园艺学报，2015，42 (7)：1338－1346.
Acta Horticulturae Sinica

doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0155；http：//www. ahs. ac. cn

青花菜衰老过程中叶绿素降解相关基因的表达分析

樊艳燕，刘玉梅*，李占省，方智远，杨丽梅，庄 木，张扬勇，孙培田
（中国农业科学院蔬菜花卉研究所，北京 100081）

摘 要：以两个耐贮性不同的青花菜高代自交系‘8554’和‘90196’为试验材料，分析其在贮藏过程中叶绿素含量的变化差异，利用实时荧光定量 PCR 技术对叶绿素降解相关基因的表达量进行研究。结果表明，在 4 ℃贮藏期间，‘8554’和‘90196’的叶绿素含量均呈下降趋势，但耐贮藏材料‘8554’下降缓慢，且始终高于不耐贮材料‘90196’。*BoCLH1*（叶绿素酶 1）的表达量变化在上述两种材料中表现一致，均只在初始时检测到较高表达，后期表达量很低。*BoCLH2*（叶绿素酶 2）的表达量在‘8554’中变化较小，在‘90196’中变化较大，且高于‘8554’。*BoPPH*（脱镁叶绿素酶）在‘8554’中一直呈下降趋势，而在‘90196’中贮藏 14 d 时有显著上升过程。*BoPaO*（脱镁叶绿酸 a 加氧酶）的表达量变化在二者中均有急剧增加的过程，但是在‘8554’中出现急剧增加的时期明显滞后于‘90196’。*BoRCCR*（红色叶绿素代谢产物还原酶）在‘90196’中于贮藏 21 d 时出现一个明显的表达高峰，而在‘8554’中未出现。上述结果表明耐贮藏性不同的青花菜叶绿素降解机制不同，其衰老过程中叶绿素含量的变化主要通过 *BoCLH2*、*BoPPH*、*BoPaO* 以及 *BoRCCR* 的表达量变化来调节，*BoCLH1* 主要在青花菜初始衰老中起降解叶绿素的作用。

关键词：青花菜；耐贮藏；叶绿素降解基因；基因表达

中图分类号：S 635　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0513-353X（2015）07-1338-09

Analysis of the Expression of Chlorophyll Degrading Genes During Senescence of Broccoli

FAN Yan-yan，LIU Yu-mei*，LI Zhan-sheng，FANG Zhi-yuan，YANG Li-mei，ZHUANG Mu，ZHANG Yang-yong，and SUN Pei-tian
（*Institute of Vegetables and Flowers*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100081，*China*）

Abstract：Two different storage properties broccoli‘8554’and‘90196’were used for the study. In this work，the changes of chlorophyll content and the relative expression levels of chlorophyll degrading genes in the two high-generation inbred lines were analyzed. The results showed that the chlorophyll contents of the two materials showed decreased during the storage，while‘8554’declined slowly and remained higher compared with‘90196’. The expression of *BoCLH1*（chlorophyllase 1）showed the same

---

收稿日期：2015－02－13；**修回日期**：2015－05－20
基金项目：国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目（CARS-25-A）；国家科技支撑计划课题（2013BAD01B04）；国家高新技术发展计划（‘863’）项目（2012AA100105）；农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目
* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：liuyumei@caas.cn）

behavior in the two materials，it was detected a higher expression before storage，then decreased to a low level during the storage. The expression of *BoCLH2*（chlorophyllase 2）changed slightly in‘8554’, however it changed largely in‘90196’，and the expression level was higher than‘8554’.The expression of *BoPPH*（pheophytinase）declined in‘8554’during the whole storage，but it had a evident increase at the 14th day in‘90196’. The expression of *BoPaO*（pheide a oxygenase）had a sharp increase in both of them，but the day appeared in‘8554’was later than‘90196’. The obvious expression peak of *BoRCCR*（red chlorophyll catabolite reductase）appeared in‘90196’，but it did not appear in‘8554’. Those results indicated that the mechanism of chlorophyll degradation was different in different storage properties broccoli，the changes of chlorophyll content were mainly regulated by the expression levels of *BoCLH2*，*BoPPH*，*BoPaO* and *BoRCCR* in the senescence，and *BoCLH1* was responsible for the degradation of chlorophyll in the initial stage.

Key words：broccoli；storage；chlorophyll degrading gene；gene expression

青花菜因其富含维生素、抗氧化物质、抗癌物质（Nestle，1998）以及健康促进因子（Yuan et al.，2010）而广受人们的青睐，尤其颜色浓绿的青花菜更受消费者的喜爱（Nath et al.，2011）。然而由于青花菜的食用部分是幼嫩的小花蕾与花梗，其呼吸代谢十分旺盛，采后极易衰老，表现为叶绿素降解而使花球黄化，茎和花蕾松软萎蔫，营养物质迅速下降，严重影响其商品价值（高雪，1998；郭李维 等，2011）。

自从 Hendry 等（1987）发表“叶绿素降解——一个生化过程”之后，叶绿素降解代谢研究进入一个崭新的起点。研究表明，叶绿素的分解代谢分为两个阶段。第一个阶段在叶绿体中完成，首先是叶绿素被叶绿素酶（CLH）催化形成脱植基叶绿素，然后由一个金属螯合物脱去镁离子形成脱镁叶绿酸 a（Pheide a），脱镁叶绿酸 a 经过由脱镁叶绿酸 a 加氧酶（Pheide a oxygenase，PaO）和红色叶绿素代谢产物还原酶（Red chlorophyll catabolite reductase，RCCR）催化的两步反应转化成初生荧光叶绿素代谢产物（‘primary’ fluorescent catabolitep，pFCC），最后 pFCC 经过几次修饰之后运输至液泡中（Hörtensteiner，2006）。第二个阶段是经修饰的 pFCC 被液泡中酸性的 pH 环境所诱导而发生非酶学的异构化形成非荧光叶绿素代谢产物（Nonfluorescent chlorophyll catabolites，NCCs），最后转化形成单吡咯降解产物（Hinder et al.，1996；Rodoni et al.，1997；Oberhuber et al.，2003）。

叶绿素酶（CLH）催化叶绿素水解生成脱植基叶绿素和植醇，曾被认为是叶绿素降解代谢的第一步（Matile et al.，1999）。然而近年来研究发现并不是所有的基因都含有转运叶绿体的信号肽，这意味着可能在叶绿体外存在其他叶绿素降解途径，或者还存在叶绿素酶之外的其它酶（Takamiya et al.，2000；Hörtensteiner，2006）。Schelbert 等（2009）发现一种新酶——脱镁叶绿素酶（PPH），已被证实对脱镁叶绿素有专一性，它能使脱镁叶绿素水解成脱镁叶绿酸，因此认为叶绿素早期的代谢过程以第 2 条代谢途径存在较为合理，即叶绿素可以不经过 CLH 的脱植基作用，而是先失去镁离子，然后在 PPH 的作用下生成脱镁叶绿酸，继而进行下面的反应。

有关不同处理对青花菜贮藏过程中叶绿素含量、叶绿素降解相关基因表达变化研究已逐渐深入。研究表明热空气、紫外线照射、1-MCP 等处理均能延缓叶绿素降解，延长青花菜的贮藏寿命（Gong & Mattheis，2003；Costa et al.，2005，2006；Agustin et al.，2011）。经 1-MCP 处理的青花菜其叶绿素降解相关基因（*BoCLH1*、*BoCLH2*、*BoPPH*、*BoPaO*、*BoRCCR*）的表达情况与对照组表现不同，1-MCP 对 *BoCLH1* 的表达无影响，诱导了 *BoCLH2* 更高的表达，抑制了 *BoPPH*、*BoPaO* 和 *BoRCCR*

的表达，但对 *BoRCCR* 的作用较小（Gómez-Lobato et al.，2012a）。Agustin 等（2011）研究发现在青花菜衰老过程中，*BoCLH1* 和 *BoCLH2* 的表达与叶绿素降解无直接相关性，而 *BoPPH* 的表达与叶绿素降解相关。可见叶绿素降解的调控机制极其复杂。

目前，有关在低温贮藏条件下不同耐贮藏性的青花菜在贮藏期间花球衰老过程中叶绿素降解相关基因表达的研究尚未见报道。因此，本研究旨在通过比较两种不同耐贮藏性的青花菜在贮藏期间花球衰老过程中叶绿素降解相关的叶绿素酶、脱镁叶绿素酶、脱镁叶绿酸 a 加氧酶以及红色叶绿素代谢产物还原酶基因的表达差异，以了解不同耐贮藏性青花菜叶绿素降解机制，为深入研究其调控机制及相关基因的功能提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验材料为耐贮藏性存在显著差异的青花菜高代纯合自交系‘8554’和‘90196’。其中‘8554’于 4 ℃贮藏时的货架寿命即黄化 30%时的贮藏天数（Ku & Wills，1999）为 35 d，‘90196’为 20 d。试验材料于 2014 年 4 月 13 日定植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所南圃场露地，设 3 次重复，每重复种植 24 株。花球成熟时，分别于 5 月 30 日采收‘90196’，6 月 3 日采收‘8554’。

1.2　取样

将采收的成熟度一致的花球迅速运送至 4 ℃冷库中预冷处理 3 h，然后去掉基部叶片，用厚度为 0.015 mm 的塑料保鲜薄膜包装单球，每个自交系材料每重复取 5 个大小一致的花球，3 次重复，置于 4 ℃冰箱中贮藏。采收后取样的时间记为贮藏 0 d，之后分别于贮藏 7、14、21、28 d 取样，取样按对角线的方法取花球周边 4 点以及中间部位 1 点的花蕾及小花茎，将 1 个重复内的样品混合后迅速用液氮处理，然后置于 –80 ℃冰箱中保存。

1.3　叶绿素含量测定

称取剪碎混匀的青花菜 0.5 g 于刻度试管中（每个样品 3 次重复），加入体积分数为 95%的乙醇溶液 10 mL，黑暗条件提取 24 h。以 95%乙醇作为空白对照，用分光光度计在波长 665 nm、649 nm 处测定吸光度 A（张怡 等，2011）。计算叶绿素含量：$C_a = 13.95 \times A_{665\ nm} - 6.88 \times A_{649\ nm}$、$C_b = 24.96 \times A_{649\ nm} - 7.32 \times A_{665\ nm}$、$C_{chl} = (C_a + C_b) \times V/m \times 1\,000$。式中：$C_a$、$C_b$ 分别为叶绿素 a 和 b 的浓度，C_{chl} 表示样品中叶绿素总含量（$mg \cdot g^{-1}$）。

1.4　RNA 提取及反转录 cDNA

采用艾德莱 RNApure 超纯总 RNA 提取试剂盒提取上述取样材料总 RNA，采用全式金公司的反转录试剂盒合成 cDNA。反转录体系为：总 RNA 3 μL，锚定的寡聚核苷酸引物 Oligo（dT）$_{18}$（0.5 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$） 1 μL，2 × TS 反应混合液 10 μL，反转录酶 1 μL，基因组 DNA 去除剂 1 μL，用无 RNA 酶的水补足到 20 μL，混合液于 42 ℃孵育 30 min，85 ℃加热 5 min。将反转录得到的 cDNA 于 –20 ℃保存，以备用于实时荧光定量分析。

1.5　实时荧光定量 PCR

采用全式金公司 SYBR Green 荧光染料试剂盒，以 AB 公司 7900HT 为平台对反转录得到的 cDNA

进行实时荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 引物引用 Gómez-Lobato 等（2012a）发表的序列（表 1），由上海生工公司负责合成。实时荧光定量 PCR 反应体系为：模板 2 μL，上下游引物各 0.4 μL，2 × *Trans Script*® Top Green qPCR SuperMix 10 μL，仪器所需专用染料（50 ×） 0.4 μL，用 ddH_2O 补足到 20 μL。反应条件为：94 ℃预变性 30 s，94 ℃变性 5 s，58 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 30 s，进行 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算其相对表达量。

表 1　引物名称及序列

Table 1　The name and sequences of the primers

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列（5′→3′） Nucleotide sequence
内参基因 Reference gene	Action-F	CCAGAGGTCTTGTTCCAGCCATC
	Action-R	GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAC
叶绿素酶 1 Chlorophyllase 1	*BoCLH1*-F	AGACCCATCCATCAAGTTTTCAGC
	BoCLH1-R	AGATTTCGGGATCGGTTCTTATGC
叶绿素酶 2 Chlorophyllase 2	*BoCLH2*-F	AGATGCCTGTTCTAGTTATTGG
	BoCLH2-R	CACGCTGGACCTTGACATTC
脱镁叶绿素酶 Pheophytinase	*BoPPH*-F	AGAGGTTATCGGTGAGCCA
	BoPPH-R	GACGAGATGAGGATGGG
脱镁叶绿酸 a 加氧酶 Pheide a oxygenase	*BoPaO*-F	GCGAAATTCCCGTCCAGAGTCTC
	BoPaO-R	TTATCTCCGCCGTGCTCTTCTTC
红色叶绿素代谢产物还原酶 Red chlorophyll catabolite reductase	*BoRCCR*-F	CCTCCCTCATCGCAAAGACCTAG
	BoRCCR-R	AGCAGAGCGGACAAAGAGAGAC

1.6　统计分析

以上试验均重复测定 3 次，试验数据用 Excel 2007 进行整理分析及数据作图，数据以“平均值 ± 标准差”表示，采用 SAS9.2 软件进行差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　青花菜贮藏过程中叶绿素含量变化

如表 2 所示，在整个贮藏过程中不同贮藏性的青花菜在 4 ℃贮藏时叶绿素含量均呈下降趋势，但耐贮藏的‘8554’的叶绿素含量下降缓慢，且始终高于‘90196’。贮藏至 21 d 时，‘8554’的叶绿素含量比贮藏前（0 d）下降了 44.4%；‘90196’下降了 64.5%。尤其在贮藏 7 ~ 14 d 时，‘8554’的叶绿素含量下降极其缓慢，由 0.26 mg · g^{-1} 下降到 0.25 mg · g^{-1}，只下降了 3.85%，而‘90196’下降了 18.18%。但是至贮藏结束时，二者的叶绿素含量下降速度又非常接近，‘8554’比贮藏前下降了 69.44%，‘90196’下降了 70.97%。

表 2　不同贮藏性青花菜自交系贮藏过程中叶绿素含量变化

Table 2　The changes of chlorophyll content in different storage properties broccoli during storage　mg · g^{-1}

贮藏天数 Days of storage	自交系材料 Inbred lines 8554	90196
0	0.36 ± 0.004	0.31 ± 0.005**
7	0.26 ± 0.007	0.22 ± 0.012**
14	0.25 ± 0.008	0.18 ± 0.005**
21	0.20 ± 0.009	0.11 ± 0.008**
28	0.11 ± 0.003	0.09 ± 0.004**

注：** 表示相同贮藏时间两种材料叶绿素含量在 0.01 水平上差异显著。

Note：** indicates the difference is extremely significant（$P < 0.01$）between the two materials storaged at the same time.

2.2 青花菜贮藏过程中叶绿素酶基因 *BoCLH1* 和 *BoCLH2* 与脱镁叶绿素酶基因 *BoPPH* 的表达变化

以贮藏前（贮藏 0 d）的青花菜为对照，分别计算‘8554’和‘90196’各个基因的相对表达量，其结果见图 1。

叶绿素酶基因 *BoCLH1* 在两个材料中只在贮藏 0 d 时检测到较高表达，之后急剧下降至很低水平。

叶绿素酶基因 *BoCLH2* 在两种材料中的表达量差异显著，在耐贮藏的‘8554’中，贮藏 7 d 时表达量上升为对照的 1.5 倍左右，随后的变化幅度较小，基本维持在对照的 1.3 倍左右；而在不耐贮藏的‘90196’中，其表达量在贮藏 7 d 时上升为对照的 5 倍，贮藏 14 d 有小幅下降但仍为对照的 4.6 倍，贮藏 21 d 又迅速上升为对照的 7.6 倍，贮藏结束时为对照的 5.4 倍。

脱镁叶绿素酶基因 *BoPPH* 的表达量在耐贮藏的‘8554’中，随着贮藏时间的延长不断下降，而在‘90196’中，贮藏 14 d 时有显著上升，之后基本维持在初始水平，且始终显著高于耐贮藏的‘8554’。

这表明 *BoCLH1* 对叶绿素降解的作用较小，而 *BoCLH2* 和 *BoPPH* 的高表达均会加速叶绿素降解。

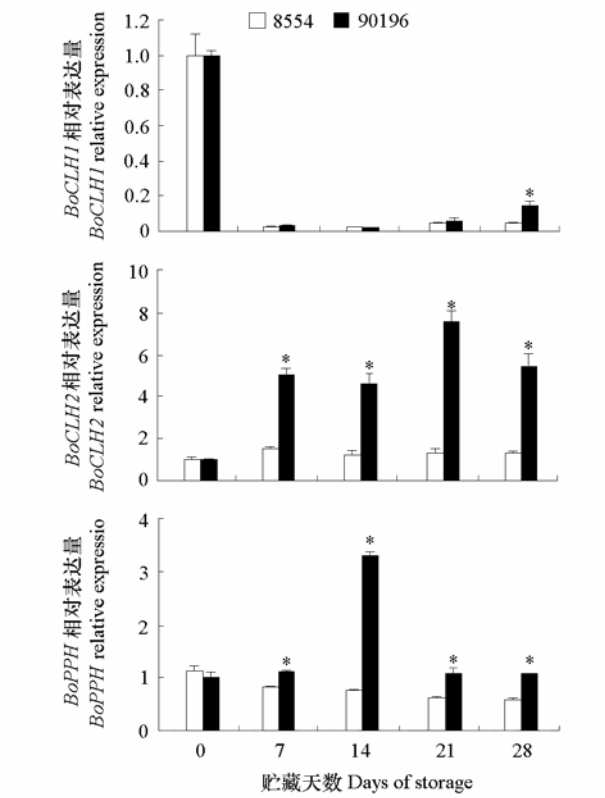

图 1 青花菜贮藏过程中 *BoCLH1*、*BoCLH2* 和 *BoPPH* 基因的表达情况

Fig. 1 Relative expression of *BoCLH1*，*BoCLH2* and *BoPPH* in broccoli florets

2.3 青花菜贮藏过程中脱镁叶绿酸 a 加氧酶基因 *BoPaO* 和红色叶绿素代谢产物还原酶基因 *BoRCCR* 的表达变化

由图 2 可以看出：*BoPaO* 的表达量在两种材料中均有急剧增加过程，但‘8554’出现的时期（贮藏 21 d）明显滞后于‘90196’（贮藏 14 d）。除贮藏 0 d 和 14 d 外，‘90196’的表达量均显著低于‘8554’。

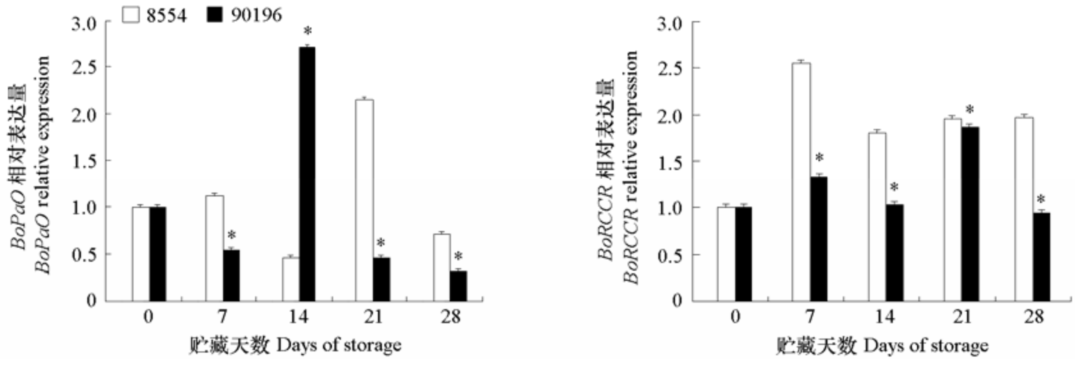

图 2 青花菜贮藏过程中 *BoPaO* 和 *BoRCCR* 基因的表达情况

Fig. 2 Relative expression of *BoPaO* and *BoRCCR* in broccoli florets

BoRCCR 的表达量在贮藏过程中‘8554’始终显著高于‘90196’。贮藏前期（0 ~ 14 d）虽然在两种材料中的变化趋势均为先上升后下降，但是耐贮藏的‘8554’的上升幅度明显大于‘90196’；在贮藏后期表现不同，耐贮藏的‘8554’的 *BoRCCR* 表达量呈小幅上升趋势，而在‘90196’中其表达量在贮藏 21 d 时有显著上升过程，之后又下降。在‘8554’中 *BoPaO* 表达高峰出现滞后表明其叶绿素降解得到延缓，而 *BoRCCR* 的高表达则促使其叶绿素降解在贮藏后期加快。

3　讨论

3.1　叶绿素酶基因 *BoCLH1* 和 *BoCLH2* 与脱镁叶绿素酶基因 *BoPPH*

随着分子生物学的发展，有关叶绿素降解相关基因的研究不断深入，并取得一定的突破性进展。目前的研究普遍认为叶绿素的降解存在两种途径，即叶绿素酶（CLH）降解途径以及脱镁叶绿素酶（PPH）途径（Schelbert et al.，2009）。许凤（2012）研究发现虽然 6-BA、1-MCP、乙醇处理均能延缓青花菜的衰老，但不同处理后 *BoCLH1*、*BoCLH2*、*BoCLH3* 的表达变化却表现不同，因此推测这 3 个基因可能在叶绿素降解中没有起到关键作用。Büchert 等（2011a，2011b）和 Gómez-Lobato 等（2012a）的研究也得出同样的结论，他们发现热空气、UV-C 辐照、白光以及 1-MCP 处理主要对 *BoPPH* 基因表达有更大的影响而不是叶绿素酶基因。本试验结果显示，*BoCLH1* 在两种耐贮性不同的青花菜中均只在贮藏前检测到较高表达，而贮藏过程中表达量很低，说明其可能主要参与青花菜初始衰老时叶绿素的降解，在随后的衰老中作用较小。对 *BoCLH2* 的表达量在两种材料中的变化与相应时期的叶绿素含量变化比较发现，当其升高时，叶绿素含量下降较大，且升高幅度越大，叶绿素降解率越大，而表达量下降时，叶绿素降解速率也降低，说明该基因在叶绿素降解中起重要作用，其表达量的升高预示着衰老的加快。*BoPPH* 的表达量在两种材料中的变化趋势表现不同，在耐贮藏的青花菜中呈下降趋势，表明该基因在耐贮藏材料叶绿素降解中作用较小或者耐贮藏材料体内有抑制该基因表达的机制；不耐贮藏青花菜 *BoPPH* 的表达量在贮藏 14 d 有一个显著上升过程，其他时期则维持在初始表达量，表明该基因可能在特定时期受到某种诱导后起加速叶绿素降解的作用。

3.2　脱镁叶绿酸 a 加氧酶基因 *BoPaO* 和红色叶绿素代谢产物还原酶基因 *BoRCCR*

在由脱镁叶绿酸 a 转化成 pFCC 的过程中，PaO 和 RCCR 起重要的作用，其中 PaO 被认为是叶绿素降解代谢途径的关键酶（Rodoni et al.，1998）。PaO 在叶绿素降解代谢中起重要的调控作用，该酶与叶绿素降解呈明显的正相关，且该酶催化的这一过程是绿色褪去的重要过程（Pružinská et al.，2003；Chung et al.，2006）。研究发现 *PaO* 基因表达与活性在衰老过程中出现很大上调（Pružinská et al.，2005）。Fukasawa 等（2010）研究指出 *BoPaO*、*BoRCCR* 在青花菜黄化前会急剧增加，但是 *BoRCCR* 增加的幅度较小。Gómez-Lobato 等（2012b）也研究发现细胞分裂素、1-MCP 以及热空气处理均能延缓 *BoPaO* 表达量的增加，而对 *BoRCCR* 的表达影响较小。本试验结果表明 *BoPaO* 的表达在两种材料的贮藏过程中均出现急剧增加过程，且相对应的叶绿素含量下降最大，说明该基因表达活性提高会加速叶绿素降解。但是耐贮藏材料‘8554’出现急剧增加的时期（贮藏 21 d）明显滞后于不耐贮藏的‘90196’（贮藏 14 d），且肉眼观测发现，‘8554’开始出现黄化的时间大约在 25 d，35 d 后黄化达 30%；而‘90196’则在贮藏 15 d 发现黄化，并于 20 d 时黄化 30%，说明 *BoPaO* 活性的急剧升高预示着黄化的开始，这与 Fukasawa 等（2010）的研究结果一致。可见，*BoPaO* 在青花菜衰老中起关键作用。*BoRCCR* 的表达量在‘8554’中的变化与叶绿素含量变化情况表现为：当其表达

量降低时，叶绿素含量下降缓慢，而在贮藏后期表达量维持在较高水平时，其叶绿素含量迅速下降；而在‘90196’中其表达量的两次升高过程均伴随着叶绿素降解率的加大，且升高幅度越大，叶绿素降解越快。可见 *BoRCCR* 的高表达预示着衰老的加快，尤其在耐贮藏材料的贮藏后期，较高的表达加速了其叶绿素降解速率。

3.3 叶绿素降解相关基因的表达与耐贮藏性的关系

青花菜衰老的一个重要指标就是叶绿素的降解。研究表明低温（张怡 等，2011）、薄膜包装（Starzyńska et al.，2003）、化学药剂（汪俏梅 等，2004）以及辐照（Aiamla-or et al.，2009）等处理均能延缓叶绿素的降解。李进才和赵习妩（2011）报道与不耐贮藏的品种相比，耐贮藏青花菜具有叶绿素含量下降幅度较小的特性。本研究与之有类似之处，耐贮藏青花菜‘8554’的叶绿素含量下降比‘90196’缓慢，但只表现在贮藏的 0 ~ 21 d，尤其是 7 ~ 14 d，只下降了 3.85%，而贮藏的 21 ~ 18 d 则降解速度加快。叶绿素降解相关基因的表达分析表明，在两种材料的贮藏过程中，除 *BoCLH1* 表达量很低外，其它 4 个基因均有表达，且表达量差异显著。在贮藏的 7 ~ 28 d，*BoCLH2* 和 *BoPPH* 在‘8554’中的表达量始终显著低于在‘90196’中的表达量；而 *BoPaO* 的表达量除贮藏 14 d 时在‘8554’中表达量较低外，其他时期均高于‘90196’中的表达量，*BoRCCR* 在‘8554’中的表达量则始终显著高于在‘90196’中的表达。研究表明，脱植基叶绿素、脱镁叶绿酸 a（杨晓棠 等，2008）、RCCs（Pružinská et al.，2007）等有关中间产物的积累，会抑制叶绿素的降解。因此，耐贮藏的‘8554’在贮藏前期（7 ~ 14 d）表现出叶绿素含量下降缓慢的原因可能是 *BoCLH2*、*BoPPH*、*BoPaO*、*BoRCCR* 表达量降低，使代谢中间产物积累，从而抑制了叶绿素的降解。而贮藏 21 d 开始降解加快则可能是由于 *BoPaO* 及 *BoRCCR* 的高表达量使积累的 RCCs 等有关中间产物迅速降解，从而消除叶绿素代谢的阻碍物。

本试验结果表明在青花菜贮藏过程中两种叶绿素降解途径均存在，但不同贮藏性的青花菜叶绿素降解调控机制不同。耐贮藏青花菜以 *BoCLH2* 控制的 CLH 降解途径为主，而不耐贮藏青花菜中 CLH 降解途径以及 PPH 途径均起重要作用，*BoPPH* 可与 *BoCLH2* 共同加快叶绿素降解。另外，本试验中所用的耐贮藏青花菜材料‘8554’与前人经 1-MCP 处理的青花菜（Gómez-Lobato et al.，2012a）其叶绿素降解相关基因的表达情况有类似之处，说明‘8554’自身延缓衰老的机制与经 1-MCP 处理后延缓衰老的机制可能相同，该结果有待进一步深入研究。

References

Agustin M，Buchert，Pedro M，Civello，Gustavo A，Martínez. 2011. Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytilation during senescence of broccoli. Journal of Plant Physiology，168 (4)：337 – 343.

Aiamla-or S，Yamauchi N，Takino S，Shigyo M. 2009. Effect of UV-A and UV-B irradiation on broccoli（*Brassica oleracea* L. *italica* Group）floret yellowing during storage. Postharvest Biology and Technology，54 (3)：177 – 179.

Büchert A M，Civello P M，Martínez G A. 2011a. Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytilation during senescence of broccoli. Journal of Plant Physiology，168 (4)：337 – 343.

Büchert A M，Civello P M，Martínez G A. 2011b. Effect of hot air，UV-C，white light and modified atmosphere treatments on expression of chlorophyll degrading genes in postharvest broccoli（*Brassica oleracea* L.）florets. Scientia Horticulturae，127 (3)：214 – 219.

Chung D W，Pruzinska A，Hortensteiner S，Ort D R. 2006. The role of pheophorbide a oxygenase expression and activity in the canola green seed problem. Plant Physiol，142：88 – 97.

Costa M L，Civello P M，Chaves A R，Martinez G A. 2005. Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli

（*Brassica oleracea* L. var. *italica*）heads. Journal of the Science of Food and Agriculture，85 (7)：1154–1160.

Costa M L，Vicente A R，Civello P M，Chaves A R，Martínez G A. 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. Postharvest Biology and Technology，39：204–210.

Fukasawa A，Suzuki Y，Terai H，Yamauchi N. 2010. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on activities and gene expression of chlorophyll catabolic enzymes in broccoli florets. Postharvest Biology and Technology，55 (2)：97–102.

Gao Xue. 1998. Research on the technology of storage in broccoli. Journal of Changjiang Vegetables，(11)：36–37. (in Chinese)

高　雪. 1998. 青花菜贮藏技术研究概况. 长江蔬菜，(11)：36–37.

Gómez-Lobato M E，Civello P M，Martínez G A. 2012b. Effects of ethylene，cytokinin and physical treatments on *BoPaO* gene expression of harvested broccoli. Journal of the Science of Food and Agriculture，92 (1)：151–158.

Gómez-Lobato M E，Hasperué J H，Civello P M，Chaves A R，Martínez G A. 2012a. Effect of 1-MCP on the expression of chlorophyll degrading genes during senescence of broccoli（*Brassica oleracea* L.）. Scientia Horticulturae，144：208–211.

Gong Y，Mattheis J P. 2003. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets. Plant Growth Regulation，40 (1)：33–38.

Guo Li-wei，Wang Qing，Yang Na，Gao Li-pu. 2011. Study on changes of nutritional quality in circulation of broccoli. Science and Technology of Food Industry，9 (32)：369–371. (in Chinese)

郭李维，王　清，杨　娜，高丽朴. 2011. 青花菜流通过程中营养品质变化的研究. 食品工业科技，9 (32)：369–371.

Hendry G A，Houghton J D，BrownS B. 1987. The degradation of chlorophyll-a biological enigma. New Phytologist，Tansley Review，11：255–302.

Hinder B，Schellenberg M，Rodoni S，Ginsburg S，Vogt E，Martinoia E，Hörtensteiner S. 1996. How plants dispose of chlorophyll catabolites：Directly energized uptake of tetrapyrrolic break down products into isolated vacuoles. Journal of Biological Chemistry，271 (44)：27233–27236.

Hörtensteiner S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. Annu Rev Plant Biol，57：55–77.

Ku V V V，Wills R B H. 1999. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. Postharvest Biol.Technol.，17：127–132.

Li Jin-cai，Zhao Xi-yuan. 2011. Antioxidative properties of broccoli florets of cultivars with different storability. Journal of Tianjin University，44 (11)：1014–1018. (in Chinese)

李进才，赵习妧. 2011. 不同贮藏性青花菜花球的抗氧化特性. 天津大学学报，44 (11)：1014–1018.

Matile P，Hortensteiner S，Thomas H. 1999. Chlorophyll degradation. Annual review of plant biology，50 (1)：67–95.

Nath A，Bagchi B，Misra L K，Deka B C. 2011. Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage. Food Chemistry，127 (4)：1510–1514.

Nestle M. 1998. Broccoli sprouts in cancer prevention. Nutrition Reviews，56：127–130.

Oberhuber M，Berghold J，Breuker K，Hörtensteiner S，Kräutler B. 2003. Breakdown of chlorophyll：A nonenzymatic reaction accounts for the formation of the colorless“nonfluorescent”chlorophyll catabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences，100 (12)：6910–6915.

Pružinská A，Anner G，Aubry S，Anders I，Moser S，Müller T，Hörtensteiner S. 2005. Chlorophyll break down in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. Plant Physiology，139 (1)：52–63.

Pružinská A，Tanner G，Anders I，Roca M，Hortensteiner S. 2003. Chlorophyll breakdown：Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron sulfur protein，encoded by the accelerated cell death gene. Proceedings of the National Academy of Sciences，100 (25)：15259–15264.

Pružinská A，Anders I，Aubry S，Schenk N，Tapernoux-Lüthi E，Müller T，Hörtensteiner S. 2007. *In vivo* participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown. The Plant Cell Online，19 (1)：369–387.

Rodoni S，Muhlecker W，Anderl M，Kräutler B，Moser D，Thomas H，Matile P，Hortensteineret S. 1997. Chlorophyll breakdown in senescent chloroplasts：Cleavage of pheophorbide a in two enzymic steps. Plant Physiol，115 (2)：669–676.

Rodoni S，Schellenberg M，Matile P. 1998. Chloroplast breakdown in senescing arley leaves as correlated with phaeophorbide a oxygenase activity. Plant Physiol，152：139–144.

Schelbert S，Aubry S，Burla B，Agne B，Kessler F，Krupinska K，Hörtensteiner S. 2009. Pheophytin pheophorbide hydrolase（pheophytinase）is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. Plant Cell，21 (3)：767 – 785.

Starzyńska A，Leja M，Mareczek A. 2003. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage，related to temperature and packaging. Plant Science，165 (6)：1387 – 1395.

Takamiya K I，Tsuchiya T，Ohta H. 2000. Degradation pathway(s) of chlorophyll：What has gene cloning revealed. Trends in Plant Science，5 (10)：426 – 431.

Wang Qiao-mei，Guo De-ping，Kyikyi Win，Yuan Jing. 2004. Effect of 1-MCP on delaying the senescence of broccoli and its possible physiological mechanism. Acta Horticulturae Sinica，31 (2)：205 – 209. (in Chinese)

汪俏梅，郭得平，Kyikyi Win，袁　晶. 2004. 1 – 甲基环丙烯延缓青花菜衰老的效应及机理. 园艺学报，31 (2)：205 – 209.

Xu Feng. 2012. Study on effect and mechanism of postharvest treatments on delaying senescence of broccoli florets[Ph. D. Dissertation]. Nanjing：Nanjing Agricultural University. (in Chinese)

许　凤. 2012. 采后处理对延缓青花菜衰老的作用及其机理研究[博士论文]. 南京：南京农业大学.

Yang Xiao-tang，Zhang Zhao-qi，Xu Lan-ying，Pang Xue-qun. 2008. Plant chlorophyll degradation. Plant Physiology Communications，44 (1)：7 – 13. (in Chinese)

杨晓棠，张昭其，徐兰英，庞学群. 2008. 植物叶绿素的降解. 植物生理学通讯，44 (1)：7 – 13.

Yuan G，Sun B，Yuan J，Wang Q. 2010. Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life，visual quality，antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets. Food Chemistry，118：774 – 781.

Zhang Yi，Guan Wen-qiang，Zhang Na，Liu Li-li，Yan Rui-xiang，Sun De-ling. 2011. Changes of antioxidant activity，compounds and quality of broccoli florets during different temperatures. Food Research And Development，32 (8)：156 – 160. (in Chinese)

张　怡，关文强，张　娜，刘莉莉，阎瑞香，孙德岭. 2011. 温度对西兰花抗氧化活性及其品质指标影响. 食品研究与开发，32 (8)：156 – 160.