

珍珠芦荟白化苗的转录组分析

陈汉鑫, 林艺辉, 马馨怡, 林秀芳, 黄婉莉

漳州市农业科学研究所, 福建漳州 363005

摘要: 本研究旨在探明珍珠芦荟苗白化突变分子机制, 挖掘相关功能基因, 为珍珠芦荟品种选育提供依据。利用 Illumina HiSeq 测序平台对珍珠芦荟正常叶色苗 WT、白化苗突变株 *ls* 和 *qj* 进行转录组高通量测序, 并对测序结果进行功能注释分析。结果表明: 本研究共得到 67.72 Gb 的有效数据 (clean data), 共获得 122 665 条 Unigenes; 与正常株 WT 相比, 突变株 *ls* 叶片中共筛选出 914 个差异表达基因 (DEGs), 其中 453 个上调, 461 个下调; 突变株 *qj* 叶片中共获得 1851 个 DEGs, 其中 868 个上调, 983 个下调。通过 GO 功能富集和 KEGG 代谢途径分析, 发现在 2 个突变株中, 色素积累、细胞壁组成或生物发生、细胞壁、细胞外周、水解 O-糖基化合物水解酶活性、作用于糖基键的水解酶活性过程, 以及在次生代谢生物合成途径中被富集的差异表达基因较多, 而与光合作用相关途径的差异基因未获得显著富集。在与光合作用相关途径中发现, 突变株 *ls* 中 *porA*、*cab13* 基因呈显著下调表达, 突变株 *qj* 中 *porA*、*moda* 基因呈显著下调表达。实时荧光定量检测结果证实了这些基因的相对表达量的变化趋势与转录组数据一致。*porA* 为 2 个突变株共同下调表达的基因, *porA* 基因下调会导致原叶绿素酸酯合成叶绿素酸酯的酶促反应受到影响, 进而影响 2 个突变株的叶绿素合成, 因此推测该基因下调对珍珠芦荟白化苗形成起着重要的作用。本研究探索了珍珠芦荟苗白化变异的转录组信息, 筛选到表达差异显著的关键基因, 为深入探讨珍珠芦荟苗白化突变分子机制提供重要的理论基础。

关键词: 珍珠芦荟; 白化苗; 转录组; 光合作用; 基因表达

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A

Transcriptomics Analysis of Leaf Albino Mutants of *Aristaloe aristata*

CHEN Hanxin, LIN Yihui, MA Xinyi, LIN Xiufang, HUANG Wanli

Zhangzhou Institute of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China

Abstract: The purpose of the study is to ascertain the molecular mechanism of the albino mutation of *Aristaloe aristata*, screen related functional genes, and provide basis for the breeding. The Illumina HiSeq sequencing platform was used to carry out transcriptome high-throughput sequencing for normal leaf color seedlings WT, albino mutant *ls* and *qj*. The sequencing results were annotated and analyzed. A total of 67.72 Gb clean data was obtained. A total of 122 665 unigene annotation results were obtained from functional annotation. For the analysis of Unigenes expression, a total of 914 differentially expressed genes (DEGs) in *ls* were screened out, among them, 453 genes were up-regulated and 461 down-regulated. There were 1851 differentially expressed genes (DEGs) screened in *qj*, of which up- and down-regulated genes were 868 and 983, respectively. According to a comparative analysis of GO functional enrichment and KEGG metabolic pathway, it was found that in the two mutant strains, there were many DEGs enriched in pigment accumulation, cell wall organization or biogenesis, cell wall, cell periphery, hydrolase activity of hydrolyzing o-glycosyl compounds, hydrolase activity acting on glycosyl bonds, and biosynthesis pathway of secondary metabolism, while the DEGs related to photosynthesis were not significantly enriched. In the pathway related to photosynthesis, the expression of *porA* and *cab13* were significantly down-regulated in mutant *ls*, and *porA* and *moda* were significantly down-regulated in mutant *qj*. The results of real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) confirmed the consistency of the relative expression trend and the transcriptome data of these genes. The expression of the key gene, *porA*, which was

收稿日期 2022-09-20; 修回日期 2022-10-17

基金项目 福建省科技计划项目 (农业引导性重点项目) (No. 2020N0060); 福建省科技特派员后补助项目 (No. 22022S210-10074)。

作者简介 陈汉鑫 (1978—), 男, 学士, 副研究员, 研究方向: 植物组织培养与生物技术, E-mail: zzchx@163.com。

down-regulated in both mutants, was assumed to be a key factor in the formation of albino seedlings of *A. aristate* since it was found to affect the enzymatic reaction of protochlorophyllin ester to chlorophyllin ester and thereby affecting the chlorophyll synthesis of the two mutants. Our study explored the transcriptome information of albinism mutation of *A. aristate*, screened the key genes with significant expression differences, and would provide an important theoretical basis for further exploring the molecular mechanism of albinism mutation of *A. aristate*.

Keywords: *Aristaloe aristata*; albino mutant; transcriptome; photosynthesis; gene expression

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.004

植物叶色白化是植物叶色突变的常见类型, 在植物界普遍存在, 目前已在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、玉米 (*Zea mays*)、荔枝 (*Litchi chinensis*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、水稻 (*Oryza sativa*)、兰花 (*Cymbidium* ssp.) 等众多植物中发现叶片白化现象^[1-7]。叶色白化产生的内在原因主要与叶绿素含量降低, 光合过程受阻, 叶绿体发育异常有关^[8-12]。就植株本身而言, 导致叶片白化的机制极其复杂, 主要涉及激素失调、叶绿体形成基因突变、叶绿素合成基因突变等多种过程^[1, 4]。植物叶片白化通常会导致植株光合作用受阻而影响植物的生长和发育, 已被广泛应用到理论基础研究和生产实践中。如叶色突变植物是研究植物光合过程中叶绿体发育分化、叶绿素合成与降解、质核基因互作等调控机制的理想材料。在生产中, 某些植物的叶片白化会带来更大的经济价值和观赏价值。安吉白茶因其叶片白化导致其氨基酸含量比普通绿茶高 3~4 倍, 多酚含量低于普通绿茶, 提高了其营养价值和经济价值。在园林及观赏花卉植物中, 特殊的叶色既丰富了园林景观的色彩, 也大大提高了其观赏价值和经济价值。例如, 禾本科植物竹子的自然突变体菲白竹、银丝竹, 十二卷属植物黑肌玉露 (*Haworthia cooperi* var. *pilifera* M. B. Bayer) 的白化突变体“拉丝锦”(又名“霓虹灯”)等植物^[13-14]。

芦荟是百合科芦荟属多年生常绿肉质草本植物, 品种繁多, 有超过 500 个品种, 具有药用和观赏价值^[15-18]。珍珠芦荟 (*Aristaloe aristata*) 也称为木锉芦荟, 属于芦荟的小型种, 叶多而短, 株型紧凑, 主要供观赏用。珍珠芦荟叶片中含有芦荟大黄素、芦荟宁, 叶肉含粘胶质丰富的多聚糖, 是保健和美容护肤的佳品^[19]。

珍珠芦荟白化苗, 因人工繁殖的难度比较高, 且叶片颜色各异, 极具观赏性, 在市场上比较稀有, 价格比普通品种更高。鉴于珍珠芦荟白化苗存在重要的观赏价值及经济价值, 为探明珍珠芦荟苗白化

突变分子机制, 本研究以组织培养过程中产生的珍珠芦荟白化苗突变株和正常叶色苗的叶片为研究对象, 在验证其叶绿素及类胡萝卜素含量差异基础上, 利用转录组高通量测序技术筛选分析珍珠芦荟白化苗的差异表达基因, 挖掘相关功能基因, 为进一步选育珍珠芦荟新品种提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 珍珠芦荟正常株 (WT) 及白化苗突变株 (*qj* 和 *ls*) 由漳州市农业科学研究所组培所得。分别取生长期约为 45 d 的植株叶片用于叶绿素和类胡萝卜素含量测定以及 RNA 提取, 每种材料 3 个生物学重复。

1.1.2 主要试剂与仪器 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司, Nanodrop 2000 微量分光光度计购自 Thermo Fisher Scientific 公司, LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司, P8 型分光光度计购自上海美谱达仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 光合色素含量测定 采用分光光度计测定珍珠芦荟及其 2 种突变株叶片中叶绿素和类胡萝卜素的含量^[20]。称取鲜叶 2.0 g 研磨, 过滤, 取提取液, 分别在波长 665、649、470 nm 下测定吸光度。根据公式分别计算出叶绿素 a (Chla)、叶绿素 b (Chlb) 和类胡萝卜素 (Caro) 含量: $Chla = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$; $Chlb = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$; $Caro = (1000 \times A_{470} - 2.05 \times Chla - 114.8 \times Chlb) / 245$ 。

1.2.2 RNA 提取 珍珠芦荟正常株 (WT) 及白化苗突变体 (*qj* 和 *ls*) 植株叶片总 RNA 提取按照 RNA 提取试剂盒中的方法步骤进行, 使用微量分光光度计 (Nanodrop 2000) 检测其纯度和浓度, 将符合要求的 RNA 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2.3 文库的构建及转录组测序 为了使测序结果更稳定, 本研究将 3 个合格样品混合为 1 个样

品,并在此基础上做 3 个生物学重复。使用 oligo (dT)磁珠从总 RNA 中富集带 poly(A)的 mRNA,随后采用超声处理成随机片段。以 mRNA 为模板,经逆转录反应合成第一链 cDNA 和第二链 cDNA,接着用纯化试剂盒纯化 cND,最后进行末端修复、加尾和加接头,构建成 cDNA 文库,基于 Illumina HiSeq TM 4000 高通量平台,以 Pair-end 150 bp 双端测序模式对 cDNA 文库进行转录组测序。

1.2.4 Unigene 序列的获得和生物信息学分析 首先获得原始读长 (raw reads),进一步过滤和质控获得 clean reads,随后借助 Trinity 软件根据序列之间的重叠信息 (kmer 长度为 31 bp, kmer 深度为 6) 组装拼接得到 Unigene。将获得的 Unigene 序列与 Nr、SwissProt、GO、KEGG 和 COG 等数据库进行 BLAST 比对分析,得到芦荟基因的蛋白功能注释和分类。

1.2.5 差异表达基因鉴定与功能富集分析 采用 DESeq2^[21]进行基因差异表达分析。以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ 为标准进行差异表达基因的鉴定。其中 $FDR < 0.05$ 且 $\log_2FC > 1$ 的基因为上调表达基因, $FDR < 0.05$ 且 $\log_2FC < -1$ 的基因为下调表达基

因。通过 FPKM 值计算定量 Unigenes 的表达丰度,公式: $FPKM = 10^6 \times C / (N \times L / 1000)$ 。通过 BLASTx 程序以 $e\text{-value} < 1e-5$ 为阈值在 Nr 数据库、Swiss-prot 蛋白数据库、KEGG 数据库和 KOG 数据库对 Unigenes 注释。基于 Nr 注释,借助 Blast2GO 软件进行 GO 注释分析^[22]。通过 WEGO 软件对 Unigenes 分类^[23]。GO 与 KEGG 富集分析是利用超几何检验进行 P 值计算并进行 Bonferroni 校正,以 $q\text{-value} < 0.05$ 为标准筛选出差异表达基因显著富集的 GO 条目或 pathway。

1.2.6 DEGs 的 qRT-PCR 验证 采用 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTM 逆转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA。采用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM 进行 Real-time PCR,反应条件为: 98 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 30 s, 35 个循环。内参选用珍珠芦荟 *actin*, 利用 Primer 5.0 对验证基因的 CDS 区域设计特异性引物,引物详细信息见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算珍珠芦荟不同材料间差异基因的相对表达量。比较转录组水平的 FPKM 值和荧光定量 PCR 的相对表达量,验证转录组数据筛选 DEGs 的可靠性。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers for this study

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	温度 Tm/°C	长度 Length/bp
Unigene0029691	<i>porA</i>	porA-F	GCAGCAGGACTGAACGG	54.5	157
		porA-R	GGGAGGCGAAGGTGATT	54.8	
Unigene0057857	<i>cab13</i>	cab13-F	TGGTGGAAAGGGTTCAGGAT	57.0	124
		cab13-R	TTCAACTCGGCGAAAGTCA	57.3	
Unigene0038573	<i>moda</i>	moda-F	AATGATGATATTCAGGGAACG	54.3	106
		moda-R	CACCCAGAAACAAGAAAGTGT	53.7	
Unigene0003025	<i>actin</i>	actin-F	CAGCCGAGCGGGAAAT	57.0	167
		actin-R	TGGGCAACGGAACCTC	54.4	

1.3 数据处理

使用 Excel 2016 和 Origin 8.0 软件进行数据整理和制图,采用 Duncan's 新复极差法检验。

2 结果与分析

2.1 珍珠芦荟白化苗突变株及其光合色素含量分析

与正常苗对比,白化苗突变株 *ls* 外部色泽呈现白绿相间,白化苗突变株 *qj* 外部色泽呈现淡淡的绿白色,而正常叶色苗呈现均匀绿色 (图 1)。对珍珠芦荟 3 种材料叶片的光合色素叶绿素 a、

叶绿素 b 和类胡萝卜素含量测定结果表明,正常植株叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量极显著高于白化突变体 (*ls* 和 *qj*)。与正常苗叶片相比,突变体 *ls* 叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量分别降低 63.8%、61.8% 和 61.1%,突变体材料 *qj* 叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量分别降低 73.4%、76.0% 和 53.1% (图 2)。

2.2 转录组数据分析

本研究共获得原始数据 (raw reads) 68.23 Gb,经过数据过滤和质控得到有效数据 (clean reads)

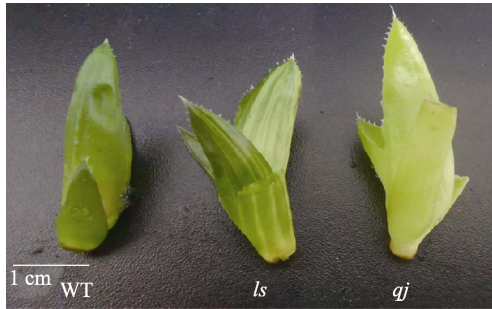
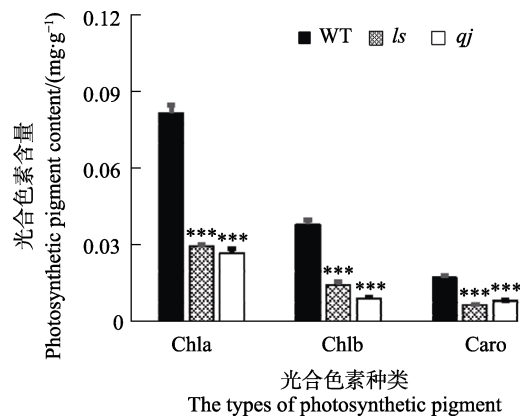


图 1 珍珠芦荟正常苗 WT、白化苗突变株 *ls* 和 *qj* 样品表型

Fig. 1 Sample phenotype of normal seedling WT, albino mutant *ls* and *qj* of *A. aristata*



***表示处理间差异极显著 ($P < 0.001$)。
 *** indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.001$).

图 2 正常苗 WT、白化苗突变株 *ls* 和 *qj* 光合色素含量
 Fig. 2 Photosynthetic pigment content in leaves of normal seedling WT, albino mutant *ls* and *qj* of *A. aristata*

67.72 Gb, GC 含量介于 47.63%~48.25%之间, Q_{20} 平均值超过 98%, Q_{30} 平均值超过 94% (表 2)。经过组装, 一共得到 122 665 条 Unigenes, 其中, 最长长度为 24 511 bp, 最短长度为 201 bp, 平均长度为 822 bp, Unigene N50 数量为 19 100, N50 长度为 1443 bp。不同长度 Unigenes 分布比例显示, 长度在 200~500 bp 的 Unigene 占 55.9%, 长度超过 2000 bp 的占 9.36%。上述结果表明, 测序结果良好, 各项质控指标达到要求, 可用于后续分析。

2.3 Unigene 功能注释 将组装得到的 122 665 条 Unigenes 序列与相关数据库进行比对, 其中, 51 798 条 Unigenes 在 Nr 数据库 (non-redundant protein database) 中获得注释, 占 42.2%; 35 338 条 Unigenes 注释到 SwissProt 数据库, 占 28.8%; 30 666 条 Unigenes 在 COG 数据库中获得注释, 占 25.0%; 29 046 条 Unigenes 在 GO 数据库中获得注释, 占 23.7%; 45 496 条 Unigene 在 KEGG 数据库中获得注释, 占 37.1% (图 3)。

将比对到 Nr 数据库的序列进一步分析, 结果表明, 珍珠芦荟与芦笋 (*Asparagus officinalis*) 匹配比例最高, 为 8822 条, 占到可匹配序列的 7.19%, 接下来依次为蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*, 5.89%)、棕榈 (*Elaeis guineensis*, 1.93%)、葡萄 (*Vitis vinifera*, 1.68%)、海枣 (*Phoenix dactylifera*, 1.57%)、金杜鹃 (*Rhodamnia argentea*, 1.29%)、石斛 (*Dendrobium catenatum*, 1.22%)、黄花蒿 (*Artemisia annua*, 1.14%) (图 4)。

表 2 转录组测序质量评估

Tab. 2 Quality assessment of transcriptome sequencing reads

样品名称 Sample name	原始数据 Raw reads/bp	有效数据 Clean reads/bp	$Q_{20}/\%$	$Q_{30}/\%$	GC 含量 GC content/%
WT	7 772 265 800	7 712 110 809	98.23	95.57	48.04
<i>ls</i>	7 512 078 000	7 458 339 174	98.10	94.44	47.74
<i>qj</i>	7 458 022 300	7 405 241 881	98.19	94.19	47.84

2.3 差异表达基因的 GO 富集分析

以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 为条件进行差异表达基因的筛选。结果表明 (图 5), 与正常植株 WT 的叶片相比, 白化苗突变株 *ls* 叶片中有 914 个差异表达基因, 其中 453 个上调, 461 个下调 (WT-vs-*ls*); 白化苗突变株 *qj* 叶片中有 1851 个差异表达基因, 其中 868 个上调, 983 个下调 (WT-vs-*qj*)。

为了研究珍珠芦荟白化苗突变株的 DEGs 涉

及的生物学功能, 将白化植株 *ls* 和 *qj* 中的 DEGs 分别进行了 GO 功能富集分析。由图 6A 和图 6B 可知, *ls* 和 *qj* 的 DEGs 均被富集到生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 个功能类别。在生物过程中, *ls* 的 DEGs 显著富集在色素积累 (pigment accumulation)、组织中的色素积累 (pigment accumulation in tissues)、细胞壁组成或生物发生 (cell wall organization

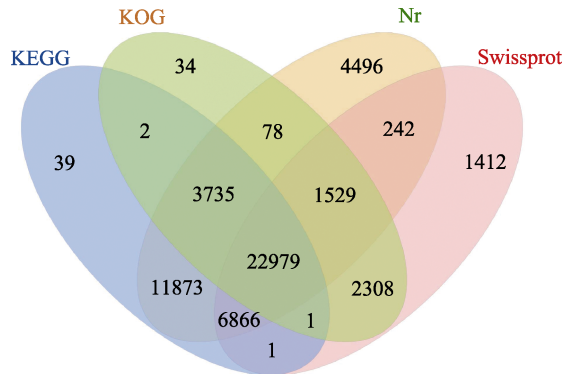
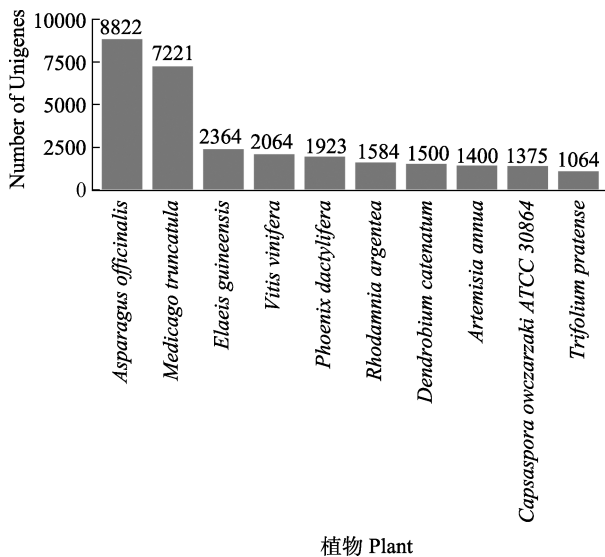


图 3 四大数据库注释韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of databases annotation



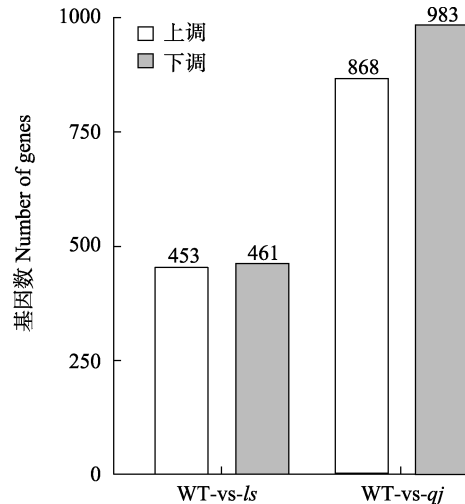
植物 Plant

图 4 珍珠芦荟与其他所选物种序列匹配的比较

Fig. 4 Comparison of sequence matching of *A. aristata* with selected plants

or biogenesis)、发育性生长 (developmental growth) 等; *qj* 的 DEGs 则显著富集在细胞壁组成或生物合成 (cell wall organization or biogenesis)、内源性刺激反应 (response to endogenous stimulus) 和色素聚集 (pigment accumulation) 等生物过程。在细胞组分中, *ls* 的 DEGs 显著富集在细胞壁 (cell wall)、细胞外周 (cell periphery)、细胞外区域 (extracellular region) 等; *qj* 的 DEGs 则显著富集在细胞外周 (cell periphery)、细胞壁 (cell wall) 和外部封装结构 (external encapsulating structure)。在分子功能中, *ls* 显著富集在水解 O-糖基化合物水解酶活性 (hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds)、作用于糖基键的水解酶活性 (hydrolase activity, acting on glycosyl bonds) 和酶抑制剂活性 (enzyme inhibitor activity); *qj* 的 DEGs 则显著富集在在水解 O-

糖基化合物水解酶活性 (hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds)、作用于糖基键的水解酶活性 (hydrolase activity, acting on glycosyl bonds) 和氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity)。

图 5 正常苗 WT、白化苗突变株 *ls* 和 *qj* 的 DEGs 数目统计Fig. 5 Numbers of differentially expressed genes (DEGs) in normal seedling WT compared with albino mutant *ls* (WT-vs-*ls*) and normal seedling compared with albino mutant *qj* (WT-vs-*qj*)

2.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

为研究白化苗突变株 *ls* 和 *qj* 的代谢通路情况, 本研究对 *ls* 和 *qj* 的 DEGs 分别进行 KEGG 富集分析。结果表明, *ls* 的差异表达基因显著富集在植物-病原互作 (plant-pathogen interaction)、代谢通路 (metabolic pathways)、MAPK 信号通路-植物 (MAPK signaling pathway-plant)、二萜生物合成 (diterpenoid biosynthesis) 及次生代谢物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolite) 等通路 (图 7A); 而 *qj* 的 DEGs 则显著富集在核糖体 (ribosome)、脂肪酶延伸 (fatty acid elongation)、次生代谢物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolite)、苯丙烷生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis) 和类黄酮生物合成 (flavonoid biosynthesis) 等通路 (图 7B), 2 个突变体 *ls* 和 *qj* 均在次生代谢物生物合成中差异表达基因存在显著富集现象。

2.5 参与光合作用相关基因的筛选及表达分析

基因 *porA* 和 *Cab13* 与叶绿素的合成紧密相关, 其在 2 个突变体中均呈现出显著的下调表达。

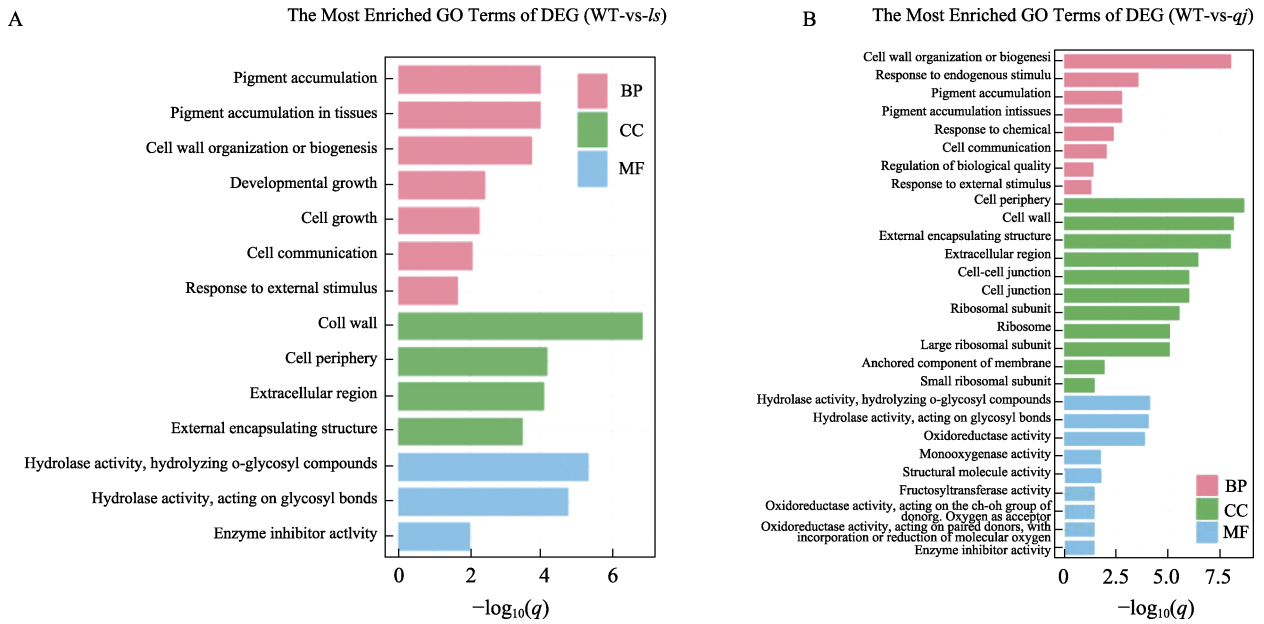


图 6 正常苗 WT、白化苗突变株 *ls* 和 *qj* DEGs 的 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis on differentially expressed genes (DEGs) between normal seedling WT and albino mutant *ls/qj*

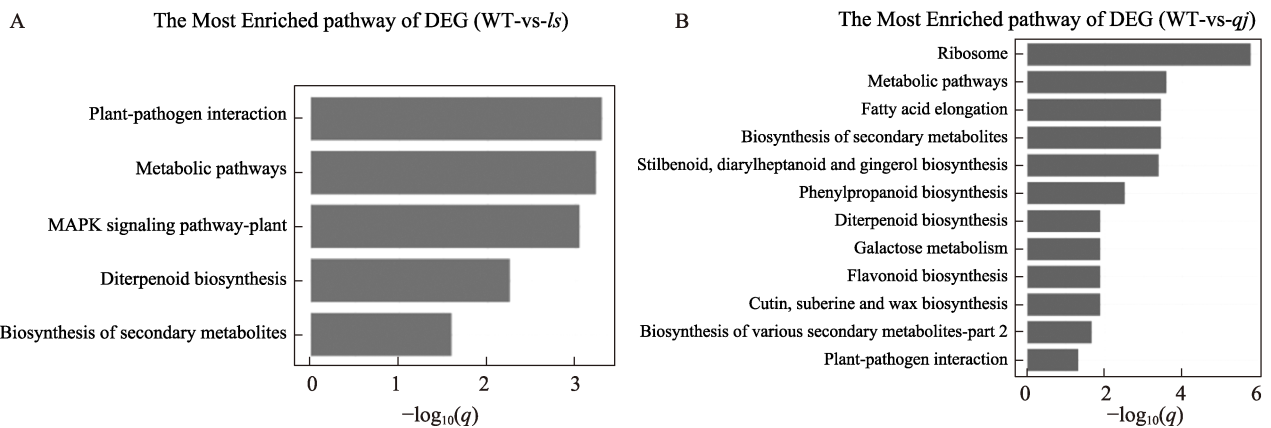


图 7 正常苗 WT 和白化苗突变株 *ls*、和白化苗突变株 *qj* DEGs 的 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis on differentially expressed genes (DEGs) between normal seedling WT and albino mutant *ls/qj*

在与光合作用相关基因（如光合途径、天线蛋白、叶绿素合成）中，以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ 为阈值，从突变体 *ls* 中选取了 7 个基因，在突变体 *qj* 中选取了 22 个基因进行分析。结果表明，与正常植株 WT 相比，在突变体 *ls* 中，呈现显著下调的基因有原叶绿素酸酯氧化还原酶 A (*porA*) 和叶绿素 a/b 结合蛋白 (*cab13*) (图 8)；在突变体 *qj* 中，呈现显著下调的基因有 *moda* 和 *porA* (图 8)。与叶绿素合成紧密相关的基因 *porA* 和 *Cab13* 在 2 个突变体中均呈现出显著的下调表达。

为验证转录组数据可靠性，采用 qRT-PCR 对与叶绿素合成的相关基因 *porA*、*cab13* 和

moda 表达情况进行验证，结果表明（图 9），与正常植株 WT 相比，白化苗突变株 *ls* 和 *qj* 的 *porA*、*cab13* 和 *moda* 的表达均显著下调，该数据与转录组中 FPKM 值的变化数据一致，说明该转录组数据可靠。

3 讨论

白化突变虽一般为致死性突变，许多植株在幼苗期就会死亡，因此在实际应用中受到了限制，但园艺植物的白化突变体却有极高的观赏价值，且白化现象也具有一定的理论价值。白化突变体可以用来标记性状，也可以作为特殊的种质资源

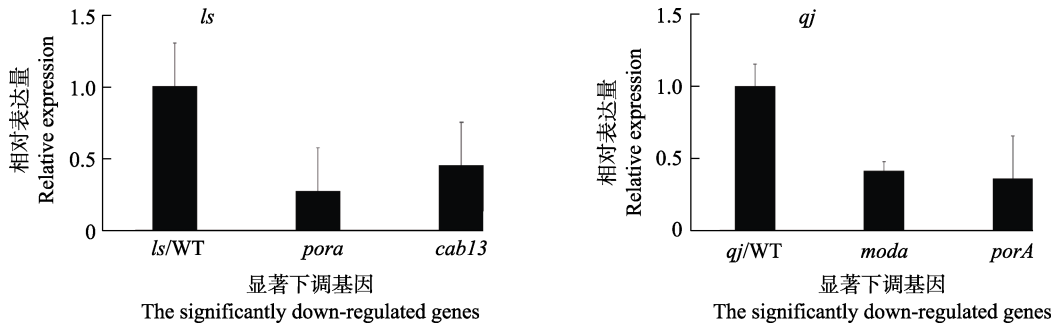


图 8 白化苗突变株 *ls*、白化苗突变株 *qj* 中光合作用相关基因表达水平比较

Fig. 8 Comparison of expression levels of photosynthesis related genes in albino mutant *ls* and albino mutant *qj*

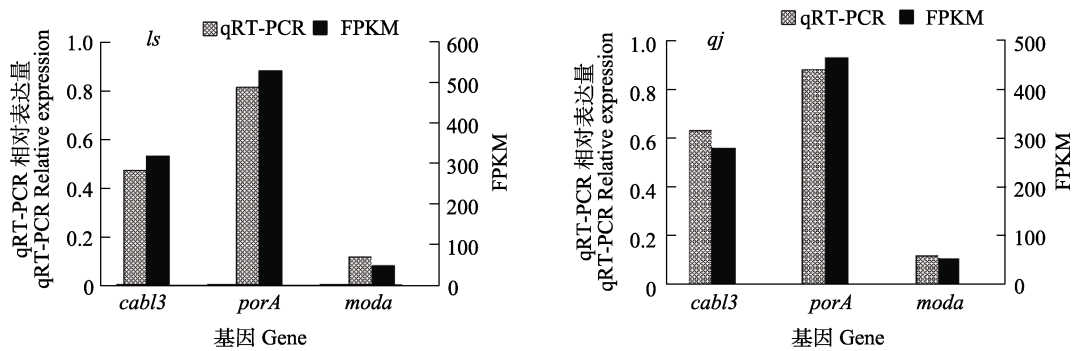


图 9 *porA*、*cab13* 和 *moda* 的 qRT-PCR 验证

Fig. 9 Validation of *porA*, *cab13* and *moda* by qRT-PCR

来研究与叶绿体发育和叶绿素合成的相关基因的调控机制。高等植物叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素等三大类光合色素含量和分布决定了其颜色^[24-27]。本研究通过测定珍珠芦荟正常植株 (WT) 和白化苗突变株 (*ls* 和 *qj*) 的光合色素表明, 白化苗突变株的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量均远远低于正常植株。

许多研究表明, 植物叶绿素的生物合成是一个高度有序的生理生化过程, 20 多个基因编码的 16 种酶参与该过程, 当此过程发生障碍, 则前体物质会积累, 进而导致其含量增加, 其后的物质含量会迅速下降, 从而产生颜色变异的叶片; 类胡萝卜素广泛存在于植物的绿色组织中, 它可以保护叶绿素免受光氧化。在合成胡萝卜素和叶黄素的过程中, 相关基因发生突变, 也能引起植物白化现象的产生, 因此, 叶色白化突变体形成的内在原因主要是叶绿素合成代谢受阻导致的^[2, 4, 5]。叶绿素的合成与代谢是一个复杂调控过程, 涉及许多酶促反应, 其中每一步酶促反应的变化都将影响叶绿素的最终合成而使叶色发生变化甚至导致植株死亡。已有研究结果表明, 与叶绿素合成和降解紧密相关基因的异常表达是促使叶片白化现象的主要原因^[28]。

在本研究中, 对叶色正常和白化的珍珠芦荟进行了转录组测序, 结果表明在白化苗突变株 *ls* 叶片中共筛选到 914 个差异表达基因 (DEGs), 其中 453 个上调, 461 个下调; 在白化苗突变株 *qj* 叶片中筛选到 1851 个差异表达基因, 其中 868 个上调, 983 个下调。GO 功能富集分析显示, *ls* 和 *qj* 的差异表达基因均显著富集在色素积累 (pigment accumulation) 的生物过程中; 在分子功能则均显著富集在水解 O-糖基化合物水解酶活性 (hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds) 和作用于糖基键的水解酶活性 (hydrolase activity, acting on glycosyl bonds) 中。在对差异基因的 KEGG 富集分析发现, *ls* 和 *qj* 均显著富集在次生代谢物合成等通路中, 而与光合作用相关途径的差异基因未获得显著富集。在对光合色素合成相关基因的表达情况分析发现, 这些基因在 2 个白化突变株中呈现出显著差异表达, 其中与叶绿素合成的关键基因除 *porA*、*cab13* 和 *moda* 在白化突变株呈现显著下调外, *sgr* 等其他搜寻获得的基因呈现上调表达; 与类胡萝卜素降解相关的基因 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (*nced*) 表达呈现显著上调表达, 这与光合色素含量的测定结果相一致。研究表明, 呈现下调

表达的基因 *porA*、*cab13* 和 *moda* 为叶绿素合成相关酶编码基因, 这些基因的突变或下调表达会影响植物叶绿素的合成。

porA 为原叶绿素酸酯氧化还原酶, 它催化底物原叶绿素的还原, 最终形成叶绿素。*porA* 为 2 个突变株共同下调表达的基因, *porA* 基因下调会导致原叶绿素酸酯合成叶绿素酸酯的酶促反应受到影响, 进而影响 2 个突变株的叶绿素合成, 因此推测该基因下调对珍珠芦荟白化苗形成起着重要的作用, 这与左朋^[29]研究中利用过表达 *porA*、*porB* 基因促进叶绿素的合成的研究结果相符合。研究显示 *porA-1* 突变体以及 *porA* RNAi 植株会呈现出严重的光合自养生长缺陷^[30]。在暗形态发生中, 缺失 *porA* 会导致初级质体基粒体积和数量减少, 以及光活性的植物原叶绿素酸酯转化的减少^[30]。此外, *porA* 基因对质体发育中膜的超微结构以及正常生化反应是至关重要的^[30]; 而在呈现上调表达的基因中, *sgr* 编码一个 Mg^{2+} 去螯合酶, 参与到叶绿素的降解过程, *sgr* 在水稻中过量表达能促进叶绿素分解, 减少正常生长叶片中的基粒类囊体片层数量和叶绿素含量^[31]。番茄、水稻、鳄梨、葡萄及草莓等植物中 *nced* 基因主要通过参与到脱落酸生物合成过程, 导致植物体内脱落酸含量变化, 使植物器官呈现不同颜色^[32]。

本研究以珍珠芦荟及其白化突变株为研究对象, 通过转录组学分析挖掘出与叶片白化形成相关的关键功能基因, 研究结果为揭示珍珠芦荟组培苗白化突变体形成可能包含的分子机制奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 曹璐, 于旭东, 蔡泽坪, 吴繁花, 罗佳佳, 黄晓薇. 植物叶色白化的研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(16): 5390-5397.
CAO L, YU X D, CAI Z P, WU F H, LUO J J, HUANG X W. Research progress of plant leaf albino[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(16): 5390-5397. (in Chinese)
- [2] YAMASATO A, TANAKA R, TANAKA A. Loss of the N-terminal domain of chlorophyllide a oxygenase induces photodamage during greening of *Arabidopsis* seedlings[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 1-12.
- [3] LU X M, HU X J, ZHAO Y Z, SONG W B, ZHANG M, CHEN Z L, CHEN W, DONG Y B, WANG Z H, LAI J S. Map-based cloning of *zb7* encoding an IPP and DMAPP synthase in the MEP pathway of maize[J]. Molecular Plant, 2012, 5(5): 1100-1112.
- [4] 栾海业, 臧慧, 沈会权, 张英虎, 乔海龙, 陶红, 申玉香, 陈和. 大麦白化颖壳突变体的转录组学分析[J]. 核农学报, 2017, 31(12): 2332-2339.
LUAN H Y, ZANG H, SHEN H Q, ZHANG Y H, QIAO H L, TAO H, SHEN Y X, CHEN H. Transcriptomics analysis of barley albino glume mutants[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(12): 2332-2339. (in Chinese)
- [5] 魏彦林, 施勇烽, 吴建利. 水稻核基因控制的叶色变异[J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1169-1178.
WEI Y L, SHI Y F, WU J L. Leaf color variation controlled by rice nuclear genes[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2011, 25(6): 1169-1178. (in Chinese)
- [6] 徐胤. 绿竹及其白化变异类型的差异分析和叶色白化机理的初步研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2020.
XU Y. Differential analysis of green bamboo and its albinism variation types and preliminary study on leaf color albinism mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2020. (in Chinese)
- [7] 杨茨. 安吉白茶白化分子机制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
YANG Y. Study on the molecular mechanism of albinism of Anji white tea[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019. (in Chinese)
- [8] 史琳, 陈彦. 植物白化基因的作用机制与研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(12): 132-135.
SHI L, CHEN Y. Action mechanism and research progress of plant albino genes[J]. Anhui Agricultural Science, 2017, 45(12): 132-135. (in Chinese)
- [9] 曾超珍, 刘仲华. 安吉白茶阶段性白化机理的研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, 13(12): 2905-2911.
ZENG C Z, LIU Z H. Research progress on stage whitening mechanism of Anji white tea[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(12): 2905-2911. (in Chinese)
- [10] 朱明库, 胡宗利, 周爽, 李亚丽, 陈国平. 植物叶色白化研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(3): 255-261.
ZHU M K, HU Z L, ZHOU S, LI Y L, CHEN G P. Research progress of plant leaf color whitening[J]. Life Science, 2012, 24(3): 255-261. (in Chinese)
- [11] JIA H Y, XI Z G, MA J Q. Endophytic bacteria from the leaves of two types of albino tea plants, indicating the plant growth promoting properties[J]. Plant Growth Regulation, 2021, 2: 96-110.
- [12] PATIL V K, PATIL M D, MARKHEDE S S. Albino wildling of *Tabernaemontana alternifolia* L. and a review of Albinism in forest plants in India[J]. Journal of Tree Sciences, 2015, 34(1): 1-10.

- [13] 兑宝峰, 郭斐. 多肉植物斑锦变异[J]. 中国花卉园艺, 2018(4): 30-31.
DUI B F, GUO F. Variation of succulent plant spectabilis[J]. China Flower Horticulture, 2018(4): 30-31. (in Chinese)
- [14] 苏畅, 李枝林, 李夏媛, 王玉英. 辐射诱发兰花叶艺突变体的叶片叶肉细胞超微结构观察[J]. 热带农业科学, 2016, 36(3): 24-27.
SU C, LI Z L, LI X Y, WANG Y Y. Ultrastructure observation of leaf mesophyll cells of orchid leaf art mutants induced by radiation[J]. Journal of Tropical Agriculture Science, 2016, 36(3): 24-27. (in Chinese)
- [15] 严雅慧, 李淑萍, 热依木古丽·阿布都拉, 阿吉艾克拜尔·艾萨. 芦荟的 HPLC 指纹图谱建立、化学模式识别分析及其含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(3): 353-361.
YAN Y H, LI S P, ABDULA R, AISA H. Establishment of HPLC fingerprint, chemical pattern recognition analysis and content determination of aloe[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(3): 353-361. (in Chinese)
- [16] 谭章斌, 徐由财, 丁文俊, 邓穗晖, 刘彬, 张竞之. 芦荟大黄素抑制肝癌细胞增殖与迁移的机制[J]. 中成药, 2021, 43(10): 2653-2658.
TAN Z B, XU Y C, DING W J, DENG S H, LIU B, ZHANG J Z. Mechanism of aloe emodin inhibiting proliferation and migration of hepatoma cells[J]. Chinese Patent Medicine, 2021, 43(10): 2653-2658. (in Chinese)
- [17] 舒克钢, 劳方毅, 黄祖权, 朱必康, 吴立蔚, 周安远, 刘奕彤, 杨渊. 芦荟苷体内外对大鼠骨关节炎模型的炎症抑制效应[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(5): 425-432.
SHU K G, LAO F Y, HUANG Z Q, ZHU B K, WU L W, ZHOU A Y, LIU Y T, YANG Y. *In vivo* and *in vitro* inhibitory effects of aloin on inflammation in rat osteoarthritis model[J]. Journal of Immunology, 2021, 37(5): 425-432. (in Chinese)
- [18] 郝继伟, 刘荣华, 周言忠. 芦荟的优良品种及无性繁殖[J]. 特种经济动植物, 2002(8): 35-36.
HAO J W, LIU R H, ZHOU Y Z. Excellent varieties and asexual propagation of aloe[J]. Special Economic Animals and Plants, 2002(8): 35-36. (in Chinese)
- [19] 赵芯芝, 甄丹丹, 甄汉深, 陈明伟. 中药芦荟研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 45-47.
ZHAO X Z, ZHEN D D, ZHEN H S, CHEN M W. Research progress of traditional Chinese medicine Aloe[J]. Asia Pacific Traditional Medicine, 2015, 11(6): 45-47.
- [20] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 71-77.
GAO J F. Experimental guidance of plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 71-77. (in Chinese)
- [21] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [22] CONESA A, GOTZ S, GARCIA J M, TEROL J, TALON M, ROBLES M. Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [23] YE J, FANG L, ZHENG H K, ZHANG Y, CHEN J, ZHANG Z J, WANG J, LI S T, LI R Q, BOLUND L, WANG J. WEGO: a web tool for plotting go annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 293-297.
- [24] 王力源, 李文杰, 麻芸娇, 刘兴菊, 梁海永. 白榆白化芽变突变体光合特性及转录组分析[J]. 西北林学院学报, 2020, 35(6): 10-16.
WANG L Y, LI W J, MA Y J, LIU X J, LIANG H Y. Photosynthetic characteristics and transcriptome analysis of Albino mutant of *Ulmus pumila*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(6): 10-16. (in Chinese)
- [25] 秦晓杰, 王园媛, 樊佳奇, 李尧. 多肉植物冬美人不同类型叶片的叶绿素含量和结构特征比较研究[J]. 现代园艺, 2021, 44(14): 12-13.
QIN X J, WANG Y Y, FAN J Q, LI Y. Comparative study on chlorophyll content and structural characteristics of different types of leaves of succulent plant winter beauty[J]. Modern Horticulture, 2021, 44(14): 12-13. (in Chinese)
- [26] 吴霞, 毛行简, 凡莉莉, 陈凌艳, 何天友, 荣俊冬, 郑郁善. 花叶鹅掌柴不同颜色叶片光合特性[J]. 热带作物学报, 2022, 43(3): 556-564.
WU X, MAO X J, FAN L L, CHEN L Y, HE T Y, RONG J D, ZHENG Y S. Photosynthetic characteristics of different color leaves of *Gleditsia lanceolata*[J]. Journal of Tropical Crops, 2022, 43(3): 556-564. (in Chinese)
- [27] ZHANG X J, YI W G, LIU G S, KANG N B, MA L M, YANG G H. Colour and chlorophyll level modelling in vacuum-precooled green beans during storage[J]. Journal of Food Engineering, 2021, 301: 110523-110535.
- [28] SMIRCICH P, EASTMAN G, BISPO S, DUHAGON M A, GUERRA-SLOMPO E P, GARAT B, GOLDENBERG S, MUNROE D J, DALLAGIOVANNA B, HOLETZ F, SOTELO-SILVEIRA J R. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 443.
- [29] 左朋. 通过调节 *ClpC1* 和 *POR* 基因的表达以提高烟草光合效率的研究[D]. 长春: 长春师范大学, 2020.
ZUO P. Research of improving tobacco photosynthetic efficiency by regulating the expression the genes of *ClpC1* and *POR*[D]. Changchun: Changchun Normal University, 2020.

- (in Chinese)
- [30] PADDOK T, LIRNA D, MASON M E. *Arabidopsis* light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) is essential for normal plant growth and development[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(4): 447-460.
- [31] SHIN D J, LEE S, KIM T H, LEE J H, PARK J, LEE J, LEE J Y, CHO L H, CHOI J Y, LEE W, PARK J H, LEE D W, ITO H, KIM D H, TANAKA A, CHO J H, SONG Y C, HWANG D, PURUGGANAN M D, JEON J S, AN G, NAM H G. Natural variations at the stay-green gene promoter control lifespan and yield in rice cultivars[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2819.
- [32] 曾旭梅, 席婉, 朱琳琳, 袁金梅, 熊康舜, 王彩云, 郑日如. 类胡萝卜素代谢途径基因变异导致园艺植物色泽差异的研究进展[J]. *华中农业大学学报(自然科学版)*, 2022, 41(3): 181-190.
- ZENG X M, XI W, ZHU L L, YUAN J M, XIONG K S, WANG C Y, ZHENG R Z. Progress on studying color difference of horticultural plants caused by gene variation of carotenoid metabolic pathway[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University (Natural Science)*, 2022, 41(3): 181-190. (in Chinese)