

转玉米 *pepc* 基因水稻的某些光合特性

何立斌^{1,2,*} 李平^{1,**} 向珣朝¹ 李季航¹ 张楷正¹

¹ 四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130; ² 合肥丰乐种业股份有限公司, 合肥 230031

摘要 测定转玉米 *pepc* 基因水稻和未转化粳稻品种 Kitaake 在分蘖初期、分蘖盛期、拔节期、始穗期、齐穗期、成熟期和剑叶不同生长时期的光合特性动态变化的结果表明: 转玉米 *pepc* 基因水稻的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)活性和净光合速率(P_n)在不同时期各不相同, 相对于 Kitaake 而言, 均有不同程度的提高; 剑叶完全展开时的 PEPCase 活性和 P_n 提高最明显。

关键词 水稻; 玉米 *pepc* 基因; 高光效育种; 光合生理特性; 动态研究

Some Photosynthetic Characteristics in Transgenic Rice with Maize Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene (*pepc*)

HE Li-Bin^{1,2,*}, LI Ping^{1,**}, XIANG Xun-Chao¹, LI Ji-Hang¹, ZHANG Kai-Zheng¹

¹Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130, China; ²Hefei Fengle Seed Co. Ltd, Hefei 230031, China

Abstract The dynamics of photosynthetic characteristics in leaves of transgenic rice plants with maize phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*pepc*) and untransformed rice cv. "Kitaake" were determined at initial-tillering stage, full-tillering stage, jointing stage, begin-heading stage, heading stage, maturing stage and six different growing stages of flag leaves. The results indicated that the levels of PEPCase activity and the net photosynthesis rate (P_n) of transgenic rice increased to some extent as compared with untransformed rice at during whole development stages. It proved that the maize *pepc* in transgenic rice had been expressed. The PEPCase activity and the P_n of transgenic rice expressed highest at flag leaf complete outspreading.

Key words rice; maize *pepc*; high photosynthetic efficiency breeding; photosynthetic characteristics; dynamic study

一般认为, 现有水稻高产品种的光能利用率为 1.0%~1.5%, 其理想的光能利用率为 3%~5%^[1]。如何提高 C₃ 植物的光合效率, 人们曾尝试用同室效应筛选 C₃ 与 C₄ 植物^[2]或 C₄ 与 C₃ 植物杂交^[3]等途径, 期望能将 C₄ 植物的高光合速率、低光呼吸等优良的光合特性导入 C₃ 植物中以提高 C₃ 植物的光合效率。多年来, 已经明确属内 C₄ 光合特性可在 C₃ 植物中传递, 但 C₄ 玉米和 C₃ 水稻杂交方法并未能获得预期效果^[4]。近年来, 随着生物技术的发展, 解决这一问题有了可能。有研究表明 C₄ 光合作用的关键不在于它的 Kranz 解剖结构, 而是控制 C₄ 途径中的关键性酶^[5]。Ku 等^[6]采用农杆菌介导系统, 已经成功地 将玉米 C₄ 途径中促进 CO₂ 固定的关键酶——磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCase)基因导入 C₃ 植物水稻粳稻品种 Kitaake 中, 并得到相当或高于玉米的表达水平。焦德茂^[7]、李霞等^[8]和王

德正等^[9]曾研究过转 *pepc* 基因水稻的光合特性, 但这类的研究多数是针对转玉米 *pepc* 基因水稻孕穗期或抽穗期的某个特定的生长时期进行的, 而对其整个生育时期的光合特性的研究未见报道。本文就转玉米 *pepc* 基因水稻的几个关键生长时期的光合特性做了研究, 希望能进一步揭示控制 C₄ 植物光合作用的关键酶 *pepc* 基因在导入 C₃ 植物水稻后的光合生理特性变化, 以供水稻高光效育种参考。

材料与方法

转 *pepc* 基因水稻由江苏农科院遗传生理研究所焦德茂先生提供。转 *pepc* 水稻的原始受体材料

收稿 2004-09-24 修定 2004-12-27

资助 国家“863”计划(2003AA212030)。

*E-mail: ricehlb@163.com, Tel: 028-82741635

** 通讯作者(E-mail: liping@cngk.com, Tel: 028-82741177)。

是日本北海道的粳稻(*Oryza sativa* L.)品种Kitaake。实验于四川温江四川农业大学水稻研究所试验基地进行, 4月21日播种, 三叶期时移栽于盆钵中, 每盆栽插2株, 共36盆, 同于大田管理。

PEPCase活性测定参照Kung等^[10]和Gonzalez等^[11]的方法。上午9:30~10:00, 取不同生长时期主茎的倒数第二叶和剑叶不同时期的剑叶0.25 g, 加入适量提取液[50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5)、1 mmol·L⁻¹ MgCl₂、5 mmol·L⁻¹ DTT、5% 甘油], 在冰冻条件下迅速充分研磨, 滤液以13 000×g离心10 min, 取上清液测酶活性。反应总体积1 mL, 含50 mmol·L⁻¹ HEPES-KOH (pH 8.0) 缓冲液、10 mmol·L⁻¹ NaHCO₃、5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol·L⁻¹ NADH、2 mmol·L⁻¹ 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、1.5 U 苹果酸脱氢酶, 加适量提取液。加入PEP开始计时, 在754紫外分光光度计上记录波长340 nm处光密度变化, 测试温度为30℃, 据此计算PEPCase活性。测定时期有: 分蘖初期、分蘖盛期、拔节期、始穗期、齐穗期及成熟期和剑叶生长的不同时期, 每个时期分别测定5株。其中, 剑叶不同时期的测定是从剑叶完全展开时开始, 每隔7 d测定1次, 到第35天为止。

净光合速率(P_n)测定用美国LI-COR公司生产的便携式光合测定系统LI-6400, 于早上10:00左右进行, 人工控制条件为: CO₂浓度400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 30℃, 光照度1 200 $\mu\text{mol}(\text{光子})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 测定不同生长时期主茎的倒数第2叶的 P_n 以及剑叶在不同时期的 P_n 。测定时期与PEPCase活性测定同步, 每个时期测定5株, 每株重复测定3次。

实验结果

1 转 $pepc$ 基因水稻和粳稻品种Kitaake不同生育期PEPCase活性和 P_n 的比较

从图1可见:

(1) 转 $pepc$ 基因水稻的PEPCase酶活性在6个时期都显著高于Kitaake, 以拔节期PEPCase活性最高, 成熟期最低。6个生育期中, 转 $pepc$ 基因水稻的PEPCase活性分别是Kitaake的4.47~25.26倍, 其中齐穗期提高的幅度最大, 而成熟期相对提高的幅度最小(图1-a)。这说明转 $pepc$ 基因工程有可能成为提高水稻光合能力的一条有效的生物技术途径。

(2) 转 $pepc$ 基因水稻的 P_n 由分蘖初期逐渐上

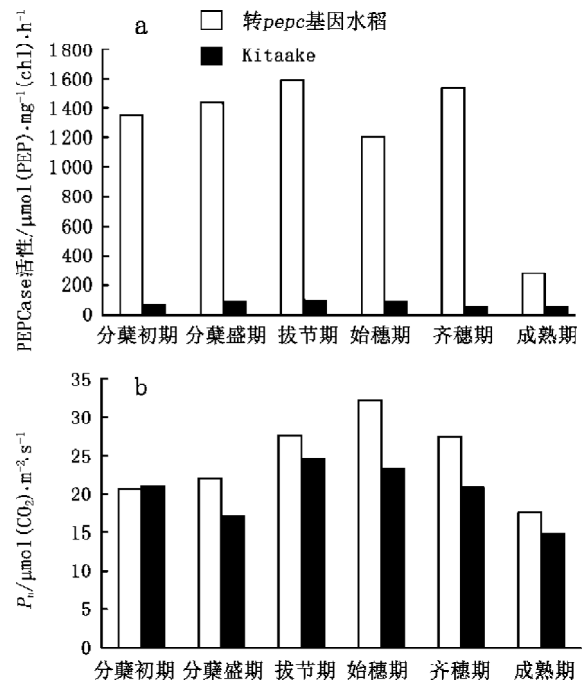


图1 不同生育期的转 $pepc$ 基因水稻和粳稻品种

Kitaake的PEPCase活性和 P_n

Fig. 1 The PEPCase activities and the P_n of the transgenic rice and cv. Kitaake at different development stages

升, 始穗期最大, 然后逐渐下降; Kitaake的 P_n 则是从分蘖盛期才逐渐上升, 拔节期最大, 然后逐渐下降。转 $pepc$ 基因水稻的 P_n 除了分蘖初期外, 其余时期均高于Kitaake, 这与李霞等^[8]报道转 $pepc$ 基因水稻在生育后期 P_n 比Kitaake提高50%的结果相似(图1-b)。

2 转 $pepc$ 基因水稻和粳稻品种Kitaake剑叶不同时期光合生理特性的比较

水稻籽粒中2/3以上的干物质是开花后通过光合作用获得的^[12], 而水稻最后3片称为功能叶的在产量形成中最重要, 三者之中又以剑叶的功能最为突出。图2显示:

(1) 转 $pepc$ 基因水稻从剑叶完全展开时到展开后35 d内的PEPCase活性均显著高于Kitaake, 其变化趋势为: 剑叶完全展开时PEPCase活性最大, 然后下降, 21 d后又骤然上升, 28 d后才逐渐下降, 呈现波动变化态势(图2-a)。

(2) 转 $pepc$ 基因水稻和Kitaake在剑叶完全展开时的 P_n 均最大, 随后均呈波浪式的下降, 转 $pepc$ 基因水稻波动幅度明显小于Kitaake。但转 $pepc$ 基因水稻剑叶从完全展开至展开后35 d内的 P_n 均

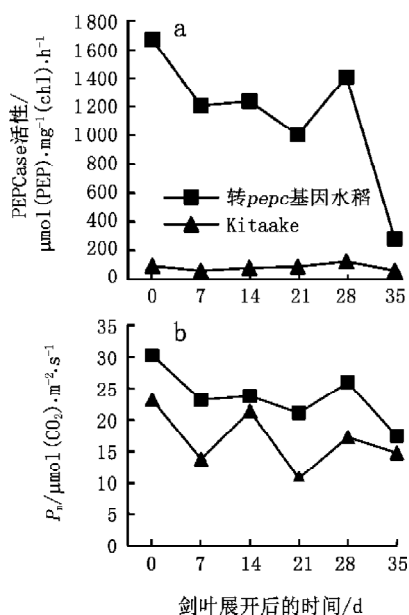


图2 剑叶生长不同时期转 $pepc$ 基因水稻和粳稻品种 Kitaake 的 PEPCase 活性和 P_n

Fig. 2 The PEPCase activities and the P_n of the transgenic rice and cv. Kitaake at different growing stages of flag leaves

比 Kitaake 的高 (图 2-b)。这显示通过转 $pepc$ 基因生物技术途径可以提高水稻的光合速率。

讨 论

Ku 等^[6]通过农杆菌介导系统, 曾获得了高表达的高光合效率的转 $pepc$ 基因水稻。焦德茂^[7]和李霞等^[8]在选育该转 $pepc$ 基因水稻中获得了第7代稳定种质, 他们的后续研究结果表明转 $pepc$ 基因水稻在孕穗或抽穗期的 PEPCase 活性比 Kitaake 高 24 倍, P_n 比 Kitaake 高 50%。本文测定几个生育关键时期转 $pepc$ 基因水稻和 Kitaake 光合生理特性的结果表明, 转 $pepc$ 基因水稻在分蘖初期、分蘖盛期、拔节期、始穗期、齐穗期及成熟期 6 个时期和剑叶不同生长时期的 PEPCase 活性各不相同, 但均显著高于 Kitaake, 转玉米 $pepc$ 基因水稻的 PEPCase 活性在拔节期和剑叶完全展开时得到最充分的表达, 齐穗期活性提高的幅度最大。相应地, 转玉米 $pepc$ 基因水稻的 P_n 除分蘖初期相近以外, 其它 5 个时期和剑叶不同生长时期均比 Kitaake 高, 剑叶完全展开时最大。 C_3 作物中仅导入一个玉米的 $pepc$ 基因就能显著提高水稻几个主要生育时期的光合速率, 其在水稻中的表达机制和稻生长不同时期的玉米 $pepc$ 基因表达运行机

制, 都值得深入研究。

季本华等^[13]研究认为, Kitaake 叶片中具有一个原初的和有限的 C_4 光合微循环, 外源 $pepc$ 基因导入 Kitaake 后, 可大幅度提高 C_4 光合微循环, 而水稻中 C_4 光合微循环的增强可以降低光呼吸速率, 因而有利于提高 P_n 。本文在 Kitaake 生长的几个关键时期, 也都或多或少测定到一定水平的 PEPCase 活性, 而导入 $pepc$ 基因后其 PEPCase 活性和 P_n 即明显提高。这种用基因工程创造的新种质是否有类似初级的 C_3 ~ C_4 中间型的某些生理表现^[14], 也待研究。

此外, 转玉米 $pepc$ 基因水稻不同生育时期的光合生理特性不尽相同, 这启示我们筛选高光效育种材料时应尽量在 PEPCase 活性和 P_n 等光合指标达到最大时进行比较好。从本文结果来看, 剑叶完全展开时的转玉米 $pepc$ 基因水稻, 其 PEPCase 活性和 P_n 均最高, 因而在这一时期测定高光效材料的各种光合生理指标的效果可能较理想。

参考文献

- 邱国雄. 植物光合作用的效率. 见: 余叔文主编. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1992. 236~243
- Menz KM, Moss DM, Cannel RQ et al. Screening for photosynthetic efficiency. *Crop Sci*, 1969, 9: 692~694
- Björkman O, Nobs M, Berry JA. Further studies on hybrids between C_3 and C_4 species of *Atriplex*. *Carnegie Inst Washington Yearb*, 1971, 70: 507~511
- 李霞, 焦德茂, 戴传超等. 转育 PEPC 基因的杂交水稻的光合生理特性. *作物学报*, 2001, 27(2): 137~143
- 滕胜, 钱前, 黄大年. C_4 途径的分子生物学和基因工程研究进展. *农业生物技术学报*, 2001, 9(2): 198~201
- Ku SBM, Sakiko A, Mika N et al. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotech*, 1999, 17: 76~80
- 焦德茂著. 运用光合机理揭示生理育种途径. 北京: 中国农业出版社, 2002. 1~57
- 李霞, 吴爽, 焦德茂等. 转 $pepc$ 基因水稻的选育. *江苏农业学报*, 2001, 17(3): 143~147
- 王德正, 迟伟, 王守海等. 转 C_4 光合基因水稻特征特性及其在两系杂交稻育种中的应用. *作物学报*, 2004, 30(3): 248~252
- Kung SD, Chollet R, Marsho TV. Crystallization and assay procedures of tobacco ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Method Enzymol*, 1980, 69: 326~335
- Gonzalez DH, Iglesias AA, Andreo CS. On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by *L*-malate: Effect of pH. *Plant Physiol*, 1984, 116: 425~430
- 殷宏章, 沈允钢, 陈因等. 水稻开花后干物质的累积和运转. *植物学报*, 1956, 5(2): 125~142
- 季本华, 朱素琴, 焦德茂. 转玉米 C_4 光合酶基因水稻株系中的光合 C_4 微循环. *作物学报*, 2004, 30(6): 536~543
- 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. *科学通报*, 2001, 46(5): 414~418