

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94171

甘蔗 Rieske Fe/S 蛋白前体基因 *ScPetC* 的克隆及表达分析

郑清雷¹ 余陈静¹ 姚坤存¹ 黄 宁¹ 阙友雄^{1,4} 凌 辉^{2,3,*}
许莉萍^{1,4,*}

¹ 福建农林大学 / 农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室, 福建福州 350002; ² 福建农林大学生命科学学院, 福建福州 350002; ³ 玉林师范学院农学院, 广西玉林 537000; ⁴ 福建农林大学 / 教育部作物遗传育种与综合利用重点实验室, 福建福州 350002

摘 要: 细胞色素 *b₆f* 复合体还原型铁硫蛋白前体(Cytochrome *b₆f* complex Rieske Fe/S precursor protein, PetC)是由细胞核 *PetC* 基因编码的蛋白, 其成熟蛋白参与构成细胞色素 *b₆f* 复合体, 是电子传递的重要元件。基于前期构建的受高粱花叶病毒(*Sorghum mosaic virus*, SrMV)侵染的甘蔗转录组数据库, 从主栽甘蔗品种‘新台糖 22 号’叶片中成功克隆到该基因, 并命名为 *ScPetC* (GenBank 登录号为 MH333037.1)。生物信息学分析发现, *ScPetC* 基因 cDNA 全长 824 bp, 包含了一个 678 bp 的开放阅读框, 编码 226 个氨基酸。*ScPetC* 属于 PRK13473 超家族, 其 C 末端具有典型的 Rieske 保守结构域; 蛋白理论等电点为 8.19, 属于稳定的、亲水性蛋白; 二级结构多为无规则卷曲, 三级结构预测其比其他植物 PetC 多出一段 α 螺旋结构。在本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)叶片瞬时表达中, *ScPetC* 定位于叶绿体、细胞质和细胞膜。尽管前人研究表明, *ScPetC* 的表达量会受 SrMV 侵染的影响, 不同于半夏(*Pinellia ternata*) PetC 与大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV) P1 蛋白之间的互作, *ScPetC* 不能与 SrMV-P1 蛋白互作, 但能与甘蔗黄叶病毒(*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) P0 蛋白互作。实时荧光定量 PCR 分析表明, *ScPetC* 基因在甘蔗不同组织中均有表达, 但在叶片中的表达量最高。甘蔗受脱落酸胁迫 3 h 时, *ScPetC* 表达量显著上调, 但是随着处理时间的延长, 表达受到抑制; 在茉莉酸甲酯、水杨酸、氯化铜、氯化镉和氯化钠胁迫下, *ScPetC* 表达量均显著下调。本研究通过对 *ScPetC* 生物学功能、环境外源激素与重金属等胁迫下的表达模式及其与甘蔗病原病毒蛋白互作的初步探究, 增加了对甘蔗 PetC 的了解, 也为深入研究其在甘蔗受黄叶病毒侵染中的作用奠定基础。

关键词: 甘蔗; 细胞色素 *b₆f* 复合体还原型铁硫蛋白前体; 生物信息学; 亚细胞定位; 蛋白互作; 实时荧光定量 PCR

Cloning and expression analysis of sugarcane Fe/S precursor protein gene *ScPetC*

ZHENG Qing-Lei¹, YU Chen-Jing¹, YAO Kun-Cun¹, HUANG Ning¹, QUE You-Xiong^{1,4}, LING Hui^{2,3,*}, and XU Li-Ping^{1,4,*}

¹ Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding (Fujian), Ministry of Agriculture and Rural Area / Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; ² College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; ³ College of Crop Science, Yulin Normal University, Yulin 537000, Guangxi, China; ⁴ Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding and Comprehensive Utilization, Ministry of Education / Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: Cytochrome *b₆f* complex Rieske Fe/S precursor protein (PetC) is encoded by the nuclear *PetC* gene, and its mature protein involved in the formation of the cytochrome *b₆f* complex, which is important for electron transfer. Based on our previous transcriptome data of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) infected by *Sorghum mosaic virus* (SrMV), a cytochrome *b₆f* complex reduced iron-sulfur precursor protein gene was cloned from leaves of sugarcane superior elite cultivar ‘ROC22’, and named as

本研究由国家自然科学基金项目(31801424)和国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-17)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31801424) and the China Agriculture Research System (CARS-17).

* 通信作者(Corresponding authors): 许莉萍, E-mail: xlpmail@126.com; 凌辉, E-mail: linghuich@163.com

第一作者联系方式: E-mail: zhengqinglei666@163.com.

Received (收稿日期): 2019-11-10; Accepted (接受日期): 2020-01-15; Published online (网络出版日期): 2020-02-17.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200215.1522.002.html>

ScPetC (GenBank accession number: MH333037.1). Bioinformatics analysis showed that the *ScPetC* gene was 824 bp in length, containing a 678 bp open reading frame (ORF), and encoding a peptide of 226 amino acids. *ScPetC* belongs to the PRK13473 superfamily and has a typical Rieske domain at its C-terminus of the amino acid chain. *ScPetC* is a stable and hydrophilic protein with pI 8.19. Most of the secondary structural elements in *ScPetC* were random coil. Compared to the *PetC* from the other plants, *ScPetC* contained one more fragment of helix in its third dimensional structure. The transient expression of YFP-fused protein in *Nicotiana benthamiana* leaves showed that *ScPetC* was located in the chloroplast, cytoplasm and cell membrane. Although the previous study indicated that the expression of *ScPetC* was affected by SrMV infection in sugarcane, different to the interaction between *Pinellia ternata* *PetC* and SMV-P1, without interaction between *ScPetC* and the SrMV-P1, it did interact with SCYLV-P0, i.e. the P0 protein of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). Real-time quantitative PCR analysis showed that *ScPetC* gene was expressed constitutively in different tissues of sugarcane, and the highest level of its expression was found in leaves. When sugarcane plant was exposed to abscisic acid stress for 3 h, the expression of *ScPetC* was significantly up-regulated, but the expression level was then inhibited with longer treatment time. Under the stress of methyl jasmine, salicylic acid, copper chloride, cadmium chloride and sodium chloride, the expression of *ScPetC* was significantly down-regulated. The study on biological function, expression pattern and interaction of *ScPetC* with the proteins of sugarcane pathogenic virus will improve the understanding of the happening of yellow leaf symptom, which caused by SCYLV.

Keywords: sugarcane; cytochrome *b₆f* complex Rieske Fe/S precursor protein; bioinformatics; subcellular location; protein interaction; real-time fluorescent quantitative PCR

甘蔗(*Saccharum* spp. hybrids)是最重要的糖料作物和重要的能源作物^[1]。甘蔗花叶病和黄叶病是甘蔗生产上最主要的 2 种病毒性病害,严重影响甘蔗产量^[2-4]。感染花叶病的甘蔗叶片会出现黄绿相间的嵌纹、条斑等症状,严重时导致叶片失绿^[2]。高粱花叶病毒(*Sorghum mosaic virus*, SrMV)属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*),是引起甘蔗花叶的主要原因之一^[5]。甘蔗黄叶病毒(*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV)属马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*),甘蔗感染后也会出现失绿症状^[3],但其典型症状是叶片的中脉发黄^[3]。研究这 2 种病毒与宿主甘蔗基因的互作机制对甘蔗抗病育种具有重要意义。

一般而言,植物 RNA 病毒的基因组具有多个开放读码框(open reading frame, ORF),它们编码的蛋白控制着病毒侵染植物过程中的不同机制,但不同的病毒之间也存在一些功能相似的蛋白。P1 和 P0 蛋白分别是 SrMV 和 SCYLV 基因编码的首个蛋白,并且都参与病毒—寄主互作以及病毒抑制宿主免疫反应^[6-11]。前人通过对马铃薯 Y 病毒属的李痘病毒(*Plum pox virus*, PPV) P1 蛋白进行研究,发现此蛋白并没有直接的沉默抑制效应,但可以通过自身剪切,与 HC-Pro 配合行使沉默抑制功能^[8-9];同属的黄瓜脉黄病毒(*Cucumber vein yellowing virus*, CVYV) P1 蛋白中的 P1a 前导蛋白对控制病毒特异性识别寄主具有重要作用^[8]。在对植物致病方面,当从 PPV 基因组中移除编码 P1 蛋白的区域后,受 PPV 侵染的本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)叶片坏死和萎缩症状加深^[9];相反地,当马铃薯卷叶病毒属的甘蔗黄叶病毒 P0 蛋白缺失 N 端的 15 个氨基酸后,该

蛋白则会丢失对植物的致病性^[10]。另外,也有报道称其同属的甜菜西黄病毒(*Beet western yellows virus*, BWYV) P0 区域能转录出一个参与病毒和寄主相互识别作用的蛋白^[11]。

叶绿体是高等植物进行光合作用的场所。一方面,对植物的生长发育起着重要作用;另一方面,也成为自身健康生长的隐患^[12-13]。当植物感染病毒后,会利用叶绿体进行复制扩繁,破坏叶绿体相关的结构原件,影响光系统、电子传递链等过程,最终影响植物正常生长^[13]。截至目前,已经发现多个植物叶绿体蛋白会同病毒蛋白互作并参与病毒侵染过程,洋葱 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基(Rubisco large subunit, RbcL)和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基(Rubisco small subunit, RbcS)都能与马铃薯 Y 病毒属的青葱黄条病毒(*Shallot yellow stripe virus*, SYSV)、芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)、大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV) P3 蛋白互作,参与叶片失绿症状的形成^[14]。甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)的 VPg 会和甘蔗 NAD(P)H 脱氢酶复合体 O 亚基在叶绿体内发生互作,阻碍电子循环,影响叶绿体的形成,最终导致花叶病症^[15]。半夏(*Pinellia ternata*)中的细胞色素 *b₆f* 复合体还原型铁硫蛋白前体(Cytochrome *b₆f* complex Rieske Fe/S precursor protein, *PetC*)会和大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV) P1 蛋白发生互作,引起寄主对病毒的适应性改变^[16]。在马铃薯卷叶病毒属病毒蛋白的研究中,拟南芥 S-相激酶相关蛋白(S-phase kinase related protein 1, AtASK1)能与甜菜西黄病毒(*Beet western yellows virus*,

BWYV)、南瓜蚜传黄化病毒(*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV)的 P0 蛋白发生互作,降低植物对病毒的抵抗能力;敲除本氏烟草内拟南芥 *AtASK1* 同源基因 *NbSKP1* 后,感病本氏烟恢复对病毒的抵抗;同时,在突变 P0 氨基酸序列中最保守的 F 基序后, P0 丢失了沉默抑制功能,并且不再与 *AtASK1* 互作^[17]。本氏烟草 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基装配因子 2 (Rubisco Assembly Factor 2, RAF2)会与芸薹黄化病毒(*Brassica yellows virus*, BrYV)的 P0 蛋白互作,并协助病毒进行侵染^[18]。

植物的光合电子链主要由 PSII (光反应系统 II)、质体醌(plastoquinone, PQ)、细胞色素 *b₆f* 复合体(cytochrome *b₆f* complex, Cyt *b₆f*)、质蓝素(plastocyanin, PC)、PSI (光反应系统 I)和铁氧还原蛋白组成;电子传递方式主要分为非环式电子传递、环式电子传递和假环式传递 3 种。在这 3 种电子传递过程中, Cyt *b₆f* 皆有参与^[19]。Cyt *b₆f* 复合体包含 4 个大亚基 (细胞色素 *f*、细胞色素 *b₆*、Fe/S 蛋白和亚基 IV)和 4 个小亚基 (PetG、PetL、PetM 和 PetN)^[20]。自从 Rieske 等人在线粒体细胞色素 *bc₁* 中发现大量携带有[2Fe-2S]结合域的蛋白之后,这类蛋白就被大家称为 Rieske 蛋白^[21-22]。现已从菠菜(*Spinacia oleracea*)^[23]、豌豆(*Pisum sativum*)^[24]等植物细胞色素 *b₆f* 复合体中分离到 Rieske Fe/S 蛋白,并且了解到该蛋白是由细胞核基因 *PetC* 编码^[25],在细胞质基质中合成蛋白前体,由 N 端信号肽引导至叶绿体基质,后被加工成成熟蛋白,结合到类囊体膜上^[26-27],与细胞色素 *f*、细胞色素 *b₆* 和亚基 IV 共同装配成叶绿体细胞色素 *b₆f* 复合体,参与光合电子传递过程^[28-30]。在转入 *PetC* 基因的水稻(*Oryza sativa*)^[31]和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[32]的试验中发现, *PetC* 成熟蛋白在叶片内富集会提高光合系统电子传递量,从而提高产量。西瓜在强光干旱胁迫下通过转变 *PetC* 蛋白翻译后修饰模式,稳定此蛋白的表达量,维持电子传递量,进而缓解胁迫对植物的危害^[33]。

时至今日,越来越多植物中编码 *PetC* 的基因被克隆出来^[31-34],并发现它会响应强光^[33]、模拟干旱^[34]等非生物胁迫。不仅如此,植物 *PetC* 在响应生物胁迫方面也有报道,在感染了白粉病菌(*Erysiohe graminis*)的小麦(*Triticum aestivum*)表达序列标签(Expressed Sequence Tags, EST)的表达文库中,编码 *PetC* 的基因出现了差异表达^[35]。课题组^[36]前期在黑穗病菌(*Sporisorium scitamineum*)侵染甘蔗黑穗病易

感与抗性品种后,质谱分析结果显示,甘蔗高感品种 Ya71-374 中 *PetC* 相对于高抗品种 NCo376 中的表达量增加。Ling 等^[37]利用 RNA 定量的方法对感染 SrMV 甘蔗叶片进行分析,结果显示 *ScPetC* 在抗性品种 YZ01-1314 中下调表达,在易感品种 ROC22、FN40 中上调表达。虽然编码 *ScPetC* 成熟蛋白的序列已经被克隆出来并被命名为 *SoCYT*^[34],但与此不同的是,本研究中克隆到的是甘蔗细胞色素 *b₆f* 复合体铁硫亚基蛋白前体基因。通过在本氏烟叶片进行瞬时表达,我们观察了 *ScPetC* 亚细胞定位情况,并利用酵母双杂交和双分子荧光互补实验,验证该蛋白与 SrMV-P1 蛋白、SCYLV-P0 蛋白的互作情况,研究结果对深入了解 *PetC* 如何参与病毒引起甘蔗叶片变黄症状奠定一定的理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料和处理方法

供试甘蔗基因型为我国主栽品种新台糖 22 号,由福建农林大学农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室提供。

RT-PCR 克隆材料:取植株的+1 叶(第 1 片可见肥厚带的叶片),用锡纸包好,液氮速冻,保存于-80℃冰箱。

组织特异性分析材料:参照黄宁等^[38]方法,从田间选取健康长势一致的植株 9 株,清理根部泥土,取白色幼根作为材料;从地面以上可见完整第 1 节间算起,选取第 7~8 节段,用 75%酒精擦拭表皮,从侧芽、蔗皮、蔗髓取样;叶片选取甘蔗+1 叶。以上样品均选择 3 株混合作为一个重复,共 3 个生物学重复,用锡箔纸包好所有材料,立刻投入液氮速冻,保存于-80℃冰箱。

不同外源胁迫处理材料:考虑到植物会释放内源激素来抵抗病毒的侵染^[13],因此我们用不同外源胁迫处理甘蔗的方法来模拟病毒侵染。参照苏亚春等^[39]方法,在田间随机选取长势一致的植株,将其蔗茎砍成单芽茎段、洗净,放在含有 100 mg L⁻¹ 多菌灵(福瑞得,中国郑州)水溶液中进行 52℃温浴脱毒 30 min,然后将这些茎段种在无菌土中(16 h 光/8 h 暗, 28℃)培养,直至长出蔗苗,切下蔗苗用于无菌苗的诱导生根。随后放入蒸馏水中培养一段时间待其生长稳定,从中挑选一部分健壮且长势一致的蔗苗,置于 250 mmol L⁻¹ 氯化钠(sodium chloride, NaCl)、100 mmol L⁻¹ 氯化铜(copper chloride, CuCl₂)、500 mmol L⁻¹ 氯化镉(cadmium chloride, CdCl₂)的水

溶液中培养, 并于 0、6、12、24 h 取样; 取另一部分蔗苗在 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 脱落酸(abscisic acid, ABA)、5 mmol L^{-1} 水杨酸 (salicylic acid, SA) (含 0.01%吐温-20, v/v)和 25 mmol L^{-1} 茉莉酸甲酯(methyl jasmine, MeJA)(含 0.01%吐温-20, v/v)水溶液中培养, 并于 0、3、6、12 h 取样, 每个处理选择 3 株混合作为 1 个重复, 共取 3 个生物学重复。每个样品取样完成、液氮速冻, 保存于 -80°C 冰箱。

1.2 RNA 提取与 cDNA 的合成

采用 TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) 试剂提取所有甘蔗样品的总 RNA, 提取方法参照 Liu 等^[40], cDNA 第一链合成方法参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Lithuania, Vilnius)和 PrimerScript RT-PCR Kit (Takara, 中国大连)试剂盒说明书。

1.3 甘蔗 *ScPetC* 基因序列获取与 RT-PCR 克隆

基于课题组构建的感染 SrMV 叶片的甘蔗转录组 uingene 注释库, 挖掘得到 *ScPetC* 基因 unigene 序列(转录本 ID: T2_Unigene_BMK.38583), 并根据其序

列设计克隆特异性引物 *ScPetC*-F/R (表 1), 以甘蔗叶片 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序为 94°C 4 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 60 s, 40 个循环; 72°C 10 min; 随后进行回收、纯化、测序与鉴定。

1.4 生物信息学分析

利用 ExPaSy、Prabi、SWISSMODEL 在线软件, 对 *ScPetC* 进行一、二、三级结构预测, 使用 NCBI conserved domains、SignalP 4.1 Server、TMHMM 2.0 Server、ProtScale 和 WoLFPSORT, 分别进行保守结构域、信号肽、跨膜结构域、疏水性和亚细胞定位预测, 在线软件网址如表 2 所示。使用 DNAMAN 6.0 将 *ScPetC* 基因编码的氨基酸序列与 NCBI 下载的来自其他植物的 PetC 的氨基酸进行多序列比对。参考 Schmidt 等^[41]的方法, 使用 MEGA 6.0 软件对 *ScPetC*、其他高等植物 PetC 和细胞色素 *bc_L* Rieske Fe/S 蛋白、蓝藻细菌细胞色素 *b_{6f}* Rieske Fe/S 蛋白和细菌细胞色素 *c* Rieske Fe/S 蛋白进行进化树构建。通过 MEME 对植物氨基酸进行 motif (基序)预测, 在 Adobe Photoshop CS6 上进行图片美化。

表 1 引物序列及用途
Table 1 Primer sequence used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>ScPetC</i> -F	TGGACGCCAGGGAGTGAAC	基因克隆
<i>ScPetC</i> -R	TGTAGCAACAACGCCTTCGG	Gene cloning
<i>ScPetC</i> -QF	GTACAACAACCAAGGCAAGG	实时荧光定量 PCR
<i>ScPetC</i> -QR	CAGGGACAGGAGGCATACAT	qRT-PCR
CAC-F	ACAACGTCAGGCAAAGCAAA	内参基因
CAC-R	AGATCAACTCCACCTCTGCG	Reference gene
CUL-F	TGCTGAATGTGTTGAGCAGC	内参基因
CUL-R	TTGTCGCGCTCCAAGTAGTC	Reference gene
<i>ScPetC</i> -Subloc-F	CGAACGATACTCGAGGTCGACATGGCGACCTCCGCG	亚细胞定位载体
<i>ScPetC</i> -Subloc-R	GCTCACCATACTAGTGGATCCTGCCTTCCACCACGG	Vector for subcellular localization
<i>ScPetC</i> -AD-F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCGACCTCCGCGGCGCT	酵母双杂交载体
<i>ScPetC</i> -AD-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTGCCTTCCACCACGGGTCCT	Vector for Y2H
<i>SrMV</i> -P1-BK-F	TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGCAGGAGCATGGAGCAC	酵母双杂交载体
<i>SrMV</i> -P1-BK-R	CGCTGCAGGTGCACGGATCC AAAATAAGTAATTTTCATTGA	Vector for Y2H
<i>SCYLV</i> -P0-BK-F	TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGCTTTTCAACGAATTCTC	酵母双杂交载体
<i>SCYLV</i> -P0-BK-R	CGCTGCAGGTGCACGGATCCTATATCATGAGAATAGGTGC	Vector for Y2H
<i>ScPetC</i> -YN-F	TCTGAGGAGGATCTTCCCGGGATGGCGACCTCCGCGGCGCT	双分子荧光互补实验载体
<i>ScPetC</i> -YN-R	AGGGCATGCCTGCAGGTGCACGTGCCTTCCACCACGGGTCCT	Vector for BiFC
<i>SrMV</i> -P1-YC-F	TCTAGGAGCTCGGTACCCGGGATGGCAGGAGCATGGAGCAC	双分子荧光互补试验载体
<i>SrMV</i> -P1-YC-R	ATCGTATGGGTACATACTAGTAAATAAGTAATTTTCATTGA	Vector for BiFC
<i>SCYLV</i> -P0-YC-F	CTAGGAGCTCGGTACCCGGGATGCTTTTCAACGAATTCTC	双分子荧光互补实验载体
<i>SCYLV</i> -P0-YC-R	TCGTATGGGTACATACTAGTTATATCATGAGAATAGGTGC	Vector for BiFC

表 2 生物信息学研究的数据库和软件

Table 2 Database and software used for bioinformatics analysis

工具 Tool	网址 Website
ORF Finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
ExPaSy	http://web.expasy.org/protparam/
Prabi	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html
SWISSMODEL	http://swissmodel.expasy.org/interactive
SignalP 4.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/servers/SignalP/
NCBI conserved domain	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
WoLFPSORT	https://wolfsort.hgc.jp/
TMHMM 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/servers/TMHMM/
ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/
MEME	http://meme-suite.org/

1.5 酵母双杂交实验

以 pMD19-*ScPetC*、pMD19-*SrMV-PI*、pMD19-*SCYLV-P0* (课题组前期实验获得)质粒为模板, 以 *ScPetC*-AD-F/R、*SrMV-PI*-BK-F/R、*SCYLV-P0*-BK-F/R (表 1)为引物, 通过 PCR、胶回收获得基因编码序列。随后使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit (诺唯赞, 中国南京)同源重组的方法, 将基因编码序列导入经过限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I (Thermo Scientific, Lithuania, Vilnius)双酶切的 pGADT7、pGBKT7 载体中, 构建载体 pGADT7-*ScPetC*、pGBKT7-*PI*、pGBKT7-*P0*。测序正确的阳性质粒以共转化方式导入酵母 Y2HGold 感受态细胞(上海维地, 中国上海)。实验参照 Matchmaker Gold 酵母双杂交系统说明书, 在 SDO (SD/-Trp)固体培养基上进行毒性验证, 在 SDO (SD/-Trp/X- α -Gal/AbA)固体培养基上进行自激活验证, 在 QDO (SD/-Ade/-His/Leu/-Trp/X- α -Gal)和 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA)固体培养基上进行互作验证。

1.6 植物表达载体构建

以携带有 *ScPetC*、*SrMV-PI*、*SCYLV-P0* 基因的相关质粒为模板, 用引物 *ScPetC*-YN-F/R、*SrMV-PI*-YC-F/R、*SCYLV-P0*-YC-F/R (表 1)进行 PCR、胶回收获得基因编码序列。随后使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 同源重组的方法, 将基因编码序列导入经过限制性内切酶 *Apa* I 和 *Sal* I、*Sma* I 和 *Spe* I 双酶切的 pCambia1300S-YN、pCambia2300S-YC^[42] 载体中, 构建载体 pCambia1300S-YN-*ScPetC*、pCambia2300S-YC-*PI*、pCambia2300S-YC-*P0* 用于双分子荧光互补试验 (Bimolecular Fluorescent Complimentary, BiFC)。

以 pMD19-T-*ScPetC* 阳性质粒为模板, 使用引

物 *ScPetC*-Subloc-F/R (表 1)进行 PCR、胶回收获得基因编码序列。随后使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 同源重组的方法, 将基因编码序列导入经过限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切的 pCambia2300-YFP 载体中, 构建载体 pCambia2300-*ScPetC*-YFP 用于蛋白亚细胞定位实验。

1.7 本氏烟草叶片注射与荧光观察

将 pCambia1300S-YN-*ScPetC*、pCambia2300S-YC-*PI*、pCambia2300S-YC-*P0* 和 pCambia2300-*ScPetC*-YFP 转化农杆菌菌株 GV3101 (上海唯地, 中国上海), 在含有 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 利福平和 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 卡纳霉素的 YPD 液体培养基中扩繁后, 收集农杆菌菌体, 用 MS 盐缓冲液悬浮, 并将菌体悬浮液 OD₆₀₀ 调至 0.8。加入乙酰丁香酮(工作浓度 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 28°C 避光诱导培养 2 h, 随后注射本氏烟叶片下表皮, 于 48 h 后在激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP8, 曼海姆, 德国)下拍摄 YFP 荧光(激发光波长 514 nm, 捕获波长为 530~590 nm)、叶绿体自发荧光(激发光波长 552 nm, 捕获波长为 650~680 nm)。

1.8 实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析

根据 *ScPetC* 基因序列设计特异性定量引物 *ScPetC*-QF/QR (表 1), 以 clathrin adaptor complex (CAC)和 cullin (*CUL*)作为内参基因^[43]。参照 SYBR Green PCR Master Mix (Roche, 中国上海)试剂盒说明书配制定量反应体系, 进行定量 PCR, 以检测目的基因在甘蔗的不同组织(根、芽、叶、蔗髓和蔗皮)和不同外源胁迫(SA、MeJA、ABA、NaCl、CuCl₂和 CdCl₂)处理样品中的相对表达量。定量 PCR 程序为 50°C 2 min; 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 15 s, 60°C

退火延伸 1 min, 40 个循环; 增加溶解曲线, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s。每个样品设 3 次技术重复和 3 次生物学重复, 阴性对照以无菌水为模板, 定量数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量。使用 DPS 7.05 对数据进行显著性分析, Original 8.0 软件做柱状图。

2 结果与分析

2.1 甘蔗 *ScPetC* 基因克隆及生物信息学分析

采用基于 SrMV 侵染甘蔗的转录组数据库基因 Unigene 序列设计扩增引物, 以叶片 cDNA 为模板, 扩增得到一条长 824 bp 的片段 (图 1-A)。扩增产物经过连接、转化、测序, 获得 *ScPetC* 基因序列。经

过 ORF Finder 在线分析, *ScPetC* 基因的完整开放读码框为 678 bp, 编码 225 个氨基酸。与 *SoCYT* 基因 (GenBank 登录号为 JQ712582) 进行序列比对发现, 核酸相似度达到 73.87%, *ScPetC* 在 5' 端比 *SoCYT* 多 129 个碱基, 在 3' 端比 *SoCYT* 少了 97 个碱基, 但不影响蛋白编码。氨基酸比对结果显示, 2 条基因编码的氨基酸序列相似度为 84.44% (图 1-B), 经过进一步的分析, *ScPetC* 氨基酸链的 N 端比 *SoCYT* 多出 33 个氨基酸残基, 并且 2 条链中的第 47 个(丙氨酸 A~缬氨酸 V)、第 70 个(丝氨酸 S~甘氨酸 G)氨基酸不同。综上结果表明, 克隆自现代杂交种的 *ScPetC* 与成熟蛋白基因 *SoCYT* 的编码序列和蛋白序列高度保守, 仅存在个别位点的差异。



图 1 甘蔗 *ScPetC* 基因的 RT-PCR 扩增及其编码氨基酸序列

Fig. 1 RT-PCR amplification of *ScPetC* gene in sugarcane and its amino acid sequence

(A) M: marker 100 bp; I: RT-PCR 产物。(B) *ScPetC*: 甘蔗细胞色素 *b₆f* 复合体还原型铁硫蛋白前体序列; *SoCYT*: 甘蔗细胞色素 *b₆f* 复合体铁硫亚基氨基酸序列^[34]。

(A) M: DNA marker 100 bp; I: RT-PCR product. (B) *ScPetC*: Sugarcane cytochrome *b₆f* complex reduced iron-sulfur protein precursor sequence; *SoCYT*: Sugarcane cytochrome *b₆f* complex iron-sulfur subunit amino acid sequence^[34]。

利用 ExPaSy 在线软件对 *ScPetC* 一级结构进行预测, 结果显示该蛋白分子式为 $C_{1054}H_{1668}N_{294}O_{315}S_{11}$, 相对分子量为 23.85 kD, 疏水性平均值为 -0.146, 蛋白不稳定系数为 21.61, 等电点为 8.19 (表 3)。蛋白不稳定系数小于 40, 等电点大于 7.5, 表明该蛋白为稳

定的碱性蛋白; 通过 SignalP 4.1 server、TMHMM 2.0 Server 和 NCBI conserved domains 软件对 *ScPetC* 结构域或基序进行预测, 结果表明该蛋白无信号肽 (图 2-A), 为非分泌蛋白, 并且在第 66 个到第 88 个氨基酸之间存在一个跨膜区域 (图 2-B), 属于

表 3 *ScPetC* 一级结构预测分析

Table 3 Primary structure analysis of *ScPetC*

一级结构特性 Primary structure characteristic	预测结果 Predicted result
编码的氨基酸个数 Number of coding amino acids	225
等电点 Theoretical pI	8.19
分子量 Molecular weight ($\times 10^3$)	23.85
分子式 Formula	$C_{1054}H_{1668}N_{294}O_{315}S_{11}$
不稳定系数 Instability index (II)	21.61
平均疏水性 Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.146

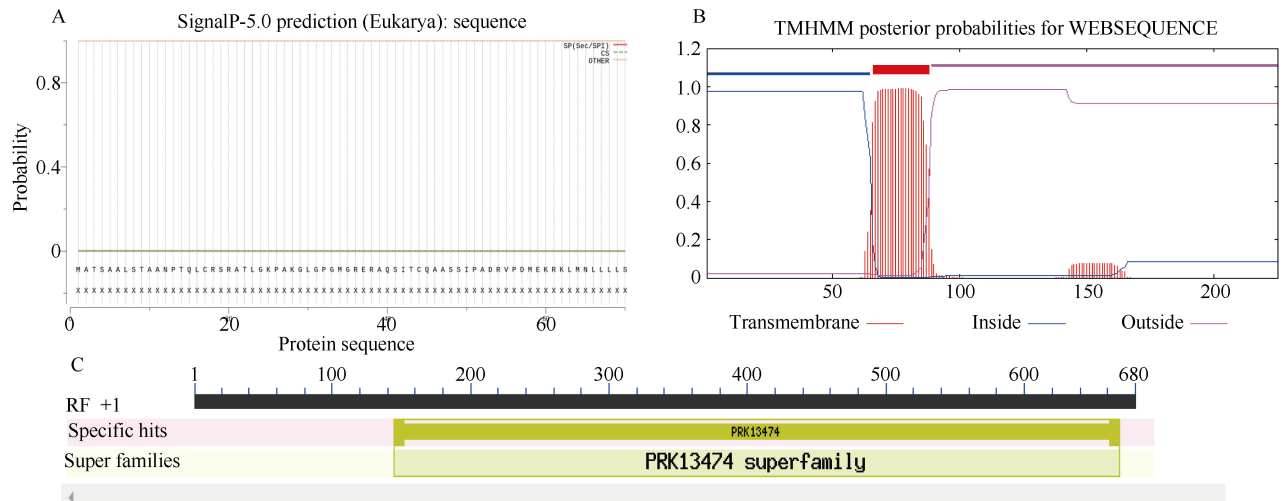


图 2 甘蔗 ScPetC 的生物信息学软件预测结果

Fig. 2 Prediction result of sugarcane ScPetC by bioinformatics software

A: 信号肽; B: 跨膜结构域; C: 保守结构域。

A: signal peptide; B: transmembrane domain; C: conservative domain.

PRK13474 超家族(图 2-C)。因此推测 ScPetC 是一个碱性稳定亲水非分泌蛋白。

ScPetC 的二级结构预测结果显示, α 螺旋、延伸链和无规则卷曲的氨基酸残基数分别为 42、49 和 134 个, 占比分别为 18.67%、21.78% 和 59.56%。

根据 SWISSMODEL 三维结构预测, 比较甘蔗与单子叶植物水稻、双子叶植物半夏和菠菜 PetC 三维空间结构 (图 3), 甘蔗 ScPetC 构象与其他 3 种植物空间构象基本相似, 都具有 N 末端 α 螺旋结构和 [2Fe-2S] 结合域, 但甘蔗该蛋白的构象中多出了一个 α 螺旋结构(图 3-A)。

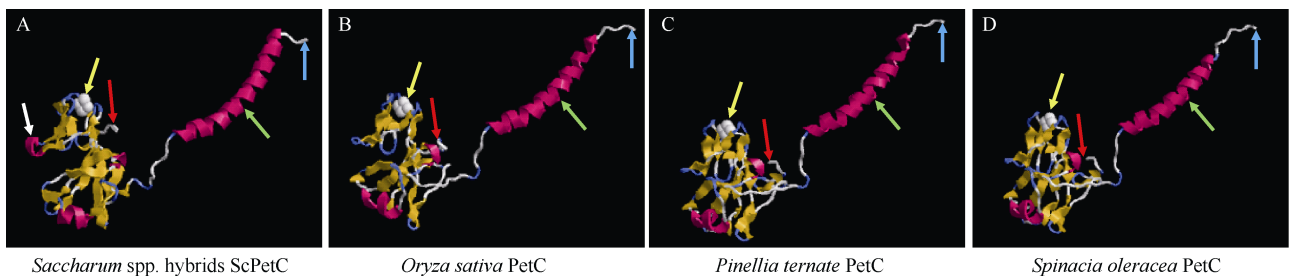


图 3 甘蔗、水稻、半夏和菠菜的 PetC 成熟蛋白三级结构预测

Fig. 3 Predicted third structure of mature PetC in *Saccharum* spp. hybrids, *Oryza sativa*, *Pinellia ternate*, and *Spinacia oleracea*

黄色箭头处为 PetC 蛋白的 [2Fe-2S] 结合域; 蓝色和红色箭头所指位点为氨基酸链的 N 端和 C 端; 绿色箭头所指位点为 α 螺旋。图 A 中白色箭头表示 ScPetC 与其他植物 PetC 的差异 α 螺旋所在位置。

Yellow arrow is the conservative binding domain [2Fe-2S] of PetC; blue and red arrows represent the N-terminus and C-terminus of the amino acid chain; green arrows represent α helix. White arrow represents the α helix in sugarcane that is different from other plants of tertiary structure in figure A.

根据 WoLFPSORT 对 ScPetC 氨基酸序列的扫描结果, 了解到该蛋白定位于甘蔗细胞的亚细胞结构中的可能性由大到小, 分别为叶绿体类囊体(65.7%)、线粒体(15.38%)、细胞质(13.29%)、细胞核(11.59%)、液泡(11.01%)和叶绿体基质(8.95%)。因此, 本研究推测 ScPetC 最有可能定位于叶绿体类囊体。

2.2 甘蔗 ScPetC 的保守结构域及系统进化

对比甘蔗与其他植物 PetC 氨基酸序列(图 4),

发现甘蔗与高粱(*Sorghum bicolor*)、水稻、半夏、本氏烟、菠菜和豌豆的 PetC 序列相似度分别是 97.35%、84.14%、70.74%、68.87%、66.95% 和 64.38%。这 7 种植物的 PetC 序列中均含有 N 末端的转移多肽区域、跨膜 α 螺旋区域、结合 [2Fe-2S] 的 Rieske 区域和靠近 C 末端的脯氨酸环区域(图 4)。

将甘蔗与 27 个其他物种 PetC 的氨基酸序列构建系统进化树(图 5)。结果显示, 所有物种的 PetC 可

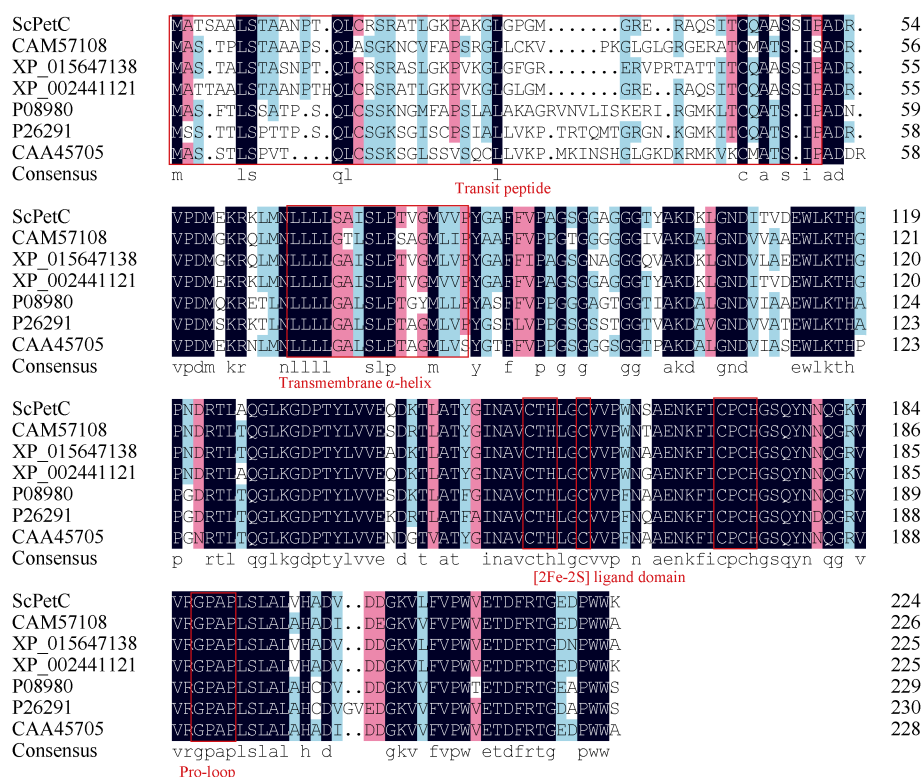


图 4 甘蔗 *ScPetC* 与其他植物 *PetC* 氨基酸序列对比

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of sugarcane *ScPetC* and other plant *PetC*

红色方框表示 *ScPetC* 内为已报道保守氨基酸基序。CAM57108: 半夏; XP_015647138: 水稻; XP_002441121: 高粱; P08980: 菠菜; P26291: 豌豆; CAA45705: 本氏烟。

Red squares indicate the reported conserved motif of amino acid regions within the *ScPetC*. CAM57108: *Pinellia ternate*; XP_015647138: *Oryza sativa*; XP_002441121: *Sorghum bicolor*; P08980: *Spinacia oleracea*; P26291: *Pisum sativum*; CAA45705: *Nicotiana benthamiana*.

以被划分为细胞色素 bc_1 复合体和细胞色素 b_6f 复合体 2 个亚类。在细胞色素 b_6f 复合体亚类中, 不同物种的 *PetC* 可以被分为 5 组(I、II、III、IV、V), 其中甘蔗与高粱的 *PetC* 聚为一个分支, 表明其亲缘关系较近。细胞色素 bc_1 复合体亚类中, 不同物种的 *PetC* 可以被分为 2 组(VI、VII)。MEME 软件预测结果显示, *ScPetC* 和其他高等植物细胞色素 b_6f 复合体 *PetC* 一样具有 6 个 motif。综上, 本研究推测 *ScPetC* 也可能与其他植物 *PetC* 具有相似的功能。

2.3 甘蔗 *ScPetC* 的亚细胞定位

由图 6 可知, 对照组中 YFP 黄色荧光信号在本氏烟叶表皮细胞的细胞膜、细胞核和细胞质均有分布; *ScPetC*-YFP 融合蛋白的黄色荧光信号既定位于质膜、细胞质, 又与叶绿体的自荧光信号重合, 显示出橙色, 表明 *ScPetC* 定位于叶绿体(图 6)。

2.4 甘蔗 *ScPetC* 与病毒蛋白的互作

酵母双杂交互作实验中, 分别导入以下质粒组合 pGADT7-T+pGBKT7-Lam、pGADT7-T+pGBKT7-

53、pGADT7-*ScPetC*+pGBKT7-*P1*、pGADT7-*ScPetC*+pGBKT7-*P0*、pGADT7-*ScPetC*+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-*P1*、pGADT7+pGBKT7-*P0* 到 Y2Hgolden 菌株中, 它们均能在 DDO (SD/-Leu/-Trp) 固体培养基上正常生长, 说明质粒组合成功转入酵母感受细胞。同时, 在 QDO (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal) 和 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) 固体培养基上, 阳性对照能正常生长并在加入 X- α -Gal 后表现出蓝色, 阴性对照不能正常生长, pGADT7-*ScPetC*+pGBKT7-*P1* 不能在酵母缺陷培养基上生长(图 7-A), 而 pGADT7-*ScPetC*+pGBKT7-*P0* 能在缺陷培养基上生长并且在加入 X- α -Gal 后成功显色, 说明 *ScPetC* 与 SrMV-P1 蛋白不存在互作, 与 SCYLV-P0 蛋白存在互作(图 7-B)。

为进一步验证互作结果, 本研究将 *ScPetC* 基因构入 pCAMBIA1300S-YN 载体, 形成 YN-*ScPetC*; SCYLV-P0 基因构入 pCAMBIA2300S-YC 载体, 形成 YC-P0; 结果在注射 YN-*ScPetC* 和 YC-P0 的本氏烟叶片细胞内出现了黄色荧光(图 7-C)。酵母互作

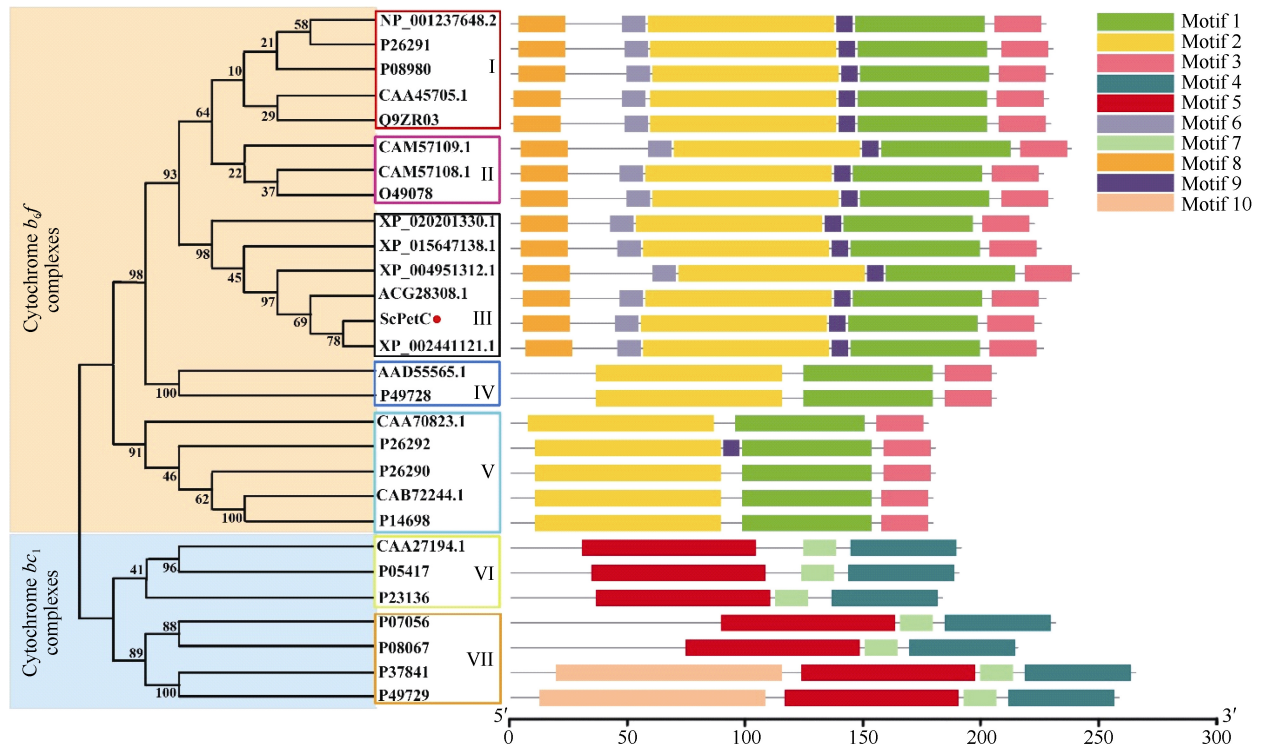
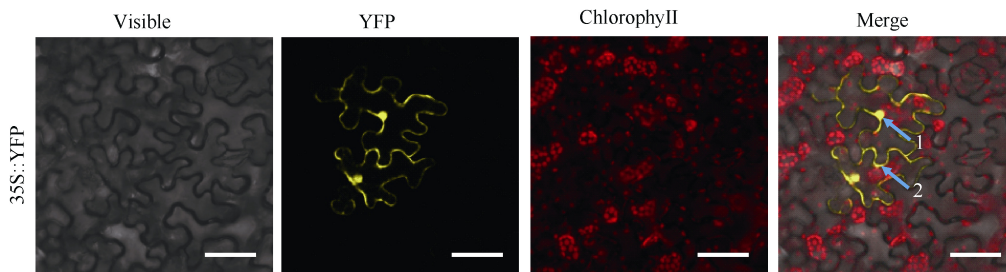


图 5 甘蔗 ScPetC 与其他物种 PetC 的系统进化树分析与 motif 预测

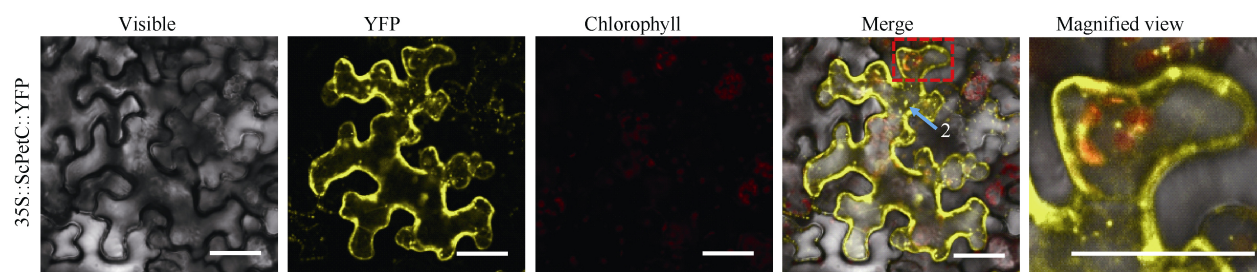
Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of sugarcane ScPetC and PetC in other species and their corresponding motif prediction

图中进化树橘色部分代表细胞色素 b_6f 复合体类, 蓝色部分代表细胞色素 bc_1 复合体类; III 组中的红色圆圈标记为 ScPetC; 不同颜色的方框代表不同的组(I、II、III、IV、V、VI、VII)。NP_001237648.2: 大豆; XP_015647138.1: 水稻; XP_0202013301.1: 小麦; Q9ZR03.1: 拟南芥; P26291: 豌豆; AAD55565.1: 团藻; CAA27194: 类红球细菌; CAA45705: 本氏烟; CAA70823: 席藻; CAB72244: 鱼腥藻; CAM57108.1: 半夏; CAM57109.1: 马蹄莲; O49078: 贝母; P05417: 脱氮副球菌; P08067: 酿酒酵母; P08980: 菠菜; P14698: 蓝藻; P23136: 深红红螺菌; P26290: 集胞藻; P26291: 豌豆; P26292: 聚球藻; P37841: 马铃薯; P49728: 衣藻; Q9ZR03: 拟南芥; XP_002441121: 高粱; ACG28308: 玉米; XP_004951312: 小米。

The orange part of the phylogenetic tree represents the cytochrome b_6f complex cluster, the blue part represents the cytochrome bc_1 complex cluster; the red circle is labeled as ScPetC; the different color boxes in the figure represent different groups (I, II, III, IV, V, VI, VII). NP_001237648.2: *Glycine max*; XP_015647138.1: *Oryza sativa*; XP_0202013301.1: *Triticum aestivum*; Q9ZR03.1: *Arabidopsis thaliana*; P26291: *Pisum sativum*; AAD55565.1: *Volvox carteri f. nagariensis*; CAA27194: *Rhodobacter sphaeroides*; CAA45705: *Nicotiana tabacum*; CAA70823: *Phormidium laminosum*; CAB72244: *Trichormus variabilis*; CAM57108.1: *Pinellia ternata*; CAM57109.1: *Zantedeschia aethiopica*; O49078: *Fritillaria agrestis*; P05417: *Paracoccus denitrificans*; P08067: *Saccharomyces cerevisiae*; P08980: *Spinacia oleracea*; P14698: *Desmonostoc* sp. PCC; P23136: *Rhodospirillum rubrum*; P26290: *Synechocystis* sp. PCC; P26291: *Pisum sativum*; P26292: *Synechococcus* sp. PCC; P37841: *Solanum tuberosum*; P49728: *Chlamydomonas reinhardtii*; Q9ZR03: *Arabidopsis thaliana*; XP_002441121: *Sorghum bicolor*; ACG28308: *Zea mays*; XP_004951312: *Setaria italica*. motif 1: X₆NAXCTHLGCVVPX₃ENKFXCPCHGSX₁₀GPAP; motif 2: NLX₁₁PDX₃RX₃NLX₂₂PX₃GX₃GXXAKGXGNDX₆LX₇LXXGLKGDPTYX₂V; motif 3: X₇WXETDFRTX₃PWW; motif 4: XGDX₃GWFCPCCHGSHYDX₂GRIRXGPAPXNLX₁₅; motif 5: X₇MX₄DX₂AX₅VX₇GX₆WXGKPVFXRXXRX₄IX₅VX₄LXDX₁₀; motif 6: X₂AXSIXADXV; motif 7: XWLX₃GXCTHLGCX; motif 8: X₉QLX₁₀; motif 9: LVVEXDXT; motif 10: FX₃FX₃DDSSX₂RSXSPSLXSXFLX₃RGFS SNSVSPAHX₂GLVXDLPXTVAIAIKNPXSKIYVDX₂NHERYPGDPDSKRAFAFYVLTGGRFVY.

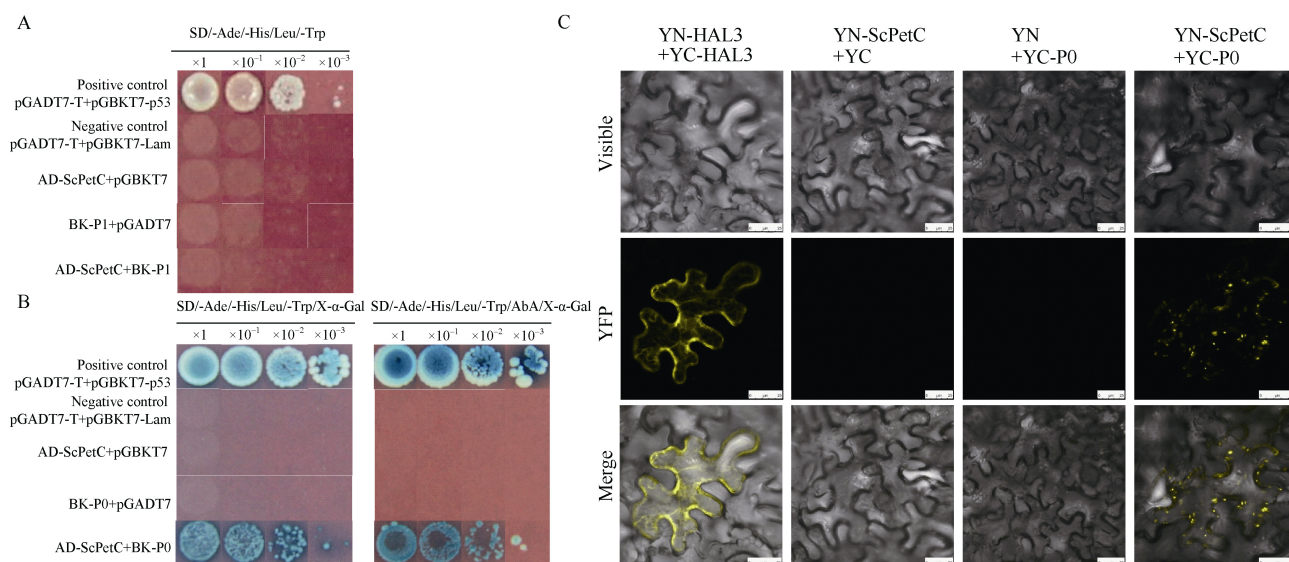


(图 6)

图 6 甘蔗 *ScPetC* 亚细胞定位结果Fig. 6 Results of subcellular localization of sugarcane *ScPetC*

农杆菌介导 *ScPetC* 及空载体在本氏烟叶片瞬时表达 48 h 后的亚细胞定位结果; 本氏烟叶片表皮细胞被用于明场、黄色荧光、叶绿体自发荧光、明场和黄色及红色荧光叠加后的图像分析; 蓝色箭头 1、2 分别表示细胞核、质膜; 红色虚线框表示被放大区域; 比例尺 = 50 μm ; 35S::YFP: 携带空载 pCAMBIA2300-YFP 的农杆菌菌株; 35S:: *ScPetC*::YFP: 携带重组载体 pCAMBIA2300-*ScPetC*-YFP 的农杆菌菌株。

Subcellular localizations of the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *ScPetC* and empty vector in *Nicotiana benthamiana* leaves after 48 h infiltration; the epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* were used for taking images of visible light, yellow fluorescence, chloroplast autofluorescence, and merged visible light. Blue arrows 1 and 2 indicate nucleus and plasma membrane. The area in the red rectangle is magnified. Bar=50 μm ; 35S::YFP: the *Agrobacterium tumefaciens* strain carrying the empty vector pCAMBIA2300-YFP; 35S:: *ScPetC*::YFP: the *Agrobacterium tumefaciens* strain carrying the recombinant vector pCAMBIA2300-*ScPetC*-YFP.

图 7 甘蔗 *ScPetC* 与高粱花叶病毒和甘蔗黄叶病毒蛋白的互作实验验证Fig. 7 The interaction assay of sugarcane *ScPetC* with virus proteins of *Sorghum mosaic virus* (SrMV) or *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV)

A: 甘蔗 *ScPetC* 与 SrMV-P1 蛋白的酵母双杂交互作验证。B: 甘蔗 *ScPetC* 与 SCYLV-P0 蛋白的酵母双杂交互作验证; SD/-Ade/-His/Leu/-Trp: 腺嘌呤、组氨酸、亮氨酸和色氨酸营养缺陷型平板培养基; SD/-Ade/-His/Leu/-Trp/X- α -Gal: 腺嘌呤、组氨酸、亮氨酸和色氨酸营养缺陷型平板培养基(添加 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-半乳糖苷); SD/-Ade/-His/Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA: 腺嘌呤、组氨酸、亮氨酸和色氨酸营养缺陷型平板培养基(添加 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-半乳糖苷和金担子素 A)。C: *ScPetC* 与 SCYLV-P0 蛋白的双分子荧光互补实验; YC、YN、YN-*ScPetC* 和 YC-P0 分别代表质粒 pCAMBIA2300S-YC、pCAMBIA2300S-YN、pCAMBIA2300S-YN-*ScPetC* 和 pCAMBIA2300S-YC-P0^[42]。

A: *ScPetC* was verified by yeast double-hybrid interaction with SrMV-P1 protein. B: *ScPetC* was verified by yeast double-hybrid interaction with SCYLV-P0 protein; SD/-Ade/-His/Leu/-Trp: synthetic dropout medium plate without adenine, histidine, leucine, tryptophan; SD/-Ade/-His/Leu/-Trp/X- α -Gal: synthetic dropout medium plate without adenine, histidine, leucine, tryptophan (plus 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- α -D-galactopyranoside); SD/-Ade/-His/Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA: synthetic dropout medium plate without adenine, histidine, leucine, tryptophan (plus 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- α -D-galactopyranoside and aureobasidin A). C: the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay of the interaction between *ScPetC* and SCYLV-P0 protein; YC, YN, YN-*ScPetC*, YC-P0 represent the plasmids pCAMBIA2300S-YC, pCAMBIA2300S-YN, pCAMBIA2300S-YN-*ScPetC*, pCAMBIA2300S-YC-P0, respectively^[42].

和双分子荧光互补实验的结果一致,说明 *ScPetC* 和 SCYLV-P0 确实存在互作。

2.5 甘蔗 *ScPetC* 基因的转录表达模式分析

由图 8-A 可知, *ScPetC* 基因在甘蔗叶片中的表达量最高,其次是蔗皮、蔗芽和蔗髓,在根中几乎不表达。分析结果显示,该基因在叶片中的表达量分别是蔗髓、蔗芽、蔗皮和根部表达量的 15、15、4 和 174 倍,说明该基因在叶绿体和线粒体丰富的细胞中均有表达。

分析 *ScPetC* 基因在不同外源胁迫下的表达特性,结果表明在对甘蔗施以 CuCl_2 、 CdCl_2 和 NaCl 处理后, *ScPetC* 的表达量下降并显著低于对照(图 8-B); 用 SA、MeJA 处理甘蔗后, *ScPetC* 表达量随着施用时间延长,持续下降; 甘蔗在受 ABA 处理 3 h 后, *ScPetC* 的表达量显著提高并达到峰值,为对照组的 1.3 倍,当处理时间达到 6 h 时,表达量下降但仍高于对照,处理达到 12 h 时,表达量下降并显著低于对照(图 8-C)。我们推测该基因可以在短时间内积极响应 ABA 的胁迫。

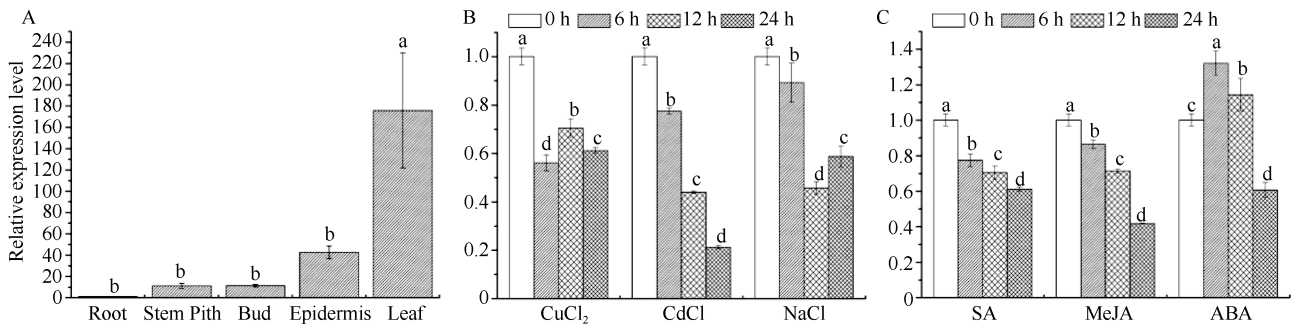


图 8 甘蔗 *ScPetC* 基因的转录表达模式分析

Fig. 8 Transcriptional expression pattern analysis of sugarcane *ScPetC* gene

A: 甘蔗 *ScPetC* 基因在甘蔗不同组织中的表达情况; B 和 C: 甘蔗 *ScPetC* 基因在不同外源胁迫下的相对表达情况。不同的小写字母(a、b、c、d)表示差异显著性($P \leq 0.05$); 误差线为每组处理的标准误差($n = 3$)。

A: the tissue-specific expression analysis of *ScPetC* gene in sugarcane; B and C: relative expression of *ScPetC* in sugarcane under different exogenous stresses. Bars with different superscripts (a, b, c, d) represent differ significantly ($P \leq 0.05$) and error bars represent the standard error of each treating group ($n = 3$).

3 讨论

植物受到病毒侵染时,会通过改变体内相关基因的表达量来抵抗病毒侵染。叶绿体作为植物重要的细胞器,其中的基因与蛋白也会参与到病毒抵御过程^[13]。到目前为止,已经发现多个叶绿体蛋白能参与到病毒的复制、移动、致病等过程中^[13]。*ScPetC* 成熟蛋白是植物细胞色素 *b₆f* 复合体的元件之一,在叶绿体光合电子转运过程中起重要的作用^[20],但是关于植物 *ScPetC* 与病毒蛋白互作研究仍比较少见,截至目前只有两例,一例是半夏 *PetC* 与马铃薯 Y 病毒属 SMV-P1 蛋白互作^[16]; 另一例是拟南芥 *PetC* 与马铃薯 Y 病毒属 TuMV-HC-Pro 蛋白互作^[44]。本研究是首次报道 *ScPetC* 与马铃薯卷叶病毒属 SCYLV-P0 蛋白互作。

ScPetC 属于 PRK13474 超家族,包含由半胱氨酸和组氨酸组成的(CTHXXC, CPCHXX) Rieske 结构域(图 4)。这个结构域位于氨基酸链的 C 端附近,是 Rieske 家族蛋白主要特征^[41]。高等植物 Rieske 蛋白主要被分为两类,分别是细胞色素 *b₆f* 复合体类和

细胞色素 *b_{c₁}*

复合体类。本研究中 *ScPetC* 属于细胞色素 *b₆f* 复合体类,其 N 端存在一个由 33 个氨基酸组成的区域,在梁潘霞等^[34]克隆到的 *SoCYT* 基因编码氨基酸链中并不存在。通过与其他植物 *PetC* 氨基酸序列比对后,认识到这段氨基酸是转移多肽区域,其中的保守序列与前人研究结果相一致^[23-24],因此我们确定克隆到的是甘蔗叶绿体细胞色素 *b₆f* 复合体 Rieske Fe/S 蛋白前体基因。生物信息学分析显示, *ScPetC* 为碱性蛋白,不同于 *SoCYT* 基因所编码蛋白质 pI 值小于 7 的结果^[34],其主要原因是 N 端转移多肽区内存在多个碱性氨基酸引起 *ScPetC* 整体平均 pI 值大于 7。使用 SWISSMODEL 对 *ScPetC* 进行三级结构预测,其结果表明其与拟南芥 *PetC* 成熟蛋白在三维结构上极为相似^[44],说明植物 *PetC* 蛋白在结构上极为保守,极可能行使高度保守的生物学功能。经过仔细比对观察,发现 *ScPetC* 三级结构组成是从第 55 个缬氨酸 V 开始, N 端转移多肽不在 *ScPetC* 成熟蛋白的三维构象中。另外,在甘蔗与其他植物 *PetC* 蛋白三级结构的对比结果中,我们发现 *ScPetC* 多出一段 α 螺旋结构(图 3-A),这或许是 *ScPetC* 和

SrMV-P1 蛋白之间不存在互作的原因, 这与半夏 *PetC* 蛋白和 SMV-P1 蛋白互作的结果有所不同^[16]。从所构建的系统进化树中, 我们发现甘蔗和高粱的 *PetC* 蛋白被聚为一簇, 表明其亲缘关系最近, 这和人研究结果一致^[34]。有研究表明, 植物 *PetC* 一共有 5 个外显子保守区域^[25], 本研究结果显示, *ScPetC* 有 6 个 motif, 包含了上述的 5 个保守区域。因此, 可以推测 *ScPetC* 与其他植物 *PetC* 具有相似的功能。

蛋白质的生物学功能与其在细胞中的定位密切相关。本研究对 *ScPetC* 亚细胞定位进行预测, 结果显示, 此蛋白定位在叶绿体类囊体的概率最大为 65.70%, 细胞质的概率为 13.29%, 叶绿体基质的概率为 8.95%。在本氏烟叶片中的亚细胞定位分析表明, *ScPetC* 定位在细胞质、细胞膜和叶绿体, 这与拟南芥 *PetC* 融合 GFP 荧光标签在本氏烟叶片细胞内的亚细胞定位结果相似^[44]。课题组前期在 SrMV 侵染甘蔗的转录组研究中, 发现 *ScPetC* 基因发生了差异表达, 且在抗感品种中表现出不同的表达模式^[37]。前人研究表明半夏 *PetC* 和马铃薯 Y 病毒属 SMV-P1 蛋白存在互作^[16]。但酵母双杂交实验结果显示, SrMV-P1 蛋白和 *ScPetC* 不存在互作, 因此, 我们对比了 SrMV 和 SMV 的 P1 蛋白氨基酸序列, 发现相似性只有 9.25%; 半夏和甘蔗的 *PetC* 蛋白之间相似率为 70.74% (图 1-B), 我们推测是序列上的差异导致马铃薯 Y 病毒属病毒的 P1 蛋白不能与其寄主 *PetC* 蛋白互作, 这种互作可能只存在某些物种之中, 因而 *ScPetC* 基因在宿主受到 SrMV 侵染时所发生的差异表达可能是其他未知机制引起的。与此同时, 酵母双杂交和 BiFC 实验结果显示, *ScPetC* 与 SCYLV-P0 蛋白互作发生在细胞膜周和细胞质内, 这和拟南芥 *PetC* 蛋白与 TuMV-HC-Pro 蛋白存在互作的结果相一致^[44]。*PetC* 蛋白是由核基因 *PetC* 编码的, 在细胞质中形成蛋白前体, 然后被引导到叶绿体内, 经过加工后的成熟蛋白钼在类囊体膜上, 参与 Cyt *b₆f* 的形成。因此, 推测 SCYLV-P0 与 *ScPetC* 在细胞质中发生互作, 可能阻断了 *ScPetC* 由细胞质向叶绿体运输的过程, 影响了 Cyt *b₆f* 正常组装, 破坏光合电子传递过程, 从而引起了甘蔗叶片变黄等症状。另外, SCYLV-P0 蛋白和马铃薯 Y 病毒属病毒 HC-Pro 蛋白都具有沉默抑制的功能^[10, 44], 但 *ScPetC* 是否参与 P0 蛋白沉默抑制作用仍需进一步验证。

在转 *PetC* 基因融合 GUS 标签的拟南芥中, *GUS* 基因在叶片、茎、花、荚均有表达, 在根中却没有

表达^[25]。甘蔗组织表达定量结果显示, *ScPetC* 在根中的表达量相对于蔗芽、蔗髓、蔗皮、叶片表现很低; 相反地, 其在叶中表达量最高。该基因之所以会在蔗芽、蔗髓、蔗皮等组织中有少量表达, 可能因为 *ScPetC* 是细胞核基因, 普遍存在于植物不同组织细胞中。课题组前期对感染 SrMV 的甘蔗易感和抗性品种进行了 RNA-seq 和 qRT-PCR 定量相关实验, 结果表明 *ScPetC* 基因在 SrMV 易感品种 ROC22 和 FN40 中上调表达, 在抗性品种 YZ01-1413 中下调表达^[37]。由于没有找到 SCYLV 侵染甘蔗的中间载体, 也无法通过人工对甘蔗实现该病毒的接种, 因此并没有相关材料。但相关研究表明, SA 或 MeJa 信号通路与病毒侵染相关^[13], 因此我们用 SA 或 MeJa 模拟病毒等生物胁迫侵染。截至目前, 植物中的 *PetC* 基因在 ABA、MeJA、SA 等激素处理条件的定量表达分析尚无人报道。ABA 是响应干旱、盐胁迫等非生物的关键调控因子^[45]。在本研究中, 发现短时间的 ABA 处理可以引起 *ScPetC* 基因上调表达。推测其原因是: 在施加 ABA 后, 甘蔗叶片缺水、细胞渗透压变化, 引起光合效率降低, 植物为了补偿光合作用而上调表达光合组分基因, 但长时间的高表达对植物造成负担, 于是降低基因表达量以适应低光合作用。SA、JA 作为植物系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)和诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR)的重要信号分子^[46]。SA、MeJA 处理甘蔗后, *PetC* 基因下调表达, 说明在植物受生物胁迫过程中, 植物可能通过抑制 *ScPetC* 的表达, 降低光合作用。用 CuCl₂、CdCl₂ 溶液处理后, 甘蔗因受到重金属离子的毒害作用, *ScPetC* 下调表达。NaCl 处理条件下, *PetC* 基因的表达量下降, 这与黄瓜幼苗在 NaCl 胁迫下, 叶片中的 *PetC* 基因的下调表达结果相似, 这同样可能是由于高盐环境的刺激引起了甘蔗叶片气孔闭合, CO₂ 吸收量下降, 光合电子传递速率降低^[47]。

4 结论

从甘蔗主栽品种新台糖 22 号叶片中成功分离到 *ScPetC* 基因, 该基因长 824 bp, 包含一个 678 bp 的 ORF, 编码 226 个氨基酸, 含有半胱氨酸和组氨酸[2Fe-2S]结合域, 属于 PRK13474 超家族。*ScPetC* 为碱性稳定亲水非分泌蛋白, 其二级结构只有 α 螺旋、延伸链、无规则卷曲; 从 *ScPetC* 的序列、三维结构推测, *PetC* 蛋白在植物中高度保守, 具有相似

的生物学功能。ScPetC 定位于细胞质、叶绿体和细胞膜, 与 SrMV-P1 蛋白不存在互作, 但与 SCYLV-P0 蛋白存在互作。ScPetC 基因在甘蔗叶片中的表达量最高, 在蔗肉、蔗芽、蔗皮表达量较低, 在根中几乎不表达。在外源激素 SA 和 MeJA、重金属 (CuCl_2 、 CdCl_2) 和高盐 (NaCl) 溶液处理下, 均呈现下调表达; 但短时间 ABA 处理, 可以引起 ScPetC 基因的上调表达。

References

- [1] Yadav R L, Solomon S. Potential of developing sugarcane by product based industries in India. *Sugar Tech*, 2006, 8: 104–111.
- [2] 何炎森, 李瑞美. 甘蔗花叶病研究现状. 中国糖料, 2006, (1): 47–49.
He Y S, Li R M. Research status of *Sugarcane mosaic virus* disease in China. *Sugar Crops China*, 2006, (1): 47–49 (in Chinese with English abstract).
- [3] Diaz O D L C A, Hechavarra M D L L O, Izaguirre Y P, Navarro M D L A Z, Lopez J M M L, Lissbrant S, Arencibia A. Genotyping of *Sugarcane yellow leaf virus* in commercial cultivars and the Cuban germplasm collection. *Sugar Tech*, 2016, 19: 102–108.
- [4] 王伯辉. 我国甘蔗病害的发生现状与研究进展. 中国糖料, 2007, (3): 261–265.
Wang B H. The occurrence status and research progress of sugarcane disease in China. *Sugar Crops China*, 2007, (3): 261–265 (in Chinese with English abstract).
- [5] Shukla D D, Frenkel J M, McKern M N, Ward C W, Jilka J, Tosic M, Ford R E. Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. *Arch Virol Suppl*, 1992, 5: 363–373.
- [6] Elsayed A I, Komor E. Investigation of ORF0 as a sensitive alternative diagnostic segment to detect *Sugarcane yellow leaf virus*. *J Gen Plant Pathol*, 2012, 78: 207–216.
- [7] Mirkov T E, Ingelbrecht I, Castillon A, Hernandez J C. Identification of sugarcane proteins involved in posttranscriptional gene silencing. *Proc Int Soc Sugarcane Technol*, 2001, 24: 327–330.
- [8] Shan H Y, Pasin F, Valli A, Castillo C, Rajulu C, Carbonell A, Mateo S C, García J A, Rodamilans B. The *Potyvirus* P1a leader protease contributes to host range specificity. *Virology*, 2015, 476: 264–270.
- [9] Fabio P, Carmen S M, Antonio G J. The hypervariable amino terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1003985. doi: 10.1371/journal.ppat.1003985.
- [10] Mangwende T, Wang M L, Borth W, Hu J, Moore P H, Mirkov T E, Albert H H. The P0 gene of *Sugarcane yellow leaf virus* encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology*, 2009, 384: 38–50.
- [11] Veidt I, Bouzoubaa S E, Leiser R M, Zieglergraff V A, Guilley H, Richards K, Jonard G. Synthesis of full-length transcripts of *Beet western yellows virus* RNA messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology*, 1992, 186: 192–200.
- [12] 燕照玲, 段俊枝, 冯丽丽, 陈海燕, 齐红志, 杨翠苹, 施艳, 张会芳. 马铃薯 Y 病毒属病毒编码蛋白与寄主植物叶绿体蛋白互作研究进展. 河南农业科学, 2017, 46(11): 1–5.
Yan Z L, Duan J Z, Feng L L, Chen H Y, Qi Z H, Yang C P, Shi Y, Zhang H F. Progress on interaction between potyviruses coded proteins and chloroplast proteins of host plants. *J Henan Agric Sci*, 2017, 46(11): 1–5 (in Chinese with English abstract).
- [13] Zhao J P, Zhang X, Hong Y G, Liu Y L. Chloroplast in plant virus interaction. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1565. doi: 10.3389/fmicb.2016.01565.
- [14] Lin L, Luo Z P, Yan F, Lu Y W. Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants. *Virus Genes*, 2011, 43: 90–92.
- [15] 翟玉山, 赵贺, 张海, 邓宇晴, 程光远, 杨宗桃, 王彤, 彭磊, 徐倩, 董萌, 徐景升. 甘蔗 NAD(P)H 脱氢酶复合体 O 亚基基因克隆及其与甘蔗花叶病毒 VPg 互作研究. 作物学报, 2019, 45: 1478–1487.
Zhai Y S, Zhao H, Zhang H, Deng Y Q, Cheng G Y, Yang Z T, Wang T, Peng L, Xu Q, Dong M, Xu J S. Cloning of NAD(P)H complex O subunit gene and its interaction with VPg of *Sugarcane mosaic virus*. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1478–1487 (in Chinese with English abstract).
- [16] Shi Y, Chen J, Hong X, Chen J, Adams M J. A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Mol Plant Pathol*, 2010, 8: 785–790.
- [17] Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Braut V, Hemmer O, Kretsch T, Richards K E, Genschik P, Graff V Z. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 1994–1999.
- [18] Sun Q Q, Li Y Y, Wang Y, Zhao H H, Zhao T Y, Zhang Z Y, Li D W, Yu J L, Wang X B, Zhang Y L, Han C G. BrYV P0 protein impairs the antiviral activity of NbRAF2 in *Nicotiana Benthamiana*. *J Exp Bot*, 2018, 69: 3127–3139.
- [19] 李合生. 现代植物生理学(第 3 版). 北京: 高等教育出版社, 2012. pp 114–118.
Li H S. Modern Plant Physiology, 3rd edn. Beijing: Higher Education Press, 2012. pp 114–118 (in Chinese).
- [20] Schottler M A, Tôth S Z, Boulouis A. Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: biogenesis, function, and turnover of ATP synthase and the cytochrome *b₆f* complex. *J Exp Bot*, 2015, 66: 2373–2400.
- [21] Rieske J S, Zaugg W S, Hansen R E. Studies on the electron transfer system. *J Biol Chem*, 1964, 242: 2051–2061.
- [22] Rieske J S. Composition, structure, and function of complex III of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 456: 195–247.
- [23] Steppuhn J, Rother C, Hermans J, Jansen T. The complete amino acid sequence of the Rieske Fe/S precursor protein from spinach chloroplasts deduced from cDNA analysis. *Mol Gen Genet*, 1987, 210: 171–177.
- [24] Salter A H, Newman B J, Napier J, Gray J C. Import of the precursor of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein by pea chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 569–574.
- [25] Knight J S, Duckett C M, Sullivan J A, Walker A R, Gray J C. Tissue-specific, light-regulated and plastid-regulated expression of the single-copy nuclear gene encoding the chloroplast Rieske Fe/S protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2002,

- 43: 522–531.
- [26] Madueno F, Bradshaw S A, Gray J C. The thylakoid-targeting domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein is located in the N-terminal hydrophobic region of the mature protein. *J Biol Chem*, 1994, 26: 17458–17463.
- [27] Vitry C D. Characterization of the gene of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii* indications for an uncleaved lumen targeting sequence. *J Biol Chem*, 1994, 269: 7603–7609.
- [28] Carrell C J, Zhang H, Cramer W A, Smith J L. Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure*, 1997, 5: 1613–1625.
- [29] Hasan S S, Yamashita E, Cramer W A. Transmembrane signaling and assembly of the cytochrome *b₆f*-lipidic charge transfer complex. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827: 1295–1308.
- [30] Cramer W A, Hasan S S, Yamashita E, Kahlau S. The Q cycle of cytochrome *bc₁* complexes: a structure perspective. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1807: 788–802.
- [31] Yamori W, Kondo E, Sugiura D, Terashima I, Suzuki Y, Makino A. Enhanced leaf photosynthesis as a target to increase grain yield: insights from transgenic rice lines with variable Rieske Fe/S protein content in the cytochrome *b₆f* complex. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 80–87.
- [32] Simkin A J, Lorna M, Lawson T, Raines C A. Over-expression of the Rieske Fe/S protein increases electron transport rates and biomass yield. *Plant Physiol*, 2017, 175: 134–145.
- [33] Sanda S, Munekage Y N, Yoshida K, Akashi K, Yokota A. Excess light-induced molecular responses of chloroplast Rieske Fe/S protein. *Photosynth Energy Sun*, 2008, 14: 941–944.
- [34] 梁潘霞, 李杨瑞. 甘蔗细胞色素 *b₆f* 复合体铁硫亚基(*SoCYT*)基因的克隆和表达分析. 西南农业学报, 2016, 29: 1032–1037.
- Liang P X, Li L R. Cloning of cytochrome *b₆f* complex iron-sulfur subunit (*SoCYT*) from sugarcane and analysis of its expression under PEG stress. *Acta Agric Boreali-occident Sin*, 2016, 29: 1032–1037 (in Chinese with English abstract).
- [35] Luo M, Kong X Y, Jiang T, Jia C, Zhou R H, Jia J Z. Analysis of resistance to powdery mildew in wheat based on Expressed Sequence Tags (EST) technique. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 567–572.
- [36] 阙友雄, 林剑伟, 徐景升, 阮秒鸿, 许莉萍, 张木清, 陈由强, 陈如凯. 甘蔗与黑穗病菌互作的叶片差异蛋白分析. 热带作物学报, 2008, 29: 136–140.
- Que Y X, Lin W J, Xu J S, Ruan M H, Xu L P, Zhang M Q, Chen Y Q, Chen R K. Analysis of protein expression patterns of leaves from interaction between sugarcane and *Ustilago scitaminea*. *Chin J Trop Crops*, 2008, 29: 136–140 (in Chinese with English abstract).
- [37] Ling H, Huang N, Wu Q B, Su Y C, Peng Q, Ahmed W, Gao S W, Su W H, Que Y X, Xu L P. Transcriptional insights into the sugarcane-*Sorghum mosaic virus* interaction. *Trop Plant Biol*, 2018, 11: 163–176.
- [38] 黄宁, 张玉叶, 凌辉, 罗俊, 吴期滨, 阙友雄. 甘蔗二氨基庚二酸异构酶基因的克隆与表达分析. 热带作物学报, 2013, 34: 2200–2208.
- Huang N, Zhang Y Y, Ling H, Luo J, Wu Q B, Que Y X. Cloning and expression analysis of a diaminopimelate epimerase gene in sugarcane. *Chin J Trop Crops*, 2013, 34: 2200–2208 (in Chinese with English abstract).
- [39] 苏亚春, 黄琰, 凌辉, 王竹青, 刘峰, 苏炜华, 黄宁, 吴期滨, 高世武, 阙友雄. 甘蔗 *CDK* 基因的 cDNA 全长克隆与表达分析. 作物学报, 2017, 43: 42–50.
- Su Y C, Huang L, Ling H, Wang Z Q, Liu F, Su W H, Huang N, Wu Q B, Gao S W, Que Y X. Cloning and expression analysis of *CDK* Gene in sugarcane. *Acta Agron Sin*, 2017, 43: 42–50 (in Chinese with English abstract).
- [40] Liu F, Huang N, Wang L, Ling H, Sun T T, Ahmad W, Muhammad K, Guo J X, Xu L P, Gao S W, Que Y X, Su Y C. A novel L-ascorbate peroxidase 6 gene, *ScAPX6*, plays an important role in the regulation of response to biotic and abiotic stresses in sugarcane. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2262. doi: 10.3389/fpls.2017.02262.
- [41] Schmidt C L, Shaw L. A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. *J Bioenerg Biomembr*, 2001, 33: 9–26.
- [42] Schütze K, Harter K, Chaban C. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to study protein-protein interactions in living plant cells. *Metho Mol Biol*, 2009, 479: 189–202.
- [43] Guo J L, Ling H, Wu Q B, Xu L P, Que Y X. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Sci Rep*, 2014, 4: 7042. doi: 10.1038/srep07042.
- [44] 郑红英. TuMV HC-Pro 蛋白自身互作及其与拟南芥编码 Rieske Fe/S 蛋白的互作研究. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2011.
- Zheng H Y. The Self Interaction of TuMV HC-Pro and Its Interaction with Rieske Fe/S Protein Encoded by *Arabidopsis thaliana*. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [45] Dashevskaya S, Horn R, Chudobova I, Schillberg S, Velez S M R, Capell T. Absciscic acid and the herbicide safener cyprosulfamide cooperatively enhance abiotic stress tolerance in rice. *Mol Breed*, 2013, 32: 463–484.
- [46] Liu B, Xue X D, Cui S P, Zhang X Y, Han Q M, Zhu L, Liang X F, Wang X J, Huang L L, Chen X M, Kang Z S. Cloning and characterization of a wheat β -1,3-glucanase gene induced by the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 1045–1052.
- [47] 严蓓. 钙缓解黄瓜幼苗 NaCl 胁迫伤害的蛋白质组学及光合碳代谢研究. 南京农业大学硕士学位论文, 江苏南京, 2013.
- Yan P. Proteomics and Photosynthetic Carbon Metabolism Research on Calcium Alleviating Salt Stress of Cucumber Seedlings. MS Thesis of Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China, 2013 (in Chinese with English abstract).