生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):229-237

杂交兰*ChChlH*基因的克隆及其表达分析

林榕燕 孔兰 吴建设 林兵 钟淮钦*
（福建省农业科学院作物研究所(福建省种质资源中心）福建省特色花卉工程技术研究中心,福州 350013）

摘 要： 【目的】克隆获得杂交兰镁螯合酶H亚基基因（*ChlH*），并对其表达水平和功能进行分析，为探究*ChlH*基因在杂交兰叶色变异中的调控作用提供重要依据。【方法】利用RT-PCR和RACE技术从杂交兰叶片中克隆获得*ChChlH*基因序列，对其进行生物信息学分析；利用基因组步移法获得*ChChlH*基因启动子序列，分析其顺式作用元件；利用RT-qPCR法分析*ChChlH*在不同组织及不同品种叶片中的表达情况；基于VIGS技术验证沉默*ChChlH*基因对烟草叶色变化的影响。【结果】*ChChlH*基因全长4 321 bp，编码区长4 155 bp，GenBank登录号为OL741687.1，编码1 384个氨基酸；ChChlH蛋白可能是一种亲水性不稳定蛋白质，无信号肽和跨膜结构，属于PLN03069超级家族；ChChlH与铁皮石斛ChlH亲缘关系较近，其中铁皮石斛ChlH与ChlI和ChlD发生蛋白互作；*ChChlH*启动子包含光响应及脱落酸、乙烯、赤霉素、水杨酸、茉莉酸甲酯信号响应元件，具有MYB、WRKY结合位点；*ChChlH*在叶中表达量较高，且绿叶区域中的表达量显著高于叶艺区域叶片中的表达量。沉默*ChChlH*后烟草老叶中的光合色素含量及*ChlH*基因的相对表达量显著降低。【结论】明确了*ChChlH*基因的序列和表达特征模式，该基因可能在叶绿素合成和叶色变异中发挥重要作用。

关键词： 杂交兰；镁螯合酶H亚基基因；基因克隆；生物信息学分析；表达分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1359

Cloning and Expression Analysis of *ChChlH* Gene in *Cymbidium* hybrid

LIN Rong-yan KONG Lan WU Jian-she LIN Bing ZHONG Huai-qin*
(*Crop Research Institute (Fujian Provincial Germplasm Resource Center), Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou* 350013)

Abstract: 【Objective】The magnesium chelatase H subunit gene (*ChlH*) was cloned from *Cymbidium* hybrid, and its expression patterns and function were analyzed, thereby providing important insights into the regulatory role of the *ChlH* gene in leaf color variation in *Cymbidium* hybrid. 【Method】The *ChChlH* gene sequence was cloned by RT-PCR and RACE, followed by bioinformatics analysis. The promoter sequence of the *ChChlH* gene was obtained via genome walking, and its *cis*-acting elements were analyzed. The expression patterns of *ChChlH* in different tissues and different cultivars were examined using RT-qPCR. Furthermore, the effect of *ChChlH* silencing on leaf color variation in *Nicotiana tabacum* was verified using a virus-induced gene silencing (VIGS) system. 【Result】The full-length sequence of *ChChlH* is 4 321 bp, with a coding region of 4 155 bp encoding 1 384 amino acids, and its GenBank accession number is OL741687.1. Bioinformatics analysis indicates that the ChChlH protein might be a hydrophilic and unstable protein, lacking a signal peptide and transmembrane domains, and belongs to the PLN03069 superfamily. ChChlH showed high affinity with the ChlH protein from *Dendrobium catenatum*, which is known to interact with ChlI and ChlD. Promoter analysis revealed that the *ChChlH* promoter contains light-responsive elements, as well as *cis*-acting elements involved in responses to abscisic acid, ethylene, gibberellin, salicylic acid, and methyl jasmonate, along with MYB and WRKY transcription factor binding sites. Expression analysis showed that *ChChlH* was highly expressed in leaves, with significantly higher transcript levels in green leaf areas than in variegated regions. Silencing of *ChChlH* in *N. tabacum* led to a significant reduction in photosynthetic pigment content and *ChlH* expression in older leaves. 【Conclusion】The study clarified the sequence and expression pattern of the *ChChlH* gene, which may play an

收稿日期：2025-12-12
基金项目：福建省属公益类科研院所专项（2024R1030004），福建省自然科学基金项目（2023J01199），福建省农业科学院英才项目（YC2021013），福建省农业科学院优秀科技创新人才专项（YCZX202502）
*通信作者：钟淮钦 zhqeast@163.com

important role in chlorophyll synthesis and the variation of leaf color.

Keywords: *Cymbidium* hybrid; magnesium chelatase H subunit gene; gene cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

叶色变异是观赏植物种质创新与品质提升的重要研究方向，其不仅直接决定了植物的观赏价值，也与光合效率及抗逆性等生理功能密切相关[1]。叶绿素代谢是叶色形成的基础，其中镁离子螯合酶是叶绿素合成途径中的一个关键酶，由3个亚基ChlI、ChlD和ChlH组成，催化镁离子螯合进入原卟啉IX，生成镁原卟啉IX，这一反应是叶绿素合成的限速步骤[2]。H亚基（CHLH）因其兼具催化底物结合、调控酶活性以及参与多种信号通路的枢纽功能，成为解析叶色变异分子机制的一个理想候选基因[3-4]。

近年来，叶绿素代谢相关基因在植物叶色变异中的作用已得到广泛关注[5-8]，关于*CHLH*基因的研究也取得一系列进展，充分证明了其调控叶色变异的巨大潜力。在棉花（*Gossypium arboreum*）黄化突变体的研究中，*GaCHLH*基因在第1 549位碱基处发生单核苷酸突变（G转A），导致第517位的甘氨酸（G）被丝氨酸（S）取代，GaChlh蛋白二级结构异常，并使其无法与D亚基（GaCHLD）正常互作，从而破坏镁螯合酶的组装与功能，最终引发叶绿素合成受阻与叶片黄化表型[9]；通过农杆菌介导法利用病毒诱导的基因沉默（VIGS）技术调控大别山冬青（*Ilex dabieshanensis*）*ChlH*基因的表达，侵染21 d的叶片表现出明显的黄化表型[10]。此外，在舒马栎（*Shumard Oak*）[11]、烟草（*Nicotiana tabacum*）[12]、连翘（*Forsythia*）[13]等物种中的研究也表明，*ChlH*基因的表达与叶绿素合成及叶色形成紧密相关，其功能缺失可能导致黄化性状的出现。这一发现为在观赏植物中利用该基因创制叶色突变体提供了坚实的理论依据和可行的技术路径。

杂交兰（*Cymbidium* hybrid）是由国兰和大花蕙兰杂交而成的一类兰属植物，其叶艺品种因独特的叶艺表现（如爪艺、中透艺）而具有极高的观赏和经济价值[14]。然而，叶艺性状形成（叶色变异）的分子机制尚不明确，严重制约了杂交兰品种叶色改良效率。课题组前期以杂交兰绿叶品种‘紫妍氏’及其叶艺品种‘福韵西施’和‘中透紫妍氏’为材料进行转录组测序，发现*ChlH*基因为显著差异表达基因，在‘紫妍氏’绿叶中的表达量显著高于‘福韵西施’和‘中透紫妍氏’，而关于该基因在这2个叶艺品种叶色变异中的作用机制还未可知。

基于此，本研究采用RT-PCR、RACE、基因组步移法等手段从杂交兰叶片中克隆获得*ChlH*基因序列，对其分子特征、差异表达规律、顺式作用元件等进行分析，并利用VIGS技术构建*ChChlH*沉默载体，转化烟草叶片，为后续杂交兰*ChChlH*基因的功能验证和叶色变异分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中所用杂交兰材料为保存于福建省农业科学院作物研究所花卉研究室的‘紫妍氏’（K21，叶片绿色）、‘福韵西施’（K21-1，叶片绿色浅黄边）和‘中透紫妍氏’（K21-3，叶片黄色带绿边）。采集K21、K21-1和K21-3的叶片用于基因序列克隆，K21的根、茎、叶及K21-1和K21-3的绿叶和叶艺区域叶片用于基因表达分析检测。

1.2 方法

1.2.1 杂交兰样品DNA、RNA的提取及cDNA的合成 利用通用基因组DNA提取试剂盒Ver.5.0（TaKaRa）进行杂交兰样品基因组DNA提取；采用通用植物总RNA提取试剂盒（BioTeke）进行杂交兰不同组织总RNA的提取，通过1%琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测DNA和RNA的质量和浓度，合格产物用于后续试验。使用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒（TaKaRa）进行cDNA第一链的合成，并将其中的Oligo dT接头引物替换为AP进行逆转录。

1.2.2 杂交兰*ChlH*基因序列克隆 基于NCBI数据库，查找获得*ChlH*基因参考序列（XM_020824640.2），设计一对引物*ChlH*-F/*ChlH*-R（表1），用于保守区的扩增。经PCR扩增、产物检测和回收、载体连接和转化、菌液PCR检测、阳性克隆测序、Blast序列验证，获得正确的保守区序列。在此基础上，根据测序结果分别设计2条正向特异引物*ChlH*-3′-1和*ChlH*-3′-2及2条反向特异引物*ChlH*-5′-1和*ChlH*-5′-2，用于3′ RACE和5′ RACE扩增。拼接获得的各片段序

列，得到该基因的cDNA全长。在此基础上，设计一对引物*ChlH*-ORF-F/*ChlH*-ORF-R，用于ORF序列验证。根据已知*ChlH*基因序列，设计合成3条反向特异性引物：*ChlH*-SP1、*ChlH*-SP2、*ChlH*-SP3；利用基因组步移试剂盒（TaKaRa）中的AP引物和3条特异性引物进行3轮PCR扩增；取适量的上轮PCR产物作为下轮PCR模板。取适量的3次PCR产物按顺序进行电泳，从凝胶中回收清晰的条带；回收的PCR产物以*ChlH*-SP3为引物进行测序，测序结果与参考序列比对，获得*ChlH*基因的启动子序列。

表1　杂交兰*ChlH*基因克隆及RT-qPCR所用引物

Table 1　Primers used in *ChlH* clone and RT-qPCR in *Cymbidium* hybrid

引物名称 Primer Name	引物序列 Primer sequence	作用 Function
AP	5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC$(T)_{17}$-3′	逆转录引物 Reverse transcription primer
AAP	5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC$(G)_8$-3′	锚定引物
AUAP	5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′	Anchored primers
ChlH-F	5′-CAATGGCTTCTCTGGTTTTCACTC-3′	保守区扩增引物
ChlH-R	5′-TTAGCGCTCAATACCCTCGATCT-3′	Conserved fragment amplification primers
ChlH-3′-1	5′-GAATCTCGTACAGTCACTTAGGCGCGA-3′	3′ RACE引物
ChlH-3′-2	5′-TATGAGGGGATGATGAGGAGC-3′	3′ RACE primers
ChlH-5′-1	5′-AGAAGGTGCGGTAAGTGGTCTCGTC-3′	5′ RACE引物
ChlH-5′-2	5′-CGTTGCAGAAGAAGACCCTTGAT-3′	5′ RACE primers
ChlH-ORF-F	5′-ACTGCCCGCGATCACTTCCTCAGC-3′	ORF扩增引物
ChlH-ORF-R	5′-CAAAAATACAAACAGTCCAACTCCTG-3′	ORF amplification primers
ChlH-SP1	5′-CGAAGATGAGCGAGCCGATGAATACG-3′	启动子序列引物
ChlH-SP2	5′-GACTGCGGCGGATAGGGAGGATTGGTACTG-3′	Promoter sequence primers
ChlH-SP3	5′-TTGATGTGGGTTGTTGGGTGAGGCGGGGAAGG-3′	
ChACT-F	5′-GGGTGCTTATGTTGGTGATG-3′	内参基因引物
ChACT-R	5′-TTCAGAGGGGCTTCAGTAAGG-3′	For the internal control
ChlH-RT-F	5′-TTCAGCAGCCCTAACCTCAACGTCGCT-3′	RT-qPCR引物（杂交兰）
ChlH-RT-R	5′-GAAGGAGTAGTAGGCGGCAAAGCCATGGTG-3′	RT-qPCR（*Cymbidium* hybrid）
ChChlH-VIGS-F	5′-CGACGACAAGACCGTCACCCCCGGTGAACAACAAGCCTTTCGT-3′	VIGS引物
ChChlH-VIGS-R	5′-GAGGAGAAGAGCCGTCGGCCCATCTTATAGCTCTTGTACATAG-3′	VIGS primers
ChChlH-RT-F	5′-CCCGGTGAACAACAAGCCTTTCGT-3′	RT-qPCR引物（烟草）
ChChlH-RT-R	5′-GCATCCCTGCCGGAAAACACTATCGG-3′	RT-qPCR（*N. tabacum*）

1.2.3　杂交兰ChChlH蛋白生物信息学分析　将杂交兰*ChChlH*基因ORF序列翻译为氨基酸序列后，利用ExPASy在线软件分析蛋白的理化性质；利用TMHMM-2.0、NetPhos-3.1、WoLF PSORT、SOPMA预测蛋白的跨膜结构、磷酸化位点、亚细胞定位、二级结构；采用NCBI Conserved Domain Search数据库分析保守结构域。除ChChlH蛋白质序列（UKI61040.1）外，从NCBI数据库中下载20个不同物种的ChlH蛋白质序列，进行序列比对和系统进化树构建。20个物种分别为铁皮石斛（*Dendrobium catenatum*，XP_020680299.1）、海枣（*Phoenix dactylifera*，XP_008802639.2）、油棕（*Elaeis guineensis*，XP_010938532.1）、深圳拟兰（*Apostasia shenzhenica*，PKA62593.1）、木薯（*Manihot esculenta*，XP_021619948.1）、菠萝（*Ananas comosus*，XP_020108684.1）、决明（*Senna tora*，KAF7819031.1）、麻风树（*Jatropha curcas*，XP_012086160.1）、姜（*Zingiber officinale*，XP_042457778.1）、榴莲（*Durio zibethinus*，XP_022766664.1）、康藏嵩草（*Carex littledalei*，KAF3326171.1）、哥伦比亚锦葵（*Herrania umbratica*，XP_021281964.1）、三裂叶薯（*Ipomoea triloba*，XP_031127328.1）、大豆（*Glycine max*，

XP_003535922.1）、美人蕉（*Canna indica*，WOL00538.1）、橡胶树（*Hevea brasiliensis*，XP_021673241.1）、花生（*Arachis hypogaea*，XP_025650653.1）、白牧豆树（*Prosopis alba*，XP_028774467.1）、蓖麻（*Ricinus communis*，XP_015582646.1）、河岸葡萄（*Vitis riparia*，XP_034694906.1），利用DNAMAN软件进行序列比对，采用MEGA5.0软件的邻位相连法（neighbor-joining）构建系统进化树。使用PlantCARE软件在线预测*ChChlH*启动子含有的顺式作用元件，使用PlantTFDB在线数据库进行*ChChlH*启动子序列转录因子结合位点预测，利用STRING数据库在线进行ChChlH蛋白互作分析。

1.2.4 杂交兰*ChChlH*基因定量表达分析 以K21的根、茎、叶及K21-1和K21-3不同区域叶片cDNA为模板，*ChACT*为内参基因，使用SYBR Premix Ex Taq^{TM}试剂盒，在7500 Real-Time PCR System仪上检测*ChChlH*基因在各个模板中的相对表达量，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。

1.2.5 VIGS重组载体pTRV2-*ChChlH*的构建 基于获得的*ChChlh*基因序列，设计引物*ChChlH*-VIGS-F和*ChChlH*-VIGS-R（表1），以K21叶片cDNA为模板，进行PCR扩增。扩增产物经电泳验证后，进行目的条带回收纯化、连接TRV2载体、转化至大肠杆菌DH5α、重组载体PCR鉴定与测序。而后，将序列比对完全正确的大肠杆菌质粒转化至农杆菌GV3101，经2–3 d培养后，挑选阳性单克隆送测。

1.2.6 VIGS后烟草叶片叶绿素含量及*ChlH*基因相对表达量测定 活化、重悬pTRV2-00载体和pTRV2-*ChChlH*载体，将其注射于生长状态较为一致的烟草幼苗（子叶全展开且真叶还未露出时）叶片，培养约20 d后，观察比较注射pTRV2-00载体、pTRV2-*ChChlH*载体及未注射载体的烟草表型。利用乙醇提取比色法进行烟草叶片叶绿素含量测定，利用RT-qPCR法进行*ChlH*基因的相对表达量检测。

2 结果

2.1 杂交兰*ChlH*基因序列的获得

以杂交兰K21叶片cDNA为模板，测序后得到4 156 bp、411 bp和206 bp的保守区、3′端和5′端序列（图1-A），测序结果经GenBank数据库在线Blast比对，与铁皮石斛（*D. catenatum*）、蝴蝶兰（*Phalaenopsis equestris*）等兰科植物*CHLH*序列的相似性较高，可达92.62%，表明所得片段为杂交兰*ChlH*基因片段序列。将所获得的3个片段序列进行拼接，得到一条长度为4 321 bp的cDNA序列，经序列扩增验证，命名为*ChChlH*，GenBank登录号为OL741687.1。以杂交兰K21-1及K21-3叶片cDNA为模板，进行ORF序列的PCR扩增，得到约4 300 bp的条带（图1-A），将测序结果进行比对后，获得完全一致的*ChlH*基因序列。

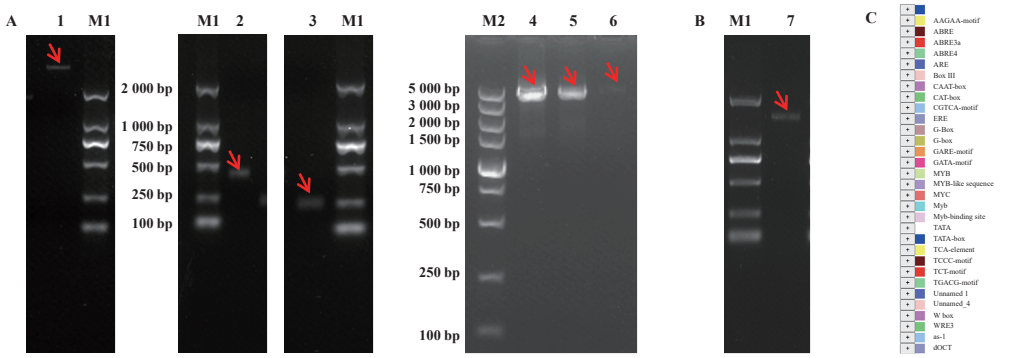
2.2 *ChChlH*启动子序列的克隆和分析

以K21基因组DNA为模板，利用基因组步移法进行启动子序列的克隆（图1-B），最终得到*ChChlH*起始密码子ATG上游-1 621–-1 bp启动子序列，其中胸腺嘧啶（T）为489个（30.2%），腺嘌呤（A）为464个（28.6%），胞嘧啶（C）为360个（22.2%），鸟嘌呤（G）为308个（19.0%）。

利用PlantCARE在线数据库分析该启动子片段包含的关键顺式作用调控元件。结果（图1-C）显示，该片段启动子除具有核心启动子元件（CAAT-box、TATA-box等）外，还具备光响应元件（G-Box、G-box、GATA-motif、TCCC-motif、TCT-motif）、厌氧诱导响应元件（ARE）、响应脱落酸（ABRE）、乙烯（ERE）、赤霉素（GARE-motif）、水杨酸（TCA-element）、茉莉酸甲酯（CGTCA-motif、TGACG-motif）的激素信号元件、与分生组织表达相关的调控元件（CAT-box）以及MYB转录因子的结合位点。使用PlantTFDB在线数据库对该启动子片段转录因子结合位点预测，结果显示，当*P*-value≤$1e^{-5}$时，该片段启动子含有76个转录因子结合位点，其中WRKY结合位点32个、MYB结合位点14个、BES1结合位点8个、BBR-BPC结合位点7个、bHLH结合位点5个、C2H2结合位点4个、NAC和bZIP结合位点各2个、Nin-like和MYB-related结合位点各1个。

2.3 ChChlH蛋白序列的生物信息学分析

经理化性质分析，发现ChChlH蛋白由1 384个氨基酸组成，分子量为154 002.91（分子式：$C_{6896}H_{10881}N_{1855}O_{2057}S_{41}$），理论等电点为5.96，由20种氨基酸组成，其中Leu（10.3%）、Ala（8.0%）和



A：*ChlH*序列扩增产物（M1：DL 2 000 Marker；M2：DL 5 000 Marker；1：保守区扩增条带；2：3′ RACE扩增条带；3：5′ RACE扩增条带；4–6：ORF验证条带）；B：*ChChlH*启动子序列扩增产物（7：启动子序列扩增条带）；C：*ChChlH*启动子作用元件预测

A: Amplification product of *ChlH* sequence (M1: DL 2 000 Marker; M2: DL 5 000 Marker; 1: conserved region amplification band; 2: 3′ RACE amplification band; 3: 5′ RACE amplification band; 4–6: ORF verification bands). B: Amplification product of the *ChChlH* promoter sequence (7: promoter amplification band). C: Promoter acting elements prediction of *ChChlH*

图1　杂交兰*ChlH*序列扩增产物及启动子作用元件预测

Fig. 1　Amplification products of *ChlH* gene from *Cymbidium* hybrid and prediction of its promoter *cis*-acting elements

Val（7.9%）所占比重较大，Trp和Cys含量最低。正、负电荷氨基酸残基总数分别为156和170。脂肪系数为89.75，不稳定系数为40.83，平均亲水性为-0.227，其亲水性上、下限分别为2.844和-3.533，亲水区域多于疏水区域（图2-A），表明其属于不稳定亲水性蛋白。ChChlH不具有信号肽，不存在跨膜区域，全部氨基酸在膜外，定位于叶绿体的可能性最大。蛋白质磷酸化位点分析显示（图2-B），ChChlH具有丝氨酸（72个）、苏氨酸（44个）和酪氨酸（22个）的活性位点，主要被unsp、PKC、cdc2、CKII等蛋白激酶磷酸化修饰。二级结构预测结果显示（图2-C），ChChlH蛋白中α-螺旋结构占主导位置，为48.70%，其余依次为无规则卷曲（34.68%）、延伸链（11.63%）和β-转角（4.99%）。杂交兰ChChlH蛋白属于PLN03069超级家族，即镁原卟啉-IX螯合酶亚基H家族，56–1 263 aa为保守结构域（图2-D）。

2.4　杂交兰Ch*ChlH*基因编码蛋白质的序列比对、进化分析与蛋白互作分析

多序列比对结果（附图）显示，杂交兰ChChlH与其他20个物种中ChlH蛋白序列的一致性达91.67%。系统进化树结果（图3-A）显示，所选蛋白序列被分为2个分支，其中杂交兰ChChlH与同为兰科植物的铁皮石斛ChlH（*Dendrobium catenatum*，XP_020680299.1）、深圳拟兰ChlH（*Apostasia shenzhenica*，PKA62593.1）处于同一分支中，亲缘关系较近。进一步分析发现ChChlH与铁皮石斛ChlH的相似性可达93.86%，选择铁皮石斛的ChlH与蛋白数据库中其他蛋白进行互作分析（图3-B），结果显示ChlH与镁离子螯合酶I亚基（CHLI）、镁离子螯合酶D亚基（CHLD）、镁原卟啉甲基转移酶（MA16_Dca003472）、原卟啉原氧化酶（PPXII）、铁螯合酶（HEMH）家族的2个成员（HEMH-2、HEMH）、镁原卟啉IX单甲酯（氧化）环化酶（CRD1）发生蛋白互作，还可能与叶绿素合酶（CHLG）、香叶基香叶基还原酶（CHLP）家族的2个成员（CHLP、CHLP-2）发生蛋白互作。

2.5　杂交兰*ChChlH*基因定量表达分析

比较不同组织中*ChChlH*基因的表达情况，结果（图4-A）显示，*ChChlH*基因的表达存在组织差异性，叶中的相对表达量显著高于根和茎中的相对表达量，在K21叶中*ChChlH*基因的相对表达量是K21根中的32.51倍。比较不同品种叶片部位中*ChChlH*基因的表达情况，结果（图4-B）显示，K21和K21-1绿叶中*ChChlH*基因相对表达量显著高于K21-3绿叶区域；K21-1和K21-3绿叶区域中的*ChChlH*基因相对表达量显著高于其相应的叶艺区域。

2.6　VIGS重组载体pTRV2-*ChChlH*的构建

经测序比对，获得与预期结果一致的*ChChlH*目的序列，基因片段长度为342 bp，无碱基突变，表明重组载体pTRV2-*ChChlH*构建成功（图5-A）。将

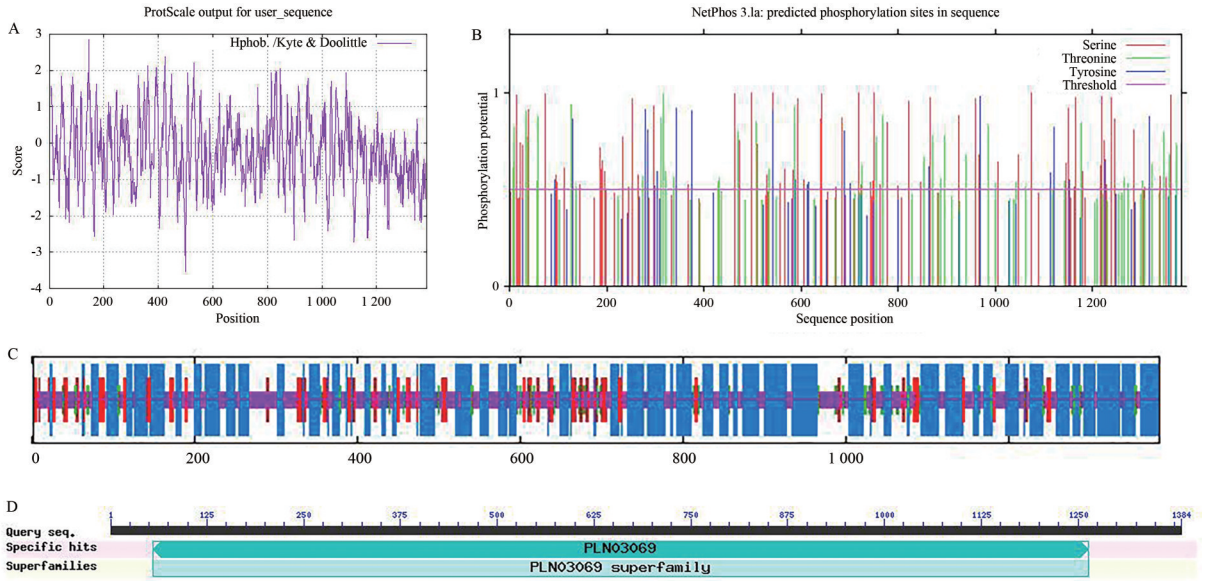


图2 杂交兰ChChlH蛋白亲/疏水性(A)、磷酸化位点(B)、二级结构(C)和保守结构域(D)预测

Fig. 2 Prediction of the hydrophilicity/hydrophobicity (A), phosphorylation sites (B), secondary structure (C), and conserved domain structure (D) of ChChlH in *Cymbidium* hybrid

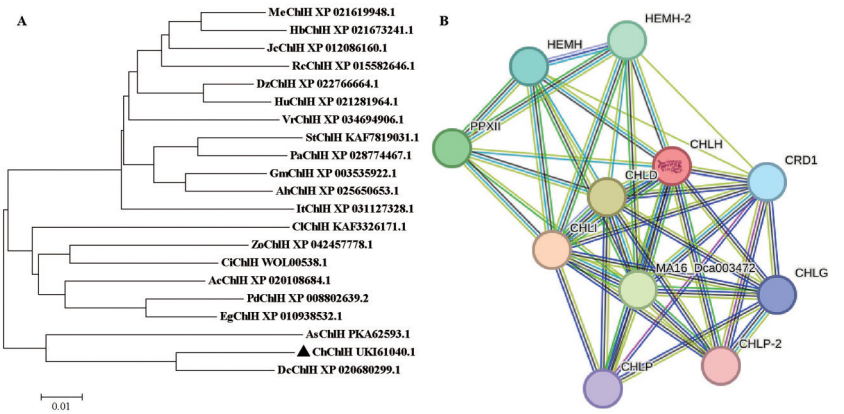


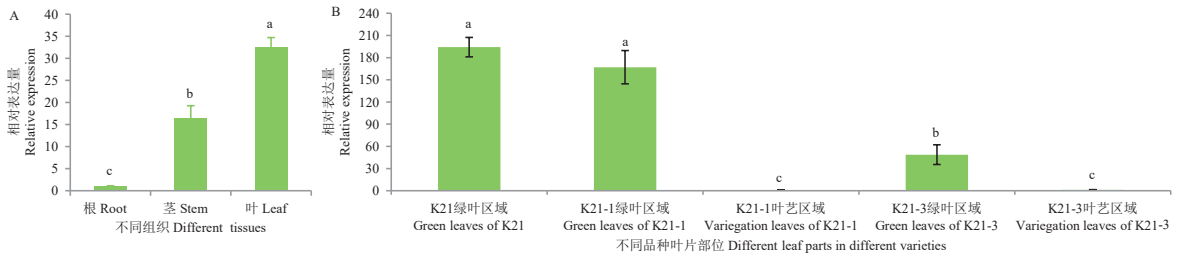
图3 杂交兰ChlH系统进化树分析(A)和蛋白质互作分析(B)

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis (A) and protein interaction analysis (B) of *Cymbidium* hybird ChlH

含有pTRV1、pTRV2及pTRV2-*ChChlH*的质粒转化农杆菌，获得清晰单一的目的条带，其位置处于250–500 bp，在预测长度范围内。结果表明成功获得Agro:pTRV2-*ChChlH*。

2.7 注射VIGS重组载体后烟草叶片光合色素含量及*ChlH*基因相对表达量

通过序列比对，发现烟草*ChlH*基因序列（NM_001325713.1）与杂交兰*ChChlH*沉默序列的一致性达71.64%，初步选择烟草作为注射植株。比较注射pTRV2-00载体、注射pTRV2-*ChChlH*载体及未处理的烟草植株表型，发现注射pTRV2-*ChChlH*载体的烟草植株老叶在培养20 d后出现黄化现象（图5-B），而注射pTRV2-00载体的烟草植株与未处理植株相比无明显症状。进一步比较不同处理植株老叶中的光合色素含量及*ChlH*基因相对表达量，发现注射pTRV2-00载体、pTRV2-*ChChlH*载体后的烟草植株老叶中的叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素含量及*ChlH*基因的相对表达量均显著低于未处理烟草植株

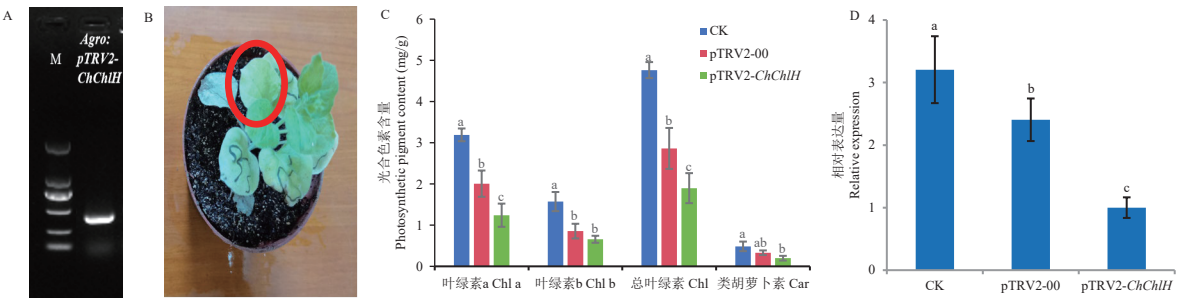


不同字母表示显著性差异（$P<0.05$），下同

Different letters indicate significant differences ($P<0.05$), the same below

图4　杂交兰*ChChlH*基因的表达情况分析

Fig. 4　Expression analysis of *ChChlH* in *Cymbidium* hybrid



A：重组载体 pTRV2-*ChChlH*扩增产物（M：DL 2 000 Marker）；B：注射pTRV2-*ChChlH*载体后的烟草表型；C：注射不同载体后烟草叶片光合色素含量；D：注射不同载体后*ChChlH*基因的相对表达量

A: Amplification product of the recombinant vector pTRV2-*ChChlH* (M: DL 2 000 Marker). B: Phenotype of tobacco after the pTRV2-*ChChlH* vector injection. C: Content of photosynthetic pigments in tobacco leaves after different vector injection. D: Relative expression of *ChChlH* gene after different vectors injection

图5　重组载体的构建及*ChChlH*基因沉默植株的效果分析

Fig. 5　Construction of recombinant vectors and the effect analysis of *ChChlH* gene silencing plants

（图5-C，D），其中注射携带pTRV2-*ChChlH*载体农杆菌的烟草植株老叶中*ChlH*基因的相对表达量仅为未处理烟草植株的31.19%；注射pTRV2-00载体、pTRV2-*ChChlH*载体后，烟草植株老叶中的类胡萝卜素含量低于未处理烟草植株，但注射pTRV2-00载体后的植株叶片类胡萝卜素含量与其他2个处理未存在显著差异。

3　讨论

镁离子螯合酶H亚基（ChlH）是叶绿素生物合成途径中的关键限速酶之一，其基因表达水平和碱基突变对叶绿素的合成和叶片呈色具有重要影响。比较连翘（*Forsythia*）黄色叶和绿色叶株系叶片*ChlH*基因的表达量时，*ChlH*基因表达量越高，叶绿素含量越高，叶片越绿；进一步利用VIGS、瞬时过表达和转录组测序技术对*ChlH*基因进行功能验证，发现其通过控制叶绿素合成通路基因，影响连翘叶片叶绿素含量和叶片颜色[15]。甘蓝型油菜突变体（yvl）的心叶呈现叶绿素含量降低，叶绿体发育滞缓的表型特征，*ChlH*基因的碱基突变（C到T）致使基因提前终止是导致心叶黄化的重要原因[16]；*ChlH*还被用作VIGS的靶标，在浸润6 d后的长春花（*Catharanthus roseus*）幼苗中观察到黄色子叶，且子叶的*CrChlH*表达和叶绿素含量显著降低[17]。本研究发现，*ChChlH*在杂交兰绿色叶片组织中高表达，而在黄化的叶艺区域表达量显著降低，这一表达模式与叶绿素含量的空间分布完全吻合[14]，说明*ChChlH*的表达下调可能导致叶艺区域叶绿素合成不足，从而产生黄化表型。进一步的VIGS功能验证证实了这一关系，在烟草中沉默该基因可导致叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量均发生同步且显著的下降，叶片出现黄化表型。此发现与在其他物种中

的研究结论相符，即*CHLH*基因的表达水平与叶绿素含量具有极大的正相关[18-20]。

生物信息学分析显示，ChChlH蛋白无信号肽与跨膜结构，属于亲水性不稳定蛋白，具有PLN03069超家族的典型特征，与同属兰科植物的铁皮石斛亲缘关系最近，氨基酸序列一致性较高，说明该基因在兰科植物中具有功能保守性。蛋白互作分析显示铁皮石斛ChlH与CHLI、CHLD发生蛋白互作，这与镁螯合酶H亚基在镁螯合酶复合体中催化镁离子螯合的功能相吻合[21-23]。此外，ChlH通过与上游（PPXⅡ）、并行分支（HEMH）和下游多个酶（MA16_Dca003472、CHLG、CHLP、CRD1）的互作，共同构成协同工作的代谢网络，在空间上锚定了整个叶绿素合成代谢流，揭示定位于叶绿体的*ChlH*在植物叶绿素积累中的重要作用[24]。

研究表明，CHLH是一种多功能蛋白，参与四吡咯生物合成、叶绿体信号传导以及脱落酸、乙烯、干旱等响应[25-28]。CHLH的短时间失活迅速导致相应酶活性降低以及镁卟啉水平改变，长时间失活导致四吡咯相关基因的转录水平有所升高[29]；甘薯（*Ipomoea batatas*）*IbCHLH*基因在干旱胁迫24 h和外源脱落酸处理4 h时表达量最高，推测其可能参与抗旱调节和脱落酸的调控[30]；茶树（*Camellia sinensis*）*CsChlH*在脱落酸和乙烯利处理6 h和12 h时上调表达；且4 ℃低温和干旱胁迫抑制其表达，而长时间38 ℃则诱导其表达[31]。本研究中，*ChChlH*启动子区域富含光响应元件、厌氧诱导元件以及MYB、WRKY等转录因子结合位点，同时包含脱落酸、乙烯、赤霉素、茉莉酸甲酯和水杨酸等多种激素应答元件。提示*ChChlH*的表达受到复杂而精细的转录调控，其能够整合环境信号与内源激素信号，从而适应生长发育及逆境响应需求。

综上所述，本研究通过基因克隆、生物信息学、表达分析和功能验证，阐明*ChChlH*是一个定位于叶绿体、受多因素调控、在杂交兰叶绿素合成中发挥关键作用的基因，其在叶艺区域的特异性低表达是导致杂交兰叶色变异的重要机制。后续可通过杂交兰稳定的遗传转化体系进一步确认其功能，加深了对兰科植物叶色发育分子机理的理解，创制叶艺新种质，为最终实现杂交兰叶艺性状的分子设计育种奠定坚实的理论与技术基础。

4 结论

从杂交兰叶片中克隆获得叶绿素生物合成途径的关键基因*ChChlH*，ChChlH蛋白与铁皮石斛ChlH亲缘关系最近，功能可能相似，与镁离子螯合酶其他亚基、镁原卟啉甲基转移酶、叶绿素合酶等多个叶绿素合成通路中的酶发生互作。*ChChlH*在叶中表达量较高，且绿叶区域中的表达量显著高于叶艺区域叶片中的表达量，沉默*ChChlH*后烟草老叶中的叶绿素含量及*ChlH*基因的相对表达量显著降低，推测*ChChlH*表达水平与叶绿素含量密切相关，可能在叶绿素合成和叶色变异中的发挥重要作用。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260604085751_NewsFile_86.pdf）

参考文献

[1] Yang GS, Yao HX, He FM, et al. Unveiling CcR2R3-MYB: a key regulator of leaf pigmentation in *Cymbidium* Orchids [J]. Horticulturae, 2025, 11(2): 190.

[2] Xu DW, Lin L, Liu XR, et al. Characterization of a tomato *chlh* mis-sense mutant reveals a new function of ChlH in fruit ripening [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(3): 911-926.

[3] Tran LH, Kim JG, Jung S. Expression of the *Arabidopsis* Mg-chelatase H subunit alleviates iron deficiency-induced stress in transgenic rice [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1098808.

[4] Sun MM, Shen YY. Integrating the multiple functions of CHLH into chloroplast-derived signaling fundamental to plant development and adaptation as well as fruit ripening [J]. Plant Sci, 2024, 338: 111892.

[5] Zhang CY, Liu HR, Wang JY, et al. A key mutation in magnesium chelatase I subunit leads to a chlorophyll-deficient mutant of tea (*Camellia sinensis*) [J]. J Exp Bot, 2024, 75(3): 935-946.

[6] Wang SL, Chen M, Zhou QH, et al. Transcriptome-metabolome integration reveals mechanisms of leaf color variation in leafy vegetable sweet potato [J]. Horticulturae, 2025, 11(11): 1317.

[7] Ma YY, Shi JC, Wang DJ, et al. A point mutation in the gene encoding magnesium chelatase I subunit influences strawberry leaf color and metabolism [J]. Plant Physiol, 2023, 192(4): 2737-2755.

[8] Shi C, Gu MF, Huang YJ, et al. Integrated genomic and transcriptomic analysis reveals the mechanisms underlying leaf variegation in 'Gonggan' mandarin [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 472.

[9] Fan LQ, Hou Y, Zheng L, et al. Characterization and fine mapping of a yellow leaf gene regulating chlorophyll biosynthesis and chloroplast development in cotton (*Gossypium arboreum*) [J]. Gene, 2023, 885: 147712.

[10] Chong XR, Wang Y, Xu XY, et al. Efficient virus-induced gene silencing in *Ilex dabieshanensis* using tobacco rattle virus [J]. Forests, 2023, 14(3): 488.

[11] Dong XY, Huang LB, Chen QS, et al. Physiological and anatomical differences and differentially expressed genes reveal yellow leaf coloration in shumard oak [J]. Plants, 2020, 9(2): 169.

[12] 唐琴, 段丽丽, 皮凯, 等. 烟草*NtChlH*基因的克隆及表达模式分析 [J]. 西南农业学报, 2024, 37(12): 2592-2601.
Tang Q, Duan LL, Pi K, et al. Cloning and expression pattern analysis of *NtChlH* gene from *Nicotiana tabacum* [J]. Southwest China J Agric Sci, 2024, 37(12): 2592-2601.

[13] Zhang M, Shen JS, Wu YT, et al. Comparative transcriptome analysis identified ChlH and POLGAMMA2 in regulating yellow-leaf coloration in *Forsythia* [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1009575.

[14] 钟淮钦, 林榕燕, 吴建设, 等. 杂交兰‘紫妍氏’叶艺性状的生理生化与细胞结构分析 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(7): 1165-1174.
Zhong HQ, Lin RY, Wu JS, et al. Physiological, biochemical and cell structure analysis of leaf mutant traits in *Cymbidium* hybrid ‘purple element’ [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2021, 41(7): 1165-1174.

[15] 吴雨桐. *POLGAMMA2*和*ChlH*基因在连翘金色叶形成中的作用 [D]. 北京: 北京林业大学, 2021.
Wu YT. The function of *POLGAMMA2* and *ChlH* gene in the formation of yellow leaves of *Forsythia* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2021.

[16] 赵传纪. 甘蓝型油菜叶色、花色和株高突变体的遗传分析与定位克隆 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Zhao CJ. Genetic analysis and positional cloning of leaf color, flower color and plant height mutants in *Brassica napus* L. [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.

[17] Liu YL, Lyu RQ, Singleton JJ, et al. A Cotyledon-based virus-induced gene silencing (Cotyledon-VIGS) approach to study specialized metabolism in medicinal plants [J]. Plant Meth, 2024, 20: 26.

[18] Tian YY, Wang HY, Zhang ZQ, et al. An RNA-seq analysis reveals differential transcriptional responses to different light qualities in leaf color of *Camellia sinensis* cv. huangjinya [J]. J Plant Growth Regul, 2022, 41(2): 612-627.

[19] Ren J, Sun L, Wang CL, et al. Expression analysis of the cDNA for magnesium chelatase H subunit (CHLH) during sweet cherry fruit ripening and under stress conditions [J]. Plant Growth Regul, 2011, 63(3): 301-307.

[20] Li YS, Wang XY, Zhang QH, et al. A mutation in SlCHLH encoding a magnesium chelatase H subunit is involved in the formation of yellow stigma in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Plant Sci, 2022, 325: 111466.

[21] 刘子琦, 汪佳. 镁螯合酶的结构与功能 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(1): 18-24.
Liu ZQ, Wang J. Structure and function of the magnesium chelatase [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2018, 34(1): 18-24.

[22] Zhao ZF, Li J, Zhao XL, et al. Mutation of a magnesium chelatase BrCHLD affects the chlorophyll content and magnesium chelatase activity in Chinese cabbage [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 228: 110319.

[23] Qi F, Xing PY, Sun YC, et al. Deletion of the gene encoding the magnesium chelatase I subunit resulted in a novel wheat leaf colour mutant [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(10): 4290-4301.

[24] Gao F, Guo JX, Shen YY. Advances from chlorophyll biosynthesis to photosynthetic adaptation, evolution and signaling [J]. Plant Stress, 2024, 12: 100470.

[25] Ibata H, Nagatani A, Mochizuki N. CHLH/GUN5 function in tetrapyrrole metabolism is correlated with plastid signaling but not ABA responses in guard cells [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1650.

[26] Sato S, Hirose M, Tamiaki H, et al. Chelatase activity of magnesium dechelatase associated with chlorophyll degradation [J]. FEBS Lett, 2025, 599(15): 2210-2219.

[27] Zhang M, Zhao Y, Du JJ, et al. Integration of multi-omics data and phenotyping provides insights into purple leaf sheaths color in millet seedling stage [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1645.

[28] Zou YP, Zhuo T, Duan Y, et al. Transcriptomic and structural insights into leaf variegation development in *Ilex* × ‘solar flare’ [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(9): 3999.

[29] Schlicke H, Hartwig AS, Firtzlaff V, et al. Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling [J]. Mol Plant, 2014, 7(7): 1211-1227.

[30] 王珧, 赵路宽, 高兵倩, 等. 甘薯镁螯合酶*IbCHLH*基因克隆及表达分析 [J]. 江苏师范大学学报: 自然科学版, 2024, 42(4): 14-20.
Wang Y, Zhao LK, Gao BQ, et al. Gene cloning and expression analysis of *IbCHLH* in sweetpotato [J]. J Jiangsu Norm Univ Nat Sci Ed, 2024, 42(4): 14-20.

[31] 叶玓璠, 王誉洁, 傅前媛, 等. 茶树镁离子螯合酶H亚基基因*CsChlH*的克隆及其表达分析 [J]. 园艺学报, 2024, 51(1): 91-102.
Ye YF, Wang YJ, Fu QY, et al. Cloning and expression analysis of Mg-chelatase H subunit gene *CsChlH* in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Acta Hortic Sin, 2024, 51(1): 91-102.

（责任编辑　朱琳峰）