

杂交兰镁原卟啉IX甲酯环化酶基因的克隆 与转录表达分析

林榕燕¹ 陈艺荃² 吴建设¹ 林兵¹ 叶秀仙¹ 钟淮钦^{1*}

(¹福建省农业科学院作物研究所/福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013;

²福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福州 350003)

摘要 镁原卟啉IX甲酯环化酶被认为是与叶绿素生物合成相关的重要酶之一。为了探究其编码基因(*MPEC*)在杂交兰叶色变异中的功能, 该研究基于杂交兰叶片转录组测序数据, 采用RT-PCR技术, 以杂交兰‘紫妍氏’K21及其叶艺品系K21-3叶片为材料, 克隆得到杂交兰*MPEC*基因的2个ORF序列, 并对其生物信息及表达情况进行分析。杂交兰*ChMPEC1*和*ChMPEC2*基因的ORF序列长度均为1 221 bp, 共编码406个氨基酸, 两者存在2个差异氨基酸。生物信息学分析表明, *ChMPEC1*和*ChMPEC2*编码的蛋白质可能是一种稳定的亲水性蛋白质, 属于Ferritin-like家族。进化树分析发现, 杂交兰*ChMPEC1*和*ChMPEC2*与同属于兰科植物的墨兰、桃红蝴蝶兰和铁皮石斛亲缘关系较近。qPCR结果显示, 在不同组织比较中, *ChMPEC*基因的表达情况为叶>茎>根; 在不同发育时期比较中, *ChMPEC*基因的相对表达量从高到低依次为中苗期、小苗期和试管苗期; 不同品系比较中, *ChMPEC*基因的相对表达量在K21中显著高于K21-3。通过叶绿素含量测定及其与*ChMPEC*基因相对表达量相关性分析, 发现*ChMPEC*基因相对表达量与叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素存在显著或极显著正相关, 推测该基因参与杂交兰叶绿素的合成途径, 且在K21-3叶艺形成中起一定作用。上述研究结果可为杂交兰叶艺形成机理研究提供参考依据。

关键词 杂交兰; *MPEC*基因; 基因克隆; qPCR

Cloning and Transcription Expression Analysis of Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester Cyclase Gene in *Cymbidium* Hybrid

LIN Rongyan¹, CHEN Yiquan², WU Jianshe¹, LIN Bing¹, YE Xiuxian¹, ZHONG Huaiqin^{1*}

(¹Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China; ²Agricultural Engineering and Technology Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase has been considered to be an important enzyme which related to chlorophyll biosynthesis. In order to explore the function of *MPEC* (Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase) gene in leaf color variation, the cDNA of *MPEC* gene was successfully cloned from the leaves of *Cymbidium* hybrid ‘Purple Element’ (K21) and its new strain K21-3 by RT-PCR on the basis of tran-

收稿日期: 2020-06-09 接受日期: 2020-08-25

福建省自然科学基金(批准号: 2019J01113)、福建省农业科学院英才项目(批准号: YC2019001)、福建省农业科学院对外合作项目(批准号: DEC201821212)和福建省农业科学院科技创新团队(批准号: STIT2017-2-9)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87572540, E-mail: zhqeast@163.com

Received: June 9, 2020 Accepted: August 25, 2020

This work was supported by Natural Science Fund Project of Fujian Province (Grant No.2019J01113), the Gifted Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.YC2019001), the Foreign Cooperation Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.DEC201821212) and the Technology Innovation Team by Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.STIT2017-2-9)

*Corresponding author. Tel: +86-591-87572110, E-mail: zhqeast@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5355>

scriptome sequencing results in this study. Meanwhile, the biological information and expression of gene were analyzed. The ORF sequence lengths of *ChMPEC1* and *ChMPEC2* were both 1 221 bp, and they encoded 406 amino acids. There were two different amino acids in *ChMPEC1* and *ChMPEC2*. Bioinformatics analysis showed that *ChMPEC1* and *ChMPEC2* might be stable hydrophilic proteins, and they belonged to the Ferritin-like family. The phylogenetic tree analysis showed that *ChMPEC1* and *ChMPEC2* of *Cymbidium* hybrid were closely related to that of *Cymbidium sinense*, *Phalaenopsis equestris* and *Dendrobium catenatum* from Orchidaceae. qPCR results indicated that the relative expression of *ChMPEC* in different tissues was as follows: leaves>stems>roots. The expression level of *ChMPEC* in descending order was at middle seedling stage, seedling stage and test-tube plantlets stage in the comparison of different development stages. Among the different strains, the expression level of *ChMPEC* in K21 was significantly higher than that of K21-3. Correlation analysis results showed that there were close correlations among *ChMPEC* gene expression, chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll. It was speculated that this gene was involved in the synthetic pathway of chlorophyll in *Cymbidium* hybrid and played a role in the formation of K21-3 leaf color variation. The above research results can provide a reference for the study on the formation mechanism of leaf color variation in *Cymbidium* hybrid.

Keywords *Cymbidium* hybrid; *MPEC* gene; gene cloning; qPCR

杂交兰(*Cymbidium* hybrid)是一类由国兰与大花蕙兰杂交选育出的新品种,兼具亲本的优良特性,极具市场发展潜力,其中叶艺品种观叶胜观花,深受消费者的青睐,经济价值成倍增长^[1-3]。鉴于叶艺性状对兰科植物商品价值的促进作用,若能揭示其叶色突变即叶艺形成的机理,将对兰科植物产业发展产生重要的意义。近年来,科研人员陆续从生理、分子及细胞结构等方面探讨不同兰科植物叶艺形成的机理^[4-7],但相较于模式植物,兰科植物叶艺形成的相关报道还很少,叶艺性状形成的机制仍然不清楚。

对一些模式植物(如水稻和拟南芥)叶色突变体的研究表明,叶色变异主要是源于调控叶绿素生物合成与分解代谢以及叶绿体发育与形成相关基因的突变,在这些代谢过程中,任何一个酶的编码基因发生突变都有可能引起叶片变化^[8-10]。叶绿素在植物光合作用中发挥着重要作用,其生物合成是一个非常复杂的多步骤的过程,在拟南芥中,叶绿素的合成途径至少有20个相关基因参与^[11]。镁原卟啉IX甲酯环化酶(Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase, *MPEC*)是叶绿素合成过程中一个必不可少的酶,催化镁原卟啉甲酯转换为原叶绿素a^[12]。*MPEC*的核心活性组分包括双铁基序和一个亮氨酸拉链,目前,编码活性组分的同源基因已在微生物和植物中被发现,并根据物种材料分别被命名为*acsF*、*PNZIP*、*Crd1*、*Cth1*、*Chl27*、*NTZIP*、*PeMPEC*、*chlE*等^[13-16]。如*PNZIP*是从裂叶牵牛中分离出来的一

个*MPEC*同源基因,其表达主要受内部生物钟和光敏色素的调控^[17];*Chl27*为拟南芥中克隆得到的*Crd1*同源基因,将反义*Chl27*转入拟南芥中,转基因植株叶片表现为褪绿或者黄化,叶绿体合成受阻,说明该基因在拟南芥叶绿素合成过程中发挥着重要作用^[18]。目前,关于*MPEC*基因在观赏植物中的报道较少,有关杂交兰的相关研究更是空白。因此,本研究在转录组测序数据的基础上,以杂交兰‘紫妍氏’及其叶艺品系‘中透紫妍氏’为材料,采用RT-PCR技术克隆得到*MPEC*基因的序列,并进行了生物信息学分析和定量表达分析,同时对相应材料的叶绿素含量进行测定,为后续杂交兰*MPEC*基因的功能验证及杂交兰叶艺品系的叶艺形成机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以杂交兰‘紫妍氏’(‘Purple Element’,编号为K21,叶片绿色)和其叶艺品系‘中透紫妍氏’(编号为K21-3,叶片中间具黄白色宽条纹,尖端绿色)叶片为材料进行*MPEC*基因的克隆;以K21和K21-3的不同组织、K21不同时期叶片为材料,进行基因的定量表达分析和叶绿素含量测定。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA的提取及cDNA第一链的合成 杂交兰不同材料总RNA提取参照通用植物总RNA提取试剂盒(BioTeke)中的操作说明进行,产物经琼脂糖

表1 杂交兰MPEC基因克隆及荧光定量PCR所用引物

Table 1 The primers used in MPEC cloning and qRT-PCR in *Cymbidium* hybrid

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	作用 Function
AP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T) ₁₇ -3'	Reverse transcription primer
MPEC-F	5'-ATG GCG GCA ACA GCT ACA GCA G-3'	For the cDNA of ORF
MPEC-R	5'-TCA ATA AAC AAG CTT CGG CTC-3'	
ChACT-F	5'-GGG TGC TTA TGT TGG TGA TG-3'	For the internal control
ChACT-R	5'-TTC AGA GGG GCT TCA GTA AGG-3'	
MPEC-RT-F	5'-AGT ATC GGC TCT ACC CTA TCT TCA AGT ACT T-3'	For the expression of MPEC
MPEC-RT-R	5'-CGC TGT TGT TCG GTT GGT CTC AAT GAT G-3'	

(1%)凝胶电泳和分光光度计检测其完整性和纯度,合格产物用于cDNA第一链的合成,合成步骤参照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(TaKaRa)的操作说明并略作修改,采用AP接头作为引物进行逆转录,产物于-20℃保存。

1.2.2 MPEC基因引物设计及扩增条件 根据杂交兰转录组测序获得的MPEC基因序列,设计一对引物MPEC-F/MPEC-R(表1),用于开放阅读框(open reading frame, ORF)的扩增。扩增体系为50 μL,其中2× PCR buffer for KOD Fx、2.0 mmol/L dNTP Mixture、10 μmol/L的上游引物、10 μmol/L的下游引物、100 ng/μL的模板cDNA、1.0 μL KOD Fx(1 U/μL)和ddH₂O的用量分别为25 μL、10 μL、1.5 μL、1.5 μL、1 μL、1 μL和10 μL。扩增程序:94℃预变性2 min;98℃变性10 s,51℃退火30 s,68℃延伸80 s,30个循环;68℃延伸7 min。扩增产物通过琼脂糖(1%)凝胶电泳进行检测后,将回收的目的片段连接载体pMD18-T,经转化大肠杆菌DH5α、菌液PCR检测,挑选阳性克隆送至铂尚生物技术(上海)有限公司完成测序。

1.2.3 生物信息学分析 将获得的ChMPEC1和ChMPEC2基因翻译为氨基酸序列,并利用蛋白质分析软件进行蛋白质理化性质、跨膜结构、亚细胞定位、保守结构域、二级结构、进化树等信息的比对分析,本研究所用分析软件主要有在线ExpASY(<https://www.expasy.org/resources>)、在线CBS Prediction Servers(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)、在线Conserved Domain Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、在线WoLFPSORT(<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>)、DNAMAN、MEGA 5.0等。

1.2.4 杂交兰MPEC基因定量表达分析 以K21不同发育时期的根、茎、叶及K21-3试管苗时期的根、茎、叶cDNA为模板,ChACT为内参基因,采用SYBR Premix Ex Taq™试剂盒并参照其操作说明,在7500 Real-Time PCR System仪上检测目的基因MPEC在杂交兰不同材料中的相对表达量。相对定量分析采用比较Ct法,目的基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.2.5 叶绿素含量测定 以K21不同发育时期的根、茎、叶及K21-3试管苗时期的根、茎、叶为材料,用ddH₂O清洗供试材料,待室温晾干后,采用95%乙醇溶液浸提法,测定供试材料在波长为649 nm和665 nm下的吸光度(D)值,并计算分析叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量。

1.3 数据分析

本研究中涉及的数据统计、显著性分析、相关性分析等均采用Excel 2007和SPSS 20.0软件完成。

2 结果与分析

2.1 杂交兰MPEC基因ORF序列的获得

以杂交兰K21绿色叶片和K21-3叶艺区叶片cDNA为模板,进行PCR扩增,得到约1 200 bp的条带(图1),测序发现,K21中获得的基因序列与K21-3中获得的基因序列存在6个碱基的差异。在线BLAST检索分析序列发现,获得的2个cDNA序列与墨兰、绿萝、茶树等植物同源性均高于80%,确定得到的片段序列为杂交兰MPEC基因序列,命名为ChMPEC1和ChMPEC2。ChMPEC1和ChMPEC2均包含1个长度为1 221 bp的完整ORF,共编码406个氨基酸,GenBank登录号分别为MN640069和MT210097。

2.2 MPEC基因生物信息学分析

ChMPEC1的分子量为47.05 kDa,理论等电点

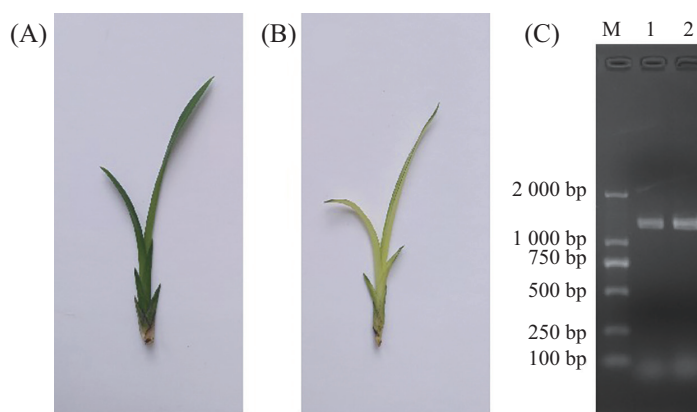
为8.96, 不稳定系数为34.07, 脂肪系数为81.50; 总平均疏水指数 (grand average of hydropathy, GRAVY) 为-0.286; ChMPEC2的分子量为47.02 kDa, 理论等电点为8.87, 不稳定系数为34.82, 脂肪系数为81.75; 总平均疏水指数 (GRAVY) 为-0.279; 推测ChMPEC1和ChMPEC2均为亲水性稳定蛋白质。经信号肽、跨膜结构和卷曲螺旋结构预测分析, 推测ChMPEC1和ChMPEC2蛋白质均不含信号肽, 无跨膜结构, 无卷曲螺旋结构, 两者定位于叶绿体 (chloroplast, chlo) 的可能性最大。经保守结构域预测分析, 推测ChMPEC1和ChMPEC2蛋白质均含有一个MPEC (PLN02508) 保守结构域 (51~406 aa), 属于Ferritin-like家族。经二级结构分析, 推测ChMPEC1二级结构中以 α -螺旋(alpha helix)和无规则卷曲(random coil)为主, 所占比率分别为55.91%和31.03%, 以延伸链(extended strand)和 β -转角(beta turn)为辅, 所占比率分别为8.87%和4.19%; ChMPEC2二级结构中以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 所占比率分别为56.40%和31.28%, 以延伸链和 β -转角为辅, 所占比率

分别为8.87%和3.45%(图2)。

2.3 杂交兰MPEC基因编码氨基酸的序列比对与进化分析

利用DNAMAN软件对杂交兰ChMPEC1和ChMPEC2推导的氨基酸序列与其他植物MPEC基因的氨基酸序列进行序列多重比对分析。结果显示, 这9个序列比对的一致性达90.85%(图3), 其中, ChMPEC1和ChMPEC2推导的氨基酸序列存在两个氨基酸的差异, ChMPEC2中第47位由苏氨酸(T)变为丙氨酸(A), 第366位由赖氨酸(K)变为谷氨酰胺(Q), ChMPEC1和ChMPEC2氨基酸序列的一致性达99.51%。通过比对还发现, ChMPEC1和ChMPEC2含有亮氨酸拉链和2个保守的谷氨酸和组氨酸残基组成的EXnDEXRH元件。

采用MEGA 5.0软件的邻位相连法 (Neighbor-joining) 构建MPEC系统进化树, 除ChMPEC1和ChMPEC2蛋白质序列外, 另从NCBI数据库中下载具有代表性的15种不同物种的MPEC蛋白质序列。由系统进化树结果(图4)可推测, 所选蛋白序列被分

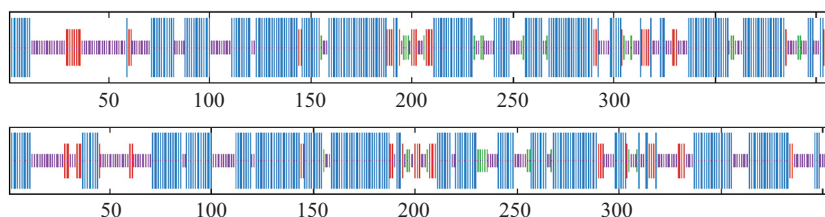


A: K21; B: K21-3; C: 扩增产物图; M: DL2000 marker; 1: K21扩增条带; 2: K21-3扩增条带。

A: K21; B: K21-3; C: amplification product figure; M: DL2000 marker. 1: K21 amplification bands; 2: K21-3 amplification bands.

图1 供试材料及含完整开放阅读框的MPEC扩增产物

Fig.1 The tested materials and amplification product of MPEC gene with whole ORF



蓝色: α -螺旋; 绿色: β -转角; 紫色: 无规则卷曲; 红色: 延伸链。

Blue: alpha-helix; green: beta-turn; purple: random coil; red: extended strand.

图2 杂交兰ChMPEC1和ChMPEC2蛋白质二级结构预测

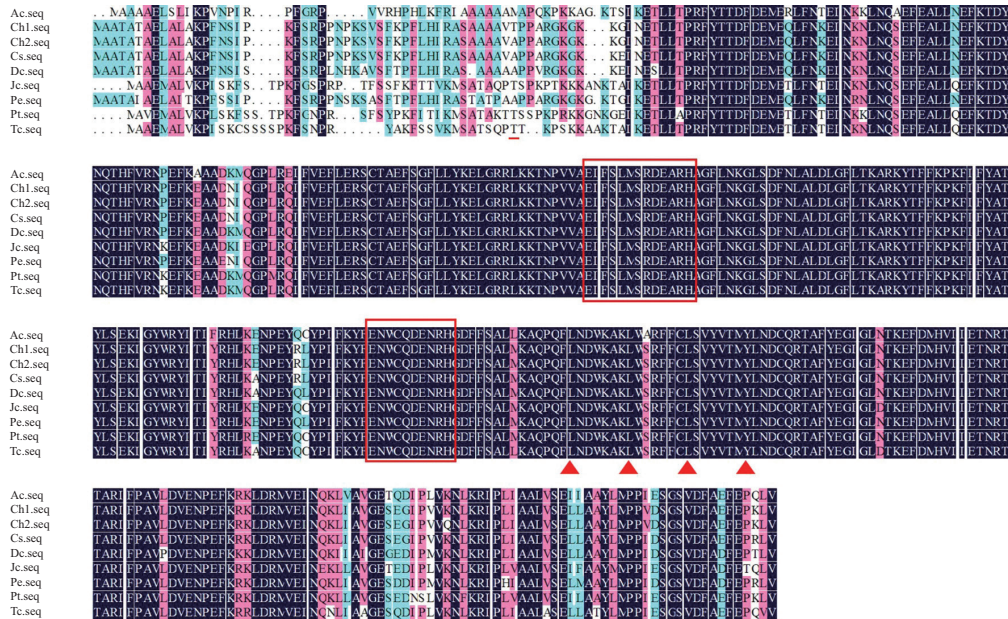
Fig.2 Prediction of secondary structures of ChMPEC1 and ChMPEC2 in *Cymbidium* hybrid

为4个分支,第I分支为8个双子叶植物蛋白序列;第II、III和IV分支中均为单子叶植物蛋白序列,其中第III分支包含了兰科的5个蛋白序列和天南星科的

绿萝蛋白序列,杂交兰就处于这一分支。

2.4 杂交兰ChMPEC基因相对定量表达分析

为了研究ChMPEC基因在杂交兰K21和K21-3

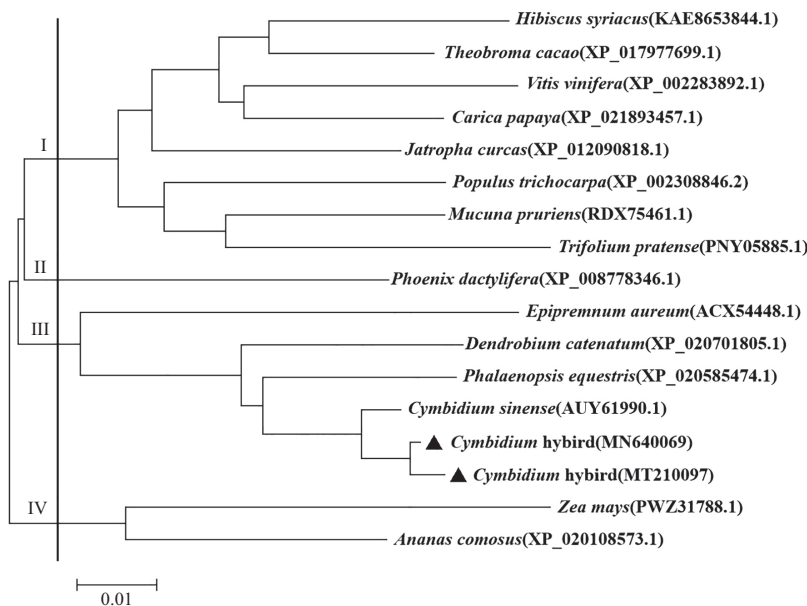


Ac: 菠萝; Ch: 杂交兰; Cs: 墨兰; Dc: 铁皮石斛; Jc: 麻风树; Pe: 桃红蝴蝶兰; Pt: 毛果杨; Tc: 可可; 方框为2个保守元件; 三角形为亮氨酸拉链; 下划线为ChMPEC1和ChMPEC2的差异氨基酸。

Ac: *Ananas comosus*; Ch: *Cymbidium hybrid*; Cs: *Cymbidium sinense*; Dc: *Dendrobium catenatum*; Jc: *Jatropha curcas*; Pe: *Phalaenopsis equestris*; Pt: *Populus trichocarpa*; Tc: *Theobroma cacao*; The boxes are two conservative elements; Triangle are leucine zipper; Underlines are differences in amino acid of ChMPEC1 and ChMPEC2.

图3 杂交兰MPEC氨基酸序列与其他植物多重比对

Fig.3 Multiple alignment of the amino acid sequence of MPEC among *Cymbidium hybrid* and other plants



黑三角代表本试验获得的ChMPEC1和ChMPEC2。

The black triangles represent ChMPEC1 and ChMPEC2 obtained in this experiment.

图4 杂交兰与其他植物MPEC系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of MPEC in *Cymbidium hybrid* and other plants

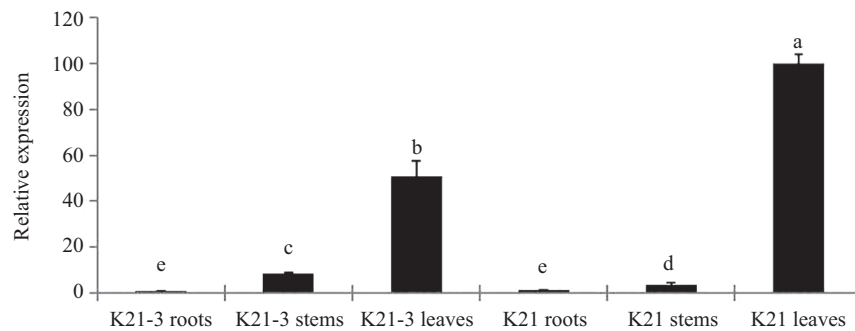
不同组织中的差异,以试管苗期K21和K21-3的根、茎、叶cDNA为模板,以杂交兰*Actin*基因为内参,在*Actin*基因和*ChMPEC*基因熔解曲线均为单峰的情况下,通过qRT-PCR分析*ChMPEC*基因的表达情况。如图5所示,*ChMPEC*基因在不同组织中均有表达,叶中的相对表达量显著高于根和茎中的相对表达量;在K21-3叶中,*ChMPEC*基因的相对表达量是K21-3根中相对表达量的288.77倍,是K21-3茎中表达量的6.02倍;在K21叶中*ChMPEC*基因的相对表达量是K21根中相对表达量的297.84倍,是K21茎中表达量的26.34倍。在不同品系比较中,发现K21叶中*ChMPEC*基因的相对表达量显著高于K21-3叶中的相对表达量。

试验还比较*ChMPEC*基因在K21试管苗期、小苗期及中苗期叶片中的表达量。由图6可知,*ChMPEC*基因的表达量在K21中苗期叶片中最高,显著高于试管苗期和小苗期叶片中该基因的表达量;小苗

期叶片中*ChMPEC*基因的表达量虽然高于试管苗期叶片中该基因的表达量,但两者差异不显著。

2.5 杂交兰不同材料叶绿素含量差异分析

以试管苗期K21和K21-3的根、茎、叶为材料,对叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量进行分析(图7)。如图所示,在不同组织比较中,叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量均表现为叶>茎>根,K21-3叶中叶绿素a和总叶绿素含量显著高于茎和根,K21-3叶、茎和根中的叶绿素b含量无显著性差异;K21叶、茎和根中叶绿素a和总叶绿素含量呈显著性差异,K21叶中的叶绿素b含量显著高于茎和根,但茎和根中的叶绿素b含量无显著性差异。在不同品系比较中,K21根、茎、叶中叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量均高于K21-3中相应的组织,且K21叶中叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量显著高于K21-3叶中的三者含量。通过比较叶绿素a与叶绿素b的比值(*Chla/b*值),发现K21-3叶中的*Chla/b*值高于K21叶中的*Chla/b*值。

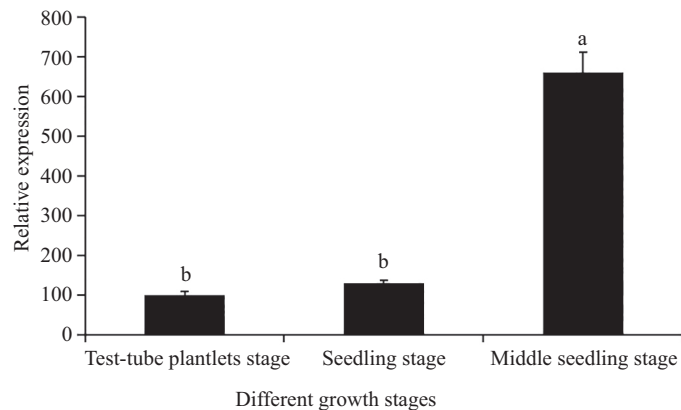


将试管苗期K21叶中的基因相对表达量定为100%。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

The gene expression in leaves of K21 with test-tube plantlets stage was set as 100%. Different normal letters represented significant difference ($P < 0.05$).

图5 K21和K21-3不同组织中*ChMPEC*基因的相对表达量

Fig.5 Expression levels of *ChMPEC* in different tissues of K21 and K21-3



将试管苗期K21叶中的基因相对表达量定为100%。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

The gene expression in leaves of K21 with test-tube plantlets stage was set as 100%. Different normal letters represented significant difference ($P < 0.05$).

图6 K21不同发育时期叶片中*ChMPEC*基因的相对表达量

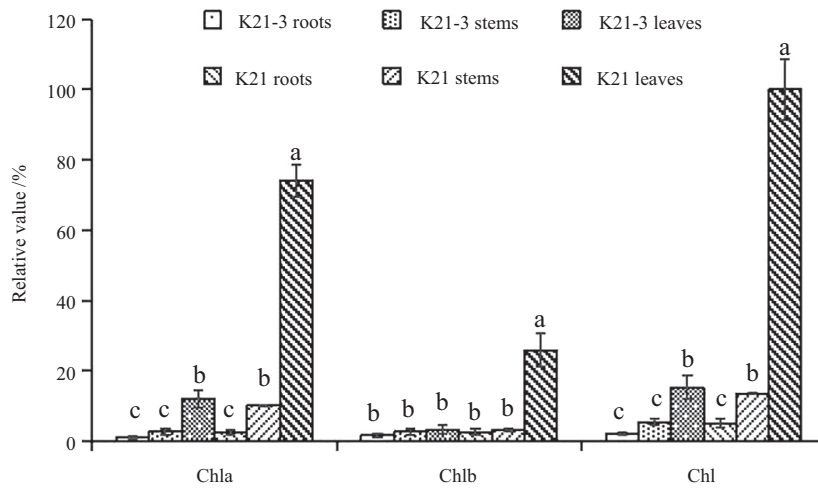
Fig.6 Expression levels of *ChMPEC* in leaves of K21 at different growth stages

此外, 试验还比较了试管苗期、小苗期、中苗期叶片中叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量。由图8可知, 中苗期叶片中叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量最高, 显著高于试管苗期和小苗期叶片中的三者含量; 小苗期叶片中叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量虽然高于试管苗期叶片, 但差异不显著。通过对叶绿素a和叶绿素b含量比较中发现, 不同发育时期叶片中叶绿素a含量均高于叶绿素b含量, Chla/b值范围为2.30~2.90。

2.6 ChMPEC基因相对表达量与叶绿素含量的相关性分析

通过比较 ChMPEC基因相对表达量与叶绿素含

量间的相关系数 r 值, 其中 r 值越高, 相关性越高(表2), 发现 ChMPEC基因相对表达量与叶绿素a存在显著或极显著相关, K21-3相关性最好的函数关系模式为线性模式 $y=0.223x+0.661(r=1.000^*)$, K21相关性最好的函数关系模式为幂模式 $y=4.712x^{0.596}(r=1.000^{**})$; ChMPEC基因相对表达量与叶绿素b同样存在显著或极显著相关, K21-3相关性最好的函数关系模式为对数模式 $y=0.291\ln(x)+2.134(r=0.999^*)$ 和幂模式 $y=2.050x^{0.124}(r=0.999^*)$, K21相关性最好的函数关系模式为线性模式 $y=0.234x+2.496(r=1.000^{**})$; ChMPEC基因相对表达量与总叶绿素存在显著相关, 且 K21-3和 K21相关性最好的函数关系模式均

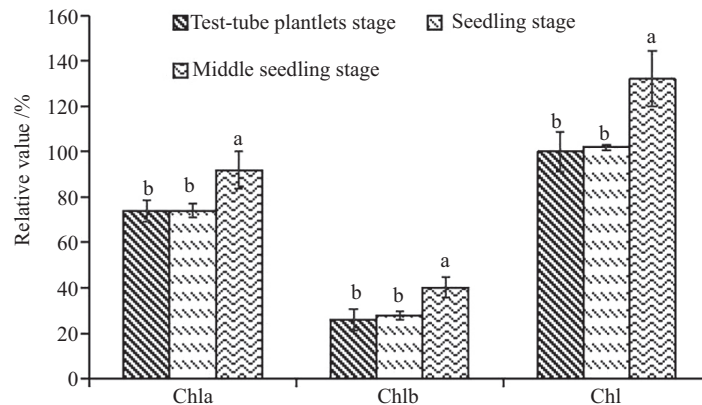


将试管苗期K21叶中的总叶绿素含量定为100%,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

The total chlorophyll content in leaves of K21 at test-tube plantlets stage was set as 100%. Different normal letters represented significant difference ($P<0.05$).

图7 K21和K21-3不同组织中叶绿素含量比较

Fig.7 Comparison of chlorophyll content in different tissues of K21 and K21-3



将试管苗期K21叶中的总叶绿素含量定为100%。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

The total chlorophyll content in leaves of K21 at test-tube plantlets stage was set as 100%. Different normal letters represented significant difference ($P<0.05$).

图8 K21不同发育时期叶片中叶绿素含量比较

Fig. 8 Comparison of chlorophyll content in leaves of K21 at different growth stages

表2 杂交兰*ChMPEC*基因相对表达量与叶绿素含量的相关性分析Table 2 Correlation analysis of relative expression of *ChMPEC* gene and chlorophyll content in *Cymbidium* hybrid

相关性	品系	线性模型	对数模型	幂模型	指数模型
Correlation	Strains	Linear model	Logarithmic model	Power model	Exponential model
Chlorophyll a	K21-3	$y=0.223x+0.661$ $r=1.000^*$	$y=1.795\ln(x)+2.482$ $r=0.853$	$y=1.211x^{0.529}$ $r=0.984$	$y=0.920e^{0.052x}$ $r=0.922$
	K21	$y=0.693x+4.849$ $r=0.998^*$	$y=12.989\ln(x)+7.865$ $r=0.943$	$y=4.712x^{0.596}$ $r=1.000^{**}$	$y=4.718e^{0.028x}$ $r=0.924$
Chlorophyll b	K21-3	$y=0.027x+2.028$ $r=0.863$	$y=0.291\ln(x)+2.134$ $r=0.999^*$	$y=2.050x^{0.124}$ $r=0.999^*$	$y=1.982e^{0.011x}$ $r=0.922$
	K21	$y=0.234x+2.496$ $r=1.000^{**}$	$y=4.260\ln(x)+3.723$ $r=0.917$	$y=3.108x^{0.416}$ $r=0.943$	$y=2.821e^{0.022x}$ $r=0.998^*$
Total chloro- phyll	K21-3	$y=0.249x+2.689$ $r=0.996^*$	$y=2.086\ln(x)+4.616$ $r=0.883$	$y=3.529x^{0.327}$ $r=0.971$	$y=2.904e^{0.034x}$ $r=0.944$
	K21	$y=0.927x+7.345$ $r=0.999^*$	$y=17.249\ln(x)+11.588$ $r=0.937$	$y=8.111x^{0.527}$ $r=0.994$	$y=7.833e^{0.026x}$ $r=0.957$

*在0.05水平上显著相关; **在0.01水平上极显著相关。

*Significant correlation at the 0.05 level; **Highly significant correlation at the 0.01 level.

为线性模式, 分别为 $y=0.249x+2.689(r=0.996^*)$ 和 $y=0.927x+7.345(r=0.999^*)$ 。

3 讨论

MPEC是叶绿素生物合成途径的关键酶之一, 在植物的光合作用中起重要作用。目前, 在低等生物(如莱茵衣藻、紫色细菌、蓝藻细菌等)和高等植物(如拟南芥、大麦、水稻等)中均有MPEC同源基因克隆的相关报道。杨丽^[19]在对毛竹中*PeMPEC*基因进行研究的结果显示, *PeMPEC*主要积累于叶片组织, 受光照和温度的调控, 其过量表达可提高叶绿素含量, 对叶绿素生物合成具有调控作用。本研究以杂交兰K21(叶片绿色)和K21-3(叶片中透艺)为材料, 克隆获得了2个MPEC基因cDNA序列, 其中K21-3与K21获得的基因序列存在6个碱基的差异, 导致了2个氨基酸的差异。对这2个基因序列与其他植物进行序列比对, 发现两者与其他植物的同源性较高; 且两者编码的蛋白质可能是稳定的亲水性蛋白质, 属于Ferritin-like家族, 还含有亮氨酸拉链和2个保守的EXnDEXRH元件。qRT-PCR结果表明, *ChMPEC*基因在叶片中的表达量最高, 说明*ChMPEC*基因在主要的光合器官叶片中表达, 与在毛竹^[19]、烟草^[20]中的表达情况基本一致; 试验中还检测了*ChMPEC*基因在不同发育时期叶片中的表达情况, *ChMPEC*基因在中苗期叶片中的表达量显著高于试管苗期和小苗期叶片。叶绿素含量测定分析结果显示, 叶中的叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量均高于根中和茎

中, 且中苗期叶片中的叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量高于试管苗期和小苗期叶片; 此外, 试验还发现*ChMPEC*基因相对表达量与叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量均存在显著或极显著正相关; 由此, 推测*ChMPEC*基因在杂交兰中可能参与到叶绿素的合成。

杂交兰叶艺品系K21-3表现为叶片中间具黄白色宽条纹, 尖端绿色, 呈现中透艺。通过叶绿素含量测定, 发现K21-3叶中叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量显著低于K21叶片, 但Chla/b值却高于K21叶片, 说明叶绿素b减少幅度较叶绿素a更大, 推测K21-3中透艺的形成可能与叶绿素b缺乏相关, 属于叶绿素b缺乏型突变体, 与‘金叶’弯刺蔷薇^[21]和菜用大豆黄化新突变体VS-5Y^[22]的突变体类型相似。为了探讨K21-3中透艺的形成是否与*ChMPEC*基因相关, 本研究通过基因克隆、序列分析、定量表达等试验, 发现K21-3叶艺区叶片中的*ChMPEC*氨基酸序列与K21绿色叶片存在2个氨基酸的差异, 且K21-3叶艺区叶中*ChMPEC*基因的相对表达量显著低于K21绿色叶片中的相对表达量, 与叶绿素含量的表达模式基本一致, 由此推测*ChMPEC*基因可能在K21-3叶艺形成中起到一定的作用。

在水稻叶色突变体*ysl8*、*m167*及*577ys*中, 引起突变表型的基因*YGL8*、*OsCRD1*、*LOC_Os01gl7170*陆续被分离, 这些基因均为等位基因, 且编码MPEC, 但不同突变体的表型差异明显, 如突变体*ysl8*仅在苗期呈现黄绿叶表型; 而突变体*m167*和*577ys*在整

个生长期均表现黄绿叶表型,且突变体577_{ys}苗期带有锈斑表型,推测导致以上表型差异可能是由于三者突变位点不同^[23-25]。在本研究中,K21-3叶艺区叶片中同样存在氨基酸序列的突变位点,分别是第A139G和第A1096C,导致第47位氨基酸由苏氨酸(T)变为丙氨酸(A)以及第366位氨基酸由赖氨酸(K)变为谷氨酰胺(Q),其中第366位氨基酸突变位点位于保守结构域内,由此推测氨基酸序列的突变有可能导致K21-3的叶色变异。至于*ChMPEC*基因是与其他基因协调合作还是其序列的突变在K21-3叶艺形成中起重要调控作用还需进一步的研究验证。

目前有关叶色变异的研究多集中在拟南芥和水稻中,而兰科植物叶艺形成机制的研究还较为滞后。本研究获得了杂交兰*ChMPEC*基因序列,对其编码蛋白的结构特征、基因表达模式进行分析,为今后通过酵母双杂交、转基因等技术对*ChMPEC*进行功能验证提供了参考资料,也为进一步研究杂交兰叶艺形成机制提供了重要线索。

参考文献 (References)

- [1] 曾瑞珍, 谢利, 郭和蓉, 等. 杂交兰新品种‘玉女兰’[J]. 园艺学报 (ZENG R Z, XIE L, GUO H R, et al. A new hybrid *Cymbidium* cultivar ‘Yuniilan’ [J]. Acta Horticulturae Sinica), 2014, 41(2): 401-2.
- [2] JAIME A, TEIXEIRA DA S. Impact of paper bridges, activated charcoal, and antioxidants on growth and development of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium* [J]. In Vitro Cell Dev-pl, 2013, 49(4): 414-20.
- [3] 苏畅, 李枝林, 任智慧, 等. 辐射诱发叶艺兰形态特征和生理特性差异的研究[J]. 西部林业科学(SU C, LI Z L, REN Z H, et al. Morphology and physiological characteristics of *Cymbidium tracyanum* × *C. Iridioides* D. Don with variegation leaves induced by irradiation [J]. Journal of West China Forestry Science), 2016, 45(3): 38-43.
- [4] 谢泰祥, 姚荣荣, 陈娟, 等. 建兰叶艺品种光合色素含量及叶绿素荧光特性分析[J]. 亚热带植物科学(XIE T X, YAO R R, CHEN J, et al. Photosynthetic pigments content and chlorophyll fluorescence kinetics parameters of a leaf mutant cultivar of *Cymbidium ensifolium* [J]. Subtropical Plant Science), 2019, 48(3): 232-6.
- [5] 许庆全, 杨凤玺, 叶庆生, 等. 墨兰‘达摩’叶艺品系光合色素含量、叶绿素荧光特性和叶绿体超微结构的比较[J]. 热带作物学报(XU Q Q, YANG F X, YE Q S, et al. Comparison of photosynthetic pigments content, chlorophyll fluorescence kinetics parameters and chloroplast ultrastructure of leaf mutant cultivars of *Cymbidium sinense* ‘Damo’ [J]. Chinese Journal of Tropical Crops), 2017, 38(7): 1210-5.
- [6] 田韦韦, 王彩霞, 田敏, 等. 文心兰浅绿条纹突变体的生理生化及叶绿素荧光特性研究[J]. 西北植物学报(TIAN W W, WANG C X, TIAN M, et al. Physiological, biochemical and chlorophyll fluorescence characters of light green stripe mutant in *Oncidium* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 2015, 35(10): 2012-7.
- [7] ZHU G F, YANG F X, SHI S S, et al. Transcriptome characterization of *Cymbidium sinense* ‘Dharma’ using 454 pyrosequencing and its application in the identification of genes associated with leaf color variation [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128592.
- [8] MEI J, LI F, LIU X, et al. Newly identified CSP41b gene localized in chloroplasts affects leaf color in rice [J]. Plant Sci, 2017, 256: 39-45.
- [9] 黄晓群, 赵海新, 董春林, 等. 水稻叶绿素合成缺陷突变体及其生物学研究进展[J]. 西北植物学报(HUANG X Q, ZHAO H X, DONG C L, et al. Chlorophyll-deficient rice mutants and their research advances in biology [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 2005, 25(8): 1685-91.
- [10] SAKURABA Y, LEE S H, KIM Y S, et al. Delayed degradation of chlorophylls and photosynthetic proteins in *Arabidopsis* autophagy mutants during stress-induced leaf yellowing [J]. J Exp Bot, 2014, 65: 3915-25.
- [11] BEALE S I. Green genes gleaned [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(7): 309-12.
- [12] LIU H H, ZHENG C C. MPEC: an important gene in the chlorophyll biosynthesis pathway in photosynthetic organisms [J]. Photosynthetica, 2008, 46(3): 321.
- [13] YANG L, LOU Y F, PENG Z H, et al. Molecular characterization and primary functional analysis of *PeMPEC*, a magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase gene of bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. Plant Cell Rep, 2015, 34(11): 2001-11.
- [14] LI C, MA F R, JIAO R J, et al. Mutation in mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase causes yellow and spotted leaf phenotype in rice [J]. Plant Mol Biol Rep, 2019, 37(4): 253-64.
- [15] MOSELEY J, QUINN J, ERIKSSON M, et al. The *Crdl* gene encodes a putative diiron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Embo J, 2000, 19(10): 2139-51.
- [16] KAORI Y, KEI M, YUICHI F. Identification of the *chlE* gene encoding oxygen-independent Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase in cyanobacteria [J]. Biochem Biophys Res Commu, 2015, 463(4): 1328-33.
- [17] ZHENG C C, PORAT R, LU P, et al. *PNZIP* is a novel mesophyll-specific cDNA that is regulated by phytochrome and the circadian rhythm and encodes a protein with a leucine zipper motif [J]. Plant Physiol, 1998, 116(1): 27-35.
- [18] TOTTEY S, BLOCK M A, ALLEN M, et al. *Arabidopsis* *CHL27*, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(26): 16119-24.
- [19] 杨丽. 毛竹镁原卟啉甲酯环化酶基因研究及SSR标记开发应用[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [20] LIU N, YANG Y T, LIU H H, et al. NTZIP antisense plants show reduced chlorophyll levels [J]. Plant Physiol Biochem, 2004, 42(4): 321-7.
- [21] 闫菲, 杨树华, 卫晶晶, 等. ‘金叶’弯刺蔷薇叶绿体结构、叶绿素合成物质含量及相关基因表达分析[J]. 园艺学报(YAN F, YANG S H, WEI J J, et al. Chloroplast ultrastructure, metabolite contents and gene expression involved in the pathway of chloro-

- phyll biosynthesis of *Rosa beggeriana* 'Aurea' [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(11): 2188-200.
- [22] 李超汉, 朱丽华, 杨红娟, 等. 菜用大豆黄化新突变体的主要农艺性状和生理特性[J]. *分子植物育种*(LI C H, ZHU L H, YANG H J, et al. Main agronomic characters and biochemical traits of xantha mutant of *Vegetable Soybean* [J]. *Molecular Plant Breeding*), 2019, 17(11): 3726-34.
- [23] KONG W, YU X, CHEN H, et al. The catalytic subunit of magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase forms a chloroplast complex to regulate chlorophyll biosynthesis in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 92(1): 177-91.
- [24] WANG X X, HUNG R, QUAN R. Mutation in Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase decreases photosynthesis capacity in rice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0171118.
- [25] 马芙蓉. 水稻黄绿叶突变体577ys的基因克隆[D]. 成都: 四川农业大学, 2017.