

黄瓜叶绿素降解关键酶基因 *PPH* 和 *PAO* cDNA 片段的克隆与表达初步分析

王 伟, 徐跃进*, 万正杰

(华中农业大学园艺林学学院, 国家蔬菜改良中心华中分中心, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘 要: 以西双版纳黄瓜和‘华黄 5 号’黄瓜叶片为试验材料, 研究了衰老过程中两种黄瓜叶片叶绿素含量变化及脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶基因 *PPH* 和脱镁叶绿酸 a 加氧酶基因 *PAO* 的表达。结果表明: 随着叶片衰老, 叶绿素 a 和叶绿素 b 含量显著降低, 叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值在 0.5 左右, 推测叶绿素 b 的含量可能对黄瓜叶片保绿起到重要作用。荧光定量 RT-PCR 分析结果显示: *PPH* 和 *PAO* 在西双版纳黄瓜叶片生长 35 d 时表达量最高, 分别为 5.50 和 1.86; *PPH* 在‘华黄 5 号’叶片 35 d 时表达量最高, 为 7.14, 而 *PAO* 在 35 和 45 d 表达量都很高, 分别为 3.90 和 3.91; *PPH* 和 *PAO* 在西双版纳黄瓜叶片中的表达量低于在‘华黄 5 号’中。

关键词: 黄瓜; 叶绿素; 降解; *PPH*; *PAO*; 衰老; 表达

中图分类号: S 642.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 06-1104-07

Cloning and Expression Analysis of Key Genes *PPH* and *PAO* for Chlorophyll Degradation in Cucumber

WANG Wei, XU Yue-jin*, and WAN Zheng-jie

(College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University; National Center for Vegetable Improvement (Central China); Key Laboratory of Horticulture Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

Abstract: The change of chlorophyll content and the expression of pheophytin pheophorbide hydrolase gene (*PPH*) and pheide a oxygenase gene (*PAO*) were analyzed during leaf senescence of *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi et Yuan and ‘Huahuang 5’. The results showed that chlorophyll a and b content decreased significantly during the leaf senescence. The ratio of chlorophyll a and b was around 0.5, suggesting that chlorophyll b content might play a role in keeping green. Real-time PCR results showed that *PPH* and *PAO* had the highest expression in leaves of *xishuangbannanensis* Qi et Yuan at 35 d, with the relative expression values of 5.50 and 1.86, respectively. The maximum expression values of *PPH* in leaf of ‘Huahuang 5’ occurred at 35 d, with relative expression value of 7.14. The highest expression of *PAO* in leaf of ‘Huahuang 5’ occurred at 35 d and 45 d, with the relative expression values of 3.90 and 3.91, respectively. The expression of *PPH* and *PAO* in leaves of *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi et Yuan were lower than that in ‘Huahuang 5’.

收稿日期: 2011-01-11; 修回日期: 2011-05-03

基金项目: 国家‘948’项目(2008-Z26); 湖北省科技攻关项目(20066109)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xyjho@mail.hzau.edu.cn)

致谢: 本文得到华中农业大学园艺林学学院院长江学者匡汉晖教授的修改, 在此表示感谢。

Key words: cucumber; chlorophyll; breakdown; *PPH*; *PAO*; senescence; expression

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 的产量和品质受叶绿素降解的影响非常明显。对叶绿素降解代谢分子机制的了解有助于探明衰老过程中光合功能衰退的调控机理, 从而为作物产量和品质性状的遗传改良提供理论依据。

脱镁叶绿素脱镁叶绿酸水解酶 (pheophytin pheophorbide hydrolase, *PPH*) 和脱镁叶绿酸 a 加氧酶 (pheideide oxygenase, *PAO*) 是叶绿素降解代谢的关键酶 (Silvia et al., 2009; Asumi et al., 2010)。*PPH* 是叶绿素降解过程中新发现的一种酶 (Nancy, 2009), 在叶绿素降解过程中 *PPH* 是卟啉-植醇水解过程参与的候选酶, 对脱镁叶绿素很活跃, 但对叶绿素却没有作用。*PPH* 酶的作用是将脱镁叶绿素 a 转换为脱镁叶绿酸 a。在叶片衰老过程中 *PPH* 基因的表达加强, 加快脱镁叶绿素 a 转换为脱镁叶绿酸 a, 加速叶片衰老。*PPH* 酶的缺失能够造成植物滞绿表现型, 是一种非功能的滞绿, 叶绿素代谢在一定程度上受损, 叶绿素缓慢降解, 叶片保绿时间较长, 衰老被延迟。脱镁叶绿酸 a 加氧酶 (*PAO*) 是催化叶绿素卟啉环开环成为四元线性吡咯衍生物的关键酶, 是一种铁硫蛋白, 被一种加速细胞死亡基因编码 (Adriana et al., 2003), *PAO* 酶作用于叶绿素降解的方式较灵活, 如持绿蛋白 *SGR* (senescence-inducible chloroplast stay-green protein) 可通过影响 *PAO* 酶的活性使植物表现为滞绿 (Stefan, 2009), *PAO* 编码基因缺失会产生滞绿突变体 (Stefan et al., 1998; Davyd et al., 2006)。*PAO* 基因的表达与衰老密切相关。在植株衰老和伤害时 *PAO* 基因表达水平上调, 在叶片衰老后期, *PAO* 活性达到最高; 在衰老的叶片中, 抑制 *PAO* 的活性, 将导致脱镁叶绿酸 a 的积累和叶绿素降解的抑制; 在滞绿突变体的叶片衰老过程中 *PAO* 活性非常低。因此通常认为编码该酶的基因突变是滞绿突变体保持绿色的原因之一。

关于黄瓜衰老及保绿的分子机理方面的研究较少, 文献报道大多仅为衰老过程生理生化特性及细胞学研究 (李艳秋, 2006; 王志坤 等, 2007; 商庆梅, 2009)。本研究中以西双版纳黄瓜野生种和栽培品种 ‘华黄 5 号’ 为研究对象, 克隆了叶绿素降解途径中 *PPH* 和 *PAO* 两个关键酶基因片段, 利用荧光定量 RT-PCR 技术手段, 研究其表达差异, 为深入研究 *PPH* 和 *PAO* 酶编码基因的生物信息学及黄瓜产量和品质进行遗传改良提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其叶绿素含量测定

试材为黄瓜品种 ‘华黄 5 号’ 和野生西双版纳黄瓜 (*Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi et Yuan), 均由华中农业大学黄瓜育种课题组提供。‘华黄 5 号’ 为本实验室 2009 年选育的新品种, 叶片深绿, 生长后期叶片黄化面积大, 数量也较多, 茎较粗, 生长势较强, 早熟。野生西双版纳黄瓜生长期可长达 200 d, 叶片墨绿, 生长后期叶片黄化面积小, 数量较少, 茎粗, 生长势强, 晚熟。两份材料于 2010 年 6 月播种于国家蔬菜改良中心华中分中心 (华中农业大学校内) 大棚内, 土壤肥力一致, 正常栽培管理。待植株生长至第 5 节位时, 选长势一致的植株对第 5 节位叶片进行叶龄 (叶片伸出后天数) 标记, 于叶片伸出后 5、15、25、35 和 45 d 取样。叶绿素含量测定参照李合生 (2000) 的方法进行。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 登录的 *PPH* 和 *PAO* 酶编码基因的保守序列, 利用 Primer 3.0 软件进行引物设计,

PPH 的引物序列为 *PPH-F*: 5'-CATCGAACAGGTCATTGGTG-3' 和 *PPH-R*: 5'-ACTTTCGGGGTCGCTTATTT-3'; *PAO* 的引物序列为 *PAO-F*: 5'-GGGCATTGAAAAGTGAAGA-3' 和 *PAO-R*: 5'-CTAATGGTCCCTGGGGATT-3'。以上引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。

1.3 RT-PCR 扩增及产物序列测定

以提取的黄瓜叶片 RNA 为模板进行反转录之后向反应体系加入 ddH₂O 36.5 μL, 10 × *Taq* buffer 5 μL, dNTP (2 mmol · L⁻¹) 4 μL, cDNA 第 1 链模板 2 μL, 正、反向引物各 1 μL, *Taq* 酶 (5 U · μL⁻¹) 0.5 μL。其 PCR 反应条件为 94 °C 预变性 4 min、94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 4 min。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物经回收、纯化, 与 *psure-T* 载体 (购自北京庄盟生物技术有限公司) 连接, 转化 DH5α 感受态细胞, 蓝白斑筛选后测序 (上海桑尼生物工程技术服务有限公司)。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

提取黄瓜叶片 RNA, 利用 ReverAid FirstStrand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania) 合成 cDNA 第 1 链备用。

按照 2 × SYBERGREENPCRMasterMix (TOYOBO, Japan) 试剂盒操作指导, 采用实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, QRT-PCR) 方法, 检测基因的相对表达量 (Ficko & Cernelc, 2005)。扩增目标 *PPH*、*PAO* 基因引物设计为 *PPH-F*: 5'-GCAATGTGACGCCCTTAAGT-3' 和 *PPH-R*: 5'-CATCGAACAGGTCATTGGTG-3'; *PAO-F*: 5'-GGGCATTGAAAAGTGAAGA-3' 和 *PAO-R*: 5'-TTA CTTGGCGATCAAAAATGG-3'。预测产物长度分别为 113 和 117 bp, 适用于 QRT-PCR; 以 *β-actin* 基因为内参, 其引物序列为 *β-actin-F*: 5'-CCAAGCAGCATGAAGATCAA 和 *β-actin-R*: 5'-ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG。预测产物长度是 100 bp, 适用于 QRT-PCR。以生长 5 d 叶片的表达量定为“1”, 按照相对定量公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 作图。

2 结果与分析

2.1 黄瓜叶片衰老过程中叶绿素含量的变化

在衰老过程中, 叶片中叶绿素含量的高低和变化的快慢可以反映叶片衰老的快慢。从图 1 可以看出, 在黄瓜叶片衰老过程中, 叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均呈先上升后下降的趋势。西双版纳黄瓜

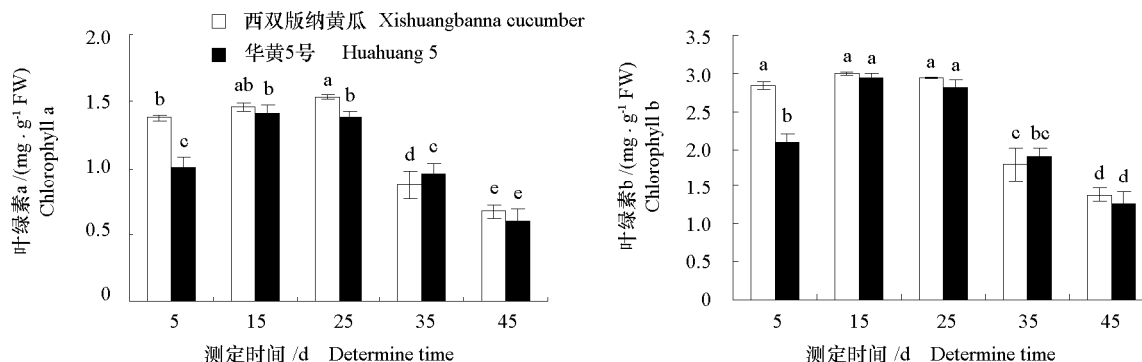


图 1 黄瓜叶片叶绿素 a、b 含量

Fig. 1 Chlorophyll a and b content of cucumber leaf

叶片在生长 25 d 时叶绿素 a 含量最高, 生长 45 d 下降 43.8%; 叶绿素 b 在生长 15 d 时最高, 生长 45 d 下降 46.4%; 叶绿素 a/b 比值只有在生长 25 d 与其它天差异显著外, 其余天数之间差异不显著 (图 2)。

‘华黄 5 号’黄瓜叶片在生长 15 d 叶绿素 a 和叶绿素 b 含量最高, 生长 45 d 时分别下降 42.8% 和 43.3% (图 1), 叶绿素 a/b 比值在生长 25、35 和 45 d 差异显著 (图 2)。

野生种和栽培品种叶绿素 a 和叶绿素 b 含量在衰老不同阶段差异显著 ($P < 0.05$) (图 1)。西双版纳黄瓜叶绿素 a/b 在生长 25 d 时最大, 华黄 5 号叶绿素 a/b 在生长 35 d 时最大, 虽然叶绿素 a/b 在生长前期差异不显著, 但在后期达到差异显著水平 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.2 *PPH* 和 *PAO* cDNA 片段的克隆

以两个黄瓜品种叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板。进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在栽培种和野生种中均扩增得到预期大小的 cDNA 片段, PCR 扩增产物均为单一条带, 各引物对的特异性较高。

PPH 基因的 cDNA 片段测序后核苷酸序列为 265 bp (图 3), 同源比对结果显示与拟南芥 (AT5G13800)、花椰菜 (OL386R)、葡萄 (XM002271131.1) 和烟草 (AM851012.1) 的同源基因分别具有 87%、88%、80% 和 78% 的核苷酸序列相似性。

PAO 基因的 cDNA 片段测序后核苷酸序列为 230 bp (图 3), 与拟南芥 (NM-114357.5)、葡萄 (FJ799360.1)、花椰菜 (AB470926)、毛果杨 (XM002331446.1) 和蓖麻 (XM002523689) 的同源基因分别具有 90%、86%、85%、83% 和 82% 的核苷酸序列相似性。证明该扩增产物是 *PPH* 和 *PAO* 酶基因片段。

2.3 *PPH* 和 *PAO* 基因在西双版纳黄瓜叶中的相对表达量

如图 4 所示, 在西双版纳黄瓜叶片衰老过程中, *PPH* 和 *PAO* 基因在叶中的相对表达量的变化趋势有所不同, *PPH* 基因的相对表达量是先上升后下降, 在生长 35 d 时最高, 为 5.50; 45 d 时为 35 d 的 69%。*PAO* 基因在生长 15 和 25 d 时表达较弱, 分别为 5 d 的 5.8% 和 20%; 在生长 35 d 时表达最强, 为 1.86; 45 d 为 35 d 的 25%。相关性分析表明, 这两个基因在西双版纳黄瓜叶片中的表达呈正相关 ($r = 0.57$)。

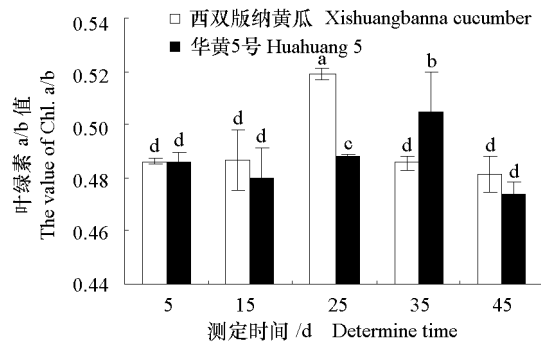


图 2 黄瓜叶片叶绿素 a/b 比值

Fig. 2 The ration of chlorophyll a and b of cucumber leaf

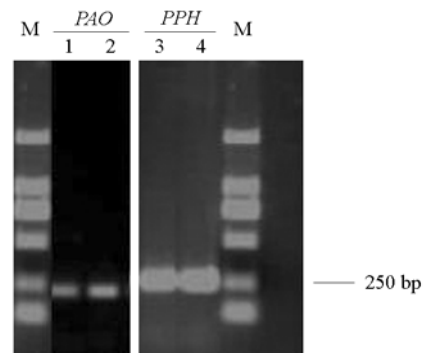


图 3 黄瓜 *PPH* 和 *PAO* 基因的 RT-PCR 产物电泳图谱

M: DNA marker 2000; 1、3: ‘华黄 5 号’;
2、4: 西双版纳黄瓜。

Fig. 3 Electrophoresis pattern of *PPH* and *PAO* RT-PCR products of cucumber

M: DNA marker 2000; 1、3: Leaf of Huahuang 5;
2、4: Leaf of Xishuangbanna cucumber.

PPH 的测序结果为: ACTTTCGGGGTCGCTTATTTTCTGCCAAACAACTTTGTGAGCTTTCT
CACGTTGTCTGGTAATGGAACTTCCCACCCCAAGGAAACAATTTTGCTAATCTCGGCGATCTT
ATAGGATTAGGAAAAAATCCCCAGAATGGAGTTGCATTTAGCAATGTGACGCCCTTAACTAAAT
CAGGATTGCACGCTGCAAAGTATAGTGCCACAAACCCTCCAAGTGAATTGCCCACAATGTAGA
CTGGTTCACCAATGACCTGTTCGATG。

PAO 的测序结果为: GGGCATTGAAAAGTGAAGAAGTTTCGAGCACTACATACAATAGAAC
GAGTTTTTCCAGGACCCATTGGCACATTGAAGGAGCAAATCCATATTACCCATTTTGTATCGCCA
AGTAAAGGAAGCTTTGAGTCAATTTCCACTTTGTTGATATAGTAACAAGGAGCAACAACTCGG
CACTAATCCTTGGGTTACCCTTATTTGCTCCA GAAAATCCCCAGGGACCATTAG。

上述下划线部分为引物序列。这两个从野生西双版纳黄瓜和‘华黄 5 号’黄瓜叶片中扩增出来的基因经过 BLAST 比对, 在序列上没有差异。

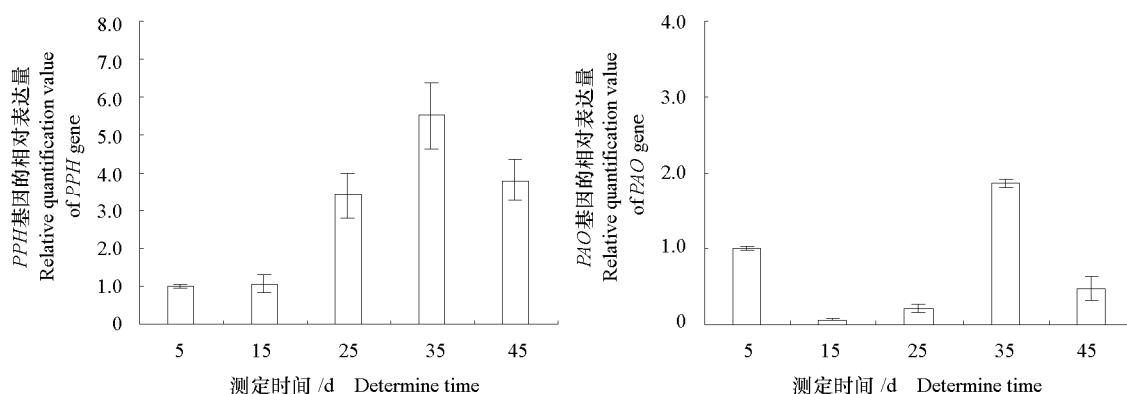


图 4 *PPH* 和 *PAO* 基因在西双版纳黄瓜叶中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *PPH* and *PAO* genes in leaf of Xishuangbanna cucumber

2.4 *PPH* 和 *PAO* 基因在‘华黄 5 号’黄瓜叶中的相对表达量

在‘华黄 5 号’叶片衰老的过程中, *PPH* 和 *PAO* 基因的表达模式与在西双版纳黄瓜叶片基本相同。*PPH* 基因的相对表达量是先上升后下降, 在 35 d 时表达量最高, 为 7.14; 45 d 时为 35 d 的 19% (图 5)。

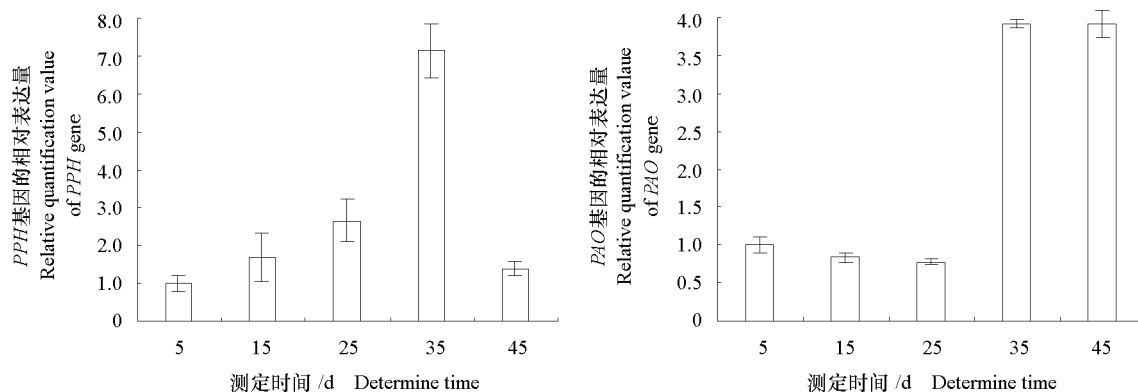


图 5 *PPH* 和 *PAO* 基因在‘华黄 5 号’黄瓜叶中的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *PPH* and *PAO* genes in leaf of Huahuang 5

PAO 基因在生长 15 和 25 d 时表达较弱, 分别为 5 d 的 83% 和 76%, 与西双版纳黄瓜不同的是, *PAO* 基因在 35 和 45 d 表达都很强, 分别为 3.90 和 3.91 (图 5)。相关性分析表明, 这两个基因在 ‘华黄 5 号’ 黄瓜叶片中的表达呈正相关 ($r = 0.52$)。

3 讨论

本试验中野生种和栽培种黄瓜叶片在衰老过程中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均先上升, 后显著下降, 叶绿素 a/b 也均在下降, 这与孙艳等 (2008) 研究结果一致。叶绿素 b 含量对叶绿素总含量起到主导作用, 与孙小镭等 (2003) 的研究结果一致。

PPH 基因在叶片衰老过程中相对表达量加强, 加快叶绿素降解, 加速叶片衰老 (Zimmermann et al., 2004)。对拟南芥叶片衰老的最新研究表明 *PPH* 酶是一种新型的水解酶, 其调控基因为 *At5g13800*, 拟南芥叶中 *PPH* 酶参与了叶绿素降解, 证实叶绿素酶不是必须的, *PPH* 基因的表达和其他滞绿相关的酶基因, 如 *NYC1*、*NOL*、*SGR* 等表达没有冲突, 有相关性。在本试验中, *PPH* 和 *PAO* 基因表达具有一定的相关性。黄瓜野生种和栽培种 *PPH* 基因的表达强弱不同, 这与在花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) 花茎中的表达模式相似 (Agustin et al., 2010), *PPH* 基因在野生种和栽培种衰老过程中表达都是先强后弱, 野生种中的相对表达量低于栽培种, 表明 *PPH* 基因可能对加速衰老有一定的作用。拟南芥 *PPH* 突变体中发现有大量的叶绿素 a 和叶绿素 b 保留 (Silvia et al., 2009), 这表明 *PPH* 酶基因的表达与叶绿素的积累可能有一定的联系, 但栽培种和野生种之间遗传背景差异很大, 该基因的差异也有可能是其他原因引起的, 所以有待于进一步深入研究。

PAO 基因在叶片的衰老过程中相对表达量同样加强, 抑制 *PAO* 的活力, 将导致脱镁叶绿酸 a 的积累和叶绿素降解抑制 (唐蕾, 2008)。酒精能显著抑制花椰菜 *PAO* 基因的表达, 酒精处理后, *PAO* 表达量较低, 随着酒精作用减弱, 其表达量逐渐上升, 而正常植株 *PAO* 表达量在衰老过程中先上升后下降 (Asumi et al., 2010)。本试验结果与正常花椰菜中 *PAO* 表达趋势略有不同, 但基本表达模式相同, *PAO* 基因在野生种和栽培种中表达量先下降, 后逐渐上升, 然后再下降。这可能由于材料的差异及处理不同造成 *PAO* 基因的表达结果不同。

在本试验中, *PPH* 和 *PAO* 基因在黄瓜叶片衰老过程中没有很高的相关性。可能叶片衰老过程中, 其他因子调控 *PPH* 和 *PAO* 基因的表达。尽管 *PPH* 和 *PAO* 缺失可以形成滞绿突变体, 但影响叶绿素降解可能还有其他一些关键酶, 如叶绿素 b 向叶绿素 a 转化所需的 *NYC1* 和 *CAO* 等。叶绿素 a 和叶绿素 b 是保绿的主要色素, 在叶绿素 b 向叶绿素 a 转化循环途径上进行深入研究可能会有一些新的发现。*PPH* 和 *PAO* 缺失主要累积叶绿素 a, 同时发现 *PAO* 引起的滞绿常与 *RCCR* 和 *SGR* 等基因相关, 如 *SGR* 通过调节 *PAO* 活性影响叶绿素和色素蛋白复合物的降解 (严波, 2007; Paavo, 2010)。

黄瓜生长期较短, 采后叶绿素易降解, 发黄变软, 难以适应长途运输和较长时间的贮藏, 其食用品质和商品品质下降。延缓黄瓜植株衰老, 延长保鲜期, 成为生产上迫切需要解决的难题。虽然在一些植物中获得滞绿突变体, 但由于遗传背景不同, 滞绿分子机理相差较大, 有自身基因引起的, 也有环境引起的。所以 *PPH* 和 *PAO* 在黄瓜中的作用机理及滞绿突变体的获得还需要深入研究。

References

- Adriana Pruzinska, Gaby Tanner, Iwona Anders, Maria Roca, Stefan Hortensteiner. 2003. Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *PNAS*, 100 (25): 15259 – 15264.
- Agustin M B, Pedro M C, Gustavo A M. 2010. Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytylation during senescence of

- broccoli. *Journal of Plant Physiology*, 7: 1 – 7.
- Asumi F, Yasuo S, Hirofumi T, Naoki Y. 2010. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on activities and gene expression of chlorophyll catabolic enzymes in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology*, 55: 97 – 102.
- Davyd W, Adriana P, Stefan H, Donald R O. 2006. The role of pheophorbide a oxygenase expression and activity in the canola green seed problem. *Plant Physiology*, 142: 88 – 97.
- Ficko T, Cernelc P. 2005. Real-time quantitative PCR assay for analysis of platelet glycol protein III a gene expression. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 62 (3): 241 – 250.
- Li He-sheng. 2000. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiment. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社.
- Li Yan-qiu. 2006. Studies on senescence and ripeness character of cucumber fruit [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 李艳秋. 2006. 黄瓜果实成熟衰老特性的研究 [硕士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Nancy A. 2009. A new chlorophyll degradation pathway. *The Plant Cell*, 21: 700.
- Paavo H, Vesa K, Erkki K. 2010. Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophyll a with hydrogen peroxide: Characterization of the products and mechanism of the reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 17 (97): 531 – 542.
- Shang Qing-mei. 2009. Studies on senescence characters of cucumber [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 商庆梅. 2009. 黄瓜衰老特征特性研究 [硕士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Silvia S, Sylvain A, Bo B, Birgit A, Felix K, Karin K, Stefan H. 2009. Pheophytin pheophorbide hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21: 767 – 785.
- Stefan H. 2009. Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends in Plant Science*, 14: 155 – 162.
- Stefan H, Karin L W, Philippe M, Karl-Hans O, Bernhard. 1998. The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (25): 15335 – 15339.
- Sun Xiao-lei, Wang Bing, Gu San-jun, Wang Zhi-feng. 2003. Correlation of immature skin color and pigments in cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (6): 721. (in Chinese)
- 孙小镭, 王 冰, 顾三军, 王志峰. 2003. 黄瓜嫩果皮色与色素含量的关系. *园艺学报*, 30 (6): 721.
- Sun Yan, Liang Yu-zhu, Chen Jing-dong, Ding Qin, Xu Wei-jun, Xu Xiang-dong. 2008. Relationships between ascorbic acid content and relative physiologic indices during senescence of cucumber leaves. *Acta Botanica Borealt Occidentalia Sinica*, 28 (3): 512 – 516. (in Chinese)
- 孙 艳, 梁宇柱, 陈敬东, 丁 勤, 徐伟君, 徐向东. 2008. 黄瓜叶片衰老过程中抗坏血酸含量与生理指标关系的研究. *西北植物学报*, 28 (3) : 512 – 516.
- Tang Lei. 2008. Pheophorbide a monooxygenase and chlorophyll degradation. *Chemistry of Life*, 28 (5): 606 – 609. (in Chinese)
- 唐 蕾. 2008. 脱镁叶绿素 a 单加氧酶与叶绿素降解. *生命的化学*, 28 (5): 606 – 609.
- Wang Zhi-kun, Qin Zhi-wei, Li Yan-qiu, Zhou Xiu-yan. 2007. Ultra structural changes of pericarp of cucumber *in vivo* during senescence. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (4): 889 – 894. (in Chinese)
- 王志坤, 秦智伟, 李艳秋, 周秀艳. 2007. 黄瓜果实衰老过程中果皮超微结构的变化. *园艺学报*, 34 (4): 889 – 894.
- Yan Bo. 2007. Cloning and function research of the tomato stay-green gene *LeSGRI* [M. D. Dissertation]. Chongqing: Chongqing University. (in Chinese)
- 严 波. 2007. 番茄滞绿基因 *LeSGRI* 的克隆和功能研究 [硕士论文]. 重庆: 重庆大学.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 136: 2621 – 2632.