

氮肥水平对杂交稻汕优 63 剑叶光合速率和 RuBP 羧化酶活性的影响*

王仁雷¹ 李霞² 陈国祥² 华春¹ 魏锦城²

(¹淮阴师范学院生物学系, 江苏淮安 223001; ²南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097)

提 要 用低氮(LN)、中氮(MN)、高氮(HN)盆栽土培的杂交水稻汕优 63 为材料, 测定其剑叶的光合速率、RuBP 羧化酶含量及活性、可溶性蛋白和叶绿素含量的变化。结果表明: 随着氮水平的提高, 叶面积增大, 气孔密度减少, RuBP 羧化酶活性和光合速率增加。随着叶龄的增加, 三个不同氮水平的叶片中 RuBP 羧化酶蛋白下降均先于可溶性蛋白的下降; HN 组的光合速率下降幅度小于 LN 组和 MN 组; HN 组的 RuBP 羧化酶较高活性的持续期长于 LN 组和 MN 组。氮素对杂交水稻的光合速率和光合功能期具有调节作用。

关键词 氮肥; 杂交水稻; 剑叶; 光合速率; RuBP 羧化酶

Effect of N-fertilizer levels on Photosynthetic Rate and RuBP Carboxylase Activity in Flag Leaves of Hybrid Rice Shanyou 63

WANG Ren-Lei¹ LI Xia² CHEN Guo-Xiang² HUA Chun¹ WEI Jin-Cheng²

(¹ Department of Biology, Huaiyin Teachers College, Huaiyan 223001; ² College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract Pot culture of low nitrogen (LN, control), medium nitrogen (MN) and high nitrogen (HN) was conducted and the photosynthetic rate, RuBP carboxylase content and activity, soluble protein content and chlorophyll content in flag leaves of hybrid rice Shanyou 63 were investigated. The results showed that leaf area, RuBP carboxylase activity and photosynthetic rate raised as increasing nitrogen levels, but stomatal density decreased. With the leaves ageing, the decline of RuBP carboxylase protein was more early than that of soluble protein in all flag leaves. The depression of photosynthetic rate in HN was less than that in MN and LN. The sustained duration of the relative high activity of RuBP carboxylase in HN was longer than that in MN and LN. Nitrogen fertilizer might play an important role in regulating photosynthetic rate and photosynthetic functional duration of flag leaves in hybrid rice.

Key words N-fertilizer, Hybrid rice, Flag leaves, Photosynthetic rate, RuBP carboxylase

水稻产量的物质基础由出穗前储存在茎、叶中碳水化合物的输出和出穗后叶片光合产物供给两部分组成。据报道杂交稻汕优系列经济产量的 65% 为出穗后光合产物所贡献^[1]。通过

* 基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK93098304); 江苏省教委自然科学基金资助项目(98KJB18004)

作者简介: 王仁雷(1963-), 男, 江苏丹阳市, 副教授, 硕士(在读博士), 一直从事作物光合作用的研究

收稿日期: 2000-10-16, 接受日期: 2001-04-05

Received on: 2000-10-16, Accepted on: 2001-04-05

氮素调节, 维持水稻等作物的高光合能力和光合酶活性, 是作物生理研究中普遍关注的问题^[2-6], 对出穗前后叶片含氮量较一般水稻低, 而根系又易早衰的杂交稻来说, 显得尤为重要^[7]。

水稻剑叶生命周期长, 受光势态好, 对物质生产贡献最大。深入解析不同氮水平对剑叶一生中可溶性蛋白、RuBP 羧化酶蛋白和叶绿蛋白的影响, 及其与光合速率、光合功能期的关系, 在理论上和实践上具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 为籼型三系杂交稻汕优 63。盆栽土培, 将肥沃的水稻土晒干、破碎、混匀后装盆。每盆盛土 15 kg, 以复合肥为基肥, 净氮量为 1.5 g。5 月下旬幼苗 3 叶 1 心期移植, 每盆植 3 穴, 每穴 2 株。按杂交稻常规方法管理。8 月初剑叶抽出前 10d 左右追施尿素, 低氮组 (LN, 对照) 不施, 中氮组 (MN) 每盆施净氮量 1 g, 高氮组 (HN) 施净氮量 2 g。每组 10 盆, 相间排列。

测定选取主茎或早期分蘖上的剑叶。剑叶抽出期, 逐日进行标记和记载。从叶龄 5d 起, 每周测定 1 次, 直至叶片衰老。每处理组取叶龄相同的叶片 3~4 张, 均设 3 个重复。测定光合速率后, 去叶片两端, 测定中部叶面积并称重, 然后剪成 1 cm 长的小块, 混合, 分别称取样品测定可溶性蛋白、RuBP 羧化酶和叶绿素。

1.2 方法

1.2.1 光合速率测定 应用 Agata 等^[8]设计的装置, 用红外线 CO₂ 分析仪 (岛津 URA-102) 测定叶片净光合速率, 在上午 8~10 时进行。测定条件: PFD 为 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, VDP 为 1500 \pm 30 Pa, CO₂ 浓度为 350 \pm 10 $\mu\text{L L}^{-1}$, 叶温为 30 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 RuBP 羧化酶粗酶液的制备与活性测定 粗酶液按前文^[9]制备。酶羧化总活性参照 Perchorowicz 等^[10]和李立人等^[11]¹⁴C 同位素方法测定。反应液组成为 100 mmol L⁻¹的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.3), 内含 25 mmol L⁻¹ MgCl₂, 5 mmol L⁻¹ KCl, 1 mmol L⁻¹ DTT, 10 mmol L⁻¹ NaH¹⁴CO₃ (7.4 \times 10⁹ Bq) 和 0.5 mmol L⁻¹ RuBP。测定温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.3 可溶性蛋白和 RuBP 羧化酶含量测定 可溶性蛋白含量按 Hartree^[12]改进 Lowry 方法测定, 以标准牛血清蛋白作对照。RuBP 羧化酶含量按 Makino 等^[5]的火箭免疫电泳法测定, 标准曲线用纯化酶制作。

1.2.4 叶绿素含量测定 参照 Arnon^[13]的方法。

2 实验结果

2.1 N 对剑叶外部形态的影响

剑叶叶龄 15d 时, 外部形态已定型。测定结果表明 (表 1), MN 组的叶面积和比叶重均高于对照组 (LN), 差异显著 ($P < 0.05$); HN 组的叶面积较 LN 组高 20.4%, 而比叶重略低, 但叶片不披搭。气孔密度随叶片中氮含量提高而下降, 但气孔长轴加长, 就密度 \times 气孔长轴数值而言, 三组无明显差异, 即 HN 组单位叶面积气孔密度的下降, 由气孔长轴加长得到补偿, 对气体扩散通道的影响不大。

表1 N肥水平对剑叶N含量和叶结构的影响 ($\bar{x} \pm SD$, n=6)

Table 1 Effect of N-fertilizer levels on nitrogen content and leaf structure in flag leaves

| 处理 Treatment | 叶片总N含量 Total N content of leaf (%) | 叶面积 Leaf area (dm ²) | 比叶重 Leaf specific weight (g dm ⁻²) | 气孔密度 Stomatal density (number mm ⁻²) | 气孔长轴 Stomatal length (μm) |
|-----------------|--|--|--|--|---------------------------------|
| LN | 3.09 ± 0.06 | 0.66 ± 0.02 | 0.38 ± 0.01 | 1031 ± 45 | 20.56 ± 1.64 |
| MN | 3.56 ± 0.04 | 0.70 ± 0.02 | 0.40 ± 0.05 | 968 ± 50 | 22.18 ± 3.72 |
| HN | 4.01 ± 0.17 | 0.79 ± 0.01 | 0.35 ± 0.02 | 889 ± 21 | 24.27 ± 2.36 |

2.2 N对剑叶光合速率的影响

氮水平对剑叶光合速率的影响是显著的(图1)。LN组光合速率的峰值在叶龄12d时出现,此后直线下降。MN组和HN组叶龄12~19d间维持近似的高水平,平均值较同期的LN组高26.1%。其后MN组光合速率以较大的陡度下降,与HN组拉开距离。叶龄26d后,不同氮处理组的光合速率保持一定的差距,基本以平行的陡度下降,33d时LN组和MN组降至各自峰值的一半,而HN组则推迟到40d,可见提高供氮水平使光合功能期相应延长。就光合速率的绝对值而言,33d时MN组和HN组分别较LN组高42.6%和88.9%,47d时则扩大到高80.6%和3倍。

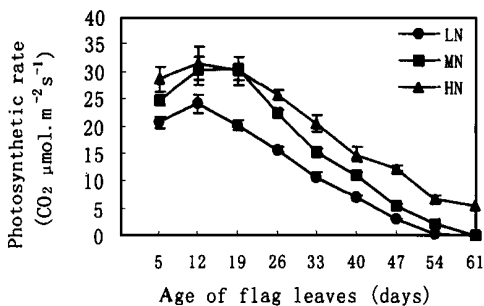


图1 N肥水平对剑叶光合速率的影响

Fig. 1 Effect of N-fertilizer levels on photosynthetic rate in flag leaves

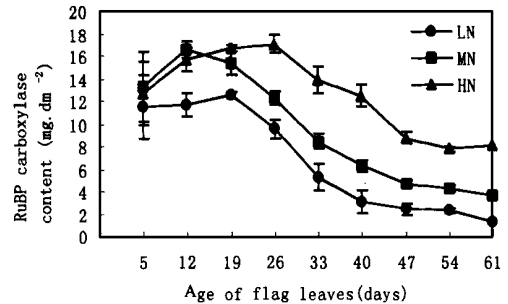


图2 N肥水平对剑叶RuBP羧化酶含量的影响

Fig. 2 Effect of N-fertilizer levels on RuBP carboxylase content in flag leaves

2.3 N对剑叶RuBP羧化酶蛋白、可溶性蛋白和叶绿素含量的影响

RuBP羧化酶蛋白、可溶性蛋白和叶绿素含量随氮水平提高而递增(图2~4)。反映酶蛋白降解先于其它可溶性蛋白的下降的现象,并不因氮水平提高而改变,但比例有所不同。LN组酶蛋白和可溶性蛋白含量,叶龄19d内较高,此后迅速下降,前者下降速度比后者大,33d时与峰值相比,酶蛋白已降解了57.9%,可溶性蛋白总量则下降46.3%。HN组剑叶一生中,酶蛋白和可溶性蛋白含量显著高于LN组,叶龄19~26d间出现峰值,此后下降陡度虽于其它两组平行,因基数高、回降期迟,与峰值相比,叶龄33d时下降幅度仅分别为18.7%和16.8%。MN组剑叶一生中,酶蛋白和可溶性蛋白含量高于LN组,但变化曲线与其类似,叶龄33d时与峰值相比,分别下降49.4%和36.5%。

在剑叶出生初期,不同氮水平组的叶绿素含量差别不大(图4),随着叶龄增长,差距拉开,HN组>MN组>LN组的趋势延续到衰老后期。叶绿素含量为缓降,陡度比酶蛋白和可溶性蛋白小,转折点不明显。

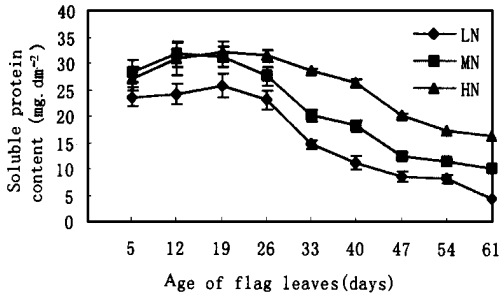


图3 N 肥水平对剑叶可溶性蛋白含量的影响
Fig 3 Effect of N-fertilizer levels on soluble protein content in flag leaves

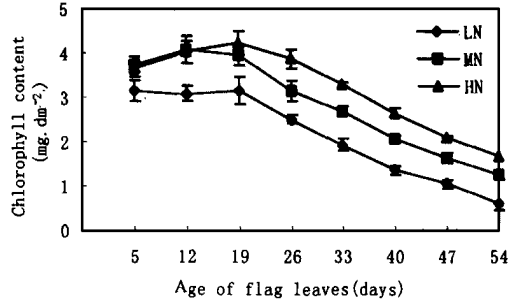


图4 N 肥水平对剑叶叶绿素含量的影响
Fig 4 Effect of N-fertilizer levels on chlorophyll content in flag leaves

2.4 N 对 RuBP 羧化酶活性的影响

不同 N 水平组 RuBP 羧化酶活性变化曲线与酶含量相对应(图 5), 既影响剑叶一生中酶活性的水平, 也影响较高酶活性的持续期。出叶初期, 各组的酶活性差别不大, 此后差距拉开, 叶龄 26d 时, MN 组和 HN 组分别较 LN 组高 45.2% 和 91.8%。酶活性达 30 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ 以上的持续期, LN 组为 19d, MN 组和 HN 组则分别为 33d 和 40d, 显示较高 N 水平有利于维持较高的羧化酶活性, 因而必然直接影响剑叶的光合速率及光合功能期。

2.5 部分光合特征值间的相关性分析

表 2 显示, LN、MN 和 HN 组的 RuBP 羧化酶活性、RuBP 羧化酶含量和光合速率之间均存在相关性, 其相关系数都达到极显著水平。

表 2 部分光合特征值间的相关系数

Table 2 Correlation coefficients between pairs of photosynthetic characteristics

| 特征 Characteristics | 处理 Treatment LN, MN, HN |
|--|----------------------------|
| 光合速率—RuBP 羧化酶活性 Photosynthetic rate vs RuBPCase activity | 0.983** 0.962** 0.892** |
| 光合速率—RuBP 羧化酶含量 Photosynthetic rate vs RuBPCase content | 0.967** 0.980** 0.899** |
| RuBP 羧化酶活性—RuBP 羧化酶含量 RuBPCase activity vs RuBPCase content | 0.980** 0.960** 0.878** |

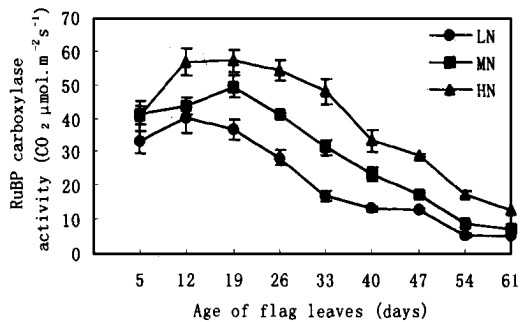


图5 N 肥水平对剑叶 RuBP 羧化酶活性的影响
Fig 5 Effect of N-fertilizer levels on RuBP carboxylase activity in flag leaves

3 讨论

水稻叶片一生中, 光合速率关键酶 RuBP 羧化酶的变化有其内在的规律^[9, 14], 但供氮水平有明显的调节作用。出穗前适度供氮的 MN 组和充分供氮而营养生长无异常的 HN 组, 其剑叶具有明显

较高的光合速率, 且光合功能期延长(图 1), 显然是氮提高了 CO₂ 同化系统中的 RuBP 羧化酶含量和活性以及光能吸收机构中叶绿素含量的结果(图 2, 4, 5)。氮在其它水稻品种或不同叶位的光合特性研究中有类似的结果^[2]。光合功能旺盛期 HN 组的光合速率与 MN 组

无差异(图 1), 显示出酶蛋白含量或活性达到一定的程度后, CO_2 成为光合作用的限制因子^[15]。改善 CO_2 供应理应可提高光合速率, 但在非设施条件下, 提高 CO_2 浓度是不现实的。光合速率进入下降后, 不同氮水平组虽以近似的陡度下降, 但绝对值相差很大。在剑叶生长后期, HN 组对提高籽粒充实度仍有积极作用。看来通过供氮延长出穗后叶片尤其是剑叶光合功能期的生理意义, 可能比提高光合速率更为重要。

剑叶一生中, 充分活化 RuBP 羧化酶活性与酶含量呈对应关系并与光合速率显著相关(表 2)。但实验表明, 与各光合参数的峰值相比, 不同氮处理组叶龄 26d 后光合速率下降的幅度, 明显大于可溶性蛋白、酶蛋白和叶绿素含量下降的幅度(图 1~ 4); 这与水稻乳熟至黄熟期间, 三种氮条件下植株叶片光合速率下降百分率均大于叶片全氮含量下降百分率的报道有类似之处^[2]。植物叶片蛋白质氮和非蛋白质氮含量直接受供氮水平调节, 但氮仅是其中调节因子之一。在叶龄增长过程中, 叶绿体数减少, 片层结构发生变化^[16], 叶内 CO_2 浓度下降^[17], RuBP 羧化酶等光合酶活性下降, 而反映衰老的指标酶酸性磷酸酯酶活性上升^[9], 势必影响其光合速率。杂交稻生育后期适当追施氮肥, 可起延缓叶片衰老进程, 提高光合物质生产的作用。

已知水稻在同一含氮条件下, 新品种开花后叶片的净光合速率高于老品种, 显示品种选育过程中光合性状对氮反应的变化。实验结果与 Makino 等^[18]的结果比较, 初步认为籼型杂交稻汕优 63 光合性状对氮水平的反应比粳型品种 Sasanishiki 敏感。这是杂交稻个体和群体大, 对氮需求量增加的反映, 还是该杂交组合叶片在光合酶和光合速率的新特征, 尚待深入阐明。

参 考 文 献

- 1 宋祥甫, 县和一, 川满方雄 日本作物学会记事, 1990, 59(1): 29~ 33
- 2 徐克章, 黑田荣喜, 平野贡 作物学报, 1995, 21(2): 171~ 175
- 3 黑田荣喜, 玖村敦彦 日本作物学会记事, 1990, 59(2): 298~ 302
- 4 Evans J R. *Plant Physiol*, 1983, 72: 297~ 302
- 5 Makino A, Mae T, Ohira K. *Plant Cell Physiol*, 1984, 25: 429~ 437
- 6 Sasaki H, Ishii R. *Photosynth Res*, 1992, 32: 139~ 146
- 7 宋祥甫, 县和一, 川满方雄 日本作物学会记事, 1990, 59(1): 107~ 112
- 8 魏锦城, Agata W. 植物生理学报, 1994, 20(3): 285~ 292
- 9 Agata W, Kawamitsu Y, Hakoyama S. *Photosynth Res*, 1986, 9: 345~ 357
- 10 王仁雷, 魏锦城 作物学报, 1996, 22(1): 6~ 12
- 11 Perchorowicz JT, Raynes D A, Jencen R G. *Proc Natl Acad Sci*, 1981, 78: 2985~ 2991
- 12 李立人, 王维光, 韩琪 植物生理学报, 1986, 12(1): 33~ 39
- 13 Hartree E F, *Anal Biochem*, 1972, 48: 422~ 424
- 14 Arnon D I. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1~ 5
- 15 Mae T, Makino A, Ohira K. *Plant Cell Physiol*, 1983, 24: 1079~ 1086
- 16 Makino A, Nakano H, Mae T. *Plant Physiol*, 1994, 105: 173~ 179
- 17 Nakano H, Makino A, Mae T. *Plant Physiol*, 1997, 115: 191~ 198
- 18 Medlyn B E. *Aust J Plant Physiol*, 1996, 23: 593~ 603
- 19 Makino A, Nakano H, Mae T. *Plant Physiol*, 1994, 105: 1231~ 1238
- 20 Terashima I, Evans J R. *Plant Cell Physiol*, 1988, 29: 143~ 155
- 21 华春, 王仁雷, 魏锦城 南京师范大学学报, 1998, 21: 71~ 74
- 22 Makino A, Mae T, Ohira K. *Planta*, 1985, 166: 414~ 420
- 23 Makino A, Mae T, Ohira K. *Plant Physiol*, 1983, 73: 1002~ 1007