

# 茶树 *CsCCD* 基因家族全基因组鉴定及乌龙茶 LED 补光晾青下表达分析

倪子鑫<sup>1,2</sup>, 武清扬<sup>1,2</sup>, 杨云<sup>1,2</sup>, 邓慧莉<sup>1,2</sup>, 周子维<sup>1,2</sup>, 赖钟雄<sup>2</sup>, 孙云<sup>1</sup>

1 福建农林大学园艺学院 茶学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002

2 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002

倪子鑫, 武清扬, 杨云, 邓慧莉, 周子维, 赖钟雄, 孙云. 茶树 *CsCCD* 基因家族全基因组鉴定及乌龙茶 LED 补光晾青下表达分析. 生物工程学报, 2022, 38(1): 359-373.

NI ZX, WU QY, YANG Y, DENG HL, ZHOU ZW, LAI ZX, SUN Y. Genome-wide identification of *CsCCD* gene family in tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis of the oolong tea processing with supplementary LED light. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 359-373.

**摘要:** 类胡萝卜素裂解双加氧酶 (carotenoid cleavage dioxygenase, CCD) 家族成员能催化类胡萝卜素裂解生成挥发性芳香物质并参与植物激素的合成。为探究茶树 *CsCCD* 基因家族成员生物学功能及基因表达模式, 采用生物信息学手段进行了茶树全基因组 *CsCCD* 基因家族成员的鉴定, 预测分析了其基因结构、保守基序、染色体定位、蛋白的理化性质、进化特性、互作网络、启动子顺式作用元件, 并通过 RT-qPCR 测定了茶树不同叶位、乌龙茶加工过程中光照处理下 *CsCCD* 的相对表达量。共鉴定出 11 个茶树 *CsCCD* 基因家族成员, 含有 1–11 个外显子、0–10 个内含子不等; 平均氨基酸个数为 519 aa, 平均分子质量为 57 643.35 Da; 聚类分析显示, CCD1、CCD4、CCD7、CCD8 和 NCED5 个亚族各自聚成一类。茶树 *CsCCD* 基因家族主要含有胁迫响应元件、激素响应元件、光响应元件与多因素响应元件, 且以光响应元件最多 (142 个)。进一步对茶树 *CsCCD* 基因在茶树不同叶位及乌龙茶加工过程中 LED 补光晾青过程的表达模式分析发现, *CsCCD1*、*CsCCD4* 在成熟叶中表达量高于嫩叶及嫩茎, 且随做青次数的增加, 表达量呈下降趋势, 但 LED 补光可在做青前期显著促进其基因表达; *NCED* 亚家族成员整体呈现嫩叶表达量高于成熟叶及嫩茎趋势, 但在做青过程中表达趋势不一, *NCED3* 的表达水平先升后降, 最高可达鲜叶的 15 倍以上, 且在做青后期 LED 补光可极显著促进其基因表达。茶树 *CsCCD* 基因家族成员表达情况受机械力及光照调控, 可进一步

**Received:** June 17, 2021; **Accepted:** September 2, 2021; **Published online:** September 9, 2021

**Supported by:** China Agriculture Research System of MOF and MARA: the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-19); Science and Technology Innovation Project of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017177); Outstanding Master Degree Thesis Funding of Fujian Agricultural and Forestry University; Special Fund for Science and Technology Innovation of Fujian Zhang Tianfu Tea Development Foundation (FJZTF01)

**Corresponding author:** SUN Yun. E-mail: sunyun1125@126.com

**基金项目:** 财政部和农业农村部: 国家现代农业 (茶叶) 产业技术体系建设专项 (CARS-19); 福建农林大学科技创新专项 (CXZX2017177); 福建农林大学优秀硕士学位论文; 福建张天福茶叶发展基金会科技创新基金 (FJZTF01)

为优化茶叶加工工艺并提升茶叶品质奠定基础。

**关键词：**茶树；类胡萝卜素裂解双加氧酶；基因家族；发光二极管；晾青

## Genome-wide identification of *CsCCD* gene family in tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis of the oolong tea processing with supplementary LED light

NI Zixin<sup>1,2</sup>, WU Qingyang<sup>1,2</sup>, YANG Yun<sup>1,2</sup>, DENG Huili<sup>1,2</sup>, ZHOU Ziwei<sup>1,2</sup>, LAI Zhongxiong<sup>2</sup>, SUN Yun<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Tea Science in Fujian Universities, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** Carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) family is important for production of volatile aromatic compounds and synthesis of plant hormones. To explore the biological functions and gene expression patterns of *CsCCD* gene family in tea plant, genome-wide identification of *CsCCD* gene family was performed. The gene structures, conserved motifs, chromosome locations, protein physicochemical properties, evolutionary characteristics, interaction network and cis-acting regulatory elements were predicted and analyzed. Real time-quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to detect the relative expression level of *CsCCD* gene family members under different leaf positions and light treatments during processing. A total of 11 *CsCCD* gene family members, each containing exons ranging from 1 to 11 and introns ranging from 0 to 10, were identified. The average number of amino acids and molecular weight were 519 aa and 57 643.35 Da, respectively. Phylogenetic analysis showed the *CsCCD* gene family was clustered into 5 major groups (CCD1, CCD4, CCD7, CCD8 and NCED). The *CsCCD* gene family mainly contained stress response elements, hormone response elements, light response elements and multi-factor response elements, and light response elements was the most abundant (142 elements). Expression analysis showed that the expression levels of *CsCCD1* and *CsCCD4* in elder leaves were higher than those in younger leaves and stems. With the increase of turning over times, the expression levels of *CsCCD1* and *CsCCD4* decreased, while supplementary LED light strongly promoted their expression levels in the early stage. The expression level of *NCED* in younger leaves was higher than that in elder leaves and stems on average, and the expression trend varied in the process of turning over. *NCED3* first increased and then decreased, with an expression level 15 times higher than that in fresh leaves. In the late stage of turning over, supplementary LED light significantly promoted its gene expression. In conclusion, *CsCCD* gene family member expressions were regulated by mechanical force and light. These understandings may help to optimize tea processing techniques and improve tea quality.

**Keywords:** tea plant; carotenoid cleavage dioxygenase; gene family; light-emitting diode; oolong tea processing

茶树 *Camellia sinensis* 是一种多年生常绿经济作物,在世界各地广泛种植。其鲜叶经过一系列加工工艺而制成可供饮用的茶,是世界三大饮料之一,具有多种保健功效。如何提升茶叶品质一直是研究者关注的热点,大量研究显示,对鲜叶采后传统加工环节进行优化处理可使茶叶香气、滋味品质得到提升<sup>[1-3]</sup>,因此,探讨加工环节优化创新方法及研究其对茶叶品质提升的内在机理具有重要意义。

类胡萝卜素裂解双加氧酶 (CCD) 是一类含有能结合  $\text{Fe}^{2+}$  的 RPE 65 (retinal pigment epithelium 65 kDa protein) 结构域的非血红素铁酶<sup>[4]</sup>, Schwartz 等<sup>[5]</sup>于 1997 年首次报道玉米 Viviparous14 (VP14) 能催化 9-顺式-紫黄质在 11'12'双键位置断裂生成脱落酸。拟南芥中有 9 条基因与 *VP14* 高度相似,其中 5 条与脱落酸合成相关的基因被命名为 *NCED* (9-顺式-环氧化-类胡萝卜素双加氧酶),分别为 *NCED2*、*NCED3*、*NCED5*、*NCED6* 和 *NCED9*;其余 4 条类胡萝卜素裂解双加氧酶被命名为 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7* 和 *CCD8*<sup>[6]</sup>。*CCD1*、*CCD4* 与降异戊二烯香气物质的形成相关,能在特定的位点裂解氧化类胡萝卜素而生成一系列水溶性低阈值的香气物质,其中具代表性的  $\beta$ -紫罗酮阈值仅有 0.12 ng/L<sup>[7]</sup>,带有木质及紫罗兰香气; $\beta$ -大马烯酮带有玫瑰花香,是葡萄酒、茶叶中重要的赋香物质<sup>[8]</sup>,也对花卉、蔬菜和水果等香气品质形成具有重要贡献<sup>[9-10]</sup>;*CCD7*、*CCD8* 与独脚金内酯的生成有关,能调节植物生长发育<sup>[11-12]</sup>。*CCD* 基因家族成员广泛存在于园艺植物中,且已在多个物种中得到鉴定,如柑橘 (*Citrus clementina*) 14 个<sup>[13]</sup>,苹果 (*Malus domestica*) 21 个<sup>[14]</sup>,番茄 (*Solanum lycopersicum*) 7 个<sup>[15]</sup>,葡萄 (*Vitis vinifera*) 19 个<sup>[16]</sup>,油菜 (*Brassica napus* L.) 30 个<sup>[17]</sup>,*CCD* 基因家族成员命名方式取决于

其与拟南芥基因的同源性<sup>[18-19]</sup>。

研究表明,*CCD* 基因家族成员启动子区域含光照响应元件,而 LED 光作为节能环保的冷光源运用于茶叶生产中能使茶叶品质得到不同程度的改善<sup>[20-21]</sup>。目前尚未见对茶树 *CsCCD* 基因家族成员鉴定及乌龙茶晾青过程光照对 *CsCCD* 基因表达量影响的报道,本研究通过对茶树 *CsCCD* 基因家族成员全基因组鉴定及表达量分析,探寻茶树鲜叶不同叶位及乌龙茶加工过程中光照处理下的表达情况,为进一步了解茶树 *CsCCD* 基因家族功能及优化加工工艺方法并提升茶叶品质奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以‘铁观音’一芽三叶鲜叶为试验材料,按闽南乌龙茶加工工艺,室内萎凋至顶二叶垂软后置于竹制摇青桶 (长 60 cm,直径 35 cm) 中,采取“看青做青”的加工方式,晾青过程设置 LED 光照射/黑暗两个处理,其中 LED 采用白光光强 ( $380 \pm 15$ )  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,每次晾青后取样。环境温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度 65%,取样进行 3 次重复,用液氮速冻后放于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

### 1.2 茶树 *CsCCD* 基因家族成员的鉴定

茶树基因组和蛋白组序列下载自茶树基因组学与生物信息学平台 (TPIA: <http://tpia.teaplant.org/>),从 Pfam 数据库 (<https://pfam.xfam.org/>) 下载 CCD 蛋白特征结构域 RPE 65 (PF03055) 的隐马尔可夫模型,并利用 HMMER 软件 (V3.0) hmmsearch 筛选出茶树数据库中目标蛋白序列信息 ( $E < 0.01$ ),获得茶树 *CsCCD* 基因家族候选成员。从拟南芥数据库中 (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 9 个 CCD 家族成员蛋白序列信息<sup>[22]</sup>,与下载的茶树数据库本地 Blast 同源比对,筛选长度 > 100 aa 且 identity > 50% 的茶树 *CsCCD*

家族候选成员。保留上述两步鉴定出的共有茶树 *CsCCD* 基因家族候选成员结果, 将序列信息提交到 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 验证其含有 RPE65 结构域, 得到 *CsCCD* 基因家族成员。

### 1.3 茶树 *CsCCD* 家族蛋白理化性质分析

采用在线工具 ExPasy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 预测 *CsCCD* 家族成员的氨基酸个数、等电点、分子质量、不稳定系数与亲水性指数等蛋白理化性质, 利用在线工具 WOLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位。

### 1.4 CCD 家族系统发育进化树构建

使用 MEGA7.0 软件 ClustalW 功能对茶树、拟南芥、水稻<sup>[23]</sup>、葡萄<sup>[24]</sup>、苹果<sup>[14]</sup>、番茄<sup>[15]</sup> 共 6 个物种 CCD 基因家族氨基酸序列进行多序列比对, 采用最大似然法 (maximum likelihood method) JTT+G 模型构建系统发育进化树, 校验参数 Bootstrap 值设置为 1 000<sup>[25-27]</sup>, 采用在线工具 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 对进化树进行美化<sup>[28]</sup>。

### 1.5 茶树 *CsCCD* 基因家族基因结构及蛋白质保守基序 (Motif) 分析

利用茶树基因组 gff3 格式文件及氨基酸序列信息, 对茶树 *CsCCD* 家族成员进行基因结构分析, 使用在线工具 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对其保守基序进行分析, 预测值设置为 12 个, 最后采用 TBtools<sup>[29]</sup> 的 Gene structure view (advanced) 功能对获得的基因结构及内含子外显子分布、保守基序信息进行可视化绘图。

### 1.6 茶树 *CsCCD* 基因家族染色体定位与进化树构建

利用茶树基因组 gff3 格式文件中 *CsCCD* 家族成员在染色体上的分布信息, 使用 TBtools 软件 Gene visualize from GTF/GFF 功能进行可视

化绘图。

### 1.7 茶树 *CsCCD* 基因家族启动子顺式作用元件分析

采用 TBtools 软件提取茶树 *CsCCD* 基因家族成员基因启动子序列 (起始密码子 ATG 上游 2 000 bp), 采用 PlantCARE 在线软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对启动子顺式作用元件进行分析, 根据结果文件自身功能注释及相关文献报道<sup>[30-32]</sup> 整理各顺式作用元件功能, 并采用 Excel 软件分类整理统计绘制柱状图, 使用 TBtools 软件绘制热图。

### 1.8 茶树 *CsCCD* 家族蛋白互作预测分析

利用在线工具 String (<https://string-db.org>) 对 *CsCCD* 家族成员进行蛋白互作预测, 选用拟南芥 CCD 家族作为参考, 其他参数采用默认设定值。

### 1.9 茶树 *CsCCD* 基因家族成员基因表达分析

采用 RNA prep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提取茶树叶片 RNA, 利用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 将 RNA 逆转录为 cDNA。RT-qPCR 选用 20  $\mu$ L 体系, 其中 Hieff<sup>®</sup>qPCR SYBR<sup>®</sup>Green Master Mix (No Rox) 荧光染料 (上海翊圣生物科技有限公司) 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, 上下游引物各 0.8  $\mu$ L。选用 DNAMAN 软件设计基因上下游引物 (表 1), 内参基因参照 Zhou 等<sup>[33]</sup> 研究结果, 选用 *CsGADPH* 与 *CsTBP*, 其中 *CsGADPH* 作为不同叶位鲜叶的内参基因, *CsTBP* 作为加工过程中在制叶片的内参基因。采用罗氏 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪测定基因相对表达量, 每个处理设置 3 个技术重复。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法<sup>[34]</sup> 计算茶树 CCD 基因相对表达量水平, SPSS 18.0 软件分析显著性差异水平 ( $P < 0.05$ ), 并用 GraphPad Prism v8.0 作图。

表 1 RT-qPCR 所用引物序列

Table 1 Primers used in RT-qPCR

Gene names	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
<i>CsCCD1a</i>	ACTTCACAGCCTCACCCT	TGACAAACTCACCATTGAGG
<i>CsCCD1b</i>	ACTTGCCGCCTTGAGAA	GCTGATAGTTTCCTCTGTGATG
<i>CsCCD4</i>	CGTGTCAGTATCAGAAGGCG	TCGGGATTGTTAGGGTCT
<i>CsCCD7a</i>	GCAAAAATATCCCGAGCCAT	TGAGATAATAGGTCCCGCAC
<i>CsCCD7b</i>	ATACTAGTGTGTTGGGGTGG	CCTATGGTGTCCAAACTCT
<i>CsCCD8</i>	CGTGCGGGACCTATTATCT	CAACCATCTTTCCACCTTTC
<i>CsNCED3a</i>	CGGACATTGAAATCCAC	CCCAAGCATTCCAAAGA
<i>CsNCED3b</i>	GCTAAGCCCAAACCCTCTA	GCAAGTCGGGATAGTAACG
<i>CsNCED3c</i>	GAAATCCCACTCTCAGAACC	TCTTCCCAAGCATTCCAG
<i>CsNCED6a</i>	CGAGTATTGGTTTGGTGG	TGACTTATCCCGCACG
<i>CsNCED6b</i>	ATCGCTCATCCTAAGGTGG	GAATCATAGTCGGCTGGTG
<i>CsGADPH</i>	TTGGCATCGTTGAGGGTCT	CAGTGGGAACACGGAAAGC
<i>CsTBP</i>	GGCGGATCAAGTGTGGAAGGGAG	ACGCTTGGGATTGTATTCGGCATT

## 2 结果与分析

### 2.1 茶树 *CsCCD* 基因家族成员的鉴定及蛋白理化性质分析

在茶树中共筛选出 11 个 *CsCCD* 基因家族成员, 并根据拟南芥中同源基因命名, 同一亚族基因按小写字母排序 (表 2)。CsCCD 家族成员氨基酸个数在 192–643 aa 之间, 平均值为 519 aa; 分子质量为 21 208.91–71 755.57 Da, 平均值为

57 643.35 Da, 等电点位于 4.84–9.41 之间, 大部分呈酸性; 共有 5 个成员蛋白质不稳定系数 < 40, 为稳定蛋白, 其中 *CsCCD1*、*CsCCD8*、*CsNCED6* 亚族所有成员为稳定蛋白; 亲水指数均 < 0, 说明 *CsCCD* 家族成员均为亲水性蛋白; 亚细胞定位预测结果显示, 大多数 *CsCCD* 家族成员定位在叶绿体中, 也有少数成员定位在细胞骨架、过氧化酶体和细胞质中。

表 2 茶树 *CsCCD* 基因家族成员蛋白理化性质Table 2 Physical and chemical properties of *CsCCD* gene family members

Gene name	Gene ID	Annotated members in <i>Arabidopsis thaliana</i>	Number of amino acids	PI	Molecular weight	Instability index	Hydropathicity Index	Subcellular localization
<i>CsCCD1a</i>	CSS0012422.1	<i>AtCCD1</i>	479	5.80	54 013.07	28.75	-0.265	Cytoskeleton
<i>CsCCD1b</i>	CSS0036960.1	<i>AtCCD1</i>	192	4.84	21 208.91	25.10	-0.394	Cytoskeleton
<i>CsCCD4</i>	CSS0017602.1	<i>AtCCD4</i>	613	5.99	66 721.94	42.01	-0.177	Chloroplast
<i>CsCCD7a</i>	CSS0033793.1	<i>AtCCD7</i>	643	6.00	71 755.57	41.04	-0.272	Peroxisome
<i>CsCCD7b</i>	CSS0041110.1	<i>AtCCD7</i>	643	6.08	71 740.56	40.77	-0.281	Chloroplast
<i>CsCCD8</i>	CSS0030796.1	<i>AtCCD8</i>	557	7.01	61 872.75	30.94	-0.284	Chloroplast
<i>CsNCED3a</i>	CSS0015210.1	<i>AtNCED3</i>	606	5.78	66 712.74	42.10	-0.268	Chloroplast
<i>CsNCED3b</i>	CSS0021789.1	<i>AtNCED3</i>	606	6.27	67 647.85	44.23	-0.329	Chloroplast
<i>CsNCED3c</i>	CSS0033791.1	<i>AtNCED3</i>	604	6.50	66 709.66	42.18	-0.312	Chloroplast
<i>CsNCED6a</i>	CSS0041843.1	<i>AtNCED6</i>	383	9.41	42 998.55	30.92	-0.354	Chloroplast
<i>CsNCED6b</i>	CSS0044321.1	<i>AtNCED6</i>	383	9.11	42 695.24	32.77	-0.297	Cytosol

## 2.2 茶树 *CsCCD* 基因家族成员基因结构与蛋白保守基序分析

了解内含子相位差异有助于预测外显子是否可能作为可变剪切的目标,更好地探究各成员的生物学功能。茶树 *CsCCD* 基因家族成员进行基因结构分析结果显示(图1),各个成员间外显子个数及基因长度差异较大,其中 *CsCCD1a* 含有 11 个外显子,10 个内含子; *CsCCD7a*、*CsCCD7b* 含有 8 个外显子,7 个内含子; *CsCCD1b*、*CsCCD8* 含有 6 个外显子,5 个内含子; *CsCCD4*、*CsNCED6a*、*CsNCED6b* 含有 3 个外显子,2 个内含子; *CsNCED3* 亚族所有成员含 1 个外显子,无内含子。内含子相位(intron phase)表示内含子位于密码子不同碱基后的位置情况, *CsCCD1a* 存在 phase 0、phase 1 和 phase 2, *CsCCD4* 存在 phase 0、phase 1, 其余含有内含子的家族成员内含子相位均为 phase 0。

通过在线工具 MEME 分析 *CsCCD* 家族蛋

白保守基序, CCD1 亚族成员共有 motif 5、motif 12, CCD7 亚族成员共有 motif 9、motif 2、motif 6、motif 5、motif 12 与 motif 10; CCD8 亚族成员含有 motif 2、motif 10、motif 5 与 motif 12; CCD4 与 NCED3 亚族所有成员保守基序一致,均含有 motif 8、motif 1、motif 4、motif 9、motif 3、motif 11、motif 2、motif 7、motif 5、motif 12 与 motif 10; NCED6 亚族成员均含 motif 8、motif 1、motif 4、motif 3、motif 11、motif 2 与 motif 12。 *CsCCD* 所有成员所共有的保守基序为 motif 12,同一亚族成员间序列相对保守。

## 2.3 茶树 *CsCCD* 基因家族染色体定位分析

茶树 *CsCCD* 基因家族染色体定位分析结果显示(图2),11 个家族成员中有 10 个成员能精确定位在 15 条茶树基因组的 3、5、6、7、8、9、12、14 号染色体上,其中 *CsCCD7* 亚族所有成员分布在 3 号染色体上, *CsCCD1* 亚族所有成员分布在 6 号染色体上。

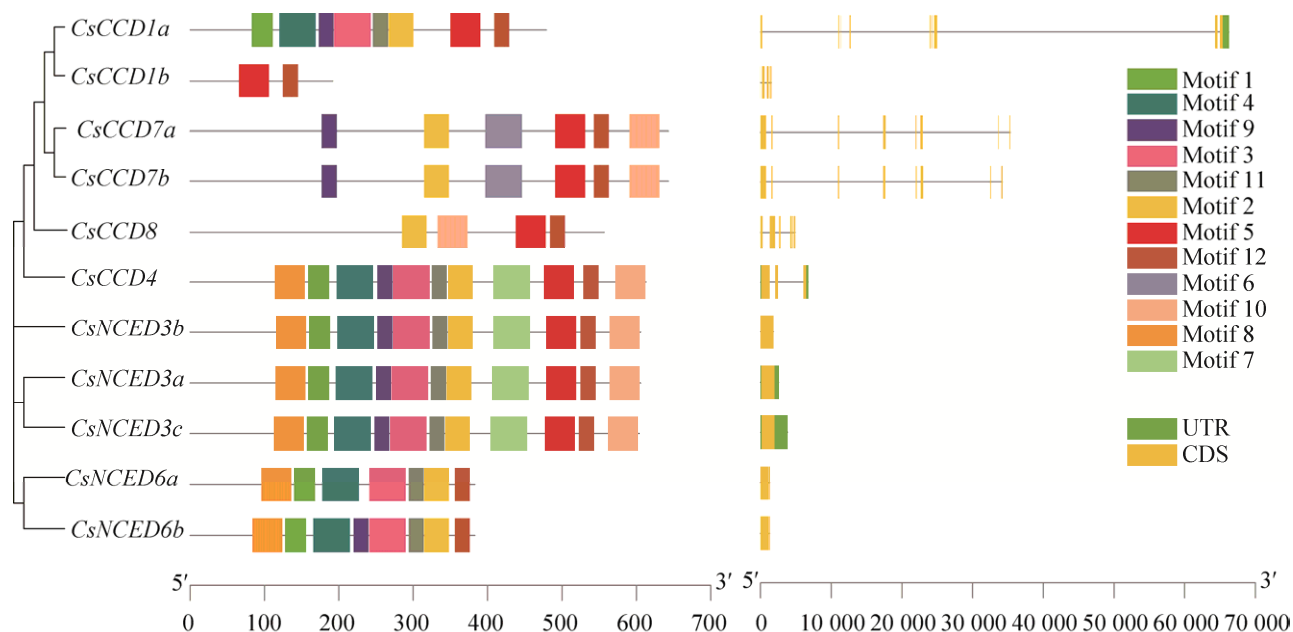


图1 茶树 *CsCCD* 基因家族成员基因结构与保守基序分布

Figure 1 Genetic structure and conserved motifs of *CsCCD* gene family members.

## 2.4 茶树 *CsCCD* 家族蛋白互作网络预测

利用在线工具 String 对茶树 *CsCCD* 家族成员蛋白互作网络进行预测,以拟南芥蛋白数据库为参考共比对到 6 个家族成员 (图 3),节点蛋白之间不同颜色的连线代表不同的互作预测方法,包括蛋白同源、基因共现、共表达、数据库数据

与文本数据挖掘。互作分值由不同预测方法综合得出,默认以 0.4 作为存在蛋白互作的筛选条件,其中 CCD7 与其他 5 个家族成员间均存在互作, CCD8 与 CCD7、CCD1、CCD4 (图中预测名为 NCED4) 存在互作, NCED3、NCED6 只与 CCD7 存在互作。与 NCED 亚族成员相比, CCD 亚族

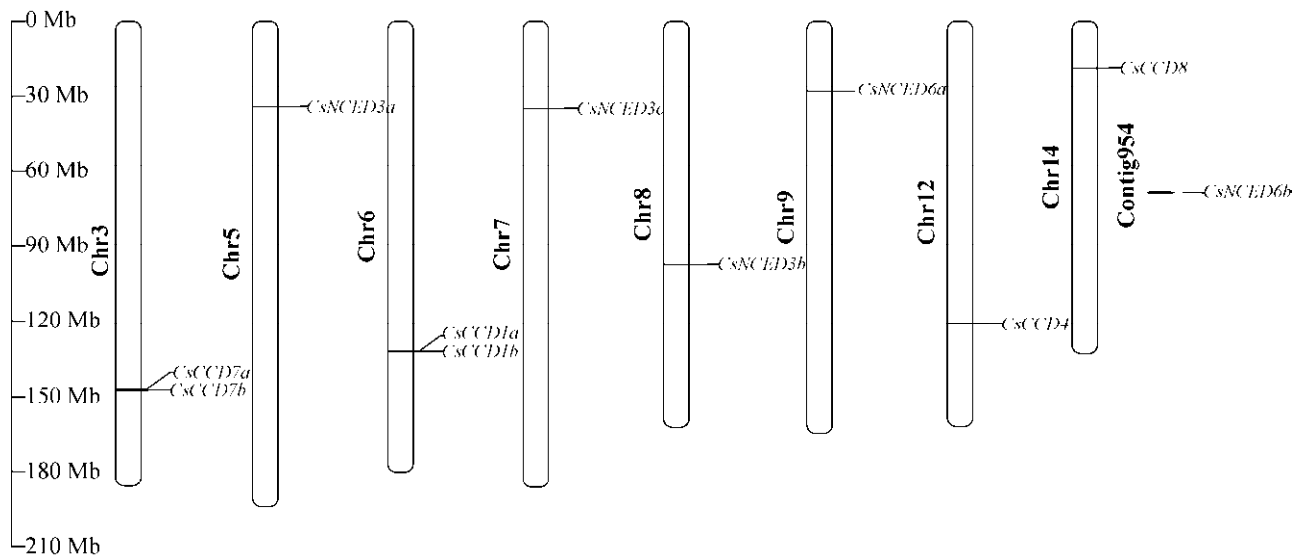


图 2 茶树 *CsCCD* 基因家族染色体定位分析

Figure 2 Chromosome locations of *CsCCD* gene family members.

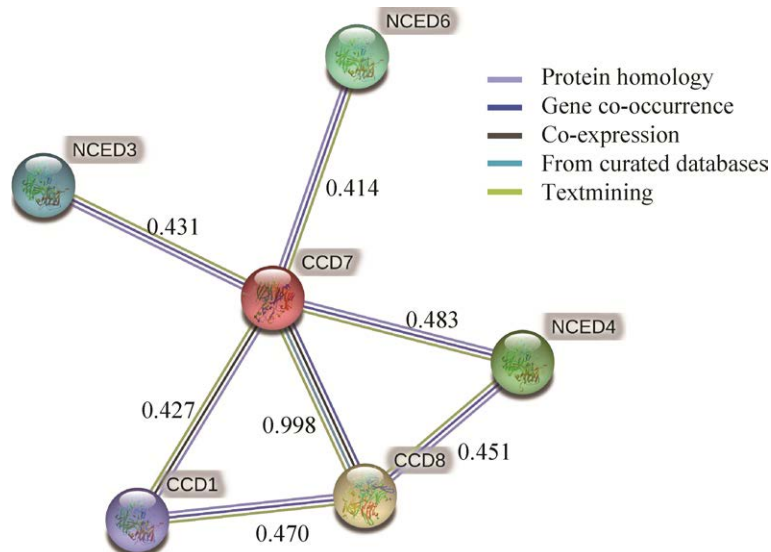


图 3 茶树 *CsCCD* 家族成员蛋白互作网络预测

Figure 3 Predication of the interactions among *CsCCD* gene family members.

成员间互作关系较强;整体上看,比对到的所有 CCD 家族成员构成一个互作网络,且互作类型较多,推测该家族成员蛋白可能在行使功能方面关联性较强。

## 2.5 茶树 *CsCCD* 基因家族启动子顺式作用元件分析

分析启动子顺式作用元件可以了解调控基因表达的诱导因素,更全面地了解基因功能。利用在线网站 PlantCARE 对茶树 *CsCCD* 基因家族成员基因翻译起始位点上游 2 000 bp 启动子顺式作用元件进行分析,结果显示,茶树 *CsCCD* 基因家族成员含有核心启动子元件 (TATA-box、CAAT-box), 生长发育相关元件 (CAT-Box、CCGTCC-box、circadian、HD-Zip 1), 结合位点相关元件 (AT-rich element、Box III、CCAAT-box、MBS、MYB-binding site) 等多种功能启动子顺式作用元件,选择类胡萝卜素降解途径及茶叶加工过程密切相关的激素响应、胁迫响应、光响应等顺式作用元件进行分析 (图 4)。

*CsCCD* 基因家族启动子序列包含大量胁迫响应、激素响应和光响应相关顺式作用元件,胁迫响应元件 78 个,激素响应元件 104 个,光响应元件 142 个,多因子响应元件 91 个,共计 415 个。胁迫响应元件中热诱导型元件 STRE 与厌氧诱导型元件 ARE 数量较多,共占 51.3%。激素响应元件中,脱落酸响应元件 ABRE 占比最大,存在于所有家族成员中,共 30 个,在 *CsCCD4*、*CsNCED3a* 中发现较多;此外也有乙烯响应元件 ERE、茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif、生长素响应元件 TGA-element、AuxRR-core 和水杨酸响应元件 TCA-element。光响应元件的元件种类、数量最多,主要有 Box4、G-box、GATA-motif、I-box、ATCT-motif、TCT-motif、ATC-motif、GT1-motif 等,所有成

员均含有 box4、G-box。*CsCCD4* 含有光响应元件数量最多 (22 个),其他亚族成员含有 9-16 个光响应元件不等。多因子响应元件 MYB、MYB-like sequence、MYC 具有响应逆境胁迫、激素应答的功能,所有成员均含 MYC。以上结果表明,*CsCCD* 基因家族的表达可能响应多种逆境胁迫,受多种激素调控,推测光照在其表达调控过程可能扮演重要角色。

## 2.6 植物 CCD 家族系统进化树的构建及分析

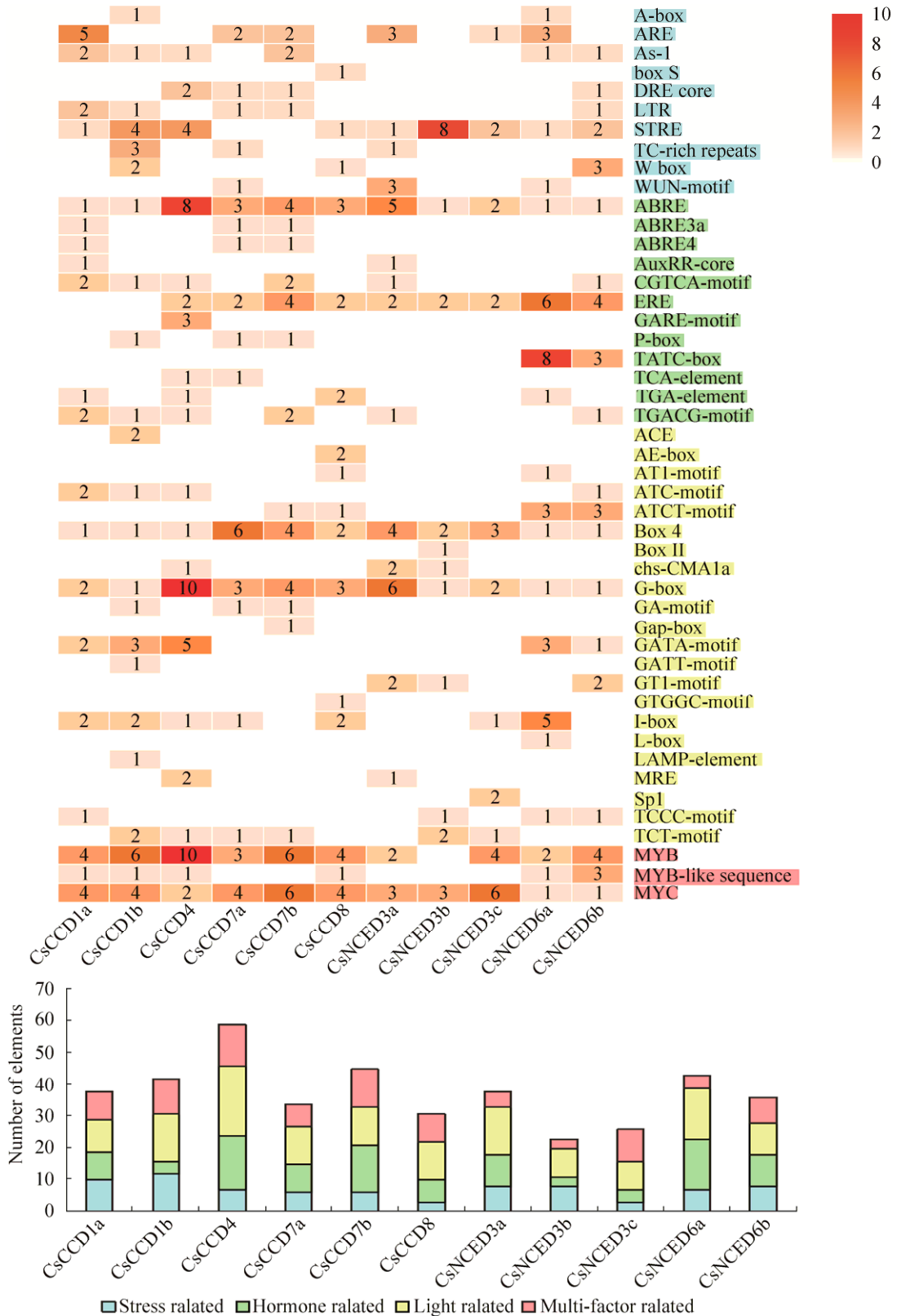
为了解茶树与其他物种之间 CCD 家族的进化关系,对茶树 *Camellia sinensis* 11 个、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 9 个、葡萄 *Vitis vinifera* 8 个、水稻 *Oryza sativa* 10 个、苹果 *Malus domestica* 17 个、番茄 *Solanum lycopersicum* 6 个共计 61 个 CCD 基因家族成员氨基酸序列进行系统发育树构建,结果 (图 5) 显示,CCD 家族可分为 5 个亚族,分别为 CCD1、CCD4、CCD7、CCD8 与 NCED 亚族,其中 CCD8 亚族、CCD7 亚族各呈一支,与其他亚族成员间进化关系较远;而 CCD1、CCD4、NCED 亚族之间聚类在同一分支中,进化关系较近。同一亚族中,茶树 *CsCCD* 家族在进化树中与葡萄、苹果、番茄的亲缘关系距离更近;而水稻大多单呈一支,与其他物种进化关系较远,表明 CCD 家族在双子叶植物间亲缘关系较单子叶植物更近。

## 2.7 茶树 *CsCCD* 基因在不同叶位及加工过程光照处理下的表达模式

### 2.7.1 茶树 *CsCCD* 基因在不同叶位的表达模式

为了解茶树 *CsCCD* 基因家族在不同叶位的表达量差异情况,采用 RT-qPCR 对其基因表达量进行相对定量检测,结果显示 (图 6),*CsCCD1* 亚族在第 2、3 叶表达量显著高于第 1 叶及嫩茎,*CsCCD4* 亚族表达量趋势与 *CCD1*



图 4 茶树 *CsCCD* 基因家族成员启动子顺式作用元件分布Figure 4 Distribution of cis-acting regulatory elements of *CsCCD* gene family members.



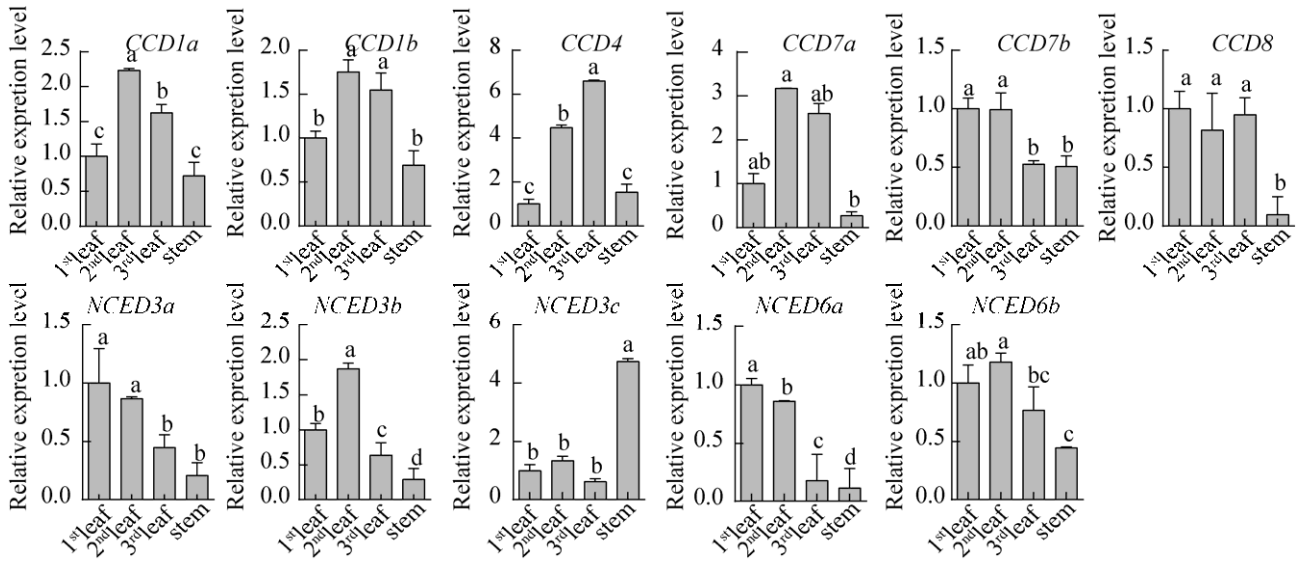


图 6 茶树 *CsCCD* 基因家族成员在不同叶位相对表达量

Figure 6 Relative expression of *CsCCD* gene family members in different leaves. Different lowercase letters indicate significant differences among different leaf positions at 0.05 level.

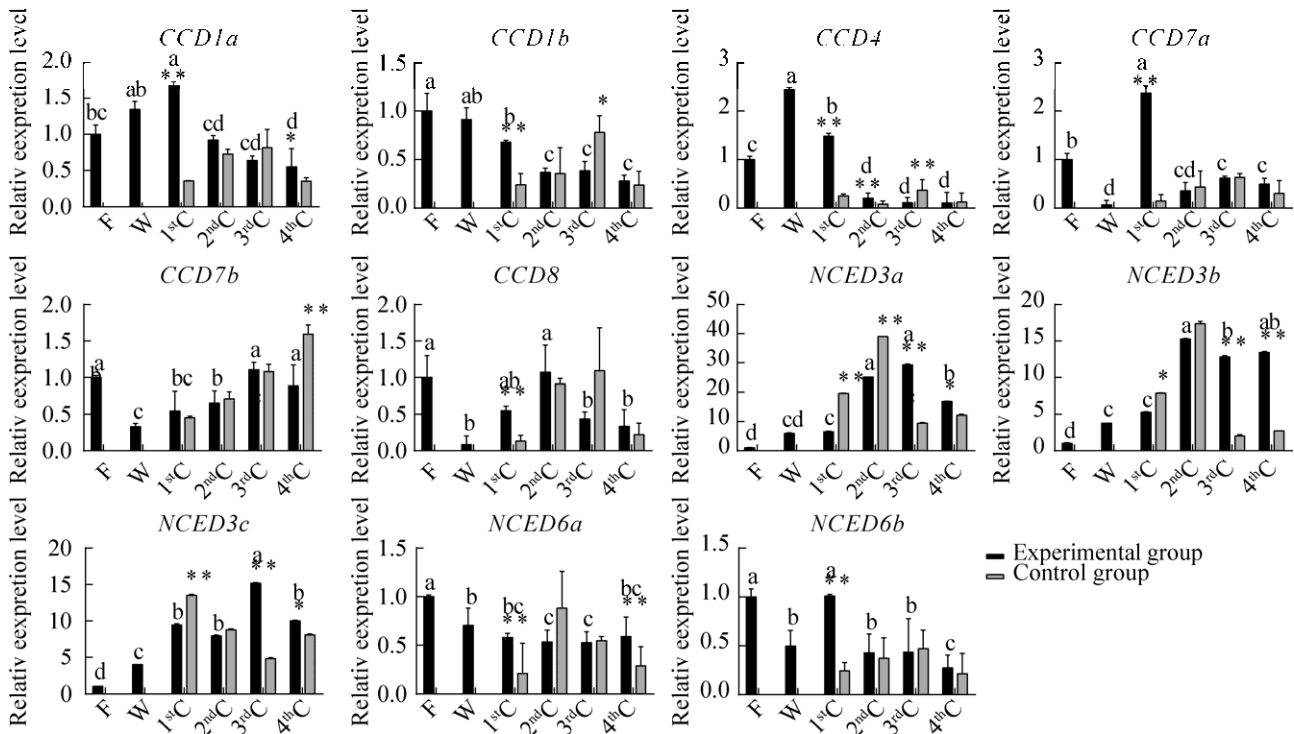


图 7 茶树 *CsCCD* 基因家族成员在不同处理下相对表达量

Figure 7 Relative expression of *CsCCD* gene family members upon different treatments. Different lowercase letters indicate significant differences among different sampling points during processing of Oolong tea at 0.05 level; "\*" indicates significant differences between LED treatment (experimental group) and dark treatment (control group) at 0.05 level, while "\*\*\*" indicates significant differences at 0.01 level.

光晾青的叶片表达量均显著高于黑暗晾青对照。*CsCCD4* 在做青阶段表达量显著下降,前两次摇青后补光晾青的表达量显著高于黑暗晾青对照。*CsCCD7* 两个亚族成员表达模式不同,*CsCCD7a* 在萎凋后表达量最低,显著低于其他处理,推测做青及光照可促进其表达;*CsCCD7b* 表达量随摇青次数不断增加呈现上升趋势,第4次摇青后黑暗晾青叶表达量最高,且显著高于光照处理。*CsCCD8* 表达量呈现先下降后上升再下降的趋势。*CsNCED3* 亚族成员间表达趋势相近,表达量都呈现先升后降的趋势;且在做青前期,黑暗晾青表达量显著高于光照晾青,而在做青后期,光照晾青表达量显著高于黑暗晾青对照。*CsNCED6* 亚族成员在加工过程中表达量均不及鲜叶,但第一次摇青后补光晾青叶片表达量高于黑暗处理。

### 3 讨论

#### 3.1 茶树 *CsCCD* 基因家族进化特性

*CCD* 基因家族成员广泛存在于植物中,通常被分为 *CCD* 及 *NCED* 两大亚族,或 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 及 *NCED* 五大亚族<sup>[19,35]</sup>。本研究共在茶树中鉴定出11个 *CsCCD* 基因家族成员,所构建的进化树结果中 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 及 *NCED* 聚类在不同分支,区分明显,但 *NCED* 亚族成员内部并未按照 *NCED2*、*NCED3*、*NCED5*、*NCED6*、*NCED9* 聚类在一起,而更倾向于按照物种差别聚类,表明 *NCED* 亚族成员间蛋白序列相差较小,而 *CCD* 与 *NCED* 间蛋白序列差异较大,且 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 亚族间蛋白序列差异也较大<sup>[36]</sup>。

在茶树中,大部分亚族均含两个或两个以上成员,而 *CsCCD4* 亚族仅有一个成员。张亚飞等<sup>[13]</sup>认为 *CCD4* 亚族成员个数差异与物种不同时期不同器官的颜色差异有关,如颜色单一的拟

南芥、水稻和马铃薯等植物中仅含1个或少数 *CCD4*,而在不同时期果实颜色有所转变的柑橘、葡萄、苹果、番茄中鉴定出的 *CCD4* 亚族成员数目较多。

*CsCCD* 家族成员氨基酸个数平均值为519 aa,分子质量平均值为57 643.35 Da,与其他物种中 *CCD* 家族成员氨基酸个数及分子质量相近,推测其家族成员蛋白结构在各物种中相对保守,但值得注意的是,本研究鉴定出的 *CsCCD1b* 氨基酸个数仅为192 aa,与平均水平差异较大,其保守基序仅有 motif 5 与 motif 12,可能由于组装序列不完整或部分序列缺失导致。

茶树 *CsCCD* 家族成员蛋白互作网络预测显示,比对到的6个家族成员构成互作网络,且预测方式以蛋白同源、基因共现和文本数据挖掘为主,暂无实验直接验证表明其互作关系。大多数互作蛋白间预测得分范围为0.4–0.5,但值得关注的是,*CCD7* 与 *CCD8* 互作预测得分为0.998,包含4种互作预测方式。两者在行使功能中存在密切联系,*CCD7* 裂解9-顺式- $\beta$ -胡萝卜素后产生的9-顺式- $\beta$ -阿朴-10'-胡萝卜醛会作为 *CCD8* 的底物参与独脚金内酯的形成,而拟南芥中 *AtCCD7*-*AtCCD8* 可能形成异源二聚体,提高类胡萝卜素裂解速率<sup>[6,37]</sup>。

#### 3.2 茶树 *CsCCD* 基因家族乌龙茶 LED 补光晾青及不同叶位的表达模式

在受到摇青机械力胁迫后,大部分 *CsCCD* 基因家族成员表达量都显著下降,值得注意的是,*CsNCED3a*、*CsNCED3b*、*CsNCED3c* 呈现大幅上升而后下降的趋势,表达量最高时可达鲜叶表达量的15–30倍,表明适度机械力胁迫能大量促进其表达。

茶树鲜叶不同部位 *CsCCD* 基因表达量不同,鲜叶嫩度为第1叶>第2叶>第3叶>嫩茎。*CsCCD* 亚族各成员总体呈现第2、3叶表达量高

于第 1 叶及嫩茎; *CsNCED* 亚族成员总体呈现随叶片嫩度降低基因表达量降低的趋势, 只有 *CsNCED3c* 嫩茎中的表达量高达叶片的 3 倍, 推测 *CsNCED3c* 在嫩茎中具有特殊功能。制作不同茶类所需原料老嫩不同, 乌龙茶鲜叶原料较绿茶、红茶原料更成熟, 进一步说明乌龙茶中类胡萝卜素降解产物及相关挥发性成分较高。

茶树 *CsCCD* 基因家族成员启动子区域包含大量胁迫响应、激素响应和光响应相关顺式作用元件, 其中光响应元件数目多达 142 个。在杏<sup>[30]</sup>、番红花<sup>[38-39]</sup>、桂花<sup>[40]</sup>等其他物种报道指出 *CCD* 基因家族成员中含有大量光响应元件, 推测光响应元件在 *CCD* 基因家族中广泛存在, 其基因表达受光照调控。茶树中已证实 *CsCCD1*、*CsCCD4* 具有裂解玉米黄质、 $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素等类胡萝卜素的生物活性, 生成芳香物质  $\beta$ -紫罗酮、假紫罗酮、6-甲基-5-庚-2-酮、香叶基丙酮、乙酸香叶酯等类胡萝卜素衍生香气物质<sup>[41-42]</sup>。本研究探究了茶树 *CsCCD* 基因家族成员在乌龙茶补光晾青下的表达模式, *CsCCD1*、*CsCCD4* 亚族成员经过摇青处理后表达量显著下调, 而一摇后经补光晾青处理其表达量显著高于黑暗对照, 说明在摇青前期, 晾青中光照处理有利于促进 *CsCCD1*、*CsCCD4* 基因表达, 推测光照能减缓摇青带来的机械损伤导致的基因表达量下降, 有助于茶类胡萝卜素衍生香气物质的形成。后续研究可进一步验证乌龙茶加工过程中胡萝卜素降解产物的变化情况, 探寻光照处理对乌龙茶香气品质的提升作用。

## 4 结论

本研究共鉴定出 11 个茶树 *CsCCD* 基因家族成员, 含有 *CCD1*、*CCD4*、*CCD7*、*CCD8* 与 *NCED* 共 5 个亚族, 所有成员蛋白均含有 RPE65 结构, 启动子区域顺式作用元件以胁迫响应元

件、激素响应元件、光响应元件和多因素响应元件为主, 其中光响应元件最多。基因表达水平受机械力及光照调控, 与脱落酸形成相关基因 *CsNCED3* 表达量在受机械力胁迫后显著上升, 与茶叶类胡萝卜素衍生香气物质直接相关的基因 *CsCCD1*、*CsCCD4* 表达量在 LED 光照射前期显著上升。这些结果有助于阐明茶树类胡萝卜素降解途径香气形成及独脚金内酯、脱落酸合成的遗传机制与光调控作用, 为进一步研究该基因家族在茶树生长发育中的功能、通过调控茶叶加工环境而提升茶叶品质奠定基础。

## REFERENCES

- [1] 钟秋生, 陈常颂, 游小妹, 等. 不同做青环境对丹桂秋季乌龙茶香气品质的影响. 福建农业学报, 2010, 25(4): 468-474.  
Zhong QS, Chen CS, You XM, et al. Effect of processing conditions on flavor of Dangui oolong tea. Fujian J Agric Sci, 2010, 25(4): 468-474 (in Chinese).
- [2] 陈寿松, 金心怡, 游芳宁, 等. 多次间歇 LED 光照射对铁观音风味组分的影响. 农业工程学报, 2018, 34(2): 308-314.  
Chen SS, Jin XY, You FN, et al. Influence of multi intermittence radiation by LED on flavor components in Tieguanyin tea. Trans Chin Soc Agric Eng, 2018, 34(2): 308-314 (in Chinese).
- [3] Ni TC, Xu SS, Wei YM, et al. Understanding the promotion of withering treatment on quality of postharvest tea leaves using UHPLC-orbitrap-MS metabolomics integrated with TMT-based proteomics. LWT, 2021, 147: 111614.
- [4] Kloer DP, Schulz GE. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(19/20): 2291-2303.
- [5] Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, et al. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. Science, 1997, 276(5320): 1872-1874.
- [6] Auldridge ME, Block A, Vogel JT, et al. Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. Plant J, 2006, 45(6): 982-993.
- [7] Serra S. Recent advances in the synthesis of

- carotenoid-derived flavours and fragrances. *Molecules*, 2015, 20(7): 12817-12840.
- [8] Timmins JJB, Kroukamp H, Paulsen IT, et al. The sensory significance of apocarotenoids in wine: importance of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in the production of  $\beta$ -ionone. *Molecules*, 2020, 25(12): 2779.
- [9] Schreier P, Drawert F, Schmid M. Changes in the composition of neutral volatile components during the production of apple brandy. *J Sci Food Agric*, 1978, 29(8): 728-736.
- [10] Buttery RG, Teranishi R, Ling LC, et al. Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(1): 336-340.
- [11] Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 2008, 455(7210): 189-194.
- [12] Umehara M, Hanada A, Yoshida S, et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 2008, 455(7210): 195-200.
- [13] 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. *中国农业科学*, 2020, 53(9): 1874-1889.  
Zhang YF, Peng J, Zhu YS, et al. Genome wide identification of CCD gene family in *Citrus* and effect of *CcCCD4a* on the color of *Citrus* flesh. *Sci Agric Sin*, 2020, 53(9): 1874-1889 (in Chinese).
- [14] Chen H, Zuo X, Shao H, et al. Genome-wide analysis of carotenoid cleavage oxygenase genes and their responses to various phytohormones and abiotic stresses in apple (*Malus domestica*). *Plant Physiol Biochem*, 2018, 123: 81-93.
- [15] Wei YP, Wan HJ, Wu ZM, et al. A comprehensive analysis of carotenoid cleavage dioxygenases genes in *Solanum lycopersicum*. *Plant Mol Biol Report*, 2016, 34(2): 512-523.
- [16] Lashbrooke JG, Young PR, Dockrall SJ, et al. Functional characterisation of three members of the *Vitis vinifera* L. carotenoid cleavage dioxygenase gene family. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 156.
- [17] Zhou XT, Jia LD, Duan MZ, et al. Genome-wide identification and expression profiling of the carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) gene family in *Brassica napus* L. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0238179.
- [18] Hermanns AS, Zhou XS, Xu Q, et al. Carotenoid pigment accumulation in horticultural plants. *Hortic Plant J*, 2020, 6(6): 343-360.
- [19] 刘玉成, 张超, 董彬, 等. 高等植物 CCD 亚家族基因研究进展. *农业生物技术学报*, 2019, 27(4): 720-734.
- Liu YC, Zhang C, Dong B, et al. Advances of CCD subfamily in higher plants. *J Agric Biotechnol*, 2019, 27(4): 720-734 (in Chinese).
- [20] 岳翠男, 王治会, 石旭平, 等. 光质对茶叶香气代谢物的影响研究进展. *食品科学*, 2020, 41(5): 299-305.  
Yue CN, Wang ZH, Shi XP, et al. Effects of light quality on aroma metabolites in tea: a review of recent literature. *Food Sci*, 2020, 41(5): 299-305 (in Chinese).
- [21] Fu X, Chen Y, Mei X, et al. Regulation of formation of volatile compounds of tea (*Camellia sinensis*) leaves by single light wavelength. *Sci Rep*, 2015, 5: 16858.
- [22] Tan BC, Joseph LM, Deng WT, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*Cis* epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J*, 2003, 35(1): 44-56.
- [23] Vallabhaneni R, Bradbury LM, Wurtzel ET. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, *Sorghum*, and rice. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 504(1): 104-111.
- [24] Leng X, Wang P, Wang C, et al. Genome-wide identification and characterization of genes involved in carotenoid metabolic in three stages of grapevine fruit development. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4216.
- [25] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [26] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [27] Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci*, 1992, 8(3): 275-282.
- [28] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(w1): W293-W296.
- [29] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [30] 冯靖, 杨灿, 卢娟芳, 等. 杏 *CCD1* 和 *CCD4* 启动子克隆及顺式作用元件分析. *园艺学报*, 2020, 47(5): 939-952.  
Feng J, Yang C, Lu JF, et al. Cloning and *Cis*-acting element analysis of *CCD1* and *CCD4* promoter in apricot. *Acta Horti Sin*, 2020, 47(5): 939-952 (in Chinese).
- [31] Redman J, Whitcraft J, Johnson C, et al. Abiotic and

- biotic stress differentially stimulate as-1 element activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2002, 21(2): 180-185.
- [32] 张毅, 尹辉, 李丹, 等. 植物环境响应启动子的诱导元件及转录因子. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(7): 122-128.
- Zhang Y, Yin H, Li D, et al. The *Cis*-elements and transcription factors of plant environmental response promoters. *China Biotechnol*, 2007, 27(7): 122-128 (in Chinese).
- [33] Zhou ZW, Deng HL, Wu QY, et al. Validation of reference genes for gene expression studies in post-harvest leaves of tea plant (*Camellia sinensis*). *Peer J*, 2019, 7: e6385.
- [34] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [35] Kim Y, Hwang I, Jung HJ, et al. Genome-wide classification and abiotic stress-responsive expression profiling of carotenoid oxygenase genes in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *J Plant Growth Regul*, 2016, 35(1): 202-214.
- [36] Walter MH, Strack D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(4): 663-692.
- [37] Schwartz SH, Qin XQ, Loewen MC. The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem*, 2004, 279(45): 46940-46945.
- [38] Ahrazem O, Trapero A, Gómez MD, et al. Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: a deeper study in *Crocus sativus* and its allies. *Genomics*, 2010, 96(4): 239-250.
- [39] Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Argandoña-Picazo J, et al. Intron retention and rhythmic diel pattern regulation of carotenoid cleavage dioxygenase 2 during crocetin biosynthesis in saffron. *Plant Mol Biol*, 2016, 91(3): 355-374.
- [40] 刘玉成, 王艺光, 张超, 等. 桂花 *OfCCD1* 基因启动子克隆与表达特性. *浙江农林大学学报*, 2018, 35(4): 596-603.
- Liu YC, Wang YG, Zhang C, et al. Cloning and transient expression assay of *OfCCD1* gene promoters from *Osmanthus fragrans*. *J Zhejiang A F Univ*, 2018, 35(4): 596-603 (in Chinese).
- [41] Wang JM, Wu B, Zhang N, et al. Dehydration-induced carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for  $\beta$ -ionone formation during tea (*Camellia sinensis*) withering. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(39): 10815-10821.
- [42] Wang JM, Zhang N, Zhao MY, et al. Carotenoid cleavage dioxygenase 4 catalyzes the formation of carotenoid-derived volatile  $\beta$ -ionone during tea (*Camellia sinensis*) withering. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(6): 1684-1690.

(本文责编 陈宏宇)