

西双版纳黄瓜 *Cs-Psy1* 基因的 序列特征与表达分析

卢萍, 王秉人, 李锡香, 宋江萍, 邱杨, 王海平, 张晓辉, 沈镛
(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 西双版纳黄瓜是我国特有的果肉橙黄色的黄瓜变种资源, 不同种质间的 β -胡萝卜素含量差异明显。PSY 是胡萝卜素生物合成途径中的第 1 个限速酶。本文以西双版纳黄瓜为试材, 分别克隆西双版纳黄瓜八氢番茄红素合成酶 (*Cs-PSY1*) 的 DNA 和 cDNA 序列, 结果显示, DNA 长 2797 bp, 包含 5 个内含子和 6 个外显子, cDNA 序列长 1385 bp, 编码 421 个氨基酸。*Psy1* 推测的氨基酸序列包含该家族的 2 个特征序列, 保守性很高。该蛋白为不稳定蛋白, 无明显疏水区, 未预测到跨膜结构; 系统进化分析结果显示, 西双版纳黄瓜的 *Cs-PSY1* 蛋白与甜瓜的同源性较高; 与栽培黄瓜深度测序材料“9930”和“GY14”的序列进行比较分析, 结合 115 份黄瓜重测序结果, 共发现 5 个 SNP, 其中 2 个位于起始密码子上游 27 bp 处和 971 bp 处, 3 个位于内含子区域。其中 SNP4 在重测序的 19 份西双版纳黄瓜中的突变率为 100%, 在 96 份栽培黄瓜中的特异性为 5.3%。转录因子结合位点预测结果显示, 在普通栽培黄瓜该位点处存在一个 CTAG motif, 在西双版纳黄瓜中该位点突变后则不存在该 motif。利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *Cs-Psy1* 的表达量变化趋势, 结果表明, 在黄瓜不同果实发育时期, 该基因的表达量均呈现先上升后下降的趋势, 在西双版纳黄瓜中表达量变化的差异明显, 在授粉后 50 d 达到最大值, 是果实发育初期表达量的 8 倍多, 是同时期普通黄瓜的 4 倍多, 而普通黄瓜表达量的总体变化相对平缓。西双版纳黄瓜果实内果皮的表达水平明显高于中果皮, 最高相差约 5 倍, 普通黄瓜差异不明显。从上述研究结果推测 *Psy1* 基因可能影响西双版纳黄瓜的 β -胡萝卜素积累。

关键词: 西双版纳黄瓜; 八氢番茄红素合成酶; 克隆; 实时荧光定量 PCR; 表达

Sequence Characteristics and Expression Analysis of *Cs-Psy1* in *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan

LU Ping, WANG Jian-ren, LI Xi-xiang, SONG Jiang-ping, QIU Yang,
WANG Hai-ping, ZHANG Xiao-hui, SHEN Di

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Xishuangbanna cucumber (*Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan) is a kind of specific cucumber germplasm resources with orange flesh which were found only in Yunnan province in China. The content of beta carotene showed obvious difference among different germplasm. Phytoene synthase (PSY) is the first speed limit enzyme in the carotene biosynthetic pathway. In this study, DNA sequence (2797 bp) containing 5 introns and 6 exons and cDNA (1385 bp) sequence encoding 421 amino acids of *Psy1* were cloned respectively in Xishuangbanna cucumber. In addition, amino acid sequence was deduced and contained two highly conservative sequences which were characteristic in PSY family. Its PSY protein was unstable, having no obvious hydrophobic domain, and the membrane structure was not predicted. Phylogenetic analysis showed that the *Cs-PSY1* protein of Xishuangbanna cucumber expressed high homology with that of melon. Furthermore, nucleotide blast with references “9930” and “GY14” were performed and five specific SNPs and one 13 bp-InDel were found in Xishuangbanna cucumber. Based on the resequencing data of 115 accessions in cucumber, SNP4, which occurred in 27 bp of the up-

收稿日期: 2016-02-01 修回日期: 2016-06-14 网络出版日期: 2016-10-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161012.0917.028.html>

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2013BAD04-7); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

第一作者研究方向为蔬菜种质资源鉴定评价。E-mail: 983721601@qq.com

通信作者: 沈镛, 研究方向为蔬菜种质资源收集保存、鉴定评价和优异基因挖掘。E-mail: shendi@caas.cn

stream of the initiation codon, expressed high specific percentage, whose mutation rate was 100% in 19 accessions of *C. sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan population and 5.3% in 96 accessions of cultivated cucumber population. The result of prediction for transcription factor binding sites showed that there was a CTAG motif in 27 bp of cultivated cucumber but it did not exist in Xishuangbanna cucumber because of SNP4. Finally, the relative expression of *Cs-PsyI* at 7 different developmental stages of fruit was studied by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the expression level of *Cs-PsyI* increased and then decreased during the fruit development, and the amount was significantly different in *C. sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan. At about the stage of flesh color conversion (50 d after pollination), it reached the maximum value, which was more than 8 times as 0 d in Xishuangbanna cucumber and more than 4 times as the same stage in common cucumber. The expression amount of common cucumber changed mildly in general. Also, the expression level of the inner peel of Xishuangbanna cucumber was 5 times higher than that in the middle peel, meanwhile the difference between inner and middle peel of common cucumber was small relatively. From above analysis, it preliminarily concluded that *Cs-PsyI* may affect the accumulation of beta carotene in *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan.

Key words: *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan; Phytoene Synthase (*Psy*); gene clone; qRT-PCR; gene expression

西双版纳黄瓜是我国特有的黄瓜变种群资源, 仅在云南省西双版纳州及周边地区有所发现, 其成熟的老瓜果肉和胎座均呈橙黄色, 果肉颜色由外向内逐渐加深^[1-4]。分析结果显示, 18 份不同类型西双版纳黄瓜种质的平均 β -胡萝卜素含量为 106.58 mg/kgDW, 约是普通栽培黄瓜的百倍, β -胡萝卜素的大量积累是其橙黄色果肉形成最主要的原因。不同西双版纳黄瓜种质间的 β -胡萝卜素含量差异最高达 7.46 倍^[5]。

类胡萝卜素广泛存在于自然界中, 使植物呈现出五颜六色的色彩, 同时也具有很重要的生物学功能。 β -胡萝卜素是类胡萝卜素之一, 它是自然界中最普遍存在也是最稳定的天然色素, 摄入人体消化器官后, 它可以转化成维生素 A, 素有维生素 A 源之称, 是一种重要的人体生理功能活性物质。大量研究证实, β -胡萝卜素的许多生物功能与人类健康有密切关系, 其在解毒、抗氧化、抗癌、预防心血管疾病、保护肝脏和防治白内障方面的生理作用已被越来越多研究证实并应用于疾病的预防和治疗中^[6-7]。

类胡萝卜素生物合成和积累调控机制十分复杂。酶基因结构差异能够影响类胡萝卜素生物合成, 突变会引起酶基因结构的改变, 从而使类胡萝卜素积累量发生变化。2012 年荷兰学者通过 TILLING 技术, 获得番茄 *PsyI* 基因的突变体, 在突变株系中未检测到类胡萝卜素代谢产物, 从而证明了番茄果实中的 PSY1 是将酶底物引向生物途径下游的唯一酶^[8]。在西双版纳黄瓜中发现一个 SNP, 其位于 β -

胡萝卜素羟化酶基因 (*BCH*) 的脂肪酸羟化酶结构域, 使编码的氨基酸由丙氨酸 (A) 突变为天冬氨酸 (D), 该位点的突变影响了西双版纳黄瓜果肉中 β -胡萝卜素的积累^[9]。类胡萝卜素的合成积累还受多种因素调控, 包括转录调控、转录后调控等方式。刘英明等^[10] 通过研究番茄红果和粉果 2 个品种中 *PsyI* 的表达量, 发现在其果实成熟过程中 *PsyI* 转录水平逐渐增加, 在完熟期达到最高, 并且红果中 *PsyI* 的表达水平高于粉果。*Psy* 基因在黄瓜类胡萝卜素合成途径中的作用鲜有报道。

本试验以西双版纳黄瓜为研究对象, 分别克隆 *Cs-PsyI* 基因的 cDNA 和 DNA 序列并分析其特征。结合已发表的重测序数据信息, 检测不同黄瓜变种群的序列特异位点及其在西双版纳变种群中的特异位点百分率。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 对该基因在黄瓜果实不同发育时期的表达量进行比较分析, 了解其变化趋势。初步阐明 *Psy* 基因和编码蛋白的序列特征及其表达特性, 以期为西双版纳黄瓜 β -胡萝卜素含量积累的分子机理研究奠定基础, 为黄瓜营养品质的改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以西双版纳黄瓜变种材料 (*C. sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan) BN35 和栽培黄瓜变种材料 (*C. sativus* L. var. *sativus*) QT501 为试材, 于 2013 年 8 月播种于北京市中国农业科学院蔬菜花卉研究所南口中试基地日光温室中, 取其幼嫩叶片

及 7 个不同发育时期(授粉后 0 d、10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d)的果实。将黄瓜果实去皮去瓢,保留果肉部分,取中段,切成小片,迅速放于液氮中,然后置于-70 °C 超低温冰箱中贮存待用。由于西双版纳黄瓜的果实在成熟过程中,果肉颜色逐渐加深,后期可形成肉眼可见的不同颜色的界限(图 1),在果实发育后期,除对果肉进行混合取样外,还在后 3 个时期 40 d、50 d、60 d 将果实分为内、外两部分分别取样,以比较不同果肉部位的表达量变化。

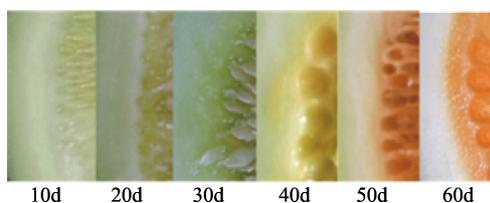


图 1 西双版纳黄瓜果实发育 6 个时期的果肉色

Fig. 1 Flesh color in six different stages in

Cucumis sativus L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan

1.2 基因克隆

西双版纳黄瓜叶片的 DNA 提取采用改良 CTAB 法。采用 Trizol 法提取果肉的总 RNA。Trizol 购买于 Invitrogen 公司,具体操作方法参照说明书进行。所提取的 RNA 经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 Nanodrop 核酸分析仪测定其浓度和纯度。取 2 μg 总 RNA,参照 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(全式金公司)使用说明合成 cDNA 第一链,保存于-20 °C 冰箱备用。

获得 BN35 *PsyI* 基因序列后,在开放阅读框之外设计特异引物。以 BN35 的 DNA 和 cDNA 为模板,扩增 *PsyI* 基因的 DNA 和 cDNA 全长。PCR 所用的酶均购于 TransGen 公司,采用 25 μL PCR 体系: 10 × TransStart Taq Buffer 2.5 μL(含 20 mmol/L Mg^{2+}), 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, TransStart™ Taq DNA Polymerase 0.5 μL, 10 μmol/L 上游引物 0.5 μL, 10 μmol/L 下游引物 0.5 μL, cDNA 或 DNA 模板(20 ng/μL) 2 μL, 17 μL ddH₂O。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min,反应结束后 PCR 产物置于 4 °C 冰箱保存。产物经过琼脂糖凝胶电泳检测后,采用天根普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)回收,具体操作方法参照说明书进行。回收产物插入 pEASY-T1 Cloning Vector,转化 *Trans1-T1* 感受态细胞,连接载体和感受态均购于 TransGen 公司。蓝白斑筛选阳

性克隆,经过菌液 PCR 检测后,将阳性重组子送至中国农业科学院作物科学研究所重大科学工程楼开放实验室进行测序。

1.3 实时荧光定量 PCR

利用 Primer5 软件设计 *Cs-PsyI* 基因的特异性引物, F: ATTACGCCATTCAAAGATA; R: TCAAC-CCAAGTGTACCAG,内参基因为本实验室基于黄瓜全基因组范围内筛选获得在黄瓜果实中稳定表达的基因 Csa4M045000,引物 F: AGGTGGGTGATTGAAGTC; R: TAATGCTCAGGAAAGTCG。20 μL qRT-PCR 反应体系: 2 × SYBR Green10 μL、10 μmol/L forward primer 0.4 μL、10 μmol/L reverse primer 0.4 μL、cDNA 第一链模板(稀释 15 倍) 2 μL, ddH₂O 7.2 μL。每样品重复 3 次。qRT-PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 3 s, 退火及延伸 45 s, 40 次循环。反应在荧光定量仪器 ABI StepOne 上进行,结束后利用熔解曲线分析和琼脂糖凝胶电泳鉴定所得产物的特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算目标基因的相对表达水平。

1.4 软件分析

通过查找 SWISSPORT 数据库和黄瓜基因组数据库([http://www. icugi. org/](http://www.icugi.org/))获得不同作物的 *Psy* 基因序列信息。利用 DNAMAN 软件进行序列比对、开放阅读框的分析、相应编码氨基酸序列的推导。利用 MEGA4.0 软件进行氨基酸序列比对和系统进化树构建。利用 Expasy 网站的在线程序 ProtParam([http://web. expasy. org/protparam/](http://web.expasy.org/protparam/))分析编码氨基酸的组成、分子量、理论等电点等理化性质,利用 TMHMM Server 2.0 分析跨膜区域, ProtScale([http://web. expasyd. org/protscale/](http://web.expasyd.org/protscale/))预测蛋白的亲水性和疏水性结构。利用 SOPMA 软件([http://npsa-pbil. ibcp. fr/cgi-bin/npsa_ automat. pl? page =/NPSA/npsa_sopma. html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html))分析蛋白质的二级结构。蛋白质结构域通过 PredictProtein([http://www. predictprotein. org/](http://www.predictprotein.org/))分析获得; Prosite 数据库用于分析 *Psy* 基因的保守结构域和特征序列。基于黄瓜基因组数据库和 115 份黄瓜重测序的 SNPs 和 InDels 相关信息,确定西双版纳黄瓜起始密码子上游 1500 bp 序列,利用在线软件 PLANTCARE([http://bioinformatics. psb. ugent. be/webtools/plantcare/html/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/))预测转录因子结合位点。利用 SAS 软件完成西双版纳黄瓜和普通黄瓜不同果实发育时期表达差异的显著性分析。

2 结果与分析

2.1 影响黄瓜果实类胡萝卜生物合成的 *Psy* 基因

在黄瓜全基因组数据库中搜索 *Psy* 基因,共有 3 个拷贝,编号为 Csa4G063980、Csa4G280510 和 Csa5G320430,分别位于第 4、第 4 和第 5 染色体。对 *Psy* 3 个拷贝的氨基酸序列进行 Blast 比对,发现不同拷贝间的序列差异较大,其中 Csa4G280510 与 Csa4G063980 的相似性为 71%,Csa5G320430 与 Csa4G280510 和 Csa4G063980 分别为 60% 和 59%。利用 DNAMAN 软件,将黄瓜不同拷贝的 *Psy* 基因与甜瓜 3 个基因的 cDNA 序列进行相似性比对,结果显示,Csa5G320430 与 *Psy1*、Csa4G280510 与 *Psy2*、Csa4G063980 与 *Psy3* 的 cDNA 序列相似性分别达到 96%、95% 和 97%,而 Csa5G320430 与 *Psy2*、*Psy3* 的相似性均为 59%;Csa4G280510 与 *Psy1*、*Psy3* 的相似性分别为 59% 和 61%;Csa4G063980 与 *Psy1*、

Psy2 的相似性分别为 67% 和 60%。据报道,甜瓜 *PSY1* 基因的表达与果实中类胡萝卜素的合成密切相关,*PSY2* 主要在根中起调控作用^[11-13]。综上推测在黄瓜果实中对胡萝卜生物合成途径起主要作用的基因为 Csa5G320430,与甜瓜一致,命名为 *Cs-Psy1* 基因。

前期课题组以西双版纳黄瓜(2 个生物学重复)和栽培黄瓜(3 个生物学重复)为试材,分别完成了 5 个不同果实发育时期的果肉转录组测序,获得 *Psy* 基因 3 个不同拷贝的 RPKM 值(表 1)。从表中数据可以看出,在果实发育中后期(授粉后 40~60 d),无论西双版纳黄瓜还是栽培黄瓜的 Csa5G320430 基因的 RPKM 值均显著高于 Csa4G280510 和 Csa4G063980,进一步说明黄瓜调控果实类胡萝卜素生物合成的主要 *PSY* 基因为 Csa5G320430,以下关于西双版纳黄瓜果实 *PSY* 基因的序列特征及表达分析均以 *Cs-psy1*(Csa5G320430)为目的基因。

表 1 西双版纳黄瓜和栽培黄瓜在不同果实发育时期 *Psy* 基因的 RPKM 值

Table 1 RPKM values of *Psy* at different stages during fruit development in var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan and var. *sativus*

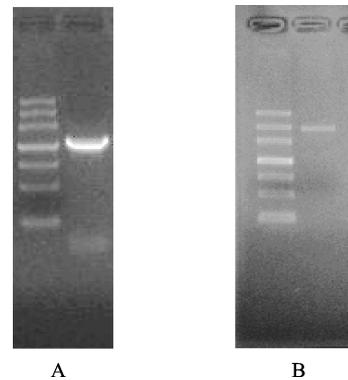
黄瓜 <i>Psy</i> 基因编号 Gene number of <i>Cs-Psy</i>	黄瓜类型 Cucumber varieties	不同果实发育时期 RPKM 值 RPKM values at different fruit developmental stages					<i>P</i> 值 <i>P</i> value
		20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	
		Csa5G320430 (<i>Psy1</i>)	版纳黄瓜	23.59	34.41	169.30	
	栽培黄瓜	26.90	85.29	215.71	85.27	151.80	0.00004
Csa4G280510 (<i>Psy2</i>)	版纳黄瓜	57.51	65.31	66.25	47.30	21.70	0.037
	栽培黄瓜	33.40	10.69	10.61	11.53	6.65	0.001
Csa4G063980 (<i>Psy3</i>)	版纳黄瓜	71.37	49.16	16.34	18.88	12.31	0.0137
	栽培黄瓜	29.14	9.31	4.37	1.34	3.16	0.00001

2.2 *Cs-Psy1* 基因的克隆

分别以西双版纳黄瓜 BN35 幼嫩叶片提取的 DNA 以及授粉后 50 d 果实总 RNA 反转录所得 cDNA 为模板,通过软件 Primer5 设计特异性引物 F1: TCCATTTTCATTTTGCTAC; R1: TTCGTTGAGTGTAT-AGAGGT。利用特异性引物扩增分别克隆 *PSY1* 基因的 DNA 和 cDNA 序列。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测得到的扩增产物,获得预期大小的片段,其中 DNA 扩增产物大小为 2797 bp,cDNA 扩增产物大小为 1385 bp(图 2)。经测序鉴定,该条带为目的基因。

2.3 *Cs-Psy1* 基因的序列特征分析

经特异性扩增获得基因的 cDNA 和 DNA 片段长度分别为 1385 bp 和 2797 bp。通过测序结果表明,扩增所得的 cDNA 序列具有完整开放阅读框,全



M: 天根 Marker III; A: cDNA 扩增产物; B: DNA 扩增产物

M: Marker III of Tian Gen, A: Amplification product of cDNA, B: Amplification product of DNA

图 2 西双版纳黄瓜 *Cs-Psy1* 基因的 PCR 扩增及检测结果

Fig. 2 The PCR amplification and identification results of *Cs-Psy1* gene

长 1266 bp, 位于 94 ~ 1359 bp 处。利用 DNAMAN 软件比较 DNA 序列和 cDNA 序列, 发现 *Psy1* 具有 6 个外显子和 5 个内含子, 内含子、外显子的连接处两处为“GT-AG”剪切, 另外存在“GG-GC”、“GG-GT”和“TA-TG”剪切位点。

通过 DNAMAN 软件对其编码的氨基酸进行预测分析, 发现西双版纳黄瓜中 *Psy1* 共编码 421 个氨基酸, 蛋白质相对分子式是 $C_{2124}H_{3336}N_{576}O_{620}S_{20}$, 相对分子质量是 47502.5, 属于中性蛋白质, 理论等电点为 6.79, 为不稳定蛋白, 不稳定系数为 46.11。利用 TM-HMM Server 2.0 软件预测该酶蛋白不含有跨膜结构, 推测 PSY1 可能不是膜结合蛋白。利用软件 ProtScale 对 PSY1 的亲水性进行分析预测, 结果表明, 在多肽链位于 53 位的赖氨酸的亲水性最强, 位于第 79 位的丙氨酸疏水性最强, 从整体上看, 亲水性和疏水性氨基酸均匀分布在整个蛋白质中, 没有明显的疏水区域。

蛋白质分子空间结构与其性质及生理功能的关系十分密切, 根据 C. Geourjon 等^[14]的研究方法, 用软件 SOPMA 预测 PSY1 氨基酸多肽链的二级结构, 发现 α -螺旋的比重最大, 占 52.26%, 主要集中在 C 端, N 端分布极少, 无规卷曲占 31.83%, 延伸链占 11.4%, β -转角所占比重最小, 为 4.51%, 这 3 个二级结构构成西双版纳黄瓜中 PSY1 蛋白的基本空间结构。利用 Prosit 分析 PSY1 蛋白的保守结构域与特征序列, 发现该酶含有 2 个保守特征序列, 分别为 255 ~ 270 bp: YCYYVAGTVGLMSVPV; 291 ~ 316 bp: LGIANQLTNILRDVGEDARRGRIYLP。

2.4 同源性分析和系统发育树构建

类胡萝卜素生物合成途径广泛存在于不同物种中, PSY1 是该途径中的第 1 个限速酶。通过 SWISSPORT 数据库检索不同物种中 PSY1 的蛋白序列, 利用 MEGA 软件将西双版纳黄瓜 PSY1 推导的氨基酸序列与部分物种的 PSY1 编码氨基酸序列构建系统进化树(图 3), 通过系统发育分析表明, PSY1 蛋白可分为植物、藻类与蓝藻 3 支。西双版纳黄瓜与同属作物甜瓜的相似性最高, 其次为同科作物西瓜和苦瓜。同一科属的 PSY1 蛋白位于系统进化树上的相同分支, 并且亲缘关系越近, 相似性越高, 与植物的进化过程基本一致,

2.5 西双版纳黄瓜变种群 SNP 和 InDel 特异性分析

将西双版纳黄瓜 BN35 中克隆的 *Cs-Psy1* 基因及上游序列与栽培黄瓜变种测序材料 9930 和 GY14 进行序列比较分析^[9], 共发现 4 个特异的单碱基变

异位点和一段 13 bp 的 InDel(序列为: TTTCAATA-AAAAG)。其中 SNP1(G/A)位于第 4 内含子, SNP2(T/A)和 SNP3(A/T)均位于第 5 内含子, SNP4(T/C)位于序列起始密码子上游 27 bp 处, InDel 位于第 5 内含子。鉴于基因序列仅克隆到起始密码子上游序列 93 bp 处, 利用重测序数据信息在该基因上游序列 2000 bp 内进行比对, 发现在起始密码子上游的 971 bp 处存在 SNP5(T/C)。将所有变异位点在 115 份黄瓜全基因组重测序结果中进行扫描, 以参考序列为依据分别计算西双版纳黄瓜群体和栽培黄瓜群体中各位点的突变率, 结果见表 3。其中 SNP4 的特异性最高, 在 19 份西双版纳黄瓜中均为 T, 突变率为 100%。在 96 份栽培黄瓜材料中, 89 份为 C, 5 份为 T, 2 份数据缺失, 突变率为 5.3%(表 2)。利用 PLANTCARE 软件对上游启动子区预测转录因子结合位点, 发现在普通栽培黄瓜的起始密码子上游 27 bp 处存在一个 CTAG motif, 而突变后的西双版纳黄瓜中则不存在该 motif。

2.6 黄瓜不同果实发育时期 *Cs-Psy1* 基因的表达分析

为了解在 β -胡萝卜素积累过程中 *Psy1* 基因表达水平的变化规律, 取西双版纳黄瓜和普通黄瓜授粉后 0 d、10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d 共 7 个不同发育时期的果实为材料, 利用 qRT-PCR 技术对 *Cs-Psy1* 的表达量进行相对定量分析, 结果见表 3。从表中数据可以看出, *Cs-Psy1* 在各个果实发育时期均有表达。方差分析结果显示, 2 份材料在不同果实发育时期该基因的表达量差异达到极显著水平。在西双版纳黄瓜中, 随着果实发育时期的延长, *Cs-Psy1* 基因的表达量呈现先上升后下降趋势。在授粉后 40 d 之前, *Psy1* 表达水平缓慢上升, 在转色期(授粉后 50 d 左右)达到最大值, 表达量是果实发育初期的 8 倍多, 在转色后期表达水平又逐渐下降。普通黄瓜 *Psy1* 基因表达水平的变化趋势与西双版纳黄瓜基本相同, 但总体变化较为平缓, 在果实发育前期与西双版纳黄瓜该基因的表达水平差异不大, 在授粉后 50 d 差异明显增大, 西双版纳黄瓜中 *Cs-Psy1* 的表达量为普通黄瓜的 4 倍之多(表 3, 图 4)。前期转录组测序结果同样显示, *Cs-Psy* 基因(*Csa5G320430*)在不同果实发育时期表达量的差异达到极显著水平, 随着果实发育时期的延长, 2 份材料的 RPKM 值均呈明显上升再下降的趋势, 在西双版纳黄瓜中授粉后 50 d 处理中达到最高值, 为 232.85(表 1)。q-PCR 分析结果与转录组测序数据基本一致。

由于达到生理成熟度的西双版纳黄瓜果肉颜色变化的部位具有明显的差异,因而比较果肉转色后期不同部位 *Cs-Psy1* 基因表达量的变化情况,结果显示,在授粉后 40 d、50 d 和 60 d 的果实样本中,西双版纳黄瓜果实的内果皮的表达水平明显高于中果皮,最高相差 5 倍之多。普通黄瓜该基因在内果皮的表达量与中果皮差异较小,与西双版纳黄瓜差异也不明显(表 3,图 5)。从以上分析可以推测,*Psy1* 基因表达水平对西双版纳黄瓜 β -胡萝卜素的积累具有一定的调控作用。

3 讨论

PSY 是类胡萝卜素生物合成途径中的第 1 个限速酶,对高等植物类胡萝卜素的合成与积累起着重要作用。*Psy* 基因的表达水平对植物中类胡萝卜素积累的影响已多有报道。反义表达 *Psy1* 会影响番茄果实中类胡萝卜素的积累,*Psy1* 的缺失会导致番茄黄果突变体的产生^[11-12]。马乐园^[15]利用 qRT-PCR 对甜瓜中 *Psy* 基因的表达特性进行了分析,结果表明,在果实发育前期,*Psy* 的相对表达量较低,

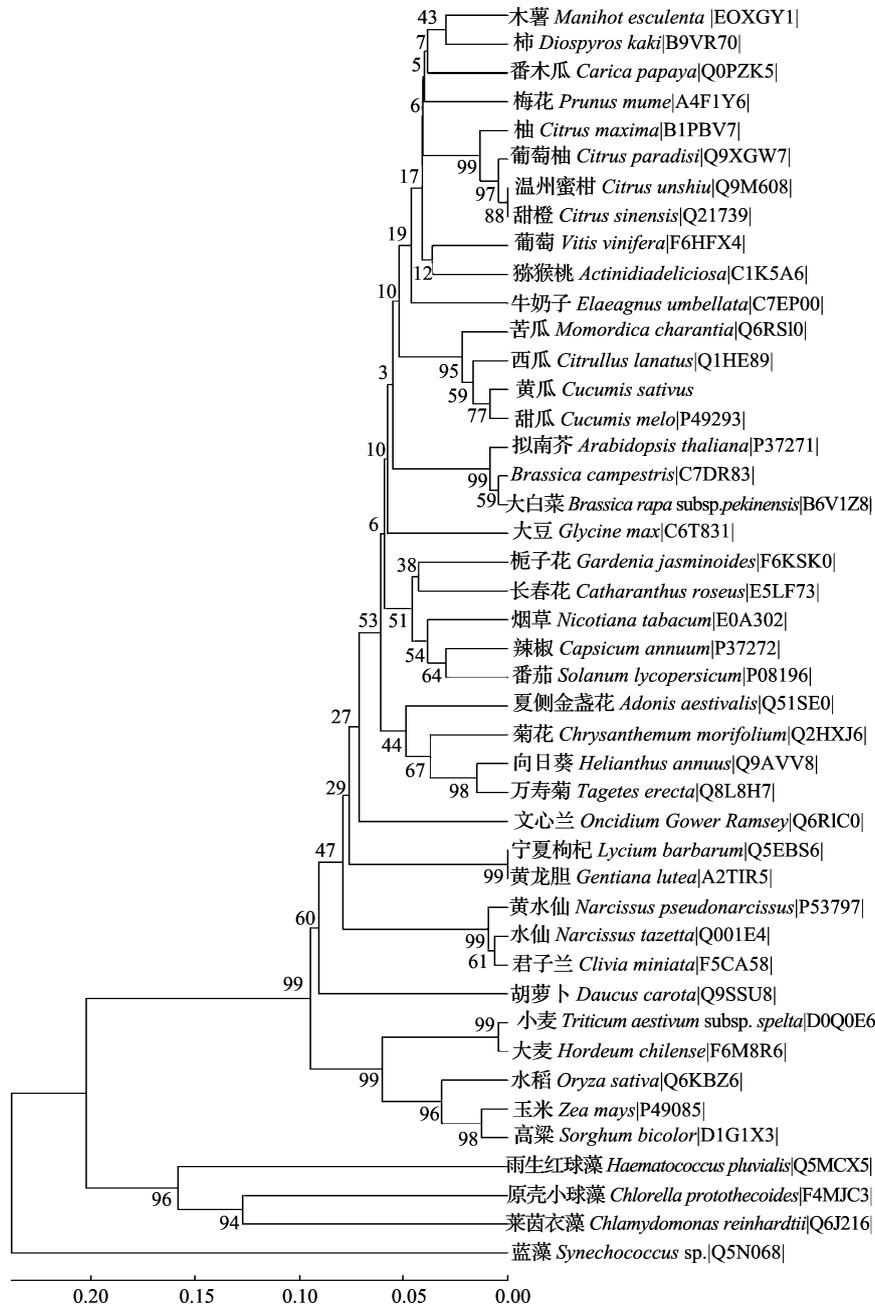


图 3 不同物种中 PSY1 蛋白的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of PSY1 protein in different species

表 2 西双版纳黄瓜群中 5 个 SNP 位点信息及变异率

Table 2 The information and variation rate of five SNPs in *C. sativus* L. var. *xishuangbannanensis* Qi & Yuan

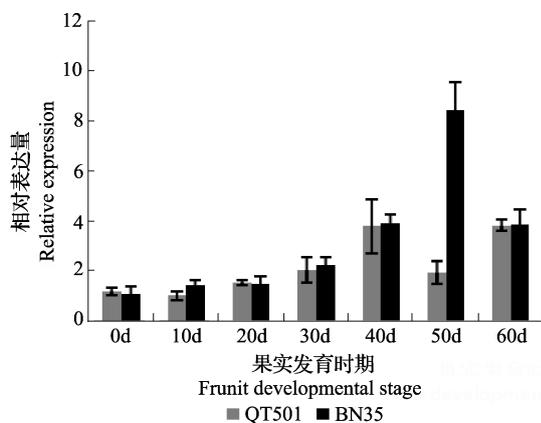
SNP	SNP1 (第 4 内含子)		SNP2 (第 5 内含子)		SNP3 (第 5 内含子)		SNP4 (起始密码子上游 27 bp)		SNP5 (起始密码子上游 971 bp)	
	版纳黄瓜 变种群	栽培黄瓜 变种群	版纳黄瓜 变种群	栽培黄瓜 变种群	版纳黄瓜 变种群	栽培黄瓜 变种群	版纳黄瓜 变种群	栽培黄瓜 变种群	版纳黄瓜 变种群	栽培黄瓜 变种群
	碱基类别 Base type	G	A	T	A	A	T	T	C	T
份数 Number of material	19	96	19	96	19	96	19	96	19	96
数据缺失份数 Number of missing datas	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2
突变率 (%) Mutation rate	100	7.3	100	10.4	100	10.5	100	5.3	100	14.9

表 3 黄瓜果实不同发育时期 *Psy1* 基因的相对表达量Table 3 The relative expression of *Psy1* gene in different developmental stages of cucumber fruit

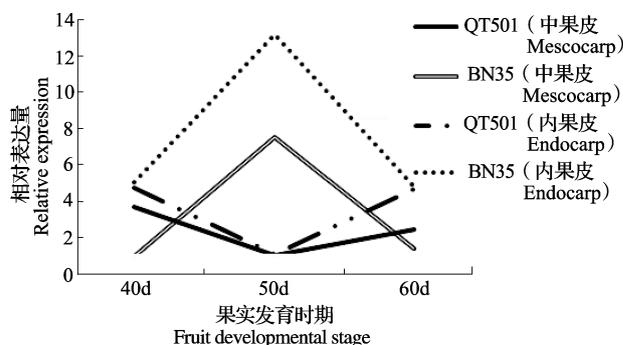
	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d			50 d			60 d		
					混样 Mixed Sample	内果皮 Endocarp	中果皮 Mescocarp	混样 Mixed Sample	内果皮 Endocarp	中果皮 Mescocarp	混样 Mixed Sample	内果皮 Endocarp	中果皮 Mescocarp
					QT501	1.16B	1.00A	1.53C	2.04D	3.78E	4.77	3.72	1.93D
BN35	1.08A	1.41B	1.46B	2.22C	3.90D	5.10	1.01	8.43E	13.22	6.60	3.86D	4.83	1.43

不同英文字母表示 $P < 0.01$ 的差异显著水平

Different letters represent significant difference at 1% level

图 4 不同果实发育时期黄瓜果肉 *Cs-Psy1* 的相对表达量Fig. 4 The expression level of *Cs-Psy1* gene at different fruit developmental stages

之后表达量升高,在果实成熟前期达到最大值,成熟期后开始下降,其转录水平与果实内 β -胡萝卜素的积累趋势一致;朱海生等^[16]利用半定量 RT-PCR 技术对草莓果实中 *Psy* 的表达水平进行测定,分析发现红果中的表达量最高,粉红果次之,白果最低。本试验利用 qRT-PCR 技术,探讨西双版纳黄瓜果实中 β -胡萝卜素的积累与 *Psy1* 表达水平上的关系,结果表明,随着果实发育时期的延长,果肉颜色逐渐加深,

图 5 不同果实发育时期黄瓜内果皮与中果皮中 *Cs-Psy1* 的相对表达量分析Fig. 5 The expression level analysis of *Cs-Psy1* gene in endocarp and mescocarp at different fruit developmental stages

Cs-Psy1 的表达量也呈上升趋势,直至转色期达到最高值,随后逐渐下降,该结果与前期本课题组基于转录组测序数据估算所得 RPKM 值的变化趋势基本相同,与甜瓜、草莓和番茄^[10]等作物的研究结果相一致。除此之外,在西双版纳黄瓜转色期果肉中, β -胡萝卜素含量较高的中果皮中 *Cs-Psy1* 的表达水平明显高于外果皮。因而,推测 *Psy1* 在转录表达水平上调控西双版纳黄瓜中 β -胡萝卜素的生物合成。另

外,在普通黄瓜中,q-PCR 和转录测序数据均显示,在授粉后 50 d 果肉的 *Cs-PsyI* 表达量呈现较明显的下降,其原因还有待进一步试验验证。

类胡萝卜素生物合成和积累的分子机制十分复杂,基因突变会影响类胡萝卜素生物合成,转录因子等因素也会参与类胡萝卜素合成途径的调控。R. Welsch^[17]通过研究启动子找到了一个存在于光合作用相关基因启动子区域的 motif (ATCTA),对 *Psy* 的转录调控十分重要,并通过拟南芥 *Psy* 基因的分析,发现转录因子 RAP2.2 (APETALA2/ERE 结合蛋白转录因子家族成员之一)可以结合到 *Psy* 启动子区主要调控区域,对拟南芥中 *PSY* 的转录物水平以及类胡萝卜素含量起到调控作用^[18]。越来越多的研究表明,内含子不仅可以促进转录起始,参与 mRNA 的修饰、代谢、转运和存放,而且会影响蛋白的翻译,增强基因的表达^[19]。内含子对基因表达有调控作用,很多基因的内含子中均发现含有基因表达的调控元件。一般认为是内含子的存在增加了 mRNA 的加工效率和 mRNA 的稳定性。也有部分研究称内含子可能具有启动子功能^[20]。本研究通过对 115 份重测序材料进行序列比对,发现在西双版纳黄瓜 *PsyI* 基因上游和内含子区域均发现了突变位点,其中上游区域的 2 个 SNP 在西双版纳黄瓜变种中突变率均为 100%,在普通黄瓜变种中突变率分别为 5.3% 和 14.9%,并且在上游 27 bp 处的突变还导致了已知 motif 的改变。推测这些位点的突变可能会对 *PsyI* 基因的表达调控产生影响,具体作用的分子机理还需要后续试验进行验证。

在不同植物中,*Psy* 基因的拷贝数也不相同。在拟南芥中,*Psy* 基因只有单个拷贝,它参与拟南芥所有组织中类胡萝卜素合成^[18];在很多其他植物中,*Psy* 会存在多个拷贝,并且不同拷贝具有功能分化和组织特异性表达。如番茄的 *PsyI* 在果实中起主要调控作用,在叶片中几乎不发挥作用;*Psy2* 主要在番茄的花瓣、根、叶中起作用,参与叶片光合作用、光保护以及 ABA 合成等过程^[11-12];推测 *Psy3* 可能是胁迫条件下,在根中发挥作用^[21-22]。在甜瓜中,果实中类胡萝卜素的合成与 *PsyI* 的表达紧密相关,而 *Psy2* 主要在根中起调控作用^[13]。本研究为了与其他作物一致,基于黄瓜基因组数据库中 3 个 *Psy* 基因的序列比对及转录组测序数据,确定了黄瓜果实中起主要作用的 *Psy* 基因为 *Csa5G320430* (*Cs-PsyI*)。

参考文献

[1] 戚春章,袁珍珍,李玉湘. 黄瓜新类型:西双版纳黄瓜[J]. 园艺学报,1983,10(4):259-264

- [2] Lv J, Qi J J, Shi Q X, et al. Genetic diversity and population structure of cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e46919
- [3] 沈镡,方智远,戚春章,等. 西双版纳黄瓜群体遗传多样性的 SSR 分析[J]. 园艺学报,2009,36(10):1457-1464
- [4] 李锡香,朱德蔚,杜永臣,等. 黄瓜种质资源遗传多样性及其亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 园艺学报,2004,31(3):309-314
- [5] 沈镡,李锡香,方智远,等. 不同类型西双版纳黄瓜果实成熟期营养成分分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(4):594-598
- [6] Wolf G. Retinoids and carotenoids as inhibitors of carcinogenesis and inducers of communication [J]. Nut Rev, 1992, 50: 270-274
- [7] Grune T, Lietz G, Palou A, et al. β -Carotene is an important vitamin a source for humans [J]. Am Soc Nutr, 2010, 140(12): 22685-22855
- [8] Gady A, Vriezen W, VandeWal M, et al. Induced point mutations in the phytoene synthase1 gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening [J]. Mol Breeding, 2012, 29: 801-812
- [9] Qi J, Liu X, Shen D, et al. A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity [J]. Nat Genet, 2013, 45: 1510-1515
- [10] 刘英明,姜晶,王晶,等. 番茄果实成熟过程中番茄红素含量及合成相关基因表达的分析 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(1): 47-52
- [11] Bramley P, Teulier C, Blain I, et al. Biochemical characterization of transgenic tomato in which carotenoid biosynthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA topTOM5 [J]. Plant J, 1992, 2(3): 343-349
- [12] Giorio G, Stigliani A L, D'Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns [J]. Febs J, 2008, 275(3): 527-535
- [13] Qin X Q, Coku A, Inoue K T, et al. Expression, subcellular localization, and cis-regulatory structure of duplicated phytoene synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Planta, 2011, 234(4): 737-748
- [14] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. Comput Applicat Biosci, 1995, 11: 681-684
- [15] 马乐园. 甜瓜果实八氢番茄红素合成酶基因的克隆、表达分析及遗传转化 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2011
- [16] 朱海生,李永平,温庆放. 草莓八氢番茄红素合成酶基因的克隆及其表达特性 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 349-357
- [17] Welsch R. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2003, 216: 523-534
- [18] Welsch R, Maass D, Vogel T, et al. Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves [J]. Plant Physiol, 2007, 145: 1073-1085
- [19] Juergen G, Anett G, Susette U, et al. Association of the human urate transporter 1 with reduced renal uric acid excretion and hyperuricemia in a German caucasian population [J]. Arthr Rheumatol, 2006, 54: 292-300
- [20] 谢先芝,吴乃虎. 番茄蛋白酶抑制剂 II 基因的分离及其内含子功能 [J]. 科学通报, 2001(11): 934-938
- [21] Fantini E, Falcone G, Frusciant S, et al. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing [J]. Plant Physiol, 2013, 163: 986-998
- [22] Fu X, Feng C, Wang C, et al. Involvement of multiple phytoene synthase genes in tissue- and cultivar-specific accumulation of carotenoids in loquat [J]. J Exp Bot, 2014, 65(16): 4679-4689