

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.12.007

魏佳琦, 王洪涛, 田雨晨, 等, 苹果 *MdCRTISO* 基因的鉴定与表达模式分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(12): 60-70.

苹果 *MdCRTISO* 基因的鉴定与表达模式分析

魏佳琦, 王洪涛, 田雨晨, 宋煜, 马锋旺, 李翠英

作物抗逆与高效生产全国重点实验室/陕西省苹果重点实验室, 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100

摘要: 类胡萝卜素异构酶(CRTISO)是类胡萝卜素生物合成途径中催化番茄红素由顺式结构向反式结构转变的关键异构酶, 在高等植物和藻类的类胡萝卜素合成途径中发挥着重要作用. 从金冠苹果叶片中克隆了 *MdCRTISO* 基因, 采用生物信息学方法对其编码蛋白的理化性质、保守结构域、亲/疏水性及系统发育关系等进行了分析, 并利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *MdCRTISO* 基因在苹果不同组织和不同胁迫下的表达模式. 结果显示: *MdCRTISO* 基因编码区长度为 2 028 bp, 编码 675 个氨基酸, 该基因的编码蛋白分子量为 74.331 kDa, 为稳定的亲水性蛋白, 定位于叶绿体中. *MdCRTISO* 基因在苹果根、叶、茎、花和果实中均有表达, 其中以在果实和叶片中的表达最为显著. 在盐、碱和低温胁迫下, 该基因表达显著上调, 在 ABA 处理、PEG 胁迫下, 该基因表达显著下调, 表明该基因能响应多种不同的逆境胁迫.

关键词: 苹果; 类胡萝卜素异构酶; 生物信息学; 表达模式

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)12-0060-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification and Expression Analysis of *MdCRTISO* Gene in Apple

WEI Jiaqi, WANG Hongtao, TIAN Yuchen,
SONG Yu, MA Fengwang, LI Cuiying

State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-Efficiency Production / Shaanxi Key Laboratory of Apple,
College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China

Abstract: Carotenoid isomerase (CRTISO) is a key isomerase that catalyzes the conversion of cis-lycopene to all-trans lycopene in the carotenoid biosynthesis pathway, and plays an important role in higher plants

收稿日期: 2024-08-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1600801-3); 大学生创新创业训练计划项目(X202310712067).

作者简介: 魏佳琦, 硕士研究生, 主要从事苹果逆境生物学研究.

通信作者: 李翠英, 博士, 副教授.

and algae. The *MdCRTISO* gene was cloned from the leaves of ‘Golden Delicious’ apple, and the physico-chemical properties, conserved domains, affinity/hydrophobicity and phylogenetic relationship of the encoded protein were analyzed by the bioinformatics methods. The expression of *MdCRTISO* gene in different tissues and under different stresses were detected by Real-time PCR. The results showed that the coding region of *MdCRTISO* gene is 2 029 bp in length, encoding 675 amino acids. The encoded protein of this gene has a molecular weight of 74. 331 kDa, which is a stable hydrophilic protein. The *MdCRTISO* gene is expressed in various tissues such as roots, leaves, stems, flowers and fruits. The expression level is significantly higher in fruits and leaves compared to other tissues. The expression level of this gene is significantly up-regulated under salt, alkali, and low temperature stresses, and significantly down-regulated under ABA treatment and PEG stress, indicating that the gene could respond to a variety of different stresses.

Key words: apple; carotenoid isomerase; bioinformatics; expression pattern

类胡萝卜素是一类重要脂溶性色素的总称, 是由异戊二烯骨架构成的 C40 或 C30 萜类化合物, 也是植物中重要的次生代谢产物^[1]. 类胡萝卜素主要存在于植物叶绿体以及花和果实的有色体内, 是果实色泽形成的重要影响因子. 此外, 类胡萝卜素作为植物激素脱落酸(ABA)等的前体物质, 参与其合成代谢过程^[2]. Havaux 等^[3]证明类胡萝卜素可以充当植物发育和对外界环境的应激反应因子, 参与抵御生物和非生物逆境胁迫.

目前, 类胡萝卜素代谢途径^[1]已基本阐明, 异戊烯焦磷酸(IPP)与二甲基丙烯焦磷酸(DMAPP)缩合, 在牻牛儿苗牻牛儿苗基焦磷酸合酶(GGPPS)的作用下生成前体物质——牻牛儿苗牻牛儿苗基焦磷酸(GGPP). GGPP 在八氢番茄红素合成酶(PSY)、八氢番茄红素脱氢酶(PDS)、6-胡萝卜素异构酶(ZISO)、 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ZDS)和胡萝卜素异构酶(CRTISO)等一系列酶的作用下生成番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质、新黄质等类胡萝卜素, 其中新黄质是 ABA 的合成前体物质. 苹果果实色泽丰富, 有关苹果色泽的研究多集中于花青苷^[4-5], 而类胡萝卜素方面的研究涉及较少. 异构化作用是类胡萝卜素代谢的重要环节, CRTISO 催化顺式番茄红素向全反式番茄红素转变^[6]. Park 等^[7]在拟南芥中定位并克隆了 CRTISO 基因, 证实了 CRTISO 催化多顺式类胡萝卜素异构化为全反式类胡萝卜素. 番茄 tangerine(t)突变体由于 CRTISO 基因突变, 导致原番茄红素积累, 果实呈现橘粉色^[8], 西瓜中 CRTISO 基因突变也导致成熟果实中原番茄红素积累^[9]. 在甜瓜中的研究表明, CRTISO 可以显著提高甜瓜中的叶绿素和类胡萝卜素含量^[10]. CRTISO 是逆境胁迫研究中的潜在目标. 番茄中的 CRTISO 通过增强抗氧化系统活性和刺激次生代谢物的产生提高其对干旱的耐受性^[11]; 在野生红球藻中 CRTISO 也可以显著促进虾青素和植物激素的合成^[12]. 最近的一项研究结果表明小麦中 *TaCRTISO* 可以显著提高小麦的株高和单株穗数^[13]; 水稻中的 ZEBRA2 编码类胡萝卜素异构酶, 在水稻叶片中不仅可以促进类胡萝卜素和叶绿素的合成, 还可以参与光保护, 避免高光下的光氧化损伤^[14], 这种现象同样在芥蓝中被发现^[15]. 拟南芥中 CRTISO 通过影响原片层体(PLBs)的生成影响叶绿体的结构, 进而调节拟南芥光形态的建成和叶绿体的发育^[7]. 这些研究结果证实了 CRTISO 在叶绿素合成以及参与光合作用中发挥重要作用, 表明 CRTISO 在类胡萝卜素、叶绿素和逆境胁迫中具有重要的潜在功能. 在不同苹果基因型果实中类胡萝卜素含量与通路基因的表达分析表明, *MdCRTISO* 的表达与苹果成熟果实中类胡萝卜素积累存在显著相关性^[16].

苹果(*Malus domestica*)是世界四大水果之一, 地域分布极为广泛. 中国是世界上最大的苹果生产国和消费国^[17], 苹果产业是主产区农业农村经济发展的支柱产业^[18]. 但是, 干旱、低温、盐碱等胁迫影响了苹

果植株的生长发育,进而影响苹果产量和品质,对我国苹果产业产生了严重影响.挖掘抗逆基因并解析其生物学功能对苹果产业发展具有重要意义.前期研究发现,苹果果实中 *MdCRTISO* 的表达显著影响类胡萝卜素和 ABA 的合成^[16],但苹果 *MdCRTISO* 基因的特性及其对逆境的响应模式尚未见报道.因此,本研究从金冠苹果叶片中克隆 *MdCRTISO* 基因,采用生物信息学方法对其编码蛋白的理化性质、保守功能域、亲/疏水性、空间结构及系统发育关系等进行分析,并利用实时荧光定量(RT-qPCR)分析 *MdCRTISO* 基因在苹果不同组织和不同胁迫条件下的表达模式,旨在为后续深入研究该基因的功能以及通过基因工程手段培育优良苹果品种奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)用于亚细胞定位,组织特异性分析采用富平楸子(*Malus prunifolia*)的不同组织,包括根、叶、茎、花和果实. PEG 处理采用长势一致、真叶 6~7 片的平邑甜茶(*M. hupehensis*)水培苗,用含 20% PEG 6000 的 1/2 Hoagland 营养液进行处理,之后分别在处理 0 h、6 h、12 h、24 h 采样.盐胁迫处理挑选长势一致、真叶 6~7 片的平邑甜茶水培苗,用含 200 mmol/L NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液进行处理,之后分别在处理 0 h、6 h、12 h、24 h 采样. ABA 处理挑选长势一致、真叶 6~7 片的平邑甜茶水培苗,用含 100 μ mol/L ABA 的 1/2 Hoagland 营养液进行处理,之后分别在处理 0 h、6 h、12 h 和 24 h 采样.低温处理采用生根移栽 30 d 后的嘎啦-3(*M. domestica*, GL-3)组培苗,在 4 $^{\circ}$ C 条件下低温处理,分别在处理 0 h、6 h、12 h 和 24 h 取样.碱胁迫处理挑选长势一致、真叶 6~7 片的平邑甜茶幼苗用 1/2 Hoagland 营养液(用 H₂SO₄ 调 pH 值为 6.0 $\pm$ 0.1)进行水培,预培养 2 周后,用 1 mol/L 的 Na₂CO₃ : NaHCO₃ = 1 : 1(v : v)将营养液 pH 值调到 9.0 $\pm$ 0.1 进行碱胁迫处理,之后分别在处理 0 h、6 h、12 h 和 24 h 采样.所有材料取材后液氮速冻,置于-80 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取及 RT-qPCR

以金冠苹果叶片为材料,采用改良的 CTAB 法提取样品 RNA.然后用一步 RT-qPCR 试剂盒(购自上海生工生物技术有限公司)反转录合成 cDNA.利用 Primer Premier 5.0 设计引物,*MdActin* 作为内参基因^[16](表 1).使用 Light Cyler 实时 PCR 仪器(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA),RT-qPCR 试剂为 SYBR $\text{\textcircled{C}}$ Premix Ex Taq TM II J. 10 μ L 体系如下:引物 F(10 μ mol/L) 0.4 μ L,引物 R (10 μ mol/L) 0.4 μ L, SYBR Premix 5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 3.2 μ L. PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 40 个循环; 37 $^{\circ}$ C 30 s.通过 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法计算基因的相对表达水平.每个处理 3 次生物学重复.

表 1 *MdCRTISO* 基因荧光定量 PCR 和克隆所用引物

基因	引物(5'-3')	用途
<i>MdActin</i>	F: TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT	荧光定量内参
	R: TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC	
<i>MdCRTISO</i>	F: TCACTTGAGGAGCCAATCTACC	荧光定量
	R: GCGAGCTATATCCCCAGCATT	
<i>MdCRTISO</i>	F: ATGGAGATTTATCAGTTTCCCAGT	基因克隆
	R: TCACGCTAATGTCCTTAACCA	

1.2.2 *MdCRTISO* 基因 CDS 的克隆

将提取的金冠苹果叶片 RNA 反转录成 cDNA 作为模板, 然后用 *CRTISO* 的特异性引物进行扩增(表 1). PCR 反应体系为 25 μ L, 模板 1 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, PrimeSTAR Mix 高保真酶 12.5 μ L, 无菌水 9.5 μ L. PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 53 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 生物信息学分析

在 NCBI 下载 *CRTISO* 蛋白序列, 使用 Expasy server(<http://www.expasy.org/tools/>)的 Prot-Param 和 ProScale 工具分析蛋白质的分子量、等电点、亲/疏水性、脂肪族指数等. 利用 SWISS models(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白质三级结构预测, 利用 NCBI 的 CDD 数据库进 *MdCRTISO* 蛋白保守结构域预测. 利用 PlantCare 网站(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)工具分析启动子序列顺式作用元件, 并对顺式作用元件可视化.

1.2.4 同源性分析

利用植物基因组网站 Phytozome(V13)(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)BLASTP 工具, 基于目标基因蛋白序列在梨(*Pyrus spp.*)、梅(*Prunus mume*)、桃(*Prunus persica*)、欧洲甜樱桃(*Prunus avium*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和玉米(*Zea mays*)等不同物种基因组中进行同源序列检索并下载相应序列, 使用 DNAMAN 软件引进行序列相似性比对, 并利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树.

1.2.5 亚细胞定位

将 *MdCRTISO* 基因扩增产物连接到 pCAMBIA2300-GFP 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 测序正确后提取质粒, 并转化农杆菌 GV3101. 将检测正确的菌液接种于 YEP 液体培养基培养 12 h, 再大摇 12 h 至 OD600 为 1.0, 离心后用 10 mmol/L MES 重悬液重悬菌体, 使 OD600 为 0.8~1.0. 注射到烟草叶片中, 侵染 48 h 后, 使用激光共聚焦显微镜(TCSP8-SR, Germany)观察 GFP 荧光.

2 结果与分析

2.1 *MdCRTISO* 基因克隆与生物信息学分析

以反转录金冠苹果叶片 cDNA 为模板, PCR 扩增 *CRTISO* 基因的全长序列, 如图 1a 所示, 琼脂糖凝胶电泳显示在 2 100 bp 左右有清晰、特异的条带. *MdCRTISO* 基因序列号为 MD14G1044400 (LOC103454192), 序列分析结果表明, cDNA 序列全长为 2 028 bp, 预测蛋白分子量为 74.331 kDa, 原子总数 10 473 个, 等电点 pI 为 8.64, 不稳定系数 36.82, 脂肪族指数为 89.21, 带负电荷的残基总数 67, 带正电荷的残基总数 75, 编码 675 个氨基酸. 蛋白质三级结构预测发现 *MdCRTISO* 蛋白包含螺旋、折叠、卷曲等二级结构(图 1b), 且 *MdCRTISO* 是稳定的亲水性蛋白(图 1c). 根据氨基酸序列分析的结果, *MdCRTISO* 具有一个保守的结构域位于 N 端的第 150 至 675 个氨基酸之间(图 1d), 分别是八氢番茄红素脱氢酶相关蛋白(次级代谢物的生物合成、运输和分解代谢)和胡萝卜素异构酶(辅因子、假体组和载体的生物合成及其他).

对 *MdCRTISO* 基因启动子进行顺式作用元件分析, 发现该启动子序列上包含多种不同功能顺式作用元件(表 2). 与植物激素相关的顺式作用元件包括: ABRE、TGA-element、CGTCA-motif、TGACG-motif; 与逆境相关的顺式作用元件包括: ARE、AT-rich element; 同时, 还有大量光响应相关元件如 AE-Box、G-Box、GATA-motif 和 MRE.

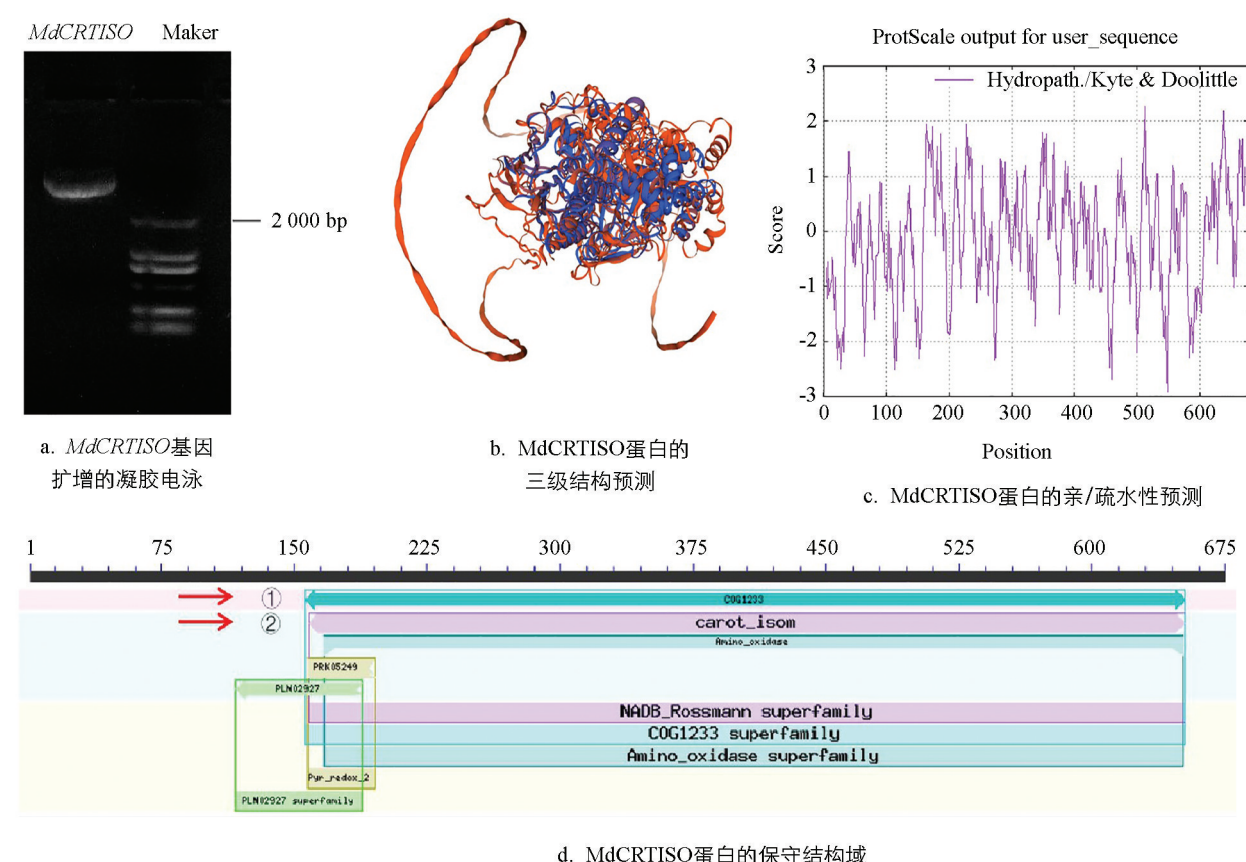


图 1 MdCRTISO 蛋白的理化性质及结构预测

表 2 启动子顺式作用元件分析

顺式作用元件	序列	位置	功能
ABRE	ACGTG	+923, +1 309	参与 ABA 应答
	GCAACGTGTC	-920	
	CACGT	+922	
AE-box	AGAAACAA	+1 628	参与光响应
ARE	AACCA	+139, +1 340, +156	厌氧诱导作用元件
AT-rich element	ATAGAAATCAA	+1 207	富含 AT 的 DNA 结合蛋白的结合位点
CCAAT-box	CAACGG	+1 641	MYBHv1 结合位点
CGTCA-motif	CGTCA	-531, -989, -794	参与 MeJA 反应
G-Box	CACGTG	+922	参与光响应调控
	tgACACGTGGCA	+919	
	TACGTG	- 1 309	
	ACACGTGGC	+921	
	CCACGTAA	+1 308	
GATA-motif	GATAGGA	+1 682	参与部分光响应调控
MRE	AACCTAA	-756	参与光响应 MYB 结合位点
MYB	CAACCA	+358, +609, +541	参与激素和环境应答等
MYB recognition site	CCGTTG	-1 641	MYB 的识别位点

续表 2

顺式作用元件	序列	位置	功能
MYC	CAATTG	+422,	与抗逆相关
	CATGTG	−1 693, +951, +1 477	
	CATTTG	+907	
TGA-element	AACGAC	+1 303	响应生长素
TGACG-motif	TGACG	+531, +989, +794	参与 MeJA 反应

2.2 MdCRTISO 蛋白的同源比对和系统进化树分析

将 MdCRTISO 蛋白与其他物种 CRTISO 蛋白进行氨基酸序列多重比对, 结果如图 2 所示, 苹果 MdCRTISO 蛋白与其他物种 CRTISO 蛋白序列整体相似度为 76.86%, 说明这些蛋白在进化上非常保守, 暗示它们在植物进化过程中发挥重要的作用. 其中, 与梨、梅、欧洲甜樱桃、桃的相似度分别为 90.32%、83.54%、83.13%、81.88%, 表明它们可能具有相似的功能.

基于 10 个植物来源 CRTISO 蛋白构建的系统进化树, 如图 2 所示. 11 个参试物种 CRTISO 基因编码蛋白经聚类可分为两大分支, 玉米和水稻被单独分为一类, 苹果和其他物种被聚在另外一个分支. 其中苹果 MdCRTISO 与梨的 PsCRTISO 亲缘关系最近, 桃、欧洲甜樱桃和梅次之; 甜橙的 CsCRTISO 也与 MdCRTISO 保持较高的亲缘关系; 拟南芥和番茄的 CRTISO 在同一个分支且与苹果 MdCRTISO 保持较高亲缘关系, 而苹果 MdCRTISO 与单子叶植物水稻和玉米 CRTISO 的同源性较远.

2.3 MdCRTISO 亚细胞定位分析

在本氏烟草中瞬时表达 MdCRTISO 蛋白, 分析该蛋白的亚细胞定位情况. 由图 3 可以看出, GFP 对照在整个烟草叶片细胞, 包括细胞质、细胞核、细胞质膜上都能观察到荧光, 而瞬时过表达 MdCRTISO 烟草叶片仅在叶绿体上观察到荧光, 表明 MdCRTISO 蛋白定位于叶绿体.

2.4 MdCRTISO 在苹果不同组织中的特异性表达分析

采用 RT-qPCR 分析 MdCRTISO 基因在苹果不同组织中的相对表达量. 结果表明, MdCRTISO 在苹果根、茎、叶、花和果实中均有表达, 其中在果实和叶片中表达较高, 在花和茎中表达次之, 在根中表达最低(图 4).

2.5 MdCRTISO 在不同逆境下的响应分析

MdCRTISO 启动子上含有多个与逆境相关的顺式元件, 类胡萝卜素作为 ABA 的合成前体, 相关研究表明过表达该基因显著提高 ABA 含量^[16], 为探究 MdCRTISO 基因对不同胁迫的响应, 对苹果在盐碱、低温、干旱等多种胁迫下的表达响应模式进行了分析. 研究结果表明, MdCRTISO 在 12 h 和 24 h 均能显著响应盐胁迫, 盐胁迫 24 h 时其表达量上调到 3.12 倍. MdCRTISO 在 6 h、12 h 和 24 h 均能显著响应低温胁迫, 低温胁迫 24 h 其表达量上调到 3.56 倍. MdCRTISO 在 6 h、12 h 和 24 h 均能响应碱胁迫, 碱胁迫 12 h 时其表达量达到最高值, 为 0 h 的 1.95 倍. MdCRTISO 在 6 h、12 h 和 24 h 均能显著响应干旱胁迫, 干旱胁迫 12 h 时其表达量达到最低值, 仅为 0 h 的 41%. MdCRTISO 在 6 h、12 h 和 24 h 均能显著响应 ABA 胁迫, ABA 胁迫 24 h 时其表达量下调到 0 h 的 30%(图 5). 以上结果表明 MdCRTISO 可能参与盐、低温、碱、干旱和 ABA 胁迫的响应.

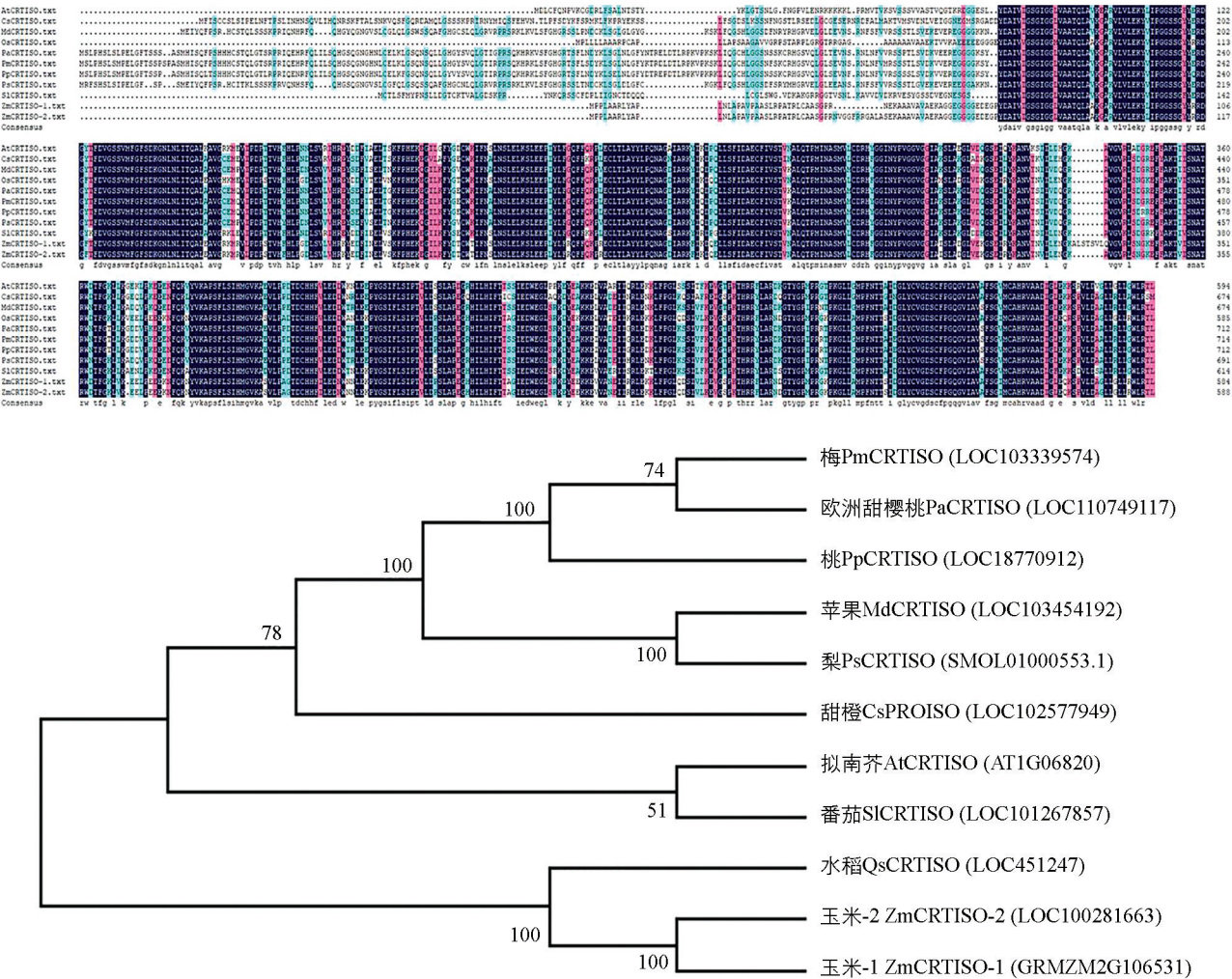


图 2 CRTISO 氨基酸序列的多重比对与不同物种 CRTISO 蛋白的进化树分析

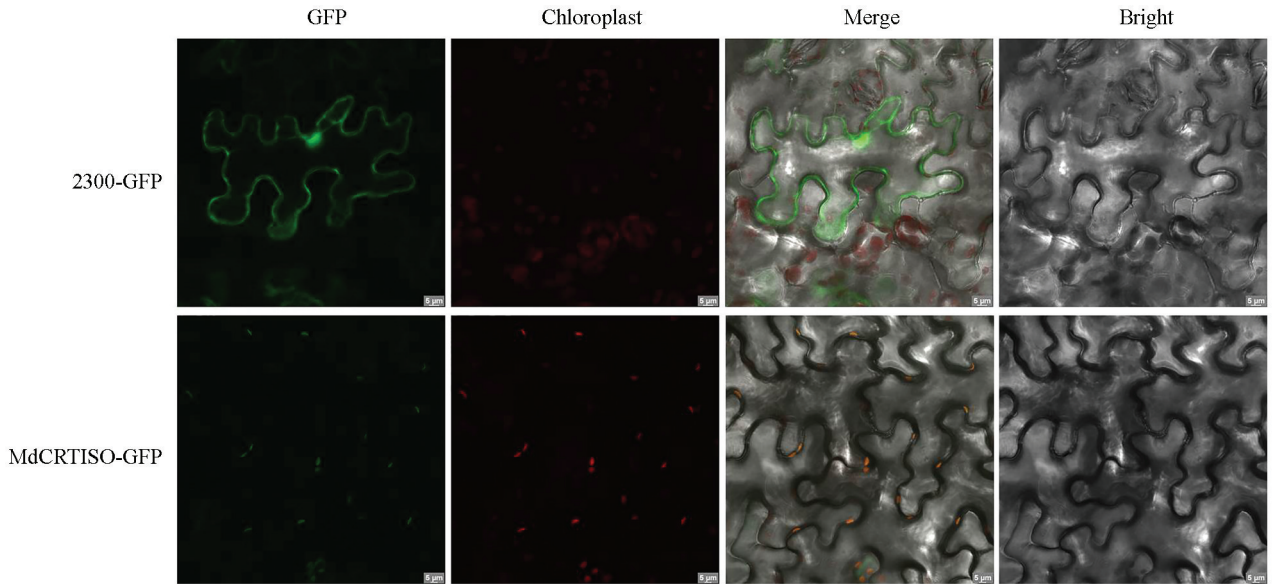


图 3 MdCRTISO 亚细胞定位

3 结论与讨论

类胡萝卜素不仅是决定果实营养价值的重要指标, 作为果实的主要呈色色素, 同时也是影响果实外观品质的重要因素. 研究表明类胡萝卜素可以通过清除植物体内的活性氧来降低氧化胁迫对植物造成的伤害^[19]. 随着类胡萝卜素合成代谢研究的深入, 植物类胡萝卜素代谢途径中的酶和基因已被广泛研究. 例如, 从柚转录组数据筛选得到

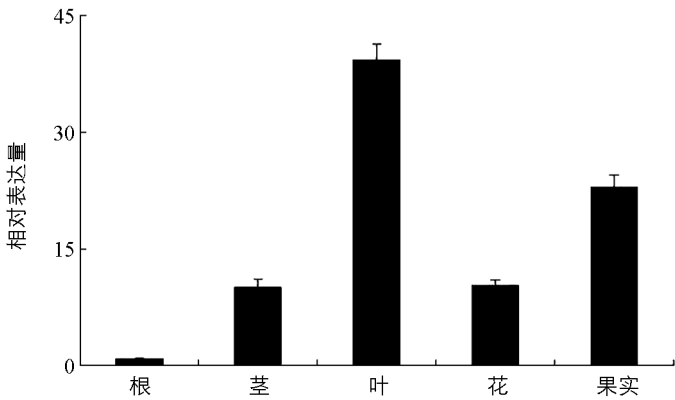


图 4 *MdCRTISO* 基因在苹果不同组织中的表达模式

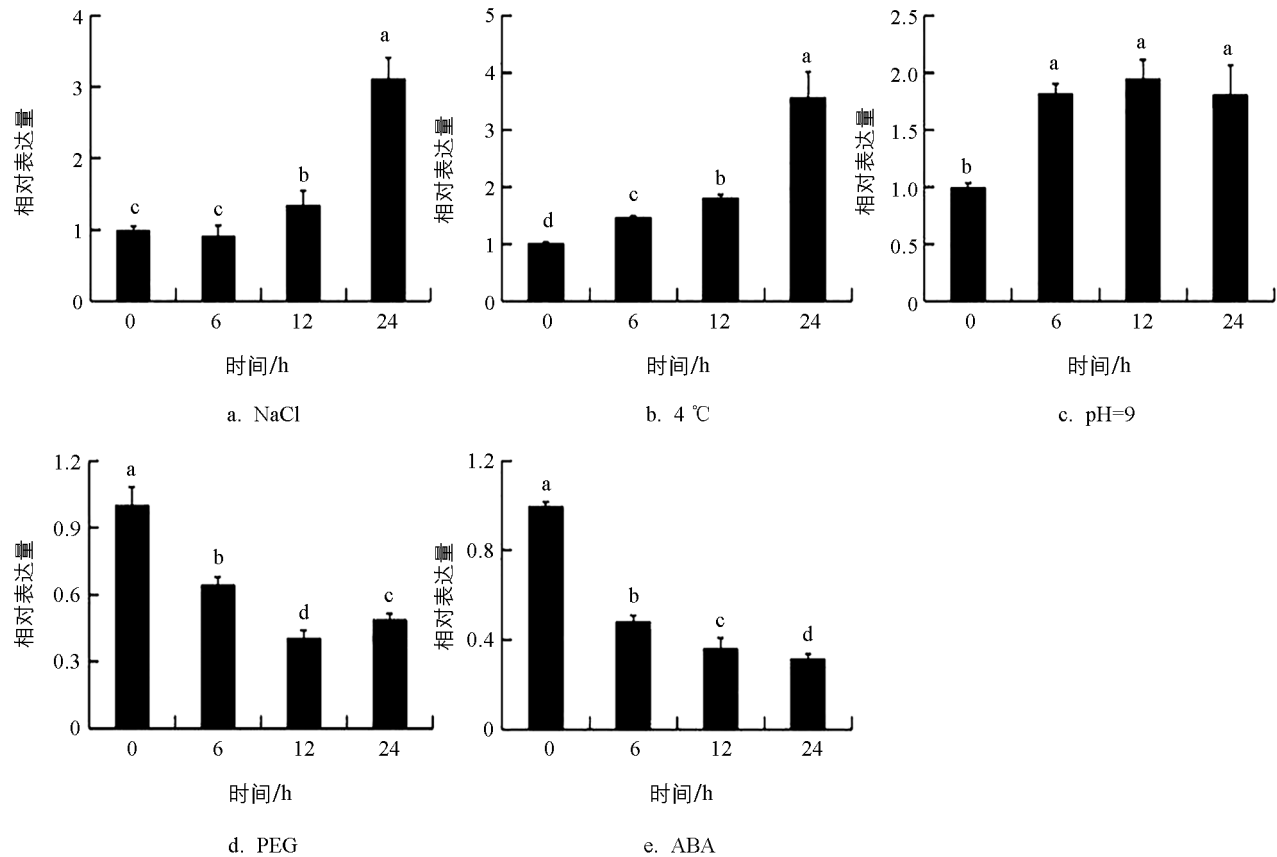


图 5 *MdCRTISO* 在不同逆境胁迫下的表达模式

CmPSY、*CmPDS*、*CmZDS* 和 *CmLCYB* 等参与蜜柚类胡萝卜素合成途径关键酶基因的序列, 并进行了表达分析^[20]. 香蕉中负责编码类胡萝卜素羟化酶 CYP97A3 的 *LUT5* (Lutein deficient 5) 基因, 在果肉类胡萝卜素途径中起正调控作用, 能促进类胡萝卜素形成^[21]. 苹果果实中, *PSY1* 过表达增加了类胡萝卜素含量, 且 *PSY1* 过表达在一定程度上可减少套袋避光对类胡萝卜素含量的影响^[22]. 这些研究表明类胡萝卜素在果实品质与逆境响应中具有很好的应用潜力.

CRTISO 是催化顺式番茄红素向全反式番茄红素转化的关键酶. 番茄中 *SlCRTISO* 在叶片和成熟果实中表达水平最高, 且在叶片中胡萝卜素的含量与 *CRTISO-L1* 和 *CRTISO-L2* 的表达水平呈正相关^[23], 这些结果同样在烟草和苹果中得到了验证^[16,24-25], 表明 *CRTISO* 是类胡萝卜素生物合成的关键

酶,且 *CRTISO* 可以显著促进苹果类胡萝卜素和 ABA 的合成.柑橘 *CRTISO* 基因的表达能够恢复柑橘突变体类胡萝卜素的生物合成^[26].三角褐指藻中的研究表明 *CRTISO* 基因表达量与岩藻黄素含量呈线性关系,表明三角褐指藻岩藻黄素的生物合成是通过调控 *CRTISO* 基因的表达来实现的^[27].同样,枸杞中的 *LcCRTISO* 过表达显著增加了转基因烟草中类胡萝卜素的积累,增强了烟草光合作用和对盐胁迫的耐受性^[25],表明 *LcCRTISO* 可能通过影响类胡萝卜素的合成间接影响植物的光合作用,进而提高植物对胁迫的耐受性;在芥蓝中敲除 *CRTISO* 基因会导致其叶绿素和类胡萝卜素的含量大幅下降,导致其对逆境胁迫的耐受性降低^[15];水稻中的 *CRTISO* 已经被证明显著影响光合作用^[14].这些研究结果显示 *CRTISO* 作为潜在因子在类胡萝卜素合成、ABA 合成、叶绿素合成和光合作用中起到重要功能.本研究在 GL-3 苹果幼苗中外源施加 ABA,分别在 6 h、12 h、24 h 发现 *CRTISO* 表达受到显著抑制,这种抑制可能是 ABA 的过量引起的反馈调节导致,这个结果与 *CRTISO* 可以显著促进 ABA 合成的结果是一致的^[16];此外,本研究还发现 *MdCRTISO* 的表达显著受到 NaCl 和 4 °C 处理的诱导,表明 *MdCRTISO* 响应低温和盐胁迫,推测在盐胁迫和低温胁迫存在的情况下,机体的免疫调控机制诱导 ABA 的增加和光合作用的增强来抵御胁迫环境,而这种机制的实施需要 *CRTISO* 的超量表达来实现,具体的分子机制需要更加深入的研究.这些研究结果均表明 *CRTISO* 是提高苹果对盐和低温处理的潜在因子.有趣的是,在 PEG 处理 6 h、12 h、24 h 条件下, *MdCRTISO* 表达均下调,这可能是受到不同的调节机制所致.以上研究均表明 *CRTISO* 是类胡萝卜素的生物合成中的关键限速酶,且该基因在提高植物对胁迫的耐受性中发挥潜在的功能,这为植物类胡萝卜素与逆境胁迫协同研究提供了一定参考.

RT-qPCR 分析表明 *MdCRTISO* 基因在苹果根、叶、花和果实等各组织中均有表达,但在叶和果实中高度表达,暗示 *MdCRTISO* 在苹果不同组织部位可能具有不同的生物学功能. *MdCRTISO* 在苹果叶片中的高表达表明 *CRTISO* 在叶片光合作用以及类胡萝卜素——叶绿素稳态中可能发挥更重要的作用. *MdCRTISO* 在苹果果实中的高表达表明 *CRTISO* 在果实类胡萝卜素合成中具有重要功能.

启动子顺式作用元件是基因功能的重要组分,反映基因潜在的功能和调控途径.本研究中,苹果 *MdCRTISO* 基因启动子的顺式作用元件可分为激素响应、胁迫响应和生长发育相关等 3 类,其中有大量响应生长发育和逆境相关的元件(如 ABRE、TGA-element、ARE、AT-rich element),暗示该基因在植物生长发育和逆境胁迫响应中可能发挥着不同的作用.本研究发现在盐胁迫和冷胁迫下 *MdCRTISO* 转录水平均显著上调,在 ABA 处理和干旱胁迫下均显著下调,这些结果初步说明, *MdCRTISO* 基因可能受多种逆境胁迫诱导,具体分子机制有待进一步研究.

本研究利用生物信息学方法分析 *MdCRTISO* 基因结构、理化性质、顺式元件和系统进化等,并检测了 *MdCRTISO* 基因在不同组织和不同逆境胁迫下的表达,为苹果 *MdCRTISO* 基因的功能研究奠定了一定的科学基础,关于 *MdCRTISO* 在苹果类胡萝卜素积累和逆境响应中的功能及其分子调控机制将有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 陆晨飞,高月霞,黄河,等.植物类胡萝卜素代谢及调控研究进展[J].园艺学报,2022,49(12):2559-2578.
- [2] GOMEZ-ROLDAN V, FERMA S, BREWER P B, et al. Strigolactone Inhibition of Shoot Branching [J]. Nature,

2008, 455(7210): 189-194.

[3] HAVAUX M. Carotenoid Oxidation Products as Stress Signals in Plants [J]. The Plant Journal, 2014, 79(4): 597-606.

[4] ZHENG J, LIU L B, TAO H H, et al. Transcriptomic Profiling of Apple Calli with a Focus on the Key Genes for ALA-Induced Anthocyanin Accumulation [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 640606.

[5] HU Y J, CHENG H, ZHANG Y, et al. The MdMYB16/MdMYB1-miR7125-MdCCR Module Regulates the Homeostasis between Anthocyanin and Lignin Biosynthesis during Light Induction in Apple [J]. New Phytologist, 2021, 231(3): 1105-1122.

[6] BREITENBACH J, VIOQUE A, SANDMANN G. Gene *Sll0033* from *Synechocystis* 6803 Encodes a Carotene Isomerase Involved in the Biosynthesis of All-E Lycopene [J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, Journal of Biosciences, 2001, 56(9-10): 915-917.

[7] PARK H, KREUNEN S S, CUTTRISS A J, et al. Identification of the Carotenoid Isomerase Provides Insight into Carotenoid Biosynthesis, Prolamellar Body Formation, and Photomorphogenesis [J]. The Plant Cell, 2002, 14(2): 321-332.

[8] EFREMOV G I, DZHOS E A, ASHIKHMIN A A, et al. Effect of the Carotenoid Content and Activity of the Carotene Cis-Trans Isomerase CRTISO on Tomato Fruit Color [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2022, 69(4): 64.

[9] JIN B K, LEE J, KWEON S, et al. Analysis of Flesh Color-Related Carotenoids and Development of a CRTISO Gene-Based DNA Marker for Polycopene Accumulation in Watermelon [J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2019, 60(3): 399-410.

[10] GALPAZ N, BURGER Y, LAVEE T, et al. Genetic and Chemical Characterization of an EMS Induced Mutation in Cucumis Melo CRTISO Gene [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2013, 539(2): 117-125.

[11] NEYSANIAN M, IRANBAKHSH A, AHMADVAND R, et al. Selenium Nanoparticles Conferred Drought Tolerance in Tomato Plants by Altering the Transcription Pattern of *microRNA-172* (*miR-172*), *bZIP* and *CRTISO* Genes, Upregulating the Antioxidant System, and Stimulating Secondary Metabolism [J]. Protoplasma, 2024, 261(4): 735-747.

[12] LI L M, CHEN Z, ACHEAMPONG A, et al. Low-Temperature Plasma Promotes Growth of *Haematococcus Pluvialis* and Accumulation of Astaxanthin by Regulating Histone H3 Lysine 4 Tri-Methylation [J]. Bioresource Technology, 2022, 343: 126095.

[13] YAN Q, LU Y, PANG Y L, et al. *TaCRTISO* Dosage Modulates Plant Height and Spike Number Per Plant in Wheat [J]. Plant Physiology, 2024, 194(4): 2208-2212.

[14] CHAI C L, FANG J, LIU Y, et al. ZEBRA2, Encoding a Carotenoid Isomerase, Is Involved in Photoprotection in Rice [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(3): 211-221.

[15] SUN B, JIANG M, ZHENG H, et al. Color-Related Chlorophyll and Carotenoid Concentrations of Chinese Kale Can Be Altered through CRISPR/Cas9 Targeted Editing of the Carotenoid Isomerase Gene *BoaCRTISO* [J]. Horticulture Research, 2020, 7(1): 161.

[16] WANG H T, TIAN Y C, LI Y X, et al. Analysis of Carotenoids and Gene Expression in Apple Germplasm Resources Reveals the Role of *MdCRTISO* and *MdLCYE* in the Accumulation of Carotenoids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(41): 15121-15131.

[17] 张强强, 霍学喜, 刘军弟, 等. 世界苹果产销格局及市场动态预测分析 [J]. 世界农业, 2016(7): 147-152, 248.

- [18] 马锋旺. 中国苹果产业发展的思考——现状、问题与出路 [J]. 落叶果树, 2023, 55(4): 1-4.
- [19] LADO J, RODRIGO M J, LÓPEZ-CLIMENT M, et al. Implication of the Antioxidant System in Chilling Injury Tolerance in the Red Peel of Grapefruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 111: 214-223.
- [20] 余磊, 潘腾飞, 张蒙, 等. ‘三红蜜柚’果实类胡萝卜素合成途径部分酶基因的克隆及表达分析 [J]. 热带作物学报, 2018, 39(10): 1990-1998.
- [21] 陈莹, 薛丙涛, 李志英, 等. 香蕉类胡萝卜素羟化酶基因 MaLUT5 克隆与分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(8): 2499-2507.
- [22] AMPOMAH-DWAMENA C, TOMES S, THRIMAWITHANA A H, et al. Overexpression of *PSY1* Increases Fruit Skin and Flesh Carotenoid Content and Reveals Associated Transcription Factors in Apple (*Malus × domestica*) [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 967143.
- [23] EFREMOV G I, SHCHENNIKOVA A V, KOCHIEVA E Z. Functional Diversification of the Carotenoid-Cis-Trans-Isomerases CrtISO, CrtISO-L1, and CrtISO-L2 in Tomato Species (*Solanum*, Section *Lycopersicon*) [J]. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2022, 507(1): 340-344.
- [24] AMPOMAH-DWAMENA C, DEJNOPRAT S, LEWIS D, et al. Metabolic and Gene Expression Analysis of Apple (*Malus × domestica*) Carotenogenesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(12): 4497-4511.
- [25] LI C, JI J, WANG G, et al. Over-Expression of *LcPDS*, *LcZDS* and *LcCRTISO*, Genes from Wolfberry for Carotenoid Biosynthesis, Enhanced Carotenoid Accumulation, and Salt Tolerance in Tobacco [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 119.
- [26] PINHEIRO T T, PERES L E P, PURGATTO E, et al. Citrus Carotenoid Isomerase Gene Characterization by Complementation of the “Micro-Tom” Tangerine Mutant [J]. Plant Cell Reports, 2019, 38(5): 623-636.
- [27] 管悦琳, 龚一富, 朱帅旗, 等. 三角褐指藻 *crtiso* 基因克隆与表达调控研究 [J]. 核农学报, 2018, 32(11): 2098-2106.

责任编辑 王新娟