

# 甘蔗 GLY 基因家族的鉴定及 *GLYI-1* 基因的功能分析

孙欣路<sup>1,2</sup>, 林佩霞<sup>1,2\*</sup>, 崔世江<sup>1,2</sup>, 李振香<sup>1,2</sup>, 王东姣<sup>1</sup>, 张媛媛<sup>1</sup>, 曾真<sup>1</sup>,  
阙友雄<sup>1,2</sup>, 吴期滨<sup>1,2\*\*</sup>, 赵婉莹<sup>1,2\*\*</sup>

1. 热带作物生物育种全国重点实验/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/中国热带农业科学院三亚研究院, 海南 三亚 572024; 2. 福建农林大学农学院/农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室, 福建福州 350002

**摘要:** 乙二醛酶系统[包括乙二醛酶 I (glyoxalase system, GLY I) 和乙二醛酶 II (glyoxalase system, GLY II)] 是植物体内解毒过量甲基乙二醛 (methylglyoxal, MG) 的关键机制, 在响应非生物胁迫与病原菌感染中发挥重要作用。迄今, GLY 基因家族在甘蔗中的全基因组鉴定和表达分析中尚未见报道。本研究从甘蔗近缘野生种割手密 (*Saccharum spontaneum*) 中鉴定获得了 50 个 *SsGLYI* 基因和 52 个 *SsGLYII* 基因, 并对其理化性质、基因结构、启动子顺式作用元件和表达模式等进行系统分析。结果表明: *SsGLY* 基因随机分布在 30 条染色体上, 43 个 *SsGLYI* 蛋白均拥有一个保守的 Motif1 (PF00903), 所有 *SsGLYII* 蛋白均拥有保守的 Motif1 (PF00753); 39 个 *SsGLYI* 蛋白含有 4 个金属结合位点 (H/Q, L, H, E), 除亚家族 IV 的 *SsGLYI* 8.1~8.4 属于  $Zn^{2+}$  依赖型 *SsGLYI* 蛋白外, 其余均是  $Ni^{2+}$  依赖型, 仅 26 个 *SsGLYII* 蛋白同时具备 THxHxDH 金属结合域和 C/GHT 活性位点。共线性分析识别出 41 对共线基因, 其中 39 对的 Ka/Ks < 1, 表明 *SsGLY* 基因家族在进化过程中主要受纯化选择。在甘蔗响应黑穗病感染中, *SsGLYI* 基因亚家族 V 和 *SsGLYII* 基因亚家族 III 在病菌胁迫下的表达量均高于其他 4 个亚家族, 其中 *SsGLYI* 3.4 基因随着黑穗病菌感染时间的延长, 其在抗病品种 YT93-159 和感病品种 ROC22 中表达模式存在差异。本研究从甘蔗主栽品种 YT93-159 中克隆获得了 *SsGLYI* 3.4 的同源基因 *ScGLYI-1*, 该基因呈组成型表达, 主要定位于叶绿体。同时, *ScGLYI-1* 的表达可被外源水杨酸及黑穗病菌胁迫诱导上调, 表明该基因可能在甘蔗应答病原菌胁迫中起重要作用。本研究为深入解析甘蔗乙二醛酶基因功能奠定理论基础。

**关键词:** 甘蔗; 乙二醛酶基因家族; 生物信息学; 甘蔗黑穗病; 表达模式

中图分类号: S566.1 文献标志码: A

## Genome-wide Identification of the GLY Gene Family and Functional Characterization of the *GLYI-1* Gene in Sugarcane

SUN Xinlu<sup>1,2</sup>, LIN Peixia<sup>1,2\*</sup>, CUI Shijiang<sup>1,2</sup>, LI Zhenxiang<sup>1,2</sup>, WANG Dongjiao<sup>1</sup>, ZHANG Yuanyuan<sup>1</sup>,  
ZENG Zhen<sup>1</sup>, QUE Youxiong<sup>1,2</sup>, WU Qibin<sup>1,2\*\*</sup>, ZHAO Wanying<sup>1,2\*\*</sup>

1. State Key Laboratory of Tropical Crop Biology and Breeding / Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology / Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China; 2. College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University / Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding (Fujian), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fuzhou, Fujian 350002, China

**Abstract:** The glyoxalase system, comprising glyoxalase I (GLYI) and glyoxalase II (GLYII), serves as a key mechanism for detoxifying excess methylglyoxal (MG) in plants and plays an important role in responses to abiotic stress and pathogen infection. To date, genome-wide identification and expression analysis of GLY gene family have not been re-

收稿日期 2025-09-25; 接受日期 2025-10-18

基金项目 热带作物生物育种全国重点实验室创新团队项目 (No. NKLTBCBXTD24, No. NKLTBCBXTD38); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队项目 (No. CATASCXTD202402)。

作者简介 孙欣路 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 甘蔗逆境生物学; \*同等贡献作者: 林佩霞 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 甘蔗逆境生物学。\*通信作者 (Corresponding author): 吴期滨 (WU Qibin), E-mail: wqbaidqq@163.com; 赵婉莹 (ZHAO Wanying), E-mail: zhaowanying@itbb.org.cn。

ported in sugarcane. In this study, we identified 50 *SsGLYI* genes and 52 *SsGLYII* genes from the wild sugarcane *Saccharum spontaneum*, and systematically analyzed the physicochemical properties, gene structures, promoter *cis*-acting elements, and expression patterns. *SsGLY* genes were randomly distributed across 30 chromosomes. All 43 *SsGLYI* members contained a conserved Motif1 (PF00903), while all *SsGLYII* proteins possessed a conserved Motif1 (PF00753). A total of 39 *SsGLYI* proteins contained four metal-binding sites (H/Q, L, H, E), except *SsGLYII*8.1-8.4 from subfamily IV, which were  $\text{Zn}^{2+}$ -dependent, the remaining *SsGLYI* proteins were  $\text{Ni}^{2+}$ -dependent. Only 26 *SsGLYI* proteins contained both the THxHxDH metal-binding domain and the C/GHT active site. Collinearity analysis identified 41 pairs of collinear genes, among which 39 pairs had Ka/Ks values less than 1, indicating that the *SsGLY* gene family has undergone predominant purifying selection during evolution. The expression levels of *SsGLYI* subfamily V and *SsGLYII* subfamily III were higher than those of the other four subfamilies under infection by *Sporisorium scitamineum*. Notably, the expression of *SsGLYI*3.4 showed differences in its expression patterns between the resistant genotype YT93-159 and the susceptible genotype ROC22. Furthermore, we cloned the homologous gene *ScGLYI-1* of *SsGLYI*3.4 from YT93-159, which was constitutively expressed and primarily localized to the chloroplast. Meanwhile, the expression of *ScGLYI-1* could be up-regulated by exogenous salicylic acid (SA) and smut pathogen stress, indicating that this gene may play a crucial role in response to pathogen stress in sugarcane. This study would provide a theoretical foundation for further elucidating the function of glyoxalase genes in sugarcane.

**Keywords:** sugarcane; glyoxalase gene family; bioinformatics; sugarcane smut; expression pattern

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.01.003

植物在遭受真菌、细菌、病毒、害虫等生物胁迫以及高温、低温、干旱、盐渍、重金属等非生物胁迫时,会产生过量的甲基乙二醛(methylglyoxal, MG)、乙二醛(glyoxal, GO)和3-脱氧葡萄糖酮(3-deoxyglucosone, DOG)等有毒醛类物质<sup>[1-3]</sup>。低浓度MG可以作为信号分子,与钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、一氧化氮(NO)、硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )等其他信号分子交互作用形成信号网络,通过多条信号转导途径调控基因表达,调节植物细胞代谢、种子萌发、生长发育等过程以抵抗和适应环境胁迫<sup>[4-6]</sup>。如MG可通过修饰组蛋白H3来调控盐胁迫响应基因的表达<sup>[7]</sup>。当植物受到病原菌侵染和各种逆境胁迫时,体内的MG含量随之增长<sup>[8]</sup>。CHEN等<sup>[9]</sup>研究发现,当玉米(*Zea mays*)遭受黄曲霉素(*Aspergillus flavus*)侵染时,体内的MG含量增加2.5倍。最新研究发现,病原细菌利用MG清除 $\text{H}_2\text{O}_2$ 来促进自身侵染,MG促进三磷酸通道金属酶2(triphosphate tunnel metalloenzyme 2, TTM2)与过氧化氢酶2(catalase 2, CAT2)的相互作用,提升CAT2活性,并减少 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的积累<sup>[3]</sup>。

植物对MG的清除途径主要有乙二醛酶(glyoxalase, GLY)系统和非乙二醛酶系统,其中GLY酶系统是最重要的防线,占整个MG清除比例的99%<sup>[1, 10]</sup>。乙二醛酶系统包括级联反应的乙二醛酶I(GLY I)和乙二醛酶II(GLY II),以及独立反应的乙二醛酶III(GLY III)。其中,谷

胱甘肽(glutathione, GSH)依赖的GLY途径普遍存在于植物体内,是最为重要的MG清除途径。GLY I又称乳酰谷胱甘肽裂解酶(lactoylglutathione lyase),是一类金属酶蛋白,大量研究表明GLY I在植物的生长发育和防御各种生物与非生物胁迫中起重要作用。ZENG等<sup>[11]</sup>报道了水稻*OsGlyI*基因的上调表达受NaCl、 $\text{ZnCl}_2$ 和甘露醇胁迫的诱导,与野生型水稻相比,过表达*OsGlyI*的转基因水稻株系表现出较高的GLY I活性和较低的MG活性,从而提高对NaCl、 $\text{ZnCl}_2$ 和甘露醇的耐受性,提高结实率和产量。LIN等<sup>[12]</sup>的研究发现,在禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的侵染下,大麦(*Triticum aestivum*)*TaGlyI*基因的表达量显著提高。GLY II是谷胱甘肽依赖的乙二醛酶系统中的第二个酶,又称羟酰谷胱甘肽水解酶(hydroxyacylglutathione hydrolase),是一种单体金属酶,其活性位点含有一个由THxHxDH保守基序构成的双核金属离子结合位点,包含一个水分子<sup>[13]</sup>。根据酶的特异性,GLY II可以结合 $\text{Zn}^{2+}$ 、铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )、锰离子( $\text{Mn}^{2+}$ )等不同的金属离子。大量研究表明,GLY II在植物响应和适应环境胁迫中也起着重要的作用,而且GLY I和GLY II往往能够同时被各种环境胁迫所诱导<sup>[14-15]</sup>。此外,参与独立反应的GLY III在非生物胁迫中发挥的功能可能优于GLY I和GLY II。*SIGLYIII2*过表达番茄植株在盐和渗透胁迫下具有更高的GSH/GSSG比值和具有较高的抗氧化潜力;在胁

胁迫耐受性方面的表现优于同时过表达 *SIGLYI4* 和 *SIGLYI2* 的植株<sup>[16]</sup>。截至目前, 在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中鉴定到 11 个 *GLY I* 基因和 3 个 *GLY II* 基因<sup>[17]</sup>, 玉米中有 13 个 *GLY I* 基因和 3 个 *GLY II* 基因<sup>[18]</sup>, 大豆 (*Glycine max*) 中有 24 个 *GLY I* 基因和 12 个 *GLY II* 基因<sup>[19]</sup>, 苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中有 29 个 *GLY I* 基因、14 个 *GLY II* 基因和 5 个 *GLY III* 基因<sup>[20]</sup>, 白菜 (*Brassica rapa* L.) 中有 16 个 *GLY I* 基因和 15 个 *GLY II* 基因<sup>[21]</sup>, 甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 中有 15 个 *GLY I* 基因和 16 个 *GLY II* 基因<sup>[22]</sup>, 拟南芥中分别有 11 个 *GLY I* 基因和 5 个 *GLY II* 基因<sup>[18]</sup>。

甘蔗遗传背景复杂, 其 GLY 基因家族的全基因组鉴定和表达分析尚未见报道。为此, 本研究以割手密基因组为基础<sup>[23]</sup>, 利用生物信息学方法, 挖掘 SsGLY 基因家族, 并对其理化性质、染色体定位、基因结构、保守基序、进化关系、基因复制关系、启动子顺式作用元件、组织表达模式及其在甘蔗黑穗病菌胁迫下的表达模式进行系统分析, 筛选可能在甘蔗胁迫响应中发挥重要功能的家族成员; 并且从甘蔗主栽品种 YT93-159 中克隆获得了割手密 SsGLYI 3.4 的同源基因 ScGLYI-1, 并对其组织特异性、亚细胞定位以及多种胁迫的表达模式进行分析。本研究旨在系统解析甘蔗 GLY 基因家族成员的序列特征、结构特性及基因表达模式, 为进一步在甘蔗栽培种上的基因克隆和生物学功能解析提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 SsGLY 基因家族的鉴定及理化性质分析

从 Species list (<http://plants.ensembl.org/species.html>) 数据库中下载甘蔗野生种割手密的基因组数据库<sup>[23]</sup>。从 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库<sup>[24]</sup>分别下载 PF00903 和 PF00753 的 HMM 模型, 利用 HMM 模型在割手密基因组数据库中进行本地检索, 获得 GLY 蛋白序列。利用 NCBI 的 Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 在线工具分析筛选保守结构域<sup>[25]</sup>, 最终获得割手密 SsGLY 基因家族序列。利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测 SsGLY 蛋白的理化性质 (分子量、等电点、亲疏水性和不稳定系数), 通过 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 Plant-mPLoc ([http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-](http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/)

multi/) 在线软件分别预测 SsGLY 蛋白的信号肽和亚细胞定位, 利用 prabi ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 在线软件预测 SsGLY 蛋白的二级结构, 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件预测 SsGLY 候选基因的三级结构。

### 1.2 SsGLY 基因家族的染色体定位和进化分析

从割手密基因组数据中下载 GFF3 文件, 获得割手密 32 条染色体的长度, 并查找获得 SsGLY 基因家族各成员在割手密染色体上的位置信息, 利用 MG2C ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.1/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/))<sup>[26]</sup> 在线软件绘制 SsGLY 基因家族的染色体物理定位图。利用 MUSCLE v3.7<sup>[27]</sup> 软件对 SsGLY 基因家族进行蛋白多序列比对, 利用 MEGA 5.0 软件的邻近法 (neighbor-joining method, NJ), 将 SsGLY 蛋白与拟南芥、水稻、玉米和白菜的 GLY 蛋白序列构建系统进化树, 设置 1000 次的迭代次数 (Bootstrap=1000)。利用 EvolView (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 在线软件对进化树进行可视化<sup>[28]</sup>。

### 1.3 SsGLY 基因家族的结构、保守基序分析和蛋白序列比对

从割手密基因组数据库中搜索 SsGLY 基因家族成员的 cDNA 和 CDS 序列, 利用 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件预测 SsGLY 基因家族成员的外显子和内含子的分布模式<sup>[29]</sup>。利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线软件分析 SsGLY 基因家族成员序列的保守基序<sup>[30]</sup>, 利用 TBtools 软件对 SsGLY 基因家族的保守基序进行可视化分析<sup>[31]</sup>。利用 ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 在线软件对 SsGLY 蛋白序列进行比对<sup>[32]</sup>, 并利用 Jalview (<http://www.jalview.org/>) 在线软件对序列比对结果进行可视化分析<sup>[33]</sup>。

### 1.4 SsGLY 基因家族的共线性、Ka/Ks 及启动子顺式作用元件分析

利用 MCScanX 软件对 SsGLY 基因家族的基因复制模式和共线性关系进行鉴定分析<sup>[34]</sup>。利用 TBtools 软件计算 SsGLY 基因家族共线性基因的 Ka/Ks 值, 并分析其进化选择压力。基于割手密基因组数据, 获取 SsGLY 基因家族转录起始位点前 2000 bp 启动子序列, 并利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件预测启动子顺式作用元件<sup>[35]</sup>, 经过筛选

整理后，导入 TBtools 软件，绘制 SsGLY 基因家族的启动子顺势作用元件图。

1.5 SsGLY 基因家族的表达模式分析

基于课题组前期构建的甘蔗栽培种 ROC22 的不同组织（蔗皮、蔗肉、根、叶和芽）转录组数据和甘蔗黑穗病抗病品种 YT93-159、感病品种 ROC22 接种甘蔗黑穗病菌后不同时间（0、1、2、3、4、5 d）的转录组数据库<sup>[36]</sup>，分析 SsGLY 基因家族在甘蔗不同组织中的表达模式和在甘蔗黑穗病菌胁迫下的表达模式。利用 TBtools 软件绘制 SsGLY 基因家族表达量热图。

1.6 甘蔗样品处理与荧光定量 PCR

实时荧光定量试验材料为甘蔗抗病品种 YT93-159 以及感病品种 ROC22。选取长势相同的抗病品种 YT93-159 的幼叶、+1 叶、老叶、叶鞘、蔗皮、新蔗肉、衰老蔗肉和蔗芽 8 个部位取样，每组设置 3 个生物学重复，-80℃保存，用于后续 RNA 提取。此外，采用单芽茎段法将生长健康、长势一致的 YT93-159 和 ROC22 的成熟蔗茎切割成含单个芽体的茎段，流水冲洗浸泡 24 h 后，转移至恒温培养箱催芽处理。待蔗芽伸长至约 2 cm 时，使用 5×10<sup>6</sup> cfu/mL 的黑穗病菌（*Sporisorium scitamineum*）孢子悬浮液进行人工接种，分别于接种黑穗病菌后的 0、1、2、3、5 d 收集蔗芽材料，每组设置 3 个生物学重复。所有样品液氮冻存后，于-80℃保存。模拟胁迫处理：选取 4~5 叶龄且长势一致的感病品种 ROC22 的组培苗，分别喷施 5 mmol/L 水杨酸（Salicylic acid, SA）和 25 μmol/L 茉莉酸甲酯（methyl jasmonate, MeJA），分别在处理后 0、3、12、24 h 取单株叶片。采用 TRIzol 法提取所有样品的总 RNA，使用 BioTek Synergy 多功能酶标仪检测 RNA 纯度和浓度。根据 Hifair<sup>®</sup> III 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit（翌圣，上海）试剂盒说明书，将总 RNA 逆转录为 cDNA，设计引物（表 1）进行荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR, RT-qPCR）分析。

1.7 甘蔗 ScGLYI-1 基因的克隆

基于割手密 SsGLYI 3.4 基因序列，通过 Primer 5.0 软件设计克隆引物（表 1），按照 2×Phanta Flash Master Mix（诺唯赞，南京）说明书配置 PCR 体系进行扩增。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，纯化回收，连接 pEASY<sup>®</sup>-Blunt Zero Cloning Kit（全式金，北京）载体并转化大肠杆菌 DH5α（唯地，上海），挑取单克隆进行菌液

PCR 检测和测序验证。测序比对成功后，提取阳性质粒，命名为 ScGLYI-1，-20℃保存备用。

表 1 引物序列信息  
Tab. 1 Primers sequence information

| 引物名称<br>Primer name    | 引物序列（5'-3'）<br>Primer sequence (5'-3') | 用途<br>Usage |
|------------------------|----------------------------------------|-------------|
| ScGLYI-1-F             | ATGGCGACGAGGTGCCTCGC                   | 基因克隆        |
| ScGLYI-1-R             | CTACACTTGGGTGAAGTCCA                   |             |
| pCAMBIA1300-ScGLYI-1-F | ACGGGGGACGAGCTCGGTACC                  | 亚细胞定位       |
| pCAMBIA1300-ScGLYI-1-R | CATGTCGACTCTAGAGGATCCC                 |             |
| ScGLYI-1-Q-F           | GGAGGTGAATCCAGCTAGGC                   | qRT-PCR     |
| ScGLYI-1-Q-R           | TTGGCAGCTCCATCAAGTGG                   |             |
| GAPDH-F                | CACGGCCACTGGAAGCA                      |             |
| GAPDH-R                | TCCTCAGGGTTCCTGATGCC                   |             |

1.8 甘蔗 ScGLYI-1 蛋白的亚细胞定位

依据 ScGLYI-1 基因的 cDNA 序列设计接头引物 pCAMBIA1300-ScGLYI-1-F/R（表 1），以 ScGLYI-1 基因克隆质粒为模板进行 PCR 扩增。胶回收并纯化目的条带，通过同源重组酶 pEASY<sup>®</sup>-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit（全式金，北京）连接酶切后的线性化载体 pCAMBIA1300-35S-EGFP（*Kpn* I /*Bam* H I）后，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。经菌液 PCR 和测序验证后，将阳性重组质粒 pCAMBIA1300-ScGLYI-1-EGFP 与空载质粒分别转化农杆菌 GV3101，挑取单克隆进行菌液 PCR 检测，成功后转入扩繁。用含 10 mmol/L MES 与 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的侵染液将菌液浓度调至 OD<sub>600</sub>≈0.6，加入 200 mmol/L 乙酰丁香酮，在暗处静置 2~3 h，选择 5~6 叶龄生长良好的本氏烟植株叶片进行注射。实验组注射含有目标基因的重组载体，对照组则注射空载 pCAMBIA1300-EGFP，放置在 28℃，16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 2 d，使用 LEICA TCS SP8 激光共聚焦显微镜（徕卡，德国）观察亚细胞定位情况。

1.9 甘蔗 ScGLYI-1 基因的表达模式分析

利用 NCBI 数据库设计 ScGLYI-1 基因的 RT-qPCR 检测引物（表 1），以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）基因为参照基因，以逆转录合成的 cDNA 样品为模板，按照 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书配制 RT-qPCR 反应体系。qRT-PCR 程序为：95℃，30 s；95℃，10 s，60℃，



30 s, 循环 40 次。利用 Applied Biosystems QuantStudio 3 实时定量 PCR 系统检测甘蔗 *ScGLYI-1* 基因在不同组织和在 MeJA、SA、黑穗病菌胁迫下的表达水平。利用 DPS 9.50 软件, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析实验结果的显著性, 并利用 prism10.1.2 软件制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 SsGLY 基因家族的鉴定及理化性质分析

从割手密基因组中鉴定到 50 个 SsGLYI 家族成员[包含一个乙二醛酶结构域(Pfam, PF00903)]和 52 个 SsGLYII 家族成员[包含金属- $\beta$ -内酰胺酶结构域(Pfam, PF00753)](附表 1)。生物信息学分析显示, SsGLYI 家族蛋白的相对分子量介于 10.10~66.20 kDa 之间, 氨基酸序列一致性为 14.53%, 理论等电点介于 4.50~9.82 之间, 多数家族成员为酸性蛋白, 主要定位于叶绿体和细胞质。52 个 SsGLYII 家族蛋白相对分子量介于 8.96~110.77 kDa 之间, 氨基酸序列的一致性为 10.26%, 理论等电点介于 5.07~9.60 之间, 多数家族成员为酸性蛋白, 主要定位于细胞核、叶绿体和线粒体。SsGLYI 和 SsGLYII 家族蛋白的二级结构均以不规则卷曲为主,  $\alpha$ -螺旋、延伸链和  $\beta$ -转角次之(附表 2)。

### 2.2 SsGLY 基因家族的染色体分布与进化树分析

染色体定位分析显示, 除 Chr8B、Chr8C 染色体外, 其余 30 条割手密染色体上均分布了数目不等的 SsGLY 基因, 其中 Chr6A、Chr6C、Chr6D、Chr7C 和 Chr8D 上只分布 1 个 SsGLY 基因, 分别为 *SsGLYI10.1*、*SsGLYI10.5*、*SsGLYI10.6*、*SsGLYI13.2* 和 *SsGLYI14.3*。Chr1D 上分布 9 个 SsGLY 基因(图 1A)。与 SsGLYII 家族基因分布相比, SsGLYI 家族基因在染色体上的分布较广, 除 Chr3D、Chr4C、Chr8B 和 Chr8D 染色体外, *SsGLYI* 基因在其余 30 条染色体上均有分布, 而 *SsGLYII* 基因只分布在染色体 Chr1A~1D、Chr2A~2D、Chr3A~3D、Chr4A~4D、Chr5A 和 Chr5D 上。为解析割手密 SsGLY 家族与其他物种的同源性, 与拟南芥、水稻、玉米构建 GLYI 的系统发育进化树, 同时与拟南芥、水稻、玉米、白菜构建 GLYII 的系统发育进化树。结果显示, GLYI 和 GLYII 均分为 5 个亚家族。在 GLYI 进化树中, 最大的亚家族是 I, 其中割手密 GLYI 20 个, 第二大亚家族是 IV, 包含 35 个 GLYI 蛋白,

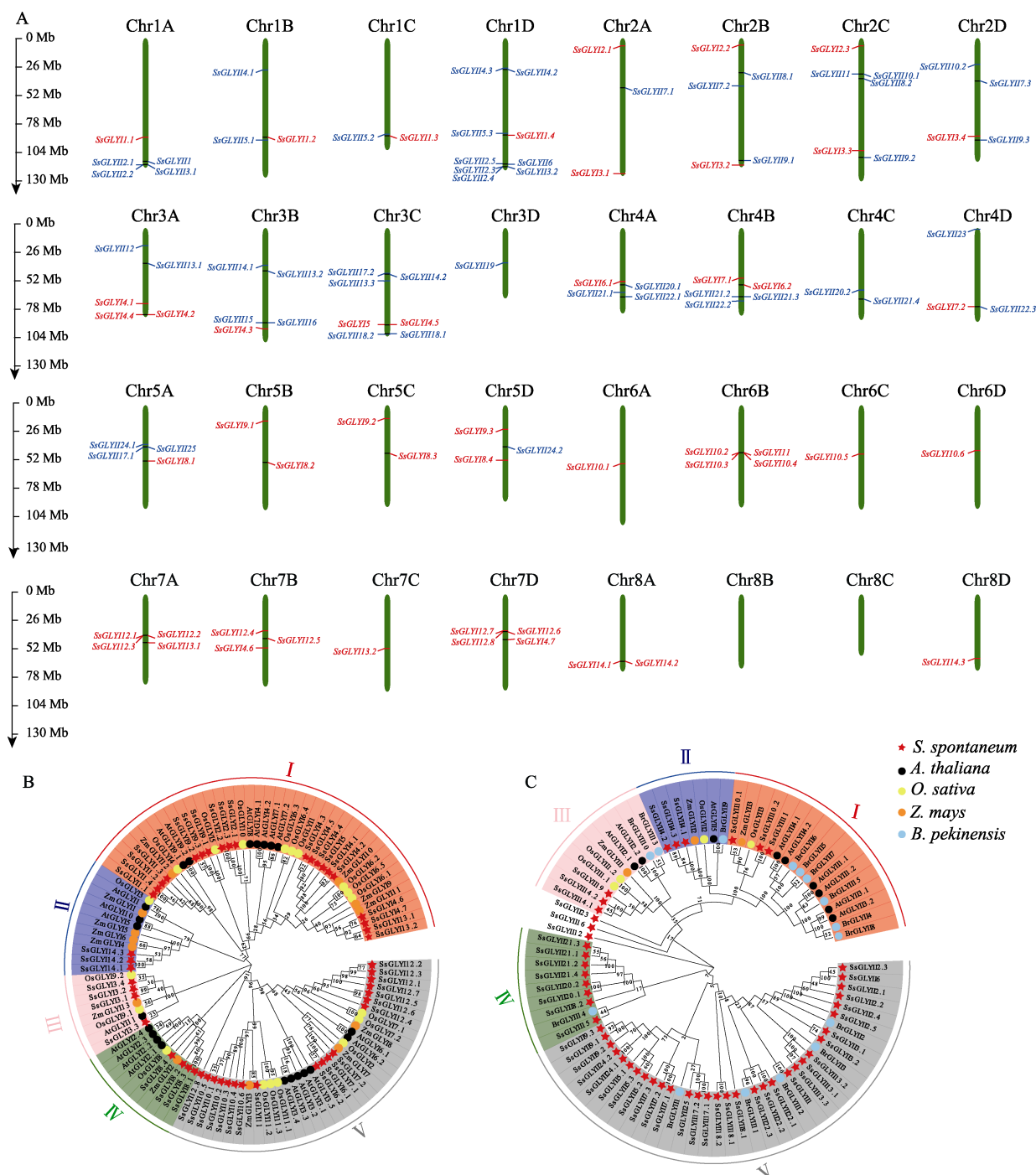
其中割手密 GLYI 19 个。最小的亚家族是 III, 包含 8 个 GLYI 蛋白, 其中割手密 GLYI 4 个(图 1B)。在 GLYII 进化树中, 最大的亚家族是 V, 包含 37 个 GLYII 蛋白; 最小的亚家族是 II, 包含 7 个 GLYII 蛋白; 亚家族 I、III、IV 分别包含 17、10、9 个 GLYII 蛋白(图 1C)。

### 2.3 SsGLY 家族的基因结构、保守基序和蛋白序列结构比对分析

SsGLY 家族的基因结构分析结果显示, 亲缘关系越近的基因, 其基因结构相似性越高, 但也有基因存在一定的变异(图 2)。SsGLYI 基因家族的外显子数目和内含子数目存在差异, 外显子数目在 2~22 个之间, 内含子数目在 1~21 个之间, 其中 *SsGLYI8.3* 外显子和内含子数目最多, 分别为 22 个和 21 个, 而 *SsGLYI2.1*、*SsGLYI2.2*、*SsGLYI2.3* 和 *SsGLYI13.2* 只有 2 个外显子和 1 个内含子。SsGLYII 基因家族除了 *SsGLYII2.3* 和 *SsGLYII5.2* 没有内含子外, 其他基因的内含子数目在 1~19 个之间, 其中 *SsGLYII23* 的内含子数目最多(19 个), 而 *SsGLYII3.1* 和 *SsGLYII3.2* 的内含子数目最少, 只有 1 个。

对 SsGLYI 和 SsGLYII 基因家族成员的保守基序进行分析, 共鉴定到 6 个保守程度较高的 Motif 基序, 并且相同亚家族间有相似的保守基序(图 3)。在 SsGLYI 家族中, 除 *SsGLYI3.1*、*SsGLYI3.2*、*SsGLYI3.4*、*SsGLYI13.2*、*SsGLYI14.1*、*SsGLYI14.2* 和 *SsGLYI14.3* 外, 其余 SsGLYI 蛋白中均包含 Motif 1(PF00903)。亚家族 I 成员中特有 Motif 4, 亚家族 II 和 IV 成员中有且仅有 Motif 2, 亚家族 III 成员中特有 Motif 6, 亚家族 V 成员中特有 Motif 3 和 Motif 5。在 SsGLYII 家族中, 所有的成员都包含 Motif 1(PF00753)。亚家族 I 成员中仅有 Motif 1, 亚家族 II 和 III 成员中包含 Motif 1 和 Motif 4, 亚家族 IV 成员中特有 Motif 2、Motif 3 和 Motif 5, 亚家族 V 成员中特有 Motif 6。结合进化关系, 可以看出同源关系越近的基因, 其基因结构和保守 Motif 越相似, 推测它们可能执行相似的功能。

SsGLY 基因家族编码蛋白的氨基酸序列比对结果(图 4)表明, 在 50 个 SsGLYI 蛋白中, 39 个 SsGLYI 蛋白拥有所有的 4 个金属结合位点(a: H/Q, b: L, c: H, d: E), 另外 11 个 SsGLYI 蛋白只有其中的 2~3 个金属结合位点。除亚家族 IV 的 *SsGLYI8.1*~*8.4* 属于  $Zn^{2+}$  依赖型(e) SsGLYI 蛋白



A: SsGLY 家族基因在割手密染色体上的分布; B: SsGLYI 家族蛋白的进化树; C: SsGLYII 家族蛋白的进化树。  
A: Distribution of SsGLY gene family members on *S. spontaneum* chromosomes; B: Phylogenetic analysis of SsGLYI; C: Phylogenetic analysis of SsGLYII.

图 1 SsGLY 基因家族在割手密染色体上的分布与进化树分析

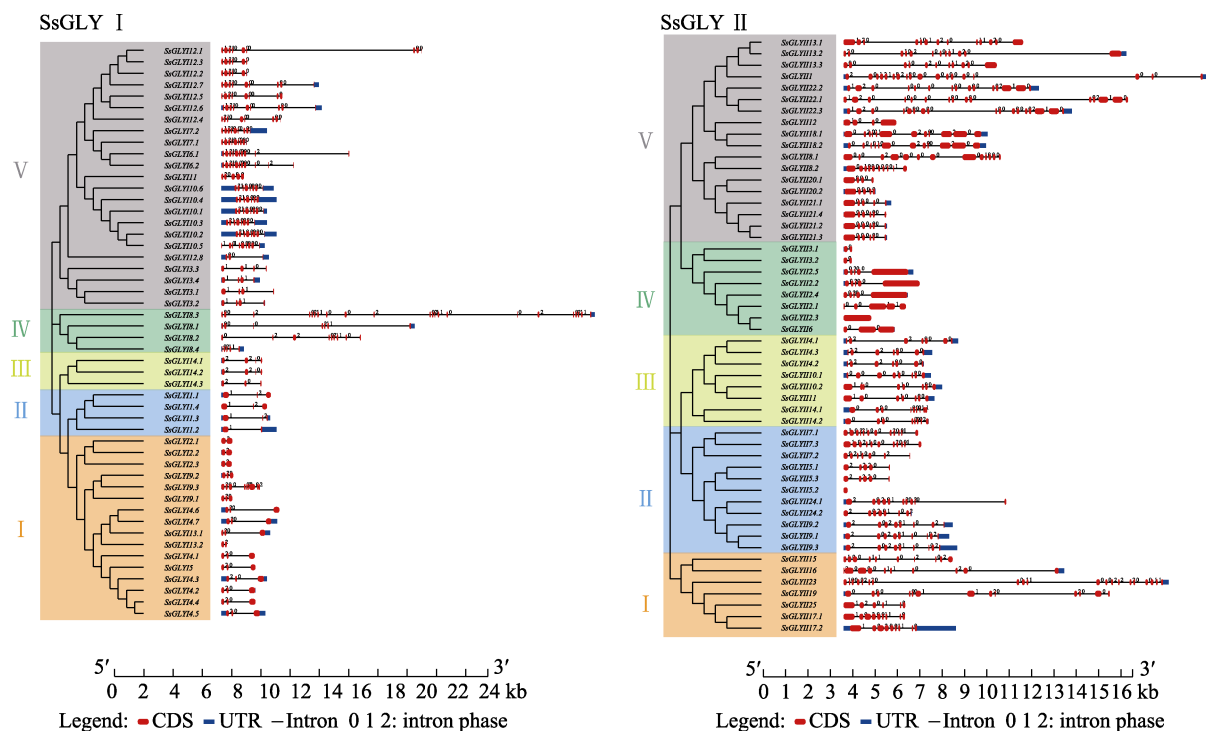
Fig. 1 Distribution and phylogenetic analysis of SsGLY gene family members on *S. spontaneum* chromosomes

外, 其余均为  $\text{Ni}^{2+}$  依赖型。在 52 个 SsGLYII 蛋白中, 26 个 SsGLYII 蛋白同时拥有 THxHxDH 金属结合域 (a) 和 C/GHT 活性位点 (b); 19 个 SsGLYII 蛋白无 C/GHT 活性位点; 8 个 SsGLYII 蛋白无 GLYII 蛋白酶特有的 THxHxDH 金属结合域, 其中除 SsGLYII3.1 和 SsGLYII3.2

蛋白的 N 端不完整外, 其余 6 个均含有 GLYII 的活性位点 (C/GHT)。

## 2.4 SsGLY 基因家族成员的共线性与 Ka/Ks 分析

共线性分析有助于揭示 SsGLY 基因家族不同成员之间的系统发育关系。使用 TBtools 软件对



红色和蓝色方框分别代表编码序列 (CDS) 和非编码序列 (UTR)，方框中间的横线代表内含子，0、1 和 2 代表内含子。  
The red and blue boxes represent the coding sequence (CDS) and the untranslated region (UTR), respectively; the horizontal line in the middle of the box represents the intron; 0, 1 and 2 represent the intron phase.

图 2 SsGLY 基因家族结构分析

Fig. 2 Gene structure analysis of SsGLY gene family

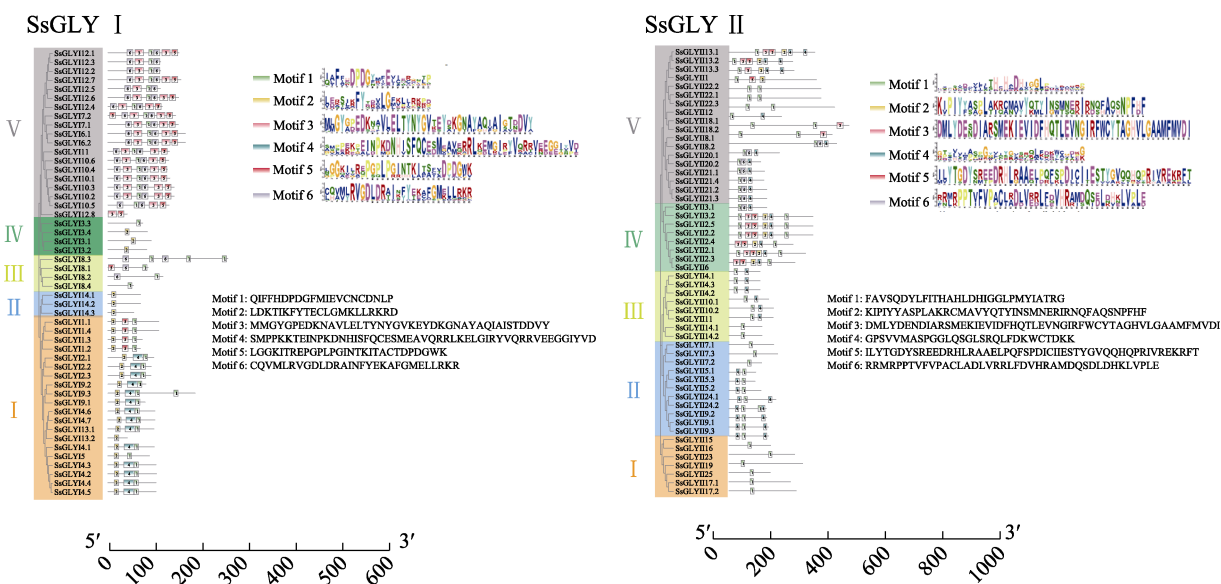


图 3 SsGLY I 和 SsGLY II 基因家族的保守基序分析

Fig. 3 Conservation motif analysis of SsGLY I and SsGLY II gene family

SsGLY 家族基因进行共线性分析，共鉴定出 41 个基因对，其中 SsGLYI 基因家族中有 23 对，SsGLYII 基因家族中有 18 对 (图 5A)。在 23 对 SsGLYI 基因对中，只有 SsGLYI8.1-SsGLYI8.3 基因对的  $Ka/Ks > 1$ ，其余基因对的  $Ka/Ks < 1$  (图 5B)，

表明 SsGLYI 基因家族在进化过程中可能经历了较强的纯化选择。在 18 对 SsGLYII 共线性基因对中，只有 SsGLYII21.3-SsGLYII21.4 基因对的  $Ka/Ks > 1$  (图 5B)，表明 SsGLYII 基因家族在进化过程中同样经历了较强的纯化选择。



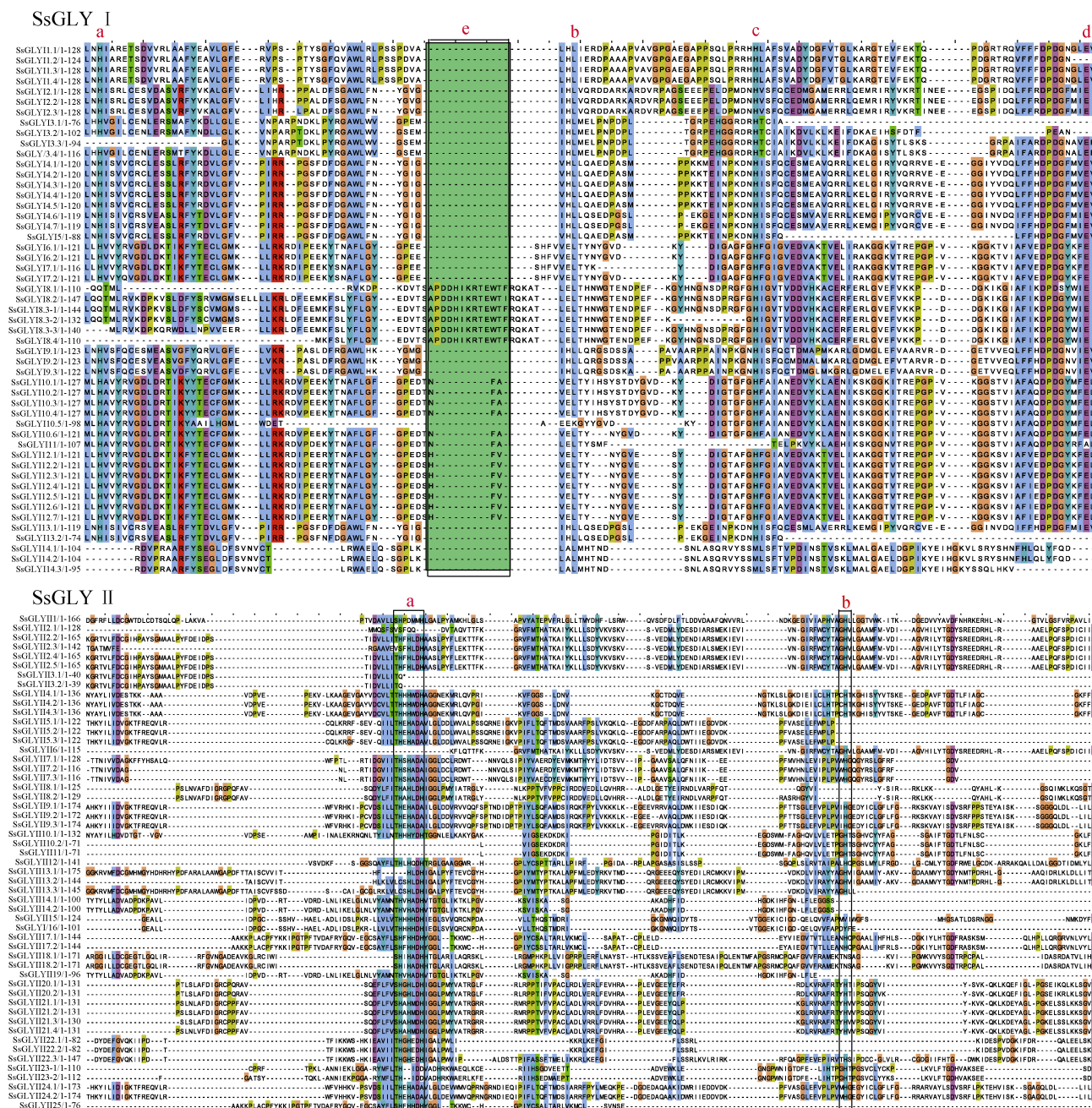


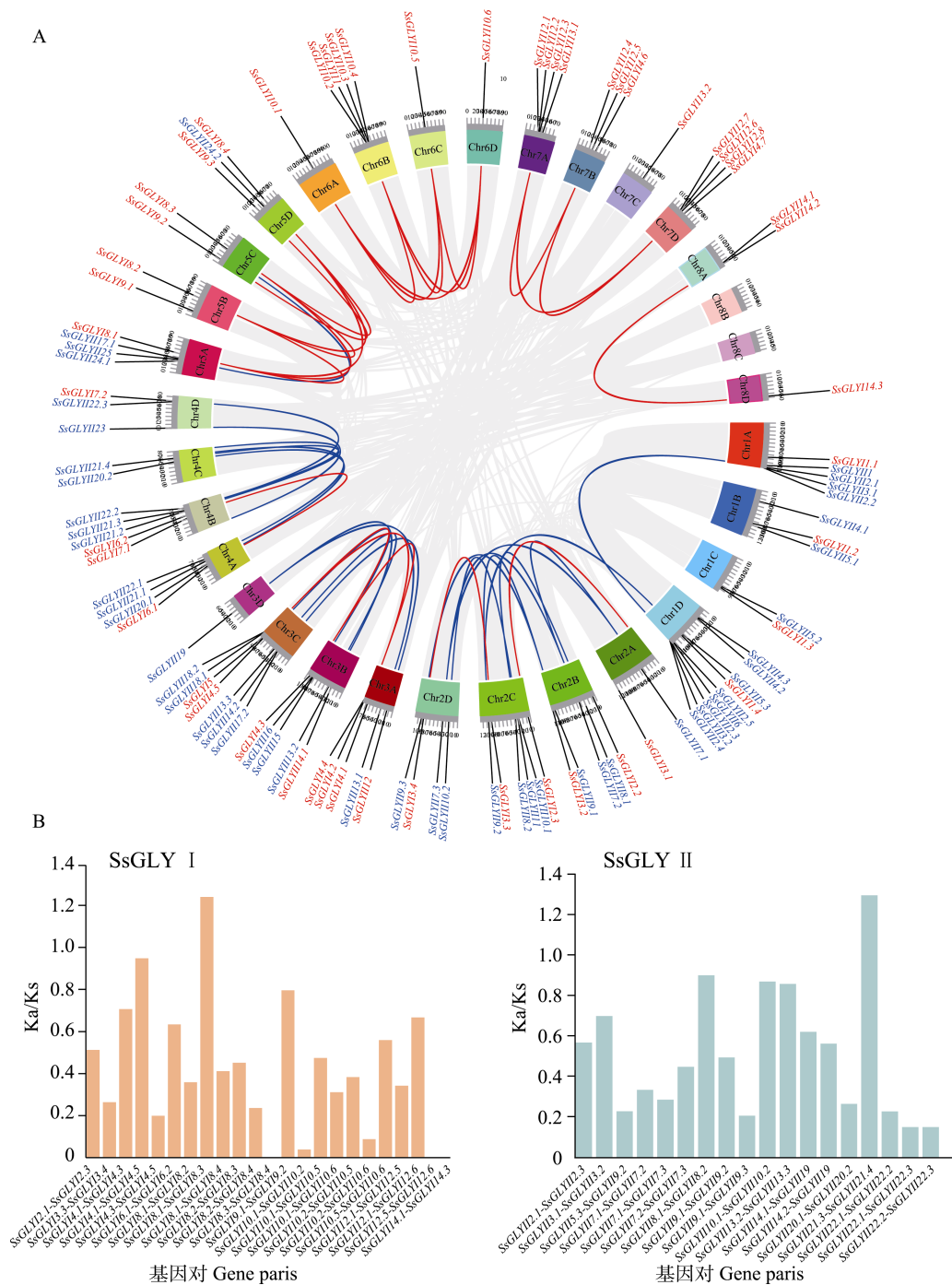
图 4 SsGLYI 和 SsGLYII 基因家族编码蛋白氨基酸序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of SsGLYI and SsGLYII gene family

## 2.5 SsGLY 基因家族的启动子顺式作用元件分析

SsGLY 基因家族的启动子顺式作用元件分析预测结果 (图 6) 显示, 所有 50 个 SsGLYI 启动子序列均含有 MYB 顺式作用元件和光反应元件, 此外, MeJA 应答元件 (TGACG-motif 和 CGTCA-motif)、脱落酸反应元件 (ABRE)、水杨酸反应元件 (TCA-element) 广泛存在于绝大多数 SsGLYI 启动子序列区域上。在胁迫响应顺式作用元件方面, 2 个干旱响应元件 (DRE core 和 MBS)、

参与厌氧诱导的顺式作用元件 (ARE)、创伤和病原体反应元件 (W box 或 WUN-motif) 也存在于绝大多数 SsGLYI 启动子序列区域上。所有 52 个 SsGLYII 启动子序列均含有 MYB 顺式作用元件和光反应元件。在胁迫响应顺式作用元件方面, 2 个干旱响应元件 (DRE core 或 MBS)、参与厌氧诱导的顺式作用元件 (ARE)、创伤和病原体反应元件 (W box 或 WUN-motif) 存在于绝大多数 SsGLYII 启动子序列区域上。



A：甘蔗 SsGLY 基因家族共线性分析；B：SsGLY 基因家族的 Ka/Ks 分析。  
A: Collinearity analysis of the SsGLY gene family; B: Ka/Ks analysis of the SsGLY gene family.

图 5 SsGLY 基因家族的共线性与 Ka/Ks 分析

Fig. 5 Collinearity and Ka/Ks analysis of SsGLY gene family

2.6 SsGLY 基因家族表达模式分析

基于课题组前期构建的甘蔗品种 ROC22 不同组织转录组数据，发现 SsGLYI 基因家族中，*SsGLYI4.6~4.7*、*SsGLYI13.1~13.2* 和 *SsGLYI10.1~10.6* 在甘蔗 5 个不同组织中的表达量均高于 2.7，其中 *SsGLYI4.6* 在芽中的表达量最高。SsGLYII 基

因家族中，*SsGLYII4.2*、*SsGLYII10.2*、*SsGLYII14.1*、*SsGLYII14.2* 和 *SsGLYII19* 在甘蔗 5 个不同组织的表达量均高于 2.6，其中 *SsGLYII14.2* 在甘蔗根中表达量最高（图 7A）。基于甘蔗黑穗病抗病品种 YT93-159 和感病品种 ROC22 接种甘蔗黑穗病菌后不同时间点的转录组数据，发现在 SsGLYI 基

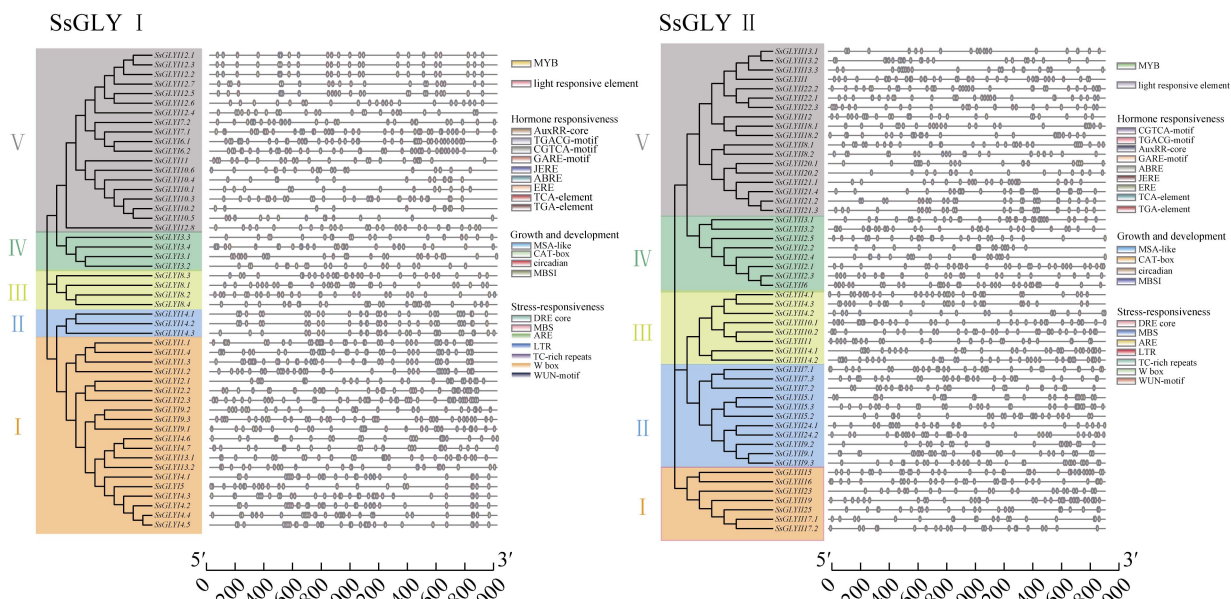
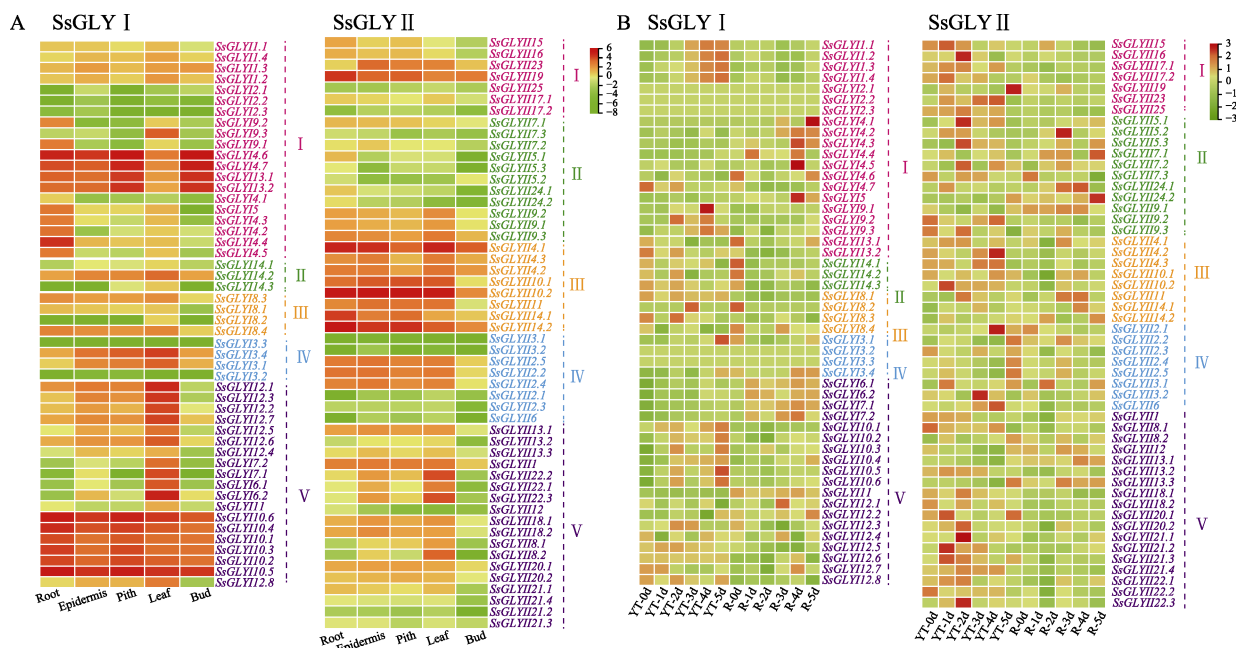


图 6 SsGLY 基因家族启动子元件分析

Fig. 6 Analysis of promoter cis-acting elements of SsGLY gene family in sugarcane



A: SsGLY 基因家族在 ROC22 不同组织中的表达模式。B: SsGLY 基因家族在甘蔗品种 YT93-159 和 ROC22 接种黑穗病菌 0、1、2、3、4、5 d 后的表达热图。

A: Expression pattern analysis of SsGLY gene family in different tissues of ROC22. B: Expression heatmap of the SsGLY gene family in sugarcane cultivars YT93-159 and ROC22 at 0, 1, 2, 3, 4 and 5 days after inoculation with *S. scitamineum*.

图 7 SsGLY 基因家族在甘蔗中组织表达模式与黑穗病侵后表达模式分析

Fig. 7 Tissue expression pattern and analysis of SsGLY gene family in sugarcane cultivar

因家族中, 亚家族 I 中的 *SsGLY I/1.1~1.4* 在 YT93-159 中显著上调, 在 ROC22 中的表达无显著变化; *SsGLY I/4.2*、*SsGLY I/4.2* 在 YT93-159 中无明显变化, 且表达量较低, 在感病品种 ROC22 中表达量显著上调。亚家族 IV 中, *SsGLY I/3.4* 基因在抗病品种 YT93-159 中上调表

达, 在感病品种 ROC22 中表达量先下降后上升。亚家族 V 中, *SsGLY I/6.1*、*SsGLY I/6.2*、*SsGLY I/7.1*、*SsGLY I/7.2* 在感病品种中表达量显著上调, 在抗病品种中无显著变化。在 SsGLY II 基因家族中, *SsGLY II/23* 和 *SsGLY II/25* 在 YT93-159 中显著上调, 在 ROC22 中下调表达。



*SsGLY II*4.2 和 *SsGLY II*4.3 在抗病和感病品种中表达也存在差异（图 7B）。

2.7 甘蔗 *ScGLYI-1* 基因的鉴定

在甘蔗响应黑穗病侵染中，多个 *SsGLY* 基因积极响应黑穗病菌的侵染，其中 *SsGLYI*3.4 基因随着黑穗病菌侵染时间的延长，在抗病品种 YT93-159 中的表达量逐渐上调（图 7），推测该基因可能在甘蔗-黑穗病菌互作中发挥重要作用。

因此，本研究通过 PCR 技术从甘蔗栽培种 YT93-159 中扩增获得了 *SsGLYI*3.4 的同源基因，命名为 *ScGLYI-1*，其长度为 567 bp，编码 191 个氨基酸（图 8A）。N 端（1~22 aa）包含 1 个信号肽，N 端的 73 个氨基酸形成一条游离的长链。靠近 C 端（74~178 aa）的区域包含 Glyoxalase-4 的保守结构域（图 8B）。在 *ScGLYI-1* 的三级结构中存在 4 个  $\alpha$ -螺旋，7 个  $\beta$ -折叠（图 8C）。

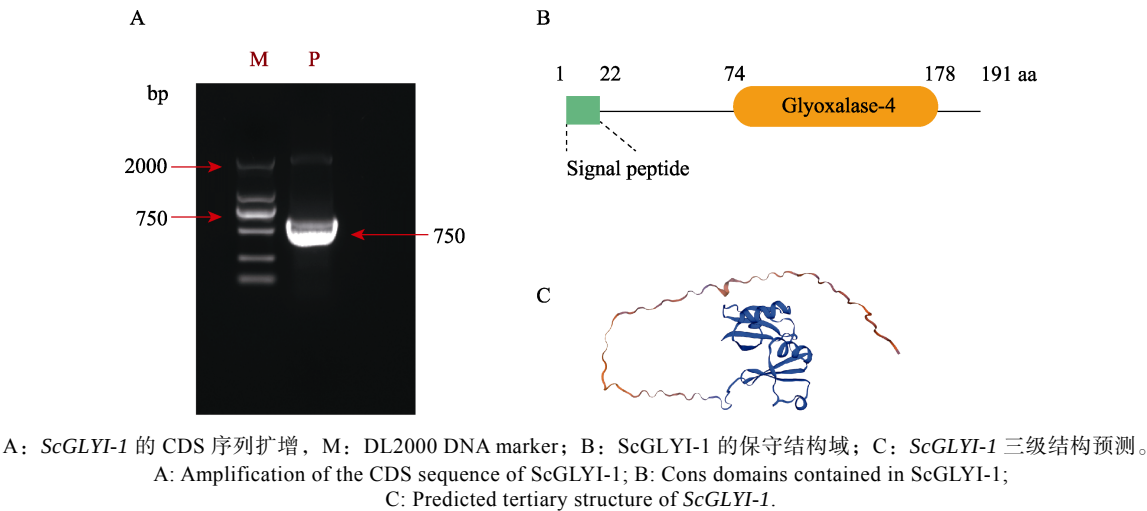


图 8 甘蔗 *ScGLYI-1* 的序列扩增与结构分析

Fig. 8 Sequence amplification and structural analysis of sugarcane *ScGLYI-1*

2.8 甘蔗 *ScGLYI-1* 蛋白的亚细胞定位分析

以 pCAMBIA1300-*ScGLYI-1*-EGFP 为实验组，空载体 pCAMBIA1300-EGFP 为阳性对照，通过农杆菌介导法注射本氏烟叶片，使用激光共聚焦显微镜观察定位情况。结果如图 9 所示，空载体 pCAMBIA1300-EGFP 的绿色荧光分布在细

胞核与细胞膜中，而实验组 pCAMBIA1300-*ScGLYI-1*-EGFP 的绿色荧光均分布在叶片表皮细胞的叶绿体上。此外，叶绿体在植物中可以自发荧光，绿色与红色荧光重叠产生黄色荧光。结果表明，*ScGLYI-1* 蛋白定位在叶绿体中，该结果与预测结果相符。

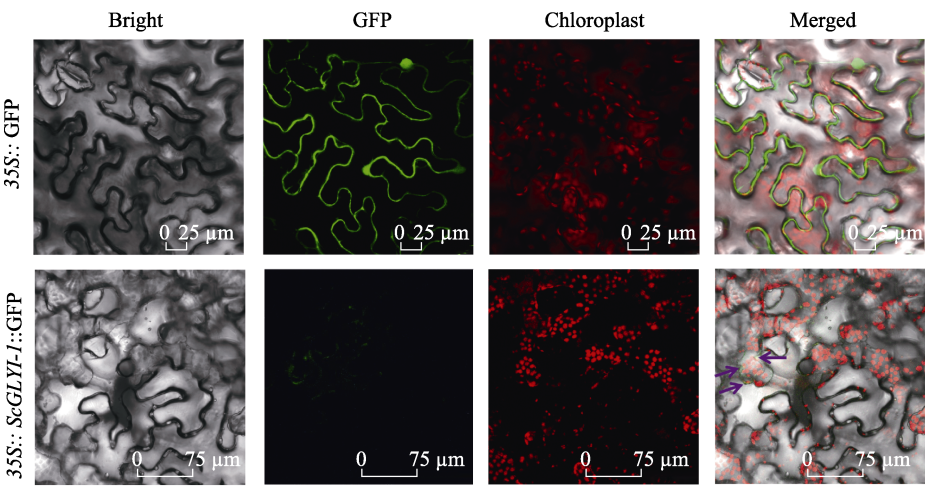


图 9 *ScGLYI-1* 蛋白在本氏烟叶片中的亚细胞定位

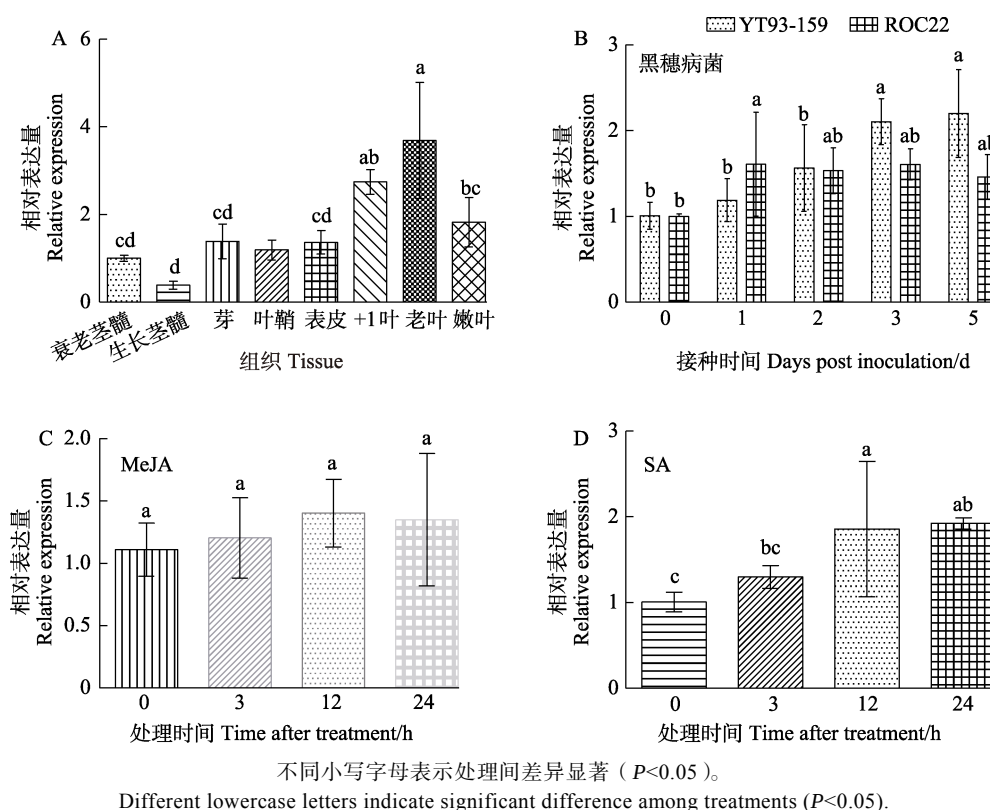
Fig. 9 Subcellular location of *ScGLYI-1* proteins in *Nicotiana benthamiana* lower epidermal cells



## 2.9 甘蔗 *ScGLYI-1* 基因的表达模式分析

*ScGLYI-1* 基因的组织表达模式分析结果 (图 10A) 显示, 该基因在甘蔗不同组织中均有不同程度的表达, 为组成型表达基因。在老叶中的表达量明显高于其他组织, 在新蔗肉中的表达量最低, 且老叶的表达量约为新蔗肉的 9.48 倍; 在衰老蔗肉、蔗芽、叶鞘及蔗皮中的表达量均差异不显著。黑穗病菌侵染后, 在抗黑穗病甘蔗品种 YT93-159 中, 与对照 (0 d) 相比, *ScGLYI-1* 的表达水平显著上调, 在第 5 d 时的表达量达到最

高, 为对照的 2.18 倍; 在感黑穗病甘蔗品种 ROC22 中, *ScGLYI-1* 在接种黑穗病菌后的 1 d 的表达量达到最高, 在接种 2~5 d 时的表达量无明显差异 (图 10B)。在植物激素 MeJA 处理甘蔗后, *ScGLYI-1* 基因的表达无显著变化 (图 10C); 而在 SA 胁迫下, *ScGLYI-1* 基因的表达呈先显著上调后下调的趋势, 在 12 h 时的表达量达到最高, 约是 0 h 时的 2.20 倍 (图 10D)。综上, *ScGLYI-1* 基因可以被外源激素和黑穗病菌胁迫诱导表达, 但在不同甘蔗品种中表现出不同的表达模式。



Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ( $P < 0.05$ ).

图 10 *ScGLYI-1* 基因组织表达模式以及胁迫处理表达模式分析

Fig. 10 Analysis of tissue-specific expression patterns and stress-induced expression profiles of the *ScGLYI-1*

## 3 讨论

植物在遭受各种生物与非生物胁迫的过程中会产生过量有毒的甲基乙二醛 (MG), 而依赖 GSH 的乙二醛酶系统 (GLYI 和 GLYII) 是清除植物体内过量的 MG 的最有效途径<sup>[10]</sup>。目前, 已在拟南芥、水稻、大豆、玉米、苜蓿、白菜和甘蓝等多种植物中鉴定出 GLY 基因家族的全基因组<sup>[17-18, 20-21]</sup>, 而 GLY 基因家族在甘蔗、甘蔗近缘种或者野生种的全基因组鉴定中尚未见报道。本研究基于甘蔗近缘野生种割手密的全基因组数据<sup>[23]</sup>, 鉴定出 50 个 *SsGLYI* 基因和 52 个

*SsGLYII* 基因。系统进化树分析显示, 割手密 *SsGLYI* 和 *SsGLYII* 基因家族均可以分为 5 个亚家族, 这与白菜和甘蓝中的分类一致<sup>[20-21]</sup>。在 *SsGLYI* 基因家族中, 所有的成员均可在模式植物拟南芥、水稻以及禾本科植物玉米中找到同源的 *GLYI* 基因。而 *SsGLYII* 基因家族的 *SsGLYII12*、*SsGLYII16* 和 *SsGLYII23* 无法被划分到 5 个亚家族中, 且亚家族 IV 和 V 的成员均无法匹配到模式植物拟南芥、水稻以及禾本科植物玉米的同源 *GLYII* 基因。植物在进化过程中, 通常会倾向于复制其重要的基因以产生新的类型或者增加数目

来适应不利的生长环境和发展进程<sup>[37-38]</sup>。本研究共鉴定出 41 个共线性基因对，其中 SsGLYI 基因家族中有 23 对，SsGLYII 基因家族中有 18 对，显著多于大豆和苜蓿<sup>[19-20]</sup>。除 SsGLYI8.1-SsGLYI8.3 和 SsGLYII21.3- SsGLYII21.4 基因对的 Ka/Ks>1，其余 39 个基因对的 Ka/Ks 均<1，表明 SsGLY 基因家族在进化过程中可能经历了较强的纯化选择。

前人研究发现，SsGLY 基因家族数目和基因复制事件比其他植物多的潜在原因之一是不同类型的子功能或新功能的出现导致的 GLY 基因的功能分化，从而形成新的家族成员，行使新的基因功能<sup>[37]</sup>。SKIPSEY 等<sup>[39]</sup>研究发现，大豆的 GLYI 基因（登录号：X68819）具有谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferase, GST）活性。本研究，50 个 SsGLYI 蛋白只有 39 个蛋白拥有全部 4 个 GLYI 蛋白酶特有的金属结合位点，具有 GLYI 蛋白酶催化功能，11 个蛋白可能拥有其他与 GLYI 蛋白酶催化功能相似的子功能或者新功能，该结果与前人的研究结果相似<sup>[20]</sup>。在 39 个具有 GLYI 蛋白酶催化功能的 SsGLYI 蛋白中，除亚家族 IV 的 4 个 SsGLYI 蛋白（SsGLYI8.1-8.4）属于 Zn<sup>2+</sup>依赖型，SsGLYI8.3 蛋白拥有 3 个 Zn<sup>2+</sup>依赖型特有的结构域外，其他 35 个均属于 Ni<sup>2+</sup>依赖型蛋白。

启动子区域的顺式作用元件可以调节基因的转录和对激素、外界胁迫的反应<sup>[21]</sup>。GHOSH 等<sup>[19]</sup>从大豆 GLYI 和 GLYII 基因上游 1 kb 的启动子区域挖掘了包括 ABRE、AuxRR-core、GRE、ERE、JERE、HSE、BOX-W1、LTR、MBS、TC-rich、TCA、W-box、WUN-motif、CGTCA box 和 TGACG motif 等 16 个与植物抗盐害、干旱、脱落酸等逆境相关的顺式作用元件。YAN 等<sup>[21]</sup>也从芥菜 GLYI 和 GLYII 基因上游 1.5 kb 的启动子区域挖掘到了包括 ABRE、ACE、AE-box、AuxRR-core 等在内的 19 个与胁迫相关顺式作用元件，这些元件在调节植物生长发育和逆境胁迫反应等过程中，对基因的转录发挥了关键作用。本研究从 SsGLY 基因家族中挖掘到 MYB、光反应、激素反应、生长发育相关和胁迫相关等 22 个顺式作用元件。不管是 SsGLYI 或是 SsGLYII 基因家族，每个家族成员均含有 MYB 顺式作用元件和光反应元件，且绝大多数家族成员含有 MeJA 反应元件（TGACG-motif 和 CGTCA-motif）、赤霉素反应元件（GARE-motif）、乙烯反应元件（ERE）和脱落酸反应元件（ABRA）等植物激素相关的顺式作用

元件，以及干旱响应元件（DRE core 和 MBS）、厌氧诱导的顺式作用元件（ARE）、创伤和病原体反应元件（W box 或 WUN-motif）等与逆境胁迫相关的顺式作用元件。以上结果有助于解析 SsGLY 基因在甘蔗生长发育过程和应对激素、逆境胁迫过程中的转录调控机制。

GLY 基因家族受各种非生物胁迫诱导表达，响应和适应盐渍、干旱和重金属等环境胁迫中发挥重要作用。例如，大豆的 GmGLYI6、GmGLYI9、GmGLYI20、GmGLYII5 和 GmGLYII10 属于非生物胁迫诱导表达基因<sup>[19]</sup>；苜蓿的 MtGLYI-8、MtGLYI-21 和 MtGLYII-9 基因在盐胁迫中上调表达，而 MtGLYI-8、MtGLYI-11、MtGLYI-21、MtGLYII-9 和 MtGLYII-13 基因在干旱胁迫下上调表达<sup>[20]</sup>。白菜的 BrGLYI1 基因在缺 Zn 条件下能够被诱导而上调表达，而 BrGLYI13 基因则是在 Zn 过量的条件下被诱导表达，此外 BrGLYII5 基因在缺 Fe、Zn 和过量 Zn 的条件下均可以被诱导表达<sup>[21]</sup>。甘蓝的 BolGLYI07、BolGLYI09、BolGLYII01 和 BolGLYII09 在磷和锌的胁迫下高表达<sup>[22]</sup>。拟南芥的 AtGLYI4、AtGLYI7 和水稻的 OsGLYI6、OsGLYII11 属于胁迫诱导表达基因<sup>[17]</sup>。除受非生物胁迫的诱导，GLY 基因也在植物防御各种病原体侵染过程中发挥重要作用。YAN 等<sup>[21]</sup>研究发现，在芸薹根肿菌（*Plasmodiophora brassicae*）侵染的不同时间点，白菜的 BrGLYI1、BrGLYI2、BrGLYI6、BrGLYI11 和 BrGLYI16 基因上调表达 1.5 倍。本研究中，甘蔗响应黑穗病菌侵染时，多个 SsGLY 基因积极响应黑穗病菌的侵染，其中 SsGLYI3.4 基因随着黑穗病菌侵染时间的延长，逐渐上调表达。ScGLYI-1 基因在甘蔗不同组织中均有不同程度的表达，为组成型表达基因，与多数 ScGLYI 家族基因相似。本研究还发现，ScGLYI-1 在接种黑穗病菌 5 d 后的表达量最高。同时，在植物激素 SA 的处理下，ScGLYI-1 基因的表达呈先显著上调后下调的趋势，ScGLYI-1 调控甘蔗黑穗病抗性可能是通过 SA 信号途径进行。本课题组后续将进一步深入解析 ScGLYI-1 发挥的生物学功能。

## 参考文献

- [1] MOSTOFA M G, GHOSH A, LI Z G, SIDDIQUI M N, FUJITA M, TRAN L P. Methylglyoxal: a signaling molecule in plant abiotic stress responses[J]. Free Radical Biology and

- Medicine, 2018, 122: 96-109.
- [2] LIN Y H, ZHOU Y N, LIANG X G, JIN Y K, XIAO Z D, ZHANG Y J, HUANG C, HONG B, CHEN Z Y, ZHOU S L, SHEN S. Exogenous methylglyoxal alleviates drought-induced 'plant diabetes' and leaf senescence in maize[J]. Journal of Experimental Botany, 2024, 75(7): 1982-1996.
  - [3] YUAN T T, FENG Y R, CHENG H, CHENG S Y, LU Y T. Bacteria suppress immune responses in *Arabidopsis* by inducing methylglyoxal accumulation and promoting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging[J]. Developmental Cell, 2025, 60(17): 2279-2293.
  - [4] SUN Y T, CHEN S X, GRIN I G, ZHARKOV D O, LI H Y. The dual role of methylglyoxal in plant stress response and regulation of DJ-1 protein[J]. Plant Physiology, 2024, 176(6): e14608.
  - [5] KANT S, LIU L, VAZQUES-TORRES A. The methylglyoxal pathway is a sink for glutathione in *Salmonella* experiencing oxidative stress[J]. PLoS Pathogens, 2023, 19(6): e1011441.
  - [6] ZHENG Q Q, XIN J P, ZHAO C, TIAN R N. Role of methylglyoxal and glyoxalase in the regulation of plant response to heavy metal stress[J]. Plant Cell Reports, 2024, 43(4): 103.
  - [7] FU Z W, LI J H, FENG Y R, YUAN X, LU Y T. The metabolite methylglyoxal-mediated gene expression is associated with histone methylglyoxalation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(4): 1886-1899.
  - [8] YADAV S K, PAREEK S L S, RAY M, REDDY M K, SOPORY S K. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 337(1): 61-67.
  - [9] CHEN Z Y, BROWN R L, DAMANN K E, CLEVELAND T E. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation[J]. Phytopathology, 2004, 94(9): 938-945.
  - [10] RABBANI N, THORNALLEY P J. Dicarbonyl proteome and genome damage in metabolic and vascular disease[J]. Biochemical Society Transactions, 2014, 42(2): 425-432.
  - [11] ZENG Z M, XIONG F J, YU X H, GONG X P, LUO J T, JIANG Y D, KUANG H C, GAO B J, LIU Y S. Overexpression of a glyoxalase gene, OsGly I, improves abiotic stress tolerance and grain yield in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 109: 62-71.
  - [12] LIN F Y, XU J H, SHI J R, LI H W, LI B. Molecular cloning and characterization of a novel glyoxalase I gene TaGly I in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 729-735.
  - [13] SILVA M S, BARATA L, FERREIRA A E N, ROMAO S, TOMAS A M, FREIRE A P, CORDEIRO C. Catalysis and structural properties of *Leishmania infantum* glyoxalase II: trypanothione specificity and phylogeny[J]. Biochemistry, 2008, 47(1): 195-204.
  - [14] SINGLA-PAREEK S L, YADAV S K, PAREEK A, REDDY M K, SOPORY S K. Enhancing salt tolerance in a crop plant by overexpression of glyoxalase II[J]. Transgenic Research, 2008, 17(2): 171-180.
  - [15] VIVEROS M F A, BLANCHETEAU C I, TIMMERMAN T, GONZALEZ M, ARCE-JOHNSON P. Overexpression of GlyI and GlyII genes in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) plants confers salt tolerance by decreasing oxidative stress[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(4): 3281-3290.
  - [16] GAMBHIR P, SINGH V, RAGHUVANSHI U, PARIDA A P, PAREEK A, ROYCHOWDHURY A, SOPORY S K, KUMAR R, SHARMA A K. A glutathione-independent DJ-1/PfpI domain-containing tomato glyoxalaseIII2, SIGLYIII2, confers enhanced tolerance under salt and osmotic stresses[J]. Plant Cell Environment, 2023, 46(2): 518-548.
  - [17] MUSTAFIZ A, SINGH A K, PAREEK A, SOPORY S K, SINGLA-PAREEK S L. Genome-wide analysis of rice and *Arabidopsis* identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses[J]. Functional & Integrative Genomics, 2011, 11(2): 293-305.
  - [18] 董伟. 玉米乙二醛酶系统的基因组学分析及 *ZmGLYI-8* 基因的功能鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
  - [19] DONG W. Genome-wide analysis of glyoxalase system and functional identification of *ZmGLYI-8* gene in maize[D]. Tai'an: Shandong Agriculture University, 2016. (in Chinese)
  - [19] GHOSH A, ISLAM T. Genome-wide analysis and expression profiling of glyoxalase gene families in soybean (*Glycine max*) indicate their development and abiotic stress specific response[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16: 87-112.
  - [20] GHOSH A. Genome-wide identification of glyoxalase genes in *Medicago truncatula* and their expression profiling in response to various developmental and environmental stimuli[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 836-855.
  - [21] YAN G X, XIAO X, WANG N, ZHANG F G, GAO G Z, XU K, CHEN B Y, QIAO J W, WU X M. Genome-wide analysis and expression profiles of glyoxalase gene families in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.)[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191159.
  - [22] 张美丽, 袁丽丽, 张付贵, 管文杰, 闫贵欣, 伍晓明. 甘蓝乙二醛酶基因家族的鉴定与表达分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(4): 1065-1076.
  - [22] ZHANG M L, YUAN L L, ZHANG F G, GUAN W J, YAN G X, WU X M. Identification and expression analysis of glyoxalase gene family in *Brassica oleracea* L.[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(4): 1065-1076. (in Chinese)

- [23] ZHANG J S, ZHANG X T, TANG H B, ZHANG Q, HUA X T, MA X K, ZHU F, JONES T, ZHU X G, BOWERS J, WAI C M, ZHENG C F, SHI Y, CHEN S, XU X M, YUE J J, NELSON D R, HUANG L X, LI Z, XU H M, ZHOU D, WANG Y J, HU W C, LIN J S, DENG Y J, PANDEY N, MANCINI M, ZERPA D, NGUYEN J K, WANG L M, YU L, XIN Y H, GE L F, ARRO J, HAN J O, CHAKRABARTY S, PUSHKO M, ZHANG W P, MA Y H, MA P P, LV M J, CHEN F M, ZHENG G Y, XU J S, YANG Z H, DENG F, CHEN X Q, LIAO Z Y, ZHANG X X, LIN Z C, LIN H, YAN H S, KUANG Z, ZHONG W M, LIANG P P, WANG G F, YUAN Y, SHI J X, HOU J X, LIN J X, JIN J J, CAO P J, SHEN Q C, JIANG Q, ZHOU P, MA Y Y, ZHANG X D, XU R R, LIU J, ZHOU Y M, JIA H F, MA Q, QI R, ZHANG Z L, FANG J P, FANG H K, SONG J J, WANG M J, DONG G R, WANG G, CHEN Z, MA T, LIU H, DHUNGANA S R, HUSS S E, YANG X P, SHARMA M, CHEN L Q, BRAUN D M, LI L, YU Q Y, WANG J P, WANG K, SCHATA M C, HECKERMAN D, SLUYS M A V, SOUZA G M, MOORE P H, SANKOFF D, VANBUREN R, PATERSON A H, NAGAI C, MING R. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L[J]. *Nature Genetics*, 2018, 50(11): 1565-1573.
- [24] EI-GEHALI S, MISTRY J, BATEMAN A, EDDY S R, LUCIANI A, POTTER S C, QURESHI M, RICHARDSON L, SALAZAR G A, SMART A, SONNHAMMER E L L, HIRSH L, PALADIN L, PIOVESAN D, TOSATTO S C E, FINN R D. The Pfam protein families database in 2019[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D427-D432.
- [25] MARCHLER-BAUER A, BO Y, HAN L Y, HE J, LANCZYCHI C J, LU S N, CHITSAZ F, DERBYSHIRE M K, GEER R C, GONZALES N R, GWADZ M, HURWITZ D, LU F, MARCHLER G H, SONG J S, THANKI N, WANG Z X, YAMASHITA R A, ZHANG D C, ZHENG C J, GEER L Y, BRYANT S H. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D200-D203.
- [26] CHAO J T, KONG Y Z, WANG Q, SUN Y H, GONG D P, LV J, LIU G S. MapGene2Chrom, a tool to draw gene physical map based on Perl and SVG languages[J]. *Yi Chuan*, 2015, 37(1): 91-97.
- [27] EDGAR R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792-1797.
- [28] SUBRAMANIAN B, GAO S H, LERCHER M J, HU S N, CHEN W H. Evolview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W270-W275.
- [29] HU B, JIN J P, GUO A Y, ZHANG H, LUO J C, GAO G. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [30] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, FRITH M, GRANT C E, CLEMENTI L, REN J Y, LI W W, NOBLE W S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: W202-W208.
- [31] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [32] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, CHENNA R, MCGETTIGAN P A M, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE I M, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON J D, GIBSON T J, HIGGINS D G. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [33] WATERHOUSE A M, PROCTER J B, MARTIN D M A, CLAMP M, BARTON G J. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(9): 1189-1191.
- [34] WANG Y P, TANG H B, DEBARRY J D, TAN X, LI J P, WANG X Y, LEE T H, JIN H J, MARLER B, GUO H, KISSINGER J, PATERSON A H. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 40(7): e49.
- [35] LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZE P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325-327.
- [36] WU Q B, ZHANG C, XU F, ZANG S J, WANG D J, SUN T T, SU Y C, YANG S L, DING Y H, QUE Y X. Transcriptional regulation of sugarcane response to *Sporisorium scitamineum*: insights from time-course gene coexpression and  $Ca^{2+}$  signaling[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(18): 10506-10520.
- [37] KUMAR B, KAUR C, PAREEK A, SOPORY S K, SINGLA-PAREEK S L. Tracing the evolution of plant glyoxalase III enzymes for structural and functional divergence[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(5): 648-667.
- [38] GU Z L, STEINMETZ L M, SCHARFE C, DAVIS R W, LI W H. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations[J]. *Nature*, 2003, 421(6918): 63-66.
- [39] SKIPSEY M, ANDREWS C G, TOWNSON J K, JEPSON I, EDWARDS R. Cloning and characterization of glyoxalase I from soybean[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 374(2): 261-268.