

转玉米 C₄ 光合酶基因水稻株系中的光合 C₄ 微循环

季本华¹ 朱素琴¹ 焦德茂^{2,*}

(¹南通师范学院生命科学与技术系,江苏南通 226007;²江苏农业科学院农业生物遗传生理研究所,江苏南京 210014)

摘要 用转 PEPC、PPDK、NADP-ME、PEPC + PPDK 等酶基因的水稻株系及原种野生型 (WT) 为材料,研究了不同基因型水稻叶片中的 C₄ 光合微循环及其功能。用外源 OAA 或 MA 饲喂叶切片或离体叶绿体后,光合放氧速率在野生型水稻中增加了 50%,在 NADP-ME 和 PPDK 转基因水稻中增加了 50%~54%,在 PEPC 和 PEPC + PPDK 转基因水稻中增加了 100%~150%。证明原种水稻 Kitaake 叶片中具有一个原初的和有限的 C₄ 光合微循环,除 PPDK 基因、NADP-ME 基因外,外源 PEPC 基因或 PEPC + PPDK 双基因导入原种水稻 Kitaake 后,可大幅度提高 C₄ 光合微循环的运行。水稻中 C₄ 光合微循环的增强有降低光呼吸速率 (P_r)、增加净光合速率 (P_n) 的作用,在光能利用上,可增加 PS 光化学效率 (F_v/F_m)、光化学猝灭 (q_p)、降低非光化学猝灭 (q_N) 的作用;这些结果为转 C₄ 光合酶基因水稻中建立 C₄ 微循环系统来提高光合作用效率的可能性提供了依据。

关键词 转基因水稻;C₄ 微循环;叶绿素荧光;C₄-光合酶;草酰乙酸;苹果酸

中图分类号:S511

Photosynthetic C₄-Microcycle in Transgenic Rice Plant Lines Expressing the Maize C₄-Photosynthetic Enzymes

Ji Ben-Hua¹, Zhu Su-Qin¹, Jiao De-Mao²

(¹Department of Life Sciences and Technology, Nantong Normal University, Nantong 226007, Jiangsu; ²Institute of Agrobiological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

Abstract Photosynthetic C₄-microcycle and its function in photosynthetic apparatus were explored by comparing the transgenic rice lines expressing the maize C₄-specific PEPC gene, PPDK gene, NADP-ME gene and PEPC + PPDK double genes with their wild type rice Kitaake. The activities of photosynthetic C₄-pathway related key enzymes, PEPC, NADP-ME, PPDK were detected in both wild type rice Kitaake and transgenic rice. Photosynthetic oxygen evolution rates of leaf segments or intact chloroplasts *in vitro* fed with oxaloacetate (OAA) or malate (MA) increased by 50% in wild type rice Kitaake, by 50% - 54% in NADP-ME and PPDK-transgenic rices (no significant difference with wild type rice Kitaake), by 100% - 150% in PEPC and PEPC + PPDK-transgenic rices, which indicated that there was a primitive and limited photosynthetic C₄-microcycle in wild type C₃-rice Kitaake, and heterogenous PEPC gene and/or PEPC + PPDK double genes, with the exception of PPDK gene and NADP-ME gene, from C₄-plant could enhance the operation of existed C₄-microcycle in C₃-transgenic rice Kitaake. As the photosynthetic C₄-microcycle enhanced, the rates of photorespiration (P_r) were lowered and the net photosynthetic rates increased by determining the CO₂ exchanging rates, and as a consequence, PS photochemical efficiency (F_v/F_m) and photochemical quenching (q_p) increased accompanied with a decrease in the non-photochemical quenching (q_N) by determining the chlorophyll fluorescence characteristics. Above results might offer the experimental evidences for photosynthetic efficiency-raising gene engineering of rice.

Key words Transgenic rice; Photosynthetic C₄-microcycle; Chlorophyll fluorescence; Photosynthetic C₄-enzyme; Oxaloacetate; Malate

*基金项目:国家重点基础研究发展规划(G1998010100)和国家自然科学基金(39870533)项目。

作者简介:季本华(1948-),男,硕士,教授,从事光合作用高效光合机理研究。E-mail: jibenhua@nttc.edu.cn

*通讯作者:焦德茂(1938-),男,研究员,从事光合作用高效光合机理研究。E-mail: photosyn@public1.ptt.js.cn

Received(收稿日期):2003-03-06; Accepted(接受日期):2003-08-11.

近 10 年来,将 C₄ 光合基因转入 C₃ 水稻以提高其光合能力的研究备受关注^[1]。随着分子生物学技术的发展,已获得转磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)^[2]、丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)^[3]、NADP-苹果酸酶(NADP-ME)^[4]等基因和转 PEPC + PPDK^[5]双基因的水稻。在高光、高温条件下,与原种水稻相比,转 PEPC 基因水稻具有高光合速率和耐光氧化的特性^[6]。对此,我们开始的研究认为将 PEPC 基因导入水稻后是叶片气孔导度的增加提高了叶片光合能力^[7]。但进一步的研究^[8]表明,转 PEPC 基因水稻中光合速率的增加与气孔导度无相关,而是由于叶片细胞中浓缩 CO₂ 能力的增加。这与 Magnin N C 等^[22]在无 Kranz 结构的 C₃ 植物 *Hydrilla verticillata* 中的研究结果一致。陈根云等^[9]用外源 C₄ 二羧酸饲喂 C₃ 菠菜叶片,看到光合能力的提高,为 C₃ 植物叶片中具有 C₄ 微循环提供了充分的证据。在上述工作基础上,本文用稳定的转 PEPC、转 PPDK、转 NADP-ME、转 PEPC + PPDK 双基因水稻株系和原种水稻 Kitaake (WT) 进行了实验。旨在了解 C₃ 水稻中是否具有 C₄ 光合微循环,以及转基因水稻株系中相关外源 C₄ 光合酶基因的生理功能,为进一步探讨 C₃ 植物中增强 C₄ 光合特性的机理和技术应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以日本水稻品种 Kitaake (*Oryza sativa* L. subsp. *Japonica* Kitaake) 为基因受体,分别导入玉米的 PEPC、PPDK、NADP-ME 基因,获得不同的转基因水稻材料;另外通过常规杂交的方法获得转 PEPC + PPDK 双基因水稻材料。由美国华盛顿州立大学 Ku 教授^[2]提供已转入 C₄ 光合酶基因的第 3 代水稻及原种材料,我们经过逐代繁殖、检测和选择,已得到第 7 代稳定的材料^[6,8]。这些材料盆栽于江苏省农业科学院农业生物遗传生理研究所网室盆钵中,5 月上旬播种,每个材料播 25 盆,每盆直播 8 穴,每穴 1 苗。在自然温光条件下按常规管理。

1.2 测定方法

取苗期 5 叶龄生长在网室盆钵中的水稻功能叶片制备叶绿体、提取酶液,测定叶切片的光合放氧速率、CO₂ 气体交换速率、叶绿素荧光特性等。

1.2.1 离体完整叶绿体制备与光合放氧速率的测定 水稻叶片在光下激活 30 min,加入 3 倍体积预冷的缓冲液 A(山梨醇 330 mmol/L, MES 50 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, 抗坏血酸 Na 盐 2 mmol/L, pH 6.1), 间歇捣碎 3~4 次,每次 6 s, 8 层纱布过滤,滤液于 2 500 × g 和 4 下离心 30 s。弃上清液并洗去破碎叶绿体,悬浮于缓冲液 B(山梨醇 330 mmol/L, HEPES 50 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, pH 6.7) 中,以浓度 > 2 mg/mL 的叶绿素保存备用。根据叶济宇和米华玲^[10]的氧电极法测定叶绿体完整度,其完整度应在 80% 以上。将水稻完整叶绿体放入含 0.4 mmol/L NaHCO₃ 的缓冲液 C(山梨醇 330 mmol/L, HEPES 50 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, pH 7.5) 中,在不同浓度 OAA 或 PEP 或 MA (Sigma 公司产品) 条件下,分别用氧电极 [Oxylab system (liquid phase) Hansatech UK] 测定其光合放氧速率。外源 OAA 或 MA 母液用 NaOH 调节其 pH 至与反应液相同。

1.2.2 叶切片光合放氧速率的测定 取网室中生长的水稻叶片切成约 1.5 mm × 1.5 mm 小块,然后将叶切片置含 0.4 mmol/L NaHCO₃ 的 STN 缓冲液(蔗糖 400 mmol/L, Tris-Cl 50 mmol/L, pH 7.5, NaCl 10 mmol/L), 在不同浓度的 OAA 或 PEP 或 MA 条件下,分别用氧电极 [Oxylab system (liquid phase) Hansatech UK] 测定其光合放氧速率。

1.2.3 叶片 CO₂ 气体交换速率测定 取水稻叶片,分别插入含 OAA (200 μmol/L) 或 MA (200 μmol/L) 的水溶液(对照叶片插入蒸馏水)中,在 1 000 μmol · m⁻² · s⁻¹ 光强下 30 min 后,用便携式光合气体分析系统 (TPS-1 型,英国 PP Systems 公司) 在 350 μL/L 的 CO₂ 和 1 000 μmol · m⁻² · s⁻¹ 光强下测定叶片的净光合速率。用 2% O₂ 与 21% O₂ 下的光合速率之差来表示光呼吸速率。

1.2.4 酶液的提取和酶活性的测定 取水稻叶片 2 g 在 Tris-HCl 缓冲液 [50 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 2% PVP (W/V) 和 10% 甘油] 中冰浴研磨,8 层纱布过滤后,将滤液在 HITACHI (20PR-52D) 型离心机于 4 下 10 000 × g 离心 20 min,弃沉淀,上清液即为酶液。C₄ 光合酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)、丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)、NADP-苹果酸酶(NADP-ME)、

NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)的活性分别参照 Gonzalez 等人^[11]、Hatch 等人^[12]、陈景治等人^[13]和李斌等人^[14]的方法测定,碳酸酐酶(CA)活性的测定按郭敏亮等^[15]的方法, RuBP 羧化酶(RuBPC)活性测定参照魏锦城等人^[16]和 Kung 等人^[17]的方法。

1.2.5 叶片叶绿素荧光参数的测定 水稻叶片经暗适应 10 min 后用 PAM-2000 荧光仪和数据采集软件 DA-2000 进行测定,测定温度 30 °C。参照文献^[18,19]的方法测定荧光动力学参数,按下式计算: PS 光化学效率 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$; 光化学猝灭 $q_p = (F_m - F_s)/(F_m - F_0)$; 非光化学猝灭 $q_n = (F_m - F_m)/(F_m - F_0)$ 。

2 结果

2.1 光抑制条件下转 C₄ 光合酶基因水稻和原种水稻(WT)叶内光合酶活性的变化

在对照条件(350 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 21% O₂, 350 $\mu\text{L/L}$ CO₂, 30 °C, 3 h)下,外源基因在水稻中都得到表达,因为转 C₄ 光合酶基因水稻中外源基因编码的酶的活性均高于其他基因型水稻中相关酶的活性,其中外源 PEPC 基因的表达活性最高。例如,转 PEPC 基因水稻中除磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)活性明显高于原种水稻(WT)外,丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)、NADP-苹果酸酶(NADP-ME)、NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)、碳酸酐酶(CA)以及 C₃ 光合酶 RuBPC 的活性均与原种水稻(WT)中的相近(图 1-A, B, C, D, E)。在光抑制条件(1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 2% O₂, 60 $\mu\text{L/L}$ CO₂, 30 °C, 3 h)下,转 C₄ 光合酶基因水稻和原种水稻(WT)中 C₃ 光合酶 RuBPC 活性约增加了 4%左右(未达显著水平),且在不同基因型水稻间无差异。但 C₄ 光合酶活性有了较明显的提高,如 PEPC、CA、NADP-MDH、NADP-ME、PPDK 的活性在野生型(WT)水稻中分别增加了 213.7%、278.9%、223.7% 以及 235.6% 和 215.0% (转 NADP-ME、转 PPDK 基因型水稻与野生型相似)(图 1-A, B, C),在转 PEPC 基因水稻中分别增加了 364.7%、342.3%、304.1%、294.2% 和 398.1% (转 PEPC + PPDK 基因型水稻与转 PEPC 基因水稻的相似)(图 1-D, E)。上述结果说明,在光抑制条件下,转 PEPC、转 PEPC + PPDK 双基因水稻中除 PEPC 活性增加且仍然高于原种水稻(WT)中的外,其他 C₄ 光合酶(CA、NADP-MDH、NADP-ME、PPDK)的活性也诱导增加了,且高于原种水稻(WT)中有关酶的活

性。图 1-F、G、H、I 和 J 中用 PEPC/RuBPC 比值和 CA/RuBPC 比值描述了不同基因型水稻在逆境下 C₃ 光合途径和 C₄ 光合途径的协调运转情况。在对照条件下原种水稻(WT)、转 NADP-ME 和转 PPDK 基因水稻的 PEPC/RuBPC 比值和 CA/RuBPC 比值分别为 0.24 和 0.32,光抑制条件下分别增加到 0.49 和 0.88 左右(图 1-F, G, H);而转 PEPC 基因和转 PEPC + PPDK 双基因型水稻在对照条件下的 PEPC/RuBPC 比值较高,约为 0.9,CA/RuBPC 比值与 WT 相似,约为 0.32,但在逆境下 PEPC/RuBPC 比值增至 4.0 左右,CA/RuBPC 比值增至 1.4 左右(图 3-I, J)。上述结果说明,无论在何种条件下,RuBPC 都起着重要的作用。但在光抑制条件下,PEPC 和 CA 所起的作用明显大于对照条件下,并且在转 PEPC 基因型水稻(PC)中的作用明显大于在野生型(WT)中的作用。

2.2 OAA、MA 和 PEP 分别对转 C₄ 光合酶基因水稻叶切片和叶绿体光合放氧的影响

图 2-A 显示,未加 OAA 时,所有基因型水稻叶切片在含 0.4 mmol/L 的 NaHCO₃ 的 STN 缓冲液中的光合放氧速率在 5.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 左右,随着外加 OAA 浓度的增加,光合放氧速率也随之增加,当 OAA 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,野生型(WT)和转 NADP-ME、PPDK 基因型的光合速率分别增加了 71.2%、76.4% 和 78.6%;转 PEPC、PEPC + PPDK 双基因型的光合速率分别增加了 133.4% 和 144.6%。当 OAA 浓度高于 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,随 OAA 浓度的增加,光合速率明显下降。由于 OAA 可能作为一种电子受体被还原,因此,还需要确定其对光合放氧的促进,是否源于 OAA 作为碳源的贡献^[9]。所以我们在同样的反应体系中将 HCO₃⁻ 的浓度增加到 1 mmol/L,此时离体叶绿体的光合放氧速率几乎是原来的 2 倍,外加 OAA 对光合放氧无促进作用。这说明反应液在低浓度 HCO₃⁻ (0.4 mmol/L) 时,OAA 对光合作用的促进至少其中一部分来自其提供额外的碳源。我们进一步用 MA 代替 OAA 进行同样的实验,可以排除电子受体效应带来的影响。结果(图 2-B)显示,MA 对水稻叶切片光合放氧的作用及其变化趋势均与 OAA 类似,当 MA 浓度增加时,叶切片的光合放氧速率迅速增加。图 2-C 显示,叶切片光合放氧对 PEP 的浓度十分敏感,低于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时有显著的促进作用,高于 100 $\mu\text{mol/L}$ 后有极其显著的抑制作用。上述结果表明,一定浓度的 OAA、MA 或 PEP 对水稻叶切片的光合放氧速率有较大的促进作用,在

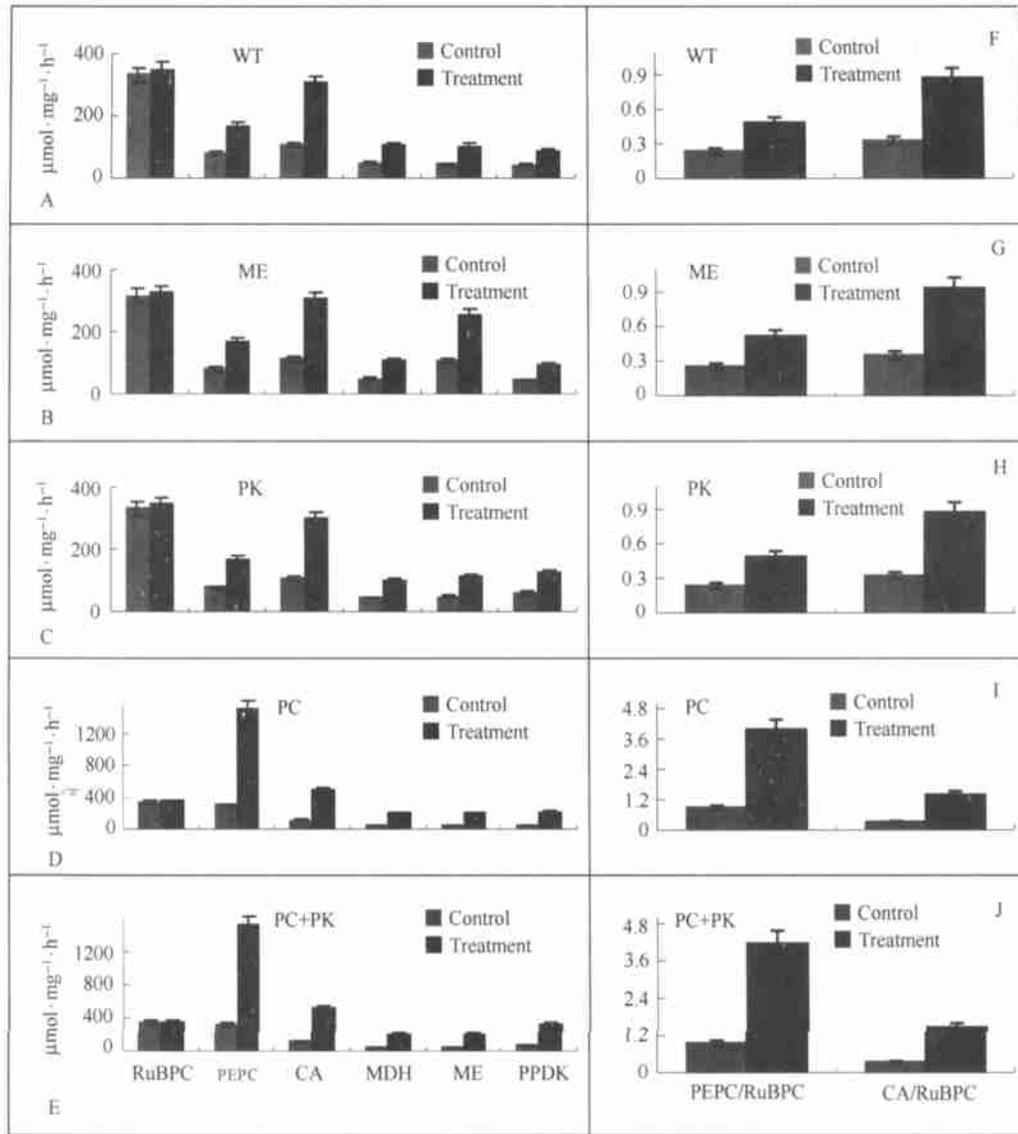


图1 光抑制条件下原种水稻(WT)和转 C₄ 光合酶基因水稻株系叶内光合酶活性的变化

Fig. 1 Changes in activities of photosynthetic enzyme in leaves of wild type (WT) rice cultivar Kitaake and photosynthetic C₄-enzyme transgenic rice plant lines under photoinhibitory conditions

WT:野生型水稻 Kitaake;ME:转 NADP-ME 基因水稻;PK:转 PPDK 基因水稻;PC:转 PEPC 基因水稻;PC+PK:转 PEPC 和 PPDK 双基因水稻。

数据为 5 次实验数据的平均值。下同。

WT:Wild type rice Kitaake;ME:NADP-ME-transgenic rice;PK:PPDK-transgenic rice;PC:PEPC-transgenic rice;PC+PK:PEPC+PPDK double transgenic rice. Mean values from 5 independent experiments. The same below.

对照(Control):350 μmol m⁻² s⁻¹, 21% O₂, 350 μL/L CO₂, 30 °C, 3 h. 处理(Treatment):1 000 μmol m⁻² s⁻¹, 2% O₂, 60 μL/L CO₂, 30 °C, 3 h.

此基础上,我们进一步研究了 OAA、MA 或 PEP 分别对水稻离体叶绿体光合放氧速率的影响。图 2-D、E 和 F 的结果表明,外加 OAA、MA 和 PEP,野生型(WT)、转 NADP-ME 和转 PPDK 基因型水稻完整离体叶绿体光合放氧速率分别增加了 37.8%~46.2%、31.2%~47.8%和 43.0%~63.1%。转 PEPC 和 PEPC+PPDK 双基因型水稻完整离体叶绿体光合

放氧速率分别增加了 98.5%~112.8%、109.7%~131.8%和 110.0%~131.2%。这与叶切片实验所得结果基本一致,说明离体叶绿体内 OAA 和 MA 等四碳双羧酸浓度的增加,确能提高光合放氧速率。从图 2 还可看出,与野生型水稻(WT)、转 NADP-ME 和转 PPDK 基因水稻相比,转 PEPC、转 PEPC+PPDK 双基因水稻叶切片或离体叶绿体经 OAA、MA 或 PEP

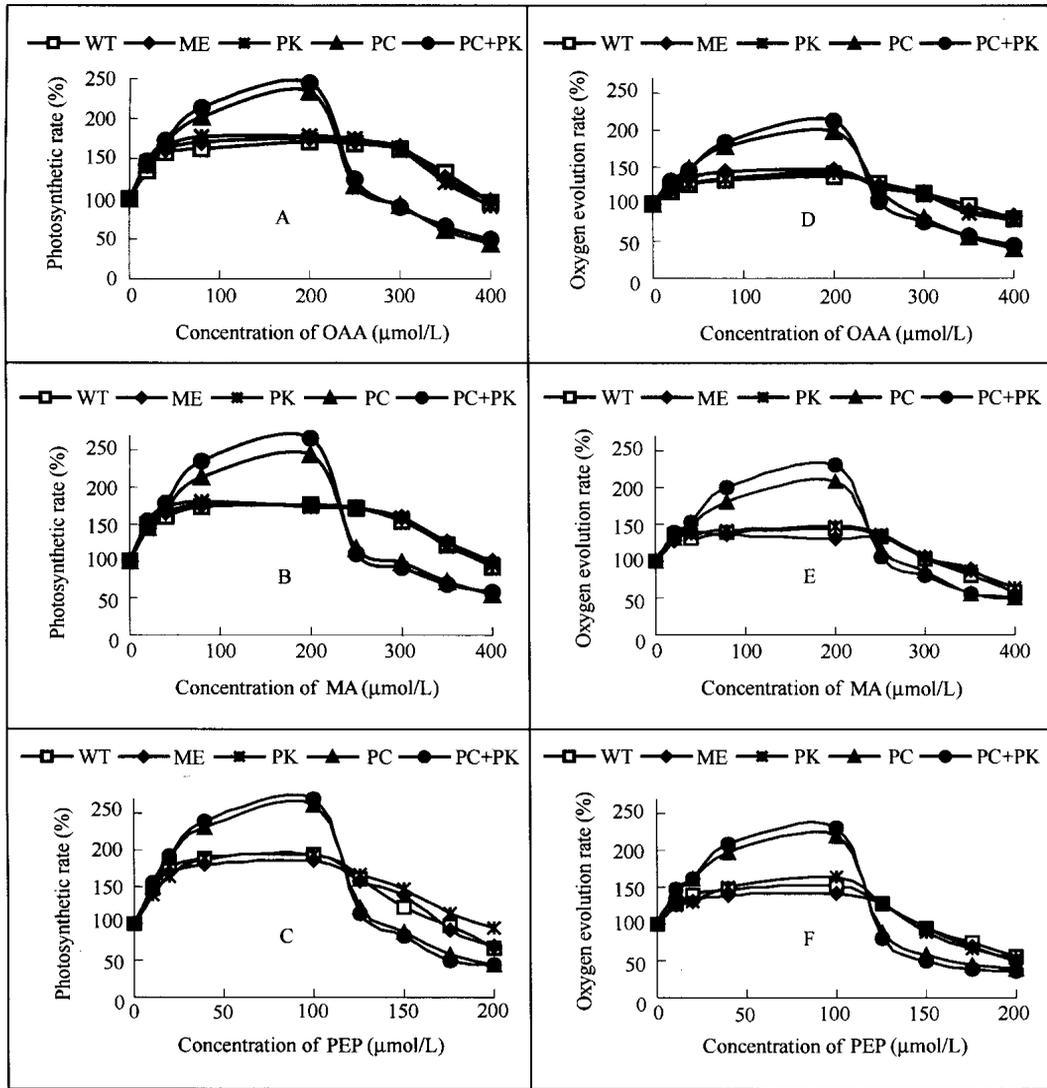


图2 草酰乙酸(OAA)、苹果酸(MA)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)分别对原种水稻(WT)和转 C_4 光合酶基因水稻叶切片(左)和离体叶绿体(右)光合放氧的影响

Fig. 2 Effect of oxaloacetate (OAA), malate (MA) and phosphoenolpyruvate (PEP) on photosynthetic oxygen evolution of leaf discs (left) and chloroplasts (right) *in vitro* in wild type (WT) rice kitake and photosynthetic C_4 enzyme transgenic rice plant lines, respectively

测定光强 $1\ 000\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$; 测定温度 $30\ ^\circ\text{C}$ 。Testing light intensity: a PFD of $1\ 000\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$; testing temperature: $30\ ^\circ\text{C}$ 。

处理后,光合放氧速率增加的幅度大,充分说明外源PEPC基因在转基因水稻中确实发挥着重要作用。

2.3 OAA、MA 分别对转 C_4 光合酶基因水稻株系叶片 CO_2 气体交换的影响

上述实验都是将叶切片置含四碳双羧酸的反应液,测定其对光合放氧的影响。为了进一步验证这些结果。我们将叶片分别插入 OAA ($200\ \mu\text{mol/L}$) 和 MA ($200\ \mu\text{mol/L}$) 水溶液中 $30\ \text{min}$, 在饱和光强下完成光诱导后,用英国 PP Systems 公司 TPS-1 型便

携式光合气体分析系统测定叶片的净光合速率和光呼吸速率。从图 3 可见,OAA 和 MA 依然表现出对光合作用的促进作用,在 WT 水稻中净光合速率 (P_n) 比对照分别增加了 15.6% 和 11.1% ,在转 NADPME 和 PPDK 基因水稻中分别增加了 14.9% 和 10.7% 、 15.0% 和 10.9% ,均达到极显著水平。同时,在 WT、转 NADPME、转 PEPC 基因型水稻中的光呼吸速率分别下降了 2.7% 和 3.2% 、 2.4% 和 4.1%

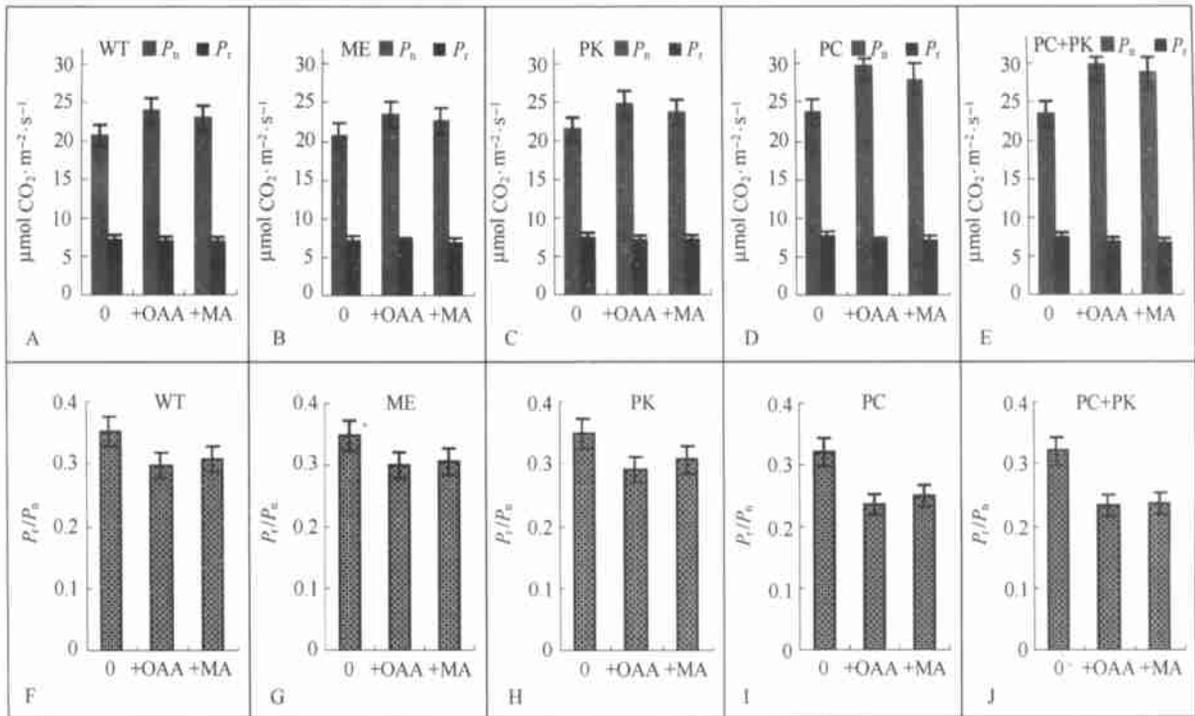


图3 草酰乙酸(OAA)、苹果酸(MA)分别对原种水稻(WT)和转 C₄光合酶基因水稻(PC)叶片光呼吸速率(P_r)和净光合速率(P_n)的影响

Fig. 3 Effect of oxaloacetate (OAA) and malate (MA) on photorespiration rates (P_r) and net photosynthetic rates (P_n) in leaves of wild type (WT) rice and photosynthetic C₄ enzyme transgenic rice lines, respectively

以及 4.9% 和 4.6% (图 3-A, B, C), 虽然未达到显著水平, 但 P_r/P_n 比值分别下降了 15.9% 和 12.8%、13.8% 和 12.1% 以及 16.2% 和 12.3% (图 3-F, G, H)。上述变化在转 PEPC 和转 PEPC + PPDK 基因型水稻中更为显著。经 OAA 和 MA 处理后, 净光合速率 (P_n) 分别增加了 25.6% 和 19.6%、27.2% 和 22.8% (极显著水平), 光呼吸速率 (P_r) 分别下降了 7.2% 和 7.0%、7.8% 和 9.0% (图 3-D, E), 这样, P_r/P_n 比值分别下降了 26.5% 和 22.1%、27.5% 和 25.9% (图 3-I, J)。由此可见, OAA 和 MA 可提高净光合速率 (P_n), 降低光呼吸速率 (P_r), 最终使 P_r/P_n 比值大幅度降低。这种现象在转 PEPC 和转 PEPC + PPDK 双基因水稻中尤为明显。

2.4 OAA、MA 分别对转 C₄光合酶基因水稻株系和原种水稻(WT)叶绿素荧光参数的影响

取水稻叶片, 分别插入含 OAA (200 $\mu\text{mol/L}$) 和 MA (200 $\mu\text{mol/L}$) 的水溶液中(对照叶片插入蒸馏水中), 在 1 000 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下照光 30 min, 测得的荧光参数如图 4 所示。WT、转 NADP-ME 和

转 PPDK 基因水稻的荧光特性相似, 对照组叶片的 PS 光化学效率 (F_v/F_m)、光化学猝灭 (q_p) 和非光化学猝灭 (q_N) 大约为 0.75、0.71 和 0.64, 在 OAA 处理组上述参数的数值分别增加了 9%、12% 和下降了 11% 左右, 在 MA 处理组上述参数的数值分别增加了 8%、11% 和下降了 10% 左右(达极显著水平)(图 4-A, B, C)。转 PEPC 和转 PEPC + PPDK 双基因水稻的荧光特性也很相似, 对照组叶片的 F_v/F_m 、 q_p 和 q_N 大约为 0.805、0.77 和 0.57, 在 OAA 处理组上述参数的数值分别增加了 2.1%、3.5% 和下降了 2.5% 左右, 在 MA 处理组上述参数的数值分别增加了 1.6%、2.1% 和下降了 1.6% 左右(未达显著水平)(图 4-D, E)。换言之, 在此实验条件下, WT 水稻叶片的 F_v/F_m 、 q_p 明显低于转 PEPC 基因型水稻, 前者不耐光抑制、后者耐光抑制; 经 OAA 或 MA 处理后 WT 水稻叶片的 F_v/F_m 、 q_p 值大幅度增加, PEPC 基因型水稻叶片的 F_v/F_m 、 q_p 略有增加, 两者都耐光抑制。可见, OAA 或 MA 可提高水稻抗光抑制的能力。

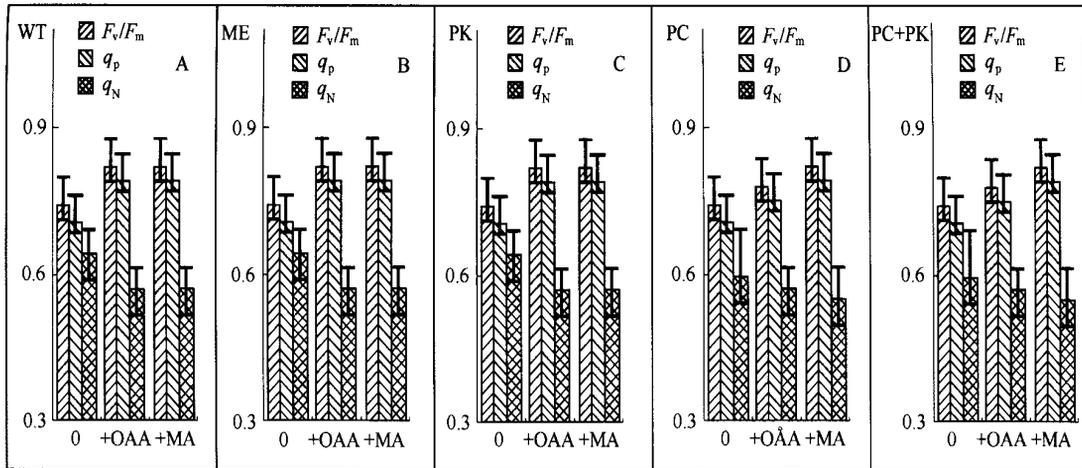


图4 OAA, MA 分别对原种水稻(WT)和转 C_4 光合酶基因水稻叶片叶绿素荧光参数的影响

Fig. 4 Effect of oxaloacetate (OAA) and malate (MA) on chlorophyll fluorescence parameters in leaves of wild type (WT) rice cultivar kitaake and photosynthetic C_4 -enzyme transgenic rice lines, respectively

3 讨论

长期以来对 C_3 植物中是否存在 C_4 光合途径受到质疑,因为 C_4 植物叶片具有特殊的 Kranz 结构。 C_4 植物在叶肉细胞中由磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化酶固定 CO_2 成草酰乙酸(OAA)后,转运进入叶片维管束鞘细胞,在维管束细胞中分别经天冬氨酸、苹果酸(MA)或 OAA 途径脱羧放出 CO_2 ,导致维管束鞘细胞中 CO_2 浓度升高,提高了强光下的光合作用速率^[11]。有趣的是近年来发现水生植物 *Hydrilla verticillata*^[22]和 *Egeria densa*^[23]并无 Kranz 结构,但有 C_4 光合途径的运行,说明在植物叶片的单一光合细胞中可以进行 C_4 光合微循环。实际上,早有报道在 C_3 作物大豆^[20]、小麦^[21]、水稻^[26]叶片中有 C_4 光合酶系统,由于酶活性较低,因此提出 C_3 植物叶片中可能具有有限的 C_4 光合途径。陈根云等^[9]的研究看到,向 C_3 植物菠菜中外加 C_4 光合原初产物 OAA 或 MA 可提高叶片的光合能力,为在 C_3 植物中建立 C_4 微循环系统来提高光合作用的效率的可能性提供了依据。为探明水稻中 C_4 微循环及其生理功能,我们借鉴这一技术,看到在离体叶绿体、叶切片和完整叶片不同结构层次上,外加 OAA 或 MA 都可以使光合速率不同程度地提高。特别是外加 OAA 或 MA 对离体叶绿体光合放氧的促进作用尤为明显,说明提高水稻叶绿体内的四碳二羧酸或 CO_2 浓度能够明显提高光合作用速率。同时暗示若能增加 C_4 循环关

键酶 PEPC 的活性,催化形成更多的 C_4 二羧酸(OAA 或 MA),则可进一步提高光合能力。本研究中,用 OAA 或 MA(30~200 $\mu\text{mol/L}$) 饲喂原种水稻(WT)和转 PEPC 基因水稻(PC),在离体叶绿体、叶切片和完整叶片不同结构层次上都可看到 OAA 或 MA 对转 PEPC 基因水稻(PC)光合放氧的促进作用明显大于对原种水稻(WT),说明若能进一步提高现有高产品种中的 PEPC 活性,则可进一步提高光合潜力。

对转基因水稻中 PEPC 的作用,目前尚有争议,在不同环境条件下可得出不同的实验结果。在日本室内中等光强下培养的转 PEPC 基因水稻未见光合能力的提高^[24]。在我国南京高温高光强下培育的转 PEPC 基因水稻有提高光合效率和减轻光抑制/光氧化的效应^[6]。在多逆境(高温、高光或强紫外线)的地区,与原种水稻(WT)相比,转 PEPC 基因水稻(PC)一般可增产 10%~30%^[25]。本文的研究表明,外加 C_4 光合原初产物可增强转 PEPC 基因水稻(PC)的 C_4 光合特性,其生理机制是通过减少光呼吸、提高净光合能力,从而提高光合效率(图 4)。 CO_2 同化能力的增加,需消耗更多的光能,即叶片吸收的光能将更多地进入光化学反应,因而使得耗散多余光能的非光化学系数(q_N)降低,PS 光能转化效率(F_v/F_m)和光化学猝灭(q_p)相应提高。上述生理过程可能是转 PEPC 基因水稻抗逆增产的生理基础。

References

- [1] Matsuoka M, Furbank R T, Fukayama H, Miyao M. Molecular engineering of C₄ photosynthesis. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol*, 2001, **52**: 297 - 314
- [2] Ku M S B, Sakae A, Mika N, Hiroshi F, Hiroko T, Kazuko O, Sakiko H, Seiichi T, Mitsue M, Makoto M. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 76 - 80
- [3] Fukayama H, Agarie S, Nomura M, Tsuchida H, Ku M S B. High-level expression of maize C₄-specific pyruvate, P_i dikinase and its light activation in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol*, 1999, **40**: s116
- [4] Tsuchida H, Tamai T, Fukayama H, Agarie S, Nomura M. High level expression of C₄-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth of C₃ plant rice. *Plant Cell Physiol*, 2001, **42**: 138 - 145
- [5] Ku M S B, Cho D, Ranade U, Hsu T P, Li X, Jiao D M, Ehleringer J, Miyao M, Matsuoka M. Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize C₄ photosynthesis enzymes, In: Sheehy J, Mitchell P L, Hardy B (eds). *Redesign Rice Photosynthesis to Improve Yield*, Elsevier/IRRI, 2000. 193 - 204
- [6] Jiao D-M, Li X, Huang X-Q, Chi W, Kuang T-Y, Ku M S B. Characteristics of CO₂ assimilation of photosynthesis and chlorophyll fluorescence in PEPC transgenic rice plants. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2001, **46**: 413 - 418
- [7] Ku M S B, Cho D, Li X, Jiao D, Pinto M, Miyao M, Matsuoka M. Introduction of genes encoding C₄ photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences. In: Khush G (ed) *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance, and Grain Yield*, Norvatis Foundation, 2001. 100 - 116
- [8] Huang X-Q, Jiao D-M, Chi W, Ku M S B. Characteristics of CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence of transgenic rice with C₄ genes. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2002, **44**(4): 405 - 412
- [9] Chen G Y (陈根云), Ye J-Y (叶济宇). Effects of oxaloacetate and malate on photosynthesis in leaves and in intact chloroplasts in spinach. *Acta Phytophysiol Sinica (植物生理学报)*. 2001, **27**(6): 478 - 482
- [10] 叶济宇, 米华玲. 离体叶绿体的制备. 见: 中国科学院上海植物生理研究所编. *现代植物生理学实验指南*. 北京: 科学出版社, 1999. 86 - 87 (in Chinese)
- [11] Gonzalez D H, Iglesias A A, Andeo C S. On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate: Effect of pH. *J Plant Physiol*, 1984, **116**: 425 - 429
- [12] Hatch M D, Slack C R. Pyruvate, P_i dikinase from leaves. In: Wood W A, ed. *Method in Enzymology*. New York: Academic Press Inc, 1975, **42**: 212 - 219
- [13] Chen J-Z (陈景治), Chen D-L (陈冬兰), Shi J-N (施教耐). Comparison of some characteristics of NADP-malic enzyme from sorghum and wheat leaves. *Acta Phytophysiol Sinica (植物生理学报)*, 1981, **7**(4): 345 - 350
- [14] Li B (李斌), Chen D-L (陈冬兰), Shi J-N (施教耐). Purification and molecular properties of NADP dependent malate dehydrogenase from sorghum leaves. *Acta Phytophysiol Sinica (植物生理学报)*, 1987, **13**(2): 113 - 121
- [15] Gao M-L (郭敏亮), Gao Y-Z (高煜珠), Wang Z (王忠). Determination of plant carbonic anhydrase activity with pHmeter. *Plant Physiol Commun (植物生理学通讯)*, 1988, **6**: 59 - 61
- [16] Wei J-C (魏锦城), Wang R-L (王仁雷), Cheng G Y (程光宇). Studies on the kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from F₁ hybrid rice. *Acta Phytophysiol Sinica (植物生理学报)*, 1994, **20**(1): 55 - 60
- [17] Kung S D, Chollet R, Marsho T V. Crystallization and assay procedures of tobacco ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. In: Pietro A S, ed. *Method in Enzymology*. New York: Academic Press Inc, 1980, **69**: 326 - 335
- [18] Schreiber U, Schliwa W, Bigger U. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res*, 1986, **10**: 51 - 62
- [19] Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **990**: 87 - 92
- [20] Li W-H (李卫华), Lu Q-T (卢庆陶), Hao N-B (郝乃斌), Ge Q-Y (戈巧英), Zhang Q-D (张其德), Du W-G (杜维广), Kuang T-Y (匡廷云). C₄ pathway enzymes in leaves of soybean. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2001, **43**(8): 805 - 808
- [21] Hata S, Matsuoka M. Immunological studies on pyruvate orthophosphate dikinase in C₃ plants. *Plant Cell Physiol*, 1987, **28**: 635 - 641
- [22] Magnin N C, Cooley B A, Reiskind J B, Bowes G. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C₄ photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol*, 1997, **115**: 1 681 - 1 689
- [23] Casati P, Lara M and Andreo C. Induction of a C₄-like mechanism of CO₂ fixation in *Egeria densa*, a submerged aquatic species. *Plant Physiol*, 2000, **123**: 1 611 - 1 622
- [24] Osaki M, Shinano T. Influence of carbon-nitrogen balance on productivity of C₃ plants and effect of high expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice. In: Sheehy J, Mitchell P L, Hardy B eds. *Redesign Rice Photosynthesis to Increase Yield*, Elsevier/IRRI, 2000. 177 - 192
- [25] Surridge C. The rice squad. News feature, *Nature*, 2002, **416**: 576 - 578
- [26] Wang Q (王强), Lu C-M (卢从明), Zhang Q-D (张其德), Hao N-B (郝乃斌), Ge Q-Y (戈巧英), Dong F-Q (董凤琴), Bai K-Z (白克智), Kuang T-Y (匡廷云). Characterization of photosynthesis, photoinhibition and the activities of C₄ pathway enzymes in a superhigh yield rice, Liangyoupeijiu. *Sci in China (中国科学)*, 2002, **45**(5): 468 - 476