

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.03.029

水稻 STN7 激酶突变体的光合生理特性分析

王秋莹, 李 雪, 杜林方

(四川大学生命科学学院, 成都 610065)

摘 要: 本实验旨在研究野生型与 *stn7* 突变体在光合性能上的差异. 实验包括检测种子萌发状况、用脉冲幅度调制成像荧光计 IMAG-MINI 测量叶绿素含量、用 SPAD-502 叶绿素仪测量 SPAD 值以及用 LI-6400XT 便携式光合仪测量叶绿素荧光动力学参数并用 photosynthesis 软件拟合光响应曲线及相关参数. 结果显示, WT 和 *stn7* 植株的种子萌发情况和 SPAD 值几乎无差异, 叶绿素荧光动力学参数显示 WT 的光合性能比 *stn7* 植株高, 叶绿素 a/b 和光响应曲线的结果得出 WT 利用弱光的能力较强, 光响应曲线结果还显示高光强下, *stn7* 植株光合速率较高. 本文研究发现 STN7 激酶在调节水稻的光合作用中发挥着重要作用.

关键词: STN7 激酶; 种子萌发; 光响应曲线; 叶绿素含量; SPAD 值

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)03-0558-05

Analysis of photosynthetic physiological characteristics of loss-of-function of STN7 in rice (*Oryza sativa*)

WANG Qiu-Ying, LI Xue, DU Lin-Fang

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In this experiment, it was designed to investigate the differences in photosynthetic performance between wild-type (WT) and *stn7* mutant. The seed germination rate of two rice was detected. Besides, chlorophyll content was measured by pulse amplitude modulation imaging fluorometer IMAG-MINI, SPAD-502 chlorophyll meter was used to measured the SPAD value of plants in the seedling stage, and the light response curve of the plants at jointing-booting stage under natural growth was measured by the LI-6400XT portable photosynthesis system. The results showed that there was almost no difference in seed germination and SPAD value between WT and *stn7*. The result of chlorophyll fluorescence parameters indicates that the photosynthetic performance of WT is better than *stn7*. The result of chlorophyll a/b value and light response curve reveals the ability to use low light in WT is stronger. And the result of the light response curve shows that the photosynthetic rate of *stn7* is higher than WT in high light. These results attest that the STN7 kinase is important for the photosynthesis of rice.

Keywords: STN7 kinase; Seed germination; Light response curve; Chlorophyll content; SPAD value

1 引 言

随着上个世纪七十年代类囊体膜蛋白磷酸化

现象被 Bennett^[1,2] 发现, 人们开始探索催化其发生磷酸化的激酶及其作用位点. STN7 激酶^[3-5] 和 STN8 激酶是目前研究最多的一种位于类囊体膜

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(30870181), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2015CB150102)

作者简介: 王秋莹(1993-), 女, 硕士, 河南驻马店人, 主要从事植物光合作用研究. E-mail: 247088457@qq.com

通讯作者: 杜林方. E-mail: dulinfang@scu.edu.cn

上的激酶.关于磷酸化位点的研究发现,它们的作用位点都是苏氨酸残基^[6-8],这证实了类囊体膜蛋白激酶是严格的苏氨酸蛋白激酶.目前对于 STN7 的功能以及调控机制的研究表明,STN7 主要参与催化 LHC II^[8],磷酸化的 LHC II 会离开 PS II 结合至 PS I,此时称为状态 2, LHC II 连接在 PS II 上时被称为状态 1,因此 STN7 对于状态转换必不可少^[9-11].也有报道成在缺乏 STN7 的突变体中,CP29 也不能发生磷酸化^[12,13],这意味着 STN7 也负责催化 CP29 的磷酸化.而最新的研究报道 STN8 对于高光强下的 CP29 的磷酸化是必不可少的^[14].因此,作用于 CP29 的激酶具体是哪一个或者两者都有也有待考证.

本研究着重比较 STN7 激酶缺失的突变体水稻与野生型水稻植株在生理参数上的差异.选用稳定遗传的野生型日本晴水稻和 *stn7* 基因突变的日本晴水稻 F₂ 代为材料,对比研究其种子萌发情况、幼苗期叶绿素含量及叶绿素荧光动力学参数和孕穗期的光强-光响应曲线,为全面研究 STN7 激酶的功能提供一定依据.

2 材料与方法

2.1 实验材料

野生型和 *stn7* 突变体均为日本晴水稻(*Oryza sativa*)T₂ 代.

2.2 实验方法

2.2.1 种子发芽率的检测 野生型和 *stn7* 突变体水稻各选 100 颗颗粒饱满的种子用 0.1% (W/V) 次氯酸钠溶液消毒并用双蒸水清洗后浸泡在双蒸水中,于 37℃ 恒温箱中催芽.每隔 1 d 观察种子发芽情况,以芽长达到种子长度一般为发芽标准,记录下发芽种子数^[15].计算出每种水稻种子的发芽率、发芽势以及种子活力指数.种子发芽率=8d 内发芽种子数/供试种子数.种子发芽势=4d 内发芽种子数/供试种子数.种子发芽指数 $G_i = \sum(G_t/D_t)$.种子活力指数 $VI = S \times G_i$.式中, G_t 为 t d 的发芽数, D_t 为发芽日数,S 为胚根到胚轴的总长(cm).

2.2.2 叶片叶绿素的提取及含量测定 叶绿素的提取方法参照邱念伟等人^[16]的方法稍作改动.称取新鲜的幼苗期的 WT 和 *stn7* 水稻叶片 0.1g 剪碎置于研钵中,加入少量 80% 丙酮,少许碳酸钙和石英砂,研磨成匀浆.再加入适量 80% 丙酮将匀浆转入离心管,并用 80% 丙酮洗涤研钵和钵棒,洗涤液一起转入离心管,用 80% 丙酮定容至 10 mL,静

置萃取 3~5min.以 80% 丙酮作对照,用可见分光光度计测量萃取液在 645nm 和 663nm 处的吸光值.叶绿素的计算公式如下:叶绿素 a (Chla) (mg/mL) = $(12.7 \times A_{663} - 2.59 \times A_{645}) / V_s$; 叶绿素 b (Chlb) (mg/mL) = $(22.9 \times A_{645} - 4.67 A_{663}) / V_s$; 叶绿素浓度 (Chla+b) (mg/mL) = $(20.2 \times A_{645} - 8.02 A_{663}) / V_s$. V_s 为提取液总体积.每种水稻重复三次提取测量,求平均值.

2.2.3 叶片 SPAD 值的测量 随机选取幼苗期的野生型和 *stn7* 水稻各三株,每株随机选取一个叶片,用 SPAD-502 叶绿素含量测定仪自上而下测量三个点,记录下测量的 SPAD 值,求平均值.

2.2.4 叶绿素荧光动力学参数的测定 随机选取幼苗期的野生型和 *stn7* 突变体水稻各三株,用 Image-PAM2100 荧光成像仪测量其初始荧光 (F_0), PSII 的最大光能转化效率 (F_v/F_m), 光下实际光化学效率 (Φ_{PSII}) 和光化学淬灭系数 (qP), 并计算平均值. F_v/F_m 值在植株暗适应 20 min 后测得.其中, $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$; $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$; $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0)$.

2.2.5 光响应曲线的测定 参照吕典华、宗学风等人^[17]的方法,在天气晴朗的上午,随机选取孕穗期的野生型和 *stn7* 突变体水稻各三株,用 LI-6400XT 便携式光合作用仪测量其光响应曲线.测得数据由 photosynthesis 软件 (美国 LI-COR 公司) 模拟光补偿点 (LCP)、光饱和点 (LSP)、暗呼吸速率 (Rd)、表观量子效率 (AQE) 和最大净光合速率 (A_{max}).

光响应曲线的测量使用仪器自带的红蓝光源, CO₂ 浓度恒定设为 400 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 温度设为 30 °C, 湿度为空气湿度, 光照强度从 0~1200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 设置 10 个点 (0、50、100、200、300、400、600、800、1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

2.2.6 数据处理及分析 基础数据用 Excel 2013 进行处理, 显著性分析采用 SPSS 13.0 软件, 相关绘图用 Origin 8.0 绘制.

3 结果与分析

3.1 水稻 *stn7* 突变体种子萌发情况

由表 1 两种水稻种子的萌发情况来看, 与 WT 相比, *stn7* 种子的发芽率、发芽势和发芽指数略低, 无明显差异, 但是活力指数显著低于 WT. 由此可以看出, 水稻里 STN7 激酶的缺失虽然会使种子萌发情况略次于野生型, 尤其是种子活力指数显著下降, 但是整体来看, 对种子萌发无较大影响.

表 1 WT 和 *stn7* 的种子萌发情况Tab. 1 Seed germination of WT and *stn7*

材料	发芽率	发芽势	发芽指数	活力指数
WT	1.00	1.00	25	155 ^a
<i>stn7</i>	0.98	0.98	24.5	142 ^b

Different lowercase letters indicate significant difference between WT and *stn7* mutant at $\alpha = 0.05$.

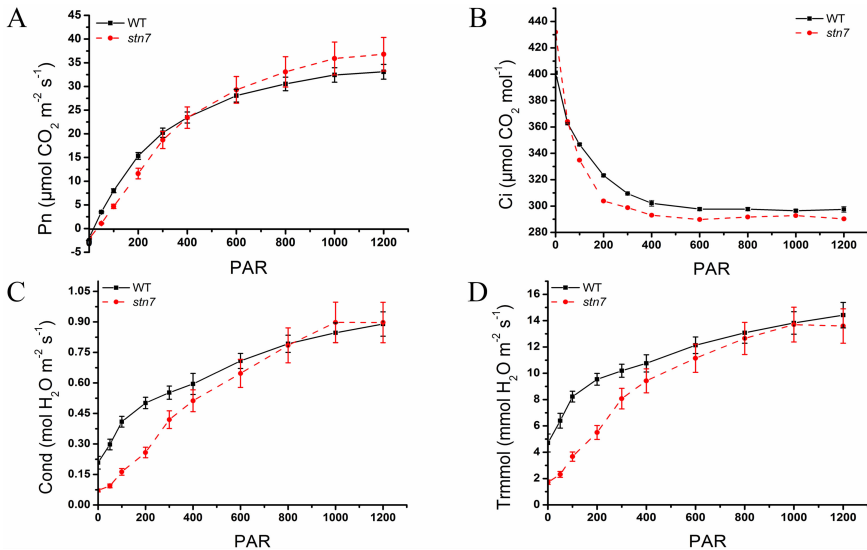
3.2 水稻 *stn7* 突变体的叶绿素含量、SPAD 值和叶绿素荧光参数

由于 *stn7* 水稻叶片在表型上看与 WT 并无差异,因此测量其叶片叶绿素含量、SPAD 值和叶绿素荧光动力学参数,结果见表 2. 由表 2 可以看出,WT 的叶绿素 a、叶绿素 b 以及总叶绿素含量都要

表 2 WT 和 *stn7* 的叶绿素含量、SPAD 值和叶绿素荧光动力学参数Tab. 2 Chlorophyll content, SPAD value and chlorophyll fluorescence kinetic parameters of WT and *stn7*

材料	叶绿素 a (mg/mL)	叶绿素 b (mg/mL)	总叶绿素 (mg/mL)	叶绿素 a/ 叶绿素 b	SPAD	初始荧光 F_0	光化学量子 效率 F_v/F_m	光下 PSII 实际 光化学效率 Φ_{PSII}	光化学淬灭 系数 qP
WT	0.358 ^a	0.160 ^a	0.516 ^a	2.234 ^a	30.4 ^a	0.087 ^a	0.701 ^a	0.662 ^a	0.808 ^a
<i>stn7</i>	0.346 ^a	0.152 ^a	0.496 ^a	2.276 ^a	30.1 ^a	0.083 ^a	0.683 ^a	0.645 ^a	0.726 ^b

Different lowercase letters indicate significant difference between WT and *stn7* mutant at $\alpha = 0.05$.

图 1 孕穗期 WT 和 *stn7* 的光响应曲线

(A) 光响应曲线 (B) 胞间二氧化碳浓度 (C) 气孔导度 (D) 蒸腾速率

Fig. 1 The light response curve of WT and *stn7* rice booting stage

(A) light response curve (B) intercellular carbon dioxide concentration (C) stomatal conductance (D) transpiration rate.

3.3 水稻 *stn7* 突变体的光响应曲线及模拟参数

由图 1A, 我们可看到, 随着光强 PAR 的增强, 野生型和 *stn7* 突变体水稻的光合速率始终成上升趋势, 但是都未能达到峰值. 其中曲线与纵坐标的交点即为暗呼吸速率 (R_d), 与横坐标的交点为光补偿点 (LCP). 在光强约 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 处两条曲线有个交点, 在低于此光强时, 野生型的净光合速率要高于突变体, 高于此光强时, 突

变体水稻的净光合速率反而高于野生型. 图 1B 是胞间 CO_2 浓度指标, 两种水稻皆呈现下降的趋势, 且在光强 $0 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 之间, 下降迅速, 之后才较为平缓稳定. 且在 $0 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强之间, 突变体的胞间 CO_2 浓度高于野生型, 光强大于 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 后, 才是野生型的高于突变体. 图 1C 的气孔导度参数, 野生型和突变体也是随着光强增强, 都呈现一个增加的趋势

略高于突变体, 但是没有形成显著性差异, 而叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值要稍低于突变体. WT 的 SPAD 值虽然略高于突变体植株, 但是无明显差异, 即 STN7 激酶缺失对水稻叶片叶绿素含量几乎无影响. *stn7* 的 F_0 略低于 WT, 但是未形成显著性差异, 这与之之前测得的叶绿素含量的结果相一致. 此外, *stn7* 的 F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 也均低于 WT, 且未形成显著性差异. 表明 WT 的 PSII 的光能转化效率和实际上的光化学量子产量均略高于 *stn7*. 最后, WT 的 qP 显著高于 *stn7*, 说明 WT 的 PSII 开放程度较大, 且 PSII 电子传递活性较大.

势,在光强约低于 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,野生型的气孔导度较大,之后则是突变体的气孔导度较大,两者的气孔导度均未明显下降可以说明植株没有处于不利的环境. 图 1D 蒸腾速率,可以看到始终是野生型的较高.

表 3 数据显示, *stn7* 突变体的 Rd 和 LCP 都比野生型要高,这说明野生型较之突变体能更快更早的进行净光合作用积累有机物. 此外,野生型的 AQE 显著高于突变体,也表明了野生型植株利用弱光的能力较强. 这与表 2 中叶绿素含量的结果相符. 随着光强越来越高,突变体的 Pn 逐渐超过野生型,且其 LSP 和 Pn 都显著高于野生型.

表 3 WT 和 *stn7* 的光响应曲线模拟参数

Tab. 3 Simulated parameters to light-response curve of WT and *stn7*

Parameter	WT	<i>stn7</i>
光补偿点 LCP ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	18.00±0.69 ^a	24.00±0.00 ^a
光饱和点 LSP ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	1274.40±10.87 ^a	1726.80±45.82 ^b
暗呼吸速率 Rd ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	1.98±0.09 ^a	2.09±0.14 ^a
表观量子效率 AQE ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	0.104±0.00 ^a	0.085±0.01 ^b
最大净光合速率 A _{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	35.16±0.90 ^a	41.40±2.82 ^b

平均值±标准误,每一行内不同小写字母表示材料间差异达到 0.05 的显著水平.

Mean±sem, different lowercase letters indicate significant difference between WT and *stn7* mutant at $\alpha=0.05$.

4 讨论

目前对于类囊体膜蛋白激酶的研究的主要材料是植物分子生物学中两种重要的模式生物拟南芥^[18-21]和水稻^[22,23],用的较多的研究方法有蓝绿活性胶电泳、western blot,测量荧光光谱和叶绿素荧光动力学参数以及一些表型的比较等^[24]. 本研究则是侧重对 *stn7* 突变体的光合生理相关参数的比较.

STN7 激酶主要作用是通过磷酸化 LHCII 上的蛋白来调节 LHCII 由 PSII 移向 PSI,进而由状态 1 变为状态 2,因此它对于调节状态转换来说必不可少^[18,25]. 状态转换可以把光能合理地分配到两个光系统. 种子的萌发过程是不需要光的,理论上 WT 和 *stn7* 两种水稻在种子萌发阶段无较大差异,但由于是 F₂ 代水稻植株,在 F₁ 代生长时也可能导致种子具有差异性. 研究结果显示 *stn7* 植

株种子萌发情况几乎无变化.

叶绿素 a 和叶绿素 b 吸收的光不同. 生理条件变化时,叶绿素 a 和叶绿素 b 的合成、分解速度会影响叶绿素 a/b 的比值,但调节叶绿素 a/b 的值主要通过“叶绿素循环”实现. 叶绿素 a 和叶绿素 b 的相互转化称为“叶绿素循环”. 弱光条件下,部分叶绿素 a 会转化为叶绿素 b,因此两者的比值会降低. 实验结果直观表明 *stn7* 植株的叶片叶绿素与 WT 相比几乎无差异,但是 WT 植株叶绿素 a/b 的值较低证明利用弱光的能力较突变体强.

叶绿素荧光动力学参数结果表明,WT 植株比 *stn7* 突变体水稻的 PSII 开放程度大、初始荧光高,实际光化学效率高. 结合各项指标,得出 WT 的光合作用效率及光合作用潜能均比 *stn7* 突变体高. 而从光响应曲线图 1. A 和图 1. B,可以看出 Ci 和 Pn 呈现负相关,这与 Zhang 等人^[26]对水稻叶片研究的结果一致,这可能是由于叶片较高的光合速率导致 Ci 降低. 总体来看,随着光强的增大,两者的气孔张开度越来越大,同时,蒸腾速率也随之高,而吸收进的二氧化碳大多都参与到暗反应中,导致光合速率越来越高. 结合图 1 和表 3,得出在中等光强以下,野生型的光能利用率较高,而到了高光强,突变体的光能利用率较高. 理论上 STN7 激酶缺失会导致植株不能更好的分配利用光能,但是结果表明突变体在高光强光合速率反而较高. 产生这种现象的具体原因还有待进一步探索. 总结,本研究为全面研究 STN7 激酶的功能提供一定依据.

参考文献:

- [1] Bennett J. Chloroplast phosphoproteins. Phosphorylation of polypeptides of the light-harvesting chlorophyll protein complex [J]. Eur J Biochem, 1979, 99: 133.
- [2] Bennett J. Phosphorylation of chloroplast membrane proteins [J]. Nature, 1977. 269: 344.
- [3] Fleischmann M M, Roach J D. Characterization of mutants with alterations of the phosphorylation site in the D2 photosystem II polypeptide of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Physiol, 1999, 5767: 1557.
- [4] Kruse O, Nixon P J, Schmid G H, et al. Isolation of state transition mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by fluorescence video imaging [J]. Photosynth Res, 1999, 61: 43.
- [5] Depège N, Bellafiore S, Roach J D. Role of Chloroplast Protein Kinase Stt7 in LHCII Phosphorylation and State Transition in *Chlamydomonas* [J].

- Science, 2003, 299: 1572.
- [6] Mullet J E. The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts [J]. J Biol Chem, 1983, 258: 9941.
- [7] Testi M G, Croce R D L P, Bassi R. A CK2 site is reversibly phosphorylated in the photosystem II subunit CP29 [J]. FEBS Lett, 1996, 399: 245.
- [8] Liu W, Tu W, Liu Y, *et al.* The N-terminal domain of Lhcb proteins is critical for recognition of the LHCII kinase [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1857: 79.
- [9] Rochaix J D. Redox regulation of thylakoid protein kinases and photosynthetic gene expression [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18: 2184.
- [10] Trotta A, Suorsa M, Rantala M, *et al.* Serine and threonine residues of plant STN7 kinase are differentially phosphorylated upon changing light conditions and specifically influence the activity and stability of the kinase [J]. Plant J, 2016, 87: 484.
- [11] Rintamäki E, Martinsuo P, Pursiheimo S, *et al.* Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 11644.
- [12] Tikkanen M, Piippo M, Suorsa M, *et al.* State transitions revisited a buffering system for dynamic low light acclimation of *Arabidopsis* [J]. Plant Mol Biol, 2006, 62: 795.
- [13] Betterle N, Ballottari M, Baginsky S, *et al.* High light-dependent phosphorylation of photosystem II inner antenna CP29 in monocots is STN7 independent and enhances nonphotochemical quenching [J]. Plant Physiol, 2015, 167: 457.
- [14] Betterle N, Poudyal R S, Rosa A, *et al.* The STN8 kinase-PBCP phosphatase system is responsible for high-light-induced reversible phosphorylation of the PS II inner antenna subunit CP29 in rice [J]. Plant J, 2017, 89: 681.
- [15] 夏芳, 康海岐, 侯勇, 等. 重金属镉对 8 个水稻品种萌发和出芽生长的影响 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 407.
- [16] 邱念伟, 王修顺, 杨发斌, 等. 叶绿素的快速提取与精密测定 [J]. 植物学报, 2016, 51: 667.
- [17] 吕典华, 宗学凤, 王三根, 等. 两个水稻叶色突变体的光合特性研究 [J]. 作物学报, 2009, 35: 2304.
- [18] Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, *et al.* State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7 [J]. Nature, 2005, 433: 892.
- [19] Pesaresi P, Hertle A, Pribi M, *et al.* Optimizing photosynthesis under fluctuating light: The role of the Arabidopsis STN7 kinase [J]. Plant Signal Behav, 2010, 5: 21.
- [20] Willig A, Shapiguzov A, Goldschmidt-Clermont M, *et al.* The phosphorylation status of the chloroplast protein kinase STN7 of Arabidopsis affects its turnover [J]. Plant Physiol, 2011, 157: 2102.
- [21] Pesaresi P, Hertle A, Pribil M, *et al.* Arabidopsis STN7 Kinase Provides a Link between Short- and Long-Term Photosynthetic Acclimation [J]. Plant Cell, 2009, 21: 2402.
- [22] Poudyal R S, Nath K, Zulfugarov I S, *et al.* Production of superoxide from photosystem II-light harvesting complex II supercomplex in STN8 kinase knock-out rice mutants under photoinhibitory illumination [J]. J Photochem Photobiol B, 2016, 162: 240.
- [23] Krishna N, Roshan Sharma P, Joon-Seob E, *et al.* Loss-of-function of OsSTN8 suppresses the photosystem II core protein phosphorylation and interferes with the photosystem II repair mechanism in rice (*Oryza sativa*) [J]. Plant J, 2013, 76: 675.
- [24] Tikkanen M, Nurmi M, Kangasjärvi S, *et al.* Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1777: 1432.
- [25] Rochaix J D. Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation [J]. FEBS Lett, 2007, 581: 2768.
- [26] Zhang D Y, Wang X H, Chen Y. Determinant of photosynthetic capacity in rice leaves under ambient air conditions [J]. Photosynthetica, 2005, 43: 273.

引用本文格式:

中文: 王秋莹, 李雪, 杜林方. 水稻 STN7 激酶突变体的光合生理特性分析 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 558.

英文: Wang Q Y, Li X, Du L F. Analysis of photosynthetic physiological characteristics of loss-of-function of STN7 in rice (*Oryza sativa*) [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2019, 56: 558.