

木本植物阳生和阴生叶片叶绿体 O_2 和 NO_2^- 光还原作用

林植芳, 彭长连, 林桂珠

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 在有 PCR 和 PCO 环活性抑制剂甘油醛和光合磷酸化解偶联剂 NH_4Cl 存在下, 比较了生长于 3 种光环境的乔木紫荆和灌木九节幼苗阳生和阴生叶片叶绿体的 O_2 和 NO_2^- 光还原速率。全自然光下两种植物阳生叶片的叶绿体 O_2 的光还原速率最高, 占总光合电子传递活性的 66%–68%, NO_2^- 光还原速率也有类似趋势, 占总电子传递的 11%–15% 左右。36% 和 16% 自然光下阴生叶片 O_2 和 NO_2^- 光还原速率及 O_2 光还原电子传递的比例显著降低, 但 NO_2^- 光还原电子传递的比例不受影响。与 NO_2^- 光还原相关的叶片 NiR 和 NR 活性及 NiR/NR 活性比也因叶片接受光强度大小而异, 随光强减弱, 紫荆的 NiR 活性降低, 九节的 NR 活性增高, 但紫荆的 NR 活性和九节的 NiR 活性变化未达差异显著性。

关键词: O_2 的光还原; NO_2^- 光还原; 木本植物; 叶绿体; 光环境; 亚硝酸还原酶

中图分类号: Q945.11

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2001)01-0001-06

THE O_2 AND NO_2^- PHOTOREDUCTION IN CHLOROPLASTS OF SUN AND SHADE LEAVES OF WOODY PLANTS

LIN Zhi-fang, PENG Chang-lian, LIN Gui-zhu

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

Abstract: O_2 and NO_2^- photoreduction in chloroplasts isolated from the leaves of *Castanopsis fissa* (tree) and *Psychotria rubra* (shrub) seedlings grown under three light intensities were compared in the presence of glyceraldehyde (an inhibitor of PCR and PCO cycle activity) and NH_4Cl (uncoupler of photophosphorylation). The highest rate of O_2 photoreduction (Mehler reaction) was observed in chloroplasts from full sun-exposed leaves of both plants, which was 66%–68% of total electron transport. NO_2^- photoreduction showed a similar trend, but it was only 11%–15% of total electron transport activity. Shade leaves exposed to 36% and 16% of full sun light significantly decreased the photoreduction rates of O_2 and NO_2^- , and the percentage of O_2 photoreduction to total electron transport, but had no effect on the percentage of electron transport partitioning to NO_2^- photoreduction. The activities of nitrite reductase (NiR), nitrate reductase (NR) in leaves and the ratio of NiR/NR activity were also affected by light intensity. As the light intensity was reduced, NiR activity decreased in *C. fissa*, and NR activity increased in *P. rubra*, whereas the

收稿日期: 2000-10-31

基金项目: 中国科学院重点基金资助项目 (KZ952-J1-105); 广东省自然科学基金资助项目 (984011)。

changes in NR activity in *C. fissa* or NiR activity in *P. rubra* were not significant. The ratio of NiR/NR activity in two sun leaves reached more than 3, and it was just 1.7–2.2 in shade leaves.

Key words: Oxygen photoreduction; Nitrite photoreduction; Chloroplasts; Woody plants; Light intensity; Nitrite reductase

O_2 、 NO_2^- 和草酰乙酸 (OAA) 是叶绿体中除 CO_2 之外的重要的交替性光合电子传递受体。高等植物叶绿体中同时进行 CO_2 和 NO_2^- 的光还原和光同化作用, 叶片中总的 CO_2 同化量约为 NO_2^- 光还原量的 5–20 倍^[1]。而两个与光合耗氧相关的电子传递途径—光呼吸和 Mehler 反应对于防止光抑制和光破坏具有重要的生理功能^[2]。近年来的研究已证明 O_2 的光还原 (Mehler 反应) 可消耗光合作用过程产生的电子而保持非环式电子传递的运行, 限制光合电子传递链的还原性中间产物的积累; Mehler 反应产物 O_2^- 的歧化作用消耗类囊体基质的质子而形成跨类囊体膜的 pH 梯度, 耗散过剩的激发能, 降低 PSII 光抑制的危险性^[3,4]。另一方面, O_2 的光还原可介导 ATP 的产生, 约有 10% 光下产生的 ATP 来自因 Mehler 反应形成的假环式电子传递^[5]。此种功能对于 C_4 植物的叶肉细胞甚至比 C_3 植物的叶绿体更重要^[6]。

在正常生理条件下, Mehler 反应只占总光合电子传递的较小比例, 干旱条件下可高达 29%^[7]。然而, 迄今对于 Mehler 反应对总光合电子传递贡献的大小, 以及其防止光抑制的有效性程度仍有争议^[3,8]。对 Mehler 反应运行特性与植物种类和环境因子的关系尚缺乏较深入的研究, 而对于 NO_2^- 光还原的电子传递与总电子传递速率关系的工作则更少见, 其原因与进行此类研究的较高技术方法难度有关。因此, 本文在控制光强条件下栽种采自自然林中的乔木鰲蒴和灌木九节的幼苗, 分别取其阳生和阴生叶片, 利用相关的抑制剂研究叶绿体的 Mehler 反应和 NO_2^- 光还原的电子传递速率的变化与叶片光适应性的关系, 为进一步了解此两种光合电子传递支路的生理功能和不同光强下光合电子传递控制的特点提供依据。

1 材料和方法

植物种类和光强抑制 乔木树种鰲蒴 *Castanopsis fissa* (Champ. ex Benth.) Rehd. et Wils. 和灌木种九节 *Psychotria rubra* (Lour.) Poir. 的幼苗采自广东省鼎湖山自然保护区。盆栽, 自然光照或遮阴降低光强到自然光的 36% 和 16%。7 月份入射于叶面的 100% 自然光为 $873 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (9:00) 和 $1605 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (12:00)。12 月份的 100% 自然光在 9:00 和 12:00 分别为 $995 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 和 $1243 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。当幼苗适应于不同光强下达 18 个月后, 采集顶端第 3–4 位成熟叶为材料。

叶绿体制备 取去中脉叶片于 -10°C 下冷冻 30 min, 按苏行等的方法^[9] 提取制备叶绿体, 但提取液中增加 2 mmol/L 异抗坏血酸, 最终的叶绿体悬浮液则不含异抗坏血酸。

全链光合电子传递速率测定 基本反应液为磷酸缓冲液 50 mmol/L, pH7.8, 含 NH_4Cl 5 mmol/L, $NaNO_3$ 10 mmol/L, MV 10 $\mu\text{mol/L}$, 叶绿体 (25–60 $\mu\text{g Chl}$)。利用甘油醛 (10 mmol/L) 抑制光合碳同化 (PCR 环) 和光呼吸 (PCO 环), 在磷酸化解偶联条件下 (以 NH_4Cl 抑制光合磷酸化) 从加或不加甘油醛时电子传递速率之差计算 O_2 的光还原速率。测定时 25°C , 光强 $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 用 Clark 氧电极测定 O_2 吸收速率。 NO_2^- 光还原测定在同一条件下进行, 但改

为以 5 mmol/L NO_2^- 部分地代替 O_2 作电子受体, 以吸 O_2 值的降低计算 NO_2^- 光还原速率。

硝酸还原酶 (NR) 和亚硝酸还原酶 (NiR) 活性测定 叶片用提取缓冲液 (25 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.5, 5 mmol/L EDTA- Na_2 , 5 mmol/L 半胱氨酸) 研磨, 四层纱布过滤, 10 000 × g 离心 10 min, 上清液为粗酶液。NiR 活性和 NR 活性分别参照林振武^[10]和 Rajasek 的方法^[11]测定, 以 $NaNO_2$ 作标准曲线, 以 $\mu\text{mol L}^{-1}NO_2^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$ 表示酶活性单位。

2 实验结果

2.1 叶绿体的 O_2 光还原速率

图 1 是在抑制碳同化和光呼吸条件下两种木本植物叶绿体中 O_2 的光还原速率及其占总的电子传递速率的百分比。生长在自然光下的两种植物的阳生性叶片叶绿体 O_2 光还原速率最高, 生长于 16% 光下的阴生叶片叶绿体的 O_2 光还原速率最低 (图 1A)。光合电子流传递到 O_2 占总光合电子传递的比例也随叶片接受光强的大小而不同, 在本试验限制光合电子正常传递的条件下, 生长于自然光下的叶片叶绿体中有约 66%–68% 的电子传递以 O_2 为受体, 36% 光下降至约 56%–61%, 而 16% 光下则在 49% 左右 (图 1B)。结果表明当光合碳同化电子传递受阻时, O_2 可作为主要的电子受体而保持非环式电子传递的运行。与阴生叶相比, 阳生性叶片明显地提高了将电子传递到 O_2 的能力。3 种光强下 O_2 的光还原速率和其占总电子传递比例的差异皆达 $p < 0.05$ 。

2.2 叶绿体的 NO_2^- 光还原速率

NO_2^- 光还原与 CO_2 还原过程在高光下并不相互竞争还原性 Fd^[1], 但加入光合碳同化抑制剂是获得最大的 NO_2^- 光还原速率之需^[12]。光合磷酸化解偶联剂可加速 NO_2^- 光还原^[13]。在本试验中加入甘油醛和 NH_4Cl , 全自然光下生长的蕨类和九节叶绿体的 NO_2^- 光还原速率比处于 36% 和 16% 光强的阴生叶叶绿体的高 (图 2A)。蕨类的 NO_2^- 光还原速率占总电子传递的 15.5%–16%, 九节的较低, 在 10%–13% 之间 (图 2B)。两种植物在不同光强下叶绿体中参与 NO_2^- 光还原的电子传

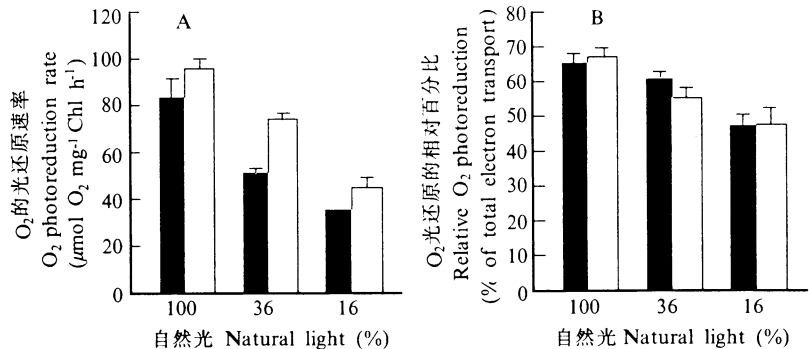


图 1 阳生和阴生叶片的 O_2 光还原速率

Fig. 1 O_2 photoreduction rates in sun and shade leaves

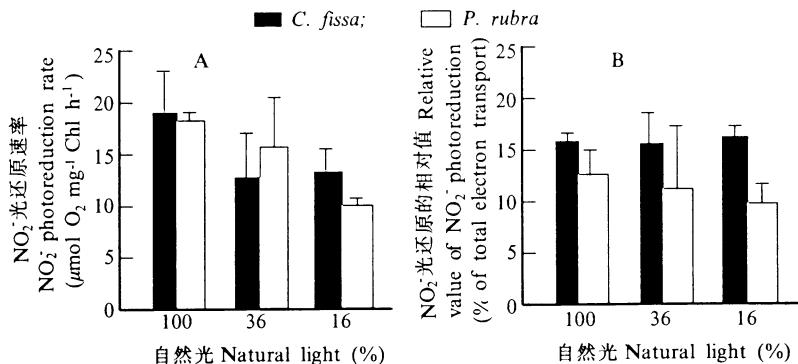


图 2 阳生和阴生叶片的 NO_2^- 光还原速率

Fig. 2 NO_2^- photoreduction rates in sun and shade leaves

■ *C. fissia*; □ *P. rubra*

递比例的变化甚小。这说明 NO_2^- 作为更替电子受体的作用比 O_2 小, 且其光还原作用与总电子传递的比例对光强变化的敏感性较低。

2.3 叶片的硝酸还原酶 (NR) 和亚硝酸还原酶 (NiR) 活性

光合细胞将 NO_3^- 、 NO_2^- 和 NH_4^+ 同化为有机 N 时需要由光产生的还原剂。细胞质中的 NR 催化 NO_3^- 还原成 NO_2^- ; 而叶绿体的 NiR 催化 NO_2^- 还原为 NH_4^+ [14]。本文为了解叶绿体 NO_2^- 光还原速率变化与有关酶类活性的关系, 测定了叶片中 NR 和 NiR 的相应活性。从图 3 看出, 乔木和灌木植物 NiR 活性水平及其随叶片受光程度不同而变化的趋势不一致。乔木种 鸢 蓂 的 NiR 活性水平较高, 叶片阴生性增强使 NiR 活性持续降低, 这与阴生叶的低 NO_2^- 光还原速率 (图 2A) 相符。灌木九节的 NiR 活性水平较 鸢 蓂 低, 其 NiR 活性平均值只为 鸢 蓂 的 54%, 且其 NiR 活性在不同光强下变化不大。

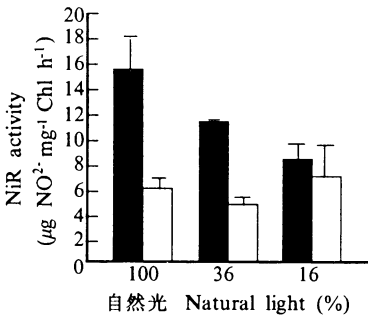


图 3 阳生和阴生叶的亚硝酸还原酶活性
Fig. 3 Activities of nitrite reductase in sun and shade leaves
■ *C. fissa* □ *P. rubra*

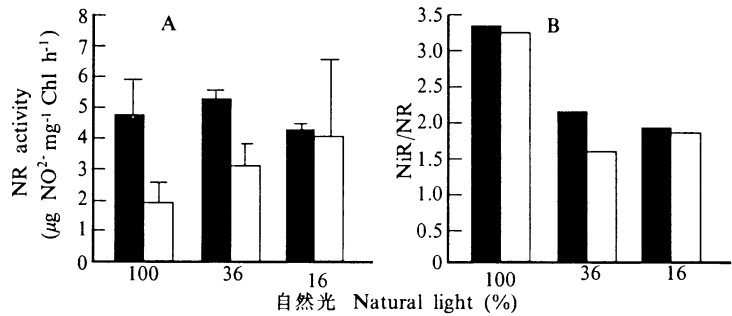


图 4 阳生和阴生叶的硝酸还原酶活性和亚硝酸还原酶/硝酸还原酶活性比
Fig. 4 Activities of nitrate reductase and the ratios of NiR/NR activity in sun and shade leaves
■ *C. fissa* □ *P. rubra*

两种植物的 NR 活性水平比 NiR 低, NR 活性范围在 $2-5 \mu\text{g NO}_2^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$ 之间 (图 4A) 与 Robinson 报道大豆叶片的 NR 活性在 $3-7 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$ [15] 近似。鸢蓂的 NR 活性在 3 种光强下未有显著的差异, 九节的 NR 活性在阴生叶中提高。图 4B 看出, NiR 活性约为 NR 活性的 1.7-3.3 倍, 自然光下的阳生叶片的 NiR/NR 比最高, 弱光下此比率下降了 34%-49%, 显示光强对 NO_2^- 还原和 N 同化的影响与其调控 NiR/NR 比有关。

3 讨论

光合作用过程存在活跃的 Mehler 反应和 N 同化作用。在正常条件下, 小麦的 O_2 和 NO_2^- 光还原两者约占总电子流的 16% [7]。苍耳叶肉细胞和菠菜叶绿体 O_2 的光还原为其净 CO_2 同化速率的 10%-13% [16]。逆境或外加碳同化抑制剂可提高 Mehler 反应速率, 饲喂甘油醛的小麦和菠菜叶片的 O_2 光还原达到最大电子流的 14% 和 20% [17]。Lovell 和 Winter 通过改变气体成分后获得榕树等 2 个树种叶片气体交换和 Chl 荧光参数, 据此而估计其 Mehler 反应在高光下约为叶片总电子流的 10%-20% [2]。我们的结果则看到两种木本植物叶绿体在 Calvin 环受抑制时, Mehler 反应速率可高达全链电子传递的 49%-68%。如此高比例的原因可能是: (1) 甘油醛直接作用于叶绿体, 不受叶片细胞壁和细胞溶质的影响, 其对 PCR 环的抑制效应比饲喂叶片更强, 在大部分 CO_2 光还原受阻情况下, O_2 则作为主要的光合电子受体; (2) 测定系统中含有甲基紫精 (MV,

人工电子受体) 和光合磷酸化解偶联剂 NH_4Cl , 两者皆有刺激 O_2 吸收的作用^[5,18]。可见, 抑制以 CO_2 为主要电子汇的光合电子传递, 方能较清楚地了解 Mehler 反应和 NO_2^- 光还原之间的关系及其对环境因子变化的响应。

O_2 的光还原占总电子传递的比例在生长于全自然光下阳生叶片的叶绿体中最高, 与 Osmond 和 Grace 报告强光下叶片有明显的 Mehler 反应活性^[19] 相一致。说明 Mehler 反应的运行状况受到光强的调控, 强光提高了光合电子向 O_2 分子传递的能力。Mehler 反应在 O_2 浓度 35–60 $\mu mol/L$ 时已饱和, 增大光强可显著提高 Mehler 反应对 O_2 的亲合力^[15,20]。故处于全自然光的供试木本植物叶绿体有较高的 O_2 光还原速率和比例可能与此条件下对 O_2 的高亲和力有关。我们已检测到高光下叶绿体中作为 Mehler 反应主要产物 O_2^- 及其他活性氧 $OH\cdot$ 和 H_2O_2 的较高产生速率, 及阳生叶中较高的叶绿素荧光非光化学猝灭能力(另文报道), 由此证明适应于高光强的叶片中 Mehler 途径运行增强有利于保持非环式电子传递和耗散激发能。这一结果与我们前文报告高光强下光合电子传递到光呼吸的比例增高的结果^[21] 相似, 皆是木本植物对光环境变化的生理调控作用的表现。

与 O_2 的光还原相比, NO_2^- 光还原速率及其占总光合电子传递比例较低, 受不同光强的影响也较小。但若以全自然光下阳生叶的此两种类型的光还原速率皆作为 100% 而计算阴生叶叶绿体的相对值, 将所得相对值与光强相对值作线性回归分析, 则光强与 O_2 或 NO_2^- 光还原的相关系数 r 分别为 0.9469 和 0.9747, 表明这两个电子传递支路的运行状况与叶片的光适应性密切相关。

光合机构中由 $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+$ 的还原由 NR(细胞溶质中) 和 NiR(叶绿体中) 催化完成, 此两个步骤分别需要 2 个和 6 个电子, 且皆受光的调控^[14,22]。本文中全自然光下的蕪菁和九节叶片的 NiR/NR 活性分别为 3.31 与 3.27, 与此两酶催化所需的电子数 3:1 相符。在弱光下生长的阴生叶的低 NiR/NR 活性比可能与活化 NiR 所需的光合电子不足有关, 因为阴生叶中的光合电子流较少^[21]。乔木蕪菁 NO_2^- 还原速率及 NiR 活性随光强变化的趋势一致, 显示高的 NO_2^- 光还原与高 NiR 相关。九节的 NO_2^- 光还原速率在低光下降低, 但 NiR 活性无显著变化, NR 活性反而提高, 其原因不明, 尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Robinson J M. Carbon dioxide and nitrite photoassimilatory processes do not intercompete for reducing equivalents in spinach and soybean leaf chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1986, 80:676–684.
- [2] Lovelock C E, Winter K. Oxygen-dependent electron transport and protection from photoinhibition in leaves of tropical tree species [J]. *Planta*, 1996, 198:580–587.
- [3] Polle A. Mehler reaction: Friend or foe in photosynthesis? [J] *Bot Acta*, 1996, 109:84–89.
- [4] Neubauer C, Yamamoto H Y. Mehler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quencing in intact chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1992, 99:1354–1361.
- [5] Badger M R. Photosynthetic oxygen exchange [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1985, 36:27–53.
- [6] Furbank R T, Badger M R, Osmond C B. Photoreduction of oxygen in mesophyll chloroplasts of C_4 plants. A model system for studying an *in vivo* Mehler reaction [J]. *Plant Physiol*, 1983, 73:1038–1041.
- [7] Biehler K, Fock H. Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112:265–272.
- [8] Wiese C, Shi L-B, Helber U. Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation [J]. *Physiol Plant*, 1998, 102:437–446.

- [9] 苏行, 林植芳, 孙谷畴. 脂氧合酶对黄瓜叶片光合电子传递活性的影响 [J]. 植物学报, 1996, 38(4):287-294.
- [10] 林振武, 孙惠珍, 陈敬祥. 硝酸还原酶活性的体内试验 [J]. 植物生理学通讯, 1985, 3:33-35.
- [11] Rajasek V K, Mohr H. Appearance of nitrite reductase in cotyledons of the mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings as affected by nitrate, phytochrome and photooxidative damage of plastids [J]. *Planta*, 1986, 168:369-376.
- [12] Anderson J W, Done J. Light dependent assimilation of nitrite by isolated pea chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1978, 61:692-697.
- [13] Williams Tr C H. Flavin containing dehydrogenase [A]. In: Boter P D. The Enzyme [M]. 3rd ed. Vol 13. New York: Academic Press, 1976. 89-173.
- [14] Torre de la A, Delgado B, Lara C. Nitrate-dependent O₂ evolution in intact leaves [J]. *Plant Physiol*, 1991, 96: 898-901.
- [15] Robinson J M. Does O₂ photoreduction occur within chloroplasts *in vivo* [J]. *Physiol Plant*, 1988, 72:666-680.
- [16] Furbank R T, Badger M R, Osmond C B. Photosynthetic oxygen exchange in isolated cells and chloroplasts of C₃ plants [J]. *Plant Physiol*, 1982, 70:927-931.
- [17] Loreto F, DiMarco G, Tricoli D, et al. Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves [J]. *Photosynth Res*, 1994, 41:397-403.
- [18] Marsho T V, Behrens P. Photosynthetic oxygen reduction in isolated intact chloroplasts and cells from spinach [J]. *Plant Physiol*, 1979, 64:656-659.
- [19] Osmond C B, Grace S C. Perspective on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? [J] *J Exp Bot*, 1995, 46:1351-1362.
- [20] Takahashi M, Asada K. Dependence of oxygen affinity for Mehler reaction on photochemical activity of chloroplast thylakoids [J]. *Plant Cell Physiol*, 1982, 23:1457-1461.
- [21] 林植芳, 彭长连, 孙梓健, 等. 光强对4种亚热带森林植物光合电子传递向光呼吸分配的影响 [J]. *中国科学, C辑*, 2000, 30(1):72-77.
- [22] Duke S H, Duke S O. Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plants [J]. *Physiol Plant*, 1984, 62:485-493.