

Eleocharis baldwinii 的光合模式鉴定及染色体观察

伍 欢 吴杰敏 陈太钰 林拥军

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/华中农业大学国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

摘要 *Eleocharis baldwinii* 是莎草科(Cyperaceae)两栖类淡水水草, 能够在陆地和沉水 2 种不同的环境下生长。本研究对生长在不同环境的 *E. baldwinii* 进行光合模式鉴定, 解剖结构观察、 C_4 循环关键酶活性测定以及稳定碳同位素比值测定的结果显示, *E. baldwinii* 的陆生型光合碳同化途径为 C_4 型, 而水生型为 C_3 - C_4 中间型。此外, 还对 *E. baldwinii* 进行了染色体压片观察, 确定其染色体数目为 20 条。

关键词 光合作用; *Eleocharis baldwinii*; 两栖植物; 染色体压片

中图分类号 Q 945.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0007-06

光合作用是绿色植物和某些细菌利用光能, 将 CO_2 和 H_2O 转化为贮存着能量的有机物, 并释放氧气的过程。作为地球上最重要的生化反应, 光合作用是一切生命生存和繁衍的根本^[1]。根据 CO_2 固定形成的初产物不同, 植物的光合作用类型分为 C_3 、 C_4 和景天酸(CCM)途径 3 种类型。在 C_3 植物中, CO_2 的同化反应发生在叶肉细胞(M)中, 由核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧合酶(RuBisCO)催化固定生成三碳化合物。而在 C_4 植物中, CO_2 的同化固定, 需要叶肉细胞和维管束鞘细胞(BS) 2 种不同形态类型的细胞间的代谢配合^[2]。 CO_2 首先由叶肉细胞中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)催化固定生成四碳酸, 随后四碳酸转运至维管束鞘细胞脱羧, 释放的 CO_2 由 RuBisCO 再固定进入卡尔文循环^[3]。 C_4 光合作用的 CO_2 浓缩机制提高了 RuBisCO 周围的 CO_2 浓度, 抑制了光呼吸, 从而降低了此过程中的能量消耗。理论上, C_4 植物的光能转化效率高达 6%, 而在 C_3 植物中仅能达到约 4.6%^[4]。此外, C_4 植物还具有更高效的水分和氮素利用率^[5]。 C_4 光合作用的这些特性使得 C_4 植物能够适应高温、干旱等恶劣的环境, 在牧草植物群和生物质产量上均占有主导优势, 并在全球广泛分布^[6-7]。

据联合国经济和社会事务部人口司 2009 年发布的《世界人口前景》2008 年修正本指出, 到 2050

年, 全球人口总数将增长到 96 亿, 粮食需求将会提高 30%~40%, 新一轮粮食危机的到来似乎已经无法避免。因此, 在有限的耕地面积上提高主要粮食作物产量的要求愈加迫切。通过将 C_4 光合循环导入 C_3 作物, 提高 C_3 作物的光合效率成为可能的解决方案之一^[8]。

要实现这个目标, 必须对 C_3 植物及与其相近的 C_4 植物有深入的理解, 以确定可将 C_4 光合系统导入 C_3 植物的关键基因及调控网络。*Eleocharis baldwinii* 是莎草科荸荠属两栖淡水类水草, 在陆地和沉水条件均能生长良好, 同时具有体型小、生长需求简单等优势。本研究对不同生长环境中的 *E. baldwinii* 进行光合模式鉴定, 以确定其在不同环境条件下的光合特征; 同时, 利用染色体压片技术对染色体数目进行观察和计数, 确定 *E. baldwinii* 的染色体数目, 旨在为后续的反向遗传研究和基因组测序奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

E. baldwinii 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室收集, 种植于华中农业大学温室。陆生材料和水生材料均种植在约 1.5 L 的装满培养土的小红桶内。水生材料连同小红桶一并放入约

收稿日期: 2014-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271314)

伍 欢, 硕士研究生。研究方向: 水稻基因工程。E-mail: 1042791688@qq.com

通信作者: 林拥军, 博士, 教授。研究方向: 水稻基因工程。E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

120 L的透明水桶内生长,为防止水藻的生长,定期更换桶内水。水生材料和陆生材料均放置在温室生长,生长温度24~28℃。

1.2 *E. baldwinii* 石蜡组织切片

取新鲜的植物材料剪短为0.5~1.0 cm的小段,用FAA固定液固定($V_{乙醇} : V_{甲醛} : V_{冰醋酸} = 90 : 5 : 5$)后,样品材料经乙醇梯度脱水,氯仿梯度透明后用石蜡浸蜡、包埋,用旋转式切片机(YD-1508A)切片、制片,切片厚度10 μm。烘片后,二甲苯脱蜡,固绿-番红复染。二甲苯透明后,加拿大树胶封片。

1.3 *E. baldwinii* 稳定碳同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $\delta^{13}\text{C}$)测定

分别取水生材料和陆生材料的空心秆,80℃烘干24 h,研磨粉碎后过孔径0.150 mm筛。参照Cousins等^[9]的方法,将粉末高温氧化,收集释放的CO₂,除去其中的水分和O₂后,将纯化的CO₂用同位素比质谱仪(MAT-253)测定,每个样品重复制备、测定3次,以国际标准物质PDB(Pee Dee Bellemnite,南卡罗来纳州Pee Dee石灰岩形成的箭石化石)为标准样品,δ¹³C计算方法如下:

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{样品}} / R_{\text{标准}} - 1) \times 1000$$

式中: $R_{\text{样品}}$ 是样品的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值; $R_{\text{标准}}$ 是国际标准物质PDB的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值。

1.4 *E. baldwinii* PEPC、NAD-ME、PPDK酶活性的测定

取新鲜样品,在预冷的研钵中加入5 mL预冷的蛋白提取缓冲液(含100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、1 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT、5% (m/V)不溶性PVP、10 mmol/L MgCl₂),加入样品约0.2 g研磨粉碎后,将匀浆转移至1.5 mL离心管中,于4℃、13 000 r/min离心15 min。取上清,移入新的离心管,即为粗酶提取液。以小牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白样品,制成蛋白梯度液,将粗酶提取液适度稀释后,各取20 μL与1 mL考马斯亮蓝反应2 min后,测定595 nm处吸光值,根据标准曲线确定粗酶样品的可溶性蛋白质含量。

测定粗酶提取液的可溶性蛋白质含量后,配制PEPC、依赖于NAD的苹果酸酶(NAD-ME)和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PPDK)酶活分析反应液。PEPC酶活分析反应液:50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),10 mmol/L MgCl₂,2 mmol/L PEP,0.2 mmol/L NADH,0.1 mmol/L EDTA,1 mmol/L

DTT,10 mmol/L NaHCO₃,3U MDH;NAD-ME酶活分析反应液:50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),2 mmol/L NAD,5 mmol/L Malate,4 mmol/L MnCl₂,0.2 mmol/L EDTA,5 mmol/L DTT;PPDK酶活分析反应液:50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),10 mmol/L MgCl₂,0.1 mmol/L EDTA,1.25 mmol/L丙酮酸钠,5 mmol/L DTT,0.2 mmol/L NADH,2.5 mmol/L K₂HPO₄,50 mmol/L NaHCO₃,1.25 mmol/L ATP,2U MDH,2U PEPC。取酶活分析反应液180 μL,加入20 μL粗酶液启动反应,从加入粗酶提取液开始计时,用酶标仪(TECAN,infinite M200)测定340 nm波长吸光值变化,即NADH的氧化或生成速率,以单位质量可溶性蛋白来标定酶的活性。

1.5 *E. baldwinii* 染色体观察计数

采集幼花,以处于减数分裂时期的花粉母细胞为材料,卡洛固定液($V_{乙醇} : V_{乙酸} = 3 : 1$)固定3 h。在载玻片上用解剖针将花药分离出来,去掉其他的组织后,将花药压碎,使花粉母细胞充分释放出来,醋酸洋红染色1 min后,盖上盖玻片。用力压片,吸除多余液体,液氮浸泡载玻片5 min后用手术刀揭去盖玻片。梯度乙醇脱水后在载玻片上加20 μL含DAPI的封片剂,盖上盖玻片,荧光显微镜(Leica DM4000B)下观察。

2 结果与分析

2.1 不同生长环境下 *E. baldwinii* 空心秆的解剖结构

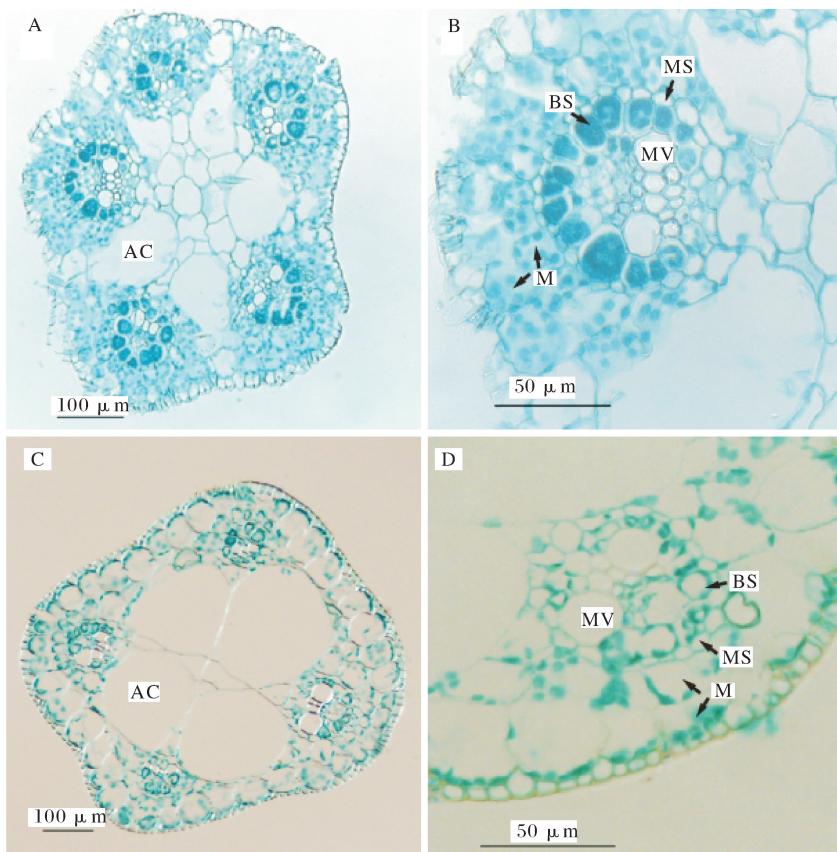
*E. baldwinii*不具有明显的茎叶分化,叶兼秆生,仅有鞘而无叶片。空心秆(茎)为其主要的光合器官。陆生型健壮挺拔,而水生型则相对柔软(图1)。空心秆的横切面近圆形,陆生型空心秆的维管组织较水生型更为发达,气腔则相对较小(图2)。陆生型 *E. baldwinii* 的空心秆具有Kranz型解剖结构,维管束鞘细胞体积大,含有大量叶绿体,叶肉细胞围绕维管束鞘细胞呈辐射状排列。不含有叶绿体的束内输导组织鞘细胞(MS)围绕在维管束鞘细胞外。叶肉细胞围绕束内输导组织鞘细胞排列。毗邻表皮细胞的叶肉细胞较邻近束内输导组织鞘细胞的叶肉细胞体积大。水生型 *E. baldwinii* 的空心秆呈现出与陆生型截然不同的结构特征,不具有Kranz结构。发育良好的叶肉细胞位于表皮细胞内,但排列松散。相比于陆生型,水生型维管束鞘细胞的体积和数目均有所下降,但维管束鞘细胞内也



A: 陆生型 The terrestrial forms; B: 水生型 The submerged forms.

图1 不同生长环境下的 *E. baldwinii*

Fig.1 *E. baldwinii* lives in different environments



A,B: 陆生环境下的空心秆 Culms of the terrestrial forms; C,D: 水生环境下的空心秆 Culms of the submerged forms; AC: 气腔 Air cavity; BS: 维管束鞘细胞 Bundle sheath cell; M: 叶肉细胞 Mesophyll cell; MS: 束内输导组织鞘细胞 Mestome sheath cell; MV: 后生木质部 Metaxylem vessel.

图2 不同生长环境下 *E. baldwinii* 空心秆的解剖结构

Fig.2 Anatomical structures of culms from different environments

含有少量叶绿体,维管束鞘细胞与叶肉细胞数比值也较低。

2.2 稳定碳同位素特征

因 RuBisCO 和 PEPC 对碳同位素的亲和力不同,不同光合类型的植物具有不同的碳同位素比值。稳定碳同位素技术因而成为区分植物光合碳同化途径的重要方式, C_3 草类植物的 $\delta^{13}C$ 值为 $(-2.67 \pm 0.23)\%$, 而 C_4 草类植物 $\delta^{13}C$ 值为 $(-1.25 \pm 0.11)\%$ ^[10]。陆生型的 $\delta^{13}C$ 值质谱测定结果为 $(-1.30 \pm 0.016)\%$, 在 C_4 植物范围内。而水生型的 $\delta^{13}C$ 值为 $(-1.89 \pm 0.056)\%$, 介于 C_3 和 C_4 植物之间。

2.3 *E. baldwinii* 光合循环酶活性

如图 3 所示,相比于水生型,陆生型 *E. baldwinii* 具较高活性水平的 PEPC、PPDK 和 NAD-ME 酶活性,陆生型 PEPC 酶活性比水生型高出 10 倍以上。

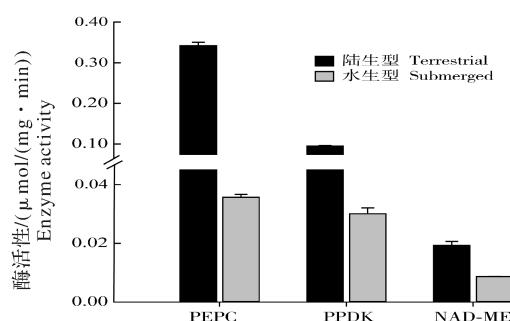
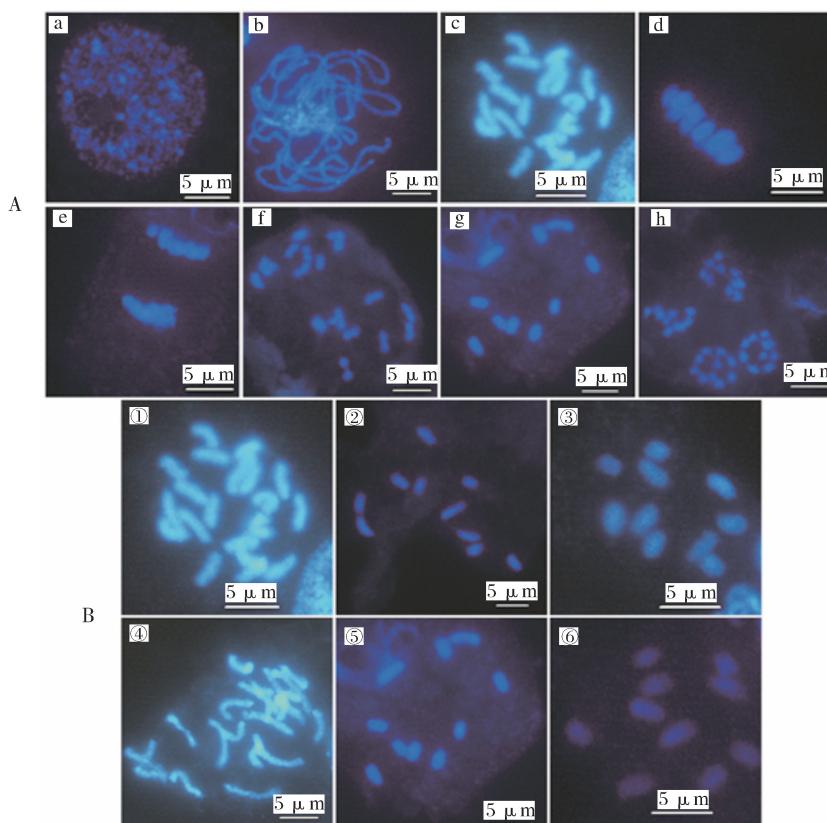


图 3 陆、水生型 *E. baldwinii* C_4 光合循环酶活性

Fig.3 Activity assay of major enzymes in C_4 cycle of terrestrial and submerged forms *E. baldwinii*

2.4 染色体观察计数

对花粉母细胞减数分裂各时期的染色体形态进行了观察,并选取染色体充分分散、轮廓清晰、数目一致的分裂细胞进行观察计数,确定其染色体数目为 20 条(图 4)。



A: *E. baldwinii* 各时期染色体 Chromosomes of *E. baldwinii* in different phase; a: 分裂间期 Interkinesis; b: 粗线期 Pachynema; c: 终变期 Diakinesis; d: 中期 I Metaphase I; e: 中期 II Metaphase II; f, g: 后期 II Anaphase II; h: 末期 Telophase; B: 染色体数目 The number of Chromosomes; ①、④ 终变期 Diakinesis; ②、③、⑤、⑥ 后期 II Anaphase II.

图 4 *E. baldwinii* 染色体 DAPI 染色压片图

Fig.4 Chromosomes tableting of *E. baldwinii* stained with DAPI

3 讨 论

E. baldwinii 在不同的生长环境下展现出不同的形态特征,相比陆生型,水生型更为纤细、柔软,维管组织相对不发达,气孔退化,这种特征被称为异形叶性^[11],是植物对不同生长环境的适应性变化。

陆生型 *E. baldwinii* 表现出明显的 C₄ 植物特征,这包括空心秆的 Kranz 解剖结构。Kranz 解剖结构为 C₄ 植物的主要特点之一,在不同的科属中,Kranz 结构也存在着变异。其中重要的区分标志之一就是束内输导组织鞘细胞的有无,在莎草科 C₄ 植物的解剖结构中,束内输导组织鞘细胞通常不含有叶绿体,位于维管束鞘细胞和叶肉细胞之间^[12],这在 *E. baldwinii* 的解剖结构中也可以观察到。同时高活性的 C₄ 循环关键酶和稳定碳同位素比值的鉴定结果均显示陆生型 *E. baldwinii* 为 C₄ 植物。高活性的 NAD-ME 酶活性也表明陆生型进行 NAD-ME 亚型的 C₄ 循环途径。而水生型则具有 C₃-C₄ 中间型特征,这也从结构、酶活性和稳定碳同位素比值几方面得到证实。进行不同光合碳同化途径的植物具有不同的生理、生化特征,可以从不同的方面进行鉴别;但由于环境的影响,单个的指标都存在着一定的变化;因此,应结合多种方法对植物的光合作用途径进行鉴定。本研究从解剖结构、稳定碳同位素比值和酶活分析三个方面进行综合研究,确定 *E. baldwinii* 在不同的生长环境下具有不同的光合模式。

染色体是遗传物质 DNA 的载体,其数目、形态、结构对后续的遗传学研究具有重要的作用。本研究利用染色体压片技术对 *E. baldwinii* 进行了初步的染色体观察计数。理论上任何能够进行细胞分裂的组织都可以作为染色体制片的材料,这包括根尖、茎尖、愈伤组织、幼胚和幼花等,最为理想的材料则是用种子萌发取根。本研究中由于材料的限制,选用花粉母细胞为材料,取样后直接固定,并未预处理,因此,取样时期是实验成功的关键性步骤。在植物开花以前的孕蕾期,取雄蕊尖端尚未露出的花蕾,最好在减数分裂发生比较旺盛的时间如上午 08:00—10:00 取样。

目前对 C₄ 光合作用的研究主要集中在对遗传调控机制和发育事件的阐述上,但进展甚微。黄顶菊属(*Flaveria*)植物包含 C₃ 植物种、C₄ 植物种,以

及 C₃—C₄ 中间型植物种,因此,常被用作于研究 C₄ 植物进化进程的模式系统^[13]。但由于黄顶菊属内不同种的植物遗传背景差异较大,并不适合用于 C₃ 和 C₄ 的遗传学和发育生物学研究。因 *E. baldwinii* 具有随环境的变化表现出不同的光合类型的自然特性而成为研究 C₄ 遗传和发育的良好材料,有助于理解 C₄ 植物对不同生态环境的适应以及 C₄ 植物进化、发育等机制。

参 考 文 献

- [1] NIU S, LI Z, XIA J, et al. Climatic warming changes plant photosynthesis and its temperature dependence in a temperate steppe of northern China[J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 63: 91-101.
- [2] EDWARDS G E, FRANCESCHI V R, VOZNESENSKAYA E V. Single-cell C₄ photosynthesis versus the dualcell (Kranz) paradigm[J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 173-196.
- [3] COOPER T G, WOOD H G. The carboxylation of phosphoenol-pyruvate and pyruvate. II. The active species of 'CO₂' utilized by phosphoenol-pyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1971, 246: 5488-5490.
- [4] ZHU X G, LONG S P, ORT D R. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? [J]. Curr Opin Biotechnol, 2008, 19: 153-159.
- [5] HUXMAN T E, MONSON R K. Stomatal responses of C₃, C₃-C₄ and C₄ *Flaveria* species to light and intercellular CO₂ concentration: implications for the evolution of stomatal behavior [J]. Plant Cell Environ, 2003, 26: 313-322.
- [6] EDWARDS E J, OSBORNE C P, STROMBERG C A E, et al. The origins of C₄ grasslands: integrating evolutionary and ecosystem science[J]. Science, 2010, 328: 587-591.
- [7] EDWARDS E J, SMITH S A. Phylogenetic analyses reveal the shady history of C₄ grasses[J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107: 2532-2537.
- [8] LANGDALE J A. C₄ cycles: past, present, and future research on C₄ photosynthesis[J]. The Plant Cell, 2011, 23: 3879-3892.
- [9] COUSINS A B, BADGER M R, VON CAEMMERER S. C₄ photosynthetic isotope exchange in NAD-ME and NADP-ME-type grasses[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59: 1695-1703.
- [10] OSBORNE C P. The geologic history of C₄ plants[M]// RAGHAVENDRA A S, SAGE R F. C₄ photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms. Dordrecht: Springer Verlag, 2011: 339-354.
- [11] DESCHAMP P A, COOKE T J. Leaf dimorphism in aquatic angiosperms: significance of turgor pressure and cell expansion [J]. Science, 1983, 219: 505-507.
- [12] EDWARDS G E. C₄ photosynthesis: Kranz forms and single-cell

- C₄ in terrestrial plants[M]//RAGHAVENDRA A S, SAGE R F. C₄ photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms. Dordrecht: Springer Verlag, 2011: 29-56.
- [13] WESTHOFF P, SVENSSON P, ERNST K, et al. Molecular evolution of C₄ phosphoenol pyruvate carboxylase in the genus *Flaveria* [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1997, 24: 429-436.

Identifying photosynthetic pattern and number of chromosomes for *Eleocharis baldwinii*

WU Huan WU Jie-min CHEN Tai-yu LIN Yong-jun

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / National Center of Plant Gene Research (Wuhan), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract *Eleocharis baldwinii* is a freshwater amphibious plant belonging to Cyperaceae. It can adapt and grow well in the submerged and terrestrial conditions. In this study, the photosynthetic characteristics of *E. baldwinii* in the submerged and terrestrial conditions were investigated. The results of anatomical section, enzymatic activity of major enzymes in C₄ cycle and stable carbon isotope analysis showed that the photosynthetic pattern was C₄ in terrestrial condition and C₃-C₄ intermediate in the submerged condition. The chromosome number is 20 based on chromosome tableting. It will lay a foundation for the reverse genetics and the genome sequencing of *E. baldwinii*.

Key words photosynthesis; *Eleocharis baldwinii*; amphibious plant; chromosome tableting

(责任编辑:张志钰)