

超高产杂交稻剑叶的光抑制及其77K荧光光谱特性

阳成伟^{1,2} 彭长连^{1,*} 陈贻竹¹ 林桂珠¹ 欧志英^{1*}

(¹中国科学院华南植物研究所,广东广州 510650; ²中山大学生命科学学院,广东广州 510275)

摘要 通过对培矮 64S/E32 和汕优 63 进行高光胁迫结果表明:与籼型杂交稻汕优 63 比较,培矮 64S/E32 的 F_v/F_m 和 Φ_{PS} 、 Φ_{PS} 和 Φ_{PS} 荧光强度下降的幅度以及 F685/F742 和 F694/F742 比率的变化较小。用 D1 蛋白合成抑制剂 CAP 处理时,培矮 64S/E32 的 F_v/F_m 和 q_P 下降程度稍高于汕优 63,而用叶黄素循环抑制剂 DTF 处理,结果则反之。表明超高产水稻品种培矮 64S/E32 有较强的耐光抑制能力,其耐光抑制特性可能与 D1 蛋白的周转有关。

关键词 超高产杂交稻;光抑制;77K 荧光光谱;D1 蛋白周转

中图分类号: S511

Photoinhibition and 77 K Fluorescence Spectra in the Flag Leaves of Super-high Hybrid Rice (*Oryza sativa* L.)

YANG Cheng-Wei^{1,2}, PENG Chang-Lian^{1,*}, CHEN Yi-Zhu¹, LIN Gui-Zhu¹, OU Zhi-Ying¹

(¹ South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, Guangdong; ² School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, Guangdong, China)

Abstract The sensitivity to photoinhibition and its mechanism were compared between super highyield rice Peiai 64S/E32 and *indica* hybrid Shanyou 63. After strong light treatment, the maximal photochemical efficiency of PS II (F_v/F_m), the quantum efficiency of PS II (Φ_{PSII}) decreased less in Peiai 64S/E32 than in Shanyou 63. High light stress treatment lead to the intensities of fluorescence emission from PS II and PS I, and the ratios of F685/F742 and F694/F742 decreased much in Shanyou 63, but had no effect on the position of chlorophyll fluorescence emission peak in the two hybrids rice subspecies. The decreased extent of F_v/F_m and q_P in CAP-pretreated leaves of Peiai 64S/E32 was more than in Shanyou 63 as the synthesis of D1 protein was inhibited, while it was on the contrary in DTFpretreated leaves between two cultivars when the xanthophylls cycle was inhibited. The results suggested that more resistance to photoinhibition in super highyield rice might be related to it's stronger D1 protein turnover.

Key words Super highyield rice; Photoinhibition; 77 K fluorescence spectra; D1 protein turnover

光合作用的光抑制现象在一百多年前就引起了人们的注意。光抑制是由光引起的,与任何发育变化无关的一种可逆的光合作用的阻滞现象。在功能上,光合作用光抑制导致吸收 CO_2 (C_{O_2}) 和释放 O_2 (O_2) 的最大量子产量下降,表现在光响应曲线的原点倾斜角变小,并随着过剩光能作用时间的延长,光合作用的光饱和点也随之下降。光抑制影响光合作用和干物质的积累,能导致碳同化产物减少 10% 左右^[1]。由于生产上的重要性,我国水稻的光抑制研究已有大量的报道^[2-5]。研究光抑制除了用荧光诱导动力学之外,也有许多学者应用低温荧光光谱

的方法,大量的研究表明,77K 低温下的 PS II 和 PS I 的荧光发射关系能被用来研究激发能在两个光系统之间的分配^[6]。本文采用人为光抑制处理来详细了解超高产杂交稻的光抑制特性和低温荧光光谱特性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

超高产杂交稻培矮 64S/E32 和对照汕优 63 种子由湖南杂交水稻研究中心提供。于 2001 年 4 月

*基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(GI998010100)。

作者简介:阳成伟(1972-),湖南省人,博士后。*通讯作者:彭长连,E-mail: pengchl@scib.ac.cn。

Received(收稿日期):2002-08-29,Accepted(接受日期):2003-01-11。

种植于华南植物研究所的实验田中,常规管理。在抽穗期选取生长势相近的植株,随着剑叶的生育过程于早晨6时取剑叶作各项指标测定。

1.2 叶片光抑制处理

水稻叶片置于石英卤灯下(1 000 W)照射,中间隔置8 cm厚的水槽,通过流动水吸收光辐射热量,使温度控制在室温(25℃)条件下。叶片切段置于含水的滤纸上。到达叶面的最大光强可达到 $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.3 叶片叶绿素荧光测定

使用调制荧光仪 PAM 101/102/103 (Walz, Effeltrich, Germany)测叶片的叶绿素荧光,测定之前将叶片暗适应15 min,用1.6 kHz的弱测量光($0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)测 F_0 ,随后给一个强闪光(Schott lamp KL 1500 HL103)(大于 $5000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,脉冲时间2 s),测定荧光的最大值 F_m 。当 F_m 位置上升 F_0 时,给出一个连续的光化光($400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$),诱导荧光再上升到 F_p ,当荧光从 F_p 下降并达稳态水平 F_s 时,加一个强闪光,获得一个稳定的 F_m 。最后关掉光化光使荧光下降到 F_0 。根据 Schreiber 等(1986)和 Adams 等(1999)计算叶绿素荧光参数^[7,8], $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$; $q_p = (F_m - F_s)/(F_m - F_0)$; $\text{NPQ} = F_m/F_m - 1$; $\phi_{\text{PSII}} = (F_m - F_s)/F_m$ 。

抑制剂的处理参照 Yang 等(2002)的方法^[9]。离体叶片于水中将基部剪去,并插入10 mmol/L DTT和5 mmol/L CAP水溶液中,在 $30 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照下2 h。对照叶片插入蒸馏水中。

1.4 叶绿素低温荧光发射光谱的测定

同时对上述用强光处理的剑叶在 F-4 500 型荧光分光光度计下测定荧光发射光谱,激发光波长为436 nm。

2 结果

2.1 F_v/F_m 和 ϕ_{PSII} 对强光的响应

F_v/F_m 的变化是光抑制程度的一个重要指标,从图1A可见,经过2 h的高光处理培矮64S/E32和汕优63的 F_v/F_m 值分别从0.798、0.795下降至0.551、0.449,而PS II光化学量子产量(ϕ_{PSII})则分别从0.39和0.37下降至0.28和0.21。经过2 h高光处理后再于弱光常温下($20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)放置4 h,培矮64S/E32和汕优63均不能恢复到处理前的水平,但培矮64S/E32的恢复能力要比汕优63强, ϕ_{PSII} 也有同样的情况(图1A、B)。这一结果表明,培矮64S/E32耐光胁迫的能力比汕优63强。

2.2 q_p 和 NPQ对强光的响应

q_p 可估测在某一光强下开放PS II反应中心的比率和反映PS II吸收的光能用于光化学电子传递的比率^[10]。从图2可见汕优63的剑叶经过2 h高光处理后, q_p 降低了14%,而培矮64S/E32仅降低4%。当在弱光室温下恢复4 h,均接近处理前的水平。培矮64S/E32剑叶经人为的高光处理后非光化学猝灭NPQ上升的幅度比汕优63低,表明培矮64S/E32在强光下吸收的光能用于非辐射能量耗散的比例较汕优63低。

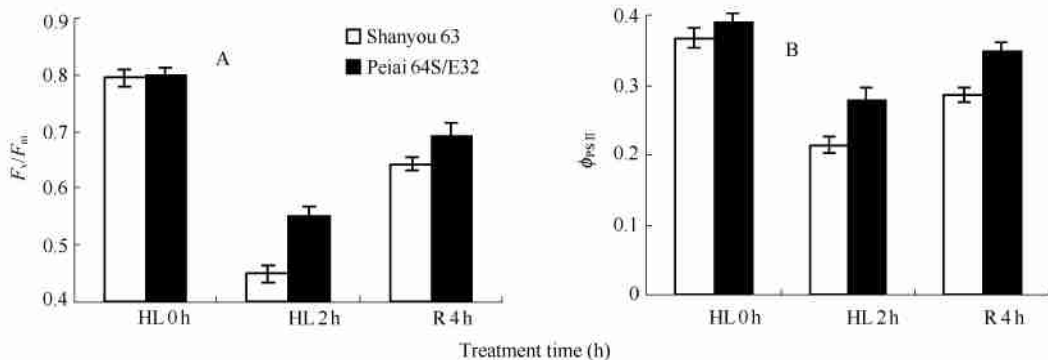


图1 培矮64S/E32和汕优63剑叶PS II最大光化学效率(F_v/F_m)(A)和 ϕ_{PSII} (B)对强光的响应

Fig. 1 Response of maximal efficiency of PS II photochemistry(F_v/F_m)(A) and ϕ_{PSII} (B) to strong light stress in flag leaves of Shanyou 63 and Peiai 64S/E32

The flag leaves were treated by strong light for 2 h then recovered for 4 h under low light ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) and room temperature.

HL-high light treatment, R-recovery under low light intensity. The same label was in Fig. 2

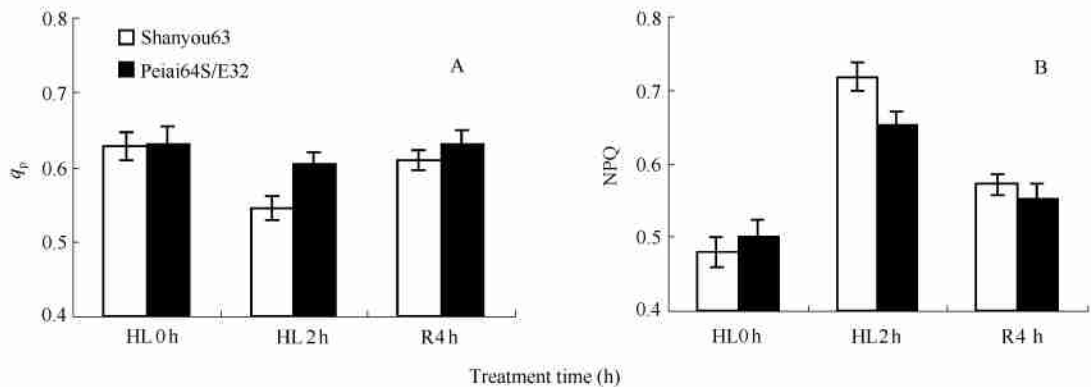


图2 培矮 64S/E32 和汕优 63 剑叶 PS 光化学猝灭(q_p) (A) 和非辐射能量耗散 (NPQ) ; (B) 对强光的响应

Fig. 2 Response of photochemical quenching coefficient(q_p) (A) and non-radiative energy dissipation (NPQ) ; (B) in flag leaves of Shanyou 63 and Pei'ai 64S/E32 to strong light stress for 2 h and recovery in low light ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) for 4 h.

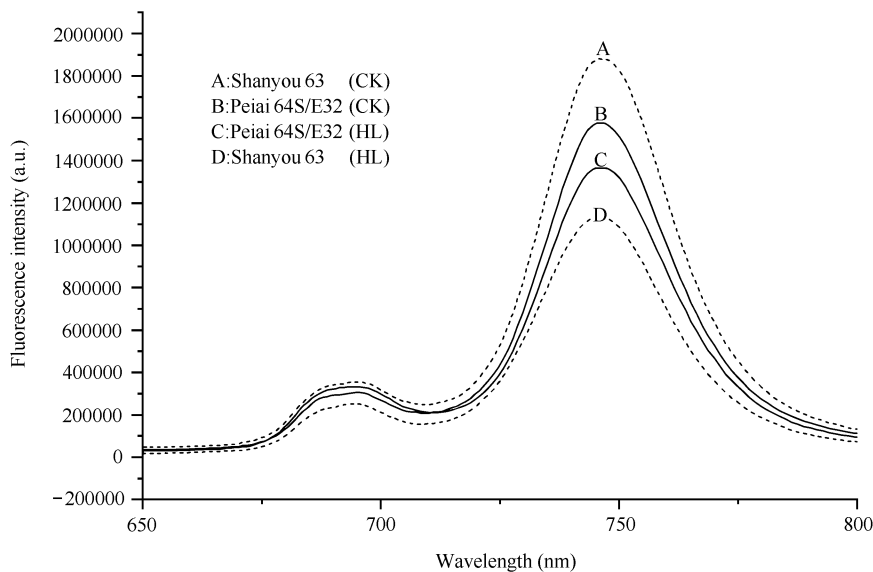


图3 强光对培矮 64S/E32 和汕优 63 剑叶 77 K 低温荧光发射光谱的影响

Fig. 3 Effect of strong light on 77 K fluorescence emission spectra in flag leaves of Shanyou 63 and Pei'ai 64S/E32

2.3 高光对剑叶 77 K 低温荧光发射光谱的影响

图3 显示培矮 64S/E32 和汕优 63 剑叶的 77 K 低温荧光发射光谱。在 685 nm 和 694 nm 的荧光发射强度代表 PS 的活性 (F685 和 F694) , F742 代表 PS 的活性。高光胁迫处理不影响两个品种的叶绿素低温荧光发射峰位,但均降低了它们的荧光强度。汕优 63 的 PS 和 PS 荧光强度下降的幅度比培矮 64S/E32 更大,高光处理使两个光系统吸能和传能的能力下降。从表 1 同样可看出, F685/F742 和 F694/F742 比率经高光后均下降,表明 PS 比 PS 对高光更敏感,高光导致激发能在两个光系统之间重新分配,使激发能更多地分配于 PS 上。与汕优 63 相比,培矮 64S/E32 的 F685/F742 和 F694/F742 比

率变化较小,表明培矮 64S/E32 比汕优 63 耐强光胁迫。

表1 高光处理 4 h 对水稻剑叶荧光发射比率的影响

Table 1 Effect of strong light treatment for 4 h on the ratios of fluorescence emission in rice flag leaves

Time of HL treatment (h)	F685/F742		F694/F742	
	Shanyou 63	Pei'ai 64S/E32	Shanyou 63	Pei'ai 64S/E32
0	0.219	0.193	0.241	0.218
4	0.161	0.174	0.177	0.191

2.4 DTT 和 CAP 对光抑制特性的影响

为了进一步研究水稻耐高光胁迫的机制,分别用 DTT 和 CAP 处理来检查这两个品种在强光 ($2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下依赖叶黄素循环的保护机制和 D1

蛋白周转的修复机制对耗散多余激发能的贡献,分别用抑制剂 DTT 和 CAP 处理的叶片探讨它们对高光 ($2\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 胁迫的响应。DTT 是叶黄素循环中紫黄质脱环氧化酶的一种抑制剂,可以抑制玉米黄质的形成^[11],CAP 是一种叶绿体蛋白的合成抑制剂^[12]。经 DTT 处理后汕优 63 的 F_v/F_m 下降了 28%,而培矮 64S/E32 只下降 18%。CAP 处理后再进行高光处理,汕优 63 和培矮 64S/E32 的 F_v/F_m 均下降了 40%左右,前者下降的幅度稍低于后者(图 4A)。

从图 4B 和图 4C 可见,培矮 64S/E32 和汕优 63 经 DTT 处理后再高光照射 2 h 后, q_p 分别下降了 14%和 24%,而经 CAP 和高光处理后分别下降了 35%和 33%。而 NPQ 的变化大致与 q_p 变化相反。这表明在光抑制过程中,培矮 64S/E32 受依赖 D1 蛋白周转的热耗散的影响比汕优 63 大,而汕优 63 受依赖叶黄素循环的热耗散影响较培矮 64S/E32 大。

3 讨论

生长在华南地区田间条件下的水稻,晴天中午自然光强可达 $1\ 500\sim 1\ 900\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,且其持续时间可达 5 h 以上,远高于水稻叶片的饱和光强(约 $800\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),易发生光抑制^[13]。而光抑制可减少光合作用和干物质的积累,导致碳同化产物减少^[11]。因此,田间光抑制是水稻,尤其是在水稻生长后限制籽粒充实的一个重要的因子。本文的目的是在人为的强光下处理,观察超高产品种培矮 64S/E32 光抑制的表现,以进一步阐明培矮 64S/E32 的高产性状的光合生理基础。

F_v/F_m 和 PS_{II} 的下降是衡量光抑制程度的一个指标^[14]。高光胁迫下培矮 64S/E32 的 PS_{II} 光化学效率和 PS_{II} 的光能利用效率较高(图 1);在相同的光强胁迫下,培矮 64S/E32 的光化学猝灭系数(q_p)高,而汕优 63 的非光化学猝灭(NPQ)高(图 2)。显示强光下汕优 63 PS_{II} 天线系统吸收的光能用于热耗散的比率比培矮 64S/E32 高,而培矮 64S/E32 在高光下由于 Q_A 的还原程度低,有更多开放 PS_{II} 反应中心,因而其 PS_{II} 天线系统吸收的激发能用于光合电子传递的比率要高。另一方面比较高光胁迫处理后两个品种的 77K 低温荧光发射光谱的变化可以看出,培矮 64S/E32 的 F685/F742 和 F694/F742 比率变化较小(图 3),显示高光下培矮 64S/E32 具有较

强的保持激发能在两个光系统之间分配平衡的能力,这些结果均表明培矮 64S/E32 耐强光胁迫的能力较强。

许多实验证据已表明光抑制的原初部位发生于 PS_{II} ^[15]。 PS_{II} 反应中心的 D1 蛋白受破坏后,会被新合成的蛋白替代,重新装配到失活的 PS_{II} 上,使 PS_{II} 活性恢复。当在强光下,D1 蛋白的修复速度不及破坏速度时,会导致光合能力下降,产生光抑制^[16]。我们用 D1 蛋白合成抑制剂 CAP 处理使 D1 蛋白的合成受抑制;用叶黄素循环抑制剂 DTT 处理,抑制 Z 和 A 的形成;均表现 PS_{II} 光化学效率降低,非光化学猝灭提高,说明依赖叶黄素循环的热耗散和依赖 D1 周转的光破坏防御机制在避免强光胁迫方面均起重要的保护作用。但用 CAP 处理时,培矮 64S/E32 的 PS_{II} 光化学效率和光化学猝灭(q_p)下降程度稍高于汕优 63,而用叶黄素循环抑制剂 DTT 处理时,由于缺乏叶黄素循环的保护作用,汕优的 F_v/F_m 和 q_p 下降程度则大于培矮 64S/E32(图 4),可见汕优 63 受依赖叶黄素循环的热耗散影响较大,而培矮 64S/E32 受 D1 蛋白周转的热耗散的影响比汕优 63 大。Andersson 等(1995)通过比较光合机构耐强光胁迫的多种策略后,指出对光抑制的耐性以质基因编码的 D1 蛋白快速合成最为重要^[17]。我们研究还表明培矮 64S/E32 的剑叶在后期表现出低的依赖叶黄素循环的热耗散能力(低的 DES 水平)(未发表资料)和具有对强光忍耐的潜在能力,也支持了剑叶后期 D1 蛋白周转的修复机制的重要作用。由此,作者推测超高产品种培矮 64S/E32 的剑叶在其生长进程中当出现严重光抑制时或叶片进入衰老期时,它对日益增加的多余激发能可能对反应中心造成伤害实施的保护策略是,在提高多条保护途径的保护能力的同时,特别加强 D1 蛋白周转的修复能力,包括有快速的合成受损 D1 蛋白的能力。季本华和焦德茂(2000)的研究表明光下质基因编码的 D1 蛋白合成能力可能是水稻亚种间耐光抑制特性差异的生理基础^[18]。考虑到培矮 64S/E32 是一种籼粳杂交稻,而汕优 63 是籼型杂交稻,据此推测,培矮 64S/E32 抗光抑制能力强可能与其含有粳型成分,从而表现有较强的 D1 蛋白的快速合成能力有关。

在水稻超高产高光效育种中,是否把 D1 蛋白的修复循环作为品种选育的指标之一仍要做更深入研究。

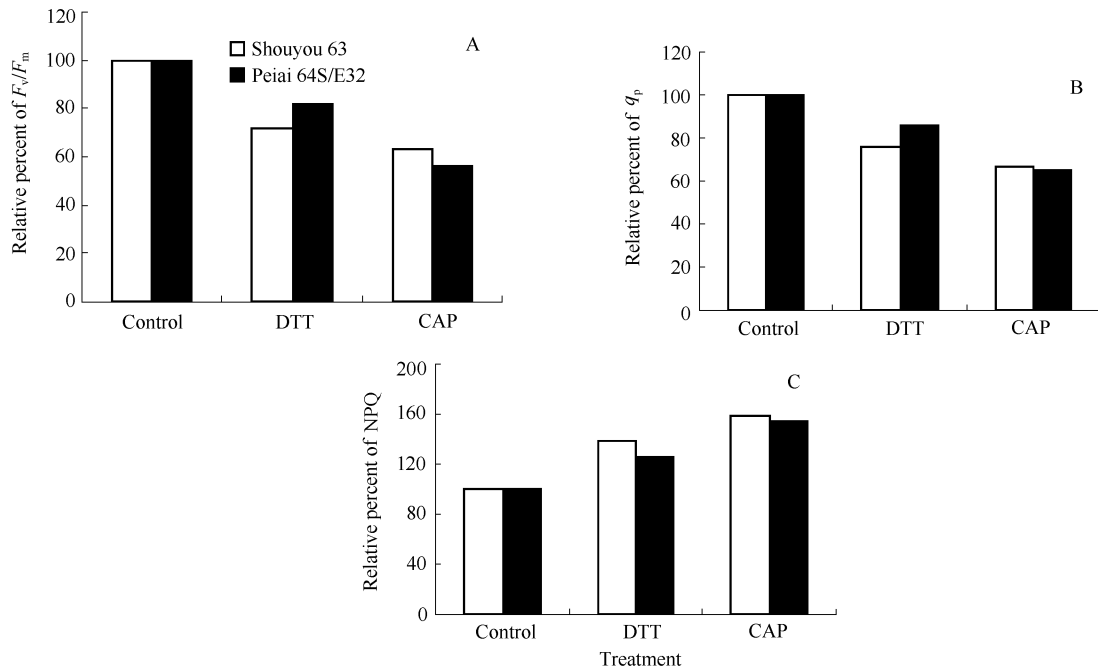


图4 DTT和CAP处理对高光胁迫下培矮64S/E32和汕优63剑叶PS最大光化学效率(F_v/F_m)

(A)、PS光化学猝灭(q_p) (B)和非辐射能量耗散(NPQ)(C)的影响

Fig. 4 Effect of DTT or CAP treatment on maximal efficiency of PS photochemistry (F_v/F_m) (A), photochemical quenching coefficient (q_p) (B) and non-radiative energy dissipation (NPQ) (C) in flag leaves of Shanyou 63 and Peiai 64S/E32 under strong light stress.

References

- [1] Long S P, Humphries S, Falkowski P G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, **45**: 633—662
- [2] Wang L (王玲), Ning S-B (宁顺斌), Song Y-C (宋运淳), et al. Progresses and applications of fluorescence in situ hybridization. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2000, **42**(11): 1101—1107
- [3] Xin Y-Y (辛越勇), Feng L-J (冯丽洁), Jiao D-M (焦德茂), et al. Effects of high light stress on chlorophyll-protein complexes of two subspecies of rice. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2000, **42**(12): 1278—1284
- [4] Huang X-Q (黄雪清), Jiao D-M (焦德茂), The characteristics of resistance to photooxidation of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants with maize genes coding for C₄ photosynthesis enzyme. *Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报)*, 2001, **27**(5): 393—400
- [5] Jiao D M, Li X. Cultivar differences in photosynthetic tolerance to photooxidation and shading in rice (*Oryza sativa* L.). *Photosynthetica*, 2001, **39**: 167—175
- [6] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basic. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, **42**: 313—349
- [7] Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosyn Res*, 1986, **10**: 51—62
- [8] Adams III W W, Demmig-Adams B, Logan B A, et al. Rapid changes in xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and photosystem II efficiency in two vines, *Stephania japonica* and *Smilax australis*. Growing in the understory of an open *Eucalyptus* forest. *Plant Cell Environment*, 1999, **22**: 125—136
- [9] Yang C W, Peng C L, Duan J, et al. Effects of β -Carotene feeding on chlorophyll fluorescence, zeaxanthin content and D1 protein turnover in the rice (*Oryza sativa* L.) leaves exposed to high light. *Bot Bull Acad Sin*, 2002, **43**: 181—185
- [10] Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **990**: 87—92
- [11] Demmig-Adams B, Adams III W W, Heber U, et al. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol*, 1990, **92**: 293—301
- [12] Okada K, Satoh K, Katoh S. Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. *FEBS Letters*, 1991, **295**: 155—158
- [13] Yang C W, Chen Y Z, Peng C L, et al. Daily changes of components of xanthophyll cycle and antioxidant systems in leaves of rice at different developing stage. *Acta Physiol Plant*, 2001, **23**(4): 361—369
- [14] Demmig-Adams B, Adams W. Survey of thermal energy dissipation pigment composition in sun and shade leaves. *Annu Rev Plant Photobiol B: Biol*, 1994, **22**: 95—103
- [15] Demmig-Adams B, Adams W W. Photoprotection and other response of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, **43**: 599—626
- [16] Melis A. Photosystem II damages and repair cycle in chloroplast: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.*, 1999, **4**: 130—135
- [17] Anderson J M, Park Y I, Chow W S. In: Mathis P (ed). *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. Vol. 4. Netherlands Kluwer Academic Publisher, 1995. 388—392
- [18] Ji B-H (季本华), Jiao D-M (焦德茂). Relationships between D1 protein, xanthophyll cycle and photodamage-resistant capacity in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2000, **45**(5): 510—515