

利用低 CO₂ 浓度培养箱筛选谷子 (*Setaria italica*) C₄ 光合作用相关突变体

罗明昭, 唐婵娟, 张 硕, 智 慧, 汤 沙, 贾冠清, 刁现民

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: C₄ 光合作用和光呼吸研究是植物学界的研究热点, 缺乏低 CO₂ 浓度培养条件和相关突变体限制了相关工作的深入开展。本研究设计了一个低 CO₂ 浓度培养箱, CO₂ 浓度、光照和温度等培养条件可稳定控制, 试验数据可通过网络实时查看记录。以该培养箱为平台, 本研究对 54 份谷子甲基磺酸乙酯 (EMS) 突变体进行了耐 40 mg/L (正常空气中 CO₂ 浓度范围是 380~400 mg/L) CO₂ 浓度培养鉴定, 根据死苗量将这些材料分为 4 类, 其中敏感的Ⅲ级突变体 19 个和Ⅳ级突变体 13 个, 对低 CO₂ 浓度极度敏感的 5 个谷子突变体均为叶脉变异系, 证实了低 CO₂ 浓度培养箱筛选鉴定的实用性。对这些材料开展包括花环解剖结构观察和相关突变基因克隆的深入研究, 将奠定谷子 C₄ 光合作用的研究基础, 所构建的低 CO₂ 浓度培养箱也适用于其他作物光合作用和光呼吸的生理学研究。

关键词: C₄ 光合作用; 谷子; 低 CO₂ 浓度; 筛选突变体

Screening of C₄ Photosynthesis-related Mutants in Foxtail Millet (*Setaria italica*) by Employment of Low CO₂ Concentration Incubator

LUO Ming-zhao, TANG Chan-juan, ZHANG Shuo, ZHI Hui,

TANG Sha, JIA Guan-qing, DIAO Xian-min

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: C₄ photosynthesis and photorespiration studies are research hotspot in plant science. However, lacking low CO₂ concentration culture conditions and related mutant resources limit the in-depth development of related work. This study designed a low CO₂ concentration incubator which can stably control plant growth conditions including light, CO₂ concentrations and temperature. Test data can be simultaneously updated onto the user-friendly remote website that allows to easily check the experimental records. Taking advantage of that, 54 EMS (Ethyl methane sulfonate) induced mutants of foxtail millet were subjected to be tested under 40 mg/L (concentration units: parts per million. The range of CO₂ concentration is 380-400 mg/L in normal air condition) CO₂ concentration. According to the number of survival seedlings at death point, these mutants can be placed into four groups. 19 mutants at level Ⅲ and 13 mutants at level Ⅳ, were found and recognized to be sensitive to CO₂ stress. There are also 5 mutants with vein variations which were hypersensitive to low CO₂ concentration. Those results confirmed low concentration of CO₂ incubator was applicable in screening for C₄ photosynthesis-related mutants, and also use for the in-depth study of Kranz anatomical structures observation and relevant gene cloning. In addition, the newly-developed low-concentration CO₂ incubator can also be applied for analyzing photosynthesis and respiration in other main crops.

Key words: C₄ photosynthesis; foxtail millet; low CO₂ concentration; mutants screening

收稿日期: 2017-09-11 修回日期: 2018-01-19 网络出版日期: 2018-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180417.1425.042.html>

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (Y2016XT05); 国家现代农业产业技术体系 (CARS07-13.5-A02); 中国农业科学院创新工程杂粮团队; 国家“863”计划 (2013AA102603); 国家自然科学基金 (31301328, 31522040, 31501324)

第一作者研究方向为基因挖掘与遗传效应分析。E-mail: caasluomingzhao@163.com

通信作者: 刁现民, 研究方向为谷子种质资源、功能基因组分析、遗传育种和产业开发。E-mail: diaoxianmin@caas.cn

光合作用被称为地球上最重要的化学反应,几乎是所有生命活动的能量来源,是生命之本。由于光合作用反应过程中,将无机物转化为有机物的关键酶——Rubisco 酶,是一种既能进行羧化反应(固定 CO₂ 形成光合产物)又能进行氧化反应(结合 O₂ 分解光合产物)的双功能酶,因此,光合作用中 CO₂ 的羧化效率受到其周边 CO₂ 与 O₂ 浓度比值的严重影响。绿色植物的光合途径主要有 C₃ 途径、C₄ 途径和景天酸代谢途径(CAM)等,其中 C₃ 途径和 C₄ 途径是主要类型。通过 C₄ 途径进行光合作用的植物——C₄ 植物,因具有特殊的花环解剖结构,在其 Rubisco 酶周边形成高 CO₂ 浓度环境,因而相较于 C₃ 植物,C₄ 植物具有更高的光合效率和水分养分利用效率等特征。据分析,地球上占绿色植物总数 3% 的 C₄ 物种,因具有高效的光合和养分水分利用效率,提供了近 23% 的能量来源^[1]。

已有的研究表明,目前地球上的 C₄ 植物是由 C₃ 植物经过 66 次以上的独立进化并再衍化而来^[2]。根据地球大气环境变化和植物系统发育进化的分析,历史上有段大气环境急剧变化期,空气中的 CO₂ 浓度从 3500 万 ~ 5500 万年前约 1 000 μmol/mol 急剧下降到 2500 万年前的约 390 μmol/mol,环境从温暖湿润变得寒冷干燥^[3],为了适应低 CO₂ 浓度和干旱的环境,C₄ 植物开始出现并逐渐增多。C₄ 植物的 CO₂ 补偿点和饱和点浓度均比 C₃ 植物的低,因此 C₄ 植物在 CO₂ 浓度低至 30 mg/L 环境中仍然可以不受影响而正常生长,而 C₃ 植物水稻在 CO₂ 浓度 50 mg/L 以下就开始死亡^[4]。

C₄ 植物在光合效率、抗旱耐逆和水分养分高效利用方面的巨大优势,引起了植物科学和作物科学工作者的高度重视。自 C₄ 光合作用途径在 1966 年发现以来^[5],科研工作者在 C₄ 光合作用的生理基础、解剖特征、C₄ 植物起源和衍化等方面做了大量工作^[6-10],并对这些工作进行了全面系统的总结^[11-13],基本反映了 C₄ 光合作用的研究历史和现状。虽然已有很多 C₄ 光合作用的研究报道,但控制 C₄ 植物花环结构形成的核心基因和分子代谢基础是什么? C₄ 植物高效的水分养分利用和相对抗旱耐逆的遗传及分子基础是什么? 这些重大科学命题至今没有一个清楚的回答。随着基因组测序技术和分子生物学各类

技术的飞速发展^[13-16],揭开 C₄ 植物高效光合作用的遗传和分子基础的时代已经来临,新的 C₄ 光合作用研究热点正在国内外形成^[17-18]。

历史上玉米(*Zea mays* L.)和高粱(*Sorghum bicolor*(L.)Moench)一直是 C₄ 光合作用研究的主要植物,但由于这两种植物相对高大的植株和较复杂的基因组,在实验室操作中有很多问题^[19]。谷子(*Setaria italica*(L.)Beauv.)是起源于中国的一种古老作物,是典型 NADP-ME 亚型的 C₄ 植物,属于禾本科黍亚科的狗尾草属。谷子及其野生种青狗尾草(*Setaria viridis*(L.)Beauv.)均是二倍体自花授粉作物,由于谷子具有基因组小(490 Mb),单穗结实数多,植株小易于实验室操作、生长条件简单,且具有高效外源基因转化技术^[20]等试验优势,目前已被国内外广泛认可为研究 C₄ 光合作用机理的模式作物^[19-21]。

突变体是功能基因研究的材料基础,A. B. Feldman 等^[22]利用 2 万多份水稻突变体筛选叶脉密度增大的突变体,并且探索了叶脉密度变化的遗传稳定性。G. Rizal 等^[23]从高粱中筛选出 2 个叶脉密度减小的突变体,深入分析发现突变体的油菜素内酯(BR)合成通路受到阻碍,说明 BR 途径可能参与促进叶脉密度增加。利用青狗尾草 EMS 突变体进行低 CO₂ 筛选也曾有研究^[24],但是未见相关突变体的后续报道。本实验室利用 EMS 诱变谷子基因组测序品种豫谷 1 号,经过多代的鉴定评价获得了大量遗传稳定的突变体材料。本研究探索利用 C₄ 植物的低 CO₂ 补偿点特点,控制突变体生长在低 CO₂ 浓度环境,期望筛选出可能与 C₄ 光合作用相关的突变体材料,为深入理解 C₄ 光合作用结构的分子基础和 C₄ 光合作用的进化历程研究提供原始研究材料和方法基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料包括突变体和野生型豫谷 1 号谷子,突变体来源于豫谷 1 号的 EMS 诱变库,经多代自交至 M₄ 代以上,表型稳定遗传。选择其中 54 份光合作用可能发生突变的材料,包括叶片异常表型或生长发育迟滞表型的突变体,作为本研究的供试材料。

1.2 材料种植

供试材料种植在 7 cm × 7 cm 的黑色盆钵中,营

养土选用疏松吸水好的育苗专用土。对照和突变体每个材料分别种植 4 盆,于温室条件中生长。隔 1 周浇水 1 次,每个托盘一次浇水量约 500 mL。出苗后每盆留 10~12 株长势一致的幼苗,待 3~4 叶期随机选择其中 3 盆放入低 CO_2 浓度培养箱,位置随机排列,每隔 3 d 按顺时针方向移动培养箱内的幼苗位置,以排除位置对材料生长的影响。相同的处理材料另安排 1 盆放在培养箱外正常空气的 CO_2 浓度条件下培养,用于生长对照,以培养箱内 3 盆植株幼苗死亡总数作为评价标准。

1.3 低 CO_2 浓度培养箱

本实验室联合河北省衡水市洪彬公司设计的低 CO_2 浓度培养箱,其光照、温度、光周期和 CO_2 浓度均可控,培养箱内环境数据即时通过互联网传输,可随时在网上登陆指定账号查看。经多次试验,培养箱 CO_2 浓度稳定可控,且光照、温度等培养条件和人工气候箱一致,均人工控制。该培养箱已经申请实用新型专利,名称为一种基础科研用的低浓度二氧化碳培养箱,证书号第 5304117 号,专利号为 ZL 2016 2 0022396.4,申请日期为 2016 年 1 月 11 日。

1.4 鉴定方法

设定培养箱 CO_2 浓度 40 mg/L、温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 、光强 2000 lx、光周期光照 16 h/黑暗 8 h,试验材料在正常环境下生长 3 周左右(3 叶期之后,一般生长 20~24 d 不等),将生长正常的幼苗放入培养箱培养。幼苗放入培养箱 6 d 后有突变体开始死亡,14 d 后统计死苗株数,根据幼苗的死亡数量将突变体分为 4 个等级。幼苗死苗量少于 5 株的定为 I 级,5~15 株为 II 级,16~25 株为 III 级,25 株以上的为 IV 级。

2 结果与分析

2.1 C_4 相关突变体资源的获得

本实验室主要以谷子作为研究材料,多年研究积累了大量的 EMS 稳定突变体,本研究关注 C_4 光合作用,根据叶片表型,选用了一批光合作用相关突变体作为研究材料(主要为白条纹突变体)。图 1 为野生型豫谷 1 号(图 1A)和试验突变体的旗叶表型(图 1B~G),野生型的叶片呈深绿色,条纹突变体的叶脉周围缺少叶绿素而出现异常。突变体 *w22*(图 1B)、*w28*(图 1D)、*w31*(图 1E)、*w42*(图 1F)和 *w108*(图 1G)都有明显的条纹,而 *w104*(图 1C)的条纹不明显。



A:野生型豫谷 1 号;B~G:叶异常突变体

A:wild type Yugu1, B-G:leaf abnormal mutants

图 1 试验材料旗叶表型

Fig. 1 Yellow discoloration of flag leaves

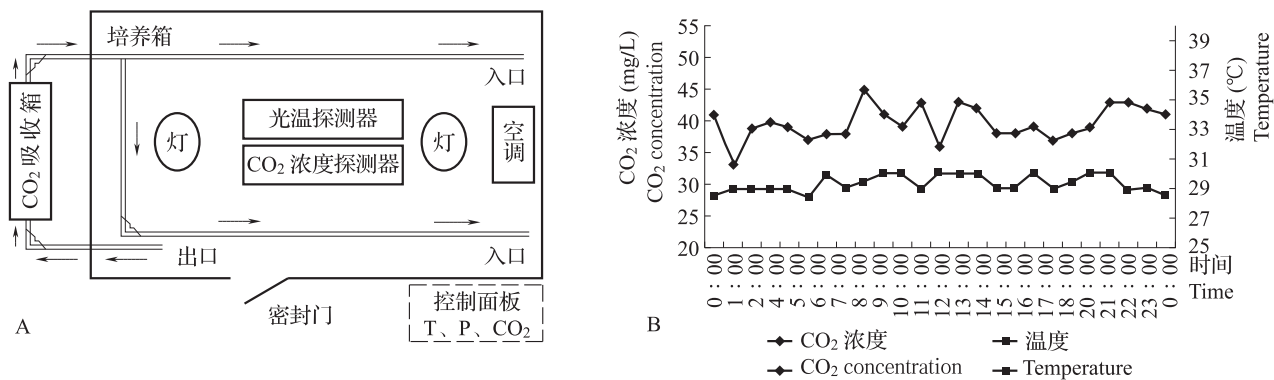
2.2 适合谷子 C_4 相关突变体筛选的低 CO_2 浓度培养箱设计

谷子是 C_4 光合作用植物,与同为禾本科的水稻和小麦等 C_3 作物相比,其光能和水肥利用效率具有显著优势。这主要归因于其高效的 CO_2 羧化效率,降低正常环境 CO_2 浓度, C_4 植物谷子因低 CO_2 补偿点具有更强的生命力,利用该培养箱可以方便地筛选不能在低 CO_2 浓度环境中正常生长的谷子突变体材料,为进一步获得 C_4 光合作用相关突变体奠定基础。

本实验室自主设计的低 CO_2 浓度培养箱主要组成部分有:空调、光温探测器、 CO_2 浓度探测器、 CO_2 吸收箱(发动机、抽气机和 CO_2 吸附剂)、控制面板(设定光照、温度和 CO_2 浓度)、透明玻璃培养箱(图 2A)。其 CO_2 浓度控制的基本原理是自动控制一个 CO_2 循环装置,空气的 CO_2 被吸收后再循环进入培养箱内,当培养箱内 CO_2 浓度降低到设定的阈值后停止循环,超过设定值 10 mg/L 立即再次启动发动机。培养箱内光温探测器和 CO_2 浓度探测器获得的环境条件数据上传互联网,可实时查看(图 2B)。该培养箱已经申请实用新型专利(ZL 2016 2 0022396.4)。

2.3 谷子耐低 CO_2 浓度突变体资源的评价分析

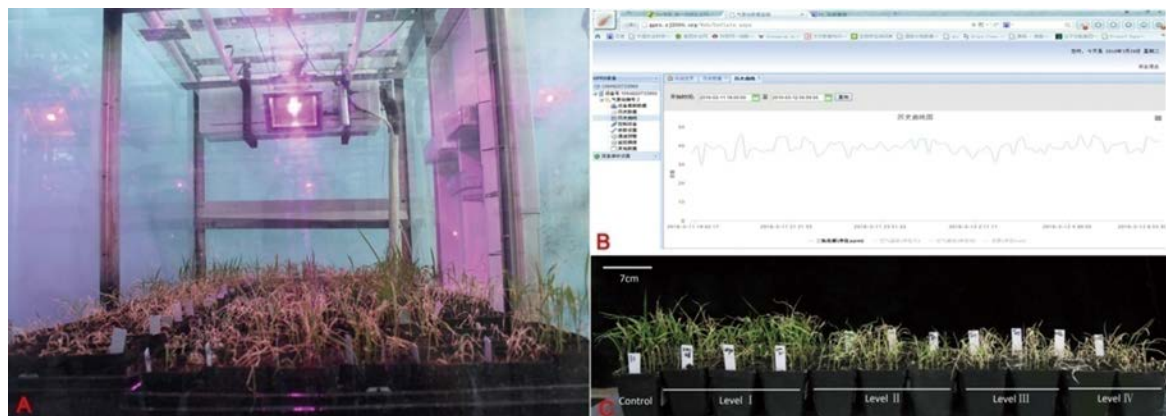
在培养箱内恒定的光周期、温度和低 CO_2 浓度环境下,对突变体材料进行低 CO_2 浓度条件下的筛选工作(图 3A)。通过互联网登陆账号实时监测培养箱内光温和 CO_2 浓度环境变化情况,结果表明,培养箱内的温度和 CO_2 浓度保持稳定(图 3B)。筛选材料放入培养箱第 6 天观察到有些突变体开始出现死苗现象,直至 14 d 后死苗数量不再增加,统计培养箱内材料每盆的成活株数。作为生长对照的材料同时期在正常环境条件下培养,这些突变体和野生型豫谷 1 号均生长正常。



A:低 CO₂ 浓度培养箱工作原理;T:温度;P:光周期;B:CO₂ 培养箱环境监测
A:The operation principle of low CO₂ concentration incubator,T:temperature,
P:photoperiod,B:monitor of the environment in the low CO₂ concentration incubator

图2 CO₂ 培养箱原理及应用

Fig. 2 The operation principle and application of low CO₂ concentration incubator



A:低 CO₂ 浓度培养箱;B:互联网实时查看培养箱光温环境;C:低 CO₂ 浓度条件下突变体的筛选结果
A:Low CO₂ concentration of the incubator,B:Light and temperature conditions monitoring via internet,
C:Example of mutants screening under low CO₂ concentration conditions

图3 低 CO₂ 浓度筛选突变体

Fig. 3 Screening for mutants being sensitive under low CO₂ concentration

培养箱内的野生型豫谷1号叶尖部有轻微的枯黄表现,但与培养箱外的材料一样保持良好的生长状态(图3C)。表明C₄植物谷子在40 mg/L的低CO₂浓度环境中仍然能够正常生长,验证了谷子具有的低CO₂补偿点浓度,在低CO₂浓度环境下的光合羧化产物能够满足正常的生长需求。培养箱内幼苗死苗量少于5株的Ⅰ级突变体有14个,分别为w14、w16、w17、w29、w30、w33、w35、w50、w69、w89、w93、w103、xm2和xm48(表1)。即使在低CO₂浓度环境培养14 d后,还能与野生型豫谷1号一样正常生长。其生长状态与培养箱外相应突变体相同,说明这14个突变体的C₄光合途径并没有受到影响,能够耐受低CO₂浓度环境。

死苗量在5~15株的Ⅱ级突变体有8个,包括w1、w10、w15、w18、w23、w45、w84和w85,第14天统计结果显示死苗株数最高不超过13株(表1)。与培养箱内野生型豫谷1号相比,成活苗的植株生长减缓,株高略有降低。与正常环境生长的相应突变体相比,株高、叶片颜色等生长状态变化不明显。死苗量在16~25株的Ⅲ级突变体共19个(表1),这些材料中不同突变体对低CO₂浓度环境的反应快慢不同,有的突变体快速的表现出不适应而死亡。w11、w12、w39、w41、w44、w51、w54、w55、w64、w91和w102放入培养箱第6天幼苗死亡数量已经超过了15株,但以后不再有更多的幼苗死亡,直到第14天其死苗量都没有变化。有的突变体则出现死苗数量逐渐

表 1 低 CO₂ 浓度培养箱筛选突变体结果Table 1 The results of mutants after screening under low CO₂ concentration conditions

突变 体号 Mutants number	总苗量 Total seedlings	成活苗 (6 d 后) Survival seedlings (after 6 days)	成活苗 (14 d 后) Survival seedlings (after 14 days)	死苗率(%) Mortality rate	等级 Classes	突变 体号 Mutants number	总苗量 Total seedlings	成活苗 (6 d 后) Survival seedlings (after 6 days)	成活苗 (14 d 后) Survival seedlings (after 14 days)	死苗率(%) Mortality rate	等级 Classes
豫谷 1 号	33	33	33	0	对照	w38	35	22	16	54.29	Ⅲ
w14	35	34	34	2.86	I	w39	30	23	12	60.00	Ⅲ
w16	30	29	29	3.33	I	w41	32	15	15	53.12	Ⅲ
w17	30	30	30	0	I	w44	32	14	14	56.25	Ⅲ
w29	33	33	33	0	I	w49	33	19	9	72.73	Ⅲ
w30	34	31	31	8.82	I	w51	32	15	15	53.12	Ⅲ
w33	30	30	30	0	I	w54	32	10	10	68.75	Ⅲ
w35	33	32	32	3.03	I	w55	31	13	13	58.06	Ⅲ
w50	34	34	34	0	I	w56	34	20	11	67.65	Ⅲ
w69	33	33	33	0	I	w64	33	11	11	66.67	Ⅲ
w89	34	32	32	5.88	I	w88	32	18	10	68.75	Ⅲ
w93	30	30	30	0	I	w91	33	13	13	60.61	Ⅲ
w103	33	33	33	0	I	w102	34	15	15	55.85	Ⅲ
xm2	34	34	34	0	I	w109	33	19	8	75.76	Ⅲ
xm48	33	32	32	3.03	I	w6	34	7	0	100.00	Ⅳ
w1	33	26	26	21.21	Ⅱ	w9	34	2	2	94.12	Ⅳ
w10	33	20	20	39.39	Ⅱ	w22	33	0	0	100.00	Ⅳ
w15	32	22	22	31.25	Ⅱ	w24	36	0	0	100.00	Ⅳ
w18	33	24	24	27.27	Ⅱ	w28	30	0	0	100.00	Ⅳ
w23	34	23	23	32.35	Ⅱ	w31	34	0	0	100.00	Ⅳ
w45	30	25	25	16.67	Ⅱ	w42	33	0	0	100.00	Ⅳ
w84	34	26	26	23.53	Ⅱ	w47	33	1	1	96.97	Ⅳ
w85	32	29	22	31.25	Ⅱ	w66	33	2	2	93.94	Ⅳ
w7	32	21	15	53.12	Ⅲ	w86	32	9	3	90.62	Ⅳ
w11	32	10	10	68.75	Ⅲ	w104	30	0	0	100.00	Ⅳ
w12	35	12	12	65.71	Ⅲ	w105	34	6	0	100.00	Ⅳ
w13	32	20	9	71.87	Ⅲ	w108	30	1	1	96.67	Ⅳ
w19	34	23	12	64.71	Ⅲ						

增多,突变体 *w7*、*w13*、*w19*、*w38*、*w49*、*w56*、*w88* 和 *w109* 在第 6 天的死苗量少于 15 株,到了第 14 天死苗量已经超过了 15 株,特别是 *w13*、*w49* 和 *w109* 的死苗率都超过了 70%。成活的幼苗的生长状态也不如培养箱外正常环境下生长的幼苗,幼苗更小,死苗率高的 3 个突变体叶片均为白色条纹状表型。

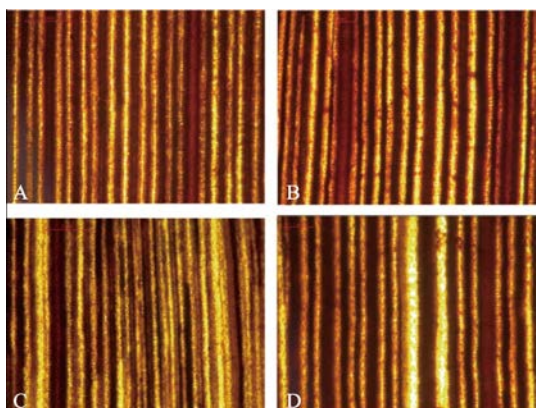
死苗量超过 25 株以上的Ⅳ级突变体有 *w6*、*w9*、*w22*、*w24*、*w28*、*w31*、*w42*、*w47*、*w66*、*w86*、*w104*、*w105* 和 *w108* 共 13 个(表 1),但是其中 *w47*、*w66* 和 *w108* 在培养箱外相应突变体也由于感染谷瘟病等原因死亡,其他突变体在低 CO₂ 浓度的培养箱中不能正常

生长,突变体 *w22*、*w24*、*w28*、*w31*、*w42* 和 *w104* 在第 6 天就已经全部死亡,*w6* 和 *w105* 也在第 14 天后全部死亡,*w9*、*w47*、*w66*、*w86* 和 *w108* 虽然最后还有个别的植株存活,但其生长状态非常弱小,而且发育更慢,植株矮小。结果表明突变体 *w22*、*w28*、*w31*、*w42* 和 *w104* 对低 CO₂ 浓度环境极度敏感,这 5 个突变体可作为进一步研究的重点材料。从表型上看它们都是白色条纹突变体,*w22*、*w28*、*w31* 和 *w42* 的白条纹更明显,*w104* 为轻度白条纹。

2.4 维管束鞘细胞淀粉合成变异

糖类被碘液染色后呈红褐色,蛋白质呈黄色,

C₄ 植物光合作用固碳途径主要发生在维管束周围的 BSC, 光合产物糖类物质非常多而被碘液染色为深褐色, 相邻维管束之间的 MC 合成糖类少而呈现黄色。野生型豫谷 1 号结果(图 4A), 对 5 个通过培养箱筛选到的不耐低 CO₂ 浓度的白条纹突变体碘液染色结果表明 *w22*(图 4B)、*w28* 和 *w42* 均没有明显变化。*w31*(图 4C) 出现叶脉密度增大, 部分叶脉周围的黄色部分增多, 说明其叶脉发育受到了影响, 淀粉等糖类物质累积量异常。*w104*(图 4D) 叶脉排列密度没有明显变化, 但其出现两个更黄亮区域, 这可能是该区域的维管束鞘细胞中淀粉合成受到了影响而出现的结果。



A: 野生型豫谷 1 号; B: 突变体 *w22*; C: 突变体 *w31*; D: 突变体 *w104*
A: wild type, Yugu1, B: mutant *w22*, C: mutant *w31*, D: mutant *w104*

图 4 碘染色结果

Fig. 4 The leaf segment stained with I₂-KI

3 讨论

3.1 低 CO₂ 浓度培养箱在 C₄ 光合作用突变体筛选和相关生理学研究具有重要作用

渐新世时期大气环境 CO₂ 浓度的骤降是进化出现 C₄ 植物的重要因素, C₄ 植物也因此具有更低的 CO₂ 补偿点, 能够适应低 CO₂ 浓度环境^[3]。有研究表明 C₃ 植物在低 CO₂ 浓度中生长受抑制, 但 C₄ 植物青狗尾草低 CO₂ 浓度不受影响^[4]。本研究基于此设计低 CO₂ 浓度培养箱能够有效地控制植物生长环境中 CO₂ 浓度, 首次详细介绍了如何控制低 CO₂ 浓度环境的方法及原理, 且目前未有利用 C₄ 植物谷子在低 CO₂ 浓度培养箱筛选与 C₄ 光合作用相关突变体的文献报道。我们期望利用此方法, 不仅可以对本实验室的大量稳定 EMS 突变体进行筛选, 也可以进一步利用我国丰富的谷子自然品种资源进行筛选, 或者在其他作物中得到应用, 如对高粱、玉

米或者青狗尾草进行筛选, 获得可能与 C₄ 进化回复突变体, 弥补 C₄ 正向遗传研究突变体缺乏的现状。光合作用和光呼吸是植物生理学的重要研究内容, 很多研究受培养箱 CO₂ 浓度调控的限制而难以开展, 本研究报道的低 CO₂ 浓度培养箱可以设置不同的 CO₂ 浓度, 对研究 CO₂ 浓度对光合作用和光呼吸的影响提供了良好的试验条件。

3.2 谷子在低 CO₂ 浓度培养箱筛选中具有明显优势, 已有结果显示必需大批量的突变体筛选才有可能发掘出 C₄ 光合作用相关的突变体

自 C₄ 光合作用发现以来, 认识其分子基础一直是研究的热点, 其中通过突变体, 特别是 C₄ 光合作用关键基因突变体的正向遗传学研究进行了很多工作, 这主要集中在玉米和高粱两个作物上, 但由于受突变体来源和植株大小等多方面限制, 除 A. B Feldman 等^[22]外, 目前在玉米和高粱上仍未鉴定出有重要分析价值的材料。谷子及其野生种青狗尾草在植株大小上具有显著的优势, 可以通过低 CO₂ 浓度培养箱大批量开展工作, 并且任何生长期均可在培养箱中进行鉴定。本研究同一批次对 54 份材料进行了鉴定, 说明可以高效率进行研究。同时, 本课题组在谷子突变体材料鉴定及基因定位领域已经建立了一套完善的研究课题, 为该研究日后的延伸奠定了基础^[25-26]。

本研究中的不同谷子突变体对低 CO₂ 浓度有不同的敏感性, 其中 5 个突变体极度不适应低 CO₂ 浓度环境, 表型观察表明这些突变体多是叶色和叶脉突变体, 叶片表现各种白色条纹等, 这些突变体的光合作用受到了严重的影响而极度不适, 这证明利用低 CO₂ 浓度培养箱筛选谷子低 CO₂ 敏感突变体具有可行性, 同时也积累了如何利用低 CO₂ 浓度培养箱筛选突变体的经验。本研究筛选出 19 个 III 级突变体和 13 个 IV 级突变体, 其中一些突变体本没有明显的叶脉条纹突变, 说明其耐受低 CO₂ 能力受到了损伤, 可能是 C₄ 途径的基因发生了改变, 对这些材料进行深入的研究, 有可能发掘出控制 C₄ 途径的关键基因。

W. Li 等^[27]对本培养箱筛选到的一个黄绿叶突变体 *siygl1* 进行了基因定位, 该突变体基因编码一个镁离子螯合酶 D 亚基 (CHLD), 单个脯氨酸突变体为亮氨酸降低了叶绿素合成量, 进而影响到了叶绿体的亚显微结构, 对该突变体的生理及功能进一步研究表明该突变体的光合利用效率不降反增, 说明 CHLD 没有完全失去原有功能, 而是获得新的功

能。该研究获得谷子叶色异常突变体相关基因,证明利用正向遗传的方法有效对表型进行研究,并探索谷子黄绿叶突变体的分子机制。本研究仅对少量谷子突变体进行了鉴定,目的在于检验所构建的试验体系,为大批量的突变体鉴定和筛选建立基础。李伟等^[28]已经创建了谷子突变体库和基因遗传定位的分子基础,并且目前实现了外源基因高效转化,为我们筛选的材料有了进一步研究的可能。但是这些材料是否与 C₄ 光合作用相关需要更多的证据。

4 结论

本研究利用 C₄ 植物耐低 CO₂ 浓度环境的特点,设计了一种 CO₂ 浓度可控培养箱,用于谷子 EMS 突变体库中 C₄ 光合作用相关突变体的鉴定发掘,以及其他植物光合作用和光呼吸的生理学研究。对 54 份有叶片和叶脉异常谷子 EMS 突变体鉴定,获得对低 CO₂ 浓度敏感的Ⅲ级突变体 19 个和Ⅳ级突变体 13 个。本研究为植物 C₄ 光合作用的深入研究提供了筛选经验和材料基础。

参考文献

- [1] Still C J, Berry J A, Collatz G J, et al. Global distribution of C₃ and C₄ vegetation: carbon cycle implications[J]. Global Biogeochem Cy, 2003, 17(1): 6-11
- [2] Sage R F, Christin P A, Edwards E J. The C₄ plant lineages of planet Earth[J]. J Exp Bot, 2011, 62(9): 3155-3169
- [3] Tipler B J, Pagani M. The early origins of terrestrial C₄ photosynthesis[J]. Annu Rev Earth Planet Sci, 2007, 35(1): 435-461
- [4] Caemmerer S V, Furbank R T. The development of C₄ rice: current progress and future challenges[J]. Science, 2012, 336(6089): 1671-1672
- [5] Slack C R, Hatch M D. Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses[J]. Biochem J, 1967, 103(3): 660-665
- [6] Ludwig M, Allakhverdiev S I, Shen J R, et al. Evolution of the C₄ photosynthetic pathway: events at the cellular and molecular levels[J]. Photosynth Res, 2013, 117(1-3): 147-161
- [7] Christin P A, Osborne C P, Chatelet D S, et al. Anatomical enablers and the evolution of C₄ photosynthesis in grasses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(4): 1381-1386
- [8] Kılaloglu C, Denton A K, Sommer M, et al. Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two Cleomaceae C₃ and C₄ plant species[J]. Plant Cell, 2014, 26(8): 3243-3260
- [9] Furbank R T. Walking the C₄ pathway: past, present, and future[J]. J Exp Bot, 2016, 67(14): 4057-4066
- [10] Schlüter U, Weber A P. The road to C₄ photosynthesis: evolution of a complex trait via intermediary states[J]. Plant Cell Physiol, 2016, 57(5): 881-889
- [11] Langdale J A. C₄ cycles: past, present, and future research on C₄ photosynthesis[J]. Plant Cell, 2011, 23(11): 3879-3892
- [12] Sage R F, Sage T L, Kocacinar F. Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis[J]. Annu Rev Plant Biol, 2012, 63(1): 19-47
- [13] Von Caemmerer S, Ghannoum O, Furbank R T. C₄ photosynthesis: 50 years of discovery and innovation[J]. J Experim Bot, 2017, 68(2): 97-102
- [14] Lin J J, Yu C P, Chang Y M, et al. Maize and millet transcription factors annotated using comparative genomic and transcriptomic data[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1-19
- [15] Huang C F, Chang Y M, Lin J J, et al. Insights into the regulation of C₄ leaf development from comparative transcriptomic analysis[J]. Curr Opin Plant Biol, 2016, 30: 1-10
- [16] Martin A P, Palmer W M, Brown C, et al. A developing *Setaria viridis* internode: an experimental system for the study of biomass generation in a C₄ model species[J]. Biotechnol Biofuels, 2016, 9(1): 1-12
- [17] Hibberd J M, Sheehy J E, Langdale J A. Using C₄ photosynthesis to increase the yield of rice: rationale and feasibility[J]. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11(2): 228-231
- [18] Karki S, Rizal G, Quick W P. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C₄ pathway[J]. Rice, 2013, 6(1): 1-8
- [19] Doust A N, Bennetzen J L. Foxtail millet: a sequence-driven grass model system[J]. Plant Physiol, 2009, 149(1): 137-141
- [20] Saha P, Blumwald E. Spike-dip transformation of *Setaria viridis*[J]. Plant J, 2016, 86(1): 89-101
- [21] Diao X, Schnable J, Bennetzen J L, et al. Initiation of *Setaria* as a model plant[J]. Front Agr Sci and Eng, 2014, 1(1): 16-20
- [22] Feldman A B, Murchie E H, Leung H, et al. Increasing leaf vein density by mutagenesis: laying the foundations for C₄ rice[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94947
- [23] Rizal G, Thakur V, Dionora J, et al. Two forward genetic screens for vein density mutants in sorghum converge on a cytochrome P450 gene in the brassinosteroid pathway[J]. Plant J, 2015, 84(2): 257-266
- [24] 王恩思. 青狐尾草突变体的筛选与鉴定及转录组分析[D]. 济南: 山东师范大学, 2013
- [25] 李雯, 智慧, 张硕, 等. 谷子 Si-SP1 小穗突变基因的遗传分析和定位[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 581-587
- [26] 张浩, 汤沙, 李迎涛, 等. 谷子窄颖花突变体 *sins1* 的表型分析和突变基因定位[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(3): 538-545
- [27] Li W, Tang S, Zhang S, et al. Gene mapping and functional analysis of the novel leaf color gene *SiYGL1* in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] [J]. Physiol Plantarum, 2015, 157(1): 24-37
- [28] 李伟, 智慧, 王永芳, 等. 谷子 EMS 诱变的处理条件分析[J]. 河北农业科学, 2010, 14(11): 77-79