

杂交水稻及其亲本光合特性的研究

II. 功能叶片的希尔反应、光合磷酸化、ATP酶活性和ATP含量

郭培国

李明启

(广州师范学院生物系, 广州 510400) (华南农业大学生物系, 广州 510642)

摘要 研究了杂交水稻青优159(母本青A, 父本R159)和广优四号(母本广A, 父本青六矮)及其亲本功能叶片的希尔反应活性、光合磷酸化、ATP含量及ATP酶活性等。实验结果表明了两组杂交水稻功能叶片的希尔反应活性高于其亲本, 其超亲优势分别为13.44%、13.93%, 平均优势分别为26.44%、17.74%; 功能叶片的光合磷酸化活性亦有杂种优势, 其超亲优势分别为21.35%、18.81%, 平均优势分别为34.06%、22.71%; 杂种F₁的两种ATP酶(Ca⁺⁺-ATP酶和Mg⁺⁺-ATP酶)活性和叶组织中ATP含量均高于其亲本, 亦表现出明显的杂种优势。另外从我们的试验结果中还可以见到, 希尔反应活性、光合磷酸化活性、ATP酶活性及ATP含量与光合速率的大小有密切的正相关关系, 说明这些生理生化特性可以作为高光合速率杂交水稻鉴别的指标。

关键词 杂交水稻; 希尔反应; 光合磷酸化; ATP; ATP酶

STUDIES ON PHOTOSYNTHETIC CHARACTERISTICS IN RICE HYBRID PROGENIES AND THEIR PARENTS

II. HILL REACTION, PHOTOPHOSPHORYLATION, ATPase ACTIVITY AND ATP CONTENT IN LEAVES

Guo Peiguo

(Dept. of Biology, Guangzhou Teachers' College, Guangzhou 510400)

Li Mingqi

(Dept. of Biology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract Two hybrid rice Qingyou 159, Guangyou No.4 and their parents were used to study on the activities of Hill reaction and photophosphorylation, ATPase activity and ATP content. It was found that the activities of Hill reaction and photophosphorylation in leaves of both hybrids were much higher than those of their respective parents with marked heterobeltiosis and mid-parent heterosis, and showed significant positive correlation with photosynthetic rates. The activities of ATPase (Ca⁺⁺-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase) and ATP content of leaves in both rice hybrids were much higher than those of their respective parents. Statistical analysis also showed that ATP content and activity of ATPase possessed marked heterobeltiosis and mid-parent heterosis, and were positive correlation with

高等学校博士点专项科研基金和广东省高校重点学科(协作组)科研项目资助课题

1995-09-27 收稿; 1996-09-04 修回

photosynthetic rates. These photosynthetic properties may be used as the indices of heterosis for rice hybrids of high photosynthetic rate.

Key words Hybrids rice; Hill reaction; Photophosphorylation; ATPase; ATP

叶片的光合作用与希尔反应活性及光合磷酸化活性关系密切, 希尔反应活性和光合磷酸化活性降低, 则碳素同化便受到抑制^[1]。刘一农^[2]报告玉米强优势杂交种叶绿体希尔反应活性明显高于二亲本活性, 并且相应的强优势杂交种二亲本叶绿体混合液希尔反应活性值近似于其相应的杂种 F_1 。在其它作物杂种优势利用的研究中, 同样发现杂种具有希尔反应活性优势^[3]。但从离体叶绿体希尔反应活性的增加来推测叶绿体能量转换的提高是不全面的, 只有同时测定希尔反应活性和光合磷酸化活性, 才能很好的反映叶绿体能量转换的效率。从目前所知的国内外研究情况来看, 对杂交种的希尔反应活性研究得较多, 而对光合磷酸化活性的研究报告较少。

在光照条件下叶片中 ATP 主要来自于叶片的光合磷酸化, 叶片中 ATP 含量高, 可以在一定程度上说明光合磷酸化的活性高, 同样有利于光合速率的提高^[4]。叶绿体中的 ATP 酶是光合磷酸化的偶联因子, 它结合于叶绿体内类囊体膜表面, 它在叶绿体中的作用是催化 ATP 的合成反应, 它由 CF_0 和 CF_1 二部分组成, 该酶是光合作用能量转化过程中的一个重要因子^[5,6]。对杂交水稻及其亲本的 ATP 酶活性与光合速率之间的关系研究还未见报道。所以对杂交水稻及其亲本功能叶片叶绿体中 ATP 酶及功能叶片 ATP 含量的研究是十分有意义的。

1 材料和方法

材料 选用二组杂交水稻及亲本: 杂种 F_1 青优 159, 母本青 A, 父本 R159; 杂种 F_1 广优四号, 母本广 A, 父本青六矮。盆栽种植于网室中, 自然光照下生长, 按常规方法栽培管理。选用分蘖期功能叶片作为研究对象。

叶绿素含量 按 Arnon^[7] 的方法测定。

叶绿体希尔反应活性的测定 依叶济宇、钱月琴^[8] 的方法, 将功能叶片剪碎, 液氮研磨, 之后提取叶绿体, 加入适量的铁氰化钾, 照光, 测反应液 OD 值, 查标准曲线可得单位时间每毫克叶绿素的 O_2 释放量。

光合磷酸化活性的测定 依薛应龙^[9] 的荧光素酶法, 稍加修改。先制备荧光素酶液(临时制备), 再制备叶绿体悬浮液。将制备好的叶绿体悬浮液 0.1 ml 加入到下列混合液中(混合液中含有 10 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 0.1 ml、0.2 mol/L Tricine (pH8.0) 0.1 ml、20 mmol/L $MgCl_2$ 0.1 ml、20 mmol/L Na_2HPO_4 0.1 ml、20 mmol/L ADP 0.1 ml、水 0.4 ml), 将上述液混匀后照光 1 min, 然后加入 20% 三氯醋酸终止反应, 另设不照光的对照。将如上所得反应液和对照样品离心(1000×g, 5 min), 取上清液 0.1 ml, 加入 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 至 10 ml, 作为测定样品, 取 0.2 ml 测定样品放入 0.5 cm 光径比色杯中, 再将此比色杯放入 FG-200 型发光光度计样品槽中, 加入 0.8 ml 荧光素酶液, 记下发光强度的最高峰 I_{max} 值。算出其 $\text{Log } I_{max}$ 值, 便可从标准曲线上(每次测定均得制作)查得相应的 ATP 浓度, 减去暗对照样品的 ATP 含量, 即为样品中 ATP 含量; 根据 ATP 和叶绿素含量, 便可计算出在光照 1 min 时间内的光合磷酸

化活力。

ATP 含量的测定 依李立人和孙炳荣^[10]的方法, 先制备荧光素酶液和制作标准曲线, 之后取 2 g 水稻叶片, 剪碎后加液氮捣碎, 倒入试管中, 加入 4 ml 蒸馏水, 在 100 °C 水浴中保温 15 min, 快速冷却后, 在日立高速离心机下 15 000 × g 离心 20 min, 取 0.2 ml 上清液加入到光径 0.5 cm 的比色杯中放入 FG-200 型发光光度计样品槽中, 迅速注入 0.8 ml 荧光素酶液, 记下峰值, 从标准曲线上查得相应的 ATP 含量。

叶绿体中 ATP 酶 (Mg⁺⁺-ATP 酶和 Ca⁺⁺-ATP 酶) 活性的测定 依黄卓辉^[11]的方法。(a) Mg⁺⁺-ATP 酶活性的测定: 取已制备好的叶绿体悬浮液 1 ml, 加入 1 ml 激活液 (pH8.0 的 0.25 mol/L Tris-HCl 缓冲液 0.2 ml, 0.5 mol/L NaCl 0.2 ml, 0.05 mol/L MgCl₂ 0.2 ml, 0.05 mol/L DTT 0.2 ml, 0.5 mmol/L PMS 0.2 ml), 在 5 000 Lux 光下进行光激活 6 min。取激活液 0.5 ml, 再加入反应液 0.5 ml, 放入 37 °C 水浴中 (另设冰浴对照) 10 min, 之后加入 0.1 ml 20% 三氯醋酸停止反应, 2000 × g 离心 10 min。取上清液 0.5 ml, 加入 2.5 ml 蒸馏水, 摇匀后加入 2 ml 硫酸亚铁 - 钼酸铵试剂, 于室温下放置 1 min 后显色稳定, 置岛津 UV-120-02 分光光度计上测 OD₆₆₀ 值, 查标准曲线便求无机磷量, 按下式计算 ATP 酶活性。

$$\text{ATP 酶活性} (\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{叶绿素 h}^{-1}) = \mu\text{mol Pi} \times \frac{V}{V_1} \times \frac{1000}{\text{叶绿素含量} (\mu\text{g})} \times \frac{60}{t}$$

$\mu\text{mol Pi}$ 为所测得的 OD₆₆₀ 值从标准曲线上查得的无机磷量; V 为反应体积; V_1 为取样体积, 因叶绿素含量以 μg 表示, 故乘 1000 变为 mg; t 为反应时间, min。

(b) Ca⁺⁺-ATP 酶活性测定: 取制备好的叶绿体悬浮液 1 ml, 加入 1 ml 激活液 (pH8.0 的 0.25 mol/L Tris-HCl 0.2 ml, 20 mmol/L EDTA 0.2 ml, 10 mmol/L ATP 0.2 ml, 2 mg ml⁻¹ 的胰蛋白酶 0.2 ml, H₂O 0.2 ml), 置 20 °C 水浴中保温 10 min, 加入 10 mg ml⁻¹ 牛血清蛋白 0.1 ml 停止激活。其活力测定及活力计算与 Mg⁺⁺-ATP 酶相同。

2 结果

2.1 杂交水稻及亲本的希尔反应活性

从表 1 中可以见到, 两杂交水稻的叶绿体希尔反应活性均明显的超过其相应的亲本, 具有杂种优势。青优 159 和广优四号超亲优势分别为 13.44%、13.93%, 它们的平均优势分别为 26.44% 和 17.74%。另外, 希尔反应活性与另文报道的光合作用速率密切正相关, 相关系数为 0.948。

表 1 杂交水稻及亲本的希尔反应活性

Table 1 The activity of Hill reaction of hybrid rice and their parents

材料 Material	希尔反应活性 Activity of Hill reaction ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$)	超亲优势 Heterobeltiosis (%)	平均优势 Mid-parent heterosis (%)	显著性差异 Significant difference
青 A(♀)	119.40 ± 2.06			b
青优 159(F ₁)	135.45 ± 3.35	13.44	26.44	c
Qingyou 159(F ₁)				
R159(♂)	94.85 ± 1.79			a
广 A(♀)	101.25 ± 3.07			a
Guang A(♀)				
广优四号(F ₁)	123.33 ± 4.37	13.93	17.74	b
Guangyou No. 4(F ₁)				
青六矮(♂)	108.25 ± 1.48			a
Qingliu'ai(♂)				

平均数 ± SD; Means ± SD (n=3)

a, b, c 表示在 $\alpha=0.05$ 水平上杂交水稻与各自亲本之间达显著性差异
a, b, c: Showing the significant difference of hybrid rice and their
respective parents at $\alpha=0.05$ level

2.2 杂交水稻及其亲本的光合磷酸化活性

从表2中可以看到,青优159和广优四号杂交水稻的光合磷酸化活性均超过其高值亲本,具有超亲优势和平均优势,其超亲优势分别为21.35%、18.81%,平均优势分别为34.06%、22.71%。光合磷酸化活性与希尔反应活性大小顺序完全一致,两者之间存在密切正相关,相关系数为0.989。光合磷酸化活性与光合作用速率的相关系数为0.973,亦是密切正相关。

2.3 杂交水稻及亲本的 P/O 比值

用表1的Hill反应活性和表

2的光合磷酸化活性的结果进行计算,得到杂交水稻及亲本的P/O比值。青A、青优159、R159、广A、广优四号、青六矮的P/O比分别是1.006、1.076、1.026、1.005、1.047、1.004;由此可见,两组杂交水稻与其亲本的P/O比值无明显差异,均在1.0左右。这表明希尔反应活性和光合磷酸化活性的增减比较一致。

2.4 杂交水稻及亲本叶绿体中 ATP 酶活性

杂交水稻青优159和广优四号有高的Ca⁺⁺-ATP酶和Mg⁺⁺-ATP酶活性,具有明显的杂种优势(如表3所示)。青优159的Ca⁺⁺-ATP酶和Mg⁺⁺-ATP酶活性的超亲优势分别为3.8%和9.14%,平均优势分别为12.09%和16.4%;广优四号这两种酶的超亲优势分别为15.21%、8.96%,平均优势分别为21.06%和16.97%。

表2 杂交水稻及亲本的光合磷酸化活性
Table 2 The activity of photophosphorylation of hybrid rice and their parents

材料 Material	光合磷酸化活性 Activity of photophosphorylation ($\mu\text{mol ATP mg}^{-1} \text{chl h}^{-1}$)	超亲优势 Heterobeltiosis (%)	平均优势 Mid-parent heterosis (%)	显著性差异 Significant difference
青A(♀) Qing A(♀)	240.28 ± 5.23			b
青优159(F ₁) Qingyou 159(F ₁)	291.60 ± 6.00	21.35	34.06	c
R159(♂)	194.72 ± 4.65			a
广A(♀) Guang A(♀)	203.50 ± 5.44			a
广优四号(F ₁) Guangyou No. 4(F ₁)	258.20 ± 11.11	18.81	22.71	b
青六矮(♂) Qingliuai(♂)	217.32 ± 4.59			a

平均数 ± SD; Means ± SD (n=3)

a,b,c 表示在 $\alpha=0.05$ 水平上杂交水稻与各自亲本之间达显著性差异

a,b,c: Showing the significant difference of hybrid rice and their respective parents at $\alpha=0.05$ level

表3 杂交水稻及亲本的ATP酶活性
Table 3 ATPase activity of hybrid rice and their parents

材料 Material	Ca ⁺⁺ -ATP酶活性 Ca ⁺⁺ -ATPase activity ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{chl h}^{-1}$)		Mg ⁺⁺ -ATP酶活性 Mg ⁺⁺ -ATPase activity ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{chl h}^{-1}$)		
青A Qing A(♀)	46.26 ± 0.70		26.38 ± 0.44		
青优159 Qingyou 159 (F ₁)	48.02 ± 0.06	3.80%* 12.09%**	28.79 ± 0.69	9.14%*	16.49%**
R159(♂)	39.42 ± 0.675		23.05 ± 0.52		
广A Guang A(♀)	39.06 ± 0.46		21.32 ± 0.42		
广优四号 Guangyou No. 4(F ₁)	45.00 ± 0.87	15.21%* 21.06%**	23.23 ± 0.34	8.96%*	16.97%**
青六矮 Qingliuai(♂)	35.28 ± 0.56		18.40 ± 0.50		

平均数 ± SD; Means ± SD (n=3); * 超亲优势 Heterobeltiosis; ** 平均优势 Mid-parent heterosis

2.5 杂交水稻及亲本功能叶组织中 ATP 含量

从图 1 中可以看到, 杂交水稻青优 159 和广优四号功能叶片组织中的 ATP 含量均高于其各自的高值亲本, 有明显的杂种优势。但二个杂交水稻亲本之间叶组织中的 ATP 含量差异不大。

3 讨论

杂交水稻与亲本功能叶片在分蘖期希尔反应活性具有明显差异, 两组杂交水稻均具有明显的超亲优势和平均优势, 表明具有杂种优势的杂交水稻其希尔反应活性具有杂种优势, 这与国内外研究者所研究的结果一致。另外我们还发现, 高的希尔反应活性伴随着高的光合速率, 两者具有高度正相关, 相关系数为 0.948。这在一定程度上可以看出希尔反应活性是影响光合速率高低的一个重要内在因子, 可以作为高光效品种鉴定的一个生理指标。

光合磷酸化活性是叶绿体在光照条件下形成 ATP 的能力, 因此, 它能反映叶绿体的光能转换情况^[4]。从我们所作的试验结果可以看出, 高光合速率的杂交水稻都具有高的光合磷酸化活性, 并都具有明显的杂种优势。从二组合杂交水稻及亲本之间的光合磷酸化活性与光合速率之间的关系来看, 亦可见到高光合速率的材料, 其光合磷酸化活性一般也高, 光合磷酸化活性与光合速率呈明显正相关, 两者之间的相关系数达到 0.973。这说明光合磷酸化活性是影响光合速率高低的一个重要的生理因子, 它也可以作为高光效品种选育的一个生理指标, 与杨肖娥和孙羲的^[12]研究结果一致。

希尔反应活性和光合磷酸化活性两者之间同样具有密切的正相关关系, 两者之间的相关系数为 0.989。这表明在水稻生长的叶片中, 高的希尔反应活性与高的光合磷酸化活性是同步的, 我们所测得的各杂交组合及亲本的 P/O 比值的大小便充分的说明了这一点。

ATP 酶的活性与光合磷酸化活性的关系非常密切^[13], 如果 ATP 酶活性下降, 则光合磷酸化活性下降, 叶片中 ATP 含量减少^[14], 这样势必影响到叶片的光合作用速率。可见 ATP 酶活性与光合作用的关系是紧密相连的。我们的试验结果证明了光合速率与 Ca^{++} -ATP 酶活力的相关系数为 0.927, t 测验结果表明达到 $\alpha=0.01$ 的极显著水平, 表明两者之间相关关系非常密切; 与 Mg^{++} -ATP 酶活力的相关系数为 0.876, 亦达到 $\alpha=0.025$ 的极显著水平, 两者之间亦存在密切相关。这表明高的 ATP 酶活性是高光合速率杂交水稻的生理特征之一。

植物组织中 ATP 含量受一系列同化和异化过程所控制, 但在光照条件下绿叶细胞中 ATP 主要来自光合磷酸化作用。从我们所做的试验结果来看, 叶片中 ATP 含量与叶片光合作用速率的相关系数为 0.900, t 测验结果表明达到 $\alpha=0.05$ 的显著水平, 所以叶片中 ATP 含量与光合速率密切正相关。

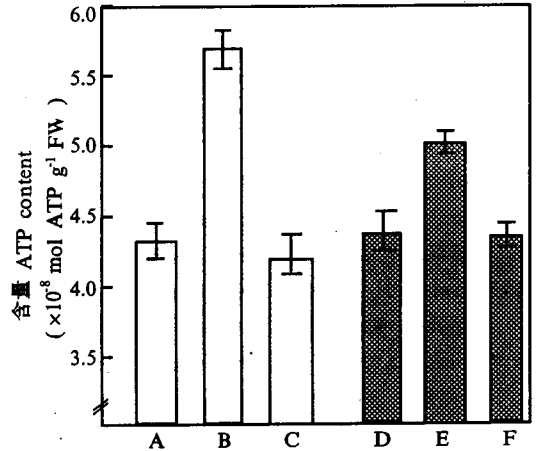


图 1 杂交水稻及亲本功能叶组织中 ATP 含量 (n=3)
Fig. 1 The ATP content in leaves of hybrid rice and their parents (n=3)
A: 青 A (Qing A); B: 青优 159 (Qingyou 159);
C: R159; D: 广 A (Guang A);
E: 广优四号 (Guangyou No. 4);
F: 青六矮 (Qingliuai)

参考文献

- 1 许大全, 沈允钢. 光合产物与光合机构运输关系的探讨. 植物生理学报, 1982, 8:173
- 2 刘一农. 玉米杂种优势与叶绿体互补. 遗传, 1979, 3:22-25
- 3 李良璧, 张正东, 谭光辉等. 植物叶绿体互补作用的研究 I. 杂交双亲叶绿体互补作用. 遗传学报, 1978, 3:196-203
- 4 Salisbury F B, Ross C. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, New York, 1969, 214
- 5 Binder A, Jagendorf A, Ngo E. Isolation and composition of the subunits of spinach chloroplast coupling factor protein. J Biol Chem, 1978, 253:3094-3100
- 6 Strotmann H, Bickel-Sandkotter S. Structure, function, and regulation of chloroplast ATPase. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35:97-120
- 7 Arnon D J. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 1949, (1): 1-15
- 8 叶济宇, 钱月琴. 希尔反应活性的分光光度法测定. 植物生理学实验手册, 上海:上海科技出版社, 1985, 104-107
- 9 薛应龙. 荧光素酶法测定光合磷酸化反应活力. 植物生理学实验, 北京:高等教育出版社, 1985, 78-81
- 10 李立人, 孙炳荣. 微量 ATP 的荧光素酶分析方法的研究. 生物化学与生物物理进展, 1980, (6):60-62
- 11 黄卓辉. 叶绿体偶联因子腺苷三磷酸酶(ATPase)活力的测定. 植物生理学实验手册, 上海:上海科技出版社, 1985, 111-115
- 12 杨肖娥, 孙毅. 杂交水稻(F₁)光合作用的优势及其与氮素营养的关系. 浙江农业大学学报, 1991, (4):355-359
- 13 Gregory R P F. Biochemistry of Photosynthesis. 3rd edition, John Wiley and Sons Ltd., London, 1989, 73-77
- 14 卢从明, 高煜珠, 张其德等. 水分胁迫对叶绿体能量转换的影响. 植物学报, 1993, (9):693-697