

胡晓薇,田 原,乔 梦,等. 小麦分子伴侣 *TaTCP22* 基因克隆及特性分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):27-31.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.007

小麦分子伴侣 *TaTCP22* 基因克隆及特性分析

胡晓薇¹, 田 原¹, 乔 梦¹, 付金梅², 张小红¹, 闵东红²

(1. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学农学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要:非生物胁迫可引起蛋白的功能紊乱,维持蛋白的功能构象和阻止非天然蛋白的聚合,对于细胞存活很关键。伴侣素可以帮助蛋白质在胁迫条件下复性,在植物抵抗非生物胁迫中扮演着非常重要的角色。为分析伴侣素 *TaTCP22* 的分子特性,解析伴侣素的胁迫响应机制,以小麦的 cDNA 为模板扩增得到 *TaTCP22*,利用生物信息学方法分析小麦 *TaTCP22* 的分子特性,使用 MEGA5 对小麦 *TaTCP22* 蛋白序列及其同源序列进行多序列比对分析并构建同源物种间的系统进化树;利用 GSDS 和 PHYRE2 在线工具分别对小麦 *TaTCP22* 基因结构和三级结构进行分析;从 Phytozome 数据库中获取小麦 *TaTCP22* 上游 2 000 bp 序列作为启动子,用 PLACE 数据库对小麦 *TaTCP22* 启动子的顺式作用元件进行分析;利用实时荧光定量 PCR 检测 *TaTCP22* 在不同组织及在脱落酸(abscisic acid,简称 ABA)、聚乙二醇(polyethylene glycol,简称 PEG)、水杨酸(salicylic acid,简称 SA)、氯化钠(NaCl)、低温胁迫处理下的表达量;利用 In-Fusion 技术构建 *TaTCP22*-16318GFP 载体,采用 PEG 介导法将外源基因转到小麦原生质体中,在激光共聚焦显微镜下观察基因定位情况。小麦 *TaTCP22* 全长 1 643 bp,基因编码区包含 UTR 区和 13 个内含子以及 13 个外显子;启动子元件分析表明,*TaTCP22* 包含多种逆境胁迫应答元件;亚细胞定位结果表明,*TaTCP22* 蛋白主要定位在细胞核、细胞膜和细胞质中;实时荧光定量 PCR 结果显示,*TaTCP22* 在不同组织中的表达水平不同;*TaTCP22* 对于多种非生物胁迫均有不同程度的响应,说明 *TaTCP22* 可能参与了多种胁迫应答途径。

关键词:小麦;分子伴侣;TCP-1;胁迫响应;亚细胞定位

中图分类号: Q785;S512.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0027-05

小麦是主要的粮食作物之一,其生长发育、产量及品质受到干旱、低温、盐和病虫害等生物和非生物胁迫的极大限制。仅盐害就影响约 20% 的灌溉农业^[1],因此揭示小麦抗逆的分子机制,对提高小麦产量和品质有重要意义。非生物胁迫通常造成蛋白质功能紊乱,维持蛋白质的功能结构域和阻止与非功能蛋白质聚合是细胞在非生物胁迫下存活的关键。热激蛋白/分子伴侣是一类在细胞中帮助其他蛋白折叠、组装、运输、降解的蛋白质,在非生物胁迫下,可帮助其他蛋白质复性。热激蛋白/分子伴侣可分为 5 类: HSP70 家族、伴侣素(HSP60)、HSP90 家族、Hsp100/Clp 家族、小分子热休克蛋白家族^[2-3]。TCP-1 属于伴侣素(HSP60)家族,伴侣素广泛存在于生物界,被分为 2 类: GroE (I 型)和伴侣素 CCT (II 型)^[4]。I 型是在细菌、线粒体、叶绿体中发现的,II 型是在古细菌和真核生物的细胞质中发现的^[5]。CCT 是一种广泛存在于细胞浆中的异型寡聚蛋白,在肌动蛋白、微管蛋白的组

装和折叠中发挥重要的作用,具有相同的双环背靠背垛叠结构(back to back stacked rings),由 14~18 个亚基组成,每个亚基的分子量约为 60 ku。真核细胞的 CCT 由 2 个花托样结构构成,只有少数蛋白是与 CCT 结合的天然底物^[6]。除哺乳动物睾丸中发现的一种组织特异性亚基类型 CCT ζ -2 外,所有生物的 CCT 都由 8 个相同的亚基(α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ)构成^[7]。Yamada 等从红树林 cDNA 中克隆 BsCCT α 转化的大肠杆菌能增强对盐和渗透胁迫的忍耐性^[8]。前期研究主要集中在 CCT 伴侣素的结构、功能及作用底物方面,且在动物中的研究较多,而对 CCT 在植物体中响应胁迫的功能研究较少。本研究从小麦中克隆到 1 个伴侣素基因 *TaTCP22*,并对小麦 *TaTCP22* 的生物学特性以及参与非生物胁迫的应答机制进行研究,为阐述 CCT 提高小麦抗逆性的分子机制提供理论依据。

1 材料方法

1.1 试验材料

小麦轮选 987 种子由西北农林科技大学小麦育种课题组提供。16318 GFP 载体由笔者所在实验室保存。小麦播种在土中(蛭石、泥炭土体积比=1:1),在温室适宜的条件中生长 2 周,取出后用蒸馏水将根冲洗干净,置于滤纸上进行干燥处理,将干燥后的整株放入液氮中冷冻 10 min 后取出并迅速保存到 -80 ℃ 冰箱中准备提取 RNA。

1.2 方法

1.2.1 基因 *TaTCP22* 的全长克隆 利用美国国立生物技术

收稿日期:2016-05-27

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2014ZX0800203B、2016ZX08002002-010); 陕西省科技攻关项目(编号:2014K02-04-05); 陕西省科技统筹创新计划(编号: 2014KTZB02-01-01)。

作者简介:胡晓薇(1990—),女,新疆阿勒泰人,硕士研究生,主要从事小麦逆境生理学方向的研究。E-mail:15209279602@163.com。
通信作者:张小红,博士,副教授,主要从事经济植物的组织培养及微体繁殖技术、植物细胞工程与作物遗传改良、植物逆境生理学方向的研究。E-mail:mdh2493@126.com;zhxh2493@126.com。

信息中心 (NCBI) 网站的相关程序对测序结果进行比对, 找出小麦 *TaTCP22* 基因的全长序列, 利用 DNAMAN 设计正向引物 5′ - ATGGCGGCCAGGC - 3′ 和反向引物 5′ - TTAAGGCTTGAGAGCAATCG - 3′。以小麦 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增片段总长为 828 bp, 反应程序为 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 45 s, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并利用 DNA 纯化回收试剂盒 (TaKaRa) 进行胶回收。用 Zero Back Fast Ligation Kit (TIANGEN) pZeroBack/blunt 载体快速连接胶回收产物, 利用热激法将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 中, 然后进行菌液 PCR 阳性鉴定, 对阳性菌液进行测序, 将其中正确的保菌备用。

1.2.2 进化树和基因蛋白序列分析 根据小麦 *TaTCP22* 蛋白序列进行同源性搜索, 下载与小麦 *TaTCP22* 蛋白序列相似度 >50% 的其他物种蛋白序列。使用 MEGA5 对 *TaTCP22* 蛋白序列进行多序列比对分析, 将分析结果使用邻接法生成系统进化树, 其中 Bootstrap 值设为 1 000。

1.2.3 基因结构和三级结构预测 根据 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 在线工具对基因的结构进行分析, 制作小麦 *TaTCP22* 基因外显子 - 内含子结构示意图。利用 PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 在线工具对基因的三级结构进行预测。

1.2.4 启动子顺式作用元件分析 从基因组数据库 Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php>) 中选取基因起始密码子上游 2 000 bp 序列作为启动子区, 利用植物顺式作用元件数据库 PLACE26.0 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 分析基因的顺式作用元件。

1.2.5 亚细胞定位 利用 In-Fusion 技术构建 *TaTCP22* - 16318GFP 载体, 利用聚乙二醇 (PEG) 诱导转化法将外源基因转到小麦原生质体中, 25 ℃ 培养 18 h, 在激光共聚焦显微镜下观察其定位情况。

1.2.6 组织特异性及表达模式分析 分别取小麦品种轮选 987 的根、茎、叶、雌蕊、雄蕊、颖壳、胚性愈伤组织为试验材料, 液氮速冻保存。对生长 2 周的小麦幼苗分别进行脱落酸

(ABA, 200 μ mol/L) 和水杨酸 (SA, 1 mmol/L)、干旱 (6% PEG)、低温 (4 ℃)、NaCl (200 mmol/L) 处理, 并分别于处理后 0、1、2、4、8、12、24、48 h 取样, 液氮速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱备用。

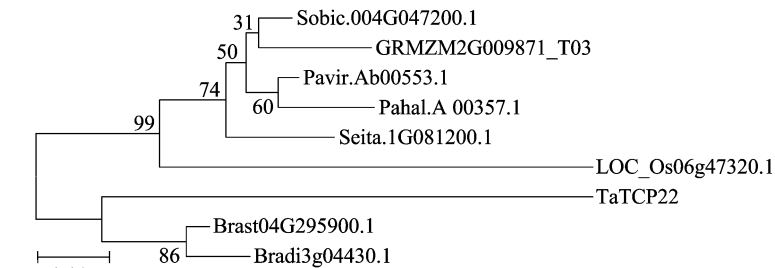
用 TRIzol 试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司) 提取总 RNA, 分别利用小麦不同组织和 5 种胁迫下的总 RNA 为模板, 以 SYBR Green 染料法进行实时荧光定量 PCR。用实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96) 进行 PCR 扩增, 反应体系如下: 2 \times Taq PCR Master Mix (含荧光染料) 12.5 μ L、10 μ mol/L 引物各 1 μ L、ddH₂O 7.5 μ L、cDNA 模板 3 μ L。反应条件为 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 10 s, 58 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环。PCR 引物序列为 F: 5′ - AGCCTGACCGCATCCTATTA - 3′, R: 5′ - AGCGACTTTGGCCTGAAC - 3′。以小麦 β -actin 基因为内标, 其引物序列为 β -actin - F: 5′ - CTCCTCACAA CAACCGC - 3′ 和 β -actin - R: 5′ - TACCAGGAACCTCCATA CCAAC - 3′。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因表达量。

2 结果与分析

2.1 *TaTCP22* 的特性分析

小麦 *TaTCP22* 全长 1 674 bp, 编码 557 个氨基酸, 其对应蛋白的分子量为 60.0 ku, 等电点为 9.13。氨基酸序列分析发现, 小麦 *TaTCP22* 蛋白包含 1 个 Porin3 保守域, 属于 Porin3 转录因子家族第一大类。运用 MEGA5 软件对 *TaTCP22* 蛋白及其他物种中的同源蛋白做系统进化树分析 (图 1)。用 DNAMAN 分析二穗短柄草、玉米、高粱、柳枝稷、水稻等作物的蛋白保守域, 图 2 结果显示, 小麦 *TaTCP22* 与短柄草亲缘关系最近, 亲缘关系越近, 蛋白结构越相似。

从 Phytozome 基因组数据库中获得基因组序列和编码序列 (coding sequence, 简称 CDS), 对小麦 *TaTCP22* 外显子 - 内含子结构进行分析。图 3 结果表明, 该基因编码区包含非编码区 (untranslated region, 简称 UTR) 和 13 个内含子以及 13 个外显子; 对该蛋白的三级结构进行分析发现, 小麦 *TaTCP22* 三级结构预测的可信度为 100%, 包含 18 个 α 螺旋结构和 19 个 β 折叠结构。



Bradi—二穗短柄草; Brast—短柄草; Sobc—高粱; GRMZM—玉米; Pavir—柳枝稷; Pahal—黍草; Seita—狗尾草; LOC_O—水稻; TaTCP22—小麦。图 2 同
图 1 小麦与二穗短柄草、玉米、高粱、柳枝稷、水稻等 *TaTCP22* 蛋白进化树分析结果

2.2 启动子顺式作用元件分析

用 PLACE 在线工具分析小麦 *TaTCP22* 启动子顺式作用元件, 结果 (表 1) 发现, 该启动子区域中包含 ABRE、ACGT、LTRE、MYB、MYC 等逆境相关的顺式作用元件^[9], 其中 MYC 元件数量最多, 为 24 个, 其次为 ACGT。据报道, 这些元件在植物处于 ABA、低温、干旱等胁迫响应中发挥作用^[10-11]。

2.3 亚细胞定位

将 *TaTCP22* 与 GFP 蛋白融合的 *TaTCP22* - hGFP 融合表达载体和 GFP 空载体分别转入小麦原生质体中, 在激光共聚焦显微镜下进行观察, 结果显示, 在转入空载体的小麦原生质体整个细胞中可见明亮的绿色荧光 (图 4 - A), 转入 *TaTCP22* - hGFP 融合表达载体的小麦原生质体主要在细胞膜、细胞质和细胞核中可见绿色荧光 (图 4 - B)。结果说明小麦 *TaTCP22* 主要分布在细胞膜、细胞质和细胞核中。



图2 不同物种间 TaTCP22 保守域序列比对

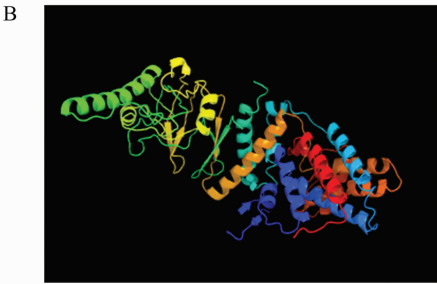


图3 基因结构(A)与三级结构预测(B)

表 1 *TaTCP22* 启动子逆境相关顺式作用元件分析

顺式作用元件	数量(个)	识别序列	功能
ABRE	6	ACGTG	ABA 响应元件
ACGT	14	ACGT	干旱和黑暗诱导
LTRE	2	CCGAA/C	低温响应元件
MYB	14	C/TAACNA/G	干旱响应元件
MYC	24	CANNTG	ABA 和低温胁迫响应元件

2.4 表达模式分析

TaTCP22 在小麦组织中的特异性表达分析结果(图 5 - A)显示,*TaTCP22* 基因在根、茎、叶、雌蕊、雄蕊、颖壳、愈伤中都有表达,根中表达量最高,说明 *TaTCP22* 主要在根中发挥作用。茎、叶中的表达量次之,雄蕊、愈伤和颖壳的表达量相似,雌蕊中表达量最少。

迄今为止,不同物种中鉴定出的大部分 *TaTCP22* 基因参与了对生物和非生物逆境的响应。通过荧光定量PCR检测

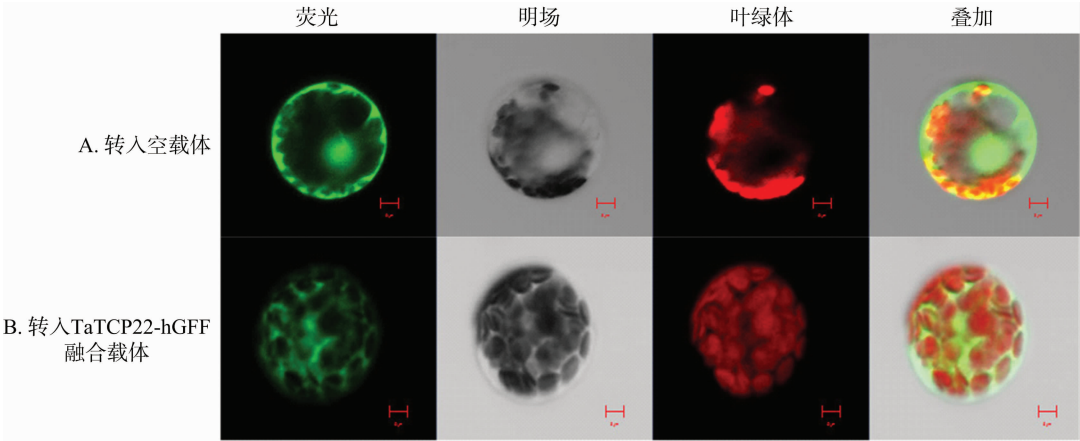
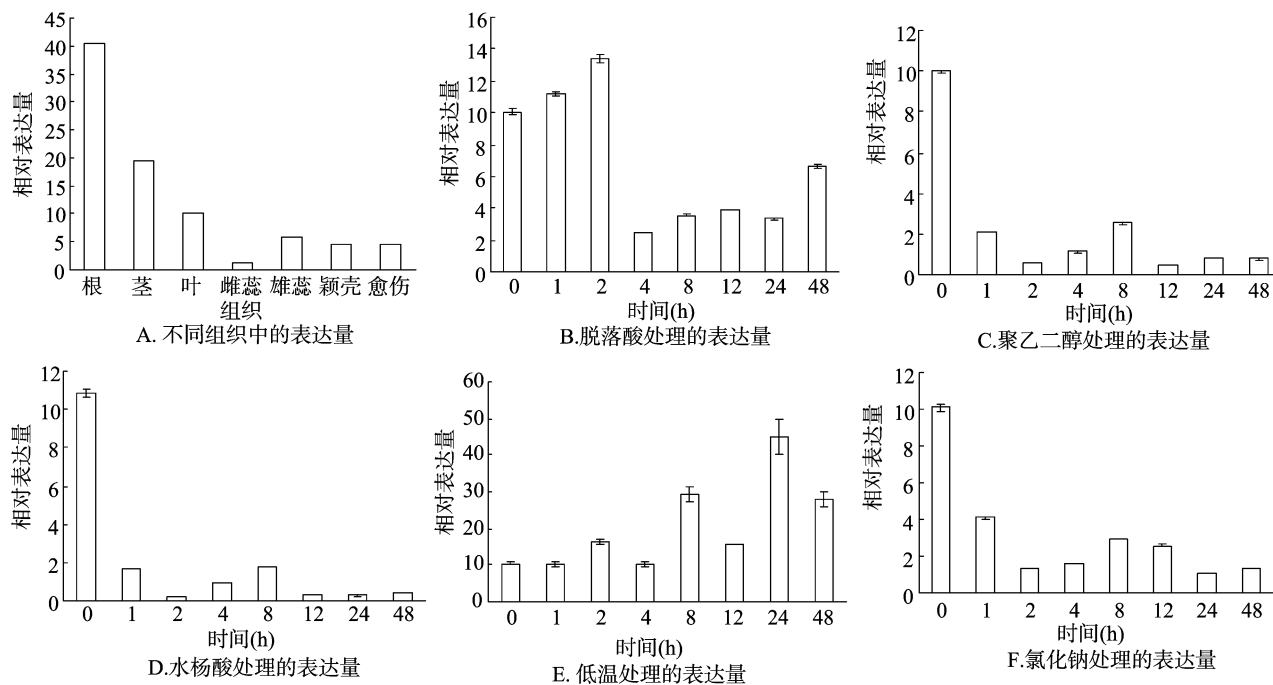


图4 *TaTCP22* 亚细胞定位

ABA(200 μ mol/L)和 SA(1 mmol/L)、干旱(6% PEG)、低温(4 $^{\circ}$ C)、NaCl(200 mmol/L)等不同胁迫处理下 *TaTCP22* 基因的表达量,图 5 结果表明,PEG、SA、NaCl 处理下 *TaTCP22* 基

因的表达量下调;4 $^{\circ}$ C 低温处理下,*TaTCP22* 在处理 2 h 后被诱导表达,2 h 后表达量波动变化,24 h 时表达量达到最大值。ABA 处理下,*TaTCP22* 表达量在处理 2 h 达到最大值,之

图5 *TaTCP22* 在小麦不同组织中的表达量和不同处理下的表达量

后都低于正常水平。上述结果表明, *TaTCP22* 基因的表达, 受 ABA、SA、干旱、低温和 NaCl 的诱导, 在 ABA、干旱、NaCl 处理下的表达模式有些相似。

3 讨论

TCP-1 广泛存在于真核及原核生物中, 是一个典型的分子伴侣, 受多种生物逆境和非生物逆境的诱导^[12]。真核细胞中双环背对背堆叠的多聚体分子伴侣素 (chaperonin) TRiC/CCT 是最为复杂的分子伴侣, 可以帮助 5% ~ 10% 的胞质蛋白进行折叠^[13-15], 包括许多重要的结构和调节蛋白, 如细胞骨架组成的微管蛋白和肌动蛋白、细胞周期调控蛋白 CDC20 和 CDH1^[16-17]。

TRiC/CCT 蛋白质的折叠是依赖 ATP^[18-19] 进行的。本研究中的 *TaTCP22* 编码 557 个氨基酸, 其保守域 C 端和 N 端包含 β 折叠结构, 其顶端结构域包含 1 个螺旋突出结构域; 赤道结构域形成 1 个环形接口, 包含参与核苷酸表达的大部分残基, 可与 ATP 结合并有微弱的 ATP 酶活性; 中间区域形成的顶端表面口袋与核苷酸结合。CCT 底物蛋白别构后形成单链, 进入 CCT 中间内腔, 与顶端结构域结合, 形成复合物, 该复合物与 ATP 结合后, 可依赖 ATP 水解释放的能量改变 CCT 顶端结构螺旋突出结构域的构象, 并带动环内构象的改变, 完成蛋白质的折叠与组装^[7,20]。

目前关于植物分子伴侣功能特性的研究是有限的, 当植物遭受胁迫时, 植物体内的酶和结构蛋白发生结构和功能的改变, 因此细胞可在应激条件下维持蛋白质功能结构的构象, 防止非天然蛋白质的聚集使得细胞在应激条件下的存活显得尤为重要^[21]。为维持细胞间的稳态, sHsp、Hsp70 可维持蛋白质的功能构象, 阻止在胁迫下对细胞存活非常重要的蛋白质的聚合, Hsp60、Hsp70 和 Hsp90 可维持非天然蛋白的复性。当聚合形成一些变性蛋白和错误折叠蛋白时, Hsp100/Clp 蛋

白可溶解错误蛋白, 重新折叠形成有功能的蛋白, 或通过蛋白酶降解这些蛋白^[22]。本研究中, *TaTCP22* 基因在 ABA 和 4 °C 低温处理下被诱导表达, 可能参与了维持一些非天然蛋白质复性的过程, 推测其参与了胁迫应答。在啤酒酵母属中, CCT α 在低温条件下, mRNA 和蛋白的表达水平都提高了^[23], 这与本试验研究结果一致; 将 4 °C 条件下的酵母细胞转移至 10 °C 条件下, 其蛋白表达水平也明显提高, 表明 CCT α 蛋白对于初期从低温恢复转至高温生长条件非常重要, 与其他热激蛋白从高温恢复一致, 推测本试验中的 *TaTCP22* 基因也有相似的功能。植物对干旱的胁迫响应分为 ABA 依赖和 ABA 不依赖 2 种途径, *TaTCP22* 基因对干旱表现为负调控, 对 ABA 表现为正调控, 说明该基因在干旱胁迫下不依赖 ABA 的信号途径。因此推测该基因可能参与了低温调控和非依赖 ABA 的干旱调控, 在小麦适应非生物胁迫中起作用, 为研究小麦的抗逆机制提供了帮助。

参考文献:

- [1] Suarez C, Cardinale M, Ratering S, et al. Plant growth - promoting effects of *Hartmanniella diazotrophicus* on summer barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95: 23 - 30.
- [2] Boston R S, Viitanen P V, Vierling E. Molecular chaperones and protein folding in plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32 (1/2): 191 - 222.
- [3] Wang J, Martin E, Gonzales V, et al. Differential regulation of small heat shock proteins in transgenic mouse models of neurodegenerative diseases[J]. *Neurobiol Aging*, 2008, 29: 586 - 597.
- [4] Kubota H, Hynes G, Willison K. The Chaperonin containing t - complex polypeptide - 1 (TCP - 1) [J]. *The FEBS Journal*, 1995, 230(1): 3 - 16.
- [5] Ranson N A, White H E, Saibil H R. Chaperonins[J]. *Biochemical*

- Journal, 1998, 333: 233–242.
- [6] Ursic D, Sedbrook J C, Himmel K L, et al. The essential yeast TCP1 protein affects actin and microtubules [J]. Molecular Biology of the Cell, 1994, 5(10): 1065–1080.
- [7] Valpuesta J M, Martín – Benito J, Gómez – Puertas P, et al. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT [J]. Febs Letters, 2002, 529(1): 11–16.
- [8] Yamada A, Sekiguchi M, Mimura T, et al. The role of plant CCT alpha in salt – and osmotic – stress tolerance [J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(9): 1043–1048.
- [9] Baker S S, Wilhelm K S, Thomashow M F. The 5′ – region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis – acting elements that confer cold –, drought – and ABA – regulated gene – expression [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24(5): 701–713.
- [10] Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, et al. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene – product binds to the conserved MYB recognition sequence [J]. Plant Cell, 1993, 5(11): 1529–1539.
- [11] Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. Plant Cell, 2003, 15(1): 63–78.
- [12] Lopez T, Dalton K, Frydman J. The mechanism and function of group II chaperonins [J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(18): 2919–2930.
- [13] Yam A Y, Xia Y, Lin H T J, et al. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies [J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2008(15): 1255–1262.
- [14] Liang X H, Shen W, Sun H, et al. TCP1 complex proteins interact with phosphorothioate oligonucleotides and can co – localize in oligonucleotide – induced nuclear bodies in mammalian cells [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(12): 7819–7832.
- [15] Wang S Q, Zhang W J, Yang K L, et al. Isolation and characterization of a novel *Dehalobacter* species strain TCP1 that reductively dechlorinates 2, 4, 6 – trichlorophenol [J]. Biodegradation, 2014, 25(2): 313–323.
- [16] Yaffe M B, Farr G W, Miklos D, et al. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis [J]. Nature, 1992, 358: 245–248.
- [17] Vinh D B, Drubin D G. A yeast TCP – 1 – like protein is required for actin function *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 9116–9120.
- [18] Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument – Bromage H, et al. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP – 1 and structurally related subunits [J]. EMBO J, 1992, 11(13): 4767–4778.
- [19] Spiess C, Meyer A S, Reissmann S, et al. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets [J]. Trends in Cell Biology, 2004, 14(11): 598–604.
- [20] Llorca O, Martín – Benito J, Grantham J, et al. The ‘sequential allosteric ring’ mechanism in the eukaryotic chaperonin – assisted folding of actin and tubulin [J]. EMBO Journal, 2001, 20(15): 3893–4323.
- [21] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat – shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 244–252.
- [22] Ben – Zvi A P, Goloubinoff P. Review: Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones [J]. Journal of Structural Biology, 2001, 135(2): 84–93.
- [23] Somer L, Shmulman O, Dror T, et al. The eukaryote chaperonin CCT is a cold shock protein in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Cell Stress & Chaperones, 2002, 7(1): 47–54.

(上接第 26 页)

等对毛竹的根、幼茎、叶片、叶鞘、节等部分的表达分析发现, *BCH* 基因主要在叶片中表达, 而根中表达量较少^[7]; 对转基因拟南芥分析发现, 叶片中叶绿素、叶黄素、类胡萝卜素等含量升高, 表明在毛竹中 *BCH* 基因的过量表达促进了类胡萝卜素向玉米黄素转化, 使其含量增加, 抗胁迫能力增加^[8–9]。本研究从金煌芒果果皮中克隆得到了 1 个 *BCH* 基因, 对该基因在芒果中的功能研究还须要进一步通过转基因验证其功能及在对芒果果实色泽形成的作用机理, 为深入理解芒果果实色泽形成多样性的原因提供理论依据, 并为生产中着色不良成因提供改善的技术支持。

参考文献:

- [1] Tian L, Magallanes – Lundback M, Musetti V, et al. Functional analysis of beta – and epsilon – ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2003, 15(6): 1320–1332.
- [2] Sun Z R, Gannt E, Cunningham F X. Cloning and functional analysis of the β – carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(40): 24349–24352.
- [3] 徐昌杰, 陈昆松, 张上隆, 等. 甜橙 β – 胡萝卜素羟化酶 cDNA 克隆及其瞬间反义表达 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(6): 593–597.
- [4] 冯唐锴, 李思光, 汪艳璐, 等. 南丰蜜橘 β – 胡萝卜素羟化酶基因的克隆和序列分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 238–243.
- [5] Wolfrum L A, Dhindsa R S. Cloning and sequencing of the cDNA for cas17, a cold acclimation – specific gene of alfalfa [J]. Plant Physiology, 1993, 103(2): 667–668.
- [6] 赵大球, 曹春燕, 孔 芬, 等. 植物 β – 胡萝卜素羟化酶的生物信息学分析 [J]. 生物技术通报, 2010(4): 116–121.
- [7] 孙化雨, 陈 颖, 赵韩生, 等. 毛竹 β – 胡萝卜素羟化酶基因的分子特征及其功能 [J]. 林业科学, 2015, 51(10): 53–59.
- [8] Kim J, Smith J J, Tian L, et al. The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis* [J]. Plant & Cell Physiology, 2009, 50(3): 463–479.
- [9] Pons E, Alquézar B, Rodríguez A, et al. Metabolic engineering of β – carotene in orange fruit increases its *in vivo*, antioxidant properties [J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(1): 17–27.