

荷花 *NnyGCS* 基因的克隆及表达分析

张阿慧¹, 刘兆磊^{1,①}, 顾春笋², 陈发棣¹, 蒋甲福¹, 陈素梅¹

[1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要: 以荷花品种‘台城拂翠’(*Nelumbo nucifera* ‘Taicheng Focui’)嫩叶为材料,采用简并引物 PCR 和 RACE 技术得到荷花 γ GCS 基因的全长 cDNA 序列,命名为 *NnyGCS*。序列分析结果表明:*NnyGCS* 基因 cDNA 序列的全长为 1 801 bp,其开放阅读框(ORF)长度为 1 569 bp,编码 522 个氨基酸残基。*NnyGCS* 蛋白质的理论相对分子质量为 59 159.0,理论等电点为 pI 6.27,稳定指数为 39.60;该蛋白质无跨膜结构域,但具有 1 个保守的 GCS2 结构域,并被定位于细胞质和叶绿体中,说明 *NnyGCS* 蛋白质较稳定,并属于谷氨酰半胱氨酸连接酶家族。系统进化分析结果表明:荷花 *NnyGCS* 氨基酸序列与龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)和黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)等双子叶植物 γ GCS 氨基酸序列的亲缘关系较近,与水稻(*Oryza sativa* Linn.)等单子叶植物 γ GCS 氨基酸序列的亲缘关系较远。实时荧光定量 PCR 扩增结果显示:*NnyGCS* 基因在荷花各器官中均能表达,且在嫩叶中的相对表达量最高、在茎中的相对表达量最低。不同浓度镉胁迫条件下,*NnyGCS* 基因在荷花嫩叶和须根中的相对表达量及表达趋势差异较大;*NnyGCS* 基因的相对表达量在嫩叶中总体表现为随胁迫时间延长先下降后上升,在须根中表现为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉胁迫 1 h 和 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉胁迫 12 h 时显著高于初始水平、而在其他胁迫时间与初始水平差异不明显。亚细胞定位结果显示:*NnyGCS* 基因能够在洋葱(*Allium cepa* Linn.)表皮细胞的细胞质中表达,说明该基因编码的蛋白质在细胞质中发挥作用。研究结果显示一定浓度的镉胁迫能够诱导 *NnyGCS* 基因的表达。

关键词: 荷花; *NnyGCS* 基因; 克隆; 相对表达量; 镉胁迫; 亚细胞定位

中图分类号: Q943.2; Q786; Q682.32 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)04-0001-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.04.01

Cloning and expression analysis of *NnyGCS* gene from *Nelumbo nucifera* ZHANG Ahui¹, LIU Zhaolei^{1,①}, GU Chunsun², CHEN Fadi¹, JIANG Jiafu¹, CHEN Sumei¹ (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(4): 1-9

Abstract: Taking tender leaf of *Nelumbo nucifera* ‘Taicheng Focui’ as materials, full-length cDNA sequence of γ GCS gene from *N. nucifera* was obtained by degenerate primer-PCR and RACE technologies, the cDNA sequence is named as *NnyGCS*. The results of sequence analysis show that full-length of cDNA sequence of *NnyGCS* gene is 1 801 bp, its open reading frame (ORF) length is 1 569 bp, which encodes 522 amino acid residues. Theoretical relative molecular mass of *NnyGCS* protein is 59 159.0, theoretical isoelectric point is pI 6.27, and stability index is 39.60. The protein has no transmembrane structure domain but with one conserved GCS2 domain and the protein is localized in cytoplasm and chloroplast, indicating that *NnyGCS* protein is stable and belonging to glutamate cysteine ligase modulatory family. The phylogenetic analysis result shows that *NnyGCS* amino acid sequence of *N. nucifera* has a close relationship with γ GCS amino acid sequence of dicotyledon including *Dimocarpus longan* Lour. and *Cucumis sativus* Linn., etc, and has a distant relationship with γ GCS amino acid sequence of monocotyledon including *Oryza sativa* Linn., etc. The amplification results of real-time fluorescence quantitative PCR show that *NnyGCS* gene can be expressed in various organs of *N. nucifera*,

收稿日期: 2015-03-17

基金项目: 国家教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCEI-11-0669); 江苏省科技支撑计划项目(BE2011325)

作者简介: 张阿慧(1988—),女,安徽阜阳人,硕士研究生,主要从事荷花耐重金属的分子生物学研究。

①通信作者 E-mail: lzl@njau.edu.cn

and the relative expression in tender leaf is the highest, that in stem is the lowest. Under cadmium stress with different concentrations, differences in relative expression and expression trend of *NnyGCS* gene in tender leaf and fibrous root of *N. nucifera* are great. Relative expression of *NnyGCS* gene in tender leaf generally appears firstly decreasing and then increasing with prolonging of stress time, that in fibrous root appears significantly higher than original level when $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress for 1 h and $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress for 12 h, while without obvious difference with the original level at other stress times. Subcellular localization result shows that *NnyGCS* gene can express in cytoplasm of epidermal cells of *Allium cepa* Linn., meaning that the protein encoded by this gene plays a role in cytoplasm. It is suggested that Cd stress with a certain concentration can induce *NnyGCS* gene expression.

Key words: *Nelumbo nucifera* Gaertn.; *NnyGCS* gene; cloning; relative expression; Cd stress; subcellular localization

荷花,学名莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.),为中国十大传统名花之一,花大色艳,且地下茎和莲子均能够食用^[1],观赏价值和经济价值具佳;此外,荷花还具有降低水体污染^[2]和积累重金属^[3-4]的潜能。

γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ GCS)是谷胱甘肽(GSH)合成过程中的限速酶,能够调节GSH的合成并受GSH的反馈调节^[5],编码该合成酶的基因即为 γ GCS基因。GSH能够参与调节植物的多种抗逆过程^[6], γ GCS基因在植物的抗逆过程中也有所响应,例如受干旱、低温和过氧化胁迫等非生物胁迫诱导后 γ GCS基因的表达水平发生明显变化^[7-9];过量表达 γ GCS基因的芥菜[*Brassica juncea* (Linn.) Czern.]较其野生型具有更强的镉积累能力,而且对重金属胁迫的耐受力也有所增强^[10];镉胁迫下番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller)^[11]和玉米(*Zea mays* Linn.)^[12]植株的 γ GCS酶活性分别增强2和8倍,且随着镉浓度升高 γ GCS酶活性逐渐增强。

植物螯合素(phytochelatin, PC)又称植物螯合肽,是GSH衍生的金属离子结合肽,能够螯合环境中的重金属离子,有效降低重金属对植物的毒害作用^[13]。冯保民等^[14]将从荷花中克隆获得的植物螯合素基因*NnPCs*转化到拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]中进行异源表达,结果显示镉胁迫下转*NnPCs*基因的拟南芥中该基因的表达增强,且其生长状况优于野生型,体内的镉积累量也显著高于野生型,说明*NnPCs*基因能够提高拟南芥植株的重金属耐受能力和镉积累能力。

GSH是PC合成的前体,因此,明确荷花 γ GCS基因的结构和功能对于研究该基因在积累重金属和解除重金属毒害中的作用具有重要意义。鉴于此,作者以荷花品种‘台城拂翠’(‘Taicheng Focui’)的嫩叶为

实验材料,采用简并引物PCR和RACE技术获得荷花 γ GCS基因的全长cDNA序列,并对该基因进行序列特征、表达模式和表达定位分析,以期为进一步阐明在荷花积累重金属的过程中 γ GCS基因的作用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试荷花品种‘台城拂翠’来源于南京艺莲苑有限公司;实验于2013年4月在南京农业大学花卉遗传与育种实验室内进行。取长约15 cm的根状茎,用等量沙土种植于长50 cm、宽38 cm、高29 cm的周转箱中,每个周转箱种植1株;注入自来水,直至水面超过沙土表面15 cm;将周转箱置于避雨温室内培养,当水面低于沙土表面时及时补充水分。

实验用RNA快速提取试剂盒购自北京原平皓生物技术有限公司,DNA片段纯化回收试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0)、Real-Time PCR Kit(SYBR Green)、DNase I、*Sal* I、*Not* I、*Pvu* I、*T*₄ DNA连接酶、LR重组酶和pMD19-T载体均购自宝生物工程(大连)有限公司,cDNA合成试剂盒(SuperScript III Reverse Transcriptase)、5'RACE试剂盒(5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Kit Version 2.0)、pENTR1A载体和pMDC43载体均为美国Invitrogen公司产品,大肠杆菌DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司;所有引物的合成和测序均委托上海捷瑞生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及cDNA合成 培养7至8周后,任意选取1株具7或8枚叶片的健康荷花植株,

采集鲜嫩叶片并包于锡纸内,液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。称取 0.1 g 嫩叶样品,参照RNA快速提取试剂盒说明书上的操作流程提取获得总RNA样品,并用DNase I去除总RNA中残留的少量DNA;用质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总RNA样品的完整性。按照cDNA合成试剂盒说明书上的操作流程合成cDNA,并使用荷花内参基因 *NnActin* 检测cDNA质量。

1.2.2 荷花 γGCS 基因全长 cDNA 序列的克隆 根据 GenBank 数据库中登录的洋葱 (*Allium cepa* Linn.)、黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.)、拟南芥和百脉根 (*Lotus corniculatus* Linn.) 等植物的 GCS 氨基酸序列的保守序列设计 1 对简并引物 GCS-F 和 GCS-R,引物序列分别为 $5'-\text{CCCTCTGGAGACCCTCAYCARACNTG}-3'$ 和 $5'-\text{GAAGATGGTGGTCAGGTGGTTYTCCCARTC}-3'$;以荷花叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应,反应体系总体积 $25\text{ }\mu\text{L}$,包括 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ cDNA 模板 $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{PCR buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mg}^{2+}$ $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs $2.0\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 及 $5.0\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ *rTaq* DNA 聚合酶 $0.2\text{ }\mu\text{L}$,用灭菌双蒸水补足体积。扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s ,共 35 个循环;最后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。

回收扩增产物并将其连接到 pMD19-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1.5 h ;将感受态细胞涂布在含有 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体培养基上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养;挑取单克隆菌落,接种至含有 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2 h ;对菌液 DNA 进行 PCR 检测,选取含有目的条带(即 γGCS 基因保守序列)的单个阳性克隆进行测序。

根据上述克隆获得的荷花 γGCS 基因的中间保守序列设计 2 条 5'RACE 反向引物 GCS-51 和 GCS-52,引物序列分别为 $5'-\text{CCTTCGCCTFACAACCAGAG}-3'$ 和 $5'-\text{AGCATCATCTGTAGGGGGGC}-3'$;接头引物为 AAP 和 AUAP,引物序列分别为 $5'-\text{GGCCACGCGTGC ACTAGTACGGGHHGGGHHGGHHG}-3'$ 和 $5'-\text{GGCCACGC GTCGACTAGTAC}-3'$ 。并设计 2 条 3'RACE 正向引物 GCS-31 和 GCS-32,引物序列分别为 $5'-\text{ATGAGAAG CCACATTTGGACCGACAC}-3'$ 和 $5'-\text{TGGGTTTGAGCA GTATGTGA}-3'$;接头引物为 Jiang-T 和 Jiang-R,引物序列分别为 $5'-\text{CTGATCTAGAGGTACCGATCCTTT}$

$\text{TTTTTTTTTTTTTT}-3'$ 和 $5'-\text{CTGATCTAGAGGTACCGG ATCC}-3'$ 。5'RACE 的 2 轮扩增程序均为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min ,共 35 个循环;最后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。3'RACE 的扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min ,共 35 个循环;最后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min 。分别对 5'RACE 和 3'RACE 扩增产物进行纯化和回收,将其连接到 pMD19-T 载体上并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞;按照上述筛选方法用 Amp 进行筛选,挑取单个阳性克隆进行测序。

将测序得到的 3'RACE 片段、5'RACE 片段及中间保守片段进行拼接,得到荷花 γGCS 基因的全长序列,并根据拼接结果设计全长引物 GCS-WF 和 GCS-WR,引物序列分别为 $5'-\text{ATTCTATCACTCGACACTCA AAGCC}-3'$ 和 $5'-\text{TCAATATAACAGCTCCTCAAAAATG GGATCCACGCATTGACCCC}-3'$ 。使用上述引物对荷花 γGCS 基因的全长序列进行验证,扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min ,共 35 个循环;最后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min 。回收扩增产物,将其与 pMD19-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞;按照上述筛选方法用 Amp 进行筛选,挑取单个阳性克隆进行测序。

1.2.3 序列分析 利用 GenBank 内的 ORF finder 工具查找序列的开放阅读框 (ORF);采用 BLASTp 软件进行序列比对分析,选择与荷花 γGCS 氨基酸序列同源的其他植物的 γGCS 氨基酸序列、用 ClustalX 1.83 软件进行多重比对,利用 MEGA 5.1 软件中的 neighbor-joining (NJ) 法构建系统进化树。利用在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测荷花 γGCS 基因编码的蛋白质的理论相对分子量及理论等电点 (pI);采用 TMHMM Sever v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测该蛋白质的跨膜结构域;采用 wolf PSORT (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>) 对该蛋白质进行亚细胞定位预测;采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析该蛋白质的保守结构域。

1.2.4 荷花 γGCS 基因的表达分析 任意选取长势一致的 3 株荷花,分别采集各单株的剑叶(刚萌出、未展开的叶片)、嫩叶(刚刚展开的叶片)、成熟叶、叶柄(成熟叶的叶柄)、茎和须根,各称取 0.1 g ,用于 γGCS 基因的组织定量表达分析,每个样品设 3 次重复。

在塑料花盆(上口径 25 cm、高 28 cm)中分别装入 200 和 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 溶液 2 L, 植入正常生长的荷花植株进行胁迫培养, 每盆 1 株; 于胁迫培养 0、1、3、6、12 和 24 h 时每处理各选取 3 株样株, 分别采集每株样株的嫩叶和须根各 0.1 g, 经液氮速冻后于 -80°C 保存、备用。

按照 RNA 快速提取试剂盒说明书上的操作流程分别提取嫩叶和须根样品的总 RNA, 取 1 μg 总 RNA, 按照 cDNA 合成试剂盒说明书上的操作流程合成 cDNA 第 1 链; 将获得的 cDNA 稀释 30 倍, 采用设计的定量引物 GCS-RTF 和 GCS-RTR 进行扩增反应, 引物序列分别为 5'-GCTTATTTCCCAGCCAAGTC-3' 和 5'-TCTCGGCACTCCATAACAAG-3', 反应体系总体积 20 μL 。参考张计育等^[15]的方法和条件进行实时荧光定量 PCR 反应, 并用 7300 Real Time PCR System 软件和 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[16]进行分析。

1.2.5 荷花 γGCS 基因表达载体的构建和亚细胞定位 以正确提取的质粒 DNA 为模板, 采用含酶切位点的引物 GCS-*Sal* I 和 GCS-*Not* I (引物序列分别为 5'-CGCGTCGACATGATGGCGCTTATTTCCCAGCCAAGTCC-3' 和 5'-AAAGCGGCCGCGATCAATATAACAGCTCCTCAAAAATGGGAT-3') 扩增荷花 γGCS 基因的

ORF; 回收扩增产物, 分别用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Not* I 对扩增出的目的片段进行双酶切, 并利用 T_4 DNA 连接酶将其连接到 pENTR1A 载体中; 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 按照上述筛选方法用 Amp 进行筛选, 挑取单个阳性克隆进行测序。提取测序正确的阳性克隆菌液中的质粒 DNA, 使用 *Pvu* I 进行单酶切后得到线性化产物; 利用 LR 重组酶与 pMDC43 载体进行重组, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并按照上述筛选方法用 Amp 进行筛选; 挑取单个阳性克隆, 采用 pMDC43 载体引物 pMDC43-Test-F 和 pMDC43-Test-R (引物序列分别为 5'-CGTCGTCCTTG AAGAAGATGG-3' 和 5'-TGAATTAGATGGTGATGTTA ATGGG-3') 以及 γGCS 基因特异引物 GCS-T-F 和 GCS-T-R (引物序列分别为 5'-CCCTCTGGAGACCCT CAYCARACNTG-3' 和 5'-GAAGATGCTGCTCAGGTG GTTYTCCARTC-3') 进行 PCR 检测, 经测序验证载体构建的正确性。

构建的 pMDC43- γGCS 表达载体含 2 个 35S 启动子和 GFP 荧光信号 (见图 1), 利用基因枪轰击法^[17]将该表达载体转化到在 MS 高渗培养基上培养 16 h 的洋葱表皮细胞中, 获得高效瞬时表达, 暗培养 16 h 后在激光共聚焦显微镜下观察细胞的荧光。

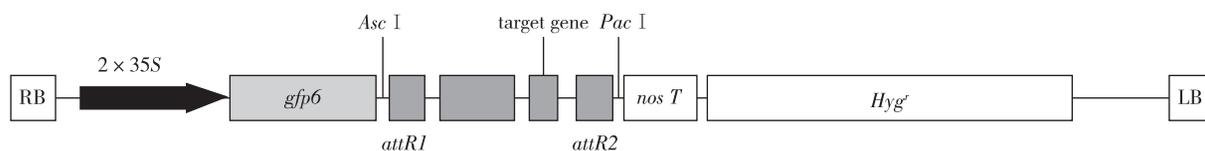


图 1 荷花 γGCS 基因表达载体的结构图
Fig. 1 Structure chart of expression vector of γGCS gene from *Nelumbo nucifera* Gaertn.

2 结果和分析

2.1 荷花 γGCS 基因全长序列分析

利用简并引物扩增获得荷花 γGCS 基因的保守中间片段, 长度为 619 bp; 其 3'RACE 和 5'RACE 片段长度分别为 596 和 668 bp。将中间片段、3'RACE 和 5'RACE 片段进行拼接, 得到总长度为 1 801 bp 的片段, 即为荷花 γGCS 基因的全长 cDNA 序列。序列分析结果 (图 2) 表明: 该序列包含 194 bp 的 3'非编码区、38 bp 的 5'非编码区以及 1 569 bp 的开放阅读框 (ORF), 共编码 522 个氨基酸残基。预测结果显示:

荷花 γGCS 基因编码的蛋白质的理论相对分子质量为 59 159.0; 理论等电点为 pI 6.27, 稳定指数为 39.60, 表明该蛋白质较稳定。跨膜结构域和亚细胞定位的预测结果显示: 荷花 γGCS 蛋白质无跨膜结构域, 且该蛋白质位于细胞质和叶绿体中。通过保守结构域分析可知, 荷花 γGCS 蛋白质具有 1 个保守的 GCS2 结构域, 属于谷氨酰半胱氨酸连接酶家族。

多重比对结果显示 (图 3): 根据获得的基因序列推导出的氨基酸序列与百脉根、洋葱、龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.)、巴西橡胶树 [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.]、黄瓜和拟南芥的 γGCS 氨基酸序列的一致性分别为 87%、85%、

```

1  cctaaattctatcactcgacactcaaagccagggacacatgatggcgcttatttcccagc
      M M A L I S Q P
61  caagtcacatccagctacattcgttctgaacataatgtcgccggcaacatggaagatagga
      S P S S Y I R S E H N V A G N M E D R I
121  ttgtctcgaggggtaaagcatataaaatgaaggaaggctggactgggttcttcttcttctgt
      V S R G K A Y K M K E G W T G S S S L L
181  tatggagtcccgagaaagtgccacgaatttcgcatttggatggtttgaggggcaaacgta
      W S A E K V P R I S H L D G L R G K R R
241  gatatcggacaattgttctgcaagccccctacagatgatgctgtaattgttacagaac
      Y R T I V A A S P P T D D A V I V T E P
301  cgttgactaaaaaggacctttaggataccttgccctctggttgaaggcgaaggagaatt
      L T K K D L V G Y L A S G C K A K E N W
361  ggaggataggtacagaavatgaaaagtttggttttgagattggaactttacatcctataa
      R I G T E H E K F G F E I G T L H P I K
421  aatagaacaaaataaaggacttgcctaatgcttctgagagattgactgggataaaa
      Y E Q I K D L L N G L A E R F D W D K I
481  taatggaaggagacaacattattggacttaaccaggggaagcaaacatatacactggagc
      M E G D N I I G L N Q G K Q S I S L E P
541  ctggtggtcaatttgagcttagtggtgcaccccttgaacattacatcaaacctgtgcag
      G G Q F E L S G A P L E T L H Q T C A E
601  aggttaattcacacctttatcaggtaaaagctgttgccagaggagttggaattgggtttt
      V N S H L Y Q V K A V A E E L G I G F L
661  tagggattggttccagcccaatgggggctgaaagatatacctataatgccaaagggaa
      G I G F Q P K W G L K D I P I M P K G R
721  ggtatgggattatgaggaaatgvatgcccaaagttggctctctgggacttgatatgatgt
      Y G I M R K Y M P K V G S K G K D M M F
781  ttaggacatgtactgttcaggtaatctggacttcagttctgagtcagacgtgatcagga
      R T C T V Q V N L D F S S E S D V I R K
841  aagttcgtgctggttcttgcctatggcaccagcagtttttgcaaatcacct
      V A G L A L Q P I A T A V F A N S P F
901  ttactgaaggaaaaccaatggctatctcagcatgagaagccacatttggaccgacactg
      T E G K P N G Y L S M R S H I W T D T D
961  ataacaatcgactggcatgcttcttttggttttgatgactcatttgggtttgagcagt
      N N R T G M L P F V F D D S F G F E Q Y
1021  atgtggaatatgctcttgatgttctatgtattttgtgtatcgaataagagatatattg
      V E Y A L D V P M Y F V Y R N K R Y I D
1081  actgactggaatgtcttccgggactttatggcaggaaaactgccttctataccagcgc
      C T G M S F R D F M A G K L P S I P G E
1141  aattgccaaactctcaatgactgggagaaccacctgaccaccatcttcccagaggtcagc
      L P T L N D W E N H L T T I F P E V R L
1201  tgaagagatatattggaatgagggcgctgatggaggaccttggaggagattatgtgctt
      K R Y L E M R G A D G G P W R R L C A L
1261  tgccagcatttgggtgggcttattatgatgaagtatctttacaacatgttcttgata
      P A F W V G L L Y D E V S L Q H V L D M
1321  tgactgcagattggactttggaagaacgacagatggttgagaaataaggtaccaaagactg
      T A D W T L E E R Q M L R N K V P K T G
1381  gtctgaagactccatttcgagatggtttggaggcatggtgcagaagatgtcttagagt
      L K T P F R D G L L R H V A E D V L E L
1441  tggcaaaggatggcctggaaagaagaggatataaagaacaggattcttgaaggaagtga
      A K D G L E R R G Y K E T G F L K E V T
1501  ctgaggtagttaggacaggtataacgccaaactgaaaagcttttggattataccatggga
      E V V R T G V T P T E K L L E L Y H G S
1561  gctggggtcaatgcgtggatcccattttgaggagctgttatattgaggtgaattgatat
      W G Q C V D P I F E E L L Y *
1621  tccttagtgctgttcagttgtaacctccctttgatttcatagattttttttttttttttt
1681  tgctctgaaccagagacagtttctggttgcattacaatataattctgtaggaatgattt
1741  gtatatcattggcactctgtcctgaactatgacctagtttttcaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1801  a

```

* : 终止密码子 Stop codon.

图2 荷花 γ GCS 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence of γ GCS gene from *Nelumbo nucifera* Gaertn. and amino acid sequence encoded by the γ GCS gene

AC	.MASISQLQP.....NQSRCWQLE.....RKGFSSLS...SSFLN....FEKNAKNLRGKFFVS	48
AT	.MALLSQAGGSYTVVPSGVCSKTGTAKAVVSGVVRNLDVLRMKEAFGSSNSRSLSTKSMML....HSVKRSKRGHQLVA	74
BJ	0
CS	.MALASHTGSAHRIGAETLRCRGGNMAFNFS..THAESLKMKEILLGSSSLSCSSGNIMHGLHIDSARMASKRGGRVIVA	77
LC	.MPVISRLG.....SSMHHAFFVP.....QTFDASHAR....KSSFV....AASGSSRRGRRLIVA	47
NN	MIALLSQPSSSYIRSEHNVAENMEDRIVS...RGKAYMKKEGWTGSSLLWSAEKVPR..ISHLDGLRGRRYRTIVA	74
HB	.MKLVSAHPSYCVF...TEISKTSQNVVFGVTNRIEASKQKEKCFRSSLLCNSIKTPG...VPRECLRIRGNQLVVA	73
AC	ASPPTEDAVVMTPELTKEDLVAYLASGCKTDEKWRIGTEHEKFGFQINTLRFMTYEQIAYLLNGIAERFDWEKVMEGLYV	128
AT	ASPPTEEAVVATEPLTREDDLIAYLASGCKTDEKWRIGTEHEKFGFEVNTLRFMKYDQIABLLNGIAERFDWEKVMEGDKI	154
BJEPLTREDDLIAYLASGCKSDEKWRIGTEHEKFGFEVNTLRFMKYEQIABLLNSTAERFDWEKVMIEGDKI	68
CS	ASPPTEDAIVAREPLTKEDLVAYLASGCKTDEKWRIGTEHEKFGFNIEITLRFMKYEQIAGLLNGIAERFDWEKVMIEGDKI	157
LC	ASPPTEDAVVATEPLTKEDLVAYLASGCKTDEKWRIGTEHEKFGFELGSLRFMKYEQIABLLNGIAERFDWEKVMIEGDKI	127
NN	ASPPTEDAVIVTPELTKEDLVAYLASGCKTDEKWRIGTEHEKFGFEIGTLHFYKYEQIKDLLNGIAERFDWEKVMIEGDKI	154
HB	ASPPTEEDTVIAREPLTKEDLVAYLASGCKTDEKWRIGTEHEKFGFELGTLRFMKYEQIADLLNGIAERFDWEKVMIEGDKI	153
AC	IGLQGGKQISISLEPGGFELSGAPLETLHQTCAEVNSHLYQVKAVAEDMIGIFLGIGFQPKWRREDIPIFMPKGRYDIMRN	208
AT	IGLQGGKQISISLEPGGFELSGAPLETLHQTCAEVNSHLYQVKAVAEDMIGIFLGIGFQPKWRREDIPIFMPKGRYDIMRN	234
BJ	IGLQGGKQISISLEPGGFELSGAPLETLHQTCAEVNSHLYQVKAVAEDMIGIFLGIGFQPKWRREDIPIFMPKGRYDIMRN	148
CS	IGLQGGKQISISLEPGGFELSGAPLETLHQTCAEVNSHLYQVKAVAEDMIGIFLGIGFQPKWRREDIPIFMPKGRYDIMRN	237
LC	IGLQGGKQISISLEPGGFELSGAPLETLHQTCAEVNSHLYQVKAVAEDMIGIFLGIGFQPKWRREDIPIFMPKGRYDIMRN	207
NN	IGLQGGKQISISLEPGGFELSGAPLETLHQTCAEVNSHLYQVKAVAEDMIGIFLGIGFQPKWRREDIPIFMPKGRYDIMRN	234
HB	IGLQGGKQISISLEPGGFELSGAPLETLHQTCAEVNSHLYQVKAVAEDMIGIFLGIGFQPKWAVREDIPIFMPKGRYDIMRN	233
AC	YMPKVGSMGLDMMFRTCTVQVNLDFSESMDMIRKFRAGLALQPIATAFANSFFTGKPNCF...LSKRSHIWTITDNNRS	286
AT	YMPKVGTLGLDMMFRTCTVQVNLDFSEADMIRKFRAGLALQPIATAFANSFFTGKPNCF...LSMRSHIWTITDKRT	312
BJ	YMPKVGSLGLDMMFRTCTVQVNLDFSEADMIRKFRVGLALQPIATAFANSFFTGKPNCF...LSMRSHIWTITDKRT	226
CS	YMPKVGSLGLDMMFRTCTVQVNLDFSEADMIRKFRAGLALQPIATAFANSFFTGKPNCF...LSMRQIWTITDNNRT	315
LC	YMPKVGSLGLDMMFRTCTVQVNLDFSEADMIRKFRAGLALQPIATAFANSFFKEGKPNCF...LSMRSHIWTITDKRT	285
NN	YMPKVGSLGLDMMFRTCTVQVNLDFSESMDMIRKFRAGLALQPIATAFANSFFTGKPNCF...LSMRSHIWTITDNNRT	312
HB	YMPKVGSLGLDMMFRTCTVQVNLDFSEADMIRKFRAGLALQPIATAFANSFFTGKPNCF...LSMRSHIWTITDNNRT	313
AC	GMLPFVFDSDFGFQYVDYALDVPMEFYRKNKYDCTGMSFRFEMAGKLPCEPGELETLDWENHLTTIFPEVRLKRYL	366
AT	GMLPFVFDSDFGFQYVDYALDVPMEFYRKNKYDCTGMSFRFELAGKLPCEPGELETLDWENHLTTIFPEVRLKRYL	392
BJ	GMLPFVFDSDFGFQYVDYALDVPMEFYRKNKYDCTGMSFRFELAGKLPCEPGELETLDWENHLTTIFPEVRLKRYM	306
CS	GMLPFVFDSDFGFQYVDYALDVPMEFYRKNKYDCTGMSFRFEMAGKLPCEPGELETLDWENHLTTIFPEVRLKRYL	395
LC	GMLPFVFDSDFGFQYVDYALDVPMEFYRKNKYDCTGMSFRFELAGKLPCEPGELETLDWENHLTTIFPEVRLKRYL	365
NN	GMLPFVFDSDFGFQYVDYALDVPMEFYRKNKYDCTGMSFRFEMAGKLPCEPGELETLDWENHLTTIFPEVRLKRYL	392
HB	GMLPFVFDSDFGFQYVDYALDVPMEFYRKNKYDCTGMSFRFEMAGKLPCEPGELETLDWENHLTTIFPEVRLKRYL	393
AC	EMRGDGGPWRRRLCALPAFWVGLLYDDESLQAILDLTADWTPAEPREMLRNKVFVTGLKTPFRDGLLKHVAEDVLKLAQGG	446
AT	EMRGDGGPWRRRLCALPAFWVGLLYDDESLQAILDLTADWTPAEPREMLRNKVFVTGLKTPFRDGLLKHVAEDVLKLAQGG	472
BJ	EMRGDGGPWRRRLCALPAFWVGLLYDDESLQAILDLTADWTPAEPREMLRNKVFVTGLKTPFRDGLLKHVAEDVLKLAQGG	386
CS	EMRGDGGPWRRRLCALPAFWVGLLYDDESLQAILDLTADWTPAEPREMLRNKVFVTGLKTPFRDGLLKHVAEDVLKLAQGG	475
LC	EMRGDGGPWRRRLCALPAFWVGLLYDDESLQAILDLTADWTPAEPREMLRNKVFVTGLKTPFRDGLLKHVAEDVLKLAQGG	445
NN	EMRGDGGPWRRRLCALPAFWVGLLYDDESLQAILDLTADWTPAEPREMLRNKVFVTGLKTPFRDGLLKHVAEDVLKLAQGG	472
HB	EMRGDGGPWRRRLCALPAFWVGLLYDDESLQAILDLTADWTPAEPREMLRNKVFVTGLKTPFRDGLLKHVAEDVLKLAQGG	473
AC	LERRCEKEGFLNEVAEVRTGVTEPEKLLDYHCEWGCQVDPIFEELL	495
AT	LERRCEKEGFLNEVAEVRTGVTEPEKLLDYHCEWGCQVDPIFEELL	521
BJ	LERRCEKEGFLNEVAEVRTGVTEPEKLLDYHCEWGCQVDPIFEELL	435
CS	LERRCEKESGFLNEVAEVRTGVTEPEKLLDYHCEWGCQVDPIFEELL	524
LC	LERRCEKESGFLNEVAEVRTGVTEPEKLLDYHCEWGCQVDPIFEELL	494
NN	LERRCEKEGFLNEVAEVRTGVTEPEKLLDYHCEWGCQVDPIFEELL	521
HB	LERRCEKEGFLNEVAEVRTGVTEPEKLLDYHCEWGCQVDPIFEELL	522

AC: 洋葱 *Allium cepa* Linn.; AT: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; BJ: 芥菜 *Brassica juncea* (Linn.) Czern.; CS: 黄瓜 *Cucumis sativus* Linn.; LC: 百脉根 *Lotus corniculatus* Linn.; NN: 荷花 *Nelumbo nucifera* Gaertn.; HB: 巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.

图3 荷花与其他6种植物的γGCS基因编码的氨基酸序列的比对分析

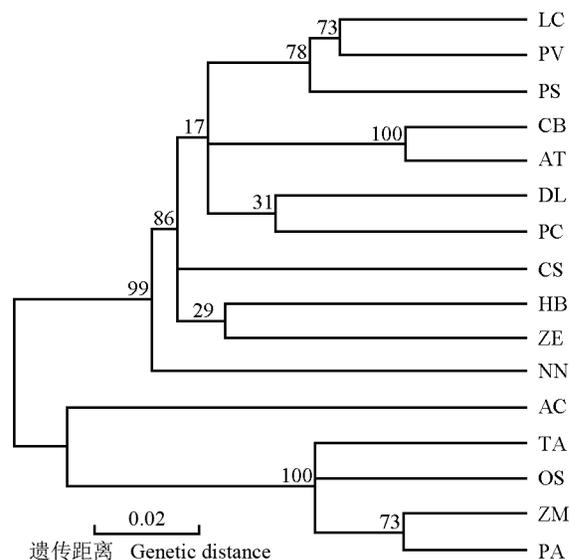
Fig. 3 Comparison analysis on amino acid sequences encoded by γGCS gene from *Nelumbo nucifera* Gaertn. and other six species

81%、80%、78%和76%。据此确定获得的序列为荷花γGCS基因,命名为NnyGCS。

2.2 基于γGCS氨基酸序列的荷花与其他植物的系统进化分析

基于 GenBank 中龙眼、百脉根和玉米等 15 种植

物的γGCS氨基酸序列及本研究预测的荷花NnyGCS氨基酸序列构建系统进化树(图4)。这些植物的γGCS氨基酸序列在进化过程中比较保守,主要分为双子叶植物和单子叶植物2个大类,其中,荷花与龙眼和百脉根等10个种类聚为一组,均为双子叶植物,



图中数据为置信度 Datums in the figure are confidence. LC: 百脉根 *Lotus corniculatus* Linn.; PV: 菜豆 *Phaseolus vulgaris* Linn.; PS: 豌豆 *Pisum sativum* Linn.; CB: 高山离子芥 *Chorispora bungeana* Fisch. et C. A. Mey.; AT: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; DL: 龙眼 *Dimocarpus longan* Lour.; PC: 豆梨 *Pyrus calleryana* Dec.; CS: 黄瓜 *Cucumis sativus* Linn.; HB: 巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.; ZE: 百日菊 *Zinnia elegans* Jacq.; NN: 荷花 *Nelumbo nucifera* Gaertn.; AC: 洋葱 *Allium cepa* Linn.; TA: 小麦 *Triticum aestivum* Linn.; OS: 梗稻 *Oryza sativa* subsp. *japonica* Kato; ZM: 玉米 *Zea mays* Linn.; PA: 芦苇 *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

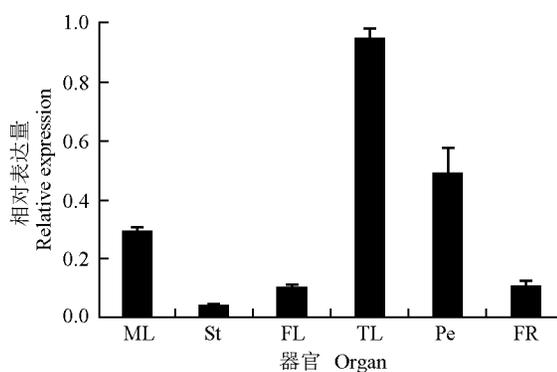
图4 基于 γ GCS 氨基酸序列构建的荷花与其他植物的 NJ 系统树
Fig. 4 NJ phylogenetic tree of *Nelumbo nucifera* Gaertn. and other species based on γ GCS amino acid sequence

与水稻和玉米等5种单子叶植物的亲缘关系较远。

2.3 荷花 *NnyGCS* 基因的表达分析

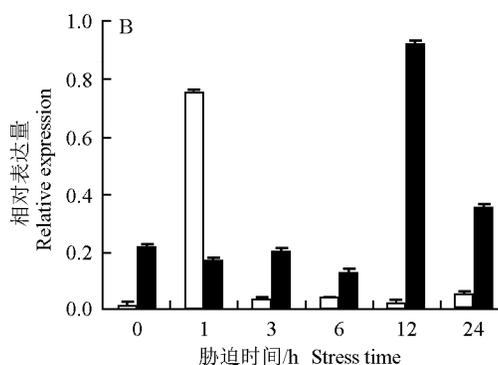
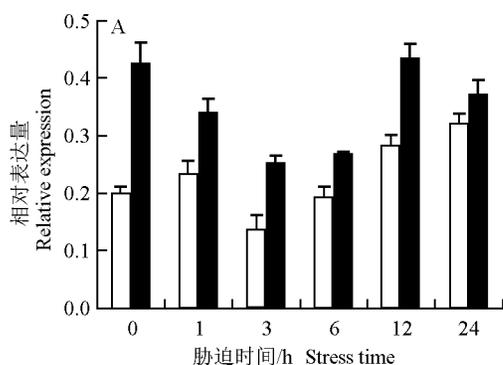
以荷花的 *NnActin* 基因为内参, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析荷花 *NnyGCS* 基因在不同组织中的表达状况, 结果见图5。分析结果显示: 荷花的 *NnyGCS* 基因在其须根、茎和叶片中均能够表达, 但表达量差异明显, 该基因在各组织中的相对表达量从高到低依次排序为嫩叶、叶柄、成熟叶、须根、剑叶、茎。

不同浓度镉胁迫条件下荷花嫩叶和须根中 *NnyGCS* 基因的表达特征见图6。由图6-A 可见: 在



ML: 成熟叶 Mature leaf; St: 茎 Stem; FL: 剑叶 Flag leaf; TL: 嫩叶 Tender leaf; Pe: 叶柄 Petiole; FR: 须根 Fibrous root.

图5 荷花不同器官中 *NnyGCS* 基因的相对表达量
Fig. 5 Relative expression of *NnyGCS* gene in different organs of *Nelumbo nucifera* Gaertn.



□: 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; ■: 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd.

图6 不同浓度镉胁迫条件下荷花嫩叶(A)和须根(B)中 *NnyGCS* 基因相对表达量的变化
Fig. 6 Change in relative expression of *NnyGCS* gene in tender leaf and fibrous root of *Nelumbo nucifera* Gaertn. under cadmium stress with different concentrations

200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫条件下, 嫩叶中 *NnyGCS* 基因的相对表达量在胁迫 1 h 时略升高, 胁迫 3 h 时明显下降, 胁迫 6、12 和 24 h 逐渐升高, 胁迫 24 h 时较初始水平(胁迫 0 h)明显升高; 在 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁

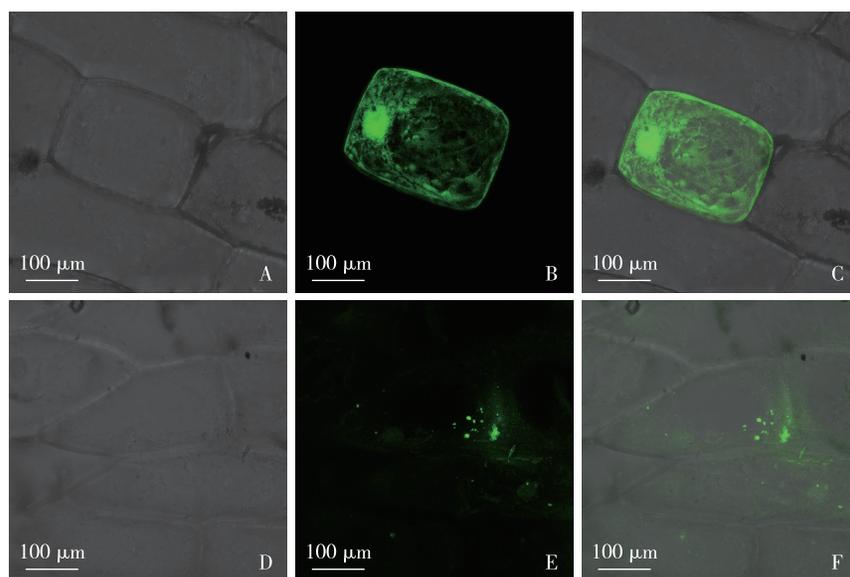
迫条件下, 嫩叶中 *NnyGCS* 基因的相对表达量在胁迫 1 和 3 h 时持续下降, 胁迫 6 和 12 h 时逐渐升高, 胁迫 24 h 时又略有下降且低于初始水平。

由图6-B 可见: 不同浓度镉胁迫条件下 *NnyGCS*

基因在须根中相对表达量的变化与嫩叶中存在较大差异。在 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫条件下,须根中 *NnyGCS* 基因的相对表达量在胁迫 1 h 时显著升高,随后下降至初始水平,之后保持在稳定状态,变化幅度较小;而在 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫条件下,须根中 *NnyGCS* 基因的相对表达量在胁迫 1、3 和 6 h 时均略低于初始水平,在胁迫 12 h 时显著升高,胁迫 24 h 时虽有一定下降但仍高于初始水平。

2.4 荷花 *NnyGCS* 基因的表达定位分析

采用洋葱表皮细胞对荷花 *NnyGCS* 基因表达进行亚细胞定位,结果(图 7)显示:该基因表达的蛋白质荧光仅出现在细胞质中,并呈分散状态,而液泡和质膜中没有荧光,与该蛋白质跨膜结构域的预测结果部分一致。虽然该基因在细胞质和叶绿体中均能表达^[18],但由于本研究所用材料为洋葱表皮,无法观察到叶绿体,因而仅在细胞质中观察到该基因的表达。



A,B,C. pMDC43 载体 pMDC43 vector; A. 可见光 Visible light; B. GFP; C. 叠加 Merged.
D,E,F. pMDC43- γ GCS 载体 pMDC43- γ GCS vector; D. 可见光 Visible light; E. GFP; F. 叠加 Merged.

图 7 洋葱表皮细胞中荷花 *NnyGCS* 基因表达的亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localization of expression of *NnyGCS* gene from *Nelumbo nucifera* Gaertn. in epidermal cells of *Allium cepa* Linn.

3 讨 论

序列分析结果显示:荷花 *NnyGCS* 蛋白与其他植物的 γ GCS 蛋白具有相同的 GCS2 结构域,为谷胱甘肽合成过程中的限速酶。比对结果显示:荷花 *NnyGCS* 蛋白的氨基酸序列与百脉根 γ GCS 蛋白的氨基酸序列一致性最高(87%),与拟南芥 γ GCS 蛋白的氨基酸序列一致性最低(76%)。在进化关系上,荷花 γ GCS 基因属于双子叶植物类,与龙眼和百脉根等双子叶植物的亲缘关系较近,与水稻等单子叶植物的亲缘关系较远,表明该基因在进化过程中具有保守性。在进化过程中, γ GCS 基因的 C 端氨基酸比较保守,而 N 端则约有 100 个氨基酸残基存在较大差异。不同

植物 γ GCS 基因的 ORF 编码的氨基酸残基数变化较大(百脉根为 435 个、小麦为 374 个、荷花为 522 个),这种差异不仅体现了不同物种间的差异性,也体现了相同基因的多态性。

GSH 广泛存在于植物体中,参与调节植物的多种抗性机制^[19]。 γ GCS 蛋白为 GSH 合成过程中的限速酶,直接影响 GSH 的生物合成量。表达分析结果显示:*NnyGCS* 基因在荷花的各个组织器官中均能够表达,说明该基因在荷花中没有组织特异性,能够在荷花各组织器官的生长发育过程中发挥作用。这一研究结果与巴西橡胶树的相关研究结果一致^[20]。

荷花 *NnyGCS* 基因的表达量对重金属镉胁迫有一定的响应,大体表现为随胁迫时间延长 *NnyGCS* 基因的相对表达量先下降后升高,与镉胁迫下番茄中

γ GCS 酶活性的变化趋势一致^[11],推测这可能是由于 γ GCS 酶能够催化合成 GSH,继而合成 PC 来抵御重金属对植物的伤害,说明镉胁迫条件下 PC 合成受镉胁迫诱导^[21-22]。然而,在不同浓度镉胁迫条件下,荷花须根中 *NnyGCS* 基因的表达模式不同,高浓度 ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}$) 镉胁迫条件下该基因的响应时间反而延迟,其响应机制有待深入研究。

利用基因枪轰击法将 *NnyGCS* 基因表达的蛋白质定位于细胞质中,说明该蛋白质在细胞质中发挥相应的生理功能,与该蛋白质跨膜结构域的预测结果一致。其作用过程可能是该蛋白质在细胞质中催化合成 GSH,进而合成 PC,PC 与重金属结合后被运至液泡内,从而降低重金属对细胞的伤害^[23]。虽然 Hell 等^[24]证实 γ GCS 基因表达的蛋白质还存在于叶绿体内,但是由于本研究所用材料为洋葱表皮,无法观察到该基因在叶绿体中的表达情况,因而,还需采用合适的材料对此进行进一步的实验验证。

参考文献:

- [1] 王其超,张行言. 荷花发展前景:从中国视角展望[J]. 中国园林, 2011, 27(1): 50-53.
- [2] 聂雅萍,冯子云,刘波,等. 荷花净化水质能力分析[J]. 林业调查规划, 2006, 31(增刊): 110-112.
- [3] VAJPAYEE P, SHARMA S C, TRIPATHI R D, et al. Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. [J]. Chemosphere, 1999, 39: 2159-2169.
- [4] KUMAR M, CHIKARA S, CHAND M K, et al. Accumulation of lead, cadmium, zinc, and copper in the edible aquatic plants *Trapa bispinosa* Roxb. and *Nelumbo nucifera* Gaertn. [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 69: 649-654.
- [5] LIU Z L, GU C S, CHEN F D, et al. Heterologous expression of a *Nelumbo nucifera* phytochelatin synthase gene enhances cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 166: 722-734.
- [6] TAKAO H, HIROSHI N, TORU N, et al. Crystal structure of γ -glutamylcysteine synthetase: insights into the mechanism of catalysis by a key enzyme for glutathione homeostasis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101: 15052-15057.
- [7] XIANG C B, Oliver D J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10: 1539-1550.
- [8] SENGUPTA D, RAMESH G, MUDALKAR S, et al. Molecular cloning and characterization of γ -glutamyl cysteine synthetase (*VrgECS*) from roots of *Vigna radiate* (L.) Wilczek under progressive drought stress and recovery [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30: 894-903.
- [9] 陈坤明,宫海军,王锁民. 植物谷胱甘肽代谢与环境胁迫[J]. 西北植物学报, 2004, 24(6): 1119-1130.
- [10] ZHU Y L, PILON-SMITS E A H, TARUN A S T, et al. Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase [J]. Plant Physiology, 1999, 121: 1169-1177.
- [11] CHEN J J, GOLDSBROUGH P B. Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance [J]. Plant Physiology, 1994, 106: 233-239.
- [12] RÜEGSEGGER A, BRUNOLD C. Effect of Cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings [J]. Plant Physiology, 1992, 99: 428-433.
- [13] MAY M J, VERNOUX T, SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ R, et al. Evidence for posttranscriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase during plant stress responses [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95: 12049-12054.
- [14] 冯保民,麻密. 植物络合素及其合酶在重金属抗性中的功能研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(6): 657-661.
- [15] 张计育,佟兆国,高志红,等. SA、MeJA、ACC 和苹果轮纹病病原菌诱导湖北海棠 *MhWRKY1* 基因的表达 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(5): 990-999.
- [16] 汪仁,蔡黎丽,徐晟,等. 石蒜 Mg^{2+} 转运体基因 *LrMGT* 的克隆与分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(4): 1-7.
- [17] SONG A P, LOU W H, JIANG J F. An isoform of eukaryotic initiation factor 4E from *Chrysanthemum morifolium* interacts with *Chrysanthemum virus B* coat protein [J]. PLoS One, 2013, 8: e57229.
- [18] VÖGELILANGE R, WAGNER G J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves [J]. Plant Physiology, 1990, 92: 1086-1093.
- [19] LI W, LI Z M, YE Q. Enzymatic synthesis of glutathione using yeast cells in two-stage reaction [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010, 33: 675-682.
- [20] 邓治,刘向红,覃碧,等. 巴西橡胶树 *HbgCS* 基因克隆及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(8): 772-778.
- [21] WEIS J S, WEIS P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration [J]. Environment International, 2004, 30: 685-700.
- [22] COBBETT C S. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification [J]. Plant Physiology, 2000, 123: 826-832.
- [23] ZENK M H. Heavy metal detoxification in higher plants: a review [J]. Gene, 1996, 179: 21-30.
- [24] HELL R, BERGMANN L. γ -glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization [J]. Planta, 1990, 180: 603-612.

(责任编辑:佟金凤)