

高光效大豆光合特性的研究

Ⅵ 高光效大豆 C_4 —途径的探讨*

戈巧英 郝乃斌 张其德

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

林建兴 张性坦

(中国科学院遗传研究所 北京 100012)

杜维广 张桂茹

(黑龙江省农业科学院大豆研究所 哈尔滨 150086)

摘 要

本文研究了不同大豆品种(系)的与 C_4 —途径有关的 PEP 羧化酶, NAD(P)—苹果酸酶和丙酮酸磷酸双激酶。结果表明, 上述三种酶活性在大豆品种(系)间具有明显的差异, 尤以高光效品种(系)的 C_4 —途径关键性酶类的活性明显地高于低光效的品种, 说明在 C_3 —植物中存在着活跃的 CO_2 β —羧化作用, 从而有利于提高光合效率。

关键词 二磷酸核酮糖羧化酶; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 光合效率; C_4 —途径

植物的生长发育是以自身同化的有机物作为物质基础的, 而有机物直接来源于植物的光合碳同化。大量研究表明, C_3 植物中, RuBP(二磷酸核酮糖)羧化酶是光合环中的关键性酶, 在饱和光强下, 它的活性与光合效率呈正相关^[1,5,9,10,15,17], 不仅如此, 光合效率与叶片中 RuBP 羧化酶含量也呈正相关^[16], 甚至叶片中 RuBP 羧化酶含量与产量也密切相

* “八五”国家科技攻关农业项目
本文于 1993 年 10 月 15 日收到。
This paper was received on Oct. 15, 1993.

关^[14]。我们的研究又进一步证明,大豆叶片中 RuBP 羧化酶活性不仅与光合速率呈正相关,而且对产量的贡献也大,说明籽粒产量取决于光合碳循环的运转效率^[1]。然而,值得注意的是 C₄ 植物中同化 CO₂ 的关键性酶—PEP(磷酸烯醇式丙酮酸)羧化酶却也广泛地存在于 C₃ 植物之中^[8,13,19]。与碳素同化中的一些限速酶的活性相比,C₃ 植物中 PEP 羧化酶的活性仍然是可观的^[12]。因此,PEP 羧化酶在 C₃ 植物的碳代谢中的作用是不可忽视的。Winter(1974)^[19]指出:在 C₃ 植物(如小麦、大麦)中不同的绿色器官中,PEP 羧化酶的活性存在着显著差异。Anthomy(1976)^[4]进一步证明,在 C₃ 植物大麦中不仅具有高活性的 PEP 羧化酶,而且还测得¹⁴C 固定的最初产物是四碳酸—苹果酸,而不是 3—PEGA(磷酸甘油酸)。同时还观察到叶片中存在着较高活性的丙酮酸磷酸双激酶^[3]。我们的研究证明^[2],大豆不同器官中 PEP 羧化酶活性存在着很大差异该酶不仅能大量固定呼吸作用中所释放出来的 CO₂,同时还可通过 C₄ 途径进行光合碳同化。因此,在 C₃ 植物中 C₄ 途径的存在与否,也应该是高光效的标志。本文试图通过对大豆中 C₄ 途径有关酶类的研究,为大豆高光效育种提供理论依据。

材料和 方法

一、实验材料

大豆(*Glycine max* (L) merr.)品种(系)为京黄 3 号。75—34、诱处 4 号,其中京黄 3 号为对照品种。于四月二十日播种于本所植物园实验田内,在结荚期采集上部完全展开的第三叶供试验。

二、测定方法

RuBP 羧化酶和 PEP 羧化酶活性测定按 Ishii 等(1978)^[11]方法,并略有改进,用 LKB 1217 Racketa 液闪计数仪测定脉冲数,并计算酶活力。苹果酸酶活力的测定按照 Sayre 等^[18](1979)的方法,略有改进;丙酮酸磷酸双激酶活力测定按照 Andrews, A. K 等(1969)^[3]方法,略有改进,用日立—557 双波长双光束分光光度计测定,以每分钟 O. D.₃₄₀ = 0.01 为一个酶活力单位计算;可溶性蛋白质含量用考马斯亮兰 G—250 染料结合法^[6]测定,标准蛋白质为进口电泳纯牛血清蛋白。

结果与 讨论

一、不同品种(系)大豆 RuBP 羧化酶活性和 PEP 羧化酶活性

从表 1 可以看出,不同品种大豆其 RuBP 羧化酶活性和 PEP 羧化酶活性都存在着差异,其中大豆品种(系)75—34 和诱处 4 号的 RuBP 羧化酶活性和 PEP 羧化酶活性均比对照品种京黄 3 号分别高 32.52%、25.73%和 26.85%、29.77%。通过比较不同品种(系)间两种羧化酶活性的差异可以看出,京黄 3 号与 75—34 和诱处 4 号之间的 RuBP 羧化酶活性的 t 值分别为 24.347*** 和 19.178***,而 PEP 羧化酶活性的 t 值分别为 14.186*** 和 8.863***,表明它们之间的差异达到非常显著程度。

表1 不同品种大豆 RuBP 羧化酶活性和 PEP 羧化酶活性
Table 1 RuBPCase and PEPCase activities in various soybean varieties

品 种 Variety	RuBP RuBPCase			PEP PEPCase		
	$\mu\text{mole } ^{14}\text{CO}_2/\text{mg. pro. h.}$	%	75—34 诱处 4 号与京黄 3 号之间的 t 值 The t value between 75—34 or Youchu No. 4 and Jinghuang No. 3	$\mu\text{mole } ^{14}\text{CO}_2/\text{mg. pro. h.}$	%	75—34 诱处 4 号与京黄 3 号之间的 t 值 The t value between 75—34 or Youchu No. 4 and Jinghuang No. 3
京黄 3 号 Jinghuang No. 3	135.386 ±3.459	100		32.303 ±0.868	100	
75—34	179.425 ±1.548	132.52	24.347***	40.977 ±0.855	126.852	14.186***
诱处 4 号 Youchu No. 4	170.22 ±1.362	125.729	19.178***	41.918 ±2.597	129.765	8.863***

注:表中***为 P_{0.001}显著水平。
Note:*** is significant level of P_{0.001} in the Table.

二、不同品种(系)大豆苹果酸酶的活力

NAD(P)(辅酶 I (I))—苹果酸酶是 C₄—途径中的重要酶类,它使苹果酸转化为丙酮酸,后者经丙酮酸磷酸双激酶的催化产生 PEP。我们的研究证明,不同品种(系)大豆均含有较高活性的 NAD(P)—苹果酸酶(见表 2),但品种(系)间有差异,其中高光效大豆 75—34 和诱处 4 号的 NAD(P)—苹果酸酶活性比对照品种京黄 3 号分别高 49.06%、

表 2 不同品种大豆苹果酸酶的活性
Table 2 Malic enzyme activity in various soybean varieties

品 种 Variety	NADP—苹果酸酶 NADP—Malic Enzyme			NAD—苹果酸酶 NAD—Malic Enzyme		
	$\mu/\text{mg} \cdot \text{pro. min}$	%	75—34 诱处 4 号与京黄 3 号之间的 t 值 The t value between 75—34 or Youchu No. 4 and Jinghuang No. 3	$\mu/\text{mg} \cdot \text{pro. min}$	%	75—34 诱处 4 号与京黄 3 号之间的 t 值 The t value between 75—34 or Youchu No. 4 and Jinghuang No. 3
京黄 3 号 Jinghuang No. 3	3.176 ±0.166	100		6.938 ±0.086	100	
75—34	4.734 ±0.25	149.055	12.274***	9.141 ±0.167	131.253	16.649***
诱处 4 号 Youchu No. 4	5.668 ±0.091	178.463	14.205***	10.421 ±0.267	150.202	21.45***

注:表中***为 P_{0.001}显著水平。
Note:*** is significant level of P_{0.001} in the Table.

78.46%和 31.75%、52.20%。对酶活性的 t 值测试表明,它们之间的差异达到极显著程度。

三、不同品种(系)大豆丙酮酸磷酸双激酶活性的比较

丙酮酸磷酸双激酶是 C_4 —途径的专一性酶,它的作用在于使丙酮酸转化成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP),参与 C_4 —途径代谢。我们的研究证明,丙酮酸磷酸双激酶活性在不同品种(系)在大豆中有着明显的差异,尤以高光效品种(系)活性最大,如 75-34 和诱处 4 号的丙酮酸磷酸双激酶的活性分别是对照品种京黄 3 号的 2.9 倍和 3.5 倍(表 3)。

表 3 不同品种大豆丙酮酸磷酸双激酶的活性

Table 3 Pyruvate phosphate dikinase activity in various soybean varieties

品 种 Variety	U/mg. pro. min.	%	75-34 诱处 4 号与京黄 3 号之间的 t 值 The t value between 75-34 or Youchu No. 4 and Jinghuang No. 3
京黄 3 号 Jinghuang No. 3	39.92 0.981	100	
75-34	116.802 0.854	292.59	126.538***
诱处 4 号 Youchu No. 4	140.376 1.10	351.164	147.197***

注:表中***为 $P_{0.001}$ 显著水平

Note: *** is significant level of $P_{0.001}$ in the Table.

上述结果表明,在大豆叶片中,不仅具有与 CO_2 固定有关的 RuBP 羧化酶和 PEP 羧化酶,同时还存在着将苹果酸转化成丙酮酸的 NAD(P)—苹果酸酶和将丙酮酸转化成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的丙酮酸磷酸双激酶。此外,我们的研究还证明,在大豆叶片中, NAD—苹果酸脱氢酶的活性也很高^[2],该酶催化草酰乙酸(OAA)转化成苹果酸,而且还是决定 TCA(三羧酸)环运转速度的控制点之一^[7]。至此,我们认为在大豆叶片中具有一个完整的 C_4 循环系统(PEP 羧化酶 $\rightarrow C_4$ 酸脱羧 \rightarrow PEP 再生),这个系统的存在标志着绿色细胞有可能通过“ CO_2 泵”的方式提高光合碳循环的 CO_2 浓度,使 RuBP 羧化酶的催化方向朝着有利于碳水化合物形成的方向运转。我们曾指出^[2], C_3 植物中活跃的 CO_2 β -羧化作用至少具有两方面的功能,一是象 C_4 植物那样通过 C_4 —途径固定大气中的 CO_2 ,尽管这种作用比较弱,另一是重新固定呼吸作用所释放出来的 CO_2 ,减少 CO_2 的流失,提高碳素的累积。

综上所述,不同品种(系)大豆中确实存在着 C_4 循环系统,而且在高光效品种(系)中,该系统中的几个关键性酶的活性明显高于低光效品种(系)。高光效品种(系)不仅 RuBP 羧化酶活性高,同时参与 CO_2 β -羧化作用的 PEP 羧化酶及其有关酶类的活性也很高,从而使两者的羧化功能有机地结合起来,大大提高总的光合效率。所以,有可能通过对 C_4 —途径变异株的筛选,获得高光效大豆种质。具有这些特性的品种不仅光合效率高,而且抗逆能力也强。

参 考 文 献

- [1] 郝乃斌等, 1989, 大豆科学, 8(3), 283~286
- [2] 郝乃斌等, 1991, 植物学报, 33(9), 692~697
- [3] Andrews, A. K. and H. D. Hatch, 1969, Properties of mechanism of action of pyruvate Pi dikinase from leaves, Biochem. J., 114, 117~125
- [4] Anthomy, R. N. and C. M. Duffus, 1976, Evidence for C_4 Photosynthesis in Barley pericarp tissue, Biochem. Biophys. Res. Comm., 70, 1198~1230
- [5] Bjorbmman, O., 1976, In CO_2 metabolism and plant productivity (R. H. Burris and C. C. Black, eds.) 287~309. University Park Press Baltimore
- [6] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248~254
- [7] Chapman, E. A., and D. Graham, 1974, The effect of light on the TCA Cycle in green leaves. I Intermediary metabolism and the location of control points. Plant Physiol., 53: 886~892
- [8] Davida Shomer-Ilan and Y. Waisel, 1973, The effect of sodium chloride on the balance between the C_3 - and C_4 -Carbon fixation pathways. Physiol. Plant, 29: 190~193
- [9] Evans, T. R., 1986, Planta, 167: 351~358
- [10] Hesketh, J. D. et al., 1981, Photosyn. Res., 2: 21~30
- [11] Ishii, R., M. Samejima and Y. Murara, 1978, Photosynthetic $^{14}CO_2$ fixation in the leaves of rice and some other species. J. Crop Sci., 46: 97~102
- [12] Kelly, G. J. and E. Latzko, 1977, Chloroplast phosphofructokinase, Plant Physiol., 60: 290~294
- [13] Latzko, E. and G. T. Kelly, 1983, The many-faced function of PEPC in C_3 plant. Physiol. Veg., 21: 805~815
- [14] Loza-Tavera, H. et al., 1987, Can J. Bot., 65: 607~611
- [15] Murthy, K. K. and M. Singh, 1979, J. Agric. Sci., 93, 7~11
- [16] Ogren, W. L., 1976, World Soybean Research, 9: 253~261
- [17] Peet, M. M., et al., 1977, Crop Sci., 17: 287~293
- [18] Sayre, R. T. and R. A. Kennedy, 1979, Plant Physiol., 64: 293~299
- [19] Winter, K., 1974, Planta, 121: 147~153

STUDY ON THE PHOTOSYNTHETIC CHARACTERS OF THE HIGH PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY SOYBEAN

VI. AN APPROACH TO C—CARBON FIXATION PATHWAYS OF THE HIGH PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY SOYBEAN

Ge Qiaoying Hao Naibin Zhang Qide

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044*)

Lin Jianxing Zhang Xingtian

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100012*)

Du Weiguang Zhang Guiru

(*Institute of Soybean Science, Agricultural Academy of
Heilongjiang province, Harbin 150086*)

Abstract

PEPC and relevant enzymes in three soybean varieties (or strain) were studied. The experimental results are summarized as follows:

1. PEPC activity of leaves in 75—34 and Youchu No. 4 were evidently higher than in Jinghuang No. 3.

2. NAD(P)—malic enzymes activity of leaves in 75—34 and Youchu No. 4 are also higher than those in Jinghuang No. 3.

3. Pyruvate—Pi—dikinase activity of leaves in 75—34 and Youchu No. 4 was 192.5% and 251.16% higher than that in Jinghuang No. 3 respectively.

The above results indicate that active CO_2 β -carboxylation took place in the C_3 —plant, thereby, this is useful to increase the photosynthetic efficiency.

Key words Ribulose biphosphate carboxylase; Phosphoenolpyruvate carboxylase; Photosynthetic efficiency; C_4 —pathway