

束红梅, 郭书巧, 巩元勇, 等. 西红花 *CCD* 家族基因序列分析及表达特性[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 417-423.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.028

西红花 *CCD* 家族基因序列分析及表达特性

束红梅, 郭书巧, 巩元勇, 蒋璐, 朱静雯, 倪万潮
(江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 西红花苷属于脱辅基类胡萝卜素化合物, 是中国传统珍贵药材西红花(藏红花)的主要活性成分。*CCDs*(类胡萝卜素裂解双加氧酶)是催化玉米黄质形成西红花苷等脱辅基类胡萝卜素的重要酶, 为了解西红花 *CCD* 家族基因的差异, 本研究从 NCBI 数据库中检索获得 11 个西红花 *CCD* 家族基因, 对基因序列及表达特性进行分析。结果表明, 西红花 *CsCCD* 家族基因包括 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 4 个亚基因家族, 各个亚家族的基因序列较为保守、编码的蛋白质三维结构存在差异。通过表达分析发现不同 *CsCCD* 基因在不同花器官中的表达特性存在明显差异, 这一结果与通过转录组测序得到的 *CsCCD* 基因表达水平相符。推测不同 *CsCCD* 基因在西红花苷合成过程中的功能存在差异。

关键词: 西红花; *CCD* 家族基因; 序列分析; 表达分析

中图分类号: S567.9; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0417-07

Sequence analysis and expression characteristics of carotenoid cleavage dioxygenases(*CCD*) genes in *Crocus sativus*

SHU Hong-mei, GUO Shu-qiao, GONG Yuan-yong, JIANG Lu, ZHU Jing-wen, NI Wan-chao
(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Crocin is an apocarotenoid compound, the major active ingredient of saffron (*Crocus sativus*) which has been cultivated and used as spice and medicinal plant for thousands of years. Carotenoid cleavage dioxygenases (*CCDs*) are important enzymes that catalyze zeaxanthin to generate crocin in *Crocus*. To understand the difference of *CCD* genes in *Crocus*, 11 *CsCCD* genes searched from NCBI were analyzed for the sequence, structure and expression. The 11 *CsCCD* genes were divided into four subfamilies (*CCD1*, *CCD4*, *CCD7*, and *CCD8*) which shared similar conserved domains and different 3D structure of encoded protein. The expressions of *CsCCD* genes differed in different floral organs (stigma, petal and stamen), which were consistent with the expression patterns of *CsCCD* gene obtained by the transcription sequencing. It is speculated that different *CsCCD* genes plays different roles in crocin biosynthesis.

Key words: crocin; *CCD* gene; sequence analysis; expression analysis

收稿日期: 2016-08-08

基金项目: 转基因生物新品种科技重大专项(2016ZX08005-001); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)5011]

作者简介: 束红梅(1982-), 女, 江苏射阳人, 博士, 副研究员, 主要从事农业生物技术研究。(Tel) 025-84390290; (E-mail) shu-hm1982@163.com

通讯作者: 倪万潮, (E-mail) nwchao2002@aliyun.com

西红花(*Crocus sativus* L.)又名藏红花, 是鸢尾科番红花属球根类多年生无茎草本植物, 仅柱头入药, 产量低(15 kg/hm²左右), 又因为其是三

倍体植物,只能通过球茎繁殖,繁殖率低,致使其价格昂贵,被誉为“植物黄金”^[1]。西红花具有强烈的活血化瘀和散郁开结的功效^[2-3],无论在传统药典还是现代医药中西红花一直被广泛利用^[4-6]。2010 版《中华人民共和国药典》以西红花苷作为西红花的主要活性指标。在西红花柱头中玉米黄质在类胡萝卜素裂解双加氧酶(*CCDs*)催化下氧化成脱辅基类胡萝卜素即西红花苷等主要活性物质^[7-8]。

CCDs 是参与类胡萝卜素裂解过程的重要酶,也是西红花苷合成途径的重要酶。随着测序技术的发展和多个物种全基因组序列的公布,植物中鉴定出越来越多的编码 *CCDs* 酶的基因,这为明确 *CCD* 蛋白家族的起源进化 and 功能提供了丰富的基因资源^[9]。研究结果表明,植物中 *CCD* 基因家族主要包括 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 4 个亚基因家族^[10-12]。目前在西红花中也鉴定出 *CCD* 家族的一些基因,但是这些基因在西红花苷合成途径中的作用是否存在差异尚不清楚。因此本研究主要分析西红花中 *CCD* 家族基因的序列特征及其在不同花器官中的表达情况,为解析 *CCD* 基因在西红花苷合成过程中的功能提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

挑选质量在 20~25 g 的西红花种球 50 个,在 11 月中上旬西红花开花时,对柱头、花瓣、雄蕊分别取样,液氮速冻,−70 ℃ 保存,用作提取 RNA。

1.2 西红花 *CCD* 基因的结构分析

在 NCBI 中检索西红花 *CCD* 家族基因,共获得 13 个 *CsCCD* 基因 CDS 序列。利用在线软件 ExPASy (<http://expasy.org/>) 对西红花 *CCD* 家族基因的氨基酸序列进行分子量、等电点预测^[13]。利用 WoLF PSORT 软件 (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 分析氨基酸序列,进行亚细胞定位预测。通过在线 SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 预测蛋白三维结构, Dali sever (http://elchidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/start) 计算目标蛋白与模板蛋白骨架原子 *RMSD* 值 (Root mean square deviation, 均方根距

离),一般情况下 *RMSD* 值越小表示目标蛋白模型越合理。

用 DNAMAN 软件,对西红花 *CCD* 基因家族成员进行序列同源性比对,在氨基酸水平上分析它们的遗传多样性;使用 Clustal X (1.83) 软件对氨基酸序列进行多序列联配,将多序列联配的结果通过 Mega 5.0 软件进行分析,构建系统进化树,采用邻近法 (Neighbor-joining, NJ) 并利用 Bootstrap 方法进行评估,数值设置为 1 000。

1.3 西红花 *CCD* 基因的表达分析

用 OMIGA 公司植物 RNA 提取试剂盒提取西红花柱头、花瓣、雄蕊的总 RNA。以梯度总 RNA 量及梯度循环数确定可区分表达强度差异的最佳 PCR 循环数。以等量总 RNA 进行 RT-PCR,反应程序为:42 ℃ 1 h;94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,退火 30 s,72 ℃ 45 s,合适循环数;72 ℃ 延伸 10 min。所用引物、退火温度见表 1。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离。反转录所用生化酶等购自 Promega 公司,PCR 所用酶等购自 TaKaRa 公司,RNA 提取过程中所需枪头、离心管等购自 Axygen 公司。

西红花柱头、花瓣、雄蕊的转录组测序由诺禾致源生物有限公司完成。在 3 个花器官的差异基因库中根据西红花 *CsCCD* 基因登录号找到目标基因,并根据 *FPKM* 值^[14] 比较 *CsCCD* 基因在西红花不同花器官的表达差异。

2 结果与分析

2.1 西红花 *CCD* 家族基因

从 NCBI 中检索获得 11 个西红花 *CsCCD* 基因 (表 1), 11 个 *CsCCD* 基因的 CDS 长度在 1 110~1 884 bp, 其中 *CsCCD7* 基因 CDS 最长,为 1 884 bp, *CsZCO* 基因最短,为 1 110 bp。通过 ExPASy 在线软件对 *CsCCD* 基因进行了蛋白质长度、分子量及等电点等生化属性分析。11 个 *CsCCD* 蛋白氨基酸长度在 369~627 aa, 分子量在 40 750 (*CsZCO*) 到 70 126 (*CsCCD7*) 间,等电点范围从 5.18 (*CsZCO*) 到 7.62 (*CsCCD2L*)。11 个 *CsCCD* 基因的亚细胞定位预测结果 (表 2) 表明, *CsCCD7* 具有 1 个亚细胞定位,定位到叶绿体,其余成员均具有 2 个以上亚细胞定位,主要定位到细胞质、叶绿体等。

表 1 本研究所用引物

Table 1 PCR primers used in this study

| 基因名称 | 引物 1(5'→3') | 引物 2(5'→3') | 退火温度(℃) |
|----------------|------------------------|-------------------------|---------|
| <i>CsCCD2</i> | CCTCCGTATCTTACTTATCG | TTCTAGGTCCCAACTCAA | 55 |
| <i>CsCCD4c</i> | GCCGCCTTACATCACCTA | CGACACGATTCCGTTCTT | 55 |
| <i>CsCCD7</i> | ACCTCCCCGTCATCCAAT | ACCTCCCCGTCATCCAAT | 60 |
| <i>CsCCD8b</i> | CAGAGGGGCACCTACTTA | CGGCAATAGCGTCCACAT | 56 |
| <i>18S</i> | AGTTTGAGGCAATAACAGGTCT | GATGAAATTTCCTCAAGATTACC | 54 |

表 2 西红花 CCD 基因家族基本信息

Table 2 Basic information of CCD gene family of *Crocus*

| 基因名称 | 基因登录号 | CDS 长度 (bp) | <i>CsCCD</i> 蛋白 | | | 亚细胞定位 |
|----------------|----------|----------------|-----------------|--------|------|--------------------|
| | | | 长度(aa) | 分子量 | 等电点 | |
| <i>CsCCD1a</i> | AJ132927 | 1 641 | 546 | 61 696 | 5.90 | 细胞质、过氧化物酶体、叶绿体、线粒体 |
| <i>CsCCD1b</i> | EU523661 | 1 692 | 563 | 63 173 | 6.75 | 叶绿体、质膜、细胞质 |
| <i>CsCCD2</i> | KJ541749 | 1 689 | 562 | 63 298 | 6.59 | 细胞质、质膜、液泡 |
| <i>CsCCD2L</i> | KP887110 | 1 872 | 623 | 69 922 | 7.62 | 叶绿体、质膜、细胞核 |
| <i>CsCCD4a</i> | EU523662 | 1 743 | 580 | 63 770 | 6.15 | 叶绿体、液泡 |
| <i>CsCCD4b</i> | EU523663 | 1 710 | 569 | 62 672 | 6.14 | 叶绿体、线粒体 |
| <i>CsCCD4c</i> | JN131499 | 1 860 | 619 | 67 337 | 6.14 | 叶绿体、细胞核 |
| <i>CsCCD7</i> | KJ361477 | 1 884 | 627 | 70 126 | 6.49 | 叶绿体 |
| <i>CsCCD8a</i> | KJ361478 | 1 536 | 511 | 57 139 | 6.61 | 细胞质、细胞核 |
| <i>CsCCD8b</i> | KJ361479 | 1 674 | 557 | 62 034 | 6.18 | 细胞质、叶绿体 |
| <i>CsZCO</i> | AJ489276 | 1 110 | 369 | 40 750 | 5.18 | 细胞质、叶绿体、细胞核 |

将 11 个 *CsCCD* 基因编码的蛋白质氨基酸序列进行比对,发现氨基酸序列有一段保守序列,都含有 RPE65 保守结构域,但是氨基酸序列的一致性较低(图 1)。根据序列一致性分为 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 4 个亚基因家族(图 2),同一个亚家族内编码的氨基酸序列一致性较高,但不同亚家族间编码的氨基酸序列差异较大、一致性低于 40%。其中 *CsCCD2*、*CsCCD2L* 氨基酸序列与 *CsCCD1a* 的氨基酸序列一致性为 72%,因此 *CsCCD2*、*CsCCD2L* 基因属于 *CCD1* 亚基因家族;而 *CsZCO* 氨基酸序列与 *CsCCD4a*、*CsCCD4b* 氨基酸序列一致性高于 98%,因此 *CsZCO* 属于 *CCD4* 亚基因家族。

2.2 西红花 CCD 家族基因的系统进化分析

为深入分析西红花 *CsCCD* 基因与其他物种

同源基因的进化关系,从 NCBI 中检索获得拟南芥、烟草、玉米、番红花部分 *CCD* 基因序列,利用 Clustal W 程序对这些 *CCD* 基因编码的氨基酸序列进行比对,并利用 MEGA5.0 软件对对比结果进行系统进化树的构建。结果(图 3)表明,不同物种的 *CCD* 基因同样分为 4 个亚基因家族,在不同 *CCD* 亚家族中与西红花关系较近的物种存在差异。*CCD1* 亚基因家族中,*CsCCD1a* 基因与番红花 *CaCCD1* 基因亲缘关系较近。*CCD4* 亚基因家族中,*CsCCD4c* 基因与番红花 *CaCCD4c* 基因亲缘关系较近。*CCD7*、*CCD8* 亚家族中,西红花中 *CsCCD7*、*CsCCD8* 基因分别与烟草中 *NtCCD7*、*NtCCD8* 的亲缘关系较近。

| | | |
|-----------|--|-----|
| CsCCD1a |MCFVAK.....FFVFFRRS.....TVAVNFCFSKTIUSSAVTIIFKAVVYI RHE.....KSKPCHYISCFAPVVRTP | 64 |
| CsCCD1b |MANKFF.....AFKRRKKKFKET KVI TTRVTFKFRKGMASVAVTIIFKAEVYI I SCNSA .ATRSSSSGRRRRKHHYI SCNYAFVCHETP | 83 |
| CsCCD2 |MANKFF.....AFKRRKKKFKET KVI TTRVTFKFRKGMASVAVTIIFKAEVYI I SCNSA .ATRSSSSGRRRRKHHYI SCNYAFVCHETP | 83 |
| CsCCD2T | MRSFATKI FAPIIMSSSEFTI ESPAKSSSTFI FRKIGFI PFKYVYVNCIHFKSSTISVUSMANKFF.....API SKKKKFKET KVI TTRVTFKFRKGMASVAVTIIFKAEVYI I SCNSA .ATRSSSSGRRRRKHHYI SCNYAFVCHETP | 144 |
| CsCCD4a |MAYRI SSSIT FHFESFCNRFTI KSCVIAFONCPSCDHEPTT.....KKKSTSTNKGSTSNRSLAAVECCATITITTRASFETPDATIESVUPHRIUICNFAPUS .RTP | 104 |
| CsCCD4b |MAYRI SSSIT FHFESFCNRFTI K.....HYVSHOCHETT.....KKKSTSTNKGSTSNRSLAAVECCATITITTRASFETPDATIESVUPHRIUICNFAPUS .RTP | 95 |
| CsCCD4c |MFAFSSSSFI SSSPUFTI ORRTHCINAUPTSESVTVISAURTKEPKAFKCCVANKVNDGHCITHI PEOKATTDKSEKKKKKTTSNAPSVKVPSELAETECNITLVI TN .FVUPPUVIRRESUPHRIUICNFAPUS .RTP | 138 |
| CsCCD7 |MHSTSHRI I I FFES.....PAUNRTI I FFERHETI TI TI AAARTI TI TRPKTI KATATPTPTVC.....ISFPAAYWYCYETI SCBARTRD | 84 |
| CsCCD8a |MAYGCTI NKI RES.....TRRRVURI KRRHSINVAICNKYIK | 37 |
| CsCCD8b |MCTNI TARART.....WTSYI SMCHRTITKVCKTSPATIDRUGFNGGTRPTRYVKTQSUST C.....CSTCPNRI TDNUSI EVACURNYIK | 83 |
| CsZCO |MCTNI TARART.....WTSYI SMCHRTITKVCKTSPATIDRUGFNGGTRPTRYVKTQSUST C.....CSTCPNRI TDNUSI EVACURNYIK | 83 |
| Consensus |MCTNI TARART.....WTSYI SMCHRTITKVCKTSPATIDRUGFNGGTRPTRYVKTQSUST C.....CSTCPNRI TDNUSI EVACURNYIK | 0 |
| CsCCD1a | ECFTI FVRGHTI ERTNG .FFVFCGNFK . FMPVACYNWVDCVTHCIRTKIGK.....ATYASRYVTKISRI KC . FRYFRGPKFMKTGTRKFFGTIEMVCMCI TRAKI KVTIUSYGVGTNTAT IYHNGTITAS | 202 |
| CsCCD1b | ESHTI FVHGTI ERTNG .VFTVGTITRS . FAPVACYNWVDCVTHCIRTKIGK.....ATYI SRYTKISRFKCG .RNITI RGAKEFMKTGTRGLI GFETITTI VI RTTIT KVTITSYGRGTNTAT IYHNGTITAS | 222 |
| CsCCD2 | ESHTI FVHGTI ERTNG .VFTVGTINRK . FAPVACYNWVDCVTHCIRTKIGK.....ATYI SRYTKISRFKCG . FRYEGRAKFMKTGTRGLI GFETITTI VI RTTIT KVTITSYGRGTNTAT IYHNGTITAS | 221 |
| CsCCD2T | ESHTI FVHGTI ERTNG .VFTVGTINRK . FAPVACYNWVDCVTHCIRTKIGK.....ATYI SRYTKISRFKCG . FRYEGRAKFMKTGTRGLI GFETITTI VI RTTIT KVTITSYGRGTNTAT IYHNGTITAS | 282 |
| CsCCD4a | PTFCRVVRETTIESAI AGGAYTRNGENEN .HTESGAHIT FREDGVI HSIT I LSSPGGGA .ATFSSRFVITYKYI VT .AKSRCAITHI SVESCI CQPTI TARAT VFFERFI TMCVDPTRGTGT ANTSI CFSMRTI HAVC | 250 |
| CsCCD4b | PTFCRVVRETTIESAI AGGAYTRNGENEN .HTESGAHIT FREDGVI HSIT I LSSPGGGA .ATFSSRFVITYKYI VT .AKSRCAITHI SVESCI CQPTI TARAT VFFERFI TMCVDPTRGTGT ANTSI CFSMRTI HAVC | 239 |
| CsCCD4c | PTFCRVVRETTIESAI AGGAYTRNGENEN .HTESGAHIT FREDGVI HSIT I LSSPGGGA .ATFSSRFVITYKYI VT .AKSRCAITHI SVESCI CQPTI TARAT VFFERFI TMCVDPTRGTGT ANTSI CFSMRTI HAVC | 283 |
| CsCCD7 | FUPRI VSESTI PTFEFTVYI TSCCTI FA .IDHASTUPLDHEVIRAEFCFC.....TSYSAVIRI EAEFRERFSCGRSVRCFESVUKCGR . VCNKRMVAVNTISVUWCKTMCWAPFAPVFR | 226 |
| CsCCD8a | RHNTSISWYINAEGRGTYLNGECLAH .IDCDEFHLEDEYATIVRHFENG.....IFGHCVSEAYKA . AKNGRILCVRESEVP .KTINELSYKELASTESGASITDNANTIC .VVVLGSRVUCIT | 171 |
| CsCCD8b | RHNTSISWYINAEGRGTYLNGECLAH .IDCDEFHLEDEYATIVRHFENG.....IFGHCVSEAYKA . AKNGRILCVRESEVP .KTINELSYKELASTESGASITDNANTIC .VVVLGSRVUCIT | 217 |
| CsZCO | RHNTSISWYINAEGRGTYLNGECLAH .IDCDEFHLEDEYATIVRHFENG.....IFGHCVSEAYKA . AKNGRILCVRESEVP .KTINELSYKELASTESGASITDNANTIC .VVVLGSRVUCIT | 38 |
| Consensus |RHTSISWYINAEGRGTYLNGECLAH .IDCDEFHLEDEYATIVRHFENG.....IFGHCVSEAYKA . AKNGRILCVRESEVP .KTINELSYKELASTESGASITDNANTIC .VVVLGSRVUCIT | 9 |

横线处为保守结构域 RPE65。

图 1 西红花 CCD 基因家族编码的氨基酸序列比对

Fig.1 Alignment of the amino acid sequence of CCD gene family of *Crocus*

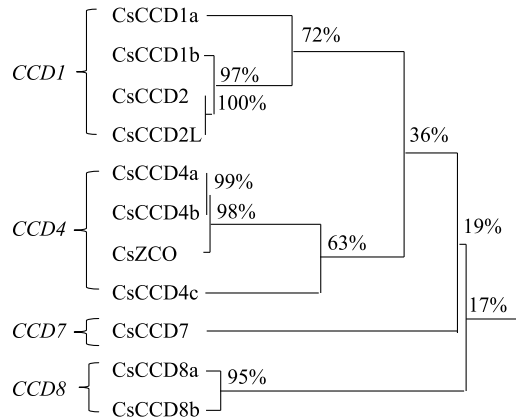


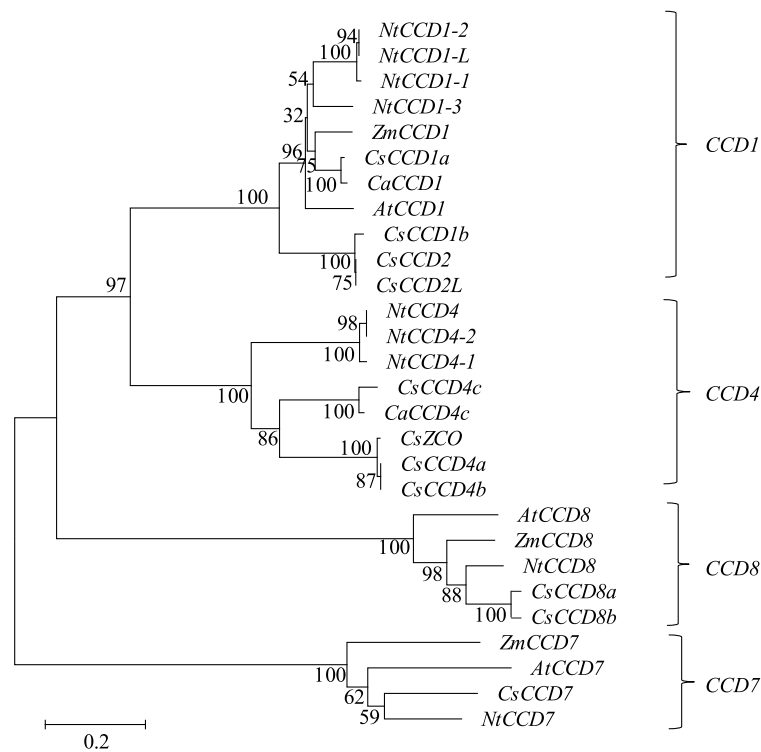
图 2 西红花 CCD 基因家族编码的氨基酸序列一致性分析

Fig.2 Similarities of amino acid sequence among CCD genes family of *Crocus*

2.3 西红花 CCD 蛋白质三维结构

为进一步了解 4 个 CCD 亚基因家族的差异,从 4 个亚基因家族中各选 1 个代表基因进行蛋白质三维结构预测。利用在线分析工具 SWISSMODEL 同源建模服务器对西红花 CCD 家族蛋白的三级结构进行预测,方法为同源比对建模的方式,取序列相似性较高的蛋白质结构作为模板进行建模,预测西红花中 CCD 蛋白质的三级结构。结果(图 4)显示,4 个 CCD 亚家族基因编码的蛋白三维结构存在差异。其中 CsCCD2 和 CsCCD4c 的蛋白三维结构相似度较高,二者均以 NECD1 蛋白为模板,序列相似度在 40%左右,覆盖度分别为 90%和 82%,RMSD 值分别为 0.9 和 0.6;CCD7 和 CCD8 的蛋白三维结构相似度较高,二者均以脱辅基类胡萝卜素分解氧化酶蛋白结构

为模板,序列相似度在 35%左右,覆盖度分别为 74%和 73%,*RMSD* 值分别为 0.9 和 1.2。



图中数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复可信度的百分比;标尺代表遗传距离;选用的 CCD 蛋白氨基酸序列分别为拟南芥 *AtCCD1* (AJ005813)、*AtCCD7* (NM_130064)、*AtCCD8* (NM-119434);玉米 *ZmCCD1* (DQ100346)、*ZmCCD7* (NM-001196999)、*ZmCCD8* (NM-1197000);烟草 *NtCCD1-1* (KC747729)、*NtCCD1-2* (KC747730)、*NtCCD1-3* (KM605431)、*NtCCD1-L* (NM-001325999)、*NtCCD4* (JF947192)、*NtCCD4-1* (KM605432)、*NtCCD4-2* (KM605433)、*NtCCD7* (JQ034523)、*NtCCD8* (XM-016648428);番红花 *CaCCD1* (KP792755)、*CaCCD4* (KP792758);西红花 *CsCCD1a*、*CsCCD1b*、*CsCCD2*、*CsCCD2L*、*CsCCD4a*、*CsCCD4b*、*CsCCD4c*、*CsCCD7*、*CsCCD8a*、*CsCCD8b*、*CsZCO*。

图 3 不同植物 CCD 基因编码的氨基酸序列的系统进化树
Fig.3 The phylogenetic tree of amino acid sequences of CCD genes in *Crocus* and other plants

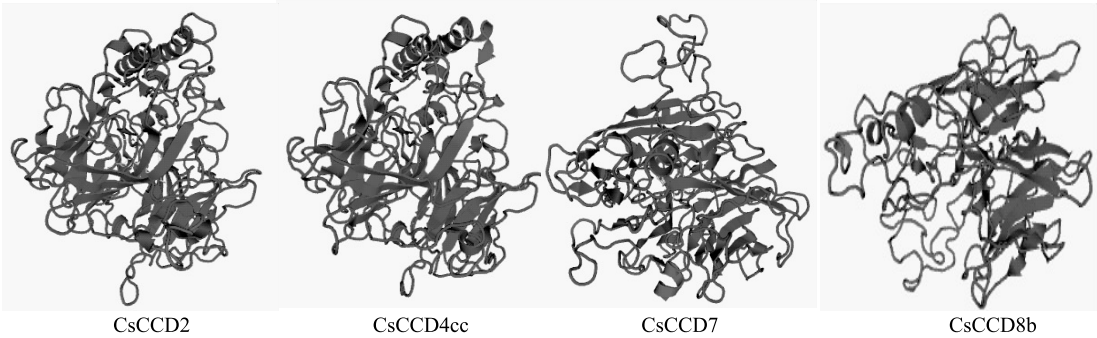


图 4 西红花 CCD 蛋白质三维结构
Fig.4 Three dimensional structure of CCD protein in *Crocus*

2.4 西红花 CCD 基因的表达分析

西红花花器官包括柱头、花瓣、雄蕊 3 个部分,其中柱头是西红花苷合成的主要器官,因此为了解

CsCCD 基因表达水平与西红花苷含量的关系,通过 RT-PCR 和转录组测序分析了 *CsCCD* 基因在不同花器官的表达情况。RT-PCR 结果(图 5A)表明:*CsC-*

CD2 基因只在柱头中表达,在其他花器官中基本不表达;*CsCCD4c* 基因在所有花器官中均有表达,但表达量存在差异,在雄蕊中的表达量较低;*CsCCD7* 基因在所有花器官中均有表达,在花瓣中表达量高于

柱头和雄蕊;*CsCCD8b* 基因在雄蕊中的表达量明显高于其他 2 个部位。通过转录组测序得到的这几个基因在柱头、花瓣、雄蕊中表达水平(图 5B)与 RT-PCR 的结果基本一致。

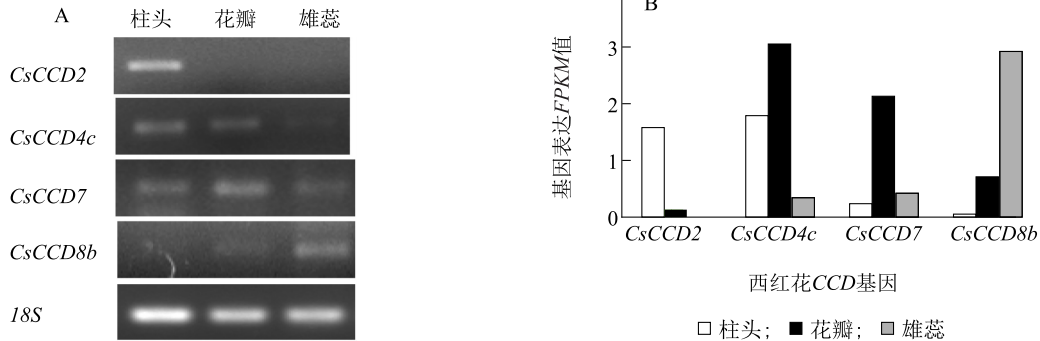


图 5 西红花 *CCD* 基因在不同花器官中的表达

Fig.5 Expression of *CCD* genes in different flower organs of *Crocus*

3 讨论

在西红花柱头中玉米黄质在类胡萝卜素裂解双加氧酶 *CCDs* 催化下氧化成脱辅基类胡萝卜素即西红花苷等主要活性物质。在 NCBI 数据库中搜索获得西红花 11 个 *CsCCD* 基因,对其编码的氨基酸序列进行比较发现,11 个基因分布在 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 4 个亚基因家族。

西红花 *CCD1* 亚基因家族包括 *CsCCD1a*、*CsCCD1b*、*CsCCD2*、*CsCCD2L* 4 个基因。植物中大量的 *CCD1* 基因被分离^[15],如番茄 *LeCCD1*、葡萄 *VvCCD1*、菊花 *CmCCD1*、玉米 *ZmCCD1* 等,但不同物种 *CCD1* 酶分解类胡萝卜素的作用位点存在差异。*CsCCD2* 是 Frusciante 等^[7]通过对西红花柱头的高通量测序发现的一个新类胡萝卜素裂解基因,其属于 *CCD1* 亚基因家族,但是 *CsCCD2* 分解类胡萝卜素的作用位点不同于 *CCD1* 亚家族基因^[8,16]。*CsCCD2* 在柱头中的表达量明显高于其他花器官,这与前人研究^[7]认为 *CsCCD2* 是西红花苷合成过程中重要基因相吻合。

西红花 *CCD4* 亚基因家族中包括 *CsCCD4a*、*CsCCD4b*、*CsCCD4c*,其中 *CsCCD4a*、*CsCCD4b* 的序列相似性为 98%,但二者在西红花柱头发育期间的表达特征存在差异^[16]。*CsCCD4c* 基因与 *CsCCD4a*、*CsCCD4b* 的同源性只有 63%,其在西红花花器官中

都有表达^[17],但在雄蕊中的表达量较低。还有研究者认为 *CsCCD4a*、*CsCCD4b*、*CsCCD4c* 3 个基因的表达水平均受逆境胁迫影响^[8,17]。此外,*CCD4* 亚基因家族还包括 *CsZCO* 基因,早期研究结果表明 *CsZCO* 基因是西红花苷合成途径中的关键基因,但近年研究者发现该基因编码的 *CCDs* 不能分解玉米黄质形成西红花苷^[7],而且其编码的氨基酸序列虽与西红花 *CCD4* 亚基因家族其他基因编码的氨基酸序列一致性较高,但明显短于其他基因^[7]。

CCD7、*CCD8* 最早从短枝突变体中鉴定出来,参与植物激素独脚金内酯的合成^[18-19]。西红花中有 *CsCCD7*、*CsCCD8a*、*CsCCD8b* 基因。*CsCCD7*、*CsCCD8* 的序列一致性较低,*CsCCD7*、*CsCCD8b* 基因在柱头中表达量较低。推测 *CsCCD7*、*CsCCD8* 基因在西红花苷合成过程中可能不起决定作用,但其是否会间接影响西红花苷的合成还需进一步研究。

比较西红花 4 个 *CCD* 亚基因家族发现,所有 *CsCCD* 基因编码的氨基酸序列都有 RPE65 保守结构域,但序列的一致性较低,而且在不同亚基因家族中西红花与其他物种的亲缘关系存在差别。西红花中 4 个 *CCD* 亚基因家族代表基因编码的蛋白预测三维结构存在差异,在不同花器官的表达特性也存在差异。在模式植物拟南芥中研究发现,*AtCCD1* 裂解类胡萝卜素产生 C_{14} 的二醛和 C_{13} 的环己衍生物,*AtCCD7* 裂解 β -类胡萝卜素产生 C_{27} 醛和 C_{13} 酮,随后

AtCCD8 裂解 C_{27} 醛^[20-21],说明不同亚家族的 CCD 基因的作用底物和产物存在明显差异。柱头是西红花苷合成的主要器官,基因在花器官的表达差异说明 *CsCCD* 基因在西红花苷合成过程中的作用可能存在差异。因此在解析西红花苷合成途径时,应根据不同 CCD 亚家族基因的特征有选择性地进行研究,进而确定参与及决定西红花中西红花苷含量的关键基因,为西红花苷合成途径解析提供研究基础。

参考文献:

- [1] 季文军,代文婷.中药藏红花的研究概况[J].海峡药学,2011,23(10):79-81.
- [2] 杜 辉,马永强,李春阳.响应面法优化复合酶提取红花黄色素工艺[J].南方农业学报,2015,46(4):657-663.
- [3] 王晓华,李景彬,坎 杂,等.红花的力学特性测定与分析[J].江苏农业科学,2015,43(3):352-354.
- [4] 黄卫娟,龙春林.番红花的药用历史与现代研究[J].中央民族大学学报(自然科学版),2015,24(3):55-58.
- [5] 王 平,童应鹏,陶露霞,等.西红花的化学成分和药理活性研究进展[J].中草药,2014,45(20):3015-3027.
- [6] 张衡锋,李成忠,高利利,等.叶面喷施微肥对藏红花光合特性的影响[J].江苏农业科学,2015,43(12):285-287.
- [7] FRUSCIANTE S, DIRETTO G, BRUNO M, et al. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(33):12246-12251.
- [8] BABA S A, JAIN D, ABBAS N, et al. Overexpression of *Crocus* carotenoid cleavage dioxygenase, *CsCCD4b*, in *Arabidopsis* imparts tolerance to dehydration, salt and oxidative stresses by modulating ROS machinery [J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 189:114-125.
- [9] BABA S A, MOHIUDDIN T, BASU S, et al. Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 698.
- [10] VALLABHANENI R, BRADBURY L M T, WURTZEL E T. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010, 504(1): 104-111.
- [11] PRIYA R, DASS J F P, SIVA R. Gene expression prediction and hierarchical clustering analysis of plant CCD genes [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(3): 618-627.
- [12] AHRAZEM O, TRAPERO A, GOMEZ M D, et al. Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: a deeper study in *Crocus sativus* and its allies [J]. Genomics, 2010, 96(4): 239-250.
- [13] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(Web Server issue): 597-603.
- [14] MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, MCCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [15] PRIYA R, SIVA R. Phylogenetic analysis and evolutionary studies of plant carotenoid cleavage dioxygenase gene [J]. Gene, 2014, 548(2): 223-233.
- [16] RUBIO-MORAGA A, RAMBLA J L, SANTAELLA M, et al. Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in β -Ionone release [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(36): 24816-24825.
- [17] RUBIO-MORAGA A, RAMBLA J L, FERNANDEZ-DE-CARMEN A, et al. New target carotenoids for CCD4 enzymes are revealed with the characterization of a novel stress-induced carotenoid cleavage dioxygenase gene from *Crocus sativus* [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 86(4): 555-569.
- [18] AULDRIDGE M E, MCCARTY D R, KLEE H J. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(3): 315-321.
- [19] LIANG Y S, JEON Y A, LIM S H, et al. Vascular-specific activity of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase 7 gene promoter [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(6): 973-980.
- [20] SCHWARTZ S H, QIN X, LOEWEN M C. The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(45): 46940-46945.
- [21] 孟凡来,赵昶灵,段丽斌,等.高等植物类胡萝卜素的生物降解途径研究进展[J].中国农学通报,2013,29(24):143-150.

(责任编辑:陈海霞)