

衣藻 β -胡萝卜素加酮酶基因在南瓜果实中的瞬时表达

周洋洋^{1,2}, 黄河勋¹, 李俊星^{1,3}, 王 瑞^{1,3}, 罗少波^{1,3}, 吴廷全^{1,3}, 钟玉娟^{1,3,*}

(¹广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640; ²华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; ³广东省蔬菜新技术研究重点实验室, 广州 510640)

摘 要: 为了研究 β -胡萝卜素加酮酶基因在南瓜中合成酮基类胡萝卜素的功能, 采用农杆菌介导瞬时表达技术, 将含有衣藻 β -胡萝卜素加酮酶基因 *CrBKT* 的 pBI121-CMTPCRBKT 载体和 pBI121 对照载体的农杆菌菌液注入授粉后 2、5、10、15 和 25 d 的南瓜果实中, 3 d 后观察发现, 授粉后 2 和 5 d 的果实转化后果肉呈微红, 其中授粉后 5 d 的颜色较深, 而 10 d 以上的无红色色素积累。经高效液相色谱 (HPLC) 分析色素成分, 发现积累的红色色素为酮基类胡萝卜素角黄素和虾青素。与对照相比, 注入 *CrBKT* 基因的授粉后 2 和 5 d 的幼果中的类胡萝卜素含量显著增加, 5 d 的幼果约增加了 1/3, 且含有 $106.31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 酮基类胡萝卜素, 其中角黄素占 80.65%, 虾青素占 19.35%, 而授粉后 10 d 以上的果实类胡萝卜素含量没有明显变化, 也没有酮基类胡萝卜素的积累。PCR 扩增表明转化组织中表达了该基因。结果表明, *CrBKT* 基因只能在授粉后 5 d 以内的幼果中表达, 并将幼果中的类胡萝卜素转化为酮基类胡萝卜素; 随着果实成熟, 菌液在果肉组织中无法渗透而阻碍基因表达。

关键词: 南瓜; 衣藻; β -胡萝卜素加酮酶; 基因; 瞬时表达

中图分类号: S 642.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 11-2126-09

Transient Expression of β -carotene Ketolase of *Chlamydomonas reinhardtii* in Pumpkin Fruit

ZHOU Yangyang^{1,2}, HUANG Hexun¹, LI Junxing^{1,3}, WANG Rui^{1,3}, LUO Shaobo^{1,3}, WU Tingquan^{1,3}, and ZHONG Yujuan^{1,3,*}

(¹Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ²College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ³Guangdong Key Laboratory for New Technology Research of Vegetables, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, transient expression system was used to analyze the function of β -ketocarotase for biosynthesis of ketocarotenoid in pumpkin fruit. The *Agrobacteria* that contained pBI121-CMTPCRBKT vector with *CrBKT* gene and the control pBI121 vector were individually injected into the pumpkin fruits at 2, 5, 10, 15 and 25 days after pollination, respectively. It was found that the fruit pulp was light reddish in 2- and 5- day fruits with darker color in pulp of 5-day fruit while there was no

收稿日期: 2017-07-24; **修回日期:** 2017-10-13

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2015A030310133); 广东省省级科技计划项目 (2015A030302044; 2015B070701014; 2015A020209059); 国家自然科学基金青年基金项目 (31601748); 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (201303112)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: tianayuu@gmail.com)

red pigment accumulated in more than 10-day fruit. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of pigment composition revealed that the accumulated red pigments were canthaxanthin and astaxanthin. Compared with the control, the carotenoid content in the 2- and 5-day fruits injected with the *CrBKT* gene were significantly increased, which increased by about 1/3 in 5-day young fruit and ketocarotenoid content was $106.31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, of which canthaxanthin accounted for 80.65%, astaxanthin was 19.35%, while the carotenoid content of the fruits in more than 10-day had no obvious change and there was no accumulation of ketocarotenoid. PCR amplification indicated that *CrBKT* was expressed in the transformed tissue. The result showed that the *CrBKT* gene could be only expressed in less than 5-day fruit and it could convert carotenoid in young pumpkin into ketocarotenoid. However, the expression of exogenous gene was discouraged due to the bacteria could not osmotic into the flesh tissue with the fruit ripening.

Keywords: pumpkin; *Chlamydomonas reinhardtii*; β -carotene ketolase; gene; transient expression

类胡萝卜素 (Carotenoids) 是一类重要的天然色素, 普遍存在于高等植物、真菌、藻类、细菌和部分动物体内, 目前已发现 700 多种 (Britton, 2004)。类胡萝卜素对人体具有重要的保健功能 (韩雅珊, 1999), 虾青素和角黄素等酮基类胡萝卜素具有抑制肿瘤生长, 提高免疫力等功能 (Guerin et al., 2003; Zhu et al., 2009)。相比其他类胡萝卜素, 酮基类胡萝卜素具有较强的抗氧化、抗癌以及光保护活性, 以其作为饲料及食品添加剂, 可促进动物及人体内抗体的产生, 从而增强免疫力 (王冉冉 等, 2011)。

β -胡萝卜素加酮酶 (BKT) 和 β -胡萝卜素羟化酶 (BHY) 是虾青素合成途径中的 2 个关键酶 (Kajiwara et al., 1995; Linden, 1999)。BHY 在所有能进行光合作用的生物体中普遍存在, 而 BKT 只存在于一些细菌和少数藻类中 (Kajiwara et al., 1995; Misawa et al., 1995)。 β -胡萝卜素能够在 BKT 的作用下, 在 C4 的位置上引入酮基, 形成角黄素, 再在 BHY 的作用下形成虾青素 (Misawa et al., 1995)。通常, 植物中已存在 3-羟化酶, 因此 β -胡萝卜素加酮酶在向虾青素转化的过程中, β -胡萝卜素羟化酶会与它竞争相同的底物, 形成各种中间产物 (Zhu et al., 2007; Zhong et al., 2011)。典型的 BKT 不能将羟基类胡萝卜素转化为虾青素, 而表达这种 BKT 的植物只能与各种中间体合成少量的虾青素 (Misawa, 2009; Zhu et al., 2009)。前人研究发现, 在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、莲 (*Lotus japonicus*)、胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 等植物中过表达不同藻类来源的 β -胡萝卜素加酮酶基因时, 这些藻类的 BKTs 在虾青素合成方面都表现较差 (Mann et al., 2000; Stalberg et al., 2003; Gerjets & Sandmann, 2006; Morris et al., 2006; Gerjets et al., 2007; Suzuki et al., 2007; Jayaraj et al., 2008)。Zhong 等 (2011) 发现来自莱茵衣藻 β -胡萝卜素加酮酶能够编码双功能加酮酶, 可以有效地将 β -胡萝卜素转化为角黄素, 玉米黄质转化为虾青素。

与传统的转基因技术相比, 瞬时表达 (Transient express) 周期短, 安全, 转化效率高, 操作简单, 在外源基因的表达、启动子功能分析、蛋白质亚细胞定位以及转基因互补等方面广泛应用 (Deng & Laugsen, 1998; Bendahmane et al., 2000; Johansen & Carrington, 2001; Feng et al., 2003; 杨至德 等, 2007; Grefen et al., 2010)。常规的瞬时表达方法包括基因枪法、原生质体法和农杆菌介导法 (Manavella & Chan, 2009; Ueki et al., 2009; Yoo et al., 2013)。农杆菌介导的瞬时转化系统利用农杆菌的天然能力将外源 DNA 导入具有完整细胞壁的植物细胞 (Yang et al., 2000)。Zhu 等 (2007)

用农杆菌介导法在黄花烟草 (*Nicotiana glauca*) 中过表达由花椰菜花叶病毒 (CaMV) 启动子驱动的蓝细菌 β -胡萝卜素加酮酶基因 (*crtO*), 花瓣中积累了大量的酮基类胡萝卜素, 导致烟草的花瓣由黄色转变为深黄色或橙色。

南瓜 (*Cucurbita moschata*) 含有丰富的类胡萝卜素, 主要为 β -胡萝卜素, 其次是 α -胡萝卜素和叶黄素 (Murkovic et al., 2002; Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya, 2007)。Murkovic 等 (2002) 在 4 个中国南瓜品种中测得 β -胡萝卜素、 α -胡萝卜素和叶黄素的含量分别为 31.0 ~ 70.0、9.8 ~ 59.0 和 0.8 ~ 11.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。虽然南瓜中含有酮基类胡萝卜素的合成底物 β -胡萝卜素, 到目前为止, 还未见有将 β -胡萝卜素加酮酶基因转入到南瓜的研究报道。本试验中通过质粒重组获得瞬时表达载体 pBI121-CMTPCRBKT, 采用农杆菌介导瞬时转化法, 使外源基因 *CrBKT* 在花后不同时期的南瓜果实中表达, 从而建立南瓜瞬时转化体系, 为快速分析南瓜果实外源基因功能和利用南瓜果实合成虾青素的基因工程研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

南瓜杂交新品种——香蜜小南瓜 (雌花多, 结果多), 由广东省农业科学院蔬菜研究所瓜类研究二室提供, 于 2015 年春季种植于广州钟落潭白云基地大田内, 常规栽培管理。取授粉后 2、5、10、15 和 25 d 的果实为试验材料; 莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* cc-124 由 Chamydomonas Center (Duke University, USA) 提供, 衣藻用 TAP 培养液 (基) 培养。

1.2 表达载体的构建

使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 根据试剂盒说明书用大约 10^8 的衣藻细胞提取总 RNA。通过分光光度法在 260 nm 处结合琼脂糖凝胶电泳测定总 RNA 的浓度。用 DNase I (Invitrogen) 处理 RNA 样品。采用 SuperScriptTM III One-Step RT-PCR 系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 在 50 °C 下 15 min 合成 cDNA。

利用 PCR 技术从衣藻的 cDNA 中获得 *CrBKT* 基因序列: 应用引物 *CrBKTL-F* 和 *CrBKTL-R* 克隆获得切去 C-末端 115 个氨基酸后改造的 *CrBKT*, 其功能效率优于其他藻类 *BKTs* 基因 (Zhong et al., 2011), 采用测序手段验证为 *CrBKT* 的改造后全长序列。PCR 产物经过 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切后连接到 pBluescript II KS 相应位置产生 pCRBKT 载体; 采用 PCR 技术从南瓜 DNA 中应用引物 *CMTP-F* 和 *CMTP-R* 克隆获得 RBCS1 (ribulose-1,5-biosphosphate carboxylase small subunit, 来源于南瓜转录组) 的信号肽 CMTP, 采用测序手段验证为 CMTP 的序列; PCR 产物经纯化和 *Sal* 及 *Hind* III 的酶切连接到 pCRBKT 的相应位置; 插入序列经测序验证, 产生的 CMTP 和 BKT 的连接体经过 *Sma* I 和 *Sac* I 的酶切连接到 pBI121 的相应位置, 产生 pBI121-CMTPCRBKT 质粒用于南瓜转化。本研究中使用的引物列于表 1。

表 1 用于载体构建和检测类胡萝卜素基因的引物
Table 1 Primers used for vector construction and detection of carotenogenic genes

引物编号 Primer No.	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>CrBKTL-F</i>	GAGAAGCTTCATGGGCCCTGGGGATACA
<i>CrBKTL-R</i>	GCGTCTAGATCAGGCCAGGGCTGCGCCGCG
<i>CMTP-F</i>	GAGGTCGACCCGGGATGGCTTCATCCATTCTCTC
<i>CMTP-R</i>	GAGAAGCTTGGCATGCACTGAACCTTTCCAC
<i>Actin-F</i>	CGGCCATTGAGAAAAGCTACGAACCT
<i>Actin-R</i>	CCCACCACTGAGGACGATGTTACCA
<i>CrBKT-F</i>	CCGCCTTCCGCTGTTCACTA
<i>CrBKT-R</i>	GGCGGCACTTGGGCAGCT

1.3 制备含有植物表达载体的农杆菌

将 2 μL 制得的 pBI121-CMTPCRBKT 质粒添加到 200 μL 获得的 LBA4404 感受态细胞中, 轻轻混匀, 在冰上放置 30 min。然后将细菌悬浮液在 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激 60 s, 迅速移至冰上放置 5 min 冷却。在细菌悬浮液中加入 800 μL 的 LB 液体培养基, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中复苏 3 h。取适量细菌悬浮液涂布于含有 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 板上, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育 2 d。从平板上挑取单菌落扩大培养, 经 PCR 鉴定和扩增提取质粒酶切鉴定。将 100 μL 农杆菌培养液接入 3 mL 的 LB 液体培养液 (含有 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素) 中培养 2 d, 使其 OD_{600} 值为 0.8, 再将含有相应质粒的农杆菌进行植物转化。

1.4 南瓜果实瞬时表达分析

将培养的农杆菌收集到悬浮液 (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 + 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS) 中, 调整其浓度为 $\text{OD}_{600} = 0.3 \sim 0.5$ 。于室温预培养 2 ~ 4 h; 将盛有 100 μL 菌液的注射器针头插入授粉后 2、5、10、15 和 25 d 的南瓜果皮中缓慢注射使菌液渗入果肉。设阴性对照, 即注入含有 pBI121 的对照农杆菌菌株渗透液。3 d 后切开注射部位观察外源基因表达后导致的类胡萝卜素含量变化。

1.5 色素分析

将转基因南瓜粉碎, 冷冻干燥并称量后研磨成粉末, 所用色素提取液为丙酮 (HPLC 级, BCR), 用冷冻离心机 (5417R, Eppendorf) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 获得类胡萝卜素提取液。色素分析参考 Zhong 等 (2011) 的报道, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 仪器设备采用 Waters HPLC 系统 (Waters, Milford, MA, USA) 装备 1 根 Waters Spherisorb[®] 5 μm ODS2 4.6250 mm 分析柱。参考 Baroli 等 (2003) 所述方法, 改进如下: 从 100% 溶液 A [乙腈: 甲醇: 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0) = 84: 2: 14, 体积比] 按线形梯度到 100% 溶液 B (甲醇: 乙酸乙酯 = 68: 32, 体积比), 流速为 1.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 维持 15 min, 接着 10 min 溶液 B。色谱峰光谱采集范围 300 ~ 700 nm, 通过购于 Sigma 和 Wako 的标准色素样品和光吸收峰及出现时间来定量色素。于 480 nm 下测虾青素, 在 450 nm 下测其他类胡萝卜素。每个样品设 3 个生物学重复。使用 Excel 2016 和 Original pro 5.0 软件进行数据处理。

1.6 *CrBKT* 基因表达检测

以转入 *CrBKT* 基因的质粒、pBI121 质粒和未经转化的南瓜幼果为材料, 称取 1 g 样品粉末, 提取总 RNA。利用 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time) (TaKaRa, 大连, 中国) 试剂盒去除基因组 DNA 并反转录合成 cDNA。选择稳定表达的 *Actin* 作为内参基因进行扩增, 使用 Primer 5.0 设计 PCR 引物: *Actin*-F、*Actin*-R; *CrBKT*-F、*CrBKT*-R (表 1)。PCR 扩增反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, X $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环 [X $^{\circ}\text{C}$ 为生工生物工程 (上海) 有限公司提供的 T_m 值; *Actin* 的为 58 $^{\circ}\text{C}$]。

2 结果与分析

2.1 pBI121-CMTPCRBKT 载体构建

以 pBI121 载体作为表达载体, 通过引物 CMTP-F 和 CMTP-R 获得含有南瓜 Rubisco 小亚基的信

号肽(Cmp),利用引物 *CrBKTL-F* 和 *CrBKTL-R* 获得来源于衣藻改造后的 *CRBKT* 基因 (Zhong et al., 2011), 构建含有 *CrBKT* 基因的瞬时表达载体 pBI121-CMTPCRBKT (图 1)。

2.2 农杆菌介导 *CrBKT* 基因的瞬时表达

分别将含有 *CrBKT* 基因和 pBI121 质粒的农杆菌侵染液注射到授粉后 2、5、10、15 和 25 d 的南瓜果实中, 3 d 后切开注射部位观察, 发现授粉后 2 和 5 d 的幼果在转化 *CrBKT* 的果肉中出现红色色素 (图 2), 10 d 的果实果肉中红色不明显, 10 d 以上的果实果肉无红色色素积累, 且转化空载体的对照南瓜果实果肉也均无红色色素积累, 表明 2~5 d 的南瓜幼果可以瞬时转化 *CrBKT* 基因载体。

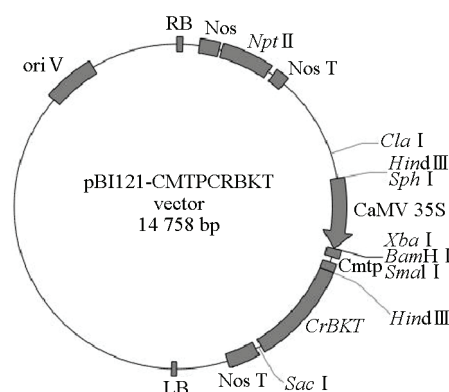


图 1 表达载体 pBI121-CMTPCRBKT 构建示意图
Fig. 1 Schemes of pBI121-CMTPCRBKT

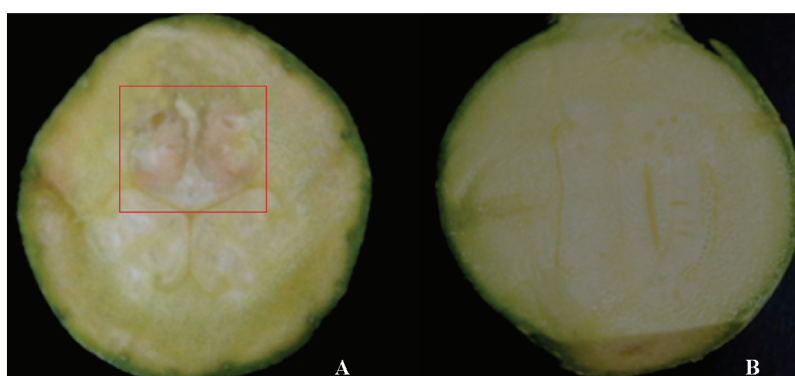


图 2 外源基因 *CrBKT* 在授粉后 5 d 南瓜幼果中的表达

A: 转入 *CrBKT* 基因的幼果; B: 阴性对照 (转化空白载体)。

Fig. 2 Expression of exogenous gene *CrBKT* in 5-day old young fruit of pumpkin after pollination

A: Young fruit transformed with *CrBKT* gene; B: Negative control (transformed with blank plasmid).

如图 3 所示, 南瓜果实中出现红色色素的表型比率, 在授粉后 5 d 的幼果中最高, 瞬时表达效果最好; 而 15 d 和 25 d 果实为 0, 说明农杆菌的菌液没有扩散到果肉中。

2.3 南瓜果实中类胡萝卜素含量和组成

图 4 显示, 授粉后 2 和 5 d 的转基因果实的类胡萝卜素含量与对照存在显著差异, 而 10 d 以后的果实与对照没有显著差异; 同时发现, 酮基类胡萝卜素主要存在授粉后 2 和 5 d 的转化幼果中, 10 d 以后的果实中很少或者没有酮基类胡萝卜素, 且对照中均没有酮基类胡萝卜素。

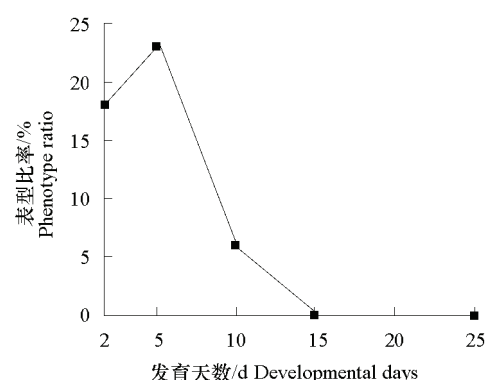


图 3 注射菌液后不同发育天数的红色表型比率

Fig. 3 Phenotype ratios of developmental days after injecting bacteria

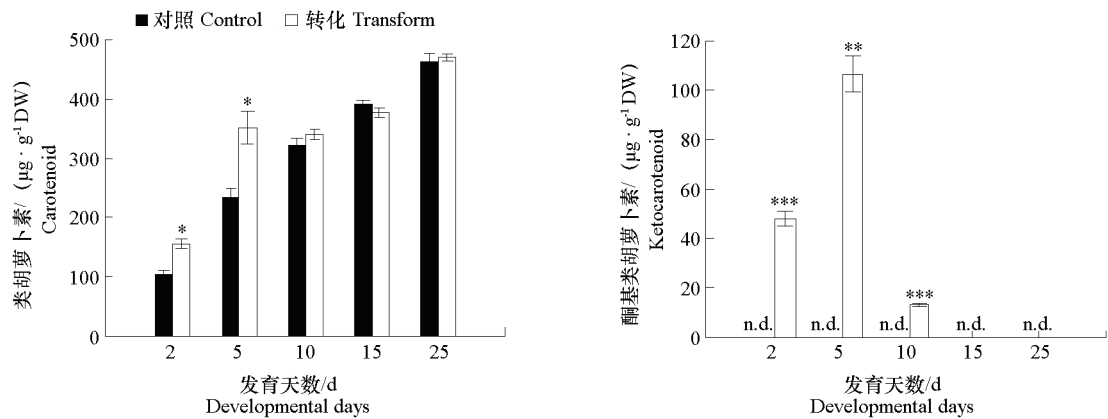


图 4 不同发育天数的类胡萝卜素和酮类胡萝卜素含量

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. n.d. 指未检测到。

Fig. 4 The content of carotenoid and ketocarotenoid in developmental days

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. n.d. is not detected.

进一步分析 (表 2) 发现, 对照处理南瓜果实中的类胡萝卜素主要由叶黄素, 苜菜黄质, α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素组成, 总含量约为 $233.34 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$; 而在有 *CrBKT* 表达的转基因幼果中的总类胡萝卜素含量增加约 1/3, 为 $353.78 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$, 且有酮基类胡萝卜素的积累, 占总类胡萝卜素含量的 30.05%。同时分析发现, pBI121-CMTPCRBKT 的表达可将 β -胡萝卜素催化合成酮基类胡萝卜素角黄素和虾青素, 这两个色素均为红色, 从而导致果肉颜色变为红色, 这表明 β -胡萝卜素加酮酶基因 *CrBKT* 可以在南瓜幼果中表达, 且可导致酮基类胡萝卜素的合成。酮基类胡萝卜素中主要是角黄素, 而终产物虾青素含量较低, 二者分别占 80.65%和 19.35%。

表 2 南瓜授粉后 5 d 的幼果中类胡萝卜素含量和组成

Table 2 Carotenoid content and composition in 5 days old young fruit of pumpkin after pollination

类胡萝卜素 Carotenoid	南瓜 Pumpkin	含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) Content	百分比/% Percent
叶黄素 Lutein	转基因 Transform	201.45 \pm 16.27	56.94
	对照 Control	194.29 \pm 15.11	83.26
苜菜黄质 Violaxanthin	转基因 Transform	5.14 \pm 0.32	1.45
	对照 Control	3.32 \pm 0.21	1.42
α -胡萝卜素 α -carotene	转基因 Transform	28.43 \pm 2.20	8.04
	对照 Control	24.35 \pm 0.15	10.43
β -胡萝卜素 β -carotene	转基因 Transform	12.45 \pm 1.04	3.52
	对照 Control	11.38 \pm 0.08	4.89
虾青素 Astaxanthin	转基因 Transform	20.57 \pm 1.25	5.81
	对照 Control	未检测到 Not detected	0
角黄素 Anthaxanthin	转基因 Transform	85.74 \pm 6.03	24.24
	对照 Control	未检测到 Not detected	0

2.4 瞬时表达材料中目的基因表达量检测

分别以转入 *CrBKT* 基因、pBI121 质粒和未经转化的南瓜幼果为材料提取总 RNA 后逆转录为 cDNA, 引物 *Actin*-F、*Actin*-R; *CrBKT*-F、*CrBKT*-R 分别以合成的 cDNA 为底物进行 PCR 扩增。转入 pBI121 质粒和未经转化的材料 cDNA 扩增没有 *CrBKT* 目的条带, 而瞬时表达材料中的 *CrBKT* 基

因出现了条带，而 *Actin* 基因在 3 个材料中均有条带（图 5），说明外源基因 *CrBKT* 在南瓜幼果中表达。

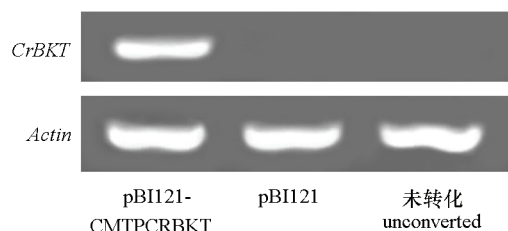


图 5 瞬时表达材料中目的基因表达量检测

Fig. 5 Detection of target gene expression in transient expression material

3 讨论

前人的报道表明 *CrBKT* 在拟南芥叶片、番茄果实等组织中表达后可改变叶片和果实类胡萝卜素组成，产生红色的酮基类胡萝卜素（包括角黄素和虾青素），从而使叶片或果实呈现棕红色或血红色（Zhong et al., 2011; Huang et al., 2013a）。在其他瓜类，如黄瓜、西瓜和甜瓜中已有应用瞬时表达外源基因的方法验证基因的功能（Li, 2007; Huang et al., 2013b; 乌斯呼吉日嘎拉·达赖胡 等, 2014）。本试验中通过农杆菌瞬时表达技术，将含有衣藻 *CrBKT* 基因的 pBI121-CMTPCRBKT 载体的农杆菌菌液转入授粉后不同天数的南瓜果实中，在授粉后 2~5 d 的幼果中出现了红色色素，且 5 d 的表型比率最高。经 HPLC 分析表明红色色素为角黄素和虾青素，说明该基因能在幼果中表达，并催化 β -胡萝卜素反应形成酮基类胡萝卜素，而在授粉后 15 d 以上的果实中没有酮基类胡萝卜素的积累，可能是由于果实成熟过程中质地变致密，菌液无法渗透，且各种次生代谢物的增长导致农杆菌转入后无法存活。

目前通过基因工程手段改变某些植物的类胡萝卜素合成途径以合成酮基类胡萝卜素的研究开展较多，并经过多年研究发现衣藻 *CrBKT* 基因经改造后在植物中的催化合成酮基类胡萝卜素的功能强于其他藻类来源的基因（Mann et al., 2000; Gerjets & Sandmann, 2006; Jayaraj et al., 2008; Zhong et al., 2011; Huang et al., 2013a）。本研究转入的外源 *CrBKT* 使果实的类胡萝卜素含量及组成发生了改变，与对照相比，授粉后 5 d 的转基因幼果中的类胡萝卜素含量约增加了 1/3，累积了 $106.31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的酮基类胡萝卜素；而 10 d 以上的果实中的类胡萝卜素含量没有明显变化。根据对烟草质体转化体的研究（Hasunuma et al., 2008）发现，*CrBKT* 转化体中总类胡萝卜素含量的增加可能是由于 *CrBKT* 的转化导致途径的泵引力增强，其他基因转录增加。研究证明，不同植物对转入的 BKT 和 BHY 的表现不一样，Huang 等（2013a）研究发现在转基因番茄叶片和果实中只转入 BKT 基因会导致叶片和果实中的虾青素含量（分别占总类胡萝卜素含量的 9.2% 和 15.9%）低，角黄素多；只有同时转入 BKT 基因和 BHY 基因才能产生较多终产物虾青素。而在模式植物拟南芥（Zhong et al., 2011）和烟草（Huang et al., 2012）中只转入 BKT 就能有效合成虾青素。从本试验终产物虾青素含量较少（占总类胡萝卜素含量的 5.81%）可以推测出南瓜自身 β -胡萝卜素羟化酶对角黄素加羟基的催化能力较差，因而只转入 β -胡萝卜素加酮酶基因将不能合成更多的虾青素。

综上所述，相对成熟果实而言，2~5 d 的幼果可以更好的转化外源基因 *CrBKT*，合成酮基类胡萝卜素，使总类胡萝卜素含量显著增加，但若利用南瓜果实作为生产虾青素的生物反应器则必须同时转化衣藻 β -胡萝卜素加酮酶基因和外源的 β -胡萝卜素羟化酶。

References

- Azevedo-Meleiro C H, Rodriguez-Amaya D B. 2007. Qualitative and quantitative difference in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (10): 4027 – 4033.
- Baroli I, Do A D, Yamane T, Niyogi K K. 2003. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. The Plant Cell, 15: 992 – 1008.
- Bendahmane A, Querci M, Kanyukak K, Baulcombe DC. 2000. *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. The Plant Journal, 21 (1): 73 – 81.
- Britton G. 2004. Carotenoids Handbook. Basel: Birkhauser Verlag, VII.
- Deng G J, Laugsen R A. 1998. Isolation and characterization of an antifreeze protein from the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecimspinosus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1388 (2): 305 – 314.
- Feng S, Catherine G, Jules A, Mark S, Jack E D, Roger W. 2003. Cleavage of Arabidopsis PBS_I by a bacterial type III effector. Science, 301: 1230 – 1233.
- Gerjets T, Sandmann G. 2006. Ketocarotenoid formation in transgenic potato. Journal of Experimental Botany, 57: 3639 – 3645.
- Gerjets T, Sandmann M, Zhu C, Sandmann G. 2007. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in leaves and flowers of tobacco species. Biotechnology Journal, 2: 1263 – 1269.
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt M R. 2010. A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. Plant Journal, 64 (2): 355 – 365.
- Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends in Biotechnology, 21 (5): 210 – 216.
- Han Ya-shan. 1999. Advance of the function of beta-carotene and carotenoid. Journal of China Agricultural University, 4 (1): 5 – 9. (in Chinese)
- 韩雅珊. 1999. 类胡萝卜素的功能研究进展 (综述). 中国农业大学学报, 4 (1): 5 – 9.
- Hasunuma T, Miyazawa S I, Yoshimura S, Shinzaki Y, Tomizawa K I, Shindo K, Choi S K, Misawa N, Miyake C. 2008. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. The Plant Journal, 55: 857 – 868.
- Huang Hong-yu, Wang Zhen-yu, Cheng Jin-tao, Zhao Wen-chao, Li Xin, Wang Hong-yun, Zhang Zhen-xin, Sui Xiao-lei. 2013b. An efficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) protoplast isolation and transient expression system. Scientia Horticulturae, 150: 206 – 212.
- Huang Jun-chao, Zhong Yu-juan, Liu Jin, Sandmann G, Chen Feng. 2013a. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. Metabolic Engineering, 17: 59 – 67.
- Huang Jun-chao, Zhong Yu-juan, Sandmann G, Liu Jin, Chen Feng. 2012. Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants. Planta, 236: 691 – 699.
- Jayaraj J, Devlin R, Punja Z. 2008. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. Transgenic Research, 17: 489 – 501.
- Johansen K, Carrington J C. 2001. Silencing on the spot: induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. Plant Physiology, 126 (3): 930 – 938.
- Kajiwa S, Kakizono T, Saito T, Knodo K, Ohtani T, Nishio H, Nagai S, Misawa N. 1995. Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. Plant Molecular Biology, 29: 343 – 352.
- Li J Y. 2007. Establishment of efficient transgenic mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in watermelon. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 19 (3): 197 – 201.
- Linden H. 1999. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. Biochim Biophys Acta, 1446: 203 – 212.
- Manavella P A, Chan R L. 2009. Transient transformation of sunflower leaf discs via an *Agrobacterium*-mediated method: applications for gene expression and silencing studies. Nature Protocol, 4 (11): 1699 – 1707.
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J. 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. Nature Biotechnology, 18: 888 – 892.

- Misawa N. 2009. Pathway engineering of plants toward astaxanthin production. *Plant Biotechnology*, 26: 93 - 99.
- Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiura S, Saito T, Ohtani T, Miki W. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *Journal of Bacteriology*, 177: 6575 - 6584.
- Morris W L, Ducreux L J M, Fraser P D, Millam S, Taylor M A. 2006. Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. *Metabolic Engineering*, 8: 253 - 263.
- Murkovic M, Mulleder U, Neunteufl H. 2002. Carotenoid content in different varieties of pumpkins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15 (6): 633 - 638.
- Stalberg K, Lindgren O, Ek B, Hoglund A S. 2003. Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 36: 771 - 779.
- Suzuki S, Nishihara M, Nakatsuka T, Misawa N, Ogiwara I, Yamamura S. 2007. Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Reports*, 26: 951 - 959.
- Ueki S, Lacroix B, Krichevsky A, Lazarowitz S G, Citovsky V. 2009. Functional transient genetic transformation of *Arabidopsis* leaves by biolistic bombardment. *Nature Protocols*, 4 (1): 71 - 77.
- Usukhjargal Dalaikhu, Hao Jin-feng, Zhang Li-quan, Zhao Ai-qi, HASI Agula. 2014. Analysis of function of α -mannosidase gene in promoting melon fruit ripening by transient expression. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (8): 1601 - 1608. (in Chinese)
- 乌斯呼吉日嘎拉 · 达赖胡, 郝金凤, 张立全, 赵爱奇, 哈斯阿拉古. 2014. 甜瓜 α - 甘露糖苷酶基因促进果实成熟功能的瞬时表达分析. *园艺学报*, 41 (8): 1601 - 1608.
- Wang Ran-ran, Zhang Hui, Tao Zheng-guo, Li Tao, Zhang Xiang-min, Zhang Wan-qing, Wang Yan-xia. 2011. Physiological function and application research of ketocarotenoid. *China Food Additives*, 153 - 157. (in Chinese)
- 王冉冉, 张 慧, 陶正国, 李 涛, 张祥敏, 张万青, 王延霞. 2011. 酮基类胡萝卜素的理功能及应用研究. *中国食品添加剂*, 153 - 157.
- Yang Y, Li R, Qi M. 2000. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant Journal*, 22 (6): 543 - 551.
- Yang Zhi-de, Wang Yan, Liu Xue-mei, Miu Kun, Tang Qiao-xiang. 2007. Preliminary study on hairy root occurrence of peony induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Forest Research*, 20 (2): 292 - 295. (in Chinese)
- 杨至德, 王 雁, 刘雪梅, 缪 崑, 汤巧香. 2007. 发根农杆菌诱导牡丹生根的初步研究. *林业科学研究*, 20 (2): 292 - 295.
- Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. 2013. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene express analysis. *Nature Protocols*, 2 (7): 1565 - 1572.
- Zhong Yu-yuan, Huang Jun-chao, Liu Jin, Li Yin, Jiang yue, Xu Zeng-fu, Sandmann G, Chen Feng. 2011. Functional characterization of various algal carotenoidketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3659 - 3669.
- Zhu C, Gerjets T, Sandmann G. 2007. *Nicotiana glauca* engineered for the production of ketocarotenoids in flowers and leaves by expressing the cyanobacterial *crtO* ketolase gene. *Transgenic Research*, 16 (6): 813 - 821.
- Zhu C, Naqvi S, Capell T, Cristou P. 2009. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 483 (2): 182 - 190.