

转 *PEPC* 基因水稻花粉株系不同生育期的光合生理表现

张边江¹, 凌丽俐², 周 峰¹, 陈全战¹, 华 春¹, 周泉澄¹, 焦德茂³

(1. 南京晓庄学院, 江苏 南京 211171; 2. 西南大学 柑橘研究所, 重庆 400712; 3. 江苏农业科学院, 江苏 南京 210014)

摘要:以父本转玉米 *PEPC* 基因水稻、母本粳稻 9516 和杂交后代稳定的花粉株系 JAAS45 为材料, 研究了 JAAS45 及其亲本的不同生育期的光合色素含量、净光合速率和水分利用效率。结果表明: 分蘖期以后, 杂交后代 JAAS45 的单位叶面积 Chl 含量超过母本 9516, 并一直维持着较高水平, 与 PC 相近。在整个生育期, JAAS45 和 PC 的叶绿素 a/b 一直高于 9516。JAAS45 苗期的净光合速率(P_n)与 9516 相近, 而到了分蘖期, 其 P_n 超过了 9516, 尤其到了抽穗及灌浆期, 其 P_n 还超过了 PC。从苗期到抽穗期, JAAS45 的水分利用效率(WUE)与 PC 相接近, 明显高于 9516。这些结果说明, JAAS45 具有较高的光合能力和水分利用效率, 与父本 PC 相似。通过转 *PEPC* 基因水稻和杂交稻的亲本杂交, 可将玉米 *PEPC* 基因转移到普通水稻品种中, 培育出高光合效率和高产的水稻品系。

关键词:水稻; *PEPC* 基因; 净光合速率; 水分利用效率

中图分类号:S511.01 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)01-0184-05

Photosynthetic Performance of Transgenic Rice with Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene during Different Developmental Stages

ZHANG Bian-jiang¹, LING Li-li², ZHOU Feng¹, CHEN Quan-zhan¹,
HUA Chun¹, ZHOU Quan-cheng¹, JIAO De-mao³

(1. Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China; 2. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; 3. Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: F_1 hybrids were obtained by crossing *PEPC* transgenic rice germplasm as male parent with *Japonica* rice cultivar 9516. Processed with the cultivation of pollen lines, selection by photosynthetic characteristic and enzyme activity, and systematic reselection and re-identification of three generations, stable JAAS45 pollen lines of pure-bred diploid plants were achieved. The content of photosynthetic pigment, net photosynthetic rate and water use efficiency of JAAS45 and its parents were investigated in this paper. After tillering stage, chlorophyll contents were higher than 9516, and retained a much higher level close to PC. From seeding to heading period, the chl a/b ratio of JAAS45 and PC were higher than that's of 9516. The net photosynthetic rate(P_n) of JAAS45 approximated that of 9516 at the seeding stage, but it exceeded 9516 at tillering stage, which was even higher than PC at heading and filling stage. From seeding to heading period, water use efficiency of for JAAS45 was evidently higher than 9516, whereas close to PC. These results suggested that the photosynthetic characteristics of JAAS45 exhibited higher photosynthetic capacity and water use efficiency, which was similar with that's of the male parent PC. By crossing *PEPC* transgenic rice germplasm as male parent with the hybrid male of *japonica* rice, the *PEPC* transgenic rice can be utilized in transferring the maize *PEPC* gene into the common rice genome and also useful in the breeding of new rice cultivars with high photosynthetic efficiency and high yield.

Key words: Rice; Phosphoenolpyruvate carboxylase(*PEPC*) gene; Net photosynthetic rate; Water use efficiency

收稿日期:2011-10-07

基金项目:江苏省教育厅高校自然基金项目(08KJD180012);南京晓庄学院生态学重点学科(2005NXY01);南京晓庄学院博士启动基金项目(2010XZRC04)

作者简介:张边江(1979-),男,江苏东海人,副教授,博士,主要从事作物生理研究。

PEPC(Phosphoenolpyruvate carboxylase) 是 C_4 途径的最初固定 CO_2 的酶, 不仅存在于 C_4 植物中, 也广泛存在于 C_3 植物中。Hermans^[1] 发现, C_4 植物 PEPC 基因与 C_3 植物 PFPC 基因有 71% 的同源性, 由于表达不同, 所以活性高低不同。Matsuoka 和 Yamamoto^[2] 与 Ku 等^[3] 比较了 C_4 植物玉米和 C_3 植物水稻叶内 PEPC 的基因构造和核苷酸序列, 发现二者具有相似同源性, 启示 C_4 植物光合关键酶 PEPC 可在 C_3 植物水稻实现高表达, 从而提高水稻的光合效率。随着转基因技术的进步, Ku 等^[4] 成功地将玉米 C_4 光合途径的关键酶 PEPC 基因导入 C_3 植物水稻中, 并获得了高表达的转基因植株, 进一步研究发现, 转 PEPC 基因水稻在高光高温条件下, 不但光合能力和抗光氧化特性较原品种大大增强, 且产量也增加 14% ~ 22%^[5], 并获得了稳定种质^[6]。王超、任承刚分别与李霞^[7-8] 发现转玉米 PEPC 基因水稻在高光强下叶绿体结构稳定, 具体有较高的光合生产力。但由于转玉米 PEPC 基因水稻受体为日本粳稻品种 Kitaake, 生育期短(在南京种植全生育期仅 90 d), 农艺性状较差, 在我国直接应用受到限制。

通过常规育种方法培育农艺性状优良且具有高 PEPC 活性的稳定材料, 存在育种周期长、生理测定量大等缺点, 影响了育种效率^[9-10]。而花药培养具有快速稳定杂种配子遗传组成的优点, 已广泛应用于我国水稻遗传改良。将转 PEPC 基因水稻和 9516 杂交后再进行花粉培养, 得到了 JAAS45 花粉株系^[11], 但未对其杂交后代整个生育时期的光合生理特性进行研究。本研究以杂交后代 JAAS45 及其亲本为材料, 分析不同生育期的光合色素含量、净光合速率和水分利用效率, 为转 PEPC 基因水稻植株的利用提供生理依据和水稻高光效生理育种提供新途径。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以 9516 为母本、PC 为父本进行人工杂交, 得到的 F_1 通过花药培养(F_1 重组配子加倍), 再进行 PEPC 酶活和光合速率的测定, 鉴定出 3 个高 PEPC 活性和光合速率的株系: H45、H119 和 H137。将 H45 经过 4 年的定向筛选和监测, 现已筛选得到稳定的二倍体花粉株系, 暂定名为 JAAS45^[7]。将 9516 和 JAAS45 材料在南京进行盆栽试验, 种子用 0.1% $HgCl_2$ 消毒 10 min, 5 月初播种, 6 月初移栽, 每个材料栽 20 盆, 每盆 5 穴, 每穴 1 苗。PC 材料 5

月初开始每隔 10 d 播种一期, 直到 6 月中旬, 每期栽种 5 盆, 每盆 5 穴, 每穴 1 苗。以上材料在自然温度光照条件下按常规管理。

1.2 方法

1.2.1 PEPC 酶活性测定 在水稻抽穗期, 取水稻剑叶叶片 2 g 在 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.8, 10 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L DTT, 2% PVP(W/V) 和 10% 甘油) 中冰浴研磨, 8 层纱布过滤后, 将滤液于 4℃ 10 000 × g 离心 20 min, 弃沉淀, 上清液即为酶液。 C_4 光合酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC) 参照 Gonzalez 等^[12] 的方法测定。

1.2.2 叶绿素含量的测定 叶绿素含量测定参照 Wellberum 等的方法^[13]。取叶片用直径为 0.50 cm 的打孔器打孔, 取 5 片叶圆片置于 10 mL 的容量瓶中, 用 96% 乙醇置于黑暗环境中进行叶绿素浸提, 等叶片全部变白后, 再用分光光度计在 665 nm 和 649 nm 处读取 OD 值, 计算叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a + b 含量和叶绿素 a/b 值。

1.2.3 叶片光合速率的测定 在各个生育期选择晴朗无云的天气, 用 CIRAS-2 型便携式光合气体分析系统测定叶片从早晨到傍晚的净光合速率(P_n) 和蒸腾速率(E) 的日变化曲线。水分利用效率(WUE) 的计算为: $WUE = P_n/E$ 。

2 结果与分析

2.1 JAAS45 与父母本 PEPC 酶活性及其净光合速率

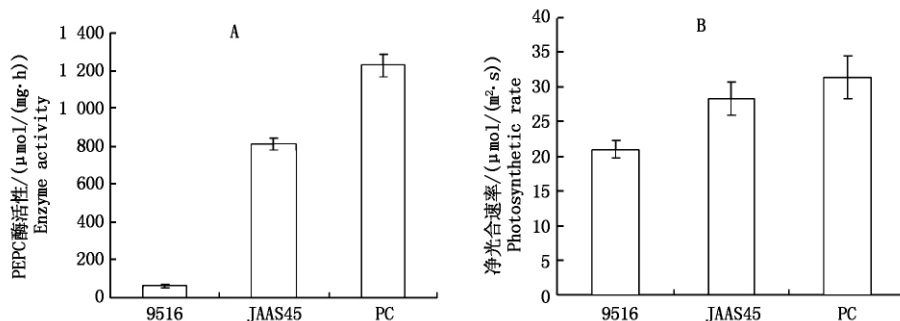
玉米 PEPC 基因转入水稻后会导致 PEPC 活性的提高, 父本 PC 水稻的 PEPC 活性为母本粳稻 9516 的 24.9 倍。通过杂交 F_1 经花药培养选育得到的 JAAS45 PEPC 活性高于母本 18 倍(图 1-A)。PEPC 基因导入后饱和净光合速率进一步提高, JAAS45 的光合速率更偏向于 PC 父本(图 1-B)。由此说明, JAAS45 高表达了 C_4 酶 PEPC, 使得水稻的光合速率有所提高。

2.2 JAAS45 与父母本不同生育期叶绿素含量的变化

从图 2-A 可以看出, 在苗期, JAAS45 与父母本的单位叶面积 Chl 含量没有显著的差别, 只是 9516 的略高于 JAAS45 和 PC。当植株发育到分蘖期, 转基因水稻 PC 及杂交后代 JAAS45 的优势开始显现, 此时期以 PC 为最高, 而 JAAS45 接近 PC。到抽穗期时, JAAS45 与 PC 的优势得以充分展现, 此时, 它们的叶绿素含量显著高于 9516(图 2-A)。在灌浆期时, PC 和 JAAS45 仍维持着较高的叶绿素含量。

JAAS45 及 PC 的 Chla/b 值在苗期和分蘖期都比 9516 高,但三者 在抽穗期和灌浆期的 Chla/b 值无

显著差别(图 2-B)。



JAAS45 示 JAAS45 花粉株系, PC 示父本转 PEPC 基因水稻种质, 9516 示母本粳稻 9516。

JAAS45. The forth generation of JAAS45 pollen lines; PC. PEPC transgenic rice as male parent; 9516. sp. Japonica rice cv. 9516 as female parent.

图 1 JAAS45 与父母本 PEPC 酶活性及其净光合速率

Fig. 1 The PEPC activity and net photosynthetic rate in 9516, JAAS45 and PC

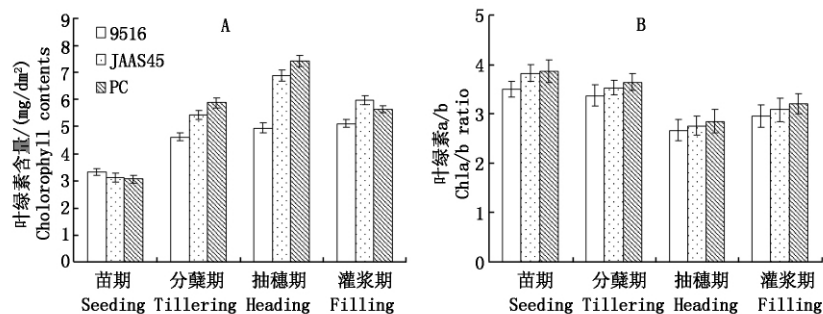


图 2 JAAS45 与父母本不同生育期叶绿素含量的变化

Fig. 2 Chlorophyll contents of JAAS45 and its parents during different developmental stages

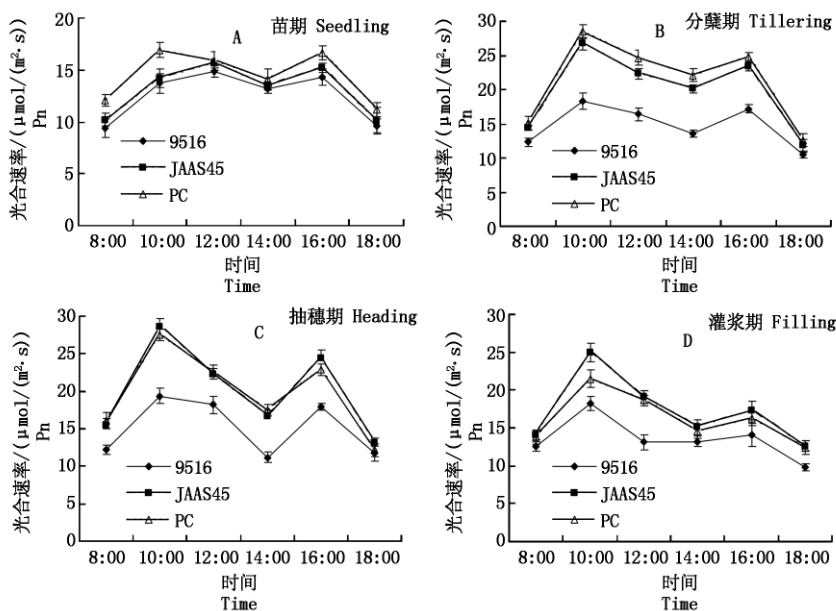


图 3 JAAS45 与父母本不同生育期净光合速率的日变化

Fig. 3 Daily changes of Pn of the rice during different developmental stages

2.3 JAAS45 与父母本不同生育期净光合速率的日变化

在苗期, 父本 PC 叶片的光合作用日进程始终高于 JAAS45 和 9516, 而 JAAS45 与母本 9516 相接近(图 3-A)。到分蘖期, 水稻进入旺盛生长阶段,

JAAS45 与亲本的 Pn 都较苗期有大幅度的提高, 并且 Pn 日变化呈双峰曲线(图 3-B)。PC 和 JAAS45 光合作用日进程要比 9516 高得多, 且 JAAS45 的 Pn 接近于 PC。在抽穗期, Pn 日变化仍呈双峰曲线, JAAS45 的光合作用略高于 PC(图 3-C)。灌浆期

JAAS45 的光合作用日进程高于 PC, 且 P_n 仍处于较高值。在整个生育期中, 除苗期外, JAAS45 的光合日进程始终高于 9516, 接近父本 PC, 这可能是由于 PEPC 的导入, 而致使其具有较强的光合能力。

2.4 JAAS45 与父母本不同生育期水分利用效率的日变化

WUE 表示消耗单位水分所能够固定的 CO_2 的量。从图 4-A 看出, 除了 8:00 和 14:00 外, 其余时间 JAAS45 苗期的 WUE 均略高于 9516。与苗期相

比, 分蘖期 JAAS45 和 PC 的 WUE 都有大幅度的提高(图 4-B), 它们的 WUE 除了 14:00 以后与 9516 差别不大外, 在其他的时间都要明显高于 9516。可见, 随着生长发育阶段的推进和群体的增大, JAAS45 的 WUE 表现出明显的优势, 与 PC 相接近。在抽穗期 JAAS45 剑叶的 WUE 除了在 14:00 与 9516 较为接近外, 在其他时间, 都要明显高于 9516, 并且在 16:00 以后超过了 PC(图 4-C)。到了灌浆期 JAAS45 的 WUE 仍能保持着较高的水平。

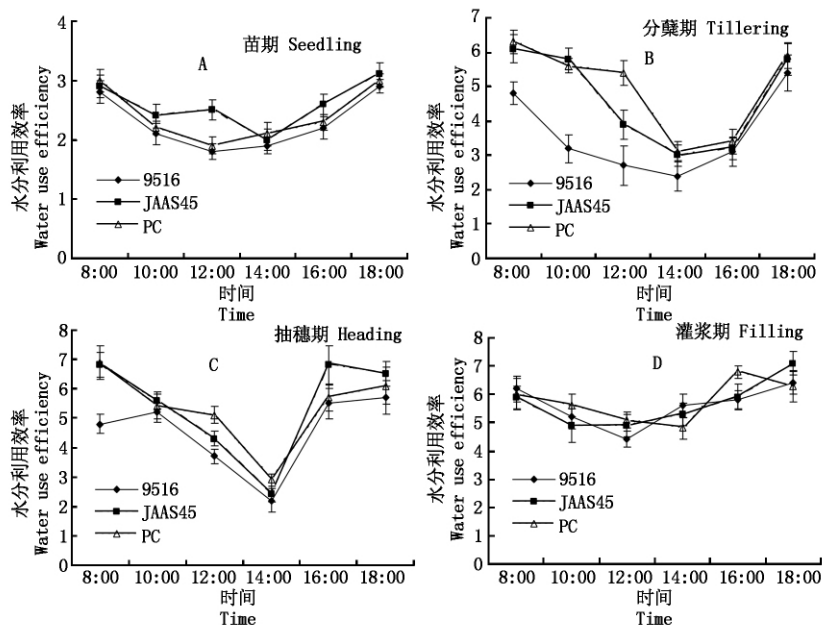


图 4 JAAS45 与父母本不同生育期水分利用效率的日变化

Fig. 4 Daily changes of water use efficiency of the rice during different developmental stages

3 讨论

光合色素尤其叶绿素, 在植物的光合作用中对光能的吸收、传递和转化起着极为重要的作用。JAAS45 的单位叶面积叶绿素含量随着发育进程逐渐上升并超过 9516, 表明它在植株旺盛生长阶段和生长发育后期能够捕获更多的光能供光合器官利用, 有利于光合作用的高效进行, 促进干物质的积累。Chla 和 Chlb 都是光合膜的组成部分, 其比值 (Chla/b) 一般在 3 左右^[14]。在各个生育期, JAAS45 与父本 PC 都具有较高的 Chla/b 值, 表明它们具有相对较高的 Chla 含量, 能够更有效地将太阳光能转化为生物化学能, 为碳同化提供更充足的能量来源, 以维持光合作用的高效运转。同时, 较高的 Chla/b 值也说明它们具有相对较低的 Chlb 含量, 这对于避免因吸收过量光能而导致光抑制具有重要意义。

植物干物质的 90% 以上来自光合作用, 而禾谷类作物产量的 60% ~ 100% 来自抽穗期的光合作用^[15]。因此, 作物的光合作用, 尤其是抽穗灌浆期

的光合作用是决定作物产量的一个至关重要的因素。从图 3 可以看出, 苗期、分蘖期和抽穗期, JAAS45 的 P_n 都高于 9516。苗期和分蘖期较高的 P_n , 有利于干物质的积累, 为植株的形态建成、健壮生长和群体的发展以及后期的生长发育奠定良好的物质基础。而抽穗期和灌浆期剑叶较高的 P_n , 则可以为籽粒的生长发育提供充足的物质供应, 是籽粒充实的物质来源。已有的研究结果表明, 在没有其他胁迫因素存在时, 光合作用的光抑制至少能造成光合碳同化降低 10%^[16]。本研究中看到, JAAS45 在各个时期的午间强光条件下都表现出比 9516 较优的光合能力(图 3), 表明它具有更强的抗光抑制能力, 这同样对于其干物质的积累具有重要意义。此外, 从 4 个不同生育期 WUE 的变化(图 4)可以看出, 在整个生育期, JAAS45 一直高于 9516, 尤其是在分蘖期和抽穗期, 这对于节约水资源具有十分重要的意义。JAAS45 具有较高的 WUE, 有利于减少稻田水分消耗, 节约农业用水。

本研究显示, 在整个生育期, JAAS45 具有与转

PEPC 基因水稻类似的光合生理表现,看来转 PEPC 基因水稻的 C_4 光合特性可以转移到我国常规稻中去,用转 PEPC 基因水稻和杂交稻的亲本杂交,结合花粉培育技术,可为我国超高产育种服务,这种常规育种和生物技术相结合的方法是值得重视的一条途径。

参考文献:

- [1] Hermans J, Westhoff P. Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in *Flaveria trinervia* (C_4) and *F. pringlei* (C_3) [J]. Mol Gen Genet, 1990, 224: 459–468.
- [2] Matsuoka M, Minami E. Complete structure of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from maize [J]. Eur J Biochem, 1989, 181: 593–598.
- [3] Ku MSB, Kano-Murakami Y, Matsuoka M. Evolution and expression of C_4 photosynthesis genes [J]. Plant Physiol, 1996, 111: 949–957.
- [4] Ku M S B, Sakae A, Mika N, et al. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 76–80.
- [5] 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 等. 转 PEPC 基因水稻的光合 CO_2 同化和叶绿素荧光特性 [J]. 科学通报, 2001, 46(5): 414–418.
- [6] 凌丽俐, 林宏辉, 焦德茂. 转 PEPC 基因水稻种质的稳定光合生理特性 [J]. 作物学报, 2006, 32(4): 527–531.
- [7] 任承刚, 李霞. 外源 H_2O_2 对孕穗期转 C_4 PEPC 水稻及原种光合特性的影响 [J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 130–135.
- [8] 王超, 李霞. 高光强下转玉米 PEPC 基因水稻和未转基因水稻秧苗叶片超微结构的比较 [J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 99–103.
- [9] 王德正, 焦德茂, 吴爽, 等. 转玉米 PEPC 基因的杂交水稻亲本的选育 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(10): 1165–1170.
- [10] 王德正, 王守海, 吴爽, 等. 玉米 PEPC 基因在杂交转育的转基因水稻后代中的传递和表达特征 [J]. 遗传学报, 2004, 31(2): 195–201.
- [11] 李霞, 高东迎, 迟伟, 等. 转玉米 PEPC 基因水稻株系 JAAS45 的选育路径与技术 [J]. 江苏农业学报, 2005, 21(1): 12–16.
- [12] 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.
- [13] Wellberum A R, Lichtenthöaler H. Formulae and program to determine total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents [M]//Sybesma C. Advances in Photosynthetic Research. Martinus Nijhoff: Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster, 1984, vol. II: 9–12.
- [14] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes [J]. Methods in Enzymology, 1987, 148: 351–383.
- [15] Khan M N A, Murayama S, Ishimine Y, et al. Physio-morphological studies of F_1 hybrids in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Production Science, 1998, 1: 233–239.
- [16] Long S P, Humphries S, Falkowski P G. Photoinhibition of photosynthesis in nature [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1994, 45: 633–662.