

过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草的生长特性和叶片光合功能

胡举伟¹, 张会慧², 孙广玉^{1*}

(1.东北林业大学生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2.东北农业大学资源与环境学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草(龙江 911)为材料,测定和分析其生长特性和光化学活性。结果表明:过表达 2-Cys Prx 基因烟草的株高、根长、生物量显著高于非转基因烟草和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草;抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草的 PS II 反应中心电子传递速率(*ETR*)显著低于过表达 2-Cys Prx 基因烟草,过表达 2-Cys Prx 基因烟草的荧光曲线与 F_m 所围成的面积(*Area*)、2 ms 时有活性反应中心的开放程度(Ψ_o)、吸收光能用于 Q_A^- 以后电子传递的量子产额(ϕE_o)、单位反应中心吸收光能用于电子传递的能量(ET_o/RC)高于非转基因烟草,非光化学猝灭的最大量子产额(ϕD_o)、单位反应中心耗散掉的能量(DI_o/RC)低于非转基因烟草,而抑制表达转 2-Cys Prx 基因烟草呈现相反趋势。说明过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片吸收的光能更倾向于分配到光化学反应,以无效形式耗散的能量比例降低,这有利于为碳同化反应提供充足的同化力,以维持较高碳同化速率;抑制表达转 2-Cys Prx 基因烟草叶片吸收的光能用于光化学反应的比例相对降低。

关键词: 2-Cys Prx 基因;烟草;叶绿素荧光动力学曲线;光合功能

中图分类号: S572.01

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)05-0486-05

Study on the growth characteristics and photosynthetic function in leaves of transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx overexpressed and suppressed

Hu Juwei¹, Zhang Huihui², Sun Guangyu^{1*}

(1.College of Life Science, Northeast Forest University, Harbin 150040, China; 2.College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Transgenic tobacco plants(Longjiang911) with 2-Cys Prx overexpressed and suppressed were chosen to investigate their growth characteristics and photochemical activity. The results showed that plant height, root length, biomass in transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx overexpressed were significantly higher than those in the non transgenic tobacco (CK); electron transport rate (*ETR*) of transgenic tobacco plants with 2-Cys Prx expression suppressed was significantly lower than that of the plant with 2-Cys Prx overexpressed. Area within OJIP curve and F_m , opening degree of active reaction center (Ψ_o) at 2 ms, quantum yield of electron transport (ϕE_o) after absorbed Photoenergy used in Q_A^- , electron transport flux per reaction center (ET_o/RC) in leaves of transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx overexpressed were lower than those in the CK, while in leaves of transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx suppressed were higher than those in the CK. Maximum quantum yield (ϕD_o) from non-photochemical quenching, dissipated energy flux per reaction center (DI_o/RC) in transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx overexpressed were lower than those of CK, whereas in transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx suppressed higher than those of the CK. In leaves of transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx overexpressed, more absorbed light energy were inclined to allocate to photochemical reaction, while the dissipated energy in invalid form decreased, which facilitated the supply of assimilation force for carbon assimilation. In leaves of transgenic tobacco plant with 2-Cys Prx suppressed, the ratio of absorbed light energy for photochemical reaction was relatively reduced.

Keywords: 2-Cys Prx(gene); tobacco; chlorophyll a fluorescence transient; photosynthetic function

Prxs是通过其所具有的半胱氨酸残基(-Cys)清除生物生理过程产生的活性氧的一类蛋白^[1-2], 不含结合金属离子辅基, 存在于多种生物中^[3-4]。植物叶绿体中, 目前发现只有一种Prxs, 即2-Cys Prx, 它由核基因编码^[5-6], 2-Cys Prx与叶绿体中的类囊体膜相结合, 具有较高的保守性^[7-8]。

植物在代谢过程中产生的活性氧可破坏细胞内多种物质的结构和活性, 叶绿体内的活性氧可对光合机构造成破坏, 2-Cys Prx可能在降低活性氧对光合机构的损伤中发挥重要作用^[9], 从而在非生物胁迫导致APX活性下降时, 清除叶绿体内的H₂O₂^[10]。2-Cys Prx清除活性氧自由基主要依赖于硫氧还蛋白为电子受体而发挥作用, 2-Cys Prx也可发生可逆性氧化失活来调节H₂O₂浓度^[11]。非生物胁迫条件可促进2-Cys Prx基因的表达^[12], 另外, 2-Cys Prx还可以通过十聚体的形式, 发挥分子伴侣的功能^[13-14], 参与植物体内多种与氧化相关的生理病理过程, 且十聚体具有较高的活性^[15-16]。2-Cys Prx基因表达水平的提高有助于增强植物对非生物胁迫的耐受能力^[17-18]。笔者分别以过表达和抑制表达2-Cys Prx基因烟草(*Nicotiana tabacum*)龙江911为试验材料, 比较了2-Cys Prx基因过表达和抑制表达烟草的生长特性和叶片光合功能, 拟为进一步揭示2-Cys Prx基因的生理功能提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验材料为过表达和抑制表达2-Cys Prx基因烟草(龙江911), 其阳性植株由东北林业大学植物生理学实验室通过反转录克隆出2-Cys Prx基因, 分别构建了过表达和抑制表达载体, 通过电击法导入农杆菌LBA4404中, 利用农杆菌叶盘法转化烟草而获得^[19]。过表达2-Cys Prx基因烟草阳性植株记为过表达Prx, 抑制表达2-Cys Prx基因烟草阳性植株记为抑制表达Prx。

1.2 方法

试验于2014年03—06月在东北林业大学植物生理实验室进行。过表达Prx和抑制表达Prx进行生根培养, 生根后移栽到培养钵中, 以混合的草炭

土、蛭石(体积比2:1)为培养基, 每钵定植1株。移栽后, 初期用保鲜膜覆盖2d, 待其缓苗后将培养钵置于光照为200 μmol/m²·s, 每天照光12h, 黑暗12h, 温度控制在25~30℃的光照培养箱培养。采用非转基因烟草作为对照(CK)。待植株长至10片叶时, 进行生长特性和叶绿素荧光参数的测定。

生长特性包括烟苗株高、根系长度、地上部和地下部的鲜重及干重。每个处理重复5次。

利用便携式脉冲调制荧光仪(英国FMS-2(Hansatch公司出品), 测定充分光适应后的幼苗倒数第2片功能叶片的开放PS II反应中心的激发能捕获效率(F_v'/F_m')、电子传递速率(ETR), 暗适应30min后测定PS II最大光化学效率(F_v/F_m)。

选取幼苗倒数第2片功能叶片, 暗适应30min, 利用Mini调制式掌上叶绿素荧光仪(捷克FluorPen FP 100 max)测定其OJIP曲线, 将OJIP曲线按 $V_i=(F_i-F_0)/(F_m-F_0)$ 公式进行标准化, 参照Strasser等^[20]的方法计算相关参数。测定时避开叶脉, 每个处理5次重复。

1.3 数据处理和统计方法

利用Excel 2003和DPS 7.05软件对试验数据进行统计分析, 采用单因素方差分析、最小显著差异法比较不同处理间的差异。

2 结果与分析

2.1 过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草的生长特性

由表1可以看出, 过表达2-Cys Prx基因烟草的株高和根长分别高于CK 24.45% ($P < 0.01$)和40.38% ($P < 0.01$), 差异均极显著。抑制表达2-Cys Prx基因烟草的长势与CK差异较小, 但整体长势弱于CK, 其株高和根长分别低于CK 15.09% ($P > 0.05$)和12.45% ($P > 0.05$), 与CK差异均不显著。过表达和抑制表达2-Cys Prx基因烟草的叶片数与CK均无显著差异。过表达2-Cys Prx基因烟草植株的地上部鲜重、地下部鲜重、总鲜重、地上部干重、地下部干重和总干重均大于CK, 抑制表达2-Cys Prx基因烟草的最低, 且不同处理之间各指标均达极显著差异水平 ($P < 0.01$)。

表 1 烟草植株的生长性状

Table 1 Growth characteristics of tobacco seedlings

烟草植株	地上部鲜重/g	地下部鲜重/g	总鲜重/g	地上部干重/g	地下部干重/g	总干重/g	株高/cm	根长/cm	叶片数/片
CK	(4.97±0.036)b	(0.98±0.022)b	(5.96±0.014)b	(0.31±0.011)b	(0.07±0.001)b	(0.38±0.011)b	(14.25±0.050)b	(13.25±0.250)b	8.25±0.500
过表达 Prx	(9.25±0.141)a	(1.70±0.100)a	(10.95±0.041)a	(0.63±0.010)a	(0.11±0.008)a	(0.74±0.019)a	(17.75±0.250)a	(18.60±1.900)a	8.50±0.577
抑制表达 Prx	(3.28±0.512)c	(0.49±0.257)c	(3.78±0.770)c	(0.21±0.053)c	(0.04±0.015)c	(0.24±0.069)c	(12.10±0.900)b	(11.60±1.400)b	8.00±0.817

2.2 过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草的叶绿素荧光参数

由表 2 可以看出 过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 F_v/F_m 均维持在 0.8 以上, 不同处理之间无显著差异。过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶

片的 F_v'/F_m' 与 CK 间没有显著差异, 而 ETR 则较 CK 增加了 9.86%($P > 0.05$), 但未达显著差异水平。抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 F_v'/F_m' 和 ETR 分别低于 CK 7.00%($P < 0.05$)和 35.96%($P < 0.01$)。

图 2 烟草叶片的叶绿素荧光参数

Fig.2 Chlorophyll fluorescence parameters in leaves of tobacco seedlings

烟草植株	F_v/F_m	F_v'/F_m'	ETR
CK	0.830±0.021	(0.747±0.024)a	(289.8±28.7)a
过表达 Prx	0.081±0.017	(0.737±0.004)a	(318.4±35.8)a
抑制表达 Prx	0.080±0.039	(0.498±0.016)b	(185.6±36.8)b

2.3 过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草的 OJIP 曲线

由图 1 可以看出 过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 OJIP 曲线形态明显不同于 CK, 其中过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片 OJIP 曲线上各点的相对荧光强度 F_t 均较 CK 有所增加, 且过表达 2-Cys Prx 基因烟草的增加幅度更大, 另

外, 随着时间的延长, 不同处理之间的差异幅度增大。将 OJIP 曲线标准化后可以看出, 不同处理之间烟草叶片 OJIP 曲线上各点的相对可变荧光 V_t 之间差异变得较小, 而大约在 J 点和 I 点不同处理之间表现出明显的差异, 不同处理烟草叶片的 V_t 较 CK 均有不同程度的增加。

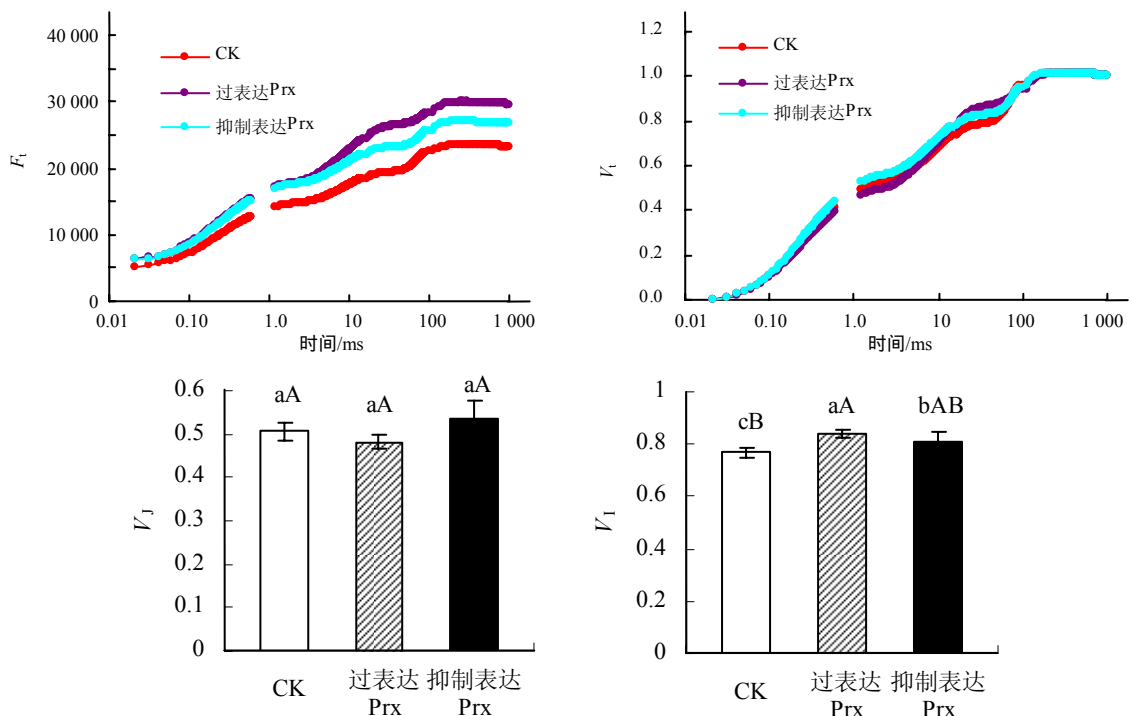


图 1 过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 OJIP 曲线和标准化 OJIP 曲线

Fig.1 Chlorophyll a fluorescence transient (OJIP) and normalized OJIP for leaves of tobacco seedlings with 2-Cys Prx overexpressed and suppressed

2.4 过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的叶绿素荧光参数雷达图

由图 2 可以看出,过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 $Area$ 和 ψ_0 分别较 CK 有不同程度的增加,而抑制表达处理则呈明显的降低趋势。过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 ϕE_0 和 ET_0/RC 较 CK 分别增加了 6.93% 和 4.24%,而 ϕD_0 和 DI_0/RC 则较 CK 分别降低了 5.49% 和 6.82%。抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 ϕE_0 和 ET_0/RC 较 CK 分别降低了 7.26% 和 7.24%,而 ϕD_0 和 DI_0/RC 则较 CK 分别增加了 3.42% 和 3.30%。过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 ABS/RC 和 TR_0/RC 均没有发生明显变化。

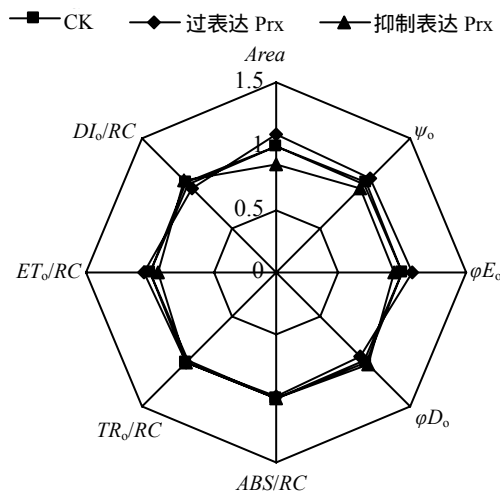


图 2 烟草叶片的叶绿素荧光参数雷达图

Fig.2 Radar plot of fluorescence data in leaves of tobacco seedlings

3 讨论

过表达 2-Cys Prx 基因烟草的生长优于 CK,表现为株高和根长明显高于 CK,并且地上部和地下部鲜重和干重也明显高于 CK,而抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草生长受到抑制。不同处理烟草植株的叶片数没有明显差异,即过表达 2-Cys Prx 基因烟草和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草生长的区别主要表现为植株叶片面积的增加或降低,而并没有明显促进新生叶片的发生,但是,株高的变化却说明过表达 2-Cys Prx 基因烟草的节间距相对增加。

没有经受环境胁迫并经过充分暗适应的植物叶片的 F_v/F_m 是比较恒定的,基本不存在物种间的差异^[21]。本试验中,过表达和抑制表达 2-Cys Prx

基因烟草叶片的 F_v/F_m 与 CK 没有明显差异,均维持在 0.8 以上,说明在没有其他环境胁迫条件下并没有引起烟草叶片发生光抑制现象。虽然过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 F_v/F_m 较 CK 没有明显增加,但过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 ETR 较 CK 明显增加,并且抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 F_v/F_m 和 ETR 也较 CK 明显降低,表明过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的光能转化和电子传递情况不同,特别是抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的电子传递能力明显降低。

不同处理下烟草叶片的 OJIP 曲线形态明显不同,但由于原始的 OJIP 曲线受外界环境的影响较大,因而,在数据处理中常常将 OJIP 曲线进行标准化^[22]。不同处理下标准化 OJIP 曲线在 J 点和 I 点出现明显差异,OJIP 曲线上 J 点荧光变化反映了 PS II 电子受体侧 Q_A 向 Q_B 的电子传递特征^[23]。结合表 2 可以发现,过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片电子传递的差别主要体现在 PS II 受体侧。过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 $Area$ 和 ψ_0 均较 CK 明显增加,而抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 $Area$ 和 ψ_0 均呈明显的降低趋势,即过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 PS II 电子受体库(Q_A 、 Q_B 和 PQ 库等)以及 PS II 反应中心的活性相对高于抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草^[24],这也说明过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片受体侧电子传递速率增加或降低的原因与 PS II 受体侧电子受体库大小的改变具有直接的关系。过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的光能分配和利用情况存在区别,虽然过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 ABS/RC 和 TR_0/RC 与 CK 相比均没有发生明显变化,但过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 ϕE_0 和 ET_0/RC 较 CK 明显增加,而 ϕD_0 和 DI_0/RC 则明显降低,说明过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片吸收的光能更倾向于分配到光化学反应,而以无效热能形式耗散的能量比例降低,这有利于光反应同化力的供应,以维持正常的碳同化。而抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片吸收光能用于光化学反应的比例相对降低。

综上所述,过表达和抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 PS II 光化学活性无明显差异,但过表达 2-Cys Prx 基因烟草叶片的 PS II 光合电子传递能力相对高于抑制表达 2-Cys Prx 基因烟草,这主要与

其 PS II 电子受体侧接受电子能力的增强有关,而抑制 2-Cys Prx 基因烟草叶片的电子传递能力和光能分配到光化学反应的比例相对降低,以无效热能形式的耗散比例相对增加。

参考文献:

- [1] Pena-Ahumada A, Kahmann U, Dietz K J, et al. Regulation of peroxiredoxin expression versus expression of Halliwell-Asada-Cycle enzymes during early seedling development of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Photosynthesis Research*, 2006, 89(2/3): 99-112.
- [2] 张海燕, 李国田, 王晓杰, 等. 小麦过氧化物还原酶基因 *TaPrx* 的克隆与功能初步分析[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(4): 1222-1229.
- [3] Horling F, Baier M, Dietz K J. Redox-regulation of the expression of the peroxide-detoxifying chloroplast 2-Cys peroxiredoxin in the liverwort *Riccia fluitans*[J]. *Planta*, 2001, 214(2): 304-313.
- [4] Jang H H, Kim S Y, Park S K, et al. Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone function[J]. *FEBS Letters*, 2006, 508(1): 351-355.
- [5] Baier M, Noctor G, Foyer C H, et al. Antisense suppression of 2-Cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(2): 823-832.
- [6] Baier M, Dietz K J. Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(4): 1407-1414.
- [7] Baier M, Dietz K J. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 31(3): 553-564.
- [8] Brehelin C, Meyer E H, de Souris J P, et al. Resemblance and dissemblance of *Arabidopsis* type II peroxiredoxins: Similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 2045-2057.
- [9] König J, Lotte K, Plessow R, et al. Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin role of the C-terminus and the quaternary structure[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(27): 24409-24420.
- [10] 张会慧, 田祺, 刘关君, 等. 转 2-Cys Prx 基因烟草抗氧化酶和 PS II 电子传递对盐和光胁迫响应[J]. *作物学报*, 2013, 39(11): 2023-2029.
- [11] Wood Z A, Poole L B, Karohs P A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling[J]. *Science*, 2003, 300(8): 650-653.
- [12] Contreras L, Moenne A, Gaillard F, et al. Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96(2): 85-89.
- [13] Lim J C, Chio H I, Park Y S. Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(43): 28873-28880.
- [14] Rhee S G, Jeong W, Chang T S, et al. Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance[J]. *Kidney International*, 2007, 72(6): 3-8.
- [15] 康瑞霞, 刘震西, 刘芸, 等. Prx1 对细胞信号转导过程的调控[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(11): 2186-2190.
- [16] Lee W, Choi K S, Riddell J, et al. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(30): 22011-22022.
- [17] König J, Baier M, Horling F, et al. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux[J]. *PNAS*, 2002, 99(8): 5738-5743.
- [18] 胡举伟, 张会慧, 逢好胜, 等. 转 2-Cys Prx 基因烟草 F1 幼苗叶片 PS II 光化学活性对干旱胁迫的响应[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2014, 40(6): 593-598.
- [19] 田祺. 2-Cys Prx 烟草遗传转化及其在光破坏防御中的功能初探[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [20] Strasser R J, Srivastava A, Govindjee. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 61(1): 32-42.
- [21] 张会慧, 张秀丽, 王娟, 等. 利用快相叶绿素荧光参数综合评价 3 种丁香的耐盐性[J]. *南京林业大学学报*, 2013, 37(5): 13-19.
- [22] 丁俊男, 张会慧, 迟德富. 土壤菲胁迫对高丹草幼苗叶片光合机构功能的影响[J]. *草业科学*, 2014, 31(9): 1732-1738.
- [23] 李鹏民, 高辉远, Strasser R J. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31(6): 559-566.
- [24] 陈锋, 田纪春, 孟庆伟, 等. 短期高温胁迫对高产小麦品系灌浆后期旗叶光系统 II 功能的影响[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(10): 1854-1858.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维