

增强 UV-B 辐射和多效唑对绿豆光合作用的影响*

郭林英 余小平** 贺军民 孟朝妮 曲 威 刘 成

(陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062)

摘 要 使用 TPS-1 便携式光合仪结合 Farquhar 和 Sharkey 的理论测定或计算增强 UV-B 辐射、多效唑(PP₃₃₃)及其复合处理幼苗的相关光合指标,并同时测定核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)含量.发现 UV-B 辐射降低净光合速率(Pn)、气孔限制值(Ls)和气孔导度(Gs),但使胞间隙 CO₂ 浓度(Ci)增加;PP₃₃₃提高 Pn、Gs 和 Ci,却使 Ls 下降;与 PP₃₃₃ 处理相较,UV-B+PP₃₃₃ 诱导 Pn、Gs 和 Ci 降低,却促进 Ls 增加;UV-B 对 Pn、叶肉细胞光合能力(Ao)、表观量子效率(AQY)、羧化效率(dPn/dCi)和 Rubisco 含量的降低程度大于 PP₃₃₃ 对上述指标的提高程度,亦大于 PP₃₃₃ 处理下 UV-B 对上述指标的抑制程度.结果表明,UV-B 降低 Pn 的主要原因为叶肉细胞光合活性的抑制,而 PP₃₃₃ 促进 Pn 及 PP₃₃₃ 减轻 UV-B 对 Pn 的抑制效应主要是通过调节 Gs 实现的.

关键词 增强 UV-B 辐射;多效唑;复合处理;绿豆幼苗;光合作用

中图分类号 Q945 文献标识码 A

0 引言

UV-B 辐射增强是当今全球性环境问题之一,增强 UV-B 辐射对植物生活的影响已受到广泛关注^[1~3].大量研究发现,增强 UV-B 辐射有降低敏感植物光合速率^[4,5]、气孔导度^[6~8]、光系统 II 活性^[9~11]以及 RuBP 羧化-加氧酶(Rubisco)活性或含量^[12~14]的效应,但对增强 UV-B 辐射下光合作用气孔限制和叶肉细胞光合活性进行全面比较、分析的工作还不多^[15].师生波等^[16]发现,增强 UV-B 辐射显著增加高原植物麻花苜蓿叶片厚度,但对光合速率无明显影响.据此推测增加叶片厚度以抵御增强 UV-B 辐射对光合作用的影响可能是这类植物对 UV-B 辐射的一种适应方式.据报道,多效唑(PP₃₃₃)有提高植物叶片厚度和光合速率的作用^[17,18].预实验也证实,虽然实验期间增强 UV-B 辐射对绿豆幼苗叶片厚度无明显影响,但 PP₃₃₃ 显著促进叶片厚度增加(数据未列出).上述结果暗示,PP₃₃₃ 处理有可能减轻 UV-B 辐射对光合作用的抑制程度,但 PP₃₃₃ 是否确有作用及作用机制如何还有待证明.基于如上分析,本文研究了增强 UV-B 辐射和 PP₃₃₃ 单独或复合处理对绿豆幼苗光合作用的影响,旨在探索气孔和相关叶肉因素在不同处理下光合作用变化中的相对作用,同时为寻求 UV-B 辐射防护措施奠定理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料培养和处理

实验所用绿豆(*Phaseolus radiatus* L.)品种为秦豆-20.种子经 5%次氯酸钠灭菌后,分别在蒸馏水和 PP₃₃₃(10 mg/L)溶液中吸胀 24 h(25℃),然后将吸胀种子均匀播种在盛有干净湿砂的瓷盘中培养.培养条件为:光照强度 300~350 μmol/m²·s(每日光照 12 h,8:00~20:00),昼/夜温度为 30/20℃,培养室相对湿度 70%,每日定时、定量灌水.

上述条件下培养 8d 后,将蒸馏水和 PP₃₃₃ 处理材料各分为 2 份,1 份继续在上述条件下培养,是为对照和 PP₃₃₃ 处理.另 1 份在上述培养条件不变的情况下于光期增加 UV-B 辐射,是为 UV-B 和 UV-B+PP₃₃₃ 处理.UV-B 辐射光源为秦牌紫外灯管(波长峰值 305 nm,宝鸡光源研究所生产),处理时将 4 支紫外灯管置于植株顶层上方 25 cm,灯管用 0.08 mm 的乙酸纤维素膜包裹以滤去波长小于 290 nm 的紫外辐射.整个实验期间通过调节紫外灯管与植株顶层的距离使 UV-B 辐射强度维持在 0.35 W/m².紫外辐射剂量用 UV-B 辐照计(北京师范大学光电仪器厂生产)测定.

1.2 光合指标测定

净光合速率(Pn)、气孔导度(Gs)、细胞间隙 CO₂ 浓度(Ci)、大气 CO₂ 浓度(Ca)、Pn/f(Ci)响应曲线(按仪器设定,Ca 梯度依次为大气 CO₂ 浓度的 100%、75%、60%、45%、25%和 0%)和 Pn/f(PAR)响应曲线(用仪器所配滤光网并适当组合以调整到达叶片表面的 PAR,并对 PAR 进行实时测定)用便携式 TPS-1 型光合测定仪(PP-SYSTEM 公司制

* 陕西省自然科学研究计划(99SM20; 2003C₁01)资助项目

** Tel: 029-85308451 Email: shexiaoping530@163.com

收稿日期:2005-04-27

造)测定. 测定选取幼苗第一对真叶, 实验重复 4 次以上. 除 Pn/f(PAR)外, 其余测定光强均为 $900 \sim 1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 测定时间为每日 8:00~12:00.

光合能力(Ao)、羧化效率(dPn/dCi)及气孔限制值(Ls)根据 Farquhar 和 Sharkey^[19]的理论由 Pn/f(Ca)和 Pn/f(Ci)两条曲线计算得出. Ao 表示 Ci 等于大气 CO₂ 浓度时的 Pn, dPn/dCi 和表观量子效率(AQY)依次用 Pn/f(Ci)、Pn/f(PAR)响应曲线直线部分的斜率表示. $L_s = [(A_o - A)/A_o] \times 100\%$, 式中 A 为大气 CO₂ 浓度下幼苗的 Pn.

1.3 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)含量的测定

参照 Makino 等^[20]的方法并略加修改. 定时称取第一对真叶 0.5 g, 加 3 mL 蛋白提取液[Tris-HCl 50 mmol/L, SDS2%(W/V), 巯基乙醇 3%(V/V), 甘油 5%(V/V), EDTA 2 mmol/L, pH8.5]充分研磨, 匀浆液冷冻离心(15000 g, 15 min)去沉淀, 上清液加 4 倍体积 -20℃冷丙酮沉淀蛋白, 再离心(10000 g, 10 min)后弃上清液, 沉淀溶于 3 mL 样品溶解液[Tris-HCl 62.5 mmol/L, SDS2%(W/V), 甘油 10%(V/V), 巯基乙醇 5%(V/V), pH6.8], 在沸水浴中 3 min 后作电泳分析用. 电泳分离胶浓度为 12%(W/V), 浓缩胶浓度为 5%(W/V), 采用 Laemmli^[21]的电泳缓冲系统. 电泳上样量 30 μL , 稳流在 15 mA. 电泳结束后将电泳胶在室温下以 0.25%(W/V)考马斯亮蓝 R250(CBB-R)染色 12h, 再以脱色液脱色至背景无色. 用刀片将 Rubisco 大、小亚基切下, 置入 2 mL 甲酰胺中, 于 50℃恒温水浴中洗脱 5 h. 洗脱液在 595 nm 比色, 并以背景胶洗脱液作空白. 用于作标准曲线的牛血清蛋白以

样品溶解液配制, 并与样品在同样条件下电泳、洗脱及测光密度.

2 实验结果

2.1 Pn 的变化

由图 1 可见, 对照幼苗的 Pn 在 5 d 中基本稳

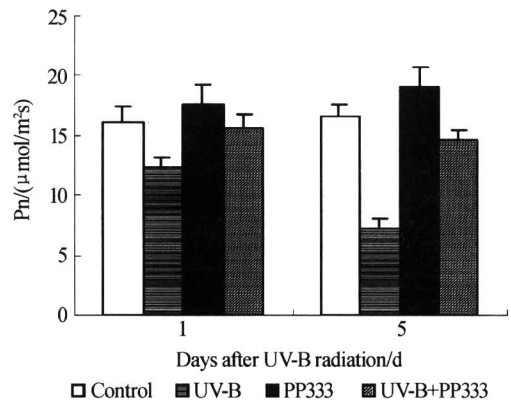


图 1 净光合速率的变化

Fig. 1 The changes of Pn

定, UV-B 处理明显抑制了幼苗的 Pn, 且随时间延长, 抑制程度增大, PP₃₃₃ 处理则有促进幼苗 Pn 的作用. 与对照相比较, UV-B 在处理的 1、5 两天分别抑制幼苗 Pn 的 23.8% 和 56.1%, 而与 PP₃₃₃ 处理相较, UV-B+PP₃₃₃ 在相同时间内分别抑制 11.5% 和 23.8%, 可以看出 PP₃₃₃ 处理明显减弱了 UV-B 对幼苗 Pn 的抑制.

2.2 Gs、Ci 和 Ls 的变化

由图 2A 可见, 无论是否经 PP₃₃₃ 处理, UV-B 均明显降低幼苗 Gs, 且随 UV-B 处理时间延长, Gs 降低程度增加. 与对照相较, PP₃₃₃ 明显促进 Gs 增加, 而且增加程度随时间延长上升.

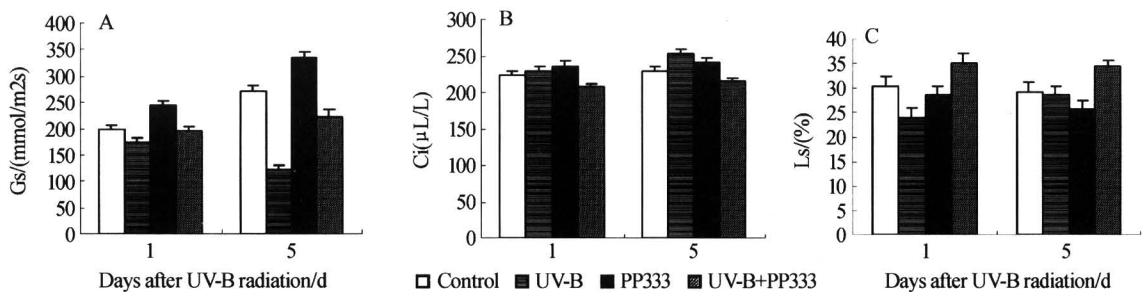


图 2 气孔导度(A), 胞间隙 CO₂ 浓度(B)和气孔限制值(C)的变化

Fig. 2 The changes of Gs(A), Ci(B) and Ls(C)

图 2B 表明, 对照幼苗 Ci 在 5 d 内稍有增加. UV-B 和 PP₃₃₃ 处理均使幼苗 Ci 提高, 随着处理时间延长, UV-B 提高 Ci 的程度增加, 而 PP₃₃₃ 促进幼苗 Ci 升高的效应在 5d 中未见明显变化. 与 PP₃₃₃ 处理相较, UV-B+PP₃₃₃ 明显降低了幼苗的 Ci, 且随时间延长, Ci 降低幅度稍有减小.

图 2C 表明, 与对照相较, UV-B 和 PP₃₃₃ 处理均有降低幼苗 Ls 的效应, 与 PP₃₃₃ 处理相较, UV-B+PP₃₃₃ 处理则明显增加幼苗的 Ls.

2.3 Ao 和 AQY 的变化

Ao 为胞间隙 CO₂ 浓度等于大气 CO₂ 浓度时, 即无气孔限制时的光合速率, 能够反映叶肉细胞的

光合活性,故称为光合能力.图 3A 表明,对照幼苗在 5d 中 A_o 无明显变化,UV-B 处理明显降低幼苗 A_o ,且随处理时间延长,降低幅度由 13.4% 增加到 59.3%. PP_{333} 处理有提高幼苗 A_o 的作用,1、5 两天分别提高 A_o 3.6% 和 13.8%,可见 PP_{333} 对幼苗 A_o 的提高幅度明显小于 UV-B 的降低幅度.与 PP_{333} 处理相比,1d 和 5d 时 UV-B+ PP_{333} 处理幼苗的 A_o 分别下降 1.5% 和 13.7%,亦明显小于 UV-B 处理对幼苗 A_o 的降低幅度(分别为 13.4% 和 59.3%).

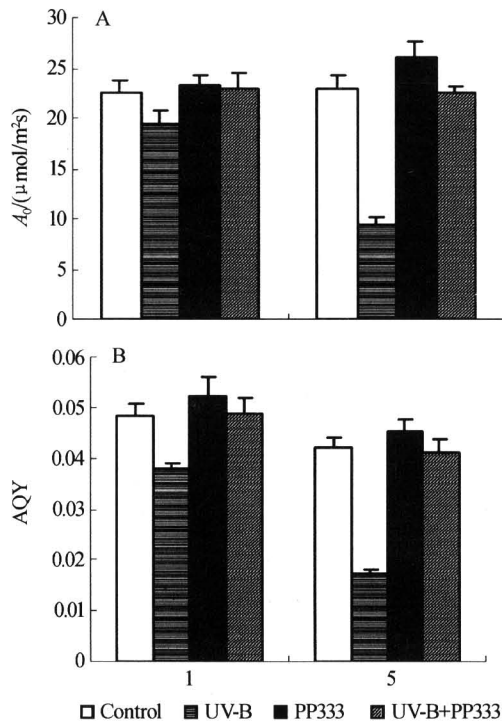


图 3 光合能力(A)和表观量子效率(B)的变化
Fig. 3 The changes of A_o (A) and AQY(B)

AQY 虽然不是直接的光化学效率指标,但在一定程度上反映光系统 II 光化学效率的大小.图 3B 表明,各处理对幼苗 AQY 的影响与对 A_o 的影响相似.与对照相比,UV-B 处理 1 d 和 5 d 分别使幼苗 AQY 降低 21.3% 和 58.9%,而 PP_{333} 处理分别提高 8.3% 和 7.1%.与 PP_{333} 处理相比,UV-B+ PP_{333} 处理仅使幼苗 AQY 降低 6.7% 和 9.3%.

2.4 dPn/dCi 和 Rubisco 含量的变化

由图 4 可见,各处理对幼苗 dPn/dCi 和 Rubisco 含量的影响比较一致,也与对 A_o 的影响相吻合.与对照相比,处理 1d 和 5d 时,UV-B 分别使 dPn/dCi 降低 23.1% 和 63.9%,分别使 Rubisco 含量降低 34.7% 和 30.1%,均大于 PP_{333} 对两指标的促进效果,亦大于 UV-B+ PP_{333} 与 PP_{333} 处理相比较的抑制效应.

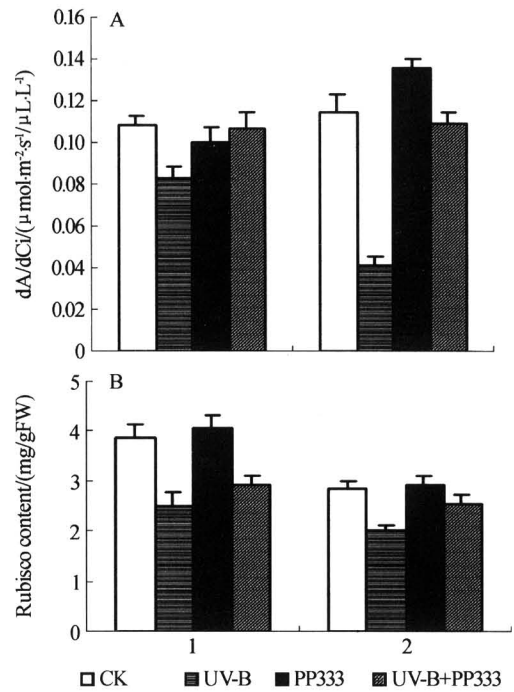


图 4 羧化效率(A)和 Rubisco 含量(B)的变化
Fig. 4 The changes of dPn/dCi(A) and Rubisco content(B)

3 讨论

关于增强 UV-B 辐射和 PP_{333} 影响光合作用的机制,已有研究分别从气孔导度、光系统 II 活性、Rubisco 活性及含量、叶片结构和叶绿体超微结构^[17,22] 等方面进行了探索,但对气孔限制和叶肉细胞光合活性的全面分析尚少见,这显然不利于了解增强 UV-B 辐射和 PP_{333} 影响光合作用的主要原因.按照 Farquhar 和 Sharkey^[19] 的理论, C_i 下降和 L_s 增加时,光合速率下降的主要原因为气孔因素(G_s 下降),而当光合速率降低伴随着 C_i 提高时,光合速率降低的主要原因一定是非气孔因素,即叶肉细胞光合活性的下降.由图 1、2 可以看出,随着 UV-B 处理时间延长, P_n 明显下降,但 C_i 逐渐提高,表明增强 UV-B 辐射抑制绿豆幼苗 P_n 的主要原因是叶肉细胞光合活性的降低. PP_{333} 处理提高了 P_n 、 G_s 和 C_i ,但 L_s 下降(图 1、2).一般而言,叶肉细胞光合活性下降和 G_s 提高所导致的胞外 CO_2 进入均可使 C_i 提高,但叶肉细胞光合活性下降会导致 P_n 下降,而 PP_{333} 处理却促进了 P_n ,所以 PP_{333} 处理幼苗的 C_i 提高(图 2B)只能是 G_s 增加所致, PP_{333} 促进 P_n 升高的作用主要是通过提高 G_s 实现的.与 PP_{333} 处理相比,UV-B+ PP_{333} 对幼苗 P_n 的抑制程度明显小于 UV-B 处理与对照相比较的抑制程度(图 1),表明 PP_{333} 处理对 UV-B 辐射有明显防护效果.

如前所述,UV-B 辐射降低 Pn 的主要原因是叶肉细胞光合活性下降,而 UV-B+PP₃₃₃ 处理与 PP₃₃₃ 处理相比,5d 中伴随 Pn 下降,Gs 和 Ci 下降,而 Ls 明显增加(图 2),表明 UV-B 辐射降低 PP₃₃₃ 处理幼苗 Pn 的主要原因为气孔因素(Gs 下降)。

叶肉细胞光合活性相关指标的测定结果(图 3、4)表明,无论是否经 PP₃₃₃ 处理,UV-B 辐射均降低幼苗叶片 Ao、AQY、dPn/dCi 和 Rubisco 含量,但 UV-B 辐射对对照幼苗上述指标的降低程度明显大于 PP₃₃₃ 处理幼苗。而且 UV-B 辐射对对照幼苗 Ao、AQY、dPn/dCi 和 Rubisco 含量的降低程度也明显大于 PP₃₃₃ 处理对上述指标的提高程度。上述结果再次证明了增强 UV-B 辐射降低,而 PP₃₃₃ 处理提高 Pn 及增强 UV-B 辐射降低 PP₃₃₃ 处理幼苗 Pn 的主要原因是 Gs 下降。

王兆龙等^[17]证明,PP₃₃₃ 处理能增加小麦叶片叶肉细胞层数及叶片厚度,同时使叶绿体基粒数及基粒类囊体数增多,本文的预实验也证实 PP₃₃₃ 有增加叶片厚度的作用(数据未列出)。叶片厚度的增加显然有利于减轻 UV-B 辐射对光合器官的伤害^[23],而叶绿体结构的改善则直接使光合功能增强。由于本实验中 Pn、Ao、AQY、dPn/dCi 等指标均是以单位叶面积为基础测定或计算的,所以 PP₃₃₃ 对幼苗上述指标的提高和减轻 UV-B 辐射对上述指标的抑制既与叶片厚度增加有关,也与叶绿体结构、功能的改善相联系。另外,PP₃₃₃ 增加气孔导度和单位重量基础上的 Rubisco 含量以及减轻 UV-B 辐射对单位重量基础上 Rubisco 含量的降低程度应该与叶片厚度增加无直接关系。看来 PP₃₃₃ 促进绿豆幼苗光合作用及减轻 UV-B 辐射对光合作用的抑制机制均包括了间接作用和直接效果两个方面,考虑到 PP₃₃₃ 的其它抗逆、增产效应,将 PP₃₃₃ 的施用作为一种 UV-B 防护措施是有效而且可行的。

参考文献

- 李韶山,王艳,王小菁,等. UV-B 诱导的水稻 DNA 损伤和修复研究. 光子学报,2000,29(7):595~598
Li S S, Wang Y, Wang X Q, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2000,29(7):595~598
- 韩榕,王勋陵,岳明,等. He-Ne 激光对小麦幼苗增强 UV-B 辐射损伤修复的影响. 光子学报,2001,30(10):1182~1187
Han R, Wang Y L, Yue M, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2001,30(10):1182~1187
- Stitt M. Raising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell and Environment*, 1991,25(6):695~706
- Van T K, Garrard L A, West S H. Effect of UV-B

- radiation on net photosynthesis of some crop plants. *Crop Science*, 1976,16(5):715~718
- Basiouny F M, Van T K, Biggs R H. Some morphological and biochemical characteristics of C₃ and C₄ plants irradiated with UV-B. *Physiologia Plantarum*, 1978,42(1):29~32
- Teramura A H, Tevini M, Iwanzik W. Effects of UV-B irradiation on plants during water stress. 1. Effects on diurnal stomatal resistance. *Physiologia Plantarum*, 1983,58(2):175~180
- Dai Q, Coronel V P, Vergara B S, et al. UV-B radiation effects on growth and physiology of four rice cultivars. *Crop Science*, 1992,32(2):1269~1274
- Middleton E M, Teramura A H. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from UV-B damage. *Plant Physiology*, 1993,103(3):741~752
- Nedunchezian N, Kulandaivelu G. Evidence for the ultraviolet-B (280~320 nm) radiation induced structural reorganization and damage of photosystem II polypeptides in isolated chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, 1991,81(4):558~563
- Nogues S, Baker N R. Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of CO₂ assimilation in pea leaves on exposure to UV-B. *Plant Cell and Environment*, 1995,18(7):781~787
- Jansen M A K, Gaba V, Greenberg B M, et al. Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetic active radiation trigger rapid degradation of the D₂ protein of photosystem II. *Plant Journal*, 1996,9(5):693~699
- Jordan B R, He J, Chow W S, et al. Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell and Environment*, 1992,15(1):91~98
- Kulandaivelu G, Nedunchezian N. Synergistic effects of ultraviolet-B enhanced radiation and growth temperature on ribulose 1, 5 bisphosphate and ¹⁴CO₂ fixation in *Vigna sinensis* L. *Photosynthetica*, 1993,29(3):377~383
- Takeuchi A, Yamaguchi T, Hidema J, et al. Changes in synthesis and degradation of Rubisco and LHC-II with leaf age in rice (*Oryza sativa* L) growing under supplementary UV-B radiation. *Plant Cell and Environment*, 2002,25(10):695~706
- Allen D J, McKee I F, Farage P K, et al. Analysis of the limitation to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two Brassica napus cultivars to UV-B. *Plant Cell and Environment*, 1997,20(5):633~640
- 师生波, 贾桂英, 赵新全, 等. 增强 UV-B 辐射对高山植

- 物麻花苻净光合速率的影响. 植物生态学报, 2001, **25**(5):520~524
- Shi S B, Ben G Y, Zhao X Q, *et al.* *Acta Phytologica Sinica*, 2001, **25**(5):520~524
- 17 王兆龙, 江海东, 严美春, 等. PP₃₃₃ 对小麦叶片结构和光合作用的影响. 江苏农学院学报, 1998, **19**(4):13~17
- Wang Z L, Jiang H D, Yan M C, *et al.* *Journal of Jiangsu Agricultural College*, 1998, **19**(4):13~17
- 18 Deyton D E, Knoxville T N, Cummins J C. Strawberry growth and photosynthetic responses to paclobutrazol. *Hort Science*, 1991, **26**(10):1178~1180
- 19 Farquhar G D, Sharkey T D. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 1982, **33**:317~345
- 20 Makino A, Mae T, Ohira K. Colorimetric measurement of protein stained with coomassie brilliant R on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis by eluting with formamide. *Agric Bio Chem*, 1986, **50**(7):1911~1912
- 21 Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(5259):680~685
- 22 Huang W D, Shen T, Han Z H, *et al.* Influence of paclobutrazol on photosynthesis rate and dry matter partitioning in the apple tree. *Journal of Plant Nutrition*, 1995, **18**(4):901~910
- 23 Johanson U C, Gehrke L O, Bjorn T V. The effect of enhanced UV-B radiation on a subarctic heath ecosystem. *Ambio*, 1995, **24**(2):106~111

The Effects of Increased UV-B Radiation and Paclobutrazo on Photosynthesis in Mung Bean Seedlings

Guo Linying, She Xiaoping**, He Junmin, Meng Zhaoni, Qu Wei, Liu Cheng

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062

Received date: 2005-04-27

Abstract The photosynthetic parameters of mung bean seedling in present of increased UV-B radiation, paclobutrazo (PP₃₃₃) or their combined treatment were determined with TPS-1 photosynthesis system or calculated according to the theory of Farquhar and Sharkey. The content of RuBP carboxylase-oxygenase (Rubisco) was also assayed simultaneously. In the first leaf of seedling, UV-B radiation resulted in decreases in net photosynthetic rate (Pn), stomatal limitation value (Ls) and stomatal conductance (Gs), which were accompanied by increase in intercellular CO₂ concentration (Ci). PP₃₃₃ elevated Pn, Gs and Ci, and reduced Ls. In comparison with PP₃₃₃ treatment, UV-B+PP₃₃₃ induced reduction of Pn, Gs and Ci, but promoted Ls to rise. Pn, mesophyll photosynthetic capacity (A_o), apparent quantum yield (AQY), carboxylation velocity of Rubisco (dPn/dCi) and the content of Rubisco were reduced both in UV-B treatment (in comparison to control) and UV-B+PP₃₃₃ treatment (in comparison to PP₃₃₃ treatment) seedlings, and the reductive extent was greater in UV-B treatment seedling than in UV-B+PP₃₃₃ treatment seedling. And the reductive effects of UV-B radiation on Pn, A_o, AQY, dPn/dCi and Rubisco content were bigger than the promotive effects of PP₃₃₃ treatment on those parameters. These results prove that UV-B radiation depresses Pn mainly by inhibiting photosynthetic activities of mesophyll cell, while the dominant reasons of PP₃₃₃ promoting Pn and UV-B radiation inhibiting Pn in UV-B+PP₃₃₃ treatment seedling are the changes of Gs.

Keywords Increased UV-B radiation; PP₃₃₃; Combined treatment; Mung bean seedling; Photosynthesis

Guo Linying was born in 1979, in Shaanxi, China. She received her bachelor degree in 2003 from Life Science College of Shaanxi Normal University, where she is working for her master degree of botany now. She is interested in plant physiology research in environment stress.

