

温度变化下银白杨叶片中线粒体呼吸对光合作用和异戊二烯释放的影响

贾凌云, 冯汉青*, 孙坤, 李岩, 张晋平

西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070

摘要: 温度的升高增加了银白杨叶片异戊二烯的释放水平; 随着温度的升高, 线粒体呼吸速率则有所下降。用线粒体呼吸途径的抑制剂处理叶片能够增加叶片异戊二烯的释放水平; 然而, 同样的处理对光系统II叶绿素荧光参数并没有显著性的影响, 并降低了叶片的光合速率。基于以上结果, 本文认为在温度上升时, 异戊二烯的释放可能并不依赖于光合作用, 而线粒体呼吸的上游底物流向异戊二烯的合成路径可能促进了温度上升时异戊二烯释放的增加。

关键词: 银白杨; 线粒体呼吸; 异戊二烯; 温度; 光合作用

Effects of Mitochrial Respiration on Photosynthesis and Emission of Isoprene under Various Temperatures in Leaves of *Populus alba* L.

JIA Ling-Yun, FENG Han-Qing*, SUN Kun, LI Yan, ZHANG Jin-Ping

College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The level of isoprene emission in *Populus alba* increased with the increase of temperature, while mitochondrial respiration decreased. Under various temperature, the treatments of the chemical inhibitors of mitochondrial respiration pathway further enhanced the isoprene emission in leaves. However, the same treatments had little effects on the photosystem II chlorophyll fluorescence, but decreased photosynthetic rate. Based on these above results, it was proposed that when the temperature rose, the isoprene emission could be independent on photosynthesis, and the biosynthetic pathway in which the upstream substrate of mitochondrial respiration flowed to the isoprene contributed to the increase of isoprene emission.

Key words: *Populus alba*; mitochondrial respiration; isoprene; temperature; photosynthesis

异戊二烯是构成植物萜类化合物的基本单元, 也是植物向大气中释放的最主要的挥发性化合物(Guenther等1995)。温度和光照等环境因素的变化均能引起植物异戊二烯合成和释放水平的改变, 而异戊二烯的释放又能对植物自身起着重要的保护作用, 可降低高温和强光等环境因素对植物造成的负面影响(Kuhn等2002)。并且, 最近的研究表明, 异戊二烯在植物开花和驱散害虫等生理过程中也扮演着重要的角色(Sharkey等2008)。

已有的研究揭示了植物主要通过叶绿体中的甲基苏糖醇磷酸酯(methyl-erythritol 4-phosphate, MEP)途径合成异戊二烯。光合二氧化碳固定所产生的甘油醛3-磷酸和丙酮酸是MEP途径合成异戊二烯的原初底物(Trowbridge等2012); 此外, 光合电子传递所产生的ATP和NADPH也为MEP途径合成异戊二烯提供了必需的能量和还原力(Sharkey等2008), 而有学者发现在热胁迫下异戊二烯能够稳定叶绿体中的类囊体膜, 可见光合作用和异戊二

烯的合成之间存在着密切的联系(Sanadze 2004; Velikova等2012)。但是, 关于植物中其它的代谢路径是否也会参与异戊二烯合成的研究较少。线粒体呼吸是植物产生碳骨架的主要位点。有研究表明, 鞭毛虫的线粒体在控制萜类化合物的碳底物供应中扮演着重要的角色(Carrero-Lérida等2009), 提示了线粒体呼吸作用有可能会参与植物异戊二烯的合成。然而, 目前国内外有关植物异戊二烯释放机理的研究仍主要以光合作用为切入点, 人们对线粒体呼吸是否会参与植物异戊二烯释放这一问题尚缺少足够的了解。另外, 近年来的研究发现, 植物线粒体呼吸电子传递中细胞色素途径

收稿 2012-04-23 修定 2012-08-27

资助 国家自然科学基金(30900105)、教育部科学技术研究重点项目(211190)和校级基金项目(NWNU-kjcxgc-03-77和NWNU-09-31&NWNU-LKQN-10-32)。

* 通讯作者(E-mail: fenghanq@nwnu.edu.cn; Tel: 0931-7971414)。

(cytochrome pathway)和交替途径(alternative pathway)均能够影响植物的光合速率(Yoshida等2006);因此,如果异戊二烯的产生和光合作用有关,那么推测线粒体呼吸、光合作用以及植物异戊二烯的释放之间可能存在的联系。但目前对这一问题也缺少相应的研究。

基于此,本文在杨树(典型的异戊二烯释放型植物)叶片中研究了不同温度条件下线粒体呼吸作用对异戊二烯释放、光合作用和叶绿素荧光参数的影响,并探讨了线粒体呼吸作用对异戊二烯释放影响的可能机理。相信该研究有利于进一步丰富人们对植物异戊二烯合成内在机理和植物代谢途径之间的相互联系的认识。

材料与方法

1 植物材料与处理

约十年生的银白杨(*Populus alba* L.)树(36.056°N, 103.440°E, 海拔1 542 m)于9月切取枝条,立刻将茎部浸入蒸馏水中并转至培养室,使其在培养室中适应环境2 h左右,从相同位置选取大小一致且完全伸展的叶片作为实验材料。

将枝条切下的叶片放置于前期配置并保存的缓冲液[50 mmol·L⁻¹ HEPES-KOH (pH7.2)、0.5 mmol·L⁻¹ CaSO₄和20 mmol·L⁻¹ NaHCO₃]中,在培养皿中对叶片进行真空渗透1 h。第1组叶片缓冲液中含有1 mmol·L⁻¹水杨基氧肟酸(SHAM, 交替呼吸途径的抑制剂),第2组叶片缓冲液中含有0.5 mmol·L⁻¹氰化钾(KCN, 细胞色素途径的抑制剂),第3组叶片缓冲液中同时含有1 mmol·L⁻¹ SHAM和0.5 mmol·L⁻¹ KCN;以不含抑制剂的缓冲液处理作为对照。渗透结束后,将叶片从培养皿中取出,清洗并吸去叶片表面残余的缓冲液。将叶片的叶柄浸入上述4种缓冲液中,并将叶片分别置于温度15、20、30和40 °C下(光照强度大约为700 μmol·m⁻²·s⁻¹) 4 h后取样测定参数。

2 叶片的光合作用、叶绿素荧光参数和异戊二烯释放的检测

叶片的光合作用使用英国PP Systems的TPS-2光合仪测定。叶绿素荧光参数使用德国PAM2500型叶绿素荧光仪测量:在上述光照强度下当叶片实时荧光达到稳态时得到荧光强度 F_s ;再给叶片一

个饱和脉冲光后得到PSII中心关闭时光下最大荧光强度 F_m' ,通过公式 $(F_m' - F_s)/F_m'$ 得到该作用光存在时光系统II (PSII)的实际的量子效率。利用远红光脉冲得到荧光强度 F_o' ,分别依据公式 $(F_m' - F_o')/F_m'$ 和 $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ 分别计算开放的PSII反应中心的激发能捕获效率(F_v'/F_m')和光化学猝灭系数(q_p)。异戊二烯释放的检测依据Zeidler和Lichtenhaler (1998)的方法进行。以上实验结果为至少3次测量的平均值。

3 叶片呼吸参数的测定

叶片称重后切成小块并放置于测量杯中。依据Bingham和Farrar (1989)的方法使用Clark型氧电极(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所)测量和计算总呼吸、交替呼吸途径和细胞色素途径的容量。

4 数据处理工具和方法

使用SPSS 9进行实验数据的录入和计算,使用单因素ANOVA对样品进行显著性差异分析。

实验结果

1 温度变化对杨树叶片异戊二烯释放的影响

当环境温度从15 °C上升至20 °C时,异戊二烯的释放水平未发生显著性变化,当温度上升至30 °C时,异戊二烯的释放显著增加,当温度达到40 °C时,异戊二烯的释放进一步增加,其水平在测试的温度范围内达到最高值(图1)。

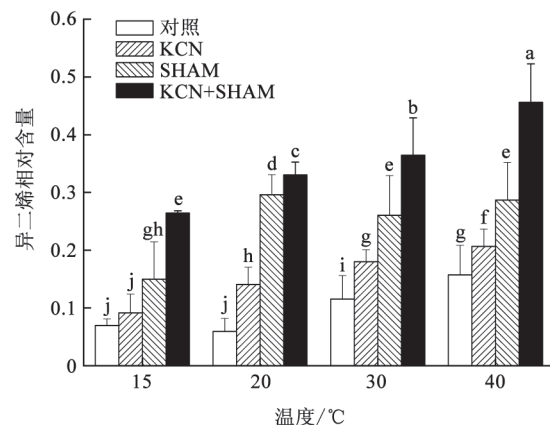


图1 不同温度下呼吸抑制剂对异戊二烯释放的影响
Fig.1 Effects of respiration inhibitors on isoprene emission of poplar leaves in different temperatures
不同字母代表显著性差异结果($P < 0.05$)。下图同此。

为了研究线粒体呼吸及其不同的呼吸途径是否会对温度变化下植物异戊二烯的释放造成影响,在温度处理前,我们分别用SHAM、KCN或是SHAM+KCN处理叶片以抑制线粒体呼吸。这些呼吸抑制剂的工作浓度已被报道不会对光合作用等其他代谢造成直接影响(Yoshida等2006; Bartoli等2005)。前期的预实验表明,SHAM和KCN分别能够对交替呼吸途径和细胞色素途径造成大约66%和68%的抑制;而SHAM+KCN复合处理能够抑制大约85%的总呼吸。

结果(图1)显示,SHAM和KCN的单独处理均导致了叶片异戊二烯释放水平的增高,而SHAM和KCN的复合处理对叶片异戊二烯释放水平的增加作用最为明显。

2 温度变化对叶片线粒体呼吸的影响

当温度从15 °C上升至20 °C,叶片的总呼吸、细胞色素和交替途径的容量并未发生显著性变化(图2)。但是当温度升至30 °C时,总呼吸、细胞色素和交替途径的容量呈现出显著性的下降;当温度升至40 °C时,总呼吸、细胞色素和交替途径的容量呈现出进一步的下降,其水平在测试的温度范围内处于最低。

3 不同温度下呼吸抑制剂对叶片光合作用的影响

光系统II叶绿素荧光参数能够反映光合作用的光反应阶段将激发能转化为化学能的效率,而光合速率能够反映植物利用光反应阶段产生的化学能对二氧化碳进行固定的能力(Stirbet和Govindjee 2011; Magel等2006)。因此,我们检测了当温度上升引起异戊二烯释放增加时叶片光系统II叶绿素荧光参数和光合速率的变化情况以及呼吸抑制剂对这种变化的影响。在不同的温度下,叶片的光合速率(P_n)并没有显著的变化;而3种呼吸抑制剂处理均显著性地降低了叶片的光合速率(图3)。

随着温度的上升,开放的PSII反应中心的激发能捕获效率(F_v'/F_m')、上述作用光下PSII的实际量子效率 $[(F_m' - F_s)/F_m']$ 和光化学荧光淬灭系数(q_p)有一定程度的降低;但在不同的温度处理过程中,无显著差异。呼吸抑制剂并没有对光照下上述PSII反应中心的激发能捕获效率(F_v'/F_m')、实际量子效率 $[(F_m' - F_s)/F_m']$ 和光化学荧光淬灭系数(q_p)造成显著影响(图4)。

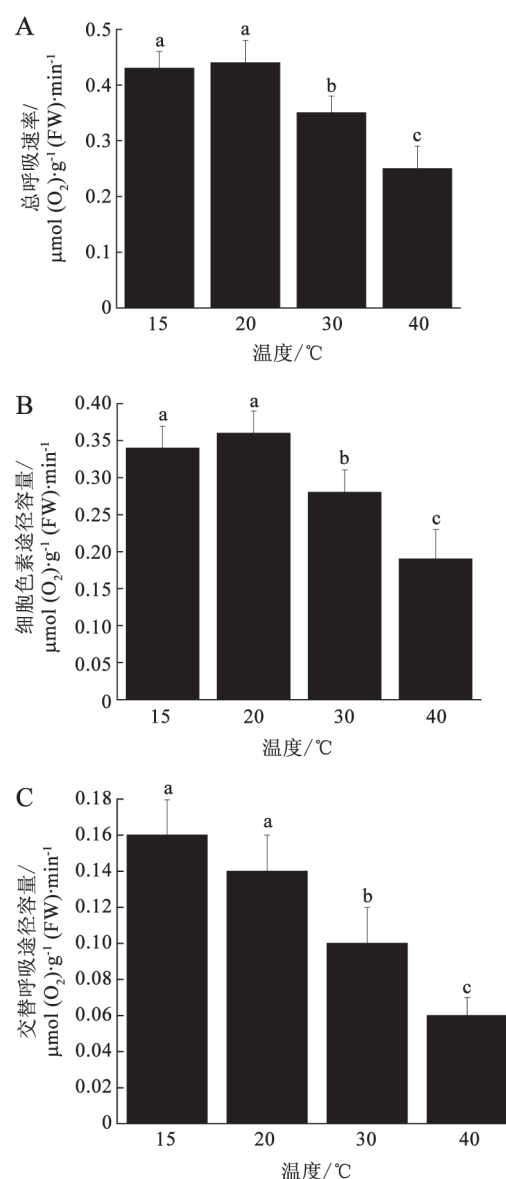


图2 温度对银白杨叶片总呼吸、细胞色素途径和交替呼吸途径容量的影响

Fig.2 Effects of temperature on total respiration, cytochrome pathway capacity and alternative pathway capacity of white poplar leaves

讨 论

呼吸作用是植物产生碳源的一个重要来源,已有研究表明,呼吸糖酵解作用所产生的甘油醛-3-磷酸(G3P)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)能够转运到叶绿体并参与异戊二烯的合成(Affek和Yakir 2003; Loreto等2007)。但G3P和PEP同时也是线粒体呼吸的上游底物,其向叶绿体的转运势必会影响线

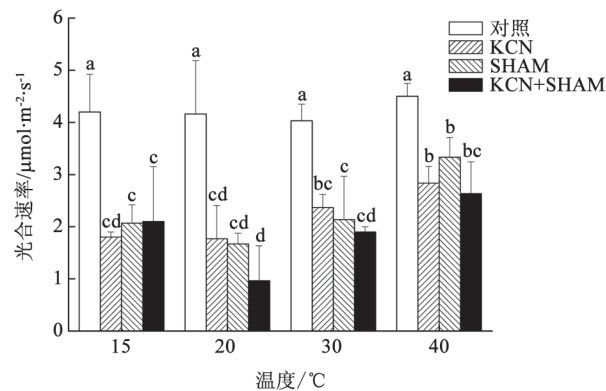


图3 不同温度下呼吸抑制剂对叶片光合速率的影响
Fig.3 Effects of respiration inhibitors on photosynthetic rate of poplar leaves in different temperatures

粒体呼吸的水平。因此, 实验中所观察到的在温度上升时随着异戊二烯水平的增加而出现的线粒体呼吸水平的降低(图1和2)很可能是细胞向叶绿体输送碳底物去促进异戊二烯的合成而同时导致线粒体呼吸底物下降的结果。而线粒体呼吸抑制剂可能通过减少了线粒体呼吸对上游底物的需求, 使得更多的碳底物流向异戊二烯的合成从而促进了异戊二烯释放的增加(图1)。

光合作用化学能的产生和二氧化碳的固定并未像异戊二烯一样在温度升高时增加, 表明它们并不是温度上升时叶片异戊二烯释放增加的决定性因素。Dinakar等(2010)报道了线粒体呼吸的抑制能够降低叶片对二氧化碳的固定能力(可能是通过刺激细胞活性氧的水平)。本研究发现, 线粒体呼吸作用的抑制并不会改变光反应阶段的化学能转化(图4), 但降低了叶片的光合速率并促进了异戊二烯的释放(图1和3), 表明即使引起了光合作用的下降, 线粒体呼吸的抑制也能对植物异戊二烯释放具有促进作用。

一些研究也显示, 当外界环境胁迫如干旱和高盐等导致叶片光合作用下降时, 异戊二烯的释放并没有随之下降(Holopainen和Gershenson 2010), 说明异戊二烯的释放可以不依赖于光合作用。温度的上升并不会刺激光合作用, 相反, 它是一种引起光抑制的环境因素, 会降低大多数植物的光合作用并引起植物的损伤(Hikosaka等2006)。尽管杨树等植物能够通过释放更多的异戊二烯来避免植物免受高温引起的光合作用的下降(Behnke等2010),

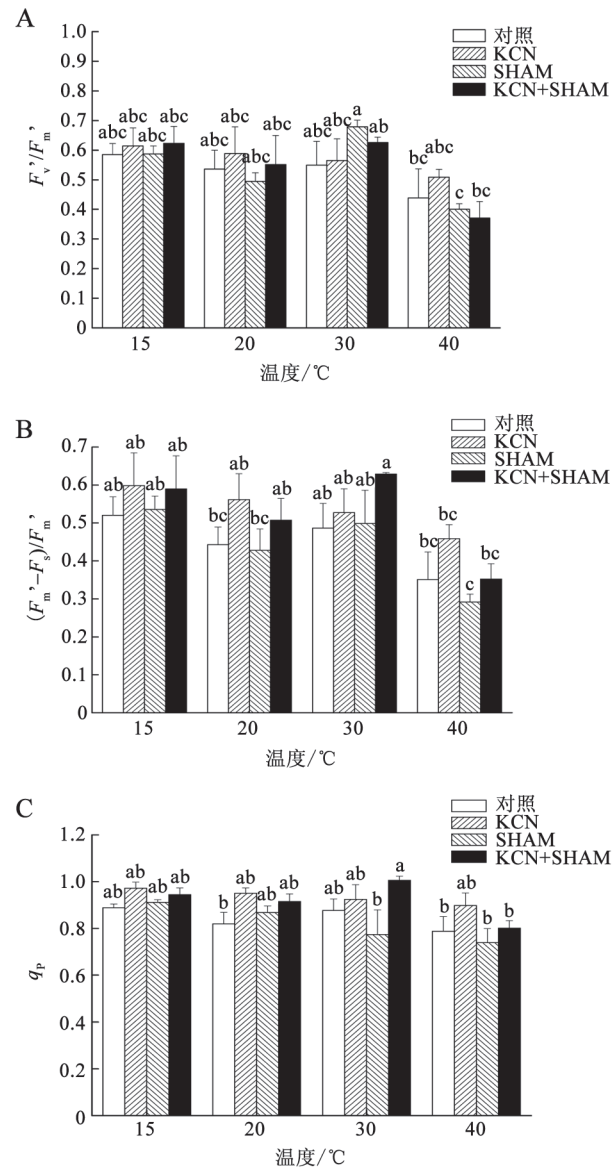


图4 温度和呼吸抑制剂对叶绿素荧光参数的影响
Fig.4 Effects of temperature and respiration inhibitors on chlorophyll a fluorescence quenching parameters

但是在环境温度升高的情况下, 很难想像叶片能够通过光合作用来满足在温度上升时植物对异戊二烯合成增加的需求。利用同位素示踪技术, Trowbridge等(2012)和Monson等(2011)最新的研究表明, 在环境中二氧化碳浓度较高时, 植物主要通过光合作用产生的碳物质来合成异戊二烯; 当环境中二氧化碳浓度较低而使得光合作用无法满足异戊二烯合成时, 植物主要使用细胞中的已有的碳源用于异戊二烯的合成。我们也注意到, 本研究测得的杨树叶片的光合速率明显低于以往工

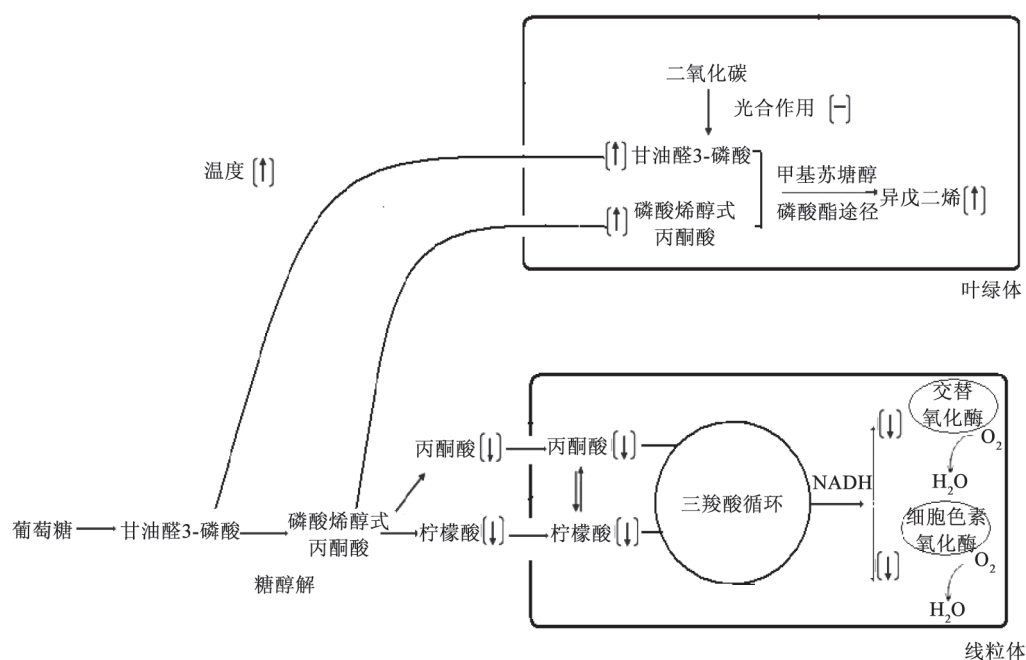


图5 温度升高下线粒体呼吸和异戊二烯合成之间关系的可能机制

Fig.5 Possible mechanism of mitochondria respiration and isoprene synthesis on temperature increment

作中所测得的水平(贾凌云等2012), 猜测是由于叶片的取样位置、时间和测量条件及环境等因素的差异所致; 而以往工作显示了在较高水平光合速率下呼吸的抑制对异戊二烯的释放具有一定的抑制作用, 而本研究显示了在这种较低水平的光合速率下呼吸的抑制对异戊二烯的释放则具有促进作用。如前文所述, 线粒体呼吸作用的抑制能通过改变细胞中已有碳源的流向而促进异戊二烯的合成。因此, 我们猜测, 在温度上升以及二氧化碳浓度降低等因素导致光合速率无法提升的情况下, 植物可能通过抑制线粒体呼吸来满足植物对异戊二烯合成增加的需求。已有的研究证明, 异戊二烯在高温和光照下的释放是植物能抵抗高温引起的光抑制和损伤的重要机制(Rasulov等2011), 杨树叶片在温度上升的情况下并没有发生光合作用的下降可能就是异戊二烯在高温下释放增加的结果。线粒体呼吸作用也被发现能使得叶片在逆境下免受光抑制, 这一般被认为和线粒体呼吸能够降低叶绿体中活性氧的积累有关; 而基于以上的实验观察, 我们认为, 线粒体呼吸也有可能通过调节植物的异戊二烯水平参与了温度升高下植物对光抑制的防御和高温的抗性。综上, 我们认为线粒体呼吸是调节植物异戊二烯释放的一个重要位点,

能够影响植物异戊二烯在环境变化时的水平。

温度升高下叶片呼吸作用降低, 使得呼吸的上游底物甘油醛3-磷酸(G3P)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)向叶绿体输送的数量增加并提升了异戊二烯的合成, 利用线粒体呼吸的抑制剂能进一步促进如上过程。

参考文献

- 贾凌云, 孙坤, 冯汉青, 李岩, 薛薇, 董欢欢(2012). 呼吸作用对叶片光合作用和异戊二烯释放的影响. 植物科学学报, 30 (2): 193~197
- Affek HP, Yakir D (2003). Natural abundance carbon isotope composition of isoprene reflects incomplete coupling between isoprene synthesis and photosynthetic carbon flow Hagit P. *Plant Physiol*, 131: 41727~41736
- Bartoli CG, Gómez F, Gergoff G, Guimét JI, Puntarulo S (2005). Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *J Exp Bot*, 56: 1269~1276
- Behnke K, Loivamäki M, Zimmer I, Rennenberg H, Schnitzler JP, Louis S (2010). Isoprene emission protects photosynthesis in sun fleck exposed Grey poplar. *Photosynth Res*, 104 (1): 5~17
- Bingham IJ, Farrar JF (1989). Activity and capacity of respiratory pathways in barley roots deprived of inorganic nutrients. *Plant Physiol Biochem*, 27 (6): 847~854
- Carrero-Lérida J, Pérez-Moreno G, Castillo-Acosta VM, Ruiz-Pérez LM, Conzález-Pacanowska D (2009). Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the try-

- panosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol*, 39 (3): 307~314
- Dinakar C, Abhaypratap V, Yearla SR, Raghavendra AS, Padmasree K (2009). Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Planta*, 231 (2): 461~474
- Guenther A, Hewitt CN, Erickson D, Fall R, Geron C, Graedel T, Harley P, Klinger L, Lerdau M, McKay WA et al (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *J Geophys Res*, 100 (D5): 8873~8892
- Hikosaka K, Ishikawa K, Borjigidai A, Muller O, Onoda Y (2006). Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *J Exp Bot*, 57 (2): 291~302
- Holopainen JK, Gershenzon J (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci*, 15 (3): 176~184
- Kuhn U, Rottenberger S, Biesenthal T, Wolf A, Schebeske G, Ciccioli P, Brancaleoni E, Frattoni M, Tavares TM, Kesselmeier J (2002). Isoprene and monoterpene emissions of Amazonian tree species during the wet season: direct and indirect investigations on controlling environmental functions. *J Geophys Res*, 107 (D20): 38.1~38.13
- Loreto F, Centritto M, Barta C, Calfapietra C, Fares S, Monson RK (2007). The relationship between isoprene emission rate and dark respiration rate in white poplar (*Populus alba* L.) leaves. *Plant Cell Environ*, 30: 662~669
- Magel E, Mayrhofer S, Müller A, Zimmer I, Hampp R, Schnitzler JP (2006). Photosynthesis and substrate supply for isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Atmos Environ*, 40 (1): 138~151
- Monson R, Trowbridge A, Asensio D, Eller A, Wilkinson M, Schnitzler JP, Jackson R (2011). Flexibility in carbon substrate use for isoprene emission in trees grown at different atmospheric CO₂ concentrations. *J Geophys Res*, 116: EGU2011-4951
- Rasulov B, Hüve K, Laisk A, Niinemets Ü (2011). Induction of a longer term component of isoprene release in darkened aspen leaves: origin and regulation under different environmental conditions. *Plant Physiol*, 156 (2): 816~831
- Sanadze GA (2004). Biogenic isoprene. *Russ J Plant Physiol*, 51: 729~741
- Sharkey TD, Wiberley AE, Donohue AR (2008). Isoprene emission from plants: why and how. *Ann Bot*, 101: 5~18
- Stirbet A, Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B*, 104: 236~257
- Trowbridge AM, Asensio D, Eller AS, Danielle A, Way DA, Wilkinson MJ, Schnitzler JP, Jackson RB, Monson RK (2012). Contribution of various carbon sources toward isoprene biosynthesis in poplar leaves mediated by altered atmospheric CO₂ concentrations. *PLoS One*, 7 (2): e32387
- Velikova V, Sharkey TD, Loreto F (2012). Stabilization of thylakoid membranes in isoprene-emitting plants reduces formation of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav*, 7 (1): 139~141
- Yoshida K, Terashima I, Noguchi K (2006). Distinct roles of the cytochrome pathway and alternative oxidase in leaf photosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 47 (1): 22~31
- Zeidler JG, Lichtenthaler HK (1998). Two simple methods for measuring isoprene emission of leaves by UV-spectroscopy and GC-MS. *Z Naturforsch*, 53c: 1087~1089