

水分胁迫下黄瓜叶片光系统II电子传递及其含铁组分变化

陈 阳 曾福礼

(兰州大学生命科学学院)

摘 要 黄瓜叶片在水分胁迫下随着胁迫程度的加深, 细胞膜透性增加, 表现出 PS II 荧光激发光谱特征峰峰值的降低。同时其 PS II 电子传递速率及 PS II 氧化侧 DCIP 光还原活性下降。通过对 PS II 的⁵⁷Fe 穆斯堡尔谱及其参数进行分析显示: 水分胁迫使 PS II 的⁵⁷Fe Mössbauer 谱的 II, VI 子谱 2 套双峰消失; 铁醌复合物(Fe-Q)、细胞色素 b₅₅₉ (Cytb₅₅₉) 由还原态向氧化态转化。以上结果表明: 铁醌复合物 Cytb₅₅₉ 因光能在 PS II 色素分子之间共振传递效率降低及 PS II 氧化侧的电子传递受到抑制, 不能及时得到从其氧化侧传来的电子, 而以高自旋 Fe³⁺-Q 复合物及低自旋氧化型 Cytb₅₅₉ 的形式存在。致使 PS II 电子传递由于含铁复合物的 Fe²⁺/Fe³⁺ 氧化电势的变化而受到阻抑。

关键词 黄瓜; 水分胁迫; 光系统II; 铁醌复合物; 细胞色素 b₅₅₉; 穆斯堡尔谱

分类号 Q 945.11; Q 63.33

Mechanism of Changes on Iron Atom in Photosystem II Particles of Cucumber Leaves Under Water Stress

Chen Yang Zeng Fuli

(College of Life Sciences, Lanzhou University)

Abstract Upon deeper water stress, cell membrane permeability of cucumber leaves increased, while the lower characteristic peak of PS II excited fluorescent spectra was found. At the same time, the activity of electron transport and DCIP photoreduction on PS II decreased. The results of ⁵⁷Fe Mössbauer spectrum and PS II Mössbauer Parameter on PS II particles showed that: The two peaks of II, VI spectrum on ⁵⁷Fe Mössbauer spectrum disappeared. Iron-quinone complex and Cytb₅₅₉ are oxidized. The results suggested that since iron-quinone complex and Cytb₅₅₉ could not obtain electron from PS II donor side in time, which was due to the decreasing efficiency of resonance transport among PS II pigment molecules and the declining velocity of electron transfer on PS II oxidant side, the complex that contains iron atoms was in form of high spin Fe³⁺-Q and low spin oxidized Cytb₅₅₉. As a result, electron transfer was inhibited at this site owing to the changes of Fe III/Fe II midpoint potential.

Key words cucumber; water stress; photosystem II particle; iron-quinone complex; Cytb₅₅₉; Mössbauer spectrum

PS II 作为复杂的膜蛋白复合体对水分胁迫的反应, 目前已有报道。如水分胁迫使 PS II 电子传递受阻^[1]; 随着放氧复合体多肽的降解, PS II 放氧活性下降^[2]; PS II 色素蛋白复合体磷酸化使光能不利于向 PS II 分配, 避免 PS II 的过度激发^[3]; 通过对 PS II 损伤机理进行研究推测, 水分胁迫的作用部位即可能位于 PS II 氧化侧, 也可能在 PS II 作用中心上^[1]。Hao^[4]借助圆二

收稿日期: 2000-06-26

国家自然科学基金资助项目(39670073)

陈阳, 甘肃省兰州市安宁区甘肃农业大学, 730070

曾福礼, 甘肃省兰州市兰州大学, 730000

色分析手段发现水分胁迫对 LHC II 的组成及构象都有影响, 其中与膜上激发能的非辐射散失有紧密联系的 LHC II 可能对减轻水分胁迫引起的激发压力有调节作用^[4]。而参与光能在 PS II 天线水平耗散的叶黄素循环, 因玉米黄质含量的增加而加强了对光系统的保护作用^[5]。但由于 PS II 中铁元素含量极低, 使得对它的研究受到可靠仪器及技术的限制, 难以用常规方法检测。因此关于 PS II 中承担电子传递作用的重要元素铁原子在干旱条件下存在状态的变化状况及铁原子发生变化对电子传递造成的影响尚未见报道。近年来已有学者利用能提供非常窄的单能射线, 分辨极细微的能量变化的原子核无反冲共振吸收和散射现象的穆斯堡尔技术, 研究检测生物固氮过程和铁硫蛋白结构, 发现该技术对铁具有专一性, 灵敏度高达 $L/E_r = 3E^{-3}$, 远优于 EPR 技术, 极适于植物体内铁环境的研究^[6]。因此我们用富含 ^{57}Fe 实验材料培养植物, 使之被吸收并参与叶片的代谢过程, 使黄瓜叶片 PS II 样品中 ^{57}Fe 丰度增高, 并针对生物样品在测定过程中活性易降低甚至丧失的情况, 在液氮温度下进行测定, 以获得高清晰度的 Mössbauer 谱及精确的 Mössbauer 超精细相互作用参数。同时结合 PS II 荧光, DCIP 还原活性变化的分析结果, 从 PS II 相关色素、氧化侧发生变化的角度, 探索 PS II 电子传递体含铁组分铁酞复合物 Cytb₅₅₉ 中铁原子存在状态在干旱条件下的变化状况及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

取津春 4 号黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 种子 25 吸涨 24 h, 暗处于 32 萌发 3 d 后, 播种于无菌石英砂中, 定期浇灌 Hoagland 完全培养液。待黄瓜长出 3~4 片真叶时, 分别将其根系置于 -0.5 MPa 的 PEG-6000 的 Hoagland 培养液中进行水分胁迫处理。

1.2 测定方法

叶片相对含水量和细胞膜相对透性的测定按分别参照李岩^[7]及李锦树提供的方法^[8]。用 DDS-11A 型电导仪测定膜透性。

叶绿体及 PS II 颗粒的提取分别按照叶济宇^[9]及杜林方提供的方法^[10]。

PS II 电子传递活性的测定参照卢从明提供的方法^[11]。用 Clark 氧电极测定。测量温度为 25, 光照强度 $350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。电子传递速率每毫克叶绿素每小时的吸氧率计算。

叶绿体 DCIP 光还原活性的测定参见 Tang Satoh 提供的方法在 722 光栅分光光度计上进行^[11]。反应液包括 Tris-HCl (pH 7.8) $40\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, MgCl_2 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCIP $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。光强 $380\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。DCIP 光还原活性单位活性单位以每毫克叶绿素每小时还原的 DCIP 的微摩尔数表示。

PS II 室温荧光激发光谱的测定在 Shimadzu RF-5301pc 荧光分光光度计上进行测定。波长 683 nm, 光路宽 5 nm, 扫描范围为 400~500 nm。处理与对照样品叶绿素浓度均为 $17.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

PS II 穆斯堡尔谱的检测, 黄瓜培养同上, 微量铁元素以 ^{57}Fe -EDTA 的形式喂饲^[12]。以提纯的 PS II 进行 Mössbauer 测定及分析。放射源为 ^{57}Co (Pd), 源强度约 15 mCi, 同质异能移相对于硝酸钠, 测量温度 77 K, 在 FH1913 型等加速仪上进行测试。数据采集由计算机实现。拟合和绘图采用配套软件在计算机上完成。

PS II 放氧活性的测定, 以 $0.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMBQ 为电子受体, 用 Clark 氧电极 25 测定

反应体系 $\text{H}_2\text{O}-\text{DMBQ}$ 的放氧速率。光照强度 $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。分别选取Mössbauer 测定前及液氮温度下经 48 h Mössbauer 测定后的 PS II 为样品。PS II 放氧活性以每小时每毫克叶绿素放出氧气的微摩尔数表示。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫对叶片相对含水量及细胞膜相对透性的影响

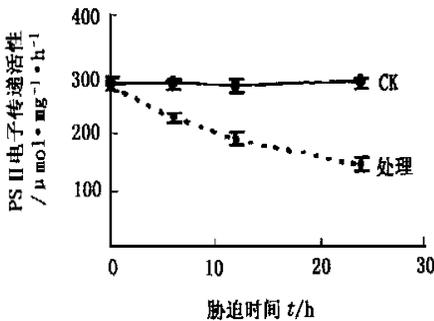
黄瓜经过 -0.5 MPa PEG 处理 6, 12, 24 h 后, 叶片相对含水量降低了 6.7%, 13.3%, 22.1%; 细胞膜相对透性增加了 2.2%, 6.98%, 13.6% (表 1)。可见黄瓜叶片分别受到了轻、中、重度水分胁迫的伤害^[13]。

表 1 水分胁迫下黄瓜叶片相对含水量及细胞膜相对透性的变化

项 目	胁迫时间 t/h			
	0	6	12	24
叶片相对含水量 $w/\%$	98.3 ± 1.1	91.6 ± 0.95	84.7 ± 0.73	76.1 ± 0.87
膜相对透性/ $\%$	75.9 ± 0.58	78.1 ± 0.33	81.2 ± 0.6	89.5 ± 0.78

2.2 PS II 电子传递活性在水分胁迫下的变化

水分胁迫 6, 12, 24 h 后, PS II 电子传递速率分别为对照的 79%, 66.4% 和 44%, 可见 PS II 电子传递受到不同程度的抑制 (图 1)。



1 水分胁迫对 PS II 电子传递活性的影响

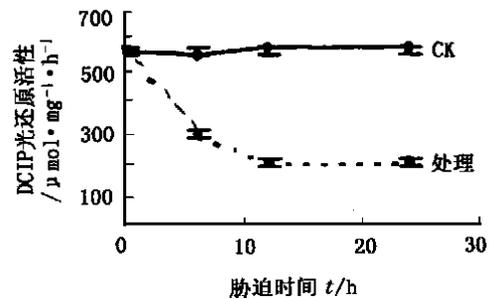


图 2 水分胁迫对 DCIP 光还原活性的影响

2.3 水分胁迫对叶绿体 DCIP 还原活性的影响

黄瓜 DCIP 还原活性在水分胁迫 6, 12, 24 h 后, 分别为对照的 52.15%, 35.7%, 35.01% (图 2), 由于 DCIP 光还原活性依赖于 PS II 氧化侧提供电子, 因而表明 PS II 氧化侧受到了水分胁迫的伤害。

2.4 水分胁迫对 PS II 室温荧光激发光谱的影响

室温 21 °C 荧光光谱测定表明, PS II 在 442 nm, 466 nm, 480 nm 处有最大荧光发射峰。其中 466 nm 是 PS II 叶绿素 b 的发射高峰, 而 442 nm, 480 nm 的峰值分别代表叶绿素 a、类胡萝卜素的吸收。水分胁迫下, 黄瓜叶片 PS II 激发光谱的特征峰位没有变化, 而属于叶绿素 a、b 和类胡萝卜素的峰值降低 (图 3)。说明激发能经由叶绿素 b、类胡萝卜素传递给叶绿素 a 的传递效率降低, 致使 PS II 光化学反应受到影响。

2 5 水分胁迫对 PS II 穆斯堡尔谱的影响

由于同质异能移反映了原子价电子轨道分布改变时所引起的核外 s 电子密度的改变, 这个密度改变导致共振线位置的移动, 因此它是能提供原子核外电子密度的有效方法。通过此参数, 可以直接了解原子的氧化还原状态、电子价态、配位、化学键等性质。而四极劈裂给出关于 Mössbauer 原子所占位置的对称性和原子核外电场梯度的信息, 主要是铁原子区域的局部结构和对称性, 有助于确定原子的氧化还原状态。由于 PS II 含铁复合物包括铁醌复合体和细胞色素 b₅₅₉ (Cyt b₅₅₉), 后者存在于 2 个多肽上, 有高电位和低电位 2 种形式, 当低电位 Cyt b₅₅₉ 被氧化时, 高电位的 Cyt b₅₅₉ 就处于还原状态。因此根据四极劈裂及化学位移, 可判断 I, II, III, IV 子谱分别为低自旋 Fe³⁺、低自旋 Fe²⁺、高自旋 Fe³⁺ 以及高自旋 Fe²⁺ (表 2, 3), 它们分别属于氧化态 Cyt b₅₅₉、还原态 Cyt b₅₅₉、Fe³⁺-Q 复合物、Fe²⁺-Q 复合物^[14]。

从表 2, 3 可以看出, 水分胁迫下, 低自旋 Fe²⁺ 与高低自旋 Fe²⁺ 消失, 低自旋 Fe³⁺ 和高自旋 Fe³⁺ 存在; 从相对强度来看, 正常黄瓜叶片 PS II 的氧化型低电势 Cyt b₅₅₉ 占 12.5%, 还原型高电势 Cyt b₅₅₉ 占 87.5%, Fe³⁺-Q 复合物占 57%, Fe²⁺-Q 复合物占 43%, 而水分胁迫使氧化型 Cyt b₅₅₉、Fe³⁺-Q 复合物子谱强度分别增强了 3.35 和 1.06 倍。因 Cyt b₅₅₉ 变化较为显著, 说明氧化型低自旋 Cyt b₅₅₉ 大量存在。以上结果说明水分胁迫使得 Cyt b₅₅₉ 和 Fe³⁺-Q 复合物由还原态向氧化态转化。这可能是由于它们氧化侧电子传递受到阻碍, 铁醌复合体因不能及时得到电子造成的。

2 6 PS II 放氧活性在 Mössbauer 测定前后的变化

取 6 次测定结果的平均值, 水分胁迫 0 和 24 h 后, PS II 放氧活性在 Mössbauer 测定前后分别为 (106.92 ± 3.03), (102.49 ± 4.25), (47.16 ± 2.01) 和 (43.52 ± 1.98) μmol·mg⁻¹·h⁻¹。说明液氮温度下测定 48 h 后对 PS II 相关活性基本没有影响。

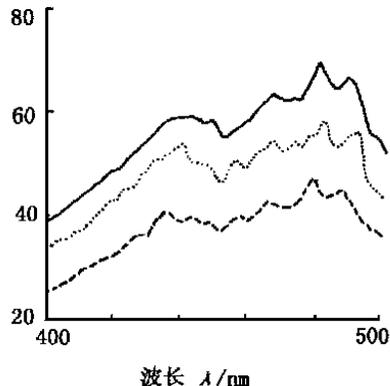


图 3 水分胁迫对 PS II 室温荧光激发光谱的影响

表 2 正常及水分胁迫 24 h 后黄瓜叶片 PS II 的穆斯堡尔谱参数

项目	子谱	相对强度 /%	同质异能移 /mm·s ⁻¹	四极矩劈裂 /mm·s ⁻¹	价态	自旋态
CK	I	8.622	0.39	1.085	Fe ³⁺	1/2
	II	19.266	0.3	0.575	Fe ²⁺	0
	III	67.195	0.516	0.387	Fe ³⁺	5/2
	IV	4.196	2.038	3.248	Fe ²⁺	2
处理	I	29.052	0.398	0.686	Fe ³⁺	1/2
	III	70.948	0.51	0.27	Fe ³⁺	5/2

3 讨论

以上研究结果表明: 水分胁迫黄瓜叶片受到不同程度伤害的情况下, 在 PS II 对光能的吸收能力降低的同时^[2], 也引起荧光发射峰的降低, 使激发能在异种或同种色素之间共振传递受

到影响,导致 PS II 对光能的吸收、传递效率降低;同时被光能激发后产生强氧化势的 P_{680} 由基态转为激发态的程度降低,表现出荧光产量下降^[2];因此光合色素通过影响光系统使电子从反应中心逸出及传递给原初电子受体的过程受到抑制;与 PS II 电子传递速率及荧光光谱变化相比较,水分胁迫在 12~24 h 之间时,可能由于放氧功能的适应性,PS II 氧化侧与放氧过程相关的 DCIP 光还原活性下降幅度较小。说明随着水分胁迫的加强,PS II 的电子传递与荧光激发对水分胁迫更为敏感。这一方面说明水分胁迫通过影响激发能传给 PS II P_{680} 反应中心色素的效率直接影响 PS II 电子传递;同时也暗示了水分胁迫抑制电子传递的另一个主要部位在 PS II 电子传递体上。而受干旱胁迫敏感的主要部位很可能是存在于铁醌复合体中^[15]。这与我们实验显示的铁醌复合体中承担电子传递的主要元素铁的价态有明显的变化结果吻合。其原因在于水分胁迫通过降低 PS II 对光能的吸收、传递、转化效率以及抑制放氧过程的方式致使光合电子在铁醌复合物电子供体侧的传递进程减慢;电子从 P_{680} 经电子受体 I Pheo 而传向 Fe-Q 的速率降低,铁醌复合物因不能及时得到从其氧化侧传来的电子,而使高自旋 Fe^{2+} -Q 复合物转变为 Fe^{3+} -Q;低自旋还原态 $Cytb_{559}$ 转化为氧化态,造成 Fe^{2+}/Fe^{3+} 氧化还原电势发生变化。Bruce^[16] 等认为,位于 Q_A 、 Q_B 之间的非血红素铁 II 元素在稳定铁醌复合物的三维结构,使之更易于电子在 Q_A - Q_B 的传递中有作用^[16]。因此铁原子氧化,还原态的变化将导致电子传递在 Q_A - Q_B 处发生障碍,PS II 电子传递因此而受到水分胁迫的抑制。

由于水分胁迫往往伴随着光抑制,而高氧化形式 $Cytb_{559}$ 在电荷分离和水裂解过程中对保护 PS II 免受光抑制损害有作用^[17]。可能出于同样的原因, $Cytb_{559}$ 的这种高氧化形式,在避免水分胁迫对 PS II 的破坏作用方面,有着积极的意义。

感谢兰州大学物理系周荣洁教授及王建波博士在穆斯堡尔测定中的指导和帮助。

参 考 文 献

- 1 卢从明,张煜珠,张其德 水分胁迫对叶绿体能量转换的影响 植物学报,1993,35(9):693~697
- 2 陈阳,曾福礼 水分胁迫对黄瓜 PS II 放氧活性的影响机制 中国科技期刊文摘,1999,(6):707~711
- 3 Douglas R H. Light in Biology and Medicine New York London: Plenum Press, 1988, 433
- 4 Hao L M, Wang H L, Wen J Q. Effect of water stress on light-harvesting complex II and expression of a gene encoding LHC II in *Zea mays* J Plant Physiol, 1996, 149(1): 30~34
- 5 许长成,李德权,邹崎 干旱条件下冬小麦不同叶龄叶绿素荧光及叶黄素循环组分的变化 植物生理学报,1999,25(1):29~37
- 6 王友桐 穆斯堡尔效应在我国化学及生物学中的应用概况 化学通报,1985,(3):58~66
- 7 李岩,邹琦 干旱条件下各生育期的大豆膨压维持方式的研究 植物生理学通讯,1995,31(1):34~38
- 8 李锦树 干旱对玉米细胞透性及膜脂的影响 植物生理学报,1983,9:223~229
- 9 叶济宇,赵海英 完整叶绿体的快速制备及完整度的测定 植物生理学通讯,1982,18(1):59~61
- 10 杜林方 具高放氧活性的 PS II 颗粒的制备与保存 植物生理学通讯,1995,31(3):212~215
- 11 Tang Satoh. The oxygen-evolving photosystem II core complex. FEBS Lett, 1985, 179(1): 60~64
- 12 Vasili Petrouleas, Jerry J, Brand, et al. A Mössbauer Analysis of the Low-potential iron-sulfur center in photosystem I Spectroscopic evidence that Fx is a [4Fe-4S] cluster. Biochemistry, 1989, 28: 8980~8983
- 13 Hasiao T C. Plant responses to water stress. Annu Rev Plant Physiol, 1973, 24(3): 519~570
- 14 任黎,曾福礼 菠菜 PS II 颗粒铁组分的 Mössbauer 谱研究 中国科学 B 辑, 1995, 25: 935~940
- 15 Bjokman J S, Power S B. Water stress and photoinhibition of photosynthesis. Planta, 1984, 101: 505~518
- 16 Bruce A, Dinner. The iron-quinone electron-acceptor complex of photosystem II. Physiologia Plantarum, 1991, 81: 423~436
- 17 Thompson L K, Brudvig G. Cytochrome b_{559} may function to protect photosystem II from photoinhibition. Biochemistry, 1998, 27: 6653~6658