

# 杂交稻及其三系生育过程中 RuBP 羧化酶 及有关光合酶的变化

王仁雷 魏锦城

(南京师范大学生物系, 江苏南京, 210097)

**提 要** 研究了杂交稻汕优 63 及其三系生育过程中叶片 RuBP 羧化酶/加氧酶及有关光合酶活性的变化, 结果表明, 供试材料 RuBP 羧化酶/加氧酶等参数的变化无本质的差异。杂交稻不同叶位叶片的 RuBP 羧化酶活性低于其母本不育系, 但与父本较接近。从 RuBP 羧化酶/加氧酶这一光合特征值来分析, 杂交稻叶片并不存在光合优势。

随着叶龄增加, 杂交稻及其三系叶片的 RuBP 羧化酶/加氧酶、乙醇酸氧化酶、过氧化氢酶活性下降, 而酸性磷酸酯酶活性上升, 可溶性蛋白质和叶绿素含量下降。各供试材料叶片衰老的进程不同, 杂交稻及其恢复系、保持系衰老较早, 而不育系衰老较迟。不育系叶片不易早衰的性状并未遗传给杂交后代。

**关键词** 杂交稻; 三系; RuBP 羧化酶/加氧酶; 生育阶段

1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco E. C. 4. 1. 1. 39)是C<sub>3</sub>植物光合作用中的关键酶, 控制着CO<sub>2</sub>固定, 与光合速率具有内在的联系, 同时它又制约着碳素向光合还原环(Calvin环)与氧化环(光呼吸环)的分流, 影响乙醇酸代谢的速度<sup>[16, 18, 26]</sup>, 在作物光合生产和光合遗传的研究中普遍受到重视。小麦<sup>[11]</sup>、燕麦<sup>[8]</sup>、大豆<sup>[12]</sup>及番茄<sup>[10]</sup>等作物的研究表明, RuBP 羧化酶/加氧酶活性与光合速率关系密切。Makino等(1983)<sup>[21]</sup>曾报道水稻第12叶 RuBP 羧化酶/加氧酶与有关光合酶的变化动态, Saka(1985)<sup>[26]</sup>认为 RuBP 羧化酶/加氧酶活性与光合、光呼吸速率显著正相关。迄今国内外尚未见杂交稻及其三系生育过程中叶片 RuBP 羧化酶/加氧酶动态的报道。

国内的研究结果一般倾向杂交稻叶片光合速率较高, 而光呼吸速率低<sup>[4, 5, 6]</sup>, 国外的报道则存在分歧, Murayama等(1987)<sup>[22]</sup>指出杂交稻的光合速率明显高于亲本, 而 Hayashi等(1977)<sup>[15]</sup>和 Song等(1990)<sup>[27]</sup>则认为与栽培品种相比, 杂交稻叶片在光合速率方面不存在优势, Kawamitsu等(1989)<sup>[17]</sup>也发现无论是以光呼吸速率计, 或以光呼吸活性计, 杂交稻都不比栽培品种低。杂交稻(三系)的光合优势体现在什么水平上, 其生化机制如何, 都有待探讨。

本文试图以 RuBP 羧化酶/加氧酶为核心, 研究杂交稻及其三系生育过程中有关光合酶的变化规律, 为杂交稻生理生化研究与遗传育种工作提供参考资料。

## 1 材料和方法

供试材料为汕优 63(杂交稻)及其三系明恢 63(恢复系)、珍汕 97A(不育系)和珍汕 97B

\* 江苏省自然科学基金资助项目  
收稿日期: 1994-03-02, 终审完毕日期: 1995-03-12

(保持系)。种子露白后播于石英砂中, 一叶一心期用春日津营养液培养, 三叶一心期移植。盆栽土培, 每盆盛有机质丰富的水稻土 15 kg, 以复合肥 2 g 作基肥。每盆种植 3 穴, 每穴 2 苗。每组均设 5—7 个重复。

定植的水稻移至人工气候箱(Conviron PGV 36, 加拿大产)培养。光照、温度、湿度模拟夏秋间晴朗气象条件输入电脑, 自动控制。每天照光 12 小时。早晨光强为  $200 \mu\text{mol E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ , 温度为  $19^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 90%; 中午光强为  $700 \mu\text{mol E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ , 温度为  $30^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 65%; 傍晚光强为  $200 \mu\text{mol E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ , 温度为  $23^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 78%; 夜间温度为  $19^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 80%, 其它条件按常规管理。

### 1.1 粗酶液的制备

参照 Saka(1985)<sup>[26]</sup>的方法。叶位测定取主茎或上位分蘖完全展开 10 天左右的叶片; 叶龄测定用主茎第 11 叶, 从叶片展开开始直至衰老。样品按 1:5(W/V)加入内含  $1 \text{mmol L}^{-1}$  EDTA 和  $0.5 \text{mmol L}^{-1}$  DTT 的 Hepes 缓冲液(pH7.7), 并加入少量石英砂于研钵中研磨, 随后在 Beckman-8M 上  $20,000 \times g$  离心 15 分钟, 其上清液为粗酶液。上述操作均在  $4^\circ\text{C}$  下进行。

### 1.2 RuBP 羧化酶活性的测定

参考 Perchorowicz 等(1982)<sup>[25]</sup>的方法并加以改进。反应液组成如下:  $500 \mu\text{l}$   $0.1 \text{mol L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(pH8.5, 内含  $12.5 \text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $10 \mu\text{l}$   $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ( $0.1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ),  $10 \mu\text{l}$   $6 \text{mmol L}^{-1}$  RuBP 及适量稀释的粗酶液。加入粗酶液后, 于  $30^\circ\text{C}$  下保温 4 分钟, 随后加入 RuBP 并开始计时, 5 分钟后加入  $500 \mu\text{l}$   $4 \text{mol HCl}$  中止酶反应, 置于室温下静置 20 分钟, 然后用红外灯使反应液干燥, 最后加入  $0.5 \text{ml}$  蒸馏水溶解烘干的样品, 再加  $4.5 \text{ml}$  闪烁液(1L Triton x-100, 2L 甲苯, 12g PP0,  $0.15 \text{g}$  P0P0P), 于 Packed 液体闪烁计数器上测定 $^{14}\text{C}$ 的放射性强度。

### 1.3 RuBP 加氧酶活性的测定

参照 Lorimer 等(1975)<sup>[19]</sup>的方法, 用薄膜氧电极仪测定。在 2ml 的反应杯中加入由空气饱和的反应混合液, 混合液为  $125 \text{mmol L}^{-1}$  Ammediol-HCl 缓冲液(内含  $12.5 \text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1.25 \text{mmol L}^{-1}$  EDTA,  $0.5 \text{mmol L}^{-1}$  DTT, pH9.3), 再加入适量稀释的粗酶液, 插入氧电极使之密封,  $30^\circ\text{C}$  恒温。待指针平衡后, 注入  $10 \text{mmol L}^{-1}$  RuBP  $0.1 \text{ml}$  作为反应开始, 记录单位时间氧的消耗量。

### 1.4 乙醇酸氧化酶活性的测定

参照 Saka(1985)<sup>[26]</sup>的氧电极法测定。反应混合液为  $150 \text{mmol L}^{-1}$  磷酸缓冲液(pH8.0),  $1 \text{mmol L}^{-1}$  的 KCN,  $10 \text{mmol L}^{-1}$  乙醇酸钠盐及适量稀释的酶液,  $30^\circ\text{C}$  下测定, 以反应系统中所消耗的溶氧量计算此酶活性。

### 1.5 酸性磷酸酯酶活性的测定

参照 Saka(1985)<sup>[26]</sup>分光光度法。酶活性以每 mg 蛋白质每小时转化对硝基酚磷酸二钠(PNP)的微克分子表示。

### 1.6 过氧化氢酶活性的测定

参考 Beers 等(1952)紫外分光光度法, 并加以改进。 $25^\circ\text{C}$  恒温条件下, 在试管中加入  $0.067 \text{mol L}^{-1}$  的磷酸缓冲液(pH7.0)  $2.9 \text{ml}$ , 其中含有  $0.067 \text{mol L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 再加入适当稀释的酶液  $0.1 \text{ml}$ , 立即用 751 型紫外分光光度计测定  $240 \text{nm}$  的光密度值。每隔半分钟读一次, 共读 3 分钟。以光密度对时间作图, 取反应最初直线部分, 计算出每分钟光密度的减少值, 最后以  $\text{H}_2\text{O}_2$  的消耗量来表示酶活性。

## 1.7 叶绿素含量的测定

根据 Arnon 法(1949)进行测定。

## 1.8 可溶性蛋白质的测定

按 Lowry 法(1951)<sup>[20]</sup>进行比色测定。取粗酶液加 10% 三氯醋酸置于 30℃ 条件下处理 20 分钟,以除去不溶性的成份,再用乙醇-乙醚混合液洗涤除去叶绿素。用牛血清蛋白作对照。

## 2 实验结果

### 2.1 不同叶龄叶片酶活性的变化

**2.1.1 RuBP 羧化酶** 图 1 显示杂交稻及其三系主茎第 11 叶一生中 RuBP 羧化酶活性的动态。叶片展开后 10~20 天内酶活性维持较高的水平,其中杂交稻和恢复系接近,而不育系的峰值明显较高。随着叶片的衰老,杂交稻及其三系 RuBP 羧化酶的活性持续下降,在叶片展开 20 天以后,杂交稻、恢复系、保持系的酶活性变化曲线相近,而不育系的酶活性一直高于其它三者。杂交稻第 11 叶一生中 RuBP 羧化酶活性没有表现出超亲优势,其变化动态与其父本恢复系相似。

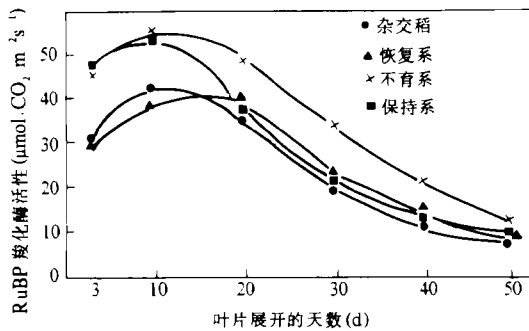


图 1 不同叶龄的叶片 RuBP 羧化酶活性的变化  
Fig. 1 Change of RuBP carboxylase activity with 11th leaf age of hybrid rice and its three lines

● hybrid rice ▲ restorers  
× male steriles ■ maintainers

**2.1.2 光呼吸有关的酶** 从图 2-A 可以看出,恢复系和保持系 RuBP 加氧酶的活性峰在展叶后 10 天左右出现,而杂交稻和不育系酶的活性峰出现较迟。随着叶龄增加杂交稻及其三系 RuBP 加氧酶的活性逐渐下降。但应指出,在叶片展开 20 天后,杂交稻叶片的加氧酶活性一直高于三系,而且 RuBP 加氧酶活性与羧化酶活性的比值(%)比其三系都高(图 2-B),从叶龄看,杂交稻叶片似乎并不具备低光呼吸的特性。

乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶参与光呼吸碳代谢过程<sup>[25]</sup>,测定这两种酶有助于阐明光呼吸有关酶系统之间的关系。在叶片

展开后的 30 天内乙醇酸氧化酶的变化与 RuBP 加氧酶基本上是一致的(图 2-C)。乙醇酸氧化酶活性在叶片展开后 10 天左右达到最高值,杂交稻的峰略后移,与 RuBP 加氧酶活性的动态相似。叶片生育后期不育系的酶活性相对较高。

不同叶龄的叶片过氧化氢酶活性变化基本与前两者相对应(图 2-D)。杂交稻和恢复系的酶活性非常接近,而不育系第 11 叶一生中酶活性明显较高,其峰值约为杂交稻峰值的 1.3 倍。

**2.1.3 酸性磷酸酯酶** 衡量叶片衰老指标的酸性磷酸酯酶的变化如图 3-A 所示。在叶片展开后的 20 天内,杂交稻及其三系的酶活性基本接近,处于较稳定的状态。叶片展开 30 天后,酶活性变化出现明显的差异,不育系的酸性磷酸酯酶活性虽然随着叶龄的增加而略有上升,但一直处于较低水平,到展叶 50 天时酶活性只有杂交稻的 1/3 左右。

**2.1.4 可溶性蛋白质和叶绿素含量** 杂交稻及其三系叶片展开后 20 天内可溶性蛋白质的含量维持较高水平(图 3-B),此后进入缓慢阶段,但各供试材料下降的幅度有差异。值得注

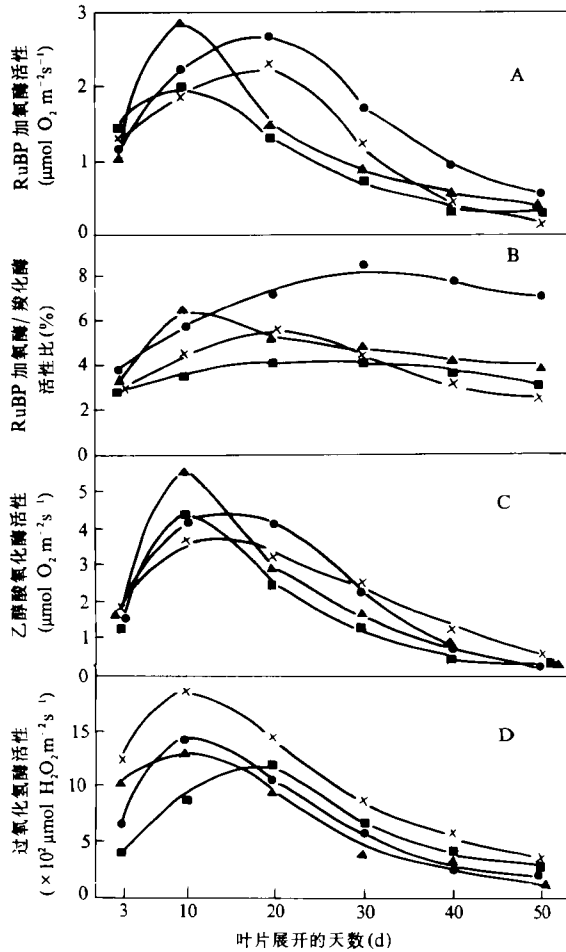


图2 不同叶龄叶片的 RuBP 加氧酶、乙醇酸氧化酶、过氧化氢酶活性的变化

Fig. 2 Changes of RuBP oxygenase, glycolate oxidase and catalase activities with 11th leaf age of hybrid rice and its three lines (See Fig. 1 for the symbols.)

供试材料叶绿素含量的变化(图 3-C)与 RuBP 羧化酶活性变化曲线一致。如以叶绿素含量下降到初始值 80% 所需的天数作为叶绿素含量的缓降期, 杂交稻、恢复系和保持系的缓降期均约为 20 天, 而不育系为 32 天, 显示其叶片的衰老进程比杂交水稻、恢复系、保持系要慢。

## 2.2 不同叶位叶片酶活性的变化

2.2.1 RuBP 羧化酶 移栽后杂交稻及其三系不同叶位叶片旺盛功能期的 RuBP 羧化酶活性变化示于图 4。各叶位叶的酶活性略有起落, 一般在第 7 叶后下降, 而在第 9 叶后除恢复系外呈回升趋势。杂交稻不同叶位的 RuBP 羧化酶活性低于母本不育系, 比较接近父本恢复系, 与叶龄测定结果相同, 不存在超亲优势。

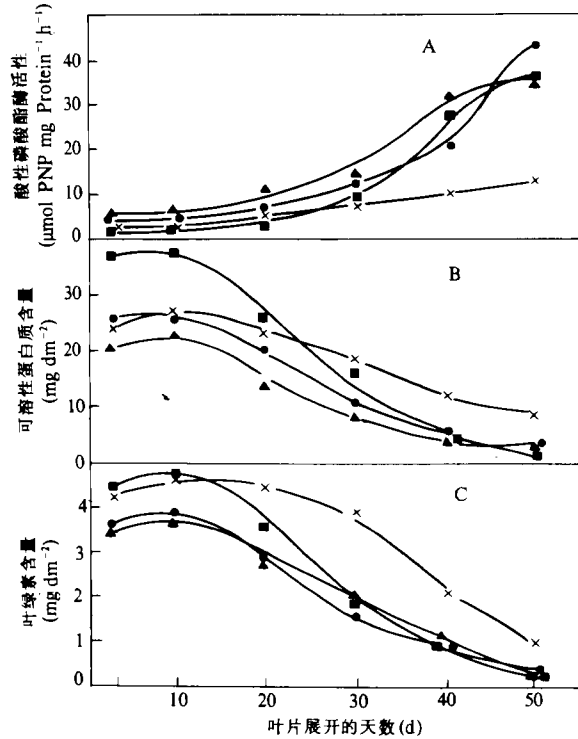


图3 不同叶龄的叶片酸性磷酸酯酶活性、可溶性蛋白质和叶绿素含量的变化

Fig. 3 Changes of acid phosphatase activity, soluble protein and chlorophyll contents with 11th leaf age of hybrid rice and its three lines (See Fig. 1 for the symbols.)

意的是不育系叶片可溶性蛋白质含量基本上以均衡的速度缓慢下降, 展叶后 50 天时还维持相对较高的水平, 含量约为杂交稻的 3.5~4 倍, 其变化曲线大体上与 RuBP 羧化酶活性相类似。

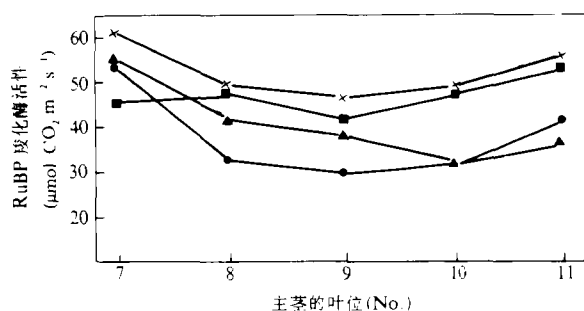


图4 不同叶位的叶片 RuBP 羧化酶活性的变化

Fig. 4 Change of RuBP carboxylase activity on the different leaf position in hybrid rice and three lines (See Fig. 1 for the symbols.)

### 2.2.2 RuBP 加氧酶和乙醇酸氧化酶

不同叶位叶片 RuBP 加氧酶活性变化(图 5-A)的特点,一是所有供试材料均以第 9 叶为界,酶活性下降后又回升;二是保持系和不育系不同叶位叶片酶活性变化与其 RuBP 羧化酶活性基本一致;而杂交稻和恢复系第 9 至 11 叶,酶活性上升的陡度较大,表明 RuBP 加氧酶与羧化酶的比值(%)略有上升(图 5-B),即光合氧化环相对增强。

杂交稻及其三系不同叶位叶片乙醇酸氧化酶活性的变化(图 5-C)与 RuBP 加氧酶一致,反映这两种酶内

在的协调一致。从酶反应中耗氧量看,乙醇酸氧化酶大体上是 RuBP 加氧酶的一倍,提示光呼吸基质来源与机体内乙醇酸氧化酶活性调节还有待深入。

## 3 讨论

### 3.1 杂交稻及其三系生育过程中有关光合酶活性的变化规律

实验待叶片展开后才取样测定,此时正值对数生长期的中、后阶段,杂交稻及其三系叶片展开后的 3~20 天是其一生中 RuBP 羧化酶、RuBP 加氧酶、乙醇酸氧化酶以及过氧化氢酶活性最高的阶段(图 1、2),而且也是可溶性蛋白质和叶绿素含量最高的时期(图 3),从生化水平上证实对数生长的中后期到生长速度渐缓初期是叶片旺盛的功能期。叶片进入生长速度渐缓期后,上述酶活性有规律地下降,叶片展开后的 20~30 天一般进入剧降阶段。杂交稻及其三系都遵循这一规律,没有本质的区别,但程度上略有差异。不同叶位叶的比较实验也选定在对数生长的后期进行,供试材料的酶活性间有一定的差异。我们认为与杂交稻和恢复系一生中出叶数较不育系和保持系多,同一叶位的叶片可能处于不同的生育阶段有关,而且供试材料间还存在育性的差异,不育系一生中

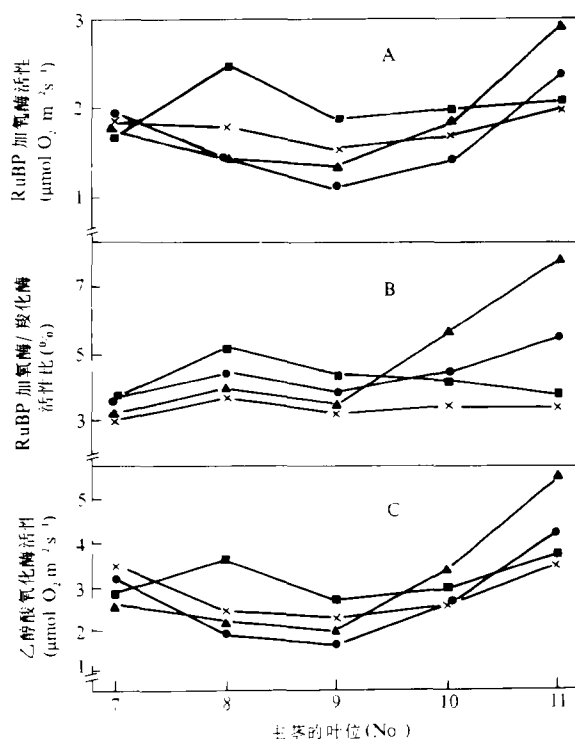


图5 不同叶位的叶片 RuBP 加氧酶、乙醇酸氧化酶活性的变化

Fig. 5 Changes of RuBP oxygenase and glycolate oxidase activities on the different leaf position in hybrid rice and three lines (See Fig. 1 for the symbols.)

光合酶活性变化的某些特点尚有待阐明。

不同叶龄和叶位的实验都证实 RuBP 加氧酶可作为光呼吸的指标酶<sup>[3]</sup>, 已知光呼吸的基质来源是多元的, 从本实验中乙醇酸氧化酶反应耗氧量显著大于 RuBP 加氧酶分析, 用存在于过氧化小体内的乙醇酸氧化酶做光呼吸的指标酶可能更加合适。

伴随水稻叶片衰老过程, RuBP 羧化酶、RuBP 加氧酶、乙醇酸氧化酶、过氧化氢酶的活性下降, 而酸性磷酸酯酶活性上升, 可溶性蛋白质和叶绿素含量减少, 这些结果与前人<sup>[16, 21, 26, 28]</sup>的报道相似。

不育系叶片的衰老进程比杂交稻、恢复系和保持系慢, 已从酸性磷酸酯酶活性、可溶性蛋白质含量, 叶绿素含量的变化上反映出来(图 3), 是否与不育系叶片一生中高活性的过氧化氢酶有关, 尚待深入。因为过氧化氢酶除参与光呼吸外, 还参与自由基的清除<sup>[14, 24]</sup>。杂交稻在生产实践中存在易早衰原因是多方面的, 但如何把不育系不易早衰的性状遗传给杂种后代, 也是一个值得探讨的问题。

### 3.2 杂交稻 RuBP 羧化酶/加氧酶活性与亲本的关系

以单位叶面积计或以叶片干重计(资料未列入), 杂交稻不同叶位叶片的 RuBP 羧化酶的活性低于其父本恢复系和母本不育系, 没有表现出超亲优势; 杂交稻 RuBP 加氧酶、乙醇酸氧化酶的活性与其亲本酶活性比较, 没有发现杂交稻在酶活性上具有明显的低光呼吸特征<sup>[1]</sup>。从与光合作用和光呼吸的有关酶的角度分析, 我们倾向于杂交稻叶片在光合酶水平上不存在明显的优势, 其优势可能在群体光合能力上表现出来<sup>[27]</sup>。

杂交稻不同叶位和不同叶龄叶片的 RuBP 羧化酶、RuBP 加氧酶、乙醇酸氧化酶、过氧化氢酶、酸性磷酸酯酶的活性及可溶性蛋白质和叶绿素含量, 与其父本恢复系变化趋势相似, 在数值上也基本相近, 而与其母本不育系差别较大, 这些都说明了杂交稻受其父本恢复系的影响较大。因此, 在选择杂交稻的父本时, 除应注意其恢复能力、大田生态表现外, 还应注意该品种的生理生化性状。

## 参 考 文 献

- 1 上海植物生理研究所, 1977, 湖南农业科学, 1, 40~51.
- 2 陈光仪、黄上志、何舒华等, 1984, 作物学报, 10(3), 195~200.
- 3 高煜珠, 1984, 光合作用研究进展, 3, 160~171.
- 4 曾世雄、卢庄文、杨秀青, 1979, 作物学报, 5(3), 24~34.
- 5 湖南农学院常德分院教研组, 1977, 植物学报, 19(1), 51~60.
- 6 湖南农学院化学教研组, 1977, 植物学报, 19(3), 226~236.
- 7 Arnon, D. I., 1949, Plant Physiol., 24, 1~5.
- 8 Ben-David, H., N. Nelson., and S. Gepstein., 1983, Plant Physiol., 73, 507~510.
- 9 Beers. R. F., I. W. Sizer, 1952, J. Biol. Chem., 195: 133~140.
- 10 Brado, B. A., A. Palgi., and S. Lurie., 1977. Plant physiol., 60: 309~312.
- 11 Camp, P. J., S. C. Huber., J. J. Burbe., et al., 1982. Plant Physiol., 70: 1641~1646.
- 12 Crafs-Brandner, S. J., F. E. Below., R. H. Hageman., et al., 1984, Plant Physiol. 75: 318~322.
- 13 Crafs-Brandner, S. J. M. E. Salvucci., and D. B. Egli., 1990, Photo. Res. 23: 223~230.
- 14 Fridovich, I., 1978, Science. 201: 875~880.
- 15 Hayashi, K., Y. Yamanoto., M. Nakagahara., 1977, Japan. J. Breed., 27, 49~56.
- 16 Jensen, R., J. T. Bahr., 1977, Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 379~408.
- 17 Kawamitsu, Y., J. C. Wei., W. Agata., 1989, Sci. Bull. Fac. Agri. Kyushu, 43, 135~144.
- 18 Kelly, G. J., E. Latzko., 1976, Ann. Rev. Plant Physiol., 27, 181~205.
- 19 Lorimer, G. H. et al, 1975, Method in enzymology, Vol. 42, Part C, 484~487.

- 20 Lowry, O. H. , N. J. Rosenbrouge. , A. L. Farr. , et al, 1951, J. Biol. Chem. , 193, 265~275.
- 21 Makino, A. , E. Mae. , K. Ohira. , 1983, Plant Physiol. , 73, 1002~1007.
- 22 Murayama. S. , K. Miyazato. , A. Nose. , 1987, Japan. Jour. Crop Sci. , 56, 198~203.
- 23 Ogren, W. L. , 1984, Ann. Rev. plant physiol. , 35, 415~442
- 24 Patterson, B. D. , 1984, Plant Physiol. , 76, 1014~1018.
- 25 Perchorowicz, J. T. et al, 1982, Plant Physiol. , 69, 1165~1168.
- 26 Saka, H. , 1985, 农技研报(日). , 36, 247~282.
- 27 Sony, X. F. , W. Agata. , Y. Kawamitsu. , 1990, Japan. Jour. Crop Sci. , 59, 19~29.
- 28 Wittenbach, V. A. , R. C. Ackerson. , R. T. Giaquinta. , et al, 1980, Crop Sci. , 20, 225~231.

## Changes in the Activities of Rubisco and Other Photosynthetic Enzymes during the Growth Stages in Hybrid Rice and Its Three Lines

Wang Renlei      Wei Jincheng

(Nanjing Normal University, Nanjing, 210097)

**Abstract** Ribulose 1,5-disphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), glycolate oxidase, catalase and acid phosphatase activities and chlorophyll and soluble protein content, were investigated at developmental stages in hybrid rice (shanyou 63) and its three lines. The results showed that RuBP carboxylase/ oxygenase activities of hybrid rice were lower than that of its parents on the different leaf position, and was close to its father. Therefore, hybrid rice hadn't significant photosynthetic superiority from Rubisco activity.

With the leaves ageing of hybrid rice and three lines, activities of Rubisco, glycolate oxidase and catalase decreased, however, acid phosphatase increased, and soluble protein and chlorophyll contents declined. But senescence courses of hybrid rice and three lines were different. Male steriles line senesced later than hybrid rice, restorers line, maintainers line. It was worthy to be discussed how to make the characteristic of late ageing of male steriles line could be inherited by hybrid rice.

**Key words** Hybrid rice; Three Line; Rubisco; Growth stages