

低浓度 CO₂ 对水车前和黑藻光合特性的影响

李兆波^{1,2,3}, 李伟^{1,3}, 顾舒平^{1,3}, 操瑜^{1,2,3}, 尹黎燕^{1,3*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;

3. 湿地演化与生态恢复湖北省重点实验室, 武汉 430074)

摘要: 本实验通过对沉水植物水车前 (*Ottelia alismoides*) 和黑藻 (*Hydrilla verticillata*) 进行低浓度 CO₂ 诱导, 研究其光合特性的变化。研究显示, 诱导后, 水车前的 PEPC/Rubisco 活性比值由 0.45 上升到 4.17, 黑藻由 0.47 上升到 4.17, 两种植物的 C₄ 途径光合酶 PEPC 和 NAD-ME 的活性升高了 10 倍左右, 其他 C₄ 光合酶如 NAD-MDH 和 PPDK 的活性也大幅升高; 诱导后, 水车前和黑藻的其他光合特性也发生了显著变化: 净光合速率比对照分别提高了 50.8% 和 74.1%, O₂ 对处理组光合速率的抑制分别为对照组的 35% 和 60%, 叶绿素荧光基本参数也有显著性变化。研究结果表明, 经低浓度 CO₂ 诱导, 水车前和黑藻光合碳同化途径可能由 C₃ 转变成为 C₄。

关键词: 低浓度 CO₂; 水车前; 黑藻; 光合特性; 光合酶; 光合速率; 氧抑制; 叶绿素荧光

中图分类号: Q945.11

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)02-0226-08

Effects of Low CO₂ on Photosynthetic Characteristics of *Ottelia alismoides* and *Hydrilla verticillata*

LI Zhao-Bo^{1,2,3}, LI Wei^{1,3}, GU Shu-Ping^{1,3}, CAO Yu^{1,2,3}, YIN Li-Yan^{1,3*}

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Hubei Key Laboratory of Wetland Evolution & Ecological Restoration, Wuhan 430074, China)

Abstract: Photosynthetic characteristics of *Ottelia alismoides* and *Hydrilla verticillata* were studied after the two species were incubated under low CO₂ conditions. The PEPC/Rubisco ratio of *O. alismoides* increased from 0.45 to 4.17 and of *H. verticillata* increased from 0.47 to 4.17 after low CO₂ induction. The activity of PEPC and NAD-ME increased more than 10-fold and other C₄ enzymes such as NAD-MDH and PPDK also increased significantly after low CO₂ induction. Other photosynthetic characteristics also changed significantly. The net photosynthetic rate of *O. alismoides* and *H. verticillata* increased by 50.8% and 74.1%, respectively, and the oxygen inhibition on photosynthetic rate of the two species decreased to 35% and 60%, respectively, after low CO₂ induction. The chlorophyll fluorescence parameters also changed after low CO₂ induction. All these facts indicated that photosynthetic carbon assimilation of *O. alismoides* and *H. verticillata* might shift from C₃ to C₄ after low CO₂ induction.

Key words: Low CO₂; *Ottelia alismoides*; *Hydrilla verticillata*; Photosynthetic characteristics; Photosynthetic enzymes; Photosynthesis rate; O₂ inhibition; Chlorophyll fluorescence

根据光合碳同化途径的不同, 可以将植物分为 C₃ 植物、C₄ 植物和 CAM 植物。一般来说, C₄ 植物具有比 C₃ 植物更强的光合作用, 其原因有二: (1) 结构方面, C₄ 植物具有独特的 Kranz“花环”结构。

这种 Kranz 结构不仅使维管束鞘细胞中 CO₂ 的浓度大大提升, 促进光合作用的进行, 还将 O₂ 阻挡于维管束鞘细胞之外, 抑制光呼吸; (2) 生理生化方面, C₃ 途径 CO₂ 的固定是通过 Rubisco (Ribulose-

收稿日期: 2010-05-04, 修回日期: 2010-08-16。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30700083) (Supported by the National Natural Science Foundation of China, 30700083)。

作者简介: 李兆波 (1984 -), 男, 硕士研究生, 主要从事水生植物生理生态学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: lyin@wbcas.cn)。

1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶)来实现的,C₄途径的CO₂固定最初由PEPC(Phosphoenolpyruvate Carboxylase,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶)催化完成。PEPC对CO₂的亲合力是Rubisco的几十倍。另外,Rubisco是一个双功能酶,叶肉细胞中的O₂会竞争性地抑制Rubisco的羧化酶活性,从而降低光合速率。而PEPC的活性则不受O₂的影响。因此,在相同O₂浓度条件下,C₄植物的光合速率比C₃植物要高。

Bowes 研究发现水鳖科(Hydrocharitaceae)沉水植物黑藻(*Hydrilla verticillata*)没有Kranz结构却能在低浓度CO₂诱导下进行C₄光合作用,其C₄循环和卡尔文循环在同一细胞中进行^[1]。由此可见,Kranz结构并非C₄光合途径的必需组件,即使没有这种结构,在单一类型的叶肉细胞中也可实现有效的C₄途径。这种新的C₄光合类型的发现,为我们更深入地了解C₄光合途径提供了新的视角,同时也为改造C₃植物,使其具备C₄光合特征提供了新的途径。

目前已发现的真正的沉水型C₄植物只有水鳖科的黑藻^[1]、水蕴草(*Egeria densa*)^[2]和伊乐藻(*Elodea canadensis*)^[3]。已见报道的C₄水生植物为什么如此之少?一些研究者认为可能是一些C₄水生植物还未被发现,而且目前大量关于光合作用的研究工作也都以陆生植物为主。水生植物由于其水生生境的特殊性,往往具有一些陆生植物不具备的独特的光合特征,但关于水生植物光合生理生化特征的系统研究非常之少。另外,沉水型C₄植物的C₄光合途径往往是在逆境条件下被诱导的,因此不容易被发现。我们通过对长江中下游的28种沉水植物的光合作用关键酶PEPC和Rubisco的研究,初步认为水鳖科植物水车前(*Ottelia alismoides*)光合碳同化途径有可能从C₃向C₄途径转变。

本实验在前期研究基础上,以两种水鳖科沉水植物水车前和黑藻为研究材料,通过低浓度CO₂诱导下两种植物光合作用关键酶活性、光合速率、氧抑制对光合速率的影响,以及叶绿素荧光等光合生理生态特征的变化来研究低浓度CO₂对水车前和黑藻光合特性的影响,初步判断水车前能否在低浓度CO₂诱导下从C₃向C₄途径转变,从而为后续研究

奠定基础并提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

本研究所用水车前(*Ottelia alismoides*)种子于2008年9月采自湖北省梁子湖,2009年春萌发长成成熟植株,备用;黑藻(*Hydrilla verticillata*)取自中国科学院武汉植物园水生植物资源圃。培养容器使用30 cm×40 cm×60 cm的透明玻璃缸,基质使用东湖底泥,阳光曝晒以杀死底泥中的水生植物种子,磨碎后平铺在缸底,基质厚度约为20 cm。玻璃缸置于温室的水池中,水池深60 cm。玻璃缸和水池都注满东湖水,且二者不相连通。湖水碱度为2.10~2.36 meq/L。分别将水车前和黑藻移栽至玻璃缸中,每缸3株,两种植物各10缸。驯化培养12 d后,水车前和黑藻各分为处理组和对照组,每种植物每组5个重复:处理组用透明塑料薄膜封口,以阻断水体和空气中CO₂的交换;对照组开放培养,每缸只保留1株,另外2株除去,并定期修剪掉过密的分枝或叶片,以保证CO₂浓度维持在较高水平。30℃/14 h光照周期处理14 d后取样,水车前选取第2片完全展开的新叶,黑藻选取颜色深绿的功能叶。

1.2 CO₂浓度的测定

分别取处理组和对照组水样,测定pH,记录温度,并使用酸碱滴定法确定水样碱度,然后按照Mackereth等人的方法^[4]计算水体中自由CO₂的浓度。

1.3 光合酶的粗提取与活性测定

1.3.1 光合酶的粗提取

采集植物材料,吸干表面水分后迅速称取1.0 g鲜重的叶片保存在液氮中。加入液氮将叶片研成粉末。待粉末解冻后,加入10 mL冷的提取缓冲液继续研磨,获得叶片提取液。叶片提取缓冲液包含100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、10 mmol/L MgCl₂、0.1 mmol/L EDTA、5.0 mmol/L DTT、10 mmol/L 异抗坏血酸、质量分数为2% PVP-40、质量分数为0.10%的Triton-X、体积分数为54.9%的蒸馏水。叶片提取液须当天提当天用。将提取液以12000 r/min的转速离心2 min。移取上清液保存在冰上,迅速检测分析。以上所有操作均需在4℃下进行。

1.3.2 光合酶活性测定

PEPC 活性的测定。PEPC 活性的测定是在 Ashton 等的方法^[5]基础上改进而来。该方法通过使用苹果酸脱氢酶 (MDH) 氧化 NADH 来测定 PEPC 的活性。反应液中含有 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)、10 mmol/L MgCl₂、0.1 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT、20 mmol/L NaHCO₃、3 U MDH、0.2 mmol/L NADH, 以及适量稀释的酶液, 以加入 5 mmol/L PEP 为反应开始, 30℃ 下测定 340 nm 的酶动力学。空白对照是用 0.1 mL 的蒸馏水代替 PEP。

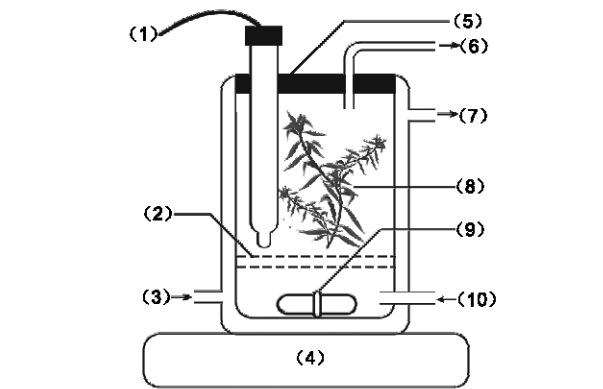
Rubisco 活性的测定。Rubisco 总活性的检测基于 Lilley 和 Walker^[6], 以及 Sharkey 等^[7]的方法。该方法通过 PGA 激酶和磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP-DH) 对 NADH 的氧化来检测 Rubisco 的活性。反应液中含有 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)、10 mmol/L MgCl₂、0.1 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT、20 mmol/L NaHCO₃、2.5 mmol/L ATP、5 mmol/L 肌氨酸磷酸激酶、过量的磷酸肌酸激酶、磷酸甘油酸激酶和磷酸甘油醛脱氢酶, 以及适量稀释的酶液, 以加入 0.5 mmol/L RuBP 为反应开始, 30℃ 下测定 340 nm 的酶动力学。空白对照是用 0.1 mL 的蒸馏水代替 RuBP。

NAD-MDH (NAD-malate dehydrogenase, NAD-苹果酸脱氢酶) 活性的测定按照 Ashton 等的方法^[5]。NAD-ME (NAD-malic enzyme, NAD-苹果酸酶) 活性的测定按照 Hatch 的方法^[8]。PPDK (Pyruvate orthophosphate dikinase, 丙酮酸磷酸双激酶) 活性的测定按照 Edwards 的方法^[9]。

1.4 净光合速率的测定

本实验中沉水植物净光合速率的测定采用 pH-stat 法^[10]。测定装置如图 1 所示。利用碳酸 (富含 CO₂ 的溶液) 作滴定剂补偿培养液 pH 的升高, 使其 pH 始终保持在 8.0 左右。其中, 滴定剂自由 CO₂ 浓度通过 Gran 滴定法计算^[10-13], Gran 滴定在 stat 718 自动电位滴定仪上进行。在 30℃、光量子通量密度为 540 μmol · m⁻² · s⁻¹ 下利用 stat 718 自动电位滴定仪测定滴定剂 pH 值和滴定剂加入速率, 结合上面求得的滴定剂自由 CO₂ 浓度, 即可求出沉水植物光合 CO₂ 净消耗速率, 即净光合速率。

净光合速率测定实验中, 培养液配方和化学成分^[14]见表 1。



(1) pH 电极 (与 stat 718 相连); (2) 有孔隔板; (3) 恒温水入口; (4) 磁力搅拌器; (5) 橡皮塞; (6) 溢液口; (7) 恒温水出口; (8) 植物材料; (9) 搅拌子; (10) 滴定剂加液孔 (与 stat 718 相连)。
(1) pH electrode (connected to the stat 718); (2) Perforated disc; (3) Inflow port; (4) Magnetic stirring apparatus; (5) Rubber plug; (6) Discharging port; (7) Outflow port; (8) Plant material; (9) Magnetic stirrer; (10) Titrating solution loading port (connected to the stat 718).

图 1 pH-stat 实验反应容器及配件
Fig. 1 Chamber with various components for the pH-stat experiment

表 1 一般用途培养液化学成分及配方
Table 1 Chemical composition and formulation of a general purpose culture solution

化学成分 Chemical composition		配方 Formulation	
参量 Parameter	浓度 Concentration	试剂 Reagent	含量(mg/L) Quantity
Ca	25.0 (mg/L)	CaCl ₂ · 2H ₂ O	91.7
Mg	6.8 (mg/L)	MgSO ₄ · 7H ₂ O	69.0
Na	16.0 (mg/L)	NaHCO ₃	58.4
K	6.0 (mg/L)	KHCO ₃	15.4
DIC	10.2 (mg/L)		
SO ₄	26.9 (mg/L)		
Cl	44.2 (mg/L)		
碱度 Alkalinity	0.85 (meq/L)		
离子强度 Ionic strength	3.9 (mmol/L)		
导电率 Conductivity	280 (μs/cm, 25℃)		
pH	7.9		

1.5 氧气对光合速率的抑制

氧抑制实验是通过氧电极 (YSI 5000) 系统实现的。利用 NaHCO₃ 配制不同浓度梯度 (从极低到饱和) 的无机碳培养液, Tris 缓冲液调节 pH 维持在 8.0, 将植物材料完全浸入培养液, 分别通以氧气含量为 2% 和 21% 的 O₂、N₂ 混合气体^[15], 10 min 后

测定光合速率。无机碳浓度过高时,光合作用强,光合速率高,氧抑制不明显,而无机碳浓度过低时,光合作用弱,光合速率小,不宜测定。为了确定最适的无机碳浓度,实验中依次按照梯度配成 0.25、0.5、0.75、1、2 mmol/L 的 NaHCO₃ 的 Tris-HCl 溶液。本实验中要求为可测速率时的最小浓度,经过预实验测定最适浓度为 0.25 mmol/L。净光合速率的测定使用溶氧仪在 30℃、光量子通量密度为 540 μmol · m⁻² · s⁻¹ 下测定其培养液中的溶氧变化,即可表示净光合速率。呼吸速率可用 30℃、黑暗条件下培养液中的溶氧变化表示。净光合速率与呼吸速率绝对值之和,即为光合速率。氧抑制程度用 2% O₂ 与 21% O₂ 下光合速率之差占 2% O₂ 下光合速率的百分比表示^[15]。

1.6 叶绿素含量测定

叶绿素含量按照 William P. Inskeep 的方法^[16]进行。

1.7 叶绿素荧光参数测定

采用已经改造可用于沉水植物叶绿素荧光测定的 PAM 2100 便携式叶绿素荧光仪(Portable Chlorophyll Fluorometer, 德国 Heinz Walz GmbH 公司生产)进行叶绿素荧光动力学参数测定,测定前用沉水植物专用叶片夹夹住叶片,暗适应 30 min,测定 F₀(初始荧光)和 F_m(最大荧光),随后利用 PAM 2100 测定暗适应后的光系统 II 最大量子产量 F_v/F_m=(F_m-F₀)/F_m;光适应下的光系统 II 实际量子产量 Yield;非光化学淬灭系数 qN 通过公式 qN=1-(F_m'-F₀)/(F_m-F₀)求得。测量过程由仪器内

置的数据采集软件 DA-2100 控制。

1.8 数据处理工具和方法

使用 Microsoft Excel 2007 进行实验数据的录入和计算、表格和图表的绘制,使用 SPSS Statistics 17.0 独立样本 t 检验(Independent-Samples t-test)对处理组 and 对照组进行差异显著性分析。

2 结果

经测定,本研究中处理组 CO₂ 浓度极低,仅为 (7.24 ± 0.13) × 10⁻⁵ μmol/L 左右,对照组 CO₂ 浓度约为 0.017 ± 0.004 μmol/L。

由表 2 可以看出,水车前和黑藻经低浓度 CO₂ 诱导后,光合酶活性表现出相似的变化,水车前的 PEPC/Rubisco 酶活性比值由 0.45 上升至 4.17,黑藻的该比值由 0.47 上升至 4.17。Rubisco 的活性在诱导前后基本保持不变,其他 4 种光合关键酶在低浓度 CO₂ 处理后活性显著升高。其中,C₄ 途径光合酶 PEPC 和 NAD-ME 的活性都升高了 10 倍左右,同时也检测到 NAD-MDH 和 PPDK 的高效表达。对照组中,无论是水车前还是黑藻,均未检测出 NAD-MDH 和 PPDK 的活性。

处理组水车前和黑藻的净光合速率与对照组均存在显著性差异(p < 0.01)。由图 2 可以看出,诱导后水车前和黑藻净光合速率比对照组明显提高。同时,O₂ 对水车前和黑藻处理组光合速率的抑制(分别为 17.6% 和 28.3%)大大低于对照组(分别为 50.3% 和 47.1%)(见表 3)。

由图 3 可知,叶绿素荧光基本参数中,水车前处

表 2 低浓度 CO₂ 对水车前和黑藻光合酶活性的影响
Table 2 The effect of low CO₂ on the activity of photosynthetic enzymes of *O. alismoides* and *H. verticillata* leaves

		酶活性 Activity of photosynthetic enzymes					
样本 Samples		PEPC (μmol CO ₂ · h ⁻¹ · mg ⁻¹ chl)	Rubisco (μmol CO ₂ · h ⁻¹ · mg ⁻¹ chl)	PEPC/ Rubisco	NAD-MDH (μmol CO ₂ · h ⁻¹ · mg ⁻¹ chl)	NAD-ME (μmol CO ₂ · h ⁻¹ · mg ⁻¹ chl)	PPDK (μmol CO ₂ · h ⁻¹ · mg ⁻¹ chl)
水车前 <i>O. alismoides</i>	处理 Treated	188.29 ± 2.96 ^{a*}	45.44 ± 0.69 [*]	4.17	2168.69 ± 123.45 [*]	75.00 ± 2.70 [*]	21.27 ± 0.87 [*]
	对照 CK	19.88 ± 0.46	42.39 ± 1.29	0.45	0	6.33 ± 0.59	0
黑藻 <i>H. verticillata</i>	处理 Treated	286.64 ± 3.09 [*]	68.64 ± 0.53 [*]	4.17	2272.90 ± 49.58 [*]	93.09 ± 4.30 [*]	41.55 ± 1.72 [*]
	对照 CK	30.32 ± 0.61	67.43 ± 1.52	0.47	0	9.03 ± 0.39	0

注: a - 均值(5 个重复) ± SE; * - 与对照存在显著性差异。
Notes: a - Mean of five replicates ± SE; * - There is a significant difference between the treatment and control.

理组的 F_v 值显著低于对照组,黑藻处理组和对照组的 F_v 值无显著差异,黑藻和水车前的处理组的 F_v/F_m

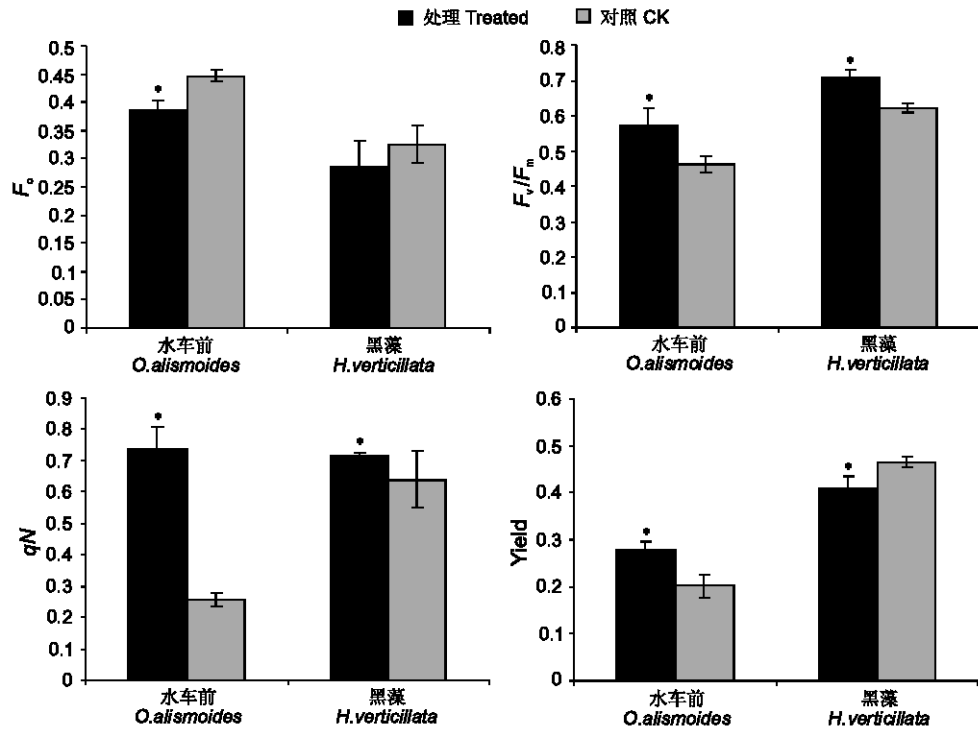
表 3 氧抑制对不同处理的水车前与黑藻的光合速率的影响
Table 3 The effect of O_2 inhibition on the photosynthesis rate in *O. alismoides* and *H. verticillata* leaves with different treatments

样本 Samples	光合速率 Photosynthesis rate ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl}$)		O_2 抑制 (%) O_2 inhibition
	21% O_2	2% O_2	
水车前(处理) <i>O. alismoides</i> (Treated)	10.8 $\pm$ 1.1 ^{a*}	13.1 $\pm$ 1.5 [*]	17.6
水车前(对照) <i>O. alismoides</i> (CK)	8.5 $\pm$ 1.7	17.1 $\pm$ 3.3	50.3
黑藻(处理) <i>H. verticillata</i> (Treated)	12.9 $\pm$ 1.1 [*]	18.0 $\pm$ 1.9 [*]	28.3
黑藻(对照) <i>H. verticillata</i> (CK)	5.5 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.7	47.1

* :与对照存在显著性差异。
* : There is a significant difference between the treatment and control.

注: a - 均值(5个重复) $\pm$ SE; * - 与对照存在显著性差异。
Notes: a - Mean of five replicates $\pm$ SE; * - There is a significant difference between the treatment and control.

图 2 低浓度 CO_2 对水车前和黑藻净光合速率的影响
Fig.2 The effect of low CO_2 on photosynthesis rate of *O. alismoides* and *H. verticillata*



* : 与对照存在显著性差异。
* : There is a significant difference between the treatment and control.

图 3 处理组与对照组之间水车前和黑藻叶绿素荧光参数 F_v 、 F_v/F_m 、Yield、 qN 的变化
Fig.3 Changes of chlorophyll fluorescence parameters of *O. alismoides* and *H. verticillata* between treated and CK groups

和 qN 值均显著高于对照组,水车前的 Yield 值处理组显著高于对照组,黑藻则相反。

3 讨论

水体中无机碳源以 3 种形态存在,即自由 CO₂ (溶解于水中的分子 CO₂ 和 H₂CO₃) 与离子态的重碳酸盐(HCO₃⁻)以及碳酸盐(CO₃²⁻)。无机碳源 3 种分布形态之间的平衡由 pH 决定,不同 pH 值时总无机碳的不同组成如图 4 所示^[17]。可以看到,当 pH > 8 时,水体中自由 CO₂ 的浓度降至极低,接近 0。

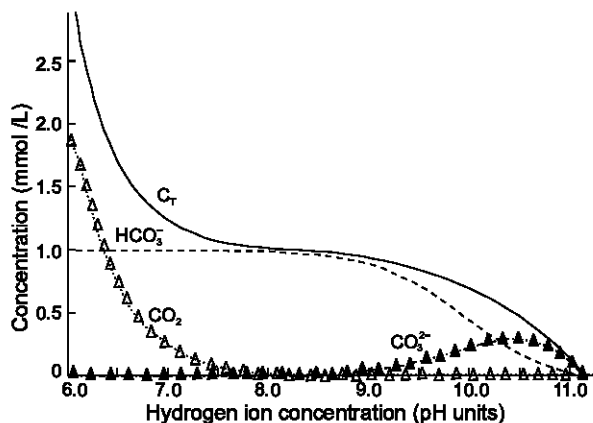


图 4 不同 pH 下无机碳存在的形态
(1 meq/L KHCO₃ 溶液, 20℃)

Fig. 4 The concentrations of different DIC species as a function of pH

夏季自然湖泊中,如果黑藻生长旺盛,在局部环境中形成一个植被密度很高的黑藻丛(mat),加上夏季高温(>35℃)、高光强等外界条件,光合作用强,CO₂ 消耗速率快,黑藻所处微环境中的自由 CO₂ 浓度迅速降低,形成低浓度 CO₂ 条件。在这样的条件下,黑藻的光合碳同化途径就会由原来的 C₃ 转变为 C₄^[18-20]。

本研究通过在温室中控制温度、光强、光周期、植被密度等条件,并阻断系统与空气的气体交换,成功构建了能够诱导黑藻和水车前光合碳同化途径由 C₃ 向 C₄ 转化的低浓度 CO₂ 环境,为后续实验的顺利进行提供了保障。其中,处理组密闭系统中湖水的 pH 值达到 10 以上,在此 pH 条件下,自由 CO₂ 浓度极低,仅为 7.24×10^{-5} μmol/L;对照组开放系统的自由 CO₂ 浓度约为 0.017 μmol/L,是对照组的上百倍。

黑藻和水蕴草(*Egeria densa*)是已证明的兼

性 C₄ 植物,经低浓度 CO₂ 诱导后,其光合碳同化途径能从 C₃ 转变成 C₄^[19,21]。诱导后的黑藻 PEPC 活性升高 10 到 15 倍,而 Rubisco 基本不变,PEPC/Rubisco 的比值从原来的 0.4 升到 5.0^[22],其他 C₄ 途径光合酶,如 NAD-ME、NAD-MDH、PP-DK 等的活性也都大幅升高^[23]。水蕴草诱导出 C₄ 后,CO₂ 补偿点降低,PEPC 活性升高 30%^[1]。另外,经低浓度 CO₂ 诱导后两种植物的净光合速率也会明显升高^[1,19]。

本实验中,低浓度 CO₂ 诱导后,黑藻 C₄ 光合酶活性比未诱导的高出数倍甚至几十倍,该结果支持了 Holaday 等的发现,也证明了本研究中低浓度 CO₂ 诱导系统构建成功。经该诱导系统处理的水车前,C₄ 光合酶的活性表现出与黑藻相一致的变化,表明与黑藻一样,水车前的光合碳同化途径也可能发生了由 C₃ 向 C₄ 的转变,水车前有可能是可诱导的单细胞 C₄ 植物家族中的一员。

由于 C₄ 途径具有比 C₃ 途径更高效的光合酶,而且前者的碳浓缩机制(carbon concentration mechanism, CCM)使得 C₄ 植物光合作用增强,光呼吸受到抑制,所以 C₄ 植物的光合速率明显高于 C₃ 植物^[23]。本实验中,低浓度 CO₂ 诱导后,水车前和黑藻净光合速率比对照分别提高了 50.8% 与 74.1%,符合 C₄ 植物的光合特征。

氧气对光合速率的抑制程度反映了植物光呼吸的强弱。对 C₃ 植物而言,氧气浓度越高,光呼吸就越强,光合作用就越弱,在氧抑制实验中表现为植物材料的光合速率受氧抑制程度越大。由于生理、生化方面的原因,氧气对 C₄ 植物光合速率的抑制程度较 C₃ 植物要小。在高浓度 O₂ 条件下,C₃ 光合途径中固定 CO₂ 的关键酶 Rubisco 更倾向于催化光呼吸作用,使光合作用受到抑制,而 C₄ 植物中除了 Rubisco,还能依靠 PEPC 固定 CO₂,而且 PEPC 对 O₂ 浓度不敏感^[25],因此,C₄ 植物光合速率受 O₂ 抑制的程度远远低于 C₃ 植物。本实验中,低浓度 CO₂ 诱导培养后,高浓度 O₂ (21% O₂ 当量)对黑藻和水车前光合速率的抑制减弱,分别为仅对照组的 60.0% 与 35.0%,说明本实验在一定程度上可能诱导出 C₄ 途径,但是氧气对黑藻和水车前净光合速率 28.3% 和 17.6% 的抑制程度,相比 *Flaveria brownii* 的 4%^[26] 仍然偏高,这可能是氧抑制实验

中反应液的无机碳浓度过低所致。一方面,在 CO_2 与 O_2 竞争 Rubisco 酶的结合位点时,过低的无机碳浓度降低了 CO_2 的竞争能力,导致更多的 Rubisco 酶被 O_2 占据,光合作用受到抑制,光呼吸增强;另一方面,由于 CO_2 浓度过低,植物材料的光合作用缺乏足够的原料,始终处于光合饥饿状态。

F_0 为初始荧光,是光系统 II (PS II) 反应中心处于完全开放时的荧光产量。水车前和黑藻对照组 F_0 均高于处理组,说明对照组光合机构遭到破坏,或者处理组非光化学能量耗散高于对照组^[27]。结合图 3 中的 qN 数据,后者的可能性更大一些。这可能是因为低浓度 CO_2 实际上已经构成了对处理组植物材料的胁迫,造成 PS II 天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递而以热的形式耗散掉,从而减轻甚至避免 PS II 天线色素吸收的过量光能对光合机构的破坏,这是一种自我保护机制。 F_v/F_m 是 PS II 最大光化学量子产量,代表 PS II 原初光能转化效率^[27];Yield 是 PS II 有效量子产额,它反映 PS II 反应中心在有部分关闭情况下的原初光能捕获效率^[28]。本研究中,处理组水车前的 F_v/F_m 和 Yield 的值均高于对照组,说明处理组水车前的 PS II 原初光能转化效率升高,这可能是水生植物对低浓度 CO_2 环境的一种补偿性反应,通过提高 PS II 的光能转化效率,来减轻低浓度 CO_2 胁迫对植物体光合作用的不利影响。

本实验从生理生态学的角度研究了低浓度 CO_2 对水车前和黑藻光合特性的影响,揭示其光合碳同化途径可能由 C_3 向 C_4 发生转化,如果能引入放射性同位素^[20]和分子生物学方法对这一转化进行更深入的研究,揭示其发生的基因及蛋白质表达和调控机理,相信能获得更进一步的认识和了解,为我们改造作物,提高 C_3 植物的光合效率和产量提供理论依据和知识基础。

参考文献:

- [1] Salvucci M E, Bowes G. Induction of reduced photorespiratory activity in submersed and amphibious aquatic macrophytes [J]. *Plant Physiol*, 1981, 67: 335–340.
- [2] Casati P, Lara M V, Andreo C S. Induction of a C_4 -like mechanism of CO_2 fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic [J]. *Plant Physiology*, 2000, 123: 1611–1621.
- [3] Degroote D, Kennedy R. Photosynthesis in *Elodea canadensis* Michx: four-carbon acid synthesis [J]. *Plant Physiology*, 1977, 59(6): 1133–1135.
- [4] Mackereth F J H, Heron J, Talling J F. Water Analysis: Some Revised Methods for Limnologists [M]. Cumbria: Scientific Publication, 1978.
- [5] Ashton A, Burnell J, Furbank R, Jenkins C, Hatch M. Enzymes of C_4 photosynthesis [J]. *Methods Plant Biochem*, 1990, 3: 39–72.
- [6] Lilley R, Walker D. An improved spectrophotometric assay for ribulosebisphosphate carboxylase [J]. *BBA-Enzymol*, 1974, 358(1): 226–229.
- [7] Sharkey T, Savitch L, Butz N. Photometric method for routine determination of kcat and carbamylation of rubisco [J]. *Photosynth Res*, 1991, 28(1): 41–48.
- [8] Hatch M, Mau S. Association of NADP- and NAD-linked malic enzyme activities in *Zea mays*: relation to C_4 pathway photosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1977, 179(2): 361–369.
- [9] Edwards G, Ujihira M, Sugiyama T. Light and temperature dependence of the rate and degree of activation of pyruvate, Pi dikinase *in vivo* in maize [J]. *Photosynth Res*, 1980, 1(3): 199–207.
- [10] Talling J F. The application of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in fresh waters [J]. *Freshwater Biology*, 1973, 3(4): 335–362.
- [11] Patrick D, Orr P T, Erskine C, Siro D J C. Potentiometric measurements of carbon dioxide flux of submerged aquatic macrophytes in pH-statted natural waters [J]. *Freshwater Biology*, 1983, 13(6): 507–519.
- [12] Gran G. Determination of the equivalent point in potentiometric titrations [J]. *Acta Chem Scand*, 1950, 4: 559–577.
- [13] 李伟, 尹黎燕. 沉水植物光合作用测定的电化学方法 [J]. 武汉植物学研究, 2008, 26(1): 99–103.
- [14] Michael Smart R, Barko J. Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments [J]. *Aquatic Botany*, 1985, 21(3): 251–263.
- [15] Magnin N C, Cooley B A, Reiskind J B, Bowes G. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115:

- 1681–1689.
- [16] Inskeep W P, Bloom P R. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone[J]. *Plant Physiology*, 1985, 77(2): 483–485.
- [17] Maberly S, Spence D. Photosynthetic inorganic carbon use by freshwater plants[J]. *J Ecol*, 1983, 71(3): 705–724.
- [18] Bowes G, Holaday A S, Haller W T. Seasonal variation in the biomass, tuber density, and photosynthetic metabolism of *Hydrilla* in three Florida lakes [J]. *J Aquat Plant Manage*, 1979, 17: 61–65.
- [19] Spencer W E, Teeri J, Wetzel R G. Acclimation of photosynthetic phenotype to environmental heterogeneity[J]. *Ecology*, 1994, 75(2): 301–314.
- [20] Van T K, Haller W T, Bowes G. Comparison of the photosynthetic characteristics of three submersed aquatic plants [J]. *Plant Physiol*, 1976, 58: 761–768.
- [21] Holaday A, Salvucci M, Bowes G. Variable photosynthesis/photorespiration ratios in *Hydrilla* and other submersed aquatic macrophyte species[J]. *Can J Bot*, 1983, 61(1): 229–236.
- [22] Ascencio J, Bowes G. Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Hydrilla* plants with varying CO₂ compensation points[J]. *Photosynth Res*, 1983, 4(2): 151–170.
- [23] Holaday A S, Bowes G. C₄ acid metabolism and dark CO₂ fixation in a submersed aquatic macrophyte (*Hydrilla verticillata*) [J]. *Plant Physiology*, 1980, 65: 331–335.
- [24] 李卫华, 郝乃斌, 戈巧英, 张其德. C₃ 植物中 C₄ 途径的研究进展[J]. *植物学通报*, 1999(2): 2–11.
- [25] Bowes G, Ogren W L. Oxygen inhibition and other properties of soybean ribulose 1, 5-diphosphate carboxylase [J]. *J Biol Chem*, 1972, 247(7): 2171–2176.
- [26] Cheng S H, Moore B D, Edwards G E, Ku M S B. Photosynthesis in *Flaveria brownii*, a C₄-like species[J]. *Plant Physiol*, 1988, 87: 867–873.
- [27] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. *植物学通报*, 1999, 16(4): 444–448.
- [28] 李晓, 冯伟, 曾晓春. 叶绿素荧光分析技术及应用进展[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(10): 2186–2196.

(责任编辑: 张 平)