

水稻淡黄绿叶色突变体的光氧化特性研究

肖辉海, 郝小花, 杨友伟, 陈春霞

(湖南文理学院 生命科学系, 湖南常德 415000)

摘要: 为了解水稻淡黄绿叶色突变体‘标 810S’的光保护机制, 在自然强光条件下对突变体‘标 810S’及其野生型‘810S’连体剑叶经 5 mmol/L 甲基紫精(MV)处理后的光氧化特性进行了比较研究。结果表明, 在 MV 处理条件下, 突变体‘标 810S’剑叶净光合速率(P_n)、PSⅡ最大光化学量子产量(F_v/F_m)、PSⅡ实际光化学量子产量($\Phi_{PSⅡ}$)和光化学淬灭(q_p)下降幅度明显低于野生型‘810S’, 而非光化学淬灭(q_N)上升幅度及 PSⅠ和 PSⅡ活性则明显高于‘810S’; 同时, ‘标 810S’剑叶抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)等抗氧化酶活性均明显高于‘810S’, 而超氧阴离子(O_2^-)产生速率、膜脂过氧化物丙二醛(MDA)含量则明显低于‘810S’。研究认为, 在光氧化处理下淡黄绿叶色突变体‘标 810S’是通过增加热耗散、提高抗氧化物质含量和保护酶活性、减少超氧阴离子和丙二醛的积累来维持较高的光系统活性和光合能力, 从而表现出耐光抑制(光氧化)的生理特性。

关键词: 水稻; 淡黄绿叶色突变体; 光氧化; 抗氧化剂; 抗氧化酶; 光系统

中图分类号: Q945.78

文献标志码: A

Photooxidation Characteristics of the Yellow-green Leaf Mutant in Rice

XIAO Huihai, HAO Xiaohua, YANG Youwei, CHEN Chunxia

(Department of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde, Hu'nan 415000, China)

Abstract: ‘Biao 810S’ is a yellow-green mutant of the thermosensitive genic male sterile (TGMS) rice ‘810S’. To elucidate the mechanism of photoprotection in ‘Biao 810S’, we compared the photooxidation characteristics in leaves between ‘Biao 810S’ and ‘810S’ under natural light conditions with treatment of 5 mmol/L methyl viologen(MV). The results showed that the decreasing amounts of the net photosynthetic rate(P_n), maximal photochemical efficiency of PSⅡ in the dark(F_v/F_m), actual photochemical efficiency of PSⅡ in the light($\Phi_{PSⅡ}$), photochemical quenching(q_p) in leaves of ‘Biao 810S’ were significantly lower than those of ‘810S’, but the increasing amount of non-photochemical quenching(q_N), activities of PSⅠ and PSⅡ in leaves of ‘Biao 810S’ were significantly higher than those of ‘810S’. The contents of ascorbate (AsA) and glutathione(GSH), the activities of superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), peroxidase(POD), ascorbate peroxidase(APX) and glutathione reductase(GR) in leaves of ‘Biao 810S’ were significantly higher than those of ‘810S’, which led to a less endogenous superoxide anion generation rate(O_2^-) and malondialdehyde(MDA) accumulation in leaves of ‘Biao 810S’ relative to ‘810S’. Under the photo-oxidation treatment, ‘Biao 810S’ can maintain higher light system activity and photosynthetic capacity by increasing thermal dissipation, antioxidant content, protect enzyme activities and decreasing accumulations of O_2^- and MDA, which showed a stronger tolerance to photoinhibition (photooxidation).

Key words: rice; yellow-green leaf color mutant; photooxidation; antioxidants; antioxidant enzymes; photo-system

收稿日期: 2015-07-10; 修改稿收到日期: 2015-09-16

基金项目: 湖南省自然科学基金资助重点项目(12JJ2018); 湖南省重点学科建设项目(湘教发[2011]42号)

作者简介: 肖辉海(1962—), 男, 博士, 教授, 主要从事植物发育与分子生物学研究。E-mail: xhh-07@126.com

光是绿色植物进行光合作用的重要能源,植物的生命活动离不开光照。水稻叶片的光合速率在一定范围内随着光照强度的增加而提高,但当光合器官吸收了超过光合作用所能利用的能量,就会引起光系统Ⅱ(PSⅡ)过量激发,导致光合效率下降,产生光抑制,而长时间光抑制会引发光氧化的发生,即光合器官受损,光合色素降解,最后甚至导致叶片死亡^[1]。光抑制是由可见光引起的光合生物光合能力下降的现象,通常伴随 PSⅠ 和 PSⅡ 损伤或活性降低^[2]。强光下植物获得更多的过剩光能,增加活性氧的产生,对 PSⅠ 和 PSⅡ 尤其是 PSⅡ,产生更严重的光氧化伤害,此时表现的光合活力下调是光损伤、损伤修复和其他各种保护机制运行的综合结果^[3-4]。光氧化现象在 C₃ 植物中普遍存在。早稻苗期在长期低温阴雨突然转晴、或生育后期长期梅雨后突然转晴、晚稻生育后期冷空气侵袭后转晴等天气极易发生光氧化现象^[5]。强光引起的光氧化会促使叶片早衰而造成水稻减产,在没有其它胁迫因素时,光氧化伤害至少可使光合生产力降低 10%^[6]。

近年来,关于水稻叶色突变体的利用价值倍受关注,已成为光合作用机制、叶绿素生物合成途径、叶绿体的结构功能和遗传发育调控机理、作物标记性状等研究的特殊材料^[7]。‘标 810S’是从温敏雄性核不育水稻‘810S’群体中筛选出来的一个淡黄绿叶色自然突变体,其特点是植株在整个生育期都为淡黄绿色叶,但生长发育正常、株叶形态与‘810S’基本一致。已有研究表明,突变体‘标 810S’的淡黄绿叶色性状属于单基因隐性遗传,与该突变基因紧密连锁的 SSR 标记 RM3838 和 18457 的遗传距离分别为 4.2 cM 和 10.6 cM,并据 RM3838 和 18457 在水稻基因组上的位置将该淡黄绿突变基因定位在第 5 染色体上^[8]。有关‘标 810S’叶片叶绿体发育和光合特性的研究表明,其叶绿体发育比‘810S’稍迟缓,基粒片层减少、结构松散以及叶绿体蛋白和光合色素(叶绿素、类胡萝卜素)含量显著下降等是其叶片呈淡黄绿叶色的根本原因^[9];同时,‘标 810S’叶绿体 PSⅡ 反应中心较高的原初光能转化效率、电子传递活性、光化学淬灭和较低的非光化学淬灭,以及叶绿体基质中较高的磷酸烯醇式丙酮羧化酶、NADP-苹果酸酶活性则是其在强光条件下较‘810S’具有更高光合速率的生理基础^[10-12]。

非光化学淬灭反映的是植物耗散过剩光能为热的能力,也就是光保护能力。‘标 810S’在强光下的非光化学淬灭较‘810S’的低^[12],其散热能力下降。

但关于在强光下‘标 810S’是如何保护其光合器官免遭失活或破坏的研究尚未见报道。本试验拟通过研究强光条件下‘标 810S’的抗氧化物质含量、抗氧化酶活性及 PSⅠ 和 PSⅡ 的活性,分析‘标 810S’光氧化特点,探讨‘标 810S’在强光条件下的光合器官保护机制,为生产上应用该突变体提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料及其培养

温敏核不育水稻‘810S’及其淡黄绿叶色突变体‘标 810S’的种子均由怀化职业技术学院提供。材料于 2014 年 4 月 30 日播种,4 叶 1 心期分单株移栽到实验田,每个材料移栽 3 个小区,‘810S’设为 A1、A2 和 A3 小区,‘标 810S’设为 B1、B2 和 B3 小区,每个小区种植 500 株。当稻株生长发育至幼穗分化的第 8 期(即花粉完熟期),从上述 6 个小区中分别挑选生长状态好且长势基本一致的植株各 40 株移栽到盆栽桶(盆深 22.0 cm,盆底内径 19.0 cm,盆口内径 33.0 cm)中,每盆种 2 株,即各小区分别移栽 20 盆,水肥管理和病虫害防治按常规方法进行。

1.2 人工光氧化处理

为了充分反映‘标 810S’剑叶耐光氧化的生理特性,参照李霞等^[13]的方法,同时考虑突变体‘标 810S’在强光条件下表现出较高的光合速率和较高的光量子转化效率等光合特性^[10]。本试验光氧化处理的光氧化剂甲基紫精(MV)的浓度设为 5 mmol/L。当稻株进入抽穗期,将每个小区移栽的材料分为两组,每组 10 盆。一组将稻株连体剑叶叶片浸泡在 5 mmol/L MV 溶液(内含 1%吐温-80)的光氧化剂中,另一组浸泡在蒸馏水(内含 1%吐温-80)中作为对照,每株选无病虫害、长势好且基本一致的稻穗剑叶叶片作为处理的对象,处理均为 5 min。田间同一小区的两组材料同时处理,处理后的材料立即移到暗处适应 2 h,接着移到自然强光下(光强 1 400~2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)适应 1 h,随后立即取样,取样时每组任选 3 盆的剑叶叶片进行叶绿素荧光参数、抗氧化物质、抗氧化酶活性和光氧化产物的测定。经 5 mmol/L MV 处理的另 7 盆材料分别在处理后的第 1 天至第 5 天取剑叶叶片,以 MV 处理前的剑叶作对照,制备叶片叶绿体类囊体膜,测定 PSⅠ 和 PSⅡ 的活性。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 叶片净光合速率和叶绿素荧光动力学参数

采用 LI-6400 便携式植物光合测定仪(美国 LI-

COR 公司生产)测定自然光下的净光合速率和叶绿素荧光。测定叶绿素荧光参数时,叶片首先暗适应 20 min 测暗荧光强度(F_0)、黑暗最大荧光(F_m),然后光适应 1 h 后进行光下最小荧光(F_0')、光下最大荧光(F_m')和稳态荧光(F_s)测定,并根据公式分别计算 PSII 最大光化学量子产量(F_v/F_m)、光化学淬灭(q_p)、非光化学淬灭(q_N)和 PSII 实际光化学量子产量(Φ_{PSII}):

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

$$q_p = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$$

$$q_N = (F_m - F_m')/(F_m - F_0')$$

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$$

1.3.2 抗坏血酸和还原型谷胱甘肽含量 剪取 0.2 g 去中脉剑叶,加入 3 mL 5%三氯乙酸研磨,15 000×g 离心 10 min,上清液定容至 3 mL 用于抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)的测定。

参照 Ellman^[14]的方法测定 GSH 含量。取 0.2 mL 样品,加 150 mmol/L NaH_2PO_4 溶液(pH 7.7) 2.6 mL,混合后再加 1.2 mL 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)试剂(75.3mg DTNB 溶于 30 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液,pH 6.8),以加磷酸缓冲液代替 DTNB 试剂做空白,摇匀,30 °C 保温 5 min,测定 412 nm 波长下的光吸收值,根据标准 GSH 溶液做的标准曲线计算鲜样品的 GSH 含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。

参照 Tanaka 等^[15]的方法测定 AsA 含量。取样品 0.4 mL,与 0.8 mL NaH_2PO_4 (pH 7.4)混匀后,再依次加入 10%三氯乙酸 0.8 mL、44%磷酸 0.8 mL、4% 2,2-二联吡啶(溶于 70%乙醇)0.8 mL 和 3% FeCl_3 0.4 mL,混匀后于 37 °C 保温 1 h,测定 525 nm 波长下的光吸收值。根据标准 AsA 溶液做的标准曲线计算鲜样品的 AsA 含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.3.3 抗氧化酶活性 取 0.5 g 去中脉剑叶,加 2 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液,冰浴下研磨,10 000×g 冷冻离心 30 min,上清液以 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(pH 7.0)定容至 10 mL 得粗酶液,用于超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性测定。SOD 活性测定用氮蓝四唑(NBT)法^[16],其总活性以每克样品鲜质量的酶单位表示($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)。POD 活性测定用愈创木酚方法^[17],其总活性以每毫克样品鲜质量每分钟的酶单位表示($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。CAT 活性测定用 CAT 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所产品),操作步骤按照试剂盒中的说明书进行,其总活性以待测样品中每毫克蛋白质质量的酶单位表示($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参照 Nakano 等^[18]的方法。取 0.5 g 去中脉剑叶置液氮中研磨成粉,在 10 mL 提取液[50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲溶液(pH 7.0),1 mmol/L EDTA,1 mmol/L 抗坏血酸(AsA),1% (W/V)PVP]中研磨成匀浆。匀浆经 4 °C、12 000×g 条件下离心 6 min,取上清液在 4 °C、26 900×g 条件下再离心 15 min。上清液用于酶活性测定,室温 25 °C 下读取 290 nm 处吸光值的变化,摩尔消光系数为 $2.8 \text{ mm} \cdot \text{cm}^{-1}$,以每分钟内每克样品鲜质量转化的 AsA 量来表示酶活性的大小($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)。

谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定参照 Foyer 等^[19]的方法,取 0.5 g 去中脉剑叶置液氮中研磨成粉,加入 5 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl 提取液[pH 7.0,其中含有 20%(V/V)的甘油,1 mmol/L AsA,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT 和 5 mmol/L MgCl_2],混匀后在 4 °C、12 000×g 下离心 6 min。将上清转入另一离心管中,再次在 4 °C、26 900×g 离心 16 min,取上清备用。在 NADPH 供氢下,氧化性谷胱甘肽被 GR 催化还原成还原型谷胱甘肽。依据 340 nm 处检测到 NADPH 的吸光度值的变化,摩尔消光系数为 $6.2 \text{ mm} \cdot \text{cm}^{-1}$,可计算 GR 活力。以每克鲜组织蛋白每分钟使 NADPH 的浓度改变 $1 \mu\text{mol/L}$ 所需的酶量定义为一个 GR 活力单位($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.3.4 超氧阴离子产生速率和丙二醛含量 超氧阴离子(O_2^-)产生速率按张志良等^[20]的方法进行测定。取 2 g 去中脉剑叶叶片,加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)2 mL 充分研磨,10 000 r/min 离心 20 min,上清液定容至 3 mL,此液即为 O_2^- 产生待测液。在 0.5 mL 待测液中加入 0.5 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)和 1.5 mL 的 1 mmol/L 盐酸羟胺,摇匀后于 25 °C 中保温 1 h,然后再加入 2 mL 的 17 mmol/L 对氨基苯磺酸(以冰醋酸:水=3:1配制)和 2 mL 的 7 mmol/L α -萘胺,混匀后于 25 °C 中保温 20 min,后测定 530 nm 波长下的吸光度值,并计算出单位鲜重组织的 O_2^- 产生速率($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)。

丙二醛(MDA)含量测定参照 Hodges 等^[21]的方法进行。取去中脉的剑叶叶片 0.5 g,加入 2 mL 10%三氯乙酸(TCA)和少量石英沙,研磨至匀浆,再加入 3 mL 10%三氯乙酸进一步研磨,匀浆 4 000×g 离心 10 min。上清液即为样品提取液。吸取上清液 2 mL(对照加 2 mL 水),加入 2 mL 0.6%

TBA 溶液,混合物于沸水浴上反应 15 min,迅速冷却后离心。取上清液测定在 532、600 和 450 nm 处的吸光度值,再算出单位鲜重组织中的 MDA 含量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.3.5 类囊体的制备及光系统活性 类囊体的制备参照 Dunahay 等^[22]的 B. B. Y 方法并加以改进。称取洗净、去中脉的叶片 2.0 g,剪碎置于预冷研钵中,加入 8 mL 预冷缓冲液 I (含 2 mmol/L MgCl_2 、0.4 mmol/L Sucrose、0.1% BSA、20 mmol/L Tricine, pH 8.0)冰浴下充分研磨成匀浆,4 层白纱布过滤,滤液经 $300 \times g$ 冷冻(4 °C)离心 2 min 去除组织沉淀,上清液经 $4\,000 \times g$ 冷冻(4 °C)离心 10 min,得破碎叶绿体沉淀,沉淀用预冷的缓冲液 II (含 5 mmol/L MgCl_2 、0.15 mmol/L 蔗糖、0.2% BSA、20 mmol/L Tricine, pH 8.0)充分悬浮,悬液以 $4\,000 \times g$ 冷冻(4 °C)离心 10 min,得沉淀,沉淀再用缓冲液 III (含 15 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl_2 、20 mmol/L MES, pH 6.5)充分悬浮即得类囊体膜悬浮液,叶绿素浓度调至 2~2.5 mg/mL。

参照 Coombs 等^[23]的方法,采用 Clark 型氧电极(英国 Hansantech 公司)测定类囊体膜的 PS I 和 PS II 的活性。测定 PS I 活性的反应体系为:27 μg /mL 叶绿素(Chl)、0.5 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tricine-NaOH (pH 7.6)、0.5 mmol/L MV、5 mmol/L NH_4Cl 、2 mmol/L NaN_3 、0.5 mmol/L DCPIP、2 mmol/L DCMU。测定 PS II 活性的反应体系为:27 μg /mL Chl、0.5 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tricine-NaOH (pH 7.6)、5 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、2 mmol/L 对苯二胺(p-Phenylenediamine)。PS I 的还原能力和 PS II 的放氧活性均用单位 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 来表示。

1.4 数据分析与作图

以上各种生理生化指标的测定均设 3 次重复,用 Excel 软件对所测定的各项指标的数据进行统计分析并作图,所有结果均用平均值 \pm SD 来表示。

2 结果与分析

2.1 MV 处理对‘标 810S’和‘810S’剑叶净光合速率的影响

经过 MV 处理后,两材料抽穗期剑叶净光合速率都下降(图 1)。与对照相比较,‘810S’的净光合速率显著下降了 25.07% ($P < 0.05$),‘标 810S’的净光合速率则下降了 22.65%,但未达到显著水平

($P > 0.05$),且‘标 810S’的净光合速率下降幅度低于‘810S’;另外,在对照和 MV 处理条件下,‘标 810S’净光合速率均始终高于相应的‘810S’。说明水稻材料‘标 810S’剑叶净光合速率不仅高于‘810S’,且受光氧化处理的影响相对较小,表现出比‘810S’更强的耐光氧化能力。

2.2 MV 处理对‘标 810S’和‘810S’剑叶叶绿素荧光动力学参数的影响

在光逆境条件下,当植物的光能吸收量超过了其光化学反应的利用量,且过剩的光能量得不到耗散时,就会引起植物光合机构的破坏,且其原初损伤部位在 PS II 上。叶绿素荧光参数是评估 PS II 状态的良好指标。

首先, F_v/F_m 是指 PS II 的最大光化学量子产量,它反映了植物的潜在最大光合能力。表 1 显示,经 MV 光氧化处理后,‘标 810S’和‘810S’剑叶的 F_v/F_m 均比相应对照(CK)不同程度地下降,下降幅度分别为 14.01% 和 28.22%,且‘810S’达到极显著水平($P < 0.01$),而‘标 810S’下降不显著;其次,光化学猝灭(q_p)是指由光合作用引起的荧光猝灭,反映的是植物光合活性的高低,光抑制导致 q_p 下降,较低的 q_p 反映 PS II 中开放的反应中心比例和参与 CO_2 固定的电子减少;而非光化学猝灭(q_n)是指由热耗散引起的荧光猝灭,反映了植物耗散过剩光能为热的能力,即光保护能力。经 MV 光氧化处理后,‘标 810S’和‘810S’剑叶的 q_p 均比相应 CK 不同程度下降,它们的 q_p 下降幅度分别为 11.98% 和 23.97%,且‘标 810S’下降不显著,而‘810S’下降达到极显著水平($P < 0.01$);‘标 810S’和‘810S’剑叶

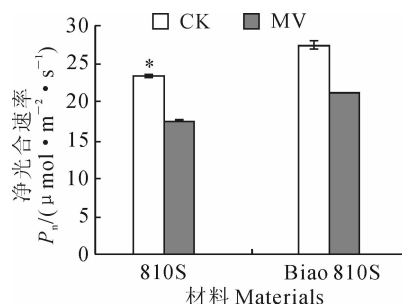


图 1 MV 处理下两材料剑叶的净光合速率
810S. 野生型; Biao 810. 淡黄绿色叶色突变体; * 表示
处理与对照间在 0.05 水平存在显著性差异;下同

Fig. 1 The net photosynthetic rate of flag leaves
of two materials after treatment with MV

810S. Wild type; Biao810S. Yellow-green mutant; * indicates
significant difference between treatment and control

(*t*-test) at 0.05 level; The same as below

的 q_N 均比相应 CK 不同程上升,它们的 q_N 上升幅度分别为 20.34%和 5.62%,且‘标 810S’的升降幅度达到极显著水平($P<0.01$),而‘810S’变化不显著。再次, Φ_{PSII} 表示在光照状态下 PSII 的实际光化学量子产量,反映了目前植物的实际光合效率。经 MV 光氧化处理后,‘标 810S’和‘810S’的 Φ_{PSII} 均比相应 CK 不同程度下降,下降幅度分别为 23.18%和 31.78%,且‘810S’变化达到显著水平($P<0.05$),而‘标 810S’变化不显著。可见,在光氧化处理后,‘标 810S’剑叶 F_v/F_m 、 q_p 、 Φ_{PSII} 的下降幅度均低于‘810S’,而其 q_N 的上升幅度远高于‘810S’,显示其 PSII 潜在最大光合能力和光保护能力比‘810S’的强,光合活性和实际光合效率也比‘810S’高。

2.3 MV 处理对‘标 810S’和‘810S’剑叶 O_2^- 和 MDA 含量的影响

植物长时间处在光氧化条件下,则 PS I 还原端上多余的电子会与分子氧发生作用而产生 O_2^- ,而光氧化伤害就是由 O_2^- 引起的。图 2 显示,经 MV 光氧化处理后,抽穗期‘标 810S’和‘810S’剑叶中 O_2^- 产生速率和 MDA 含量均明显上升,出现不同程度的 O_2^- 和 MDA 积累。‘标 810S’剑叶的 O_2^- 产生速率和 MDA 积累量上升幅度分别为 27.93%和 27.42%,与相应的 CK 差异均不显著;‘810S’剑叶

的 O_2^- 产生速率和 MDA 积累量上升幅度分别是 57.95%和 60.44%,与相应的 CK 相比,其变化均达到显著水平($P<0.05$)。另外,‘标 810S’的 O_2^- 产生速率和 MDA 积累量均明显低于‘810S’。可见,在光氧化条件下,‘标 810S’体内保护系统清除光氧化产物的能力明显强于‘810S’,因而光氧化产物积累量较少,抵抗光氧化胁迫的能力较强。

2.4 MV 处理对‘标 810S’和‘810S’叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

AsA、GSH 是植物内 2 种重要的活性氧清除剂,且由 AsA 和 GSH 组成的 AsA-GSH 循环是植物内清除光氧化产物的重要途径之一。在 MV 处理前,抽穗期‘标 810S’剑叶 AsA 和 GSH 含量都明显低于‘810S’,分别是‘810S’的 36.28%和 62.88%;在 MV 处理后,‘标 810S’剑叶的 AsA、GSH 含量分别比 CK 极显著上升 172.25%和 145.92%($P<0.01$),‘810S’剑叶则分别比 CK 显著上升 58.26%和 75.65%($P<0.05$),但‘标 810S’剑叶的 AsA、GSH 含量均低于‘810S’(图 3、A、B)。可见,在光氧化条件下,‘标 810S’叶片中 ASA、GSH 含量的上升幅度均远大于‘810S’的,其对光氧化响应程度大于‘810S’,表现出较强的耐光氧化特性。

表 1 MV 处理下剑叶的叶绿素荧光动力学参数
Table 1 The chlorophyll fluorescence kinetic parameters of flag leaves after treatment with MV

荧光参数 Fluorescence parameter	810S		Biao 810S	
	对照 CK	MV 处理 Treatment with MV	对照 CK	MV 处理 Treatment with MV
F_v/F_m	0.847±0.070	0.608±0.060 **	0.835±0.070	0.718±0.080
q_p	0.680±0.010	0.517±0.010 **	0.743±0.010	0.645±0.010
q_N	0.712 ±0.007	0.752±0.007	0.462±0.010	0.556±0.010 *
Φ_{PSII}	0.343±0.007	0.234±0.004 *	0.466±0.006	0.358±0.006

注: * 和 ** 分别表示处理与对照间在 0.05 和 0.01 水平存在显著性差异;下同。
Note: * and ** represent significant difference at 0.05 and 0.01 levels between treatment and control by *t* test, respectively; The same as below.

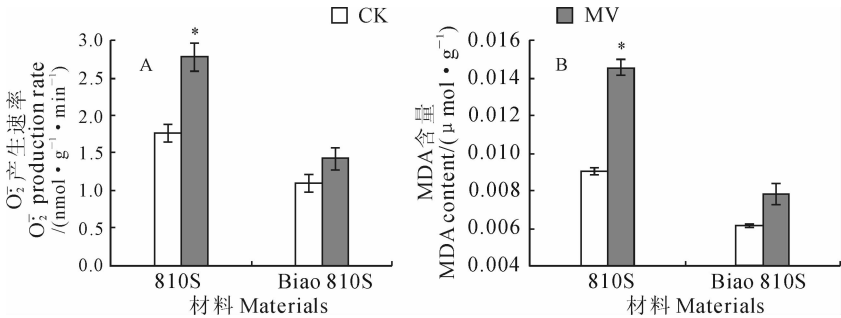


图 2 MV 处理下两材料剑叶 O_2^- 产生速率和 MDA 含量的变化
Fig. 2 The production rate of O_2^- and MDA content in flag leaves of two materials after treatment with MV

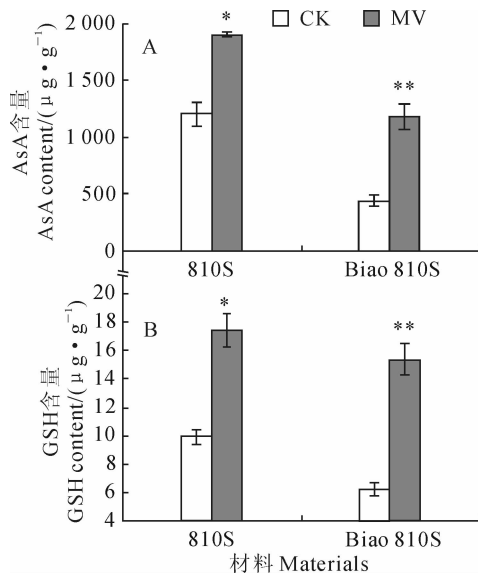


图3 MV处理下两材料剑叶AsA和GSH含量的变化

Fig. 3 The contents of AsA and GSH in flag leaves of two materials after treatment with MV

2.5 MV处理对‘标810S’和‘810S’叶片抗氧化酶活性的影响

在环境胁迫(如光氧化)条件下,植物中由SOD、POD、CAT和APX等抗氧化酶类组成的抗氧化酶系统能清除 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 、 1O_2 等活性氧,降低或消除活性氧对膜结构及许多生物功能分子(如核酸、蛋白质和脂质)的破坏,进而减缓和抵御活性氧对细胞的伤害^[24]。在光氧化处理前,‘标810S’剑叶中的SOD、POD、CAT、APX等4种酶活性都低于‘810S’,并以CAT、APX表现更明显;但在MV光氧化处理后,‘标810S’的SOD、POD、CAT和APX活性比CK分别显著或极显著上升61.32%、49.67%、93.33%和255.17%,‘810S’的SOD、POD、CAT和APX活性比CK分别上升34.33%、7.94%、50.94%和30.22%,但仅CAT活性上升显著($P < 0.05$);经MV光氧化处理后,‘标810S’剑叶中上述4种抗氧化酶活性的增幅均显著高于‘810S’(图4,A~D)。GR是一种利用还原型NAD(P)将氧化型谷胱甘肽(GSSG)催化反应成还原型(GSH)的酶,而GSH是植物体内非酶自由基清除剂之一。在MV光氧化处理前,‘标810S’剑叶中的GR活性明显高于‘810S’;在MV光氧化处理后,‘标810S’和‘810S’的GR活性分别比相应CK极显著或显著上升157.69%和94.12%,同时‘标810S’GR活性及其上升幅度均显著高于‘810S’(图4,E)。结果表明,‘标810S’叶片中抗氧化酶系统活性对光氧化胁迫的响应强度比‘810S’大,非常有利

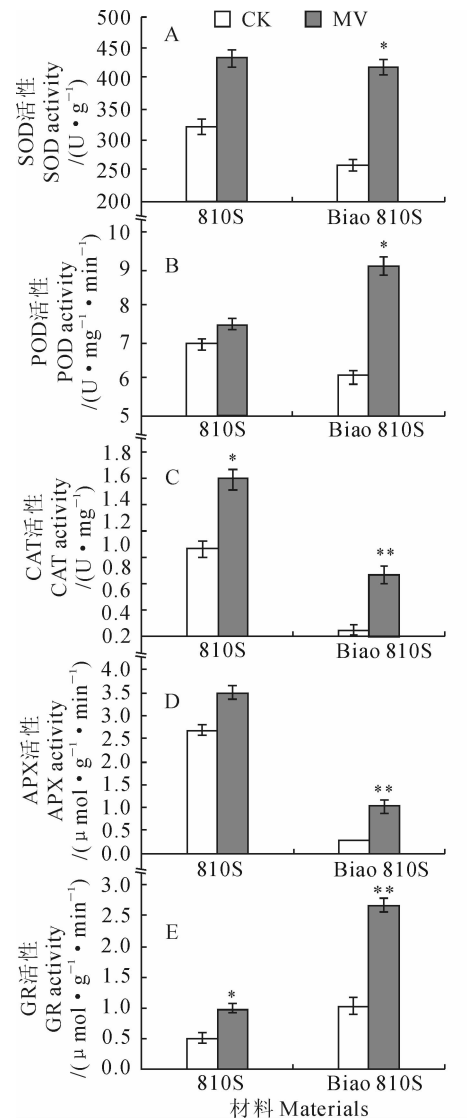


图4 MV处理下两材料剑叶抗氧化酶活性的变化

Fig. 4 The activities of antioxidant enzymes in flag leaves of two materials after treatment with MV

于其清除因光胁迫产生的活性氧,从而保护其叶绿体结构的完整及其功能的正常发挥。

2.6 MV处理对‘标810S’和‘810S’叶片光系统活性的影响

由表2可知,‘标810S’剑叶的PS I活性在MV处理后的第1天上升,随后逐渐下降,而‘810S’的PS I活性在MV处理后的第1天就开始下降,且两者PS I活性下降的程度不同。其中,在MV处理后的第5天,‘标810S’的PS I活性比CK仅下降了39%,而‘810S’的PS I活性比CK大幅下降了69%,‘标810S’的PS I活性下降程度远小于‘810S’。同时,在MV光氧化处理后,‘标810S’和‘810S’剑叶的PS II活性均逐渐下降(表2)。其中,在MV处理后的第5天,‘标810S’和‘810S’的PS II

表 2 MV 处理下两材料剑叶的 PS I 和 PS II 电子传递活性

Table 2 The electron transport activities of PS I and PS II in flag leaves of two materials after treatment with MV

MV 处理时间 MV treatment time/d	PS I 还原能力 PS I reducing power activity/($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)		PS II 放氧活性 PS II oxygen evolution activity/($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	Biao 810S	810S	Biao 810S	810S
0(CK)	96.48±8.2 (100%)	73.32±8.7 (100%)	89.59±8.1 (100%)	78.13±8.9 (100%)
1	109.02±10.4 (113%)	68.92±6.8 (94%)	76.15±9.8 (85%)	55.47±8.4 (71%)
2	90.69±5.4 (94%)	52.06±6.5 (71%)	66.30±5.6 (74%)	46.10±5.4 (59%)
3	82.97±4.7 (86%)	46.92±5.0 (64%)	49.27±4.8 (55%)	35.94±4.7 (46%)
4	72.36±4.3 (75%)	35.93±3.1 (49%)	37.63±2.5 (42%)	24.22±3.4 (31%)
5	58.85±5.2 (61%)	22.73±3.4 (31%)	29.56±4.1 (33%)	13.28±2.3 (17%)

注:括号内的数值表示相对百分比。
Note:The values in parentheses indicated the relative percentages.

活性分别比 CK 下降了 67%和 83%,‘标 810S’的 PS II 活性下降的程度亦明显小于‘810S’。上述结果说明,‘标 810S’剑叶 PS II 和 PS I 活性受光氧化的伤害程度较轻,其剑叶具有比‘810S’更强的抗光氧化能力;两个光系统比较而言,PS II 较 PS I 更容易发生光氧化伤害。

3 讨 论

叶绿素荧光动力学技术在研究 PS II 对光能的吸收、传递、耗散、分配等方面具有独特的作用。在叶绿素荧光动力学参数中,PS II 最大光化学量子产量(F_v/F_m)、光化学淬灭(q_p)、PS II 实际光化学量子产量(Φ_{PSII})等 3 个参数是衡量 PS II 活性高低和光能转化效率的重要指标,同时也是衡量强光下光合器官受光氧化伤害程度的重要指标;而非光化学淬灭(q_N)的高低则反映了植物耗散过剩光能为热的能力,也就是光保护能力^[25]。本研究结果显示,经 MV 处理后,淡黄绿叶色突变体水稻‘标 810S’和其野生型‘810S’叶的 F_v/F_m 、 q_p 和 Φ_{PSII} 均比其对照(蒸馏水处理)低,且突变体‘标 810S’的下降幅度明显低于野生型‘810S’;同时,突变体‘标 810S’和其野生型‘810S’叶片的 q_N 则比其对照(蒸馏水处理)高,但‘标 810S’叶片 q_N 增加的降幅度明显高于野生型‘标 810S’。表明水稻淡黄绿叶色突变体‘810S’在光氧化剂(5 mmol/L MV)处理后,其叶绿体 PS II 仍然具有比其野生型‘810S’更高的光合活性和光保护能力。这一结果与欧立军等在强光下所获得的实验结果基本一致^[11-12]。

一般认为,PS II 是光氧化伤害的原初位点和主要作用部位^[26]。正常光照下,植物体内活性氧($^1\text{O}_2$ 、 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 等)的产生和清除之间存在一个稳定的动态平衡,对叶绿体不会产生光氧化伤害。但在强光下,当叶绿体所吸收的光能超过光合

作用所能利用的能力时,这些活性氧的生成速率就会大于其清除速率,其产生和清除之间的平衡就会遭到破坏,从而对叶绿体造成光氧化伤害^[27]。为了避免活性氧可能对叶绿体造成的伤害,叶绿体在进化过程中形成了一套完整的抗氧化系统,这个系统包括由过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸-过氧化物酶(AsaPOD)、超氧化物歧化酶(SOD)等酶组成的酶促反应系统和由抗坏血酸、 α -维生素 E、谷胱甘肽、类胡萝卜素等抗氧化物质组成的非酶促反应系统^[28-29]。本研究结果显示,在光氧化条件下,‘标 810S’剑叶的 SOD、POD、CAT、APX 和 GR 等保护酶活性的上升幅度均显著高于‘810S’,其中 APX、GR 活性的上升比值又显著大于其他酶,这对 H_2O_2 的清除尤为重要,加之在光氧化条件下,‘标 810S’剑叶的非酶自由基清除剂 AsA、GSH 含量上升的幅度也显著高于‘810S’,从而有效地保护其叶绿体不受伤害,因此‘标 810S’比‘810S’具有较高的耐光氧化性。

欧立军等^[12]研究表明,在强光低 CO_2 浓度下,‘标 810S’的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性显著低于‘810S’(只有‘810S’的 69.80%),而 C_4 光合酶(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、NADP 苹果酸酶)活性则显著高于‘810S’的(分别比‘810S’的高 79.50%和 69.06%),认为 C_4 光合酶活性增高导致 CO_2 的固定更有效,‘标 810S’可能存在类似 C_4 植物的光合特性。本研究结果显示,在光氧化条件下‘标 810S’剑叶的 SOD 等保护酶活性及 AsA、GSH 等非酶自由基清除剂含量均较高,同时 PS II 的光能转换效率 F_v/F_m 降低较少,光的耗散也较少,证明‘标 810S’确实可能存在类似 C_4 植物的光合特性。

在中国长江中下游地区,水稻营养生长期常遭受高光强、高温胁迫,而在抽穗后期常遭受高光强、低温胁迫,严重时叶片会发生光氧化伤害。目前生

产大面积推广的籼型杂交稻由于对光氧化敏感,在生育后期叶片易黄化早衰。另外,目前正在推广的籼粳杂交稻由于带有籼稻的遗传因子,仍表现出光氧化早衰现象。而水稻淡黄绿叶色突变体‘标810S’抗光氧化能力强,且表现出 C₄ 植物的光合特

性,在今后的水稻育种工作中,如果我们利用‘标810S’这样一些特殊的水稻种质进行遗传育种,从后代中筛选目的植株,可能是进一步提高水稻光合能力、减轻光氧化、防止水稻早衰的一条有效途径。

参考文献:

- [1] LIN ZH F(林植芳), PENG CH L(彭长连), LIN G ZH(林桂珠). The modulation of PS II photochemical activity by carbon metabolic intermediates and photosynthetic electron transport under photooxidation conditions[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 2005, **13**(1): 1–7 (in Chinese).
- [2] GARCÍA-PLAZAOLA J I, ARTETXE U, BECRRIL J M. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter[J]. *Plant Science*, 1999, **143**(2): 125–133.
- [3] ANDERSON J M, PARK Y I, *et al.* Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature[J]. *Physiol. Plant*, 1997, **100**(2): 214–223.
- [4] HU Z L(胡紫菱), CUI ZH H(崔震海), QIN P(秦 萍), *et al.* Excess light energy dissipation and photooxidation defence of Chinese pine needles during the late winter[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University* (沈阳农业大学学报), 2012, **43**(5): 555–559 (in Chinese).
- [5] CHEN D M(陈冬梅), XIAO M X(肖美秀), *et al.* The performance of characteristics of tolerance to photooxidation and its relationship with stability of grain quality of rice in early and late seasons[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2005, **21**(6): 71–74 (in Chinese).
- [6] ÖGREN E, ROSENQVIST E. On the significance of photoinhibition of photosynthesis in the field and its generality among species[J]. *Photosynthesis Research*, 1992, **33**(1): 63–71.
- [7] HUANG X Q(黄晓群), ZHAO H X(赵海新), DONG CH L(董春林), *et al.* Chlorophyll-deficit rice mutants and their research advances in biology[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(8): 1 685–1 691 (in Chinese).
- [8] 欧立军. 水稻叶色突变体的光合生理特点及遗传规律分析[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2008.
- [9] OU L J(欧立军). Chloroplast development of a yellow-green mutant in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2010, **30**(1): 85–92 (in Chinese).
- [10] OU L J(欧立军). High photosynthetic efficiency of leaf colour mutant of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2011, **37**(10): 1 860–1 867 (in Chinese).
- [11] OU L J, CHEN Z, DAI X J, *et al.* Photosynthetic characteristics of a new yellow-green mutant with high photosynthetic rate in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Photosynthetica*, 2008, **46**(3): 395–399.
- [12] OU L J, TIAN L F, CHEN Z, *et al.* Photosynthetic characteristics of C₄ trait of chlorine mutant in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Photosynthetica*, 2008, **46**(4): 589–594.
- [13] LI X(李 霞), JIAO D M(焦德茂), DAI CH CH(戴传超). The response to photooxidation in leaves of PEPC transgenic rice plant (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2005, **31**(4): 408–413 (in Chinese).
- [14] ELLMAN G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **82**: 70–77.
- [15] TANAKA K, SUDA Y, KONDO N, *et al.* Ozone tolerance and the ascorbate-dependent hydrogen peroxide decomposing system in chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol.*, 1985, **26**: 1 425–1 431.
- [16] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术(第2版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 172–173.
- [17] 郑炳松. 现代植物生理生化研究技术[M]. 北京: 气象出版社, 2006: 41–42.
- [18] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast[J]. *Plant and Cell Physiol.*, 1981, **22**(5): 867–880.
- [19] FOYER C H, HALLIWELL B. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. *Planta*, 1976, **133**: 21–25.
- [20] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导(第4版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 223–224.
- [21] HODGES D M, DELONG J M, FORNEY C F, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. *Planta*, 1999, **207**(4): 604–611.
- [22] DUNAHAY T Q, STAEHELIN L A, SEIBERT M, *et al.* Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1984, **764**(2): 179–193.
- [23] COOMBS J, HALL D O. Techniques in bioproductivity and photosynthesis[M]. Oxford: Pergamon Press, 1982.
- [24] QIAN Q Q(钱琼秋), ZAI W SH(宰文珊), ZHU ZH J(朱祝军), *et al.* Effects of exogenous silicon on active oxygen scavenging systems in chloroplasts of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under salt stress[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报), 2006, **32**(1): 107–112 (in Chinese).
- [25] ZHANG SH R(张守仁). A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance[J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 1999, **16**(4): 444–448 (in Chinese).
- [26] ANDERSON J M, PARK Y I, CHOW W S. Unifying model for the photoinactivation of photosystem II *in vivo* under steady-state photosynthesis[J]. *Photosyn. Res.*, 1998, **56**: 1–13.
- [27] FOYER C H, NOCTOR G. Leaves in the dark see the light[J]. *Science*, 1999, **284**(5 414): 599–601.
- [28] ALSCHER R G, DONAHUE J L, CRAMER C L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells[J]. *Physiol. Plant*, 1997, **100**: 224–233.
- [29] SMIRNOFF N. Plant resistance to environmental stress[J]. *Curr. Opin. Biotech.*, 1998, **9**: 214–219.