

C₃ 和 C₄ 植物叶片对光氧化响应的日变化

彭长连 林植芳 林桂珠

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 田间生长的 C₃ 植物花生和 C₄ 植物玉米分别于晴天上午 9:00、中午 12:00、下午 15:00 取样。中午 12:00 花生叶片的 Fv/Fm 较早上 9:00 下降 16%，出现了光抑制现象，玉米叶片的 Fv/Fm 则未下降。不同时间取样的花生和玉米叶片经甲基紫精 (MV) + 强光的人为光氧化处理，叶绿素和类胡萝卜素出现不同程度的氧化降解，中午 12:00 降解幅度最大，15 时降幅最小。植物叶片的抗氧化能力与其 SOD 活性相关，而与 PEPCase 的活性没有明显的相关性。光氧化处理后，花生和玉米的叶绿素荧光参数 Fv/Fm、q_p、ΦPSII 都下降，花生在 12:00 的降幅最小，玉米的降幅最大。光氧化引起花生的 q_N 和热耗散系数 (KD) 上升，玉米则都下降。结果显示 C₃ 植物花生和 C₄ 植物玉米对光氧化的响应可能存在不同的机制。

关键词 花生；玉米；光氧化作用；叶绿素荧光

中图分类号 Q947.8

DIURNAL CHANGES OF PHOTOOXIDATION RESPONSE IN LEAVES OF C₃ AND C₄ PLANTS

Peng Changlian Lin Zhifang Lin Guizhu

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Diurnal changes of SOD, POD and PEPCase activities, pigment contents and chlorophyll fluorescence parameters were compared between C₃ plant peanut (*Arachis hypogaea*) and C₄ plant maize (*Zea mays*) under natural condition and photooxidation condition. Plant leaves were collected at 9:00(a.m.), 12:00(noon) and 15:00(p.m.) in the field during a day, respectively, and then treated by 500 μmol/L methyl viologen (MV) under 1500 μmol m⁻²s⁻¹ light intensity for 30 min. In the midday (12:00), Fv/Fm in untreated peanut leaves decreased by 16% indicating that the photoinhibition occurred, while that in untreated maize leaves showed no change. After MV-photooxidation treatment, the maximal decrease in chlorophyll and carotenoid were found in both peanut and maize leaves at 12:00. The antioxidative ability was related to SOD activity but seemed not to be related to PEPCase activity. Under MV-photooxidation, Fv/Fm, q_p and ΦPSII were found to have a maximal decrease in maize leaves and a minimal decrease in

peanut leaves at 12:00. MV-induced q_N and KD (coefficient of heat dissipation) were increased in peanut leaves but decreased in maize leaves during a day. It is proposed that a different mechanism in response to photooxidation may exist between C_3 plant and C_4 plant.

Key words *Arachis hypogaea*; *Zea mays*; Photooxidation; Chlorophyll fluorescence

当绿色植物的光合器官吸收了超过光合作用所能利用的光能而引起 PSII 的过量激发, 光合效率下降, 即光抑制。这种依赖氧和光的色素漂白作用称为光氧化^[1]。大量的研究证明光氧化损伤是强光甚至中等强光下其它逆境因子损伤作用的一种重要的生理机制^[2,3]。

光氧化逆境往往出现于 CO_2 同化能力下降而导致光合电子传递系统的调节能力降低时。 C_3 和 C_4 植物的 CO_2 固定途径、光呼吸以及胞间 CO_2 浓度 (C_i) 皆有明显的差别, 光合效率的日变化也有显著的不同^[4,5]。关于植物光抑制和光氧化损伤的研究虽已有大量的报道, 但尚未见系统比较 C_3 和 C_4 植物对光氧化作用响应特性的日变化。为此, 本文以常见的 C_3 和 C_4 植物花生和玉米为材料, 初步探讨了一天中不同时间取样的叶片经人为光氧化处理后, 光合色素含量和叶绿素荧光参数的变化, 为光氧化与叶片生理状况之间的关系及其调控提供部分依据。

1 材料与方 法

植物材料 C_3 植物花生 (*Arachis hypogaea*), C_4 植物玉米 (*Zea mays*) 栽于本所实验地, 常规管理。以约 30 d 植物顶端成熟叶片为材料, 在广州地区 4 月下旬选一晴天分别于上午 9:00、中午 12:00、下午 15:00 取样, 不同时间的叶面入射光强分别为 $700 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, $1300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ 和 $450 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, 取样后立即进行光氧化处理, 以未处理的叶片为对照。

光氧化处理 叶圆片 ($d 0.95 cm^2$) 预先于暗下真空渗入 H_2O 或 $500 \mu mol/L$ 甲基紫精 (MV, 为 $-O_2$ 产生源) 30 min, 接着在强光 $1500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ 下照射 30 min。经光氧化处理的叶圆片立即作叶绿素荧光和光合色素的测定。

酶活性的测定 PEPCase 活性的测定参照李双顺等^[6]的方法, SOD 和 POD 活性的测定见林植芳等^[7]的方法。

光合色素的测定 参照林植芳等^[8]的方法。

叶绿素荧光的测定 叶绿素荧光用脉冲调制荧光仪 (PAM, Walz) 测定, 弱测定光为 $0.01 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, 光化光 $250 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, 强闪光为 $4000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ 。参照 Schreiber 等^[9]和 Foyer^[10]的公式计算叶绿素荧光参数: $q_P = (F_m - F_s) / F_v$, $q_N = (F_m - F_m') / F_m$, $\Phi PSII = (F_m' - F_s) / F_m'$, $KD = F_m / F_m' - 1$ 。其中 q_P 为光化学猝灭系数, q_N 为非光化学猝灭, $\Phi PSII$ 代表经 PSII 的线性电子传递电子流的量子效率, KD 为热耗散速率系数。

2 实验结果

2.1 自然条件下 PSII 光化学量子效率 F_v/F_m 的日变化

F_v/F_m 的降低是光抑制发生的最明显的特征之一^[11]。花生叶片的 F_v/F_m 在中午较早上下降了 15.5% (图 1), 下午随太阳光强的减弱, F_v/F_m 又恢复至上午的水平。玉米叶片的 F_v/F_m 在

中午的强光、高温条件下并没有下降,早上、中午和下午玉米叶片的 Fv/Fm 变化甚微。结果表明, C₃ 的花生在自然光照条件下,中午的高光高温可导致光抑制现象的发生,而 C₄ 的玉米则不出现光抑制。

2.2 自然条件下叶片 PEPCase、SOD 和 POD 活性的日变化

PEPCase 是 C₄ 植物固定 CO₂ 的关键酶。玉米叶片 PEPCase 活性中午最高(图 2),是早上的 6.12 倍,下午的 3.13 倍,中午的强光和高温促进了玉米叶片 PEPCase 的活化。C₃ 植物花生叶片的 PEPCase 活性较低,日变化不明显。

SOD 和 POD 是植物细胞内重要的抗氧化酶,花生和玉米叶片 SOD 活性呈现出不同的日变化趋势(图 3A),玉米叶片 SOD 活性在下午有最高值,中午最低。而花生叶片 SOD 活性最高值出现在中午,早上最低。玉米 SOD 的活性除中午与花生相近外,早上和下午都高于花生,分别为花生的 127%(9 时)、98%(12 时)和 128%(15 时)。玉米 POD 活性也明显高于花生(图 3B),玉米 POD 活性早上最高,中午最低,而花生叶片的 POD 活性从早上到下午呈下降的趋势。

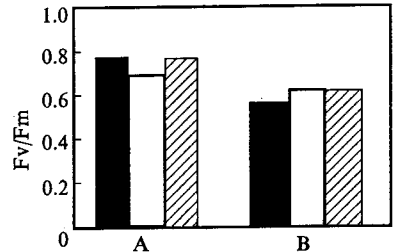


图 1 花生(A)和玉米(B)叶片的 Fv/Fm 的日变化
Fig. 1 Diurnal changes of Fv/Fm in leaves of *Arachis hypogaea* (A) and *Zea mays* (B)
■ 9:00 □ 12:00 ▨ 15:00

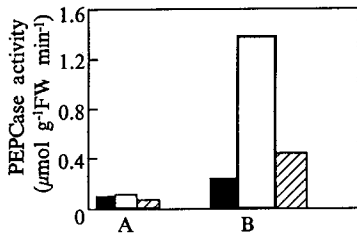


图 2 花生(A)和玉米(B)叶片 PEPCase 活性的日变化
Fig. 2 Diurnal changes of activities of PEPCase in leaves of *Arachis hypogaea* (A) and *Zea mays* (B)
■ 9:00 □ 12:00 ▨ 15:00

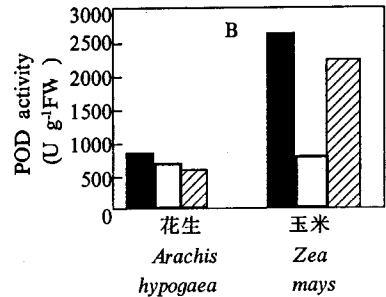
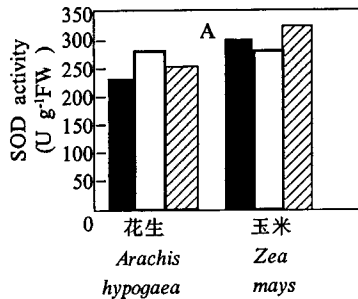


图 3 花生和玉米叶片 SOD(A)和 POD(B)活性的日变化
Fig. 3 Diurnal changes of activities of SOD (A) and POD (B) in leaves of *Arachis hypogaea* and *Zea mays*
■ 9:00 □ 12:00 ▨ 15:00

2.3 光氧化条件下光合色素降解的日变化

将来自一天中 9:00、12:00 和 15:00 的玉米和花生叶片作 MV-光氧化处理,以光氧化处理前的色素含量为 100%,计算处理后色素降解的百分比。图 4 看出光氧化逆境下,玉米和花生光合色素的降解速率都是中午高,早上和下午是单峰型。类胡萝卜素的降解大于叶绿素的降解,中午时叶绿素含量降低 4%—5%,类胡萝卜素含量降低 10%—11.5%。色素的氧化降解程度与田间太阳光强弱的变化相一致。这表明人为光氧化条件下光合色素的降解受到叶片在田间中预先接受光强大小的影响,无论是 C₃ 或 C₄ 植物,预先接受强光的辐射加剧了 MV-光氧化条件下光合色素的漂白作用。采自中午强光下的玉米叶片色素降解较花生少,但两者的差异不明显。

2.4 光氧化条件下叶绿素荧光的日变化

玉米和花生叶片无论在早上、中午、下午取样,经光氧化处理后,其 PSII 原初光化学效率

Fv/Fm、PSII 线性电子传递的量子效率 Φ PSII 和光化学猝灭 q_P 都下降(图5)。玉米和花生下降的日变化趋势相反,玉米叶片的 Fv/Fm、 Φ PSII 和 q_P 在中午 12:00 下降最大(图5A),花生叶片的同样参数在中午的下降最少(图5B)。光氧化条件下,玉米和花生 Fv/Fm 下降的幅度较少(玉米 31%–34%,花生 25%–29%), Φ PSII 下降的幅度大(玉米 19%–48%,花生 47%–62%),9:00 和 15:00 样品的 Φ PSII 和 q_P 为花生的下降幅度大于玉米,反之,中午强光下的玉米叶片的 Φ PSII 和 q_P 则比花生叶片对光氧化更为敏感。

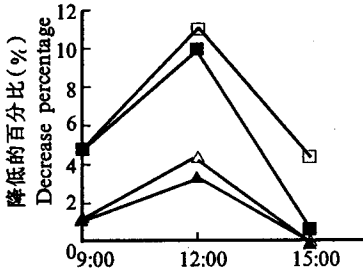


图4 光氧化条件下花生和玉米色素降解的日变化

Fig. 4 Diurnal changes of pigment decrease in leaves of *A. hypogaea* and *Zea mays* under photooxidation treatment

- △— 花生 Chl (Chlorophyll of *A. hypogaea*)
- 花生 Car (Carotenoid of *A. hypogaea*)
- ▲— 玉米 Chl (Chlorophyll of *Z. mays*)
- 玉米 Car (Carotenoid of *Z. mays*)

非光化学猝灭系数 (q_N) 和热耗散系数 (KD) 都是表示光合作用过程中通过非辐射耗散过剩光能的两个荧光参数。光氧化条件下,从 9:00、12:00 和 15:00 取样的玉米叶片的 q_N 和 KD 都下降(图6A),而花生叶片的则都上升(图6B)。其中玉米 q_N 和 KD 下降的最大值出现于中午,早上和午后的下降值较小,而花生叶片的 q_N 和 KD 上升的最小值也在中午。

从光氧化处理后叶绿素荧光参数的日变化趋势的差别看来, C_3 植物花生和 C_4 植物玉米在防护光合器官的氧化伤害方面可能存在着不同的机理。

3 讨论

MV 对植物的毒性在于产生超氧阴离子自由基 ($-O_2^{\cdot}$)。MV 是水溶性的二价有机阳离子,可从叶绿体 PSI 的氧化端接受一个电子而被还原为稳定的 MV 阳离子自由基,随后以很高的反应速率迅速与分子 O_2 反应形成 $-O_2^{\cdot}$,并通过复杂的反应系列而转化为其他的活性氧品种如羟基自由基 OH^{\cdot} 和 H_2O_2 等^[12]。高浓度的 MV 在微体和线粒体中也可作为电子传递的受体而形成

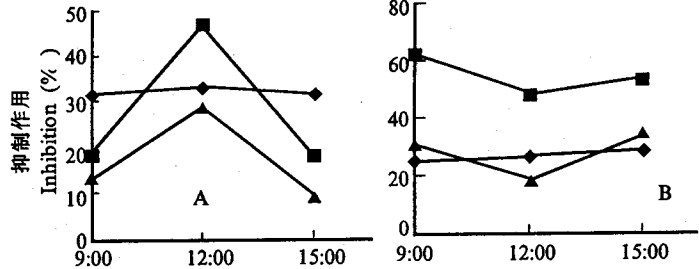


图5 光氧化条件下玉米(A)和花生(B) Fv/Fm、 Φ PSII 和 q_P 的日变化

Fig. 5 Diurnal changes of Fv/Fm, Φ PSII and q_P in leaves of *Zea mays* (A) and *Arachis hypogaea* (B) under photooxidation treatment

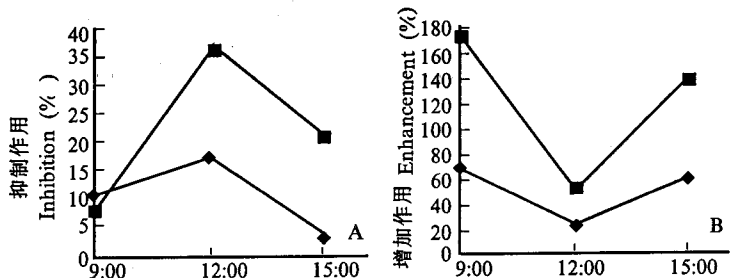


图6 光氧化条件下玉米(A)和花生(B)的 q_N 和 KD 的日变化

Fig. 6 Diurnal changes of q_N and KD in leaves of *Zea mays* (A) and *Arachis hypogaea* (B) under photooxidation treatment

- ◆— q_N
- KD

-O₂^[13]。MV 的光氧化反应需依赖于光和 O₂ 的存在, 植物对除草剂百草枯的抗性有敏感型与强抗性型之分^[14]。本文的结果表明 C₃ 植物花生和 C₄ 植物玉米对 MV 光氧化作用的响应受到叶片生理状态制约。自然条件下花生与玉米叶片的光合特性 (PEPCase 活性、Fv/Fm) 和细胞保护酶 SOD、POD 活性在白天不同时间表现日变化动态 (图 1-3), 因而经人为的 MV- 强光作用后, 光合色素的氧化降解和反映 PSII 功能状态的叶绿素荧光参数也呈显著的日变化 (图 4-6)。中午 12:00 的预先经过自然强光照的叶片, 其光氧化响应引起的变幅最大, 早上与下午处于较低光照下的叶片, 光氧化响应的程度差别较小。

高的抗氧化保护酶类活性对活性氧的脱毒作用被视为植物抗 MV 损伤的一种重要机理^[15,16], 但过去对 C₄ 植物光合碳固定的 CO₂ 泵是否有助于减轻体内的光氧化逆境, 尚无明确的定论。玉米 12:00 叶片比 9:00 及 15:00 叶片有高的 PEPCase 活性和较高的 Fv/Fm, 显示其光合羧化过程甚为活跃, 未出现光抑制现象, 但同时却有低的 SOD 和 POD 活性, 尤其 POD 活性的下降更甚。未观察到一天内玉米的光合效率与其抗氧化之间的一致性。中午 12:00 叶片经 MV 光氧化作用后, 部分叶绿素和类胡萝卜素氧化褪色, Fv/Fm、ΦPSII 和 q_p 明显下降, 甚至反映植物光保护作用的 q_N 和 KD 也比 9:00 与 15:00 叶片下降更大。看来, 中午的玉米叶片对 MV 光氧化的敏感性可能主要与其较低的 SOD 和 POD 活性有关, 而其活跃的 CO₂ 同化作用在外源的强氧化条件下似未显示有利的作用。

与玉米不同, 12:00 已出现轻度光抑制 (Fv/Fm 降低) 的花生叶片在光氧化处理后, 虽然光合色素也有所下降, 但 Fv/Fm、ΦPSII 和 q_p 的下降幅度比 9:00 与 15:00 的叶片低, 即 PSII 对光能的吸收转换和线性电子传递的量子效率和光化学猝灭受光氧化损伤的程度较轻。光氧化条件下, 花生叶片中加强了通过热耗散以消耗过量激发能的保护途径的积极运行, 三种生理状态的叶片中非光化学猝灭 q_N 和热耗散系数 KD 皆显著增大, 只是中午叶片 q_N 和 KD 的增加幅度较低。中午时花生叶片 PSII 光化学功能在光氧化下受抑制较少, 可能也与中午叶片有较高的能清除 -O₂[·] 的 SOD 活性有关。

玉米和花生叶片对光氧化响应日变化趋势之间的差别, 尤其是 q_N 或增或减的相反变化趋势, 和中午 12:00 其他叶绿素荧光参数值的不同变化规律, 反映花生和玉米在调节自身的代谢响应于强光和强光氧化作用方面, 可能存在除了抗氧化酶保护能力之外的不同的机制。Fuerst 和 Vaughnh 曾综述了植物对抗百草枯的 5 种假说^[15], 然而具体到光合作用的 C₃ 与 C₄ 植物之间抗性的差别与其机制的研究, 尚需提供更详尽而系统的证据。

参考文献

- 1 Powles S B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann Rev Plant Physiol*, 1984, 35:15-44
- 2 曾韶西, 王以柔, 刘鸿先. 光对低温处理的木薯叶圆片光合色素的影响. *热带作物学报*, 1990, 11(2):79-84
- 3 吕庆, 郑荣梁. 干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化与脱酯化. *中国科学*, 1996, 26(1):26-30
- 4 许大全, 徐宝基, 沈允钢. C₃ 植物光合效率的日变化. *植物生理学报*, 1990, 16(1):1-5
- 5 许大全, 丁勇, 沈允钢. C₄ 植物玉米光合效率的日变化. *植物生理学报*, 1993, 19(1):43-48
- 6 李双顺, 孙谷畴, 林桂珠等. 生长后期的玉米植株不同叶位叶片中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶活性的变化. *中国科学院华南植物研究所集刊, 第三集*, 北京: 科学出版社, 1986, 83-87

- 7 林植芳, 李双顺, 张东林等. 采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化. 植物学报, 1988, 30(1):40-45
- 8 林植芳, 李双顺, 张东林等. 采后荔枝果实中氧化和过氧化作用的变化. 植物学报, 1988, 30(4):382-387
- 9 Schreiber V, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res*, 1986, 10:51-62
- 10 Foyes C H, Furbank R, Harbinson J. The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth Res*, 1990, 25:83-100
- 11 郭连旺, 许大全. 自然条件下珊瑚树 (*Viburnum odoratissimum*) 叶片光合作用的光抑制. 植物生理学报, 1994, 20(1):45-64
- 12 Babbs C F, Pham J A, Coolbaugh R C. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol*, 1989, 90:1267-1270
- 13 Hassan H M. Exacerbation of superoxide radical formation by paraquat. *Methods Enzymol*, 1984, 105:523-529
- 14 Shaaltiel Y G, Ressel J. Kinetic analysis of resistance to paraquat in *Coryza*. *Plant Physiol*, 1987, 85:869-871
- 15 Fuerst E P, Vaughn K C. Mechanisms of paraquat resistance. *Weed Technol*, 1990, 4:150-156
- 16 Harper D B, Harvey B M R. Mechanisms of paraquat to tolerance in perennial ryegrass II. Role of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. *Plant Cell Environ*, 1978, 1:211-215