

毛竹早期光诱导蛋白基因克隆及功能分析

娄永峰¹, 高志民²

(1. 江西省林业科学院 江西省植物生物技术重点实验室, 江西 南昌 330032; 2. 国际竹藤中心 竹藤资源基因科学与基因产业化研究所 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: 【目的】探究早期光诱导蛋白 (ELIP) 基因在竹子光保护中的作用, 为进一步阐述竹子光保护机制提供参考依据。

【方法】以毛竹 *Phyllostachys edulis* 实生苗为材料, 在前期研究的基础上克隆毛竹 ELIP 基因, 利用 qRT-PCR 技术研究其在不同光照诱导下的表达谱, 同时通过在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中异位表达对 1 个基因的功能进行初步鉴定。

【结果】克隆获得了 3 个毛竹 ELIP 基因 (*PeELIP1*、*PeELIP2* 和 *PeELIP3*), 分别编码 165、179 和 182 个氨基酸。蛋白结构分析表明: 3 个 *PeELIPs* 蛋白均具有典型的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白功能域, 含 3 个 α -螺旋跨膜结构, 属于叶绿素 a/b 结合蛋白超家族。序列比对及进化分析表明: *PeELIPs* 与水稻 *Oryza sativa*、玉米 *Zea mays* 等单子叶植物的 ELIPs 相似性较高, 同源性达 72% 以上, 聚类在同一分支。qRT-PCR 分析表明: 3 个 *PeELIPs* 基因在毛竹黄化苗中仅检测到微弱表达, 光照处理使 3 个基因的表达量均显著上调; 同时在正常毛竹实生苗叶片中, 随着光照强度的增强和强光胁迫处理时间的延长, 3 个 *PeELIPs* 基因的表达量都显著上调。过表达 *PeELIP3* 可减缓转基因拟南芥在强光下 F_v/F_m 的下降幅度, 但未影响转基因植株的非光化学猝灭系数。【结论】毛竹中至少存在 3 个 *PeELIPs*, 且其表达均受光照的诱导。过量表达 *PeELIP3* 能够减缓转基因拟南芥受光抑制的程度, 具有一定的光保护作用。图 8 表 1 参 40

关键词: 毛竹; 早期光诱导蛋白基因; 表达分析; 光保护

中图分类号: S722.3; Q781 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)01-0093-10

Cloning and functional analysis of early light induced protein genes of *Phyllostachys edulis*

LOU Yongfeng¹, GAO Zhimin²

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Plant Biotechnology, Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, Jiangxi, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration / Beijing for Bamboo & Rattan Science and Technology, Institute of Gene Science and Industrialization for Bamboo and Rattan Resources, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: [Objective] With an exploration of the role of early light induced proteins (ELIPs) in photoprotection of bamboo, this study is aimed at providing reference for the further elucidation of the photoprotective mechanism in bamboo. [Method] The ELIP genes were isolated from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves using qRT-PCR before an analysis was conducted of their expression profiles under different light conditions employing qRT-PCR and the function of one ELIP gene was initially validated by ectopic expression in *Arabidopsis thaliana*. [Result] All the three ELIP genes (*PeELIP1*, *PeELIP2* and *PeELIP3*) isolated from moso bamboo, with 165, 179 and 182 amino acids encoded respectively have the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein domain that consists of three α -helices transmembrane domains, indicating that they belonged with the chlorophyll a/b binding protein superfamily. As was shown in the

收稿日期: 2020-03-26; 修回日期: 2020-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31971736, 31370588)

作者简介: 娄永峰, 从事林木遗传育种研究。E-mail: louyf1983@163.com。通信作者: 高志民, 研究员, 从事竹藤生长发育的分子基础研究。E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

phylogenetic analysis, *PeELIPs* were closely related to the *ELIPs* from monocotyledonous plants including *Oryza sativa* and *Zea mays*, which had a high homology of more than 72% and clustered in a same branch. With the employment of qRT-PCR, it was found that the three *PeELIPs* were weakly expressed in etiolated bamboo seedlings, but their expression was dramatically increased upon light treatment. Meanwhile, with the increase of light intensity and the duration of treatment with strong light stress, they were all upregulated significantly in the normal bamboo leaves. In addition, the over-expression of *PeELIP3* in *Arabidopsis thaliana* inhibited the decline of F_v/F_m under strong light treatment, but it had no effect on non-photochemical quenching coefficient (NPQ). [Conclusion] In conclusion, at least three homologous genes of *ELIPs* can be identified from moso bamboo, all with light-inducible expression. On the other hand, the over-expression of *PeELIP3* could alleviate the photoinhibition in transgenic *Arabidopsis thaliana*, implying that *PeELIP3* might play a positive role in photoprotection. [Ch, 8 fig. 1 tab. 40 ref.]

Key words: *Phyllostachys edulis*; early light induced protein gene; expression analysis; photoprotection

绿色植物吸收光能主要依靠捕光色素蛋白复合体 (light harvesting complex, LHC) 完成, 该复合体由 LHC 基因家族编码的蛋白结合叶绿素和类胡萝卜素组成, 而这些 LHC 基因的表达是受光照调控的。强光可以抑制 LHC 基因的转录表达, 同时能诱导一些本身具有光保护功能的 LHC-Like 基因表达, 例如强光下 OHPs(one helix proteins)、SEPs(stress enhanced proteins) 和 ELIPs(early light induced proteins) 基因的表达增加^[1-2]。ELIPs 是核基因编码的受光诱导的叶绿体类囊体膜蛋白, 最早发现于豌豆 *Pisum sativum* 黄化苗转绿过程。在此过程中 ELIPs 比其他的光诱导蛋白出现的更早, 并在光合细胞器叶绿体发育完全后迅速消失^[3-4]。ELIPs 在蛋白结构上高度保守, 目前已知的所有 ELIPs 都有 3 个 α -螺旋跨膜结构, 其中螺旋 I 和螺旋 III 与光系统中所有捕光叶绿素 a/b 结合蛋白相应部位有很高的序列同源性, 因此 ELIP 蛋白被归入叶绿素 a/b 结合蛋白超家族, 并根据其跨膜螺旋数量分为 3 个亚组^[2,5]。目前, 已经在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[6]、葡萄 *Vitis vinifera*^[7]、紫花苜蓿 *Medicago sativa*^[8]、银杏 *Ginkgo biloba*^[9] 等多种植物中克隆鉴定获得了 ELIP 基因。有关 ELIP 蛋白基因功能的研究也越来越得到研究者的重视。ELIPs 是在有光的情况下产生的, 在类囊体色素-蛋白质复合物的光保护或组装中起作用, 也可在叶绿体到有色体的转换中发挥作用, 对光合作用系统起到光修复作用^[10-12]。一些 ELIP 基因在山墙藓 *Tortula ruralis* 中被干旱激活^[13], 在豌豆中能被紫外线 B 波段 (UV-B) 激活^[14], 在小麦 *Triticum aestivum* 中被低温激活^[15]。推测 ELIPs 除了具有光保护功能外, 可能具有适应与光抑制有关的非生物胁迫环境的功能^[16]。此外, 在拟南芥中发现, *AtELIP1* 和 *AtELIP2* 基因的缺失会使其种子萌发率下降, 且 ELIP 蛋白的抑制因子 DAG1 突变后, 拟南芥种子萌发率则高于野生型, 表明 ELIP 蛋白具有促进种子萌发的作用^[17]。可见 ELIPs 在多种生理过程中可能具有重要作用。毛竹 *Phyllostachys edulis* 是重要的森林资源, 生长迅速, 材质优良, 其光合作用一直倍受关注。人们已从竹子光合作用生理特性^[18-19]、分子机理^[20-25] 等方面进行了大量研究。然而, 对于毛竹的 ELIPs 尚缺乏研究。本研究以毛竹为研究对象, 克隆 ELIP 基因, 全面分析它的分子特征及表达模式, 构建了 *PeELIP3* 表达载体并转化模式植物拟南芥, 对基因功能进行了初步分析, 以期深入研究 ELIP 基因在竹子光保护中的生物学功能提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

以实验室培养的毛竹实生苗为材料。培养条件: 温度为 18~25 ℃, 光周期为 16 h/8 h, 光照强度为 250~350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 待长至 6 个月时进行光照处理。光强处理: 将毛竹实生苗在黑暗适应 24 h 后分别移至于不同的光照强度 (0、300、600、900、1 200 和 1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 下, 处理 2 h 后取样。强光处理: 将毛竹实生苗置于 1 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的强光下, 分别在处理后 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 和 12.0 h 时取样。黄化苗处理: 在黑暗条件下培养毛竹实生黄化苗, 待长至 1 个月时, 将毛竹黄化苗放置在 250~350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照下进行处理, 分别在处理后 0、0.5、1.0、4.0 和 8.0 h 取样, 并以

室内正常光照 ($250\sim350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 条件下生长的毛竹实生苗为对照 (ck)。3 次重复，每次重复的每个处理 4~6 株毛竹实生苗，所有处理均取苗顶端第 3 片叶为样本，液氮速冻后置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2 毛竹 ELIP 基因克隆与序列分析

从前期毛竹基因组测序和 RNA-Seq 结果^[22, 26]中筛选出与拟南芥 *ELIPs* 相似的基因，暂时将其认定为毛竹 ELIP 基因，并根据其序列设计特异性扩增引物 (表 1)，进行目的基因扩增。利用 Trizol 法提取毛竹叶片的总 RNA，并使用反转录试剂盒 (Promage, 美国) 合成 cDNA 作为模板。PCR 产物经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒完成回收，然后连接到 pGEM-T easy Vector，转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞，筛选阳性克隆，在生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行基因测序。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers			
用途	基因名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
基因克隆	<i>PeELIP1</i>	ATGGCGACCAAGGTGGCCTT	CTAGACGTTGACGAGCGGGGC
	<i>PeELIP2</i>	ATGGCGACGACCATGATGGC	TTACACTACTAGTTTACGTTGAC
	<i>PeELIP3</i>	ATGGCGACGACCATGATGAC	TTAGATGTTGACGAACGGCGC
表达分析	<i>PeELIP1</i>	ATCATGTCCGCTGACGCCGA	CTTTGTGCTAGACGTTGACGAGC
	<i>PeELIP2</i>	ACGACCATGATGGCCTCGAG	TTGGGCGTCTCCGTTGGATC
	<i>PeELIP3</i>	GCGCATCTAGCCTGTGCAAT	TTGTTCTGGGCCCTCACGAC

对克隆获得的基因及其编码的氨基酸序列进行分析，其中编码蛋白的基本理化性质通过 ExPasy (<http://www.expasy.org/>) 在线工具获取，相应功能结构域分析使用美国国家生物信息中心 (NCBI) 链接的在线数据库 CD Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)；利用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/#>) 和 WoLF PSORT (https://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) 预测亚细胞定位。此外，利用 MEGA 7.0^[27] 提供的 Clustal W 工具对毛竹 ELIP 基因编码的氨基酸序列与其他物种 ELIPs 序列进行比对分析，且使用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统进化树，重复次数 1 000 次，其他参数使用系统默认值。

1.3 毛竹 ELIPs 基因的表达分析

根据获得的毛竹 ELIP 基因序列的非保守区域设计定量引物 (表 1)。利用 qRT-PCR 技术分析毛竹 ELIP 基因在不同光照处理条件下的表达模式，反应在 qTower 荧光定量 PCR 仪上进行，体系为 10.0 μL ：2 $\times$ SYBR II Green 1 Master 5.0 μL ；正/反向引物各 0.3 μL ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)；cDNA 模板 1.0 μL ； H_2O 3.4 μL 。两步法进行 PCR 扩增：95 $^\circ\text{C}$ 6 min；95 $^\circ\text{C}$ 10 s，62 $^\circ\text{C}$ 10 s，40 个循环。选择 *PeNTB* 为内参基因^[28]，基因的表达变化情况采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析^[29]。

1.4 *PeELIP3* 植物表达载体构建

通过 PCR 扩增得到两端分别带有 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点的 *PeELIP3* 基因片段，酶切回收纯化后，将目的片段连接到 pCambia1301 载体的多克隆位点，得到重组质粒 pCambia1301-*PeELIP3*。经测序验证正确后，将植物表达载体质粒利用电击法导入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 菌株，并经 PCR 验证正确后用于转化拟南芥。

1.5 转化拟南芥、筛选与鉴定

利用农杆菌介导的浸花法^[30]转化拟南芥，获得的 T_0 代拟南芥种子经消毒后播种在含 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的 1/2 MS 培养基中培养，初步挑选出具有抗性的转基因植株，并移栽到营养土中。提取 T_1 代候选转基因植株的 DNA，经 PCR 扩增 *PeELIP3* 基因序列，进一步鉴定转基因植株。在此基础上，筛选转基因植株至 T_3 代，进行后续分析。同时，利用半定量 RT-PCR 检测 *PeELIP3* 在转基因拟南芥中的表达水平^[23]。

1.6 转基因植株叶绿素荧光参数及荧光成像初步分析

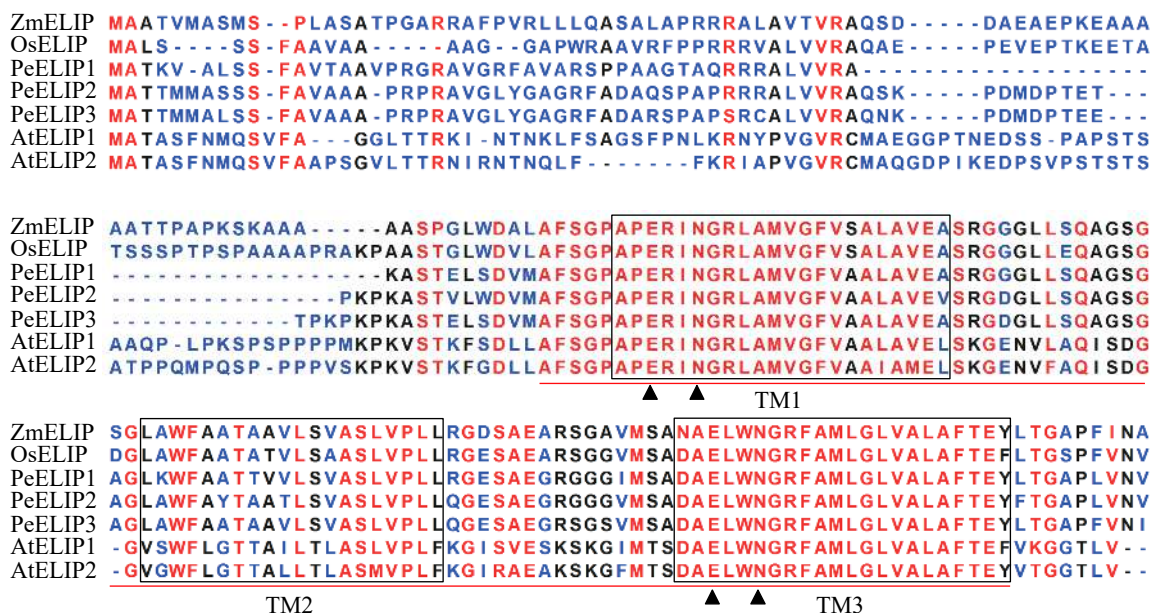
参照韩志国等^[31]方法，以 3 周的拟南芥植株为材料，利用 IMAGING-PAM 叶绿素荧光仪进行叶绿素荧光参数的测定，包括光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m)、非光化学猝灭 (NPQ) 诱导曲线等。同时获取拟南芥的叶绿素荧光成像，分析野生型与转基因拟南芥植株之间的非光化学猝灭差异。

2 结果和分析

2.1 *PeELIPs* 基因克隆和序列分析

经基因克隆、测序、序列分析和鉴定,从毛竹中获得3个ELIP同源基因,分别命名为*PeELIP1*、*PeELIP2*和*PeELIP3*。序列分析表明:3个*PeELIPs*基因的开放阅读框分别为498、540和549 bp,对应编码氨基酸大小分别为165、179和182个氨基酸,预测蛋白分子量为16.70、18.42和18.61 kDa。用DNAMAN分析3个*PeELIPs*基因编码的氨基酸序列,发现它们相互之间具有高度的相似性(80%以上),其中*PeELIP2*和*PeELIP3*之间达到91.1%。分别对3个*PeELIPs*蛋白的保守结构域进行预测,结果显示:它们的蛋白序列中都含有典型的捕光叶绿素a/b结合蛋白功能域,同时在该结构上都有3个 α -螺旋跨膜结构,其中第1、3跨膜 α -螺旋高度保守,且包括2个叶绿素结合位点:谷氨酸(Glu)残基和天冬酰胺(Asn)残基(图1),这一结构域是捕光叶绿素a/b结合蛋白的典型结构域^[1,5]。因此,3个*PeELIPs*均属于叶绿素a/b结合蛋白超家族成员。序列比对分析发现:3个*PeELIPs*与水稻*Oryza sativa*、玉米*Zea mays*等单子叶植物的ELIPs具有较高的相似性,同源性达72%以上,而与拟南芥等双子叶植物的ELIPs相似性较低,同源性低于67%。

用Plant-PLoc在线软件进行亚细胞定位预测显示:*PeELIP1*和*PeELIP2*蛋白定位于叶绿体,而*PeELIP3*蛋白则定位在线粒体中。为了使预测结果更加准确,使用蛋白亚细胞定位预测专业软件WoLFPSORT在线对*PeELIPs*蛋白再次进行预测,结果显示:*PeELIP1*、*PeELIP2*和*PeELIP3*都最有可能定位于叶绿体中,进一步支持了它们属于叶绿素a/b结合蛋白超家族成员。



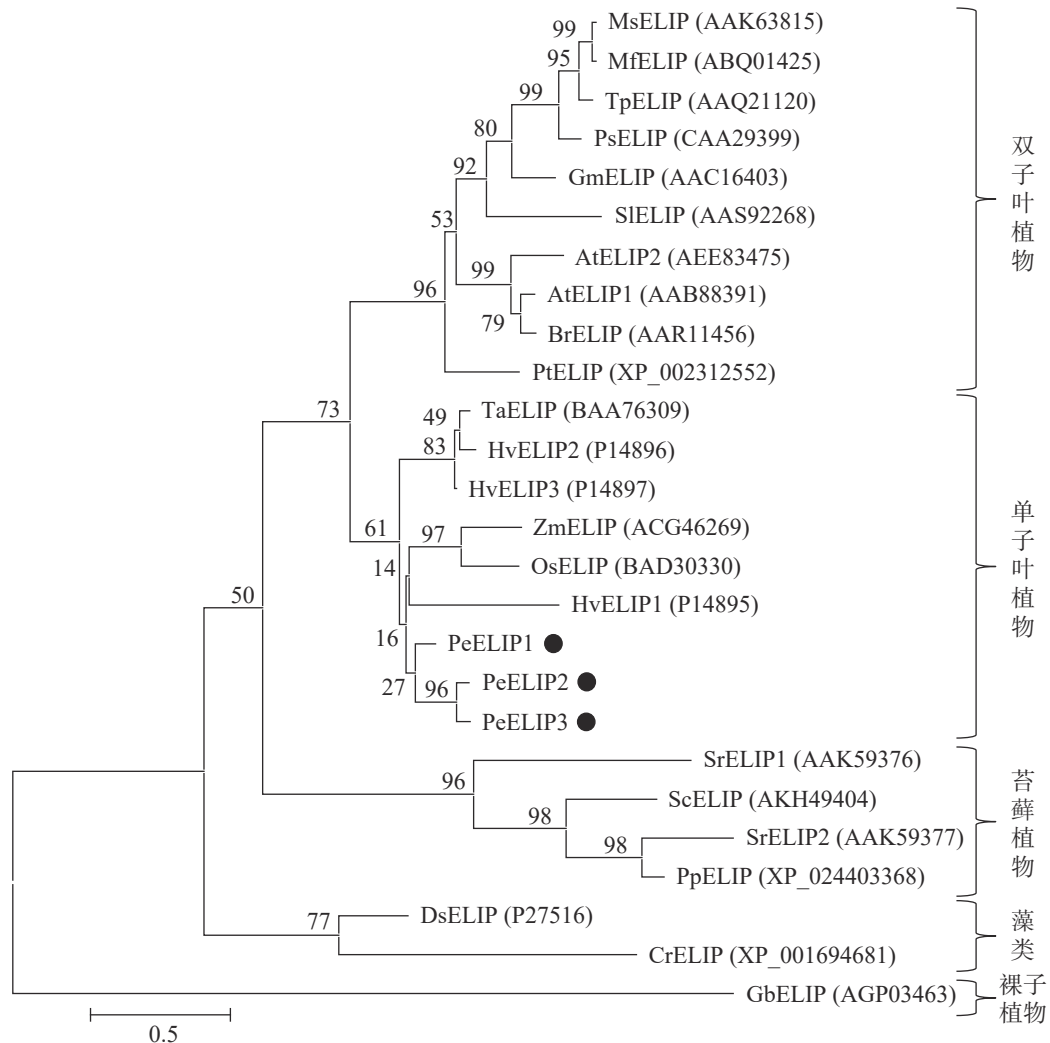
At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; Pe: 毛竹 *Phyllostachys edulis*; Os: 水稻 *Oryza sativa*; Zm: 玉米 *Zea mays*。TM1~TM3 表示 3 个 α -螺旋跨膜结构。叶绿素 a/b 结合蛋白超家族的保守域用红线标出, 三角形符号表示叶绿素结合位点

图1 毛竹与拟南芥、水稻、玉米的 ELIPs 氨基酸序列比对

Figure 1 Alignment of the deduced amino acid sequences of ELIPs from *Ph. edulis*, *A. thaliana*, *O. sativa* and *Z. mays*

2.2 ELIPs 系统进化分析

为揭示 *PeELIPs* 与其他物种 ELIPs 之间的进化关系,将 *PeELIPs* 与拟南芥、水稻、小立碗藓 *Physcomitrella patens* 等 18 个不同物种 ELIPs 的氨基酸序列进行比对分析,并构建进化树。结果(图2)表明:ELIPs 进化可分为四大类,包括被子植物(双子叶植物和单子叶植物)、藻类、苔藓及裸子植物。毛竹 ELIPs 与水稻、玉米等单子叶植物 ELIPs 聚在一起,说明毛竹 ELIPs 与单子叶植物 ELIPs 蛋白具有较近的亲缘关系,然后是双子叶植物,与裸子植物、苔藓植物及藻类家族的亲缘关系较远,这与植物系统发育分类结果相一致。



At. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; Br. 芜菁 *Brassica rapa*; Cr. 莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii*; Ds. 杜氏盐藻 *Dunaliella salina*; Gb. 银杏 *Ginkgo biloba*; Gm. 大豆 *Glycine max*; Hv. 大麦 *Hordeum vulgare*; Mf. 黄花苜蓿 *Medicago falcate*; Ms. 紫花苜蓿 *Medicago sativa*; Os. 水稻 *Oryza sativa*; Pe. 毛竹 *Phyllostachys edulis*; Pp. 小立碗藓 *Physcomitrella patens*; Ps. 豌豆 *Pisum sativum*; Pt. 毛果杨 *Populus trichocarpa*; Sc. 齿肋赤藓 *Syntrichia caninervis*; Si. 番茄 *Solanum lycopersicum*; Sr. 山齿藓 *Syntrichia ruralis*; Ta. 普通小麦 *Triticum aestivum*; Tp. 红车轴草 *Trifolium pretense*; Zm. 玉米 *Zea mays*

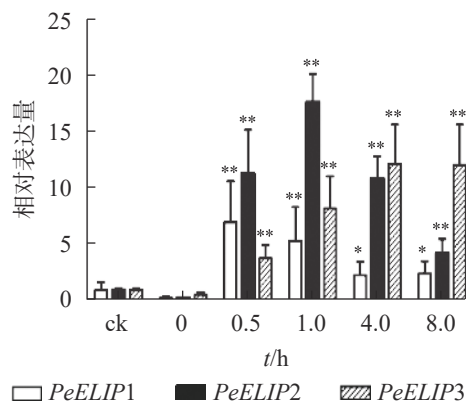
图 2 基于 ELIPs 氨基酸序列构建的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of ELIPs

2.3 *PeELIPs* 基因的表达分析

为分析光照对 *PeELIPs* 基因表达的影响, 选择毛竹实生苗中的黄化苗为材料, 进行光照处理 (光照强度 $250\sim350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 以绿色正常苗为对照 (ck)。qRT-PCR 结果 (图 3) 显示: *PeELIPs* 在毛竹黄化苗中仅检测到微量的表达, 而在光照条件处理后黄化苗中 3 个 *PeELIPs* 的基因表达量均显著增加, 其中 *PeELIP1* 和 *PeELIP2* 的表达量在光照处理的前 1.0 h 内快速增加, 分别在 0.5 和 1.0 h 达峰值, 与未光照处理的黄化苗相比, 分别增加约 21 倍和 58 倍, 随后出现下降趋势, 至 8.0 h 时仍然高于 ck, 分别约为 ck 的 2 倍和 4 倍。而 *PeELIP3* 的表达量随光照处理时间的延长而上升, 在 4.0 h 以后逐渐趋向平稳, 在光照 8.0 h 后, 其表达量约是对照的 12 倍, 是黄化苗的 20 倍。

为进一步研究光照对 *PeELIPs* 基因表达的影响, 选择不同光照强度 (0、300、600、900、1 200 和 1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 处理正常生长的毛竹实生苗叶片, 检测其中 *PeELIPs* 的表达情况。qRT-PCR 结果 (图 4) 显示: 随着光照强度增加, *PeELIPs* 的表达量均比对照 (0 h) 增加, 经 1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光强处理 2 h 后, *PeELIP1*、*PeELIP2* 和 *PeELIP3* 的表达量分别约是光照处理前的 22、18 和 13 倍, 约是正常培养



*表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$)

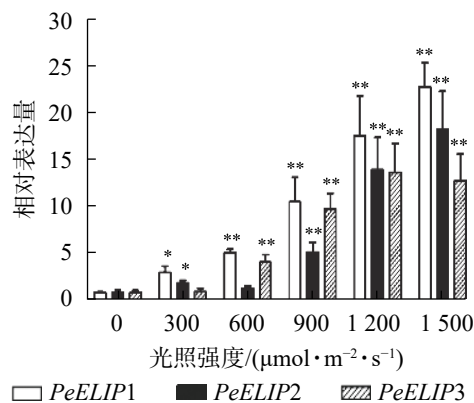
图3 *PeELIPs* 在毛竹黄化苗中的表达分析

Figure 3 Expression analysis of *PeELIPs* in etiolated seedlings of moso bamboo

条件 ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下的 7、9 和 12 倍。在强光条件 ($1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下, 随着处理时间的延长, *PeELIPs* 的表达量都是先快速上升, 随后变化不大, 整体趋向平稳 (图 5)。毛竹黄化苗和正常苗中 *PeELIPs* 在不同光照强度、不同处理时间的表达变化表明, *PeELIPs* 基因的表达受光照的诱导, 且在光照初期的表达变化更为明显, 进一步说明了 *PeELIPs* 编码的蛋白符合光早期诱导表达蛋白的特点。

2.4 *PeELIP3* 转基因拟南芥鉴定

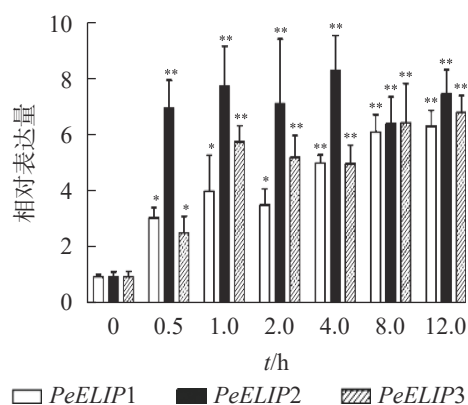
为验证 *PeELIPs* 基因的功能, 选择其中 1 个基因 *PeELIP3* 构建了表达植物载体 pCambia1301-*PeELIP3*。将 pCambia1301-*PeELIP3* 重组质粒通过农杆菌介导转化野生型拟南芥 (Col-0), 通过抗性筛选出的 T_1 代拟南芥经基因组 PCR 和半定量 RT-PCR 鉴定, 结果 (图 6A) 显示: 获得的 10 个抗性转基因拟南芥中 6 个株系 (L2、L3、L4、L7、L8 和 L9) 可检测到 *PeELIP3* 基因片段, 而野生型拟南芥中没有检测到。随后对 6 个转基因株系继续进行培养, 至 T_3 代不分离后通过半定量 RT-PCR 进一步检测。结果 (图 6B) 发现: *PeELIP3* 基因在 6 个株系中均得到了表达, 其中 L3、L4、L8 和 L9 株系中的表达量略高于 L2 和 L7。这表明: *PeELIP3* 基因已成功导入拟南芥中并得到转录表达, 但不同株系中的表达量存在一定的差异。正常培养条件下, *PeELIP3* 过量表达没有引起转基因拟南芥植株表型的变化。



*表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$)

图4 不同光照强度处理下 *PeELIPs* 的表达分析

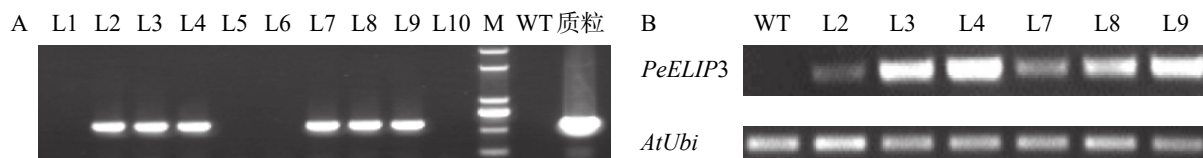
Figure 4 Expression analysis of *PeELIPs* under different light intensity



*表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$)

图5 强光 ($1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 胁迫下 *PeELIPs* 的表达分析

Figure 5 Expression profile analysis of *PeELIPs* under high light stress ($1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)



L1~L10. 拟南芥抗性植株; WT. 野生型; M. DNA 分子量标记; 质粒. 阳性对照

图6 *PeELIP3* 转基因拟南芥 PCR 鉴定 (A) 及表达检测 (B)

Figure 6 Detection of transgenic *Arabidopsis* by PCR (A) and expression analysis of *PeELIP3* in transgenic lines (B)

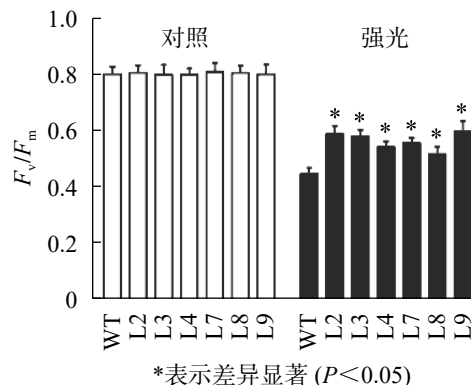
2.5 *PeELIP3* 转基因拟南芥叶绿素荧光参数分析

强光处理野生型和各转基因株系拟南芥, 结果 (图 7) 发现: 经过 4.0 h 用 $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的强光处理后, 野生型和转基因拟南芥的 F_v/F_m 都迅速下降, 但两者的下降幅度存在显著差异, 其中野生型拟

南芥的 F_v/F_m 下降 43.8%，而转基因拟南芥植株的下降幅度明显低于野生型拟南芥，仅下降 25.1%~35.4%。由此表明：1 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强光处理后野生型和各转基因拟南芥均受到了胁迫，但过量表达 *PeELIP3* 可降低转基因拟南芥受强光胁迫的光抑制，以减缓 F_v/F_m 的下降程度。

对 *PeELIP3* 转基因植株进行了非光化学猝灭成像和诱导+弛豫动力学分析。非光化学猝灭成像结果显示：在 185 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光强下，野生型和转基因拟南芥植株的非光化学猝灭成像均显示为黄色(图 8A)，当光强增加至 925 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时，两者的非光化学猝灭成像均转变成青蓝色(图 8B)。这说明在弱光或强光下，野生型和转基因拟南芥植株间的非光化学猝灭没有明显差异。

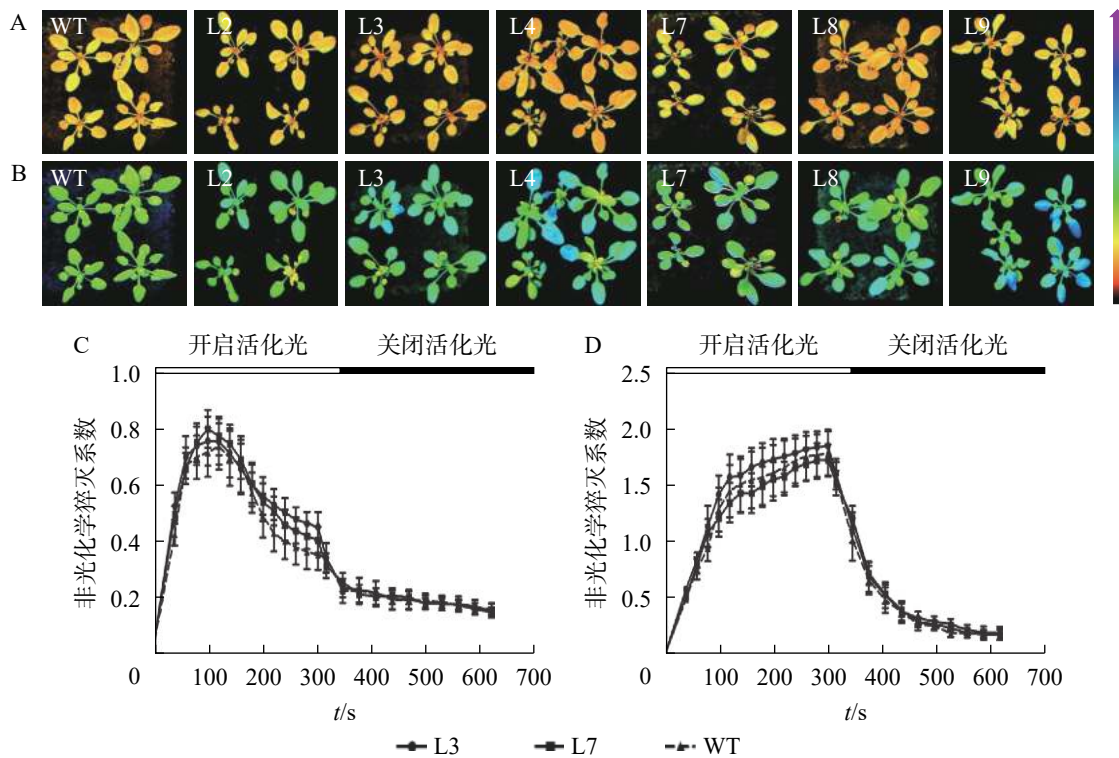
同时，随机选取 2 个株系 (L3 和 L7) 进行非光化学猝灭诱导+弛豫动力学曲线分析。结果表明：在不同的活化光 (弱光和强光) 下，野生型与转基因拟南芥植株的非光化学猝灭诱导+弛豫动力学曲线没有明显差异，即 185 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 活化光下，野生型和转基因拟南芥的非光化学猝灭系数变化趋势都是先快速上升到达峰值，然后开始下降(图 8C)；当活化光光强设置为 925 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时，两者的非光化学猝灭系数都是迅速上升，短时间内到达峰值，然后保持平稳(图 8D)。在关闭活化光，进入暗弛豫后，两者的非光化学猝灭系数都在约 5 min 内快速弛豫(图 8C 和图 8D)。以上结果表明：*PeELIP3* 基因不影响转基因植株的非光化学猝灭，可能未参与热耗散相关的光保护途径。



L2~L9. 拟南芥抗性植株; WT. 野生型

图 7 强光 (1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 对 *PeELIP3* 转基因拟南芥 F_v/F_m 的影响

Figure 7 Effect of high light (1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) on F_v/F_m of *PeELIP3* transgenic *Arabidopsis*



L2~L9. 拟南芥抗性植株; WT. 野生型

A 和 B 分别代表光强为 185 和 925 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时的叶绿素荧光猝灭成像;
C 和 D 分别代表光强为 185 和 925 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时的非光化学猝灭诱导+弛豫动力学曲线

图 8 *PeELIP3* 转基因拟南芥非光化学猝灭分析

Figure 8 Analysis of NPQ in *PeELIP3* transgenic *Arabidopsis*

3 讨论

早期光诱导蛋白是核编码的叶绿体蛋白,在植物中广泛分布。但不同植物间编码 ELIPs 的基因数量存在较大差异,部分植物仅含有 1 个 ELIP 基因,如豌豆^[14]和紫花苜蓿^[8],而茶树 *Camellia sinensis*^[32]、番红花 *Crocus sativus*^[33]、杜鹃 *Rhododendron catawbiense*^[34] 等部分植物中则有 2~7 个差异表达的 ELIPs 基因。本研究从毛竹中克隆得到了 3 个 *PeELIPs*,它们分别编码的蛋白之间具有较高的相似性,均包含叶绿素 a/b 结合的结构域,属于捕光叶绿素 a/b 结合蛋白超家族成员。此外,*PeELIPs* 蛋白与水稻、玉米等单子叶植物的 ELIPs 蛋白同源性较高,聚类在一个分支,但与苔藓植物和藻类的同源性相对偏低,这说明不同物种 ELIPs 蛋白存在较大差异。被子植物(双子叶和单子叶植物)、苔藓植物和藻类各自聚在一起,这表明 ELIPs 蛋白在相同进化等级的物种间相对比较保守,与物种的进化相一致。

大量研究结果表明:光照、温度、干旱等非生物胁迫影响 ELIP 基因表达调控。例如,17 个旋蒴苣苔 *Boea hygrometrica* ELIP 基因中有 7 个基因受到干旱处理诱导^[35],紫花苜蓿 *MsELIPs* 和杜鹃 *RcELIPs* 在低温胁迫中基因表达量增加^[8,34]。光照是诱导 ELIP 基因表达的主要因素。本研究中,毛竹黄化苗光照处理过程中,*PeELIPs* 的表达量快速增加,在前 1 h 中达到顶峰,然后出现下降。这与番茄 ELIP 基因在其黄化苗转绿过程中的表达模式类似^[36]。此外,3 个毛竹 *PeELIPs* 的表达量都随着光照强度增加而上调,这表明光照诱导毛竹 *PeELIPs* 表达,其表达模式与拟南芥 *AtELIP1* 和 *AtELIP2*^[6]、葡萄 *VvELIP*^[7]、银杏 *GbELIP*^[9] 基因类似。

研究^[11]表明:拟南芥 *chaos* 突变体因为不能快速积累 ELIPs 蛋白,对强光和低温十分敏感,在强光胁迫下拟南芥 *chaos* 突变体植株叶片白化,表现出明显的光氧化现象,但将拟南芥 ELIP 基因在 *chaos* 突变体中组成性表达后,转基因拟南芥的强光耐受性又恢复到野生型状态,这表明 ELIP 蛋白具有光保护功能。盐藻 *Dunaliella salina* *DsCBR* 基因转化拟南芥 *elip* 突变体后,转基因拟南芥的强光耐受性提高到野生水平,这表明 *DsCBR* 基因与其高等植物 ELIP 基因同样具有光保护功能^[37]。过量表达 *PeELIP3* 基因可减缓转基因拟南芥在强光胁迫下 F_v/F_m 的下降幅度,这表明 *PeELIP3* 可降低转基因拟南芥在强光胁迫中的光抑制程度,具有一定的光保护作用。另外,*PeELIP1* 和 *PeELIP2* 的功能如何,有待深入研究。

热耗散过剩光能是植物重要的光保护途径,而叶绿素荧光参数非光化学猝灭系数能反映植物耗散过剩光能的能力,即光保护能力^[38]。本研究中过表达 *PeELIP3* 基因不影响转基因拟南芥植株的非光化学猝灭,表明 *PeELIP3* 可能未参与非光化学猝灭的热耗散光保护途径。ELIPs 光保护功能可能与其作为色素临时载体有关,强光胁迫下能加剧叶绿素结合蛋白的破坏,产生游离的叶绿素,而其容易被光敏化,形成叶绿素三聚体,叶绿素三聚体则与氧分子反应形成单线态氧,进而发生光氧化破坏,ELIP 蛋白通过与叶绿素的短暂结合,防止游离叶绿素的积累,从而防止光氧化胁迫^[11,39]。同时,ELIP 蛋白作为叶绿素传感器可调控叶绿素合成防止过多游离态叶绿素的积累^[40]。因此,毛竹 *PeELIP3* 基因在光保护中的作用机制需要更多的研究去验证。

4 参考文献

- [1] HEDDAD M, ADAMSKA I. The evolution of light stress proteins in photosynthetic organisms [J]. *Comp Funct Genom*, 2002, 3(6): 504 – 510.
- [2] BECK J, LOHSCHIEDER J N, ALBERT S, *et al.* Small one-helix proteins are essential for photosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 1(8): 7. doi: 10.3389/fpls.2017.00007.
- [3] MEYER G, KLOPPSTECH K. A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea unclear DNA [J]. *Eur J Biochem*, 1984, 138(1): 201 – 207.
- [4] GRIMM B, KRUSE E, KLOPPSTECH K. Transiently expressed early light-inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light-harvesting chlorophyll binding proteins [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 13(5): 583 – 593.
- [5] ENGELKEN J, BRINKMANN H, ADAMSKA I. Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 233.
- [6] HEDDAD M, NORÉN H, REISER V, *et al.* Differential expression and localization of early light-induced proteins in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(1): 75 – 87.

- [7] PINTO F, BERTI M, OLIVARES D, *et al.* Leaf development, temperature and light stress control of the expression of early light-inducible proteins (ELIPs) in *Vitis vinifera* L. [J]. *Environ Exp Bot*, 2011, **72**(2): 278 – 283.
- [8] ZHUO Chunliu, CAI Jiongliang, GUO Zhenfei. Overexpression of early light-induced protein (ELIP) gene from *Medicago sativa* ssp. *falcata* increases tolerance to abiotic stresses [J]. *Agron J*, 2013, **105**(5): 1433 – 1440.
- [9] WANG Huanli, CAO Fuliang, LI Guangping, *et al.* The transcript profiles of a putative early light-induced protein (ELIP) encoding gene in *Ginkgo biloba* L. under various stress conditions [J]. *Acta Physiol Plant*, 2015, **37**(1): 1720.
- [10] TIMERBAEV V, DOLGOV S. Functional characterization of a strong promoter of the early light-inducible protein gene from tomato [J]. *Planta*, 2019, **250**(4): 1307 – 1323.
- [11] HUTIN C, NUSSAUME L, MOISE N, *et al.* Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress [J]. *PNAS*, 2003, **100**(8): 4921 – 4926.
- [12] BERTI M, PINTO M. Expression of early light induced protein in grapevine and pea, under different conditions and its relation with photoinhibition [J]. *Chin J Agric Res*, 2012, **72**(3): 371 – 378.
- [13] ZENG Qin, CHEN Xinbo, WOOD A J. Two early light-inducible protein (ELIP) cDNAs from the resurrection plant *Tortula ruralis* are differentially expressed in response to desiccation, rehydration, salinity and high light [J]. *J Exp Bot*, 2002, **53**(371): 1197 – 1205.
- [14] SÄVENSTRAND H, OLOFSSON M, SAMUELSSON M, *et al.* Induction of early light-inducible protein gene expression in *Pisum sativum* after exposure to low levels of UV-B irradiation and other environmental stresses [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, **22**(7): 532 – 536.
- [15] SHIMOSAKA E, SASANUMA T, HANDA H. A wheat cold-regulated cDNA encoding an early light-inducible protein (ELIP): its structure, expression and chromosomal location [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, **40**(3): 319 – 325.
- [16] 周雅, 张道远. 植物早期光诱导蛋白的结构、功能及表达模式研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, **34**(6): 1339 – 1346.
- ZHOU Ya, ZHANG Daoyuan. The research progress of early light induced protein in plant [J]. *Genom Appl Biol*, 2015, **34**(6): 1339 – 1346.
- [17] RIZZA A, BOCCACCINI A, LOPEZ-VIDRIERO I, *et al.* Inactivation of the *ELIP1* and *ELIP2* genes affects *Arabidopsis* seed germination [J]. *New Phytol*, 2011, **190**(4): 896 – 905.
- [18] 杜澜, 谢锦忠, 赖秋香, 等. 遮荫对绿竹容器苗光合作用及生长的影响[J]. 生态学杂志, 2019, **38**(1): 67 – 73.
- DU Lan, XIE Jinzhong, LAI Qiuxiang, *et al.* The effects of shading on photosynthetic characteristics and growth of *Dendrocalamopsis oldhami* seedling in container [J]. *Chin J Ecol*, 2019, **38**(1): 67 – 73.
- [19] 周哲宇, 徐超, 胡策, 等. 毛竹快速生长期的叶绿素荧光参数特征[J]. 浙江农林大学学报, 2018, **35**(1): 75 – 80.
- ZHOU Zheyu, XU Chao, HU Ce, *et al.* Chlorophyll fluorescence characteristics of *Phyllostachys edulis* during its fast growth period [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, **35**(1): 75 – 80.
- [20] JIANG Zhehui, PENG Zhenhua, GAO Zhimin, *et al.* Characterization of different isoforms of the light-harvesting chlorophyll a/b complexes of photosystem II in bamboo [J]. *Photosynth Res*, 2012, **50**(1): 129 – 138.
- [21] 姜永峰. 毛竹光保护及相关基因功能研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2016.
- LOU Yongfeng. *Study on Photoprotection and Related Gene Function of Phyllostachys edulis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2016.
- [22] ZHAO Hansheng, LOU Yongfeng, SUN Huayu, *et al.* Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Phyllostachys edulis* in response to high light [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, **16**: 34.
- [23] GAO Zhimin, LIU Qing, ZHENG Bo, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of violaxanthin deepoxidase gene (*PeVDE*) from *Phyllostachys edulis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, **32**(9): 1381 – 1391.
- [24] LOU Yongfeng, SUN Huayu, LI Lichao, *et al.* Characterization and primary functional analysis of a bamboo *ZEP* gene from *Phyllostachys edulis* [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, **36**(9): 747 – 758.
- [25] LOU Yongfeng, SUN Huayu, WANG Sining, *et al.* Expression and functional analysis of two *PsbS* genes in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Physiol Plantarum*, 2018, **163**(4): 459 – 471.
- [26] PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin, *et al.* The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, **45**(4): 456 – 461.

- [27] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, **33**(7): 1870 – 1874.
- [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN D T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [29] FAN Chunjie, MA Jinmin, GUO Qirong, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(2): e56573. doi: 10.1371/journal.pone.0056573.
- [30] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, **16**(6): 735 – 743.
- [31] 韩志国. 20种湿地植物的叶绿素荧光特性[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- HAN Zhiguo. *Chlorophyll Fluorescence of 20 Species of Wetland Plants* [D]. Guangzhou: Jinan University, 2006.
- [32] LI Xianwen, LIU Huijuan, XIE Suxia, *et al.* Isolation and characterization of two genes of the early light-induced proteins of *Camellia sinensis* [J]. *Photosynthetica*, 2013, **51**: 305 – 311.
- [33] AHRAZEM O, ARGANDOÑA J, CASTILLO R, *et al.* Identification and cloning of differentially expressed SOUL and ELIP genes in saffron stigmas using a subtractive hybridization approach [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(12): e0168736. doi: 10.1371/journal.pone.0168736.
- [34] PENG Yanhui, LIN Wuling, WEI Hui, *et al.* Phylogenetic analysis and seasonal cold acclimation-associated expression of early light-induced protein genes of *Rhododendron catawbiense* [J]. *Physiol Plantarum*, 2008, **132**(1): 44 – 52.
- [35] 李菲, 张习敏, 王野影, 等. 复苏植物旋蒴苣苔早期光诱导蛋白的特征分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, **38**(3): 1162 – 1167.
- LI Fei, ZHANG Ximin, WANG Yeying, *et al.* Characterization analysis of early light-induced proteins (ELIPs) in resuscitation plant *B. hygrometrica* [J]. *Genom Appl Biol*, 2019, **38**(3): 1162 – 1167.
- [36] BRUNO A K, WETZEL C M. The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit [J]. *J Exp Bot*, 2004, **55**(408): 2541 – 2548.
- [37] 陈晨. 盐生杜氏藻 Dscbr 基因的光保护功能及机制研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- CHEN Chen. *Studies on Photoprotective Function and Mechanism of Dscbr Gene in the Green Alga Dunaliella salina* [D]. Chengdu: Sichuan University, 2007.
- [38] GOSS R, LEPETIT B. Biodiversity of NPQ [J]. *J Plant Physiol*, 2015, **172**: 13 – 32.
- [39] 李先文, 谢素霞, 张苏锋, 等. 植物早期光诱导蛋白基因研究进展[J]. 植物生理学报, 2011, **47**(6): 540 – 544.
- LI Xianwen, XIE Suxia, ZHANG Sufeng, *et al.* Research advances in the genes of early light-induced proteins of plants [J]. *J Plant Physiol*, 2011, **47**(6): 540 – 544.
- [40] TZVETKOVA-CHEVOLLEAU T, FRANCK F, ALAWADY A E, *et al.* The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2007, **50**(5): 795 – 809.