

高光强下转玉米 *PEPC* 基因水稻和未转基因水稻秧苗叶片超微结构的比较

王 超^{1,2}, 李 霞¹

(1. 江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了阐明转玉米 *PEPC* 基因水稻高光效的结构基础, 以转玉米 *PEPC* 基因水稻和未转基因原种为试验材料, 在水稻的三叶期, 施以 100 min, 1 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的高光强处理, 以 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 下的水稻为对照, 运用透射电镜观察叶肉细胞、维管束鞘以及叶绿体内类囊体片层结构。结果发现, 与对照材料相比, 转玉米 *PEPC* 基因水稻材料经高光强处理后, 叶片叶绿体的排列更加紧密, 叶绿体中类囊体片层堆垛整齐, 有序片层较厚, 排列更加致密, 类囊体结构更加完整, 而且叶绿体周围的线粒体数量明显增多; 而未转基因原种的叶片经高光强处理后, 叶绿体内类囊体片层松散, 结构混乱, 部分甚至解体, 表现出受到损伤的迹象, 叶绿体基质中淀粉大颗粒的含量明显增多。转玉米 *PEPC* 基因水稻叶片光合器官在高光强下结构稳定以及线粒体的有序排列有利于其利用较高的光能, 从而提高其光合生产力, 为阐明转 C_4 光合基因水稻高光效的理论提供了证据。

关键词: 转玉米 *PEPC* 基因水稻; 类囊体片层; 叶肉细胞; 超微结构

中图分类号: S513.01 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2007) 04- 0099- 05

Comparison of Micro-structure Between Transgenic Rice of *PEPC* Gene from Maize and Wild Type under the Strong Light

WANG Chao^{1,2}, LI Xia¹

(1. Institute of Foods Crop, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing 210014, China;

2. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To elucidate the biological structure basis of transgenic rice plants expressing maize *PEPC* gene with high photosynthesis efficiency, *PEPC* transgenic rice and its wild type with at 3 leaves seedling stage were treated under 1 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ light intensity for 100 min, respectively, and those under 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ light as the control. The structure of mesophyll cells, bundle sheath and thylakoids of the second blade were observed with a transmission electron microscope. The results showed that compared with the control, the chloroplasts of transgenic rice were arranged denser, the stacking of thylakoids was in a much order condition, the ordered lamella was more thicker and arranged denser, the structure of thylakoids became more completed and the mitochondria among the chloroplast increased after strong light treatment. But, the lamella of thylakoids in WT was looser and the structure of them were confusion even disorganization under strong light, additionally, the amount of amyloplasts in the stroma of WT under strong light had an obviously increase. It indicated that the photosynthesis organs of the blades of *PEPC* transgenic rice under strong light had a steady micro-structure, which could be the structure basis for higher light utilization ability, therefore increasing photosynthesis ability.

Key words: Transgenic rice of *PEPC*; Thylakoids; Mesophyll cells; Micro-structure

C_4 植物具有独特的组织结构而且有浓缩 CO_2 功能, 在高温、高氧分压和干旱条件下比 C_3 植物有

较高的光合速率^[1,2]。遗传育种工作者试图在 C_3 植物中引入 C_4 光合特性, 以提高主要作物如水稻、

收稿日期: 2006- 06- 02

基金项目: 教育部 2006 年留学基金项目; 江苏省人事厅 2006 年留学择优项目; 江苏省农业科学院基金项目(6510707)

作者简介: 王 超(1984-), 男, 山东泰安人, 硕士, 主要从事水稻高光效生理育种研究工作

通讯作者: 李 霞(1970-), 女, 广西桂平人, 副研究员, 博士, 主要从事水稻高光效生理育种研究。

小麦、大豆的光合生产力^[3,4]。进入 20 世纪 90 年代后,随着转基因技术的迅速发展, Ku 等^[5]通过农杆菌介导系统,成功将玉米 C₄ 光合途径的关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC), 丙酮酸磷酸二激酶(PPDK), 和 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)的基因导入 C₃ 作物水稻中,特别是转 PEPC 基因水稻株系表现出较高的光合能力,并在高光强、高温下保持较高光合速率^[6]。在此基础上,焦德茂等^[7,8]用 PEPC 酶活性和光合生理指标逐代鉴定,经世代繁殖,获得了稳定的高光效转玉米 PEPC 基因水稻种质。经测定,转玉米 PEPC 基因水稻的 PEPC 的活性比未转基因原种 Kitaake 高 20 倍,光饱和光合速率比原种提高 55%,羧化效率提高 50%,CO₂ 补偿点降低 27%,PS II 光化学效率(F_v/F_m)和光化学淬灭(q_p)下降较少,单株产量较原种增加 10%~35%。

生物体的形态结构和生理机能是相互联系相互适应的,形态结构的变化是生理机能实现的基础和前提。近年来,有关转 C₄ 光合基因水稻的形态结构的研究开始引起关注。研究表明,高表达的转玉米 NADP-ME 基因水稻的叶绿体超微结构中无基粒,表现出类似于 C₄ 植物维管束细胞中叶绿体超微结构的特点^[9];袁莉民等^[10]在研究 C₄ 转基因水稻秧苗叶片气孔和叶维管束结构研究中观察到转基因水稻叶片气孔密度提高,气孔面积增大;类囊体结构比原种更完整、有序;叶鞘比原种发达,更加有利于物质的运输。这些结果表明,转 C₄ 光合基因水稻在形态结构上比未转基因水稻有一定的优势,从而支撑了高光效生理机能的变化。而从已有的转 PEPC 基因水稻的研究来看,转 PEPC 基因水稻高光效的表现都与外界高光强条件密切相关,但其吸收光能的光合机构如何与其高光效的生理机能响应的研究并不多,在强光下其光合器官超微结构的变化,国内外几乎没有报道。本试验试图通过对转 PEPC 基因水稻和未转基因进行高光强处理,运用透射电镜观察其叶片内形态结构以及叶绿体超微结构的特征,从而进一步阐明高光强下转玉米 PEPC 基因水稻高光效的结构基础,为转 C₄ 光合基因水稻高光效的理论分析提供证据。

1 材料和方法

1.1 试验材料与种植

试验材料:以日本稻 Kitaake 作为对照(Wild type,简称 WT),转 PEPC 基因水稻材料(简称 PEPC,含 PEPC 基因)以 Kitaake 为基因受体,导入玉米 PEPC 基因而获得的第 7 代稳定的水稻材料。

试验材料的种植:试验于 2006–2007 年在江苏省农业科学院进行,分别取 50 粒 WT 和 PEPC 种子,放入 0.1% 的氯化汞中表面消毒 15 min,然后用蒸馏水清洗 3 次,30℃浸种 24 h,35℃催芽 48 h,然后选择生长一致的芽,种植到培养皿中,培养到三叶期的稻苗待用。

1.2 水稻秧苗的高光强处理

取三叶期生长整齐一致的 WT 和 PEPC 材料稻苗。其中 WT 和 PEPC 每 3 株稻苗为 1 组,分别进行高光强处理,处理的光强为 1 000 μmol/(m²·s),处理的叶片垂直于光源放置,处理时间为 100 min。

而其另一组未处理的 WT 和 PEPC 的稻苗处于室内正常光强下,光强为 200 μmol/(m²·s),作为对照。

1.3 叶片的电镜制备

每个处理取 3 张叶片进行电镜观察,每个叶片取样部位为倒二叶(第二完全展开叶)距叶尖 1.5 cm 处。用锋利剪刀截取 4~5 片长条形,1 mm 宽,2~3 mm 长的小条共 12 片,材料离体后立即投入到预冷的 2.5% (pH 7.2) 戊二醛中进行抽气固定;3 h 后用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次;再经梯度浓度丙酮脱水;环氧树脂浸透和包埋,聚合成包埋块后在超薄切片机上切成 50~70 nm 的切片,醋酸双氧铀和柠檬酸双重染色,最后于日立 H-7650 透射电子显微镜下观察、摄影并记录。

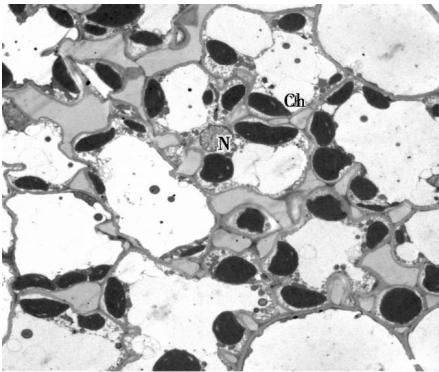
2 结果与分析

2.1 高光强下转 PEPC 基因水稻和未转基因原种的叶肉细胞和维管束鞘结构的变化

C₄ 植物叶片的维管束鞘细胞较大,其中含有许多较大的叶绿体,维管束鞘外侧密接一层叶肉细胞,组成“花环型”结构。C₃ 植物的维管束鞘细胞较少,没有“花环型”结构,维管束鞘周围的叶肉细胞排列松散。C₄ 植物固定 CO₂ 的反应是在叶肉细胞中进行的,形成一个 CO₂ 泵的作用,生成的双羧酸转移到维管束鞘细胞中,然后放出 CO₂,参与卡尔文循环。C₄ 植物只有在维管束鞘细胞内进行光合作用生成淀粉,而水稻等 C₃ 植物由于仅有叶肉细胞含有叶绿体,整个光合过程都是在叶肉细胞中进行的^[11]。

从图 1~4 清晰可见,经高光强处理的转 PEPC 基因水稻比未处理的叶肉细胞中叶绿体的排列更加紧密,说明其叶绿体对高光强有适应性运动。进一步观察到,经高光强处理的转 PEPC 基因水稻维管束鞘细胞的叶绿体数目都是 3~5 个,与未高光处理的相比,未见明显差异,暗示转 PEPC 基因水稻高光

效的生理表现并不是通过增加维管束鞘细胞的叶绿体数目来实现的。但转基因原种 WT 叶绿体未见上述变化。



Ch. 叶绿体; M. 线粒体; N. 细胞核; S. 淀粉粒;
T. 类囊体; V. 液泡; VB. 维管束
Ch. Chloroplast; M. Mitochondrion; N. Nucleus;
S. Starch grain; T. Thylakoids; V. Vacuole; VB. Vascular bundle

图1 未经高光强处理的转 *PEPC* 基因水稻叶肉细胞结构 (bar= 50.0 μm)

Fig. 1 Structure of mesophyll cells of the leaf of transgenic rice of *PEPC* untreated (bar= 50.0 μm)

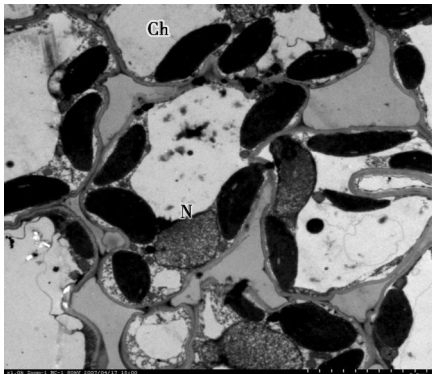


图2 经高光强处理的转 *PEPC* 基因水稻叶肉细胞结构 (bar= 25.0 μm)

Fig. 2 Structure of mesophyll cells of the leaf of transgenic rice of *PEPC* after the treatment of strong light (bar= 25.0 μm)

2.2 高光强下转基因水稻和未转基因原种的叶绿体类囊体片层结构和淀粉粒含量的变化

进一步对高光强下转 *PEPC* 基因水稻和未转基因原种的叶绿体进行观察, 发现未经高光强处理的水稻材料中(图 5~ 8), 与 WT 相比, *PEPC* 叶肉细胞中叶绿体基粒堆密集, 基粒类囊体沿长轴方向排列整齐, 片层较厚, 排列更加致密, 类囊体结构更加完整, 有序, 这增加了其与光照的接触面积, 提高了对光能的吸收能力; 同时紧密的片层结构缩短了电子的传递距离, 从而提高了光合电子传递速率, 而且经高光强的处理后, 其叶绿体内类囊体的片层结构依然完整有序, 这也是其耐光抑制光氧化的结构基础。而从图 5 和 6 清晰显示 WT 材料经高光强处理后与其未经高光强处理的材料相比, 叶绿体内类囊体片

层松散, 结构混乱, 部分甚至解体, 表现出受到损伤的迹象, 而且, 叶绿体基质中淀粉大颗粒的含量明显增多(图 6), 表明 WT 经高光强处理后, 叶绿体结构遭到部分破坏, 导致光合终产物的运输不畅, 出现积累。由此可以认为, 转 *PEPC* 基因水稻独特叶绿体的超微结构可能与高光效生理特性有关。

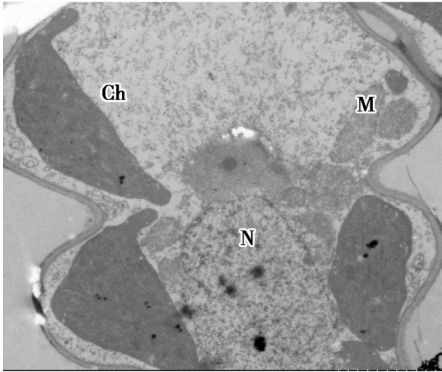


图3 未经高光强处理的原种 WT 叶肉细胞结构 (bar= 10.0 μm)

Fig. 3 Structure of mesophyll cells of the leaf of wild type untreated (bar= 10.0 μm)

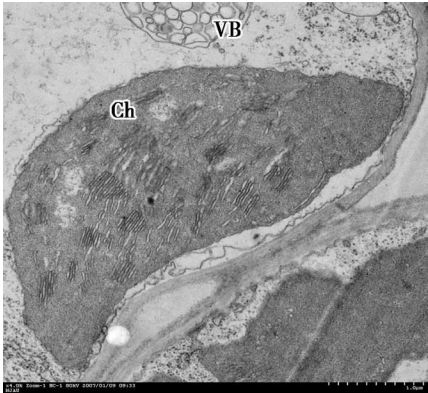


图4 经高光强处理的原种 WT 叶肉细胞结构 (bar= 5.0 μm)

Fig. 4 Structure of mesophyll cells of the leaf of wild type after the treatment of strong light (bar= 5.0 μm)

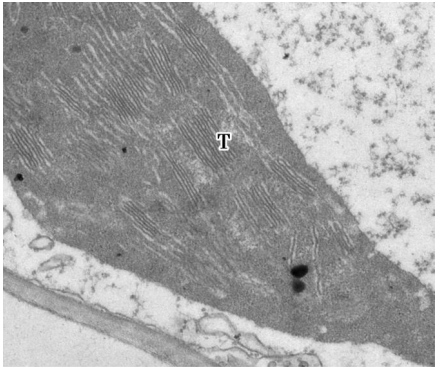


图5 未经高光强处理的原种 WT 类囊体片层结构 (bar= 2.5 μm)

Fig. 5 Structure of thylakoids of the leaf of wild type untreated (bar= 2.5 μm)

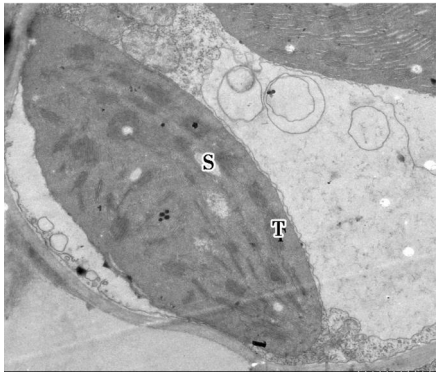


图 6 经高光强处理的原种 WT 类囊体片层结构(bar= 5.0 μm)

Fig. 6 Structure of thylakoids of the leaf of wild type after the treatment of strong light(bar= 5.0 μm)

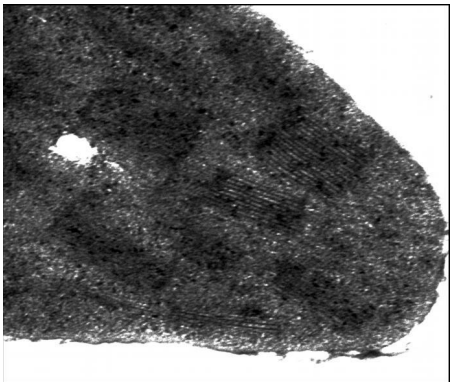


图 7 未经高光强处理的 PEPC 类囊体片层结构(bar= 1.0 μm)

Fig. 7 Structure of thylakoids of the leaf of transgenic rice of PEPC untreated(bar= 1.0 μm)



图 8 经高光强处理的 PEPC 类囊体片层结构(bar= 0.25 μm)

Fig. 8 Structure of thylakoids of the leaf of transgenic rice of PEPC after the treatment of strong light (bar= 0.25 μm)

2.3 高光强下转 *PEPC* 基因水稻和未转基因原种叶肉细胞中线粒体数量及位置的变化

本研究还发现(图 9 和 10), 在高光强下, 转 *PEPC* 基因水稻叶片比其未处理的叶肉叶绿体周围的线粒体数量增多, 说明高光强诱发了其叶绿体周

围线粒体的运动, 使较多的线粒体与叶绿体靠近, 而且线粒体之间排列紧密, 这种结构的变化暗示了其光合能力的增加与其高能利用的细胞器是密切相关的。线粒体通过与叶绿体的配合, 便于提供足够的能量, 从而有利于光合物质的运输和累积。而未转基因水稻 WT 没有发现此现象。

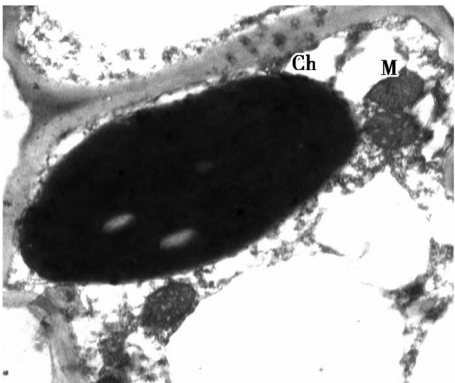


图 9 未经高光强处理的 PEPC 叶绿体结构 (bar= 5.0 μm)

Fig. 9 Structure of chloroplast of the leaf of transgenic rice of PEPC untreated(bar= 5.0 μm)

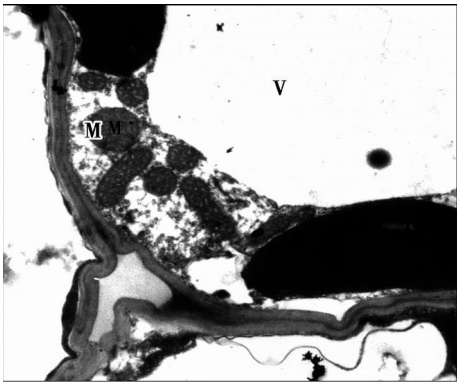


图 10 经高光强处理的 PEPC 叶绿体结构(bar= 10.0 μm)

Fig. 10 Structure of chloroplast of the leaf of transgenic rice of PEPC after the treatment of strong light (bar= 10.0 μm)

3 讨论与结论

C_4 光合途径是一个多酶系统, 但在水稻中只导入一个 C_4 光合关键酶 *PEPC* 基因就能显著增加其光合效率, 在理论上是一个值得深入研究的科学问题。转 *PEPC* 基因水稻材料使单个基因高表达与高光合效率联系起来, 为作物高光效机理研究提供了其他常规水稻无法比拟的试材, 对于揭示作物高光效机理具有重要意义。 C_3 植物小麦的研究表明, 叶片中也有 C_4 光合途径的几个关键酶^[12] 如 *PEPC*, *PPDK*, *NADP-ME*。而近年来也发现水生植物 *Hydrilla verticillata* 是一个没有花环状解剖结构的初级

的 C_4 光合型植物^[13]。焦德茂等^[14]发现水稻叶内也具有完整的一套 C_4 光合酶系统, 只是活性较低, 但转 C_4 光合酶基因水稻均不同程度的增加这些酶的活性, 可见酶活性的提高是其表现高光合能力的基础, 转 C_4 光合基因水稻的气孔和维管束鞘结构的变化也表明其高光合能力是有其组织结构基础的。本研究的电镜观察表明: 在高光强下, 转 *PEPC* 基因水稻类囊体片层厚, 排列有序, 堆叠整齐, 这些结构特征有利于叶绿体类囊体较多地吸收光能以及其膜上光化学和电子传递的能力的增加, 这与转 *PEPC* 基因水稻在高光强下具有较强的耐光抑制和光氧化能力的生理表现是一致的^[15]。而未转基因的原种 WT 经高光强后, 其叶绿体的类囊体片层出现明显分离, 片层排列松散, 并有淀粉粒积累。有研究表明, 淀粉等终产物的积累会抑制 C_4 光合酶的活性, 降低植物的光合作用, 从而限制了其光合能力的发挥^[16]。

转 C_4 光合酶基因水稻高效光合作用的发挥不仅决定于 C_4 光合酶、反应底物和效应剂的浓度的高低, 更重要的还与其高能的驱动有关, 因此能量代谢机理是需要进一步阐明的关键问题, 否则其高光效机理就成为无“源”之水。值得注意的是本研究还观察到转 *PEPC* 基因水稻维管束鞘细胞内含有大量的线粒体, 且位置与叶绿体靠近, 经高光强处理后, 其叶绿体周围的线粒体数量明显增多, 可能为转 *PEPC* 基因水稻光合代谢途径深入研究提供了更多的能量。但转 *PEPC* 基因水稻是如何调节线粒体适应高光效机制还有待深入研究。

通过对高光强响应后的水稻叶片超微结构变化的观察, 转 *PEPC* 基因水稻经高光强处理后, 叶肉细胞中叶绿体的排列更加紧密, 叶绿体中类囊体片层较厚, 堆叠致密, 且没有淀粉等终产物积累现象。值得注意的是其叶绿体周围的线粒体数量明显增多, 这些形态结构变化与其机理的联系需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Black C C Jr. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO_2 uptake[J]. *Annu Rev of plant Physiol*, 1973, 24: 253–286.
- [2] Ku M S B, Kane-Murakami Y, Matsuoka M. Evolution and expression of C_4 photosynthesis genes[J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 949–957.
- [3] Brown R H, Bouton J H. Physiology and genetics of interspe-

cific hybrids between photosynthetic types[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 435–456.

- [4] Matsuoka M, Furbank R T, Fukayama H, *et al.* Molecular engineering of C_4 photosynthesis[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 297–314.
- [5] Ku M S B, Sakae A, Mika N. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 76–80.
- [6] Matsuoka M, Fukayama H, Tsuchida H, *et al.* How to express some C_4 photosynthesis genes at high levels in rice[M]// Sheehy J E, Mitchell P L, Hardy B. Redesigning Rice Photosynthesis to Increase Yield. Phillipar: Elsevier Science, 2000: 167–175.
- [7] 焦德茂, 匡廷云, 李 霞, 等. 转 *PEPC* 基因水稻的具有初级 CO_2 浓缩机制的生理特点[J]. *中国科学(C 辑)*, 2003, 33: 33–39.
- [8] 王德正, 王守海, 吴 爽, 等. 玉米 *PEPC* 基因在杂交转育的转基因水稻后代传递和表达特征[J]. *遗传学报*, 2004, 31: 195–201.
- [9] Takeuchi Y, Akagi H, Kamasawa N, *et al.* Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expression a high level of maize NADP dependent malic enzyme[J]. *Planta*, 2000, 211: 265–274.
- [10] 袁莉民, 仇 明, 王 朋, 等. C_4 转基因水稻秧苗叶片气孔与叶鞘维管束结构特征[J]. *中国农业科学*, 2006, 39: 902–909.
- [11] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [12] Aoyagi K, Bassham J A. Appearance and accumulation of C_4 carbon pathway enzymes in developing wheat leaves[J]. *Plant Physiol*, 1986, 80: 334–340.
- [13] Magnin N C, Cooley B A, Reiskind J B, *et al.* Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C_4 photosynthesis in *Hydrilla verticillate*[J]. *Plant. Physiol*, 1997, 115: 1681–1689.
- [14] 焦德茂, 李 霞, 黄雪清, 等. 转 *PEPC* 基因水稻的光合 CO_2 同化和叶绿素荧光特性[J]. *科学通报*, 2001, 46: 414–418.
- [15] 王仁雷, 华 春, 李 霞, 等. 光抑制条件下转 *PEPC* 基因水稻的光合表现[J]. *作物学报*, 2002, 28: 321–326.
- [16] Shinchu Sawada, Takeshi Sakamoto, Makiko Sato, *et al.* Photosynthesis with Single-Rooted *Amaranthus* Leaves II Regulation of Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase, Phosphoenolpyruvate Carboxylase, NAD-Malic Enzyme and Malate Dehydrogenase and Coordination between PCR and C_4 Photosynthetic Metabolism in Response to Changes in the Source-sink Balance[J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 1293–1301.