

尹 莲, 孙玉东, 陈龙正, 等. 不结球白菜类胡萝卜素裂解双加氧酶基因 *BrCCD4a* 的克隆及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(6): 1386-1394.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.06.015

不结球白菜类胡萝卜素裂解双加氧酶基因 *BrCCD4a* 的克隆及表达分析

尹 莲^{1,2}, 孙玉东^{1,2}, 陈龙正³, 罗德旭^{1,2}, 任旭琴⁴, 王林闯^{1,2}, 许文钊^{1,2}, 于雯雯⁴, 刘 璐^{1,2}, 赵建锋^{1,2}

(1. 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所, 江苏 淮安 223001; 2. 淮安市设施蔬菜重点实验室, 江苏 淮安 223001; 3. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 4. 淮阴工学院生命科学与食品工程学院, 江苏 淮安 223003)

摘要: 为探究 *CCD* 基因在不结球白菜叶片类胡萝卜素调控中的作用, 本试验以不结球白菜 NN2108 为试验材料, 克隆获得 *BrCCD4a* 基因。应用生物信息学方法对 *BrCCD4a* 蛋白氨基酸序列、理化性质及 *CCD4* 基因亲缘关系等方面进行分析, 利用亚细胞定位技术明确 *BrCCD4a* 基因的空间表达。此外, 以 3 个不结球白菜品种 HB02、SX04 和 NN2108 为材料, 测定叶片中类胡萝卜素含量及 *BrCCD4a* 基因的相对表达水平。结果表明, *BrCCD4a* 含有 1 个长为 1 797 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 598 个氨基酸, 其编码的蛋白质相对分子质量为 65 860, 等电点为 6.42。氨基酸序列分析结果表明, *BrCCD4a* 属于 *CCD* 蛋白家族成员, 与甘蓝 *CCD4* 氨基酸序列相似度最高。系统进化结果也显示其与甘蓝的进化关系最近。*BrCCD4a* 蛋白主要由无规则卷曲、延伸链构成, 且不存在信号肽。亚细胞定位分析发现 *BrCCD4a* 定位在叶绿体上。不同不结球白菜品种叶片中叶黄素和 β -胡萝卜素含量差异较大, HB02 叶片中叶黄素含量最低, 为 1.14 mg/g, SX04 叶片中叶黄素含量最高, 达 2.34 mg/g。NN2108 叶片中 β -胡萝卜素含量最高, 达 2.31 mg/g, 是 HB02 含量的 1.94 倍。*BrCCD4a* 在 3 个品种叶片中的相对表达水平趋势与 β -胡萝卜素含量趋势一致, 在 NN2108 叶片中表达量最高, 在 SX04 中次之, 在 HB02 叶片中表达量最低。本研究结果为探究 *BrCCD4a* 在不结球白菜叶片类胡萝卜素降解过程中的作用提供理论基础。

关键词: 不结球白菜; 类胡萝卜素裂解双加氧酶 4; 类胡萝卜素

中图分类号: Q344⁺.13

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2023)06-1386-09

Cloning and expression analysis of carotenoid cleavage dioxygenase gene *BrCCD4a* in non-heading Chinese cabbage

YIN Lian^{1,2}, SUN Yu-dong^{1,2}, CHEN Long-zheng³, LUO De-xu^{1,2}, REN Xu-qin⁴, WANG Lin-chuang^{1,2}, XU Wen-zhao^{1,2}, YU Wen-wen⁴, LIU Lu^{1,2}, ZHAO Jian-feng^{1,2}

(1. Huaiyin Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province, Huaian 223001, China; 2. Huaian Key Laboratory for Facility Vegetables, Huaian 223001, China; 3. Institute of Vegetable, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 4. School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223003, China)

Abstract: In order to explore the role of *CCD* gene on the carotenoid regulation in non-heading Chinese cabbage leaf

收稿日期: 2022-09-05

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(21)2020]

作者简介: 尹 莲 (1996-), 女, 江苏淮安人, 硕士, 研究实习员, 主要

从事蔬菜育种研究。(E-mail) yinlian1996@163.com

通讯作者: 赵建锋, (E-mail) 350043736@qq.com

blades, the *BrCCD4a* gene was cloned from experimental material NN2108. The amino acid sequence, physicochemical properties of *BrCCD4a* protein and genetic relationship of *CCD4* were analyzed with bioinformatics methods. The spatial expression of *BrCCD4a* was clarified

by subcellular localization technology. In addition, three varieties, HB02, SX04 and NN2108, were used to determine the carotenoid content and the relative expression level of the *BrCCD4a* gene. The results showed that *BrCCD4a* gene contained an open reading frame (ORF) with a length of 1 797 bp, encoding 598 amino acids. The relative molecular mass of the protein encoded by *BrCCD4a* was 65 860, and the isoelectric point was 6.42. *BrCCD4a* belonged to the CCD protein family, and had the highest similarity with the amino acid sequence of CCD4 protein in *Brassica oleracea*. Phylogenetic analysis also displayed that *BrCCD4a* had the closest evolutionary relationship with *Brassica oleracea*. *BrCCD4a* protein was mainly composed of random coils and extended chains, and there was no signal peptide. Subcellular localization analysis revealed that *BrCCD4a* was localized on chloroplasts. The lutein contents and β -carotene contents in leaf blades of non-heading Chinese cabbage with different colors varied greatly. The content of lutein in the leaf blades of HB02 was the lowest (1.14 mg/g), and the content in the leaf blades of SX04 was the highest (2.34 mg/g). The content of β -carotene in the leaf blades of NN2108 was the highest, reaching 2.31 mg/g, which was 1.94 times higher than that of HB02. The results of relative expression analysis manifested that the trend of relative expression levels of *BrCCD4a* in leaf blades of the three cultivars was consistent with the trend of β -carotene content. The expression level of *BrCCD4a* was the highest in the leaf blades of NN2108, followed by SX04, and the lowest in HB02. The results of this study provide a basis for exploring the role of *BrCCD4a* in the degradation of carotenoids in non-heading Chinese cabbage leaf blades.

Key words: non-heading Chinese cabbage; carotenoid cleavage dioxygenase 4; carotenoid

类胡萝卜素是自然界广泛存在的脂溶性色素,也是重要的次生代谢产物^[1]。类胡萝卜素参与植物生长和发育的许多过程,其种类和含量与植物植株呈色、产量及品质密切相关^[2-3]。

类胡萝卜素裂解双加氧酶(CCD)是植物类胡萝卜素裂解酶的重要成员,其裂解功能在脱辅基类胡萝卜素及色素形成过程中发挥重要作用。*CCD4*酶存在于质体中,以紫黄质、叶黄素、 β -胡萝卜素、 β -隐黄质和玉米黄质等为底物,是许多植物呈色的决定因素^[4]。刘晓丛等^[5]从万寿菊中克隆获得*TeCCD4b*基因,发现*TeCCD4b*蛋白主要分布在质体膜上,可以增加接触底物的机会,有助于类胡萝卜素降解从而导致万寿菊花瓣颜色变浅。王昊等^[6]对芹菜*AgCCD4*基因进行克隆和表达分析,发现*AgCCD4*基因的表达量与类胡萝卜素含量负相关,表明该基因可能通过降解类胡萝卜素来调控芹菜植株着色。Bai等^[7]通过病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术敲除白果肉桃*CCD4*基因,发现桃果肉中叶黄素、 β -胡萝卜素和 β -隐黄质等黄色色素积累量上升,果肉黄化,说明*CCD4*基因在白桃果实呈色方面起重要作用。贾乐东^[8]在甘蓝型油菜黄花品种中超表达*BnaC03.NCED4*基因后,花瓣颜色由黄变白,证明该基因能调控花瓣的着色。此外,柑橘、大白菜和桂花等作物的*CCD4*基因克隆及功能研究也有类似报道^[9-11]。

不结球白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino)是十字花科芸薹属的叶菜类植物,俗称小白

菜,含有丰富的矿物质和维生素。不结球白菜品种丰富,颜色多样,不同品种间形态差异明显^[12]。王真真等^[13]分析了不结球白菜花芽分化过程中叶绿体色素含量的动态变化。目前关于*CCD*基因在不结球白菜叶片类胡萝卜素调控中的作用未见报道。

本研究拟克隆不结球白菜*CCD*基因——*BrCCD4a*基因,分析*BrCCD4a*蛋白氨基酸序列、理化性质及*BrCCD4a*基因空间表达和亲缘关系;然后选取3个颜色差异明显的不结球白菜品种,通过叶片类胡萝卜素含量及*BrCCD4a*基因的相对表达水平测定,探究*BrCCD4a*基因在不结球白菜叶片着色中的作用。以期从分子层面探究不结球白菜类胡萝卜素代谢机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验在江苏省淮安市农业科学院科研创新基地(33°50'N, 119°05'E)进行。试验材料为浅绿品种HB02、深绿品种SX04和紫色品种NN2108,种质资源保存于淮安市设施蔬菜重点实验室。HB02是矮脚黄类型白菜,叶色黄绿,叶形近圆,叶柄为白色;SX04是苏州青类型白菜,叶色深绿,叶片光泽度高,叶形近圆,叶柄为绿色,植株较矮小;NN2108是青梗菜类型白菜,叶片为紫色,叶形阔椭圆,叶柄白绿色,株型较大且产量较高(图1)。于2021年9月10日使用穴盘育苗,每穴播1粒种子,播后用基质覆

盖。10 月 5 日将幼苗移栽定植于田间, 试验地每 667 m² 施入复合肥 (N : P₂O₅ : K₂O = 15 : 15 : 15) 40 kg。定植行株距为 25 cm×25 cm。该试验以每个品种为一个区组完全随机排列, 各品种均设置 3 次重复。播种后 55 d 每个品种选取长势一致的健康植株 3 株, 取其叶片部位, 用液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

烟草(本氏烟)种子保存于本实验室, 在光照培养箱中(白天 25 °C 16 h, 夜晚 18 °C 8 h; 30 000 lx) 培养用于后续试验。大肠杆菌菌株 DH5 α 、农杆菌菌株 GV3101、载体 pCAMBIA-1301 和 pSPYE 均由本实验室保存, 高保真酶 PrimeSTAR Max Premix 为日本 TaKaRa 公司产品, 荧光定量 PCR 酶采购于上海翊圣生物科技有限公司。叶黄素和 β -胡萝卜素标准品均购于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 *BrCCD4a* 的克隆

依据不结球白菜转录组基因序列^[14], 利用 Primer Premier 6.0 设计 *BrCCD4a* 的克隆引物, 正向引物序列 5'-ATGGACTCTCTTTCTTCCTCTTCCT-3', 反向引物序列 5'-CTAAAGCTTATTAAGGTCACTCTC-3'。使用 20 μ l PCR 反应体系: 高保真酶 10 μ l, ddH₂O 7 μ l, cDNA 模板 1 μ l, 上、下游引物各 1 μ l。扩增程序为: 98 °C 预变性 10 s; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳进行检测大小, 回收后送至生工生物工程上海(股份)有限公司进行测序。测序后将正确的序列构建到 pCAMBIA-1301 载体上获得 *BrCCD4a*-pCAMBIA-1301 重组质粒, 然后转化至大肠杆菌 DH5 α 中扩繁, 并进行测序验证。

1.3 序列生物学分析

依据测序结果, 利用 BioXM 软件分析 *BrCCD4a* 基因编码氨基酸序列。在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库找到拟南芥 (O49675.1)、水稻 (Q69NX5.1)、黄芩 (AGN03860.1)、长筒石蒜 (AXQ00539.1)、甘蓝 (QBR98072.1)、桃 (AGL08676.1)、白屈菜 (UOL49148.1)、芹菜 (UDO48187.1)、茶树 (AYK03325.1)、洋水仙 (AZP54317.1)、牵牛 (FAA01245.1)、烟草 (AKO22632.1)、玫瑰 (AKT74335.1)、黑果枸杞 (AIX87534.1)、苦瓜 (AFU91490.1) 和桂花 (ABY60887.1) 等物种的 CCD4 氨基酸序列, 利用 NCBI CDD (Conserved Do-

main Database) 数据库中保守结构域搜索功能 (CD-search) 对 *BrCCD4a* 保守域进行预测, 并利用 MEGA7.0 软件, 设置 Bootstrap 为 1 000, 采用邻近法构建系统进化树。使用 DNAMAN 8.0 进行亲/疏水性分析及不结球白菜与上述物种的 CCD4 氨基酸序列比对。氨基酸组成、蛋白质相对分子质量和等电点分析采用 Prot Param 在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行。利用 SOPMA 在线软件 (<http://pbil.ibcp.fr/>) 分析 *BrCCD4a* 蛋白二级结构, 通过 SWISS-MODEL 网站建立蛋白质三级结构。使用 Signal P 软件进行信号肽预测。



图 1 不同颜色的不结球白菜品种

Fig.1 Non-heading Chinese cabbage with different colors

1.4 不结球白菜叶片中类胡萝卜素含量测定

叶黄素和 β -胡萝卜素是两类重要的类胡萝卜素, 分布广泛, 在不结球白菜中含量较高。利用液相色谱仪进行叶黄素含量和 β -胡萝卜素含量的测定。在研钵中迅速加入液氮将不结球白菜叶片研磨成粉末, 然后使用 Christ ALPHA 2-4 LD plus 冷冻干燥机 (德国 Marin Christ 公司产品) 将样品冻干。称取 50 mg 样品置入装有丙酮的 5 ml 离心管中, 在 50 °C 水浴锅中浸提至无色后将所有浸提液收集于 10 ml 离心管中, 用 0.45 μ m 过滤器过滤。使用 UPLC 超高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司产品) 对提取液进行检测。色谱柱规格为 250.0 mm×4.6 mm, 流动相为体积比 10 : 90 的甲醇和乙腈混合溶液, 流速为 1 ml/min, 柱温设置为 30 °C, 洗脱吸光度为 450 nm。分别配制 1 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml 和 250 μ g/ml 的叶黄素和 β -胡萝卜素标准品溶液, 以标准品质量浓度为横坐标, 标准品峰面积

为纵坐标绘制标准曲线,进样后通过比较样品与标准的保留时间鉴定类胡萝卜素的种类,根据检测到的样品积分峰面积代入标准曲线计算类胡萝卜素含量。每个样品设置3个重复。

1.5 亚细胞定位

使用 Primer Premier 6.0 设计特异引物 5'-ACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGGACTCTCTTTCTTCCTCTTCCT-3' 和 5'-GCCCTTGCTCACCATGGATC-CAAGCTTATTAAGGTCACTCTC-3' 扩增 *BrCCD4a* 的 cDNA 序列,然后插入带有绿色荧光蛋白基因(*EGFP*)的表达载体 pSPYE 中,获得 *BrCCD4a*-EGFP 重组质粒,测序验证正确后通过电转化将重组质粒导入农杆菌。挑选成功转化的菌株于 YEB 培养基中,28℃ 摇床培养,待 OD_{600} 为 0.5 时立刻离心菌液,然后加入 30 ml 缓冲液(10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸 3 ml, 10 mmol/L 氯化镁 3 ml, 150 μ mol/L 乙酰丁香酮 30 μ l, ddH₂O 23.97 ml)洗菌,离心重悬后将 OD_{600} 调节为 0.8。于室温下避光放置 4 h,然后使用注射器将悬液注射入 30 d 苗龄的烟草叶片背面^[15],培养 5 d 后,使用 Zeiss LSM 780 激光共聚焦扫描显微镜(德国 Zeiss 公司产品)观察蛋白质定位情况。

1.6 不同品种 *BrCCD4a* 基因表达水平分析

使用 CFX 96 Touch 系统(美国 Bio-rad 公司产品)进行实时荧光定量 PCR 反应。选用不结球白菜 *Actin* 作为内参基因(登录号: Bra022356),正向引物序列为 5'-CTGTGACAATGGTACCGGAATG-3',反向引物序列为 5'-ACAGCCCTGGGAGCATCA-3'。根据 *BrCCD4a* 序列特征,利用 Primer Premier 6.0 设计定量引物,正向引物序列为 5'-TCGAGATTCAGATTCGGATGAGGA-3',反向引物序列为 5'-GGAGCGATGAGAACGATGCTGTC-3'。扩增程序为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,40 个循环;熔解曲线分析范围为 65℃ 到 95℃,每隔 5 s 增加 0.5℃。每个 PCR 反应设置 3 次重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因相对表达量^[16]。

1.7 数据处理

利用 SPSS (26.0) 软件选择 Duncan's 法进行处理间差异显著性分析。使用 Microsoft Excel 2007 软件对基因表达水平进行作图。

2 结果与分析

2.1 *BrCCD4a* 基因序列与进化分析

测序结果表明,*BrCCD4a* 基因含有 1 个 1 797

bp 的开放阅读框(ORF),编码 598 个氨基酸。保守域预测显示 *BrCCD4a* 与 NCED(9-cisepoxycarotenoid dioxygenase) 有相同的保守结构域,属于 CCD 蛋白家族(图 2A)。CCD4 氨基酸序列比对结果显示不结球白菜与甘蓝、拟南芥和桂花相似度较高,分别为 86.19%、85.36% 和 68.24%(图 2B)。系统进化分析结果表明,不结球白菜 *BrCCD4a* 与甘蓝和拟南芥的进化关系最近,其次是芹菜(图 3)。

理化性质分析结果显示,不结球白菜 *BrCCD4a* 蛋白的相对分子质量为 65 860,等电点为 6.42(表 1)。不同物种 CCD4 氨基酸残基数为 582~613,相对分子质量为 63 750~66 990,等电点为 5.64~7.19。CCD4 总平均疏水性系数均为负值,显示不结球白菜 *BrCCD4a* 为亲水性蛋白。

2.2 *BrCCD4a* 蛋白的二级结构与三级结构

不结球白菜的 *BrCCD4a* 蛋白二级结构预测结果显示,*BrCCD4a* 蛋白的二级结构组成中无规则卷曲的占比最多,达 55.52%。其次是延伸链,占 23.08%, α -螺旋和 β -转角比例较少,分别占 14.55% 和 6.86%(图 4A)。*BrCCD4a* 的三级结构预测结果显示,以相似度较高的玉米 VP14(ID: 3npe.1) 三级结构为模板,其序列一致性为 40%,GMQE 值为 0.69,覆盖率达 85%,覆盖区域在第 80~598 位(图 4B)。

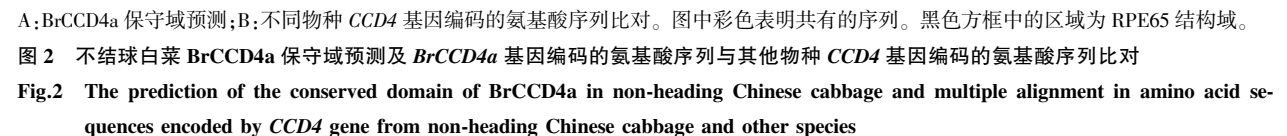
信号肽预测结果表明 *BrCCD4a* 蛋白不存在信号肽。

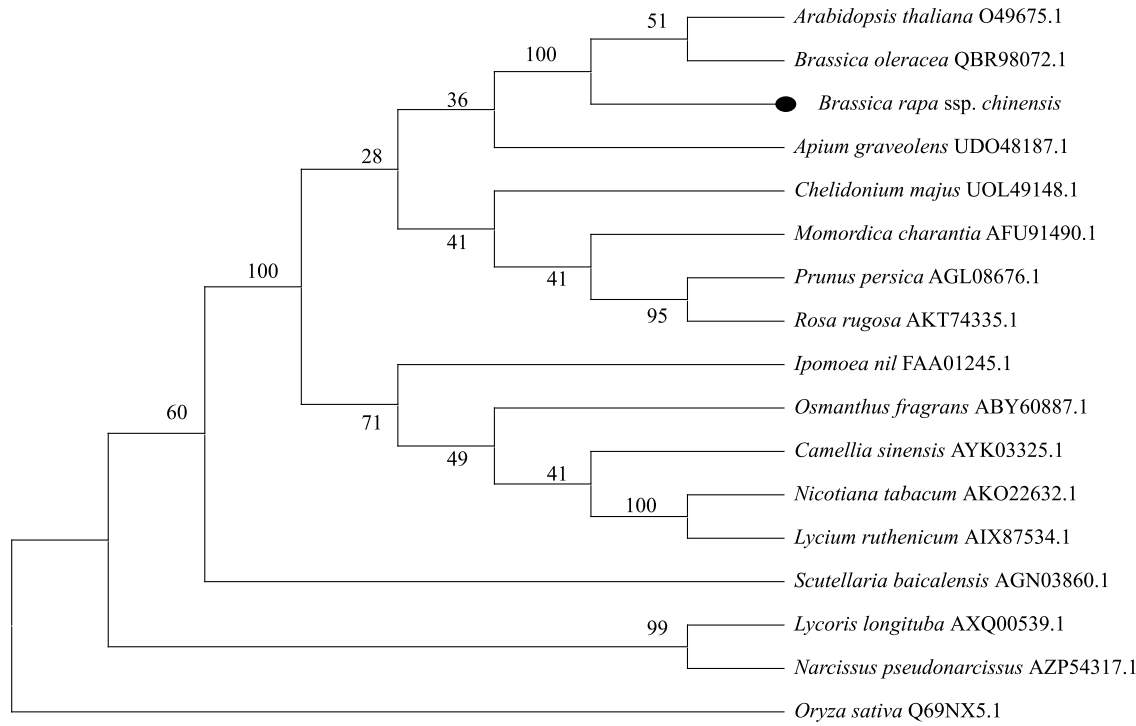
2.3 *BrCCD4a* 的亚细胞定位

观察农杆菌瞬时表达后的烟草叶片荧光,发现 *BrCCD4a*-EGFP 的绿色荧光信号位于叶绿体,并与叶绿体自发的红色荧光重叠,表明 *BrCCD4a*-EGFP 定位在叶绿体上(图 5)。

2.4 不同颜色不结球白菜叶片类胡萝卜素含量

不结球白菜叶片中叶黄素和 β -胡萝卜素含量较高,但不同品种间差异显著(图 6)。HB02 叶片中叶黄素含量和 β -胡萝卜素含量均最低,分别为 1.14 mg/g 和 1.19 mg/g。SX04 叶片中叶黄素含量最高,为 HB02 叶片中含量的 2.05 倍,达 2.34 mg/g。NN2108 和 SX04 叶片中 β -胡萝卜素含量没有显著差异,但两者均显著高于 HB02,分别为 HB02 的 1.94 倍和 1.92 倍。





标尺上的数字表示遗传距离。

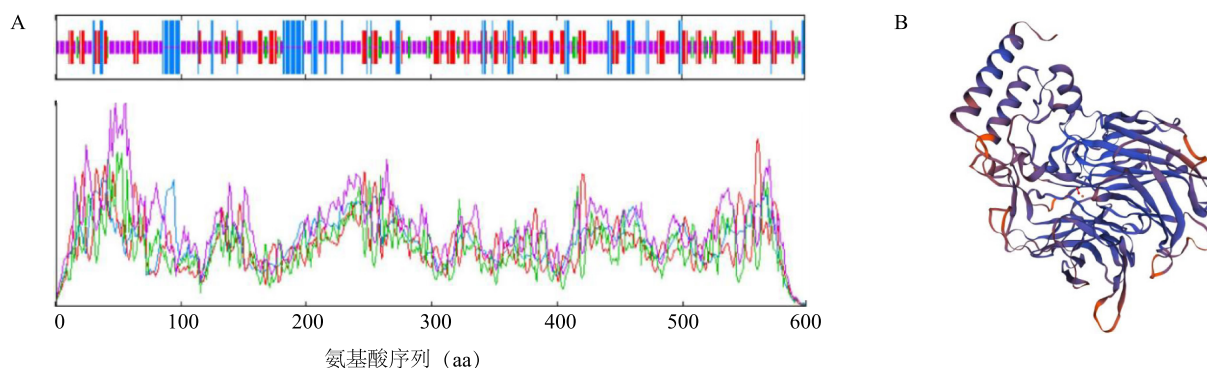
图 3 不结球白菜与其他物种的遗传进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of non-heading Chinese cabbage and other species

表 1 不结球白菜与其他植物 CCD4 蛋白氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 The analysis of amino acid composition and physicochemical properties of CCD4 proteins in non-heading Chinese cabbage and other plants

植物类型	氨基酸 残基数 (个)	相对分子 质量 ($\times 10^3$)	等电点	氨基酸比例(%)				疏水性 系数总 平均值
				酸性	碱性	脂肪族	芳香族	
不结球白菜(<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>)	598	65.86	6.42	13	11	21	9	-0.225
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	595	65.60	6.42	14	11	22	9	-0.218
水稻(<i>Oryza sativa</i>)	582	65.95	6.21	14	13	21	7	-0.233
黄芩(<i>Scutellaria baicalensis</i>)	597	65.37	6.07	13	11	22	9	-0.168
长筒石蒜(<i>Lycoris longituba</i>)	604	66.20	6.43	13	10	22	9	-0.143
甘蓝(<i>Brassica oleracea</i>)	596	65.80	6.58	13	11	21	9	-0.211
桃(<i>Prunus persica</i>)	597	65.52	6.10	12	11	20	10	-0.222
白屈菜(<i>Chelidonium majus</i>)	611	66.99	6.23	12	11	21	9	-0.183
芹菜(<i>Apium graveolens</i>)	592	65.07	6.03	12	11	19	10	-0.269
茶树(<i>Camellia sinensis</i>)	613	66.75	5.99	11	10	20	9	-0.186
洋水仙(<i>Narcissus pseudonarcissus</i>)	601	66.24	6.70	13	10	22	8	-0.186
牵牛(<i>Ipomoea nil</i>)	591	64.13	5.64	11	11	21	9	-0.146
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	601	65.94	6.58	12	11	20	10	-0.212
玫瑰(<i>Rosa rugosa</i>)	583	63.75	5.79	12	11	19	9	-0.266
黑果枸杞(<i>Lycium ruthenicum</i>)	599	65.70	6.21	13	11	20	9	-0.232
苦瓜(<i>Momordica charantia</i>)	596	64.98	6.25	12	11	21	9	-0.172
桂花(<i>Osmanthus fragrans</i>)	609	66.68	7.19	12	10	20	9	-0.275



A 图中蓝色、红色、绿色和紫色分别表示 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲。

图 4 *BrCCD4a* 编码的蛋白质二级和三级结构预测

Fig.4 The prediction of secondary and tertiary structure of protein encoded by *BrCCD4a*

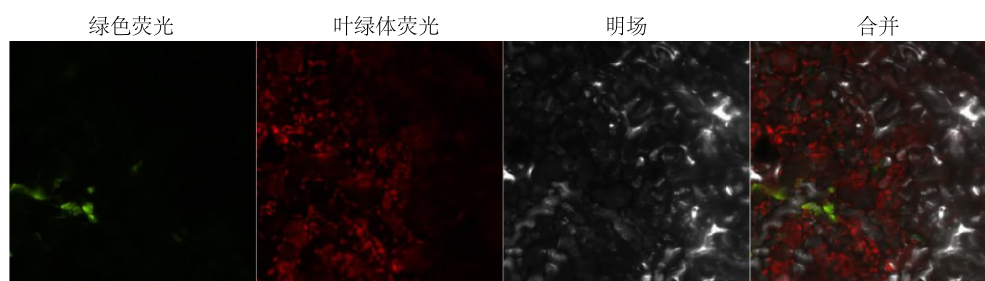
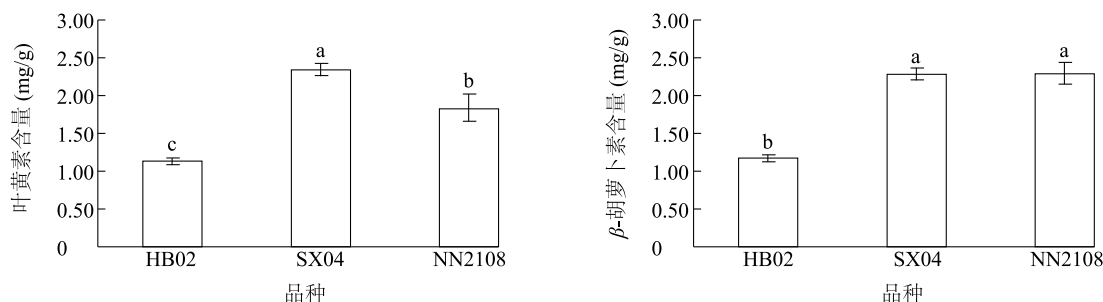


图 5 *BrCCD4a* 在烟草叶片中的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of *BrCCD4a* in leaf blades of *Nicotiana benthamiana*



不同字母表示品种间类胡萝卜素含量存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 6 不同颜色不结球白菜叶片中类胡萝卜素含量

Fig.6 Carotenoids contents in leaf blades of non-heading Chinese cabbage with different colors

2.5 不同颜色不结球白菜叶片中 *BrCCD4a* 的转录水平

相对表达量分析结果表明,不同颜色不结球白菜叶片中 *BrCCD4a* 基因转录水平存在显著差异(图 7)。*BrCCD4a* 在 NN2108 叶片中表达量最高,其次是 SX04,在 HB02 叶片中表达水平最低。在 NN2108 叶片中的转录水平是 SX04 叶片中的 1.70 倍,是 HB02 叶片中的 5.53 倍。

3 讨论

类胡萝卜素代谢调控一直是园艺植物研究的热点。越来越多的研究表明,*CCD4* 在植物的类胡萝卜素和香气等物质代谢中发挥着重要作用^[17]。本研究从不结球白菜 NN2108 中克隆获得 *BrCCD4a* 基因,发现不同物种间 *CCD4* 蛋白的氨基酸序列和理化性质存在差异,氨基酸残基数集中在 600 个左

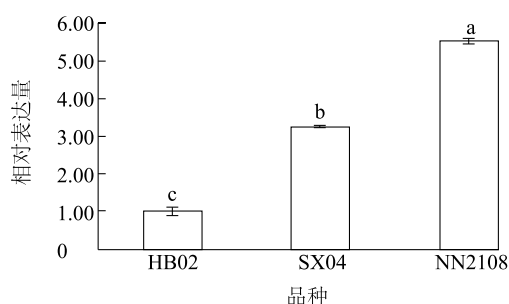


图7 *BrCCD4a* 在不同颜色不结球白菜叶片中的转录水平

Fig.7 Transcriptional levels of *BrCCD4a* in leaf blades of non-heading Chinese cabbage with different colors

右。二级结构预测发现不结球白菜 *BrCCD4a* 蛋白 β -转角的比例最低,无规则卷曲占比最高,表明该蛋白质结构高度保守,这与梨 *CCD4* 蛋白的特征一致^[18]。系统进化结果表明,*BrCCD4a* 与同科植物甘蓝亲缘更近,亚细胞定位结果显示 *BrCCD4a* 蛋白定位在叶绿体。张志硕^[19]对7个不结球白菜品种的品质进行测定,发现苏州青叶片中的类胡萝卜素含量显著高于其他品种。本研究中,SX04属于苏州青类型白菜,其叶黄素和 β -胡萝卜素含量也相对较高。

CCD4 酶具有不同的存在形式,各亚型不仅具有不同的表达模式,对底物的亲和力也不同, β -胡萝卜素通常被认为是 *CCD4* 的首选底物,此外其对叶黄素尤其是玉米黄质的亲和性也较强^[4]。Watanabe等^[20]利用 CRISPR/Cas9 体系敲除白色牵牛中的 *In-CCD4* 基因,发现阳性植株花瓣变为淡黄色;Song等^[21]在水稻中过表达拟南芥 *AtCCD4* 基因,发现 β -胡萝卜素含量和叶黄素含量显著降低,而 β -紫罗酮含量增加了2倍;Li等^[22]发现白色胡萝卜中 *Dc-CCD4* 的表达水平明显高于橙色胡萝卜,证实该基因是通过裂解肉质根中的 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素而影响类胡萝卜素的积累;周伟权^[23]也发现杏果实中 *CCD4* 基因表达水平与类胡萝卜素含量呈负相关。本研究中 *BrCCD4a* 在紫色不结球白菜品种 NN2108 中表达水平最高,其叶黄素含量低于深绿色品种 SX04,这与前人研究一致。深绿色品种 SX04 叶片中类胡萝卜素含量最高,其颜色最深可能是由于其他叶绿体色素积累所致。浅绿色品种 HB02 中 *BrCCD4a* 表达量最低,但叶黄素和 β -胡萝卜素含量也最低,可能是因为不同品种中的 *CCD4* 亚型差异引起降解能力不同,也可能是品种差异性

导致,这有待进一步分析。

CCD 蛋白家族成员众多,各亚家族成员之间结构差异较大,在植物生长发育与果实形成等过程中发挥着广泛的作用^[24]。*CCD4* 在万寿菊^[25]、牵牛^[20]、桂花^[11]等植物花色调控方面的作用研究较多,在桃^[7]、番木瓜^[26]和柑橘^[9]等果实色泽调控中的作用也有较多报道,但在不结球白菜中的相关研究还较为匮乏。针对性状形成的分子机制研究对定向育种具有重大意义,本研究从分子水平对不结球白菜 *CCD* 亚家族关键基因 *BrCCD4a* 进行了较为系统的分析,初步探讨其在不结球白菜类胡萝卜素代谢中的作用,为进一步探究 *CCD4* 基因在不结球白菜叶片色泽形成中的调控机理提供基础。

参考文献:

- [1] JING J, WANG G, WANG J H, et al. Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on beta-carotene production in transgenic tobacco[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(2): 305-312.
- [2] LANGI P, KIOKIAS S, VARZAKAS T, et al. Carotenoids: From plants to food and feed industries[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1852: 57-71.
- [3] JOHRA F T, BEPARI A K, BRISTY A T, et al. A mechanistic review of β -carotene, lutein, and zeaxanthin in eye health and disease[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(11): 1046.
- [4] VARGHESE R, S UK, C GPD, et al. Unraveling the versatility of *CCD4*: Metabolic engineering, transcriptomic and computational approaches[J]. Plant Science, 2021, 310: 110991.
- [5] 刘晓丛,曾 丽,张邀月,等. 万寿菊类胡萝卜素裂解双加氧酶基因 *CCD4b* 的克隆与表达分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2018, 36(2): 1-8, 21.
- [6] 王 昊,尹 莲,刘洁霞,等. 类胡萝卜素裂解双加氧酶基因 *AgCCD4* 调控芹菜不同组织的着色[J]. 中国农业科学, 2021, 54(15): 3279-3294.
- [7] BAI S L, TUAN P A, TATSUKI M, et al. Knockdown of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 (*CCD4*) via virus-induced gene silencing confers yellow coloration in peach fruit; evaluation of gene function related to fruit traits[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(1): 257-264.
- [8] 贾乐东. 甘蓝型油菜花色调控主效基因挖掘与功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [9] ZHENG X J, ZHU K J, SUN Q, et al. Natural variation in *CCD4* promoter underpins species-specific evolution of red coloration in citrus peel[J]. Molecular Plant, 2019, 12(9): 1294-1307.
- [10] 张 宁. 大白菜橙花和白花基因克隆及其形成的分子机理研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.
- [11] 胡诗洋. 桂花花瓣类胡萝卜素合成机制及胚性愈伤培养与转

- 化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [12] 侯华兰. 不结球白菜叶片弯曲相关基因的鉴定和功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [13] 王真真, 侯瑞贤, 李晓峰, 等. 不结球白菜花芽分化分级及叶绿体色素含量的变化[J]. 植物生理学报, 2013, 49(6): 568-572.
- [14] XU H M, WANG C H, SHAO G R, et al. The reference genome and full-length transcriptome of pakchoi provide insights into the cuticle formation and heat adaption[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac123.
- [15] HUANG Y, LI T, XU Z S, et al. Six NAC transcription factors involved in response to TYLCV infection in resistant and susceptible tomato cultivars[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 120: 61-74.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEM T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [17] WALTER M H, STRACK D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(4): 663-692.
- [18] 胡盼盼, 付鸿博. 梨 *PbrCCD* 基因家族鉴定与表达分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(11): 3505-3513.
- [19] 张志硕. 夏播不结球白菜主要营养品质测定与分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [20] WATANABE K, ODA-YAMAMIZO C, SAGE-ONO K, et al. Alteration of flower colour in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4[J]. Transgenic Research, 2018, 27(1): 25-38.
- [21] SONG M H, LIM S H, KIM J K, et al. In planta cleavage of carotenoids by *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenases 4 in transgenic rice plants[J]. Plants Biotechnology Reports, 2016, 10: 291-300.
- [22] LI T, DENG Y J, LIU J X, et al. DcCCD4 catalyzes the degradation of α -carotene and β -carotene to affect carotenoid accumulation and taproot color in carrot[J]. The Plant Journal, 2021, 108(4): 1116-1130.
- [23] 周伟权. 杏果实类胡萝卜素代谢及积累机理研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- [24] 张亚飞, 彭洁, 朱延松, 等. 柑橘 CCD 基因家族鉴定及 *CcCCD4a* 对果肉颜色的影响[J]. 中国农业科学, 2020, 53(9): 1874-1889.
- [25] ZHANG H, ZHANG S, ZHANG H, et al. Carotenoid metabolite and transcriptome dynamics underlying flower color in marigold (*Tagetes erecta* L.) [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 16835.
- [26] SCHWEIGGERT R M, STEINGASS C B, HELLER A, et al. Characterization of chromoplasts and carotenoids of red-and yellow-fleshed papaya (*Carica papaya* L.) [J]. Planta, 2011, 234(5): 1031-1044.

(责任编辑: 石春林)