

杂交水稻及其亲本光合特性的研究

Ⅲ. 功能叶片碳代谢中一些酶活性

郭培国

李明启

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

摘要 对杂交水稻青优 159 (母本青 A, 父本 R159) 和广优四号 (母本广 A, 父本青六矮) 及其亲本功能叶片光合碳代谢中一些酶活性进行了研究。实验结果表明了两组杂交水稻的 RuBPCase 活性、RuBPCase/RuBPOase 活性比值超过其各自的亲本; 而杂交水稻青优 159 和广优四号的 RuBPOase 活性、乙醇酸氧化酶活性、光呼吸速率、光呼吸速率与光合速率的比值明显的低于其各自双亲。对 RuBPCase 活性和乙醇酸氧化酶活性与光合速率进行相关分析, 结果表明 RuBPCase 活性与光合速率有正相关关系, 相关系数为 0.768; 而乙醇酸氧化酶活性与光合速率负相关, 相关系数为 -0.834; 两者均达到 $\alpha=0.05$ 显著水平。

关键词 杂交水稻; 酶活性; 光呼吸; 光合速率

STUDIES ON PHOTOSYNTHETIC CHARACTERISTICS IN RICE HYBRID PROGENIES AND THEIR PARENTS Ⅲ. SOME ENZYME ACTIVITIES OF CARBON METABOLISM IN LEAVES

Guo Peiguo

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

Li Mingqi

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

Abstract Some enzyme activities of carbon metabolism in leaves of two rice hybrid progenies and their parents were compared. The rice hybrids used were Qingyou 159 [from Qing A (♀) and R159 (♂)] and Guangyou No.4 [from Guang A (♀) and Qingliuai (♂)]. It was found that the activity of RuBPCase, and the RuBPCase/RuBPOase ratio in both hybrids were higher than those in their own parents. The activities of glycolate oxidase and RuBPOase, the photorespiration(Pr) and Pr/Pn ratio in both rice hybrids were lower than those in their respective parents. Statistical analysis showed that the photosynthetic rates (Pn) were in positive correlation with RuBPCase activity ($r=0.768$), and in negative correlation with the activity of glycolate oxidase ($r=-0.834$). Both correlation coefficients were significantly different at $p=0.05$ levels.

Key words Hybrid rice; Enzyme activities; Photorespiration; Photosynthetic rate

光合作用是植物绿色组织利用光能将 CO_2 和 H_2O 同化成碳水化合物及其它有机物的过程。 C_3 植物中 Rubisco (核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶) 是光合碳还原循环反应的第一个关键酶, 酶活性大小对 CO_2 的同化利用起着重要作用, 在很大程度上调节叶片的光合能力^[1]。另一方面, Rubisco 又能起氧合反应, 在自然条件下, 羧化作用与加氧作用在体内的比率是 3:1 至 4:1 左右^[2]。在有氧存在时, Rubisco 可把 RuBP 加氧生成磷酸乙醇酸, 后者进一步生成乙醇酸, 乙醇酸在乙醇酸氧化酶的作用下, 经乙醇酸途径, 释放 CO_2 。据推测, 在正常大气条件下, 由乙醇酸途径释放的 CO_2 占光合固定 CO_2 的 25% 左右, 实测结果表明 C_3 植物光呼吸释放 CO_2 量占净光合所固定的 CO_2 量 25–50%^[3]; 乙醇酸氧化酶活性与光呼吸相关联, 如果用抑制剂抑制乙醇酸氧化酶的活性, 可提高净光合速率达 40–50% 以上^[4]。可见 Rubisco 的活性及乙醇酸氧化酶的活性等直接关系到植物的光合作用, 已有许多学者在考虑如何“改良”Rubisco, 即改变其相对的羧化活性与加氧活性, 使羧化反应活性与加氧反应活性的比率提高^[5]。

杂交水稻的光合速率高于其亲本, 具有光合优势, 表明其功能叶片对 CO_2 羧化和固定的效率较高。我们已经报道杂交水稻功能叶片的光能吸收能力、电子传递能力及光合磷酸化能力高于其各自亲本, 具有杂种优势^[6]; 而功能叶片碳代谢中的一些酶活性(如 Rubisco、ruBPCase 活性与 RuBPOase 活性比值、乙醇酸氧化酶活性及光呼吸)在杂交水稻及亲本间是否存在差异, 值得进行研究和探讨, 有利于全面系统地了解杂交水稻及其亲本之间光合特性的差异。本文报道这方面的研究结果。

1 材料和方法

1.1 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。

1.2 方法

蛋白质含量的测定 按 Bradford^[6] 考马斯亮蓝法测定。

核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶(RuBPCase)活性的测定 依李粹芳、李立人^[7] 的分光光度法, 稍加修改。2 g 水稻叶片加液氮研磨, 再加入 10 ml 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.8, 内含 2 mmol/L EDTA), 在冰浴上快速研磨, 四层纱布过滤, 滤液于冷冻离心机上 12000 ×g 离心 10 min, 上清液即为酶粗提液。取此粗提液 50 μl , 加入反应混合液中。混合液为 500 μl 0.1 mol/L Tris-HCl (pH8.2, 内含 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L NADH, 10 mmol/L ATP, 20 mmol/L NaHCO_3), 300 μl 酶液 (3-磷酸甘油酸激酶: 3-磷酸甘油醛脱氢酶, 1:1), 120 μl 蒸馏水。酶反应以加入 12.5 mmol/L RuBP 30 μl 开始, 在 340 nm 波长处测光吸收变化。反应总体积 1 ml。

核酮糖-1, 5-二磷酸加氧酶(RuBPOase)活性的测定 依 Kung 等^[8] 的氧电极法, 酶反应在约 2.0 ml 的反应杯中进行, 反应液为 0.1 mol/L Tris-HCl, pH8.6, 含 3 mmol/L MgCl_2 和 15 μl 25 mmol/L RuBP, 混合平衡后, 加入 20 μl 粗酶提取液开始反应。反应速度根据酶蛋白

加入后最初的直线速率部分(约 40–60 s)计算。

乙醇酸氧化酶活性的测定 依汤小仪、欧阳光察^[9]的方法,取 2 g 水稻叶片在液氮下捣碎,提取制备粗酶液。取 0.1 ml 粗提液,加入到光径 1 cm 的石英比色杯中(内含 0.3 ml 50 mmol/L 的盐酸苯肼, 2.5 ml 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH7.5), 摇匀后在紫外分光光度计上测定 324 nm 处的吸光度, 作为反应零点值; 吸取 0.1 ml 50 mmol/L 乙醇酸钠溶液加入比色杯启动反应, 每 30 s 测一次吸光度, 共测 3 min。

光合作用与光呼吸 在 $827 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光强下对分蘖期连体功能叶片用 LI-6200 光合作用测定仪测定其光合速率和光呼吸, 每个样品测定 10 片叶片, 取平均值。

2 实验结果

2.1 杂交水稻及亲本的光呼吸速率

从表 1 中可以看出, 杂交水稻的光合速率高而光呼吸比较小, 其光呼吸速率均略低于其低值亲本值, 并且杂交水稻的光呼吸与光合速率的比值低于其双亲。

表 1 杂交水稻及亲本的光呼吸速率和光呼吸/光合速率比值的比较

Table 1 The comparison of photorespiration (Pr) and ratio of photorespiration to photosynthesis (Pn) among rice hybrids and their parents

材料 Material	光合速率* Photosynthetic rate ($\text{CO}_2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)*	光呼吸 Photorespiration ($\text{CO}_2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	光呼吸/光合速率 Pr/Pn ratio
青 A (Qing A) (♀)	10.79 ± 0.10	4.42 ± 0.06	0.4096
青优 159 (Qingyou 159) (F ₁)	12.81 ± 0.12	4.29 ± 0.05	0.3349
R159 (♂)	8.98 ± 0.11	4.60 ± 0.06	0.5122
广 A (Guang A) (♀)	9.38 ± 0.13	4.89 ± 0.04	0.5213
广优四号 (Guangyou No.4) (F ₁)	11.09 ± 0.10	4.33 ± 0.05	0.3904
青六矮 (Qingliu'ai) (♂)	8.19 ± 0.07	4.41 ± 0.05	0.5385

平均数 ± SD, Means ± SD (n=10)

* 引自文献 [18] 文章 I 中的表 1。

2.2 杂交水稻及亲本的 Rubisco 活性

从图 1、图 2 中可以看到, 杂交水稻青优 159 的 RuBPCase 活性均明显高于其双亲, RuBPOase 活性则明显低于其双亲; 广优四号的 RuBPCase 活性略高于其高值母本广 A, RuBPOase 活性则略低于其低值父本青六矮。这说明杂交水稻具有较高的 RuBPCase 活性和较低的 RuBPOase 活性。

从 RuBPCase 活性与 RuBPOase 活性的比值来看(如图 3), 二组杂交水稻表现出相同的特性, 其 RuBPCase/RuBPOase 活性比值均高于其各自亲本, 具有明显的超亲优势。

2.3 杂交水稻及亲本的乙醇酸氧化酶活性

杂交水稻的乙醇酸氧化酶活性明显低于其双亲值(如图 4)。

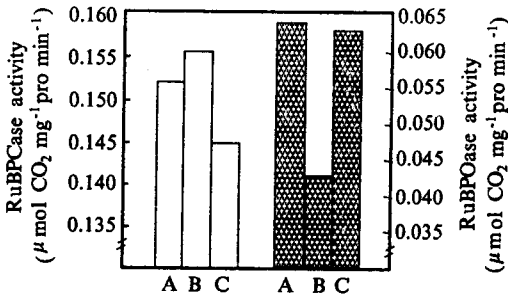


图 1 杂交水稻青优 159 与其亲本的 Rubisco 活性 (数据为测定三次的平均数)

Fig. 1 The Rubisco activity in Qingyou 159 and its parents (means, n=3)

A: 青 A (Qing A); B: 青优 159 (Qingyou 159); C: R159; □ RuBPCase; ▨ RuBPOase

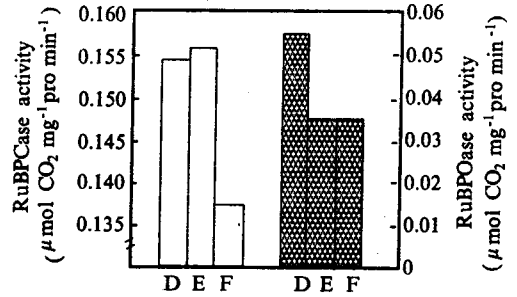


图 2 杂交水稻广优四号与其亲本的 Rubisco 活性 (数据为测定三次的平均数)

Fig. 2 The Rubisco activity in Guangyou No. 4 and its parents (means, n=3)

D: 广 A (Guang A); E: 广优四号 (Guangyou No. 4); F: 青六矮 (Qingliuai); □ RuBPCase; ▨ RuBPOase

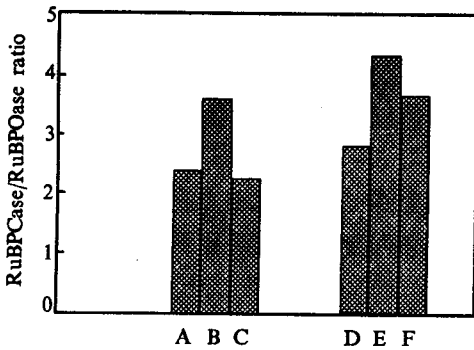


图 3 杂交水稻及亲本 RuBPCase 活性与 RuBPOase 活性的比值

Fig. 3 The RuBPCase/RuBPOase ratio in hybrid rice and their parents

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)

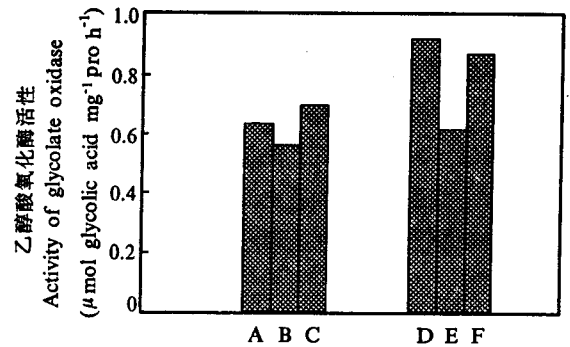


图 4 杂交水稻及亲本乙醇酸氧化酶活性 (数据为测定四次的平均数)

Fig. 4 The activity of glycolate oxidase in hybrid rice and their parents (means, n=4)

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)

3 讨论

据 Wittenbach^[10] 对小麦旗叶整个生活期间 Rubisco 的研究认为, Rubisco 的比活在叶子一生中是相对稳定的, 即叶片中 RuBPCase 活力与 Rubisco 的蛋白含量的比率在植物生长过程中是一个常数。而 RuBPCase 活力与光合作用速率相关, 光合作用速率受 Rubisco 的含量水平和羧化酶活性控制^[11]。可见 RuBPCase 活性与光合作用速率关系密切。我们的试验结果也表明: 具有杂种优势的高光合速率的杂交水稻, 其 RuBPCase 的比活高于其双亲; RuBPCase 比活与光合作用速率的相关系数为 $r=0.768$, 这说明 RuBPCase 活性与光合速率之间有一定的正相关关系, 杂交水稻光合速率高于其亲本原因之一可能是由于其体内具有高的 RuBPCase 活性。当然亦有人认为 Rubisco 含量及羧化酶活性与光合作用速率无直接关系^[12], 这可能是由于分析时酶

所在部位 CO_2 分压显著下降和在体内是钝化态的酶在体外分析时被活化造成的误差^[13]。

由于 Rubisco 是双功能酶, 同时催化羧化和加氧反应, 产生磷酸乙醇酸, 进而经乙醇酸途径释放出 CO_2 , 影响光合同化效率。从我们的试验结果来看, 杂交水稻功能叶片的 RuBPOase 活性低于其双亲, 表明杂交水稻进行光合作用过程中产生的磷酸乙醇酸的量较少, 降低了光呼吸的底物量。

高光合低氧合的 Rubisco 能提高植物的光合效率^[2]。从我们的试验结果可见杂交水稻的 RuBPCase 活性与 RuBPOase 活性的比值超过其亲本, 具有明显超亲优势, 这可以解释杂交水稻为什么具有较高的 CO_2 同化固定能力和相对较低的光呼吸。

高煜珠^[1]曾测定了 18 个水稻品种和材料的光合速率和光呼吸速率, 结果表明光合作用速率高的水稻材料, 其光呼吸亦高, 两者之间相关系数 $r=0.9143$; 同时他还指出: 光呼吸和乙醇酸氧化酶活性与 RuBPCase 活性有一定联系, RuBPCase 活性高, 乙醇酸氧化酶活性和光呼吸都高; 他认为凡是光合速率高的水稻品种, 其光呼吸亦高。但许多试验表明杂交水稻同其亲本及常规水稻品种相比, 光合速率较高, 而光呼吸较弱, 乙醇酸氧化酶活性较低, 光呼吸与乙醇酸氧化酶活性密切相关^[14]。杂种优势越强的杂交种, 其乙醇酸氧化酶活性越低, 乙醇酸氧化酶比活性较低的水稻, 有可能具备高的杂种优势潜力^[15]。本文中杂交水稻的乙醇酸氧化酶活性明显低于其双亲值。乙醇酸氧化酶的活性与光呼吸大小的相关性分析结果表明它们之间存在正相关, 相关系数为 0.729。乙醇酸氧化酶活性与光合作用速率之间也存在密切的负相关, 相关系数为 -0.834, t 测验表明达到 $\alpha=0.05$ 水平上的显著。

最近一些研究结果指出光呼吸是 C_3 植物保护光合机构免受强光破坏的因素之一^[16], 因为光呼吸可消耗强光下产生的过多激发能, 减弱叶绿体光氧化损伤的可能, 并有回补 Pi 的作用。然而在相同的自然条件下, 同种植物光呼吸的高低并不能说明其光合机构耐受强光损伤的能力。同种植物(如水稻)在相同条件下, 亚种间、品种间、杂交水稻之间其光抑制的敏感性均有差异^[17], 而造成这些差异的原因是多方面的。在正常的自然条件下, 高的光呼吸和过高比例的 Pr/Pn 值减少了 CO_2 的同化量, 降低光合效率。我们的试验结果表明杂交水稻的光呼吸速率略低于其亲本, 而光呼吸与光合作用速率的比值明显低于其双亲, 关于这些特性与其强光适应性和去抑制的关系, 尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Chang L W, Lin K H, Yang C N. Manifestation of hybrid vigor in rice. *J Taiwan Agric Res*, 1971, (4):8-23
- 2 孙崇荣. 光合作用碳代谢的蛋白质及其基因. 荆玉祥, 匡廷云, 李德葆主编. 植物分子生物学—成就与前景, 北京: 科学出版社, 1995, 125-137
- 3 高煜珠. 光呼吸与光合碳代谢的关系. 光合作用研究进展, 第三集. 北京: 科学出版社, 1984, 160-171
- 4 陈锦强, 李明启. 光呼吸研究进展. 植物生理学通讯, 1984, (3):5-12
- 5 吴相钰, 吴光耀. Rubisco 的分子生物学. 荆玉祥, 匡廷云, 李德葆主编. 植物分子生物学—成就与前景. 北京: 科学出版社, 1995, 114-124
- 6 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254
- 7 李粹芳, 李立人. 分光光度法与 ^{14}C 标记法测定 RuBPCase 的活性比较. 植物生理学通讯, 1989, (1):49-50

- 8 Kung S D, Chollet R, Marsho T T. Crystallization and assay procedures of tobacco ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Methods in Enzymology*, 1980, 69:326-335
- 9 汤小仪, 欧阳光察. 乙醇酸氧化酶活性测定. *植物生理学实验手册*. 上海:上海科技出版社, 1985, 195-197
- 10 Wittenbach V A. Ribulose biphosphate carboxylase and proteolytic activity in wheat leaves from anthesis through senescence. *Plant Physiol*, 1979, 64:884-887
- 11 Evans J R. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*, 1983, 72:297-302
- 12 Makino A, Mae T, Ohira K. Variations in the contents and kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylases among rice species. *Plant Cell Physiol*, 1987, 28(5):799-804
- 13 朱根海, 张荣统. 叶片含氮量和光合作用. *植物生理学通讯*, 1985, (2):9-12
- 14 饶立华. 水稻产量形成过程中的一些生理指标的研究(简报)—乙醇酸氧化酶活性, 比叶重与光合产物积累的关系. *浙江农业大学学报*, 1979, (1):13-16
- 15 何之常, 李文裕, 龚景武等. 早稻杂交水稻根系生理特性的研究. *植物生理学通讯*, 1980, (5):17-20
- 16 邹琦, 许长成, 赵世杰等. 午间强光胁迫下 SOD 对大豆叶片光合机构的保护作用. *植物生理学报*, 1995, 12(4):397-401
- 17 焦德茂, 季本华, 董红玉等. 水稻耐光抑制种质的简易筛选技术的原理和应用. *作物学报*, 1994, 20(4):322-326
- 18 郭培国, 李明启. 杂交水稻及其亲本光合特性的研究 I 和 II. *热带亚热带植物学报*, 1996, 4(4):60-65; 1997, 5(1):65-70