

银腺杨不同部位叶片形态、生理及转录差异分析

毕楷杰, 孙耀国, 杨敏生, 张 军

(河北农业大学林学院/河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 保定 071000)

摘要: 本研究以银腺杨成年树木为对象, 测定了不同类型叶片形态、生理和基因表达差异, 为揭示银腺杨的成熟效应提供参考。主要研究结果如下: (1) 长枝叶和短枝叶的叶片形态差异显著, 不同部位的叶片有很大程度的重叠。(2) 不同部位叶片所含化合物差异显著, 即: 下部叶片的叶绿素a和叶绿素总含量显著大于上部和中部; 下部叶片的SOD酶活性显著高于上部和中部, MDA含量表现为中部>上部>下部; 下部叶片的淀粉含量显著低于上部和中部; 不同部位叶片的IAA含量随着高度的降低而上升, ABA含量表现为中部>上部>下部; 长枝叶的IAA和IAA/ABA显著大于短枝叶, ZR含量呈现相反的变化趋势。(3) 基于转录组数据对差异显著基因进行筛选, 不同部位叶片之间的差异显著基因数量少于不同类型叶片之间差异显著基因数量。(4) 对各比较组的差异显著基因进行GO和KEGG富集分析, 结果显示上部长枝叶相对于下部长枝叶(SC-vs-XC)、上部短枝叶相对于下部短枝叶(SD-vs-XD)差异显著基因显著富集到光合作用通路上, 对其中的2个基因进行基因注释, 发现这2个基因均编码PsbR蛋白, 且下部叶片中基因表达量上调; 对生长素转导过程进行分析, 发现短枝叶中相关基因表达量均上调。

关键词: 银腺杨(*Populus alba* × *P. glandulosa*); 叶片形态; 生理特性; 转录差异

Leaf Morphology and Physiological Analysis of Different Parts of Silver Glandular Poplar

BI Kai-jie, SUN Yao-guo, YANG Min-sheng, ZHANG Jun

(College of Forestry Science, Agricultural University of Hebei/Hebei Key Laboratory for Tree Genetic Resources and Forest Protection, Baoding 071000)

Abstract: In this study, the morphology, physiology and transcriptome of different types of leaves were measured in adult trees of Silver Poplar, which provided a reference for revealing the maturation effect. The main results are listed: (1) The leaf morphology at long branches and short branches was significantly different, and the leaves in different parts overlap to a large extent. (2) The in different parts of leaves was significantly different, and the content of chlorophyll a and total chlorophyll in the lower leaves were significantly higher than those of the upper and middle parts. The SOD enzyme activity in the lower leaves was significantly higher than that in the upper and middle parts. The MDA content was manifested as the middle > upper > lower par; . The starch content in lower leaves was significantly lower than that in upper and middle leaves; The IAA content of the leaves in different parts increased with the decrease of height, and the ABA content was the middle > the upper part > the lower part; The IAA and IAA/ABA of leaves at the long branches were significantly larger than those of the short branches, and the ZR content showed an opposite trend. (3) The number of differentially significant genes between different parts of leaves was less than the number of differentially significant genes between different types of leaves based on transcriptome data screening. (4) GO and KEGG enrichment analysis of different genes in each comparison group showed that the genes significantly enriched in the photosynthetic pathway in the upper long branching leaves relative to the lower long branching leaves (SC-vs-XC) and in the

收稿日期: 2022-09-24 修回日期: 2022-12-07 网络出版日期: 2022-12-27

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220924002>

第一作者研究方向为林业生物技术, E-mail: gowhere.jojo@qq.com

通信作者: 张 军, 研究方向为林木遗传育种, E-mail: zhangjunem@126.com

基金项目: 河北省重点研发计划项目(21326301D)

Foundation project: Hebei Province Key R&D Project(21326301D)

upper short branching leaves relative to the lower short branching leaves (SD-vs-XD), and gene annotation of two of these genes showed that both genes encoded PsbR proteins, and the gene expression was up-regulated in the lower leaves. The expression of these two genes was found to be up-regulated in the lower leaves, and the analysis of the growth hormone transduction process showed that the expression of the genes was up-regulated in the shorter leaves.

Key words: *Populus alba*×*P. glandulosa*; leaf shape; physiological characteristics; transcriptome difference

林木无性繁殖过程中,常伴随着成熟效应和位置效应。当无性繁殖材料因年龄的逐渐变大,随之产生生理衰老的现象,即成熟效应。因无性繁殖材料在原株上生长位置不同而造成影响的现象,称为位置效应。在杨树无性繁殖过程中成熟效应和位置效应常会对无性系造林造成严重影响。有研究表明成熟效应会严重影响扦插繁育和嫁接繁殖的过程^[1],进而对杨树的无性系造林造成严重影响。成熟效应与繁殖材料的母树年龄有关,繁殖材料衰老程度越深,成熟效应越明显。不仅如此,在同一棵树上,当同种繁殖材料不在同一位置,其组织和成熟度也大不相同。

为解析杨树成熟效应和位置效应形成机制,本研究以银腺杨成年树木为对象,测定了不同部位及同一部位长枝叶和短枝叶形态及生理差异,并基于转录组测序技术探究不同部位和不同类型叶片的基因表达差异,解析不同部位及类型叶片差异的生理及分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自河北省保定市易县洪崖山国有林场七里亭分场,为场区内一株30多年生的银腺杨,于2020年8月初从树体的同一方向分别采集树冠上部(S)、中部(Z)和树干基部(X)(以下简称为:上部、中部和下部)萌生出来的枝条上的功能叶,再分别从这3个部位上采集相对位置一致的长枝叶(C)和短枝叶(D),分别用上部长枝叶(SC)、上部短枝叶(SD)、中部长枝叶(ZC)、中部短枝叶(ZD)、下部长枝叶(XC)、下部短枝叶(XD)表示6种不同处理的叶片。每一项指标的测定均采集相对位置一致的长枝叶和短枝叶(5~6叶位)。

1.2 试验方法

1.2.1 不同部位叶片形态变异分析 对同一类型不同部位的叶片(SC/ZC/XC和SD/ZD/XD)分别进行叶片形状差异分析。(1)根据长枝叶和短枝叶的形态特征,在叶片上选取12个标志点,叶片标志点

的位置及其描述详见表1和图1。利用Image J^[2]软件对每个叶片上的12个标志点进行标记,用于后续分析。(2)数据的处理把上一步的数据信息导入到Morpho J^[3]中进行分析,分析的第一步,使用普氏叠印法(GPA, generalized procrustes analysis)对不同部位的长枝叶和不同部位的短枝叶进行分析,通过GPA分析可以得到一个样品平均形状的图像化结果。经过去除离群值,对数据进行提取和重新分类^[4]。(3)统计分析根据上一步分析出来的叶片标志点数据,进行主成分分析(PCA, principal component analysis),通过PCA分析找出与叶片形态变化相关的几个主要因素,并且可以发现叶片形态变化的主要特征。

表1 叶片标志点位置描述

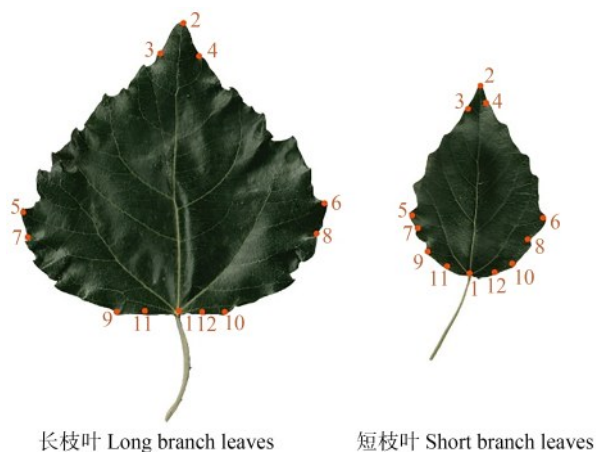
Table 1 Description of leaf landmark

标志点 Landmark	描述 Description
1	叶片与叶柄的连接点
2	叶片的顶端
3	叶片轮廓上能代表叶尖程度的点(叶片左侧)
4	叶片轮廓上能代表叶尖程度的点(叶片右侧)
5	叶片轮廓上能代表叶片最宽部位的端点(叶片左侧)
6	叶片轮廓上能代表叶片最宽部位的端点(叶片右侧)
7	紧接标志点5下边的凹陷点
8	紧接标志点6下边的凹陷点
9	能代表叶基部形状的点(叶片左侧),叶片基部第一个突出的点
10	能代表叶基部形状的点(叶片右侧),叶片基部第一个突出的点
11	能代表叶基部形状的点(叶片左侧),在标志点1和9之间
12	能代表叶基部形状的点(叶片右侧),在标志点1和10之间

1.2.2 叶片解剖结构 从树体上采集6个不同处理的功能叶各3片,经FAA固定液处理后,根据石蜡制片法^[5]制作永久切片。对每个切片选取3个视野,通过Motic B1Series System Microscope软件进行拍照、观察并测量叶片厚度、上表皮厚度、下表皮厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度和细胞结构紧实度(CTR, cell structure compactness)。将测得的数

据取平均值。CTR的计算公式如下:

$$\text{CTR} = (\text{栅栏组织厚度} / \text{叶片厚度}) \times 100$$



标记点序号同表1
Number of leaf landmark is the same as Table 1

图1 标志点位置

Fig.1 Location of the landmark

1.2.3 叶片色素含量测定 从树体的同一方向上采集6个不同处理的功能叶各3片,把叶片用蒸馏水洗净吸水纸擦干后,置于液氮中带回实验室,参照李合生^[6]的方法测定叶片光合色素含量。在470、649和665 nm下用紫外分光光度计测定叶片的吸光度值(A₄₇₀、A₆₄₉、A₆₆₅),计算出叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素的含量。计算公式如下:

$$C_a = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$$

$$C_b = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$$

$$C_{\text{类}} = (1000 \times A_{470} - 2.05 \times C_a - 114.8 \times C_b) / 245$$

叶绿素含量 = $CVb/S \times 1000$, 其中,C为各光合色素的浓度;S为叶片鲜重;V代表提取液总体积(10 mL);b为稀释倍数。

1.2.4 SOD、POD、CAT酶活性及MDA含量测定 从树体的同一方向上采集6个不同处理的功能叶各3片,洗净擦干后用锡箔纸包好,放入液氮中保存,后期进行超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)、过氧化氢酶(CAT, catalase)酶活性和丙二醛(MDA, malondialdehyde)含量的测定。测定方法参照李合生^[6]的方法,采用紫外吸收法测定叶片中的CAT含量,采用氮蓝四唑法测定叶片中的SOD含量;采用愈创木酚法测定叶片中的POD含量;采用硫代巴比妥酸法测定叶片中的MDA含量。

1.2.5 营养元素含量测定 从树体的同一方向上采集6个不同处理的功能叶各3片,洗净擦干后用锡箔纸包好,放入液氮中保存,采用考马斯亮蓝

法^[6]测定可溶性蛋白含量,利用邹琦^[7]的方法测定淀粉含量,采用国标法^[8-9]测定粗脂肪和粗纤维含量。

1.2.6 内源激素含量测定 从树体的同一方向上采集6个不同处理的功能叶各3片,经过剪碎混合后用于植物内源激素含量的测定。提取内源激素后使用Rigol L3000高效液相色谱仪对样品进行测定,色谱柱为Kromasil C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)反相色谱柱,流动相为甲醇:1%乙酸水=4:6,进样量10 μL,流速0.8 mL/min,柱温35 ℃,走样时间为40 min,紫外检测波长254 nm。

1.2.7 转录组测序分析 从树体的同一方向上分别采集上部和下部两个部位相对位置一致的长枝叶和短枝叶,每个处理采集3片,作为3次重复,将叶片清洗干净,吸水纸擦干后,用锡箔纸包好后放进液氮中,以备后期转录组测序。转录组测序分析主要包含以下步骤:(1)用植物总RNA提取试剂盒提取叶片中的总RNA,随后用NanoPhotometer spectrophotometer和Agilent2100 bioanalyzer检测RNA的纯度和完整性。(2)用带有Oligo(dT)的磁珠富集具有polyA尾巴的真核mRNA后,用超声波把mRNA打断。随后以片段化的mRNA为模版,随机寡核苷酸为引物,在M-MuLV逆转录酶体系中合成cDNA第一条链,随后用RNaseH降解RNA链,并在DNA polymerase I体系下,以dNTPs为原料合成cDNA第二条链。纯化后的双链cDNA经过末端修复,加A尾并连接测序接头,用AMPure XP beads筛选200bp左右的cDNA,进行PCR扩增并再次使用AMPure XP beads纯化PCR产物,最终获得文库。构建好的文库利用NanoPhotometer spectrophotometer和Agilent 2100 bioanalyzer检测RNA的纯度和完整性。(3)文库质检合格后,利用Illumina HiSeq2500平台进行测序,下机数据通过过滤掉低质量的数据,得到Clean reads。本研究与NCBI版本的毛果杨基因组(Populus trichocarpa-NCBI-NLM(nih.gov))进行比对。(4)利用StringTie v1.3.1软件^[10]进行转录本的重构,并利用RSEM^[11]计算每个样本中基因的表达量,结果再以FPKM的形式表现出来。利用DESeq2^[12]软件筛选各比较组的显著差异显著基因,筛选的标准为:FDR<0.05,且|log2FC|>1。(5)利用clusterProfiler(3.4.4)软件对筛选出的差异表达基因进行GO功能富集和KEGG通路富集分析。(6)根据转录组测序数据,从4个比较组中的植物激素信号转导途径中寻找与IAA和ABA有关的差异表达基

因,共10个差异表达基因进行RT-qPCR验证(其中上部长枝叶相对于上部短枝叶(SC-vs-SD)、下部长枝叶相对于下部短枝叶(XC-vs-XD)共有6个差异表达基因,上部长枝叶相对于下部长枝叶(SC-vs-XC)内有2个差异表达基因,上部短枝叶相对于下部短枝叶(SD-vs-XD)内有2个差异表达基因)。利用Primer 5.0软件设计每个基因的特异性引物,内参基因为杨树18s ribosomal基因,每个基因的引物信息见表2。利用反转录试剂盒将每个样本的RNA反转录为cDNA,之后进行RT-qPCR试验。RT-qPCR

试验用2× M5 HiPer Realtime PCR Super mix with Low Rox(SYBRgreen, with anti-Taq)试剂盒,购于北京聚合美生物科技有限公司。试验扩增的体系为10 μL 2× M5 HiPer Realtime PCR Super mix with Low Rox,上下游引物各0.5 μL,1 μL cDNA,8 μLddH₂O,共20 μL,每个样品进行3次生物学重复。PCR反应条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃变性15 s,退火15 s(根据引物设定不同温度),延伸72 ℃ 30 s,共35个循环。利用2^{-ΔΔCT}法计算基因的相对表达量。

表2 RT-qPCR引物信息表

Table 2 Primer sequence for RT-qPCR

处理 Treatment	引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
SC-vs-SD/ XC-vs-XD	LOC7472133	ACTACTTACACTGCTTGGTACC	CAATATACTGCTGCTGCTGAAG
	LOC7490982	GACTAGAAATCACAGAGCTAAGGTTGGG	TCTTCTTTTCGATAGGAACATACTGGTGG
	LOC7475739	GACTTGAAATCACAGAGCTAAGGTTGGG	CTCTTTGTTTGAACTTTTCGGTCATCGG
	LOC7494286	GAAAGGTTTCATAGCGGTATATGTTGGG	GAAGTGACATCAAGGAAAGTCTCTTCGT
	LOC7472711	AGAAGTATAAGCCATTTGTAAGCAGGTG	AATCTTCATACCAAAAATATGCTCATCG
SC-vs-XC	LOC7453841	AAGAGGAGGGATAGGATGTGTTGAGAGT	ATGAAAGGCTTGACTTCTGTGGTTGAT
	LOC7465052	CAGTAATGAACCTTTACGTGCC	GGGTCTTGTTTCAGACTTCAC
	LOC18108586	GAGCTTCGCGTTGTTAAGATAG	GAAGAACCTCGTAATGGTGCTA
SD-vs-XD	LOC7480000	GAAGTGCAAGAACAGAAGCTAC	CTCTCGGAACACAACCTAGAGTT
	LOC7469610	GTATCCAAGCATTTTAGCCAG	TTCTCAGATGTATTCCTCGCTC

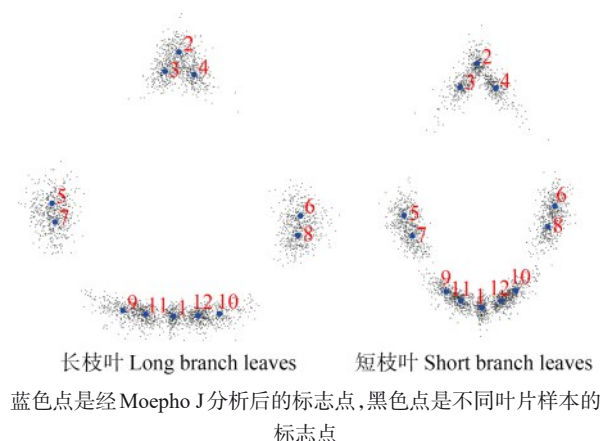
SC代表上部长枝叶;XC代表下部长枝叶;SD代表上部短枝叶;XD代表下部短枝叶;SC-vs-SD代表上部长枝叶相对于上部短枝叶;XC-vs-XD代表下部长枝叶相对于下部短枝叶;SC-vs-XC代表上部长枝叶相对于下部长枝叶;SD-vs-XD为上部短枝叶相对于下部短枝叶;下同
SC represents the upper long branch; XC represents the lower long branch; SD represents the upper short branch; XD represents the lower short branch; SC-vs-SD represents the upper long branch relative to the upper short branch; XC-vs-XD represents the lower long branch relative to the lower short branch; SC-vs-XC represents the upper long branch relative to the lower long branch; SD-vs-XD is the upper short branch relative to the lower short branch; The same as below

1.2.8 数据分析 使用Excel对数据进行处理,利用SPSS 26.0软件对各项指标进行方差分析和差异显著性检验,利用Origin 2019软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 不同部位叶片形态变异分析

2.1.1 叠印后形状 利用Morpho J软件对不同部位的长枝叶以及不同部位的短枝叶的标志点数据进行普氏叠印法分析(图2)。不同部位的长枝叶和短枝叶的散点集中分布在12个标志点(蓝色的点)附近,使所有叶片最大限度地重合,没有多余散点距对应标志点较远,说明GPA分析排除了非形态变异因素带来的差异,较好的表现了叶片形状。



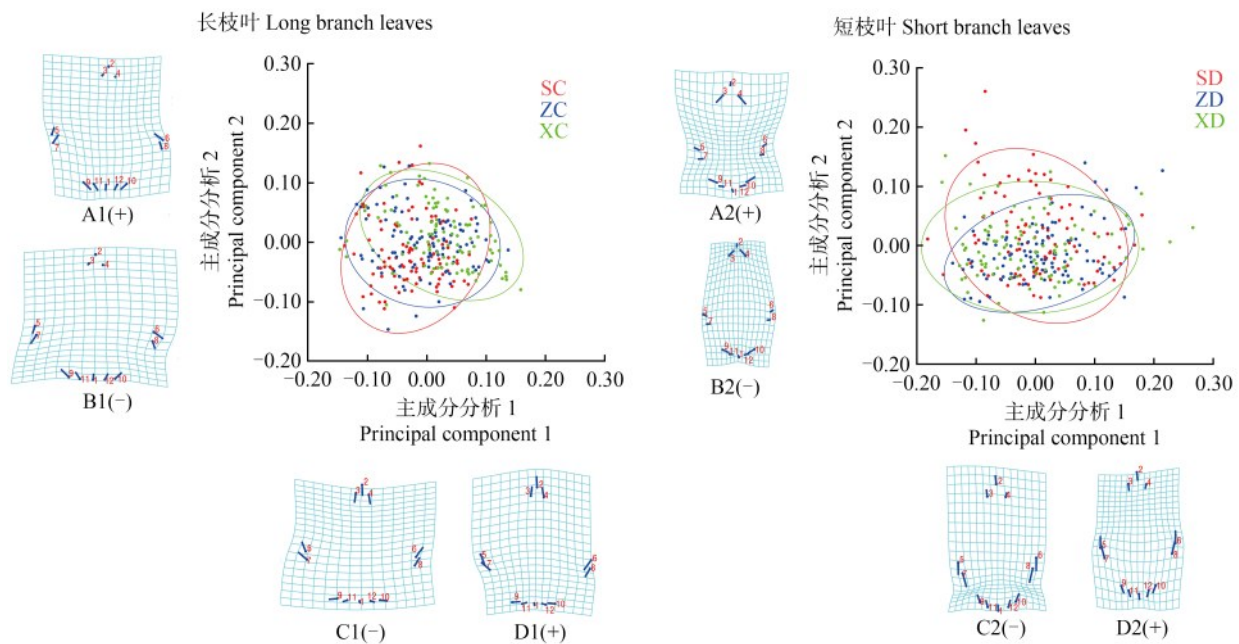
The blue dot is the marker point after Moepho J analysis, and the black dot is the marker point of different leaf samples

图2 不同部位之间叶片普氏叠印分析散点图

Fig.2 Generalize procrustes analysis of the leaf shape between different positions

2.1.2 不同部位叶片差异可视化分析 图3中的A1、B1、C1、D1图展示了不同部位的长枝叶在PC1和PC2轴上的变化趋势,在PC1轴的负方向上,叶片的宽度较大,表现为表示叶尖程度的3个标志点(2、3、4)向内收缩,其他标志点向外扩张;而处于PC1正轴方向的叶片表现出相反的趋势。在PC2轴上,表示叶尖程度的3个标志点变化较小,其他标志点变化较大,在负轴的叶片表现为5、6、7、8标志点向外扩张,表示叶基程度的5个标志点向内收缩,并且叶片最宽处以下部分的叶片发生向左扭曲;当PC2逐渐增大时,叶片的形状表现出相反的变化。图3中的A2、B2、C2、D2图展示了不同部位的短枝叶在

PC1和PC2轴上的变化趋势,在PC1轴的负方向上,叶片的最宽处距叶尖的距离较大,叶片基部距叶片最宽出的距离较小,并且叶片上表现叶尖程度的3个点(2、3、4标志点)向外扩张,5、6、7、8标志点向下延伸,表示叶片基部的5个标志点向内收缩;而处于PC1正轴上的叶片则表现出相反的趋势。在PC2轴的负方向上,叶片较尖,并且叶片基部较窄,叶片更加的狭长,12个标志点都表现为向内收缩;当PC2逐渐增大时,叶片的形状表现出相反的变化,12个标志点都向外扩张,叶片的叶尖较钝,叶基较宽。叶尖、叶基以及叶片最宽处的变化为叶形变异的主要特征。



每个网格图中深蓝色圆点代表的是叶片的平均形态,线条的末端代表的是每个标志点与叶片平均形态之间的差异,线条的长短代表的是对应标志点的变化幅度,浅蓝色网格的变化即代表叶片的变化趋势。A1:PC2轴的值0.12时的叶片平均形态;B1:PC2轴的值-0.12时的叶片平均形态;C1:PC1轴的值-0.15时的叶片平均形态;D1:PC1轴的值0.15时的叶片平均形态。A2:PC2轴的值0.15时的叶片平均形态;B2:PC2轴的值-0.1时的叶片平均形态;C2:PC1轴的值-0.18时的叶片平均形态;D2:PC1轴的值0.18时的叶片平均形态;ZC代表中部长枝叶;ZD代表中部短枝叶;下同

The dark blue dots in each grid graph represent the average shape of the leaves, the end of the line represents the difference between each marker point and the average shape of the leaves, the length of the line represents the change amplitude of the corresponding marker point, and the change of the light blue grid represents the change trend of the leaves. Average leaf shape with PC2 axis values of 0.12(A1) and -0.12(B1); Average leaf shape with PC1 axis values of -0.15(C1) and 0.15(D1). Average leaf shape with PC2 axis values of 0.15(A2) and -0.1(B2); Average leaf shape with PC1 axis values of -0.18(C2) and 0.18(D2); ZC represents the middle long branch; ZD represents the middle short branch; The same as below

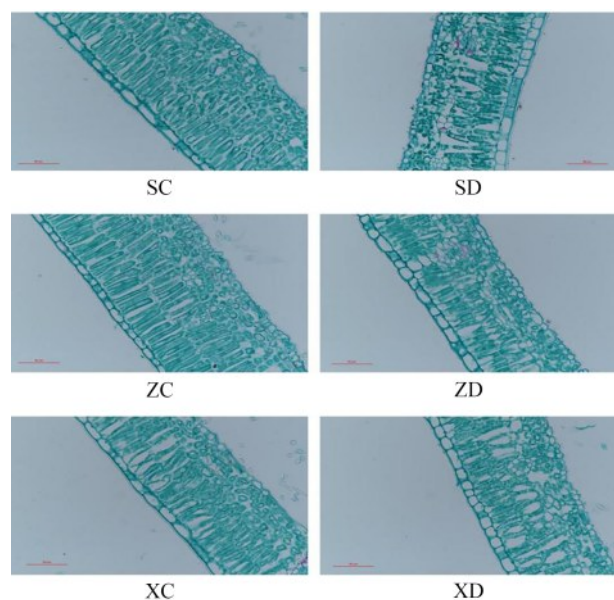
图3 不同部位之间叶片形态主成分分析散点图及网格轮廓图

Fig.3 Principal component analysis and outline variation of the leaf shape between different positions

2.2 不同部位及类型的叶片解剖结构分析

由图4可知,在长枝叶中,下部叶片的叶片厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度均显著小于上部和中部的叶片;而上部叶片的上表皮厚度则显著大于中部和下部。而在短枝叶中,下部叶片的栅栏组

织厚度和细胞结构紧实度显著大于上部和中部。5个观测指标中,长枝叶的栅栏组织厚度、细胞结构紧实度均显著大于短枝叶;且长枝叶的栅栏组织厚度占整个叶片厚度的比例更大。

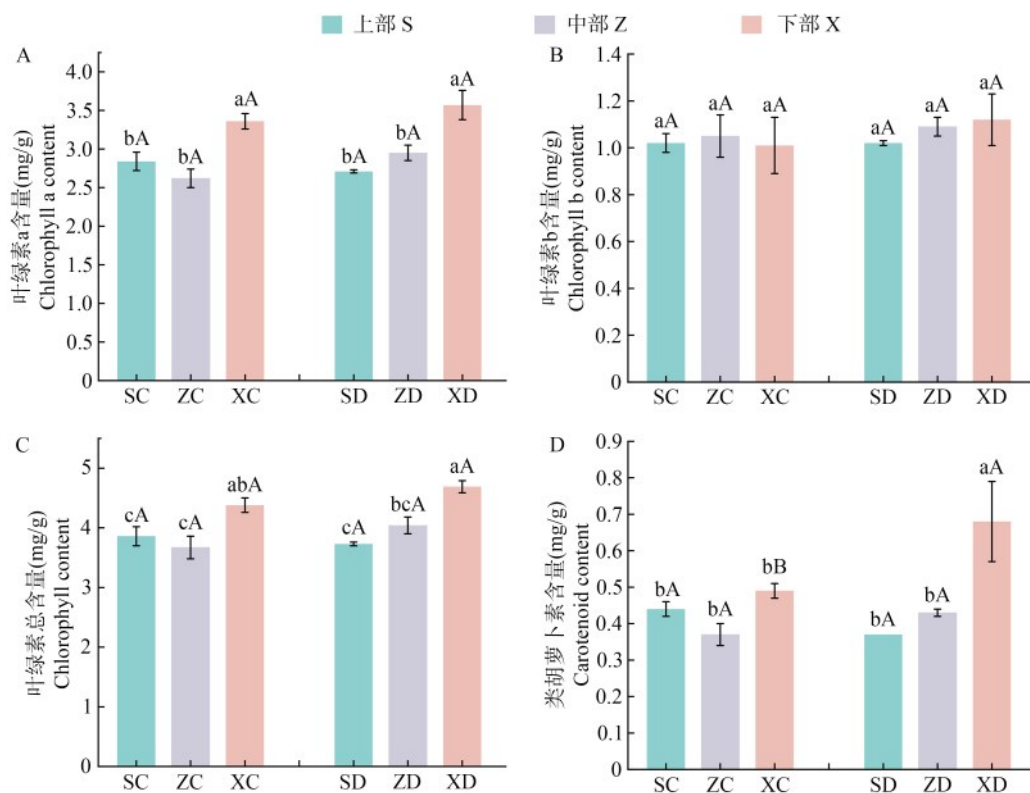


图中的比例尺为 50 μm

The scale bar in the figure is 50 μm

图4 不同部位及类型叶片横切结构(40 $\times$)

Fig.4 Blade cross-cutting structure of different positions and types(40 $\times$)



图中的小写字母代表同一类型不同部位在 $P<0.05$ 水平下的差异显著性;大写字母代表每个部位不同类型叶片在 $P<0.05$ 水平下的差异显著性;下同

The lowercase letters in the figure represent the difference in the difference between different parts of the same type at the level of $P<0.05$ and the uppercase letters represent the difference in the significance of the difference between different types of leaves in each part at the level of $P<0.05$;

The same as below

图5 不同部位及类型叶片光合色素含量的差异

Fig.5 The difference of photosynthetic pigment content in different parts and types of leaves

2.3 不同部位及类型叶片生理指标分析

2.3.1 叶片光合色素含量差异 由图5可知,不同部位叶片的光合色素含量差异显著,在长枝叶中,下部叶片的叶绿素a、叶绿素总含量都显著大于上部和中部;在短枝叶中,下部叶片的叶绿素a、类胡萝卜素含量和叶绿素总含量显著大于其他两个部位。长枝叶和短枝叶的光合色素含量对比中,不同类型叶片的类胡萝卜素含量存在差异,在不同部位呈现不同的变化趋势,在下部,短枝叶的类胡萝卜素含量大于长枝叶。

2.3.2 叶片抗氧化酶分析 由图6可知,不同部位的SOD酶活性和MDA含量存在显著差异且具有明显的变化趋势,下部叶片的SOD酶活性显著高于上部和中部,不同部位的长枝叶和不同部位的短枝叶的MDA含量均表现为中部>上部>下部。SOD酶活性在长枝叶和短枝叶中差异显著,在不同部位中呈现不同的变化规律,上部的长枝叶和短枝叶未表现出显著差异,下部和中部均表现为短枝叶>长枝叶。

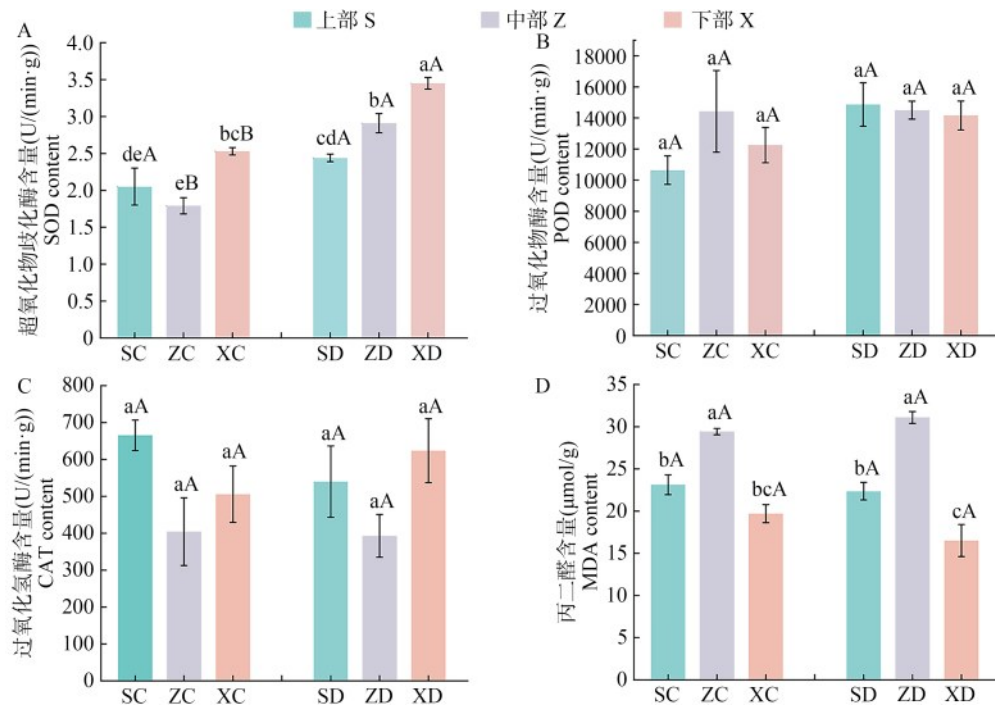


图6 不同部位及类型叶片抗氧化酶含量的差异

Fig.6 The difference of antioxidant enzyme content in different parts and types of leaves

2.3.3 叶片营养物质分析 不同部位及类型叶片的可溶性蛋白、淀粉、粗脂肪、粗纤维含量测定结果如图7所示。不同部位叶片的营养物质含量差异显著。在长枝叶中,下部叶片的淀粉含量显著低于上部和中部。在短枝叶中,不同部位叶片的可溶性蛋白、粗纤维、淀粉含量均存在显著差异且变化趋势

相同,即下部叶片显著小于上部和中部。在上部和中部,叶片的可溶性蛋白含量、粗纤维含量均差异显著,表现为长枝叶显著小于短枝叶。在下部,短枝叶的淀粉含量显著小于长枝叶、粗脂肪含量显著大于长枝叶。

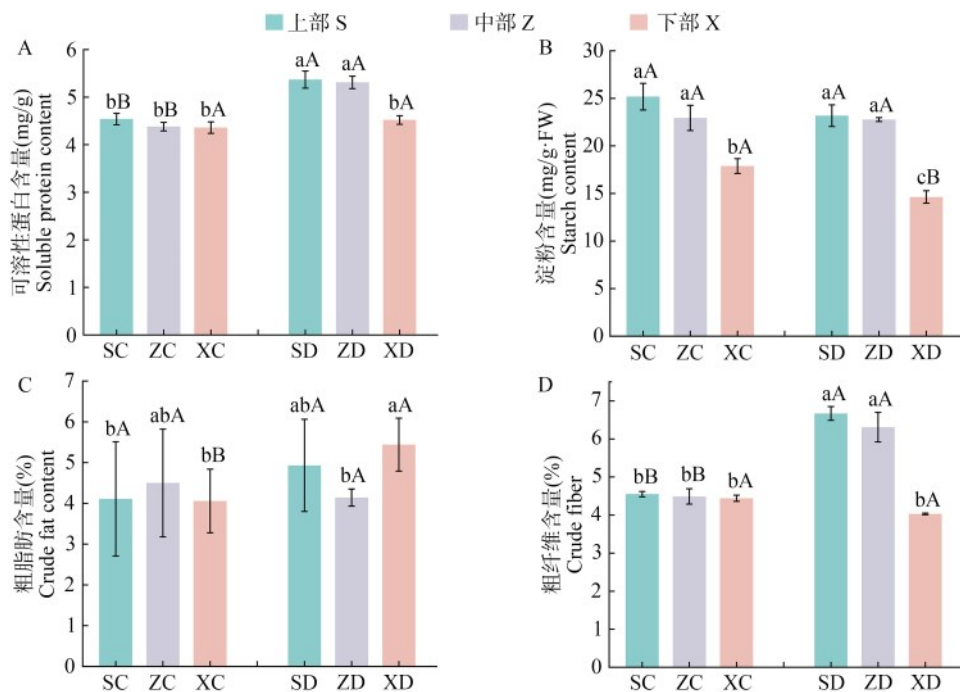


图7 不同部位及类型叶片营养物质含量差异

Fig.7 Differences in nutrient content of different parts and types of leaves

2.3.4 叶片内源激素含量分析 不同部位及类型叶片中的 IAA、ABA、ZR 和 GA_3 含量及 IAA/ABA 值测定结果如图 8 所示。不同部位叶片在观测的 5 个指标中均差异显著,不同部位叶片的 IAA 含量随着高度的降低呈现上升趋势,不同部位叶片中的 ABA

含量表现为中部>上部>下部的趋势,下部叶片的 ZR 含量显著小于上部和中部,IAA/ABA 值则是下部显著大于上部和中部,不同部位的 GA_3 含量在不同叶片类型中呈现不同的变化趋势。

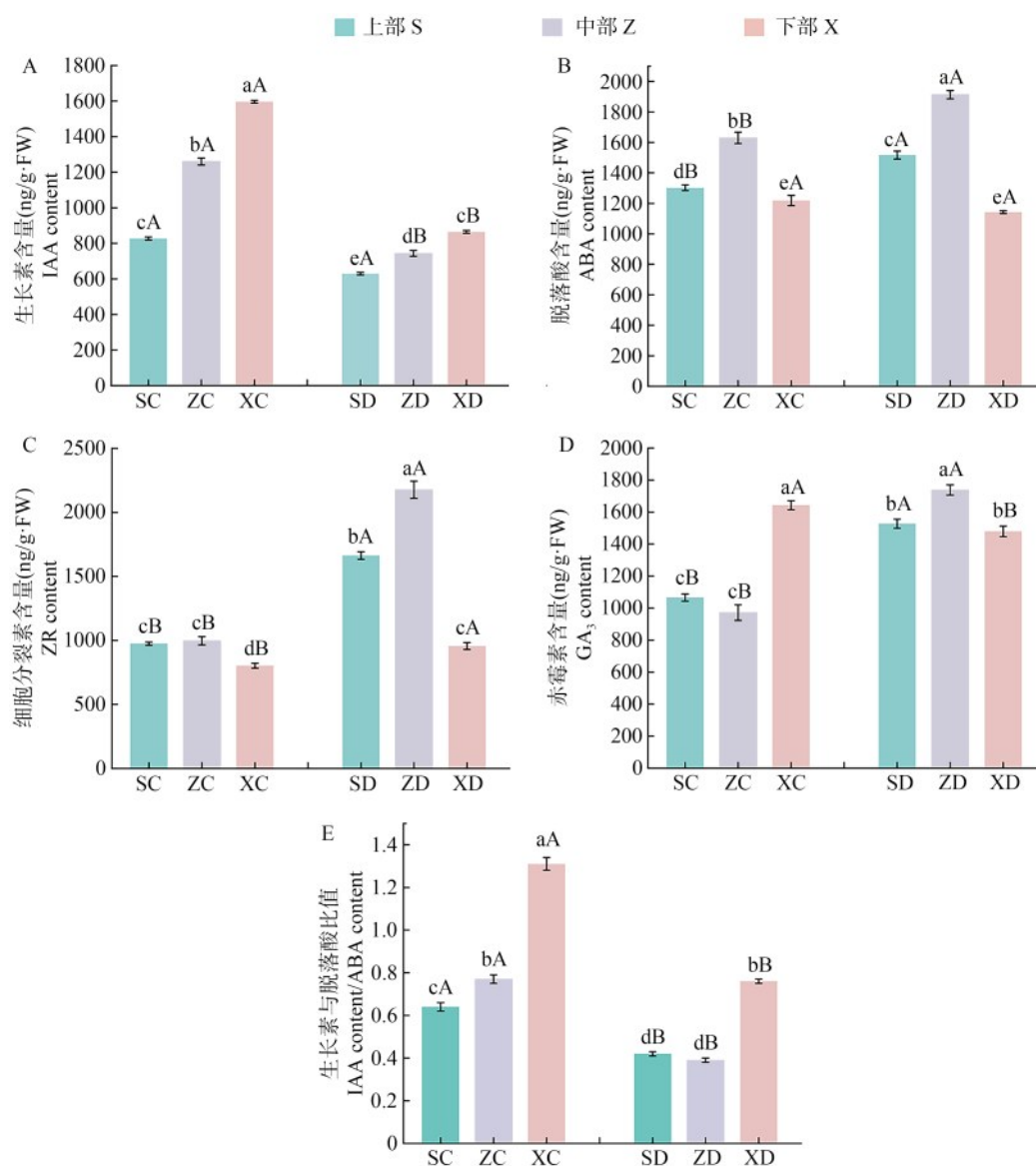


图8 不同部位及类型叶片内源激素含量差异

Fig.8 Difference of endogenous hormone content in different parts and types

长枝叶和短枝叶的激素含量存在显著差异。长枝叶和短枝叶在观测的 5 个指标中均差异显著,长枝叶的 IAA 含量、IAA/ABA 值均显著大于短枝叶,ZR 含量呈现相反的变化趋势,长枝叶和短枝叶的 ABA 含量和 GA_3 含量存在显著差异,在不同部位中的变化趋势不同。

2.4 不同部位及类型叶片转录组测序分析

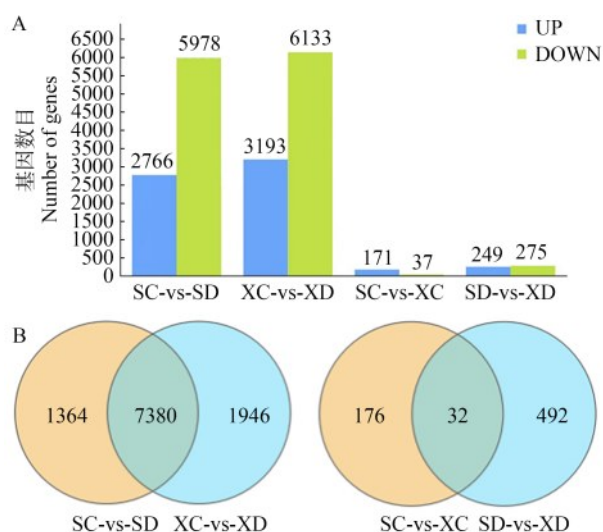
2.4.1 转录组数据质量分析

对 12 个样品进行转录

组测序共获得 79.3 Gb 的数据,531193874 条 Clean reads。平均每个样本的数据量为 6.6 Gb。各样本 GC 含量均大于 43%,Q20 和 Q30 的碱基百分比分别在 98% 和 94% 左右。利用 HISAT2 软件,将测序得到的序列与毛果杨参考基因组进行比对,比对结果显示各样本的总映射(Total_Mapped)都超过了 70%,非重复映射(Unique_Mapped)在 68.83%~72.33% 之间,多重映射(Multiple_Mapped)在 2.78%~3.18% 之

间。从上面的结果可以看出,转录组测序数据质量较好,可以用于后续生物信息学分析。

2.4.2 不同比较组间差异显著基因分析 图9A结果显示,由不同类型叶片(上部长枝叶相对于上部短枝叶(SC-vs-SD)、下部长枝叶相对于下部短枝叶(XC-vs-XD))所引起的差异显著基因数量明显多于不同部位叶片(上部长枝叶相对于下部长枝叶(SC-vs-XC)、上部短枝叶相对于下部短枝叶(SD-vs-XD))引起的差异显著基因数量。此外,上部长枝叶相对于下部长枝叶的上调基因数量大于下调基因数量,而其他3个比较组的上调基因数量都小于下调基因数量。



A表示不同比较组上调和下调基因数量图。B表示不同比较组之间差异显著基因韦恩图。其中,图B左图表示不同类型叶片比较组差异显著基因韦恩图,图B右图表示不同部位叶片比较组差异显著基因韦恩图。图B中每一个圆圈内数字表明相对应比较组的差异显著基因数量,圆圈重叠处数字为两个比较组之间共有的差异显著基因数量

A represents the number of up-regulated and down-regulated genes in different comparison groups. B represents the Wayne map of different genes between different comparison groups. Among them, the left figure of figure B shows the Wayne map of different types of leaf comparison groups, and the right figure of figure B shows the Wayne map of different types of leaf comparison groups. In figure B, the number in each circle indicates the number of significantly different genes in the corresponding comparison group, and the number at the overlap of the circle indicates the number of significantly different genes shared between the two comparison groups

图9 不同比较组差异显著基因分析图

Fig.9 Analysis plot of different comparative groups of different genes

差异显著基因维恩图可以看出不同比较组中共有和特有的差异显著基因数量,从图9B可以看出,上部长枝叶相对于下部长枝叶和上部短枝叶相

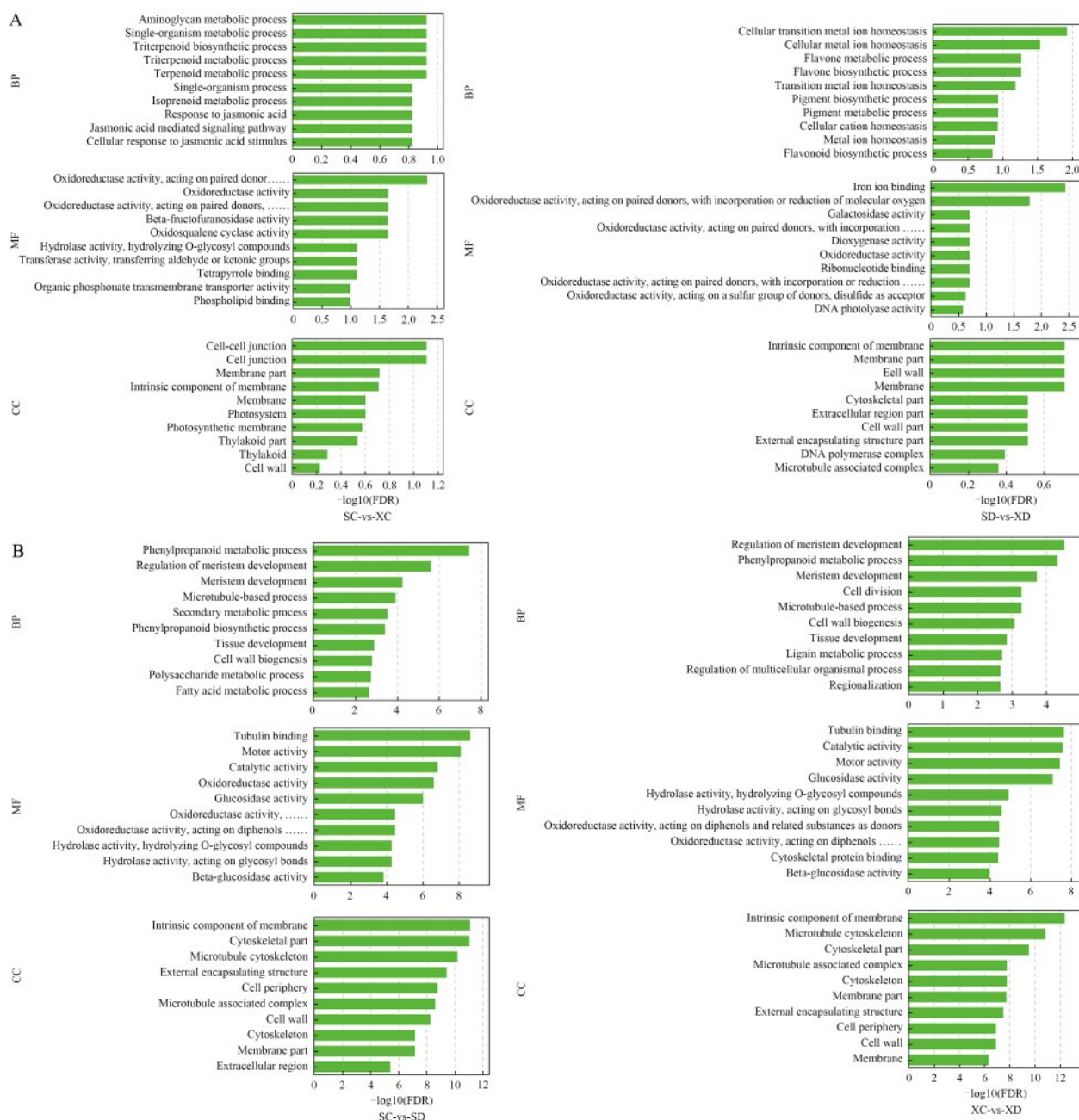
对于下部短枝叶之间共有的差异显著基因有32个。上部长枝叶相对于上部短枝叶和下部长枝叶相对于下部短枝叶之间共有的差异显著基因有7380个。

2.4.3 差异表达基因的GO功能注释和富集分析

(1)不同部位叶片比较组分析,上部长枝叶相对于下部长枝叶差异显著基因富集在344个GO条目上,其中细胞组分中富集到34个条目上,分子功能中富集到94个条目上,生物学过程中富集到216个条目上。上部短枝叶相对于下部短枝叶差异显著基因共富集到655个GO条目上,其中细胞组分中富集到68个条目上;分子功能中富集到158个条目上;生物学过程中富集到399个条目上。如图10A所示,涉及生物学过程的差异表达基因显著富集在单一生物代谢过程(Single-organism metabolic process)、三萜类生物合成过程(Triterpenoid biosynthetic process)和氨基糖代谢过程(Aminoglycan metabolic process)、细胞过渡金属离子稳态(Cellular transition metal ion homeostasis)等GO条目上。涉及分子功能的差异表达基因显著富集在氧化还原酶活性(Oxidoreductase activity)和氧化还原酶活性,作用于成对的供体上,并结合或还原分子氧,还原的黄素或黄素蛋白作为一个供体,并结合一个氧原子(Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen)等GO条目上;涉及细胞组分的差异表达基因显著富集在细胞间连接(Cell-cell junction)、细胞连接(Cell junction)和膜部分(Membrane part)等GO条目上。总体来说,不同部位叶片差异表达基因在细胞组分主要富集到细胞间连接、膜和膜的固有成分GO条目上;在分子功能主要富集到结合过程、氧化还原酶活性GO条目上;在生物学过程主要富集到生物合成过程、代谢过程和金属离子稳态GO条目上。(2)不同类型叶片比较组分析,上部长枝叶相对于上部短枝叶差异显著基因共富集到1831个GO条目上,其中富集到细胞组分、分子功能和生物学过程上的数量分别是170、437和1224个。下部长枝叶相对于下部短枝叶差异显著基因共富集到1934个GO条目上,其中富集到细胞组分、分子功能和生物学过程上的数量分别是181、449和1304个。从图10B可以看出,下部长枝叶相对于下部短枝叶涉及生物学过程的差异表达基因显著富集在分生组织发育的调控、苯丙烷代谢过程和分生组织发展等GO条目中;涉及分子功能的差异表达基因显著富集在微管蛋白

结合(Tubulin binding)、催化活性(Catalytic activity)和运动活动(Motor activity)等GO条目中;涉及细胞

组分的差异表达基因显著富集在膜的固有成分、微管细胞骨架和细胞骨架部分等GO条目。



A代表不同部位;B代表不同类型;CC代表细胞组分部分;MF代表分子功能部分;BP代表生物学过程部分;分别在CC、MF和BP中选择显著性排名前10的条目进行绘图,纵坐标为富集到的GO条目,横坐标代表显著性,横坐标的数值越大表示越显著

A represents different parts; B represents different types; CC represents cell component; MF represents molecular function and BP represents biological process; Select the top 10 terms of significance in CC, MF and BP respectively for drawing. The ordinate is the enriched GO term, the abscissa represents the significance, and the larger the value of the abscissa, the more significant

图10 不同类型及部位叶片差异显著基因GO富集分类图

Fig.10 Different types and positions of leaf differential genes GO enrichment classification map

2.4.4 差异表达基因的KEGG富集分析 (1)不同部位叶片比较组分析,上部长枝叶相对于下部长枝叶差异显著基因共富集到50条通路上,可分为5大类,分别是环境信息处理(Environmental Information

Processing)、代谢(Metabolism)、细胞过程(Cellular Processes)、遗传信息处理(Genetic Information Processing)和生物有机体系统(Organismal Systems)。其中在代谢类别中富集到42条通路。上部短枝叶

相对于下部短枝叶差异显著基因共富集到 68 条通路上,也被分为了 5 大类。差异表达基因在代谢类别富集到 53 条。差异显著基因显著富集到的通路有 2 条,分别为次生代谢产物的生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)和氨基糖和核苷酸糖代谢(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)。(2)不同类型叶片比较组分析,上部长枝叶相对于上部短枝叶差异显著基因共富集到 132 条通路上,被分为 5 大类。在代谢类别中富集到的通路最多,有 103 条。下部长枝叶相对于下部短枝叶差异显著基因共富集到 133 条通路上,和上部长枝叶相对于上部短枝

叶差异显著基因富集到的通路类别一样,也被分为同样的 5 大类。差异表达基因富集到的通路大多数属于代谢类别。

2.4.5 RT-qPCR 验证 为验证 RNA-Seq 数据的准确性,从 4 个比较组内共找出 10 个与植物激素信号转导有关的差异表达基因,进行 RT-qPCR 验证,图 11 展示了 4 个比较组的转录组结果及 RT-qPCR 验证结果。RT-qPCR 试验结果表明,10 个差异表达基因中,6 个差异表达基因发生上调,4 个差异表达基因下调,与 RNA-Seq 数据的基因表达趋势相同,表明转录组测序结果的可靠性较高。

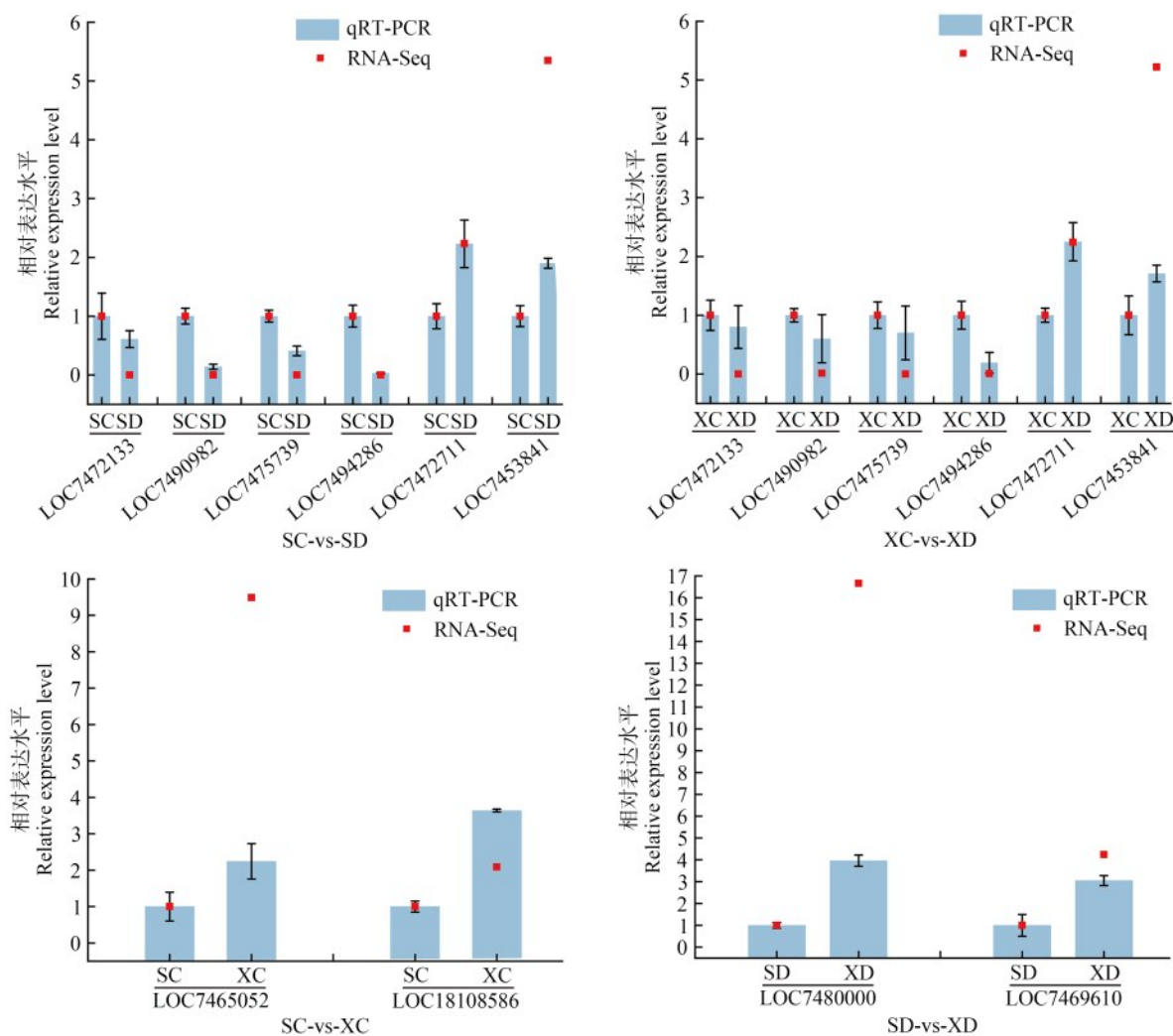


图 11 RT-qPCR 验证

Fig.11 RT-qPCR verification

2.5 不同部位及类型叶片共有差异表达基因分析

2.5.1 不同部位比较组 由图 9B 可知,上部长枝叶相对于下部长枝叶与上部短枝叶相对于下部短枝叶有 32 个共有差异表达基因,其中 20 个上调差异表达基因,10 个下调差异表达基因,2 个转录调控相

反基因。对 32 个共有差异表达基因进行 KEGG 通路分析,结果表明:共有差异表达基因共富集到 6 条通路上,被分为代谢和环境信息处理 2 大类。其中有显著富集到光合作用通路。对光合作用通路下的差异表达基因做热图分析(图 12)。发现有 2 个基

因 (*LOC18095762* 和 *LOC7470970*) 富集到这一通路,并且这 2 个基因与对照相比 (SC、SD 为对照组, XC、XD 为处理组), 表达量都发生了上调, 所涉及的途径是与光合作用有关的 ko00195。对基因进行注释发现, 这 2 个基因参与光合作用 PSII 过程, 编码 PsbR 蛋白。

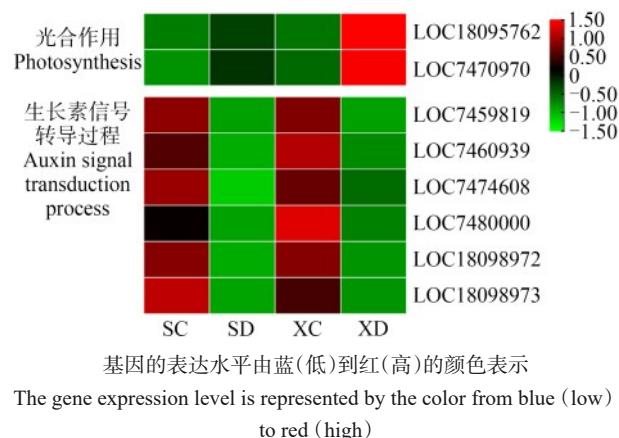


图 12 光合作用及生长素信号转导过程差异表达基因热图
Fig.12 Heat map of differentially expressed genes in photosynthesis and during auxin signal transduction

2.5.2 不同类型比较组 由图 9B 可知,上部长枝叶相对于上部短枝叶与下部长枝叶相对于下部短枝叶有 7380 个共有差异表达基因,其中 2190 个上调表达基因,5188 个下调表达基因,2 个转录调控相反基因。对 7380 个共有差异表达基因进行 KEGG 通路分析,结果表明共有差异表达基因富集到 132 条通路上,被分为 5 大类:代谢、环境信息处理、遗传信息处理、生物有机体系统、细胞过程。显著富集的通路有 34 条在上部长枝叶相对于上部短枝叶、下部长枝叶相对于下部短枝叶中基本相同。对显著富集到的生长素信号转导过程的差异表达基因做热图分析(图 12)。从图中可以看出,短枝叶相对于长枝叶的基因都发生了下调。

不同部位及不同类型比较组的共有差异表达基因分析结果均主要指向或包括了代谢类别,再次验证了差异表达基因的富集分析以及功能验证结果。

3 讨论

3.1 不同部位及类型叶片形态及结构的差异

研究表明,随着树龄的增加,树木的叶面积、比叶质量和叶厚度会发生变化^[13]。Bastiaanse 等^[14]在研究杨树叶片的形态变异时发现,杨树叶片大小与叶片长宽比的比值区间具有显著相关性。Thomas

等^[15]在研究叶片形态和生理的关系时,发现树高和叶面积大小以及叶片齿数具有显著相关性。盛宝龙等^[16]在研究银杏的叶片形态时发现,即使是同一株树上的银杏叶片,因其着生在枝条上的位置不同而形态差异很大。本研究对不同部位及类型的叶片形态指标进行了分析,结果表明长枝叶和短枝叶的叶片形态差异显著。本研究利用几何形态学的方法对不同部位的叶片进行分析,发现不同部位叶片没有明显的形态变异。叶片 PCA 分析结果显示,不同部位的叶片有很大程度的重叠,不同部位的叶片主要差异集中在叶柄长短、叶尖变化趋势和叶片最宽处。除此之外,本研究对不同部位及类型的叶片进行解剖结构水平上的分析,发现不同部位及类型的叶片的上表皮厚度都大于下表皮厚度,这种结构有利于气体交换^[17]。本研究中,长枝叶和短枝叶解剖结构差异显著,长枝叶的栅栏组织厚度显著大于短枝叶,说明长枝叶的光合作用可能强于短枝叶。不同部位叶片的解剖结构没有明显的规律性变化,这与杨美玲等^[18]对不同树龄新疆野苹果叶片解剖结构的研究结果不同,原因可能是所选树种不同以及长枝叶和短枝叶下部叶片的基因表达模式不同。

3.2 不同部位及类型叶片生理特性的差异

本研究中不同部位叶片的光合色素含量差异显著,下部叶片的叶绿素 a 含量和叶绿素总含量都显著大于上部和中部叶片,说明下部叶片的光合作用速率可能比上部和中部的要高,这与马林^[19]和高增璐等^[20]对不同树龄光合色素含量变化的研究结果相似。

本研究对不同部位及类型叶片的抗氧化酶系统进行分析,结果表明长枝叶和短枝叶差异较为明显,不同部位叶片的抗氧化酶活性存在显著差异,下部叶片的 SOD 酶活性显著高于上部和中部的叶片。这与何东明等^[21]对黄檗不同树龄叶片内抗氧化酶活性的研究结果一致。

在本研究中,发现不同部位及类型叶片的 IAA 含量存在显著差异,长枝叶的 IAA 含量和 IAA/ABA 值都显著大于短枝叶,下部叶片的 IAA 含量和 IAA/ABA 显著大于上部和中部。结合转录组结果,在生长素信号转导通路中,下部叶片和长枝叶中的上调基因数量远远大于下调基因数量,使生长素合成增多,这可能是下部叶片和长枝叶中的 IAA 含量较多的原因。

3.3 不同部位及类型叶片转录组测序差异分析

转录组是特定组织或细胞在某一发育阶段或

功能状态下转录出来的全部RNA的总和,具有时间性和空间性的特点^[22]。胡娟娟^[23]对不同树龄的大别山1号良种油茶的研究中发现,初果期和盛果期的表达模式类似,但是幼苗期和这两个时期相比,其表达模式有显著差异,在后续的聚类分析中发现,随着树龄的增加,基因表达模式的差异越来越大。本研究通过对不同部位及类型的叶片进行转录组测序,结果表明不同部位叶片比较组的差异显著基因数量明显少于不同类型叶片比较组内的差异显著基因数量。

从不同比较组差异显著基因韦恩图可以看出,同一类型叶片在不同部位上的差异会因为叶片类型的不同而造成,而长枝叶和短枝叶之间的差别不会因采样部位的不同而造成很大的差异。对差异显著基因进行GO功能富集分析,发现不同部位和不同类型比较组在分子功能上都富集到氧化还原酶活性GO条目上,推测这可能是不同部位及类型叶片中抗氧化酶活性存在差异的原因。对各比较组的差异表达基因进行KEGG通路富集分析,发现下部叶片相对于上部叶片,差异显著基因都富集到植物激素信号转导、光合作用、淀粉和蔗糖代谢通路上,推测下部与上部叶片差异的形成与这些通路有关。短枝叶相对于长枝叶差异显著基因都富集到植物激素信号转导、苯丙烷生物合成和氨基酸生物合成等通路上。

为了鉴定成熟效应关键响应基因,对上部长枝叶相对于下部长枝叶与上部短枝叶相对于下部短枝叶的共有差异表达基因进行分析,并对共有差异表达基因进行KEGG通路分析,发现差异表达基因显著富集到了光合作用通路,进一步通过基因注释发现,2个基因都参与PSII过程,编码PsbR蛋白。PSII位于类囊体膜的垛叠区,是由多个亚基组成的色素蛋白复合体,是绿色植物进行光合作用原初反应的场所,主要在水的光解和放氧反应发挥功能^[24-25]。而PsbR是PSII的一个小分子亚基蛋白,其主要在协助PSII系统核心复合体的稳固装配和水的氧化中发挥作用^[26]。李衡等^[27]对陆地棉研究时发现,PsbR在能进行光合作用组织中的表达水平高于不能进行光合作用组织中的表达水平。许耀照等^[28]在对冬油菜的研究也发现,PsbR的相对表达量与光合作用强弱有关。本研究中发现的2个PsbR基因在长枝叶和短枝叶中均表现为下部叶片的表达量均高于上部叶片,这与下部叶片的叶绿素a含量和叶绿素总量均高于上部和中部叶片相呼应。

这可能代表着下部叶片的光合能力大于上部叶片。对不同类型叶片比较组的共有差异显著基因进行KEGG通路分析,发现富集到的通路与上部长枝叶相对于下部长枝叶与上部短枝叶相对于下部短枝叶很相似,对生长素信号转导过程中的差异显著基因进行分析,发现短枝叶相对于长枝叶中基因的表达量都发生了下调。

4 结论

不同部位长枝叶之间和不同部位短枝叶之间外部形态无明显差异。长枝叶和短枝叶的外部形态存在明显差异,长枝叶的叶面积、叶周长、叶长、叶宽、锯齿数量、栅栏组织厚度显著大于短枝叶。关于年龄效应表现为随着繁殖材料与树干部距离的增加,叶面积、叶周长等6项叶形特征均显著增加。不同部位长枝叶之间和不同部位短枝叶之间生理指标差异明显,下部叶片的叶绿素a、叶绿素总量、SOD酶活性和IAA含量显著大于上部和中部,淀粉含量显著小于上部和中部。长枝叶和短枝叶的生理指标中除内源激素含量外,其他指标均无明显差异。关于位置效应表现为随着繁殖材料在树干部位置的增高,叶绿素a、叶绿素总量、SOD酶活性和IAA含量显著增加,淀粉含量则显著减少。转录组分析表明,上部和下部叶片生理指标上的差异与参与植物激素信号转导、光合作用、淀粉和蔗糖代谢通路中基因的差异表达有关。长枝叶和短枝叶形态和激素的差异与参与植物激素信号转导、苯丙烷生物合成和氨基酸生物合成等通路中基因的差异表达有关。

参考文献

- [1] 吴丽君. 木本植物组织培养技术在林业科研与生产中的应用与局限. 福建林业科技, 2003(30): 67-74
Wu L J. Application and limitations of the woody plant tissue culture technique in the forestry scientific research and production. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 2003(30): 67-74
- [2] Song Y G, Deng M, Andrew L, Li Q S. Leaf morphological evidence of natural hybridization between two oak species (*Quercus austrocochinchinensis* and *Q. kerrii*) and its implications for conservation management. European Journal of Forest Research, 2015, 134(1): 139-151
- [3] Klingenberg C P. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources, 2011, 11(2): 353-357
- [4] 王贺崑元, 汤永涛, 李国刚. 高原裸裂尻鱼头部轮廓形状及其变异的几何形态测量分析. 水生生物学报, 2017, 41(1): 182-193
Wang H K Y, Tang Y T, Li G G. Geometric morphometric

- analysis of the head profile shape and its variation in Plateau Naked Crabeater. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 182-193
- [5] 李正理. 植物制片技术. 北京: 科学出版社, 1978: 129-138
Li Z L. Botanical filmmaking techniques. Beijing: Science Press, 1978: 129-138
- [6] 李合生. 生物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-137
Li H S. Principles and techniques of biological physiology and biochemical experiments. Beijing: Higher Education Press, 2000: 134-137
- [7] 邹琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2000: 56-172
Zhou Q. Experimental guidance in plant physiology. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 56-172
- [8] 张苏, 李丽蓓, 范志影, 杨曙明, 苏晓鸥. 饲料中粗脂肪的测定. GB/T 6433-206. 2006-06-09
Zhang S, Li L P, Fan Z Y, Yang S M, Su X O. Determination of crude fat in feed. GB/T 6433-206. 2006-06-09
- [9] 中华人民共和国卫生部食品卫生监督检验所. 植物类食品中粗纤维的测定. GB/T 5009.10-2003. 2003-08-11
Food Hygiene Supervision and Inspection Institute of the Ministry of Health. Determination of crude fiber in plant foods. GB/T 5009.10-2003. 2003-08-11
- [10] Perteu M, Perteu G M, Antonescu C M, Tsung-Cheng C, Joshua T M, Salzberg S L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290
- [11] Li B, Dewey C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323
- [12] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- [13] Steppe K, Niinemets Ü, Teskey R O. Size-and Age-Related changes in tree structure and function. New York: Springer, 2011: 235-253
- [14] Bastiaanse H L S, Henry I M, Tsai H, Lieberman M, Canning C, Comai L, Groover A. A systems genetics approach to deciphering the effect of dosage variation on leaf morphology in *Populus*. *Plant Cell*. 2021, 33(4): 940-960
- [15] Thomas F M, Yu R D, Schäfer P, Zhang X M, Lang P. How diverse are *Populus* "diversifolia" leaves? Linking leaf morphology to ecophysiological and stand variables along water supply and salinity gradients. *Flora*, 2021, 233: 68-78
- [16] 盛宝龙, 赵洪亮, 马连宝, 蔺经, 刘昌迎, 陈学广. 银杏叶片形态研究. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 65-68
Sheng B L, Zhao H L, Ma L B, Lin J, Liu C Y, Chen X G. Study on leaf morphology of *Ginkgo biloba*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004, 5(1): 65-68
- [17] 陈旭, 刘洪凯, 王强, 邹红阳, 朱启良, 王延平. 鲁东丘陵同质生境中 11 个树种叶解剖学特性比较. 应用与环境生物学报, 2019, 25, 655-664
Chen X, Liu H K, Wang Q, Zou H Y, Zhu Q L, Wang Y P. Leaf anatomical characteristics of 11 tree species in the homogeneous habitats of eastern Shandong province hills. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2019, 25, 655-664
- [18] 杨美玲, 闫秀娜, 于玮玮, 龙鸿, 阎国荣. 新疆野苹果不同地理分布与树龄的叶片解剖结构特征. 植物研究, 2015, 35(4): 509-514
Yang M L, Yan X N, Yu W W, Long H, Yan G R. Characteristics of leaf anatomical structure of *malus sieversii* in different geographical distribution and plant age. *Bulletin of Botanical Research*, 2015, 35(4): 509-514
- [19] 马林. 植物衰老期间生理生化变化的研究进展. 生物学杂志, 2007, 24(3): 12-15
Ma L. Research progress on physiological and biochemical changes during plant aging. *Journal of Biology*, 2007, 24(3): 12-15
- [20] 高增璐, 高玉葆, 郑志荣, 张晓春. 皇甫川流域梁地生境中间锦鸡儿不同龄级植株光合生理特性的比较研究. 植物研究, 2009, 29(2): 182-186
Gao Z L, Gao Y B, Zheng Z R, Zhang X C. A comparative study of photosynthetic characteristics of *caragana davazamcii* between plants of different ages in Huangfuchuan basin of ordos plateau. *Bulletin of Botanical Research*, 2009, 29(2): 182-186
- [21] 何冬明, 严善春, 付莉. 树龄及性别对黄檗叶片内主要防御蛋白活力的影响. 东北林业大学学报, 2011, 39(5): 120-122
He D M, Yan S C, Fu L. Effects of tree age and gender on activities of primary defense proteins in leaves of *phellodendron amurense*. *Journal of North China University of Forestry*, 2011, 39(5): 120-122
- [22] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用. 遗传, 2011, 33(11): 1191-1202
Qi Y X, Liu Y B, Rong W H. RNA-Seq and its applications: A new technology for transcriptomics. *Heredity*, 2011, 33(11): 1191-1202
- [23] 胡娟娟. 油茶不同发育阶段生理生化指标及转录组的比较. 合肥: 安徽农业大学, 2016
Hu J J. Comparison of physiological and biochemical indexes and transcriptome at different developmental stages of *Camellia oleifera*. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016
- [24] 程建峰, 沈允钢. 试析光合作用的研究动向. 植物学报, 2011, 46(6): 694-704
Cheng J F, Shen Y G. Analyze research trends in photosynthesis. *Chinese Bulletin of Botany*, 2011, 46(6): 694-704
- [25] Suorsa M, Aro E M. Expression, assembly and auxiliary function of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynthesis Research*, 2007, 93(1-3): 89-100
- [26] Shi L X, Hall M, Funk C, Schröder W P. Photosystem II, a growing complex: Updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1817(1): 13-25
- [27] 李衡, 魏亦农, 李志博, 李操, 戎福喜. 陆地棉光合系统 II *PsbR* 基因的克隆和表达分析. 西北农业学报, 2014, 23(8): 79-84
Li H, Wei Y N, Li Z B, Li C, Rong F X. Cloning and expression analysis of photosystem II *PsbR* gene in *Gossypium hirsutum*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014, 23(8): 79-84
- [28] 许耀照, 曾秀存, 孙万仓, 武军艳, 方彦, 刘自刚, 马骊. 白菜型冬油菜 *PsbR* 基因的克隆及低温下表达分析. 农业生物技术学报, 2017, 25(9): 1423-1433
Xu Y Z, Zeng X C, Sun W C, Wu J Y, Fang Y, Liu Z G, Ma L. Cloning of *PsbR* gene in winter Turnip Rape (*Brassica campestris*) and its expression analysis under low temperature stress. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(9): 1423-1433