

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20150507

超表达杨树 RPEase 基因促进了拟南芥的生长发育

王丹 安轶 韩潇 周扬颜 王厚领 郭惠红 夏新莉 尹伟伦

(北京林业大学林木育种国家工程实验室)

摘要:卡尔文循环是光合作用 CO₂同化的重要途径,在植物生长发育过程中起着重要作用。磷酸核酮糖 3-差向异构酶(RPEase; EC 5.1.3.1)是卡尔文循环再生阶段的一种重要酶类。本文从速生欧美杂交黑杨 NE-19 中克隆得到 RPEase 基因,构建植物表达载体,利用农杆菌花序侵染法转化野生型和突变体拟南芥,通过普通 PCR 检测和绿色荧光蛋白(GFP)观测进一步鉴定得到 CaMV35S:PdRPE:GFP 超表达株系,然后对野生型、超表达株系、突变体和回补株系的生理指标进行测定。结果显示,超表达株系 RPEase 活性显著升高($P < 0.05$)。在正常浇水的生长条件下,超表达株系相比于其他 3 个株系(野生型、突变体、回补株系),气孔数目减少,气孔变大,提高了植物的水分利用效率以及净光合速率,使得超表达株系有更好的生长优势,积累更多的淀粉。在 10 d 的短期干旱条件下,超表达株系的净光合速率和水分利用效率依然显著高于其他 3 个株系($P < 0.01$)。因此,研究表明超表达 RPEase 基因会提高植物生物量的积累以及对短期干旱的抵抗能力。

关键词:杨树; 卡尔文循环; RPEase; 生长; 发育; 水分利用效率

中图分类号:S718.46; S792.11 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2016)05-0067-10

WANG Dan; AN Yi; HAN Xiao; ZHOU Yang-yan; WANG Hou-ling; GUO Hui-hong; XIA Xin-li; YIN Wei-lun. **Over-expression of RPEase gene promotes the growth and development of *Arabidopsis thaliana*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2016) 38 (5) 67–76 [Ch, 37 ref.] National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China.

The Calvin cycle is an irreplaceable pathway for photosynthetic organisms to assimilate CO₂ from the air and therefore plays a crucial role in plant growth and development. The ribulose-phosphate 3-epimerase (RPEase; EC 5.1.3.1) is one of the integral enzymes in the Calvin cycle regeneration phase. In our study *PdRPE* gene was cloned from fast-growing hybrid poplar NE-19 (*Populus nigra* × (*Populus deltoids* × *Populus nigra*)), and then *PdRPE* was transformed into *Arabidopsis thaliana* by the floral dip method. Using PCR and Green Fluorescent Protein (GFP) detection methods, we obtained the CaMV35S:*PdRPE*:GFP transgenic plants. Then we validated the growth status and physiological indexes of wild type (Col-0), overexpressing (Ox*PdRPE*), mutant (*rpe*) and complementary (*rpe/PdRPE*) lines. The results indicated that in overexpressing lines RPEase activity increased significantly ($P < 0.05$). When well-watered, the overexpressing lines had lower leaf stomatal density, larger stomatal size, improved water use efficiency and higher net photosynthetic rate, showing a better growth condition and more starch accumulation. When exposed to 10 days of short-term drought, the net photosynthetic rate and water use efficiency of overexpressing lines were still significantly higher than those of the other three strains ($P < 0.01$). Therefore, we reach the conclusion that over-expression of RPEase gene can promote the plant growth and development and enhance the resistance of short-duration drought in

收稿日期: 2015-12-28 修回日期: 2016-01-15

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划课题(2015BAD07B01)、国家自然科学基金项目(31270656)、北京市科学研究与研究生培养共建项目。

第一作者:王丹。主要研究方向:植物抗逆分子生物学。Email: summer1045@163.com 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学林木育种国家工程实验室。

责任作者:郭惠红,副教授。主要研究方向:植物发育生物学。Email: guohh@bjfu.edu.cn 地址:同上。夏新莉,教授,博士生导师。主要研究方向:植物抗逆分子生物学。Email: xiaxl@bjfu.edu.cn 地址:同上。尹伟伦,教授,博士生导师。主要研究方向:植物生理与生物技术。Email: yinwl@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

Arabidopsis thaliana.

Key words poplar; Calvin cycle; RPEase; growth; development; water use efficiency

当前世界人口不断增长,增加作物产量是植物生物学的核心挑战^[1]。地球上绝大多数的高等植物属于自养生物,它们通过光合作用进行碳同化制造有机物,满足自身生命所需的同时还能直接或间接作为人类或动物界的食物。提高光合作用是增加作物产量的重要途径^[2]。

卡尔文循环是自养生物光合作用固定同化 CO₂最重要的途径,卡尔文循环又被称为还原戊糖磷酸循环(reductive pentose phosphate cycle)。该循环存在于很多的原核生物和所有光合真核生物中,如最原始的藻类和最高等的被子植物。卡尔文循环有3个阶段:羧化、还原和再生阶段。羧化阶段:核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)羧化形成稳定的中间产物3-磷酸甘油酸(3-PGA);还原阶段:3-磷酸甘油酸(3-PGA)还原产生甘油醛-3-磷酸(G-3-P)以及一种碳水化合物;再生阶段:甘油醛-3-磷酸(G-3-P)再生为核酮糖-1,5-二磷酸,并作为CO₂的受体分子,继续在核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco:EC4.1.1.39)催化下固定空气中的CO₂。卡尔文循环利用光合作用的光反应产物ATP、NADPH,将大气中的CO₂固定进入碳骨架从而进行淀粉和蔗糖的生物合成^[3-4],即卡尔文循环中输出的磷酸丙糖被用来合成淀粉和蔗糖等。这对于植物的生长发育具有重要的作用^[5]。

1990年以来植物科学研究者利用代谢控制分析和反义转基因技术作为研究手段对卡尔文循环进行了探究^[6],得到了一些意想不到的发现。如利用植物基因反义表达使得到的转基因植株Rubisco蛋白水平降低,以此来验证Rubisco酶对于卡尔文循环的作用。结果表明,Rubisco酶对于卡尔文循环的限制主要是在高光强和高温的条件下表现明显^[6]。在Rubisco酶活性方面,当Rubisco反义植株生长在低光照(300 μmol/(m²·s))和氮素充足的条件下时,降低Rubisco酶活性对植株的生长并没有或者只有很小的影响,但当Rubisco酶活性低于野生型50%时,植株中淀粉和蔗糖的水平降低,茎根比增大;当Rubisco酶活性只保留20%时,反义植株的比叶面积增加^[7-8],所以说Rubisco酶活性的改变影响了植物碳同化产物的分配。

在很多条件下,降低在卡尔文循环中起重要作用的催化不可逆反应的酶类的活性,如降低甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和磷酸核酮糖激酶(PRK:EC 2.7.1.19)等酶活性对卡尔文循环碳同化影响

不大^[9]。如在低氮条件下,反义转基因烟草植株只有当PRKase的活性降低了94%时光合作用才有所降低^[10-11]。相比较而言,景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶(SBPase EC 3.1.3.37)活性小范围的降低就导致了卡尔文循环碳同化和生长的下降。当植株中SBPase活性小于野生型植株的20%时,植株中几乎检测不到淀粉生成^[12],说明SBPase在卡尔文循环中起重要的作用。SBPase在卡尔文循环中的相对重要性随植株的生长发育以及环境条件的改变而不同,这也说明了没有一种酶可以在任何条件下都限制卡尔文循环^[13-15]。

在卡尔文循环再生阶段中的磷酸核酮糖3-差向异构酶(RPEase: EC 5.1.3.1)也起着重要作用,但是目前对于该酶在卡尔文循环中是否具有限速作用尚未见到报道。我们从速生欧美杂交黑杨NE-19(*Populus nigra* × (*P. deltoids* × *P. nigra*))中克隆得到RPEase基因,对其功能进行研究,探索其对植物生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

试验中所用的欧美杂交黑杨品系为NE-19。取15 cm长茎段扦插,种植于北京林业大学苗圃,每3 d浇水1次。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型(WT)种子Columbia-0型保存于本实验室。T-DNA插入突变体rpe购于Arabidopsis Biological Resource Center,并利用PCR方法检测获得纯合体。拟南芥种子先用70%的酒精清洗60 s,然后用1%的NaClO清洗10 min,最后用灭菌蒸馏水清洗5遍^[16]。把消毒后的拟南芥种子播种于含有30 g/L蔗糖和7 g/L琼脂的1/2MS固体培养基上。将其放在4 °C春化2 d后移入培养间,16 h/8 h光照条件下培养。发芽后生长10 d移入土中继续培养。试验中所用大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态Top 10购于北京博迈德基因技术有限公司。所用根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)为GV3101菌株,植物表达载体为本实验室改造的pBI121-GFP载体。

1.2 表达载体的构建及农杆菌转化

根据毛果杨(*Populus trichocarpa*)基因库中的RPE基因同源序列,设计克隆引物PdRPEs(5'-ATGTCAACAGCACTAGCAGCATCAG-3')和PdRPEa(5'-AACTGCCACTGCCTCTGGCCT-3')。用RN38 EASYspin plus植物RNA快速提取试剂盒(Aidlab

Biotech, Beijing, China) 提取黑杨 NE-19 叶片中总 RNA, 第一链 cDNA 的合成是用 First-strand cDNA 第一链合成试剂盒 (Promega, Madison, WI, USA), 按照生产商的说明进行操作, 反转得到 cDNA。利用 RPEs 和 RPEa 引物克隆得到 *RPE* 的 CDS。将该基因插入 pBI121-GFP 表达载体上, 转化农杆菌感受态, 利用花序侵染法^[17] 转化野生型拟南芥和 *RPE* 基因突变体, 得到 CaMV35S: PdRPE: GFP 和 *rpe*/PdRPE 转基因植株。种子播种在含有 50 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 筛选培养基上, 筛选得到 T3 代纯合体植株, 用于形态学观察及分析。

1.3 转基因植株的 PCR 及 GFP 定位

用 DN14 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (Aidlab Biotech, Beijing, China) 提取野生型和转基因拟南芥的基因组 DNA, 以 35 s (AGATTAGCCTTTCAATTCAGA) 和 GFPa (TTACTTGTAC-AGCTCGTCCA) 作为上下游引物进行 PCR 反应, 以带有表达载体的农杆菌作为阳性对照, 野生型植株为阴性对照。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。利用激光共聚焦显微镜 (DMI6000 CS; Leica, Wetzlar, Germany) 观察转基因植株的 GFP 融合蛋白的亚细胞定位, 同时进一步确定是否为转基因植株。

1.4 各株系生长状况测定试验

1.4.1 株系间叶面积比较试验

种子发芽后 10 d 移栽到土中, 在正常浇水的条件下生长 3 周, 用数码相机拍摄野生型、超表达株系、突变体和回补株系的地上莲座部分的图片, 每个株系设置 3 个重复。用 ImageJ software (Version 1.42; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 分析并根据比例计算叶面积。

1.4.2 在正常和胁迫条件下的根长试验

为了比较正常条件和干旱胁迫条件对拟南芥根长的影响, 把野生型 (Col-0)、超表达 (OxPdRPE)、突变体 (*rpe*)、回补 (*rpe/pdRPE*) 4 个株系播种在分别含有 0、100、200 和 300 mmol/L 甘露醇的 1/2MS 培养基上, 春化 2 d 后转入 16 h/8 h 光照条件下竖直培养。设置 3 个重复, 得到的测量数据通过单因素方差分析法 (One Way ANOVA) 进行统计分析, 下同。

1.4.3 株高试验

拟南芥发芽后 10 d, 移入土中, 在正常浇水的条件下生长到 19 d, 分别选取野生型、超表达株系、突变体和回补株系进行拍照并测量株高。对测量数据进行统计分析。

1.5 各项生理指标的测定试验

1.5.1 光合参数测定和瞬时水分利用效率分析方法

在正常浇水的条件下, 拟南芥移入土中 2 周后进行第 1 次的光合数据的测量。测量选取完全展开的成熟叶片。测量仪器为产于美国的 Licor-6400 光合便携仪, 所有的测量均在 09:00—11:00 之间完成, 环境 CO₂ 浓度为 380~400 μmol/mol, 室内温度为 (24 ± 1) °C。测定的主要光合参数为净光合速率 (P_n)、蒸腾速率 (T_r) 并利用 P_n 、 T_r 计算瞬时水分利用效率 (WUE_i), 其中 $WUE_i = P_n/T_r$ 。之后的光合数据测定方法同上。

1.5.2 淀粉含量的测定

用淀粉试剂盒 (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) 测定拟南芥叶片中的淀粉含量, 具体的操作方法按生产厂商的说明进行。

1.5.3 RPEase 活性试验

正常浇水的条件下, 生长 25 d 的拟南芥, 选取无变色, 无病虫害的植株叶片, 清洗, 晾干后称取鲜质量。然后将叶片放在研钵中, 液氮快速研磨至粉碎。匀浆比例按照 10% 比例配制, 按照 0.1 g 叶片鲜质量加 900 μL PBS 溶液 (pH = 7.4 浓度为 0.01 mol/L)。充分震荡, 4 000 r/min, 4 °C 离心 15~30 min, 取上清, 用于后续试验。根据双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA) 原理^[18], 往预先包被磷酸核酮糖 3-差向异构酶 (RPEase) 抗体的包被微孔中, 依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体, 经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色, TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的磷酸核酮糖 3-差向异构酶 (RPEase) 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品浓度。

1.5.4 气孔密度及气孔大小的测定

用打孔器取正常浇水条件下的野生型、超表达株系、突变体和回补株系完全展开叶片的叶圆片, 样品的处理参考 Cao^[19] 等人。样品首先浸泡在气孔开放缓冲液中 10 h, 然后用 pH 7.2 的磷酸缓冲液清洗 3 次, 清洗后在 0~4 °C 条件下用 25% 的戊二醛前固定 24 h, 之后用梯度为 30%、50%、70%、85%、95%、100% 的乙醇脱水, 每一级脱水时间为 15 min, 期间适当摇动。然后将叶圆片分别用醋酸异戊酯: 乙醇为 1:1 和 100% 的醋酸异戊酯处理 10 min, 最后在 4 °C 用叔丁醇覆盖过夜, 干燥后用扫描电镜观察拍照。得到的图片用 ImageJ software (Version 1.42; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 分析, 根据标尺比例计算气孔的密度以及气孔的大小。

2 结果与分析

2.1 *PdRPE* 基因的克隆、表达载体的构建以及转基因植株的 PCR 检测

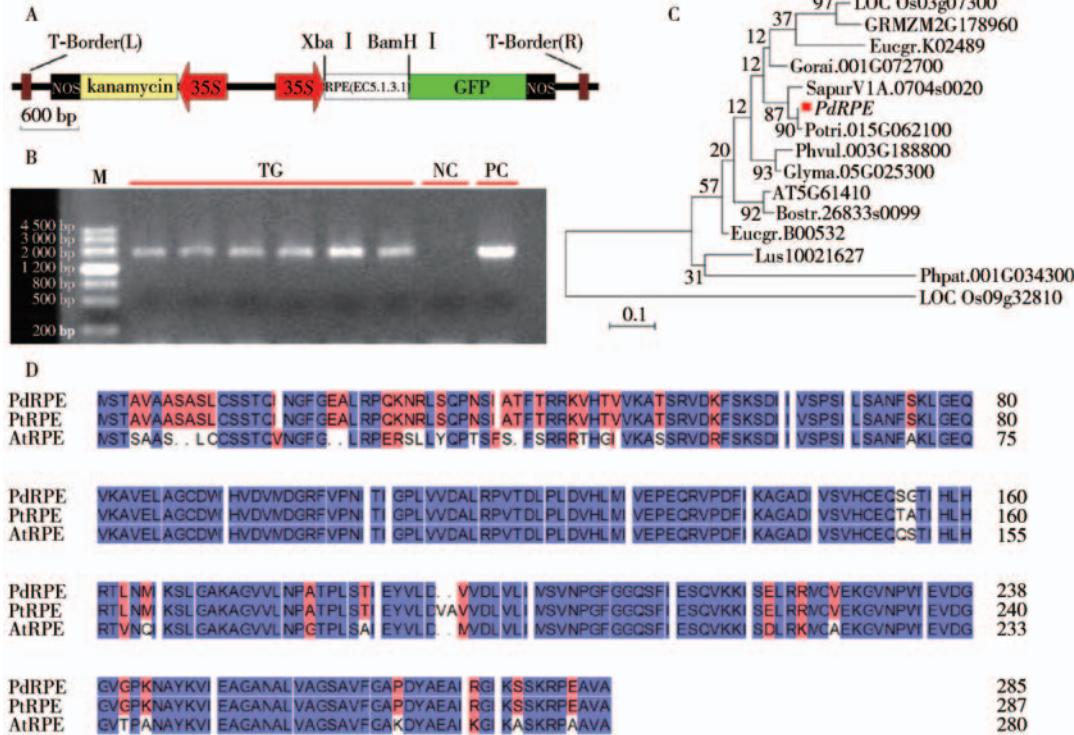
为了进一步验证该基因的功能,构建了 *PdRPE* 基因的表达载体 CaMV35S:PdRPE:GFP(图 1A),并且用来转化野生型及 *rpe* 突变体拟南芥,分别得到超表达株系和回补株系。在得到的转化株系中选取长势较好的 3 个转基因株系(OxPdRPE 1, OxPdRPE 2, OxPdRPE 3)和一个回补株系(*rpe/PdRPE*)来做进一步的研究。

超表达植株 PCR 检测进一步确定得到转基因植株(图 1B)。

2.2 *PdRPE* 基因家族进化分析

选取 15 种植物的 *RPE* 基因编码氨基酸序列,分别为毛果杨(*Populus trichocarpa*, Potri. 015G062100)、水稻(*Oryza sativa*, LOC_Os09g32810、LOC_Os03g07300)、巨尾桉(*Eucalyptus*

grandis, Eucgr. B00532、Eucgr. K02489)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AT5G61410)、红皮柳(*Salix purpurea*, SapurV1A. 0704s0020)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*, Phpat. 001G034300)、十字花科(*Boechera stricta*, Bostr. 26833s0099)、雷蒙德氏棉花(*Gossypium raimondii*, Gorai. 001G072700)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*, Phvul. 003G188800)、大豆(*Glycine max*, Glyma. 05G025300)、亚麻(*Linum usitatissimum*, Lus10021627)、玉米(*Zea mays*, GRMZM2G178960)。用 Clustal X 软件进行序列比对,然后用 MEGA 6.0 软件,选择最大似然法(maximum likelihood),绘制分子进化树(图 1C)。欧美杨 *PdRPE* 基因与毛果杨 *PtRPE*(Potri. 015G062100)基因的同源性最高,且欧美杨 *PdRPE* 氨基酸与毛果杨 *PtRPE* 氨基酸的序列比对显示两者只有少数氨基酸存在差异(图 1D)。这也与欧美杨和毛果杨同源关系较近,在进化上相对保守相一致。此外, *PdRPE* 氨基酸与 *AtRPE* 氨基酸序列比对



A. CaMV35S:PdRPE:GFP 植物表达载体构建; B. 超表达植株 PCR 检测(TG: transgenic gene; NC: negative control; PC: positive control); C. *PdRPE* 与其他物种 RPE 蛋白的分子进化树, 红点表示所研究的黑杨 *PdRPE*。D. 黑杨与毛果杨以及拟南芥 RPE 蛋白序列比对, 蓝色表示相同的序列。A. Construction of CaMV35S:*PdRPE* expression vector; B. The PCR detection of over-expression plants (TG: transgenic gene; NC: negative control; PC: positive control); C. Molecular phylogenetic tree of *PdRPE* compared with other species. The red dots indicated the gene we studied; D. Comparison of RPE proteins between *Populus deltoids*, *P. trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana*. The blue indicated the same sequence.

图 1 CaMV35S:PdRPE:GFP 植物表达载体构建、超表达植株 PCR 检测、*PdRPE* 与其他物种 RPE 的分子进化树、黑杨与毛果杨以及拟南芥 RPE 蛋白序列比对

Fig. 1 Construction of CaMV35S:PdRPE:GFP expression vector, the PCR detection of over-expression plants, molecular phylogenetic tree of *PdRPE* compared with other species, comparison of RPE proteins between *Populus deltoids*, *P. trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana*

显示,两者也具有较高的同源性。

2.3 GFP 亚细胞定位

为了进一步验证PdRPE蛋白的亚细胞定位,利

用激光共聚焦显微镜观察转基因株系。结果表明,PdRPE-GFP融合蛋白主要作用在转基因植株叶绿体中(图2)。

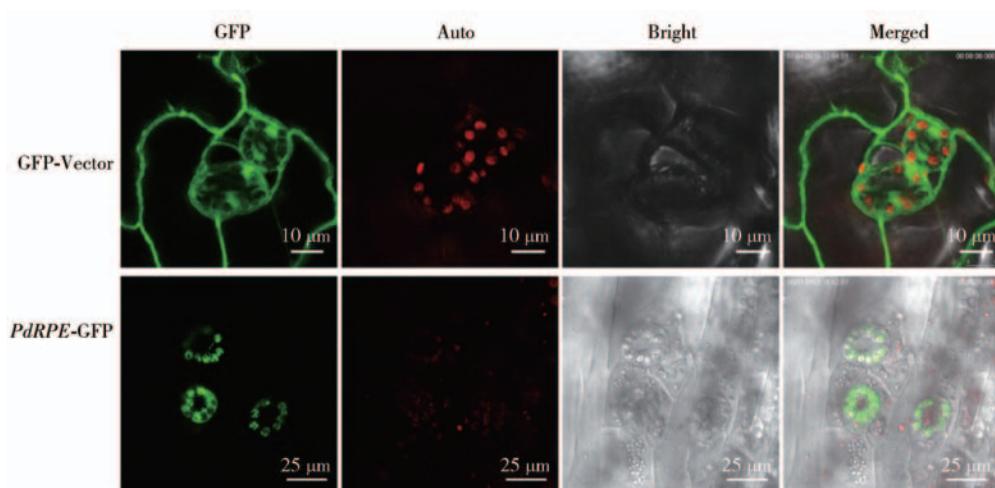


图2 超表达拟南芥植株叶片 GFP 检测及亚细胞定位

Fig. 2 Detection and subcellular localization of CaMV35S:PdRPE:GFP expression in *Arabidopsis thaliana* leaf cells

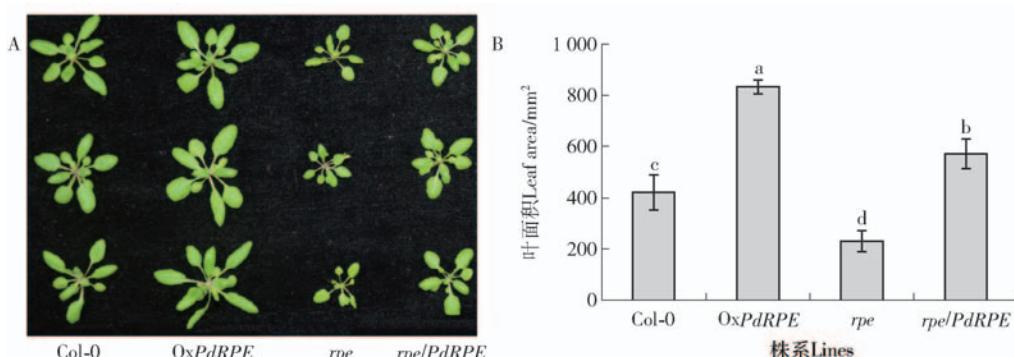
2.4 各株系生长状况

2.4.1 叶面积比较

在正常浇水的条件下超表达株系的叶面积与突变体、野生型以及回补株系都存在极显著的差异(图3A、3B)($P < 0.01$,下同)。超表达株系的叶面积最大,平均值为 833 mm^2 ,是野生型的1.9倍,突变体的叶面积最小。

2.4.2 根长测定

试验在4种不同处理条件下,超表达植株根系的生长优于野生型、突变体和回补株系。在1/2MS和1/2MS+200 mmol/L甘露醇生长条件下,超表达株系的根长都极显著高于野生型、突变体和回补株系(图4),超表达株系的根长分别是野生型和突变体的1.7、2倍和1.6、2.1倍。



A. 4个株系的叶面积比较,野生型(Col-O)、超表达(OxPdRPE)、突变体(rpe)及回补(rpe/pdRPE),下同; B. 4个株系的叶面积统计。4个株系间不同字母表示在 $P < 0.01$ 水平上差异极显著,相同字母表示差异不显著。

A. Comparison of leaf area between the four lines, wild type (Col-O)、overexpressing (OxPdRPE)、mutant (rpe) and complementary (rpe/pdRPE), the same below; B. Statistics of leaf area between the four lines. Different letters in the four strains mean significant difference at $P < 0.01$, while same letters mean insignificant difference.

图3 4个株系叶面积的比较

Fig. 3 Comparison of leaf area between the four lines

2.4.3 株高的测定

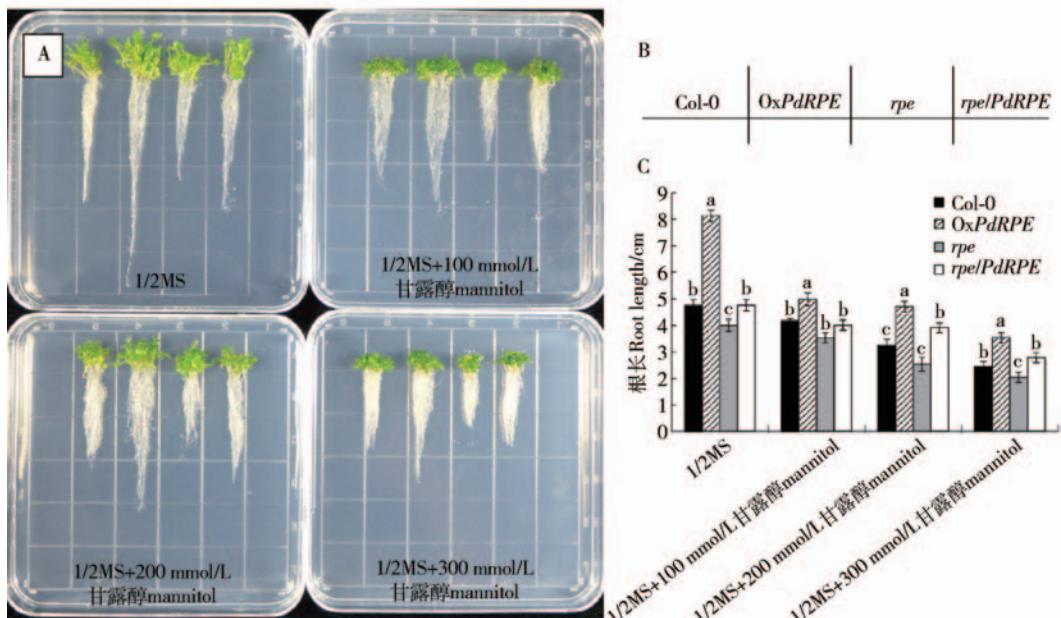
如图5所示,在正常浇水的条件下,超表达株系在拔节期的早期(19~25 d)茎的平均伸长率比野生型、突变体和回补株系高。在拔节期的中后期(25~31 d),先是野生型、回补株系表现出较高的茎伸长率,最后突变体平均茎伸长率较高(图5D)。超表达株系的株高最终达到27 cm,明显高于野生

型、突变体、回补株系(图5A、5B),其中突变体株高最小(图5C)。这表明超表达株系生长速率比野生型、突变体、回补株系更快。

2.5 各项生理指标测定

2.5.1 净光合速率测定

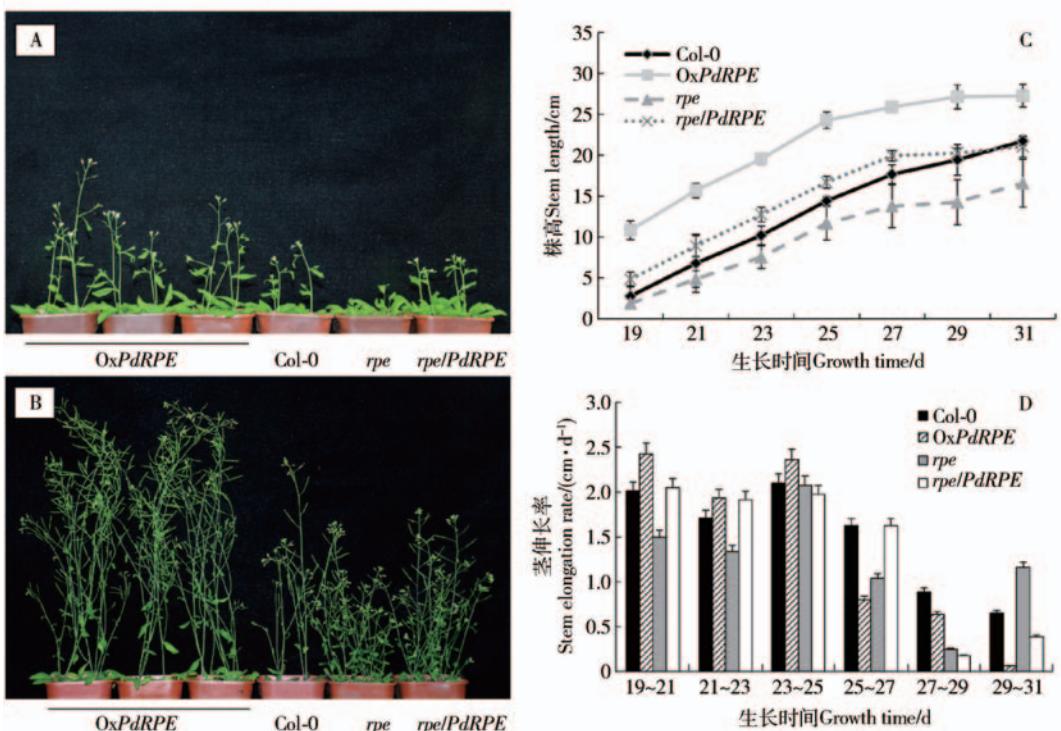
在正常浇水和干旱10 d的条件下,超表达株系的净光合速率都显著的高于野生型、突变体以及



A. 0、100、200 和 300 mmol/L 甘露醇处理条件下 4 个株系的根长; B. 图 4A 中 4 个株系的位置图例; C. 0、100、200 和 300 mmol/L 甘露醇处理条件下 4 个株系的根长统计。A. Root length of 0, 100, 200 and 300 mmol/L mannitol treatment between the four lines; B. Position of the four lines in Fig. 4A; C. Statistics of 0, 100, 200 and 300 mmol/L mannitol treatment between the four lines.

图 4 4 个株系在不同甘露醇处理条件下根长的比较

Fig. 4 Comparison of root length between the four lines under different mannitol treatments



A. 正常生长 19 d 拟南芥的株高; B. 正常生长 31 d 拟南芥的株高; C. 株高统计; D. 19~31 d 生长期茎伸长率统计。A. Stem length of 19 d normal grown; B. Stem length of 31 d normal grown; C. Statistics of stem length; D. Statistics of plant average stem elongation rate in the time course of growth.

图 5 4 个株系株高的比较

Fig. 5 Comparison of stem length of the four lines

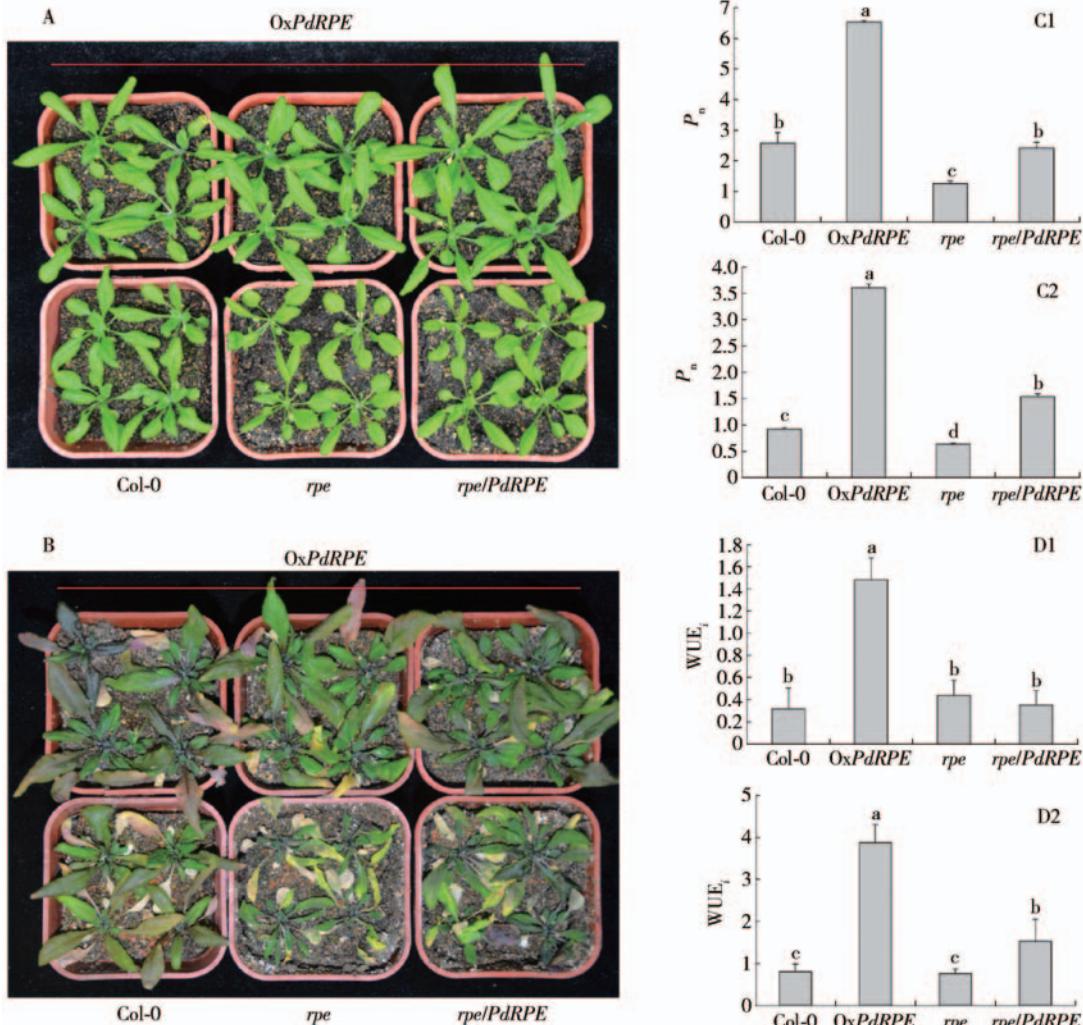
回补株系,超表达株系的净光合速率分别为 6.5、3.6 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 分别是野生型的 2.5 和 3.9 倍

(图 6A、6B、6C)。结果说明,超表达 *PdRPE* 基因可以明显增强植株的净光合速率。

2.5.2 水分利用效率

在正常浇水和干旱10 d的条件下,超表达株系的瞬时水分利用效率都极显著高于野生型、突变体以及回补株系。但在正常浇水的条件下野生型、突变体以及回补株系之间没有显著差异;这是由于野生型及回补株系的蒸腾速率较高,使得其瞬时水

利用效率与突变体差异不明显。在干旱了10 d后,回补株系的瞬时水分利用效率显著高于野生型和突变体;这可能与在干旱条件下回补株系有更高的净光合速率有关。在干旱前后超表达株系水分利用效率分别是野生型的4.6和4.8倍(图6)。



A. 正常生长14 d; B. 干旱10 d; C. 正常条件下(C1)和干旱10 d时(C2)的净光合速率;D. 正常条件下(D1)和干旱10 d时(D2)的水分利用效率。A. 14 days of normal growth; B. 10 days of drought treatment; C. The net photosynthetic rate in normal condition (C1) and in drought condition (C2) for 10 days; D. The water-use efficiency in normal condition (D1) and in drought condition (D2) for 10 days.

图6 干旱处理条件下4个株系的净光合速率和水分利用效率

Fig. 6 Net photosynthetic rate and water-use efficiency of the four lines under drought stress

2.5.3 淀粉含量的测定

在正常浇水的条件下,超表达株系的淀粉含量为59.4 μg/g,达到了野生型的3.6倍(图7A),突变体植株的淀粉含量最少。表明超表达PdRPEase基因的拟南芥能积累更多的碳水化合物,有利于植物的生长。

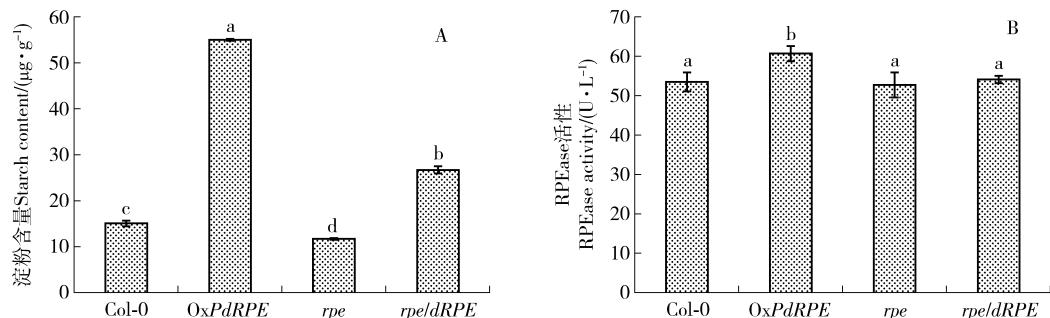
2.5.4 PdRPEase活性

在正常生长的条件下,超表达株系的RPEase活

性显著高于其他3个株系(图7B)。

2.5.5 叶片气孔数目及气孔大小的测定

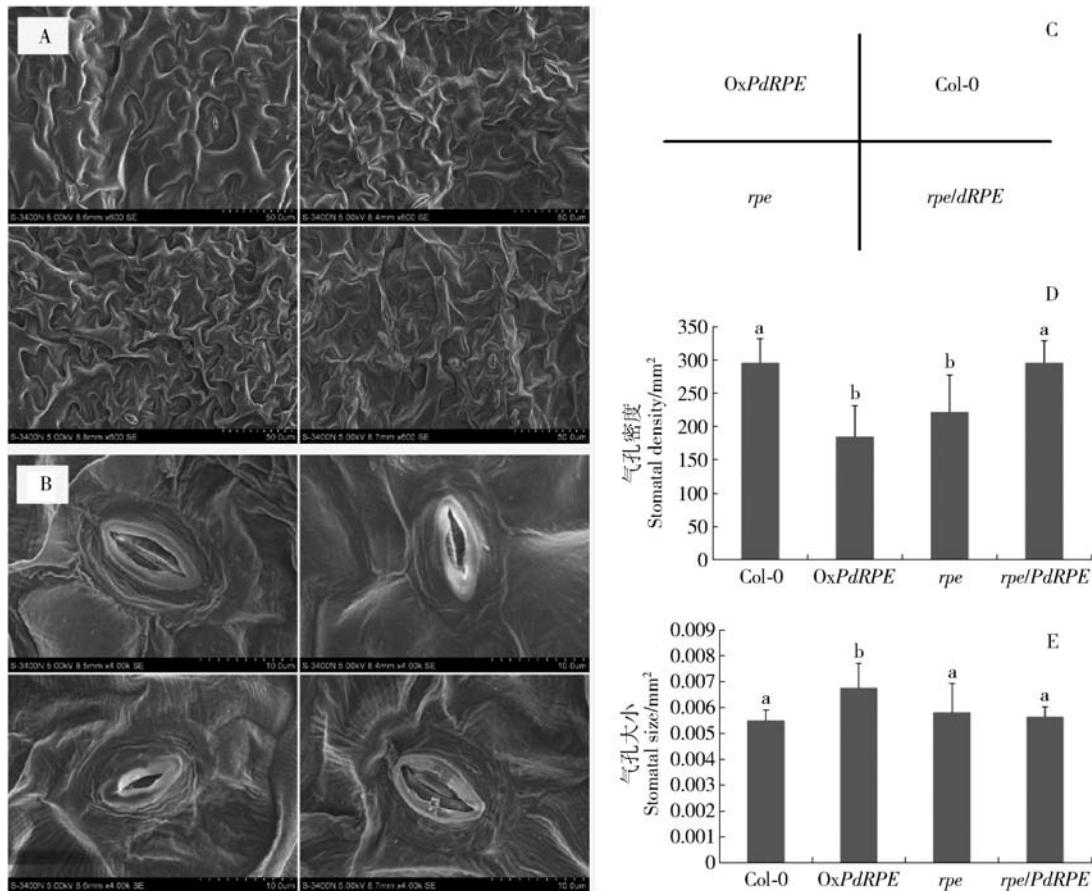
图8结果显示,超表达株系叶片远轴面单位气孔数最少,其平均值为185个/mm²,与野生型和回补株系相比较存在显著的差异(图8A、8D)。对于气孔的大小而言,在远轴面超表达株系的气孔面积最大,与野生型、突变体、回补株系存在显著的差异(图8B、8E)。



A. 正常生长条件下淀粉含量统计；B. 正常生长条件下 RPEase 活性统计。在图 7A 中,4 个株系间不同字母表示在 $P < 0.01$ 水平上差异极显著, 相同字母表示差异不显著。在图 7B 中,4 个株系间不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, 相同字母表示差异不显著。A. Statistics of starch content under normal growth; B. Statistics of RPEase activity under normal growth. In Fig. 7A, different letters in the four strains mean significant difference at $P < 0.01$, while same letters mean insignificant difference. In Fig. 7B, different letters in the four strains mean significant difference at $P < 0.05$, while same letters mean insignificant difference.

图 7 正常生长条件下 4 个株系淀粉含量以及 RPEase 活性的比较

Fig. 7 Comparison of starch content and RPEase activity between the four lines under normal growth



A. 正常生长条件下 4 个株系的气孔密度；B. 正常生长条件下 4 个株系的气孔大小；C. 图 8A 和图 8B 中 4 个株系的位置图例；D. 正常生长条件下 4 个株系的气孔密度统计；E. 正常生长条件下 4 个株系的气孔大小统计。A. Leaf stomatal density of the four lines under normal growth; B. Leaf stomatal size of the four lines under normal growth; C. Position of the four strains in Fig. 8A and Fig. 8B; D. Statistics of leaf stomatal density of the four lines under normal growth; E. Statistics of leaf stomatal size of the four lines under normal growth.

图 8 正常生长条件下 4 个株系远轴端气孔的密度和大小

Fig. 8 Leaf stomatal density and stomatal size of the abaxial leaf epidermis among the four lines under normal growth

3 结论与讨论

欧美杂交黑杨是中纬度地区最适合的短轮伐期工业用材集约经营树种之一^[20],因其具有速生的特点,近年来我国引进了许多优良的欧美杨无性系用于营造大面积的速生丰产林,并已取得很好的经济效益。Hao 等人^[21]对 2 种不同基因型的欧美杨无性系 NE-19 和 DN2 进行研究,通过基因芯片分析发现了一些与速生相关的差异基因。在这些基因中,RPEase 基因在具有较快生长速率并且较高光合能力的速生杨树中表现出明显的上调。因此本研究在速生欧美杨 NE-19 品系中克隆得到 RPEase 基因,转化模式植物拟南芥得到转基因植株,并进行了一系列关于生长发育方面的研究。

结果表明,超表达植株具有更加明显的生长优势,体现在更大的叶面积和在正常及逆境胁迫下更发达的根系上;并且生长速度快,株高更高,能更早地形成成熟植株。卡尔文循环的意义在于积累植物生命所需的有机物。超表达株系的淀粉含量显著的高于其他 3 个株系,达到了野生型的 3.6 倍,进一步说明了超表达 RPEase 基因对卡尔文循环起到了促进作用,有利于磷酸丙糖的形成,增加了碳水化合物的含量。形成的磷酸丙糖可用于叶绿体中淀粉和胞质中蔗糖的合成,而蔗糖可以分配到其他异养器官中,进行后续的代谢或者转化为储存物质,如淀粉等^[22]。

提高植物水分利用效率是对蓝色革命的积极响应^[23],在较干旱的环境条件下提高植物的水分利用效率能够提高产量并且减少水分散失^[24-25]。Timothy^[26]通过对 EPF(epidermal patterning factor)突变体和超表达拟南芥植株的研究发现,EPF 影响植物的气孔密度及气孔大小,并且气孔密度和气孔大小呈负相关,而植株的大小又和气孔密度呈负相关。其研究表明,在 $4\text{140 mg/m}^3\text{CO}_2$ 条件下,当拟南芥气孔密度减小而气孔增大时,植物的蒸腾作用降低,生物量的积累增加,有利于植株的生长,也增强了植物对于水分亏缺环境的抵抗力。本研究中超表达植株气孔密度降低,降低了水分蒸腾,从而提高了植株的水分利用效率。并且其净光合速率也比其他 3 个株系更高。也有研究显示,很多植物不论是进行 C₃还是 C₄循环,气孔密度的适度减小不会降低植物的光合速率^[27],而非气孔因素如 RuBP 的再生速率对其影响较大^[28],因此超表达株系比其他 3 个株系有更高的净光合速率。

SBPase 和 PRKase 同样在卡尔文循环的再生阶段起作用。已有研究表明,增强 SBPase 的活性促进了转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)的光合作用和生

长^[29-30],同样的在转基因水稻中也增强了植物的光合能力以此抵抗逆境胁迫^[31-32]。也有研究表明在反义转基因的烟草中,PRKase 活性比野生型减少 94% 时,低氮条件下($0.4 \text{ mmol/L NH}_4\text{NO}_3$)植物叶片的光合降低了 50%,植物整体的光合降低了 35%;而在高氮条件下($5 \text{ mmol/L NH}_4\text{NO}_3$)植物的光合降低了约 20%^[11]。本试验对不同的株系进行 RPEase 酶活性的测定,超表达植株 RPEase 活性显著的高于其他 3 个株系,且突变体活性最低。说明超表达 RPEase 基因导致了 RPEase 活性的升高,也进一步说明了,本研究中 RPEase 的活性影响了植物的生长发育、光合速率以及生物量的积累。

本研究中确定了 RPEase 定位在拟南芥的叶绿体中,参与卡尔文循环的再生阶段,促进了拟南芥的光合作用,提高了水分利用效率,使得拟南芥的生物量积累有所增加,并体现在了更好的生长优势上,也因为有更好的生长优势所以超表达拟南芥可以比其他的株系更能抵抗短期干旱。这些研究对于增加作物产量和抵抗短期干旱也有重要的指导意义,并且我们在杨树中的同期工作也在进行。

而且随着多酶复合体在动物以及微生物中的研究^[33-35],卡尔文循环中多酶形成的复合体也被发现^[36-37],多酶复合体与类囊体膜相结合使得代谢物通道更加通畅。RPEase 作为单一酶或者多酶复合体的形式对植物的意义有待更多探索。总的来说,超表达 RPEase 基因对促进植物的生长,增加其生物量的积累有重要的意义,也使得植株对短期的干旱有更强的抵抗力,因此对于增加作物的产量有积极作用。

参 考 文 献

- [1] EDGERTON M D. Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel [J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 7-13.
- [2] BLACK C C, BURRIS R H. CO₂ metabolism and plant productivity [M]. Baltimore: University Park Press, 1976: 31-41.
- [3] ANDREW E W, BERRY J A. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants [J]. Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology, 2003, 39(1): 533-594.
- [4] SERVAITES J C, GEIGER D R. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by metabolites [J]. Journal of Experimental Botany, 1995, 46(290): 1277-1283.
- [5] RAINES C A. The Calvin cycle revisited [J]. Photosynthesis Research, 2003, 75(1): 1-10.
- [6] STITT M T, SCHULZE D. Does rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth: an exercise in molecular ecophysiology [J]. Plant Cell & Environment, 1994, 17(5): 465-487.
- [7] QUICK W P, STITT M. Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" rbcS 4: Impact on photosynthesis in conditions of altered nitrogen supply [J]. Planta, 1992, 188(1): 522-531.

- [8] FICHTNER K, QUICK W P, SCHULZE E D, et al. Decreased ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" rbcS 5: Relationship between photosynthetic rate, storage strategy, biomass allocation and vegetative plant growth at three different nitrogen supplies[J]. *Planta*, 1993, 190(1): 1-9.
- [9] STITT M, LUNN J, USADEL B. *Arabidopsis* and primary photosynthetic metabolism-more than the icing on the cake [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(6): 1067-1091.
- [10] BANKS F M, SCOLL S P, PARRY M A J, et al. Decrease in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: Relationship between photosynthesis, growth, and allocation at different nitrogen levels[J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(3): 1125-1136.
- [11] HABASH D Z, PARRY M A J, PARMAR S, et al. The regulation of component processes of photosynthesis in transgenic tobacco with decreased phosphoribulokinase activity [J]. *Photosynthesis Research*, 1996, 49(2): 159-167.
- [12] RAINES C A, HARRISON E P, OLCER H, et al. Investigating the role of the thiol-regulated enzyme sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase in the control of photosynthesis [J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 110(3): 303-308.
- [13] HARRISON E P, WILLINGHAM N M, LLOYD J C, et al. Reduced sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation[J]. *Planta*, 1998, 204(1): 27-36.
- [14] OLCER H, LLOYD J C, RAINES C A. Photosynthetic capacity is differentially affected by reductions in sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase activity during leaf development in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(2): 982-989.
- [15] HARRISON E P, OLCER H, LLOYD J C, et al. Small decreases in SBPase cause a linear decline in the apparent RuBP regeneration rate, but do not affect Rubisco carboxylation capacity [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(362): 1779-1784.
- [16] HAN X, TANG S, AN Y, et al. Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(14): 4589-4601.
- [17] BECHTOLD N, JOLIVET S, VOISIN R, et al. The endosperm and the embryo of *Arabidopsis thaliana* are independently transformed through infiltration by agrobacterium tumefaciens[J]. *Transgenic Research*, 2003, 12(4): 509-517.
- [18] REEN D. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Methods in Molecular Biology*, 1998, 27(1): 816-819.
- [19] CAO W, LIU J, HE X. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 707-719.
- [20] 赵凤君, 高荣孚, 沈应柏, 等. 水分胁迫下美洲黑杨不同无性系间叶片($\delta^{13}\text{C}$)和水分利用效率的研究[J]. *林业科学*, 2005, 41(1): 36-41.
- ZHAO F J, GAO R F, SHEN Y B, et al. A study on foliar carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) and water use efficiency of different *Populus deltoides* clones under water stress [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2005, 41(1): 36-41.
- [21] SHUANG H, TENG Z, XIA X, et al. Genome-wide comparison of two poplar genotypes with different growth rates [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76(6): 575-591(17).
- [22] 宋纯鹏, 王学路, 周云, 等. 植物生理学 [M]. 5 版. 北京: 科学出版社, 2015.
- SONG C P, WANG X L, ZHOU Y, et al. *Plant physiology* [M]. 5 ed. Beijing: Science Press, 2015.
- [23] 杨建伟, 梁宗锁, 韩蕊莲, 等. 不同土壤水分含量对4个树种WUE的影响[J]. *西北林学院学报*, 2004, 19(1): 9-13.
- YANG J W, LIANG Z S, HAN R L, et al. Water use efficiency of four species under the different soil water content [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2004, 19(1): 9-13.
- [24] SLATYER R O. Efficiency of water utilization by arid zone vegetation[J]. *Annals of Arid Zone*, 1964, 3: 1-12.
- [25] SINCLAIR T R, TANNER C B, BENNETT J M. Water-use efficiency in crop production[J]. *Bioscience*, 1984, 34(1): 36-40.
- [26] TIMOTHY D A, LEE H, FRANKS P J, et al. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth CO₂ gradient[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 367(1588): 547-55.
- [27] BACSO R, JANDA T, GALIBA G, et al. Restricted transpiration may not result in improved drought tolerance in a competitive environment for water[J]. *Plant Science*, 2008, 174(2): 200-204.
- [28] FARQUHAR G D, SHARKEY T D. Stomatal Conductance and Photosynthesis[J]. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 2003, 33(4): 317-345.
- [29] MIYAGAWA Y, TAMOI M, SHIGEOKA S. Overexpression of a cyanobacterial fructose-1, 6-/sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(10): 965-969.
- [30] STEPHANE L, TRACY L, ZAKHLENIUK O V, et al. Increased sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(1): 451-460.
- [31] FENG L, HAN Y, LIU G, et al. Overexpression of sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase enhances photosynthesis and growth under salt stress in transgenic rice plants [J]. *Functional Plant Biology*, 2007, 34(9): 822-834.
- [32] FENG L, WANG K, LI Y, et al. Overexpression of SBPase enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plants. [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(9): 1635-1646.
- [33] SRERE P A. The infrastructure of the mitochondrial matrix[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1980, 5(5): 120-121.
- [34] OVADI J. Old pathway-new concept: control of glycolysis by metabolite-modulated dynamic enzyme associations. [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1988, 13(12): 486-490.
- [35] KELETI T, OVADI J, BATKE J. Kinetic and physico-chemical analysis of enzyme complexes and their possible role in the control of metabolism. [J]. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 1989, 53(2): 105 - 152.
- [36] NOORT V, WILDMAN S G. Proteins of green leaves. ix. Enzymatic properties of fraction-I protein isolated by a specific antibody[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1964, 90: 309-17.
- [37] MENDIOLA L, AKAZAWA T. Partial purification and the enzymatic nature of fraction I protein of rice leaves[J]. *Biochemistry*, 1964, 3(2): 174-179.