

柑橘叶片中叶黄素循环对 PSII 反应中心 D1 蛋白的保护效应

郑洁^{1,2}, 周慧芳³, 陈蔚涛¹, 徐建旭², 郭延平^{2,*}

¹上海市柑橘研究所, 上海 201913; ²浙江大学园艺系, 杭州 310029; ³浙江省农业厅, 杭州 310020

摘要: 用叶黄素循环抑制剂二硫苏糖醇(DTT)处理7h的柑橘离体叶片, 其非光化学猝灭系数NPQ大幅度下降; 在中等强度光(500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和高强度光(1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下, DTT处理的叶片光化学效率(F_v/F_m)分别下降3.8%和39.7%, 光合电子传递速率(ETR)分别下降12%和49.5%, D1蛋白含量也分别下降87%和92.3%; 黑暗对DTT处理叶片的各种荧光参数和D1蛋白的影响不大。显示叶黄素循环在保护光系统(PS) II反应中心、抵御光抑制中有一定的积极效应, 可能影响了D1蛋白周转。

关键词: 柑橘; 叶黄素循环; 光系统II; 叶绿素荧光; D1蛋白; 保护效应

Protective Effect of Xanthophyll Cycle on the D1 Protein of PSII in Leaves of *Citrus reticulata* Blanco.

ZHENG Jie^{1,2}, ZHOU Hui-Fang³, CHEN Wei-Tao¹, XU Jian-Xu², GUO Yan-Ping^{2,*}

¹Shanghai Citrus Institute, Shanghai 201913, China; ²Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

³Department of Agriculture of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, China

Abstract: In this study, NPQ (non-photochemical quenching coefficient) in leaves of *Citrus reticulata* Blanco. declined significantly after seven hours with DTT (dithiothreitol) treatment. After DTT treatment, under moderate light of 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, F_v/F_m (photochemical efficiency), ETR (electron transport rate), and the content of D1 protein in leaves of *C. reticulata* decreased by 3.8%, 12%, and 87%, respectively. Under high light of 1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, the corresponding parameters decreased by 39.7%, 49.5%, and 92.3%, respectively. In the dark, DTT treatment did not have significant effect on the chlorophyll fluorescence parameters and the level of the D1 protein. This result indicated that xanthophyll cycle played role in protecting PSII against photoinhibition and might have effect on the D1 protein turnover.

Key words: *Citrus reticulata* Blanco.; xanthophyll cycle; PSII; chlorophyll fluorescence; D1 protein; protective effect

一般来说,在我国南方柑橘种植区夏季常出现持续高温高光天气,以致柑橘发生光合作用的光抑制,影响柑橘的产量和品质。光抑制的原初作用部位是PSII。强光下,植物吸收的过剩光能必须及时耗散掉,否则就会损伤PSII反应中心。已有研究表明,植物具有多种光保护机制,如叶黄素循环(Demmig-Adams和Adams 1996)、活性氧清除系统(Asada 1992)、光呼吸(郭连旺等 1995)等。所谓叶黄素循环是指叶黄素的3种组成物质通过环氧化和脱环氧化作用在不同的光照和pH条件下相互转化的循环机制(Yamamoto 1975)。叶黄素循环在耗散过剩光能、保护PSII免受强光破坏中起重要作用,这在小麦、茶树、银杏、黄瓜、生姜、杨梅等植物中已有报道(孟庆伟和赵世杰 1998; 韦朝领等 2000; 张宁等 1999; 孙艳等 2006; 赵世杰等 1999; Guo等 2006),但在柑橘中还未见叶黄素循环对D1蛋白影响的报道。

本文以橘橙类柑橘品种‘象山红’幼苗为试材,在不同强度光下用叶黄素循环抑制剂DTT处理其离体叶片后,测定叶片叶绿素荧光参数和PSII反应中心D1蛋白含量的变化,研究叶黄素循环与D1蛋白的关系。

材料与方法

选取大小和生长状态一致的橘橙品种‘象山红’(*Citrus reticulata* Blanco. cv. Xiangshanhong)幼苗10盆,从室外移至控温控光的培养室内,在室温为(25±2)°C、光照强度为(600±50) $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (光源为镝灯,灯与叶片之间有隔热流动水槽)和光周期为

收稿 2009-07-23 修定 2009-11-23

资助 国家自然科学基金(30771497)。

* 通讯作者(E-mail: ypguo@zju.edu.cn; Tel: 0571-86971121)。

12 h 的条件下预培养 30 d。

选取测定叶片, 暗适应 30 min 以上后, 使用 PAM-2000 (Walz, Germany) 便携式叶绿素荧光仪, 依据 Guo 等(2006)的方法测定 F_o 、 F_m 、 F_o' 、 F_m' 、 F_v/F_m 、 q_p 和 NPQ。按公式 $ETR = (F_m' - F_t)/F_m' \times PAR \times 0.5 \times 0.84$ 计算(Genty 等 1989)。

叶片的快相荧光诱导动力学参照 Lichtenthaler (1992) 和 Govindjee (1995) 的方法。经过充分黑暗的叶片以每点 1 000 μs 的测样速率照射红光(PAR 约为 50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 2 s), 整个过程持续 4 s。为了使 PQ 库完全氧化, 在快相荧光诱导动力学测定前, 照射 5 s 的远红光。

将荧光参数相近的 2 个叶片在水中从叶柄处剪下, 一个叶片插入 10 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 DTT 溶液中, 另一叶片插入蒸馏水中作为对照, 2 个叶片一同置于 PFD 约 20 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 的弱光下至少 4 h, 然后置于强光(1 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)、中等光(500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) 以及黑暗中处理 7 h, 观察不同处理叶片荧光参数的变化。

类囊体膜的制备, 参照 Russell 等(1995)文中方法提取。称取处理后的叶片 3.0 g, 洗净后除去中脉。放入研钵中, 加入冰冷的提取液(含 10 $mmol \cdot L^{-1}$ NaF、50 $mmol \cdot L^{-1}$ Tricine、100 $mmol \cdot L^{-1}$ 蔗糖、5 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$, pH 7.8), 期间加入少量 PMSF, 研碎, 然后 1 157 \times g 离心 3~5 min 去沉淀, 再用 12 857 \times g 离心 30 min, 去上清液, 在沉淀中加入适量的提取液保存, 最后所得即为类囊体颗粒。

类囊体膜样品制备好后, 加入样品缓冲液[25 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl (pH 6.8), 7% SDS, 10% 甘油, 8 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素, 5% 2-巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝]后离心。采用 Leamli (1970)文中改进法(在分离胶和堆积胶中分别加入 8 $mol \cdot L^{-1}$ 和 4.8 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素)进行 SDS-PAGE 电泳。

Western-blotting 蛋白质印迹分析采用 Yamamoto 等(2004)文中方法并加以改进, 每孔上样量为 5 μg 。将凝胶转移印迹至 PVDF 膜后, 与特异性 D1 蛋白抗体进行反应。最后用 ECL 显色试剂盒进行显色, 显色后在暗室内曝光, 显影。试验用的 D1 蛋白一抗为兔抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗体(horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody)。

结果与讨论

1 DTT 对柑橘叶片叶绿素荧光参数及快相动力学的影响

(1)与中等强度光(500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)相比, 高强度光(1 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)照射柑橘离体叶片 7 h 后, 叶片的光化学效率(F_v/F_m)和光合电子传递效率(ETR)均显著下降, 而黑暗中的变化不明显(图 1-a、b), 表明 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 以上强度的光就可致使柑橘离体叶片发生光抑制, PSII 反应中心功能下调。DTT 是叶黄素循环的抑制剂。在中等光强和较高光强下, DTT 处理后的叶片 F_v/F_m 分别比不经 DTT 处理的叶片(加 H_2O)下降 3.8% 和 39.7%, ETR 分别下降 12% 和 49.5%。这说明, DTT 处理的离体叶片受光抑制的程度加剧, 有可能是发生光破坏所致。

(2)光化学淬灭系数 q_p 反映的是 PSII 天线色素吸收的光能用于光化学电子传递的份额, q_p 变小, 证明从 PSII 氧化侧向 PSII 反应中心的电子流动受到抑制(王可玢等 1997)。经 DTT 处理后, 中等光强和高光下的叶片其 q_p 均低于对照叶片(H_2O), 高光下的叶片下降了 25% (图 1-c), 这可能是导致 F_v/F_m 和光合电子传递效率(ETR)下降的主要原因。

(3)依赖叶黄素循环的热耗散是近年来人们经常关注的一种重要的非辐射能量耗散方式。Demmig-Adams 和 Adams (1992)认为与叶黄素有关的热耗散可能是防御光合机构光破坏的主要途径。非光化学淬灭系数 NPQ 反映了 PSII 天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递而以热的形式耗散掉的光能部分。用叶黄素循环抑制剂 DTT 处理后, 非光化学淬灭系数 NPQ 大幅下降(图 1-d), 说明 PSII 反应中心依赖于叶黄素循环热耗散途径已被抑制, 尤其是在中等光强下差异非常明显, 这也进一步表明叶黄素循环在保护 PSII 反应中心、抵御光抑制方面发挥着重要作用。在强光下, DTT 处理的叶片与不经 DTT 处理的叶片其 NPQ 差异并不明显, 说明高光强下叶黄素循环热耗散作用不足以保护对 PSII 免受强光破坏。

(4) q_p 也反映了 PSII 原初电子受体 Q_A 的还原状态。在线性电子传递过程中, Q_A^- 向 Q_B 的光合电子传递是必不可少的环节。正常情况下, 植物体内的荧光动力学曲线按时间先后分为 7 个相位: O-I-

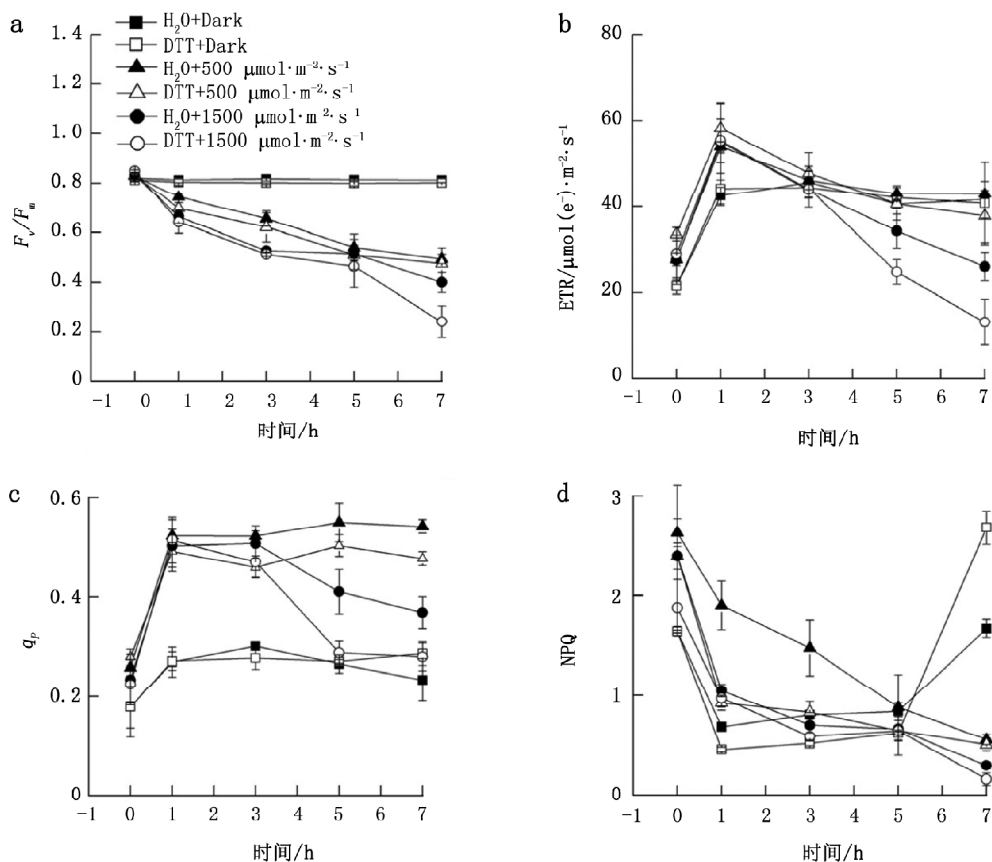


图1 DTT对柑橘叶片光化学效率(F_v/F_m)、电子传递效率(ETR)、光化学猝灭系数(q_p)和非光化学猝灭系数(NPQ)的影响
Fig.1 Effects of DTT on photochemical efficiency (F_v/F_m), electron transport rate (ETR), photochemical quenching coefficient (q_p) and non-photochemical quenching coefficient (NPQ) in leaves of *Citrus reticulata*

D-P-S-M-T, 因此该曲线称为 OIDPSMT 曲线。从荧光动力学快速诱导曲线O相上升到P相反映电子由 PSII 反应中心向 Q_A 、 Q_B 和 PQ 库传递的过程。 $(F_i-F_0)/(F_p-F_0)$ 反映具有非还原性 Q_B 的 PSII 反应中心(即电子传递从 Q_A 到 Q_B 受阻的 PSII 反应中心)的比率(Lichtenthaler 1992); I 至 P 反映 PSII 有活性中心 Q_A 的还原, I 至 P 的斜率可以用于估计 Q_A 的还原速率, 即 Q_A 的活性(Govindjee 1995)。DTT 处理柑橘离体叶片在高光强(1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下, 荧光动力学曲线中 P 点均明显下降(图 2), $(F_i-F_0)/(F_p-F_0)$ 值显著升高, 而 F_i 到 F_p 的斜率极显著下降(表 1)。这说明 DTT 处理后其叶片的 PSII 反应中心 Q_B 比例增加, 而 Q_A 的比例减少, 即电子传递从 Q_A 到 Q_B 受阻, Q_A 的活性下降。在黑暗中, DTT 处理的柑橘离体叶片, 其荧光动力学曲线变化不明显(图 2)。我们推测 Q_A 到 Q_B 电子传递受阻可能是导致 F_v/F_m 下降的原因。

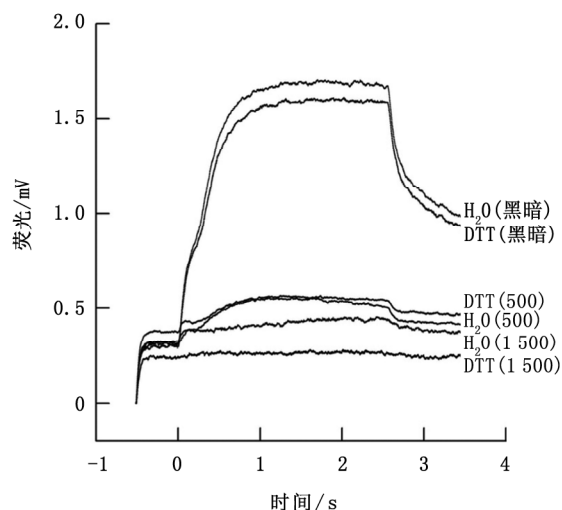


图2 DTT对柑橘叶片叶绿素荧光快相诱导动力学曲线的影响
Fig.2 Effect of DTT on chlorophyll fluorescence kinetic fast phase in leaves of *Citrus reticulata*

表1 DTT处理后柑橘叶片叶绿素荧光快相诱导动力学参数的变化

Table 1 Change of chlorophyll fluorescence kinetic fast parameters in leaves of *Citrus reticulata* after DTT treatment

PAR/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	处理 7 h	$(F_i - F_o)/(F_p - F_o)$	F_i 到 F_p 的斜率
0	H ₂ O	0.356±0.002 ^d	1.369±0.07 ^a
0	DTT	0.378±0.002 ^c	1.508±0.11 ^a
500	H ₂ O	0.270±0.002 ^f	0.158±0.006 ^b
500	DTT	0.291±0.003 ^e	0.149±0.012 ^b
1 500	H ₂ O	0.524±0.004 ^b	0.128±0.007 ^b
1 500	DTT	0.543±0.003 ^a	0.020±0.001 ^b

用 SPSS 数据处理软件分析各处理间的差异, 不同字母表示差异达 $P < 0.05$ 显著水平。

2 DTT对柑橘叶片中D1蛋白的影响

较大的叶黄素循环池和较高的叶黄素循环活性可以防止高光强下菠菜叶片中 D1 蛋白的失活 (Thiele 等 1996)。当水稻叶黄素循环受到抑制时, q_N 下降并导致 D1 蛋白更多的降解和 F_i/F_m 的大幅度下降 (季本华和焦德茂 2003)。Ciompi 等 (1997) 报道, 叶黄素循环能防止南瓜在臭氧条件下 D1 蛋白的降解, 对维持 PSII 反应中心的活性有作用。高光强下, 叶黄素循环突变体的研究表明, 三组分中的玉米黄质可以调节 D1 蛋白的周转, 保护 PSII 反应中心免遭失活 (Jahns 等 2000)。在本研究中, 与黑暗及中等光强下相比, 高光强下的 D1 蛋白含量急剧下降, 而且中等光强 ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 和高光强 ($1\ 500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 下, DTT 处理的离体叶片其 D1 蛋白含量分别比不经 DTT 处理的叶片 (加 H₂O) 下降 87% 和 92.3%, 黑暗中变化不明显 (图 3)。

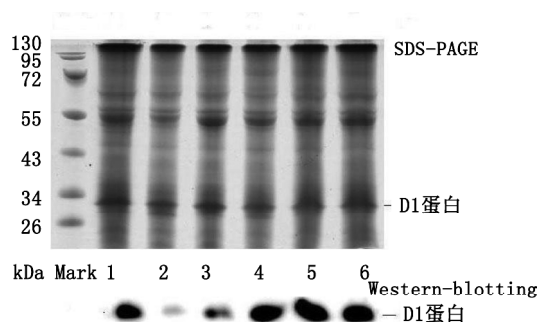


图3 不同光强下 DTT 处理后的柑橘叶中类囊体膜的 SDS-PAGE 电泳图谱及 D1 蛋白含量的变化

Fig. 3 Changes of the SDS-PAGE and D1 contents in thylakoid of *Citrus reticulata* leaves with DTT treatment under different light intensity conditions

1: H₂O+1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 2: DTT+1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 3: DTT+500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 4: H₂O+500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 5: H₂O+Dark; 6: DTT+Dark。

这说明当叶黄素循环受到抑制时, 由于失去叶黄素循环的保护因而 D1 蛋白被更多的降解。联系到 F_i/F_m 、ETR 及 Q_A 的氧化还原状态, 我们推测光化学效率的下降也与 D1 蛋白降解有关。

参考文献

- 郭连旺, 许大全, 沈允钢 (1995). 棉花叶片光合作用的光抑制与光呼吸的关系. 科学通报, 40: 1885~1888
- 季本华, 焦德茂 (2003). 水稻抗光破坏能力与 D1 蛋白和叶黄素循环的关系. 科学通报, 45 (5): 510~515
- 孟庆伟, 赵世杰 (1998). 午间强光胁迫下叶黄素循环对小麦叶片光合机构的保护作用. 作物学报, 24 (6): 747~750
- 孙艳, 徐伟君, 范爱丽 (2006). 高温强光下水杨酸对黄瓜叶片叶绿素荧光和叶黄素循环的影响. 应用生态学报, 17 (3): 399~402
- 王可玢, 许春辉, 赵福洪, 唐崇钦, 戴云玲 (1997). 水分胁迫对小麦旗叶某些体内叶绿素 a 荧光参数的影响. 生物物理学报, 13 (2): 273~278
- 韦朝领, 江昌俊, 陶汉之 (2000). 依赖于叶黄素循环的热耗散对茶树叶片防御强光破坏的相关试验研究. 激光生物学报, 14 (3): 218~223
- 张宁, 孟庆伟, 赵世杰, 许长城, 邹琦 (1999). 光胁迫下银杏光合作用的光抑制. 西北植物学报, 19 (3): 461~465
- 赵世杰, 艾希珍, 王绍辉, 张振贤, 邹琦 (1999). 叶黄素循环和光呼吸对生姜光抑制破坏的防御作用. 西北农业学报, 8 (3): 81~85
- Asada K (1992). Photooxidative damage of plants—It's suppress and amplification. J Pesticide Sci, 10: 729~747
- Ciompi S, Castagna A, Ranieri A, Ranieri A, Nali C, Lorenzini G, Soldatini F (1997). CO₂ assimilation, xanthophyll cycle pigments and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. Physiol Plant, 101 (4): 881~889
- Demmig-Adams B, Adams IIIWW (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 43: 599~626
- Demmig-Adams B, Adams IIIWW (1996). Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. Planta, 198: 460~470
- Genty B, Briant JM, Baker NR (1989). The relationship between

- the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 990: 87~92
- Govindjee SK (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust J Plant Physiol*, 22: 131~160
- Guo YP, Guo DP, Zhou HF, Hu MJ, Shen YG (2006). Photoinhibition and xanthophyll cycle activity in bayberry (*Myrica rubra*) leaves induced by high irradiance. *Photosynthetica*, 44 (3): 439~446
- Jahns P, Depka B, Trebst A (2000). Xanthophyll cycle mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* indicate a role for zeaxanthin in the D1 protein turnover. *Plant Physiol Biochem*, 38 (5): 371~376
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680~685
- Lichtenthaler HK (1992). The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica*, 27: 45~55
- Russell AW, Critchley C, Robinson SA, Franklin LA, Seaton GG, Chow WS, Anderson JM, Osmond CB (1995). Photosystem II regulation and dynamics of the chloroplast D1 protein in *Aradopsis* leaves during photosynthesis and photoinhibition. *Plant Physiol*, 107: 943~952
- Thiele A, Schirwitz K, Winter K, Krause GH (1996). Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Sci*, 115 (2): 237~250
- Yamamoto HY (1975). Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure App Chem*, 51: 639~648
- Yamamoto Y, Nishi Y, Yamasaki H (2004). Assay of photoinhibition of photosystem II and protease activity. *Photosynth Res Protocols*, 274: 217~228