

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.06.008

引用格式:谢明宇,刘雪,王晨晨,等.菊苣持绿基因 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的鉴定及胁迫条件下的表达分析[J].草地学报,2026,34(6):2043–2054

XIE Ming-yu, LIU Xue, WANG Chen-chen, et al. Identification and Stress-Induced Expression Profiling of Stay-Green Genes *CiSGR* and *CiSGRL* in Chicory[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(6):2043–2054

菊苣持绿基因 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的鉴定及胁迫条件下的表达分析

谢明宇¹, 刘雪^{2,3}, 王晨晨⁴, 冯清香⁴, 李大勇^{2,3}, 张德春^{1*}, 张彬^{2,3*}

(1. 三峡大学生物与制药学院, 湖北宜昌 443000; 2. 北京市农林科学院蔬菜研究所, 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100097; 3. 北京市农林科学院蔬菜研究所, 作物分子设计与智慧育种北京市重点实验室, 北京 100097; 4. 山东师范大学生命科学学院, 山东济南 250014)

摘要:菊苣(*Cichorium intybus* L.)是一种被广泛用于畜牧业中的多年生牧草。持绿蛋白脱镁螯合酶参与调控叶绿素的分解,是植物调控持绿性状的关键因子,对提高菊苣的抗逆性至关重要。本研究在菊苣基因组中初步筛选到了2个菊苣 *SGR* 基因,这两个基因编码的蛋白质分别属于 *SGR* 亚家族和 *SGRL* 亚家族,分别将其命名为 *CiSGR* 和 *CiSGRL*。二者编码的蛋白质分别由 274 和 232 个氨基酸组成。蛋白结构域分析表明, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 具有叶绿体转运肽结构域、高度保守的 *SGR* 结构域和 C 端可变区。顺式元件分析表明, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的启动子含有光、激素和胁迫相关转录元件。亚细胞定位表明 *CiSGR* 主要定位于叶绿体和细胞核, *CiSGRL* 主要定位于细胞核和细胞质。组织表达模式分析发现, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 均在茎中表达量最高,并受到 6 种不同胁迫信号的显著诱导。本研究对菊苣 *SGR* 和 *SGRL* 基因进行了系统鉴定和分析,为提升菊苣牧草的产量与品质提供理论依据。

关键词:菊苣; *SGR* 基因家族; 饲草; 胁迫反应

中图分类号:Q943.2

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)06-2043-12

Identification and Stress-Induced Expression Profiling of Stay-Green Genes *CiSGR* and *CiSGRL* in Chicory

XIE Ming-yu¹, LIU Xue^{2,3}, WANG Chen-chen⁴, FENG Qing-xiang⁴, LI Da-yong^{2,3},
ZHANG De-chun^{1*}, ZHANG Bin^{2,3*}

(1. College of Biology and Pharmaceutical, China Three Gorges University, Yichang, Hubei Province 443000, China;
2. National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China; 3. Beijing Key Laboratory of Crop Molecular Design and Intelligent Breeding, Beijing 100097, China;
4. College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan, Shandong Province 250014, China)

Abstract: Chicory (*Cichorium intybus* L.) is a perennial forage extensively utilized in livestock production. The magnesium-dechelatase involved in chlorophyll degradation plays a pivotal role in regulating chlorophyll breakdown and is a key factor in the control of stay-green traits of plants. Enhancing the stay-green phenotype is critical for improving chicory's resilience to environmental stresses. In this study, two putative *SGR* (Stay-Green) genes were preliminarily identified in the chicory genome, and designated as *CiSGR* and *CiSGRL* based on their respective phylogenetic affiliations to the *SGR* and *SGRL* subfamilies. The proteins encoded by these genes were composed of 274 and 232 amino acids, respectively. Structural domain analysis revealed that both

收稿日期:2025-06-16;修回日期:2025-10-28

基金项目:北京市农林科学院创新能力建设专项科技攻关项目(KJCX20251008);北京市农林科学院蔬菜研究所改革与发展项目(KYCX202604)资助

作者简介:谢明宇(2001-),男,满族,河北承德人,硕士研究生,主要从事植物基因组学研究, E-mail:921947629@qq.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail:zhangbin@nrcv.org; zhangdechun@ctgu.edu.cn

CiSGR and CiSGRL possessed chloroplast transit peptide domains, highly conserved SGR domains, and variable regions at the C-terminus. Cis-regulatory element analysis indicated that the promoters of *CiSGR* and *CiSGRL* contained light-responsive, hormone-related, and stress-inducible transcriptional elements. Subcellular localization assays demonstrated that CiSGR predominantly localized to chloroplasts and nuclei, whereas CiSGRL primarily resided in nuclei and cytoplasm. Tissue-specific expression profiling showed the highest transcript levels of both genes in stems and significant induction under six different abiotic stress conditions. This systematic identification and analysis of chicory *SGR* and *SGRL* genes provides a theoretical foundation for strategies aimed at improving chicory forage yield and quality.

Key words: *Cichorium intybus*; SGR gene family; Forage grass; Stress response

菊苣(*Cichorium intybus* L.), 又称欧洲菊苣, 是一种起源于地中海地区的多年生草本植物。它属于菊科(Asteraceae)菊苣属(*Cichorium*)。菊苣广泛分布在欧洲、亚洲西部和非洲北部地区, 具有耐寒、抗旱的特性, 能够适应多种气候条件, 常被用作传统的牧草资源。作为优质的饲草作物, 菊苣具有显著的农业经济价值与生物学特性^[1]。它的叶片柔嫩多汁, 纤维素含量低, 反刍动物摄食后消化率可达80%以上。此外, 菊苣植株分蘖能力强、产量高, 且再生能力强, 展现出高效的生物量积累能力与可持续利用潜力^[2]。当前, 菊苣研究主要聚焦于遗传育种与品种选育、食品营养组分解析、植物化学成分鉴定、药用活性机制探究及牧草资源开发利用等领域^[3]。而牧草的持绿性不仅有助于增强其抗环境胁迫能力, 还可以显著提高牧草的产量, 这对于菊苣等牧草资源的开发与利用具有重大意义^[4]。

植物的持绿能力是由叶绿素含量直接决定的。叶绿素(Chlorophyll, Chl)是一类具有四吡咯结构的分子, 主要包含两种类型: 叶绿素a(Chl a)和叶绿素b(Chl b)。它们在光合作用过程中承担着吸收光能并传递电子的重要功能^[5]。脱镁作用是叶绿素a降解的关键步骤, 指在脱镁螯合酶的催化下, 叶绿素a失去中心镁离子, 形成脱镁叶绿素a并释放电子^[6-7]; 所释放的电子是光合作用中光能转化的起始环节, 而脱镁叶绿素a同时也是光系统II(PSII)起始合成过程中不可或缺的组成部分^[8]。*STAY-GREEN*(*SGR*)基因编码脱镁过程的关键酶脱镁螯合酶, 在叶绿素a中提取中心镁元素的过程中发挥关键作用^[9]。此外, 持绿蛋白(*STAY-GREEN*, *SGR*)还能够与光收集复合物II(Light-Harvesting complex II, LHCII)以及叶绿素分解代谢酶(Chlorophyll catabolic enzymes, CCEs)相互作用形成复合体。这一复合体不仅加速了叶绿素的降解过程, 还减轻了分解代谢物对细胞膜造成的潜在损伤^[10-11]。

绿色子叶调控基因的研究始于孟德尔在豌豆中的经典工作, 并通过草地羊茅(*Festuca pratensis* Huds.)的基因渐渗系统得以完成其精确定位。在拟南芥中发现*At4g22920*基因的表达在衰老叶片中显著上调, 并利用RNA干扰技术确定*At4g22920*可能是调控子叶持绿的关键基因^[12], 因此被命名为*STAY-GREEN1*(*SGR1*)^[13]; 此后, 多个物种中的同源基因相继被鉴定和克隆, 例如Jiang等^[14]在梗稻(*Oryza sativa* subsp. *japonica* Kato)中通过突变体分离出*OsSGR*基因; Hu等^[15]从番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中克隆出*LeSGR1*(番茄*SGR1*)基因; Barry等人^[16]在甜椒(*Capsicum annuum* var. *Grosum*)突变体中克隆并鉴定出*CaSGR*基因; Shi等^[17]在大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]中通过文库筛选获得*GmSGR1*; Luo等^[18]在猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)基因组数据库中通过BLASTp筛选并鉴定出多个猕猴桃*SGR*家族基因。根据进化关系, *SGR*基因家族可分为*SGR*亚家族和*SGRL*亚家族^[19]。高等植物通常含有至少一个*SGRL*蛋白和多个*SGR*蛋白^[20-21]。该家族蛋白普遍具有叶绿体传递肽、*SGR*结构域, 以及可变的C端区域, *SGR*相比*SGRL*在C端具有特有的富含半胱氨酸基元(Cysteine-Rich motif, CRM), 该基元对于脱镁螯合酶活性以及叶绿素降解至关重要^[22-23]。研究表明, *SGR*基因主要参与调节叶绿素降解、类胡萝卜素代谢、果实成熟和叶片衰老^[24-25]。拟南芥有三个*SGR*成员: *SGR1*/*NYE1*, *SGR2*/*NYE2*和*SGRL*。其中, *SGR1*/*NYE1*蛋白通过调节叶绿素a加氧酶活性促进衰老期间的叶绿素降解^[26]。*SGR2*的功能研究结果存在看似矛盾之处, 即*SGR2*过表达会导致拟南芥持绿而其突变体却提前黄化^[27], 但有研究证实*SGR2*蛋白具有促进叶绿素降解的能力^[28]。*SGRL*蛋白则主要参与衰老前叶绿素的周转^[26]。在水稻中过表达*SGR1*和*SGRL*均导致叶片在黑暗诱导下早衰, 但*SGRL*蛋白可能主要参与非衰老期叶绿素

稳态和光系统复合体调控^[29]。大豆的遗传研究表明, *sgr1*, *sgr2* 单突变及双突变体均能产生持绿表型, 印证了 *SGR* 基因在促进叶绿素降解方面的功能保守性^[30]。此外, *SGR* 基因还广泛参与植物胁迫响应, 它通过调控叶绿素降解途径, 影响植物对多种病害的抗性, 如黄瓜炭疽病^[31-32]、水稻纹枯病^[33]、大豆锈病^[34]及茶树白化病^[35]等。在非生物胁迫方面, 番茄 *SlSGR2* 的表达受盐胁迫调控^[36]; 茶树 *CsSGR1* 在冷胁迫下受到显著诱导^[35]; 柳杉 *CjSGR2* 转基因的拟南芥在多种胁迫下表现出更强的抗性^[37]; 而日本结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.) *ZjSGR* 基因突变体在低温下表现出更强的持绿和抗衰老能力^[38]。这些研究表明 *SGR* 基因可能参与对生物和非生物胁迫的反应。

目前, 菊苣持绿基因 *SGR* 的功能及其潜在作用缺乏系统性研究。因此, 为了鉴定菊苣 *SGR* 基因家族成员并研究其在菊苣中的潜在作用, 本文对菊苣 *SGR* 基因家族进行了鉴定与克隆, 并对其参与叶绿素降解的关键特征(包括进化关系、蛋白质特性、亚细胞定位以及表达模式)进行了分析, 为进一步阐明菊苣 *SGR* 成员的功能奠定基础, 为深入解析其生物学作用提供重要参考, 同时也为培育具有优异性状的饲草菊苣提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及栽培条件

试验在北京市农林科学研究院蔬菜所(116°42′10.41″E, 39°42′1.35″N)进行, 所用菊苣品种为‘普那’(K017)。挑选饱满种子播种于湿滤纸上, 进行萌发; 当芽伸长约2 cm时, 转到蛭石: 营养土为3:1比例的基质中; 5~6天后转入大棚, 自然培养^[39]。当菊苣生长至抽薹开花, 取其根、茎、叶、花于-80℃冰箱贮存。非生物胁迫处理实验设置6个实验组, 将23日龄的菊苣幼苗分别放置在不同的处理液和培养环境中, 干旱处理组为加入15% PEG6000的霍格兰溶液, 盐处理组为加入0.15 mol·L⁻¹ NaCl的霍格兰溶液^[40], 碱处理组为加入0.2 mol·L⁻¹ NaHCO₃的霍格兰溶液^[41], 高温处理组为37℃恒温培养箱处理, 低温处理组为4℃冰箱处理, 黑暗处理组为完全隔绝光照的暗培养箱处理, 对照为每组0 h取样的样品, 实验组(除高温、低温

和暗处理外)和对照组菊苣材料均在24℃恒温培养箱培养。取处理0 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h和48 h的幼嫩叶片, 立即放入液氮中速冻, 随后转移至-80℃冰箱保存, 以备后续实验使用。

1.2 *SGR* 基因家族鉴定及基本特征分析

在网站(ftp://ftp.agis.org.cn/Inulin_plants/)下载菊苣全基因组数据^[42]; TAIR(<https://www.arabidopsis.org>)下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *SGR* 成员基因序列、蛋白编码序列和全长氨基酸序列; 在数据库 Phytozome v13(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>)下载生菜 (*Lactuca sativa* L.) *SGR* 成员基因序列、蛋白编码序列和全长氨基酸序列。本文使用拟南芥和生菜的 *SGR* 基因家族成员的基因序列在菊苣全基因组数据库进行blast比对, 删掉E值大于1⁻¹⁶的基因; 然后将序列上传至在线分析软件 InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro>)和 Batch CD-Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>), 删掉不含 *SGR* 保守结构域的基因, 最终确定了2个具有绿色保守结构域的菊苣 *SGR* 基因家族成员。利用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线工具对2个 *SGR* 蛋白序列进行分析, 得出其蛋白分子量、理论等电点、氨基酸数量等理化性质数据。

1.3 蛋白系统进化分析

根据文献下载其他物种中 *SGR* 的同源序列。通过 DNAMAN 获得不同物种中 *SGR* 氨基酸序列比对图, 采用1000次 bootstrap 试验的邻接法构建系统发育树。

1.4 Domain 和 Motif 分析

使用菊苣基因组 GFF 文件和筛选后的菊苣 *SGR* 家族的核苷酸序列, 利用 TBtools 软件进行基因结构的分析。将菊苣2个 *SGR* 家族成员以及其他物种中 *SGR* 蛋白序列上传至在线分析软件 Batch CD Search 进行 Domain 分析; 使用在线网站 MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)进行 Motif 分析, motif 数目设置为10。使用 TBtools 软件对菊苣 *SGR* 家族基因结构、Domain, Motif 分析进行可视化作图。

1.5 顺式作用元件分析

在网站下载菊苣全基因组序列与 GFF 文件,使用 TBtools 软件,提取每个基因转录起始位点上游 2000 bp 区域的序列。将其上传至在线预测网站 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行预测。使用 TBtools 软件对预测的结果进行可视化作图。

1.6 蛋白二级结构分析和三维结构预测

将确定好的菊苣 SGR 家族成员蛋白序列依次上传到蛋白二级结构分析网站 SOPMA (<https://npsa.lyon.inserm.fr>) 和蛋白质三维结构在线预测网站 Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>), 得到各成员的蛋白质二级结构和三维预测结构。

1.7 亚细胞定位分析

为了阐明 CiSGR1 和 CiSGR2 的亚细胞定位, 将它们缺少终止密码子的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 整合到 *pCambia2300-35S::GFP* 载体中, 得到 *35S::CiSGR-GFP* 和 *35S::CiSGRL-GFP* 载体。随后对这两个重组载体质粒进行大量提取, 并将其转化到拟南芥原生质体中。12 h 后, 利用激光扫描共聚焦显微镜 (LSM980; Zeiss, Oberkochen, Germany)。构建重组载体所使用的引物如表 1 所示。

表 1 *CiSGR* 和 *CiSGRL* GFP 标签表达载体的构建引物序列

Table 1 Primer sequences construction of *CiSGR* and *CiSGRL* GFP tag expression vectors

基因 Gene	上游引物 Forward primer 5'-3'	下游引物 Reverse primer 3'-5'
<i>CiSGR</i>	GAGCTCAAGCTTCGAATTCATGGCTTCTCTGATCCTTCCAG	GCCCGCGGTACCGTCGACgAGCTTTTGTGCAACCCTTGT
<i>CiSGRL</i>	GAGCTCAAGCTTCGAATTCATGTTTCGGTTGCAGTCTAAACC	GCCCGCGGTACCGTCGACgCAAAAGAAACGTTACAAGTAGTTGAAA

1.8 荧光定量 PCR 及数据分析

选择菊苣 *Actin* (*CiACT*) 作为内参基因^[43], 根据各成员编码序列 (Coding sequence, CDS) 在线网站设计引物 (表 2)。采集菊苣的根、茎、叶、花进行 RNA 提取。RNA 提取和实时荧光定量 PCR 预

混液均采用南京诺唯赞公司试剂盒进行, 试验方法以说明书为准, RT-qPCR 实验以罗氏 (Roche) LC480 荧光定量 PCR 仪进行基因表达检测。选用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[44] 进行数据分析, 将每一个样本技术重复 3 次, 用平均值 ± 标准差表示基因的相对表达量。

表 2 *CiSGR* 和 *CiSGRL* RT-qPCR 引物序列

Table 2 *CiSGR* and *CiSGRL* RT-qPCR primer sequence

基因 Gene	上游引物 Forward primer 5'-3'	下游引物 Reverse primer 3'-5'
<i>CiSGR</i>	TGAAGTTGTAGCAGAATGGAGG	CAGAGGGAGTTCTTTGGTGAAG
<i>CiSGRL</i>	GGGATCGTGCCTTATTTCAGTC	CATTTGATCCCCTACTCGTCC
<i>CiACT</i>	CCAAATCCAGCTCATCAGTCG	TCTTTCGGCTCCGATGGTGAT

2 结果与分析

2.1 菊苣 SGR 家族基因的鉴定

本研究以拟南芥 SGR 氨基酸序列为检索序列, 在菊苣基因组中利用同源比对鉴定到 2 个基因, 分别为 Cint. ptg000044l. g622. t1 和 Cint. ptg000101l. g945. t1, 前者与 AtSGR1 同源率为 64%, *P* 值 (显著性) 为 $2e-121$, 后者与 AtSGRL 同源率为 56%, *P* 值 (显著性) 为 $4e-79$, 所以这两个基因很有可能是后续研究的菊苣 SGR 基因, 暂时分别命名为 *CiSGR1* 和 *CiSGR2*。

2.2 系统进化分析及保守结构域分析

本研究对已鉴定到的菊苣以及拟南芥、水稻、大豆、番茄等其他物种 SGR 家族进行系统进化分析

(图 1A)。在进化树中, 明确划分出单子叶植物分支与双子叶植物分支, 其中单子叶分支包含水稻 (Os)、玉米 (Zm)、小麦 (Hv) 等物种的 SGR 和 SGRL 基因; 双子叶分支包含拟南芥、烟草、大豆、番茄的目标基因。系统进化树的结果显示, 双子叶植物如菊苣 CiSGR 与双子叶的番茄 SiSGR 同源率最高, CiSGRL 与双子叶的番茄 SiSGRL、烟草 NtSGRL 亲缘关系最近, 而与单子叶的水稻 OsSGR 和 OsSGRL、玉米 ZmSGR1 和 ZmSGR2 亲缘关系较远。所以根据系统进化分析结果并参考拟南芥 SGR 基因家族的分类^[26], 将菊苣 SGR 家族分为 SGR 和 SGRL 两个亚家族, 其中 *CiSGR1* 属于 SGR 亚家族, *CiSGR2* 属于 SGRL 亚家族。因此将其分别命名为 *CiSGR* 和 *CiSGRL*。对菊苣和拟南芥共

17 个 SGR 蛋白的全长序列进行比对,结果显示,所有 SGR 蛋白和 SGRL 蛋白均具有 3 个典型的结构域,包括叶绿体转运肽结构域、高度保守的 SGR 结构域和 C 端可变区(图 1B)。

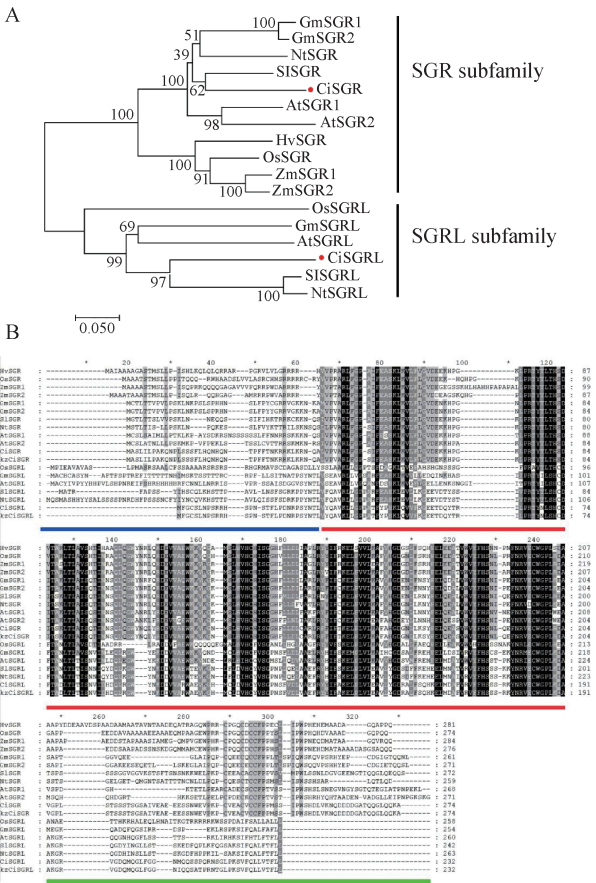


图 1 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白的系统进化树分析(A)和多序列比对(B)

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis(A) and multiple sequence alignment(B) of *CiSGR* and *CiSGRL* proteins

注:图 B 为 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白的多序列比对。叶绿体传递肽(蓝色)、保守 SGR 结构域(红色)和可变 C 端区域(绿色)用三条底线表示
Note: Figure B presents a multiple sequence alignment of *CiSGR* and *CiSGRL* proteins. Blue line, chloroplast transit peptide domain; red line, conserved SGR domain; green line, variable C-terminal region

2.3 菊苣 SGR 家族 Domain, Motif 分析及 SGR 和 SGRL 顺式作用元件分析

利用 TBtools 软件与在线工具对菊苣 SGR 家族进行 Domain 和 Motif 分析。Domain 分析发现,这

些不同物种的 SGR 家族成员均含有 SGR 保守结构域。Motif 分析发现,这些 SGR 家族成员均含有 Motif 1-5 及 Motif 9,但 *CiSGR* 与 *CiSGRL* 在 N、C 两端的 Motif 不同(图 2A)。*CiSGR* 的 N 端为 Motif 8, C 端为 Motif 6(CRM 基序);*CiSGRL* 的 N 端为 Motif 10, C 端为 Motif 9,推测 Motif 8, Motif 6 和 Motif 10, Motif 9 可能分别是这两个亚家族的特有结构。

启动子中的顺式作用元件在一定程度上可以反映基因的转录调控功能。我们对 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的 ATG 上游 2 kb 的启动子序列中的顺式作用元件进行了分析,结果发现, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的启动子序列中存在光和植物激素响应元件,此外, *CiSGR* 启动子中还存在低温、防御和厌氧等与胁迫相关的响应元件(图 2B)。结果表明,菊苣 SGR 家族可能在植物激素调控、生长发育和应对环境胁迫方面发挥作用。

2.4 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白的二级和三级结构预测

利用蛋白质结构预测工具对 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的二级和三级结构进行预测,结果显示 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 均具有 3 种蛋白质二级结构,但所占比例有所不同(表 3)。其中 *CiSGR* 蛋白的 α -螺旋占比约为 25%,无规则卷曲的占比超过 60%, *CiSGRL* 蛋白的 α -螺旋占比最大,且与无规则卷曲的占比相近,二者蛋白结构均无 β -转角。*CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白的三级结构模型显示二者的三级结构存在显著差异(图 3)。

2.5 *CiSGR* 基因家族克隆和基本特征分析

为了对菊苣 SGR 基因家族进行初步功能分析,我们在菊苣的基因组和 cDNA 中对 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 进行了克隆,分别获得 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 基因 CDS 全长序列,分别为 825 bp 和 699 bp(图 4)。然后对 2 个菊苣 SGR 基因家族成员的理化性质进行分析,结果显示, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白分别由 274 和 232 个氨基酸残基组成,对应分子量为 30.85 和 26.44 kDa;二者均为疏水蛋白;等电点分别为 8.43 和 8.54(表 4)。

表 3 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白的二级结构预测结果

Table 3 The prediction results of secondary structure of *CiSGR* and *CiSGRL* protein in *Cichorium intybus*

蛋白 Protein	蛋白二级结构 Protein secondary structure					三级结构模型 3D structure
	α -螺旋 α -helix	延长链 Extended strand	β -转角 β -turn	无规则卷曲 Random coil		
<i>CiSGR</i>	25.55	12.77	0	61.68		7y5y.1.A
<i>CiSGRL</i>	41.81	16.81	0	41.38		7mk2.1.A

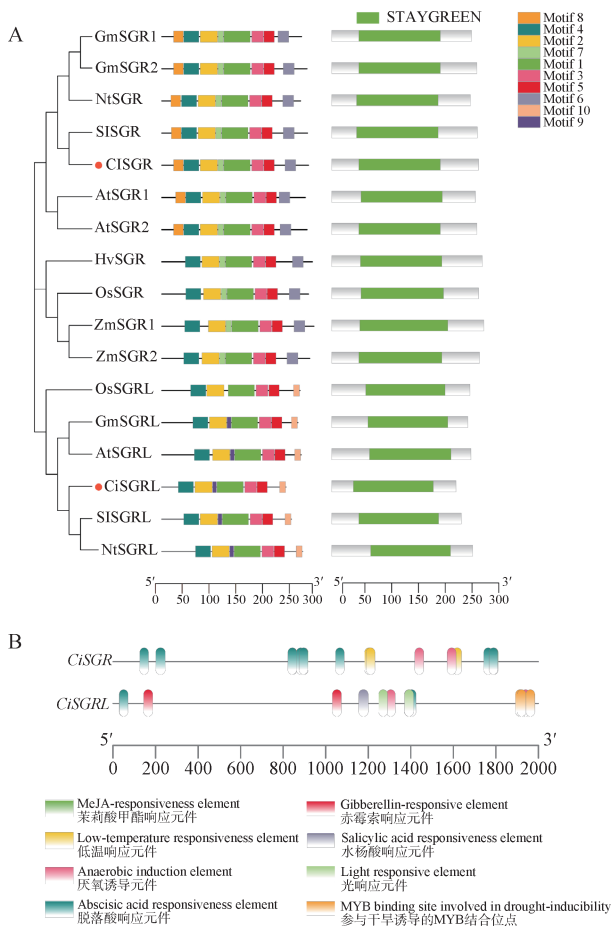


图2 植物SGR蛋白的Domain, Motif分析(A)和菊苣SGR家族启动子的顺式调控元件(B)

Fig. 2 Plant SGR proteins Domain, gene structure and Motif analysis(A) and cis-regulatory elements of the *Cichorium intybus* SGR family promoters(B)

注:图A为CiSGR和CiSGRL Domain和Motif分析,绿色矩形为SGR保守结构域,不同颜色矩形代表不同基序。图B为CiSGR和CiSGRL的启动子(ATG上游2 kb)中转录元件分析

Note: Figure A illustrates the Domain and Motif analysis of CiSGR and CiSGRL. The green rectangle denotes the conserved SGR domain, while rectangles of varying colors represent distinct motifs identified in the protein sequences. Figure B illustrates the analysis of cis-regulatory elements within the promoter regions (2 kb upstream of ATG) of *CiSGR* and *CiSGRL*.

2.6 CiSGR和CiSGRL的亚细胞定位

为了确定CiSGR和CiSGRL在细胞中的功能位置,我们构建了35S::CiSGR-GFP和35S::

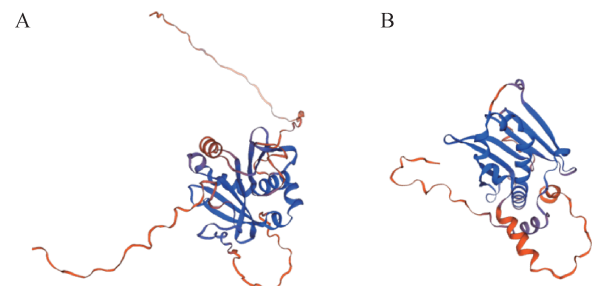


图3 CiSGR(A)和CiSGRL(B)蛋白三级结构预测
Fig. 3 Tertiary structure prediction of CiSGR(A) and CiSGRL(B) proteins

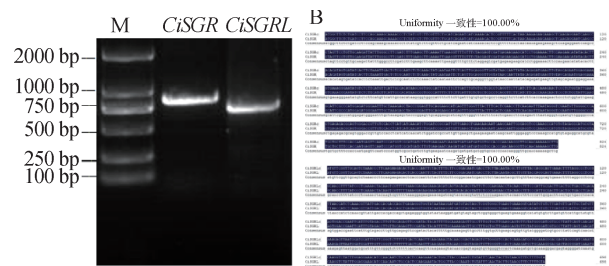


图4 CiSGR和CiSGRL的克隆

Fig. 4 Molecular cloning of *CiSGR* and *CiSGRL*

注:泳道M为DNA Marker

Note: Lane M is DNA Marker

CiSGRL-GFP瞬时表达载体,并转化拟南芥原生质体,使用激光共聚焦显微镜观察荧光表达情况(图5)。结果显示,在对照样品(35S::GFP)的转化细胞中观察到GFP荧光信号广泛分布在细胞中, CiSGR-GFP主要定位于叶绿体和细胞核中, CiSGRL-GFP主要定位于细胞核和细胞质(图5)。结果进一步暗示了CiSGR和CiSGRL可能在叶绿体、细胞核或细胞膜上发挥功能。

2.7 CiSGR和CiSGRL在菊苣不同组织中的表达模式分析

为了研究CiSGR和CiSGRL在菊苣不同组织中的表达模式,我们利用RT-qPCR技术在菊苣的根、茎、叶、花序组织中对CiSGR和CiSGRL的表达量进行了检测。结果显示, CiSGR和CiSGRL的表达模式相似, CiSGR和CiSGRL在茎中表达量最高,其次是叶, CiSGR在根中表达量高于花序,而 CiSGRL在根中表达量低于花序(图6)。

表4 CiSGR和CiSGRL理化性质分析

Table 4 Analysis of physicochemical properties of CiSGR and CiSGRL

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	氨基酸数 Amino acid number	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 Isoelectric point pI
<i>CiSGR</i>	Cint.ptg0000441.g622	274	30.85	8.43
<i>CiSGRL</i>	Cint.ptg0001011.g945	232	26.44	8.54

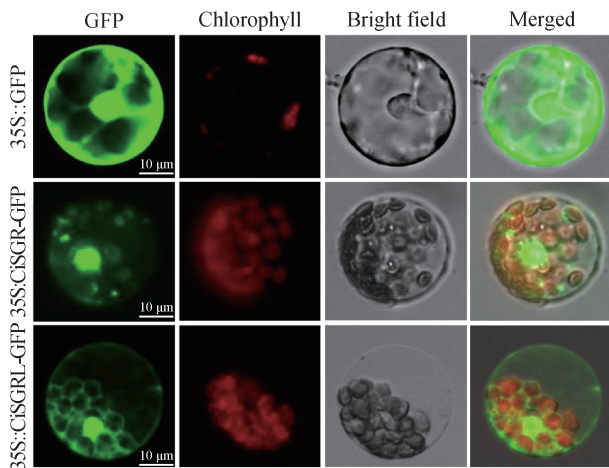


图5 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of the *CiSGR* and *CiSGRL* proteins

注:拟南芥原生质体中 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 蛋白的亚细胞定位。35S::GFP 作为阳性对照。叶绿体用红色表示。比例尺=10 μm

Note: Subcellular localization of *CiSGR* and *CiSGRL* proteins in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. 35S::GFP served as the positive control. Chloroplasts are pseudo-colored in red. Scale bar=10 μm

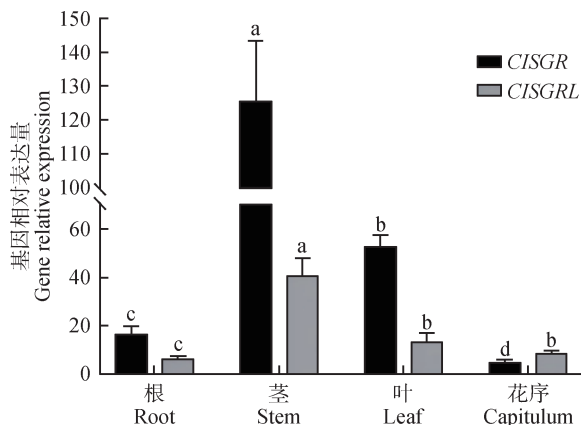


图6 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 在不同菊苣组织中的表达水平

Fig. 6 Expression levels of *CiSGR* and *CiSGRL* in different chicory tissues

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同

Note: Significant differences are indicated by different letters ($P < 0.05$). The same as below

2.8 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 在不同胁迫下的表达模式分析

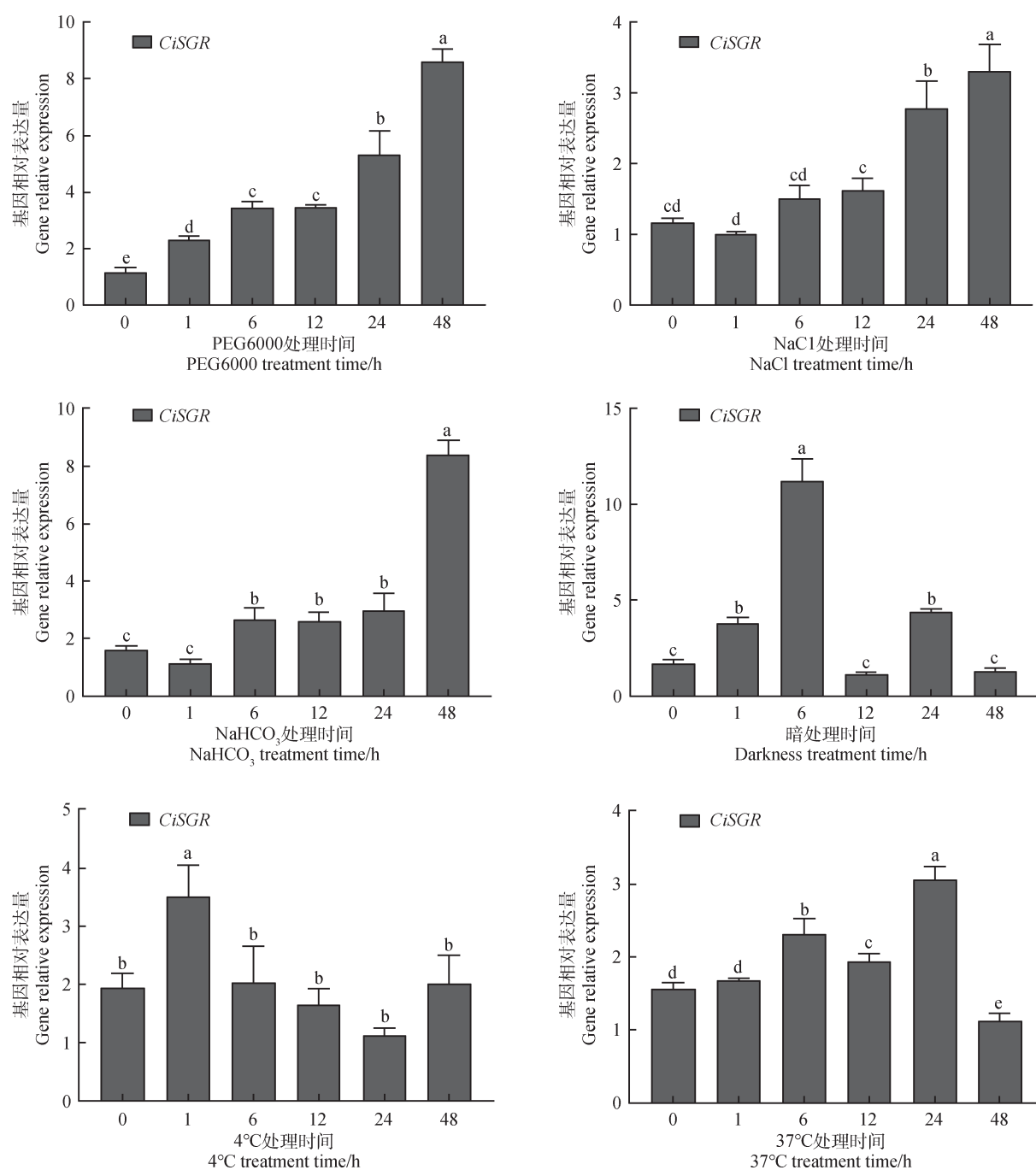
在 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的启动子中检测到胁迫相关元件,为了进一步确定这两个基因在胁迫环境下的潜在功能,对菊苣进行了 PEG6000 模拟干旱处理、NaCl 盐胁迫处理、NaHCO₃ 碱胁迫处理、4℃ 低温处理、37℃ 高温处理和黑暗处理。RT-qPCR 结果显示(图7),经 NaCl 处理后, *CiSGR* 的表达量呈先下降后上升的趋势,其表达量在 1 h 下降,随后在 24 h

显著上升,在 48 h 达到峰值, *CiSGRL* 的表达趋势与 *CiSGR* 相似,在 24 h 和 48 h 同样显著上升;在 PEG 模拟的干旱胁迫处理后, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的表达量趋势基本相同,整体呈现上升趋势,并在 48 h 达到峰值;经 4℃ 处理的冷胁迫中, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的表达量呈先上升后下降又上升的波动趋势,均在 1 h 达到峰值随后下降,其中 *CiSGRL* 表达量在 12 h 和 48 h 显著升高;37℃ 处理的高温胁迫中, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的表达量整体上均呈现先上升再下降的趋势,在 24 h 显著升高并达到峰值,随后下降;NaHCO₃ 处理后, *CiSGR* 的表达量呈逐渐上升趋势,在 48 h 被显著上调;黑暗处理后, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 的表达模式相似,均呈现先上升再显著下降,在 6 h 表达量达到峰值,为 0 h 表达量的 7.67 倍。这些发现表明, *CiSGR* 和 *CiSGRL* 在不同非生物胁迫中的表达趋势基本一致,并都可以响应 NaCl, PEG, NaHCO₃, 黑暗胁迫和高低温胁迫的信号。

3 讨论

SGR 同源物在叶片衰老的 Chl 降解和响应逆境胁迫方面起重要作用。近年来,一些研究发现 SGR 基因的表达在番茄、茶树、柳杉等植物中受到不同逆境胁迫的影响,然而缺乏对菊苣 SGR 基因的功能研究。本研究中,我们首次在菊苣中鉴定了两个 SGR 基因家族成员。系统发育分析表明,两个成员 *CiSGR* 和 *CiSGRL* 分属 SGR 和 SGRL 亚家族(图 2A),这一分类模式与拟南芥、水稻等物种中 SGR 家族的功能分化高度一致^[24,27]。所有成员均定位于叶绿体,且蛋白序列中均包含叶绿体转运肽、高度保守的 SGR 结构域及 C 端可变区,该结构特征与拟南芥、番茄等其他植物物种中 SGR 家族成员的报道结果高度一致^[10,23]。

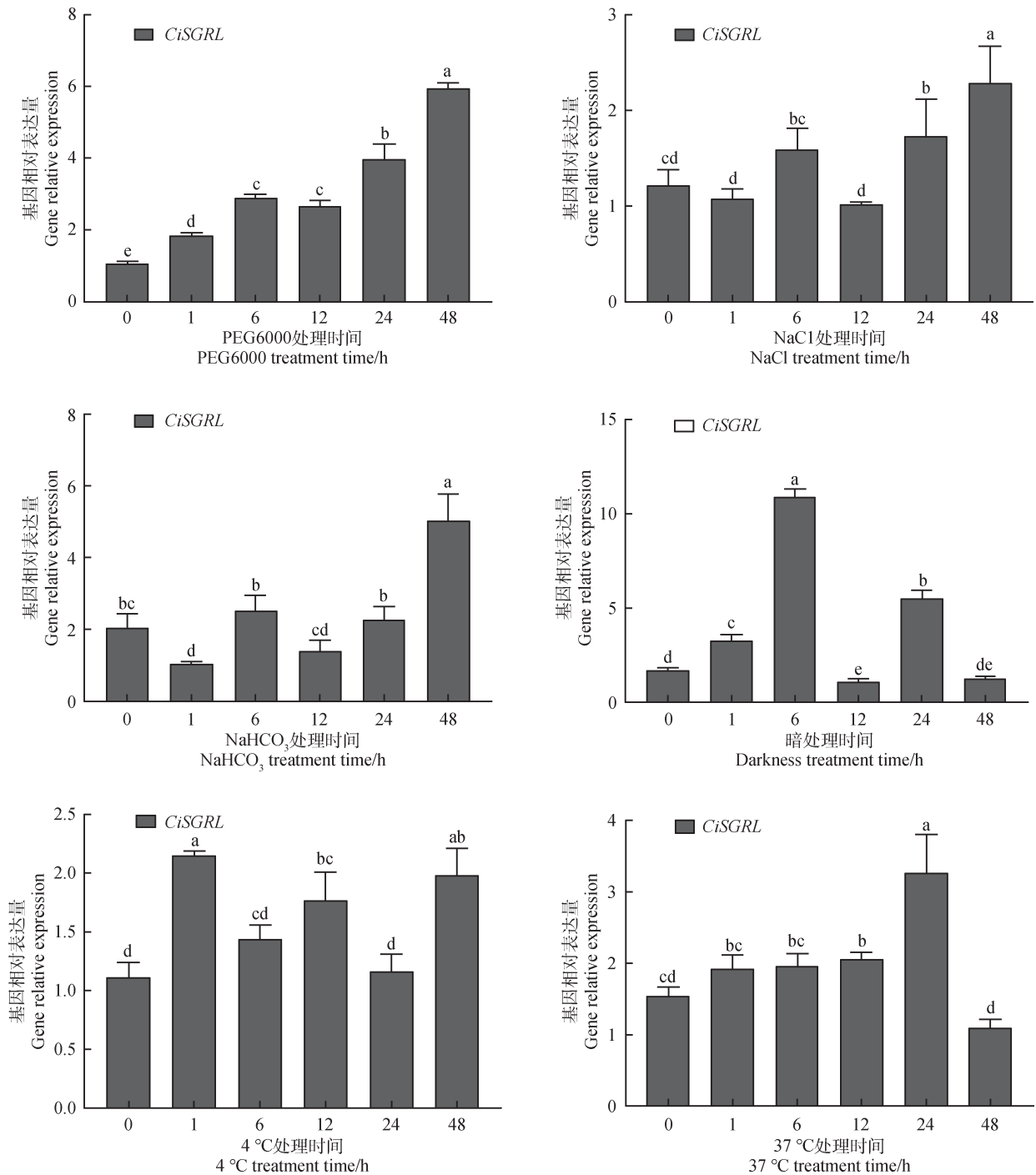
亚细胞定位表明 *CiSGR* 主要定位于叶绿体和细胞核中, *CiSGRL* 主要定位于细胞核和细胞质。这一发现与 SGR 家族的主要功能及潜在调控作用高度契合。叶绿体作为植物叶绿素合成与降解的核心场所,是 SGR 蛋白发挥脱镁整合酶功能的关键位置。此前的研究已证实,拟南芥 *AtSGR1* 基因与水稻 *OsSGR* 基因均通过其编码蛋白的叶绿体定位,调控叶绿素降解过程^[14,26],而细胞核定位的潜在可能性则暗示二者可能存在除叶绿素代谢外的其他功能。 *CiSGR* 与 *CiSGRL* 启动子区域均含有丰富

图7 *CiSGR*在不同胁迫下的表达水平Fig. 7 Expression levels of *CiSGR* in response to different stresses

的光响应元件(如 G-box)、激素响应元件(如 ABA 响应元件 ABRE, MeJA 响应元件)及胁迫响应元件(如干旱响应 MYB 结合位点),这些元件是转录因子结合的关键区域,直接关联基因的转录调控功能^[40]。已有研究报道,部分叶绿体定位蛋白可通过“核质穿梭”机制参与核内转录调控,例如拟南芥叶绿素合成相关的原叶绿素酸酯氧化还原酶(Protochlorophyllide oxidoreductase, POR)可进入细胞核,通过结合光敏色素互作因子(Phytochrome Interact-

ing Factors, PIFs)调控光响应基因表达^[45]。据此推测, *CiSGR* 与 *CiSGRL* 基因的编码蛋白可能定位于细胞核,进而直接或间接调控下游胁迫响应及激素信号通路相关基因的表达,从而协同叶绿体中的叶绿素代谢功能,增强菊苣对逆境的适应性。

从胁迫响应模式来看, *CiSGR* 与 *CiSGRL* 的表达量能够受盐、干旱、碱及黑暗胁迫的显著诱导,且不同胁迫下的表达模式差异反映了基因功能的特异性与环境适应性,为解析菊苣抗逆机制提供了关

图8 *CiSGRL*在不同胁迫下的表达水平Fig. 8 Expression levels of *CiSGRL* in response to different stresses

键分子证据。盐胁迫处理下, *CiSGR* 与 *CiSGRL* 的表达量均呈现先下降后上升的趋势, 这一表达模式与番茄 *SfSGR2* 在盐胁迫下的响应特征相似^[36]。盐胁迫初期(1 h)基因表达的短暂下调, 而后期表达上调, 该现象可能与水稻 *OsSGR* 过表达植株在盐胁迫下应对离子失衡的应答机制具有相似性^[33], 水稻 *OsSGR* 在盐胁迫初期基因表达短暂下调以减少短期内叶绿素过度降解导致的光合效率骤降; 而后期

表达上调则可能通过加速受损叶绿素的降解, 减少活性氧的产生。干旱胁迫处理下, *CiSGR* 与 *CiSGRL* 的表达量整体呈现持续上升趋势, 并在 48 h 达到峰值, 这一响应模式与柳杉 *CfSGR2* 在干旱胁迫下的表达特征高度符合^[37]。此外, *CiSGR* 与 *CiSGRL* 启动子中的干旱响应 MYB 结合位点, 暗示其可能受 MYB 类转录因子直接调控, 这与报道的草地早熟禾 *PpMYB2* 基因通过调控下游抗逆基因

表达提升耐旱性的机制相似^[40]。碱胁迫作为盐碱地常见的胁迫类型,其对植物的伤害不仅包括离子毒害,还涉及高pH值对酶活性的抑制^[41]。本研究中,*CiSGR*的表达量在碱胁迫下与*CiSGRL*不同,这可能与苜蓿在碱胁迫下通过代谢重编程适应逆境的结果相似^[41];苜蓿*SGR*主导碱胁迫后期的叶绿素降解调控,通过清除受损叶绿素维持细胞稳态;*SGRL*则参与中期的应激响应,调控叶绿素周转以适应高pH环境。*CiSGR*和*CiSGRL*在响应碱胁迫时有同样的功能分工。黑暗胁迫作为诱导植物叶片黄化(叶绿素降解)的典型环境信号,其通过抑制光合作用光反应过程,进而激活叶绿素分解代谢通路^[10,29]。本研究中,*CiSGR*与*CiSGRL*在黑暗胁迫下6 h即达表达峰值,随后虽有下降但仍维持较高水平,这与拟南芥*AtSGR1*在黑暗中24 h达峰的趋势一致^[26],但响应速度更快,这一机制可能是菊苣作为牧草在高密度种植及遮阴环境下形成的特异性适应策略。从实际应用来看,菊苣在高密度种植时易因光照不足出现叶片黄化,导致生物量与营养品质下降^[1],而*CiSGR*与*CiSGRL*在黑暗中的高响应性提示,通过基因编辑技术(如CRISPR/Cas9)抑制二者在黑暗中的表达,可能延迟遮阴下的叶片衰老,从而提升单位面积生物量,这一方向需后续通过转基因实验验证。例如参考构建日本结缕草*ZjsgR*突变植株的方法^[46],明确基因编辑对菊苣持绿性的实际影响。在4℃低温胁迫下,*CiSGR*与*CiSGRL*的表达变化趋势完全同步;处理0~6 h内均维持较低表达水平;12 h时达到表达峰值,24 h时表达量略有回落。这一响应模式虽表明两基因能感知低温信号并上调表达,但与其他物种相比,响应幅度更小;例如茶树*CsSGR1*在4℃处理12 h时表达量较对照上调2.5倍^[35],柳杉*CjSGR2*在5℃处理48 h时上调幅度达3.8倍^[37],而菊苣两基因的最大上调幅度均未超过2倍,且峰值后快速回落,未出现持续高表达现象。在37℃高温胁迫中,*CiSGR*与*CiSGRL*的协同响应特征更为明显:二者均在处理6 h时开始显著上调,24 h时达到表达峰值,且峰值阶段两基因表达量无显著差异。同样,这一响应与番茄*SlSGR1*的高温响应存在差异:番茄*SlSGR1*在37℃处理24 h时表达量为对照的3.1倍^[36],显著高于菊苣两基因的响应幅度,且番茄*SlSGR1*在峰值后仍能维持高表达,而菊苣两基因在37℃处理36 h时表达量已降至对照的1.3倍左右,表现出“快速响应、适度上调、及时回落”的独特模式。

4 结论

本研究鉴定并克隆了菊苣的2个*SGR*家族成员(*CiSGR*和*CiSGRL*),并对这两个成员基因进行了一系列生物信息学的分析。亚细胞定位表明*CiSGR*主要定位于叶绿体和细胞核中,*CiSGRL*主要定位于细胞核和细胞质。组织表达模式分析显示,*CiSGR*和*CiSGRL*在不同的组织中存在表达量的差异,但表达模式相似,均在茎中表达量最高,叶中其次。胁迫处理后,*CiSGR*和*CiSGRL*的表达量均显著受到盐、干旱、碱、黑暗和高低温胁迫的诱导,但*CiSGR*和*CiSGRL*的胁迫诱导模式在不同胁迫处理间存在差异。本研究首次完成了菊苣*SGR*基因的鉴定与功能的初步分析,为靶向改良菊苣持绿性状,提升菊苣产量及饲用品质奠定了分子基础。

参考文献

- [1] 王若楠,曹升旭,郑飞,等. 菊苣作为饲用牧草的研究与应用[J]. 饲料工业,2018,39(11):19-22
WANG R N, CAO S X, ZHENG F, et al. Research and application of chicory as forage crop [J]. Feed Industry, 2018, 39 (11):19-22
- [2] KIDANE A, HOUDIJK J G M, ATHANASIADOU S, et al. Effects of maternal protein nutrition and subsequent grazing on chicory (*Cichorium intybus*) on parasitism and performance of lambs [J]. Journal of Animal Science, 2010, 88(4):1513-1521
- [3] 林志健,王雨,郭凡帆,等. 菊苣研究进展的CiteSpace知识图谱分析[J]. 中国中药杂志,2020,45(18):4490-4499
LIN Z J, WANG Y, GUO F F, et al. Analysis of CiteSpace knowledge map for *Cichorium intybus* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(18):4490-4499
- [4] LOPES M S, REYNOLDS M P. Stay-green in spring wheat can be determined by spectral reflectance measurements (normalized difference vegetation index) independently from phenology [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10):3789-3798
- [5] HU X Y, GU T Y, KHAN I, et al. Research progress in the interconversion, turnover and degradation of chlorophyll [J]. Cells, 2021, 10(11):3134
- [6] HÖRTENSTEINER S. Chlorophyll degradation during senescence [J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57:55-77
- [7] 陈耀宇,王曙光,孙黛珍. 作物STAYGREEN功能与调控的研究进展[J]. 生物学杂志,2019,36(3):83-87
CHEN Y Y, WANG S G, SUN D Z. The research progress in the function and regulation of STAYGREEN in crops [J]. Journal of Biology, 2019, 36(3):83-87
- [8] NICKELSEN J, RENGSTL B. Photosystem II assembly:

- from cyanobacteria to plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 609-635
- [9] SAKURABA Y, HAN S H, LEE S H, et al. Arabidopsis NAC016 promotes chlorophyll breakdown by directly upregulating *STAYGREEN1* transcription [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(1): 155-166
- [10] JIAO B Z, MENG Q W, LÜ W. Roles of stay-green (*SGR*) homologs during chlorophyll degradation in green plants [J]. *Botanical Studies*, 2020, 61(1): 25
- [11] WANG P, GRIMM B. Connecting chlorophyll metabolism with accumulation of the photosynthetic apparatus [J]. *Trends in Plant Science*, 2021, 26(5): 484-495
- [12] ARMSTEAD I, DONNISON I, AUBRY S, et al. Cross-species identification of Mendel's I locus [J]. *Science*, 2007, 315(5808): 73
- [13] SAKURABA Y, PARK S Y, PAEK N C. The divergent roles of *STAYGREEN* (*SGR*) homologs in chlorophyll degradation [J]. *Molecules and Cells*, 2015, 38(5): 390-395
- [14] JIANG H W, LI M R, LIANG N T, et al. Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice [J]. *The Plant Journal*, 2007, 52(2): 197-209
- [15] HU Z L, DENG L, YAN B, et al. Silencing of the *LeSGR1* gene in tomato inhibits chlorophyll degradation and exhibits a stay-green phenotype [J]. *Biologia Plantarum*, 2011, 55(1): 27-34
- [16] BARRY C S, MCQUINN R P, CHUNG M Y, et al. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper [J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(1): 179-187
- [17] SHI S Y, MIAO H Y, DU X M, et al. *GmSGR1*, a stay-green gene in soybean (*Glycine max* L.), plays an important role in regulating early leaf-yellowing phenotype and plant productivity under nitrogen deprivation [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(4): 97
- [18] LUO J, ABID M, ZHANG Y, et al. Genome-wide identification of kiwifruit SGR family members and functional characterization of *SGR2* protein for chlorophyll degradation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 1993
- [19] PARK S Y, YU J W, PARK J S, et al. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(5): 1649-1664
- [20] 杨晓棠, 张昭其, 徐兰英, 等. 植物叶绿素的降解 [J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(1): 7-14
- YANG X T, ZHANG Z Q, XU L Y, et al. Plant chlorophyll degradation [J]. *Plant Physiology Communications*, 2008, 44(1): 7-14
- [21] 邵允, 张蒙蒙, 陈云, 等. 桃 *PpSGR* 基因功能鉴定及其对乙烯合成的调控 [J]. *果树学报*, 2023, 40(12): 2513-2523
- SHAO Y, ZHANG M M, CHEN Y, et al. Function identification of *PpSGR* gene and its regulation of ethylene synthesis in peach [J]. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40(12): 2513-2523
- [22] BADE R G, BAO M L, JIN W Y, et al. Genome-wide identification and analysis of the SGR gene family in *Cucumis melo* L. [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(4): gmr15048485
- [23] XIE Z K, WU S D, CHEN J Y, et al. The C-terminal cysteine-rich motif of NYE1/SGR1 is indispensable for its function in chlorophyll degradation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2019, 101(3): 257-268
- [24] SHIN D, LEE S, KIM T H, et al. Natural variations at the *Stay-Green* gene promoter control lifespan and yield in rice cultivars [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2819
- [25] LUO Z D, ZHANG J H, LI J H, et al. A STAY-GREEN protein *SISGR1* regulates lycopene and β -carotene accumulation by interacting directly with *SIPSY1* during ripening processes in tomato [J]. *The New Phytologist*, 2013, 198(2): 442-452
- [26] REN G D, AN K, LIAO Y, et al. Identification of a novel chloroplast protein *AtNYE1* regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1429-1441
- [27] SAKURABA Y, PARK S Y, KIM Y S, et al. *Arabidopsis* *STAYGREEN2* is a negative regulator of chlorophyll degradation during leaf senescence [J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(8): 1288-1302
- [28] WU S X, LI Z P, YANG L F, et al. *NON-YELLOWING2* (*NYE2*), a close paralog of *NYE1*, plays a positive role in chlorophyll degradation in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(4): 624-627
- [29] RONG H, TANG Y Y, ZHANG H, et al. *The Stay-Green Rice like* (*SGRL*) gene regulates chlorophyll degradation in rice [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(15): 1367-1373
- [30] FANG C, LI C C, LI W Y, et al. Concerted evolution of D1 and D2 to regulate chlorophyll degradation in soybean [J]. *The Plant Journal*, 2014, 77(5): 700-712
- [31] PAN J S, TAN J Y, WANG Y H, et al. *STAYGREEN* (*CsSGR*) is a candidate for the anthracnose (*Colletotrichum orbiculare*) resistance locus *cla* in *Gy14* cucumber [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(7): 1577-1587
- [32] ACEVEDO-GARCIA J, SPENCER D, THIERON H, et al. Mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(3): 367-378
- [33] XIE W Y, XUE X, WANG Y, et al. Natural mutation in Stay-Green (*OsSGR*) confers enhanced resistance to rice sheath blight through elevating cytokinin content [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(3): 807-823
- [34] ISHIGA Y, RAO UPPALAPATI S, GILL U S, et al. Transcriptomic and metabolomic analyses identify a role for chlorophyll catabolism and phytoalexin during *Medicago* nonhost resistance against Asian soybean rust [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13061
- [35] REN H Z, YU Y T, HUANG C, et al. Genome-wide identification and characterization of tea *SGR* family members reveal their potential roles in chlorophyll degradation and stress toler-

- ance[J]. *Agronomy*, 2024, 14(4):769
- [36] ULUISIK S, KIYAK A, KURT F, et al. *STAY-GREEN* (*SGR*) genes in tomato (*Solanum lycopersicum*): genome-wide identification, and expression analyses reveal their involvements in ripening and salinity stress responses[J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2022, 63(4):557-569
- [37] ZHANG Y T, WEI G Q, XUE J Y, et al. *CjSGR1* and *CjSGR2* from *Cryptomeria fortunei* exhibit contrasting responses to hormones and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 216: 109152
- [38] 茅远煜, 李丽菁, 李进超, 等. 结缕草 *ZjSGR* 基因在离体模拟逆境胁迫环境下的功能[J]. *草地学报*, 2022, 30(6): 1396-1402
- MAO Y Y, LIL J, LI J C, et al. Gene functional analysis of *ZjSGR* gene in *Zoysia japonica* leaves in response to vitro stress[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(6):1396-1402
- [39] 杜洋, 张智韦, 陆爽, 等. 菊苣 *TCP* 基因家族鉴定与分析[J]. *草地学报*, 2024, 32(8):2428-2439
- DU Y, ZHANG Z W, LU S, et al. Chicory *TCP* gene family identification and analysis[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(8):2428-2439
- [40] 苏浩天, 刘曼, 尹淑霞. 草地早熟禾 *PpMYB2* 基因的克隆、生物信息学及亚细胞定位分析[J]. *草地学报*, 2024, 32(10): 3071-3079
- SU H T, LIU M, YIN S X. Cloning, bioinformatics analysis and subcellular localization analysis of *PpMYB2* gene in *Poa pratensis*[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(10):3071-3079
- [41] GUO R, ZHOU Z Y, CAI R, et al. Metabolomic and physiological analysis of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in response to saline and alkaline stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 207:108338
- [42] ACQUADRO A, BARCHI L, PORTIS E, et al. Genome reconstruction in cynara cardunculus taxa gains access to chromosome-scale DNA variation[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5617
- [43] MAROUFI A, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR[J]. *BMC Molecular Biology*, 2010, 15:11-15
- [44] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D L. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [45] AGRAWAL D, JAJOO A. Study of high temperature stress induced damage and recovery in photosystem II (PSII) and photosystem I (PSI) in Spinach leaves (*Spinacia oleracea*) [J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 30(3): 532-544
- [46] 陆爽, 刘月月, 毛佳静, 等. 日本结缕草 *Zjsgr* 突变植株在北京地区的耐寒性初步分析[J]. *草地学报*, 2025, 33(1):28-33
- LU S, LIU Y Y, MAO J J, et al. Preliminary analysis on cold resistance of *Zoysia japonica* mutant plant *Zjsgr* in Beijing district[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2025, 33(1):28-33

(责任编辑 闵芝智)