

C₄植物白花菜叶片发育不同阶段的基因表达谱分析

刘征^{1*}, 杨尚君¹, 张书敏¹, 赵彦宏², 高双成³, 韩渊怀⁴

¹河北大学生命科学学院, 河北保定071002; ²鲁东大学农学院, 山东烟台264025; ³河南科技大学农学院, 河南洛阳471003; ⁴山西农业大学农学院, 山西太谷030801

摘要: C₄植物白花菜与拟南芥是姊妹科的近缘植物, 是一种新近开发的研究C₄光合作用的模式植物。对其叶片发育不同阶段进行了基因表达谱的比较和分析, 结果表明在叶脉正在发育的幼叶中, 细胞分裂旺盛, 蛋白质大量合成, 表现为核糖体蛋白基因、组蛋白基因、翻译因子基因、分子伴侣基因等的表达上调; 幼叶光合作用相关基因表达下调, 暗示着光合器官仍处于发育阶段; 多种激素相关的基因如生长素、脱落酸、赤霉素、油菜素内酯、细胞分裂素、茉莉酸合成途径基因或信号传导基因参与了叶片的发育, 表明激素对发育的调控作用。

关键词: 白花菜; 基因表达谱; 叶片发育; 蛋白质合成; 光合作用; 植物激素

Gene Expression Profiling during Leaf Development of a C₄ Plant, *Cleome gynandra*

LIU Zheng^{1*}, YANG Shang-Jun¹, ZHANG Shu-Min¹, ZHAO Yan-Hong², GAO Shuang-Cheng³, HAN Yuan-Huai⁴

¹College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; ²School of Agriculture, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China; ³College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; ⁴College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

Abstract: *Cleome gynandra* is a C₄ species closely related with *Arabidopsis thaliana* and a newly developed non-sequenced model plant for C₄ photosynthesis. Here we conducted the comparative gene expression profiling to study the leaf development of *C. gynandra*. Data analysis showed in young leaves when veins were developing, expressions of ribosomal protein genes, histone genes, translational factors genes, molecular chaperonin genes, etc were up-regulated, indicating that cells were dividing quickly and a lot of nascent proteins were being produced. Photosynthesis related genes were down-regulated in young leaves, suggesting that photosynthetic apparatuses were still stay in developing stage. Various genes related to phytohormones such as auxin, abscisic acid, gibberellin, brassinosteroid, cytokinin, jasmonic acid were participating in the leaf development, showing their regulating functions on development.

Key words: *Cleome gynandra*; gene expression profiling; leaf development; protein synthesis; photosynthesis; phytohormones

白花菜(*Cleome gynandra* Linn.)为一年生草本植物, 原产美洲, 在我国主要产区是湖北省。白花菜属十字花目的山柑科(Capparaceae), 与十字花科(Brassicaceae)是姐妹科(Hall等2002), 因此与拟南芥的亲缘关系很接近。经叶片解剖结构、生理生化及分子鉴定, 白花菜是一种典型的NAD-ME类型的C₄植物(Marshall等2007)。另外, 白花菜植株相对矮小, 生长周期短, 一般种子发芽后6周开花, 且属于自花授粉植物, 每株植物可生产约4 000粒种子(Brown等2005)。白花菜叶片mRNA经转录组测序结果显示, 该植物的基因与拟南芥的同源基因具有很高的序列一致性(Brautigam等2011), 因而

研究白花菜的C₄光合作用分子机理, 可以方便地利用拟南芥的基因库信息。研究C₄的光合进化和发育机理, 以玉米(*Zea mays*)为材料受限于植株生长周期, 以黄顶菊(*Flaveria bidentis*)为材料受限于没有可供参考的基因库信息, 以狗尾草(*Setaria virid-*

收稿 2013-04-18 修定 2013-05-15
资助 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留2011-1139)、河北大学引进人才项目(2010-185)和国家自然科学基金(30800682和31201199)。

致谢 英国剑桥大学植物科学系Julian Hibberd博士对本研究提供了重要的指导和支持。

* 通讯作者(E-mail: liuzhengxp@yeah.net; Tel: 0312-5079364)。

is)为材料受限于缺乏近缘的C₃植物进行比较,而以白花菜为材料除了可以借鉴拟南芥的基因库信息,还能利用同属近缘的C₃植物醉蝶花(*Cleome spinosa*)进行比较,极大地方便了C₄光合机理的研究,因此白花菜是一种开展C₄光合研究的新近开发出的模式植物。

叶是植物进行光合作用的主要器官,对植物的生命活动起着重要的作用,对叶发育的研究可以探明植物光合器官的发育过程,为提高植物光合效率的实践提供线索。C₄植物叶片发育与C₄光合作用机制的建立密切相关。比如叶脉直接决定着叶片的生理功能,如光合作用的效率、水的利用率和气体交换的效率等。在C₄植物中叶脉还有一个特殊的功能:维持C₄光合作用的进行,特别是C₄循环的进行。叶脉的发育在C₄叶片发育过程中起着十分关键的作用,它指导或影响着邻近组织、细胞的分化,如维管束鞘细胞和叶肉细胞(McKown和Dengler 2010),据推测叶脉在发育过程中向周边细胞传递一种信号物质,诱导了维管束鞘细胞和叶肉细胞的特异性分化(Langdale 2011)。因此,研究C₄叶片的发育将有助于理解C₄高光效的分子机理。

C₄植物发育的研究是近年植物学研究的一个热点,探明C₄发育的机理也是研发C₄水稻的前提,以期水稻的产量实现跨越式增长,满足日益增长的世界人口的需要。近几年已在白花菜属中建立了白花菜和醉蝶花成熟叶片的基因表达谱(Brautigam等2011)、在黄顶菊属中建立了C₃、C₃-C₄中间体和C₄植物基因表达谱(Gowik等2011)、在玉米中开展了叶肉细胞和维管束鞘细胞叶绿体的比较蛋白组研究(Majeran等2005, 2008; Friso等2010)、开展了玉米从叶基部到叶尖发育梯度的比较转录组和蛋白组研究(Li等2010; Majeran等2010)。但在C₄植物中,有关从幼嫩叶片到成熟叶片发育的分子机理研究仍然较少,为此我们通过基因芯片技术比较了白花菜叶脉正在发育的幼嫩叶片和叶脉已发育完整的成熟叶片的基因表达差异。

材料与方法

1 材料

白花菜(*Cleome gynandra* Linn.)种子经30 °C

黑暗发芽后,移栽到营养土于玻璃温室生长,白天温度保持在24 °C,夜晚温度保持在20 °C,用金属卤光灯补充自然日照,光强至少200 μmol·m⁻²·s⁻¹,光周期为16 h光照、8 h黑暗。当植株生长到30~40 cm高时,开始采集叶片样品,分别采集0.7 cm细脉正在发育且叶片尚未展开的幼叶和5 cm细脉已完全形成且叶片完全展开的成熟叶片,迅速置于液氮中,并储存于-80 °C备用。

Tripure试剂购自Roche公司; On-Column DNase I Digestion Set试剂盒购自Sigma公司; polyATtract mRNA isolation试剂盒购自Promega公司; cDNA逆转录试剂、酶及cy3、cy5荧光染料购自Invitrogen公司; Qiaquick PCR cleanup试剂盒购自Qiagen公司,其余常用化学药品购自Sigma公司。

2 拟南芥基因芯片

采用澳大利亚联邦科学与工业研究组织研制的拟南芥基因芯片进行跨种杂交。整张芯片序列来源于13 426个高质量EST,包含约10 798个非冗余的基因序列(Wilson等2005)。

3 方法与步骤

3.1 mRNA提取

叶片总RNA采用Tripure试剂提取, RNA溶液中可能残留的DNA采用On-Column DNase I Digestion Set试剂盒去除, mRNA的提取采用polyATtract mRNA isolation试剂盒,样品于-80 °C保存备用。

3.2 cDNA逆转录及探针制备

将5 μg poly(A)⁺ RNA和5 μg Oligo(dT)引物混于超纯水中,终体积为16.8 μL,置于70 °C金属浴10 min,迅速置于冰上冷却5 min,加入13.2 μL预先混合好的如下试剂: 5×cDNA第一链合成缓冲液6 μL, 0.1 mol·L⁻¹ DTT 3 μL, 50×氨基丙烯酸基标记的dNTP混合物0.7 μL, RNaseOut 1.5 μL, Superscript II 2 μL, 42 °C孵育1 h后,加入1 μL反转录酶,并继续于42 °C孵育1 h。加入15 μL 0.1 mol·L⁻¹ NaOH,于70 °C孵育10 min以终止反应,加入15 μL 0.1 mol·L⁻¹ HCl中和反应液。

将上述溶液体积加超纯水至100 μL,加入100 μL酚氯仿后混匀,离心5 min,将上清液转入一个新的离心管中,加入10 μL 3 mol·L⁻¹醋酸钠(pH 5.2)和250 μL的无水乙醇,于-20 °C沉淀过夜。将样品

于13 000×g、4 °C离心30 min, 分别用70%和无水乙醇洗涤各一次, 空气干燥5 min, 加入3 μL超纯水, 于-80 °C保存。

取出上述样品, 加入1.66 μL 0.3 mol·L⁻¹碳酸氢钠(pH 9.0)和5 μL DMSO, 混匀后转到有cy3或cy5荧光染料的离心管中, 轻轻混匀后, 于黑暗条件下室温反应1 h, 每15 min混合一次。加入4.5 μL 4 mol·L⁻¹羟胺, 黑暗下于室温继续反应15 min, 最后用Qiaquick PCR cleanup试剂盒除去未反应的染料。

3.3 芯片预杂交、杂交及杂交后清洗

将芯片置于42 °C预杂交溶液(50%去离子甲酰胺, 5×SSC, 0.1% SDS, 0.1 mg·mL⁻¹ BSA)中30~60 min, 然后用去离子水浸泡清洗30 s 4次, 再用异丙醇浸泡清洗一次, 最后在1 000 r·min⁻¹离心2 min。

将cy3和cy5标记的探针样品(一种为幼嫩叶片、另一种为成熟叶片)混合, 于黑暗条件下真空干燥离心至体积1~2 μL, 加入36 μL杂交液(50%甲酰胺, 5×SSC, 0.1% SDS, 0.1 mg·mL⁻¹鱼精液)中, 95 °C加热5 min、离心2 min, 并冷却至室温。将芯片放入杂交盒中, 将混有探针的杂交液滴加到芯片表面, 轻轻放上盖片, 并于杂交盒的两个槽中各加入15 μL 3×SSC, 拧紧杂交盖, 于42 °C水浴中过夜杂交。

取出芯片, 浸于42 °C的2×SSC、0.1% SDS清洗液中, 于摇床上轻摇直至盖片滑落。取出芯片于摇床上在42 °C进行如下清洗: 2×SSC、0.1% SDS 5 min; 0.1×SSC、0.1% SDS 5 min; 0.1×SSC 1 min 8次; 0.01×SSC 10 s。最后于1 000 r·min⁻¹离心甩干2 min。每份材料进行2组4次独立的杂交实验, 组间实验采用荧光交换方式标记, 组内重复2次。

3.4 芯片扫描和数据处理

杂交芯片采用GenePix 4000A microarray scanner (Molecular Devices Ltd)扫描, 高背景信号、不规则杂交斑点及不正常的荧光信号等均在进一步分析中排除, 统计分析(包括微阵列标准化)采用GeneSpring GX 7.3.1 2006 (Agilent Technologies)。数据标准化采用依赖于单点、单芯片强度的标准化、并基于全部样品数据的20%。默认情况下(default)进行背景校正, 杂交信号所代表的基因通过拟南

芥信息资源中最新的拟南芥基因组标注信息进行标注, 并应用MapMan软件对光合作用相关基因进行合成、代谢途径作图。

实验结果

1 芯片杂交结果统计

杂交结果统计显示: 在10 798个芯片探针中, 信号良好的杂交有7 360个, 检测率为68.16%。将两组实验的荧光数据校正、整合后做散点图, 可以比较直观地看出2个样品之间基因表达的差异情况(图1): 多数数据点集中在上下两条斜线之间, 说明大多数基因在幼嫩叶片和成熟叶片中的表达差异不大。可查出对应拟南芥atg编号的白花菜差异表达基因434个, 其中幼叶中上调表达基因222个, 下调表达基因212个。

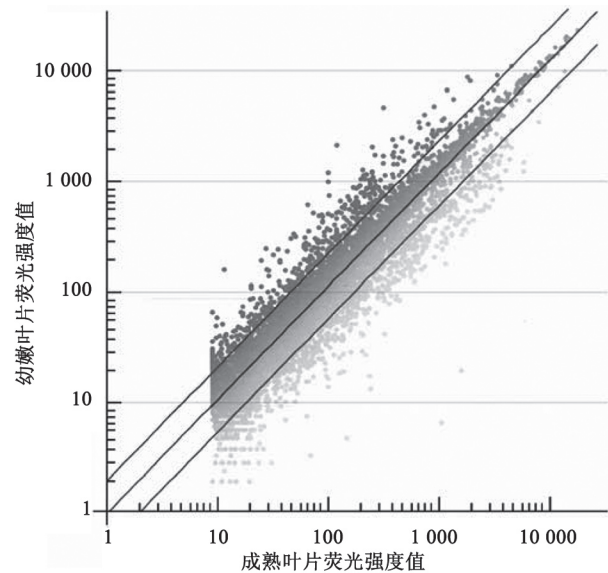


图1 白花菜幼叶与成熟叶片基因芯片杂交散点图

Fig.1 Scatter plot of gene expression profiling in young and mature leaves of *C. gynandra*

每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号。居中45°斜线代表在幼嫩和成熟叶片中基因表达量一样, 该斜线上方的点表示在幼嫩叶片中上调(成熟叶片中下调)的基因、该斜线下方的点表示在幼嫩叶片中下调(成熟叶片中上调)的基因。上端斜线上方的数据点表示幼嫩叶片基因表达量2倍以上上调, 下端斜线下方的数据点表示幼嫩叶片基因表达量2倍以上下调。

2 对应拟南芥atg编号的白花菜差异表达基因功能分类

参照Bevan等(1998)的植物基因功能分类方

法,将白花菜叶片基因芯片表达差异超过2倍以上的基因按照其参与的生物过程进行分类(表1)。

3 基因差异表达分析

在幼嫩叶片上调的基因中,最引人注目的是有大量与核糖体组成相关的基因,共有46个基因上调,分别占全部上调基因222个的20.7%和蛋白质合成相关基因的86.8% (表1),其中大多数为核糖体蛋白基因。在剩下的蛋白质合成相关的基因中,分别是4个编码翻译起始因子和3个编码翻译延长因子的基因,如起始因子基因*eIF4A1* (at3g-13920)、*eIF3K* (At4g33250)、*eIF3B* (at5g27640)和*eIF-3* (at5g44320)及GTP结合延长因子Tu家族基因(at1g07920、at1g07930和at5g60390)。在蛋白质归宿和储存相关的19个上调基因中,则多数(有15个)与蛋白质折叠有关,约占全部上调基因的6.8%及该组上调基因的78.9%,与蛋白质折叠有关的基因基本上是分子伴侣基因[如*TCP-1/cpn60*分子伴侣基因家族的一些基因(at1g24510、at3g02530、at3g03960)、*chaperonin-60 alpha* (At2g28000)、*jacalin-related lectin 30* (at3g16420)、*chloroplast chaperonin 10* (at5g20720)和*chaperonin-60 beta3* (at5g56500)]以及热激蛋白基因[如*hsp60* (at3g-23990)、*hsp90.7* (at4g24190)、*mitochondrial hsp70-1* (at4g37910)]。与细胞结构相关的15个上

调基因中,一个显著的特点是组蛋白基因表达上调(6个),约占该组上调基因的40%,它们是*histone H2A protein 9* (at1g52740)、*histone H2B* (at3g-45980)、*histone H3.3* (at5g10980)、组蛋白超级基因家族基因(at4g40040、at5g12910、at5g59690)。其余的上调基因还包括编码微管蛋白的基因,用于构建新生成细胞的细胞骨架。

在幼嫩叶片中下调的基因中,与能量相关的基因所占比例最高,在这一组基因中,与光系统建立和色素合成有关的基因为39个,占全部下调基因212个的18.4%及该组下调基因63个的61.9%,比如组成光系统I和II的一些亚基基因(at1g03130、at1g31330、at1g52230、at1g55670等)、捕光复合体亚基基因(at1g15820、at1g29930、at3g08940等)、光合电子传递相关蛋白的基因(at1g15980、at1g18730等)、叶绿素a/b结合蛋白基因(at1g-29910、at1g61520、at2g34420等)及叶绿素合成途径相关酶的基因(at1g58290、at2g26540、at4g27440)。将芯片数据导入在线MapMan软件(<http://mapman.gabipd.org/web/guest>),输出结果获得叶片在光反应系统、卡尔文循环和光呼吸途径中基因表达变化示意图(图2),从图中明显可见上述3条途径在幼嫩叶片中多数基因表达都下调。

同时,与C₄光合作用有关的一些基因也下调,

表1 白花菜幼嫩叶片中差异表达基因的功能分类

Table 1 Functional category of the differentially expressed genes in young leaves of *C. gynandra*

相关功能	上调表达基因数	占上调基因比例/%	下调表达基因数	占下调基因比例/%
代谢	12	5.4	14	6.6
能量	8	3.6	63	29.7
细胞生长/分裂	8	3.6	10	4.7
转录	33	14.9	8	3.8
蛋白质合成	53	23.9	-	-
蛋白质归宿及储存	19	8.6	13	6.1
运载蛋白	9	4.1	14	6.6
胞内运输	4	1.8	1	0.5
细胞结构	15	6.8	5	2.4
信号转导	11	5.0	21	9.9
疾病/防卫	7	3.2	14	6.6
次生代谢	3	1.4	-	-
转座子	-	-	1	0.5
核糖体RNA	1	0.5	4	1.9
不明分类	19	8.6	8	3.8
未知功能	20	9.0	36	17.0

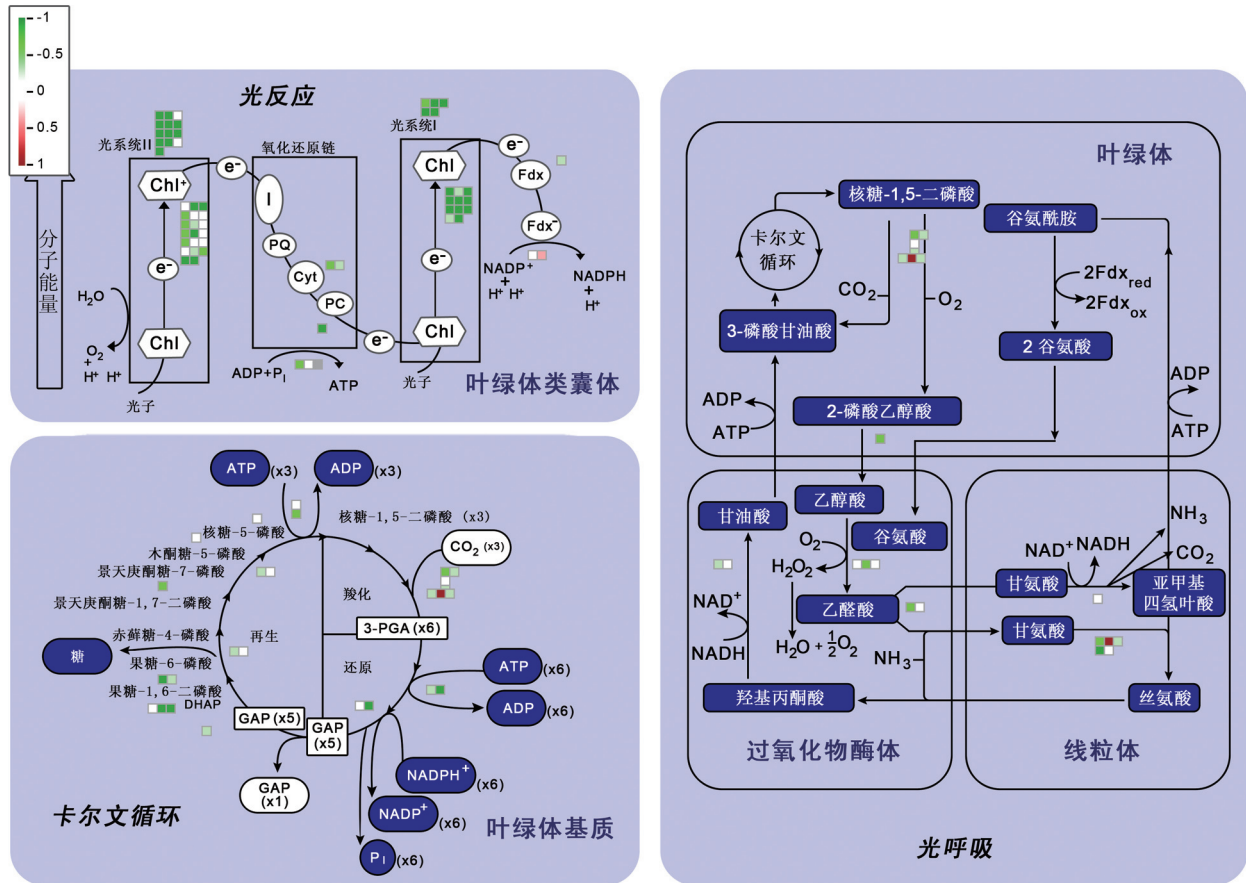


图2 白花菜幼叶在光反应系统、卡尔文循环和光呼吸途径中的基因表达

Fig.2 Expressions of genes involved in light reactions, Calvin cycle and photorespiratory pathway in young leaves of *C. gynandra*

绿色代表基因表达在幼叶中下调, 从深绿到浅绿代表基因差异表达量逐渐减弱; 红色代表基因表达在幼叶中上调, 从深红到粉红代表基因差异表达量逐渐减弱; 白色代表基因表达无差异。

如碳酸酐酶(CA, at3g01500和at5g14740)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPC, at3g14940)、丙酮酸磷酸双激酶(PPDK, at4g15530)。总之, 与成熟叶片相比, 在叶脉正在建立的幼嫩叶片中, 与光合作用的光反应和暗反应有关的基因表达量均较低。

需要注意的是, 叶片发育过程涉及众多激素的合成及信号转导, 如生长素、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)、茉莉酸(JA)、细胞分裂素(CK)、油菜素内酯(BR)等。本研究发现有5个与生长素有关的基因在叶片发育过程中差异表达, 其中2个上调, 分别是*wat1* (at1g75500)和*abcb19* (at3g28860); 3个下调, 它们是*snx1* (at5g06140)、休眠/生长素相关基因家族的基因(at2g33830)和*ailp1* (at5g19140)。ABA合成的关键基因*NCED1* (at3g63520)和*NCED4*

(at4g19170)在幼嫩叶片中表达下调, 同时筛选出与ABA信号转导相关的差异表达基因还包括*ATCYS-3A* (at4g14880)、*myb-like*转录因子基因(at1g70000)、*ARCK1* (at4g11890)、*FBA2* (at4g38970)、*BBD1* (At1g75380)、*ALT31* (At5g27420)、原生质膜质子ATP酶基因(At2g18960)、*MAPK3* (at3g45640)。与BR合成及信号转导有关的一些基因在幼嫩叶片中上调, 如*cabbage1* (at3g19820)和*aact2* (At5g48230)是BR合成途径的两个重要基因, *grf6* (at5g10450)则在BR信号转导中发挥作用。本研究还发现一些受GA调控的基因在幼叶中表达上调, 如*atarca* (at1g18080)、2个GA调控蛋白家族基因(at2g14900和at5g14920)及*gasa4* (at5g15230)。另外还发现一个水孔蛋白基因上调(at4g35100)。

讨 论

1 近缘植物的跨种芯片杂交

基因芯片是大规模分析基因表达谱的有效手段,可以同时检测上万个基因的转录水平,由此可以检测植物不同发育阶段基因的表达差异,进而探讨植物发育的分子机理。针对目前一些基因组序列未知、cDNA文库也未构建的物种,可以采取与近缘物种的基因芯片进行跨种杂交的方法,因为彼此之间基因序列比较一致。目前在近缘动、植物种间进行跨种杂交成功的案例已经很多。在植物中有油菜与拟南芥(Gaeta等2009)、马铃薯和西红柿(Bar-Or等2006)的跨种杂交等。跨种杂交成功的一个关键是采用长序列的探针制作cDNA芯片,这样探针序列与所选物种基因序列之间的个别碱基差异将对杂交和分析结果不产生影响(Adjaye等2004; Chen等2004)。本实验采用的是拟南芥cDNA芯片,探针长度均在70个碱基以上,有一部分超过100,为跨种杂交的成功提供了前提。另外,白花菜和拟南芥亲缘关系很近,白花菜和醉蝶花的高通量转录组测序与拟南芥的基因序列比对结果可以直接判断各自所属的光合类型(Brautigam等2011),表明它们之间基因序列的一致性很高。对一些白花菜C₄循环的关键基因的测序也表明,它们与拟南芥同源基因序列一致性高达90%以上。总之,由于白花菜和拟南芥的近缘关系以及我们所选芯片探针较长,最终获得了理想的杂交效果。

2 C₄叶片发育与核糖体蛋白基因的表达

对拟南芥叶片发育的形态及基因表达谱分析表明,新生幼嫩叶片中所有细胞均进行分裂增殖,此时细胞质核糖体蛋白基因的表达最高;随后叶尖处先进入细胞膨大期,并向靠近叶柄处扩展,在细胞膨大期核糖体蛋白基因的表达最低;最后细胞膨大停止,叶片进入成熟期,此时核糖体蛋白基因的表达高于膨大期、但低于增殖期(Beemster等2005; Andriankaja等2012)。我们所采用的白花菜幼嫩叶片,正处于细胞分裂增殖的旺盛时期,共检测出46个核糖体蛋白基因上调。成熟叶片中则未检测出上调的核糖体蛋白基因。核糖体蛋白基因在幼嫩叶片中高表达一方面暗示在叶片发育过程中有大量核糖体的合成与组装,为各种发育相关

基因的翻译提供了前提条件;另一方面,有众多的证据表明核糖体蛋白与叶片发育的调控有关,即在翻译水平调控叶片发育(Horiguchi等2012)。在拟南芥中已明确与发育相关的核糖体蛋白基因,如*rpl24b* (At3g53020)、*rps5b* (At2g37270)、*rpl23* (At4g16720)、*rpl28a* (At2g19730)、*rpl27a* (At1g-23290)等,它们的同源基因在白花菜幼叶中均上调。总之,在白花菜幼叶中大量核糖体蛋白基因高量表达,暗示着众多核糖体蛋白及其在翻译水平调控的发育相关基因协调作用,实现了叶片的正常发育。

3 C₄叶片发育与细胞分裂、蛋白质合成

细胞分裂过程中新合成的DNA需要与组蛋白形成核小体,因而DNA复制、细胞分裂与组蛋白的合成密切相关(Marzluff和Duronio 2002)。在本研究中发现有一些组蛋白基因表达在幼嫩叶片中上调,表明在白花菜发育的叶片中进行着活跃的细胞分裂。在橄榄叶片发育早期同样也观察到组蛋白基因表达上调(Maayan等2008),暗示着陆生植物在叶片发育初期存在着一些共同的分子机理。

白花菜幼叶中生命活动旺盛,进行着大量蛋白质的合成。其中的一个证据来自于蛋白质翻译的起始因子和延长因子的基因表达上调;另一个证据是大量分子伴侣基因和与蛋白质折叠有关的热激蛋白基因的表达上调,这些基因的蛋白产物将帮助新生肽正确的折叠,如组蛋白的折叠、核糖体蛋白的折叠及核糖体的组装(Karbstein 2010)等。幼叶中核糖体组装活跃的证据还在于本实验筛选出一个新生肽相关复合体基因(*NAC*, *at1g73230*) 在幼叶中表达上调,该基因产物的功能是促进核糖体的组装(Karbstein 2010)。热激蛋白基因在幼叶中高表达的另一可能原因是幼叶光合器官不健全,对光线的照射较敏感,可能产生光损伤(Maayan等2008),导致一些蛋白质空间结构异常,热激蛋白等参与了蛋白质的损伤修复。

4 C₄叶片发育与光合作用

Maayan等(2008)对橄榄叶片发育的研究表明正在发育的幼叶光合作用很低,与光合器官未发育成熟有关,如缺乏成熟的叶绿体,尽管光系统、捕光复合体和光合电子传递相关蛋白已存在,但含量较低,且随叶片发育而逐渐增加。本研究则

进一步证明在白花菜幼叶中众多与光系统I和II、捕光复合体及光合电子传递有关基因的表达至少在转录水平受抑制。同时还发现叶绿素合成相关蛋白的基因表达下调,暗示着幼叶中叶绿素含量较低,这与橄榄幼叶叶绿素含量较低相一致(Maayan等2008),可见在叶片发育初期叶绿素合成途径的相关基因表达尚未完全激活。从进化及经济的角度考虑,由于光合器官发育不完善,植物幼叶还无法进行有效的光合作用,光系统组装及叶绿素合成相关基因的高量表达只会造成浪费。

另外,从图2可以看出在幼嫩叶片中卡尔文循环中多数基因表达均下调,表明在叶片发育阶段CO₂的同化并不活跃。由于幼叶发育初期检测不到Rubisco(Maayan等2008),因而Rubisco的加氧反应也不能实现,光呼吸不活跃,光呼吸代谢相关基因表达呈下调。同样值得关注的是,作为NAD-ME类型的C₄植物白花菜,幼叶中C₄循环的一些关键基因的表达也呈下调,表明在幼叶中活跃的C₄循环并未完全建立。

总之,正在发育的幼叶中,无论是光反应还是暗反应均未完全建立。此时叶片仍以异养型为主,需要由叶源向其运输养分和能量,以供发育的需要(Šesták 1985)。

5 C₄叶片发育与植物激素

5.1 生长素

生长素在叶片发育中具有重要地位,比如生长素运输和分布决定叶原基的起始、参与叶片极性建立和叶片形态构建、调控叶片细胞分裂、参与叶片维管模式形成等(李林川和瞿礼嘉2006)。在白花菜幼叶中,与生长素相关的差异表达基因可能涉及生长素极性运输(如*abcb19*)(Nagashima等2008)、维管束形成(如*wat1*)(Ranocha等2010)、生长素运载蛋白的降解及回用(如*snx1*)(Cui等2010)等。C₄植物叶脉密度远高于C₃植物可能与生长素的极性运输、维管束原形成层的形成有关(McKown和Dengler 2010),因而进一步探究这些生长素相关基因在C₄植物发育中的作用可能会为探究C₄高密度细脉系统之谜提供一些线索。

5.2 脱落酸

虽然一般认为ABA是与胁迫相关的植物激素,但在一些水生植物中,它可以决定叶片的解剖

结构及细胞的生理功能,如ABA可以触发大莎草(*Eleocharis vivipara*) C₄形态建成及C₄循环(Ueno 2001)。目前仍未发现在陆生C₄植物,如玉米、黄顶菊等中ABA对C₄酶有诱导作用。本研究经比对正在发育的C₄白花菜幼嫩叶片和成熟叶片的基因表达谱,发现一些与ABA有关的基因差异性表达,如ABA合成的关键基因*NCED1*和*NCED4*在幼叶中表达下调。目前比较流行的C₄植物进化的假说认为低大气CO₂浓度、高温、干旱、盐碱等因素加剧C₃植物的光呼吸,从而促成植物向C₄方向进化,其中进化的一个动力是改善植物叶片水分的运输和利用率,比如胁迫条件下ABA的积累诱导了维管束鞘细胞的水通道蛋白表达下调,临时阻断从微管组织到叶肉细胞的水分流动,减缓了水分向叶片的供应。自然选择的结果导致维管束鞘细胞体积增大,便于储存更多的水分,以平衡向叶肉细胞的水分供应(Liu等2013)。有趣的是本研究同时筛选出一个水通道蛋白基因*plasma membrane intrinsic protein 3 (pip3, at4g35100)*在幼叶中表达上调。需要指出的是该实验是在水分供应充足的条件下进行的。虽然此时ABA没必要积累以诱导水通道蛋白表达下调,但却从另一个侧面暗示ABA积累和水通道蛋白基因表达存在一定相关性。本实验筛选出众多ABA合成及信号转导相关基因在C₄叶片发育过程中差异表达,暗示着ABA可能参与了陆生C₄叶片的发育。

5.3 油菜素内酯、赤霉素

BR是一种在叶片发育和细胞分化中起重要作用的植物激素。C₄植物叶片的发育与成熟存在一个逐渐过渡的过程,如玉米叶片靠近柄部的部位表现为维持基本的细胞功能,并进行活跃的细胞分裂,中间则体现从库到源的过渡状态,靠近叶尖处进行活跃的光合作用(Li等2010; Majeran等2010; Nelissen等2012)。研究发现BR合成途径在靠近叶柄处表达量最高,随着远离叶柄处其表达量迅速下降(Majeran等2010)。与此相一致的是,我们发现在白花菜幼嫩叶片中一些与BR合成及信号转导相关的基因表达上调。BR存在于快速分化和扩展的叶片或叶片区域,这与BR促进细胞增大的功能相一致(Kim和Wang 2010)。

GA可以促进细胞的分裂和叶片伸长的速率

(Nelissen等2012)。一些受GA调控的基因在白花菜幼叶中表达上调暗示着GA在幼叶中积累,并对叶片发育起作用。与此推测相一致的是,玉米叶片从柄部到叶尖的发育梯度研究证实靠近柄部(细胞分裂区)GA的合成达最高,而在细胞分裂区和细胞增大区的分界处GA的代谢最活跃(Nelissen等2012)。

本研究还发现与JA和CK相关的一些基因差异表达,表明叶片发育是一个复杂的过程,涉及多种激素的调控。

总之,C₄植物叶片发育是一个复杂的过程,幼叶细胞生命活动、细胞分裂旺盛,进行着大量蛋白质的合成以满足生长的需要,表现为核糖体蛋白基因、组蛋白基因、翻译因子基因、分子伴侣基因等的表达上调。由于幼叶光合器官尚未建立,与光合作用有关的基因均下调,幼叶仍处于异养生长阶段。各种植物激素参与了叶片发育这一复杂的过程,比如生长素、ABA、GA、BR等,生长素相关基因在幼叶的高表达可能与生长素极性运输及叶脉的发育有关,GA和BR相关基因的高表达与叶片细胞分裂、伸长有关,ABA也可能以某种形式参与了陆生C₄植物叶片的发育,但具体的机理有待进一步探讨。

参考文献

- 李林川, 瞿礼嘉(2006). 生长素对拟南芥叶片发育调控的研究进展. 植物学通报, 23 (5): 459-465
- Adjaye J, Herwig R, Herrmann D, Wruck W, Benkahl A, Brink TC, Nowak M, Carnwath JW, Hultschig C, Niemann H, Lehrach H (2004). Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays. BMC Genomics, 5: 83
- Andriankaja M, Dhondt S, Bodt SD, Vanhaeren H, Coppens F, Milde LD, Muhlenbock P, Skirycz A, Gonzalez N, Beemster GTS, Inze D (2012). Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. Dev Cell, 22: 1-15
- Bar-Or C, Bar-Eyal M, Gal TZ, Kapulnik Y, Czosnek H, Koltai H (2006). Derivation of species-specific hybridization-like knowledge out of cross-species hybridization results. BMC Genomics, 7: 110
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Staveren MV, Stiekema W et al (1998). Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. Nature, 391: 485-488
- Beemster GT, Veylder LD, Vercautere S, West G, Rombaut D, Hummelen PV, Galichet A, Gruissem W, Inzé D, Vuytsteke M (2005). Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of *Arabidopsis*. Plant Physiol, 138: 734-743
- Brautigam A, Kajala K, Wullenweber J, Sommer M, Gagneul D, Weber KL, Carr KM, Gowik U, Mass J, Lercher MJ et al (2011). An mRNA blueprint for C₄ photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C₃ and C₄ species. Plant Physiol, 155: 142-156
- Brown NJ, Parsley K, Hibberd JM (2005). The future of C₄ research - maize, *Flaveria* or *Cleome*? Trends Plant Sci, 10: 215-221
- Chen YA, McKillen DJ, Wu S, Jenny MJ, Chapman R, Gross PS, Warr GW, Almeida JS (2004). Optimal cDNA microarray design using expressed sequence tags for organisms with limited genomic information. BMC Bioinformatics, 5: 191
- Cui Y, Li X, Chen Q, He X, Yang Q, Zhang A, Yu X, Chen H, Liu N, Xie Q et al (2010). BLOS1, a putative BLOC-1 subunit, interacts with SNX1 and modulates root growth in *Arabidopsis*. J Cell Sci, 123: 3727-3733
- Friso G, Majeran W, Huang M, Sun Q, van Wijk KJ (2010). Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. Plant Physiol, 152: 1219-1250
- Gaeta RT, Yoo SY, Pires JC, Doerge RW, Chen J, Osborn TC (2009). Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70mer oligo microarrays. PLoS ONE, 4 (3): e4760
- Gowik U, Brautigam A, Weber KL, Weber APM, Westhoff P (2011). Evolution of C₄ photosynthesis in the genus *Flaveria*: how many and which genes does it take to make C₄? Plant Cell, 23: 2087-2105
- Hall JC, Sytsma KJ, Iltis HH (2002). Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. Am J Bot, 89: 1826-1842
- Horiguchi G, Lijsebettens MV, Candela H, Micol JL, Tsukaya H (2012). Ribosomes and translation in plant developmental control. Plant Sci, 191-192: 24-34
- Karstein K (2010). Chaperoning ribosome assembly. J Cell Biol, 189 (1): 11-12
- Kim TW, Wang ZY (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. Annu Rev Plant Biol, 61: 681-704
- Langdale JA (2011). C₄ cycle: past, present, and future research on C₄ photosynthesis. Plant Cell, 23: 3879-3892
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Myers CR et al (2010). The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. Nat Genet, 42: 1060-1067
- Liu Z, Sun N, Yang SJ, Zhao YH, Wang XQ, Hao XY, Qiao ZJ (2013). Evolutionary transition from C₃ to C₄ photosynthesis and the route to C₄ rice. Biologia, 68 (4): 577-586
- Maayan I, Shaya F, Ratner K, Mani Y, Lavee S, Avidan B, Shahak Y, Ostersetzer-Biran O (2008). Photosynthetic activity during olive

- (*Olea europaea*) leaf development correlates with plastid biogenesis and Rubisco levels. *Physiol Plant*, 134: 547~558
- Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ (2005). Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell*, 17: 3111~3140
- Majeran W, Zybailov B, Ytterberg AJ, Dunsmore J, Sun Q, van Wijk KJ (2008). Consequences of C₄ differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1609~1638
- Majeran W, Friso G, Ponnala L, Connolly B, Huang M, Reidel E, Zhang C, Asakura Y, Bhuiyan NH, Sun Q et al (2010). Structural and metabolic transitions of C₄ leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize. *Plant Cell*, 22: 3509~3542
- Marshall DM, Muhaidat R, Brown NJ, Liu Z, Stanley S, Griffiths H, Sage RF, Hibberd JM (2007). *Cleome*, a genus closely related to *Arabidopsis*, contains species spanning a developmental progression from C₃ to C₄ photosynthesis. *Plant J*, 51: 886~896
- Marzluff WF, Duronio RJ (2002). Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 14: 692~699
- McKown AD, Dengler NG (2010). Vein patterning and evolution in C₄ plants. *Botany*, 88: 775~786
- Nagashima A, Suzuki G, Uehara Y, Saji K, Furukawa T, Koshiba T, Sekimoto M, Fujioka S, Kuroha T, Kojima M et al (2008). Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of *Arabidopsis* hypocotyls in both a PGP19-dependent and a PGP19-independent manner. *Plant J*, 53: 516~529
- Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuynck K, Lijsebettens MV, Kamiya Y, Inze D, Beemster GTS (2012). A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol*, 22: 1183~1187
- Ranocha P, Denancé N, Vanholme R, Freydier A, Martinez Y, Hoffmann L, Köhler L, Pouzet C, Renou JP, Sundberg B et al (2010). *Walls are thin1 (WAT1)*, an *Arabidopsis* homolog of *Medicago truncatula NODULIN21*, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. *Plant J*, 63: 469~483
- Šesták Z (1985). Chlorophylls and carotenoids during leaf ontogeny. In: Šesták Z (ed). *Photosynthesis during Leaf Development*. Prague: Academia, 76~106
- Ueno O (2001). Environmental regulation of C₃ and C₄ differentiation in the amphibious sedge *Eleocharis vivipara*. *Plant Physiol*, 127: 1524~1532
- Wilson IW, Kennedy GC, Peacock JW, Dennis ES (2005). Microarray analysis reveals vegetative molecular phenotypes of *Arabidopsis* flowering-time mutants. *Plant Cell Physiol*, 46: 1190~1201