

黄瓜叶片发育过程中光合机构活性与其核心蛋白表达的关系

钟昕^{1,2}, 李玉婷^{1,3}, 车兴凯^{1,3}, 张子山^{1,3}, 刘彬彬¹, 李清明^{1,2,4,*}, 高辉远^{1,3,*}

¹作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

²山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安271018

³山东农业大学生命科学学院, 山东泰安271018

⁴农业部黄淮海设施农业工程科学观测实验站, 山东泰安271018

摘要: 本实验研究了黄瓜叶片展开过程中, 光系统I (PSI)、光系统II (PSII)核心蛋白PsaA和D1以及卡尔文循环关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)的表达和PSI、PSII及卡尔文循环的发育速度快慢以及它们与光合速率的关系。PSI、PSII的活性、羧化效率(CE)和光合作用核心蛋白的表达量都随着叶片的展开而逐渐升高, 但是幼叶中PSII活性的完善要显著早于PSI活性的完善, 表现为与成熟叶相比, 幼叶的PSII活性 F_m-F_0 、PSII最大光化学效率 F_v/F_m 、单位叶片截面积PSII有活性反应中心数目 RC/CS_0 等均大于幼叶的PSI最大氧化还原活性 AII/I_0 ; PSII核心蛋白D1的相对表达量也显著高于PSI核心蛋白PsaA的相对表达量。此外, 虽然在幼叶中, 卡尔文循环关键酶Rubisco的相对表达量高于PSI和PSII核心蛋白的相对表达量, 但是幼叶的CE却很低, 这说明光合作用核心蛋白的表达量与光合机构的活性并不成正比关系。综合分析表明, 幼叶较低的CE是幼叶发育过程中光合作用的主要限制因素。

关键词: 黄瓜; 叶片发育; 光合作用核心蛋白; OJIP test; PSI和PSII

植物的光合作用分为光反应和暗反应。光反应需要光系统I (photosystem I, PSI)和光系统II (photosystem II, PSII)的协调工作才能完成正常的线性电子传递, 形成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP), 为暗反应CO₂的固定和还原提供同化力。植物光合机构的正常运转必须要靠PSI、PSII以及暗反应的协调合作。

在叶片逐渐发育的过程中, 叶面积、叶绿素含量和光合机构都是一个从无到有逐渐完善的过程(Gao等2014; Maayan等2008)。随着叶片的不断展开, 叶片的叶绿素含量、气孔导度(stomatal conductance, G_s)、光合速率(photosynthetic rate, P_n)、羧化效率(carboxylation efficiency, CE)、PSI、PSII的活性以及CO₂同化速率都逐渐增加(Gratani和Bonito 2015)。关于在植物生长发育过程中, 光反应与暗反应、PSI与PSII的发育速度问题近些年来受到了许多关注。Jiang等(2006)在研究葡萄叶片时提出, 葡萄叶片在发育过程中, PSI和PSII是协同发育的。Gao等(2014)最近发现了西府海棠叶片在发育过程中PSII供体侧和受体侧以及PSI的活性都随发育而逐渐增加, 且PSII的完善速度要快于PSI的完善速度。此外, Maayan等(2008)的研究认为,

在叶片发育过程中暗反应的发育速度要慢于光反应。然而, 对于叶片发育过程中, 光合机构中具体哪一步反应是 P_n 的主要限制因素, 迄今为止仍然存在争议。

虽然已经有人探讨过叶片发育过程中光反应与暗反应发育速度关系, 也发现暗反应的核心蛋白核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)和PSII的核心蛋白D1蛋白都是随着叶片发育而不断增加的(Maayan等2008)。然而, 人们只是单独从蛋白表达水平上进行简单分析, 并没有把光合机构的活性与其核心蛋白表达量之间进行相关分析; 在叶片发育过程中, 对PSI、PSII以及暗反应三者之间的活性和光合核心蛋白表达量的联系也缺少报道。

此外, 前人在评价叶片发育过程中PSII最大活性时, 总是习惯使用 F_v/F_m 来表达, 但是Li等(2009)的研究表明, F_v/F_m 虽然是大家公认光抑制的传统指标, 但它反映的只是PSII有活性反应中心的最大

收稿 2018-01-05 修定 2018-05-23

资助 国家自然科学基金(31471918、31701966、31771691)、山东省自然科学基金(ZR2013CM008)和国家科技支撑计划(2014BAD05B03)。

* 共同通讯作者: 李清明(gslqm@sdau.edu.cn)、高辉远(gaohy@sdau.edu.cn)。

光化学效率,不能有效地反映PSII的真实活性。在高温胁迫下,相同的 F_v/F_m 下,大豆叶片的光合放氧速率、放氧复合体(oxygen-evolving complex, OEC)的活性、有活性反应中心的数目等许多指标都大不相同(Li等2009)。因此要准确地反映PSII的活性,必须使用反映PSII活性的综合参数,只用 F_v/F_m 来表示PSII的活性是不够严谨的。

针对上述问题,我们以黄瓜为试材,利用叶绿素荧光诱导动力学曲线和820 nm反射技术研究PSI和PSII活性,利用Western Blot技术分析了PSI的核心蛋白PsaA、PSII的核心蛋白D1、卡尔文循环核心蛋白Rubisco在叶片发育过程中表达量的变化,并且利用气体交换手段研究叶片的 P_n ,综合分析在叶片发育过程中它们之间的相互关系。阐明叶片发育过程中光合作用核心蛋白的表达与光合机构完善之间的关系,以及叶片发育过程中光合作用的限制因素,为深入理解叶片发育过程中光合机构完善的机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以‘津优35号’黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为材料,种植在蛭石和壤土按3:1混合的花盆中。花盆置于温室中,温室的光强为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,温度 25°C ,幼苗出土后及时浇营养液和杀虫,确保幼苗生长过程中保持充足的营养和水分,待到黄瓜长到四叶一心时,选取黄瓜从幼叶到成熟叶的4种不同叶龄叶片进行试验。

1.2 方法

1.2.1 叶面积的测定

叶面积用CI-202 (CID Inc, USA)叶面积仪测定,本文中以最大展开叶的相对面积为100%,其它黄瓜叶片的相对面积分别为最大叶面积的72%、24%和8%。

1.2.2 叶绿素含量的测定

每只试管加入80%的丙酮溶液10 mL,取每个叶龄的6片叶片打成直径为0.75 cm的叶圆片,然后将每个叶龄叶片的叶圆片混匀,随机选取8片叶圆片放入试管,每个叶龄的叶片重复3次,于黑暗中浸泡72 h,参照Porra (2005)的方法,用UV-1601紫外分光光度计(Shimadzu, 日本)进行叶绿素含量的测定。

1.2.3 叶绿素荧光和820nm反射曲线及环式电子传递(cyclic electron flow, CEF)的测定

参考Fan等(2014)的方法,先将叶片暗适应15 min,然后利用m-PEA (Hansatech, 英国)测定叶片快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP曲线)。由 $5000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的红光诱导,荧光信号记录从10 μs 开始,至1 s结束,记录的初始速率为每秒钟 10^5 个数据。测得的数据通过JIP-test (Srivastava等1995; Strasser等2000)的方法分析。公式如下:

PSII活性: $F_m - F_o$ (Tian等1996; Weis和Berry 1987)

PSII最大光化学效率: $F_v/F_m = 1 - (F_o/F_m)$

PSII捕获的激子将电子传递到 Q_A 以下载体的概率: $\Psi_o = ET_o/TR_o = 1 - V_j$

单位叶片截面积PSII有活性反应中心的数目: $RC/CS_o = (F_v/F_m) \times (V_j/M_o) \times (ABS/CS_o)$

使用M-PEA (Hansatech, 英国)对不同发育程度的叶片进行820 nm反射曲线和环式电子传递的测定,经过暗适应的叶片在0 s时用远红光($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射,直到P700的光氧化达到稳定(20 s时),然后关闭远红光。在用远红光照射的同时打一个820 nm的调制性测量光,计算820 nm反射曲线的振幅变化用来表示有活性P700的相对含量(Kim等2001; Zhang等2011),本文中, $\Delta I/I_o$ 被用来反映PSI的相对活性。

用下列公式计算 $\Delta I/I_o$ 。PSI最大氧化还原活性: $\Delta I/I_o = (I_o - I_m)/I_o$ (Schansker等2003; Zhang等2011); 用关闭远红光后820 nm反射曲线的弛豫程度来反映CEF的大小(Klughammer和Schreiber 1998)。 I_o : 820 nm反射曲线信号的0.4 ms到10 ms的平均值, I_m : 820 nm反射曲线信号的最小值。

1.2.4 叶绿素荧光淬灭分析

使用FMS-2脉冲调制荧光仪(Hansatech, 英国)测定不同叶面积的黄瓜叶片在光适应下的叶绿素荧光参数,将生长在光下的叶片放入叶片适应夹中,再由FMS-2提供 $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的作用光将待测叶片在光下适应5 min后,测定叶片在稳定状态下的荧光(F_s),光适应下的最小荧光 F_o' 和最大荧光 F_m' 。

以下参数根据Maxwell和Johnson (2000)的方法计算,公式如下。

PSII实际光化学效率 $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$

PSII反应中心关闭程度: $1 - q_p = 1 - (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$

线性电子传递速率(electron transport rate, ETR):

$$\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{实际光强} \times 0.83 \times 0.5$$

1.2.5 P_n 、 G_s 、细胞间隙 CO_2 浓度(intercellular CO_2 concentration, C_i)、 CE 和RuBP最大再生速率的测定

利用CIRAS-3便携式光合测定系统(PP Systems, 美国)对不同展开叶面积的黄瓜幼苗进行 P_n 的测定, 测定光强为 $1\ 600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (饱和光强), CO_2 浓度 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 湿度控制在60%左右, 叶温 25°C 。 CO_2 响应曲线的测定过程中, 由CIRAS-3控制 CO_2 浓度、测定光强、湿度和叶温, P_n 按照 CO_2 浓度400、300、200、100、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600和1 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的顺序进行测定, 在每个 CO_2 浓度下, 叶片适应3 min后记录数据, 以 P_n - C_i 响应曲线的初始斜率作为 CE 。RuBP最大再生速率为饱和 CO_2 浓度和饱和光强下叶片的最大 P_n (Farquhar等1980)。

1.2.6 蛋白的测定及分析

利用Western Blot技术测定PSI的核心蛋白PsaA、PSII的核心蛋白D1和卡尔文循环核心蛋白Rubisco, 蛋白质的提取、分离和测定方法参考Fan等(2014)的方法。PSI、PSII核心蛋白为膜蛋白, 卡尔文循环核心蛋白为可溶性蛋白, 实验中对膜蛋白和可溶性蛋白进行分别提取, 用SDS缓冲液对待测蛋白进行变性, 然后用12%聚丙烯酰胺梯度凝胶进行蛋白分离, 用半干电转膜法将凝胶中变性的蛋白质复合物转移到PVDF膜上, 之后在PVDF膜上进行抗体杂交, 通过化学发光法进行显色, 用Gel-Pro Analyzer 4.0软件对蛋白质进行定量图像分析。抗体来源于Agrisera公司(Sweden)。

1.2.7 数据分析

所有的实验至少重复3次, 利用Microsoft Excel 2003软件统计分析标准差和平均值, 采用SPSS 11计算显著性差异, 用Origin 2017软件作图。

2 实验结果

2.1 黄瓜叶片展开过程中叶绿素含量和叶片光合特性的变化

结果(图1)表明, 叶面积和叶绿素含量随着叶片发育而逐渐增加。说明随着叶片的发育, 叶片对光能吸收、传递和转换的能力都不断增加。

图2表明, 随着叶片的展开, 叶片的 G_s 和 P_n 都

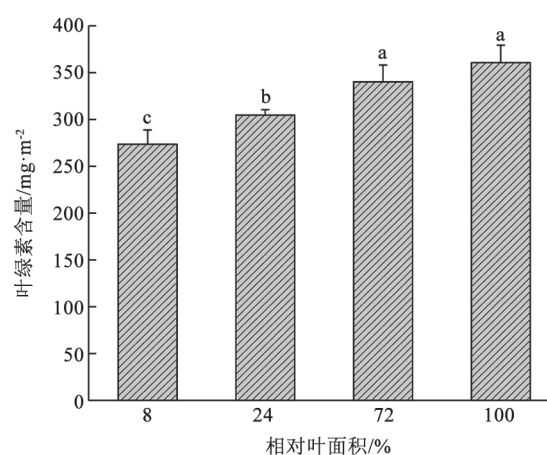


图1 不同展开程度黄瓜叶片叶绿素含量的变化
Fig.1 Changes of chlorophyll contents in different expanding leaves of *C. sativus*

数据柱上的不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$), 后图同此。

显著增加, 然而 C_i 值却随着叶片的展开而逐渐下降, 幼叶的 C_i 值显著高于成熟叶片的 C_i 值。根据Farquhar和Sharkey (1982)的判据, 只有当 G_s 和 C_i 都下降时, 光合作用的下降才是由气孔限制造成的, 否则光合的下降是由叶肉因素造成的。因此, 幼叶 P_n 比成熟叶低的原因不是由于幼叶气孔较低造成的, 而是由于幼叶叶肉光合能力较低造成的。

2.2 PSII活性的研究

叶绿素荧光诱导动力学曲线的形状反映了PSII结构和功能(Srivastava等1995; Strasser等2000)。实验结果(图3)表明, 不同发育程度黄瓜叶片的OJIP曲线具有显著的差异。说明叶片在发育过程中, PSII的结构和功能都发生了显著的变化。

实验结果(图4)显示, $F_m - F_0$ 、 F_v/F_m 、 RC/CS_0 以及 Ψ_0 都随叶片的展开而上升, 并且PSII活性的完善速度较快, 当幼叶面积达到成熟叶24%左右时, PSII的活性基本就接近成熟叶片的活性。

尽管PSII的活性发育较快, 但是整个光合机构的ETR在幼叶中仍然非常低。实验结果表明, 从成熟叶到幼叶, ETR显著下降, 并且PSII反应中心也显著关闭(图5)。

2.3 PSI活性的研究

将不同发育程度黄瓜叶片的820 nm反射曲线标准化, 820 nm反射曲线的下降程度反映了PSI的最大氧化还原活性。实验结果表明, 随着叶片发育, 曲线的下降程度越来越大(图6-A), 作为衡量

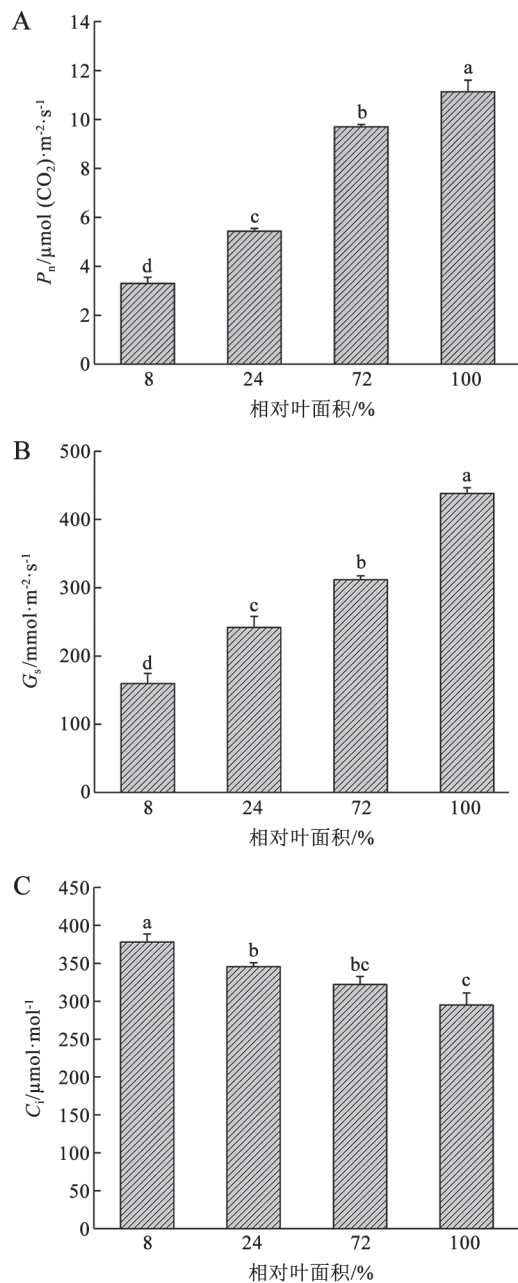


图2 不同展开程度黄瓜叶片的光合特性变化
Fig.2 Changes of photosynthetic characteristics in different expanding leaves of *C. sativus*

A: P_n ; B: G_s ; C: C_i .

PSI最大氧化还原能力的指标 $\Delta I/I_0$ (Schansker等2003)也随着叶片的展开而不断增高(图6-B); CEF的测定结果显示,不同展开程度叶片间的CEF存在显著差异,幼叶中的CEF活性显著低于成熟叶(图6-C)。

2.4 不同发育程度叶片PSII与PSI的相对活性

由图7可以看出,不论是哪个参数的比值,均

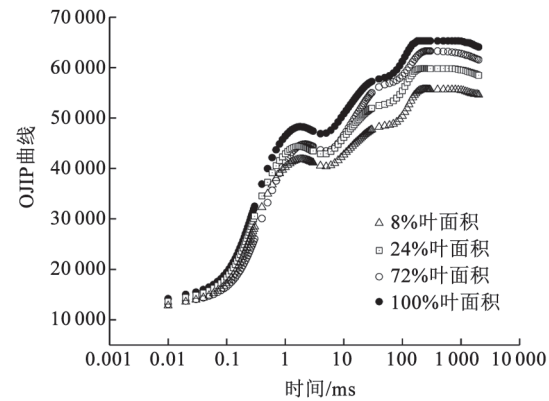


图3 不同展开程度黄瓜叶片叶绿素快速荧光诱导动力学曲线OJIP的变化

Fig.3 Changes of chlorophyll fluorescence transients (OJIP) in different expanding leaves of *C. sativus*

是幼叶远远高于成熟叶,这说明幼叶中PSII的完善程度高于PSI的完善程度。

2.5 不同发育程度叶片的暗反应活性的变化

通过 CO_2 响应曲线和 CE 的测定可以看出,幼叶的 CE 很低,只有成熟叶的17%左右(图8-A和B)。说明幼叶固定 CO_2 的速率很低,然而随着 CO_2 浓度的增加,幼叶和成熟叶中的 P_n 都大幅度提升,但是成熟叶的 P_n [$16 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]增加幅度显著大于幼叶 [$7 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]。随着叶片的展开, RuBP最大再生速率也显著增加(图8-C)。

2.6 光合作用核心蛋白表达分析

利用Western Blot技术对PSI的核心蛋白PsaA, PSII的核心蛋白D1以及卡尔文循环的核心蛋白Rubisco进行表达分析。

实验结果(图9)表明,随着叶片的发育,PSI、PSII及卡尔文循环的核心蛋白都是一个逐渐增多的过程,黄瓜幼叶中这三种核心蛋白的相对表达量是Rubisco>D1>PsaA。

3 讨论

随着植物叶片的展开,光合机构的结构和功能是一个不断完善的过程。综合分析表明:在黄瓜叶片发育过程中,PSI、PSII和卡尔文循环关键酶的表达以及它们的活性随着叶片的发育表现出不同发育速度,并且暗反应的羧化能力是幼叶 P_n 的主要限制因素。

随着叶片的不断展开,虽然 P_n 和 G_s 都是以相

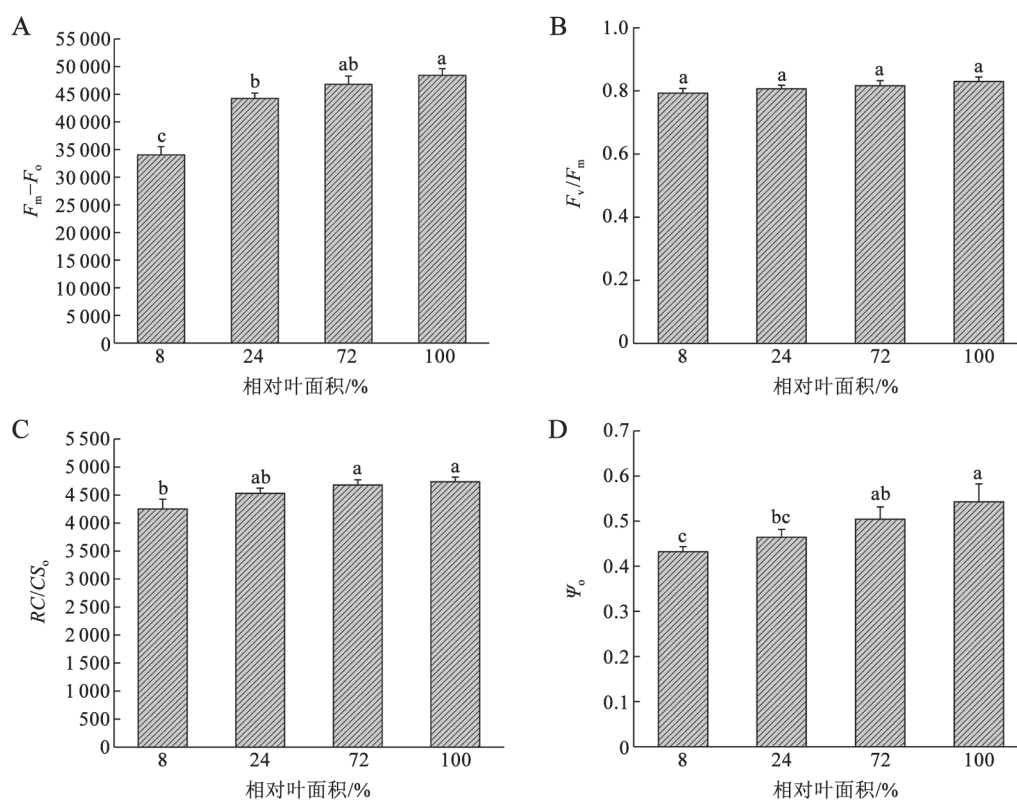


图4 不同展开程度黄瓜叶片叶绿素荧光参数的变化

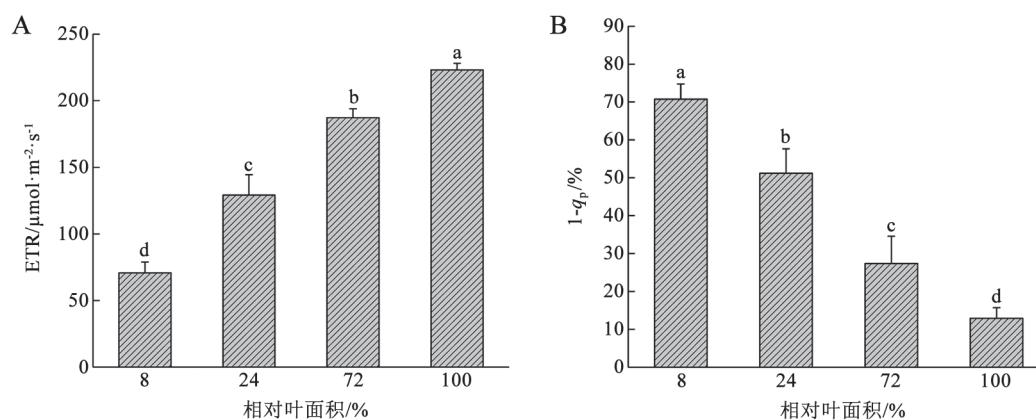
Fig.4 Changes of chlorophyll fluorescence parameters in different expanding leaves of *C. sativus*A: $F_m - F_o$; B: F_v/F_m ; C: RC/CS_o ; D: Ψ_o .

图5 不同展开程度黄瓜叶片光适应下叶绿素荧光参数的变化

Fig.5 Changes of chlorophyll fluorescence parameters under light in different expanding leaves of *C. sativus*A: ETR; B: $1-q_p$.

同趋势变化, C_i 值却是逐渐下降的, 根据Farquhar和Sharkey (1982)的判据, 我们认为, 黄瓜叶片在发育过程中, 幼叶较低的 P_n 不是因为 G_s 较低而是因为叶肉光合能力较低造成的。虽然提高 CO_2 浓度显著增加了叶片的 P_n , 但本文的结果并不能说明幼叶

较低的 P_n 是气孔限制造成的, 因为和幼叶相比, 成熟叶片的气孔限制要小得多, 但当 CO_2 浓度(C_i)增至到饱和时, 成熟叶 P_n 的增加幅度要显著高于幼叶(图8-A)。这是因为在自然条件下, 对所有叶片来说, CO_2 的供应都没有达到饱和, 虽然幼叶的叶肉光合

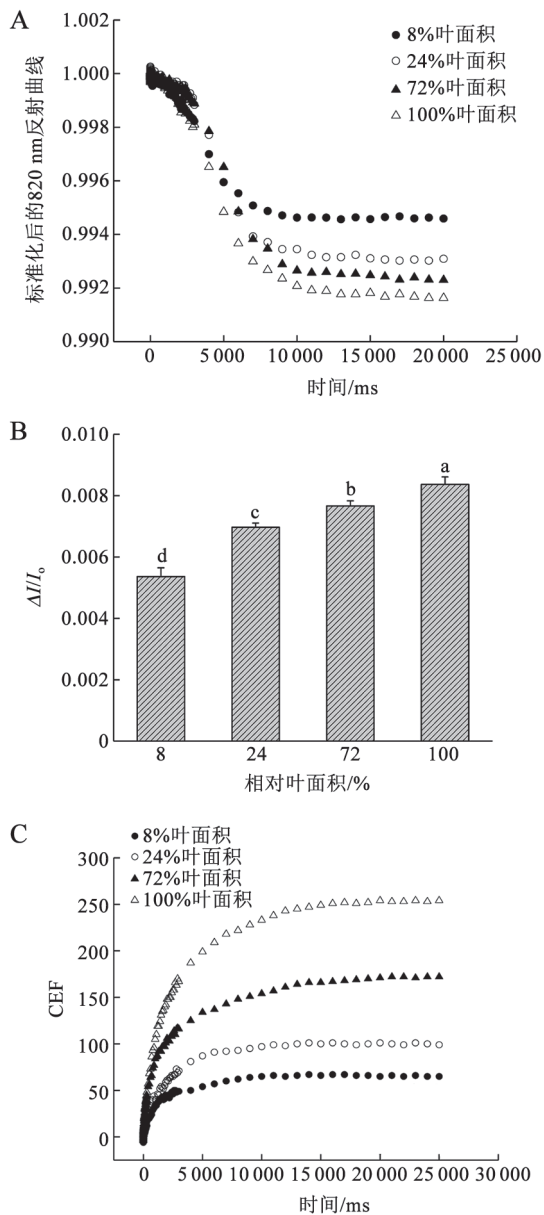


图6 不同展开程度黄瓜叶片PSI活性的变化

Fig.6 Changes of the activities of PSI in different expanding leaves of *C. sativus*

A: 标准化后的820 nm反射曲线; B: 820 nm反射曲线最大值与最小值差值的相对值 $\Delta I/I_0$; C: CEF。

能力比成熟叶片低(图2-C)但是当提高外界 CO_2 浓度后,所有不同发育程度叶片的 P_n 都会显著增加,叶肉活性最高的成熟叶, P_n 增加的幅度也最大。

限制植物光合作用的叶肉因素有很多,包括叶绿体上的PSI、PSII以及卡尔文循环的活性等。通过OJIP曲线的分析可知,幼叶中 F_m-F_0 、 RC/CS_0 以及 Ψ_0 均低于成熟叶片(图4),然而从幼叶到成熟

叶,PSII的活性增加幅度不大。这说明,幼叶中PSII的活性已经发育得比较完善,接近于成熟叶,而幼叶中的PSI活性还不到成熟叶的一半(图6-B)。我们将PSI光化学活性与PSII光化学活性的完善程度进行了比较之后发现,所有反映PSII活性的参数与反映PSI活性参数的相对比值,都是在幼叶中最高,并且随着叶片的不断展开而下降(图7)。证明在幼叶中,PSII活性的完善程度要显著高于PSI活性的完善程度,而且在叶片的整个发育过程中,PSII活性的发育速度要快于PSI活性的发育速度。

相对PSI活性来说,虽然幼叶中的PSII活性较高,然而,在照光下,幼叶的ETR却很低,反应中心关闭程度很高(图5)。这表明电子从 Q_A 到 Q_B 的传递受阻,幼叶中 Ψ_0 比成熟叶显著降低,以及D1蛋白在幼叶中表达量很低进一步证明了在幼叶中电子从 Q_A 到 Q_B 的传递受到显著的抑制(图4-D和图9-A)。此外,ETR的大小不仅取决于PSII的活性,还取决于PSI的活性以及卡尔文循环的运转速率,如果PSI和卡尔文循环的活性都很低,就会反馈抑制电子从PSII向PSI的传递,引起反应中心的关闭。我们认为,本实验中幼叶中较低的PSI活性极大地抑制了ETR,引起反应中心进一步关闭。如果ETR不能顺利进行,会限制ATP和NADPH的产生。除了ETR之外,CEF也是合成ATP的重要途径,幼叶中的CEF活性也远远低于成熟叶(图6-C),这进一步限制了ATP的产生。最终会因为同化力供应的限制,抑制卡尔文循环的运转。

在一定程度上,光合作用核心蛋白的表达量可以反映叶片光合机构的发育状况。Tang等(2005)在研究小麦旗叶的衰老过程中发现,PSI叶绿素荧光产额的下降程度显著高于PSII,是由于PSI叶绿体蛋白复合体的衰退要明显高于PSII的下降程度。我们的结果表明,在黄瓜叶片发育的过程中,无论是PSI、PSII,还是卡尔文循环的核心蛋白都是一个逐渐增加的过程。卡尔文循环的核心蛋白Rubisco在幼叶中的相对表达量要明显高于PSI与PSII的核心蛋白,这似乎表明光合作用中暗反应的发育速度很快。然而,实际在植物中,Rubisco的量是大量冗余的,大约只有30%的Rubisco表现出活性,Rubisco的活性受Rubisco活化酶的调节(Portis 2003),而Rubisco活化酶的活性又受到ATP的调节

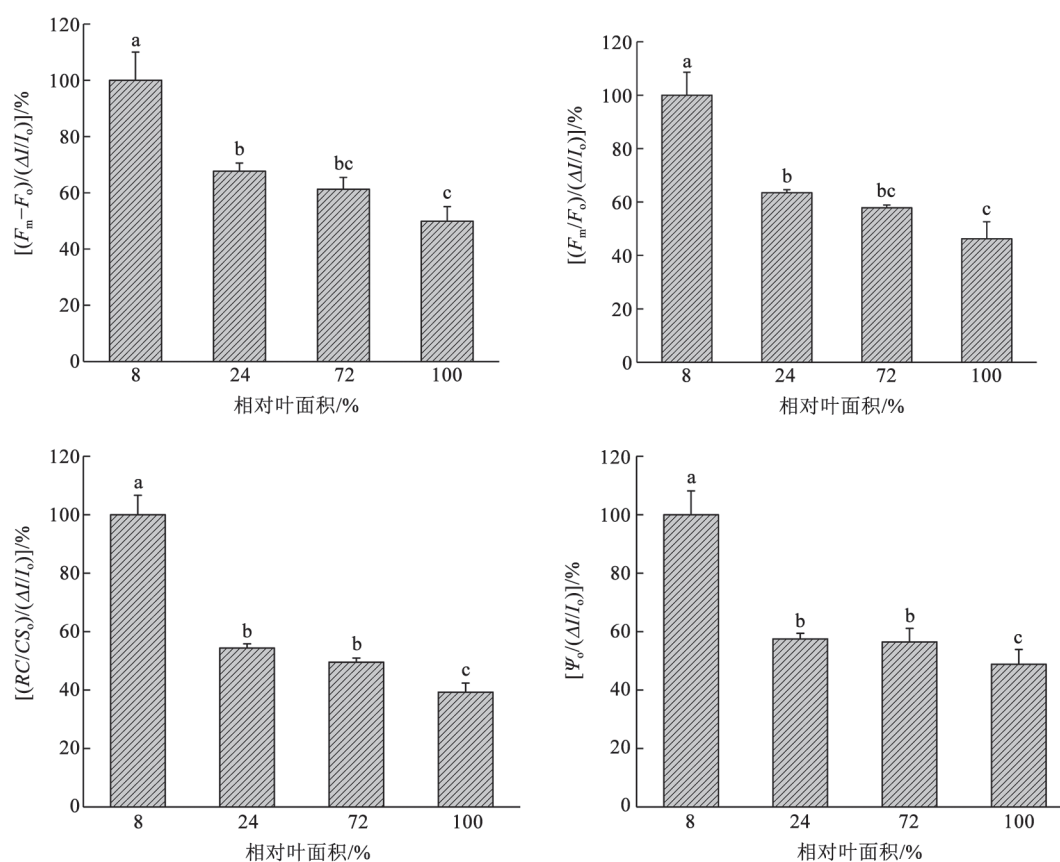


图7 不同展开程度黄瓜叶片PSII相对活性和PSI相对活性比值的变化

Fig.7 The changes in the ratio of relative PSII activity to PSI activity in different expanding leaves of *C. sativus*

A: $(F_m - F_o)/(\Delta II_o)$; B: $(F_m/F_o)/(\Delta II_o)$; C: $(RC/CS_o)/(\Delta II_o)$; D: $\Psi_o/(\Delta II_o)$ 。分别以最幼叶的PSI或PSII活性作为100%,其他叶片的PSI和PSII活性化作幼叶PSI和PSII活性的百分数。

(Portis等2008)。前人的研究表明,在体外,如果存在ATP再生系统,Rubisco的活性会大幅度提升(Streusand和Portis 1987),Mächler等(1984)也证明ATP的消耗反应会引起Rubisco活性的下降。本研究的结果暗示,由于ETR和CEF受抑导致幼叶中ATP的供应很低,这在一定程度上会抑制Rubisco的活性,导致幼叶CE较低,我们推测这可能是导致幼叶CE较低的一个重要因素。通过对比分析光合作用核心蛋白表达量和对应过程的活性,我们发现,光合机构的活性与核心蛋白表达量之间并不成正比关系。

在幼叶中,各种测定的活性和成熟叶活性的比值中,CE是最低的,说明相对成熟叶片来说,幼叶的羧化活性是黄瓜叶片发育过程中最慢的一个过程(图8-B)。从不同发育阶段黄瓜叶片的CO₂响应曲线(饱和光强下)可以看出,随着CO₂浓度的增

加,幼叶和成熟叶的P_n大幅度增加(图8-A)。CO₂浓度的增加除了提高了卡尔文循环的CO₂供应外,CO₂提高会增加CO₂/O₂的比值,进而促进Rubisco的羧化活性,加速了CO₂的固定和RuBP的再生(图8-C),导致P_n的增加。在饱和CO₂浓度下,幼叶的P_n由大气条件下的3 μmol (CO₂)·m⁻²·s⁻¹提升至11 μmol (CO₂)·m⁻²·s⁻¹左右,而成熟叶的P_n提升至28 μmol (CO₂)·m⁻²·s⁻¹。这个结果说明,在大气CO₂浓度及饱和光强下,黄瓜幼叶和其它展开叶光反应产生的同化力是高于碳同化需要量的,也就是说光反应的能力是大于暗反应能力的。只有在这种情况下,给不同叶片提供饱和CO₂后才能导致P_n的大幅度增加。

综上所述,在黄瓜叶片发育过程中,PSII活性的完善要早于PSI活性的完善,完善最慢的CO₂羧化阶段成为限制整个光合速率的主要因素。此外,

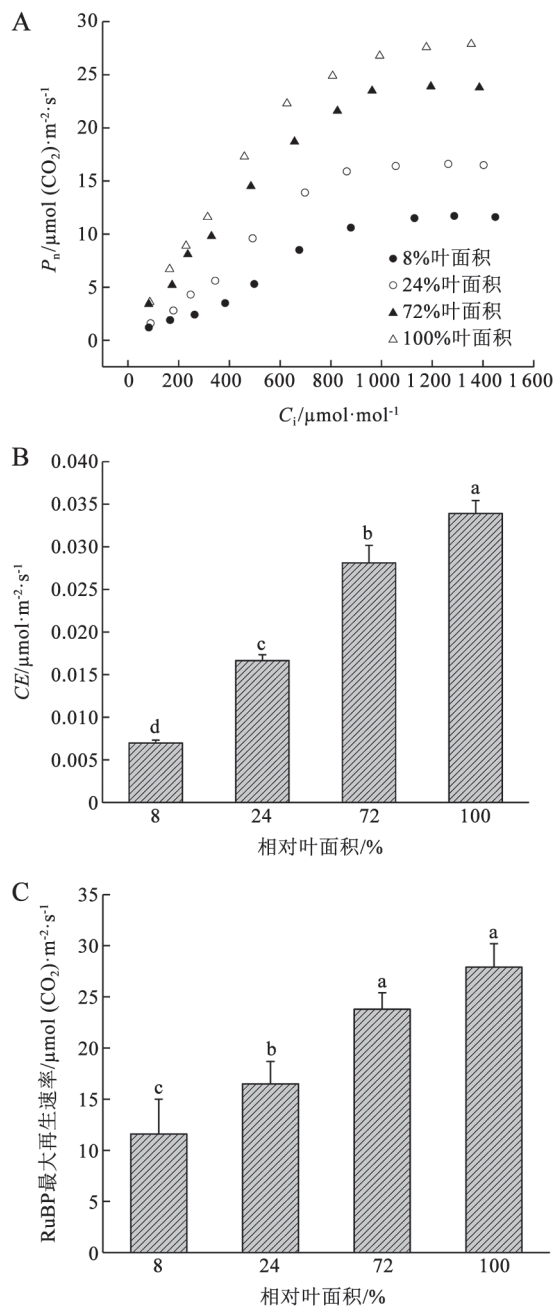


图8 不同展开程度黄瓜叶片的暗反应活性的变化

Fig.8 Changes of the activities of dark-reaction in different expanding leaves of *C. sativus*

A: P_n - C_i 响应曲线; B: CE; C: RuBP最大再生速率。

光合机构的核心蛋白表达程度与叶片光合机构的活性并不成正比关系。

然而, 整个卡尔文循环由十多种不同的酶催化完成, 虽然在正常条件下Rubisco是黄瓜卡尔文循环的限速酶, 但是本实验的现有数据无法证明, 在发育过程中, 整个卡尔文循环过程中是否有其

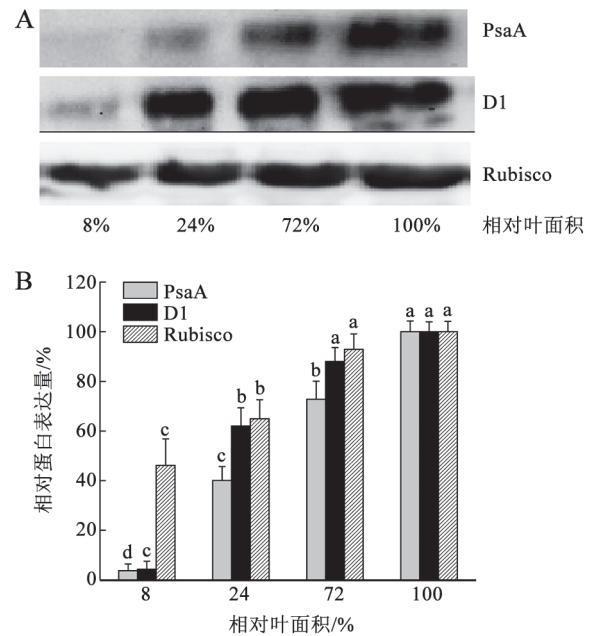


图9 不同展开程度黄瓜叶片的PSI、PSII及卡尔文循环核心蛋白表达量的变化

Fig.9 Changes of the expression of the photosynthetic core proteins of PSI, PSII and Calvin cycle, in different expanding leaves of *C. sativus*

A: 不同展开程度黄瓜叶片的PSI、PSII及卡尔文循环核心蛋白表达量的变化; B: 3种蛋白的相对表达量的变化。以完全展开叶片的蛋白质含量为100%, 其他叶片的蛋白质含量换算成完全展开叶的百分数。

它酶比Rubisco的发育更慢, 成为发育过程中光合作用的主要限制因素。此外, 温室里生长的黄瓜是否和大田里生长的黄瓜表现出相同的趋势以及不同植物是否也表现不同的趋势? 要阐明这些问题, 还需要做进一步的研究。

参考文献(References)

- Fan XL, Zhang ZS, Gao HY, et al (2014). Photoinhibition-like damage to the photosynthetic apparatus in plant leaves induced by submergence treatment in the dark. *PLoS One*, 9: e89067
- Farquhar GD, Caemmerer SV, Berry JA (1980). A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. *Planta*, 149: 78-90
- Farquhar GD, Sharkey TD (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 33: 317-345
- Gao J, Li PM, Ma FW, et al (2014). Photosynthetic performance during leaf expansion in *Malus micromalus* probed by chlorophyll a fluorescence and modulated 820 nm reflection. *J Photochem Photobiol B*, 137: 144-150
- Gratani L, Bonito A (2015). Leaf traits variation during leaf

- expansion in *Quercus ilex* L. *Photosynthetica*, 47: 323–330
- Jiang CD, Shi L, Gao HY, et al (2006). Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll *a* fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica*, 44: 454–463
- Kim SJ, Lee CH, Hope A, et al (2001). Inhibition of photosystems I and II and enhanced back flow of photosystem I electrons in cucumber leaf discs chilled in the light. *Plant Cell Physiol*, 42: 842–848
- Klughammer C, Schreiber U (1998). Measuring P700 absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system. In: Garab G (ed). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Dordrecht: Springer, 4357–4360
- Li PM, Cheng LL, Gao HY, et al (2009). Heterogeneous behavior of PSII in soybean (*Glycine max*) leaves with identical PSII photochemistry efficiency under different high temperature treatments. *J Plant Physiol*, 166: 1607–1615
- Maayan I, Shaya F, Ratner K, et al (2008). Photosynthetic activity during olive (*Olea europaea*) leaf development correlates with plastid biogenesis and Rubisco levels. *Physiol Plant*, 134: 547–558
- Mächler F, Schnyder H, Nösberger J (1984). Influence of inorganic phosphate on photosynthesis of wheat chloroplasts I. Photosynthesis and assimilate export at 5°C and 25°C. *J Exp Bot*, 35: 481–487
- Maxwell K, Johnson GN (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot*, 51: 659–668
- Porra RJ (2005). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth Res*, 73: 149–156
- Portis AR Jr (2003). Rubisco activase — Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth Res*, 75: 11–27
- Portis AR Jr, Li C, Wang D, et al (2008). Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *J Exp Bot*, 59: 1597–1604
- Schansker G, Srivastava A, Strasser RJ (2003). Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Funct Plant Biol*, 30: 785–796
- Srivastava A, Strasser RJ, Govindjee (1995). Differential effects of dimethylbenzoquinone and dichlorobenzoquinone on chlorophyll fluorescence transient in spinach thylakoids. *J Photochem Photobiol B*, 31: 163–169
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Mohammad Y (ed). *Probing Photosynthesis*. England: CRC Press, 445–483
- Streusand VJ, Portis AR (1987). Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of Ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol*, 85: 152–154
- Tang YL, Wen XG, Lu CM (2005). Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiol Bioch*, 43: 193–201
- Tian MS, Wolf AB, Bowen JH, et al (1996). Changes in color and chlorophyll fluorescence of broccoli florets following hot water treatment. *J Am Soc Hortic Sci*, 121: 310–313
- Weis E, Berry JA (1987). Quantum efficiency of photosystem II in relation to 'energy'-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *BBA-Bioenergetics*, 894: 198–208
- Zhang Z, Jia Y, Gao H, et al (2011). Characterization of PSI recovery after chilling-induced photoinhibition in cucumber (*Cucumis Sativus* L.) leaves. *Planta*, 234: 883–889

The relationship between the activities of photosynthetic apparatus and the expressions of photosynthetic core proteins during the leaf expansion of *Cucumis sativus*

ZHONG Xin^{1,2}, LI Yu-Ting^{1,3}, CHE Xing-Kai^{1,3}, ZHANG Zi-Shan^{1,3}, LIU Bin-Bin¹,
LI Qing-Ming^{1,2,4,*}, GAO Hui-Yuan^{1,3,*}

¹State Key Laboratory of Crop Biology, Taian, Shandong 271018, China

²College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

³College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

⁴Scientific Observing and Experimental Station of Environment Controlled Agricultural Engineering in Huang-Huai-Hai Region, Ministry of Agriculture, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: This study explored the relationship between the expressions of photosystem I (PSI), photosystem II (PSII) core proteins PsaA, D1 and the key enzyme of Calvin cycle ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), development activities of PSI, PSII, Calvin cycle and photosynthetic rate during the development of *Cucumis sativus* leaves. The results showed that the activities of PSI and PSII, carboxylation efficiency (*CE*) and the expressions of photosynthetic apparatus core proteins increased with the leaf expansion, but the development speed of the PSII activity in the youngest initiating leaf was significantly greater than that of PSI, which was supported by the observation that the relative PSII activity F_m-F_o , PSII maximum photochemical efficiency F_v/F_m , active reaction centers per leaf cross section RC/CS_o and so on were much higher than that of PSI maximum redox activity $\Delta I/I_o$. In addition, the relative expression of PSII core protein (D1) was also significantly higher than PSI core protein (PsaA) in youngest initiating leaves. Although the relative expression of Calvin cycle key enzyme Rubisco was higher than that of PSI and PSII core proteins in youngest initiating leaves, the *CE* was still very low. It demonstrated that the expression extent of the photosynthetic-apparatus-core- proteins was not positively correlated with the photosynthetic rate. Through comprehensive analysis, we suggest that the *CE* is the main limiting factor of photosynthetic rate in the youngest initiating leaves during the leaf development of cucumber.

Key words: cucumber (*Cucumis sativus*); leaf development; photosynthesis core protein; OJIP test; PSI and PSII

Received 2018-01-05 Accepted 2018-05-23

This work was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (31471918, 31701966, 31771691), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2013CM008) and National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2014BAD05B03).

*Co-corresponding authors: Li QM (gslqm@sdau.edu.cn), Gao HY (gaohy@sdau.edu.cn).