

# 木薯磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因全长cDNA克隆及表达分析

张杨<sup>1</sup>, 陈新<sup>2</sup>, 卢诚<sup>2</sup>, 王文泉<sup>2\*</sup>

(1. 海南大学农学院, 海口 571101; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 能源作物分子育种实验室, 海口 571101)

**摘要:** 应用巢式 PCR 从木薯栽培种 (*Manihot esculenta*) Arg7 和野生种 W14 (*M. esculenta* subsp. *flabellifolia*) 叶片中克隆到磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 *pepc* 全长 cDNA, GenBank 序列号为 JN387052 和 JN387053。cDNA 全长 2945 bp, 含 1 个 2895 bp 的开放阅读框, 预测编码的蛋白含 964 个氨基酸, 具有磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶保守结构域。木薯 PEPC 与麻疯树和蓖麻的 PEPC 氨基酸序列具有高度同源性。表达分析表明 *pepc* 在 W14 和 Arg7 叶中的表达量最高, 其次是须根和块根, 茎中最低。单日表达量动态分析表明, Arg7 叶中 *pepc* 总体表达量高于 W14, 但是 16:00 后 W14 高于 Arg7, 推测两种木薯 *pepc* 调控区域存在差异。

**关键词:** 木薯; *pepc* 基因; 生物信息学

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.04.008

## Cloning and Expression Analysis of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene *pepc* from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

ZHANG Yang<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, LU Chen<sup>2</sup>, WANG Wen-quan<sup>2\*</sup>

(1. Department of Agriculture, Hainan University, Haikou 571101, China; 2. Laboratory of Energy Crops and Molecular Breeding, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract:** The full-length cDNAs of phosphoenolpyruvate carboxylase gene *pepc* were cloned from cassava (*Manihot esculenta*) cultivar Arg7 and wild species (*M. esculenta* subsp. *flabellifolia*) W14 by using Nest-PCR method, respectively, with corresponding GenBank accession number of JN387053 and JN387052. Both of two cDNA sequences were 2945 bp in length including a ORF of 2895 bp, predicting to encode a protein with 964 amino acids and containing typical conserved sequences/domains of *pepc* gene. Cassava PEPC had high homologous with that in *Ricinus communis* and *Jatropha curcas*. The *pepc* expression was the highest in leaves of W14 and Arg7, followed fibrous roots and tuberous roots, and the lowest expression was in stems. The one-day dynamic expression analysis showed that the *pepc* expression in Arg7 leaves was higher than in W14 before 16:00, while it was higher in W14 than Arg7 after 16:00. Therefore, it suggested that the regulatory regions of *pepc* gene in two cassava species were different.

**Key words:** Cassava; *pepc* gene; Bioinformatics

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 又名树薯、木番薯, 是大戟科 (Euphorbiaceae) 木薯属植物, 为世界 3 大薯类作物之一, 全球 7 亿多人口的食物来源<sup>[1]</sup>。

木薯为适应热带与亚热带气候的淀粉高效累积作物, 具有较高的光合产物累积效率与独特的抗逆性等生物学特性<sup>[2]</sup>。在我国热带地区, 木薯是淀粉和

收稿日期: 2011-10-13

接受日期: 2012-01-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2010CB126600)资助

作者简介: 张杨, 在读博士生, 种质资源学专业。E-mail: zysummer@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wquanww@hotmail.com

酒精加工的主要原料。同时木薯作为一种生物能源和生物材料的原料,将会在应对全球能源与环境危机中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。

木薯具有高于一般 C<sub>3</sub> 植物的净光合速率(net photosynthetic rate, Pn, 达 43  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )和光合作用最适温度(45  $^{\circ}\text{C}$ )<sup>[4-5]</sup>。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, 简称 PEPC)是 C<sub>4</sub> 植物光合作用途径中的关键酶,在典型 C<sub>4</sub> 植物叶肉细胞中表现出很高的活性,它催化磷酸烯醇式丙酮酸和 CO<sub>2</sub> 不可逆地生成草酰乙酸,起到高效固定 CO<sub>2</sub> 的作用,最终提高 C<sub>4</sub> 植物的光合效率。栽培种木薯叶片中具有类似于 C<sub>4</sub> 植物叶片中的较高 PEPC 活性<sup>[6-7]</sup>,但野生型木薯则被认为是 C<sub>3</sub> 型植物<sup>[8]</sup>,且野生型叶片中的 PEPC 活性和净光合效率普遍低于栽培种。目前,对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[9]</sup>、玉米(*Zea mays*)<sup>[10]</sup>、蓖麻 (*Ricinus communis*)<sup>[11]</sup>、高粱 (*Sorghum vulgare*)<sup>[12]</sup>等和一些 C<sub>4</sub> 植物中 PEPC 的功能都有较深入的研究。近年来利用基因工程技术将 C<sub>4</sub> 植物的 *pepc* 基因导入水稻(*Oryza sativa*)等 C<sub>3</sub> 植物也取得了一些可喜进展,成为提高 C<sub>3</sub> 植物光合效率的新途径<sup>[13]</sup>。

本研究分别从木薯野生种(*Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia*) W14 和栽培种(*M. esculenta*) Arg7 叶片中克隆得到 *pepc* 基因全长 cDNA,对它们的核苷酸序列及编码的氨基酸序列进行了生物信息学分析,同时对木薯 *pepc* 基因的表达进行了分析,旨在探讨木薯 *pepc* 基因的结构与功能在野生种与栽培种间的差异,及其与典型 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 植物的同源性关系,为揭示木薯高光效、高淀粉累积机理奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**植物材料** 选择木薯栽培种(*Manihot esculenta*) Arg7 和野生种(*Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia*) W14 为材料。Arg7 为引自阿根廷的高淀粉种质,块根淀粉率在 32%~34%;W14 是来自国际热带农业研究中心(CIAT)的木薯野生种,生长较弱,能够结少数块根,块根淀粉率低,只有 4%~5%,以种子繁殖为主,茎秆一般没有繁殖再生能力。材料保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所木薯实验种质圃。

**菌株和质粒** 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和 pMD19-Vector 购自 TaKaRa 公司。

**试剂** 总 RNA 提取试剂 RNA plant plus Reagent 购自 TIANGEN 公司,反转录试剂盒 Revert Aid<sup>TM</sup> First Stand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司。快速 PCR 扩增聚合酶 Speed STAR HS DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 连接酶以及其它工具酶均购自 TaKaRa 公司。PCR 引物由上海生工合成,凝胶回收试剂盒购自 OMEGA bio-tek 公司。

### 1.2 叶片RNA提取以及cDNA第一条链合成

将木薯叶片在液氮中迅速研磨成粉末状,取 50~100 mg 转入 1.5 mL 离心管中,具体步骤按 RNA plant plus Reagent 操作手册进行。提取完毕后取 1  $\mu\text{L}$  RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。cDNA 第一链合成按照 Revert Aid<sup>TM</sup> First Stand cDNA Synthesis Kit 反应步骤进行。

### 1.3 *pepc*基因的克隆

**引物设计与巢式PCR扩增** 以麻疯树 (*Jatropha curcas*) *pepc* 基因的 cDNA 全长序列 (GenBank 序列号为 EU069413)为探针,通过 Blastn 搜索 GenBank 数据库中的木薯 EST 数据库,得到与其相似性较高的木薯 EST 序列。将搜索到的 EST 序列连同麻疯树 *pepc* 基因 cDNA 全长序列用软件 Vector NTI Suite 11.0 中的 Assemble 进行组装,去掉含有较多碱基差异的 EST 序列,用 Vector NIT Suite 11.0 中的 Analysis 分析组装后的 cDNA 序列的开放阅读框,用木薯 EST 序列拼接出较完整的 5'UTR 区域和 3'UTR 区域。根据 5'UTR 区域和 3'UTR 区域序列设计两轮巢式 PCR 引物进行木薯 *pepc* 基因全长 cDNA 序列克隆。

**巢式引物序列设计** 第一轮引物:上游引物为 5'-GTATAGCAAAGTAACAGGGC-3';下游引物为 5'-AGCCTTCCATAAATACACAGC-3'。第二轮引物:上游引物为 5'-CGCAACACAATCCTATGGCT3-3';下游引物为 5'-CCAACGGGAATAACACACATCA-3'。根据快速 PCR 扩增聚合酶 Speed STAR HS DNA Polymerase 手册进行两轮巢式 PCR 扩增。第一轮 PCR 扩增产物稀释 100 倍后,取 1  $\mu\text{L}$  作为第二轮扩增模板。

**PCR 产物的克隆** 利用凝胶回收试剂盒回

收纯化 PCR 产物,连接至 pMD-19 载体,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,通过氨苄青霉素 Amp 培养基筛选阳性克隆并测序。

#### 1.4 核苷酸、氨基酸生物信息学分析

蛋白质的基本性质预测等在 Vector NTI Suite 11.0 软件上进行,用软件 DNAMAN 进行同源性比对,运用 NCBI 中保守功能域(CDD)搜索程序分析结构功能域,在数据库 <http://cn.expasy.org/prosite/> 搜索蛋白质 Motif。

#### 1.5 组织特异性表达分析

分别采集种植 150 d 后的 W14 和 Arg7 的须根、块根、功能叶、茎等组织,并提取 RNA。采用 TaKaRa 公司的 One-Step RT-PCR Kit 试剂盒。*pepc* 基因表达分析引物为 *pepc*-F (5'-CGGATCAACGGGAAGCAAGA-3') 和 *pepc*-R (5'-GCAAGATGAGTGGGTCCTCC-3')。内参选择 18S rRNA 基因,引物为 18S-F (5'-ATGATAACACGACGGCTCGC-3') 和 18S-R (5'-CTTGGATGTCGTAGCCGTTT-3');反应中的 RNA 用分光光度计定量 500 ng。PCR 反应条件为:50 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min, 共 25 个循环(18S 基因);94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 28 个循环(*pepc* 基因)。

#### 1.6 叶片中单日动态表达分析

在晴朗天气,从早 8:00 至下午 18:00 每隔 2 h 采样一次,共 6 次分别采集种植 150 d 后的 W14 和 Arg7 顶部完全展开叶(共 12 份样),并提取 RNA。采用购自 Fermentas 公司的 First Strand cDNA Synthesis Kit (K1621) 试剂盒合成第一链 cDNA,采用购自 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 实时定量 PCR 试剂盒(DRR041)进行定量分析。所用实时定量 PCR 仪为 Rotor-Gene 6000。*pepc* 基因日动态表达分析引物与组织特异性表达分析引物相同。内参选择木薯 *Actin* 基因,引物为 *Actin*-F (5'-CGATGGTCGTACAACACTGGTAT-3') 和 *Actin*-R (5'-ATCCTCCAATCCAGACACTGT-3')。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 56 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 共 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算相对表达量, $CT$  值即循环阈值,表示每一个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。将原始  $CT$  值用 Rotor-Gene 6000 软件 1.7 版本的  $\Delta\Delta CT$  法转换成相对表达量,相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\Delta\Delta CT =$

( $\Delta CT_{\text{待测样}} - \Delta CT_{\text{对照}}$ ),  $\Delta CT = CT_{\text{pepc}} - CT_{\text{Actin}}$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 *pepc* 基因 cDNA 的克隆

利用 RNA plant plus Reagent 获得较完整的 W14 与 Arg7 叶片总 RNA,其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.93,电泳显示 28S rRNA 和 18S rRNA 都比较清晰明亮, RNA 完整性较好。

第一轮巢式 PCR 扩增没有出现特异条带。分别将 W14 和 Arg7 第一轮巢式 PCR 产物稀释 100 倍后,取 1  $\mu$ L 作为第二轮巢式 PCR 的模板进行扩增。结果在第二轮 PCR 扩增中均出现一条特异的亮带,大小约为 3000 bp,与预测的长度基本一致,分别回收得到的条带并克隆到 pMD19-Vector 后测序。

### 2.2 PCR 扩增片段测序与分析

通过比较多个测序结果(W14 和 Arg7 各回收 6 个克隆),证明来自 W14 和 Arg7 的片段长度均为 2945 bp,应用 Vector NTI Suite 11.0 的 AlignX 与其它物种进行比对,表明该片段是木薯 *pepc* 基因的 cDNA 片段。应用 Vector NTI Suite 11.0 中 find ORF 分析,说明 W14 与 Arg7 的 *pepc* cDNA 序列均包括 1 个 2895 bp 的开放阅读框,在起始密码子前还有个 18 bp 的序列,证明获得的是木薯 W14 与 Arg7 的 *pepc* 基因的全长 cDNA 序列。将获得的两个木薯 *pepc* 基因 cDNA 序列在 GenBank 中登录, Arg7 和 W14 的 *pepc* 基因 cDNA 序列号分别为 JN387052 和 JN387053。

### 2.3 木薯 *pepc* 基因编码的蛋白质特性及功能位点、结构功能域确定

通过 Vector NTI Suite 11.0 软件推测出 W14 和 Arg7 的 *pepc* 基因编码的 PEPC 均含 964 个氨基酸,通过 DNAMAN 比对表明, W14 和 Arg7 的 PEPC 氨基酸序列同源性高达 99%,仅存在 10 个不连续的氨基酸差异。

利用 ExPASy 的 ProtParam 预测 W14 和 Arg7 的 PEPC 分子量分别为 110.44 kD 和 110.36 kD,酸性氨基酸分别占总氨基酸的 14.50% 和 14.61%,碱性氨基酸分别占 13.37% 和 13.06%,理论等电点分别为 5.95 和 6.16,稳定系数分别为 45.35 和 44.35,两 PEPC 单条肽链均属于不稳定蛋白。用

DNAman 分析 W14 和 Arg7 PEPC 蛋白的二级结构表明,两 PEPC 的蛋白质螺旋( $\alpha$ -helix, 379 AA) 均占 39.27%, 折叠片(pleated sheet, 99 AA)均占 10.26%, 无规卷曲(Coil, 487 AA)均占 50.47%, 说明木薯 PEPC 主要以无规卷曲为主,间或螺旋和折叠。亲水性、疏水性以及跨膜蛋白分析、信号肽分析表明, W14 和 Arg7 的 PEPC 没有跨膜区及信号肽。

所有植物的 PEPC 氨基酸序列由 2 个区域构成, 1 个保守区域(C 末端区)和 1 个可变区域(N 末端区),C 末端有 100 个氨基酸总是保守不变的。本文选择的其它物种 PEPC 氨基酸序列均具有多个高度保守的区域, W14 和 Arg7 的 PEPC 氨基酸

序列在第 159~312 个氨基酸间仅有 12 个氨基酸与其它物种略有差异,其它都是保守序列,另一处较大的保守区在 745~789 个氨基酸间。除拟南芥外,这 45 个氨基酸在这些物种间是共有的序列。

C 末端是高度保守的,来源不同的 PEPC 氨基酸序列长度的差异几乎都是由在 N 末端或内部区域中添加或缺失额外的氨基酸序列引起的。高度保守的残基和基序可能与酶的活性位点和调控有关。通过 CDD 搜索, W14 和 Arg7 的 PEPC 均在 34~964 氨基酸位点间存在一个典型的大 Ppc 结构域(图 1)。根据 PROSITE 数据库分析表明, W14 和 Arg7 的 PEPC 氨基酸序列含均有 2 个大的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性

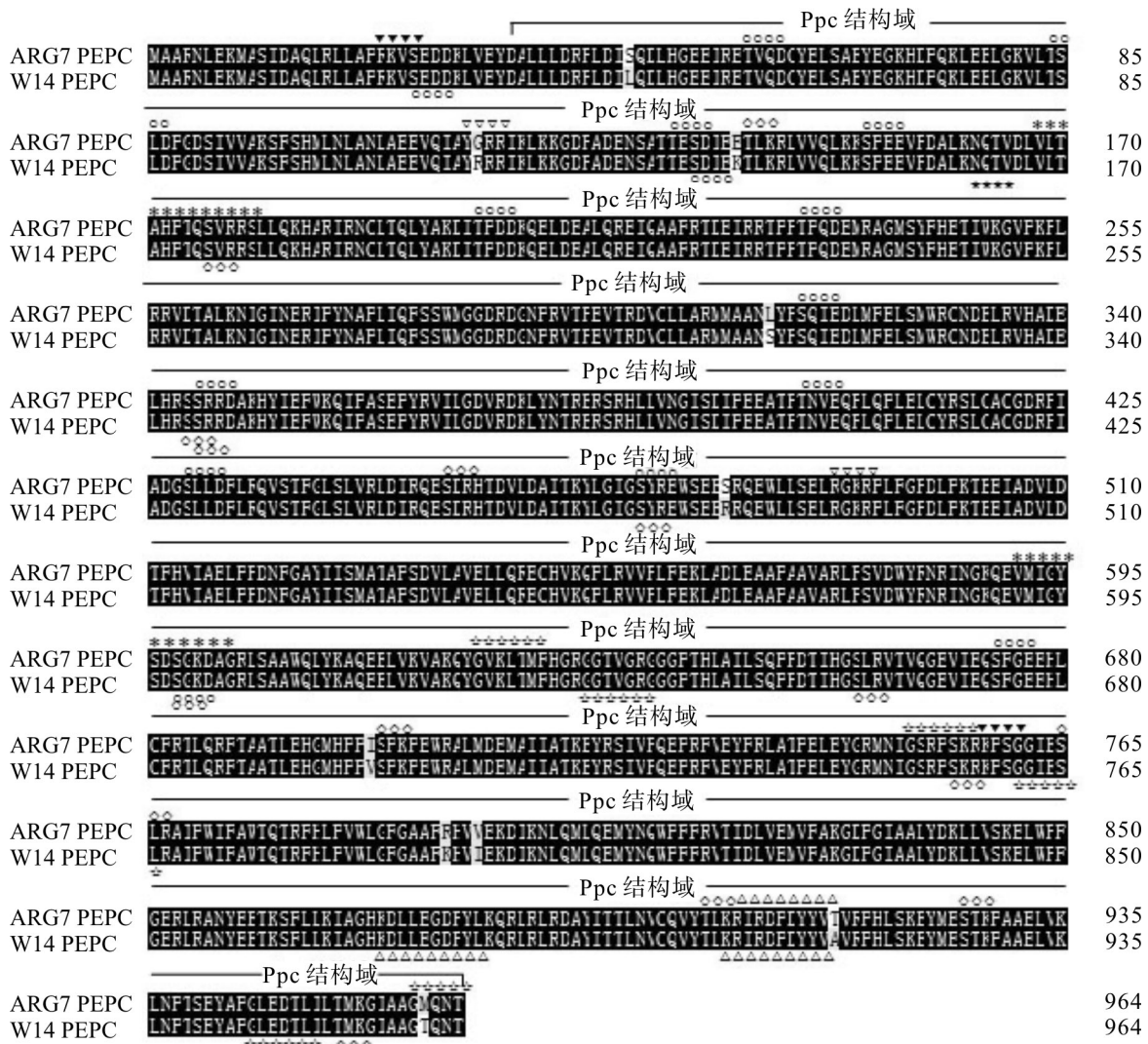


图 1 木薯 PEPC 蛋白的保守功能结构区域。\*: 2 个大的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性位点; ▼: PS00004; ○: PS00006; ▽: PS00009; ◇: PS00005; ★: PS00001; ☆: PS00008; △: PS00007。

Fig. 1 Conservative regions of cassava PEPC protein. \*: Two mainly phosphoenolpyruvate carboxylase active sites; ▼: PS00004; ○: PS00006; ▽: PS00009; ◇: PS00005; ★: PS00001; ☆: PS00008; △: PS00007.

位点,且都是位于168~179氨基酸位点(PS00781, VITAHPQTsvRR)和591~603氨基酸位点(PS00393, VMIGYSDSgKDAG)(图1)。搜索蛋白质的 Motif, W14 和 Arg7 的 PEPC 功能位点分别为 44 和 47 个(图1),均可分为7种模式:依赖于cAMP和cGMP的蛋白激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, PS00004) 2个;酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site, PS00006)分别为15和16个;蛋白激酶 C 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation site, PS00005)分别为14和15个;N端糖基化位点(N-glycosylation site, PS00001) 1个;酰胺化位点(Amidation site, PS00009)分别为1和2个;N端十四烷酰化位点(N-myristoylation site, PS00008) 8个;酪氨酸激酶磷酸化位点(Tyrosine kinase phosphorylation site, PS00007) 3个。

## 2.4 PEPC氨基酸序列同源性及系统进化分析

多重比对分析结果表明:Arg7 和 W14 的 PEPC 氨基酸序列与麻疯树的同源性最高,均达 95.00%;其次是蓖麻,分别为 94.81% 与 94.72%;与拟南芥、落花生(*Arachis hypogaea*)、柑橘(*Citrus sinensis*)、

黄花菊(*Flaveria trinervia*)、槽豆(*Glycine max*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、白羽扇豆(*Lupinus albus*)、玉米的分别为 88.56%、88.53, 89.20%、88.90%, 91.61%、91.62%, 86.11%、86.12%, 91.81%、91.71%, 93.11%、92.80%, 86.96%、86.97% 和 88.50%、88.10%。

对 PEPC 氨基酸序列进行系统进化分析结果表明(图2),两种木薯的亲缘关系最近,最先聚类,然后与大戟科的麻疯树、蓖麻和陆地棉聚在一起。木薯的 PEPC 与柑橘以及 C<sub>4</sub> 植物玉米等热带起源作物的 PEPC 呈现出进化的相似性;而落花生和白羽扇豆的 PEPC 与木薯的 PEPC 进化关系较远。

此外,从图3还可看出,木薯 PEPC 与蓖麻和麻风树的 PEPC1 最先聚合,与其它物种如拟南芥的多个 *pepc* 基因家族成员编码的 PEPC1 的遗传距离更近,可推测本研究克隆的两个木薯 *pepc* 基因属于 *pepc* 基因家族编码 PEPC1 的类型。

一般来说, C<sub>4</sub> 型 PEPC 蛋白的 C 末端对应于第 774 位或附近的氨基酸残基都为丝氨酸(S),而所有 C<sub>3</sub> 型 PEPC 蛋白相应位置均为丙氨酸(A)。本研究克隆得到的两种木薯 PEPC 蛋白在 C 末端第 774 位氨基酸均是丙氨酸,表明本研究得到的两

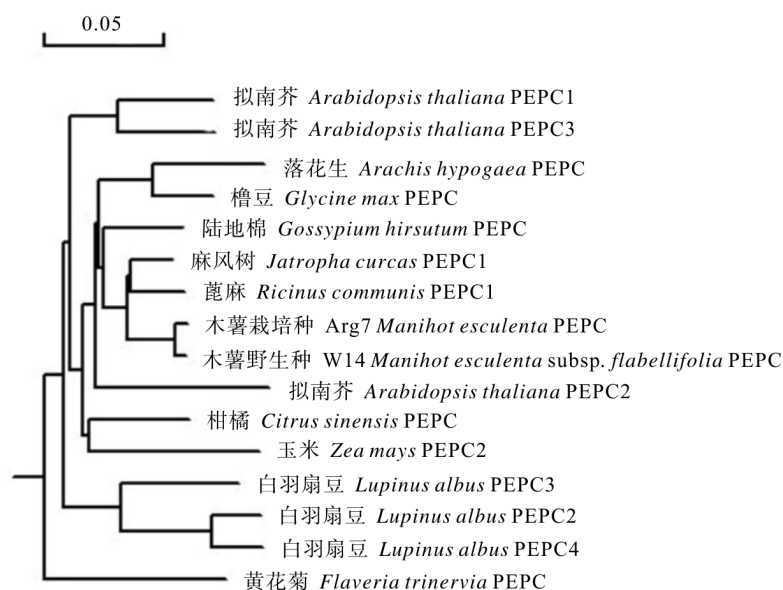


图2 PEPC蛋白的系统进化树。拟南芥 PEPC1: NP\_175738.1;PEPC2: NP\_850373.4;PEPC3: NP\_188112.1;落花生 PEPC: ACO48250.1;槽豆 PEPC: AAS67006.1;陆地棉 PEPC1: AAB80714.1;麻风树 PEPC1: ABU41519.1;蓖麻 PEPC1: ABR29878.1;柑橘 PEPC: ABK54024.2;玉米 PEPC2: NP\_001105438.1;白羽扇豆 PEPC3: AAU07998.1;PEPC4: AAU07999.1;黄花菊 PEPC: CAA81072.1。

Fig. 2 Phylogenetic tree of PEPC proteins. *Arabidopsis thaliana* PEPC1: NP\_175738.1; PEPC2: NP\_850373.4; PEPC3: NP\_188112.1; *Arachis hypogaea* PEPC: ACO48250.1; *Glycine max* PEPC: AAS67006.1; *Gossypium hirsutum* PEPC1: AAB80714.1; *Jatropha curcas* PEPC1: ABU41519.1; *Ricinus communis* PEPC1: ABR29878.1; *Citrus sinensis* PEPC: ABK54024.2; *Zea may* PEPC2: NP\_001105438.1; *Lupinus albus* PEPC3: AAU07998.1; PEPC4: AAU07999.1; *Flaveria trinervia* PEPC: CAA81072.1.

个木薯 PEPC 蛋白都属于 C<sub>3</sub> 型。

## 2.5 木薯 *pepc* 基因的表达

用 RT-PCR 的方法分析了 *pepc* 基因在木薯野生种和栽培种不同组织中的表达谱。结果表明, *pepc* 在 W14 和 Arg7 的须根、块根、叶中均有表达, 且在功能叶中的表达量最高, 而在茎中的表达量较少 (图 3)。

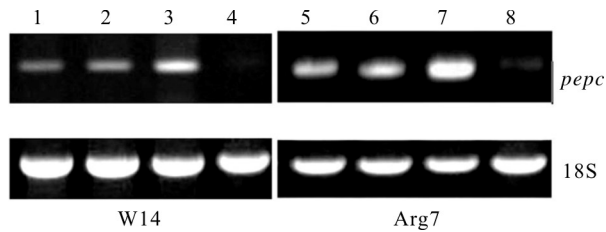


图 3 木薯 *pepc* 基因的表达。1~4. W14; 1. 须根; 2. 块根; 3. 功能叶; 4. 茎; 5~8. Arg7; 5. 须根; 6. 块根; 7. 功能叶; 8. 茎。

Fig. 3 Expression of *pepc* gene in cassava. 1~4. W14; 1. Fibrous root; 2. Tuberos root; 3. Function leaf; 4. Stem; 5~8. Arg7; 5. Fibrous root; 6. Tuberos root; 7. Function leaf; 8. Stem.

## 2.6 木薯 *pepc* 基因在叶片中的单日动态表达

用实时定量表达分析法, 研究了温室生长条件下 W14 和 Arg7 的 *pepc* 基因在功能叶的单日表达情况, 结果表明, W14 与 Arg7 的 *pepc* 基因表达存在较大差异 (图 4)。从上午 8:00 到 14:00, 栽培种 Arg7 中 *pepc* 基因的表达量明显高于 W14, 尤其是 8:00。从下午 16:00 到 18:00, Arg7 的 *pepc* 基因表达量则低于 W14, 但是最高表达水平出现在 Arg7 中。

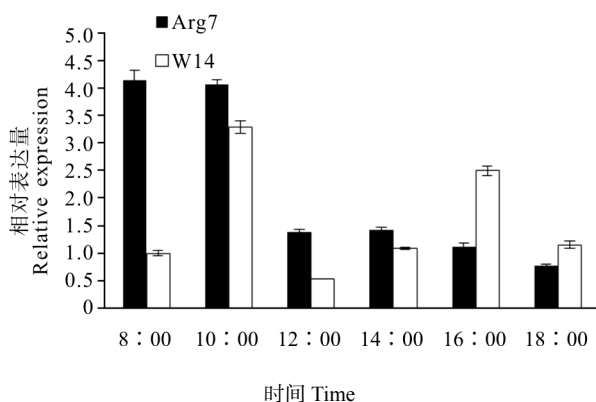


图 4 木薯 *pepc* 实时定量表达分析

Fig. 4 Expression levels of *pepc* by real-time PCR in cassava

## 3 讨论

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶是植物, 尤其是 C<sub>4</sub> 植物光合作用过程的关键酶, 在 C<sub>3</sub> 植物中, 该酶为三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle) 补充四碳二羧酸水平起着回补反应的功能<sup>[14]</sup>。菊科 (Asteraceae) 黄菊属 (*Flaveria*) 植物是研究 C<sub>4</sub> PEPC 进化的独特例子, 黄菊属的一些物种分别含有 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 及 C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 中间型的 PEPC, 研究表明 C<sub>4</sub> 型 *pepc* 基因是由 C<sub>3</sub> 型 *pepc* 基因进化而来的<sup>[15]</sup>。目前, 已有大量的研究证明应用 *pepc* 基因的超表达可以显著提高 C<sub>3</sub> 植物如水稻<sup>[16-17]</sup>、小麦 (*Triticum aestivum*)<sup>[18]</sup> 等经济作物的光合速率, 最终提高作物的产量。

麻疯树 *pepc* 基因 cDNA 全长序列<sup>[19]</sup> 以及 PEPC 在 C 末端的高度保守性为本研究 *pepc* 基因的克隆提供了可靠的序列信息。本研究首次从木薯野生种 W14 和栽培种 Arg7 中克隆得到了木薯 *pepc* 基因 cDNA 全长序列。它们的氨基酸序列在进化树中最先与同为大戟科的蓖麻和麻疯树聚合, 遗传距离最近, 然后才与锦葵科 (Malvaceae) 的落地棉、豆科 (Leguminosae) 的落花生和白羽扇豆聚合, 与十字花科 (Cruciferae) 的拟南芥距离较远, 表明 PEPC 在进化过程中既具有较强的保守性, 又存在不同的种属间的差异。

木薯叶片高光效的机制一直是木薯高淀粉率研究的关键点。有研究证明木薯栽培种叶片具有类似于 C<sub>4</sub> 类型植物叶片的维管束鞘细胞结构<sup>[6]</sup>, 并且叶片中的 PEPC 活性明显高于野生型木薯<sup>[6-7]</sup>。本研究结果表明, 木薯野生种和栽培种 *pepc* 基因高度同源 (达 98%), 且编码的氨基酸序列仅存在较小差异 (同源性达 99%)。W14 和 Arg7 功能叶 *pepc* 的单日动态表达存在明显差异 (图 4), 该基因在 W14 和 Arg7 的须根、块根、功能叶中均有较高表达, 在茎中表达量较低 (图 3), 这可能是由基因的表达调控差异造成的。因此, 克隆木薯野生种 W14 和栽培种 Arg7 *pepc* 基因的表达调控区域——启动子将是下一步的研究重点, 以解释木薯野生种和栽培种 *pepc* 基因表达差异的原因。

## 参考文献

- [1] Taylor N, Chavarriaga P, Raemakers K, et al. Development and application of transgenic technologies in cassava [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(4): 671-688.

- [2] Jansson C, Westerbergh A, Zhang J M, et al. Cassava: A potential biofuel crop in (the) People's Republic of China [J]. Appl Energy, 2009, 86(S1): S95-S99.
- [3] Ziska L H, Runion G B, Tomecek M, et al. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland [J]. Biom Bioen, 2009, 33(11): 1503-1508.
- [4] Hunt C A, Wholey D M, Cock J H. Growth physiology of cassava [J]. Field Crop Abstr, 1977, 30(2): 77-91.
- [5] Angelov M N, Sun J D, Byrd G T, et al. Novel characteristics of cassava, *Manihot esculenta* Crantz: A reputed C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate photosynthesis species [J]. Photosynth Res, 1993, 38(1): 61-72.
- [6] Edwards G E, Sheta E, Moore B D, et al. Photosynthetic characteristics of cassava (*Manihot esculenta*): A C<sub>3</sub> species with chloranthly mates bundle sheath cell [J]. Plant Cell Physiol, 1990, 31(8): 1199-1206.
- [7] EI-Sharkawy M A. International research on cassava photosynthesis, productivity, eco-physiology, and responses to environmental stresses in the tropics [J]. Photosynthetica, 2006, 44(4): 481-512.
- [8] Calatayud P A, Barón C H, Velásquez H, et al. Wild *Manihot* species do not possess C<sub>4</sub> photosynthesis [J]. Ann Bot, 2002, 89(1): 125-127.
- [9] Gregory A L, Hurley B A, Tran H T, et al. *In vivo* regulatory phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase AtPPC1 in phosphate-starved *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochem J, 2009, 420(1): 57-65.
- [10] Takahashi-Terada A, Kotera M, Ohshima K, et al. Maize phosphoenolpyruvate carboxylase: Mutations at the putative binding site for glucose 6-phosphate caused desensitization and abolished responsiveness to regulatory phosphorylation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11798-11806.
- [11] Gennidakis S, Rao S, Greenham K, et al. Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides interact in the hetero-oligomeric class-2 PEPC complex of developing castor oil seeds [J]. Plant J, 2007, 52(5): 839-849.
- [12] Cousins A B, Adam N R, Wall G W, et al. Development of C<sub>4</sub> photosynthesis in sorghum leaves grown under free air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) [J]. J Exp Bot, 2003, 54(389): 1969-1975.
- [13] Wu M, Zhang B J, Chen Q Z, et al. Research progress on introducing efficient photosynthetic C<sub>4</sub> genes into C<sub>3</sub> plant [J]. Chin Agri Sci Bull, 2010, 26(3): 68-71.  
吴梅, 张边江, 陈全战, 等. C<sub>4</sub> 高效光合基因在 C<sub>3</sub> 植物中的应用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(3): 68-71.
- [14] Hao N B, Ge Q Y, Du W G. Advances in the study of the photosynthetic physiology in breeding high photosynthetic efficiency soybean [J]. Chin Bull Bot, 1991, 8(2): 13-19.  
郝乃斌, 戈巧英, 杜维广. 大豆高光效育种光合生理研究进展 [J]. 植物学通报, 1991, 8(2): 13-19.
- [15] Westhoff P, Gowik U. Evolution of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase genes and proteins: A case study with the genus *Flaveria* [J]. Ann Bot, 2004, 93(1): 13-23.
- [16] Zhang B J, Hua C, Zhou F. Photosynthetic characteristics of transgenic rice with *PEPC+PPDK* gene [J]. Agri Sci China, 2008, 41(10): 3008-3014.  
张边江, 华春, 周峰. 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的光合特性 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3008-3014.
- [17] Ding Z S, Zhao M, Jin Y X. Effect of overexpression of maize *ppc* gene on photosynthesis in transgenic rice plants [J]. Acta Agron Sin, 2007, 33(5): 717-722.  
丁在松, 赵明, 荆玉祥. 玉米 *ppc* 基因过表达对转基因水稻光合速率的影响 [J]. 作物学报, 2007, 33(5): 717-722.
- [18] Zhang B, Ding Z S, Zhang G F. Introduction of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from *Echinochloa crusgalli* into wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Acta Agron Sin, 2007, 33(3): 356-362.  
张彬, 丁在松, 张桂芳. 瘤农杆菌介导获得稗草 *Ecpc* 转基因小麦的研究 [J]. 作物学报, 2007, 33(3): 356-362.
- [19] Fan Z Q, Li J Y, Tian M, et al. Cloning and sequence analysis of full-length cDNA of *pepc* gene from *Jatropha curcas* [J]. For Res, 2010, 23(3): 349-354.  
范正琪, 李纪元, 田敏, 等. 麻疯树磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 *pepc* 基因全长 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 林业科学研究, 2010, 23(3): 349-354.