

墨兰‘达摩’原叶绿素酸酯氧化还原酶基因 *CsPORB* 功能的初步研究

梁迪^{1,2}, 杨凤玺², 叶庆生^{1*}, 朱根发^{1,2*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; 2. 广东省农业科学院环境园艺研究所, 广东省园林花卉种质创新综合利用实验室, 广州 510640)

摘要: 为了解墨兰‘达摩’(*Cymbidium sinense* ‘Dharma’)的 *POR* 基因功能, 从其嫩叶中克隆得到 *CsPORB* 基因。*CsPORB* 的开放阅读框长度为 1 200 bp, 编码 399 个氨基酸, *CsPORB* 分子量为 43.13 kDa, 理论等电点 9.30; *CsPORB* 与其他物种的 *POR* 蛋白序列高度同源, 在进化关系上较为保守; qRT-PCR 表达分析表明, *CsPORB* 在墨兰不同发育阶段和不同组织中的表达有明显差异, 其集中于生长旺盛的嫩叶中表达。经高表达转基因表型验证, 35S:*CsPORB* 转拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株中 *PORB* 及其下游叶绿素合成代谢酶活性显著提高, 叶绿素含量增加, 尤其在黑暗处理 1 周后, 35S:*CsPORB* 转基因植株仍表现持绿表型。因此, *CsPORB* 基因可能在墨兰‘达摩’叶绿素合成代谢中发挥重要作用。

关键词: 墨兰; 叶绿素; *CsPORB*; 基因功能

doi: 10.11926/jtsb.3957

Preliminary Study on the Function of NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase (*CsPORB*) Gene in *Cymbidium sinense* ‘Dharma’

LIANG Di^{1,2}, YANG Fen-xi², YE Qing-sheng^{1*}, ZHU Gen-fa^{1,2*}

(1. School of Life Sciences, South China Normal University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China; 2. Environmental Horticulture Research Institute, Guangdong Key Laboratory of Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to understand the function of *POR* gene in *Cymbidium sinense* ‘Dharma’, one *POR* gene family member *CsPORB* was cloned from young leaves. The *CsPORB* gene contained an open reading frame of 1 200 bp, which encoded a protein of 399 amino acids with molecular weight of 43.13 kDa and theoretical isoelectric point of 9.30. Sequence alignment showed that *CsPORB* was highly homologous to the sequence of *POR* family protein of other species, indicating conservative evolution of this gene family. The *CsPORB* expression showed obviously difference in different developmental stages and tissues, and high expression in growing young leaves. Furthermore, both of the *PORB* and its downstream chlorophyll biosynthesis enzyme activity increased in transgenic 35S:*CsPORB Arabidopsis*, as well as chlorophyll content, especially 35S:*CsPORB* transgenic plants remained green under dark for one week. Therefore, *CsPORB* could play an important roles in chlorophyll synthesis pathway of *Cymbidium sinense* ‘Dharma’.

收稿日期: 2018-05-08 接受日期: 2018-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471915); 广东省现代农业产业技术体系花卉创新团队首席专家项目(2016LM1095, 2017LM1095); 广东省农科院学科团队建设项目(201612TD); 广东省农业科学院环境园艺研究所创新能力建设项目(2017A070702008)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31471915), and the Project for Chief Expert in Flower Innovation Team of Modern Agricultural Industry Technology System in Guangdong Province (Grant No. 2016LM1095, 2017LM1095), the Project for Discipline Team Construction of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (Grant No. 201612TD); and the Project for Research Innovation Capacity Building of Guangdong Academy of Agricultural Sciences Environmental Horticulture Institute (Grant No. 2017A070702008).

作者简介: 梁迪, 硕士, 研究方向, 植物生长发育的分子调控。E-mail: 3029713631@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: ye-lab@scnu.edu.cn, genfazhu@163.com

Key words: *Cymbidium sinense*; Chlorophyll; *CsPORB*; Gene function

叶绿素是植物光合作用所必需的重要色素, 植物体叶绿素合成代谢失衡会严重影响其生长发育^[1]。合成途径中原叶绿素酸酯氧化还原酶(protochloro-phyllide oxidoreductase, NADPH; POR, EC 1.3.1.33)是黄化质体膜蛋白的主要组成部分^[2]。植物早期阶段的前质体在黑暗条件下形成黄化质体, 光照后进一步发育形成叶绿体, 在此过程中, POR 催化原叶绿素酸酯生成叶绿素酸酯是唯一一步需光的反应, 只有在光下 POR 才能催化原叶绿素酸酯 D 环双键还原形成叶绿素酸酯 a, POR 在植物光形态建成中发挥重要作用^[3-5]。

POR 主要以 PORA 和 PORB 两种形式存在被子植物中^[3], 目前只在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中报道第 3 种蛋白质 PORC^[6]。研究表明, 在水稻(*Oryza sativa*) *OsPORB* 突变体中抑制 *OsPORA* 表达和拟南芥 *AtPORB* 和 *AtPORC* 双突变体植株会黄化致死^[2,7], 而过表达 *PORB* 可明显改变转基因植株中叶绿素含量, 并对植物叶绿体的发育有着重要的调节作用^[8-11]。

墨兰‘达摩’(*Cymbidium sinense* ‘Dharma’)为兰科(Orchidaceae)兰属多年生草本植物, 是我国的传统名贵花卉, 其在长期栽培过程中选育出多种叶色变异品种, 具有极高的观赏价值和经济价值。研究表明, 不同品种墨兰的叶片形态、细胞结构和叶色表型差异显著, 墨兰叶艺性状与其叶绿素合成代谢和叶绿体发育特性紧密相关^[12-13]。但到目前为止, 墨兰‘达摩’叶艺性状中 POR 功能的研究尚未见报道。

本研究中以墨兰‘达摩’栽培植株作为试验材料, 从其嫩叶中克隆得到叶绿素合成代谢中关键酶 *CsPORB* 基因, 并对其编码的蛋白进行生物信息学分析, 利用 qRT-PCR 技术分析其在墨兰‘达摩’不同组织和不同发育时期表达量与叶色变异之间的关系。并通过构建 35S:*CsPORB* 转基因拟南芥植株进行表型分析, 检测其叶绿素代谢途径关键酶活性和叶绿素含量, 首次鉴定并初步阐明墨兰‘达摩’叶绿素合成途径中关键酶基因 *CsPORB* 的功能, 为深入解析墨兰‘达摩’合成代谢途径及其对叶色变异的调控提供前期研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料墨兰‘达摩’品系(*Cymbidium sinense* ‘Dharma’)选自广东省农业科学院环境园艺研究所,

挑选长势良好的株系, 分别采集墨兰绿叶‘达摩’(没有叶艺)根、茎、叶(苗期嫩叶、老叶)、叶芽(1、2 和 3 周), 以及墨兰叶艺‘达摩’同一叶片的黄、绿色区, 所有材料收集后用液氮速冻, 保存于-80℃冰箱中待用。

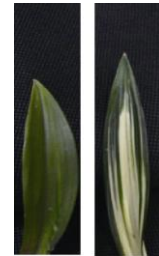


图 1 墨兰‘达摩’绿叶(左)和叶艺(右)

Fig. 1 *Cymbidium sinense* ‘Dharma’ green leaf (left) and leaf color variation (right)

1.2 光照处理

选取长势相同的 12 盆墨兰绿叶‘达摩’植株, 分别黑暗处理 0、0.5、1、2、3 和 4 h 后转移至光照下继续处理 0、0.5、1、2、3、4 h, 收集每个处理的叶片, 用液氮速冻, 保存于-80℃冰箱中待用。

1.3 菌株、载体和试剂

RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(DP441)、FastQuant cDNA 第 1 链合成试剂盒(去基因组)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(普通离心柱型)、快速质粒小提试剂盒(离心柱型)、DH5 α 大肠杆菌感受态细胞购于天根生化科技有限公司(北京); Phanta Max DNA Polymerase 和 ChamQTM SYBR[®] qPCR Master Mix、GV1301 农杆菌感受态细胞购于维诺赞生物科技有限公司。

1.4 *CsPORB* 的克隆

利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取墨兰总 RNA, 以总 RNA 为模板, 用 FastQuant cDNA 第 1 链合成试剂盒(去基因组)合成 cDNA。根据 GenBank 上已登录的 *PORB* 基因(XP_020593560.1)保守序列, 利用 Premier premier 5.0 设计引物 Cs-PCR-F: 5'-TCTCAGAGAGTCCTCCATGGC-3', Cs-PCR-R: 5'-GAAGAGCATCGGGCATCAAG-3', 以墨兰‘达摩’嫩叶 cDNA 为模板, 扩增 *Cs-*

PORB 基因, 反应总体系为 25 μL , 包含模板 cDNA 1.0 μL , Phanta Max DNA Polymerase 0.5 μL , 2 \times Phanta Max buffer 12.5 μL , dNTP Mix 0.5 μL , 正、反向引物各 1 μL , 用 ddH₂O 补足。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测, 对目的片段进行切胶、回收, 回收产物与 pUM19-T vector 链接, 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 菌液 PCR, 挑选阳性克隆进行测序。

1.5 *CsPORB* 生物信息学分析

cDNA 序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 搜索和同源性比较, 在 ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 上分析氨基酸理化性质, 利用 DNAMAN (Ver. 7.0) 软件对 *PORB* 同源性较高的氨基酸序列进行比对、亲疏水性分析, 利用 MEGA (Ver. 6.0) 软件进行不同物种进化树的构建。

1.6 *CsPORB* 表达分析

根据 *CsPORB* 基因序列, 设计 qRT-PCR 引物, *CsPORB*-qPCR-F: 5'-CTGCGAAAGGGAAATGTCGTG-3', *CsPORB*-qPCR-R: 5'-TCGAGGTGCATGATGCTGTAA-3'。以 *CsACTIN* 为内参基因^[14], 并设计引物: *CsACTIN*-F: 5'-CAATGAGCTTCGTGTTGCCC-3', *CsACTIN*-R: 5'-GATACGAACCAGTTGTGCGG-3'。荧光定量 PCR 扩增体系为 20 μL , 根据 ChamQTM SYBR[®] qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行操作。每个样品设置 3 次重复, 共进行 3 次独立试验, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析结果。

1.7 转基因拟南芥验证 *CsPORB* 功能

超表达载体的构建: 根据 *CsPORB* 基因 CDS 测序结果, 设计 1 对带有酶切位点的引物: *CsPORB*-*sacI*-F: 5'-AAAGAGCTCATGGCACTCCAGGCCTCCT-3', *CsPORB*-*SmaI*-R: 5'-TCCCCGGGTCAAGCCAGGGCGAGCAAC-3'。使用 Phanta Max DNA Polymerase 高保真酶扩增目的片段, 表达载体 PC-AM1300 经改造后, 用 *Sac I*/*Sma I* 对载体和片段进行双酶切、连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 12~16 h, 挑选阳性克隆进行测序, 根据测序结果, 将正确的重组载体转入 GV1301 农杆菌

感受态细胞中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, PCR 检测, 筛选阳性克隆。

采用菌液侵染花序方式转化野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), 将收获的 T₀ 代植株在含有 40 mg L⁻¹ 潮霉素的 1/2MS 培养基上培养 1 周左右, 筛选阳性植株。挑选 T₃ 代长势良好的 10 个转基因拟南芥株系, 以野生型植株为对照, 进行荧光定量 PCR 检测分析(用拟南芥 *ACTIN* 为内参基因), 方法同上。

1.8 叶绿素合成途径中关键酶活性检测

参照植物酶联免疫分析试剂盒, 对 35S:*PORB* 转基因拟南芥植株叶片叶绿素合成途径中关键酶活性进行检测。采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据方差分析, 用 EXCEL 进行数据的处理和作图。

2 结果和分析

2.1 *CsPORB* 的克隆分析

以墨兰‘达摩’嫩叶 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到特异性条带, 经测序后得到长 1 200 bp 的片段, 共编码 399 个氨基酸, 编码的蛋白分子量为 43.13 kDa, 理论等电点为 9.30, 编码的蛋白包含原叶绿素酸酯氧化还原酶(light-dependent protochlorophyllide erductase, LPOR-like)功能区, 属于经典短链脱氢酶(classical short chain dehydrogenase, SDR-c-like)亚类群, 并含有 Rossmann 折叠 NAD (P)(+)-结合蛋白(图 2)^[14]。

2.2 *CsPORB* 蛋白序列比对和进化分析

在 NCBI 数据库中用 BLASTp 检索 *CsPORB* 和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)和小麦(*Triticum aestivum*)等物种 POR 序列的相似性(图 3), 结果表明, 墨兰‘达摩’*CsPORB* 与 4 种植物的 POR 有极高的相似性, 同源性分别为 73%、74%、73%和 74%, 都含有高度保守的典型辅因子 NADPH 结合位点(TGASSG-LG)和活性位点(YK2DSK)^[15]。因此, *CsPORB* 属于 POR 类蛋白家族。

进一步研究 *CsPORB* 与 POR 蛋白家族的进化关系, 利用 MEGA (Version 6.0) 软件, 采用邻接法 (Neighbour-joining) 构建系统发育树, Bootstarp 校正值设置为 1 000, 从图 4 可见, 墨兰‘达摩’*CsPORB* 蛋白与单子叶植物凤梨(*Ananas comosus*)、铁皮石

```

1 M A L Q A S S F L A P A L S A H K E G K A N G G L K D S A F L G V H L
1 ATGGCACTCCAGGCTCTCTTTCTCGCACCAGCCATCCGGCATAAAGAGGGGAAGCCAATGGTGGACTCAAGGACTCGGCTTTTTGGGAGTTTCATCTC
36 S E N R I K S S F G F T L H S H G K R L N A S T I I R A Q T T A T A S
106 TCTGAGAACCGCATAAAGTCCAGCTTCGGTTTACTCTGCATTCACATGGCAAGCGCCTAAATGCATCCACCATTACAGAGCCCAGACGACGAAACAGCTCC
71 P A I N R A T P E A K K T L R K G N V V I T G A S S G L G L A T A K A
211 CCAGCCATCAACAGGGCCACCGCGGAAGCTAAAAAGACTTCGCGAAAGGAAATGTCGTGATCACAGGAGCCTATCCGGCTAGGCTGGCGACCCCAAGGCA
106 L A E T G K W N I V M A C R D F L K A E K A A K S A G M A K E N Y S I
316 CTGGCGGAGACCGCAAGTGAATATCGTGATGGCTGCCGACTTCTCAAAGCCGAGAAGCCGGAATCAGCCGGCATGGCAGGAGAATTACAGCATC
141 M H L D L A S L D S V R Q F V N N F R R S G M P L D A L V C N A A V Y
421 ATGCACCTCGACTCGCTCCCTCGACAGCGTGCAGCTTCGTGAACAATTCGGCGGTTCGGGATGCCGCTCGACGCCCTGGTTTGCATGCCCGCTTAC
176 F P T A S E P T Y T A D G F E M S V G V N H I G H F L L A R E M I E D
526 TTCCCCACCGCAAGTGACCTACCTACCCCGCATGGGTCGAGATGAGTGTGGGGTCAACCATATCGGCCATTTCTGCTGCTCGAGAGATGATAGAGGAT
211 M K Q S D Y P S R R L I I V G S I T G N T N T L A G N I P P K A N L G
631 ATGAAGCAGTCTGATTACCTCTCGGCGCTTATTATTGTTGGCTCCATCACAGGAACACAAACAGTGGCGGGCAACATACCACCGAAAGCGAACCTCGGA
246 D L R G L A G G L N G T T G S P M I D G G K F D G A K A Y K D S K V C
736 GATCTCCGAGGGCTTGACGGCGGGCTAAATGGGACTACCGGATCGCGATGATCGAGGTGGCAAGTTCGACGGCGCAAGGCTTACAAGGACGAGAAGTTGT
281 N M L M M Q E F H R Q Y H E E T G I S F A S L Y P G C I A T T G L F R
841 AACATGCTGATGATGACGAATTCACCGGCAATACCATGAGGAGACAGGCATAAGCTTCGCTCCCTACCTGGCTGCATCGCCACCACCGGTCTATTAGA
316 E H I G L F R A L F P P F Q K Y I T K G Y V S E E E A G K R L A Q V V
946 GAACACATCGGTCTCTCCGCGACTTCCCTCCTTCCAGAAATATATACCAAAGGCTACGCTCCGAAGAAGAGGCAAGGAGGCTTGACAGGTGGTG
351 S D P S L T K S G V Y W S W N K N S A S F E N Q L S Q E A S D V E K A
1051 AGCGATCCGAGCTTGACCAAGTGGCGGTCTACTGGAGCTGGAACAAGAAGCTTCGCTCGTTTGAAGACAGCTTTCGAGGAGGCGAGTGTGGAGAAGGCT
386 R K V W E M T E K L L A L A *
1156 CGAAAGGTGGGAGATGACGGAGAAGTTGCTCGCCCTGGCTTGA

```

图 2 墨兰‘达摩’CsPORB 核苷酸序列和推测的氨基酸序列。划线部分为 POR 保守结构域。

Fig. 2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of CsPORB in *Cymbidium sinense* ‘Dharma’. Underline indicate POR conserved domain.

CsPORB	...NALCASSFLAPALSAHKEKANGLKDSAF LGVHL	100
TaPORA	...NALCLPSTLSPVKKSSNGAAVKTAAFLGVSSKAKKSLAVRTC	88
TaPORB	...NALCAATSFPLSALSRKEGAKCSAFFCVRLADCLKFETTLGLRKTVCRRLLVAARSCRHARHEPTCRVNTSSVAIRACAAVSAPTATPASPSCKQIVRTCAV	118
AtPORA	...NALCAASLVSSAFVSRKCKLNASASSFKESLFGVLSSECKADFVSSLLCKRECS	106
AtPORB	...NALCAASLVSSAFVSRKCKLNASASSFKESLFGVLSSECKADFVSSLLCKRECS	102
AtPORA	...NALCAASLVSSAFVSRKCKLNASASSFKESLFGVLSSECKADFVSSLLCKRECS	103
OsPORA	...NALCVAALLPSPALVSPKKN...LSAVVKEPFLSVSCAKKPSLWVR	87
OsPORB	...NALCAATTSFLPSALSARKEGAVKCSAFVLRVCLCEKLETSALGLRTRVRS	99
NtPORA	...NALCAASLVSSAFVSRKCKLNASASSFKESLFGVLSSECKADFVSSLLCKRECS	100
Consensus	...NALCASSFLAPALSAHKEKANGLKDSAF LGVHL	

CsPORB	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	220
TaPORA	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	208
TaPORB	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	238
AtPORA	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	226
AtPORB	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	222
AtPORA	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	223
OsPORA	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	207
OsPORB	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	219
NtPORA	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	220
Consensus	ATAKALAEETKIVVWACRDFLKAERAKRSVNSKEDYTVNLDLASLSVRCFVDFRRAENPLDVLVCNAAVPTASEFTYTADEFEVSVGNHGFLAREMENA	

CsPORB	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	339
TaPORA	MIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	328
TaPORB	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	357
AtPORA	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	345
AtPORB	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	341
AtPORA	MIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	341
OsPORA	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	327
OsPORB	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	338
NtPORA	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	339
Consensus	LIYSGITGNTLNLGNPPKANLGLRCLACGLNCTGSPNDEGKFECAKYKCSKCNLLNCEFRRCYEEETGIFASLYPCGATITCLFREHPLFRLLFPFPFKYITKGVSE	

CsPORB	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	399
TaPORA	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	388
TaPORB	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	421
AtPORA	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	405
AtPORB	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	401
AtPORA	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	401
OsPORA	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	387
OsPORB	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	402
NtPORA	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	399
Consensus	EACKRLAQWSDPSLTKSQVYWSVNSASFENCLSEASDEKARKWVEKELVLA	

图 3 CsPORB 与其他物种的 POR 序列的多重比对。方框为高度保守的 NADPH 结合位点(TGASSSLG)和活性位点(YKDSK)。CsPORA: 墨兰; AtPORA: 拟南芥; OsPORA: 水稻; NtPORA: 烟草; TaPORA: 小麦。

Fig. 3 Multiple alignment of CsPORB sequences and POR sequences in other species. The boxes indicate highly conserved NADPH binding site (TGASSSLG) and active site (YKDSK). CsPORA: *Cymbidium sinense*; AtPORA: *Arabidopsis thaliana*; OsPORA: *Oryza sativa*; NtPORA: *Nicotiana tabacum*; TaPORA: *Triticum aestivum*.

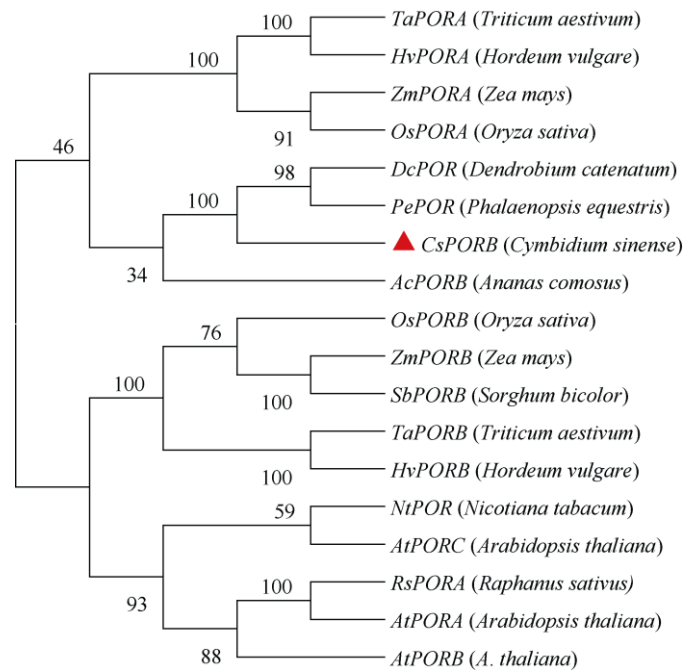


图4 *CsPORB* 与其他物种的 POR 系统进化树。CsPOR: 墨兰; AcPOR: 凤梨; ZmPOR: 玉米; HvPOR: 大麦; AtPOR: 拟南芥; OsPOR: 水稻; NtPOR: 烟草; TaPOR: 小麦; RsPOR: 萝卜; PePOR: 蝴蝶兰; DcPOR: 铁皮石斛; SbPOR: 高粱。

Fig. 4 Phylogenetic tree of *CsPORB* and POR in other species. *CsPOR*: *Cymbidium sinense*; *AcPOR*: *Ananas comosus*; *ZmPOR*: *Zea mays*; *HvPOR*: *Hordeum vulgare*; *AtPOR*: *Arabidopsis thaliana*; *OsPOR*: *Oryza sativa*; *NtPOR*: *Nicotiana tabacum*; *TaPOR*: *Triticum aestivum*; *RsPOR*: *Raphanus sativus*; *PePOR*: *Phalaenopsis equestris*; *DcPOR*: *Dendrobium catenatum*; *SbPOR*: *Sorghum bicolor*.

斛(*Dendrobium catenatum*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*)的 POR 蛋白亲缘关系最近, 聚为 PORB 类, 与禾本科植物的 PORA 相距较远, 与双子叶植物拟南芥的 3 种类型 POR 分离, 初步推测 *CsPORB* 属于 PORB 类蛋白家族。

2.3 *CsPORB* 表达模式分析

结果表明(图 5), *CsPORB* 在不同组织的表达水平差异明显, 在根和茎中表达量偏低, 在叶片有较高表达; 在叶芽生长发育的不同时期表达模式各不相同, *CsPORB* 在生长 1 周的叶芽中表达量最低, 随叶芽发育表达量逐渐升高, 且在生长旺盛的嫩叶中表达量达到最高, 在老叶中又下降。同时, *CsPORB* 的表达量在同一片叶的绿色区显著高于黄色区, 说明 *CsPORB* 基因在墨兰‘达摩’的叶绿素生物合成过程中有重要调节作用。

POR 基因家族成员对光照响应有差异, 从而发挥不同的生物学功能。结果表明(图 6), 黑暗处理 0~4 h 的 *CsPORB* 表达并无显著变化。而在黑暗处理 4 h 后移至光下, 在光 0~1 h 的 *CsPORB* 表达瞬时增加, 随后随着光照时间的延长表达逐

渐下降, 并在复光 4 h 后表达量基本恢复至处理前水平, 说明 *CsPORB* 可能受光强调控。

2.4 *CsPORB* 超表达

超表达植株验证 将 PCAM1300:*CsPORB* 载体转入拟南芥植株中, 在获得的阳性苗中随机选取 10 株进行实时荧光定量 PCR 检测(图 7)。结果表明, 野生型中无法检测到 *CsPORB* 表达, 10 株转基因株系中 *CsPORB* 表达量有显著提高(5~140 倍), 说明已获得 35S:*CsPORB* 转基因拟南芥植株。

表型变化 挑选 3 个转基因株系, *CsPORB* 表达量依次为 line 2>line 7>line 5, 这些植株的叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b)、总叶绿素(Chl a+b)和总类胡萝卜素(TCC)含量均高于野生型。经黑暗处理 1 周后, 野生型的 Chl a、Chl b、Chl a+b 和 TCC 含量明显降低, 而这些超表达植株下降的较少(表 1)。从表型上看野生型和 *CsPORB* 超表达植株叶片出现叶色变黄现象, 且野生型株系变黄现象更为严重(图 8); 在转基因株系中, *CsPORB* 表达量低的株系比表达量高的株系变黄现象严重。这

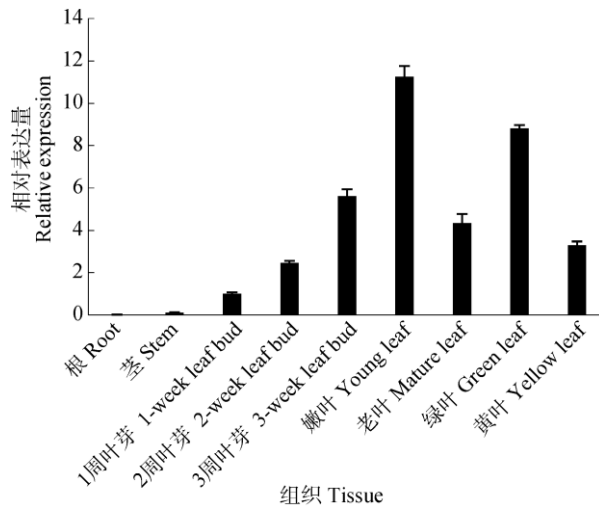


图 5 *CsPORB* 在墨兰‘达摩’组织中的表达

Fig. 5 Expression of *CsPORB* in tissues of *Cymbidium sinense* ‘Dharma’

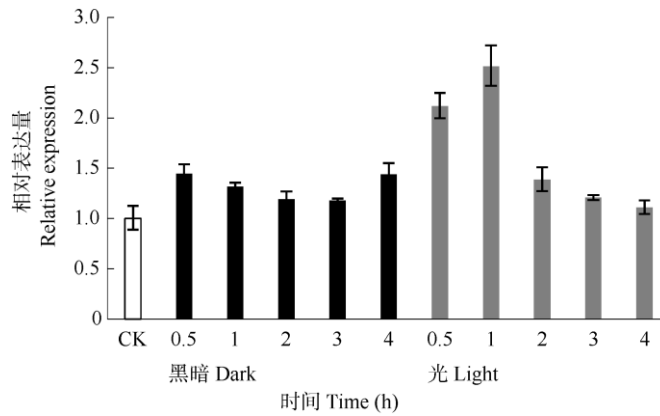


图 6 光照处理对墨兰‘达摩’*CsPORB* 表达的影响

Fig. 6 Effect of light on *CsPORB* expression in *Cymbidium sinense* ‘Dharma’

表 1 黑暗处理对 *CsPORB* 超表达植株的光合色素含量的影响

Table 1 Effect of dark on photosynthetic pigments content in *CsPORB* over-expression lines

		Chl a (mg g ⁻¹ FW)	Chl b (mg g ⁻¹ FW)	Chl a+b (mg g ⁻¹ FW)	Chl a/b	TCC (mg g ⁻¹ FW)	TCC/Chl a+b
光照 Light	WT	1.298 ±0.019c	0.447 ±0.001c	1.865 ±0.027b	2.902 ±0.036c	0.156 ±0.001c	0.083 ±0.001c
	<i>CsPORB</i>	1.412 ±0.001a	0.458 ±0.004b	1.989 ±0.003a	3.084 ±0.029a	0.192 ±0.003a	0.096 ±0.001a
黑暗 Dark	WT	0.711 ±0.002b	0.266 ±0.001b	1.102 ±0.005b	2.893 ±0.016c	0.157 ±0.002c	0.142 ±0.001b
	<i>CsPORB</i>	0.888 ±0.003a	0.310 ±0.002a	1.268 ±0.005a	2.955 ±0.010b	0.185 ±0.001b	0.138 ±0.002a

同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。WT: 野生型。

Data followed different letters within column indicate significant difference at 0.05 level. WT: Wild type.

表明黑暗处理影响了拟南芥超表达植株叶绿素降解的进程, *CsPORB* 基因是通过提高 POR 活性来促进叶绿素的合成, 使得植株中叶绿素含量增加, 从而使黑暗处理的 *CsPORB* 超表达植株中叶绿素的减少量要低于对照。

关键酶活性变化 选取 35S:*CsPORB* 转基因株系中表达量最高的 line 2, 对其叶片叶绿素合成代谢途径中 14 种关键酶活性进行了检测(图 9)。结果表明, *CsPORB* 超表达植株叶绿素合成代谢途径中的 POR 活性比野生型植株明显增高, 在 POR 参

与反应前的阶段中, BDPG (胆色素原脱氨酶, hydroxymethylbilane synthase) 显著降低, CPD (粪卟啉原氧化脱羧酶, coproporphyrinogen oxidative decarboxylase) 明显增高。而在 POR 参与反应后的阶段, 各

关键酶活性都相应增高, 尤其以 POR 和 MDCase (脱镁螯合酶, Mg chelatase) 增高显著。这说明超表达 *CsPORB* 基因提高了拟南芥叶绿素合成代谢途径中的 POR 活性, 并且参与叶绿素合成途径的调节。

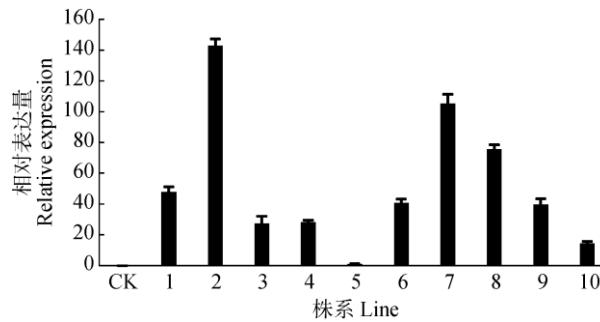


图7 *CsPORB* 超表达株系中 *CsPORB* 的表达。CK: 野生型。

Fig. 7 Expression of *CsPORB* in *CsPORB* over-expressing lines of *Arabidopsis*. CK: Wild type.



图8 *CsPORB* 超表达植株黑暗处理后的表型。WT: 野生型。

Fig. 8 Phenotype of *CsPORB* over-expression lines after dark treatment. WT: Wild type.

3 讨论

光在植物生长发育过程中具有重要作用^[16], 不仅为植物的光合作用提供能源, 还参与植物生长的一系列生理生化反应。在植物叶绿素合成途径中, POR 对光信号十分敏感^[17]。Sakuraba 等^[18]的研究表明, 水稻 *OsPORA* 表达受光抑制, 主要在叶发育的早期阶段发挥功能; *OsPORB* 在整个叶片发育中表达相对稳定, 特别在高光条件下, 它是光依赖叶绿素合成途径的关键因子, 类似于拟南芥中 *AtPORA* 和 *AtPORB* 的表达模式, 并与叶绿体合成途径有一定联系, 可见 POR 蛋白作为叶绿素合成

代谢途径中的最关键酶之一, 对植物生长发育有重要作用。

本研究从墨兰‘达摩’品系中克隆得到叶绿素合成关键酶基因 *CsPORB*, 其编码蛋白 CsPORB 与铁皮石斛、凤梨等物种的 PORB 同源性较近, 且与 POR 蛋白类似, 有高度保守结构域, 初步推测 CsPORB 属于 PORB 蛋白家族。表达模式分析表明, *CsPORB* 表达量随墨兰‘达摩’叶芽的生长逐渐升高, 在嫩叶中达到顶峰, 而老叶中明显降低; 在暗处理 4 h 后再见光 *CsPORB* 表达量显著上升, 并在随后的 4 h 内逐渐降至正常水平, 这与 Runge 等^[19]和 Holtorf 等^[20]的研究结果一致, 即 *CsPORB*

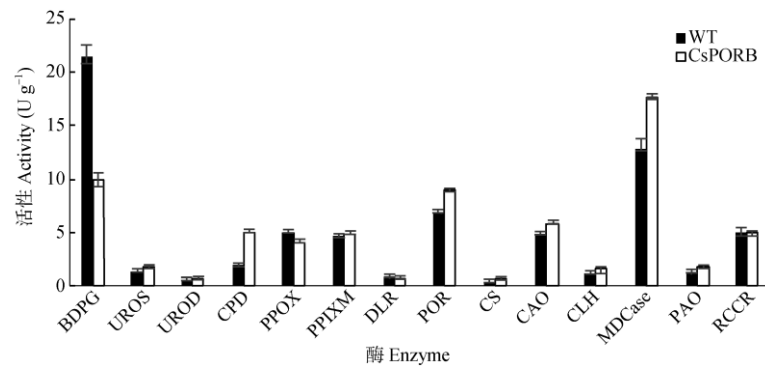


图9 *CsPORB* 超表达植株叶绿素合成代谢关键酶活性。BDPG: 胆色素原脱氨酶; UROS: 尿卟啉 III 合酶; UROD: 尿卟啉原脱羧酶; CPD: 粪卟啉原氧化脱羧酶; PPOX: 原卟啉原氧化酶; PPIXM: 镁原卟啉 IX 甲基转移酶; DLR: 二乙烯还原酶; POR: 原叶绿素酸酯氧化还原酶; CS: 叶绿素合成酶; CLH: 叶绿素酶; CAO: 叶绿素酸酯 a 氧化酶; MDCase: 脱镁螯合酶; PAO: 脱镁叶绿素 a 氧化酶; RCCR: 红色叶绿素降解产物还原酶。

Fig. 9 Activities of key enzymes involved in chlorophyll synthetic pathway of *CsPORB* over-expression lines. BDPG: Hydroxymethylbilane; UROS: synthase Uroporphyrinogen III synthase; UROD: Uroporphyrinogen decarboxylase; CPD: Coproporphyrinogen oxidative decarboxylase; PPOX: Protoporphyrinogen oxidase; PPIXM: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase; DLR: Divinyl reductase; POR: Protochlorophyllide oxidoreductase; CS: Chlorophyll synthase; CLH: Chlorophyllase; CAO: Chlorophyllide a oxygenase; MDCase: Mg chelatase; PAO: Chlorophyllide a oxygenase; RCCR: Red chlorophyll catabolite reductase.

伴随叶片发育的整个过程, 且其表达有可能受光照强度调节。对比墨兰叶艺‘达摩’叶片的绿色、黄色区 *CsPORB* 表达量, 绿色区的表达均高于黄色区, 推测墨兰‘达摩’叶色变异可能是由于 *CsPORB* 发生突变或者是其表达量发生变化造成的。在模式植物拟南芥中高表达 *CsPORB* 后, 明显提高植物的叶绿素含量, 同时, 超表达植株的 POR 活性明显增高, 且 POR 参与反应后的阶段中各关键酶活性都相应增高, 但合成途径早期的 BDPG 却有所降低, 表明 *CsPORB* 在不同物种间功能高度保守且与叶绿素合成代谢途径存在反馈调节机制。

参考文献

- [1] WU Z M, ZHANG X, HE B, et al. A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(1): 29–40. doi: 10.1104/pp.107.100321.
- [2] MASUDA T, FUSADA N, OOSAWA N, et al. Functional analysis of isoforms of NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(10): 963–974. doi: 10.1093/pcp/pcg128.
- [3] REINBOTHE S, REINBOTHE C, LEBEDEV N, et al. PORA and PORB, two light-dependent protochlorophyllide-reducing enzymes of angiosperm chlorophyll biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(5): 763–769. doi: 10.1105/tpc.8.5.763.
- [4] MASUDA T, TAKAMIYA K I. Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms [J]. *Photosynth Res*, 2004, 81(1): 1–29. doi: 10.1023/B:PRES.0000028392.80354.7c.
- [5] DAHLIN C, ARONSSON H, ALMKVIST J, et al. Protochlorophyllide-independent import of two NADPH: Pchlde oxidoreductase proteins (PORA and PORB) from barley into isolated plastids [J]. *Physiol Plant*, 2000, 109(3): 298–303. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.100311.x.
- [6] SU Q X, FRICK G, ARMSTRONG G, et al. POR C of *Arabidopsis thaliana*: A third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 47(6): 805–813. doi: 10.1023/A:1013699721301.
- [7] FRICK G, SU Q, APEL K, et al. An *Arabidopsis porB porC* double mutant lacking light-dependent NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested [J]. *Plant J*, 2010, 35(2): 141–153. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01798.x.
- [8] SPERLING U, van CLEVE B, FRICK G, et al. Overexpression of light-dependent PORA or PORB in plants depleted of endogenous POR by far-red light enhances seedling survival in white light and protects against photooxidative damage [J]. *Plant J*, 2010, 12(3): 649–658. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.00649.x.
- [9] PADDOCK T N, MASON M E, LIMA D F, et al. *Arabidopsis* protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) restores bulk chlorophyll synthesis and normal development to a *porB porC* double mutant

- [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 72(4/5): 445–457. doi: 10.1007/s11103-009-9582-y.
- [10] WU W J, ELSHEERY N, WEI Q, et al. Defective etioplasts observed in variegation mutants may reveal the light-independent regulation of white/yellow sectors of Arabidopsis leaves [J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53(11): 846–857. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01079.x.
- [11] GAO X L, LI S J, SHAO J F, et al. Preliminary study on isolation, mapping, and function of NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductase (*POR*) gene in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant Physiol J*, 2015, 51(6): 860–868. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2015.0105.
高小丽, 李素娟, 邵健丰, 等. 水稻 *POR* 基因的分选、定位与功能的初步研究 [J]. *植物生理学报*, 2015, 51(6): 860–868. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2015.0105.
- [12] ZHU G F, YANG F X, SHI S S, et al. Transcriptome characterization of *Cymbidium sinense* ‘Dharma’ using 454 pyrosequencing and its application in the identification of genes associated with leaf color variation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128592. doi: 10.1371/journal.pone.0128592.
- [13] XU Q Q, YANG F X, YE Q S, et al. Comparison of photosynthetic pigments content, chlorophyll fluorescence kinetics parameters and chloroplast ultrastructure of leaf mutant cultivars of *Cymbidium sinense* ‘Damo’ [J]. *Chin J Trop Crops*, 2017, 38(7): 1210–1215. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.07.006.
许庆全, 杨凤玺, 叶庆生, 等. 墨兰‘达摩’叶艺品系光合色素含量、叶绿素荧光特性和叶绿体超微结构的比较 [J]. *热带作物学报*, 2017, 38(7): 1210–1215. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.07.006.
- [14] JIANG K Y. Cloning and functional analysis of key genes involved in chlorophyll biosynthetic pathway in *Pseudosasa japonica* cv. Akebobosuji [D]. Hangzhou: Zhejiang Agricultural & Forest University, 2013: 44–55.
姜可以. 花叶矢竹叶叶绿素生物合成关键基因 *PjPORB* 和 *PjCAO* 的克隆与功能分析 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013: 44–55.
- [15] GABRUK M, STECKA A, STRZALKA W, et al. Photoactive protochlorophyllide-enzyme complexes reconstituted with PORA, PORB and PORC proteins of *A. thaliana*: Fluorescence and catalytic properties [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116990. doi: 10.1371/journal.pone.0116990.
- [16] LI H M, CULLIGAN K, DIXON R A, et al. *CUE1*: A mesophyll cell-specific positive regulator of light-controlled gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(10): 1599–1610. doi: 10.1105/tpc.7.10.1599.
- [17] ARMSTRONG G A, RUNGE S, FRICK G, et al. Identification of NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductases A and B: A branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108(4): 1505–1517. doi: 10.1104/pp.108.4.1505.
- [18] SAKURABA Y, RAHMAN M L, CHO S H, et al. The rice *faded green leaf* locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions [J]. *Plant J*, 2013, 74(1): 122–133. doi: 10.1111/tpj.12110.
- [19] RUNGE S, SPERLING U, FRICK G, et al. Distinct roles for light-dependent NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants [J]. *Plant J*, 2010, 9(4): 513–523. doi: 10.1046/j.1365-313X.1996.09040513.x.
- [20] HOLTORF H, REINBOTHE S, REINBOTHE C, et al. Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8): 3254–3258. doi: 10.1073/pnas.92.8.3254.