

研究报告 Original Papers

低温弱光处理及恢复期间黄瓜叶片的光抑制与类囊体膜中脂肪酸组成的变化

代玉华 刘训言 孟庆伟* 赵世杰

山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018

摘要 低温导致黄瓜叶片严重的光抑制, 同时类囊体膜不饱和脂肪酸含量下降。低温弱光处理后恢复期间, F_v/F_m 和多聚不饱和脂肪酸含量都迅速恢复, 暗示两者之间可能有一定的联系。

关键词 低温弱光; 光抑制; 饱和脂肪酸; 多聚不饱和脂肪酸

Changes of Photoinhibition and Fatty Acid Composition in Thylakoid Membrane of Cucumber Leaves During Low Temperature and Weak Light Stress and the Course of Recovery

DAI Yu-Hua, LIU Xun-Yan, MENG Qing-Wei*, ZHAO Shi-Jie

College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Abstract Photoinhibition occurred and the content of unsaturated fatty acids in thylakoid membrane of cucumber leaves decreased during low temperature and weak light stress for 5 d. During the course of recovery after stress, both F_v/F_m and the content of polyunsaturated fatty acids increased quickly, which implied that there was relationship between them.

Key words low temperature and weak light; photoinhibition; saturated fatty acids; polyunsaturated fatty acids

低温是限制冷敏感植物生长的一个重要因素。它往往改变植物类囊体膜的流动性, 并且造成光合效率下降^[1]。Vijayan和Browse^[2]的假说认为膜脂的特殊结构对维持正常光合功能有主要作用。在自然界中, 当植物吸收的光能超过其所能利用的程度时, 便产生光抑制, 并且光抑制与D1蛋白的周转存在密切关系^[3]。有报道认为类囊体膜的脂肪酸组成有可能通过影响D1蛋白的周转影响光抑制^[4]。有人采用转基因的技术降低多聚不饱和脂肪酸含量后, 植物的光抑制程度加重, 且光抑制后的恢复速度减慢^[4,5]。低温影响黄瓜叶片类囊体膜脂肪酸组成变化, 并加重光抑制^[6], 但低温处理后, 类囊体膜中脂肪酸各个组分的恢复有何不同? 另外, 有关光抑制程度及其恢复与类囊体膜中脂肪酸组分关系的研究主要用转基因技术, 而在低温下, 正常的黄瓜叶片光抑制的恢复与类囊体膜中脂肪酸的恢复又存在何种联系呢? 生产上除了低温强光外, 还经常出现低温弱光胁迫, 对喜温蔬菜作物黄瓜危害严重。为此, 我们以冷敏

感植物黄瓜叶片为材料, 检测了低温弱光处理及而后恢复过程中光抑制与类囊体膜脂中脂肪酸组成的变化情况。

材料与方 法

黄瓜(*Cucumis sativus*)品种津研4号种子经精选后, 用塑料盆(盆上口口径13.5 cm, 高10.5 cm)育苗。在白天27°C和120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照(12 h)与黑夜25°C(12 h)下培养30 d后, 处理苗转移到白天10°C和120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照(12 h)与黑夜10°C(12 h)下处理5 d, 再放到白天27°C和120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照(12 h)与黑夜25°C(12 h)下恢复3 d; 对照苗一直在白天27°C和120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照(12 h)与黑夜25°C(12 h)下培养。

收稿 2003-03-07 修定 2003-10-14

资助 国家重点基础研究发展规划项目(G1998010100)和国家自然科学基金项目(30370854)。

* 通讯作者(E-mail: qwmeng@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8249606)。

$\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照与黑夜 25°C (12 h)下培养。分别在第0、5、6、8天时测定各项指标。

测定叶绿素荧光参数时,将黄瓜幼苗预先放在室温暗适应20 min,用FMS2型调制式荧光仪(英国Hansatech)测定各项荧光参数。测定光强为 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,饱和脉冲光强为 $4000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。光系统II最大光化学效率 (F_v/F_m)按公式: $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ 计算,光系统II电子传递的量子效率 (Φ_{PSII})按公式: $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$ 计算。各荧光参数均为3次实验的平均值。

类囊体膜的制备参照Thomas和Aubrey^[7]的方法。类脂的提取参照Siegenthaler等^[8]的方法。类脂的分离与纯化参照Xu和Siegenthaler^[9]的方法。用气相色谱仪(Shimadzu GC-9A型)分析类囊体膜脂脂肪酸,色谱柱为 $3 \text{ mm} \times 2 \text{ m}$ 玻璃填充

柱,担体为Chromosorb W AW DWCS $80 \sim 100$ 目,固定液为15%聚二乙二醇丁二酸脂(DEGS),色谱仪配CR-2AX数据处理机。所有结果均为3次测定的平均值。

叶绿素含量的测定参照Bruinsma^[10]的方法。用UV-160型分光光度计测定OD值。

结果与讨论

1 叶绿素荧光参数的变化

从图1可见,低温弱光处理5 d后,光系统II的 F_v/F_m 明显下降,表明低温弱光严重地抑制PS II的光化学功能。与此同时,PS II电子传递的 Φ_{PSII} 也急剧下降。恢复1 d后, F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 基本恢复,3 d后完全恢复。说明低温弱光处理后,受破坏的PS II反应中心能较快修复。

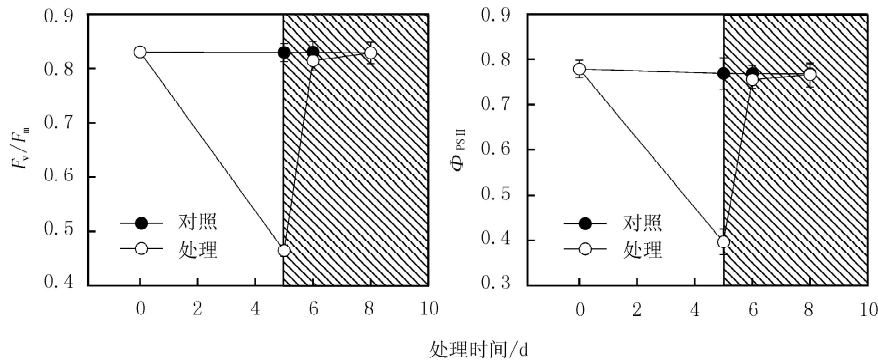


图1 低温弱光处理的黄瓜叶片 F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 的变化

Fig. 1 Changes in the F_v/F_m and Φ_{PSII} of cucumber leaves with low temperature and weak light
阴影部分表示恢复过程

2 叶绿素含量变化

低温胁迫会造成许多冷敏感植物的叶绿素降解,因此,叶绿素含量变化常用作低温伤害的一个指标^[11]。图2显示,低温弱光处理5 d后,叶绿素含量下降;恢复1 d后,叶绿素含量仍然下降;恢复3 d后才稍有上升。说明 10°C 下 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照处理5 d后的叶绿素重新合成是一个较慢的过程。

3 类囊体膜脂脂肪酸组成的变化

从表1可见,低温弱光处理5 d后,单半乳糖甘油二酯(MGDG)、双半乳糖甘油二酯(DGDG)、硫代异鼠李糖基甘油二酯(SQDG)3种甘油酯的18:3(亚麻酸)组分均呈现下降趋势。MGDG、SQDG中18:2(亚油酸)与

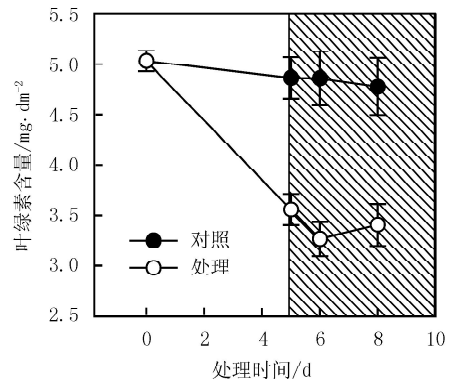


图2 低温弱光处理的黄瓜叶片叶绿素含量的变化
Fig. 2 Changes in the chlorophyll content of cucumber leaves with low temperature and weak light
阴影部分表示恢复过程

16:0 (棕榈酸) 相对含量明显增加, 而 DGDG 中只有 16:0 有所增加。恢复 1 d 后, DGDG、SQDG 中 18:3 组分基本上恢复到正常水平; 而 MGDG 中 18:3 组分的相对含量仍处于下降状态, 恢复 3 d 后虽有所增加, 但仍未达到未经低温处理的水平。在整个试验过程中, 未经低温处理的 18:3 稍有下降。其余各脂肪酸组分变化不大 (数据略)。可见尽管 SQDG 中 18:3 相对含量下降较大, 但它与 DGDG 的 18:3 组分都能很快恢复; 而 MGDG 则否。

MGDG、DGDG 的主要脂肪酸为 18:3, 该组分在 SQDG 中所占比例接近 50%。由于 18:3 和 18:2 是由 18:1 脱饱和形成, 显示低温引起 18:3 相对含量的变化主要取决于脂肪酸合成与去饱和过程中酶的相对活性。低温胁迫及恢复期间, MGDG、SQDG、DGDG 中 18:3 的变化程度不一致。低温胁迫的同时也削弱脂肪酸合成酶与去饱和酶的活性^[12], 低温弱光处理 5 d 后, MGDG、DGDG、SQDG 中 18:3 含量的下降, 说明在此期间, 尽管两种脂肪酸酶活性都下降,

表1 低温弱光处理和恢复期间黄瓜叶片中甘油酯的脂肪酸组成变化
Table 1 Changes in fatty acid composition of glycerolipids of cucumber leaves with low temperature and weak light and subsequent recovery

处理	时间/d	类脂	16:0	16:1(3t)	18:0	18:1	18:2	18:3
低温弱光	0	MGDG	1.6±0.3	0	0.5±0.1	1.2±0.1	4.9±1.1	91.9±1.6
		DGDG	8.6±1.2	0	2.2±0.2	1.2±0.1	2.8±0.7	85.1±1.7
		SQDG	31.4±2.1	0	8.0±0.7	4.4±0.3	9.1±1.1	47.0±1.7
	5	MGDG	3.5±0.8	0	1.6±0.2	1.3±0.2	9.3±1.3	84.3±2.3
		DGDG	9.8±1.3	0	2.1±0.3	1.0±0.1	2.6±0.5	84.5±1.9
		SQDG	34.4±2.4	0	8.8±1.0	3.3±0.4	12.1±1.4	41.4±1.5
常温下恢复	1	MGDG	6.1±0.6	0	0	0	10.0±1.1	83.9±2.2
		DGDG	8.4±0.5	0	2.4±0.6	0.7±0.1	3.5±0.3	85.0±1.6
		SQDG	35.5±0.9	0	7.1±0.5	2.8±0.4	6.9±0.7	47.8±1.2
	3	MGDG	2.3±0.2	0	1.6±0.3	2.0±0.7	9.2±1.0	84.9±1.5
		DGDG	9.6±1.1	0	1.7±0.3	0.7±0.1	2.0±0.2	86.0±2.3
		SQDG	38.1±2.1	0	6.4±0.9	2.7±0.3	4.1±0.2	48.8±1.8

但是去饱和酶活力较合成酶受低温抑制更严重。而恢复过程中只有 MGDG 的 18:3 难以恢复, 说明其去饱和酶活性相于合成酶来讲, 不但受低温严重抑制, 而且在恢复初期也没有合成酶恢复得快。

4 磷脂酰甘油的饱和脂肪酸组分变化

磷脂酰甘油 (PG) 是类囊体膜脂中决定膜脂相变的主要因素^[13], 其中的脂肪酸组成比类囊体膜的其它脂类更易受到低温的影响^[14], 它所特有的脂肪酸 16:1(3t) 构型和高熔点等物理性质与 16:0 相似^[15], 因此与 16:0、18:0 一起均称为饱和脂肪酸。由图 3 可以看到, 在低温弱光处理期间, PG 中饱和脂肪酸相对含量下降, 恢复期间逐渐上升, 3 d 后与未经低温处理的黄瓜相差甚微。

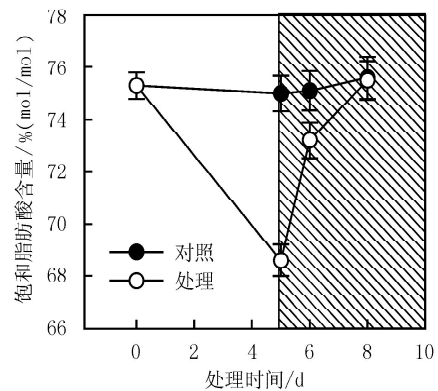


图3 低温弱光处理的黄瓜叶片PG饱和脂肪酸含量的变化

Fig. 3 Changes in the saturated fatty acids of PG in cucumber leaves with low temperature and weak light
阴影部分表示恢复过程

16:1(3t)含量增加与叶绿体发育相关,如果此种脂肪酸不再增加,即说明叶绿体已经完全成熟^[14]。未经低温处理的黄瓜叶片中16:1(3t)含量轻微下降,表明叶片已经完全成熟并开始进入衰老期。

植物PG中饱和脂肪酸含量与膜的相变温度有关。而对PG饱和脂肪酸含量与光抑制关系的看法还存在分歧^[16,17]。低温胁迫5 d后,PG中饱和脂肪酸含量下降,说明黄瓜叶片有可能是通过降低膜脂相变温度来维持一定的生物膜功能的。但这并没有阻止光抑制的产生,只是可能在一定程度上减轻了光抑制,因此有可能是一种对低温的适应性反应。在恢复过程中,PG中饱和脂肪酸含量一直处于上升趋势,即不利于降低膜脂相变温度。但 F_v/F_m 的很快恢复说明,在此期间PG中饱和脂肪酸含量上升并没有使光抑制抑制到不能恢复的程度。Moon等^[16]推测,光抑制的恢复所需要

的PG中饱和脂肪酸的量局限于一定的范围之内,其含量超过这一阈值时,就会限制光抑制的恢复。因此说明,本文中见到的恢复期间PG中饱和脂肪酸含量并没有超过这一阈值,所以对光抑制恢复的影响不大。

5 类囊体膜脂不饱和脂肪酸含量的变化

据报道,蓝藻(*Synechocystis* sp. PCC6803)大量缺失三烯脂肪酸而仍含有双烯脂肪酸的突变体的D1蛋白低温恢复程度与野生型区别不大^[18],但所有多聚不饱和脂肪酸缺失的突变体,其受光抑制破坏的程度却十分明显^[4]。图4显示,类囊体膜脂中不饱和脂肪酸(18:1+18:2+18:3)的相对含量虽然一直呈下降趋势,但它的变化不大,而多聚不饱和脂肪酸(18:2+18:3)的含量在胁迫期间也呈下降趋势,但恢复1 d后就基本上恢复。多聚不饱和脂肪酸与 F_v/F_m 的相关性分析表明,两者相关系数达到84.91% ($r=0.8491$),

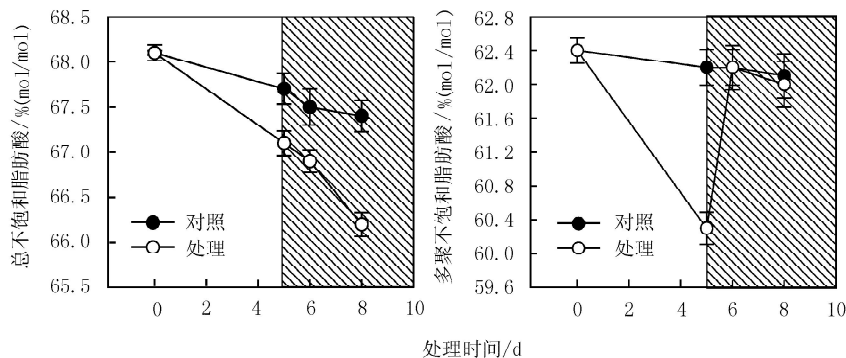


图4 低温弱光处理的黄瓜膜脂不饱和脂肪酸和多聚不饱和脂肪酸含量的变化
Fig. 4 Changes in the content of unsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids in cucumber leaves with low temperature and weak light
阴影部分表示恢复过程

表明光抑制的恢复与多聚不饱和脂肪酸的恢复可能存在一定联系。

Gombos等^[4]认为,在烟草突变体中多聚不饱和脂肪酸含量的下降是导致在低温下光抑制加重并且恢复减慢的重要因素。据此,我们推断低温弱光下黄瓜叶片的光抑制及其恢复与多聚不饱和脂肪酸含量的变化有关。Vijayan和Browse^[2]认为类囊体膜脂不饱和度降低有可能减慢了重新合成的D1蛋白

装配到PS II反应中心的速率。然而本文结果则显示,膜脂不饱和脂肪酸含量一直处于下降状态,即便在恢复期间也是如此。如果膜脂不饱和度的降低是导致光抑制的主要原因,那么它在恢复期间的下降应该使光抑制更加严重。但事实并非如此。我们的结果表明恢复1 d后, F_v/F_m 就基本恢复。这说明在低温弱光处理后的恢复期间膜脂不饱和度与光抑制的关系不如与多聚不饱和脂肪酸密切。

参考文献

- 1 Raison JK, Chapman EA. Membrane phase changes in chilling-sensitive *Vigna radiata* and their significance to growth. *Aust J Plant Physiol*, 1976, 3(3):291~299
- 2 Vijayan P, Browse J. Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiol*, 2002, 129: 876~885
- 3 Aro EM, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1143:113~134
- 4 Gombos Z, Wada H, Murata N. The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:8787~8791
- 5 Tasaka Y, Gombos Z, Nishiyama Y *et al.* Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J*, 1996, 15:6416~6425
- 6 杨玲. 不同低温处理对黄瓜子叶极性脂组成的影响. *园艺学报*, 2001, 28(1):36~40
- 7 Thomas CP, Aubrey WN. A comparison of the effects of chilling on thylakoid electron transfer in pea (*Pisum sativum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol*, 1988, 86:147~151
- 8 Siegenthaler PA, Rawlyer A, Smutny J. The phospholipids population which sustains the uncoupled noncyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of the thylakoid membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 975:104~111
- 9 Xu YN, Siegenthaler PA. Low temperature treatments induce an increase in the relative content of both linolenic and trans-hexadecenoic acids in thylakoid membrane. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(5):611~618
- 10 Bruinsma J. A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim Biophys Acta*, 1961, 53:576~578
- 11 Schapendonk AHCM, Dolstra O, Van Kooten O. The use of chlorophyll fluorescence as a screening method for cold tolerance in maize. *Photosynth Res*, 1989, 20:235~247
- 12 Browse J, Slack CR. The effects of temperature and oxygen on the rates of fatty acid synthesis and oleate desaturation in safflower (*Carthamus tinctorius*) seed. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 753:145~152
- 13 Murata N. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plant. *Plant Cell Physiol*, 1983, 24: 81~86
- 14 Xu YN, Siegenthaler PA. Effect of non-chilling temperature and light intensity during growth of squash cotyledons on the composition of thylakoid membrane lipids and fatty acids. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37:471~479
- 15 Bishop DG, Kenrick JR. Thermal properties of 1-hexadecanoyl-2-trans-3-hexadecenoyl phosphatidylglycerol. *Phytochem*, 1987, 26:3065~3067
- 16 Moon BY, Higashi S-I, Gombos Z *et al.* Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:6219~6223
- 17 Bruggemann W, Wolter FP. Decrease of energy-dependent quenching, but no major changes of photosynthesis parameters in *Arabidopsis thaliana* with genetically-engineered phosphatidylglycerol composition. *Plant Sci*, 1995, 108:13~21
- 18 Tasaka Y, Gombos Z, Nishiyama Y *et al.* Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J*, 1996, 15: 6416~6425