

# 两个银杏品种叶片衰老过程中 叶绿体功能特性的比较

韩彪, 陈国祥, 高志萍, 魏晓东, 解凯彬, 杨贤松, 唐加红, 刘丹

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 研究了两个重要银杏品种大佛指和七星果在自然生长条件下叶片衰老过程中叶绿体功能特性和类囊体膜多肽组分的变化规律. 结果显示: 大佛指叶绿素含量、ATPase 活力、 $F_v/F_m$  和  $F_v/F_0$  在 8 月呈上升状态, 8 月 31 日达到最大值后开始迅速下降; 而伴随着光合磷酸化活力的变化, ATP 含量从 8 月 10 日开始一直呈下降状态; 七星果的光能转换指标从 8 月 10 日开始缓慢下降, 但是下降的幅度比大佛指慢; 大佛指类囊体膜多肽组分在叶片衰老后期降解速度大于七星果. 实验显示, 七星果的衰老时间早于大佛指, 而大佛指衰老速率比七星果快; 叶绿体光能转化指标衰退早于 ATP 酶类活性的衰退.

[关键词] 银杏, 叶绿体, 光能转换特性, 叶绿素荧光

[中图分类号] Q 945 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)03-0099-05

## The Comparison of Chloroplasts Function Characteristics During Leaf Senescence in Two *Ginkgo* Varieties

Han Biao Chen Guoxiang Gao Zhiping Wei Xiaodong  
Xie Kabin Yang Xiansong Tang Jiahong Liu Dan

(School of Life Sciences Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract** The change of chloroplasts function characteristics and thylakoid membrane polypeptide component during leaf senescence in nature condition of two important species of *Ginkgo*—"Dafozhi" and "Qixingguo" were studied. The results showed that the leaf chlorophyll content, ATPase activity,  $F_v/F_m$  and  $F_v/F_0$  of Dafozhi increased in August. After they got the maximum number at the end of August, they descended quickly. However, the content of ATP descended with the activity of photophorylation from the beginning of August. The light-energy conversion characteristic of Qixingguo descended slowly from the beginning of August, but it was not so quickly as dafozhi. Thylakoid membrane polypeptide component of Dafozhi degraded more quickly than Qixingguo's, but there is no difference at seeds output between this two *Ginkgo* varieties. From the results we know that the leaf senescence of Qixingguo is earlier than Dafozhi, but Dafozhi's leaf senescence is faster than Qixingguo's. Chloroplast light-energy conversion index declined earlier than photosynthetic apparatus and some enzymes.

**Key words** *Ginkgo*, Chloroplast, light-energy conversion characteristics, chlorophyll fluorescence

银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.) 又名公孙树, 是著名的“活化石”, 银杏是裸子植物门银杏纲中繁衍至今的惟一生存物种. 现在世界其他国家的银杏都是直接或间接从中国引进, 因此中国是银杏古树珍贵的种质资源库<sup>[1]</sup>. 银杏具有较高的经济价值和生态效益, 尤其是银杏叶和银杏果含有黄酮、银杏内酯等多种生理活性物质, 对心脑血管疾病具有独特疗效<sup>[2]</sup>, 因此, 对于银杏生理活性的研究具有重要的意义.

目前, 国内外对银杏已有大量的研究, 但主要集中在有效成分的提取工艺、药理以及次生物质组织化学定位等方面, 对于作为银杏光合作用基础的叶绿体功能特性还缺乏较系统、深入的研究. 鉴于银杏系统

收稿日期: 2009-04-16

基金项目: 国家自然科学基金 (30671254); 江苏省高校自然科学基金 (08KJB180004).

通讯联系人: 陈国祥, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物生理生化, E-mail: gxchen@njnu.edu.cn

发育演化地位以及经济价值, 本文选用农业生产中栽培最广泛的两个果用银杏品种大佛指和七星果, 对二者叶片从成熟到衰老时期叶绿体功能特性进行比较研究, 旨在探明银杏叶片衰老规律, 并比较两个品种的差异, 为银杏植株的合理栽培及银杏资源的有效开发利用提供理论和实验依据.

1 材料与方法

选用扬州市江都林业管理站育种园内的十年生嫁接大佛指和十年生嫁接七星果 2 个银杏品种的雌株, 取生长和受光相对一致, 无病变损伤新枝顶端叶片为实验材料. 自 2008 年 8 月 10 日起 (叶片边缘颜色变浅) 至 2008 年 11 月 2 日 (开始落叶) 结束, 每隔 3 周采样 1 次, 测定各项光合生理指标, 重复 3 次. 每次采样在上午 10 点进行, 现场测定的气温按日期顺序依次为: 28℃、31℃、27℃、20℃、16℃.

1.1 叶片叶绿素含量的测定

参照  $A_{mon}^{[3]}$  的方法, 鲜叶用分光光度计测定, 单位为  $mg/g$

1.2 离体叶绿体的制备及叶绿素含量的测定

根据薛应龙<sup>[4]</sup>的方法并做适当修改制备叶绿体. 用纱布将银杏叶片擦干净, 准确称取 5 g 剪碎, 加入预冷的分离介质 STN 溶液 (50mmol/L Tris-HCl pH 7.6 10mmol/L NaCl 0.4 mol/L 蔗糖; 0.1% BSA) 中研磨, 4 层纱布过滤, 滤液 300 × g 离心 2min, 上清液再经 1 500 × g 离心 5min, 用 STN 溶液悬浮沉淀, 即得叶绿体悬浮液. 取叶绿体悬浮液 0.05 mL 加 1.45 mL 80% 的丙酮, 6 000 r/min 离心 10 min 取上清, 用分光光度计测定, 计算叶绿素含量.

1.3 叶绿体光合磷酸化活力、ATP 含量及偶联因子腺苷三磷酸酶活力 (ATPase) 的测定

参照薛应龙的方法测定非循环式光合磷酸化活力<sup>[4]</sup>和偶联因子腺苷三磷酸酶活力<sup>[5]</sup>; 按照王维光生物发光法测定 ATP 含量<sup>[6]</sup>.

1.4 叶绿素荧光参数的测定

使用连续激发式荧光仪 Handy PEA 测定活体银杏叶片的荧光参数, 参照 Strasser<sup>[7]</sup>的方法对数据进行处理分析. 每次上午 10 点取相同位置叶片测定, 重复 8 次, 最后取平均值.

1.5 类囊体膜的制备及多肽组分分析

参照 Dunahay<sup>[8]</sup>等所介绍的 B. B. Y 法提取类囊体膜, 利用 SDS-PAGE 蛋白质电泳技术分离类囊体膜多肽组分, 使用 LICOR Odyssey 凝胶成像系统得到多肽组分条带图谱, 相对分子质量的确定根据标准蛋白的迁移率采用对数回归法计算.

2 结果与分析

2.1 叶片叶绿素含量的变化

叶绿素在光合作用过程中起着非常重要的作用, 叶片叶绿素含量的变化在很大程度上反映了该植株光合能力的变化. 研究表明, 高等植物衰老程度越严重, 叶绿素含量降低程度越高<sup>[9]</sup>. 图 1 显示了银杏叶片叶绿素含量的变化情况. 从总体来看, 银杏叶片叶绿素含量随着叶片的衰老而逐渐下降. 两个品种相比, 七星果在 8 月 10 日叶绿素含量达到最高后开始迅速下降, 而大佛指在 8 月 31 日叶绿素含量才达到最高, 然后大佛指叶绿素含量开始迅速下降, 在后期二者趋于相近.

2.2 叶绿体光合磷酸化活力和 ATP 含量的变化

光合磷酸化在光合作用的能量转化中担负着重要的作用, 它是叶绿体在光照条件下形成 ATP 的重要一步. 而 ATP 含量是活细胞进行新陈代谢最重要的生理指标之一. 在光照条件下, 叶片细胞的 ATP 主要来自于光合磷酸化作用, 为碳同化提供还原力. 如图 2 所示, 银杏叶绿体光合磷酸化活力和 ATP 含量随着叶片的衰老而逐渐下降. 2 个品种

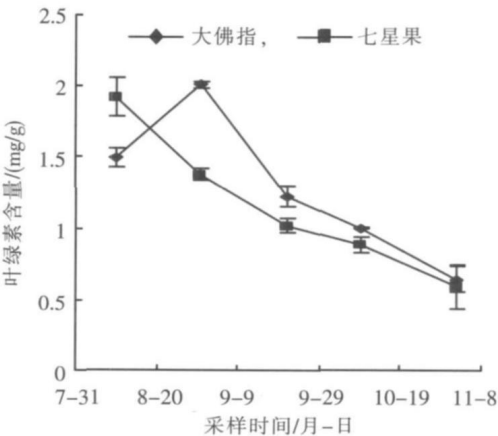


图 1 银杏叶片叶绿素含量的变化  
Fig.1 Changes in chlorophyll content of Ginkgo

相比较可以看出从 8 月 10 日到 9 月 21 日这段衰老初期,大佛指的光合磷酸化活力和 ATP 含量高于七星果,并处在一个比较高的水平;在 9 月份之后,大佛指的光合磷酸化活力和 ATP 含量迅速下降,相比之下七星果下降较为缓慢.

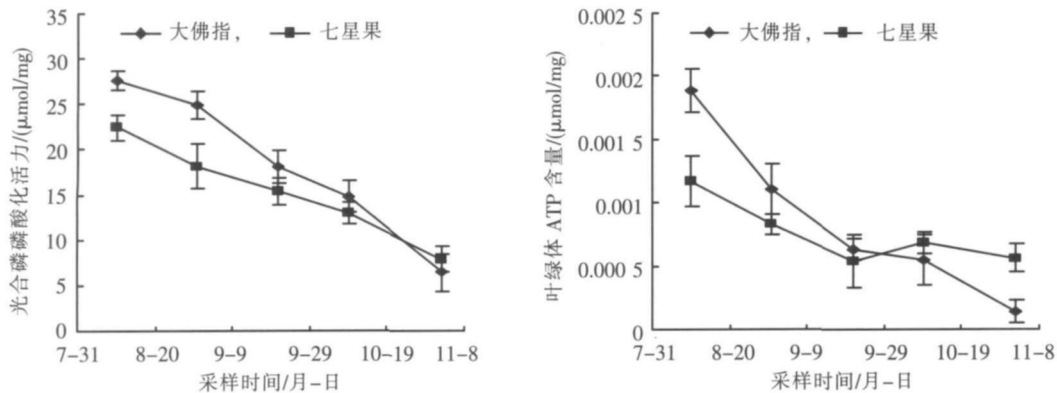


图 2 银杏叶绿体光合磷酸化活力(a)和 ATP 含量的变化(b)  
Fig.2 Changes in photophorylation activity (a) and ATP content (b) of chloroplast in Ginkgo

2.3 叶绿体 ATPase 活力的变化

叶绿体类囊体膜表面的 ATP 合成酶 (ATPase) 在光下能催化光合磷酸化的最末一步反应, 即把 ADP 和 P<sub>i</sub> 合成 ATP, 它经过激活处理, 在黑暗中可将 ATP 水解为 ADP 和 P<sub>i</sub> 图 3 显示了 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力和 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活力的变化情况. 大佛指的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力和 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活力都在 8 月 31 日达到最大值, 然后开始迅速下降到一个较低水平; 七星果的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力和 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活力从 8 月 10 日到 9 月 21 日处于一个相对稳定的状态, 9 月 21 日之后迅速下降. 2 个品种比较, 大佛指 ATPase 活力达到最大值的时间比七星果晚, 而达到最大值之后, 大佛指 ATPase 活力下降速率比七星果 ATPase 活力下降速率大.

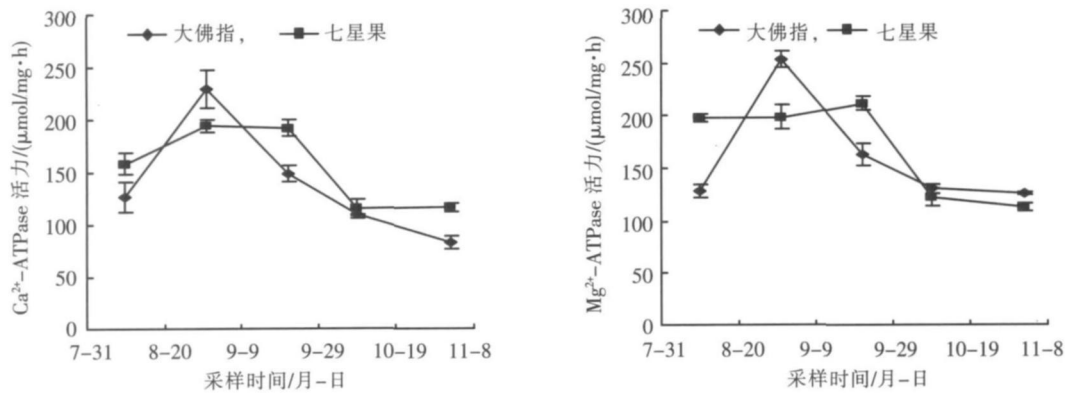


图 3 银杏叶绿体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力(a)和 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活力(b)的变化  
Fig.3 Changes in Ca<sup>2+</sup>-ATPase (a) activity and Mg<sup>2+</sup>-ATPase (b) activity of chloroplast in Ginkgo

2.4 叶绿素荧光参数的变化

叶绿素荧光动力学技术在测定叶片光合作用过程中光系统对光能的吸收、传递、耗散、分配等方面具有独特的作用, 与“表现性”的气体交换指标相比, 叶绿素荧光参数更具有反映“内在性”的特点<sup>[10]</sup>. 图 4 (a) 中 F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> 反映了光系统 II (PSII) 的最大光化学效率, 图 4 (b) 中 F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> 代表了光系统 II (PSII) 的潜在活性. 由图 4 (a) 可知, 2 个银杏品种的 PSII 的最大光化学效率 (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) 都随着叶片的衰老而逐渐下降, 二者差别不大, 惟一区别是大佛指在 8 月 31 日 PSII 的最大光化学效率达到最大值, 而七星果从 8 月 10 日 PSII 的最大光化学效率一直在下降. 图 4 (b) 显示银杏叶片衰老过程中 PSII 的潜在活性 (F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>) 下降迅速, 表明此时 PSII 受到较大的影响; 大佛指 PSII 的潜在活性在 8 月 31 日达到最大值, 而七星果 PSII 的潜在活性从 8 月 10 日一直在下降, 且数值低于大佛指.

2.5 类囊体膜多肽组分分析

植物叶绿体功能特性最终是由位于叶绿体类囊体膜上的各功能蛋白协同作用完成的, 图 5 显示了七

星果和大佛指叶片衰老过程中叶绿体类囊体膜多肽组分的变化情况. 从图 5 (a)可以看出, 七星果在 11 月份之前类囊体膜多肽组分变化不大, 但相对分子质量在 31 000~ 43 000 之间的条带随着叶片衰老而逐渐降解, 11 月多肽条带明显减少. 图 5 (b)显示大佛指类囊体膜多肽组分在 8 月 31 日之后迅速降解, 11 月时大部分多肽组分已经降解. 总体而言, 大佛指在叶片衰老后期类囊体膜多肽组分降解速度明显大于七星果.

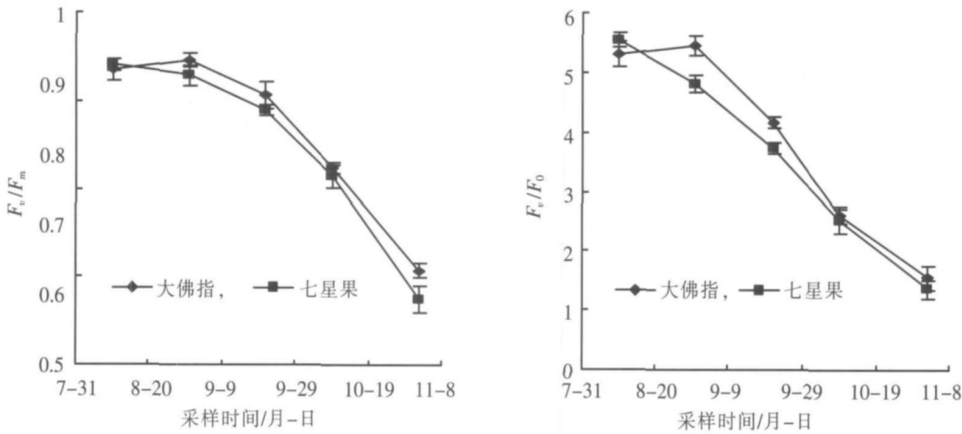


图 4 银杏叶绿素荧光参数  $F_v/F_m$ (a)和  $F_v/F_0$ (b)的变化  
Fig.4 Changes in chlorophyll fluorescence parameters  $F_v/F_m$  (a) and  $F_v/F_0$ (b)of Ginkgo

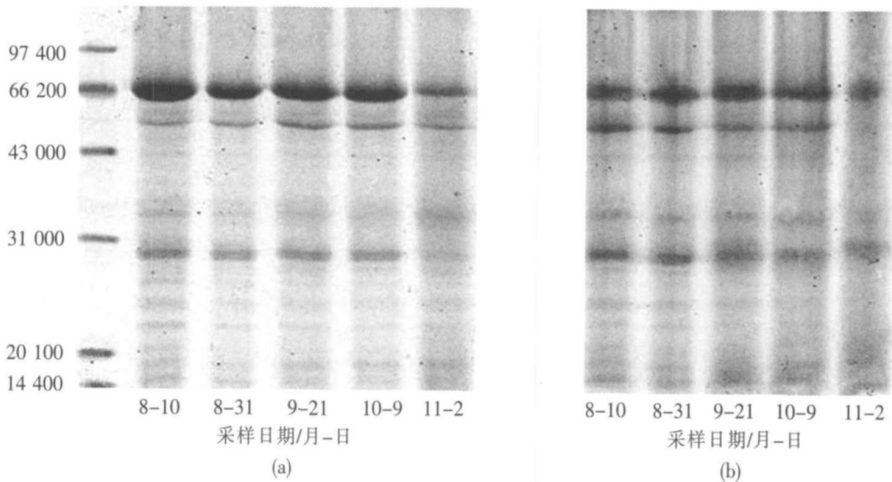


图 5 七星果(a)和大佛指(b)类囊体膜多肽组分的变化  
Fig.5 Changes in thylakoid membrane polypeptide component of Qixingguo(a) and Dafuzhi(b)

3 讨论

叶绿体是植物进行光合作用核心反应的细胞器,在自然界的物质同化和转移过程中具有极其重要的作用. 在光照条件下, 叶绿体可把 ADP和无机磷 (P<sub>i</sub>)形成 ATP. 叶绿体 ATP作为植物维持生命活动最重要的能量库, 其含量的高低与叶绿体的光能转化效率直接相关.

叶绿素是植物进行光合作用的主要色素, 它的改变影响着植物光合作用的强弱<sup>[11]</sup>. 有研究表明, 高等植物衰老程度越严重, 叶绿素含量降低程度越高<sup>[9]</sup>. 图 1 显示, 在银杏叶片衰老初期, 其叶绿素含量有一个迅速下降的过程, 然后下降速度趋于平稳, 到后期下降到较低的水平, 叶片颜色也变浅变黄. 叶片叶绿素含量的下降使得叶片不能吸收较多的光能, 从而最终导致叶片光合作用的下降. 大佛指和七星果叶绿素下降阶段的直线回归斜率分别为  $k_{\text{大佛指}} = -0.0208$  和  $k_{\text{七星果}} = -0.0121$ , 这显示大佛指叶片衰老的更加迅速.

光合磷酸化活力是叶绿体在光照条件下形成 ATP的能力, 而叶绿体 ATP是植物维持生命活动最重要的能量库, 生命活动所需的能量大部分是由 ATP直接提供或转化的, 因此光合磷酸化活力和 ATP含量代表了细胞的光能转换水平<sup>[12]</sup>.

图 2 中光合磷酸化活力和 ATP含量成显著正相关, 相关系数分别为  $r_{\text{大佛指}} = 0.93$  和  $r_{\text{七星果}} = 0.84$  这

说明银杏叶片衰老过程中 ATP 含量与光合磷酸化活力有关. 图 2 显示, 叶片衰老初期大佛指光合磷酸化活力和 ATP 含量明显高于七星果, 并且处在一个较高的水平上, 因此, 此时大佛指的能量供给能力比七星果强.

ATPase 是分布在叶绿体类囊体膜表面的一种复合蛋白, 在光合作用能量转换反应中起着重要的作用. 图 3 显示,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活力和  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活力呈极显著正相关 ( $r_{\text{大佛指}} = 0.96$   $r_{\text{七星果}} = 0.94$ ); 2 个品种比较, 大佛指 ATPase 活力在叶片衰老初期大于七星果, 但是在叶片衰老后期小于七星果. 图 4 中大佛指的  $F_v/F_m$  和  $F_v/F_0$  在叶片衰老阶段均高于七星果, 说明叶片衰老过程中大佛指 PSII 的最大光化学效率和 PSII 的潜在活性比七星果强.

植物叶绿体功能特性归根结底是由位于叶绿体类囊体膜上的各种功能蛋白协同完成的, 因此在银杏叶片衰老过程中叶绿体功能特性的变化与类囊体膜上的功能蛋白的变化有着密切的联系. 图 5 显示出大佛指类囊体膜多肽组分在 8 月 31 日之后迅速降解, 而七星果类囊体膜多肽组分降解相对缓慢, 这与叶绿体功能指标的变化是一致的, 说明大佛指叶片衰老得更加迅速.

本实验表明, 以光合磷酸化活力和 ATP 含量为代表的叶绿体光能转化指标衰退早于叶绿素含量、PSII 光化学效率和 ATPase 活性的衰退. 2 个银杏品种相比较, 大佛指叶片开始衰老的时间较晚, 但是叶片衰老速率比七星果要快, 因此大佛指是一个晚衰的品种. 至于是什么原因导致叶绿体功能的衰退, 以及叶绿体各部分生理功能衰退的顺序还需要进一步研究.

#### [参考文献]

- [1] 梁朝晖, 梁立兴. 银杏的起源与演化 [J]. 特产研究, 2002 2 56-57.
- [2] 陈学森, 张艳敏, 李健, 等. 叶用银杏资源评价及选优研究 [J]. 园艺学报, 1997, 24 (3): 215
- [3] Amon D I. Copper enzymes in isolated chloroplast Polyphenoloxidase in Beta vulgaris [J]. Plant Physiol, 1949, 24 1-15.
- [4] 薛应龙. 植物生理学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1985 78-80
- [5] 薛应龙. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985 111-115.
- [6] 王维光. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985 115-117.
- [7] Strasser R. J. Tsimilli-Michael M, Srivastava A. Mechanisms, regulation and adaptation [M]. London: Taylor & Francis, 2000 445-483
- [8] Dunahay T G, Staehelin L A, Seibert M. Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen evolving photosystem II preparations from spinach [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1984, 764 179-193.
- [9] 陈贵, 胡文王, 谢甫绶, 等. 提取植物体内 MDA 的溶剂及 MDA 作为衰老指标的探讨 [J]. 植物生理通讯, 1991, 27 (1): 44-46
- [10] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论 [J]. 植物学通报, 1999 16(4): 444-448
- [11] 杨艳华, 陈国祥, 刘少华, 等.  $\text{Hg}^{2+}$  胁迫下两优培九和武运粳 7 号水稻幼苗抗性差异的研究 [J]. 农村生态环境, 2002, 18(3): 34-37
- [12] Wangwei G. Comparison of the methods for extracting ATP from plant leaves [J]. Plant Physiol Commun, 1986, 22(5): 54-55.

[责任编辑: 孙德泉]