4] 巫继拓、沈允钢, 1990: 菠菜叶绿体的光抑制部位。植物生理学报, 16 (1): 31—36。
- [5] 张志良、吴光耀主编, 1996: 植物生物化学技术和方法。农业出版社, P. 218—222。
- [6] 库姆斯, 丁·霍尔DO、朗SP、斯卡洛克JMO主编, 1986: 生物生产力和光合作用测定技术。科学出版社, P. 107—108。
- [7] Cleland, RE., C. Crichley, 1985: Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants II. Inactivation by high light of photosystem II reaction center function in isolated spinach thylakoids and O₂-evolving particles. Photobiochem photobiophys. 10: 83—92。
- [8] Cleland, RE., A. Melis, P.J. Neale, 1986: Mechanism of photoinhibition: Photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts. Photosynth Res. 9: 79—88。
- [9] Gerber, DW., J.E. Burris, 1981: Photoinhibition and P700 in the Marine Diatom Amphora SP. Plant Physiol. 69: 699—702。
- [10] Greer, DH., J.A. Berry, O. Bjorkman, 1986: Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: Role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery. Planta, 168: 253—260。
- [11] Greer, DH., 1988: Effect of temperature on Photoinhibition and recovery in Actinidia deliciosa. Aust J Plant Physiol., 15: 195—205。
- [12] Gritchley, C., 1988: The molecular mechanism of photoinhibition-facts and fiction. Aust J Plant Physiol. 15: 27—41。
- [13] Harvey, GW., 1978: Photolability of photosynthesis in two separate mutants of Scenedesmus obliquus. Preferential inactivation of photosystem I. Plant Physiol. 62: 330—336。
- [14] Powles, SB., 1984: Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Ann Rev Plant Physiol. 35: 15—44。
- [15] Oquist, G., O. Martensson, B. Martin, G. Malmberg, 1978: Seasonal effects on chlorophyll-protein complexes isolated from Pinus silvestris. Physiol Plant. 44: 197—192。
- [16] Oquist, G., B. Martin, O. Martensson, L. Christersson, G. Malmberg, 1978: Effect of season and low temperature on polypeptides from thylakoids isolated from chloroplasts of Pinus silvestris. Physiol. Plant, 44: 300—306。
- [17] Yaker, D., J. Rudich, B.A. Bravdo, S. Malkin, 1986: Prolonged chilling under moderate light: effect on photosynthetic activity measured with the photoacoustic method. Plant Cell Environment 9: 581—586。