

柑橘 β -柠乌素积累及其调控研究进展

王莎莎, 栾雨婷, 徐昌杰*

(浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310058)

摘要: 色泽是果实外观品质的重要指标, 类胡萝卜素是柑橘等成熟果实的特征色素, 其积累影响果实外观。 β -柠乌素是一种红色类胡萝卜素, 在柑橘成熟果实红色色泽形成中起着重要作用。笔者从 β -柠乌素物理化学特性、在柑橘中的分布、合成途径、关键基因类胡萝卜素裂解双加氧酶4(CCD4)、影响/调控积累的果实发育阶段、温度、乙烯和GA₃等内外因子等方面综述了柑橘 β -柠乌素积累及其调控研究进展, 并对未来研究热点作了展望, 以期为增进柑橘果实色泽提供参考。

关键词: 柑橘; β -柠乌素; 类胡萝卜素; 类胡萝卜素裂解双加氧酶4基因(CCD4)

中图分类号: S666.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)06-0760-09

Research progress in the regulation of β -citraurin accumulation in citrus fruits

WANG Shasha, LUAN Yuting, XU Changjie*

(Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: Color is an important attribute for external fruit quality and carotenoids are responsible for the color of some fruits including citrus. β -citraurin is a red carotenoid, and its presence in citrus fruits plays an important role in generating the red fruit color. In this paper, we review the progress in research on the accumulation and regulation of β -citraurin production in citrus fruits. β -citraurin is a C₃₀ carotenoid, which is different from other common plant C₄₀ carotenoids. It was first reported in 1936 in the peel of an orange and thereafter in various other citrus fruits. β -citraurin contains nine conjugated C=C bonds and a C=O group in its molecule, which is responsible for producing the red color of this pigment, with a maximum absorption around 456 to 462 nm. Chromatographically, β -citraurin R_f (for TLC) or retention time (for HPLC) are close to some xanthophylls such as 9-cis-violaxanthin, a predominant carotenoid in citrus peel, and therefore the presence of β -citraurin should be carefully evaluated during analysis to avoid the overlap of HPLC peaks from other compounds. β -citraurin has been reported in various citrus, especially sweet oranges, clementines and mandarins, and can sometimes account for as much as 40% of total carotenoids. However, it is primarily restricted to some citrus and its peel tissues and accumulation is rarely reported in other plants apart from genus Citrus. β -citraurin is generated from the oxidative cleavage of two common C₄₀ carotenoids, β -cryptoxanthin and zeaxanthin, catalyzed by carotenoid cleavage dioxygenase4 (CCD4), as reported by two recent studies in clementine and Satsuma mandarin. CCD4 is a member of the CCD/NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) family, which encodes enzymes catalyzing oxidative cleavage of C₄₀ carotenoids. In Arabidopsis, nine CCD/NCEDs have been identified according to their cleavage positions and substrates. CCD1 can result in the formation of aromatic apocarotenoids; CCD7 and CCD8 are involved in the generation of the apocarotenoid hormone strigolactones; NCEDs (NCED2, NCED3, NCED5, NCED6, NCED9) partici-

收稿日期: 2017-11-13

接受日期: 2018-04-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0401303)

作者简介: 王莎莎, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果实品质生物学。Tel: 0571-88982223, E-mail: 397100482@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0571-88982289, E-mail: chjxu@zju.edu.cn

pate in ABA biosynthesis. The CCD4 enzymes catalyze the degradation of carotenoids, which is the same as CCD1, but are targeted to plastids rather than cytosol as with CCD1. Previously CCD4 has been reported to be responsible for the white petal color of a chrysanthemum, the white appearance of a potato tuber and the fruit flesh of various peaches where the symmetrical cleavage of the carotenoids at positions 9, 10 and 9', 10' results in production of only colorless apocarotenoids. In citrus, however, the cleavage catalyzed by CCD4 occurs asymmetrically at either positions 7, 8 or 7', 8' and therefore produces a C₃₀ apocarotenoid, i.e., β -citraurin. Only one CCD4 is present in Arabidopsis but there are five in citrus with different expression profiles. Among them, CCD4b1 has the strongest expression in the peel and was confirmed to be the member responsible for the biosynthesis of β -citraurin. The accumulation of β -citraurin is influenced by various intrinsic or external factors. First, accumulation starts only when the fruit is mature and approaching the color turning stage; secondly, the accumulation is favored by moderate temperatures from 12 to 24 °C, while is inhibited under either a higher temperature (around 30 °C) or lower temperature (around 5 °C); finally, ethylene promotes the biosynthesis of β -citraurin while GA₃ inhibits its production. In summary, progress in understanding the profiles and underlying mechanisms of accumulation and regulation of β -citraurin in citrus fruits has been recently achieved. Further efforts should be focused on the mechanisms for the unique presence of this pigment in only some citrus species and cultivars and only in peel tissues, and on how the expression of CCD4b1 is regulated.

Key words: *Citrus*; β -citraurin; Carotenoid; Carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4)

β -柠乌素(β -citraurin)是一种具有30个C原子的类胡萝卜素,在常见植物类胡萝卜素中其红色程度仅次于番茄红素。 β -柠乌素在克里曼丁、甜橙等多种柑橘果皮中存在,有时甚至达类胡萝卜素总量的30%,使得柑橘果皮呈现鲜艳的红色^[1-3]。由于色泽是果实品质的重要外观指标, β -柠乌素积累对于提高柑橘果实外观品质、吸引消费者具有重要作用。

β -柠乌素于1936年在柑橘果皮中首次发现^[4]。之后陆续有零星研究对其理化特性和分布情况及影响因素进行报道,近来催化该色素合成的关键基因也得到鉴别,但这些进展未见专门集中的总结。因此,笔者结合自身研究发现,介绍柑橘 β -柠乌素积累及其调控研究的最新进展,探讨可行的促进 β -柠乌素积累的措施以及未来的研究趋势和主题。

1 β -柠乌素的发现与特性

β -柠乌素于1936年首次在一种橙的果皮中发现^[4],之后陆续在多种柑橘上报道。 β -柠乌素属于类胡萝卜素的一种,与常见的具40个C原子的C₄₀类胡萝卜素不同,它为C₃₀分子(具有30个C原子),是C₄₀类胡萝卜素的降解产物(统称为阿朴类胡萝卜素,apocarotenoid)的一种。 β -柠乌素的分子结构如表1所示,与C₄₀类胡萝卜素不同,该色素分子具有1个

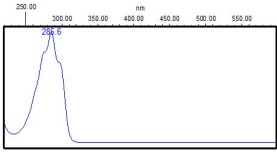
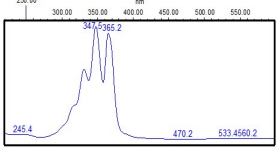
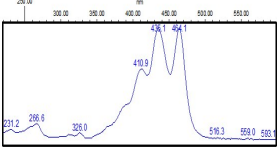
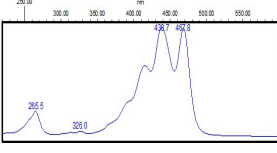
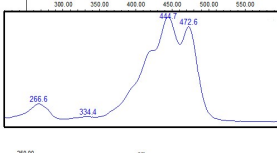
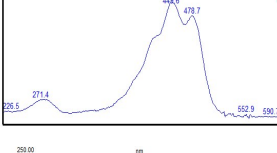
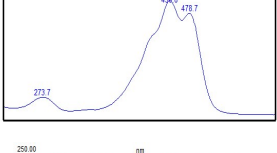
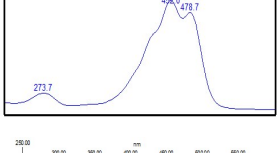
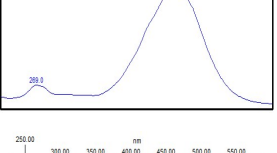
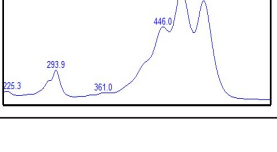
醛基,这使得它更易被氧化,因而在提取时常需加入2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)等抗氧化剂^[2]。

类胡萝卜素可分为有色类胡萝卜素和无色类胡萝卜素2类。类胡萝卜素分子的颜色因共轭双键(由1个单键隔开的2个碳碳双键,C=C-C=C)数目以及具体结构(如共轭双键是否延伸到环上,是否存在C=O双键等)不同而存在差异。共轭双键数目为7个的类胡萝卜素分子可呈现颜色,数目越多,颜色越偏向红色。C=O双键的存在使最大吸收波长发生红移,同时使吸收光谱不再呈现常见类胡萝卜素的两峰或三峰型^[5]。 β -柠乌素具有9个共轭双键和1个C=O双键,其最大吸收波长在460 nm左右,其红色程度在柑橘常见类胡萝卜素中仅次于番茄红素(表1)。值得一提的是,由于 β -柠乌素分子中的C=O双键使得吸收光谱呈现钝峰型,最大吸收波长判断常受所处溶剂(HPLC流动相)影响,因此,在不同研究中报道的最大吸收波长存在一定的差异,有456 nm^[6]、457 nm^[7]、458 nm^[3]、460 nm^[2]、462 nm^[8-9]等。

与其他类胡萝卜素类似, β -柠乌素不溶于水而易溶于乙酸乙酯等有机溶剂。但由于 β -柠乌素分子较小,且所含醛基中的C=O双键具有相对较强的极性,因此,薄层层析(TLC)分析时的R_f以及HPLC分析时的保留时间常与极性相对较强的类胡萝卜素接

表 1 柑橘常见类胡萝卜素的理化特征

Table 1 The physical and chemical characteristics of common carotenoids in citrus

类胡萝卜素 Carotenoid	分子式 Molecular formula	结构式 Structural formula	吸收光谱 Absorption spectrum	最大吸收波长 ^[3] λ_{\max}	颜色 Color
八氢番茄红素 Phytoene	C ₄₀ H ₆₄			286	无色 Colorless
六氢番茄红素 Phytofluene	C ₄₀ H ₆₂			331, 348, 365	无色 Colorless
9-顺-苜蓿黄质 9-cis-Violaxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	HO O		411, 435, 464	黄 Yellow
苜蓿黄质 Violaxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	HO O OH		415, 439, 468	黄 Yellow
叶黄素 Lutein	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	HO		(420), 445, 473	黄 Yellow
玉米黄质 Zeaxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	HO		(427), 450, 479	黄 Yellow
β -隐黄质 β -Cryptoxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O	HO		(426), 451, 479	橙 Orange
β -胡萝卜素 β -Carotene	C ₄₀ H ₅₆			(427), 452, 479	橙 Orange
β -柠乌素 β -Citaurin	C ₃₀ H ₄₀ O ₂	HO		458	红 Red
番茄红素 Lycopene	C ₄₀ H ₅₆			446, 473, 503	红 Red

近。如在 TLC 分析中, β -柠乌素条带与隐黄质环氧化物以及含有 2 个羟基的类胡萝卜素相邻近^[10]。在 HPLC 中,其保留时间与 9-顺-莨菪素相近^[3]。笔者研究中发现,在一些 HPLC 分析条件下, β -柠乌素的保留时间可与柑橘果实中富含的 9-顺-莨菪素十分接近,从而当 β -柠乌素含量不高时,它的存在常被掩盖。

2 β -柠乌素在柑橘中的分布与合成途径

2.1 β -柠乌素的分布

β -柠乌素最先在柑橘上发现,在其他植物上偶见报道。在一些柑橘果皮中, β -柠乌素含量为类胡萝卜素总量的 30% 以上^[1]。在非柑橘类植物上, β -柠乌素仅在 *Frutita* (*Allophylus psilospermus*, 一种分布于加勒比海岸地区的热带果树)果实中大量存在,可占类胡萝卜素总量的 29.8%^[9]。 β -柠乌素在黄色百香果 (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) 果实^[11]和欧洲七叶树 (*Aesculus hippocastanum*) 芽和花粉^[12]中也被检测出,但含量较低或甚微。

β -柠乌素在多种柑橘上被检测到,主要集中于

甜橙、克里曼丁等,在柠檬、葡萄柚和温州蜜柑上也见报道(表 2)。笔者在红皮胡柚(2000 年前后在浙江衢州一个普通胡柚园中发现的一个红皮突变体)中也检测到了 β -柠乌素,在成熟果实中约占类胡萝卜素总量的 7%。此外,金柑属的一个种^[2]以及柑橘种间杂种橘柚^[13]和属间杂种枳橙金柑^[14]上也存在 β -柠乌素。值得一提的是,尽管多种柑橘中存在 β -柠乌素,但品种间存在差异,如椪柑等大多数宽皮柑橘以及温州蜜柑的大多数品种中均不存在 β -柠乌素。同时, β -柠乌素主要存在于柑橘果皮中,至今未见柑橘营养组织中存在 β -柠乌素的报道, β -柠乌素在果肉中很少出现,即使存在,含量也甚低^[6]。

此外,柑橘组织中存在一些 β -柠乌素的结构类似物,如 β -阿朴-8'-胡萝卜醛(β -apo-8'-carotenal,与 β -柠乌素的结构差异是 β 环上少 1 个羟基)、 β -citaurinene (β -apo-8'-carotene-3-ol)、 β -citraurolo (β -apo-8'-carotene-3,8'-ol)和 β -柠乌素环氧化物(β -citaurin epoxide)等^[6,15]。其中 β -阿朴-8'-胡萝卜醛是 β -隐黄质的裂解产物,而其余类似物可能是由 β -柠乌素/ β -阿朴-8'-胡萝卜醛进一步转化而来,但具体涉及的酶和基因等均尚无报道。

表 2 β -柠乌素在柑橘成熟果实果皮中的分布

Table 2 The distribution of β -citaurin in mature citrus peels

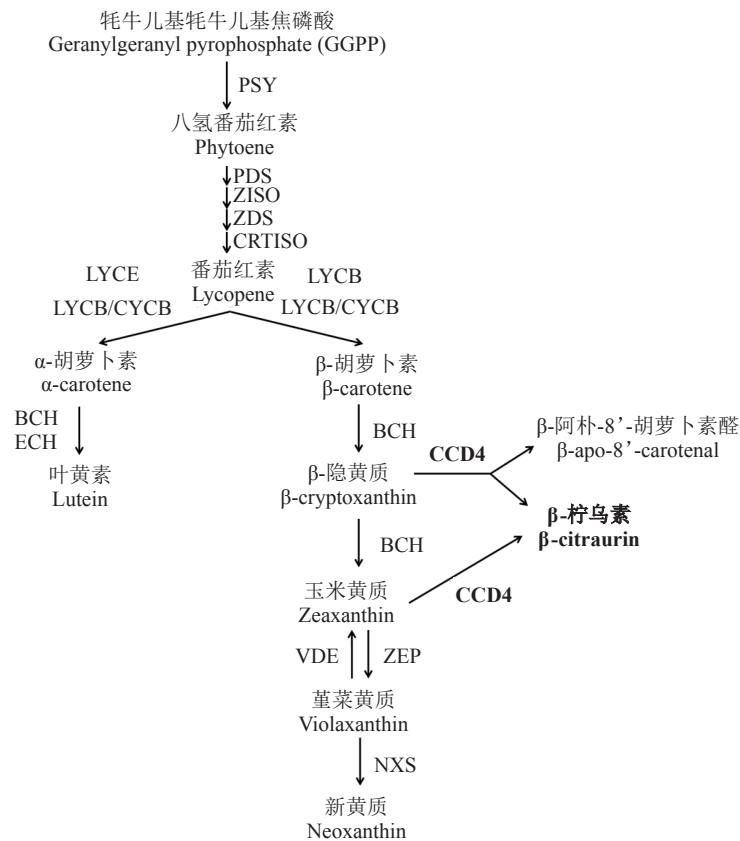
种类(拉丁名) Species (Latin name)	品种 Cultivar	ω (β -柠乌素) β -citaurin content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	β -柠乌素占类胡萝卜素总量比例 Percentage of β -citaurin in total carotenoids/%	参考文献 Reference
克里曼丁 Clementine (<i>Citrus clementina</i>)		7.00		[6]
克里曼丁 \times 宽皮柑橘 Clementine \times mandarin (<i>C. clementina</i> \times <i>C. reticulata</i>)	Fortune	17.50		[6]
柠檬 Lemon (<i>C. limon</i>)			4.00	[2]
葡萄柚 Grapefruit (<i>C. paradisi</i>)			9.30	[2]
葡萄柚 Grapefruit (<i>C. paradisi</i>)	星路比 Star Ruby	0.92	0.42	[3]
宽皮柑橘 Mandarin (<i>C. reticulata</i>)	川府红橘 Chuanfuhongju	23.61		[16]
宽皮柑橘 Mandarin (<i>C. reticulata</i>)	年橘 Nianju	3.22		[13]
宽皮柑橘 Mandarin (<i>C. reticulata</i>)			13.30, 28.00	[2]
橘柚 Tangelo (<i>C. reticulata</i> \times <i>C. paradisi</i>)	Page	1.18		[13]
甜橙 Sweet orange (<i>C. sinensis</i>)	华盛顿 Washington	7.50		[6]
甜橙 Sweet orange (<i>C. sinensis</i>)	伏令夏橙 Valencia	10.00	6.00	[7]
甜橙 Sweet orange (<i>C. sinensis</i>)			10.80	[2]
甜橙 Sweet orange (<i>C. sinensis</i>)	朋娜 Bonanza	35.25	23.25	[3]
甜橙 Sweet orange (<i>C. sinensis</i>)	卡拉卡拉 Cara Cara	20.02	9.18	[3]
温州蜜柑 Satsuma mandarin (<i>C. unshiu</i>)	山下红早生 Yamashitabeni-wase	120.00	40.00	[8]
金柑 Kumquat (<i>Fortunella</i> sp.)			16.60	[2]
枳橙金柑 Citrangequat [<i>F. margarita</i> \times (<i>P. trifoliata</i> \times <i>C. sinensis</i>)]	Sinton		3.30	[14]

2.2 β -柠乌素的合成途径

β -柠乌素是类胡萝卜素的一种。植物类胡萝卜素合成的主链途径在上一世纪末得到阐明^[17-19](图1),但催化 β -柠乌素合成的酶与基因仅在近年来得到确定。

根据 β -柠乌素的分子结构,前人推测 β -柠乌素是由 β -隐黄质和玉米黄质降解而来^[3,7]。这一推测后来得到同行研究的证实。Ma等^[8]从‘山下红早生’

温州蜜柑中分离了类胡萝卜素裂解双加氧酶4 (*CitCCD4*)基因(与后来其他小组发现的*CCD4b1*为同一基因),原核表达分析表明该*CCD4*可催化 β -隐黄质生成 β -柠乌素和 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛,催化玉米黄质生成 β -柠乌素。同年,Rodrigo等^[6]从克里曼丁中分离了*CCD4b1*基因,原核表达分析表明,*CCD4b1*催化 β -柠乌素合成。基于这些发现,柑橘 β -柠乌素的合成途径如图1所示。



PSY. 八氢番茄红素合成酶; PDS. 八氢番茄红素脱饱和酶; ZISO. ζ -胡萝卜素异构酶; ZDS. ζ -胡萝卜素脱饱和酶; CRTISO. 胡萝卜素异构酶; LYCB. 番茄红素 β 环化酶; CYCB. 有色体特异番茄红素 β 环化酶; LYCE. 番茄红素 ϵ 环化酶; BCH. β -胡萝卜素羟化酶; ECH. 胡萝卜素羟化酶; CCD4. 类胡萝卜素裂解双加氧酶4; ZEP. 玉米黄质环氧化酶; VDE. 堇菜黄质脱环氧化酶; NXS. 新黄质合成酶。

PSY. Phytoene synthase; PDS. Phytoene desaturase; ZISO. ζ -carotene isomerase; ZDS. ζ -carotene desaturase; CRTISO. Carotene isomerase; LYCB. Lycopene beta-cyclase; CYCB. Chromoplast-specific lycopene β -cyclase; LYCE. Lycopene epsilon-cyclase; BCH. Carotene β -ring hydroxylase; ECH. Carotene epsilon-ring hydroxylase; CCD4. Carotenoid cleavage dioxygenases4; ZEP. Zeaxanthin epoxidase; VDE. Violaxanthin de-epoxidase; NSY. Neoxanthin synthase.

图1 植物类胡萝卜素合成途径

Fig. 1 Carotenoid biosynthesis pathway in plants

根据分子中是否含有氧原子可将类胡萝卜素分为胡萝卜素类和叶黄素类,其中叶黄素类分子中的氧原子大多以羟基形式存在。在柑橘果实中,含羟基的类胡萝卜素分子大多以酯化状态存在,这也是柑橘类胡萝卜素制备过程中需要皂化的原因。 β -柠

乌素也是一种带羟基的类胡萝卜素分子,具有被酯化的潜力。Ma等^[20]研究表明,在‘山下红早生’温州蜜柑成熟果皮中, β -柠乌素主要(占 β -柠乌素总量的96%)以酯化的形式存在,分别为 β -柠乌素月桂酸盐(28%), β -柠乌素豆蔻酸盐(38%)和 β -柠乌素棕榈酸

盐(30%),游离的 β -柠乌素只占4%。

3 柑橘类胡萝卜素裂解双加氧酶(CCDs)与 β -柠乌素合成

涉及 β -柠乌素合成的 $CCD4$ 是植物9-顺-环氧类胡萝卜素加双氧酶($NCED$)/ CCD 基因家族中的一个成员。在拟南芥中,该基因家族有9个成员,包括5个 $NCED$ ($NCED2$ 、 $NCED3$ 、 $NCED5$ 、 $NCED6$ 、 $NCED9$)和4个 CCD ($CCD1$ 、 $CCD4$ 、 $CCD7$ 、 $CCD8$)^[21]。 $NCED$ 主要参与ABA合成^[22], $CCD7$ 和 $CCD8$ 主要参与独脚金内酯(一种可调节植株分枝以及菌根发育的气态信号分子)的合成^[23-24]。

$CCD1$ 是 $NCED/CCD$ 家族中唯一定位于细胞质中的酶,可以催化多种类胡萝卜素裂解生成无色挥发性香气物质^[25-26]。植物 $CCD1$ 主要对称地裂解9,10(9',10')C=C双键,但在一些植物中也对称地裂解5,6(5',6')和7,8(7',8')C=C双键^[27]。

$CCD4$ 也主要对称地裂解类胡萝卜素的9,10

(9',10')C=C双键形成无色挥发性物质,但不同于 $CCD1$,它定位于质体中^[28]。 $CCD4$ 基因的高表达是白色菊花花瓣^[29]、白色土豆块茎^[30]和白肉桃果肉^[31]不能积累类胡萝卜素的原因。无论是 $CCD1$ 还是 $CCD4$,在绝大多数植物中,它们对类胡萝卜素的裂解是对称进行的。然而,柑橘是罕见的例外之一,柑橘 $CCD4b1$ 对类胡萝卜素分子的裂解以不对称方式进行(对1个底物分子只裂解1次),而且作用于7,8或7',8'C=C双键[而非大多数 $CCD4$ 的9,10(9',10')C=C双键]上,从而产生了其他植物中不多见的 C_{30} 分子,即 β -柠乌素^[6,8]。

$CCD4$ 基因在拟南芥上以单个成员的形式存在,而在柑橘上则有5个成员(表3),其中 $CCD4b1$ 是被确认为涉及 β -柠乌素合成的成员^[6]。不同柑橘 $CCD4b1$ 的催化特性存在一些差异,如克里曼丁 $CCD4b1$ 除了以 β -隐黄质和玉米黄质为底物外,还可催化 β -胡萝卜素、 α -胡萝卜素、叶黄质和番茄红素的裂解^[6],然而‘山下红早生’温州蜜柑 $CCD4b1$ (在

表3 柑橘 $CCD4$ 基因家族成员的特性^[6,8,32]

Table 3 The characteristics of citrus $CCD4$ gene family members^[6,8,32]

$CCD4$ 成员	染色体定位	蛋白质大小/氨基酸残基数量	表达模式
$CCD4$ members	Chromosomal localization	Protein size/Amino acid number	Expression pattern
$CCD4a$	7	603/603	主要在叶片和花瓣中表达 Mainly expressed in leaves and petals
$CCD4b1$	8	563/563	主要在部分柑橘品种的果皮中表达,在叶片和花中有低量表达 Mainly expressed in the peels of some citrus, a weak expression in the leaves and flowers
$CCD4b2$	8	557/358, 418	主要在叶片中表达 Mainly expressed in leaves
$CCD4c$	6	597/597	主要在叶片中表达,在克里曼丁中仅在花瓣中表达 Mainly expressed in leaves, only expressed in petals in clementine
$CCD4d$	6	412/420	在所有组织中不表达 Not expressed in any tissues

注: $CCD4b1$ 在文献[6]中称为 $CCD4$,在文献[32]中称为 $CCD4b$ 。 $CCD4b2$ 在文献[32]中称为 $CCD4e$ 。

Note: $CCD4b1$ was named $CCD4$ in reference [6] or $CCD4b$ in reference [32]. $CCD4b2$ was named $CCD4e$ in reference [32].

文献中称为 $CCD4$)不能以 β -胡萝卜素、 α -胡萝卜素和番茄红素为底物^[8]。

柑橘 $CCD4$ 的5个成员在表达模式上存在差异。Rodrigo等^[6]基于柑橘表达序列标签(EST)库信息,发现 $CCD4b1$ 表达最强, $CCD4a$ 和 $CCD4c$ 次之,在EST库中的记录分别达26、12和4条,而 $CCD4b2$ 和 $CCD4d$ 在柑橘EST库中没有发现,表明不表达或表达很低。不同 $CCD4$ 成员表达的组织也存在差异, $CCD4b1$ 主要在果皮中表达,而 $CCD4a$ 、 $CCD4b2$ 和 $CCD4c$ 均主要在叶片中表达,同时在其他组织中有低量表达(表3)。笔者以普通胡柚和积累 β -柠乌

素的红皮胡柚为试材,发现2种胡柚的 $CCD4a$ 和 $CCD4c$ 表达都很低, $CCD4b2$ 和 $CCD4d$ 均没有表达。2种胡柚的 $CCD4b1$ 表达差异很大,该基因在普通胡柚中不表达,而在红皮胡柚成熟果实的果皮中表达较强(占 $CCD4$ 各成员表达量之和的90%以上)。

4 柑橘 β -柠乌素积累的调控

4.1 果实发育阶段

柑橘类胡萝卜素的积累受果实发育阶段的影响^[3], β -柠乌素也不例外。在大多数柑橘中, β -柠乌

素在果实转色期出现,并随果实成熟而含量升高,这在甜橙、克里曼丁、‘丹西’橘、温州蜜柑等柑橘上均见报道^[6-8]。Farin等^[1]发现一种克里曼丁的绿果中也存在少量 β -柠乌素。笔者以红皮胡柚为试材,发现果实转色时 β -柠乌素在果皮中开始出现,然后随果实成熟或贮藏持续积累。

4.2 温度

温度对柑橘 β -柠乌素的积累有明显的影响。与2℃贮藏相比,‘林娜’脐橙在12℃贮藏时 β -柠乌素积累更多,使果皮呈现深红,而2℃贮藏的果实只积累少量 β -柠乌素,果皮呈橙黄色。12℃贮藏49d时,果皮中 β -柠乌素含量可达2℃贮藏时的4~8倍^[33]。笔者以红皮胡柚为试材,比较了不同贮藏温度对果实色泽形成和 β -柠乌素积累的影响,发现15℃最有利于果皮红色发育, β -柠乌素含量可占类胡萝卜素总量的10%左右,5℃和10℃下 β -柠乌素积累减少,果皮红色程度减弱,20℃及以上温度不利于 β -柠乌素的积累和果皮红色发育。柑橘商业冷藏多采用10℃左右的温度,这对 β -柠乌素积累和果皮红色形成稍有不和。

高温(30℃及以上)对柑橘果实着色的不利影响广见报道。如‘华盛顿脐橙’成熟果实于37℃处理3d后果实呈橙黄色,而于20℃贮藏的果实呈橙红色,前者果皮中 β -柠乌素含量仅为后者的11%,这是由于37℃条件下,*CCD4b1*基因表达受抑制^[6]。Stewart等^[34]研究了乙烯脱绿处理的温度对‘Temples’甜橙和‘奥兰多’橘柚果实色泽的影响,发现产业上普遍采用的85°F(折合29.4℃)不利于 β -柠乌素积累,果实色泽较差,而65°F(折合18.3℃)和75°F(折合23.9℃)下脱绿处理的果实积累了较多 β -柠乌素,果皮呈现红色。 β -柠乌素积累对高温的敏感性也可能是热带产区果实红色程度偏浅的原因^[34]。

4.3 乙烯

乙烯脱绿是产业上的常规措施之一,通过促进叶绿素降解和调控果实类胡萝卜素积累而改善果实外观^[35-38]。对于具有积累 β -柠乌素能力的柑橘种类,前人研究发现,乙烯可以促进 β -柠乌素积累,特别是在合适的温度(如18~24℃)下效应更加明显^[6,34]。在20℃下贮藏3d,供试的一种脐橙果皮中检测不出 β -柠乌素,而经乙烯处理的果实则有较多 β -柠乌素积累;在一种克里曼丁上,尽管不经乙烯处理的果

实可积累 β -柠乌素,但乙烯处理可使含量提高1.2倍^[6]。乙烯诱导 β -柠乌素积累的机制在不同柑橘上可能有所不同,在克里曼丁上,20℃下乙烯对 β -柠乌素积累的促进作用与乙烯处理刺激了上游胡萝卜素(八氢番茄红素和六氢番茄红素)的积累有关,乙烯处理对*CCD4b1*基因表达没有影响^[6];而在‘山下红早生’温州蜜柑上,乙烯处理则通过上调*CCD4b1*基因表达而诱导 β -柠乌素积累^[8]。此外,因为高温或光照不良(如树体北侧着果)等原因而导致的‘Temples’甜橙和‘奥兰多’橘柚果实着色不良也可通过合适温度下的乙烯处理进行改善^[34]。

4.4 GA₃

与乙烯的效应不同,GA₃对柑橘 β -柠乌素的积累有抑制作用,这在‘纳佛来特’脐橙^[37]和‘伏令夏橙’^[39]上均见报道。GA₃的效应可能与阻碍乙烯效应发挥相关,因为在乙烯处理之前对‘纳佛来特’脐橙果实进行GA₃处理会抑制乙烯诱导的类胡萝卜素合成早期途径中的相关基因表达从而减少 β -柠乌素积累^[37]。目前就GA₃处理是否直接影响*CCD4b1*基因表达尚无报道,但GA₃处理可能通过减少 β -柠乌素合成前体的积累实现这一效应。在‘红柿柑’上,外源GA₃处理提高了果皮GA₃水平,抑制 β -隐黄质的积累^[40]。

5 展 望

由于呈现鲜艳的红色, β -柠乌素早在1936年起就开始受到关注,目前人们对其在柑橘中的分布以及影响其积累的主要因素等有了较充分的了解;得益于分子生物学研究技术的进步, β -柠乌素合成途径以及关键酶及编码基因已经得到鉴别。但由于 β -柠乌素只存在于少部分柑橘类果实,与在植物上普遍存在的其他类胡萝卜素相比,其合成及调控研究仍相对薄弱,诸多科学问题没有得到解决。

如前所述, β -柠乌素源于柑橘*CCD4*对底物的独特切割(非对称切割且切割位点与众不同),但为何只有柑橘的*CCD4*才有此独特功能需要进一步探究。柑橘*CCD4*有5个成员,目前仅*CCD4b1*被确认为参与 β -柠乌素合成,其他4个成员的催化特性尚不清楚,是否与 β -柠乌素合成有关尚待进一步研究。在不同文献中,*CCD4b1*的底物也有所不同^[6,8],这是否是由于柑橘种类不同引起的需要进一步研究。目前关于*CCD4b1*生化特性的研究仅局限于克

里曼丁和温州蜜柑^[6,8],需要应用能积累 β -柠乌素的更多柑橘材料进行分析。

β -柠乌素主要存在于柑橘中,但大多数柑橘品种并不积累 β -柠乌素,这是由于 $CCD4$ 基因序列不同造成还是由于 $CCD4$ 基因表达有异所致,需要进一步分析。在一些先前报道中,已经发现 $CCD4b1$ 表达与 β -柠乌素积累具有良好的相关性^[6,8],但也有研究发现,在一些 $CCD4b1$ 高表达的组织中并无 β -柠乌素积累^[32],其中原因有待分析。同时,影响 $CCD4b1$ 表达强度的上游调控元件有待挖掘。

在 β -柠乌素积累的调控方面,尽管已经明确了果实发育阶段、温度和乙烯等的调控效应,但试验尚不够系统,有利于 β -柠乌素积累的最适温度尚不明确,而且这一最适温度是否随柑橘种类而异尚不清楚。此外,乙烯与温度在调控 β -柠乌素积累中的互作研究也很少,需要更进一步的研究。对于这些不同调控的内在机制也有待进一步探明,产业化调控措施有待进一步完善。对上述问题的深入研究有助于进一步明晰柑橘 β -柠乌素积累及调控机制,为产业上增进柑橘果实色泽提供参考。

参考文献 References:

- [1] FARIN D, IKAN R, GROSS J. The carotenoids pigments in the juice and flavedo of a mandarin hybrid (*Citrus reticulata*) cv. Michal during ripening[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(2): 403-408.
- [2] AGÓCS A, NAGY V, SZABÓ Z, MÁRK L, OHMACHT R, DELI J. Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2007, 8(3): 390-394.
- [3] XU C J, FRASER P D, WANG W J, BRAMLEY P M. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(15): 5474-5481.
- [4] STEWART I, WHEATON T A. Conversion of β -citraurin to reticulataxanthin and β -apo-8'-carotenal to citranaxanthin during the isolation of carotenoids from *Citrus* [J]. *Phytochemistry*, 1973, 12(12): 2947-2951.
- [5] MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A J, BRITTON G, VICARIO I M, HEREDIA F J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(3): 1145-1150.
- [6] RODRIGO M J, ALQUÉZAR B A E, MEDINA V, CARMONA L, BRUNO M, AL-BABILI S, ZACARÍAS L. A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of *Citrus* fruit-specific apocarotenoid pigments[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(14): 4461-4478.
- [7] OBERHOLSTER R, COWAN K, MOLNÁR P, TÓTH G. Biochemical basis of color as an aesthetic quality in *Citrus sinensis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(1): 303-307.
- [8] MA G, ZHANG L C, MATSUTA A, MATSUTANI K, YAMAWAKI K, YAHATA M, WAHYUDI A, MOTOHASHI R, KATO M. Enzymatic formation of β -citraurin from β -cryptoxanthin and zeaxanthin by carotenoid cleavage dioxygenase 4 in the flavedo of citrus fruit[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 682-695.
- [9] MURILLO E, GIUFFRIDA D, MENCHACA D, DUGO P, TORRE G, MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A J, MONDELLO L. Native carotenoids composition of some tropical fruits[J]. *Food Chemistry*, 2013, 140(4): 825-836.
- [10] GROSS J A. Rapid separation of citrus carotenoids by thin-layer chromatography[J]. *Chromatographia*, 1980, 13(9): 572-573.
- [11] MERCADANTE A Z, BRITTON G, RODRIGUEZ-AMAYA D B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(10): 4102-4106.
- [12] DELI J, MATUS Z, TOTH G. Comparative study on the carotenoid composition in the buds and flowers of different *Aesculus* species[J]. *Chromatographia*, 2000, 51(1): 179-182.
- [13] XU J, LIU B Z, LIU X, GAO H J, DENG X X. Carotenoids synthesized in citrus callus of different genotypes[J]. *Acta Physiologia Plantarum*, 2011, 33(3): 745-753.
- [14] YOKOYAMA H, WHITE M J. Carotenoid pigments in the flavedo of sinton citrangequat[J]. *Phytochemistry*, 1966, 5(6): 1159-1173.
- [15] LEUENBERGER U, STEWART I, KING R W. Isolation and identification of 8-citrauroil, a C_{30} carotenoid in citrus[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1976, 41(5): 891-892.
- [16] 郭琳琳. 柑橘果实发育及保鲜的色泽和色素分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2007.
- [16] GUO Linlin. Color and pigment analysis of citrus fruit during development and storage[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [17] 徐昌杰, 张上隆. 植物类胡萝卜素的生物合成及其调控[J]. *植物生理学通讯*, 2000, 36(1): 64-70.
- [17] XU Changjie, ZHANG Shanglong. Biosynthesis and regulation of plant carotenoids[J]. *Plant Physiology Communications*, 2000, 36(1): 64-70.
- [18] MCQUINN R P, GIOVANNONI J J, POGSON B J. More than meets the eye: from carotenoid biosynthesis, to new insights into apocarotenoid signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 27: 172.
- [19] WEI X U, CHEN C X, YU Q B, GADY A, YU Y, LIANG G L, GMITTER J R F G. Novel expression patterns of carotenoid pathway-related genes in citrus leaves and maturing fruits[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10(3): 439-448.

- [20] MA G, ZHANG L C, IIDA K, MADONO Y, YUNGYUEN W, YAHATA M, YAMAWAKI K, KATO M. Identification and quantitative analysis of β -cryptoxanthin and β -citraurin esters in Satsuma mandarin fruit during the ripening process[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 356-364.
- [21] SCHWARTZ S H, TAN B C, GAGE D A, ZEEVAART J A D, MCCARTY D R. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize[J]. Science, 1997, 276(5320): 1872-1874.
- [22] TAN B C, SCHWARTZ S H, ZEEVAART J A D, MCCARTY D R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(22): 12235-12240.
- [23] WALTER M H, STRACK D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(4): 663-692.
- [24] AL-BABILI S, BOUWMEESTER H J. Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone[J]. Annual Review of Plant Biology, 2015, 66(1): 161-186.
- [25] SCHWARTZ S H, QIN X Q, ZEEVAART J A D. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(27): 25208-25211.
- [26] SIMKIN A J, SCHWARTZ S H, AULDRIDGE M, TAYLOR M G, KLEE H J. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone[J]. The Plant Journal, 2004, 40(6): 882-892.
- [27] RUBIO-MORAGA A, RAMBLA J L, FERNÁNDEZ-DE-CARMEN A, TRAPERO-MOZOS A, AHRAZEM O, ORZÁEZ D, GRANELL A, GÓMEZ-GÓMEZ L. New target carotenoids for CCD4 enzymes are revealed with the characterization of a novel stress induced carotenoid cleavage dioxygenase gene from *Crocus sativus*[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 86(4/5): 555-569.
- [28] AHRAZEM O, TRAPERO A, GÓMEZ M D, RUBIO-MORAGA A, GÓMEZ-GÓMEZ L. Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: a deeper study in *Crocus sativus* and its allies[J]. Genomics, 2010, 96(4): 239-250.
- [29] OHMIYA A, KISHIMOTO S, AIDA R, YOSHIOKA S, SUMITOMO K. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals[J]. Plant Physiology, 2006, 142(3): 1193-1201.
- [30] CAMPBELL R, DUCREUX L J, MORRIS W L, MORRIS J A, SUTTLE J C, RAMSAY G, BRYAN G J, HEDLEY P E, TAYLOR M A. The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase4 from potato[J]. Plant Physiology, 2010, 154(2): 656-664.
- [31] BRANDI F, BAR E, MOURGUES F, HORVÁTH G, TURCSI E, GIULIANO G, LIVERANI A, TARTARINI S, LEWINSOHN E, ROSATI C. Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 24.
- [32] ZHENG X J, XIE Z Z, ZHU K J, XU Q, DENG X X, PAN Z Y. Isolation and characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes from different citrus species[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(4): 1589-1603.
- [33] CARMONA L, ZACARÍAS L, RODRIGO M J. Stimulation of coloration and carotenoid biosynthesis during postharvest storage of 'Navelina' orange fruit at 12 °C [J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 74: 108-117.
- [34] STEWART I, WHEATON T A. Effects of ethylene and temperature on carotenoid pigmentation of citrus peel[J]. Florida Agricultural Experiment Stations Journal Series, 1971, 4151: 264-266.
- [35] STEWART I, WHEATON T A. Carotenoids in citrus-their accumulation induced by ethylene[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1972, 20(2): 448-449.
- [36] YOUNG R, JAHN O. Ethylene-induced carotenoid accumulation in citrus fruits rinds[J]. Journal of the American Society of Horticultural Science, 1972, 97(2): 258-261.
- [37] RODRIGO M J, ZACARIAS L. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 43(1): 14-22.
- [38] YIN X R, XIE X L, XIA X J, YU J Q, FERGUSON I B, GIOVANNONI J J, CHEN K S. Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit de-greening[J]. The Plant Journal, 2016, 86(5): 403-412.
- [39] GAMBETTA G, MESEJO C, MARTÍNEZ-FUENTES A, REIG C, GRAVINA A, AGUSTÍ M. Gibberellic acid and norflurazon affecting the time-course of flavedo pigment and abscisic acid content in 'Valencia' sweet orange[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 180: 94-101.
- [40] 陶俊, 张上隆, 陈昆松, 赵智中, 陈俊伟. GA₃处理对柑橘果皮色素变化的影响[J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 566-568.
- TAO Jun, ZHANG Shanglong, CHEN Kunsong, ZHAO Zhizhong, CHEN Junwei. Effect of GA₃ treatment on changes of pigments in peel of citrus fruit[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(6): 566-568.