

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.07.004

蜡梅类胡萝卜素合成与代谢基因表达差异分析

田明康¹, 李政¹, 朱建飞^{2,3}, 张弈¹,
陈如玉¹, 眭顺照¹, 李志能¹

1. 西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室/重庆市花卉工程技术研究中心, 重庆 400715;
2. 重庆工商大学 环境与资源学院, 重庆 400067; 3. 西南大学 食品科学学院, 重庆 400715

摘要: 在植物花发育过程中, 类胡萝卜素的含量会随之发生变化, 类胡萝卜素的合成与代谢受多个基因调控。通过分析蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢基因的表达差异, 可以为蜡梅类胡萝卜素合成与代谢调控机制的研究以及人工调控蜡梅类胡萝卜素含量提供理论基础。该研究对蜡梅转录组数据库中不同花发育时期及不同需冷量积累下类胡萝卜素合成与代谢相关基因进行表达差异分析; 以蜡梅露瓣、盛开、衰败3个发育时期的花为材料, 利用有机溶剂法与高效液相色谱法测定其类胡萝卜素与 β -胡萝卜素含量; 利用实时荧光定量PCR技术进一步验证蜡梅类胡萝卜素合成及代谢相关基因在露瓣期、盛开期、衰败期的表达差异。结果表明: 从露瓣期到盛开期, 类胡萝卜素合成基因 *CpPSY2* 表达量升高, 类胡萝卜素含量升高; 到衰败期, 类胡萝卜素代谢基因 *CpNCEDs* 表达量升高, *CpPSY2* 表达量降低, 类胡萝卜素含量降低。从露瓣期到盛开期, 再到衰败期, *CpLCYB* 表达量一直较低, *CpBCH1a* 和 *CpBCH1b* 在盛开期表达量最高, *CpBCH2* 在衰败期表达量最高, 使得 β -胡萝卜素含量逐渐降低, 影响了类胡萝卜素不同组分的含量; *CpCCD1a* 在盛开期表达量最高, 此时蜡梅香气最为浓郁, 可能与 *CpCCD1a* 裂解 β -胡萝卜素, 产生芳香类物质有关。在蜡梅花发育过程中, 类胡萝卜素合成及代谢基因表达量差异较大, 影响了花中类胡萝卜素总量及各组分的含量。

关键词: 蜡梅; 类胡萝卜素; 基因; 表达差异; 合成与代谢

中图分类号: S685.17 文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2022)07-0035-13

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis of Expression Differences of Carotenoid Synthesis and Metabolism Related Genes in *Chimonanthus praecox*

TIAN Mingkang¹, LI Zheng¹, ZHU Jianfei^{2,3}, ZHANG Yi¹,
CHEN Ruyi¹, SUI Shunzhao¹, LI Zhineng¹

1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/

Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountains Region, Ministry of Education/
Flower Engineering Technology Research Institute of Chongqing, Chongqing 400715, China;

2. School of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China;

3. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

收稿日期: 2021-07-02

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2020jcyj-msxmX1014); 中央高校基本科研业务费项目(XDJK2020B059).

作者简介: 田明康, 硕士研究生, 主要从事园林植物生物技术与遗传育种研究.

通信作者: 李志能, 博士, 副教授.

Abstract: The carotenoid content fluctuates during flower development in plants. The synthesis and metabolism of carotenoids are regulated by multiple genes. Analyzing the expression differences of carotenoid synthesis and metabolism genes at different flower development stages can provide a theoretic basis for the study of the regulation mechanism of the carotenoid synthesis and metabolism in *C. praecox*, as well as the artificial regulation of the carotenoid content. In this study, the differences in gene expression related to carotenoid synthesis and metabolism were analyzed at different flower development stages and chilling requirements (CR) accumulation based on the transcriptome database of *C. praecox*. The flowers in displayed petal stage (DP), open flower stage (OF), and senescing flower stage (SF) of *C. praecox* were used as materials to determine carotenoid and β -carotene contents by organic solvent method and high performance liquid chromatography (HPLC). Quantitative real-time PCR technique was used to further verify the differences of genes expression related to carotenoid synthesis and metabolism in three stages of flower development. The results showed that from DP to OF, the expression of carotenoid synthesis gene *CpPSY2* and the carotenoid content were increased. In SF, the expression of carotenoid metabolism gene *CpNCEDs* was increased, the expression of *CpPSY2* was decreased, and the carotenoid content was decreased. The expression of *CpLCYB* was low throughout the three stages. The highest expression of *CpBCH1a* and *CpBCH1b* were observed in OF, while *CpBCH2* in SF, which resulted in the gradual decrease of β -carotene content, and affected the contents of different components of carotenoids. The expression of *CpCCD1a* reached to the highest in OF and the floral aroma was the strongest at this time. This may be related to the cleavage of β -carotene by *CpCCD1a* to produce aromatic substances. The expression of carotenoid synthesis and metabolism related genes differed greatly, which affected the total carotenoid content and content of each component during the flower development in *C. praecox*.

Key words: *Chimonanthus praecox*; carotenoid; gene; expression differences; synthesis and metabolism

蜡梅 *Chimonanthus praecox* 为蜡梅科蜡梅属落叶灌木, 是我国特有的传统名贵花木, 也是少有的冬季开花观赏植物, 具有悠久的栽培历史^[1]. 蜡梅因其色如蜜蜡, 芳香馥郁而得名, 并深受人们喜爱, 在我国西南地区被广泛应用于园林绿化^[2], 也用于香精提取、花茶炮制及窖制. 近年来, 高通量测序技术及基因挖掘技术飞速发展, 促进了解析基因表达差异、新基因发掘、基因功能研究的进步. 同时, 蜡梅 cDNA 文库^[3] 和转录组数据库^[4-5] 的构建, 为蜡梅分子生物学研究奠定了基础. 类胡萝卜素是一类含有 40 个碳且呈黄色、橙红色及红色的类异戊烯聚合物, 属于四萜类脂溶性多烯色素, 分为胡萝卜素和叶黄素两类^[6-8]. 目前, 已鉴定出的类胡萝卜素有 1 000 多种^[9], 在动物、植物、真菌和细菌中广泛存在. 高等植物的类胡萝卜素主要存在于叶、花、果实、根等有有色体的质体中. 存在于叶中的类胡萝卜素在植物光合作用过程中发挥着重要作用^[10]. 在果实、根和花等非光合作用组织中, 具有不同成分和含量的类胡萝卜素作为特殊代谢产物聚集, 不仅使植物的花和果实呈现不同的颜色, 还可以分解成有气味和味道的化合物, 吸引昆虫传粉和动物传播种子^[7, 11-12]. 另外, 类胡萝卜素也参与植物激素如脱落酸 (abscisic acid, ABA)、独角金内酯 (strigolactones) 等的生物合成^[13-14].

2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径和甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径是植物萜类化合物合成的两个途径^[15]. 类胡萝卜素的前体物质异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 通过 MEP 途径合成 (图 1), 由甘油醛-3-磷酸 (glyceraldehyde 3-phosphate, GA3P) 和丙酮酸盐 (pyruvate) 在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS) 作用下发生缩合反应, 生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP), 再由 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR) 催化, 经过一系列反应生成 IPP^[16]. IPP 在 IPP 异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase, IPI) 的催化下转化为二甲烯丙基二磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP), DMAPP 在牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl

diphosphate synthase, GGPS/GGPPS)作用下与3个IPP发生缩合反应,生成20碳的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP). GGPP由八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, PSY)催化,缩合形成15-顺式-八氢番茄红素(15-cis-phytoene). 15-顺式-八氢番茄红素在八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)和类胡萝卜素异构酶(ζ -carotene isomerase, ZISO)作用下,生成 ζ -胡萝卜素. ζ -胡萝卜素在 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ζ -carotene desaturase, ZDS)和类胡萝卜素异构酶(carotenoid isomerase, CrtISO)作用下形成全反式番茄红素(all trans lycopene). 全反式番茄红素的环化反应由番茄红素环化酶(lycopene β -cyclase, LCYB与lycopene ϵ -cyclase, LCYE)催化,生成两种不同的类胡萝卜素,即 β -胡萝卜素(含2个 β 环)和 α -胡萝卜素(含1个 β 环和1个 ϵ 环)^[17]. α -胡萝卜素与细胞色素P450胡萝卜素羟化酶(cytochrome P450 carotene hydroxylase, CYP97)发生反应生成叶黄素(lutein)^[18]. β -胡萝卜素与 β -环羟化酶(β -carotene hydroxylase, CHY- β /BCH)及玉米黄质环氧酶(zeaxanthin epoxidase, ZEP)反应形成玉米黄质(zeaxanthin)、紫黄质/堇菜黄质(violaxanthin)等物质. 紫黄质可通过新黄质合成酶(neoxanthin synthase, NXS)催化进一步形成新黄质(neoxanthin)^[19]. β -胡萝卜素可被类胡萝卜素裂解双加氧酶(carotenoid cleavage dioxygenases, CCD)经过一系列反应裂解,合成独角金内酯^[20]、挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)^[14, 21]等;紫黄质和新黄质可被9-顺-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases, NCED)催化裂解生成脱落酸合成的前体物质^[22].

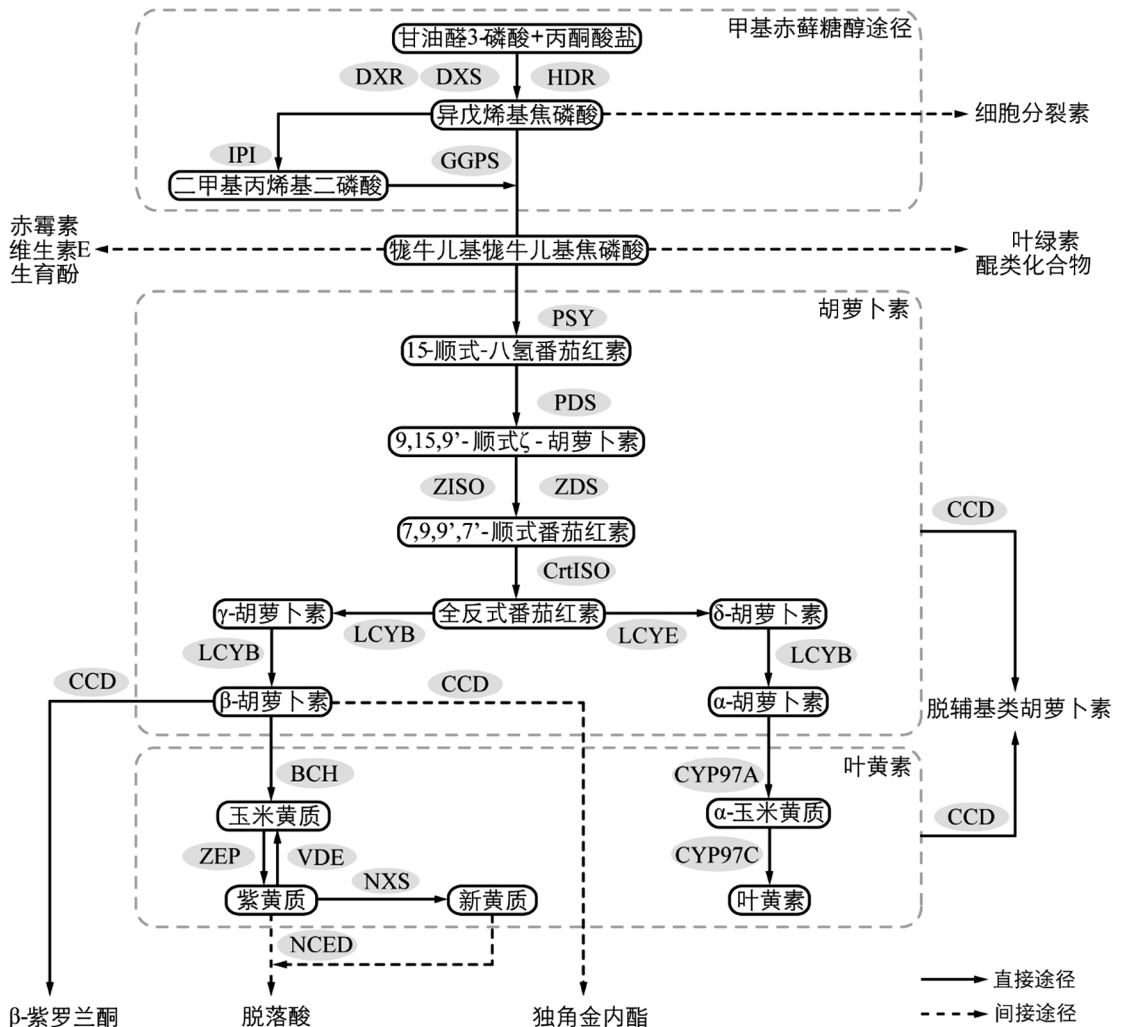


图1 类胡萝卜素合成与代谢通路(椭圆形代表酶,圆角矩形代表底物)

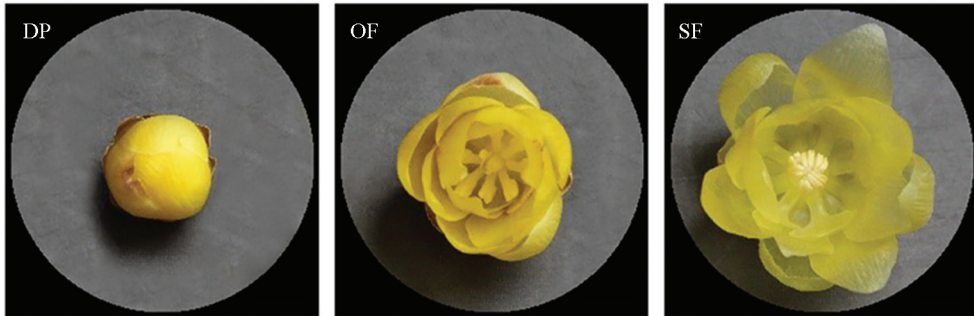
在植物生长发育过程中,控制类胡萝卜素合成与代谢的机制复杂而多样,不能对单一基因开展研究,需结合多个基因的协同作用进行分析. 本文通过研究类胡萝卜素生物合成与代谢相关基因转录水平的变化及类胡萝卜素含量变化之间存在的相关性,为探索蜡梅类胡萝卜素代谢机制及人工调控蜡梅类

胡萝卜素含量提供一定的理论基础,同时也为蜡梅花中黄色可食用色素的提取及茶用蜡梅花的保健功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

基于西南大学花卉工程技术研究中心构建的蜡梅不同花期转录组数据库^[4]及低温打破蜡梅花芽休眠并膨大开放的转录组数据库^[5],筛选类胡萝卜素合成与代谢相关的基因.西南大学校园内长势较一致且无病虫害的蜡梅,采其露瓣期(displayed petal stage, DP)、盛花期(open flower stage, OF)、衰败期(senescing flower stage, SF)的花(图 2),每个样本设置 3 个生物学重复.采集到的样本立即用液氮冷冻,然后保存到-80℃冰箱中,用于总 RNA 提取,另取相同的材料用于类胡萝卜素提取。



DP: 露瓣期, OF: 盛花期, SF: 衰败期.

图 2 蜡梅不同花发育时期样本

1.2 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素的提取与含量测定

1.2.1 总类胡萝卜素的提取与含量测定

采用有机溶剂法^[23]对总类胡萝卜素进行提取与测定.分别称取露瓣期、盛花期和衰败期蜡梅花 0.2 g,液氮研磨后迅速放入 10 mL 离心管中,加入 10 mL 80%丙酮溶液,利用超声波充分振荡直至提取液无色;吸取上层溶液于新的离心管中,高速冷冻离心机(美国 Thermo)5 000 r/min、4℃离心 10 min,再次吸取上清液,密封避光 4℃保存备用.每个处理重复 3 次.吸取 300 μ L 上清液于 96 孔酶标板中,用 Varioskan Flash 酶标仪(美国 Thermo)分别测定其在 663 nm,646 nm,470 nm 处的吸光值,每个处理重复 3 次,实验全程避光操作。

1.2.2 β -胡萝卜素提取与含量测定

β -胡萝卜素含量的测定利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC).分别称取 2 g 露瓣期、盛花期和衰败期的蜡梅花,放入研钵加液氮研磨,然后迅速将粉末置于 10 mL 离心管中,加入 8 mL 80%丙酮溶液,放于 4℃冰箱避光浸提 48 h.对浸提液低温(4℃)离心 5 min,用丙酮溶液重复洗脱沉淀并离心,直至沉淀无色,合并上清液,定容至 25 mL,过 0.22 mm 有机滤头,备用,每个处理重复 3 次;利用 40℃旋转蒸发器蒸干过滤后的浸提液,然后用 4 mL 乙酸乙酯溶解、测定.混合标样的制备:以 10 mg/L 混合标样溶液为标准储备溶液,制备系列质量浓度为 0.005,0.01,0.05,0.1,0.25,0.5,0.75,1.0,5.0 mg/L 的标准溶液,过 0.22 mm 有机滤头,备用.以 80%丙酮溶液为空白,利用 UV755B 紫外可见分光光度计(上海精科),在波长 300~700 nm 范围内扫描,确定最佳吸收波长,测定类胡萝卜素的总含量;利用 Agilent1100 series 高效液相色谱仪(美国 Agilent)进行梯度冲洗,测定 β -胡萝卜素的含量.实验全程避光操作,将测得的数据导入 GraphPad Prism 9 进行方差分析及图形绘制。

1.3 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢基因表达差异分析

对蜡梅不同花发育时期转录组数据库中类胡萝卜素相关基因进行表达差异分析,利用 TBtools 软件^[24]进行基因表达差异热图绘制,选取表达差异显著的基因利用生物信息在线分析软件“微生信”

(www. bioinformatics. com. cn)进行 GO(gene ontology, GO)富集条形图绘制. 对低温打破蜡梅花芽休眠并膨大开放的转录组数据库中类胡萝卜素代谢通路的基因进行表达差异分析, 利用 TBtools 软件进行基因表达差异热图绘制. 所有图片均利用 Adobe Illustrator 2020 进行组合及美化.

1.4 蜡梅不同花发育时期总 RNA 的提取及反转录 cDNA

选取露瓣期、盛花期、衰败期的蜡梅花为材料, 采用北京天根公司生产的 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 提取. 用 1% TBE 琼脂糖凝胶电泳(北京六一)和 NanoDrop 2000c 分光光度计(美国 Thermo)检测 RNA 的完整性、纯度及浓度. 以提取的总 RNA 为模板, 用 TaKaRa 公司生产的 Prime-Script RT-PCR Kit 反转录试剂盒进行 cDNA 第一链的合成.

1.5 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢相关基因 qRT-PCR 分析

选取部分蜡梅类胡萝卜素合成与代谢相关基因, 利用实时定量 PCR 方法进行表达量验证. 选用蜡梅 *CpActin-b* 和 *CpTublin* 基因作为实时定量 PCR 的双内参基因. 利用 Primer Premier 5.0 软件设计内参基因和目标基因的实时定量 PCR 引物, 送华大生物进行引物合成, 引物序列见表 1. 应用 Bio-Rad IQ5(美国 Bio-Rad)进行不同花期各基因实时定量 PCR 检测, 方法同文献[25], 将结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 转化成线性关系, 并进行统计学分析.

表 1 实时荧光定量 PCR 引物表

基因	正向引物	反向引物
<i>CpActin-b</i>	AGGCTAAGATTCAAGACAAGG	TTGGTCGCAGCTGATTGCTGTG
<i>CpTublin</i>	TAGTGACAAGACAGTAGGTGGAGGT	GTAGGTTCCAGTCCTCACTTCATC
<i>CpGGPS1a</i>	CTTTGTAAGATTTTGCTCCCCCG	CGATCATGTAGTAAGATAACCTGGC
<i>CpPSY2</i>	GGCGTCCACCTGTCATTTCTATCTG	CCCATCAACGCCAGAAAAAT
<i>CpPDS</i>	CAAGTGAGTTGTGCTTTCCTTATTC	TTGGGAAGGTTTTGATGATCAGATC
<i>CpZDS</i>	GTTGTTTTCCCCAGAACCTGAGCAC	CAGCTCCAATGATAGCCACTTTAAG
<i>CpCriISO</i>	GGCGAAAGATGATTGACAACCTAAG	CAAAAGATTAGTGCAGCAATGTGC
<i>CpLCYE</i>	GAACAGATGGCGAATCTGCTTT	TTAAGAACCTCAGCCTCTCTGCATT
<i>CpLCYB1a</i>	GTTTGGGGCAGTCTGTGGCA	TCAACAGTGTCTCCATTCCAAAGC
<i>CpZEP</i>	CACTGCGAGTTCTCATTGTTGC	GCTTTCATGTTTCCACCTTTCC
<i>CpCCD1</i>	TTGATTTCCCACTCTCTGGTTCTGC	GTCTGTATCTGCTGTTGATTTTCC
<i>CpNCED</i>	CCAAAGTTACCTACTCCTTACACGC	GGACCCGAGTCACTGGTTTCCTTCAT

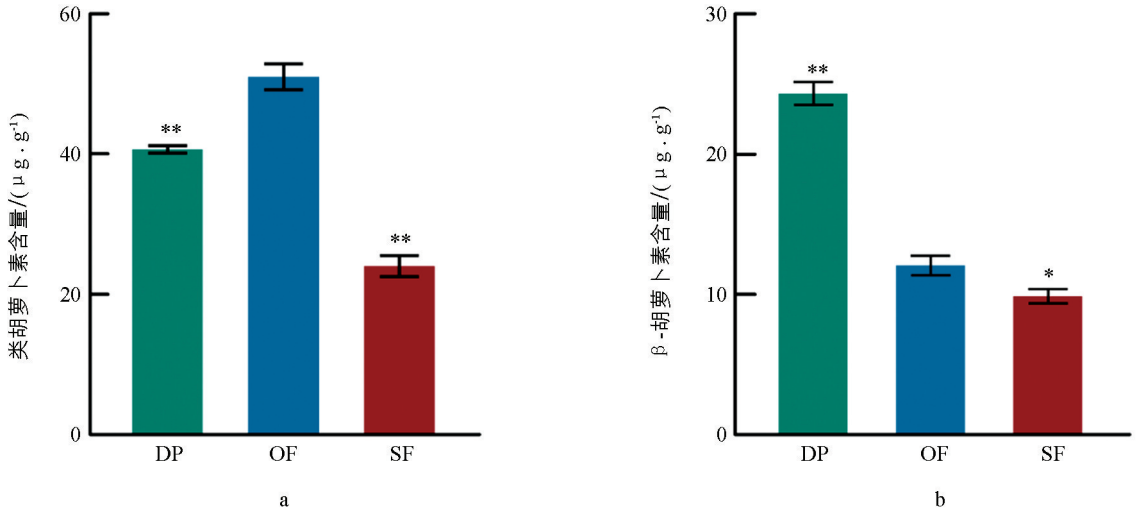
1.6 蜡梅类胡萝卜素合成与代谢蛋白互作网络预测分析

将低温打破蜡梅花芽休眠并膨大开放的转录组数据库^[5]中涉及类胡萝卜素生物合成与代谢的基因所编码的蛋白序列上传到 STRING v10 在线网站(www. string-db. org), 进行蛋白相互作用网络构建及相关代谢通路预测, 进一步分析直接参与蜡梅类胡萝卜素代谢的各蛋白之间的互作关系及作用过程.

2 结果与分析

2.1 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素含量

从露瓣期到盛花期, 再到衰败期, 蜡梅花中类胡萝卜素的总含量呈先升高、后降低的趋势, 并在盛花期达到最高, 此时含量为 51.47 $\mu\text{g/g}$, 分别极显著高于露瓣期和衰败期(图 3a), 表明在蜡梅盛开的过程中, 类胡萝卜素合成基因, 如 *CpPSY* 表达量升高. β -胡萝卜素含量整体呈下降趋势, 其中露瓣期 β -胡萝卜素含量为 24.99 $\mu\text{g/g}$, 极显著高于盛花期(近 2 倍), 衰败期与盛花期 β -胡萝卜素含量差异显著, 但未达到极显著水平(图 3b).



数据为平均值±标准差, 多重比较 OF 为控制组, 星号为显著差异。
(单因素方差分析及 Dunnett 多重比较, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$).

图 3 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素(a)和 β -胡萝卜素(b)含量

2.2 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢基因表达差异

对蜡梅不同花发育时期转录组数据库中与类胡萝卜素合成与代谢相关的基因进行筛选和表达差异分析, 利用 TBtools 软件进行表达差异热图绘制(图 4).

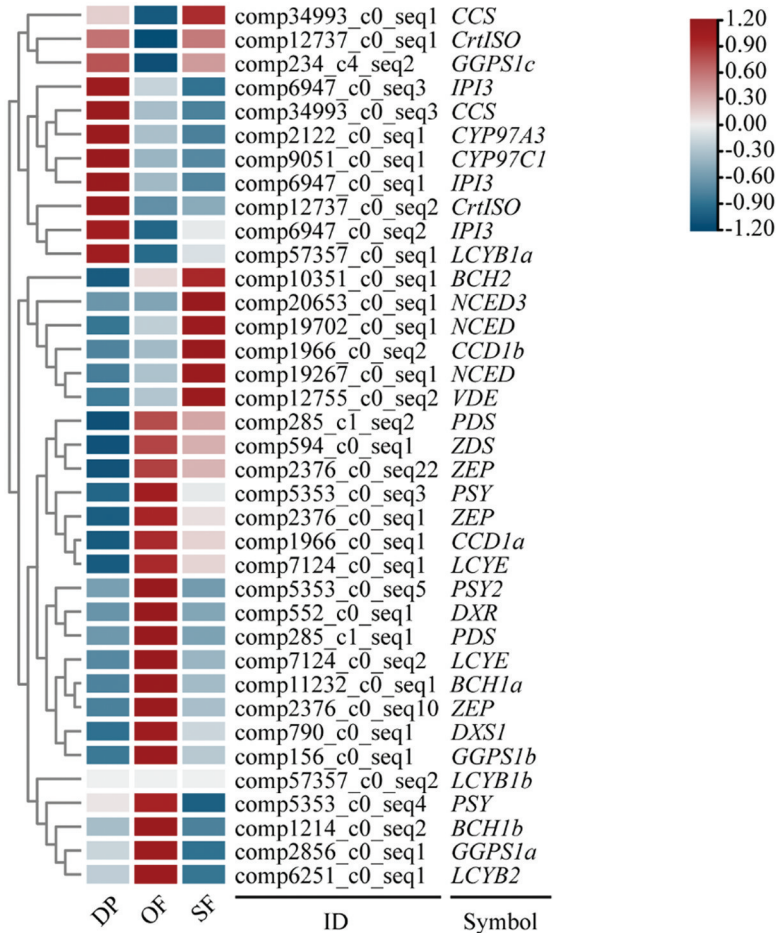
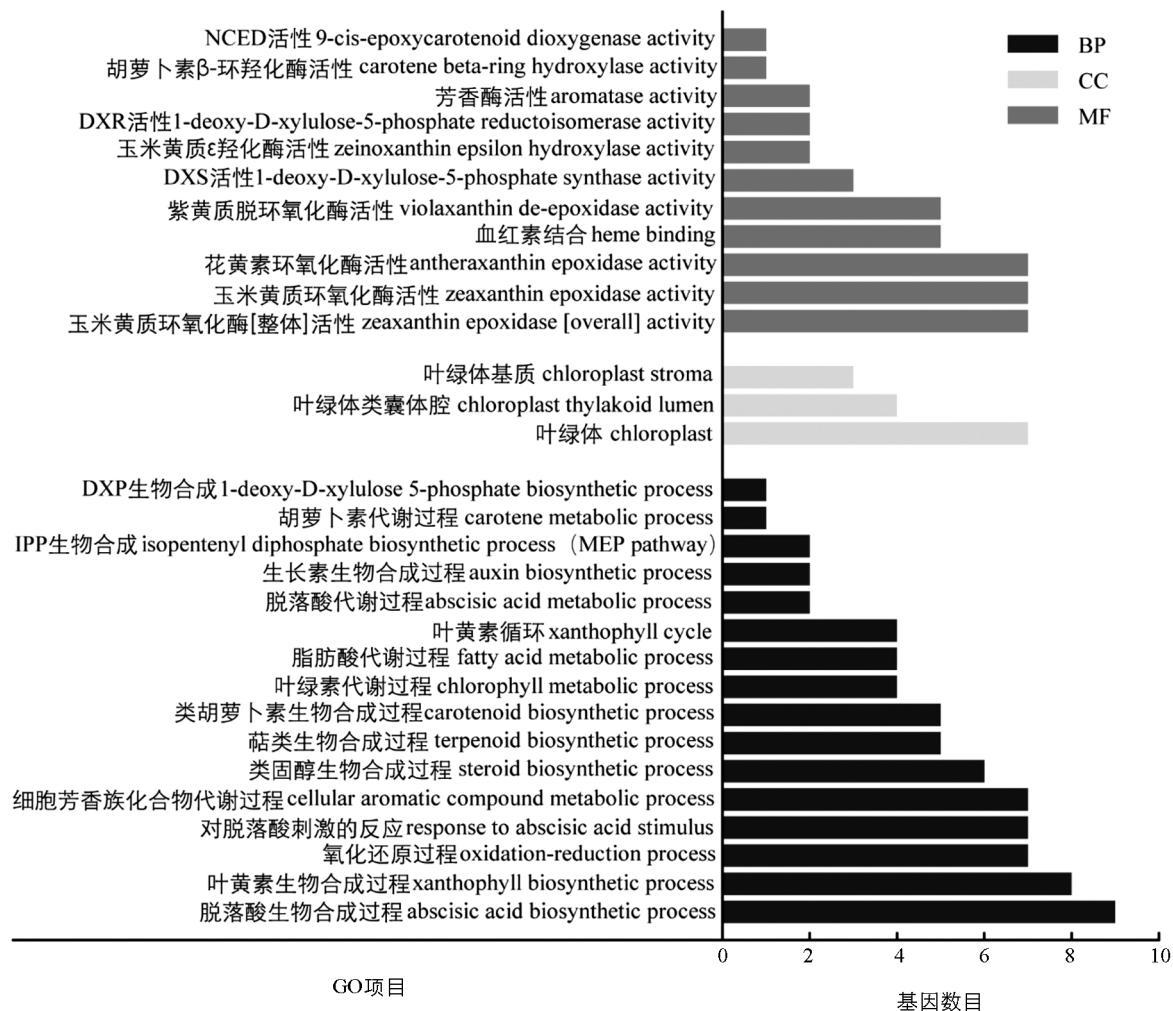


图 4 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢基因表达热图

盛开花与露瓣期相比(OF vs DP), $CpPSY2$ 表达量上调 5.98 倍, $CpBCH1a$, $CpBCH2$ 上调均超过 8.18 倍, 表达差异显著; 衰败期与盛开花相比(SF vs OF), $CpPSY2$ 表达量下调 6.63 倍, $CpNCED3$ 上

调 9.53 倍,表达差异显著。从露瓣期到盛开期,再到衰败期,MEP 途径中的类胡萝卜素底物合成基因 *Cp-DXS1*,*CpDXR*,*CpGGPS1a* 和 *CpGGPS1b* 表达量先升高、后降低;类胡萝卜素合成基因 *CpPSY*,*CpPDS*,*CpZDS*,*CpLCYE*,*CpLCYB2*,*CpBCH1a*,*CpBCH1b* 和 *CpZEP* 表达趋势同样先升高、后降低;*Cp-CYP97C1* 和 *CpCYP97A3* 表达量持续降低;*CpCrtISO*,*CpGGPS1c* 和 *CpIPI3* 表达量先降低,后略升高;*CpLCYB1a* 和 *CpLCYB1b* 几乎不表达,未检测到 *CpZISO* 表达;类胡萝卜素代谢基因 *CpNCED* 和 *CpCCD1b* 表达量持续升高,*CpCCD1a* 则先升高,后降低; β -胡萝卜素代谢基因 *CpBCH1a*,*CpBCH1b* 在盛开期表达量最高,*CpBCH2* 在衰败期表达量最高。

对表达差异显著(\log_2 Fold Changes ≥ 1 或 \log_2 Fold Changes ≤ -1)的基因进行 GO 富集分析,筛选直接或间接参与类胡萝卜素合成与代谢的 GO Terms 作图,结果如图 5 所示。GO Terms 主要富集在生物过程和分子功能上,其中直接参与类胡萝卜素合成及代谢过程的有类胡萝卜素生物合成(carotenoid biosynthetic process)、萜类生物合成(terpenoid biosynthetic process)、叶黄素生物合成(xanthophyll biosynthetic process)、DXS 活性(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase activity)、紫黄质脱环氧化酶活性(violaxanthin de-epoxidase activity)、玉米黄质环氧化酶活性(antheraxanthin epoxidase activity)、叶黄素循环(xanthophyll cycle)及胡萝卜代谢(carotene metabolic)等。



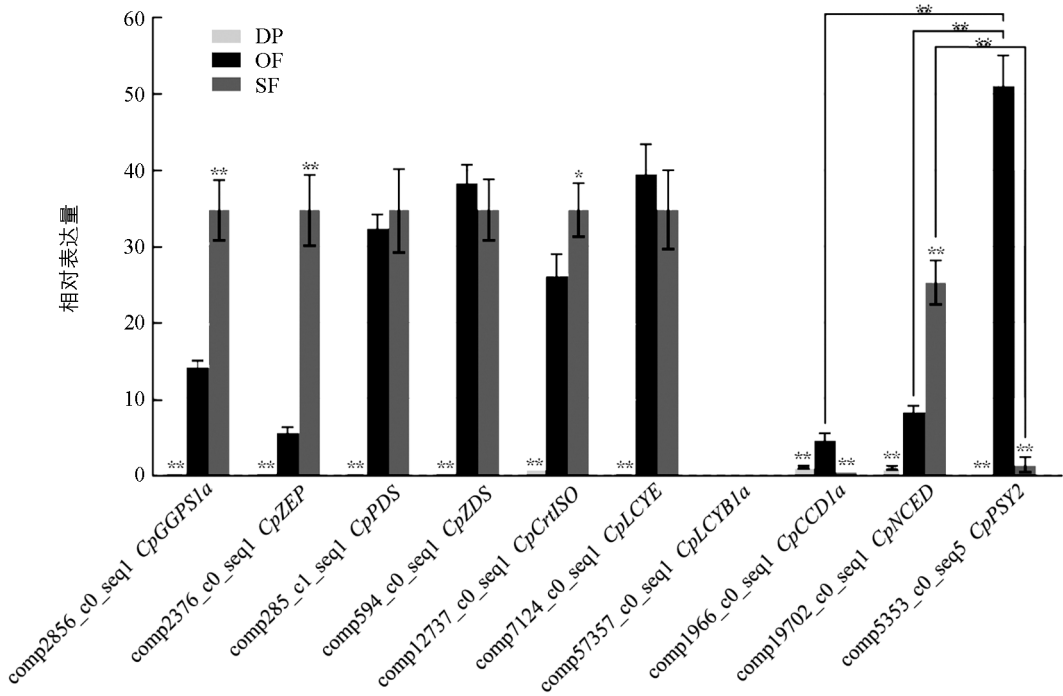
BP: 生物过程; CC: 细胞组成; MF: 分子功能。

图 5 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢基因 GO 富集

2.3 蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢基因相对表达量

为了明确蜡梅不同花发育时期类胡萝卜素合成与代谢相关基因的表达差异,对蜡梅花露瓣期、盛开期、衰败期类胡萝卜素合成与代谢相关基因的表达特性进行 qRT-PCR 验证。结果表明,分析的 10 个基因

在露瓣期表达量均较低,甚至不表达,在盛开期和衰败期表达量较高;在盛开期,*CpPSY2* 表达量极显著高于 *CpNCED* 和 *CpCCD1a*;在衰败期,*CpNCED* 表达量极显著高于 *CpPSY2*;盛开期与露瓣期相比(OF vs DP),除未检测到 *CpLCYB1a* 表达,其他基因相对表达量均具极显著差异,且盛开期均是露瓣期的 4.58 倍以上,其中 *CpPSY2* 表达量上调高达 101.19 倍;衰败期与盛开期相比(SF vs OF),类胡萝卜素合成基因 *CpPSY2* 相对表达量下调高达 63.10 倍,类胡萝卜素代谢基因 *CpCCD1a* 下调 11.60 倍,表达差异极显著(图 6). *CpPSY2*, *CpZDS*, *CpLCYB1a*, *CpLCYE*, *CpCCD1a* 和 *CpNCED* 表达趋势与转录组数据库分析结果基本一致,而另外 4 个基因表达趋势则与分析结果不完全相同(图 4, 图 6);qRT-PCR 结果表明 *CpGGPS1a*, *CpPDS*, *CpZEP* 和 *CpCrtISO* 表达量持续上升,在衰败期达到最高(图 6);而转录组数据库分析结果显示 *CpGGPS1a*, *CpPDS* 和 *CpZEP* 在盛开期表达量最高,衰败期表达量出现下降, *CpCrtISO* 表达量则在盛开期下降(图 4). 值得注意的是,这些基因表达量的变化不会对类胡萝卜素总含量造成影响,只会影响类胡萝卜素不同组分的含量,比如会使 β -胡萝卜素含量降低.



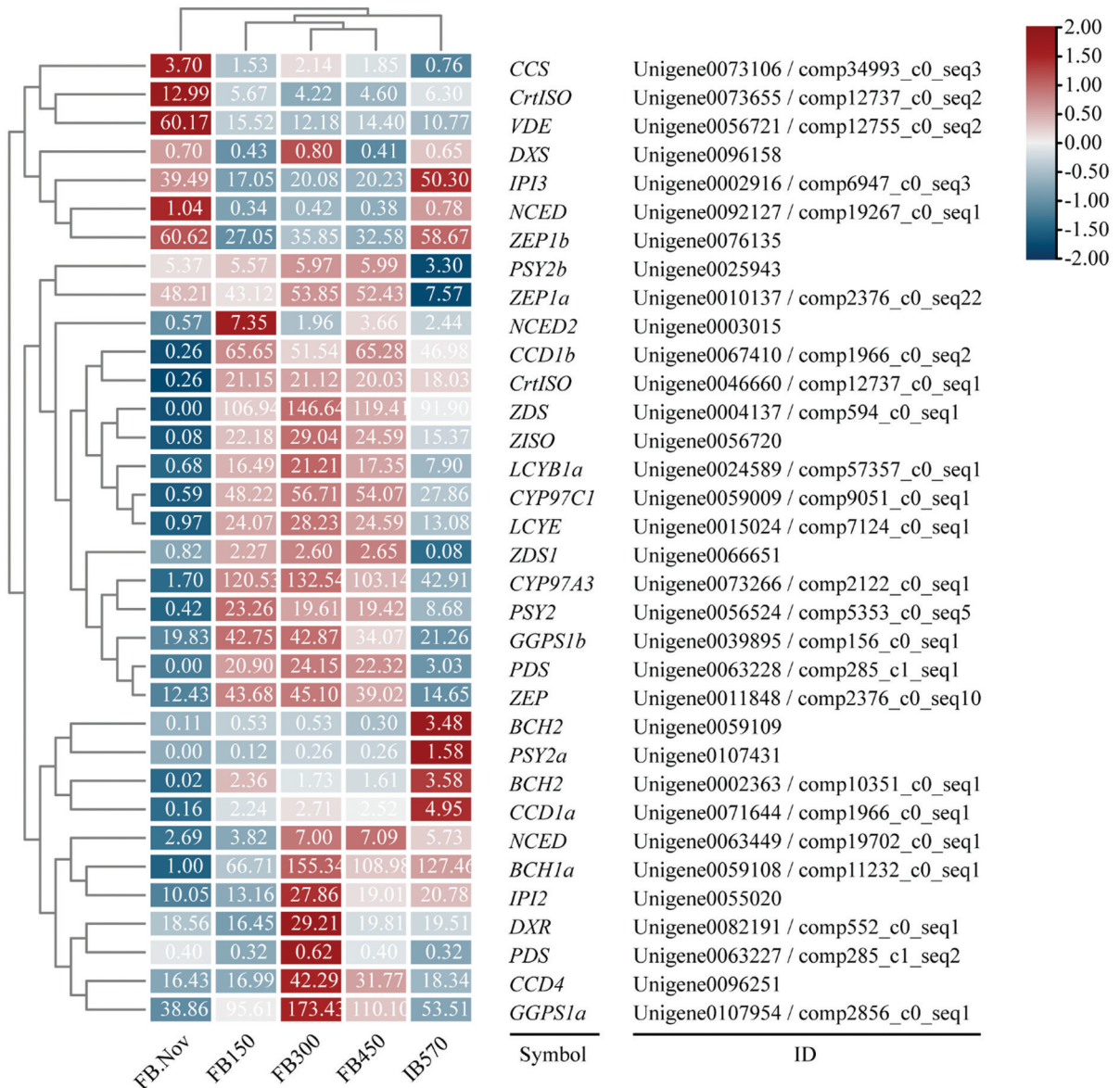
数据为平均值±标准差,相同基因多重比较 OF 为控制组,不同基因多重比较 *CpPSY2* 为控制组,且方差分析用线连接,星号为显著差异(单因素方差分析及 Dunnett 多重比较, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$).

图 6 部分类胡萝卜素合成与代谢基因在蜡梅花不同花发育时期相对表达量分析

2.4 类胡萝卜素合成与代谢基因在不同需冷量积累下的表达模式

低温对多年生植物的生长发育起着重要作用,在蜡梅花发育过程中只有需冷量(chilling requirement, CR)的积累达到 570 CU(chill units, CU)时,蜡梅花蕾(flower bud, FB)才会膨大开放,否则不能开放并逐渐落蕾^[5]. 为了进一步研究不同需冷量处理条件下蜡梅花中类胡萝卜素合成与代谢相关基因的变化,基于低温打破蜡梅花芽休眠并膨大开放的转录组数据库,课题组以蜡梅花不同需冷量处理(150/300/450 CU)的花蕾(FB150/300/450)、11 月份对照花蕾(FB. Nov)及 570 CU 处理可以始花的花蕾(IB570)样品为材料,筛选并分析各样品中类胡萝卜素合成与代谢相关基因的表达差异. 结果表明,随着需冷量的积累, *CpBCH1a*, *CpBCH2*, *CpCCD1a* 和 *CpCCD1b* 表达量增加, *CpCCD4* 表达量短暂升高后降低(图 7),使得 β -胡萝卜素含量下降; *CpLCYB1a* 和 *CpLCYE* 在 FB. Nov 与 IB570 中表达量都很低,但在需冷量积累过程中一直保持高表达量;值得一提的是,类胡萝卜素合成基因 *CpPSY2* 在需冷量积累前低表达,开始需冷量积累后表达量升高,到始花期 IB570 其表达量又出现下降,说明在打破休眠后的始花期之前,类胡萝卜素出现过短暂积累,含量升高;类胡萝卜素代谢基因 *CpNCEDs* 在开始需冷量积累后,表达量也出现了升高,但其表达量低于 *CpPSY2*,因此蜡梅类胡萝卜素含量升高. 样品聚类分析表明,在需冷量积累过程中,

FB150/FB300/FB450 花蕾中类胡萝卜素合成与代谢基因具有相同的表达模式, 而在需冷量积累达到 570 CU 的始花期花蕾样品 (IB570) 中, 类胡萝卜素合成与代谢基因表达模式会发生变化, 以上两种表达模式均不同于低温处理前的对照 FB. Nov (图 7)。



同一基因的两个 ID 分别来自 LI 等^[5]和 LIU 等^[4]数据库。FB. Nov: 11 月份花蕾 (对照), FB150/FB300/FB450: 需冷量 150 CU/300 CU/450 CU 处理下的花蕾, IB570: 需冷量达到 570 CU 始花期花蕾。

图 7 不同需冷量积累下蜡梅类胡萝卜素合成与代谢基因表达热图

2.5 类胡萝卜素相关蛋白互作调控网络预测

基于前期转录组测序结果^[5], 利用 STRING v10 (www.string-db.org) 在线软件, 以拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 为参照, 对低温诱导开花过程中蜡梅类胡萝卜素合成与代谢相关蛋白进行蛋白相互作用网络预测, 明确参与蜡梅类胡萝卜素合成与代谢的蛋白之间的关系及作用通路。预测结果表明, 参与蜡梅类胡萝卜素合成与代谢的蛋白有 CpCCD4, CpPSY2, CpZEP 和 CpCYP97C1 (图 8)。同时, CpPSY2 与 CpGGPS1a 有直接作用关系, CpZEP 与 CpCCD4 有直接作用关系。PSY 作为类胡萝卜素合成的第一个限速酶, 以 GGPP 为底物合成 15-顺式-八氢番茄红素, 而 GGPP 是以 IPP 和 DMAPP 为底物, 在 GGPS 的催化下合成的; CCD2 和 CCD4 可裂解玉米黄质, 分别生成藏红花素 (crocetin/crocinins) 和 β -柠乌素 (β -citraurain)^[26-27], 而 ZEP 可环化玉米黄质生成紫黄质。蛋白互作网络预测结果还表明, CpZEP, CpCCD4, CpC-

YP97C1, CpPSY2 和 CpGGPS1a 可能是代谢通路的功能蛋白以及次生代谢物生物合成的功能蛋白。

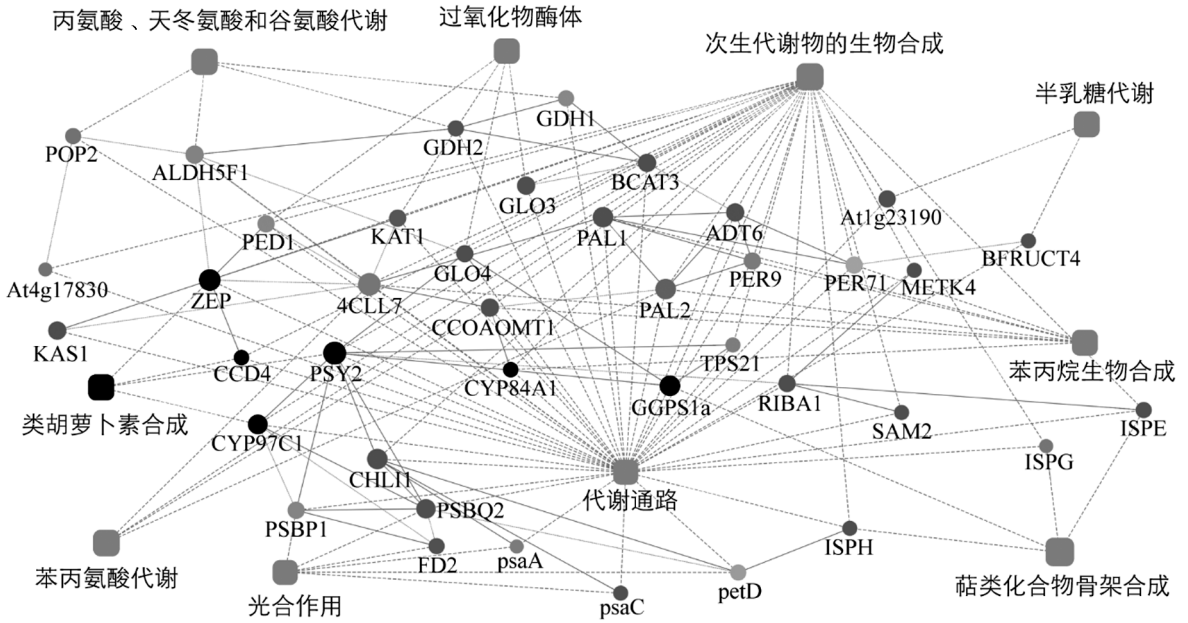


图 8 蜡梅类胡萝卜素合成与代谢蛋白相互作用网络预测

3 讨论

类胡萝卜素的积累途径包括生物合成、降解和质体中的稳定储存, 这些通路都会影响植物组织中类胡萝卜素的最终水平^[18]. 在类胡萝卜素的合成通路中, PSY 是关键限速酶之一, 决定着类胡萝卜素最终的积累水平. 番茄 *Solanum lycopersicum* 因其含有丰富的类胡萝卜素而被广泛种植^[28-29], 转录激活番茄 SIP-SY1 可使其类胡萝卜素生物合成水平显著升高^[30], PSY2 能够弥补 PSY1 功能的损失, 增加类胡萝卜素的积累^[31]. 在蜡梅花发育过程中, 从露瓣期到盛花期, *CpPSY2* 大量表达, 类胡萝卜素得到积累, 含量增加; 在需冷量积累的过程中, *CpPSY2* 表达量也出现了短暂升高, 类胡萝卜素含量短暂增加. 增加 PSY 的作用底物, 也可增加类胡萝卜素的积累水平, 如在 MEP 途径过表达 *DXS* 以提供合成途径初期的中间产物 DXP, 进而增加可利用的 IPP 与 DMAPP 含量. 在拟南芥中过表达 *DXS*, 其类胡萝卜素总积累量达到正常水平的 1.5 倍^[32]. *LCYB* 与 *LCYE* 是将番茄红素转化为胡萝卜素的关键酶, *LCYB* 的表达量影响 β -胡萝卜素的积累. 研究发现, 沉默表达 *TaLCYB* 会降低小麦 *Triticum aestivum* 籽粒 β -胡萝卜素和叶黄素含量, 增加番茄红素含量^[33]. *BCH* 可环羟化 β -胡萝卜素生成玉米黄质, *ZEP* 可环氧化玉米黄质生成紫黄质, 紫黄质去环氧化酶 (violaxanthin de-epoxidase, *VDE*) 可将紫黄质还原成玉米黄质, 它们的相互转化形成了叶黄素循环, 这是保护植物免受光损伤的重要机制^[34]. *BCH* 的表达量显著影响 β -胡萝卜素的积累. 从露瓣期到盛花期, 再到衰败期, *CpBCH* 的高表达是蜡梅 β -胡萝卜素含量降低的主要原因.

NCEDs 和 *CCDs* 属于类胡萝卜素裂解加氧酶家族 (CCO), 是类胡萝卜素代谢的关键酶. 类胡萝卜素通过氧化裂解过程被降解, 产生一种被称为脱辅基类胡萝卜素 (apocarotenoids)^[34] 的代谢产物. 脱辅基类胡萝卜素与花、果实的风味及色泽有关, 在植物激素产生和防御中也起着重要作用. *NCEDs* 只与特定的类胡萝卜素发生反应, 即紫黄质和新黄质, 生成脱落酸 (ABA) 合成的前体物质. 抑制番茄 *SUNCED1* 的表达, 可以增加番茄红素和 β -胡萝卜素的积累^[35]. 从蜡梅花蕾开始需冷量积累, 经膨大开放, 到衰败的整个过程中, *CpNCED* 的表达量持续升高, 至衰败期, *CpNCED* 表达量达到最高是蜡梅类胡萝卜素减少的主要原因, 其花瓣的黄色也较盛花期有所变浅 (图 2); 另外, 在人工低温处理 (需冷量 150 CU, 300 CU, 450 CU, 570 CU) 实验中, 与 11 月份花蕾 (FB. Nov) 相比, 随着需冷量的积累, ABA 含量逐渐升高, 至 570 CU 打破花蕾休眠 (IB570) 时达到最高, 之后在始花期 (IB570)、盛开后 (LB570) 和衰败期 (WP570) ABA 含量逐渐降低^[5]; 从露瓣期到衰败期, β -胡萝卜素含量持续降低 (图 3b), ABA 含量也相应降低^[5]; 推测 *CpNCED* 表达量的差异可能与 ABA 含量的变化直接相关. *CCD1*, *CCD2* 和 *CCD4* 的表达可使花呈现多种多样的色

彩^[36], 其中 *CCD4* 常有较高的表达水平^[37-38], 可使 β -胡萝卜素的累积明显降低, 同时也影响一些植物花和果实的颜色, 常使得花、果实呈现白色、淡黄色^[39-41]. 在菊花 *Chrysanthemum morifolium* 中, *CmCCD4* 的表达被抑制时, 白花突变为黄花^[42]. *CCD1* 可氧化裂解番茄红素、 β -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄质等类胡萝卜素, 生成含 13 个碳且具有挥发性的脱辅基类胡萝卜素, 如 α -紫罗兰酮(α -ionone)、 β -紫罗兰酮(β -ionone)、3-OH- β -紫罗兰酮(3-OH- β -ionone)及假紫罗兰酮(pseudoionone)等^[43-44], 其中 β -紫罗兰酮是一种有显著气味和芳香的物质, 是植物花香的主要成分之一^[45-47]. 玉米 *Zea mays* 自交系关联分析中发现 *ZmCCD1* 拷贝数越高, 类胡萝卜素的含量越低^[48]; 在拟南芥、玉米、番茄等植物中还发现 *CCD1* 可裂解番茄红素生成挥发性香气物质甲基庚烯酮(6-methyl-5-hepten-2-one, MHO)^[49-50]. 在蜡梅花蕾开始需冷量积累, 经膨大开放, 到盛开的过程中, *CpCCD1a* 和 *CpCCD1b* 表达量持续升高, 且 *CpCCD1a* 在盛开期表达量最高, 此时蜡梅香气最为浓郁, 可能与 *CpCCD1a* 氧化裂解 β -胡萝卜素及番茄红素产生芳香物质有关.

4 结论

在蜡梅花发育过程中, 从露瓣期到盛开期, 再到衰败期, 类胡萝卜素总含量先升高、后降低, β -胡萝卜素含量则呈下降趋势. 类胡萝卜素合成基因 *CpPSY2* 在盛开期表达量最高, 在衰败期表达量下降, 同时类胡萝卜素代谢基因 *CpNCEDs* 表达量达到最高. 在这 3 个时期, *CpLCYB* 表达量都不高, *CpBCH1* 和 *CpBCH2* 表达量持续增高, 这种表达模式不仅限制了 β -胡萝卜素含量的增加, 也加速了玉米黄质的积累, 进而影响类胡萝卜素的组分及含量. 通过调控 *CpPSY* 及 *CpLCYB* 的表达, 改变类胡萝卜素的组分和含量, 为人工调控蜡梅花发育不同时期类胡萝卜素的组分及含量提供借鉴和参考.

参考文献:

- [1] SHANG J, TIAN J, CHENG H, et al. The Chromosome-Level Wintersweet (*Chimonanthus praecox*) Genome Provides Insights into Floral Scent Biosynthesis and Flowering in Winter [J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 200-228.
- [2] 王雷, 李玲莉, 王海洋, 等. 重庆市 46 种木本园林植物不同生长型对开花物候的效应 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(11): 86-94.
- [3] SUI S, LUO J, MA J, et al. Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Chimonanthus praecox* (Wintersweet) Flowers for Discovering Stress-Responsive and Floral Development-Related Genes [J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2012(5): 134596-134609.
- [4] LIU D F, SUI S F, MA J, et al. Transcriptomic Analysis of Flower Development in Wintersweet (*Chimonanthus praecox*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86976.
- [5] LI Z N, LIU N, ZHANG W, et al. Integrated Transcriptome and Proteome Analysis Provides Insight into Chilling-Induced Dormancy Breaking in *Chimonanthus praecox* [J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1): 198-207.
- [6] WURTZEL E T. Changing Form and Function through Carotenoids and Synthetic Biology [J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(3): 830-843.
- [7] SUN T, LI L. Toward the 'Golden' Era: The Status in Uncovering the Regulatory Control of Carotenoid Accumulation in Plants [J]. *Plant Science*, 2020, 290(1): 110331-110342.
- [8] ZHENG X, GIULIANO G, AL-BABILI S. Carotenoid Biofortification in Crop Plants: Citius, Altius, Fortius [J]. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(11): 158664-158681.
- [9] YABUZAKI J. Carotenoids Database: Structures, Chemical Fingerprints and Distribution among Organisms [J]. *Database*, 2017(4): 1-11.
- [10] SUN T, YUAN H, CAO H, et al. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(1): 58-74.
- [11] YUAN H, ZHANG J, NAGESWARAN D, et al. Carotenoid Metabolism and Regulation in Horticultural Crops [J]. *Horticulture Research*, 2015, 2(9): 15036-15047.
- [12] GAO L, GONDA I, SUN H, et al. The Tomato Pan-Genome Uncovers New Genes and a Rare Allele Regulating Fruit Flavor [J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(6): 1044-1051.
- [13] UMEHARA M, HANADA A, YOSHIDA S, et al. Inhibition of Shoot Branching by New Terpenoid Plant Hormones [J].

Nature, 2008, 455(7210): 195-200.

- [14] LIU L, SHAO Z, ZHANG M, et al. Regulation of Carotenoid Metabolism in Tomato [J]. Molecular Plant, 2015, 8(1): 28-39.
- [15] EISENREICH W, ROHDICH F, BACHER A. Deoxyxylulose Phosphate Pathway to Terpenoids [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(2): 78-84.
- [16] RODRIGUEZ-CONCEPCION M, BORONAT A. Breaking New Ground in the Regulation of the Early Steps of Plant Isoprenoid Biosynthesis [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 25(6): 17-22.
- [17] MCQUINN R P, WONG B, GIOVANNONI J J. *AtPDS* Overexpression in Tomato: Exposing Unique Patterns of Carotenoid Self-Regulation and an Alternative Strategy for the Enhancement of Fruit Carotenoid Content [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(2): 482-494.
- [18] KIM J E, CHENG K M, CRAFT N E, et al. Over-Expression of *Arabidopsis thaliana* Carotenoid Hydroxylases Individually and in Combination with a Beta-Carotene Ketolase Provides Insight into in Vivo Functions [J]. Phytochemistry, 2010, 71(2/3): 168-178.
- [19] SUN T, TADMOR Y, LI L. Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation, and Storage [J]. Methods in Molecular Biology, 2020, 2083(11): 3-23.
- [20] JIA K P, BAZ L, AL-BABILI S. From Carotenoids to Strigolactones [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(9): 2189-2204.
- [21] VOGEL J, TIEMAN D, SIMS C, et al. Carotenoid Content Impacts Flavor Acceptability in Tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(13): 2233-2240.
- [22] KANG L, PARK S C, JI C Y, et al. Metabolic Engineering of Carotenoids in Transgenic Sweetpotato [J]. Breed Science, 2017, 67(1): 27-34.
- [23] 郝再彬, 苍晶, 徐仲, 等. 植物生理实验 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 46-49.
- [24] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. Tbtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [25] LI S, STRID A. Anthocyanin Accumulation and Changes in Chs and Pr-5 Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* after Removal of the Inflorescence Stem (Decapitation) [J]. Plant physiology and Biochemistry, 2005, 43(6): 521-525.
- [26] DEMURTAS O C, DE BRITO FRANCISCO R, DIRETTO G, et al. ABCC Transporters Mediate the Vacuolar Accumulation of Crocins in Saffron stigmas [J]. Plant Cell, 2019, 31(11): 2789-2804.
- [27] ZHENG X J, ZHU K J, SUN Q, et al. Natural Variation in *CCD4* Promoter Underpins Species-Specific Evolution of Red Coloration in Citrus Peel [J]. Molecular Plant, 2019, 12(9): 1294-1307.
- [28] 岳宁波, 李云洲, 李玉龙, 等. 番茄 SIMAPK6 基因克隆及其表达特性分析 [J]. 南方农业学报, 2020, 51(7): 1625-1633.
- [29] 阙怡, 张基林, 王梦榕, 等. 番茄的酵母双杂交 cDNA 文库构建与评价 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2021, 46(9): 75-80.
- [30] CAO H B, LUO H M, YUAN H, et al. A Neighboring Aromatic-Aromatic Amino Acid Combination Governs Activity Divergence between Tomato Phytoene Synthases [J]. Plant Physiology, 2019, 180(4): 1988-2003.
- [31] JANG S J, JEONG H B, JUNG A, et al. Phytoene Synthase 2 Can Compensate for the Absence of PSY1 in the Control of Color in Capsicum Fruit [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(12): 3417-3427.
- [32] ZHU C F, NAQVI S, BREITENBACH J, et al. Combinatorial Genetic Transformation Generates a Library of Metabolic Phenotypes for the Carotenoid Pathway in Maize [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(47): 18232-18237.
- [33] ZENG J, WANG C, CHEN X, et al. The Lycopene B-Cyclase Plays a Significant Role in Provitamin a Biosynthesis in Wheat Endosperm [J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(5): 112-126.
- [34] HERMANN S A S, ZHOU X, XU Q, et al. Carotenoid Pigment Accumulation in Horticultural Plants [J]. Horticultural Plant Journal, 2020, 6(6): 343-360.
- [35] SUN L, YUAN B, ZHANG M, et al. Fruit-Specific RNAi-Mediated Suppression of *SINCE1* Increases Both Lycopene and B-Carotene Contents in Tomato Fruit [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(8): 3097-3108.
- [36] WANG Y, ZHI Y L, JIN Q M, et al. Discovery of 4-((7h-Pyrrolo [2, 3-D] Pyrimidin-4-Yl) Amino)-N-(4-((4-Meth-

- ylpiperazin-1-YlMethyl)P Henyl)-1h-Pyrazole-3-Carboxamide (Fn-1501), an Flt3- and Cdk-Kinase Inhibitor with Potentially High Efficiency against Acute Myelocytic Leukemia [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(4): 1499-1518.
- [37] LASHBROOKE J G, YOUNG P R, DOCKRALL S J, et al. Functional Characterisation of Three Members of the *Vitis Vinifera* L. Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene Family [J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13(10): 156-173.
- [38] TUAN P A, PARK S U. Molecular Cloning and Characterization of Cdnas Encoding *Carotenoid Cleavage Dioxygenase* in Bitter Melon (*Momordica charantia*) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(1): 115-120.
- [39] OHMIYA A, KISHIMOTO S, AIDA R, et al. Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CmCCD4a) Contributes to White Color Formation in Chrysanthemum Petals [J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 1193-1201.
- [40] JING G X, LI T T, QU H, et al. Carotenoids and Volatile Profiles of Yellow-and Red-Fleshed Papaya Fruit in Relation to the Expression of *Carotenoid Cleavage Dioxygenase* Genes [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 109(11): 114-119.
- [41] NACKE C, HÜTTMANN S, ETSCHMANN M M, et al. Enzymatic Production and In Situ Separation of Natural B-Ionone from B-Carotene [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(12): 1771-1778.
- [42] URESHINO K, NAKAYAMA M, MIYAJIMA I. Contribution Made by the *Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4* Gene to Yellow Colour Fade in Azalea Petals [J]. *Euphytica*, 2016, 207(2): 401-417.
- [43] BAI S L, TUAN P A, TATSUKI M, et al. Knockdown of *Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 (CCD4)* Via Virus-Induced Gene Silencing Confers Yellow Coloration in Peach Fruit; Evaluation of Gene Function Related to Fruit Traits [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, 34(1): 257-264.
- [44] WATANABE K, ODA-YAMAMIZO C, SAGE-ONO K, et al. Alteration of Flower Colour in *Ipomoea Nil* through CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of *Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4* [J]. *Transgenic Research*, 2018, 27(1): 25-38.
- [45] SIMKIN A J, UNDERWOOD B A, AULDRIDGE M, et al. Circadian Regulation of the PhCCD1 Carotenoid Cleavage Dioxygenase Controls Emission of Beta-Ionone, a Fragrance Volatile of *Petunia* Flowers [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136(3): 3504-3514.
- [46] HUANG F C, MOLNÁR P, SCHWAB W. Cloning and Functional Characterization of *Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4* Genes [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(11): 3011-3022.
- [47] SONG M-H, LIM S-H, KIM J K, et al. In Planta Cleavage of Carotenoids by *Arabidopsis* Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 in Transgenic Rice Plants [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2016, 10(5): 291-300.
- [48] VALLABHANENI R, BRADBURY L M, WURTZEL E T. The Carotenoid Dioxygenase Gene Family in Maize, Sorghum, and Rice [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 504(1): 104-111.
- [49] VOGEL J T, TAN B C, MCCARTY D R, et al. The Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 Enzyme Has Broad Substrate Specificity, Cleaving Multiple Carotenoids at Two Different Bond Positions [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(17): 11364-11373.
- [50] ILG A, BRUNO M, BEYER P, et al. Tomato Carotenoid Cleavage Dioxygenases 1a and 1b; Relaxed Double Bond Specificity Leads to a Plenitude of Dialdehydes, Mono-Apocarotenoids and Isoprenoid Volatiles [J]. *FEBS Open Bio*, 2014, 4(6): 584-593.

责任编辑 夏娟