

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.08.008

引用格式:张力允,徐爱娇,马喆,等. *PvPCF5-SRDX*通过改善多年生黑麦草的光合作用提高高温耐受性[J].草地学报, 2026, 34(8):2837–2846

ZHANG Li-yun, XU Ai-jiao, MA Zhe, et al. *PvPCF5-SRDX* Enhances Heat Tolerance in Perennial Ryegrass Through Improved Photosynthesis[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(8):2837–2846

*PvPCF5-SRDX*通过改善多年生黑麦草的光合作用提高高温耐受性

张力允, 徐爱娇, 马喆, 王克华*

(中国农业大学草业科学与技术学院, 北京 100193)

摘要:多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)作为一种重要的草坪草和牧草,其生长常受高温胁迫制约。为探究*PvPCF5*基因功能抑制对多年生黑麦草高温耐受性的影响及其与光合作用的关系,本研究以野生型植株(WT), *PvPCF5*功能抑制型(*PvPCF5-SRDX*)和过表达型(*PvPCF5-OX*)植株为材料,设置热锻炼与无热锻炼两组,并于42℃高温下处理不同时间。结果表明,在高温胁迫下,*PvPCF5-SRDX*的多年生黑麦草较WT表现出更优的生理状态:叶片相对含水量显著更高,电解质渗漏和丙二醛含量显著更低($P<0.05$)。同时,*PvPCF5-SRDX*植株的光合色素含量显著高于*PvPCF5-OX*植株($P<0.05$),并具有最高的净光合速率、气孔导度和蒸腾速率,以及最低的胞间二氧化碳浓度。综上所述,抑制*PvPCF5*基因功能可通过有效改善多年生黑麦草的光合作用,显著增强其对高温的耐受性。本研究为利用*PCF5*基因培育耐热型多年生黑麦草新品种提供了理论依据。

关键词:高温胁迫;多年生黑麦草;*PCF5*;光合作用

中图分类号:S812

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)08-2837-10

PvPCF5-SRDX Enhances Heat Tolerance in Perennial Ryegrass Through Improved Photosynthesis

ZHANG Li-yun, XU Ai-jiao, MA Zhe, WANG Ke-hua*

(College of Grassland Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: As an important turfgrass and forage grass, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is frequently constrained by high temperature stress during its growth. To explore the effects of *PvPCF5* gene functional repression on heat tolerance of perennial ryegrass and its correlation with photosynthesis, wild-type (WT), *PvPCF5* functional repression (*PvPCF5-SRDX*), and overexpression (*PvPCF5-OX*) plants were used as experimental materials and divided into 2 groups with or without heat acclimation, followed by heat stress treatment at 42℃ for different durations. The results showed that under high temperature stress, *PvPCF5-SRDX* plants exhibited superior physiological performance compared with WT ones, with significantly higher relative water content, and significantly lower electrolyte leakage and malondialdehyde content ($P<0.05$). Meanwhile, the photosynthetic pigment contents of *PvPCF5-SRDX* plants were significantly higher than those of *PvPCF5-OX* ones ($P<0.05$), accompanied by the highest net photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration rate, as well as the lowest intercellular CO₂ concentration. In conclusion, repression of *PvPCF5* gene function can effectively improve the photosynthesis of perennial ryegrass and thereby significantly enhance its high temperature tolerance. This study provides a theoretical basis for breeding new heat-tolerant perennial ryegrass varieties.

Key words: High temperature; Perennial ryegrass; *PCF5*; Photosynthesis

收稿日期:2025-10-09;修回日期:2025-12-19

基金项目:国家自然科学基金项目(32271754);国家自然科学基金项目(32071887)资助

作者简介:张力允(2001-),女,汉族,河北沧州人,硕士研究生,主要从事草坪草逆境生物学研究, E-mail: zly20010527@163.com; *通信作者
Author for correspondence, E-mail: kehwan@cau.edu.cn

全球气候变化预计导致21世纪末的地球平均气温升高2~4℃,高温成为植物生长和发育阶段中主要的非生物胁迫之一^[1-4]。多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.),别名宿根黑麦草,属于禾本科冷季型草种^[5],对高温尤其敏感。

MiRNA是一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,它在转录后水平通过碱基互补配对的方式识别并调控靶基因,参与多种生物学过程^[6-8]。MiR319家族是在不同植物中高度保守的miRNA家族的一员。在柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)中,*PvPCF5*为miR319的靶点^[9],其中*PvPCF5*的抑制导致转基因植株中乙烯积累增加,耐盐性增强^[10]。此外,上调*PCF5*的表达可通过*PCF5*负调控茉莉酸途径增强植物的抗虫性^[11]。MiR319也可以通过调节*PCF5*提高小麦(*Triticum aestivum* L.)的耐盐性^[12]。水稻(*Oryza sativa* L.)转录抑制因子*OsTIE1*与*TCP*转录因子*OsTCP1/PCF5*相互作用,控制JA的生物合成、花药开裂和雄性不育^[13]。由此可见,*PCF5*在植物非生物胁迫响应、激素信号传导及生殖发育等生物学过程中均发挥核心调控作用。然而,关于*PCF5*在多年生黑麦草非生物胁迫方面的研究尚未见报道。

嵌合抑制基因沉默技术(CRES-T)核心原理是将目标转录因子与植物特异的EAR基序抑制域(SRDX)融合,使嵌合基因转化为原转录因子靶基因的特异性抑制子,过表达该嵌合基因的转基因植株可呈现目标转录因子的功能缺失表型^[14-15]。该技术直接在转录调控层面发挥作用,与RNAi通过核酸互补配对降解靶标mRNA或抑制翻译的核酸水平调控机制存在本质区别^[16]。在模式植物与作物中,CRES-T技术已展现出卓越的抗逆改良潜力。例如,在拟南芥中通过该技术抑制AtMYB102,ZAT6等转录因子表达,显著提升了植株耐盐性^[17];在黑麦草中,已有研究证实转DST-SRDX融合基因可显著提高植株耐盐性^[18]。

本研究利用嵌合抑制子基因沉默技术将转录抑制结构域SRDX与柳枝稷的抗逆基因*PvPCF5*融合,探究*PvPCF5*基因对多年生黑麦草高温耐受性的影响。研究结果将有助于补充现有的热胁迫反应调控网络,同时转基因所获得的植物材料也为将来通过遗传育种提高冷季型草坪草的耐热性提供了重要的种质资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料准备和生长条件

对miR319与*PvPCF5*和*LpPCF5*的靶向关系进行预测,结果显示,miR319在*PvPCF5*和*LpPCF5*的CDS序列中均存在潜在结合位点,其中*PvPCF5*的靶位点位于CDS第1092-1112 nt,*LpPCF5*的靶位点位于CDS第1104-1124 nt(图1A)。两个靶位点序列均为GAGGGGACCCCTTCAGTCCAG,序列完全一致,表明该miR319结合区域在柳枝稷和多年生黑麦草PCF5序列中具有较高保守性。psRNATarget预测结果显示,miR319对*PvPCF5*和*LpPCF5*的Expectation值均为3.0,预测作用方式均为Cleavage,提示miR319可能通过切割*PCF5*转录本的方式参与其转录后调控。对*PvPCF5*和*LpPCF5*的TCP保守结构域序列进行多序列比对,结果显示二者TCP结构域长度均为61个氨基酸,其中60个氨基酸位点完全一致,仅在第60位存在K/S差异,序列一致性达到98.36%。该结果表明,*PvPCF5*和*LpPCF5*在TCP功能结构域区域具有高度保守性,提示二者可能具有相似的DNA结合及转录调控功能(图1B)。结合*PvPCF5*和*LpPCF5*均含有典型TCP保守结构域的结果,说明*PCF5*作为miR319下游靶基因的调控关系在两种禾本科植物中可能具有一定保守性。由于*LpPCF5*基因敲除的载体构建困难,而通过将*PvPCF5*与EAR基序抑制结构域SRDX连接,构建出能够抑制靶基因表达的显性抑制子(图1C),已有相关研究发表。因此本研究将Liu等^[10]报道的载体*pZh01-PvPCF5-SRDX*,*pZh01-PvPCF5-OX*分别转进农杆菌菌株(本实验所用载体由中国农业大学张万军/刘燕蓉课题组惠赠),进行农杆菌介导的多年生黑麦草遗传转化^[19],供试黑麦草品种‘Citation fore’种子作为外植体。从无农杆菌侵染的愈伤组织分化而来的幼苗作为WT。将分化的野生型植株(WT),*PvPCF5*功能抑制型(*PvPCF5-SRDX*)和过表达型(*PvPCF5-OX*)多年生黑麦草幼苗转移到基质土壤(沙土:泥炭土:蛭石=1:1:1)中,在25℃下以14 h光照/10 h黑暗和350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照强度在温室中进一步生长。采用CTAB法提取植物DNA进行PCR检测(图1D)。RNA提取使用TRIzol试剂,从100 mg新鲜叶样品中分离总RNA,如前所述^[20]。RT-qPCR通过使用PrimeScript™

RT 试剂盒和 gDNA Eraser (Takara, NO. RR047Q) 合成第一链 cDNA, 用于基因表达水平检测 (图 1E-F)。通过阳性植株的分蘖分离成单独的幼苗, 将获得的转基因植物进一步扩繁。

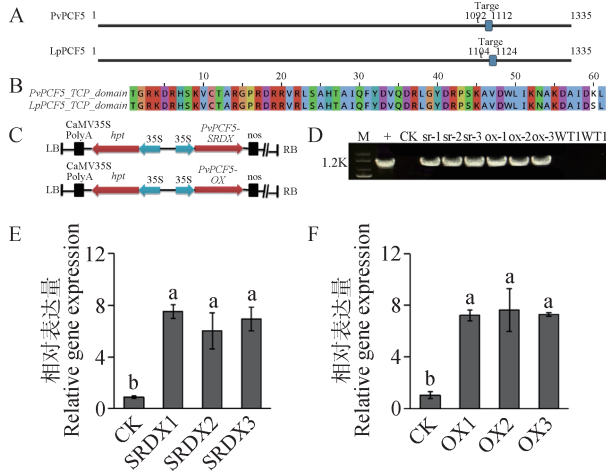


图 1 序列比对、载体构建和阳性植株验证

Fig. 1 Sequence alignment, vector construction and positive plant verification

注: A 为 *PvPCF5* 和 *LpPCF5* 靶位点。B 为 *PvPCF5* 和 *LpPCF5* 保守核苷酸序列比对。C 为 *PvPCF5* 基因抑制载体 (*pZH01-PvPCF5-SRDX*) 和 *PvPCF5* 基因过表达 (*pZH01-PvPCF5-OX*) 质粒的 T-DNA 区域。35S, CaMV 35S 启动子; nos, nos 终止子; LB, 左边界; RB, 右边界; hpt, 潮霉素磷酸转移酶基因。D 为采用 CTAB 法提取植物 DNA 进行 PCR 检测, E-F 为 2 种转基因植株在 RNA 水平进行相对表达量的检测, CK 为阴性植株, SRDX1, SRDX2, SRDX3, OX1, OX2, OX3 分别表示获得的 *PvPCF5-SRDX*, *PvPCF5-OX* 转基因的阳性植株, 因同一基因型的阳性植株间无显著差异, 所以下文中用 *PvPCF5-SRDX* 和 *PvPCF5-OX* 统一表示”。

Note: A shows the target sites of *PvPCF5* and *LpPCF5*. B shows the alignment of conserved nucleotide sequences between *PvPCF5* and *LpPCF5*. C shows the T-DNA region of the *PvPCF5* gene suppression vector plasmid (*pZH01-PvPCF5-SRDX*) and *PvPCF5* overexpression vector plasmid (*pZH01-PvPCF5-OX*). 35S, CaMV 35S promoter; nos, nos terminator; LB, left border; RB, right border; hpt, hydroxychloroquine phosphotransferase gene. D shows PCR detection using plant DNA extracted by the CTAB method. E-F show the relative expression analysis results of two transgenic lines at the RNA level. CK denotes the negative plant. SRDX1, SRDX2, SRDX3, OX1, OX2, OX3 represent positive plants expressing *PvPCF5-SRDX* and *PvPCF5-OX* respectively. Since there were no significant differences among positive plants of the same genotype, *PvPCF5-SRDX* and *PvPCF5-OX* were used uniformly in the following text”

1.2 热处理

对 2 月龄的多年生黑麦草进行热处理。实验处理 2 周前, 选取生长状况基本一致的 WT, *PvPCF5-SRDX*, *PvPCF5-OX* 黑麦草各 12 株, 去除枯黄老叶后, 将不同基因型的多年生黑麦草放置于三个智能

人工气候箱 (22°C/14 h 光照, 16°C/10 h 黑暗, 光照强度约 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度 70%) 中培养。每天给每株植物浇水 50 mL, 适应 2 周后开始高温处理。其中一个气候箱作为对照处理, 其余两个培养箱做高温处理。无高温热锻炼处理条件为: 42°C/14 h 光照, 42°C/10 h 黑暗, 光照强度约 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度 70%。有热锻炼的处理为: 先于 35°C 光照下处理 6 h 后, 转为 42°C/14 h 光照, 42°C/10 h 黑暗, 光照强度约 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度 70% 的条件下继续处理。

1.3 测定指标和方法

1.3.1 形态学指标测定方法 随机选取生长一致的植株, 用直尺测量其自然高度, 记作垂直高度; 测量第一片完全展开的叶片从叶基部到叶顶端的长度, 记作叶片长度。用游标卡尺测量每株第一片完全展开的叶片最宽部位, 记作叶宽; 分蘖数采用人工计数。每个处理选取 15 个样本, 即 15 次重复。

1.3.2 生理指标测定方法 每个指标检测的样本数为 4。相对含水量测定参考^[21], 相对电导率测定采用陈爱葵等^[22]的浸泡法, 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量参考丁志超等^[23]的方法, 叶绿素总量、叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量和类胡萝卜素含量的测定方法参考张冉等^[24]的方法, 净光合速率 (Net photosynthetic rate, Pn)、气孔导度 (Stomatal conductance, Gs)、蒸腾速率 (Transpiration rate, Tr)、胞间 CO₂ 浓度 (Intercellular CO₂ concentration, Ci) 的测定使用 Yaxin-1105 便携式光合荧光仪。

1.4 数据分析

使用 Microsoft Excel 2019 计算并整理原始数据; 首先对所有数据进行 Shapiro-Wilk 正态性检验和 Levene's 方差齐性检验, 随后, 利用 SPSS22.0 软件进行 0.05 的差异水平下的单因素方差分析, 同时, 使用 Duncan's 新复极差法对数值进行多重比较 ($P < 0.05$), 作图采用 SigmaPlot 14.0 软件完成。

2 结果与分析

2.1 转基因植株形态比较

为明确黑麦草 *PvPCF5* 基因对植株表型的影响, 本研究测定了野生型 (WT) 及两种转基因植株 (*PvPCF5-SRDX*, *PvPCF5-OX*) 的叶片宽度、叶片

长度、茎粗、自然高度、分蘖数5个核心表型指标,结果显示三者所有指标上均存在显著差异($P < 0.05$,表1)。其中叶片形态相关指标中,*PvPCF5-SRDX*的叶片宽度和叶片长度均显著高于WT,而*PvPCF5-OX*的两项指标均显著低于WT,表现为叶片窄小的特征;茎粗方面呈现与叶片形态一致的差异趋势,*PvPCF5-SRDX*显著粗于WT,*PvPCF5-*

*OX*株系则显著细于WT。自然高度上三者呈现明显梯度差异,WT植株平均28.43 cm,为最高,*PvPCF5-OX*植株(27.15 cm)次之,*PvPCF5-SRDX*植株最低(24.41 cm)。分蘖数指标中,*PvPCF5-SRDX*植株显著高于WT,*PvPCF5-OX*植株则显著低于WT,初步印证了*PvPCF5*基因对黑麦草生长发育的调控作用。

表1 3种株型常规形态指标

Table 1 Morphological traits of 3 genotypes

植株 Plants	叶片宽度 Leaf blade width/mm	叶片长度 Leaf blade length/cm	自然高度 Plants height/cm	茎粗 Internode diameter/mm	分蘖数 Tiller number/个
WT	2.92±0.08 ^b	21.68±0.27 ^b	28.43±1.60 ^a	2.30±0.06 ^b	41.40±2.39 ^b
SRDX	3.48±0.08 ^a	22.67±0.30 ^a	24.41±1.41 ^c	2.66±0.15 ^a	51.33±2.77 ^a
OX	2.76±0.03 ^c	19.57±0.66 ^c	27.15±0.18 ^b	1.99±0.13 ^c	34.27±2.84 ^c

注:WT表示野生型黑麦草,SRDX表示*PvPCF5-SRDX*转基因黑麦草,OX表示*PvPCF5-OX*转基因黑麦草。不同小写字母表示不同处理之间黑麦草生理指标的差异显著($P < 0.05$)。下同

Note: WT denotes wild-type ryegrass, SRDX represents the *PvPCF5-SRDX* transgenic ryegrass, and OX indicates the *PvPCF5-OX* transgenic ryegrass. Subscripts below denote statistically significant differences in physiological parameters between treatments ($P < 0.05$). As noted below

2.2 高温胁迫下无高温锻炼的3种株型黑麦草的相对含水量、相对电导率和MDA含量变化

本实验通过测量3个基因型的黑麦草在热处理0 h,48 h,72 h后的相对含水量、相对电导率及MDA含量(图2A-C)。对于相对含水量(图2A),WT从81.56%骤降至48 h的46.37%和72 h的24.94%,叶片逐渐萎蔫失活。*PvPCF5-OX*在48 h时与WT无显著差异、72 h后显著低于WT,而*PvPCF5-SRDX*的0-48 h仅从75.89%降至57.62%(降幅较WT少16.92%),72 h降至36.21%,持水能力显著高于WT($P < 0.05$)。实验结果说明,3种基因型的黑麦草相对含水量受热胁迫影响程度从小到大排序为:*PvPCF5-SRDX* < WT < *PvPCF5-OX*。这说明*PvPCF5*基因功能抑制可显著提升黑麦草在高温

胁迫前期的持水能力。

相对电导率的动态变化反映了细胞膜完整性对高温胁迫的响应,3种基因型植株的电导率均随胁迫时间延长呈上升趋势,但增幅存在显著差异(图2B)。胁迫前,WT与*PvPCF5-SRDX*植株电导率均低于20%,表明细胞膜结构完整;48 h高温处理后,WT电导率骤升至63.23%,较初始值升高51.15%,而*PvPCF5-SRDX*植株增幅仅32.04%,*PvPCF5-OX*植株电导率则显著高于WT;72 h后,WT电导率仍显著高于*PvPCF5-SRDX*植株,且*PvPCF5-OX*植株电导率高达76.93%。这一结果表明,*PvPCF5*基因功能抑制可有效减轻高温胁迫对黑麦草细胞膜的损伤,而过表达该基因则加速细胞膜通透性增加。

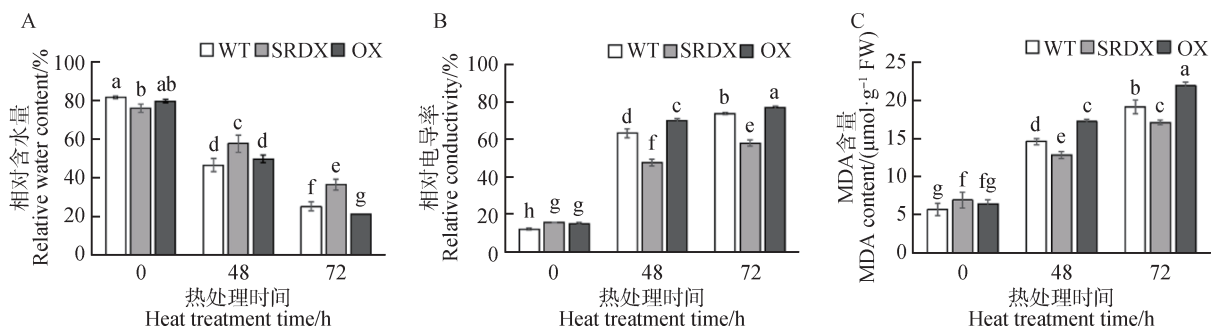


图2 无高温锻炼的3种株型黑麦草的相对含水量、相对电导率和MDA含量

Fig. 2 Relative water content, relative electrical conductivity and malondialdehyde content of transgenic plants and wild type without heat acclimation

MDA的含量变化可以反映植株氧化损伤程度^[32]。胁迫前,3种基因型植株MDA含量均未超过7 μmol·g⁻¹;48 h高温处理后,*PvPCF5-OX*植株MDA含量增幅最

大(增加10.86 μmol·g⁻¹),而*PvPCF5-SRDX*植株增幅最小(仅增加5.94 μmol·g⁻¹);72 h后,WT植株MDA含量较初始值上涨2.40倍(达19.14 μmol·g⁻¹),

PvPCF5-OX 植株 MDA 含量显著高于 WT ($P < 0.05$), 而 *PvPCF5-SRDX* 植株 MDA 含量为 $17.10 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, 仅上涨 1.48 倍, 且显著低于 WT。上述结果表明, 抑制 *PvPCF5* 基因功能可减缓高温诱导的脂质过氧化进程, 降低氧化损伤程度, 这与相对电导率反映的细胞膜稳定性结果一致, 进一步证实 *PvPCF5-SRDX* 植株通过维持细胞膜完整性、减少氧化损伤, 从而增强对高温胁迫的耐受性, 而 *PvPCF5-OX* 则可能加剧植株在高温下的损伤程度。

2.3 高温胁迫下无高温锻炼的3种株型黑麦草的光合色素含量变化

无热锻炼条件下, 3 种基因型黑麦草 (WT, *PvPCF5-OX*, *PvPCF5-SRDX*) 的叶绿素总量均随 42°C 高温胁迫延长呈下降趋势 (图 2A), 反映持续高温对光合色素合成或稳定性的破坏, 且基因型显著影响降解进程。胁迫 48 h 后, *PvPCF5-SRDX* 植株叶绿素总量 ($4.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 显著高于 WT ($P < 0.05$), 而 *PvPCF5-OX* 植株显著低于 WT ($P < 0.05$, 低 $0.56 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$); 72 h 时三者持续下降, *PvPCF5-SRDX* 从初始 $4.85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 降至 $3.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, *PvPCF5-OX* 从 $4.84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 降至 $2.99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 表明 *PvPCF5-SRDX* 可显著减缓高温诱导的叶绿素

降解, *PvPCF5-OX* 则加剧光合色素流失。

叶绿素 a 作为光反应核心色素, 变化趋势与叶绿素总量一致 (图 2B), 进一步印证 *PvPCF5* 对光合系统的调控作用。未处理时 3 种基因型叶绿素 a 含量无显著差异; 48 h 胁迫后, WT 下降 $0.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, *PvPCF5-SRDX* 仅下降 $0.40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (降幅远低于 WT), *PvPCF5-OX* 降幅最大 ($1.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。72 h 时, *PvPCF5-SRDX* 叶绿素 a 含量降至 $2.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (低于 WT 的 $2.40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 但全程降幅显著低于 WT ($P < 0.05$), 表明其能更好维持叶绿素 a 稳定性, 为高温下光合功能的部分保留提供结构基础。

叶绿素 b 与叶绿素 a 协同参与光能吸收与传递, 其变化规律与叶绿素 a 相呼应 (图 2C), *PvPCF5-OX* 植株在高温胁迫 48 h 和 72 h 时叶绿素 b 含量均为 3 种基因型中最低, 进一步证实 *PvPCF5-OX* 会加剧光合色素系统的损伤。

类胡萝卜素作为抗氧化剂和光能保护色素, 其含量在 3 种基因型中未随高温处理呈现一致变化趋势 (图 2D), 但 *PvPCF5-SRDX* 植株在胁迫 48 h 和 72 h 时类胡萝卜素含量均为最高, 通过维持较高水平的类胡萝卜素, 减轻高温引发的氧化应激对光合系统的破坏, 与叶绿素稳定性的提升形成协同保护效应, 共同增强植株对高温胁迫的耐受性。

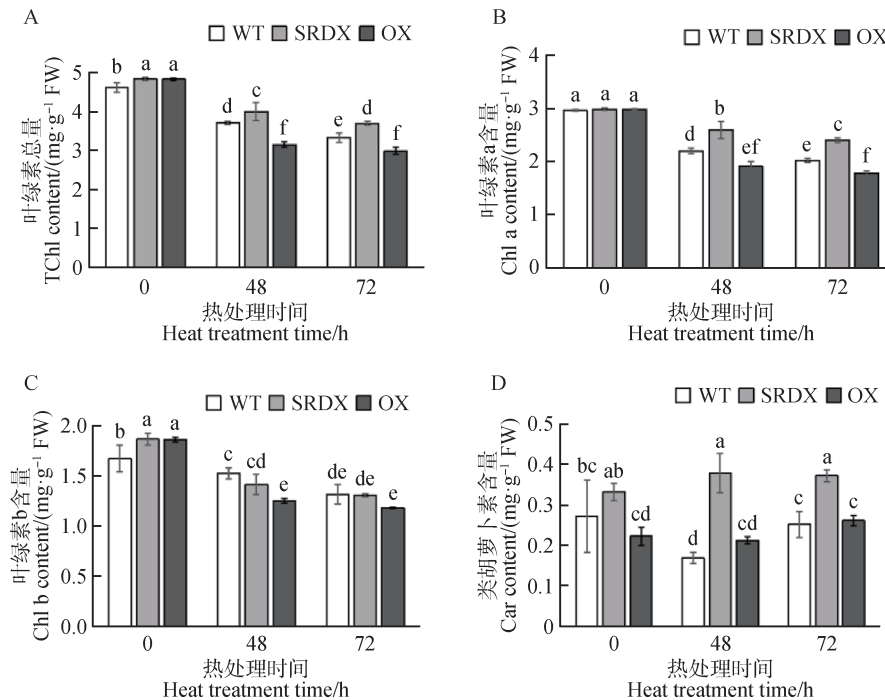


图3 高温胁迫下无高温锻炼的3种株型黑麦草的光合色素含量

Fig. 3 Photosynthetic pigment content of transgenic plants and wild type without heat acclimation

注: 本文中 TChl 表示叶绿素总含量, Chl a 表示叶绿素 a 含量, Chl b 表示叶绿素 b 含量, Car 表示类胡萝卜素含量

Note: TChl represents the total chlorophyll content, Chl a represents the chlorophyll a content, Chl b represents the chlorophyll b content, and Car represents the carotenoid content

2.4 高温胁迫下无高温锻炼的3种株型黑麦草的光合指标变化

高温胁迫下,3种株型黑麦草的光合生理特性呈现规律性响应:Pn,Gs,Tr均随热处理时间延长呈渐进式下降,而Ci呈反向升高趋势,这一变化模式反映高温通过抑制气孔开放与光合酶活性的双重途径调控碳同化过程。不同株型间的光合特性差异显著:*PvPCF5-OX*过表达植株的Pn在热处理后两个关键时间点均维持最低水平,而*PvPCF5-SRDX*抑制表达植株的Pn显著高于WT(图3A),证实*PvPCF5*基因的表达调控与黑麦草高温环境下的光合能力直接相关,其功能抑制可增强植株对高温胁迫的光合适应性。未进行高温处理时,3种株型的Gs,Tr和Ci无

显著统计学差异($P<0.05$)(图3B-D),表明*PvPCF5*基因未改变植株正常生长条件下的气孔相关生理稳态;经72 h高温胁迫后,各指标的基因型差异显著凸显:*PvPCF5-OX*植株的Gs和Tr降幅最大,分别达81.33%和81.38%,对应Ci升高至 $624.54 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$,说明过表达该基因会加剧高温诱导的气孔关闭与蒸腾抑制,进而导致胞间 CO_2 积累;相比之下,*PvPCF5-SRDX*植株的Gs和Tr降幅最小,分别仅为45.45%和37.58%,Ci上升幅度也最低($497.49 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$),这一结果进一步验证*PvPCF5*基因的抑制表达可通过减轻气孔导度与蒸腾速率的下降程度,维持相对稳定的胞间 CO_2 供应,为高温胁迫下光合系统的功能维持奠定基础。

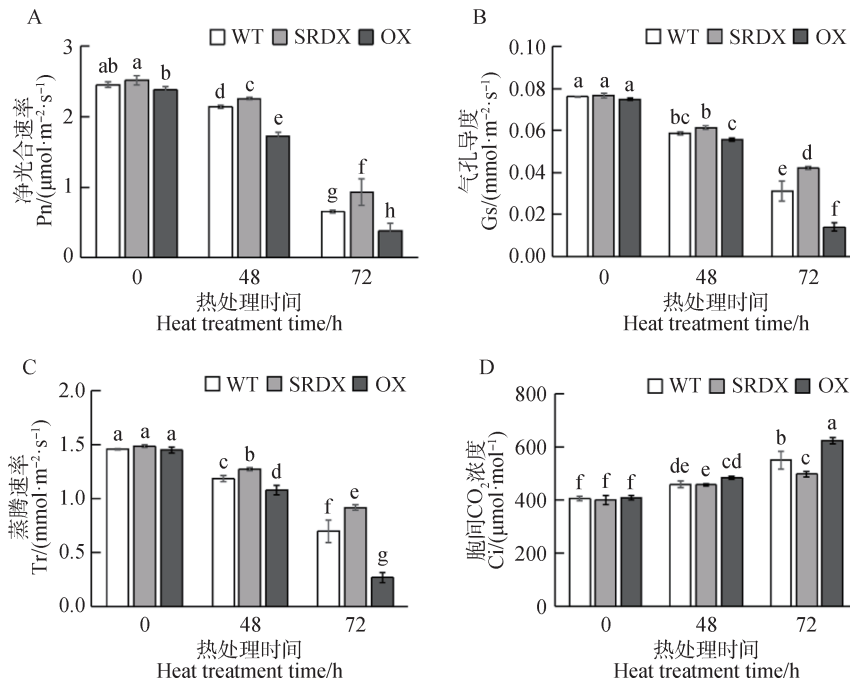


图4 高温胁迫下无高温锻炼的3种株型黑麦草的光合指标

Fig. 4 Photosynthetic indices of transgenic plants and wild type without heat acclimation.

注:本文中Pn表示净光合速率,Gs表示气孔导度,Tr表示蒸腾速率,Ci表示胞间 CO_2 浓度

Note: In this paper, Pn represents the net photosynthetic rate, Gs represents the stomatal conductance, Tr represents the transpiration rate, and Ci represents the intercellular CO_2 concentration

2.5 高温胁迫下经高温锻炼的3种株型黑麦草的相对含水量、相对电导率和MDA含量变化

经高温锻炼后进行高温胁迫,3种株型黑麦草的水分与膜系统稳定性呈现明确的基因型差异响应:植株相对含水量随胁迫时间延长持续下降,而反映细胞膜损伤程度的相对电导率和MDA含量则呈同步升高趋势(图4A-C),这一变化表明高温胁迫通过破坏细胞水分平衡与膜结构完整性影响植株生理功能。不同株型的抗逆差异在胁迫进程中

逐渐凸显:胁迫初始(0 h)时,*PvPCF5-SRDX*植株的相对含水量最低,但随着胁迫持续至48 h和72 h,该株型的相对含水量始终维持为同期最高水平,而*PvPCF5-OX*植株则持续处于最低水平,说明*PvPCF5*基因功能抑制可增强黑麦草在长期高温胁迫下的水分保持能力。相对电导率指标显示,胁迫初始时WT植株的细胞膜稳定性最优,但经48 h和72 h高温胁迫后,*PvPCF5-SRDX*植株的相对电导率与MDA含量均为3种株型中最低,*PvPCF5-OX*

植株则均为最高,这一结果证实 *PvPCF5-OX* 会加剧高温诱导的细胞膜脂质过氧化损伤,而其抑制表

达可通过减轻膜结构破坏,提升植株对高温胁迫的耐受性。

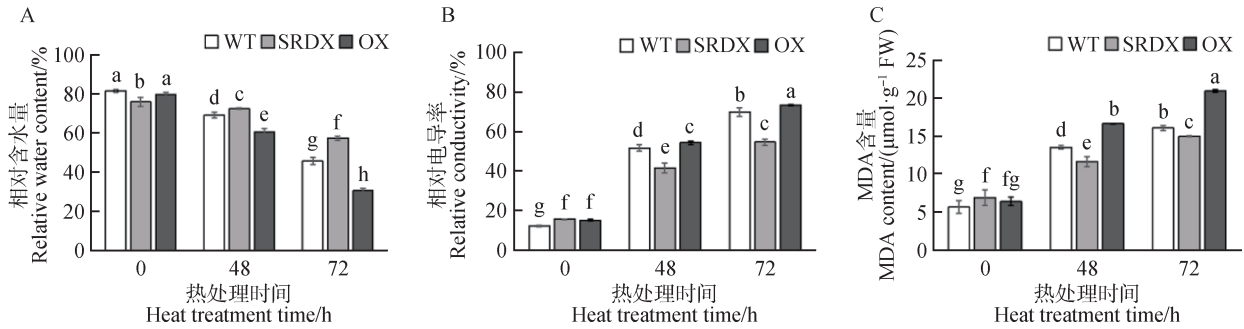


图5 高温胁迫下经高温锻炼的3种株型黑麦草的相对含水量、相对电导率和丙二醛含量

Fig. 5 Relative water content, relative electrical conductivity and malondialdehyde content of transgenic plants and wild type with heat acclimation

注:所有经高温锻炼组中,0 h表示未经任何高温处理,48 h代表经35℃6 h热锻炼后,在42℃高温下胁迫48 h;72 h代表经相同热锻炼后,在42℃高温下胁迫72 h。下同

Note: In all groups with high temperature acclimation, 0 h means no high temperature treatment, 48 h indicates 48 h of heat stress at 42℃ following 6 h of heat acclimation at 35℃, while 72 h indicates 72 h of heat stress at 42℃ after the same heat acclimation. The same as below

2.6 高温胁迫下经高温锻炼的3种株型黑麦草的光合色素含量变化

经35℃热锻炼6 h后,3种株型黑麦草在后续高温胁迫下的光合色素代谢呈现特异性响应:叶绿素总量随胁迫时间延长持续下降(图5A),反映高温对光合色素合成的抑制或降解作用。热胁迫48 h时, *PvPCF5-OX* 植株的叶绿素总量显著低于WT,差值达 $1.36 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ($P<0.05$);至72 h,各基因型叶绿素总量进一步下降,其中 *PvPCF5-SRDX* 抑制表达植株维持最高水平,而 *PvPCF5-OX* 植株始终为

最低,表明 *PvPCF5* 基因功能抑制可缓解高温诱导的叶绿素总量减少。叶绿素a含量的变化更能体现基因型差异:35℃热锻炼6 h后,3种株型叶绿素a含量无显著差异,但经42℃48 h胁迫后,WT植株叶绿素a含量下降 $0.18 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, *PvPCF5-SRDX* 植株无显著变化,而 *PvPCF5-OX* 植株降幅达 $1.09 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,且显著低于其余两种株型($P<0.05$),该差异在72 h胁迫后仍持续存在。叶绿素b含量方面, *PvPCF5-OX* 植株在48 h胁迫后即成为3种株型中最低(图5C)。类胡萝卜素含量随高温处理时间未呈现一致

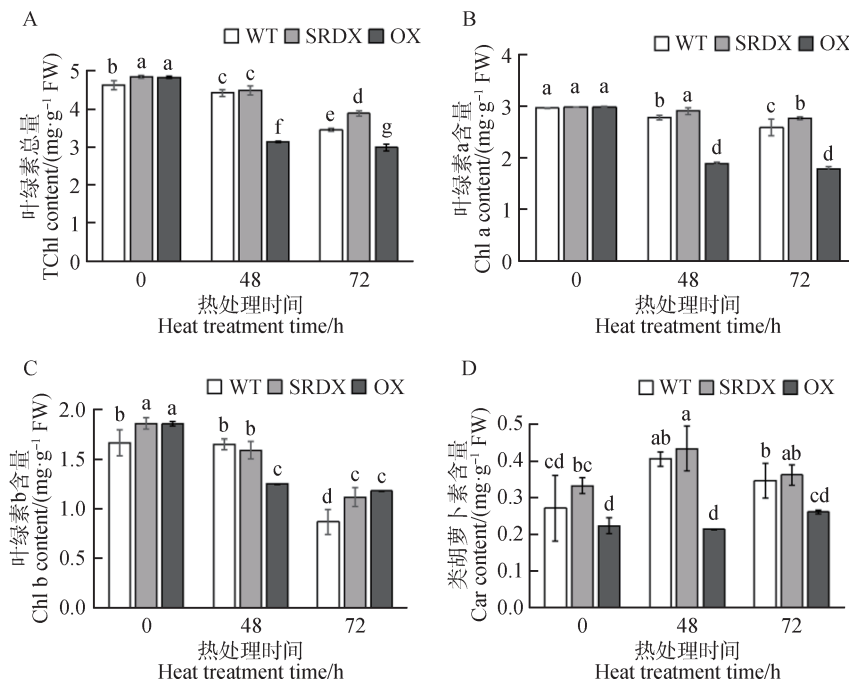


图6 高温胁迫下经高温锻炼的3种株型黑麦草的光合色素含量

Fig. 6 Photosynthetic pigment content of transgenic plants and wild type with heat acclimation

变化趋势(图5D),但 *PvPCF5*-OX 植株在 48 h 和 72 h 时均维持最低水平,综合表明 *PvPCF5*-OX 会加剧高温对黑麦草光合色素系统的损伤,而抑制其功能可增强光合色素的热稳定性,为高温下光合功能的维持提供结构基础。

2.7 高温胁迫下经高温锻炼的3种株型黑麦草的光合指标变化

经热锻炼处理后,3种株型黑麦草的光合生理响应趋势与无热锻炼组一致:Pn, Gs, Tr 随高温胁迫时间延长持续降低, Ci 呈反向升高,反映热锻炼未改变高温对光合生理指标的调控方向,但显著影响其响应幅度。基因型差异在胁迫进程中清晰显现:*PvPCF5*-OX 过表达植株的 Pn 在热处理后两个时间点均维持最低水平,而 *PvPCF5*-SRDX 抑制表达植株在 42°C

72 h 胁迫后 Pn 显著高于 WT ($P < 0.05$) (图 6A),表明 *PvPCF5* 基因功能抑制可增强热锻炼后植株的光合持续能力。未进行高温胁迫时,3 种株型的 Gs, Tr 和 Ci 无显著统计学差异 ($P < 0.05$) (图 6B-D); 经 42°C 72 h 胁迫后,各指标的基因型差异凸显且热锻炼的保护效应明确:*PvPCF5*-OX 植株的 Gs 和 Tr 降幅最大,分别达 77.33% 和 75.04%, *PvPCF5*-SRDX 植株降幅最小,仅为 44.49% 和 36.81%,且所有株型的降幅均低于无热锻炼组,证实热锻炼可减轻高温诱导的气孔关闭与蒸腾抑制。Ci 变化与 Gs, Tr 呈反向关联, *PvPCF5*-OX 植株 Ci 上升最多, *PvPCF5*-SRDX 植株上升最少,结合降幅差异可知, *PvPCF5* 基因的功能抑制与热锻炼协同作用,通过维持相对稳定的气孔导度与蒸腾速率,减少胞间 CO₂ 积累,为高温胁迫下光合系统的功能稳态提供保障。

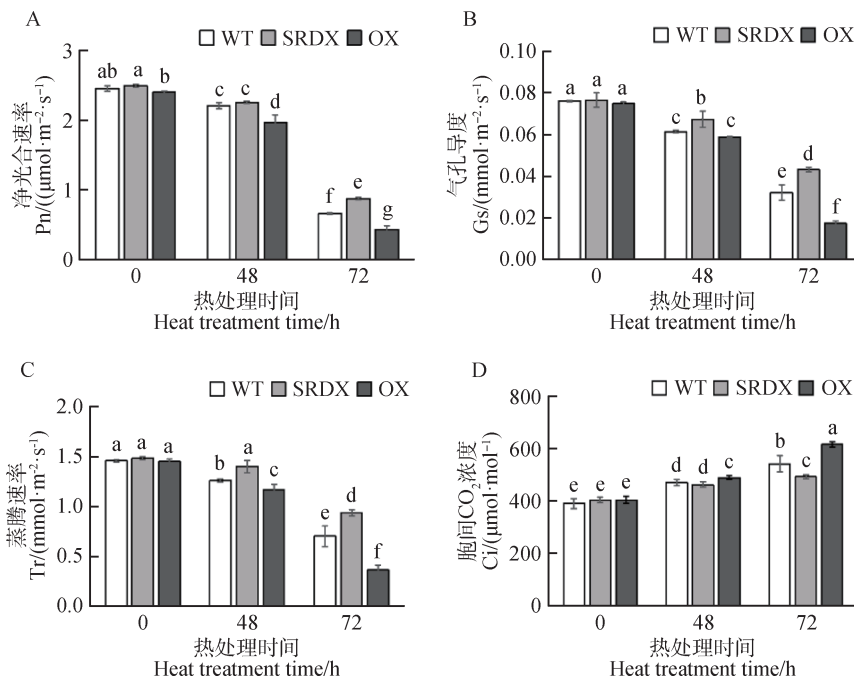


图7 高温胁迫下经高温锻炼的3种株型黑麦草的光合指标

Fig. 7 Photosynthetic indices of transgenic plants and wild type with heat acclimation

3 讨论

高温胁迫作为限制黑麦草生长发育与生产力的关键环境因子,严重影响植株抗逆性与环境适应性^[25]。*PvPCF5*属于PCF家族(植物特异性TCP转录因子亚家族),现有研究多聚焦于其在植物生长发育中的作用^[26-29]和在植物非生物胁迫中的作用^[10-11,30],而关于其参与高温胁迫响应的报道极少。本研究发现, *PvPCF5*基因功能抑制可通过调控植株水分代谢、膜系统稳定及光合作用提升多年生黑麦草高温耐受性,

不仅拓展了PCF家族基因的功能边界,更为解析植物抗逆调控网络的多元调控机制提供全新线索。

本研究通过分析高温胁迫下 *PvPCF5* 基因功能抑制植株、野生型及过表达植株的生理指标差异,揭示 *PvPCF5* 基因在多年生黑麦草高温耐受性调控中的作用。植物表型可以量化植物生长状态和遗传特性。本研究表明, *PvPCF5*-SRDX 植株在株高、叶宽、分蘖等多方面均优于 WT 和 *PvPCF5*-OX。同时,叶片相对含水量可指示植株叶片水分流失的情况,反映热胁迫对黑麦草叶片的损害程度^[31]。研究发现,高温

胁迫下 *PvPCF5-SRDX* 多年生黑麦草的相对含水量显著优于野生型。说明抑制 *PvPCF5* 功能可有效减少高温诱导的细胞水分流失,维持细胞正常膨压与生理代谢活性,为植株抵御高温胁迫奠定基础。水稻中 *OsTCP19* 基因在缺乏水分时表达显著上调,并通过调节与盐和干旱胁迫相关基因表达,上调水分利用效率和蒸腾作用^[32],侧面印证 TCP 转录因子家族在植物水分代谢调控中的保守性作用。此外,抑制 *PvPCF5* 功能可显著增强多年生黑麦草高温胁迫下的膜系统稳定性:相对电导率作为反映细胞膜透性和植物抗逆性的核心指标^[33],高温胁迫下, *PvPCF5-SRDX* 植株的相对电导率在后期显著低于其他株型,表明其细胞膜完整性更优。表明抑制 *PvPCF5* 基因功能可增强植株的水分保持能力,减轻细胞膜脂质过氧化损伤。MDA 含量作为膜脂过氧化程度的直接体现^[34],在 *PvPCF5-SRDX* 植株中也显著低于 WT,说明其氧化损伤更轻。这表示, *PvPCF5-SRDX* 通过抑制高温诱导的膜结构破坏(如脂质过氧化、蛋白变性),减少细胞内电解质外渗,从而维持细胞膜的选择透过性,为细胞生理代谢提供稳定的内环境^[35]。因此, *PvPCF5* 功能抑制可通过双重途径维护膜系统完整,一是依托自身水分保持能力的提升,减少水分亏缺引发的膜结构损伤,二是直接抑制高温诱导的膜脂过氧化进程,从根源降低膜系统破坏程度,构建高温下膜系统稳定的双重保障机制。

光合系统是植物对高温最敏感的生理过程之一,而光合色素含量与光合参数是衡量光合功能的核心指标^[36]。 *PvPCF5* 功能抑制可从多维度优化高温下多年生黑麦草的光合性能。本研究中, *PvPCF5-SRDX* 植株的叶绿素 a 和类胡萝卜素含量显著高于过表达植株:叶绿素 a 作为捕获光能和驱动光反应的关键色素,其含量升高意味着植株光合潜力的提升;类胡萝卜素作为胁迫下的“光保护剂”,可通过清除活性氧、缓解光抑制保护光合结构,其积累进一步增强了植株在高温下的光合系统稳定性^[37]。该特性使 *PvPCF5-SRDX* 株系在高温下可维持绿色表型,具备草坪草高温适应性育种的理想性状,后续可通过田间试验进一步验证其生产应用价值。也有研究表明热胁迫下, *LpSGR-RNAi* 的多年生黑麦草失绿,叶绿体破坏增加^[38],更反向印证了光合色素稳定对维持植株高温光合功能的关键意义。与之呼应的是,基因功能抑制的黑麦草植株的 Pn, Gs 和 Tr 显著升高,而 Ci 显著降低。这一结果表明, *PvPCF5-*

SRDX 不仅通过提高色素含量增强了光能捕获能力,还通过优化气孔行为(如气孔导度升高促进 CO₂ 进入)和碳同化效率(如胞间 CO₂ 消耗加快),使光合系统在高温下仍能高效运转^[39]。

通过本研究,构建 *PvPCF5-SRDX* 增强多年生黑麦草耐热性的协同调控模型: *PvPCF5* 功能抑制首先启动水分保持通路,减少高温诱导的细胞失水,为膜系统与光合系统提供基础水分支撑;其次直接抑制膜脂过氧化进程,维持膜系统完整,保障细胞物质与能量转运正常;最后依托稳定的胞内环境与结构完整的光合系统,实现光合色素积累与光合参数优化,提升光合效能,三者形成级联调控网络,协同提升植株高温耐受性。由此明确 *PvPCF5* 在多年生黑麦草耐热性调控中的负调控作用,其功能抑制的调控模式为禾本科牧草抗逆育种提供理论参考。

4 结论

本研究结果表明,热锻炼可显著提升多年生黑麦草高温胁迫下的整体生理状态。在有热锻炼和无热锻炼的高温胁迫下, *PvPCF5* 基因功能抑制的多年生黑麦草较野生型都表现出更优的生理状态:其相对含水量显著提高,相对电导率和丙二醛含量显著降低($P < 0.05$),表明 *PvPCF5-SRDX* 可减轻高温导致的细胞水分流失与膜系统损伤。同时, *PvPCF5-SRDX* 植株的光合色素含量显著高于过表达植株,净光合速率、气孔导度、蒸腾速率均为三类供试株系中最高,胞间二氧化碳浓度为最低,表明 *PvPCF5* 功能抑制可从色素积累与光合运转双维度优化植株光合性能。综上, *PvPCF5* 基因在多年生黑麦草高温耐受性调控中呈负调控效应,其功能抑制可通过协同增强植株水分保持能力、维持膜系统稳定、优化光合效能,构建多层次高温适应机制,最终显著提升植株高温耐受性,该研究结果为多年生黑麦草抗热品种改良提供坚实理论依据与核心基因靶点。

参考文献

- [1] SHAH F, HUANG J, CUI K, et al. Impact of high-temperature stress on rice plant and its traits related to tolerance [J]. The Journal of Agricultural Science, 2011, 149(5): 545-556
- [2] HEMANTARANJAN A, BHANU A N, SINGH M N, et al. Heat stress responses and thermo tolerance [J]. Advances in Plants & Agriculture Research, 2014, 1(3): 62-70
- [3] MITTLER R, FINKA A, GOLOUBINOFF P. How do plants feel the heat? [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37(3): 118-125
- [4] NOGALES A, RIBEIRO H, NOGALES-BUENO J, et al.

- Response of mycorrhizal 'Touriga Nacional' variety grapevines to high temperatures measured by calorimetry and near-infrared spectroscopy[J]. *Plants*, 2020, 9(11):1499
- [5] CORNISH M A, HAYWARD M D, LAWRENCE M J. Self-incompatibility in ryegrass[J]. *Heredity*, 1979, 43(1):95
- [6] LIN J S, KUO C C, YANG I C, et al. MicroRNA160 modulates plant development and heat shock protein gene expression to mediate heat tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:68
- [7] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nature reviews Genetics*, 2004, 5(7):522-531
- [8] ROGERS K, CHEN X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs[J]. *Plant Cell*, 2013, 25(7):2383-2399
- [9] XIE Q, LIU X, ZHANG Y, et al. Identification and characterization of microRNA319a and its putative target gene, *PuPCF5*, in the bioenergy grass switchgrass (*Panicum virgatum*)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017(8):396
- [10] LIU Y R, LI D Y, YAN J P, et al. MiR319-mediated ethylene biosynthesis, signalling and salt stress response in switchgrass[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(12):2370-2383
- [11] 时振英, 苗雪霞, 杨小芳, 等. 调控植物抗虫性状的基因及其应用: 中国, CN112522297B[P]. 2023-01-31
- SHI Z Y, MIAO X X, YANG X F, et al. Genes regulating plant insect-resistance traits and applications thereof. China Patent, CN112522297B[P]. Jan 31, 2023
- [12] ZEESHAN M, QIU C W, NAZ S, et al. Genome-wide discovery of miRNAs with differential expression patterns in responses to salinity in the two contrasting wheat cultivars[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22):12556
- [13] FANG Y, GUO D, WANG Y, et al. Rice transcriptional repressor *OsTIE1* controls anther dehiscence and male sterility by regulating JA biosynthesis[J]. *Plant Cell*. 2024, 36(5):1697-1717
- [14] CEN H F, LIU Y R, LI D Y, et al. Heterologous expression of a chimeric gene, *OsDST-SRDX*, enhanced salt tolerance of transgenic switchgrass (*Panicum virgatum* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(6):723-736
- [15] MITSUDA N, IWASE A, YAMAMOTO H, et al. Functional analysis of Arabidopsis transcription factors using a chimeric repressor system[J]. *Plant and Cell Physiology Supplement*, 2008;S0014
- [16] BOLOGNA N G, VOINET O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65:473-503
- [17] MITO T, SEKI M, SHINOZAKI K, et al. Generation of chimeric repressors that confer salt tolerance in Arabidopsis and rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9:736-746
- [18] CEN H F, YE W X, LIU Y R, et al. Overexpression of a chimeric gene, *OsDST-SRDX*, improved salt tolerance of perennial ryegrass. *Scientific Reports*, 2016, 6:27320
- [19] ZHANG W J, DEWEY R E, BOSS W, et al. Enhanced Agrobacterium-mediated transformation efficiencies in monocot cells is associated with attenuated defense responses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 81(3):273-286
- [20] SUN X, ZHU J, LI X, et al. *AsHSP26.8a*, a creeping bentgrass small heat shock protein integrates different signaling pathways to modulate plant abiotic stress response[J]. *BMC Plant Biology*, 2020(20):184
- [21] SMART R E, BINGHAM G E. Rapid estimates of relative water content[J]. *Plant Physiology*, 1974, 53(2):258-260
- [22] 陈爱葵, 韩瑞宏, 李东洋, 等. 植物叶片相对电导率测定方法比较研究[J]. *广东教育学院学报*, 2010, 30(5):88-91
- CHEN A K, HAN R H, LI D Y, et al. Comparative study on determination methods of relative conductivity in plant leaves[J]. *Journal of Guangdong Education Institute*, 2010, 30(5):88-91
- [23] 丁志超, 胡南, 朱若男, 等. 黑曲霉发酵液和过氧化钙协同强化黑麦草提取土壤中铀[J]. *有色金属工程*, 2020, 10(11):129-136
- DING Z C, HU N, ZHU R N, et al. Synergistic enhancement of phytoextraction of uranium using *Lolium perenne* L. from soil by aspergillus niger fermentation broth and calcium peroxide[J]. *Nonferrous Metals Engineering*, 2020, 10(11):129-136
- [24] 张冉, 韩博, 杨蔚, 等. 遮阴对建群初期混播草坪草光响应曲线的影响[J]. *草业科学*, 2019, 36(10):2507-2515
- ZHANG R, HAN B, YANG W, et al. Effect of shading on light response curves of mixed turfgrass during initial establishment stage[J]. *Pratacultural Science*, 2019, 36(10):2507-2515
- [25] 孙永江, 王琪, 邵琪雯, 等. 高温胁迫对植物光合作用的影响研究进展[J]. *植物学报*, 2023, 58(3):486-498
- SUN Y J, WANG Q, SHAO Q W, et al. Research advances on the effect of high temperature stress on plant photosynthesis[J]. *Bulletin of Botany*, 2023, 58(3):486-498
- [26] LIU C, DONG K, DU H, et al. *AsHSP26.2*, a creeping bentgrass chloroplast small heat shock protein positively regulates plant development[J]. *Plant Cell Reports*, 2024(43):32
- [27] LIU Y, YAN J, WANG K, et al. Heteroexpression of *Osa-miR319b* improved switchgrass biomass yield and feedstock quality by repression of *PuPCF5*[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2020(13):56
- [28] CHALLA K R, RATH M, NATH U. The CIN-TCP transcription factors promote commitment to differentiation in Arabidopsis leaf pavement cells via both auxin-dependent and independent pathways[J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(2):e1007988
- [29] JIAN C, HAO P, HAO C, et al. The *miR319/TaGAMYB3* module regulates plant architecture and improves grain yield in common wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *New Phytologist*, 2022, 235(4):1515-1530
- [30] 关紫薇. 水稻耐逆基因 *OsTCP* 家族及 *OsSRZ1* 基因的功能研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021:13-42
- GUAN Z W. Functional studies of rice stress-tolerant *OsTCP* gene family and *OsSRZ1* gene[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021:13-42
- [31] ZHU Y, LIAO Z, YANG J, et al. Genotypic and phenotypic diversity of heat tolerance among and within perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Brazilian Journal of Botany*, 2022(45):1223-1234
- [32] MUKHOPADHYAY P, TYAGI A K. *OsTCP19* influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways[J]. *Scientific Reports*, 2015(5):9998
- [33] ALMESELMANI M, DESHMUKH P S, SAIRAM R K, et al. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress[J]. *Plant Science*, 2006, 171(3):382-388
- [34] 刘大林, 张华, 胡楷崎, 等. 多年生黑麦草在高温胁迫下生理生化特性的变化[J]. *草地学报*, 2013, 21(1):142-146, 151
- LIU D L, ZHANG H, HU K Q, et al. Changes in physiological and biochemical characteristics of *Lolium perenne* L. under high temperature stress[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2013, 21(1):142-146, 151
- [35] 杨昕颖. 外源茉莉酸甲酯提高多年生黑麦草耐热性的效应研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2021:13-21
- YANG X Y. Effect of exogenous methyl jasmonate on improving thermotolerance of *Lolium perenne* L. [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2021:13-21
- [36] 徐志然, 张丽, 张智, 等. γ -氨基丁酸对 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下甜瓜幼苗耐性的影响[J]. 咸阳: 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(3):125-131
- XU Z R, ZHANG L, ZHANG Z, et al. Effect of γ -aminobutyric acid on tolerance of melon seedlings under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2015, 43(3):125-131
- [37] DOMONKOS I, KIS M, GOMBOS Z. Versatile roles of lipids and carotenoids in membranes[J]. *Acta Biologica Szegedien-sis*, 2015, 59(sup):83-104
- [38] ZHANG J, LI H, HUANG X, et al. STAYGREEN-mediated chlorophyll catabolism is critical for photosystem stability during heat-induced leaf senescence in perennial ryegrass[J]. *Plant, cell & Environment*, 2022, 45(5):1412-1427
- [39] CHENG W, WANG X, HU H, et al. Closed-loop enhancement of plant photosynthesis via biomass-derived carbon dots in biohybrids[J]. *Communications Materials*, 2025, 6:40