

# 黄肉桃中 *PpSGRs* 对蓝光的响应及其对贮藏中类胡萝卜素积累的影响

沈子明<sup>1,2</sup>, 徐利伟<sup>2</sup>, 施丽愉<sup>2</sup>, 陈伟<sup>2</sup>, 杨震峰<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>上海海洋大学食品学院, 上海 201306; <sup>2</sup>浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100)

**摘要:** 为揭示蓝光处理促进黄肉桃果实类胡萝卜素积累的机制, 以黄肉桃‘金丽’果实为研究对象, 从桃基因组中筛选出 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 基因进行生物信息学分析, 并通过 q-PCR 分析 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 在不同组织和不同发育阶段果实及其在 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  蓝光处理果实中的表达。结果表明, *PpSGR1* 具有多半胱氨酸保守域, 属于 SGR 亚族; *PpSGRL* 基因 C 端突变失去多半胱氨酸保守域, 属于 SGR-Like 亚族; *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 都含有叶绿体信号肽, 与梅亲缘关系最近。*PpSGRs* 在‘金丽’桃不同组织和不同成熟阶段果实中均有表达, 其中 *PpSGR1* 与果实采后类胡萝卜素的合成密切相关。蓝光处理可快速抑制桃果实 *PpPIF3* 进而抑制 *PpSGR1* 的转录, 促进贮藏前期果实中 *PpPSY* 的表达, 提高类胡萝卜素的合成和积累。同时, 蓝光处理可能通过促进桃果实内源乙烯合成, 上调 *PpSGR1* 表达进而抑制 *PpPSY* 转录水平, 降低桃果实贮藏后期类胡萝卜素的合成能力。

**关键词:** 桃; 果实; 黄肉; 蓝光; 类胡萝卜素; SGR; PIF

**中图分类号:** S 662.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 02-0229-10

## *PpSGRs* Responded to Blue Light and Affect Carotenoids Accumulation in Postharvest Yellow-flesh Peach Fruit

SHEN Ziming<sup>1,2</sup>, XU Liwei<sup>2</sup>, SHI Liyu<sup>2</sup>, CHEN Wei<sup>2</sup>, and YANG Zhenfeng<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; <sup>2</sup>College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

**Abstract:** In order to explore the mechanism of blue light promoting carotenoids accumulation in postharvest peaches (‘Jinli’, yellow-flesh), *PpSGR1* and *PpSGRL* were identified based on peach genome and analyzed by bioinformatics. Furthermore, the expression profile of *PpSGR1* and *PpSGRL* in different tissues and developmental fruits and the effects of blue light treatment (40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) on *PpSGR1* and *PpSGRL* expression were investigated in ‘Jinli’ peach fruit during storage. Results showed that *PpSGR1* possessed cysteine-rich motif and belonged to STAY GREEN subfamily, while *PpSGRL* belonged to STAY GREEN-like subfamily due to the mutation of cysteine-rich motif in C-terminal. *PpSGR1* and *PpSGRL* both contained a chloroplast transit peptide in their N-terminal, and shared high similarity homology with *Prunus mume*. Expression pattern of *PpSGR1* and *PpSGRL* differed significantly in peach

收稿日期: 2017-10-24; 修回日期: 2018-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371866); 浙江省自然科学基金项目 (Q15C200013); 浙江省重中之重学科学生创新计划项目 (CX2016003)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yangzff@zhu.edu.cn; Tel: 0574-88222352)

tissues and developmental fruit, especially the expression of *PpSGR1* was closely related to carotenoids accumulation in peach fruit. Blue light treatment suppressed *PpPIF3* and resulted in a rapid depression of *PpSGR1* expression, but up-regulated the transcription level of *PpPSY*, and promoted carotenoids accumulation in postharvest peaches during first 6 days storage. Meanwhile, blue light promoted ethylene production in postharvest peaches which up-regulated expression of *PpSGR1*, and resulted in the *PpPSY* repression and carotenoids accumulation.

**Keywords:** peach; fruit; yellow-flesh; blue light; carotenoid; STAY GREEN; phytochrome-interacting factor

黄肉桃因果肉富含类胡萝卜素成为国内外研究的焦点 (Caprioli et al., 2009; Brandi et al., 2011; Oliveira et al., 2012; 董新甜 等, 2015)。类胡萝卜素是果实中的重要色素之一, 其合成代谢途径已逐渐明晰 (Fraser et al., 2002; Galpaz et al., 2006), PSY (phytoene synthase-1) 所催化的八氢番茄红素合成反应是类胡萝卜素生物合成途径的关键限速步骤 (Fraser et al., 2007)。因此, 调控 PSY 基因表达已成为了调节果实成熟过程中类胡萝卜素积累的重要手段。

植物在生长发育和果实成熟过程中建立了一套复杂的光信号转导网络, 通过光感受器、转录因子和信号分子之间的相互作用调控植物体内各项生命活动 (Jiao et al., 2007)。PIFs (phytochrome-interacting factors) 转录因子家族是植物光调控网络中重要的组成部分 (Lau & Deng, 2010), 其中 PIF3 在蓝光信号转导 (Xu et al., 2016) 和成熟衰老 (Song et al., 2014) 中均有重要作用。研究发现, 不同颜色的光可以通过调控鞑靼荞麦种子萌发时类胡萝卜素合成基因的表达来促进类胡萝卜素的积累 (Tuan et al., 2013); 不同强度的蓝光照射, 均能提高柑橘中  $\beta$ -叶黄素、 $\beta$ -隐黄质和类胡萝卜素的积累量 (Zhang et al., 2015)。最近的研究发现,  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  蓝光处理能促进黄肉桃果实成熟 (Gong et al., 2015), 显著提高采后黄肉桃果实中类胡萝卜素含量 (Cao et al., 2017), 但其作用机制尚不清晰。

SGR (STAY GREEN) 基因普遍存在于高等植物中 (Armstead et al., 2006; Ren et al., 2007; Sato et al., 2007), 是参与叶绿素分解和植物叶片衰老的关键调控因子 (Sakuraba et al., 2014b)。在拟南芥中先后鉴定获得了 *AtSGR1* (Ren et al., 2007)、*AtSGR2* (Sakuraba et al., 2014a) 和 *AtSGRL* (Sakuraba et al., 2014b); *OsSGR1*、*OsSGR2* (Park et al., 2007) 以及 *OsSGRL* (Rong et al., 2013) 也在水稻中被发现; 在番茄 (Barry et al., 2008)、胡椒 (Barry et al., 2008) 和大豆 (Fang et al., 2014) 中也发现 1 个或 2 个 SGR 家族基因。植物中 SGR 基因家族分为两个亚族, 一类是突变后使植物呈滞绿性状且具有 STAY GREEN 结构域, 并且 C 端含有保守多半胱氨酸结构的基因 (Barry et al., 2008); 另一类包含 SGR 保守域但是 C 端序列突变程度高, 通常称为 SGR-LIKE (SGRL), 功能与 SGR 基因类似 (Rong et al., 2013)。Park 等 (2007) 的研究表明, 水稻中 *OsSGR1* 和 LHCP II (light-harvesting chlorophyll binding protein) 会在类囊体上形成聚合物, 这种聚合物是叶绿素和 LHCP 分解的前提条件; SGR 可以与叶绿素代谢相关酶 CCEs (chl catabolic enzymes) 和 LHCP II 形成一个多重复合体, 在植物衰老过程中促进叶绿素的降解 (Sakuraba et al., 2012, 2013)。此外, Roca 等 (2006) 在甜椒中发现, 有滞绿表型的品种在成熟期间类胡萝卜素的积累变得极为缓慢。而在番茄中, *SISGR1* 能与 *SIPSYI* 直接作用抑制类胡萝卜素的合成 (Luo et al., 2013)。这表明, SGR 家族基因可能参与调控果实成熟过程中类胡萝卜素的生物合成。

本研究中以黄肉桃‘金丽’果实为研究材料, 通过与拟南芥中的 SGR 基因家族比对, 从桃基因

组中筛选出 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 进行生物信息学分析, 并通过 q-PCR 分析其在不同组织和发育阶段果实及其在  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  蓝光处理果实中的表达, 以期明确其在蓝光促进桃果实采后类胡萝卜素积累中的重要作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及处理

‘金丽’桃不同组织和发育阶段果实均取自浙江省宁波市奉化水蜜桃研究所。分别采集花苞 (2016 年 3 月 11 日)、花 (2016 年 3 月 25 日)、叶芽 (2016 年 3 月 25 日)、叶 (2016 年 3 月 25 日)、软核期果实 (2016 年 5 月 11 日)、硬核期果实 (2016 年 5 月 27 日) 和硬熟期果实 (2016 年 6 月 8 日)。样品采集后 1 h 内运回实验室, 在液氮下研磨成粉末后置于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱储存备用。

选择大小均匀, 成熟度相对一致, 无腐烂无损伤的硬熟期果实随机分为两组, 每组 40 个, 一组作为对照贮藏在  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  黑暗环境中, 另一组在  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  贮藏期间连续接受  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  蓝光处理。每组重复 3 次。贮藏期间每 3 d 取样 1 次, 果肉用液氮冷冻,  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  储存备用。

### 1.2 桃果实类胡萝卜素含量和乙烯释放量测定

参考 Tuan 等 (2013) 的方法提取桃果实类胡萝卜素, 参考 Biehler 等 (2010) 的方法测定类胡萝卜素总量。参考 Gong 等 (2015) 的方法, 使用 GC-2014C 气相色谱仪 (岛津, 日本) 测定桃果实乙烯释放量。色谱柱 Rtx-5MS ( $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ ), 进样口温度  $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , FID 检测器温度  $270 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 柱温  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样量 5 mL, 高纯  $\text{N}_2$  作载气。

### 1.3 桃果实 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用改进的植物 RNA 提取试剂盒 (Omega, 美国) 提取不同组织和果肉的总 RNA。洗脱前加入无 RNase 活性的 DNase I (Omega, 美国) 去除残留的基因组 DNA, 用 NanoDrop2000 核酸蛋白仪 (Thermo, 美国) 检测总 RNA 的浓度, 用 1.5% 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性。以总 RNA 为模板, 采用 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒 (CWBI0, 中国江苏) 合成 cDNA。

### 1.4 *PpSGRs* 鉴定和生物信息学分析

从 GDB 数据库 (<http://www.plantgdb.org/PeGDB/>) 下载桃全基因组数据, 构建本地 Blast 数据库; 以拟南芥和番茄 SGR 家族基因成员作为靶基因, 执行 PSI-Blast (Position-Specific Iterated-BLAST) 程序。从 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 上下载 STAY GREEN 结构域的隐马尔可夫模型, 使用 Hmmer3.0 软件在桃基因组中执行 Hmmsearch 程序。去除所得序列中的重复部分, 在 NCBI-CCD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 中鉴定剩余基因的保守域结构, 将含有 STAY GREEN 结构域的基因留下做进一步分析。从 GDB 数据库得到 *PpSGRs* 的氨基酸序列, 使用 ClustalW 2 和 GeneDoc 软件对氨基酸序列进行比对分析。用 MEGA 7.0 邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树分析, 自展值 (bootstrap) 设为 1 000。

利用 ExPASy 在线分析 *PpSGRs* 蛋白质基本性质, 通过在线软件 ChloroP1.1Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 分析所含基因中叶绿体转运信号肽。以 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白的跨膜结构。利用 Predictprotein (<https://www.predictprotein.org>) 在线分析蛋白二级结构及亚细胞定位。根据筛选到的序列从 GDB 数据库中得到登录号为

ppa009788m 和 ppa010416m 的 *PpSGRs* 家族基因, 用 Oligo 7 设计全长引物 (表 1), 以 ‘金丽’ 桃果实的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证长度后送往华大基因测序。

**表 1 相关基因全长引物及扩增特性**

**Table 1 Primer sequences and amplicon characteristics designed for the cloning of SGRs genes**

基因 Gene name	GDB 登录号 GDB accession No.	引物序列 (5' - 3') Forward and reverse primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	扩增子长/bp Amplicon size
<i>PpSGR1</i>	ppa009788m	F: TTCACAGACAATAGACAACCTC R: CACTCAGCCACAACCTC	55.2	834
<i>PpSGRL</i>	ppa010416m	F: TTCTGAGGCTGTTAGTCT R: AATGTGATAGGATGTAAGTTCT	51.1	753

## 1.5 实时荧光定量 PCR 分析

从 GDB 数据库中获得 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 的 mRNA 序列, 运用 Beacon Designer 7 软件设计 q-PCR 引物 (表 2), 用 SYBR Green 染料法以 *PpTEF2* (Tong et al., 2009) 为内参基因, 分析 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 在不同组织和发育阶段果实及其在 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  蓝光处理果实中的表达。q-PCR 程序设置: 95 °C 初始变性 7 min, 95 °C 保持 15 s, 进行 39 个循环, 45 ~ 60 °C 退火 30 s, 75 °C 保持 15 s, 每个样品重复 3 次。所需引物见表 2。

**表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列及扩增特性**

**Table 2 Primer sequences and amplicon characteristics designed for q-PCR of genes**

基因 Gene name	GDB/NCBI 登录号 GDB/NCBI accession No.	引物序列 (5' - 3') Forward and reverse primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	扩增子长/bp Amplicon size
<i>PpSGR1</i>	ppa009788m	F: TTCACAGACAATAGACAACCTC R: CACTCAGCCACAACCTC	51.0	75
<i>PpSGRL</i>	ppa010416m	F: TTCTGAGGCTGTTAGTCT R: AATGTGATAGGATGTAAGTTCT	46.3	125
<i>PpPSY</i>	ppa005962m	F: TATTATGTTGCTGGGACTG R: GTGTTTGTGAGCTGATTCG	58.0	131
<i>PpPIF3</i>	ppa001899m	F: GACTCCAATACCAACTCT R: TAACATCAGCACCATCT	48.3	88
<i>PpTEF2</i>	JQ732180	F: GGTGTGACGATGAAGAGTG R: TGAAGGAGAGGGAAGGTGA	59.0	129

## 2 结果与分析

### 2.1 *PpSGRs* 序列比对分析

综合 PSI-BLAST、HMMER 以及结构域的分析, 从桃基因组中获得的 ppa009788m 和 ppa010416m 可能属于 STAY GREEN 转录因子家族。通过与拟南芥中 *AtSGR1*、*AtSGR2* 和 *AtSGRL* 序列比对分析发现, ppa009788m 与 *AtSGR1* 和 *AtSGR2* 具有较高的相似性, 而 ppa010416m 与 *AtSGRL* 有较高的相似性 (图 1)。

亚细胞定位预测发现 ppa009788m 和 ppa010416m 蛋白均定位在叶绿体内。叶绿体转运多肽的检测结果表明, ppa009788m 的叶绿体转运多肽长为 40 个氨基酸残基, 切割位点在第 41 位的丙氨酸上; ppa010416m 的叶绿体转运多肽长 49 个氨基酸残基, 切割位点在第 50 位的缬氨酸。叶绿体转运多肽的检测与亚细胞定位预测的结果一致, 说明 ppa009788m 和 ppa010416m 蛋白会被转运至叶绿体。ppa009788m 和 ppa010416m 都拥有高度保守的 STAY GREEN 保守域, 且 ppa009788m 的 C 端蛋白

含有与 *AtSGR1* 和 *AtSGR2* 高度相似的富含半胱氨酸的保守域。

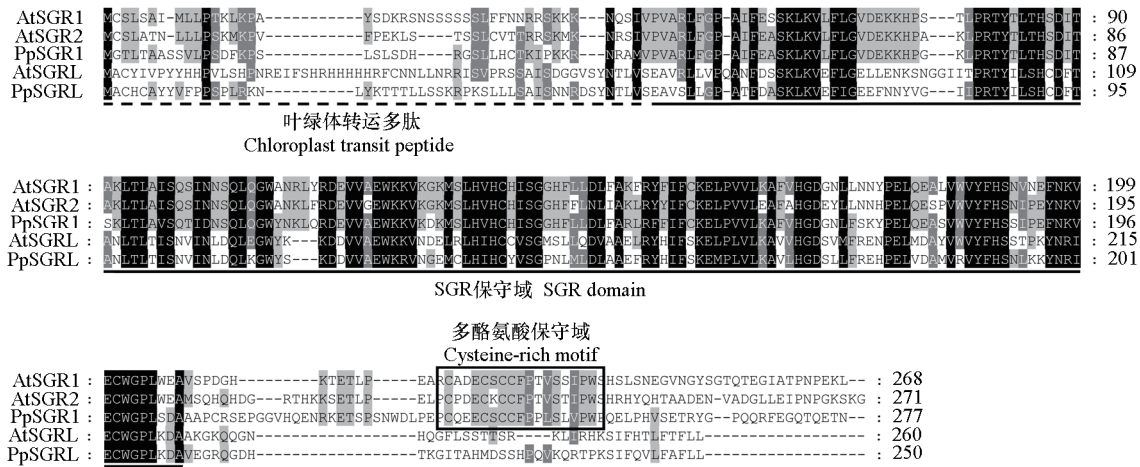


图 1 桃果实 *PpSGRs* 基因家族与拟南芥 *AtSGRs* 氨基酸序列比对图  
 Fig. 1 Alignment of the deduced amino acid sequence of *PpSGRs* with *AtSGRs*

## 2.2 *PpSGRs* 聚类分析

为了进一步确定筛选基因与 *SGR* 家族基因的关系, 选择模式植物拟南芥、番茄、玉米、水稻、大豆、烟草的 *SGR* 家族基因编码的氨基酸序列, 以及亲缘关系较为接近的蔷薇科植物梨、苹果、梅的 *SGR* 家族基因编码的氨基酸序列, 与筛选出的 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 构建进化树。由图 2 可知, 植物中 *SGR* 家族基因分为 *SGR* 亚族和 *SGRL* 亚族, 这两个亚族的基因拥有高度相似的保守域, 但是 *SGRL* 亚族缺失了一段富含半胱氨酸的保守域。桃果实中 *ppa009788m* 属于 *SGR* 亚族, *ppa010416m* 则属于 *SGRL* 家族, 因此分别命名为 *PpSGR1* 和 *PpSGRL*。桃果实 *SGRs* 与其他蔷薇科植物 *SGRs* 同属于一个聚类, 与梅 (*Prunus mume*) 亲缘关系最近。

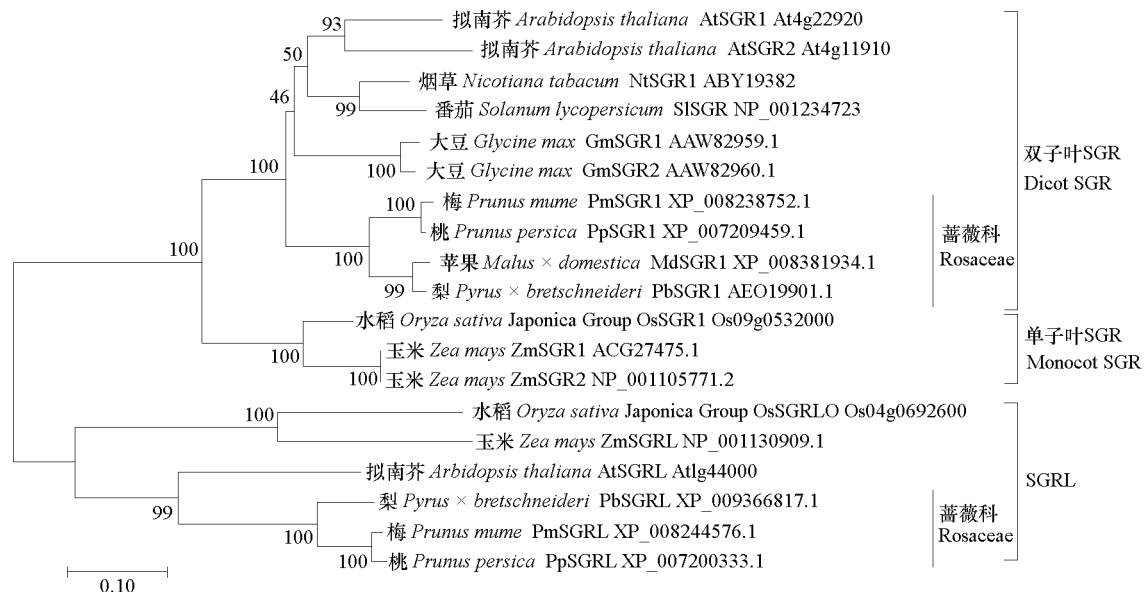


图 2 *PpSGRs* 和其他植物 *SGRs* 的系统进化关系  
 Fig. 2 Phylogenetic relationship between *PpSGRs* and other *SGRs* proteins

### 2.3 PpSGR1 和 PpSGRL 蛋白基本信息

对 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 全长测序, 并比对基因组序列发现 ‘金丽’ 桃果实中 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 序列与其在桃基因组中的序列一致。*PpSGR1* 编码 277 个氨基酸组成的蛋白质多肽, 预测分子量为 31.28 kD, 等电点为 8.05; *PpSGRL* 编码 250 个氨基酸组成的蛋白质多肽, 预测分子量 28.47 kD, 等电点 8.65 (表 3)。跨膜结构预测发现, *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 蛋白不含跨膜结构, 不属于跨膜蛋白。

表 3 *PpSGE1* 和 *PpSGRL* 蛋白基本信息  
 Table 3 Basic information related to *PpSGRs* proteins

蛋白 Protein	氨基酸长度/aa Amino acid length	分子量/kD Molecular weight	亲水性平均系数 GRAVY	等电点 pI	分子式 Molecular formula
<i>PpSGR1</i>	277	31.28	- 0.386	8.05	C <sub>1409</sub> H <sub>2177</sub> N <sub>383</sub> O <sub>401</sub> S <sub>12</sub>
<i>PpSGRL</i>	250	28.47	- 0.114	8.65	C <sub>1290</sub> H <sub>2009</sub> N <sub>343</sub> O <sub>360</sub> S <sub>12</sub>

### 2.4 PpSGR1 和 PpSGRL 时空表达分析

由图 3 可知, *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 在 ‘金丽’ 桃不同组织和不同成熟阶段果实中均有表达, 但存在显著差异。*PpSGR1* 在花中表达量最高, 在果实中随着发育进程表达量逐渐增强, 这表明桃果实中 *PpSGR1* 可能参与调控成熟衰老。*PpSGRL* 在 ‘金丽’ 桃叶芽中表达量远高于其他组织, 但在果实发育期间无显著变化。硬熟果实中 *PpSGR1* 表达水平显著高于 *PpSGRL*, 表明 *PpSGR1* 可能在桃果实成熟中起重要作用。

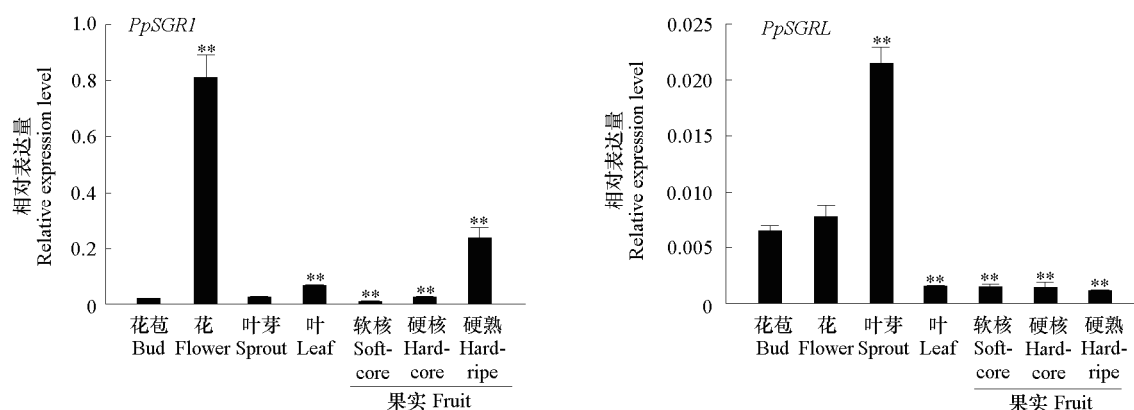


图 3 不同组织和发育阶段果实中 *PpSGR1* 和 *PpSGRL* 的表达

\*\* 代表花苞中 *PpSGRs* 在  $P < 0.01$  水平与其他组织基因表达的差异显著。

Fig. 3 Expression profile of *PpSGR1* and *PpSGRL* in different tissues and developmental fruits

\*\* indicates that the values are significantly different at the level of  $P < 0.01$ .

### 2.5 蓝光对桃果实采后贮藏期间类胡萝卜素含量及乙烯释放的影响

与对照果实相比,  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  蓝光处理显著提高了贮藏期间桃果实中类胡萝卜素的含量, 贮藏 12 d 时达到  $7.46 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  FW。整个贮藏期间, 对照果实的类胡萝卜素总量虽然随着贮藏时间的延长略有增加, 但显著低于蓝光处理果实 (图 4, A), 这表明蓝光处理能诱导采后 ‘金丽’ 桃果实类胡萝卜素的合成和积累。

与对照果实相比, 蓝光处理 9 d 以后显著提高桃果实乙烯释放速率 (图 4, B), 表明蓝光能促进采后果实乙烯合成。

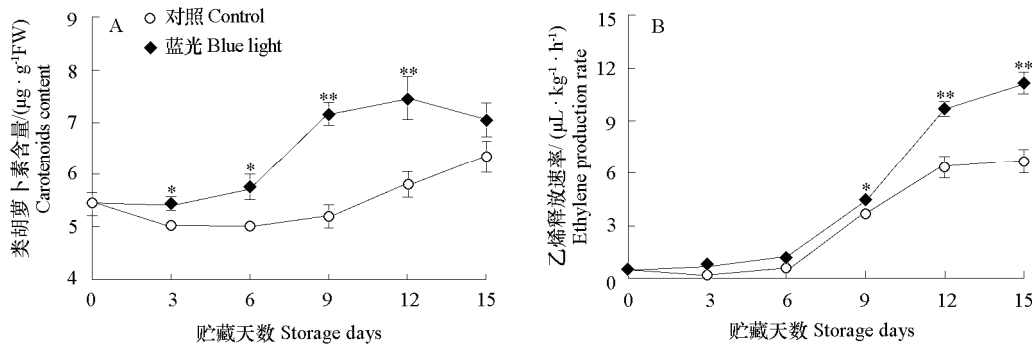


图 4 蓝光处理对桃果实后熟过程中类胡萝卜素积累总量 (A) 及乙烯释放速率 (B) 的影响

\*和\*\*分别代表对照果实在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平与蓝光处理果实存在显著差异。

Fig. 4 Effects of blue light treatment on the total carotenoids contents (A) and ethylene production (B) in postharvest peaches

\* and \*\* indicate that the values are significantly different at the level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

## 2.6 蓝光处理对 *PpSGR1*、*PpSGRL*、*PpPIF3* 及 *PpPSY* 表达的影响

蓝光处理桃果实 *PpSGR1* 表达水平随贮藏时间的延长而提高 (图 5), 在贮藏前期显著低于对照组, 贮藏 15 d 时极显著高于对照果实, 对照果实 *PpSGR1* 表达量在整个贮藏期间变化较小。对照果实 *PpSGRL* 的表达在桃果实贮藏前 3 d 略有上升, 然后随着贮藏时间的延长不断下降, 但蓝光处理的果实 *PpSGR1* 在整个贮藏期间显著高于对照组, 这表明蓝光处理能诱导采后桃果实 *PpSGRL* 的表达, 维持贮藏过程中其较高的表达水平。同时, 蓝光处理能显著提高贮藏 3 d 后果实中 *PpPSY* 的表达水平, 却显著抑制贮藏前期果实中 *PpPIF3* 的表达。

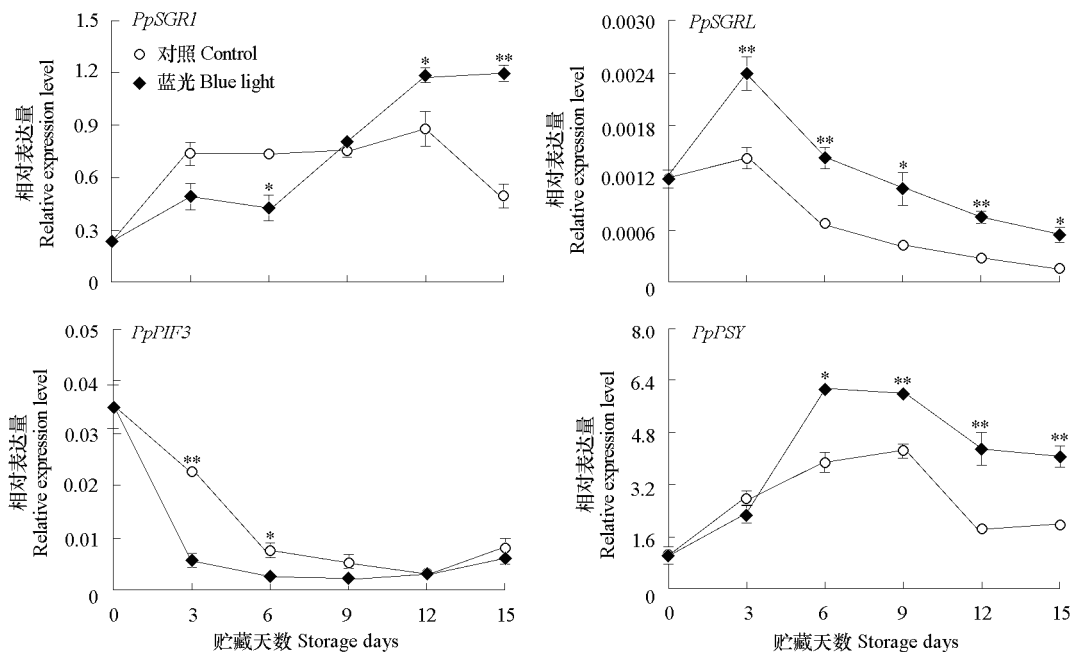


图 5 蓝光处理对 *PpSGR1*、*PpSGRL*、*PpPIF3* 和 *PpPSY* 表达的影响

\*和\*\*分别代表对照果实在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平与蓝光处理果实存在基因表达的显著差异。

Fig. 5 Effects of blue light treatment on the expression of *PpSGR1*, *PpSGRL*, *PpPIF3* and *PpPSY* in postharvest peaches

\* and \*\* indicate that the values are significantly different at the level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

### 3 讨论

滞绿现象一直是植物生理领域研究的热点问题,其中由SGR家族基因突变引起的植物滞绿现象近几年来得到广泛研究(Thomas & Howarth, 2000; Armstead et al., 2006; Zhou et al., 2011; Charoenchongsuk et al., 2015)。本试验中以拟南芥和番茄等模式植物中已确定的SGR家族基因为模板,从桃基因组中筛选获得了*PpSGR1*和*PpSGRL*。生物信息学分析发现,*PpSGR1*和*PpSGRL*的C端都具有叶绿体转运肽的基本特征,并且包含C端和N端都极其保守的STAY GREEN结构域,表明*PpSGR1*和*PpSGRL*都能够在叶绿体中参与叶绿素降解。同时,*PpSGR1*含有在其他植物中已确定SGR亚家族所具有的多聚半胱氨酸结构,而*PpSGRL*则因丢失多聚半胱氨酸结构导致C端突变。

本研究中,*PpSGR1*在‘金丽’桃花中的表达量最高,这与拟南芥中*SGR1*的表达(Ren et al., 2007)相似;随着果实发育和成熟,*PpSGR1*表达量不断升高,与*SISGR1*在番茄果实成熟期间的表达一致,这表明*PpSGR1*可能与*SISGR1*一样在果实成熟过程中发挥作用(Hu et al., 2011)。与*PpSGR1*相比,*PpSGRL*在‘金丽’桃不同组织和不同发育阶段果实中的表达量较低;*PpSGRL*在叶芽中的表达相对较高,且与*PpSGR1*形成互补表达,这与*SGR1*和*SGRL*在水稻中的表达情况(Rong et al., 2013)相似,表明*PpSGR1*和*PpSGRL*可能在‘金丽’桃不同组织和果实成熟期间发挥作用。在水稻和大豆上的研究发现,*SGRL*基因是独立于*SGR1*基因产生作用的(Bell et al., 2015),这可能是‘金丽’桃果实中*PpSGRL*表达量显著低于*PpSGR1*的重要原因。

已有的研究表明,SGRs对叶绿素(Park et al., 2007; Sakuraba et al., 2014b)和类胡萝卜素(Luo et al., 2013)的合成代谢均有调控作用,但SGRs对外源光信号的响应却不清晰。本研究表明,40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 蓝光处理能显著抑制贮藏前6d‘金丽’桃果实中*PpSGR1*和*PpPIF3*的表达,抑制*PpSGRL*表达水平的下降,提高果实采后贮藏期间类胡萝卜素含量。研究发现,拟南芥*AtPIF3*能结合在*AtSGR1*的启动子上促进其表达(Song et al., 2014);而蓝光处理则能快速分解*AtPIFs*(Toledo-Ortiz et al., 2010),导致结合*AtSGR1*启动子的*AtPIFs*减少,进而抑制*AtSGR1*的表达。上述结果表明,蓝光处理可能通过光信号传导分解*PpPIF3*,抑制贮藏前6d‘金丽’桃果实中*PpSGR1*的表达。同时,蓝光处理能促进柑橘(Ma et al., 2011)和桃(Cao et al., 2017)果实中*PSY*基因的表达,提高果实中类胡萝卜素合成与积累。因此,蓝光处理促进‘金丽’桃果实采后贮藏前期类胡萝卜素积累可能与抑制*PpSGR1*表达和促进*PpPSY*表达有关。

本研究中,蓝光处理6d后,果实中*PpSGR1*表达快速上升,*PpSGRL*和*PpPSY*表达水平逐渐下降,类胡萝卜素继续积累,这可能与蓝光处理作为一种光胁迫因子促进桃果实内源乙烯合成有关(Gong et al., 2015)。拟南芥中的研究表明,乙烯可以迅速诱导*AtSGR1*的表达(Qiu et al., 2015);并且强光、盐胁迫和干旱等环境胁迫因子能诱导拟南芥*AtSGR1*表达(Sakuraba et al., 2014b),表明蓝光处理可通过促进桃果实内源乙烯合成而上调*PpSGR1*表达。蓝光处理12d后,桃果实类胡萝卜素含量和*PpPSY*表达呈下降趋势,但显著高于对照果实。Luo等(2013)研究发现,*SISGR1*在番茄果实成熟过程可直接与*SIPSY*互作,抑制*SIPSY*活性并反馈下调*SIPSY*转录,减缓类胡萝卜素的合成。这表明‘金丽’桃果实贮藏后期*PpSGR1*的大量表达可能减弱了*PpPSY*的活性,导致蓝光处理后期果实中类胡萝卜素的合成下降。

综上所述,*PpSGR1*和*PpSGRL*在‘金丽’桃不同组织和发育阶段果实中的表达模式存在较大差异,其中*PpSGR1*与果实采后类胡萝卜素的合成密切相关。蓝光处理可快速抑制桃果实*PpPIF3*而抑制后期*PpSGR1*的转录,促进贮藏前期*PpPSY*的表达,提高类胡萝卜素的合成和积累。同时,



蓝光处理可通过促进桃果实内源乙烯合成, 上调 *PpSGRI* 表达进而抑制 *PpPSY* 转录水平, 降低桃果实贮藏后期类胡萝卜素的合成能力。但桃果实中 *PpSGRI* 响应乙烯和蓝光的机制及其参与果实类胡萝卜素合成的互作因子并不清楚, 仍需要进一步研究。

## References

- Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L, Thomas A, Weeden N, Thomas H, King I. 2006. From crop to model to crop: identifying the genetic basis of the staygreen mutation in the Lolium/Festuca forage and amenity grasses. *New Phytologist*, 172 (4): 592 - 597.
- Barry C S, McQuinn R P, Chung M Y, Besuden A, Giovannoni J J. 2008. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the *green-flesh and chlorophyll retainer* mutations of tomato and pepper. *Plant Physiology*, 147 (1): 179 - 187.
- Bell A, Moreau C, Chinoy C, Spanner R, Dalmais M, Signor C L, Bendahmane A, Klenell M, Domoney C. 2015. SGRL can regulate chlorophyll metabolism and contributes to normal plant growth and development in *Pisum sativum* L. *Plant Molecular Biology*, 89 (6): 539 - 558.
- Biehler E, Mayer F, Hoffmann L, Krause E, Bohn T. 2010. Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 75 (1): 55 - 61.
- Brandi F, Bar E, Mourgues F, Horvath G, Turcsi E, Giuliano G, Liverani A, Tartarini S, Lewinsohn E, Rosati C. 2011. Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology*, 11 (1): 24.
- Cao S F, Liang M H, Shi L Y, Shao J R, Song C B, Bian K, Chen W, Yang Z F. 2017. Accumulation of carotenoids and expression of carotenogenic genes in peach fruit. *Food Chemistry*, 214: 137 - 146.
- Caprioli I, Lafuente M T, Rodrigo M J, Mencarelli F. 2009. Influence of postharvest treatments on quality, carotenoids, and abscisic acid content of stored "Spring Belle" peach (*Prunus persica*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15): 7056 - 7063.
- Charoenchongsuk N, Ikeda K, Itai A, Oikawa A, Murayama H. 2015. Comparison of the expression of chlorophyll-degradation-related genes during ripening between stay-green and yellow-pear cultivars. *Scientia Horticulturae*, 181: 89 - 94.
- Dong Xin-tian, Cao Hong-bo, Zhang Fei-yan, Han Yan, Jia Hao, Li Dan, Zhang Xue-ying, Chen Hai-jiang. 2015. Effects of shading fruit with opaque paper bag on carotenogenesis and related gene expression in yellow-flesh peach. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (4): 633 - 642. (in Chinese)
- 董新甜, 曹洪波, 张飞燕, 韩艳, 贾浩, 李丹, 张学英, 陈海江. 2015. 遮光性套袋对黄肉桃类胡萝卜素合成及相关基因表达的影响. *园艺学报*, 42 (4): 633 - 642.
- Fang C, Li C C, Li W Y, Wang Z, Zhou Z K, Shen Y T, Wu M, Wu Y S, Li G Q, Kong L A, Liu C M, Jackson S A, Tian Z X. 2014. Concerted evolution of D1 and D2 to regulate chlorophyll degradation in soybean. *The Plant Journal*, 77 (5): 700 - 712.
- Fraser P D, Enfissi E M A, Halket J M, Truesdale M R, Yu D, Gerrish C, Bramley P M. 2007. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *The Plant Cell*, 19 (10): 3194 - 3211.
- Fraser P D, Romer S, Shipton C A, Mills P B, Kiano J W, Misawa N, Drake R D, Schuch W, Bramley P M. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (2): 1092 - 1097.
- Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D, Hirschberg J. 2006. A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *The Plant Cell*, 18 (8): 1947 - 1960.
- Gong D D, Cao S F, Sheng T, Shao J R, Song C B, Wo F C, Chen W, Yang Z F. 2015. Effect of blue light on ethylene biosynthesis, signalling and fruit ripening in postharvest peaches. *Scientia Horticulturae*, 197: 657 - 664.
- Hu Z L, Deng L, Yan B, Luo M, Chen X Q, Hu T Z, Chen G R. 2011. Silencing of the *LeSGRI* gene in tomato inhibits chlorophyll degradation and exhibits a stay-green phenotype. *Biologia Plantarum*, 55 (1): 27 - 34.
- Jiao Y, Lau O S, Deng X W. 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature reviews Genetics*, 8 (3): 217.
- Lau O S, Deng X W. 2010. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (5): 571 - 577.
- Luo Z D, Zhang J H, Li J H, Yang C X, Wang T T, Bo O Y, Li H X, Giovannoni J, Ye Z B. 2013. A STAY-GREEN protein SISGR1 regulates

- lycopene and  $\beta$ -carotene accumulation by interacting directly with SIPSY1 during ripening processes in tomato. *New Phytologist*, 198: 442 - 452.
- Ma G, Zhang L, Kato M, Yamawaki K, Kiriwa Y, Yahata M, Ikoma Y, Matsumoto H. 2011. Effect of blue and red LED light irradiation on  $\beta$ -cryptoxanthin accumulation in the flavedo of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (1): 197 - 201.
- Oliveira A, Pintado M, Almeida D P F. 2012. Phytochemical composition and antioxidant activity of peach as affected by pasteurization and storage duration. *LWT-Food Science and Technology*, 49 (2): 202 - 207.
- Park S Y, Yu J W, Park J S, Li J J, Yoo S C, Lee N Y, Lee S K, Jeong S W, Seo H S, Koh H J, Jeon J S, Park Y I, Paek N C. 2007. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *The Plant Cell*, 19 (5): 1649 - 1664.
- Qiu K, Li Z P, Yang Z, Chen J Y, Wu S X, Zhu X Y, Gao J, Ren G D, Kuai B, Zhou X. 2015. EIN3 and ORE1 accelerate degreening during ethylene-mediated leaf senescence by directly activating chlorophyll catabolic genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 11 (7): e1005399.
- Ren G D, An K, Liao Y, Zhou X, Cao Y J, Zhao H F, Ge X H, Kuai B. 2007. Identification of a novel chloroplast protein AtNYE1 regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144 (3): 1429 - 1441.
- Roca M, Hornero-Méndez D, Gandul-Rojas B, Mínguez-Mosquera M I. 2006. Stay-green phenotype slows the carotenogenic process in *Capsicum annuum* (L.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (23): 8782 - 8787.
- Rong H, Tang Y Y, Zhang H, Wu P Z, Chen Y P, Li M, Wu G J, Jiang H W. 2013. The *Stay-Green Rice like* (SGRL) gene regulates chlorophyll degradation in rice. *Journal of Plant Physiology*, 170 (15): 1367 - 1373.
- Sakuraba Y, Kim D, Kim Y S, Hörtensteiner S, Paek N C. 2014b. *Arabidopsis* STAYGREEN-LIKE (SGRL) promotes abiotic stress-induced leaf yellowing during vegetative growth. *FEBS Letters*, 588 (21): 3830 - 3837.
- Sakuraba Y, Kim Y S, Yoo S C, Hörtensteiner S, Paek N C. 2013. 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase functions in metabolic channeling of chlorophyll breakdown intermediates during leaf senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430 (1): 32 - 37.
- Sakuraba Y, Park S Y, Kim Y S, Wang S H, Yoo S C, Hörtensteiner S, Paek N C. 2014a. *Arabidopsis* STAY-GREEN2 is a negative regulator of chlorophyll degradation during leaf senescence. *Molecular Plant*, 7 (8): 1288 - 1302.
- Sakuraba Y, Schelbert S, Park S Y, Han S H, Lee B D, Andrés C B, Kessler F, Hörtensteiner S, Paek N C. 2012. STAY-GREEN and chlorophyll catabolic enzymes interact at light-harvesting complex II for chlorophyll detoxification during leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24 (2): 507 - 518.
- Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H, Kusaba M. 2007. Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (35): 14169 - 14174.
- Song Y, Yang C W, Gao S, Zhang W, Li L, Kuai B K. 2014. Age-triggered and dark-induced leaf senescence require the bHLH transcription factors PIF3, 4, and 5. *Molecular Plant*, 7 (12): 1776 - 1787.
- Thomas H, Howarth C J. 2000. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany*, 51 (suppl 1): 329 - 337.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M. 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (25): 11626 - 11631.
- Tong Z G, Gao Z H, Wang F, Zhou J, Zhang Z. 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 10 (1): 71.
- Tuan P A, Thwe A A, Kim Y B, Kim J K, Kim S J, Lee S H, Chung S O, Park S U. 2013. Effects of white, blue, and red light-emitting diodes on carotenoid biosynthetic gene expression levels and carotenoid accumulation in sprouts of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (50): 12356 - 12361.
- Xu P B, Lian H L, Wang W X, Xu F, Yang H Q. 2016. Pivotal roles of the phytochrome-interacting factors in cryptochrome signaling. *Molecular Plant*, 9 (4): 496 - 497.
- Zhang L, Ma G, Yamawaki K, Ikoma Y, Matsumoto H, Yoshioka T, Ohta S, Kato M. 2015. Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice sacs. *Journal of Plant Physiology*, 188: 58 - 63.
- Zhou C, Han L, Pislariu C, Nakashima J, Fu C X, Jiang Q Z, Quan L, Blancaflor E, Tang Y H, Bouton J, Udvardi M, Xia G M, Wang Z Y. 2011. From model to crop: functional analysis of a *STAY-GREEN* gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement. *Plant Physiology*, 157 (3): 1483 - 1496.