

毛竹茎秆快速生长期光合关键酶活性及基因表达分析

王灵杰¹, 栗青丽¹, 高培军^{1,2}, 韦赛君¹, 吕嘉欣¹, 高 岩^{1,2}, 张汝民^{1,2}

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】揭示毛竹 *Phyllostachys edulis* 快速生长期茎秆光合碳同化规律。【方法】以毛竹笋竹为试材, 采用分光光度法测定了毛竹茎秆和成熟叶片核酮糖-1,5-二磷酸氧合酶(Rubisco)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)、NADP-苹果酸酶(NADP-ME)、NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)、PEP 羧激酶(PEP-CK)、磷酸烯醇式丙酮酸双激酶(PPDK)活性, 运用实时荧光定量聚合链式反应(qPCR)对相应部位光合关键酶基因相对表达量进行分析。【结果】茎秆 7~19 节间 Rubisco 活性均极显著低于叶片($P<0.01$), 随着节间的升高, Rubisco 活性逐渐降低; 茎秆中 PEPC、NADP-ME、NADP-MDH、PPDK 活性在第 7 节间最高, 分别是叶片的 3.01 倍、5.69 倍、4.46 倍、4.05 倍($P<0.01$), 随着节间的升高, 酶活性均极显著降低($P<0.01$)。茎秆中 *PePEPC*、*PeNADP-ME*、*PeNADP-MDH*、*PePPDK* 基因表达量在第 7 节间最高, 分别是叶片的 3.48、7.89、6.48、3.46 倍($P<0.01$), 随着节间的升高, 这些基因表达量均极显著降低($P<0.01$)。【结论】毛竹快速生长期茎秆主要以 NADP-ME 和 NAD-ME 途径对竹腔内部高浓度二氧化碳(CO_2)再固定, 减少自身碳损耗, 形成的碳水化合物被茎秆快速生长再利用。图 13 表 1 参 37

关键词: 毛竹; 茎秆; 光合酶; 基因表达; C₄ 途径

中图分类号: S718.4 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)01-0084-09

Activities of key enzymes involved in photosynthesis and expression patterns of corresponding genes during rapid growth of *Phyllostachys edulis*

WANG Lingjie¹, LI Qingli¹, GAO Peijun^{1,2}, WEI Saijun¹, LÜ Jiaxin¹, GAO Yan^{1,2}, ZHANG Rumin^{1,2}

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The aim is to reveal the law of photosynthetic carbon assimilation of *Phyllostachys edulis* stem during rapid growth period. [Method] The activities of ribulose-1,5-diphosphate oxidase (Rubisco), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), NADP-malate (NADP-ME), NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH), PEP carboxykinase (PEP-CK) and phosphoenolpyruvate double kinase (PPDK) in the stems of different internodes of *Ph. edulis* shoots and mature leaves were determined by spectrophotometry, the relative expression of photosynthetic key enzyme genes in the corresponding parts was analyzed by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). [Result] The Rubisco activity of the 7–19 internodes of the stems was significantly lower than that of the leaves ($P<0.01$). With the increase of the internodes, the Rubisco activity gradually decreased first. The activities of PEPC, NADP-ME, NADP-MDH and PPDK in the stems were the highest among the 7th internodes, which were 3.01 times, 5.69 times, 4.46 times and 4.05 times of the leaves ($P<0.01$), with the increase of internodes, the activity of PEPC, PPDK, NADP-ME

收稿日期: 2020-04-15; 修回日期: 2020-10-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31570686); 浙江省省院合作项目(2018SY07)

作者简介: 王灵杰, 从事植物生理生化研究。E-mail: 762216988@qq.com。通信作者: 高培军, 副教授, 博士, 从事竹林培育与利用研究。E-mail: 316919866@qq.com

and NADP-MDH first significantly reduced ($P<0.01$). The gene expression levels of *PePEPC*, *PeNADP-ME*, *PeNADP-MDH* and *PePPDK* in the stems were the highest among the 7th nodes, which were 3.48 times, 7.89 times, 6.48 times and 3.46 times of the leaves ($P<0.01$). Increased, *PePEPC*, *PeNADP-ME*, *PeNADP-MDH*, *PePPDK* gene expression was significantly reduced ($P<0.01$). [Conclusion] The fast growing stems of *Ph. edulis* mainly fix the high concentration of CO₂ in the bamboo cavity through the NADP-ME and NAD-ME pathways to reduce their own carbon loss, and the carbohydrates formed are rapidly grown and reused by the stalks. [Ch, 13 fig. 1 tab. 37 ref.]

Key words: *Phyllostachys edulis*; stem; photosynthetic enzyme; gene expression; C₄ pathway

光合作用在绿叶中进行，也可在非同化器官叶柄，绿花，花萼，绿色水果，球果，茎组织，甚至根中发生^[1-4]。非同化器官光合作用，无论表现为净光合作用还是内部二氧化碳(CO₂)再固定，都是增加碳获取的重要方式^[5]。蔡锡安等^[6]研究发现植物茎秆组织能同化树干向生境排放的60%~90%CO₂。LIU等^[7]研究发现茎光合作用能够促进旱柳 *Salix matsudana* 扦插幼苗的器官发育。在干旱林地或沙漠中发现一些常见木本植物依赖绿茎作为碳同化器官^[8]。ÁVILA-LOVERA等^[9]发现霍金斯树 *Cercidium praecox* 在雨季主要由叶片进行光合作用，在旱季叶片完全脱落，主要由绿茎发生光合作用。植物碳同化方式多种多样，花环结构与3种不同细胞类型被认为是C₄光合碳同化途径关键特征^[10]。HIBBERD等^[11]发现在典型C₃植物烟草 *Nicotiana tabacum* 和芹菜 *Apium graveolens* 中，木质部和韧皮部周围的茎和叶柄细胞表现出NADP-苹果酸酶(NADP-ME)型细胞类型特征，这些细胞需要的碳来自于呼吸作用。SHEN等^[12]发现水稻 *Oryza sativa* 叶片中脉具有C₄光合特性。王莹等^[13]发现木本植物丁香 *Syringa meyeri*，银白杨 *Populus alba*，落叶松 *Larix gmelinii* 绿色茎秆组织中均表现出典型C₄光合生化特征。毛竹 *Phyllostachys edulis* 属禾本科 Gramineae 亚热带竹种，自然分布于中国南方省份，具有生长快，产量高，固碳能力强等特点。目前，关于毛竹光合作用前人已做了一些工作，温星等^[14]发现毛竹幼叶叶绿素质量分数和净光合速率随其生长发育不断增加，从幼叶生长至第15天完全展叶，叶片就具备正常的光合生理功能。陈登举等^[15]发现毛竹茎秆中光合色素含量较高，叶绿体发育完整，其类囊体垛叠程度高于叶片并含有淀粉粒。同时，毛竹在糖代谢^[16]、激素调节^[17]、非生物胁迫^[18]、基因组鉴定与表达分析^[19-20]等方面研究取得了较好的进展，但毛竹笋快速生长期茎秆光合碳同化分子特征的研究鲜有报道。本研究以快速生长阶段毛竹笋竹为研究对象，测定毛竹茎秆不同节间C₃光合碳同化途径关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)、C₄光合碳同化关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)、丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)、NADP-ME、NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEP-CK)活性及各个关键酶基因相对表达量，探讨毛竹快速生长期笋竹茎秆光合碳同化规律，以期为进一步揭示毛竹茎秆快速生长机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试毛竹来自浙江省杭州市临安区青山湖街道毛竹高效示范园。2018年4月中旬至5月下旬，选取生长状况良好，生境相同，株高6.0±0.2 m，基径约15 cm的当年自然生毛竹笋竹，在10:00~12:00从茎秆基部将其伐倒，由基部至顶部方向第1节间起顺序编号，依次取编号为7、10、13、16、19节间，切取各节间1/3处下部的绿色外层组织，取样厚度2~3 mm。成熟叶片样品采自成竹冠层，在同一生境和采样时间段选取生长状况良好的自然生成竹，取其冠层无斑点、无病害、延展性良好、大小均匀的深绿色成熟叶片，去叶脉。节间组织和叶片样品均液氮冷冻，-80 °C冰箱保存备用。取5株毛竹笋竹，5次重复，每株为1个独立实验。

1.2 方法

1.2.1 酶液提取与酶活测定 酶液提取参照BERVEILLER等的方法^[20]，稍有改动。取待测毛竹笋竹绿色茎秆和叶片各0.5 g分置于研磨机中，加入5 mL预冷的提取液，研磨至匀浆。12 000 r·min⁻¹离心30 min，取上清液即为粗酶液。Rubisco酶活性的测定参照姜振升等^[21]的方法。PEPC和NADP-ME活性

测定参照 BERVEILLER 等的方法^[20]。NADP-MDH 活性测定参照 JOHNSON 等的方法^[22]。PEPCK 活性测定参照 BURNELL 的方法^[23]。PPDK 活性测定参照 HATCH 等的方法^[24]。

1.2.2 毛竹笋竹茎秆和叶片总 RNA 的提取、质量检测及反转录 毛竹笋竹茎秆和叶片总 RNA 的提取使用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)RNAiso Plus (Code No.9109)*试剂盒,按其说明书的方法提取。使用 Nano-100 微量分光光度计检测 RNA 浓度与质量,用琼脂糖(添加量为 12 g·L⁻¹)凝胶电泳筛选可用 RNA。反转录使用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)PrimeScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒,按其说明书的方法合成 cDNA, 反转录后的 cDNA 放于-20 ℃保存。

1.2.3 荧光定量 PCR 通过美国国家生物信息中心(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 PLAZ 4.0 Monocots(https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v4_monocots/) 搜索毛竹光合关键酶基因 CDS 序列,所有用于目的基因表达的定量引物序列(表 1)均利用 NCBI 引物设计工具 Primer-BLAST 设计,同源比对后由浙江有康生物科技有限公司合成。各个基因表达分析使用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)。反应体系 20 μL,采用两步法 PCR 扩增标准程序在 Bio-Rad CFX manager 3.1 PCR 仪上扩增。定量结果采用 2^{-ΔΔCt} 的方法计算^[25],选用毛竹 *PeNTB* 作为内参基因,每个样品 3 次重复。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

基因名	5'→3'	3'→5'
<i>PeNTB</i>	TCTTGTGACACCGAAGAGGGAG	AATAGCTGCCCTGGAGGAGTT
<i>Percbl</i>	ATCGTGCTCGCGGTATCTTT	ATTCGGTCAGAGCTGGCAT
<i>PePEPC</i>	TCGAGGGTTCGGACTGTTGG	GAGTTGGCTGAGTTCTCGGA
<i>PeNADP-MDH</i>	CTGGATTGGCCTTGGTGTG	TGTGCGCGGATATTTCTG
<i>PeNADP-ME</i>	TTTAGTGCAGAACGATCGTGGG	ATGCCAACCTTGCACTCCC
<i>PePEP-CK</i>	CAGTACCACCAACCACTACACCAC	CTGGACGTGATGAACGAACCC
<i>PePPDK</i>	GAAACGTACGGCAAAGTG	GCTCTACCATCTGATCGCTG

1.3 数据分析

所有数据均为 5 次重复的平均值±标准差。利用 Origin 9.0 软件(OriginLab 公司,美国)进行统计分析和作图。采用 one-way ANOVA 进行 Tukey 多重比较 ($P<0.01$)。

2 结果与分析

2.1 不同节间和叶片 Rubisco 和 PEPC 活性变化

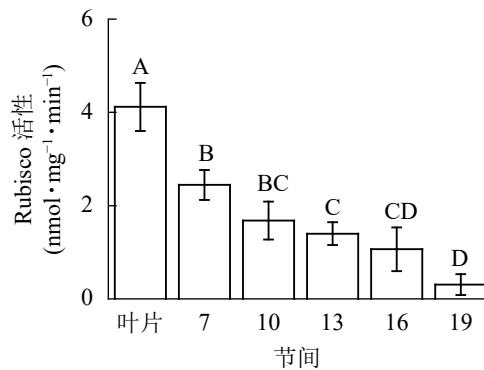
由图 1 可知:毛竹叶片 Rubisco 初始活性最高,极显著高于茎秆快速生长节间($P<0.01$),分别是第 7、10、13、16、19 节间的 1.69、2.45、2.95、3.87、13.40 倍;随着节间的升高, Rubisco 初始活性呈下降趋势,第 7 节间 Rubisco 初始活性高于其他节间。第 19 节间 Rubisco 活性最低,极显著低于叶片和第 7 节间($P<0.01$),分别下降了 92.5% 和 87.4%。

由图 2 可知:茎秆第 7 节间 PEPC 活性最高,极显著高于茎秆其他节间及叶片($P<0.01$),分别是第 10、13、16、19 节间和叶片的 1.70、2.19、3.01、5.70 和 3.01 倍;随着节间的升高, PEPC 活性呈下降趋势,第 19 节间 PEPC 活性最低,与第 7 节间相比下降了 82.5%($P<0.01$)。毛竹茎秆第 7~19 节间 PEPC 活性整体呈先极显著下降($P<0.01$)而后在低水平趋于平稳的趋势。

2.2 不同节间和叶片 NADP-MDH 和 NADP-ME 活性变化

由图 3 可知:茎秆第 7 节间 NADP-MDH 酶活性最高,极显著高于 13~19 节间及叶片($P<0.01$),分别是第 10、13、16、19 节间和叶片的 1.45、1.87、2.14、4.50 和 4.46 倍;随着节间的升高, NADP-MDH 活性呈下降趋势,第 19 节间 NADP-MDH 活性最低,与第 7 节间相比下降了 77.8%($P<0.01$)。毛竹茎秆第 7~19 节间 NADP-MDH 酶活性整体呈先下降而后在低水平趋于平稳的变化规律。

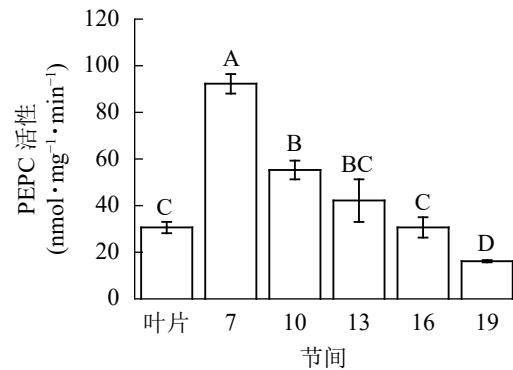
由图 4 可知:茎秆第 7 节间 NADP-ME 酶活性最高,极显著高于 13~19 节间及叶片($P<0.01$),分别



不同大写字母表示不同节间(叶片)差异极显著($P<0.01$)

图1 毛竹茎秆不同节间 Rubisco 初始活性变化

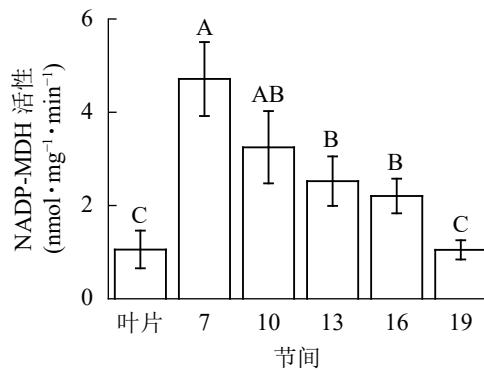
Figure 1 Changes of initial activity of Rubisco in different internodes of the *Ph. edulis* stems



不同大写字母表示不同节间(叶片)差异极显著($P<0.01$)

图2 毛竹茎秆不同节间 PEPC 活性变化

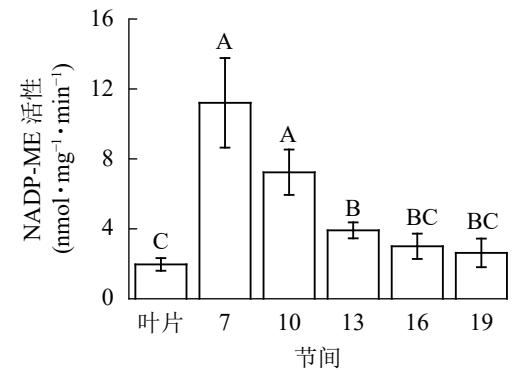
Figure 2 Changes of activity of PEPC in different internodes of the *Ph. edulis* stems



不同大写字母表示不同节间(叶片)差异极显著($P<0.01$)

图3 毛竹不同部位 NADP-MDH 活性变化

Figure 3 Changes of activity of NADP-MDH in different internodes of the *Ph. edulis* stems



不同大写字母表示不同节间(叶片)差异极显著($P<0.01$)

图4 毛竹不同部位 NADP-ME 活性变化

Figure 4 Changes of activity of NADP-ME in different internodes of the *Ph. edulis* stems

是第 10、13、16、19 节间和叶片的 1.55、2.86、3.73、4.27 和 5.69 倍；随着节间的升高，NADP-ME 活性呈下降趋势，第 19 节间 NADP-ME 活性最低，与第 7 节间相比下降了 76.6%($P<0.01$)。毛竹茎秆第 7~19 节间 NADP-ME 酶活性整体呈下降，而后趋于平稳的变化规律。

2.3 不同节间和叶片 PEP-CK 和 PPDK 活性变化

由图 5 可知：茎秆各节间与毛竹叶片 PEP-CK 活性无显著性差异。由图 6 可知：毛竹茎秆第 7 节间 PPDK 酶活性最高，极显著高于其他节间及叶片($P<0.01$)，分别是第 10、13、16、19 节间和叶片的 1.69、2.15、2.38、2.69 和 4.05 倍；随着节间的升高，PPDK 活性呈下降趋势，第 19 节间 PPDK 活性最低，与第 7 节间相比下降了 62.9%($P<0.01$)。毛竹茎秆第 7~19 节间 PPDK 活性整体呈极显著下降($P<0.01$)，而后趋于平稳的变化规律。

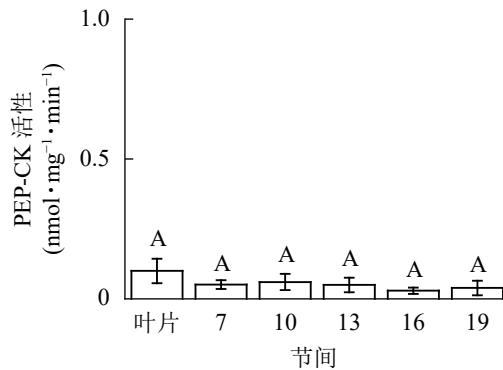
2.4 毛竹茎秆提取总 RNA 完整性及纯度检测

由图 7 可知：提取毛竹茎秆总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳条带清晰、明亮，分离明显，28 S 和 18 S 处的条带亮度是 5 S 处条带亮度的 2 倍，可见样品总 RNA 完整，未降解。

2.5 不同节间和叶片 *Percbl* 及 *PePEPC* 基因相对表达量的变化

由图 8 可知：茎秆 7~19 节间和叶片 *Percbl* 基因表达丰度不同，毛竹叶片 *Percbl* 基因相对表达丰度最高，极显著高于茎秆快速生长节间($P<0.01$)，分别是第 7、10、13、16、19 节间的 1.30、2.13、5.41、12.94、18.51 倍。随着节间的升高，*Percbl* 基因相对表达量极显著降低($P<0.01$)，第 19 节间 *Percbl* 基因相对表达量最低，极显著低于叶片和第 7 节间($P<0.01$)，相比分别下降了 94.6% 和 93.0%。

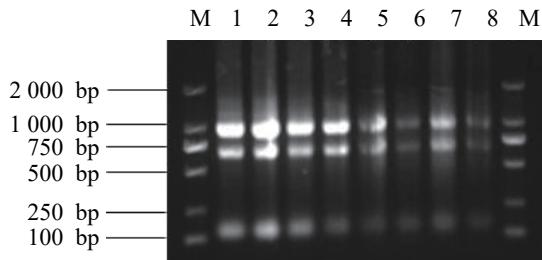
由图 9 可知：茎秆 7~19 节间和毛竹叶片 *PePEPC* 基因相对表达量不同，茎秆第 7 节间 *PePEPC* 基因



相同大写字母表示不同节间(叶片)差异不显著

图 5 毛竹不同部位 PEP-CK 活性变化

Figure 5 Changes of activity of PEP-CK in different internodes of the *Ph. edulis* stems



M: DL2000. 1~8: 毛竹快速生长期茎秆不同节间组织样品。其中, 1 和 2 为茎秆第 13 节间; 3 和 4 为茎秆第 16 节间; 5 和 6 为茎秆第 7 节间; 7 和 8 为茎秆第 10 节间。样品由上至下 3 个条带分别指 28 S、18 S、5 S

图 7 毛竹茎秆总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

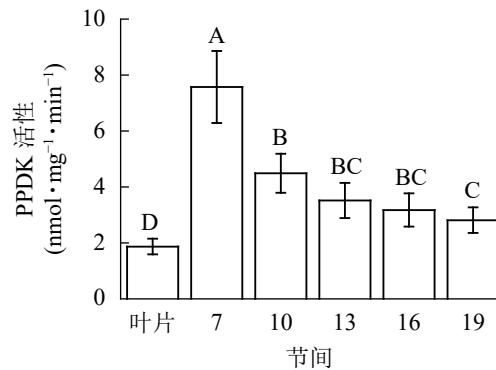
Figure 7 Total RNA agarose gel electrophoresis of bamboo stalks

相对表达量最高, 极显著高于叶片及各个节间($P<0.01$), 分别是叶片、第 10、13、16、19 节间的 2.43、1.82、2.50、2.95、3.48 倍。随着节间的升高, *PePEPC* 基因相对表达量极显著降低($P<0.01$), 第 19 节间 *PePEPC* 基因相对表达量最小, 极显著低于叶片和第 7 节间($P<0.01$), 分别下降了 30.1% 和 71.3%。

2.6 不同节间和叶片 *PeNADP-MDH* 及 *PeNADP-ME* 基因相对表达量的变化

由图 10 可知: 茎秆 7~19 节间和毛竹叶片 *PeNADP-MDH* 基因相对表达量不同, 第 7 节间 *PeNADP-MDH* 基因相对表达量最高, 极显著高于叶片及各个节间($P<0.01$), 分别是叶片、10、16、19、22 节间的 3.43、1.82、2.73、4.73、6.48 倍。随着节间的升高, *PeNADP-MDH* 基因相对表达量极显著降低($P<0.01$), 第 19 节间 *PeNADP-MDH* 基因相对表达量最低, 极显著低于叶片和第 7 节间($P<0.01$), 相比分别降低了 47.0% 和 84.6%。

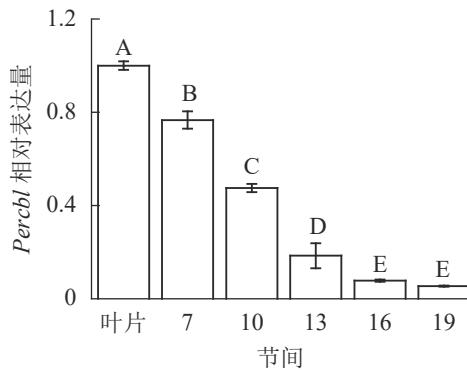
由图 11 可知: 茎秆 7~19 节间和毛竹叶片 *PeNADP-ME* 基因相对表达量不同, 第 7 节间 *PeNADP-ME* 基因相对表达量最高, 极显著高于叶片及各个节间($P<0.01$), 分别是叶片、10、13、16、19 节间



不同大写字母表示不同节间(叶片)差异极显著($P<0.01$)

图 6 毛竹不同部位 PPDK 活性变化

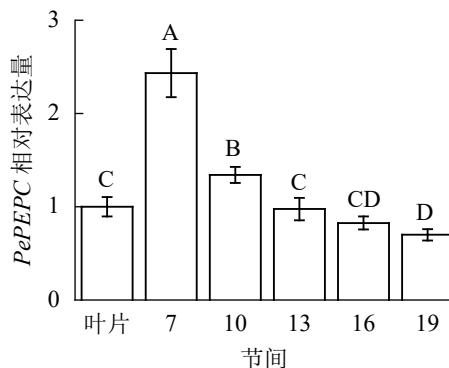
Figure 6 Changes of activity of PPDK in different internodes of the *Ph. edulis* stems



不同大写字母表示不同节间(叶片)差异极显著($P<0.01$)

图 8 不同部位毛竹笋竹 *Percbl* 基因相对表达量

Figure 8 Relative expression ration of *Percbl* gene in different parts of the *Ph. edulis* stems



不同大写字母表示不同节间(叶片)差异极显著($P<0.01$)

图 9 不同部位毛竹笋竹 *PePEPC* 基因相对表达量

Figure 9 Relative expression ration of *PePEPC* gene in different parts of the *Ph. edulis* stems

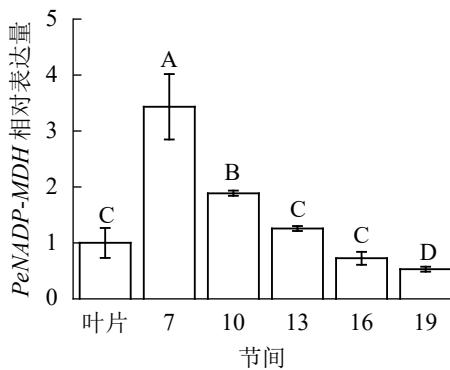


图 10 不同部位毛竹笋竹 *PeNADP-MDH* 基因相对表达量
Figure 10 Relative expression ration of *PeNADP-MDH* gene in different parts of the *Ph. edulis* stems

的 3.27、2.25、3.41、3.99、7.89 倍。随着节间的升高，*PeNADP-ME* 基因相对表达量极显著降低 ($P < 0.01$)，第 19 节间 *PeNADP-ME* 基因相对表达量最低，极显著低于叶片和第 7 节间 ($P < 0.01$)，分别降低了 58.5% 和 87.3%。

2.7 不同节间和叶片 *PePEP-CK* 及 *PePPDK* 基因相对表达量的变化

由图 12 可知：茎秆 7~19 节间和毛竹叶片 *PePEP-CK* 基因相对表达量不同，各个节间 *PePEP-CK* 基因相对表达量极显著低于叶片 ($P < 0.01$)，第 7~19 节间 *PePEP-CK* 基因相对表达量无显著性差异。

由图 13 可知：茎秆 7~19 节间和毛竹叶片 *PePPDK* 基因相对表达量不同，第 7 节间 *PePPDK* 基因相对表达量最高，极显著高于叶片及各个节间 ($P < 0.01$)，分别是叶片、10、13、16、19 节间的 5.57、1.39、1.80、2.70、3.46 倍。随着节间的升高，*PePPDK* 基因相对表达量逐渐降低，第 19 节间 *PePPDK* 基因相对表达量最低，与第 7 节相比降低了 71.1% ($P < 0.01$)。

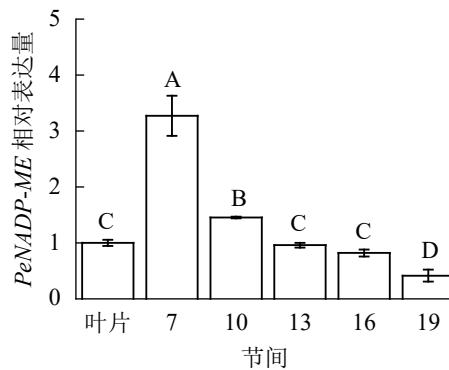


图 11 不同部位毛竹笋竹 *PeNADP-ME* 基因相对表达量
Figure 11 Relative expression ration of *PeNADP-ME* gene in different parts of the *Ph. edulis* stems

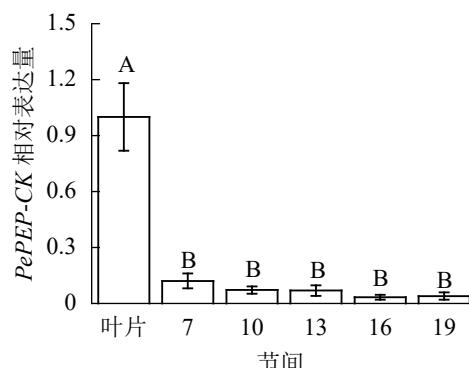


图 12 不同部位毛竹笋竹 *PePEP-CK* 基因相对表达量
Figure 12 Relative expression ration of *PePEP-CK* gene in different parts of the *Ph. edulis* stems

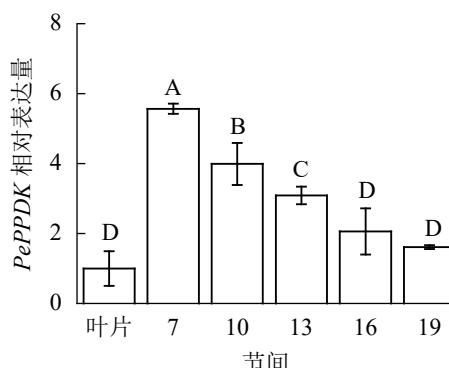


图 13 不同部位毛竹笋竹 *PePPDK* 基因相对表达量
Figure 13 Relative expression ration of *PePPDK* gene in different parts of the *Ph. edulis* stems

3 讨论

植物光合碳固定主要通过 C₃ 途径进行，也可由 C₄ 途径进行^[26~27]。IVANOV 等^[28]研究发现欧洲赤松 *Pinus sylvestris* 树皮和针叶 NAD-ME、NADP-ME 和 PEPC 活性较低，认为茎秆光合碳固定主要是 C₃ 途径；BERVEILLER 等^[29]研究发现成年欧洲山毛榉 *Fagus sylvatica* 树干和叶片 Rubisco 及 PEPC 动力学和免疫学特征与 C₃ 植物一致。HIBBERD 等^[11]研究发现烟草茎和叶柄周围细胞存在类似 C₄ 植物的花

环束鞘结构,这些细胞NADP-ME、NADP-MDH和PEP-CK活性较高,认为此部位主要以C₄途径固定无机碳。本研究中,毛竹茎秆快速生长节间PEPC、NADP-ME、NADP-MDH、PPDK活性均极显著高于叶片,茎秆Rubisco活性均极显著低于叶片,这与王莹等^[13]对不同木本植物枝条中C₄酶活性普遍高于叶片的研究结果相一致。结合毛竹茎秆存在与C₄植物相类似的花环结构^[30],推断毛竹茎秆快速生长阶段茎秆主要通过C₄途径固定CO₂。除此之外,本研究发现茎秆节位越高C₄途径关键酶活性和基因表达越低。这是因为茎秆下部节间已发育成熟竹箨脱落,节间裸露于有光环境中,光合作用活跃;上部节间竹箨未脱落,光不能被茎秆接收,光合作用无法进行,这与王珂杨等^[31]对毛竹茎秆中下部节间PSⅡ反应中心活性强,光能转换效率高,上部节间光合功能弱生长缓慢的研究结果相对应。

非同化器官光合固碳方式可能与相关光合酶基因选择性表达密切相关。黑杨 *Populus nigra* 中存在与玉米高同源性的PEPC基因,其茎组织有明显高水平选择性表达,对其碳代谢有潜在积极作用^[32]。烟草茎和叶柄光合细胞通过优先、特异性地表达高活性NADP-ME、NADP-MDH和PEP-CK固定无机碳^[11]。本研究中,毛竹茎秆快速生长节间PeNADP-ME基因和PeNADP-MDH基因相对表达量均极显著高于叶片,茎秆PePEPC基因和PePPDK基因相对表达量均极显著高于叶片,茎秆快速生长节间Rubisco基因Perbcl相对表达量极显著低于叶片,与其酶活性水平具有一致性,这与LI等^[32]对杂种黑杨 *Populus simonii* × *P. nigra* 茎组织PsnPEPC₂基因高水平表达的研究结果类似。表明毛竹茎秆由C₄途径固定无机碳可能受基因水平的调控,茎秆内PEPC催化无机碳羧化形成草酰乙酸,之后主要通过NADP-ME型和NAD-ME型通路由NADP-ME和NADP-MDH进行转化,这与烟草叶柄和芹菜中C₄同化途径类似^[11]。毛竹茎秆速生时期以C₄途径固定无机碳可能是其能进行高效生长的重要原因之一。

植物组织用于光合作用的CO₂主要来源于大气,一些木本植物茎秆、树干组织气孔较少,外皮层组织间排列紧密,气体通透性差,大气CO₂难以扩散进茎秆皮层绿色组织^[6]。木本植物树枝和茎秆光合作用普遍被认为利用内部代谢及呼吸产生的CO₂^[5]。根系吸收的无机碳盐和自身组织呼吸作用释放的CO₂会被装载到木质部液流供茎秆光合细胞重新固定利用^[11]。本研究中,毛竹茎秆表皮不具气孔,大气CO₂不能由气孔扩散进皮层组织^[30],茎秆内部测得高浓度CO₂(数据未显示),这与ZACHARIAH等^[33]对竹腔中空部具高浓度CO₂和气体正压的研究结果相一致。表明茎秆处于高CO₂低氧气(O₂)环境,这与C₄植物维管束细胞所处环境类似^[6,34],PEPC在高CO₂环境下往往活性更强^[35],茎秆内部组织呼吸作用所产生的CO₂被其羧化吸收重新固定。一方面避免了呼吸碳外排损耗,碳利用更加节约成本^[5,34,36];另一方面,其二次积累产生的糖类支持茎秆进行快速生长,释放的O₂在一定程度上缓解了茎秆组织内部缺氧状态和潜在酸化威胁^[37],毛竹茎秆这种特殊固碳机制可能是其能进行快速生长的重要原因之一。

综上所述,毛竹快速生长期茎秆主要以C₄途径固定CO₂,NADP-ME和NAD-ME型是茎秆进行C₄途径的主要通路;茎秆C₄途径主要用于竹腔内部高浓度CO₂再固定,形成的碳水化合物被茎秆快速生长再利用,这在一定程度上减少了自身碳损耗,为进一步解析毛竹茎秆快速生长机制提供理论依据。

4 参考文献

- [1] WEISS D, SCHÖNFELD M, HALEVY A H. Photosynthetic activities in the *Petunia corolla* [J]. *Plant Physiol*, 1988, 87(3): 666–670.
- [2] XU Huilian, GAUTHIER L, DESJARDINS Y, et al. Photosynthesis in leaves, fruits, stem and petioles of greenhouse-grown tomato plants [J]. *Photosynthetica*, 1997, 33(1): 113–123.
- [3] CHOMICKI G, BIDEL L P R, MING Feng, et al. The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic [J]. *New Phytol*, 2015, 205(3): 1330–1341.
- [4] SUI Xiaolei, SHAN Nan, HU Liping, et al. The complex character of photosynthesis in cucumber fruit [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(7): 1625–1637.
- [5] ASCHAN G, PFANZ H. Non-foliar photosynthesis: a strategy of additional carbon acquisition [J]. *Flora-Morphol Distrib Funct Ecol Plants*, 2003, 198(2): 81–97.

- [6] 蔡锡安,曾小平,陈远其.树干皮层光合作用:生理生态功能和测定方法[J].生态学报,2015,35(21): 6909 – 6922.
CAI Xi'an, ZENG Xiaoping, CHEN Yuanqi. Stem corticular photosynthesis: ecophysiological functions and their measurement [J]. *Acta Ecol Sin*, 2015, 35(21): 6909 – 6922.
- [7] LIU Junxiang, GU Lin, YU Yongchang, et al. Stem photosynthesis of twin and its contribution to new organ development in cutting seedlings of *Salix matsudana* Koidz [J]. *Forests*, 2018, 9(4): 207 – 218.
- [8] ÁVILA-LOVERA E, HARO R, EZCURRA E, et al. Costs and benefits of photosynthetic stems in desert species from southern California [J]. *Funct Plant Biol*, 2019, 46(2): 175 – 186.
- [9] ÁVILA-LOVERA E, TEZARA W. Water-use efficiency is higher in green stems than in leaves of a tropical tree species [J]. *Trees*, 2018, 32(6): 1547 – 1558.
- [10] BROWN W V. Variations in anatomy, associations, and origins of Kranz tissue [J]. *Am J Bot*, 1975, 62(4): 395 – 402.
- [11] HIBBERD J M, QUICK W P. Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants [J]. *Nature*, 2002, 415(6870): 451 – 454.
- [12] SHEN Weijun, YE Luhuan, MA Jing, et al. The existence of C₄-bundle-sheath-like photosynthesis in the mid-vein of C₃ rice [J]. *Rice*, 2016, 9(1): 1 – 14.
- [13] 王莹,王文杰,许慧男,等.3种C₃木本植物绿色组织C₄酶活性,色素含量及叶绿素荧光参数的比较[J].*植物研究*,2011,31(4): 461 – 466.
WANG Ying, WANG Wenjie, XU Huinan, et al. Comparison of 5 species C₄ enzymes activities, pigments contents and chlorophyll fluorescence parameters in leaf and branch chlorenchyma of 3 species C₃ woody plants [J]. *Bull Bot Res*, 2011, 31(4): 461 – 466.
- [14] 温星,程路芸,李丹丹,等.毛竹叶片发育过程中光合生理特性的变化特征[J].*浙江农林大学学报*,2017,34(3): 437 – 442.
WEN Xing, CHENG Luyun, LI Dandan, et al. Photosynthetic characteristics in the development process of *Phyllostachys edulis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2017, 34(3): 437 – 442.
- [15] 陈登举,高培军,吴兴波,等.毛竹茎秆叶绿体超微结构及其发射荧光光谱特征[J].*植物学报*,2013,48(6): 635 – 642.
CHEN Dengju, GAO Peijun, WU Xingbo, et al. Chloroplast ultrastructure and emission fluorescence spectrum characteristics for stems of *Phyllostachys pubescens* [J]. *Chin Bull Bot*, 2013, 48(6): 635 – 642.
- [16] 翟建云,孙建飞,马元丹,等.毛竹快速生长期茎秆不同节间碳水化合物代谢的变化[J].*竹子学报*,2018,37(1): 42 – 48.
ZHAI Jianyun, SUN Jianfei, MA Yuandan, et al. Changes of carbohydrates metabolism in different internodes of *Phyllostachys edulis* during rapid growth period [J]. *J Bamboo Res*, 2018, 37(1): 42 – 48.
- [17] 方楷,杨光耀,杨清培,等.毛竹成竹过程中内源激素动态变化[J].*江西农业大学学报*,2011,33(6): 1107 – 1111.
FANG Kai, YANG Guangyao, YANG Qingpei, et al. Dynamic changes of endogenesis hormone in bamboo formation course (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2011, 33(6): 1107 – 1111.
- [18] LIU Jun, CHENG Zhanchao, XIE Lihua, et al. Multifaceted role of PheDof12-1 in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 424 – 436.
- [19] PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456 – 461.
- [20] BERVEILLER D, DAMESIN C. Carbon assimilation by tree stems: potential involvement of phosphoenolpyruvate carboxylase [J]. *Trees*, 2008, 22(2): 149 – 157.
- [21] 姜振升,孙晓琦,艾希珍,等.低温弱光对黄瓜幼苗Rubisco与Rubisco活化酶的影响[J].*应用生态学报*,2010,21(8): 2045 – 2050.
JIANG Zhensheng, SUN Xiaoqi, AI Xizhen, et al. Responses of Rubisco and Rubisco activase in cucumber seedlings to low temperature and weak light [J]. *J Appl Ecol*, 2010, 21(8): 2045 – 2050.
- [22] JOHNSON H S, HATCH M D. Properties and regulation of leaf NADP-malate dehydrogenase and ‘malic’ enzyme in plants with the C₄ dicarboxylic acid pathway of photosynthesis [J]. *Biochem J*, 1970, 119(2): 273 – 280.
- [23] BURNELL J N. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from C₄ plants [J]. *Funct Plant Biol*, 1986, 13(5): 577 – 587.

- [24] HATCH M D, SLACK C R. Pyruvate, Pi dikinase from leaves [J]. *Methods Enzymol*, 1975, **42**: 212 – 219.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [26] HATCH M D. C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Rev Bioenerg*, 1987, **895**(2): 81 – 106.
- [27] CACEFO V, RIBAS A F, ZILLIANI R R, et al. Decarboxylation mechanisms of C₄ photosynthesis in *Saccharum* spp.: increased PEPCK activity under water-limiting conditions [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, **19**(1): 144 – 157.
- [28] IVANOV A G, KROL M, SVESHNIKOV D, et al. Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma of Scots pine [J]. *Planta*, 2006, **223**(6): 1165 – 1177.
- [29] BERVEILLER D, VIDAL J, DEGROUARD J, et al. Tree stem phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC): lack of biochemical and localization evidence for a C₄ - like photosynthesis system [J]. *New Phytol*, 2007, **176**(4): 775 – 781.
- [30] 王星星, 刘琳, 张洁, 等. 毛竹出笋后快速生长期茎秆中光合色素和光合酶活性的变化[J]. 植物生态学报, 2012, **36**(5): 456 – 462.
WANG Xingxing, LIU Lin, ZHANG Jie, et al. Changes of photosynthetic pigment and photosynthetic enzyme activity in stems of *Phyllostachys pubescens* during rapid growth stage after shooting [J]. *J Plant Ecol*, 2012, **36**(5): 456 – 462.
- [31] 王柯杨, 卜柯丽, 马元丹, 等. 毛竹茎秆发育过程中不同节间叶绿素荧光的变化[J]. 浙江农林大学学报, 2019, **36**(4): 697 – 703.
WANG Keyang, BU Keli, MA Yuandan, et al. Changes of chlorophyll fluorescence in different internodes during *Phyllostachys edulis* stem development [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(4): 697 – 703.
- [32] LI Yuan, DONG Xiumei, JIN Feng, et al. Histone acetylation modifications affect tissue-dependent expression of poplar homologs of C₄ photosynthetic enzyme genes [J]. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 950.
- [33] ZACHARIAH E J, SABULAL B, NAIR D N K, et al. Carbon dioxide emission from bamboo culms [J]. *Plant Biol*, 2016, **18**(3): 400 – 405.
- [34] 王文杰, 祖元刚, 王慧梅. 林木非同化器官树枝(干)光合功能研究进展[J]. 生态学报, 2007, **27**(4): 1583 – 1595.
WANG Wenjie, ZU Yuangang, WANG Huimei. Review on the photosynthetic function of non-photosynthetic woody organs of stem and branches [J]. *Acta Ecol Sin*, 2007, **27**(4): 1583 – 1595.
- [35] VUORINEN A H, KAISER W M. Dark CO₂ fixation by roots of willow and barley in media with a high level of inorganic carbon [J]. *J Plant Physiol*, 1997, **151**(4): 405 – 408.
- [36] BLOEMEN J, MCGUIRE M A, AUBREY D P, et al. Transport of root-respired CO₂ via the transpiration stream affects aboveground carbon assimilation and CO₂ efflux in trees [J]. *New Phytol*, 2013, **197**(2): 555 – 565.
- [37] PFANZ H, ASCHAN G, LANGENFELD-HEYSER R, et al. Ecology and ecophysiology of tree stems: corticular and wood photosynthesis [J]. *Die Naturwissenschaften*, 2002, **89**(4): 147 – 162.