

罗 庆,钟秀来,卢 松,等. 胡萝卜 1 个新 4CL 基因的克隆、进化及表达分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(15):89-94.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.15.015

# 胡萝卜 1 个新 4CL 基因的克隆、进化及表达分析

罗 庆,钟秀来,卢 松,王天文,孟平红,谭国飞

(贵州省农业科学院园艺研究所,贵州贵阳 550006)

**摘要:**胡萝卜(*Daucus carota* L.)在 NCBI(美国国家生物信息中心)上总共公布了 13 个 4-香豆酰-CoA 连接酶(4CL)基因,而在芹菜转录数据中发现 1 个 4CL 基因,利用该基因序列设计 1 对克隆引物,成功得到 1 个新胡萝卜 4CL 基因,命名为 *Dc4CL-1*。*Dc4CL-1* 基因长 1 635 bp,编码 544 个氨基酸,位于胡萝卜基因组第 2 染色体上。进化树分析显示,*Dc4CL-1* 基因聚集在与木质素合成有关的 4CL I 亚族。实时荧光定量 PCR 转录表达发现,在胡萝卜根生长发育期间,*Dc4CL-1* 基因在野生胡萝卜中高表达,而在栽培胡萝卜中低表达。推测 *Dc4CL-1* 基因与胡萝卜木质素合成有关。

**关键词:**胡萝卜;4CL 基因;克隆;进化;表达

**中图分类号:** S631.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)15-0089-06

胡萝卜(*Daucus carota* L.)是一种在全世界广泛栽培的、重要的根类蔬菜<sup>[1-2]</sup>。然而,高木质素含量会降低胡萝卜肉质根的口感和质量<sup>[3]</sup>。有研究表明,4-香豆酰-CoA 连接酶(4-coumarate-CoA ligase,简称 4CL)是苯丙烷类代谢途径的关键酶,是调控木质素和黄酮类代谢途径中的关键限速酶<sup>[4-6]</sup>。在植物体上,苯丙烷类代谢途径是一个非常重要的第 2 代谢途径;而 hydroxycinnamate-CoA 硫酯是木质素及其他重要苯丙烷类的前体物质<sup>[7-8]</sup>。

目前,胡萝卜基因组在 NCBI(美国国家生物信息中心)上已公布、注释发表了 13 个 4CL 基因<sup>[9]</sup>。但是,在芹菜(*Apium graveolens* L.)转录组中发现有 1 个 4CL 基因已发表的胡萝卜 4CL 基因非常不同。因芹菜与胡萝卜同属伞形科家族,据进化树分析表

明,胡萝卜与芹菜在分子水平上应具有高度相似性。因此,推测胡萝卜基因组中有可能存在新 4CL 基因。

本研究利用发现的芹菜 4CL 基因序列来设计引物,从野生胡萝卜贵野中克隆得到 1 个新 4CL 基因,命名为 *Dc4CL-1* 基因;并构建进化树,进行序列比对分析,预测其染色体定位等。实时荧光定量检测 *Dc4CL-1* 基因在整个胡萝卜根生长、发育过程中的表达水平。本试验进一步研究 *Dc4CL-1* 基因在胡萝卜根木质素合成中的作用,以期延伸其相关知识面及奠定相应的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

野生胡萝卜贵野收集于贵州省贵阳市,栽培于贵州省农业科学研究院园艺研究所种质资源圃,无明显的肉质根,且木质素含量很高;Kuroda 是一种在亚洲广泛栽培的胡萝卜品种,有明显的肉质根,且木质素含量很低。将野生胡萝卜贵野和栽培胡萝卜 Kuroda 的种子播种于含蛭石混合物(土壤与蛭石体积比为 3:1)的塑料花盆中,置于人工气候箱中培养(昼、夜温度分别为 25、22℃,光—暗周期为 12 h—12 h,光照度为 3 000 lx)。于种子发芽后第 3、5、8、20、40、60、90 天时,分别将野生、栽培胡萝卜的根分离出来,立即用液氮处理,保存在 -70℃ 冰箱中。

### 1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 RNA simple Total RNA kit 试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取样品中的总 RNA,再

收稿日期:2020-04-30

基金项目:贵州省科技支撑计划[编号:黔科合支撑(2019)2257号];贵州省科技计划[编号:黔科合平台人才(2018)5768-03];贵州省科技计划[编号:黔科合基础(2019)1307号];贵州省科技支撑计划[编号:黔科合支撑(2016)2599号];贵州省科研机构服务企业行动计划[编号:黔科合平台人才(2017)5715-08];贵州省农业科学院蔬菜项目[编号:黔农科院种质资源(2020)10号];贵州省高层次创新型人才培养“百”层次人才项目[编号:黔科合人才(2015)4024号]。

作者简介:罗 庆(1987—),女,四川资阳人,硕士,研究实习员,主要从事分子生物学研究。E-mail:lqjng85@foxmail.com。

通信作者:谭国飞,博士,副研究员,主要从事伞形科蔬菜遗传育种与分子遗传学研究。E-mail:tgfei@foxmail.com。

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的数量与质量,采用 ND - 1000 分光光度计 (Nanodrop Technologies, Inc.) 进行总 RNA 的浓度测定,利用 HiScript® 1st Strand cDNA Synthesis kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 将提取的总 RNA 反转录成一链 cDNA。将 cDNA 稀释 15 倍,放在 -20 ℃ 冰箱中保存,用于胡萝卜 *Dc4CL-1* 基因的克隆及实时荧光定量分析。

### 1.3 胡萝卜 *Dc4CL-1* 基因的克隆

根据芹菜 Ventura 转录组数据中的 *4CL* 基因序列,用 Primer Premier 5 软件设计胡萝卜 *Dc4CL-1* 基因的正反引物序列 (*Dc4CL-1F* 和 *Dc4CL-1R*)<sup>[10]</sup>。引物序列如下:*Dc4CL-1F*: 5'-ATGGAGA AATCAGGGTACGGGAGAG-3'; *Dc4CL-1R*: 5'-TC AGATTTTGGCTCTGACTTGCTC-3'。扩增 PCR 体系均为 25 μL,反应条件为:98 ℃ 预变性 5 min; 98 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 34 个循环;最后 72 ℃ 延伸 2 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,用 PCR 提纯试剂盒提纯,再回收目的片段 (诺唯赞生物科技股份有限公司)。回收后的目的片段连接到 pMD19-T 载体上,并转化到大肠杆菌 (*Escherich coli*) DH5α 上,随后进行质粒的酶切与鉴定,委托南京金斯瑞生物科技股份有限公司进行 DNA 测序。

### 1.4 序列比对和进化分析

将 NCBI 上获得的其他胡萝卜 4CL 蛋白序列与本研究克隆得到的序列用 DNAMAN 软件对所有序列进行多重比较分析。用 MEGA 5 软件分别通过邻接法 (NJ)、最大简约法 (MP)、最大似然法 (ML)、最小进化法 (ME)、非加权配对平均法 (UPGMA) 算法对胡萝卜 4CL 及其他物种的 4CL 蛋白序列构建进化树,并进行进化分析<sup>[11]</sup>。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 采用高特异性染料法定量 PCR 检测试剂盒 (AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司),按照操作说明进行,于荧光定量 PCR 仪 StepOnePlus™ 中进行 3 步法反应程序实时荧光定量 PCR 扩增,使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  值法来分析该基因的相对表达水平。qPCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 30 s, 95 ℃ 延伸 10 s, 40 个循环;熔点曲线为 65 ~ 95 ℃,每 0.5 ℃ 增加 1 个梯度。*DcActin1* 作为胡萝卜内参对照基因,其正向序列为 5'-CGGTATT

GTGTTGGACTCTGGTGAT-3',反向序列为 5'-CA GCAAGGTCAAGACGGAGTATGG-3'<sup>[12-13]</sup>。根据克隆到的 *Dc4CL-1* 基因序列用 Primer Premier 5 软件的设计定量引物 (正向序列, 5'-TCTCCCAACTCAC TTCACTTCCC-3'; 反向序列, 5'-TTCAACATTTTC ATCAAACCCCA-3')。在非冗余蛋白序列 (Nr) 数据库中,利用 BLASTn 搜索得到分离的 *Dc4CL-1* 基因 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。qPCR-RT 数据用 IBM Statistics 20.0 软件进行方差显著性分析 (ANOVA),所有数据重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 胡萝卜 *Dc4CL-1* 基因的序列分析

根据芹菜 Ventura 转录组数据中的 *4CL* 基因序列,设计 1 对正反引物序列 (*Dc4CL-1F* 和 *Dc4CL-1R*),在野生胡萝卜贵野中成功扩增、克隆得到 1 个新 *4CL* 基因片段,命名为 *Dc4CL-1*。*Dc4CL-1* 基因长 1 635 bp,编码 544 个氨基酸;而芹菜 *4CL* 基因长 1 620 bp,编码 539 个氨基酸 (图 1、图 2)。野生胡萝卜 *Dc4CL-1* 基因与芹菜 *4CL* 基因有 89.79% 的同质性 (图 1)。据胡萝卜基因组数据库结果显示,此基因位于胡萝卜基因组第 2 染色体上 (GenBank: LNRQ01000002.1, 区域: 21 933 004 ~ 21 937 748, 共 4 745 bp),包含 5 个内含子和 6 个外显子。然而,本研究得到的胡萝卜 *Dc4CL-1* 基因的 DNA 全长 4 749 bp,同样包含 5 个内含子和 6 个外显子 (图 3)<sup>[14]</sup>。结果还显示,此基因序列中包含完整的 4CL 保守结构域及 AMP 结合位点及 CoA 结合位点。此外 BLASTp 预测胡萝卜基因结果显示,4CL 蛋白是一种似 4-香豆酰-CoA 连接酶,同样 *Dc4CL-1* 蛋白属于 AFD (adenylate forming domain) I 亚族 (图 3)。

### 2.2 *Dc4CL-1* 蛋白的进化分析

本研究发现,在 NCBI 上共注释、公布了 13 个胡萝卜 *4CL* 基因,但是其中有 2 个 *4CL* 基因 (GenBank: XM\_01739850.1 和 XM\_017398506.1) 具有相同的开放阅读框 (ORF) 和氨基酸序列 (XP\_017253996.1 和 XP\_017253995.1)。因此,舍弃前者 (XP\_017253996.1),将其他 12 个胡萝卜基因蛋白 (GenBank: XP\_017215228.1、XP\_017215416.1、XP\_017222125.1、XP\_017229849.7、XP\_017232211.1、XP\_017234894.1、XP\_017243044.1、XP\_017244257.1、XP\_017253062.1、XP\_017253894.1、XP\_017253995.1、

<i>Ag4CL</i>	ATGGAGAAATCAGGGTACGGGAGAGATGGAATATACAGATCACTCAGGCCACCACTAAACCTCCCTAAAACTCAAAACAT	80
<i>De4CL-1</i>	ATGGAGAAATCAGGGTACGGGAGAGATGGAATATACAGGTCACCTCGGCCACCACTAAACCTCCCAAAACCCAAACAT	80
<i>Ag4CL</i>	CTCCATGACATCTTTTCTCTTTCCGTAACATCTCTTATACCCCTCATCACCCCTGCAGTTACTGACTCCAACTCTAACCCAA	160
<i>De4CL-1</i>	CTCCATGACATCTTTTCTCTTTCCGAAACATCTCTTCCACCCCATCACCCCTGCAGTTATAGACTCCAACTCTAACCCAA	160
<i>Ag4CL</i>	CTCTCAGTTTCTCTCAACTCAACTCCACTGTTTCCAAGCTCTCAGTGGCTTACAACAACATTTGGTGTCAAGAAAAATGAT	240
<i>De4CL-1</i>	CCCTCACTTTTCTGCAACTCAACTCCACTGTTTCCAAGCTCTCAGTGGCTTACAGCAACTGGGTGTCAAGAAAAACGAC	240
<i>Ag4CL</i>	GTAGTTCTGATTTTTCGCCAAATTCACCTTCACCTCCCTGTTTCTTTGGGATCATTAATGCTGGAGCTATTGCCAC	320
<i>De4CL-1</i>	GTCTTTCTGATTTTCTGTCGCAACTTCACCTTCACCTCCCTGTTCTGTTTCTTTGGGATCATTAATGCCGGAGCTATTGCCAC	320
<i>Ag4CL</i>	AAGTGTCAACCCTAGTTACACTTCTCAAGAGGTAGCAAAACAGGTTCAAGATTTGTAAACCTTAAAGTTATTTTACTGTTT	400
<i>De4CL-1</i>	TACTGTCAACCCGAGTTACACTTCTCATGAGGTAGCTAAACAGGTTCAAGACTGTAAACCTTAAAGTCATTTTACTGTTT	400
<i>Ag4CL</i>	TTGAGCTGTTTGTATGAAGTTAAAGAGTTCCGTTTTCGCTTGTGTATATAGGTTTGTGATCAAAATGTGAATAAAA	476
<i>De4CL-1</i>	TTGAGCTGTTTGTATGAAGGTTTAAAGGTTTGTAGTTTTCGCTTGTGTATATAGGTTTGTGATCATGGGTTTGTGAAATGTGAAAT	480
<i>Ag4CL</i>	.....GGATTCTAGAATTGTGTTGTTGATGATTTGTTTGAAGATGATGGGTCTTTGTTGTTTCCGGTTGATGT	545
<i>De4CL-1</i>	GGGGTGGGTTGGAATCAAGAATTGTGTTGTTGATGATTTGATTGAAGATGATGGGTCTTTGTTGTTTCCGGTTGAGGT	560
<i>Ag4CL</i>	TTTCGGGTGATGACACTGCTGTTTGTGTATTCTTCGGGTACTACTGGGATTAGTAAAGGCGTGGTATTGAGTCATAGGA	625
<i>De4CL-1</i>	TTTCGGGGGATGATACTGCTGCCCTGTTGTATTCTTCGGGTACTACTGGTGTAGTAAAGGCTGGTATTGAGTCATAGGA	640
<i>Ag4CL</i>	ATTTTATTGCTGCTGCTTTGATGGCTTGTAGTGATTTGGATTTGATGGGGAGTGTAGTGTGTGTTTGTGTCATTGTG	705
<i>De4CL-1</i>	ATTTTATTGGCGCTGCTTTGATGGCTTGTGGTGATATGGATGATGGGTGAGATGAGCAGTGTGTTTGTGTATTGTTG	720
<i>Ag4CL</i>	CCTATGTTTTCATGCTTTTGGACTTTGTGTTTATTTACTTTATGCTCAATTGCAAAAGGGGAAGTACGATTGTGACAATGGCAA	785
<i>De4CL-1</i>	CCTATGTTTTCATGCTTTTGGACTTTGTGTTTATTTACTTTATGCTCAATTGCAAAAGGGGAAGTACGATTGTGACAATGGCAA	800
<i>Ag4CL</i>	ATATGATTTTGAAGTGTCTTTTGGAGACGTTGAGAGCTATAAGGTTACACATACATGGATTGTGCTCCGATTGTGCTTG	865
<i>De4CL-1</i>	ATTTGATTTTGAAGTGTCTTTTGGAGACGTTGAGAGCTATAAGGTTACACATATATGGGTTGTGCCCCGATTGTACTTG	880
<i>Ag4CL</i>	CGTTGGCGAAGTATAATGGGGTTGAGAAATTTGACTTGTGCTCTTTGAAGCAAAATTTGGTTCCGGTGTGCTCGTTGGGT	945
<i>De4CL-1</i>	CATTGGCAAAATATAGCGGGGTTGTAACTATGACTTGTGCTCTTTGAAGCAAAATTTGGTTCTGGTGTGCTCGTTGGGT	960
<i>Ag4CL</i>	AGAGAGTTGATGCAAGAAATGTGCTAAGAAATTTCCGCAAGCGTTGGTTATGCAGGGTTATGGTATGACGGAACGACTGC	1 025
<i>De4CL-1</i>	AAAGAGTTGATGCAAGAAATGTGCGAAGAAATTTCCGCAAGCGTTGGTTATGCAGGGTTATGGTATGACGGAACGACTTC	1 040
<i>Ag4CL</i>	AGTACTGTCTGTGGAGAGTCAGCTTGGAGGTCCTCGACATACTGGTTGAGCAGGAATGCTTGTCTCTGGAGTGAATGCC	1 105
<i>De4CL-1</i>	AGTTATCTCTGTGGAGAAATCAGCTTGGAGGTCCTCGAAATACTGGTTTGCAGGAATGCTTGTCTCTGGAGTGAATGCC	1 120
<i>Ag4CL</i>	AAATTGTGAGTGTGGATACACTTGAACGCTCTTCTCTAAGCAGTTGGGTGAAATATGTGTTAGGGGACCTAACATCATG	1 185
<i>De4CL-1</i>	AAATTTTGTGAGTGTGATACACTTGAACGCTCTTCTCTAAGCAGTTGGGTGAAATATGTGTTAGGGGCTAACATCATG	1 200
<i>Ag4CL</i>	CAAGGTTATTTTAAACAATCCACAAGCTACAGAGCTTACTATAGATAAACAAGGCTGGCTGCACACAGCGGACCTTTGGTTA	1 265
<i>De4CL-1</i>	CAAGGTTATTTTAAACAATCCACAAGCTTACTATAGATAAACAAGGTTGGCTGCACACAGCTTACTGCAGACCTAGGTTA	1 280
<i>Ag4CL</i>	TTTTGATGAGGAAGGACTACTATATGTTGTTGATCGAATTAAGAGCTCATCAAGTACAAAGGATTTTCAAGTTGCACCAG	1 345
<i>De4CL-1</i>	TTTTGATGAGGAAGGAGACTATATGTTGTTGATCGAATTAAGAGCTCATCAAGTACAAAGGATTTTCAAGTTGCACCAG	1 360
<i>Ag4CL</i>	CAGAGCTTGAAGGCCTACTCGTGTCTCAGCCAGACATATTAGACGCTGTAGTCATCCCCTTTCTGATGCTGAAGCTGGT	1 425
<i>De4CL-1</i>	CAGAGCTTGAAGGCCTACTCGTGTCTCAGCCAGACATATTAGATCGCGTGTAGTCATCCCCTTTCTGATGCTGAAGCTGGT	1 440
<i>Ag4CL</i>	GAACTCCCAAGTGCACATGTTGTGAGAGCTCCCAACAGTTCACTAACTGAAGAAGATGTCAAGAAATTTTATCTCAGAGCA	1 505
<i>De4CL-1</i>	GAAGTACCAAGTGCACATGTTGTGAGAGCTCCCAACAGTTCACTAACTGAAGAAGATGTCAAGAAATTTTATCTCAGAGCA	1 520
<i>Ag4CL</i>	GGTTGCGCCCTTTTAAAGATTTGCGGAGGGTCACCTTTTATAAATCAGTGCCAAAGTCAGCTTTCAGGAAAAATTTCTAGAA	1 585
<i>De4CL-1</i>	GGTGGCCCTTTTAAAGATTTGCGGAGGGTCACCTTTTATAAATCAGTGCCAAAGTCAGCTTCTGGAAAAATCTTAGAA	1 600
<i>Ag4CL</i>	GAGAACTCGTTGAGCAAGTCAGAGCCAAATCTGA	1 620
<i>De4CL-1</i>	GGGAGCTTGTGAGCAAGTCAGAGCCAAATCTGA	1 635

下划线为克隆引物

图1 胡萝卜 *De4CL-1* 和芹菜 *Ag4CL* 的核酸序列比对

<i>Ag4CL</i>	MEKSGYGRDGIYRSLRPPLNLPKNSNISMTSFLFRNIISSYPHPHPAVTDSNSNQTITFTSOLNSITVSKLSRGLQQLGVKKND	80
<i>De4CL-1</i>	MEKSGYGRDGIYRSLRPPLNLPKTPKLSMTSFLFRNIISSHPHPHPALI DSNSNQTITFTSOLNSITVSKLSRGLQQLGVKNND	80
<i>Ag4CL</i>	VVLII FSPNSLHFFVCFHGI I NAGAI ATTVPNSYTSQEVAKQVQDCNPKVI FTVFELFDKVKFELGFLPVVI I GFDDQNVNKMVD	160
<i>De4CL-1</i>	VVLII FSPNSLHFFVCFHGI I NAGAI ATTVPNSYTSHEVAKQVQDCNPKVI FTVFELFDKVKFGLFIPVI VI NGFDENVKELQ	160
<i>Ag4CL</i>	.....SRI VLFDDLF RNDGSLFFPVDVSGDDTAALYSSGTTGII SKGVVLSHRNF I AAALVACS DLDLNGELSSVFLCI V	235
<i>De4CL-1</i>	GGGLESR I VLFDDLI RNDGSLFFPVEVSGDDTAALYSSGTTGVSKGVVLSHRNF I AAALVACGD DLDNGEMSSVFLCI L	240
<i>Ag4CL</i>	PMFHVFGLCVI TYAQLQRGSTI VTMAKYDLEVLURTVERYKVTHTW VPPI VLALAKYNGVEKF DLSLKLQI GSGAAPUG	315
<i>De4CL-1</i>	PMFHVFGLCVI TYAQLQRGSTI VTMAKF DLEVLURTVEYKVTHTM WVPI VLALAKYSWGCKYDLSLKLQI GSGAAPUG	320
<i>Ag4CL</i>	RELMOECACKFPQALVMQGYGMTETTTAVSVSVESQLGGPRHTGSAGMLVP GVECOI VSVDTLIERLPKQLGEI CVRGPNI M	395
<i>De4CL-1</i>	RELMOECACKFPQALVMQGYGMTETTTV SVENQLGGPRHTGSAGMLVP GVECOI VSVDTLIERLPKQLGEI CVRGPNI M	400
<i>Ag4CL</i>	QGYFNNPQATELTI DKQGLHTGDLGYFDEEGLUYVVDRI KELI KYKGFQVAPAELEGLVSHPD I L DAVVI PFPDAEAG	475
<i>De4CL-1</i>	QGYFNNPQATKLTI DKQGLHTGDLGYFDEEGLUYVVDRI KELI KYKGFQVAPAELEGLVSHPD I L DAVVI PFPDAEAG	480
<i>Ag4CL</i>	EVPSAHVVRAPNSLIT EEDVKKFI SEQVAPFKRLRRVTFI KSVPKSASGKI LRRELVEQVRAKI	539
<i>De4CL-1</i>	EVPSAHVVRAPNSLIT EEDVKKFI SEQVAPFKRLRRVTFI KSVPKSASGKI LRRELVEQVRAKI	544

图2 胡萝卜 *De4CL-1* 和芹菜 *Ag4CL* 的氨基酸序列比对

XP\_017258809.1) 与芹菜及得到的胡萝卜 *De4CL-1* 蛋白一起构建进化树, 进行进化关系分析。本研

究运用 MEGA 5 软件对此 14 个蛋白用不同方法进行聚类分析, 聚类结果如图4所示。进化树显示,

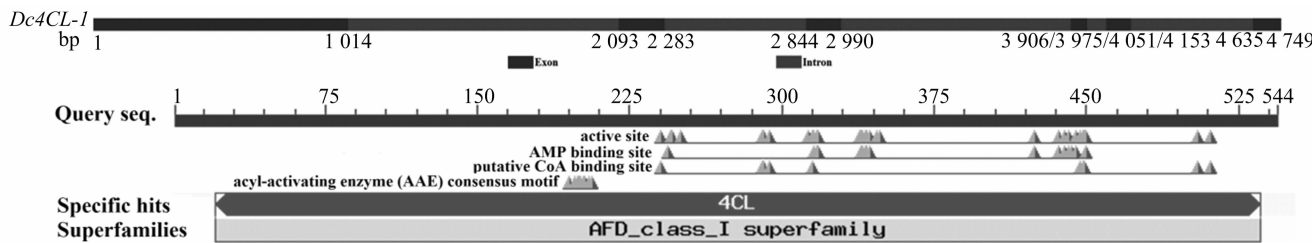
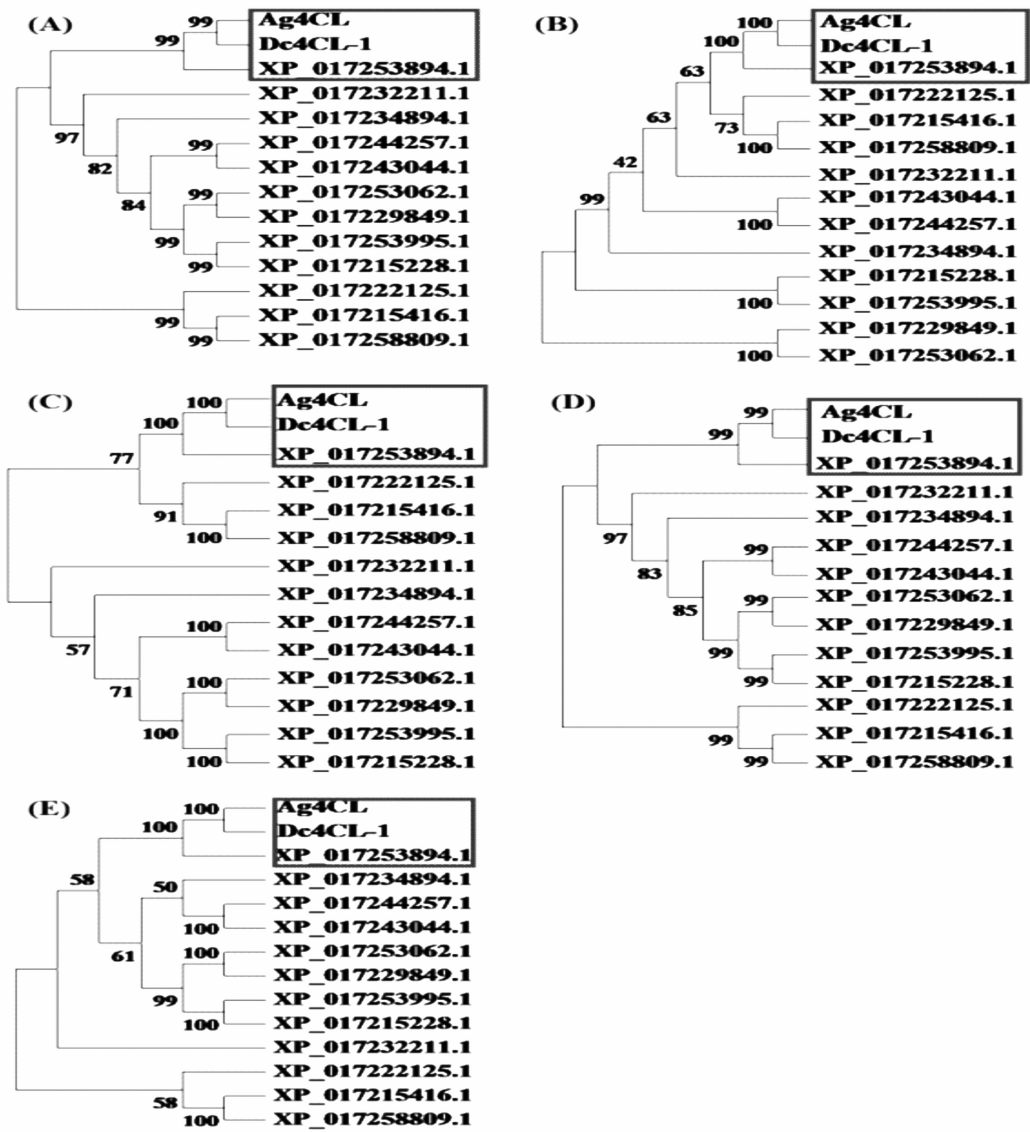


图3 胡萝卜 *Dc4CL-1* 氨基酸保守域分析

*Dc4CL-1*、*Ag4CL* 蛋白质及其中 1 个胡萝卜 4CL 蛋白质 (XP\_017253894.1) 在 5 种不同进化分析方法下均位于同一分支上 (图 4, 以方框标注出)。蛋白质序列比对结果显示, *Dc4CL-1* 蛋白质和其他物种

的 4CL 蛋白质序列具有 72.98% 的同源性 (图 4)。由此推测, *Dc4CL-1* 是胡萝卜 4CL 基因家族的新成员, 其功能与其他成员具有相似性。



A~E 分别用 NJ、MP、ML、ME、UPGMA 算法构建, 1 000 次自展重复, 泊松模型; 14 个蛋白中, 有 12 个为在 NCBI 上注释、公布的胡萝卜 4CL 基因登录号 (GenBank: XP\_017215228.1、XP\_017215416.1、XP\_017222125.1、XP\_017229849.1、XP\_017232211.1、XP\_017234894.1、XP\_017243044.1、XP\_017244257.1、XP\_017253062.1、XP\_017253894.1、XP\_017253995.1、XP\_017258809.1), 1 个为芹菜 *Ag4CL* 蛋白, 1 个为胡萝卜 *Dc4CL-1* 蛋白

图4 4CL 氨基酸序列的进化分析

### 2.3 胡萝卜 *Dc4CL-1* 基因的表达分析

胡萝卜 *Dc4CL-1* 和 4CL 蛋白质都属于参与木质素合成的 AFD I 亚族成员;与前人在水稻<sup>[5]</sup>、烟草<sup>[15]</sup>的研究结果相一致。已有研究表明,在胡萝卜生长、发育期间,野生胡萝卜根中木质素含量高于栽培品种<sup>[16-17]</sup>。本研究结果表明,在胡萝卜生长、

发育期间,*Dc4CL-1* 基因在野生品种中表达量较高,而在栽培品种中表达水平较低。尤其在种子发芽后 60、90 d,其表达水平差异极显著( $P < 0.01$ )。野生品种在发育期间,*Dc4CL-1* 基因相对表达水平变化没有明显的规律,但均较高(图 5)。

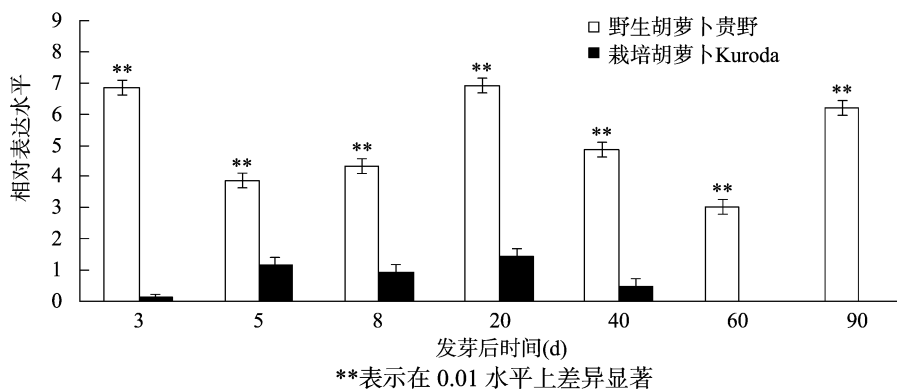


图5 *Dc4CL-1* 基因在胡萝卜种子发芽后不同生长发育阶段中的 qRT-PCR 表达水平分析

### 3 讨论与结论

木质素是一种自然无组织的高分子聚合物,在维管植物中起着支撑其结构刚度和维持颜色的重要作用<sup>[18-19]</sup>。生产树木中木质素结构或含量的变化对于造纸工业和生物燃料的生产也具有重要性<sup>[6,20]</sup>。然而,肉质根作为胡萝卜可食用的器官,木质素含量过高会降低胡萝卜根的口感及质量<sup>[17,21]</sup>。外源赤霉素<sup>[17]</sup>、处理加工<sup>[22]</sup>及成熟化<sup>[21]</sup>都会影响胡萝卜根中木质素的含量。此外,胡萝卜木质素含量的降低对其繁殖、栽培也有一定的影响。有研究显示,香蕉(*Musa nana*) A 基因组中有 25 个 4CL 基因同源序列,其中 *Mu4CL15* 在烟草中过表达能够增加烟草植株茎秆的木质素含量和抗倒伏能力,推测 *Mu4CL15* 极有可能提高香蕉植株假茎的抗倒伏能力。有研究表明,胡萝卜木质素大部分沉积在胡萝卜木质部导管的细胞壁上;在胡萝卜发育过程中<sup>[23]</sup>,木质素含量呈现连续下降的趋势,推测这可能与木质素生物合成相关基因的表达量降低有关<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,*Dc4CL-1* 基因在野生胡萝卜中高表达,而在栽培胡萝卜中低表达,推测 *Dc4CL-1* 基因与胡萝卜木质素的合成有关。

4CL 基因是木质素合成的关键限速酶的调控基因,且 4CL 与植物腺苷酸构成酶的大亚组有关,由多拷贝基因编码;在其他蔬菜作物中已有相关报道,如白杨、水稻和烟草<sup>[5,15]</sup>。4CL 氨基酸序列的系

统重建显示,4CL 蛋白分别划入 I、II 2 个亚组;其中, I 亚组 4CLs 与木质素及其他苯丙脂类的合成有更近的关系,而 II 亚组 4CLs 与黄酮类有更近的关系<sup>[4-5,25]</sup>。有关于海南龙血树(*Dracaena cambodiana*)的研究表明,*Dc4CL1* 属于 Class III 类 4CL,血竭诱导剂能够诱导 *Dc4CL1* 基因的表达,为进一步阐明 *Dc4CL1* 基因在海南龙血树中类黄酮生物合成中的功能提供帮助<sup>[26]</sup>。在水稻的研究中发现,4CL 基因家族有 5 位成员,其中 *Os4CL2* 属于 Type II 亚组,其他 4 位成员属于 Type I 亚组;研究还得出,*Os4CL3* 表达量的降低显著影响木质素的合成且效果最好,降低植物体木质素含量,降低植株株高<sup>[27]</sup>。这些试验结果均表明,可以通过调节 4CL 基因的表达量来调控植物木质素的含量。

本研究通过 BLAST 比对和系统分析发现,野生胡萝卜中的新 4CL 属于 I 亚组。无论野生胡萝卜,还是栽培胡萝卜,*Dc4CL-1* 基因的表达水平与胡萝卜的总木质素含量呈正相关关系,由此推测 *Dc4CL-1* 基因可能参与胡萝卜木质素的合成。但有报道说,根据胡萝卜基因组注释,4CLs 均属于 I 亚组。胡萝卜木质素的合成是一个复杂的过程,其不仅受多基因的影响,同时也受栽培环境、管理方式的影响,须要全方位深入研究。因此,须要发掘胡萝卜其他新 4CL 基因,乃至与木质素合成的相关基因都研究彼此之间的相关性及各基因的具体功能,并进行相关深入的研究,为植物木质素的相关

研究提供更加有力的理论基础。

## 参考文献:

- [1] Tan G F, Wang F, Zhang X Y, et al. Different lengths, copies and expression levels of the mitochondrial *atp6* gene in male sterile and fertile lines of carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Mitochondrial DNA, 2018, 29(3): 446–454.
- [2] Bergh B O. Genetic improvement of vegetable crops [M]. Amsterdam; Pergamon Press, 1993: 479–484.
- [3] Wang G L, Huang Y, Zhang X Y, et al. Transcriptome – based identification of genes revealed differential expression profiles and lignin accumulation during root development in cultivated and wild carrots [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(8): 1743–1755.
- [4] Ehling J, Buttner D, Wang Q, et al. Three 4 – coumarate; coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms [J]. Plant Journal, 1999, 19(1): 9–20.
- [5] Cukovic D, Ehling J, Vanziffle J A, et al. Structure and evolution of 4 – coumarate; coenzyme A ligase (*4CL*) gene families [J]. Biological Chemistry, 2001, 82(4): 645–654.
- [6] Hisano H, Nandakumar R, Wang Z Y. Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2009, 145(3): 306–313.
- [7] Hu Y, Gai Y, Yin L, et al. Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4 – coumarate; CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms [J]. Plant Cell, 2010, 22(9): 3093–3104.
- [8] Fraser C M, Chapple C. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis* [J]. The Arabidopsis Book, 2011, 9: e0152.
- [9] Iorizzo M, Ellison S, Senalik D, et al. A high – quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution [J]. Nature Genetics, 2016, 48(6): 657–666.
- [10] Jia X L, Wang G L, Xiong F, et al. De novo assembly, transcriptome characterization, lignin accumulation, and anatomic characteristics: novel insights into lignin biosynthesis during celery leaf development [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8259.
- [11] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist – centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. Briefings in Bioinformatics, 2008, 9(4): 299–306.
- [12] Xu Z S, Huang Y, Wang F, et al. Transcript profiling of structural genes involved in cyanidin – based anthocyanin biosynthesis between purple and non – purple carrot (*Daucus carota* L.) cultivars reveals distinct patterns [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 262.
- [13] Tian C, Jiang Q, Wang F, et al. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117569.
- [14] Xu Z S, Tan H W, Wang F, et al. CarrotDB: a genomic and transcriptomic database for carrot [J]. Database, 2014, 2014: bau096.
- [15] Souza C A, Barbazuk B, Ralph S G, et al. Genome – wide analysis of a land plant – specific acyl; coenzyme A synthetase (*ACS*) gene family in *Arabidopsis*, poplar, rice and *Physcomitrella* [J]. New Phytologist, 2008, 179(4): 987–1003.
- [16] Tan G F, Wang F, Ma J, et al. Identification and analysis of the characteristics of a wild petaloid male – sterile carrot Wuye – BY [J]. Plant Genet Resour, 2017, 18(6): 1216–1220.
- [17] Wang G L, Que F, Xu Z S, et al. Exogenous gibberellin enhances secondary xylem development and lignification in carrot taproot [J]. Protoplasma, 2017, 254(2): 839–848.
- [18] Dixon R A, Chen F, Guo D, et al. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? [J]. Phytochemistry, 2001, 57(7): 1069–1084.
- [19] Koskinen O. Catalytic hydrogenation and hydrogenolysis of lignin model compounds in ionic liquid environment [D]. Helsinki: University of Helsinki, 2017.
- [20] 陈磊, 陈汉平, 陆强, 等. 木质素结构及热解特性 [J]. 化工学报, 2014, 65(9): 3626–3633.
- [21] Schafer J, Trierweiler B, Bunzel M. Maturation – related changes of carrot lignins [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(3): 1016–1023.
- [22] Howard L R, Griffin L E. Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot sticks [J]. Journal of Food Science, 1993, 58(5): 1065–1067.
- [23] 舒海燕, 孙威, 魏卿, 等. 香蕉 4 – CL 基因 *Mu4CL15* 的功能鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3025–3033.
- [24] 王广龙. 胡萝卜肉质根发育过程中激素和品质的变化规律研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [25] 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, 1998, 95(9): 5407–5412.
- [26] 夏栋楠, 朱家红, 李辉亮, 等. 海南龙血树 4 – 香豆酰辅酶 A 连接酶基因的克隆与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(23): 7656–7662.
- [27] Gui J S, Shen J H, Li L G. Functional characterization of evolutionarily divergent 4 – coumarate; coenzyme A ligases in rice [J]. Plant Physiology, 2011, 157(2): 574–586.