

不同胁迫处理对促进 *Eleocharis baldwinii* 形成C₄结构的效应

朱亚莎 陈太钰 吴杰敏 伍 欢 林拥军

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

摘要 分别用不同质量分数的 NaCl、PEG-6000 处理水生型 *Eleocharis baldwinii*,解剖结构观察、叶绿素含量测定以及 C₄循环相关酶活性测定结果显示:0.4% NaCl 或 3.0% PEG-6000 溶液诱导水生型 *E. baldwinii* 长出新的“花环型”结构,呈现类 C₄ 表型。

关键词 *Eleocharis baldwinii*; C₄; C₃-C₄中间型; 酶活测定; “花环型”结构

中图分类号 Q 945.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0010-06

根据 CO₂同化固定生成初产物的不同,高等植物的光合作用主要分为 C₃、C₄ 和景天酸(crasulacean acid metabolism, CAM)3 种光合类型。C₃光合作用仅在叶肉细胞中进行,CO₂首先被 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase, RuBisCO)直接同化固定,产生 2 个三碳化合物——磷酸甘油酸。在 C₄植物中,依靠 2 种不同类型的细胞——叶肉细胞(mesophyll cells, MC)和维管束鞘细胞(bundle sheath cells, BSC)协同完成对 CO₂ 的同化过程,BSC 叶绿体中存在的 CO₂浓缩机制(CO₂ concentrating mechanism, CCM)对 RuBisCO 作用位点的 CO₂进行了浓缩,提高了 RuBisCO 的羧化活性,抑制了光呼吸^[1],减少了能量消耗,使得 C₄植物拥有更高的生物产量^[2]。CCM 中,CO₂的浓缩由 MC 和 BSC 分工合作而实现,外层 MC 和内层 BSC 围绕维管束整齐排列呈环状,故称为“Kranz”结构,这是 C₄植物最特殊的解剖结构。广义的“Kranz”结构较为复杂,一共包含外、中、内 3 层,即富含少量叶绿体的外层薄壁组织鞘细胞,排列整齐;不含叶绿体的中层束内输导组织鞘细胞;靠近维管束的为内层“Kranz”细胞,含有数目众多的细胞器,叶绿体体积大,主要是基质类囊体,基粒发育异常甚至无基粒,是进行卡尔

文循环的主要场所,因此,有很多卵形淀粉粒。C₃植物中没有“Kranz”结构,维管束鞘细胞体积小、几乎不含叶绿体,围绕在维管束鞘细胞外的一圈叶肉细胞排列松散,叶绿体发育正常,不论是光反应还是暗反应都在此进行。不同于 C₃植物,C₄植物对水分、氮素具有更高的利用率^[3],在高效利用资源和环境保护上更为有效,更能耐高温、干旱、高光强等恶劣环境下生存。

随着全球人口增长、耕地面积减少、生物燃料需求增加、环境恶化等^[4-5]变化,对粮食需求日益加大,能够在有限的耕地上实现更高的生物产量已成为我们追求的目标,而大部分主要粮食作物是 C₃植物,这就使得能够在 C₃植物中进行 C₄光合循环成为所关注和研究的焦点^[6]。要实现这个目标,必须对 C₄光合结构形成和发育过程有深入的了解,以寻找可将 C₃改造成 C₄模式的关键基因^[7]。*E. baldwinii* 在不同的生长环境下行使不同的光合类型,陆生型为 C₄光合类型,水生型则是 C₃-C₄中间型^[8]。本研究分别用不同质量分数的 NaCl、PEG-6000 对水生型 *E. baldwinii* 进行处理,以探索其在高盐、干旱等外界环境选择下“Kranz”结构以及光合作用类型的变化,旨在为寻找与“Kranz”结构形成有关的基因、解析 C₄光合作用调控网络进而厘清 C₃、C₄光

收稿日期: 2016-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271314)

朱亚莎,硕士研究生。研究方向:水稻基因工程。E-mail: 1257189956@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

合路径转变过程提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

E. baldwinii 生长于华中农业大学温室。水生材料种植于约 1 L 的透明塑料桶内, 及时更换新鲜水, 以防止水中藻类的生长。取水生材料的珠芽种植于泥土中, 待水生空心秆枯萎后便会长出新鲜的陆生材料^[9]。NaCl 或 PEG-6000 诱导的材料是取水生 *Eleocharis baldwinii* 的珠芽种植于装有泥土的塑料瓶内, 并分别将其置于 0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 和 0.6% NaCl 或 2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0% PEG-6000 溶液中。NaCl 或 PEG-6000 诱导的材料隔天更换培养液, 以免水分蒸发, 诱导的质量分数发生改变。生长温度为 24~28 ℃。

1.2 *E. baldwinii* 石蜡组织切片

取新鲜的材料剪短为 5~10 mm 左右的小段, 迅速置于 FAA($V_{\text{50\%乙醇}} : V_{\text{甲醛}} : V_{\text{冰醋酸}} = 90 : 5 : 5$) 固定液中, 固定 24 h 后, 用真空干燥仪抽取真空至材料下沉, 室温保存。固定后的材料经过各级乙醇脱水, 二甲苯梯度透明、石蜡浸蜡与包埋后修块, 用旋转式切片机(YD-1508A)切片, 于展片台上 42 ℃ 展片、42 ℃ 恒温箱烘片 1~2 d, 二甲苯脱蜡、固绿染色, 在二甲苯中透明, 并用加拿大树胶封片。利用光学显微镜观察成熟区空心秆的解剖学结构。

1.3 *E. baldwinii* 叶绿素含量的测定

取新鲜的水生型、陆生型 *E. baldwinii* 以及分别用 NaCl、PEG-6000 诱导的水生型 *E. baldwinii* 材料, 分别称取 10 mg 置于 2.0 mL 的离心管中, 每管加入 1.6 mL 的叶绿素抽提液($V_{\text{无水乙醇}} : V_{\text{丙酮}} : V_{\text{水}} = 4.5 : 4.5 : 1$)^[10], 4 ℃ 避光抽提 36 h。以抽提液为空白对照, 使用紫外分光光度计 DU640 测量叶绿素抽提物在 645 nm 和 663 nm 波长处的吸光值。

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

取新鲜的水生型、陆生型 *E. baldwinii* 以及分别用 NaCl、PEG-6000 诱导的水生型 *E. baldwinii* 材料, 在预冷的研钵中加入 2.5~3.0 mL 预冷的蛋白抽提缓冲液(含 Tris-HCl, pH = 7.5, 100 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; DTT 5 mmol/L; MgCl₂ 10 mmol/L; 甘油 10%; 不溶性 PVP₄₀ 5%), 取适量材料放入研钵中, 冰浴迅速研磨粉碎, 将匀浆

转入 2.0 mL 的离心管中, 4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min。将上清转入一新的 1.5 mL 离心管中, 重复上次操作, 离心后吸上清转入 0.5 mL 离心管中, 此为所抽提的蛋白粗提取液。以小牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白样, 配成蛋白梯度溶液, 取 20 μL 与 1 mL 考马斯亮蓝反应制成标准曲线; 再将蛋白粗抽提液适度稀释后同样取 20 μL 与 1 mL 考马斯亮蓝反应, 用酶标仪测量 595 nm 处的吸光值, 根据标准曲线确定稀释蛋白的浓度, 计算出蛋白粗提取液的浓度。

测定蛋白提取液的浓度后, 参照文献[11], 配制 PEPC、PPDK、NAD-ME 的酶活测定反应液, 进行以下 3 种相关酶活的测定。①PEPC 活性测定反应体系为 200 μL, 反应混合液含 50 mmol/L Tris-HCl(pH = 7.5)、0.1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、10 mmol/L NaHCO₃、10 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L PEP、0.2 mmol/L NADH、3 U MDH。②PPDK 酶活测定反应体系为 200 μL, 反应混合液含 50 mmol/L Tris-HCl(pH = 8.0)、0.1 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT、50 mmol/L NaHCO₃、10 mmol/L MgCl₂、2.5 mmol/L K₂HPO₄ · 3H₂O、1.25 mmol/L ATP、1.25 mmol/L 丙酮酸钠、0.2 mmol/L NADH、2 U PEPC、2 U MDH。③NAD-ME 酶活测定反应为 200 μL, 反应混合液含 50 mmol/L Tris-HCl(pH = 7.5)、0.2 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT、4 mmol/L MnCl₂ · 4H₂O、5 mmol/L 苹果酸钠、0.1 mmol/L CoA、2 mmol/L NAD。以上 3 种酶活测定均是取酶活分析反应液 180 μL, 加入 20 μL 蛋白粗提取液启动反应, 反应温度 25 ℃。从加入粗酶提取液开始计时, 用酶标仪测定 340 nm 处吸光值的变化, 即 NADH 的生成或氧化速率, 用单位质量可溶性蛋白来确定酶的活性。

2 结果与分析

2.1 *E. baldwinii* 的解剖结构特征

陆生型 *E. baldwinii* 叶肉细胞呈半圆辐射状排列, 含有基粒发育良好的叶绿体。“Kranz”结构由 3 层维管束鞘结构所组成, 内层即为我们常说的“Kranz”细胞, 含有数目众多的细胞器; 叶绿体体积大, 主要是基质类囊体, 基粒发育异常或无基粒, 线粒体比其他 2 层细胞中的较大。这些结构特征反映出陆生 *E. baldwinii* 是典型的 NAD-ME 型 C₄模式^[12]。水生型 *E. baldwinii* 呈现出与陆生型不同

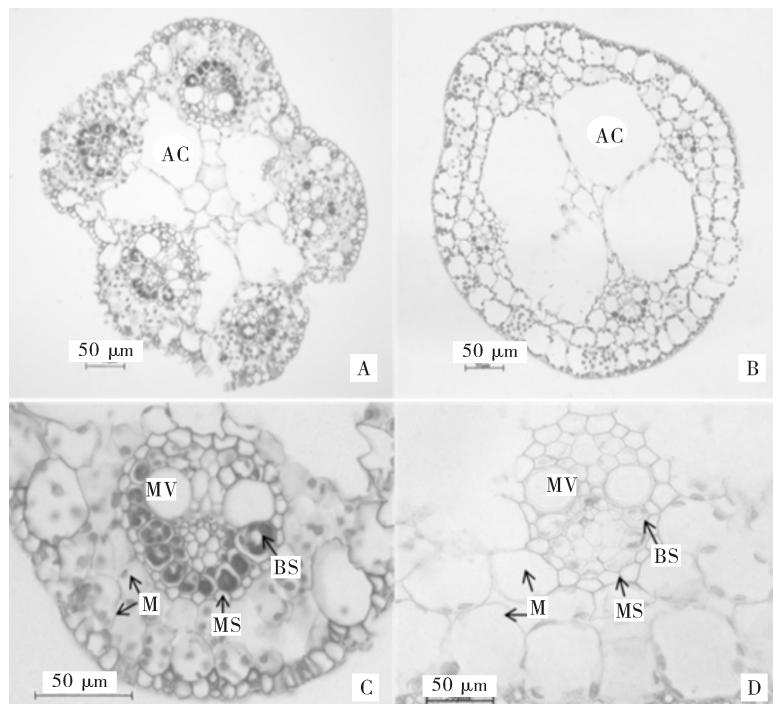
的解剖结构,不具有“Kranz”结构。虽然水生型 *E. baldwinii* 维管束鞘结构也有 3 层,但维管束鞘细胞数量和体积均下降,含有少量的细胞器,叶绿体变小、排列疏松、几乎不具备光合作用能力,薄壁组织鞘细胞变大,且含有叶绿体。维管结构中机械组织比陆生型弱,但通气组织气腔较陆生型更为发达,这些结构特征说明水生环境下 *E. baldwinii* 表现为类似 C₃解剖结构^[13]。

用不同质量分数的 NaCl 和 PEG-6000 诱导水生型 *E. baldwinii*,1 周左右后,材料逐渐长出新的空心秆,从外观上观察,处理后的 *E. baldwinii* 空心秆较水生型粗壮。取经过 NaCl 或 PEG-6000 诱导的 *E. baldwinii* 成熟区空心秆进行石蜡切片观察。

1)用 NaCl 处理的水生型 *E. baldwinii* 解剖结构。0.2% NaCl、0.3% NaCl 的诱导条件下,材料出现维管束鞘细胞膨大、少量叶绿体膨大并贴着维管束鞘细胞边缘积累的现象;0.4% NaCl 诱导下维管束鞘细胞膨大更明显、稳定,有大量叶绿体在 BSC 中富集,出现较为标准的“Kranz”结构,且与陆生型

结构类似;0.5% NaCl、0.6% NaCl 同样也会出现维管束鞘细胞膨大、膨大叶绿体分布在维管束鞘细胞内壁的边缘等特征,但与 0.4% NaCl 处理出现的结构无明显区别,反而因质量分数提高、盐胁迫严重材料很难生长。因此,最终确定以 0.4% NaCl 为盐胁迫诱导条件。

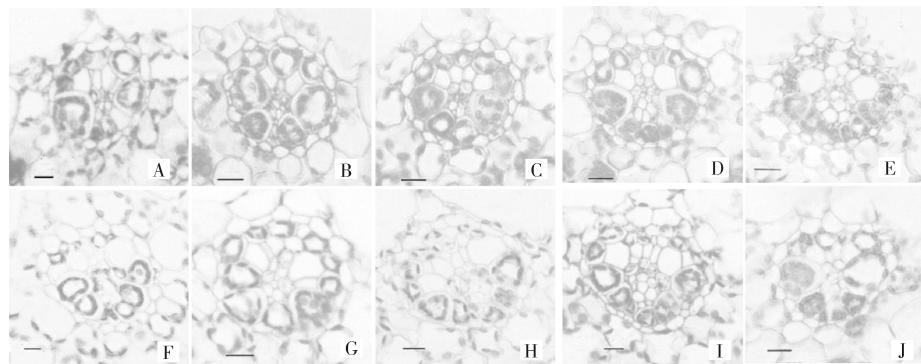
2)PEG-6000 处理的水生型 *E. baldwinii* 解剖结构。2.0% PEG-6000 诱导下有极少量的维管束鞘细胞膨大,开始膨大的叶绿体紧贴细胞周围排列;当 PEG-6000 质量分数提高到 2.5% 时,可以观察到维管束鞘细胞、叶绿体继续膨大,且数目逐渐增多;PEG-6000 诱导质量分数为 3.0% 时,维管束鞘细胞不仅膨大,同时还有更多的叶绿体在细胞内积累增多;3.5% PEG-6000、4.0% PEG-6000 诱导条件下,维管束鞘细胞继续膨大,叶绿体积累越来越多,直至布满整个维管束鞘细胞,但随着 PEG-6000 质量分数再提高,水体呈现富营养化、土质发黑,导致材料无法正常生长。因此,最终确定以 3.0% PEG-6000 作为干旱胁迫诱导条件进行后续研究。



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

图 1 处于不同生长环境下 *E. baldwinii* 空心秆的解剖结构

Fig.1 Anatomical structure of culms lives in different environments



A:0.2% NaCl 处理; B:0.3% NaCl 处理; C:0.4% NaCl 处理; D:0.5% NaCl 处理; E:0.6% NaCl 处理; F:2.0% PEG-6000 处理; G:2.5% PEG-6000 处理; H:3.0% PEG-6000 处理; I:3.5% PEG-6000 处理; J:4% PEG-6000 处理; Bar=10 μm . A: 0.2% NaCl treatment; B: 0.3% NaCl treatment; C: 0.4% NaCl treatment; D: 0.5% NaCl treatment; E: 0.6% NaCl treatment; F: 2.0% PEG-6000 treatment; G: 2.5% PEG-6000 treatment; H: 3.0% PEG-6000 treatment; I: 3.5% PEG-6000 treatment; J: 4.0% PEG-6000 treatment; Bar=10 μm .

图 2 不同质量分数的 NaCl 或 PEG-6000 处理的水生型 *E. baldwinii* 空心秆的解剖结构

Fig.2 Anatomical structure of culms of the submerged forms under different gradient concentration of NaCl and PEG-6000 treatment

2.2 *E. baldwinii* 叶绿素含量测定结果

采用 Arnon 的方法稍作改进测定叶绿素含量, 结果(图 3)表明:0.4% NaCl 或 3.0% PEG-6000 诱导的水生型 *E. baldwinii* Chl a、Chl a+Chl b 含量较水生型有微弱上升, 可能是由于处理后的 *E. baldwinii* 空心秆中出现“Kranz”结构, 叶绿体在膨大的维管束鞘细胞中大量积累, 引起叶绿素 Chl a+Chl b 总含量上升。

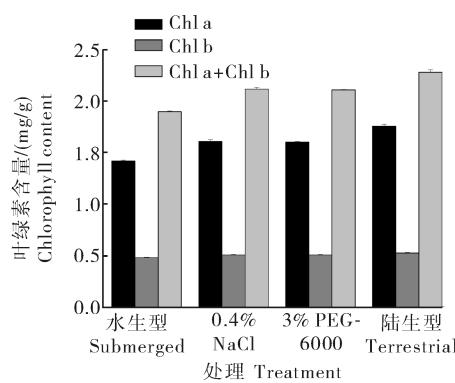


图 3 水生型、0.4% NaCl、3% PEG-6000 处理的水生型以及陆生型的 Chl a、Chl b、Chl a+Chl b 含量

Fig.3 Chl a, Chl b, Chl a+Chl b content of submerged, 0.4% NaCl, 3% PEG-6000 stress on submerged, terrestrial forms of *E. baldwinii*

2.3 *E. baldwinii* 光合循环酶活性测定

的 C₄关键酶活性,可以明显看出陆生型 *E. baldwinii* 比水生型具有较高的 PEPC、NAD-ME、PPDK 酶活性,陆生型 *E. baldwinii* PEPC 的酶活性是水生型的 10 倍左右。用 0.4% NaCl、3.0% PEG 诱导处理的水生型材料,其 3 种 C₄循环关键酶活性比未处理水生型材料的有所提高,但均低于陆生型。

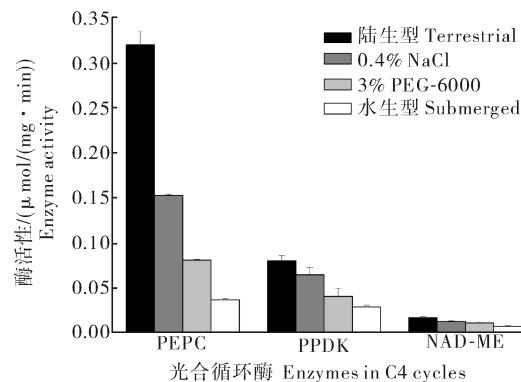


图 4 陆生型、0.4% NaCl、3% PEG-6000 处理的陆生型以及水生型 *E. baldwinii* C₄光合循环酶活性

Fig.4 Activity assay of major enzymes in C₄ cycle of terrestrial, 0.4% NaCl, 3% PEG-6000 stress on submerged, submerged forms of *E. baldwinii*

3 讨论

E. baldwinii 不具有叶片结构,靠空心秆进行

光合作用以维持正常的生命活动。当把水生的 *E. baldwinii* 放置于陆生条件下,空心秆会慢慢枯死,随之长出新的具有 C₄ 模式的光合组织,健壮碧绿,呈现出明显的 C₄ 植物“花环型”结构,C₄ 代谢关键酶活性较高。相反,把陆生的 *E. baldwinii* 浸没水中,长出具有 C₃ 光合作用模式的空心秆,纤细柔软如发丝,基本不具有“Kranz”结构,C₃ 代谢旺盛。

本研究用 NaCl 或 PEG-6000 诱导处理水生型 *E. baldwinii* 后,重新长出“Kranz”结构,促使叶绿体等细胞器像陆生型那样在叶肉细胞和维管束鞘细胞中生长发育,维管束鞘细胞膨大,排列整齐,叶绿体在维管束鞘细胞中大量富集,C₄ 循环关键酶的活性有所上升。NaCl 或 PEG-6000 造成植物体内渗透压发生改变,可能作为信号因子调节 C₄ 光合作用相关基因的特异表达,改变了光合代谢的通路,形成“Kranz”结构,以应对外界环境的变化。PEG-6000 处理的材料表型不如 NaCl 明显,一个原因可能是前者仅仅是渗透压发生改变,而后者还有盐胁迫,使材料处于一个更类似陆生的环境,呈现类 C₄ 光合类型特征;另一个原因可能是进行诱导处理所用的 NaCl 或 PEG-6000 质量分数偏低,但提高处理的质量分数后,材料难以生长。

植物的光合特征虽具有极大的可塑性,但光合类型的转变肯定涉及大量的生理学和分子生物学的复杂事件,需要多基因共同控制,具有复杂的调控网络。但是目前这方面的具体机制还不是很清楚,*E. baldwinii* 能够随着外界环境变化在 C₄、C₃ 光合类型间进行转换的这种独特优势,有助于加深对 C₃、C₄ 光合作用基因表达调控的深入理解。

C₄ 植物存在的 CCM 机制以及典型的“Kranz”结构,使其在处于不利环境如强辐射、高温、高压、盐碱下表现出明显的生长优势,对水、氮、光能利用率高,更能提高生物产量^[14]。但大部分粮食作物如水稻、小麦、大豆等都是 C₃ 植物,科学家曾试图利用基因工程手段把 C₄ 植物中的高光效特征导入到 C₃ 植物中^[15-16],以培育出类 C₄ 植物,但结果不仅未出现预期的性状反而影响植物正常的生长发育等。这可能归因于目前仅了解 C₄ 循环的基本生化过程,对 C₄ 植物叶肉细胞和维管束鞘细胞分化机制、叶片结构发育调控、BSC 中叶绿体的分化和积累等方面了解甚少。*E. baldwinii* 能够在不同的环境下采用不同的光合作用模式以及能够进行光合类型转变这

些特征使其成为研究 C₄ 光合系统的好材料,在探索“Kranz”结构的形成方面具有独特的优势,为后续研究寻找与叶片结构发育过程相关的基因,解密 C₄ 光合模式,真正意义上实现在 C₃ 植物中进行 C₄ 循环提供了研究材料。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] BEER K D, ORELLANA M V, BALIGA N S. Modeling the evolution of C₄ photosynthesis[J]. Cell, 2013, 153(7): 1427-1429.
- [3] 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 environment, 2003, 26: 313-322.
- [4] MORINAKA Y, SAKAMOTO T, INUKAI Y, et al. Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice[J]. Plant physiology, 2006, 141: 924-931.
- [5] PENG S B, TANG Q, ZOU Y. Current status and challenges of rice production in China[J]. Plant Prod Sci, 2009, 12: 3-8.
- [6] LANGDALE J A. C₄ cycles: past, present, and future research on C₄ photosynthesis[J]. Plant cell, 2011, 23: 3879-3892.
- [7] ZHU X G, STEPHEN P L, DONALD R O. Improving photosynthetic efficiency for greater yield[J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 235-261.
- [8] OSAMU U, MUNEAKI S, SHOSHI M, et al. Photosynthetic characteristics of an amphibious plant, *Eleocharis vivipara*: expression of C₄ and C₃ modes in contrasting environments[J]. Proc Natl Acad Sci, 1988, 85: 6733-6737.
- [9] OSAMU U. Induction of Kranz anatomy and C₄-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid[J]. Plant cell, 1998, 10: 571-583.
- [10] 沈伟其. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法[J]. 植物生理学通讯, 1988 (3): 62-64.
- [11] 伍欢, 吴杰敏. *Eleocharis baldwinii* 的光合模式鉴定及染色体观察[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(5): 7-12.
- [12] SAGER F, KHOSHRAVESH R, SAGE T L. From proto-Kranz to C₄ Kranz: building the bridge to C₄ photosynthesis [J]. J Exp Bot, 2014, 65(13): 1-16.
- [13] CHENT Y, YER J, FAN X L, et al. Identification of C₄ photosynthesis metabolism and regulatory-associated genes in *Eleocharis vivipara* by SSH[J]. Photo Synth Res, 2011, 108: 157-170.
- [14] ZHU X G, SHAN L L, WANG Y, et al. C₄ rice—an ideal arena for systems biology research[J]. Integrative plant biology,

2010,52(8): 762-770.

[15] WEISSMANN S, BRUTNELL T P. Engineering C₄ photosynthetic regulatory networks [J]. Biotechnol, 2012, 23: 298-304.

[16] THOLEN D, CAROLINA B, ZHU X G, et al. Opinion: prospects for improving photosynthesis by altering leaf anatomy [J]. Plant science, 2012, 197: 92-101.

Effects of different stress on formation of C₄ anatomy in *Eleocharis baldwinii*

ZHU Yasha CHEN Taiyu WU Jiemin WU Huan LIN Yongjun

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

Abstract *Eleocharis baldwinii* in the submerged forms were treated with different concentration of NaCl and PEG-6000. Results of anatomical observation, chlorophyll content determination and activity of key enzymes in C₄ cycle showed that the anatomical structure of culms of *Eleocharis baldwinii* induced by 0.4% NaCl or 3.0% PEG-6000 appeared “Kranz” type with C₄-like phenotype.

Keywords *Eleocharis baldwinii*; C₄; C₃-C₄ intermediate phenotype; “Kranz” structure

(责任编辑:张志钰)