

种子有刺毛与无刺毛胡萝卜转录因子 DcTTG1 的分离及表达分析

谭国飞, 钟秀来, 卢松, 罗庆, 王天文

(贵州省农业科学院园艺研究所, 贵阳 550006)

摘要: 胡萝卜种子中刺毛严重影响胡萝卜播种质量。在胡萝卜播种前需要将种子上的刺毛用机械或者人工方法去除。转录因子 TTG1 (TRANSPARENT TESTA GLABRA 1) 是调节植物刺毛发育的主要因子之一,而在胡萝卜中未有研究报道。本研究报道一种从武汉洪山区野生胡萝卜(武野)中,筛选到植株、茎叶及种子均无毛的材料(命名为:武野-无毛),并对其毛发育调节转录因子 DcTTG1 进行研究。结果表明,武野和武野-无毛材料的 DcTTG1 长度均为 1011 bp,均可编码 336 个氨基酸残基。两个材料的 DcTTG1 序列上有 3 个位置不同,导致其推导的氨基酸有 3 个位点不同。两个材料 DcTTG1 蛋白序列,均含有 4 个 WD-40 基序。以拟南芥为外群,进化分析上胡萝卜的 DcTTG1 与其他伞形科的 TTG1 处在同一分枝上,其他科植物的 TTG1 也处在同一分枝上。表达分析表明,DcTTG1 在武野材料中的茎、叶及授粉 5 d 的花,表达量显著高于武野-无毛,但在未授粉花及形成的种子(授粉 20 d)不存在显著性。

关键词: 胡萝卜; 种子; 刺毛; DcTTG1; 表达分析

Isolation and Expression of Transcription Factor DcTTG1 in Seed Hairy and Hairless of Carrot

TAN Guo-fei, ZHONG Xiu-lai, LU Song, LUO Qing, WANG Tian-wen

(Institute of Horticulture, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006)

Abstract: Seed hairs in carrot negatively affect the germination of carrot seeds. They were necessary to be removed by mechanical or manual approaches before sowing. The development of seed hairs has been shown to be relevant to the regulation mechanism of transcription factor DcTTG1. In this study, we analyzed the genomic and transcriptional variation of DcTTG1 in a seed-hairless carrot genotype (named: Wuye-hairless), which was identified from the wild carrot germplasm Wuye in Hongshan district of Wuhan city. In both genotypes Wuye and Wuye-hairless, DcTTG1 contained an open reading frame with a length of 1011 bp, encoding for 336 amino acid residues. Three amino acid substitutions caused by three nucleotide mutations were observed between two genotypes. By bioinformatic analysis, the deduced DcTTG1 protein sequence contained four WD-40 motifs in both genotypes. The cluster analysis showed that the DcTTG1 of carrot and other TTG1 of Apiaceae plant were clustered in same branch. The transcriptional level of DcTTG1 in Wuye

收稿日期: 2018-08-07 修回日期: 2018-09-17 网络出版日期: 2018-11-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181109.1626.005.html>

第一作者主要从事蔬菜遗传育种与分子遗传, E-mail: tagfei@foxmail.com

基金项目: 贵州省蔬菜现代农业产业技术体系(GZCYTX2018-0102); 贵州省高层次创新型人才培养计划—“百”层次人才(黔科合平台人才([2016]5671); 贵州蔬菜新品种创制及产业化(黔科合平台人才[2017]5715); 贵州省农业科学院青年科技基金(黔农科院青年基金[2018]44); 贵州特色野生蔬菜资源选育及重金属安全性研究(黔科支撑字[2016]2599)

Foundation project: Guizhou Province Vegetable Modern Agricultural Industry Technology System (GZCYTX 2018-0102), Guizhou Province High-level Innovative Talents Training Plan-“100” level talents (Qiankehe Platform Talents ([2016]5671), Guizhou Vegetable Varieties Creation and Industrialization (Qiankehe Platform Talents [2017]5715), Guizhou Academy of Agricultural Sciences Youth Science and Technology Fund (Qiankehe Academy of Agricultural Sciences [2018]44), Guizhou Province Breeding of Wild Vegetable Resources with State Characteristics and Safety of Heavy Metals (Guizhou Branch Supporting [2016]2599)

was significantly higher than Wuye-hairless in the stem, leaf and 5 d after pollination of flowers, while no significant difference was observed at the stages of un-pollinated flowers and seeds formation (20 d after pollination).

Key words: carrot; seed; trichomes; DcTTG1; expression analysis

胡萝卜(*Daucus carota L.*)是世界重要的根类蔬菜之一,其膨大的肉质根中含有丰富的胡萝卜素、矿质营养物质、糖类成分等^[1-3]。胡萝卜在其地上部分茎叶及种子中含有大量的刺毛组织^[4-5]。胡萝卜种子中的刺毛,抑制种子吸收水分和发芽^[6-7]。为此,在胡萝卜种植前需要用机械或者人工的方法将种子刺毛去除^[6]。然而,去除胡萝卜种子刺毛不仅消耗人力和物力,而且还会浪费种子和破坏种子结构^[7]。据统计,中国每年胡萝卜种子需要量约1100 t,约占世界的1/3^[8]。韩国报道的胡萝卜材料中,其种子表皮无刺毛特性不彻底,植株是否有刺毛也未有说明^[9-11]。因此,研究和培育胡萝卜种子无刺毛材料具有积极的实际意义^[6-7, 9-10]。

前人对植物毛发育研究表明,转录因子TTG1(TRANSPARENT TESTA GLABRA 1)是影响植物茎、叶片、种子表皮毛发育的重要调控因子之一^[12-14]。该转录因子在拟南芥中含有4个WD-40基序,在拟南芥含有刺毛组织中具有很高的表达水平,特别是在花芽中^[13]。该基因在拟南芥中发生突变后,植株刺毛含量将明显减少^[15]。研究还表明TTG1与拟南芥根毛发育、花青素聚集及种子的粘液合成相关^[16-17]。在胡萝卜中,该基因未有研究报道,也未在胡萝卜种子有无刺毛材料中进行研究。

为此,本研究利用筛选到的胡萝卜植株及种子无刺毛材料(武野-无毛)与其原始野生胡萝卜武野为材料,分析两个材料形态上的差别。利用胡萝卜基因组数据库([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid79200\[Organism;noexp\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid79200[Organism;noexp])),设计引物克隆胡萝卜刺毛发育转录因子DcTTG1,对该转录因子进行分析。并进一步利用实时荧光定量PCR技术,检测该转录因子在武野-无毛和武野胡萝卜茎、叶及种子发育过程中的表达情况。其研究结果为该材料用于培育胡萝卜种子无刺毛材料,以及刺毛发育转录因子DcTTG1在胡萝卜中的研究,提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 植物材料与种植

野生胡萝卜武野搜集于武汉洪山区,该材料茎

叶和种子中均含有刺毛,无明显的肉质根,该材料已通过染色体、杂交等鉴定为野生胡萝卜^[4]。武野-无毛是从武野材料中选择出来,经过不断自交获得的,其植株、种子和茎叶等均不含刺毛。两种材料均保存于贵州省园艺研究所蔬菜实验室。

将两种材料于2017年8月,播种于贵州省园艺研究所蔬菜实验室试验地。2018年春化花开后,观察两种材料植株地上部分茎叶、种子形态。分别选取两种材料的茎、叶、未开放的花、授粉5 d 和授粉20 d 的种子,用于提取植物总RNA,作为检测目的转录因子DcTTG1的表达水平。选取两种材料的叶片,用于提取植物组DNA,作为DcTTG1克隆的模板。

1.2 胡萝卜转录因子DcTTG1的克隆

利用公布的胡萝卜基因组数据,搜索到胡萝卜DcTTG1转录因子。该转录因子存在3个不同转录本(XM_017398748.1、XM_017398749.1和XR_001807362.1),但3个不同的转录本其ORF框一致,对应的氨基酸序列一致。以登录号为XM_017398748.1的胡萝卜转录因子DcTTG1为参考序列,该转录因子无内含子。利用提取的两种胡萝卜材料DNA为模板克隆目的转录因子DcTTG1。克隆正向引物DcTTG1-F:5'-ATGGACAACTCAACGCAAGAACCTC-3',反向引物DcTTG1-R:5'-TTAAACTTCAACAGCTGCATCTTG-3'。

克隆体系为40 μL: 20 μL ExTaq mix(TaKaRa,大连)、2 μL DNA模板、正反引物各1.5 μL, 15 μL灭菌的ddH₂O。反应程序为:95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 34个循环;其后72 °C延伸10 min。用1.2%的琼脂糖凝胶电泳分离目的片段,使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(索莱宝,北京)。回收后的PCR产物,连接到pMD18-T克隆载体上,用热激的方法(42 °C, 60 s)将连接的载体转化到大肠杆菌DH5a上。经过含AMP(氨苄青霉素,100 mg/L)的平板筛选,倒置黑暗培养14 h后,挑取单菌落进行摇菌,摇好的菌液进行PCR鉴定。将鉴定正确的大肠杆菌,委托安徽通用生物有限公司进行测序。

1.3 胡萝卜DcTTG1进化及保守结构域分析

利用伞形科植物芹菜^[18]、欧芹^[19]、鸭儿芹^[20]、

水芹^[21]等转录组数据库,寻找各伞形科植物的转录因子TTG1,并翻译成对应的蛋白序列(表1)。另外,利用NCBI蛋白数据库,分别找到了2个十字花科植物、4个蔷薇科植物和4个茄科植物(表1)。胡萝卜转录因子DcTTG1翻译的蛋

白序列与寻找的14个物种TTG1蛋白序列,利用MEGA5.2软件NJ计算方法构建同源进化树^[22]。利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线软件对获得的14个物种TTG1蛋白结构域进行分析。

表1 各物种TTG1蛋白信息

Table 1 The information of TTG1 proteins from different species

物种 Species	科 Family	登录号 GenBank	长度(aa) Length
胡萝卜 <i>D.carota</i> L.	伞形科 Apiaceae	—	336
芹菜 <i>Apium graveolens</i> L.	伞形科 Apiaceae	—	340
欧芹 <i>Petroselinum crispum</i> (mill.) Fuss	伞形科 Apiaceae	—	336
鸭儿芹 <i>Cryptotaenia japonica</i> Hassk.	伞形科 Apiaceae	—	333
水芹 <i>Oenanthe javanica</i> (Blume) D C.	伞形科 Apiaceae	—	333
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	十字花科 Brassicaceae	NP_197840.1	341
油菜 <i>Brassica napus</i> L.	十字花科 Brassicaceae	NP_001303154.1	337
月季 <i>Rosa chinensis</i> Jacq.	蔷薇科 Rosaceae	XP_024178664.1	343
覆盆子 <i>Rubus idaeus</i> L.	蔷薇科 Rosaceae	AEI55401.1	344
玫瑰 <i>Rosa rugosa</i> Thunb.	蔷薇科 Rosaceae	AFY23208.1	346
烟草 <i>Nicotiana attenuata</i> Torr.ex S.Watson	茄科 Solanaceae	XP_019243463.1	342
美花烟草 <i>Nicotiana sylvestris</i> Spieg.	茄科 Solanaceae	XP_009782290.1	342
西红柿 <i>Solanum lycopersicum</i> L.	茄科 Solanaceae	XP_004235332.1	342
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> L.	茄科 Solanaceae	XP_006347519.1	342

“—”表示TTG1序列从胡萝卜、芹菜、欧芹、鸭儿芹和水芹转录组数据中找到,但未在NCBI上公布

‘—’ Indicated that TTG1 sequences were found from *D.carota* L., *Apium graveolens* L., *Petroselinum crispum* (mill.) Fuss, *Cryptotaenia japonica* Hassk. and *Oenanthe javanica* (Blume) D C. transcriptome data, respectively, but unpublished on NCBI

1.4 两种胡萝卜材料总RNA的提取及cDNA的合成

植物总RNA使用无氯仿型植物总RNA提取试剂盒(百泰克,北京),按照说明书分别对两个材料的总RNA进行提取。提取的RNA使用琼脂糖浓度为1.5%(v/v)检测其纯度,使用Nanodrop ND-1000分光光度计(Nanodrop Technologies Inc.,美国)检测其浓度。提取的RNA使用HiScript 1st Strand cDNA试剂盒(诺唯赞生物有限公司,南京),按照说明书进行cDNA的合成。合成的cDNA利用灭菌的ddH₂O稀释15倍后,保存于-20℃冰箱中,用于DcTTG1表达水平的检测。

1.5 转录因子DcTTG1在两种材料中表达分析

DcTTG1基因在两种材料中的表达水平,采用实时荧光定量PCR进行检测。使用CFX Connect PCR检测系统(Bio-Rad, Hercules, CA)仪器检测,使用的荧光PCR试剂盒为AceQ qRCR SYBR Green

Master Mix(诺唯赞生物有限公司,南京)。检测体系20 μL:10 μL荧光酶,正反引物各0.5 μL,7 μL灭菌的ddH₂O,2 μL稀释的cDNA模板。反应程序为:95℃5 min;95℃10 s,55℃30 s,40个循环;65~95℃之间,每10 s升高0.5℃做熔解曲线;最后8℃保存。DcTTG1基因检测引物根据测序结果设计,其正向引物:5'-GCCAACGATATTCTCGCGTCTT-3',反向引物:5'-GCGGCTCACCTCATTCCAGTCA-3'。使用胡萝卜*DcActin1*为内参基因,正向引物:5'-CGGTATTGTGTTGGACTCTGGTGAT-3',反向引物:5'-CAGCAAGGTCAAGACGGAGTATGG-3'^[23]。相对定量,使用参照基因ΔCT法,表达差异等于2^{-ΔCT},ΔC_T=C_T目标基因-C_Tactin₀。相对定量是基于处理和对照之间,目标基因对参考基因表达量的比较^[24]。每个样品设置3次独立重复。

1.6 数据分析

数据统计分析使用Microsoft Excel 2007软件,显著性分析使用IBM Statistics 20.0软件,显著水平

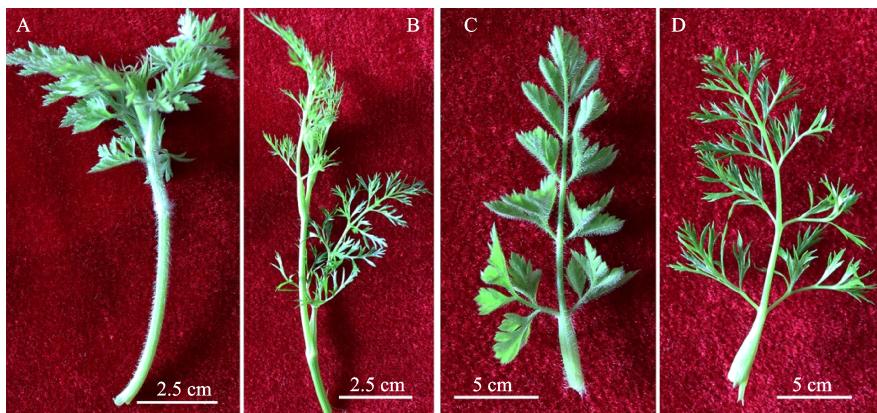
设置为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 两种胡萝卜地上部分形态分析

观察可见,武野在其茎中具有非常明显的白色刺毛(图1A),而武野-无毛其茎上不含有白色的刺毛(图1B)。武野叶柄及叶片上具有明显的白色刺毛(图1C),而武野-无毛叶柄及叶片上无白色的刺毛(图1D)。

花发育过程中,武野与武野-无毛未开放的花序形态相似,且未授粉之前两种的子房部位未出现明显的刺毛(图2A,2a)。当开花授粉5d后,武野-无毛子房表皮未出现刺毛(图2B),而在武野子房表皮上开始出现刺毛(图2b)。当授粉20d后,形成明显的种子,其中武野-无毛种子表皮上未出现刺毛(图2C),而武野种子表皮刺毛非常明显(图2c)。种子进一步发育,武野-无毛种子表皮上始终未出现刺毛(图2D),而武野材料种子表皮刺毛仍非常明显(图2d)。

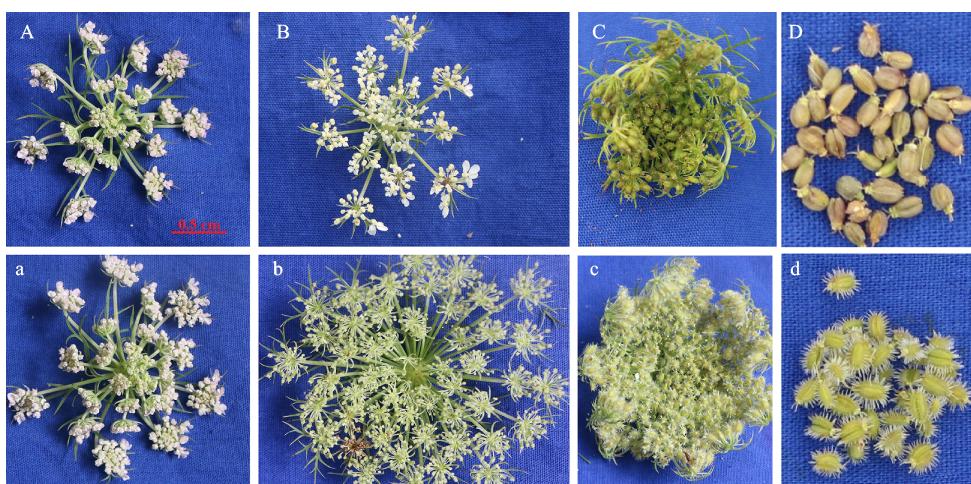


A: 武野茎; B: 武野 - 无毛茎; C: 武野叶片; D: 武野 - 无毛叶

A: Wuye stem, B: Wuye-hairless stem, C: Wuye leaf, D: Wuye-hairless leaf

图1 武野与武野-无毛茎及叶比较

Fig.1 Photos of stem and leaf in genotypes Wuye and Wuye-hairless



A~D: 分别表示武野-无毛花未开放、授粉5d、授粉20d、种子; a~d: 分别表示武野花未开放、授粉5d、授粉20d、种子

A~D: The flowers hasn't open of Wuye-hairless, 5 d after pollination, 20 d after pollination, seeds of Wuye-hairless, respectively.

a~d: The flowers hasn't open, 5 d after pollination, 20 d after pollination, seeds of Wuye, respectively

图2 武野与武野-无毛种子发育过程比较

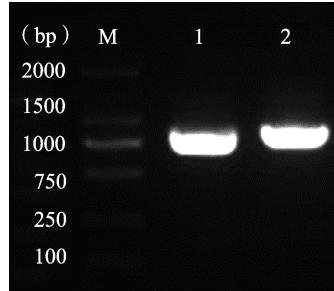
Fig.2 The graphical presentation of seed development in Wuye and Wuye-hairless

2.2 胡萝卜转录因子DcTTG1克隆

分别以武野-无毛与武野DNA为模板,引物DcTTG1-F与DcTTG1-R进行克隆,均得到一条约1000 bp的扩增产物(图3)。测序表明,

两个材料的该转录因子长度均为1011 bp(图4),均编码336个氨基酸。其中武野-无毛与武野DcTTG1碱基序列出现了3个位点差异(245, 490和911),245、490位置均为A与G,

911位置为C与A(图4)。导致编码的氨基酸序列也出现了3个位点差异(81, 164和304)(图5), 其中81位置为组氨酸(H, 编码碱基为CAT)与精氨酸(R, 编码碱基为CGT), 164位置为苏氨酸(T, 编码碱基为ACG)与丙氨酸(A, 编码碱基为GCG), 304位置为半胱氨酸(C, 编码碱基为TCT)与酪氨酸(Y, 编码碱基为TAT)。两者氨基酸序列使用SMART在线分析表明, 两者均含有4个WD-40基序, 分别在氨基酸63~106、111~156、159~197, 以及248~288位(图5)。



M: DNA maker; 1: 武野 - 无毛; 2: 武野
M: DNA maker, 1: Wuye-hairless, 2: Wuye

图3 武野与武野 - 无毛的 DcTTG1 克隆

Fig.3 PCR amplicons of DcTTG1 in Wuye and Wuye-hairless

武野-无毛Wuye-hairless	ATGGACAACTCAACGCAAGAACCTCACCTCCGATCCGACACGCTGGTACACCTACGACTCTCCCCACACTCTACGCCAT	80
武野/Wuye	ATGGACAACTCAACGCAAGAACCTCACCTCCGATCCGACACGCTGGTACACCTACGACTCTCCCCACACTCTACGCCAT	80
武野-无毛Wuye-hairless	GTCCCATCTCCTCCCTCCCCCACCCTCGCATCGCTCTCGGCAGCTTCCCTCGAGGAATTACCAACCGAGTCGACGTCGTTT	160
武野/Wuye	GTCCCATCTCCTCCCTCCCCCACCCTCGCATCGCTCTCGGCAGCTTCCCTCGAGGAATTACCAACCGAGTCGACGTCGTTT	160
武野-无毛Wuye-hairless	CGTCTGACGACCAAAACCTAACTCTCAAACGAAACCTAAATCTCTTGCGACCACCCCTACCCCTCCTACTAAAGCTCATG	240
武野/Wuye	CGTCTGACGACCAAAACCTAACTCTCAAACGAAACCTAAATCTCTTGCGACCACCCCTACCCCTCCTACTAAAGCTCATG	240
武野-无毛Wuye-hairless	TTCATCCCCAATCCACTCGCCTCGGGAAAGCCAACGATATTCTCGCGCTCTCCGGCGATTTATCTCCGGCTTGGGAAT	320
武野/Wuye	TTCATCCCCAATCCACTCGCCTCGGGAAAGCCAACGATATTCTCGCGCTCTCCGGCGATTTATCTCCGGCTTGGGAAT	320
武野-无毛Wuye-hairless	TAAGAGAATTGGTTGAGCCGATATCGCTGCTTAATAATAGTAAGAGTAGTGAGTTTGTGCGCCGTGACCTCGTTTG	400
武野/Wuye	TAAGAGAATTGGTTGAGCCGATATCGCTGCTTAATAATAGTAAGAGTAGTGAGTTTGTGCGCCGTGACCTCGTTTG	400
武野-无毛Wuye-hairless	ACTGGAATGAGGTGGAGCCGGCGGATGGGACGTTGAGACTTGATACGACTTGATGGGATGAGTTGGGATGTGGAGGGCC	480
武野/Wuye	ACTGGAATGAGGTGGAGCCGGCGGATGGGACGTTGAGACTTGATACGACTTGATGGGATGAGTTGGGATGTGGAGGGCC	480
武野-无毛Wuye-hairless	GTGGTGGAGACGAGCTGATGGCGCATGATAAGGAGGTTCATGACATTGGCTTGGGGTGGGGTGGGGTGTGGCTCGGT	560
武野/Wuye	GTGGTGGAGACGAGCTGATGGCGCATGATAAGGAGGTTCATGACATTGGCTTGGGGTGGGGTGGGGTGTGGCTCGGT	560
武野-无毛Wuye-hairless	GTCCGGGGATGGTCCGGTAGGATTTGATTTGAGGATTAAGGAGCATTCGACAATTATTTGAGAGTCCGCATCCGG	640
武野/Wuye	GTCCGGGGATGGTCCGGTAGGATTTGATTTGAGGATTAAGGAGCATTCGACAATTATTTGAGAGTCCGCATCCGG	640
武野-无毛Wuye-hairless	ATACTCCGTGCTTAGGCTGGCGTGGAAATAGCAGGATTTGAGGTATATGGCAGCATTTGATGGATAGTAAGGTT	720
武野/Wuye	ATACTCCGTGCTTAGGCTGGCGTGGAAATAGCAGGATTTGAGGTATATGGCAGCATTTGATGGATAGTAAGGTT	720
武野-无毛Wuye-hairless	GTGATTGGATATTGGTCCGCTACTATGCCTTGCGGGAGTTGGAGAGGCATAGGGGGAGGTGTGAATGGCATTGGCTG	800
武野/Wuye	GTGATTGGATATTGGTCCGCTACTATGCCTTGCGGGAGTTGGAGAGGCATAGGGGGAGGTGTGAATGGCATTGGCTG	800
武野-无毛Wuye-hairless	GGCTCCGGTGGAGCTGAGGTGTAGGCATATTGTGCGGTGGGGATGATGGACAGGGCTGATATTGGGGAGTTGGCTACGGTGGCTG	880
武野/Wuye	GGCTCCGGTGGAGCTGAGGTGTAGGCATATTGTGCGGTGGGGATGATGGACAGGGCTGATATTGGGGAGTTGGCTACGGTGGCTG	880
武野-无毛Wuye-hairless	GGCTAGTGGATTGATCCGATGTCATGTGACTGCTAGCTGGAGATTAATCAGCTCAGTGGCTCAGTGGCTCAGCTGCAAAGCCT	960
武野/Wuye	GGCTAGTGGATTGATCCGATGTCATGTGACTGCTAGCTGGAGATTAATCAGCTCAGTGGCTCAGTGGCTCAGCTGCAAAGCCT	960
武野-无毛Wuye-hairless	GATTGGATTGGCTATTGCAATTGCCAACAAAGATGCAAGCTGTTGAAAGTTAA	1011
武野/Wuye	GATTGGATTGGCTATTGCAATTGCCAACAAAGATGCAAGCTGTTGAAAGTTAA	1011

克隆引物用黑色箭头标注

Cloned primers were marked by black arrows

图4 武野与武野 - 无毛 DcTTG1 序列比较

Fig.4 Sequence alignment of DcTTG1 in Wuye-hairless and Wuye

武野-无毛Wuye-hairless	MDNS[TQESHLRS[DTL[VTDSPHTLYANSI[SSSPTNR1[ALGS[FLEEF[TNRVDVVS[DDQT[LTL[KRNPNLNF[DHP[YPP[TKLM	80
武野/Wuye	MDNS[TQESHLRS[DTL[VTDSPHTLYANSI[SSSPTNR1[ALGS[FLEEF[TNRVDVVS[DDQT[LTL[KRNPNLNF[DHP[YPP[TKLM	80
武野-无毛Wuye-hairless	I: F[PNP[LAS[GKP[NDI[LAS[GDPYLR[LWE[KENS[VEPI[SLLNNS[KSS[EFCAPI[TSFDWNEVEP[RRI[GTSS[DTT[CTI[WDVERG	160
武野/Wuye	I: F[PNP[LAS[GKP[NDI[LAS[GDPYLR[LWE[KENS[VEPI[SLLNNS[KSS[EFCAPI[TSFDWNEVEP[RRI[GTSS[DTT[CTI[WDVERG	160
武野-无毛Wuye-hairless	II: V[ET[QLI[AHDKE[VHDI[AWGE[AGVF[AS[VS[ADGS[VR[FDLRDKE[HSTI[IYESPHDTP[LLRL[AWNKQDL[RYNATI[LMDSNKV	240
武野/Wuye	II: V[ET[QLI[AHDKE[VHDI[AWGE[AGVF[AS[VS[ADGS[VR[FDLRDKE[HSTI[IYESPHDTP[LLRL[AWNKQDL[RYNATI[LMDSNKV	240
武野-无毛Wuye-hairless	III: VI[LDI[RSPT[MPVAELERHRGS[VNAI[GWA[LS[CRH[CS[GDDGQALI[WELPTIVAGPSGI[DPNS[NTASSEI[NQLOWSAAKP	320
武野/Wuye	III: VI[LDI[RSPT[MPVAELERHRGS[VNAI[GWA[LS[CRH[CS[GDDGQALI[WELPTIVAGPSGI[DPNS[NTASSEI[NQLOWSAAKP	320
武野-无毛Wuye-hairless	IV: DW[AI[AF[ANKM[QLL[KV	336
武野/Wuye	IV: DW[AI[AF[ANKM[QLL[KV	336

方框标记 I、II、III、IV 的 WD-40 基序

Sequences in the boxes marked with I, II, III, IV indicated WD-40 motifs

图5 武野与武野 - 无毛 DcTTG1 蛋白序列比较

Fig.5 Alignment of amino acid sequences from Wuye-hairless and Wuye

2.3 DcTTG1 进化分析

研究表明,植物 TTG1 进化过程中非常保守,以拟南芥为外群(outgroup),利用 MEGA5.2 软件将找到的 14 个物种 TTG1 蛋白与胡萝卜 DcTTG1 构建进化树。结果显示,各科植物 TTG1 进化均处在各自的分枝上,进化上非常保守。在伞形花科植物分枝上,水芹与鸭儿芹为中国原产植物,进化关系较近(图 6)。另外,在伞形花科植物中,胡萝卜植株为有刺毛物种,其他 4 种伞形花科植物(芹菜、欧芹、鸭儿芹和水芹)几乎不含刺毛,这可能是胡萝卜 TTG1 蛋白与其他伞形花科植物 TTG1 蛋白存在一定进化距离的原因。

进一步利用 SMART 在线软件对获得的 14 个物种 TTG1 蛋白结构域分析表明,14 个物种 TTG1 均为 4 个 WD-40 基序(表 2)。基序结构在第 1 个 WD-40 基序上各科植物之间存在差异(十字花科和茄科植物均为 46 个碱基,其余为 44 个),在 II ~ IV 基序中,各科植物基序长度一致(表 2)。暗示着各植物 TTG1 在进化过程中,其基序在各科植物之间中相对保守。

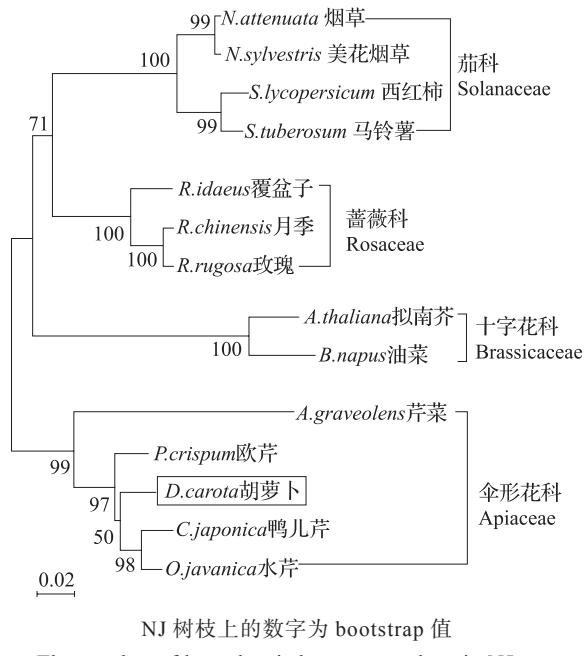
表 2 不同植物 TTG1 蛋白序列 WD-40 基序及长度预测

Table 2 Prediction of WD-40 motifs and length of TTG1 proteins from different plant species

物种 Species	基序 I 及长度 (aa) Motif I and length	基序 II 及长度 (aa) Motif II and length	基序 III 及长度 (aa) Motif III and length	基序 IV 及长度 (aa) Motif IV and length
胡萝卜 <i>D.carota</i> L.	63~106, 44	111~156, 46	159~197, 39	248~288, 41
芹菜 <i>A.graveolens</i> L.	65~108, 44	113~158, 46	161~199, 39	250~290, 41
欧芹 <i>P.crispum</i> (mill.) Fuss	63~106, 44	111~156, 46	159~197, 39	248~288, 41
鸭儿芹 <i>C.japonica</i> Hassk.	60~103, 44	108~153, 46	156~194, 39	245~285, 41
水芹 <i>O.javanica</i> (Blume) D C.	60~103, 44	108~153, 46	156~194, 39	245~285, 41
拟南芥 <i>A.thaliana</i> (L.) Heynh.	64~109, 46	116~161, 46	164~202, 39	253~293, 41
油菜 <i>B.napus</i> L.	60~105, 46	112~157, 46	160~198, 39	249~289, 41
月季 <i>R.chinensis</i> Jacq.	67~110, 44	118~163, 46	166~204, 39	255~295, 41
覆盆子 <i>R.idaeus</i> L.	68~111, 44	119~164, 46	167~205, 39	256~296, 41
玫瑰 <i>R.rugosa</i> Thunb.	70~113, 44	121~166, 46	169~207, 39	258~298, 41
烟草 <i>N.attenuata</i> Torr.ex S.Watson	67~112, 46	117~162, 46	165~203, 39	254~294, 41
美花烟草 <i>N.sylvestris</i> Speg.	67~112, 46	117~162, 46	165~203, 39	254~294, 41
西红柿 <i>S.lycopersicum</i> L.	67~112, 46	117~162, 46	165~203, 39	254~294, 41
马铃薯 <i>S.tuberosum</i> L.	67~112, 46	117~162, 46	165~203, 39	254~294, 41

2.4 DcTTG1 基因的表达分析

使用荧光定量 PCR 技术,对胡萝卜转录因子 DcTTG1 在两种不同材料之间的表达水平进行分析。结果表明,DcTTG1 在武野茎和叶中的表达水平极显著高于武野 - 无毛 ($P<0.01$, 图 7)。未授粉时,DcTTG1 在武野花中的表达水平高于武野 - 无



NJ 树枝上的数字为 bootstrap 值
The number of branches is bootstrap values in NJ tree
图 6 不同植物氨基酸序列 TTG1 进化树
(自检: 1000 次重复)
Fig.6 Phylogenetic tree of TTG1 proteins from different plant species (Bootstrap test: 1000 bootstrap replicates)

毛,但两者之间不存在显著性 ($P>0.05$) ;授粉 5 d 时,DcTTG1 在武野花中的表达水平极显著高于武野 - 无毛 ($P<0.01$);然而,在形成种子时(授粉 20 d),DcTTG1 在武野种子中的表达水平高于武野 - 无毛,但两者之间无显著性(图 7)。

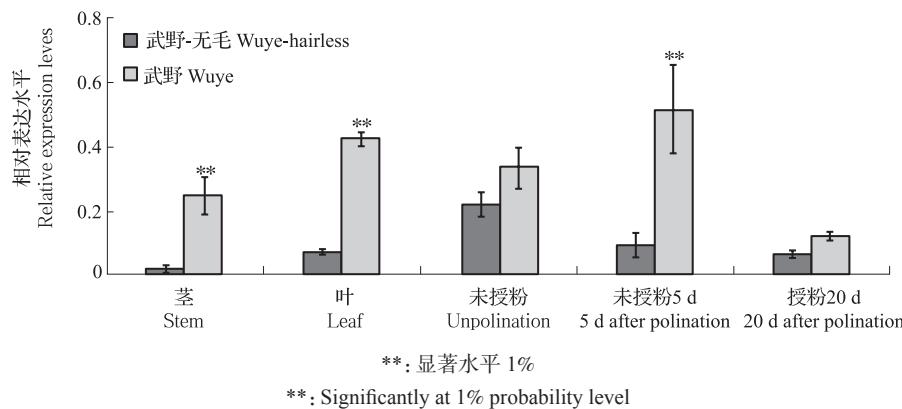


图 7 DcTTG1 在武野和武野 - 无毛中的表达分析

Fig.7 Tissue expression analysis of DcTTG1 in Wuye and Wuye-hairless

3 讨论

植物表皮刺毛是植物进化过程中,表皮细胞形成的一层特殊结构组织。刺毛存在于植物茎叶及种子表皮上,对植物抗病虫、抵抗高温等不良环境及促进植物传播(种子上的刺毛,能够粘连动物或者利于种子飞行等,使植物种子借助外力传播)等具有非常明显的作用^[14, 25-27]。然而,在人工不断地驯化栽培过程中,植物体上的刺毛作为一种不良的农艺性状,往往被弱化,如芥菜、白菜等。胡萝卜作为伞形花科肉质根蔬菜之一,往往由于其地上部分茎叶含有丰富的刺毛,使得其地上茎叶无法作为蔬菜或者饲料利用开发。为此,培育胡萝卜地上部分茎叶无刺毛材料,对充分利用胡萝卜地上部分,具有积极的意义。本课题组获得的武野 - 无毛材料,其地上部分茎叶、种子等均为无刺毛材料,为利用该材料培育无毛材料提供了可能。

韩国最早提出了培育胡萝卜种子无毛材料的设计,但韩国获得的胡萝卜材料,其种子仍含有一定量的刺毛,到目前也未见获得种子无刺毛胡萝卜商品种的报道。对胡萝卜种子刺毛的研究,韩国科学家进行了分子标记研究,但所用的胡萝卜材料种子无刺毛不彻底^[6-7, 9-10],其研究结果有待验证。我国学者在编写《胡萝卜种质资源描述规范和数据标准》时,在胡萝卜种子刺毛描述中,增加了胡萝卜种子(即果实)表皮无刺毛等级,但未有具体的参照标准和实例图片^[28]。为此,本研究培育获得的武野 - 无毛种子表皮中无刺毛特征彻底,可作为胡萝卜种子刺毛发育机理研究的材料及种子无刺毛材料的实例。

胡萝卜杂交育种的突破在于发现和利用胡萝卜雄性不育材料,特别是瓣化型雄性不育材料^[29-30]。目前使用的胡萝卜雄性不育材料中,其植株和种子

中均含有刺毛,制种过程中仍需要去除种子刺毛。之前,我们在武野材料中选择出一株茎叶无刺毛的瓣化型雄性不育材料,将其命名为武野 - 不育,但该雄性不育材料种子发育过程中会形成刺毛^[4]。为此,我们将武野 - 无毛与武野 - 不育杂交,已经初步筛选出植株和种子均无毛的雄性不育材料。为更好地培育胡萝卜种子无毛的雄性不育材料,用于胡萝卜实践育种中提供了可能。

植物 TTG1 转录因子被证实是与植物表皮刺毛发育正相关的转录因子之一,在拟南芥各种 ttg1 突变体中,植株均表现出无刺毛或者刺毛发生了明显变化^[15-16, 26]。本研究中,有无刺毛胡萝卜材料的该转录因子序列长度和对应的蛋白序列一致,只是在碱基序列中发生了 3 个位点的差异,导致氨基酸也发生了 3 个位点差异,但未改变两个材料的 TTG1 蛋白序列的 WD-40 基序,其基序数目与拟南芥一致,均为 4 个。然而,使用克隆得到的两种材料 DcTTG1 转录因子在 NCBI 进行 blastx 比对和预测时,两个材料的 TTG1 的 WD-40 基序均为 5 个,使用对应的蛋白序列进行 blaxtp 时,两个材料的 TTG1 的 WD-40 基序均为 6 个(数据未显示)。使用拟南芥 TTG1 蛋白序列与胡萝卜该蛋白序列进行对比,发现胡萝卜 TTG1 只有 4 个,与 SMART 在线分析结果一致。为此,胡萝卜 TTG1 预测应使用 SMART 在线分析。有与无刺毛 DcTTG1 基因表达分析显示,有毛材料中 DcTTG1 在叶片、茎中的表达量极显著高于无刺毛的胡萝卜材料。在授粉 5 d 时, DcTTG1 在授粉的有刺毛材料武野中的表达水平极显著高于武野 - 无毛材料,也高于花未开放的武野材料。表明胡萝卜 DcTTG1 与植株表皮和种子刺毛的发育相关,研究结果与前人在拟南芥、油菜等植物研究结果一致^[14-16]。

参考文献

- [1] Bystrická J, Kavalcov P, Musilová J, Vollmannová A, Tóth T, Lenková M. Carrot (*Daucus carota* L.ssp.*sativus* (Hoffm.) Arcang.) as source of antioxidants. *Acta Agriculturae Slovenica*, 2015, 105: 303-311
- [2] Schmaelzle S, Tanumihardjo S A. Carrots of various colors. Totowa: Humana Press, 2013: 21-28
- [3] 谭国飞,王枫,马静,田畅,陈逸云,熊爱生.室温贮藏过程中胡萝卜口感及部分营养成分含量变化.植物资源与环境学报,2014,23(1): 107-109
- Tan G F, Wang F, Ma J, Tian C, Chen Y Y, Xiong A S. Changes of taste and content of some nutritional components of carrot during storage period under room temperature. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2014, 23 (1): 107-109
- [4] 谭国飞,王枫,马静,张馨月,熊爱生.野生瓣化型雄性不育胡萝卜‘武野 - 不育’的特征鉴定与分析.植物遗传资源学报,2017,18(6): 1216-1220
- Tan G F, Wang F, Ma J, Zhang X Y, Xiong A S. Identification and analysis of the characteristics of a wild petaloid male-sterile carrot ‘Wuye-BY’. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18 (6): 1216-1220
- [5] 单人骅,余孟兰.中国植物志:第55(3)卷.北京:科学出版社,1992: 225-226
- Shan R H, She M L. *Flora of China*: Volume 55 (3). Beijing: Science Press, 1992: 225-226
- [6] Gyudong O, Eunjo S, Sangjin J, Youngdoo P. Development of SNP molecular markers related to seed-hair characteristic based on EST sequences in carrot. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 2013, 31 (1): 80-88
- [7] Gyudong O, Eunjo S, Sangjin J, Youngdoo P. Construction of cDNA library and EST analysis related to seed-hair characteristics in carrot. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 2013, 31 (6): 782-789
- [8] 孙美玲,吕爽,邱李梅.浅析我国胡萝卜育种概况.赤子,2012(1): 133
- Sun M L, Lv S, Qiu L M. Brief analysis of carrot breeding in china. *Chizi*, 2012 (1): 133
- [9] Gyudong O, Eunmi H, Eunjo S, Sangjin J, Youngdoo P. EST profiling for seed-hair characteristic and development of EST-SSR and SNP markers in carrot. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 2010, 28 (6): 1025-1038
- [10] Eunjo S, Sungkwan P, Gyudong O, Sangjin J, Youngdoo P. Development of RAPD-SCAR molecular marker related to seed-hair characteristic in carrot. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 2013, 31 (6): 756-763
- [11] Hwang E M, Oh G D, Shim E J, Jeon S J. Analysis of seed hair formation related genes by EST profiling in carrot (*Daucus carota* var.*sativa*). *Korean J Hortic Sci*, 2010, 28 (6): 1039-1050
- [12] 刘凯歌,齐双慧,段绍伟,李东,金倡宇,高晨浩,刘绚霞,陈明训.甘蓝型油菜BnTTG1-1基因的功能分析.植物学报,2017,52(6): 713-722
- Liu K G, Qi S H, Duan S W, Li D, Jin C Y, Gao C H, Liu X X, Chen M X. Functional analysis of *Brassica napus* BnTTG1-1 gene. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52 (6): 713-722
- [13] Walker A R, Davison P A, Bolognesi-Winfield A C, James C M, Srinivasan N, Esch J J, Marks M D, Gray J C. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell*, 1999, 11 (7): 1337-1350
- [14] Alahakoon U. Effect of TRANSPARENT TESTA GLABRA1 on trichome development, growth, and insect resistance in a *Brassica napus* AtGLABRA3⁺ background. Canada Saskatoon: University of Saskatchewan Saskatoon, 2014
- [15] Larkin J C, Oppenheimer D G, Lloyd A M, Paparozzi E T, Marks M. Roles of the *GLABROUS1* and *TRANSPARENT TESTA GLABRA* genes in *Arabidopsis* trichome development. *Plant Cell*, 1994, 6 (8): 1065-1076
- [16] Koornneef M. The complex syndrome of *ttg* mutants. *Arabidopsis Information Service*, 1981, 18: 45-51
- [17] Lloyd A M. The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental Biology*, 1994, 166 (2): 740-754
- [18] Jia X L, Wang G L, Xiong F, Yu X R, Xu Z S, Wang F, Xiong A S. *De novo* assembly, transcriptome characterization, lignin accumulation, and anatomic characteristics: novel insights into lignin biosynthesis during celery leaf development. *Scientific Reports*, 2015, 5: e8259
- [19] Li M Y, Tan H W, Wang F, Jiang Q, Xiong A S. *De novo* transcriptome sequence assembly and identification of *AP2/ERF* transcription factor related to abiotic stress in parsley (*Petroselinum crispum*). *PLoS One*, 2014, 9 (9): e108977
- [20] Tan G F, Wang F, Li M Y, Wang G L, Jiang Q, Xiong A S. *De novo* assembly and transcriptome characterization: novel insights into the temperature stress in *Cryptotaenia japonica* Hassk. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37 (1): 1-12
- [21] Jiang Q, Wang F, Tan H W, Li M Y, Xu Z S, Tan G F, Xiong A S. *De novo* transcriptome assembly, gene annotation, marker development, and miRNA potential target genes validation under abiotic stresses in *Oenanthe javanica*. *Molecular Genetics & Genomics*, 2015, 290 (2): 671-683
- [22] Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9 (4): 299-306
- [23] Tian C, Jiang Q, Wang F, Xu Z S, Xiong A S. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS One*, 2015, 10 (2): e0117569
- [24] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: e45
- [25] Wagner G J, Wang E, Shepherd R W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*, 2004, 93 (1): 3-11
- [26] Werker E. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research*, 2000, 31: 1-35
- [27] Cardoso M Z. Herbivore handling of a plants trichome: the case of *Heliconius charithonia* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Passiflora lobata* (Killip) Hutch. (Passifloraceae). *Neotropical Entomology*, 2008, 37 (3): 247-252
- [28] 庄飞云,朱德蔚.胡萝卜种质资源描述规范和数据标准.北京:中国农业出版社,2007
- Zhuang F Y, Zhu D W. *Descriptors and Data Standard for Carrot (Daucus carota L.).* Beijing: China Agriculture Press, 2007
- [29] Simon P W, Freeman R E, Vieira J V, Boiteux L S, Briard M, Nothnagel T. *Carrot Handbook Plant Breeding*, 2017, 16 (S1): 165-178
- [30] Tan G F, Wang F, Zhang X Y, Xiong A S. Different lengths, copies and expression levels of the mitochondrial *atp6* gene in male sterile and fertile lines of carrot (*Daucus carota* L.). *Mitochondrial DNA Part A*, 2017, 29 (3): 446-454