

锦叶栎光合特性变化与光合电子传递关键基因 *KpPetC*的克隆及特性分析

鲁海琳 吴茹茜 安新民*

(林木遗传育种全国重点实验室, 林木育种与生态修复国家工程中心, 林木分子设计育种高精尖创新中心,
林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室,
生物科学与技术学院, 北京林业大学, 北京 100083)

摘要 细胞色素b6f复合体是植物光合电子传递中潜在的限速因子, 增强该复合物的活性, 将有助于提高植物光合作用的效率, 因此开展光合电子传递关键基因的研究具有重要的科学意义。该研究以锦叶栎叶色变异现象为切入点, 以栎树及其突变体锦叶栎为材料, 利用Li-COR6800光合分析仪测量栎树和锦叶栎生长期内的光合生理指标; 结合转录组数据克隆光合关键基因*PetC*并对其生物信息学分析; 采用实时定量PCR分析*KpPetC*基因在不同组织、不同发育时期叶片中的表达模式及与净光合速率之间的相关性; 通过P2A串联*KpPetC*和*eGFP*构建*KpPetC*超表达载体, 并在84K杨中进行异源遗传转化。结果显示, 锦叶栎净光合速率和蒸腾速率普遍低于栎树, 胞间CO₂浓度显著高于栎树, 非气孔限制是其光合速率减弱的主导因素; 7月强光高温的天气可能导致锦叶栎光合系统元件受损, 产生更严重的光抑制, 从而使锦叶栎对强光的耐受性减弱; *KpPetC*在根、茎、叶、花芽和种子中呈组成型表达, 但在叶片中高丰度表达, 且与其他组织间存在显著差异; 7、8、9月栎树叶片中*KpPetC*基因的表达量均显著高于锦叶栎, 净光合速率与*KpPetC*基因表达量之间存在正相关关系, 推测锦叶栎*KpPetC*基因表达的下调可能是光合速率下降的主要原因之一。总之, 与栎树相比, 锦叶栎光合作用能力明显减弱, 这可能是*KpPetC*基因的表达受到抑制, 使得光合通路元件受损, 最终影响光合电子传递速率。该研究为今后深入研究*PetC*基因的功能奠定了基础, 对于光合电子传递机制的研究具有重要的科学意义。

关键词 锦叶栎; 光合作用; 非气孔限制; *PetC*; 基因克隆; 表达分析; 遗传转化

Changes in Photosynthetic Traits, Cloning and Characteristics Analysis of *KpPetC* Gene Involving in Photosynthetic Electron Transfer of *Koelreuteria paniculata* 'Jinye'

LU Hailin, WU Ruqian, AN Xinmin*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

收稿日期: 2024-03-10 接受日期: 2024-04-10

国家自然科学基金(批准号: 31870652)资助的课题

*通信作者。Tel: 13381379249, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

Received: March 10, 2024

Accepted: April 10, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31870652)

*Corresponding author. Tel: +86-13381379249, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

Abstract The cytochrome b6f complex is a potential limiting factor in plant photosynthetic electron transfer, and increasing the activity of this complex may improve the efficiency of photosynthesis. It is of great scientific significance to investigate key genes involved in photosynthetic electron transfer. In this study, starting from color variation phenotype in *Koeleruteria paniculata* ‘Jinye’, and using *K. paniculata* and its mutant *K. paniculata* ‘Jinye’ as experimental materials. The photosynthetic physiological indicators was measured by Li-COR6800 photosynthetic analyzer during the growth period. Then the *PetC* gene involved in the photosynthetic pathway was isolated by RT-qPCR, and comprehensive bioinformatics analysis was conducted by online tools. Furthermore, the expression patterns of *PetC* gene in different tissues and its dynamic expression in leaves of different development stages in *K. paniculata* were detected using RT-qPCR. Meanwhile, the correlation between *KpPetC* gene expression and net photosynthetic rate was analyzed. Additionally, an overexpression vector containing tandem *KpPetC* and *eGFP* with P2A elements was also constructed and carried on ectopic genetic transformation in 84K poplar. The results showed that the net photosynthetic rate and transpiration rate of *K. paniculata* ‘Jinye’ were generally down-regulated, while the intercellular CO₂ concentration was significantly increased. These results indicated that the decreasing of photosynthetic rate in *K. paniculata* ‘Jinye’ was mainly caused by non-stomatal limitation. The strong light and high temperature in July might damage the photosynthetic elements of *K. paniculata* ‘Jinye’, resulting in serious inhibition of photosynthesis, and the tolerance to light of *K. paniculata* ‘Jinye’ was weakened. The results of RT-qPCR assay revealed that *KpPetC* presented constitutive expression patterns in different tissues, but high abundant transcripts detected in leaf, and its expression in *K. paniculata* leaves was significantly higher than that in *K. paniculata* ‘Jinye’ in different development stages. And there was a positive correlation between the net photosynthetic rate and the expression of *KpPetC* in *K. paniculata* and *K. paniculata* ‘Jinye’. These data suggested that the down-regulation of *KpPetC* gene expression might be one of the main reasons for the decline of photosynthetic rate in *K. paniculata* ‘Jinye’. In conclusion, compared with *K. paniculata*, the photosynthetic capacity of *K. paniculata* ‘Jinye’ was significantly down-regulated. This might be due to the inhibition of *KpPetC* gene expression, which impairs some elements in the photosynthetic pathway, and ultimately affects the photosynthetic electron transport rate. These results provide a basis for future studies of *PetC* gene function and has important scientific significance for the study of photosynthetic electron transport mechanism.

Keywords *Koeleruteria paniculata* ‘Jinye’; photosynthesis; non-stomatal limitation; *PetC*; gene clone; expression analysis; genetic transformation

在气候变化、林地面积不断减少的背景下, 增强林木光合作用能力是改善气候、增加木材产量的有效方法。高等植物大部分的干物质来自光合作用所同化的CO₂, 叶片光合速率的高低对于林木生长和产量至关重要, 通过分子设计定向改良提高光合作用效率可能成倍地增加林木的CO₂同化能力及产量。如何在有限林地的基础上提高光合作用已经成为了人们研究的热点, 提高单叶水平的光合作用能力将是通过生物技术进行改良的一个重要目标。电子传递链位于类囊体膜上, 主要由光系统II、细胞色素b6f复合体(cytochrome b6f complex, Cyt b6f)、光系统I和ATP合成酶组成^[1]。研究显示, 细胞色素b6f复合体Qo位的质体氢醌氧化是光系统II和光系

统I之间电子传递的“瓶颈”步骤, 它决定着系统间电子传递的总体速度^[2]。该复合体参与线性电子传递(ATP和NADPH的产生)和环式电子传递(仅ATP的产生), 并作为质体醌-质体蓝素氧化还原酶发挥作用, 在光捕获、电子转移和光合作用基因表达的调控中处于氧化还原中枢位置, 其活性是电子传输速率的关键决定因素^[3-10]。

锦叶栎又名金叶栎(*Koeleruteria paniculata* ‘Jinye’), 因具有金黄叶色而得名, 是栎树(*Koeleruteria paniculata*)芽变选育出的彩叶突变体, 其生物学特性和普通栎树相似, 但光合作用和生长量呈现出减弱的趋势^[11-15]。目前, 对于锦叶栎的研究主要集中在繁育技术^[12-13]、叶色变异^[15]及代谢物含量的测定等方面^[14],

对其光合速率减弱的主要限制形式及分子机制鲜有研究。本实验前期转录组分析结果显示, 光合电子传递链中 Cyt b6f 复合体相关基因 *PetC* 在栎树和锦叶栎中表达差异极显著, 推测锦叶栎光合作用减弱可能是由于 *PetC* 基因表达下调, 影响 Cyt b6f 复合体的组装, 进而影响光合电子传递而导致光合作用的减弱^[15]。Cyt b6f 复合体为对称的同源二聚体结构, 每个单体由 8 个亚基组成, *PetC* 和 *PetM* 由细胞核基因组编码, 其他亚基由叶绿体基因组编码^[16-20]。作为 Cyt b6f 复合体的主要核编码亚基, *PetC* 可能在复合体的组装中起关键作用。相关研究表明, 最初被鉴定为 *PetC* 蛋白缺失的浮萍突变体也完全缺乏 Cyt b6f 复合体的其他亚基^[21]。随后证明该突变体不能产生 *PetC* 转录本, 而叶绿体基因组编码的亚基是合成的且会迅速发生降解^[22]。拟南芥、集胞藻和衣原体中的 *PetC* 突变体仍能组装 Cyt b6f 复合体^[7,23-24], 而其他物种如月见草、玉米和浮萍中的 *PetC* 突变体则不能继续组装^[22]。全红杨中也有类似的结果, 参与光合电子传递的 *PetC*、*PetF* 和 *PetH* 基因表达显著下调, 使得光合作用电子传递减慢^[25]。小黑麦干旱及复水后研究也表明在干旱胁迫和复水后维持 *PetC* 蛋白水平的不变是植物完全恢复的先决条件之一^[26]。Cyt b6f 复合体的寿命至少为一周, 其未组装组分会很快被光诱导降解^[27]。Cyt b6f 复合体的生物发生和组装是一个复杂的过程, 必须与其他核编码因子高度协调, 但参与这一复合体组装的因素和机制尚未被完全揭开^[28-29]。虽然该复合体具有遗传和结构上的复杂性, 但越来越多的证据表明, *PetC* 蛋白的数量调节 Cyt b6f 复合体的丰度^[30-35]。

PetC 基因在光合作用中的重要作用已经在几种草本植物及浮萍植物中得到了验证, 但在木本植物中鲜有报道。本研究聚焦于锦叶栎叶色变异这一现象, 拟通过分析栎树和锦叶栎生长周期内的光合特征参数, 揭示锦叶栎光合速率改变的主要限制因素, 结合转录组数据克隆潜在高光合基因 *PetC* 并对其进行生物信息学分析, 分析其在栎树和锦叶栎中的表达模式及旺盛生长期内的表达差异, 再综合分析 *PetC* 基因表达与光合强度间的相关性, 期望为 *PetC* 基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及实验试剂

栎树及其黄叶突变体锦叶栎均定植于北京大

兴区黄垆苗圃, 于 2023 年 7 月 15 日选取 3 株长势一致的成年栎树, 收集其根、茎、叶、花芽和种子材料, 速冻后保存于 -80°C 待用。光合数据测量分别于 2023 年 7 月 14 日、8 月 25 日和 9 月 18 日进行, 并于当日 14:00 采集叶片速冻后带回实验室, 用于后续的基因表达差异分析。栎树无菌组培苗无性系于实验室保存培养。

植物 DNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒和 TB Green Premix Ex TaqTM II FAST qPCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 栎树、锦叶栎生长期光合生理指标测定 在 2023 年的 7 月、8 月和 9 月分别选择晴朗无风的天气, 使用 Li-COR6800 便携式光合仪 (LI-COR, USA) 分别测量年龄相似、立地环境相似的栎树和锦叶栎的光合参数, 测量时间为 8:00 至 18:00, 其间每间隔 2 h 测量 1 次, 每次测量 3 个生物学重复。光合测定指标包括净光合速率 (net photosynthetic rate, P_n)、蒸腾速率 (transpiration rate, T_r) 和胞间 CO_2 浓度 (intercellular CO_2 concentration, C_i) 等。测量叶片选择南侧生长一致的 3 根当年生标准枝 (枝粗 0.5 cm 以上、枝长 50 cm 以上), 每根枝条选取 1 枚生长一致的向阳功能叶作为测试叶片。测量结束后采集叶片用液氮速冻后, 于 -80°C 保存, 以用于两品种不同月份的 *KpPetC* 基因表达差异分析。

1.2.2 *KpPetC* 基因的克隆 使用植物 DNA 提取试剂盒和总 RNA 提取试剂盒分别提取栎树和锦叶栎各组织材料 DNA 和 RNA, 利用 NanoDrop 2000 分光光度计 (IMPLEN, CA, USA) 测定所提 DNA 和 RNA 的浓度和纯度, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和质量。使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 于 -20°C 保存备用。

参考本课题组的栎树转录组数据, 利用在线网站 Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>) 设计特异性引物 *KpPetC*-F、*KpPetC*-R (表 1)。以栎树叶片 DNA 和 cDNA 为模板, 扩增 *KpPetC* 基因的基因组 DNA 和 cDNA 全长序列。扩增反应体系为 20 μL , 包括 0.3 μL LA Taq, 1 μL dNTP Mixture, 2 μL 10 $\times$ LA PCR Buffer II, 上、下游引物各 0.5 μL , 2 μL

模板, 13.7 μL ddH₂O。扩增条件为95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, DNA为模板时72 °C延伸2 min, cDNA为模板时72 °C延伸30 s, 共34个循环; 最后72 °C延伸5 min, 4 °C终止保温。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后, 用DNA凝胶回收试剂盒纯化, 将其与pGEM-T载体连接, 转化至大肠杆菌DH5 α 感受态中, 涂布在加卡那霉素(Kan, 50 mg/L)的LB平板上过夜培养。挑取单克隆菌落并进行PCR验证, 阳性单菌落送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.2.3 *KpPetC* 基因的生物信息学分析 采用DNAMAN软件推导其氨基酸序列; 利用GSDS2.0软件(<http://gsds.gao-lab.org/>)绘制基因结构图; 使用在线软件ProtParam(<http://web.expasy.org/prot-param/>)分析蛋白质的基本理化性质; 使用SOPMA分析工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)和SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)分别预测蛋白的二级结构和三级结构; 通过SignalP-5.0

工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)预测蛋白的信号肽; 利用TMHMM-2.0在线软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)分析蛋白质的跨膜结构域; 采用NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)分析蛋白质的特异结构域; 通过Plant-mPloc server在线软件(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)进行亚细胞定位预测; 蛋白的无序化、活性位点和磷酸化位点分别通过在线软件PSIPRED(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)、PROSITE(<https://prosite.expasy.org/>)和Netphos3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行分析。

利用NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载与*KpPetC*同源性比较高的几个物种的氨基酸序列, 利用DNAMAN进行多序列比对分析, 并利用MEME分析工具(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)预测分析保守基序(motif), 利用MEGA软件对栲树及其他物种的PetC蛋白进行系统

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Application
KpPetC-F	ATG GCT TCT TCC GCT CTG TCT CC	Gene cloning
KpPetC-R	CAA AGC TGA TCA ACA CCA ATG	Gene cloning
KpPetC-SpeI-F	GGT CGA CAT TTA AAT ACT AGT ATG GCT TCT TCC GCT CTG TCT	Construction of subcellular localization vector
KpPetC-SpeI-R	CAT GGT ACC GGA TCC ACT AGT AGC CCA CCA GGG AGC TTC A	Construction of subcellular localization vector
KpPetC-qPCR-F	TCT GTC TCC TGT AGC CCC TTC	Gene expression analysis
KpPetC-qPCR-R	GGA ACC AAC ATG ATG CCA GTT	Gene expression analysis
KpActin-F	AAA TTA ACG AGG ACA CCA ATG C	Gene expression analysis
KpActin-R	GGG TAT GGA TAT GGC GAT CTT A	Gene expression analysis
OE-KpPetC-KpnI-F	TAC GAA TTC GAG CTC GGT ACC ATG GCT TCT TCC GCT CTG TCT	Construction of overexpression vector
OE-KpPetC-KpnI-R	TCT AGA GGA TCC CCG GGT ACC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Construction of overexpression vector
OE-KpPetC-F	GTT CCA ACC ACG TCT TCA AAG C	Detection of transgenic plants
OE-KpPetC-R	CAA CAG TAC CAC TAG CAC CAC	Detection of transgenic plants
qPCR-PopActin-F	CTC CAT CAT GAA ATG CGA TG	Gene expression analysis in transgenic plants
qPCR-PopActin-R	TTG GGG CTA GTG CTG AGA TT	Gene expression analysis in transgenic plants
qPCR-Pop-KpPetC-F	GTA GCC CCT TCT CA	Gene expression analysis in transgenic plants
qPCR-Pop-KpPetC-R	CAA CCC AGG TGG AGC A	Gene expression analysis in transgenic plants

进化分析, 构建多物种系统进化树, 并通过 ITOL 工具(<https://itol.embl.de/>)美化进化树。

1.2.4 *KpPetC*基因的亚细胞定位 以载体 pCAMBIA1300 为骨架, 根据 *KpPetC* 的基因序列设计引物 *KpPetC*-SpeI-F 和 *KpPetC*-SpeI-R (表 1), 引入 *Spe* I 酶切位点, 以栎树 cDNA 为模板扩增 *KpPetC* 基因。用 *Spe* I 对纯化后的 pCAMBIA1300 质粒进行酶切。采用同源重组技术将 *KpPetC* 克隆至 *Spe* I 酶切位点, 构建亚细胞定位载体, 将其命名为 pCAMBIA1300-MASPro::KpPetC-eGFP。载体测序验证后转化至农杆菌 GV3101, 将 pCAMBIA1300-MASPro::KpPetC-eGFP 和 pCAMBIA1300-MASPro::eGFP 空载体注射本氏烟草进行瞬时表达, 暗培养 12 h 后, 再转入光下培养 24 h, 于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.5 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)分析 分别提取同一时期成年栎树各组织及不同月份栎树和锦叶栎叶片的总 RNA, 并反转录成 cDNA, 检测 *KpPetC* 的表达水平。根据 *KpPetC* 基因测序结果, 设计实时荧光定量引物 (表 1), 以栎树 *Actin* 基因作为内参基因进行实时荧光定量。利用 TB Green Premix Ex Taq™ II FAST qPCR 试剂盒, 在实时荧光定量 PCR 仪 (7500 FAST) 上进行 RT-qPCR 分析。为了确保数据的准确性, 上述实验设置 3 个生物学重复。反应体系为 10 μ L: 1 μ L cDNA 模板 (5 ng), 上、下游引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L), 0.2 μ L Rox Reference Dye, 5 μ L 2 $\times$ Green Premix Ex Taq II, 3 μ L ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 82 $^{\circ}$ C 读板 1 s, 45 个循环。扩增产物是否特异通过熔解曲线来鉴定, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因的表达进行相对定量分析^[36]。

1.2.6 转基因 84K 杨的获得 以载体 pCAMBIA2300 为骨架, 通过 P2A 串联 *KpPetC* 和 *eGFP*, 构建过表达载体 pCAMBIA2300-35S::KpPetC-P2A-eGFP。由北京睿博兴科生物技术有限公司合成包含 *KpPetC* 3' 端去掉终止密码子的 100 bp、P2A 和 *eGFP* 5' 端 100 bp 的序列片段, 通过 Overlap PCR 将 *KpPetC*、P2A 和 *eGFP* 片段串联, 构建到 pCAMBIA2300 载体的 *Kpn* I 位点, 扩增引物为 OE-KpPetC-KpnI-F 和 OE-KpPetC-KpnI-R (表 1)。载体测序验证后转化至农杆菌 GV3101。

通过农杆菌介导的叶盘法将 *KpPetC* 过表达载体转化至 84K 杨。84K 杨生长 1 个月左右, 选择健

壮的功能叶, 用解剖刀轻轻划断主脉, 造成伤口, 在不添加抗生素的分化培养基上光下预培养 3 天, 用培养至 D_{600} 值为 0.6~0.8 的农杆菌菌液侵染 10 min, 擦干表面菌液后放回不加抗生素的分化培养基中, 在黑暗条件下共培养 3 天。共培养结束后, 将侵染的叶片放在添加了卡那霉素 (Kan, 50 mg/L) 的分化培养基上, 在光照下分化不定芽, 10 天左右换一次培养基。当不定芽长至 2~3 cm 时, 剪下不定芽, 放到添加 Kan (25 mg/L) 的生根培养基中进行生根培养和筛选。提取获得的 84K 杨抗性芽叶片总 DNA, 利用检测引物 OE-KpPetC-F 和 OE-KpPetC-R (表 1) 扩增载体上包含 35S 启动子和 *KpPetC* 序列的 500 bp 左右的片段进行 DNA 水平的 PCR 检测, 以过表达重组质粒模板作为阳性对照, 无菌双蒸水和野生型模板作为阴性对照。提取转基因阳性植株的 RNA, 反转录成 cDNA, 利用荧光定量引物 qPCR-Pop-KpPetC-F 和 qPCR-Pop-KpPetC-R 进行 mRNA 水平的半定量 PCR 检测和 RT-qPCR 分析, 以杨树 *Actin* 基因作为内参基因, 特异性引物为 qPCR-PopActin-F 和 qPCR-PopActin-R (表 1)。

1.2.7 数据处理 使用 Excel 软件对数据进行筛选汇总; 使用 SPSS 22.0 软件进行数据的统计及分析, 各指标平均值间的差异显著性采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA); 并使用 Origin 2019 进行图的制作。

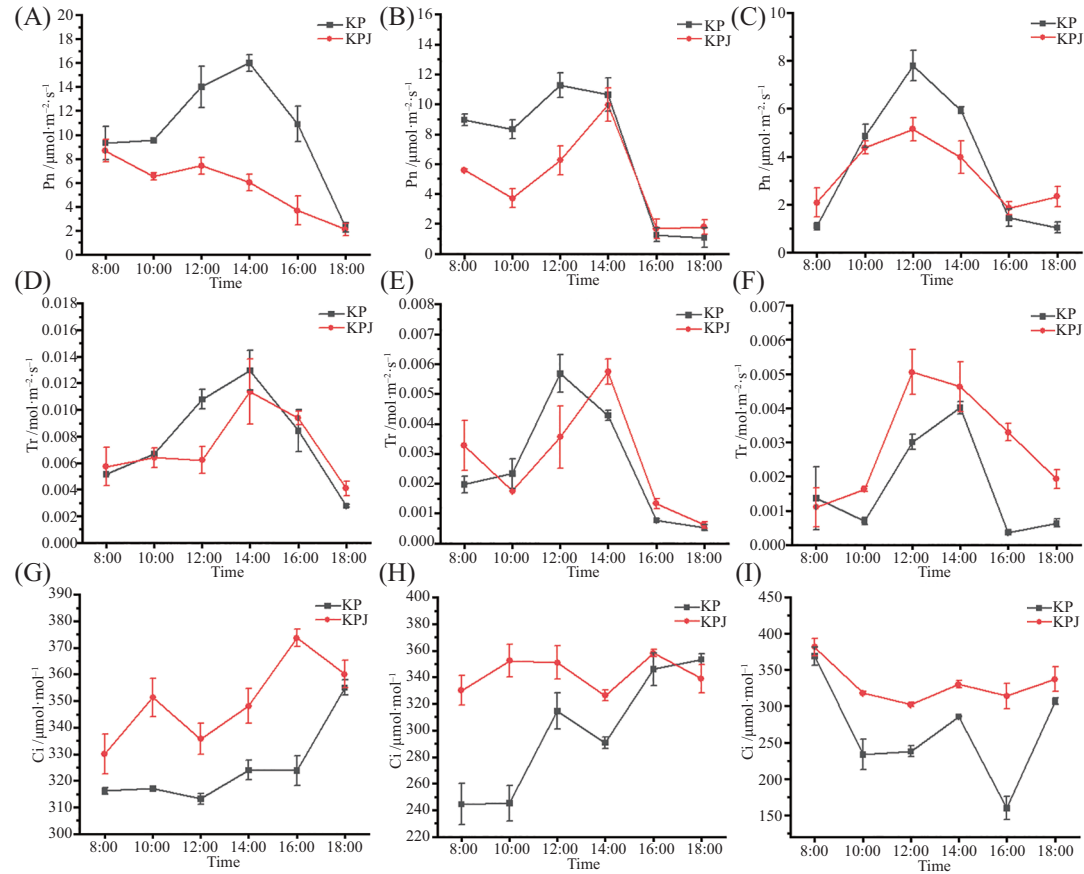
2 结果与分析

2.1 栎树和锦叶栎生长期光合特性分析

2.1.1 净光合速率日变化规律分析 净光合速率是代表植物光合作用强弱的重要指标, 一天之中影响植物净光合速率的生理生态因子是不断变化的, 因此植物的净光合速率也呈现出不同的变化规律。如图 1 所示, 7、8、9 月栎树和锦叶栎叶片净光合速率日变化规律相似, 均表现为单峰曲线, 不存在明显的“光合午休”现象。7 月, 栎树 P_n 峰值出现在 14:00, 达到 16.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 锦叶栎峰值出现在 12:00, 为 7.41 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 之后 P_n 逐渐下降至 18:00 达到最低值。8 月, 栎树 P_n 峰值出现在 12:00, 为 11.27 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 锦叶栎峰值出现在 14:00, 为 9.96 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。9 月, 栎树和锦叶栎 P_n 峰值均出现在 12:00, 分别为 7.80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 5.14 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。8 月和 9 月, 栎树和锦叶栎的 P_n 在

12:00至14:00达到峰值后逐渐下降, 均在16:00降至谷底, 后在18:00略有升高。这可能和测量当天的天气有关。从Pn日变化的最大值来看, 3个月份Pn均表现为栎树>锦叶栎, 栎树表现为7月>8月>9月, 锦叶

栎表现为8月>7月>9月。如表2所示, 栎树净光合速率日均值在3.68~9.97 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 锦叶栎净光合速率日均值在5.73~3.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 两品种均表现为7月>8月>9月。同一树种在不同月份间Pn变化差异



A、D、G为7月的测量数据; B、E、H为8月的测量数据; C、F、I为9月的测量数据。KP: 栎树; KPJ: 锦叶栎。
A, D and G are the measurement data in July; B, E and H are the measurement data in August; C, F and I are the measurement data in September. KP: *K. paniculata*; KPJ: *K. paniculata* 'Jinye'.

图1 栎树和锦叶栎光合指标的日变化曲线

Fig.1 Diurnal variation curves of photosynthetic indices of *K. paniculata* and *K. paniculata* 'Jinye'

表2 7~9月两个品种各光合参数的日均值比较

Table 2 Multiple comparisons of photosynthetic parameters of two species from July to September

月份 Months	品种名 Cultivars	净光合速率/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Net photosynthetic rate $P_n/\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	蒸腾速率/ $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Transpiration rate $Tr/\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	胞间 CO_2 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ Intercellular CO_2 concentration $C_i/\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$
7	KP	9.97±4.60 ^a	0.007 8±0.003 6 ^a	324.88±14.69 ^{ab}
	KPJ	5.73±2.38 ^{bc}	0.007 2±0.002 7 ^a	349.82±15.80 ^a
8	KP	6.91±4.35 ^{ab}	0.002 6±0.001 9 ^b	299.08±45.82 ^{bc}
	KPJ	4.82±3.02 ^{bc}	0.002 7±0.001 8 ^b	342.77±14.74 ^a
9	KP	3.68±2.75 ^c	0.001 7±0.001 4 ^b	265.44±68.46 ^c
	KPJ	3.29±1.36 ^c	0.002 9±0.001 6 ^b	330.70±27.80 ^{ab}

同列数据后相同字母表示无显著差异, 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); KP: 栎树; KPJ: 锦叶栎。
The same letter indicates no significant difference in the same column, the different small letter indicates significant different at 0.05 level. KP: *K. paniculata*; KPJ: *K. paniculata* 'Jinye'.

大, 主要是由于7~9月光照强度逐渐减弱所致的。在7、8、9月, 两品种的净光合速率日均值均表现为栎树>锦叶栎。综合来看, 锦叶栎在一天内的净光合速率变化趋势及日平均值均显著低于栎树。在正午时段12:00至14:00的光合强度差异最大, 表明锦叶栎光合能力发生明显减弱。

2.1.2 蒸腾速率日变化规律分析 蒸腾速率是指植物在一定时间内单位叶面积蒸腾的水量, 反映了植物蒸腾作用的强弱, 是衡量植物水分代谢能力强弱的重要因子, 是植物水分代谢极其重要的环节之一。由图1可知, 蒸腾速率的日变化趋势与净光合速率相似, 大致也呈现出“单峰”的变化趋势, 在日出之后 *Tr* 逐渐升高, 在中午 12:00 或 14:00 左右达到峰值。日出后, 由于太阳辐射逐渐增强, 温度升高, 水分子的动能逐渐加快, 叶片失水在正午时分处于最大, *Tr* 达到峰值, 下午太阳辐射逐渐降低, 导致 *Tr* 逐渐下降。7月和8月, 除正午时分, 栎树和锦叶栎 *Tr* 差异均不大。7月, 栎树和锦叶栎均在 14:00 达到峰值, 分别为 $0.130\ 0\ \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 $0.110\ 0\ \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。8月, 栎树和锦叶栎分别在 12:00 和 14:00 达到峰值, 均为 $0.005\ 7\ \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。9月, 栎树和锦叶栎 *Tr* 差异明显, 栎树和锦叶栎分别在 14:00 和 12:00 达到峰值, 分别为 $0.004\ 0\ \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 $0.005\ 1\ \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 锦叶栎 *Tr* 在全天持续高于栎树。从 *Tr* 日变化的最大值来看, 栎树和锦叶栎均表现为 7月>8月>9月。如表2所示, 栎树蒸腾速率日均值在 $0.007\ 8\sim 0.001\ 7\ \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 锦叶栎蒸腾速率日均值在 $0.007\ 2\sim 0.002\ 7\ \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 从蒸腾速率日均值来看, 栎树表现为 7月>8月>9月, 锦叶栎表现为 7月>9月>8月, 但 9月和 8月差异不显著, 这种变化可能是由于不同测量时期光照强度和温度差异导致的。

2.1.3 胞间CO₂浓度日变化规律分析 植物叶片胞间 CO₂ 浓度可以表征外界 CO₂ 进入植物叶片的浓度, 它不仅会受到大气 CO₂ 浓度的制约, 同时还受到植物叶片气孔导度和叶片光合消耗的影响和制约^[37]。如图1所示, 两品种 *Ci* 日变化曲线变化趋势相似, 在早晨和傍晚光合作用较弱, CO₂ 的吸收效率高于其消耗效率, 使得 *Ci* 值升高, 正午光合作用增强, *Ci* 值逐渐下降, *Ci* 峰值普遍出现在早上或傍晚时分。在 7、8、9月, 锦叶栎全天内的 *Ci* 均普遍高于栎树。如表2所示, 栎树 *Ci* 日均值在 $324.88\sim 265.44\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 锦叶栎 *Ci* 日均值在 $349.82\sim 330.70\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 从 *Ci* 日均值来看,

两品种均表现为 7月>8月>9月。在同一月份, 锦叶栎 *Ci* 均值均显著高于栎树 ($P>0.05$), 可能是由于锦叶栎光合作用较弱, 消耗的 CO₂ 有限, 最终使得 CO₂ 在细胞间逐渐积累导致的。

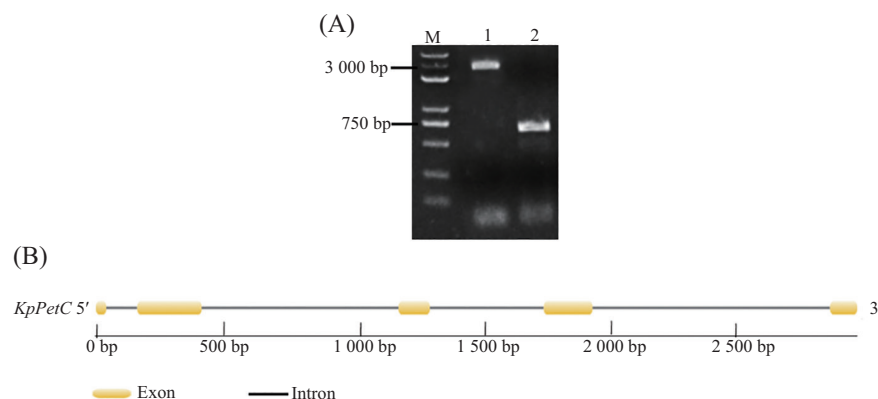
综合来看, 栎树和锦叶栎的 *Pn* 日变化与 *Tr* 变化表现为正相关, 与 *Ci* 变化表现出一定的负相关。净光合速率降低的原因主要包括气孔限制和非气孔限制^[38-40]。气孔限制是因为叶片细胞程序性死亡、输导组织受到损伤、气孔阻力增大, CO₂ 进入叶片受阻^[41]。非气孔限制表现为光合有关酶活性降低, 光合机构受损, 电子传递速率下降, 光合作用表观量子效率下降, 导致光合效率下降^[42]。锦叶栎的 *Ci* 在各月份均显著高于栎树, 但 *Pn* 仍发生显著降低, 说明锦叶栎光合能力减弱不是由于气孔限制导致的 CO₂ 不足引起的, 推测锦叶栎 *Pn* 降低主要是由于叶肉细胞光合活性降低引起的, 非气孔限制是其主要因素。结合本研究前期的转录组数据发现, 编码光合电子传递链中 Cyt b6f 复合体 Rieske FeS 蛋白的 *PetC* 基因在锦叶栎中发生极显著降低^[15], 推测锦叶栎光合作用受到非气孔限制可能是由于 *PetC* 基因表达下调, 影响 Cyt b6f 复合体的组装, 使得光合机构受损而导致的。

2.2 *KpPetC* 基因克隆与结构分析

以栎树无菌组培苗叶片的 DNA 和 cDNA 为模板, 成功克隆出栎树 *PetC* 基因, 将其命名为 *KpPetC* (图2)。该基因在栎树中以单拷贝形式存在, 基因组 DNA 长度为 2 856 bp, cDNA 长度为 684 bp, 编码包含 227 个氨基酸残基的蛋白质。使用 GSDS2.0 绘制 *KpPetC* 的基因结构图 (图2), 该基因包含 5 个外显子和 4 个内含子, 外显子长度分别为 39 bp、242 bp、118 bp、183 bp 和 102 bp, 4 个内含子的长度分布在 116 到 891 bp 不等。

2.3 *KpPetC* 基因生物信息学分析

ProtParam 预测结果显示, *KpPetC* 基因所编码的氨基酸序列的蛋白分子式为 C₁₀₇₄H₁₇₀₆N₂₉₂O₃₁₂S₁₂, 分子量为 24.09 kDa, 蛋白不稳定系数为 26.39, 等电点为 8.74, 总平均亲水性值为 0.004, 为稳定的碱性疏水蛋白。二级结构预测分析显示, *KpPetC* 由 23.79% 的 α 螺旋, 15.86% 的延伸链, 7.49% 的 β 转角和 52.86% 的无规则卷曲组成, α 螺旋和无规则卷曲构成了二级结构的主要部分 (图3)。通过 SWISS-MODEL 分析该蛋白的 3D 结构 (图3), 发现其蛋白三级结构主要由 α 螺

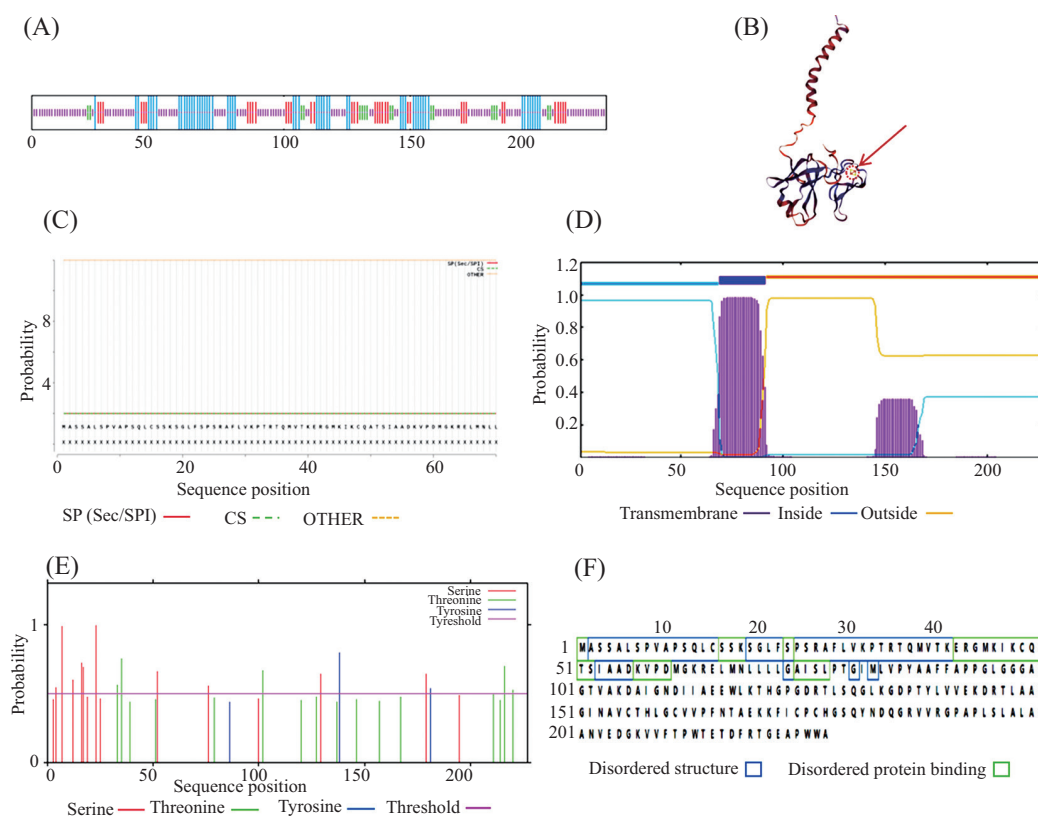


A: *KpPetC*基因的克隆; B: *KpPetC*基因结构。M: DL5000 Marker; 1、2分别代表*KpPetC*基因组DNA和cDNA全长。

A: cloning of the *KpPetC* gene; B: gene structure of *KpPetC*. M: DL5000 Marker; 1,2 represent *KpPetC* genomic DNA and cDNA full-length, respectively.

图2 *KpPetC*基因的克隆及基因结构

Fig.2 Cloning and gene structure of *KpPetC* gene



A: 二级结构预测, 红色: 延伸链; 绿色: β 折叠; 蓝色: α 螺旋; 紫色: 无规则卷曲; B: 三级结构预测, 红色箭头所指红色圆圈处为[2Fe-2S]结合域; C: 信号肽预测; D: 跨膜结构域预测; E: 磷酸化位点预测; F: 无序化位点预测。

A: prediction of secondary structure, red: the extended chain; green: the β -fold; blue: the α helix; purple: the random curl; B: prediction of tertiary structure, and the circle indicated by the red arrow is the conservative binding domain [2Fe-2S]; C: prediction of signal peptide; D: prediction of transmembrane domain; E: prediction of phosphorylation sites; F: prediction of disorderization sites.

图3 *KpPetC*蛋白的结构和特征分析

Fig.3 Analysis of structures and features of *KpPetC* protein

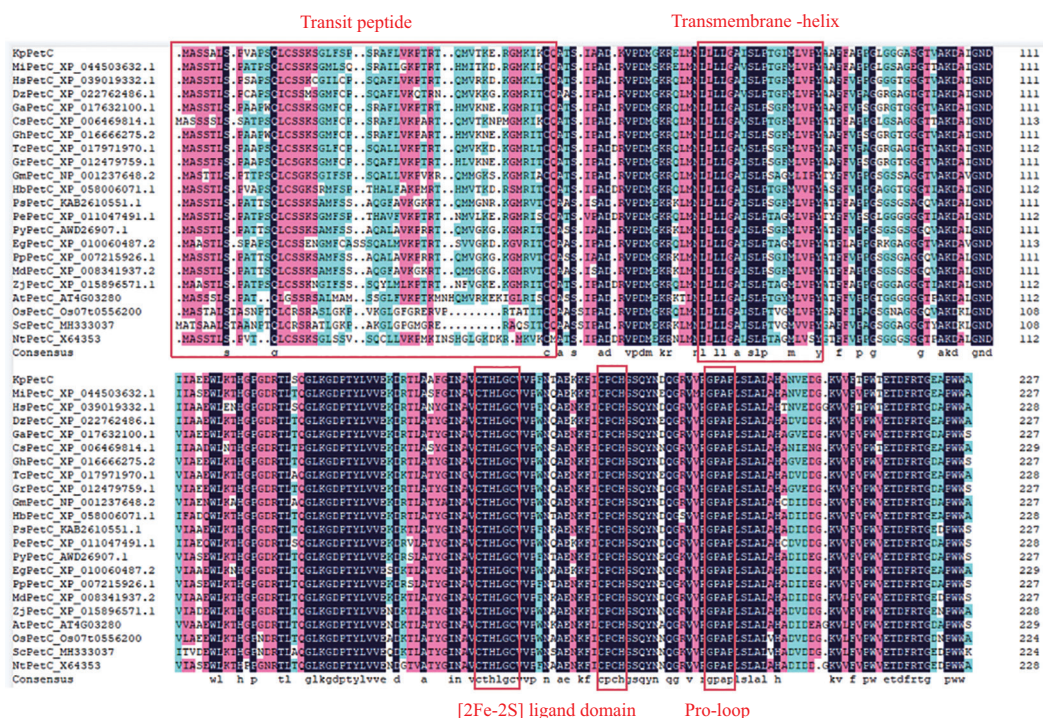
旋和无规则卷曲组成, 与二级结构蛋白预测结果一致。与已报道的甘蔗(*Saccharum officinarum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)等

的PetC蛋白结构相似度很高, 证明PetC蛋白较为保守^[3,7,43]。TMHMM2.0和SignalP5.0在线软件预测*KpPetC*蛋白的结构特征(图3), 结果显示*KpPetC*不含

信号肽, 属于非分泌蛋白, 在69—91氨基酸区域有一个由内到外的跨膜结构域, 推测其为跨膜蛋白。通过Netphos3.1对其氨基酸序列进行分析, 结果如图3所示, 蛋白质包含丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点, 其中丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点占比较高, 表明该蛋白可能受磷酸化作用调控。DISOPRED3的蛋白无序化分析结果(图3)显示, KpPetC蛋白序列中有4个无序化区域, 包含67个氨基酸, 无序化比例为29.5%。

NCBI保守结构域分析结果显示, KpPetC具有由半胱氨酸和组氨酸组成的Rieske结构域, 属于Rieske超家族(c100938)。Rieske结构域近C-端, 是Rieske家族蛋白主要特征^[44]。PROSIT分析结果显示

PetC蛋白具有一个活性位点, 为Rieske结构域。为了更好地了解栎树KpPetC蛋白与其他物种间的系统发育关系, 通过NCBI的blast获取了与KpPetC序列相似度比较高的其他21种植物, 包括芒果(*Mangifera indica*)、木槿(*Hibiscus syriacus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和榴莲(*Durio zibethinus*)等的PetC蛋白序列。通过Mega11用邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)构建进化树, 进行1 000次Bootstrap统计学检验。蛋白多序列比对结果(图4)显示, KpPetC编码的氨基酸序列与其他21个物种的PetC蛋白在功能区域很保守, 存在N末端的转移多肽区域、跨膜 α 螺旋区域、结合[2Fe-2S]的Rieske区域和靠近C末端的脯氨酸环区域。利用MEME更全



红色方框表示PetC已报道的保守氨基酸基序。MiPetC XP_044503632.1: 芒果; HsPetC XP_039019332.1: 木槿; DzPetC XP_022762486.1: 榴莲; GaPetC XP_017632100.1: 树棉; CsPetC XP_006469814: 柑橘; GhPetC XP_016666275.2: 陆地棉; TcPetC XP_017971970.1: 可可树; GrPetC XP_012479759.1: 雷蒙德棉; GmPetC NP_001237648.2: 大豆; HbPetC XP_058006071.1: 橡胶树; PsPetC KAB2610551.1: 梨; PePetC XP_011047491.1: 胡杨; PyPetC AWD26907.1: 樱花; EgPetC XP_010060487.2: 巨桉; PpPetC XP_007215926.1: 桃; MdPetC XP_008341937.2: 苹果; ZjPetC XP_015896571.1: 枣; AtPetC AT4G03280: 拟南芥; OsPetC Os07t0556200: 水稻; ScPetC MH333037: 甘蔗; NtPetC X64353: 烟草。

Red squares indicate the reported conserved motif of amino acid regions within the PetC. MiPetC XP_044503632.1: *Mangifera indica*; HsPetC XP_039019332.1: *Hibiscus syriacus*; DzPetC XP_022762486.1: *Durio zibethinus*; GaPetC XP_017632100.1: *Gossypium arboreum*; CsPetC XP_006469814.1: *Citrus sinensis*; GhPetC XP_016666275.2: *Gossypium hirsutum*; TcPetC XP_017971970.1: *Theobroma cacao*; GrPetC XP_012479759.1: *Gossypium raimondii*; GmPetC NP_001237648.2: *Glycine max*; HbPetC XP_058006071.1: *Hevea brasiliensis*; PsPetC KAB2610551.1: *Pyrus spp*; PePetC XP_011047491.1: *Populus euphratica*; PyPetC AWD26907.1: *Prunus yedoensis*; EgPetC XP_010060487.2: *Eucahyptus grandis*; PpPetC XP_007215926.1: *Prunus persica*; MdPetC XP_008341937.2: *Malus domestica*; ZjPetC XP_015896571.1: *Ziziphus jujuba*; AtPetC AT4G03280: *Arabidopsis thaliana*; OsPetC Os07t0556200: *Oryza sativa*; ScPetC MH333037: *Saccharum officinarum*; NtPetC X64353: *Nicotiana tabacum*.

图4 栎树PetC蛋白与其他物种的蛋白同源比对

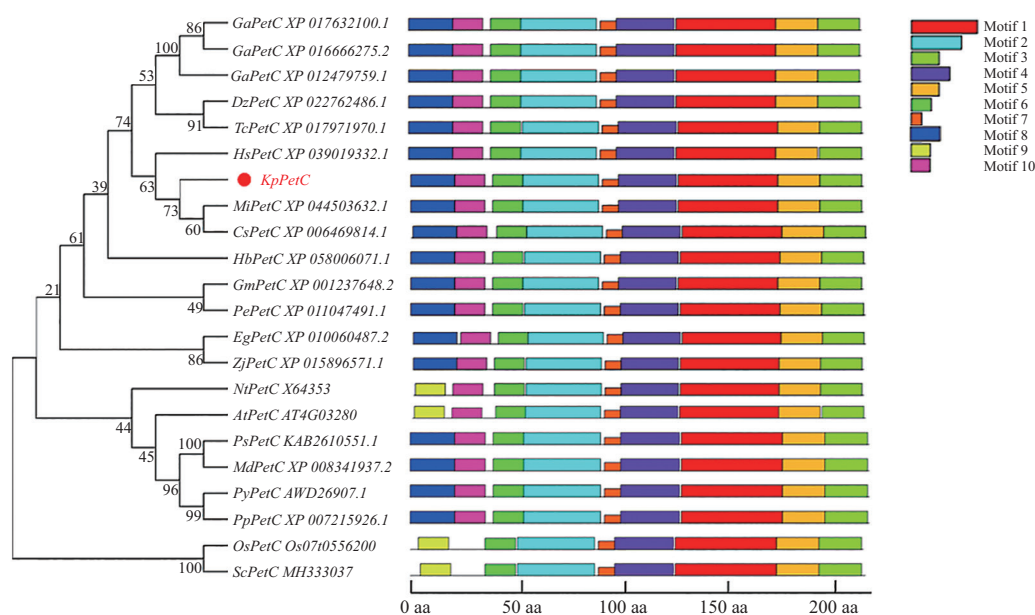
Fig.4 Protein homology comparison between the PetC protein from *K. paniculata* and other species

面地分析*PetC*序列中包含的结构域, 结果如图5所示, *PetC*蛋白普遍包含8~9个基序, 且基序分布位置相似。所有物种均具有motif 1~7, 木本植物具有motif 8和motif 10, motif 9为草本植物烟草、拟南芥、水稻和甘蔗中所特有的motif。蛋白进化树分析结果(图5)显示, 栎树*PetC*蛋白与芒果和柑橘的亲缘关系最近。

2.4 *KpPetC*基因的亚细胞定位分析

Plant-mPLocserver在线软件预测结果显示, *Kp-*

*PetC*基因定位在叶绿体。为了更准确地确定*KpPetC*蛋白在细胞内的表达位置, 利用pCambia1300-MASPro::Kp*PetC*-eGFP植物表达载体瞬时转化烟草叶片进行亚细胞定位分析, 结果(图6)显示: 对照组的eGFP荧光信号在本氏烟草叶片表皮细胞的细胞核、细胞质和细胞膜中均有分布, 在叶绿体、细胞膜和细胞质中均可以检测到*KpPetC*::eGFP融合蛋白的荧光信号, 说明*KpPetC*可能在叶绿体、细胞膜和细胞



红色圆圈标记为*KpPetC*。物种对应关系同图4。

KpPetC is marked by red circles. The interrelationships between species are the same as Fig.4.

图5 *KpPetC*与其他物种*PetC*的系统进化树分析与motif预测

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of *KpPetC* and *PetC* in other species and their corresponding motif prediction

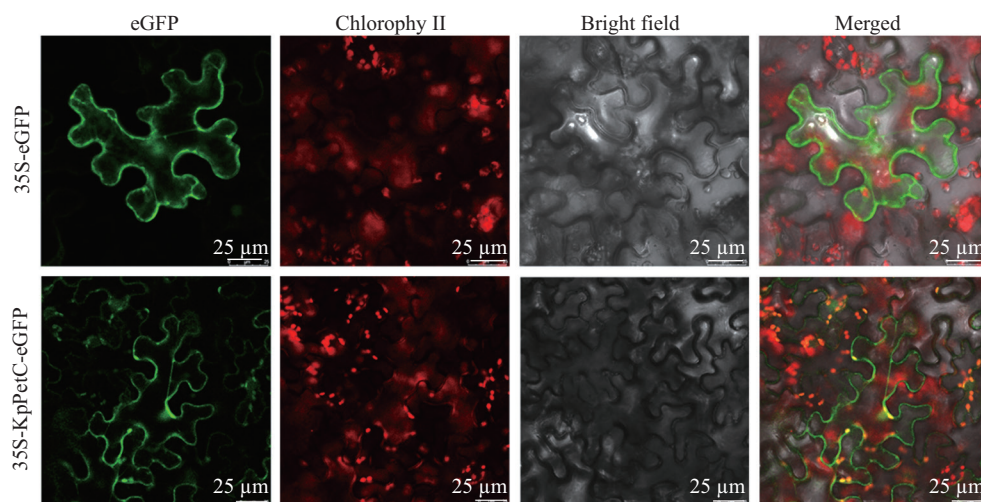
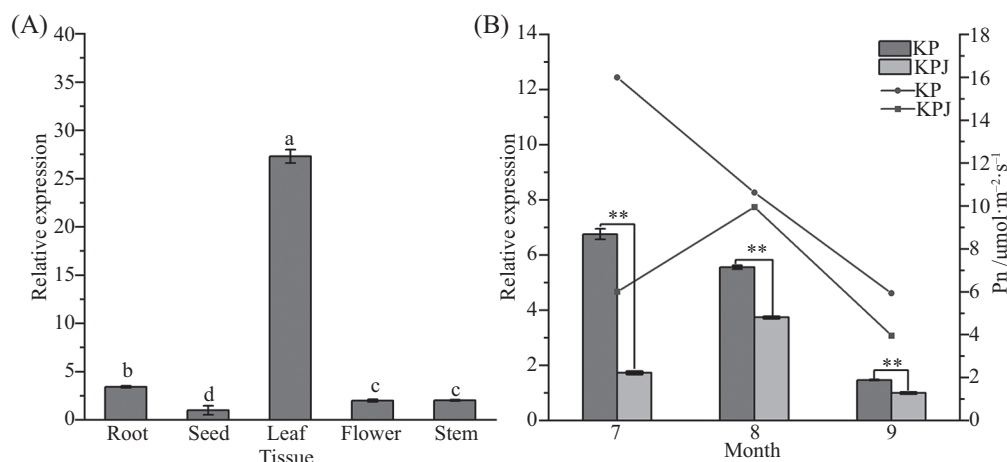


图6 *KpPetC*基因亚细胞定位

Fig.6 Subcellular localization analysis of *KpPetC* gene



A: *KpPetC*基因组织特异性表达分析; B: 栎树和锦叶栎叶片*KpPetC*相对表达量和净光合速率相关性分析。KP: 栎树; KPJ: 锦叶栎。不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。** $P < 0.01$ 。

A: analysis of tissue-specific expression of the *KpPetC* gene; B: correlation analysis between relative expression levels of *KpPetC* and net photosynthetic rate in the leaves of *K. paniculata* and *K. paniculata* 'Jinye'. KP: *K. paniculata*; KPJ: *K. paniculata* 'Jinye'. Different letters represent significant differences at $P < 0.05$ level. ** $P < 0.01$.

图7 *KpPetC*基因表达差异分析
Fig.7 Differential analysis of *KpPetC* gene expression

质中均有所表达,这与之前甘蔗中的报道一致^[43]。

2.5 *KpPetC*在不同组织、不同发育时期叶片中的表达模式及光合相关性分析

为了进一步了解*KpPetC*基因的功能,采集栎树的根、茎、叶、花芽和种子材料进行RT-qPCR,检测栎树不同组织中*KpPetC*的表达水平,结果(图7)显示:*KpPetC*基因在根、茎、叶、花芽和种子中均有表达,叶中的表达水平最高,相对表达量为27.31,与其他组织间存在显著差异,在花和种子中表达量偏低,在茎中表达量最低。

对7、8、9月采集的栎树和锦叶栎的叶片进行RT-qPCR,探究*KpPetC*基因在7、8、9月栎树和锦叶栎叶片中的表达规律。结果(图7)显示,在3个月份中栎树叶片中*KpPetC*基因的表达量均高于锦叶栎,且存在显著差异($P > 0.01$)。随着月份的增加,栎树中*KpPetC*的表达量一直呈现下降的趋势,锦叶栎则呈现出先上升后下降的趋势。综合分析*KpPetC*基因的表达量和净光合速率之间的关系,发现栎树和锦叶栎在各个月份间的Pn变化趋势与*KpPetC*基因表达量的变化趋势一致,两者之间表现出一定的正相关性,推测锦叶栎净光合速率降低,可能是由于*KpPetC*基因的表达受到抑制,光合通路受损,电子传递速率降低导致的。

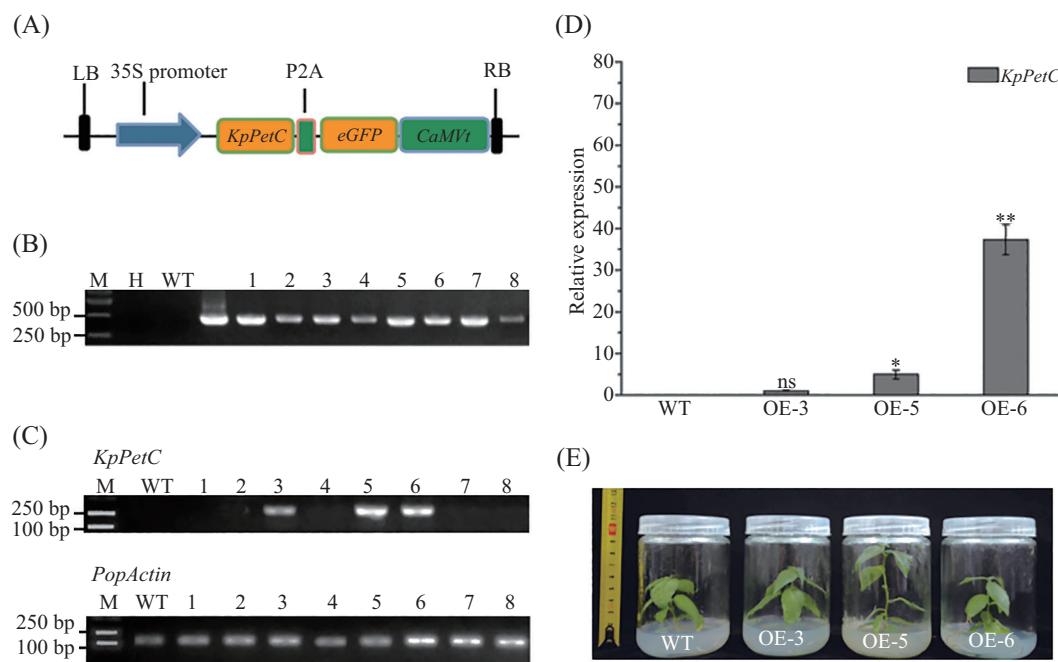
2.6 转基因84K杨的获得

为了验证*KpPetC*基因的功能,构建带有该基

因的表达载体(图8),转化木本植物84K杨,通过RT-qPCR进行DNA水平的鉴定,如图8所示,阴性对照双蒸水和野生型均未扩增出条带,株系OE-1~8与阳性对照扩增出的片段大小一致,表明*KpPetC*过表达载体成功转化至植物体内。对转基因阳性植株进行mRNA水平的半定量PCR分析,结果(图8)显示,野生型未扩增出条带,株系OE-3、株系OE-5和株系OE-6中均扩增出对应条带,其相对表达量分别为1.03、1.98和1.75,表明*KpPetC*基因已被整合到其基因组上并能在其体内正常表达。采用RT-qPCR对株系OE-3、株系OE-5和株系OE-6中*KpPetC*表达量进行进一步的定量分析,结果如图8显示,OE-5和OE-6的相对表达量分别达到了4.9和37.3,与野生型相比具有显著差异,*KpPetC*过表达转基因植株的获得为后续*KpPetC*基因功能的研究奠定了基础。

3 讨论与结论

C3物种的光合速率通常被认为会受到核酮糖-1,5-二磷酸(ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP)羧化或再生能力的限制,而RuBP再生速率又取决于产生NADPH和ATP的光合电子传递能力或参与RuBP再生的卡尔文循环中酶的活性^[45]。提高光合作用是提高植物生物量和产量的有效途径之一,在C3和C4植物中均已证明,通过过表达电子传递链的基因来促进电子传递可产生更高的同化率^[1,29,46-47]。*PetC*基因



A: *KpPetC*过表达载体示意图; B: *KpPetC*转基因植株PCR检测; C: *KpPetC*转基因植株半定量PCR检测; D: *KpPetC*转基因植株RT-qPCR检测; E: 扩繁时间相同的野生型与转基因植株的生长状态。M: DL2000 Marker; H: ddH₂O; WT: 野生型; +: pCambia2300-35S::KpPetC-P2A-eGFP; 1~8: 转基因植株。ns: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与WT组比较。

A: schematic representation of *KpPetC* overexpression vector; B: PCR assay of *KpPetC* transgenic plants; C: semi-quantitative PCR assay of *KpPetC* transgenic plants; D: RT-qPCR assay of *KpPetC* transgenic plants; E: growth status of wild-type and transgenic plants with the same propagation time. M: DL2000 Marker; H: ddH₂O; WT: wild type; +: pCambia2300-35S::KpPetC-P2A-eGFP; 1-8: transgenic plants. ns: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT group.

图8 *KpPetC*过表达载体及转基因植株的鉴定

Fig.8 Schematic representation of *KpPetC* overexpression vectors and identification of transgenic plants

编码的Rieske FeS蛋白是Cyt b6f复合体组装的关键,与光合作用密切相关。关于*PetC*基因的研究普遍集中在模式植物和草本植物中,在木本植物中的研究相对较少。本研究从锦叶栎叶色变异现象出发,在分析栎树和锦叶栎光合生理指标差异的基础上,探究光合作用强度与*PetC*基因表达之间的相关性,以期对*PetC*基因功能的研究提供理论依据。

光合作用是地球上生命的核心,它利用阳光、水和二氧化碳来产生化学能和氧气,为植物正常的生长发育提供物质基础,光合能力的强弱可以反映植物的生长状况^[48]。净光合速率是表示植物光合作用强弱变化的一个核心指标,同时与蒸腾速率、气孔导度、胞间CO₂浓度等参数密切相关,共同调控植物的光合作用。通过分析栎树和锦叶栎7至9月的光合生理指标,我们发现:锦叶栎净光合速率在7至9月均显著低于栎树,这种变化并不是由于环境因子造成的,可能是由于遗传变异导致的锦叶栎光合能力减弱。栎树和锦叶栎的净光合速率日变化均表现为“单峰曲线”,其最大值普遍出现在12:00至14:00。从

Pn日变化的最大值来看,栎树净光合速率的最大值出现在7月,而锦叶栎则出现在8月,这表明锦叶栎光合能力下降的同时对强光的耐受性也减弱。锦叶栎对强光更加敏感,产生了更严重的光抑制,最终使得光合效率下降。光合速率减弱的原因可以主要概括为气孔限制和非气孔限制^[38-42]。气孔限制是由于植株的气孔导度降低使得Ci降低,导致植物无法维持光合作用的需求。非气孔限制指叶片是由于叶绿体受损、光合有关酶活性改变、光合色素降解、电子传递过程受损等原因导致的光合能力减弱。锦叶栎在7、8、9月的净光合速率均显著低于栎树,同时其胞间CO₂浓度却始终高于栎树,表明CO₂浓度并不是其光合速率减弱的限制因素,推测锦叶栎光合能力降低是由于非气孔限制因素导致的。转录组分析结果显示,锦叶栎中参与光合电子传递中的*PetC*基因表达量发生极显著降低,推测锦叶栎光合速率降低可能是由于*PetC*基因表达下调,使得光合系统元件受损,最终导致光合能力的下降。

*PetC*蛋白在胞质核糖体上被解码翻译,作为前

体蛋白到达叶绿体并被蛋白水解加工成成熟的多肽链,成熟多肽含有两个短的高度保守序列,其含有[2Fe-2S]中心的配体^[49-50]。在本研究中,栎叶绿体PetC蛋白由单拷贝核基因*KpPetC*编码,该基因全长2 856 bp, CDS为684 bp, 编码227个氨基酸,属稳定的碱性疏水蛋白。该蛋白不含信号肽,在69—91氨基酸区域有一个由内到外的跨膜结构域,具有由半胱氨酸和组氨酸组成的Rieske结构域,属于Rieske超家族(c100938)。亚细胞定位结果显示,*KpPetC*可定位到叶绿体、细胞膜和细胞质中,这与甘蔗*ScPetC*的结果一致^[43]。将栎树*KpPetC*蛋白与其他21个物种的PetC蛋白进行多序列比对(图4),结果显示其在功能区域很保守,存在N末端的转移多肽区域、跨膜 α 螺旋区域、结合[2Fe-2S]的Rieske区域和靠近C末端的脯氨酸环区域。木本植物与草本植物的PetC蛋白所含 motif略有差异,草本植物拟南芥、烟草、水稻和甘蔗具有一个特有的 motif, 栎树PetC蛋白与芒果和柑橘的亲缘关系最近。将拟南芥*PetC*基因启动子片段与 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GUS)报告基因融合组成嵌合基因转化拟南芥和烟草,在转基因拟南芥的叶、茎、花和角果中均检测到GUS活性,但在根中没有检测到,在转基因烟草中,光照下的根变绿,并检测到低水平的GUS活性,说明GUS活性与叶绿体的存在有很强相关性^[17]。栎树*PetC*组织表达模式分析结果(图7)显示,*KpPetC*基因在根、茎、叶、花芽和种子中呈组成型表达,在叶中的表达水平最高,且与其他组织间存在显著差异,*KpPetC*的表达量与叶绿体间存在一定的相关性。综合分析各个月份Pn与*KpPetC*在叶片中的表达规律,发现Pn与*KpPetC*表达量变化趋势一致,存在一定的正相关性,推测锦叶栎净光合速率降低可能是由于*KpPetC*基因的表达受到抑制,导致光合电子传递过程受影响,最终导致光合能力减弱。

在探究C4植物光合作用是否受到电子传递的限制时,组成性过表达狗尾草中的*PetC*基因,导致叶肉和束鞘细胞中的Cyt b6f复合体的含量升高,而其他光合蛋白的丰度没有显著变化,*PetC*过表达植株在两种光系统中都表现出更高的光转换效率^[1]。在高粱中过表达*PetC*基因,虽然电子传递和CO₂同化的稳态速率没有明显提升,但在诱导过程中植物对非光化学猝灭的反应更快,光系统II的产量和CO₂同化速率也增加^[51],表明PetC蛋白在C4植物的电子传

递中具有重要的作用。过表达*PetC*基因的转基因拟南芥植物表现出Cyt b6f复合体其他亚基数量的增加,对光系统II电子传递速率和CO₂同化速率产生积极的影响,并降低了非光化学淬灭^[23]。在烟草中也有类似的结果,过表达*KpPetC*后,光系统II和质体醌库的初级醌受体氧化程度更高,并且随着辐照度的变化,电子从质体醌库传输到光系统I的速度更快,但电子传递或CO₂同化的稳态速率并没有持续增加,这表明该复合物的体内活性仅在辐照度变化时短暂增加^[52]。目前栎树的遗传转化体系和再生体系尚不完善,不利于分析*KpPetC*基因的代谢调控机制。因此,本研究通过叶盘法将*KpPetC*过表达到木本植物84K杨中,通过DNA和RNA水平的检测,共获得3株可以在体内表达*KpPetC*的84K杨转基因株系,其中OE-5和OE-6的相对表达量分别达到了4.9和37.3,为后续进一步研究*PetC*基因功能奠定了基础。

在本研究中,我们以锦叶栎叶色变异现象为切入点,分析了栎树和锦叶栎在生长期内的光合生理指标的变化规律和差异,并结合转录组数据克隆分析了光合电子传递关键基因*KpPetC*,进一步在84K杨中转化*KpPetC*过表达载体,并获得了转基因植株。该研究结果为今后*PetC*基因功能的研究提供了依据,为光合电子传递机制的研究奠定了基础,具有重要的科学价值。

参考文献 (References)

- [1] ERMAKOVA M, LOPEZ-CALCAGNO P E, RAINES C A, et al. Overexpression of the Rieske FeS protein of the cytochrome b6f complex increases C4 photosynthesis in *Setaria viridis* [J]. *Commun Biol*, 2019, 2(1): 314.
- [2] TIKHONOV A N. The cytochrome b6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2014, 81: 163-83.
- [3] YAMORI W, KONDO E, SUGIURA D, et al. Enhanced leaf photosynthesis as a target to increase grain yield: insights from transgenic rice lines with variable Rieske FeS protein content in the cytochrome b6/f complex [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39(1): 80-7.
- [4] CLASSICS MITCHELL P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1966, 41: 445-502.
- [5] ALLEN J F. Cytochrome b6f: structure for signalling and vectorial metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(3): 130-7.
- [6] HASAN S S, YAMASHITA E, CRAMER W A. Transmembrane signaling and assembly of the cytochrome b6f-lipidic charge transfer complex [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827(11/12): 1295-308.
- [7] LAN Y, CHEN Q, KONG M, et al. *PetM* is essential for the sta-

- bilization and function of the cytochrome b6f complex in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2021, 62(10): 1603-14.
- [8] MALONE L A, PROCTOR M S, HITCHCOCK A, et al. Cytochrome b6f-orchestrator of photosynthetic electron transfer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2021, 1862(5): 148380.
- [9] LI N, WONG W S, FENG L, et al. The thylakoid membrane protein NTA1 is an assembly factor of the cytochrome b6f complex essential for chloroplast development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Commun*, 2023, 4(1): 17.
- [10] YAMORI W, TAKAHASHI S, MAKINO A, et al. The roles of ATP synthase and the cytochrome b6/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(2): 956-62.
- [11] 杨雄. 桉树离体高效再生体系的建立[D]. 北京: 北京林业大学 (YANG X. Establishment of an efficient regeneration system of *Koeleruteria paniculata* in vitro [D]. Beijing: Beijing Forestry University), 2019.
- [12] 祁新华. 锦叶桉新品种繁育技术[J]. 中国林副特产 (QI X H. Breeding technology of *Koeleruteria paniculata* 'Jinye' new variety [J]. *Forest by-Product and Specialty in China*), 2011(6): 62-3.
- [13] 王国栋, 石聚宝, 贾敏, 等. “锦叶桉”新品种选育[R]. 襄垣县国栋园林花木种植专业合作社, 2010.
- [14] 李小雨, 梅广云, 李扬, 等. 锦叶桉黄酮含量及叶绿素荧光参数动态分析[J]. 福建林业科技 (LI X Y, MEI G Y, LI Y, et al. Dynamic analysis of flavonoids content and chlorophyll fluorescence parameters in *Koeleruteria paniculata* 'Jinye' [J]. *Journal of Fujian Forestry Science and Technology*), 2016, 43(2): 66-72,84.
- [15] 郭婷. 桉树彩叶突变体叶色变异机理的初步探究[D]. 北京: 北京林业大学 (GUO T. Preliminary study on the mechanism of leaf color variation in *Koeleruteria paniculata* color leaf mutants [D]. Beijing: Beijing Forestry University), 2021.
- [16] SAREWICZ M, SZWALEC M, PINTSCHER S, et al. High-resolution cryo-EM structures of plant cytochrome b6f at work [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(2): eadd9688.
- [17] KNIGHT J S, DUCKETT C M, SULLIVAN J A, et al. Tissue-specific, light-regulated and plastid-regulated expression of the single-copy nuclear gene encoding the chloroplast Rieske FeS protein of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(5): 522-31.
- [18] CRAMER W A, ZHANG H, YAN J, et al. Transmembrane traffic in the cytochrome b6f complex [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 769-90.
- [19] BANIULIS D, YAMASHITA E, WHITELEGGE J P, et al. Structure-function, stability, and chemical modification of the cyanobacterial cytochrome b6f complex from *Nostoc sp.* PCC 7120 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(15): 9861-9.
- [20] SCHÖTTLER M A, TÓTH S Z, BOULOUIS A, et al. Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: biogenesis, function, and turnover of ATP synthase and the cytochrome b6f complex [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(9): 2373-400.
- [21] LAM E, MALKIN R. Characterization of a photosynthetic mutant of *Lemna* lacking the cytochrome b6-f complex [J]. *BBA-Bioenergetics*, 1985, 810(1): 106-9.
- [22] BRUCE B D, MALKIN R. Biosynthesis of the chloroplast cytochrome b6f complex: studies in a photosynthetic mutant of *Lemna* [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(2): 203-12.
- [23] MAIWALD D, DIETZMANN A, JAHNS P, et al. Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase δ -subunit of *Arabidopsis*. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133(1): 191-202.
- [24] DE VITRY C, FINAZZI G, BAYMANN F, et al. Analysis of the nucleus-encoded and chloroplast-targeted rieske protein by classic and site-directed mutagenesis of *Chlamydomonas* [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(10): 2031-44.
- [25] LI J, LIN L, ZHANG F, et al. Variation in leaf photosynthetic characteristics in a new bud mutant of *Populus* [J]. *Pak J Bot*, 2017, 49(3): 1033-8.
- [26] HURA T, HURA K, OSTROWSKA A, et al. Rieske iron-sulfur protein of cytochrome-b6f is involved in plant recovery after drought stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2018, 156: 228-39.
- [27] OSTERSETZER O, ADAM Z. Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of the FtsH protease [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 957-65.
- [28] XIAO J, LI J, OUYANG M, et al. DAC is involved in the accumulation of the cytochrome b6/f complex in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(4): 1911-22.
- [29] SANDOVAL-IBÁÑEZ O, ROLO D, GHANDOUR R, et al. De-etiolation-induced protein 1 (DEIP1) mediates assembly of the cytochrome b6f complex in *Arabidopsis* [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4045.
- [30] SIMKIN A J, MCAUSLAND L, LAWSON T, et al. Overexpression of the Rieske FeS protein increases electron transport rates and biomass yield [J]. *Plant Physiol*, 2017, 175(1): 134-45.
- [31] PRICE G D, YU J W, CAEMMERER S V, et al. Chloroplast cytochrome b6/f and ATP synthase complexes in tobacco: transformation with antisense RNA against nuclear-encoded transcripts for the Rieske FeS and ATP δ polypeptides [J]. *Funct Plant Bio*, 1995, 22(2): 285-97.
- [32] PRICE G D, VON CAEMMERER S, EVANS J R, et al. Photosynthesis is strongly reduced by antisense suppression of chloroplastic cytochrome bf complex in transgenic tobacco [J]. *Funct Plant Bio*, 1998, 25(4): 445-52.
- [33] ANDERSON J M, DEAN PRICE G, SOON CHOW W, et al. Reduced levels of cytochrome bf complex in transgenic tobacco leads to marked photochemical reduction of the plastoquinone pool, without significant change in acclimation to irradiance [J]. *Photosynth Res*, 1997, 53: 215-27.
- [34] RUUSKA S A, ANDREWS T J, BADGER M R, et al. The role of chloroplast electron transport and metabolites in modulating Rubisco activity in tobacco. Insights from transgenic plants with reduced amounts of cytochrome b/f complex or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122(2): 491-504.
- [35] BARKAN A, MILES D, TAYLOR W C. Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize [J]. *EMBO J*, 1986, 5(7): 1421-7.
- [36] 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): 402-8.
- [37] 夏振华, 陈亚宁, 朱成刚, 等. 干旱胁迫环境下的胡杨叶片气

- 孔变化[J]. 干旱区研究(XIA Z H, CHEN Y N, ZHU C G, et al. Stomatal changes of *Populus euphratica* under drought stress [J]. Arid Zone Research), 2018, 35(5): 1111-7.
- [38] ZHANG W, WANG L, ZHANG L, et al. H₂S-mediated balance regulation of stomatal and non-stomatal factors responding to drought stress in Chinese cabbage [J]. Horticulture Research, 2023, 10(3): uhac284.
- [39] 朱新广, 张其德. NaCl对光合作用影响的研究进展[J]. 植物学通报(ZHU X G, ZHANG Q D. Effect of NaCl on photosynthesis [J]. Chinese Bulletin of Botany), 1999(4): 332-8.
- [40] 刘建新, 王金成, 王瑞娟, 等. 盐、碱胁迫对燕麦幼苗光合作用的影响[J]. 干旱地区农业研究(LIU J X, WANG J C, WANG R J, et al. Effects of salt and alkali stress on photosynthesis of oat seedlings [J]. Agricultural Research in the Arid Areas), 2015, 33(6): 155-60.
- [41] FARQUHAR G D, SHARKEY T D. Stomatal conductance and photosynthesis [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1982, 33(1): 317-45.
- [42] 高冠龙, 冯起, 张小由, 等. 植物叶片光合作用的气孔与非气孔限制研究综述[J]. 干旱区研究(GAO G L, FENG Q, ZHANG X Y, et al. Review of stomatal and non-stomatal limitations on photosynthesis in plant leaves [J]. Arid Zone Research), 2018, 35(4): 929-37.
- [43] 郑清雷, 余陈静, 姚坤存, 等. 甘蔗Rieske Fe/S蛋白前体基因*ScPetC*的克隆及表达分析[J]. 作物学报(ZHENG Q L, YU C J, YAO K C, et al. Cloning and expression analysis of sugarcane Fe/S precursor protein gene *ScPetC* [J]. Acta Agronomica Sinica), 2020, 46(6): 844-57.
- [44] SCHMIDT C L, SHAW L. A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins [J]. J Bioenerg Biomembr, 2001, 33: 9-26.
- [45] FARQUHAR G D, VON CAEMMERER S, BERRY J A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species [J]. Planta, 1980, 149: 78-90.
- [46] WALTER J, KROMDIJK J. Here comes the sun: how optimization of photosynthetic light reactions can boost crop yields [J]. J Integr Plant Biol, 2022, 64(2): 564-91.
- [47] CHIDA H, NAKAZAWA A, AKAZAKI H, et al. Expression of the algal cytochrome c6 gene in *Arabidopsis* enhances photosynthesis and growth [J]. Plant Cell Physiology, 2007, 48(7): 948-57.
- [48] LEISTER D. Enhancing the light reactions of photosynthesis: strategies, controversies, and perspectives [J]. Mol Plant, 2023, 16(1): 4-22.
- [49] STEPPUHN J, ROTHER C, HERMANS J, et al. The complete amino-acid sequence of the Rieske FeS-precursor protein from spinach chloroplasts deduced from cDNA analysis [J]. Mol Genet, 1987, 210: 171-7.
- [50] SALTER A H, NEWMAN B J, NAPIER J A, et al. Import of the precursor of the chloroplast Rieske iron-sulphur protein by pea chloroplasts [J]. Plant Mol Biol, 1992, 20: 569-74.
- [51] ERMAKOVA M, WOODFORD R, TAYLOR Z, et al. Faster induction of photosynthesis increases biomass and grain yield in glasshouse-grown transgenic *Sorghum bicolor* overexpressing Rieske FeS [J]. Plant Biotechnol J, 2023, 21(6): 1206-16.
- [52] HEYNO E, ERMAKOVA M, LOPEZ-CALCAGNO P E, et al. Rieske FeS overexpression in tobacco provides increased abundance and activity of cytochrome b6f [J]. Physiol Plantarum, 2022, 174(6): e13803.