

综 述 Reviews

硅藻C₄光合作用研究回顾与展望赵志方^{1,2,3}, 赵东会^{1,4}, 任庆敏^{1,2,3}, 王寅初^{1,2,*}, 秦松^{1,2}, 郭少方⁵¹中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东烟台264003²中国科学院海洋大科学研究中心, 山东青岛266071³中国科学院大学, 北京101407⁴哈尔滨工业大学(威海), 山东威海264209⁵烟台市科技情报研究所, 山东烟台264003

摘要: 硅藻(Bacillariophyta)是海洋浮游植物的主要类群之一, 也是海洋生态系统中的主要初级生产者, 在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着极其重要的作用。20世纪70年代以来, 科学家们陆续发现了硅藻的某些种类中可能存在C₄光合作用, 但直至目前, 人们对硅藻C₄光合作用的认识还很有限。本文主要对硅藻C₄光合作用发现的历程、二氧化碳浓缩机制及其与高等植物C₄光合作用的比较进行论述, 解析硅藻C₄光合作用的机制。

关键词: 硅藻; C₄光合作用; 二氧化碳浓缩机制; “花环”结构; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶

真核浮游植物在水生生物地球化学循环和海洋生态系统中发挥着重要作用(Ewe等2018)。硅藻(Bacillariophyta)是单细胞的光合真核生物(Peers和Price 2006; Tachibana等2011), 作为海洋浮游植物的主要类群之一, 在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着极其重要的作用(Sengupta等2017)。在全球碳循环中, 硅藻更是贡献了全球海洋、内陆水域以及陆地20%的初级生产力(刘乾等2018)。海洋硅藻每年固定的无机碳超过100亿t, 占海洋中总固定无机碳的25%~40% (高亚辉等2011)。

在高等陆生植物中, C₄途径是植物进化过程中出现的一种高级形式, 提高了CO₂的利用效率(华春等2013)。C₄植物比C₃植物能更好地适应高温、干旱和光照强烈的恶劣环境(Huang等2015)。在硅藻中是否存在C₄光合途径以及该途径是否与其适应水生环境有关的争论由来已久(Sage等2012), 研究硅藻C₄光合作用及其机制对解释其在海洋中的巨大贡献以及对生物圈的碳循环研究至关重要。

1 硅藻C₄光合作用的发现史

1.1 硅藻C₄光合作用研究溯源

Beardal等(1976)首先在中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricor-*

nutum)中发现了一种类似于C₄途径的光合代谢通路, 这种代谢通路在其他微藻中很少发现。他们采用荧光定量PCR (qPCR)和同位素标记技术, 在光照条件下, 将海洋硅藻暴露在¹⁴C标记的CO₂中, 经过一段时间的光合作用, 硅藻中显示出标记有¹⁴C的C₄有机化合物, Beardal等(1976)将其解释为C₄光合作用。

1.2 威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*) C₄光合作用的研究

在Beardal等(1976)的研究之后, Reinfelder等(2000)和Morel等(2002)重新对海洋单细胞硅藻的C₄光合作用进行了研究。其中, Reinfelder等(2000)在威氏海链藻的研究中采用了5 s的短时间标记, 发现了一种新的标记模式, 他将其解释为C₄生物化学。虽然Reinfelder等(2000)用C₄光合作用对他们的数据进行了解释, 但在标记细胞的最短时间内, C₃产物中也出现了显著的标记。他们采用脉冲追踪的方法, 即在短期内供应无机¹⁴C标记的CO₂后, 跟踪光合产物中同位素标记的分布, 并且在一次

收稿 2019-10-15 修定 2020-02-21

资助 国家重点研发计划(2016YFE0106700)。

* 通讯作者(ycwang@yic.ac.cn)。

间隔以后用无机 ^{12}C 标记,发现标记物从 C_4 化合物转移到了 C_3 化合物。这种情况在某些 C_4 或者 $\text{C}_3\text{-C}_4$ 中间类型的被子植物中曾有发现,所以他们认为威氏海链藻进行的是 C_4 光合作用或 $\text{C}_3\text{-C}_4$ 中间光合作用(Morel等2002; Reinfelder等2004)。然而,Roberts等(2007a)发现,将威氏海链藻暴露于 ^{14}C 标记的 CO_2 的环境中2~30 s,可在其光合产物中检测到 ^{14}C 标记的 C_3 和 C_4 化合物。虽然在较长的标记时间内, C_4 化合物中的 ^{14}C 标记减少了,但从起始时间推断, C_3 和 C_4 化合物中的标记仍然显著。综上,Roberts等(2007a)认为威氏海链藻进行的是 $\text{C}_3\text{-C}_4$ 中间光合作用,而并不只是 C_4 光合作用。

1.3 假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*) C_4 光合作用的研究

Roberts等(2007b)研究了假微型海链藻的标记模式,使用了与威氏海链藻相同的标记技术和标记间隔,但标记结果与威氏海链藻非常不同:假微型海链藻的标记物显示出完全的 C_3 模式,在 C_4 产物中并没有发现和威氏海链藻中相同的 C_4 标记;同时,在假微型海链藻中,磷酸乙醇酸[来自1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RubisCO)的活动]代谢产物的标记也比威氏海链藻中多,并且在海水低无机碳浓度的情况下,这种情况仍然存在。虽然两种海链藻在 ^{14}C 标记物上有非常明显的差异,但这两个物种都有二氧化碳浓缩机制(carbon-concentrating mechanism, CCM),并且生长速率和对无机碳浓度的依赖非常地相似(Clark和Flynn 2000),对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)抑制剂的反应也非常相似,显示出 C_4 代谢的特征(McGinn和Morel 2008a)。Bowler等(2010)分析认为,假微型海链藻的有机碳标记结果中的 ^{14}C 可能与一种涉及有机酸的 C_4 代谢途径兼容,他认为这种酸最可能是草酰乙酸。虽然这种化合物很少,但在苹果酸和天冬氨酸被排除的情况下,它是唯一可能参与 C_4 光合作用的二羧酸,而Roberts等(2007b)没有对此进行进一步研究,故关于假微型海藻中是否存在 C_4 光合作用仍然存在很大争议。Clement等(2016)使用了多种方法,对暴露于不同浓度 CO_2 环境中的假微型海链藻的CCM进行了研究。他们发现碳吸收的动力学特性与碳

酸酐酶(CA)的活性紧密相关,并且酶的活性谱显示碳固定途径涉及 C_3 代谢而不是 C_4 代谢。

1.4 三角褐指藻 C_4 光合作用的研究

三角褐指藻是另一种被深入研究是否存在 C_4 光合作用的硅藻。在三角褐指藻 C_4 光合代谢的研究中,研究者通常使用不同于其他两种硅藻的研究方法(Raven 2010)。McGinn和Morel (2008a)发现 CO_2 浓度降低对三角褐指藻 C_4 酶转录水平的影响小于对假微型海链藻 C_4 酶转录水平的影响,但它们受 C_4 酶抑制剂的影响相似。而在此之前,Cassar等(2007)检测了酶的活性,得出结论:三角褐指藻可能具有 C_3 光合作用特性。Kroth等(2008)基于全基因组的分析也得出了相似的结论,其中包括对PEPCK靶向序列的分析。

在最近的一项研究中,Huang等(2015)发现三角褐指藻中可能存在 C_4 光合作用,他们使用 ^{13}C 标记的代谢通量比分析鉴定了三角褐指藻 C_3 和 C_4 化合物之间的通量比率,并使用各种可透过细胞的荧光探针对细胞进行染色。代谢通量比分析表明 C_3/C_4 交换比率很高,细胞染色表明三角褐指藻中存在 C_4 光合作用所需的细胞器分区,这两项研究结果支持了三角褐指藻中存在 C_4 光合作用的推断。

1.5 其他硅藻 C_4 光合作用的研究

Trimborn等(2009)进一步对假微型海链藻中是否存在 C_4 光合作用进行了研究。他们研究了PEPC和RubisCO的体外活性,并且扩展到其他三种海洋硅藻——浮动弯角藻(*Eucampia zodiacus*)、中肋骨条藻和菱形海线藻(*Thalassionema nitzschioides*)。他们发现这四种硅藻中PEPC与RubisCO活性的比值均符合 C_3 被子植物的低范围特征,不符合 C_4 被子植物的高范围特征。他们还利用蛋白质组学来研究光合作用的代谢途径,结果表明:尽管PEPC活性值不符合 C_4 光合代谢特征,但 C_4 通路中酶的表达水平暗示了假微型海链藻有进行 C_4 光合作用的可能(Nunn等2009; Trimborn等2009)。

刘乾等(2016)对玛氏骨条藻(*Skeletonema marino*)转录组的碳固定代谢途径进行了分析,发现18个与碳固定代谢途径相关的酶及34个对应的编码基因,经基因序列比对,这些编码基因与假微型海链藻的基因序列有较高的一致性。根据KEGG

注释结果, 他们分析了玛氏骨条藻的碳固定代谢途径, 发现了玛氏骨条藻含有类似于陆地C₄植物CCM所需的全部酶类。

综上所述, 关于硅藻中是否存在C₄光合作用, 各报道之间仍然存在着明显分歧(表1)。

2 硅藻的CCM研究

CO₂在水中扩散得非常缓慢, 特别是在生物体表面的边界层, 所以CO₂潜在地限制了水生环境中植物的光合作用(Granum等2005)。但许多植物都克服了这种潜在的碳限制, 在细胞内形成一种主动转移无机碳的机制——CCM, 提高了它们的光合效率 and 生产力。微藻也在适应水体无机碳浓度变化的过程中形成了这一机制, 为进行C₄光合作用聚集充足的CO₂。

CCM在接近光合羧化酶RubisCO的空间位置上增加了CO₂浓度, 使植物在CO₂受限的环境中有更高的固碳速率。同时CCM的运行也使更丰富的碳酸氢盐可用于光合碳固定, 这是因为CA的存在使HCO₃⁻转化为CO₂。CCM通常可划分为生物物理CCM (图1)和生物化学CCM (图2)。生物物理CCM

的一个特征是: 通过质膜上特定的碳酸氢盐转运体在质体内积累活性无机碳, 由CA催化CO₂和HCO₃⁻发生互变反应(Tachibana等2011); 另一个特征是: 细胞内存在蛋白核, 这是一种类似于细菌羧酶体的结构, 含有高浓度的CO₂、RubisCO和三种CA。转运体和蛋白核的存在, 可以有效控制胞内溶解无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC)的含量, 提高CCM效率。生物化学CCM则是将运输的无机碳以有机碳化合物的形式储存起来。这些有机化合物通常由4个碳原子组成, 它们在接近RubisCO的地方脱羧可以增加局部CO₂的浓度。因此, 这种机制也被称为C₄通路或C₄型CCM (Reinfelder 2011)。

蓝藻(Cyanobacteria)以及其他水生高等植物如黑藻(*Hydrilla verticillata*)、水蕴草(*Egeria densa*)、伊乐藻(*Elodea canadensis*)和水车前(*Otteliaalis-moides*)都存在C₄型CCM (Bowes和Salvucci 1989; Zhang等2014; Shao等2017)。一般认为, 硅藻具有生物物理CCM是因为细胞膜上存在无机碳的转运系统。但是生物化学CCM在硅藻中的报道很少, 目前只在威氏海链藻和假微型海链藻中被发现

表1 几种主要硅藻中可能存在C₄光合作用的证据
Table 1 Evidences for C₄ photosynthesis in several diatom species

硅藻种类	光合作用碳同化途径的证据	参考文献
三角褐指藻	无机 ¹⁴ C标记显示C ₄ 代谢	Beardall等1976
	酶活性分析显示C ₃ 代谢	Cassar和Laws 2007
	基因组分析显示C ₃ 代谢	Kroth等2008
	无机碳固定酶的分布显示C ₃ 代谢	Ewe等2018
	代谢通量比分析显示C ₄ 代谢	Huang等2015
	细胞荧光染色显示C ₄ 代谢	Huang等2015
假微型海链藻	无机 ¹⁴ C标记显示C ₃ 代谢	Roberts等2007b
	转录组分析显示C ₃ 代谢	McGinn和Morel 2008a
	蛋白质组分析显示C ₃ 或C ₄ 代谢	Nunn等2009
	酶活性分析显示C ₃ 代谢	Nunn等2009
	C ₄ 酶的抑制剂分析显示C ₄ 代谢	McGinn和Morel 2008a, b
	C ₄ 有机酸代谢相关酶的定位显示C ₃ 代谢	Tanaka等2014
威氏海链藻	酶的活性谱分析显示C ₃ 代谢	Trimborn等2009; Clement等2016
	无机 ¹⁴ C标记显示C ₄ 代谢或C ₃ -C ₄ 中间代谢	Morel等2002; Reinfelder等2004
	无机 ¹⁴ C标记显示C ₃ -C ₄ 中间代谢	Roberts等2007a
	酶的定位显示C ₄ 代谢或C ₃ -C ₄ 中间代谢	Reinfelder等2000
玛氏海链藻	C ₄ 酶的抑制剂分析显示C ₄ 代谢	McGinn和Morel 2008a, b
	转录组和代谢组分析显示C ₄ 代谢	Liu等2016

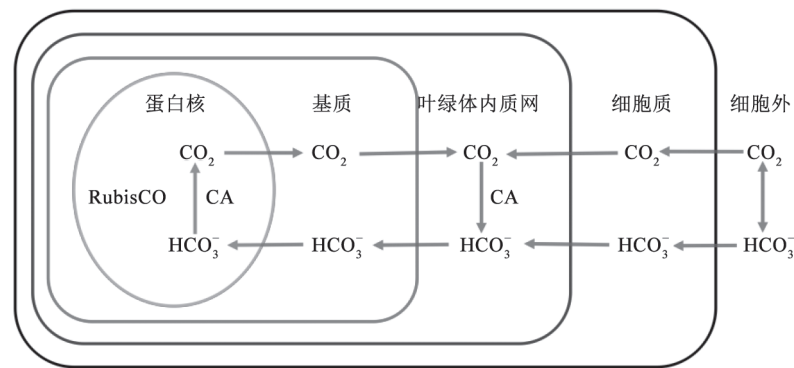


图1 硅藻的生物物理CCM

Fig.1 The biophysical CCM in diatoms

CA: 碳酸酐酶; RubisCO: 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶。参考Hopkinson等(2016)并修改。

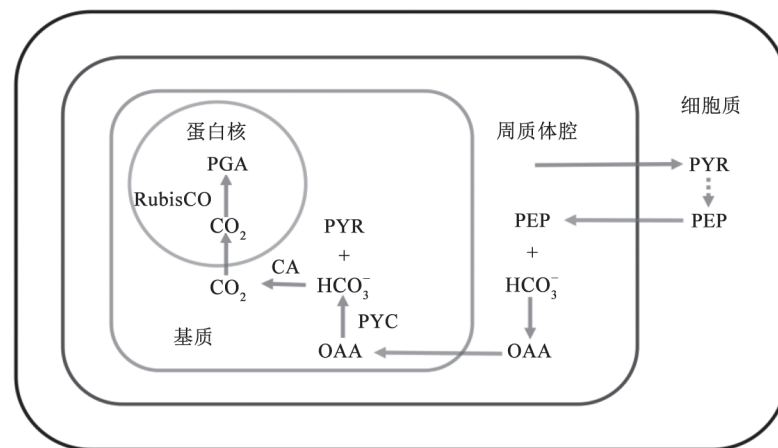


图2 硅藻的生物化学CCM

Fig.2 The biochemical CCM in diatoms

CA: 碳酸酐酶; OAA: 草酰乙酸; PEP: 磷酸烯醇丙酮酸; PGA: 磷酸甘油酸; PYC: 丙酮酸羧化酶; PYR: 丙酮酸; RubisCO: 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶。虚线箭头表示可能存在的途径。参考Hopkinson等(2016)并修改。

(Tanaka等2014)。Ewe等(2018)的研究证明了硅藻当中的三角褐指藻并不存在生物化学CCM。他们研究了C₄途径的有关酶, 无论是丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)还是NAD-苹果酸酶(NAD-ME)的活性都不受CO₂浓度变化的影响, 因此得出结论: 三角褐指藻中不进行生物化学CCM。相反, 核心C₄酶更可能参与其他途径, 如糖异生、氨基酸合成或三羧酸循环(Haimovich-Dayana等2012)。

3 硅藻的“花环”结构

3.1 C₄高等植物的“花环”结构

包括水稻(*Oryza sativa*)在内的大多数植物首

先通过RubisCO将CO₂固定在C₃化合物中, 这个过程被称为C₃光合作用。RubisCO本质上是低效的, 因为它也可以催化与氧气的反应, 进行光呼吸(侯学文等2019)。为了克服这种低效率, C₄途径最初利用对O₂不敏感的PEPC将大气中的CO₂固定成C₄酸, 然后从C₄中释放CO₂用于RubisCO的重新固定。在大多数C₄植物中, C₄途径的这两个阶段在形态上不同的光合细胞类型中是分离的。C₄植物可以使高浓度的CO₂在RubisCO附近积累, 从而提高光合效率(Haimovich-Dayana等2012)。

在玉米(*Zea mays*)和一些双子叶C₄植物中, 扩大的维管束鞘(BS)细胞围绕着叶脉(V), 然后维管

束鞘细胞被叶肉(M)细胞包围。因此, 每对叶脉由两个维管束鞘细胞和两个叶肉细胞组成, 并以V-BS-2M-BS-V模式排列, 称为“花环”结构。C₃植物的解剖结构通常以V-BS-nM-BS-V模式排列, 并且维管束鞘细胞比C₄植物的要小。在陆生植物中, “花环”结构是C₄植物的典型形态结构(华春等2013)。

3.2 硅藻C₄光合作用的细胞结构基础——质体

在单细胞中, C₄光合作用是较罕见的(Reiskind和Bowes 1991), 但它却在一些水生被子植物中存在。其中研究最深入的是淡水被子植物黑藻, 它具有可诱导的C₄特征, 但缺少“花环”结构(Granum等2005)。当C₄光合作用在单个细胞中进行时, 叶绿体可以充当防止CO₂泄漏的小室(compartment) (Reiskind和Bowes 1991), 将CO₂进行聚集, 提高光合作用的效率。在硅藻中, 质体也可以充当浓缩CO₂的隔间(Kilian和Kroth 2010), 它被四层膜包围, 这四层膜将内质网管腔、细胞周质间隙、包层间隙和间质分开。目前尚不清楚这些膜是否能有效阻止CO₂的泄漏。有报道称绿藻的质膜可以充当DIC的转运位点, 防止叶绿体中的CO₂逃逸到胞质中。在低、高DIC浓度下, 细胞叶绿体膜对DIC分别具有高亲和性和低亲和性(Palmqvist等1994; Amoroso等1998)。硅藻质体的基质pH主要为碱性, 无机碳池中含有大量的HCO₃⁻, HCO₃⁻经被动单向运输被转运至类囊体的内腔, 进一步与积累的质子反应生成CO₂, 从而导致腔内的CO₂浓度升高(Sengupta等2017)。

3.3 蛋白核的提出

蛋白核是一类亚细胞结构, 存在于许多藻类的色素体和陆生角藓门的叶绿体中, 硅藻的叶绿体中也含有蛋白核。科学家发现蛋白核与CCM有关, 证实了蛋白核的功能与高等植物的“花环”结构相似。蛋白核的主要作用是作为CO₂固定的中心, 在与光合作用相关的加氧酶周围创造并维持一个高CO₂浓度环境。由此可见, 蛋白核的作用也和蓝细菌的羧酶体相似。但和羧酶体不同, 蛋白核通常由蛋白外壳和淀粉鞘包裹, 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的蛋白核在淀粉鞘外还有一层由两种蛋白质组成的高分子复合物。目前的假说认为该层高分子复合物可以起到防止CO₂泄漏或重新捕获

从蛋白核中逸出的CO₂的作用(Giordano和Beardall 2005)。现有的生物物理CCM的模型指出, 蛋白核是某些藻类CCM运行的核心结构(Grossman等2007)。

Badger和Price (1992)最先提出蛋白核的功能可能和蓝细菌的羧酶体相似, 即与CCM有关。蓝藻和真菌共生的地衣CCM已通过气体交换和碳同位素标记这两项技术阐明(Máguas等1993)。Palmqvist (1993)和Badger等(1993)证明了藻类的CCM与蛋白核有关。Kikutani等(2016)发现了三角褐指藻蛋白核中含有大量与CCM有关的CO₂、RubisCO和3种CA。

4 C₄光合作用关键酶的研究

Reinfelder等(2000)发现了威氏海链藻进行C₄光合作用的证据。这种硅藻中显示出一定的C₄酸标记, 同时在叶绿体中存在两种C₄通路关键酶PEPC和PEPCK。进一步表明PEPC在威氏海链藻中具有C₄功能的证据来自于Reinfelder等(2000)的C₄酸的标记和PEPC抑制剂的实验。三角褐指藻和中肋骨条藻均被报道具有PEPC活性, 但后来被证明很可能是PEPCK的活动。Descolas-Gros和Oriol (1992)提出所有的硅藻都有PEPCK, 但并不是都有PEPC或丙酮酸羧化酶(PC)。此外, Armbrust等(2004)的基因组数据证明了假微型海链藻中也存在PEPC和PEPCK。Granum等(2005)在假微型海链藻基因组中发现了两种不同的PEPC基因, 将假设的蛋白序列(PEPC1和PEPC2)与相应的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)酶和大肠杆菌(*Escherichia coli*)酶进行比较。这两种不同的PEPC在氨基酸水平上只有44%的序列一致性, 而它们与拟南芥酶或大肠杆菌酶只有36%一致。从威氏海链藻中也克隆出了一个PEPC基因, 该基因在氨基酸水平上与假微型海链藻PEPC2相似性达到92%。与被子植物PEPC相比, 硅藻PEPC中没有N-末端调控磷酸化结构域。在研究假微型海链藻的PEPCK基因时, 他们也将假设的蛋白质序列与相应的拟南芥酶和大肠杆菌酶进行对比。硅藻PEPCK在序列上与大肠杆菌酶相比(46%相同)比与拟南芥酶相比(34%相同)更相似, 并且也不具有N-末端调控磷酸化结构域(Leegood和Walker 2003)。

PEPCK研究的另一个重要方面是其在细胞内的定位(Granum等2005)。在绿藻钙扇藻(*Udotea flabellum*)中, PEPCK作为羧化酶在胞质中发挥作用, 并且在所有研究的植物中PEPCK都位于胞质中(Leegood和Walker 2003)。但是如果PEPCK扮演了C₄脱羧酶的角色, 它很可能位于一个可以聚集CO₂的小室中, 即叶绿体或蛋白核中(Reinfelder等2000)。最近有两项证据表明PEPCK可能位于硅藻的叶绿体中(Nunn等2009): 第一, 发现威氏海链藻的叶绿体片段中含有PEPCK, 但是并不排除实验过程中细胞质污染造成的双重定位(Reinfelder等2000); 第二, PEPCK已经被免疫定位于中肋骨条藻和海带(*Laminaria japonica*)的叶绿体中(Cabello-Pasini等2001)。

最近Ewe等(2018)研究了三角褐指藻中可能与C₄通路有关的酶。他们通过表达GFP融合蛋白对C₄相关酶在细胞内的定位进行了研究, 并与C₄模式植物玉米和C₃模式植物拟南芥中各自酶的位置进行了比较。他们认为质体是单个细胞C₄型CCM存在的先决条件(Li等2017), 但脱羧酶苹果酸酶(MEs)和PEPCK都不位于质体中。Tanaka等(2014)测定的假微型海链藻细胞内酶的分布与三角褐指藻内酶的分布相似, 并且这些酶的基因序列与三角褐指藻中的序列具有同源性。研究发现, 假微型海链藻NAD-ME的转录水平极低, 在黑暗条件下能诱导PEPCK转录, 表明PEPCK参与了黑暗中线粒体的代谢, 如呼吸作用和氨基酸代谢。用PEPCK和PEPC抑制剂处理低CO₂浓度生长环境中的假微型海链藻可以有效地降低最大光合作用速率, 而这些处理方法不会影响高亲和力的光合作用。他们的研究结果证实了类似C₄的CCM在三角褐指藻和假微型海链藻的CO₂固定中没有起重要作用, 而且表明研究的酶更有可能参与C₃光合作用(Holdsworth和Colbeck 1976; Tanaka等2014)。但Haimovich-Dayana等(2012)认为三角褐指藻中存在C₄代谢, 并研究了C₄代谢在三角褐指藻中的作用。他们使用RNA干扰来沉默三角褐指藻中对C₄代谢至关重要的编码PPDK的单个基因, 发现该突变体的PPDK活性较低, 并且转录物较少, 但光合作用的K_{1/2}(CO₂)几乎没有受到影响, 因此表明C₄途径并

没有提高三角褐指藻RubisCO附近CO₂的浓度。所以他们提出C₄代谢在三角褐指藻净CO₂固定中可能不起重要作用。

5 总结与展望

作为海洋初级生产力的最大贡献者, 硅藻的研究一直是国内外研究的热门。C₄植物的出现是光合作用进化过程中的重大事件, 硅藻中C₄机制的发现也推动了藻类光合作用研究的进程。尽管关于硅藻中是否存在C₄光合作用还存在质疑, 但鉴于它在全球物质循环和能量流动中的重要作用, 关于它的光合作用研究仍具有重大的实际意义。本文对硅藻C₄光合作用的探究历程和CCM展开了讨论, 分析了硅藻的“花环”结构, 并且对C₄通路中的酶进行了活性和定位分析。

硅藻C₄光合作用的研究主要集中在假微型海链藻、威氏海链以及三角褐指藻中, 还有部分对中肋骨条藻和玛氏骨条藻的研究。高坤山(2014)从进化的角度阐述了硅藻存在C₄途径的可能性以及原因。近三年来对三角褐指藻C₄光合作用的研究居多, 而对于其他硅藻的研究较少。并且有一些硅藻, 比如浮动弯角藻和菱形海线藻当中是否存在C₄光合作用以及它的的机制没有太多的证据, 需要我们深入研究来揭开谜底。本文认为, 如果要满足C₄光合作用, 需要存在两个重要的前提条件: 第一, 必须存在C₄光合作用的酶, 比如PEPC、PPDK等; 第二, 必须有进行CCM的分区, 比如高等植物的“花环”结构或者是蛋白核结构等。

目前, 国外对于此类的研究较多, 关于硅藻中是否存在C₄光合作用还存在着争论和分歧。因此, 在未来需要开发更精准的标记技术, 定位C₄途径中的关键酶以及分离完整的有功能活性的叶绿体。除此之外, 还需要进一步研究细胞的超微结构, 将其与关键酶在细胞中的定位相结合, 以增进对海洋浮游藻类生物物理CCM和生物化学CCM的了解。基因组、转录组、蛋白组和代谢组能提供基因遗传和进化、转录、翻译及最终代谢水平上的大量信息(Fang等2018)。近几年来, 各种组学在不断地完善和发展, 但是关于硅藻中存在C₄光合作用的证据则常常停留在单一组学的水平上, 往往造

成不同方法得出的结论相悖。本文认为整合多组学的研究, 将基因组与转录组进行结合, 以及引入蛋白组、代谢组的支持证据进行多方面验证, 将会为硅藻C₄光合作用的深入研究提供新的方向。结合比较基因组学, 发掘新基因、新蛋白及代谢标志物是未来研究植物光合作用通路及其机制的发展方向之一。

参考文献(References)

- Amoroso G, Sültemeyer D, Thyssen C, et al (1998). Uptake of HCO₃⁻ and CO₂ in cells and chloroplasts from the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol*, 116: 193–201
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, et al (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306: 79–86
- Badger MR, Price GD (1992). The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol Plant*, 84: 606–615
- Badger MR, Pfanz H, Büdel B, et al (1993). Evidence for the functioning of photosynthetic CO₂-concentrating mechanisms in lichens containing green algal and cyanobacterial photobionts. *Planta*, 191: 57–70
- Beardall J, Mukerji D, Glover HE, et al (1976). The path of carbon in photosynthesis by marine phytoplankton. *J Phycol*, 12: 409–417
- Bowes G, Salvucci ME (1989). Plasticity in the photosynthetic carbon metabolism of submersed aquatic macrophytes. *Aquat Bot*, 34: 233–266.
- Bowler C, Vardi A, Allen AE (2010). Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. *Ann Rev Mar Sci*, 2: 333–365
- Cabello-Pasini A, Swift H, Smith GJ (2001). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from the marine diatom *Skeletonema costatum* and the phaeophyte *Laminaria setchellii*. II. Immunological characterization and subcellular localization. *Bot Mar*, 44: 199–207
- Cassar N, Laws EA (2007). Potential contribution of β -carboxylases to photosynthetic carbon isotope fractionation in a marine diatom. *Phycologia*, 46: 307–314
- Clark DR, Flynn KJ (2000). The relationship between the dissolved inorganic carbon concentration and growth rate in marine phytoplankton. *Proc R Soc Lond*, 267: 953–959
- Clement R, Dimnet L, Maberly SC, et al (2016). The nature of the CO₂-concentrating mechanisms in a marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*. *New Phytol*, 209: 1417–1427
- Descolas-Gros C, Oriol L (1992). Variations in carboxylase activity in marine phytoplankton cultures. β -carboxylation in carbon flux studies. *Mar Ecol Prog Ser*, 85: 163–169
- Ewe D, Tachibana M, Kikutani S, et al (2018). The intracellular distribution of inorganic carbon fixing enzymes does not support the presence of a C₄ pathway in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photosynth Res*, 137: 263–280
- Fang CY, Fernie AR, Luo J (2018). Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends Plant Sci*, 24: 83–98
- Gao KS (2014). *Algae Carbon Fixation—Basis, Advances and Methods*. Beijing: Science Press (in Chinese) [高坤山(2014). 藻类固碳——理论、进展与方法. 北京: 科学出版社]
- Gao YH, Liang JR, Chen CP, et al (2011). Studies on biodiversity and ecological importance of marine diatoms. *J Xiamen Univ*, 50: 455–464 (in Chinese with English abstract) [高亚辉, 梁君荣, 陈长平等(2011). 海洋硅藻多样性与生态作用研究. 厦门大学学报, 50: 455–464]
- Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005). CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 99–131
- Granum E, Raven JA, Leegood RC (2005). How do marine diatoms fix 10 billion tonnes of inorganic carbon per year? *Can J Bot*, 83: 898–908
- Grossman AR, Croft M, Gladyshev VN, et al (2007). Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 190–198
- Haimovich-Dayan M, Garfinkel N, Ewe D, et al (2012). The role of C₄ metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol*, 197: 177–185
- Holdsworth ES, Colbeck J (1976). The pattern of carbon fixation in the marine unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Biol*, 38: 189–199
- Hopkinson BM, Dupont CL, Matsuda Y (2016). The physiology and genetics of CO₂ concentrating mechanisms in model diatoms. *Plant Biol*, 31: 51–57
- Hou XW, Li YJ, Zhong Q, et al (2019). Recent progress of photorespiration pathway and its regulation. *Plant Physiol J*, 55: 255–264 (in Chinese with English abstract) [侯学文, 李英杰, 钟琪等(2019). 光呼吸代谢途径及其调控的研究进展. 植物生理学报, 55: 255–264]
- Hua C, Wang RL, Chen QZ, et al (2013). Evolution of the C₄ pathway in photosynthesis. *Jiangsu Agr Sci*, 41: 20–21 (in Chinese) [华春, 王仁雷, 陈全战等(2013). 光合作用C₄途径的进化. 江苏农业科学, 41: 20–21]
- Huang A, Liu L, Zhao P, et al (2015). Metabolic flux ratio analysis and cell staining suggest the existence of C₄ photosynthesis in *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl Microbiol*, 120: 705–713
- Kikutani S, Nakajima K, Nagasato C, et al (2016). Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and pho-

- tosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Proc Natl Acad Sci USA, 113: 9828–9833
- Kilian O, Kroth PG (2010). Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. Plant J, 41: 175–183
- Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, et al (2008). A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. PLoS One, 3: 1426–1438
- Leegood RC, Walker RP (2003). Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. Arch Biochem Biophys, 414: 204–210
- Li F, Beardall J, Collins S, et al (2017). Decreased photosynthesis and growth with reduced respiration in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown under elevated CO₂ over 1800 generations. Global Change Biol, 23: 127–137
- Liu Q, Mi TZ, Zhen Y, et al (2016). Description of carbon fixation pathway based on *Skeletonema marinoi* transcriptome. Chin Sci Bull, 61: 2483–2493 (in Chinese with English abstract) [刘乾, 米铁柱, 甄毓等(2016). 基于玛氏骨条藻(*Skeletonema marinoi*)转录组的碳固定代谢途径分析. 科学通报, 61: 2483–2493]
- Liu Q, Mi TZ, Zhen Y, et al (2018). Research progress on C₄ carbon fixation pathway of diatoms. Mar Sci, 42: 131–140 (in Chinese with English abstract) [刘乾, 米铁柱, 甄毓等(2018). 硅藻C₄固碳途径的研究进展. 海洋科学, 42: 131–140]
- Máguas C, Griffiths H, Ehleringer J, et al (1993). 14 - Characterization of photobiont associations in lichens using carbon isotope discrimination techniques. In: Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD (eds). Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations. Salt Lake City: Academic Press, 63: 201–212
- McGinn PJ, Morel FMM (2008a). Expression and inhibition of the carboxylating and decarboxylating enzymes in the photosynthetic C₄ pathway of marine diatoms. Plant Physiol, 146: 300–309
- McGinn PJ, Morel FMM (2008b). Expression and regulation of carbonic anhydrases in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* and in natural phytoplankton assemblages from Great Bay, New Jersey. Physiol Plant, 133: 78–91
- Morel FMM, Cox EH, Kraepiel AML, et al (2002). Acquisition of inorganic carbon by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. Funct Plant Biol, 29: 301–308
- Nunn BL, Aker JR, Shaffer SA, et al (2009). Deciphering diatom biochemical pathways via whole-cell proteomic. Aquat Microb Ecol, 55: 241–253
- Palmqvist K (1993). Photosynthetic CO₂-use efficiency in lichens and their isolated photobionts: the possible role of a CO₂-concentrating mechanism. Planta, 191: 48–56
- Palmqvist K, Yu JW, Badger MR (1994). Carbonic anhydrase activity and inorganic carbon fluxes in low- and high-C₁ of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. Physiol Plant, 90: 537–547
- Peers G, Price NM (2006). Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom. Nature, 441: 341–344
- Raven JA (2010). Inorganic carbon acquisition by eukaryotic algae: four current questions. Photosynth Res, 106: 123–134
- Reinfelder JR, Kraepiel AM, Morel FMM (2000). Unicellular C₄ photosynthesis in a marine diatom. Nature, 407: 996–999
- Reinfelder JR, Milligan AJ, Morel FM (2004). The role of the C₄ pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom. Plant Physiol, 135: 2106–2111
- Reinfelder JR (2011). Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. Ann Rev Mar Sci, 3: 291–315.
- Reiskind JB, Bowes G (1991). The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a marine macroalga with C₄-like photosynthetic characteristics. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 2883–2887
- Roberts K, Granum E, Leegood RC, et al (2007a). C₃ and C₄ pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control. Plant Physiol, 145: 230–235
- Roberts K, Granum E, Leegood RC, et al (2007b). Carbon acquisition by diatoms. Photosynth Res, 93: 79–88
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F (2012). Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis. Ann Rev Plant Biol, 63: 19–47
- Sengupta S, Gorain PC, Pal R (2017). Aspects and prospects of algal carbon capture and sequestration in ecosystems: a review. Chem Ecol, 33: 695–707
- Shao H, Gontero B, Maberly SC, et al (2017). Responses of *Ottelia alismoides*, an aquatic plant with three CCMs, to variable CO₂ and light. J Exp Bot, 68: 3985–3995
- Tachibana M, Allen AE, Kikutani S, et al (2011). Localization of putative carbonic anhydrases in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. Photosynth Res, 109: 205–221
- Tanaka R, Kikutani S, Mahardika A, et al (2014). Localization of enzymes relating to C₄ organic acid metabolisms in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*. Photosynth Res, 121: 251–263
- Trimborn S, Wolf-Gladrow D, Richter KU, et al (2009). The effect of pCO₂ on carbon acquisition and intracellular as-

simulation in four marine diatoms. *J Exp Mar Biol Ecol*, 376: 26–36
Zhang YZ, Yin LY, Jiang HS, et al (2014). Biochemical and

biophysical CO₂ concentrating mechanisms in two species of freshwater macrophyte within the genus *Ottelia* (Hydrocharitaceae). *Photosynth Res*, 121: 285–297

Retrospect and prospect of research on C₄ photosynthesis in diatoms

ZHAO Zhifang^{1,2,3}, ZHAO Donghui^{1,4}, REN Qingmin^{1,2,3}, WANG Yinchu^{1,2,*}, QIN Song^{1,2}, GUO Shaofang⁵

¹Key Laboratory of Coastal Biology and Bio-Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China

²Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101407, China

⁴Harbin Institute of Technology (Weihai), Weihai, Shandong 264209, China

⁵Yantai Institute of Science and Technology Information Research, Yantai, Shandong 264003, China

Abstract: Diatoms (Bacillariophyta) is one of the main groups of marine phytoplankton and plays an important role in global carbon cycle. The emergence of C₄ photosynthesis is a major stride in plant evolution, and also affects the global carbon cycle. However, the understanding of C₄ photosynthesis of diatoms is still limited. Since the 1970s, scientists have argued whether C₄ is involved in diatoms. In this paper, the discovery history of diatom C₄ photosynthesis, the diatom carbon dioxide concentration mechanism (CCM) and the comparison of C₄ photosynthesis between diatom and higher plants were reviewed. New methodology in the study of diatom's C₄ photosynthesis is prospected to know better about the role of diatoms in global carbon cycle.

Key words: diatom; C₄ photosynthesis; carbon-concentrating mechanism; kranz anatomy; phosphoenolpyruvate carboxylase

Received 2019-10-15 Accepted 2020-02-21

This work was supported by the National Key R&D Program of China (2016YFE0106700).

*Corresponding author (ycwang@yic.ac.cn).