

# 不同植物光合膜中镁离子诱导荧光同膜表面电荷变化相关性的比较研究\*

马红 高振洋 翟小京 娄清香<sup>†</sup> 马桂芝

邓文涛 毛大璋 李良璧

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

(<sup>†</sup>中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**提要** 用水培的大麦苗及 1992 年夏、秋在青岛汇泉湾采集的大叶藻和刺松藻制备叶绿体膜, 观测了  $Mg^{2+}$  诱导它们的 PS-II Chl $a$  荧光和膜表面电荷变化之间的相互关系。发现在大麦和大叶藻中,  $Mg^{2+}$  诱导荧光的增高与其诱导膜表面电荷密度的降低平行相关; 而在刺松藻中, 则无类似的相关性变化。这不仅证明在大麦和大叶藻的叶绿体膜中阳离子对激发能分配的调节作用受膜表面静电性质的控制, 而在刺松藻的叶绿体膜中则与膜表面静电性质的变化无关; 揭示这两种不同的调节机理与植物的生长环境无关, 而可能取决于植物的进化程度。

**关键词** 叶绿体膜 光系统捕光叶绿素  $a/b$ -蛋白复合体

绿色植物光合作用原初过程的光能转化效率取决于激发能在两个光系统之间的分配, 受金属阳离子调节, 并可通过叶绿素  $a$  (Chl $a$ ) 荧光强度的变化监测 (Murata, 1969)。作者的研究已经证明: 在陆生双子叶植物大豆和菠菜的叶绿体膜中  $Mg^{2+}$  诱导光系统 II (PS-II) Chl $a$  荧光强度的变化受膜表面静电性质的控制; 而在海生绿藻的叶绿体膜中则与膜表面静电性质的变化无关 (李良璧等, 1984; 1985; 1992)。由于这两类植物的生长环境和进化程度均相差甚远, 难以判断上述两种不同的阳离子调节机理与植物生境或系统进化的关系。为探明这种关系, 本文报告陆生单子叶植物大麦及生长在同一海洋环境 (潮间带) 的单子叶植物大叶藻和绿藻刺松藻的叶绿体膜中,  $Mg^{2+}$  诱导荧光和膜表面电荷变化之间的相互关系比较的研究。

## 1 材料和方法

**1.1 试验材料** 大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 苗通过在室温、8 400 lx 白光照射下水培 7d, 每天照光 12h 而得。大叶藻 (*Zostera marina*) 和刺松藻 (*Codium fragile*) 于 1992 年夏、秋采自青岛汇泉湾。

**1.2 叶绿体膜的制备及其  $Mg^{2+}$  处理** 参照李良璧等 (1984; 1985) 的方法进行。

**1.3 Chl  $a$  低温荧光发射光谱和膜表面电荷密度的测定** 按李良璧等 (1992) 的方法进

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2340 号。中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室资助, 923011 号。

收稿日期: 1993 年 5 月 21 日, 接受日期: 1994 年 1 月 9 日。

行。测试时使用的叶绿体膜浓度分别为 15 和 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.4 叶绿素浓度的测定 按 Arnon (1949) 的方法进行。

## 2 结果

2.1  $\text{Mg}^{2+}$  对叶绿体膜 Chl $a$  荧光发射的影响结果 3 种供试植物叶绿体膜的 Chl $a$  低温 (77K) 荧光发射光谱及  $\text{Mg}^{2+}$  对其的影响结果见图 1。在大麦的发射谱中仅呈现

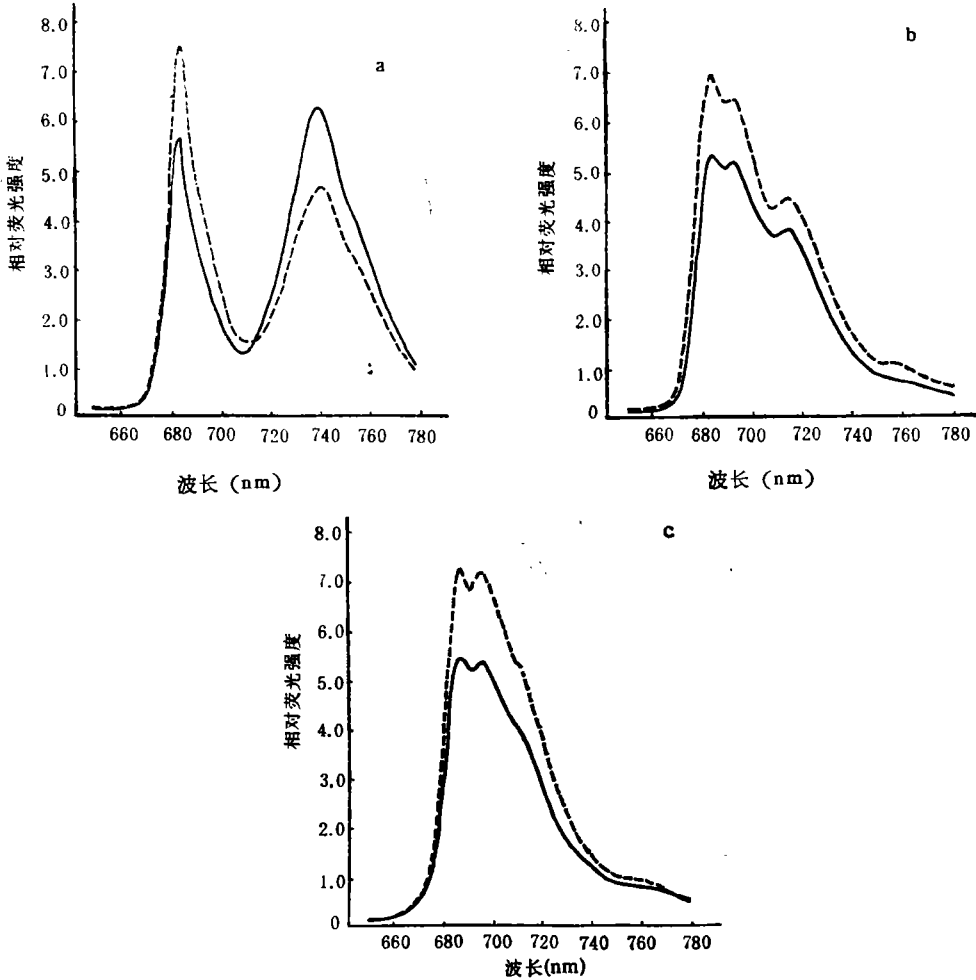


图 1  $\text{Mg}^{2+}$  对不同植物叶绿体膜 Chl $a$  低温荧光发射光谱的影响

Fig. 1 Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  on Chl $a$  fluorescence emission spectrum of the chloroplast membranes from different plants at 77K.

a. 大麦, ---- +2.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ; b. 大叶藻, ----+0.25 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ;  
c. 刺松藻, ----+0.25 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 。——对照。

两个峰, 位于 685nm(F685) 和 740nm(F740), 它们分别来自 PS-II 捕光 Chl $a/b$ -蛋白复合体 (LHC-II) 和 PS-I 天线 Chl-蛋白复合体 (Chl  $a$ -1); 而无高等植物中可观察到的、来自 PS-II 天线 Chl-蛋白复合体 (Chl $a$ -II) 的 695nm(F695) 发射峰: 这可能与我们的测定时使用的叶绿体膜浓度不同有关。但在同样的条件下, 将 2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  加至

大麦的叶绿体膜中于 25°C 保温 2min, 可诱导 F685 增高和 F740 下降, 表现出典型的“满溢效应”(图 1a)。与此不同, 在大叶藻的发射谱中有 3 个明显的峰, 分别位于 687nm (F687), 697nm (F697) 和 715nm (F715), 其中来自 PS-II 的两个短波峰 (F687 和 F697) 红移 2nm; 而来自 PS-I 的长波峰 (F715) 则蓝移 25nm。其原因可能与它们的色素组成不同有关(见表 1)。表 1 中的结果清楚地表明, 3 种供试植物叶绿体膜的 Ch1b 含量是大麦 < 大叶藻 < 刺松藻。此外, 在大叶藻的叶绿体膜中加入 0.25mmol/L  $MgCl_2$  于 25°C 保温 2min, 对 3 个荧光峰值均有明显的刺激作用, 但对 F687 和 F697 的刺激强度远比对 F715 的大(图 1b)。在刺松藻的荧光发射谱及  $Mg^{2+}$  对其的影响中, 除位于 715nm 的发射峰仅表现为一个小肩之外, 其余均与在大叶藻中所观测到的结果相似(图 1c)。

比较  $Mg^{2+}$  对上述 3 种荧光发射谱的影响表明, 其共同点是  $Mg^{2+}$  对来自 LHC-II 的发射峰强度(在大麦中为 F685; 在大叶藻和刺松藻中为 F687) 均有显著的刺激作用。由于 LHC-II 在阳离子调节激发能的分配中起着关键性的作用 (Barber, 1982), 因此为本研究之目的, 在下面定量分析不同浓度  $Mg^{2+}$  对荧光发射强度的影响中仅以 F685 或 F687 的变化来表示。

表 1 不同植物叶绿体膜的 Ch1a/b 比值

Tab. 1 The Ch1a/b ratios of the chloroplast membranes from different plants

叶绿体膜的来源	Ch1a/b 比值
大麦 ( <i>Hordeum vaigare</i> )	2.80±0.05
大叶藻 ( <i>Zostera marina</i> )	2.46±0.05
刺松藻 ( <i>Codium fragile</i> )	1.36±0.02

不同浓度  $Mg^{2+}$  对 3 种植物叶绿体膜 LHC-II Ch1a 荧光发射强度影响的结果见图 2a。在 3 种植物的叶绿体膜中加入不同浓度的  $MgCl_2$  于 25°C 保温 2min, 对 F685 (在大麦中) 或 F687 (在大叶藻和刺松藻中) 均有明显的刺激作用, 且刺激强度随  $Mg^{2+}$  浓

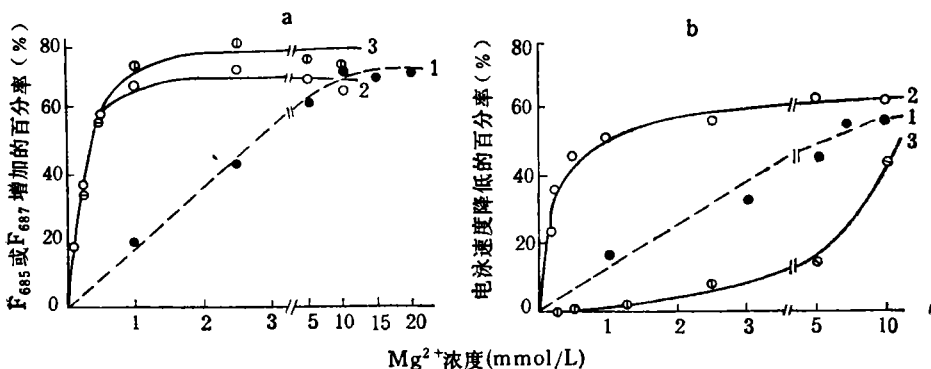


图 2 不同浓度  $Mg^{2+}$  对 3 种植物叶绿体膜 Ch1a 荧光发射的刺激作用 (a) 和电泳速度的抑制作用 (b)

Fig. 2 Stimulative effects (a) and Inhibitory effects (b) of  $Mg^{2+}$  at different concentrations on Ch1a fluorescence emission of the chloroplast membranes from three species of plants

曲线 1, 2 和 3 分别代表大麦、大叶藻和刺松藻。

度的增高而加强,其最大的刺激作用在这 3 种植物中基本相似,分别为 70%, 71% 和 76%;但所要求的  $Mg^{2+}$  浓度则不相同,在大麦中约需要 10mmol/L,而在大叶藻和刺松藻中仅需要 2.5mmol/L(分别见图 2a 曲线 1, 2 和 3)。这说明,海生植物中激发能分配的调节机构对介质中离子强度的敏感性远比陆生高等植物中的高得多。这可能与海生植物长期生活在高离子强度的海水介质中密切相关。

**2.2  $Mg^{2+}$  对叶绿体类囊体膜表面电荷密度的影响结果**  $Mg^{2+}$  对叶绿体类囊体膜表面电荷密度的影响可以通过在一定外电场作用下,  $Mg^{2+}$  诱导叶绿体膜电泳速度的变化来监测。结果表明,在大麦和大叶藻的叶绿体膜中加入不同浓度的  $MgCl_2$  于 25℃ 保温 2min, 对它们的电泳速度均表现出明显的抑制作用(图 2b), 其抑制的程度随  $Mg^{2+}$  浓度的增高而加强,且最大的抑制作用彼此相似,分别为 55% 和 60%。但达到最大抑制效应所需要的  $Mg^{2+}$  浓度则不相同,前者约需要 10mmol/L; 而后者仅需要 2.5mmol/L 左右(图 2b 曲线 1 和 2)。这可能与大麦叶绿体类囊体膜表面携带的电荷密度比大叶藻的高 62.3% 有关(资料未示出)。然而与此不同,在刺松藻的叶绿体膜中,虽然其类囊体膜表面携带的电荷密度比大叶藻的约高 19%(资料未示出),但在同样的条件处理下, 0—5 mmol/L  $Mg^{2+}$  对其电泳速度无明显的影响,只有当  $Mg^{2+}$  浓度增至 10mmol/L 时才能观测到较显著的抑制作用,约 40%(图 2b 曲线 3)。这种高  $Mg^{2+}$  浓度下产生的抑制作用与荧光的变化无关联(比较图 2a 和图 2b 中的曲线 3), 可视为非特异性静电屏蔽作用的结果(Barber, 1982)。

### 3 讨论与结语

**3.1 关于阳离子调节激发能分配的机理** 若将图 2a 和图 2b 的结果作一比较,不难看出,在大麦和大叶藻的叶绿体膜中,  $Mg^{2+}$  诱导荧光的增高与其诱导膜表面电荷密度的降低是平行相关的。这与李良璧等在大豆(1984)和菠菜(1985),以及 Barber (1982) 在菠菜叶绿体膜中所观察到的结果一致。然而,在刺松藻的叶绿体膜中,  $Mg^{2+}$  诱导的上述两种效应则是彼此无关联的。这说明,在这 3 种不同植物的光合膜中,阳离子调节激发能在两个光系统之间分配的机理截然不同,在大麦和大叶藻的光合膜中受膜表面静电性质的控制;而在刺松藻的光合膜中则不受膜表面静电性质的控制。关于静电控制的机理 Barber (1982) 曾认为,  $Mg^{2+}$  屏蔽膜表面负电荷而引起膜结构或构型的改变是阳离子诱导荧光变化的重要原因。但用这种假设解释我们的实验结果是困难的,这不仅是因为在我们测试的 3 种植物中存在着两种迥然不同的阳离子调节机理,即静电控制(存在于大麦和大叶藻中)和非静电控制(存在于刺松藻中);而且在刺松藻的叶绿体膜中,高  $Mg^{2+}$  浓度(10mmol/L)引起的静电屏蔽作用并不伴随有相应的荧光变化。因此,对于上述两种不同的阳离子调节机理还需谋求另外的解释。

阳离子诱导类囊体膜表面负电荷的改变一般可以通过两种不同的方式实现,除上述非特异性的静电屏蔽作用之外,另一种方式是特异性的电荷的中和作用。由于在中性 pH 下叶绿体类囊体膜表面所携带的净负电荷主要来源于膜表面蛋白质的羧基(Barber, 1982); 而膜表面蛋白质的带电羧基是阳离子结合的敏感性部位(Prochaska et al., 1977),因此根据本文的实验结果,我们对静电控制机理的解释是:  $Mg^{2+}$  与类囊体膜表面蛋白质带电羧基的特异性结合、中和膜表面净负电荷而引起膜构型的改变,可能是阳离子

诱导激发能分配变化的主要原因。至于在刺松藻中所观察到的阳离子调节激发能分配的非静电控制机理,还有待进一步的实验加以解释。

**3.2 不同阳离子调节机理与植物进化的关系** 如上讨论,我们的实验结果已经证明,生长在不同环境下的陆生单子叶植物大麦和海生单子叶植物大叶藻的叶绿体膜中,  $Mg^{2+}$  调节激发能分配的机理不仅彼此相同,而且与陆生双子叶植物大豆和菠菜叶绿体膜中的情形亦相似,均受膜表面静电性质的控制。但生长在相同环境(潮间带)下的大叶藻和低等绿藻刺松藻,它们的叶绿体膜中  $Mg^{2+}$  调节激发能分配的机理却不相同,前者受膜表面静电性质的控制;而后者则不受膜表面静电性质的控制。这些事实说明,这两种不同的阳离子调节机理与植物的生境条件无关联,而可能取决于植物的进化程度。曾呈奎等(1980)曾对 12 种潮间带底栖绿藻、大叶藻和两种陆生双子叶植物(刺槐和菠菜)的光合性质及色素组成进行过比较详细的分析,并依据这些植物的 Chl *a/b* 比值将它们划分成比值为 2.0 和 3.0 两种不同的类型,其中比值等于 1.48 的刺松藻属于进化中较原始的类型;而比值等于 2.40 的大叶藻和比值接近 3.0 的刺槐及菠菜,则同属于进化程度较高的类型。我们对大麦、大叶藻和刺松藻分离叶绿体膜 Chl *a/b* 比值的测定结果分别是 2.80, 2.46 和 1.36 (表 1),与曾呈奎等(1980)用整体植物或叶片的 80% 丙酮提取液测定的结果基本一致。因此有理由推测,两种阳离子调节激发能分配的机理是植物长期进化的结果,其中静电控制机理是一种比较进化的调节方式;而非静电控制机理则是一种比较原始的调节方式。如果这一推论成立,那么我们的实验结果将为“象大叶藻这类现代海洋高等植物并非起源于海洋,而是从陆地重返海洋并终于发展成为海洋中的高等植物”的假设(曾呈奎等,1980)提供又一新的生化证据。

本文的实验结果已经证明,生长在同一海洋环境而系统进化程度不同的植物叶绿体膜中,存在有两种不同的阳离子调节激发能分配的机理,即静电控制机理和非静电控制机理。这一发现对进一步阐明海洋植物的系统进化将具有重要的意义,但还需在更多的植物中加以验证。

### 参 考 文 献

- 李良璧、周佩珍、翟小京等, 1984, 在两个品种大豆叶绿体膜中,  $Mg^{2+}$  诱导荧光改变与类囊体膜表面电荷的关系 植物学报, **26**(6): 623—629。
- 李良璧、翟小京、张正东等, 1985, 关于光合膜上蛋白质的功能分析—— $Mg^{2+}$  和 BSA 对胰酶诱导菠菜叶绿体 Chl *a* 荧光及膜表面电荷变化的影响, 中国科学(B 辑), **12**: 1 090—1 097。
- 李良璧、高振洋、马红等, 1992, 刺松藻类囊体膜 23KD 和 25KD 多肽在阳离子调节激发能分配中的作用, 中国科学(B 辑), **7**: 690—702。
- 曾呈奎、周百成、潘忠正, 1980, 底栖“海藻比较光合作用研究 1. 潮间带绿藻光合作用特性和色素组成, 海洋与湖沼, **11**(2): 134—140。
- Arnon, D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Betavulgavis*, *Plant Physiol.*, **24**: 1—15。
- Barber, J., 1982, Influence of surface charge on thylakoid structure and function, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**: 261—295。
- Murata, N., 1969, Control of excitation transfer in photosynthesis II. Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **198**: 171—181。
- Prochaska, L.J. and Gross, E.L., 1977, Evidence for the location of divalent cation binding sites on the chloroplast membrane, *J. Membrane Biol.*, **36**: 13—32。

# COMPARATIVE STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN $Mg^{2+}$ -INDUCED FLUORESCENCE CHANGE AND $Mg^{2+}$ -INDUCED THYLAKOID SURFACE CHARGE ALTERATION IN THE CHLOROPLASTS ISOLATED FROM DIFFERENT PLANTS

Ma Hong, Gao Zhenpan<sup>†</sup>, Zhai Xiaojing, Lou Qingxiang<sup>†</sup>, Ma Guizhi,

Deng Wentao, Mao Dazhang, Li Liangbi

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044*)

(*†Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

## ABSTRACT

Chloroplasts isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) seedling grown in liquid solution and from *Zostera marina* and *Codium fragile* collected in summer and autumn of 1992 at Huiquan Bight of Qingdao Were used in this study on the relationship between  $Mg^{2+}$ -induced Chl $a$  fluorescence change and  $Mg^{2+}$ -induced thylakoid surface charge alteration in chloroplasts. Result shows that  $Mg^{2+}$ -induced Chl $a$  fluorescence intensity increase from PS-II closely correlated with  $Mg^{2+}$ -induced electric charge density decrease on the outer surface of the thylakoid in the chloroplasts from barley and *Zostera marina*. However, under the same conditions the correlation was not noted in the chloroplast from *Codium fragile*. These experimental results not only demonstrated that the regulating effect of the cation on excitation energy distribution between two photosystems was controlled by the electrostatic property of the thylakoid surface in the chloroplasts of barley and *Zostera marina* and not controlled by the electrostatic property of the thylakoid surface in the chloroplast of *Codium fragile*, but also illustrated that these two kinds of regulating mechanisms did not depend on the growing environment of plants while they might be associated with the evolutionary level of plants.

**Key words** Chloroplast Photosystem Light-harvesting chlorophyll  $a/b$ -protein complex