

杂交水稻灌浆期光合生理特性的研究*

孙国荣** 刘文芳 肖翊华

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

提 要 本文对3个杂交水稻及其亲本灌浆期叶绿体诱导荧光动力学光谱、活体叶片光合放氧速率、叶绿体低温(77K)荧光发射光谱与二磷酸核酮糖羧化酶的活性研究表明: 强优势的杂种均表现出高活性和高效率, 而弱优势的杂种则相反。并对光合优势的生理机制进行了分析。

关键词 叶绿体; 放氧速率; 二磷酸核酮糖羧化酶

光合产物的多少, 是光合面积、光合能力(单位叶面积的光合强度)和光合时间三者的乘积^[1], 光合强度的大小主要取决于叶绿体光合强度, 优势杂种叶绿体破碎膜的悬浮液和亲本叶绿体破碎膜悬浮液的混合液均表现出较高的希尔反应活性^[2]。叶绿体中含量最多的蛋白质——二磷酸核酮糖羧化酶(RuBPCase)约占植物蛋白质含量的20—30%^[3], 由此可见, 光合强度——CO₂固定速率的大小很大程度上取决于叶绿体对光能的吸收和转换效率, 而叶绿体又有一定的自主性, 有自己的基因库——质体DNA和质体核糖体蛋白质合成系统。因此, 本文通过杂交水稻三套组合灌浆期活体叶片光合放氧速率、叶绿体低温荧光发射光谱、叶绿体诱导荧光动力学光谱与(RuBPCase)活性的研究, 对叶绿体光合生理系统遗传特性和杂交水稻光合优势的生理机制进行了初步分析。

材 料 与 方 法

供试材料由湖南农业科学院杂交水稻研究中心提供, 生产实践证明的优势组合: 威优64和汕优桂33及其亲本, 弱优势组合: II-32A×测64及其亲本。

试验为盆栽, 每盆6株。一般管理, 灌浆期取主茎剑叶及倒2叶进行测定, 试验重复3次。

二磷酸核酮糖羧化酶(RuBPCase)活性测定 取1g鲜叶加入5ml研磨介质[内含: 0.15M Tris-HCl(pH7.5)、1mMEDTA、0.001M MgCl₂、0.01MKCl和1mM DTT]匀浆用纱布过滤, 于10000g离心20分钟, 上清液为粗酶提取液。将含20μl

本文于1989年1月19日收到。

* 本文的实验工作得到中国科学院植物研究所谭克辉研究员和有关同志的指导、帮助谨此致谢。

** 现在哈尔滨师范大学生物系工作。

0.5M Tris- H_2SO_4 (pH 7.8)、10 μl 0.1M MgCl_2 、40 μl 0.1M $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (25 $\mu\text{Ci/ml}$)、10 μl 20 mM DTT 和 10 μl 粗酶提取液的反应体系 25 $^\circ\text{C}$ 恒温以后, 加入 10 μl 10 mM RuBP 为反应开始。反应 5 分钟后, 加入两滴 6N HCl 终止反应。终止后的反应液用滴管移至闪烁瓶中。用两滴蒸馏水洗, 85 $^\circ\text{C}$ 保温除去未固定的 CO_2 , 且使之干燥, 冷却后每闪烁瓶加入 0.1 ml 水使之溶解, 再加入 5ml 闪烁液 (Bray 改进液) 在液体闪烁仪上计数。

粗酶提取液蛋白质含量测定 5ml 考马斯亮兰 G250 溶液加 0.1ml 稀释 20 倍的水稻 RuBPCase 粗酶提取液, 摇匀后于 595nm 分光光度计比色。

叶绿体低温荧光发射光谱和荧光诱导动力学光谱 取 1g 水稻叶片于 5ml 提取液 (pH 7.2, 0.3M 蔗糖-0.01M KCl-0.05M 磷酸钠缓冲溶液) 研磨, 于 1000g 离心弃去沉淀, 上清液于 5000g 离心 10 分钟, 沉淀加 3ml 提取缓冲液再于 5000g 离心 10 分钟, 留沉淀加 1.5ml 提取液匀浆为叶绿体悬浮液, 分别参照 W.L. Buttler 等^[5] 和 R.A. Gasanov 等^[7] 的方法进行叶绿体诱导荧光动力学光谱和叶绿体低温荧光发射光谱的测定。

水稻活体叶片光合放氧速率 用直径 0.5cm 打孔器 取水稻 5 片圆叶于 3ml 0.1M NaHCO_3 溶液中抽气 10 分钟, 参考 李德耀等^[3] 的方法, 用氧电极法测定光合放氧速率。

结果与讨论

1. 叶绿体诱导荧光动力学光谱和光合放氧

由于捕光叶绿素 a/b 蛋白质复合物 (LHCP)^[6,9] 是由核基因编码并由细胞质核糖

表 1 杂交水稻及其亲本灌浆期叶绿体可变荧光和最大量子产率

Table 1 Efficiency of variable fluorescence yield and maximum efficiency of quantum yield of chloroplasts of hybrids and their parents at filling stage

杂种及其亲本名称 Name of hybrids and their parents	可变荧光产率 (F_v/F_o) Efficiency of variable fluorescence yield	最大量子产率 (F_m/F_m) Efficiency of maximum quantum yield
威 20A Wei 20A	1.167	0.538
威优 64 Wei You 64	1.265	0.558
测 64 Che 64	1.091	0.522
II-32A $\times$ 测 64 II-32A $\times$ Che 64	1.083	0.520
II-32A II-32A	1.686	0.628
珍汕 97A Zhen Shan 97A	1.286	0.563
汕优桂 33 Shan You Gui 33	1.414	0.586
桂 33 Gui 33	1.308	0.567

注: F_v : 可变荧光强度; F_m : 最大荧光强度; F_o : 基础荧光强度。

Note: F_v : variable fluorescence, F_m : maximum level of fluorescence, F_o : minimum level of fluorescence.

体合成的^[4,11,12], 而光系统 II 的 32 KD 蛋白质和光系统 I 的 P700 蛋白质是由质体 NDA 编码并由质体核糖体合成的^[13-16]; 因此, PSII 的活性和原初光能转换效率的遗传规律比较复杂, 其遗传行为应为核-质互作类型。三套杂交水稻灌浆期叶绿体动力学研究结果见表 1 和图 1。表 1 中数据由图 1 计算而来。F₀ 为基础荧光相对强度, F_m 为最大荧光相对强度, F_v (可变荧光) = F_m - F₀。F_v/F₀ 为可变荧光产率, 一般反映 PS II 的活性, 而 F_v/F_m 为最大量子产率, 是 PS II 原初光能转换效率的量度。由图 1 和表 1 可见, 高产优势组合杂种汕优桂 33 和威优 64 的可变荧光产率和最大量子产率都大于其父母本, 而弱优势杂种则与父本相接近但远小于母本, 并且优势杂种均高于弱优势杂种, 因此, 优势杂种灌浆期具有较高的 PS II 活性和原初光能转换效率可能是光合生理优势的重要原因。

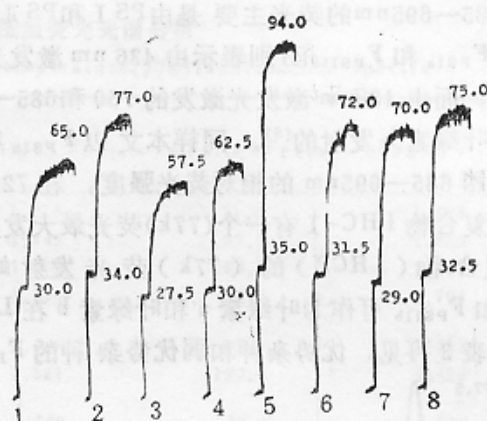


图 1 杂交水稻及其亲本灌浆期叶绿体诱导荧光动力学光谱

Fig.1 Kinetics of fluorescence induction in chloroplasts of hybrids and their parents at filling stage

1. 威 20A; 2. 威优 64; 3. 测 64; 4. II-32A × 测 64;
5. II-32A; 6. 珍汕 97A; 7. 汕优桂 33; 8. 桂 33
1. Wei 20A, 2. Wei You 64, 3. Che 64, 4. II-32A × Che 46, 5. II-32A, 6. Zhan Shan 97A, 7. Shan You Gui 33, 8. Gui 33

表 2 杂交水稻及其亲本灌浆期活体叶片光合放氧速率 ($\mu\text{M}\text{O}_2/\text{cm}^2$ 叶片 · 小时)
Table 2 In vivo photosynthetic O_2 release rate of leaves of hybrids and their parents at filling stage ($\mu\text{M}\text{O}_2/\text{cm}^2$ leaf · hr)

杂种及其亲本名称 Name of hybrids and their parents	倒二叶 First leaf below flag leaf	剑叶 Flag leaf
威 20A Wei 20A	5.832	7.344
威优 64 Wei You 64	8.033	8.295
测 64 Che 64	5.239	5.627
II-32A × 测 64 II-32A × Che 64	5.408	5.594
II-32A II-32A	6.549	6.985
珍汕 97A Zhen Shan 97A	5.588	6.468
汕优桂 33 Shan You Gui 33	6.350	7.095
桂 33 Gui 33	5.821	6.677

由于光合放氧速率的大小本质上取决于 PS II 活性的大小, 其遗传行为亦应与 PS II 活性相一致。优势杂种汕优桂 33 和威优 64 的剑叶和倒二叶均具有较高的光合放氧速率 (表 2), 而弱优势杂种 II-32A × 测 64 的光合放氧速率则较低, 仅与父本相接近, 表 2 与表 1 结果一致。因此, 我们可以认为, PS II 的活性、光合放氧速率和原初光能利用效率, 对杂交水稻光合生理优势与产量优势起着非常重要的作用。

2. 叶绿体低温 (77K) 荧光发射光谱

由于没有证据表明反应中心叶绿素可发出荧光^[5], 因而, 由 436 nm 激发光激发的

730和685—695nm的荧光主要是由PS I和PS II的天线和捕光叶绿素a发射的^[5],所以,本文用 F_{PSIa} 和 F_{PSIIa} 分别表示由436nm激发光激发的730和685—695nm的相对荧光强度,而由480nm激发光激发的730和685—695nm荧光主要是由PSI和PS II的天线和捕光叶绿素b发射的^[5],同样本文以 F_{PSIb} 和 F_{PSIIb} 分别表示由480nm激发光激发的730和685—695nm的相对荧光强度。在729—730nm处光系统I的捕光叶绿素a/b蛋白质复合物LHC-I有一个(77k)荧光最大发射峰^[10],光系统II的捕光叶绿素a/b蛋白质复合物(LHCP)的(77k)荧光发射峰在685nm^[10]。所以, F_{PSIa} 、 F_{PSIIa} 、 F_{PSIb} 和 F_{PSIIb} 可作为叶绿素a和叶绿素b在LHC-I和LHCP中的相对值,由图2、图3和表3可见,优势杂种和弱优势杂种的 F_{PSIa} 、 F_{PSIIa} 、 F_{PSIb} 和 F_{PSIIb} 没有什么规

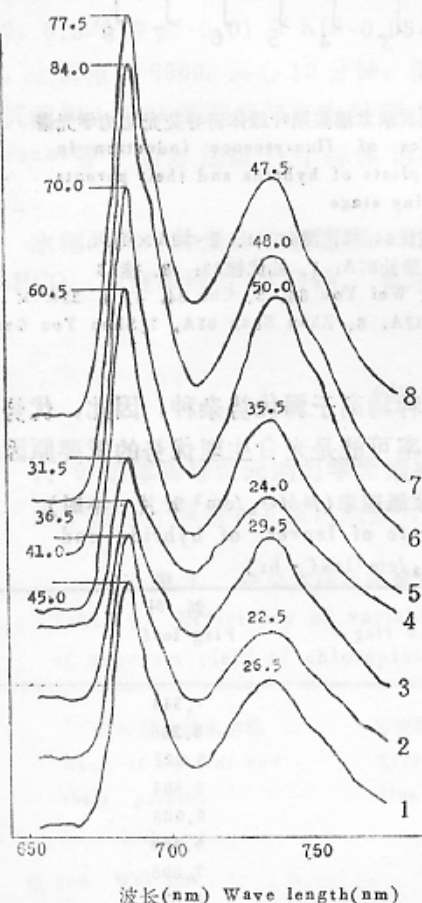


图2 杂交水稻及其亲本灌浆期480nm光激发的叶绿体低温(77k)荧光光谱

Fig.2 Low temperature (77k) fluorescence spectra excited by 480 nm light in chloroplasts of hybrids and their parents at filling stage

1. 威20A; 2. 威优64; 3. 测64; 4. II-32A; 5. II-32A×测64; 6. 珍汕97A; 7. 汕优桂33; 8. 桂33.
1. Wei 20A, 2. Wei You 64, 3. Che 64, 4. II-32A, 5. II-32A × Che 64, 6. Zhen Shan 97 A, 7. Shan You Gui 33, 8. Gui 33.

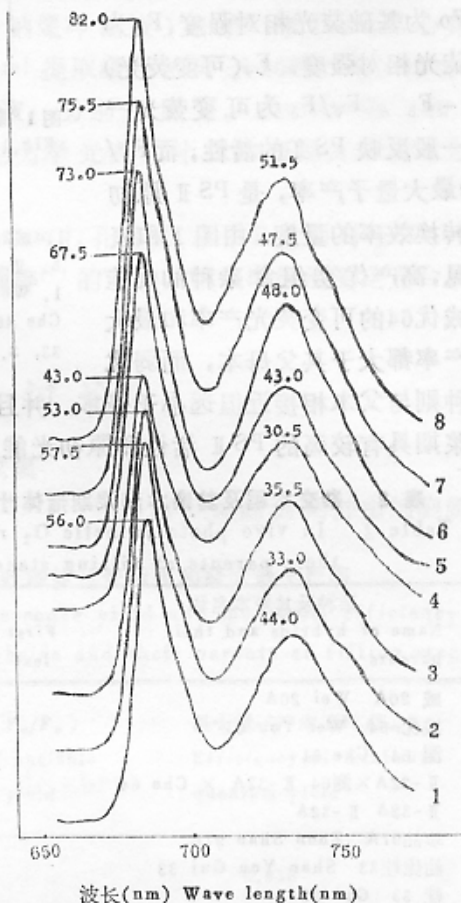


图3 杂交水稻及其亲本灌浆期436nm光激发的叶绿体低温(77k)荧光光谱

Fig.3 Low temperature (77k) fluorescence spectra excited by 436 nm light in chloroplasts of hybrids and their parents at filling stage

1. 威20A; 2. 威优64; 3. 测64; 4. II-32A; 5. II-32A×测64; 6. 珍汕97A; 7. 汕优桂33; 8. 桂33.
1. Wei 20A, 2. Wei You 64, 3. Che 64, 4. II-32A, 5. II-32A × Che 64, 6. Zhen Shan 97 A, 7. Shan You Gui 33, 8. Gui 33

表 3 低温荧光光谱分析

Table 3 Analysis of low temperature(77k)fluorescence spectra

杂种及其亲本名称 Name of hybrids and their parents	$F_{PSIIa} + F_{PSIa}$	F_{PSIIa} / F_{PSIa}	$F_{PSIIb} + F_{PSIb}$	F_{PSIIb} / F_{PSIb}
威 20A Wei 20A	100.0	1.273	71.5	1.698
威优 64 Wei You 64	90.5	1.742	63.5	1.822
测 64 Che 64	88.5	1.493	66.0	1.237
Ⅱ-32A×测64	110.5	1.570	96.0	1.704
Ⅱ-32A Ⅱ-32A	73.5	1.410	55.5	1.313
珍汕 97A Zhen Shan 97A	121.0	1.521	120.0	1.400
汕优桂 33 Shan You Gui 33	123.0	1.589	132.0	1.750
桂 33 Gui 33	133.5	1.592	125.0	1.832

律,但是,从 F_{PSIIa}/F_{PSIa} 和 F_{PSIIb}/F_{PSIb} 的值上看 杂种均高于其父母本,而优势杂种又高于弱优势杂种。此种现象是由于叶绿素 a、b 在 LHC-I 和 LHCP 中的分配比例不同所造成,还是由于 LHC-I 和 LHCP 在 PS I 和 PS II 中的分配比例不同所造成,现在还不太清楚。但是, LHCP 和 LHC-I 与 PS I 和 PS II 之间的光能分配调节有关^[10],因此,我们可以认为优势杂种光合生理优势可能与光能在 PS I 和 PS II 中的合理分配有关,并且,对优势杂种来说,光能可能更多地分配于 PS II 中。是否如此,还有待于更深入的研究。

表 4 杂交水稻及其亲本灌浆期叶片 RuBPCase 活性

Table 4 RuBPCase activity of leaves of hybrids and their parents at filling stage

杂种及其亲本名称 Name of hybrids and their Parents	RuBPCase 活性 RuBPCase activity ($\mu\text{m CO}_2/\text{g}\cdot\text{F}\cdot\text{W}\cdot\text{hour}$)	RuBPCase 比活性 Specific RuBPCase activity ($\mu\text{m CO}_2/\text{mg}\cdot\text{protein}\cdot\text{hour}$)
威 20A Wei 20A	281.32	7.815
威优 64 Wei You 64	348.76	9.426
测 64 Che 64	366.90	5.517
Ⅱ-32A×测64 Ⅱ-32A × Che 64	246.23	4.690
Ⅱ-32A Ⅱ-32A	238.75	3.460
珍汕 97A Zhen Shan 97A	260.76	4.967
汕优桂 33 Shan You Gui 33	309.84	4.695
桂 33 Gui 33	275.95	4.181

3. 二磷酸核酮糖羧化酶 (RuBPCase) 活性

RuBPCase 的大亚基是由叶绿体 DNA 基因编码并由叶绿体蛋白质合成系统合成的^[6, 12],小亚基则是由细胞核 DNA 编码并由细胞质核糖体合成的^[12, 13]。RuBPCase 的催化部位在大亚基上,小亚基对酶的羧化和放氧活性也在一定程度上起调节作用。因此,RuBPCase 活性的遗传应倾向于细胞质遗传规律,但也不应忽视细胞核通过小亚基的调节作用。从表 4 中可见,杂种的酶活性都较母本高,而比活性则接近于母本,表现为细胞质遗传规律。优势杂种酶活性均较弱优势杂种高。

本文所测强优势杂交水稻威优 64 和汕优桂 33 为近年生产上大面积推广的杂交稻, 而 II-32A × 测 64 为实践证明的弱优势组合, 其产量性状(表 5)与以上结果综合

表 5 杂交水稻及其亲本产量性状

Table 5 Yield characters of hybrids and their parents

杂种及其亲本名称 Name of hybrids and their parents	穗长(厘米) Panicle length (cm)	总粒数 Grain in a panicle	结实率(%) Seed setting rate (%)	千粒重(克) 1000-grain weight(g)
威 20A Wei 20A	20.5	755	—	—
威优 64 Wei You 64	26.0	1010	86.77	29.60
测 64 Che 64	24.8	841	89.66	26.33
II-32A × 测 64 II-32A × Che 64	26.2	530	83.67	25.00
II-32A II-32A	22.5	635	—	—
珍 汕 97A Zhen Shan 97 A	21.5	973	—	—
汕优桂 33 Shan You Gui 33	29.2	1315	83.27	27.50
桂 33 Gui 33	22.9	629	85.45	27.00

分析表明, 产量优势与光合作用一系列过程优势趋于一致。由于杂交水稻叶绿体光合系统是由父母本两套遗传系统与叶绿体遗传系统相互作用而形成的复杂系统, 因此杂种光合生理优势不仅表现在几个生理指标上, 它是光能吸收、转换到 CO_2 固定一系列过程多个因子相互作用的结果, 所以, 对于杂交水稻光合作用优势机理的阐明还有待于从多层次进行更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 李泽炉, 肖翊华等. 杂交水稻的研究与实践, 上海科学技术出版社, 1982: 186-289
- 2 朱鹏, 刘文芳, 肖翊华. 武汉植物学研究, 1987; 5(3): 257-266
- 3 李德耀, 叶济宇. 植物生理学通讯, 1980; (1): 35-40
- 4 Bedbrook J R, Kolodner R. Ann Rev Plant Physiol, 1979; 30: 593-620
- 5 Buttler W L, Kilajima M. Biochim Biophys Acta, 1975; 396: 72-85
- 6 Ellis R J, In L Bogorad and J H Weil, Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants. Plenum Press, New York and London, 1977: 195-212
- 7 Casanov R A, Govindjee. Z Pflanzen Physiol Bd, 1974; 72(s): 193-202
- 8 Govindjee. Photosynthesis, Vol. II: Development, Carbon Metabolism and Plant Productivity. Academic Press, 1982: 1-11
- 9 Govindjee. Photosynthesis, Vol. II: Development, Carbon Metabolism and Plant Productivity. Academic Press, 1982: 419-457
- 10 Kuang T Y et al. Arch Biochem Biophys, 1984; 235: 618-627
- 11 Link F. Planta, 1982; 154: 81-86
- 12 Harpster M, Apel K. Physiol Plant, 1985; 64: 147-152
- 13 Fister J et al. Eur J Biochem, 1982; 126: 143-148
- 14 Vierling E, Alberte R S. J Cell Biol, 1983; 97: 1806-1814
- 15 Westhoff P et al. Plant Mol Biol, 1983; 2: 95-107

STUDIES ON PHYSIOLOGIC CHARACTERS OF PHOTOSYNTHESIS OF HYBRID RICE AT FILLING STAGE

Sun Guorong, Liu Wenfang, Xiao Yihua

(Department of Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract In this paper the kinetics of fluorescence induction and low temperature (77k) fluorescence excited in chloroplasts, in vivo photosynthetic O_2 release rate and ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase in leaves of hybrids and their parents at filling stage were studied. The results indicated that the vigorous hybrids has higher activity and efficiency. The physiological mechanism of heterosis in photosynthesis was discussed.

Key words Chloroplast; O_2 release rate; Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (RuBPCase)

新 书 征 订 启 事

由中国科学院武汉植物研究所钟杨、黄德世和武汉大学生物系陈家宽同志合著的《数量分类的方法与程序》一书,已于1990年10月由武汉大学出版社出版发行。

数量分类学是一门应用数学理论和电子计算机技术处理生物分类问题的边缘学科。本书主要内容为数量分类的基本概念和常用方法(如系统聚类、图论聚类和主成分分析等),以及一些正在发展的方法(如模糊聚类和数量分支分类等)。同时,介绍了这些数量分类方法的计算机程序(BASIC语言编程),是目前国内从事数量分类学研究最完备的参考书。它既可作为从事生物分类学研究和其它有兴趣的科研工作者的工具书,亦可供大专院校生物、农业、林业、中药、环境科学等专业的师生阅读学习。

本书为大32开本,共24万余字,系用计算机激光照排,图文并茂,印刷精美。每本定价5.00元,另加挂号邮寄费0.80元。需购者请汇款至武昌磨山中国科学院武汉植物研究所张晓艳收(邮政编码430074),并在汇款单附言栏内写清购书册数,购者姓名及单位地址(注明邮政编码);单位购书可经银行汇款,信汇银行及帐号;工行武汉关山办事处 88—67。