

叶绿素缺乏对大豆光系统 II 和光能分配的影响

郭晶晶, 龚丽丽, 韩涛, 张雪, 许晓明

(南京农业大学生命科学院, 江苏南京, 210095)

摘要: 研究田间条件下大豆叶绿素缺乏突变体以及野生型叶片逐步展开过程中的叶绿素含量、气体交换、叶绿素荧光动力学等特性, 并分析了二者在叶片展开过程中吸收光能分配的差异。结果表明: 叶绿素缺乏导致突变体大豆有活性的 PS II 反应中心数目减少, 每个反应中心的光能吸收和激发能捕获增加, 但是 PS II 电子传递受阻, 致使每个反应中心的激发能耗散增加。与野生型相比, 突变体大豆叶片所吸收的能量中分配给热耗散的能量较多, 而过剩的激发能较少; 同时随着叶绿素含量降低, 光合电子传递中向光呼吸分配的比例增大。

关键词: 大豆; 叶绿素缺乏; 突变体; PSII 反应中心; 光能分配

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2009)04-0605-06

Effect of Chlorophyll-deficient on PS II and Distribution Properties of Absorbed Light Energy in Leaves of Soybean

GUO Jing-jing, GONG Li-li, HAN Tao, ZHANG Xue, XU Xiao-ming

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: The chlorophyll contents, gas exchange and chlorophyll fluorescence kinetics were extensively studied in chlorophyll-deficient mutant soybean leaves and its wild-type from emergency to full expansion under field conditions. The difference of the absorbed light distribution between two soybean varieties during the development of leaves was also assessed. Results showed that chlorophyll deficient induced a decrease of PS II reaction centers, and resulted in an increase of excited energy capture per active reaction centers. It also showed that PS II electron transport was blocked apparently, and the energy dissipation increased per PS II reaction centers. Compared with wild-type soybean, the mutant had less excitation energy and the fraction of absorbed light allocated to energy dissipation. Furthermore, with the deficiency of the chlorophyll content allocation of photosynthetic electron transport to photorespiration was enhanced.

Key words: Soybean; Chlorophyll - deficient; Mutant; PS II reaction centers; Distribution of light energy

在研究光合色素的过程中, 人们发现叶绿素缺乏的突变体是研究植物叶片光合机构与功能以及对各种因素响应的理想材料。一般认为, 色素含量的缺乏可以降低叶片捕光的能力, 同时色素缺乏, 捕光天线的成分和结构的改变也会引起光合作用效率的改变。研究中的大豆叶绿素缺乏突变体属田间自然突变体, 突变性状受 1 对隐性单基因控制。突变体幼叶的叶绿素含量显著低于野生型, 表现现象是严重缺绿, 呈现明显的芽黄性状。但其在幼叶阶段具有较强的捕光能力, 这是叶绿素缺乏突变体中少有的现象。

植物叶片往往不能将所吸收的光能全部用于光

合碳同化, 它们用于光合电子传递的光能比例约为 10% ~ 50%^[1]。从 PS II 天线上耗散热能的百分比因叶片吸收光能的多少和光合作用能力的不同而异。如果光合作用对光能的利用受限制将会导致光合机构内产生过多的过剩光能, 而这些过剩的光能不能被快速消耗就会引起光合机构的光破坏^[2]。那么, 突变体在叶绿素缺乏的情况下是如何维持一定的光合效率以及如何协调吸收光能在光化学途径与热耗散的分配呢? 针对以上问题, 以田间生长的大豆叶绿素缺乏突变体及其野生型为材料进行研究。

收稿日期: 2008-11-02

作者简介: 郭晶晶 (1980-), 女, 硕士研究生。研究方向为光合生理。E-mail: jerry9988@sohu.com。

通讯作者: 许晓明。E-mail: xuxm@njau.edu.cn。

1 材料方法

1.1 材料种植

以大豆 (*Glycine max* L) 叶绿素缺乏突变体 (T5578, NG96V-1) 及其野生型 (T5577) 为材料。室外自然条件下盆栽, 盆径 15 cm, 高 14 cm, 装干土 3.8 kg 左右。每盆留苗 2 株, 正常水肥管理。生长 1 个月后选择大小一致、长势良好的盆栽大豆, 取主茎上刚刚伸出的顶叶为材料。

1.2 叶绿素的测定

参考 Arnon 的方法^[3], 选择合适的叶片用直径 1 cm 打孔器打取叶圆片, 混匀, 随意抽取其中 10 片以 80% 丙酮 20 mL 于暗处浸提 48 h, 至叶片呈白色。其间每隔 12 h 左右取出振荡片刻, 使色素均匀分布于丙酮溶液中。用 UV754 分光光度计分别在 663 nm, 646 nm 测定 OD 值, 计算出叶绿素 a (Chl a), 叶绿素 b (Chl b) 的含量。

1.3 气体交换和荧光淬灭动力学参数的测定

采用美国基因公司带叶绿素荧光叶室的 LICOR-6400 便携式光合系统同步测定净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s)、暗呼吸 (R) 等气体交换参数和荧光参数 (F_o 、 F_o' 、 F_v 、 F_m 、 F_m'), 控制 CO_2 浓度为 $(380 \pm 10) \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, 光量子通量密度 (PFD) 为 $1\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 相对湿度 (RH) 为 50% ~ 60%, 叶室和外界温度相符为 28°C 。每个指标 5 ~ 6 个重复。每天天亮前测定荧光参数 F_o , 以保证叶片完全暗适应。

1.4 快速荧光诱导动力学的测定

用 Handy-PEA 连续激发式荧光仪 (Hansatech, UK) 测定快速叶绿素荧光诱导动力学曲线, 按照 Cao 和 Strasser 的方法^[4-5] 由快速叶绿素荧光诱导曲线计算以下参数: 最大光化学效率 (φP_o)、捕获激

发能的电子转化效率 (ψ_o)、PS II 电子传递的量子效率 (φE_o)、非 Q_B 还原中心比例、单位反应中心吸收的光能 ABS/RC 、单位反应中心捕获的用于还原 Q_A 的能量 TR_o/RC 、单位反应中心捕获的用于电子传递的能量 ETo/RC 、单位反应中心耗散的能量 DIo/RC 、单位面积光合机构内反应中心的数量 RC/CSm 。

1.5 光能分配与电子传递速率的计算公式

根据 Demmig - Adam^[6] 等提出的公式计算光合机构吸收的光能用于光化学反应的份额 $P = Fv'/Fm' \times qp$, 用于天线热耗散的份额 $D = 1 - Fv'/Fm'$, 用于反应中心由非光化学反应耗散的份额 $Ex = Fv'/Fm' \times (1 - qp)$ 。用荧光方法估算叶片总电子传递速率 J_F 参照 Krall 和 Edward^[7] 的公式: $J_F = \Phi PS II \cdot I \cdot a \cdot f$ 。I 是入射于叶面的光强; a 是叶片吸光占入射光强的比例, 通常为 80%; f 是光能在 PS II 的分配比例, 对 C_3 植物而言, 常为 50%。参与光呼吸的非环式光合电子流 J_o 按 Epron 等^[8] 的公式计算: $J_o = 2/3 [J_F - 4(A + R)]$, A 为净光合速率, R 为暗呼吸。

2 结果与分析

2.1 叶绿素含量变化

在大豆叶片伸出后, 8 d 内叶面积快速增大直至全展, 这一时期是叶片叶绿素含量、光合速率等指标变化幅度最大的阶段。突变体在叶片从伸出到全展之前的叶绿素含量 (图 1) 非常低, 总叶绿素含量仅为野生型的 66%, 表现为明显的芽黄特征。其中 Chla、Chlb 含量分别为野生型的 65% 和 60%, 但两个品种叶绿素 a/叶绿素 b 的比值差异不大。这表明该突变体黄化是总叶绿素含量降低的结果。

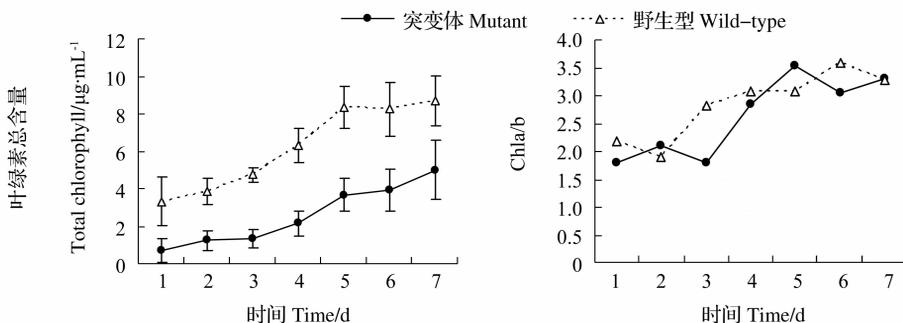


图 1 叶绿素总含量、叶绿素 a/b 的变化

Fig. 1 Changes of the content of total chlorophyll (Chl) and the ratio of Chla/Chlb in the mutant and wild-type soybean leaves

2.2 光合速率的变化

由图 2 可知,在展叶过程中突变体的净光合速率低于野生型,突变体和野生型大豆叶片的气孔导度区别不大,因此突变体光合速率的下降不是气孔导度导致的结果。图 3 反映了大豆叶片的净光合速率

率随叶绿素含量增加而增大,两者呈显著正相关;而且随着叶片发育,突变体和野生型叶绿素含量接近时,突变体的净光合速率与野生型相差不大(数据未列出)。可见叶绿素含量缺乏是导致大豆叶片光合同化能力下降的重要因素之一。

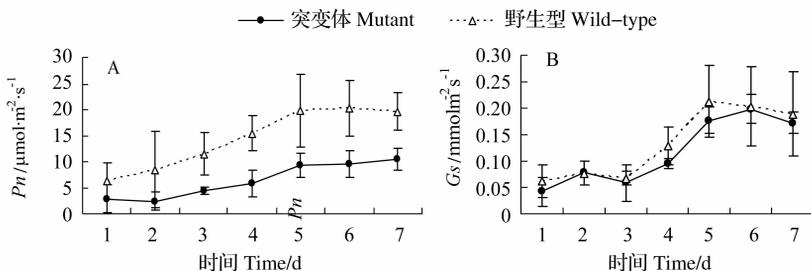


图 2 突变体和野生型大豆叶片发育过程中净光合速率和气孔导度的变化

Fig. 2 Changes of net photosynthetic rate (P_n) and stomatal conductance (G_s) in mutant and wild-type soybean leaves during its development

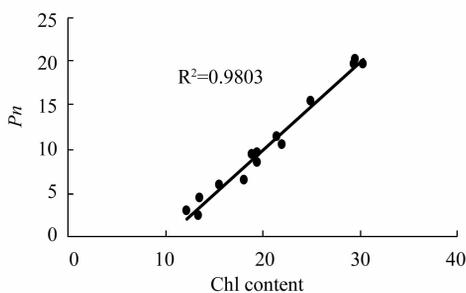


图 3 净光合速率与叶绿素含量的关系

Fig. 3 Relationship between the net photosynthetic rate (P_n) and the content of chlorophyll

2.3 快速叶绿素荧光诱导动力学参数的分析

图 4 所反映的是从大豆顶叶伸出后快速叶绿素荧光诱导动力学参数的变化。叶绿素缺乏突变体的最大光化学效率 (ϕP_o) 和 PS II 电子传递的量子效率 (ϕE_o) 在发育前期大幅下降(图 4A、B), 捕获激发能的电子转化效率 (ψ_o) 也有所下降(图 4C), 同时还观察到突变体叶片中非 Q_B 还原中心比例增加(图 4D), 说明在发育前期 PS II 受体侧 Q_A 和 Q_B 间的电子传递受阻。但随着叶片的展开, ϕP_o 逐渐升高, 这是突变体叶片光合功能逐渐成熟的标志, 结果表明与野生型叶片刚伸出光合机构发育就较完善不同,

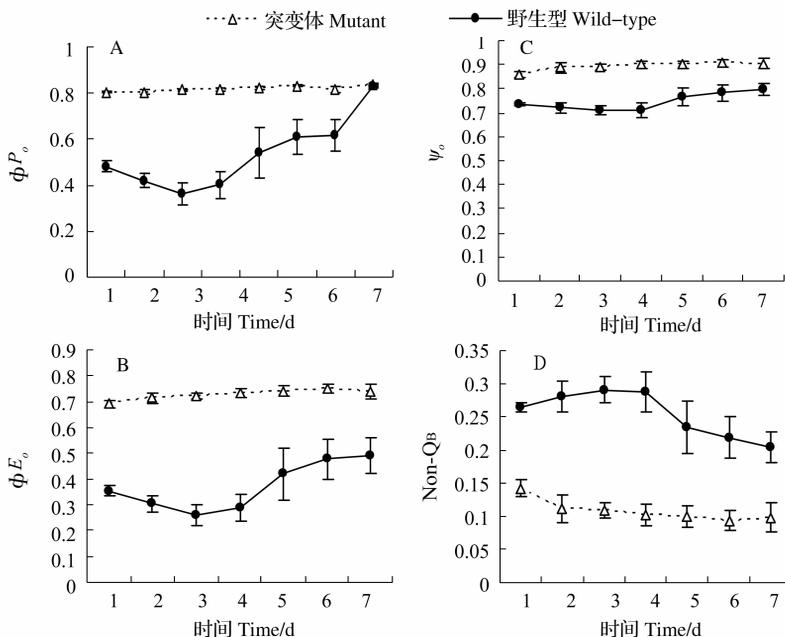


图 4 突变体和野生型大豆叶片展开过程中 PS II 光能转化效率及非 Q_B 还原中心比例的差异

Fig. 4 Difference of the conversion efficiency of light energy of photosystem II and Non- Q_B -reducing reaction centers in the mutant and wild-type soybean leaves from emergence to full expansion

突变体的光合机构成熟滞后。

随着叶片的发育,单位面积有活性的 PSII 反应中心的密度(RC/CSm)逐渐上升(图 5A),但和野生型相比,突变体单位面积内有活性的反应中心数目较少,同比之下只有野生型的 50%左右。突变体大豆叶片单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)比野生型高(图 5B),与 ABS/RC 相同,捕获的能量(TRo/RC)也相应升高(图 5C),从而增加单位反应中心的

激发压,为了耗散相对较多的剩余激发能,突变体中单位反应中心热耗散掉的能量(DIo/RC)相对较高(图 5D)。这显然是大豆光合机构的一种保护机制,减少反应中心所承受的激发压。而两者单位反应中心用于电子传递的能量(ETo/RC)却相当(图 5E),表明突变体用吸收和捕获更多的光能,来弥补其单位反应中心数目不足的缺陷,从而达到一定量的能量转换,这可能是突变体对环境的一种适应。

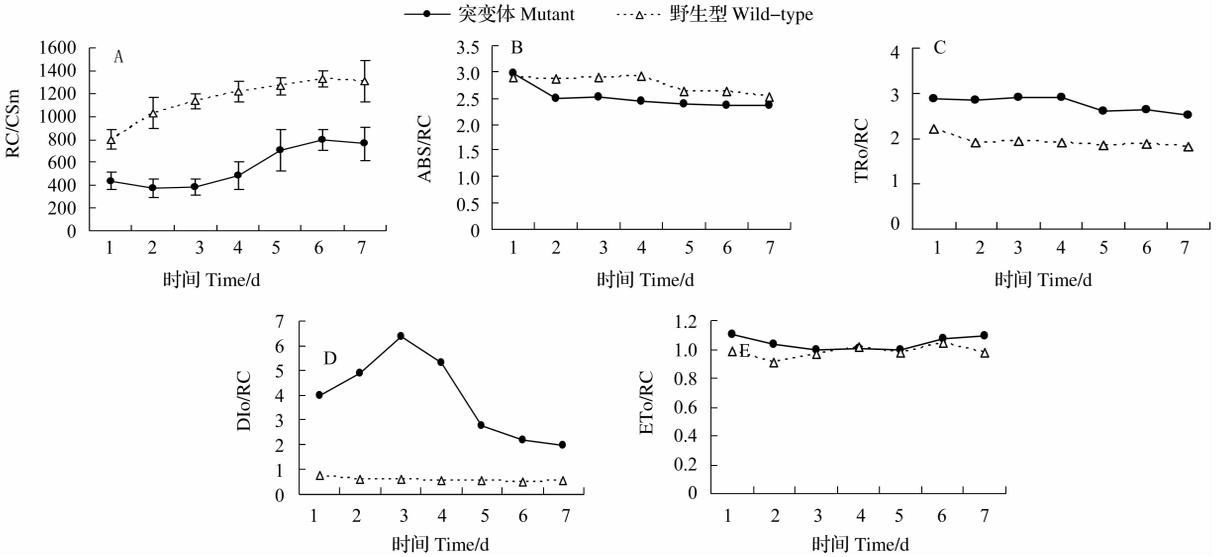


图5 突变体和野生型大豆叶片展开过程中反应中心密度(A)及单位反应中心光能吸收(B)、捕获(C)、热耗散(D)及电子传递(E)的差异

Fig. 5 The difference of the density of PSII reaction centers(A), active reaction centers(B), trapping(C), heat dissipation(D) and electron transport(E) in the mutant and wild-type soybean leaves from emergence to full expansion

2.4 叶片吸收光能分配的差异

植物叶片吸收的光能可分为三部分,一是在天线色素上热耗散的部分(D),二是用于光化学反应的部分(P),三是反应中心的过刺激能部分(E)。

图6反映了田间条件下突变体及其野生型大豆在叶片展开过程中,吸收光能向光化学反应、热耗散及过剩光能分配的情况。野生型大豆叶片吸收的光能用在光化学反应上的比例要大于突变体,但是

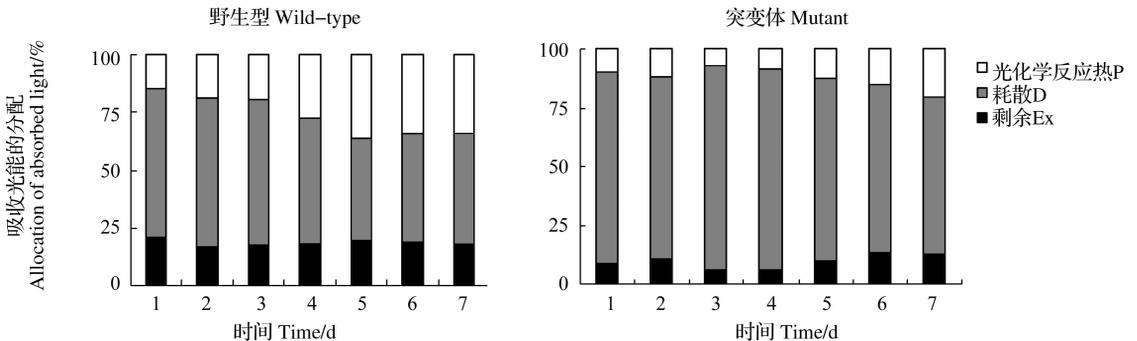


图6 突变体及其野生型叶片光能吸收与分配的比较

Fig. 6 Changes in allocation of light absorbed in the mutant and wild-type soybean leaves

随着叶片的展开,野生型大豆叶片吸收的光能过剩而较多地转变成激发压。由图 7 可以看出,叶片展开的 7 d 内突变体大豆光合机构中的过剩光能只有 9%,而野生型大豆叶片剩余 21% 左右的能量,这部分既没有被捕光天线耗散掉,也没有被光化学反应利用的过剩光能必然会导致植物体内活性氧分子含量增加,进而对光合机构造成破坏。突变体大豆叶片光合机构中的过剩光能通过热耗散消耗的能量比野生型多 17%,有效地防止了强光下过剩光能引起 PS II 中心过度激发,从而对光合机构起一定的保护作用^[9]。

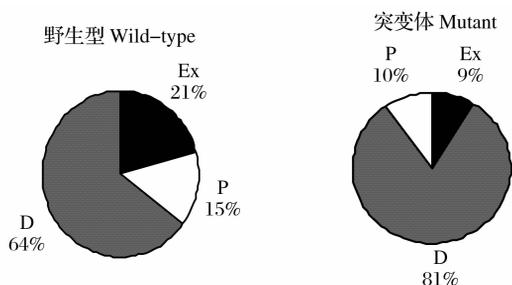
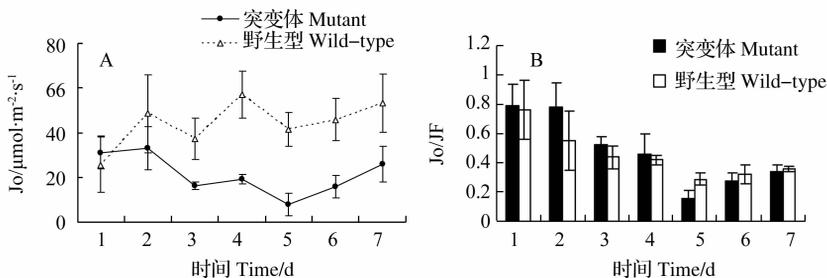


图 7 叶片展开过程中(7 d)吸收光能分配的平均值

Fig. 7 Averages for allocation of light absorbed in the mutant and wild-type soybean leaves from emergence to full expansion



Jo: Electron flow ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) through photorespiration. Jo/JF: Fraction of total electron flow partitioned to photorespiration

图 8 光合电子向光呼吸的分配

Fig. 8 Allocation of photosynthetic electron transport to photorespiration

3 讨论

叶绿素分析结果表明该叶绿素缺乏大豆突变体应该属于缺乏叶绿素型,但突变体光合速率下降又与气孔导度无关,所以很可能与叶绿素含量降低有关。Strasser 等^[10]认为 ABS/RC 可以作为衡量 PS II 反应中心捕光天线大小的一个指标。与野生型大豆相比,突变体叶片的 ABS/RC 增加,因此推测叶绿素缺乏的突变体大豆叶片 PS II 反应中心的捕光天线相对增加。在叶绿素缺乏的条件下 PS II 捕光天线的相对增加是由于部分反应中心失活所致^[11],结果

2.5 光合电子传递分配于光呼吸的差异

研究表明光呼吸也是大豆消耗过剩激发能的重要途径之一。结果显示,大豆幼叶可以利用光呼吸耗散掉一部分的激发能。用荧光配合红外 CO₂ 分析技术可以估测 PS II 在照光条件下的电子流传递速率 (J_F) 和参与光呼吸的电子流速率 (J_0)。野生型大豆 J_0 明显高于叶绿素缺乏的突变体(图 8A),说明野生型大豆用于光呼吸作用耗散掉的激发能大于突变体,但两者总电子流分配到光呼吸的比例 J_0/J_F 却很接近(图 8B),说明叶绿素缺乏并没有影响光呼吸在耗散激发能方面所起的作用。此外,随着叶片的发育成熟、叶绿素含量的增加,用于光呼吸的电子传递总量占总电子传递的比例逐渐下降并最终稳定(图 8B)。结果表明,在叶片发育早期叶绿素含量很低时,光合电子传递中向光呼吸分配的比例较大。随着发育过程中叶绿素含量的增加,光呼吸的作用在逐渐减少。提高参与光呼吸的光合电子传递虽以降低参与碳同化的电子流速率比例为代价,但却有助于防止或减轻强光等对光合机构的损伤,而光呼吸在叶绿素缺乏时同样起着保护作用来弥补光暗反应的不平衡。

表明,叶绿素缺乏的突变体叶片中有活性的反应中心数目少于野生型(图 5A)。正是由于反应中心数目的减少,导致每个反应中心捕获的激发能增加。但是捕获激发能并没有完全用于光化学反应,每个反应中心的激发能耗散增加。可见突变体光合速率的降低应该主要是由于叶绿素缺乏而导致电子传递效率下降的结果。

叶绿素缺乏导致 PS II 受体侧 Q_A 和 Q_B 间的电子传递受阻(图 4),从而 Q_A 的氧化速率降低,再加上天线转化效率的下降,进而导致 PS II 的量子效率和电子传递速率下降(图 4)。然而叶绿素缺乏对 PS II 的光化学反应和光合电子传递的抑制也能够导致

过剩激发能的产生,为了保护光合机构免遭强光伤害,叶片必须有效耗散过剩激发能^[12]。结果也显示 DI_0/RC 显著增加(图 5D),验证了依赖叶黄素循环的热耗散增加是叶绿素缺乏突变体重要的光破坏防御机制^[13]。

对吸收光能分配的分析表明,突变体大豆叶片光合机构中的过剩光能比野生型少 12% 左右,有效的减少了植物体内活性氧分子含量增加,从而对光合机构起一定的保护作用^[9]。这体现了大豆叶绿素缺乏突变体在光能分配上的优势,其主要依赖于天线上的热耗散,推测可能是依赖于叶黄素循环的热耗散,这种热耗散将来自叶绿素的过剩光能无害的耗散掉,导致传递给光化学反应中心的光能减少,这与姜闯道等^[14]的研究一致。进一步分析表明,光呼吸可能也是大豆在代谢水平上耗散过剩光能的一种有效保护机制,以调节光合作用光反应与碳代谢之间的平衡,防止强光伤害。但在叶片的发育过程中,通过光呼吸耗散过剩光能的作用在逐渐下降。

综上所述,叶绿素缺乏造成光合机构的结构发生了改变,也影响了电子传递、光能吸收和捕获以及激发能的分配^[15-16]。首先,单位受光面积内反应中心数目减少,引起该突变体 PS II 反应中心吸收和捕获的光能增加,说明了突变体有可能是通过吸收和捕获较多的光能来补偿反应中心数目的减少和光合机构发育的不成熟;其次,强光下剩余光能必然造成活性氧的产生,叶绿素缺乏的突变体通过天线耗散掉过多的剩余光能,这暗示了突变体叶片的天线调节能力的提高,也许是叶绿素缺乏突变体应对色素缺乏,光保护能力上升的一种调控机制。总之,突变体可以通过协调自身光能利用和分配来满足正常生长的需要。

致谢:感谢南京农业大学国家大豆改良中心赵团结副教授提供试验材料。

参考文献

- [1] Björkman O, Demming-Adams B. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants[C]. Berlin: Springer, 1994: 17-47.
- [2] 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]. Journal of Experimental Botany, 1995, 46: 1351-1362.
- [3] Aron D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxi-

- dase in *Beta Vulgaris* [J]. Plant Physiol, 1949, 24: 1-15.
- [4] Cao J, Govindjee. Chlorophyll a fluorescence transient as indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1015: 180-188.
- [5] Strasser B J, Strasser R J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test [C]. Kluwer Academic, Dordrecht. 1997: 977-980.
- [6] Demming-Adams B, Adams W W III, Baker D H, et al. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 98: 253-264.
- [7] Krall J P, Edwards G E. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves [J]. Physiologia Plantarum, 1992, 86: 180-187.
- [8] Epron D, Godard D, Cornic G, et al. Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistance to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.) [J]. Plant, Cell and Environment, 1995, 18: 43-51.
- [9] Ögren E. Prediction of photoinhibition of photosystems from measurements of fluorescence quenching components [J]. Planta, 1991, 184: 538-544.
- [10] Strasser B J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients [J]. Photosynthesis Research, 1997, 52: 147-155.
- [11] Krüger G H J, Tsimilli-Michael M, Strasser R J. Light stress provokes plastic and elastic modification in structure and function of photosystem II in camellia leaves [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 101: 265-277.
- [12] Deming-Adams B, Adams W W, Heber U, et al. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by DTT in Spinach leaves and chloroplast [J]. Plant Physiology, 1990, 92: 293-301.
- [13] Jiang C D, Gao H Y, Zou Q. Enhanced thermal energy dissipation depending on xanthophyll cycle and D1 protein turnover in iron-deficient maize leaves exposed to high light [J]. Photosynthetica, 2001, 39 (2): 269-274.
- [14] 姜闯道, 高辉远, 邹琦. 缺铁大豆叶片激发能耗散的增加 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28 (2): 127-132. (Jiang C D, Gao H Y, Zou Q. Increase in excitation energy dissipation by iron deficiency in soybean leaves [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002, 28 (2): 127-132.)
- [15] Viktor R T, Ilona M, Szilvia V, et al. Effects of the available nitrogen on the photosynthetic activity and xanthophyll cycle pool of maize in field [J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159 (6): 627-634.
- [16] Masaharu C K, Kouki H, Tadaki H. Photoinactivation and recovery of photosystem II in *Chenopodium album* leaves grown at different levels of irradiance and nitrogen availability [J]. Functional Plant Biology, 2002, 29 (7): 787-795.