



ISSN 0513-353X

CN11-1924/S

CODEN YUHPAA

# ACTA HORTICULTURAE SINICA

# 园艺学报

第46卷

Vol. 46

第6期

No. 6

# 2019

中国园艺学会 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 主办

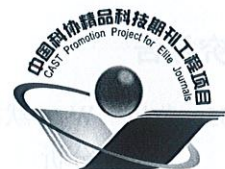
Sponsored by the Chinese Society for Horticultural Science and  
Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences





# 园艺学报

## YUANYI XUEBAO



2019年6月 第46卷 第6期

### 目次

#### 研究论文

- 1021 苹果 WUSCHEL-related homeobox (WOX) 家族基因的鉴定与分析 王楚堃 韩朋良 王咏梅 王鹏飞 胡大刚
- 1033 苹果乙烯响应因子 MdERF1B-like 的克隆与功能鉴定 张 静 慈志娟 许海峰 姜生辉 房鸿成  
王意程 张宗营 杨官显 陈学森
- 1045 中国华北和东北地区杏种质资源遗传多样性分析 刘 硕 刘 宁 章秋平 张玉萍 张玉君  
徐 铭 马小雪 刘威生
- 1057 贮藏温度对砂糖橘果皮表面结构及蜡质的影响 徐呈祥 吴秀兰 马艳萍 郑福庆 叶思敏  
陈小婷
- 1068 柑橘 4CL 基因家族的结构及其功能分析 申晚霞 王志彬 薛 杨 赵婉彤 朱世平  
赵晓春
- 1079 基于叶球转录组数据比较的甘蓝杂种优势分析 李升娟 许忠民 郭 佳 张恩慧 姜 娇  
石汶汶
- 1093 黄瓜 SAUR 基因家族的鉴定与表达分析 王红飞 尚庆茂
- 1112 辣椒反向温敏雄性核不育突变体 E6421S 不育特征及遗传规律研究 冯文鹏 周书栋 杨博智 易 婷 谢玲玲  
刘 峰 马艳青
- 1123 建兰 *AGL6* 基因的表达及功能分析 吴菁华 杨 超 吴少华
- 1134 桂花 *O/SVP* 响应环境低温对花芽分化的影响 朱益民 王千千 董 彬 张 超 赵宏波
- 1145 金花茶和白色山茶及其 3 个杂交品种类黄酮成分与花色的关系 李辛雷 王佳童 孙振元 王 洁 殷恒福  
范正琪 李纪元

# 柑橘 4CL 基因家族的结构及其功能分析

申晚霞, 王志彬, 薛 杨, 赵婉彤, 朱世平, 赵晓春\*

(中国农业科学院/西南大学柑桔研究所, 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

**摘 要:** 植物中编码类黄酮和木质素生物合成关键酶, 4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶 (4CL) 的基因通常是家族基因。通过生物信息分析, 从克里曼丁橘 (*Citrus clementina*) 基因组数据库中筛选出若干条拟为 4CL 基因的序列。通过对其蛋白结构进行分析, 发现其中仅有 3 个基因具有典型的 4CL 家族基因的特性。聚类分析结果表明柑橘 *Cit4CL1* 聚到 Class I, *Cit4CL2* 和 *Cit4CL3* 聚到 Class II。利用荧光定量 PCR (qPCR) 对北京柠檬不同组织和发育过程中的果实 *Cit4CL* 的表达进行分析, 发现各成员的表达存在明显的差异, 其中 *Cit4CL1* 的表达水平与类黄酮含量呈显著正相关, 说明该基因对调控柑橘类黄酮的生物合成具有重要作用。*Cit4CL2* 和 *Cit4CL3* 的表达与类黄酮的含量相关性不显著, 但其表达的组织特异性和木质素生物合成较为活跃的组织明显相关, 表明这两个基因是与木质素生物合成相关的基因。

**关键词:** 柑橘; 4CL; 生物信息学分析; 黄酮; 木质素; 表达

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 06-1068-11

## Characterization of 4-coumarate: CoA Ligase (4CL) Gene Family in *Citrus*

SHEN Wanxia, WANG Zhibin, XUE Yang, ZHAO Wantong, ZHU Shiping, and ZHAO Xiaochun\*

(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Southwest University, National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** 4-coumarate co-enzyme A ligase (4CL) gene is a gene family in the plants. It is responsible for biosynthesis of flavonoides and lignin. A group of 4CL-like genes have been discovered from the genomic database of *Citrus clementina*. Analysis of their protein structures indicated that only three genes possessed typical characters of 4CL family. Phylogenetic relationship analysis divided those three citrus *Cit4CL* genes into two groups: Class I and Class II. Gene expression profiles in Meyer lemon [*C. limon* (L.) Burm. f.] demonstrated a tissue-specific and temporal-specific fashion. The expression of *Cit4CL1* was highly positively correlated with the concentration of flavonoids, indicating that this gene is important in the biosynthesis of flavonoids. However, the expression of the *Cit4CL2* and *Cit4CL3* genes did not relate to the flavonoids contents, but showed strong relationship with the tissues where the lignin biosynthesis occur red. This suggested that those two genes could be involved in the lignification. This study provided the basic information on function of 4CL family genes in citrus.

**Keywords:** *Citrus*; 4CL; bioinformatic analysis; flavonoids; lignin; expression

收稿日期: 2019-03-09; 修回日期: 2019-06-11

**基金项目:** 中央高校基本业务费项目 (XDJK2016C143); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目 (cstc2016shms-ztx80002, cstc2016shms-ztx80004); 重庆市现代山地特色高效农业技术体系创新团队建设计划项目; 国家重点研发计划项目 (2018YFD1000101); 西南大学双一流学科建设项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhaoxiaochun@cric.cn)

类黄酮是植物中一类重要的多酚类次生代谢物质, 具有强烈的生物活性, 在果实的色泽和风味, 植物抗逆性和抗病虫害等方面有重要作用 (Sun et al., 2013a; Golawska et al., 2014)。4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶 (4CL) 是类黄酮、木质素生物合成的关键酶之一, 位于苯丙氨酸代谢途径的最末端, 催化相应的肉桂酸及其羟基或甲氧基衍生物生成相应的辅酶 A 酯, 来自不同 4CL 的中间产物会分别被分配至类黄酮或木质素等苯丙烷类衍生物的代谢支路进行类黄酮或木质素的合成。植物中编码 4CL 的基因通常以基因家族形式存在, 编码 2~5 种同工酶 (Lindermayr et al., 2002; Gui et al., 2011; Sun et al., 2013b)。根据所编码蛋白的功能, 4CL 基因可以分为两组: Class I 和 Class II, 其中 Class I 与木质素合成相关, Class II 参与类黄酮生物合成 (Gui et al., 2011)。

由于木质素的重要生物学功能和经济价值, 对 4CL 在木质素生物合成中的重要作用已经有了较深入的研究 (周建英 等, 2010; Li et al., 2013; Hue et al., 2016), 从而也促进了对植物 4CL 基因的认识。自 1987 年从欧芹 (*Petroselinum hortense*) 中克隆得到第 1 个 4CL 基因 (Douglas et al., 1987), 目前已经在几十种植物中克隆出了 4CL 基因 (NCBI 数据)。研究发现, 4CL 的蛋白质序列中存在有几个保守的多肽序列, 其中多肽序列 Box I (SSGTTGLPKG V) 和 Box II (GEICIRG) 几乎完全保守 (Schneider et al., 2003)。4CL 属于调控基因, 对其表达调控的研究指出, 4CL 基因的表达主要受植物发育的影响 (Osakabe et al., 2009), 在植物不同发育阶段、不同组织中的表达存在差异 (Lois & Hahlbrock, 1992; Hu et al., 1998; Ehlting et al., 1999; Gui et al., 2011)。

4CL 的功能在多种植物中均有报道。拟南芥有 *At4CL1*、*At4CL2*、*At4CL3* 和 *At4CL5* (许多文献中也称为 *At4CL4*) 等 4 个编码具有催化活性蛋白的 4CL 基因 (Costa et al., 2005); 其中, *At4CL3* 调控拟南芥类黄酮的合成, 在花、成熟叶片中高表达 (Soltani et al., 2006)。*At4CL3* 受光诱导调控, 蓝光能诱导其表达, 在拟南芥中调控类黄酮的合成, 表现出具有昼夜节律性的调控模式 (林建中, 2009)。研究缺失突变体发现, *At4CL3* 对拟南芥的开花时间等也具有重要的调节作用 (林建中, 2009)。通过对水稻 (*Oryza sativa*) 的 5 种 4CL 基因进行分析, 确定 *Os4CL2* 参与水稻类黄酮的生物合成 (Sun et al., 2013b)。*Os4CL2* 在水稻中的表达有组织特异性, 在花药中表达量最高 (Sun et al., 2013b)。大豆 (*Glycine max*) 中与类黄酮生物合成相关的基因 *Gm4CL3* 和 *Gm4CL4* 在根和上胚轴中的表达量较高 (Lindermayr et al., 2002)。山杨 (*Populus tremuloides*) 中与类黄酮生物合成相关的 *Pt4CL2* 在叶和茎的表皮中高表达 (Harding et al., 2002)。在芸香科芸香属的芸香 (*Ruta graveolens* L.) 中调控类黄酮生物合成的 *Rg4CL1* 在花中表达量最高, 其次是在茎中; 而调控木质素合成的 *Rg4CL2* 的表达在不同时期、不同组织中都相对稳定 (Endler et al., 2008)。

柑橘富含多种类黄酮, 是人类膳食中多酚类物质的重要来源 (Durand-Hulak et al., 2015)。柑橘用于医药已有 2 000 多年历史, 其药用价值和类黄酮的含量密切相关 (童红梅, 2012), 由柑橘加工而来的陈皮、青皮、枳实和化橘红等都是著名的传统中药, 它们均含有较高水平的类黄酮。现代医学研究进一步证明, 柑橘类黄酮, 如多甲氧黄酮等具有特有的生理活性 (Sergeev et al., 2007; Akachi et al., 2010; Du & Chen, 2010; Lee et al., 2011; Asikin et al., 2012)。目前, 4CL 家族成员在柑橘中对类黄酮和木质素生物合成的影响尚未见报道。本研究中通过生物信息学分析, 从克里曼丁橘 (*Citrus clementina*) 基因组数据库筛选类似 4CL 基因的序列, 对其在北京柠檬中的表达进行分析, 以阐明其家族成员的基本功能, 为揭示其调控柑橘类黄酮生物合成的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料来自国家果树种质(重庆)柑橘圃。供试叶片采自 10 个不同的柑橘种质资源: 北京柠檬 [*C. limon* (L.) Burm. f.]、斯文格枳柚 (*Poncirus trifoliata* Raf. × *C. paradisi* Macfad)、宜昌橙 (*C. ichangensis* Swingle)、塔罗科血橙 [*C. sinensis* (L.) Osbeck]、汤姆逊葡萄柚 (*C. paradisi* Macfad)、梁平柚 [*C. grandis* (L.) Osbeck]、莽山大坑野橘 (*C. mangshanensis* S. W. He)、澳指檬杂种 (*C. reticulata* Blanco)、广西凭祥土柠檬 (*C. limonia* Osbeck)、巴西酸橙 (*C. aurantium* L.)。

以北京柠檬为材料观察不同发育时期(分别在 2014 年 5 月 23 日、6 月 19 日、7 月 24 日、8 月 29 日、9 月 29 日和 10 月 27 日采样)的果皮中相关基因的表达情况。

2014 年 5 月 7 日, 在天气晴朗的条件下, 随机选取生长健壮的植株, 按东西南北 4 个方向采取适量的主根皮层组织、主茎皮层组织、幼茎、幼嫩叶片和果实样品, 立即置于液氮中速冻, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存, 用于类黄酮含量和基因表达水平检测。

### 1.2 类黄酮含量检测

由农业部柑橘及苗木质量监督检验测试中心(重庆)检测, 以圣草枸橼苷(Eriocitrin)、芦丁(Rutin)、芸香柚皮苷(Ruenaringin)、柚皮苷(Naringin)、橙皮苷(Hesperidin)、新橙皮苷(Neohesperidin)、香风草苷(Didymin)、柚皮素(Narirutin)、橙皮素(Hesperitin)、甜橙黄酮(Sinensetin)、川皮苷(Nobiletin)、橘黄酮(Tangeretin)等 12 种柑橘类黄酮为标准品, 采用 UPLC 方法(冉玥等, 2013)检测果实不同发育时期样品中的类黄酮含量。不同组织部位样品的总黄酮含量采用 NY/T2010-2011/农业部行业标准的方法进行检测。

### 1.3 柑橘 4CL 基因的生物信息与表达分析

4CL 基因序列、编码区序列、在染色体上的分布位置等信息直接从 Phytozome 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) 中搜索获得 (Goodstein et al., 2012)。运用在线工具 ([http://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)) 对 *Cit4CLs* 家族成员间的相似度进行分析; 利用在线工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的基本性质; 使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 采用 CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cgi/main.cgi>) 进行亚细胞定位。

用 Ident and Sim ([http://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)) 比较氨基酸序列的相似性。

通过 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 搜索保守基序 (Motif) (Bailey et al., 2006)。

应用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 比较从 Phytozome 数据库中获得的 cDNA 和 gDNA 序列, 对基因内含子和外显子的结构组成进行分析 (Hu et al., 2014)。

用 Invitrogen AlignX 软件对基因的蛋白进行序列比对分析。

使用 MEGA6.0 软件的邻接法 (Neighbor-joining) 绘制系统进化树, 自展值 (Bootstrap) 设置为 1 000 (Tamura et al., 2011)。

用 NCBI 在线软件 Primer-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)) 设计 *Cit4CL* 家族基因特异性引物 (表 1), 采用 SYBR Green 荧光染料法 (Bio-RAD) 进行荧光定量 PCR 反应, 以  $\beta$ -actin 为内参基因进行相对表达水平分析。用 SPSS20 软

件（双变量 - Pearson 法）对基因的表达水平与类黄酮含量间的相关性进行分析。

表 1 引物信息列表  
Table 1 The list of primers

| 目标基因            | 目的片段长度/nt       | 引物名称             | 引物序列 (5' - 3')           |
|-----------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| Genbank ID      | Amplicon length | Primer           | Primer sequence          |
| Ciclev10025866m | 101             | <i>β-actin</i> F | CCAAGCAGCATGAAGATCAA     |
|                 |                 | <i>β-actin</i> R | ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG     |
| Ciclev10019532m | 128             | 4CL QF2          | CAAACGGAGACGTTGTGCTG     |
|                 |                 | 4CL QR2          | CAGCGCCCTATCTCAAACCT     |
| Ciclev10007733m | 137             | 4CL QF3          | CCAATACTCAAAACCAACTCAGGG |
|                 |                 | 4CL QR3          | GGTGATCTTGTGCTGCCA       |
| Ciclev10025280m | 86              | 4CL QF4          | TGGGCAGGGATATGGAATGAC    |
|                 |                 | 4CL QR4          | CCGCTTTAATCTCAATGGCTCC   |

## 2 结果与分析

### 2.1 柑橘 4CL 基因家族的蛋白结构特性分析

用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 4CL 基因 (GenBank ID: BAB01715.1) 和来自芸香科的芸香 (*Ruta graveolens*) 的两个 4CL 基因 (GenBank ID: ABY81910.1 和 ABY81911.1) 的氨基酸序列在 Phytozome 数据库对克里曼丁橘 (*C. clementina*) 基因组进行 BLASTP 分析, 共搜索到 103 条期望值 (Expected value) 小于  $1E-3$  的候选序列, 其中有 3 条序列含有 4CL 基因家族的保守结构域 BOX I 和 BOX II 序列, 它们分别为 Ciclev10019532m、Ciclev10025280m 和 Ciclev10007733m, 命名为 *Cit4CL1*、*Cit4CL2* 和 *Cit4CL3*。这 3 个基因分别分布在克里曼丁橘基因组的第 3、7 和 1 号染色体上。

利用氨基酸序列进行同源性分析显示, *Cit4CL1*、*Cit4CL2* 和 *Cit4CL3* 分别与哥伦比亚锦葵 (*Herrania umbratica*)、芸香 (*Ruta graveolens*) 和巴西橡胶 (*Hevea brasiliensis*) 的 4CL 同源性最高 (表 2)。氨基酸相似度分析表明, *Cit4CL1* 与 *Cit4CL2* 的序列一致性最高, 为 75.92%, 其次为 *Cit4CL2* 和 *Cit4CL3*, 序列一致性为 74.02%, *Cit4CL1* 与 *Cit4CL3* 之间的序列一致性为 68.82%。

表 2 柑橘 4CL 家族相关信息  
Table 2 Information of 4CL family genes in citrus

| 基因             | JGI 登录号         | 染色体定位          | 最高同源性物种                          | 登录号            | 一致性/%    |
|----------------|-----------------|----------------|----------------------------------|----------------|----------|
| Gene           | JGI-locus       | Chromosome No. | Highest homolog                  | Accession No.  | Identity |
| <i>Cit4CL1</i> | Ciclev10019532m | 3              | 哥伦比亚锦葵 <i>Herrania umbratica</i> | XP_021282810.1 | 83       |
| <i>Cit4CL2</i> | Ciclev10025280m | 7              | 芸香 <i>Ruta graveolens</i>        | ABY81911.1     | 85       |
| <i>Cit4CL3</i> | Ciclev10007733m | 1              | 巴西橡胶 <i>Hevea brasiliensis</i>   | XP_021655378.1 | 85       |

3 个柑橘 4CL 基因中, *Cit4CL1* 和 *Cit4CL2* 均含有 5 个外显子, *Cit4CL3* 有 6 个外显子 (图 1, A), 它们的外显子数与杨树等植物中的类似。*Cit4CL* 编码蛋白的氨基酸序列均含有 3 个保守基序 (Motif), 其中 Motif 1 中包含 4CL 基因家族的保守结构域 Box II (GEICIRG), Motif 2 中含有 Box I 的主体部分 “SGTTGLPKG V”, Motif 3 具有 AMP 结合功能 (图 1, B)。



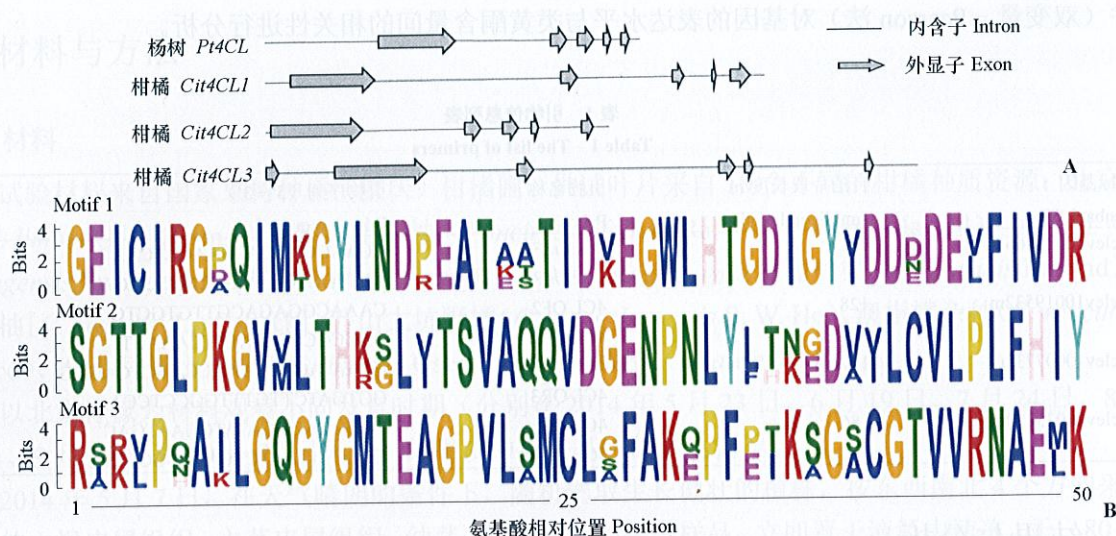


图 1 柑橘 4CL 基因的外显子和内含子结构 (A) 和编码氨基酸序列的 3 个保守基序 (B)  
Fig. 1 Gene structure of citrus 4CL genes (A), the structures of intron and exon of citrus 4CL (B),  
three conserved motifs of citrus 4CL proteins

3 个柑橘 4CL 基因虽然在 Box I [(SSGTTGLPKGV) 为 AMP 结合区域] 和 Box II [(GEICIRG) 为酶催化位点] (Hamberger & Hahlbrock, 2004) 区域的多肽序列上高度保守, 但在基因长度和核苷酸序列等因结构上存在明显差异。Cit4CL1、Cit4CL2 和 Cit4CL3 蛋白序列长度分别为 560、567 和 635 个氨基酸残基, 等电点分别为 5.68、5.96 和 7.62。亲水性平均系数 (GRAVY) 表明, Cit4CL1 为疏水性蛋白, Cit4CL2 和 Cit4CL3 可能为亲水性蛋白。这 3 个 4CL 成员均没有信号肽位点。亚细胞定位预测结果表明, 这 3 个蛋白均定位于细胞质 (表 3)。

表 3 柑橘 4CL 蛋白的特征  
Table 3 The characteristics of citrus 4CL proteins

| 蛋白<br>Protein | 氨基酸序列长度/aa<br>Length of amino acid<br>sequence | 分子量/kD<br>Molecular<br>weight | 等电点<br>pI | 亲水性平均系数<br>GRAVY | 跨膜结构域和信号肽<br>Transmembrane domain<br>and signal peptide | 亚细胞定位<br>Subcellular<br>localization |
|---------------|--|-------------------------------|-----------|------------------|---|--------------------------------------|
| Cit4CL1       | 560  | 60.57                         | 5.68      | 0.135            | 无 No  | 细胞质 Cytoplasm                        |
| Cit4CL2       | 567  | 62.22                         | 5.96      | -0.015           | 无 No  | 细胞质 Cytoplasm                        |
| Cit4CL3       | 635  | 70.11                         | 7.62      | -0.032           | 无 No  | 细胞质 Cytoplasm                        |

## 2.2 Cit4CLs 的序列联配分析

以杨树 *Pt4CL* (GenBank ID: AAL02144.1) 编码氨基酸序列为参考, 经 AlignX 的多序列比对, 柑橘 *Cit4CL1*、*Cit4CL2* 和 *Cit4CL3* 与该参考序列的相似性分别为 63.67%、80.15% 和 74.34%。*Cit4CL1*、*Cit4CL2* 和 *Cit4CL3* 都有 3 个保守的催化残基 (相对于图 2 中 *Pt4CL* 的位置, 用黑色三角形表示), Lys-523 是半腺苷化反应 (Adenylation half reaction) 的催化反应中心 (Nakatsu et al., 2006; Hu et al., 2010), Lys-438 和 Gln-443 是硫酯合成反应 (thioester-forming partial reaction) 的催化中心 (Hu et al., 2010)。与底物结合的区域位于 Box I 和 Box II 这两个 AMP 结合位点中间。在其他物种中保守的 K303 位点, 在 *Cit4CL1* 和 *Cit4CL3* 中分别被 L323 和 M331 取代。

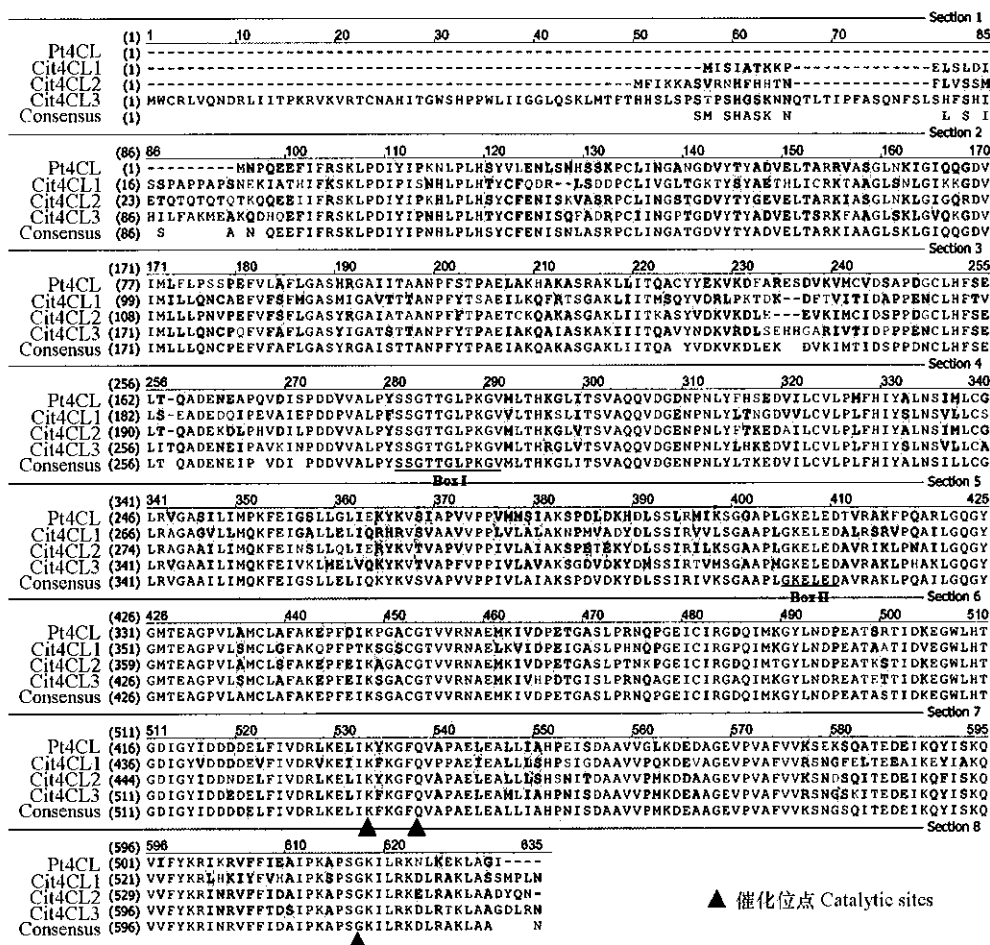


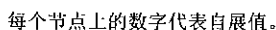
图 2 柑橘与杨树 4CL 蛋白序列联配分析

Fig. 2 Alignment of Pt4CL and Cit4CLs

### 2.3 Cit4CL 的聚类分析

为了研究柑橘 4CL 家族成员的进化关系, 基于各个成员的氨基酸序列组成构建了系统进化树, 同时选择了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、北美云杉 (*Picea sitchensis*)、辐射松 (*Pinus radiata*)、马尾松 (*Pinus massoniana*)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、芜菁 (*Brassica rapa*)、巨桉 (*Eucalyptus grandis*)、大豆 (*Glycine max*)、玉米 (*Zea mays*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、水稻 (*Oryza sativa*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、小立碗藓 (*Physcomitrella patens*)、芸香 (*Ruta graveolens*)、江南卷柏 (*Selaginella moellendorffii*) 高粱 (*Sorghum bicolor*) 等 18 种植物和藓类的 4CL 作为参照 (序列据来自 Phytozome 10, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, 详细信息见图 3)。聚类结果 (图 3) 显示 Cit4CL1 (包括两个转录本) 与其他来源的 4CL 聚为 Class II, 与其关系最近的 Rg4CL1 参与芸香类黄酮生物合成; Cit4CL2 和 Cit4CL3 与其他来源的 4CL 聚为 Class I, 其中与 Cit4CL2 关系最近的 Rg4CL2 参与芸香木质素生物合成 (Endler et al., 2008)。





The bootstrap values are indicated by the number at each node.

## 2.4 *Cit4CL* 的表达特征及与类黄酮含量的关系

以北京柠檬为主要试验材料, 分别在不同的组织部位及果实的发育过程中分析了这 3 个 *Cit4CL* 基因的相对表达水平 (图 4)。qRT-PCR 结果显示, *Cit4CL1* 在幼果中的表达水平最高, 其次为幼叶, 根中的表达水平最低; *Cit4CL2* 在幼茎中的表达水平最高, 在根中的表达水平最低; *Cit4CL3* 在根中的表达水平最高, 在幼茎、幼叶及幼果中的表达水平都很低。

随着北京柠檬果实的成熟, *Cit4CL1* 的表达水平呈现逐渐降低的趋势, *Cit4CL2* 在果实发育的早期和后期表达水平较高, *Cit4CL3* 在果实发育前期和中期表达水平稳定, 后期升高 (图 4)。

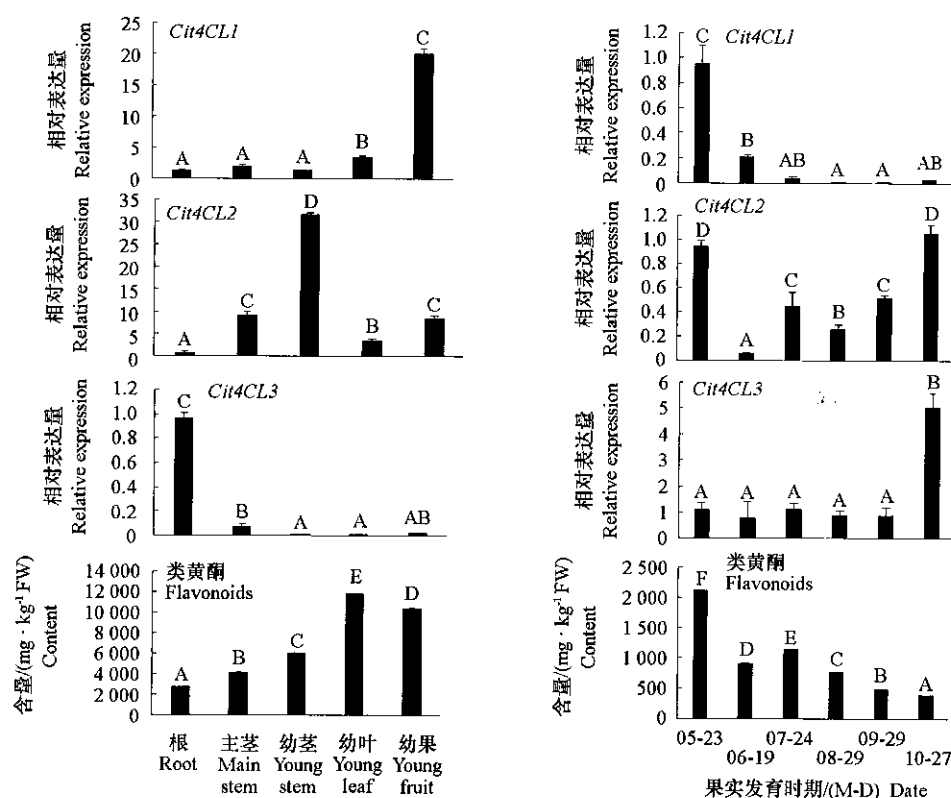


图 4 *Cit4CL* 基因在柑橘不同组织部位和果实发育不同阶段的表达量及类黄酮含量

大写英文字母为  $P < 0.01$  水平的 ANOVA 分析结果。

Fig. 4 Relative expression of *Cit4CL* and flavonoids contents in Meyer lemon

Alphabet indicated the ANOVA analysis results at  $P < 0.01$  level.

类黄酮含量分析的结果 (图 4) 显示, 北京柠檬 5 个组织部位和器官中类黄酮含量与 *Cit4CL1* 的表达量呈正相关关系 ( $r = 0.56$ ), 与 *Cit4CL3* 的表达量呈负相关关系 ( $r = -0.64$ ), 而与 *Cit4CL2* 的表达相关性不显著 ( $r = 0.08$ )。在北京柠檬的果实生长发育过程中, *Cit4CL1* 的表达水平与类黄酮含量显著正相关 ( $r = 0.89^*$ ,  $P < 0.05$ ), 而与 *Cit4CL2* 的表达水平相关性不显著 ( $r = 0.18$ ), 与 *Cit4CL3* 的表达水平则呈负相关关系 ( $r = -0.43$ )。以上分析表明 3 个 *Cit4CL* 中 *Cit4CL1* 对类黄酮的生物合成有显著影响, 推测其是调控类黄酮生物合成的重要基因。

*Cit4CL1* 在不同柑橘属、种 9 个种质的幼叶 (50%展开度) 中的表达结果 (图 5) 也显示其与类黄酮的含量呈极显著正相关 ( $r = 0.83^{**}$ ,  $P < 0.01$ ), 也进一步证实了 *Cit4CL1* 是影响类黄酮生物合



成的重要基因。

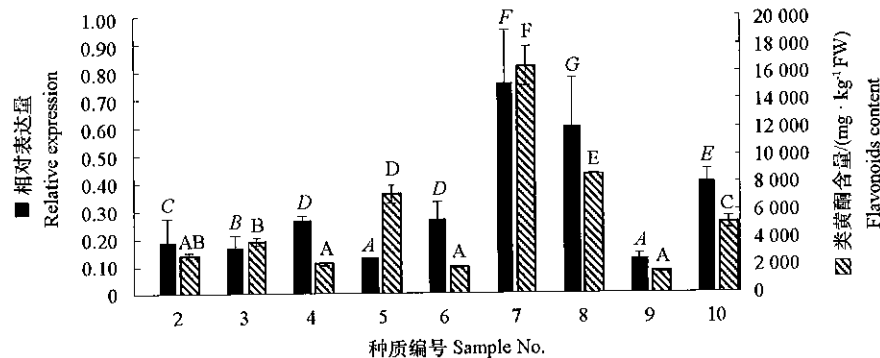


图5 *Cit4CL1* 基因在不同柑橘种质幼叶中的表达及类黄酮含量分析

不同大写字母表示  $P < 0.01$  水平差异显著 (斜体表示基因表达量间, 正体表示类黄酮含量间)。2: 斯文格枳柚; 3: 宜昌橙; 4: 塔罗科血橙; 5: 汤姆逊葡萄柚; 6: 梁平柚; 7: 莽山大坑野橘; 8: 澳指檬杂种; 9: 广西凭祥土柠檬; 10: 巴西酸橙。

Fig. 5 Relative expression of *Cit4CL* genes and flavonoids contents in the young leaf of various citrus germplasm

Alphabet indicated the ANOVA analysis results at  $P < 0.01$  level (The Italics present the gene expression, the Roman type present flavonoids content).

2: *Poncirus trifoliata* Raf. × *C. paradisi* Macfad; 3: *C. ichangensis* Swingle; 4: *C. sinensis* (L.) Osbeck; 5: *C. paradisi* Macfad; 6: *C. grandis* (L.) Osbeck; 7: *C. mangshanensis* S. W. He; 8: *C. reticulata* Blanco; 9: *C. limonia* Osbeck; 10: *C. aurantium* L.

### 3 讨论

在北京柠檬果实的生长过程中, *Cit4CL1* 的表达水平与总黄酮含量呈现出显著正相关关系, 这种相关性也表现在不同组织部位的材料中。本研究中所用的 10 个柑橘类植物材料, 除斯文格枳柚是枳属和柑橘属的杂种外, 其余 9 个材料均来自柑橘属的不同种, 材料间遗传差异较大, 但 *Cit4CL1* 的表达水平与总黄酮含量在这些不同遗传背景的种质中有显著的相关关系。虽然个别物种中类黄酮含量较高、而 *Cit4CL1* 表达水平较低, 但总体来说这些种质材料的类黄酮含量与 *Cit4CL1* 表达水平显著相关。说明该基因对柑橘类黄酮的生物合成有重要影响。综合以上试验结果, 可以基本确定 *Cit4CL1* 是调控柑橘类黄酮生物合成的重要基因, 这与在桑树 (*Morus alba* L.) (Wang et al., 2016)、梨 (*Pyrus bretschneideri*) (Cao et al., 2016) 及野葛 (*Pueraria lobata*) (Li et al., 2014) 等的研究结果一致。

木质素的生物合成通常发生在木质部及叶片的维管组织等部位, 在分析柑橘不同组织部位的样品时发现, *Cit4CL2* 在幼叶中有表达, 在嫩茎和主茎的组织中表达水平较高, 这一结果与之前的报道 (Hu et al., 1998) 一致, 说明该基因与木质素的生物合成相关。聚类分析结果也指出, *Cit4CL2* 与芸香木质素生物合成相关基因 *Rg4CL2* 关系最为紧密, 进一步说明该基因对柑橘木质素生物合成的重要性。*Cit4CL2* 和 *Cit4CL3* 虽然都聚在 Class I 类, 但是它们在柑橘中的表达水平及组织特异性差异明显。*Cit4CL3* 仅在根组织中高表达, 推测该基因是根系特异的木质素生物合成相关基因。

本研究中基本明确了 3 个柑橘 4CL 基因在调控类黄酮和木质素生物合成方面的功能, 研究结果为今后在柑橘中开展苯丙氨酸代谢、包括类黄酮和木质素生物合成的遗传调控研究奠定了基础。

### References

- Akachi T, Shiina Y, Ohishi Y, Kawaguchi T, Kawagishi H, Morita T, Mori M, Sugiyama K. 2010. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha (*Citrus depressa*) against D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (Tokyo),

56 (1): 60 - 67.

- Asikin Y, Taira I, Inafuku-Teramoto S, Sumi H, Ohta H, Takara K, Wada K. 2012. The composition of volatile aroma components, flavanones, and polymethoxylated flavones in Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) peels of different cultivation lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (32): 7973 - 7980.
- Bailey T L, Williams N, Misleh C, Li W W. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34: W369 - W373.
- Cao Y P, Han Y H, Li D H, Lin Y, Cai Y P. 2016. Systematic analysis of the 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) related genes and expression profiling during fruit development in the Chinese pear. *Genes*, 7 (10): doi.org/10.3390/genes7100089.
- Costa M A, Bedgar D L, Moinuddin S G A, Kim K W, Cardenas C L, Cochrane F C, Shockey J M, Helms G L, Amakura Y, Takahashi H, Milhollan J K, Davin L B, Browse J, Lewis N G. 2005. Characterization *in vitro* and *in vivo* of the putative multigene 4-coumarate: CoA ligase network in *Arabidopsis*: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation. *Phytochemistry*, 66 (17): 2072 - 2091.
- Douglas C, Hoffmann H, Schulz W, Hahlbrock K. 1987. Structure and elicitor or UV-light-stimulated expression of 2, 4-coumarate-CoA ligase genes in parsley. *Embo Journal*, 6 (5): 1189 - 1195.
- Du Q Z, Chen H. 2010. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. *Food Chemistry*, 119 (2): 567 - 572.
- Durand-Hulak M, Dugrand A, Duval T, Bidel L P R, Jay-Allemand C, Froelicher Y, Bourgaud F, Fanciullino A L. 2015. Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in *Citrus* species using a UPLC - MS approach. *Annals of Botany*, 115 (5): 861 - 877.
- Ehlting J, Buttner D, Wang Q, Douglas C J, Somssich I E, Kombrink E. 1999. Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant Journal*, 19 (1): 9 - 20.
- Endler A, Martens S, Wellmann F, Matern U. 2008. Unusually divergent 4-coumarate: CoA-ligases from *Ruta graveolens* L. *Plant Molecular Biology*, 67 (4): 335 - 346.
- Golawska S, Sprawka I, Lukasik I, Golawski A. 2014. Are naringenin and quercetin useful chemicals in pest-management strategies? *Journal of Pest Science*, 87 (1): 173 - 180.
- Goodstein D M, Shu S Q, Howson R, Neupane R, Hayes R D, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar D S. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40 (D1): D1178 - D1186.
- Gui J S, Shen J H, Li L G. 2011. Functional characterization of evolutionarily divergent 4-coumarate: coenzyme A ligases in rice. *Plant Physiology*, 157 (2): 574 - 586.
- Hamberger B, Hahlbrock K. 2004. The 4-coumarate: CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (7): 2209 - 2214.
- Harding S A, Leshkevich J, Chiang V L, Tsai C J. 2002. Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate: coenzyme a ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. *Plant Physiology*, 128 (2): 428 - 438.
- Hu B, Jin J, Guo A, Zhang H, Luo J, Gao G. 2014. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. Oxford, England: Bioinformatics.
- Hu W J, Kawaoka A, Tsai C J, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang V L. 1998. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (9): 5407 - 5412.
- Hu Y, Gai Y, Yin L, Wang X, Feng C, Feng L, Li D, Jiang X N, Wang D C. 2010. Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate: CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. *The Plant Cell*, 22 (9): 3093 - 3104.
- Hue H T T, Ha D T T, Hai N V, Hien L T T. 2016. Isolation and characterization of the 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL1) promoter from *Eucalyptus camaldulensis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22 (3): 399 - 405.
- Lee Y S, Cha B Y, Saito K, Choi S S, Wang X X, Choi B K, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo J T. 2011. Effects of a *Citrus depressa* Hayata (shiikuwasa) extract on obesity in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine*, 18 (8 - 9): 648 - 654.
- Li Y, Gu H, Qi C. 2013. Expression of lignin synthesis key genes of F5H, 4CL and COMT on loding resistance of *Brassica napus* L. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 35 (1): 24 - 28.



- Li Z B, Li C F, Li J, Zhang Y S. 2014. Molecular cloning and functional characterization of two divergent 4-coumarate: coenzyme A ligases from Kudzu (*Pueraria lobata*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37 (1): 113 - 122.
- Lin Jianzhong. 2009. Functional analysis of *Arabidopsis* 4CL3 gene in flavonoid [Ph. D. Dissertation]. Changsha: Hunan University. (in Chinese)
- 林建中. 2009. 拟南芥 4CL3 基因在类黄酮合成代谢中的功能分析 [博士论文]. 长沙: 湖南大学.
- Lindermayr C, Möllers B, Fliegmann J, Uhlmann A, Lottspeich F, Meimberg H, Ebel J. 2002. Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate: coenzyme A ligase gene family. *European Journal of Biochemistry*, 269 (4): 1304 - 1315.
- Lois R, Hahlbrock K. 1992. Differential wound activation of members of the phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: CoA ligase gene families in various organs of parsley plants. *Zeitschrift für Naturforschung section C*, 47 (1 - 2): 90 - 94.
- Nakatsu T, Ichiyama S, Hiratake J, Saldanha A, Kobashi N, Sakata K, Kato H. 2006. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, 440 (7082): 372 - 376.
- Osakabe Y, Osakabe K, Chiang V L. 2009. Isolation of 4-coumarate CoA ligase gene promoter from loblolly pine (*Pinus taeda*) and characterization of tissue-specific activity in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (11 - 12): 1031 - 1036.
- Ran Yue, Jiao Bining, Zhao Qiyang, Tian Ling, Su Xuesu, Zeng Chaobo. 2013. Simultaneous determination of 11 flavonoids in citrus fruits by ultra performance liquid chromatography. *Food Science*, 34 (4): 168 - 172. (in Chinese)
- 冉 玥, 焦必宁, 赵其阳, 田 玲, 苏学素, 曾朝波. 2013. 超高效液相色谱法同时测定柑橘中 11 种类黄酮物质. *食品科学*, 34 (4): 168 - 172.
- Schneider K, Hovel K, Witzel K, Hamberger B, Schomburg D, Kombrink E, Stuible H P. 2003. The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate: coA ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (14): 8601 - 8606.
- Sergeev I N, Ho C T, Li S M, Colby J, Dushenkov S. 2007. Apoptosis-inducing activity of hydroxylated polymethoxyflavones and polymethoxyflavones from orange peel in human breast cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (12): 1478 - 1484.
- Soltani B M, Ehlting J, Hamberger B, Douglas C J. 2006. Multiple cis-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of *Arabidopsis thaliana* 4CL gene family members. *Planta*, 224 (5): 1226 - 1238.
- Sun H Y, Li Y, Feng S Q, Zou W H, Guo K, Fan C F, Si S L, Peng L C. 2013b. Analysis of five rice 4-coumarate: coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430 (3): 1151 - 1156.
- Sun Y J, Qiao L P, Shen Y, Jiang P, Chen J C, Ye X Q. 2013a. Phytochemical profile and antioxidant activity of physiological drop of *Citrus* fruits. *Journal of Food Science*, 78 (1): C37 - C42.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731 - 2739.
- Tong Hongmei. 2012. Detection of oxidation resisting activity and content of flavonoid in different Chenpi with HPLC. *Western Journal of Traditional Chinese Medicine*, 25 (7): 17 - 19. (in Chinese)
- 童红梅. 2012. 用 HPLC 检测不同成药时间陈皮中类黄酮含量及其抗氧化活性. *西部中医药*, 25 (7): 17 - 19.
- Wang C H, Yu J, Cai Y X, Zhu P P, Liu C Y, Zhao A C, Lu R H, Li M J, Xu F X, Yu M D. 2016. Characterization and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase genes in mulberry. *PLoS ONE*, 11 (6): doi: 10.1371/journal.pone.0155814.
- Zhou Jianying, Cao Ying, Sun Xia, Chen Ke, Lu Xueqin, Hu Shanglian. 2010. Construction of RNAi carrier of 4CL gene of *Neosinocalamus affinis* and its transformation into tobacco. *Journal of Fujian Forestry Science and Technology*, 37: 28 - 32. (in Chinese)
- 周建英, 曹 颖, 孙 霞, 陈 珂, 卢学琴, 胡尚连. 2010. 慈竹木质素合成酶基因 4CL RNAi 载体构建与烟草转化. *福建林业科技*, 37 (2): 28 - 32.