

Cu 胁迫对脐橙幼苗光合特性的影响

张国军 江 虹 郑丽芹 陈 娟 邱栋梁* 刘星辉

(福建农林大学园艺学院 福州 350002)

摘要 以“脐橙 52”为材料，采用水培方法，研究了 Cu 胁迫对脐橙幼苗光合作用的影响。结果表明， $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理的脐橙叶片叶绿素含量比对照显著增加，而 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理使绿素含量下降，且 Cu 浓度越高下降幅度越大；类胡萝卜素含量随 Cu 浓度增加不断下降。 $\text{Cu} \geq 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胁迫造成光合效率降低，净光合速率、光饱和点下降。 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理使脐橙叶片蒸腾速率和气孔导度增加，而 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理使蒸腾速度和气孔导度下降， $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理的两个指标变化不大。 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理叶绿体光还原活性比对照有所增加，而 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理叶绿体光还原活性受到抑制。说明低浓度 Cu 处理可促进脐橙幼苗的光合作用，而高浓度有明显的抑制作用。

关键词 脐橙 Cu 胁迫 光合作用 光还原活性

中图分类号: Q945.78 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2009)01-0130-05

Effect of copper stress on photosynthesis of navel orange seedlings

ZHANG Guo-Jun, JIANG Hong, ZHENG Li-Qin, CHEN Juan, QIU Dong-Liang, LIU Xing-Hui

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract The hydroponic method was used to study the photosynthetic characteristics of navel orange “No.52” seedlings under Cu stress. The study shows that chlorophyll (Chl.) content under $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of Cu increases significantly, but decreases under $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of Cu. Carotenoid content decreases with increasing Cu concentration. Net photosynthetic rate and light saturation point reduces under Cu stress as Cu concentration exceeds $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of Cu improves, but $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of Cu decrease transpiration rate and stomatal conductance of orange. These parameters do not change significantly under $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of Cu. At the same time, high Cu concentration ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) restricts photoreduction activity. The findings indicate that lower Cu concentration improves photosynthesis while high Cu concentration inhibits it.

Key words Navel orange(*Citrus sinensis* Osbeck), Copper stress, Photosynthesis, Photoreduction activity

(Received Sept. 15, 2007; accepted May 10, 2008)

近年来，随着含 Cu 杀菌剂的大量使用、Cu 矿的过度开采及工业 Cu 污染物的大量排放，Cu 对植物的毒害与日俱增。Cu 对作物毒害效应的表现之一是抑制生长和使产量降低^[1, 2]。刘春生等^[3]研究表明，褐土施加过量 Cu 会抑制苹果新梢伸长，且抑制程度随 Cu 施入量增加而加剧。土壤施加高剂量 Cu 的苹果叶片网状失绿，呈黄色或黄白色，叶片边缘褐色干枯，严重时部分叶片枯死。酸性土壤如施 Cu 过量或波

尔多液残留累积会引起柑橘树皮开裂和流胶，出现部分落叶，或引起大量落叶，枝梢枯萎，甚至全树死亡^[4]。过量 Cu 还可引起柑橘须根腐烂，干粗和树冠容积减小。Alva 和 Chen^[5]指出随外源 Cu 浓度增大，柑橘幼苗枝叶和根干重显著下降。有关 Cu 胁迫对果树光合作用的影响尚未见报道，而果树的光合作用直接关系到果品的产量和品质。因此本文探讨 Cu 胁迫对脐橙光合作用的影响，为柑橘生产提供理论基础。

* 通讯作者：邱栋梁，博士，教授，博士生导师。E-mail: qiudl1970@yahoo.com.cn

张国军(1979~),男, 硕士, 主要从事果树生理研究。

收稿日期: 2007-09-15 接受日期: 2008-05-10

1 材料与方法

1.1 材料和苗木的处理

试验在福建农林大学校内试验地进行, 以1年生的柑橘品种“脐橙52”嫁接苗(枳壳砧)为材料, 于2004年7月10日采用水培法培养, 恢复45 d后进行处理。

水培养液采用Alva的配方^[5], 容器采用外壁漆黑的10 L的塑料桶, 每桶1株, 每桶装8 L培养液, 每10 d更换1次, 更换时调节pH至6.5。每天定时通气3次, 每次2 h。Cu处理采用在营养液中加CuSO₄·5H₂O的方法, 设0.1 μmol·L⁻¹、5 μmol·L⁻¹、20 μmol·L⁻¹、40 μmol·L⁻¹4个Cu浓度, 以不加CuSO₄·5H₂O的营养液为对照(CK), 每个处理设3个重复。在露天培养3个月后采叶样进行光合色素含量和叶绿体光还原活性测定。采样在早晨8:00~9:00进行, 叶样均取自苗木顶端向下第2~4片复叶。

1.2 测定指标和方法

1.2.1 光合色素含量

用打孔器沿叶脉两侧打取20个直径为0.5 cm的圆叶片, 在黑暗中浸泡于20 mL混合液(乙醇丙酮H₂O=4.5:4.5:1)中24 h, 过滤后用分光光度计测定OD₆₄₅和OD₆₆₃, 参照波钦诺克^[6]方法计算叶绿素a(Chl. a)、叶绿素b(Chl. b)及类胡萝卜素(Car.)含量。

1.2.2 光合速率(*Pn*)、蒸腾速率(*Tr*)、气孔导度(*Cs*)

采用美国CID公司生产的CID-301 PS光合作用测定系统测定, 开放式气路, 光响应曲线的*PAR*为0~2 000 μmol·m⁻²·s⁻¹, Cu胁迫15 d时测定。不同时期比较时*PAR*=1 000 μmol·m⁻²·s⁻¹。选择同一叶片从处理前开始每隔15 d测定1次。

1.2.3 叶绿体光还原活性(PS II的电子传递活力)

按张志良等^[7]的方法制备叶绿体, 并采用二氯酚靛酚(DCPIP)方法^[7]测定叶绿体光还原活性。分别取4.5 mL反应混合液(2,6-D KCl NaCN 0.2 mol PBS 蔗糖 制备液=1 1 1 1 5 0.5)于各试管中, 并在每个试管内加入0.5 mL叶绿体悬浮液。在40 klx的白质光照20 下水浴30 s(以不光照为对照), 立即测定OD₆₀₀, $OD = OD_{暗} - OD_{光}$ 。用2,6-D制作标准曲线, 并计算出光还原活性。以μmol·mg⁻¹(叶绿素)·h⁻¹表示。

2 结果与分析

2.1 Cu 胁迫对脐橙叶片光合色素含量的影响

Cu 胁迫对脐橙叶片光合色素含量有明显影响(表1)。0.1 μmol·L⁻¹ Cu 处理下, Chl. a 和 Chl. b 含量分别比对照增加8.62%、9.29%; 5 μmol·L⁻¹、20

μmol·L⁻¹、40 μmol·L⁻¹ Cu 处理使 Chl. a 含量分别比对照下降10.05%、22.45%、36.49%, Chl. b 含量下降9.29%、22.59%、37.34%; 而 Car. 含量则随着 Cu 浓度增加而减少, 0.1 μmol·L⁻¹、5 μmol·L⁻¹、20 μmol·L⁻¹、40 μmol·L⁻¹ Cu 处理下, 分别比对照降低11.51%、13.33%、18.67%和27.88%。

表1 Cu 胁迫对脐橙叶片色素含量的影响

Tab.1 Effect of Cu stress on contents of chlorophyll and carotenoid in leaves of navel orange μg·cm⁻²

Cu 浓度(μmol·L ⁻¹) Cu concentration	叶绿素 a Chl. a	叶绿素 b Chl. b	类胡萝卜素 Car.
	0(CK)	14.03±0.25Bc	5.49±0.16Bb
0.1	15.24±0.32Aa	6.00±0.20Aa	7.30±0.15Bb
5	12.62±0.28Cc	4.98±0.20Cc	7.15±0.30Bbc
20	10.88±0.30Dd	4.25±0.28Dd	6.71±0.25Cc
40	8.91±0.27Ee	3.44±0.32Ee	5.95±0.17Dd

不同大、小写字母表示0.01、0.05显著水平。下同。Small and capital letters indicate 5% and 1% significant difference. The same below.

2.2 Cu 胁迫对脐橙叶片气体交换的影响

2.2.1 净光合速率

从图1a可见, Cu 处理下脐橙叶片净光合速率(*Pn*)随光照强度增加而提高, 达到光饱和点时开始下降。CK 和 0.1 μmol·L⁻¹、5 μmol·L⁻¹ Cu 处理叶片 *Pn* 最大值出现在光合有效辐射为 1 200 ~ 1 400 μmol·m⁻²·s⁻¹, 而 20 μmol·L⁻¹ Cu 处理叶片 *Pn* 最大值出现在 1 000 μmol·m⁻²·s⁻¹ 左右, 40 μmol·L⁻¹ 出现在 800 μmol·m⁻²·s⁻¹ 左右。0.1 μmol·L⁻¹ Cu 处理使脐橙叶片 *Pn* 在任何光强下都大于对照, 而 5 μmol·L⁻¹、20 μmol·L⁻¹、40 μmol·L⁻¹ Cu 处理使脐橙叶片 *Pn* 在任何光强下都小于对照, 并且处理浓度越大, 下降幅度越大, 光补偿点提高。

从图1b可以看出, Cu 处理时间越长, 浓度越大, 脐橙叶片 *Pn* 下降幅度越大。5 μmol·L⁻¹、20 μmol·L⁻¹、40 μmol·L⁻¹ Cu 处理 15 d 后 *Pn* 分别比对照下降 14.53%、17.81%、44.06%, 60 d 后下降 38.97%、67.88%、75.8%, 差异极显著(*P*<0.01)。0.1 μmol·L⁻¹ Cu 处理下叶片 *Pn* 下降幅度前 15 d 小于对照, 15~60 d 大于对照; 其他浓度 Cu 处理下叶片 *Pn* 下降幅度在各时期均高于对照。Cu 浓度>5 μmol·L⁻¹ 处理的植株前 15 d 下降幅度大于其他时期的下降幅度。

2.2.2 蒸腾速率

从图2a可以看出, 0.1 μmol·L⁻¹ Cu 处理使脐橙叶片蒸腾速率(*Tr*)在各光强下都比对照有所升高, 且变化趋势与对照相似, 即: 随光强增加 *Tr* 变大。20 μmol·L⁻¹ Cu 处理下, 叶片 *Tr* 随光强增加而不断下降, 且随光强增加下降幅度渐趋缓和, 在 0~400 μmol·m⁻²·s⁻¹ 光强范围内 *Tr* 大于对照, 当光强大

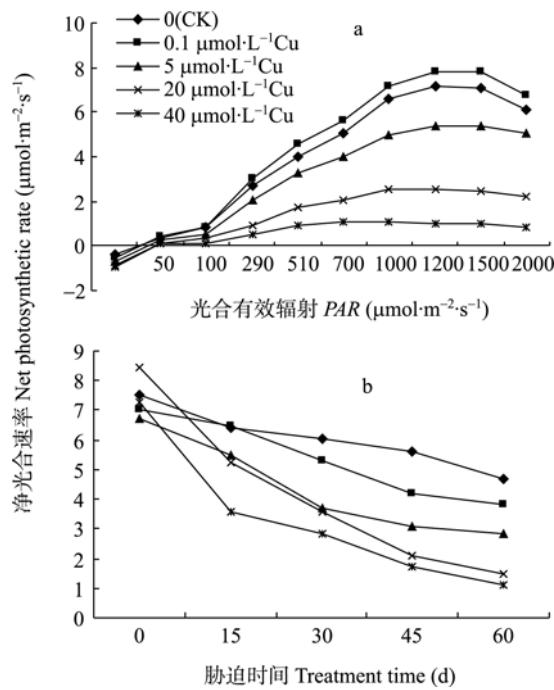


图 1 Cu 胁迫下脐橙叶片净光合速率对光强(a)和胁迫时间(b)的响应

Fig. 1 Responses of net photosynthetic rate of navel orange leaves under Cu stress to light intensity (a) and stress time (b)

于 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 后，则显著小于对照； $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下，叶片 Tr 基本趋于稳定，变化不明显，但此时叶片 Tr 已经很小，显著低于其他处理。

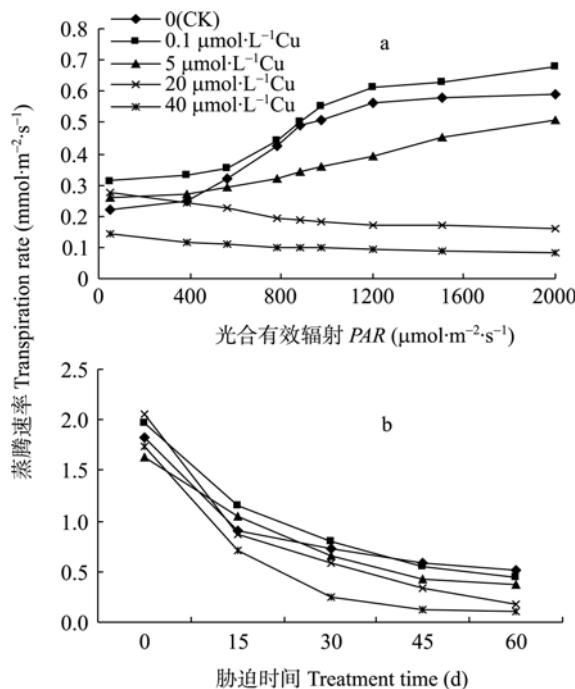


图 2 Cu 胁迫下脐橙叶片蒸腾速率对光强(a)和胁迫时间(b)的响应

Fig. 2 Responses of transpiration rate of navel orange leaves under Cu stress to light intensity (a) and stress time (b)

从图 2b 可以看出，Cu 处理下脐橙叶片 Tr 随胁迫时间和 Cu 浓度的增加而下降。 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下叶片 Tr 的下降幅度在前 30 d 小于对照，后 15 d 高于对照；其他浓度 Cu 处理下 Tr 下降幅度在各时期均大于对照。各 Cu 处理 60 d 时分别比对照下降 13.72%、25.49%、64.7%、78.43%，差异极显著 ($P<0.01$)。

2.2.3 气孔导度

从图 3a 可见， $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下，叶片气孔导度 (C_s) 随光强的变化趋势与对照相似， $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理叶片 C_s 各光强下均高于对照，而 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下叶片 C_s 各光强下均低于对照。 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理的叶片 C_s 变化不大，但显著低于对照及其他处理。其原因是高浓度的 Cu 处理使叶片细胞结构受到破坏，功能丧失。

从图 3b 可见，Cu 处理下脐橙叶片 C_s 随胁迫时间和 Cu 浓度增加而下降，且处理时间越长，浓度越大， C_s 下降幅度越大。各处理脐橙叶片 C_s 下降幅度前 30 d 均大于后 30 d。 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理 15 d 后 C_s 分别比对照下降 8.26%、15.21%、45.34%，60 d 后分别下降 20.87%、69.42%、78.79%，差异极显著 ($P<0.01$)。

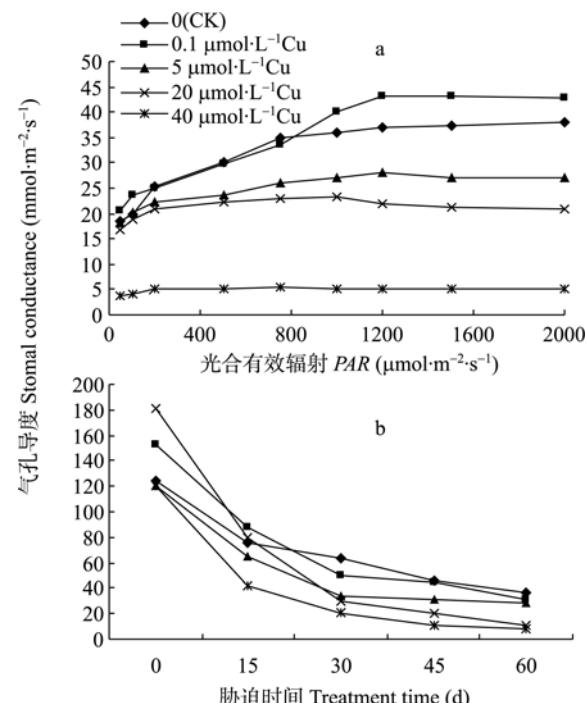


图 3 Cu 胁迫下脐橙叶片气孔导度对光强(a)和胁迫时间(b)的响应

Fig. 3 Responses of stomatal conductance of navel orange leaves under Cu stress to light intensity (a) and stress time (b)

2.3 Cu 胁迫对脐橙叶片叶绿体光还原活性的影响

PS 的电子传递是光合作用的重要环节之一, 对整个光合作用有很大影响。Cu 处理对脐橙叶片叶绿体光还原活性影响显著(图 4)。0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理叶绿体光还原活性比对照增加 2.12%, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理使叶绿体光还原活性分别比对照降低 28.32%、33.75%、44.02%, 较高浓度的 Cu 引起叶绿体光还原活性下降, 浓度越高, 下降幅度越大。可以看出, 高浓度 Cu 胁迫严重影响了 PS 的电子传递, 从而抑制了整个光合作用的进行。

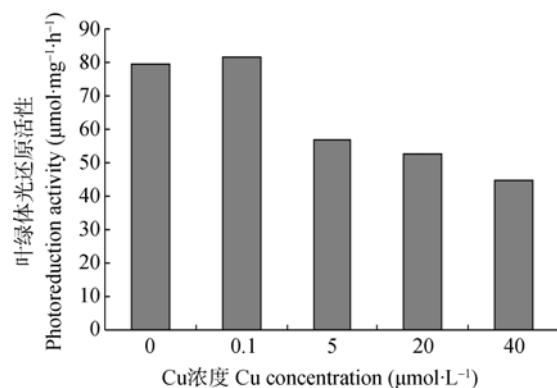


图 4 Cu 胁迫对脐橙叶片叶绿体光还原活性的影响

Fig. 4 Effect of Cu stress on photoreduction activity of navel orange leaves

3 讨论

3.1 Cu 胁迫影响脐橙叶片光合色素含量

Cu 胁迫使光合色素含量下降已有大量报道^[3,8-10]。本试验结果显示: 高浓度 Cu 处理导致脐橙叶绿素含量降低, 可能是由于 CAT 活性下降, 导致 H_2O_2 的积累所致, 与沈文飚等^[11]报道的 H_2O_2 积累会促进叶绿素的降解一致。至于 H_2O_2 的积累促进叶绿素降解的原因一方面是 H_2O_2 通过 Fenton、Harber-Weiss、Winterboum 反应或光解反应形成 ·OH, 直接引发脂质过氧化^[12], 这一点可从高 Cu 处理使 SOD 活性下降、MDA 含量上升, 导致过氧化产物积累, 膜透性增加的结果得到佐证^[13]; 另一方面, 高 Cu 处理使 POD 活性上升, POD 的上升导致叶绿素含量下降^[13], 与王康等^[14]报道的高水平 H_2O_2 诱导酚特异过氧化物酶(PPOD)合成, 而 PPOD 使酚氧化物形成酚自由基从而攻击叶绿素的结果一致。

3.2 Cu 胁迫影响脐橙叶片光合特性

Cu 是植物微量元素, 适量的 Cu 有利于叶绿素的形成与稳定。试验结果表明, 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理有利于脐橙叶片光合色素的形成, Chl. a 和 Chl. b 分别比对照增加 8.62% 和 9.29% ($P < 0.05$), 叶绿体

活性增加, 这和 Cu 与叶绿体色素形成配位化合物有关。0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理还促进脐橙叶片气孔开放, 增加气孔导度, 有利于气体交换, 因而增加了叶片的光合速率, 促进生长。

逆境抑制光合作用已有大量报道^[15-17], Pn 的下降可由气孔限制和非气孔限制引起^[18-20]。前者是指逆境胁迫后引起气孔关闭, CO_2 供应受阻^[19], 后者指叶肉细胞气相空间和 CO_2 扩散阻力, PSII 及光合磷酸化活性下降^[21-23], Rubisco 羧化酶活性降低^[24,25], 叶绿体电子传递受阻和叶绿素含量下降等^[19,24]。本试验结果表明, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理使脐橙叶片气孔导度和蒸腾速率下降, 表明 Pn 下降存在着气孔因素, 但同时观察到叶绿素含量降低, 叶绿体的光还原活性下降, 说明 Pn 的下降也有非气孔因素存在, 高 Cu 胁迫使柑橘叶片 Pn 下降是由气孔因素和非气孔因素共同作用的结果, 但二者的比例如何有待于进一步考究。

蒸腾作用是植物体内重要的生理活动, 受气孔开闭的影响和制约。气孔开放时 Tr 加大, 关闭时 Tr 减少。试验结果表明, Cu 浓度大于 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Tr 明显下降, 显示 Pn 与 Tr 同步受到抑制。

水培法作为生物模拟试验法的一种, 有利于开展单因子试验研究, 多用于田间难以进行的探索性试验。有关脐橙在田间出现的 Cu 毒害机理尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 黄细花, 赵振纪, 刘永厚, 等. 铜对紫云英生长发育影响的研究[J]. 农业环境保护, 1993, 12(1): 1-6
- [2] 王宏康, 阎寿沧. 泥污施肥时铜对农作物的污染[J]. 环境科学, 1990, 11(3): 6-11
- [3] 刘春生, 史衍玺, 马丽, 等. 过量铜对苹果树生长及代谢的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2000, 6(4): 451-456
- [4] 庄伊美. 柑橘营养与施肥[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 21-71
- [5] Alva A. K., Chen E. Q. Effects of external copper concentrations on uptake of trace elements by citrus seedlings[J]. Soil Sci., 1995, 159: 59-64
- [6] 波钦诺克. 植物生物化学分析方法[M]//荆家海, 丁钟荣, 译. 北京: 科学出版社, 1976: 255-259
- [7] 张志良, 吴光耀. 植物生理生化技术方法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 212-213
- [8] 王友保, 刘登义. Cu, As 及其复合污染物对小麦生理生态指标的影响[J]. 应用生态学报, 2001, 12(5): 773-776
- [9] Penelope A. R., Helen C. H., Kenneth L. S. Physiological responses of cabbage to incipient copper toxicity[J]. J. Amer.

- Soc. Hor. Sci., 1989, 114(1): 149–152
- [10] Branquinho C., Brown D. H., Catarino F. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence[J]. Environ. Exp. Bot., 1997, 38: 165–179
- [11] 沈文飚, 张荣锐. 外源抗坏血酸和过氧化氢对小麦离体叶片衰老的调节[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(5): 338–340
- [12] 李晓玲, 杨进, 骆炳山. 活性氧代谢与植物的抗逆性[J]. 荆门职业技术学院学报, 1999, 14(3): 30–35
- [13] 张国军. Cu 对柑橘的毒害研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2005: 26–36
- [14] 王康, 冯有胜. H₂O₂ 对过氧化氢酶和过氧化物酶活性的影响[J]. 西南农业大学学报, 1988, 10(2): 101–103
- [15] 郭延平, 张良城, 沈允钢. 低温胁迫对温州蜜柑光合作用的影响[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 111–116
- [16] 罗华建, 刘星辉. 水分胁迫条件下枇杷若干生理指标的变化[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(1): 19–21
- [17] Qiu D. L., Liu X. H., Guo S. Z. Effects of simulated acid rain on longan photosynthesis[J]. Acta Horticulturae, 2001, 258: 301–304
- [18] Hay R. K. M., Walker A. J. Endogenous and environmental factors affecting photosynthesis: water stress[M]//Hay R. K. M., Walker A. J. An Introduction to the Physiology of Crop Yield. New York: Longman Scientific and Technical, 1989: 48–80
- [19] Boyer J. S. Water deficits and photosynthesis[M]//Kozlowski T. T. Water Deficits and Plant Growth. New York: Academic Press, 1976: 153–159
- [20] Levitt J. Response of plants to environmental stress. II[M]//Levitt J. Water, Radiation, Salt and Other Stresses. New York: Academic Press, 1980: 40–46
- [21] Keck R. W., Boyer J. S. Chloroplast response to low leaf water potential III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation[J]. Plant Physiology, 1974, 53: 474–479
- [22] Youngis H. M., Boyer J. S. Conformation and activity of chloroplast coupling factor exposed to low chemical potential water in cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 548: 328–340
- [23] Qiu D. L., Liu X. H., Guo S. Z. Effects of simulated acid rain stress on gas exchange and chlorophyll a fluorescence parameters in leaves of longan[J]. Acta Phytocology Sin., 2002, 26(4): 441–446
- [24] Kumer P. J., Gupta P. K. Influence of different leaf water potential on photosynthetical carbon metabolism in sorghum[J]. Photosynthetica, 1986, 20: 391–396
- [25] Vu C. V., Allen J. L., Bowers G. Drought stress and elevated CO₂ effects on soybean ribulose bisphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rate[J]. Plant Physiol., 1987, 83: 573–578