

苹果叶绿素合成关键酶基因 *MdHEMA1* 生物信息学和表达分析

张修德, 安秀红, 李 壮, 李 敏, 厉恩茂, 程存刚

(中国农业科学院果树研究所/农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100)

摘要: *HEMA1* 编码谷氨酰-tRNA 还原酶 (GluTR) 的合成, 是叶绿素生物合成的关键酶基因。本研究利用 RACE 技术从苹果叶片中克隆 GluTR 的编码基因, 将其命名为 *MdHEMA1*。生物信息学分析表明: *MdHEMA1* 基因位于苹果 8 号染色体上, 其 CDS 长 1638 bp, 编码 545 个氨基酸残基, 蛋白分子量为 59279.4 Da, 等电点为 8.45。蛋白序列及结构分析显示该蛋白包含保守的谷氨酰-tRNA 还原酶的 N 端结构域、莽草酸/奎尼酸脱氢酶结构域及谷氨酰-tRNA 还原酶二聚结构域。进化树分析显示 *MdHEMA1* 蛋白与白梨 (*Pyrus × bretschneideri*) *PbHEMA1* 亲缘关系最近。qRT-PCR 结果显示, *MdHEMA1* 在根、茎、叶、花、果实各组织器官中均有表达, 但光合组织 (茎、叶、果实) 中的表达水平较高; 该基因在叶片和果实不同发育期表达存在差异, 表达量与叶片和果实内叶绿素含量变化趋势一致; 而且干旱胁迫能够诱导该基因表达。启动子分析显示 *MdHEMA1* 基因启动子区域含有多钟非生物胁迫相关的顺式作用元件。

关键词: 苹果; *MdHEMA1*; 表达分析; 启动子

Bioinformatics and Expression Analysis of *MdHEMA1* Encoding the Key Enzyme for Chlorophyll Biosynthesis in Apple

ZHANG Xiu-de, AN Xiu-hong, LI Zhuang, LI Min, LI En-mao, CHENG Cun-gang
(Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Fruit Germplasm
Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Xingcheng Liaoning 125100)

Abstract: GluTR encoded by *HEMA1* is the key enzyme in regulating chlorophyll biosynthesis. In this study, the encoding gene was cloned from apple leaves by RACE technology and designated as *MdHEMA1*. Bioinformatics analysis revealed that *MdHEMA1* located on chromosome 8 of apple genome, with a CDS length of 1638 bp and encoded 545 amino acid residues. The calculated molecular mass was 59279.4 Da with an isoelectric point of 8.45. Sequence analysis showed that *MdHEMA1* protein contained 3 conserved domains. *MdHEMA1* possessed the closest phylogenetic relationship with *PbHEMA1* from *Pyrus × bretschneideri*. qRT-PCR results revealed that *MdHEMA1* exhibited a high expression level in photosynthetic tissues compared with that in other tissues. Besides, the expression level of *MdHEMA1* varied in leaves and fruits at different developmental stages, which was positively correlated with the level of chlorophyll accumulation. The gene expression could also be induced by drought stress. Promoter analysis revealed that *MdHEMA1* promoter possessed multiple putative cis-acting elements involved in abiotic stress.

Key words: apple; *MdHEMA1*; expression analysis; promoter

收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-06-17 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1521.012.html>

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-28); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (0032015019)

第一作者研究方向为果树栽培生理与生物技术。E-mail: xdz0827@163.com

通信作者: 安秀红, 研究方向为果树栽培生理与生物技术。E-mail: anxiuhong2007@126.com

程存刚, 研究方向为果树栽培生理。E-mail: ccungang@sohu.com

叶绿素能够吸收光能并将其传递下去进行其他形式的转换,在植物光合作用中起着巨大的作用^[1]。通过光合作用,叶绿素能够影响植物体内糖、淀粉、有机酸等有机物质的合成,进而影响果实内在品质。苹果是我国的主产水果,果实总产量和种植总面积都位列世界首位^[2]。近几年,我国苹果产业发展迅速,苹果品质得到很大提高,尤其是外观品质(果形、大小、色泽、果面光洁度等)已经明显得到了改善,但内在品质低下问题仍然表现明显^[3]。研究苹果叶绿素生物合成途径及分子机理有助于进一步提高苹果的内在品质。

植物叶绿素生物合成途径是一个非常复杂的过程,有多种生物酶参与其中,目前已经从模式植物拟南芥中找到这些生物酶并且分离出编码这些酶的基因^[4-6]。在植物中,叶绿素生物合成的初始底物是 L-谷氨酰-tRNA,由 L-谷氨酰-tRNA 到 5-氨基乙酰丙酸(ALA)的生物合成过程是整个叶绿素合成的重要组成部分^[4-6],ALA 的合成被证明是植物叶绿素合成途径的限速步骤,在叶绿素合成途径中起着主导作用,对植物的发育是至关重要的^[7-8]。ALA 的合成需要 2 步反应,谷氨酰-tRNA 还原酶(GluTR)催化 L-谷氨酰-tRNA 生成谷氨酸酯-1-半醛(GSA),GSA 再经谷氨酸酯-1-半醛-2,1-氨基转位酶(GSAT)的催化生成 ALA。GluTR 是叶绿素生物合成的中心控制者^[9],该酶由 *HEMA* 基因编码,因此 *HEMA* 是调控叶绿素合成途径的关键酶基因^[10-11]。相比之下,GSAT 在 ALA 合成过程中只是催化氨基的转位,所起的作用就小一些^[12]。*HEMA* 是一个基因家族,包含多个成员,不同植物 *HEMA* 成员数目可能有一定差异。模式植物拟南芥中有 3 个,分别是 *HEMA1*、*HEMA2*、*HEMA3*^[12-14],而黄瓜中只有 *HEMA1* 和 *HEMA2* 两个基因^[15]。研究发现,*HEMA* 基因家族成员之间有一定的差异。*HEMA1* 基因受光诱导^[14],在所有组织中都能表达,并且在光合组织中的表达量明显高于其他组织^[14-15],其表达活性受激素^[16]、生物钟^[17]及质体信号等^[14,18]调节;*HEMA2* 基因不受光诱导,仅在根和花中表达^[13];而 *HEMA3* 基因在大多条件下不表达,R. Tsnala 等^[19]曾在 *Hordeum vulgare* 的根组织中发现 *HEMA3*。A. M. Kumar 等^[20]发现在 *HEMA1* 基因表达沉默的植株中,ALA 含量和叶绿素含量都不同程度下降,而 GluTR 蛋白质的含量也明显降低,首次直接证实 *HEMA1* 在高等植物中的作用。

本研究克隆了 *MdHEMA1* 基因及启动子序

列。利用生物信息学对 *MdHEMA1* 基因的序列特征、基因结构、蛋白功能域、系统发育、启动子序列进行分析,然后利用 qRT-PCR 技术检测 *MdHEMA1* 在苹果不同组织器官、不同发育时期以及 PEG 诱导下的表达情况,为深入研究 *MdHEMA1* 功能,探讨苹果叶绿素合成的分子机理以及利用分子手段提高苹果果实内在品质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

本研究所使用的植物材料来自中国农业科学院果树研究所农业部园艺作物种质资源利用重点实验室保存的嘎啦组培苗以及研究所试验基地种植的 9 年生嘎啦苹果树。植物 RNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,反转录试剂盒、pMD18-T 克隆载体、 T_4 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 等试剂购自宝生物(TaKaRa)公司,PCR 反应所需试剂、大肠杆菌(*E. coli*) *DH5 α* 、提取质粒试剂盒等购自全式金(TransGen)生物技术有限公司。

1.2 苹果总 RNA 提取及 cDNA 合成

取 3~4 片嘎啦组培苗叶片,利用 RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)试剂盒提取苹果总 RNA。经过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,并用分光光度计测定 RNA 浓度。以苹果总 RNA 为模板,参照反转录试剂盒 Prime Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)反转录得到 cDNA 第 1 条链,用于基因克隆与定量分析。本文所用引物序列见表 1。

1.3 *MdHEMA1* 基因克隆

在 TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)上搜索拟南芥叶绿素合成关键酶基因 *AtHEMA1*,通过在苹果基因组数据库(<http://genomics.research.iasma.it/blast/blast.html>)中进行比对,获得苹果的 *MdHEMA1* 基因序列。设计特异引物 *MdHEMA1*-F 和 *MdHEMA1*-R,PCR 扩增该基因。PCR 反应程序:95℃ 5 min;95℃ 40 s,55℃ 40 s,72℃ 70 s,34 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保存。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,切取目的片段凝胶,用 DNA 凝胶试剂盒回收。回收产物连接克隆载体 pMD18-T,转化到大肠杆菌感受态 *DH5 α* ,37℃ 过夜培养,筛选出阳性克隆,摇菌进行测序鉴定。测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers and their sequences used in this paper

用途 Use	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences
ORF 扩增	MdHEMA1-F	GATGTCGACCAGTTTCGCC
Complete ORF amplification	MdHEMA1-R	TTACTTCTGGGTTTGTTC
3'端 RACE	HEMA1-F1;	CAGAGCTGCAGAGCTCGAC
3'-end amplification	HEMA1-F2;	ATGGTCCGATGCAGCACTT
	B26	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT
	B25	GACTCGAGTCGACATCGA
荧光定量 PCR	MdHEMA1 (RT)-F	GAACATGCACGCTCTTAAC
RT-PCR	MdHEMA1 (RT)-R	CGAGTTGAAGATTACACCAG
扩增启动子	MdHEMA1 (P)-F	CACGTAGGACTTAATTTGAAACC
Promoters amplification	MdHEMA1 (P)-R	TGACCCAAACCAGACGGCGTTT

利用 ExPASy Proteomics Server (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测苹果 MdHEMA1 蛋白的基本信息,包括蛋白质的长度、分子量以及等电点^[21]。利用 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 在线分析 MdHEMA1 蛋白保守结构域。利用 Clustal 1.8.1 软件结合 MEGA 5.0 软件对 MdHEMA1 与拟南芥等其他植物 HEMA 蛋白进行系统发生分析,构建系统发育进化树。

1.4 荧光定量 PCR 分析

提取嘎啦苹果树的根、茎、叶、花、果实的 RNA,反转录得到 cDNA,qRT-PCR 对 *MdHEMA1* 基因在不同组织器官中的表达情况进行分析。取叶龄为 5 ~ 10 d (幼叶)、20 ~ 25 d (展开叶)、40 ~ 45 d (成熟叶) 的叶片,提取叶片 RNA,反转录得到 cDNA,检测 *MdHEMA1* 基因在不同发育状态叶片的表达情况。从花后 60 d 开始,到花后 120 d 果实成熟,每隔 30 d 取一次果实,分 3 次同时摘取套袋与未套袋的果实,分别提取果皮 RNA,反转录得到 cDNA,检测 *MdHEMA1* 基因在果实不同发育期的表达。

选取生长状态一致的嘎啦组培苗,用 20% PEG 模拟干旱进行处理。分别在处理后 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h 时取样,液氮保存。然后分别提取总 RNA,反转录成 cDNA,qRT-PCR 检测 *MdHEMA1* 在干旱胁迫条件下的表达特性。

设计 *MdHEMA1* 定量引物,以苹果 *Actin* 为内参基因,参考 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq 说明书设置 qRT-PCR 反应程序,所有反应均进行 3 次重复。配制 20 μL 反应体系:SYBR Premix Ex Taq 10 μL,正反向引物(5 μmol/L)各 1 μL,cDNA 1 μL,ddH₂O 7 μL。

基因相对表达量采用 2^{-ΔΔCT} 公式进行计算分析。

1.5 叶绿素含量的测定

分别称取苹果叶片和果皮 0.5 g 左右,切碎,装入 25 mL 的三角瓶中,精确加入 1:1 的 80% 的丙酮和 95% 的乙醇混合液 20 mL,使材料完全浸入提取液中,密封,然后将其放入暗环境下震荡。当材料完全变白时,将浸提液倒入比色皿,同时用 1:1 的 80% 丙酮和 95% 的乙醇混合液作为参比,在 663 nm、645 nm 波长下测其 OD 值。参照下列公式计算材料中叶绿素含量(mg/g)^[22]:

Ca = (12. 21 × OD₆₆₃ - 2. 81 × OD₆₄₅) × V/(W × 1000)

Cb = (20. 13 × OD₆₄₅ - 5. 03 × OD₆₆₃) × V/(W × 1000)

Chl = Ca + Cb

式中 Ca:叶绿素 a 浓度;Cb:叶绿素 b 浓度;V:叶绿素提取液总体积(mL);W:材料鲜重(g)。

1.6 MdHEMA1 上游启动子的克隆

根据得到的 *MdHEMA1* 基因,在 GDR 数据库 (<http://www.rosaceae.org>) 中进行搜索,找到 *MdHEMA1* 基因的启动子序列,设计引物并进行测序。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线分析 *MdHEMA1* 启动子序列中的顺式作用元件。

2 结果与分析

2.1 苹果 MdHEMA1 基因克隆及基因结构分析

以拟南芥叶绿素合成关键酶基因 *AtHEMA1* 为探针,在 GDR 数据库中进行比对,获得一条同源性较高的序列,命名为 *MdHEMA1*。设计引物扩增该序列,同时利用 3'端特异引物 HEMA1-F1、HEMA1-

F2 和 B26、B25 扩增得到 366 bp 长度的 3'UTR 序列 (图 1)。

MdHEMA1 基因位于苹果 8 号染色体上,开放阅读框长度为 1638 bp,编码 545 个氨基酸。该基因的 DNA 序列分析表明该基因的结构比较简单,只含有

3 个外显子和 2 个内含子 (图 2)。外显子长度分别为 265 bp、242 bp 和 1131 bp,内含子长度分别为 471 bp 和 273 bp。ExPASy Proteomics Server 工具显示 *MdHEMA1* 蛋白分子量为 59279.4 Da,等电点为 8.45。

ATGGCGATGTCGACCAATTTCGCCGGAGCAAAATTGGAGGCTTTGCTGTCATTGTCTTCGTCGTCGGCTGCGACGACGTCGT
CCAGGGCTTCTACCGTTCTTCTTTGGTGGTTCTGTGAGGCCCAATTAGGACTAGAAGGCTCCAAATTCAGAGAGGAGTGC
GTGCGAAGTGGCGCTTCTTCTGTAGTCTTACC GCGGTGTTTCAGTCTGTCGCTTCCAATGTCTCCGCTCTTGAGCAGCTCA
AGACCTCTGCTTCTGACAGGTACACCAAGGAAAGAACGACGCAATTGTGGTCATCGGACTTAGTATTCACACAACACCGGTTG
AAATGCGTGAAAACTAGCCATTCCAAGAGCAGAATGGCCTCGAGCCATAGGGGAGCTGTGTGGCTTAAATCACATAGAAG
AAGTGCTGTCTTAGCAGCTGCAACCGAATGGAGATATATGTTGTAGCTCTATCTCAGCATCCTGGTGTCAAAGAAAGTTACC
GAGTGGATGTCAAAGACAAGTGGAGTACCTGTTTCCGAGCTATGCCAGCACMGGTTTTTACTCTATAATAATGACGCCACTC
AGCATCTCTTCGAAGTATCAGCAGGTCCTGACTCTCTTGTCCITGGAGAAGGTCAAATCTTGCCCAAGGTAAACAAGTTGT
TAAAGTCGGCCAAGGAGTTGTTGGCTTTGGTAGAAACATMAGTGGGCTGTTCAAGCACGCAATCACTGTGGGAAAAGCGGG
TTAGAACTGAAACTAACAITGCTGCTGGGGCAGTTTCTGTAAGCTCTGCTGCTGTTGAACTTGCTTGATGAAGCTTCTCGCA
TCGTACATGCTACTGCAAGAATGTTGGTGATTGGTGCCGGCAAAATGGGAAAGCTTGTGATCAAACACTTGTAGCAAAA
GGTTGCACAAAGATGGTTGTTGTGAATAGGACTGAGGAGAGAGTGGCATCTATCCGCGAGGAGCTGCATGGTAITGAGATCA
TTTACAAGCCTCTTACAGAAATGCTTACCTGTGCAGCAGAGGCCGATGTGGTTTTTACTAGCACC GCATCTGAAACCCCAATTA
TTTTTCAAAGAGATGTGAAGGACCTTCTGCTGTAGGTCCAGAGACTGGCGGTTTGAGGCTTTTTGTTGATATTTCCGTCCC
CCGGAACGTGAGTTCACTGTGTTGCAGATGTTGATGGTGCTCGACTTTACAATGTTGATGACCTTAAAGGAGTTGTGGCTGCT
AACAAAGAGGATCTGCTCGCGAAAGCAATGGAAGCTCAGGAAATTACACTGAAGATCAAACAATTTGAAGCTTGGAG
GGATTCTTTGGAACAGTACCTACCATCAAGAAATTAAGAGCTTATGCTGAAA GAATCAAGCTCGCAGAGCTCGACAAATGC
TTATCAAATATGGGCGACGACATATCAAAGAAAACAAGAAAAGCCGTA GATGATCTTAGCCGAGGAATTGTGAACAAAGCTCC
TTCATGCTCCGATGCAGCACTTAAGATGCGATGGGAGTGATAGTCGAACTCTGAGTGAGACCTTGAACATGCACGCTCT
TAACAGAATGTTCAAGCTCGAGACAGAAATATCCGTAATTGGAACAGAAAATTCAGGCTAAGGTGGAACAAACCCAGAGTA
AAGCTACAATGTCAAATTTCTCCACGACACATCGACTTCCTCAAACCTCGAATAAGGGGAAAAACATCTCACATTGTCAATTT
CGTGTTCCTTCTGTTAATCTCAACTCGATAGACATATTGTGTTGGTCCCGCTGGGGGATCTTCAATTCATTCACTGGTG
AAAGACACCGTAACATGATTTTCTGTGGGAGTTGTTTATATGTCTACCACCACATGTTCTGAAGTGCTGTTCGGCTTTGTAT
CGAAATTATGAGATATCTGTAATACTGTCAATTC TTGTAATTAAGAGTCATTGTGTATGAATGTGTAATTGTAATTCATAAAAAA
AAAAAAAAA

图 1 *MdHEMA1* 基因序列
Fig. 1 The sequence of *MdHEMA1* gene

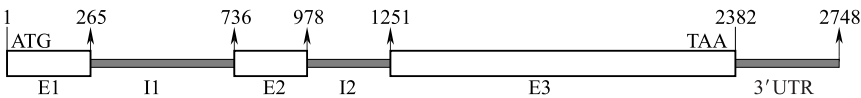


图 2 *MdHEMA1* 基因结构分析
Fig. 2 The structure diagrams of *MdHEMA1* gene

2.2 苹果 *MdHEMA1* 保守结构域分析

MdHEMA1 基因编码 545 个氨基酸残基。利用蛋白结构分析软件 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 进行分析,结果显示 *MdHEMA1* 蛋白含有 3 个重要保守结构域: GlutR_N、Shikimate_DH 和 GlutR_dimer。GlutR_N 是谷氨酰-tRNA 还原酶 N 端功能域,由 *MdHEMA1* 蛋白上第 100 ~ 251 之间共 152 个氨基酸残基组成;Shikimate_DH 是莽草酸/奎尼酸脱氢酶,由第 265 ~ 407 之间共 143 个氨基酸残基组

成,该功能域负责谷氨酰-tRNA 还原酶的氧化还原; GlutR_dimer 是谷氨酰-tRNA 还原酶二聚化结构域,由第 420 ~ 526 之间共 107 个氨基酸残基组成。

2.3 苹果 *MdHEMA1* 系统进化分析

为了探索 *MdHEMA1* 蛋白与其他物种 HEMA 蛋白的同源性,在 NCBI 上进行 BLAST 程序操作 ($E\text{-value} = e^{-45}$)。BLAST 结果表明 *MdHEMA1* 与多种植物 HEMA 氨基酸序列都有比较高的同源性,其中与白梨 PbHEMA1 和梅 PmHEMA1 的蛋白

序列同源性分别高达 96% 和 93%。使用 MEGA5.0 采用邻接法 (NJ, neighbor-joining) 构建系统发育进化树^[23], Bootstrap 重复 1000 次。进化

树结果显示, 苹果 MdHEMA1 与同为蔷薇科物种的白梨 PbHEMA1 和梅 PmHEMA1 同源性最高, 亲缘关系最近(图 3)。

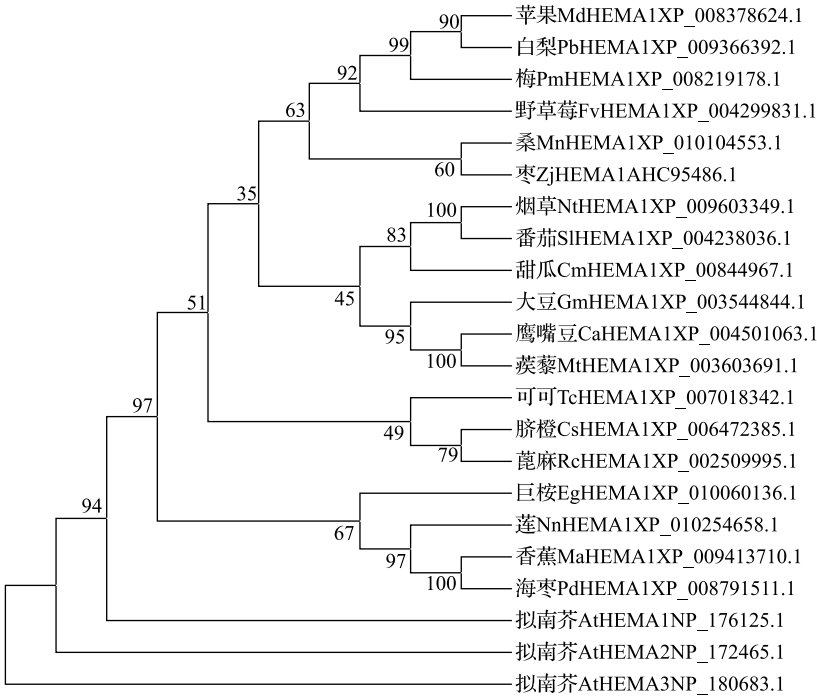


图 3 苹果 MdHEMA1 蛋白与其他植物 HEMA 蛋白系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic relationship of HEMA1 proteins from apple and other plants

2.4 MdHEMA1 在苹果各组织中的表达分析

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术分别对苹果的根、茎、叶、花、果实等不同组织中 MdHEMA1 的表达进行检测。结果表明, MdHEMA1 在嘎啦苹果的不同组织器官都能够表达, 但是表达水平存在差异。该基因在叶、茎、果实等存在叶绿素的器官中表达量较高, 而在根和花中表达量相对较低一些(图 4)。

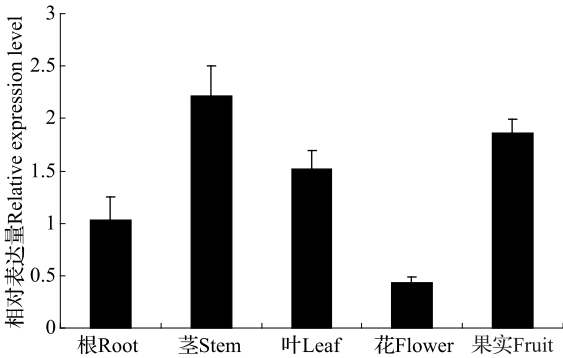


图 4 MdHEMA1 在苹果不同组织中的表达

Fig. 4 The expression of MdHEMA1 in different tissues of apple

2.5 苹果 MdHEMA1 在不同发育状态叶片中的表达分析

分别对苹果幼叶、展开叶、成熟叶 3 个不同发育状态的叶片进行叶绿素含量检测与 MdHEMA1 基因的表达分析。结果表明(图 5), 苹果叶片在由幼叶到成熟叶的发育过程中叶绿素含量不断增加。qRT-PCR 检测结果显示, MdHEMA1 基因在 3 种不同发育状态叶片中均有表达, 且随着叶片发育逐渐升高, 与叶绿素含量变化趋势相一致。

2.6 MdHEMA1 在苹果果实不同发育期的表达分析

为了检测 MdHEMA1 在苹果果实中不同发育期的表达情况, 分别取花后不同时期未套袋的嘎啦苹果果实, 取果皮进行表达量检测。qRT-PCR 结果显示(图 6): 不同时期, MdHEMA1 的表达量差距很大, 从花后 60 d 到花后 120 d, 果皮中该基因的表达呈下降趋势, 在花后 60 d 时表达量最高, 成熟期(花后 120 d)表达量最低。同时, 也检测了不同时期套袋果皮中 MdHEMA1 基因的表达, 其表达量低于相同时期未套袋果皮中 MdHEMA1 基因的表达, 而且表达量也随着果实的发育不断减少。

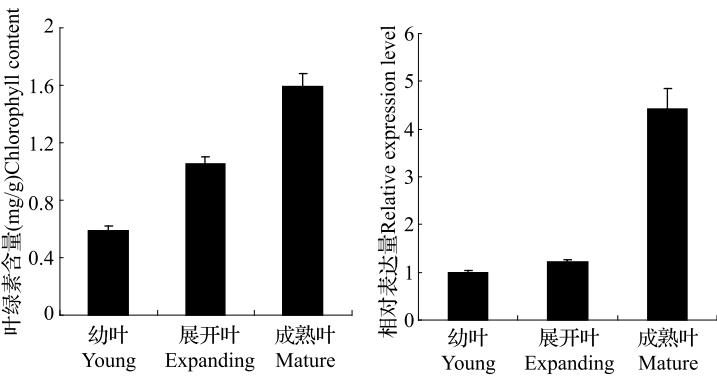


图5 不同发育状态叶片中叶绿素含量和 *MdHEMA1* 的表达分析

Fig. 5 Chlorophyll content and the expression of *MdHEMA1* in leaves at different developmental stages

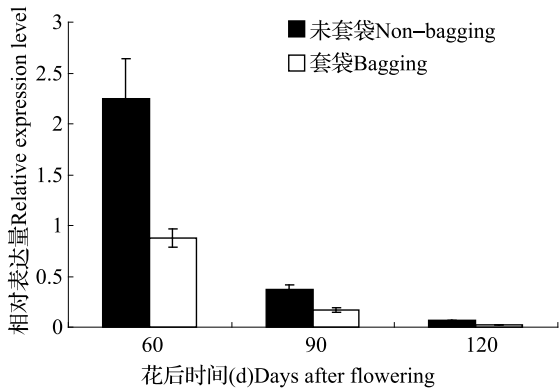


图6 *MdHEMA1* 在苹果果皮中的相对表达分析

Fig. 6 Relative expression of *MdHEMA1* in apple skin

此外,对未套袋与套袋果实果皮中叶绿素的含量进行了测定,结果显示,随着果实发育,果皮中叶绿素含量逐渐减少,而且未套袋果皮中的叶绿素含量均高于同一时期套袋果皮中的含量(图7),这一变化趋势与 *MdHEMA1* 基因的表达相一致。

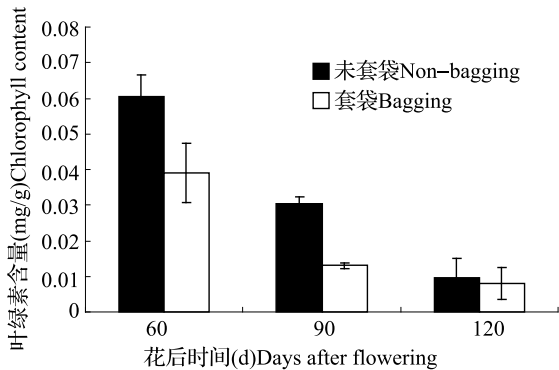


图7 苹果不同发育期果皮中叶绿素含量

Fig. 7 Chlorophyll content of apple skin in different developmental stages

2.7 PEG 诱导条件下的表达分析

利用荧光定量 PCR 检测苹果在 PEG 模拟干旱条件下的 *MdHEMA1* 的表达量。结果表明,PEG 处理后, *MdHEMA1* 基因的表达上调。在处理 1h 时表达量最高,随着时间的推移,表达量逐渐下降(图8),表明 *MdHEMA1* 表达受干旱胁迫诱导。

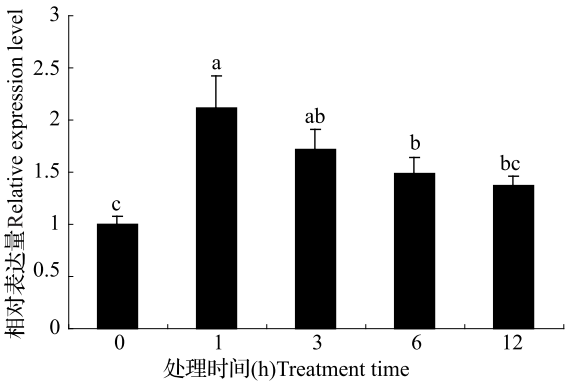


图8 PEG 处理条件下 *MdHEMA1* 的表达

Fig. 8 Expression of *MdHEMA1* gene under PEG treatment

2.8 苹果 *MdHEMA1* 启动子序列分析

以 *MdHEMA1* 基因起始密码子上游 1500 bp 碱基序列作为启动子,对该序列进行克隆、测序、序列比对后再经 PlantCARE 软件分析,发现该序列中含有光、植物激素、生物钟等非生物因素响应元件以及低温、抗旱诱导等胁迫响应元件(表2),这些结果说明 *MdHEMA1* 基因的转录可能受到植物光照、激素等非生物因素以及低温、干旱等逆境胁迫的诱导。

表 2 *MdHEMA1* 上游顺式作用元件分析

Table 2 *Cis-acting elements potentially associated with MdHEMA1*

元件 Motif	与起始密码子的距离 (bp) Distance from ATG	序列 Sequence	功能 Function
ABRE	425	CGCACGTGTC	ABA 响应元件 <i>cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness</i>
G-Box	423	CACGTT	光响应元件
	1197		<i>cis-acting regulatory element involved in light responsiveness</i>
GARE-motif	1355	AAACAGA	GA 响应元件 gibberellin-responsive element
GT1-motif	850	GGTTAAT	光响应元件 light responsive element
LTR	598	CCGAAA	低温响应元件
	1124		<i>cis-acting element involved in low-temperatureresponsiveness</i>
MBS	1278	CAACTG	抗旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility
Sp1	145	CC(G/A)CCC	光响应元件
	165		light responsive element
	276		
TCA-element	239	CAGAAAAGGA	SA 响应元件
			<i>cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness</i>
Circadian	402	CAANNNNATC	生物钟控制元件
	1220		<i>cis-acting regulatory element involved in circadian control</i>
	1302		

3 讨论

植物的光合作用需要叶绿素的参与,负责吸收和转化太阳能,在细胞电子传递和能量转化过程中起着十分重要的作用,因此,叶绿素对植物的生长发育、果实品质及产量的提高都是极其重要的^[24-26]。苹果果实中叶绿素的含量多少不仅对其外观品质(果皮着色)产生影响^[27-28],也会对其内在品质造成一定的影响。研究发现,苹果的绿色果皮也能进行光合作用,其碳同化能力能够达到叶片的 1/10,而且光合产物可以直接贮于果实中用于自身品质的形成^[29]。

叶绿素生物合成关键酶的编码基因可能会由于某些原因发生变异,这将会引起生物酶活性的降低甚至丧失,叶绿素的生成量也会随之降低^[30]。*HEMA1* 是叶绿素生物合成的关键酶基因,控制着植物体内叶绿素的含量。R. Tsnala 等^[15]发现黄瓜细胞中,*HEMA1* 基因的表达与叶绿素的生物合成有关。张治平等^[31-32]研究表明,在烟草中异位表达酿酒酵母 ALA 合成酶基因 *Hem1*,其转基因植株在光照条

件下过量合成 ALA,叶片的光合作用明显增强。本研究中,不同发育时期苹果果皮中的叶绿素含量与 *MdHEMA1* 的表达具有相似的变化趋势,暗示了 *MdHEMA1* 很可能与 *AtHEMA1* 功能相似,在叶绿素合成过程中发挥重要作用。

L. L. Ilag 等^[9]证明在自然光照射下,*HEMA1* 基因在成熟的绿色植物体内强烈表达,而把这些植物移到暗处时,*HEMA1* 基因表达会相应的下调。A. C. McCormac 等^[14,18]证明拟南芥 *AtHEMA1* 基因受光诱导,而且在不同的光质下其表达量也不同,在红光、远红光、蓝光和白光照射下其表达量明显增加。J. Schmied 等^[33]分别在拟南芥和烟草中证明 *HEMA1* 基因受光照调节。本研究检测了不同时期套袋与未套袋苹果果皮中的 *MdHEMA1* 表达,发现套袋果皮中的表达均明显低于未套袋果皮中的表达,可能是套袋导致光照减弱,进而抑制了 *MdHEMA1* 的表达。此外,*MdHEMA1* 启动子上含有多个光响应元件(表 2),以上结果均暗示 *MdHEMA1* 表达可能受到光照的调节。除包含光响应元件外,*MdHEMA1* 启动子上还包含多个激素响应、低温响应及

干旱响应等元件(表 2),暗示 *MdHEMA1* 基因可能参与激素响应以及逆境响应等途径。本研究中检测了 *MdHEMA1* 基因在 PEG 模拟干旱诱导下的表达,结果显示,该基因受 PEG 诱导表达上调,这与启动子分析相一致。研究表明,植物在遭受干旱、高盐等非生物胁迫时会导致细胞脱水,使得相应调控基因表达量上调^[34]。

目前,HEMA 基因的研究主要集中在拟南芥及烟草等模式植物上,苹果 *MdHEMA1* 的研究尚无报道。果实品质和产量是苹果研究的一个重点方向,而品质这一特殊性状在拟南芥、烟草等模式植物中很难研究。基于拟南芥中 *AtHEMA1* 所具有的功能,确定 *MdHEMA1* 是否能够在提高苹果品质上发挥作用,这将是本研究的最终目标。本研究以苹果全基因组序列为研究背景,完成了苹果 *MdHEMA1* 基因的生物信息学和表达分析,也为进一步鉴定其功能奠定了基础。

参考文献

[1] Fromme P, Melkozernov A, Jordan P, et al. Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems [J]. *Febs Lett*, 2003, 555(1): 40-44

[2] 陈学森, 韩明玉, 苏桂林, 等. 当今世界苹果产业发展趋势及我国苹果产业优质高效发展意见 [J]. *果树学报*, 2010, 27(4): 598-604

[3] 聂继云, 李静, 杨振锋, 等. 苹果品质和质量安全问题与对策 [J]. *中国果树*, 2007(3): 60-62

[4] Beale S I. Green genes gleaned [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(7): 309-312

[5] Nagata N, Tanaka R, Satoh S, et al. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of prochlorococcus species [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 233-240

[6] Nagata N, Tanaka R, Tanaka A. The major route for chlorophyll synthesis includes [3, 8-divinyl]-chlorophyllide a reduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(12): 1803-1808

[7] 王平荣, 张帆涛, 高家旭, 等. 高等植物叶绿素生物合成的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2009, 29(3): 629-636

[8] Stephenson P G, Terry M J. Light signaling pathways regulating the Mg-chelatase branchpoint of chlorophyll synthesis during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Photoch Photobio Sci*, 2008, 7(10): 1243-1251

[9] Ilag L L, Kumara A M, Söll D. Light regulation of chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinic acid formation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(2): 265-275

[10] Liu W, Fu Y, Hu G, et al. Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 2007, 226(3): 785-795

[11] Reinbothe S, Reinbothe C. Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111(1): 1-7

[12] Grimm B. Primary structure of a key enzyme in plant tetrapyrrole synthesis: glutamate 1-semialdehyde aminotransferase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(11): 4169-4173

[13] Kumar A M, Csankovszki G, Solld D. A second and differentially expressed glutamyl-tRNA reductase gene from *Arabidopsis thali-*

ana [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(3): 419-426

[14] McCormac A C, Fischer A, Kumar A M, et al. Regulation of *HEMA1* expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2001, 25(5): 549-561

[15] Tsnala R, Yoshida K, Nakayashik T, et al. Differential expression of two hemA mRNAs encoding glutamyl-tRNA reductase proteins in greening cucumber seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110(4): 1223-1230

[16] Masuda T, Ohta H, Shioi Y. Stimulation of glutamyl-tRNA reductase activity by benzyladenine in greening cucumber cotyledons [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(7): 1237-1243

[17] Kruse E, Grimm B, Beator J, et al. Developmental and circadian control of the capacity for -aminolevulinic acid synthesis in green barley [J]. *Planta*, 1997, 202(2): 235-241

[18] McCormac A C, Terry M J. Light-signalling pathways leading to the co-ordinated expression of *HEMA1* and *Lhcb* during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2002, 32(4): 549-59

[19] Tsnala R, Yoshida K, Nakayashik T, et al. The third member of the hemA gene family encoding glutamyl-tRNA reductase is primarily expressed in roots in *Hordeum vulgare* [J]. *Photosynth Res*, 1997, 53(2): 161-171

[20] Kumar A M, Söll D. Antisense *HEMA1* RNA expression inhibits heme and chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122(1): 49-55

[21] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(1): 597-603

[22] 赵世杰. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 41-45

[23] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739

[24] Beale S I, Weinstein J D. Biochemistry and regulation of photosynthetic pigment formation in plants and algae [J]. *New Compr Biochem*, 1991, 19(12): 155-235

[25] Von Wettstein D, Gough S, Kannangara C G. Chlorophyll biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1039-1057

[26] Fromme P, Melkozernov A, Jordan P, et al. Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems [J]. *Febs Lett*, 2003, 555(1): 40-44

[27] 程存刚, 刘凤之, 魏长存, 等. 套袋对富士苹果果皮叶绿素和花青苷含量的影响 [J]. *中国果树*, 2002(4): 9-10

[28] 王昭. 红富士苹果套袋栽培技术对果实品质的影响研究 [D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2011

[29] 高华君, 王少敏, 刘嘉芬. 红色苹果套袋与除袋机理研究概要 [J]. *中国果树*, 2000(2): 46-48

[30] Nakanishi H, Nozue H, Suzuki K, et al. Characterization of the *Arabidopsis thaliana* mutant *pcb 2* which accumulates divinyl chlorophylls [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(3): 467-473

[31] Zhang Z P, Yao Q H, Wang L J. Expression of yeast Hem1 controlled by *Arabidopsis* HemA1 promoter enhances leaf photosynthesis in transgenic tobacco [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(7): 4369-4379

[32] 张治平, 汪良驹, 姚泉洪. 过量合成 ALA 转基因烟草叶片光合与叶绿素荧光特性的研究 [J]. *西北植物学报*, 2008, 28(6): 1196-1202

[33] Schmied J, Hedtke B, Grimm B. Overexpression of *HEMA1* encoding glutamyl-tRNA reductase [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168(12): 1372-1379

[34] 郭婷, 王茅雁, 董博, 等. 蒙古沙冬青 *AmDREB2C* 基因的克隆及表达分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(2): 344-348