

两种不同肉色枇杷果实类胡萝卜素积累及合成相关基因的表达

张 玲, 郑婷婷, 魏伟淋, 朱云美, 高用顺, 杨向晖*, 林顺权*

(华南农业大学园艺学院, 广州 510642)

摘 要: 以‘早钟 6 号’(黄肉)和‘白玉’(白肉)两类枇杷为材料, 测定不同发育阶段果实果皮和果肉中类胡萝卜素含量, 并对 15 个生物合成相关基因的表达进行了分析。随着果实发育成熟, β -胡萝卜素含量在黄肉‘早钟 6 号’果皮和果肉中增加, 到成熟期达到最高值, 分别为 68.53 和 $11.92 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW; 在白肉的‘白玉’果皮中也呈增加趋势, 到成熟期最高, 为 $38.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, 但果肉中略有下降, 从最初的 $0.47 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW 降低至 $0.29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW。两个品种果皮和果肉的 β -隐黄质含量表现为持续增加, 均在成熟期达到最高值。叶黄质含量在‘早钟 6 号’果皮中表现为下降, 在果肉中则持续上升; 在‘白玉’果皮中表现为先降后升, 在果肉中变化不大, 维持较低水平。‘早钟 6 号’进入转色期后, 与‘白玉’相比, 在果皮中的 *PSY* 和 *CYCB* 表达量较高, 而在果肉中 *CYCB* 和 *BCH* 的表达量较高, 提示枇杷不同发育阶段类胡萝卜素的积累主要受 *PSY*、*CYCB*、*BCH* 基因的共同调控。

关键词: 枇杷; 类胡萝卜素; 基因; 表达

中图分类号: S 667.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 11-2153-10

Characterization of Carotenoids Accumulation and Carotenogenic Genes Expression During Fruit Development in Two Loquat Cultivars with Different Colour

ZHANG Ling, ZHENG Ting-ting, WEI Wei-lin, ZHU Yun-mei, GAO Yong-shun, YANG Xiang-hui*, and LIN Shun-quan*

(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The yellow-fleshed loquat ‘Zaozhong 6’ and the white-fleshed loquat ‘Baiyu’ were used as materials, the accumulation of carotenoids in peel and pulp during different fruit development stages were detected, and the expression of 15 carotenogenic genes were analyzed. During loquat fruit ripening, the content of β -carotene in peel and pulp of ‘Zaozhong 6’ increased gradually and peaked at the fully ripe stage, in the peel it was $68.53 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, while in the pulp it was $11.92 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW. And in the peel of ‘Baiyu’, the content of β -carotene increased and peaked at the fully ripe stage, reached to $38.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, while it decreased in the pulp of ‘Baiyu’, from the original $0.47 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW reduced to $0.29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW; The content of β -cryptoxanthin in the peel and pulp of ‘Zaozhong 6’ and ‘Baiyu’ both

收稿日期: 2015-06-08; 修回日期: 2015-10-14

基金项目: 广州市科技计划项目 (201504010028)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gzyxh@scau.edu.cn; loquat@scau.edu.cn)

increased steadily, and peaked at the fully ripe stage; However, the content of lutein decreased in the peel of 'Zaozhong 6' and increased in the pulp of 'Zaozhong 6'; It dropped and then rised in the peel of 'Baiyu', and there was no significant change of β -cryptoxanthin in the pulp of 'Baiyu'. After the breaker stage, the mRNA levels of phytoene synthase (*PSY*) and chromoplast-specific lycopene β -cyclase (*CYCB*) were higher in the peel, and *CYCB* and β -carotene hydroxylase (*BCH*) mRNAs were higher in the flesh of 'Zaozhong 6', compared with 'Baiyu'. The results showed that the expression level of *PSY*, *CYCB* and *BCH* was likely to cooperatively regulate the accumulation of carotenoids.

Key words: loquat; carotenoids; gene; expression

20 世纪由于分子生物学的兴起, 基因的克隆及功能的研究成热点, 植物类胡萝卜的生物合成途径及其合成途径中关键基因研究也备受关注。在 1990 年前后, 植物类胡萝卜素合成的主链途径已经阐明, 1987 年番茄 *PSY* (八氢番茄红素合成酶) 基因的分离以及随后的功能验证标志着植物类胡萝卜素代谢研究进入分子时代。2000 年, 其合成途径中第一个合成酶——1 - 脱氧木酮糖 - 5 - 磷酸合成酶 (*DXS*) 被认为是植物类胡萝卜素等萜类物质合成的关键酶 (Lois et al., 2000), 其编码基因最早从拟南芥中获得 (Mandel et al., 1996)。 *DXS* 基因的分离与功能鉴定首先在薄荷 (Lange & Croteau, 1999) 和辣椒 (Bouvier et al., 1998) 中获得成功, 随后该基因在番茄 (Lois et al., 2000) 等多种植物上获得。番茄红素是类胡萝卜素进一步合成代谢的分支点, 一条途径是在番茄红素 β - 环化酶 (*LCYb*) 和番茄红素 ϵ - 环化酶 (*LCYe*) 的共同作用下生成 α - 胡萝卜素, 随后在胡萝卜素 β 环羟化酶 (*BCH*) 和胡萝卜素 ϵ 环羟化酶 (*ECH*) 共同作用下生成叶黄素。另一条途径是在番茄红素 β - 环化酶 (*LCYb*) 的作用下产生 β - 胡萝卜素, 之后在 *BCH* 作用下转变成 β - 隐黄素。类胡萝卜素合成途径中其它合成酶基因, 如 *DXP* 还原异构酶 (*DXR*), 异戊烯焦磷酸/3,3 - 二甲基丙烯基焦磷酸合成酶 (*IDS*)、番茄红素环化酶 (*LYC*)、八氢番茄红素脱饱和酶 (*PDS*)、 ζ - 胡萝卜素脱饱和酶 (*ZDS*) 等先后被克隆, 并对其功能进行了研究。其中 *DXR* 活性的高低决定了 *DXP* 用于萜类物质合成的比例, 因此对类胡萝卜素合成起着十分重要的作用 (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002)。而在番茄上的研究表明 *IDS* 是类胡萝卜素合成又一关键酶, 其基因表达与番茄果实成熟期间类胡萝卜素的积累呈现良好的相关性, 并与 *DXS* 和 *PSY* 基因表达变化相平行, 将番茄 *IDS* 基因导入拟南芥可使植株类胡萝卜素含量提高 50% (Botella-Pavía et al., 2004)。同样, 在番茄上对 *DXPS*、*PSYI* 和 *PDS* 的表达研究表明: 果实成熟期间这些基因表达明显增强, 特别是 *PSYI* 表达增强 20 多倍, 导致总类胡萝卜素含量上升 10 多倍 (Giuliano et al., 1993; Lois et al., 2000)。柑橘果实成熟期间类胡萝卜素合成基因的表达呈现出相同的趋势, 如伏令夏橙果实成熟时果皮类胡萝卜素总量上升, 是由于 *PSY*、*PDS* 和 *ZDS* 等基因表达协同增强而造成 (Kato et al., 2004)。但也有研究指出, 类胡萝卜素的积累与其生物合成途径上的基因表达不相关, Li 等 (2006) 发现花椰菜 *Or* 突变体花蕾上积累大量的 β - 胡萝卜素而呈现金黄色, 但类胡萝卜素合成基因的表达并没有明显增加。近几年来, 关于类胡萝卜素的积累又有了新的观点, Fu 等 (2012) 研究不同类型枇杷 '洛阳青' 和 '白沙' 不同发育阶段中的质体变化及质体脂结合蛋白基因 (*PAP*) 的表达, 发现二者果皮果肉中的有色体的数量和结构以及 *PAP* 表达均有差异, 指出 '白沙' 枇杷果肉中不能形成正常的有色体才是其类胡萝卜素含量低的原因。Fu 等 (2014) 又报道 *EjPSY2A* 基因产生失活的突变缺失直接导致白肉枇杷果肉不积累类胡萝卜素。

本研究中用黄肉和白肉两类枇杷的代表品种研究果实发育过程中果皮和果肉类胡萝卜素的变化

规律; 并分析两类果实的不同发育阶段的类胡萝卜素合成相关基因的表达水平, 以期阐明枇杷果实类胡萝卜素积累的分子机制, 为科学调控枇杷类胡萝卜素的形成, 改善果实品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘早钟 6 号’ (黄肉) 和 ‘白玉’ (白肉) 枇杷取自华南农业大学园艺学院枇杷属植物种质资源圃。两种试材的砧木均为普通枇杷, 树龄约 10 年。根据花后果实生长天数和果皮颜色变化初步将果实分为 5 个不同的发育阶段: I 期, 未转色期, 花后 92 ~ 98 d; II 期, 转色期, 花后 112 ~ 114 d; III 期, 褪绿期, 花后 115 ~ 120 d; IV 期, 橙黄期/浅黄期, 黄熟期, 花后 118 ~ 122 d; V 期, 橙色期/深黄期, 成熟期, 花后 124 ~ 128 d (张玲 等, 2013)。样品采后, 迅速去掉果实顶部和基部, 分果皮和果肉用液氮速冻, 然后于 - 70 °C 贮藏, 用于色素分析、类胡萝卜素合成相关基因表达分析等。相关试验于 2011 年和 2012 年完成。

1.2 主要类胡萝卜素组分含量的测定

枇杷类胡萝卜素提取和皂化按熊作明等 (2007) 的方法进行。成分鉴定和定量分析采用 Agilent 1200 HPLC-DAD 分析系统, 5 μ m C18 反相柱 (250 mm \times 4.6 mm) 和 20 mm \times 4.6 mm C18 预柱, 使用外标法。色谱条件参考惠伯棣 (2005) 的方法。测定了 β -胡萝卜素、 β -隐黄质和叶黄质在不同类型果实成熟过程中的含量变化。 β -胡萝卜素、 β -隐黄质和叶黄质标样购自 Sigma 公司。

1.3 枇杷果实类胡萝卜素生物合成相关基因的表达分析

参考 Zhang 等 (2013) 的方法, 分别提取 ‘早钟 6 号’ 和 ‘白玉’ 枇杷果实 5 个时期果皮和果肉的总 RNA。cDNA 第一链的合成按照 M-MLV 逆转录酶 (TaKaRa) 的说明书进行。

根据 Real-time PCR 引物的设计原则, 设计引物分离得到的 *DXS*、*DXR*、*IDI*、*PSY*、*LCYb*、*LCYe*、*BCH* 和 *ECH* 基因序列 (基因登录号分别为: JX097047、JX089590、JX097049、JX097048、JX089591、JX097050、JX097051 和 JX097052), 用 Primer premier 6.0 设计引物 (表 1), 通过 Real-time PCR 进行检测, 并制作标准曲线, 以检测其扩增效率 (E) 是否在 90% ~ 110% 范围内。其他类胡萝卜素生物合成相关基因 (*PDS*、*ZDS*、*CRTISO*、*CYCB*、*ZEP*、*VDE*、*CCD*) 使用 Fu 等 (2012) 设计的引物。

表 1 实时定量 PCR 引物
Table 1 Primers for Real-time PCR

基因 Gene	上游引物 (5' - 3') Forward primer (5' - 3')	下游引物 (5' - 3') Reverse primer (5' - 3')	扩增长度/bp Product size
<i>DXS</i>	CATAGATGACCGACCAAGT	AGGAGGCAGCCAAACAG	179
<i>DXR</i>	ATCCGCAGTCCATTATACATTC	CAGCAGCATAGGCAAGGT	231
<i>IDI</i>	TCGCCTTGGTTCAGACTTG	AAGCCGCAATCAAAGTTTCC	147
<i>PSY</i>	ACATTCAGCCCTTCAGA	ATCCAACAGTTCCAGCA	117
<i>LCYb</i>	CGGTATGGCTATTCTGCTTA	AGTCATCCTAATCTCTATCCTG	251
<i>LCYe</i>	TTCCTCGGCTCTACATTGT	GGCAGTGACCTCATCTCTT	209
<i>BCH</i>	GCCTTGTTCTGCTCTTTGTT	ATGAGCCGCAGCAACCTT	152
<i>ECH</i>	AGTTTGCTCTGCTGGAAG	CGAAGACGAGGATGATGT	185

以各样品的 cDNA 为模板, 在 BIO-RAD iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行 Real-time PCR 反应。每个样品设 3 个重复, 以 ddH₂O 为阴性对照。

反应体系如下: SsoAdvanced SYBR Green Supermix (BIO-RAD) 10.0 μL , 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL , 1.0 μL cDNA 模板, ddH₂O 8.0 μL , 总体积为 20.0 μL 。扩增程序为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 40 个循环。反应结束后确认扩增曲线和融解曲线, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据分析, 计算类胡萝卜素生物合成相关基因在不同样品中的表达情况。

2 结果与分析

2.1 不同发育阶段枇杷色素的含量和组成分析

如图 1 所示, 随着果实发育成熟, ‘早钟 6 号’果皮和果肉的 β -胡萝卜素含量逐渐增加, 到成熟期 (V) 达到最高值, 分别为 $68.53 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 和 $11.92 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$; ‘白玉’果皮中也呈增加趋势, 在成熟期最高, 为 $38.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 但果肉中略有下降, 从最初的 $0.47 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 降低至 $0.29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

两个品种果皮果肉的 β -隐黄质含量表现为持续增加, 均在成熟期达到最高值; 但其在总类胡萝卜素中所占比例相对较小。

叶黄质含量在 ‘早钟 6 号’果皮中随果实成熟持续下降, 在果肉中先轻微下降后迅速上升至成熟时含量达最高 $3.83 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 但仍低于果皮; 在 ‘白玉’果皮中也先下降, 成熟期上升至 $7.94 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 但仍低于未转色期 (I) 水平, 在果肉中一直维持较低水平。

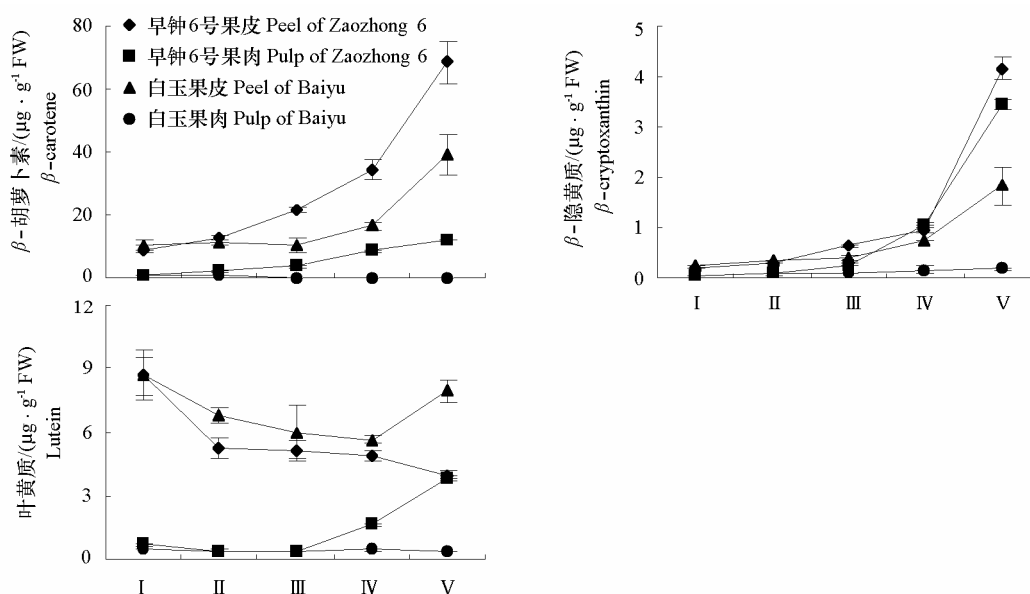


图 1 枇杷果实不同发育阶段色素的含量分析

I: 未转色期; II: 转色期; III: 褪绿期; IV: 黄熟期; V: 成熟期。

Fig. 1 The analysis of pigment content in loquat fruit during different developmental phase

I: Immature green; II: Breaker; III: Degreening; IV: Yellow mature; V: Full mature.

2.2 不同发育阶段枇杷类胡萝卜素生物合成相关基因在果肉和果皮中的表达分析

在‘早钟6号’和‘白玉’的5个不同发育阶段果皮和果肉中, 对类胡萝卜素生物合成途径中的15个基因的表达进行了分析。

如图2所示, *DXS* 在同种枇杷果皮和果肉中的表达趋势相似: ‘早钟6号’先上升后下降, 在Ⅱ期达最高峰; ‘白玉’先上升后下降, 到第Ⅴ期有所回升, 也在Ⅱ期达最高峰。 *DXR* 在两品种的同部位表达趋势相似: 在果皮中第Ⅲ期表达量最高, 然后下降, 到第Ⅴ期稍有所升高; 在果肉中随果实成熟下降, 至第Ⅴ期有所上升。 *IDI* 则在两个品种果皮和果肉中的表达趋势都较一致, 均在Ⅰ期表达量最高, 在到Ⅱ期过程中迅速下降, 之后稍有波动但一直维持较低水平。

PSY、*PDS* 和 *ZDS* 在‘早钟6号’和‘白玉’中表达趋势相似, 在前期上升然后一直下降或下降至Ⅴ期略有上升, 且 *PSY* 在果皮中表达量高于果肉 (图2)。

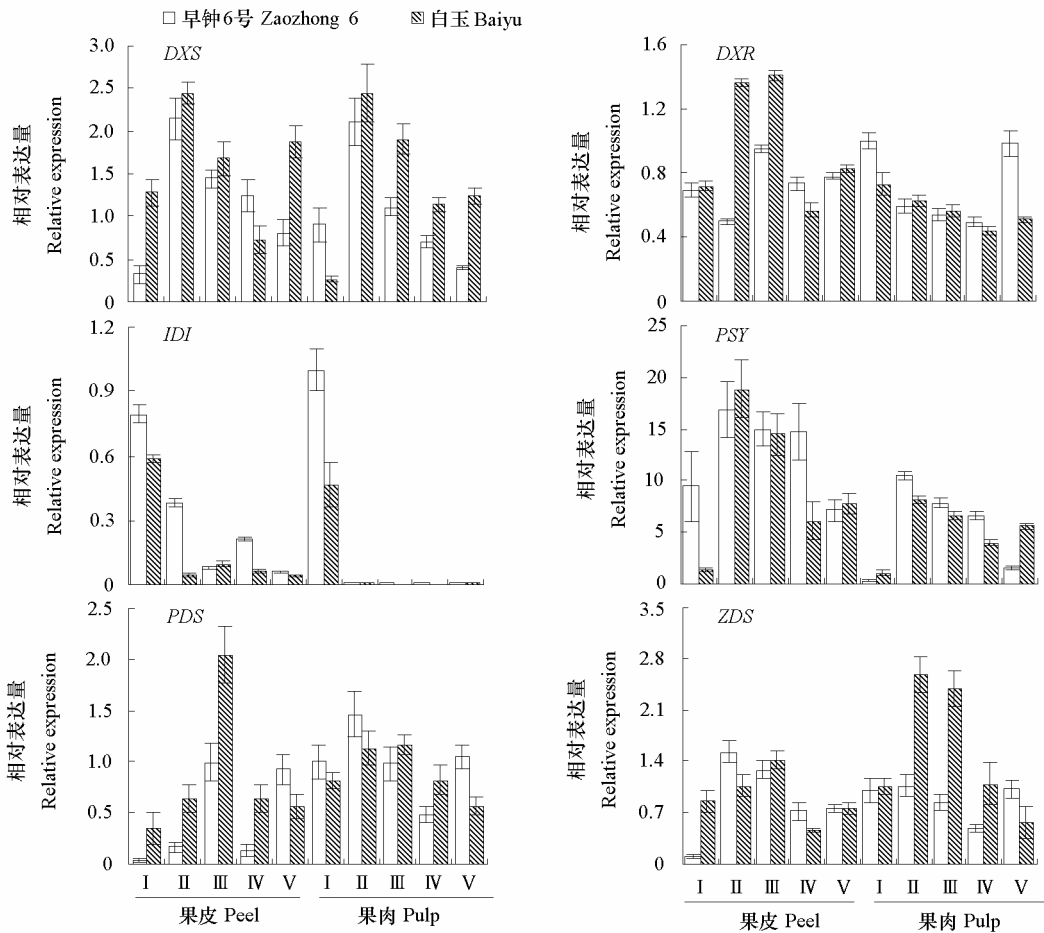


图2 类胡萝卜素生物合成相关基因 *DXS*、*DXR*、*IDI*、*PSY*、*PDS* 和 *ZDS* 在不同发育阶段的表达
Fig. 2 Expression patterns of carotenoid biosynthetic genes *DXS*、*DXR*、*IDI*、*PSY*、*PDS* and *ZDS* during different developmental phase

CYCB 在‘早钟6号’果皮中先迅速上升后稍有下降然后又上升至第Ⅴ期达到最高值, 且均高于在其它样品中的表达, 在果肉中前期上升至第Ⅲ期达最高峰然后下降; 在‘白玉’果皮和果肉中均先上升在第Ⅱ期达最高峰然后下降至第Ⅴ期又稍有上升 (图3)。

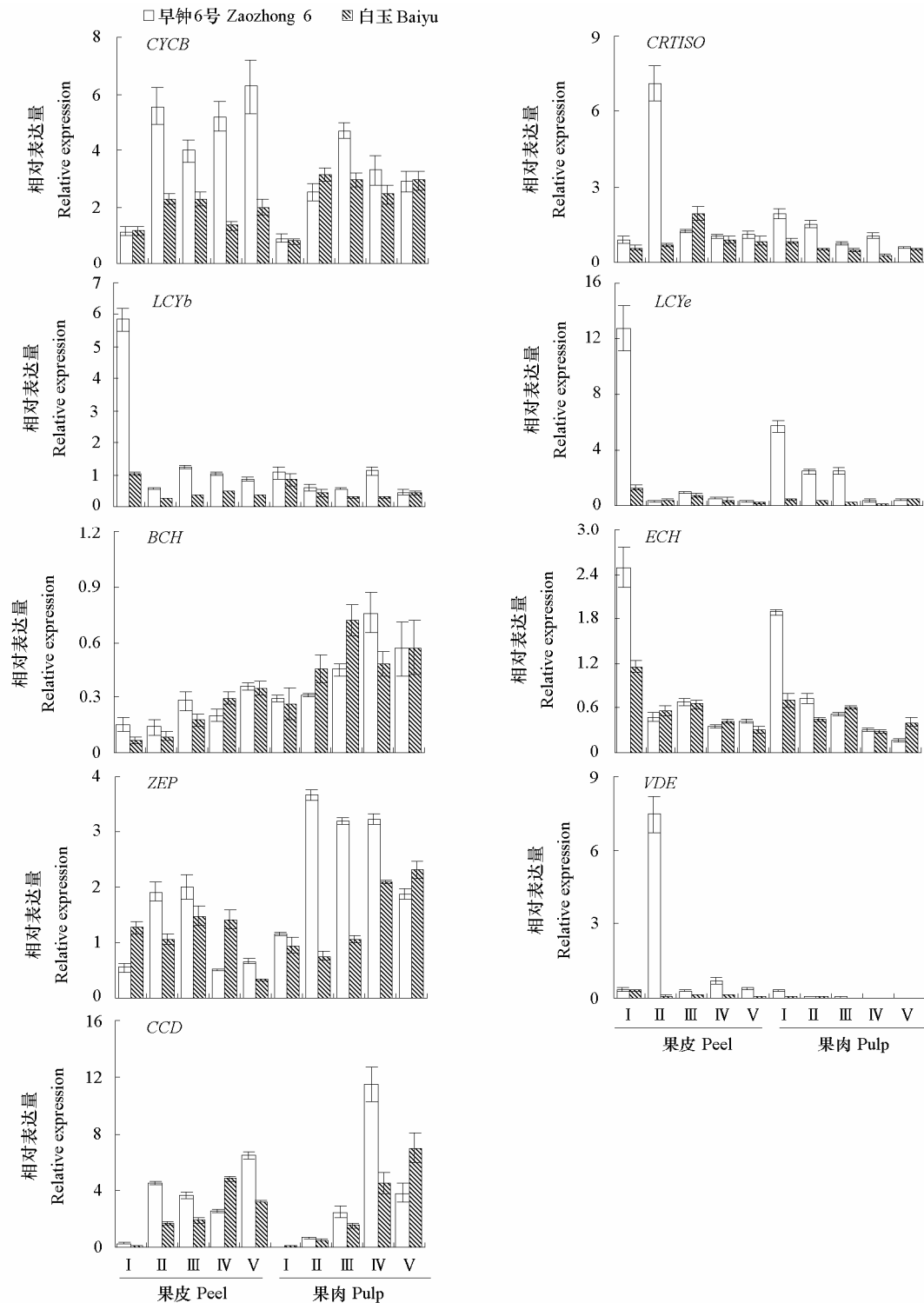


图3 类胡萝卜素生物合成相关基因 *CYCB*、*LCYb*、*LCYe*、*BCH*、*ECH*、*ZEP*、*VDE*、*CRTISO* 和 *CCD* 在不同发育阶段的表达
 Fig.3 Expression patterns of carotenoid biosynthetic genes *CYCB*, *LCYb*, *LCYe*, *BCH*, *ECH*, *ZEP*, *VDE*, *CRTISO* and *CCD* during different developmental phase

LCYb 在‘早钟 6 号’果皮早期大量表达至 II 期急剧下降随后维持平衡; 在‘早钟 6 号’果肉和‘白玉’中其表达水平一直较低, 总体呈平稳下降趋势 (图 3)。*LCYe* 在‘早钟 6 号’果皮和果肉中的表达趋势相似, 均在早期大量表达然后迅速下降至后期维持平衡; 在‘白玉’果皮和果肉中则一直都维持较低表达 (图 3)。

BCH 在两个品种果皮中的表达量随果实成熟而上升, 果肉中先上升然后有所下降, 但仍高于果皮 (图 3)。*ECH* 的表达趋势则与 *LCYe* 相似: ‘早钟 6 号’果皮和果肉中均在早期大量表达然后迅速下降至后期维持平衡, 在‘白玉’中相对较低, 在不同发育阶段有所波动总体上呈下降均势 (图 3)。*ZEP* 在‘早钟 6 号’果皮和果肉的表达量均先上升后下降, 且在果肉中表达量更高; ‘白玉’果皮中后期有所下降, 而在果肉中先稍有下降然后随果实成熟而上升, 且也高于果皮中的表达量 (图 3)。*VDE* 的表达趋势与 *CRTISO* 相似, 在‘早钟 6 号’果皮第 II 期中大量表达, 在其他时期或其它样品中其表达量都相对较低, 在果肉后期更是极其微弱 (图 3)。*CCD* 的表达水平, 在‘早钟 6 号’和‘白玉’I 期均最低, 随果实成熟总体呈上升趋势, 且第 V 期在‘白玉’果肉中最高 (图 3)。

3 讨论

3.1 枇杷果实不同发育阶段色素含量变化

目前已有一些对枇杷果实发育期间类胡萝卜素组分含量变化的报道, 其共同规律为 β -胡萝卜素和 β -隐黄质均呈上升趋势, 叶黄质一直下降或下降至果实成熟时平缓或略有上升, 其中果皮的主要色素为 β -胡萝卜素和叶黄质, 而在果肉中则以 β -胡萝卜素和 β -隐黄质为主 (刘兴满, 2007; 周春华, 2007)。

本研究中对‘早钟 6 号’和‘白玉’果皮果肉不同发育阶段类胡萝卜素含量变化的结果与上述结论基本类似。 β -胡萝卜素在‘早钟 6 号’果皮果肉和‘白玉’果皮中的含量呈上升趋势, 至成熟期达到最高值, 但在‘白玉’果肉中含量略有下降。 β -隐黄质在‘早钟 6 号’和‘白玉’果皮果肉中也呈上升趋势, 特别是在‘早钟 6 号’的果皮果肉和‘白玉’果皮中表现尤为明显, 出现了在成熟期急剧上升的现象, 但在‘白玉’果肉中则表现较为平缓, 一直维持较低水平。叶黄质在‘早钟 6 号’和‘白玉’果皮中含量一直高于果肉中的含量, 但二者的变化趋势不同: 在‘早钟 6 号’果皮中, 叶黄质的含量表现为一直下降, 而在‘白玉’果皮中则表现为下降至果实成熟时略有上升。

‘早钟 6 号’果肉中的叶黄质先下降后迅速上升, 在成熟期达到最高值, 而在‘白玉’中则表现为持续下降。与前人的研究相比, 叶黄质在果肉中的含量略高于相同时期果皮中 β -隐黄质的含量, 形成这一差异的原因可能是品种不同、采样时期不同, 另外植物类胡萝卜素生物合成容易受环境因素 (如光照、温度、化学物质及栽培条件等) 的影响 (陶俊 等, 2003), 检测方法不同也会造成差异。

3.2 枇杷果实类胡萝卜素生物合成相关基因的表达分析

在幼果期 (I 期), ‘早钟 6 号’和‘白玉’果皮果肉的 β -类胡萝卜素和 β -隐黄质开始增加, 可能与 *LCYe*、*LCYb*、*ECH* 和 *IDI* 的高表达相关, 尽管在这个阶段两个品种类胡萝卜素含量差异不大。而 *IDI* 的表达随果实的发育成熟, 迅速下降并维持较低水平, 说明两品种果实发育过程中类胡萝卜素的积累主要来自于前期合成的 IPP 或 DMAPP, ‘白玉’果肉中类胡萝卜素的下降是否与该

基因表达下降有关, 还需进一步研究。

在转色期(Ⅱ期), ‘早钟6号’和‘白玉’果皮果肉的叶黄质表现为下降, 可能与 *LCYe*、*LCYb* 和 *ECH* 基因表达下调有关。果实开始转色时, 由于 *DXS*、*DXR*、*PSY*、*PDS*、*CYCB* 和 *ZDS* 的上调, 导致两个品种果实中开始积累 β -类胡萝卜素和 β -隐黄质, 这与前人的研究结果(Fu et al., 2012)类似。

在果实成熟阶段, ‘早钟6号’果皮大量积累 β -类胡萝卜素, 可能与 *PSY* 的高表达及 *CYCB* 和 *BCH* 基因的表达上调相关。*PSY* 催化合成第一个类胡萝卜素分子——八氢番茄红素, 是公认的植物类胡萝卜素合成的关键酶, 在类胡萝卜素家族各种成分的生物合成环节中起着重要作用(王亮等, 2009; 朱海生等, 2011)。另外也发现该基因在两不同品种果皮中的表达量均高于果肉, 与果皮和果肉中类胡萝卜素含量差异相一致, 说明该基因可能调控类胡萝卜素在果皮和果肉不同部位的合成和积累。*CYCB* 对于 β -类胡萝卜素积累起到重要的作用(朱长甫等, 2004; Alquézar et al., 2009; Blas et al., 2010)。而 *CYCB* 可催化番茄红素向 β -胡萝卜素转化的酶, 且只存在于有色体中(Ronen et al., 2000)。在本研究中, *CYCB* 的表达无论是在果肉或是果皮中, ‘早钟6号’的表达量均高于‘白玉’。*BCH* 是植物类胡萝卜素合成代谢途径中的关键酶, 是催化系列叶黄素合成的第一个关键酶(徐昌杰和张上隆, 2002)。*BCH* 随果实成熟呈上升趋势, 对应于枇杷果实 β -隐黄质的上升, 暗示 *BCH* 可能调控枇杷果实 β -隐黄质的合成和积累。

ZEP 和 *VDE* 催化玉米黄素和莖菜黄素经环氧玉米黄质相互转化, 组成叶黄素循环。在类胡萝卜素生物合成途径中, 叶黄素循环具有重要作用(周莉和刘莉, 2011)。*ZEP* 和 *VDE* 在不同研究中表现出不同的结果[熊玉兰, 2002; 戚佳妮等, 2009(私人通讯)]。对不同发育阶段‘早钟6号’和‘白玉’果皮果肉中的 *ZEP* 和 *VDE* 进行表达分析, 发现 *VDE* 的表达趋势却与 *CRTISO* 相似, 在‘早钟6号’果皮第Ⅱ期中大量表达, 在其它时期或其它样品中其表达量都相对较低, 在果肉后期更是极其微弱; *ZEP* 在‘早钟6号’果皮果肉和‘白玉’果皮中的表达量均先上升后下降, 在‘白玉’果肉中先稍有下降然后随果实成熟而上升; 同时对枇杷果实类胡萝卜素成分鉴定结果显示枇杷果实中含有莖菜黄质和新黄质, 暗示 *ZEP* 和 *VDE* 可能与枇杷果实莖菜黄质和新黄质合成有关, 然而, 莖菜黄质和新黄质均是在枇杷色素所占比例较小, 所以 *ZEP* 和 *VDE* 对枇杷果实类胡萝卜素积累的影响, 有待进一步证明。

CCD 是一类具有双加氧特性的类胡萝卜素氧化酶, 能在特定的位点裂解氧化类胡萝卜素, 从而影响对类胡萝卜素的转化(由淑贞和杨洪强, 2008)。本试验中对 *CCD* 在枇杷果实中的表达研究显示其随果实成熟总体上呈上升趋势, 说明随枇杷果实成熟类胡萝卜素的降解能力也加强, 但从各时期类胡萝卜素的积累来看, *CCD* 表达的加强对类胡萝卜素的积累影响不大。

综合上述分析可以推测: ‘早钟6号’果皮、果肉和‘白玉’果皮中 β -胡萝卜素含量表现为持续升高, 仅‘早钟6号’果皮中 *PSY* 和 *CYCB* 基因及果肉中 *BCH* 基因的表达与之相对应, 表现为上调, 并在成熟期仍保持较高的表达量。提示‘早钟6号’和‘白玉’不同发育阶段类胡萝卜素的积累主要受 *PSY*、*CYCB*、*BCH* 基因的共同调控。Fu等(2012)对代表不同类型枇杷的‘洛阳青’和‘白沙’不同发育阶段类胡萝卜素的积累和相关基因的表达分析也得出类似结论, 并指出‘白沙’枇杷果肉中不能形成正常的有色体才是其类胡萝卜素含量低的主要原因。‘早钟6号’和‘白玉’两个品种果皮和果肉类胡萝卜素的积累差异是否也与此有关, 需要进一步试验验证。

References

- Alquézar B, Zacarias L, Rodrigo M J. 2009. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast- specific lycopene β -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 60 (6): 1783 – 1797.
- Blas A L, Ming R, Liu Z Y, Veatch O J, Paull R E, Moore P H, Yu Q Y. 2010. Cloning of the papaya chromoplast-specific lycopene β -cyclase, CpCYC-b, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination hot spot. *Plant Physiology*, 152 (4): 2013 – 2022.
- Botella-Pavía P, Besumbes O, Phillips M A, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodríguez-Concepción M B. 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: Evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J*, 40 (2): 188 – 199.
- Bouvier F, D'harlingue A, Suire C, Backhaus R A, Camara B. 1998. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol*, 117: 1423 – 1431.
- Fu X M, Feng C, Wang C Y, Yin X R, Lu P J, Grierson D, Xu C J, Chen K S. 2014. Involvement of multiple phytoene synthase genes in tissue and cultivar-specific accumulation of carotenoids in loquat. *J Exp Bot*, 65 (16): 4679 – 4689.
- Fu X M, Kong W B, Peng G, Zhou J Y, Azam M, Xu C J, Grierson D, Chen K S. 2012. Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits. *J Exp Bot*, 63 (1): 341 – 354.
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor M A. 1993. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnology*, 26 (3): 139 – 145.
- Hui Bo-di. 2005. Carotenoid chemistry and biochemistry. Beijing: China Light Industry Press. (in Chinese)
- 惠伯棣. 2005. 类胡萝卜素化学及生物化学. 北京: 中国轻工业出版社.
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol*, 134: 824 – 837.
- Lange B M, Croteau R. 1999. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: Cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys*, 365 (1): 170 – 174.
- Li L, Lu S, Cosman K M, Earle E D, Garvin D F, O'Neill J. 2006. β -carotene accumulation induced by the cauliflower *Or* gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry*, 67 (12): 1177 – 1184.
- Liu Xing-man. 2007. Primary studies on carotenoid accumulation in loquat fruit [M. D. Dissertation]. Yangzhou: Yangzhou University. (in Chinese)
- 刘兴满. 2007. 枇杷果实类胡萝卜素积累的初步研究[硕士论文]. 扬州: 扬州大学.
- Lois L M, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A. 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J*, 22 (6): 503 – 513.
- Mandel M A, Feldmann K A, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, Leon P. 1996. CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J*, 9: 649 – 658.
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*, 130 (3): 1079 – 1089.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J. 2000. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (20): 11102 – 11107.
- Tao Jun, Zhang Shang-long, Zhang Liang-cheng, An Xin-min, Liu Chun-rong. 2003. Relationship between color formation and change in composition of carotenoids in peel of citrus fruit. *J Plant Physiol Mol Biol*, 29 (2): 121 – 126. (in Chinese)
- 陶 俊, 张上隆, 张良诚, 安新民, 刘春荣. 2003. 柑橘果皮颜色的形成与类胡萝卜素组分变化的关系. *植物生理与分子生物学学报*, 29 (2): 121 – 126.
- Wang Liang, Mu Pei-yuan, Xu Hong-jun, Zhuang Li, Sang Wei, Nie Ying-bin, Han Xin-nian, Zou Bo. 2009. Allelic variations of *Psy-A1* gene for yellow pigment content in Xinjiang wheat cultivars. *Journal of Triticeae Crops*, 29 (4): 782 – 786. (in Chinese)
- 王 亮, 穆培源, 徐红军, 庄 丽, 桑 伟, 聂迎彬, 韩新年, 邹 波. 2009. 新疆小麦品种黄色素含量基因 (*Psy-A1*) 等位变异的分子检测. *麦类作物学报*, 29 (4): 782 – 786.

- Xiong Yu-lan. 2002. Comparative analysis of carotenoid biosynthetic enzyme gene expression in juhongxin and popular heading chinese cabbage [M. D. Dissertation]. Beijing: Capital Normal University. (in Chinese)
- 熊玉兰. 2002. 橘红心白菜和普通大白菜类胡萝卜素代谢途径主要酶基因的表达分析 [硕士论文]. 北京: 首都师范大学.
- Xiong Zuo-ming, Zhou Chun-hua, Tao Jun. 2007. Changes of carotenoid content in pulp of different loquat types during fruit coloring. Scientia Agricultura Sinica, 40 (12): 2910 - 2914. (in Chinese)
- 熊作明, 周春华, 陶 俊. 2007. 不同类型枇杷果实着色期间果肉类胡萝卜素含量的变化. 中国农业科学, 40 (12): 2910 - 2914.
- Xu Chang-jie, Zhang Shang-long. 2002. Advances in research of genes responsible for carotenoid biosynthesis in citrus. Acta Horticulturae Sinica, 29 (S1): 376 - 382. (in Chinese)
- 徐昌杰, 张上隆. 2002. 柑橘类胡萝卜素合成关键基因研究进展. 园艺学报, 29 (S1): 376 - 382.
- You Shu-zhen, Yang Hong-qiang. 2008. Carotenoid cleavage dioxygenases and their physiological function. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 28 (3): 630 - 637. (in Chinese)
- 由淑贞, 杨洪强. 2008. 类胡萝卜素裂解双加氧酶及其生理功能. 西北植物学报, 28 (3): 630 - 637.
- Zhang Ling, Lin Shun-quan, Hu You-li, Zheng Ting-ting, Yang Xiang-hui. 2013. Cloning of *DXR* gene and its expression analysis during fruit ripening in loquat. Journal of Fruit Science, 30 (4): 563 - 566, 724. (in Chinese)
- 张 玲, 林顺权, 胡又厘, 郑婷婷, 杨向晖. 2013. 枇杷 *DXR* 基因的克隆及其在果实成熟过程中的表达分析. 果树学报, 30 (4): 563 - 566, 724.
- Zhang L, Zhang Z K, Lin S Q, Zheng T T, Yang X H. 2013. Evaluation of six methods for extraction of total RNA from loquat. Not Bot Horti Agrobi, 41 (1): 313 - 316.
- Zhou Chun-hua. 2007. Bioactive components and antioxidant capacity of loquat (*Eriobotrya Japonica* Lindl.) flower and fruit [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 周春华. 2007. 枇杷花、果主要生物活性组分与抗氧化活性研究 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Zhou Li, Liu Li. 2011. Regulation factors of carotenoid biosynthesis and their impacts on photosynthesis. Tianjin Agricultural Sciences, 17 (5): 5 - 8. (in Chinese)
- 周 莉, 刘 莉. 2011. 类胡萝卜素生物合成的调控因素及其对光合作用的影响. 天津农业科学, 17 (5): 5 - 8.
- Zhu Chang-fu, Chen Xing, Wang Ying-dian. 2004. The application of plant carotenoid biosynthesis and its related genes in genetic engineering. J Plant Physiol Mol Biol, 30 (6): 609 - 618. (in Chinese)
- 朱长甫, 陈 星, 王英典. 2004. 植物类胡萝卜素生物合成及其相关基因在基因工程中的应用. 植物生理与分子生物学学报, 30 (6): 609 - 618.
- Zhu Hai-sheng, Li Yong-ping, Wen Qing-fang. 2011. Cloning and expression analysis of phytoene synthase gene in *Fragaria ananassa* Duch. Scientia Agricultura Sinica, 44 (2): 349 - 357. (in Chinese)
- 朱海生, 李永平, 温庆放. 2011. 草莓八氢番茄红素合成酶基因的克隆及其表达特性. 中国农业科学, 44 (2): 349 - 357.