

## 兰属植物光合途径的研究

叶庆生 潘瑞炽 丘才新

(华南师范大学生物系, 广州 510631) (新加坡国立大学植物系, 新加坡)

**摘要** 本文对兰属 (*Cymbidium*) 植物的七个种中的 10 个栽培种的光合途径进行了生理生化研究。结果表明, 这些兰属植物叶片的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 和丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 的活性很低, 乙醇酸氧化酶的活性较高。在光下用  $\alpha$ -羟基吡啶甲烷磺酸 ( $\alpha$ -HPMS) 处理叶片后, 乙醇酸积累量明显高于对照。叶绿素 a/b 比值在 1.24-2.69 之间。光合速率最低为  $0.96-3.33 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。这些结果表明所研究的几种兰属植物均为  $\text{C}_3$  植物。

**关键词** 兰属; 光合途径; PEPCase; PPK; 乙醇酸氧化酶

**分类号** Q945.11

## STUDY ON THE PHOTOSYNTHETIC PATHWAY OF *CYMBIDIUM*

Ye Qingsheng Pan Ruichi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Hew Choy-sin

(Department of Botany, National University of Singapore, Singapore 0511)

**Abstract** The photosynthetic pathway of 10 cultivars of 7 species in *Cymbidium* were studied. The results showed that in *Cymbidium* leaves, the activities of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) and pyruvate phosphate dikinase (PPDK) were very low, but the activity of glycolate oxidase was rather high. The glycolate content in the leaves treated with  $\alpha$ -hydroxypyridine methane sulfonate ( $\alpha$ -HPMS) was obviously higher than that of control under the light. Chlorophyll a/b ratios in these cultivars were between 1.24 and 2.69. Photosynthetic rates of *Cymbidium* were in the range of  $0.96$  to  $3.33 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . All the results confirmed that the investigated *Cymbidium* plants were  $\text{C}_3$  plants.

**Key words** *Cymbidium*; Photosynthetic pathway; PEP carboxylase; Pyruvate phosphate dikinase; Glycolate oxidase

兰花是具有较高经济价值及观赏价值的花卉, 其生理生化及光合作用的研究已有大量的报道<sup>[1,2]</sup>。在兰花光合特性方面的研究, 都是以热带兰(即所谓的“洋兰”)为研究材料。研究表明, 肉质的厚叶兰大多是景天酸代谢(即 CAM)植物, 而薄叶兰一般都表现为  $\text{C}_3$  途径。然

而, 兰属 (*Cymbidium*) 植物的光合作用及光合途径的研究却较少。我们曾对墨兰的光合途径和光合特性做过较为系统的研究, 但仅选择兰属中的一个种, 缺乏普遍性<sup>[3,4]</sup>。本文进一步研究兰属植物七个种中的 10 个栽培种的光合途径。

## 1 材料和方法

**材料** 实验用兰花盆栽, 每株都保留 1—3 年生叶片, 在自然温度条件下遮光(大约全光照的 30% 左右)栽培, 相对湿度保持在 70% 以上, 每星期施用一次 1/5 浓度的 Hoagland 营养液。

**酶液的提取** 选择无病虫害、生长健康的一年生功能叶片, 取样前在约  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  光强下照光 2 h 以上。2 g 叶片加入 10 ml 预冷的提取液和 2 g 石英砂, 在冰浴中磨成匀浆。提取液(100 mmol/L Tricine 缓冲液, pH8.0, 含 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mmol/L DTT, 5% 蔗糖)在加入 DTT 之前充  $\text{N}_2$  20 min。匀浆液置冰箱中提取 2 h, 经 4 层纱布过滤后的滤液在 Beckman J2-MC 高速冷冻离心机中  $15\,000 \times g$  离心 20 min, 上清液经过 Sephadex G-25 柱初步纯化后用于各种酶活性的测定。

**酶活性测定** 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEP carboxylase, EC.4.1.1.31) 活性按 Maeba 和 Sanwal 方法<sup>[5]</sup>。丙醇酸磷酸双激酶 (PPDK, EC 2.6.1.2) 提取的缓冲液为 pH7.0, 其它过程同上, 活性按 Hocking 和 Anderson 的分光光度法测定<sup>[6]</sup>。乙醇酸氧化酶 (EC1.1.3.1) 的提取和过柱的洗脱液为 Tricine 缓冲液 (100 mmol/L, pH8.3), 其余过程与前面相同。活性测定同 Baker 和 Tolbert 的分光光度法<sup>[7]</sup>。酶液的蛋白质采用 Folin-phenol 法。

**叶片中乙醇酸含量的测定** 按 Zelitch 的方法<sup>[8]</sup> 提取和纯化叶片中的乙醇酸。取处理后的叶片 0.5 g 剪碎投入沸腾的 20% 乙醇溶液中 3 min 杀死, 残渣用沸腾的蒸馏水反复提取 2 次, 合并提取液, 然后将提取液加入已转化成乙酸型的阴离子交换树脂 (Dewex-1-x10) 柱 (10 cm $\times$ 0.7 cm), 以分离乙醇酸, 并按 Calkin 的方法定量测定<sup>[9]</sup>。

**叶片光合速率的测定** 光合速率用 LI-6200 便携式光合作用测定系统测定, 光强为  $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 兰属叶片的 PEPCase 和 PPDK 活性

由表 1 可见, 所测定的兰属 10 个栽培种的叶片的 PEPCase 活性很低, 活性最高的象牙白叶片也仅为  $3.27 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ 蛋白 min}^{-1}$ , 一般都在  $1-2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ 蛋白 min}^{-1}$  之间。PEPCase 是  $\text{C}_4$  植物的主要标记酶之一, 在  $\text{C}_4$  植物甘蔗叶片中活性高达  $100 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ 蛋白 min}^{-1}$  以上<sup>[4]</sup>, 而在  $\text{C}_3$  植物中活性极低。这一研究结果与 Edwards 和 Walker<sup>[10]</sup> 的结果以及我们测定墨兰的结果<sup>[4]</sup> 是一致的。这说明我们所研究的兰属 10 个栽培种应该是  $\text{C}_3$  光合途径植物。

PPDK 也是  $\text{C}_4$  植物的标记酶, 在  $\text{C}_3$  植物中该酶活性极低或测不出活性<sup>[11]</sup>, Hocking 和 Anderson<sup>[12]</sup> 研究比较了多种  $\text{C}_3$ 、 $\text{C}_4$  和 CAM 植物的 PPDK 活性, 结果表明,  $\text{C}_3$  植物中 PPDK

活性都很低, 而  $C_4$  植物的酶活性都在  $15 \text{ nmol AMP mg}^{-1} \text{ 蛋白 min}^{-1}$  以上。本文所测定的十种兰花的 PPDK 活性都在  $6.4 \text{ nmol AMP mg}^{-1} \text{ 蛋白 min}^{-1}$  以下, 与 Hocking 和 Anderson 的结论一致。从 PPDK 活性的测定结果看来, 兰属植物也表现出  $C_3$  植物的酶学特性。

表1 兰属植物叶片 PEP 羧化酶和 PPDK 的活性  
Table 1 Activities of PEPCase and PPDK in *Cymbidium* leaves

种名 Species	品种 Cultivars	PEPCase ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ )	PPDK ( $\text{nmol AMP}$ $\text{mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ )
春兰 <i>C. goeringii</i> (Rchb. f.) Rchb. f.	赤花龙岩 Chihua Longyan	$1.58 \pm 0.08$	$2.34 \pm 0.02$
蕙兰 <i>C. faberi</i> Rolfe	宜良夏蕙兰 Yiliang Xiahuilan	$0.99 \pm 0.06$	$3.24 \pm 0.18$
建兰 <i>C. ensifolium</i> (L.) Sw.	长仁化白 Changren Huabai	$1.47 \pm 0.07$	$6.27 \pm 0.18$
	大一白 Dayibai	$2.09 \pm 0.11$	$5.65 \pm 0.21$
墨兰 <i>C. sinense</i> (Andr.) Willd.	企黑 Qihei	$1.33 \pm 0.02$	$6.39 \pm 0.33$
	徽州墨 Huizhoumo	$1.18 \pm 0.01$	$5.77 \pm 0.02$
	海南墨兰 Hainan Molan	$1.25 \pm 0.03$	$3.41 \pm 0.02$
寒兰 <i>C. kanran</i> Makino	广东寒兰 Guangdong Hanlan	$1.21 \pm 0.05$	$2.76 \pm 0.04$
春剑 <i>C. longibracteatum</i> Y. S. Wu et S. C. Chen	通海剑兰 Tonghai Jianlan	$1.30 \pm 0.04$	$2.88 \pm 0.01$
大雪兰 (变种) <i>C. eburneum</i> var. <i>parishii</i> (Rchb. f.) Hook. f.	象牙白 Xiangyabai	$3.27 \pm 0.06$	$5.97 \pm 0.16$

表2 兰属植物叶片乙醇酸氧化酶活性和乙醇酸的积累  
Table 2 Glycolate oxidase activity and glycolate accumulation in *Cymbidium* Leaves

种名 Species	品种 Cultivars	乙醇酸氧化酶 Glycolate oxidase activity ( $\text{nmol glyoxylate}$ $\text{mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ )	乙醇酸积累 *	
			$\text{H}_2\text{O}$	$\alpha\text{-HPMS}$
春兰 <i>C. goeringii</i> (Rchb. f.) Rchb. f.	赤花龙岩 Chihua Longyan	$2.02 \pm 0.06$	$2.87 \pm 0.11$	$3.06 \pm 0.09$
蕙兰 <i>C. faberi</i> Rolfe	宜良夏蕙兰 Yiliang Xiahuilan	$12.37 \pm 0.36$	$3.80 \pm 0.17$	$5.74 \pm 0.14$
建兰 <i>C. ensifolium</i> (L.) Sw.	长仁化白 Changren Huabai	$10.42 \pm 0.15$	$2.74 \pm 0.13$	$5.62 \pm 0.37$
	大一白 Dayibai	$16.05 \pm 0.67$	$2.95 \pm 0.02$	$4.70 \pm 0.23$
墨兰 <i>C. sinense</i> (Andr.) Willd.	企黑 Qihei	$12.32 \pm 0.87$	$2.81 \pm 0.17$	$8.40 \pm 0.31$
	徽州墨 Huizhoumo	$18.45 \pm 0.76$	$3.36 \pm 0.22$	$8.22 \pm 0.41$
	海南墨兰 Hainan Molan	$16.96 \pm 0.41$	$3.39 \pm 0.24$	$6.94 \pm 0.29$
寒兰 <i>C. kanran</i> Makino	广东寒兰 Guangdong Hanlan	$17.10 \pm 0.42$	$3.99 \pm 0.24$	$6.94 \pm 0.26$
春剑 <i>C. longibracteatum</i> Y. S. Wu et S. C. Chen	通海剑兰 Tonghai Jianlan	$8.81 \pm 0.92$	$3.31 \pm 0.15$	$5.36 \pm 0.17$
大雪兰 (变种) <i>C. eburneum</i> var. <i>parishii</i> (Rchb. f.) Hook. f.	象牙白 Xiangyabai	$6.27 \pm 0.53$	$4.09 \pm 0.36$	$7.06 \pm 0.42$

\* 叶片用水或  $10 \text{ mmol/L } \alpha\text{-HPMS}$  浸泡, 在  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  光强下照光 1 h.

Leaf sections were immersed with water or  $10 \text{ mmol/L } \alpha\text{-HPMS}$ , and illuminated under  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  for 1 h.

## 2.2 乙醇酸氧化酶活性和乙醇酸的代谢

$C_3$  植物与  $C_4$  和 CAM 植物的差别之一是  $C_3$  植物表现较强的光呼吸。乙醇酸氧化酶是光呼吸过程中的关键酶，它将光呼吸产生的乙醇酸氧化。兰属植物都存在乙醇酸氧化酶活性(表 2)，但差别较大，春兰(赤花龙岩)和大雪兰(象牙白)的乙醇酸氧化酶活性较低(分别是 2.02 和 6.27 nmol 乙醛酸  $\text{mg}^{-1}$  蛋白  $\text{min}^{-1}$ )，而蕙兰、建兰、墨兰和寒兰都具有较高的乙醇酸氧化酶活性。在光下以  $\alpha$ -HPMS 处理叶片，都导致兰花植物叶片的乙醇酸的积累(表 2)，这进一步说明，所研究的兰属植物叶片中存在明显的乙醇酸代谢的途径，即存在较强光呼吸，从这个意义上来说，这些兰属植物表现出  $C_3$  植物的显著特征。

## 2.3 兰属植物叶片的叶绿素含量和叶绿素 a/b 的变化

从表 3 可见，所测定的兰属植物叶片的叶绿素含量变化很大，最低的为来自海南的大雪兰(1.39  $\text{mg g}^{-1}\text{FW}$ )，最高是春兰，达到 4.00  $\text{mg g}^{-1}\text{FW}$ ，但它们的叶绿素 a/b 值都在 1.2–2.7 之间。光合途径与叶绿素 a/b 值有一定的联系。Holden<sup>[13]</sup> 广泛地比较了  $C_4$  植物和  $C_3$  植物的叶绿素 a/b 值，结果认为， $C_4$  植物比  $C_3$  植物具有较高的叶绿素 a/b 值，特别是在单子叶植物中，差别更为明显，因为在单子叶  $C_4$  植物维管束鞘细胞中叶绿体的叶绿素 a/b 值比叶肉细胞高。我们以甘蔗叶片为对照，测得其叶绿素 a/b 值高达 4.22<sup>[4]</sup>。兰属植物是单子叶植物，其叶绿素 a/b 值表现出  $C_3$  植物的特点。

表 3 兰属植物叶片叶绿素含量和叶绿素 a/b 的比值及光合速率

Table 3 Chlorophyll content, chlorophyll a/b ratio and photosynthetic rate in *Cymbidium* leaves

种名 Species	品种 Cultivars	叶绿素含量 Chl content ( $\text{mg g}^{-1}\text{FW}$ )			叶绿素 a/b Chl a/b ratio	光合速率 Photo- synthetic rate ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
		Chl a	Chl b	Chl a+b		
春兰 <i>C. goeringii</i> (Rchb. f.) Rchb. f.	赤花龙岩 Chihua Longyan	1.66 ± 0.03	1.34 ± 0.04	4.00 ± 0.04	1.24	3.33 ± 0.10
蕙兰 <i>C. faberi</i> Rolfe	宜良夏蕙兰 Yiliang Xiahuilan	1.68 ± 0.05	0.87 ± 0.04	2.55 ± 0.04	1.93	1.97 ± 0.05
建兰 <i>C. ensifolium</i> (L.) Sw.	长仁化白 Changren Huabai	2.03 ± 0.03	0.82 ± 0.03	2.85 ± 0.03	2.48	2.92 ± 0.13
	大一白 Dayibai	1.92 ± 0.02	0.78 ± 0.01	2.70 ± 0.03	2.46	3.05 ± 0.11
墨兰 <i>C. sinense</i> (Andr.) Willd.	企黑 Qihei	1.83 ± 0.03	0.70 ± 0.03	2.53 ± 0.03	2.61	1.84 ± 0.14
	徽州墨 Huizhoumo	1.40 ± 0.01	0.59 ± 0.02	1.99 ± 0.03	2.37	2.01 ± 0.08
	海南墨兰 Hainan Molan	1.80 ± 0.41	0.67 ± 0.03	2.47 ± 0.01	2.69	1.55 ± 0.04
寒兰 <i>C. kanran</i> Makino	广东寒兰 Guangdong Hanlan	2.22 ± 0.02	0.95 ± 0.04	3.17 ± 0.05	2.34	0.96 ± 0.02
春剑 <i>C. longibracteatum</i> Y. S. Wu et S. C. Chen	通海剑兰 Tonghai Jianlan	1.86 ± 0.04	0.80 ± 0.02	2.66 ± 0.03	2.33	1.05 ± 0.08
大雪兰(变种) <i>C. eburneum</i> var. <i>parishii</i> (Rchb. f.) Hook. f.	象牙白 Xiangyabai	0.98 ± 0.02	0.41 ± 0.03	1.39 ± 0.02	2.39	3.09 ± 0.07

## 2.4 兰属植物的光合速率

兰属植物的光合速率较低，在 10 个兰属栽培种中，光合速率最高的春兰为 3.33  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，最低的是寒兰只有 0.96  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (表 3)。通常，大多数植物的光合速率在 5–50  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  之间<sup>[14]</sup>，而兰属植物的光合速率都低于这个数值。所以，本文中的兰属植物可能是  $C_3$  植物而不是  $C_4$  植物，也不会是 CAM 植物。

兰属植物资源丰富, 种类繁多, 是否所有的兰属植物都是  $C_3$  植物, 需要做更多的研究工作。

### 参考文献

- 1 Arditti J. Aspects of the physiology of orchid. In: Woolhouse H W ed. *Advances in Botanical Research*, Vol. 7. New York: Academic Press, 1979, 442-665
- 2 Hew C S.  $CO_2$  fixation in orchids (minireview). *Acta Phytophysiol. Sinica*, 1989, 15:217-222
- 3 叶庆生, 潘瑞炽, 丘才新. 墨兰叶片结构和光合作用的研究. *植物学报*, 1991, 34:771-776
- 4 叶庆生, 潘瑞炽, 丘才新. 墨兰光合途径研究. *植物学报*, 1993, 35(6):441-446
- 5 Maeba P, Sanwal B D. Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Salmonella typhimurium*, Strain LT1. In: Lowenstein J M ed. *Methods in Enzymology*, Vol. 13. Citric Acid Cycle. New York, Academic Press, 1969, 283-286
- 6 Hocking C G, Anderson J W. Estimation of pyruvate, phosphate dikinase activity in maize-leaf tissue by phosphoenolpyruvate plus phosphorylation of AMP. *Phytochemistry*, 1985, 24:2173-2179
- 7 Baker A L, Tolbert N E. Glycolate oxidase (Ferroxin-containing form). In: Wood W A ed. *Methods in Enzymology*, Vol. 9. New York, Academic Press, 1986, 288-457
- 8 Zelitch I. *Dark Respiration and Photorespiration*. New York, Academic Press, 1971, 127-171
- 9 Calkins V P. Colorimetric determination of glycolic acid. *Chemistry*, 1943, 15:99-100
- 10 Edwards G, Walker D.  $C_3$ ,  $C_4$ : Mechanisms, Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis. Oxford, Blackwel, 1983, 542
- 11 Edwards G E, Nakamoto H. Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in  $C_4$  photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation. *Ann Rev Plant Physiol*, 1985, 36:255-286
- 12 Hocking C G, Anderson J W. Survey of pyruvate phosphate dikinase activity of plants in relation to the  $C_3$ ,  $C_4$  and CAM mechanisms of  $CO_2$  assimilation. *Photochemistry*, 25:1537-1543
- 13 Holden M. Chloroplast pigment in plants with the  $C_4$ -dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Photosynthetica*, 1973, 7:41-49
- 14 索尔兹伯里 F B, 罗斯 C. 北京大学生物系等译. *植物生理学*. 北京: 科学出版社, 1969, 236-237