

# 胡萝卜中类胡萝卜素积累与主要合成基因转录水平相关性分析

王 慧, 欧承刚, 庄飞云\*, 赵志伟, 马振国

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

**摘 要:** 以胡萝卜白色野生资源‘松滋野生’和欧洲橘色栽培品种‘Amsterdam’及其回交重组自交系(BILs)中的5个不同根色株系为试材, 研究其根和叶中 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素合成途径分支点上 $LCYE$ 、 $LCYB1$ 、 $CHXE$ 、 $CHXB1$ 基因转录表达与类胡萝卜素含量之间的关系。cDNA测序结果表明, 松滋野生和 Amsterdam 之间存在多个 SNP 变异位点。类胡萝卜素测定发现, Amsterdam 叶中 $\alpha$ -胡萝卜素含量( $87.3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )显著高于松滋野生( $2.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 而其 $\beta$ -胡萝卜素含量( $122.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )显著低于松滋野生( $237.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )。qRT-PCR 结果显示,  $LCYE$ 、 $LCYB1$ 、 $CHXE$  和  $CHXB1$  在不同材料的根和叶中均表达, 其中  $LCYE$  与根中 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素及总类胡萝卜素含量之间呈显著正相关; 与叶中叶黄素和总类胡萝卜素含量之间呈显著负相关, 说明  $LCYE$  对类胡萝卜素积累起着关键性作用。

**关键词:** 胡萝卜; 类胡萝卜素; 积累; 转录表达

**中图分类号:** S 631.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 12-2513-08

## Relationship of Carotenoid Accumulation and Transcript of Main Genes in Carotenoid Biosynthesis in Carrot

WANG Hui, OU Cheng-gang, ZHUANG Fei-yun\*, ZHAO Zhi-wei, and MA Zhen-guo

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The relationship of carotenoid content and expression level of  $LCYE$ ,  $LCYB1$ ,  $CHXE$  and  $CHXB1$  in the  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene branches of carrot root and leaf was investigated with carrot wild species Songzi, orange cultivar Amsterdam and their five backcross inbred lines (BILs) with different color. cDNA sequences analysis revealed several SNP of the four genes exist between Songzi and Amsterdam. Amsterdam leaves had higher levels of  $\alpha$ -carotene ( $87.3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) than Songzi leaves ( $2.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), but the content of  $\beta$ -carotene was higher in Songzi ( $237.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) than in Amsterdam ( $122.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). qRT-PCR results showed that  $LCYE$ ,  $LCYB1$ ,  $CHXE$  and  $CHXB1$  were functional in roots and leaves, and that the expression of  $LCYE$  was positively correlated with  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and total carotenoid content in roots, and negatively correlated with lutein and carotenoid content in leaves, which indicated  $LCYE$  playing a key role in carotenoids accumulation.

**Key words:** carrot; carotenoid; accumulation; transcript

收稿日期: 2014-06-13; 修回日期: 2014-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101543, 31272162); 国家科技支撑计划项目(2013BAD01B04); 中国农业科学院创新工程项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhuangfeiyun@caas.cn)

类胡萝卜素是植物中广泛存在的天然色素,参与植物光合作用,赋予植株器官丰富的颜色,是植物激素(脱落酸、独角金内酯)的前体物质,对植物生长和发育以及细胞膜的稳定性起着关键性作用(van Norman & Sieburth, 2007; Xie et al., 2010)。类胡萝卜素也是维生素 A 和抗氧化剂的主要来源,培育富含  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素的作物品种成为育种的一个重要目标,但多数作物食用器官中的  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素含量很低(Bai et al., 2011)。植物类胡萝卜素是在质体中通过类异戊二烯途径合成的,包括缩合、脱氢、环化、羟基化及环氧化等一系列反应,番茄红素环化形成  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素合成的重要分支点(Park et al., 2002)。在  $\alpha$ -胡萝卜素分支途径中,由番茄红素  $\epsilon$ -环化酶(LCYE)和番茄红素  $\beta$ -环化酶(LCYB)共同催化  $\alpha$ -胡萝卜素的合成,再由  $\epsilon$ -环羟化酶(CHXE)和  $\beta$ -环羟化酶(CHXB)转变为叶黄素;在  $\beta$ -胡萝卜素分支途径中,由 LCYB 催化  $\beta$ -胡萝卜素的合成,再由 CHXB 转变成玉米黄质(Park et al., 2002)。通过转基因技术改造作物中类胡萝卜素合成途径关键酶基因,已实现食用器官类胡萝卜素含量大幅提高,例如“黄金水稻”(Ye et al., 2000),还有番茄、马铃薯等(Bai et al., 2011),但植物中  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素积累的分子机理仍不清楚。

胡萝卜是富含  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素的蔬菜作物之一,橘色类型中类胡萝卜素含量能达到  $2\,000 \sim 4\,000 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$ ,可作为类胡萝卜素合成研究的模式植物(Just et al., 2007; Clotault et al., 2008)。目前许多研究主要关注胡萝卜肉质根(Just et al., 2007; Cavagnaro et al., 2011),但叶中类胡萝卜素合成机理研究报道较少。在已发表的胡萝卜遗传图谱中有 22 个相关合成酶基因的报道,但这些基因与胡萝卜根色性状之间并没有建立连锁关系(Santos & Simon, 2002; Just et al., 2007, 2009)。通过对不同品种资源类胡萝卜素含量与合成关键基因相关性分析发现,  $\zeta$ -胡萝卜素脱氢酶基因(ZDS)的表达水平与红色类型根中番茄红素积累相关,LCYE 的表达则与黄色类型根中的叶黄素积累相关,但没有发现与橘色类型根中  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素积累相关的基因(Clotault et al., 2008)。现代测序发现不同胡萝卜种质资源中类胡萝卜素合成基因存在 SNP 位点变异(Clotault et al., 2012; Iorizzo et al., 2013),通过对基因选择偏差分析发现番茄红素分支点的下游基因 LCYB、LCYE、CHXE 和玉米黄素环氧酶基因(ZEP)的选择压力显著高于上游基因异戊烯基焦磷酸异构酶基因(IPI)、八氢番茄红素脱氢酶基因(PDS)和类胡萝卜素异构酶基因(CRTISO),其中 LCYB1 和 LCYE 是平衡选择的目标基因(Clotault et al., 2012)。但胡萝卜叶和根中类胡萝卜素合成与积累之间是否存在相似性仍是个未知问题。

本研究基于前期转录组测序结果,以胡萝卜白色野生资源‘松滋野生’(Ws)、橘色栽培品种‘Amsterdam’(Af)及其回交重组自交系(Backcross inbred lines, BILs)为试材,着重分析根和叶中  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素合成途径分支点上 LCYE、LCYB1、CHXE 和 CHXB1 基因转录表达与类胡萝卜素含量之间的关系,为进一步研究胡萝卜中类胡萝卜素的合成和积累机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为胡萝卜白色野生资源‘松滋野生’(Ws),欧洲橘色栽培品种‘Amsterdam’(Af),及以两者为亲本, Af 为回交亲本构建的回交重组自交系(BILs; BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>代)中的 E09041(白色肉质根)、E52081(黄色肉质根)、E04041(橘黄色肉质根)、E35073(浅橘色肉质根)、E2003(橘色肉质根)。各材料于 2013 年 8 月初在中国农业科学院南口试验基地进行露地播种,10 月底对植株的根和叶进行取样。每份材料取 5 个植株,重复 3 次,液氮速冻后置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中贮存待用。

## 1.2 基因RT-PCR

根据转录组测序以及 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中注释的 *LCYE* (DQ192192)、*LCYBI* (DQ192190)、*CHXE* (DQ192196)、*CHXB1* (DQ192193) 的 cDNA 序列, 分别在 5'UTR 和 3'UTR 区设计特异性引物 (表 1)。使用植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生物技术公司) 提取样品总 RNA, 采用 PrimeScript<sup>®</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 公司) 反转录合成 cDNA 第一链。利用合成的 cDNA 第 1 链为模板, 使用 *Ex Taq* HS 酶 (TaKaRa 公司) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 20  $\mu\text{L}$ : cDNA ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 0.8  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  PCR buffer 2  $\mu\text{L}$ , dNTP mixture ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ , *Ex Taq* HS 酶 ( $2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 13.4  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  (*LCYE*、*LCYBI*) 或 56  $^{\circ}\text{C}$  (*CHXE*、*CHXB1*) 退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 4 min, 35 个循环后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 连接 pMD-18T 载体 (TaKaRa 公司), 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞 (天根生物技术公司), 筛选阳性克隆, 送北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。利用 DNAMAN 分析工具和 CLUSTALW 网站 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 进行序列比对。

## 1.3 类胡萝卜素含量测定

分别对根和叶样品进行冷冻抽干, 称取 0.200 g 干样, 使用 1:1 的丙酮和石油醚 (含 0.1% 二丁基羟基甲苯, BHT) 提取类胡萝卜素, 重复 2 次。采用超高效液相色谱 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC, Waters 公司, 美国) 检测类胡萝卜素含量。UPLC 检测柱型: UPLC BEH C18 ( $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ , 1.7  $\mu\text{m}$ ; Waters 公司, 美国), 检测波长 450 nm, 流动相为丙酮: 乙腈 (1:1), 流速为  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素及玉米黄质的标样均购自美国 Sigma 公司。总类胡萝卜素含量为  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄质之和。

## 1.4 基因相对表达量分析

提取样品总 RNA, 并反转录成 cDNA。根据 *LCYE*、*LCYBI*、*CHXE* 和 *CHXB1* 的 cDNA 序列设计荧光引物 (表 1), 选取 *Ubiquitin* 为内参基因 (Fuentes et al., 2012)。以 cDNA ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 为模板, 在 StepOnePlus Real-time PCR system (Applied Biosystems, CA) 实时定量 PCR 仪上, 使用 SYBR<sup>®</sup> Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> II (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行分析, 重复 3 次。PCR 反应体系: cDNA ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 0.8  $\mu\text{L}$ , SYBR Green Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , ROX 0.4  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 个循环, 反应结束后增加 60~95  $^{\circ}\text{C}$  溶解曲线分析。试验结果采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。

表 1 类胡萝卜素合成相关基因 RT-PCR 及 Real-time qPCR 分析引物  
Table 1 The primers of carotenoids biosynthesis genes for RT-PCR and Real-time qPCR analysis

用途 Use	基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	片段/bp Size of the fragment
RT-PCR	<i>LCYE</i>	ACCGTAACTAAAACACACAT	ATAACTTCTGAACCGAGCA	1 682
	<i>LCYBI</i>	GTCTGTATCTACCTCCAATC	TAACACAATGAGTCAAAATC	1 795
	<i>CHXE</i>	GAGTTACAAACTCCCAA	CATCATCCACATTCTATAC	1 712
	<i>CHXB1</i>	TCTCACTCTCTTCTCCACC	CCTTTACGTTCTCAITCCTA	1 102
qPCR	<i>LCYE</i>	AAAGGAAACGCCAGAGAGC	CGACTGAGGATAGAGAAGAACC	153
	<i>LCYBI</i>	AGTGGGAATTGGCGGTACAG	GCAGCTAGAGTTCTTGCTACCATATATC	72
	<i>CHXE</i>	TGGTTCCTTCGCTTCACAAG	TTCTCCATATTCACAGCAGAG	128
	<i>CHXB1</i>	CTAAGGAAGTTGAGGATGTGGG	TATGATCGGCTAGCTCTGGAAG	94
参照基因 Reference gene	<i>Ubiquitin</i>	ACCTCGTTCTGCGTCTCC	GCCACTCTCATCCACCTTATAG	134

1.5 数据分析

采用 DPS 软件对各试材根、叶中类胡萝卜素含量及各基因转录水平进行邓肯氏多重比较。类胡萝卜素含量与基因表达量之间相关性采用 SAS 9.0 软件中 Pearson 方法分析 (Li et al., 2008)。

2 结果与分析

2.1 基因的RT-PCR

RT-PCR 显示所有材料均扩增出了番茄红素下游分支途径中 *LCYE*、*LCYBI*、*CHXE* 和 *CHXB1* 的 cDNA 片段 (图 1)。测序结果表明橘色栽培品种 Af 的 4 个基因与 NCBI 公布的序列一致, 但白色野生资源 Ws 中存在多个 SNP 变异位点。*LCYE* 的 cDNA 序列长为 1 682 bp, Ws 中存在 1 个变异位点;*LCYBI* 的 cDNA 序列长为 1 795 bp, Ws 中存在 14 个变异位点;*CHXE* 的 cDNA 序列长为 1 712 bp, Ws 中存在 8 个变异位点;*CHXB1* 的 cDNA 序列长为 1 102 bp, Ws 中存在 21 个变异位点 (表 2)。

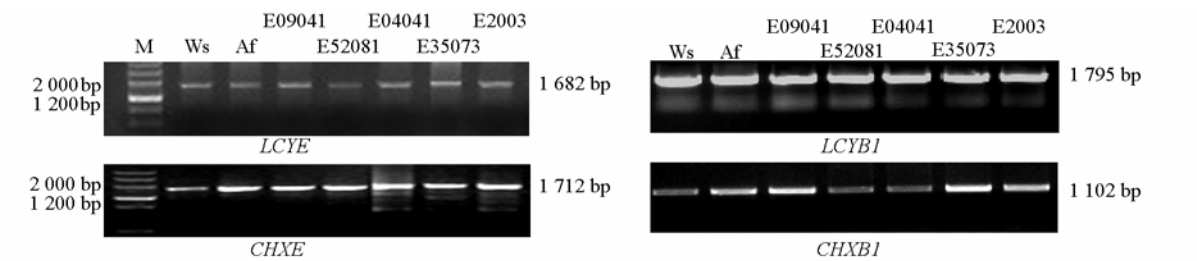


图 1 RT-PCR 扩增产物  
Fig. 1 RT-PCR amplifications

表 2 Ws、Af 及 NCBI 中 *LCYE*、*LCYBI*、*CHXE* 和 *CHXB1* cDNA 编码区序列的变异碱基  
Table 2 Variable nucleotides of cDNA coding sequences of *LCYE*, *LCYBI*, *CHXE* and *CHXB1* among Ws, Af and deposited sequences in NCBI

基因 Gene	变异碱基位点 Site of variable nucleotide	变异碱基 Variable nucleotide			基因 Gene	变异碱基位点 Site of variable nucleotide	变异碱基 Variable nucleotide		
		Ws	Af	NCBI			Ws	Af	NCBI
<i>LCYE</i>	291	A	T	T	<i>CHXB1</i>	96	T	A	A
<i>LCYBI</i>	624	T	C	C		113	G	A	A
	628	C	T	T		117	A	G	G
	645	C	T	T		121	A	C	C
	1 026	G	A	A		123	C	T	T
	1 053	A	G	G		188	T	G	G
	1 086	T	C	C		251	C	G	G
	1 123	A	C	C		267	A	G	G
	1 146	C	T	T		300	C	T	T
	1 153	A	G	G		318	G	A	A
	1 201	A	G	G		354	A	C	C
	1 212	T	C	C		366	A	G	G
	1 248	C	A	A		400	T	C	C
	1 353	A	G	G		537	A	G	G
	1 449	A	T	T		585	A	T	T
<i>CHXE</i>	10	T	C	C		591	A	T	T
	297	C	T	T		672	G	A	A
	327	C	T	T		699	A	C	C
	363	T	C	C		727	C	G	G
	621	A	G	G		741	T	C	C
	738	A	C	C		744	T	C	C
	1 246	C	G	G					
	1 305	C	T	T					

## 2.2 根和叶中类胡萝卜素含量差异分析

虽然 Ws 根中没有检测出类胡萝卜素, 但其叶中的总类胡萝卜素含量显著高于 Af (图 2), 而且两者叶中的  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素含量存在显著差异, 其中 Ws 中  $\alpha$ -胡萝卜素含量仅为  $2.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\beta$ -胡萝卜素含量为  $237.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 而 Af 为  $87.3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\beta$ -胡萝卜素含量为  $122.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。Ws 叶中的叶黄素和玉米黄质含量显著高于 Af。白色 E09041 根中只检测出了微量叶黄素, 但其叶中类胡萝卜素含量和组分与 Af 相似。黄色 E52081 根中检测出了微量  $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄质, 但其叶中类胡萝卜素含量和组分更接近于 Ws。橘黄色 E04041 根中叶黄素含量最高, 为  $18.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 显著高于 Ws 和 Af, 其  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素和玉米黄质含量分别是 3.5、19.9 和  $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 叶中的总类胡萝卜素含量与 Af 相当, 但其组分则与 Ws 相似。浅橘色 E35073 根中  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素含量与 E04041 相当, 而其叶黄素含量只有  $2.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 叶中的总类胡萝卜素含量最高, 达到  $642.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 其组分与 Af 相似。橘色 E2003 根中总类胡萝卜素含量低于 Af, 但叶中含量则高于 Af, 根和叶中的组分均与 Af 相似。

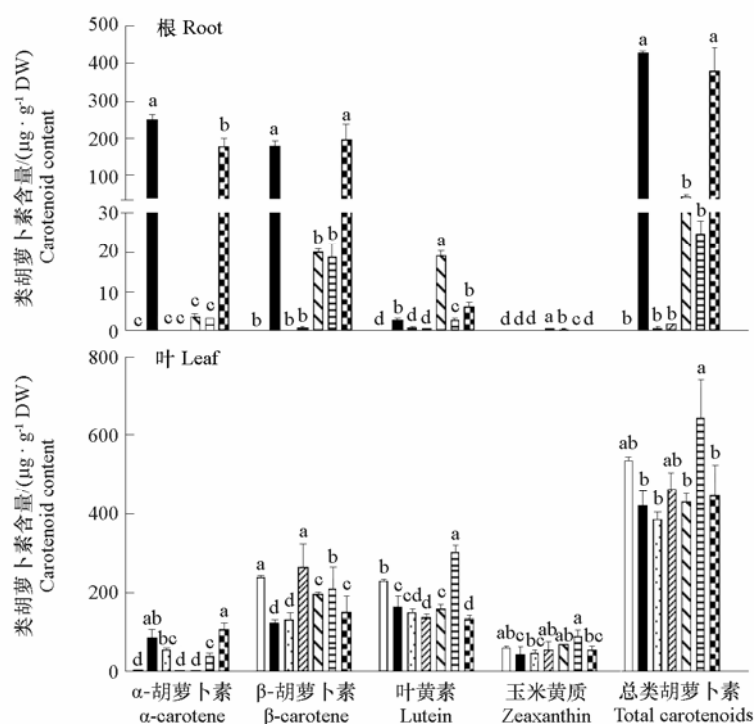


图 2 试材根和叶中类胡萝卜素含量比较

邓肯氏显著性检验, 小写字母代表 0.05 显著性水平。下同。

Fig. 2 Comparison of carotenoid content in root and leaf

Duncan's multiple test, different letter indicated the significant differences of 0.05 level. The same below.

## 2.3 根和叶中类胡萝卜素合成基因的表达量分析

*LCYE*、*LCYB1*、*CHXE* 和 *CHXB1* 在不同材料的根和叶中均有表达, 但相对表达量差异显著 (图 3)。Ws 根中这 4 个基因的表达量最低, 但叶中 *LCYE*、*LCYB1* 和 *CHXB1* 表达量最高, 而 *CHXE* 则最低。Af 根中 4 个基因均显著高表达, 其中 *LCYE* 为 Ws 的 136 倍, 而 *LCYB1* 只有 3.6 倍, 叶中 *LCYE*、*LCYB1* 和 *CHXB1* 表达量相对 Ws 较低, 而 *CHXE* 则是 Ws 的 3.3 倍。E09041 根中 4 个基因表达量与 Ws 相似, 但在叶中则与 Af 相似。E52081 根中 4 个基因均显著表达, 但在叶中 *LCYE*、*LCYB1*

和 *CHXB1* 表达量最低, 而 *CHXE* 介于 *Ws* 和 *Af* 之间。E04041 和 E2003 的 4 个基因表达量相似, 在根中 E04041 均低于 E2003, 在叶中则反之。E35073 根中 *CHXE* 的表达量最高, 为 *Ws* 的 7.5 倍, 而 *CHXB1* 表达量相对较低, 只有 *Ws* 的 2.7 倍, 但在叶中 4 个基因的表达量与 *Af* 较为相似。

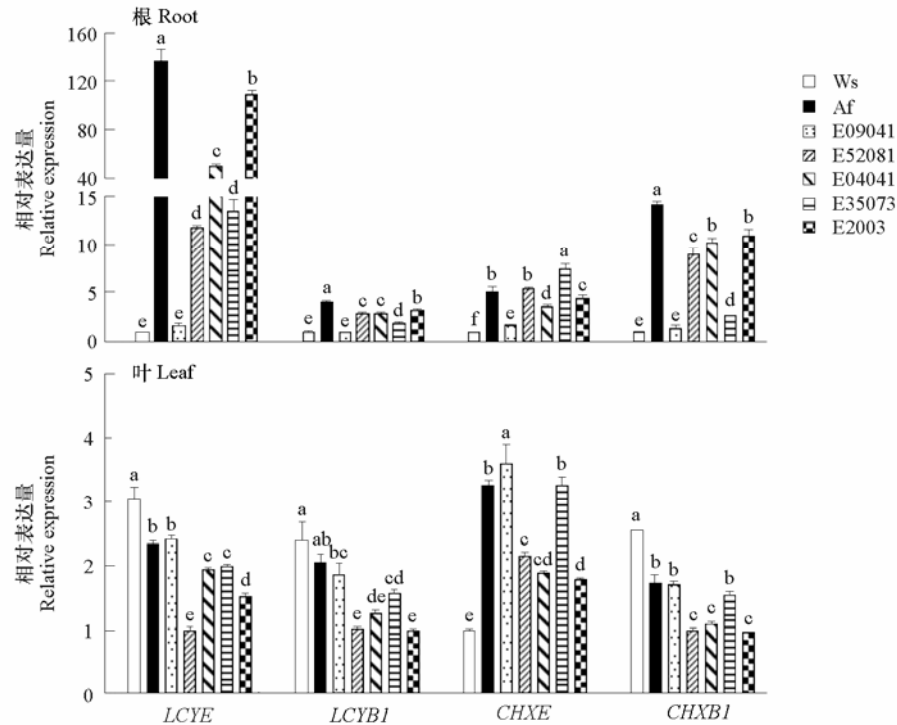


图3 试材根和叶中相关基因的相对表达量分析  
Fig. 3 Relative expression analysis of carotenoid biosynthesis genes in root and leaf

2.4 根和叶中类胡萝卜素含量与基因表达量相关性分析

从表 3 可看出, 在根中, *LCYE* 表达量与  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素含量呈正相关, 相关系数分别是 0.96、0.95 和 0.97; 但在叶中, *LCYE* 表达量与叶黄素、总类胡萝卜素含量之间呈负相关, 相关系数分别为 -0.80、-0.77。

表3 叶和根中类胡萝卜素含量与基因相对表达量相关性分析  
Table 3 Pearson correlation analysis between carotenoid content and gene expression in leaf and root

器官 Organ	组分 Component	相关系数 <i>r</i>			
		<i>LCYE</i>	<i>LCYB1</i>	<i>CHXE</i>	<i>CHXB1</i>
根 Root	$\alpha$ -胡萝卜素 $\alpha$ -carotene	0.96**	0.74	0.23	0.74
	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	0.95**	0.73	0.30	0.72
	叶黄素 Lutein	0.37	0.44	0.06	0.50
	玉米黄质 Zeaxanthin	-0.29	0.24	0.28	0.24
	总类胡萝卜素 Total carotenoid	0.97**	0.76	0.25	0.75
叶片 Leaf	$\alpha$ -胡萝卜素 $\alpha$ -carotene	0.06	-0.09	0.44	-0.19
	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	-0.05	-0.12	-0.30	-0.05
	叶黄素 Lutein	-0.80*	-0.69	-0.09	-0.58
	玉米黄质 Zeaxanthin	0.15	0.26	-0.37	0.38
	总类胡萝卜素 Total carotenoid	-0.77*	-0.72	-0.08	-0.62

注: \* 表示 0.05 显著水平, \*\* 表示 0.01 极显著水平。  
Note: \* Correlation is significant at the 0.05 level, \*\* Correlation is significant at the 0.01 level.

### 3 讨论

胡萝卜肉质根颜色丰富, 不同根色性状与其类胡萝卜素组分和含量有密切的关系, 如白色类型只含有微量类胡萝卜素, 黄色类型主要含有叶黄素和玉米黄质等, 红色类型主要含有番茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素, 橘色类型含有大量  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素 (Grassmann et al., 2007)。而且根色遗传极为复杂, 已报道了多个有关的性状位点, 如 *A* ( $\alpha$ -胡萝卜素积累), *L<sub>1</sub>* 和 *L<sub>2</sub>* (番茄红素积累), *Io*、*O* 和 *y* (木质部颜色), *Y*、*Y<sub>1</sub>* 和 *Y<sub>2</sub>* ( $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素的分布和含量), *P<sub>1</sub>* 和 *P<sub>2</sub>* (花青素积累) 等 (Buishand & Gabelman, 1979; Bradeen & Simon, 1998; Simon, 2000), 但这些位点并没有与类胡萝卜素合成基因之间确立连锁关系 (Santos & Simon, 2002; Just et al., 2007, 2009)。本研究中 BILs 群体根色变异极为广泛, E09041、E52081、E04041、E35073 和 E2003 为 5 个不同根色代表性的株系, 其类胡萝卜素组分和含量截然不同, 进一步验证了胡萝卜根色遗传与类胡萝卜素合成之间存在不同的调控机制。同时还发现白色野生资源 Ws 和橘色栽培品种 Af 叶片中的类胡萝卜素组分和含量差异极大, 特别是 Ws 叶中  $\alpha$ -胡萝卜素含量仅为  $2.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 不到总类胡萝卜素含量的 1%, 与其它作物叶片中的组分较为相似 (Britton, 1993), 但 Af 中的  $\alpha$ -胡萝卜素含量达到  $87.3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 占到总类胡萝卜素含量的 21%, 出现了一种倾向  $\alpha$ -胡萝卜素合成分支途径的变异现象, 而且这一现象与地下部根色的变化似乎没有关联, 可以遗传给后代, E52081 和 E04041 与 Ws 相似, 而 E09041、E35073 和 E2003 则与 Af 相似, 这在其它植物中尚未见报道。

在不同基因型玉米中, *LCYE* 和 *CHXB1* 基因的多态性是造成籽粒  $\beta$ -胡萝卜素含量差异的主要原因 (Harjes et al., 2008; Yan et al., 2010)。在西瓜中, *LCYB* 基因 1 个单核苷酸多态性 (C572A) 的变异导致保守催化位点上 1 个氨基酸改变, 造成酶结合底物活性减弱, 从而使果肉呈现红色和黄色的分离 (Bang et al., 2007)。在甘薯块根中, *LCYB* 是  $\beta$ -胡萝卜素合成途径的关键酶基因 (陈选阳和张招娟, 2011)。在胡萝卜品种驯化过程中, 下游基因 *LCYB*、*LCYE*、*CHXE* 和 *ZEP* 选择偏差显著高于上游基因 *IPI*、*PDS* 和 *CRTISO* (Cloutault et al., 2012)。本研究中亦发现 *LCYE*、*LCYB1*、*CHXE* 和 *CHXB1* 在 Ws 和 Af 之间存在多个 SNP 位点变异, 从根和叶中转录水平分析表明各个基因均表现出其功能, 但是否影响类胡萝卜素合成效率还需要深入研究。从根和叶中 4 个基因的表达水平与类胡萝卜素含量的相关性分析发现根中 *LCYE* 表达量与  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素及总类胡萝卜素含量之间达到显著正相关, 叶中 *LCYE* 表达量与叶黄素、总类胡萝卜素含量之间呈负相关, 说明 *LCYE* 对根和叶中主要类胡萝卜素的积累起着关键性作用, 但作用方式可能存在不同。

### References

- Bai C, Twyman R M, Farré G, Sanahuja G, Christou P, Capell T, Zhu C. 2011. A golden era - Pro-vitamin A enhancement in diverse crops. The Society for In Vitro Biology, 47: 205 - 221.
- Bang H, Kim S, Leskovaar D, King S. 2007. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene b-cyclase (*LCYB*) gene. Molecular Breeding, 20: 63 - 72.
- Bradeen J M, Simon P W. 1998. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. Theoretical and Applied Genetics, 97: 960 - 967.
- Britton G. 1993. Carotenoids in chloroplasts pigment-protein complexes // Sundqvist C, Ryberg M. Pigment-protein complexes in plastids: Synthesis and assembly. San Diego: Academic Press: 447 - 483.
- Buishand J G, Gabelman W H. 1979. Investigations on the inheritance of color and carotenoid content in phloem and xylem of carrot roots (*Daucus carota* L.). Euphytica, 28: 611 - 632.
- Cavagnaro P F, Chung S M, Manin S, Yildiz M, Ali A, Alessandro M S, Lorizzo M, Senalik D A, Simon P W. 2011. Microsatellite isolation and

- marker development in carrot – genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC Genomics*, 12: 386 – 405.
- Chen Xuan-yang, Zhang Zhao-juan. 2011. Study on the relationship between accumulation of  $\beta$ -carotene and expression of genes for  $\beta$ -carotene biosynthesis in the storage roots of sweet potato [*Ipomoea batatas* L. (Lam)]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32: 1838 – 1842. (in Chinese)
- 陈选阳, 张招娟. 2011. 甘薯生长期块根  $\beta$ -胡萝卜素合成基因的表达分析. *热带作物学报*, 32: 1838 – 1842.
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal Experimental Botany*, 59: 3563 – 3573.
- Clotault J, Peltier D, Soufflet-Freslon V, Briard M, Geoffriau E. 2012. Differential selection on carotenoid biosynthesis genes as a function of gene position in the metabolic pathway: A study on the carrot and dicots. *PLoS One*, 7: e38724.
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno J C, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C. 2012. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology*, 79: 47 – 59.
- Grassmann J, Schnitzler W H, Habegger R. 2007. Evaluation of different coloured carrot cultivars on antioxidative capacity based on their carotenoid and phenolic contents. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 58: 603 – 611.
- Harjes C E, Rocheford T R, Bai L, Brutnell T P, Kandianis C B, Sowinski S G, Stapleton A E, Vallabhaneni R, Williams M, Wurtzel E T, Yan J, Buckler E S. 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319: 330 – 333.
- Iorizzo M, Senalik D A, Ellison S L, Grzebelus D, Cavagnaro P F, Allender C, Brunet J, Spooner D M, Deynze A V, Simon P W. 2013. Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) (Apiaceae). *American Journal of Botany*, 100: 930 – 938.
- Just B J, Santos C A F, Fonseca M E N, Boiteux L S, Oloizua B B, Simon P W. 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): Isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 693 – 704.
- Just B J, Santos C A F, Yandell B S, Simon P W. 2009. Major QTL for carrot color are positionally associated with carotenoid biosynthetic genes and interact epistatically in a domesticated  $\times$  wild carrot cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 1155 – 1169.
- Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T, Wurtzel E T. 2008. The maize phytoene synthase gene family: Overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and the thermal stress tolerance. *Plant Physiology*, 147: 1334 – 1346.
- Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 – 408.
- Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J, DellaPenna D, Pogson B J. 2002. Identification of the carotene isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis. *Plant Cell*, 14: 321 – 332.
- Santos C A F, Simon P W. 2002. QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. *Molecular Genetics and Genomics*, 268: 122 – 129.
- Simon P W. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. *Plant Breeding Reviews*, 19: 157 – 190.
- van Norman J M, Sieburth L E. 2007. Dissecting the biosynthetic pathway for the bypass1 root-derived signal. *Plant Journal*, 49: 619 – 628.
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K. 2010. The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 93 – 117.
- Yan J, Kandianis C B, Harjes C E, Bai L, Kim E H, Yang X, Skinner D J, Fu Z, Mitchell S, Li Q, Fernandez M G, Zaharieva M, Babu R, Fu Y, Palacios N, Li J, DellaPenna D, Brutnell T, Buckler E S, Warburton M L, Rocheford T. 2010. Rare genetic variation at *Zea mays* crtRB1 increases  $\beta$ -carotene in maize grain. *Nature Genetics*, 42: 322 – 327.
- Ye X D, Babilli S A, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. 2000. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287: 303 – 305.