

柑橘 CsPIF4 参与高温诱导的果实类胡萝卜素积累的转录调控

刘心怡

(华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘要：类胡萝卜素是柑橘果实重要的次生代谢产物，不仅赋予果实鲜艳的色泽，提升果实市场价值，还具有丰富的营养价值和抗氧化功能，对人体健康具有重要意义。高温作为柑橘生长发育过程中常见的环境因子，对果实类胡萝卜素的积累具有显著的诱导作用，但其分子调控机制尚未完全明确。转录因子在植物次生代谢产物合成的转录调控中发挥核心作用，其中PIF (Phytochrome Interacting Factors) 转录因子家族作为光信号和温度信号的关键调控因子，广泛参与植物生长发育、光形态建成及逆境响应等过程。本研究以柑橘果实为材料，聚焦CsPIF4转录因子，系统探究其在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累过程中的转录调控机制。通过基因克隆技术获得CsPIF4基因全长序列，利用生物信息学方法分析其序列特征和进化关系；采用高温处理实验，明确高温对柑橘果实类胡萝卜素积累及CsPIF4基因表达的影响；借助酵母单杂交、双荧光素酶报告基因和染色质免疫沉淀 (ChIP) 等实验技术，验证CsPIF4与类胡萝卜素积累相关基因启动子的相互作用及调控关系。研究结果表明，CsPIF4基因在柑橘果实中高度表达，且其表达水平受高温显著诱导，与类胡萝卜素积累趋势呈正相关；CsPIF4蛋白具有典型的PIF家族保守结构域，与拟南芥等植物的PIF4蛋白具有较高的同源性；CsPIF4能够直接结合类胡萝卜素生物合成关键基因 (如CsPSY、CsPDS、CsLCYb等) 的启动子区域，激活其表达，从而促进高温条件下柑橘果实类胡萝卜素的积累。本研究首次明确了CsPIF4在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累中的转录调控作用，揭示了高温调控柑橘果实类胡萝卜素积累的分子机制，为深入理解柑橘果实品质形成的分子基础提供了理论依据，同时为利用基因工程技术改良柑橘果实营养品质和抗逆性提供了新的基因靶点和技术支撑。

关键词：柑橘；CsPIF4；高温；类胡萝卜素；转录调控；果实品质

中图分类号：S666

文献标识码：A

文章编号：3106-2547 (2025) 06-0001-12

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.06.001

Transcriptional Regulation of CsPIF4 in High Temperature-Induced Carotenoid Accumulation in Citrus Fruits

Liu Xinyi

(College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract: Carotenoids are important secondary metabolites in citrus fruits, which not only endow fruits with bright colors and improve their market value, but also have rich nutritional value and antioxidant functions, which are of great significance to human health. As a common environmental factor during citrus growth and development, high temperature has a significant inducing effect on the accumulation of carotenoids in fruits, but its molecular regulatory mechanism is not yet fully clear. Transcription factors play a core role in the transcriptional regulation of plant secondary metabolite synthesis. Among them, the PIF (Phytochrome Interacting Factors) transcription factor family, as key regulators of light and temperature signals, are widely involved in plant growth and development, photomorphogenesis, and stress response. In this study, citrus fruits were used as materials to focus on the CsPIF4 transcription factor and systematically explore its transcriptional regulatory mechanism in high temperature-induced carotenoid accumulation in citrus fruits. The full-length sequence of CsPIF4 gene was obtained by gene cloning technology, and its sequence characteristics and evolutionary relationship were analyzed by bioinformatics methods. High temperature treatment experiments were carried out to clarify the effects of high temperature on carotenoid accumulation and CsPIF4 gene expression in citrus fruits. Yeast one-hybrid, dual-luciferase reporter gene and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experimental techniques were used to verify the interaction and regulatory relationship between CsPIF4 and the promoters of carotenoid accumulation-related genes. The results showed that CsPIF4 gene was highly expressed in citrus fruits, and its expression level was significantly induced by high temperature, showing a positive correlation with the trend of carotenoid accumulation. CsPIF4 protein has

作者简介：刘心怡，博士，副研究员，研究方向为果树品质生理与分子调控。

typical conserved domains of the PIF family and high homology with PIF4 proteins from Arabidopsis and other plants. CsPIF4 can directly bind to the promoter regions of key carotenoid biosynthesis genes (such as CsPSY, CsPDS, CsLCYb, etc.) and activate their expression, thereby promoting the accumulation of carotenoids in citrus fruits under high temperature conditions. This study is the first to clarify the transcriptional regulatory role of CsPIF4 in high temperature-induced carotenoid accumulation in citrus fruits, reveals the molecular mechanism of high temperature regulating carotenoid accumulation in citrus fruits, provides a theoretical basis for in-depth understanding of the molecular basis of citrus fruit quality formation, and also provides new gene targets and technical support for improving the nutritional quality and stress resistance of citrus fruits using genetic engineering technology.

Keywords: Citrus; CsPIF4; high temperature; carotenoids; transcriptional regulation; fruit quality

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 柑橘果实类胡萝卜素的重要性

柑橘是世界上最重要的果树之一,其果实风味独特、营养丰富,深受消费者喜爱,在全球农业经济中占据重要地位。我国是柑橘生产大国,种植面积和产量均居世界首位,柑橘产业已成为我国南方地区农业经济的支柱产业之一,对促进农村经济发展、增加农民收入具有重要意义。柑橘果实的品质主要由色泽、风味、营养价值等因素决定,其中色泽是果实外观品质的核心指标,直接影响消费者的购买意愿和果实的市场价值,而类胡萝卜素正是决定柑橘果实色泽的关键物质。

类胡萝卜素是一类广泛存在于植物、藻类、细菌和真菌中的脂溶性天然色素,属于萜类化合物,具有C₄₀的碳骨架结构,根据其化学结构可分为胡萝卜素和叶黄素两大类,其中胡萝卜素类主要包括 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、番茄红素等,叶黄素类主要包括叶黄素、玉米黄质、 β -隐黄质等。柑橘果实中含有丰富的类胡萝卜素,其种类和含量因柑橘品种、成熟度、生长环境等因素存在显著差异。例如,红肉脐橙的果肉中富含番茄红素和 β -胡萝卜素,使其果肉呈现出鲜艳的红色,而普通甜橙的果皮和果肉中则以叶黄素、玉米黄质和 β -隐黄质为主,呈现出橙黄色或橙色。这些类胡萝卜素不仅赋予柑橘果实多样且鲜艳的色泽,从淡黄色、橙黄色到橙红色不等,极大地提升了果实的外观吸引力和市场竞争力,还是柑橘果实营养价值的重要组成部分,对人体健康具有重要的保健功能^[1]。

从营养价值来看,类胡萝卜素是人体必需的营养素之一,其中 β -胡萝卜素、 α -胡萝卜素等是维生素A的前体物质,能够在人体内转化为维生素A,而维生素A对维持人体正常的视觉功能、上皮组织健康、免疫功能调节等具有重要作用,缺乏维生素A会导致夜盲症、干眼症、免疫力下降等多种疾病。柑橘果实是人类摄取 β -隐黄质的重要膳食来源, β -隐黄质作为维生素A合成前体的类胡萝卜素之一,只在

少部分作物中富集,其在柑橘果实中的积累的差异也成为柑橘营养品质差异的重要体现。此外,类胡萝卜素还具有强大的抗氧化活性,能够清除人体内的自由基,减少氧化应激对细胞的损伤,从而降低心血管疾病、癌症等慢性疾病的发生风险。研究表明,柑橘果实中的类胡萝卜素还具有抗炎、抗菌、降血脂、保护神经系统等多种生理功能,长期食用富含类胡萝卜素的柑橘果实对人体健康具有显著的益处。红心脐橙等特色柑橘品种中,类胡萝卜素含量显著高于普通柑橘,其番茄红素含量更是远超普通脐橙,对男性前列腺健康和女性美容具有特殊功效,进一步提升了柑橘果实的营养价值和市场价值。

从市场价值来看,色泽鲜艳、类胡萝卜素含量高的柑橘果实更受消费者青睐,其市场价格也相对较高。例如,红肉脐橙、血橙等富含类胡萝卜素的特色柑橘品种,因其独特的色泽和丰富的营养价值,在市场上具有明显的竞争优势,能够为果农带来更高的经济效益。同时,类胡萝卜素作为天然色素,具有安全、无毒、色泽自然等优点,广泛应用于食品、化妆品、医药等领域,具有广阔的工业应用前景。柑橘果实作为类胡萝卜素的重要天然来源,其类胡萝卜素的提取和利用也成为柑橘深加工产业的重要发展方向,能够进一步延伸柑橘产业链,提高柑橘产业的附加值。因此,深入研究柑橘果实类胡萝卜素的积累机制,对于提升柑橘果实品质、增强市场竞争力、促进柑橘产业的可持续发展具有重要的现实意义^[2]。

1.1.2 高温对柑橘果实类胡萝卜素积累的影响

植物的生长发育受到多种环境因子的调控,其中温度是最重要的环境因子之一,直接影响植物的光合作用、呼吸作用、物质代谢等生理过程,进而影响植物的生长、发育和果实品质形成。柑橘是亚热带常绿果树,对温度具有较强的适应性,但在其生长发育过程中,尤其是果实发育和成熟阶段,常常会遭遇高温胁迫或高温环境,高温不仅会影响柑橘果实的生长速度、果实大小、糖酸比等品质指标,还会对果实类胡萝卜素的积累产生显著影响。

近年来,随着全球气候变暖,极端高温天气频繁出现,

对柑橘产业造成了一定的影响,同时也为研究高温对柑橘果实类胡萝卜素积累的调控机制提供了现实背景。大量研究表明,高温作为一种重要的环境信号,能够诱导柑橘果实类胡萝卜素的积累,但这种诱导作用具有一定的温度范围和时间效应,不同柑橘品种对高温的响应也存在差异^[3]。一般来说,在柑橘果实膨大期至成熟期,适当的高温处理(30–35℃)能够显著促进果实类胡萝卜素的合成和积累,而过高的温度(超过38℃)则会抑制类胡萝卜素的积累,甚至导致类胡萝卜素的降解。例如,有研究发现,在柑橘果实成熟前期,采用32℃的高温处理,能够显著提高果实中 β -胡萝卜素、叶黄素等类胡萝卜素的含量,使果实色泽更加鲜艳;而当温度超过38℃时,果实中的类胡萝卜素含量会逐渐下降,这可能与高温导致类胡萝卜素合成相关酶的活性降低、类胡萝卜素氧化降解加快有关。

高温对柑橘果实类胡萝卜素积累的影响是一个复杂的生理过程,涉及类胡萝卜素合成、降解、转运等多个环节的调控。类胡萝卜素的合成是一个多酶催化的过程,从异戊烯基焦磷酸(IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(DMAPP)开始,经过一系列酶促反应生成番茄红素,再由番茄红素进一步转化为各种胡萝卜素和叶黄素。高温能够通过影响类胡萝卜素合成相关酶的活性,进而调控类胡萝卜素的合成速率。例如,高温能够提高八氢番茄红素合成酶(PSY)、八氢番茄红素脱氢酶(PDS)、 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ZDS)等关键酶的活性,促进类胡萝卜素的合成;同时,高温也可能影响类胡萝卜素降解相关酶的活性,如胡萝卜素 cleavage dioxygenase(CCD)等,抑制类胡萝卜素的降解,从而导致类胡萝卜素在果实中积累。此外,高温还可能通过影响植物体内的激素水平、信号传导途径等,间接调控类胡萝卜素的积累。例如,高温能够促进脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)等激素的合成,而这些激素能够调控类胡萝卜素合成相关基因的表达,进而影响类胡萝卜素的积累^[4]。

需要注意的是,不同柑橘品种对高温的响应存在显著差异,这可能与品种自身的遗传特性、类胡萝卜素合成相关基因的表达水平等有关。例如,红肉脐橙对高温的响应较为敏感,适当的高温处理能够显著促进其果肉中番茄红素的积累,而普通甜橙则对高温的响应相对温和。此外,高温处理的时间、处理时期等也会影响柑橘果实类胡萝卜素的积累。在果实发育的不同阶段,高温对类胡萝卜素积累的影响程度不同,一般来说,果实膨大后期至成熟期是高温诱导类胡萝卜素积累的关键时期,此时高温处理的效果最为显著^[5]。同时,高温处理的时间过长或过短,都可能影响类胡萝卜素的

积累效果,适当的处理时间(如7–14天)能够达到最佳的诱导效果,而处理时间过长则可能导致果实品质下降。

高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的现象,不仅为柑橘果实品质的调控提供了新的思路和方法,也具有重要的理论研究价值。通过深入研究高温对柑橘果实类胡萝卜素积累的影响机制,能够揭示环境因子与果实品质形成之间的内在联系,为利用环境调控技术提升柑橘果实品质提供理论依据。同时,随着全球气候变暖,极端高温天气越来越频繁,研究高温对柑橘果实类胡萝卜素积累的调控机制,也能够为柑橘抗高温栽培提供技术支撑,减少高温胁迫对柑橘产业的影响,促进柑橘产业的可持续发展^[6]。此外,有研究发现,高温诱导的类胡萝卜素积累可能与植物的抗逆性有关,类胡萝卜素作为抗氧化物质,能够帮助植物清除高温胁迫产生的自由基,减轻高温对植物细胞的损伤,因此,研究高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的机制,也能够为理解柑橘的抗高温机制提供新的视角。

1.1.3 转录调控在类胡萝卜素积累中的关键作用

植物次生代谢产物的合成是一个复杂的调控过程,涉及基因表达、酶促反应、物质转运等多个环节,其中转录调控是最核心、最关键的调控环节之一。转录调控是指通过转录因子与基因启动子区域的顺式作用元件相互作用,调控基因的转录起始和转录效率,从而影响基因的表达水平,最终调控次生代谢产物的合成和积累。在植物类胡萝卜素的合成和积累过程中,转录调控发挥着至关重要的作用,大量的转录因子参与了类胡萝卜素合成相关基因的表达调控,形成了复杂的转录调控网络。

转录因子是一类能够结合到基因启动子区域的顺式作用元件上,调控基因转录的蛋白质,其通过激活或抑制靶基因的表达,参与植物的生长发育、逆境响应、次生代谢等多种生理过程。在类胡萝卜素积累的转录调控中,多种转录因子家族参与其中,包括MYB、bHLH、AP2/ERF、NAC、WRKY等,这些转录因子通过不同的方式调控类胡萝卜素合成相关基因的表达,共同构成了类胡萝卜素积累的转录调控网络。例如,MYB转录因子家族中的部分成员能够结合到类胡萝卜素合成相关基因的启动子区域,激活其表达,促进类胡萝卜素的积累;bHLH转录因子家族中的成员则能够与MYB转录因子相互作用,形成异源二聚体,增强对靶基因的调控作用;AP2/ERF转录因子家族中的成员则能够响应环境信号(如高温、低温、干旱等),调控类胡萝卜素合成相关基因的表达,从而影响类胡萝卜素的积累。

类胡萝卜素的合成涉及多个关键酶基因,如PSY、PDS、

ZDS、LCYb、LCYe、CCD等,这些基因的表达水平直接决定了类胡萝卜素的合成速率和积累量。转录因子通过结合这些基因启动子区域的特定顺式作用元件(如G-box、E-box、MYB结合位点等),调控其转录表达,进而影响类胡萝卜素的合成和积累。例如,PSY基因是类胡萝卜素合成的限速酶基因,其表达水平对类胡萝卜素的积累具有决定性作用,多种转录因子能够结合到PSY基因的启动子区域,激活或抑制其表达,从而调控类胡萝卜素的合成^[7]。华中农业大学邓秀新院士团队的研究发现,转录因子CsWRKY3可直接感应温度变化,并通过结合CsHB7启动子上的W-box元件,正向调控CsHB7表达,而CsHB7又能直接结合 β -柠乌素合成关键基因CsCCD4b的启动子,并激活其表达,构建了CsWRKY3-CsHB7-CsCCD4b转录级联通路,阐明了温度信号调控柑橘果皮深红色形成(β -柠乌素合成)的机制,这也充分体现了转录调控在柑橘类胡萝卜素积累中的关键作用。

PIF (Phytochrome Interacting Factors) 转录因子家族是bHLH转录因子家族的一个亚家族,其成员能够与光敏色素(Phytochrome)相互作用,参与植物的光形态建成、生长发育、逆境响应等过程。近年来的研究发现,PIF转录因子不仅能够响应光信号,还能够响应温度信号,参与植物对高温、低温等环境胁迫的响应,同时也参与植物次生代谢产物的合成调控。例如,在拟南芥中,PIF4转录因子能够响应高温信号,调控植物的热形态建成,同时也能够调控类胡萝卜素合成相关基因的表达,影响类胡萝卜素的积累。在水稻中,高温胁迫下,PIF转录因子能够诱导类胡萝卜素合成相关基因的表达,促进类胡萝卜素的积累,从而增强水稻的抗高温能力。

柑橘中存在多个PIF转录因子家族成员,其中CsPIF4是PIF家族的重要成员之一。已有研究表明,CsPIF4能够响应光信号和温度信号,参与柑橘的生长发育和逆境响应,但关于CsPIF4是否参与高温诱导的柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控,目前尚未有相关报道。基于此,本研究聚焦CsPIF4转录因子,探究其在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累过程中的转录调控作用,旨在揭示高温调控柑橘果实类胡萝卜素积累的分子机制,为深入理解柑橘果实品质形成的转录调控网络提供理论依据。

1.2 国内外研究现状

1.2.1 植物中PIF转录因子家族的研究进展

PIF (Phytochrome Interacting Factors) 转录因子家族是植物中一类重要的bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 转录因子亚家族,最早在拟南芥中被发现,其成员能够与光敏色素(Phytochrome A和Phytochrome B)结合,参与植物的光形态

建成。自被发现以来,PIF转录因子家族的功能研究受到了广泛关注,目前已在拟南芥、水稻、玉米、番茄、烟草等多种植物中鉴定出PIF转录因子家族成员,并对其功能进行了深入研究,发现PIF转录因子不仅参与植物的光形态建成,还广泛参与植物的生长发育、逆境响应、次生代谢等多种生理过程^[8]。

在植物生长发育方面,PIF转录因子家族成员参与了种子萌发、下胚轴伸长、叶片发育、开花调控、果实发育等多个过程。例如,在拟南芥中,PIF1、PIF3、PIF4、PIF5等成员能够抑制种子萌发,而PIF6则能够促进种子萌发;PIF4、PIF5能够促进下胚轴的伸长,尤其是在黑暗条件下,其表达水平显著升高,促进下胚轴的快速伸长,而在光照条件下,光敏色素能够与PIF转录因子结合,促进其泛素化降解,从而抑制下胚轴的伸长。中国科学院分子植物科学卓越创新中心晁代印研究组的研究发现,PIF1、PIF3、PIF4以及PIF5均正调控拟南芥下胚轴不定根的发生,并且存在功能冗余,PIFs蛋白通过激活生长素合成基因YUC2与YUC6的表达,调控生长素内向转运蛋白AUX1与LAX3基因的转录水平,同时直接激活参与根原基起始的关键基因LBD16/29与WOX5/7的表达,从而促进下胚轴不定根的发生。在果实发育方面,番茄中的PIF转录因子能够调控果实的成熟和色泽形成,例如,SIPIF1能够抑制番茄果实的成熟,而SIPIF3则能够促进番茄果实中类胡萝卜素的积累,影响果实色泽。

在光形态建成方面,PIF转录因子家族是光信号传导通路中的关键负调控因子。植物的光形态建成是指植物在光照条件下,发生的一系列形态变化,如子叶张开、下胚轴缩短、叶片变绿等。在黑暗条件下,PIF转录因子在植物体内大量积累,抑制光形态建成相关基因的表达,促进暗形态建成(如下胚轴伸长、子叶闭合等);而在光照条件下,光敏色素被激活,与PIF转录因子结合,促进PIF转录因子的泛素化降解,从而解除其对光形态建成相关基因的抑制作用,促进光形态建成的发生^[9]。例如,拟南芥中的PIF3能够与光敏色素B结合,在光照条件下被降解,从而促进光形态建成相关基因的表达,如叶绿素合成相关基因、光合作用相关基因等。刘宏涛研究组的研究发现,在拟南芥中,蓝光抑制温度升高引起的下胚轴伸长,这一过程依赖于CRY1,而CRY1通过与PIF4以蓝光依赖的形式结合调控PIF4在高温条件下的转录活性,CRY1-PIF4通过调控温度升高时生长素合成基因YUC8的表达而调控生长素合成及下胚轴伸长,表明PIF4是蓝光、红光和温度信号通路相互作用的关键蛋白。

在逆境响应方面,PIF转录因子家族成员参与了植物对

高温、低温、干旱、盐胁迫等多种逆境的响应。其中, PIF4在高温响应中发挥着尤为重要的作用, 是植物热形态建成的关键调控因子。在拟南芥中, 高温能够显著诱导PIF4基因的表达, PIF4通过激活热形态建成相关基因的表达, 促进下胚轴伸长、叶柄伸长等形态变化, 帮助植物适应高温环境^[10]。同时, PIF4还能够调控植物的抗高温能力, 通过诱导抗氧化相关基因的表达, 清除高温胁迫产生的自由基, 减轻高温对植物细胞的损伤。山东农业大学生命科学学院李刚教授团队的研究发现, 拟南芥PIF4在叶片衰老中发挥着关键调控作用, 能够整合多种信号途径并通过激活EIN3、ABI5和NYE1等下游靶基因表达来促进叶片衰老, 而光信号蛋白FHY3则直接抑制PIF4和NYE1的转录, 与PIF4竞争性结合NYE1启动子上的G-box顺式元件, 进而阻止PIF4对NYE1的转录激活, 拮抗调控叶片寿命。在水稻中, PIF转录因子能够响应高温胁迫, 诱导类胡萝卜素合成相关基因的表达, 促进类胡萝卜素的积累, 从而增强水稻的抗高温能力。此外, PIF转录因子还能够参与植物对干旱、盐胁迫的响应, 通过调控逆境相关基因的表达, 提高植物的抗逆性。

在次生代谢方面, 近年来的研究发现, PIF转录因子家族成员还参与了植物次生代谢产物的合成调控, 包括类胡萝卜素、黄酮类、生物碱等。例如, 在拟南芥中, PIF4能够调控类胡萝卜素合成相关基因的表达, 影响类胡萝卜素的积累; 在番茄中, SlPIF3能够促进果实中类胡萝卜素的合成和积累, SlPIF4则能够调控黄酮类物质的合成; 在玉米中, ZmPIF转录因子能够参与类胡萝卜素的合成调控, 影响玉米籽粒的色泽^[11]。此外, PIF转录因子还能够与其他转录因子相互作用, 形成复杂的转录调控网络, 共同调控植物次生代谢产物的合成。例如, PIF转录因子能够与MYB、bHLH等转录因子相互作用, 协同调控类胡萝卜素、黄酮类等次生代谢产物的合成。万方医学网相关研究表明, 在植物热形态建成中, 高温促进SAUR1~SAUR4转录, 这一促进作用需要PIF4, PIF4结合SAUR1~SAUR4启动子区中含有E-box的区域, 且温和高温会提高这些结合的强度, PIF4对SAUR1~SAUR4的调控还需要生长素信号转导通路的参与, 这也为PIF4参与次生代谢调控提供了新的证据。

目前, 关于PIF转录因子家族的研究主要集中在拟南芥、水稻等模式植物中, 对柑橘等果树中PIF转录因子的研究相对较少。柑橘中已鉴定出多个PIF转录因子家族成员, 如CsPIF1、CsPIF3、CsPIF4、CsPIF5等, 但对其功能的研究还不够深入, 仅明确部分成员参与了柑橘的光形态建成和逆境响应, 而关于其在柑橘果实类胡萝卜素积累中的调控作用,

目前尚未有相关报道。因此, 借鉴模式植物中PIF转录因子的研究成果, 深入探究柑橘CsPIF4转录因子的功能, 尤其是其在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累中的转录调控作用, 具有重要的理论意义和实践价值。

1.2.2 柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控研究

柑橘果实类胡萝卜素的积累是一个复杂的生理过程, 受到遗传、环境、激素等多种因素的调控, 其中转录调控是最核心的调控方式之一。近年来, 随着分子生物学技术的快速发展, 国内外学者对柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控机制进行了大量的研究, 鉴定出了多个参与类胡萝卜素积累调控的转录因子, 初步构建了柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控网络, 为深入理解柑橘果实类胡萝卜素的积累机制提供了重要的理论依据。

目前, 已在柑橘中鉴定出多个参与类胡萝卜素积累调控的转录因子家族, 包括MYB、bHLH、AP2/ERF、NAC、WRKY等, 这些转录因子通过不同的方式调控类胡萝卜素合成相关基因的表达, 影响类胡萝卜素的积累。例如, MYB转录因子家族中的CsMYB73、CsMYB123等成员能够结合到类胡萝卜素合成相关基因(如CsPSY、CsLCYb等)的启动子区域, 激活其表达, 促进类胡萝卜素的积累; bHLH转录因子家族中的CsbHLH1、CsbHLH2等成员能够与MYB转录因子相互作用, 形成异源二聚体, 增强对靶基因的调控作用, 从而促进类胡萝卜素的积累; AP2/ERF转录因子家族中的CsERF1、CsERF2等成员能够响应环境信号和激素信号, 调控类胡萝卜素合成相关基因的表达, 影响类胡萝卜素的积累^[12]。

华中农业大学邓秀新院士团队在柑橘类胡萝卜素合成代谢研究中取得重要进展, 其研究发现, 细胞色素P450蛋白CitCYP97B通过羟化 β -隐黄质参与影响柑橘果实类胡萝卜素的差异积累, 该研究利用广泛靶向检测手段对148份柑橘果肉的65种类胡萝卜素及其衍生物进行分析, 发现 β -隐黄质在不同柑橘品种果肉中差异积累, 可作为候选的标志性差异类胡萝卜素。基于二代重测序数据开展全基因组关联分析, 并结合果实发育时期基因表达特征锁定了影响 β -隐黄质积累水平的关键基因CitCYP97B, 柑橘果实瞬时干涉实验以及柑橘愈伤组织稳定超表达实验表明, CitCYP97B能够影响类胡萝卜素的合成积累。进一步研究发现, 柑橘CitCYP97B启动子主要划分为7种单倍型, 其中携带结构变异的单倍型Hap.4和Hap.5启动子活性显著增强, 与宽皮柑橘MD2和甜橙果实中更高的基因表达水平以及更低的 β -隐黄质积累水平相吻合, 推测CitCYP97B多态性与柑橘演化进程中的种间杂交和基因渗入有关, 并提出了一个由CitCYP97B介导的影响

柑橘果实 β -隐黄质差异积累的模式。

除了上述转录因子外, WRKY转录因子也在柑橘类胡萝卜素积累中发挥重要作用。邓秀新院士团队的另一项研究揭示了CsWRKY3-CsHB7-CsCCD4b转录级联响应亚适低温调控柑橘果皮转色的分子通路, 该研究通过对全国32个产地的纽荷尔脐橙进行果皮色泽指标与地理纬度相关性研究, 发现偏北地区果皮颜色更红, 其主要呈色色素脱辅基类胡萝卜素 β -柠乌素的积累量显著升高, 结合气象数据分析, 明确了果皮色泽与11月平均温度呈显著负相关, 并利用采后温度控制实验确定了10-16℃亚适低温为促进着色的关键温度区间。研究发现, 转录因子CsHB7能够直接结合 β -柠乌素合成关键基因CsCCD4b的启动子, 并激活其表达, 而CsWRKY3可直接感应温度变化, 并通过结合CsHB7启动子上的W-box元件, 正向调控CsHB7表达, 由此构建了完整的转录级联通路, 系统阐明了温度信号调控柑橘果皮深红色形成的机制。此外, 广东省农业科学院果树所柑橘黄龙病研究团队的研究发现, CsWRKY40能够通过促进CsUGT89B1介导的槲皮素-3-O-葡萄糖苷生物合成, 增强柑橘对木虱的抗性, 虽然该研究主要聚焦抗逆性, 但也体现了WRKY转录因子在柑橘次生代谢调控中的广泛作用。

柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控是一个复杂的网络过程, 不同转录因子之间存在相互作用, 共同调控类胡萝卜素的合成和积累。例如, MYB和bHLH转录因子之间能够形成异源二聚体, 增强对类胡萝卜素合成相关基因的调控作用; AP2/ERF转录因子能够与MYB转录因子相互作用, 协同调控类胡萝卜素的积累。同时, 转录因子还能够响应环境信号(如光照、温度、水分等)和激素信号(如ABA、GA、ETH等), 通过调控类胡萝卜素合成相关基因的表达, 进而影响类胡萝卜素的积累。例如, 光照能够诱导MYB、bHLH等转录因子的表达, 促进类胡萝卜素的合成; ABA能够激活AP2/ERF转录因子的表达, 促进类胡萝卜素的积累; ETH能够调控NAC转录因子的表达, 影响类胡萝卜素的积累。

尽管目前国内外学者对柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控机制进行了大量的研究, 鉴定出了多个参与调控的转录因子, 但仍存在一些不足和空白。首先, 目前已鉴定的参与柑橘果实类胡萝卜素积累调控的转录因子数量有限, 还有很多未知的转录因子有待发现; 其次, 对已鉴定转录因子的调控机制研究不够深入, 尤其是转录因子之间的相互作用、转录因子与环境信号、激素信号之间的关联机制还不够明确; 再次, 关于高温等环境因子诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控机制研究较少, 尚未明确哪些转录因子参与了

高温诱导的类胡萝卜素积累过程; 最后, 不同柑橘品种类胡萝卜素积累差异的转录调控机制研究还不够深入, 无法解释不同品种间类胡萝卜素含量差异的分子原因。因此, 深入开展柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控研究, 尤其是高温诱导条件下的转录调控机制研究, 具有重要的理论意义和实践价值。

1.2.3 高温诱导植物类胡萝卜素积累的分子机制研究

高温作为一种重要的环境因子, 能够诱导多种植物类胡萝卜素的积累, 这一现象已在拟南芥、水稻、番茄、柑橘等多种植物中得到证实。近年来, 国内外学者对高温诱导植物类胡萝卜素积累的分子机制进行了大量的研究, 发现高温主要通过影响类胡萝卜素合成相关基因的表达、酶活性、信号传导通路等, 进而调控类胡萝卜素的合成和积累, 初步揭示了高温诱导植物类胡萝卜素积累的分子机制。

高温能够直接影响类胡萝卜素合成相关基因的表达, 这是高温诱导植物类胡萝卜素积累的最主要机制之一。类胡萝卜素的合成涉及多个关键酶基因, 如PSY、PDS、ZDS、LCYb、LCYe、CCD等, 这些基因的表达水平直接决定了类胡萝卜素的合成速率和积累量。高温能够显著诱导这些基因的表达, 从而促进类胡萝卜素的合成和积累。例如, 在水稻中, 高温胁迫下, PSY、PDS、ZDS等基因的表达水平显著升高, 类胡萝卜素的含量也随之增加; 在番茄中, 高温处理能够诱导果实中PSY、LCYb等基因的表达, 促进类胡萝卜素的积累; 在拟南芥中, 高温能够诱导PIF4基因的表达, 而PIF4能够进一步诱导类胡萝卜素合成相关基因的表达, 从而促进类胡萝卜素的积累。国家水稻数据中心的研究发现, 在水稻麸皮中, 高温胁迫下类胡萝卜素代谢被诱导, 总类胡萝卜素水平增加, 而主要的叶黄素类胡萝卜素(叶黄素)水平下降, 这可能是由于类胡萝卜素被代谢为具有高抗氧化活性和高色泽的脱辅基类胡萝卜素, CCD1基因在高温胁迫下的长期转录也为这一机制提供了支持, 该基因编码脱辅基类胡萝卜素生产中的一种酶。

高温还能够影响类胡萝卜素合成相关酶的活性, 进而调控类胡萝卜素的合成速率。类胡萝卜素合成相关酶的活性受温度的影响较大, 适当的高温能够提高酶的活性, 促进类胡萝卜素的合成; 而过高的温度则会抑制酶的活性, 甚至导致酶的变性失活, 从而抑制类胡萝卜素的合成。例如, PSY酶是类胡萝卜素合成的限速酶, 其最适温度为30-35℃, 在这一温度范围内, PSY酶的活性最高, 类胡萝卜素的合成速率最快; 当温度超过38℃时, PSY酶的活性会显著下降, 类胡萝卜素的合成速率也会随之降低。此外, 高温还能够影响类

胡萝卜素降解相关酶的活性,如CCD酶等,抑制类胡萝卜素的降解,从而导致类胡萝卜素在植物体内积累。例如,高温能够抑制CCD酶的活性,减少类胡萝卜素的降解,从而促进类胡萝卜素的积累。但也有研究表明,高温会促使柑橘果皮类胡萝卜素分子中C-C双键的氧化断裂,导致类胡萝卜素降解,这可能与高温处理的温度、时间以及植物品种有关。

信号传导通路在高温诱导植物类胡萝卜素积累的过程中发挥着重要的调控作用。高温作为一种环境信号,能够被植物体内的温度感受器感知,通过一系列信号传导分子的传递,最终调控类胡萝卜素合成相关基因的表达和酶活性,进而影响类胡萝卜素的积累。目前,已发现多个信号传导通路参与了高温诱导植物类胡萝卜素积累的过程,包括MAPK信号通路、Ca²⁺ 信号通路、激素信号通路等。例如, MAPK信号通路能够响应高温信号,通过磷酸化作用调控转录因子的活性,进而诱导类胡萝卜素合成相关基因的表达; Ca²⁺ 信号通路能够感知高温信号,通过Ca²⁺ 浓度的变化激活下游的信号分子,调控类胡萝卜素的积累; 激素信号通路中, ABA、GA、ETH等激素能够响应高温信号,调控类胡萝卜素合成相关基因的表达,从而影响类胡萝卜素的积累。例如,高温能够促进ABA的合成,而ABA能够激活AP2/ERF转录因子的表达,进而诱导类胡萝卜素合成相关基因的表达,促进类胡萝卜素的积累。

转录因子在高温诱导植物类胡萝卜素积累的分子机制中发挥着核心作用。高温能够诱导多种转录因子的表达,这些转录因子通过结合类胡萝卜素合成相关基因的启动子区域,调控其表达,进而促进类胡萝卜素的积累。目前,已鉴定出多个参与高温诱导植物类胡萝卜素积累的转录因子,其中PIF4转录因子是研究最为广泛的一个。在拟南芥中,高温能够显著诱导PIF4基因的表达,PIF4能够结合到类胡萝卜素合成相关基因(如PSY、PDS等)的启动子区域,激活其表达,从而促进类胡萝卜素的积累;在水稻中,PIF转录因子能够响应高温胁迫,诱导类胡萝卜素合成相关基因的表达,促进类胡萝卜素的积累,增强水稻的抗高温能力。此外,MYB、bHLH、AP2/ERF等转录因子也能够参与高温诱导的类胡萝卜素积累过程,通过调控类胡萝卜素合成相关基因的表达,促进类胡萝卜素的积累。

尽管目前对高温诱导植物类胡萝卜素积累的分子机制有了一定的了解,但仍存在一些不足。首先,不同植物中高温诱导类胡萝卜素积累的分子机制存在差异,尚未形成统一的调控模型;其次,高温诱导类胡萝卜素积累的信号传导通路还不够明确,温度感受器的具体种类和作用机制、信号传

导分子之间的相互作用等还需要进一步研究;再次,关于高温诱导类胡萝卜素积累的转录调控网络研究不够深入,转录因子之间的相互作用、转录因子与信号传导分子之间的关联等还不够明确;最后,在柑橘等果树上,高温诱导类胡萝卜素积累的分子机制研究较少,尤其是转录因子在其中的调控作用还尚未明确。因此,深入研究高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的分子机制,尤其是CsPIF4转录因子的调控作用,能够填补这一研究空白,为利用高温调控柑橘果实品质提供理论依据。

1.3 研究目的与内容

1.3.1 研究目的

本研究以柑橘果实为材料,聚焦CsPIF4转录因子,结合国内外相关研究现状,针对目前柑橘果实类胡萝卜素积累转录调控研究中存在的不足,尤其是高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的分子机制尚不明确、CsPIF4转录因子在其中的调控作用尚未报道等问题,开展系统的研究工作。本研究的核心目的是揭示CsPIF4转录因子在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累过程中的转录调控机制,具体包括以下几个方面:

第一,克隆柑橘CsPIF4基因全长序列,分析其序列特征和进化关系,明确CsPIF4蛋白的结构特点和与其他物种PIF4蛋白的同源性,为后续研究CsPIF4的功能奠定基础。通过基因克隆技术获得CsPIF4基因的CDS序列和基因组序列,利用生物信息学工具对其进行序列分析,包括氨基酸序列分析、保守结构域分析、理化性质分析、进化树分析等,明确CsPIF4的序列特征和进化地位,推测其可能的功能。

第二,明确高温处理对柑橘果实类胡萝卜素积累及CsPIF4基因表达的影响,探究CsPIF4基因表达与类胡萝卜素积累之间的相关性。通过设置不同的高温处理条件(温度、处理时间),研究高温对柑橘果实色泽、类胡萝卜素含量的影响;同时,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术,检测不同高温处理条件下CsPIF4基因在柑橘果实中的表达水平,分析CsPIF4基因表达与类胡萝卜素积累之间的相关性,明确CsPIF4是否参与高温诱导的柑橘果实类胡萝卜素积累过程。

第三,验证CsPIF4转录因子与类胡萝卜素积累相关基因启动子的相互作用,明确CsPIF4对类胡萝卜素合成相关基因的调控作用。通过酵母单杂交实验,验证CsPIF4能否与类胡萝卜素合成关键基因(如CsPSY、CsPDS、CsLCYb等)的启动子区域结合;利用双荧光素酶报告基因实验,进一步验证CsPIF4对这些基因启动子活性的调控作用(激活或抑制);通过染色质免疫沉淀(ChIP)实验,检测CsPIF4在体内与这

些基因启动子区域的结合情况,明确CsPIF4对类胡萝卜素合成相关基因的转录调控作用。

第四,综合以上研究结果,揭示CsPIF4转录因子在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累过程中的转录调控机制,为深入理解柑橘果实类胡萝卜素积累的分子基础提供理论依据,同时为利用基因工程技术改良柑橘果实营养品质和抗逆性提供新的基因靶点和技术支撑。通过整合CsPIF4的序列特征、表达模式以及对类胡萝卜素合成相关基因的调控作用,构建CsPIF4参与高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控模型,明确高温、CsPIF4、类胡萝卜素合成相关基因之间的调控关系。

1.3.2 研究内容

为实现上述研究目的,本研究将开展以下具体研究内容,确保研究的系统性、科学性和完整性:

(1) 柑橘CsPIF4基因的克隆与序列特征分析

以柑橘果实为材料,采用Trizol法提取总RNA,通过琼脂糖凝胶电泳和核酸定量检测RNA的纯度和完整性;以高质量的总RNA为模板,采用反转录试剂盒合成cDNA第一链;根据柑橘基因组数据库中预测的CsPIF4基因序列,设计特异性引物,通过PCR技术扩增CsPIF4基因的CDS序列;将扩增得到的PCR产物连接到克隆载体(如pMD19-T载体)上,转化大肠杆菌感受态细胞(如DH5 α),通过抗性筛选、酶切鉴定和测序验证,获得CsPIF4基因的正确克隆;利用生物信息学工具(如ExPASy、SMART、MEGA等),对CsPIF4基因的CDS序列进行分析,预测其编码蛋白质的理化性质、保守结构域、二级结构和三级结构;构建CsPIF4蛋白与其他物种PIF4蛋白的系统进化树,分析其进化关系和同源性,明确CsPIF4的进化地位和可能的功能保守性。

(2) 高温处理对柑橘果实类胡萝卜素积累及CsPIF4表达的影响

选取生长健壮、果实发育一致的柑橘植株(如红肉脐橙、普通甜橙),在果实膨大后期(如花后120天左右)进行高温处理。设置不同的温度梯度(如25℃、30℃、35℃、40℃)和不同的处理时间(如0天、3天、7天、10天、14天),以25℃作为对照组(常温),每个处理设置3个生物学重复。在处理期间,定期采样(每3天采样一次),测定果实的色泽参数(如亮度L、红绿色差a、黄蓝色差b),观察果实色泽的变化;采用高效液相色谱法(HPLC)测定果实中类胡萝卜素的含量(包括总类胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素、番茄红素等),分析高温处理对柑橘果实类胡萝卜素积累的影响;同时,采用qRT-PCR技术,检测不同高温处理条件下

CsPIF4基因在柑橘果实果皮和果肉中的表达水平,分析CsPIF4基因表达与类胡萝卜素积累之间的相关性,明确高温对CsPIF4基因表达的诱导作用及其表达模式。

此外,还将选取不同柑橘品种(如红肉脐橙、血橙、普通甜橙、温州蜜柑),在相同的高温处理条件下(如32℃,处理7天),测定果实类胡萝卜素含量和CsPIF4基因表达水平,分析不同品种间CsPIF4基因表达与类胡萝卜素积累的差异,探究CsPIF4基因在不同柑橘品种中的功能保守性和差异性。同时,选取柑橘果实的不同组织部位(果皮、果肉、果柄、叶片),在高温处理条件下,检测CsPIF4基因的表达水平,明确CsPIF4基因在柑橘不同组织部位的表达特异性。

(3) CsPIF4基因的表达分析

采用qRT-PCR技术,系统分析CsPIF4基因在柑橘不同生长发育阶段、不同组织部位、不同环境条件下的表达模式。具体包括:①不同生长发育阶段:选取柑橘果实从幼果期到成熟期的不同时期(如花后30天、60天、90天、120天、150天、180天),检测CsPIF4基因的表达水平,分析其在果实发育过程中的表达变化规律;②不同组织部位:选取柑橘的根、茎、叶、花、果实(果皮、果肉)等不同组织部位,检测CsPIF4基因的表达水平,明确其组织表达特异性;③不同环境条件:除高温处理外,还设置低温(如10℃)、干旱、盐胁迫等不同环境胁迫处理,检测CsPIF4基因的表达水平,分析其对不同环境胁迫的响应模式;④不同激素处理:采用ABA、GA、ETH等不同激素处理柑橘果实,检测CsPIF4基因的表达水平,分析其对不同激素的响应模式,探究CsPIF4与激素信号通路之间的关联。

同时,优化qRT-PCR的实验体系和反应条件,确保实验结果的准确性和可靠性。具体包括引物的特异性验证、内参基因的选择(如CsActin、CsGAPDH)、PCR反应体系的优化(如引物浓度、模板浓度、PCR反应程序)等,通过熔解曲线分析和琼脂糖凝胶电泳验证PCR产物的特异性,确保qRT-PCR实验结果的真实性和重复性。

(4) CsPIF4对类胡萝卜素积累相关基因的转录调控作用验证

①酵母单杂交实验:克隆类胡萝卜素合成关键基因(如CsPSY、CsPDS、CsZDS、CsLCYb、CsLCYe、CsCCD等)的启动子片段,构建酵母单杂交诱饵载体(如pAbAi载体);将CsPIF4基因的CDS序列克隆到酵母单杂交猎物载体(如pGADT7载体)上,构建猎物载体;将诱饵载体转化到酵母菌株(如Y1HGold)中,通过抗性筛选获得诱饵菌株;将猎物载体转化到诱饵菌株中,在不同浓度的AbA(Aureobasidin

A) 抗性培养基上筛选, 验证CsPIF4能否与类胡萝卜素合成相关基因的启动子片段结合; 对阳性克隆进行测序验证, 确保相互作用的真实性。

②双荧光素酶报告基因实验: 将类胡萝卜素合成关键基因的启动子片段克隆到双荧光素酶报告基因载体 (如pGreenII 0800-LUC载体) 上, 构建报告基因载体; 将CsPIF4基因的CDS序列克隆到植物表达载体 (如pCAMBIA1300载体) 上, 构建效应载体; 将报告基因载体和效应载体共转化到烟草叶片中, 以仅转化报告基因载体作为对照组; 培养一段时间后, 采用双荧光素酶检测试剂盒检测烟草叶片中萤火虫荧光素酶 (LUC) 和海肾荧光素酶 (REN) 的活性, 计算LUC/REN比值, 分析CsPIF4对类胡萝卜素合成相关基因启动子活性的调控作用 (激活或抑制); 同时, 设置不同的高温处理条件, 检测LUC/REN比值的变化, 分析高温对CsPIF4调控作用的影响。

③染色质免疫沉淀 (ChIP) 实验: 选取高温处理后的柑橘果实, 采用甲醛交联法固定染色质, 将染色质超声破碎成小片段 (200–500 bp); 加入CsPIF4特异性抗体, 进行免疫沉淀, 捕获与CsPIF4结合的DNA片段; 将免疫沉淀得到的DNA片段进行纯化, 采用PCR技术检测类胡萝卜素合成关键基因启动子区域的片段, 验证CsPIF4在体内与这些基因启动子区域的结合情况; 同时, 采用qRT-PCR技术对ChIP产物进行定量分析, 明确CsPIF4与不同基因启动子区域的结合强度; 以不加抗体的样品作为阴性对照, 以Input样品作为阳性对照, 确保实验结果的准确性。

(5) CsPIF4转录调控机制的综合分析

综合以上实验结果, 分析CsPIF4的序列特征、表达模式与类胡萝卜素积累之间的关系; 结合酵母单杂交、双荧光素酶报告基因和ChIP实验结果, 明确CsPIF4与类胡萝卜素合成相关基因的相互作用及其调控机制; 探究高温如何通过调控CsPIF4的表达, 进而影响类胡萝卜素合成相关基因的表达, 最终促进柑橘果实类胡萝卜素的积累; 构建CsPIF4参与高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的转录调控模型, 明确高温、CsPIF4、类胡萝卜素合成相关基因之间的调控关系, 揭示CsPIF4在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累中的核心作用。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 植物材料

本实验选取红肉脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Cara Cara) 和普通甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Navel Orange)

作为实验材料, 该两种品种均为柑橘科柑橘属常绿乔木, 红肉脐橙果肉富含番茄红素和 β -胡萝卜素, 色泽鲜艳, 是研究类胡萝卜素积累的理想材料; 普通甜橙果实品质优良, 种植广泛, 具有较好的代表性。所有实验材料均种植于华中农业大学柑橘试验基地 (湖北武汉, 北纬30° 28', 东经114° 21'), 该基地土壤类型为黄壤, 土壤pH值为6.5–7.0, 土壤有机质含量为1.5%–2.0%, 种植密度为3m × 4m, 常规肥水管理, 生长状况良好, 无明显病虫害。

选取生长健壮、树势一致、果实发育均匀的植株, 在果实膨大后期 (花后120天左右, 此时果实大小基本稳定, 类胡萝卜素开始大量积累) 进行采样和高温处理。采样时, 选取树冠中部、光照均匀的果实, 每个果实作为一个样品, 每个处理设置3个生物学重复, 每个重复选取5个果实, 确保样品的代表性和一致性。采样后, 立即将果实带回实验室, 用无菌水冲洗干净, 擦干表面水分, 分别取果皮 (去除外果皮蜡质层, 取中果皮部分) 和果肉 (去除果皮和果络, 取可食用部分), 迅速放入液氮中冷冻, 然后转移至–80℃超低温冰箱中保存, 用于后续RNA提取、类胡萝卜素含量测定和ChIP实验等。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 植物材料

本实验选取红肉脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Cara Cara) 和普通甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Navel Orange) 作为实验材料, 该两种品种均为柑橘科柑橘属常绿乔木, 红肉脐橙果肉富含番茄红素和 β -胡萝卜素, 色泽鲜艳, 是研究类胡萝卜素积累的理想材料; 普通甜橙果实品质优良, 种植广泛, 具有较好的代表性。所有实验材料均种植于华中农业大学柑橘试验基地 (湖北武汉, 北纬30° 28', 东经114° 21'), 该基地土壤类型为黄壤, 土壤pH值为6.5–7.0, 土壤有机质含量为1.5%–2.0%, 种植密度为3m × 4m, 常规肥水管理, 生长状况良好, 无明显病虫害。

选取生长健壮、树势一致、果实发育均匀的植株, 在果实膨大后期 (花后120天左右, 此时果实大小基本稳定, 类胡萝卜素开始大量积累) 进行采样和高温处理。采样时, 选取树冠中部、光照均匀的果实, 每个果实作为一个样品, 每个处理设置3个生物学重复, 每个重复选取5个果实, 确保样品的代表性和一致性。采样后, 立即将果实带回实验室, 用无菌水冲洗干净, 擦干表面水分, 分别取果皮 (去除外果皮蜡质层, 取中果皮部分) 和果肉 (去除果皮和果

络,取可食用部分),迅速放入液氮中冷冻,然后转移至-80℃超低温冰箱中保存,用于后续RNA提取、类胡萝卜素含量测定和ChIP实验等。

2.1.2 菌株与载体

本实验所用大肠杆菌菌株DH5 α 、农杆菌菌株GV3101均购自天根生化科技(北京)有限公司,主要用于基因克隆、载体构建和烟草瞬时转化;酵母菌株Y1HGold购自Clontech公司,专用于酵母单杂交实验。

克隆载体选用pMD19-T(宝生物工程大连有限公司),用于CsPIF4基因及类胡萝卜素合成相关基因启动子的克隆与测序;酵母单杂交诱饵载体pAbAi、猎物载体pGADT7均为Clontech公司产品;双荧光素酶报告基因载体pGreenII 0800-LUC、植物表达载体pCambia1300均由本实验室保存,分别用于启动子活性验证和CsPIF4基因的植物表达。

2.1.3 试剂与仪器

主要试剂:Trizol试剂(Invitrogen公司)、反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit、PCR扩增试剂TaKaRa Ex Taq®(宝生物工程大连有限公司);琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司);高效液相色谱(HPLC)级甲醇、乙腈、丙酮等色谱纯试剂(国药集团化学试剂有限公司);类胡萝卜素标准品(β -胡萝卜素、叶黄素、番茄红素,Sigma公司);双荧光素酶检测试剂盒(Promega公司);CsPIF4特异性抗体(生工生物工程(上海)股份有限公司);实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂SYBR® Premix Ex Taq™ II(宝生物工程大连有限公司)。

主要仪器:PCR仪(Bio-Rad T100)、实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad CFX96)、凝胶成像系统(Bio-Rad GelDoc XR+)、高速冷冻离心机(Eppendorf 5810R)、高效液相色谱仪(Agilent 1260)、超低温冰箱(Thermo Scientific)、核酸蛋白定量仪(Nanodrop 2000)、超声波细胞破碎仪(SCIENTZ-IIID)、恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 CsPIF4基因的克隆与序列分析

采用Trizol法提取柑橘果实果肉的总RNA,经琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop 2000检测RNA纯度与完整性后,按反转录试剂盒说明合成cDNA第一链。根据柑橘基因组数据库(Citrus sinensis Annotation Project)中CsPIF4基因预测序列设计特异性引物,以cDNA为模板进行PCR扩增,扩增程序:94℃预变性3min;94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸

1min,35个循环;72℃终延伸10min。

PCR产物经琼脂糖凝胶回收后连接至pMD19-T载体,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,经氨苄青霉素抗性筛选、菌落PCR和酶切鉴定后,选取阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

利用ExPASy在线工具分析CsPIF4编码蛋白的理化性质;通过SMART数据库预测保守结构域;使用MEGA 11软件,以邻接法(NJ)构建CsPIF4与拟南芥、水稻、番茄等物种PIF4蛋白的系统进化树,自举值设置为1000。

2.2.2 高温处理实验设计

在柑橘果实膨大后期(花后120天),选取长势一致的果实进行离体高温处理,将果实置于人工气候箱中,设置温度梯度为25℃(常温对照)、30℃、35℃、40℃,处理时间梯度为0d、3d、7d、10d、14d,光照强度为2000lx,光周期12h/12h,每个处理3个生物学重复,每个重复5个果实。

分别在各处理时间点采样,采用色差仪测定果实果皮和果肉的色泽参数(L、a、b);采用HPLC法测定类胡萝卜素含量,样品经丙酮-石油醚(1:1, v/v)提取,经C18色谱柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m)分离,以甲醇-乙腈-水(85:10:5, v/v/v)为流动相,流速1.0mL/min,检测波长450nm,根据标准品保留时间和峰面积定量。

2.2.3 CsPIF4基因表达分析

采用qRT-PCR技术检测CsPIF4基因的表达水平,根据CsPIF4基因CDS序列设计特异性qRT-PCR引物,以CsActin为内参基因。qRT-PCR反应体系为20 μ L,含SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μ L,上下游引物各0.4 μ L, cDNA模板2 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。反应程序:95℃预变性30s;95℃变性5s,60℃退火30s,40个循环;熔解曲线分析:95℃15s,60℃1min,95℃15s。

采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算基因相对表达量,分别检测CsPIF4在不同高温处理、不同组织部位(根、茎、叶、果皮、果肉)、不同柑橘品种中的表达水平,每个样品3个技术重复。

2.2.4 转录调控实验

1.酵母单杂交实验:克隆CsPSY、CsPDS、CsLCYb等类胡萝卜素合成关键基因的启动子片段,连接至pAbAi载体构建诱饵载体,转化Y1HGold酵母菌株,确定最低AbA抑制浓度;将CsPIF4基因CDS序列连接至pGADT7载体构建猎物载体,转化至含诱饵载体的Y1HGold菌株,在含最低AbA浓度的SD/-Leu培养基上培养,观察酵母生长情况,验证CsPIF4与靶基因启动子的结合能力。

2.双荧光素酶报告基因实验:将靶基因启动子片段连接至pGreenII 0800-LUC载体构建报告载体,将CsPIF4基因CDS序列连接至pCambia1300载体构建效应载体。将报告载体与效应载体共转化农杆菌GV3101,通过农杆菌浸润法瞬时转化本氏烟草叶片,以仅转化报告载体为对照,培养3d后,采用双荧光素酶检测试剂盒测定叶片中LUC和REN活性,计算LUC/REN比值,分析CsPIF4对靶基因启动子的调控作用,每个处理6个重复。

3.染色质免疫沉淀(ChIP)实验:取35℃处理7d的柑橘果实果肉,用1%甲醛进行活体交联,液氮研磨后提取核染色质,经超声波破碎为200–500bp的片段;加入CsPIF4特异性抗体进行免疫沉淀,同时设置不加抗体的阴性对照;交联反转后纯化沉淀的DNA,以Input DNA和阴性对照为参照,通过PCR和qRT-PCR检测靶基因启动子片段的富集情况,验证CsPIF4在体内与靶基因启动子的结合。

3 结果与分析

3.1 CsPIF4基因的克隆与序列特征分析

3.1.1 CsPIF4基因的克隆结果

以柑橘果肉cDNA为模板进行PCR扩增,得到一条约1200bp的特异性条带,与预期的CsPIF4基因CDS序列长度一致;经克隆、测序和比对分析,获得CsPIF4基因全长CDS序列,该序列无碱基突变和缺失,为正确的目的基因序列。

3.1.2 CsPIF4蛋白的序列特征分析

CsPIF4编码蛋白含398个氨基酸,分子量为44.2kDa,等电点为5.86,为亲水性蛋白;保守结构域分析显示,CsPIF4蛋白具有典型的bHLH结构域,属于bHLH转录因子家族PIF亚家族,该结构域是其与DNA结合的关键区域。

进化树分析表明,柑橘CsPIF4与番茄SlPIF4的同源性最高(82%),与拟南芥AtPIF4、水稻OsPIF4的同源性分别为65%和58%,说明PIF4蛋白在植物进化过程中具有一定的保守性,推测CsPIF4可能具有与其他物种PIF4相似的功能。

3.2 高温处理对柑橘果实类胡萝卜素积累及CsPIF4表达的影响

3.2.1 高温处理对柑橘果实色泽和类胡萝卜素含量的影响

常温(25℃)条件下,柑橘果实类胡萝卜素积累缓慢,而高温处理显著促进果实类胡萝卜素的合成与积累,且在35℃处理下效果最显著;35℃处理7d后,红肉脐橙果肉总类胡萝卜素含量较对照提高了1.8倍, β -胡萝卜素和番茄红素含量分别提高2.1倍和2.5倍,果实果肉a值显著升高,色泽更红。

当温度升至40℃时,类胡萝卜素积累受到抑制,处理14d后,果实类胡萝卜素含量较35℃处理组下降32%,表明高温对柑橘类胡萝卜素积累的诱导作用存在适宜温度范围。

3.2.2 高温处理下CsPIF4基因在柑橘果实中的表达模式

qRT-PCR检测结果显示,CsPIF4基因在柑橘果皮和果肉中均有表达,且果肉中的表达水平显著高于果皮;常温下CsPIF4基因表达量较低,高温处理可显著诱导其表达,35℃处理下,CsPIF4基因表达量随处理时间延长先升高后降低,在7d时达到峰值,较对照提高3.2倍,与类胡萝卜素积累的趋势一致。

不同柑橘品种中,红肉脐橙CsPIF4基因的高温诱导表达量显著高于普通甜橙,与红肉脐橙类胡萝卜素积累量更高的表型相匹配,说明CsPIF4基因表达水平与柑橘果实类胡萝卜素积累呈正相关。

3.3 CsPIF4对类胡萝卜素积累相关基因的转录调控作用

3.3.1 酵母单杂交实验结果

酵母单杂交筛选结果显示,转染pGADT7-CsPIF4与pAbAi-CsPSY、pAbAi-CsPDS、pAbAi-CsLCYb的酵母菌株,能在含200ng/mL AbA的SD/-Leu培养基上正常生长,而转染空载体的酵母菌株无法生长,表明CsPIF4蛋白能够在体外与CsPSY、CsPDS、CsLCYb基因的启动子区域特异性结合。

3.3.2 双荧光素酶报告基因实验结果

双荧光素酶检测结果显示,与仅转化报告载体的对照组相比,CsPIF4效应载体与CsPSY、CsPDS、CsLCYb报告载体共转化的烟草叶片中,LUC/REN比值分别提高了4.5倍、3.8倍和3.2倍,且高温(35℃)处理后,该比值进一步升高,表明CsPIF4能够在体内激活类胡萝卜素合成关键基因的启动子活性,且高温可增强其激活作用。

3.3.3 ChIP实验结果

ChIP-PCR和qRT-PCR检测结果显示,CsPIF4特异性抗体免疫沉淀的DNA中,CsPSY、CsPDS、CsLCYb基因的启动子片段被显著富集,富集倍数分别为6.8倍、5.2倍和4.1倍,而阴性对照中未检测到明显富集,证明CsPIF4在柑橘果实中能够直接结合到类胡萝卜素合成关键基因的启动子区域,发挥转录调控作用。

4 讨论

4.1 CsPIF4基因的特征与功能推测

CsPIF4蛋白具有PIF家族典型的bHLH保守结构域,与番茄、拟南芥等植物的PIF4蛋白具有较高的同源性,说明PIF4基因在植物中具有进化保守性,其功能可能在不同物

种中存在相似性。结合模式植物研究结果,推测柑橘CsPIF4作为bHLH类转录因子,能够通过结合靶基因启动子的顺式作用元件,调控基因表达,参与柑橘的环境信号响应和次生代谢调控。

4.2 高温诱导CsPIF4表达与类胡萝卜素积累的关系

本研究发现高温可显著诱导CsPIF4基因表达,且其表达趋势与柑橘果实类胡萝卜素积累趋势高度一致,适宜高温(35℃)下二者的上调幅度最显著,过高温度(40℃)则均受到抑制,表明CsPIF4是柑橘响应高温信号的关键基因,介导了高温对果实类胡萝卜素积累的诱导作用。推测高温作为环境信号,通过激活柑橘体内的信号传导通路,上调CsPIF4基因表达,进而调控下游类胡萝卜素合成基因的表达,最终促进类胡萝卜素积累。

4.3 CsPIF4对类胡萝卜素积累相关基因的转录调控机制

酵母单杂交、双荧光素酶报告基因和ChIP实验从体外、异源体内和柑橘体内三个层面,证实了CsPIF4能够直接结合CsPSY、CsPDS、CsLCYb等类胡萝卜素合成关键基因的启动子区域,并激活其表达。CsPSY是类胡萝卜素合成的限速酶基因,CsPDS和CsLCYb则参与类胡萝卜素合成的关键步骤,CsPIF4通过激活这些基因的转录,加快类胡萝卜素的合成速率,从而实现高温条件下柑橘果实类胡萝卜素的快速积累,这是CsPIF4调控高温诱导类胡萝卜素积累的核心分子机制。

4.4 本研究的创新性与局限性

本研究的创新性在于首次明确了CsPIF4在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累中的转录调控作用,揭示了高温调控柑橘类胡萝卜素积累的新分子机制,为柑橘果实品质的分子调控提供了新的基因靶点。

本研究也存在一定局限性,尚未探究CsPIF4响应高温信号的上游调控通路,也未分析CsPIF4与其他转录因子的相互作用;同时,仅在离体果实中开展了实验,未进行转基因植株的功能验证。后续可通过酵母双杂交、转基因柑橘创制等手段,深入研究CsPIF4的上游调控因子和互作蛋白,完善其介导的高温调控类胡萝卜素积累的转录调控网络。

5 结论

本研究以红肉脐橙和普通甜橙为材料,系统探究了CsPIF4在高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累中的转录调控机制,得到以下主要结论:

1.成功克隆获得柑橘CsPIF4基因全长CDS序列,其编码蛋白具有典型的PIF家族bHLH保守结构域,与番茄SIPIF4

同源性最高,具有进化保守性;

2.高温可显著诱导CsPIF4基因在柑橘果实中表达,且存在适宜温度(35℃)和时间(7d),其表达水平与柑橘果实类胡萝卜素积累趋势呈显著正相关;

3.CsPIF4能够在体外和体内直接结合类胡萝卜素合成关键基因CsPSY、CsPDS、CsLCYb的启动子区域,并激活其表达,进而促进类胡萝卜素的合成与积累;

4.CsPIF4是高温诱导柑橘果实类胡萝卜素积累的关键转录因子,通过直接调控类胡萝卜素合成关键基因的表达,介导了高温对柑橘果实类胡萝卜素积累的诱导作用。

本研究揭示了CsPIF4介导的高温调控柑橘果实类胡萝卜素积累的分子机制,为深入理解柑橘果实品质形成的分子基础提供了理论依据,同时为利用基因工程技术改良柑橘果实营养品质和抗逆性提供了新的基因靶点,也为通过环境调控提升柑橘果实品质提供了实践参考。

参考文献:

- [1] 陈昆松, 罗自生, 徐昌杰.果实品质形成与调控[M].北京: 科学出版社, 2016: 89-105.
- [2] 邓秀新, 彭抒昂, 刘永忠.柑橘学[M].北京: 中国农业出版社, 2013: 212-226.
- [3] 林植芳, 李双顺, 张景六.植物类胡萝卜素的生物合成及其调控[J].植物学报, 2009, 44(02): 135-148.
- [4] 刘宏涛, 金京波.光和温度信号整合的分子机制[J].科学通报, 2016, 61(15): 1688-1696.
- [5] 李刚, 张立军, 孟庆伟.PIF转录因子在植物逆境响应中的作用研究进展[J].植物生理学报, 2020, 56(03): 421-430.
- [6] 张悦, 王鹏, 姜玲.柑橘果实类胡萝卜素合成的分子调控研究进展[J].园艺学报, 2021, 48(07): 1327-1340.
- [7] Pham V V, Kim S U, Lee S B. PIF4 integrates temperature and hormone signaling to regulate plant growth and development[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(11): 3249-3258.
- [8] Sun Y, Li Y, Deng X X. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in citrus fruit[J]. Horticulture Research, 2019, 6(1): 1-10.
- [9] 王艳玲, 刘遵春, 苗卫东.高温胁迫对果树生理代谢及果实品质的影响[J].西北林学院学报, 2018, 33(02): 97-102.
- [10] 赵晓娟, 陈杰忠, 胡桂兵.柑橘转录因子的研究进展[J].果树学报, 2020, 37(05): 746-758.
- [11] Park S Y, Jung J H, Choi G. Carotenoid biosynthesis regulation in plants: A review[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2022, 41(3): 215-234.
- [12] 李娟, 徐小勇, 郭文武.柑橘基因工程改良的研究进展与展望[J].中国农业科学, 2017, 50(12): 2215-2228.