

牛毛黄大豆叶片衰老 与其RUDP羧化酶活性的关系

刘富林 刘宗群

(河北农业大学)

摘 要

本文对植物叶片衰老与其RUDP羧化酶活性的关系进行探讨。测定的结果表明,牛毛黄大豆叶片的衰老与其RUDP羧化酶的绝对含量无关;牛毛黄大豆叶片衰老与其叶内RUDP羧化酶活性直接有关。叶片开始衰老(达到开花)之后,此酶活性显著降低。

关键词: 1.5—二磷酸核酮糖羧化酶 牛毛黄大豆

1.5—二磷酸核酮糖羧化酶(简称RUDP或RUDPcase)是光合作用中碳素同化的关键酶。外界条件,如光强度、 CO_2 浓度、水分供应状况,以及施肥(如供给镁盐);内部条件,如不同生育期、碳水化合物库的容量、叶片衰老基因的转录时间等等都影响RUDP羧化酶活性^[14]。

根据RUDP羧化酶活性与叶片衰老关系的研究,Woolhouse (1968)^[15]认为RUDP羧化酶活性水平是决定光合碳素同化的主要因素。RUDP羧化酶是卡尔文循环的关键性固碳酶,占叶片可溶性蛋白质的50%,叶片衰老,叶片可溶性蛋白质分解,当然会减少RUDP羧化酶的量,这便影响光合作用的碳素固定。Kawashima和Mitake (1969)^[5]用烟草、Heyes和Dale (1971)用菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、Peoples和Dalling (1978)用小麦,研究了叶片的衰老,都测出叶片衰老过程中,RUDP羧化酶活性降低。

小麦叶片是在开花之后开始衰老的,在开始衰老之前,RUDP羧化酶活性最高,待开花之后的时期则下降^[10]。这时,衰老使植株冠层叶片的光合作用速率很快从最高降下来。在籽粒干重正迅速增加的此时,光合却下降,这将会限制产量。如果叶片衰老能延迟到来,那么植株冠层的叶片光合作用便能保持。在开花之后如果施 CO_2 肥能产生籽粒增产的有益反应^{[3][6]},这是因为增加 CO_2 ,使环境中 CO_2/O_2 之比增高,既是

RUDP 羧化酶的活化剂, 又是底物的 CO_2 将促进 RUDP 羧化酶活性的提高。

有些研究报导^[1], 在个体发育中农作物光合作用的降低与 RUDP 羧化酶活性的降低是同步的。

至于叶片衰老时, 为什么 RUDP 羧化酶活性降低的原因, 还未完全弄清楚。有资料报导^[14], 叶绿体 DNA 编码许多叶绿体组分, 其中包括全部 RUDP 羧化酶的大亚基。当叶片衰老时, 质体的基因组就几乎完全受抑制。至于影响质体基因组编码 RUDP 羧化酶大亚基的条件是多种多样的, 其中包括日照长短、矿质营养 (如 CO_2 和 Mg^{++}), 水分供应、干旱、热害、病虫害等等。

过去估量作物叶片衰老的经典指标, 如叶片内叶绿素含量和蛋白质浓度的降低, 以及游离氨基酸含量的增加。但是这些指标往往有不妥之处, 例如叶绿素破坏不一定是衰老的结果。而且上述指标的测定, 其工作量很大。因此, 大家都在寻找测定叶片衰老灵敏而可靠的方法, 但须符合下列条件: (1) 所取材料少; (2) 适于处理多种样品; (3) 差异显著, 即用来诊断衰老很明显。这里应用测定 RUDP 羧化酶活性的方法颇为方便, 符合上述条件。本研究就是基于此原因来进行的。

材 料 和 方 法

(一) 材料: 河北农业大学栽培教研室供给的牛毛黄品种大豆。

(二) 方法: 1、粗酶液的制备——采用不同时期、不同部位的牛毛黄大豆叶片 (从基部往上数叶序数), 准确称取去掉中脉的叶片 1 g, 用 pH 7.8 的冷缓冲液 5 ml (内含 25 mM Tris; 25 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM MgCl_2 ; 0.1 mM EDTA; 2% PVP; 20 mM NaHCO_3 和 10 mM 巯基乙醇进行研磨, 然后过滤。取滤液 100 ml 用于测定叶绿素含量, 其余的冷冻离心 (4°C , 15,000 $\times g$) 15 分钟, 上清液置于冰浴中备用。

2. 各项指标的测定:

(1) RUDP 羧化酶的酶蛋白含量的测定。

取 0.5 ml 上清液, 加 4.5 ml 重蒸馏水, 混匀, 取稀释后液体 0.2 ml, 加 1 ml 试剂 I*, 混合 10 分钟, 加 0.1 ml 试剂 II**, 搅拌 30 分钟, 用 751 分光光度计, 在波长 500 nm 下比色, 测定其 O.D 值。

(2) RUDP 羧化酶活性的测定:

采用同位素法进行测定***——取 20 μl 上清液 (上述的酶粗提取液), 加 0.5 ml 0.1 M 的 Tris (pH 8.2) 缓冲液, 加 40 μl NaHCO_3 , 30°C 下反应 10 分钟, 然后加 20 μl

* 试剂 I 配制: (A) 1 g Na_2CO_3 溶于 50 ml 0.1 N NaOH 中; (B) 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 ml 1% 的酒石酸钾钠液中。50 ml (A) + 1 ml (B) 混合后即可使用。

** 试剂 II 配制: 在 1.5 l 磨口回流瓶中加 100 g 钨酸钠, 25 g 钼酸钠及 700 ml 水和 50 ml 80% 磷酸及 100 ml 浓 HCl, 充分混合, 按上述回流冷凝管回流 10 小时后, 加 150 g 硫酸钼, 50 ml 水, 置于 1000 ml 棕色瓶中, 然后以标准 NaOH 滴定, 以酚酞作指示剂, 使最后浓度为 1 N 酸度的溶液即可使用。

*** 本项数据系李红华同志协助测定, 特此致谢。

RUDP。1 分钟后，加 2N HCl 200 μ l，取上述反应液 0.6 ml 烘干，加 0.5ml 水，4.5ml 闪烁液，然后用闪烁计数器记录。

(3) 叶绿素含量测定：

取滤液 100 μ l，加 4.9 ml 80% 的丙酮，混匀后，离心 (4,000 \times g) 5 分钟，用 72 型分光光度计在 652 nm 波长下进行比色，记录 O.D 值。

试 验 结 果

(一) RUDP 羧化酶含量的测定结果表明 (见表 1)，第四片叶子在 6 月 29 日测定酶蛋白量是 6.55mg/ml，7 月 2 日是 9.45 mg/ml，7 月 10 日是 7.85 mg/ml，而 7 月 17 日是 11.0mg/ml。第五叶片，从 7 月 2 日、7 月 10 日和 7 月 17 日 各为 8.6 mg/ml、10.5 mg/ml 和 10.6 mg/ml。第六叶片在 7 月 10 日和 7 月 17 日 各为 10.05 mg/ml 和 13.9mg/ml。

表 1 不同发育期叶片内 RUDP 羧化酶含量 (mg/ml)

Table 1 The content of RUDP Case in dfferent stage of leaf development

取样日期 The date of sampling	叶序数 Leaf number	第 四 叶 片 The fourth leaf	第 五 叶 片 The fifth leaf	第 六 叶 片 The sixth leaf
6 月 29 日 29 June		6.55	—	—
7 月 2 日 2 July		7.45	8.6	—
7 月 10 日 10 July		7.85	10.5	10.05
7 月 17 日 17 July		11.0	10.6	13.9

13.9mg/ml。总的趋势是逐渐上升的。各层叶片的 RUDP 羧化酶的酶蛋白含量是随时间的推进而逐渐增加，开花前达到最大量，各叶序的叶片也均如此。

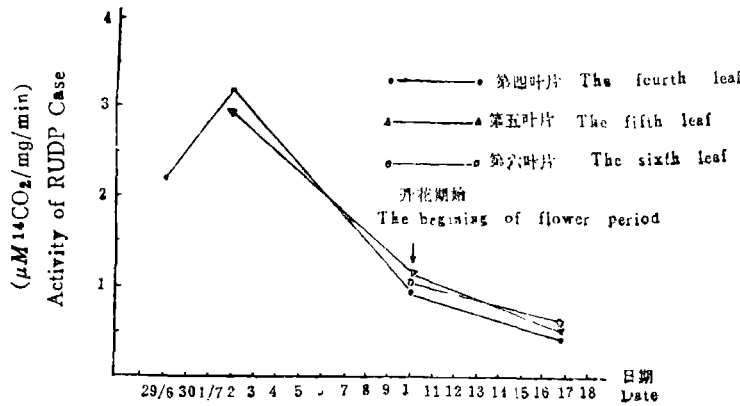


图 1 不同发育期牛毛黄大豆叶片的 RUDP 羧化酶活性 (μM¹⁴CO₂/mg/min)

Fig 1 The activity of RUDP Case of Niumaohuang soybean on different stage of the leaf development (μM¹⁴CO₂/mg/min)

(二) RUDP 羧化酶活性的测定表明：各叶片 (从叶序第四叶片到第六叶片) 的总趋势见图 1。从 6 月 29 日起酶活性 (以 μM¹⁴CO₂/mg/min 表示) 曲线逐渐上升，到 7 月 2 日达最高峰，以后下降到 7 月 10 日之后，下降趋势比较平稳。

(三) 叶绿素含量的测定表明：从第四叶到第

六叶片各时期的叶绿素含量变化，都是随时间的推进，各叶片叶绿素含量都成增加的趋势，例如第四叶片，从 6

表 2 不同时期叶片叶绿素含量 (mg/ml) 的变化
Table 2 The change of the chlorophyll content of leaf on different stage of development

叶期 Date of sampling	叶序数 Leaf number	第四叶片	第五叶片	第六叶片
		The fourth leaf	The fifth leaf	The sixth leaf
6月29日	29 June	0.0034	—	—
7月2日	2 July	0.0054	0.0048	—
7月10日	10 July	0.0064	0.0086	0.0073
7月17日	17 July	0.0068	0.0068	0.0088

月29日的0.0034mg/ml、7月2日的0.0054mg/ml、7月10日的0.0064mg/ml、直到0.0068mg/ml。

讨 论

从表 1 中可看出，第四、第五、第六叶片的

RUDP 羧化酶含量 (mg/ml) 都是随时间的推进而增加，也就是说到开花时，从叶片发育进程来看已进入衰老，但是 RUDP 羧化酶含量反而增加，而 RUDP 羧化酶活性则降低 (见图 1)，说明叶片衰老可能是 RUDP 羧化酶活性低，导致光合作用碳同化减少，出现衰老的表型效应。因此可以用测定 RUDP 羧化酶的活性来表示叶片代谢水平和是否达到衰老期的指标 [2][7][8]。

叶片内叶绿素含量与衰老过程无直接联系 [14]，正如表 2 所示，第四和第六叶片的叶绿素含量 (mg/ml) 都随着时间的推进而提高，到开花时反而达到最高。第五叶片则先提高，达到开花时又下降。Fhomas H. 等 (1975, 1977) 的研究结果表明，叶绿素的破坏不能作为衰老的证据 [12][13]，而叶绿素的降解受核基因组控制 [13]，因此与叶片衰老无直接关系。

小 结

- 1. 牛毛黄大豆在达到开花期之前，RUDP 羧化酶绝对含量增加，而此时叶片已到衰老时期。
- 2. 在牛毛黄大豆叶片达到衰老期之前，RUDP 羧化酶活性有一高峰，而到开花之后，即进入衰老期，活性急剧下降。
- 3. 在牛毛黄大豆叶片达衰老期，其内叶绿素含量反而增高，可见叶片内叶绿素含量与衰老无直接关系。

从上述材料看 RUDP 羧化酶活性可作为判断叶片衰老及其代谢水平的指标。

参 考 文 献

- (1) Besford, R. T. 1984, *Journal of Experimental Botany* 35: 459—504.
- (2) Callow, J. A., 1974, *New Phytol.*, 73: 13—20.
- (3) Fischer, R. A. and I. Aguilar M., 1976, *Crop Sci.* 68: 747—52.
- (4) Heyes J. K. Dale, J. E., 1971, *New Phytol.*, 70: 415—26.
- (5) Kawashima, N. and Mitake T., 1969, *Agr. biol. chem.* 33: 539—43.
- (6) Krenzer, E. G. Moss, D. N., 1975, *Crop Sci.* 15: 71—74.
- (7) Mortin C. and Thimann, K. V., 1972, *Plant physiol.* 49: 64—71.
- (8) Mckersie, G. D. Thompson J. E., 1977, *Plant physiol.* 59: 803—807.
- (9) Peoples, M. B. Dalling M. J., 1978, *Planta*, 138: 453—60.
- (10) Petterson, D. N. Moss, S. N. and Brun, W. A., 1980, *Crop Science*, Vol. 20, January—February.
- (11) Puckidge D. W., 1971, *Aust. J. Agric. Res.* 22: 1—9.
- (12) Thomas H. Stoddart, J. L., 1977, *Appl. Biol.* 85: 461—63.
- (13) Thomas H. Stoddart, J. L., 1975, *Plant physiol.* 56: 438—41.
- (14) Thomas H. and Stoddart J. L., 1980, *Ann. Rev. Plant physiol.* 56: 438—41.
- (15) Woolhouse H. W., 1968, *Agr. biol. Chem.* 33: 539—43.
- (16) 吴光耀, 1980, *植物生理学报*, Vol. 6, No. 3.

THE RELATION BETWEEN THE LEAF SENESCENCE OF NIUMAOHUANG SOYBEAN AND THE ACTIVITY OF RUDP CASE

Liu Fulin Liu Zhongqun

(Hebei Agricultural University)

Abstract

In this research we discuss the relationship between the senescence of leaves and the activity of RUDP Case. The data of our research suggests:

1. There is no relationship between the leaf senescence of Niumao-huang soybean and the absolute content of RUDP Case, but the content of active RUDP Case.

2. There is direct relationship exists between leaf senescence of Niumaohuang soybean and the activity of RUDP Case. Following the leaf senescence (flowering), the activity of RUDP Case decline.

3. There is no relation ship existing between the chlorophyll content of leaf of Niumaohuang soybean and the leaf senescence.

Key words: RUDP Case Niumaohuang soybean