

光呼吸对光合过程中磷代谢的影响

何生根^{*} 陈升枢 李明启

(华南农业大学农业生物系光合作用研究室, 广州 510642)

摘要

与光呼吸受抑制的 2%O₂浓度下相比, 在 21%O₂浓度下, 离体甘薯叶细胞光合作用最适介质无机磷浓度较低。另外, 在 21%O₂浓度下, 降低甘薯叶细胞介质 NaHCO₃浓度, 叶细胞光下吸收介质³²Pi 的量减少; 降低完整菠菜叶绿体介质 NaHCO₃浓度, 乙醇酸形成相对加强, 而介质³²Pi 掺入到有机磷化合物的量则相对减少。这些结果表明, 有利于光呼吸的条件, 可降低光合对外界 P_i的需求量。

关键词: 甘薯; 菠菜; 叶绿体; 光合作用; 光呼吸; 无机磷

叶绿体是消耗无机磷(Pi)的细胞器^[13, 19]。在 PCR 循环中, 有同化 1 分子 CO₂就要利用 1 分子含磷酸基的 3-酮基二碳部分, 生成 1 分子磷酸丙糖。这样, 如果没有 Pi 的及时补偿, 叶绿体内 Pi 水平将随着 PCR 循环的运转而不断降低, 甚至下降到影响光合作用正常进行的程度^[10, 19]。目前已知有两种机制补偿叶绿体内 Pi: 叶绿体被膜上的磷酸转运器^[12, 13]和叶绿体内淀粉合成作用^[4, 9]。但是, 磷酸转运器在动力学上是光合作用的限制因子^[14, 17, 20], 而淀粉合成速率很慢, 也难以满足光合作用对 Pi 的需求^[11]。因此, 可能还存在其它机制来补偿叶绿体内的 Pi。

Ray 和 Portis^[18]用菠菜叶绿体研究发现: 降低介质中 Pi 浓度, 促进乙醇酸合成, 并推测: 在 RuBP 加氧反应中生成的磷酸乙醇酸水解后可回收 1 分子 Pi, 因而, 在较低 Pi 浓度下光合作用能维持较长时间运转。Usuda 和 Edwards^[21]曾报道, 提高 O₂浓度可降低小麦叶绿体的光合最适 Pi 浓度。高守疆等^[6]的试验证明, 烟草缺磷时光呼吸增强, 真空渗入 Pi 可降低光呼吸, 由此得出结论认为, 光呼吸的运转有补充叶绿体内进行光合作用所需的 Pi 的功能。周开勇等^[9]的试验观察到, 提高磷营养可降低烟草叶片的 CO₂补偿点, 用光呼吸抑制剂处理烟草叶片, 则提高其光合最适 Pi 浓度, 进一步证明上述结论。本文以离体甘薯叶细胞和完整菠菜叶绿体用材料, 运用³²Pi 示踪技术, 进一步探讨光呼吸对光合过程中磷代谢的影响, 以期获得更多的有关光呼吸确能补偿叶绿体内 Pi 的证据。

国家自然科学基金资助项目

* 现工作单位: 仲恺农业技术学院生理生化教研室, 广州 510225

收稿日期: 1992-04-20; 修稿日期: 1992-09-28

材料与方法

植物材料 蝇石盆栽甘薯苗(*Ipomoea batatas* Lam.)浇Hoagland营养液,三个月后取第3、4叶用于分离叶细胞;田间种植菠菜(*Spinacia loeracea* L.),出苗20d后取第3、4叶用于分离完整叶绿体。台四许士令和沈介钢^[3]的方法用氧电极测定。基本

甘薯叶细胞分离和光合速率测定 参照许大全和沈允钢^[3]的方法用氧电极测定。基本反应介质改为: 330 mmol/L 蔗糖、50 mmol/L Tricine (pH 7.8)、0.5 mmol/L NaHCO₃。反应杯温度维持在 30±0.1 °C, 光强为 340 W·m⁻²。

温度维持在 30 ± 0.1 °C, 光强为 $340 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ 。参照叶济宇和赵海英^[2]的方法。匀浆介质改为: 完整菠菜叶绿体分离及完整度测定 参照叶济宇和赵海英^[2]的方法。匀浆介质改为: 330mmol/L 山梨醇、10mmol/L 焦磷酸钠、5mmol/L MgCl₂、2mmol/L 抗坏血酸、0.1%BSA, pH6.8; 悬浮介质改为: 330mmol/L 山梨醇、1mmol/L MgCl₂、1mmol/L MnCl₂、50mmol/L HEPES (pH7.8)。800 # 台式离心机离心两次(皆为 2000rpm,1min), 并取第二次离心沉淀作为完整叶绿体制剂(完整度 80% 以上)。

³²Pi 掺入实验 方法类似上段, 改用菠菜叶绿体作材料。分别取叶绿体基本反应液(330 mmol/L 山梨醇、0.01 mmol/L Pi、1 mmol/L MnCl₂、1 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L HEPES(pH7.8)、过氧化氢酶100units·mL⁻¹)。叶绿体悬浮液和不同浓度NaHCO₃溶液共6.1ml加入, 反应杯中, 暗中平衡2-3min(25±0.1℃)后, 从反应杯盖小孔注入50 μl ³²P_i溶液(0.5 μCi), 立即照光, 6min后停止光照。迅速吸取2ml反应混合液置于100℃沸水中水浴3min, 留作测定乙醇酸含量和有机³²P-CPM。同时测定6min内的光合放氧量。各个处理均设暗对照, 并以相同NaHCO₃和O₂浓度处理的照光样品和暗样品的有机³²P-CPM之差作为实验条件下叶绿体反应介质³²Pi掺入到有机磷化合物中的量。有机磷和无机磷的分离依 Lipman 和 Tuttle^[15]的方法。乙醇酸提取和分离依 Usuda 和 Edwards^[21]的方法; 乙醇酸含量测定依宁正祥和李明的方法。乙醇酸的方法, 用变色酸显色后, 用分光光度计在570nm波长下测定。

叶绿素含量测定 按 Arnon^[7] 的方法。

结果与讨论

一、不同 O_2 浓度下甘薯叶细胞光合速率与介质 Pi 浓度的关系

用 Clark 氧电极分别测定甘薯叶细胞在 2% 和 21% 两种 O_2 浓度下、不同介质 Pi 浓度中的光合放氧速率, 结果见图 1。图 1 表明, 甘薯叶细胞光合放氧速率与介质 Pi 浓度之间呈单峰曲线关系。此结果与许大全和沈允钢^[3]的结果类似, 表明介质 Pi 浓度对甘薯叶细胞光合作用存在一个最适值(即光合最适 Pi 浓度); 而且, 2% O_2 浓度下的光合最适 Pi 浓度高于 21% O_2 浓度下的。这表明在有利于光呼吸的条件(21% O_2)下, 甘薯叶细胞的光合作用对外界 Pi 的需求量减少了, 这与 Usuda 和 Edwards^[2]用小麦离体叶绿体实验观察到的结果, 以及高守疆等^[4]和周开勇等^[5]的结果是一致的。

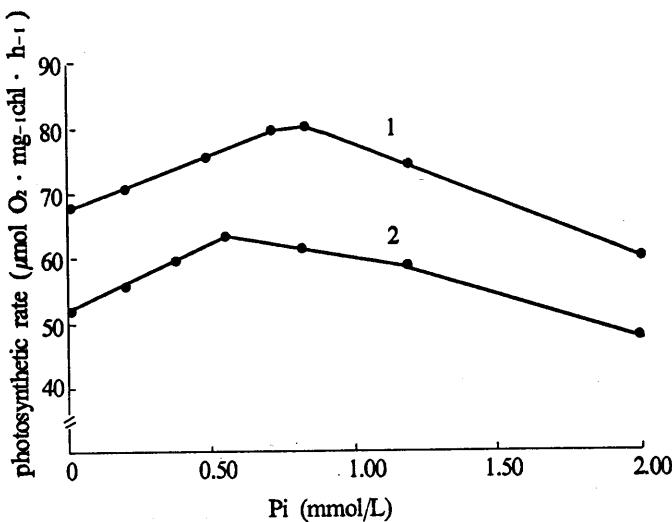


图 1 不同介质 Pi 浓度对离体甘薯叶细胞光合放氧速率的影响

Fig. 1 The influence of eifferent concentrations of Pi on photosynthetic O_2 evolution of isolated sweet potato leaf cells in a medium containing 0.5 mmol/L $NaHCO_3$

1. 2% O_2 ; 2. 21% O_2

二、不同 O_2 和 $NaHCO_3$ 浓度下, 甘薯叶细胞光合放氧与其对介质 ^{32}Pi 吸收的关系

分别测定甘薯叶细胞在 2% 和 21% 两种 O_2 浓度下、不同 $NaHCO_3$ 浓度时的光合放氧及其对介质 ^{32}Pi 的吸收, 结果见表 1。表 1 表明, 当甘薯叶细胞处于光呼吸受抑制的 2% O_2 浓度下, 4 种 $NaHCO_3$ 浓度时 ^{32}Pi 的吸收/光合放氧量的比值相近, 甘薯叶细胞在此条件下光合速率降低, 吸收介质 ^{32}Pi 的量亦减少, 并呈平行的变化, 这与非光呼吸条件下光合碳同化和 Pi 同化之间理论上的平行关系($3CO_2 + Pi + 2H_2O \rightarrow$ 磷酸丙糖 + $3O_2$)相吻合。但是, 在有利于光呼吸进行的 21% O_2 浓度下, 这个比值随着 $NaHCO_3$ 浓度降低而减小。这意味着随着光呼吸相对加强, 甘薯叶细胞从介质吸收 ^{32}P 的数量相对减少, 也即光呼吸具有减少甘薯叶细胞光合作用对介质 Pi 需求量的作用。

三、不同 O_2 和 $NaHCO_3$ 浓度下, 菠菜叶绿体光合放氧、乙醇酸积累与介质 ^{32}Pi 掺入的关系

2% O_2 浓度下, 不同浓度 $NaHCO_3$, 菠菜叶绿体光合放氧和介质 ^{32}Pi 在有机磷化合物中的掺入见表 2。表 2 中 ^{32}Pi 掺入/光合放氧的比值用以反映完整菠菜叶绿体在一定光合强度下同化 ^{32}Pi 为有机磷化合物的量。由于实验时 ^{32}Pi 最初是在叶绿体外的反应介质中, ^{32}Pi 只有进

表1 不同O₂和NaHCO₃浓度对甘薯离体叶细胞光合放氧和介质³²Pi吸收的影响
Table 1 The influence of different concentrations of O₂ and NaHCO₃ on photosynthetic oxygen evolution of isolated sweet potato leaf cells and the uptake of ³²Pi from the medium

NaHCO ₃ concentration (mmol/L)	³² Pi uptake*		Photosynthetic O ₂ evolution**	Ratio of A/B
	A (cpm)	B		
2% O ₂	2.00	788±15	4.53	173.9 (100%)
	1.00	691±17	4.08	169.4 (97.4%)
	0.50	584±20	3.61	161.8 (93.0%)
	0.25	472±18	2.84	166.2 (95.6%)
21% O ₂	2.00	625±16	3.95	158.2 (100%)
	1.00	462±12	3.19	144.8 (91.5%)
	0.50	308±17	2.41	127.8 (80.8%)
	0.25	194±11	1.72	112.8 (71.3%)

* mean±SD (n=4)

** determination data, unit is $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl (3min)}^{-1}$

入叶绿体才能被同化为有机磷化合物。显然, 叶绿体内Pi需求量越大, 进入的³²Pi就越多,³²Pi被同化的量也就越多, 因此该比值实际上也可间接反映叶绿体对Pi的需求量与其光合速率之间的数量关系。表2表明, 在光呼吸受抑的2%O₂浓度下, 该比值在4种NaHCO₃浓度强度之间的数值相对较接近, 反映出非光呼吸条件下, 菠菜叶绿体Pi需求量与光合速率之间的平行数量关系。Baldry等^[8]曾用豌豆离体叶绿体为材料观察到, 在10 mmol/L NaHCO₃条件下(这不利于光呼吸作用), 介质³²P在有机磷化合物中的相对掺入与¹⁴CO₂固定量之间存在平行数量关系, 表2与其结果是相一致的。

表2 2% O₂浓度下, NaHCO₃浓度对菠菜叶绿体光合放氧和介质³²Pi在有机磷化合物中掺入量的影响
Table 2 The influence of different concentrations of NaHCO₃ on photosynthetic oxygen evolution of isolated spinach chloroplasts and incorporation of ³²Pi into the organic phosphates from the medium with 2% O₂

NaHCO ₃ concentration (mmol/L)	³² Pi incorporation*		Photosynthetic O ₂ evolution**	Ratio of A/B
	A (cpm)	B		
2.00	739±18		7.12	103.8 (100%)
			6.24	95.8 (92.3%)
	597±12		4.78	99.0 (95.3%)
	473±14		3.28	100.9 (97.2%)
0.25	331±16			

* mean±SD (n=4) ** determination data, unit is $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl (6min)}^{-1}$

21% O₂浓度下不同 NaHCO₃浓度时的菠菜叶绿体光合放氧、乙醇酸积累与介质³²Pi在有机磷化合物中的掺入见表3。表3中乙醇酸积累/光合放氧量的比值,可反映一定光合强度下乙醇酸的形成速率。由表3可知,随着NaHCO₃浓度降低,³²Pi掺入/光合放氧的比值变小;乙醇酸积累/光合放氧的比值则增大,二者之间呈高度负相关(相关系数r=-0.9943)。这表明,利于乙醇酸形成的条件会使叶绿体光合作用对外界Pi的需求相对减少;而且,乙醇酸形成越快,这种作用越显著。这就证明RuBP加氧反应后,由磷酸乙醇酸形成乙醇酸的过程可部分补偿叶绿体内Pi的设想^[5,6,18,21]。

表3 21% O₂浓度下,不同NaHCO₃浓度对菠菜叶绿体光合放氧、乙醇酸积累和介质³²Pi掺入到有机磷化合物量的影响
Table 3 The influence of different concentrations of NaHCO₃ on photosynthetic oxygen evolution, glycolate accumulation and incorporation of ³²Pi into organic phosphates from the medium with 21% O₂

NaHCO ₃ concentration (mmol/L)	³² Pi incorporation* A (cpm)	Photosynthetic O ₂ evolution** B	Glycolate accumulation*** C	A/B	C/B
2.00	618±22	5.87	0.71±0.04	105.3 (100%)	0.121 (100%)
1.00	492±16	5.06	1.13±0.07	97.2 (92.3%)	0.223 (184.6%)
0.50	305±14	3.65	1.94±0.06	83.6 (79.4%)	0.532 (439.3%)
0.25	179±9	2.53	1.85±0.07	70.8 (67.2%)	0.731 (604.3%)

* mean±SD (n=4) ** determination data, unit is $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}\text{chl (6 min)}^{-1}$

*** mean±SD (n=3), unit is $\mu\text{mol Glycolate} \cdot \text{mg}^{-1}\text{chl (6min)}^{-1}$.

结 论

本文分别在细胞水平和叶绿体水平探讨了光呼吸对光合作用过程中磷代谢的影响。总结本文及我们前二文^[5,6]的试验结果,可以认为:光呼吸作用具有部分补偿叶绿体因PCR循环运转而消耗的Pi,从而降低光合过程中对Pi需求的作用。光呼吸这种补偿叶绿体内Pi的机制,可视为光呼吸作用有利于植物的一面。

参 考 文 献

- [1] 宁正祥、李明启, 变色酸法同时测定核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性。植物生理学报, 1990, 16 (2): 131-138.
- [2] 叶济宇、赵海英, 完整叶绿体的快速制备及完整度的测定。植物生理学通讯, 1982, (1):59-61.
- [3] 许大全、沈允钢, 甘薯叶细胞的机械分离与光合作用活力测定。植物生理学通讯, 1983, (5):50-51.
- [4] 张振清、夏叔芳, 无机磷对叶片淀粉和蔗糖积累的影响。植物生理学报, 1982, 8(4):385-391.
- [5] 周开勇、陈升枢、李明启, 不同磷营养水平对烟草叶片光合作用和光呼吸的影响。植物生理学报, 1993, 19 (1):3-7.

- [6] 高守疆、陈升枢、李明启, 磷素营养对烟草叶片光合作用和光呼吸的影响(英文). 植物生理学报, 1989, 15 (3): 281—287.
- [7] Arnon, D. I., Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiol.*, 1949, 24:1—15.
- [8] Baldry, C. W., C. Buke, D. A. Walker, Incorporation of inorganic phosphate into sugar phosphates during CO₂ fixation by illuminated chloroplasts. *Nature*, 1966, 210:793—796.
- [9] Sheu-Hwa, Chen-She., D. H. Lewis, D. A. Walker, Stimulation of photosynthetic starch formation by sequestration of cytoplasmic orthophosphate. *New Phytol.* 1975, 74:383—392.
- [10] Cockburn, W., C. W. Baldry, D. A. Walker, Some effects of inorganic phosphate on O₂ evolution by isolated chloroplasts. *Biochim Biophys. acta*, 1976, 143:614—624.
- [11] Edwards, G. E. S. P. Robinson, N. J. C. Tyler, et al., Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extracis and chloroplasts of wheat. *Plant Physiol.*, 1978, 62:313—319.
- [12] Fliege, R., U. I. Fluegge, K. Werden, et al., Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 502:232—247.
- [13] Heldt, W., L. Rapley, Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and dihydroxyacetone phosphate and of dicarboxylates across the inner membrane of chloroplasts. *FEBS*, 1979, 10:143—148.
- [14] Laisk, A., D. A. Walker, Control of phosphate turnover as a ratelimiting factor and possible cause of oscillations in photosynthesis: a mathematical model. *Proc. Roy. Soc., London B*, 1986, 227:281—302.
- [15] Lipman, F., C. Tuttle, Acetyl phosphate: chemistry, determination, and synthesis. *J. Biol. Chem.*, 1944, 153:571—582.
- [16] Nakamoto, H., M. N. Sivak, D. A. Walker, Sudden changes in the rate of photosynthesis oxygen evolution and chlorophyll fluorescence in intact isolated chloroplasts: the role of orthophosphate. *Photosyn. Res.*, 1978, 11:119—130.
- [17] Portis, A. R. Jr., Analysis of the role of the phosphate translocator and chloroplast photosynthesis. *Plant Physiol.* 1983, 71:936—943.
- [18] Ray, P. G. A. R. Jr. Portis, Regulation of photosynthetic carbon metabolism under photorespiratory and non-photorespiratory conditions: the role of phosphate and triose phosphates. In Sybesma C.(ed.), *Adv. Photosyn. Res.*, Vol. 3, 1984, 821—824.
- [19] Robinson, S. P., C. Giersch, Inorganic phosphate concentration in the stroma of isolated chloroplasts and its influence on photosynthesis. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1987, 14:451—462.
- [20] Stitt, M. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism: I. Evidence for excess electron transport capacity in leaves carrying out photosynthesis in saturating light and CO₂. *Plant Physiol.*, 1986, 81:1115—1122.
- [21] Usuda, H., G. E. Edwards, Influence of varying CO₂ and orthophosphate concentration on rates of photosynthesis, and synthesis of glycolate and dihydroxyacetone phosphate by wheat chloroplasts. *Plant Physiol.*, 1982, 69:469—473.

EFFECTS OF PHOTORESPIRATION ON PHOSPHATE METABOLISM DURING PHOTOSYNTHESIS

He Shenggen Chen Shengshu Li Mingqi

(Photosynthesis Research Laboratory Department of Agricultural
Biology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract

Isolated sweet potato (*Ipomoea batatas Lam.*) leaf cells and spinach (*Spinacia oleracea L.*) intact chloroplasts were used to study the effects of photorespiration on phosphate metabolism during photosynthesis. The results were as follows:

1. Sweet potato leaf cells had a lower optimum Pi concentration for photosynthesis in the reaction medium with 21% O₂ concentration than that with 2%O₂ in which photorespiration was inhibited(Fig.1).

2. With 21% O₂ concentration, the uptake of ³²Pi by sweet potato leaf cells from the medium was lowered by decreasing NaHCO₃ concentration from 2.00mmol/L, to 0.25 mmol/L to enhance photorespiration (Table 1).

3. With 21% O₂ concentration in the reaction medium, glycolate formation was enhanced by decreasing NaHCO₃ concentration from 2.00 mmol/L to 0.25 mmol/L, while the incorporation of ³²Pi into organic phosphates by isolated spinach chloroplasts was lowered (Table 2 and 3).

These results indicate that the condition favouring photorespiration can decrease the demand of Pi for photosynthesis. Photorespiration releases Pi during hydrolysis of phosphateglycolate to glycolate and the Pi thus released in the chloroplasts can partially compensate the Pi consumption in the PCR cycle.

Key words: Sweet potato; Spinach; Chloroplasts; Photosynthesis; Photrespiration; Inorganic phosphate