热带作物学报 2024, 45(6): 1110–1119
Chinese Journal of Tropical Crops

澳洲坚果叶片黄化期间光合能量代谢相关基因的表达研究

杨为海，郭善祥，徐　婷，肖　逸，雷文君

宜春学院生命科学与资源环境学院，江西宜春　336000

摘　要：叶片光合作用是维持植物生命活动的能量来源，但在华南地区一些澳洲坚果品种的新梢叶片通常在夏季持续高温条件下发生黄化，严重影响了植株生长和果实生产。为了探究澳洲坚果黄化叶片的光合能量发生机制，本研究基于前期获得的 HAES344 澳洲坚果不同黄化时期叶片转录组测序数据，鉴定与筛选光合能量代谢相关基因，并通过 qRT-PCR 分析光合能量代谢中的关键基因在 HAES344 澳洲坚果叶片黄化过程中的表达变化。结果表明：通过 KEGG 功能注释和富集分析，在 HAES344 澳洲坚果叶片黄化期间共鉴定出 96 个差异表达基因与能量代谢相关，以氧化磷酸化路径富集的差异基因数量最多，其次是碳固定路径，而富集到天线蛋白的差异基因最少；经过筛选（RPKM>0.5），共获得 43 个基因与光合能量代谢相关，其中有 27 个基因的表达量在黄化叶片中明显降低，另有 16 个基因的表达量变化则相反。利用 qRT-PCR 分析光合能量代谢中重要功能基因的相对表达量发现，在 HAES344 澳洲坚果黄化叶片中有关光系统Ⅱ（PSⅡ）天线蛋白编码基因 *CAP10A*、ATP 合酶亚基蛋白编码基因（*ATPC*、*ATPF*）、碳同化酶基因（*GAPA*、*GPD*、*At4g2652*、*rbcL*）、硫氧还蛋白编码基因（*Os05g0200100*、*CXXS1*）及质体蛋白跨膜转运基因 *TIC32* 的转录水平均显著低于其正常叶片，而有关硫代谢基因（*SIR*、*APR3*）和环式电子传递介导基因（*PGR5*、*ndhB*、*ndhD*）的相对表达量则显著高于其正常叶片，表明澳洲坚果黄化叶片中光合能量代谢相关基因的表达模式发生了较大改变，进而影响了光合能量的产生。该研究结果为深入探讨光合能量代谢相关基因在澳洲坚果黄化叶片中的作用机制提供参考依据。

关键词：澳洲坚果；叶片黄化；光合作用；能量代谢；电子传递

中图分类号：S664.9　　**文献标志码：**A

Expression of Genes Related to Photosynthetic Energy Metabolism During Leaf Yellowing of Macadamia

YANG Weihai, GUO Shanxiang, XU Ting, XIAO Yi, LEI Wenjun

College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, China

Abstract: Leaf photosynthesis is the energy source of plant life activities. However, some macadamia varieties (*Macadamia integrifolia*) planted in southern China are prone to generate the etiolated leaves under the continuous high temperature in summer, which seriously affects the shoot growth and fruit production of macadamia trees. In order to explore the mechanism of photosynthetic energy generation in the etiolated leaves of macadamia, the genes related to photosynthetic energy metabolism were identified and screened in this study, based on the previously obtained transcriptome sequencing data from the leaves of HAES344 macadamia at different yellowing stages, and the expression changes of the key genes in photosynthetic energy metabolism were analyzed during leaf yellowing of HAES344 macadamia by qRT-PCR. 96 genes with differential expression in the etiolated leaves of HAES344 macadamia were identified to be related to energy metabolism according to KEGG functional annotation and enrichment analysis, and the number of the differentially expressed genes enriched in the oxidative phosphorylation pathway was the highest, followed by carbon fixation pathway, and the least genes were enriched in the antenna proteins. After screening (RPKM>0.5), a total of 43 genes related to photosynthetic energy metabolism were obtained. Among these genes, the expression level of 27 genes decreased significantly in the yellowed leaves, while the remaining 16 genes did the oppo-

收稿日期　2023-09-27；**修回日期**　2023-11-13

基金项目　国家自然科学基金项目（No. 32060652）；江西省重点研发计划项目（No. 20212BBF63019）。

作者简介　杨为海（1978—），男，博士，研究员，研究方向：果树栽培与生理学；E-mail：seayang2004@126.com。

site. Through the qRT-PCR analysis of the relative expression level of key functional genes in the photosynthetic energy metabolism, the *CAP10A* gene encoding photosystem Ⅱ (PSⅡ) antenna protein, the *ATPC* and *ATPF* genes encoding ATPase subunit protein, the enzyme genes related to carbon assimilation (*GAPA*, *GPD*, *At4g2652* and *rbcL*), the *Os05g0200100* and *CXXS1* genes encoding thioredoxin, and the *TIC32* gene associated with plastid protein transmembrane transport showed a significant lower transcription level in the etiolated leaves of HAES344 macadamia compared with the normal leaves, while the *SIR* and *APR3* genes related to sulfur metabolism and the *PGR5*, *ndhB* and *ndhD* genes mediating cyclic electron transfer did the opposite, which suggested that the greatly changed expression patterns of genes related to photosynthetic energy metabolism affected the production of photosynthetic energy in the macadamia yellowing leaves. The results of this study would provide a reference for further exploring the mechanism of photosynthetic energy metabolism-related genes in the etiolated leaves of macadamia.

Keywords: macadamia (*Macadamia integrifolia*); leaf yellowing; photosynthesis; energy metabolism; electron transport

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.06.003

澳洲坚果（*Macadamia integrifolia*）起源于澳大利亚，因其果仁营养丰富、风味独特而在热带及亚热带地区广泛栽培。中国是澳洲坚果生产大国，种植面积超过 20 万 hm^2，稳居世界第一[1]。云南与广西作为我国澳洲坚果的两大重要产区，其主栽品种 HAES344 和桂热 1 号在夏季持续的高温条件下经常出现新梢叶片黄化现象，严重时甚至干枯，进而影响果实产量[2]，严重制约了当地澳洲坚果产业的发展。

光合作用对高温胁迫尤为敏感。高温能够破坏光系统Ⅱ（PSⅡ）的捕光天线系统、供体侧放氧复合体以及反应中心结构，影响 PSⅡ受体侧电子传递及其光合放氧功能；同时，高温影响光合反应过程中相关酶的活性，进而影响碳同化效率[3]。核酮糖-1,5-二磷酸（RuBP）羧化酶/加氧酶（Rubisco）是碳同化的关键酶和限速酶，该酶在叶绿体基质中大部分处于钝化形态，只有经 Rubisco 活化酶（RCA）活化后才具备活性[4]。然而，RCA 对高温非常敏感，因 RCA 活性受到抑制而造成活化的 Rubisco 数量减少，是高温胁迫下叶片 Rubisco 活性及光合速率降低的一个重要原因[5]。在梨黄化叶片中，RCA 活性及其编码基因 *Rubisco activase Ⅳ/Ⅴ* 的表达均正向调控光合作用[6]。Rubisco 的大亚基（rbcL）在光合作用中起着关键性作用[7]，胁迫条件下 *rbcL* 基因的表达量下调可导致其光合作用下降[8-9]。另外，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）[10]、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶（FBA）[11]、核糖-5-磷酸异构酶（RPI）[12]等酶的活性水平也与卡尔文循环的运转速率有关，影响着植物的光合能力。高温条件下，叶绿体中 *GAPDH*[13]与 *FBA*[6, 14]显著上调表达，有利于提高其编码酶的蛋白表达水平及活性，增强叶片光合能力。

正常情况下，光反应能够为碳同化提供比例合适的 ATP/NADPH 能量分子。然而，发生在类囊体片层的光反应是容易受到高温胁迫损伤的关键位点，造成 ATP 及 NADPH 的生产和消耗失衡，进而诱导光化学电子传递链组分过度还原与活性氧（ROS）过量产生，导致光抑制的增强和光系统的氧化损伤[15-16]。在叶绿体中，ATP 是由 ATP 合酶（ATPase）催化光合磷酸化反应而产生，NADPH 则是在线性电子传递链末端通过叶型铁氧还蛋白（Fd）-$NADP^+$氧化还原酶（LFNR）催化而成。高温胁迫明显降低苜蓿叶绿体的 ATPase 活性和 ATP 含量，光合速率亦明显下降[17]。叶面喷施亚精胺可显著增加热胁迫下 ATPase 亚基 CF1 及其编码基因 *ATPA* 的表达[18]。ZHANG 等[19]指出，高温胁迫容易使得光合线性电子传递受阻，导致非循环光合磷酸化活性下降，影响 ATP 的产生。HUANG 等[20]发现，在短暂的温度胁迫下，植物会激活围绕光系统Ⅰ（PSⅠ）的环式电子传递，亦可通过 ATPase 驱动 ATP 合成，保证有足够的 ATP 用于碳同化、光呼吸以及 PSⅡ修复。YAMORI 等[21]认为，环式电子传递循环对提高叶绿体内 ATP 含量或者 ATP/NADPH 比值以及保护光系统免遭胁迫引起的氧化损害具有重要作用。然而，环式电子传递循环对各电子载体的氧化还原平衡高度敏感。温度变化可通过影响硫氧还蛋白（Trx）的氧化还原状态来调节电子载体的氧化还原活性及其电子传递效率[22]。KANG 等[23]认为，Trx 不仅可以通过依赖 Fd 的 Trx 氧化还原酶（FTR）调节 PGR5/PGRL1 介导的环式电子传递途径，也可以通过依赖 NADPH 的 Trx 还原酶 C（NTRC）控制光合电子传递和非光化学淬灭，还能够对叶绿体酶（如 GAPDH、RCA）的巯基进行

还原调控，以调节光合碳同化过程。过表达 *NTRC* 能够促进叶绿体 ATPase 和 Trx 调节酶的活化[23]，提高 *PGR5* 表达量可增强环式电子流[24]，进而增强植物的抗性。

前期研究已表明，受高温胁迫引发的 HAES344 澳洲坚果黄化叶片中叶绿素含量和 PSⅡ活性均明显降低[2]，但在叶片黄化过程中光合能量代谢相关基因的表达情况尚不清楚。因此，本研究基于前期测序的 HAES344 澳洲坚果黄化叶片转录组数据[25]，采用生物信息学方法对其光合能量代谢相关差异表达基因进行筛选，通过 qRT-PCR 进一步分析其中重要基因的表达变化，进而解析澳洲坚果叶片黄化过程中光合能量代谢相关基因的差异表达规律，为深入认识澳洲坚果叶片黄化机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以广东省湛江市的 3 株树冠生长较一致、夏梢正常抽生的 8~10 年生 HAES344 澳洲坚果植株作为供试材料，于 2019 年 6 月 1 日（S_1：全绿叶片）、20 日（S_2：中度黄化叶片，黄化面积占总叶面积的 50%~70%）和 28 日（S_3：重度黄化叶片，黄化面积接近 100%）分别在树冠外围采集夏梢上初始成熟的第 4~5 轮叶片作为样品（图 1），将叶片用超纯水冲洗干净后剪碎，置于–80 ℃冰箱中备用。

S_1 S_2 S_3

图 1 澳洲坚果的不同黄化程度叶片

Fig. 1 The etiolated leaves with different degree in HAES344 macadamia

1.2 方法

1.2.1 能量代谢相关基因的筛选 基因表达量数据来源于前期获得的 HAES344 澳洲坚果不同黄化时期叶片（各时期均为 3 个生物学重复）转录组数据[25]。利用 DESeq2 软件进行差异基因分析，结合 KEGG、Nr、Pfam 等数据库的基因功能注释，按照 $P<0.05$ 且[$|\log_2$ (Fold Change)$| \geqslant 1$]的标准，筛选出 HAES344 澳洲坚果叶片黄化过程中与能量代谢相关的差异表达基因。

1.2.2 qRT-PCR 分析 从能量代谢差异基因中选择与光合作用相关的部分重要基因进行 qRT-PCR 分析。根据转录组测序结果中的转录本序列，应用 Primer Premier 6.0 软件设计引物，以澳洲坚果中的苹果酸脱氢酶基因 *MDH* 为内参基因[26]。基因的引物序列委托南京集思慧远生物科技有限公司合成（表 1）。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	正向引物（5′–3′）Forward primer (5′–3′)	反向引物（5′–3′）Reverse primer (5′–3′)
MDH	GCTGGTCTCATCTATTCTTTCC	CGTCCAACTTCTTCCTTGAG
CAP10A	GAGAAGCAGAGCTGATCCACG	CACCCATCCCATAAGCAGAAG
ATPC	ATTGGGGCAGGAGGCTATG	GATTGGAGCAGGACATGATTTT
ATPA	TTGTAATGTAGCGGGCGAGT	GACAGACGGGTAAAACGGCA
ATPF	ACCCAGGATTTTTCCAGCCG	GCGAAAGAGAGAGCCAAACCT
RPI2	AGTTTGTTTCGTGGGTGGATAG	CTCCTAAAGAGCAAAAGCCAAG
At4g2652	ACATAGCAACACCAGGAAAGGG	GACTTTAATTCCAGGGATGACG
GAPA	CTGCCTTGCTTGGATTGTAAA	GGAAGGATTGGCTACCGAGATA
GPD	TTGAAGGGTGGTGCGAAGAA	GGCGTTGGAGATGACTGGAA
rbcL	TCTCCAACAACACGCTCGATG	TCTCCAACAACACGCTCGATG
RCA	CGTTTCGTTTCTGCCGTGTT	CCGTGGAGTCGTTTGAGGTT
ndhB	TGCTGACAAAGAAGCCACAAG	TTCCATTCCTCAAGCCCACT
ndhD	AGGAAATAAGGTGATTCGCTGGTA	CTAAAGTTGTAATGAAGCCCGTC
ndhK	ATGGGCAGATTTGATACGGC	AGATAATCGCTCGGAGTTTGTG
TIC32	CTAAATCCCTCCTACTCCCACC	GAAGCTGATCCGAACCCACT
PGR5	GCTCCAGTTGTTGTTTATACCCG	AATCCAAGCCTTTCTCCATTCT
CXXS1	AATCATGGGGTTTGCTCGTT	CCTTATCTACTTGGGCTCCTTCC
Os05g0200100	GGGAACCTACAAGAGCACAAAA	CTTCGGGTGGACCAATACTACA
NTR2	ATGGGCAGATTTGATACGGC	AGATAATCGCTCGGAGTTTGTG
APR3	GCACCAGGTCTGAAATCCCC	CATTCATCGCCCGCACA
SIR	CAGGCTGGATTGCTGGTAAG	GCTGAAAACAATATGGTCTGGAAG

应用多糖多酚植物总 RNA 试剂盒（DP441，北京天根生化科技有限公司）提取叶片样品的 RNA，经检测 RNA 质量后，使用 Hifair®III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒（YEASEN，上海翌圣生物科技股份有限公司）反转录合成第 1 链 cDNA，再采用 Genious 2× SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒（ABclonal，武汉爱博泰克生物科技有限公司）对目标基因进行 qRT-PCR 检测。PCR 反应体系（20 μL）为：1.0 μL cDNA，1.0 μL 正向引物，1.0 μL 反向引物，10 μL SYBR Premix Ex Taq，7.0 μL ddH_2O。测定仪器为 BIOER 实时荧光定量 PCR 仪（FQD-96A），反应程序（两步法）为：95 ℃ 5 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40 个循环。试验设置 3 个生物学重复，每个样品重复 3 次；用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量。

1.3　数据处理

所有的试验数据均是 3 个独立生物学重复的平均值，利用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行 One-Way ANOVA（LSD 测验）检验，$P<0.05$ 表示显著性差异。应用 GraphPad Prism 8.0 软件制图。

2　结果与分析

2.1　能量代谢相关基因的鉴定

基于前期获得的 HAES344 澳洲坚果不同黄化时期（S_1、S_2 和 S_3）叶片转录组数据[25]，根据 KEGG 的注释结果，鉴定出 96 个与能量代谢途径相关的差异基因。如图 2A 所示，S_1 vs S_2、S_1 vs S_3 和 S_2 vs S_3 比较组分别有 6、17 和 14 个上调基因以及 33、46 和 6 个下调基因。韦恩图分析表明，仅有 2 个差异基因共同存在于 S_1 vs S_2、S_1 vs S_3 和 S_2 vs S_3 比较组中，但 S_1 vs S_2 和 S_1 vs S_3 共同包含的差异基因最多，达到 18 个（图 2B）。

KEGG 富集分析表明，S_1 vs S_2、S_1 vs S_3 和 S_2 vs S_3 分别有 20、29 和 8 个差异基因注释到氧化磷酸化路径，是基因数量富集最多的路径；其次是碳固定路径，3 个比较组中分别有 9、14 和 7 个差异基因得到注释，但注释到天线蛋白的差异基因最少，仅在 S_1 vs S_3 中发现有 1 个基因被注释（表 2）。

2.2　光合能量代谢相关基因的表达分析

筛除低表达丰度的基因（RPKM<0.5）后，共获得 1 个天线蛋白基因 *CAP10A* 和 6 个光合作用相关基因（图 3A）以及 16 个碳固定相关基因（图 3B）、14 个光合磷酸化相关基因（图 3C）与 6 个硫代谢相关基因（图 3D），这些基因在 HAES344 澳洲坚果叶片黄化过程中具有不同的表达趋势。

与正常绿叶（S_1）相比，在天线蛋白与光合作用途径中，除 PS Ⅰ相关基因 *psaI* 在黄化叶片 S_2 中显著上调表达外，其余 6 个基因则在黄化叶片（S_2、S_3）中显著下调表达，包括 2 个 ATPase 相关基因（*ATPC* 与 *atpI*）和 4 个 PS Ⅱ复合体组成蛋白相关基因（*CAP10A*、*PSBP* 和 2 个 *PSBR*）（图 3A）；在碳固定途径中，包括 3 个 FBA 编码基因

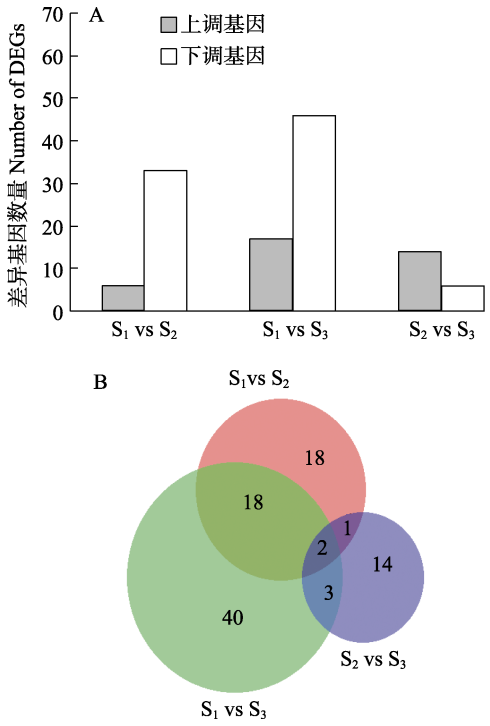


图 2　不同比较组中富集到能量代谢通路的差异基因数量（A）及其韦恩图（B）

Fig. 2　Number of the differential expressed genes (DEGs) enriched in energy metabolism pathway among different comparison groups (A) and the Venn diagram (B)

表 2　不同比较组中富集到不同路径的能量代谢相关基因

Tab. 2　Energy metabolism-related genes enriched in different pathways in different comparison groups

路径 Pathway	注释的差异基因数量 Number of differentially expressed genes		
	S_1 vs S_2	S_1 vs S_3	S_2 vs S_3
天线蛋白	0	1	0
光合作用	2	7	4
碳固定	9	14	7
氧化磷酸化	20	29	8
硫代谢	4	8	2
氮代谢	4	8	0

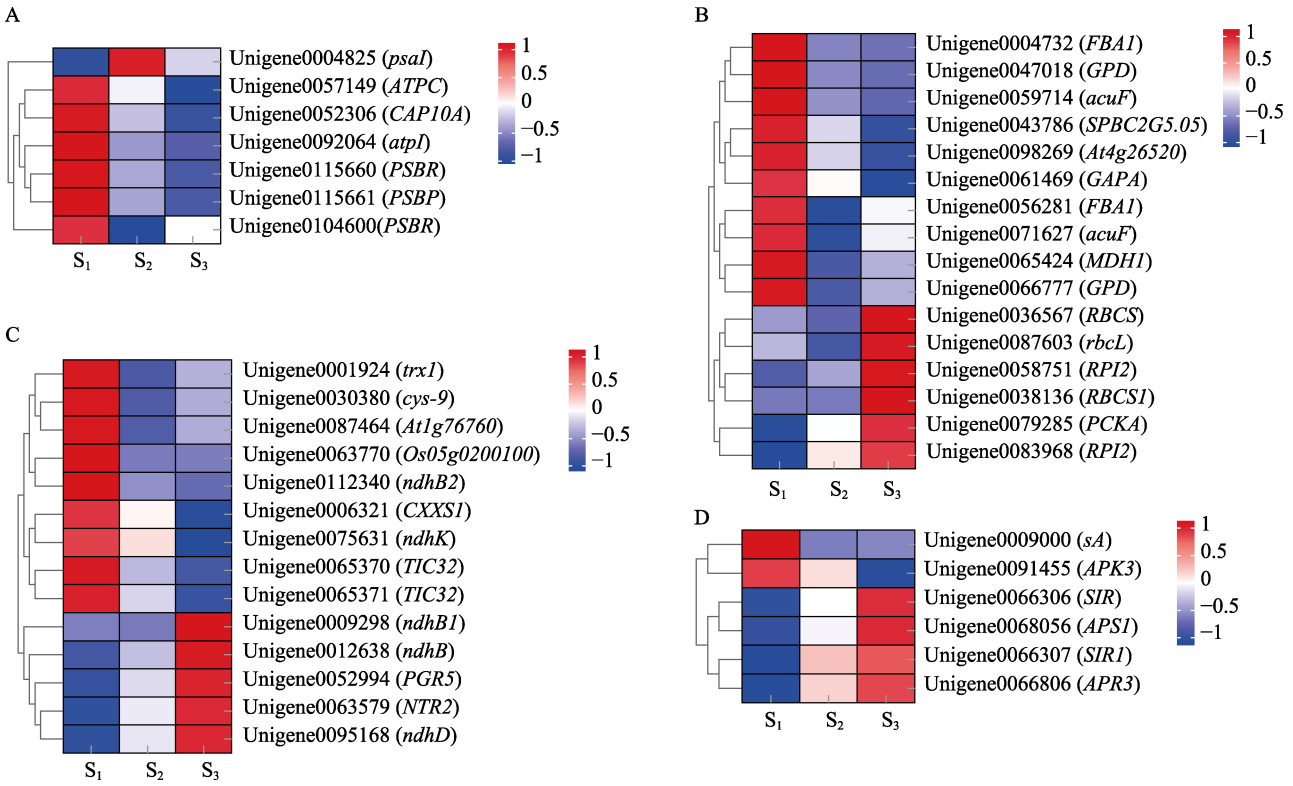


图 3 能量代谢通路中有关天线蛋白和光合作用（A）、碳固定（B）、光合磷酸化（C）与硫代谢（D）的差异基因表达模式

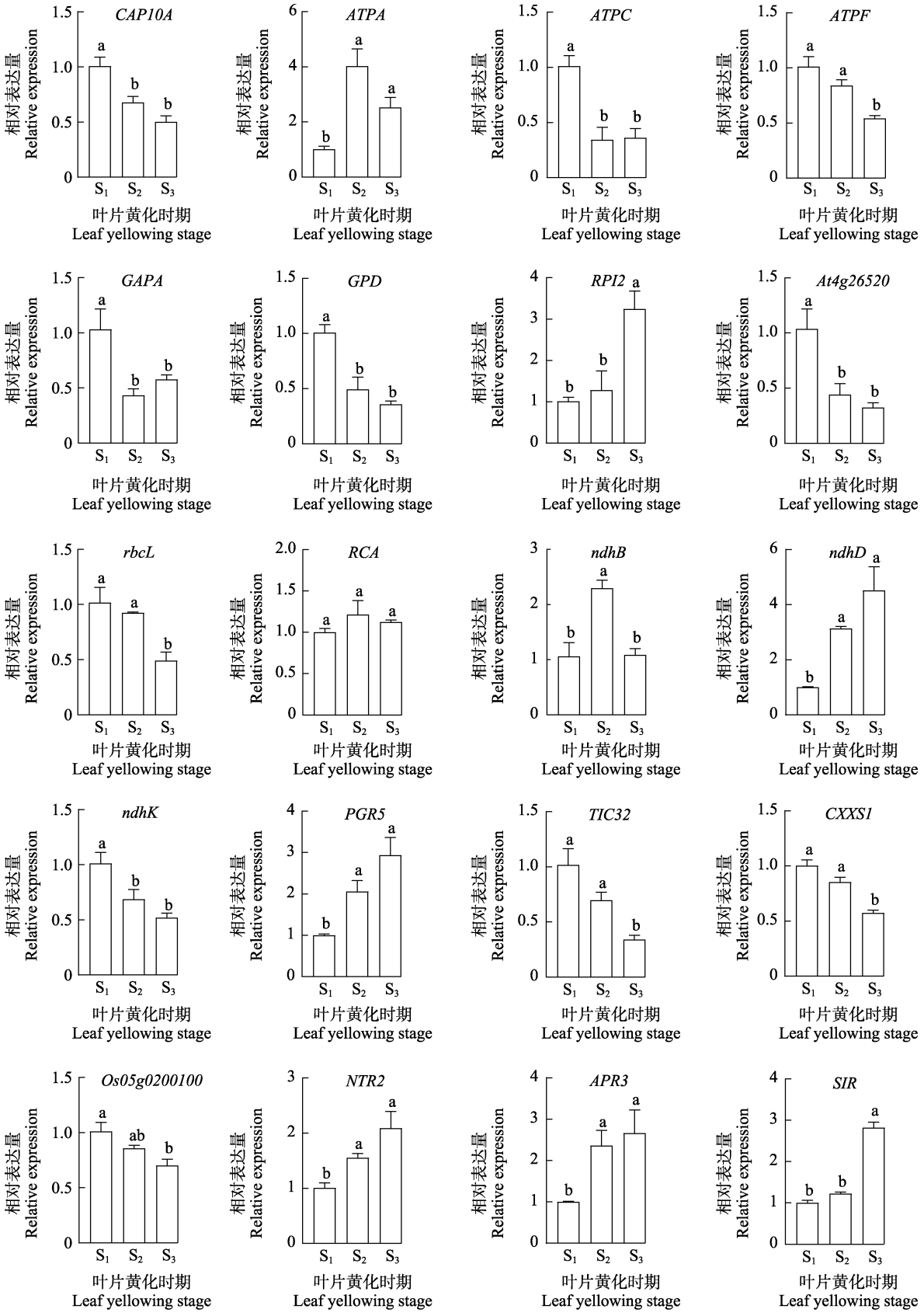
Fig. 3 Expression patterns of differential expressed genes related to photosynthetic apparatus (A), photophosphorylation (B), carbon fixation (C) and sulfur metabolism (D) in the energy metabolism pathway

（2 个 *FBA1* 和 *At4g26520*）、3 个 GAPDH 编码基因（*GAPA* 和 2 个 *GPD*）等在内的 10 个基因在黄化叶片中显著下调表达，而另外的 6 个基因的表达则相反，其中包括 2 个 RPI 编码基因（*RPI2*）和 3 个 Rubisco 相关基因（*rbcL*、*RBCS* 和 *RBCS1*）（图 3B）；在光合磷酸化途径中，包括 4 个 Trx 编码基因（*Trx1*、*CXXS1*、*Os05g0200100*、*Atlg76760*）、2 个 NADH-质体醌氧化还原酶相关基因（*ndhK* 与 *ndhB2*）和 2 个 LFNR 跨膜转运相关基因（*TIC32*）等在内的 9 个基因均在黄化叶片中发生下调表达，而包括 Trx 还原酶编码基因 *NTR2*、PGR5 蛋白编码基因 *PGR5*、NADH 脱氢酶（NDH）相关基因 *ndhB* 等在内的 5 个基因的表达则相反（图 3C）；对于硫代谢相关基因，包括亚硫酸还原酶（SIR）编码基因（*SIR* 和 *SIR1*）、5′-腺苷酰硫酸还原酶（APR）基因 *APR3* 等在内的 4 个基因均在黄化叶片中明显上调表达，其余 2 个基因的表达则相反（图 3D）。这一结果显示，上述基因的显著上调或下调表达可能在 HAES344 澳洲坚果叶片黄化过程中对光合能量代谢具有正调控或负调控作用。

2.3 光合能量代谢相关基因的 qRT-PCR 分析

对 20 个重要的光合能量代谢相关基因进行 qRT-PCR 分析发现，*CAP10A*、*ATPC*、*ATPF*、*rbcL*、*GAPA*、*GPD*、*At4g26520*、*ndhK*、*TIC32*、*CXXS1* 和 *Os05g0200100* 的相对表达量在叶片黄化过程中逐渐降低。其中，*CAP10A*、*ATPC*、*GAPA*、*GPD*、*At4g26520* 和 *ndhK* 在 S_1 时期的相对表达量均显著高于 S_2 和 S_3，但其在 S_2 与 S_3 之间的表达量差异均不显著；*ATPF*、*rbcL*、*TIC32* 和 *CXXS1* 在 S_3 时期的相对表达量均显著低于 S_1 和 S_2，而其在 S_1 与 S_2 之间的表达量差异均不显著；*Os05g0200100* 在 S_1 时期的相对表达量显著高于 S3，但其在 S1 与 S2 之间以及 S2 与 S3 之间的表达量差异均不显著（图 4）。

在叶片黄化期间，*RPI2*、*ndhD*、*PGR5*、*NTR2*、*APR3* 和 *SIR* 的相对表达量逐渐升高。其中，*ndhD*、*PGR5*、*NTR2* 和 *APR3* 在 S_1 时期的相对表达量均显著低于 S_2 和 S_3，但其在 S_2 与 S_3 之间的表达量差异均不显著；*RPI2* 和 *SIR* 在 S_3 时期的相对表达量均显著高于 S_1 和 S_2，而其在 S_1 与 S_2 之间的表达量差异均不显著。另外，*ATPA* 和 *ndhB* 的相对



不同小写字母表示不同时期间差异显著（$P<0.05$）。

Different lowercase letters indicate significant difference among different stage ($P<0.05$).

图 4　光合能量代谢相关差异基因的相对表达量

Fig. 4　Relative expression levels of differential expressed genes related to photosynthetic energy metabolism

表达量均呈现先升后降的变化趋势，*RCA* 的表达变化则相对平稳。其中，*ATPA* 在 S_2 和 S_3 时期的相对表达量均显著高于 S_1，但其在 S_2 与 S_3 之间差异不明显；*ndhB* 在 S_2 时期的相对表达量均显著高于 S_1 和 S_3，但其在 S_1 与 S_3 之间差异不显著（图 4）。

3 讨论

在本研究中，基于 KEGG 注释和富集分析，从鉴定出的 96 个与能量代谢途径相关的差异基因中筛选到了 43 个参与光合能量代谢的功能基因，发现有 27 个基因在 HAES344 澳洲坚果黄化叶片中下调表达，其余 16 个基因则在黄化叶片中上调表达，说明这些基因对黄化叶片的光合能量代谢发挥了重要作用。进一步选取 20 个关键的光合能量代谢相关基因进行实时荧光定量 PCR 分析发现，大部分基因的相对表达量变化与转录组中基因的 RPKM 值变化趋势基本一致，进一步表明本研究挑选的 20 个关键基因极可能参与了光合能量代谢。

3.1 PSⅡ结构与功能

夏季高温常导致 HAES344 澳洲坚果新梢叶片变黄，这与 ROS 积累引起的叶绿素降解和 PSⅡ损伤密切相关[2]。叶绿素作为光合作用的决定性因素，影响着光合同化产物的形成[27]。植物在进行光合作用时，叶绿素只有与叶绿素 a/b 结合蛋白结合形成色素蛋白复合体后才能行使其吸收与传递光能以及参与光化学反应的功能。CP24 是 PSⅡ捕光天线中的一种外周捕光天线蛋白，在传递光能、维持 PSII 及类囊体膜结构、耗散过量激发能方面起着重要作用[28]。贾兵等[6]认为，增强砀山酥梨黄化叶片中叶绿素 a/b 结合蛋白编码基因 *Chl a-b P4/CP24/29.1* 的表达量可提升类囊体膜中电子及质子的转移能力。KOVÁCS 等[29]证实，CP24 蛋白与 ROS 的清除有关，在敲除其编码基因的拟南芥植株中 ROS 的积累明显较野生型更高。本研究中，编码 CP24 的 *CAP10A* 在澳洲坚果叶片黄化期间显著下调表达，可能是由于澳洲坚果黄化叶片中 ROS 过量累积所引起的 CP24 蛋白降解所致，进而影响光能的吸收与传递。另外，*PSBP* 和 *PSBR* 也在黄化叶片中显著下调表达，意味着 PSⅡ复合体的结构完整性和驱动电子传递反应功能可能遭到破坏[30]。

3.2 叶绿体 ATP 合成

碳同化是叶绿体利用光反应中形成的同化力（ATP 和 NADPH）将 CO_2 转化为稳定碳水化合物的过程。其中，ATP 是由 ATPase 催化光合磷酸化反应而产生。高温下编码叶绿体 ATPase 中 CF_1 蛋白 α 亚基的 *ATPA* 和 γ 亚基的 *ATPC1* 在白杨叶片中显著上调表达，促进 ATP 的合成以用于 PSⅡ修复[31]，但在遭受热胁迫的黄瓜叶片中 *ATPA* 明显下调表达[18]。本研究中，*ATPC* 和编码 CF_0 蛋白 a 亚基的 *ATPF* 均在 HAES344 澳洲坚果黄化叶片中显著下调表达，表明 ATPase 的 CF_1 及 CF_0 蛋白含量明显减少，可能使得 CF_0 与 CF_1 的结合更松散，导致 CF_1 脱离 CF_0，进而造成 ATPase 丧失 ATP 合成功能而表现出 ATP 酶水解 ATP 的活性[30]。因此，*ATPA* 在黄化叶片中表现为显著上调表达，说明 ATPase 水解 ATP 的能力增强，可能是通过释放能量来提高黄化叶片应对 ROS 过量积累的一种防卫反应[32]。

3.3 环式电子传递

电子传递链是光合作用形成同化力的核心环节。在高等植物的叶绿体中，NADPH 是在光合线性电子传递的最后一步反应中通过 LFNR 催化还原 $NADP^+$ 而成。杨超等[33]认为，位于叶绿体内膜上的易位子 TIC 参与了将 LFNR 前体蛋白从细胞质基质中转运至叶绿体的定位过程。TIC32 属于 TIC 复合体的亚基，介导了质体蛋白这一转运过程[34]。本研究发现，*TIC32* 在黄化叶片中显著下调表达，意味着 LFNR 的跨膜转运可能发生减弱，进而限制了线性电子传递，降低了叶绿体基质中 NADPH 的生成能力。环式电子传递是叶绿体中 ATP 合成的一个重要替代路径，存在 PGRL1/PGR5 介导途径与 NAD(P)H 脱氢酶（NDH）复合体介导途径，对植物正常生长发育和抵御逆境具有重要作用[35]。DALCORSO 等[36]认为，PGRL1/PGR5 复合体可作为质子梯度调节蛋白参与高温条件下线性电子流到环式电子流的转换，对诱导热耗散和保护 PSⅡ免遭光抑制是必需的。NDH 介导的环式电子传递能够缓解叶绿体基质过度还原，维持电子传递链氧化还原系统的平衡，驱动 ATP 合成[35]。敲除编码 *NDH* 基因的烟草对高温胁迫敏感[37]。本研究中，*PGR5*、*ndhB* 和 *ndhD* 在黄化叶片中显著上调表达，意味着黄化叶片能通过增强环式电子流来生成 ATP 和耗散

过剩热量，用以修复或减轻氧化胁迫对光系统造成的损伤。然而，*ndhK* 和 *ndhB2* 在黄化叶片中显著下调表达，说明黄化叶片中构成 NDH 复合体的亚基含量明显减少，暗示了整个 NDH 复合体的稳定性可能受到影响[35]。

3.4　叶绿体氧化还原状态

硫氧还蛋白（Trx）是一类小分子蛋白，不仅直接参与 ROS 的清除，还能通过改变其氧化还原状态来调节光合电子传递速率[22]。KANG 等[23]认为，在 Trx 系统中，氧化态的 Trx 和 Trx 类蛋白可被 NTR 还原，用以维持叶绿体的氧化还原平衡。本研究表明，编码 Trx 的 *Trx1* 和 *Os05g0200100* 以及编码 Trx 类蛋白的 *CXXS1* 均在黄化叶片中显著下调表达，意味着 Trx 的功能可能受到抑制，导致黄化叶片细胞内的氧化还原状态失衡，进而影响了光合电子传递；然而，*NTR2* 显著上调表达，表明黄化叶片可能发生了氧化应激，通过将 Trx 从氧化态转化为还原态，提高其清除 ROS 的能力，以缓解氧化胁迫。硫代谢在植物体的生长发育中起着至关重要的作用，SIR 和 APR 可充当电子供体来还原 Trx[38]。在黄化叶片中，*SIR* 和 *APR3* 的相对表达量显著增加，说明更多的 Trx 可能得到还原，用以维持光合电子传递和抵抗氧化胁迫。

3.5　碳同化能力

在光合碳同化过程中，Rubisco 是最重要的限速酶，但 Rubisco 活性受到 RCA 的调控[4]。紫花苜蓿叶片中编码 Rubisco 大亚基的 *rbcL* 在干热胁迫下呈现出先显著增加、后持续降低的表达变化趋势[9]，干旱胁迫下 *rbcL* 的下调表达导致冬油菜叶片光合作用的下降[8]。PERDOMO 等[5]认为，高温胁迫下叶片中 Rubisco 活性的降低是因为 RCA 活性受到高温抑制而造成活化的 Rubisco 数量减少所致。本研究发现，*rbcL* 在重度黄化叶片中显著下调表达，表明 Rubisco 的大亚基发生了降解，可能是黄化叶片中 ROS 引起的酶促或非酶促裂解所致[7]。然而，*RCA* 的表达在叶片黄化过程中未发生显著性变化，意味着 RCA 可能发生了热聚合，使得 RCA 从可溶性组分向不溶性组分转移，导致 RCA 含量变化不明显[39]。另外，卡尔文循环的运转速率与 GAPDH、FBA、RPI 等酶的活性水平关系密切[10-12]。GAPDH 是催化光合最初产物 1,3-二磷酸甘油酸还原为 3-磷酸甘油醛的关键调节酶，其活性的高低会影响光合速率及光合产物的积累。叶绿体 *GAPDH* 上调表达及其编码的酶活性提高，有利于增强光合代谢在逆境下的抗性[13]。本研究结果表明，编码 GAPDH 的 *GAPA* 和 *GPD* 在黄化叶片中显著下调表达，说明黄化叶片的光合能力下降，也意味着 GAPDH 的活性变化可能与叶绿体所遭受的氧化还原失衡有关[23]。FBA 所催化的反应位于 RuBP 再生阶段，在很大程度上控制碳的固定和流量。本研究中，编码 FBA 的 *At4g2652* 也在黄化叶片中显著下调表达，意味着 RuBP 的再生能力减弱，与 HAAKE 等[11]发现马铃薯叶中因 *FBA* 表达减弱而引起光合作用显著降低的结果较一致。然而，编码核糖-5-磷酸异构酶的 *RPI2* 在重度叶片黄化中显著上调表达，可能是黄化叶片对高温环境的应激响应所致。

4　结论

本研究基于转录组数据分析，确定了 43 个光合能量代谢相关基因在 HAES344 澳洲坚果夏梢叶片自然黄化过程的表达模式；通过 qRT-PCR 分析发现，*CAP10A*、*ATPC*、*ATPF*、*GAPA*、*GPD*、*At4g2652* 与 *rbcL* 等基因在黄化叶片中显著下调表达，可能导致了 PSⅡ捕获天线蛋白降解、叶绿体 ATP 合成功能减弱和碳同化能力下降，而 *PGR5*、*ndhB*、*ndhD*、*NTR2*、*SIR* 和 *APR3* 等基因显著上调表达以及 *TIC32*、*Os05g0200100*、*CXXS1* 等基因显著下调表达，可能造成叶绿体内氧化还原状态失衡，并激发环式电子流，用以减轻氧化胁迫对光合能量机构的损伤。本研究为深入探讨澳洲坚果叶片黄化机制提供参考依据。

参考文献

[1] 杨为海, 曾利珍, 曾辉, 万继锋, 陈倪, 邹明宏, 陆超忠, 张汉周, 罗炼芳, 朱文华. 澳洲坚果种质资源叶片形态性状观测分析[J]. 热带作物学报, 2020, 41(1): 69-76.
YANG W H, ZENG L Z, ZENG H, WAN J F, CHEN N, ZOU M H, LU C Z, ZHANG H Z, LUO L F, ZHU W H. Investigation and analysis on leaf morphological characters of macadamia germplasm resources[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(1): 69-76. (in Chinese)

[2] 杨为海, 曾辉, 万继锋, 张汉周, 陆超忠. 高温条件下澳洲坚果叶片黄化的生理特性[J]. 热带作物学报, 2021, 42(3): 830-838.
YANG W H, ZENG H, WAN J F, ZHANG H Z, LU C Z.

Preliminary study on physiological characteristics of macadamia leaf etiolation under high temperature[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(3): 830-838. (in Chinese)

[3] 唐婷, 郑国伟, 李唯奇. 植物光合系统对高温胁迫的响应机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(2): 127-132.
TANG T, ZHENG G W, LI W Q. Defense mechanisms of plants photosystem to heat stress[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(2): 127-132. (in Chinese)

[4] PORTIS J A R. Rubisco activase-rubisco's catalytic chaperone[J]. Photosynthesis Research, 2003, 75: 11-27.

[5] PERDOMO J A, CAPÓ-BAUCÀ S, CARMO-SILVA E, GALMÉS J. Rubisco and rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 490.

[6] 贾兵, 董炜昱, 郭国凌, 张舒琴, 陈猛, 许波, 衡伟. 外源 Fe^{2+}对梨黄化叶光合能力及糖合成代谢的影响[J]. 果树学报, 2022, 39(1): 25-35.
JIA B, DONG W Y, GUO G L, ZHANG S Q, CHEN M, XU B, HENG W. Effects of ferrous sulfate applied by foliar spray on photosynthesis and photoproducts metabolism of the chlorotic pear leaves (*Pyrus bretschneideri* 'DangshanSuli')[J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(1): 25-35. (in Chinese)

[7] 刘拥海, 彭新湘, 李明启. 水稻叶片中过氧化氢与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶降解的关系[J]. 植物生理学报, 2000, 26(6): 481-486.
LIU Y H, PENG X X, LI M Q. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves under oxidative stress induced by methyl viologen[J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 2000, 26(6): 481-486. (in Chinese)

[8] 米超, 赵艳宁, 刘自刚, 陈其鲜, 孙万仓, 方彦, 李学才, 武军艳. 白菜型冬油菜 RuBisCo 蛋白亚基基因 *rbcL* 和 *rbcS* 的克隆及其在干旱胁迫下的表达[J]. 作物学报, 2018, 44(12): 1882-1890.
MI C, ZHAO Y N, LIU Z G, CHEN Q X, SUN W C, FANG Y, LI X C, WU J Y. Cloning of RuBisCo subunits genes *rbcL* and *rbcS* from winter rapeseed (*Brassica rapa*) and their expression under drought stress[J]. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44(12): 1882-1890. (in Chinese)

[9] 许超, 何承刚, 牟兰, 毕玉芬, 姜华. 干热胁迫下紫花苜蓿 Rubisco 羧化酶和活化酶活性变化及其基因表达的研究[J]. 草地学报, 2021, 29(2): 228-293.
XU C, HE C G, MU L, BI Y F, JIANG H. The activities of rubisco carboxylase and activase and their gene expressions in alfalfa under drought and heat stresses[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(2): 228-293. (in Chinese)

[10] 张爱军, 商振清, 董永华, 李广敏, 张晓红. 6-BA 和 KT 对干旱条件下小麦旗叶甘油醛-3-磷酸脱氢酶及光合作用的影响[J]. 河北农业大学学报, 2000, 32(2): 37-41.
ZHANG A J, SHANG Z Q, DONG Y H, LI G M, ZHANG X H. Effect of 6-BA and KT on glyceraldehy-3-phospate dehydrogenase activity and phytosynthesis in wheat flag leaves under soil drought[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2000, 32(2): 37-41. (in Chinese)

[11] HAAKE V, ZRENNER R, SONNEWALD U, STITT M. Amoderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants[J]. The Plant Journal, 1998, 14(2): 147-157.

[12] 巴桑玉珍, 扎桑, 王玉林, 徐齐君, 原红军, 尼玛扎西. 青稞新光合作用相关基因的克隆和序列分析[J]. 大麦与谷类科学, 2017, 34(6): 1-7.
BASANG YUZHEN, ZASANG, WANG Y L, XU Q J, YUAN H J, NYIMA TASHI. Cloning and sequence analysis of photosynthesis-related genes in Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare* L. var. *Nudum* HK. f.)[J]. Barley and Cereal Sciences, 2017, 34(6): 1-7. (in Chinese)

[13] 吴巧玉, 何天久. 五种相关光合蛋白基因在马铃薯野生种冷驯化中的表达分析[J]. 种子, 2021, 40(12): 56-60.
WU Q Y, HE T J. Expression analysis of five photosynthesis-related protein genes in cold acclimation of wild potato varieties[J]. Seed, 2021, 40(12): 56-60. (in Chinese)

[14] MICHELIS R, GEPSTEIN S. Identification and characterization of a heat induced isoform of aldolase in oat chloroplast[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 44: 487-498.

[15] LI H, AHAMMED G J, ZHOU G N, XIA X J, ZHOU J, SHI K, YU J Q, ZHOU Y H. Unraveling main limiting sites of photosynthesis under below- and above-ground heat stress in cucumber and the alleviatory role of luffa rootstock[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 746.

[16] CHOUDHURY F K, RIVERO R M, BLUMWALD E, MITTLER R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination[J]. The Plant Journal, 2017, 90: 856-867.

[17] 莫亿伟, 郭振飞. 温度胁迫对苜蓿和柱花草光合作用及 N 同化的影响[J]. 草地学报, 2008, 16(1): 100-102.
MO Y W, GUO Z F. The Effects of temperature stress on photosynthesis and nitrogen reduction of alfalfa and Guyana stylosanthes[J]. Acta Agrestia Sinica, 2008, 16(1): 100-102. (in Chinese)

[18] WANG L, ZHOU H, GUO S, AN Y, SHU S, LU N, SUN J. Exogenous spermidine maintains the chloroplast structure of cucumber seedlings and inhibits the degradation of photosynthetic protein complexes under high-temperature stress[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2018, 40(3):1-15.

[19] ZHANG R, SHARKEY T D. Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heatstress[J]. Photosyn-

thesis Research, 2009, 100: 29-43.

[20] HUANG W, ZHANG S B, CAO K F. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection of tropical trees illuminated at temporal chilling temperature[J]. Plant Cell Physiology, 2011, 52: 297-305.

[21] YAMORI W, SHIKANAI T. Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem Ⅰ in sustaining photosynthesis and plant growth[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67(1): 81-106.

[22] DIETZ K J, PFANNSCHMIDT T. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression[J]. Plant Physiology, 2011, 155(4):1477-1485.

[23] KANG Z, QIN T, ZHAO Z. Thioredoxins and thioredoxin reductase in chloroplasts: a review[J]. Gene, 2019, 706: 32-42.

[24] OKEGAWA Y. Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts[J]. Plant & Cell Physiology, 2008, 49(5): 825-834.

[25] YANG W H, XU H Y, XIAO Q S, LI X P, SHAO Q. Combined analysis of metabolome and transcriptome provides insights into metabolisms of chlorophylls, carotenoids, and flavonoids in the yellowing leaves of 'HAES344' macadamia[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 308: 111600.

[26] 杨倩, 杨子平, 周娅丽, 陈东泉, 刘恒. 澳洲坚果实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1505-1512.
YANG Q, YANG Z P, ZHOU Y L, CHEN D Q, LIU H. Screening of stable reference genes for qRT-PCR analysis in *Macadamia integrifolia*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(8): 1505-1512. (in Chinese)

[27] LI J, CAO X M, JIA X C, LIU L Y, CAO H W, QIN W Q, LI M. Iron deficiency leads to chlorosis through impacting chlorophyll synthesis and nitrogen metabolism in *Areca catechu* L.[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 710093.

[28] 李韵佳. 低温胁迫下三倍体枇杷微量捕光天线蛋白基因 *EjLhcb4.1/5/6* 的功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2021.
LI Y J. Functional characterization of light harvesting chlorophyll a/b binding antenna proteins *EjLhcb4.1/5/6* genes in triploid loquat (*Eriobotrya japonica*) under cold stress[D]. Chongqing: Southwest University, 2021. (in Chinese)

[29] KOVÁCS L, DAMKJÆR J, KEREÏCHE S, LLIOAIA C, RUBAN A V, BOEKEMA E J, JANSSON S, HORTON P. Lack of the light harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts[J]. The Plant Cell, 2006, 18(11): 3106-3120.

[30] 武维华. 植物生理学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2018: 122-130.
WU W H. Plant physiology[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2018: 129-130. (in Chinese)

[31] SONG Y P, CHEN Q Q, CI D, SHAO X N, ZHANG D Q. Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 111.

[32] 蔡智博. 拟南芥 *atpA* 基因调控植物响应低温胁迫的分子机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
CAI Z B. Studies on molecular mechanism of *atpA* gene regulating plants response to low temperature stress in *Arabidopsis*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020. (in Chinese)

[33] 杨超, 胡红涛, 吴平, 莫肖蓉. 高等植物铁氧还蛋白-$NADP^+$氧化还原酶研究进展[J]. 植物生理学报, 2014, 50(9): 1353-1366.
YANG C, HU H T, WU P, MO X R. Advances in the research of ferredoxin-$NADP^+$ oxidoreductase in higher plants[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(9): 1353-1366. (in Chinese)

[34] ARONSSON H, JARVIS P. The chloroplast protein import apparatus, its components, and their roles[C]//SANDELIUS A S, ARONSSON H. Plant cell monographs, Vol. 13: the chloroplast-interactions with the environment. Heidelberg: Springer-Verlag, 2009: 100-102.

[35] 刘玉凤, 王珍琪, 鹿嘉智, 张耀丰, 刘翰林, 王峰, 齐明芳, 李天来. 叶绿体 NAD(P)H 脱氢酶复合体调控光合作用的研究进展[J]. 植物生理学报, 2019, 55(7): 932-940.
LIU Y F, WANG Z Q, LU J Z, ZHANG Y F, LIU H L, WANG F, QI M F, LI T L. Regulation of chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in photosynthesis[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(7): 932-940. (in Chinese)

[36] DALCORSO G, PESARESI P, MASIERO S, ASEEVA E, SCHÜNEMANN D, FINAZZI G, JOLIOT P, BARBATO R, LEISTER D. A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2008, 132(2): 273-285.

[37] PENG W, WEI D, TAKABAYASHI A, ENDO T, SHIKANAI T, YE J Y, MI H L. Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature Stress[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 465-474.

[38] KIM S K, RAHMAN A, MASON J T, HIRASAWA M, CONOVER R C, JOHNSON M K, MIGINIAC-MASLOW M, KERYER E, KNAFF D B, LEUSTEK T. The interaction of 5′-adenylylsulfate reductase from *Pseudomon asaeruginosa* with its substrates[J]. Biochimica *et* Biophysica Acta, 2005, 1710: 103-112.

[39] 陈候鸣, 陈跃, 王盾, 蒋德安. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶在植物抗逆性中的作用[J]. 植物生理学报, 2016, 52(11): 1637-1648.
CHEN H M, CHEN Y, WANG D, JIANG D A. The role of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in resistance of plant to abiotic stresses[J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52 (11): 1637-1648. (in Chinese)