

植物利用碳酸氢根离子的特征分析

吴沿友, 邢德科, 刘莹

(中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)

摘要:以构树、椿树、金银花、盐肤木等植物为材料,分析植物的碳酸酐酶活力与 $\delta^{13}\text{C}$ 的关系,结果表明,碳酸酐酶的活力与 $\delta^{13}\text{C}$ 值呈显著的正相关。以甘蓝型油菜、诸葛菜、构树、桑树为实验材料,通过测定植物叶片稳定碳同位素组成以及光合速率来获得植物利用碳酸氢根离子的信息,结果表明,构树和诸葛菜碳酸氢根离子的利用能力明显地大于桑树和甘蓝型油菜。以构树、芥菜型油菜和诸葛菜叶片为实验材料,研究了它们的碳酸酐酶活力与 $\delta^{13}\text{C}$ 的变异性,结果表明,构树和诸葛菜叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有较大的变异性。植物对碳酸氢根离子的利用能力的大小与碳酸酐酶活力以及植物的喀斯特适生性有关,植物能交替利用碳酸氢根离子作无机碳源。

关键词:碳酸盐利用能力; 稳定碳同位素组成; 碳酸酐酶; 喀斯特适生性

中图分类号: P593 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-9250(2011)02-0273-05

植物不仅能利用空气的二氧化碳为原料进行光合作用,而且也可以通过碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)(EC 4.2.1.1)的作用,利用储存的碳酸氢根离子为原料进行光合作用。在遭受喀斯特逆境(岩溶干旱、高钙、pH、重碳酸根离子以及低无机营养等)后,喀斯特适生植物的叶片碳酸酐酶活力升高,一方面导致气孔导度减小或关闭,减少蒸腾以防止植物进一步脱水;另一方面将细胞内的碳酸氢根离子转化成水和 CO_2 ,以应对因气孔导度减小或关闭造成的水分和 CO_2 的不足,在喀斯特逆境下进行光合碳还原,利用无机碳^[1-4]。

喀斯特地区土壤重碳酸盐浓度过高,这会导致该地区的土壤 pH 值偏高,也阻碍了植物对一些营养元素如铁、锌等的吸收,造成植物缺乏这些营养元素,严重地影响植物的生长发育^[5-8]。植物利用碳酸氢根离子,一方面能增加了无机碳的利用,另一方面降低根际环境中碳酸氢根离子的浓度,再者还能降低土壤的 pH 值。植物对碳酸氢根离子的利用能力大小,对喀斯特地区的植物至关重要,是判断植物的喀斯特适生性的重要标准之一。

目前,比较准确地测定植物叶片的光合作用的

仪器如 Li-6400 便携式光合仪,是采用气体交换法来测量植物光合作用,通过测量流经叶室前后的 CO_2 浓度的变化和湿度变化来计算植物的净光合速率和蒸腾速率,并计算出气孔导度和胞间 CO_2 浓度。但是植物叶片利用碳酸氢根离子进行光合作用不能为 Li-6400 便携式光合仪所测得,因为这部分的无机碳源不经过叶室,所以无法用如 Li-6400 便携式光合仪这样的仪器测出植物利用这部分碳源所进行的光合利用。

稳定碳同位素的强烈分馏特征是识别植物体无机碳来源的基础^[9-11]。自然界中碳元素有两种稳定同位素: ^{12}C 和 ^{13}C ,它们的天然平均丰度分别为 98.89%和 1.11%。稳定碳同位素组成通常用 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)表示,自然界中 $\delta^{13}\text{C}$ 的变化为 -90‰ ~ +20‰。稳定碳同位素的强烈分馏特征有利于我们识别植物体无机碳来源。质量平衡原理以及同位素混合模型和化学计量学方法,是我们定量识别植物体无机碳来源的基础,因此,我们可以通过利用同位素技术结合常规净光合速率的测定植物利用碳酸氢根离子的能力。本文通过测定植物的碳酸酐酶活力、稳定碳同位素组成 $\delta^{13}\text{C}$ 以及光合速率来分析植

收稿日期: 2010-10-18; 改回日期: 2010-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070365; 40973060)

第一作者简介: 吴沿友(1966—),男(汉族),博士,研究员,博士生导师,专业方向为生物地球化学。E-mail: wuyanyou@mails.gyig.ac.cn.

物利用碳酸氢根离子的特征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以同一生境下的构树(*Broussonetia papyrifera*)、椿树(*Toona sinensis*)、金银花(*Lonicera japonica*)、盐肤木(*Rhus chinensis*)、爬山虎(*Parthenocissus tricuspidata*)、诸葛菜(*Orychophragmus violaceus*)、木姜子(*Litsea pungens*)、悬铃木(*Platanus acerifolia*)以及甘蓝型油菜(*Brassica napus*)等植物叶片为材料,测定它们的碳酸酐酶活力和 $\delta^{13}\text{C}$ 值。

以喀斯特地区生长的甘蓝型油菜(*Brassica napus*)、诸葛菜(*Orychophragmus violaceus*)、构树(*Broussonetia papyrifera*)、桑树(*Morus alba*)为实验材料,以悬铃木为对照。选取生长旺盛的叶片,测定其光合作用以及 $\delta^{13}\text{C}$ 。

以不同生境的构树(*Broussonetia papyrifera*)、芥菜型油菜(*Brassica juncea*)和诸葛菜(*Orychophragmus violaceus*)叶片为实验材料,测定它们的碳酸酐酶活力和 $\delta^{13}\text{C}$ 值。

1.2 碳酸酐酶活力的测定

取植物叶片 0.3~1 g, 放到预冷的研钵中, 迅速加入液氮, 再加入 3 mL 巴比妥缓冲液(10 mmol/L, 含巯基乙醇 50 mmol/L, pH8.3)进行研磨, 取研磨液倒入 5 mL 的离心管中, 离心管置于冰浴中 20 min 后, 在 13000 r/min 下离心 5 min, 取上清液, 冷藏备测。

碳酸酐酶活力的测定采用 pH 计法。保持反应系统在 0~2℃, 取待测上清液 50~1000 μL , 加入到含 15 mL 的巴比妥缓冲液(20 mmol/L, pH8.3)的反应容器中, 然后迅速加入 10 mL 预冷的(0~2℃)的饱和 CO_2 的蒸馏水, 用 pH 电极监测反应体系 pH 值变化, 记下 pH 值下降一个单位(例如 pH 值从 8.2~7.2)所需的时间, 记为 t , 同时记录在酶失活条件下 pH 值下降一个单位所需的时间, 记为 t_0 , 酶的活力用 WA-unit 表示^[12]。WA = $t/t_0 - 1$ 。

1.3 光合速率的测定

利用便携式光合测定仪 LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) 于上午 9:00 至 10:00 对植物叶片的光合作用进行测定。测定条件为固定光强 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 胞间二氧化碳浓度为 396 $\mu\text{mol}/\text{mol}$, 温度 22~23℃。

1.4 稳定碳同位素 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定

植物叶片烘干, 粉碎, 过筛, 称取一定量转化成供质谱仪分析的二氧化碳气体; 在 MAT-252 质谱仪上进行测定(中国科学院地球化学研究所)。测量精度为小于 $\pm 0.1\text{‰}$, 分析结果以 $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ 表示。

1.5 植物利用碳酸氢根离子能力的计算

利用二端元模型 $\delta_r = \delta_a - f_B \delta_a + f_B \delta_b$ 来计算 f_B 。这里 δ_r 为被考察植物叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δ_a 为基本上不利用碳酸氢根离子作无机碳源、碳酸酐酶活力极低的植物的叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δ_b 为极少利用二氧化碳作碳源以碳酸氢根离子为主要无机碳源的微藻的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, f_B 为植物利用的碳酸氢根离子占无机碳源比例份额。通过计算, 可以求出 f_B 。根据光合仪如 Li-6400 便携式光合仪测定的光合速率为 P_n , 利用公式 $\text{BUC} = f_B P_n / (1 - f_B)$ 可计算出该植物利用碳酸氢根离子的能力, 这里 BUC 为植物利用碳酸氢根离子的能力(Bicarbonate use capacity)。

2 结果与讨论

2.1 碳酸酐酶活力与 $\delta^{13}\text{C}$ 值

通过分析植物叶片的碳酸酐酶活力和 $\delta^{13}\text{C}$ 值之间的关系, 可以发现, 植物碳酸酐酶的活力、 $\delta^{13}\text{C}$ 值在不同植物间差异很大(图 1), 碳酸酐酶活力强的 $\delta^{13}\text{C}$ 值偏正。碳酸酐酶活力与 $\delta^{13}\text{C}$ 值呈显著地正相关。这与高碳酸酐酶活力的植物利用碳酸氢根离子的能力明显高于低碳酸酐酶活力的植物有关^[13]。喀斯特地区的土壤中的 $\text{HCO}_3^- - \delta^{13}\text{C}$ 在 $-1.5 \sim +1.5\text{‰}$ 之间, 平均为 -0.5‰ ^[14], 而大气的 CO_2 的 $\delta^{13}\text{C}$ 平均为 -8‰ , 因此, 当利用碳酸氢根离子份额多时, $\delta^{13}\text{C}$ 则偏正, 反之则偏负, 也即高碳酸酐酶活力则带来较正的 $\delta^{13}\text{C}$, 低碳酸酐酶活力则带来较负的 $\delta^{13}\text{C}$ 。可以用 $\delta^{13}\text{C}$ 来表征无机碳的利用。

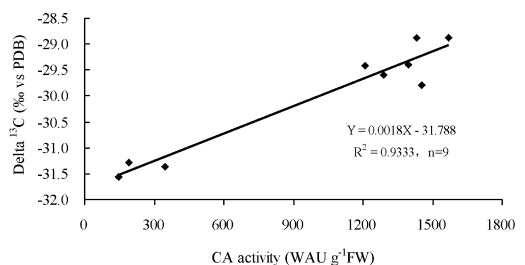


图 1 不同植物碳酸酐酶活力与 $\delta^{13}\text{C}$ 值之间的关系

Fig. 1 The relationship between CA activity and

$\delta^{13}\text{C}$ value of plants leaves

2.2 植物碳酸氢根离子的利用能力

表 1 表示的是几种植物的碳酸氢根离子的能力的差异。从表 1 中可以看出, 构树和诸葛菜利用碳酸氢根离子作无机碳源所占份额都明显大于甘蓝型油菜和桑树的。它们的碳酸氢根离子利用能力 (Bicarbonate use capacity, BUC) 也明显地大于桑树和

甘蓝型油菜的 BUC, 这与构树和诸葛菜是喀斯特适生植物的事实是吻合的^{15, 19}。尤其是构树, 虽然它的利用二氧化碳的能力小于桑树, 但把 BUC 加到一起, 可以看出, 构树整无机碳同化能力明显高于桑树的整无机碳同化能力。

表 1 几种植物利用碳酸氢根离子的能力的比较

Table 1 Comparison of bicarbonate use capacity among some plants species

指标	诸葛菜 <i>O. violaceus</i>	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	构树 <i>B. papyrifera</i>	桑树 <i>M. alba</i>
δT (‰) (以 PDB 为标准)	-28.34	-31.37	-28.88	-30.25
δA (‰) (以 PDB 为标准)	-31.56	-31.56	-31.56	-31.56
δB (‰) (以 PDB 为标准)	-22.74	-22.74	-22.74	-22.74
f_B	0.37	0.02	0.30	0.15
P_n ($\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}$)	7.65	3.89	15.40	16.00
BUC ($\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}$)	4.49	0.08	6.60	2.82
备注	δT 为被考察植物叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δA 为悬铃木的叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δB 为小球藻的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, f_B 为植物利用的碳酸氢根离子占无机碳源比例份额, P_n 为被考察植物第一完全展开叶的净光合速率, BUC 为被考察植物利用碳酸氢根离子的能力。			

2.3 植物交替利用碳酸氢根离子

表 2、3 表示的几种植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 CA 的变异性。从表 2、3 中可以看出, 构树和诸葛菜叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有较大的变异性, 并且大的变异性与高的碳酸酐酶活力相关。这表明植物是交替利用碳酸氢根离子和二氧化碳的。因为, 当植物遇到气孔关闭时, 碳酸酐酶的表达升高¹¹, 利用碳酸氢根离子的能力加强。当内外环境改善后, 气孔张开, 叶片又回复到主要利用空气中的二氧化碳的状态。碳酸酐酶的活力是一个即时指标, 变异也很大。这个结果能说明利用一些裸子植物的纤维素的 $\delta^{13}\text{C}$ 开展气候变化的研究是合适的。陈克龙和刘晓宏研究的喜马拉雅冷杉和林芝云杉年轮稳定碳同位素的变异性较小¹⁷, 因此可以指代气候意义。因为裸子植物的碳酸酐酶活力较小^{18, 19}, 难以影响 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 因此它们的 $\delta^{13}\text{C}$ 变异性小, 适宜指代气候意义。两种类型的油菜的 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有明显不同的特征, 这可能与芥菜型油菜吸收碳酸氢根离子多, 体内的碳酸氢根离子在芥菜型油菜体内发生类似 C4 代谢²⁰, 导致 $\delta^{13}\text{C}$ 偏正, 又因为它的碳酸酐酶活力小, $\delta^{13}\text{C}$ 值的变异性小。芥菜型油菜的这个特征可能也是其比甘蓝型油菜较适应喀斯特环境的一个原因。

表 2 一些植物叶片 $\delta^{13}\text{C}$ 的变异性

Table 2 The variation of $\delta^{13}\text{C}$ value in the leaves from some plants species (‰ vs PDB)

指标	构树 <i>B. papyrifera</i>	芥菜型油菜 <i>B. juncea</i>	诸葛菜 <i>O. violaceus</i>
均值 (Mean)	-29.656	-27.683	-26.805
标准差 (Std Dev)	0.794	0.234	1.207
最小值 (Min)	-30.920	-28.132	-29.125
最大值 (Max)	-28.842	-27.343	-24.254
样品数 (n)	10	10	20
变异系数 (CV) %	2.677	0.845	4.503

表 3 一些植物叶片碳酸酐酶活力的变异性

Table 3 The variation of CA activity in the leaves from some plants species (WAU g⁻¹ FW)

指标	构树 <i>B. papyrifera</i>	芥菜型油菜 <i>B. juncea</i>	诸葛菜 <i>O. violaceus</i>
均值 (Mean)	3450	246	1350
标准差 (Std Dev)	576	38	247
最小值 (Min)	2842	63	922
最大值 (Max)	4526	489	1848
样品数 (n)	10	10	12
变异系数 (CV) %	17	16	18

酸酐酶活力与 $\delta^{13}\text{C}$ 值呈显著地正相关, 高碳酸酐酶活力的植物利用碳酸氢根离子的能力强; 喀斯特适生植物具有较强的碳酸氢根离子的能力; 植物利用碳酸氢根离子与利用二氧化碳是交替进行的。

3 结论

植物利用碳酸盐作无机碳源具有以下特征: 碳

参 考 文 献

- [1] Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, *et al.* Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12: 87-93.
- [2] Wu Y Y, Zhao X Z, Li P P, *et al.* A study on the activities of carbonic anhydrase of two species of bryophytes, *Tortula sinensis* (Mull. Hal.) Broth. and *Barbula convoluta* Hedw. [J]. *Cryptogamie Bryologie*, 2006, 27 (3): 349-355.
- [3] 吴沿友, 邢德科, 朱咏莉, 等. 营养液 pH 对 3 种藤本植物生长和叶绿素荧光的影响[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(2): 338-343.
- [4] Wu Y Y, Wu X M, Li P P, *et al.* Comparison of photosynthetic activity of *Orychophragmus violaceus* and oil-seed rape [J]. *Photosynthetica*, 2005, 43(2): 299-302.
- [5] Overstreet R, Ruben S, Broyer T C. The absorption of bicarbonate ion by barley plants as indicated by studies with radioactive carbon[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1940, 26(12): 688-695.
- [6] Wallihan E F. Effect of sodium bicarbonate on iron absorption by orange seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1961, 36(1): 52-53.
- [7] Yang X, Romheld V, Marschner H. Effect of bicarbonate on root growth and accumulation of organic acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant and Soil*, 1994, 164: 1-7.
- [8] Mengel K, Breining M T, Bibl W. Bicarbonate the most important factor inducing iron chlorosis in vine grapes on calcareous soil [J]. *Plant and Soil*, 1984, 81(3): 333-344.
- [9] Tcherkez G, Mahe A, Gauthier P, *et al.* In folio respiratory fluxomics revealed by C-13 isotopic labeling and H/D isotope effects highlight the noncyclic nature of the tricarboxylic acid "Cycle" in illuminated leaves [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(2): 620-630.
- [10] Tomescu A M F, Pratt L M, Rothwell G W, *et al.* Carbon isotopes support the presence of extensive land floras pre-dating the origin of vascular plants [J]. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 2009, 283(1-2): 46-59.
- [11] Skrzypek G, Kaluzny A, Wojtun B, *et al.* The carbon stable isotopic composition of mosses: A record of temperature variation [J]. *Organic Geochemistry*, 2007, 38(10): 1770-1781.
- [12] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase [J]. *J. Biol. Chem.* 1948, 176: 147-154.
- [13] 吴沿友. 植物碳酸酐酶对稳定碳同位素分馏作用的影响 [J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2008, 27(2): 175-179.
- [14] Clark I D, Fritz P. *Environmental Isotopes in Hydrogeology* [M]. CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.
- [15] Wu Y Y, Liu C Q, Li P P, *et al.* Photosynthetic characteristics involved in adaptability to Karst soil and alien invasion of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.) in comparison with mulberry (*Morus alba* L.) [J]. *Photosynthetica*, 2009, 47 (1): 155-160.
- [16] 吴沿友, 刘丛强, 王世杰. 诸葛菜的喀斯特适生性研究 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2004: 1-160.
- [17] 陈克龙, 刘晓宏. 喜马拉雅冷杉和林芝云杉年轮稳定碳同位素气候意义比较 [J]. *盐湖研究*, 2003, 11(2): 29-34.
- [18] 吴沿友, 李西腾, 郝建朝, 等. 不同植物的碳酸酐酶活力差异研究 [J]. *广西植物*, 2006, 26(4): 366-369.
- [19] Wu Y Y, Li P P, Wang B L, *et al.* Significance of carbonic anhydrase and its distribution in the karst ecosystem [J]. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 2005, 81: 135-141.
- [20] 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.

The Characteristics of Bicarbonate Used by Plants

WU Yan-you, XING De-ke, LIU Ying

(State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry,
Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract The relationship between foliar carbonic anhydrase activity and $\delta^{13}\text{C}$ of *Broussonetia papyrifera*, *Toona sinensis*, *Lonicera japonica*, *Rhus chinensis* and other plant species was analyzed. The results showed that there was a significantly positive correlation between foliar carbonic anhydrase activity and $\delta^{13}\text{C}$. The information on bicarbonate used by plants was obtained via determining foliar stable carbon isotopic composition and net photosynthetic rate of *Brassica napus*, *Orychophragmus violaceus*, *Broussonetia papyrifera* and *Morus alba*. The results showed that the bicarbonate-use capacity of *Broussonetia papyrifera* and *Orychophragmus violaceus* was greater than that of *Morus alba* and *Brassica napus*. The variability of foliar carbonic anhydrase activity and $\delta^{13}\text{C}$ in *Broussonetia papyrifera*, *Brassica juncea* and *Orychophragmus violaceus* was studied. The results showed that the $\delta^{13}\text{C}$ values of *Broussonetia papyrifera*, and *Orychophragmus violaceus* indicated greater variability. The bicarbonate-use capacity of plants was related to foliar carbonic anhydrase activity and the adaptability to karst, and plants can use bicarbonate as inorganic carbon sources, alternatively.

Key words: bicarbonate-use capacity; stable carbon isotopic composition; carbonic anhydrase; the adaptability to karst