

中华猕猴桃品种‘Hort16A’果肉颜色形成的分子机制

张计育^①, 潘德林^①, 贾展慧, 王 刚, 王 涛, 翟 敏, 郭忠仁^②

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要: 对中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.) 品种‘Hort16A’果实发育过程(花后 2~140 d 及采后 7~16 d) 中果肉颜色的变化进行了观察, 并对果实采后果肉中叶绿素和类胡萝卜素含量以及叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因的表达进行了研究。结果表明: 花后 2~140 d, 中华猕猴桃品种‘Hort16A’的果肉为绿色; 采后 7~16 d, 果肉颜色由绿变黄, 果肉中叶绿素含量先升高后显著降低, 类胡萝卜素含量无显著变化; 类胡萝卜素/叶绿素比在采后 16 d 显著升高。采后 12 d 果肉中叶绿素生物合成相关基因中 *CAO1*、*GluTR1*、*LHCB1*、*LHCB2*、*CBR1* 和 *CLH1* 基因的相对表达量较采后 7 d 显著升高, 之后显著降低; 采后 12~16 d 果肉中叶绿素降解相关基因中 *PAO1*、*PAO2*、*PPH1*、*PPH2*、*PPH3*、*SGR1* 和 *SGR2* 基因的相对表达量总体上显著高于采后 7 d, 说明果肉中叶绿素含量降低是叶绿素的生物合成减少及其降解增加共同作用的结果。采后 12~16 d 果肉中类胡萝卜素生物合成相关基因中 *CrtISO1*、*ZISO1*、*LCYB2*、*CYP1* 和 *CHY1* 基因的相对表达量较采后 7 d 显著升高, 类胡萝卜素降解相关基因中 *NCED1*、*NCED2*、*ZEP1* 和 *CCD2* 基因的相对表达量也显著升高, 说明类胡萝卜素生物合成和降解达到平衡, 导致类胡萝卜素含量无显著变化。相关性分析结果显示: 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素含量与 *PAO2* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, 但与 *SGR1* 基因的相对表达量显著负相关; 类胡萝卜素含量与 *LCYB2* 和 *CYP1* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关; 个别叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因相对表达量间的相关性在 0.05 或 0.01 水平上显著。研究结果显示: 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素的生物合成减少及其降解增加是导致叶绿素含量降低和果肉变黄的主要原因。

关键词: 中华猕猴桃品种‘Hort16A’; 果肉颜色; 叶绿素; 类胡萝卜素; 基因表达

中图分类号: Q946-33; Q786; S663.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)03-0001-10
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.03.01

Molecular mechanism of flesh color formation of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’ ZHANG Jiyu^①, PAN Delin^①, JIA Zhanhui, WANG Gang, WANG Tao, ZHAI Min, GUO Zhongren^② (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(3): 1-10

Abstract: Flesh color change during fruit development process (2-140 d after flowering and 7-16 d after harvesting) of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’ were observed, and contents of chlorophyll and carotenoid and expressions of their biosynthesis and degradation related genes from flesh of postharvest fruit were studied. The results show that flesh of *A. chinensis* ‘Hort16A’ is green during 2-140 d after flowering. During 7-16 d after harvesting, flesh color changes from green to yellow, chlorophyll content in flesh first increases and then decreases significantly, carotenoid content shows no significant variation, and carotenoid/chlorophyll ratio increases significantly at 16 d after harvesting. Relative expression levels of *CAO1*, *GluTR1*, *LHCB1*, *LHCB2*, *CBR1*, and *CLH1* genes of chlorophyll biosynthesis related genes from flesh at 12 d after harvesting increase significantly compared with those from flesh at 7 d after harvesting,

收稿日期: 2017-11-29

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK20171328)

作者简介: 张计育(1982—), 男, 山西沁县人, 博士, 副研究员, 主要从事猕猴桃种质资源收集和抗逆分子生物学方面的研究。

潘德林(1992—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事猕猴桃种质资源收集和利用方面的研究。

① 共同第一作者

② 通信作者 E-mail: zhongrenguo@cnbg.net

and then decrease significantly; relative expression levels of *PAO1*, *PAO2*, *PPH1*, *PPH2*, *PPH3*, *SGR1*, and *SGR2* genes of chlorophyll degradation related genes from flesh at 12–16 d after harvesting are significantly higher than those from flesh at 7 d after harvesting in general, indicating that decrease of chlorophyll content in flesh is the combination effects of biosynthesis decrease of chlorophyll and its degradation increase. Relative expression levels of *CrtISO1*, *ZISO1*, *LCYB2*, *CYP1*, and *CHY1* genes of carotenoid biosynthesis related genes from flesh during 12–16 d after harvesting increase significantly compared with those from flesh at 7 d after harvesting, and relative expression levels of *NCED1*, *NCED2*, *ZEP1*, and *CCD2* genes of carotenoid degradation related genes also increase significantly, indicating that biosynthesis and degradation of carotenoid reach a balance, which lead to no significant variation of carotenoid content. The correlation analysis result shows that chlorophyll content in flesh of postharvest fruit of *A. chinensis* ‘Hort16A’ shows a significantly positive correlation with relative expression level of *PAO2* gene at 0.05 level, but shows a significantly negative correlation with relative expression level of *SGR1* gene at 0.05 level; carotenoid content shows significantly positive correlations with relative expression levels of *LCYB2* and *CYP1* genes at 0.05 level; correlations among relative expression levels of several biosynthesis and degradation related genes of chlorophyll and carotenoid are significant at 0.05 or 0.01 level. It is suggested that biosynthesis decrease of chlorophyll and its degradation increase in flesh of postharvest fruit of *A. chinensis* ‘Hort16A’ are the major causes which lead to decrease of chlorophyll content and yellow of flesh.

Key words: *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’; flesh color; chlorophyll; carotenoid; gene expression

猕猴桃 (*Actinidia* spp.) 种质资源极其丰富, 果肉颜色变异丰富^[1], 包括浅绿色、深绿色、黄色、橙色、红色和紫色等^[2]。目前世界上主要栽培的中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 品种有 ‘Hort16A’ 和 ‘红阳’ (‘Hongyang’), 二者果肉颜色均为黄色。猕猴桃果肉颜色主要取决于猕猴桃果实中叶绿素、类胡萝卜素和花青素的含量, 在果实生长、成熟和软化过程中, 叶绿素、类胡萝卜素和花青素等色素的含量不断变化^[2]。黄肉中华猕猴桃果实发育早期果实中主要含叶绿素和类胡萝卜素, 随着果实发育、成熟和软化, 叶绿素降解, 而保留原有的类胡萝卜素, 果肉颜色变为黄色^[2]。研究猕猴桃果肉颜色以及色素的代谢和表达调控对于培育彩色猕猴桃新种质具有重要意义。已有研究者对猕猴桃果肉中部分叶绿素和类胡萝卜素的生物合成和降解相关基因的表达调控进行了分析^[3–4]。而有关叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解通路的所有基因尚未进行全面系统的研究和分析。Huang 等^[5]完成了中华猕猴桃品种 ‘红阳’ 的全基因组测序, 为系统研究猕猴桃果肉颜色形成的分子调控机制奠定了基础。

中华猕猴桃品种 ‘Hort16A’ 为黄肉中华猕猴桃品种之一。作者已对该品种在南京地区的生物学特性和果实发育规律进行了研究^[6]。在此基础上, 本研究对中华猕猴桃品种 ‘Hort16A’ 果实发育的动态变化进行了观察, 并选择采后贮藏过程中果肉颜色变

化的关键节点分析叶绿素和类胡萝卜素含量以及叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因的表达特性, 以期阐明中华猕猴桃品种 ‘Hort16A’ 果肉颜色形成的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

供试中华猕猴桃品种 ‘Hort16A’ 果实采自江苏省中国科学院植物研究所南京六合基地。于 2016 年 4 月 22 日至 9 月 7 日 (花后 2~140 d), 随机选取 5 株样株, 每株采集 5 个无病虫害且大小基本一致的果实, 每 7 d 采集 1 次, 并拍照记录。并于 9 月 7 日采收所有果实, 置于 (23±2) °C 恒温箱中, 每天观察果肉颜色, 根据果肉颜色的变化差异拍照和取样。每次取 10 个果实, 重复 3 次。

1.2 方法

1.2.1 叶绿素和类胡萝卜素含量测定 称取果肉混合样品约 5 g, 参考李合生^[7]的方法测定果肉中叶绿素和类胡萝卜素的含量。然后根据公式 “类胡萝卜素/叶绿素比 = 类胡萝卜素含量/叶绿素含量” 计算类胡萝卜素/叶绿素比。每次取 10 个果实, 重复测定 3 次。

1.2.2 基因表达特性分析 根据已报道的中华猕猴桃 ‘红阳’ 基因组数据库中叶绿素和类胡萝卜素生物

合成和降解相关基因的序列 (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/kiwi/home.cgi>), 利用 Beacon Designer 7.0 软件设计引物(表1), 引物由北京擎科新业生物科技有限公司合成。内参基因为猕猴桃 *Actin* 基因^[8], 引物为 Actin-F (5'-TGCATGAGCGATCAAGTTTCAAG-3') 和 Actin-R (5'-TGTCCCATGTCTGTTGATGACT-3')。

采用改良的 CTAB 法^[9] 提取果肉中的总 RNA, 利用能消除 RNA 中残留 DNA 的反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)[宝生物工程(大连)有限公司] 合成 cDNA, 具体操作参照说明书。实时荧光定量 PCR 反应参考文献[10] 的方法。反应体系包含 10 倍稀释 cDNA 1.0 μL、0.15 nmol · L⁻¹ 上游引物和下

表1 用于中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实中叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification of biosynthesis and degradation related genes of chlorophyll and carotenoid from fruit of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	
		正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
叶绿素生物合成和降解相关基因 Chlorophyll biosynthesis and degradation related genes			
<i>CAO1</i>	Achn353001	TCCCGTTCACATCTTACCATCCC	TTATTGAGCCAAGGTGAAGAGGAC
<i>GluTR1</i>	Achn041311	AGGTCAAACAAGTCGCAAAGTCG	CGGTGATTGCGTGTAAACAG
<i>LHCB1</i>	Achn154321	TTCGGGTTACAGCGGTTACAGG	ATCAGCGTGGTTATGGAGAAGGG
<i>LHCB2</i>	Achn152591	ATGGATTGAGTCTAGTCATTGG	TCTTCTTCTCTGGTCCGATGC
<i>RBCS1</i>	Achn311511	TCAAGACTCTCAACTGGCTTCAAC	CATCAAACCTCAAGGCAAGGGAACC
<i>CBR1</i>	Achn146001	GTGAACCTGATGATGTCGGAAG	TGTTCTGCCAGCATTGTTTATCC
<i>CLH1</i>	Achn378091	GCTCATCAGACACATCGCTTCC	CGTGGACTTGATCTCATCGGTTG
<i>CLH2</i>	Achn378101	TGTAATCGGGTTCGGTTTGG	AAGCCCTTGTCTCATCATCTAGC
<i>CLS1</i>	Achn001951	TTCAGTCACTTCTGTGGCTTTTG	CCAAGAAGAGCAAGGGCGTTATAC
<i>PAO1</i>	Achn068721	ACGCTCCGAATCTCTCCAACAG	CTTCCACTGCCTTCCCGACAC
<i>PAO2</i>	Achn212711	TGAAGGAGGGTCTGTGATGTC	CGTTTGGATAGGATGGTTGATGGC
<i>PPH1</i>	Achn193491	AGAGGATGAAAAGATCGTGAGAGG	CGAGCAACCAAGGAGCCAATTC
<i>PPH2</i>	Achn193501	GGAAGACGGTGTGATCTGGTAAC	TAGCCGCCTCAATCCATCTGC
<i>PPH3</i>	Achn334341	GGAAGACGGAAGATAGCGAGAGG	TGCCATACCAGAACCCAGGAC
<i>SGR1</i>	Achn361611	CCAAGAAGTACACACTCACACAC	ACCAACCCTGTAAGTGGGAATTG
<i>SGR2</i>	Achn284841	GCCACGAACCTACACCCTCTC	ACTTCTTCCACTCAGCAACAACG
类胡萝卜素生物合成和降解相关基因 Carotenoid biosynthesis and degradation related genes			
<i>PSY1</i>	Achn148841	CGACCATCTACAATGCTGCTCTC	ACTCTTTCCACCCATCACTCACC
<i>PSY2</i>	Achn335751	CGATGAGCGGGAGAAAGGAGTC	TCGTGAAGTTGTGTAGTCGTTGG
<i>CrtISO1</i>	Achn058301	TTTGATAACCTGGCATTGGAAGC	ACTCGGACGGAGAGATTGTTGG
<i>PTOX1</i>	Achn150731	GCTTGGTGGTTTGACCGCTTTC	GCTCCTCTCCTTGTGCCTTGATG
<i>ZDS1</i>	Achn274521	TAGTTGGAGTGCCTGTGTTACG	GCTTGCCCTTAGTTGCCCTTGATCG
<i>ZISO1</i>	Achn248961	GATGGTTGGGCAGGTGATTTGG	AATGACGCTTGTTCGGCTCTTC
<i>PDS1</i>	Achn199641	TGTGAACCTTGCCTGCCCTTAC	TTTCTTGAAGAAGACAGCACCTTCC
<i>LCYB1</i>	Achn198281	CGAGCGTTGTGTATTCTATAGG	GCTGCGGTAGAGTCCTTGC
<i>LCYB2</i>	Achn347121	GAGGCATTTGGGCATCAGAGTG	CTATGGCATCGGCTAGGACAGG
<i>LCYE1</i>	Achn061261	CACAAGAAAGGAAACGCCAGAGAG	CCCAGAAATCCCTGCCACATC
<i>CYP1</i>	Achn106371	GTTATCGGCTCGTATTGCTTCGG	ACTAATCGCTCCCTTTGCCTCAG
<i>CYP2</i>	Achn318041	CAGATTTTGCCTTGTTCCTTTCG	CATFGCCAGTGCTACCGTTGAC
<i>CHY1</i>	Achn011691	TCCTGCGATAGCCCTCCTCTC	GCCATCCCAAACCCGTTATTCC
<i>NCED1</i>	Achn061851	CAGAAAGCGGGCGCAATGG	GCGAAGTTCCCTGCGATTGCG
<i>NCED2</i>	Achn176351	TGGTGTACGACGAGAAGAAGACG	CAGAGGTGGAAGCAGAAGCAATC
<i>ZEP1</i>	Achn013171	GCCTGCTGATATTGAGACTGTTGG	AGGTTGCTCGTTGTGAAATGCG
<i>VDE1</i>	Achn368030	TTGTGGATGAGTTCAACGAGTGTG	AGAGTAGGATCAGGGACAGGAAAG
<i>VDE2</i>	Achn368041	GGTCTGAACCAACCCCTTGTAG	CCCACCTTCTCAACCTCCTCTTC
<i>CCD1</i>	Achn378731	AGAAGCGGAGGAGGAGAGG	CTGGTGTGGCTGTGAAGAATCG
<i>CCD2</i>	Achn276731	TGATGGCGGGTGGTTTGTCT	CTGTGTTGGCTACTATTGGATGCG

游引物以及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] [宝生物工程(大连)有限公司] 10.0 μ L, ddH₂O 补足至 20.0 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s、57 $^{\circ}$ C 退火 20 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 40 个循环。每个样品 3 次重复, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算各基因的相对表达量^[11]。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件处理数据, 采用 Duncan's 新复极差法进行显著性检验。实时荧光定量 PCR 数据采用 MeV 4.9.0 软件绘制热图。对叶绿素和类胡

萝卜素含量与其生物合成和降解相关基因相对表达量间以及叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因相对表达量间进行皮尔森相关性分析。

2 结果和分析

2.1 果实发育动态变化分析

中华猕猴桃品种 'Hort16A' 果实发育动态变化见图 1。由图 1 可见: 花后 2~140 d, 中华猕猴桃品种



1-25: 分别为花后 2、9、16、23、30、37、44、51、58、65、72、79、86、93、100、107、114、121、128、135 和 140 d 以及采后 7、12、14 和 16 d 的果实横切面
Transverse section of fruit at 2, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51, 58, 65, 72, 79, 86, 93, 100, 107, 114, 121, 128, 135, and 140 d after flowering, and 7, 12, 14, and 16 d after harvesting, respectively.

图 1 中华猕猴桃品种 'Hort16A' 果实发育动态变化
Fig. 1 Dynamic change of fruit development of *Actinidia chinensis* 'Hort16A'

‘Hort16A’的果肉为绿色,其中,花后 58 d,果实中种子开始变白;花后 79 d,种子为浅棕色;花后 93 d,种子开始变黑。花后 140 d 采收后,随着果实的成熟和软化,果肉颜色逐渐变黄。

2.2 果实采后果肉中叶绿素和类胡萝卜素含量的动态变化分析

根据中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉颜色的变化情况(图1),对采后7、12、14和16d果肉中叶绿素和类胡萝卜素含量分别进行了测定。结果(表2)表明:采后7~16d,中华猕猴桃品种‘Hort16A’果肉中叶绿素含量呈先升高后降低的变化趋势,采后16d(果肉完全变成黄色),果肉中叶绿素含量显著降低;采后12~16d,果肉中类胡萝卜素含量较采后7d升高,但差异未达到显著水平;而果肉中类胡萝卜素/叶绿素比呈逐渐升高的变化趋势,且在采后16d显著升高。

表2 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中色素含量变化($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 2 Change of pigment content in flesh of postharvest fruit of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’ ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

采后天数/d Days after harvesting	色素含量/(mg·kg ⁻¹) Pigment content		类胡萝卜素/ 叶绿素比 Carotenoid/ chlorophyll ratio
	叶绿素 Chlorophyll	类胡萝卜素 Carotenoid	
7	0.094±0.012a	0.028±0.006a	0.303±0.073b
12	0.135±0.017a	0.043±0.007a	0.327±0.067b
14	0.140±0.017a	0.052±0.010a	0.375±0.089b
16	0.024±0.007b	0.045±0.013a	2.029±0.850a

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$).

2.3 果实采后果肉中叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因的表达特性分析

中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素生物合成相关基因 *CAO1*、*GluTR1*、*LHCB1*、*LHCB2*、*RBCS1*、*CBR1*、*CLH1*、*CLH2* 和 *CLS1*, 叶绿素降解相关基因 *PAO1*、*PAO2*、*PPH1*、*PPH2*、*PPH3*、*SGR1* 和 *SGR2*, 类胡萝卜素生物合成相关基因 *PSY1*、*PSY2*、*CrtISO1*、*PTOX1*、*ZDS1*、*ZISO1*、*PDS1*、*LCYB1*、*LCYB2*、*LCYE1*、*CYP1*、*CYP2* 和 *CHY1* 以及类胡萝卜素降解相关基因 *NCED1*、*NCED2*、*ZEP1*、*VDE1*、*VDE2*、*CCD1* 和 *CCD2* 的表达特性见图2。

2.3.1 叶绿素生物合成和降解相关基因的表达特性分析 由图2-A可见:采后12d叶绿素生物合成相

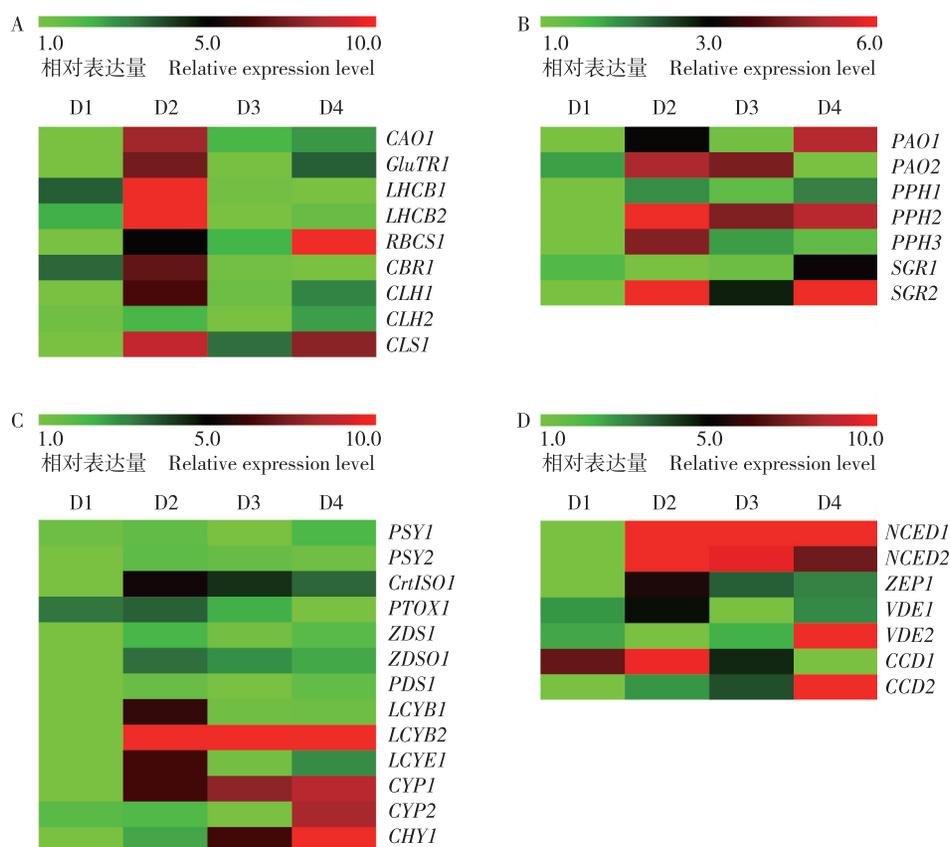
关基因中 *CAO1*、*GluTR1*、*LHCB1*、*LHCB2*、*CBR1* 和 *CLH1* 基因的相对表达量较采后7d的相对表达量显著升高,之后显著降低;采后7~16d,*RBCS1* 和 *CLS1* 基因的相对表达量呈先升高后降低再升高的变化趋势;采后7~16d,*CLH2* 基因的相对表达量无显著变化。

由图2-B可见:采后7~16d,叶绿素降解相关基因中 *PAO2*、*PPH2* 和 *PPH3* 基因的相对表达量呈先显著升高后降低的变化趋势;*PAO1*、*PPH1* 和 *SGR2* 基因的相对表达量呈先升高后降低再升高的变化趋势;采后16d,*SGR1* 基因的相对表达量显著升高。总体上看,*PAO1*、*PPH1*、*PPH2*、*SGR1* 和 *SGR2* 基因在采后16d的相对表达量显著高于采后7d的相对表达量。
2.3.2 类胡萝卜素生物合成和降解相关基因的表达特性分析 由图2-C可见:采后7~16d,类胡萝卜素生物合成相关基因中 *CrtISO1*、*ZISO1* 和 *LCYB1* 基因的相对表达量呈先升高后降低的变化趋势;*CYP1* 和 *CHY1* 基因的相对表达量呈逐渐升高的变化趋势;*LCYB2* 基因的相对表达量显著升高;*CYP2* 基因的相对表达量在采后16d显著升高;*LCYE1* 基因的相对表达量则呈先升高后降低再升高的变化趋势;*PSY1*、*PSY2*、*ZDS1* 和 *PDS1* 基因的相对表达量无显著变化;*PTOX1* 基因的相对表达量呈逐渐降低的变化趋势。总体上看,*CrtISO1*、*ZISO1*、*LCYB2*、*CYP1* 和 *CHY1* 基因在采后12~16d的相对表达量显著高于采后7d的相对表达量。

由图2-D可见:采后7~16d,类胡萝卜素降解相关基因中 *NCED1*、*NCED2*、*ZEP1* 和 *CCD2* 基因的相对表达量显著升高,*VDE1* 基因的相对表达量呈先升高后显著降低再升高的变化趋势,*VDE2* 基因的相对表达量呈先降低后升高的变化趋势,*CCD1* 基因的相对表达量呈先升高后显著降低的变化趋势。

2.4 相关性分析

中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素和类胡萝卜素含量与其生物合成和降解相关基因相对表达量间的相关性分析分别见表3和表4。结果表明:中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素含量与叶绿素降解相关基因中 *PAO2* 基因的相对表达量在0.05水平上显著正相关,与叶绿素降解相关基因中 *SGR1* 基因的相对表达量在0.05水平上显著负相关。果肉中类胡萝卜素含量与类胡萝卜素生物合成相关基因中 *LCYB2* 和 *CYP1* 基因的相



D1, D2, D3, D4: 分别为采后 7、12、14 和 16 d Representing 7, 12, 14, and 16 d after harvesting, respectively.

A: 叶绿素生物合成相关基因 Chlorophyll biosynthesis related genes; B: 叶绿素降解相关基因 Chlorophyll degradation related genes; C: 类胡萝卜素生物合成相关基因 Carotenoid biosynthesis related genes; D: 类胡萝卜素降解相关基因 Carotenoid degradation related genes.

图 2 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因的表达特性
Fig. 2 Expression characteristics of biosynthesis and degradation related genes of chlorophyll and carotenoid from flesh of postharvest fruit of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’

对表达量在 0.05 水平上显著正相关。

中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因相对表达量间的相关性分析分别见表 5 和表 6。结果显示：中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素

和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因中个别基因相对表达量间在 0.05 或 0.01 水平上显著相关。其中,叶绿素生物合成和降解相关基因中, *CAO1* 基因的相对表达量与 *GluTR1*、*LHCB1*、*LHCB2*、*CLH1* 和 *PPH3* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关,

表 3 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素含量与叶绿素生物合成和降解相关基因相对表达量间的相关性分析
Table 3 Analysis on correlation between chlorophyll content and relative expression levels of chlorophyll biosynthesis and degradation related genes from flesh of postharvest fruit of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’

指标 Index	与不同基因相对表达量的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient with relative expression levels of different genes ¹⁾							
	<i>CAO1</i>	<i>GluTR1</i>	<i>LHCB1</i>	<i>LHCB2</i>	<i>RBCS1</i>	<i>CBR1</i>	<i>CLH1</i>	<i>CLH2</i>
叶绿素含量 Chlorophyll content	0.350	0.072	0.474	0.440	-0.763	0.483	0.146	-0.655
指标 Index	与不同基因相对表达量的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient with relative expression levels of different genes ¹⁾							
	<i>CLS1</i>	<i>PAO1</i>	<i>PAO2</i>	<i>PPH1</i>	<i>PPH2</i>	<i>PPH3</i>	<i>SGR1</i>	<i>SGR2</i>
叶绿素含量 Chlorophyll content	-0.180	-0.744	0.908*	-0.388	0.092	0.535	-0.972*	-0.865

¹⁾ * : 表示在 0.05 水平上显著相关 Indicating the significant correlation at 0.05 level.

表 4 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中类胡萝卜素含量与类胡萝卜素生物合成和降解相关基因相对表达量间的相关性分析
Table 4 Analysis on correlation between carotenoid content and relative expression levels of carotenoid biosynthesis and degradation related genes from flesh of postharvest fruit of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’

指标 Index	与不同基因相对表达量的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient with relative expression levels of different genes ¹⁾									
	<i>PSY1</i>	<i>PSY2</i>	<i>CrtISO1</i>	<i>PTOX1</i>	<i>ZDS1</i>	<i>ZISO1</i>	<i>PDS1</i>	<i>LCYB1</i>	<i>LCYB2</i>	<i>LCYE1</i>
类胡萝卜素含量 Carotenoid content	-0.065	0.767	0.828	-0.452	0.335	0.823	0.235	0.150	0.940*	0.194

指标 Index	与不同基因相对表达量的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient with relative expression levels of different genes ¹⁾									
	<i>CYP1</i>	<i>CYP2</i>	<i>CHY1</i>	<i>NCED1</i>	<i>NCED2</i>	<i>ZEP1</i>	<i>VDE1</i>	<i>VDE2</i>	<i>CCD1</i>	<i>CCD2</i>
类胡萝卜素含量 Carotenoid content	0.925*	0.106	0.623	0.549	0.467	0.679	-0.285	0.151	-0.328	0.390

¹⁾ * : 表示在 0.05 水平上显著相关 Indicating the significant correlation at 0.05 level.

表 5 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中叶绿素生物合成和降解相关基因相对表达量间的相关性分析
Table 5 Analysis on correlation among relative expression levels of chlorophyll biosynthesis and degradation related genes from flesh of postharvest fruit of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’

相对表达量 Relative expression level	不同基因相对表达量间的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient among relative expression levels of different genes ¹⁾							
	<i>CAO1</i>	<i>GluTR1</i>	<i>LHCB1</i>	<i>LHCB2</i>	<i>RBCS1</i>	<i>CBR1</i>	<i>CLH1</i>	<i>CLH2</i>
<i>CAO1</i>	1.000							
<i>GluTR1</i>	0.959*	1.000						
<i>LHCB1</i>	0.920*	0.851	1.000					
<i>LHCB2</i>	0.964*	0.903*	0.991**	1.000				
<i>RBCS1</i>	0.214	0.440	-0.090	0.012	1.000			
<i>CBR1</i>	0.798	0.728	0.970*	0.930*	-0.244	1.000		
<i>CLH1</i>	0.978*	0.997**	0.869	0.922*	0.392	0.740	1.000	
<i>CLH2</i>	0.475	0.699	0.268	0.344	0.915*	0.148	0.647	1.000
<i>CLS1</i>	0.803	0.895	0.540	0.639	0.745	0.347	0.886	0.841
<i>PAO1</i>	0.308	0.539	0.035	0.128	0.989**	-0.110	0.488	0.964*
<i>PAO2</i>	0.637	0.394	0.617	0.634	-0.422	0.529	0.467	-0.321
<i>PPH1</i>	0.636	0.775	0.331	0.440	0.881	0.133	0.754	0.903*
<i>PPH2</i>	0.779	0.776	0.472	0.584	0.573	0.244	0.796	0.583
<i>PPH3</i>	0.978*	0.880	0.933*	0.965*	0.026	0.824	0.914*	0.284
<i>SGR1</i>	-0.340	-0.080	-0.550	-0.485	0.834	-0.602	-0.145	0.654
<i>SGR2</i>	0.026	0.272	-0.260	-0.165	0.981**	-0.383	0.217	0.857

相对表达量 Relative expression level	不同基因相对表达量间的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient among relative expression levels of different genes ¹⁾							
	<i>CLS1</i>	<i>PAO1</i>	<i>PAO2</i>	<i>PPH1</i>	<i>PPH2</i>	<i>PPH3</i>	<i>SGR1</i>	<i>SGR2</i>
<i>CAO1</i>								
<i>GluTR1</i>								
<i>LHCB1</i>								
<i>LHCB2</i>								
<i>RBCS1</i>								
<i>CBR1</i>								
<i>CLH1</i>								
<i>CLH2</i>								
<i>CLS1</i>	1.000							
<i>PAO1</i>	0.791	1.000						
<i>PAO2</i>	0.229	-0.400	1.000					
<i>PPH1</i>	0.970*	0.904*	0.029	1.000				
<i>PPH2</i>	0.918*	0.583	0.501	0.868	1.000			
<i>PPH3</i>	0.684	0.115	0.774	0.489	0.724	1.000		
<i>SGR1</i>	0.257	0.789	-0.824	0.475	0.052	-0.520	1.000	
<i>SGR2</i>	0.602	0.957*	-0.578	0.773	0.414	-0.166	0.925*	1.000

¹⁾ * : 表示在 0.05 水平上显著相关 Indicating the significant correlation at 0.05 level; ** : 表示在 0.01 水平上显著相关 Indicating the significant correlation at 0.01 level.

表 6 中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采后果肉中类胡萝卜素生物合成和降解相关基因相对表达量间的相关性分析
 Table 6 Analysis on correlation among relative expression levels of carotenoid biosynthesis and degradation related genes from flesh of postharvest fruit of *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’

相对表达量 Relative expression level	不同基因相对表达量间的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient among relative expression levels of different genes ¹⁾									
	<i>PSY1</i>	<i>PSY2</i>	<i>CrtISO1</i>	<i>PTOX1</i>	<i>ZDS1</i>	<i>ZISO1</i>	<i>PDS1</i>	<i>LCYB1</i>	<i>LCYB2</i>	<i>LCYE1</i>
<i>PSY1</i>	1.000									
<i>PSY2</i>	0.000	1.000								
<i>CrtISO1</i>	0.104	0.987**	1.000							
<i>PTOX1</i>	-0.442	0.114	-0.042	1.000						
<i>ZDS1</i>	0.716	0.667	0.708	-0.058	1.000					
<i>ZISO1</i>	0.121	0.986**	1.000**	-0.045	0.721	1.000				
<i>PDS1</i>	0.932*	0.361	0.457	-0.397	0.902*	0.472	1.000			
<i>LCYB1</i>	0.236	0.740	0.678	0.541	0.792	0.684	0.468	1.000		
<i>LCYB2</i>	-0.122	0.933*	0.950*	-0.141	0.466	0.944*	0.233	0.448	1.000	
<i>LCYE1</i>	0.515	0.704	0.688	0.289	0.938*	0.699	0.719	0.951*	0.428	1.000
<i>CYP1</i>	0.304	0.663	0.769	-0.668	0.520	0.770	0.542	0.131	0.813	0.288
<i>CYP2</i>	0.868	-0.175	-0.025	-0.817	0.410	-0.012	0.760	-0.217	-0.111	0.096
<i>CHY1</i>	0.473	0.127	0.281	-0.970*	0.245	0.284	0.512	-0.344	0.356	-0.095
<i>NCED1</i>	0.766	0.609	0.706	-0.453	0.912*	0.717	0.940*	0.501	0.545	0.721
<i>NCED2</i>	0.163	0.920*	0.881	0.351	0.804	0.885	0.473	0.944*	0.717	0.906*
<i>ZEP1</i>	0.174	0.980**	0.974*	0.120	0.798	0.976*	0.513	0.826	0.861	0.826
<i>VDE1</i>	0.620	0.288	0.259	0.408	0.785	0.274	0.661	0.819	-0.054	0.879
<i>VDE2</i>	0.721	-0.272	-0.115	-0.917*	0.204	-0.106	0.592	-0.433	-0.126	-0.133
<i>CCD1</i>	-0.304	0.299	0.153	0.973*	0.167	0.152	-0.202	0.719	0.010	0.497
<i>CCD2</i>	0.735	0.007	0.166	-0.927*	0.392	0.175	0.708	-0.248	0.146	0.051

相对表达量 Relative expression level	不同基因相对表达量间的相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient among relative expression levels of different genes ¹⁾									
	<i>CYP1</i>	<i>CYP2</i>	<i>CHY1</i>	<i>NCED1</i>	<i>NCED2</i>	<i>ZEP1</i>	<i>VDE1</i>	<i>VDE2</i>	<i>CCD1</i>	<i>CCD2</i>
<i>PSY1</i>										
<i>PSY2</i>										
<i>CrtISO1</i>										
<i>PTOX1</i>										
<i>ZDS1</i>										
<i>ZISO1</i>										
<i>PDS1</i>										
<i>LCYB1</i>										
<i>LCYB2</i>										
<i>LCYE1</i>										
<i>CYP1</i>	1.000									
<i>CYP2</i>	0.466	1.000								
<i>CHY1</i>	0.825	0.793	1.000							
<i>NCED1</i>	0.778	0.655	0.620	1.000						
<i>NCED2</i>	0.415	-0.185	-0.118	0.611	1.000					
<i>ZEP1</i>	0.637	-0.065	0.123	0.710	0.964*	1.000				
<i>VDE1</i>	-0.120	0.149	-0.306	0.499	0.626	0.460	1.000			
<i>VDE2</i>	0.475	0.970*	0.862	0.519	-0.360	-0.202	-0.096	1.000		
<i>CCD1</i>	-0.514	-0.737	-0.895	-0.239	0.548	0.326	0.557	-0.877	1.000	
<i>CCD2</i>	0.692	0.952*	0.939*	0.708	-0.116	0.070	-0.036	0.960*	-0.835	1.000

¹⁾ * : 表示在 0.05 水平上显著相关 Indicating the significant correlation at 0.05 level; ** : 表示在 0.01 水平上显著相关 Indicating the significant correlation at 0.01 level.

RBCS1 基因的相对表达量与 *CLH2*、*PAO1* 和 *SGR2* 基因的相对表达量在 0.05 或 0.01 水平上显著正相关,

PAO1 基因的相对表达量还与 *CLH2*、*PPH1* 和 *SGR2* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, *SGR1*

基因的相对表达量与 *SGR2* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, *PAO2* 基因的相对表达量与其他叶绿素生物合成和降解相关基因的相对表达量的相关性均不显著。类胡萝卜素生物合成和降解相关基因中, *PSY1* 基因的相对表达量与 *PDS1* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, *PSY2* 基因的相对表达量与 *CrtISO1*、*ZISO1*、*LCYB2*、*NCED2* 和 *ZEP1* 基因的相对表达量在 0.05 或 0.01 水平上显著正相关, *ZDS1* 基因的相对表达量与 *PDS1*、*LCYE1* 和 *NCED1* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, *PDS1* 基因的相对表达量还与 *NCED1* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, *LCYB1* 基因的相对表达量与 *LCYE1* 和 *NCED2* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, *LCYB2* 基因的相对表达量还与 *CrtISO1* 和 *ZISO1* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关, *CYP1* 基因的相对表达量与其他类胡萝卜素生物合成和降解相关基因的相对表达量的相关性均不显著。

3 讨论和结论

猕猴桃果实发育早期,果肉颜色为绿色。随着果实发育,黄肉猕猴桃果肉色度显著降低,变为黄色,而绿肉猕猴桃果肉仍呈绿色,色度变化较小^[3]。中华猕猴桃品种‘金丰’(‘Jinfeng’)在花后 130~140 d,色度迅速降低,果实变软,可溶性固形物含量增加,果肉颜色由绿变黄^[12]。叶绿素和类胡萝卜素是黄肉猕猴桃果实中的主要色素,其含量决定了果肉颜色^[2]。黄肉猕猴桃果实成熟和软化过程中,果肉中的叶绿素降解成无色的叶绿素中间产物,剩下黄色的类胡萝卜素^[4]。中华猕猴桃品种‘Hort16A’在果实采后成熟和软化过程中,果肉逐渐变黄,叶绿素含量先升高后显著降低,类胡萝卜素含量有所升高但无显著变化,说明其果肉中叶绿素含量降低是果肉变黄的主要原因。

叶绿素代谢分为叶绿素生物合成、叶绿素循环和叶绿素降解 3 个阶段^[13]。Pilkington 等^[3]研究认为,叶绿素生物合成相关基因中 *RBCS* 和 *CAO* 基因在黄肉猕猴桃中相对表达量的降低导致叶绿素生物合成下降。叶绿素降解相关基因中 *PAO* 基因编码的蛋白质可以催化脱镁叶绿素 *a* 为叶绿素分解物,使果肉中绿色减少^[14],该基因在黄肉中华猕猴桃和绿肉美味

猕猴桃[*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.]中均表达,但是在黄肉猕猴桃果实发育阶段其相对表达量更高,是叶绿素降解的关键基因。*SGR* 基因同样也是叶绿素降解的关键基因,可以通过激发 PPH、PAO 和 RCCR 等多个叶绿素降解酶(chlorophyll catabolic enzymes, CCEs)和捕光复合物 II (light-harvesting complex II, LHC II)相互作用,形成 SGR-CCE-LHC II 复合体,从而促使叶绿素从 LHC II 上解离,进入降解途径^[15]。本研究中,中华猕猴桃品种‘Hort16A’果肉中叶绿素含量与 *PAO2* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关,与 *SGR1* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著负相关,与上述研究结果存在异同,具体原因需进行进一步研究。本研究中,中华猕猴桃品种‘Hort16A’果肉中 *CAO1*、*GluTR1*、*LHCB1*、*LHCB2*、*CBR1* 和 *CLH1* 6 个叶绿素生物合成相关基因的相对表达量随着叶绿素的降解显著降低,而 *PAO1*、*PAO2*、*PPH1*、*PPH2*、*PPH3*、*SGR1* 和 *SGR2* 7 个叶绿素降解相关基因在果实采后 12~16 d 的相对表达量总体上显著高于采后 7 d 的相对表达量,推测这是造成果肉中叶绿素含量降低的原因。

类胡萝卜素在植物果实中积累,可以使果实呈现黄色、橙色或红色^[16]。植物体内类胡萝卜素的生物合成途径在物种间相对保守^[17-19]。但类胡萝卜素生物合成的调控机制在不同物种间存在差异。辣椒(*Capsicum annuum* Linn.)中 *PSY* 和 *PDS* 基因的相对表达量高,类胡萝卜素含量高^[20]。甜橙[*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck]中 *PDS* 基因的相对表达量与类胡萝卜素含量正相关^[21]。大籽猕猴桃(*Actinidia macrosperma* C. F. Liang)中 *PSY*、*ZDS* 和 *LCYB* 等基因的相对表达量升高,类胡萝卜素含量升高^[4]。大籽猕猴桃和黑蕊猕猴桃(*Actinidia melanandra* Franch.)杂交后代中,随着果实发育进程类胡萝卜素含量升高,同时 *LCYB* 基因的相对表达量升高,并且在高类胡萝卜素含量或低类胡萝卜素含量基因型中相对表达量差异大,说明 *LCYB* 基因在类胡萝卜素的积累过程中起着非常重要的作用^[4]。本研究中,中华猕猴桃品种‘Hort16A’果肉中类胡萝卜素含量与 *LCYB2* 基因的相对表达量在 0.05 水平上显著正相关,与上述研究结果一致。在采后 7~16 d,中华猕猴桃品种‘Hort16A’果肉颜色逐渐变黄,类胡萝卜素含量升高但无显著变化,而类胡萝卜素生物合成相关基因中 *CrtISO1*、*ZISO1*、*LCYB2*、*CYP1* 和 *CHY1* 基因的相对表

达量以及类胡萝卜素降解相关基因中 *NCED1*、*NCED2*、*ZEP1* 和 *CCD2* 基因的相对表达量均显著升高,说明可能是类胡萝卜素生物合成和降解达到了平衡。

综上所述,中华猕猴桃品种‘Hort16A’果实采收后贮藏过程中,果肉中叶绿素生物合成减少和叶绿素降解增加导致叶绿素含量降低,是果肉变黄的主要原因。建议选择猕猴桃果肉中叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解中的关键基因进行功能分析,并对其调控机制进行深入研究。此外,叶绿素和类胡萝卜素生物合成和降解相关基因中个别基因的相对表达量间存在显著相关性,而这些基因间的联系尚未见报道,需要通过进一步的实验进行验证。

参考文献:

- [1] HUANG H. Kiwifruit: the Genus *Actinidia* [M]. Beijing: Science Press, 2016: 239–263.
- [2] 张计育, 莫正海, 宣继萍, 等. 猕猴桃果肉颜色相关色素代谢研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(13): 77–85.
- [3] PILKINGTON S M, MONTEFIORI M, JAMESON P E, et al. The control of chlorophyll levels in maturing kiwifruit[J]. *Planta*, 2012, 236: 1615–1628.
- [4] AMPOMAH-DWAMENA C, MCGHIE T, WIBISONO R, et al. The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60: 3765–3779.
- [5] HUANG S, DING J, DENG D, et al. Draft genome of the kiwifruit *Actinidia chinensis* [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2640.
- [6] 张计育, 潘德林, 王涛, 等. 中华猕猴桃品种‘Hort16A’的果实发育特征[J]. 植物资源与环境学报, 2017, 26(3): 109–111.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134–137.
- [8] YIN X R, ALLAN A C, XU Q, et al. Differential expression of kiwifruit *ERF* genes in response to postharvest abiotic stress [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 66: 1–7.
- [9] 张计育, 杜小丽, 渠慎春, 等. 一种简便的同步提取烟草叶片 DNA 和总 RNA 的方法 [J]. 上海农业学报, 2011, 27(3): 140–143.
- [10] ZHANG J, MO Z, LI Y, et al. Cloning and functional analysis of the MADS-box *CiMADS9* gene from *Carya illinoensis* [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2015, 1: 11–16.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [12] MONTEFIORI M, MCGHIE T K, HALLETT I C, et al. Changes in pigments and plastid ultrastructure during ripening of green-fleshed and yellow-fleshed kiwifruit [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 119: 377–387.
- [13] ECKHARDT U, GRIMM B, HÖRTENSTEINER S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56: 1–14.
- [14] PRUŽINSKÁ A, TANNER G, ANDERS I, et al. Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the *accelerated cell death 1* gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 15259–15264.
- [15] SCHELBERT S, AUBRY S, BURLA B, et al. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21: 767–785.
- [16] SUZUKI S, NISHIHARA M, NAKATSUKA T, et al. Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26: 951–959.
- [17] HENARE S J. The nutritional composition of kiwifruit (*Actinidia* spp.) [M] // SIMMONDS M S J, PREEDY V R. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. San Diego: Elsevier Science Press, 2016: 337–370.
- [18] KARPPINEN K, ZORATTI L, SARALA M, et al. Carotenoid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development under different light conditions is regulated by biosynthesis and degradation [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16: 95.
- [19] KITA M, KATO M, BAN Y, et al. Carotenoid accumulation in Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold & Zucc.): molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55: 3414–3420.
- [20] HA S H, KIM J B, PARK J S, et al. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58: 3135–3144.
- [21] FANCIULLINO A L, CERĆOS M, DHIQUE-MAYER C, et al. Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 3628–3638.

(责任编辑: 张明霞)