

干旱胁迫下大蒜叶绿素合成基因家族鉴定分析

王紫彤^a, 周倩怡^a, 田洁^{a,b,①}

(青海大学: a. 农林科学院 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, b. 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要: 为探究干旱胁迫对大蒜(*Allium sativum* Linn.)叶绿素合成的影响,本研究基于大蒜转录组测序数据,筛选出响应干旱胁迫的大蒜叶绿素合成基因家族成员,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术验证其表达情况后,采用生物信息学方法鉴定其序列属性。结果表明:从大蒜转录组数据中搜索得到的 17 个叶绿素合成基因家族中,筛选出 6 个积极响应于干旱胁迫的大蒜叶绿素合成基因家族,即 *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO*。qRT-PCR 和 RNA-Seq 结果显示:干旱胁迫 6 d, *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族成员的表达量总体上显著增加。生物信息学分析结果显示:大蒜上述 6 个基因家族 32 个 unigenes 编码序列的氨基酸残基数为 104~773,理论相对分子质量为 11 978~84 411,理论等电点为 pI 4.78 至 pI 9.86,不稳定指数为 24.66~60.13,脂溶系数为 80.04~104.59;除 *AsGSA* 家族外,其余 5 个家族成员的总平均亲水性为负值,即 *AsGSA* 家族成员为亲水蛋白,其余 5 个家族成员为疏水蛋白。保守基序分析结果表明:大蒜这 6 个叶绿素合成基因家族成员编码的氨基酸序列具有较高的保守性和相似性,其中, *AsHEMA*、*AsGSA* 和 *AsCHLD* 家族高度保守; *AsHEMB*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 家族保守性也较高,仅个别家族成员存在差异。进化树结果显示:大蒜同一叶绿素合成基因家族成员聚在一起,说明各基因家族的成员在进化上具有较高的保守性和相似性; *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族与单子叶植物小麦 (*Triticum aestivum* Linn.)、石刁柏 (*Asparagus officinalis* Linn.) 和玉簪 [*Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers.] 相关基因的同源性较高。上述研究结果显示: *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族的保守性和相似性较高,在大蒜响应干旱胁迫中发挥重要作用。

关键词: 大蒜; 干旱胁迫; 叶绿素合成基因; 生物信息学分析

中图分类号: Q78; S633.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)03-0054-11

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.03.07

Identification and analysis on chlorophyll synthesis gene families in *Allium sativum* under drought stress WANG Zitong^a, ZHOU Qianyi^a, TIAN Jie^{a,b,①} (Qinghai University: a. Qinghai Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Academy of Agricultural and Forestry Sciences, b. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Xining 810016, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(3): 54-64, 74

Abstract: To explore the effect of drought stress on chlorophyll synthesis of *Allium sativum* Linn., members of chlorophyll synthesis gene families of *A. sativum* in response to drought stress were screened based on the transcriptome sequencing data of *A. sativum*, and their sequence properties were identified with bioinformatics method after validation of expression levels by using real-time fluorescence quantification PCR (qRT-PCR). The results show that six chlorophyll synthesis gene families of *A. sativum* namely *AsHEMA*, *AsHEMB*, *AsGSA*, *AsCHLD*, *AsCHLI*, and *AsCAO*, which are actively responsive to drought stress, are selected from 17 chlorophyll synthesis gene families searched from the transcriptome data of *A. sativum*. The qRT-PCR and RNA-Seq results show that after 6 d of drought

收稿日期: 2021-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31960590); 青海省科学技术厅省级重点实验室项目(2020-ZJ-Y02); 2019 年度中国科学院“西部之光”人才培养计划(1-2)

作者简介: 王紫彤(1999—),女,陕西安康人,本科,主要从事大蒜农艺与种业方面的研究。

①通信作者 E-mail: tiantian8092001@163.com

引用格式: 王紫彤, 周倩怡, 田洁. 干旱胁迫下大蒜叶绿素合成基因家族鉴定分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(3): 54-64, 74.

stress, the expression levels of members of *AsHEMA*, *AsHEMB*, *AsGSA*, *AsCHLD*, *AsCHLI*, and *AsCAO* gene families significantly increase in general. The bioinformatics analysis result shows that the numbers of amino acid residues of sequences encoded by 32 unigenes in above-mentioned six gene families of *A. sativum* are 104–773, their theoretical relative molecular mass are 11 978–84 411, their theoretical isoelectric points are from pI 4.78 to pI 9.86, their instability indexes are 24.66–60.13, and their aliphatic indexes are 80.04–104.59. Except for *AsGSA* family, grand average of hydropathicity of members of the other five families are negative, indicating that members of *AsGSA* family are of hydrophilic protein, while members of the other five families are of hydrophobic proteins. The conserved motif analysis result shows that the amino acid sequences encoded by members of these six chlorophyll synthesis gene families of *A. sativum* have high conservation and similarity, in which, *AsHEMA*, *AsGSA*, and *AsCHLD* families are highly conserved; *AsHEMB*, *AsCHLI*, and *AsCAO* families are also relatively well conserved, and there are differences only in a few family members. The result of phylogenetic tree shows that members of the same chlorophyll synthesis gene family are clustered together, which have high conservation and similarity in evolution; *AsHEMA*, *AsHEMB*, *AsCHLD*, *AsCHLI*, and *AsCAO* gene families have high homology with related genes in monocotyledons *Triticum aestivum* Linn., *Asparagus officinalis* Linn., and *Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers. It is suggested that *AsHEMA*, *AsHEMB*, *AsGSA*, *AsCHLD*, *AsCHLI*, and *AsCAO* gene families are highly conserved and similar, which play important roles in response to drought stress in *A. sativum*.

Key words: *Allium sativum* Linn.; drought stress; chlorophyll synthesis gene; bioinformatics analysis

大蒜(*Allium sativum* Linn.)为百合科(Liliaceae)葱属(*Allium* Linn.)植物,又称胡蒜、蒜。大蒜栽培历史悠久,具有重要的营养和药用价值,是青海省露地主栽蔬菜之一^[1,2]。大蒜作为一种浅根性作物,耐旱性较弱^[3,4],而青海东部农业区易发生旱灾,并且春季和夏季是大蒜生长的关键时期,也是旱灾发生的高频时期^[5],因此在高原大蒜生产过程中,干旱胁迫对大蒜的正常生长、产品品质以及经济效益均造成不利影响。在干旱生长环境中,大蒜叶片的形态结构和生理功能,尤其是光合特性会发生一系列变化^[6],且干旱胁迫影响大蒜叶绿素的合成,抑制叶绿体的发育,从而使大蒜的光合效率降低,生长迟缓^[7]。

叶绿素生物合成是一个涉及多步反应且十分复杂的过程,有多种酶和基因参与^[8]。目前已有研究证实拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]的叶绿素生物合成大致需要15步反应,包含起催化作用的17种酶和27种编码基因^[9]。叶绿素合成的第1步是由L-谷氨酰-tRNA合成原卟啉IX,其中的编码基因*HEMA*、*HEMB*、*GSA*、*HEMC*、*HEMD*、*HEME*、*HEMF*和*HEMG*已从拟南芥^[8]和水稻(*Oryza sativa* Linn.)^[10]中分离获得;第2步由原卟啉IX合成叶绿素,相关催化酶基因有*CHLD*、*CHLH*、*CHLI*、*CHLM*、*CRD1*、*DVR*、*POR*、*CHLG*和*CAO*^[11],已在大麦(*Hordeum vulgare* Linn.)^[11]、烟草(*Nicotiana tabacum* Linn.)^[12]和玉米(*Zea mays* Linn.)^[13]等植物中被鉴

定得到。叶绿素合成基因家族成员虽已在模式植物和一些禾本科(Poaceae)作物中鉴定到并进行了功能分析,但对于一些追求高品质、高产量的经济作物来说,对其叶绿素合成基因家族进行系统分析,探究其调控机制是亟待解决的问题。

叶绿素合成基因在逆境胁迫应答过程中发挥着重要作用。黄蔚^[14]发现,极端温度条件下,芹菜(*Apium graveolens* Linn.)的17个叶绿素合成基因分别通过显著上调或下调其表达水平应答环境温度的变化。李翠^[15]将酿酒酵母5-氨基乙酰丙酸(ALA)合酶基因(*YHemI*)转入番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.),盐胁迫下转基因植株的*HEMA*、*HEMB*和*GSA*基因通过上调或下调表达来应答胁迫。张修德等^[16]认为,聚乙二醇(PEG)模拟的干旱能够诱导苹果(*Malus pumila* Mill.)组培苗*HEMA*基因表达量增加,从而抵御干旱胁迫。目前,对于逆境胁迫下大蒜叶绿素合成的研究多集中于生理指标^[17,18],大蒜中叶绿素合成基因家族成员尚未被鉴定,相关基因家族成员的功能和作用机制尚未完全清晰。

本研究基于前期干旱胁迫大蒜转录组测序结果(未公布),筛选出响应干旱胁迫的大蒜叶绿素合成基因家族,结合实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析其在干旱胁迫下的表达情况,并利用生物信息学方法对其进行综合鉴定和分析,以期为进一步研究大蒜叶绿素合成基因家族的生物学功能奠定基础,并为大蒜

在干旱胁迫下提高光合效率、延缓衰老和增强适应性等方面提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为青海省特色大蒜品种‘乐都紫皮大蒜’(‘Ledu Purple Skin Garlic’),选取蒜瓣较饱满、大小均匀、表面光滑、色泽光亮且已经解除休眠的大蒜鳞茎,于2021年3月播种在栽培基质为珍珠岩、蛭石和草炭(体积比1:1:2)的盆(口径12 cm、底径9 cm、高12 cm)中,每盆栽种1个鳞茎,共60盆。然后置于植物光照培养箱中,培养条件为:昼温25℃,夜温15℃,光照时间14 h·d⁻¹,光照度12 000 lx,空气相对湿度70%左右。培养至大蒜幼苗期(株高10 cm左右)时进行干旱胁迫处理。

1.2 方法

1.2.1 干旱胁迫处理 参照铁原毓等^[19]的方法通过停止浇水进行人工控水,保持空气相对湿度30%,参照杨彦会等^[20]的方法控制土壤相对湿度为45%~55%,其他培养条件不变。各处理设置3个重复。分别于处理0(CK)、3、6、9、12和15 d取样。每个重复取长势均匀的5株大蒜植株上部的幼嫩叶片,取样后立即放入液氮中冷冻,然后置于-80℃冰箱中保存、备用。

1.2.2 叶片总RNA的提取 利用TRNzol Universal总RNA提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司]提取大蒜叶片总RNA,采用质量体积分数1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,利用TGM微量分光光度计(OSE-260)[天根生化科技(北京)有限公司]检测总RNA质量。

1.2.3 cDNA文库构建与转录组测序 上述RNA样品交由北京诺禾致源科技股份有限公司测序。首先构建叶片cDNA文库,库检合格后进行Illumina HiSeq测序。测序片段经CASAVA碱基识别转化为序列数据(raw reads),过滤后得到clean reads,基于此测序数据进行后续分析。

1.2.4 叶绿素合成基因筛选 将由转录组测序得到的大蒜unigenes序列与NR、NT、Pfam、KOG/COG、Swiss-Prot、KEGG和GO数据库进行基因功能注释,获得unigenes的蛋白功能注释信息后,参考张少平等^[21]的方法筛选被注释的叶绿素合成基因。

1.2.5 转录组表达分析 对不同干旱胁迫时间大蒜叶绿素合成基因转录组数据的FPKM值(每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片)进行统计,以FPKM值大于0.3作为基因表达的阈值,统计FPKM值大于0.3的unigenes,分析其在不同干旱胁迫时间的表达水平和表达模式,使用TBtools软件绘制大蒜叶绿素合成基因表达热图,筛选unigenes表达量较高的叶绿素合成基因家族进行后续的鉴定与分析。

1.2.6 qRT-PCR分析 为验证转录组数据的可靠性,同时进一步分析筛选到的叶绿素合成基因的表达情况,采集不同干旱胁迫时间的大蒜叶片进行qRT-PCR分析。按照Honor™ II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(gDNA digester plus)反转录试剂盒(天津诺禾致源生物信息科技有限公司)说明书合成cDNA。从大蒜转录组数据筛选出的unigenes表达量较高的叶绿素合成基因家族中,随机选取1个unigene进行验证,利用Primer Premier 5.0设计qRT-PCR引物后交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1,然后进行qRT-PCR检测,每个样品3次技术重复。

表1 大蒜叶绿素合成基因家族部分unigenes的引物序列及其退火温度

Table 1 The primer sequences of some unigenes in chlorophyll synthesis gene families of *Allium sativum* Linn. and their annealing temperatures

基因 Gene	编号 ID	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature
AsHEMA	Cluster-22080.172499	TCGGTCCAAGAAATGTA	TCTCAAGTGAATCCCTCC	49
AsHEMB	Cluster-22080.214927	GCTATGCCTGGATGCTTT	TGCCTCGTCTCTGTTT	54
AsGSA	Cluster-22080.179393	ACCGCAGACACCCTCACT	CAACAGGCTCAAGGATAACA	57
AsCHLD	Cluster-22080.172914	AAACCGCCTGTCCACTTA	GGATTCCATTGTCCACT	53
AsCHLI	Cluster-22080.197723	GAAGCAGCCAGCCAACAG	TAATCGGAAATGGAGACC	53
AsCAO	Cluster-22080.157276	TTCGGGTTTACAAGGATA	TTGAAGAAGGAAGGCATA	47
AsCYP		AAGGACGAGAACTTCATC	TCAATATCTCTCACCCTTC	48

qRT-PCR 反应体系总体积为 20.0 μL , 包括 SYBR Green Master Mix(天津诺禾致源生物信息科技有限公司) 10.0 μL 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 0.6 μL 、100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cDNA 1.0 μL 、ddH₂O 7.8 μL 。扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、相应温度退火 30 s(退火温度见表 1)、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 150 s,共 35 个循环。每个样品 3 次技术重复。选取大蒜 *CYP* 基因作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.2.7 蛋白质理化性质分析 利用 ExPASy 网站中的 ProtParam 在线工具 (<https://www.expasy.org/resources/protparam/>) 预测大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 编码氨基酸序列的理论相对分子质量、理论等电点、不稳定指数、脂溶系数和总平均亲水性等。

1.2.8 氨基酸序列多重比对及进化树分析 将大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 编码氨基酸序列在 NCBI 数据库中通过 BLAST 比对,选择相似性高且已在其他植物中鉴定到的叶绿素合成基因编码氨基酸序列,使用 Mega X 的最大似然法(maximum likelihood, ML) 构建系统进化树,校验参数 Bootstrap

值设置为重复 1 000 次。通过 Evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 对进化树进行优化。

1.2.9 保守基序分析 使用在线分析软件 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 对不同大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 编码的氨基酸序列分别进行保守基序分析,基序的最大数量设置为 3~5,将得到的 meme.xml 文件放入 TBtools 进行结构可视化,并绘制图形。

1.3 数据统计和处理

采用 SPSS 25.0 软件中的 Duncan's 新复极差法 ($p < 0.05$) 对实验数据进行差异显著性分析^[22],采用 Origin 2021 软件绘制图表。

2 结果和分析

2.1 叶绿素生物合成基因的筛选

从大蒜转录组序列中筛选出 160 个与叶绿素合成相关的 unigenes,经鉴定被注释为 17 个叶绿素合成基因家族(表 2)。其中被注释数量最多的是 *AsHEMG* 基因家族,共有 43 个 unigenes。在 L-谷氨

表 2 大蒜叶绿素合成基因的筛选信息

Table 2 Screening information of chlorophyll synthesis genes in *Allium sativum* Linn.

酶 Enzyme	酶编号 Enzyme ID	基因家族 Gene family	KO 通路编号 KO pathway ID	N ¹⁾
L-谷氨酰-tRNA 到原卟啉 IX 的合成途径 Synthesis pathway of L-glutamyl-tRNA to protoporphyrin IX				
谷氨酰-tRNA 还原酶 Glutamyl-tRNA reductase	EC:1.2.1.70	<i>AsHEMA</i>	K02492	5
谷氨酸酯-1-半醛 2,1 氨基变位酶 Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	EC:5.4.3.8	<i>AsGSA</i>	K01845	2
5-氨基酮戊酸脱水酶 5-aminolevulinatase dehydratase	EC:4.2.1.24	<i>AsHEMB</i>	K01698	8
胆色素原脱氨酶 Porphobilinogen deaminase	EC:2.5.1.61	<i>AsHEMC</i>	K01749	14
尿卟啉原 III 合成酶 Uroporphyrinogen III synthase	EC:4.2.1.75	<i>AsHEMD</i>	K01719	8
尿卟啉原 III 脱羧酶 Uroporphyrinogen III decarboxylase	EC:4.1.1.37	<i>AsHEME</i>	K01599	8
粪卟啉原 III 氧化酶 Coproporphyrinogen III oxidase	EC:4.1.1.37	<i>AsHEMF</i>	K01599	8
原卟啉原氧化酶 Protoporphyrinogen oxidase	EC:1.3.3.4	<i>AsHEMG</i>	K00231	43
原卟啉 IX 到叶绿素的合成途径 Synthesis pathway of protoporphyrin IX to chlorophyll				
镁螯合酶 H 亚基 Magnesium chelatase H subunit	EC:6.6.1.1	<i>AsCHLH</i>	K03403	7
镁螯合酶 I 亚基 Magnesium chelatase I subunit	EC:6.6.1.1	<i>AsCHLI</i>	K03405	6
镁螯合酶 D 亚基 Magnesium chelatase D subunit	EC:6.6.1.1	<i>AsCHLD</i>	K03404	5
镁原卟啉 IX 甲基转移酶 Magnesium protoporphyrin IX methyltransferase	EC:2.1.1.11	<i>AsCHLM</i>	K03428	2
镁原卟啉 IX 单甲基酯环化酶 Magnesium protoporphyrin IX monomethylester cyclase	EC:1.14.13.81	<i>AsCRD</i>	K04035	16
3,8-联乙烯原叶绿素酸酯 a 8-乙烯基还原酶 3,8-divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl reductase	EC:1.3.1.75	<i>AsDVR</i>	K19073	2
原叶绿素酸酯氧化还原酶 Protochlorophyllide oxidoreductase	EC:1.3.1.33	<i>AsPOR</i>	K00218	18
叶绿素合酶 Chlorophyll synthase	EC:2.5.1.62	<i>AsCHLG</i>	K04040	2
叶绿素酸酯 a 加氧酶 Chlorophyllide a oxygenase	EC:1.14.13.122	<i>AsCAO</i>	K13600	6

¹⁾ N: Unigenes 数量 Number of unigenes.

酰-tRNA 到原卟啉IX的合成途径中, σ -氨基酮戊酸(ALA)的合成是叶绿素合成过程中一个重要的控制点^[23],编码的基因家族为 *AsHEMA* 和 *AsGSA*,分别注释到 5 和 2 个 unigenes。从原卟啉IX到叶绿素的合成途径中,金属离子插入原卟啉IX是叶绿素合成过程中另一个重要的分支点^[24],编码的基因家族为 *AsCHLH*、*AsCHLI* 和 *AsCHLD*,分别注释到 7、6 和 5 个 unigenes。

2.2 转录组表达分析

干旱胁迫下大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 表达热图见图 1。结果显示:17 个大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 响应干旱胁迫的模式大致分为 2 种:*AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族 unigenes 在干旱胁迫 6 d 时相对表达量明

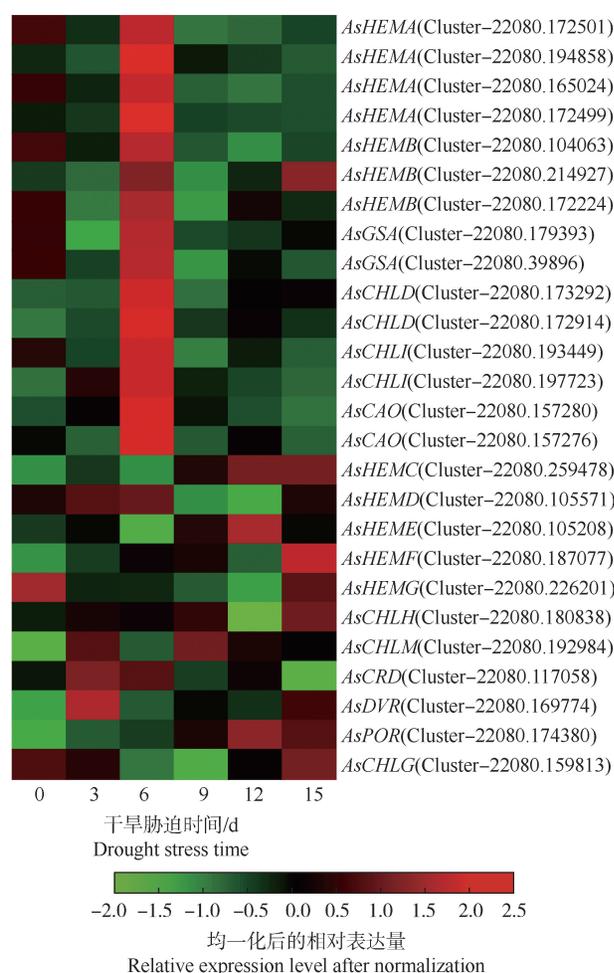


图 1 干旱胁迫下大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 表达 (FPKM 值大于 0.3) 热图

Fig. 1 Heat map of expression of unigenes (FPKM value greater than 0.3) in chlorophyll synthesis gene families of *Allium sativum* Linn. under drought stress

显增加,达到峰值,积极响应干旱胁迫;而 *AsHEMC*、*AsHEMD*、*AsHEME*、*AsHEMF*、*AsHEMG*、*AsCHLH*、*AsCHLM*、*AsCRD*、*AsDVR*、*AsPOR* 和 *AsCHLG* 基因家族 unigenes 在干旱胁迫下的相对表达量相对较低,且响应干旱胁迫的变化趋势和模式不明显。因此,后续的鉴定和分析将在 *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族中进行。

2.3 qRT-PCR 分析

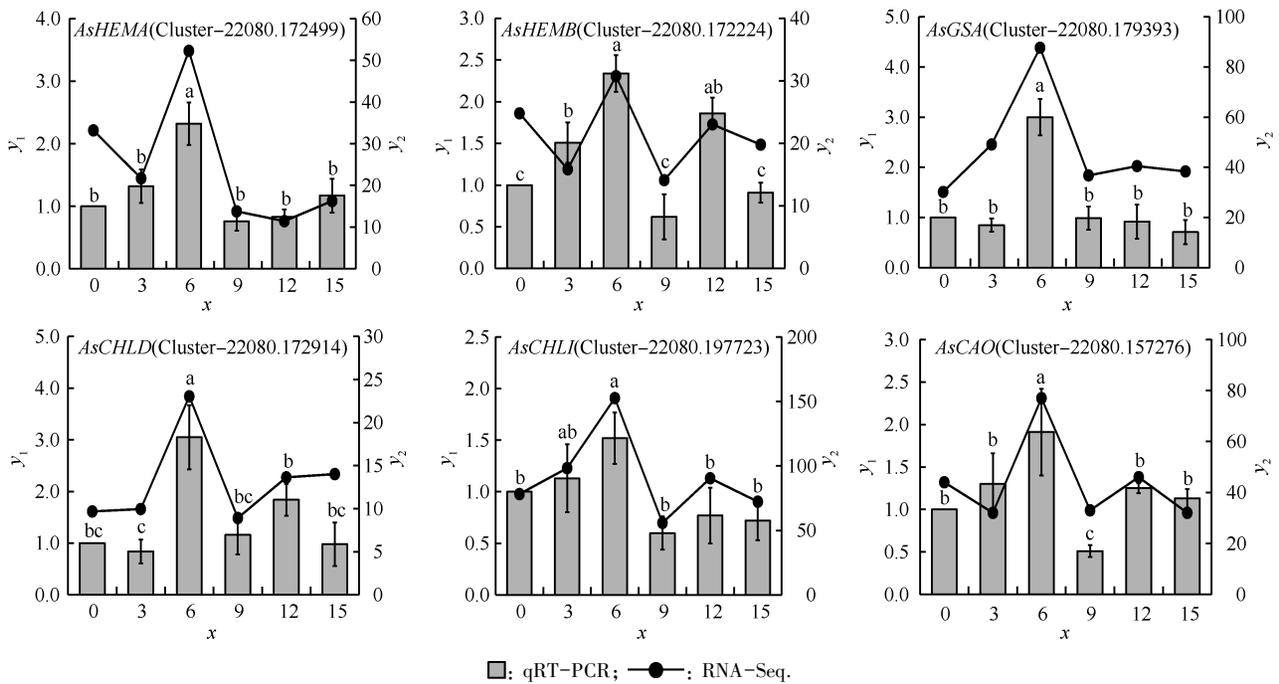
为了证实上述 6 个大蒜叶绿素合成基因家族在干旱胁迫下转录组测序结果的可信性和真实性,从这 6 个基因家族中各随机选取 1 个 unigene 进行 qRT-PCR 验证。结果(图 2)显示:*AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 这 6 个基因家族成员的表达趋势与转录组结果基本吻合,均于干旱胁迫 6 d 时相对表达量最高。除 *AsHEMB* 和 *AsCHLI* 基因家族成员外,剩余 4 个基因家族成员均在干旱胁迫 6 d 时与其他干旱胁迫时间差异显著。这表明 RNA-Seq 数据具有准确性和可靠性,可对这 6 个大蒜叶绿素合成基因家族进行后续鉴定分析。

2.4 蛋白质理化性质分析

上述 6 个大蒜叶绿素合成基因家族 32 个 unigenes 编码氨基酸序列的理化性质见表 3。结果显示:32 个 unigenes 编码序列的氨基酸残基数为 104~773,理论相对分子质量为 11 978~84 411,理论等电点为 pI 4.78 至 pI 9.86,其中同一家族中各成员的理论等电点相对接近,例如:*AsCHLI* 家族成员的理论等电点为 pI 4.80 至 pI 5.75,整体较低;而 *AsCAO* 家族成员的理论等电点为 pI 7.33 至 pI 9.86,整体较高。不稳定指数为 24.66~60.13,其中 8 个成员的不稳定指数高于 40,属不稳定蛋白,*AsCAO* 家族中有 4 个成员属于不稳定蛋白,在 6 个家族中稳定性最差;*AsHEMB* 和 *AsGSA* 家族的全部成员均为稳定蛋白。脂溶系数为 80.04~104.59。除 *AsGSA* 家族外,其余 5 个家族成员的总平均亲水性均为负值,即 *AsGSA* 家族成员为亲水蛋白,其余 5 个家族成员为疏水蛋白。由此可以看出,这 6 个大蒜叶绿素合成基因家族成员氨基酸序列的理化性质存在一定差异,但同一家族成员氨基酸序列的理化性质较相似。

2.5 进化树与保守基序分析

大蒜 *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族 unigenes 与其他植物叶绿素合成基因编码氨基酸序列的进化树见图 3。结果显示:上



x : 干旱胁迫时间 Drought stress time (d); y_1 : 相对表达量 Relative expression level; y_2 : FPKM 值 FPKM value. 同一 unigene 不同小写字母表示不同干旱胁迫时间的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same unigene indicate the significant ($P < 0.05$) differences in the relative expression levels at different drought stress times.

图 2 大蒜叶绿素合成基因家族部分 unigenes 的 qRT-PCR 验证
 Fig. 2 Validation of some unigenes in chlorophyll synthesis gene families of *Allium sativum* Linn. by using qRT-PCR

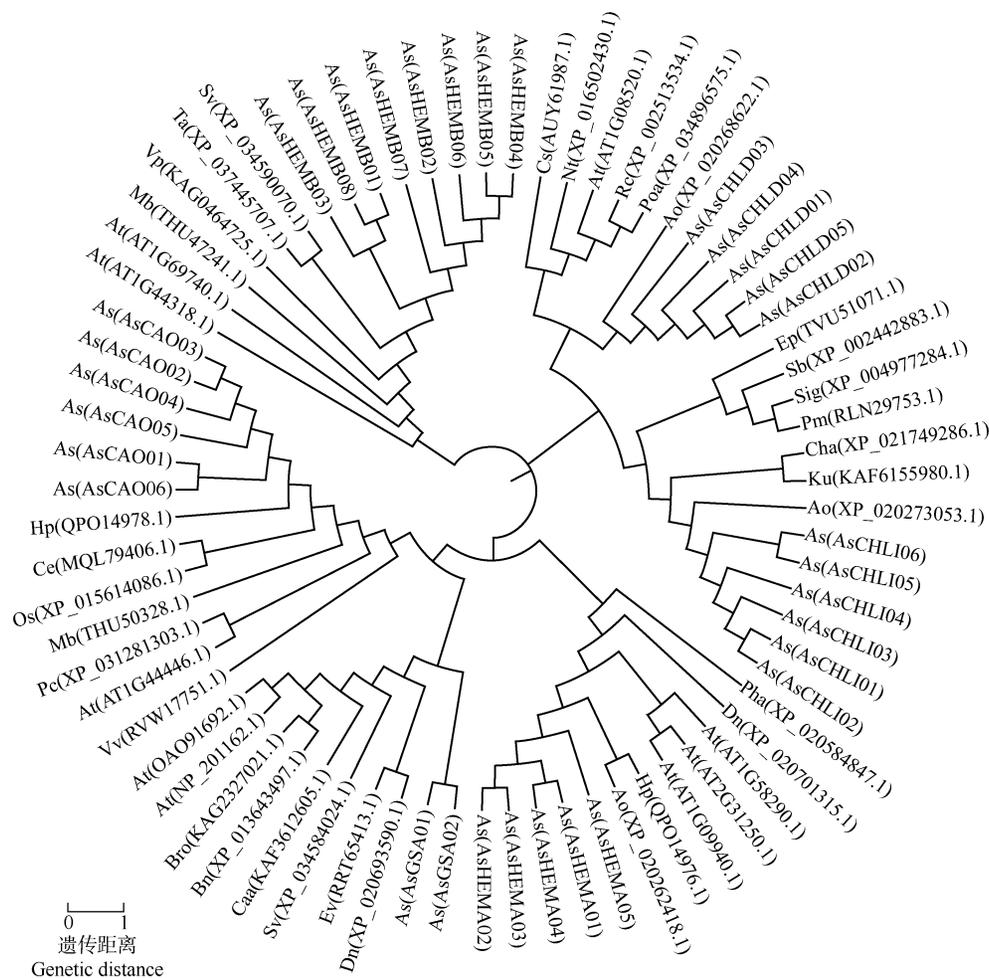
表 3 大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 编码氨基酸序列的理化性质¹⁾
 Table 3 Physicochemical properties of amino acid sequences encoded by unigenes in chlorophyll synthesis gene families of *Allium sativum* Linn.¹⁾

Unigene	编号 ID	N	MW	pI	II	AI	GRAVY
AsHEMA01	Cluster-22080.172501	556	61 873	8.58	37.10	97.12	-0.18
AsHEMA02	Cluster-22080.194858	425	47 258	6.77	38.78	100.42	-0.17
AsHEMA03	Cluster-22080.165023	412	45 909	6.28	40.28	100.51	-0.17
AsHEMA04	Cluster-22080.165024	409	45 583	7.16	37.14	100.29	-0.12
AsHEMA05	Cluster-22080.172499	491	54 770	6.89	38.43	100.04	-0.14
AsHEMB01	Cluster-22080.139842	241	26 338	8.84	36.21	87.39	-0.27
AsHEMB02	Cluster-22080.172224	432	47 273	7.16	36.26	89.65	-0.19
AsHEMB03	Cluster-22080.158954	434	47 339	5.97	35.13	89.26	-0.17
AsHEMB04	Cluster-22080.175640	432	47 259	6.69	35.91	89.65	-0.19
AsHEMB05	Cluster-22080.175641	432	47 259	6.69	35.91	89.65	-0.19
AsHEMB06	Cluster-22080.93628	241	26 338	8.84	36.21	87.39	-0.27
AsHEMB07	Cluster-22080.104063	421	46 062	6.33	36.29	89.43	-0.23
AsHEMB08	Cluster-22080.214927	299	32 695	4.78	24.66	93.34	-0.10
AsGSA01	Cluster-22080.179393	355	37 421	5.87	31.09	86.08	0.10
AsGSA02	Cluster-22080.39896	342	36 000	5.57	30.15	83.07	0.09
AsCHLD01	Cluster-22080.172914	359	38 905	5.45	35.94	96.99	-0.09
AsCHLD02	Cluster-22080.72345	409	44 600	5.67	32.25	98.51	-0.12
AsCHLD03	Cluster-22080.173293	576	63 735	5.32	42.95	87.41	-0.46
AsCHLD04	Cluster-22080.173292	773	84 411	5.75	40.83	89.65	-0.35
AsCHLD05	Cluster-22080.307334	428	46 760	5.87	33.79	100.51	-0.05
AsCHLI01	Cluster-22080.197723	433	47 401	5.42	39.41	99.45	-0.17
AsCHLI02	Cluster-22080.193449	427	46 663	5.35	39.24	99.25	-0.18
AsCHLI03	Cluster-22080.193462	257	28 139	4.80	35.00	97.78	-0.23

续表3 Table 3 (Continued)

Unigene	编号 ID	N	MW	pI	II	AI	GRAVY
AsCHLI04	Cluster-22080.198111	217	23 592	5.75	41.26	95.58	-0.01
AsCHLI05	Cluster-22080.191575	239	26 737	5.31	34.37	104.39	-0.24
AsCHLI06	Cluster-22080.197722	259	29 025	5.44	32.78	104.59	-0.26
AsCA001	Cluster-22080.157276	435	49 134	7.33	37.27	82.92	-0.24
AsCA002	Cluster-22080.157280	156	18 116	9.54	49.81	84.29	-0.36
AsCA003	Cluster-22080.157288	104	11 978	9.47	48.34	85.29	-0.03
AsCA004	Cluster-22080.157291	119	14 123	9.86	60.13	93.28	-0.38
AsCA005	Cluster-22080.157292	229	25 804	8.13	49.16	80.04	-0.15
AsCA006	Cluster-22080.221807	435	49 134	7.33	37.27	82.92	-0.24

¹⁾ N: 氨基酸残基数 Amino acid residue number; MW: 理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass; pI: 理论等电点 Theoretical isoelectric point; II: 不稳定指数 Instability index; AI: 脂溶系数 Aliphatic index; GRAVY: 总平均亲水性 Grand average of hydropathicity.



Ao: 石刁柏 *Asparagus officinalis* Linn.; As: 大蒜 *Allium sativum* Linn.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Bn: 欧洲油菜 *Brassica napus* Linn.; Bro: 芸薹 *Brassica rapa* var. *oleifera* de Candolle; Caa: 辣椒 *Capsicum annuum* Linn.; Ce: 芋 *Colocasia esculenta* (Linn.) Schott.; Cha: 藜 *Chenopodium album* Linn.; Cs: 墨兰 *Cymbidium sinense* (Jackson ex Andr.) Willd.; Dn: 石斛 *Dendrobium nobile* Lindl.; Ep: 画眉草 *Eragrostis pilosa* (Linn.) Beauv.; Ev: 粗柄象腿蕉 *Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman; Hp: 玉簪 *Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers.; Ku: 独叶草 *Kingdonia uniflora* Balf. F. et W. W. Smith; Mb: 野蕉 *Musa balbisiana* Colla; Ni: 烟草 *Nicotiana tabacum* Linn.; Os: 水稻 *Oryza sativa* Linn.; Pc: 黄连木 *Pistacia chinensis* Bunge; Pha: 蝴蝶兰 *Phalaenopsis aphrodite* H. G. Reichenbach; Pm: 稷 *Panicum miliaceum* Linn.; Poa: 银白杨 *Populus alba* Linn.; Re: 蓖麻 *Ricinus communis* Linn.; Sb: 高粱 *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench; Sig: 粟 *Setaria italica* var. *germanica* (Mill.) Schred.; Sv: 狗尾草 *Setaria viridis* (Linn.) Beauv.; Ta: 小麦 *Triticum aestivum* Linn.; Vp: 香荚兰 *Vanilla planifolia* Andrews; Vv: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.

图3 大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 与其他植物叶绿素合成基因编码氨基酸序列的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by unigenes in chlorophyll synthesis gene families of *Allium sativum* Linn. and chlorophyll synthesis genes in other plants

述 6 个大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 与石刁柏 (*Asparagus officinalis* Linn.)、玉簪 [*Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers.]、小麦 (*Triticum aestivum* Linn.)、狗尾草 [*Setaria viridis* (Linn.) Beauv.]、粗柄象腿蕉 [*Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman]、石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 和芋 [*Colocasia esculenta* (Linn.) Schott.] 等植物的叶绿素合成基因编码氨基酸序列聚为 6 类, 各类中大蒜 AsHEMA、AsHEMB、AsGSA、AsCHLD、AsCHLI 和 AsCAO 家族成员首先聚在一起, 保守性较强。其中, AsHEMA 家族成员与登录号 XP_020262418.1 (石刁柏) 和 QP014976.1 (玉簪) 序列的同源性相对较高; AsHEMB 家族的 8 个成员也比较保守, 可进一步分为 2 个小类, AsHEMB01、AsHEMB03 和 AsHEMB08 聚为一个小类, 与登录号 XP_034590070.1 (狗尾草) 和 XP_037445707.1 (小麦) 序列的同源性较高, AsHEMB02、AsHEMB04、

AsHEMB05、AsHEMB06 和 AsHEMB07 聚为另一个小类; AsGSA 家族成员与登录号 RRT65413.1 (粗柄象腿蕉) 和 XP_020693590.1 (石斛) 序列的同源性较高; AsCHLD 家族成员与登录号 XP_020268622.1 (石刁柏) 序列的同源性较高; AsCHLI 家族成员与登录号 XP_020273053.1 (石刁柏) 序列的同源性也较高; AsCAO 家族可进一步划分为 AsCAO01 和 AsCAO06 以及 AsCAO02、AsCAO03、AsCAO04 和 AsCAO05 2 个小类, 其中 AsCAO01 和 AsCAO06 与登录号 QP014978.1 (玉簪)、MQL79406.1 (芋) 和 XP_015614086.1 (水稻) 序列的同源性较高。

上述 6 个大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 编码氨基酸序列的保守基序及其结构分别见图 4、图 5 和图 6。结果显示: AsHEMA、AsGSA 和 AsCHLD 家族成员氨基酸序列所含的保守基序一致且排列位置也相似, 说明同一家族中的成员高度保守; AsHEMB、

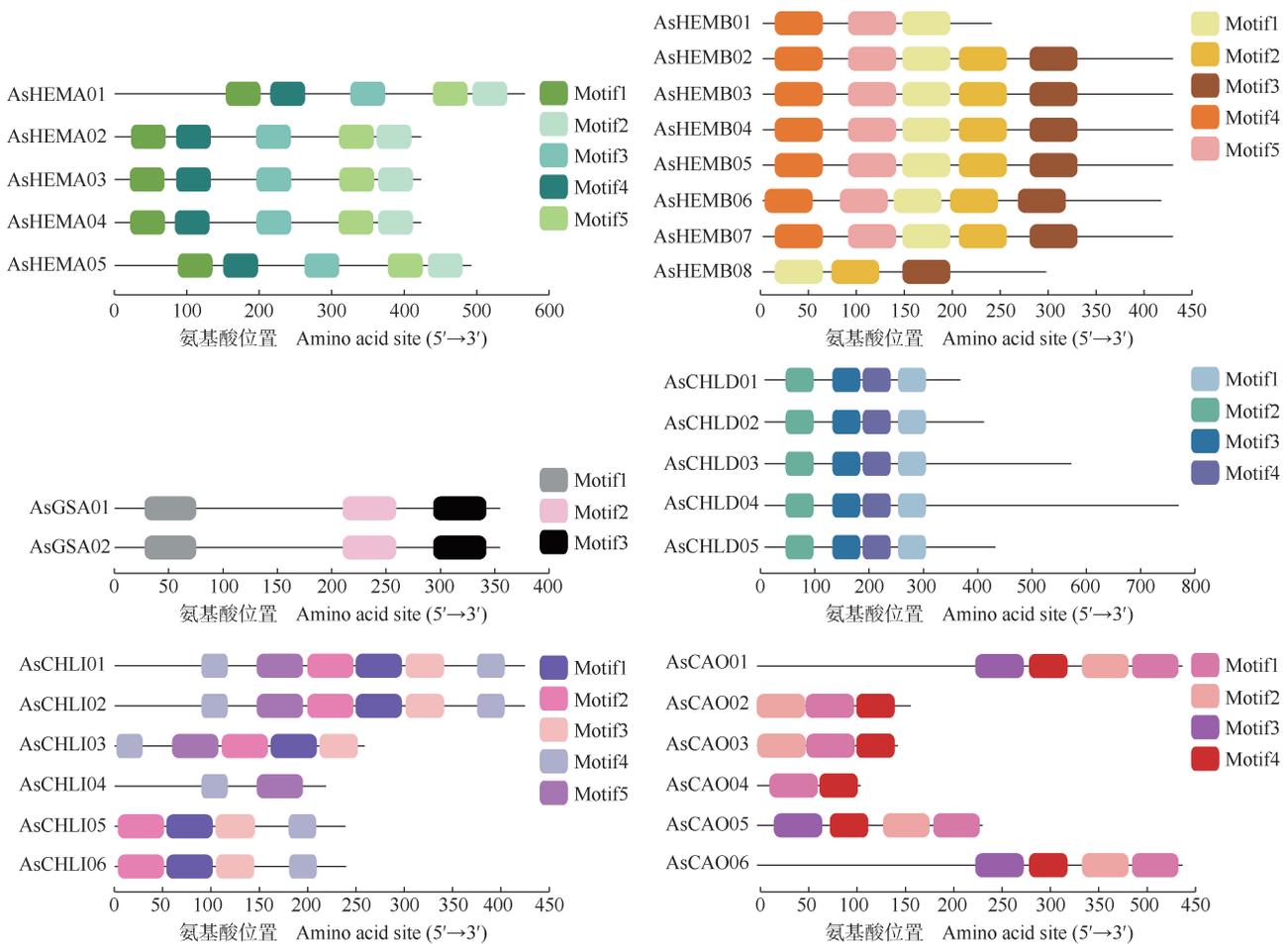


图 4 大蒜叶绿素合成基因家族 unigenes 编码氨基酸序列的保守基序
 Fig. 4 Conserved motifs in amino acid sequences encoded by unigenes in chlorophyll synthesis gene families of *Allium sativum* Linn.

AsCHLI 和 AsCAO 家族相对保守,部分家族成员存在差异。AsHEMB 家族中,AsHEMB01 和 AsHEMB08 的保守基序与其他 6 个成员存在差异,这与构建的进化树的分析结果基本一致,AsHEMB01 和 AsHEMB08 与登录号 XP_034590070.1 (狗尾草) 和 XP_037445707.1 (小麦) 序列在进化上同源性更高; AsCHLI 家族中,AsCHLI05 和 AsCHLI06 与登录号

XP_020273053.1 (石刁柏) 序列的同源性更高,而这 2 条序列均含有 AsCHLI 家族成员中的 motif1、motif2、motif3 和 motif4 这 4 个保守基序,推测这 4 个保守基序在进化上有更为重要的作用; AsCAO 家族中,AsCAO01 和 AsCAO06 的序列最长,含有的保守基序数量也较多,与登录号 QPO14978.1 (玉簪) 序列的同源性更高。



图5 大蒜 *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA* 和 *AsCHLD* 基因家族 unigenes 编码氨基酸序列的保守基序结构
Fig. 5 Structures of conserved motifs in amino acid sequences encoded by unigenes in *AsHEMA*, *AsHEMB*, *AsGSA*, and *AsCHLD* gene families of *Allium sativum* Linn.



图 6 大蒜 *AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族 unigenes 编码氨基酸序列的保守基序结构
 Fig. 6 Structures of conserved motifs in amino acid sequences encoded by unigenes in *AsCHLI* and *AsCAO* gene families of *Allium sativum* Linn.

3 讨 论

叶绿素作为参与植物光合作用的重要色素,在捕获光能和电子传递过程中起着十分重要的作用^[25]。叶绿素合成基因与植物叶色变化和光合特性密切相关。例如:玉簪叶绿素合成酶基因的表达量控制叶绿素含量,玉簪 *HEMA*、*POR* 和 *CAO* 的过量表达促进其叶片的光合作用^[26];小麦 *CHLI* 基因^[27],花叶矢竹 (*Pseudosasa japonica* ‘Akebonosuji’) 的 *PORB* 和 *CAO* 基因^[28] 以及水稻的 *YGLI*、*CHLD* 和 *CHLI* 基因^[29] 在叶片呈色或叶色异变过程中发挥关键作用。叶绿素合成基因的转录不仅与植物自身生长发育状态有关,还受植物所处的外界环境调控。Liu 等^[30] 发现,水分亏缺条件下,水稻的 *HEMA* 和 *CHLH* 基因显著下调;Wang 等^[31] 发现,低温胁迫导致辣椒的 *HEMA1*、*HEMB* 和 *CHLH* 基因的表达量以及叶绿素含量均显著降低。这些研究结果说明植物的光合作用对环境条件非常敏感,参与叶绿素合成的关键酶及其编码基因会受到逆境胁迫的影响。本课题组前期研究发现,干旱胁迫下大蒜叶片变黄,总叶绿素含量显著降低^[6],但干旱胁迫是否对大蒜叶绿素合成基因具有

调控作用目前还未见相关报道。因此,本研究通过挖掘干旱胁迫下大蒜转录组测序数据,筛选鉴定得到 17 个大蒜叶绿素合成基因家族;并通过分析各基因家族 unigenes 在不同干旱胁迫时间的响应模式,发现 *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族 unigenes 在干旱胁迫下表达模式相似,总体呈现先升高后降低的趋势,且均在胁迫 6 d 时相对表达量达到峰值。推测这 6 个基因家族 unigenes 在大蒜干旱胁迫响应中具有协同调控作用。

进一步对 *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族的 32 个 unigenes 进行生物信息学分析,发现这 6 个叶绿素合成基因家族 unigenes 编码氨基酸序列的理化性质存在一定差异,但同一家族成员氨基酸序列的理化性质较相似。从进化树可以看出:这 6 个大蒜基因家族的成员基本上都各自紧密地聚类在一起,具有较高的保守性和相似性,同时与其他植物叶绿素合成基因也具有一定的同源性,推测他们具有相似或相近的生物学功能。结合 RNA-Seq 和 qRT-PCR 的结果,这 6 个叶绿素合成基因家族的成员在应答干旱胁迫中发挥重要作用。其中, *HEMA* 基因作为叶绿素合成限速步骤 (ALA 的合成) 中第 1 步反应的催化酶基因,是植物叶绿素合成

起点的关键基因^[24,32]。*HEMA* 基因家族能够参与植物对逆境的响应。张修德等^[16]分析苹果 *MdHEMA1* 基因的启动子顺式作用元件发现, *MdHEMA1* 基因的转录受干旱胁迫等逆境的诱导。除了 *HEMA* 基因家族, *HEMB* 和 *CHLI* 也是叶绿素响应逆境的重要调控基因家族。孟昭娟^[33]发现弱光逆境下, 番茄 *HEMB* 基因的表达量显著下调, 叶绿素合成水平明显降低。Bhor 等^[34]将黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.) *CHLI* 基因家族成员沉默, 不仅导致叶绿素含量下降, 还使其防御相关基因的表达量显著上调。此外, 虽然不同基因家族成员的功能具有多样性, 但同源性较高的基因家族或成员往往对植物具有类似的调控作用。本研究中, *AsHEMA05* 与石刁柏和玉簪相关基因的同源性较高, *AsHEMB01*、*AsHEMB03* 和 *AsHEMB08* 与小麦相关基因的同源性较高, *AsCHLD05*、*AsCHLD06*、*AsCHLI03* 和 *AsCHLI04* 与石刁柏相关基因的同源性较高, *AsCA001* 和 *AsCA006* 与玉簪相关基因的同源性较高, 说明同为单子叶植物的大蒜与小麦、石刁柏和玉簪的亲缘关系较近。

综上所述, 本研究首次鉴定了大蒜叶绿素合成基因家族成员, 发现大蒜 *AsHEMA*、*AsHEMB*、*AsGSA*、*AsCHLD*、*AsCHLI* 和 *AsCAO* 基因家族在响应干旱胁迫中发挥重要作用, 这将为解析干旱胁迫下大蒜的叶绿素合成基因的功能和作用机制提供了研究基础。

参考文献:

- [1] 李世云, 吕建平, 朱生青. 青海东部地区富硒大蒜栽培及发展方向[J]. 农业开发与装备, 2016(4): 133.
- [2] 高丹娜, 吴淑华, 涂丽琴, 等. 河南大蒜韭葱黄条病毒的分子鉴定及其系统进化分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 875-881.
- [3] SÁNCHEZ-VIROSTA Á, SADRAS V O, SÁNCHEZ-GÓMEZ D. Phenotypic plasticity in relation to inter-cultivar variation of garlic (*Allium sativum* L.) functional performance and yield-stability in response to water availability [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 285: 110128.
- [4] 杨青青, 赵永强, 刘灿玉, 等. 大蒜 *AsPEX7* 基因的克隆与非生物胁迫响应分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(6): 24-31.
- [5] 孙晓晓, 张鑫. 青海省东部农业旱灾风险分析[J]. 灌溉排水学报, 2015, 34(11): 84-88.
- [6] 田萌, 王丽慧, 钟启文, 等. 干旱胁迫对大蒜生长及生理特性的影响[J]. 青海大学学报, 2018, 36(4): 48-53.
- [7] 倪霞, 周本智, 曹永慧, 等. 干旱胁迫对植物光合生理影响研究进展[J]. 江苏林业科技, 2017, 44(2): 34-39, 52.
- [8] 王平荣, 张帆涛, 高家旭, 等. 高等植物叶绿素生物合成的研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 629-636.
- [9] BEALE S I. Green genes gleaned [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(7): 309-312.
- [10] ZENG Z Q, LIN T Z, ZHAO J Y, et al. *OsHemA* gene, encoding glutamyl-tRNA reductase (GluTR) is essential for chlorophyll biosynthesis in rice (*Oryza sativa*) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(3): 612-623.
- [11] XU D, SUN D, DIAO Y, et al. Fast mapping of a chlorophyll *b* synthesis-deficiency gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) via bulked-segregant analysis with reduced-representation sequencing [J]. The Crop Journal, 2019, 7: 58-64.
- [12] PAPANBROCK J, GRÄFE S, KRUSE E, et al. Mg-chelatase of tobacco; identification of a *Chl D* cDNA sequence encoding a third subunit, analysis of the interaction of the three subunits with the yeast two-hybrid system, and reconstitution of the enzyme activity by co-expression of recombinant CHL D, CHL H and CHL I [J]. The Plant Journal, 1997, 12(5): 981-990.
- [13] SAWERS R J H, VINEY J, FARMER P R, et al. The maize *Oil Yellow1 (Oy1)* gene encodes the I subunit of magnesium chelatase [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60(1): 95-106.
- [14] 黄蔚. 温度胁迫对芹菜叶中叶绿素合成与抗坏血酸含量的影响[D]. 南京: 南京农业大学园艺学院, 2017: 33-35.
- [15] 李翠. 转 *YHem1* 基因番茄植株耐盐机理研究[D]. 南京: 南京农业大学园艺学院, 2012: 45-49.
- [16] 张修德, 安秀红, 李壮, 等. 苹果叶绿素合成关键酶基因 *MdHEMA1* 生物信息学和表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(2): 348-355.
- [17] 张亚娟, 闫芳, 李翊华, 等. 不同施氮水平对“民乐紫皮”大蒜光合特性与叶绿素含量及品质的影响[J]. 北方园艺, 2016(7): 31-34.
- [18] 惠伟, 谢欣蔚, 李彩香, 等. 气体 NO 处理大蒜对蒜苗生长和叶绿素荧光特性的影响[J]. 西北农业学报, 2013, 22(9): 141-145.
- [19] 铁原毓, 田洁. 大蒜蔗糖: 蔗糖 1-果糖基转移酶基因 *As-I-SST* 的克隆与表达分析[J]. 核农学报, 2021, 35(11): 2501-2511.
- [20] 杨彦会, 马晓, 张子山, 等. 干旱胁迫对蜡质含量不同小麦近等基因系光合特性的影响[J]. 中国农业科学, 2018, 51(22): 4241-4251.
- [21] 张少平, 张少华, 邱珊莲, 等. 基于转录组测序的紫背天葵花青素相关基因分析[J]. 核农学报, 2018, 32(4): 639-645.
- [22] 贾丽丽, 尹莲, 刘洁霞, 等. 芹菜 *AgLIMS* 基因的克隆和生物信息学分析及其表达特性[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(6): 23-31.
- [23] 姚嘉龙, 郭蓓, 谢皓. 叶绿素合成关键酶基因表达的半定量 RT-PCR 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(3): 593-598.
- [24] 李佳佳, 于旭东, 蔡泽坪, 等. 高等植物叶绿素生物合成研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(18): 6013-6019.

- b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 144: 307–313.
- [21] 罗夏琳, 胡玉斐, 李攻科. 微波辅助消解-电感耦合等离子体原子发射光谱测定烟草中的重金属[J]. *分析科学学报*, 2016, 32(2): 249–252.
- [22] 张守科, 方林鑫, 王毅, 等. 基于组成型抗性性状的油茶抗茶籽象的评价模型[J]. *林业科学*, 2020, 56(12): 67–74.
- [23] PIETRINI F, ZACCHINI M, IORI V, et al. Screening of poplar clones for cadmium phytoremediation using photosynthesis, biomass and cadmium content analyses [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2010, 12: 105–120.
- [24] KAUR R, YADAV P, SHARMA A, et al. Castasterone and citric acid treatment restores photosynthetic attributes in *Brassica juncea* L. under Cd (II) toxicity [J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2017, 145: 466–475.
- [25] PARMAR P, KUMARI N, SHARMA V. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress [J]. *Botanical Studies*, 2013, 54: 45.
- [26] ANSARI A A, GILL S S, GILL R, et al. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants: Vol. 1* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2015: 87–98.
- [27] KUMEROVÁ M, ZEŽULKA Š, KRÁL'OVÁ K, et al. Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita* [J]. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(2): 308–314.
- [28] DOGANLAR Z B, DOGANLAR O, ERDOGAN S, et al. Heavy metal pollution and physiological changes in the leaves of some shrub, palm and tree species in urban areas of Adana, Turkey [J]. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 2012, 24(2): 65–78.
- [29] GRAJEK H, RYDZYŃSKI D, PIOTROWICZ-CIEŚLAK A, et al. Cadmium ion-chlorophyll interaction: examination of spectral properties and structure of the cadmium-chlorophyll complex and their relevance to photosynthesis inhibition [J]. *Chemosphere*, 2020, 261: 127434.
- [30] 黄鑫浩, 朱凡, 胡丰姣, 等. 基于 Lake 模型的 Pb 胁迫对木荷和栎树幼树叶片叶绿素荧光参数的影响研究 [J]. *生态学报*, 2018, 38(4): 1284–1292.
- [31] PIETRINI F, ZACCHINI M, IORI V, et al. Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones [J]. *Plant Biology*, 2010, 12: 355–363.
- [32] PIETRINI F, IANNELLI M A, PASQUALINI S, et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133: 829–837.
- [33] ROSSI L, BAGHERI M, ZHANG W L, et al. Using artificial neural network to investigate physiological changes and cerium oxide nanoparticles and cadmium uptake by *Brassica napus* plants [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 246: 381–389.

(责任编辑: 郭严冬)

(上接第 64 页 Continued from page 64)

- [25] LIU D, KONG D D, FU X K, et al. Influence of exogenous 5-aminolevulinic acid on chlorophyll synthesis and related gene expression in oilseed rape de-etiolated cotyledons under water-deficit stress [J]. *Photosynthetica*, 2016, 54(3): 468–474.
- [26] ZHANG J, SUI C, LIU H, et al. Effect of chlorophyll biosynthesis-related genes on the leaf color in *Hosta* (*Hosta plantaginea* Aschers) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21: 45.
- [27] 王超杰. 小麦淡绿叶突变体 chl1 表型分析、突变基因克隆及功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学农学院, 2020: 111–112.
- [28] 姜可以. 花叶矢竹叶绿素生物合成关键基因 *PjPORB* 和 *PjCAO* 的克隆与功能分析 [D]. 杭州: 浙江农林大学林业与生物技术学院, 2013: 36–39.
- [29] 滕炎桐, 叶莲, 何福收, 等. 一个水稻黄叶突变体的叶绿素合成关键基因的表达分析 [J]. *中国农学通报*, 2017, 33(22): 30–35.
- [30] LIU W, FU Y, HU G, et al. Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 2007, 226(3): 785–795.
- [31] WANG H, LIU Z, LUO S, et al. 5-aminolevulinic acid and hydrogen sulphide alleviate chilling stress in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings by enhancing chlorophyll synthesis pathway [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 167: 567–576.
- [32] MCCORMAC A C, FISCHER A, KUMAR A M, et al. Regulation of *HEMA1* expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(5): 549–561.
- [33] 孟昭娟. 外源钙缓解弱光影响番茄叶片类囊体膜蛋白及叶绿素代谢的机制研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学园艺学院, 2017: 29–59.
- [34] BHOR S A, TATEDA C, MOCHIZUKI T, et al. Inducible expression of magnesium protoporphyrin chelatase subunit I (CHLI)-amiRNA provides insights into cucumber mosaic virus Y satellite RNA-induced chlorosis symptoms [J]. *Virusdisease*, 2017, 28(1): 69–80.

(责任编辑: 张明霞)