

梅花肉桂醇脱氢酶基因的鉴定和功能分析

刘巴塬, 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 *PmCAD* 同源基因, 发现梅花 *PmCAD* 家族成员可分为 5 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 *PmCAD* 在基因组中复制进化的两种形式。梅花 *PmCAD* 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 *PmCAD* 基因主要参与梅花的生长发育和抗逆响应。分析与多物种来源 CAD 蛋白共建树, 结果表明位于第 III 亚组的 3 个 *PmCAD* 可能参与梅花花香合成过程。不同组织器官热图分析表明这 3 个 *PmCAD* 基因都在花器官中表达。基因相对表达量分析发现它们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 *PmCAD* 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 *PmCAD* 基因的进化和功能分化, 为梅花重要花香成分的合成研究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

Identification and Functional Analysis of *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (PmCAD)* Genes 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)

Abstract: *Prunus mume* Siebold & Zucc., known for its numerous varieties and diverse floral scents, includes cinnamyl alcohol and cinnamyl acetate as unique floral scent components in pink varieties. In plants, cinnamaldehyde is reduced to cinnamyl alcohol under the catalytic action of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), which in turn forms cinnamyl acetate under the catalysis of acetyltransferase. Therefore, cinnamyl alcohol is not only a significant floral scent component in *P. mume*, but also a crucial precursor for the synthesis of cinnamyl acetate. This study identified 56 *PmCAD* homologous genes based on the updated genome of *P. mume*. These *PmCAD* family members can be categorized into five subgroups. 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 divergence. Chromosome segmental duplication and tandem duplication were identified as two forms of *PmCAD* replication in genome evolution. The promoters of *PmCAD* genes were found

收稿日期: 2024-05-16 网络出版日期: 2024-10-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240516001>

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); 北京市大学生科学研究与创业行动计划 (S202310022093)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32271910); College Student Research and Career-creation Program of Beijing (S202310022093)

to extensively contain abscisic acid, methyl jasmonate, salicylic acid responsive elements, and meristem related elements, suggesting that *PmCAD* genes are mainly involved in the growth, development, and stress response. Phylogenetic analysis of CAD from *P. mume* and other species indicated that the three *PmCAD* genes located in subgroup III may be involved in floral scent synthesis. Heat map analysis in different tissues and organs indicated that the three *PmCAD* were all expressed in flowers. Furthermore, analysis of relative gene expression revealed that the expression patterns of the three candidate *PmCAD* 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 *PmCAD* possess cinnamyl alcohol dehydrogenase activity, indicating that they jointly participate in the synthesis of cinnamyl alcohol. Subcellular localization analysis revealed differences in their intracellular distribution, suggesting distinct cellular roles. This study sheds light on the evolution and functional differentiation of the *PmCAD* genes in *P. mume*, laying a theoretical foundation for the synthesis of key 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”。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, 肉桂醛在肉桂醇脱氢酶 (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。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他衍生物, 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。肉桂醇脱氢酶广泛存在于植物界, 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, 即肉桂醇脱氢酶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, 肉桂醇脱氢酶广泛分布在各种植物的不同组织中, 通常认为肉桂醇脱氢酶可以同时催化多种不同的底物, 对于不同的底物亲和性有差异。比如, 拟

南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 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 5 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 5 种底物的活性均较低^[6]。

植物的肉桂醇脱氢酶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肉桂醇脱氢酶可能参与梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) 果肉的石细胞形成^[7]、枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 果实木质化^[8]、桃 (*Prunus persica* L.) 内果皮木质化^[9]等, 以及与黑莓 (*Rubus fruticosus* Pollich) 果实的硬度^[10]、草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 果实的硬度^[11]、薄皮甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 的抗旱能力^[12]相关。这些园艺表型和抗逆性都与肉桂醇脱氢酶参与木质素合成的功能相关。研究还发现, 肉桂醇脱氢酶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, 关于肉桂醇脱氢酶在观赏植物花香合成中的功能鲜有报道。本课题组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, 肉桂醇脱氢酶在梅花基因组中的进化关系, 以及是否还有其他 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 *PmCAD* 同

源基因,进一步开展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 *PmCAD* 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,并通过体外酶活体系分析梅花 *PmCAD* 蛋白的酶活性,最后用烟草叶片瞬时表达的方法对梅花 *PmCAD* 蛋白进行亚细胞定位。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amp;方法

1.1 梅花 *PmCAD* 基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析

利用梅花二代基因组数据库^[15](数据已上传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 *PmCAD* 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 *PmCAD* 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/wolfpsort.html>)在线预测 *PmCAD* 蛋白的亚细胞定位。整理 *PmCAD* 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 *PmCAD* 基因结构图。利用 MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)在线预测 *PmCAD* 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。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 *PmCAD* 基因进行染色体定位和共线性分析,并在线绘制 circos 图。运用 Tbttools 软件提取梅花 *PmCAD* 基因起始密码子 ATG 上游 2000 bp 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的可视化。

1.2 梅花 *PmCAD* 家族成员系统发育树分析

在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线提取杨树 (*Populus alba* L.) PaCAD1 (XP_034919559.1)、PaCAD2 (XP_034903675.1)、PaCAD3 (XP_034903674.1)、PaCAD4 (XP_034903673.1),葡

萄 (*Vitis vinifera* L.) VvCAD1 (XP_002283356.1)、VvCAD2 (XP_002279718.1),水稻 (*Oryza sativa* L.) 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)等物种的肉桂醇脱氢酶氨基酸序列。运用 Clustal X 2.0 对梅花 *PmCAD* 和已报道的其他物种的肉桂醇脱氢酶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(数据已上传NCBI,项目号PRJNA172987),从中提取梅花 *PmCAD* 基因表达的 RPKM 值,将数据进行 \log_{10} 对数处理后用联川生物云平台(<https://www.omicstudio.cn/>)绘制热图,并进行聚类分析。

1.3 梅花 *PmCAD* 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。于同日上午 9:00-10:00 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱,用于基因表达分析。使用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒[DP441,天根生化科技(北京)有限公司]提取梅花花瓣总 RNA,使用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)[KR116,天根生化科技(北京)有限公司]反转录成 cDNA,用于基因相对表达量分析和基因克隆。根据 *PmCAD* 基因的 CDS 序列设计荧光定量引物(表 1),以梅花 *PmPP2A* 或烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 的 *NbTublin* 基因作为内参基因,每个时期的样品设置 4 次重复,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行处理,计算其相对表达量。qRT-PCR 扩增体系为 $15\text{ }\mu\text{L}$,包含:cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$ ($2\text{ }\mu\text{g}$ RNA 反转录 cDNA 后稀释 10 倍使用),正、反向引物各 $0.2\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$),SYBR Premix Ex TaqII 预混液 $7.5\text{ }\mu\text{L}$,加水补足 $15\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增程序为:预变性($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s);循环 45 个($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 34s);最后进行熔解曲线分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequence of qRT-PCR primers

引物名称 Primer name	正向序列(5'-3') Forward sequence(5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
Pm021215	CCAAGTTCAGAGTAGGAGAT	CGGAATAAGTGTCATTGTAAGA
Pm021214	TTGCCACACTGATACTCA	CGTCTCCTACTCTGAACTT
Pm002468	GGAGAAGTGGTGGAGTTG	ATTGGCAAGACAGGCATT
PmPP2A	ATGCCGGCTCACGGGATCTG	TTACAAAAATAATCTGGAGTC
NbTublin	CCAGGTGACAAGACAGTT	AATGACAGTAGGCTCAAGAT

1.4 梅花 PmCAD 体外酶活性检测

以梅花‘江砂宫粉’的花的 cDNA 为模板,使用试剂盒 KOD-Plus-Neo(KOD-401, Toyobo)PCR 扩增 *PmCAD* 编码序列,克隆引物见表 2。PCR 反应体系 50 μ L, 包含如下组分: 10 \times buffer 5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 3 μ L, 10 μ mol/L 正向克隆引物各 1.5 μ L, 模板 cDNA 4 μ L (约 200 ng), KOD 酶 1 μ L, 加水补足 50 μ L。扩增程序为: 预变性(94 $^{\circ}$ C 2 min); 循环 25 个(98 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s); 延伸(68 $^{\circ}$ C 1 min)。使用试剂盒 In-Fusion HD Cloning Kit(PT5162-1, Clontech)将切

胶回收的 *PmCAD* 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 10 mmol/L MES (pH5.7)、10 mmol/L MgCl₂、150 μ mol/L 乙酰丁香酮, 用于悬浮农杆菌(农杆菌浓度: 目的基因 OD₆₀₀ 为 0.5, P19 为 0.2), 72 h 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

引物名称 Primer name	正向序列(5'-3') Forward sequence(5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
Pm021215	GTCGACATTTAAATACTAGTATGGGTAGCCTTGAAGTGA	ATGGTACCGGATCCACTAGTTGGATTAAGATTGCTGCCGG
Pm021214	GTCGACATTTAAATACTAGTATGAGGAATGAGATTCACAA	ATGGTACCGGATCCACTAGTTTCCAGTTACTGCCAGCTA
Pm002468	GTCGACATTTAAATACTAGTATGGTTAGCCTTGAGGTGA	ATGGTACCGGATCCACTAGTTTGATGAAGATTGCTGGCAG

肉桂醇脱氢酶酶活性检测的原理是反应底物 NADPH 在 340 nm 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。酶活性检测采用 200 μ L 的体外酶反应体系, 包括: 20 mmol/L MES (pH5.7)、1 mmol/L 肉桂醛、1 mmol/L NADPH 和 20 μ g 叶片提取蛋白。用酶标仪检测 340 nm 下的吸光值, 体外反应温度为 30 $^{\circ}$ C, 检测时间为 30 min。最后通过 0 min 和 30 min 吸光值的变化计算肉桂醇脱氢酶酶活, 公式为: CAD 酶活(U/ μ g) = $\Delta A / (\epsilon \times d) \times 10^9 / M / T$, 其中 ΔA : 0 min 和 30 min 吸光值差值; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 为 6.22×10^3 L/(mol \cdot cm); d : 光径, 为 1 cm; 10^9 : 单位换算系数, 1 mol = 10^9 nmol; M : 蛋白的质量(单位为 μ g); T : 反应时间(单位为 min)。

2 结果与分析

2.1 梅花 PmCAD 基因家族成员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 *PmCAD* 基因家族成员(表 3)。蛋白序列一级结构的理化性质分析显示, 这 56 个 *PmCAD* 蛋白长度为 118~802 个氨基酸, 其中 Pm022689 的蛋白序列最长, Pm001767 和 Pm002267 的蛋白序列短于其他成员; 分子量介于 12.86~89.25 kDa 之间, 等电点范围为 5.05~9.52, 其中 40 个 *PmCAD* 蛋白的理论等电点处于酸性区间内, 16 个 *PmCAD* 蛋白的理论等电点处于碱性范围内, 表明 *PmCAD* 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 -0.702~0.291 之间, 其中亲水性 *PmCAD* 蛋白有

36个,疏水性PmCAD蛋白有20个;不稳定系数范围为12.11~105.76,其中48个PmCAD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,40个PmCAD蛋白位于细胞质中,占比71%,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。

表3 梅花PmCAD家族成员信息

Table 3 Information of PmCAD family in *P.mume*

基因ID Gene ID	登录号 Accession number	氨基酸数目 (aa) Number of amino acids	分子量(kD) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 The instability index	亲水性均值 Gravy	亚细胞定位 Subcellular localization
Pm021215	XP_008236378.1	359	38.92	5.43	24.47	-0.028	细胞质
Pm021214	XP_008236377.1	388	42.41	5.73	26.28	-0.029	细胞质
Pm002468	XP_008238749.1	334	36.32	5.47	34.39	0.026	叶绿体
Pm002257	XP_008236481.1	392	42.60	5.96	86.76	-0.013	细胞质
Pm002259	XP_008236502.1	360	38.75	7.14	32.32	0.022	细胞质
Pm002246	XP_008236420.1	363	39.24	6.50	30.74	0.015	细胞质
Pm002258	XP_008236492.1	361	38.87	6.50	31.46	0.053	细胞质
Pm001694	XP_008231559.1	267	38.32	6.75	65.81	-0.702	细胞质
Pm002261	XP_008236513.1	361	38.96	6.39	31.48	0.042	细胞质
Pm002254	XP_008236460.1	360	39.02	6.50	23.99	-0.003	细胞质
Pm002255	XP_008236471.1	364	39.39	5.86	31.06	-0.072	细胞质
Pm002247	XP_008237214.1	366	39.24	6.31	33.95	0.055	叶绿体
Pm002264	XP_008236534.1	361	38.66	6.51	29.82	0.054	细胞质
Pm002266	XP_008236562.1	362	38.71	6.23	25.13	0.046	细胞质
Pm002250	XP_008236492.1	362	39.45	5.95	22.90	0.032	细胞质
Pm002263	XP_008236524.1	361	38.53	6.71	27.46	0.101	细胞质
Pm006164	XP_008221221.1	361	39.38	6.73	26.61	-0.073	过氧化物酶体
Pm002265	XP_008236551.1	363	39.02	6.39	21.86	0.074	细胞质
Pm024279	XP_016651112.1	362	39.38	6.39	34.03	-0.094	细胞质
Pm014932	XP_008229770.1	340	36.49	6.59	31.64	0.049	细胞骨架
Pm002252	XP_008236513.1	258	28.20	9.28	40.24	-0.050	叶绿体
Pm010608	XP_016648186.1	217	23.47	9.40	30.06	0.174	叶绿体
Pm001767	XP_016647223.1	119	13.09	6.07	12.11	0.219	细胞质
Pm002267	XP_008237261.2	118	12.86	6.90	105.76	0.164	细胞质
Pm024278	XP_016651112.1	230	25.18	5.51	34.47	-0.188	细胞质
Pm001691	XP_008231559.1	348	39.44	6.51	41.01	-0.243	叶绿体
Pm012776	XP_008227684.1	609	65.57	8.38	48.08	0.030	叶绿体
Pm019393	XP_008234305.1	367	39.24	6.46	23.96	0.116	细胞质
Pm020413	XP_008235523.1	711	77.36	6.20	31.73	-0.039	细胞质
Pm006116	XP_008221166.1	389	42.40	5.34	36.33	0.066	细胞质
Pm021179	XP_008236330.1	371	39.70	6.79	25.34	0.058	细胞质
Pm021180	XP_008236330.1	371	39.78	6.56	25.81	0.043	细胞质
Pm024263	XP_008239269.1	395	42.88	6.40	24.31	-0.118	细胞质

表3 (续)

基因 ID Gene ID	登录号 Accession number	氨基酸数目 (aa) Number of amino acids	分子量(kD) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 The instability index	亲水性均值 Gravy	亚细胞定位 Subcellular localization
Pm022682	XP_008237683.1	379	41.22	5.98	34.85	-0.116	细胞质
Pm004008	XP_016651112.1	163	17.62	5.50	21.94	-0.133	细胞质
Pm022684	XP_008237684.1	379	41.18	5.92	35.37	-0.110	细胞质
Pm006677	XP_008221813.1	393	41.80	8.74	23.52	0.008	叶绿体
Pm004006	XP_016648186.1	255	27.91	8.87	31.42	0.291	叶绿体
Pm020469	XP_008235567.1	405	43.25	7.49	28.62	0.092	液泡
Pm022687	XP_008237686.1	382	41.45	6.33	28.26	-0.065	细胞质
Pm025214	XP_008240325.1	699	75.99	5.05	44.03	0.062	细胞质
Pm019578	XP_008234855.1	362	38.92	8.14	35.61	0.024	细胞质
Pm015711	XP_008230609.1	329	34.74	9.42	22.74	-0.030	细胞质
Pm029864	XP_008244673.1	321	34.16	8.30	27.73	0.088	细胞骨架
Pm015719	XP_008230614.1	323	34.46	5.81	22.53	0.077	叶绿体
Pm029868	XP_008244675.1	330	34.86	9.52	19.84	0.087	细胞质
Pm015714	XP_008230611.1	322	34.32	6.17	22.22	0.007	细胞质
Pm015717	XP_008230612.1	323	34.31	5.61	23.03	0.079	叶绿体
Pm029863	XP_008244672.1	333	34.76	9.17	28.97	-0.042	细胞质
Pm029866	XP_008244674.1	332	35.06	7.69	29.04	0.032	细胞质
Pm022689	XP_008237687.1	802	89.25	5.59	38.82	-0.134	叶绿体
Pm020292	XP_008235420.1	329	34.53	9.19	22.87	0.003	细胞质
Pm029865	XP_008244675.1	302	31.55	9.29	22.86	0.029	细胞质
Pm009933	XP_008224971.1	326	34.97	6.17	43.67	0.136	细胞质
Pm015712	XP_008230610.1	325	34.65	5.73	25.75	0.091	叶绿体
Pm015713	XP_008230947.1	323	34.48	8.42	23.26	0.048	细胞质

2.2 梅花 PmCAD 基因家族成员的基因结构、保守基序及保守结构域分析

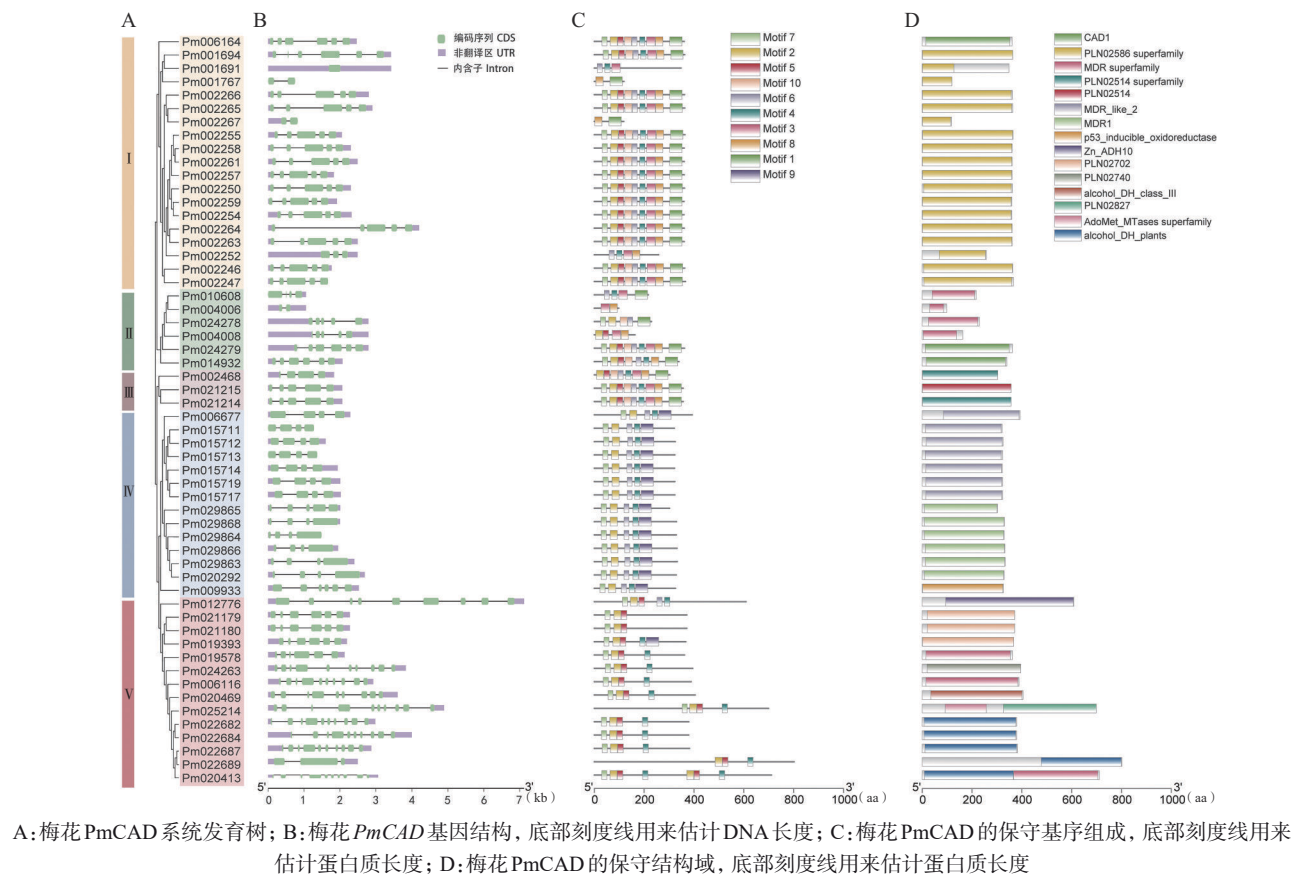
为了更好地展示梅花 PmCAD 基因家族成员之间的进化关系,运用生物信息学的方法分析各成员基因结构、蛋白保守基序和保守结构域的差异(图1)。进化树分析表明,梅花 PmCAD 基因家族可以分为5个亚组(图1A)。基于梅花基因组数据得到梅花 PmCAD 基因家族各成员的基因结构(图1B),外显子和内含子的基因结构可以从核酸上反映基因的进化特征,梅花 PmCAD 基因均具备完整的基因结构,家族基因成员在结构上存在较明显的差异。PmCAD 基因家族成员中外显子数量最多为10个,包括基因 *Pm006116*、*Pm020413*、*Pm022682*、*Pm022684*、*Pm022687*、*Pm024263* 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 PmCAD 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。

进一步分析梅花 PmCAD 基因家族的蛋白保守基序和结构域。如图1所示,处于同一亚组的 PmCAD 家族成员有相对较相似的保守基序(Motif)(图1C)和保守结构域(图1D)。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3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 Motif 2、Motif 4、Motif 5 和 Motif 7。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亚组的成员大多具有肉桂醇脱氢酶家族特有的PLN02514结构域,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alcohol_DH结构域。以上结果说明梅花PmCAD基因家族成员在进化过程中可能发生了较为系统的功能分化。



A: Phylogenetic relationship of PmCAD; B: The gene structures of PmCAD, the bottom scale line is used to estimate the length of the DNA; C: The motif compositions of PmCAD, the bottom scale line is used to estimate the length of the proteins; D: Conserved domains of PmCAD, the bottom scale line is used to estimate the length of the proteins

图1 梅花PmCAD的系统发育关系、基因结构、保守基序和结构域

Fig. 1 Phylogenetic relationships, gene structures, architectures of conserved protein motifs and conserved domains in PmCAD

2.3 梅花PmCAD基因在染色体上的分布及共线性分析

对梅花PmCAD基因进行染色体定位分析,发现51个PmCAD基因在梅花Pm1到Pm7染色体上都有分布(图2),另有5个PmCAD基因成簇分布在scaffold371上(图2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PmCAD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PmCAD基因复制的重要形式。梅花PmCAD基因染色体共线性分析表明,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PmCAD基因Pm00667和Pm015711之间以及

Pm002468和Pm021214之间发生基因复制。

2.4 PmCAD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PmCAD基因家族成员的功能分化,利用PlantCARE在线网站对梅花PmCAD基因的启动子序列进行分析,发现在梅花PmCAD基因的启动子区域广泛存在4类顺式作用元件,包括参与脱落酸响应、茉莉酸甲酯响应、水杨酸响应和分生组织表达相关的顺式作用元件(图3),这说明梅花PmCAD基因家族成员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PmCAD基因中占比最多,推测这些PmCAD基因在梅花抵抗生物或非生物胁迫过程中发挥重要作用。

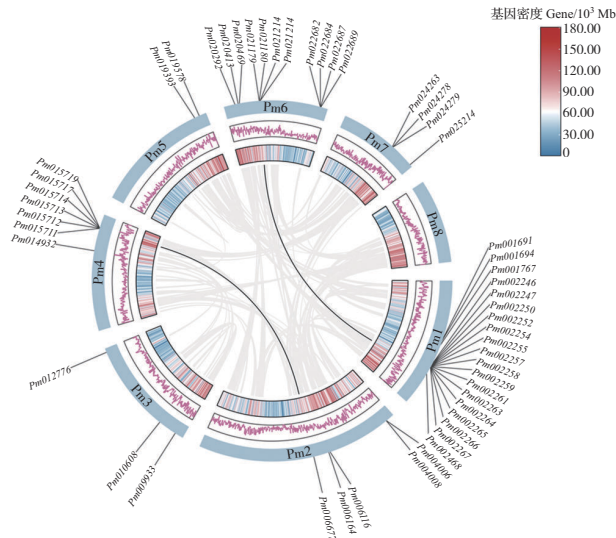


图2 梅花 *PmCAD* 基因染色体定位和共线性关系
 Fig. 2 Chromosome locations and synteny relationship of *PmCAD* genes

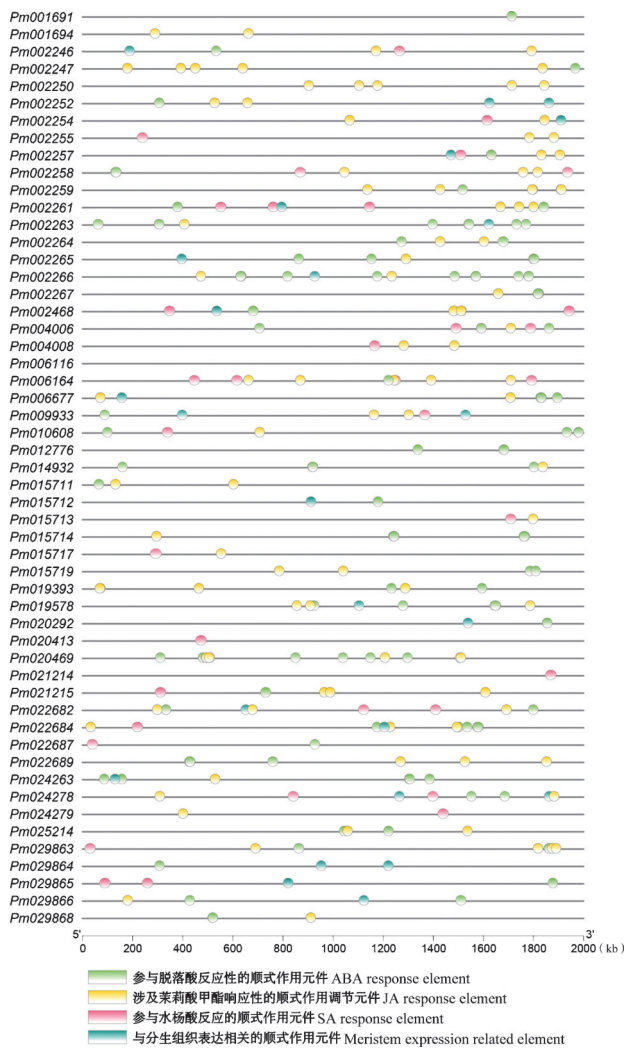


图3 梅花 *PmCAD* 基因启动子区域顺式作用元件分析
 Fig. 3 Cis-acting elements in the promoter regions of *PmCAD* genes

2.5 梅花 *PmCAD* 家族与其他物种肉桂醇脱氢酶的系统进化树分析

为预测梅花 *PmCAD* 家族成员可能的生物学功能,选择拟南芥、水稻、白杨、草莓和葡萄中已报道的肉桂醇脱氢酶蛋白与梅花 *PmCAD* 蛋白一起构建系统发育树(图4)。根据系统发育树的分支关系,将梅花 *PmCAD* 家族成员分为5个亚组,第I亚组中还包含草莓 *FxaCAD1*、*FxaCAD2*、*FxaCAD3*、拟南芥 *AtCAD6*、*AtCAD7*、*AtCAD8* 和葡萄 *VvCAD2* 等;第II亚组中包含拟南芥 *AtCAD1* 等;第III亚组包含拟南芥 *AtCAD4*、*AtCAD5* 和葡萄 *VvCAD1*;第IV亚组包含拟南芥氧化还原酶 *AtAOR*, 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羰基的清除^[17];第V亚组包含醇脱氢酶 *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亚组的梅花 *PmCAD*,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亚组的3个 *PmCAD* 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进行下一步的研究。

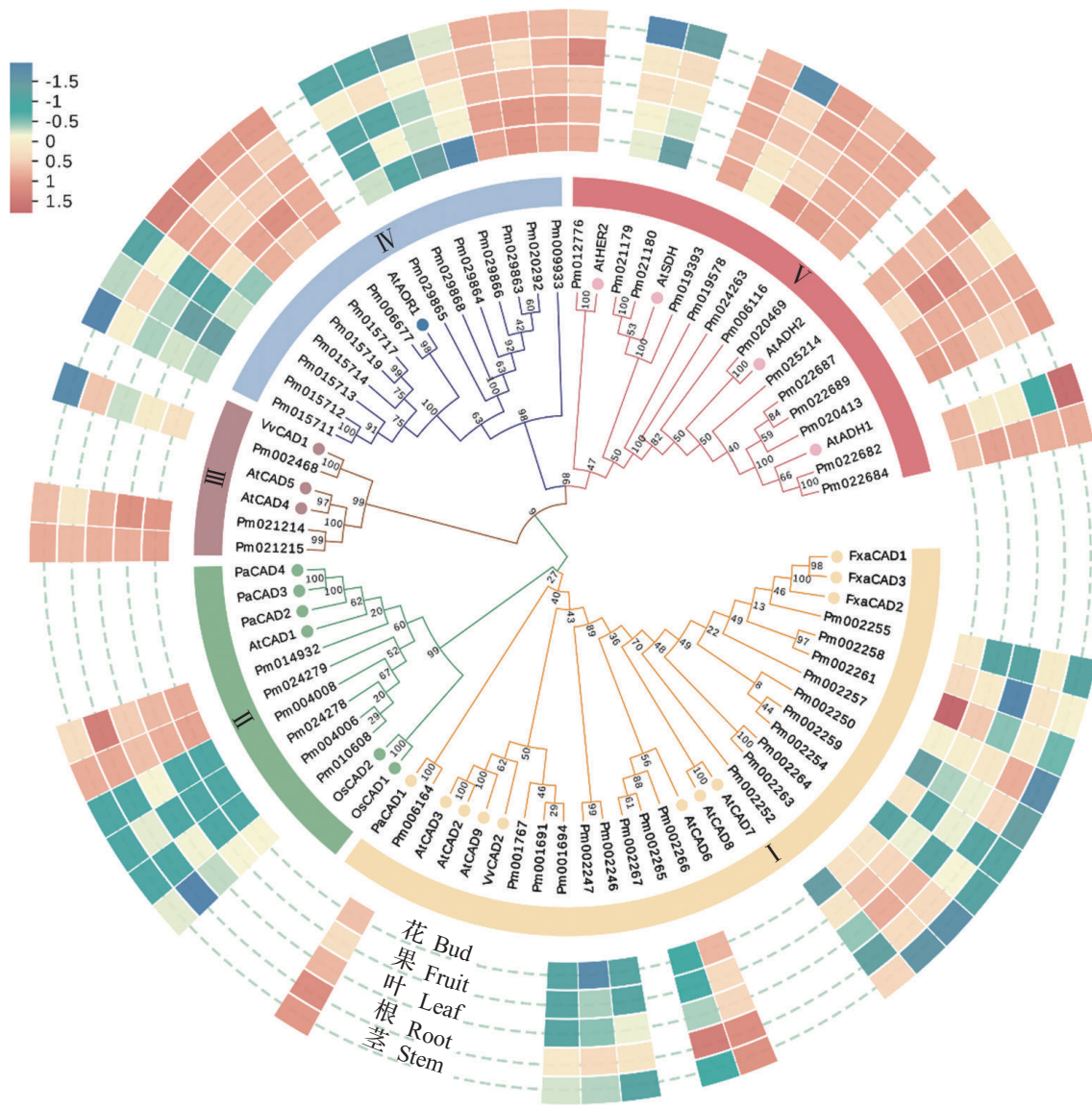
2.6 *PmCAD* 基因的时空表达模式分析和酶活性检测

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5A),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* 和 *Pm021214* 在花朵开放过程中呈现先升高后降低的表达模式,其中 *Pm021215* 在盛花期表达水平达到峰值(图5B),而 *Pm021214* 在初花期表达水平达到峰值(图5C); *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5D)。进一步克隆梅花‘江砂宫粉’的 *PmCAD* 基因(图5E),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* 基因与35S启动子连接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 *PmCAD*, 如图 5F~H 所示, *PmCAD* 基因在烟草叶片中均过量表达。提取烟草叶片粗蛋白, 在体外酶反应体系中验证了这 3 个候选 *PmCAD* 的酶活性, 如图 5I 所示, 以空载为阴性对照, 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, 认为 *Pm021215*、*Pm002468* 和 *Pm021214* 都参与梅花宫粉品种群特征花香成分肉桂醇的合成。

2.7 *PmCAD* 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 *PmCAD* 蛋白进行了亚细胞定位。如图 6 所示, *Pm021215* 和 *Pm021214* 主要定位在细胞质中, 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。

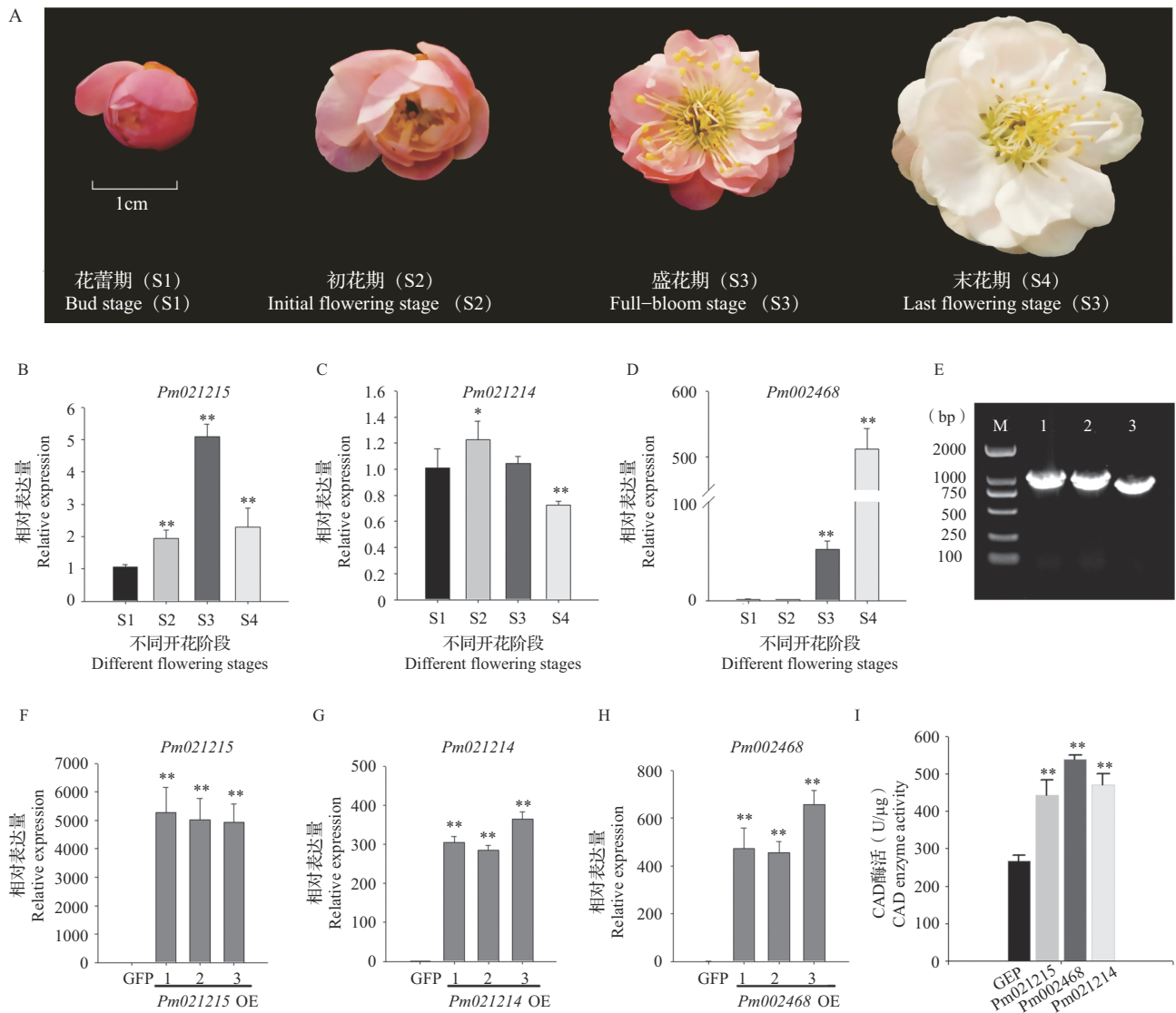


Pm: 梅花; *At*: 拟南芥; *Os*: 水稻; *Pa*: 白杨; *Fxa*: 草莓; *Vv*: 葡萄

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

图 4 *PmCAD* 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. 4 Phylogenetic tree analysis of *PmCAD* and homologous sequences in other species and heat map analysis of expression in different tissues and organs of *P. mume*



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

A: Different flowering stages of *P. mume* ‘Jiangsha Gongfen’; B-D: *PmCAD* genes relative expression analysis at different flowering stages; E: Amplification of *PmCAD* genes in *P. mume*; M: Marker; 1: *Pm021215*; 2: *Pm021214*; 3: *Pm002468*; F-H: Expression level analysis of *PmCAD* gene in tobacco leaves, with *Nbtubulin* as an internal reference gene; I: *PmCAD* cinnamyl alcohol dehydrogenase activity analysis; *: Reached a significant level at $P < 0.05$ level; **: Reached a highly significant level at $P < 0.01$ level

图5 ‘江砂宫粉’不同开花阶段候选 *PmCAD* 基因表达分析及酶活性检测

Fig. 5 The candidate *PmCAD* genes relative expression analysis at different flowering stages of *P. mume* ‘Jiangsha Gongfen’ and enzyme activity analysis

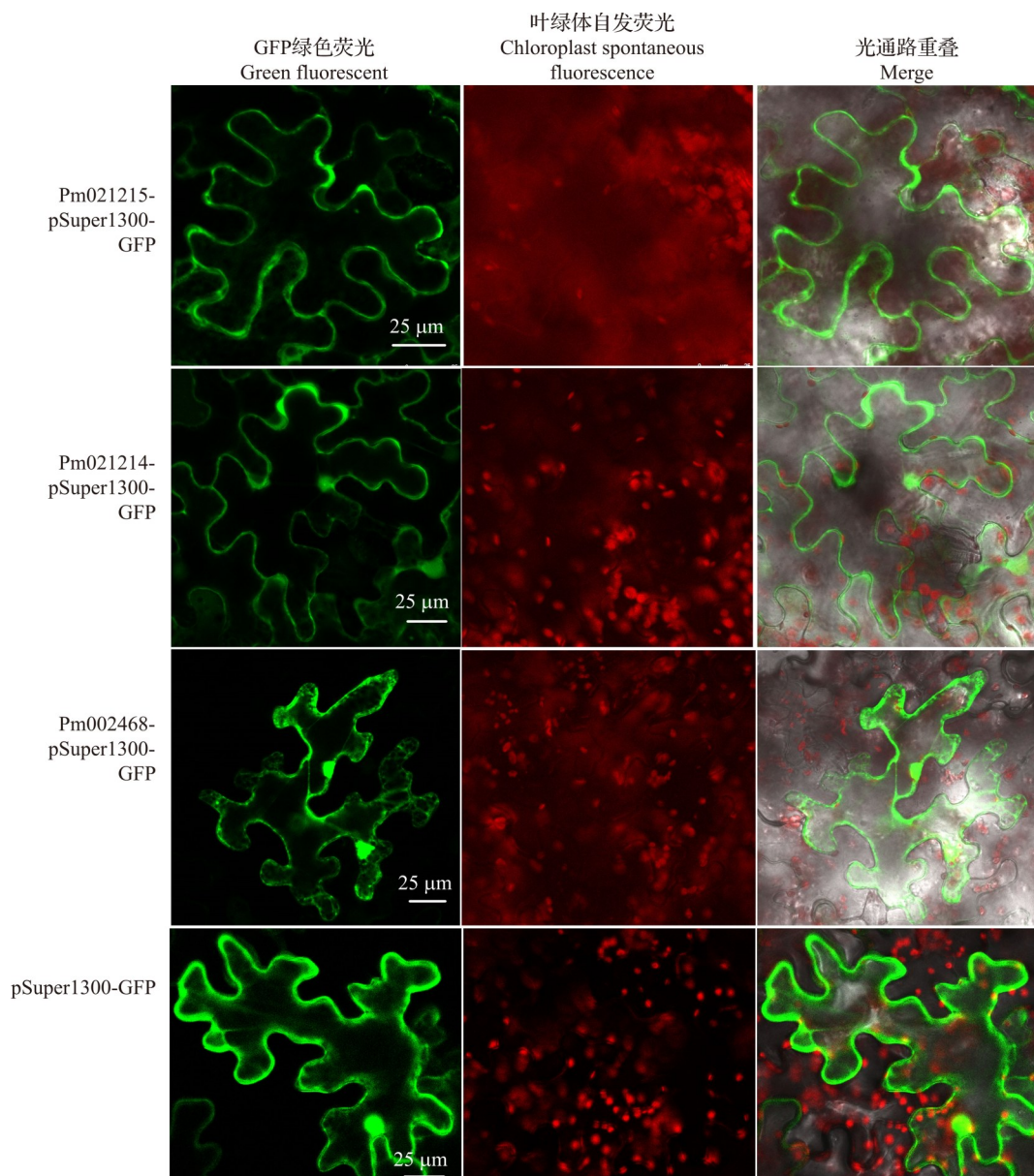


图6 PmCAD蛋白的亚细胞定位分析

Fig. 6 Subcellular localization analysis of PmCAD protein

3 讨论

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PmCAD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PmCAD家族成员间可能存在较大的功能分化。染色体定位及其线性分析发现梅花PmCAD家族成员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PmCAD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PmCAD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,本研究中3个PmCAD(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*PmBEAT*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]。运用比较基因组的方法,将梅和桃基因组中筛选到的肉桂醇脱氢酶共建进化发育树,发现梅和桃的肉桂醇脱氢酶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3个基因在开花的各个阶段都表达,且表达模式有差异,其中*Pm021214*在初花期表达量较高,*Pm021215*在盛花期表达量较高,而*Pm002468*在末花期表达量较高。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官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,但是试验验证的结果发现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,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PmCAD家族成员的进化关系,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*PmCAD*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异的基因储备。

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