

DOI: 10.13376/j.cbls/20240155

文章编号: 1004-0374(2024)10-1268-11



朱新广, 中国科学院分子植物科学卓越创新中心研究员, 博士生导师, 国家“万人计划”科技创新领军人才。1996年获山东师范大学学士学位, 2004年获美国伊利诺伊大学博士学位。获国际光合作用协会“卡尔文-本森”奖, 主持编写《光合作用研究技术》, 创立 *in silico Plants* 杂志。自2017年起担任中国科学院分子植物科学卓越创新中心光合室主任, 主要从事植物高光效的改良研究, 包括构建从代谢到冠层的多尺度“数字植物”模型, 以及 C_3 植物的 C_4 光合改造研究, 在 *Cell*、*PNAS*、*Nat Plant* 和 *Ann Rev Plant Biol* 等期刊发表论文 160 余篇。

C_4 光合作用的演化和遗传

吕明菊, 倪晓祥, 赵永耀, 黄榆慧, 曹永森, 王雨檬, 杨建钊, 王滢, 朱新广*
(中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 上海 200032)

摘要: C_4 光合作用是一种高效的 CO_2 同化机制, C_4 物种仅占维管植物总数的 3%, 却贡献约 25% 的陆地光合作用初级生产力。 C_4 光合作用大约在 3 千万年前由祖先型 C_3 光合作用演化而来, 在被子植物中独立演化了约 65 次。这一演化过程涉及多种细胞代谢和叶片结构的改变, 是复杂性状趋同演化的典型例子。近年来, 随着 C_4 光合作用的分子演化被逐步解析, 发现基因的复制为演化提供了遗传物质的基础。 C_4 相关代谢和叶片结构的调控机制也逐步被揭示, 目前控制花环结构的关键调控因子已有报道, 如短根基因 (*short-root*, *SHR*)、稻草人基因 (*scarecrow*, *SCR*)、类金色 2 基因 (*golden2-like*, *GLK*)、针状形成基因 (*pin-formed*, *PIN*) 和不定域基因 (*indeterminate domain*, *IDD*) 等; 此外, 还有多个控制叶肉细胞及维管束鞘细胞蛋白特异性表达的顺式及反式元件的相关报道。本文探讨 C_4 光合作用演化的相关研究, 并介绍 C_4 植物解剖结构和代谢的遗传学研究最新进展。

关键词: C_4 演化; C_4 代谢; C_4 花环结构; 叶脉密度

中图分类号: Q945.11 **文献标志码:** A

The evolution and genetics on C_4 photosynthesis

LYU Ming-Ju, NI Xiao-Xiang, ZHAO Yong-Yao, HUANG Yu-Hui, CAO Yong-Sen,

WANG Yu-Meng, YANG Jian-Zhao, WANG Ying, ZHU Xin-Guang*

(Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: C_4 photosynthesis is an efficient CO_2 assimilation mechanism, with C_4 photosynthesis species representing only 3% of vascular plant species but contributing to approximately 25% of terrestrial photosynthesis primary productivity. C_4 photosynthesis evolved from the ancestral C_3 photosynthesis around 30 million years ago

收稿日期: 2024-02-01; 修回日期: 2024-07-02

基金项目: 上海市科学技术委员会基础研究项目(23JC1403900); 中国科学院战略性先导项目(XDB0630100); 国家自然科学基金联合基金-重点支持项目(U22A20464); 广东省农业农村厅财政专项(粤财农[2022]184号)

*通信作者: E-mail: zhuxg@cemps.ac.cn

and has arisen around 65 times independently in angiosperms. This evolutionary process involves different changes in cellular metabolism and leaf anatomy, representing an excellent example of convergent evolution of complex traits. Recent studies have suggested that gene duplication plays a pivotal role during the evolution of C₄ photosynthesis. The regulatory mechanisms governing C₄-related metabolism and anatomy have been progressively unveiled, including *Short-Root (SHR)*, *Scarecrow (SCR)*, *Golden2-Like (GLK)*, *PIN-Formed (PIN)* and *Indeterminate Domain (IDD)*. Furthermore, a variety of *cis*- and *trans*-elements that regulate the specific overexpression of C₄ genes in mesophyll cells and bundle sheath cells have been identified. Here we review research progresses in the evolutionary history of C₄ photosynthesis and the genetics of C₄ anatomy and metabolism.

Key words: C₄ evolution; C₄ metabolism; Kranz anatomy; vein density

1 C₄光合作用的特点

在 C₃ 植物中, CO₂ 直接通过核酮糖 -1,5- 二磷酸羧化酶 / 加氧酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RubisCO) 的催化, 在叶肉细胞 (mesophyll cell, MC) 中的叶绿体内被固定, 形成 3- 磷酸甘油酸。在 C₄ 植物中, CO₂ 的固定涉及 MC 和维管束鞘细胞 (bundle sheath cell, BSC) 的协作。CO₂ (以 HCO₃⁻ 形式) 首先在 MC 中经磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 等酶的催化, 形成草酰乙酸等四碳化合物, 这些四碳化合物随后被运输到 BSC, 被 NADP- 苹果酸酶 (NADP-dependent malate enzyme, NADP-ME)、NAD-ME 或磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPC) 催化脱羧后释放 CO₂, 供那里的 RubisCO 再次羧化固定^[1]。该过程形成了一个 CO₂ 浓缩机制 (称之为 C₄ CO₂ 浓缩机制, C₄ CCM), 使得 CO₂ 富集在 BSC 中的 RubisCO 周围。据估计, C₄ 物种 BSC 内 CO₂ 浓度约为 1 500 μmol·mol⁻¹, 是其 MC 的 100~150 倍^[2], 也远高于 C₃ 植物 MC 内的浓度, 该浓缩机制有效减少了光呼吸造成的能量与碳损失^[1,3]。因具有 CO₂ 浓缩机制, C₄ 植物在高温和强光等逆境条件下能保持较高的光合效率^[2]。参与 C₄ 代谢的酶在 MC 或 BSC 中呈现出特异的分布^[4-5], 而这些酶如何实现 MC 和 BSC 特异分布是 C₄ 研究的重点 (图 1)^[5]。

高等植物 C₄ 的代谢依赖于其特殊的花环结构 (Kranz anatomy)^[1]。C₄ 植物 BSC 中含有大量叶绿体, 其围绕着维管组织, 在叶片横切面的解剖结构上呈现类似花环的结构, 因此得名 “Kranz anatomy”。C₄ 植物 BSC 叶绿体的增多导致其体积增大^[6], 数量也增多, 同时 MC 数量则减少; 其 MC 与 BSC 紧密相连, 叶片叶脉密度增加^[7-9]。BSC 叶绿体增加和叶脉密度增加, 尤其是细小叶脉的增加, 是 C₄

结构最显著的解剖特征 (图 1)^[10]。

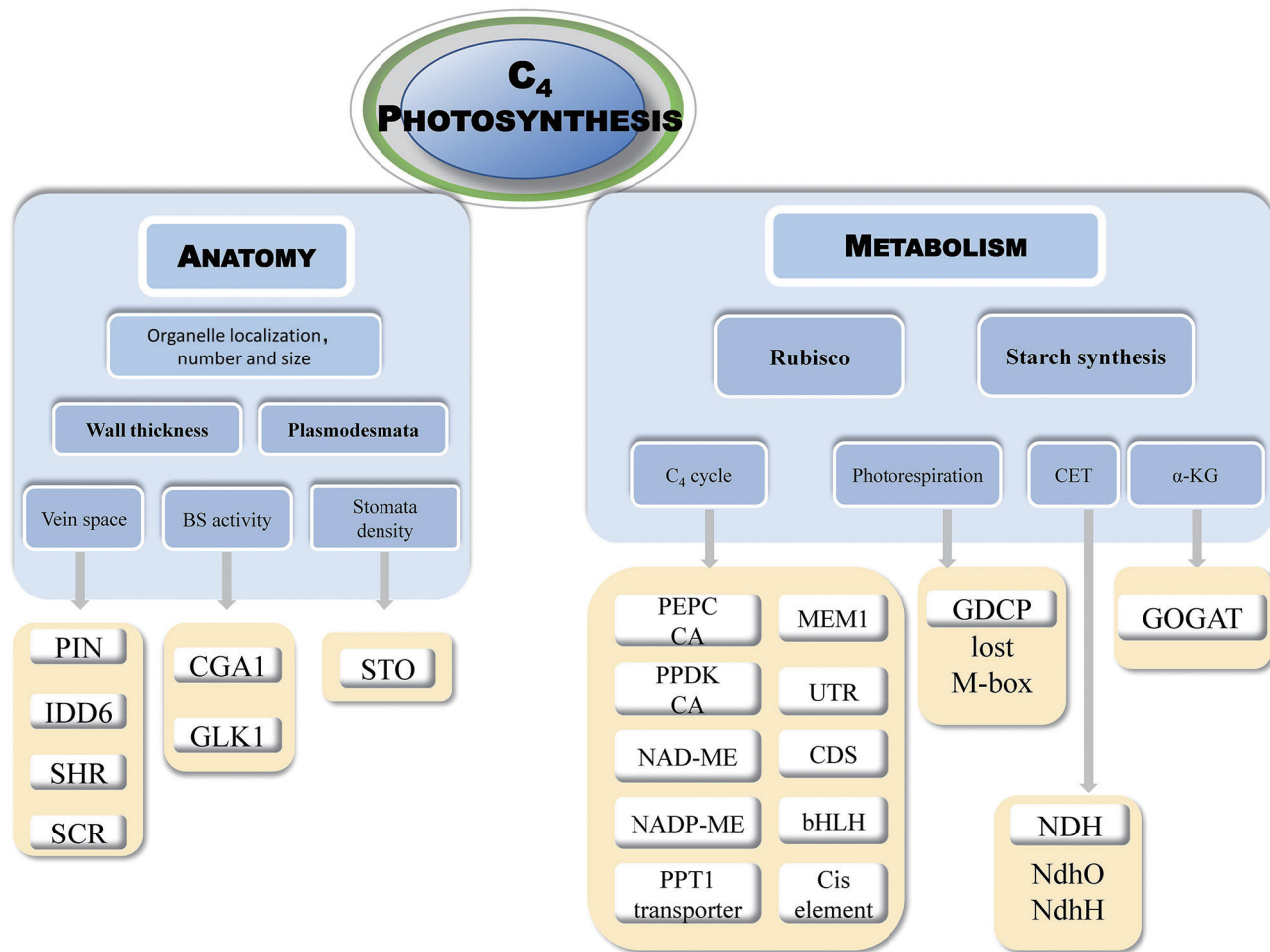
2 C₄光合作用的演化

2.1 C₄光合作用演化的环境因素

C₄ 植物最早出现在 3 千万年前的渐新世 (Oligocene)^[2, 11]。在单子叶植物中, C₄ 物种主要分布在禾本科 (约 5 000 种) 和莎草科 (约 1 300 种); 而在双子叶植物中, 约 1 800 种物种属于 C₄ 植物^[2]。C₄ 植物主要分布在温暖、干燥和热带地区, 尤其是在热带草原、沙漠和亚热带地区^[12-14]。历史上 C₄ 植物的两次大爆发都与大气 CO₂ 浓度的下降时间相吻合^[2, 15]。根据最新地质数据, 发现 C₄ 植物出现于大气 CO₂ 浓度在 550 ppm 以下的时期^[16]。长期低浓度 CO₂ 处理使得拟南芥编码 C₄ 蛋白的同源基因表达显著上升^[17-18], 低 CO₂ 也可以诱导硅藻利用 C₄ 途径固定 CO₂^[19]。因此, 低 CO₂、高温和高光等被认为是 C₄ 光合作用演化的重要的驱动力。

2.2 C₄光合作用演化的分子基础

外界环境驱动并塑造了 C₄ 光合作用的演化^[20], 基因组水平的变化则为 C₄ 光合的演化提供了分子基础。比如, C₄ 物种白花菜 *Gynandropsis gynandra*, 在物种形成的过程中经历了一次近期的全基因组复制事件, 并在演化中保留了几乎所有来自全基因组复制产生的与叶脉发育相关的同源基因^[21-22]。C₄ 黄顶菊物种的碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA)、PEPC 和 PEPC 激酶 (PEPC kinase, PEPC-k) 编码基因在 C₄ 物种中出现串联复制现象, 显著提高了 C₄ 基因的表达水平^[23]。与 *Gynandropsis gynandra* 不同, 黄顶菊属的上述 C₄ 基因的复制是由转座子引起的^[23]。值得一提的是, 除了增加基因拷贝, 转座子也为 C₄ 基因带来新的顺式调控元件, 为 C₄ 基因获得新的功能提供了基础^[23-24]。此外, 通过比较毛颖草属 (*Alloteropsis*) 不同光合类型的物种 / 亚种的 PEPC, 发现 PEPC 在不同种间存在基因水平转移 (lateral



图示C₄光合相关的结构和代谢组分, 以及目前报道的相关调控机制, 如C₄叶片结构(anatomy)、叶脉间距(vein space)等, 相关的调控因子包括PIN、IDD6、SHR和SCR等。

图1 C₄植物的解剖结构和代谢基础及调控机制

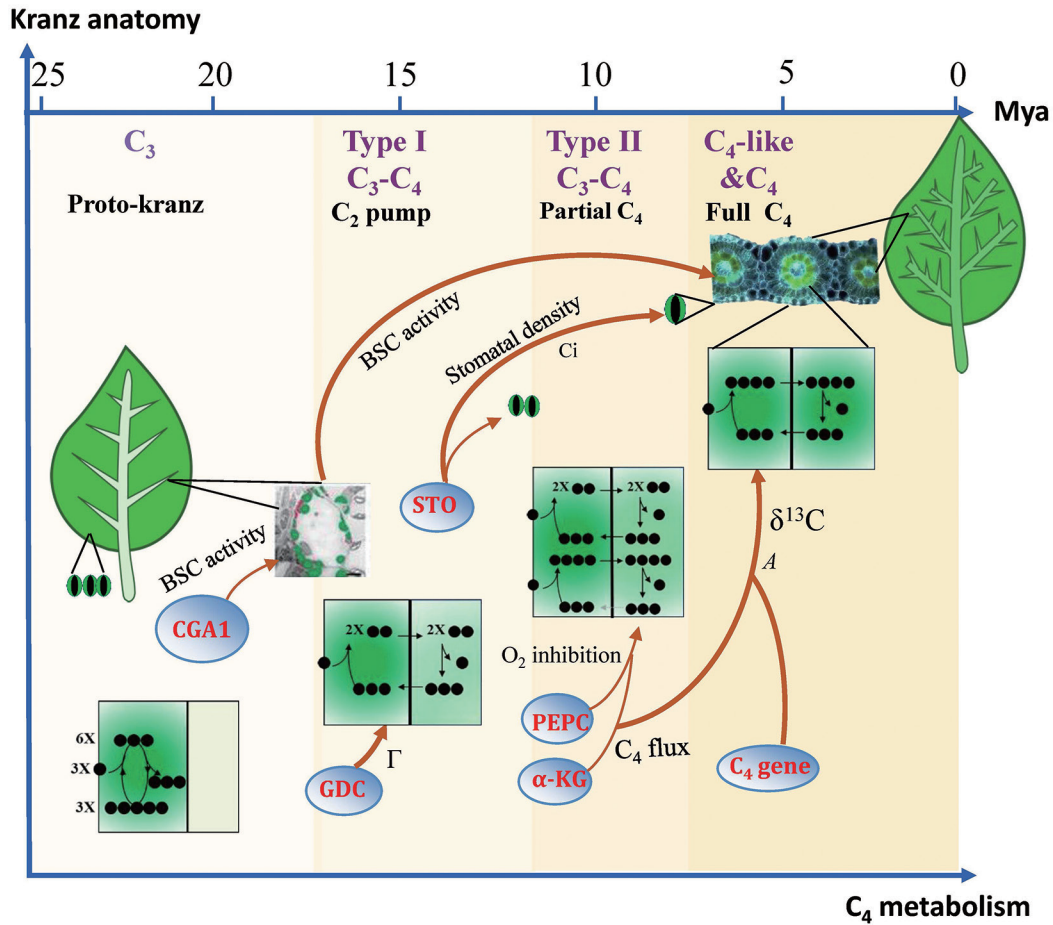
gene transfer, LGT) 现象, 而通过 LGT 获得的 *PEPC* 比本源的 *PEPC* 有更高的催化效率和底物亲和力^[25]。因此, LGT 为演化提供了一种捷径, 加速了 C₄ 光合的演化^[25]。综上所述, 全基因组复制、串联复制、转座子和基因水平转移等都为 C₄ 光合作用的演化提供了分子基础。

2.3 C₄光合作用演化的分子历程

很多出现 C₄ 物种的属中含有表型介于 C₃ 和 C₄ 之间的中间型物种, 通常称之为 C₃-C₄ 物种。比如黄顶菊属 (*Flaveria*)、粟米草属 (*Mollugo*)、猪毛菜属 (*Salsola*)、董娘芥属 (*Moricandia*)、毛颖草属 (*Alloteropsis*) 等^[26-27]。这些 C₃-C₄ 物种 CO₂ 补偿点、水分氮素利用效率和叶脉密度都介于 C₃ 和 C₄ 物种之间, 被认为是 C₄ 光合演化的中间状态。C₃-C₄ 物种为 C₄ 光合作用的演化研究提供了理想的材料。

以黄顶菊属为例, 通过分析 C₄ 相关的生理表

型、基因表达和蛋白质序列, 结合系统发生树的分析, 本团队初步绘制出了 C₄ 光合分子演化历程 (图 2)。黄顶菊属中间型物种可细分为 I 型 C₃-C₄、II 型 C₃-C₄ 以及类 C₄ 三种类型。I 型 C₃-C₄ 物种具有所有 C₃-C₄ 物种典型特征, 即甘氨酸脱羧酶复合物 P 亚基 (glycine decarboxylase complex P subunit, GDC-P) 特异地在 BSC 中表达, 将光呼吸过程中释放的 CO₂, 以甘氨酸 (glycine, Gly) 形式从 MC 转运到 BSC 中释放, 在 BSC 中实现 CO₂ 的再同化^[28]; 因甘氨酸是 2- 碳有机物, 该过程又被称为 C₂ CO₂ 浓缩机制。在此过程中, GDC-P 在 BSC 中催化两分子 Gly 生成一分子丝氨酸 (serine), 并产生一分子 NH₄⁺ 和一分子 CO₂, 这会导致 NH₄⁺ 不断地从 MC 转移到 BSC, 使得 MC 和 BSC 之间的 NH₄⁺ 失衡^[29-30]。参与 C₄ 代谢的酶, 比如丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, AlaAT) 和天冬氨酸氨基转移酶



图示黄顶菊属中C₄光合代谢和“Kranz”结构的演化历程、时间节点以及推测的内在分子机制。下方横轴代表C₄代谢的演化历程, 上方横轴代表物种起源的时间, 纵轴代表Kranz结构的演化历程。黄顶菊属在演化的过程中依次出现C₃、I型C₃-C₄、II型C₃-C₄、类C₄ (C₄-like)以及C₄物种。黄顶菊属中, 有些C₃物种的BSC增大, 其中叶绿体增多, 控制该性状的基因CGA1表达水平升高, 因此被认为是原始花环结构型(Proto-Kranz)。I型C₃-C₄物种的主要特征是GDC-P特异性地在BSC细胞中表达, 形成C₂ CO₂浓缩机制; 此外, 负责调控气孔发育的Stomagen (STO)基因表达下调, 气孔密度下降。II型C₃-C₄物种形成了部分C₄代谢的特征, 尤其是C₄酶PEPC表达量提高, 参与C₄循环的代谢物α-酮戊二酸(α-KG)水平提高。类C₄物种(C₄-like)和C₄物种中气孔密度显著下降, 叶脉密度、C₄代谢水平、光合效率以及δ¹³C值显著提高。值得注意的是, 类C₄物种和C₄物种一样, 具有完整的C₄循环, 但仍有少量CO₂由RubisCO直接固定, 因此类C₄物种到C₄物种的演化被认为是代谢的优化过程。

图2 黄顶菊属C₄光合演化分子历程的推测示意图

(aspartate aminotransferase, AspAT), 能有效地解决 I 型 C₃-C₄ 植物 Gly 穿梭带来的 NH₄⁺ 失衡的问题, 为 C₄ 代谢的发生提供了前提^[30]。此外, C₃-C₄ 中间体叶脉密度比同属的 C₃ 物种增加, 维管束鞘细胞中叶绿体增多, 这些结构和代谢特征似乎都为 C₄ 光合的建成做了铺垫。此外, 基于代谢约束模型 (constraint-based)^[30]、定量模型^[13] 以及代谢流分析^[31], 绘制的 C₃ 到 C₃-C₄ 再到 C₄ 代谢的演化历程, 支持 C₃-C₄ 代谢是 C₄ 代谢演化的过渡态的观点^[32]。

II 型 C₃-C₄ 黄顶菊部分 C₄ 基因表达水平上升, 尤其是 CA 和 PEPC 两个基因表达水平提高最为明显^[30]。在这类物种中, 约有 50% 的 CO₂ (以 HCO₃⁻

形式) 被 PEPC 固定, 然而其 δ¹³C 的数值变化很小^[32-33]。此外, II 型 C₃-C₄ 物种叶脉密度增加, BSC 相对 MC 的体积增大, BSC 细胞中叶绿体增多, 花环结构发育更趋向 C₄ 物种^[34]。类 C₄ 物种已经具有较典型的花环结构和完整的 C₄ 代谢循环, 但还是存在少量 CO₂ 由 MC 中的 RubisCO 直接固定^[34], 因此类 C₄ 到 C₄ 的演化被认为是一个代谢优化的过程^[2] (图 2)。

2.4 C₄光合作用演化的多途径

目前报道的约 50 个 C₃-C₄ 物种来自于 20 个单、双子叶属^[27]。然而, 并不是所有的 C₃-C₄ 代谢都是 C₄ 演化的过渡态。如黄顶菊属 C₃-C₄ 物种 F

ramosissima 中, 大约 50% 的 CO₂ 由 PEPC 固定, CO₂ 补偿点、水分利用效率、叶脉密度、气孔密度等都呈现出 C₃ 和 C₄ 的中间水平^[34-35]; 在物种进化树上, *F. ramosissima* 和 *F. trinervia* 的进化距离也很近^[36]。因此, *F. ramosissima* 一直被认为是 II 型 C₃-C₄ 物种, 即不仅具有甘氨酸穿梭机制, 即 I 型 C₃-C₄ 的特征, 同时还有部分 C₄ 代谢循环^[37]。然而, 本课题组近期通过代谢流分析发现, *F. ramosissima* 中经 PEPC 催化生成的苹果酸 (malate) 并没有经过脱羧把 CO₂ 呈递给 RubisCO, 而是进入 BSC 线粒体生成天冬氨酸, 再穿梭回 MC, 从而解决了 C₂ 甘氨酸穿梭代谢带来的两类细胞 NH₄⁺ 不平衡的问题。这种代谢途径其实位于和 C₄ 代谢平行的演化地位, 而不是 C₄ 演化的过渡态^[32]。

此外, 毛颖草属 *Alloteropsis semialata* 的 C₃-C₄ 代谢在演化上是可逆的, 从 C₃ 演化而来的 C₃-C₄ 代谢可以退回到 C₃ 代谢的状态^[38]。因此, C₃-C₄ 植物的代谢可能是多种多样的, 它们可能采用了不同的策略解决 C₂ 代谢带来的 NH₄⁺ 不平衡的问题, 也提示 C₄ 代谢的演化存在不同途径^[39]。随着更多的 C₃-C₄ 代谢特征被揭示, C₄ 演化路径也会逐渐丰富。

3 C₄光合作用的遗传学

3.1 控制C₄花环结构发育的机制

C₄ 植物叶片具有特殊的花环结构, 其主要的两个特点是 BSC 中叶绿体增多和叶脉密度增加。Slewinski 等^[40]发现玉米 *scarecrow* (*scr*) 突变体中, BSC 叶绿体异常分化和叶脉错乱以及叶脉密度降低。他们还发现, 在 SCR 的互作蛋白基因 *short-root1* (*shr1*) 突变的玉米叶片中 Kranz 结构紊乱, 提出 SCR/SHR 信号机制可能是控制 C₄ “Kranz” 结构发育的基础^[41]。Gallagher 等^[42]和 Wang 等^[43]通过比较玉米真叶 (foliar leaf) 和包叶 (husk leaf) 发育的转录组数据, 进一步提出了 SHR 和 SCR 调控玉米 MC 和 BSC 发育的模型, 揭示 SHR 和 SCR 是花环结构的主要调控因子^[42-43]。但在 C₃ 植物拟南芥中, SCR/SHR 信号是用来控制根内皮层发育的^[44]。这表明, 在 C₄ 演化过程中, 植物可以通过招募已有的基因调控元件演化出新的功能。

Lundgren 等^[10]通过广泛采集和量化 *Alloteropsis semialata* 中 C₃、C₃-C₄ 以及 C₄ 亚种的叶片解剖特征, 提出 C₄ 叶脉密度的增加主要源于细小叶脉的增加。除了 SHR 和 SCR, Kumar 等^[8]推测 PIN (pin-formed, 生长素流出载体家族)、生长素和 IDD (indeterminate

domain, 不定域) 也参与小叶脉的发生, 调控 C₄ 物种叶脉的发育。该推测在 2023 年的两个报道中被证实。水稻的 SHR1 (short root 1, 短根 1) 和 SHR2 特异分布在 BSC 中, 直接与 IDD12 和 IDD13 互作, 调控 PIN 的转录, 从而调控叶脉的发育^[45]; SHR1 和 SHR2 基因过表达可导致水稻、狗尾草和玉米的 MC 增加和叶脉减少, 而 *shr1* 和 *shr2* 缺失突变后小叶脉数量增加^[45]。在生长素处理后的 SHR 过表达玉米和水稻中, BSC 和叶脉密度均增加, 水稻叶片呈现出类 C₄ 植物的花环结构^[46]。在演化过程中, C₄ 物种不仅可以保留 C₃ 植物中已存在的 SHR 调控叶脉发育的机制, 也通过招募新的调控途径来控制叶脉发育, 比如 NKD (*naked-endsperm*, 裸胚乳) 基因参与 SCR 调控 C₄ 物种叶脉的发育, 而在 C₃ 水稻中的 NKD 不参与对叶脉发育的调控^[47]。

在 BSC 叶绿体发育方面, 转录因子 GLK (golden2-like) 的机制研究最为清楚。GLK 有两个拷贝, C₃ 物种水稻和拟南芥内源 *GLK1* 和 *GLK2* 都在 MC 中高表达, 其功能是冗余的^[43, 48]。而在玉米、狗尾草和高粱等单子叶 C₄ 物种中, *GLK1* 主要在 MC 中表达, *GLK2* 主要在 BSC 中表达^[43, 49-50]。玉米和狗尾草 *glk2* 缺失可导致明显的生长缺陷和光合下降, 而 *glk1* 单基因缺失不影响叶片叶绿体的整体发育或光系统 II 功能, 但 *GLK1* 过表达能部分恢复 *glk2* 的表型, 表明在 C₄ 禾本科植物的演化过程中, 两个基因都保留了调控叶绿体发育的功能, 但 *GLK2* 在 BSC 叶绿体激活方面的功能更为突出^[47]。双子叶植物拟南芥的 *GLK1* 和 *GLK2* 也参与光合作用基因的调控, *glk1/glk2* 缺失的拟南芥叶片和果莢的光合作用都下降^[51], 表明 GLK 在叶绿体发育和光合基因表达调控中的功能在双子叶和单子叶物种中是保守的。Tu 等^[52]认为虽然 GLK 调控叶绿体发育和光合基因表达的功能是保守的, 但是其结合的顺式调控元件在不同的物种中呈现物种特异性, 而这种特异性是由基因组序列变异 (*cis*-变异) 导致的。

水稻组成型启动子 UBI_{pro} 过表达玉米 *ZmGLK2* 可以增加 BSC 叶绿体在整个细胞中的体积占比^[42], 并提高其光合效率和产量^[53]。此外, 在表达 *ZmGLK1* 或 *ZmGLK2* 的水稻叶片中, 叶绿素和色素-蛋白天线复合物的水平以及光合效率均上调, 并能通过加速气孔关闭提高水稻的抗旱性^[50, 54]。因此, GLK 被认为是可以提高植物光合作用的“黄金”候选基因^[55]。除了 GLK, 在水稻 BSC 中特异表达内源 *GNC* (*GATA*,

nitrate-inducible, carbon-metabolism-involved) 家族转录因子 *CGAI* (*cytokinin GATA transcription factor 1*), 可使 BSC 叶绿体占整个细胞的体积比例增加, 同时光合相关基因的表达上调, 光合效率提高^[56]。与 *GLK* 不同的是, *GNC* 主要作为转录抑制因子, 通过抑制光敏素互作因子 (*phytochrome interacting factors*, PIFs) 和油菜素甾醇 (*brassinosteroid*, BR) 活性相关基因来促进叶绿体的生物发生^[57]。但 *GNC* 家族的转录因子如 *CGAI* 是否在 C₄ 物种中调控叶绿体发育还有待进一步研究。

值得注意的是, 目前 C₄ 花环结构形成的分子机制研究大多集中在单子叶植物中, 而双子叶 C₄ 植物花环结构相关的研究还很少, 双子叶和单子叶植物 C₄ 花环结构发育的分子机制是否一致还有待进一步研究。

3.2 调控C₄光合代谢酶细胞特异性分布的机制

3.2.1 调控C₄光合代谢酶细胞特异性分布的转录因子

参与 C₄ 代谢途径的酶和转运蛋白很早就有报道^[58-59], 这些酶和转运蛋白如何实现在 MC 和 BSC 的特异性分布是 C₄ 光合研究的重点^[5]。在单细胞测序技术成熟之前, 研究者通过激光显微切割和叶片滚压等方法分离 MC 和 BSC, 再通过比较它们的转录组, 获得一些在 MC 或 BSC 中特异表达的候选转录因子^[60-61], 进一步筛选不同 C₄ 物种保守的特异表达的转录因子^[49]。通过研究发现, 单/双子叶 C₄ 植物中确实存在保守的细胞特异性表达的转录因子^[62]。2023 年, Swift 等^[63] 利用单细胞测序分析比较 C₃ 和 C₄ 物种 MC 和 BSC 发育轨迹的异同, 认为 *MYB* 和 *DOF* (*DNA binding with one finger*) 可能是决定 C₄ 物种中 BSC 特异性的转录因子。

另一方面, 研究人员也通过构建基因调控网络挖掘调控 C₄ 基因的转录因子。Tu 等^[64] 结合原生质体 ChIP-seq (*chromatin immunoprecipitation*, 染色质免疫共沉淀技术) 和模型预测构建了玉米基因组水平的基因调控网络。本课题组基于基因共表达信息分别构建黄顶菊属 C₃、C₃-C₄ 中间体和 C₄ 物种中的 C₄ 基因调控网络, 发现 C₄ 基因在演化过程中获得大量新的调控。此外, 本课题组通过比较玉米和黄顶菊 C₄ 物种基因调控网络, 还发现约 40 多个调控 C₄ 基因的转录因子是保守的^[23]。通过体外和瞬转实验, Borba 等^[65] 报道 *bHLH128* 和 *bHLH129* 调控玉米 *NADP-ME* 在 BSC 中的表达。通过分析玉米两类细胞特异的转录组数据并结合体外实验验证,

Borba 等^[66] 研究发现, *DOF2* 和 *MADSI* (*minichromosome maintenance factor 1/agamous/deficiens/serum response factor*) 可以激活玉米 *NADP-ME* 和 *PEPCK* 的表达。迄今为止, 虽然对调控 C₄ 基因在 MC 和 BSC 中特异表达的转录因子已经有很多推测, 但还缺乏确切的遗传学证据。

3.2.2 调控C₄光合代谢酶细胞特异性分布的顺式调控元件

控制 C₄ 基因在 MC 和 BSC 中特异表达的顺式调控元件已有相关报道。单子叶和双子叶植物中控制 *PEPC* 在 MC 中特异表达的顺式调控元件并不相同, 比如 MEM1 (*mesophyll expression module 1*) 决定双子叶物种黄顶菊 *CA* 和 *PEPC* 在 MC 中特异高表达^[67-68], 而禾本科 C₄ 物种中起作用的是 *PEPC* 启动子上的四段基序^[69]。*G. gynandra* 的 UTR (*untranslated region*, 非翻译区) 决定 *CA* 和 *PPDK* (*pyruvate orthophosphate dikinase*, 丙酮酸正磷酸双激酶) 基因在 MC 中特异表达^[70], 而位于蛋白质编码区间的 240 bp 基序决定该物种 *NAD-ME* (*NAD-dependent malic enzyme*) 基因在 BSC 中的特异表达, 类似的序列也存在于玉米和水稻 *NADP-ME* 以及拟南芥 *NAD-ME* 中^[71]。此外, Borba 等^[65] 通过体外实验表明, 玉米 *NADP-ME* 启动子上被 7 个碱基分隔的一对顺式元件协同结合 *ZmbHLH128* 或 *ZmbHLH129*, 实现其在 BSC 中的特异表达^[65]。这对顺式元件在黍亚科的 C₃ 和 C₄ 物种中也都存在。

在 C₃-C₄ 中间型和 C₄ 物种中, *GDC-P* 在 BSC 中特异表达。黄顶菊 C₄ 物种 *F. trinervia* 和 *F. bidentis* 的 *GDC-P* 基因启动子上 1 571 bp 的区间负责其 BSC 特异性表达^[72-73]。该区间分为两个关键的区域: 一个是近端的 R7 (约 300 bp), 起一般的转录增强作用; 另一个是远端的 R2 区间 (约 200 bp), 起到抑制基因在 MC 中表达的作用^[72-73]。由于启动子 R2 区间衍生的转录本 5' 端内含子剪切低效, 最后被降解, 从而使得 *GDC-P* 在 MC 中表达水平很低。*F. trinervia* 和 *F. bidentis* 的 *GDC-P* 启动子在 C₃ 物种中也能够发挥 BSC 特异性表达的功能, 因此常被用于在 C₃ 植物中实现目标基因的 BSC 特异性过表达^[56, 74]。类似地, 在十字花科植物中, *GDC-P* 启动子上的 M-框决定其在 MC 表达^[75]; 而 *Moricandia* 属的 C₃-C₄ 物种, 由于 *GDC-P* 启动子上 M-框丢失, 使得其在 MC 中表达很低, 从而实现了 *GDC-P* 在 BSC 中特异表达^[76]。

组学技术的发展使得从全基因组寻找细胞特异

表达的顺式调控元件成为可能。Burgess 等^[77]利用 DNaseI-seq 测序技术比较了禾本科 C₃ 和 C₄ 物种基因组染色体可及性区域的转录因子结合位点 (transcription factor binding site, TFBS), 报道了 41 个禾本科 C₄ 物种保守的 BSC 特异的 TFBS, 而这些 TFBS 在 C₃ 物种中不具有细胞特异性。2023 年, Swift 等^[63]的单细胞测序结果提示, DOF 家族的顺式调控元件可能与高粱 BSC 特异性相关。Singh 等^[78]通过光诱导的转录组和 DNaseI-seq 研究发现, 双子叶 C₄ 植物 *G. gynandra* 的 *PPDK* 和 *PEPCK* 获得 TGA (TGACG-binding factor motif) 基序和光响应元件, 如 G-框和 I-框, 可能与它们的细胞特异表达相关。此外, Dai 等^[79]基于玉米 MC 和 BSC 两类细胞特异的 ATAC-seq (transposase-accessible chromatin sequencing, 转座酶可接近染色质测序) 分析结果, 发现 AAAG 基序 (DOF 家族) 与 BSC 特异性表达相关, TGACC/T 基序 (WRKY 家族) 与 MC 特异性表达相关。这些预测的顺式调控元件的功能以及对应的转录因子还有待进一步的证实和研究。

3.3 获得顺式调控元件是C₄基因演化的关键

在 C₄ 物种演化过程中, 其编码的 C₄ 基因从非光合基因变为光合基因的一部分^[80], 其表达和光合基因一样受光调控^[81-83]。通过比较水稻和玉米黄化苗在光照转绿过程中的转录组, Xu 等^[81]发现, 玉米 C₄ 相关基因更快地响应光强变化, 可能与这些基因获得的新的顺式调控元件有关。以 *PPT1* (*phosphoenolpyruvate transporter 1*, 磷酸烯醇式丙酮酸转运蛋白 1) 为例, 从 C₃ 到 C₃-C₄ 中间体到 C₄, *PPT1* 转录逐渐获得光响应特征, C₄ 物种 *PPT1* 的启动子上含有光响应顺式调控元件^[84]。拟南芥编码的 C₄ 蛋白基因虽然也受光以及叶绿体到细胞核逆向信号的调控, 但在其近缘 C₄ 物种 *G. gynandra* 中, 这些基因受光和叶绿体信号的调控更为明显^[83], 其 *PPDK* 和 *PEPCK* 也获得光响应顺式调控元件, 如 G-框和 I-框等^[78]。2023 年, 本课题组研究发现, 黄顶菊属 C₄ 物种中 C₄ 基因与光合基因的共调控, 可能源于演化过程中 C₄ 基因招募了光合基因相关的顺式作用元件^[32]。因此, 获得新的顺式调控元件可能是 C₄ 光合基因演化获得新的调控机制的关键。

4 环式电子传递对C₄光合作用的意义

环式电子传递 (cyclic electron transport, CET) 是光合作用的一个重要组成部分, 它在调节 ATP 和 NADPH 的生产比例、保护光系统以及响应环境变

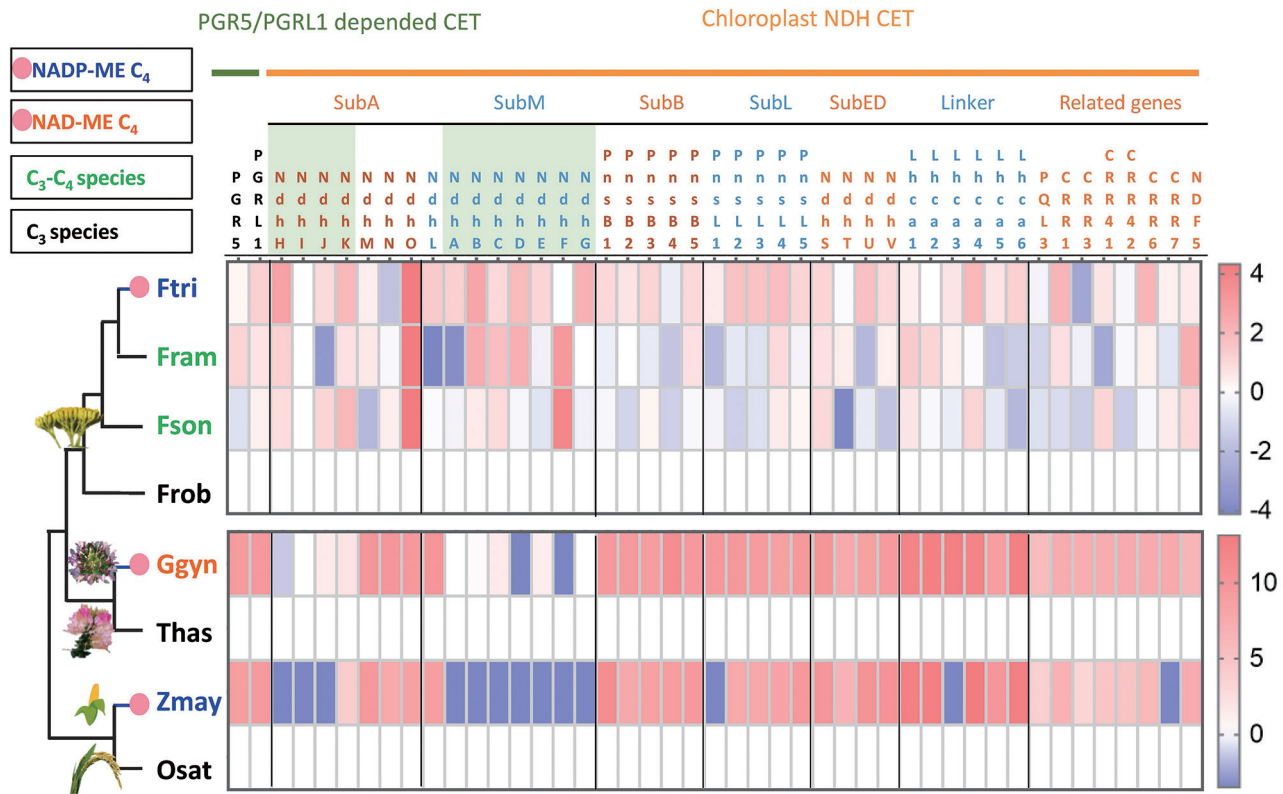
化中起关键作用^[85-86]。C₄ 植物, 特别是 NADP-ME 型, 通常比 C₃ 植物具有更高的 CET 水平, 以满足 C₄ 代谢所需的额外 ATP 需求^[87]。在 C₃ 光合作用中, 叶绿体所需的 ATP/NADPH 比例为 1.55~1.67; 而在 NADP-ME 亚型的 C₄ 光合作用中, ATP/NADPH 在 MC 叶绿体中的比例为 1.8~1.9, 在 BSC 叶绿体中的比例为 5.0~7.5^[87]。在线性电子传递中, ATP/NADPH 产生比例为 1.29, 而在 CET 中仅生成 ATP^[88]。因此, CET 还提供一种调节 ATP/NADPH 比例和细胞氧化还原状态的机制。故而在 C₄ 物种中, CET 相关基因的表达水平高于近缘的 C₃ 物种^[34, 89] (图 3)。

CET 有两条途径, 一条由 PGR5 (proton gradient regulation 5) 蛋白介导, 另一条是由叶绿体 NDH (NADH dehydrogenase) 复合物介导^[90]。在 C₃ 物种中, PGR5 介导的 CET 途径发挥主要作用; 而在 C₄ 物种中, 尤其是 NADP-ME 亚型的 C₄ 物种, NDH-介导的 CET 途径更为重要^[87, 91-92]。黄顶菊 C₄ 物种 *pgr5* 突变体的光合效率降低 20%, 而 NDH-介导的 CET 相关基因 *ndh-o* 缺失后, 光合效率降低 80%^[92]。同样, C₄ 物种狗尾草 *ndh-o* 突变体和玉米 *ndh-h* 突变体的光合效率也都大大降低^[93-94]。

在黄顶菊属中, C₄ 物种 CET 相关基因的表达水平高于其同属的 C₃ 和 C₃-C₄ 物种^[32], 在白花菜科 C₃ 和 C₄ 物种^[95] 以及禾本科 C₃ 和 C₄ 物种的比较研究中^[81] 也发现类似现象 (图 3)。NDH 介导的环式电子传递涉及 30~40 个蛋白, 这些蛋白通过形成复合物行使功能, 其中约 10 个由叶绿体基因组编码 (图 3)^[86]。目前环式电子传递相关基因以及蛋白质结构已有很多研究, 但 C₄ 物种环式电子传递调控机制鲜有报道。

5 展望

C₄ 光合作用的研究对于理解植物适应环境、应对全球气候变化以及推动可持续农业生产意义重大。在全球为实现“双碳”目标奋斗的背景下, 具有 CO₂ 浓缩机制的高效 C₄ 光合作用对实现“碳达峰”和“碳中和”的目标具有重要意义^[96]。50 多年来, 很多研究者基于生理生态数据描绘了 C₄ 大演化 (macro evolution) 路径, 提出了 C₄ 演化中伴随的环境因子, 并明确了相关基因的多拷贝现象为 C₄ 演化提供了遗传物质基础。然而 C₄ 光合作用的分子演化, 尤其是花环结构关键特征、MC 和 BSC 蛋白特异性表达以及 CET 转录因子及顺式调控元件相关调控机制研究仍然处于初步阶段, 一个完整的 C₄



图中热图的颜色显示物种相对于其近缘C₃物种表达水平的log₂值。红色表示表达水平高于相比较的C₃物种, 蓝色表示低于相比较的C₃物种。*Flaveria trinervia* (Ftri)和*Zea mays* (Zmay)是NADP-ME亚型C₄植物, *G. gynandra* (Ggyn)是NAD-ME亚型C₄植物。*Oryza sativa* (Osat)、*Tarenaya hassleriana* (Thas)和*F. robusta* (Frob)是C₃物种, *F. sonorensis* (Fson)和*F. ramosissima* (Fram)是C₃-C₄物种。每一列表示一个蛋白, 其中绿色背景表示由叶绿体基因编码(如*NdhH*、*NdhI*和*NdhJ*等)。不同的亚复合物, 如SubA (subcomplex A)和SubB (subcomplex B)之间由黑色线条分割。

图3 C₃、C₃-C₄和C₄物种环式电子传递相关基因表达水平比较

光合作用演化的分子历程图还需要更多的研究来描绘。未来, C₄ 光合作用研究需要有效利用系统生物学技术和方法, 系统阐明 C₄ 光合在单子叶和双子叶植物中演化的精确分子历程以及花环结构关键特征的遗传调控机制, 这些都将成为未来作物高光效改良以及在 C₃ 作物中实现 C₄ 光合改造提供重要指导。

致谢: 感谢许大全和陈根云两位老师对本文语法瑕疵、表达不当之处进行了细致和严格的校订。

[参 考 文 献]

[1] Hatch MD. C₄ photosynthesis - a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 895: 81-106
 [2] Sage RF, Sage TL, Kocacinar F. Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63: 19-47
 [3] Hatch MD, Slack CR. Photosynthesis by sugar-cane

leaves. *Biochem J*, 1966, 101: 103-11
 [4] Hibberd JM, Covshoff S. The regulation of gene expression required for C₄ photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 181-207
 [5] Schluter U, Weber APM. Regulation and evolution of C₄ photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 183-215
 [6] McKown AD, Dengler NG. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C₄ vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *Am J Bot*, 2007, 94: 382-99
 [7] Griffiths H, Weller G, Toy LFM, et al. You're so vein: bundle sheath physiology, phylogeny and evolution in C₃ and C₄ plants. *Plant Cell Environ*, 2013, 36: 249-61
 [8] Kumar D, Kellogg EA. Getting closer: vein density in C₄ leaves. *New Phytol*, 2019, 221: 1260-7
 [9] Sedelnikova OV, Hughes TE, Langdale JA. Understanding the genetic basis of C₄ Kranz anatomy with a view to engineering C₃ crops. *Annu Rev Genet*, 2018, 52: 249-70
 [10] Lundgren MR, Dunning LT, Olofsson JK, et al. C₄ anatomy can evolve via a single developmental change. *Ecol Lett*, 2019, 22: 302-12
 [11] Sage RF, Christin PA, Edwards EJ. The C₄ plant lineages

- of planet Earth. *J Exp Bot*, 2011, 62: 3155-69
- [12] Christin PA, Osborne CP. The recurrent assembly of C_4 photosynthesis, an evolutionary tale. *Photosynth Res*, 2013, 117: 163-75
- [13] Heckmann D, Schulze S, Denton A, et al. Predicting C_4 photosynthesis evolution: modular, individually adaptive steps on a Mount Fuji fitness landscape. *Cell*, 2013, 153: 1579-88
- [14] Christin PA, Osborne CP. The evolutionary ecology of C_4 plants. *New Phytol*, 2014, 204: 765-81
- [15] Christin PA, Osborne CP, Sage RF, et al. C_4 eudicots are not younger than C_4 monocots. *J Exp Bot*, 2011, 62: 3171-81
- [16] Cenozoic CO₂ Proxy Integration Project (CenCO₂PIP) Consortium, Honisch B, Royer DL, et al. Toward a Cenozoic history of atmospheric CO₂. *Science*, 2023, 382: eadi5177
- [17] Li Y, Xu J, Haq NU, et al. Was low CO₂ a driving force of C_4 evolution: *Arabidopsis* responses to long-term low CO₂ stress. *J Exp Bot*, 2014, 65: 3657-67
- [18] You L, Zhang JM, Li L, et al. Involvement of abscisic acid, ABI5, and PPC2 in plant acclimation to low CO₂. *J Exp Bot*, 2020, 71: 4093-108
- [19] Zhang H, Zhou Y, Liu TQ, et al. Initiation of efficient C_4 pathway in response to low ambient CO₂ during the bloom period of a marine dinoflagellate. *Environ Microbiol*, 2021, 23: 3196-211
- [20] Sage RF, Zhu XG. Exploiting the engine of C_4 photosynthesis. *J Exp Bot*, 2011, 62: 2989-3000
- [21] Huang CF, Liu WY, Lu MJ, et al. Whole-genome duplication facilitated the evolution of C_4 photosynthesis in *Gynandropsis gynandra*. *Mol Biol Evol*, 2021, 38: 4715-31
- [22] Hoang NV, Sogbohossou EOD, Xiong W, et al. The *Gynandropsis gynandra* genome provides insights into whole-genome duplications and the evolution of C_4 photosynthesis in Cleomaceae. *Plant Cell*, 2023, 35: 1334-59
- [23] Lyu MJ, Du H, Yao H, et al. Born with intronless ERF transcriptional factors: C_4 photosynthesis inherits a legacy dating back 450 million years. *BioRxiv*, 2022, doi: 10.1101/2022.10.14.512192
- [24] Cao C, Xu J, Zheng G, et al. Evidence for the role of transposons in the recruitment of cis-regulatory motifs during the evolution of C_4 photosynthesis. *BMC Genomics*, 2016, 17: 201
- [25] Phansopa C, Dunning LT, Reid JD, et al. Lateral gene transfer acts as an evolutionary shortcut to efficient C_4 biochemistry. *Mol Biol Evol*, 2020, 37: 3094-104
- [26] Yu Y. Paving the way for C_4 evolution: study of C_3 - C_4 intermediate species in grasses. *Plant Physiol*, 2020, 182: 453-4
- [27] Mercado MA, Studer AJ. Meeting in the middle: lessons and opportunities from studying C_3 - C_4 intermediates. *Annu Rev Plant Biol*, 2022, 73: 43-65
- [28] Monson RK, Edwards GE, Ku MSB. C_3 - C_4 intermediate photosynthesis in plants. *Bioscience*, 1984, 34: 563-74
- [29] Walsh CA, Brautigam A, Roberts MR, et al. Evolutionary implications of C_2 photosynthesis: how complex biochemical trade-offs may limit C_4 evolution. *J Exp Bot*, 2023, 74: 707-22
- [30] Mallmann J, Heckmann D, Brautigam A, et al. The role of photorespiration during the evolution of C_4 photosynthesis in the genus *Flaveria*. *Elife*, 2014, 3: e02478
- [31] Borghi GL, Arrivault S, Gunther M, et al. Metabolic profiles in C_3 , C_3 - C_4 intermediate, C_4 -like, and C_4 species in the genus *Flaveria*. *J Exp Bot*, 2022, 73: 1581-601
- [32] Lyu MJ, Tang Q, Wang Y, et al. Evolution of gene regulatory network of C_4 photosynthesis in the genus *Flaveria* reveals the evolutionary status of C_3 - C_4 intermediate species. *Plant Commun*, 2023, 4: 100426
- [33] Adachi S, Stata M, Martin DG, et al. The evolution of C_4 photosynthesis in *Flaveria* (Asteraceae): insights from the *Flaveria linearis* complex. *Plant Physiol*, 2023, 191: 233-51
- [34] Lyu MA, Gowik U, Kelly S, et al. The coordination of major events in C_4 photosynthesis evolution in the genus *Flaveria*. *Sci Rep*, 2021, 11: 15618
- [35] Zhao YY, Lyu MA, Miao FF, et al. The evolution of stomatal traits along the trajectory toward C_4 photosynthesis. *Plant Physiol*, 2022, 190: 441-58
- [36] Lyu MJ, Gowik U, Kelly S, et al. RNA-Seq based phylogeny recapitulates previous phylogeny of the genus *Flaveria* (Asteraceae) with some modifications. *BMC Evol Biol*, 2015, 15: 116
- [37] Rumpho ME, Ku MS, Cheng SH, et al. Photosynthetic characteristics of C_3 - C_4 intermediate *Flaveria* species: III. reduction of photorespiration by a limited C_4 pathway of photosynthesis in *Flaveria ramosissima*. *Plant Physiol*, 1984, 75: 993-6
- [38] Lundgren MR, Christin PA, Escobar EG, et al. Evolutionary implications of C_3 - C_4 intermediates in the grass *Alloteropsis semialata*. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 1874-85
- [39] Williams BP, Johnston IG, Covshoff S, et al. Phenotypic landscape inference reveals multiple evolutionary paths to C_4 photosynthesis. *Elife*, 2013, 2: e00961
- [40] Slewinski TL, Anderson AA, Zhang CK, et al. Scarecrow plays a role in establishing Kranz anatomy in maize leaves. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 2030-7
- [41] Slewinski TL, Anderson AA, Price S, et al. Short-root1 plays a role in the development of vascular tissue and Kranz anatomy in maize leaves. *Mol Plant*, 2014, 7: 1388-92
- [42] Gallagher KL, Paquette AJ, Nakajima K, et al. Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Curr Biol*, 2004, 14: 1847-51
- [43] Wang P, Khoshravesh R, Karki S, et al. Re-creation of a key step in the evolutionary switch from C_3 to C_4 leaf anatomy. *Curr Biol*, 2017, 27: 3278-87.e6
- [44] Wang P, Fouracre J, Kelly S, et al. Evolution of GOLDEN2-LIKE gene function in C_3 and C_4 plants. *Planta*, 2013, 237: 481-95
- [45] Liu Q, Teng S, Deng C, et al. SHORT ROOT and INDETERMINATE DOMAIN family members govern PIN-FORMED expression to regulate minor vein

- differentiation in rice. *Plant Cell*, 2023, 35: 2848-70
- [46] Dong W, Chang T, Dai H, et al. Creating a C₄-like vein pattern in rice by manipulating SHORT ROOT and auxin levels. *Sci Bull (Beijing)*, 2023, 68: 3133-6
- [47] Hughes TE, Sedelnikova O, Thomas M, et al. Mutations in NAKED-ENDOSPERM IDD genes reveal functional interactions with SCARECROW during leaf patterning in C₄ grasses. *PLoS Genet*, 2023, 19: e1010715
- [48] Rossini L, Cribb L, Martin DJ, et al. The maize *Golden2* gene defines a novel class of transcriptional regulators in plants. *Plant Cell*, 2001, 13: 1231-44
- [49] John CR, Smith-Unna RD, Woodfield H, et al. Evolutionary convergence of cell-specific gene expression in independent lineages of C₄ grasses. *Plant Physiol*, 2014, 165: 62-75
- [50] Li X, Wang P, Li J, et al. Maize *GOLDEN2-LIKE* genes enhance biomass and grain yields in rice by improving photosynthesis and reducing photoinhibition. *Commun Biol*, 2020, 3: 151
- [51] Zhu X, Zhang L, Kuang C, et al. Important photosynthetic contribution of silique wall to seed yield-related traits in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res*, 2018, 137: 493-501
- [52] Tu X, Ren S, Shen W, et al. Limited conservation in cross-species comparison of GLK transcription factor binding suggested wide-spread cistrome divergence. *Nat Commun*, 2022, 13: 7632
- [53] Yeh SY, Lin HH, Chang YM, et al. Maize Golden2-like transcription factors boost rice chloroplast development, photosynthesis, and grain yield. *Plant Physiol*, 2022, 188: 442-59
- [54] Li X, Li J, Wei S, et al. Maize GOLDEN2-LIKE proteins enhance drought tolerance in rice by promoting stomatal closure. *Plant Physiol*, 2024, 194: 774-86
- [55] Hernández-Verdeja T, Lundgren MR. GOLDEN2-LIKE transcription factors: a golden ticket to improve crops? *Plants People Planet*, 2024, 6: 79-93
- [56] Lee DY, Hua L, Khoshravesh R, et al. Engineering chloroplast development in rice through cell-specific control of endogenous genetic circuits. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 2291-303
- [57] Zubo YO, Blakley IC, Franco-Zorrilla JM, et al. Coordination of chloroplast development through the action of the GNC and GLK transcription factor families. *Plant Physiol*, 2018, 178: 130-47
- [58] Hatch MD, Slack CR. A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C₄ dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J*, 1968, 106: 141-6
- [59] Johnson HS, Hatch MD. The C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Identification of intermediates and products and quantitative evidence for the route of carbon flow. *Biochem J*, 1969, 114: 127-34
- [60] Chang YM, Liu WY, Shih AC, et al. Characterizing regulatory and functional differentiation between maize mesophyll and bundle sheath cells by transcriptomic analysis. *Plant Physiol*, 2012, 160: 165-77
- [61] Wang L, Czedik-Eysenberg A, Mertz RA, et al. Comparative analyses of C₄ and C₃ photosynthesis in developing leaves of maize and rice. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1158-65
- [62] Aubry S, Kelly S, Kumpers BM, et al. Deep evolutionary comparison of gene expression identifies parallel recruitment of trans-factors in two independent origins of C₄ photosynthesis. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004365
- [63] Swift J, Luginbuehl LH, Schreier TB, et al. Single nuclei sequencing reveals C₄ photosynthesis is based on rewiring of ancestral cell identity networks. *bioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.10.26.562893
- [64] Tu X, Mejia-Guerra MK, Valdes Franco JA, et al. Reconstructing the maize leaf regulatory network using ChIP-seq data of 104 transcription factors. *Nat Commun*, 2020, 11: 5089
- [65] Borba AR, Serra TS, Gorska A, et al. Synergistic binding of bHLH transcription factors to the promoter of the maize *NADP-ME* gene used in C₄ photosynthesis is based on an ancient code found in the ancestral C₃ state. *Mol Biol Evol*, 2018, 35: 1690-705
- [66] Borba AR, Reyna-Llorens I, Dickinson PJ, et al. Compartmentation of photosynthesis gene expression in C₄ maize depends on time of day. *Plant Physiol*, 2023, 193: 2306-20
- [67] Akyildiz M, Gowik U, Engelmann S, et al. Evolution and function of a cis-regulatory module for mesophyll-specific gene expression in the C₄ dicot *Flaveria trinervia*. *Plant Cell*, 2007, 19: 3391-402
- [68] Gowik U, Schulze S, Saladie M, et al. A MEM1-like motif directs mesophyll cell-specific expression of the gene encoding the C₄ carbonic anhydrase in *Flaveria*. *J Exp Bot*, 2017, 68: 311-20
- [69] Gupta SD, Levey M, Schulze S, et al. The *C₄Ppc* promoters of many C₄ grass species share a common regulatory mechanism for gene expression in the mesophyll cell. *Plant J*, 2020, 101: 204-16
- [70] Williams BP, Burgess SJ, Reyna-Llorens I, et al. An untranslated cis-element regulates the accumulation of multiple C₄ enzymes in *Gynandropsis gynandra* mesophyll cells. *Plant Cell*, 2016, 28: 454-65
- [71] Brown NJ, Newell CA, Stanley S, et al. Independent and parallel recruitment of preexisting mechanisms underlying C₄ photosynthesis. *Science*, 2011, 331: 1436-9
- [72] Engelmann S, Wiludde C, Burscheidt J, et al. The gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from the C₄ species *Flaveria trinervia*: analysis of transcriptional control in transgenic *Flaveria bidentis* (C₄) and *Arabidopsis* (C₃). *Plant Physiol*, 2008, 146: 1773-85
- [73] Wiludde C, Schulze S, Gowik U, et al. Regulation of the photorespiratory GLDPA gene in C₄ flaveria: an intricate interplay of transcriptional and posttranscriptional processes. *Plant Cell*, 2012, 24: 137-51
- [74] Ermakova M, Arrivault S, Giuliani R, et al. Installation of C₄ photosynthetic pathway enzymes in rice using a single construct. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 575-88
- [75] Adwy W, Laxa M, Peterhansel C. A simple mechanism for the establishment of C₂-specific gene expression in *Brassicaceae*. *Plant J*, 2015, 84: 1231-8
- [76] Adwy W, Schlüter U, Papenbrock J, et al. Loss of the

- M-box from the glycine decarboxylase P-subunit promoter in *C₂ Moricandia* species. *Plant Gene*, 2019, 18: 612-32
- [77] Burgess SJ, Reyna-Llorens I, Stevenson SR, et al. Genome-wide transcription factor binding in leaves from *C₃* and *C₄* grasses. *Plant Cell*, 2019, 31: 2297-314
- [78] Singh P, Stevenson SR, Dickinson PJ, et al. *C₄* gene induction during de-etiolation evolved through changes *in cis* to allow integration with ancestral *C₃* gene regulatory networks. *Sci Adv*, 2023, 9: eade9756
- [79] Dai X, Tu X, Du B, et al. Chromatin and regulatory differentiation between bundle sheath and mesophyll cells in maize. *Plant J*, 2022, 109: 675-92
- [80] Aubry S, Brown NJ, Hibberd JM. The role of proteins in *C₃* plants prior to their recruitment into the *C₄* pathway. *J Exp Bot*, 2011, 62: 3049-59
- [81] Xu J, Brautigam A, Weber AP, et al. Systems analysis of cis-regulatory motifs in *C₄* photosynthesis genes using maize and rice leaf transcriptomic data during a process of de-etiolation. *J Exp Bot*, 2016, 67: 5105-17
- [82] Lyu MJ, Wang Y, Jiang J, et al. What matters for *C₄* transporters: evolutionary changes of phosphoenolpyruvate transporter for *C₄* photosynthesis. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 935
- [83] Burgess SJ, Granero-Moya I, Grange-Guermente MJ, et al. Ancestral light and chloroplast regulation form the foundations for *C₄* gene expression. *Nat Plants*, 2016, 2: 16161
- [84] Reyna-Llorens I, Hibberd JM. Recruitment of pre-existing networks during the evolution of *C₄* photosynthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2017, 372: 20160386
- [85] Pan X, Cao D, Xie F, et al. Structural basis for electron transport mechanism of complex I-like photosynthetic NAD(P)H dehydrogenase. *Nat Commun*, 2020, 11: 610
- [86] Shikanai T. Regulation of photosynthesis by cyclic electron transport around photosystem I. *Adv Bot Res*, 2020, 96: 177-204
- [87] Munekage YN, Taniguchi YY. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I with the development of *C₄* photosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57: 897-903
- [88] Allen JF. Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 15-9
- [89] Nakamura N, Iwano M, Havaux M, et al. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type *C₄* photosynthesis in the genus *Flaveria*. *New Phytol*, 2013, 199: 832-42
- [90] Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, et al. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 2004, 429: 579-82
- [91] Munekage YN, Taniguchi YY. A scheme for *C₄* evolution derived from a comparative analysis of the closely related *C₃*, *C₃-C₄* intermediate, *C₄*-like, and *C₄* species in the genus *Flaveria*. *Plant Mol Biol*, 2022, 110: 445-54
- [92] Ogawa T, Kobayashi K, Taniguchi YY, et al. Two cyclic electron flows around photosystem I differentially participate in *C₄* photosynthesis. *Plant Physiol*, 2023, 191: 2288-300
- [93] Ermakova M, Woodford R, Fitzpatrick D, et al. NDH complex-mediated cyclic electron flow in 1 bundle sheath cells enables *C₄* photosynthesis. *bioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.09.17.558135
- [94] Zhang Q, Tian S, Chen G, et al. Regulatory NADH dehydrogenase-like complex optimizes *C₄* photosynthetic carbon flow and cellular redox in maize. *New Phytol*, 2024, 241: 82-101
- [95] Kulahoglu C, Denton AK, Sommer M, et al. Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two Cleomaceae *C₃* and *C₄* plant species. *Plant Cell*, 2014, 26: 3243-60
- [96] 朱新广, 王佳伟, 韩斌. 植物碳汇系统与中国碳中和之路. *科学通报*, 2023, 68: 12-7