

烟草叶绿体NAD(P)H脱氢酶在抵御高温胁迫中的作用*

王 鹏 叶济宇 沈允钢 米华玲**

(中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要 经 42 °C 高温处理 48 h 以上, 烟草(*Nicotiana tabacum* L.)*ndhC-ndhK-ndhJ* 基因缺失突变体 (Δ ndhCKJ) 植株较其野生型(WT)先出现茎部褐变、叶片萎蔫等氧化伤害症状. 作用光关闭后的叶绿素荧光动力学表明, WT 植株中 NAD(P)H 脱氢酶(NDH)介导的 PSI 循环电子传递和叶绿体呼吸在高温胁迫时被促进了. 用甲基紫精(MV)处理叶圆片的结果显示, Δ ndhCKJ 光合机构更易受到光氧化伤害, 甚至首先发生叶绿素漂白. P700 氧化还原分析表明, NDH 介导的循环电子传递途径可能通过与 MV 竞争电子而减少活性氧(ROS)的积累. 将叶圆片于 42 °C 处理 6 h 后, Δ ndhCKJ 光化学反应活性的下降比 WT 更显著, 与此一致, 可溶性 Rubisco 活化酶含量显著低于 WT, 且电子传递链还原程度和非光化学能量耗散水平均显著高于 WT. 叶绿素毫秒延迟发光慢相的测定结果显示 NDH 介导的循环电子传递有助于跨膜质子梯度(Δ pH)的形成, 但其耗用在 Δ ndhCKJ 中受到严重抑制. 根据以上结果推测, NDH 介导的循环电子传递在高温胁迫下运转加快, 并将过剩的电子分流至叶绿体呼吸途径, 此外, NDH 途径提供的 Δ pH 可能在一定程度上有利于维持 CO₂ 同化的进行, 从而能够减轻光氧化胁迫的伤害.

关键词 NAD(P)H 脱氢酶 高温 光氧化胁迫 循环电子传递

温度是影响植物生长发育的主要环境因素之一. 夏季自然条件下, 植物经常受到高温的影响, 特别是由于近年来全球气候变化引起气温显著升高, 一些地区的温度甚至高达 42 °C, 使植物面临严重的高温胁迫. 高温条件往往能够间接地导致植物在光下的

光氧化胁迫. CO₂ 同化反应常常是植物光合作用中对高温最敏感的步骤^[1], 当 CO₂ 同化被高温抑制而减慢时, 光合电子传递链还原程度增加, 电子更容易渗漏给 O₂ 而产生 $\cdot$ O₂⁻, H₂O₂ 等活性氧分子(ROS)^[2]. 当活性氧产生和清除系统的平衡在过度的高温胁迫下被

收稿日期: 2005-10-18; 接受日期: 2005-11-04

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30270123, 90306013)

** 联系人, E-mail: mihl@iris.sipp.ac.cn

破坏时, 过多积累的活性氧就会引起生物大分子的氧化损伤和生物膜完整性的破坏^[3]. 此外光下低温也会间接造成植物光氧化胁迫. 因此, 植物对光氧化胁迫的抗性机理成为近年来植物生理和分子生物学中备受关注的问题.

Niyogi^[4]把CO₂ 同化反应以外可能的光能和电子耗散途径分为: PSII捕光天线的非光化学能量耗散, 消耗O₂的Mehler反应和光呼吸, 以及与PSI循环电子传递相关联的叶绿体呼吸途径. 当光下CO₂ 同化受温度等环境条件抑制时, 这些途径就可能加强以行使光保护功能. 最近的研究表明, 除流经两种光系统(PSII和PSI)的线性电子传递以外, 围绕PSI的循环电子传递在光合作用中也是不可缺少的^[5], 包括PGR5(质子梯度调节蛋白)介导的循环电子传递^[6]和NAD(P)H脱氢酶复合体(NDH, 与线粒体复合体I高度同源)介导的循环电子传递^[7~10]. 目前, 更多的工作集中在叶绿体NDH. 随着质体末端氧化酶(PTOX, 与线粒体交替氧化酶高度同源)的发现^[11,12], NDH参与的叶绿体呼吸在平衡电子传递链氧化还原状态以及抵御光氧化胁迫过程中的作用也日渐引起了人们的重视^[13,14].

已有很多工作显示NDH可能参与抵御光氧化胁迫. Martin等人^[15]发现大麦叶片处于强光下和高浓度氧气中时NDH-A亚基表达量明显升高. Casano等人^[14]的研究表明在光氧化胁迫下, 由于植物体内产生的H₂O₂的作用, *ndhB*, *ndhF*基因的转录水平增加, NDH复合体的NADH脱氢酶活力增高. Catalá等人^[16]和Guéra等人^[17,18]的工作进一步指出NDH可能通过叶绿体呼吸参与活性氧代谢, 减轻叶绿体发育或果实成熟过程中的光氧化伤害. 我们对烟草进行 50 °C 高温胁迫时, 同样发现叶绿体中NDH-K表达量增加, NADPH脱氢酶活性被促进^[19]. 可见, 多数工作集中在氧化胁迫对NDH表达量和活性的影响, 对其在缓解氧化胁迫过程中的作用机理尚缺少进一步的解析. 本文通过对烟草WT和NDH-C, -K, -J缺失突变体进行 42 °C 高温胁迫和外源光氧化剂甲基紫精(MV)处理, 获得了NDH能够减少活性氧积累的直接证据. 结果表明, NDH介导的循环电子传递可能通过将因CO₂ 同化受抑制而产生的过剩电子分流至叶绿体呼吸途径,

从而减轻高温胁迫引起的光氧化伤害.

1 材料与方法

1.1 烟草材料及生长和高温处理条件

烟草(*Nicotiana tabacum* c.v. Xanthi)野生型(WT)和 *ndhC-ndhK-ndhJ* 基因缺失突变体(Δ ndhCKJ)由日本九州大学 Shikanai 教授提供, 栽培于人工气候室(温度: 白天 25 °C, 夜晚 20 °C; 光暗周期: 12 h 光照/12 h 黑暗; 光源: 氙灯, 光强约 200~300 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). 播种后生长 4~6 周的烟草用于实验, 整株高温处理在 42 °C 光照培养箱里进行, 叶圆片高温处理通过叶面朝上漂浮在 42 °C 恒温水浴的水面上进行, 对照处理在 25 °C 进行. 两者均以荧光灯为光源, 光照强度约 100 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.2 MV 诱导的光氧化胁迫

从生长状态一致的 WT 和 Δ ndhCKJ 叶片分别切取叶圆片($d=1$ cm), 使其叶面朝上浮于 10 $\mu\text{mol/L}$ MV 溶液中, 以浮于水面的叶圆片为对照, 于 25 °C 培养箱中照光处理, 荧光灯的光强约 100 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. 处理 6 h 后吸干叶圆片表面液体, 测定叶绿素荧光及 P700 氧化还原速率. 处理 24 h 后拍照记录叶绿素漂白情况.

1.3 叶绿素荧光及 P700 氧化还原参数的测定

处理结束后, 连体叶片(测定作用光关闭后叶绿素荧光的瞬时上升)或叶圆片(测定其他荧光参数)继续于 25 °C 或 42 °C 下暗适应 10 min, 测定仍在相应温度进行. 参照Schreiber等人^[20]的方法, 采用调制式(PAM 101)叶绿素荧光仪(德国Walz公司制造), 用带有发射和检测装置的 101-ED测定叶绿素荧光参数: 打开检测光得到初始荧光 F_0 , 以 200 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的白光为作用光, 照光 2 min, 记录关光后叶绿素荧光的瞬时上升情况; 最大荧光 F_m 通过在 F_0 的基础上施加 0.8 s 的饱和脉冲光得到, $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$; 打开作用光后每间隔 30 s 连续施加 0.8 s 的饱和脉冲光从而得到 F'_m , 光诱导持续 15 min 以达到稳态, 此时可计算 PSII 的有效量子效率 $\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F)/F'_m$, 光化学淬灭系数 $qP = (F'_m - F)/F'_m$.

($F'_m - F'_o$), 以及非光化学淬灭系数 $q_N = 1 - ((F'_m - F'_o) / (F_m - F_o))$.

P700 氧化还原速率通过用ED-P700DW-E光吸收附件测定 810~830 nm光吸收变化来实现, 开远红光 (FR, >720 nm, >5.2 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)照射 30 s使光吸收增加到稳定状态后立即关闭, 计算开光后光吸收上升及关光后光吸收下降的速率^[21].

1.4 毫秒延迟发光(ms-DLE)测定

高温处理结束后, 叶圆片在相应温度暗适应 5 min, 立即放入样品室, 按李德耀和沈允钢^[22]的方法采用转盘磷光仪测定叶绿素毫秒延迟发光.

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及免疫印迹分析

参照Crafts-Brandner和Salvucci^[23]的方法, 高温处理结束后, 叶圆片加入 SDS-PAGE样品缓冲液充分研磨, 12000×*g*离心 3 min; 取上清液, 煮沸 3 min后, 各泳道按代表相同叶绿素量(0.8 μg)的样品量上样, 经 15%(w/v)SDS-PAGE分离后, 考马斯亮蓝染色分析 Rubisco大亚基含量或电转移至尼龙膜供Rubisco活化酶免疫印迹分析. Rubisco活化酶抗体由陈根云博士惠赠. 电泳或免疫印迹条带通过Gel-pro软件进行分析.

2 结果

2.1 高温处理前后烟草植株的表型和循环电子传递的运转

在 42 °C 下进行整株高温处理, 一般经过 48 h 以

上(保持光暗周期), ΔndhCKJ 较WT先出现叶片萎蔫和茎部的褐色损伤(图 1), 推测是活性氧过多积累的结果. 作用光关闭后叶绿素荧光的瞬时上升是由于光下积累的还原产物在暗中还还原质醌(PQ)所致, 可以间接地反映围绕PSI的循环电子传递速率^[10], 随后荧光的下降阶段则反映了叶绿体呼吸引起的PQ再氧化^[24,25]. 图 2 显示, 与 ΔndhCKJ 相比, 25 °C时WT中存在明显的关光后荧光上升, 表明依赖NDH的循环电子传递的运转. 整株烟草在 42 °C光下处理 12 h后, 关光后荧光上升在WT中无论上升速率还是高度均有显著增加, 荧光的再下降阶段也比 25 °C时加快, 表明在高温引起的光氧化胁迫期间, 植株体内NDH参与的循环电子传递和叶绿体呼吸均被促进了.

2.2 MV 处理后叶圆片的光漂白及其对循环电子传递运转的影响

MV 是常用的人工电子受体, 由于 MV 可将来自铁氧还蛋白(Fd)的电子传递给氧分子而产生超氧阴离子, 在超氧歧化酶(SOD)的作用下产生过氧化氢, 因而也被称为外源光氧化剂. 为了探讨 NDH 途径与光氧化条件下活性氧的主要产生途径(Mehler反应)的关系, 我们用低浓度的 MV(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对叶圆片进行光氧化处理. 由于活性氧对叶绿素的破坏作用, 24 h 后 ΔndhCKJ 叶圆片被严重漂白而 WT 叶圆片伤害程度低得多(图 3), 表明NDH的缺失与氧化伤害的加重有关.

为了探测 MV 处理过程中 NDH 介导的 PSI 循环电子传递的变化情况, 我们比较了 WT 和 ΔndhCKJ 叶



图1 高温胁迫后烟草 WT 和 ΔndhCKJ 表型的比较
整株 42 °C 处理 48 h 以上, ΔndhCKJ 开始呈现萎蔫, 白色箭头指示茎部的氧化损伤

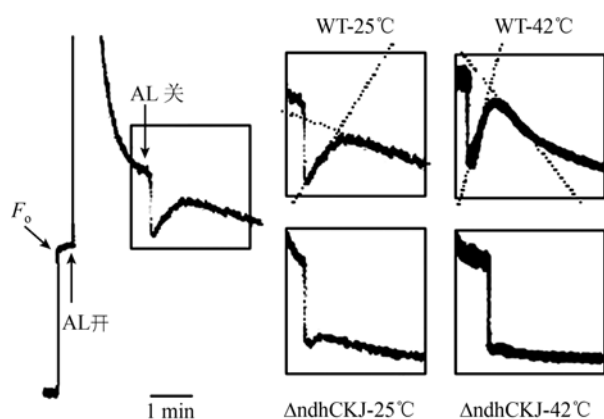


图 2 作用光关闭后叶绿素荧光的上升在高温处理前后的变化

整株处理 12 h 后对靶叶片进行测量。F₀ 示初始荧光; AL 示作用光。左边为示意图, 右边方框中为不同条件下关光后荧光上升的截取和放大

圆片的 P700 氧化还原速率。远红光诱导的 810~830 nm 光吸收增加表示 P700 的氧化, 远红光关闭后光吸收的下降表示暗中 P700⁺的再还原(图 4(a)). MV 处理前, 由于 NDH 介导的 PSI 循环电子传递对 P700⁺的部分还原, WT 中 P700 氧化速率慢于 ΔndhCKJ 的, 而

P700⁺再还原速率快于 ΔndhCKJ 的。叶圆片经 10 μmol · L⁻¹ MV, 100 μmol photons · m⁻² · s⁻¹ 光下处理 6 h 后, 其 P700 氧化水平没有显著变化, 而 P700 氧化速率在 ΔndhCKJ 中加快 27.8%, 在 WT 中虽然加快 45.1%, 但仍低于 ΔndhCKJ 处理前的氧化速率; P700⁺再还原速率在 ΔndhCKJ 和 WT 中都显著减慢(73.0%和 60.5%), WT 中 P700⁺再还原速率仍高于 ΔndhCKJ(图 4(b)).

根据以上结果推测, 在较强的光氧化胁迫条件下, 虽然大量电子通过 MV 流向活性氧产生途径而使 P700 氧化加快, 但 NDH 介导的 PSI 循环电子传递仍然继续运转, 在一定程度上起到从活性氧产生途径分流电子的作用, 从而在 WT 叶片中减轻了氧化伤害。

2.3 叶圆片高温处理前后光化学反应及非光化学能量耗散的变化

活性氧对光合机构的破坏可以通过光化学反应的抑制程度反映出来。PSII 的最大光化学效率或潜在的量子效率通常以叶绿素荧光参数 F_v/F_m 为指标来评估。ΦPSII 则代表 PSII 的有效量子效率, 即其吸收



图 3 MV 处理前后 WT 和 ΔndhCKJ 叶圆片叶绿素光漂白程度的比较

处理条件: 叶面朝上浮于 10 μmol · L⁻¹ MV 溶液中, 于 25 °C 培养箱中照光处理 24 h, 光强约 100 μmol photons · m⁻² · s⁻¹, 以浮于水面的叶圆片为对照

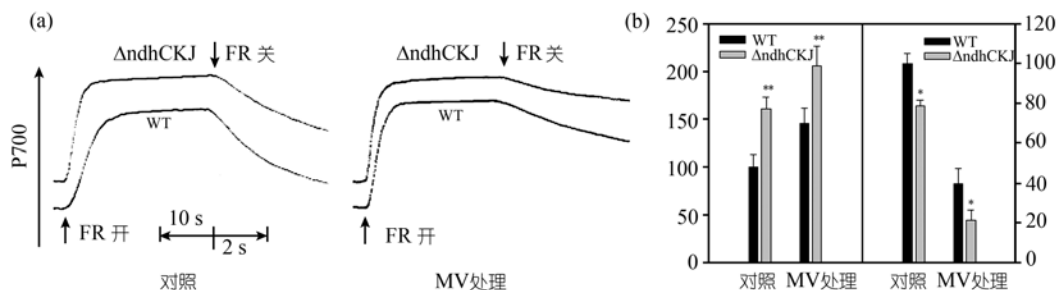


图 4 MV 处理前后 WT 和 ΔndhCKJ 叶圆片 P700 氧化还原速率的变化

FR 示远红光。远红光关闭后记录速度加快 5 倍。图中数值为 6 次测定的平均值, * 示 $P < 0.05$; ** 示 $P < 0.01$

的光能被用于光化学反应的效率。MV 处理叶圆片 6 h 后, F_v/F_m 和 $\Phi PSII$ 均大幅下降, 且在 $\Delta ndhCKJ$ 中比在 WT 中下降得更显著(图 5), 其中 $\Phi PSII$ 在 $\Delta ndhCKJ$ 和 WT 中分别下降了 68.9% 和 48.0%。进一步显示了 NDH 介导的 PSI 循环电子传递在光氧化条件下对光合机构可能的保护作用。

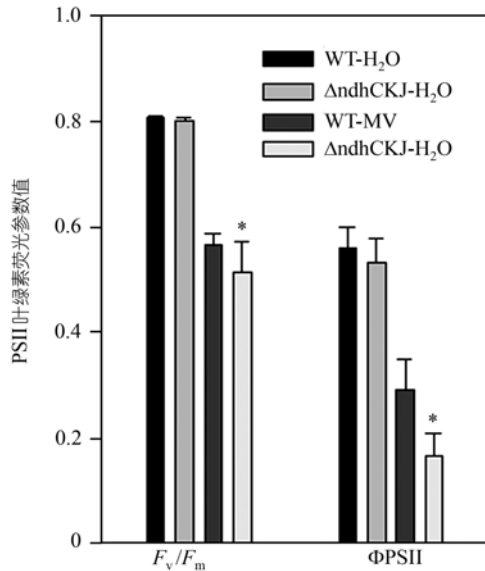


图5 MV 处理前后 WT 和 $\Delta ndhCKJ$ 叶圆片 PSII 光化学效率的变化

图中数值为 4 次测定的平均值, * 示 $P < 0.05$

为了便于对比高温处理和 MV 处理对光合机构的抑制程度, 进而采用水浴对叶圆片进行高温处理, 因为与整株处理相比, 水浴处理效果更加显著和稳定, 并且与以上 MV 处理的环境介质一致。42℃ 处理 6 h 后, F_v/F_m 有所下降, 但在 WT 与 $\Delta ndhCKJ$ 之间没有明显差别, 而 $\Phi PSII$ 的下降幅度在 $\Delta ndhCKJ$ 中比在 WT 中更加显著(图 6)。此外, 叶片光合放氧的结果也显示高温处理导致 CO_2 同化在 $\Delta ndhCKJ$ 中受到更加严重地抑制¹⁾。这表明高温处理后光合电子传递超出了 CO_2 同化反应的利用能力, 而 NDH 途径的缺失使得光合机构更易受到高温的影响。

F_v/F_m 和 $\Phi PSII$ 的受抑制程度显示高温处理导致的光氧化胁迫较 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ MV 处理要弱些(图 5

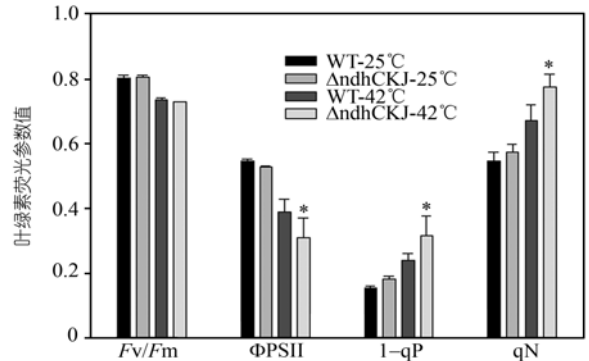


图6 叶圆片高温处理前后叶绿素荧光参数的变化

图中数值为 4 次测定的平均值, * 示 $P < 0.05$

和 6), 加之 NDH 介导的循环电子传递和叶绿体呼吸被促进(图 2), 因此其分流过剩电子的作用可能更明显。另外, 当环境条件变化间接引起光氧化胁迫时, 植物可以通过多种途径耗散过多的光能来调节电子传递速率并使之与 CO_2 固定的速率相符合, 因此, 其他能量耗散途径的变化也间接反映了由于 NDH 途径的缺失而引起的变化。叶绿素荧光的非光化学淬灭系数(q_N)常与跨膜质子梯度的变化及热耗散有关^[26]。42℃ 处理 6 h 后, $\Delta ndhCKJ$ 中稳态时的 q_N 显著高于 WT, 相应地, 反映 Q_A 还原状态的 $1-q_P$ 也高于 WT(图 6), 表明由于电子传递链的相对过度还原, $\Delta ndhCKJ$ 中更多的过剩光能不仅被迫通过氧代谢途径耗散, 还使其热耗散水平增加幅度显著高于 WT。

2.4 叶圆片高温处理前后跨膜质子梯度的变化

叶绿素毫秒级延迟发光的慢相主要反映跨类囊体膜质子梯度(ΔpH)的变化^[22], 经过短暂的诱导期, 慢相先升高再降低并达到稳态, 表明 ΔpH 用于 ATP 形成而被消耗^[27]。图 7 显示, 25℃ 下 WT 中前 10 s 所形成的毫秒级延迟发光的慢相高于 $\Delta ndhCKJ$ 的, 随后的 1 min 内两者都逐渐降至较低的稳态水平。42℃ 处理 6 h 后, 延迟发光慢相的上升受到抑制, 表明由于电子传递链还原程度增高, 线性电子传递速率减慢(图 6), 从而限制了 ΔpH 的建立。此时 WT 中前 10 s 所形成的延迟发光的慢相仍高于 $\Delta ndhCKJ$ 的。另一方面, 反映 ΔpH 耗用的慢相的下降阶段均受到抑制,

1) Wang P, Duan W, Takabayashi A, Endo T, Shikanai T, Ye J Y, Mi H. Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. Plant Physiol, 2006, Reactive Oxygen Species Special Issue

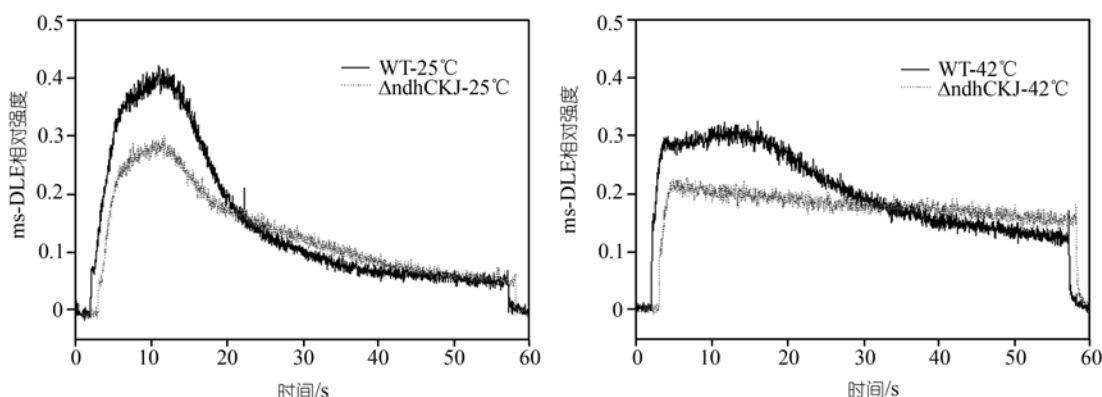


图 7 叶圆片高温处理前后叶绿素毫秒延迟发光的变化

最终的稳态水平均较高, 且 $\Delta ndhCKJ$ 中抑制程度明显高于 WT 中。以上结果显示, 除与线性电子传递耦联的 ΔpH 以外, NDH 介导的循环电子传递可能也为 CO_2 同化提供 ΔpH , 特别是在胁迫的初期。持续高温胁迫 6 h 后 ΔpH 的耗用在 $\Delta ndhCKJ$ 中比在 WT 中受到更严重的抑制, 滞留在较高的水平, 也显示了 NDH 的缺失导致 CO_2 同化对高温更加敏感。

2.5 叶圆片高温处理前后 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的变化

Rubisco 和 Rubisco 活化酶是 CO_2 同化反应的关键酶, 为了进一步探测 $\Delta ndhCKJ$ 中 CO_2 同化在高温下受到更严重抑制的原因, 我们分析了 Rubisco 和具有活性的可溶性 Rubisco 活化酶含量的变化。图 8 显示,

25 条件下, $\Delta ndhCKJ$ 叶圆片中 Rubisco 大亚基含量比 WT 中低 7.8%, 而可溶性 Rubisco 活化酶含量比 WT 中低 17.6%。42 处理 6 h 后, Rubisco 大亚基含量没有降低, 而可溶性 Rubisco 活化酶含量则大幅下降, 在 WT 和 $\Delta ndhCKJ$ 中分别下降了 75.1% 和 84.6%, 此时 $\Delta ndhCKJ$ 中可溶性 Rubisco 活化酶含量比 WT 中低 49.2%。根据以上结果推测, 高温对 $\Delta ndhCKJ$ 中 CO_2 同化更严重的抑制很大程度上与过多积累的活性氧对 Rubisco 活化酶的破坏有关。

3 讨论

在高温胁迫条件下, Calvin 循环有关酶系(特别是 Rubisco 和 Rubisco 活化酶)先于 PSII 的损伤而首先受到抑制, CO_2 同化速率减慢^[1,28], 光呼吸也被 6 h

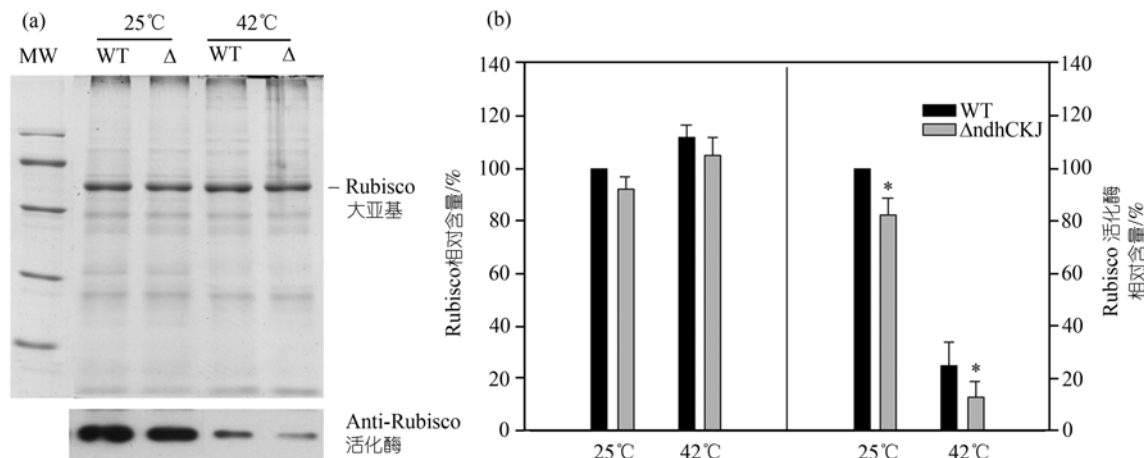


图 8 叶圆片高温处理前后 Rubisco 及 Rubisco 活化酶含量的变化

(a) SDS-PAGE 及免疫印迹分析; (b) Rubisco 及 Rubisco 活化酶相对含量, 图中数值为 6 次测定的平均值, * 示 $P < 0.05$

的 42 °C 高温处理所抑制^[29], 造成叶绿体中 NADPH 等还原物质相对积累和电子传递链还原程度增加。将烟草进行整株高温胁迫时, $\Delta ndhCKJ$ 往往比 WT 首先出现叶片的萎蔫和茎部的褐色损伤(图 1), 推测 NDH 循环支路的缺失可能使得更多过剩电子渗漏给 O_2 而产生活性氧。 $\Delta ndhCKJ$ 叶绿体中来不及清除的活性氧很容易扩散到叶肉及维管组织中。由于 H_2O_2 与木质素的亲合作用, 富含木质素的输导组织便容易受到 H_2O_2 等活性氧的损伤, 最终导致水分吸收不畅、叶片萎蔫甚至植株茎部的氧化损伤。在 WT 植株中, NDH 参与的围绕 PSI 的循环电子传递和叶绿体呼吸不仅在常温下运转, 而且在高温下被诱导加快, 并在相当长时间内保持这种快速运转(图 2)。因此, 循环电子流对 PQ 库的还原以及叶绿体呼吸将其再氧化的过程均更加活跃, 可能为过剩的电子提供了安全的出路, 减少了活性氧的积累^[4,25,30]。

彭长连等人^[31]曾运用 MV 进行一系列光合碳代谢与氧代谢关系的研究, 从而揭示了一些光氧化胁迫对光合作用的抑制机理。温度胁迫导致的是一种相对的光能过剩, 为了在更加纯粹和强烈的光氧化胁迫条件下求证 NDH 途径与活性氧产生途径的竞争作用, 我们用外源光氧化剂 MV 对烟草 WT 和 $\Delta ndhCKJ$ 叶圆片进行了处理。 H_2O_2 可以破坏叶绿素分子, 光下 MV 处理 24 h 后 $\Delta ndhCKJ$ 叶圆片严重漂白(图 3), 表明 NDH 确实通过某种途径减少了叶绿体中活性氧的积累。P700 氧化还原分析进而显示, 在 MV 处理的过程中, NDH 介导的循环电子传递在一定时间内、一定程度上起到了与活性氧产生途径竞争电子的作用(图 4)。由于与 NDH 相关联的叶绿体呼吸途径不产生活性氧^[32,33], 从而在 WT 中减轻了光合机构的氧化伤害(图 5)。Martin 等人^[25]曾观察到用低浓度 MV (<500 nmol/L) 对烟草叶圆片进行光氧化处理后, NDH 表达和活性以及类囊体过氧化物酶活性均发生上调。与此类似, 我们对烟草植株进行 50 °C 的高温胁迫时, 也观察到 NDH 表达和活性均提高了^[19]。MV 具有很强的负氧化电势, 可作为 PSI 的电子受体而抑制 CO_2 同化所需的电子供应, 而高温处理则通过抑制 CO_2 同化反应间接地引起光氧化胁迫, 但 NDH 途径在其中的响应方式可能是相同的,

并且在一定的胁迫强度下被促进时, 其分流电子的作用可能更加突出。

各光合电子传递途径之间存在相互消长的动态关系, 以保持电子传递链的氧化还原平衡。在高温处理引起 CO_2 同化抑制的条件下, 由于 PSII 捕获和传递的光能并没有随之大幅减少, 一部分线性电子流被迫流向围绕 PSI 的循环电子传递(包括 NDH 介导的循环以及叶绿体呼吸)和消耗氧的 Mehler 反应, 过多的光能还使热耗散水平增高(图 6)。在 $\Delta ndhCKJ$ 中, 由于 NDH 介导的循环电子传递失活, 更多的电子被迫流向 Mehler 反应, 因此经过一定时间的胁迫, 其活性氧积累水平较高, 氧化伤害程度也高于 WT(图 1)。活性氧能够破坏 CO_2 同化酶系^[34,35], 实验结果显示 $\Delta ndhCKJ$ 中具有活性的可溶性 Rubisco 活化酶含量在高温处理后显著低于 WT(图 8), 因此 CO_2 同化受到更严重的抑制, ΔpH 的耗用严重受阻(图 7), 并进一步导致 $\Delta ndhCKJ$ 中电子传递链还原程度和非光化学能量耗散水平显著高于 WT(图 6), 从而趋向产生更多活性氧的恶性循环。

另外, 即使在 25 °C 条件下, $\Delta ndhCKJ$ 中 qN 和 $1-qP$ 也往往轻微高于 WT(图 6), 与此一致, Rumeau 等人^[36]也报道 $NdhM$, N 和 O 缺失突变体非光化学荧光淬灭水平高于野生型。我们发现, 25 °C 下 WT 叶片中 ATP 含量稍高于 $\Delta ndhCKJ$ (数据未列出), 因此 NDH 介导的 PSI 循环电子传递可能还起到为 CO_2 同化提供 ΔpH 而在一定程度上促进光化学反应高效运转的作用。叶绿素毫秒级延迟发光的测定结果显示 WT 比 $\Delta ndhCKJ$ 形成较高的 ΔH (图 7), 为人们有关 NDH 途径能够为 CO_2 同化补充 ATP 的推测^[37,38]提供了直接的试验支持。Campbell 和 Ogren^[39]曾报道通过 PSI 而不是 PSII 的电子传递能够促进 Rubisco 活化酶的活性。WT 中可溶性 Rubisco 活化酶含量高于 $\Delta ndhCKJ$ (图 8) 可能也与 NDH 介导的 PSI 循环电子传递有关, 因为 Rubisco 活化酶的活性和热稳定性是需要 ATP 的^[40,41]。因此, 我们推测 NDH 途径除了能够减少流向活性氧产生途径的电子外, 还能够为 CO_2 同化补充 ATP, 从而在一定程度上减轻高温对光合碳同化的抑制。

总之, 在以前工作的基础上, 我们提供了进一步的证据表明 NDH 介导的 PSI 循环电子传递可能通过

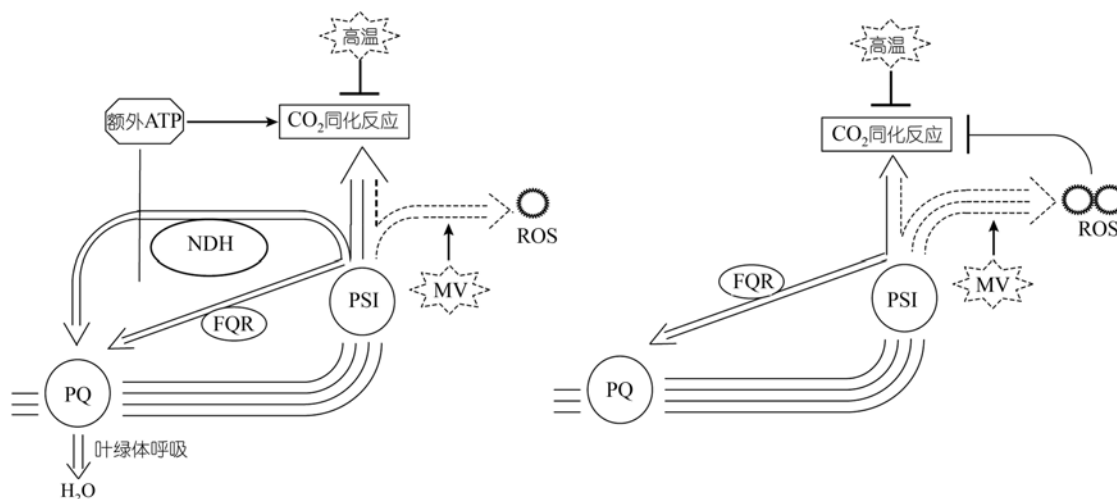


图9 NDH 介导的循环电子传递及叶绿体呼吸作用在减轻高温引起的光氧化胁迫过程中可能的作用方式

NDH 示 NAD(P)H 脱氢酶复合体; FQR 示铁氧还蛋白-质醌还原酶; PQ 示质醌; ROS 示活性氧分子

叶绿体呼吸途径分流过剩电子, 并可能在一定时期内为 CO_2 同化提供 ΔpH , 如胁迫的前期, 从而减轻 CO_2 同化酶系的光氧化损伤, 降低高温对光合碳同化的抑制程度。WT 烟草植株中这些机制在高温胁迫期间持续运转, 使活性氧的积累程度低于 ΔndhCKJ , 因此其长期效应将是较 NDH 缺失突变体减轻了光氧化胁迫的伤害(图 9)。王宏伟等人^[42]的工作显示, 喷施低浓度 NaHSO_3 可能通过促进 PSI 循环电子传递及其耦连光合磷酸化而促进植物光合作用, 因此, 有关低浓度 NaHSO_3 的应用能否有助于增强植物抵御光氧化胁迫能力的研究, 我们正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Salvucci M E, Crafts-Brandner S J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: The activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiol Plant*, 2004, 120: 179~186[DOI]
- 2 Asada K. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, 1992, 85: 235~241[DOI]
- 3 Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, 33: 73~96[DOI]
- 4 Niyogi K K. Safety valves for photosynthesis. *Curr Op Plant Biol*, 2000, 3: 455~460[DOI]
- 5 Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka M, Shikanai T. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 2004, 429: 579~582[DOI]
- 6 Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T. PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell*, 2002, 110: 361~371[DOI]
- 7 Mi H, Endo T, Ogawa T, Asada K. Thylakoid membrane-bound pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediates cyclic electron transport in the cyanobacteria *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 661~668
- 8 Burrows P A, Sazanov L A, Svab Z, Maliga P, Nixon P J. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J*, 1998, 17: 868~876[DOI]
- 9 Kofer W, Koop H U, Wanner G, Steinmuller K. Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol Gen Genet*, 1998, 258: 166~173[DOI]
- 10 Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K, Yokota A. Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impaired cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9705~9709[DOI]
- 11 Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M. Mutations in the *Arabidopsis* gene *immutans* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 1999, 11: 57~68[DOI]
- 12 Wu DY, Wright D A, Wetzal C, Voytas D F, Rodermeil S. The *immutans* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, 1999, 11: 43~55[DOI]
- 13 Casano L M, Zapata J M, Martin M, Sabater B. Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. *J Biol Chem*, 2000, 275:

- 942~948[DOI]
- 14 Casano L M, Martín M, Sabater B. Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh Complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiol*, 2001, 25: 1450~1458[DOI]
- 15 Martín M, Casano L M, Sabater B. Identification of the product of *ndhA* gene as a thylakoid protein synthesized in response to photooxidative treatment. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 293~298
- 16 Catalá R, Sabater B, Guéra A. Expression of the plastid *ndhF* gene product in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of developing barley seedlings. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 1382~1388
- 17 Guéra A, de Nova P G, Sabater B. Identification of the Ndh (NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase) complex in etioplast membranes of barley: Changes during photomorphogenesis of chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 49~59
- 18 Guéra A, Sabater B. Changes in the protein and activity levels of the plastid NADH-plastoquinone-oxidoreductase complex during fruit development. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 423~429[DOI]
- 19 姚正菊, 叶济宇, 米华玲. 高温胁迫对烟草叶绿体 NADPH 脱氢酶复合体活性的促进. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(5): 395~400
- 20 Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res*, 1986, 10: 51~62[DOI]
- 21 Klughammer C, Schreiber U. Measuring P700 absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system. In: Grab G, ed. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Vol V. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. 4357~4360
- 22 李德耀, 沈允钢. 质子动力势各组成部分与光合作用的关系. *科学通报*, 1994, 39(18): 1712~1715
- 23 Crafts-Brandner S J, Salvucci M E. Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1773~1780[DOI]
- 24 Joët T, Genty B, Josse E M, Kuntz M, Cournac L, Peltier G. Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *J Biol Chem*, 2002, 277: 31623~31630[DOI]
- 25 Martín M, Casano L M, Zapata J M, Guéra A, del Campo E M, Schmitz-Linneweber C, Maier R M, Sabater B. Role of thylakoid Ndh complex and peroxidase in the protection against photo-oxidative stress: Fluorescence and enzyme activities in wild-type and *ndhF*-deficient tobacco. *Physiol Plant*, 2004, 122: 1~10[DOI]
- 26 Horton P, Ruban A V, Walters R G. Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 655~684[DOI]
- 27 叶济宇, 王颖君, 李德耀, 沈允钢. 高浓度 CO₂ 诱导的小麦叶片毫秒延迟发光的振荡. *植物生理学报*, 1997, 23(2): 187~191
- 28 Weis E. Reversible heat-inactivation of the Calvin Cycle: A possible mechanism of the temperature regulation of photosynthesis. *Planta*, 1981, 151: 33~39[DOI]
- 29 Law R D, Crafts-Brandner S J. Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol*, 1999, 120: 173~182[DOI]
- 30 Peltier G, Cournac L. Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 523~550[DOI]
- 31 彭长连, 林植芳, 林桂珠. 光氧化胁迫下几种植物叶片的超氧自由基产生速率和光合特性. *植物生理学报*, 2000, 26(2): 81~87
- 32 Cournac L, Redding K, Ravenel J, Rumeau D, Josse E M, Kuntz M, Peltier G. Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem*, 2000, 275: 17256~17262[DOI]
- 33 Josse E M, Alcaraz J P, Labouré A M, Kuntz M. *In vitro* characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *Eur J Biochem*, 2003, 270: 3787~3794[DOI]
- 34 Ishida H, Makino A, Mae T. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *J Biol Chem*, 1999, 274: 5222~5226[DOI]
- 35 Ishida H, Shimizu S, Makino A, Mae T. Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. *Planta*, 1998, 204: 305~309[DOI]
- 36 Rumeau D, Becuwe-Linka N, Beyly A, Louwagie M, Garin J, Peltier G. New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell*, 2005, 17: 219~232[DOI]
- 37 Endo T, Shikanai T, Takabayashi A, Asada K, Sato F. The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS Lett*, 1999, 457: 5~8[DOI]
- 38 Horváth E M, Peter SO, Joët T, Rumeau D, Cournac L, Horváth G V, Kavanagh T A, Schäfer C, Peltier G, Medgyesy P. Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1337~1350[DOI]
- 39 Campbell W J, Ogren W L. Electron transport through photosystem I stimulates light activation of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) by Rubisco activase. *Plant Physiol*, 1990, 94: 479~484
- 40 Salvucci M E, Osteryoung KW, Crafts-Brandner S J, Vierling E. Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1053~1064[DOI]
- 41 Streusand V J, Portis A R Jr. Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol*, 1987, 85: 152~154
- 42 王宏伟, 魏家绵, 沈允钢, 张荣铨, 杨图南. 低浓度 NaHSO₃ 促进田间水稻的光合磷酸化和光合作用. *植物学报*, 2000, 42(12): 1295~1299