

# 水稻灌浆期剑叶碳酸酐酶活性与基因表达分析

乔 醒 唐红玲 张凯岳 李 鑫 曾汉来 何 莹

华中农业大学植物科学技术学院/农业部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为探讨水稻碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA, EC 4. 2. 1. 1)对光合作用的影响,选取不同光合特性的 4 个水稻品种,测定灌浆期不同时段(开花后 5、15 和 25 d)剑叶 *O<sub>s</sub>CA* 基因的相对表达量、CA 的活性和叶片净光合速率,分析 CA 活性及相关基因转录与光合作用之间的关系。结果表明:水稻剑叶的 *O<sub>s</sub>CA* 基因表达量、CA 活性与叶片净光合速率显著相关,其相关程度在不同类型品种间存在差异,高光合特性品种 R49 在测定期各指标均处于最高水平。各品种的 CA 活性随着灌浆进程的推进呈现先升后降的动态趋势,并于灌浆中期(开花后 15 d)达到最大值;剑叶净光合速率在灌浆期呈现逐渐下降的趋势,而下降幅度存在品种差异性。基于以上结果,认为 *O<sub>s</sub>CA* 基因表达和 CA 酶活性水平及其变化可作为评估水稻叶片光合功能稳定性和品种间生理差异的重要指标。

**关键词** 水稻; 碳酸酐酶; 净光合速率; *O<sub>s</sub>CA* 表达水平

**中图分类号** S 511 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0021-05

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA, EC 4. 2. 1. 1)是一种广泛存在于动植物、细菌和真菌中的金属蛋白酶,其活性中心含有催化必需的锌(Zn),具有催化  $\text{CO}_2$  与  $\text{HCO}_3^-$  之间发生可逆水合反应、呼吸作用中转换和扩散  $\text{CO}_2$  等重要生物学功能<sup>[1-2]</sup>。在生物体内非催化条件下,  $\text{CO}_2$  与  $\text{HCO}_3^-$  转换速率很慢,不能满足生物体中的生理需要;而在 CA 催化下,  $\text{CO}_2$  与  $\text{HCO}_3^-$  转换速率非常高,其转换常数可高达  $10^6$ 。在植物的光合器官中, CA 最重要功能之一是催化  $\text{CO}_2$  与  $\text{HCO}_3^-$  之间形态的可逆反应,降低  $\text{CO}_2$  在叶肉细胞中的扩散阻力,从而为羧化反应提供底物  $\text{CO}_2$ , 从碳源供应水平上调节  $\text{C}_3$  和  $\text{C}_4$  植物的光合作用。

CA 是一类蛋白家族,包含多基因编码蛋白成员。研究表明, CA 蛋白家族按照氨基酸序列的同源性和晶体结构的相似性可分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\zeta$ -CA 等 6 个不同的亚族。不同 CA 亚家族的氨基酸序列没有明显相似性,同时各亚族也表现出进化独立性<sup>[3]</sup>。高等植物中主要含有  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -CA 等 3 个亚族,均为含 Zn 的金属酶。 $\text{C}_3$  植物的  $\beta$ -CA 定位于

叶绿体基质中;同 CA 蛋白其他亚族成员含量比较,  $\beta$ -CA 最为丰富,其含量占叶片组织可溶性蛋白的 1%~2%。不同亚族的 CA 蛋白除了具有组织、含量的差异性,不同组织具备的 CA 催化活性也存在差异;如  $\text{C}_3$  植物的维管束鞘组织 CA 活性比较低,而其叶片组织 CA 活性较高。已有研究对植物叶片的叶绿体型 CA(即叶片组织中含量最高且特异性表达的叶绿体型  $\beta$ -CA)进行了大量相关活性和功能方面的研究,包括利用反义 RNA 技术和化学抑制剂方法处理植株,导致植株的叶片 CA 催化活性降低,从而影响到整个植物的光合作用强度和功能。日本学者 Sasaki 等<sup>[4]</sup>对水稻叶片组织的  $\text{CO}_2$  运输进行研究,将此过程中存在阻力细分为“扩散”和“羧化”两个方面;结果显示,“羧化阻力”同光合速率具有更强相关性,并推测造成低光合速率的原因是羧化位点周围 CA 催化活力不足,导致提供给 Rubisco 羧化酶的底物量有限从而影响到光合速率。目前, CA 被认为是一种与光合作用密切相关的酶,因此,对于植物生长具有重要意义。Ferreira 等<sup>[5]</sup>研究表明,  $\beta$ -CA1 在拟南芥的苗期形态建成中发挥了重要功能,特别是对维持拟南芥子叶的光合功能起到关键

收稿日期: 2013-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371600)和湖北省自然科学基金重点项目(2012DBA03001)

乔 醒, 硕士。研究方向: 水稻生理。E-mail: qx456888@163.com

通信作者: 何 莹, 博士, 讲师。研究方向: 水稻遗传生理。E-mail: yinghe@mail.hzau.edu.cn

作用。

目前,已有的 CA 相关研究多以油菜、豆类与藻类等植物为试验材料,对其叶片组织 CA 催化活性与相关功能进行研究。但是,针对水稻进行相关 CA 活性与表达的研究报道较少。稻米中 2/3 以上干物质来自于灌浆期叶片的光合产物,剑叶是其中对产量和品质贡献最大的功能性叶片<sup>[6-7]</sup>。在水稻籽粒灌浆期,植株剑叶光合速率对水稻产量起关键性作用,有研究认为,光合速率提高可能为达到其高产目标的重要途径之一<sup>[7-8]</sup>。因此,研究水稻品种间的光合特性和 CA 活性差异,了解水稻产量形成的生理基础,对高光效生理育种、资源评价与筛选和水稻产量提高具有理论和实践意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料种植与田间管理

选用在前期研究中筛选出的光合速率高且稳定的品种 R49、早衰的温度敏感型品种特粘占 25 (TXZ-25)、耐高温的品种 N22、非洲稻 ITA312 共 4 个水稻品种。2012 年 5 月 11 日播种,生长 20 d 的单株移栽到华中农业大学试验田(30.52°N, 114.32°E),根据水稻生长不同时期施用尿素并在试验田用复合肥作基肥。运用叶龄标记法标记植株长势,采集长势一致的植株用于其后的田间和室内分析试验。对植株进行抽穗开花期田间挂牌,开花当天进行标记,并于上午 08:30 开花后不同时期(开花后 5、15 和 25 d,取样均在晴日进行)采集水稻剑叶。采集的叶片组织用于 CA 蛋白酶活性测定和 RNA 提取。

### 1.2 总 RNA 提取、检测、纯化和反转录

水稻叶片总 RNA 参照 TRNzol 提取液(In-vitrogen)操作手册用 TRNzol 提取。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 样品 28S、18S 和 5S 条带,对其完整性进行检测。参照 DNase 试剂盒(TaKaRa)说明用 DNase 去除样品中基因组 DNA。随后,按照 cDNA 合成试剂盒(Fermentas)操作说明将纯化后 RNA 样品反转录成 cDNA,并分装于-80 °C 保存。设计水稻看家基因  $\beta$ actin (GenBank 登录号: X15865, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)跨内含子的特异引物对(命名为 *actin5*,其上游引物序列 5'-CGTCTGCGATAATGGAAC-3',其下游引物序列 5'-CAGGGCGATGTAGGAAAG-3')。PCR 程序设定为 94 °C 预变性 1 min,随后进

行 35 个循环(94 °C 变性 30 s,52 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min),最后 72 °C 延伸 10 min 后结束。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物 642 bp。

### 1.3 定量 PCR 引物设计

利用在线 Primer3.0 引物设计软件(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>)和 Mfold 软件(<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>),根据 NCBI 公布(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)水稻基因组序列中的  $\beta$ CA 基因(GenBank 登录号:U08404)和内参 *actin* 基因(GenBank 登录号:X16280)序列外显子部分高度保守区设计引物(由上海捷瑞生物技术有限公司合成),用于实时荧光定量 PCR: $\beta$ CA 上游引物 5'-CGAACTCATCGTGGTGATTG-3',下游引物 5'-TGCTCGGTCTGAACCTTCTT-3';*actin7* 上游引物 5'-GAGACCTTCAACACCCCTGCTA-3',下游引物 5'-ATCACCAGAGTCCAACACATTACCT-3'。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 分析

使用 Ssofast Evagreen Supermix 试剂盒(Bio-Rad)进行荧光定量 PCR 分析。反应体系为 20  $\mu$ L,包含 10  $\mu$ L 的 PCR Master Mix(2 $\times$ ),0.4  $\mu$ L 的 10 mmol/L 各引物;7.2  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O,2.0  $\mu$ L 的模板 cDNA(样品 10 倍稀释,约为 100 ng)。在 iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR 检测系统(Bio-Rad)上进行 PCR 扩增,程序为 95 °C 变性 30 s 后进行(95 °C 变性 5 s,56 °C 退火 5 s,65 °C 延伸 10 s)40 个循环。设置 cDNA 浓度稀释梯度,利用 iQ<sup>TM</sup>5 软件分析。程序结束后根据扩增曲线得到基因 Ct 值后,考虑扩增效率采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法用 Excel 软件(Microsoft)分析得到校准样本的  $\beta$ CA 相对表达量。

### 1.5 CA 粗酶液提取和酶活测定

参照 Brownell 等<sup>[9]</sup>和邓秋红等<sup>[10]</sup>的方法提取 CA 粗酶液,并按照邓秋红等<sup>[10]</sup>的方法略加改动测定 CA 活性。反应体系:约含 0.1 mg 可溶蛋白待测粗酶液、巴比妥缓冲液(20 mmol/L,pH 8.3)、饱和 CO<sub>2</sub> 的 ddH<sub>2</sub>O。检测方法:用 pHs-320S 酸度计检测其 pH 值变化,以 pH 值下降 1 个单位(pH 8.3 $\rightarrow$ 7.3)所需的时间( $t$  和  $t_0$ )为参数,通过公式  $U = 10(t_0/t - 1)$  计算 CA 活性(以每克叶片酶活单位数表示,U/g),技术重复 3 次。

### 1.6 光合速率的测定

采用 LI-6400 便携式光合仪(美国 LI-COR 公

司)于晴日上午 09:00—12:00 测定水稻不同时期剑叶(开花后 5、15 和 25 d)的光合效率。测定叶片面积为 1.7 cm<sup>2</sup>,测定光强 1 000 μmol/(m<sup>2</sup>·s),温度(30±1)℃,CO<sub>2</sub>浓度为 400 μmol/mol 和相对湿度为 50%,重复 3 次以上。

1.7 数据分析

用 SPSS19.0(SPSS Incorporation)软件对 4 个品种 CA 酶活性和净光合速率进行统计分析。GraphPad Prism5(GraphPad Software Incorporation)软件作图。

2 结果与分析

2.1 灌浆期 OsCA 基因表达

实时荧光定量 PCR 的熔解曲线分析表明引物特异性较好,熔解温度只有 1 个尖峰,没有非特异性扩增产物及引物二聚体出现。标准曲线显示 Ct 值和起始模板拷贝数线性相关系数(R<sup>2</sup>=0.992)和扩增效率(E=100.1%)较好。

从图 1 可看出,供试材料的剑叶 OsCA 基因 mRNA 含量在灌浆期(开花后 5、15 和 25 d)呈现先上升后下降的动态趋势,OsCA 基因 mRNA 含量最高出现在灌浆中期即开花后 15 d,随后迅速降低。与其他品种相比,R49 的 OsCA 基因转录丰度高且下降较慢。

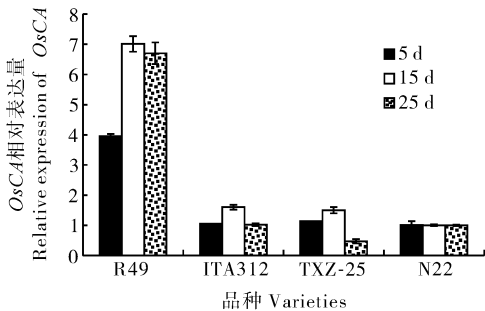


图 1 供试水稻品种开花后 5、15 和 25 d 剑叶中 OsCA 基因相对表达量分析

Fig.1 Analysis of OsCA gene relative expression in the 5 DAF,15 DAF,and 25 DAF rice flag leaves of tested rice varieties

2.2 灌浆期 CA 活性

CA 酶活测定结果(图 2)表明,不同水稻品种剑叶中 CA 活性在灌浆期变化趋势相似,特别是灌浆中期(开花后 15 d)剑叶中 CA 酶活性达到最高点,接近籽粒成熟期(开花后 25 d)时叶片 CA 酶活性水平最低。但是,水稻剑叶中 CA 酶活性存在品

种间的显著差异。在灌浆相同时期,剑叶中 CA 活性最高品种是 R49,而最低的是 N22,其中 R49 的 CA 活性除了明显高于其他品种之外,灌浆后期(开花后 25 d)下降幅度最慢(图 2)。

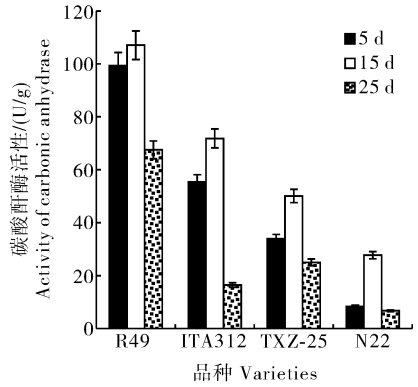


图 2 供试水稻品种开花后 5、15 和 25 d 剑叶中 CA 催化活性分析

Fig.2 Analysis of carbonic anhydrase activity in the 5 DAF,15 DAF,and 25 DAF rice flag leaves of tested rice varieties

2.3 灌浆期剑叶净光合速率

灌浆不同时期(开花后 5、15 和 25 d)叶片净光合速率动态结果(图 3)显示,植株的剑叶在开花后 5 d 均具有最大净光合速率,此后呈逐渐下降趋势。对不同品种在灌浆同一时期叶片净光合速率的比较分析表明,R49 剑叶净光合速率最高而 N22 最低。随着灌浆进程推进,R49 剑叶净光合速率下降幅度最小(开花后 5~15 d 和 5~25 d 下降幅度分别为 7.1% 和 38.2%),而 N22 下降幅度最大(开花后 5~15 d 和 5~25 d 下降幅度分别为 19.5% 和 51.3%)。

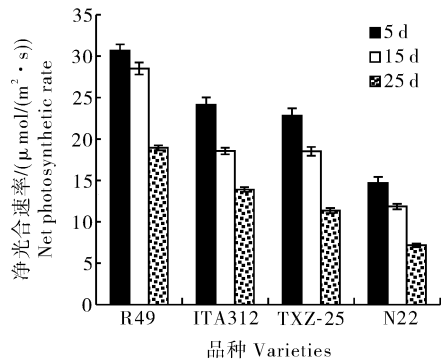


图 3 供试水稻品种开花后 5、15 和 25 d 剑叶中叶片光合速率比较分析

Fig.3 Comparison of net photosynthetic rates in the 5 DAF,15 DAF,and 25 DAF rice flag leaves of tested rice varieties

由此推测灌浆过程中水稻剑叶衰老程度  $N22 > TXZ-25 > ITA312 > R49$ 。

### 3 讨 论

自然界中 CA 具有存在的广泛性和重要的生物学功能,参与 pH 调节、离子交换、羧化及脱羧作用、呼吸作用等一系列生物过程<sup>[10-11]</sup>,在大豆、油菜、小麦和玉米等研究中都发现 CA 活性与光合作用具有一定相关性。光合作用是地球上最普遍、最大规模的光能转换和 CO<sub>2</sub> 同化过程。

本研究中 4 个供试水稻品种剑叶的 CA 酶活性以及叶片净光合速率之间均表现出正相关关系。焦德茂等<sup>[12]</sup>通过比较 4 个转 C<sub>4</sub> 光合酶基因 PEPC 水稻材料发现转基因植株的光合能力高于普通植株,推测 CA 可能参与促进 CO<sub>2</sub> 运输和同化。

本研究还表明不同品种间 CA 活性、基因表达量、光合速率存在较大差异,同时其相关性程度也不相同,如品种 N22 和 TXZ-25 的相关指标均较低,表明基因型间存在系统性差异,此类 CA 活性低的品种生长势偏弱、叶片后期生理功能下降较快<sup>[13]</sup>。如 CA 活性高品种 R49 具有较强的生长势并且能最早达到最大灌浆速率<sup>[14]</sup>;相比之下,品种 R49 净光合速率下降幅度仅为 7.1% 和 38.2%,而品种 N22 净光合速率同期分别大幅度下降了 19.5% 和 51.3%。

CA 活性与光合速率之间可能存在较复杂的关系,与不同基因型光合能力的限制因子存在差异有关。陈雄文<sup>[15]</sup>研究表明水稻中 CA 含量丰富,CA 活性下降到正常水平的 10%~21% 时其光合作用只下降约 10%,从而推测水稻中少量 CA 足以维持正常的光合作用。因此,对于 OsCA 基因表达水平低、CA 蛋白或活性偏低、同时光合作用其他组分功能强的材料,提高 CA 活性可能对增强光合能力的效果更为明显,如果光合作用主要组分功能弱,提高 CA 活性则所起作用较小;同理,提高“光合能力强且 CO<sub>2</sub> 供应为限制因子”材料中 CA 催化活性可显著增强其光合能力。

水稻作为我国重要的粮食作物之一,其产量高低与光合作用强弱密切相关,同时成熟稻米中干物质主要来源于剑叶灌浆过程产物<sup>[16-18]</sup>,剑叶生理功能水平及其稳定性对提高水稻产量和品质有重要意义。本研究认为叶绿体型 βCA 基因表达和 CA 活

性可作为叶片光合能力及生育后期叶片功能稳定性评价的生理指标,并可为水稻品种改良提供一定参考。

### 参 考 文 献

- [1] KHALIFAH R G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase, stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C [J]. J Bio Chem, 1971, 246: 2561-2573.
- [2] MORONEY J V, BARLETT S G, SAMUELSSON G. Carbonic anhydrase in plants and algae [J]. Plant Cell Environ, 2001, 24: 141-53.
- [3] KAUL T, REDDY P S, MAHANTY S, et al. Biochemical and molecular characterization of stress-induced carbonic anhydrase from a C<sub>4</sub> plant, *Pennisetum glaucum* [J]. J Plant Physiol, 2011, 168: 601-610.
- [4] SASAKI H, HIROSE T, WATANABE Y, et al. Carbonic anhydrase activity and CO<sub>2</sub>-transfer resistance in Zn-deficient rice leaves [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 929-934.
- [5] FERREIRA F J, GUO C, COLEMAN J R. Reduction of plastid-localized carbonic anhydrase activity results in reduced *Arabidopsis* seedling survivorship [J]. J Plant Physiol, 2008, 147: 585-594.
- [6] 刘化龙, 田红刚, 樊冬生, 等. 寒地粳稻生育后期剑叶光合特性变化的研究 [J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(6): 17-21.
- [4] 吴光南, 邹江石. 水稻栽培理论与技术 [M]. 北京: 农业出版社, 1981: 540.
- [8] 齐藤邦行, 下田博之, 石原邦. 水稻多收性品种的干物生产特性的解析 [J]. 日本作物学会纪事, 1992, 61(1): 62-73.
- [9] BROWNELL P F, BIELIG L M, GROF C P L. Increased carbonic anhydrase activity in leaves of sodium-deficient C<sub>4</sub> plants [J]. Plant Physiol, 1991, 18: 589-592.
- [10] 邓秋红, 甘露, 付春华, 等. 芸薹属中几个物种碳酸酐酶活性的比较 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(7): 663-666.
- [11] MORONEY J V, BARTLETT S G, SAMUELSSON G. Carbonic anhydrases in plants and algae [J]. Plant Cell Environ, 2001, 24: 141-153.
- [12] 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 等. 转 PEPC 基因水稻的光合 CO<sub>2</sub> 同化和叶绿素荧光特性 [J]. 科学通报, 2001, 46(5): 414-418.
- [13] QIAO X, HE Y, WANG Z M, et al. Effect of foliar spray of zinc on chloroplast β-carbonic anhydrase expression and enzyme activity in rice (*Oryza sativa* L.) leaves [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36: 263-272.
- [14] 邱献锟, 刘宪虎, 许明子, 等. 水稻大粒种质灌浆特性研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4): 1752-1754.
- [15] 陈雄文. 不同环境条件下水稻叶片中叶绿体内碳酸酐酶活性的变化 [J]. 湖北师范学院学报, 2000, 20(4): 40-41.

- [16] 王建林,徐正进,马殿荣. 北方杂交稻与常规稻籽粒灌浆特性的比较[J]. 中国水稻科学,2004,18(5):425-430.
- [17] 唐文帮,陈立云,肖应辉,等. 水稻功能叶形态及光合速率与产量构成因素的相关研究[J]. 湖南农业科学,2004(2):229-231.
- [18] 翟虎渠,杨国南. 水稻种质资源光合速率及光合功能期的研究[J]. 中国水稻科学,2001,15(1):29-34.

## Activity and gene expression analysis of carbonic anhydrase in rice flag leaves at the filling stage

QIAO Xing TANG Hong-ling ZHANG Kai-yue LI Xin ZENG Han-lai HE Ying

MOA Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture/College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Carbonic anhydrase (CA, EC 4. 2. 1. 1), catalyzing reversible hydration of  $\text{CO}_2$  to  $\text{HCO}_3^-$ , plays an important role in turbo-charge  $\text{CO}_2$  supply to photosynthetic organisms in plants. In order to understand the effect of CA on photosynthesis, four rice cultivars with different photosynthetic characteristics, i. e., R49, N22, TXZ-25 and ITA312, were selected in the experiment, and their flag leaves at the filling stage (in the 5 DAF, 15 DAF, and 25 DAF rice flag leaves) were used to study at the transcriptional, physiological and biochemical levels. The relative quantitative expression of *OsCA* gene, enzyme activity of CA protein and net photosynthetic rate were analyzed to reveal the relationship of CA and photosynthesis. Results showed that a significant correlation was found between the gene expression and enzyme activity of rice CA and the net photosynthetic rate. The CA enzyme activity and its gene expression quantity existed a cultivar-specific difference, and the corresponding values of R49 were highest among the four cultivars at the same stage. the CA enzyme activity showed a similar dynamic trend of a rise first followed by a decline with grouting process, of which the value reached a maximum at the middle filling stage (15 DAF); and the changes on net photosynthetic rate of the different cultivars were consistent, showing a trend of gradual decline. Therefore, the changes of *OsCA* gene transcripts and enzyme activity values can be considered as an indicator for physiological status to test the stability of leaf and/or to identify cultivar-specific difference in rice.

**Key words** rice; carbonic anhydrase; net photosynthesis rate; *OsCA* gene expression

(责任编辑:张志钰)