

引用格式:

叶丽, 杨俊枫, 李民华, 李泽航, 马小川, 常媛媛, 尹韬, 盛玲, 卢晓鹏. 亚砷酸钠抑制柑橘果实柠檬酸积累的机制 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(5): 549–557.

YE L, YANG J F, LI M H, LI Z H, MA X C, CHANG Y Y, YIN T, SHENG L, LU X P. Mechanism of sodium arsenite inhibiting citrate accumulation in citrus fruits[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2023, 49(5): 549–557.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



亚砷酸钠抑制柑橘果实柠檬酸积累的机制

叶丽^{1,2}, 杨俊枫^{1,2}, 李民华³, 李泽航^{1,2}, 马小川^{1,2}, 常媛媛^{1,2}, 尹韬^{1,2}, 盛玲^{1,2}, 卢晓鹏^{1,2*}

(1.湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心长沙分中心, 湖南 长沙 410128; 3.怀化市农业气象试验站, 湖南 怀化 418000)

摘要: 以亚砷酸钠(NaAsO_2)溶液(含 6.16 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 mL/L Triton X-100、0.17 g/L NaAsO_2)喷施处理‘山下红’温州蜜柑、‘橘湘早’温州蜜柑、‘大红甜橙’树体, 离体处理‘冰糖橙’汁胞(MS 培养基含 1.0 mg/L NaAsO_2)及愈伤组织(MS 培养基含 0.5、1.0 mg/L NaAsO_2), 测定可溶性固形物(TSS)、苹果酸和柠檬酸的含量, 分析 *CsANI* 和 *CsPH8* 基因的表达及其启动子活性。结果表明: NaAsO_2 可有效降低果实、汁胞和愈伤组织的柠檬酸含量; NaAsO_2 处理后, ‘山下红’‘橘湘早’和‘大红甜橙’果实柠檬酸含量分别较对照降低 4.59% ~ 61.57%、0.67% ~ 14.92%、13.22% ~ 54.35%; NaAsO_2 处理 60 d 的‘橘湘早’果实中 *CsANI* 和 *CsPH8* 的表达量分别下降 73%和 32%, 在 NaAsO_2 处理 21 d 的‘冰糖橙’汁胞中的表达量分别降低 55%和 27%, 在 0.5 mg/L NaAsO_2 处理 20 d 的‘冰糖橙’愈伤组织中分别降低 73%和 84%; 启动子区域缺失试验结果表明, 干旱信号可能作用在 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子的 ABRE 元件上, 并调控它们的表达, NaAsO_2 处理后含有 ABRE 元件的启动子区段活性明显减弱, 推测 NaAsO_2 抑制了柑橘中 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子活性进而降低其表达, 从而减弱了柠檬酸在果实中的积累。

关键词: 柑橘; 亚砷酸钠; 柠檬酸; 基因表达; 启动子活性; *CsANI*; *CsPH8*

中图分类号: S666.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)05-0549-09

Mechanism of sodium arsenite inhibiting citrate accumulation in citrus fruits

YE Li^{1,2}, YANG Junfeng^{1,2}, LI Minhua³, LI Zehang^{1,2}, MA Xiaochuan^{1,2},
CHANG Yuanyuan^{1,2}, YIN Tao^{1,2}, SHENG Ling^{1,2}, LU Xiaopeng^{1,2*}

(1.College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.National Center for Citrus Improvement(Changsha), Changsha, Hunan 410128, China; 3.Huaihua Agrometeorological Experimental Station, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: In order to investigate the mechanism of sodium arsenite inhibiting citric acid accumulation in citrus fruits, sodium arsenite solution(containing 6.16 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL/L Triton X-100, 0.17 g/L NaAsO_2) was applied by spraying onto ‘Yamashitabeni wase’(*Citrus unshiu* Marc), ‘Juxiangzao’(*C. unshiu* Marc) and ‘Dahongtiancheng’(*C. sinensis* Osbeck), as well as to detached juice sacs(MS medium containing 1.0 mg/L NaAsO_2) and callus of ‘Bingtangcheng’(*C. sinensis* Osbeck)(MS medium containing 0.5 and 1.0 mg/L NaAsO_2). The total soluble solid(TSS), citrate and malate contents, expression levels of *CsANI* and *CsPH8* genes, and their promoter activities were analyzed. The results showed that NaAsO_2 could reduce the citrate contents of fruit, juice sacs and callus tissues. After NaAsO_2 treatment, the citrate contents of ‘Yamashitabeni wase’, ‘Juxiangzao’ and ‘Dahongtiancheng’ decreased by 4.59 to 61.57%, 0.67% to 14.92% and 13.22% to 54.35%, respectively, compared with CK group. *CsANI* and *CsPH8*

收稿日期: 2023-02-14

修回日期: 2023-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172520); 国家柑橘产业技术体系(CARS-26)

作者简介: 叶丽(1995—), 女, 贵州兴义人, 硕士研究生, 主要从事果实品质形成与调控研究, y11113273496@163.com; *通信作者, 卢晓鹏, 博士, 副教授, 主要从事果实品质形成与调控研究, xl678@hunau.edu.cn

expression levels were significantly reduced under NaAsO_2 treatment, with a 73% and 32% respectively decrease in 'Juxiangzao' fruit after 60 days of treatment, a 55% and 27% respectively decrease in 'Bingtangcheng' juice sacs after 21 days, and 73% and 84% respectively in the 'Bingtangcheng' calli callus treated with 0.5 mg/L NaAsO_2 for 20 days. The experiment under the absence of promoter subregions indicated that drought signals might act on the ABRE elements in the *CsANI* and *CsPH8* promoters to regulate their expression, while the activity of promoter segments containing ABRE elements was significantly reduced after NaAsO_2 treatment. It is speculated that NaAsO_2 inhibits the activity of *CsANI* and *CsPH8* promoters in citrus, thereby reducing their expression and weakening the accumulation of citric acid in the fruit.

Keywords: citrus; sodium arsenate; citrate; gene expression; promoter activities; *CsANI*; *CsPH8*

在产业规模不断扩大的背景下,人们对柑橘果实品质的要求越来越高^[1]。酸是影响柑橘果实口感及品质的重要评价指标^[2]。柠檬酸是柑橘中主要的有机酸,占总酸含量的85%~90%,是影响柑橘类水果风味的主要因素之一^[3]。不同类型柑橘品种的酸含量差异较大,无酸与极高酸品种的柠檬酸含量差异达44倍^[4]。有研究^[5-6]表明干旱能够影响柑橘果实柠檬酸的积累,但可通过栽培技术手段起到增糖降酸的效果,如喷施亚砷酸盐^[7-8]、砷酸铅^[9]、磷酸盐^[10]和亚砷酸钠等^[11]。

柠檬酸代谢是一个复杂的生物过程。研究显示,液泡质子泵转运是控制柑橘果实酸度的关键步骤^[12], bHLH转录因子(*CsANI*)和 $\text{P}_3\text{A-ATPase}$ 质子泵(*CsPH8*)是调控柑橘果实柠檬酸积累的主效基因^[13]。石彩云^[14]研究发现,*CsPH8*的低表达是柑橘'红暗柳'果实柠檬酸含量显著降低的主要原因。LI等^[15]发现*CsPH8*同源基因(*CitPH5*)在酸柠檬、橙、柚和朗布尔酸橙中的表达水平显著高于无酸品种。SHI等^[16]发现*CsPH8*参与了柠檬酸盐的积累。杨文萱^[17]认为,*CsANI*通过调控*CsPH8*基因表达影响果实细胞液泡内柠檬酸的积累,从而调控温州蜜柑果实酸含量。也有研究^[18]表明,*CsANI*与*CsPH4*(MYB)、*CsPH3*(WRKY)、*CsANI1*(WD)形成蛋白复合体来协同调控柑橘果实酸的积累。

本研究以柑橘果肉、愈伤组织和汁胞为材料,探究亚砷酸钠处理对酸积累的主效基因*CsANI*和*CsPH8*表达的影响,分析*CsANI*和*CsPH8*启动子活性,以明晰亚砷酸钠对柑橘有机酸积累的调控机制,为开发安全有效的果实品质调控剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

'山下红'温州蜜柑、'橘湘早'温州蜜柑和'大红

甜橙'栽种于湖南农业大学教学科研基地;分离汁胞所用'冰糖橙'果实来自湖南省怀化市麻阳县果园;'冰糖橙'愈伤组织为国家柑橘改良中心长沙分中心保存。

1.2 试验设计

1.2.1 亚砷酸钠溶液喷施试验

树体喷施 NaAsO_2 溶液(含 6.16 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 mL/L Triton X-100、0.17 g/L NaAsO_2 、HCl 调 pH 至 3.5),对照(CK) 喷施清水。2017 年 6 月 1 日用 NaAsO_2 溶液喷施'山下红'树体,每 30 d 喷施 1 次,共喷施 4 次;分别在喷施后第 60、90、120、146 天进行采样。2019 年 7 月 23 日用 NaAsO_2 处理溶液喷施'橘湘早'树体 1 次;于 2019 年 8 月 12 日开始进行采样,每隔 20 d 取样至果实成熟,共取样 3 次。于 2018 年 6 月 28 日起用 NaAsO_2 溶液喷施'大红甜橙'树体,每 30 d 喷施 1 次,于喷施后 84、135、165 d 分别取样。以上试验均选取树体健康、树势基本一致的植株,每个处理 3 株重复,采集树冠四周外围中上部大小和成熟度一致的果实 5~10 个。果实采摘后一部分用于可溶性固形物、柠檬酸和苹果酸含量的测定;一部分分离果肉,置于液氮速冻,于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,备用。

1.2.2 亚砷酸钠溶液处理'冰糖橙'汁胞

2021 年 10 月 5 日取样,采用 75%乙醇消毒果实 10 min,1%次氯酸钠溶液对果实消毒 15~20 min,去果皮,剥开囊瓣,切成 0.5 cm^3 左右的小块,每小块基部带一薄层中果皮(白色组织)。用镊子分别取 4~5 块接种于 MS 无菌培养基(CK)和含 1.0 mg/L NaAsO_2 的 MS 培养基中,白色组织接触培养基表面。培养温度为 $(25 \pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$,16 h 光培养或 8 h 暗培养。于第 1 天取样后每隔 7 d 取样至 35 d

结束, 样品一部分用于测定可溶性固形物、柠檬酸和苹果酸的含量, 一部分用液氮速冻, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存, 备用。

1.2.3 亚砷酸钠处理‘冰糖橙’愈伤组织

将‘冰糖橙’愈伤组织分别置于含 0.5、1.0 mg/L NaAsO_2 的 MS 培养基, 于第 20 天和第 40 天取样, 一部分取样置于液氮中速冻, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用; 一部分用于可溶性固形物、柠檬酸和苹果酸含量的测定。

1.3 果实品质的分析

采用手持糖酸一体机(爱拓, PAL-BX/ACID1, 日本)测定可溶性固形物和酸含量; 参照 LU 等^[19]方法, 采用日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱(HPLC)测定可溶性固形物、柠檬酸和苹果酸含量。

1.4 总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 分析

采用 SteadyPure 通用型 RNA 提取试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司)提取果肉、汁胞、愈伤组织的总 RNA; 采用紫外分光光度计(IMPLEN Nanophotometer P-330, 德国)测定 RNA 的纯度和浓度; 采用反转录试剂盒(Evo M-MLV, 艾科瑞生物工程有限公司)合成 cDNA, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。荧光定量 PCR 所用的引物 *Actin*-F(5'-CACAC TGGAGTGATGGTTGG-3'), *Actin*-R(5'-ATTGGC CTTGGGGTTAAGAG-3'), *CsANI*-F(5'-GCTGTT GATTGAAGTTACTG-3'), *CsANI*-R(5'-CCTCTT ACCTCCACAATG-3'), *CsPH8I*-F(5'-ACCCTTCA TGGGCTTCAAC-3'), *CsPH8I*-R(5'-GCTTCACC ACTGACTCGACA-3')均由 Primer Premier 5 设计, 送北京擎科生物科技有限公司合成。使用荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, FX96, CA)进行 RT-PCR 扩增, PCR 反应体系(10 μL): SYBR Green 5 μL 、上下游引物各 0.25 μL 、模板 cDNA 1 μL 和 ddH₂O 3.5 μL 。PCR 反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 40 个循环。以 *Actin* 为内参基因, 计算相对表达量, 3 次生物学重复。

1.5 *CsANI* 与 *CsPH8* 启动子顺式作用元件的分析及载体的构建

选取 *CsANI* 与 *CsPH8* 启动子, 参考甜橙基因

组^[20]获得 *CsANI* 与 *CsPH8* 基因启动子序列, 运用在线软件 Plant-CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子序列中的逆境相关顺式作用元件。

CsANI 启动子从 5'端逐段缺失, 分别命名为 $P_{ANI(-2.0K)}$ 、 $P_{ANI(-1.5K)}$ 、 $P_{ANI(-1.1K)}$ 和 $P_{ANI(-0.3K)}$; *CsPH8* 启动子缺失后分别命名为 $P_{PH8(-1.6K)}$ (启动子全长为 1600 bp)、 $P_{PH8(-0.7K)}$ 、 $P_{PH8(-0.5K)}$ 。克隆 *CsANI* 与 *CsPH8* 全长及缺失的启动子片段, 连接至含 35S 驱动的 pCAMBIA1301-GUS 植物表达载体上。将上述构建成功的载体转化农杆菌, 备用。片段扩增引物如表 1 所示。

表 1 不同启动子片段扩增所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in different promoter fragment amplifications

引物名称	引物序列(5'-3')
$P_{ANI(-2.0K)}$ -F	cccaagcttCCGTCATTAATAAATAATATTAACAT
$P_{ANI(-1.5K)}$ -F	cccaagcttTGATATTGGTTCATTTACAAA
$P_{ANI(-1.1K)}$ -F	cccaagcttGAAGAAGAAAAAGAAATAAAAG
$P_{ANI(-0.3K)}$ -F	cccaagcttTCTATATGCATGTTACCTTCT
P_{ANI} -R	catgccatggTCCTTTACCGACTGTATTCA
$P_{PH8(-1.6K)}$ -F	cccaagcttTAATTTGCTCAATATATAACT
$P_{PH8(-0.7K)}$ -F	cccaagcttTTAGGTTTGGGAAGATTAAGTTTTGA
$P_{PH8(-0.5K)}$ -F	cccaagcttAAAGAGGAGGCTCCTCACTCT
P_{PH8} -R	catgccatggGATTAGAGTTTGAAATCTCAACCTG

1.6 ‘冰糖橙’愈伤组织的遗传转化

参照石玮等^[21]的方法, 将构建成功的 *CsANI* 与 *CsPH8* 全长及缺失的启动子利用农杆菌转化法转化‘冰糖橙’愈伤组织。对获得的转基因愈伤株系进行阳性鉴定, 分别获得 2 个转基因愈伤阳性株系, 用 L1、L2 表示, 普通冰糖橙愈伤组织用 WT 表示。

1.7 转基因愈伤 GUS 染色

将获得的不同区段启动子阳性株系和 WT 采用 GUS 染色试剂盒(Coolaber)进行 GUS 染色。将普通冰糖橙愈伤(WT)和愈伤阳性株系(L1、L2)分别于 MS、MS+PEG、MS+PEG+ NaAsO_2 的培养基培养 25 d 后, 各称取 0.2 g 于 2 mL 离心管, 加入 1 mL GUS 染色工作液, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温育过夜, 观察愈伤组织化学反应, 拍照记录试验结果。

1.8 数据处理与分析

采用 Excel 2016 进行数据统计; 运用 SPSS 23.0 进行差异显著性分析; 采用 Sigmaplot 10.0 绘图。

2 结果与分析

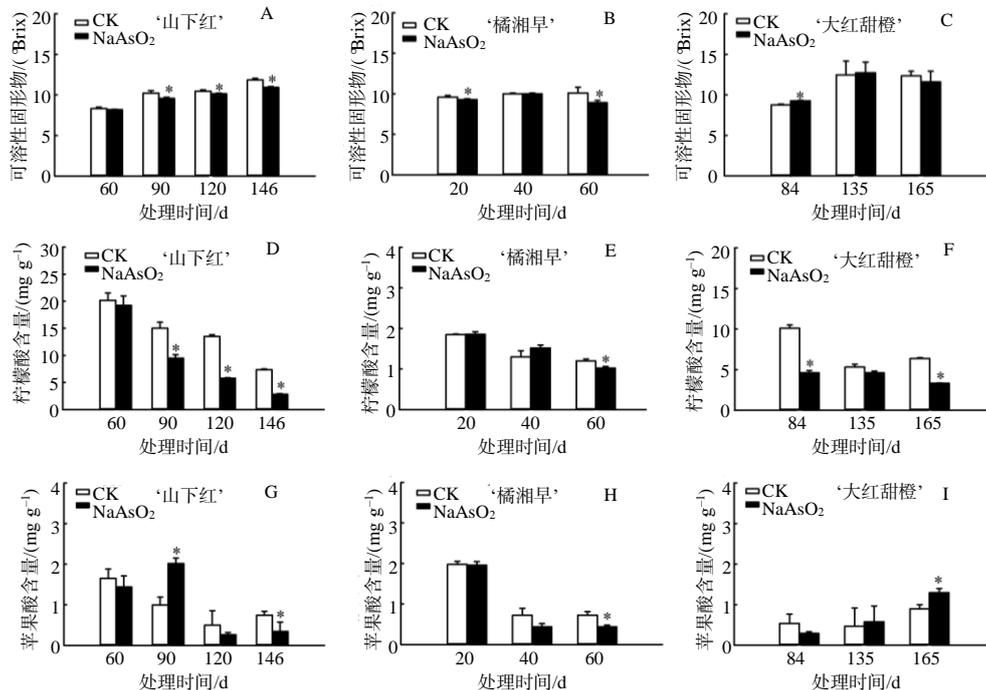
2.1 喷施亚砷酸钠对柑橘果实可溶性固形物及柠檬酸和苹果酸含量的影响

亚砷酸钠对不同品种柑橘可溶性固形物(TSS)含量的影响不同。NaAsO₂处理 90、120、146 d 的‘山下红’的 TSS 含量显著低于 CK 的, 在 146 d 时 TSS 含量较 CK 显著降低 8%(图 1-A)。“橘湘早”果实 TSS 含量在果实发育期间变化趋势平缓, 经 NaAsO₂处理 60 d 后较 CK 显著降低 12%(图 1-B)。“大红甜橙”果实 TSS 含量在果实发育前期有所积累, 果实发育后期趋于平缓, NaAsO₂处理 84 d 的果实的 TSS 含量显著高于 CK 的, 处理 135、165 d 的则低于 CK 的(图 1-C)。

NaAsO₂能显著降低柑橘的柠檬酸含量。‘山下

红’‘橘湘早’‘大红甜橙’果实柠檬酸含量随果实发育整体呈递减的趋势。‘山下红’经 NaAsO₂处理后, 柠檬酸含量较对照降低 4.59%~61.57%, 120 d 时柠檬酸含量较 CK 显著降低 57%(图 1-D)。“橘湘早”果实经 NaAsO₂处理后柠檬酸含量较对照降低 0.67%~14.92%, 60 d 时柠檬酸含量较 CK 显著降低 15%(图 1-E)。“大红甜橙”果实经 NaAsO₂处理后柠檬酸含量较对照降低 13.22%~54.35%, 84 d 时柠檬酸含量较 CK 显著降低 54%(图 1-F)。

NaAsO₂处理对不同品种果实苹果酸含量影响不同, 随果实发育‘山下红’‘橘湘早’果实的苹果酸含量整体呈现下降的趋势, 在‘大红甜橙’果实中苹果酸含量呈上升趋势。经 NaAsO₂处理后, 随处理时间延长, NaAsO₂能够抑制‘山下红’‘橘湘早’苹果酸含量的积累, 分别在 146、60 d 显著低于 CK 的(图 1-G、图 1-H), 而‘大红甜橙’果实经 NaAsO₂处理后随处理时间的延长, 苹果酸含量则逐渐高于 CK 的(图 1-I), 这可能与品种特性有关。



“*”表示同一时间 NaAsO₂处理与 CK 间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图 1 不同处理柑橘果实的可溶性固形物、柠檬酸和苹果酸含量

Fig.1 The total soluble solid, citrate and malate contents of citrus fruits under different treatments

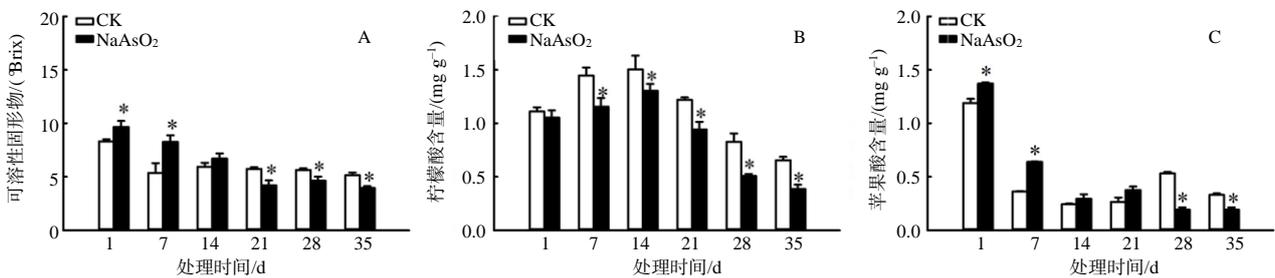
2.2 亚砷酸钠处理对离体培养‘冰糖橙’汁胞可溶性固形物及柠檬酸和苹果酸含量的影响

离体培养‘冰糖橙’汁胞的 TSS 含量随培养时间的延长整体呈递减趋势, 经 NaAsO₂处理后, 离体

‘冰糖橙’汁胞 TSS 含量于 21 d 开始显著低于 CK 的(图 2-A)。在离体培养条件下, ‘冰糖橙’汁胞中柠檬酸含量呈先上升后下降的趋势, 于第 7 天开始, NaAsO₂处理的柠檬酸含量显著低于 CK 的,

至第 35 天柠檬酸含量较 CK 显著降低 41%(图 2-B)。离体培养条件下‘冰糖橙’汁胞中苹果酸含量整体呈下降的趋势, 于第 28 天开始 NaAsO₂ 处理的

苹果酸含量显著低于 CK 的, 较 CK 显著降低 64%(图 2-C)。



“*”表示同一时间 NaAsO₂ 处理与 CK 间的差异有统计学意义(P < 0.05)。

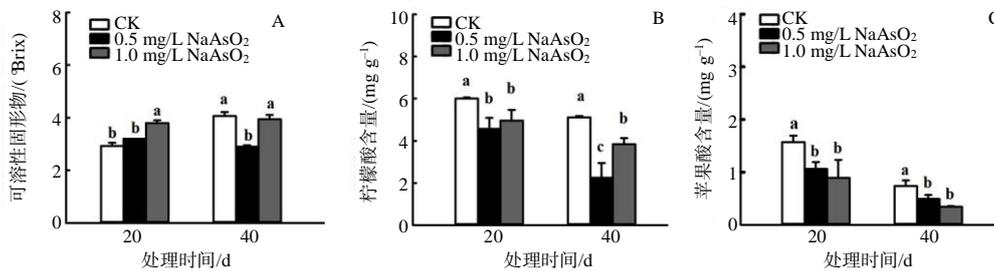
图 2 不同处理‘冰糖橙’汁胞的可溶性固形物、柠檬酸和苹果酸含量

Fig.2 The total soluble solid, citrate and malate contents of ‘Bingtangcheng’ juice sacs under different treatments

2.3 亚砷酸钠处理对‘冰糖橙’愈伤组织可溶性固形物及柠檬酸和苹果酸含量的影响

不同浓度 NaAsO₂ 对‘冰糖橙’愈伤组织 TSS 含量影响不同, NaAsO₂ 处理 20 d 时, TSS 含量均高于 CK, 且 1.0 mg/L NaAsO₂ 处理‘冰糖橙’愈伤组织的效果较 0.5 mg/L NaAsO₂ 明显; 培养至 40 d, 0.5 mg/L NaAsO₂ 处理的‘冰糖橙’的 TSS 含量较 1.0

mg/L NaAsO₂ 处理的下降明显, 较 CK 显著降低 29%(图 3-A)。不同浓度 NaAsO₂ 均能显著降低柠檬酸含量, 培养至 40 d 时, 0.5 mg/L NaAsO₂ 处理的‘冰糖橙’中柠檬酸含量下降明显, 较 CK 显著下降 56%(图 3-B)。不同浓度 NaAsO₂ 也能抑制‘冰糖橙’愈伤组织苹果酸的积累, 1.0 mg/L NaAsO₂ 处理对苹果酸的抑制效果较好(图 3-C)。



“*”表示同一时间亚砷酸钠处理与 CK 间的差异有统计学意义(P < 0.05)。

图 3 不同处理‘冰糖橙’愈伤组织的可溶性固形物、柠檬酸和苹果酸含量

Fig.3 The total soluble solid, citrate and malate contents of ‘Bingtangcheng’ calli under different treatments

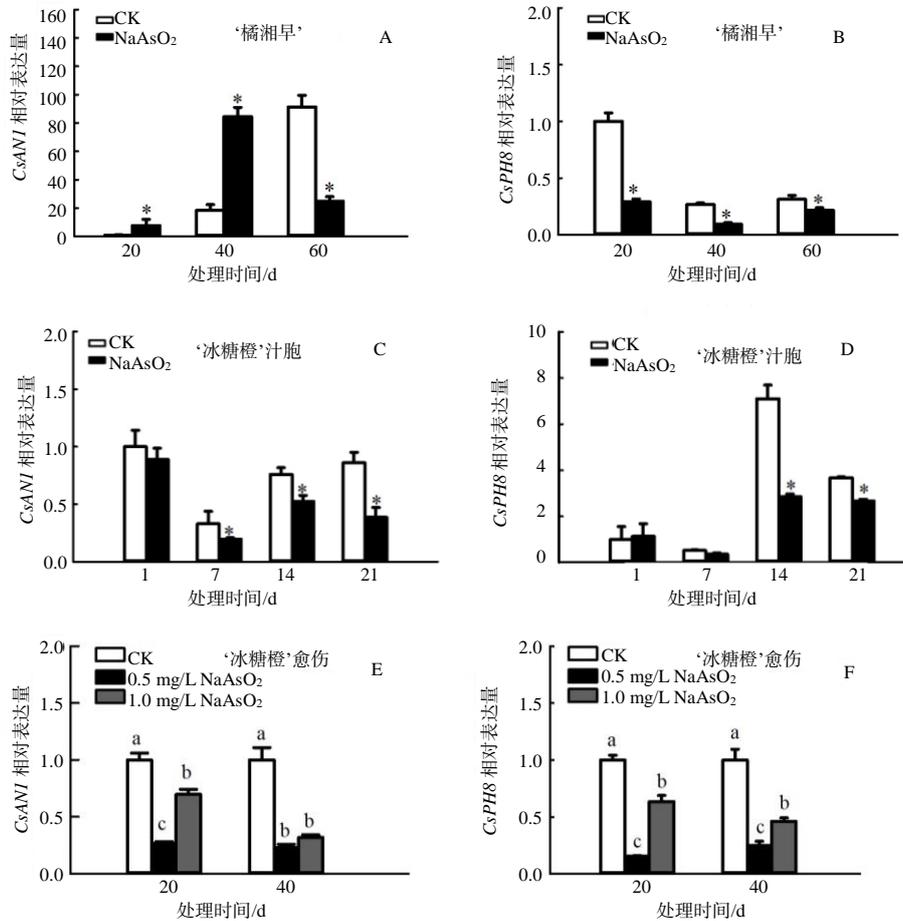
2.4 亚砷酸钠处理对柑橘柠檬酸积累关键基因 CsANI 和 CsPH8 表达的影响

为探究亚砷酸钠处理对柑橘柠檬酸积累途径相关基因表达的影响, 本研究对 CsANI 和 CsPH8 基因表达进行了分析。‘橘湘早’发育过程中 CsANI 表达量随果实成熟持续上升; 经 NaAsO₂ 处理, 20、40 d 果实中的 CsANI 表达量显著提升, 60 d 果实中 CsANI 表达量显著降低, 较 CK 低 73%(图 4-A)。CsPH8 基因表达量随果实成熟持续下降, 经 NaAsO₂ 处理后, CsPH8 表达量均显著低于 CK, 20 d 时较 CK 显著降低 71%, 60 d 时较 CK

降低 32%(图 4-B)。离体培养‘冰糖橙’汁胞中 CsANI 表达量随培养时间延长呈先下降后上升的趋势, NaAsO₂ 处理 7、14、21 d 时 CsANI 表达量均显著低于 CK 的, 其中, 第 21 天的表达量较 CK 显著降低 55%(图 4-C)。离体培养‘冰糖橙’汁胞中 CsPH8 表达量呈先下降后上升再下降的趋势, 经 NaAsO₂ 处理 14 d 时 CsPH8 表达量较 CK 显著降低 60%, 21 d 时较 CK 降低 27%(图 4-D)。0.5、1.0 mg/L 的 NaAsO₂ 处理均能显著抑制 CsANI 和 CsPH8 在‘冰糖橙’愈伤组织中的表达, 其中 0.5 mg/L 的 NaAsO₂ 处理 20 d 和 40 d 后, CsANI 表达量分别较 CK 降低 73%和 77%(图 4-E), CsPH8 的

表达量分别较 CK 降低 84% 和 75%(图 4-F)。综上所述, NaAsO₂ 可抑制柑橘果实中 *CsANI*、*CsPH8* 的

表达, 从而抑制柠檬酸的积累。



“*”和不同小写字母示同一时间 NaAsO₂ 处理与 CK 间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图 4 不同处理 *CsANI* 和 *CsPH8* 的基因表达水平

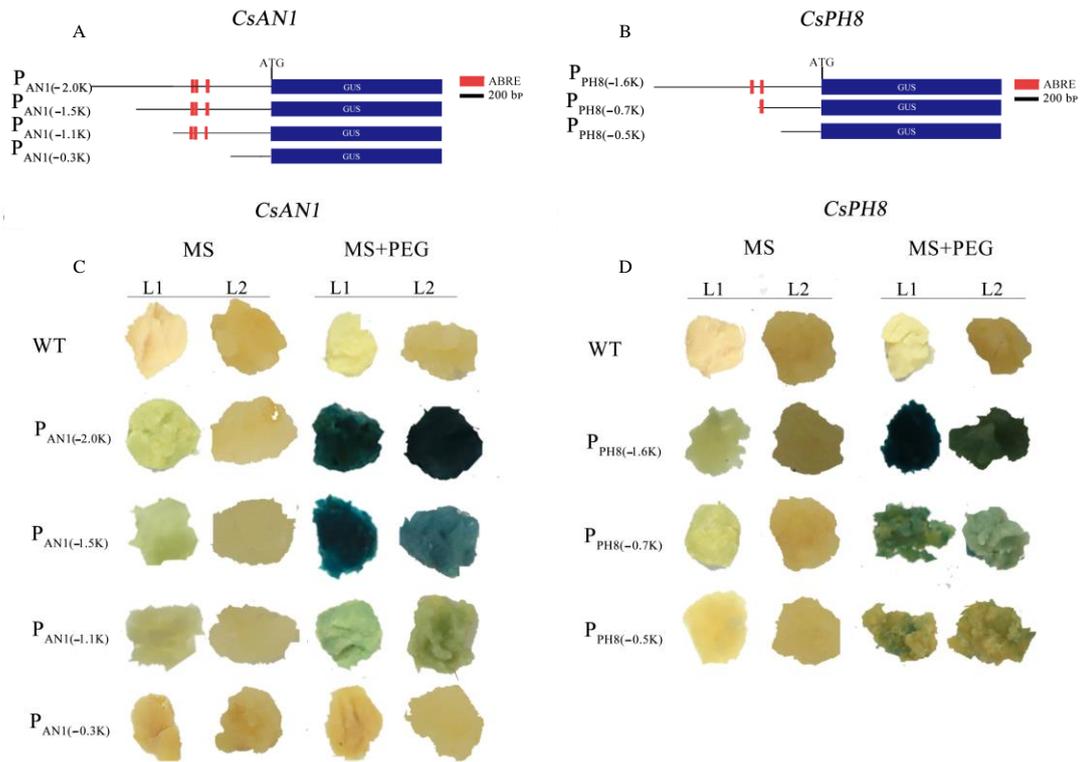
Fig.4 The expression level of *CsANI* and *CsPH8* under different treatments

2.5 柠檬酸积累关键基因 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子活性分析

对 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子序列进行分析, 发现了多个响应非生物胁迫的元件, 如 ABRE、MYB、MYC、MBS 等。将 *CsANI* 的启动子短截成 4 个不同长度的片段: P_{ANI(-2.0K)} 为启动子全长片段; P_{ANI(-1.5K)} 片段缺失多个 CGTCA-motif 元件; P_{ANI(-1.1K)} 片段分别缺失掉 1 个 ERE、MYB、MYC 元件; 而 P_{ANI(-0.3K)} 片段缺失掉全部非生物元件(图 5-A)。将全长 P_{PH8(-1.6K)} 的 5'端短截为 3 个不同长度: P_{PH8(-1.6K)} 为启动子全长片段; P_{PH8(-0.7K)} 片段缺失 2 个 MYB 和 1 个 ABRE 等元件; P_{PH8(-0.5K)} 缺失掉全部非生物元件(图 5-B)。

将不同缺失片段的 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子区

段遗传转化‘冰糖橙’愈伤组织, GUS 组织化学染色结果(图 5-C、图 5-D)显示: WT 愈伤组织无论有无 PEG 处理均未检测到 GUS 信号; PEG 处理后, P_{ANI(-2.0K)} 及 P_{ANI(-1.5K)} 愈伤组织的 GUS 信号较强, P_{ANI(-1.1K)} 愈伤组织的 GUS 信号较弱, P_{ANI(-0.3K)} 愈伤组织无信号, 表明在 *CsANI* 启动子-300~ -1500 bp 处存在响应干旱信号的核心元件; P_{PH8(-1.6K)} 愈伤组织的 GUS 信号较强, P_{PH8(-0.7K)} 愈伤组织的 GUS 信号明显变弱, P_{PH8(-0.5K)} 愈伤组织的 GUS 信号进一步变弱, 表明 *CsPH8* 启动子-500~ -700 bp 及 -700~ -1600 bp 处存在响应干旱信号的核心元件。进一步分析 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子对应区段, 均含有响应干旱胁迫的 ABRE 元件, 猜测其可能是 *CsANI* 和 *CsPH8* 响应干旱的核心元件。



A *CsAN1* 启动子缺失; B *CsPH8* 启动子缺失; C *CsAN1* 启动子超表达愈伤组织的 GUS 染色结果; D *CsPH8* 启动子超表达愈伤组织的 GUS 染色结果。

图 5 PEG 诱导 *CsAN1* 和 *CsPH8* 基因启动子活性分析结果

Fig.5 Analysis result of promoter activities of *CsAN1* and *CsPH8* induced by PEG

2.6 亚砷酸钠对 *CsAN1* 和 *CsPH8* 基因启动子活性的影响

从图 6-A、图 6-B 可以看出, NaAsO₂ 处理后 *CsAN1* 和 *CsPH8* 启动子核心区域活性均受到抑制。P_{AN1(-2.0K)}、P_{AN1(-1.5K)}和 P_{AN1(-1.1K)}的‘冰糖橙’愈伤组织在经 PEG+NaAsO₂ 处理后, GUS 信号较 PEG 组明显减弱, 而以上 3 个转基因愈伤组织均包含 ABRE 元件; 在不含 ABRE 元件上的 P_{AN1(-0.3K)}上进行 PEG 处理和 PEG+NaAsO₂ 处理后两者无显

著差异, 且活性较弱, 几乎染不上色。PEG+NaAsO₂ 处理后, 包含 ABRE 元件的 P_{PH8(-1.6K)}和 P_{PH8(-0.7K)}愈伤组织较 PEG 处理 GUS 信号明显减弱; 不含 ABRE 元件的 P_{PH8(-0.5K)}片段经 PEG 和 PEG+NaAsO₂ 处理均无显著差异, 且活性较弱。以上结果表明, NaAsO₂ 处理显著抑制了 *CsAN1* 和 *CsPH8* 启动子活性, 推测 NaAsO₂ 主要作用在 ABRE 元件上, 抑制 *CsAN1* 和 *CsPH8* 启动子活性, 从而抑制果实中柠檬酸的积累。

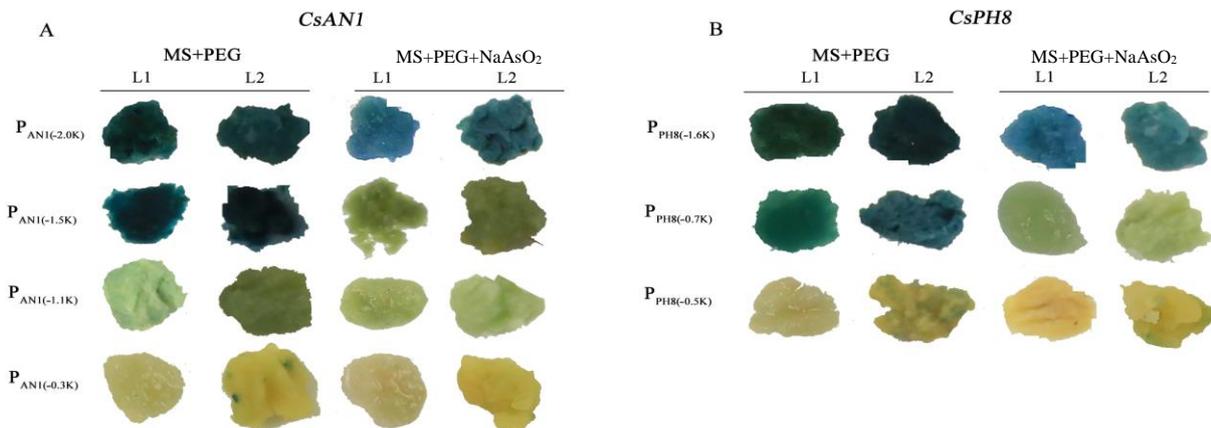


图 6 不同处理 *CsAN1* 和 *CsPH8* 基因启动子的染色活性

Fig. 6 Staining activities of *CsAN1* and *CsPH8* gene promoters under different treatments

3 结论与讨论

柠檬酸是柑橘果实中的主要有机酸,影响柑橘果实的口感和风味等^[22]。生产中为了追求果实优良品质,常使用外源物质来提升果实品质。在柑橘果实膨大期对叶面喷施硒酸钠、亚硒酸钠、酵母硒都能促进 TSS 的积累,降低有机酸的含量,从而达到提升柑橘果实品质的目的^[23]。喷施 HC-3、磷酸盐^[10]或 Zn、B^[24],使用核苷酸有机营养剂^[25]以及注射硒肥^[26]等均可降低柑橘果实酸含量。本研究中,对‘大红甜橙’‘橘湘早’和‘山下红’幼果喷施亚硒酸钠溶液,发现果实酸含量基本上都有所降低,表明喷施亚硒酸钠溶液可降低柑橘果实酸的含量。亚硒酸钠处理离体‘冰糖橙’汁胞和愈伤组织,其柠檬酸含量和苹果酸含量也显著降低。但不同柑橘品种对亚硒酸钠抑制作用的响应有所差异,对‘橘湘早’果实酸含量的影响较小,这可能与不同品种果实生长发育的特性有关。综上,亚硒酸钠对柑橘柠檬酸积累具有抑制作用,且在不同品种上抑制作用的效果存在差异。

调控柠檬酸转运的 *CsANI* 和 *CsPH8* 是控制柑橘果实酸性状的主效基因^[27]。SHI 等^[28]发现柑橘中 *CsPH8* 基因在红暗柳果实中的低表达是造成其果实低酸的重要原因。杨文萱^[17]研究发现在柑橘上喷施过量的矿质元素,如镁、氮、钙,可上调 *CsANI* 表达,增加有机酸的含量,而喷施磷肥与钾肥能够降低 *CsANI* 的表达和有机酸含量。杨文萱等^[29]采用 ABA 注射温州蜜柑果实,发现果实中柠檬酸含量变化与 *CsANI* 和 *CsPH8* 的表达水平的变化一致。本研究结果显示,亚硒酸钠处理显著抑制了‘橘湘早’果肉、‘冰糖橙’汁胞和‘冰糖橙’愈伤组织中的 *CsANI* 和 *CsPH8* 基因表达,抑制了柠檬酸积累。这些结果表明, *CsANI* 和 *CsPH8* 介导了亚硒酸钠对柑橘果实柠檬酸积累的调控。

高永峰等^[30]研究发现番茄 *SIWRKY31* 基因启动子含 ABRE 核心元件,受非生物胁迫诱导后 *SIWRKY31* 启动子活性与 ABRE 元件紧密相关。秦玉芝等^[31]发现 *SlR2R3-MYB1* 的调控区域存在脱落酸诱导相关元件 ABRE, *SlR2R3-MYB1* 的转录很可能受环境胁迫的诱导。BÖTTCHER 等^[32]发现葡萄 *GH3* 启动子区域含有多个 ABA 响应元件(ABRE),

ABA 能响应生长素酰胺合成酶 *GH3* 基因表达。宁源生等^[33]对苹果 NCL 家族基因进行分析,发现 *MdNCL-1* 的启动子上包含脱落酸(ABA)响应元件(ABRE),对 *MdNCL-1* 转录水平有影响。本研究中, *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子 ABRE 元件逐个缺失后 GUS 染色活性逐渐变弱,说明 ABRE 元件在介导 *CsANI* 和 *CsPH8* 响应干旱和促进果实柠檬酸积累方面起着重要作用。进一步将转 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子的愈伤组织用 PEG+NaAsO₂ 处理,结果显示在启动子不缺失 ABRE 元件的情况下也抑制 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子转录,最终降低果实柠檬酸含量。推测亚硒酸钠在干旱胁迫条件下可能是通过 ABRE 元件抑制 *CsANI* 和 *CsPH8* 启动子的活性,降低柠檬酸的含量。

参考文献:

- [1] 邓秀新. 世界柑橘品种改良的进展[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1140-1146.
- [2] 卢晓鹏, 李菲菲, 谢深喜. 柑橘果实柠檬酸积累调控基因研究进展[J]. 果树学报, 2018, 35(1): 118-127.
- [3] 罗安才, 杨晓红, 邓英毅, 等. 柑橘果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化[J]. 中国农业科学, 2003, 36(8): 941-944.
- [4] WANG L, HUANG Y, LIU Z A, et al. Somatic variations led to the selection of acidic and acidless orange cultivars[J]. Nature Plants, 2021, 7(7): 954-965.
- [5] 周铁, 马小川, 唐超兰, 等. 果实膨大期干旱对冰糖橙果实品质的影响[J]. 南方农业学报, 2020, 51(10): 2507-2514.
- [6] 潘斌, 李菲菲, 文斌, 等. 不同果实发育期干旱胁迫对温州蜜柑果实品质形成的影响[J]. 果树学报, 2019, 36(6): 729-737.
- [7] YAMAKI Y T. Organic acids in the juice of *Citrus* fruits[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1989, 58(3): 587-594.
- [8] YAMAKI Y T. Seasonal changes in the organic acids in juice of *Citrus* fruits[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1990, 58(4): 895-898.
- [9] YAMAKI Y T. Effect of lead arsenate on citrate synthase activity in fruit pulp of satsuma mandarin[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1990, 58(4): 899-905.
- [10] 文涛, 熊庆娥, 曾伟光, 等. 脐橙果实有机酸代谢调控措施的初步研究[J]. 四川农业大学学报, 2001, 19(2): 144-147.

- [11] SADKA A, ARTZI B, COHEN L, et al. Arsenite reduces acid content in *Citrus* fruit, inhibits activity of citrate synthase but induces its gene expression[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2000, 125(3): 288–293.
- [12] STRAZZER P, SPELT C E, LI S J, et al. Hyperacidification of *Citrus* fruits by a vacuolar proton-pumping P-ATPase complex[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 744.
- [13] MÜLLER M, IRKENS-KIESECKER U, RUBINSTEIN B, et al. On the mechanism of hyperacidification in lemon: comparison of the vacuolar H(+)-ATPase activities of fruits and epicotyls[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(4): 1916–1924.
- [14] 石彩云. 柑橘柠檬酸积累相关的质子泵基因挖掘与关键基因的功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [15] LI S J, LIU X J, XIE X L, et al. *CrMYB73*, a PH-like gene, contributes to citric acid accumulation in citrus fruit[J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 197: 212–217.
- [16] SHI C Y, HUSSAIN S B, HAN H, et al. Reduced expression of *CsPH8*, a P-type ATPase gene, is the major factor leading to the low citrate accumulation in citrus leaves[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 160: 211–217.
- [17] 杨文萱. 柑橘 AN1 基因(*CsANI*)在柠檬酸积累中的作用及不同因素对 *CsANI* 的表达影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [18] QUATTROCCHIO F, VERWEIJ W, KROON A, et al. PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(5): 1274–1291.
- [19] LU X P, CAO X J, LI F F, et al. Comparative transcriptome analysis reveals a global insight into molecular processes regulating citrate accumulation in sweet orange(*Citrus sinensis*)[J]. *Physiologia Plantarum*, 2016, 158(4): 463–482.
- [20] XU Q, CHEN L L, RUAN X A, et al. The draft genome of sweet orange(*Citrus sinensis*)[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(1): 59–66.
- [21] 石玮, 李东栋, 邓秀新, 等. 根癌农杆菌介导绿色荧光蛋白基因转化印度酸桔的研究[J]. *园艺学报*, 2002, 29(2): 109–112.
- [22] 胡小梅. 柑橘 ATP-柠檬酸裂解酶基因的挖掘与其在柠檬酸代谢中的作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [23] 张德健, 毛聪明. 不同硒源对柑橘硒含量、果实品质、矿质养分和抗氧化酶活性的影响[J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2022, 19(5): 114–119.
- [24] 姚益云, 张德远, 刘经荣. 硼、锌在温州蜜柑上的应用研究[J]. *江西农业大学学报*, 1996, 18(3): 282–286.
- [25] 姜小文, 张秋明, 王灿辉, 等. 喷施核苷酸有机营养剂改进椪柑果实品质的效果[J]. *中国南方果树*, 2001, 30(3): 12–13.
- [26] 吴其飞, 黄达明, 管国强. 茎部注射硒肥对金桔的生长及果实品质的影响[J]. *水土保持学报*, 2002, 16(6): 92–95.
- [27] SHIMADA T, NAKANO R, SHULAEV V, et al. Vacuolar citrate/H⁺ symporter of citrus juice cells[J]. *Planta*, 2006, 224(2): 472–480.
- [28] SHI C Y, HUSSAIN S B, YANG H, et al. *CsPH8*, a P-type proton pump gene, plays a key role in the diversity of citric acid accumulation in citrus fruits[J]. *Plant Science*, 2019, 289: 110288.
- [29] 杨文萱, 罗丽娟, 陈欢, 等. 柑橘 AN1 基因(*CsANI*)在柠檬酸积累中的作用及不同因素对其表达的影响[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 51(1): 6–12.
- [30] 高永峰, 杨丰铭, 李琴中, 等. 番茄 *SlWRKY31* 基因启动子的克隆与逆境应答模式分析[J]. *西北植物学报*, 2018, 38(12): 2155–2164.
- [31] 秦玉芝, 邢铮, 潘妃, 等. 马铃薯光响应 *StR2R3-MYB1* 基因的克隆与表达分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(4): 378–384.
- [32] BÖTTCHER C, KEYZERS R A, BOSS P K, et al. Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry(*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(13): 3615–3625.
- [33] 宁源生, 李欢, 宋建飞, 等. 苹果 NCL 家族基因与根系细胞钙离子浓度变化的关系[J]. *园艺学报*, 2023, 50(3): 475–484.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳正