

木薯品种(系)类胡萝卜素代谢相关 基因和蛋白表达水平分析

邓昌哲^{1,2}, 姚 慧¹, 安飞飞¹, 李开绵¹, 陈松笔¹

(¹中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室,
海南儋州 571737;²海南大学农学院,海口 570228)

摘要:以白心木薯华南 6068、华南 9 号、紫叶黄心木薯 BGM019 和粉红木薯 Mirasol 为材料,探究木薯块根膨大期和成熟期与类胡萝卜素代谢通路相关的 14 个基因和 4 种蛋白质表达水平变化。用 HPLC 检测块根 β -胡萝卜素含量的变化,分别用 qRT-PCR 和 Western blot 方法对类胡萝卜素代谢通路相关基因和蛋白酶的表达水平进行分析。以华南 6068 为对照,研究结果表明:华南 9 号和紫叶黄心木薯 BGM019 成熟期中的类胡萝卜素合成途径关键基因 *PSY2*、*LCYB* 基因显著高于膨大期,而降解相关的关键基因 *CCD1*、*NCED3* 在成熟期的表达量显著低于膨大期 ($P < 0.05$)。粉红木薯 Mirasol 成熟期中 *PSY2*、*LCYB* 的显著下调与 *CCD1*、*NCED3* 的显著上调 ($P < 0.05$) 是造成 β -胡萝卜素含量差异的原因之一。通过分析不同木薯品种(系)在膨大期和成熟期块根类胡萝卜素代谢途径相关基因的表达水平,有助于解析 β -胡萝卜素积累的分子机理。此外,Western blot 结果显示抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶、超氧化物歧化酶和 HSP70 虽然和块根类胡萝卜素代谢途径没有直接关联,但它们在木薯膨大期和成熟期块根表达水平有显著差异 ($P < 0.05$)。

关键词:木薯块根; β -胡萝卜素含量;类胡萝卜素代谢通路;基因表达;蛋白质表达

Analysis of Genes and Enzymes Associated with Carotenoid Metabolism in Cassava

DENG Chang-zhe^{1,2}, YAO Hui¹, AN Fei-fei¹, LI Kai-mian¹, CHEN Song-bi¹

(¹Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory
of Ministry of Agriculture for Germplasm Resources Conservation and Utilization of Cassava,
Hainan Danzhou 571737;²College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: The expressions of genes and enzymes related with carotenoid metabolic pathway in the storage roots of cassava swelling and mature periods was validated using white cassava SC6068, yellow cassava SC9, purple-leaf and yellow cassava BGM019 and pink cassava Mirasol as research materials. HPLC method was used to detect the changes of β -carotene contents. qRT-PCR and Western blot methods were applied to analyze the expressed changes of the genes and proteins regarding carotenoid pathway, respectively. In the present study, SC6068 was used as a control, the results showed that in mature period the SC9 and BGM019 carotenoid biosynthesis pathway genes *PSY2* and *LCYB* expression was significantly higher than swelling period ($P < 0.05$). On the contrary, the degradation genes *CCD1* and *NCED3* was significantly lower than swelling period. During the mature period, the Mirasol carotenoid biosynthesis genes *PSY2* and *LCYB* was down-regulation and the *CCD1* and *NCED3* was up-regulation ($P < 0.05$) which was the one reason resulted in carotenoid content change. These data regarding the analysis of the gene expressions related with carotenoid metabolic pathway of storage roots in swelling and mature periods, will be helpful

收稿日期:2016-07-07 修回日期:2016-09-07 网络出版日期:2017-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170417.0853.014.html>

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31271776);海南省高层次创新创业人才基金(2012-2016)

第一作者研究方向为植物生化与分子生物学。E-mail:dczlovefy@icloud.com

通信作者:陈松笔,研究方向为作物遗传育种和蛋白质组学。E-mail:songbichen@catas.cn

to understand the mechanism of β -carotene accumulation. Furthermore, the Western blot results showed that there was no correlation relationship between β -carotene accumulation and ascorbate peroxidase, glutathione reductase, FeSOD and HSP70. However, their expression was significantly differed during swelling and mature periods ($P < 0.05$).

Key words: cassava storage root; β -carotene contents; carotenoid metabolic pathway; gene expression; protein expression

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 为大戟科木薯属植物, 不仅具有高光效和高淀粉积累特性, 而且耐贫瘠和干旱, 对环境适应能力强。木薯与马铃薯和红薯并列世界三大薯类作物, 是世界热区近 8 亿人的主粮^[1-3]。然而普通栽培木薯品种类胡萝卜素含量较低, 长期食用会引起视力下降和夜盲症、干眼病等症状。因此, 选育高类胡萝卜素含量的木薯品种, 成为育种学家关注的焦点。

在过去的 20 年中, 植物的类胡萝卜素合成途径已基本阐明 (图 1)^[4], 大部分的基因已经得到分离和验证。类胡萝卜素合成的直接前体为牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (GGPP), 来源于质体中 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸 (MEP) 途径合成的异戊烯二磷酸 (IPP)。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (DXS) 是 MEP 途径第一个催化酶, 最开始由拟南芥 *cla-1* 突变体分离获得, 该突变体最显著的特征是不能积累类胡萝卜素和叶绿素而表现白化特征^[5]。而 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (DXR) 是 MEP 第二步催化酶, DXR 的特异抑制剂处理番茄可以完

全抑制幼苗发育但对果实成熟没有影响^[6]。转基因实验表明, 超表达 *DXS* 和 *DXR* 能够提高拟南芥种子类胡萝卜素含量 12%, 而干涉 *DXS* 将降低 13% 的类胡萝卜素含量。

八氢番茄红素合成酶 (PSY) 催化 GGPP 形成无色的八氢番茄红素, 为类胡萝卜素合成途径关键限速酶^[7]。木薯中存在 3 个 *PSY* 基因, 其中 *PSY1* 和 *PSY2* 在叶片和块根中有表达, 而 *PSY3* 几乎不表达^[8]。而八氢番茄红素的脱氢反应是由脱氢酶 (PDS) 和 ζ -胡萝卜素去饱和酶 (ZDS) 作用形成。它们参与线状类胡萝卜素的合成, 同时也是类胡萝卜素合成中重要的限速酶^[9]。番茄红素环化是类胡萝卜素代谢中一个主要的分支点, 植物中存在 2 条支流 (LYCB 和 LYCE) 控制着番茄红素向下转化, 使类胡萝卜素合成途径中出现 β 和 ϵ 两大分支。在 β 分支中, 番茄红素分子的两端被 LYCB 环化形成 β -胡萝卜素; 在 ϵ 路径中, 番茄红素经 LYCB 和 LYCE 环化后形成 α -胡萝卜素。通过氨基酸序列比对推测, LYCB 和 LYCE 可能有共同的起源^[10]。在非血红素铁加氧酶类羟化酶 (HYD) 的作用下, 环化后的类胡萝卜素形成 β 类胡萝卜素。而该酶定位在质体膜及类囊体膜上^[11]。在 β 路径中, 经羟化反应后 β -类胡萝卜素形成玉米黄素, 并在环氧酶 (ZEP) 的作用下生成紫黄质。

在植物中, 有 2 条主要的类胡萝卜素裂解途径, 分别为类胡萝卜素双加氧酶 (CCDs) 和 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (NCEDs)。拟南芥 *CCD1* 缺陷型种子的类胡萝卜素含量增加, 说明 *CCD1* 可以催化类胡萝卜素的裂解^[12]。NCED 催化紫黄质或新黄质裂解形成 ABA 的前体 C_{15} 黄素质, 是调控类胡萝卜素向 ABA 转化的限速酶^[13]。

在烟草蜜腺细胞中的有色体是由淀粉体发育而来的^[14], 转化过程中最显著的变化为淀粉逐渐消失, 类胡萝卜素积累结构有色体逐渐形成。而有色体的发育往往受到一些非类胡萝卜素合成途径关键调控因子的影响。*OR* 是一个功能获得性基因, 它导致花椰菜菜头出现橙色变异; 研究表明 *OR* 可以

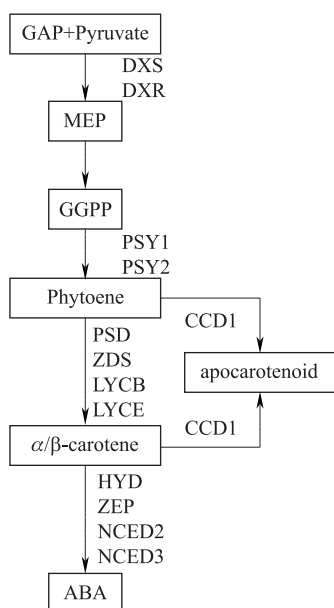


图 1 高等植物类胡萝卜素合成途径^[4]

Fig. 1 The carotenoid biosynthetic pathway in high plants^[4]

控制非有色质体向有色体的转变^[15]。

分子伴侣是一系列热激蛋白,参与蛋白质的折叠和去折叠及组装和去组装^[16-17]。分子伴侣在质体的形成中至关重要,其中 HSP90 和 HSP70 在细胞质中含量最丰富,招募其他前体蛋白转运到质体中,并在质体发生和转化中具有重要的作用^[18]。果实成熟的一个特征就是产生活性氧。一些研究发现活性氧作为一个中心因子参与细胞中复杂的信号网络,并作为一个特殊的信号分子参与其中^[19]。质体产生活性氧并作为第二信使参与一系列的级联转导反应,并诱导有色体中特殊的类胡萝卜素基因分化表达。而控制活性氧稳态需要细胞内过氧化物酶的维持。细胞内的一些酶参与了氧化还原水平的维持,例如抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶,并且这些酶高度富集在有色体中^[20-21]。

本研究通过分析 4 个不同木薯品种(系)块根在膨大期和成熟期 β -类胡萝卜素含量的变化,研究类胡萝卜素合成途径相关基因及相关酶的表达水平变化,探讨导致不同木薯品种间类胡萝卜素含量差异的原因,为今后选育高类胡萝卜素含量的木薯新品种及下一步的基因克隆与标记开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以木薯栽培品种白心木薯华南 6068、华南 9 号、紫叶黄心木薯 BGM019 和粉红木薯 Mirasol 为研究材料。以华南 6068 为对照,其特点是类胡萝卜素含量低;以华南 9 号、紫叶黄心木薯 BGM019 和粉红木薯 Mirasol 为实验组。在种植后 6 个月(膨大期)、9 个月(成熟期)分别挖取块根,每个品种挖取 3 次,用双蒸水洗净后切碎液氮冻存。材料均由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质资源圃提供。

1.2 方法

1.2.1 块根 β -胡萝卜素的提取 分别对华南 9 号、华南 6068、紫叶黄心木薯 BGM019 和粉红木薯 Mirasol 的块根膨大期和块根成熟期进行 β -胡萝卜素的提取,提取方法参照 M. Lucia 等^[22]的方法进行,并进

行 HPLC 分析。

1.2.2 目的基因荧光定量分析 依照 TAKARA 公司的 SYBR Prime Ex Taq 试剂的要求进行反应液混合;SYBR Prime Ex Taq II 5 μ L,上游引物 0.5 μ L,下游引物 0.5 μ L,cDNA 模板 1 μ L,dH₂O 3 μ L。PCR 反应循环条件为 94 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环,绘制溶解曲线。以华南 6068 的表达量为 1,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析不同品种的基因表达量,每个处理 3 次重复。以 *Actin* 为对照基因,分析 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原原异构酶基因(*DXR*)、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因(*DXS*)、八氢番茄红素合成酶基因(*PSY1* 和 *PSY2*)、八氢番茄红素脱氢酶基因(*PDS*)、 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因(*ZDS*)、番茄红素 β -环化酶基因(*LYCB*)、番茄红素 ϵ -环化酶基因(*LYCE*)、 β -胡萝卜素羟化酶基因(*HYD*)、玉米黄质环化酶基因(*ZEP*)、胡萝卜素裂解双加氧酶(*CCD1*)、9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(*NCED2*、*NCED3*)和质体发育基因(*OR*) 在 4 个木薯品种(系)块根膨大期和成熟期的表达水平。

1.2.3 RNA 样品的提取及反转录 参照 TIANGEN RNAPrep Pure Plant Kit 多糖多酚试剂盒说明书进行木薯块根总 RNA 提取。RNA 反转录参照 TAKARA 公司 PrimeScriptTM RT regant Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 进行基因组去除及反转录。

1.2.4 块根蛋白质提取及 Western Blot 检测 蛋白质的提取与溶解参照 L. J. Camalho 等^[23] 丙酮沉淀法,提取块根蛋白质后加入适量的 1 \times SDS loading buffer (1 mol/L Tris-HCL (pH6.8)、0.2 mol/L DTT、4% SDS、20% 甘油)溶解。采用 SDS-PAGE 对溶解后的蛋白样品进行电泳,电泳结束后置于转膜仪 (iBlotTM Dry Blotting System) 转移到醋酸纤维膜 (PVDF) 后进行 Western Blot 检测。以各个木薯品种 *Actin* 作为内参,其中 APX、GR、Fe-SOD、HSP70 抗体稀释倍数分别为 1:1000、1:1000、1:2000 和 1:2000,2 次重复。

1.2.5 数据分析 Western Blot 条带利用 Image J 软件进行图片数据转换,用 EXCEL 2016 plus 和 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,差异显著性分析采用新复极差法 (Duncan) 和最小显著差异法 (LSD)。

表 1 类胡萝卜素合成途径相关基因实时定量 PCR 引物

Table 1 The real-time quantitative PCR primer for carotenoid biosynthetic pathway associated genes

基因名称 Genes name	上游引物 Upstream primers	下游引物 Downstream primers
<i>Actin</i>	TGATGAGTCTGGTCCATCCA	CCTCCTACGACCCAATCTCA
<i>DXS</i>	GACCGAGATGTAAAGCCAGA	CGCACCAGTGGACAAGATAC
<i>DXR</i>	ATATGCTTTCCCTGCTGA	GCTGCCCAAAATCCTT
<i>PSY1</i>	CCGACGAGACGGCCATT	CATAGGATTAGGTAGTGAAGCAATTTA
<i>PSY2</i>	GCAGCATCAAGCATATCAAAGG	TGGAAAGCAAGTTGGAAGA
<i>PDS</i>	CGTGAATTTAGCCGGACTTC	GCTTTGCATGCCAATTGTTG
<i>ZDS</i>	TGATAACATCAGTGCCCGTTGT	CCTCCGTCTTAGTGGCAAACA
<i>HYD</i>	TGGCACGTTGGCAATGG	TTGTACACGATGCTCTTGTTCACA
<i>CCD1</i>	GGAGGTAGAGAAGAAGCAAGGAAA	TCACCTCCACGATCGGAACT
<i>LYCE</i>	GACAGAGTCGACCCAAGGAATC	CTTCCATACTTTCTTCCGCTTACC
<i>LYCB</i>	CTAGTTGCTCGGCTGGAGTA	CTTAATCTAGCCACCATCCTTTCC
<i>ZEP</i>	CCTACTGTGACCGAATCAAATG	AAAACCAGCCGCCAAT
<i>NCED2</i>	GAGGGATTGCTTCAGATACG	CAAATAAAAAACGAACCCAGAAAAA
<i>NCED3</i>	TGGGATGGTTTCATGCTGTCC	TATCCCAGACTGGCCATGGA
<i>OR</i>	ACTGAGCTTGTCCGGTTCTC	CAAAATCCAGCGGCGTTA

2 结果与分析

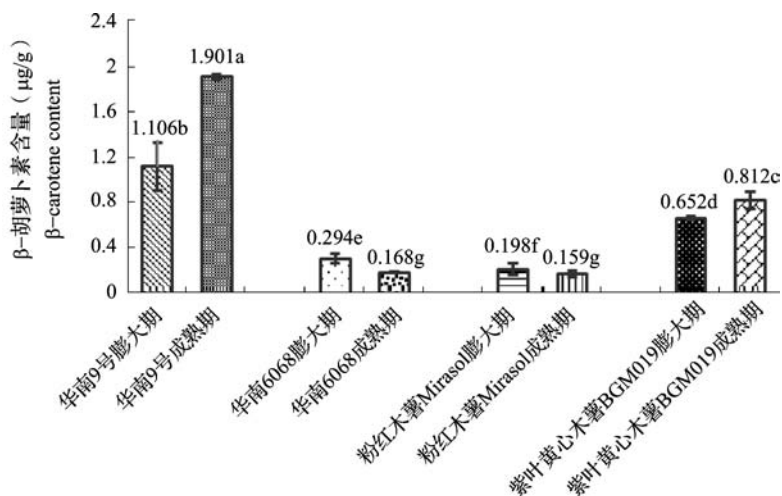
2.1 不同时期 4 个木薯品种 (系) β -胡萝卜素含量分析

4 个木薯品种 (系) 不同时期 β -胡萝卜素含量的变化如图 2 所示。在 4 个木薯品种 (系) 膨大期、成熟期中, 华南 9 号的 β -胡萝卜素含量显著高于华南 6068、紫叶黄心木薯 BGM019、粉红木薯 Mirasol。在膨大期及成熟期中, β -胡萝卜素的含量从高到低依次为华南 9 号 > 紫叶黄心木薯 BGM019 > 华南 6068 > 粉红木薯 Mirasol。其中, 成熟期华南 9 号的

β -胡萝卜素含量相对于膨大期提高了 0.795 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.05$)。成熟期的紫叶黄心木薯 BGM019 相对于膨大期提高 0.16 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.05$); 而华南 6068 与粉红木薯 Mirasol 在成熟期的 β -胡萝卜素含量都有所下降, 其中华南 6068 降低 0.126 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.05$), 而粉红木薯 Mirasol 降低了 0.039 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.05$)。

2.2 不同时期类胡萝卜素合成及代谢途径相关基因表达分析

以华南 6068 作为对照, 3 个木薯品种 (系) 膨大期和成熟期类胡萝卜素合成途径相关基因的表达水平变化结果如图 3 所示。



字母表示差异显著性 Alphabets mean significant difference

图 2 4 个木薯品种不同时期 β -胡萝卜素含量Fig. 2 β -carotene content of four cassava lines in different periods

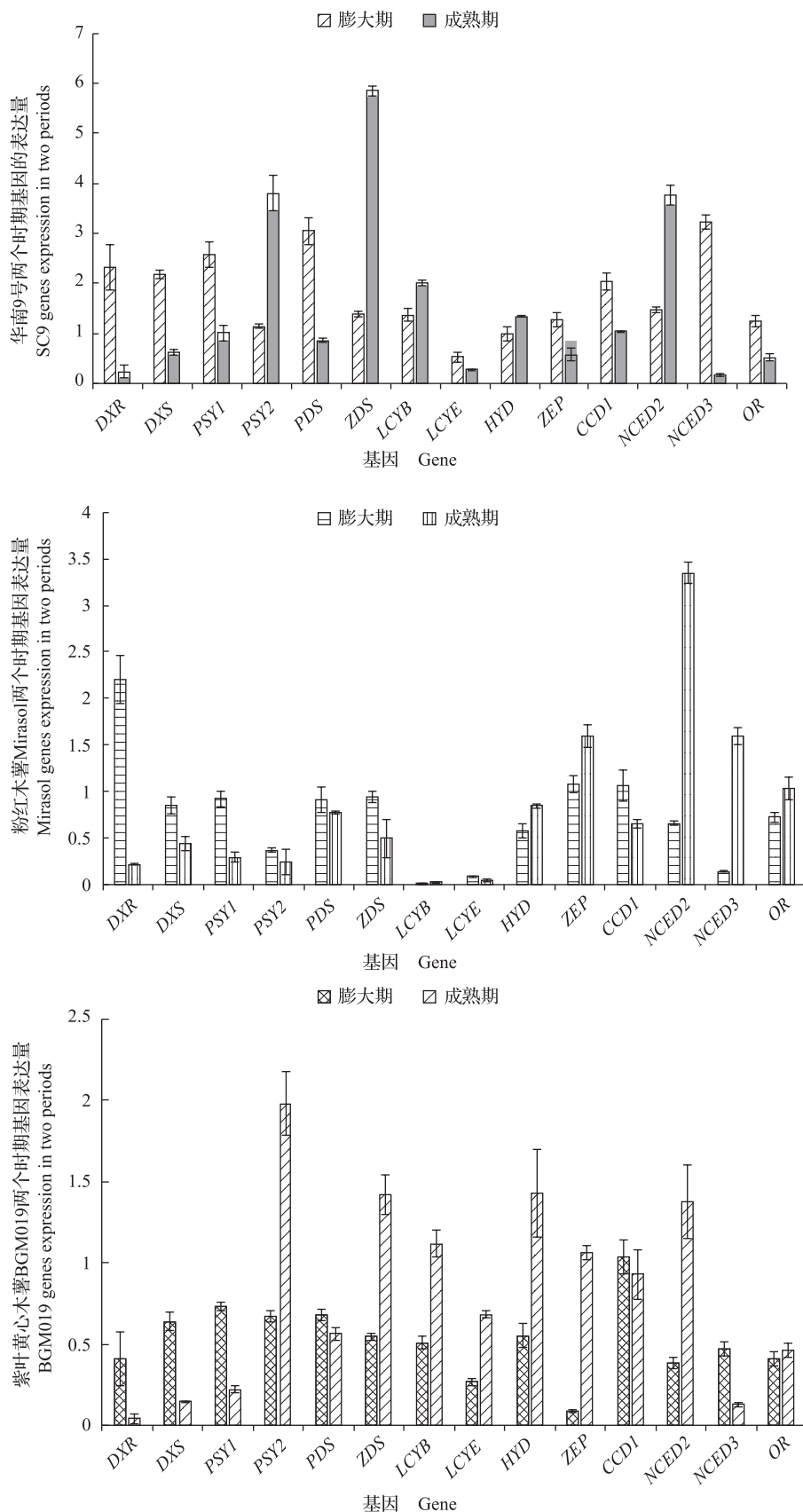


图3 不同木薯品种(系)膨大期和成熟期类胡萝卜素代谢途径相关基因表达分析
 Fig.3 Carotenoid metabolic pathway genes expression during swelling and mature periods in different cassava varieties (lines)

在华南9号块根参与类胡萝卜素合成的基因中,在膨大期表达量显著高于成熟期的基因为 *DXR*、*DXS*、*PSY1*、*PDS*、*LCYE*、*ZEP*、*CCDI*、*NCED3* 和 *OR* ($P < 0.05$); 而表达量显著低于成熟期的基因包括 *PSY2*、*ZDS*、*LCYB*、*HYD* 和 *NCED2* ($P < 0.05$)。在 MEP 途径,华南9号木薯 *DXR* 和 *DXS* 基因膨大期表达量分别是成熟期的 10 倍和 3.44 倍。在催化 GGPP 合成八氢番茄红素代谢通路中,涉及催化酶 *PSY1* 和 *PSY2* 基因,这 2 个基因在膨大期和成熟期表达水平相反,*PSY1* 基因在膨大期表达高于成熟期 2.5 倍,*PSY2* 基因在成熟期表达是膨大期的 3.5 倍。在八氢番茄红素合成 α/β -胡萝卜素过程中,与合成相关的基因 *PDS* 和 *LCYE* 在膨大期表达水平高于成熟期,而 *ZDS* 和 *LYCB* 基因在成熟期表达水平高于膨大期,其中成熟期 *ZDS* 基因表达水平在 14 个分析的基因中达到最高,是膨大期的 4.2 倍。此外,与 α/β -胡萝卜素降解相关基因 *CCDI* 在膨大期表达水平是成熟期的 1.79 倍。最后导致成熟期 β -胡萝卜素含量显著高于膨大期。在 α/β -胡萝卜素合成 ABA 过程中,*ZEP* 和 *NCED3* 基因在膨大期的表达水平高于成熟期,而 *HYD* 和 *NCED2* 基因在成熟期的表达水平高于膨大期。调控质体发育的 *OR* 基因在膨大期表达水平高于成熟期。

在粉红木薯 Mirasol 块根参与类胡萝卜素合成的基因中,在膨大期表达量显著高于成熟期的基因为 *DXR*、*DXS*、*PSY1*、*PSY2*、*PDS*、*ZDS*、*LCYE* 和 *CCDI* ($P < 0.05$); 而表达量显著低于成熟期的基因包括 *HYD*、*ZEP*、*NCED2*、*NCED3* 和 *OR* ($P < 0.05$)。从 MEP 到 α/β -胡萝卜素合成途径,所涉及的基因在膨大期表达水平均高于成熟期,导致粉红木薯 Mirasol 块根膨大期 β -胡萝卜素含量显著高于成熟期;而在 α/β -胡萝卜素合成 ABA 过程中涉及的基因在膨大期均低于成熟期。*OR* 基因在膨大期表达水平低于成熟期。

紫叶黄心木薯 BGM019 块根参与类胡萝卜素合成的基因中,除 *ZEP*、*LCYE* 和 *OR* 基因外,在膨大期表达量显著高于成熟期的基因与华南9号相同;而表达量显著低于成熟期的基因也与华南9号相同;与华南9号相似,紫叶黄心木薯 BGM019 块根膨大期 β -胡萝卜素的含量显著低于成熟期 ($P < 0.05$)。其中 MEP 途径的 *DXR*、*DXS* 和核心催化酶 *PSY1* 在膨大期的表达量显著高于成熟期,羟化酶 *PDS* 基因略有下调,但差异并不显著,而核心催化酶 *PSY2* 基

因与脱氢酶 *ZDS* 基因以及控制类胡萝卜素支流的 *LYCE* 在成熟期均显著上调,表明紫叶黄心木薯 BGM019 的类胡萝卜素均有向 α 和 β 下游途径转化的趋势,造成 β -类胡萝卜素的含量低于华南9号。而涉及降解途径的 *CCDI* 与 *NCED3* 在膨大期的表达量要高于成熟期,说明类胡萝卜素向下游转化的趋势受到抑制,涉及质体相关发育的 *OR* 基因在膨大期的表达水平与成熟期没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

以华南6068为对照,分析3个木薯品种(系)块根参与类胡萝卜素合成的14个基因的表达水平,发现在14个基因中,华南9号成熟期 *ZDS* 基因表达水平为最高,其次是成熟期的 *PSY2* 和 *NCED2* 基因。而粉红木薯 Mirasol 成熟期 *NCED2* 基因表达水平达到最高,其次是膨大期的 *DXR* 基因。在紫叶黄心木薯 BGM019 块根中,成熟期 *PSY2* 基因的表达水平最高,其次是成熟期的 *ZDS*、*HYD* 和 *NCED2* 基因。

2.3 不同时期类胡萝卜素途径相关酶表达分析

膨大期内华南9号木薯与紫叶黄心木薯 BGM019 的 HSP70 表达量相近但高于华南6068 与粉红木薯 Mirasol,但在成熟期内,华南9号、华南6068 与紫叶黄心木薯 BGM019 差异不显著但都显著高于粉红木薯 Mirasol,且成熟期相对于膨大期都有下调。活性氧相关途径的谷胱甘肽还原酶(GR)在4个品种膨大期的表达量由高到低分别为粉红木薯 Mirasol > 华南9号 > 紫叶黄心木薯 BGM019 > 华南6068,成熟期的表达量由高到低为华南6068 > 华南9号 > 粉红木薯 Mirasol > 紫叶黄心木薯 BGM019,除了粉红木薯 Mirasol 在两个时期的表达差异不大外,在其他3个木薯品种的成熟期都显著高于膨大期(华南9号,1.84倍;华南6068,3.77倍;紫叶黄心木薯 BGM019,1.83倍)。4个木薯品种抗坏血酸过氧化物酶(APX)在成熟期的表达量都显著高于膨大期(华南9号,5.64倍;华南6068,25.64倍;粉红木薯 Mirasol,11.06倍;紫叶黄心木薯 BGM019,6.31倍)。在膨大期中,表达量由高到低依次为:华南9号 > 紫叶黄心木薯 BGM019 > 粉红木薯 Mirasol > 华南6068。而超氧化物歧化酶(SOD)在华南9号和华南6068的成熟期呈现上调表达,且华南6068呈显著的上调表达;而粉红木薯在成熟期的表达量呈下调,而紫叶黄心木薯在2个时期内差异并不显著(图4)。整体上,活性氧途径相关的酶在成熟期的表达量要高于膨大期。

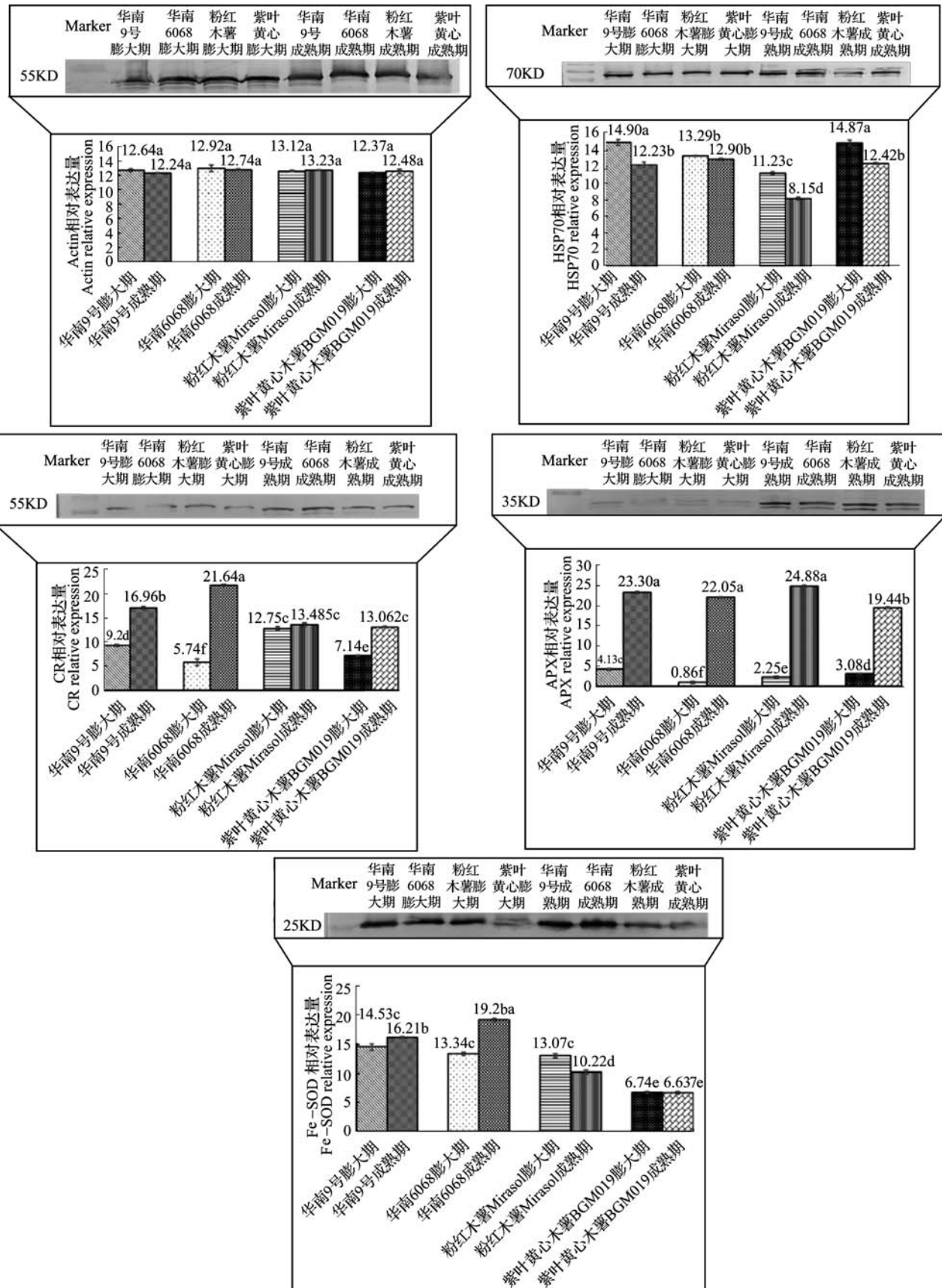


图 4 4 个木薯品种不同生长期类胡萝卜素相关酶表达量分析

Fig. 4 Carotenoid associated enzymes expression during different periods in four cassava lines

3 结论与讨论

在高等植物中,番茄红素环化的步骤是类胡萝卜素合成的重要分支点,LYCB与LYCE是2个参与其中的关键酶,其基因编码的酶的活性是决定番茄红素分支流量的重要因素^[4]。在本研究中华南9号和紫叶黄心木薯BGM019在膨大期和成熟期LYCB显著上调表达,使得类胡萝卜素的代谢途径向下游的类胡萝卜素合成,而紫叶黄心木薯BGM019中LYCE上调表达也造成一部分的番茄红素向下游 α 途径转化,使得紫叶黄心木薯BGM019的 β -胡萝卜素含量低于华南9号。粉红木薯Mirasol的2个番茄红素分支酶基因(LYCB和LYCE)在2个时期相对于对照华南6068极显著下调表达造成 β -胡萝卜素含量的降低。PSY是决定植物组织中类胡萝卜素总量的核心催化酶^[24],但在木薯中,PSY1主要参与叶片类胡萝卜素合成,而PSY2主要在块根中表达^[25],华南9号和紫叶黄心木薯BGM019中PSY2在成熟期的表达量显著高于膨大期,表明这两个品种在成熟期的类胡萝卜素合成活性相当活跃。而粉红木薯Mirasol膨大期的PSY2在成熟期的表达量显著下调,表明随着生长发育的进行其类胡萝卜素合成的相关能力降低。

在类胡萝卜素降解相关基因中,与对照华南6068相比,华南9号的CCDI基因在成熟期显著下调表明类胡萝卜素的积累很可能与CCDI的低转录活性有关,造成类胡萝卜素降解受到阻碍。研究表明,CCDI可以在类胡萝卜素C9-C10端切割番茄红素、胡萝卜素、玉米黄质形成芳香类物质^[26]。此外,NCED2和NCED3的在不同生育期表达趋势并不一致,NCED2在3个品种中的成熟期的表达量都要高于膨大期,除去粉红木薯Mirasol外,NCED3的表达趋势与NCED2相反。在木薯中,NCED2在叶片中高表达,而NCED3在块根中的表达量要高于NCED2^[7],而NCED是控制类胡萝卜素向下游ABA转化的限速酶。华南9号和紫叶黄心木薯BGM019在成熟期NCED3基因的表达量显著低于膨大期,也是类胡萝卜素在成熟期高于膨大期的原因之一。

分子伴侣HSP70在品种间差异不显著但都随着生长发育的进行呈现下调的趋势,其表达的下调也伴随着PDS表达的下调,与HSP70在水仙花有色体中组成蛋白质复合体并调控八氢番茄红素脱氢酶(PDS)的活性^[27]结果相一致。细胞内活性

氧相关酶谷胱甘肽还原酶(GR)与抗坏血酸过氧化物酶(APX)在4个品种成熟期的表达量要高于膨大期,高活性的活性氧相关酶能够保护质体相关组分免受氧化胁迫并使质体能够适应有色体发育过程中代谢变化,维持质体的稳态,与辣椒转色中有色体的合成伴随着活性氧相关酶高表达^[28]结果相一致。但相同时期内不同品种间活性氧相关酶的表达差异并不显著,可能是其只参与质体的转化但不涉及类胡萝卜素的积累。而超氧化物歧化酶(Fe-SOD)在不同品种发生的变化可能参与不同的功能。

本研究对4个木薯品种膨大期和成熟期类胡萝卜素相关酶和基因的研究表明,类胡萝卜素合成及降解关键基因的变化是造成不同品种间类胡萝卜素含量变化的原因之一,而活性氧相关酶的变化也涉及到质体发育过程的变化。这些研究结果有助于了解不同品种木薯类胡萝卜素分子机制,为将来进一步提高木薯块根类胡萝卜素含量奠定基础。

参考文献

- [1] 张振文,李开绵,叶剑秋,等.木薯光合作用特性研究[J].云南大学学报:自然科学版,2007,29(6):628-632
- [2] 陈冠喜,李开绵,叶剑秋,等.6个木薯品种生长发育及产量性状的初步研究[J].热带农业科学,2009,29(6):26-29
- [3] Li K, Zhu W, Zeng K, et al. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberos roots[J]. Proteome Sci, 2010, 8:10
- [4] Cazzonelli C, Pogson B. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants[J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(5): 266-274
- [5] Estevez J M, Cantero A, Reindl A, et al. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants[J]. J Agric Food Chem, 2001, 276(25): 22901-22909
- [6] Rodriguez C, Ahumada M, Diez-Juez L, et al. 1-Deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening[J]. Plant J, 2001, 27(3): 213-222
- [7] Terol J, Naranjo M A, Ollitrault P, et al. Development of genomic resources for *Citrus clementina*; Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46, 000 BAC end sequences[J]. BMC Genomics, 2008, 9:423
- [8] Jacobo A, Ralf W. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses[J]. Planta, 2010, 232(5): 1251-1262
- [9] Josse E M, Simkin A J, Gaffe J, et al. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation[J]. Plant Physiol, 2000, 123(4): 1427-1436
- [10] Yu Q, Schaub P, Ghisla S, et al. The lycopene cyclase CrtY from *Pantoea ananatis* (ex *Erwinia uredovora*) catalyzes an FAD-dependent non-redox reaction[J]. J Biol Chem, 2010, 285(16): 12109-12120
- [11] Vallabhaneni R, Wurtzel E T. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize[J]. Plant Physiol, 2009, 150(2): 562-572

- [12] Schwartz S H, Qin X, Zeevaart J. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27):25208-25211
- [13] Nambara E, Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2005, 56:165-185
- [14] Horner H T, Healy R A, Ren G, et al. Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection [J]. *J Exp Bot*, 2007, 94(1):12-24
- [15] Lu S, Van Eck J, Zhou X, et al. The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation [J]. *Plant Cell*, 2006, 18:3594-3605
- [16] Sun W, Montagu M W, Verbruggen N. Small heat shock protein and stress tolerance in plants [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2002, 1577(1):1-9
- [17] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5):244-252
- [18] Flores P, Jarvis P. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import [J]. *Biochim Acta Mol Cell Res*, 2013, 1833:332-340
- [19] Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, et al. ROS signaling: The new wave [J]. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(6):300-309
- [20] Bouvier F, Backhaus C A, Camara B. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(460):30651-30659
- [21] Galvez-Valdivieso G, Mullineaux P M. The role of reactive oxygen species in signaling from chloroplasts to the nucleus [J]. *Physiol Plant*, 2010, 138(4):430-439
- [22] Lucia M, Alcides R, Ronoel L, et al. Retention of total carotenoid and β -carotene in yellow sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) after domestic cooking [J]. *Food Nutr Res*, 2012, 56:15788
- [23] Camalho L J, Lippolis J, Chen S, et al. Characterization of carotenoid-protein complexes and gene expression analysis associated with carotenoid sequestration in pigmented cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root [J]. *Open Biochem J*, 2012, 6:116-130
- [24] Burkhardt P K, Beyer P, Wunn J, et al. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis [J]. *Plant J*, 1997, 11(5):1071-1078
- [25] Ralf W, Jacobo A, Comelia B. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(10):3348-3356
- [26] Simkin A J, Schwartz S H, Auldridge M, et al. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone and geranylacetone [J]. *Plant J*, 2004, 40(6):882-892
- [27] Babili A, Lintig J. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation [J]. *Plant J*, 1996, 9(5):601-612
- [28] Egea I, Barsan C, Bian W, et al. Chromoplast differentiation: current status and perspectives [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(10):1601-1611