

桃类胡萝卜素合成关键基因 *PpCCD4* 的表达与启动子活性分析

范家琪, 吴金龙, 李 勇, 别航灵, 王 蛟, 郭 健, 曹 珂, 王力荣*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘 要:【目的】分析桃果实成熟过程中类胡萝卜素总量与关键基因 *PpCCD4* 表达的相关性, 探究不同品种 *PpCCD4* 启动子的活性差异, 进而解释 *PpCCD4* 在黄白肉果实中的表达差异。【方法】测定果实发育时期类胡萝卜素总含量, 并与该时期 *PpCCD4* 的表达进行相关性分析, 分别检测果实 *PpCCD4* 转录本差异, 进行基因全长与启动子序列分析。构建 *PpCCD4* 启动子驱动 *GUS* 表达载体并转化农杆菌侵染桃果肉, 根据果肉 *GUS* 染色分析 2 种启动子活性的差异, 以期解释 *PpCCD4* 在果实发育时期表达量的差异。【结果】‘燕红’成熟过程中果实类胡萝卜素总含量降低, 其 *PpCCD4* 在发育过程中的表达显著上调; ‘金童 6 号’果实类胡萝卜素总含量升高, 其 *PpCCD4* 的表达始终处于较低水平。‘金童 6 号’中 *PpCCD4* 相较‘燕红’在 CDS 区发生了 2 个碱基的插入, 且两 *PpCCD4* 转录本不同, 启动子克隆发现‘燕红’对应的启动子有较多的转录增强和启动元件, 而黄肉品种则具有更多的抗逆应答元件; 同时 *GUS* 染色结果表明, 桃果肉中 2 种启动子驱动的 *GUS* 染色有明显的显色差异, 启动子活性差异显著。【结论】黄肉品种中移码突变的产生造成了 *PpCCD4* 的功能丧失; 2 个品种果肉 *PpCCD4* 转录模式不同, 其启动子活性的差异是造成 *PpCCD4* 在黄肉和白肉果实中表达差异显著的主要原因。

关键词: 桃; 类胡萝卜素; *PpCCD4*; 启动子活性

中图分类号: S662.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)09-1271-10

Expression and promoter activity analysis of *PpCCD4* closely related to carotenoid synthesis in peach

FAN Jiaqi, WU Jinlong, LI Yong, BIE Hangling, WANG Jiao, GUO Jian, CAO Ke, WANG Lirong*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】Carotenoids are important terpenoids in the secondary metabolites of plants. They not only have the function of protecting the plant itself by photoprotection and removal of reactive oxygen species, but also are important precursors of vitamins synthesized by the human body. Based on the color change of the yellow-flesh and the -flesh peach (*Amygdalus persica* L.) fruits during ripening, the correlation between the total carotenoids and the expression of the gene *PpCCD4* was analyzed to explore the difference of the *PpCCD4* promoter activity among different varieties, and then to explain the expression differences of the *PpCCD4* in the yellow-flesh fruits. 【Methods】The representative varieties of yellow flesh peach ‘Golden Baby 6’ and white flesh peach ‘Yan Hong’ were selected. The total carotenoid contents were measured at significant periods of fruit phenotypic change of the two cultivars, and specific primers were designed to analyze the fruit developmental period. Correlation analysis between the changes of total carotenoid contents and the expressions of the *PpCCD4* in the flesh was made, specific primers were designed according to the peach reference genome. The differences of the *PpCCD4* transcripts of the different peach varieties were detected. The sequences of *PpCCD4* and pro-

收稿日期: 2020-04-10 接受日期: 2020-05-21

基金项目: 国家桃产业技术体系(CARS-30-1-04); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-ZZFR-01)

作者简介: 范家琪, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为桃种质资源与遗传育种。Tel: 13269106855, E-mail: 690510307@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13700883956, E-mail: wanglirong@caas.cn

motor were cloned. The analysis of sequences and analysis of promoter regulatory elements was subsequently made. Using homologous recombination technology, the separately recovered promoter sequences were ligated with the digested pCAMBIA1301 vector plasmid to construct a *PpCCD4* promoter to drive the GUS expression vector and to transform *Agrobacterium* to infect the peach pulp. The two promoters were analyzed according to the GUS staining of the pulp. The different activity of the promoters was employed to explain the difference of the expression of *PpCCD4* during the fruit development. **【Results】** The total amount of carotenoids in the white flesh fruits during maturity was reduced to $6.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, and the total amount of carotenoids in the yellow flesh fruits was increased to $334.46 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. During the period of 40 d to 85 d after flowering, the expression of the *PpCCD4* in the fruits of ‘Yanhong’ was significantly up-regulated. The fruit development approached to full maturity on 85 d, after flowering, the expression of *PpCCD4* approached zero, and the expression of *PpCCD4* in ‘Golden Baby 6’ fruits was low and hardly changed. There was a significant difference in the expression of *PpCCD4* between the yellow flesh and the white flesh. On At 65 d after flowering, the peak expression of the *PpCCD4* in the fruits of ‘Yanhong’ reached 13.6 times more than that of ‘Golden Baby 6’. There was a correlation between the expression of *PpCCD4* and carotenoids during the development of ‘Yanhong’ ($r^2 > 0.8$). The total carotenoid content of ‘Golden Baby 6’ had no correlation with the expression of *PpCCD4*. In the yellow flesh variety, the *PpCCD4* had two base insertions in the CDS region compared with the white flesh variety. ‘Golden Baby 6’ inserted a TC repeat at position 864 bp from the gene’s starting point, and the TC insertion in this transcription mode caused a frameshift. The mutation caused premature termination of transcription, resulting in the loss of the function of the enzyme that degraded carotenoids encoded by the *PpCCD4*, and inducing accumulation of carotenoids in the pulp. The sequence of *PpCCD4* in the white flesh peach variety ‘Yanhong’ did not mutate, so the sequence of the amino acid was not altered and the function of the protein was normal. In addition, the *PpCCD4* had alternative splicing in the yellow and the white flesh fruits. According to promoter cloning analysis, it was found that the promoter corresponding to the white flesh had more transcription enhancements and promoter elements, while the yellow flesh had more stress response elements. Meanwhile, GUS staining results showed that there was a significant difference in the color of GUS staining driven by the two promoters in the peach pulp, and there was a significant difference in GUS protein activity. **【Conclusion】** The generation of frame shift mutations in the yellow-flesh cultivars caused by the loss of the *PpCCD4* function. And the flesh of the two cultivars had different *PpCCD4* transcription patterns. Difference of promoter activity was the main reason for the significant differences of the *PpCCD4* expression in the yellow-flesh and the white-flesh fruits.

Key words: Peach; Carotenoid; *PpCCD4*; Promoter activity

类胡萝卜素是植物体次生代谢产物中一种重要萜类物质,不但对植物体本身具有光保护和清除活性氧的作用,而且是人体合成维生素的重要前体物质^[1],对人体健康十分重要。全面、深入地瞭解类胡萝卜素代谢以及关键基因的调控机制,对类胡萝卜素层面上的桃品种改良有着十分重要的意义。近年来,植物中类胡萝卜素代谢路径的研究已经被公认^[2-4],但在各个物种中不尽相同。类胡萝卜素代谢在不同物种中积累类似,但在关键调控上有所不

同^[5]。类胡萝卜素裂解加氧酶基因家族(*CCDs*)是代谢通路上控制类胡萝卜素降解的重要基因^[6],该家族基因编码的酶被证明是多种作物的类胡萝卜素途径的限速酶^[7],其代谢产物独脚金内酯也作为新型植物激素成为研究热点^[8]。*CCD*家族基因 *CCD4*在多种植物的类胡萝卜素代谢中被证明是一个关键基因,例如藏红花在环境胁迫时类胡萝卜素的表达响应与 *CsCCD4c*密切相关^[9],矮牵牛花的黄色与白色花朵表型差异是由于 *CCD4*转座子插入的突变导致

的功能丧失^[10]。*PpCCD4* 也被证明是控制桃果实黄白肉色的关键基因^[11], 然而关于 *PpCCD4* 在桃中调控类胡萝卜素积累主要存在两种观点: 一是黄色果肉是由于 *PpCCD4* 基因突变造成编码的蛋白功能紊乱, 类胡萝卜素降解道路受阻, 使果肉中的类胡萝卜素积累导致果肉变黄^[12]; 二是 *PpCCD4* 基因在不同黄白肉品种的表达量不同, 因此不同品种的类胡萝卜素含量不同也导致肉色的差异^[13]。*PpCCD4* 在黄白肉色果实发育过程中有显著转录差异, 其调控机制鲜有报道。笔者利用不同果肉颜色的品种, 探究类胡萝卜素代谢途径关键基因的变异类型以及 *PpCCD4* 在果实发育过程中的转录调控模式。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为 15 a(年)生栽培品种‘金童 6 号’(黄肉)和‘燕红’(白肉), 栽植于中国农业科学院郑州果树研究所国家桃种质资源圃。于 2019 年盛花期后

45、65、75、85、95 d 分别采摘果实, 每个品种于树冠外围取均匀一致的果实 5 个, 取果后带回实验室, 去果皮, 液氮处理下将果肉切碎, -80 °C 超低温保存。

1.2 类胡萝卜素总含量的测定

分别称取‘金童 6 号’和‘燕红’不同发育时期果肉粉末 5 g, 装入 50 mL 离心管置于 CHRIST 冻干机中将样品冻干。色素提取液制备方法及类胡萝卜素提取、测定和总含量计算方法(以干质量计)参考曹洪波等^[4]的方法, 提取、测定, 3 次重复。

1.3 *PpCCD4* 基因克隆和分析

采用 Aidlab 公司(Aidlab, 北京)植物 DNA 快速提取试剂盒提取‘金童 6 号’和‘燕红’2 个品种幼嫩叶片总 DNA, 提取的 DNA 经过琼脂糖凝胶电泳检测其条带, 并且用核酸蛋白检测仪检测其浓度。DNA 样品保存于 -20 °C 冰箱。

分别以 2 个品种的全基因组 DNA 为模板, 对桃中 *PpCCD4* 基因全长进行扩增, 引物见表 1。引物合成由尚亚生物公司完成, 采用 Vazyme Phanta Max

表 1 试验中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	用途 Function
β -Actin	F:GATTCCGGTGCCCAAGAAGT R:CCAGCAGCTTCCATTCCAA	荧光定量内参基因 Reference gene in qPCR
qCCD4	F:GGCTAGAGAGCCCGAGAATC R:GAGGAGACTTGGCATCCATC	荧光定量 <i>PpCCD4</i> 引物 <i>PpCCD4</i> in qPCR
CCD4.1-pro	F:tatgaccatgattacgaattcCCTCCCTGGAACCCATAAG R:tgctgcaggctcgactctagaACATGTAAACTTGGTACTAGAA	转录本 Prupe.1G255500.1 启动子序列引物, 含有 EcoR I、Xba I 酶切位点 Cloning of <i>PpCCD4</i> promoter, including cleavage sites of restriction enzyme EcoR I and Xba I
CCD4.2-pro	F:tatgaccatgattacgaattcCAATTGCAACATGGGTGGCTT R:tgctgcaggctcgactctagaGTCTCCGTCAAACAGGTGGT	转录本 Prupe.1G255500.2 启动子序列引物, 含有 EcoR I、Xba I 酶切位点 Cloning of <i>PpCCD4</i> promoter, including cleavage sites of restriction enzyme EcoR I and Xba I
CCD4	F:GCACTCACCTAGTTTGGGGT R:AGGTGAATTCTAGTACCAAGTT	<i>PpCCD4</i> 全长基因扩增引物 Cloning of <i>PpCCD4</i>
CCD4.1-CDS	F:ATGGGTTGTAGTGAAGGGCA R:TCCATGGAAGCCATAAGGCAC	转录本 Prupe.1G255500.1 CDS 区扩增引物 Cloning of <i>PpCCD4</i> CDS region
CCD4.2-CDS	F:TAGGATCTCAAAGGCCGTG R:CCATGGAAGCCATAAGGCAC	转录本 Prupe.1G255500.2 CDS 区扩增引物 Cloning of <i>PpCCD4</i> CDS region

Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒完成扩增。

将扩增出的目标片段进行琼脂糖凝胶电泳, Aidlab 凝胶回收试剂盒回收纯化连接 TransGene 公司(TransGene, 北京)克隆载体, 挑取多个单克隆后由尚亚生物公司测序。

将得到的序列进行氨基酸序列和蛋白质结构预

测与分析。

1.4 *PpCCD4* 的实时荧光定量 PCR 分析

用华越洋生物植物总 RNA 提取试剂盒(华越洋, 北京)提取 2 个品种、5 个时期的果肉总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测条带检测 RNA 完整性, 并利用核酸蛋白检测仪检测其浓度。利用 Takara 公司反

转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 将 RNA 反转录为 cDNA。

荧光定量 PCR 反应在 LightCycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪上进行, 每个样品 3 次重复。PCR 扩增程序为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环, β -actin 为内参基因, 基因相对表达量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [14]。引物见表 1。

1.5 *PpCCD4* 基因启动子的克隆及功能元件的分析

使用 CDS 区特异引物分别对两种试验材料的 cDNA 进行扩增(表 1), 以分辨两种试验材料的转录模式, 然后分别对启动子区域 2 kb 长度序列进行克隆、测序并将所得序列导入 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行功能元件预测。

1.6 *PpCCD4* 启动子的植物表达载体构建

利用同源重组技术, 使用 Vazyme 无缝连接试剂盒将回收的 *PpCCD4*^{Pro1} 和 *PpCCD4*^{Pro2} 质粒(含有 *Xba* I、*Eco* R I 酶切位点)与酶切过的 pCAM-BIA1301 载体质粒进行连接, 构建重组质粒 pCAM-BIA1301-*Pro1PpCCD4*-GUS、pCAM-BIA1301-*Pro2PpCCD4*-GUS。

1.7 农杆菌介导的表达载体瞬时转化桃果肉

重组质粒采用液氮速冻法转化农杆菌, 通过菌液 PCR 检测阳性克隆, 使用 LB 培养基培养农杆菌, 收集菌体后稀释至 $OD_{600}=0.7\sim 0.8$ 备用。分别选取 3 个相同发育时期离核 1 cm 处果肉, 切成 4 mm 长的小块, 无菌水清洗 2~3 次备用。

将果肉浸泡在农杆菌悬浮液中, 抽真空 30 min, 后放在 MS 培养基中黑暗培养 12 h, 25 °C, 光照培养 2 d。

1.8 GUS 组织化学染色

培养完成的果肉浸泡在华越洋 GUS 染色试剂盒染液中, 抽真空 30 min, 操作过程需避光, 置于 37 °C 培养箱中 24 h, 无水乙醇脱色, 然后观察颜色变化。

2 结果与分析

2.1 不同品种果实发育时期颜色变化

如图 1 所示, 硬核期至花后 65 d, 黄肉品种和白肉品种果肉均没有褪去绿色, 而在花后 75 d 时, 果实开始逐渐褪绿, 且黄肉桃品种‘金童 6 号’开始呈现微弱程度的黄色。花后 85~95 d, ‘金童 6 号’黄色程度加深(图 1), 白肉桃‘燕红’绿色完全褪去, 呈现白

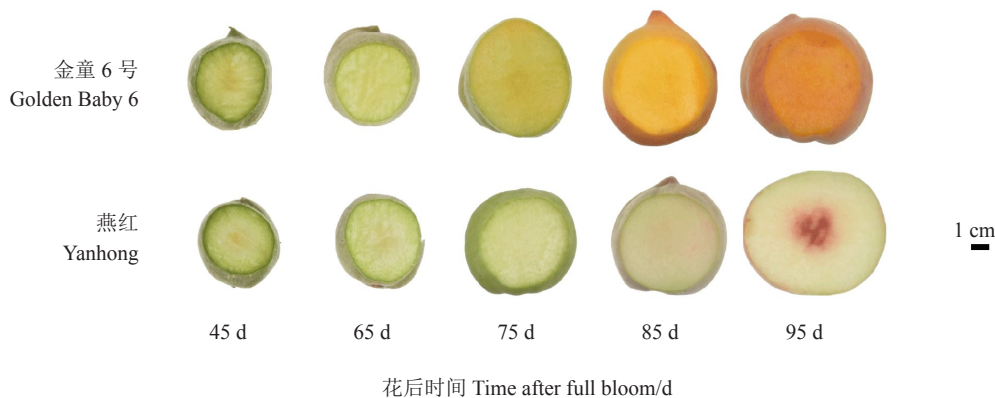


图 1 花后不同果实发育时期的果实纵切面

Fig. 1 Cutting surfaces of post-flowering fruits at different stages of development

色果肉。

2.2 不同品种果实发育时期果肉类胡萝卜素总含量变化

桃果肉呈现白色与黄色的主要原因是类胡萝卜素含量不同, 黄肉桃的类胡萝卜素含量显著高于白肉桃 [15], 本研究中 2 个品种果实成熟时黄肉、白肉果实的类胡萝卜素总含量差别显著, 其中‘燕红’的完全成熟时期类胡萝卜素总含量(w , 后同)仅为 6.6

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 而‘金童 6 号’完全成熟时期类胡萝卜素总含量能够达到 $334.46\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 是‘燕红’类胡萝卜素总含量的 50.6 倍(图 2)。

由图 2 可知, 黄肉品种类胡萝卜素总含量自花后 75 d 显著上升, 这与表型果肉由绿色转黄色再渐变为深黄一致; 与此同时, 白肉品种的果肉类胡萝卜素总含量在果实发育时期的变化趋势是逐渐降低, 与发育时期的变白果肉表型对应。

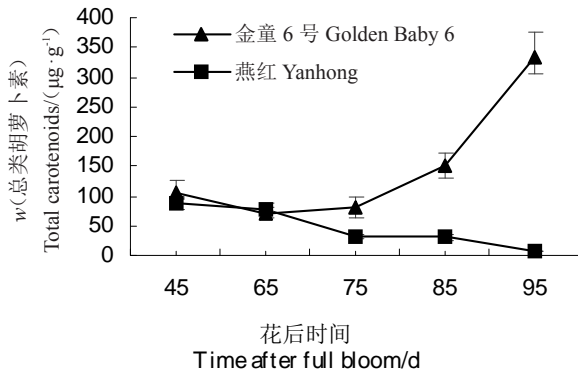


图2 不同品种果实发育时期的类胡萝卜素总含量的变化
Fig. 2 Total amount of carotenoids varied in different varieties in fruit development stages

2.3 不同品种果实发育时期*PpCCD4*的表达规律

由图3可知,本研究中2个品种,*PpCCD4*基因的表达在果实发育时期有较大的差别,花后40 d到85 d的过程中,果实的*PpCCD4*明显上调表达,在‘燕红’品种上调明显,花后85 d以后果实发育趋近于完全成熟,*PpCCD4*的表达趋近于零,而‘金童6号’果实的*PpCCD4*表达量较低且几乎不发生变化。黄肉品种和白肉品种在*PpCCD4*表达量上有着明显的差异,显著上调表达的花后65 d时,‘燕红’*PpCCD4*的表达峰值可达‘金童6号’的13.6倍。

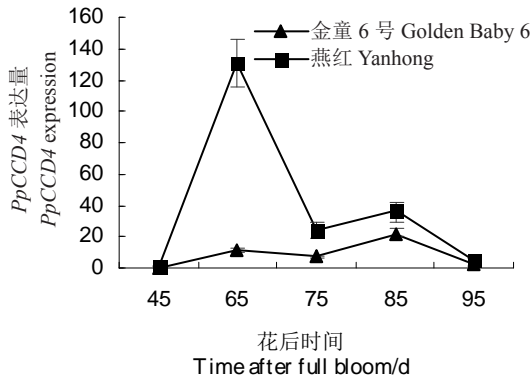


图3 黄白肉果实发育时期*PpCCD4*的表达
Fig. 3 *PpCCD4* expression in yellow and white flesh peach during development

通过线性拟合,构建自变量与因变量函数公式,分析‘燕红’和‘金童6号’果实发育过程中类胡萝卜素总含量与*PpCCD4*表达的相关性(图4)。“燕红”发育时期类胡萝卜素与*PpCCD4*表达水平的相关性系数 $r^2 > 0.8$,可知在果实发育时期该品种的*PpCCD4*表达与类胡萝卜素的积累有一定的相关性,但非线性关系($r^2 = 0.88, p > 0.01$);‘金童6号’的类胡萝卜素总

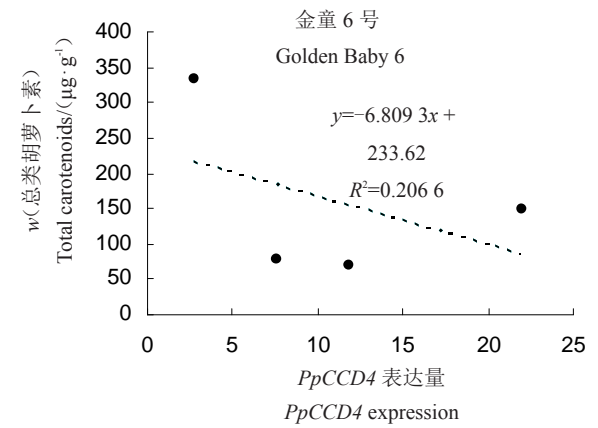
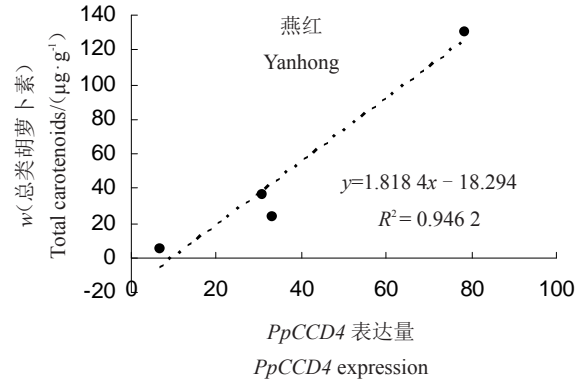


图4 ‘燕红’和‘金童6号’发育时期*PpCCD4*表达与类胡萝卜素总含量变化的相关性
Fig. 4 Correlation between *PpCCD4* expression and total carotenoid change during development of ‘Yanhong’ and ‘Golden Baby 6’

含量与*PpCCD4*表达相关性较弱,与黄肉桃中关键基因不能行使功能的结论一致。

2.4 不同桃*PpCCD4*基因型分析

测序结果表明(图5),‘金童6号’在距离基因起点875 bp的位置插入了TC重复,该位置突变位于转

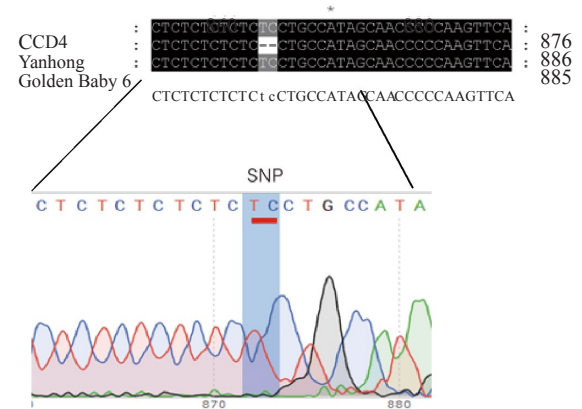


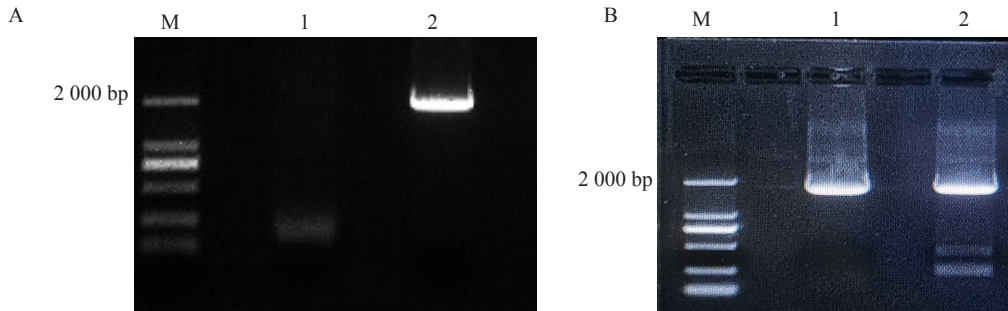
图5 变异位点2个品种*PpCCD4*序列差异
Fig. 5 The differences of selected test materials in *PpCCD4* sequence

录本 Prupe.1G255500.1 的编码区,故该种转录模式下 TC 插入导致了移码突变,造成转录提前终止,使得本该由 *PpCCD4* 编码降解类胡萝卜素的酶功能丧失,果肉中的类胡萝卜素积累。但该位置的突变位于转录本 Prupe.1G255500.2 的内含子区域,对该种转录本编码区蛋白质结构与功能的预测发现,其蛋

白仍有完整的功能(图6)。白肉桃品种‘燕红’*PpCCD4*未发生变异,氨基酸序列完整,蛋白质功能正常。

2.5 *PpCCD4* 启动子序列调控元件分析

PpCCD4 存在两种转录模式(图7)。对两个品种的编码区特异性扩增结果分析发现,品种‘金童6



1. 金童6号;2. 燕红;A. *PpCCD4.1* 在两果实中的检测;B. *PpCCD4.2* 在两果实中的检测。

1. Golden Baby 6; 2. Yanhong; A. Detection of transcript 1 in both varieties; B. Detection of transcript 2 in both varieties.

图6 CDS区凝胶电泳示意图

Fig. 6 Schematic of gel electrophoresis in the CDS region

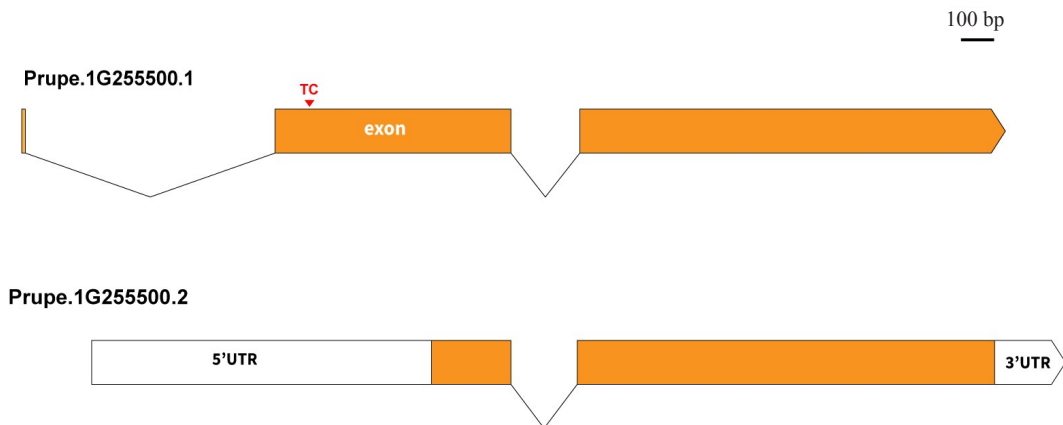


图7 *PpCCD4* 基因转录本示意图

Fig. 7 *PpCCD4* Transcripts

号’的转录模式以 *PpCCD4.2* 形式为主;而‘燕红’的转录模式对应 *PpCCD4.1*。

转录本 *PpCCD4.1* 无5’端和3’端的侧翼结构,三段外显子,转录起始的位点在第一段 ATG 处;转录本 *PpCCD4.2* 有侧翼结构,只有两段外显子,编码区较短,转录起始位点在第二段编码区的 ATG 处。两种转录本的转录起始位点不同,造成了调控转录起始的启动子在基因组中位置、序列的差异。2 kb 序列不同的两种启动子元件差异见表2。

‘燕红’的启动子相比‘金童6号’具有更多的 TATABOX 和更多的 CAATBOX,这些基础元件多具有启动转录和增强转录的作用。与果实发育时期以

‘燕红’为例的白肉品种 *PpCCD4* 的转录水平显著高于‘金童6号’为例的黄肉品种果实 *PpCCD4* 表达的现象一致。

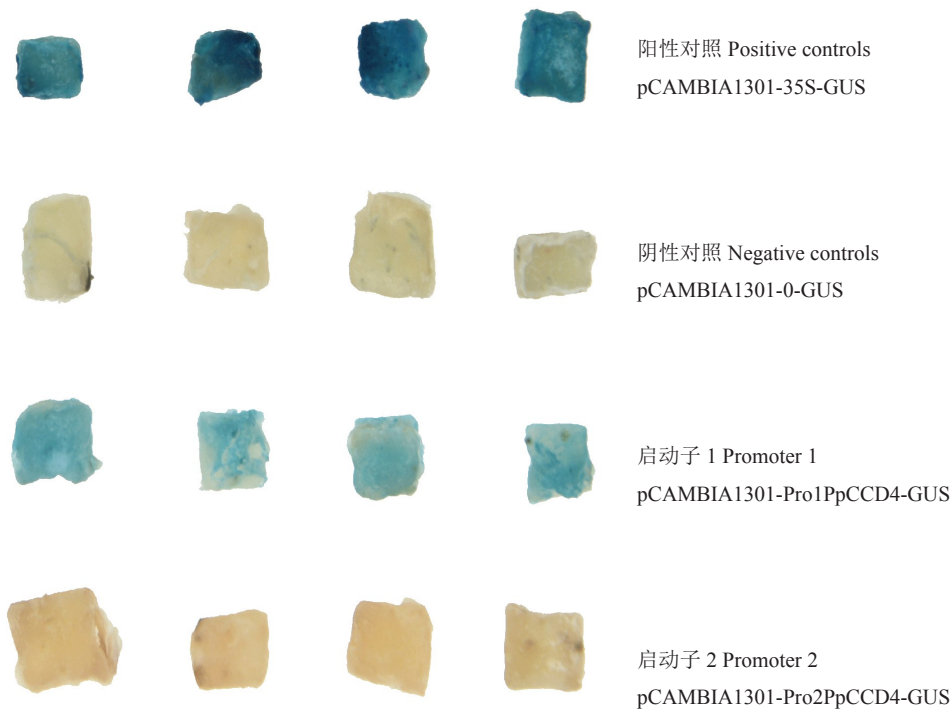
就一些特殊元件而言,黄肉桃品种‘金童6号’启动子上存在脱落酸、赤霉素和更多的生长素和茉莉酸反应元件,以及较多的抗逆胁迫响应元件,白肉桃品种‘燕红’启动子上则没有。

2.6 *PpCCD4* 启动子活性差异验证

如图8所示, *PpCCD4^{pro1}* 驱动的 GUS 蛋白在果肉中显淡蓝色,相较于 *PpCCD4^{pro2}* (淡黄色) 有更强的活性,表明白肉桃‘燕红’果实在发育时期 *PpCCD4* 启动子比‘金童6号’果实的该基因启动子

表2 ‘燕红’和‘金童6号’ *PpCCD4* 启动子顺式区作用元件Table 2 The *cis*-acting element in *PpCCD4* promoter of ‘Yanhong’ and ‘Golden Baby 6’

品种 Cultivar	功能元件名称 cis-acting element name	序列 Sequence	数量 Amount	功能 Function
燕红 Yanhong	TGA-element	AACGAC	2	生长素响应元件 Auxin-responsive element
	LTR	CCGAAA	1	低温响应元件 Cis-acting element involved in low-temperature responsiveness
	ARE	AAACCA	2	厌氧诱导所需的顺式调控元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
	AuxRR-core	GGTCCAT	1	生长素响应元件 Cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness
	G-Box	TCCACATGGCA	2	光响应元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
	CGTCA-motif	CGTCA	2	茉莉酸响应元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
	TGACG-motif	TGACG	2	茉莉酸响应元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
	CAT-box	GCCACT	2	分生组织表达顺式调控元件 Cis-acting regulatory element related to meristem expression
	CAAT-box	CAAAT	20	启动子和增强子区调控元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
	TATA-box	TATA/ATTATA/ TATAA	81	转录起始 - 30 核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start
	MRE	AACCTAA	1	光响应MYB结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness
	CCAAT-box	CAACGG	1	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
	Box 4	ATTAAT	4	光调控元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
	GATA-motif	AAGATAAGATT	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element
I-box	CCATATCCAAT	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element	
金童6号 Golden Baby 6	TATC-box	TATCCCA	1	赤霉素反应参与顺式作用元件 Cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness
	ABRE	ACGTG	1	赤霉素反应参与顺式作用元件 Cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness
	ARE	AAACCA	2	脱落酸反应参与顺式作用元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
	G-box	CACGTC	1	光顺式作用调控元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
	CGTCA-motif	CGTCA	2	茉莉酸响应元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
	TGACG-motif	TGACG	2	茉莉酸响应元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
	CAT-box	GCCACT	1	分生组织表达顺式调控元件 Cis-acting regulatory element related to meristem expression
	CAAT-box	CAAAT	14	启动子和增强子区调控元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
	CAAT-box	CCCAATTT	1	启动子和增强子区调控元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
	TATA-box	TATA	66	转录起始 - 30 核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start
	GT1-motif	GGTTAA	3	光响应原件 Light responsive element
	3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	1	光响应原件 Light responsive element
	MBS	CAACTG	1	干旱诱导MYB结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility
	MRE	AACCTAA	1	光响应MYB结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility
	Box 4	ATTAAT	3	光响应元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
	GATA-motif	GATAGGA	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element
	GA-motif	ATAGATAA	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element



启动子 1、2 分别表示携带 pCAMBIA1301-Pro1PpCCD4-GUS 和 pCAMBIA1301-Pro2PpCCD4-GUS 的农杆菌感染果肉后染色处理,阳性对照、阴性对照分别表示 pCAMBIA1301-35S-GUS、pCAMBIA1301 空载驱动 GUS 的农杆菌感染果肉后染色处理。

Post dyeing treatment, promoters 1 and 2 indicate that the *Agrobacterium* carrying pCAMBIA1301- Pro1PpCCD4- GUS, pCAMBIA1301-Pro2PpCCD4-GUS infects the pulp, the positive control and the negative control indicate pCAMBIA1301-35S-GUS, pCAMBIA1301 which drives GUS-infected pulp without load.

图 8 果肉 GUS 染色结果
Fig. 8 GUS staining in flesh

有更强的活性。阳性对照含有强启动子 35S 驱动的 GUS 基因有着较强的表达活性,果肉呈深蓝色;阴性对照不含启动子,果肉呈白色。

3 讨 论

本试验选取的 2 个品种,‘燕红’的白肉与‘金童 6 号’的黄肉是由单一基因座(Y)控制的一对质量性状,白肉对黄肉呈显性^[16]。随着果实发育时期的变化,黄肉桃果实中的类胡萝卜素总量呈持续上升的趋势,对应的果肉表型也是逐渐变黄且程度加深。‘燕红’中,类胡萝卜素的总含量在成熟过程中不断降低并趋近于零。*PpCCD4*在果肉中不同时期的表达与类胡萝卜素总含量的改变是有相关性的,在白肉桃中表达量是显著高于黄肉桃的,这与 Cao 等^[17]的检测结果吻合。

对所选的 2 个品种 *PpCCD4* 全长克隆发现,黄肉品种‘金童 6 号’*PpCCD4* 的 5' 端第 875 碱基处的位置比白肉品种‘燕红’多了 TC 重复(两碱基),造成了移码突变,其突变位置导致了 *PpCCD4* 转录的提

前终止,蛋白功能失效,这一结果与 Falchi 等^[18]试验结果一致,但根据蛋白质结构与功能的预测,该位点的突变不会影响转录本 *PpCCD4.2* 行使正常功能。除此之外,黄肉的突变机制还有 *CCD4* 内含子 3' 段之前插入 6.2 kb 片段;编码区 1 520 处 A/T 的替换,形成一个过早的终止密码子,导致缺少 91 个 C 末端残基的截断蛋白质都是黄肉的突变机制^[18]。‘金童 6 号’中 *CCD4* 功能改变是否与该基因在黄肉中的表达量较低有关尚无法证明,但是通过本实验,可以明确的是,可变剪接造成的转录起始位点的不同,对转录调控有较大的影响。

本实验中发现 *PpCCD4.1^{pro}*、*PpCCD4.2^{pro}* 的差异,造成了不同果实发育过程中 *PpCCD4* 表达有显著差异,而启动子区域差异的主要原因是果实在发育过程中对 *PpCCD4* 发生的可变剪接,进而产生两种起始位点不同的转录本。可变剪接是个体从相对简单的基因组水平提高蛋白质组多样性的重要机制^[19],蛋白质组的多样性与多细胞高等生物的复杂性相适应,从可变剪接实际的基因分布格局分析,可

变剪接多发生在参与信号传导和表达调节等复杂过程的基因上,如受体、信号传导通路、转录因子等,对个体的精准调控有重要的意义^[20]。转录和 mRNA 前体的加工、转运、降解并不是互相独立的过程,而是时间空间上的高度协同,前人在人体细胞中的研究^[21]证明,调节基因表达的启动子结构与可变剪接相互影响^[22]。

植物体在生长发育过程中,通过自身调整和环境影响^[19]有可能发生基因转录模式的改变,Ricardo^[23]的研究结果表明,对草莓果实发育过程中施加外源 ABA,会影响草莓的基因表达模式。对于功能基因存在的不同转录本的转录丰度的改变往往体现在植株的发育过程中,例如从茎瘤芥胞质雄性不育(cytoplasmic male sterile, CMS)系线粒体 cDNA 中扩增获得的 CMS 相关 T 基因的 2 个不同转录本在苗期基因转录水平的表达以 T1170 为主,盛花期以另一个转录本 T1243 表达模式为主^[24]。结合本试验中的 *PpCCD4* 表达推测,果实的成熟过程中转录模式 *PpCCD4.1* 受到了显著上调,但黄肉‘金童 6 号’移码突变的产生,使得转录提前终止,由此推测‘金童 6 号’的这种转录模式并非不存在,只是难以被检测。

本实验中, *PpCCD4.1*、*PpCCD4.2* 规律性地分别分布在白肉和黄肉中,黄肉中 *PpCCD4* 启动子活性很低,若移码突变不存在,那么可变剪接引起的启动转录区域的差异很有可能造成果实黄肉白肉的区别,但有多少品种的果实转录本为 *PpCCD4.2* 类型尚未可知。两种转录本,其一是无侧翼序列,另一种则是有侧翼序列,属于可变剪接类型中的可变外显子的保留或切除^[25]。启动子活性的不同对 *PpCCD4* 转录调控或许只是一个方面,转录因子等其他方面的差异是否有更显著的影响需要更加深入的研究。

类胡萝卜素的代谢在植物中是十分重要的,一方面它是植物光合系统中的关键保护物质,另一方面它是植物激素的合成前体,对植物的发育起调控作用^[26]。类胡萝卜素的代谢受多方面因素的调节,外界环境的改变可以显著地影响类胡萝卜素的积累,光^[27]、温度^[28]、外源乙烯^[29]等条件的差异,都会影响类胡萝卜素含量的改变,即便是同一个体在不同发育时期和不同植物组织中,类胡萝卜素裂解基因家族之间密码子的使用、酶的切割作用差异也十分

显著^[30]。

4 结 论

本研究克隆到的 DNA 全长以及不同转录本的启动子 2 kb 序列,分析结果证明了桃黄、白肉中存在 TC 重复的序列变异,该位点的突变使转录本 *PpCCD4.1* 过早的终止转录,蛋白无法正常行使功能。根据蛋白质编码区的扩增,证明了成熟的桃果肉 *PpCCD4* 转录时存在可变剪切,利用农杆菌介导的瞬时转化桃果肉染色,证明了可变剪切造成了启动转录的活性改变,原因是可变剪接的存在使转录起始位点发生改变。*PpCCD4^{pro1}* 的结果活性明显强于 *PpCCD4^{pro2}* 的结果表明:不同果实成熟过程中 *PpCCD4* 表达水平的差异是由不同果实成熟过程中可变剪接的选择造成的。

参考文献 References:

- [1] MIKI W. Biological functions and activities of animal carotenoids[J]. Pure & Applied Chemistry, 1991, 63(1): 141-146.
- [2] LICHTENTHALER H K, ROHMER M, SCHWENDER J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants[J]. Physiologia Plantarum, 1997, 101(3): 643-652.
- [3] 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.
XU Changjie, ZHANG Shanglong. Carotenoid biosynthesis and its regulation in plants [J]. Plant Physiology Communications, 2000, 36(1): 64-70.
- [4] 曹洪波. 转基因调控柑橘类胡萝卜素积累的细胞学和代谢研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2012.
CAO Hongbo. Cytologic and metabolic studies of engineered carotenoid accumulation in citrus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [5] BARTLEY G E, VIITANEN P V, PECKER I, CHAMOVITZ D, HIRSCHBERG J, SCOLNIK P A. Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88(15):6532-6536.
- [6] RUIZ- SOLA M A, RODRÍGUEZ- CONCEPCIÓN M. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: A colorful pathway[J]. The Arabidopsis Book, 2012, 10: e0158.
- [7] VALLABHANANI R, BRADBURY L M T, WURTZEL E T. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010, 504(1): 1-111.
- [8] TSUCHIYA Y, VIDAURRE D, TOH S. A small- molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolac-

- tone [J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(10): 741-749.
- [9] 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.
- [10] PHADUNGSAWAT B, WATANABE K, MIZUNO S. Expression of CCD4 gene involved in carotenoid degradation in yellow-flowered *Petunia × hybrida*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 261: 108916.
- [11] BRANDI F, BAR E, MOURGUES F. 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
- [12] ADAMI M, DE FRANCESCO P, BRANDI F. Identifying a carotenoid cleavage dioxygenase (ccd4) gene controlling yellow/white fruit flesh color of peach[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(5): 1166-1175.
- [13] 朱运钦, 曾文芳, 鲁振华, 牛良, 崔国朝, 王志强. '中油桃9号'及其黄肉芽变的类胡萝卜素代谢和基因表达分析[J]. *园艺学报*, 2015, 42(4): 623-632.
- ZHU Yunqin, ZENG Wenfang, LU Zhenhua, NIU Liang, CUI Guochao, WANG Zhiqiang. Carotenoid metabolism and gene expression analysis of 'CN9' nectarine and its yellow flesh mutant 'CN9Y' [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(4): 623-632.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] 颜少宾. 桃果实发育阶段类胡萝卜素的变化分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- YAN Shaobin. Analysis of carotenoid of the fruit development in *Prunus persica*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [16] CONNORS C H. Some notes on the inheritance of unit characters in the peach[J]. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 1919, 16: 24-36.
- [17] CAO S, LIANG M, SHI L. Accumulation of carotenoids and expression of carotenogenic genes in peach fruit[J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 137-146.
- [18] FALCHI R, VENDRAMIN E, ZANON L. Three distinct mutational mechanisms acting on a single gene underpin the origin of yellow flesh in peach[J]. *The Plant Journal*, 2013, 76(2): 175-187.
- [19] DE FRANCISCO AMORIM M, WILLING E M, SZABO E X, FRANCISCO-MANGILET A G, DROSTE-BOREL I, MACEK B, SCHNEEBERGER K, LAUBINGER S. The U1 snRNP subunit LUC7 modulates plant development and stress responses via regulation of alternative splicing[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(11): 2838-2854.
- [20] CÁCERES J F, KORNBLIHTT A R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease[J]. *Trends in Genetics*, 2002, 18(4): 186-193.
- [21] GOLDSTROHM A C, GREENLEAF A L, GARCIA-BLANCO M A. Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing[J]. *Gene*, 2001, 277(1/2): 31-47.
- [22] HASTINGS M L, KRAINER A R. Pre-mRNA splicing in the new millennium[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(3): 302-309.
- [23] AYUB R A, BOSETTO L, GALVÃO C W. Abscisic acid involvement on expression of related gene and phytochemicals during ripening in strawberry fruit *Fragaria × ananassa* cv. Camino Real[J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 203: 178-184.
- [24] 裴雁曦, 陈竹君, 曹家树. 茎瘤芥胞质雄性不育性与线粒体 T 基因选择性剪接有关[J]. *中国科学通报*, 2004, 49(22): 2312-2317.
- PEI Yanxi, CHEN Zhujun, CAO Jiashu. Cytoplasmic male sterility in stem mustard is related to alternative splicing of mitochondrial T gene [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(22): 2312-2317.
- [25] GRAVELEY B R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world[J]. *Trends in Genetics*, 2001, 17(2): 100-107.
- [26] SUN T, YUAN H, CAO H. Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids[J]. *Molecular plant*, 2018, 11(1): 58-74.
- [27] 陈栋, 谢红江, 李靖. 套袋对桃果实品质形成和果皮色素变化规律的影响[J]. *西南农业学报*, 2011, 24(6): 118-122.
- CHEN Dong, XIE Hongjiang, LI Jing. Effects of bagging on fruit quality and variation of skin pigment of peach[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(6): 118-122.
- [28] 杨映根, 张立军. 桃果实采后生理特性初探[J]. *植物学通报*, 1995, 12(4): 47-49.
- YANG Yinggen, ZHANG Lijun. Study on the postharvest physiology properties of peach fruit [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1995, 12(4): 47-49.
- [29] 张学英. 李果实着色与花色素苷合成机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- ZHANG Xueying. Research on pigmentation and mechanism of anthocyanin synthesis in plum (*Prunus* spp.) fruits[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [30] PRIYA R, SNEHA P, DASS J F P. Exploring the codon patterns between CCD and NCED genes among different plant species [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2019, 114: 103449.