

两个品种烟草叶片发育过程中几种光合参数变化的比较

江力^{1,2,*} 曹树青¹ 张荣铎²

¹合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009; ²南京农业大学生命科学院, 南京 210095

摘要 比较烟草2个品种‘NC89’和‘JYH’叶片发育过程中几个光合参数变化的结果表明, 烟草叶片发育过程中光合速率变化表现为上升期、高值持续期(APD)和速降期, 叶绿素含量变化经历上升期、相对稳定期(RSP)和速降期。光合功能衰退过程中, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBPCase)活性比电子传递活性下降快。可逆衰退阶段的2个品种类囊体膜多肽组分和‘NC89’的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶(Rubisco)大亚基基本上无变化; 不可逆衰退阶段的2个品种类囊体膜多肽组分、Rubisco大小亚基均快速降解, 尤其是光系统II(PSII)复合体和Rubisco小亚基。‘JYH’的叶龄为10~40 d的叶中各光合参数与‘NC89’的差别不大, 但‘JYH’的光合功能期短, 光合功能衰退过程中光合电子传递与碳同化失衡较严重, 光合功能衰退比‘NC89’早而迅速。

关键词 烟草品种; 光合功能衰退; 光合参数

Comparison on Changes of Several Photosynthetic Parameters in Leaf Developing Process between Two Tobacco Cultivars

JIANG Li^{1,2,*}, CAO Shu-Qing¹, ZHANG Rong-Xian²

¹School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; ²College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Changes of photosynthetic parameters in leaves developing process in two tobacco cultivars (*Nicotiana tabacum* L. cv. ‘NC89’ & ‘JYH’) were comparatively analyzed. The results suggested that the photosynthetic rate displayed elevated phase, active photosynthesis duration (APD) and sharp fall phase while the chlorophyll content displayed elevated phase, relative steady phase (RSF) and Sharp fall phase during leaf developing process. The decline of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RuBPCase) activities was obviously faster than that of photosynthetic electron transport activity during the period of decline in leaf photosynthetic function. SDS-PAGE showed that thylakoid membrane polypeptide components of two tobacco cultivars and large subunits (LSU) of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) of ‘NC89’ remained relative steady during reversible decline (RD). During irreversible decline (IRD) thylakoid membrane polypeptide components, LSU and small subunits (SSU) of Rubisco of two tobacco cultivars, especially photosystem II (PSII) complex and Rubisco SSU were degraded rapidly. There were no significant differences of photosynthetic parameters in 10–40 day leaves between the ‘JYH’ and the ‘NC89’. But the APD was shorter, the unbalance between electron transport and carbon assimilation during the decline of photosynthetic function was more serious, and the decline of photosynthetic function was sooner and faster in ‘JYH’ leaves.

Key words tobacco cultivars; photosynthetic function decline; photosynthetic parameter

烟草光合作用及其机构的研究报道很多(刘雪松等1991; 刘贞琦等1995; Hurry等1996)。我们以前的工作表明, 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 为烟叶光合机构运转的最适光强, 光强大于900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时烟叶即发生光抑制(江力等2000a); 烟叶成熟过程中, 光合速率下降与光系统中电子传递、RuBP羧化酶和碳酸酐酶活性变化密切相关(江力等2000b)。本文用2个生育期接近、遗传背景不同的烟草品种[一种是高产优质品种‘NC89’(亩产

175 kg左右), 另一种是产量较低的品种‘净叶黄’(‘JYH’, 亩产101 kg左右)(中国烟草育种研究南方中心和云南烟草科学研究所1999)]为材料, 比较和研究它们的叶片发育过程中光合功能和光合功能衰退过程中的光合电子传递与碳同化平

收稿 2006-07-11 修定 2006-09-08

资助 国家重点基础研究专项经费项目(G1998010100)。

*E-mail: jiangli@ustc.edu.cn, Tel: 0551-2901506

衡, 旨在说明2个品种的光合功能衰退与产量的关系。

材料与方 法

材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘NC89’和‘净叶黄’(‘JYH’), 由云南昆明卷烟厂烟科所提供。常规育苗, 在幼苗生长到2片真叶时, 移栽入钵, 置温房中常规管理。幼叶长到0.5 cm时开始计算叶龄, 2个品种的第12片叶分别在35 d左右(‘NC89’)和28 d左右(‘JYH’)长成(相当于叶片全展, 基本定型)。自10 d叶龄起, 每隔10 d取生长一致的第12片叶, 测定各项指标, 每项测定重复3次。

光合速率(IAPS)用英国ADC公司生产的红外CO₂气体分析仪LCA-4测定。开放气路系统, CO₂浓度为340~370 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$, 光强为600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为25~30 $^{\circ}\text{C}$ 。取样点均在叶片中部主脉右侧。

光合速率高值持续期(APD)指叶片全展至光合速率下降到全展时的50%的天数。

光合速率高值持续期指叶片光合功能可逆衰退期(RD), 光合速率速降期指叶片光合功能的不可逆衰退期(IRD)。

叶绿素含量测定按Arnon (1949)方法。叶绿素含量相对稳定期(RSP)指叶片从全展开始到叶中叶绿素含量下降至全展的80%时所经历的天数。

以甲基紫精(MV)为电子受体, 采用氧电极法测定电子传递活性(H₂O → MV)。所用氧电极由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所制作。

类囊体膜的制备根据Dunahay和Staehelin (1984)的方法加以改进。叶片加入预冷的STN缓冲液(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.8, 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂)于冰浴中研磨, 4层纱布过滤后以600 \times g离心1 min, 上清液以3 000 \times g离心5 min, 沉淀用STN悬浮, 再以3 800 \times g离心7 min, 所得沉淀用TN缓冲液(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.8, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂)悬浮。此悬浮液即为类囊体膜制备液, 叶绿素浓度控制在1~2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

参照Laemmli (1970)的方法, 用SDS-尿素-

PAGE分离类囊体膜多肽组分。分离胶为15% 丙烯酰胺, 浓缩胶为5% 丙烯酰胺。类囊体膜制备液以12 000 \times g离心5 min, 得到的沉淀加样品缓冲液(125 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.6, 4%SDS, 20%甘油, 10% β -巯基乙醇, 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 0.1%溴酚蓝)配成5 μg (蛋白) $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 悬浮液, 于沸水浴中煮沸5 min后, 再以12 000 \times g离心5 min, 取10 μL 上清液上样, 浓缩胶60 V, 分离胶150 V恒压电泳。

标准蛋白分子量分别为97.4 kDa (磷酸化酶b)、66.2 kDa (牛血清白蛋白)、42.7 kDa (卵清蛋白)、31.0 kDa (碳酸酐酶)、14.4 kDa (溶菌酶)。

叶片加提取液(100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.7, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 聚乙烯吡咯烷酮少许)冰浴研磨, 12 000 \times g离心15 min, 上清液即为RuBPCase粗提液。用Perchorowicz等(1982)的同位素法测定RuBPCase初始活性。粗酶提取液中可溶性蛋白质含量参照Bradford (1976)法测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

参照Laemmli (1970)的方法, 用SDS-PAGE分离Rubisco大小亚基, 4%浓缩胶, 12%分离胶。160 V恒压电泳。

衰退百分率=(电子传递活性或RuBPCase初始活性的最大值-不同叶龄时的电子传递活性或RuBPCase初始活性)/电子传递活性或RuBPCase初始活性的最大值 \times 100%。

结果与讨论

1 烟草叶片发育过程中光合速率的变化

图1显示, 2个品种烟草叶片发育过程中光合速率的变化均呈现先上升后下降趋势。‘JYH’在衰退前期(40~60 d叶龄)下降即较快, 70 d叶龄时下降73.22%, 80 d叶龄时已为负值(实为呼吸速率); 而品种‘NC89’在70 d叶龄时光合速率下降48.26%, 90 d叶龄时才下降为负值。‘NC89’的光合速率及光合速率高值持续期均高于‘JYH’, ‘NC89’和‘JYH’的APD分别是(37.0 \pm 1.2) d和(32.0 \pm 1.0) d。

2 烟草叶片发育过程中的叶绿素含量变化

从图2可看出, 2个品种烟草叶片中叶绿素含量均是先上升, 然后‘JYH’经过30 d的缓

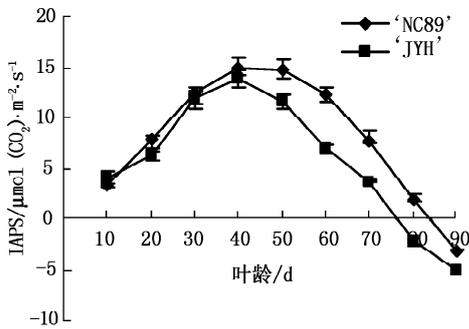


图1 烟草叶片发育过程中光合速率的变化
Fig. 1 Changes of IAPS in developing process of tobacco leaves

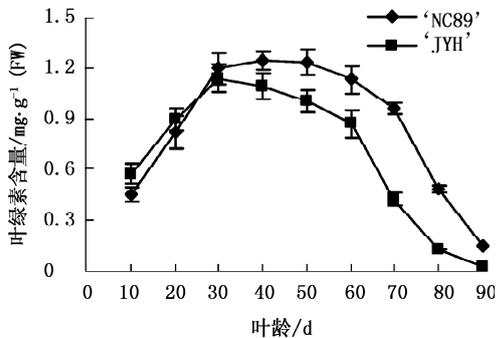


图2 烟草叶片发育过程中的叶绿素含量变化
Fig. 2 Changes of chlorophyll content in developing process of tobacco leaves

慢下降后,再迅速下降,而‘NC89’在30~50 d叶龄时的变化很小,50 d叶龄后缓慢下降,70 d叶龄后迅速下降。2个品种在30 d叶龄以前的叶绿素含量相差不大,30 d叶龄以后,‘NC89’的叶绿素含量明显高于‘JYH’,60 d、70 d叶龄的‘NC89’叶片中叶绿素含量分别比‘JYH’的高出30.00%和129.22%,90 d叶龄的‘JYH’叶绿素含量几乎为零。2个品种的叶绿素含量相对稳定期和光合速率高值持续期极为接近。‘NC89’的光合功能可逆衰退期为35~71 d叶龄,‘JYH’为28~60 d叶龄;‘NC89’光合功能不可逆衰退期为71 d叶龄后,‘JYH’为60 d叶龄后。

3 烟草叶片发育过程中电子传递活性和类囊体膜多肽组分的变化

烟草叶片发育过程中电子传递活性的变化较

为缓慢(图3),叶绿素含量相对稳定期结束时,电子传递活性下降28.29% (‘NC89’)和19.19% (‘JYH’),90 d叶龄时下降76.13% (‘NC89’)和72.69% (‘JYH’)。‘JYH’在50 d叶龄以前的电子传递活性比‘NC89’高,50 d以后略低于‘NC89’。‘JYH’的电子传递活性比光合速率和叶绿素含量显示出一定的优势。可逆衰退阶段的类囊体膜多肽组分基本不变,只是‘NC89’在70 d叶龄时28~29 kDa PSII复合体有所降解,与其电子传递活性下降快于‘JYH’的结果相一致;不可逆衰退阶段,2个品种多肽组分迅速降解,特别是小分子多肽(图4)。

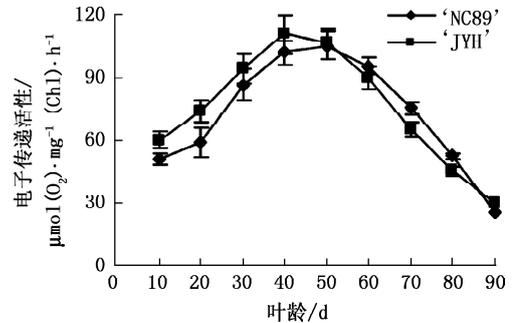


图3 烟草叶片发育过程中电子传递活性的变化
Fig. 3 Changes of electron transport chain activity in developing process of tobacco leaves

4 烟草叶片发育过程中Rubisco的大小亚基和羧化活性变化

图5、6显示:

(1) RuBPCase的初始活性快速上升而后快速下降,RSP结束时,‘NC89’和‘JYH’的RuBPCase初始活性分别下降38.67%和37.14%;90 d叶龄时的初始活性分别下降86.67%和95.71%,RuBPCase的初始活性比光合电子传递活性下降迅速。‘JYH’的RuBPCase初始活性低于‘NC89’,尤其在光合功能衰退阶段,且下降较早(图5)。

(2)在可逆衰退阶段,‘NC89’的Rubisco大亚基基本上无变化,‘JYH’的大亚基和两品种的小亚基有所降解(可逆衰退后期)。在不可逆衰退阶段,2个品种的Rubisco大小亚基快速降解,尤其是小亚基。‘JYH’Rubisco的降解快于‘NC89’,与其RuBPCase初始活性下降快于

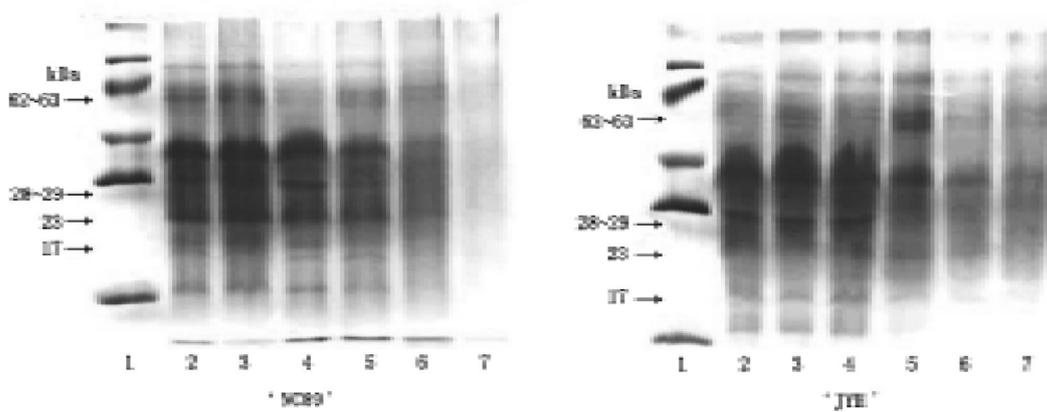


图4 光合功能衰退过程中烟草叶片类囊体膜多肽组分的变化

Fig. 4 Changes of thylakoid membrane polypeptide components in tobacco leaves during photosynthetic function decline
泳道1: 标准蛋白; 泳道2~7: 40、50、60、70、80、90 d 叶龄的样品。

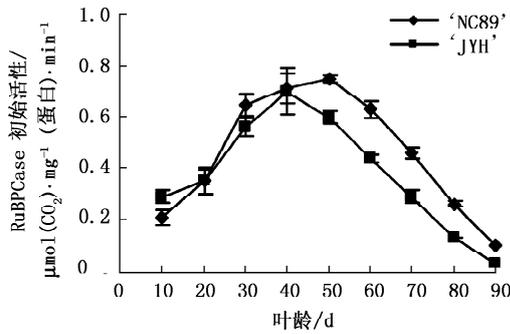


图5 烟草叶片发育过程中RuBPCase初始活性的变化
Fig. 5 Changes of RuBPCase initial activity in developing process of tobacco leaves

‘NC89’的结果一致(图6)。

一般来说, Rubisco 活性和含量变化反映了体内光合碳同化能力的变化。唐如航和李立人

(1998)认为, 在叶片衰老初期, 酶是相对过剩的, 光合速率较少受Rubisco酶蛋白含量的限制, 而与其活化形式的酶量相关, 衰老引起体内酶活化状态的变化。本文结果确认了这一点。在可逆衰退阶段, 2个品种Rubisco大小亚基含量变化没有RuBPCase初始活性下降明显(图5、6), 说明活化形式的酶量是减少的。

5 烟草叶片光合功能衰退过程中光合电子传递与碳同化的衰退比

图7显示, 由于RuBPCase初始活性下降较电子传递活性下降迅速, 所以电子传递活性和RuBPCase初始活性的衰退百分率之比(衰退比)小于1.0。‘NC89’电子传递与碳同化的衰退比大于‘JYH’而更接近1.0, 尤其是在RSP结束时两品种衰退比差别较大(60 d叶龄时的‘NC89’

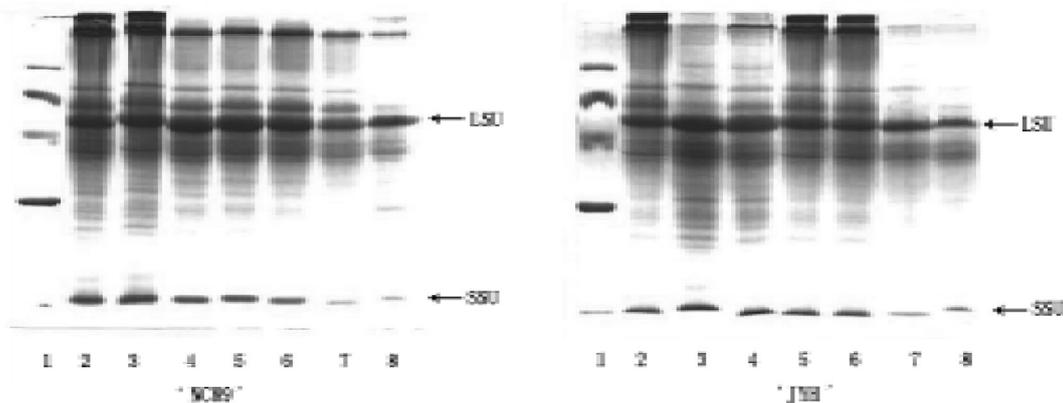


图6 光合功能衰退过程中烟草叶片Rubisco大小亚基的变化

Fig. 6 Changes of large and small subunits of Rubisco in tobacco leaves during photosynthetic function decline
泳道1: 标准蛋白; 泳道2~8: 30、40、50、60、70、80、90 d 叶龄的样品。

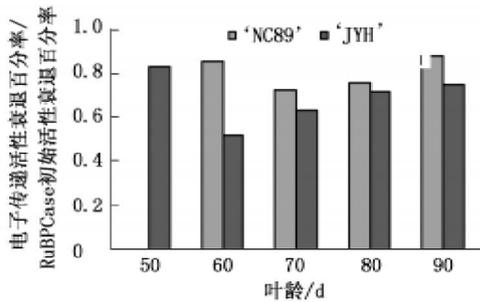


图7 烟草叶片光合功能衰退过程中电子传递与碳同化的衰退比

Fig. 7 Ratio of decrease of electron transport activity to decrease of carbon assimilation in tobacco leaves during photosynthetic function decline

为0.86, 'JYH'为0.52, 70 d叶龄时的'NC89'为0.73, 'JYH'为0.63。叶片衰老后期(80 d、90 d叶龄)衰退比有所增大,可能是叶片处于不可逆衰退阶段所致,光合电子传递与碳同化酶活性下降均迅速,二者衰退百分率相对较为接近。

此外,还有两点需要指出的是:(1) Rubisco大小亚基的降解快于类囊体膜蛋白的降解的情况在可逆衰退后期表现得较明显(图4、6),故烟草叶片光合电子传递与碳同化的衰退比在转折点(RSP结束)时远离1.0,“光碳”平衡状态最差。可逆衰退后期'JYH'类囊体膜多肽组分的降解慢于'NC89', Rubisco大小亚基的降解快于'NC89',致使其电子传递活性下降慢于'NC89', RuBPCase活性下降快于'NC89'(图3、5),“光碳”失衡程度较'NC89'严重。“光碳”失衡程度越严重,消耗的ATP和NADPH⁺越少,叶绿体中电子受体NADP⁺越匮乏,多余的电子被传递给氧,形成的超氧阴离子及其他活性氧就越多,叶片衰老光合功能衰退就越迅速(张荣铎等2001;江力和张荣铎2006)。光合功能进入不可逆衰退阶段后,类囊体膜多肽组分、Rubisco大小亚基均快速降解,尤其是PSII复合体和Rubisco小亚基,说明随着叶片衰老,光合膜和碳同化关键酶均出现结构和功能的破坏,导致光合电子传递、RuBPCase活性和光合速率下降,最终导致光能转化效率和碳同化效率的不可逆衰退。(2) 2个品种第12叶叶片发育过程中的光合作用变化的比较结果说明,叶片在10~40 d叶

龄期间,2个品种差异不大,甚至个别光合参数'JYH'高于'NC89', 'JYH'叶片全展及成熟早于'NC89';差别大的是在之后的衰退过程中,'JYH'各光合参数下降较快,而'NC89'在叶片全展后的相当一段时间(30~70 d叶龄)仍维持较高水平,即'NC89'的光合功能期较长。由于2个品种的大田生育期及第12叶的寿命接近,所以认为'JYH'属于叶片光合功能早衰型品种。而'NC89'的光合功能期长、光合功能衰退较慢,其在烟叶生产中可能有一定的应用价值。

参考文献

- 江力,曹树青,戴新宾,许晓明,陆巍,张荣铎(2000a). 光强对烟草光合作用的影响. 中国烟草学报, 6 (4): 17~20
- 江力,刘义新,张荣铎(2000b). 烟叶成熟衰老过程中光合电子传递和光合酶活性变化的研究. 华中农业大学学报, 19 (6): 533~536
- 江力,张荣铎(2006). 烟草叶片发育过程中光合功能衰退与H₂O₂积累的关系. 分子细胞生物学报, 39 (4): 325~330
- 刘雪松,刘贞琦,赵德刚(1991). 烤烟成熟过程中光合特性的变化. 贵州农学院学报, 10 (1): 1~6
- 刘贞琦,伍贤进,刘振业(1995). 土壤水分对烟草光合生理特性的影响. 中国烟草学报, 2 (3): 44~49
- 唐如航,李立人(1998). Rubisco活化酶的研究进展. 生命科学, 10 (4): 159~166
- 张荣铎,戴新宾,许晓明(2001). 叶片光合功能期与作物光合生产潜力. 见: 姜成后,王学臣编. 作物产量形成的生物学基础. 北京: 中国农业出版社, 52~63
- 中国烟草育种研究南方中心,云南烟草科学研究所编(1999). 云南烟草育种志. 昆明: 云南科技出版社, 1~18
- Arnon D (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 24: 1~15
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Dunahay TG, Staehelin LA (1984). Structural biochemical and biophysical characterizations of four oxygen evolving photosystem II preparations from spinach. Biochim Biophys Acta, 764: 179~193
- Hurry V, Anderson JM, Badger MR, Price GD (1996). Reduced levels of cytochrome b₆/f in transgenic tobacco increases the excitation pressure on photosystem II without increasing sensitivity to photoinhibition *in vivo*. Photosynth Res, 50 (2): 159~169
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680~685
- Perchorowicz JT, Raynes DA, Jensen RG (1982). Measurement and perservation of the *in vivo* activation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in leaf extracts. Plant Physiol, 69: 1165~1168