

光对绿豆种子和叶片分离线粒体耗氧的影响

王异星

李明启

(暨南大学医学院生化教研室, 广州 510632) (华南农业大学农业生物系光合作用研究室, 广州 510642)

摘 要

实验结果表明: 照光时绿豆叶片分离线粒体通过细胞色素氧化酶途径的 NADH 氧化部分受阻, 电子转向交替途径。不产生能量, 不受能荷控制的 NADH 氧化途径有利于绿色细胞线粒体在光合作用时执行其提供碳架的功能。看来绿色细胞线粒体本身具有对光的敏感性, 在照光时调节呼吸途径以适应其功能的转换。呼吸途径的转换机制目前还不清楚。绿豆种子线粒体与叶片线粒体不同, 没有上述的这种对光的反应。

关键词: 绿豆; 线粒体; 光; 交替途径

植物线粒体电子传递链能氧化由 TCA 环各种脱氢酶产生的 NADH 和线粒体外细胞质的 NADH^[22]。在光合作用条件下, 叶绿体中光合磷酸化产生的 ATP 可通过磷酸丙糖穿梭运出叶绿体, 供细胞质各种代谢活动利用。因此, 在光下绿色细胞线粒体氧化磷酸化产生 ATP 的过程可能不如暗中那样是个必须的过程。但是, 由于 TCA 环在光合细胞的合成过程中有提供碳架的作用, 因此在光下 TCA 环仍需运转^[15]。由 TCA 环产生的 NADH 以及光合作用产生的还原当量可以通过以下几条途径氧化: 1) 被合成反应利用; 2) 通过偶联的线粒体电子传递链氧化; 3) 不偶联产生 ATP 的交替途径氧化。

我们已有实验结果表明绿色细胞在照光条件下线粒体偶联呼吸受到部分抑制, NADH 通过线粒体偶联电子传递链氧化的过程被削弱。Azcon-Bieto 等^[8,9]根据实验结果推测照光后小麦叶片呼吸强度增高, 可能是氰不敏感的交替途径的作用。氰不敏感的交替途径电子传递不偶联产生 ATP, 不受能量状态如 ATP/ADP 比值的控制, 因此交替途径的参与可以在没有磷酸受体(ADP)时增加细胞质 NADH 的氧化, 用以调节细胞内还原当量和高能磷酸化合物之间的平衡。可以设想绿色细胞线粒体在照光时由于功能的转变而发生电子传递途径的转变。

已知光对呼吸作用有影响^[18], 在分离的动、植物细胞线粒体中都发现光促进呼吸耗氧的现象^[4,17]。李淑俊等^[2]报道光对玉米芽, 根和水稻根线粒体嵴膜小囊磷酸化活力有触发和抑制双重效应。有可能在光下绿色细胞线粒体呼吸的调节中, 除了光合作用通过一定的机制对线粒体功能产生影响外, 线粒体本身也可以作为一个光敏细胞器对光作出应答, 产生相应的功能转变。为了证实这一设想, 我们从绿色和非绿色组织中分离线粒体, 研究

光对其耗氧和磷酸化活力的影响,结果表明,分离的叶片线粒体在光下的耗氧速率和途径与暗中不同,说明光可直接作用于分离线粒体,对线粒体电子传递途径进行调节。

材料与方法

材料 绿豆(*Phaseolus radiatus* L.)种子用5%次氯酸钠溶液消毒后,用蒸馏水洗净,置培养皿中于25℃发芽12h,洗净吸干水分。叶片取自盆栽1周幼苗的第一对叶,用蒸馏水洗净,吸干水分备用。

线粒体制备 种子线粒体按沈全光等^[5]的方法制备。叶片线粒体按 Dry and Wislich^[13]的方法,稍作修改。制备步骤:取50g预冷的绿豆叶片,加入200ml预冷的研磨介质(0.35mol/L甘露醇,1mmol/L EDTA,1mmol/L MgCl₂,10mmol/L 异抗坏血酸,1%PVP-40,0.4%牛血清蛋白,50mmol/L Hepes, pH7.5),在ZK高速自控组织捣碎机匀浆5s×2,四层纱布过滤,滤液于5000×g离心2min,弃沉淀;上清液再于20000×g离心5min,弃上清液;沉淀加入60ml洗涤介质(0.3mol/L甘露醇,0.4%牛血清蛋白,20mmol/L Hepes, pH7.5。此液也作悬浮介质用),洗涤均匀后于5000×g离心5min,弃沉淀;上清液于12000×g离心5min,重复洗涤一次,沉淀悬浮于2ml洗涤介质中,得到绿豆叶片线粒体悬浮液。

线粒体耗氧速率测定 用氧电极(YSI 4004型)测定线粒体耗氧量。反应介质:0.3mol/L甘露醇,10mmol/L KH₂PO₄,5mmol/L MgCl₂,0.2%牛血清蛋白,10mmol/L Hepes, pH7.5。反应杯体积4.5ml。用KF-4型低温浴槽维持温度在25℃。加入反应介质,平衡后加入线粒体悬浮液200μl,以1mmol/L NADH作为呼吸底物,0.1mmol/L ADP为偶联呼吸底物,记录耗氧曲线。照光系统采用汽车用灯(H4 12V-60/55W),用透镜聚焦于反应杯,光强为4万lx。

线粒体氧化磷酸化测定 在光径为0.5cm的玻璃比色杯中依次加入:25μl ADP(3μmol/L),25μl NADH(1mmol/L),400μl反应介质,50μl线粒体悬浮液,立刻用荧光素酶法^[1]测定ATP含量。反应系统中加入5μg寡霉素抑制氧化磷酸化,测得的ATP含量作为线粒体内源本底。

蛋白质含量测定 用考马期亮蓝法^[3]测定蛋白质含量。依Arnon法^[6]测定叶片线粒体中混合的类囊体碎片的叶绿素含量,根据Douce等^[12]叶绿体蛋白质与叶绿素之比为7:1修正叶片线粒体蛋白质含量。

结 果

一、不同浓度 NADH 对线粒体耗氧的影响

植物线粒体在以外源NADH作为底物进行氧化时的呼吸链与线粒体内由脱氢酶产生的内源NADH氧化的呼吸链有所不同,但大部分电子传递途径仍是相同的^[4]。细胞质的NADH对线粒体来说是外源的。在光合作用条件下牵涉到细胞质还原当量的线粒体氧化,即外源NADH通过线粒体氧化,因此在本实验中用外源NADH作为呼吸底物进行

测定。不同浓度 NADH 作为呼吸底物的测定表明: 0.6—1.0mmol/L 的 NADH 是绿豆种子和叶片分离线粒体状态 3 呼吸的最适浓度(表 1), 故在以下的试验中所用 NADH 浓度均为 1mmol/L。

表 1 不同浓度的 NADH 对绿豆种子和叶片线粒体状态 3 呼吸耗氧的影响

Table 1 The effect of NADH concentrations on O₂ consumption at state 3 of mitochondria isolated from mung bean seeds or leaves.

NADH concentration (mmol/L)	O ₂ uptake (nmol mg ⁻¹ Protein min ⁻¹)	
	Seed Mit.	Leaf Mit.
0.2	122	38
0.6	139	46
1.0	140	46

Temperature: 25°C, ADP: 0.1mmol/L

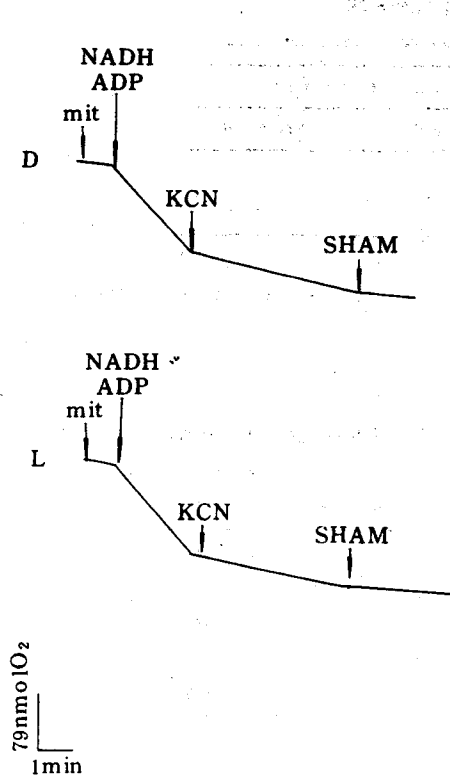


图 1 光(L), 暗(D)条件下绿豆种子线粒体呼吸耗氧
Fig. 1 O₂ consumption of mitochondria from mung bean seeds in the dark or light.

200μl mit.; NADH: 1mmol/L;
ADP: 0.1mmol/L; KCN: 1mmol/L;
SHAM: 0.5mmol/L; temperature: 25°C;
light intensity: 40 000lx

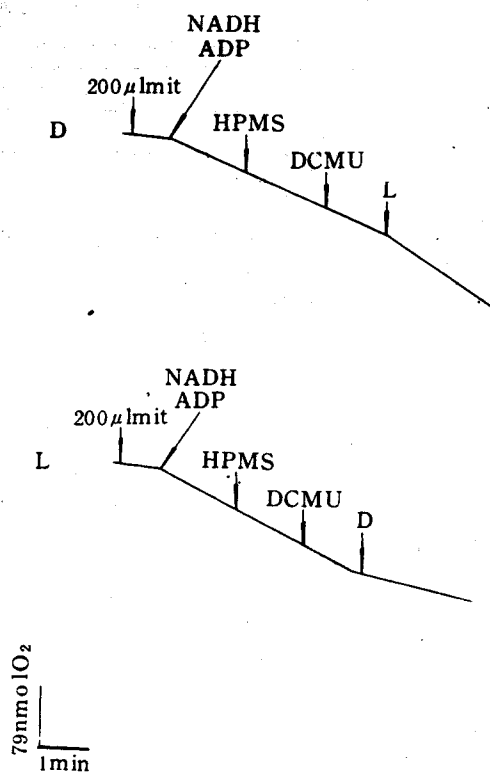


图 2 光(L), 暗(D)条件下 HPMS 和 DCMU 对绿豆叶片分离线粒体耗氧的影响

Fig. 2 Effects of HPMS and DCMU on the O₂ uptake of mung bean leaf mitochondria in the dark or light.
NADH: 1mmol/L; ADP: 0.1mmol/L;
HPMS: 0.1mmol/L; DCMU: 1μmol/L;
temperature: 25°C; light intensity: 40 000lx

二、光、暗条件下绿豆种子线粒体耗氧情况

试验结果表明,光(4万lx)对绿豆种子线粒体以NADH为底物的偶联呼吸耗氧活力没有影响(图1),照光时和暗中耗氧速率分别为123和124nmol O₂·mg⁻¹protein min⁻¹。用细胞色素氧化酶抑制剂KCN和抗氰氧化酶抑制剂SHAM处理的实验结果表明电子传递途径在光下和暗中也无变化(表2)。测定线粒体氧化磷酸化产生ATP量,发现光对绿豆种子线粒体磷酸化活力没有影响(表3)。

三、光、暗条件下绿豆叶片线粒体耗氧情况

用差速离心法分离的叶片线粒体,因不能完全去掉混合的类囊体碎片而呈绿色。同时在线粒体表面也可能吸附有乙醇酸氧化酶。我们在测定呼吸耗氧的介质中加入乙醇酸氧化酶的抑制剂HPMS和Mehler反应的抑制剂DCMU,观察到在光下和暗中对线粒体耗氧均无影响(图2),故可以认为在测定光对叶片线粒体呼吸、耗氧的影响时不受乙醇酸氧化酶和Mehler反应的干扰。

表2 光对绿豆种子线粒体耗氧的影响

Table 2 O₂ consumption of mitochondria from mung bean seeds in the dark or light

Condition	O ₂ uptake (nmol·mg ⁻¹ Protein min ⁻¹)		
	State 3	+KCN	+KCN, SHAM
Dark	123	.18	~0
Light	124	18	~0

Temperature: 25°C; NADH: 1 mmol/L; ADP: 0.1 mmol/L; Light intensity: 40 000lx; KCN: 1mmol/L; SHAM: 0.5mmol/L

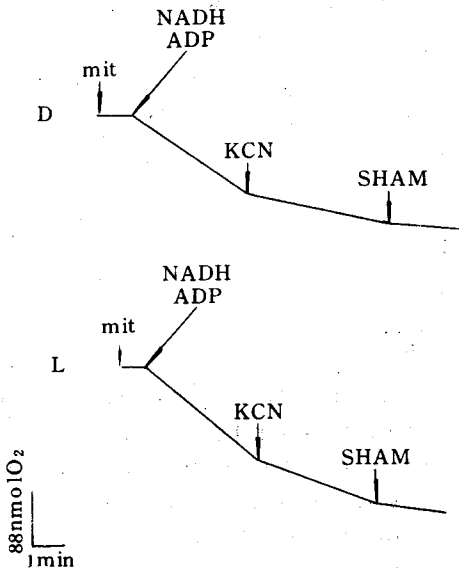


图3 光(L),暗(D)条件下绿豆叶片线粒体呼吸耗氧

Fig. 3 O₂ consumption of mitochondria from mung bean leaves in the dark or light.

表3 光对绿豆种子线粒体氧化磷酸化活力的影响

Table 3 Effect of light on seed mitochondrial oxidative phosphorylation

Time (min)	Oxidative Phosphorylation (10 ⁻¹¹ mol ATP/ 50μl Mit.)	
	Dark	Light
0.5	7.57	7.52
1.0	7.81	7.76
1.5	8.36	8.77
3.0	9.36	9.50
5.0	9.52	9.52

Temperature: 25°C; Light: 40,000lux; NADH: 1mmol/L; ADP: 3μmol/L -

200μl mit. ; NADH: 1mmol/L; ADP: 0.1mmol/L; KCN: 1mmol/L; SHAM: 0.5mmol/L; temperature: 25°C; light intensity: 40 000lx

表 4 光对绿豆叶片分离线粒体不同呼吸途径耗氧的影响
 Table 4 Effect of light on the O₂ consumption of mitochondria from mung bean leaves through different pathway of respiration

Pathway	O ₂ uptake (nmol · mg ⁻¹ protein min ⁻¹)		$\frac{(B)-(A)}{(A)} \times 100\%$
	Dark (A)	Light (B)	
Coupled	32.9	29.0	-11.85
Alternative	5.2	8.9	71.15
Residual	7.9	14.0	77.22

实验结果表明,光促进绿豆叶片线粒体以 NADH 为底物的呼吸耗氧(图 3),暗中和光下叶片线粒体在有 NADH 和 ADP 存在时耗氧速率分别为 46.0 和 51.9 nmol O₂ · mg⁻¹ protein · min⁻¹,光下增加了 12.83%。在豌豆叶片线粒体中也观察到相似的结果。豌豆叶片线粒体在以甘氨酸和异柠檬酸为底物时也观察到光促进呼吸耗氧的现象^[4]。用大鼠肝脏线粒体的试验中也发现光促进呼吸耗氧^[17]。我们的结果和这些结果一致。

四、光对绿豆叶片分离线粒体不同呼吸途径耗氧的影响

用呼吸抑制剂的试验表明,绿豆叶片线粒体受 KCN 抑制的细胞色素氧化酶途径耗氧在光下受到部分抑制,降低 12%;受 SHAM 抑制的交替途径耗氧在光下增加 71%;未知氧化反应耗氧在光下也增加 77%。(表 4)可见光促进叶片线粒体耗氧是促进了交替途径和未知耗氧反应。在有 KCN 存在时受 SHAM 抑制的耗氧认为是交替途径的最大通量。在光下交替途径的最大通量增加,可能是由于交替氧化酶在光下受到活化。

讨 论

整体植物经一段时间照光后,暗呼吸速率明显增加的现象在绿藻和高等植物中都观察到^[8]。在 1943 年,Emerson 和 Lewis^[14]就已经观察到照光后叶片暗呼吸速率大大增加。我们的实验结果表明,绿豆叶片和豌豆叶片分离线粒体以 NADH 为底物的耗氧速率受光促进。单从线粒体本身对光的反应来看,光促进暗呼吸耗氧是存在的。Azcon-Bieto^[7]最近报告,小麦和菜豆叶的暗呼吸强度在光下有所下降。因此,叶片经一段时间光合作用后与进行光合作用时暗呼吸情况并不相同。而且从整个细胞来看,由于线粒体受到包括光合作用在内的许多因子的影响和调节,不一定表现出暗呼吸受光促进的现象。

Gordon 等^[16]曾报道红光和远红光对燕麦线粒体氧化磷酸化活力均有抑制作用。我们的结果表明绿豆叶片线粒体偶联呼吸耗氧受光抑制,与 Gordon 的结果一致,说明至少在这些植物的线粒体中,偶联的细胞色素氧化酶电子传递途径在光下受到抑制。

Azcon-Bieto 等^[8,9]认为叶片经一段光合作用期后,碳水化合物水平提高导致呼吸速率增加,交替途径对照光后叶片呼吸速率增加作出一定贡献。从本实验结果(表 4)看,我们认为在照光条件下,绿豆叶片线粒体经细胞色素氧化酶途径氧化外源 NADH 的活力受部分抑制,而交替途径容量在光下增加,因此交替途径在绿色细胞线粒体在光下功能的调节中可能起重要作用。

交替途径的生理功能尚不清楚,值得注意的是,在呼吸大大增强的情况下,如自然的果实成熟或人为的老化组织切片,总是伴随着抗氰呼吸的增加^[19,20]。另外,植物线粒体在外界条件变化时电子传递途径可以发生改变,如细胞分裂素可以改变电子传递途径^[21]。Bahr^[10]提出通过细胞色素途径的电子传递通量控制交替途径的运行,当通过细胞色素途径的电子传递受阻,如 KCN 抑制了细胞色素氧化酶时,电子传递转向氰不敏感的交替途径。

底物通过交替途径氧化不偶联产生 ATP,其运行可以在没有磷酸受体时增加 NADH 的氧化。在正常情况下,线粒体内由 TCA 环产生的 NADH 通过细胞色素氧化酶氧化,并偶联产生 ATP。绿色细胞在照光条件下,叶绿体内进行的光合作用使细胞质 ATP/ADP 比值升高,NAD⁺/NADH 比值下降,此时交替途径的参与显然有利于氧化 NADH,保证 TCA 环的运行和细胞代谢的平衡。因此交替途径可以参与调节光下绿色细胞中 NADH 水平与高能磷酸之间的平衡。

从萌发种子分离的线粒体与从绿色叶片分离的线粒体对光的反应不同。在我们的实验中,绿豆种子线粒体的以 NADH 为底物的耗氧速率不受光影响,而绿豆叶片线粒体以 NADH 为底物氧化时的耗氧明显受光促进(图 3)。这种叶片线粒体与种子线粒体对光的反应不同的现象可能是植物个体发育中的一种适应性。吸胀 12h 的绿豆种子线粒体的功能已基本完备^[5],叶绿体还没有出现,此时线粒体既作为动力工厂产生细胞代谢所需 ATP,又供应合成代谢所需碳架,在照光条件下这两种功能亦同样重要。因此,这时的线粒体很可能还没有建立起光敏机制对光作出应答。叶片细胞的线粒体则不同,由于光合作用的存在,使得绿色细胞中光下线粒体的功能侧重于碳架供应;在暗中,线粒体的供能作用与供应碳架的功能并行,因此叶片线粒体须有精密的调节机制以适应这种光暗条件下的功能转换。但是这种调节的具体机制还不清楚,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 李立人、孙炳荣,微量 ATP 的荧光素酶分析方法的研究。生物化学和生物物理进展,1980,(6):60—62。
- [2] 李淑俊、肖建平、蔡剑萍、徐亚南、王国强,光对植物线粒体磷酸化活力及耗氧的影响。植物生理学报,1984,10:29—35。
- [3] 李琳、焦新之,应用蛋白染色剂考马斯蓝 G-250 测定蛋白质的方法。植物生理学通讯,1980,(6):52—55。
- [4] 张少红、李明启,豌豆叶片线粒体内甘氨酸氧化脱羧对苹果酸和异柠檬酸氧化的影响。植物生理学报,1990,16:185—191。
- [5] 沈全光、刘存德、李守全、阎田、阎隆飞、汤佩松,绿豆子叶吸胀过程中线粒体发育的研究,植物学报,1985,27:482—488。
- [6] Arnon D. I., Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 1949, 24: 1—5.
- [7] Azcon-Bieto J. Effect of oxygen on the contribution of respiration to the CO₂ compensation point in wheat and bean leaves. *Plant Physiol.*, 1986, 81: 379—382.
- [8] Azcon-Bieto J., Lambers H., Day DA., Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative pathway in leaf respiration. *Plant Physiol.*, 1983, 72: 598—603.
- [9] Azcon-Bieto J, Osmond C. B., Relationship between photosynthesis and respiration: The effect of carbohydrate status on the rate of CO₂ production by respiration in darkened and illuminated wheat leave. *Plant Physiol.*, 1983, 71: 574—581.
- [10] Bahr J. T., Bonner W. D. Jr. Cyanide insensitive respiration. II. Control of the alternative pathway. *J. Biol Chem.*, 1973, 248: 3446—3450.
- [11] Day D. A., Arron G. P. and Laties G. G., Nature and control of respiratory pathways in plants. The interaction of cyanide-resistant respiration with the cyanide-sensitive pathway. In *Biochemistry of Plants. Vol II.* Davies DD (ed), Academic Press, New York, 1980, pp197—242.

- [12] Douce R, Moore A. L., Neuburger M. Isolation and oxidative properties of intact mitochondria isolated from spinach leaves. *Plant Physiol.*, 1977, **60**: 625—628.
- [13] Dry I. B. and Wiskich J. T., Characteristics of glycine and malate oxidation by pea leaf mitochondria; evidence of differential access to NAD and respiratory chains. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1985, **12**: 329—339.
- [14] Emerson R, Lewis C. M., The dependence of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis on wavelength of light. *A. J. Bot.*, 1943, **30**: 165—178.
- [15] Gardestrom P, Edwards GE, Effects of light on dark respiration. In Higher Plant Cell Respiration. Douce R, Day DA (eds), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985, pp314—346.
- [16] Gordon S. A. A., Sürrey K., Red and far-red action on oxidative phosphorylation. *Radiation Res.*, 1960, **12**: 325—329.
- [17] Kato, Masru, Shinzawa, Kyoko, Yoshikawa, Shinya. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria. *Photochem. Photobiophys.*, 1981, **2**: 263—269.
- [18] Kowallik W. Blue light effects on respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1982, **33**: 51—72.
- [19] Lance C, chauveau M, Dizengremel P. The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria. In Higher Plant Cell Respiration. Douce R, Day DA (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1985, pp202—247.
- [20] Laties G. G., The cyanide-resistant alternative path in higher plant respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1982, **33**: 519—555.
- [21] Musgrave M. E., Siedow JN. A relationship between plant respiration to cytokinins and cyanide-resistant respiration. *Physiol. Plant*, 1985, **64**: 161—166.
- [22] Palmer J. M., The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1976, **27**: 133—157.

LIGHT EFFECT ON THE OXYGEN CONSUMPTION OF MITOCHONDRIA FROM MUNG BEAN SEEDS AND LEAVES

Wang Yixing

(Department of Biochemistry; Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632)

Li Mingqi

(Department of Agricultural Biology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract

Oxygen consumption of mitochondria isolated from mung bean seeds and leaves was determined with an oxygen electrode in the dark or light. In mitochondria isolated from mung bean leaves, strong light (40 000 lx) suppressed the NADH oxidation by 11.8% through cytochrome pathway, and the capacity of the alternative pathway was increased by 71.5%. This suggested that illumination caused part of the electrons diverting from the cytochrome pathway to the alternative pathway. It was postulated that one of the physiological functions of the alternative pathway was to regulate the balance between levels of NADH and high-energy phosphate in green cells. The mechanism of this light effect on the change in respiratory pathway still remains unknown.

The mitochondria from germinated seeds of mung bean, however, were different to that from leaves of mung bean, it showed no response to light.

Key words: mung bean; mitochondria; light; alternative pathway