DOI: 10.5846/stxb201404200774
杨晶,祝建波,张亚敏,李曹龙,王海霞,王爱英.低温胁迫对转新疆雪莲 *sikRbcs*2 基因烟草光合作用的影响.生态学报,2015,35(23): - .
Yang J, Zhu J B,Zhang Y M, Li C L, Wang H X, Wang A Y.Effects of low temperature stress on photosynthesis in *sikRbcs*2 transgenic tobacco .Acta Ecologica Sinica,2015,35(23): - .

低温胁迫对转新疆雪莲 *sikRbcs2* 基因烟草光合作用的影响

杨 晶[1],祝建波[1,*],张亚敏[1],李曹龙[1],王海霞[1],王爱英[1]
新疆石河子大学生命科学学院,石河子 832000

摘要:研究分布于新疆的雪莲(*Saussurea involucrata*)中的 *sikRbcs*2 基因在低温条件下对植物光合作用的影响,以 16 ℃、10 ℃、6 ℃、4 ℃温度梯度处理非转基因型和转 *sikRbcs*2 基因型烟草,每个温度处理 72 h,比较研究其叶绿素荧光特性和光合特性。实验分析结果:低温胁迫下,转基因型烟草叶片叶绿素 *a*(*Chla*)、叶绿素 *b*(*Chlb*)、叶绿素 *a*+*b*(*Chla*+*Chlb*)、类胡萝卜素(*Car*)含量都显著高于非转基因型烟草。叶绿素荧光参数分析:低温胁迫下,转基因烟草 PSⅡ最大光化学效率(*Fv/Fm*)、*qp*(光化学猝灭系数)、*ETR*(电子传递效率)都显著或极显著高于非转基因型,光合参数测定:随着低温胁迫程度的加剧,转基因烟草和非转基因型烟草净光合速率(*Pn*)、气孔导度(*Gs*)、蒸腾速率(*Tr*)、胞间 CO_2 浓度(*Ci*)总体都呈下降趋势,但转基因烟草的净光合速率有一个明显的动态变化,先急剧下降后有一个稳定上升的趋势。通过对生长指标的测定发现:在低温处理后和恢复后转基因烟草生物量的积累都显著高于非转基因型烟草。综合研究结果表明:转新疆雪莲 *sikRbcs*2 基因的烟草在低温条件下具有较高的 *Fv/Fm*、*qp*、*ETR*,对光合机构的损伤小,降低了低温胁迫效应,提高了烟草在低温胁迫条件下的耐受性。

关键词:低温胁迫;叶绿素荧光;光合作用;*Rbcs*

Effects of low temperature stress on photosynthesis in *sikRbcs*2 transgenic tobacco

YANG Jing[1], ZHU Jianbo[1,*], ZHANG Yamin[1], LI Caolong[1], WANG Haixia[1], WANG Aiying[1]
College of Life Science Shihezi University, Shihezi 832000, *China*

Abstract: 1,5-Diphosphate ribulose carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39, Rubisco) is the key enzyme in the metabolism of photosynthetic carbon in higher plants, and it catalyzes CO_2 fixation and reduction. Rubisco controls the metabolic rate of photosynthesis and photorespiration and has a critical effect on the net photosynthetic rate. The enzyme comprises eight major subunit (rbcL) and eight small subunit (rbcs) L8S8 polymer composites. The expression of small subunits is important for regulating the expression of large subunits. Enzyme activity is important in photosynthetic electron transport and photochemical quenching.The influence of low temperature on plant physiological metabolism is multifaceted, especially with respect to the key factors that influence the photosynthetic system. The major manifestations are the blocking synthesis in the chloroplast, the destruction of chloroplast structure, the decrease in photosynthetic electron transport activity, and the decline in related enzyme activity in the process of photosynthesis. Under low temperature stress, reactive oxygen species accumulate and damage the photosynthetic apparatus through oxidation. In contrast, the light-harvesting ability, Photosystem II maximal photochemical efficiency (Fv/Fm), and other indices decrease. In addition, enzyme activities that catalyze the photo dark reaction also decline. *Saussurea involucrata* is a typical extreme low temperature-resistant higher plant. After a long period of natural selection in extreme environmental conditions, *S. involucrata* formed a series of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160049)
收稿日期:2014-04-20; **网络出版日期**:2015- -
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: zjbshz@126.com

mechanisms to adapt to harsh natural conditions, and developed a unique mechanism to maintain high photosynthetic activity at low temperatures. Previous research by our laboratory isolated a full-length cDNA encoding a Rubisco small subunit gene, named *sikRbcs*2, from a cDNA library of *S. involucrata* leaves induced by cold stress. Sikrbcs2 showed high identity of 57.54% to that of rbcs from *Helianthus annuus*, and could noticeably improve the cold resistance ability of tobacco.Tobacco is used as one of the model organisms for studying plant molecular biology. Low temperature has a clear effect on tobacco photosynthesis. To study the effects of the *S. involucrata sikRbcs*2 gene on plant photosynthesis under cold conditions, *sikRbcs*2-transgenic tobacco and non-transgenic tobacco plants were exposed to various temperatures (16, 10, 6, and 4 °C) under low light (70 μmol $m^{-2}s^{-1}$) for 72 h, and the chloroplast pigment content, photosynthetic rate, and chlorophyll fluorescence parameters were measured in the leaves. The contents of chlorophyll a, chlorophyll b, and chlorophyll a+b were significantly higher in transgenic tobacco than in non-transgenic tobacco after cold stress treatment. Furthermore, the *Fv/Fm*, photosynthetic electron transport (*ETR*), and photochemical quenching coefficient (*qP*) of transgenic tobacco decreased more slowly than those of non-transgenic tobacco under low temperature stress. In comparison, the nonphotochemical quenching coefficient (*qN*) increased faster in transgenic than non-transgenic tobacco. Measurements of the photosynthetic parameters showed that, as temperature decreases, the net photosynthesis rate (*Pn*), stomatal conductance (*Gs*), transpiration rate (*Tr*), and intercellular CO_2 concentration (*Ci*) of both transgenic tobacco and non-transgenic tobacco declines. However, the *Pn* of transgenic tobacco exhibited a noticeably variable trend, initially falling sharply and then rising steadily. After cold treatment, the leaf plastochron index, shoot length, stem diameter, fresh weight of the shoot and root, and dry weight of the shoot and root were higher for transgenic than non-transgenic tobacco. The results indicate that low temperatures damage non-transgenic tobacco. In contrast, the damage to transgenic tobacco containing large numbers of sikRbcs2 proteins, which act as molecular chaperones, was reduced in response to cold stress, with better low temperature stress tolerance and higher biomass accumulation.

Through the preliminary analysis ofchlorophyll fluorescence and photosynthesis characteristics of *sikRbcs*2-transgenic tobacco and non-transgenic tobacco plants under low temperature conditions, this study provides the experimental and theoretical grounding for the further study of the mechanism of how the sikrbcs2 gene acts in photosynthesis.

Key Words: low temperature stress; photosynthesis; chlorophyll fluorescence; *Rbcs*

温度是影响植物光合作用的重要因素[1],植物处于高温或低温的环境中其光合作用会受到明显的影响。低温胁迫会引起植物叶绿素合成受到阻碍[2],叶绿体结构遭到破坏[3],光合电子传递活性下降[4],光合作用过程中酶的活性降低,CO_2的同化受阻[5],导致植物光合作用效率降低。

Rubisco(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶)是高等植物光合碳代谢过程中的关键酶,处于光合碳还原和光合碳氧化这两个方向相反但又相互连锁的循环的交叉点上,调节着光合作用和光呼吸的代谢比例,其活性大小对净光合速率起着决定性作用[6]。Rubisco 由 8 个大亚基(RbcL)和 8 个小亚基(Rbcs)组成,大亚基由叶绿体基因组编码,小亚基是由细胞核基因组编码。小亚基 *Rbcs* mRNAs 表达水平与 Rubisco 含量是高度相关的,二者之间有很好的协同表达,小亚基对大亚基的表达具有调控作用[7,8]。Rubisco 的活性中心位于大亚基上,行使主要功能,但其多个小亚基编码基因的功能还不是很清楚。Spreitzer[9]认为,小亚基可能在进化过程中扮演聚集大亚基活性位点的角色,并且小亚基可能有更多特异性功能,小亚基能促进 CO_2与 Mg^{2+}对 Rubisco 的活化,维持和稳定 Rubisco 的活化构象。Miao 和 Li 通过烟草和水稻大、小亚基的异源分子杂交发现,杂合酶的羧化和氧化比值与小亚基的来源有很大的关系。Du YC 等[10]利用蓝藻的实验结果也揭示小亚基在调控 Rubisco 羧化/氧化比值方面的重要作用。为此,人们希望用不同植物的大、小亚基组成全酶来提高羧化活性和降低加氧活性[11]。但是,到目前为止,还没有成功的报道。澳大利亚的 Badger 认为 Rubisco 的羧化和氧化的比值与酶反应速率有某种相关,羧化和氧化的比值越高,反应速率越慢[12]。因此推测提高 Rubisco 羧化和

氧化的比值的定点修饰有可能会导致酶反应速率的下降。

大豆 *Rbcs* 基因含有 3 个不同拷贝,对许多外界因子如水杨酸、盐胁迫和干旱处理具有明显的应答反应。但不同浓度的水杨酸和 NaCl 对 *Rbcs* 基因的转录有不同程度的诱导[13]。说明 *Rbcs* 基因表达调控与植物抗逆性有一定的关联。新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar.et Kir.Exmaxim.),主要生长在海拔 2400—5800 m 的高山流石坡以及雪线附近的碎石间。那里气候奇寒、终年积雪不化,最高月平均温 3—5 ℃,最低月平均温 -19—-21 ℃,无霜期仅有 50 天左右[14]。经过长期极端环境条件的自然选择,新疆雪莲自身形成了独特的光合保护机制,研究其 *Rbcs* 基因在低温光保护机制中的作用具有重要的意义。

烟草作为植物分子生物学研究的模式植物,原产于亚热带,生长最适温度为 25—28 ℃,低于 10 ℃时生长受阻,低温对烟草的生长发育、产量和品质都有明显的影响[15]。本试验前期从新疆雪莲 cDNA 文库中克隆了 1 个 Rubisco 的小亚基基因(*sikRbcs*2) cDNA 全长序列,该基因与向日葵氨基酸序列的同源性最高,只有 57.54%。构建了诱导表达载体 *RD*29*A*: *sikRbcs*2 和过表达载体 35*S*: *sikRbcs*2,通过农杆菌介导转化 NC-89 烟草,获得了 T0 代的转基因烟草种子。组成型表达的转基因烟草植株能够明显的提高烟草的抗寒能力,并且在低温条件保持较高的光化学效率。在此基础上本试验采用低温胁迫法对非转基因型烟草和转 *SikRbcs*2 基因的烟草进行处理,测定叶绿体色素含量、叶绿素荧光参数、光合参数以及生物量,分析在不同低温胁迫下 *sikRbcs*2 对叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素,净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 浓度以及叶绿素荧光参数的影响,为进一步研究新疆雪莲 *sikRbcs*2 基因在低温光合中的作用机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

植物材料　植物材料为'NC98'烟草、转 *RD*29*A*: *sikRbcs*2 和 35*S*: *sikRbcs*2 基因的'NC98'烟草由本实验保存。

1.2　方法

1.2.1　试验材料的培养与胁迫处理

将经卡那霉素筛选获得的转基因型烟草幼苗(*RD*29*A*: *sikRbcs*2 和 35*S*: *sikRbcs*2)和空白对照烟草移栽于装有营养土(草炭、蛭石、珍珠岩 3:1:1)的营养钵(内径为 8 cm,高度为 10 cm 杯底有孔)中,置于植物生长室中培养。定期浇水,每天光照 12 h,昼夜温度为 25 ℃ / 18℃。当苗生长 3 月龄时,将长势一致的对照烟草和 2 种转基因烟草移入人工气候箱中(光照强度 70 umol . m^{-2}. s^{-1},温度 25 ℃/25 ℃,光周期为 12 h/12 h,相对湿度为 60%—70%)适应两天后,进行持续低温胁迫处理,温度梯度为 16 ℃、10 ℃、6 ℃、4 ℃,每个温度处理 72 h。实验重复 3 次,每次重复非转基因型和转基因型烟草(*RD*29*A*∶ *sikRbcs*2 和 35*S*∶ *sikRbcs*2)各 20 株苗。

1.2.2　叶绿素荧光参数及光合参数的测定

选择并标记植株倒四叶,各温度处理 72 小时后,用 GFS-3000 便携式光合系统测定仪测定气孔导度(*Gs*)、蒸腾速率(*Tr*)、净光合速率(*Pn*)、胞间 CO_2 浓度(*Ci*)。将待测植株暗处理 20 min 后,用 Mini-PAM 光量子分析仪测定荧光参数:初始荧光强度(*Fo*)、最大荧光强度(*Fm*)、PSⅡ最大光化学效率(*Fv/Fm*)、光化学猝灭系数(*qP*)、非光化学猝灭系数(*qN*)、电子传递速率(*ETR*)。每叶测定 3 个值,取平均值。

1.2.3　叶绿素含量和类胡萝卜素含量的测定[16]

在各温度处理后,取非转基因型烟草和转基因型烟草植株倒四叶中部叶片,选取的叶片要求无黑斑、无病变、无腐烂,颜色均匀一致。剪成约 1 mm 宽的细丝,准确称取 0.1 g 放至试管,加入 15 mL 丙酮乙醇混合液(*V*∶*V* 为 1∶1),在室温下避光提取至细丝完全变白后,混匀取上清液用分光光度计测定 470 nm、645 nm 和 663 nm 处的吸光度值。计算叶绿素 a(*Chla*),叶绿素 b(*Chlb*)和类胡萝卜素(*Car*)含量。

1.2.4　生长指标的测定

叶片生长指数(*PI*) 根据 Coleman 和 Grcyson[17]的测定方法,计算公式为 $PI = n + (In\ n - In\ R) / (In\ Ln - In\ Ln + 1)$,其中参比叶长 *R* 为 180 mm, *n* 为叶片长度长于参比叶长的叶片数,*In Ln* 和 *In Ln* + 1 分别为第 *n* 及 *n* + 1 片叶的长度。株高用直尺测量,茎的直径用游标卡尺测量,叶长和叶宽用直尺测量,鲜重和干重用电子天平测量,

分别在处理前、低温梯度持续处理 12 天后和恢复 14 后测定。

1.2.5 数据处理

采用 SPSS17.0 软件进行数据处理分析,以 LSD 法进行差异显著性分析,显著性水平设定为 $P<0.05$(显著水平)和 $P<0.01$(极显著水平),采用 Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对转 *sikRbcs*2 基因烟草叶绿素荧光参数的影响

2.1.1 低温胁迫对初始荧光强度(*Fo*)、最大荧光强度(*Fm*)和 PSⅡ最大光化学效率(*Fv/Fm*)的影响

Fo 为初始荧光,表示已经暗适应的光合机构 PSⅡ反应中心完全开放时的荧光强度,即原初电子受体 QA 完全氧化时的荧光产量。*Fo* 值的上升表明 PSⅡ反应中心发生可逆失活或破坏[18]。由图 1 可知,随着胁迫温度的降低,非转基因型烟草的 *Fo* 值呈逐渐上升的趋势,转基因型烟草的 Fo 值先下降后上升,在 4℃胁迫处理后,转基因型烟草 *Fo* 值极显著低于非转基因型烟草,说明转基因型烟草 PSⅡ反应中心遭到的破坏程度要小于非转基因型烟草。*Fm* 为最大荧光产量,指已经暗适应的光合机构 PSⅡ反应中心完全关闭时的荧光强度。随着胁迫温度的降低,非转基因型烟草的 *Fm* 值降幅较大,组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草 *Fm* 值在 10 ℃胁迫后,极显著高于非转基因型烟草的 Fm 值,但是诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草 *Fm* 值一直保持较低的水平,并且随着胁迫温度的降低其降幅也较小。*Fv/Fm* 是 PSⅡ最大光化学效率,能反映 PSⅡ反应中心光能转化效率,其值的降低表明植物发生了光抑制[19]。低温胁迫下非转基因型烟草和转基因型烟草叶片的 *Fv/Fm* 下降与胁迫程度呈正相关,到 4 ℃胁迫处理后非转基因型烟草 *Fv/Fm* 值下降 20%,组成型表达 *sikRbcs*2 烟草 *Fv/Fm* 值下降 11%,诱导型表达 *sikRbcs*2 烟草 *Fv/Fm* 值下降 14%,由此说明转 35*S*:*sikRbcs*2 型烟草发生光抑制程度小于转 *Rd*29*A*:*sikRbcs*2 型烟草且都小于非转基因型烟草。

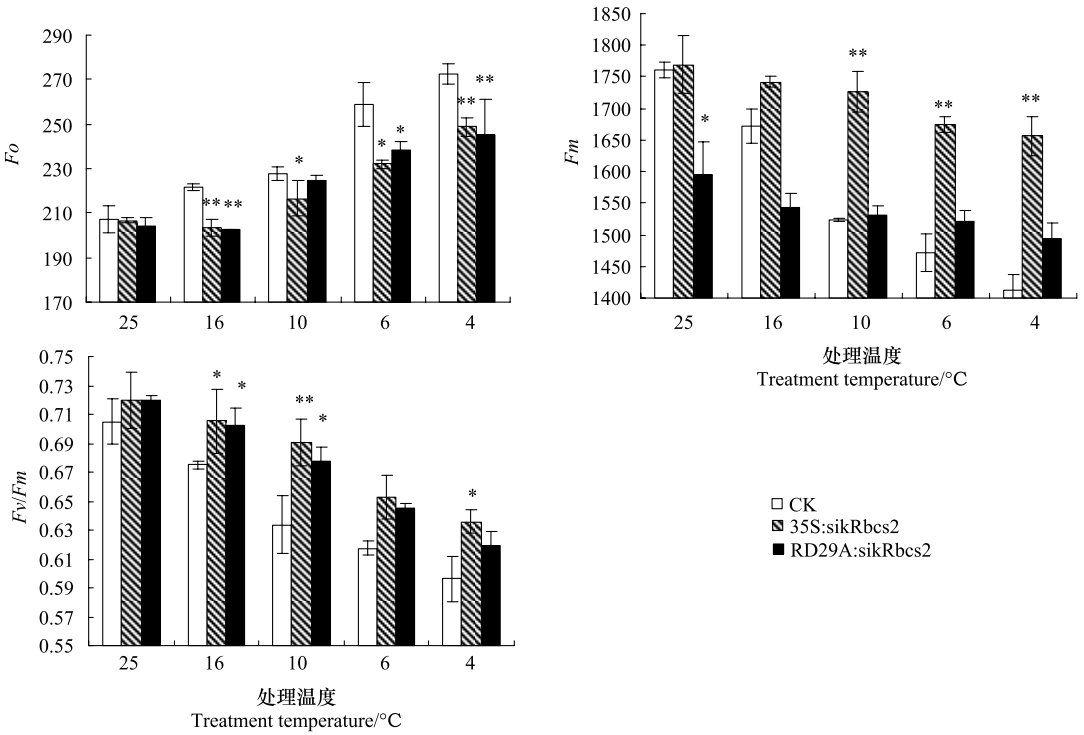

图 1 低温胁迫对 CK 型和 *sikRbcs*2 型烟草初始荧光、最大荧光和 PSⅡ最大光化学效率的影响

Fig. 1 Effect of low temperature stress on *Fo*、*Fm* and *Fv/Fm* in CK and *sikRbcs*2 tobacco

CK 表示非转基因型烟草、35*S*:*sikRbcs*2 表示转 35*S*:*sikRbcs*2 型烟草、*RD*29*A*:*sikRbcs*2 表示转 *RD*29*A*:*sikRbcs*2 型烟草;*Fo* 为初始荧光(Minimal fluorescence)、*Fm* 为最大荧光(Maximal fluorescence)、*Fv/Fm* 为 PSⅡ最大光化学效率(The maximal photochemical efficient of PSⅡ);* 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到显著水平($P<0.05$);** 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到极显著水平($P<0.01$)

2.1.2　低温胁迫对光化学猝灭系数(*qP*)、非光化学猝灭系数(*qN*)的影响

qP 为光化学猝灭系数,反映了 PSⅡ原初电子受体 QA 的还原状态和 PSⅡ开放中心的数目,其值下降说明 QA-QB 的电子传递受到抑制[18]。其值越低说明 PSⅡ反应中心开放部分的比例越小,能够传递的电子数量也较少,在单位时间内光合电子传递的速度较慢[20]。由图 2 可知,随着胁迫温度的降低,非转基因型烟草的 *qP* 值有明显的下降趋势,4 ℃胁迫后其值下降 50.15%,组成型表达 *sikRbcs*2 烟草 *qP* 值下降 26.39%,诱导型表达 *sikRbcs*2 烟草 *qP* 值下降 10.29%,由此说明,低温胁迫下,非转基因型烟草 QA-QB 的电子传递发生了较大程度的抑制,而转基因型烟草 QA-QB 的电子传递受到的抑制程度较小。

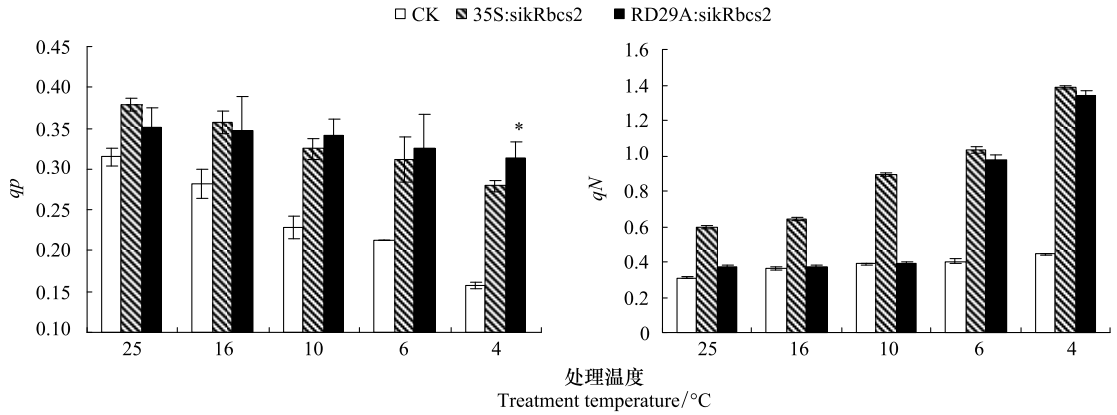

图 2　低温胁迫对 CK 型和 *sikRbcs*2 型烟草光化学猝灭系数和非光化学猝灭猝系数的影响

Fig. 2　Effect of low temperature stress on *qP* and *qN* in CK and *sikRbcs*2 tobacco

qP 为光化学猝灭系数(Photochemical quenching)、*qN* 为非光化学猝灭系数(Non- photochemical quenching);* 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到显著水平(P<0.05);** 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到极显著水平(P<0.01)

qN 为非光化学淬灭,反映了 PSⅡ天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递而是以热的形式耗散的部分,当 PSⅡ反应中心天线色素吸收了过量的光能时,如不能及时地耗散掉,将对光合机构造成失活或破坏,所以非光化学淬灭是植物体的一种自我保护机制,对光合机构起一定的保护作用[21]。由图 2 所示,随着低温胁迫程度的加剧,非转基因型烟草的 *qN* 基本没有变化,但转基因型烟草 *qN* 呈上升趋势,诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草在 16 ℃处理后有明显的上升趋势,说明转基因型烟草受到低温胁迫后能够以热的形式耗散过多的光能,对光合机构起到一定的保护作用,在低温胁迫下有更好的适应性和耐受性。

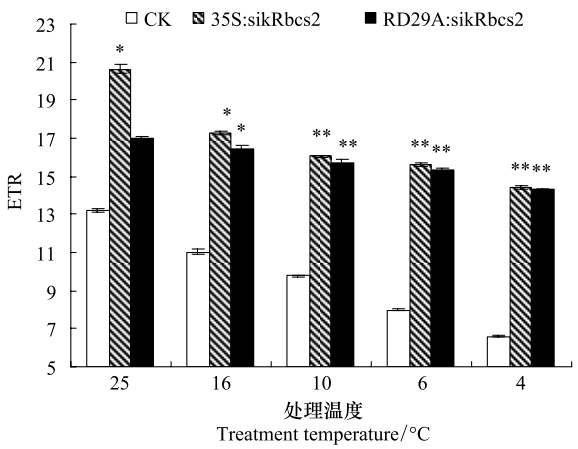

图 3　低温胁迫对 CK 型和 *sikRbcs*2 型烟草电子传递效率的影响

Fig. 3　Effect of low temperature stress on *ETR* in CK and *sikRbcs*2 tobacco

ETR 为电子传递效率(Rate of electronic transmission);* 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到显著水平(P<0.05);** 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到极显著水平(P<0.01)

2.1.3　低温胁迫对电子传递速率(*ETR*)的影响

ETR 为表观光合电子传递速率,是光合作用中光能转化最大效率的一种度量,可以反映光合机构机能的变化[3,22]。如图 3 所示,在低温胁迫后,非转基因型烟草的电子传递效率极显著低于转基因型烟草的 *ETR* 值(P<0.01)并且降幅较大。在正常生长条件下,组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草电子传递效率显著高于非转基因型烟草,16 ℃胁迫处理后转基因烟草的电子传递效率显著高于非转基因型烟草(P<0.05),随着胁迫温度的降低,转基因烟草的电子传递效率极显著高于非转基因型。在 4 ℃胁迫处理后,非转基因型烟草电子传递效率下降 50%,组

成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草电子传递效率下降 30%,诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草电子传递效率下降 16%,说明在低温胁迫期间,转基因型烟草与非转基因型烟草相比,一定程度上改善了低温胁迫对烟草叶片表观光合量子传递效率的抑制。

2.2 低温胁迫对叶绿体色素含量的影响

通过对转基因型和非转基因型烟草的植物学性状比较发现,转基因型烟草和非转基因型烟草有较大的区别(结果如表 1 所示)。如叶色,非转基因型烟草叶色呈绿色,组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草叶色呈浓绿色,诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草叶色呈深绿。其次叶片厚度有明显的差异,厚度依次为 35*s* :*sikRbcs*2 > *RD*29*A* :*sikRbcs*2>CK。由此推断转基因烟草叶片叶绿素含量可能高于非转基因型烟草,进一步对叶绿体色素含量进行测定,结果如图 4 所示,组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草在正常生长条件下和低温处理处理期间,叶绿素含量都显著高于非转基因型烟草,而诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草在在正常生长条件下低于非转基因型烟草,但随着胁迫程度的加剧,叶绿素含量缓慢上升,非转基因型烟草则呈下降趋势。叶绿素 *a*/*b* 的比值在 16℃胁迫后低于非转基因型烟草,随后缓慢上升。组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草在胁迫处理前后,叶绿素 a 和叶绿素 b 含量显著高于非转基因型烟草,而诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草与非转基因型烟草相比变化不显著,但随着胁迫温度的降低,其值有一定的波动。与叶绿素含量相似,类胡萝卜素(*Car*)含量的变化是转基因烟草随胁迫温度的降低有一个动态变化的过程,而非转基因型烟草呈下降趋势。

表 1 正常生长条件下(3 月龄) CK 型和 *sikRbcs*2 型烟草植物学性状

Tablel 1 Botanical traits of CK and *sikRbcs*2 In normal condition(3 months)

株系 Type	CK	35*S* :*sikRbcs*2	*RD*29*A* :*sikRbcs*2
叶形 Leaf type	卵圆形	橄榄形	卵圆形
叶面 Leaf surface	平	皱折	较平
叶缘 Leaf margin	较平	皱折	较平
叶色 Leaf color	绿	浓绿	深绿
叶片厚度 Leaf thickness	中	厚	较厚
最大叶片长/cm Length of maximum leaf	20.91	19.56	21.46
最大叶片宽/cm Width of maximum leaf	9.56	11.82	11.53
叶片数 Vane number	14	18	17

2.3 低温胁迫对光合特性的影响

由图 5 可知,低温对于烟草植物的净光合速率,气孔导度,蒸腾速率影响很大,不论是转基因烟草还是非转基因型烟草,在 16 ℃处理 72 小时后,净光合速率,气孔导度,蒸腾速率急剧下降,并在持续的低温处理期间,一直处于较低的水平。转基因烟草和非转基因型烟草胞间 CO_2浓度随着温度梯度的呈下降趋势,转基因烟草下降趋势趋缓,并在 16 ℃—4 ℃区间维持相对较高的水平。通常认为植物在受到逆境胁迫时,净光合速率的下降是由以下两种因素引起,一种是气孔因素,另一种是非气孔因素[23,24]。当净光合速率下降是由于气孔关闭导致细胞间隙 CO_2浓度降低从而降低了光合能力说明是由气孔因素引起的。当净光合速率和气孔导度下降的同时胞间 CO_2浓度却上升,即净光合速率的降低是由非气孔因素引起的。本试验结果表明在低温胁迫下非转基因型烟草和转基因型烟草的净光合速率下降主要是由气孔关闭引起的。

2.4 低温胁迫对生长发育及生物量的影响

2.4.1 低温胁迫对叶片生长指数、株高、直径的影响

如图 6 所示,在低温胁迫处理 12 天后,非转基因型烟草叶片生长指数 *PI* 基本不变,表明其生长基本停止,转基因型烟草叶片生长指数与处理前相比有一定的增加,其中组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 12.18% ,诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 10.55%。恢复处理 14 天后,非转基因型烟草 *PI* 值增加 9.1%,组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 36.81% ,诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 22.68%。由此可见,在低温胁迫解除后,转基因型烟草能够迅速恢复生长而非转基因型烟草恢复较慢。株高、直径是对温度十分敏感的主要农艺性状之一[25]。低温处理期间,非转基因型烟草的株高和直径基本不变,生长被抑制,转基因型烟草在低温处理后及恢复后株高和直径都高于非转基因型烟草,其中株高极极显著高于非转基因型烟草。

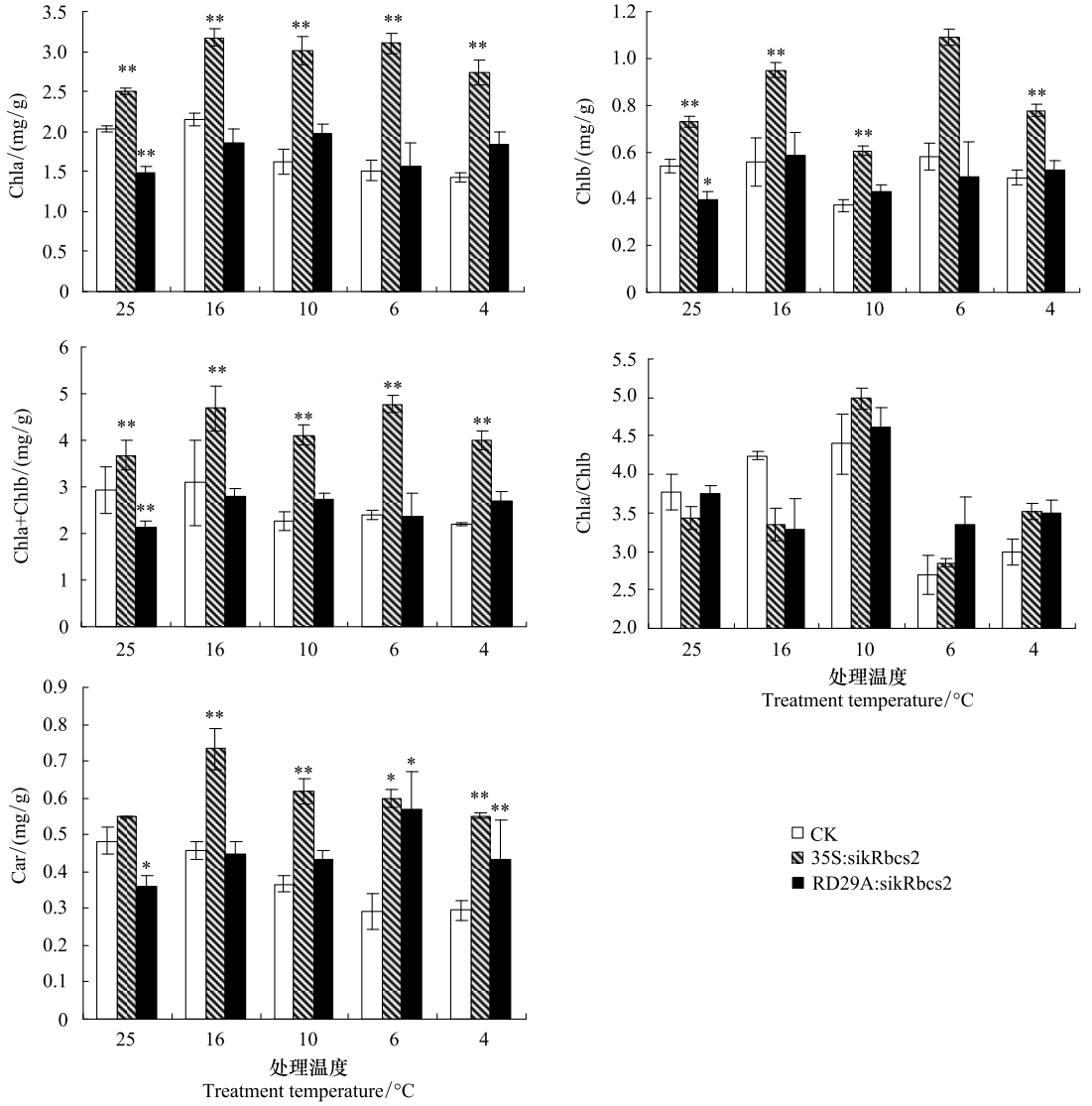

图 4　低温胁迫对 CK 型和 *sikRbcs*2 型烟草叶绿体色素含量的影响

Fig. 4　Effect of low temperature stress on the chlorophyll contents in CK and *sikRbcs*2 tobacco

Chl a 为叶绿素 a(Chlorophyll a)、Chl b 为叶绿素 b(Chlorophyll b)、Car 为类胡萝卜素(Carotenoids);* 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到显著水平(P<0.05);** 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到极显著水平(P<0.01)

2.4.2　低温胁迫对生长量的影响

低温处理对生长量的影响如表 2 所示,经持续低温处理后非转基因型烟草地上部分鲜重下降,而转基因型烟草地上部分鲜重有比较明显的增加,其中组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 74.49%,诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 19.53% 。恢复 14 天后转基因型烟草和非转基因型烟草生长量都呈增加趋势,其中组成型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 43.1%,诱导型表达 *sikRbcs*2 基因的烟草增加 55.5%,非转基因型烟草增加 22.55%。对于地下部分而言,转基因型烟草根系比较发达,经低温处理后均导致了非转基因型烟草和转基因型烟草鲜重的降低,在恢复处理后均有所升高。通过干重的比较可以发现,经低温处理后,非转基因型烟草的地上部分干重下降,而转基因型烟草地上部分干重有一定程度的增加,恢复 14 天后地上部分干重的增幅为 35*S*:*sikRbcs*2(50.26%)>*RD*29*A*:*sikRbcs*2(38.4%)>CK(26.88%)。低温处理后地下部分干重并未下降,在恢复过程中都有一定程度的升高,增幅变化为 *RD*29*A*:*sikRbcs*2(58.95%)> 35*S*:*sikRbcs*2(41.34%)>CK(32.14%)。

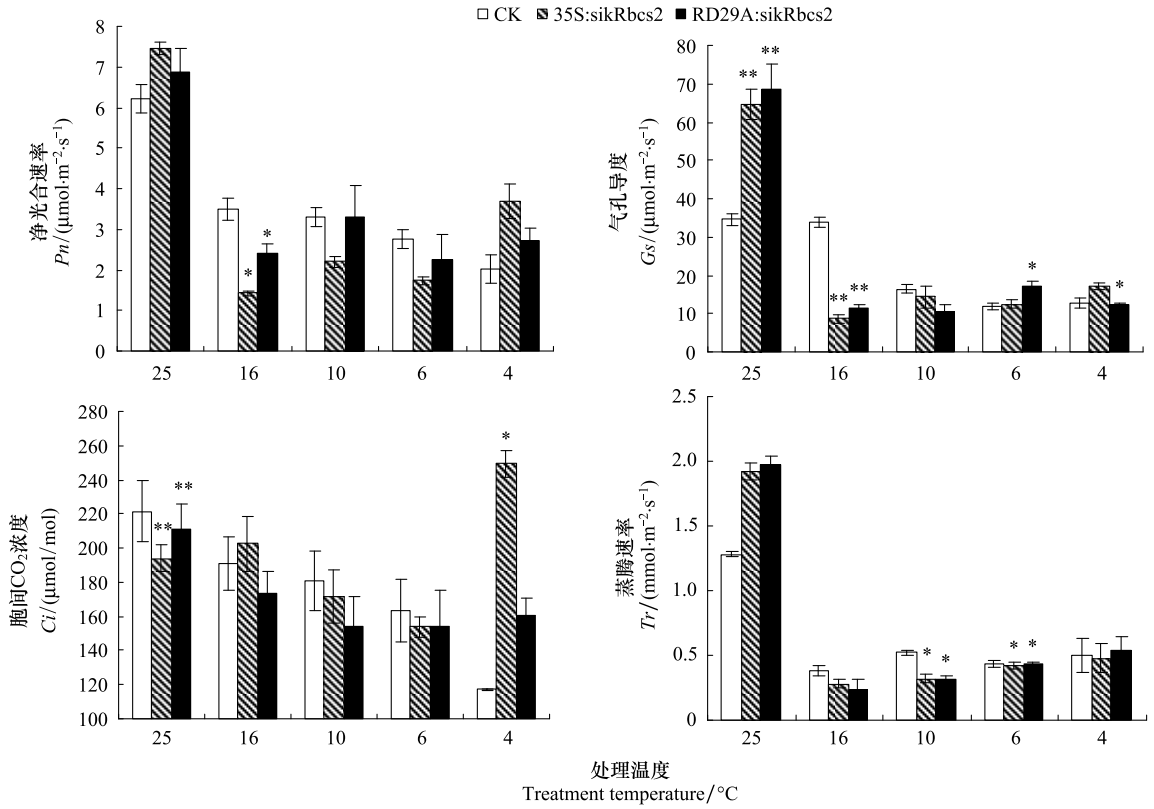

图 5 低温胁迫对 CK 型和 *sikRbcs2* 型烟草净光合速率(A)、气孔导度(B)、胞间 CO_2 浓度(C)蒸腾速率(D)的影响

Fig. 5 Effect of low temperature stress on *Pn*、*Gs*、*Ci*、and *Tr* in CK and *sikRbcs2* tobacco

Pn 为净光合速率(Net photosynthetic rate)、Gs 为气孔导度(Stomatal conductance)、Ci 为胞间 CO_2 浓度(Intercellular CO_2 concentration)、Tr 为蒸腾速率(Traspiration ratio);* 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs2* 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到显著水平($P<0.05$);** 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs2* 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到极显著水平($P<0.01$)

表 2 低温处理对 CK 型和 *sikRbcs2* 型烟草地上部、地下部生长量的影响

Table 2 Effect of low temperature stress on FW、DW of shoot and root in CK and *sikRbcs2* tobacco

	处理 Treatment		鲜重 Fresh weight(g/株)	干重 Dry weight(g/株)
地上部	处理前	CK	22.27±2.04	2.09±0.08
Shoot	Before treatment	35*S*:*sikRbcs2*	26.66±2.90	2.69±0.67
		RD29A:*sikRbcs2*	25.6±1.47	2.43±0.22
	处理后	CK	21.2±2.57	1.86±0.85
	After treatment	35*S*:*sikRbcs2*	46.52±2.79**	3.92±0.32**
		RD29A:*sikRbcs2*	30.6±2.31	2.5±0.38
	恢复后	CK	25.98±0.60	2.36±0.90
	After recovery	35*S*:*sikRbcs2*	66.57±2.49**	5.89±0.18**
		RD29A:*sikRbcs2*	47.46±2.17**	3.46±0.42
地上部	处理前	CK	1.71±0.76	0.24±0.04
Shoot	Before treatment	35*S*:*sikRbcs2*	5.6±1.20	0.86±0.16**
		RD29A:*sikRbcs2*	3.32±1.39	0.47±0.19**
	处理后	CK	1.45±0.27	0.28±0.06
	After treatment	35*S*:*sikRbcs2*	5.53±0.32**	1.04±0.12**
		RD29A:*sikRbcs2*	3.28±0.43**	0.56±0.17**
	恢复后	CK	2±0.81	0.37±0.13
	After recovery	35*S*:*sikRbcs2*	6.33±1.06**	1.47±0.17**
		RD29A:*sikRbcs2*	4.12±0.43*	0.89±0.05**

处理后指从 16—4 ℃持续低温 12 天后;恢复后指从低温处理后放置正常生条件下 14 天后;* 表示相同处理下 *sikRbcs2* 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到显著水平($P<0.05$);** 表示相同处理下 *sikRbcs2* 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到极显著水平($P<0.01$)

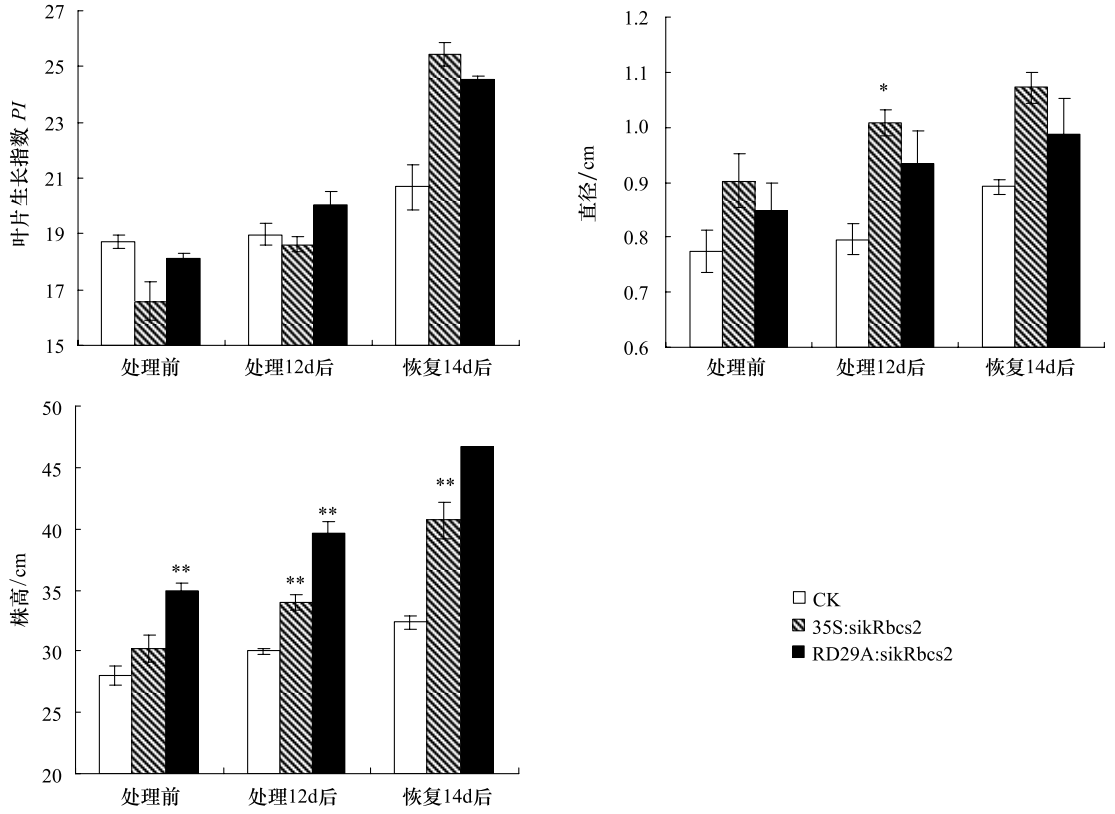

图 6　低温胁迫对 CK 型和 *sikRbcs*2 型烟草叶片生长指数、株高和直径的影响

Fig. 6　Effect of low temperature stress on *PI* 、shoot lenght and stem diameter in CK and *sikRbcs*2 tobacco

处理后指从持续低温 16 ℃—4 ℃的 12 天后;恢复后指从低温处理后放置正常生条件下 14 天后;* 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到显著水平(P<0.05);** 表示同一温度胁迫处理下 *sikRbcs*2 型烟草与 CK 型烟草相比差异达到极显著水平(P<0.01)

当前,对于 Rubisco 小亚基在抗逆方面尤其是光保护机制的研究几乎是空白。本研究发现,表达新疆雪莲 Rubisco 小亚基 *sikRbcs*2 基因的烟草,不仅对光合系统具有良好的低温光保护作用,而且能够使转基因植物在低温条件下具有良好的生长特性。在正常的生长条件下,转基因型烟草在形态上与非转基因型烟草表现出明显的区别。转基因型烟草叶色深,叶片厚,叶面皱折,长宽比减小,根系发达,生长快。这与高山植物叶绿体小而多,叶片厚,栅栏组织发达相类似。诱导型表达 *sikRbcs*2 基因烟草和组成型表达 *sikRbcs*2 烟草与非转基因型烟草相比表现出明显的高山植物光合机构特点的趋向性,这说明 *sikRbcs*2 基因对于植物生态适应性的表型发育可能具有一定调节作用。

植物在受到逆境胁迫时,叶绿体色素的含量和组成会发生相应的变化,能够反映植物光合能力的强弱[26]。转基因烟草在正常和低温胁条件下,叶绿素的含量显著高于非转基因型烟草,保持了较高的光能捕获能力。在低温胁迫条件下,转基因烟草的 PSII 最大光化学效率(Fv/Fm)显著高于非转基因型烟草,而且转基因型烟草的 qP 下降缓慢,电子传递效率 ETR 值也显著高于非转基因型烟草,说明转基因型烟草能够保持较高的光合电子传递效率,产生较多的同化力以满足暗反应过程的需求。生物量的测定也证明:在持续的低温胁迫条件下,转基因型烟草鲜重,干重都远高于非转基因型烟草。

值得一提的是转基因烟草的净光合速率对低温处理更敏感,虽然随着低温处理强度增加和时间的延长,转基因烟草的净光合速率有缓慢增高的趋势,但总体上净光合速率的水平与非转基因型烟草相差不大。那为什么非转基因型烟草在低温处理期间,净同化产物为负增长,而转基因植物却产生较多的净同化产物呢? 在光周期 12 h/12 h 处理期间,非转基因型烟草全天的呼吸消耗大于净光合速率,而转基因烟草植株一方面可能由于处理前期的生长量大,用于光合作用的叶面积较多,另一种方面转基因植物电子传递效率较好,产生的同

化力积累较多,可能在非光照条件下,能够重新利用呼吸作用产生的 CO_2用于暗反应中的碳同化。

较高的电子传递效率,能够产生更多的 ATP 和 NADPH,这对于低温条件生长的植物可能是重要的。非转基因型烟草在低温胁迫下,光化学猝灭系数 qN 处在一个较低的水平,*Fo* 上升,*Fv/Fm* 下降,有效电子传递效率 *ETR* 降低,表明 PSⅡ反应中心发生部分失活或伤害,降低了反应中心对激发能的捕获能力和光合电子由 PSⅡ反应中心向质体醌(QA,QB,PQ)库传递。而转基因烟草 *Chla/Chlb* 比值较高,而较高的叶绿素 *a/b* 也是高山植物对低温和强光辐射等多变环境的适应[18,19],*Chla/chlb* 比值的变化可以反映出两个光系统核心复合物与外周天线组分对低温的敏感性和损伤程度[27]。同时,转基因烟草还含有较高水平的类胡萝卜素,它与热能的耗散密切相关,能够帮助植物耗散过多的光能来抵御光造成的损伤[28]。这说明转基因烟草具有较好的光合保护力,在低温条件下维持较高的线性电子传递能力。

RD29A 的启动子具有冷诱导的特点,由它驱动的 *sikRbcs2* 基因在烟草中的表达,在低温条件下,表现出与组成型表达 *sikRbcs2* 基因烟草相似的 *Fv/Fm*、*ETR*、*qP*、*qN* 和净干物积累较多的光合特性,说明 *sikRbcs2* 基因在提高烟草植物的低温光合中起到了重要作用,这种作用是否是由于改变了 Rubisco 羧化酶/加氧酶特性还不清楚,需要进一步的研究确定。

参考文献(References):

[1] Zhou Y H, Huang L F, Zhang Y L, Shi K, Yu J Q, Nogués S. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H_2O_2 accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf gourd. Annals of Botany, 2007, 100(4): 839-848.

[2] 杨华庚, 林位夫. 低温胁迫对油棕幼苗光合作用及叶绿素荧光特性的影响. 中国农学通报, 2009, 25(24): 506-509.

[3] 陈世茹, 于林清, 易津, 乌日娜, 吉仁花, 刘曙娜. 低温胁迫对紫花苜蓿叶片叶绿素荧光特性的影响. 草地学报, 2011, 19(4): 596-600.

[4] Yordanov I, Velikova V. Photoinhibition of photosystem Ⅰ. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 2000, 26(1-2): 70-92.

[5] Hutchison R S, Groom Q, Ort D R. Differential effects of chilling induced photooxidation on the redox regulation of photosynthesis enzymes. Biochemistry, 2000, 39(22): 6679-6688.

[6] Suzuki Y, Ohkubo M, Hatakeyama H, Ohashi K, Yoshizawa R, Kojima S, Hayakawa T, Yamaya T, Mae T, Makino A. Increased rubisco content in transgenic rice transformed with the 'Sense' rbcS gene. Plant & Cell Physiology, 2007, 48(4): 626-637.

[7] Genkov T, Spreitzer R J. Highly conserved small subunit residues influence rubisco large subunit catalysis. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(44): 30105-30112.

[8] Suzuki Y, Nakabayashi K, Yoshizawa R, Mae T, Makino A. Differences in expression of the RBCS multigene family and rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. Plant & Cell Physiology, 2009, 50(10): 1851-1855.

[9] Spreitzer R J. Role of the small subunit in ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 414(2): 141-149.

[10] Du Y C, Hong S, Spreitzer R J. RbcS suppressor mutations improve the thermal stability and CO_2/O_2 specificity of rbcL-mutant ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(26): 14206-14211.

[11] Livingston A K, Kanazawa A, Cruz J A. Regulation of cyclic electron flow in C_3 plants: differential effects of limiting photosynthesis at ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Plant Cell & Environment, 2010, 33(11): 1779-1788.

[12] Mann CC. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis. Science, 1999,283: 314-316.

[13] Ramalho J C, Quartin V L, Leitão E, Campos P S, Carelli M L C, Fahl J L, Nunes M A. Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. Plant Biology, 2003, 5(6): 631-641.

[14] 宁慧霞, 努尔波拉提, 刘敏, 王卉, 康喜亮, 王晓军. 低海拔种植天山雪莲一年生植株的生物学特性. 植物研究, 2012, 32(6): 662-668.

[15] 马文广, 崔华威, 李永平, 郑昀晔, 韩瑞, 胡晋. 20 个烟草品种低温逆境下发芽和苗期生理生化特性的变化及耐寒性评价. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 232-238.

[16] 张宪政. 植物叶绿素含量的测定-丙酮乙醇混合液法. 辽宁农业科学, 1986, (3): 26-28.

[17] Coleman W K, Greyson R I. The growth and development of the leaf in tomato (*Lycopersicon esculentum*). I. The plastochron index, a suitable basis for description. Canadian Journal of Botany, 2011, 54(21): 2421-2428.

[18] Demming-Adams B, Winter K, Kruger A, Czygan F. Zeaxanthin synthesis, energy dissipation, and photoprotection of PSⅡ at chilling temperature. Plant Physiology, 1989, 90(3): 894-898.

[19] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991, 42: 313-349.

[20] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(345): 659-668.

[21] Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plant: A role for the xanthophylls zeaxanthin. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1990, 1020(1): 1-24.

[22] 李新国, 段伟, 孟庆伟, 邹琦. PSI 的低温光抑制. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 375-381.

[23] 胡春梅, 朱月林, 杨立飞, 陈淑芳. 黄月明. 低温条件下黄瓜嫁接株与自根株光合特性的比较. 西北植物学报, 2006, 26(2): 247-253.

[24] 刘建, 叶露, 周坚, 于敬修, 项东云. 夜间低温对 2 种桉树幼苗光合特性的影响. 西北植物学报, 2007, 27(10): 2024-2028.

[25] 王玉萍, 何文亮, 程李香, 叶佳, 李雅博, 安黎哲, 张峰. 不同海拔珠芽蓼叶片类囊体膜色素含量及光系统功能变化. 草业学报, 2011, 20(1): 75-81.

[26] 曾乃燕, 何军贤, 赵文, 梁厚果. 低温胁迫期间水稻光合膜色素与蛋白水平的变化. 西北植物学报, 2000, 20(1): 8-14.

[27] Hong X, Dmitrii V, Wim V. Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem Ⅱ complexes of cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(24): l4l68-14173.

[27] Hong X, Dmitrii V, Wim V. Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem Ⅱ complexes of cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(24): l4l68-14173.

[28] 李伟, 曹坤芳. 干旱胁迫对不同光环境下的三叶漆幼苗光合特性和叶绿素荧光参数的影响. 西北植物学报, 2006, 26(2): 266-275.