



论文

缘管浒苔 C₄ 途径主要光合作用酶活性许建方^①, 张晓雯^②, 叶乃好^{②*}, 郑洲^①, 牟善莉^②, 董美涛^③, 徐东^②, 缪锦来^{①*}^① 国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室, 青岛 266061;^② 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071;^③ 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109

* 联系人, E-mail: yenh@ysfri.ac.cn; miaojinlai@163.com

收稿日期: 2012-10-24; 接受日期: 2012-12-28

山东省科技计划(批准号: 2011GHY11528)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 20603022012004)、国家自然科学基金面上项目(批准号: 41176153)、山东省自然科学基金面上项目(批准号: 2009ZRA02075)、青岛市科技计划(批准号: 11-3-1-5-hy)、青岛市科技计划(批准号: 10-3-4-11-1-jch)和国家海洋公益项目(批准号: 200805069)资助

摘要 缘管浒苔是一种绿海藻, 在解析其转录组的基础上, 发现缘管浒苔中存在编码丙酮酸磷酸双激酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶等 C₄ 途径关键酶的基因. 通过实时荧光定量 PCR 法, 检测缘管浒苔在不同环境条件下 *rbcL* 和丙酮酸磷酸双激酶基因的表达式变化. 结果显示, 正常培养条件下缘管浒苔 *rbcL* 基因的表达式比较高, 在胁迫条件下表达式比较低; 丙酮酸磷酸双激酶基因在某些胁迫条件(如干出、高盐和低盐)下表达式会升高. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶和丙酮酸磷酸双激酶在光合碳同化过程中都起作用, 而且在干出、高盐和低盐等胁迫条件下, 丙酮酸磷酸双激酶的酶活性会显著升高. 以上结果表明, 在某些胁迫条件下, 丙酮酸磷酸双激酶酶活性的升高可能改变了缘管浒苔碳代谢途径的走向, C₄ 代谢途径功能加强, 这可能提升了缘管浒苔耐受胁迫的能力, 从而有助于其广泛分布.

关键词C₄ 途径

PPDK

RuBPCase

缘管浒苔

根据光合作用碳同化机制的不同, 可以将植物分为 3 类: C₃ 植物、C₄ 植物和景天酸代谢(crassulacean acid metabolism, CAM)植物. 这 3 类光合碳代谢途径中最常见最原始的是 C₃ 途径, 它的最初光合产物是 3-磷酸甘油酸(三碳化合物)^[1]. 然而, 在 C₄ 途径中, 大气中的 CO₂ 最初形成的是一种四碳化合物. C₄ 途径是在原始的 C₃ 植物的基础上经过一系列的结构和生理适应性变化进化而来的^[2,3]. 与 C₃ 植物相比, C₄ 植物通过一种生化上的 CO₂ 浓缩机制来提高核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(rubisco)周围

CO₂ 的浓度, 使之能够更有效地利用氮和水^[4]. C₃-C₄ 中间型植物同时拥有 C₃ 植物和 C₄ 植物的特征, 它可能代表了 C₃ 途径向 C₄ 途径进化过程中的一个过渡阶段^[5].

陆生植物光合作用无机碳的吸收与固定机制已被广泛研究, 但水生植物这方面的研究却相对较少. 到目前为止, 还没有固定的标准可以把水生植物按照光合作用碳同化途径进行分类. 水生植物的某些种类, 如 *Hydrilla*, *Egeria*, *Orcuttia* 和 *Eleocharis* 属, 可以进行 C₄ 光合作用, 但它们并没有大部分陆生 C₄

引用格式: 许建方, 张晓雯, 叶乃好, 等. 缘管浒苔 C₄ 途径主要光合作用酶活性研究. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 596–605英文版见: Xu J F, Zhang X W, Ye N H, et al. Activities of principal photosynthetic enzymes in green macroalga *Ulva linza*: functional implication of C₄ pathway in CO₂ assimilation. Sci China Life Sci, 2013, 56: 571–580, doi: 10.1007/s11427-013-4489-x

植物拥有的 Kranz 结构^[6]. 在某些胁迫条件下, 这些物种在叶绿体内利用 NADP 苹果酸酶(NADP-ME)完成苹果酸脱羧反应从而形成一种叶绿体内的 CO₂ 浓缩机制(CO₂ concentrating mechanism, CCM)^[6]. C₃ 和 C₄ 途径在同一细胞中进行, 而磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(rubisco)分别在细胞质和叶绿体中起作用^[6]. 水生植物黑藻(*Hydrilla verticillata*)具有 C₃ 途径的气体交换和生化特征, 但当暴露在低浓度的 CO₂ 环境中 10~12 天, 会诱导产生 C₄ 类型的 CO₂ 浓缩机制^[7]; 这种从 C₃ 到 C₄ 途径的转变发生在新叶中, 并且在野外栖息地和实验室条件下都可以发生转变^[7,8]; 当 CO₂ 浓度比较低时, 黑藻叶片中 C₄ 途径的基因也会表达上调^[7,9].

尽管受到 CO₂ 浓度低的限制^[10], 海洋藻类仍通过 CO₂ 浓缩机制来增加主要的光合作用羧化酶 rubisco 周围 CO₂ 的浓度^[11~13]. 这个机制通过增加 CO₂ 与 O₂ 的比例, 减少了光呼吸过程中能量的浪费. 尽管生态因子对光合作用的碳吸收途径有较大的影响, 但是到目前为止, 在海洋藻类中有关这方面的研究比较少. 海洋藻类光合作用的碳固定途径一般被认为是 C₃ 途径^[14], 但是最近的代谢标记和基因组测序数据表明, 藻类中也存在 C₄ 途径, 如海洋硅藻威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)单细胞中存在 C₄ 途径^[15,16]. 在三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)和绿藻(*Ostreococcus tauri*)中已经发现了 C₄ 光合作用的相关基因^[17,18]. 在低浓度的 CO₂ 环境中, 威氏海链藻细胞中 PEPC 的活性会增加, 表明无机碳的吸收与 PEPC 可能存在联系^[15]. McGinn 和 Morel^[19]发现在低浓度的 CO₂ 环境中, 假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)胞中 2 个 PEPC 基因的转录水平提高了 2~4 倍. 威氏海链藻(*T. weissflogii*)在低浓度的 CO₂(10 $\mu\text{mol/L}$)环境中, PEPC 的活性被 3,3-dichloro-2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate 所抑制时, 整个细胞的光合作用降低幅度超过 90%, 但是对 C₃ 海洋绿藻衣藻几乎没有影响^[16].

石莼属藻类曾被认为是一种典型的 C₃ 植物^[20]. 缘管浒苔(*Ulva linza*)是一种典型的绿潮大型海藻, 是黄海沿岸 5 月前主要的优势石莼属物种^[21,22]. 缘管浒苔作为一种潮间带物种, 必须通过生理和分子调节手段来面对温度、太阳辐射和干出等极端环境^[23,24]. 在进化位置上, 潮间带多细胞绿藻可能位于单细胞

绿藻和低等陆地植物之间, 因此可以用来研究 CO₂ 固定途径的进化历程^[25]. 本研究首先通过转录组测序和分析, 确定缘管浒苔中同时存在 C₃ 和 C₄ 途径所需要的基因, 然后主要研究核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBPCase)和丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate orthophosphate dikinase, PPDK) 2 个关键酶在不同处理条件下的活性变化. RuBPCase 是 C₃ 途径的一个关键酶, 广泛分布在光合作用生物体中, 通过卡尔文循环催化光合作用中 CO₂ 的固定. PPDK 是 C₄ 途径的一个关键酶, 催化 C₄ 途径中 CO₂ 的原初受体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的形成^[26]. PPDK 催化形成 PEP 的速率在 C₄ 途径中是最低的, 因此这个反应被认为是 C₄ 途径中的限速步骤^[27,28]. 研究结果发现, 缘管浒苔中可能存在 C₄ 光合作用, 而且这可能有助于缘管浒苔的大规模暴发.

1 材料与方法

1.1 取样与培养条件

缘管浒苔于 2011 年 4 月采自青岛市栈桥码头的潮间带区域(35°35'N, 119°30'E). 实验中挑选藻体完整的样品, 用无菌海水冲洗数次, 然后用 1% 的次氯酸钠杀菌 2 min, 接着用高压灭菌的海水冲数次, 最后把缘管浒苔放入连续充气盛有富营养海水(500 $\mu\text{mol/L}$ NaNO₃ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ NaH₂PO₄)的玻璃缸中培养. 培养温度为 10℃, 光照周期为 12L:12D, 光照强度为 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ^[28].

1.2 转录组测序

缘管浒苔分别用低温(5℃)处理 1 h, 高温(42℃)处理 1 h, 高光强(1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)处理 3 h, 高盐(93‰)处理 3 h, UV-B(60 $\mu\text{W/cm}^2$)处理 3 h. 然后提取总 RNA 并纯化, 接着反转录成双链 cDNA 并纯化, 最后用罗氏 GS FLX 序列分析仪并配合钛测序试剂测序. 在构建缘管浒苔的代谢途径过程中, 使用 MEGAN4.0 把高质量的 reads 和京都基因及基因组百科全书(KEGG)数据库进行比较分析^[29].

1.3 序列分析

rbcL 基因与 *PPDK* 基因 cDNA 的开放阅读框(open reading frame, ORF)序列分别来自于 GenBank 和转录组测序, 然后用 NCBI 上的 BLAST X 程序

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)将这些序列与其他一些已知序列进行同源性比较. 用 the Six Frame Translation of Sequence System (http://molbiol.ru/eng/scripts/01_13.html)将核苷酸序列翻译成氨基酸序列. 源于 GenBank 的 *rbcL* 可读框序列(登录号: DQ813497)有 1425 bp, 编码 474 个氨基酸残基; 缘管浒苔转录组的 *PPDK* 的可读框序列(登录号: JN222388)有 2700 bp, 编码 889 个氨基酸残基.

1.4 叶绿素荧光检测

用 Dual-PAM-100 (Walz GmbH, Germany)通过脉冲幅度调制测量缘管浒苔活体光系统 II 的荧光参数. 先将样品暗适应 15 min, 测量最小荧光产额(F_0), 然后应用饱和脉冲法测量最大荧光产额(F_m)^[30].

用以下公式计算 PS II 的最大光化学效率(F_v/F_m)和实际光化学效率 $Y(II)$, 它们分别反映了植物的潜在最大光合能力和实际光合能力^[31]:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

$$Y(II) = (F'_m - F)/F'_m$$

式中, F'_m 为样品光适应后的最大荧光产额; F 为样品光适应后的荧光产额.

实验中所有的结果都用平均值表示, 并且用 SPSS (17.0 版本)软件进行统计学分析(ANOVA).

1.5 胁迫处理

将缘管浒苔分别进行干出、不同盐度、不同光照强度和不同温度处理. 干出处理时, 将缘管浒苔分别放在 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照强度下处理 0, 1, 2, 3, 4 和 5 h; 用不同的盐度(0‰, 15‰, 30‰, 45‰和 60‰)分别处理缘管浒苔 1 h; 用不同的光照强度(0, 50, 200, 600, 1000 和 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)分别处理缘管浒苔 1 h; 用不同温度(0, 5, 10, 15, 20, 25 和 30℃)分别处理缘管浒苔 1 h. 处理缘管浒苔时, 其他培养条件不变. 然后用 Dual-PAM-100 测量每种处理后缘管浒苔的 F_v/F_m 和 $Y(II)$, 用 qPCR 测量 *rbcL* 和 *PPDK* 基因 mRNA 的表达量, 测量每种处理后 RuBPCase 和 PPDK 的酶活性.

1.6 实时荧光定量 PCR

按照说明书上的方法用 Trizol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取缘管浒苔每种处理后的总 RNA, 用 DEPC 处理过的水溶解 RNA. 用 Moloney

Murine Leukemia Virus 反转录酶(Promega Biotech Co., Madison, Wisconsin, USA)把 RNA 反转录成 cDNA, 然后进行实时定量 PCR 分析.

用 ABI StepOne Plus Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystems, USA)配合 SYBR Green 荧光染料(TaKaRa)进行实时荧光定量 PCR 反应. 为了使选择的基因相对表达量标准化, 选用 *18S rDNA* 基因作为内参基因^[32]. 根据 *rbcL*, *PPDK* 和 *18S rDNA* 序列, 用 Primer Express 3.0 设计的 3 对定量引物见表 1. 每个基因的表达都做 3 次独立的重复. qPCR 反应体系为: 10 μL 的 2 $\times$ SYBR Premix Ex TaqTM II, 0.6 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)的上游引物, 0.6 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)的下游引物, 2.0 μL 的 cDNA, 6.8 μL 的去离子水. qPCR 反应程序为: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 10 s, 72℃ 40 s, 40 个循环. 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析实时定量 PCR 的结果.

1.7 酶活性的测定

缘管浒苔的 RuBPCase 和 PPDK 的酶活性分别用 Gerard 和 Driscoll^[33]和 Sayre 等人^[34]方法测量, 2 种方法都根据需要进行改动.

测量 RuBPCase 的酶活性时, 先将样品用液氮研成粉末, 然后加入预冷的 rubisco 提取介质(每克鲜重加入 1 mL 提取介质). Rubisco 提取介质: 40 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.6, 内含 10 mmol/L MgCl_2 溶液, 0.25 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 谷胱甘肽. 将样品在 4℃, 10000 $\times g$ 条件下离心 10 min, 弃沉淀, 上清液即是酶粗提液. 酶活性是在一个 4.5 mL 的比色杯内, 通过加入 3 mL 的反应混合液测量的. 反应混合液包括 0.2 mL NADH (5 mmol/L), 0.2 mL ATP (50 mmol/L), 0.1 mL 酶提取液, 0.2 mL 磷酸肌酸(50 mmol/L), 0.2 mL NaHCO_3 (0.2 mmol/L), 1.4 mL 反应缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.8, 内含 12 mmol/L MgCl_2 溶液, 0.4 mmol/L EDTA), 0.1 mL 磷酸肌酸激酶 (160 U/L), 0.1 mL 磷酸甘油酸激酶(160 U/L), 0.1 mL 磷酸甘油醛脱氢酶(160 U/L)和 0.3 mL 蒸馏水. 向比色杯中加入 0.1 mL 核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)后反应开始, 每隔 20 s 记录一次 340 nm 处的 A 值, 共测 3 min. 酶活单位为微摩尔每克鲜重每分钟($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW min}^{-1}$).

测量 PPDK 的酶活性时, 先将样品用液氮研成粉末, 然后加入预冷的 PPDK 提取介质, 提取介质为

表 1 实时荧光定量 PCR 中所用的引物

基因		引物(5'→3')
<i>rbcl</i>	F	TACAAATCTCAAGCCGAACTG
	R	AATCTTTAGCAAATTGACCACG
<i>PPDK</i>	F	CACGAACGACCTTACGCAGA
	R	ACGGATCAAACGCCATCAC
<i>18S rDNA</i>	F	ATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACC
	R	TCTGTCAATCCTTCCTATGTCTGG

100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(内含 5 mmol/L 巯基乙醇和 2 mmol/L EDTA, pH 8.3), 每克浒苔鲜重加入 1 mL 提取介质. 将样品在 4℃, 10000×g 条件下离心 10 min, 弃沉淀, 上清液即是酶粗提液. 酶活性是在一个 4.5 mL 的比色杯内, 通过加入 3 mL 的反应混合液测量的. 反应混合液包括 0.1 mL Tris-HCl 缓冲液(150 mmol/L, pH 8.3, 内含 18 mmol/L MgSO₄), 0.1 mL DTT (300 mmol/L), 0.1 mL PEP (30 mmol/L), 0.1 mL NADH (4.5 mmol/L), 0.1 mL AMP (30 mmol/L), 0.1 mL 乳酸脱氢酶(60 U/mL), 0.1 mL 酶粗提液和 1.3 mL 蒸馏水. 向比色杯中加入 0.1 mL 焦磷酸钠后反应开始, 每隔 20 s 记录一次 340 nm 处的 A 值, 共测 3 min. PPDK 酶活单位为微摩尔每克鲜重每分钟($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$).

2 结果

2.1 转录组测序

用罗氏 GS FLX 序列分析仪并配合钛测序试剂测量在各种条件下处理的缘管浒苔的转录组, 从基因组水平上揭示其快速暴发的机制. 转录组测序产生了 503789 个平均长度为 396 bp 的原始序列, 382884 个序列进一步组装成 13426 个平均长度为 1000 bp 的重叠群. KEGG 分析表明, 9356 个序列与碳固定途径相关, 它们编码的酶包括磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、冬氨酸转氨酶、核酮糖二磷酸羧化酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸核酮糖激酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PCK)、丙氨酸转氨酶、苹果酸脱氢酶(NADP⁺)、丙酮酸磷酸双激酶和丙酮酸激酶. 这些结果表明, 缘管浒苔中可能同时存在 2 种固碳途径: C₃ 途径和 C₄ 途径(图 1).

2.2 光合作用参数

PS II 的最大光化学效率(F_v/F_m)和实际光化学效率 $Y(\text{II})$ 可以反映出缘管浒苔在各种条件下的光合作

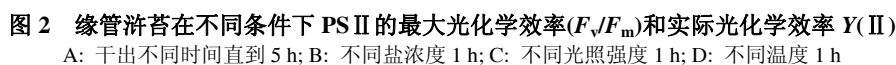
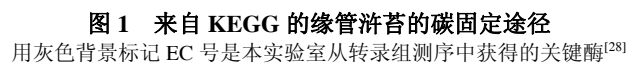
用状态. 如图 2A 所示, 在干出条件下, F_v/F_m 和 $Y(\text{II})$ 降低, 表明干出对缘管浒苔来说是一种胁迫条件. 在盐度和温度梯度实验中, F_v/F_m 和 $Y(\text{II})$ 在高盐、低盐、高温和低温条件下仅有轻微的变化(图 2B 和 2D), 表明在这些处理条件下缘管浒苔没有受到明显的胁迫. 从图 2C 可以看出, 在高光强下 F_v/F_m 和 $Y(\text{II})$ 迅速降低, 表明高光强对缘管浒苔是一种胁迫条件.

2.3 在各种胁迫条件下 *rbcl* 和 *PPDK* 基因的表达分析

用相对定量 PCR 来分析 *rbcl* 和 *PPDK* 基因在各种胁迫条件下表达量的变化. 图 3A 和 3B 表明, *rbcl* 和 *PPDK* 基因的表达受干出条件的影响很大. 把正常条件下 *rbcl* 和 *PPDK* 基因的表达量设为 1. 随着干出时间的增加, *rbcl* 基因的表达量逐渐降低, 而 *PPDK* 基因的表达量先慢慢上升, 在 4 h 时达到峰值, 增加了 25.2 倍, 随后降低. 把正常海水盐度(30‰)时两基因的表达量设为 1, 与正常海水盐度相比, 不同盐度对两基因的表达量变化影响显著. 在海水盐度为 30‰时, *rbcl* 基因的表达量最大, 在高盐和低盐条件下, *rbcl* 基因的转录水平都有所下降, 然而 *PPDK* 却与之相反, 在高盐和低盐条件下, *PPDK* 基因的表达量都明显升高(图 3C 和 3D). 图 3E 和 3F 显示不同光照条件下 2 个基因表达量的变化. 光照强度为 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时 2 个基因的表达量设为 1. 在黑暗处理 1 h 时, *rbcl* 基因的表达量变化很小, 而 *PPDK* 基因的表达量升高了 2 倍. 两基因的表达量在 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时都达到峰值. 尽管在高光强条件下, *PPDK* 基因的表达量降低了, 但是仍高于对照组的表达量. 而且, 光照强度对 *PPDK* 基因表达量的影响要明显高于 *rbcl*. 在正常培养温度(10℃)条件下, *rbcl* 和 *PPDK* 基因的表达量设为 1, 这时, 2 个基因的表达量正好达到峰值, 在高温和低温条件下, 表达量都有所下降, 但是在 0 和 30℃条件下, *PPDK* 基因变化更显著(图 3G 和 3H). 总之, 在正常培养条件下, *rbcl* 基因的表达量比较高, 在胁迫条件下, 表达量比较低, 但 *PPDK* 基因在干出、高盐和低盐这 3 个胁迫条件下表达量明显升高.

2.4 RuBPCase 和 PPDK 的酶活性

随着干出时间的增加, RuBPCase 的酶活性明显降低, 最低时降到了正常水平的一半, 然而 PPDK 的酶活性在前 4 h 逐渐升高, 升到的最大值是正常水平



的 2 倍, 随后随着时间推移逐渐降低(图 4A). 在干出条件下, PPDK 的酶活性非常高, 在 3~5 h 时, 甚至超过了 RuBPCase. 盐度对 RuBPCase 和 PPDK 酶活性的影响正好相反(图 2B): RuBPCase 在盐度为 30‰ 时活性最高, 而此时 PPDK 的酶活性最低. 不同的光照

强度对两酶活性的影响趋势一样: 刚开始时酶活性升高, 在 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时达到最大值, 随着光照强度的继续增加, 两酶的活性慢慢降低(图 4C). 黑暗和正常光照条件相比, RuBPCase 和 PPDK 的酶活性几乎没有变化. 温度对 RuBPCase 和 PPDK 的酶活性影

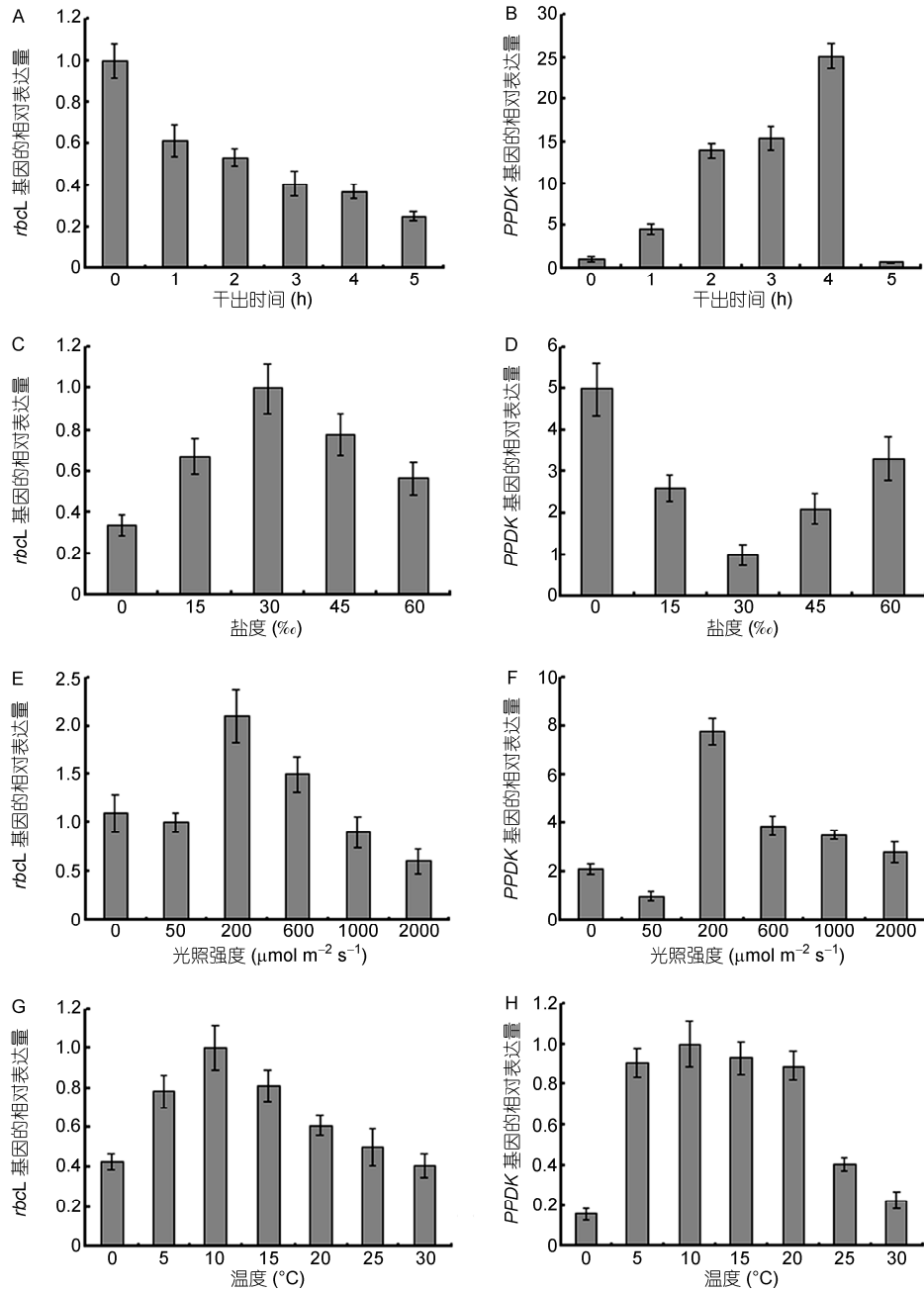


图 3 实时定量 PCR 分析缘管浒苔在不同条件下 *rbcL* 和 *PPDK* 基因的相对表达量

A, B: 干出不同时间直到 5 h; C, D: 不同盐浓度 1 h; E, F: 不同光照强度 1 h;

G, H: 不同温度 1 h

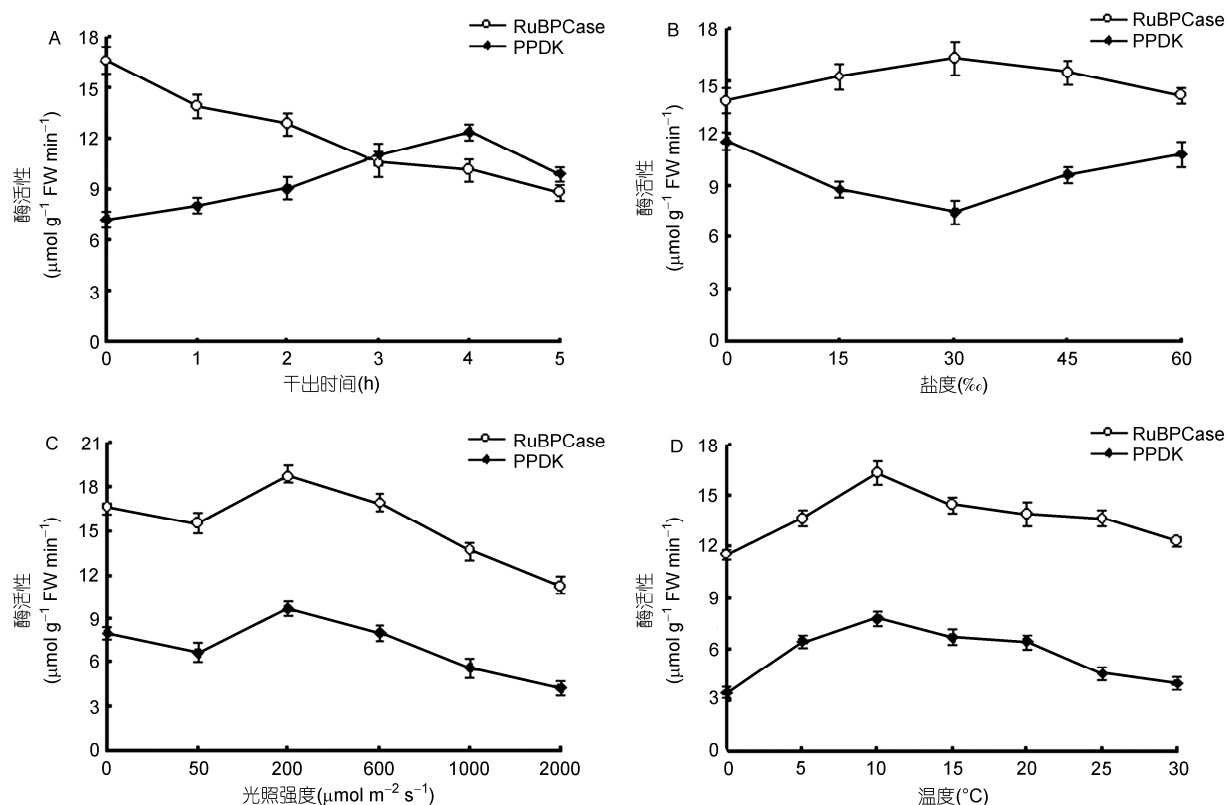


图4 缘管浒苔在不同条件下 RuBPCase 和 PPDK 的酶活性

A: 干出不同时间直到 5 h; B: 不同盐浓度 1 h; C: 不同光照强度 1 h; D: 不同温度 1 h

响显著, 并且趋势类似(图 4D): 两酶的活性均在 10℃ 时达到最大值, 分别是最低温时的 1.4 和 2.2 倍。总之, RuBPCase 和 PPDK 在光合作用碳固定中都起作用, 并且在某些胁迫条件下, PPDK 的酶活性显著升高。

3 讨论

C_4 光合途径的形成被认为是植物进化过程中一种独特的适应。通过基因编码突变导致了结构和生化上的改变, 编码的蛋白质大部分是对原始 C_3 物种功能上的补充, 使 C_4 植物获得了在干旱、高的光照强度和高盐环境中更好生存的能力^[3]。 C_4 植物被认为是 C_3 植物经过 C_3 - C_4 植物等中间过渡阶段进化而来的^[35]。然而, 在进化过程中导致出现 C_3 - C_4 中间型植物和 C_4 植物的原因至今也没有阐明。在本研究中, 通过对绿潮藻缘管浒苔进行转录组测序和分析, 发现了 C_4 光合作用固碳途径, 并且通过实验揭示 C_4 途径可能在缘管浒苔应对逆境过程中起作用, 因为

酶活分析表明 PPDK 在胁迫条件下比在正常生长条件下活性明显升高。这些研究结果为进一步阐明 C_4 途径的起源和在 C_3 植物中的功能奠定了基础。

胁迫条件下, PPDK 基因的表达水平比 *rbcL* 高。干出条件下, PPDK 基因的转录量增加, 而 *rbcL* 降低, RuBPCase 和 PPDK 的酶活性也有类似的趋势, 这表明干出可能诱导 C_4 光合途径的表达, 而抑制 C_3 光合途径的表达。在高盐和低盐条件下, PPDK 基因的表达量升高, 而 *rbcL* 基因的表达量降低了, RuBPCase 和 PPDK 的酶活性也有类似的趋势, 这表明高盐和低盐可能诱导 C_4 光合作用的表达, 而抑制 C_3 光合作用的表达。在不同光照强度和温度条件下, *rbcL* 和 PPDK 基因的表达有类似的趋势, 这表明在缘管浒苔中高光强和高温可能并不诱导 C_4 光合作用的表达。

近来, 通过比较分析 C_4 物种和与之关系比较亲近的 C_3 物种的转录组, C_4 途径的进化历程已经被系统的研究^[5,36]。 C_4 光合作用的多源独立进化表明, C_3 到 C_4 植物的进化在基因水平上相对比较容易^[37]。据推

断, 原始的 C_3 植物进化为 C_4 植物大约发生在 3000 万年前^[38], C_4 植物的扩张是在第三纪中新世大规模持续的气候和生态系统变化条件下进行的, 这些变化改变了火灾的发生频率, 影响了 C_4 食草动物包括人类的分布和进化^[1,39,40]. 水生环境对植物来说相对温和, 缺乏导致形成陆地上 C_4 型 CO_2 浓缩机制的选择压力. 因而, 藻类中的 C_4 系统可能是一种比较古老的 C_4 光合作用形式, 陆地上的 C_4 植物可能起源于局部 CO_2 浓度比较低的水中^[6].

胁迫条件经常消极地影响植物的关键代谢过程^[41]. 然而, 一些高等植物在一些非生物胁迫条件下, 如干旱、臭氧、高盐、在土壤中存在重金属、磷酸盐和铁的缺乏, 包括 PPK 在内的 C_4 途径中的蛋白质活性增强^[40]. 而且, 在植物受到病毒感染等生物胁迫时, 这些酶的活性也增强^[40]. 相对最适生长条件, 胁迫条件下植物 C_4 途径中酶的作用更加重要^[42]. 高温是 C_4 途径进化过程中主要的环境因素, 因为高温直接刺激 C_3 植物的光呼吸和暗呼吸^[43,44]. 高温还可降低 CO_2 的利用率, 因为对于 O_2 , CO_2 有相对低的溶解度^[45]. 干旱和盐度也是非常重要的环境因子, 因为它们可以促进气孔的关闭、减少细胞间 CO_2 的浓度, 这 2 种条件也刺激了光呼吸, 进一步加剧了 CO_2 缺乏的

状态^[46-48]. 这些原因一定程度上解释了许多 C_3 - C_4 中间型植物来自于干旱和盐碱地带的原因, 如 *Heliotropium*^[49], *Salsola*^[50], *Alternanthera*^[51], *Neurachne*^[51] 和一些 *Flaveria*^[52] 属的中间型植物.

在海洋环境中光合生物的 C_4 途径功能尤为重要, 因为它可能影响藻类对 CO_2 浓度的敏感性^[16]. 如果在一些海洋物种中 C_4 光合作用固碳量占有份额较大, 这将在很大程度上影响海洋生态和生物地球化学循环的许多方面^[16]. 石莼属物种对盐度、温度和太阳辐射等变化有很强的耐受性, 是引发绿潮的主要物种之一. 胁迫条件下缘管浒苔 C_4 光合作用的存在和表达水平的升高可以解释绿潮藻类对各种不利环境条件的高耐受性.

虽然海洋绿藻中无机碳吸收的精确机制, 特别是在各种条件下 C_4 和 C_3 途径的相对重要性, 需要进一步阐明, 但是本研究结果表明 C_4 途径可能在碳固定中起了非常重要的作用. 短期的光合作用 ^{14}C 标记可以用来详细地探索缘管浒苔的 C_4 途径. 有趣的是, 有研究表明, 在进化上光呼吸的 CO_2 浓缩泵在 C_4 途径 CO_2 浓缩泵之前建立^[40]. 这些研究结果增加了对 C_4 途径进化的了解, 并提供了充足的数据指导本实验室下一步工作.

参考文献

- 1 Cerling T E, Wang Y, Quade J. Expansion of C_4 ecosystems as an indicator of global ecological change in the late Miocene. *Nature*, 1993, 361: 344-345
- 2 Christin P A, Freckleton R P, Osborne C P. Can phylogenetics identify C_4 origins and reversals? *Trends Ecol Evol*, 2010, 25: 403-409
- 3 Ludwig M. Carbonic anhydrase and the molecular evolution of C_4 photosynthesis. *Plant Cell Environ*, 2012, 35: 22-37
- 4 Whitney S M, Sharwood R E, Orr D, et al. Isoleucine 309 acts as a C_4 catalytic switch that increases ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) carboxylation rate in *Flaveria*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 14688-14693
- 5 Gowik U, Westhoff P. The path from C_3 to C_4 photosynthesis. *Plant Physiol*, 2011, 155: 56-63
- 6 Bowes G. Single-cell C_4 photosynthesis in aquatic plants. In: Raghavendra A S, Sage R F, eds. *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V., 2011. 63-80
- 7 Magnin N C, Cooley B C, Reiskind J B, et al. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol*, 1997, 115: 1681-1689
- 8 Spencer W E, Teeri J, Wetzel R G. Acclimation of photosynthetic phenotype to environmental heterogeneity. *Ecology*, 1994, 75: 301-314
- 9 Rao S K, Fukayama H, Reiskind J B, et al. Identification of C_4 responsive genes in the facultative C_4 plant *Hydrilla verticillata*. *Photosynth Res*, 2006, 88: 173-183
- 10 Beer S, Israel A, Drechsler Z, et al. Photosynthesis in *Ulva fasciata* V. evidence for an inorganic carbon concentrating system, and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase CO_2 kinetics. *Plant Physiol*, 1990, 94: 1542-1546
- 11 Axelsson C, Larsson C, Ryberg H. Affinity, capacity and oxygen sensitivity of two different mechanisms for bicarbonate utilization in *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta). *Plant Cell Environ*, 1999, 22: 969-978
- 12 Giordano M, Beardall J, Raven J A. CO_2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 99-131

- 13 Reinfelder J R. Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. *Annu Rev Mar Sci*, 2011, 3: 291–315
- 14 Kremer B P. Aspects of carbon metabolism in marine macroalgae. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 1981, 19: 41–94
- 15 Reinfelder J R, Kraepiel A M I, Morel F M M. Unicellular C₄ photosynthesis in a marine diatom. *Nature*, 2000, 407: 996–999
- 16 Reinfelder J R, Milligan A J, Morel F M M. The role of the C₄ pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2106–2111
- 17 Montsant A, Jabbari K, Maheswari U, et al. Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol*, 2005, 137: 500–513
- 18 Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, et al. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11647–11652
- 19 McGinn R J, Morel F M M. Expression and inhibition of the carboxylating and decarboxylating enzymes in the photosynthetic C₄ pathway of marine diatoms. *Plant Physiol*, 2008, 146: 300–309
- 20 Beer S, Israel A. Photosynthesis of *Ulva* sp.: III. O₂ effects, carboxylase activities, and the CO₂ incorporation pattern. *Plant Physiol*, 1986, 81: 937–938
- 21 Dong M, Zhang X, Zhuang Z, et al. Characterization of the LhcSR gene under light and temperature stress in the green alga *Ulva linza*. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 30: 10–16
- 22 Ye N, Zhang X, Mao Y, et al. ‘Green tides’ are overwhelming the coastline of our blue planet: taking the world’s largest example. *Ecol Res*, 2011, 26: 477–485
- 23 Cohen R A, Fong P. Using opportunistic green macroalgae as indicators of nitrogen supply and sources to estuaries. *Ecol Appl*, 2006, 16: 1405–1420
- 24 Conley D J, Paerl H W, Howarth R W, et al. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 2009, 323: 1014–1015
- 25 Aquino R S, Grativol C, Mourao P A S. Rising from the sea: correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants. *PLoS ONE*, 2011, 6: e18862
- 26 Hatch M D. C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochem Biophys Acta*, 1987, 895: 81–106
- 27 Ishimaru K, Ohkawa Y, Ishige T, et al. Elevated pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C₃ transgenic potatoes with a C₄ maize *PPDK* gene. *Physiol Plantarum*, 1998, 103: 340–346
- 28 Xu J, Fan X, Zhang X, et al. Evidence of coexistence of C₃ and C₄ photosynthetic pathways in a green-tide-forming alga, *Ulva prolifera*. *PLoS ONE*, 2012, 7: e37438
- 29 Huson D H, Auch A F, Qi J, et al. Megan analysis of metagenome data. *Genome Res*, 2007, 17: 377–386
- 30 Beer S, Larsson C, Poryan O, et al. Photosynthetic rates of *Ulva* (Chlorophyta) measured by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Eur J Phycol*, 2000, 35: 69–74
- 31 Lin A P, Wang G C, Yang F, et al. Photosynthetic parameters of sexually different parts of *Porphyra katadai* var. *hemiphylla* (Bangiales, Rhodophyta) during dehydration and re-hydration. *Planta*, 2009, 229: 803–810
- 32 Dong M T, Zhang X W, Chi X Y, et al. The validity of a reference gene is highly dependent on the experimental conditions in green alga *Ulva linza*. *Curr Genet*, 2012, 58: 13–20
- 33 Gerard V A, Driscoll T. A spectrophotometric assay for RuBisCO activity: application to the kelp *Laminaria saccharina* and implications for radiometric assays. *J Phycol*, 1996, 32: 880–884
- 34 Sayre R T, Kennedy R A, Pringnitz D J. Photosynthetic enzyme activities and localization in *Mollugo verticillata* population differing on the leaves of C₃ and C₄ cycle operations. *Plant Physiol*, 1979, 64: 293–299
- 35 Ueno O. Structural and biochemical characterization of the C₃-C₄ intermediate *Brassica gravinae* and relatives, with particular reference to cellular distribution of Rubisco. *J Exp Bot*, 2011, 62: 5347–5355
- 36 Brautigam A, Kajala K, Wullenweber J, et al. An mRNA blueprint for C₄ photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C₃ and C₄ species. *Plant Physiol*, 2011, 155: 142–156
- 37 Westhoff P, Gowik U. Evolution of C₄ photosynthesis—looking for the master switch. *Plant Physiol*, 2010, 154: 598–601
- 38 Edwards E J, Osborne C P, Strömberg C A E, et al. The origins of C₄ grasslands: integrating evolutionary and ecosystem science. *Science*, 2010, 328: 587–591
- 39 Cowling S A, Jones C D, Cox P M. Consequences of the evolution of C₄ photosynthesis for surface energy and water exchange. *J Geophys Res*, 2007, 112: G01020
- 40 Gowik U, Brautigam A, Weber K L, et al. Evolution of C₄ photosynthesis in the genus *Flaveria*: how many and which genes does it take to

- make C₄? Plant Cell, 2011, 23: 2087–2105
- 41 Moons R, Valcke R, Montagu M V. Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C₃ plant. Plant J, 1998, 15: 89–98
- 42 Doubnerova V, Ryslava H. What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress? Plant Sci, 2011, 180: 575–583
- 43 Brooks A, Farquhar G D. Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Planta, 1985, 165: 397–406
- 44 Sharkey T D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. Physiol Plantarum, 1988, 73: 147–152
- 45 Jordan D B, Ogren W L. The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Planta, 1984, 161: 308–313
- 46 Guy R D, Reid D M, Krouse H R. Shifts in carbon isotope ratios of two C₃ halophytes under natural and artificial conditions. Oecologia, 1980, 44: 241–247
- 47 Schulze E D, Hall A E. Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In: Lange O L, Nobel P S, Osmond C B, eds. Physiological Plant Ecology II: Water Relations and Carbon Assimilation. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 181–230
- 48 Adam P. Saltmarsh Ecology. Cambridge: Cambridge University Press, 1990
- 49 Frohlich M W. Systematics of *Heliotropium* section *Orthistachys* in Mexico. Doctor Dissertation. Boston: Harvard University, 1978
- 50 Voznesenskaya E V, Artyusheva E G, Franceschi V R, et al. *Salsola arbusculiformis*, a C₃-C₄ intermediate in *Salsola* (Chenopodiaceae). Ann Bot, 2001, 88: 337–348
- 51 Monson R K, Moore B D. On the significance of C₃-C₄ intermediate photosynthesis to the evolution of C₄ photosynthesis. Plant Cell Environ, 1989, 12: 689–699
- 52 Powell A M. Systematics of *Flaveria* (flaveriinae-asteraceae). Ann Mo Bot Gard, 1978, 65: 590–636