

# 小麦突变体返白系返白阶段叶绿素代谢的变化\*

王保莉 郭蔼光 汪沛洪

(西北农业大学植物分子遗传国家重点实验室, 陕西杨陵 712100)

**摘要** 小麦(*Triticum aestivum*)返白系在返白阶段 Chl、胡萝卜素(Caro)含量均下降,但 Caro/Chl 的比值大于对照,表明叶片白化不是因 Caro 减少引起的。Chl 下降的同时,Chl a 和 Chl b 均下降,表明该突变体属阶段性缺总 Chl 型。返白初期 Chlase 活性增高,返白中期活性下降,表明 Chl 降解不是造成叶片失绿的主要原因;Chl 合成中间物  $\delta$ -氨基酮戊酸(ALA)、胆色素原(PBG)积累,尿卟啉 III(Uro III)、原卟啉 IX(Proto IX)、镁-卟啉 IX(Mg-Proto IX)、原叶绿素酸 Pchl 减少,特别是 Uro III 在返白中期含量最低,复绿初期却急剧积累,表明叶绿素合成受阻于尿卟啉原 III(Urogen III)的形成上。

**关键词** 返白阶段;返白系;叶绿素代谢;合成受阻

## CHANGES OF CHLOROPHYLL METABOLISM DURING THE ALBINIC STAGE OF A WHEAT MUTANT

Wang Bao-li, Guo Ai-guang and Wang Pei-hong

(State Key Laboratory of plant Molecular Genetics, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** Changes of chlorophyll metabolism during the albinic stage including both degreening and regreening processes were studied. The results indicated that an decrease of Caro content was not the cause of mutant degreening and that the mutant belonged to the total Chl-deficient type. The changes of Chlase activity level indicated that Chl breakdown was not the main factor which led to degreen of the mutant. A greater changes of content of intermediates of Chl biosynthesis during the albinic period  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) and porphobilinogen (PBG) were accumulated, but uroporphyrin III (Uro III), protoporphyrin IX (Proto IX), Mg-protoporphyrin IX (Mg-Proto IX) and protochlorophyll (ide) (Pchl (lide)) were decreased. Specially during the degreening process Uro III was gradually decreased, but an initiation of regreening, the Uro III was markedly accumulated. It was proved that there was a blockage in Chl biosynthesis in the mutant, which could be somewhere in the formation of uroporphyrinogen III (Urogen III).

**Key words** Albinic stage; "Stage albinism line winter wheat" mutant; Chl metabolism; Biosynthesis block

小麦返白系是矮变 1 号的一个突变株。返白特性受细胞质基因控制,受低温诱导,而温度升高可使白化逆转<sup>[1]</sup>。返白过程中蛋白质组分变化不大,但合成速率及色素蛋白复合

收稿日期:1994-11-23 接受日期:1995-03-03

Pchl. 原叶绿素酸(酯); Chlase. 叶绿素酶; Caro. 类胡萝卜素; ALA.  $\delta$ -氨基酮戊酸; PBG. 胆色素原; Uro III. 尿卟啉 III; Urogen III. 尿卟啉原 III; Proto IX. 原卟啉 IX; Mg-proto IX. 镁-卟啉 IX

\* 国家自然科学基金资助项目。

体形成与叶绿素有关。返白过程中叶绿素代谢异常<sup>[2]</sup>,但导致异常的原因尚不清楚。为此,本实验以返白系及其原始品种“矮变 1 号”为材料,对返白阶段叶绿素降解水平和叶绿素生物合成中间物含量的积累进行了系统分析,以探讨造成叶绿素代谢异常的原因。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 材 料

小麦(*Triticum aestivum*)返白系及其原始品种“矮变 1 号”于 10 月上旬播于西北农业大学试验小区,翌年 2 月根据返白系叶色变化采取未完全展开的顶端第一叶基部 3~4 cm 切段,采样后立刻进行各项指标测定。重复 3 次。结果以平均值表示。

### 1.2 Chl、Chl a、Chl b 和 Pchl 测定

用 Anderson 方法<sup>[3]</sup>、UVIKON810 型分光光度计,含量以  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  鲜重表示。

### 1.3 Caro 总量的测定

采用波钦诺克方法<sup>[4]</sup>,含量以  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  鲜重表示。

### 1.4 Chlase 活性分析

采用外源基质法。以菠菜叶绿素为底物,用 Margret<sup>[5]</sup>方法测酶活性,活性用  $\text{mg Chl} \cdot \text{L}^{-1} \cdot (3 \text{ h})^{-1}$  表示。

### 1.5 ALA 和 PBG 测定

以 4% TCA 研磨提取,NaAc 缓冲液调 pH 至 4.6 后,按照 Richard 方法<sup>[6]</sup>,并以 ALA 盐酸盐(Sigma 公司)为标样,含量以  $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  鲜重计。

### 1.6 卟啉含量测定

Uro III 采用 Bogorad 方法<sup>[7]</sup>,Proto IX 和 Mg-proto IX 分别采用 Rebeiz<sup>[8]</sup>和 Lee<sup>[9]</sup>方法,并加以改进。叶片用丙酮-0.1 mol/L  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (9:1) 暗中研磨提取后,分别用等体积、1/3 体积正己烷萃取丙酮液。将己烷提取后的丙酮液于日立 850 型荧光分光光度计上测定( $E_{400}F_{633}$ )、( $E_{400}F_{622}$ )、( $E_{440}F_{640}$ ) 荧光强度,依据公式计算 Proto IX 的相对荧光强度,并以( $E_{440}F_{595}$ )表示 Mg-Proto IX 相对含量。其中( $E_{400}F_{633}$ )表示在 400 nm 激发光下的 633 nm 处的发射光荧光强度,其它类推。

### 1.7 Urogen III 合成活力测定

采用 Elena 方法<sup>[10]</sup>,并以 ALA(Sigma 公司)代替 PBG 作为反应底物,活力用  $\text{ALA nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{鲜重} \cdot (5 \text{ h})^{-1}$  表示。

## 2 结 果 和 分 析

### 2.1 返白过程中叶片 Chl 和 Caro 含量变化

小麦返白系在返白过程中随叶片白化,Chl 和 Caro 含量均下降,但下降的幅度不同,从 Caro/Chl 值变化可以看出(表 1):返白系从 0.109 增至 5.320,而对照则保持在 0.116~0.287 之间,随叶片复绿,Caro 和 Chl 均上升,其比值也接近于对照。返白系在返白阶段 Chl 和 Caro 含量均降低,叶片的白化主要是因为 Chl 的降低引起的。

### 2.2 返白过程中叶片 Chl 组成的变化

返白阶段返白系和“矮变 1 号”叶片的 Chl a 和 Chl b 变化列于表 2。随着返白程度加深,返白系 Chl a 和 Chl b 均下降,至叶片完全变白时(返白中期,2 月 27 日)达最低值;随

着叶片复绿,其含量回升至对照水平;返白中期 Chl a/Chl b 比值降低,表明 Chl a 和 Chl b 在代谢速率上存在一定的差异。

表 1 返白过程中返白系和矮变叶绿素和胡萝卜素含量变化 (mg/L FW)  
Table 1 Changes of Chl and Caro content of the mutant and albian during the albinic period (mg/g FW)

品种 Species	色素 Pigment	日期 Date (date/month) <sup>1)</sup>				
		1/2	10/2	27/2	10/3	25/3
矮变 Aibian	叶绿素 Chl	1.090±0.190	1.320±0.140	1.440±0.030	2.100±0.020	1.170±0.060
	胡萝卜素 Caro	0.222±0.022	0.305±0.041	0.415±0.011	0.485±0.015	0.289±0.007
	胡萝卜素/叶绿素 Caro/Chl	0.116±0.011	0.233±0.039	0.287±0.003	0.231±0.005	0.246±0.005
返白系 Mutant	叶绿素 Chl	1.970±0.020	0.203±0.001	0.014±0.001	0.796±0.028	1.260±0.070
	胡萝卜素 Caro	0.215±0.022	0.104±0.046	0.074±0.037	0.474±0.013	0.352±0.026
	胡萝卜素/叶绿素 Caro/Chl	0.109±0.011	0.621±0.114	5.320±2.020	0.534±0.063	0.282±0.035

1) 1/2. 返白前期; 10/2. 返白初期; 27/2. 返白中期; 10/3. 复绿初期; 25/3. 复绿后期。

1) 1/2. Before albinism; 10/2. Primary stage of albinism; 27/2. Middle of albinism; 10/3. Initiation of regreening; 25/3. After regreening.

表 2 返白过程中返白系和矮变叶绿素 a 和 b 含量变化 (mg/g FW)  
Table 2 Changes of Chl a and b content of the mutant and albian during the albinic period (mg/g FW)

品种 Species	色素 Pigment	日期 Date (date/month)				
		1/2	10/2	27/2	10/3	25/3
矮变 Aibian	叶绿素 a Chl a	1.360±0.040	0.956±0.072	1.130±0.010	1.530±0.020	0.862±0.032
	叶绿素 b Chl b	0.548±0.014	0.360±0.018	0.388±0.001	0.567±0.004	0.311±0.023
	叶绿素 a/b Chl a/b	2.49±0.08	2.65±0.22	2.92±0.01	2.70±0.01	2.77±0.10
返白系 Mutant	叶绿素 a Chl a	1.400±0.010	0.144±0.001	0.067±0.008	0.579±0.015	0.981±0.015
	叶绿素 b Chl b	0.567±0.008	0.059±0.003	0.049±0.006	0.216±0.010	0.368±0.006
	叶绿素 a/b Chl a/b	2.47±0.03	2.45±0.01	1.35±0.01	2.68±0.05	2.66±0.09

### 2.3 返白过程中叶片 Chlase 活性变化

返白过程中叶色的变化与叶绿素代谢有直接关系。导致叶片 Chl 缺少的原因不外是 Chl 降解加快和合成受阻两方面。为此,对 Chlase 活性进行系统分析,以了解 Chl 降解水平。如图 1 所示,与对照相比,返白初期(2月10日)Chlase 活性很高,为同期对照的 1.49 倍,并达整个返白阶段的最高水平,最白期(2月27日)其活性却下降。这种活性水平的变化表明 Chlase 对叶片 Chl 的水解作用主要表现在返白初期;返白中期 Chlase 活性反而降低,据此分析 Chl 的降解不是导致叶片返白、Chl 含量降低的主要原因。

### 2.4 返白过程中返白系 Chl a 生物合成中间物含量变化

2.4.1 ALA、PBG 和 Pchl 含量变化 返白过程中,返白系 ALA、PBG 及 Pchl 含量变化分别如图 2~4 所示。返白系 ALA、PBG 变化与 Chl 呈负相关,而 Pchl 与 Chl 呈正相关,即叶片白化程度越高,Chl 越低,ALA 和 PBG 相对积累越高,Pchl 积累越低;在完全白化的叶片中(2月27日),ALA 和 PBG 分别为对照的 1.58 倍和 1.12 倍,Pchl 仅为对照的 22%;随着叶片复绿,ALA、PBG 和 Pchl 均恢复至对照水平。Chl 合成中间产物 ALA、

PBG 的积累说明在返白阶段返白系叶绿素生物合成在 ALA 和 PBG 形成之后的某部位受阻。

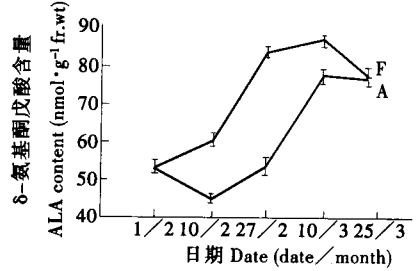
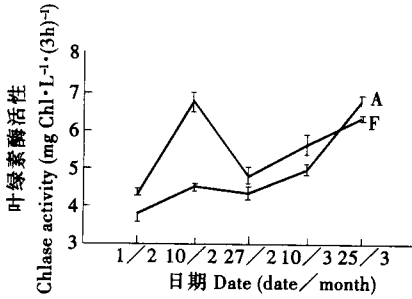


图 1 返白过程中返白系(F)和矮变(A)Chlase 活性变化  
Fig. 1 Changes of Chlase activity of the mutant (F) and aibian (A) during the albinic period

图 2 返白过程中返白系(F)和矮变(A)ALA 含量变化  
Fig. 2 Changes of δ-aminolevulinic acid (ALA) content of mutant(F) and aibian(A) during the albinic period

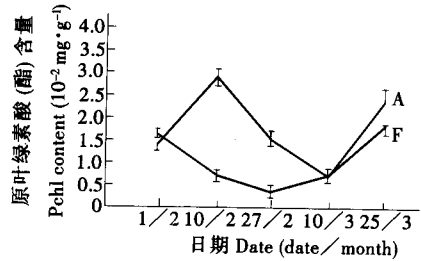
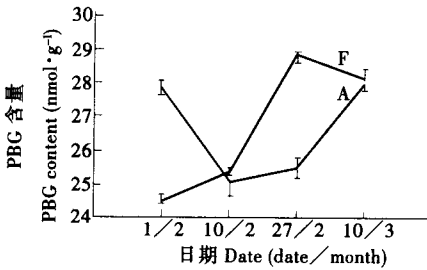
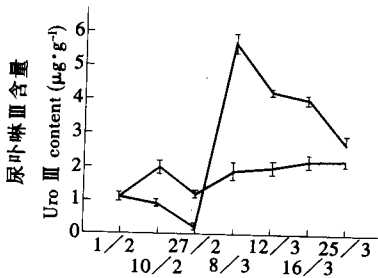


图 3 返白过程中返白系(F)和矮变(A)PBG 含量变化  
Fig. 3 Changes of porphobilinogen (PBG) content of mutant (F) and aibian (A) during the albinic period

图 4 返白过程中返白系(F)和矮变(A)Pchl 含量变化  
Fig. 4 Changes of protochlorophyll (ide) (Pchl) content of mutant (F) and aibian (A) during the albinic period



2.4.2 卟啉类物质含量变化 返白过程中返白系叶片 Uro III、Proto IX、Mg-Proto IX 含量变化分别如图 5~7 所示。由图可见:随着叶片返白,卟啉类物质含量均减少,叶片最白期(2月27日)达最低值;随着叶片复绿,其含量又都恢复至对照水平。值得注意的是尿卟啉含量的变化:返白中期(2月27日最白时期)含量达最低值,为对照的 15.3%,但在初复绿时(3月8日)其含量急剧增加,为对照的 3.09 倍,随着叶片复绿,其含量接近对照水平。

图 5 返白过程中返白系(F)和矮变(A) Uro III 含量变化  
8/3. 微复绿期; 12/3. 复绿中前期; 16/3. 复绿中后期; 25/3. 完全复绿期  
Fig. 5 Changes of uroporphyrin III (Uro III) content of mutant (F) and aibian (A) during the albinic period  
8/3. Slightly regreening; 12/3. Early middle regreening; 16/3. Late middle-regreening; 25/3. Complete regreening

### 2.5 返白过程中返白系 Urogen III 合成活性变化

以上实验表明：返白过程中返白系叶片中 Uro III 等卟啉类物质含量降低，造成这种现象的因素可能有多种，而催化 Urogen III 合成的酶类活性变化是其中的主要因素。返白阶段叶片中 Urogen III 合成活性的变化如图 8 所示。与对照相比，返白系在返白叶中的 Urogen III 合成能力减弱，为对照的 76.9%，随着叶片复绿，合成活性增加，至完全复绿时，合成活性超过了对照水平。

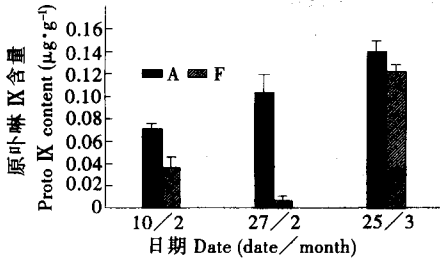


图 6 返白过程中返白系(F)和矮变(A) Proto IX 含量变化

Fig. 6 Changes of proporphyrinogen IX (Proto IX) of the mutant (F) and aibian (A) during the albinic period

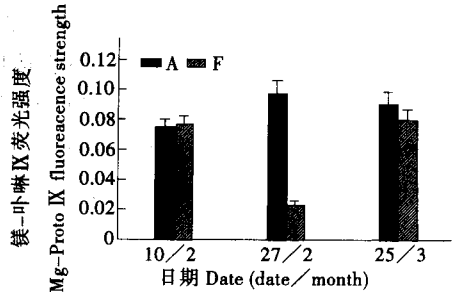


图 7 返白过程中返白系(F)和矮变(A) Mg-Proto IX 含量变化

Fig. 7 Changes of Mg-protophyrin IX (Mg-Proto IX) of the mutant (F) and aibian (A) during the albinic period

## 3 讨 论

Caro 在光合组织中有两个重要作用。首先，作为辅助捕光色素有效地扩大了吸收光的范围，其次是能够消除叶绿体中的自由基氧，保护叶绿素分子免遭光氧化的破坏<sup>[11]</sup>。Koskit 和 Smith<sup>[12]</sup>研究的玉米突变体 W-3 为典型的 Caro 合成受阻、Chl 光氧化大于合成的色素缺失型突变体。小麦返白系在返白阶段 Caro 含量随 Chl 下降而降低，而 Caro/Chl 值始终大于对照(表 1)，表明 Caro 的降低不是造成叶片返白的原因。

目前已发现的色素突变体大多数为缺总 Chl 型或缺 Chl b 型<sup>[13]</sup>。返白系在返白阶段总 Chl 下降，Chl a 和 Chl b 均减少，表明该突变体属于阶段性缺总 Chl 型的，导致叶片返白的原因是 Chl 代谢异常。

Chl 缺失可由合成受阻和降解加速引起。本实验对返白系在返白阶段 Chlase 活性变化的分析表明：返白初期(2 月 10 日)Chlase 活性增加(图 1)，其原因可能在于：此时的返白主要发生于冬前已开始发育的幼叶基部，此幼叶尚有冬前合成的色素存在。翌年春，随返白的出现 Chl 含量减少导致叶绿体发育不完善<sup>[14]</sup>，使色素以游离状态存在，这是引起 Chlase 活性增高的主要原因；而返白中期(最白期 2 月 27 日)Chlase 活性反而降低，相对活性(112%)与返白前的绿叶相近(110%)。从 Chlase 活性变化，特别是返白中期活性的

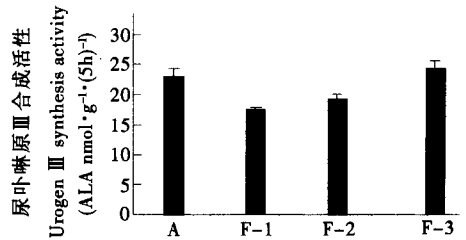


图 8 返白系叶片 Urogen III 合成活性变化  
A. 矮变；F-1. 返白系全白叶；F-2. 返白系初复绿叶；F-3. 返白系完全复绿叶

Fig. 8 Changes of Urogen III synthetic activity of the mutant

A. Aibian; F-1. White leaves of the mutant; F-2. Primary regreening leaves of the mutant; F-3. Complete regreening leaves of the mutant

降低,说明 Chl 降解不是造成叶绿素代谢异常的主要原因。

高等植物 Chl a 的生物合成依下列途径进行:Glu→ALA→PBG→Urogen Ⅲ→Coprogen Ⅲ→Proto Ⅹ→Mg-Proto Ⅹ→Pchl(lide)→Chl a<sup>[15]</sup>。通过对返白系返白阶段 Chl a 生物合成中间物含量分析表明:ALA 和 PBG 明显积累(图 2、3),返白中期时积累最多。Pchl 积累减少(图 4),与 Chl 变化相一致。卟啉类物质的含量均减少(图 5~7),返白中期达最低值,特别是 Uro Ⅲ,在最白期(2月27日)仅为对照的 14.5%,复绿初期(3月8日)含量迅速增加,达对照的 3.09 倍,随着叶片复绿其含量接近于对照水平。这是因为叶绿素的合成从 Mg-卟啉及以后的反应均在类囊体膜上进行<sup>[16]</sup>,与叶绿体发育有关。返白系在返白中期叶绿体片层缺乏<sup>[15]</sup>,复绿初期叶绿体膜层系统也尚未恢复正常,导致 Mg-Proto 及以后的一系列中间物的合成能力减弱,使 Uro Ⅲ 大量积累;随着叶片复绿,叶绿体恢复正常,Chl 合成正常,Uro Ⅲ 积累减少,达到对照水平。这种积累变化证实 Chl 合成受阻位点是在 Urogen Ⅲ 的形成上。从返白过程中返白系叶片 Caro 和 Chl 含量变化、Chlase 活性变化、Chl 合成中间产物 ALA、PBG、Uro Ⅲ、Proto Ⅹ 和 Mg-Proto Ⅹ 含量变化表明返白系叶片返白的原因是叶绿素合成受阻,而受阻的位点是在 PBG→Urogen Ⅲ 部位。

PBG 脱氨酶和 Urogen Ⅲ 同合酶是催化 Urogen Ⅲ 形成的酶。返白过程中 Uro Ⅲ 含量减少,同时 Urogen Ⅲ 合成活性也降低(图 8)。而 Uro Ⅲ 降低是否由于 PBG 脱氨酶或 Urogen Ⅲ 同合酶活性降低引起还有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 郭嵩光,王振镛,汪沛洪等.小麦返白系的白化特征及其与环境因素的关系.西北植物学报.1991.11(5):112~117
- 2 苏小静,汪沛洪,陈毓荃.小麦突变体返白系返白机理研究Ⅰ.返白阶段叶绿素代谢变化研究.西北农业大学学报.1990.18(3):80~84
- 3 Anderson J M, Boardman N K. Studies on the greening of dark-grown bean plants. *Aust J Biol Sci*. 1964. 17: 93~101
- 4 波钦诺克 H X 著.荆家海,丁钟荣译.植物生物化学分析方法.北京:科学出版社.1981. 247~249
- 5 Margaret H. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. *Biochem J*. 1961. 78: 359
- 6 Richard A T. Biochemical Spectroscopy. Vol. 1. London: Adam Hilger Ltd. 1975. 327~330
- 7 Bogorad L. Porphyrin synthesis. In: Colowick S P, Kaplan N O eds. Methods in Enzymology 5. New York: Academic Press. 1962. 885~891
- 8 Rebeiz C A, Mattheis J R, Smith B B *et al*. Chloroplast biogenesis biosynthesis and accumulation of protochlorophyll by isolated etioplasts and developing chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*. 1975. 171: 549~567
- 9 Leo H J, Mark D B, Rebeiz C A *et al*. Chloroplast biogenesis 65 enzymic conversion of protoporphyrin Ⅹ to Mg-protoporphyrin Ⅹ in a subplastidic membrane fraction of cucumber etioplasts. *Plant Physiol*. 1992. 99: 1134~1140
- 10 Lambias E B C, Battle A M del C. Studies on the porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen cosynthetase system of cultured soybean cells. *Biochem J*. 1971. 121: 327~340
- 11 Andrew J Y. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol Plant*. 1991. 83: 702~708
- 12 Koski V M, Smith J H C. Chlorophyll formation in a mutant, white seedling-3. *Arch Biochem Biophys*. 1951. 34: 189~193
- 13 Sommerville L R. Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae. *Ann Rev Plant Physiol*. 1986. 37: 467~507
- 14 苏小静,汪沛洪.小麦突变体返白系返白机理研究Ⅰ.返白阶段叶绿体超微结构的观察.西北农业大学学报.1990.18(2):73~76
- 15 石田政弘,植田胜已,远山益著.黄宗甄译.光合作用器官的细胞生物学.北京:科学出版社.1986. 250~257
- 16 Smith B B, Rebeiz C A. Chloroplast biogenesis XXIV. Intrachloroplastic localization of the biosynthesis monoester, and accumulation of protoporphyrin Ⅹ, magnesium-protoporphyrin and longer wavelength metalloporphyrins monoester, and longer wavelength metalloporphyrins during greening. *Plant Physiol*. 1979. 63: 227~231