



# He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼叶 叶绿素荧光和 Rubisco 活化酶的影响

常阿丽,毛晓芳,韩榕\*

(山西师范大学 生命科学学院细胞工程研究所,山西临汾 041000)

**摘要:**选用小麦‘ML7113’品种为材料,人工模拟 He-Ne 激光( $5 \text{ mJ} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ )、增强 UV-B( $10.8 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ )辐射及两者复合辐照进行处理,利用叶绿素荧光仪、考马斯亮蓝 G-250 染色法和 PCR 技术研究 7 d 龄小麦幼苗叶绿素荧光特性、Rubisco 活化酶含量、基因表达量及其基因序列的变化。结果表明:(1)与对照组相比,增强 UV-B 辐射后,小麦幼苗叶绿素荧光特性减弱,Rubisco 活化酶含量及其基因表达量均下降;而低剂量的 He-Ne 激光辐照后能够在一定程度上修复经 UV-B 辐射后对小麦幼苗叶绿素荧光特性所造成的损伤,且使 Rubisco 活化酶含量及其基因表达量上升。(2)与对照组相比,经 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射以及两者复合辐照处理后基因序列均出现两个相同的点突变,但并未造成氨基酸序列的变化。研究认为,低剂量 He-Ne 激光辐照能够在一定程度上修复受 UV-B 辐射小麦幼苗叶绿素荧光活性、Rubisco 活化酶含量及其基因表达量的降低;He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼苗 Rubisco 活化酶活性的影响可能发生在其转录水平,从而使小麦光合能力发生相应的变化。

**关键词:**小麦;He-Ne 激光;UV-B 辐射;叶绿素荧光;Rubisco 活化酶

中图分类号:Q945.79; Q789 文献标志码:A

## Effects of He-Ne Laser and UV-B Radiation on Chlorophyll Fluorescence and Rubisco Activase of Wheat Leaves

CHANG Ali, MAO Xiaofang, HAN Rong\*

(Cell Engineering, College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000, China)

**Abstract:** With ‘ML7113’ wheat seedlings as the materials, artificial simulation of He-Ne laser( $5 \text{ mJ} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ), enhanced UV-B( $10.8 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ) radiation and combined radiation processing. Using chlorophyll fluorescence spectrometer, coomassie brilliant blue G-250 dyeing method and PCR technique, we studied the changes of chlorophyll fluorescence characteristics, content of rubisco activase, changes of gene expression and gene sequence on seven day age of wheat seedling. The results show that: (1) Compared with the control group, after enhanced UV-B radiation, wheat seedling chlorophyll fluorescence characteristics is abate. Rubisco activase content and its gene expression quantity decreased. But low doses of He-Ne laser irradiation can repair the damage on wheat seedling chlorophyll fluorescence characteristics which caused by after UV-B radiation and make rubisco activase content and its gene expression increased. (2) Compared with the control group, after He-Ne laser and enhanced UV-B radiation and combined irradiation gene sequences were presented with two identical point mutations, but did not cause the change of amino acid sequence. Visible, low dose He-Ne laser irradiation can be repaired by UV-B radiation on chlorophyll fluorescence activity of wheat seedlings to a certain extent and make the rubisco activase content and its

收稿日期:2013-05-06;修改稿收到日期:2013-08-29

基金项目:国家自然科学基金(30671061);山西省自然科学基金(20081101)

作者简介:常阿丽(1986—),女,在读硕士研究生,主要从事植物细胞学研究。E-mail:609561565@qq.com

\*通信作者:韩榕,博士,教授,主要从事细胞生物学。E-mail:hhwrsl@yahoo.com.cn

lower amount of gene expression. Speculate that the influence of He-Ne laser and enhanced UV-B radiation on wheat seedling rubisco activase due to the change of transcriptional. So that the wheat photosynthetic capacity was changed accordingly.

**Key words:** wheat; He-Ne laser; UV-B radiation; chlorophyll fluorescence; rubisco activase

随着人类社会的进步,工业化进程的推进不可避免地带来了大气的污染,引起了臭氧层的破坏,导致到达地表的太阳紫外线B辐射(UV-B,280~320 nm)增强,对地球上的生物产生一定的危害<sup>[1-2]</sup>。UV-B辐射增强会影响植物的生长发育、生理生化过程以至整个地球生态系统,并造成农作物减产<sup>[3]</sup>。目前,植物的UV-B效应研究主要集中在其对植物个体的形态建成、生长抑制和生理生化效应上,包括细胞膜伤害、光合作用和酶活性变化等方面<sup>[4]</sup>。UV-B效应破坏植物的光合作用,导致作物减产、光合速率降低、生产力下降等现象<sup>[5]</sup>。激光作为一种新的技术,在生物工程上获得了广泛的应用。适当剂量的激光辐照可以提高种子的萌发力,同时提高酶的活性、叶绿素含量以及植物的抗逆性等。齐智<sup>[6]</sup>、韩榕<sup>[7]</sup>分别对经增强UV-B辐射损伤的蚕豆、小麦幼苗进行研究,发现激光对UV-B损伤的幼苗具有防护和修复作用。

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)是催化植物光合作用光化学合成和光呼吸早期反应的关键酶,也是将CO<sub>2</sub>还原成有机碳的限速酶<sup>[8]</sup>,其活性的高低直接影响植物的净光合产量。但后来研究发现,影响植物光合速率的限制因子不是Rubisco的总量,而是活化的Rubisco量<sup>[9]</sup>。Rubisco要完成催化反应必须处于活化状态<sup>[10]</sup>,钝化态的Rubisco必须经过Rubisco活化酶(RCA)的活化才能表现出其羧化/加氧活性,即Rubisco在植物体内的活性强弱取决于RCA对它的活化程度。Martinez等<sup>[11]</sup>发现,玉米低产品系中RCA含量很低,若人为提高品系RCA水平,则其Rubisco活性和净光合速率( $P_n$ )都随之上升,产量增加。翁晓燕等<sup>[12]</sup>根据水稻光合日变化过程中Rubisco活性的变化规律,提出光对光合速率影响的本质是通过RCA调节Rubisco的初始活力而影响光合速率。

自从Someville等<sup>[13]</sup>和Salvucci等<sup>[14]</sup>发现RCA以来,人们采用RCA抗体研究发现,RCA普遍存在于高等植物、绿藻、部分蓝细菌和古细菌之中,这说明依赖于RCA的Rubisco活性调节机制广泛存在于光合生物中,为体内Rubisco的活化机制研究展现了良好的前景。有研究发现,小麦的

Rubisco是一种核基因编码的叶绿体蛋白,约由45 kD和41 kD 2个亚基组成<sup>[15]</sup>,Rubisco的活化是决定叶片碳同化效率的关键因子<sup>[16-17]</sup>。目前RCA的生理、生化和分子生物学的研究引起了人们的广泛兴趣,成为近年来光合作用研究的重要领域之一。据报道,UV-B辐照过的豌豆、黄豆和黄瓜中的Rubisco含量会降低<sup>[18]</sup>。但有关RCA对He-Ne激光和增强UV-B辐射响应的研究至今未见报道。为此,本试验人工模拟UV-B辐射、He-Ne激光和复合He-Ne激光+增强UV-B辐射的条件,研究小麦RCA含量及其蛋白和基因表达及序列对不同处理环境的响应特征,分析其与光合速率的关系,为小麦高产栽培提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及培养

试验选用小麦‘ML7113’品种为材料,其种子由山西省农业科学院小麦研究所提供。选取籽粒饱满,大小均一的小麦种子,经0.1% HgCl<sub>2</sub>浸泡消毒后,培养于盛有双层纱布的培养皿内,每盘30粒。设置3次重复。25℃下恒温培养箱中培养,待小麦种子露白后开始处理。

### 1.2 材料处理

小麦种子露白后开始处理。试验共设对照(CK)、UV-B处理(B)、激光处理(L)、UV-B和激光复合处理(BL)4组,各组每天的处理程序见表1。其中,UV-B辐射强度为10.08 kJ·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>,采用紫外辐照计(UV-B型,北京师范大学光电仪器厂)对UV-B辐射功率密度进行测定,UV-B灯(南京华强,30 W,297 nm)垂直悬于培养皿的上方,通过调整UV-B灯与植物培养皿之间的距离来控制UV-B辐射的强度。He-Ne激光辐照采用西北大学光电研究所制造的He-Ne激光(MSHN-A, B450MM),波长632.8 nm,光斑直径2 mm,功率为5 MW·mm<sup>-2</sup>的大功率,采用He-Ne激光生物辐照仪(南京激光仪器厂)测定强度,辐照时间为2 min。激光处理在光照处理后暗室中进行,以排除杂光影响。激光处理后立即转入暗处25℃条件下继续培养。以处理7 d后的小麦幼苗叶片为样品进行指标测定。

表 1 各处理组的设置及处理程序  
Table 1 The establishment and treatment procedure of different groups

处理 Treatment	光照时间 Light time /(h · d <sup>-1</sup> )	UV-B 辐射时间 UV-B radiation time/(h · d <sup>-1</sup> )	激光辐照时间 He-Ne irradiation time/(min · d <sup>-1</sup> )	暗培养时间 Darkness time /(h · d <sup>-1</sup> )
CK	8	0	0	16
B	8*	8	0	16
L	8	0	2	16
BL	8*	8	2	16

注:CK. 对照组;B. UV-B 辐射处理组;L. He-Ne 激光处理组;BL. He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射的复合处理;\* 表示光照与 UV-B 辐射同时进行。下同。

Note: CK. Contrast; B. UV-B radiation; L. He-Ne irradiation; BL. UV-B radiation and He-Ne irradiation; \*. Represents light and enhanced UV-B radiation at the same time. The same as below.

### 1.3 测定指标及方法

**1.3.1 叶绿素荧光参数** 上午 8:30~11:00,取各处理后生长 7 d 的小麦幼苗 3 个不同位置的完全伸展叶片,用 PAM-2100 便携式叶绿素荧光仪(Walz, 德国)分别测定自然光条件下和内部光条件下的初始荧光( $F_0$ )、最大荧光强度( $F_m$ )、PS II 反应中心最大光能转换效率( $F_v/F_m$ )、光合电子传递效率(ETR)、PS II 实际光化学效率(Yield)、光化学荧光猝灭系数( $q_p$ )和非光化学猝灭系数( $q_N$ ),记录数据。

**1.3.2 Rubisco 活力的测定** 取新鲜小麦叶片各 1.0 g,加入研钵中,并加入 1 mL 预冷的提取介质,研磨成匀浆。将匀浆液用 4 层纱布过滤,滤液于 20 000 r/min、4 ℃ 下离心 15 min,取上清液进行 Rubisco 活力的测定<sup>[19]</sup>。

**1.3.3 Rubisco 活化酶含量** 剪取各处理组生长到 7 d 的小麦幼叶各 1.0 g,分别装入研钵内,用保鲜膜加封,置于 -87 ℃ Freezer 冰箱内充分冷冻,待冷冻完全后取出,迅速研磨成粉末,采用李卫芳等<sup>[15]</sup>方法进行 Rubisco 活化酶的纯化。采用考马斯亮蓝 G-250 染色法在 595 nm 光下比色测定,用牛血清蛋白为标准品作标准曲线测定蛋白含量。

**1.3.4 半定量 RT-PCR 以及测序分析** 取各处理组生长到 7 d 时的小麦幼叶各 100 mg,迅速转移至液氮中研磨成粉末,采用 Trizol 法按试剂说明书提取各组小麦的总 RNA,进行琼脂糖电泳(150 V,10~15 min)检测 RNA 完整性,并用紫外分光光度计测定各处理组中 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值,测定 RNA 纯度。根据 NCBI 上已注册的 RCA 基因序列为模板,用 Prime Primier 5.0 软件设计如下引物:RCAF(5'-GCATCGTGGACTCCCTCTTC-3')、RCAR(5'-GAC-CCTTGCCACCCAGATAC-3')、ActinF(5'-GTTCC-AATCTATGAGGGATACACGC-3') 和 ActinR(5'-G-AACCTCCACTGAGAACACATTACC-3')。

使用 PrimeScript RT-PCR Kit 试剂盒(购自 TaKaRa 公司),用 PrimeScript RTase 将 RNA 合成 cDNA,再取反应液的一部分作为模板,由 TaKaRa Ex Taq HS 进行 PCR 扩增,以小麦稳定表达的肌动蛋白基因 Actin 为对照,进行 RT-PCR 分析。PCR 产物经过低熔点琼脂糖凝胶电泳并用凝胶回收试剂盒纯化回收后,送至公司测序,序列结果采用 Blast 程序和 Vector NTI Advance 10 软件进行分析。

**1.3.5 实时荧光定量 PCR 分析** 取各处理组生长到 7 d 的小麦幼叶各 100 mg,提取各组 RNA,用实时荧光定量 PCR 检测扩增效率。使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)(购自 TaKaRa 公司)进行扩增,RCA 引物为 F(5'-GCATCGTGGACTCCCT-CTTC-3') 和 R(5'-GACCCTTGCCACCCAGATAC-3');内参基因 18SrRNA 为 F(5'-CCTGCATACCG-CAGCTAGGA-3') 和 R(5'-GCGCGCAATACGAAT-GCCCC-3'),均由 TaKaRa 公司合成。实时荧光定量 PCR 的结果采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法进行基因表达的相对定量分析计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼苗叶绿素荧光参数的影响

叶绿素荧光参数是反映叶片光合性能的重要指标。表 2 显示,与 CK 组相比,经 UV-B 辐照(B)处理后,小麦幼苗的  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v/F_m$ 、ETR、Yield、 $q_p$  均显著下降,而  $q_N$  值却显著升高,说明 UV-B 辐照使光合电子传递速率下降,光合作用强度减弱<sup>[20-21]</sup>;经 He-Ne 激光和 UV-B 复合处理(BL)后,小麦幼苗的  $F_0$ 、 $F_m$ 、ETR、Yield 均比 CK 和 B 处理显著上升, $F_v/F_m$ 、 $q_p$ 、 $q_N$  值均与 CK 相近,而  $F_v/F_m$ 、 $q_p$  比 B 处理显著增加,而  $q_N$  却显著下降;在所有处理中,单独 He-Ne 激光辐照处理(L)小麦幼苗的  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v/F_m$ 、

表2 不同辐照剂量处理下小麦幼叶叶绿素荧光参数比较

Table 2 The comparison of chlorophyll fluorescence parameters of wheat leaves under different handle groups

处理 Treatment	$F_0$	$F_m$	$F_v/F_m$	ETR	Yield	$q_P$	$q_N$
CK	281±8.965c	1194±25.379b	0.786±0.012b	22.15±6.934b	0.029±0.005a	0.965±0.117bc	0.038±0.008b
B	250±5.503a	1171±13.953a	0.771±0.014a	20.32±3.769a	0.026±0.002a	0.956±0.056a	0.044±0.005c
BL	264±4.237b	1249±9.501c	0.785±0.012b	33.51±4.493c	0.043±0.004c	0.959±0.061b	0.040±0.002b
L	291±6.986d	1348±16.988d	0.792±0.013c	55.17±6.951c	0.070±0.007d	0.968±0.097c	0.034±0.003a

注:  $F_0$ . 初始荧光强度;  $F_m$ . 最大荧光;  $F_v/F_m$ . 最大光化学效率; ETR. 光合电子传递效率; Yield. PS II 实际光化学效率;  $q_P$ . 光化学荧光猝灭系数;  $q_N$ . 非光化学猝灭系数。同列不字母相表示处理间在 0.05 水平存在显著差异。n=3, 平均值±标准差。

Note:  $F_0$ . Initial fluorescence;  $F_m$ . Maximum fluorescence;  $F_v/F_m$ . Maximal photochemical efficiency; ETR. Apparent electron transport rates; Yield. Effective quantum yield of photosystem II;  $q_P$ . Photochemical Quenching;  $q_N$ . Non-photochemical quenching. The different normal letters in the same column indicate significant difference among treatments at 0.05 level. n=3, means±SD.

ETR、Yield、 $q_P$  均最高, 而  $q_N$  值最低, 说明此时小麦叶片中光活化酶 Rubisco 的催化作用最强, PS II 反应中心的能量捕获效率最高, 叶片的光合能力最强。总之, UV-B 辐照处理能够减弱小麦幼苗的叶绿体荧光活性, 降低小麦的光合能力; 而低剂量 He-Ne 激光辐照后能够在一定程度上修复经 UV-B 辐射后对小麦幼苗造成的损伤, 使光合能力有所恢复。

## 2.2 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼叶 Rubisco 活力的影响

如图 1 所示, 与 CK 组相比, B 组小麦幼叶 Rubisco 活力极显著降低了 47.73% ( $P<0.01$ ); 与 B 组相比, BL 组小麦幼叶 Rubisco 活力极显著上升 158.67%, 且高于 CK 组 35.20%; L 组的 Rubisco 活力比 CK 组极显著高出 119.34%。这说明 UV-B 辐射处理降低了小麦幼叶 Rubisco 活力, 适宜剂量 He-Ne 激光在一定程度上修复 UV-B 对 Rubisco 活力造成的损伤, 而单独激光处理后 Rubisco 活力最高, 即激光可以使小麦 Rubisco 活力提高。

## 2.3 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼叶 RCA 含量的影响

如图 2 所示, B 组处理小麦幼叶 RCA 蛋白含量比 CK 组降低了 2.41%, 但差异不显著; 复合处理 BL 组幼叶 RCA 蛋白含量较 B 组显著上升 4.29%, 且略高于对照组 1.78%; L 组的 RCA 蛋白含量较 CK 组高 3.72%, 但差异不显著。表明在本实验条件下, 增强 UV-B 辐射在一定程度上抑制了小麦幼叶 Rubisco 活化酶的合成, 适宜剂量 He-Ne 激光辐照在一定程度上促进了 Rubisco 活化酶的合成, 从而缓解 UV-B 辐射对幼苗光合作用伤害。

## 2.4 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼叶 RCA 基因表达的影响

2.4.1 实时荧光定量 PCR 分析 不同处理下生长 7 d 的小麦幼苗叶片 RCA 基因的表达结果如图 3

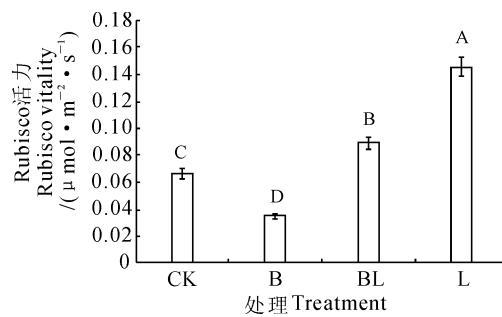


图 1 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射

对小麦幼苗 Rubisco 活力的影响

不同大小写字母分别表示处理间在 0.01、0.05 水平存在显著差异。下同

Fig. 1 Effect of He-Ne laser and enhanced UV-B radiation on wheat seedlings rubisco

The different capital and normal letters indicate significant different among treatments at 0.01 and 0.05 level, respectively; The same as below

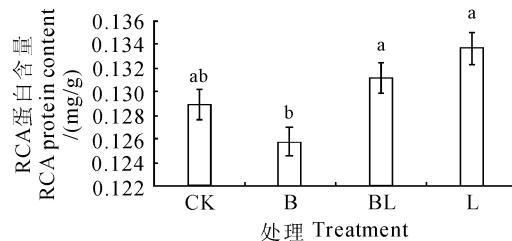


图 2 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对

小麦幼叶 Rubisco 活化酶含量的影响

Fig. 2 Influence of He-Ne laser and enhanced UV-B radiation on RCA protein content of wheat leaves

所示。经增强 UV-B 辐照处理(B)后, 小麦幼苗叶片 RCA 基因的表达量呈现下降趋势, 比 CK 组极显著降低了 23.7%; 复合处理组(BL)较单独 UV-B 辐射处理(B)的表达量极显著上升 24.4%, 但仍低于 CK 组; He-Ne 激光单独辐照(L)下 RCA 基因的表达量较 CK 组提高 9.1%, 但差异不显著。这说明

本实验条件下小麦幼叶中 RCA 基因的表达受到增强 UV-B 辐照处理的显著抑制,而受到 He-Ne 激光辐照的促进,He-Ne 激光辐照能有效减轻增强 UV-B 辐照对 RCA 基因的表达的抑制作用。

**2.4.2 半定量 RT-PCR 分析** 选取生长 7 d 的各处理组小麦幼苗叶片进行 RT-PCR 分析(图 4),*Actin* 基因和 RCA 基因分别得到与预期片段大小一致的特异性扩增产物。其中,*Actin* 基因在各处理条件下叶片中扩增条带亮度基本相同;以此为对照,叶片中 RCA 基因在各处理条件下都有不同程度表达。与对照组(CK)相比,B 组叶片中 RCA 基因的表达水平明显降低,BL 组的表达水平较 B 组稍高,L 组的表达水平最高且与对照相当。由此可见,小

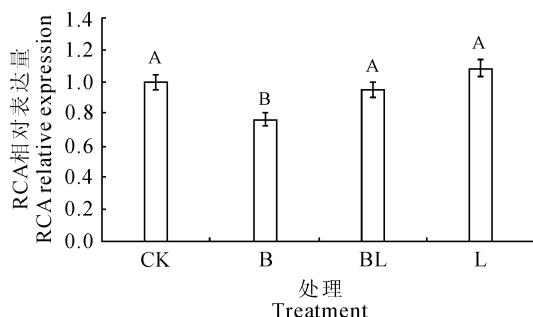


图 3 不同处理小麦幼苗叶片 RCA 相对表达量

Fig. 3 Relative expression of RCA in wheat leaves under different treatments

```

Query   8 GAGAGAGAGG-ACACCGAC-AGTGGAAAGGGTCTTGCCTACGATATCTCCGACGACCAGCA 65
Sbjct  244 GAGA-AGAGGAACACCGACAAGTGGAAAGGGTCTTGCCTACGATATCTCCGACGACCAGCA 302
Query   66 GGACATCACCAGAGGGAAAGGGCATCGTGGACTCCCTCTTCCAGGCGCCACGGCGACGG 125
Sbjct  303 GGACATCACCAGAGGGAAAGGGCATCGTGGACTCCCTCTTCCAGGCGCCACGGCGACGG 362
Query   486 CTGCCTCTTCATCAACGATCTGACGCCGTGCGGGTCTGGATGGCGGGACACAGTA 545
Sbjct  723 CTGCCTCTTCATCAACGATCTGACGCCGTGCGGGTAGGATGGCGGGACACAGTA 782
Query   606 TGTGCAGCTCCCAGGCATGTACAACAAGGAGGAGAACCTCTGTGTGCCATCGTCGTAC 665
Sbjct  843 TGTGCAGCTCCCAGGCATGTACAACAAGGAGGAGAACCAACGTGTGCCATCGTCGTAC 902
Query   846 CTTTTTCGG 854-(RCA-CK RT-PCR products)
Sbjct  1083 CTTTTTCGG 1091-(NCBI published sequence)

```

图 5 小麦幼苗对照组 RCA 的 RT-PCR 与 NCBI 公布序列 Blast 分析结果

因为采用的是 PCR 产物测序,所以在引物结合部位测不很准,实际突变碱基已用黑色标记出来(共计 3 个位点突变)

Fig. 5 Blast analysis of the RCA RT-PCR results in control and NCBI published sequence

Because of the sequenced were PCR products,in the primer binding site measurement is not very accurate,actual mutation bases have been marked with black(three sites mutation)

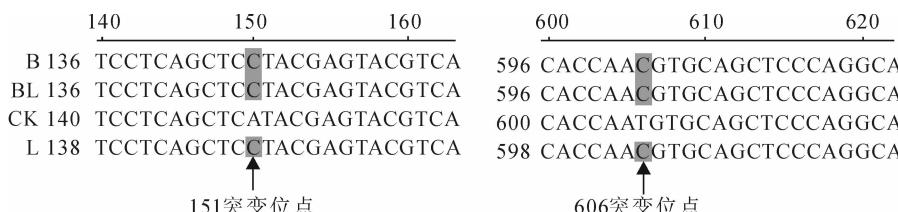


图 6 不同处理小麦幼苗叶片 RCA 部分基因核苷酸序列比较

Fig. 6 RCA partial gene sequence analysis of wheat leaves in different treatments

麦幼苗叶片 RCA 基因表达在受到 UV-B 辐照后被明显抑制,在受 He-Ne 激光诱导后表达量升高,He-Ne 激光复合处理能一定程度上缓解 UV-B 辐照对基因表达的抑制。

## 2.5 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对 RCA 基因核苷酸序列及其氨基酸序列的影响

利用 BLAST 软件对 RT-PCR 的扩增结果切胶回收后进行各处理组基因序列分析,对照组序列结果与 NCBI 上已经注册的序列结果相比对,一致性高达 99%(图 5)。Vector NTI Advance 10 软件分析各组序列结果如图 6 所示,与对照组相比,经过 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射以及两者的复合辐照处理后,幼苗 RCA 基因序列都有 2 个相同的碱基位点发生了相同的点突变。但 Vector NTI Advance 10 软件分析各处理组 RCA 蛋白的氨基酸序列发现,与对照组相比,其他各处理组的 RCA 氨基

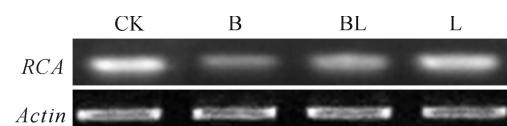


图 4 不同处理小麦幼苗叶片 RCA 基因表达的 RT-PCR 分析

Fig. 4 Expression analysis of wheat leaf RCA gene in different treatments with RT-PCR

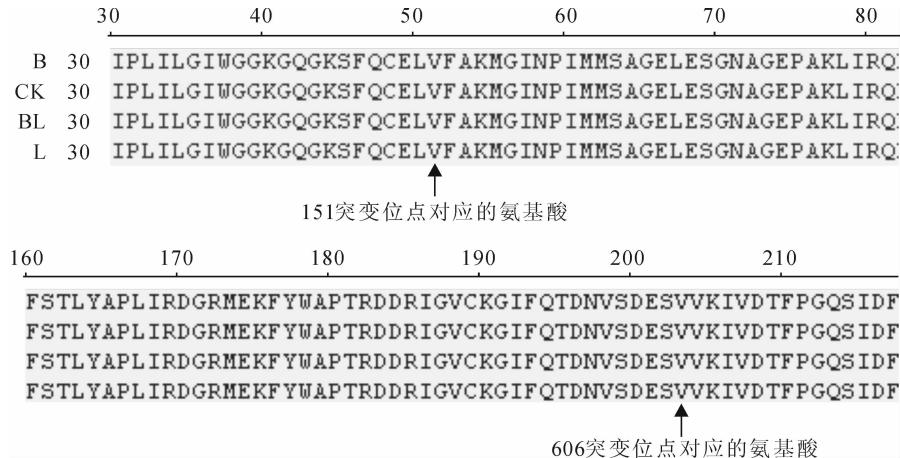


图 7 不同处理小麦幼苗叶片 RCA 部分氨基酸序列比较

Fig. 7 RCA partial amino acid sequence analysis of wheat leaves in different treatments

酸序列无变化(图 7)。以上结果说明 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼苗 Rubisco 活化酶的影响变化不是由于基因的突变和氨基酸变化而引起的。

### 3 讨 论

小麦是中国主要粮食作物,国内外研究发现,增强 UV-B 辐射有降低植物光合速率<sup>[22-23]</sup>、气孔导度<sup>[24]</sup>、光系统Ⅱ活性<sup>[25]</sup>的效应。而适宜的 He-Ne 激光辐照处理能加速植物的新陈代谢和生长<sup>[26]</sup>, 提高酶活性, 增加叶绿素含量, 增强抗逆性<sup>[27]</sup>。本研究表明, 适宜的 He-Ne 激光辐照可以减缓经 UV-B 辐射后造成的小麦幼苗叶绿素荧光所造成的损伤。这是由于激光光子能够代替酶激活 ATP 的产生, 进而恢复类囊体膜 ATP 酶活性, 并产生有关的生物效应<sup>[28]</sup>。利用 He-Ne 激光处理增强 UV-B 处理后的小麦幼苗, 有利于探索 He-Ne 激光对损伤小麦幼苗光合作用的修复程度和修复机理, 对深入研究光合作用的机理具有重要的意义。

Rubisco 是光合作用的关键酶, 对植物的光合速率起到决定作用<sup>[29]</sup>, 但是钝化态的 Rubisco 必须经过 Rubisco 活化酶的活化才能表现出其催化活力<sup>[30]</sup>。Rubisco 活化酶除了能活化 Rubisco 外, 还有 ATPase 的活性, 在 ATP 参与下, 能使 Rubisco 迅速与 CO<sub>2</sub>、Mg<sup>2+</sup> 结合形成 ECM 三元复合物, 从而达到最大活化程度<sup>[15]</sup>。探讨小麦 Rubisco 活化酶可对小麦光合作用的研究起到非常重要的作用。本实验选用小麦‘ML7113’品种为材料, 人工模拟

He-Ne 激光( $5 \text{ mJ} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ )、增强 UV-B( $10.8 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ )辐射及两者复合辐照对小麦进行处理, 研究不同处理对小麦幼苗叶绿素荧光活性, 以及 Rubisco 活化酶含量、基因表达量及其基因序列差异的影响。结果表明, 与对照组相比, 增强 UV-B 辐射处理后, 小麦幼苗叶绿体荧光特性减弱, Rubisco 活化酶含量及其基因表达量均下降; 而低剂量的 He-Ne 激光辐照后能够在一定程度上修复经 UV-B 辐射后对小麦幼苗造成的损伤。可见, Rubisco 活化酶含量及其基因表达量对 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射的响应与光合特性的变化具有很强的一致性。同时, 对不同处理下的小麦幼苗叶片 Rubisco 活化酶基因序列进行测序发现, 与对照组相比, 经 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射以及两者的复合辐照处理后, 都有 2 个相同的碱基位点发生了相同的点突变, 但它们的氨基酸序列比对结果与对照相比无变化, 即碱基的突变对 Rubisco 活化酶翻译水平上并未造成影响。推测经 UV-B 辐照后 Rubisco 活化酶含量的减少归结于转录水平上 Rubisco 活化酶基因表达量的降低, 从而使 Rubisco 活化酶对 Rubisco 的活化能力减弱, 引起 Rubisco 与 CO<sub>2</sub>、Mg<sup>2+</sup> 结合形成 ECM 的三元复合物减少, 活性氧的产生速度和清除速度失调, 对光合机构产生破坏作用, 致使光化学效率降低。所以, 增强 UV-B 辐射处理后, RCA 的含量和基因表达水平的下降是引起小麦幼苗光合功能降低的重要原因。

**参考文献:**

- [1] DONAT P,HDER,RAJESHWAR P,SINBA. Solar ultraviolet radiation induced DNA damage in aquatic organisms:potential environmental impact[J]. *Mutation Research*,2005,571:221—233.
- [2] MICHAEL Y,ROLEDAL,CHRISTIAN WIENCKE,ULRIKE H LUDEM. Impact of ultraviolet radiation on cell structure UV-absorbing compounds,photosynthesis,DNA damage, and germination in zoospores of Arctic *Saccorhiza ermatodea*[J]. *Journal of Experimental Botany*,2006,57(4):3 847—3 856.
- [3] TERAMURA A H, SULLIVAN J H, LYDON J. Effects of UV-B radiation on soybean yield and seed quality;a 6 year field study[J]. *Physiol. Plant.* 1990,81(1):5—11.
- [4] TERAMURA A H, SULLIVAN J H. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants[J]. *Photosyn Res.* , 1994,249:810—812.
- [5] SHI SH B(师生波),BEN G Y(贲贵英),ZHAO X Q(赵新全),et al. Effects of supplementary UV-B radiation on net photosynthetic rate in the alpine plant *Gentiana straminea*[J]. *Acta Phytocologica Sinica(植物生态学报)*,2001,5;520—524(in Chinese).
- [6] QI ZH(齐智),YUE M(岳明),WANG X L(王勋陵),et al. Protect effect of He-Ne Laser pretreatment on Broad Bean seedling damage by UV-B radiation[J]. *Chinese Journal of Lasers(中国激光)*,2002,29(1):91—94(in Chinese).
- [7] 韩榕. He-Ne 激光对小麦增强 UV-B 辐射损伤的修复效应及机理[D]. 西安:西北大学,2002.
- [8] JENSEN RG,BAHR J T. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxy-genase[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Mol. Biol.* ,1997,28:379—400.
- [9] 许大全. 光合作用效率[M]. 上海:上海科学出版社,2002:130—157.
- [10] LORIMER G H, MIZIORKO H M. Carbamate formation on the  $\Sigma$ -amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulose bisphosphate carboxylase by  $\text{CO}_2$  and  $\text{Mg}$ [J]. *Biochemistry*,1980,19:5 321—5 325.
- [11] MARTINEZ,BARAJAS E,MOLINA GALAN J,et al. Regulation of Rubisco activity during grain-fill in maize:Possible role of Rubisco activase[J]. *The Journal of Agricultural Science*,1997,128:155—161.
- [12] WENG X Y,LU Q,JIANG D A. Rubisco activase and its regulation on diurnal changes of photosynthetic rate and the activity of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxyase /oxygenase (Rubisco)[J]. *Chinese Journal of Rice Science*,2001,15(1):35—40.
- [13] SOMEVILLE C R,PORTIS AR JR,OGREN W L. A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP carboxylase *in vivo* [J]. *Plant Physiol.* ,1982,70:381—387.
- [14] SALVUCCI M E,PORITIS AR JR,OGREN W L. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activation *in vivo*[J]. *Photosynth Res.* , 1985,7:193—201.
- [15] LI W F(李卫芳),WANG ZH(王忠),HAN Y(韩鹰),et al. Purification and activity characteristics of Rubisco activase from wheat leaves[J]. *Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)*,2002,35(8):929—933(in Chinese).
- [16] MORRALES A,ORTEGA D M,MOLINA G J. Importance of Rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedure [J]. *J. Exp. Botany*,1999,50:823—829.
- [17] BEUF L,KURANO N,MIYACHI S. Rubisco activase transcript (rca) abundance increase when the marine unicellular green alga *Chlorococcum littorale* is grown under high  $\text{CO}_2$  stress[J]. *Plant Mol. Bio.* ,1999,41:627—635.
- [18] ALLEN D J,MEKEE F,FARAGE P K,et al. Analysis of limitations to  $\text{CO}_2$  assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B[J]. *Plant Cell Environ.*,1997,20:633—640.
- [19] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2005:67—70.
- [20] DAI Y L(戴云岭),XU CH H(许春辉),ZHAO F H(赵福洪),et al. The effects of freezing temperature on chlorophyll fluorescence induction kinetics and photochemical activities of Winter wheat[J]. *Acta Biophysica Sinica(生物物理学报)*,1988,4:104—109(in Chinese).
- [21] LU C M(卢从明),ZHANG Q D(张其德),KUANG T Y(匡延云). The effects of water stress on photosystem II in wheat[J]. *Acta Botanica Sinica(植物学报)*,1994,36:93—98(in Chinese).
- [22] MIDDLETON E M,TERAMURA A H. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from UV-B damage[J]. *Plant Physiology November*,1993,103(3):741—752.
- [23] NOGUES S,BAKER N R. Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of  $\text{CO}_2$  assimilation in pea leaves on exposure to UV-B radiation plant[J]. *Cell & Environment*,1995,18(7):781—787.
- [24] ALAN H,TERAMURA M C P,et al. Effects of ultraviolet-B radiation on plants during mild water stress. III. Effects on photosynthetic recovery and growth in soybean[J]. *Physiologia Plantarum* ,1984,60(4):484—492.
- [25] DANIEL I,ARNON. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiol.* ,1949,24(1):1—15.
- [26] 孙乃恩,孙东旭,朱德熙. 分子遗传学[M]. 南京:南京大学出版社,1990:139—150.
- [27] CAI S W(蔡素雯),QI ZH(齐智),MA X L(马小来),et al. The effect of He-Ne laser irradiation on soluble protein synthesis of corn seedling[J]. *Chinese Journal of Lasers(中国激光)*,2000,27(3):284—288(in Chinese).
- [28] YAN H J(颜红金),WANG ZH G(王之光). Effects of low intensity laser irradiation on antioxidative system in ageing mice[J]. *Acta Laser Biology Sinica(激光生物学报)*,2001,10(3):131—133(in Chinese).
- [29] LI W F(李卫芳),WANG X H(王秀海),WANG ZH(王忠). Correlation between Rubisco,Rubisco activase and diurnal photosynthesis rate changes of flag leaf in wheat[J]. *Journal of Anhui Agricultural University(安徽农业大学学报)*,2006,33(1):30—34(in Chinese).
- [30] PORTIS AR JR. The regulation of Rubisco by Rubisco activase[J]. *Journal of Experimental Botany*,1995,46:1 285—1 292.