



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：梅花花香合成相关肉桂醇脱氢酶基因(PmCAD)的鉴定和功能分析
作者：刘巳塬，罗瑜杭，邓思航，陈赟，包菲
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20240516001
收稿日期：2024-05-16
网络首发日期：2024-10-23
引用格式：刘巳塬，罗瑜杭，邓思航，陈赟，包菲. 梅花花香合成相关肉桂醇脱氢酶基因(PmCAD)的鉴定和功能分析[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240516001>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

梅花花香合成相关肉桂醇脱氢酶基因(*PmCAD*)的鉴定 和功能分析

刘巳堦, 罗瑜杭, 邓思航, 陈贇, 包菲

(北京林业大学园林学院/花卉种质资源创新与分子育种北京市重点实验室/国家花卉工程技术研究中心/城乡生态环境北京实验室, 北京 100083)

摘要: 梅花 (*Prunus mume* Siebold & Zucc.) 品种丰富, 花香香型多样, 其中肉桂醇和乙酸肉桂酯是梅花粉色花品种特有的花香成分。在植物体内肉桂醛在肉桂醇脱氢酶 (CAD) 的催化下还原生成肉桂醇, 肉桂醇又在乙酰转移酶的催化下生成乙酸肉桂酯。因此, 肉桂醇不仅是梅花重要的特征花香成分, 还是合成乙酸肉桂酯的重要前体。本研究基于梅花二代基因组数据鉴定了 56 个 *PmCADs* 同源基因, 发现梅花 *PmCADs* 家族可分为五个亚组, 第 I、II 和 III 亚组的蛋白保守基序组成较相似, 与第 IV 和 V 亚组的差别较大, 推测它们之间可能存在功能分化; 染色体片段复制和串联复制是 *PmCADs* 在基因组中复制进化的两种形式; 梅花 *PmCADs* 基因启动子区域广泛存在脱落酸、茉莉酸甲酯、水杨酸响应元件和分生组织表达相关元件, 推测 *PmCADs* 基因主要参与梅花的生长发育和抗逆响应; 多物种来源 CAD 共建树分析, 表明位于第 III 亚组的 3 个 *PmCADs* 基因可能参与梅花花香合成过程, 不同组织器官热图分析表明它们都在花器官中表达。基因相对表达量分析发现梅花 3 个候选 *PmCADs* 基因在花开放不同阶段的表达规律不同, 在花开放后表达水平较高。体外酶活试验验证了这 3 个 *PmCADs* 都具有肉桂醇脱氢酶活性, 因此认为它们共同参与梅花重要花香成分肉桂醇的合成。亚细胞定位分析发现它们在细胞内的分布存在差异, 推测它们可能在细胞的不同部位发挥作用。本研究揭示了梅花 *PmCADs* 基因的进化和功能分化, 为梅花重要花香成分的合成奠定了理论基础和为花香分子育种提供了理论依据。

关键词: 梅花; 花香; 肉桂醇; CAD; 基因家族; 表达模式; 酶活性

Floral Scent Synthesis Related *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase* (*PmCAD*) Genes Identification and Functional Analysis in *Prunus* *mume*

LIU Siyuan, LUO Yuhang, DENG Sihang, CHEN Yun, BAO Fei

(School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University/ Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation and Molecular Breeding/
National Engineering Research Center for Floriculture/ Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing 100083, China)

Abstract: *Prunus mume* Siebold & Zucc. has many varieties and diverse floral scent types, among which cinnamyl alcohol and cinnamyl acetate are unique floral scent components in pink varieties of *P. mume*. In plants, cinnamaldehyde is reduced to cinnamyl alcohol under the catalysis of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), which in turn generates cinnamyl acetate under the catalysis of acetyltransferase. Therefore, cinnamyl alcohol is not only an important floral scent component in *P. mume*, but also an important precursor for the synthesis of cinnamyl acetate. This study identified 56 *PmCADs* homologous genes based on the second-generation genome of *P. mume*. It was found that the *PmCADs* family can be divided into five subgroups, and the protein conserved motif composition of subgroups I, II, and III is relatively similar, with significant differences from subgroups IV and V suggesting potential functional differentiation between them. Chromosome fragment replication and tandem replication were identified as two forms of *PmCADs* replication in genome evolution. It was found that the promoter regions of *PmCADs* genes extensively contained abscisic acid, methyl jasmonate, salicylic acid responsive elements, and meristem related elements suggesting that the *PmCADs* genes are mainly involved in the growth, development, and stress response of *P. mume*. Phylogenetic analysis of CAD from *P. mume* and other

收稿日期: 2024-05-16

第一作者研究方向为花卉种质资源与遗传育种, E-mail: 1309707639@qq.com; 罗瑜杭为共同第一作者

通信作者: 包菲, 研究方向为花卉种质资源与遗传育种, E-mail: baofei@bjfu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32271910)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (32271910)

species suggested that the three *PmCADs* genes located in subgroup III may be involved in the floral scent synthesis in *P. mume*. Heat map analysis of *PmCADs* genes in different tissues and organs indicated that the three *PmCADs* were all expressed in flowers. Furthermore, analysis of relative gene expression revealed that the expression patterns of the 3 candidate *PmCADs* genes varied at different stages of flowering, with higher expression levels after the flowers bloom. The in vitro enzyme activity analysis confirmed that all three *PmCADs* have cinnamyl alcohol dehydrogenase activity, indicating that they jointly participate in the synthesis of cinnamyl alcohol, an important floral scent component of *P. mume*. Subcellular localization analysis revealed differences in their distribution within the cell, suggesting that they may play roles in different parts of the cell. This study revealed the evolution and functional differentiation of the *PmCADs* genes in *P. mume*, laying theoretical foundations for the synthesis of important floral scent components and providing theoretical bases for floral fragrance molecular breeding in *P. mume*.

Key words: *Prunus mume*; floral scent; cinnamyl alcohol; CAD; gene family; expression pattern; enzyme activity

梅花 (*Prunus mume* Siebold & Zucc.) 是我国的传统名花, 具有悠久的栽培历史和丰富的文化内涵。花香是梅花的重要观赏性状, 文人把梅花的花香统称为“暗香”。其实, 梅花品种众多, 因品种不同香型存在差异。研究发现, 梅花的花香类型可能与梅花的花瓣颜色相关: 白色的梅花玉碟、绿萼品种群的主要花香成分为乙酸苯甲酯和丁子香酚^[1]; 粉色的梅花朱砂、宫粉品种群的花香成分较丰富, 主要包括肉桂醇、乙酸肉桂酯、乙酸苯甲酯和丁子香酚^{[2], [3]}; 而深红色的梅花朱砂品种群的主要花香成分为丁子香酚^{[2], [4]}。因此, 肉桂醇和乙酸肉桂酯是梅花粉色花品种特有的花香成分, 研究它们的合成代谢, 鉴定其中关键基因, 对梅花香花育种有重要意义。

通常认为, 以肉桂醛为底物在肉桂醇脱氢酶 (CAD, Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase) 的作用下生成肉桂醇, 又以肉桂醇为底物可以在酰基转移酶的作用下生成乙酸肉桂酯。已知, 肉桂醛大量存在于香料肉桂中, 在工业上常以之为原料, 用化学方法合成肉桂醇等其它衍生物, 并广泛应用于食品、化妆品等香精领域。而在植物体内如何合成芳香化合物肉桂醇、乙酸肉桂酯等研究的不多。CAD 广泛存在于植物界, 它为大家熟悉的功能是木质素生物合成过程中的关键酶, 催化木质素单体合成的最后一步反应, 即 CAD 可以分别催化芥子醛、松柏醛和香豆醛, 生成芥子醇、松柏醇和香豆醇^[5]。木质素是构成植物细胞壁的重要成分, 作为合成植物细胞壁成分的关键酶, CAD 广泛分布在各种植物的不同组织中, 通常认为 CAD 可以同时催化多种不同的底物, 对于不同的底物亲和性和性有差异。比如, 拟南芥的 AtCAD5 可以催化香豆醛、咖啡醛、松柏醛、5-羟基松柏醛和芥子醛五种底物, 其中催化香豆醛的活性最高, 其次是芥子醛和 5-羟基松柏醛。与 AtCAD5 同源性高达 83% 的 AtCAD4 催化活性显著降低, 且不能催化芥子醛, 而 AtCAD1-3 和 AtCAD6-9 催化这五种底物的活性都较低^[6]。

植物的 CAD 在进化过程中形成较精细的功能分化。在园艺植物的研究中发现 CAD 可能参与梨果肉的石细胞形成^[7]、枇杷果实木质化^[8]、桃内果皮木质化^[9]等, 以及与黑莓果实的硬度^[10]、草莓果实的硬度^[11]、薄皮甜瓜的抗旱能力相关^[12]。这些园艺表型和抗逆性都与 CAD 参与木质素合成的功能相关。研究还发现, CAD 不仅参与薄皮甜瓜果实木质化过程, 而且与果实风味物质肉桂醇合成相关^[13]。然而, 关于 CAD 在观

赏植物花香合成中的功能鲜有报道。我们的前期研究从梅花粉色品种‘江砂宫粉’和‘粉皮宫粉’的花器官转录组中鉴定了一个肉桂醇脱氢酶 *PmCAD1* 基因,并在体外酶反应体系中检测到它可以催化肉桂醛生成肉桂醇,推测它可能是影响梅花花香成分肉桂醇合成的重要基因^[14]。但是, CAD 在梅花基因组中的进化关系,以及是否还有其它 CAD 基因参与梅花的花香成分肉桂醇的合成还不清楚。本研究基于梅花二代基因组数据^[15],在梅花全基因组检索获得 *PmCADs* 同源基因,进一步对其开展了编码蛋白的理化性质、亚细胞定位预测、基因结构、保守结构域、染色体定位、染色体共线性、顺式作用元件、系统发育进化、表达热图等生物信息学分析,并筛选出 3 个花香合成相关的 *PmCADs* 基因,进一步通过实时荧光定量 PCR 技术分析其花开放不同阶段的表达模式和通过体外酶活性分析最终验证了这 3 个 *PmCADs* 基因与肉桂醇合成相关。本研究鉴定了 3 个梅花特征花香成分肉桂醇合成相关的酶基因,为梅花香花分子育种奠定了理论基础和提供了优异基因储备。

1 材料与方法

1.1 梅花 *PmCADs* 基因的全基因组鉴定及理化特性分析

利用梅花二代基因组数据库^[15] (数据上传 NCBI,项目号 PRJNA171605),以拟南芥 *AtCAD5* 的氨基酸序列作为参考序列执行本地 BlastP 搜索比对,筛选条件为 E 值 $\leq 1 \times 10^{-5}$,获得梅花 *PmCADs* 家族成员的基因序列。利用 ExPASy-ProtParam (<https://www.expasy.org/resources/protparam/>) 网站在线计算梅花 *PmCADs* 蛋白的氨基酸数目、亲水性和分子量等基本理化性质。利用 GenScript 网站中的 WoLFPSORT 工具 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 在线预测 *PmCADs* 蛋白的亚细胞定位。

1.2 梅花 *PmCADs* 的基因结构及保守结构域分析

整理 *PmCADs* 基因的 CDS 序列和基因序列,利用 GSDS2.0 网站 (gsds.gao-lab.org) 在线绘制梅花 *PmCADs* 基因结构图。利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线预测 *PmCADs* 蛋白质基序,并进行保守结构域比对。在 Tbttools^[16] 中进行 domains 和 motif 可视化。

1.3 梅花 *PmCADs* 基因染色体的定位和共线性分析

基于梅花二代基因组的 fasta 序列及基因注释 GFF3 文件,利用 Tbttools 对梅花 *PmCADs* 基因进行染色体定位和共线性分析,并在线绘制 circos 图。

1.4 梅花 *PmCADs* 家族系统发育树分析

在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线提取杨树 *PaCAD1* (XP_034919559.1)、*PaCAD2* (XP_034903675.1)、*PaCAD3* (XP_034903674.1)、*PaCAD4* (XP_034903673.1),葡萄 *VvCAD1* (XP_002283356.1)、*VvCAD2* (XP_002279718.1),水稻 *OsCAD1* (NP_001406095.1)、*OsCAD2* (XP_015612799.1),拟南芥 *AtCAD1* (NP_177412.1)、*AtCAD2* (NP_179765.1)、*AtCAD3* (NP_179780.1)、

AtCAD4 (NP_188576.1)、AtCAD5 (NP_195149.1)、AtCAD6 (NP_195510.1)、AtCAD7 (NP_195511.1)、AtCAD8 (NP_195512.1)、AtCAD9 (NP_195643.1)、ADH1 (NP_177837.1)、ADH2 (NP_001190468.1)、AOR1 (NP_173786.1)、HCS1 (NP_001324828.1)、HER2 (NP_851257.1)、AtSDH (NP_974925.1)和草莓 FxaCAD1 (AAD10327.1)、FxaCAD2 (AAK28509.1)、FxaCAD3 (AFQ36034.1) 等物种的 CAD 氨基酸序列。运用 Clustal X 2.0 对梅花 PmCAD 和已报道的其它物种的 CAD 蛋白进行多序列比对。利用 MEGA7.0 软件的邻接法进行分子演化树的构建。根据已有的梅花根、茎、叶、花、果的转录组数据(数据上传 NCBI, 项目号 PRJNA172987), 从中提取梅花 PmCADs 基因表达的 RPKM 值, 将数据进行 log10 对数处理后, 用联川生物云平台 (<https://www.omicstudio.cn/>) 在线绘制热图, 并根据热图进行聚类分析。在 evolview 官网 (<http://www.evolgenius.info/evolview/#/>) 中进行在线美化并结合 Adobe Illustrator、Adobe Photoshop 等软件进行美化。

1.5 梅花 PmCADs 基因的顺式作用元件分析

运用 Tbttools 软件提取梅花 PmCAD 基因 ATG 上游 2000bp 序列为启动子序列, 利用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线预测梅花 PmCAD 基因启动子的顺式作用元件, 筛选后在 Tbttools 软件中进行顺式作用元件图的可视化。

1.6 梅花 PmCADs 基因在不同开花阶段表达模式分析

以梅花‘江砂宫粉’为试验品种, 采集于北京鹫峰国家森林公园梅花资源圃。在同一时间和地点采集‘江砂宫粉’花蕾期、初花期、盛花期、末花期的花朵数朵, 剥离花瓣后用锡纸包住, 迅速置于液氮中速冻, 并保存于-80°C超低温冰箱, 用于基因表达分析。应用“RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒”(DP441, 天根)提取梅花花瓣总 RNA, 应用“FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)”(KR116, 天根)反转录成 cDNA, 用于基因相对表达量分析和基因克隆。根据 PmCADs 基因的 CDS 序列设计荧光定量引物, 以梅花 PmPP2A 基因作为内参基因, 每个时期的样品设置 4 次重复, 利用 2^{-ΔΔCt} 法对数据进行处理, 计算其相对表达量。本研究中所用到的引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primers sequence

基因编号	上游序列 (5'-3')	下游序列 (5'-3')
Gene ID	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
Pm021215	CCAAGTTCAGAGTAGGAGAT	CGGAATAAGTGTCATTGTAAGA
Pm021214	TTGCCACACTGATACTCA	CGTCTCTACTCTGAACTT
Pm002468	GGAGAAGTGGTGGAGTTG	ATTGGCAAGACAGGCATT
PmPP2A	ATGCCGGCTCACGCGGATCTG	TTACAAAAATAATCTGGAGTC
NbTublin	CCAGGTGACAAGACAGTT	AATGACAGTAGGCTCAAGAT

1.7 梅花 PmCADs 基因克隆和烟草瞬时表达

以梅花‘江砂宫粉’的花的 cDNA 为模板, 应用试剂盒“KOD-Plus-Neo”(KOD-401, Toyobo) PCR 扩增 PmCADs 编码序列(克隆引物见表 2)。PCR 反应体系 50 μL, 包含如下组分: 10×buffer 5μL, 2 mmol/L dNTPs

5 μL , 25 mmol/L MgSO_4 3 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 克隆引物各 1.5 μL , 模板 cDNA 4 μL (约 200ng), KOD 酶 1 μL 。扩增程序为: 预变性 (94 $^\circ\text{C}$, 2 min); 循环 25 个 (98 $^\circ\text{C}$, 10 sec; 56 $^\circ\text{C}$, 30 sec; 68 $^\circ\text{C}$, 30 sec); 最后延伸: 68 $^\circ\text{C}$, 1 min。应用试剂盒 “In-Fusion HD Cloning Kit” (PT5162-1, Clontech) 将切胶回收的 *PmCADs* 基因片段与植物过量表达载体 pSuper1300-GFP 连接 (载体线性化用限制性内切酶 *SpeI*), Sanger 测序确定片段无误后, 将构建好的 *PmCAD*-pSuper1300-GFP 的载体质粒分别转化农杆菌 GV3101, 并通过农杆菌介导的方法瞬时转化烟草叶片, 转化液包括: 10mmol/L MES (pH5.7)、10mmol/L MgCl_2 、150 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮, 用于悬浮农杆菌 (农杆菌浓度: 目的基因 OD_{600} 为 0.5, P19 为 0.2), 72 小时后提取烟草叶片总蛋白用于体外酶活性检测。以转化空载的烟草叶片作为负对照。

表 2 基因克隆引物序列

Table 2 Gene clone primers sequence

基因编号	上游序列 (5'-3')	下游序列 (5'-3')
Gene ID	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
Pm021215	GTCGACATTTAAATACTAGTATGGGTAGCCTTGAAGTGGA	ATGGTACCGGATCCACTAGTTGGATTAAGATTGCTGCCGG
Pm021214	GTCGACATTTAAATACTAGTATGAGGAATGAGATTCACAA	ATGGTACCGGATCCACTAGTTTCCAGGTTACTGCCAGCTA
Pm002468	GTCGACATTTAAATACTAGTATGGTTAGCCTTGAGGTGGA	ATGGTACCGGATCCACTAGTTTGATGAAGATTGCTGGCAG

1.8 梅花 *PmCADs* 体外酶活性检测

CAD 酶活性检测的原理是反应底物 NADPH 在 340nm 的光下有特异的吸收峰, 通过检测酶反应前后吸光值的变化可以计算底物的消耗速度, 进而换算成酶活性。检测酶活性用的是 200 μL 的体外酶反应体系, 包括: 20mmol/L MES (pH5.7)、1mmol/L 肉桂醛、1mmol/L NADPH 和 20 μg 叶片提取蛋白。用酶标仪检测 340nm/L 下的吸光值, 体外反应温度为 30 $^\circ\text{C}$, 检测时间为 30 min。最后通过 0 min 和 30 min 吸光值的变化计算 CAD 酶活, 公式为: $\text{CAD 酶活 (U}/\mu\text{g}) = \Delta A / (\epsilon \times d) \times 10^9 / M / T$, 其中 ΔA : 吸光值差值; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 为 $6.22 \times 10^3 \text{L}/(\text{mol cm})$; d : 光径, 为 1cm; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9 \text{nmol}$; M : 蛋白的质量 (单位为 μg); T : 反应时间 (单位为 min)。

2 结果与分析

2.1 梅花 *PmCADs* 基因家族的鉴定及各成员理化性质分析

通过梅花全基因组搜索, 共鉴定出 56 个梅花 *PmCADs* 基因家族成员 (见附表 1)。蛋白序列一级结构的理化性质分析显示: 这 56 个 *PmCADs* 蛋白编码长度为 118~802 个氨基酸不等, 其中 Pm022689 编码的蛋白序列最长, Pm001767 和 Pm002267 的蛋白序列显著短于其它成员; 分子量介于 12.86~89.25kDa 之间, 等

电点范围为 5.05~9.52，其中 40 个 PmCADs 蛋白的理论等电点处于酸性区间内，16 个 PmCADs 蛋白的理论等电点处于碱性范围内，表明 PmCADs 蛋白质酸碱分布极不均匀，表现为酸性的蛋白占比大；亲水性平均值在-0.291~0.702 之间，其中亲水性 PmCADs 蛋白有 36 个，疏水性 PmCADs 蛋白有 20 个；不稳定系数范围为 12.11~105.76，其中有 48 个 PmCADs 蛋白的不稳定系数值小于 40，为相对稳定蛋白质；亚细胞定位预测显示，大部分 PmCADs 蛋白位于细胞质中，占比 71%，有 12 个位于叶绿体，2 个位于细胞骨架，1 个位于液泡，1 个位于过氧化物酶体上。

2.2 梅花 PmCADs 的基因结构、保守结构域及保守基序分析

外显子和内含子的基因结构可以反映基因的进化特征，为了进一步了解梅花 PmCADs 基因家族各成员之间的进化关系，基于梅花基因组数据得到梅花 PmCADs 基因家族各成员的基因结构图（图 1）。如图所示，梅花 PmCADs 基因均具备完整的基因结构，家族基因成员在结构上存在较明显的差异：PmCADs 基因家族成员中外显子数量最多为 10 个，包括基因 Pm006116、Pm020413、Pm022682、Pm022684、Pm022687、Pm024263 和 Pm025214；而 Pm001691 基因有且仅有 1 个外显子，不含内含子。基因结构上的差异表明梅花 PmCADs 基因家族成员间存在进化的多样性，可能存在较大的功能分化。

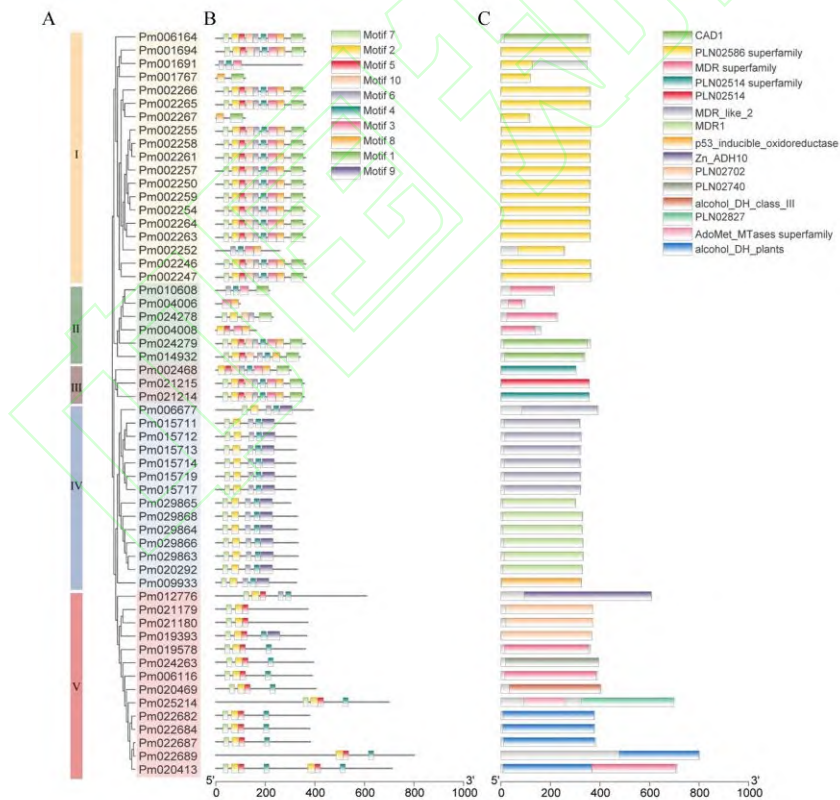


图注 Legend: 绿色 编码序列 CDS 紫色 非翻译区 UTR 黑色 内含子 Intron

图 1 梅花 *PmCADs* 的基因结构

Fig.1 Gene structure of *PmCADs* in *P. mume*

进一步分析梅花 *PmCADs* 基因家族成员的蛋白保守基序和结构域。如图 2 所示，梅花 *PmCADs* 基因家族可以分为五个亚组（图 2A），处于同一亚组的 *PmCADs* 家族成员有相对较相似的保守基序（Motif）组成（图 2B）和保守结构域（图 2C）。第 I、II、III 亚组的成员基序的组成较相似，而第 IV 和 V 亚组成员的保守基序组成与前三个亚组的保守基序组成差异较大，表明它们的生物功能可能存在明显的差异。其中，第 IV 亚组的成员都含有较独特的 Motif 9，而第 V 亚组的成员含有的基序类型较少，主要有基序 Motif2、Motif4、Motif5 和 Motif7。从保守结构域的分布上看，第 I 亚组的成员主要含有 PLN02586 结构域，预测具有肉桂醇脱氢酶活性；第 II 亚组的成员主要含有 MDR 结构域，预测具有锌离子依赖的中链脱氢酶活性；第 III 亚组的成员具有肉桂醇脱氢酶家族特有的 PLN02514 结构域，它们属于典型的肉桂醇脱氢酶；第 IV 亚组的成员主要含有类 MDR 结构域；第 V 亚组的成员含有的保守结构域类型较多，其中主要为醇类脱氢酶特有的 ADH 结构域。以上结果说明梅花 *PmCADs* 基因家族在进化过程中可能发生了较为系统的功能分化。



A: 梅花 *PmCADs* 系统发育树; B: 梅花 *PmCADs* 的保守基序组成; 底部刻度线用来估计蛋白质长度; C: 梅花 *PmCADs* 的保守结构域; 底部刻度线用来估计蛋白质长度

A: Phylogenetic relationship of *PmCADs*; B: The motif compositions of *PmCADs*; The bottom scale line is used to estimate the length of the proteins; C: Conserved domains of *PmCADs*; The bottom scale line is used to estimate the length of the proteins

图 2 梅花 *PmCADs* 基因的系统发育关系、保守基序和结构域

Fig.2 Phylogenetic relationships, architectures of conserved protein motifs and conserved domains in *PmCADs*

2.3 梅花 *PmCADs* 在染色体上的分布及共线性分析

对梅花 *PmCADs* 基因进行染色体定位分析，发现 *PmCADs* 基因在梅花第 1 号到第 7 号染色体上都有分布（图 3），另有 5 个 *PmCADs* 基因成簇分布在 scaffold371 上（图中未显示）。除了散状分布外，在 Pm1、Pm4、Pm6、Pm7 染色体都有成簇基因分布，这表明梅花 *PmCADs* 基因在基因组中的复制存在片段复制和串联复制两种形式，并且串联复制是梅花 *PmCADs* 基因复制的重要形式。梅花 *PmCADs* 基因染色体共线性分析表明，与梅花基因组共线性分析比较，在梅花 Pm2 和 Pm4 染色体，以及 Pm1 和 Pm6 染色体上片段的交换复制导致梅花 *PmCADs* 基因 Pm00667 和 Pm015711 之间以及 Pm002468 和 Pm021214 之间发生基因复制。

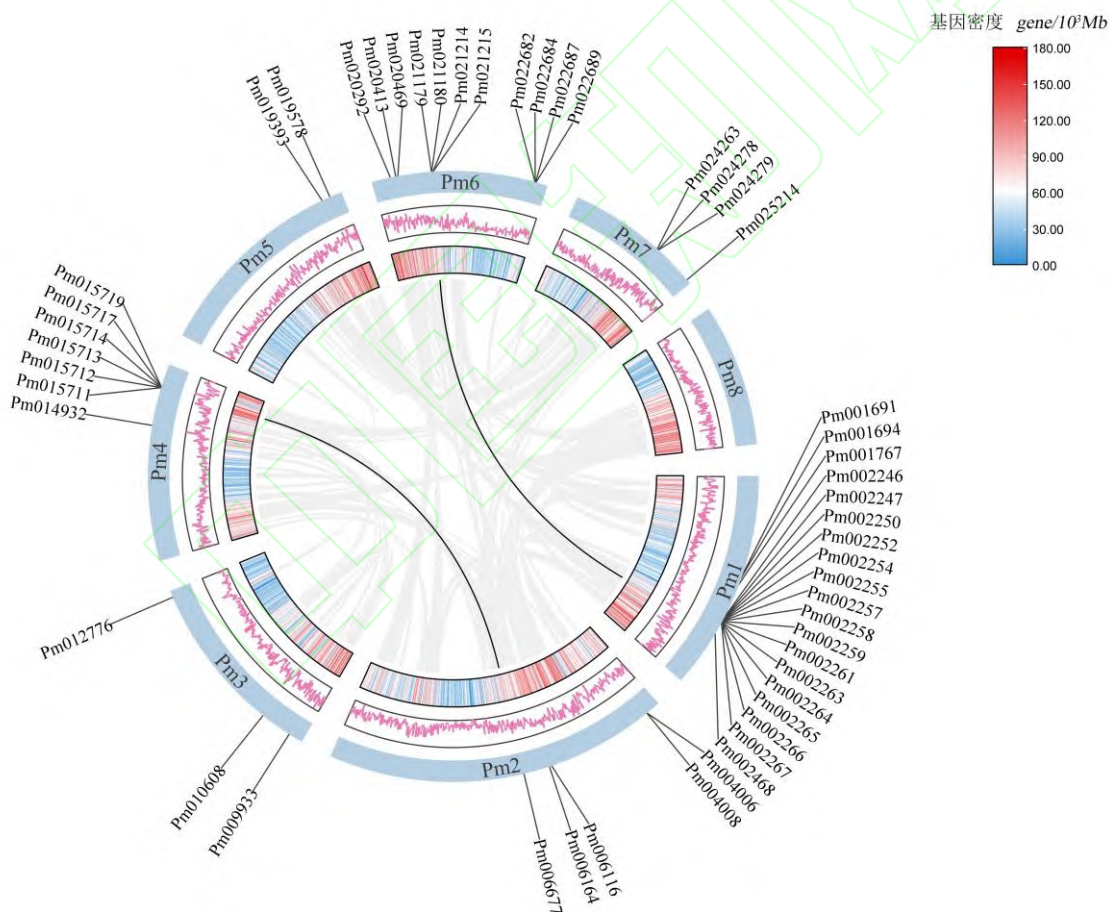


图 3 梅花 *PmCADs* 基因染色体定位和共线性关系

Fig.3 Chromosome locations and synteny relationship of *PmCADs* genes

2.4 *PmCADs* 基因的启动子顺式作用元件分析

进一步从基因的表达调控方面解析梅花 *PmCADs* 基因家族的功能分化, 利用 PlantCARE 在线网站对梅花 *PmCADs* 基因的启动子序列进行分析, 发现在梅花 *PmCADs* 基因的启动子区域广泛存在四类顺式作用元件, 包括参与脱落酸响应、茉莉酸甲酯响应、水杨酸响应的顺式作用元件和分生组织表达相关的顺式作用元件 (图 4), 这说明梅花 *PmCADs* 基因家族主要参与植物的生长发育和逆境响应。其中参与茉莉酸甲酯和脱落酸响应的顺式作用元件在 *PmCADs* 基因中占比最多, 推测这些 *PmCADs* 基因在梅花抵抗生物或非生物胁迫过程中发挥重要作用。

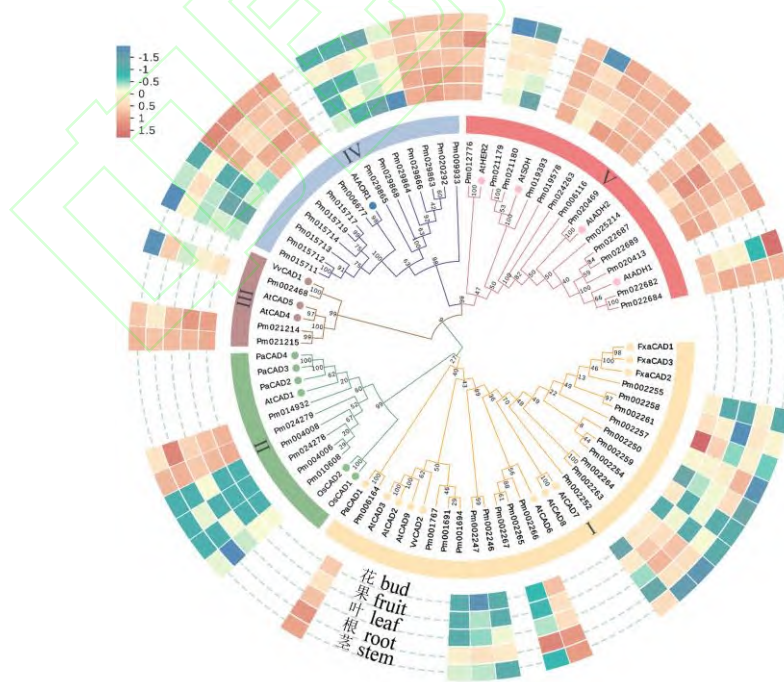


图 4 梅花 *PmCADs* 启动子区域顺式作用元件分析

Fig.4 Cis-acting elements in the promoter regions of *PmCADs* genes

2.5 梅花 PmCADs 家族与其它物种 CAD 的系统进化树分析

为预测梅花 PmCADs 家族各成员可能的生物学功能，我们选择了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、白杨 (*Populus alba*)、草莓 (*Fragaria × ananassa*) 和葡萄 (*Vitis vinifera*) 中已报道的 CAD 与梅花 PmCAD 一起构建系统发育树 (图 5)。根据系统发育树的分支关系，将梅花 PmCADs 家族分为 5 个亚组：第 I 亚组中包含草莓 FxaCAD1、拟南芥 AtCAD6、AtCAD7、AtCAD8 和葡萄 VvCAD2。第 II 亚组中包含拟南芥 AtCAD1；第 III 分支包含拟南芥 AtCAD4、AtCAD5 和葡萄 VvCAD1；第 IV 分支包含拟南芥氧化还原酶 AtAOR，已报道它编码一个 NADPH 依赖的烯醛/酮氧化还原酶，参与植物叶绿体光合作用产生的活性碳基的清除^[17]；第 V 分支包含醇脱氢酶 AtADHs 和山梨醇脱氢酶 AtSDH 等。已有研究报道，拟南芥 AtCAD4 和 AtCAD5 催化香豆醛、咖啡醛、松柏醛、5-羟基松柏醛和芥子醛还原成相应醇的活性较高，而 AtCAD1-3 和 AtCAD6-9 催化这些底物的活性较低^[5]。基于以上分析推测位于第 III 分支的梅花 PmCADs，包括 Pm021215、Pm021214 和 Pm002468，它们可能与梅花花香化合物肉桂醇的合成相关。梅花的花、果、根、茎、叶不同组织器官的转录热图分析也表明位于第 III 分支的 3 个 *PmCADs* 基因可以在花器官中表达，其中 Pm021215 和 Pm021214 在各个器官中的表达水平都较高，而 Pm002468 在根中的表达量最高，其次是花和果，在茎中表达量最低。因此，我们选择这 3 个基因作为梅花花香合成相关肉桂醇脱氢酶候选基因，做下一步的研究。



Pm:梅花; At:拟南芥; Os:水稻; Pa:白杨; Fxa:草莓; Vv:葡萄

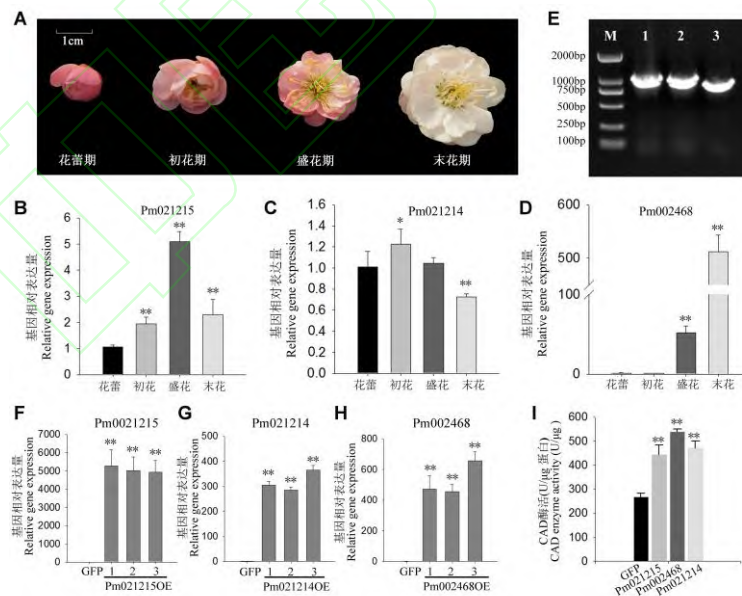
Pm: *Prunus mume*; At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; Pa: *Populus alba*; Fxa: *Fragaria × ananassa*; Vv: *Vitis vinifera*

图 5 PmCADs 与其他物种同源序列的系统进化树及在梅花不同组织器官中的表达热图分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of PmCADs and homologous sequences in other species and heat map analysis of expression in different tissues and organs of *P. mume*

2.6 PmCADs 基因的时空表达模式分析和酶活性检测

在梅花的花期采集花蕾期、初花期、盛花期和末花期的花朵（图 6A），分离花瓣用于基因表达模式分析。实时荧光定量 PCR 结果显示：Pm021215 在花朵开放过程中呈现先升高后降低的表达模式，在盛花期表达水平达到峰值（图 6B）；Pm021214 的表达水平在花开放不同阶段变化幅度不大，其中在初花期和末花期表达水平较高（图 6C）；Pm002468 的表达水平在花朵开放过程中呈现持续升高的趋势，在末花期表达水平达到峰值（图 6D）。进一步，我们克隆了梅花‘江砂宫粉’的 *PmCADs* 基因（图 6E），其中 Pm021215 的 CDS 为 1074 bp，Pm021214 的 CDS 为 1074 bp，而 Pm002468 的 CDS 为 912 bp。构建了梅花 *PmCAD* 基因连接 35S 启动子的植物过量表达载体，通过农杆菌注射的方法在烟草叶片中瞬时表达 *PmCADs*，如图 6F，6G 和 6H 所示，*PmCADs* 基因在烟草叶片中都过量表达。提取烟草叶片粗蛋白，在体外酶反应体系中验证了这三个候选 *PmCADs* 的酶活性，如图 6I 所示，与空载为负对照，梅花 Pm021215、Pm021214 和 Pm002468 都表现较高的将肉桂醛转化为肉桂醇的酶活性。结合基因表达规律和酶活性的研究，我们认为 Pm021215、Pm002468 和 Pm021214 都参与梅花宫粉品种特征花香成分肉桂醇的合成。



A: 梅花‘江砂宫粉’不同开花阶段; B, C, D: *PmCADs* 基因在花开放不同阶段的表达分析; E: 梅花 *PmCADs* 基因的扩增; M: 分子大小指示带, 1: Pm021215, 2: Pm021214, 3: Pm002468; F, G, H: *PmCADs* 基因在烟草叶片中的表达量分析, 以 *Nbtublin* 作为内参基因; I: *PmCADs* 肉桂醇脱氢酶活性分析; *: 达到显著水平, $P < 0.05$; **: 达到极显著水平, $P < 0.01$

A: Different flowering stages of *P. mume* ‘JiangshaGongfen’; B, C, D: *PmCADs* genes relative expression analysis at different flowering stages; E: Amplification of *PmCADs* genes in *P. mume*; M: Maker, 1: Pm021215, 2: Pm021214, 3: Pm002468; F, G, H:

Expression level analysis of *PmCADs* gene in tobacco leaves, with *Nbtubulin* as an internal reference gene; I: *PmCADs* cinnamyl alcohol dehydrogenase activity analysis; *: Reached a significant level, $P < 0.05$; **: Reached a highly significant level, $P < 0.01$

图 6 ‘江砂宫粉’不同开花阶段候选 *PmCADs* 基因表达分析及酶活性检测

Fig.6 The candidate *PmCADs* genes relative expression analysis at different flowering stages of *P. mume* ‘JiangshaGongfen’ and enzyme activity analysis

2.7 *PmCADs* 的亚细胞定位

蛋白的亚细胞定位对大分子酶的生物功能的正常执行起重要的作用。针对鉴定获得的 3 个具有肉桂醇脱氢酶活性的 *PmCADs* 蛋白，我们对其的亚细胞定位进行了分析。如图 7 所示，*Pm021215* 和 *Pm021214* 主要定位与细胞质中，其中 *Pm021214* 在细胞核中也观察到信号；*Pm002468* 蛋白在细胞中呈网状分布，推测它可能定位于内质网中，此外它在细胞核中也有分布。*Pm021215*、*Pm002468* 和 *Pm021214* 亚细胞定位的差异表明它们在细胞的不同区域发挥作用，可能参与不同的代谢过程。

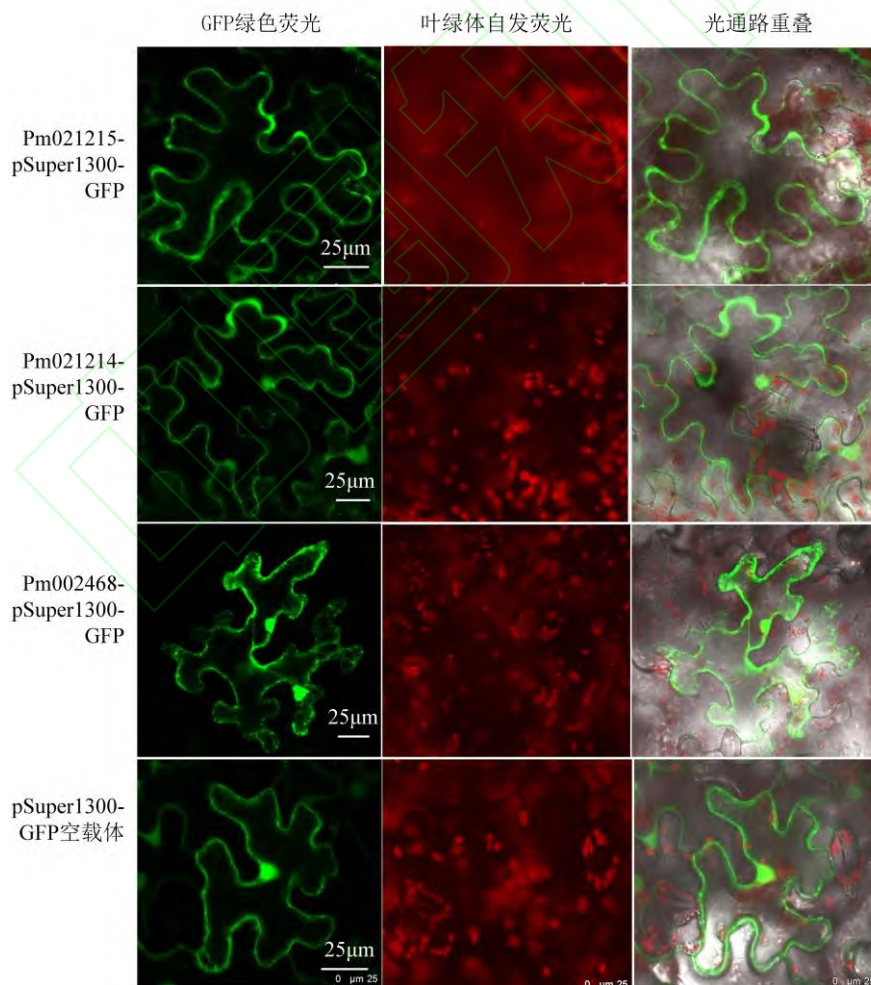


图 7 *PmCADs* 蛋白的亚细胞定位分析

3 讨论

“遥知不是雪，为有暗香来”，花香是梅花的重要观赏性状，肉桂醇是梅花宫粉品种群的主要特征花香成分。本研究聚焦梅花花香成分肉桂醇的合成代谢研究，从梅花全基因组中共鉴定了 56 个梅花 PmCADs 家族成员，蛋白理化性质、基因结构和蛋白保守基序分析都表明梅花 PmCADs 家族成员间可能存在较大的功能分化。染色体定位及共线性分析发现梅花 PmCADs 家族在进化过程中发生了包括染色体片段的交换复制和串联复制。对于本研究鉴定的 3 个花香成分肉桂醇合成相关 PmCADs 基因，其中 Pm021214 和 Pm021215 之间通过串联复制产生，位于第 1 号染色体；而 Pm002468 为 Pm021214 通过染色体片段复制产生，分别位于第 1 号染色体和第 6 号染色体。通过启动子顺式作用元件分析，推测梅花 PmCADs 基因主要参与生长发育和抗逆响应，这与其在植物中保守的木质素合成功能是相一致的。虽然 Pm002468 和 Pm021214 是通过染色体片段复制产生，但是它们的启动子顺式元件类型差别较大，两者仅有 1 个相同的参与水杨酸响应的元件，说明 Pm002468 和 Pm021214 复制事件发生后基因的启动子又发生了新进化，启动子的进化可能进一步推动基因的功能发生分化。

依据进化发育树关系和不同组织器官表达热图分析，我们认为 3 个 PmCADs 基因 Pm021215、Pm021214、Pm002468 可能与花香成分肉桂醇合成相关。其中 Pm021215 为本课题组前期通过转录组鉴定的 PmCAD1，它催化肉桂醛生成肉桂醇的功能已被验证，Pm021214 为 PmCAD2，之前的研究未检测出其具有催化肉桂醛生成肉桂醇的活性^[12]。而本研究对体外酶反应体系中的底物浓度和检测手段进行优化后，证明 Pm021215、Pm021214 和 Pm002468 都具有催化肉桂醛生成肉桂醇的活性。梅和桃同属蔷薇科李属植物，和桃花比较，梅花具有典型的特征花香，课题组前期通过比较梅和桃的基因组，发现梅花基因组中 PmBEATs 基因的串联复制最终导致梅花能够合成特征花香成分乙酸苯甲酯^[18]。我们运用比较基因组的方法，将梅和桃基因组中筛选到的 CAD 共建进化发育树，发现梅和桃的 CAD 在进化树中呈较均匀分布，没有发现梅花中存在特殊的分支，并且梅花的 Pm021215、Pm021214 和 Pm002468 基因在桃基因组中都各有一个对应的旁系同源基因，这说明梅花基因组中可能不存在额外的、特异作用于花香成分肉桂醇合成的 CAD 基因，推测梅花的花香成分肉桂醇的合成可能与木质素的合成共用一套 CAD 基因。

实时荧光定量 PCR 分析表明这三个基因在开花的各个阶段都表达，且表达模式有差异，其中 Pm002468 和 Pm021215 在花开放各个阶段的表达规律较一致，即在花开放后期表达量较高，而 Pm021214 的基因表达规律较不明显。鉴于它们都可以在花开放过程中表达，且都具有较高的肉桂醇脱氢酶活性，推测它们共同参与了梅花宫粉品种群特征花香成分肉桂醇的合成。生物信息学预测 Pm021215 和 Pm021214 定位于细胞质，

Pm002468 定位于叶绿体中，但是实验验证的结果发现 Pm021215 和 Pm021214 主要定位于细胞质，而 Pm002468 可能定位于内质网中，并且 Pm021214 和 Pm002468 在细胞核中也有分布。亚细胞定位存在差异，说明它们在细胞不同的区域可能参与不同的代谢过程。已有研究报道拟南芥 AtCAD5 定位在细胞壁和细胞质中，与其细胞壁合成的功能是相一致^[19]。Pm021215、Pm021214 和 Pm002468 是否定位在细胞壁上，以及 Pm002468 更精细的亚细胞定位需要进一步设计试验加以确认。

综合生物信息学分析和试验验证，我们认为梅花 Pm021215、Pm021214 和 Pm002468 基因可能同时在木质素合成和花香成分肉桂醇的合成上都发挥作用。综上所述，本研究分析了梅花 PmCADs 家族的进化关系，并在已有的研究基础上重新鉴定了 2 个新的可能参与梅花花香合成的 PmCADs 基因（Pm021214 和 Pm002468），为梅花特征花香成分肉桂醇的合成研究奠定基础，为梅花特色品种特征花香分子育种提供优良的基因储备。

参考文献

- [1] Hao R J, Du D L, Wang T, Yang W R, Wang J, Zhang Q X. A comparative analysis of characteristic floral scent compounds in *Prunus mume* and related species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 78(10):1640-1647
- [2] Zhang T X, Bao F, Yang Y J, Hu L, Ding A Q, Wang J, Cheng T R, Zhang Q X. A comparative analysis of floral scent compounds in intraspecific cultivars of *Prunus mume* with different corolla colours. *Molecules*, 2019, 25, 145
- [3] Wang X, Song Z, Ti Y, Ma K, Li Q. Comparative transcriptome analysis linked to key volatiles reveals molecular mechanisms of aroma compound biosynthesis in *Prunus mume*. *BMC Plant Biology*, 2022, 22: 395
- [4] 杨钰, 王艺光, 董彬, 肖政, 赵洪波. 不同梅花品种花香成分鉴定与分析. *浙江农林大学学报*, 2024, 41(2): 262-274
Yang Y, Wang Y G, Dong B, Xiao Z, Zhao H B. Identification and analysis of floral scent components in different varieties of *Prunus mume*. *Journal of Zhejiang Agricultural and Forestry University*, 2024, 41(2): 262-274
- [5] Mansell R, Gross G, Stockigt J, Franke H, Zenk M. Purification and properties of cinnamyl alcohol dehydrogenase from higher plants involved in lignin biosynthesis. *Phytochemistry*, 1974, 13, 2427-2435
- [6] Kim S, Kim M, Bedgar D, Moinuddin S, Cardenas C, Davin L, Kang C, Lewis N. Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101, 1455-1460
- [7] 张倩, 贡鑫, 张天正, 陈燕, 王浩, 吴翠云, 陶书田, 包建平. ‘库尔勒香梨’ *PsiCAD1* 和 *PsiPRX6* 基因的亚细胞定位和表达分析. *分子植物育种*, 2023, 21(18):5947-5954
Zhang Q, Gong X, Zhang T Z, Chen Y, Wang H, Wu C Y, Tao S T, Bao J P. Subcellular localization and expression analysis of *PsiCAD1* and *PsiPRX6* genes in ‘Kuerle Pear’. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(18):5947-5954
- [8] Ge H, Zhang J, Zhang Y J, Li X, Yin X R, Grierson, D., Chen K S. E3NAC3 transcriptionally regulates chilling-induced lignification of loquat fruit via

- physical interaction with an atypical CAD-like gene. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68, 5129-5136
- [9] 陈建中, 葛水莲, 王有年, 叶嘉. 桃内果皮木质化与其相关酶的关系. *河南农业科学*, 2008 (9):100-103
- Chen J Z, Ge S L, Wang Y N, Ye J. Relationship between lignification of peach fruit endocarp and the activities of related enzyme. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2008(9):100-103
- [10] 张春红, 熊振豪, 吴文龙, 李维林. 黑莓果实发育成熟期木质素合成 CAD 酶及其基因表达. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2019,43(1):141-148.
- Zhang C H, Xiong Z H, Wu W L, Li W L. CAD enzyme activity and gene expression in connection with lignin synthesis during fruit development and ripening process of blackberry. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 2019,43(1):141-148
- [11] Wang P, Yang J, Li Z Y, Zhu J J, Gao Q H, Ni D A, Duan K. Genome-wide identification and expression analysis revealed cinnamyl alcohol dehydrogenase genes correlated with fruit-firmness in strawberry. *Journal of Berry Research*, 2021, 11, 447-464
- [12] Liu W, Jiang Y, Wang C H, Zhao L L, Jin Y Z, Xing Q J, Li M, Lv, T., Qi H Y. Lignin synthesized by CmCAD2 and CmCAD3 in oriental melon (*Cucumis melo* L.) seedlings contributes to drought tolerance. *Plant Molecular Biology*, 2020, 103, 689-704
- [13] 张翠. CmCAD2 和 CmCAD5 在薄皮甜瓜果实发育后期香气物质合成中的作用. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017
- Zhang C. The role of *CmCAD2* and *CmCAD5* in aroma synthesis during the late period of melon fruit development (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017
- [14] Zhang T X, Bao F, Ding A Q, Yang Y J, Cheng T R, Wang J, Zhang Q X. Comprehensive analysis of endogenous volatile compounds, transcriptome, and enzyme activity reveals PmCAD1 involved in cinnamyl alcohol synthesis in *Prunus mume*. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13, 820742
- [15] Zhang Q X, Cheng W B, Sun L D, Zhao F Y, Huang B Q, Yang W R, Tao Y, Wang J, Yuan Z Q, Fan G Y, Xing Z, Han C L, Pan H T, Zhong X, Shi W F, Liang X M, Du D L, Sun F M, Xu Z D, Hao R J, Lv T, Lv Y M, Zheng Z Q, Sun M, Luo L, Cai M, Gao Y K, Wang J Y, Yin Y, Xu X, Cheng T R, Wang J. The genome of *Prunus mume*. *Nature Communications*, 2012, 3: 1318
- [16] Chen C J, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y H, Xia R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020,13(8):1194-1202
- [17] Yamauchi Y, Hasegawa A, Mizutani M, Sugimoto Y. Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. *FEBS Letters*, 2012, 586, 1208-1213
- [18] Bao F, Ding A Q, Zhang T X, Luo L, Wang J, Cheng T R, Zhang Q X. Expansion of *PmBEAT* genes in the *Prunus mume* genome induces characteristic floral scent production. *Horticulture Research*. 2019, 6: 24
- [19] Chen A P, Zhong N Q, Qu Z L, Wang F, Liu N, Xia G X. Root and vascular tissue-specific expression of glycine-rich protein AtGRP9 and its interaction with AtCAD5, a cinnamyl alcohol dehydrogenase, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 2007, 120, 337-343