

文章编号:1673-1689(2008)05-0117-03

外源激素和糖类对银杏离体叶叶绿素降解的调节

周凤丽^{1,2}, 唐蕾^{*1,2}, 廖祥儒^{1,2}, 王武^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:以银杏叶为材料,采用叶圆片法,探讨了外源糖类、植物生长调节物质对叶绿素降解和叶绿素酶活性的影响,结果表明0.02 mol/L蔗糖或葡萄糖在叶绿素降解初期能够显著提高叶绿素酶活性, 10^{-7} mol/L的6-苄基腺嘌呤能够延缓叶绿素降解的速率,并使叶绿素酶的活性维持在较高水平。

关键词:叶绿素降解; 叶绿素酶; 植物生长调节物质

中图分类号:Q 831.12

文献标识码:A

Regulation of Chlorophyll Degradation by Exogenous Application of Hormones and Sugars in Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.)

ZHOU Feng-li^{1,2}, TANG Lei^{*1,2}, LIAO Xiang-ru^{1,2}, WANG Wu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The discs of *Ginkgo biloba* leaves are incubated with sugar and plant growth regulator solutions in order to investigate the effects of those substances on chlorophyll degradation and chlorophyllase activities. The results showed that 0.02 mol/L sucrose or glucose could stimulate the chlorophyll activity at the initial stage of chlorophyll degradation, whereas 10^{-7} mol/L 6-benzylaminopurine could retard chlorophyll degradation and maintain the chlorophyll activity at higher level.

Key words: chlorophyll degradation; chlorophyllase; plant growth regulators

叶衰老过程伴随着叶绿素降解,许多因素可以加速或延缓该反应过程。一般认为植物生长调节物质如乙烯和甲基茉莉酸可以加速叶绿素降解,激活叶绿素降解酶类^[1-2],而外源细胞分裂素的添加可以抑制叶绿素和光合成蛋白的降解^[3]。此外,在非衰老的植物叶中,糖的积累可以导致叶绿素含量

的下降,以及光合成基因的转录^[4],但对叶绿素降解酶的影响尚不清楚。作者所在课题组曾经报道了在自然生长条件下银杏叶绿素衍生物的组成^[5]以及叶绿素酶随季节的变化^[6],本文意在探讨外源激素和糖类对叶绿素以及叶绿素酶的影响,为进一步了解落叶树木叶绿素的降解机制提供依据。

收稿日期:2007-09-21.

基金项目:工业生物技术教育部重点实验室主任基金项目(KLIB-ZR200501)

作者简介:周凤丽(1981-),女,山东潍坊人,生化与分子生物学硕士研究生。

* 通讯作者:唐蕾(1966-),女,江苏无锡人,工学博士,副教授,主要从事生化与分子生物学的教学与研究。Email: ltang@jiangnan.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 材料

银杏(*Ginkgo biloba*)树叶采自10月份作者所在学校校园中自然生长的银杏树,选用成熟的完全伸展、无病虫害、大小一致的叶片。叶片洗净,体积分数70%的乙醇表面消毒后,制成直径为6 mm的叶圆片,漂浮于已灭菌的含有糖类、激素类的溶液中,置于温度为26℃的培养箱1~2周,定期取样,测定叶绿素含量和叶绿素酶活性水平。

1.2 叶绿素含量测定

15片叶圆片为一组,丙酮抽提后,测定提取液在645和663 nm处的吸光值,按照Arnon公式计算叶绿素含量^[7]。实验结果为3组的平均值。

1.3 叶绿素酶活性的测定

参照Benedetti和Arruda^[8]的方法,叶圆片(约0.2 g鲜重)剪碎后立即浸于6 mL丙酮,置于4℃,避光12 h浸出液与正己烷以体积比4:6混合,8 000 r/min离心5 min,测定丙酮相脱镁叶绿素含量。

2 结果与讨论

2.1 外源糖类对叶绿素及叶绿素酶活性的影响

实验中选用了葡萄糖、蔗糖作为单糖和二糖源,以山梨醇作为对照碳源,考察了0、20、50 mmol/L浓度时对叶绿素和叶绿素酶的影响。以初始叶绿素相对含量为100%,比较第12天时叶绿素含量,发现葡萄糖和蔗糖能够显著促进叶绿素的降解,其中20 mmol/L葡萄糖处理12 d时叶绿素含量仅存32%;20 mmol/L蔗糖处理,叶绿素含量残存39%;山梨醇对降解影响不明显(图1)。分别选用20 mmol/L葡萄糖、蔗糖、山梨醇,以无糖溶液为对照,测定叶绿素和叶绿素酶随时间变化的关系,发现对照和山梨醇组叶绿素的含量随着时间的延长自第4天起略有下降,而葡萄糖和蔗糖组则显著下降,由初始的30.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 分别降至9.7和12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (图2)。叶绿素酶活性则呈现先上升后下降的趋势,葡萄糖和蔗糖处理的叶片中叶绿素酶的活性较对照和山梨醇组有显著提高,而且在时间上早于对照和山梨醇组(图3),表明外源葡萄糖和蔗糖在处理前期能够提高细胞内叶绿素酶的水平,促进叶绿素的降解。

2.2 外源激素对叶绿素及叶绿素酶活性的影响

实验中考察了浓度范围在 10^{-7} ~ 10^{-4} mol/L的6-BA(6-苄基腺嘌呤)、KT(激动素)、NAA(萘乙酸)和2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)对叶圆片失绿和叶绿素酶

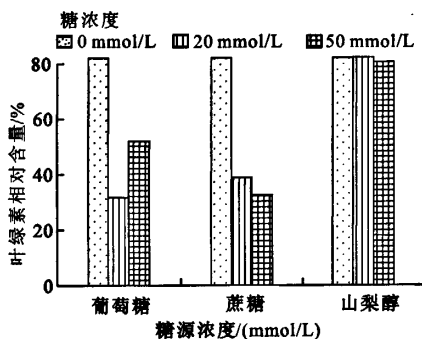


图1 不同浓度糖源对叶绿素降解的影响

Fig. 1 Effect of sugar concentrations on chlorophyll degradation

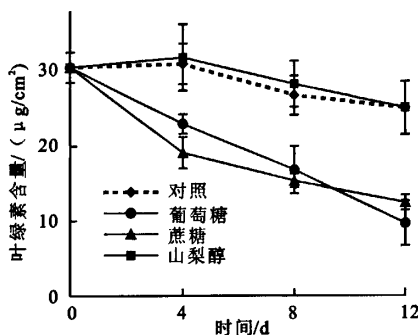


图2 不同糖源处理过程叶绿素含量随时间的变化

Fig. 2 Time course of chlorophyll content under different sugars treatment

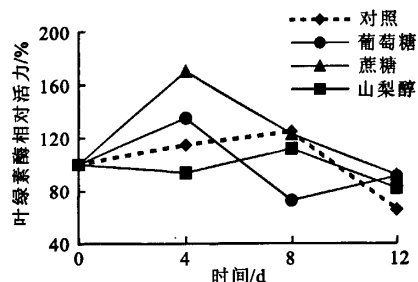


图3 不同糖源处理过程叶绿素酶相对活力随时间的变化

Fig. 3 Time course of relative chlorophyllase activity under different sugars treatment

影响。以初始叶绿素相对含量为100%,结果表明在所选用的范围内,在高浓度的6-BA、KT和NAA中的叶圆片叶绿素降解程度较在低浓度的6-BA、KT和NAA中的叶圆片要迅速,其中以6-BA的效果最为明显, 10^{-4} mol/L的6-BA处理8 d时,叶绿素含量下降了46%,而低浓度 10^{-7} mol/L时,叶绿素含量基本保持原有水平(图4)。为此,选取 10^{-4} 、 10^{-7} mol/L的6-BA,以无激素的水溶液为对照,处理叶圆片,测定叶绿素和叶绿素酶随时间的变化

(图5、图6)。结果表明 10^{-7} mol/L 的 6-BA 能够延缓叶绿素降解的速率,叶绿素酶的含量维持在较高水平。无激素和 10^{-4} mol/L 的 6-BA 处理液中,叶圆片叶绿素含量下降,叶绿素酶活性略有增加。

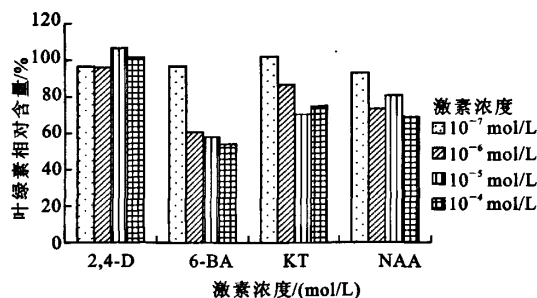


图4 不同浓度激素对叶绿素降解的影响

Fig. 4 Effect of plant hormone concentrations on chlorophyll degradation

3 结 语

对于叶绿素酶生理功能的争论由来已久,主要表现在:一方面幼嫩叶片和组织中存在较高的叶绿素酶活性,随着叶绿素自然降解的发生,酶活性下降或维持低水平^[6,2];另一方面在植物衰老促进剂作用下,叶绿素酶活性的增加伴随着绿色消失^[1-2]。对此的解释包括同功酶的存在,合成与降解的动态平衡。本实验的结果再次表现出上述类似的情况,即具有持绿效果的 6-BA 同时能维持较

高的叶绿素酶活性,而外源糖类在前期促进了酶活的提高和叶绿素的降解,具体机理尚待进一步的研究。

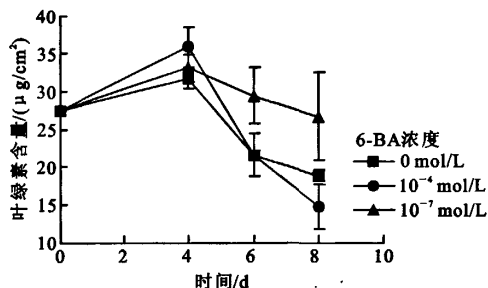


图5 不同浓度 6-BA 处理过程叶绿素含量随时间的变化

Fig. 5 Time course of chlorophyll content under various 6-BA concentration

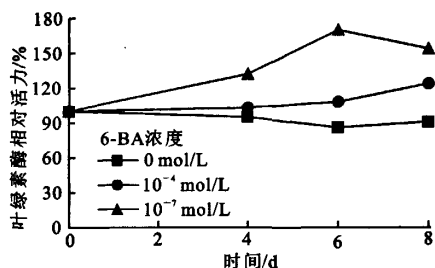


图6 不同浓度 6-BA 处理过程叶绿素酶相对活力随时间的变化

Fig. 6 Time course of relative chlorophyllase activity under various 6-BA concentration

参考文献(References):

- [1] Tsuchiya T, Ohta H, Okawa K, et al. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 15362—15367.
- [2] Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt E E, et al. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development[J]. *Plant J*, 1999, 20: 653—661.
- [3] 安建申, 张懋, 郭杰, 等. 6-苄氨基嘌呤对气调包装芦笋贮藏的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(2): 1673—1689. AN Jian-shen, ZHANG Min, GUO Jie, et al. Effect of 6-BA treatment on modified atmosphere packaging of asparagus[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24 (2): 1673—1689. (in Chinese)
- [4] Krapp A, Quick W P, Stitt M. Influence of high carbohydrate content on the activity of plastidic and cytosolic isozyme pairs in photosynthetic tissue[J]. *Plant Cell Environ*, 1995, 17: 861—866.
- [5] 唐蕾, 陈蕴, 王武. 银杏叶中叶绿素衍生物的反相高效液相色谱分析[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(2): 265—267. TANG Lei, CHEN Yun, WANG Wu. Reversed phase high performance liquid chromatography analysis of chlorophyll derivatives in Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) Leaves[J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42(2): 265—267. (in Chinese)
- [6] 唐蕾. 银杏叶生长过程中的叶绿素酶活性变化[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(6): 561—563. TANG Lei. Change of chlorophyllase activity in Ginkgo leaf during development[J]. *Plant Physiology Communications*, 2002, 38(6): 561—563. (in Chinese)
- [7] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1—15.
- [8] Benedetti C E, Arruda P. Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic Arabidopsis caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128: 1255—1263.

(责任编辑:秦和平,杨萌)