

红花花冠伸长相关基因 *CtXTH1* 的特征与功能研究

贾鑫磊^{1,2}, 何贝轩², 郭丹丹², 高越^{2*}, 郭美丽^{1,2*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 本研究从红花花冠转录组数据库筛选出 13 个木葡聚糖内切转葡糖基/水解酶基因 (*XTHs*) 和 8 个膨胀素基因 (*EXPs*)。通过花冠表达谱芯片数据和花冠长度的相关分析和 qRT-PCR 确认, 筛选出可能与花冠伸长相关的 4 个 *XTHs* 和 1 个 *EXP* ($r \geq 0.60$), 分别为 *CtXTH1*、*CtXTH2*、*CtXTH3*、*CtXTH4* 和 *CtEXP1*。采用 RACE 法克隆了这 5 个基因的全长序列, 生物信息学分析发现 *CtXTH1* 可能与花冠发育有关, 表达模式分析发现其在花中特异性积累。通过构建红花过表达重组载体 (pMT39-*CtXTH1*) 进行遗传转化发现, *CtXTH1* 的过表达可以显著增加红花花冠长度 (约 5.34%~10.25%) 和花冠重量 (约 30.00%~36.02%), 同时, 过表达植株种子重量、每果球小花数和种子数均有增大的趋势, 而对花冠中的主要黄酮类成分的含量没有显著影响。对花冠显微结构观察发现, 过表达植株在花冠管状部分表现出更松散和不规则的特征, 提示 *CtXTH1* 可能有助于增加组织的松弛从而促进花冠伸长。本研究为高产红花品种的选育提供重要的参考价值。

关键词: 红花; *CtXTH1*; 花冠伸长; 转基因

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2019)06-1132-09

The characteristics and functions of *CtXTH1*: the gene boosts the corolla elongation in safflower

JIA Xin-lei^{1,2}, HE Bei-xuan², GUO Dan-dan², GAO Yue^{2*}, GUO Mei-li^{1,2*}

(1. Pharmacy College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2. Pharmacy College, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: In this study, 13 xyloglucan endotransglycosylases/hydrolases (*XTHs*) and 8 expansin (*EXPs*) were screened from safflower floret transcriptome database. Through correlation analysis between the safflower gene expression profile chip and the corolla development, only 4 *XTHs* (*CtXTH1-4*) and 1 *EXP* (*CtEXP1*) have positive relevance with corolla elongation ($r \geq 0.60$) and were therefore validated by qRT-PCR. The full length of these genes were cloned by RACE. According to the bioinformatic analysis, *CtXTH1* correlated with the development of the floret, and the expression pattern analysis indicated that *CtXTH1* had accumulated in the floret. The recombinant vector (pMT39-*CtXTH1*) was constructed for gene transformation. Overexpression of *CtXTH1* significantly increased the corolla length (about 5.34% to 10.25%) and corolla weight (about 30.00% to 36.02%) in transgenic safflower. The overexpression lines also showed an increasing tendency in the weight of seeds, average number of corollas per cone and average number of seeds in each cone. Meanwhile, overexpression of *CtXTH1* had no significant effect on flavonoids. According to the corolla microstructure, the OVX-line tubular part of floret exhibited a looser and irregular character. These data suggested that *CtXTH1* can potentially increase relaxation of the tissues and boost corolla elongation. Our study provides a valuable clue for plant breeding in the future.

Key words: safflower; *CtXTH1*; corolla length; transgenic

收稿日期: 2019-02-25; 修回日期: 2019-03-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473300, 81173484); 上海市自然基金资助项目 (13ZR1448200); “863”国家高技术发展计划 (2008AA02Z137).

*通讯作者 Tel: 86-21-81871312, E-mail: mlguo@126.com; gaoyue2000@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0130

红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 是一种重要的经济作物。其花冠具有活血化痰功效, 同时还是提取色素的原料^[1,2]; 而红花籽油亚油酸含量高达 71%~75%^[3], 是一种高档的食用油。据报道, 2014 年全球红花种植面积约为 116.8 万公顷, 花冠产量为 2.5 万吨, 种子产量为 176 万吨, 可以生产 31.6 万吨红花籽油^[4]。但其产量尚不能满足日益增长的市场需求。新疆是我国红花药材的主产区, 其产量也一直偏低, 每公顷产量约为 180~225 kg。众所周知, 花冠的长度是影响红花药材产量的一个重要因素, 因此, 挖掘与花冠伸长相关的基因, 研究其特征和功能对于提高红花药材的产量具有重要意义。

据报道, 在棉纤维细胞伸长过程中, 其长度通常会伸长约 1 000 倍^[5]。而棉纤维细胞的快速伸长是由血压驱动的并且受到植物细胞壁的限制^[6]。植物细胞壁为植物细胞提供支持和保护作用, 主要由纤维素、半纤维素和果胶多糖组成。其中半纤维素是植物细胞壁的基质多糖, 负责构建细胞壁、调节细胞生长过程^[7]。植物细胞壁受到多种因素的调节如转录因子等^[8,9], 且现有研究认为木葡聚糖内切转葡糖基/水解酶基因 (xyloglucan endotransglycosylases/hydrolases, *XTHs*) 和膨胀素 (expansin, *EXPs*) 是两类直接参与细胞壁松弛与重构的基因^[10,11]。这两类基因在植物种子萌发、根系建成、花和果实的发育中具有重要的作用。尤其是在花的发育过程中, 一些 *EXPs* 可能参与花原基的形成和花瓣开放过程中的快速伸长阶段。Zenoni 等^[12]发现 *PhEXPI* 基因在花开放过程中高表达, 进一步的功能研究发现 *PhEXPI* 反义植株在花瓣区域表现出较小的花瓣细胞。同时在 *Dianthus caryophyllus*^[13] 和 *Cymbidium ensifolium*^[14] 中也发现了类似的结果。最近在菊花上进行的研究发现, *CmXTH1/2/3/4* 基因参与菊花花序的开放和花瓣伸长过程^[15]。上述研究表明, *XTHs* 和 *EXPs* 基因在花发育过程中具有重要作用, 其可能在药用植物特别是花类药用植物育种上具有较高价值。因此, 本研究从课题组构建的红花花冠转录组数据库筛选 *XTHs* 和 *EXPs* 基因, 通过 PEARSON 相关分析、生物信息学分析以及表达模式分析筛选出与红花花冠伸长相关的基因, 并通过过表达的红花遗传转化对其进行了功能验证。

材料与amp;方法

材料 实验所用红花为云南巍山红花 ZHH0119 品系, 由第二军医大学生药学教研室郭美丽教授鉴定。所有红花均种植于第二军医大学药学院红花专用温室, 25 °C、16 h 光照 8 h 黑暗, 常规水肥管理。实验涉及

的花及其他组织材料采集后立即在液氮中速冻, -80 °C 保存。

基因筛选 在前期构建的红花花冠转录组数据库^[16]中筛选 *XTHs* 和 *EXPs* 基因, 基于花冠表达谱芯片数据和花冠长度的相关分析进行筛选, 并通过 qRT-PCR 对其进行验证。qRT-PCR 操作步骤如下: 采集不同花冠发育期红花花冠组织样品, 使用 TransZol Up Plus RNA Kit (TransGen Biotech, Beijing, China) 提取红花总 RNA, 使用 TransScript®One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech, Beijing, China) 合成红花 cDNA。使用 ABI 7500 (ABI, USA), TransStart Top Green qPCR Super-Mix (+ Dye II) (TransGen Biotech, Beijing, China) 进行 qRT-PCR。反应体系按产品说明书进行, 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 30 个循环, 60 °C 退火 1 min, 95 °C 解链 30 s, 在 72 °C 及最后 95 °C 解链时采集荧光信号。在 qRT-PCR 之前通过普通 PCR 确认引物的特异性, 60S (60S 酸性核糖体蛋白) 作为内参基因^[17]。使用 ΔCt 方法计算基因的相对表达水平, 重复 3 次计算标准偏差。

全长克隆 基于红花花冠转录组数据库中的相关基因序列设计基因特异性引物, 用 Clontech Smart™ RACE cDNA 试剂盒 (Clontech, USA) 通过 RACE 法克隆 5' 和 3' 未知序列。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (120 V, 200 mA, 1 h) 中电泳, 用 QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) 回收目标条带, 并将其克隆至 pMD-19T 载体 (TaKaRa, Dalian, China) 中进行测序。根据测序结果进行拼接并据此设计全长引物, 以红花花冠 cDNA 为模板, 使用高保真 KOD-Plus-Neo 聚合酶 (Toyobo, 日本) 进行全长扩增。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后 (120 V, 200 mA, 1 h), 切取目的条带胶块进行胶回收。胶回收产物克隆至 pEASY-Blunt Zero 平末端载体 (pEASY-Blunt Zero Cloning Kit, TransGen, China) 中进行测序。

生物信息学分析 获得 *XTHs* 和 *EXPs* 基因全长后, 对获得的基因序列进行系统的生物信息学分析。首先, 使用 Open Reading Frame Finder (ORF Finder, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测出各基因的开放阅读框; 使用 ExPASy 服务器上的 ExPASy-ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/compute/>) 预测理论等电点 (pI)、分子量 (M_w) 和分子式。同时为了解蛋白的潜在功能, 使用 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白结构功能域分析。使用 ProtScale 程序 (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 和 TMHMM

Server v.2.0 (<http://www.cbsdtdk.dk/services/TMHMM/>) 分析这些蛋白的疏水性和跨膜区域, 使用 SignalP 4.1 程序 (<http://www.cbsdtdk.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽序列。之后, 使用 ClustalX2.1 将红花 *XTHs* 和 *EXPs* 分别与拟南芥 *XTHs* 和 *EXPs* 进行多序列比对, 并通过 MEGA5.0 使用邻接法 (N-J) 构建系统发育树^[18], 1 000 个自引重复确保发育树的可靠性。最后, 使用 PBILYON-GERLAND 数据库 (https://npsaprabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_hnnhtml), 通过 Hopfield Neural Network (HNN) 方法预测蛋白二级结构, 并采用线程建模方法, 使用 phyre2.0 服务器 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测蛋白三级结构^[19]。

表达模式分析 为了解与花冠伸长相关基因的表达模式, 在盛花期, 采集了根、茎、叶、苞片、花以及幼嫩种子, 通过 qRT-PCR 方法测定了各基因在不同器官中的表达量。

红花遗传转化 使用高保真 KOD-Plus-Neo (Toyobo, Japan) 聚合酶克隆目标基因的 CDS 区。之后, 通过 In-Fusion HD 无缝克隆试剂盒 (Toyobo, Japan), 将胶回收产物重组至线性化的真核表达载体 pMT39, 形成 pMT39-XTH 重组载体。热激法转化大肠杆菌 DH-5 α 并测序验证后, 使用液氮冻融法, 将验证正确的质粒转化至根癌农杆菌 GV3101 菌株中备用。按文献报道的方法^[16], 使用农杆菌介导的花粉管通道法进行红花遗传转化工作。通过 PCR 检测阳性转化植株并测序验证。同时, 将 pMT39 空载体的阳性转化植株作为对照 (CK)。

转基因植株 *CtXTH1* 基因转录水平检测、农艺性状及显微结构分析 在开花期, 对转基因阳性植株 (OVX) 和空载对照 (CK) 植株, 每株选择 3 个相同部位的花球, 用游标卡尺测量花球直径, 测量其中 30 个小花的花冠长度, 计数每个花球的小花数并称重。通过 qRT-PCR 检测 *CtXTH1* 的转录水平。待种子成熟后, 计数每个果球的种子数并称重。同时为探究 *XTHs* 基因如何影响花冠的发育, 对花冠组织结构进行了显微观察。具体操作如下: 在开花期间从收集的花中随机选择 3 个小花, 使用 FAA 固定 48 h (在此期间更换 2~3 次 FAA 固定液) 后, 使用酒精进行梯度脱水并采用二甲苯透明。所有样品包埋于蜡块中进行切片, 花冠裂片采用横切, 花冠管状部分采用纵切。脱蜡后, 番红-O 染色, 然后使用显微镜 (DM2500, Leica, Germany) 观察拍照并保存。

UPLC/Q-TOF/MS 检测转基因红花指标成分 采用课题组建立的 UPLC/Q-TOF/MS 法检测过表达植株

和空载对照植株花冠中的 7 种主要黄酮类成分和苯丙烷类代谢途径的起始分子^[20]。依次为: 芦丁 (rutin)、山柰酚 (kaempferol)、羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A)、山柰酚-3-*O*- β -芸香糖苷 (kaempferol-3-*O*- β -rutinoside)、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (kaempferol-3-*O*- β -D-glucoside)、红花黄色素 (carthamin)、野黄芩苷 (scutellarin) 和 *D*-苯丙氨酸 (*D*-phenylalanine)。

数据分析 使用 SPSS 21.0 (IBM, New York, USA) 对数据进行分析。所有数值均以平均值 \pm 标准差或标准误表示。通过独立样本 *T* 检验或 ANOVA 检验处理数据, 显著性水平设定为 **P*<0.05, ***P*<0.01。

结果

1 基因筛选

在红花花冠转录组数据库中, 通过基因注释共筛选出 13 个 *XTHs* (注: *CtXTH1* 与 *CtXTH13* 为同一基因) 和 8 个 *EXPs* 基因。根据红花花冠表达谱芯片与花冠长度的 Pearson 相关分析发现其中有 7 个 *XTHs* 和 3 个 *EXPs* 可能与花冠伸长相关 (图 1)。之后通过 qRT-PCR 进行验证后, 最终筛选出 5 个 *XTHs* 和 1 个 *EXP* 基因。通过 RACE 法获得基因全长并分别命名为 *CtXTH1* (GenBank 登录号 MK103355)、*CtXTH2* (GenBank 登录号 MK103356)、*CtXTH3* (GenBank 登录号 MK103357)、*CtXTH4* (GenBank 登录号 MK103358) 和 *CtEXP1* (GenBank 登录号 MK103359)。

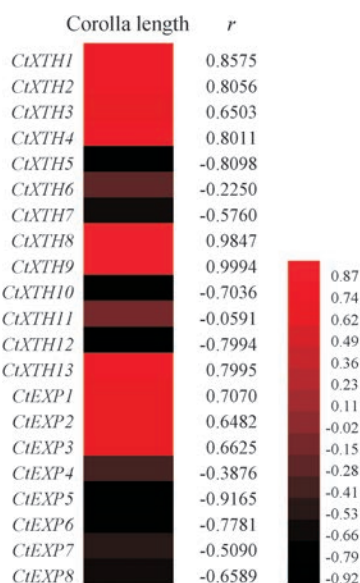
2 生物信息学分析

从红花花冠克隆到的与花冠伸长相关的 4 个 *CtXTHs* 全长为 1 107~1 353 bp, 预测的 CDS 区长度为 864~1 050 bp, 编码 287~349 个氨基酸, 蛋白分子质量为 32.6~40.6 kDa, pI 值为 8.18~8.86, *CtXTH1* 的 pI 为 5.98。 *CtEXP1* 全长 1 158 bp, 预测的 CDS 区为 780 bp, 编码 259 个氨基酸, 蛋白分子质量为 27.8 kDa, pI 值为 7.56。具体见表 1。

蛋白结构功能域分析显示 4 个 *CtXTHs* 基因都含有 Glyco_hydro_16 功能域和 XET_C 功能域, 表明筛选出的 *CtXTHs* 基因属于 XET 亚家族, *CtXTH1* 和 *CtXTH2* 含有跨膜区, 推测其属于膜蛋白, *CtXTH3* 和 *CtXTH4* 含有信号肽, 推测其属于分泌蛋白。 *CtEXP1* 含有 DPBB_1 和 Pfam 功能域, 推测其属于花粉过敏原类, 禾本科植物的 I 组花粉过敏原与膨胀素具有序列同源性, 已被归为 α -膨胀素, 因此 *CtEXP1* 应属于 α -膨胀素基因亚家族。 *CtEXP1* 同样含有信号肽, 因此推测其也属于分泌蛋白。根据 SMART 分析结果, 对信号肽、疏水性和跨膜区进行了额外的预测。结果显示 *CtXTH3*、*CtXTH4* 和 *CtEXP1* 具有信号肽, *CtXTH1* 和

Table 1 Gene characteristics of four *CtXTHs* and *CtEXP1* proteins from safflower

Name	Full-length/bp	CDS/bp	Star	Stop	ORF (aa)	Mass/Da	pI	Molecular formula
<i>CtXTH1</i>	1 167	888	27	914	295	33 623.91	5.98	C ₁₅₁₆ H ₂₂₆₂ N ₄₀₂ O ₄₄₁ S ₁₄
<i>CtXTH2</i>	1 250	1 050	43	1 092	349	40 653.21	8.86	C ₁₈₃₇ H ₂₈₀₅ N ₄₉₇ O ₅₂₆ S ₁₂
<i>CtXTH3</i>	1 107	864	25	888	287	33 033.53	8.18	C ₁₅₀₃ H ₂₂₄₀ N ₄₀₀ O ₄₁₉ S ₁₃
<i>CtXTH4</i>	1 353	876	252	1 127	291	32 630.27	8.41	C ₁₄₅₆ H ₂₁₉₄ N ₄₀₈ O ₄₃₉ S ₆
<i>CtEXP1</i>	1 136	780	2	781	259	27 792.06	7.56	C ₁₂₃₂ H ₁₈₄₃ N ₃₃₇ O ₃₇₃ S ₁₄

**Figure 1** Heatmap for Pearson correlation analysis between the signal values by gene chip and corolla length with the floret development. The color key was set from -1 to +1. $r \geq 0.60$

CtXTH2 无信号肽; 且所有基因均在 N-末端具有疏水区域, 在 C-末端具有亲水区域; 跨膜区分析显示 *CtXTH1*、*CtXTH2* 和 *CtEXP1* 均具有 TMhelix 结构, *CtXTH3* 和 *CtXTH4* 仅具有 outside 结构。二级结构预测显示它们均只包含 3 种二级结构: α 螺旋、无规卷曲和延伸链, 并且无规卷曲的比例 >50%, 而该结构通常被认为是蛋白分子活性位点的重要构象。通过 DNAMAN 多序列比对显示了 *XTHs* 和 *EXPs* 基因家族的保守位点和保守区, 并使用 phyre 2.0 预测了蛋白三级结构。基于三级结构发现 *CtXTHs* 基因具有相对保守的折叠方法, 其蛋白三级结构骨架一致, 同时可识别出典型的双- ψ -桶 (DPBB) 结构。系统发育树结果显示 (图 2) 4 个 *CtXTHs* 被划分到 3 个 *XTHs* 基因亚家族^[21], *CtXTH1* 和 *CtXTH3* 属于亚家族 I, 与拟南芥 *AtXTH6*、*AtXTH7* 具有高度同源性, 而 *AtXTH6*、*AtXTH7* 在拟南芥花、茎和叶中高表达, 可能参与植株生长的多个阶段, 尤其在花发育中^[15,22,23]。*CtXTH4* 属于亚家族 II, 与拟南芥 *AtXTH15*、*AtXTH16* 具有高度同源性, *AtXTH15*、*AtXTH16* 在拟南芥根、子叶脉和心皮中高表达, 可

能与根系发育有关^[23]。*CtXTH2* 属于亚家族 III, 与拟南芥 *AtXTH29*、*AtXTH30* 具有高度同源性, *AtXTH29*、*AtXTH30* 在拟南芥胚芽、种皮、下胚轴和花药中具有高表达, 推测与花药开裂和花粉释放有关^[23-25]。拟南芥 *AtEXPs* 基因被划分为 3 个亚家族^[26], *CtEXP1* 属于 EXPA 亚家族, 与拟南芥 *AtEXP2*、*AtEXP8* 具有高度同源性, *AtEXP2*、*AtEXP8* 在发芽的种子中高表达, 可能与种子萌发及盐胁迫有关^[27,28]。

3 表达模式分析

根据生物信息学分析, 认为筛选到的 4 个 *CtXTHs* 和 *CtEXP1* 基因功能存在分化, 因此, 进一步对其组织表达特征进行分析。结果表明 *CtXTHs* 和 *CtEXP1* 在不同组织中存在差异表达, 表现出不同的表达模式 (图 3)。*CtXTH1* 在花中表达量最高, 约为根中的 73.4 倍, 其次在苞片中表达量较高, 约为根中的 23.86 倍, 而在茎、叶和幼嫩种子中的表达水平与根中相似。*CtXTH2* 在除花和幼嫩种子外的其他部位均有较高表达, 在叶片中表达量最高为根中表达量的 3.01 倍, 在幼嫩种子中表达量最低, 约为根中表达量的 1/45, 花中的表达量约为根中的 1/3。对于 *CtXTH3*、*CtXTH4* 以及 *CtEXP1*, 它们在根中均具有较高的表达水平, *CtXTH4* 在花中的表达水平次之, 但仅为根中表达量的 1/11。苞片中的表达最低。对于 *CtXTH3*, 苞片和花中的表达小于根中表达量, 约为 1/4。在幼嫩种子中, 表达水平最低, 约为根中表达量的 1/82。对于 *CtEXP1*, 除了在根中具有最高表达外, 在叶、苞片和花中具有相对较高的表达, 约为根中表达的 1/3 至 1/2, 在幼嫩种子中的表达水平最低, 仅为根中表达水平的 1/36。因此, 推测 *CtXTH1* 可能在花发育中发挥关键作用, 同样 *CtXTH4* 可能在根系发育中起重要作用, *CtXTH2* 可能在营养生长阶段发挥作用, 尤其是在叶片发育过程中, *CtXTH3* 可能在根系发育中起主要作用, 并且可能影响花的发育, 而对于 *CtEXP1*, 其功能类似于 *CtXTH3*。

综合考虑 Pearson 相关分析、生物信息学分析和表达模式分析结果, 认为 *CtXTH1* 可能是影响花冠伸长的关键基因。因此将其作为目标基因, 通过红花遗传转化方法进一步探究其功能。

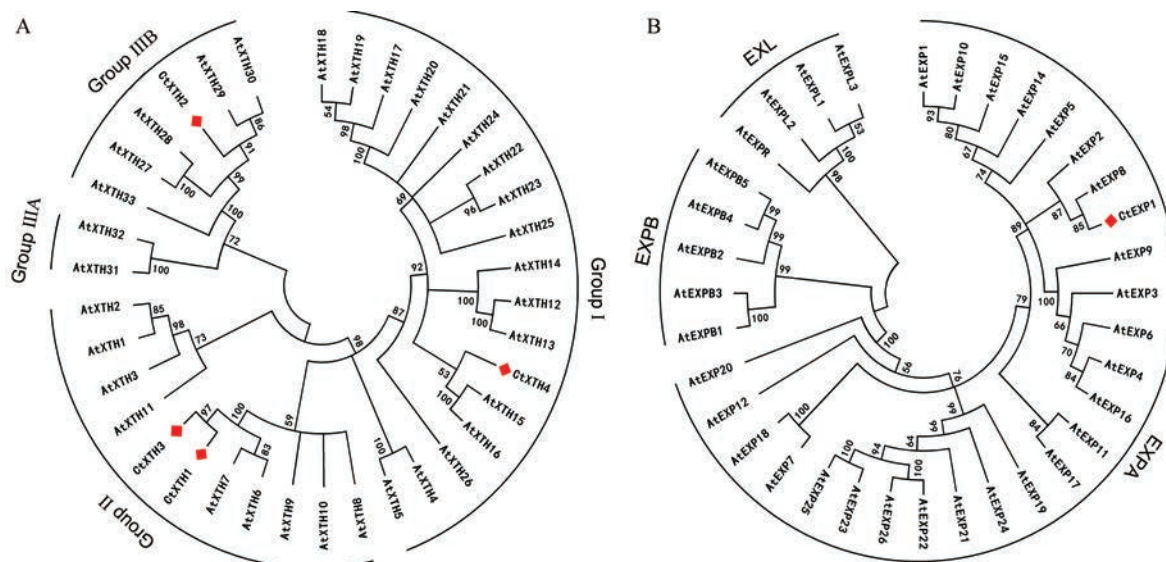


Figure 2 A: Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method using amino acids of XTHs from safflower and *Arabidopsis thaliana*. B: Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method using amino acids of EXPs from safflower and *Arabidopsis thaliana*

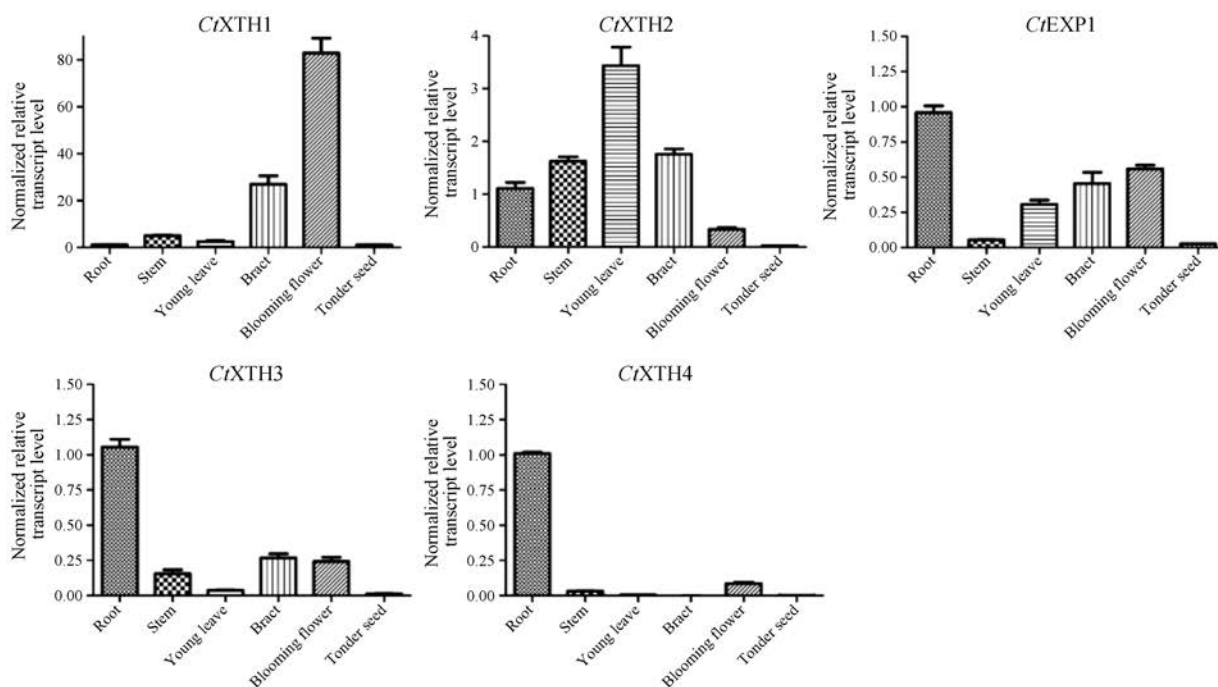


Figure 3 The expression patterns of XTHs and EXPs in safflower

4 转基因红花的鉴定及 *CtXTH1* 转录水平测定

通过根瘤农杆菌介导的花粉管通道法转化 pMT39-*CtXTH1* 载体。采用 PCR 结合测序从 24 株潜在个体中筛选出 8 株独立的阳性转基因植株。之后采用 qRT-PCR 方法确定各阳性植株与对照组 *CtXTH1* 基因的转录水平。根据 qRT-PCR 结果筛选出 5 株阳性植株 (OVX) 和 5 株对照植株 (CK) 用于后续分析。如图 4A 所示, *CtXTH1* 基因的相对表达量在 OVX 中发生明显的增加, 约为 CK 的 2~3 倍, 说明 *CtXTH1* 基因在获

得的阳性植株中得到了过表达。

5 转基因红花农艺性状比较及花冠显微结构分析

为探究 *CtXTH1* 过表达对花和种子的影响, 对过表达组 and 对照组中的每株花球数、花球直径、花冠长度、小花和种子数量及重量进行了比较。如图 4B、4C, 在过表达组中, 花冠长度发生了显著的伸长, 增长约 5.34%~10.25%, 尤其是在 OVX-7 中, 平均花冠长度为 3.70 cm, 比对照组的 3.35 cm 长约 10.25%。对于每株花球数以及花球直径, 两组之间没有显著性差异 (图

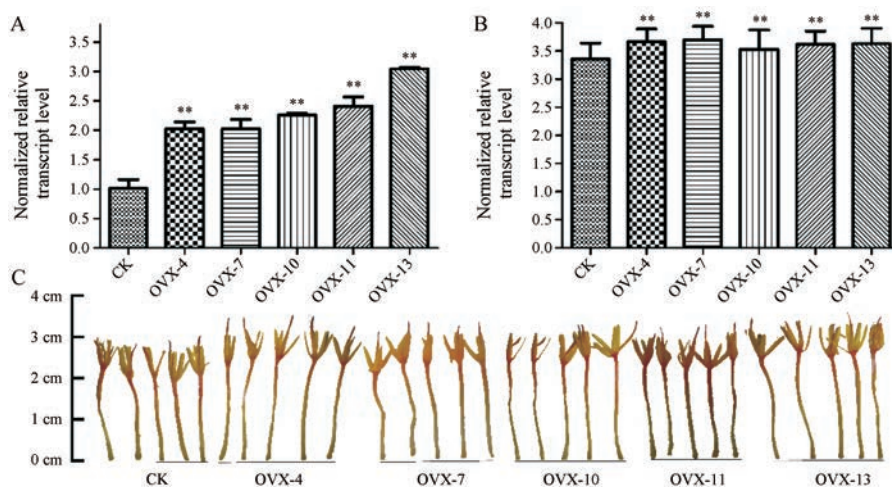


Figure 4 A: Transcript levels in negative control (CK) and Contig41 over-expression safflower as determined by qRT-PCR. Each over-expression safflower line vs CK-group, error bar is mean \pm SD, ** $P < 0.01$. B: The corolla length in negative control (CK) and Contig41 over-expression safflower. Each over-expression safflower line vs CK-group, error bar is mean \pm SD, ** $P < 0.01$. C: The abridged general view of inflorescences in negative control (CK) line and *CtXTH1* over-expression safflower lines

5A、5B)。对于花, 每花球的平均小花数量与重量均比对照组大, 分别大约 15.95%~30.60% 和 30%~36%, 尤其在 OVX-13 中, 平均小花数量 101, 比对照多 30.60%, 小花重量为 1.1061 g, 比对照重 36%, 除 OVX-10 外其余各株与对照均显示出显著差异 (图 5C、5D)。对于种子, 过表达系在每果球种子数和种子重上均比对照组大, 分别大约 7.27%~69% 和 6.09%~36.53%,

但除了 OVX-4、-13 在种子数目上与对照组具有显著差异外, 其余均没有显著性差异 (图 5E、5F)。在对转基因植株与对照组植株花冠的显微结构观察结果发现, 与对照组相比, 过表达植株花冠囊似乎没有明显变化, 但在花柱及花瓣上均表现出增大的趋势, 并在花冠管状部分的纵切面, 过表达植株组织结构表现出不规则的特征, 并且似乎也更为松散 (图 6A、6B)。

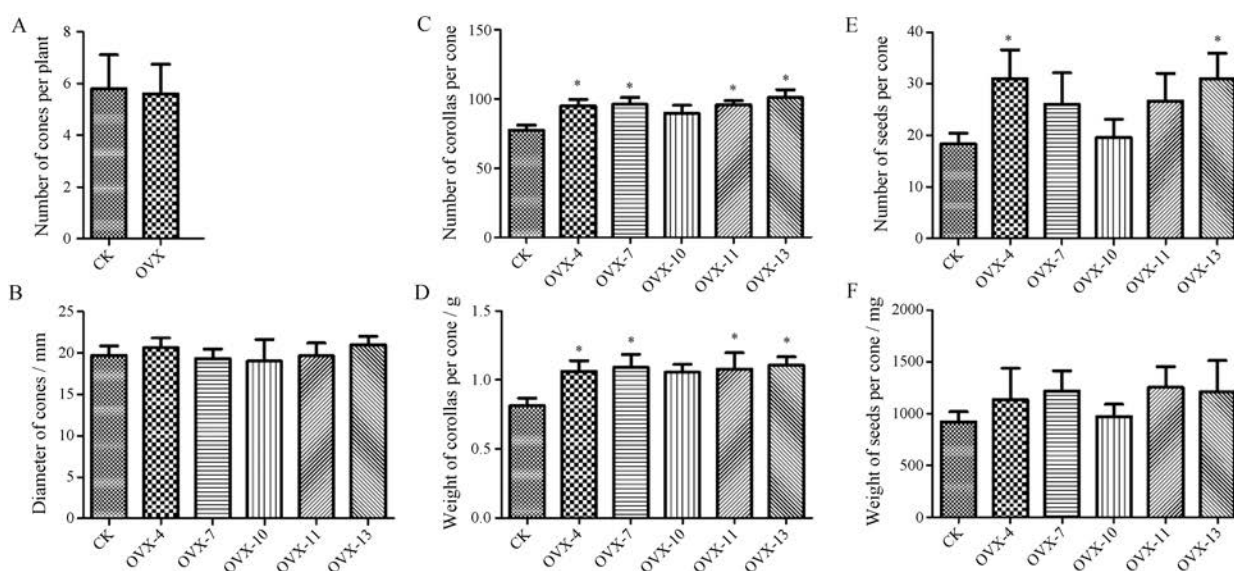


Figure 5 Flower and fruit traits in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower. A: The number of cones per plant in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower. B: The diameter of cones in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower lines. C and D: The number and weight of corollas per cone in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower lines. E and F: The number and weight of seeds per cone in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower lines. For A, over-expression safflower group vs CK-group; For B-F, each over-expression safflower line vs CK-group. error bar is mean \pm SEM, for CK group SEM means biological duplication, while over-expression safflower lines mean technical duplication, * $P < 0.05$

6 过表达植株黄酮类化合物的积累分析

通过UPLC/Q-TOF/MS检测过表达植株和对照植株花冠中的7种主要黄酮类成分和苯丙烷类代谢途径的起始物质D-苯丙氨酸,发现与对照组相比,野黄芩苷、红花红色素、羟基红花黄色素A、芦丁、山柰酚、山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-β-芸香糖苷均无显著差异,但D-苯丙氨酸发生显著积累(图7)。

讨论

膨胀素和木葡聚糖转糖基/水解酶基因均属于多基因家族。据报道,在拟南芥中有33个XTHs基因和36个EXPs基因^[22,29,30],在水稻中有29个XTHs基因和58个EXPs基因^[31,32],并且在其他物种中也存在众多XTHs和EXPs。来自多基因家族的基因通常发挥不同的生理功能,例如:XTHs和EXPs可以促进种子萌发^[27,33,34],并且在根系建成^[35-37]、植株生长^[38-40]以及花和果实的发育中^[14,41-43]发挥作用,并且最近研究表明,XTHs可能参与非生物胁迫及寄生植物的寄生过程^[44,45]。因此,认为红花中的某些XTHs或EXPs基因可能参与花冠发育,其通过松弛和重构花冠细胞壁来影响花冠细胞的大小或数量,从而促进花冠伸长。正如Shin在对*BcXTH1*基因功能的研究中发现,*BcXTH1*可以介导表皮和叶肉细胞的膨大进而引起叶片伸长^[46]。本研究中,基于红花花冠转录组数据库和表达谱芯片数据,结合qRT-PCR验证,通过PEARSON相关分析筛选出可能促进花冠伸长的4个*CtXTHs*和*CtEXP1*。基于生物信息学分析和表达模式分析,认为*CtXTH1*可能是影响花冠伸长的关键基因。之后通过红花过表达

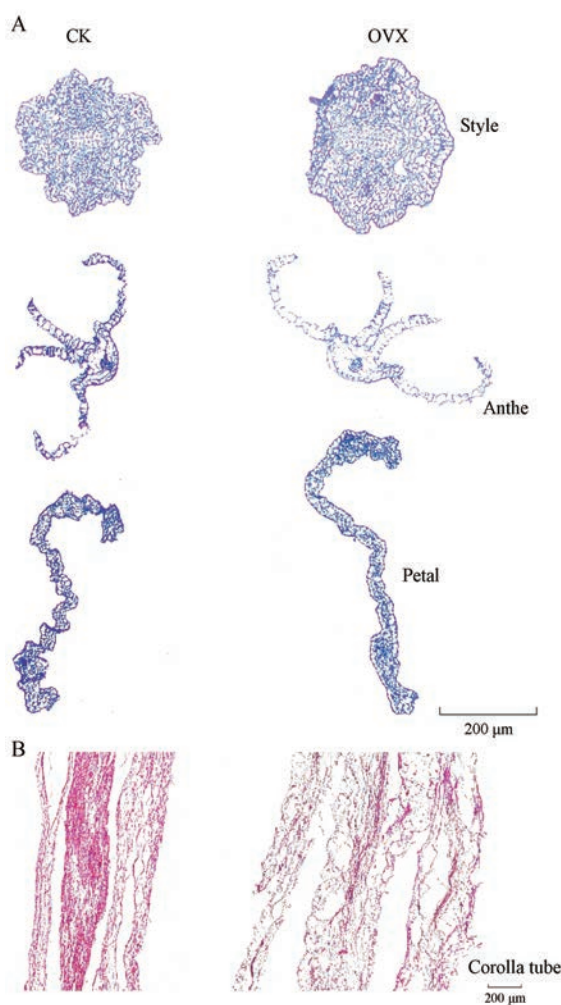


Figure 6 A: Transverse sections of the tissue in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower. B: Longitudinal sections of the tissue in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower

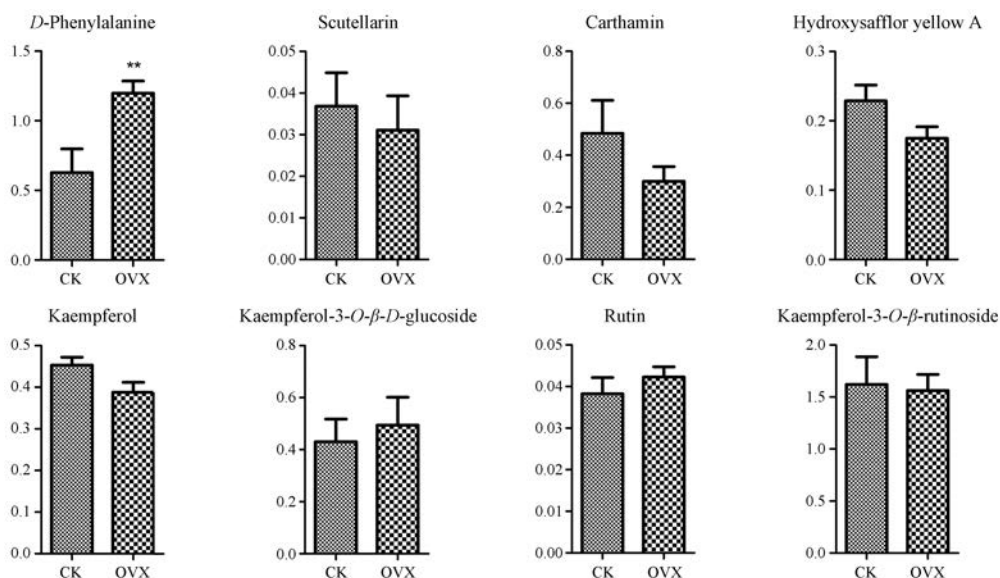


Figure 7 Levels of flavonoid compounds in negative control (CK) and *CtXTH1* over-expression safflower determined by UPLC-MS analysis. The over-expression safflower line vs CK-group, error bar is mean ± SD, ***P*<0.01

遗传转化,发现 *CtXTH1* 过表达能够显著促进花冠的伸长,其小花数量及重量也均有显著提高,并且其种子数及种子重也表现出增加的趋势。在对花冠显微结构的观察中发现,花冠组织变得松散和不规则,这种现象与 *DkXTH8* 过表达后的柿果实表皮细胞变化相似。因此推测 *CtXTH1* 与 *DkXTH8* 一样都能够引起细胞壁的松弛,从而使得靶组织增大^[47]。同时,通过对过表达植株花冠主要黄酮类化合物的检测发现, *CtXTH1* 的过表达红花药材品质没有显著影响。

本研究首次揭示了红花 *CtXTHs* 和 *CtEXPI* 基因的序列特征和表达模式,发现 *CtXTH1* 在红花花冠中特异性积累,通过遗传转化实验,证明了 *CtXTH1* 基因在促进红花花冠伸长进而提高花冠以及种子产量方面的重要价值,为红花育种工作提供了重要线索。

References

- [1] Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19: 153-159.
- [2] Delshad E, Yousefi M, Sasannezhad P, et al. Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (safflower): a comprehensive review from traditional medicine to modern medicine [J]. Electron Physician, 2018, 10: 6672-6681.
- [3] Gecgel U, Demirci M, Esendal E, et al. Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. J Am Oil Chem Soc, 2007, 84: 47-54.
- [4] Tian ZM. The current situation, development advantages and countermeasures of Chinese safflower industry [J]. Yunnan Agric Sci Technol (云南农业科技), 2014, (4): 57-59.
- [5] Lee J, Burns T, Light G, et al. Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase genes in cotton and their role in fiber elongation [J]. Planta, 2010, 232: 1191-1205.
- [6] Shao MY, Wang XD, Ni M, et al. Regulation of cotton fiber elongation by xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase genes [J]. Gen Mol Res, 2011, 10: 3771-3782.
- [7] Li XB, Zhang JZ. Chemical structure and physiological function of hemicellulose [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 1994, 11: 27-33.
- [8] Ferreira SDS, Hotta C, Poelking VGDC, et al. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane [J]. Plant Mol Biol, 2016, 91: 15-35.
- [9] Gruber M, Alahakoon A, Taheri A, et al. The biochemical composition and transcriptome of cotyledons from *Brassica napus* L. lines expressing the *AtGL3* transcription factor and exhibiting reduced flea beetle feeding [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18: 64-65.
- [10] Cosgrove DJ. New genes and new biological roles for expansins [J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 73-78.
- [11] Fry SC. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall [J]. Ann Rev Plant Biol, 2003, 46: 497-520.
- [12] Zenoni S, Reale L, Tornielli GB, et al. Downregulation of the *Petunia hybrida* V. alpha-expansin gene *PhEXPI* reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs [J]. Plant Cell, 2004, 16: 295-308.
- [13] Harada T, Torii Y, Morita S, et al. Cloning, characterization and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening [J]. J Exp Bot, 2011, 62: 815-823.
- [14] Li XB, Xu WW, Chowdhury MR, et al. Comparative proteomic analysis of labellum and inner lateral petals in *Cymbidium ensifolium* flowers [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15: 19877-19897.
- [15] Li Z, Xia WS, Hong R, et al. Cloning and functional verification of chrysanthemum *CmXTHs* genes related to petal elongation [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2017, 11: 2150-2162.
- [16] Guo DD, Xue YR, Li DQ, et al. Overexpression of *CtCHS1* increases accumulation of quinochalcone in safflower [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1409.
- [17] Liu F. Cloning and Functional Verification of Key Enzyme Genes in the Biosynthesis Pathway of Safflower Flavonoids (红花黄酮类化合物生物合成途径关键酶基因的克隆与功能验证) [D]. Shanghai: The Second Military Medical University (第二军医大学), 2014.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28: 2731-2739.
- [19] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis [J]. Nat Protoc, 2015, 10: 845-858.
- [20] He BX, Xue YR, Tu YH, et al. *CtCHS4* induces the accumulation of safflower quinone chalcones in response to methyl jasmonate induction [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2018, 53: 636-645.
- [21] Baumann MJ, Eklf JM, Michel G, et al. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endotransglycosylases: biological implications for cell wall metabolism [J]. Plant Cell, 2007, 19: 1947-1963.
- [22] Yokoyama R, Nishitani K. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of arabidopsis [J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42: 1025-1033.
- [23] Becnel J, Natarajan M, Kipp A, et al. Developmental expression patterns of arabidopsis *XTH* genes reported by transgenes and genevestigator [J]. Plant Mol Biol, 2006, 61: 451-467.
- [24] Keijzer CJ. The process of anther dehiscence and pollen dispersal. Part II [J]. New Phytol, 1987, 3: 499-507.

- [25] Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, et al. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants [J]. Sex Plant Reprod, 1999, 11: 297-322.
- [26] Lee Y, Choi D, Kende H. Expansins: ever-expanding numbers and functions [J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4: 527-532.
- [27] Yan A, Wu MJ, Yan LM, et al. *AtEXP2* is involved in seed germination and abiotic stress response in arabidopsis [J]. PLoS One, 2014, 9: e85208.
- [28] Nardi CF, Villarreal N, Rossi F, et al. Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism [J]. Plant Mol Biol, 2015, 88: 101-117.
- [29] Mayer K, Schiller C, Wambutt R, et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 1999, 402: 769-777.
- [30] Carey RE, Hepler N, Cosgrove DJ. *Selaginella moellendorffii* has a reduced and highly conserved expansin superfamily with genes more closely related to angiosperms than to bryophytes [J]. BMC Plant Biol, 2013, 13: 4.
- [31] Yokoyama R, Rose JKC, Nishitani K. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase / hydrolases in rice classification and expression analysis [J]. Plant Physiol, 2004, 134: 1088-1099.
- [32] Sampedro J, Cosgrove DJ. The expansin superfamily [J]. Gen Biol, 2005, 6: 242-253.
- [33] Kaku T, Tabuchi A, Wakabayashi K, et al. Xyloglucan oligosaccharides cause cell wall loosening by enhancing xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase activity in azuki bean epicotyls [J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45: 77-82.
- [34] Miedes E, Zarra I, Hoson T, et al. Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility [J]. J Plant Physiol, 2011, 168: 196-203.
- [35] Maris A, Suslov D, Fry SC, et al. Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of arabidopsis and their effect on root growth and cell wall extension [J]. J Exp Bot, 2009, 60: 3959-3972.
- [36] Soltys-Kalina D, Rudzińska-Langwald A, Gniazdowska A, et al. Inhibition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) root growth by cyanamide is due to altered cell division, phytohormone balance and expansin gene expression [J]. Planta, 2012, 236: 1629-1638.
- [37] Xu P, Cai XT, Wang Y, et al. *HDG11* upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in arabidopsis [J]. J Exp Bot, 2014, 65: 4285-4295.
- [38] Choi D, Lee Y, Cho HT, et al. Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants [J]. Plant Cell, 2003, 15: 1386-1398.
- [39] Matsui A, Yokoyama R, Seki M, et al. *AtXTH27* plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements [J]. Plant J, 2005, 42: 525-534.
- [40] Han Y, Han SK, Ban QY, et al. Overexpression of persimmon *DkXTH1* enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants [J]. Plant Cell Rep, 2017, 36: 583-596.
- [41] Bae JM, Kwak MS, Noh SA, et al. Overexpression of sweetpotato expansin cDNA (*IbEXPI*) increases seed yield in arabidopsis [J]. Transgenic Res, 2014, 23: 657-667.
- [42] Li WC, Wu JY, Zhang HN, et al. *De novo* assembly and characterization of pericarp transcriptome and identification of candidate genes mediating fruit cracking in *Litchi chinensis* Sonn [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15: 17667-17685.
- [43] Zhang ZY, Wang N, Jiang SH, et al. Analysis of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family during apple fruit ripening and softening [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65: 429-434.
- [44] Olsen S, Popper Z, Krause K. Two sides of the same coin: xyloglucan endotransglucosylases / hydrolases in host infection by the parasitic plant cuscutea [J]. Plant Signal Behav, 2016, 11: e1145336.
- [45] Olsen S, Striberny B, Hollmann J, et al. Getting ready for host invasion: elevated expression and action of xyloglucan endotransglucosylases / hydrolases in developing haustoria of the holoparasitic angiosperm cuscutea [J]. J Exp Bot, 2015, 258: 193-204.
- [46] Shin YK, Yum H, Kim ES, et al. *BcXTH1*, a brassica campestris homologue of arabidopsis *XTH9*, is associated with cell expansion [J]. Planta, 2005, 224: 32-41.
- [47] Han Y, Ban QY, Li H, et al. *DkXTH8*, a novel xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in persimmon, alters cell wall structure and promotes leaf senescence and fruit postharvest softening [J]. Sci Rep, 2016, 6: 39155-39170.