

巴西橡胶两品系叶片 RuBP 羧化酶的免疫荧光定位

张江洪¹, 杨汉金², 林梅馨², 潘廷国³

(1. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361012; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 3. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 巴西橡胶树的 2 个品系即 RR M 600 和 IAN 873 的维管束鞘细胞富含叶绿体, 但没有“Kranz”结构。用从烟草提纯的 RuBP 羧化酶制备兔抗 RuBP 羧化酶抗体, 并以 FITC 荧光素标记抗体。采用直接免疫荧光法对典型的 C₃ 植物水稻、C₄ 植物甘蔗和巴西橡胶树等进行了 RuBP 羧化酶的定位。结果表明: C₃ 和 C₄ 植物叶切片中 RuBP 羧化酶的分布明显不同, C₃ 植物的特异荧光存在于叶肉细胞, 而 C₄ 植物的特异荧光绝大部分存在于维管束鞘细胞。巴西橡胶树 IAN 873 和 RR M 600 品系的叶肉细胞和维管束鞘细胞均存在 RuBP 羧化酶。上述结果表明, 巴西橡胶的一些品系(如 IAN 873、RR M 600)可能属于 C₃-C₄ 中间型植物。

关键词: 巴西橡胶树; RuBP 羧化酶; 免疫荧光法

中图分类号: Q 945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7817(2002)02-0234-04

Localization of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase in leaves of two clones of *Hevea brasiliensis* by immunofluorescence method

ZHANG Jiang-hong¹, YANG Han-jin², LIN Mei-xin², PAN Ting-guo³

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen, Fujian 361012, China; 2. Life Science College, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 3. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract The clones(RR M 600 and IAN 873) of *Hevea brasiliensis* contain large amount of chloroplasts, but have no Kranz-type. Rabbit antiserum was refined from ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase(RuBPCase) of tobacco, and the antibody was marked with fluorescein isothiocyanate (FITC). RuBPCase in leaf blade transection of typical C₃, C₄ plants and *Hevea brasiliensis* was located by direct immunofluorescence method. The results were as follows: there was difference in the localization of RuBPCase between typical C₄ and C₃ plants, the specific fluorescence of C₃ plant (rice) existed in mesophyllous cell of chloroplasts, while the specific fluorescence of C₄ plant (sugarcane) mostly existed in bundle sheath cell of chloroplasts. The specific fluorescence of IAN 873, RR M 600 was located in both mesophyllous cell and bundle sheath cell of chloroplasts, so it was concluded that the clones(IAN 873, RR M 600) of *Hevea brasiliensis* might be belong to C₃-C₄ intermediate plant.

Key words: *Hevea brasiliensis*; ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase; immunofluorescence method

粟米草属(*Mollugo nudicaulis*)植物中,嫩叶向 C₃ 途径转变,老叶向 C₄ 途径转变,中部叶则呈中间光合类型^[1]。高粱本来为 C₄ 植物,但在开花后其光合碳同化也向 C₃ 途径转变;而在 C₃ 植物大麦、大豆中,也存在 C₄ 途径^[1-2]。随着研究的日益深入,科学家们发现 C₃ 和 C₄ 植物是相互联系的,CO₂ 的 2 种代谢途径在一定条件下可以相互转化。这为高光效育种提供了新的思路和选择。多年来人们希望通过 C₃ 与 C₄ 植物的杂交,将 C₄ 植物同化 CO₂ 的高效性转移到 C₃ 植物中,但至今尚未取得令人满意的结果。根据 C₃ 植物中存在 C₄ 途径的特点,寻找 C₄ 途径表达强的 C₃ 植物以及由此而进行的高光效品系的筛选工作,逐渐成为光合研究的一个侧重点,并已取得了令人欣喜的成果。目前关于巴西橡胶的高产育种尚未有突破性的进展,其碳素同化途径以及不同品系间的差异尚未见报道。因此,我们在对巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)叶切片的显微及超微结构观察的基础上,采用直接免疫荧光法进行了 RuBP 羧化酶的免疫荧光定位。旨在探

收稿日期: 2001-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39270461)。

作者简介: 张江洪(1966-),男,农艺师,硕士。研究方向: 植物生理生化。

明巴西橡胶的碳素同化途径及其个体发育过程的光合特性, 以期为品系选育中的早期测产提供形态生理学依据, 并对巴西橡胶不同品系间光合效率的差异作深入的研究

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料巴西橡胶 RR M 600 和 IAN 873 等叶片, 采自厦门大学植物园温室中的 1 龄实生小苗, 福建省热带作物研究所的橡胶系比苗圃中芽接的 IAN 873、RR M 600 等 3 龄幼苗以及诏安县建设农场实验山的 20 龄割胶树(芽接苗), 以典型的 C₃ 植物水稻和 C₄ 植物甘蔗作分析比较

本试验所用的兔子均由厦门大学原生物系实验动物饲养房提供

试验主要试剂有: 异硫氰酸盐荧光素(FITC)(瑞典 Fluka 产品)、Sephadex G-25(Pharmacia 产品)、G-50(Pharmacia 产品)、G-200(Pharmacia 产品)、DEAE-纤维素(DE-52)(Whatman 产品)、卡介苗(厦门卫生防疫站提供)以及 Kodacolor Gold 400(27D N)彩胶(澳大利亚 Melbourne 产品)。紫外分光光度计(UV-240 型)为日本岛津产品, Olympus 荧光显微镜属 BH2-RFL5 型

1.2 巴西橡胶叶片 RuBP 羧化酶的提取、纯化

参照张志良等^[3]改进过的方法, 透明液依次经过 Sephadex G-50 柱、Sephadex G-200 柱及 DEAE-纤维素柱(DE-52), 以磷酸缓冲液洗脱, 合并酶活部分的洗脱液

1.3 RuBP 羧化酶抗体的制备、纯化

用于 RuBP 羧化酶兔抗血清制备的抗原是从烟草中提取的 RuBP 羧化酶, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 呈现一单谱带

1.3.1 免疫方法 按照单价免疫球蛋白常量免疫方法^[4](多点注射)进行, 分别取烟草 RuBP 羧化酶抗原 10、20、25 mg 溶于 1 mL 50 mmol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH 7.4)中, 加入等体积的 Freund 完全佐剂, 分 3 次分别注射至四脚掌皮下、肩甲骨中间及髂骨部位下; 10 d 后再注射水剂抗原(RuBP 羧化酶 10 mg)1 针; 1 周后取兔耳静脉血测定血清的抗体效价, 另取 1 只不进行免疫的灰色雄兔为对照

1.3.2 抗体鉴定 按免疫电泳法进行抗体鉴定^[3]: 将抗原稀释 1024 倍, 抗体对质量浓度为 60 μg·mL⁻¹的 RuBP 羧化酶仍能产生一条兰色沉淀线。此外, 免疫电泳法测试试验表明, 纯化后的巴西橡胶 RuBP 羧化酶稀释后也能与烟草 RuBP 羧化酶的兔抗血清产生一兰色沉淀线, 存在明显的交叉反应。因而这一抗体的荧光标记物可用来检测橡胶叶片内该酶的分布。当抗体纯化对免疫兔耳静脉血的效价测定值较高时, 参照文献^[3], 经过相关的纯化步骤, 将制备好的抗体溶于少量 10 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.6)中。

1.4 抗体的荧光素标记、鉴定

采用 Tchan 改进的直接法, 用 FITC 直接标记纯化的 RuBP 羧化酶抗体, 反应液的 pH 值维持在 9.0-9.5^[5]。标记完毕的抗体蛋白液经 Sephadex G-25 柱, 分装于若干小管, 其中 2、3、4 管为精制的荧光抗体液, 其 F/P 比值符合文献^[6]的要求

1.5 组织切片的染色及荧光显微观察、拍照

供试叶片置于 0℃ 下预冷 20-30 min 后, 徒手切片, 用体积分数为 75% 的乙醇固定 10-15 min, 冷风吹干, 用 0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4)反复冲洗 15 min, 冷风吹干。滴加 2-3 滴精制的荧光抗体液于载玻片中的组织切片上, 结合反应 60 min(37℃, 自然光, 保湿), 以 0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4)反复冲洗 15 min, 封片。设置的对照有: 正常血清、0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4), 先加未标记的抗体液反应 60 min, 后加标记抗体液。3 种对照结合反应均为 1 h, 用 PBS 冲洗, 封片。

以超高压汞灯为激发光源, 用 510 nm 滤光片将叶绿素的红色自发荧光滤去, 选用 27D N 高速彩胶, 荧光显微拍照的曝光时间宜控制在 20 s 以内

2 结果与分析

2.1 两品系胶苗稳定叶的免疫荧光定位

水稻叶切片经 FITC 标记的 RuBP 羧化酶抗体染色^[7]后, 叶肉细胞特异荧光较强, 表明该酶广泛分布于叶肉细胞的叶绿体内; 而在甘蔗的叶切片中, 其特异荧光则聚集在维管束鞘细胞内, 环绕维管束呈花环状, 表明 RuBP 羧化酶分布于鞘细胞的叶绿体内。上述两种植物中特异荧光分布不同说明它们的 RuBP 羧化酶分布不同。

IAN 873 和 RR M 600 胶苗稳定叶的组织切片经 FITC 标记的 RuBP 羧化酶抗体染色后, 除了叶肉细胞有特异荧光反应外, 维管束鞘中也有明显的特异荧光反应; 而在正常血清对照组中没有特异荧光, 只有维管束的细胞壁有自发荧光反应。

2.2 同一叶龄的叶肉免疫荧光定位

RuBP 羧化酶免疫荧光反应的试验结果还表明, 不同品系间 RuBP 羧化酶的发育存有差异, 这种差异主要表现在下表皮毗接的叶肉细胞分化成栅栏组织方面: IAN 873、RR M 600 叶子的下表皮毗接的叶肉, 较早就分化成富含 RuBP 羧化酶的栅栏组织, 而天任 31-45 等品系的同样叶龄的叶片下表皮毗接的叶肉的 RuBP 羧化酶发育较迟。IAN 873 和 RR M 600 叶片下表皮毗接的叶肉的特殊结构, 使其下表皮旁侧的特殊细胞群能与上表皮毗接的栅栏组织共同完成极为重要的 CO₂ 固定功能, 具有较强的光合效率。

我们详细比较了 IAN 873 和 RR M 600 实生小苗叶的解剖结构和免疫组织化学的反应结果之后, 发现其维管束鞘特异荧光始终出现在叶肉富含 RuBP 羧化酶的早生结构之后。在反复的免疫荧光定位和形态学观察中, 尚未发现与发育程序相反的例子。

3 讨论

RR M 600、IAN 873 的叶片维管束解剖结构中^[8], 不仅维管束鞘细胞含有叶绿体, 而且韧皮部和木质部薄壁细胞以及射线薄壁细胞也含有数量较多而颗粒较小的叶绿体, 厚壁细胞 1-5 层, 有零星的叶绿体。而巴西橡胶的叶肉细胞分化具有早生结构的特征, 即下表皮毗接的叶肉并不分化成海绵组织, 而是分化成一层排列紧凑而细胞较短小的栅栏组织。下表皮毗接的这层栅栏组织的细胞和上表皮毗接栅栏组织的细胞一样, 富含 RuBP 羧化酶, 其面积约为上表皮毗接的栅栏组织的 1/3-1/2。这一特殊结构为各个品系所共有, 只是在其幼苗的发育先后上存有一些差异。

我们的研究表明, 无论是早期幼苗还是开割树的叶片, 在叶肉细胞和维管束鞘细胞均有很明显的特异荧光, 表明 RuBP 羧化酶分布于这两类细胞的叶绿体内。曾志杰^[9]、杨汉金^[10]等对巴西橡胶 IAN 873 等品系 CO₂ 补偿点等生理生化指标的测定结果, 也进一步证实了巴西橡胶是属于 C₃-C₄ 中间型植物。我们的研究结果与 Bauw e 的观察结果^[11]一致。Holaday^[12]对 *Panicum m ilioides*, *M oricand ia arvensis* 和 *Flave-ria floridana* 中间型植物进行了超微结构观察, 结果表明, 维管束鞘细胞里除了富含叶绿体外, 还含有许多大线粒体, 其它细胞器也相当丰富, 这一结果和我们的试验结果^[8]相符合, 这说明中间型植物的维管束鞘细胞有比 C₃ 植物丰富得多的各种细胞器, 以保证其旺盛的能量代谢和物质代谢。

B row n 和 M organ 在对中间型植物的代表种 *M . arvensis* 和 *P . m ilioides* 研究后提出了“光呼吸 CO₂ 再循环学说”^[13], 认为在维管束鞘细胞中, 线粒体里由甘氨酸生成丝氨酸而释放的 CO₂ 可以为 Calvin 循环再固定和利用。对 CO₂ 扩散过程的研究结果表明^[14], 叶肉细胞对 CO₂ 的扩散阻力 (R_m) 占总扩散阻力的比例是最主要的。这一纯物理学意义的阻力应表现在 2 个不同方向的扩散中。故通过上述试验, 我们认为, CO₂ 气体在巴西橡胶的叶肉细胞和维管束鞘细胞之间扩散的阻力相对较小; “光呼吸 CO₂ 再循环”学说忽视了叶肉细胞光呼吸释放的 CO₂ 的再循环这种可能, 这从植物体自身能量来考虑也是很有利的^[15]; 高煜珠等^[16]提出的“回迁”新概念也揭示了叶片内部光呼吸的复杂性。巴西橡胶树叶下表皮毗接叶肉分化为特殊的“类栅栏组织”, 为 CO₂ 的再利用提供极佳的内环境。由于毗接下表皮的叶肉细胞排列紧凑, 使得叶肉细胞光呼吸释放的 CO₂ 不易逸回大气, 使栅栏与类栅栏之间的空间里有较高的 CO₂ 含量, 而较高的 CO₂/O₂ 分压也增强了 RuBP 羧化酶的羧化活性, 减弱其氧合反应。换言之, 巴西橡胶叶片上下两面毗接的叶肉

细胞中,广泛存在的活化 RuBP 羧化酶,可能代替了典型 C₄ 植物中 PEP 羧化酶对 CO₂ 的高亲和力,使净光合效率提高

致谢 用于 RuBP 羧化酶兔抗血清制备的烟草 RuBP 羧化酶抗原由中国科学院植物生理研究所李立人研究员惠赠,谨此致谢

参考文献:

- [1] 李卫华,郝乃斌,戈巧英,等 C₃ 植物中 C₄ 途径的研究进展[J] 植物学通报,1999,16(2): 97- 106
- [2] 李卫华,卢庆陶,郝乃斌,等 大豆 C₄ 途径与光系统化学功能的相互关系[J] 植物学报,2000,42(7): 689- 692
- [3] 张志良,吴光耀 植物生物化学技术和方法[M] 北京: 农业出版社,1985 1- 17, 77- 82
- [4] 王世中 免疫化学技术[M] 北京: 科学出版社,1978 43- 163
- [5] 中山大学生物系生化微生物室 生物化学导论[M] 北京: 人民教育出版社,1978 251- 267
- [6] 解放军 59175 部队 荧光显微术[M] 上海: 上海科技情报出版社,1975 5- 182
- [7] 张江洪,杨汉金,林梅馨,等 荧光抗体在热带作物小粒种咖啡的 C₃/C₄ 属性鉴别中的应用[J] 福建农业大学学报,2001,30(2): 257- 261
- [8] 张江洪,杨汉金,林梅馨 巴西橡胶树若干品系叶切片的超微结构观察[J] 福建热作科技,2001,26(1): 1- 5
- [9] 曾志杰 巴西橡胶树叶片内 RuBPCase 的免疫酶标定位[D] 厦门: 厦门大学,1994
- [10] 杨汉金,张江洪,曾志杰,等 巴西橡胶树 IAN 873 品系光合碳素同化途径的研究[A] 福建省热作学会秘书处 福建省热作学会第六次代表大会暨学术讨论年会论文摘要汇编[C] 厦门: 福建省热作学会,1998 1- 2
- [11] BAUWE H. Photosynthetic enzyme activities and immunofluorescence studies on the localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaves of C₃, C₄ and C₃- C₄ intermediate species of *Flaveria*[J] **Biochem Physiol Pflanzen**, 1984, 179: 253- 268
- [12] HOLADA YA S. C₃- C₄ intermediate species in the genus *Flaveria*: leaf anatomy, ultrastructure, and the effect of O₂ on the CO₂ compensation concentration[J] **Planta**, 1984, 160: 25- 32
- [13] BROWN R H, MORGAN J A. Photosynthesis of grass species differing in CO₂ fixation pathways, differential effects of temperature and light intensity on photorespiration in C₃, C₄ and C₃- C₄ intermediate species[J] **Plant Physiol**, 1980, 66: 541- 544
- [14] 李明启 关于植物的光能效率与作物产量问题[J] 光合作用研究进展,1980, (2): 175
- [15] 吴相钰 光合作用碳代谢研究进展[J] 光合作用研究进展,1980, (2): 108- 128
- [16] 高煜珠,熊复生 光合能量代谢对 C₃ 植物光呼吸的调节作用[J] 植物生理学报,1986, 12(2) 132- 139

(责任编辑: 叶济蓉)