

甘薯 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因的生物信息学鉴定和表达分析

徐 靖, 林延慧, 王效宁, 韩义胜, 唐力琼, 王新华, 朱红林*

(海南省农业科学院 粮食作物研究所, 海南省农作物遗传育种重点实验室, 农业部作物基因资源与种质创制海南科学观测实验站, 海口 571100)

摘 要: 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate:CoA ligase, 4CL) 在苯丙烷类代谢途径中具有重要调控作用。该研究利用转录组数据在甘薯品种 QS48 中鉴定了 11 个 4CL 基因, 并将这些基因命名为 *Ib4CL1*~*Ib4CL11*。序列比对和功能域分析发现, 11 个 *Ib4CL* 蛋白均具有典型的 4CL 结构特征, 包含保守的 Box I 和 Box II 的结构域。进化和保守基序分析显示, *Ib4CL1* 和 *Ib4CL2* 属于 I 类 4CL, *Ib4CL3* 属于 II 类 4CL, 而 *Ib4CL4*~*Ib4CL11* 属于 4CL 类似蛋白。转录组数据和荧光定量 PCR 分析显示, *Ib4CL3* 和 *Ib4CL10* 在甘薯 QS48 的叶中转录表达水平显著高于茎和块根, 与绿原酸的积累呈正相关关系; *Ib4CL4* 和 *Ib4CL8* 在嫩叶中表达较高, 与花青素的积累密切相关。研究结果为进一步揭示甘薯 4CL 基因在苯丙烷类代谢途径中的功能奠定了基础。

关键词: 甘薯; 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL); 绿原酸; 花青素; 表达分析

中图分类号: Q786; Q789

文献标志码: A

Bioinformatic Identification and Expression Analysis of 4CL Genes in *Ipomoea batatas*

XU Jing, LIN Yanhui, WANG Xiaoning, HAN Yisheng, TANG Liqiong,
WANG Xinhua, ZHU Honglin*

(Scientific Observation Station for Gene Resources and Germplasm Creation of Hainan, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Hainan Province, Institute of Cereal Crops, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China)

Abstract: 4-coumarate: CoA ligase (4CL) plays an important regulatory role in the phenylpropanoid metabolism. In this study, 11 4CL genes named *Ib4CL1*–*Ib4CL11* were identified in sweet potato (*Ipomoea batatas*) based on transcriptome data. The results of sequence alignment and functional domain analysis showed that all *Ib4CL* had typical 4CL structural feature, containing the conserved Box I and Box II domains. Evolutionary and conserved motif analysis suggested that *Ib4CL1* and *Ib4CL2* belong to Class I, *Ib4CL3* belongs to Class II, and *Ib4CL4*–*Ib4CL11* belong to 4CL-like proteins. Transcriptome data and quantitative real-time PCR analysis showed that the transcriptional levels of *Ib4CL3* and *Ib4CL10* in leaves were significantly higher than that in stems and roots, which were positively related to the accumulation of

收稿日期: 2020-01-02; 修改稿收到日期: 2020-03-27

基金项目: 海南省科研院所技术开发专项(KYYS-2018-03)

作者简介: 徐 靖(1981–), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事甘薯种质资源创新利用研究。E-mail: jing_jing_xu@163.com

* 通信作者: 朱红林, 副研究员, 主要从事甘薯种质资源创新利用研究。E-mail: 714420368@163.com

chlorogenic acid; *Ib4CL4* and *Ib4CL8* were higher expressed in young leaves, closely related to the accumulation of anthocyanins. The results laid the foundation for further revealing possible function of 4CL genes in phenylpropanoid metabolism of sweet potato.

Key words: *Ipomoea batatas*; 4-coumarate; CoA ligase (4CL); chlorogenic acid; anthocyanin; expression analysis

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] 是世界上重要的粮食、饲料、工业原材料作物。甘薯同时也是一种健康食品, 甘薯富含淀粉、纤维素及多种有益的次生代谢物, 如 β 胡萝卜素、花青素和绿原酸等^[1-2]。甘薯中的绿原酸和花青素具有抗氧化、抗菌消炎、抑制肿瘤和活血降压、抗衰老、降高血糖、增强记忆力以及抵抗病毒等多种生物活性^[1-2]。绿原酸和花青素都是苯丙烷类代谢产物, 相对于模式植物拟南芥和烟草而言, 甘薯绿原酸和花青素生物合成和调控机理研究相对滞后^[3-5]。

4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumarate: CoA ligase, 4CL) 能够催化 4-香豆酸形成肉桂酰辅酶 A, 在类黄酮、木质素、香豆素、孢粉素、绿原酸等苯丙烷类代谢途径中具有重要调控作用^[6-7]。在高等植物中, 4CL 由一个多基因家族编码, 基因成员的数量因植物物种而异^[8]。自 1981 年第一个 4CL 基因在欧芹中被克隆并鉴定以来^[9], 已在多种植物中发现并鉴定了一系列 4CL 同源基因, 如水稻^[10]、大豆^[11]、火炬松^[12]、拟南芥^[13-14]、烟草^[15-16]、桑树^[17]、前胡^[18]、杨树^[8-19] 和水曲柳^[20] 等。关于 4CL 基因功能的研究主要集中在调控木质素和类黄酮的生物合成上, 而参与其他苯丙烷类代谢物的合成报道较少^[7]。目前甘薯中关于 4CL 基因家族的分析还未见报道。本研究利用生物信息学对甘薯 4CL 基因家族进行挖掘, 并对其表达特征进行分析, 旨在为今后深入地研究甘薯 4CL 基因家族成员以及功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试的甘薯品种 (编号 QS48) 种植于海南省农业科学院永发种质资源圃。采集 4 个月龄甘薯不同发育阶段叶片 (叶芽、嫩叶、成熟叶和老叶)、成熟茎和块根, 用于 RNA 提取以及绿原酸和花青素的测定。每次实验进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

1.2 方法

1.2.1 甘薯 4CL 基因的筛选和鉴定 4CL 候选基因来自本室所测的甘薯 (编号 QS48) 不同组织转录组数据。通过 Pfam 和 SMART 程序检验注释为

4CL 基因编码蛋白是否含有 4CL 结构域, 将含有 4CL 结构域的序列通过 DNAMAN 8 工具进行多重序列比对, 去除重复序列。

1.2.2 甘薯 4CL 生物信息学分析 利用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 软件预测蛋白分子量和等电点。利用 DNAMAN 8 软件进行多重序列比对。利用 MEGA10.0 软件通过邻接法 (Neighbor-Joining method, N-J) (Bootstrap = 1000) 进行系统进化树的构建, 分析甘薯、拟南芥、大豆和杨树 4CL 基因家族的进化关系。利用 MEME 软件 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 搜索蛋白质的保守基序, 最大基序数量设置为 20 个, 其余设置为默认参数。

1.2.3 甘薯绿原酸和花青素的测定 将甘薯叶片、茎和块根用清水洗净后, 65 °C 烘干、研磨粉碎 (过 100 目筛) 待用。准确称取 1 g 样品, 利用紫外分光光度法测定总绿原酸含量和总花青素含量, 具体方法参见向昌国等^[21] 和刘桂玲等^[22] 的方法。在 Excel 软件中通过 CORREL 函数进行苯丙烷类代谢物含量和基因表达相关性分析。

1.2.4 核酸提取和 cDNA 的合成 甘薯不同组织中 RNA 提取采用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒; 按照 Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将 RNA 反转录合成 cDNA 第一链。

1.2.5 基因表达分析 通过甘薯不同组织及发育阶段转录组数据中 4CL unigenes 的 RPKM 值, 分析 4CL 基因在不同组织及发育阶段的表达特征, 并通过荧光定量 PCR 对 *Ib4CL3* 和 *Ib4CL4* 的表达特征进行验证。使用 Mx3005P Real-Time PCR System 进行荧光定量 PCR 分析。*Ib4CL3* 的引物为 q4CL3 F (5'-AACCAACCCGGAGAGATTTG-3') 和 q4CL3 R (5'-CAGCCATCCACGTCAATAGT-3'); *Ib4CL4* 的引物为 5'-CCAGATTGCTCCT-GCTGATT-3' 和 5'-CGGGAATCTCTCCAAC-TCTTC-3'; 内参引物为 ACT-F (5'-CTGGTGT-TATGGTTGGGATGG-3') 和 ACT-R (5'-GGG-GTGCCTCGGTAAGAAG-3')。反应体系为: 10

μL 2 $\times$ SYBR mix,上下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),1 μL cDNA 模板,7 μL ddH₂O,总体积 20 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。利用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法分别计算 4CL 基因在甘薯不同组织及发育阶段中的表达量。

2 结果与分析

2.1 甘薯 4CL 基因的鉴定和理化特征

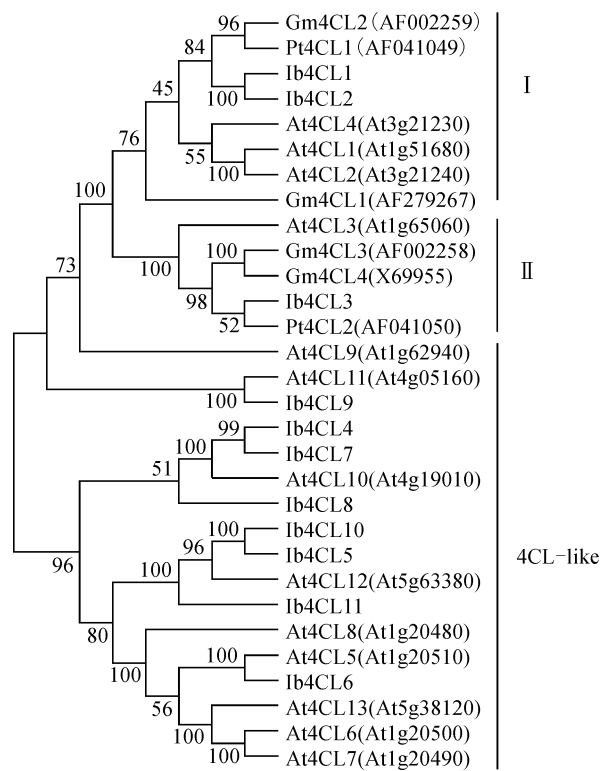
在甘薯不同组织全长转录组数据中,共有 25 个 unigenes 被注释为 4CL 基因。通过 CDD 和 Pfam 对候选 4CL 基因的氨基酸进行分析,删除重复序列和缺乏 4CL 保守结构域的序列,最终确定了 11 个 4CL 家族成员,并将这些名为 *Ib4CL1*~*Ib4CL11*。这些基因均具有完整开放阅读框,长度 1 629~1 743 bp 之间(表 1)。

Ib4CL 蛋白序列理化性质分析发现,各蛋白序列长度在 542~580 个氨基酸之间,分子量在 59.27~64.76 kD 之间,等电点在 5.57~9.14 之间。*Ib4CL* 蛋白均具有典型的 4CL 结构特征,包含保守 Box I 和 Box II 的结构域(图 1)。Box I 是 AMP 结合功能域,参与底物的识别,而 Box II 与蛋白稳定性和催化活性有关^[7]。

2.2 *Ib4CL* 蛋白的进化

为了进一步探索甘薯的 *Ib4CLs* 系统发育关系和潜在的生物学功能,将 11 个 *Ib4CLs* 与拟南芥、大豆和杨树中的 4CL 蛋白序列进行多重序列比对和系统进化分析。结果显示,*Ib4CL1* 和 *Ib4CL2* 与拟南芥

At4CL1、*At4CL2* 和 *At4CL4* 聚在一起,属于 I 类 4CL,*Ib4CL3* 与 *At4CL3* 的关系较近,属于 II 类 4CL,而 *Ib4CL4*~*Ib4CL11* 属于 4CL 类似蛋白(图 2)。



Gm、Pt、Ib 和 At 分别表示大豆、杨树、甘薯和拟南芥 4CL 家族蛋白
图 2 不同物种 4CL 的系统进化分析
Gm, Pt, Ib and At represent 4CL family protein
from *Glycine max*, *Populus tremuloides*,
Ipomoea batatas and *Arabidopsis thaliana*, respectively
Fig. 2 Phylogenetic relationships of 4CLs from
different species

表 1 甘薯 4CL 基因及其预测蛋白信息
Table 1 Information of *Ib4CL* genes and their predicted proteins

基因 Gene	阅读框 ORF/bp	预测的蛋白 Predicted protein			
		大小 Size/aa	类型 Type	分子量 MW/kD	等电点 pI
<i>Ib4CL1</i>	1 632	543	Class I	59.75	5.73
<i>Ib4CL2</i>	1 629	542	Class I	59.27	5.65
<i>Ib4CL3</i>	1 713	570	Class II	62.89	8.11
<i>Ib4CL4</i>	1 743	580	4CL-like	64.76	8.50
<i>Ib4CL5</i>	1 665	554	4CL-like	59.73	7.67
<i>Ib4CL6</i>	1 659	552	4CL-like	60.14	8.96
<i>Ib4CL7</i>	1 719	572	4CL-like	62.61	7.23
<i>Ib4CL8</i>	1 704	567	4CL-like	61.19	5.57
<i>Ib4CL9</i>	1 629	542	4CL-like	59.37	9.14
<i>Ib4CL10</i>	1 665	554	4CL-like	59.76	7.61
<i>Ib4CL11</i>	1 653	550	4CL-like	60.26	9.06

Ib4CL1	MATKTEQA.....GGDIIFSKLDE.....IYIN.....HLPLHSYCEENISAFDRPCLINGSDRRVITYIAEVELTCKRVA	68
Ib4CL2	METKSEQ.....GDVIFRSKLDE.....IYIK.....HLPLHSYCEENISEFNDPCLIDGATERITYIAEVELTSRRVA	66
Ib4CL3	MLSVETQRAELVADSGKTQACS.....SQIHIFRSKLDE.....IPIEN.....QIPLHYCEQNLAEYRDRTCLVSGTGYTSAETHLICRKA	86
Ib4CL4	MATTCEKNHVDSHAPEFINIHKNIFKTLNSENSG.....TFYWYSAQGGYRSIHES.....VSLF.....SHFFLDVVSIEFISHHNGVVSALVDSKSGFSISYFELRSLVNSMA	100
Ib4CL5	MAVPGAVDPFNG.....YCSEKTKFESIRFP.....VSLFADEPLSIAEYASISLRSPATAAATFIIDAATDKRLYSDFLRRTRALA	80
Ib4CL6	MASQITVDSRSG.....FCTSNSTFYSKRKP.....IPLF.....SPESIDVITEISSRAHQGKIIFIDAATGRQLSFSVWRRAVESVA	74
Ib4CL7	MNPESAAQNAEAKGNCYPHWFSVETGKCYSTYIS.....VHLE.....SDPFLDVVSIEFSKHHGGVSALVDSKSAVSIYSSELRSIVESTA	97
Ib4CL8	MSGVDGWLFPP.....IVDEPFVVGRRGGG.....FDSKTIKGYISLQLDEHSKIPTSPLDITATFVLSQEPINISAEKRVALVDSATGRQSVTYAQICRSIASIA	94
Ib4CL9	MEKSGYG.....RGDIYSIRFP.....IVIFRD.....PNESMVSLERNISCFDPCFAIHDAATGQTLLFAKRLKSGVSKVA	68
Ib4CL10	MAVPGAVDPFNG.....YCSEKTKFESIRFP.....VSLFADEPLSIAEYASISLRSPATAAATFIIDAATDKRLYSDFLFRIRALA	80
Ib4CL11	MFRNSNSSSSAMSQ.....FCSHGTGIFCSKRP.....TALFPEITFLTVAGYSLSQLTLFWPDSSTALINSATGHRISYSNTHFRVITTA	82
Ib4CL1	AGLH.KVG.INHGTIMILFNSPEFVFAFLGASYRCVATMANHFIIPAEVIRKVK...ASNAKLIVTLACYVDVREYAWEN....DIKVICDSAPFKGCSHFSESEADERDMP.ETEVEKPD	183
Ib4CL2	AGLD.KQG.IKQRTIMILFNSPEFVFAFLGASFRCAVSTMANHFIITAAEVVKCAK...ASNAKLIVTCACYVDVRVDYARDH....GVKVCADISAPEGCLHFSELAGADERDMP.EVEIAAE	181
Ib4CL3	SGLA.KLG.VKRGDVMITLFCNCFEEVFSEMGASMICAVTITANHFYTKAPFKCMS...ASKARVVITQSVYVNDLKSDSEYEPKIGEDFSVVIIDDPFENCLHFSVLSAEDEEDMPATFIAED	204
Ib4CL4	AGLH.GMG.VSQGVVALILFNSVYFVFIFLGLLSVCAIATATNHSLAPLKKLAFDHCNIALAFATPRVKNIES.ALGIPIVF.IPESDNLDSFPAENSGSVFRKLISTDPKSAFNPKIRQ	222
Ib4CL5	GATRSFESLARNVAFVLSHSLDLTVFVLYFALLSLGVVSPFNHLSRPSLAHMVR...LSKPAVAFATSAASNLPKLEPLGTVIDL.SSD.....ESAMLEGTHSHHSDPDRRLVRQS	192
Ib4CL6	TSLSVDMG.IRKHGVULLSSENFIEFIICLAVMSICAVITITNHNIPFGKGIS...LSKFLVIAETVTELLPLADSNLPVVLIG.GNSSSTPKTNLIRVSLPEEMHRMFPSPQTRFEKRVTDQ	195
Ib4CL7	AGLH.QMD.VSQGVVMILLNSYFVVLVGLSLGVAVVTANHESSLVBPKKCVS...ECNVRIVETILERVKMDL.TLGVQIIG.LPKEHMFNS.ERNLDSAFHKLISCDFKLPKFRKIQQ	214
Ib4CL8	TGLHHGLG.VKRGDVMFVSPNLLYFVVICLAVIKGAILSTNHNIPADIGKVS...LSKGAFLAAEPFVHVLVTPGVETIYLT.LPFDHMS...ALSIELIENECFQDLFCRESQS	209
Ib4CL9	HGMKHLG.VKRNDVVLIFSNSIDFELCLFGATAGCAITATYMHYIVSLSKLIK...DCSPFLIVTVFQGLGVKAFNLFVLVL.GQEITSSISGAFSGITYFSLVKNMSGSLNFDVAVSNGS	188
Ib4CL10	GATRCRFPSLDRNDVAFVLSHSLDLTVFVLYFALLSLGVVSPFNHLSRPSLAHMVR...LSKPAVAFATSAASNLPKLEPLGTVIDL.SSD.....ESAMLEGTHSHHSDPDRRLVRQS	192
Ib4CL11	ASLQTRFG.LSKGTAFVSSNHTFIFILYFSLLSHGVISPNHISIDTETSKRLE...LSKFLVIAEATSAATRLPKLRYGTVIDL.SPE.....LESMTN...SSDCELRRVEVEVNGS	191
Ib4CL1	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...HLYFHQDQVICALFFHINS.NSILLCGLRVAGRILNCKEDINLFLILQIKYKTIIGFVPEIIVLAIARSPVDN...YDLS	301
Ib4CL2	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...NLYFHKDDMCVILHFIKSNISVILCGLRASAILNCKEDIVPFLILQIKYKTIIGFVPEIIVLAIARSPVDN...YDLS	300
Ib4CL3	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...NLYKEDDVCVILHFIKSNISVILCGLRASAILNCKEDIVPFLILQIKYKTIIGFVPEIIVLAIARSPVDN...YDLS	323
Ib4CL4	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...CYEFPATANVYLDVLEHFIKSNISVILCGLRASAILNCKEDIVPFLILQIKYKTIIGFVPEIIVLAIARSPVDN...YDLS	342
Ib4CL5	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...LDDAETQTFICTVPMFINGLAFAATGLLACSTIVLSKSEHDEMESTHXYRASYLEPFLIPALVALINSEKIRK...YDLS	313
Ib4CL6	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...TSSQ...DDFICFCEVMEYINGLAFFGLGFLCFTITTVLNCKEDQFQACLEQTHKXNHIAEPFVILGVYVNRGQ...YDLS	315
Ib4CL7	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...TSCQVMAADQ...DAAGEPQNTFCFLHFFVGLSIIYSLARNSVINGKNERIKTVVDYRVTHMNVPEIILAIARNSVVK...YDLS	335
Ib4CL8	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...TSCQVMAADQ...DAAGEPQNTFCFLHFFVGLSIIYSLARNSVINGKNERIKTVVDYRVTHMNVPEIILAIARNSVVK...YDLS	325
Ib4CL9	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...TSCQVMAADQ...DAAGEPQNTFCFLHFFVGLSIIYSLARNSVINGKNERIKTVVDYRVTHMNVPEIILAIARNSVVK...YDLS	305
Ib4CL10	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...TSCQVMAADQ...DAAGEPQNTFCFLHFFVGLSIIYSLARNSVINGKNERIKTVVDYRVTHMNVPEIILAIARNSVVK...YDLS	313
Ib4CL11	LVVALHSSGTGHLKRVMLTHKGLVTSIAQQVDGENF...TSCQVMAADQ...DAAGEPQNTFCFLHFFVGLSIIYSLARNSVINGKNERIKTVVDYRVTHMNVPEIILAIARNSVVK...YDLS	310
Ib4CL1	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRHQGSGICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	425
Ib4CL2	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRHNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	424
Ib4CL3	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	447
Ib4CL4	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	463
Ib4CL5	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	434
Ib4CL6	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	436
Ib4CL7	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	436
Ib4CL8	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	456
Ib4CL9	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	447
Ib4CL10	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	426
Ib4CL11	SVRTVMSGAFLGKELQDVTVKTEFNARLQCYGCTEAGSVLAMCLAFAKEFFEIRKSGCCTVVRNADMRIVDFTGSSLRGNKSGPICIRGDOIMKYLNDPEAKERTIKRE...WHTGDLGFI	434
Ib4CL1	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKTS.GCSLTIDEVKEFVSQVSVYRIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLEAGPIN...	543
Ib4CL2	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GSVISEDDIRAEVSKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	542
Ib4CL3	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	569
Ib4CL4	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	580
Ib4CL5	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	554
Ib4CL6	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	552
Ib4CL7	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	572
Ib4CL8	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	567
Ib4CL9	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	542
Ib4CL10	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	554
Ib4CL11	LDDELFVDRKELIKYRGQVFPAPLEALLLTHFCISDAATIMKTEQCEGEVAVVVKRS.GDLTEAEVKEIAKQVYIRKIRKRVFVDAVHKEPSGKRLRRNRRARLADGVPA...	550

黑线为 Box I 和 Box II 保守功能域

图 1 甘薯 Ib4C 蛋白的氨基酸序列比对

Two conservative function domains Box I and Box II are marked with blacklines

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of Ib4CL proteins

2.3 Ib4CL 保守基序分析

为了进一步了解 Ib4CLs 蛋白的多样性,利用 MEME 软件检测了蛋白的 20 个不同基序。预测发现,不同的 Ib4CLs 蛋白中包含的基序数量为 13~17 个,所有蛋白都包含基序 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13 和 17(图 3)。其中基序 7 包含保守的 AMP 结合功能域,参与底物的识别,而基序 3 与蛋白稳定性和催化活性有关。此外,结果也显示进化关系较近的蛋白中基序的序列和排列也较为一致。例如 Ib4CL1 和 Ib4CL2 同属于 I 类 4CL,所包含的基序和排列基本一致,与 4CL 类似蛋白的基序差异较大(图 3)。

2.4 Ib4CLs 的表达与花青素和绿原酸积累的相关性分析

为了进一步揭示 Ib4CLs 在甘薯中潜在的生物学功能,分析了甘薯不同组织或发育阶段中 Ib4CLs 的表达与花青素和绿原酸积累的相关性。在所检测的甘薯品种中,绿原酸主要在叶片中积累,不同发育阶段没有明显差异,但都显著高于茎和块根(图 4, A),而花青素主要在幼嫩叶片和茎中积累(图 4, B)。转录组数据显示,Ib4CLs 的表达具有组织和发育阶段的特异性。其中,Ib4CL3 和 Ib4CL10 在叶中的表达显著高于茎和块根,与绿原酸的积累正相关,相关系数均在 0.95 以上;Ib4CL4 和 Ib4CL8 在

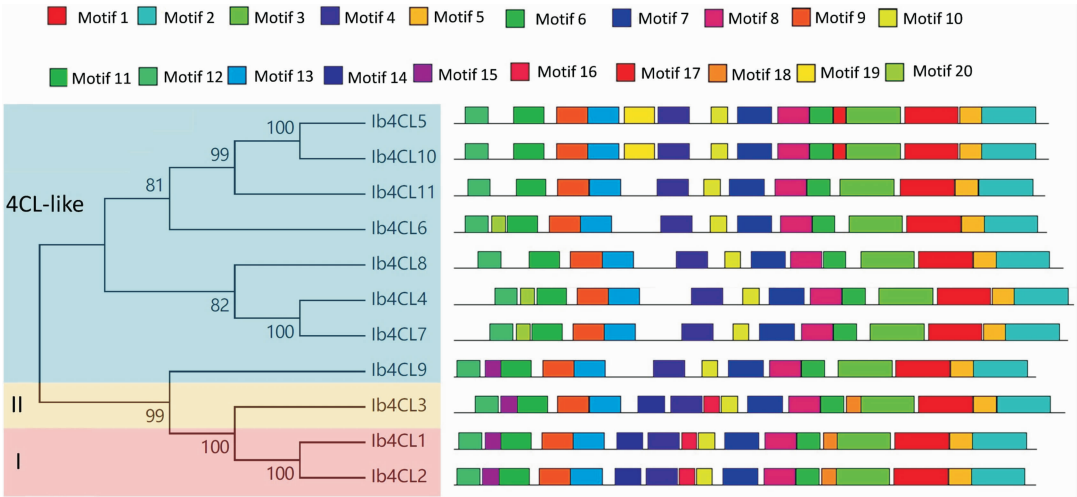
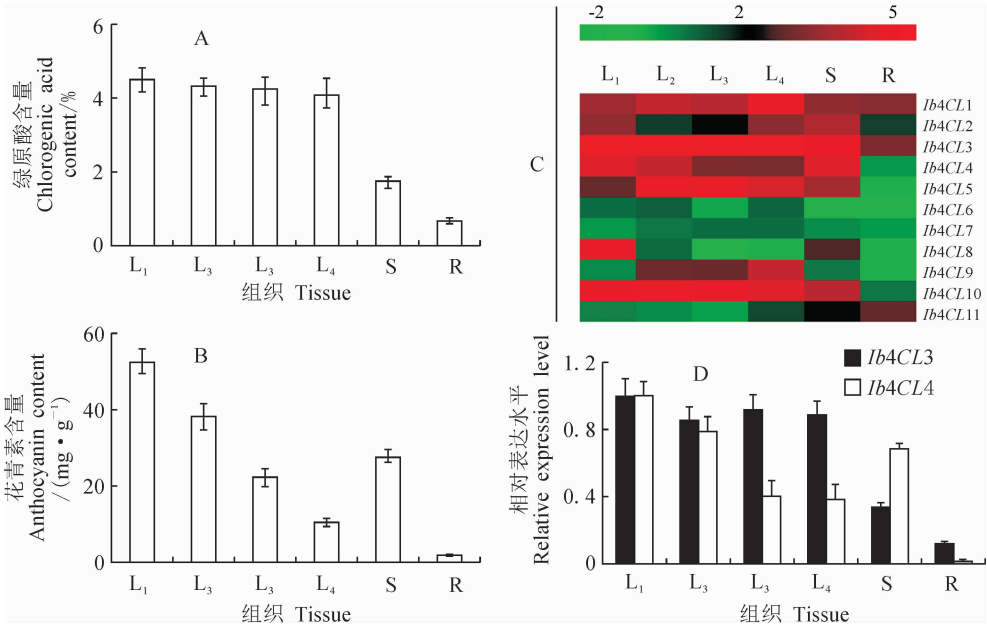


图 3 甘薯 Ib4CLs 的保守基序分布
Fig. 3 Distribution of 20 conserved motifs of Ib4CLs



A. 绿原酸含量;B. 花青素含量;C. 基于 FPKM 值的 *Ib4CLs* 转录表达谱分析;D. *Ib4CL3* 和 *Ib4CL4* 的荧光定量 PCR 分析。
 L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 分别代表甘薯的叶芽、嫩叶、成熟叶和老叶,S 和 R 代表成熟茎和块根

图 4 甘薯 *Ib4CLs* 表达与次生代谢物积累的相关性

A. Chlorogenic acid content; B. Anthocyanin content; C. The transcriptional expression profiles of *Ib4CLs* based on FPKM value; D. Quantitative real-time PCR-analysis of *Ib4CL3* and *Ib4CL4*. L_1 , L_2 , L_3 and L_4 represent buds, young leaves, mature leaves and old leaves of sweet potato, respectively; S and R represent mature stems and tuberous roots

Fig. 4 Correlation analysis between expression of *Ib4CLs* and secondary metabolite accumulation in sweet potato

嫩叶中表达较高,与花青素的积累密切相关,相关系数均在 0.86 以上(图 4,C)。为了验证转录组数据的可靠性,利用荧光定量 PCR 技术对 *Ib4CL3* 和 *Ib4CL4* 的表达进一步进行了分析,取得了和转录组数据基本一致的结果(图 4,D),证实了转录组基因表达数据的可靠性。

3 讨论

4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)催化肉桂酸及其羟基或甲氧基衍生物生成相应的辅酶 A 酯,这些中间产物随后进入苯丙烷类衍生物支路合成途径^[7]。根据蛋白结构特征,4CL 可分为 I 类和 II 类两大

类,其中Ⅰ类蛋白在不同植物中高度保守,而Ⅱ类 4CL 蛋白差异较大^[7, 14]。在拟南芥基因组中含有 4 个 4CL 基因,其中 4CL1、4CL2 和 4CL4 属于Ⅰ类, 4CL3 属于Ⅱ类;此外,还有 9 个 4CL 类似基因 (4CL5~4CL12)^[23]。研究显示,Ⅱ类 4CL 与类黄酮的生物合成密切相关,Ⅰ类 4CL 参与木质素和其他类苯丙素的生物合成,而 4CL 类似基因的确切作用尚不清楚^[7, 23]。本研究根据转录组学数据在甘薯中鉴定 11 个 4CL 基因,这些基因编码蛋白也具有典型 4CL 蛋白结构特征,进化和保守结构基序分析显示 Ib4CL1 和 Ib4CL2 属于Ⅰ类 4CL, Ib4CL3 属于Ⅱ类 4CL, Ib4CL4~Ib4CL11 属于 4CL 类似蛋白。

花青素和绿原酸是甘薯中主要的苯丙烷类代谢产物,它们的积累具有发育阶段和组织的特异性^[1]。本研究发现花青素主要在所检测甘薯品种的嫩叶中积累,随着叶的成熟花青素含量逐渐降低;而绿原酸在叶不同发育阶段含量差异不大,但都显著高于茎和块根中的含量。为了挖掘甘薯花青素和绿原酸合成中相关的 4CL 基因,利用转录组数据和荧光定量 PCR 对 *Ib4CLs* 在不同发育阶段和组织的表达特征进行了分析。结果发现 *Ib4CLs* 表达既表现出在组织及发育阶段上的特异性,又在一定程度上表现出

交叉,表明 *Ib4CLs* 功能上出现了的分化和重叠。其中, *Ib4CL3* 和 *Ib4CL10* 的表达与绿原酸的积累正相关; *Ib4CL4* 和 *Ib4CL8* 的表达与花青素的积累密切相关,说明 *Ib4CL3* 和 *Ib4CL10* 可能参与甘薯绿原酸生物合成, *Ib4CL4* 和 *Ib4CL8* 可能参与花青素的生物合成。值得一提的是 *Ib4CL3* 属于Ⅱ类 4CL 成员,其表达水平和绿原酸积累正相关而和花青素积累没有相关性,与前人的研究并不一致,说明不同物种中 4CL 的功能有所分化。除了 *Ib4CL3* 外, *Ib4CL4*、*Ib4CL8* 和 *Ib4CL10* 都属于 4CL 类似基因。4CL 类似基因的具体功能还不明确,但也不能排除其参与苯丙烷类代谢物生物合成的可能。近年来研究发现,水曲柳 (*Fraxinus mandshurica*) 4CL 类似基因 *Fm4CL-like 1* 表达与木质素积累正相关,过表达 *Fm4CL-like 1* 后的转基因烟草木质素提高了 39.5%^[20];水稻 4CL 类似基因 *OsAAE3* 是木质素生物合成的负调控因子^[24]。这些结果说明, 4CL 类似基因在苯丙烷类代谢物生物合成中同样具有重要的作用。下一步将进一步研究 *Ib4CL3*、*Ib4CL4*、*Ib4CL8* 和 *Ib4CL10* 在甘薯绿原酸和花青素的生物合成中潜在的生物学功能,为甘薯品质改良奠定基础。

参考文献:

[1] TANAKA M, ISHIGURO K, OKI T, *et al.* Functional components in sweetpotato and their genetic improvement[J]. *Breeding Science*, 2017, **67**(1): 52-61.

[2] MOHANRAJ R, SIVASANKAR S. Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam)-A valuable medicinal food: a review[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2014, **17**(7): 733-741.

[3] 王 珍, 李宗芸. 绿原酸的生物活性及甘薯绿原酸研究进展[J]. 江苏师范大学学报(自然科学版), 2017, **35**(3): 30-34, 48.

WANG Z, LI Z Y. Research progress of biological activity of chlorogenic acid and chlorogenic acid in sweetpotato[J]. *Journal of Jiangsu Normal University* (Natural Science Edition), 2017, **35**(3): 30-34, 48.

[4] 徐 靖, 朱红林, 朱家红, 等. 甘薯 *IbGL3* 的克隆和表达分析[J]. 广西植物, 2018, **38**(10): 1 356-1 362.

XU J, ZHU H L, ZHU J H, *et al.* Cloning and expression analysis of *IbGL3* in *Ipomoea batatas* [J]. *Guihaia*, 2018, **38** (10): 1 356-1 362.

[5] 李 霞, 王 欣, 刘亚菊, 等. 甘薯花青苷生物合成调控研究进展[J]. 分子植物育种, 2014, **12**(3): 567-576.

LI X, WANG X, LIU Y J, *et al.* Progress on anthocyanin biosynthesis of sweetpotato [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2014, **12**(3): 567-576.

[6] HU W J, KAWAOKA A, TSAI C J, *et al.* Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**(9): 5 407-5 412.

[7] LAVHALE S G, KALUNKE R M, GIRI A P. Structural, functional and evolutionary diversity of 4-coumarate-CoA ligase in plants[J]. *Planta*, 2018, **248**(5): 1 063-1 078.

[8] ZHANG C H, MA T, LUO W C, *et al.* Identification of 4CL genes in desert poplars and their changes in expression in response to salt stress[J]. *Genes*, 2015, **6**(3): 901-917.

[9] RAGG H, KUHN D N, HAHLBROCK K. Coordinated regulation of 4-coumarate: CoA ligase and phenylalanine Ammonia-lyase mRNAs in cultured plant cells[J]. *The Journal of Bio-*

- logical Chemistry*, 1981, **256**(19): 10 061-10 065.
- [10] ZHAO Y, KUNG S D, DUBE S K. Nucleotide sequence of rice 4-coumarate: CoA ligase gene, 4-CL. 1 [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(20): 6 144.
- [11] UHLMANN A, EBEL J. Molecular cloning and expression of 4-coumarate: coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance response of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack [J]. *Plant Physiology*, 1993, **102** (4): 1 147-1 156.
- [12] VOO K S, WHETTEN R W, O'MALLEY D M, *et al.* 4-coumarate: coenzyme A ligase from loblolly pine xylem (isolation, characterization, and complementary DNA cloning) [J]. *Plant Physiology*, 1995, **108**(1): 85-97.
- [13] LEE D, ELLARD M, WANNER L A, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate: CoA ligase (4CL) gene: stress and developmentally regulated expression and nucleotide sequence of its cDNA [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, **28** (5): 871-884.
- [14] EHLTING J, BUTTNER D, WANG Q, *et al.* Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms [J]. *The Plant Journal*, 1999, **19**(1): 9-20.
- [15] KAJITA S, KATAYAMA Y, OMORI S. Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: coenzyme A ligase [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1996, **37**(7): 957-965.
- [16] LEE D, DOUGLAS C J. Two divergent members of a tobacco 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) gene family (cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins) [J]. *Plant Physiology*, 1996, **112**(1): 193-205.
- [17] WANG C H, YU J, CAI Y X, *et al.* Correction; characterization and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase genes in mulberry [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(6): e0157414. DOI:10.1371/journal.pone.0155814.
- [18] LIU T T, YAO R L, ZHAO Y C, *et al.* Cloning, functional characterization and site-directed mutagenesis of 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) involved in coumarin biosynthesis in *Peucedanum praeruptorum* Dunn [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 4. DOI:10.3389/fpls.2017.00004.
- [19] ZHANG C, ZANG Y, LIU P, *et al.* Characterization, functional analysis and application of 4-coumarate: CoA ligase genes from *Populus trichocarpa* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 302: 92-100.
- [20] CHEN X H, WANG H T, LI X Y, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase 4 (4CL-like 1) from *Fraxinus mandshurica* and its role in abiotic stress tolerance and cell wall synthesis [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 231.
- [21] 刘昌国, 李文芳, 向 宁, 等. 甘薯叶绿原酸测定方法的研究 [J]. 食品科学, 2009, **30**(24): 279-282.
- XIANG C G, LI W F, XIANG N, *et al.* Determination of chlorogenic acid in sweet potato leaves [J]. *Food Science*, 2009, **30**(24): 279-282.
- [22] 刘桂玲, 李海霞, 郭宾会, 等. 不同提取方法对甘薯花青素含量测定的影响 [J]. 中国农学通报, 2007, **23**(4): 91-94.
- LIU G L, LI H X, GUO B H, *et al.* Effects of different extraction methods on anthocyanin content detection in sweet potato [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, **23** (4): 91-94.
- [23] RAES J, ROHDE A, CHRISTENSEN J H, *et al.* Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2003, **133**(3): 1 051-1 071.
- [24] LIU H, GUO Z H, GU F W, *et al.* 4-coumarate-CoA ligase-like gene OsAAE3 negatively mediates the rice blast resistance, floret development and lignin biosynthesis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 7: 2 041. DOI:10.3389/fpls.2016.02041.

(编辑:宋亚珍)