

研究论文

Research Article

谷子类胡萝卜素生物合成途径 *SiLCYB* 基因与米色形成的关系

张耀元^{1,3,4} 路阳¹ 张彬¹ 禾璐¹ 刘龙龙³ 王兴春^{2,4} 李红英^{2,3} 韩渊怀^{1,2,3,4*}

1 山西农业大学农学院, 太谷, 030801; 2 山西农业大学农业生物工程研究所, 太谷, 030801, 3 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 太原, 030031; 4 杂粮种质资源发掘与遗传改良山西省重点实验室, 太谷, 030801

* 通讯作者, swgctd@163.com

摘要 谷子是中国北方重要杂粮作物,米色是评价谷子品质的重要指标,目前关于谷子米色的形成机制仍不明确。本研究选用米色分别为深黄、浅黄、白色和绿色的谷子品种各 2 个,对这 8 个谷子品种进行了总类胡萝卜素含量、 β -胡萝卜素含量与米色差异间关系的分析,以及分子水平 4 个 β -胡萝卜素代谢相关基因在籽粒不同灌浆阶段的表达模式分析,结果表明 CCI 指数作为米色测定的综合指标,可对不同品种米色差异进行鉴定,且分别与总类胡萝卜素、 β -胡萝卜素含量呈显著与极显著正相关。通过对 8 个品种 *SiLCYB* 基因组 DNA 克隆发现,只有深黄品种 JG21 中出现序列变异,有两个 SNP 位点,且第二处单核苷酸变异使相应氨基酸由谷氨酰胺变为精氨酸。*SiLCYB* 表达不具有组织特异性,在叶中表达最高,茎中最低。通过对籽粒不同灌浆阶段 β -胡萝卜素合成基因 *SiLCYB* 与另外 3 个 β -胡萝卜素代谢相关基因(*SiLCYE*, *SiHYD*, *SiCCD1*)的表达分析发现:*SiLCYB* 在大多数品种中表达基本恒定,且与 β -胡萝卜素积累没有表现出显著相关性;而 *SiLCYE* 在不同品种中普遍呈现出与 *SiLCYB* 同增同减的表达模式,但表达水平低于 *SiLCYB*;同时发现 2 个降解相关基因(*SiHYD*, *SiCCD1*)的表达与 β -胡萝卜素积累在灌浆特定阶段表现出了显著或极显著负相关。因此,推测 *SiLCYB* 与降解基因 *SiHYD* 和 *SiCCD1* 共同作用,通过影响 β -胡萝卜素和总类胡萝卜素在籽粒中的积累,进而影响米色的形成。

关键词 β -胡萝卜素, 米色, *SiLCYB*, 籽粒灌浆, 表达模式

The Relationship between the Gene *SiLCYB* Related to Carotenoid Synthesis and the Colored Formation of Foxtail Millet

Zhang Yaoyuan^{1,3,4} Lu Yang¹ Zhang Bin¹ He Lu¹ Liu Longlong³ Wang Xingchun^{2,4} Li Hongying^{2,3}
Han Yuanhuai^{1,2,3,4*}

1 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, 030801; 2 Institute of Agricultural Bioengineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, 030801; 3 Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan, 030031; 4 Shanxi Key Laboratory of Resources and Genetic Improvement of Minor Crops, Taigu, 030801

* Corresponding author, swgctd@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.014.001341

Abstract Foxtail millet is an important minor crop in Northern China, hullless grain color is a key visual index to evaluate foxtail millet quality, but the formation mechanism of hullless grain color remains unclear. Here, eight foxtail millet cultivars were selected including dark and light yellow, white and green foxtail millet varieties, with two cultivars of each color. We mainly analyzed the relationship between the content of total carotenoid and β -carotene and the color difference of foxtail millet grain, and the expression patterns of four genes related to β -carotene metabolism at different filling stages of different foxtail millet varieties. The results showed that citrus color index (CCI), as a comprehensive index for the analysis of grain color, is effective on identification of color

基金项目 本研究由国家自然科学基金(31371693, 31471556, 31471502)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(2013140311 0001)和山西农业大学科技创新基金(20142-07)共同资助

difference, CCI also showed the significantly positive correlation with the content of total carotenoid and extremely significant positive correlation with the content of β -carotene. Next, the sequence alignment of *SiLCYB* in eight cultivars was analyzed, and the sequence variations only occurred in JG21, with two SNP (single nucleotide polymorphism) loci, and the second one led to changes in amino acids, with glutamine replaced with arginine. Moreover, the expression of *SiLCYB* wasn't tissue specific, with the highest expression in leaves and the lowest expression in stem. The expression patterns of *SiLCYB* and three other genes related to β -carotene metabolism (*SiLCYE*, *SiHYD*, *SiCCDI*) at different filling stages were further analyzed, the results showed that the expression of *SiLCYB* was almost constant and there is no significantly positive correlation between the expression of *SiLCYB* and the accumulation of β -carotene. The expression patterns of *SiLCYE* were similar to *SiLCYB*, with lower expression level than *SiLCYB*. Meanwhile, it was discovered that the relative expression level of *SiHYD* and *SiCCDI* related to carotenoid degradation showed significant and highly significant negative correlation at specific stages during filling. Therefore, the formation of different hullless grain color might be caused by the mutual interaction of *SiLCYB*, *SiCCDI* and *SiHYD*, with differential accumulation of carotenoid and β -carotene.

Keywords β -carotene, Hullless grain color, *SiLCYB*, Grain filling, Expression pattern

谷子(*Setaria italica* (L.) P. Beauv.)属禾本科狗尾草属,具有耐旱、耐瘠薄、生育期短,适播期长等优点,是我国北方重要杂粮作物(李国营, 2009)。谷子脱壳后即小米,其米色性状具有多样性,包括黄色、浅黄色、白色、绿色、红色等多种性状,其中,黄米品种所占比例最高(禾璐, 2015)。而米色是评价谷子品质的重要指标,直观反映小米品质的优劣。相关研究表明:不同米色谷子品种其营养品质差异明显,小米米色与其蒸煮后米饭的色泽、香味、适口性呈极显著正相关,即米色越黄,米饭的香味、色泽、适口性越好(何继红等, 2002; 王玉文等, 2008)。同时,小米中黄色素含量与其外观品质也呈现显著正相关,而黄色素主要成分为天然类胡萝卜素(杨延兵等, 2012; 贾鹏禹等, 2015),可见小米米色与类胡萝卜素积累存在相关性。Fu等(2012)通过对枇杷果实发育过程的研究表明:红果肉与白果肉枇杷品种在其果实发育的不同阶段,果肉与果皮的颜色变化与类胡萝卜素积累的种类与含量是密切相关的。Messias等(2014)通过对23个不同玉米品种籽粒发育过程类胡萝卜素含量及其代谢相关基因的表达分析,表明不同颜色的籽粒所含类胡萝卜素含量是有差别的,并揭示了类胡萝卜素积累与其代谢相关基因表达模式的相关性。禾璐(2015)从类胡萝卜素代谢、叶绿素代谢与花青素代谢3方面对大青谷米色形成机制进行了研究,发现大青谷绿色米色的形成可能主要与叶绿素降解相关的*SiSGR*基因启动子序列变异及其在籽粒成熟过程的低表达有关。但目前对于谷子米色形成机制仍未明确,从类胡萝卜素代谢角度探究米色形成机制的相关研究也比较少。

类胡萝卜素是一类由异戊二烯组成的萜类物质,常积累于高等植物花和果实的色素母细胞中,使其呈黄色、红色或橙色(王玉萍等, 2006)。高等植物类胡萝卜素生物合成途径(图1)包括缩合、脱氢、环化、羟化及环氧化五个主要环节,是类异戊二烯代谢体系中的一个分支(da Silva Messias et al., 2014)。其中,番茄红素的环化由番茄红素 β -环化酶(lycopene beta cyclase, *LCYB*)和番茄红素 ϵ -环化酶(lycopene epsilon cyclase, *LCYE*)共同催化,分别形成2个 β -环的 β -胡萝卜素和1个 β -环、1个 δ -环的 α -胡萝卜素,是植物类胡萝卜素生物合成的重要分支点。Bai等(2009)认为*ZmLCYB*和*ZmLCYE*转录本的相对积累与最初番茄红素环化产物高度相关,即*LYCE/LYCB*两种环化酶表达丰度的相对强弱决定了底物转化为 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的比例,进而决定由 α -胡萝卜素生成叶黄素和 β -胡萝卜素生成玉米黄质、新黄质等产物在类胡萝卜素总量中所占的比例。*LCYB*作为途径中唯一不含内含子的基因,是 β -胡萝卜素生物合成的关键酶,在番茄红素向下游代谢物质转化中起重要作用。Ronen等(2000)利用番茄*Beta*突变体研究表明*LCYB*过表达促使其果实中 β -胡萝卜素大量积累。而Kato等(2004)研究证实,不同柑橘品种果实成熟过程中,其果皮主要积累的类胡萝卜素由 α -胡萝卜素向 β -胡萝卜素转变,这种变化与*LCYB*表达丰度增强*LCYE*表达丰度减弱有关。此外,类胡萝卜素的酶降解主要有羟化酶降解、双加氧酶裂解和脂氧合酶降解(孟凡来等, 2013)。HYD (hydroxylase)是一种羟化酶,可使 β -胡萝卜素结构中的2个 β -环发生羟基化,进而影响

β -胡萝卜素的积累。CCDs (carotenoid cleavage dioxygenases) 是一种非血红素加氧酶, 包括 9 个双加氧酶异构体, 其中 *CCD1* 影响果实的色泽和风味, 使 β -胡萝卜素氧化裂解成假紫罗酮和 β -紫罗酮等挥发性香味分子 (由淑贞和杨洪强, 2008; Zheng et al., 2015a; Zhang et al., 2015b)。

本研究选用 8 个不同米色的谷子品种, 通过总类胡萝卜素含量、 β -胡萝卜素含量与不同米色差异间关系的分析, 以及分子水平 *SiLCYB* 基因在不同米色品种中的序列比对及 β -胡萝卜素代谢相关基因在籽粒不同灌浆阶段的表达模式分析, 以期阐明 *SiLCYB* 与 β -胡萝卜素、总类胡萝卜素含量的关系, 并从类胡萝卜素代谢角度进一步探究 *SiLCYB* 与谷子米色形成的关系, 为今后高类胡萝卜素含量谷子品种的选育奠定理论基础。

1 结果与分析

1.1 不同品种小米米色色差分析

通过色差仪对 8 个谷子品种进行米色测定 (表 1), 发现色差分析与人为感官判断较为一致, 其中, 白米品种 L^* 值最高, L^* 表示亮度, 白米反射性最强, 因此其亮度值最高; 黄米品种 b^* 值最高, b^* 表示黄度, 小米越黄则对应的 b^* 值越高。各色差参数与人视觉判断有一定相关性。CCI 作为米色测定的综合指标, 表

表 1 不同品种米色色差分析

Table 1 The analysis of color difference in eight foxtail millet varieties

感官评价 - 谷子品种 Sensory evaluation-foxtail millet cultivar	L^*	b^*	CCI
深黄 - 晋谷 21 (JG21) Dark yellow-Jingu21 (JG21)	53.672±2.013	41.944±1.013	4.018±0.095
深黄 - 长农 35 (CN35) Dark yellow-Changnong35 (CN35)	55.785±1.892	42.957±1.956	4.082±0.114
浅黄 - 晋谷 36 (JG36) Light yellow-Jingu36 (JG36)	54.194±0.736	39.526±0.692	3.886±0.087
浅黄 - 公穗 4 号 (GS4) Light yellow-Gongsui 4 (GS4)	59.472±0.991	41.972±0.864	3.321±0.032
白色 - 支生谷 (ZSG) White-Zhishenggu (ZSG)	61.703±1.542	24.038±1.522	2.717±0.054
白色 - 牛毛白 (NMB) White-Niumaobai (NMB)	61.218±1.964	27.207±0.613	2.748±0.105
绿色 - 大青谷 (DQG) Green-Daqinggu (DQG)	38.472±1.055	20.985±0.981	3.279±0.156
绿色 - 露米青谷 (LMQG) Green-Lumiqinggu (LMQG)	40.295±0.564	26.916±0.813	3.485±0.176

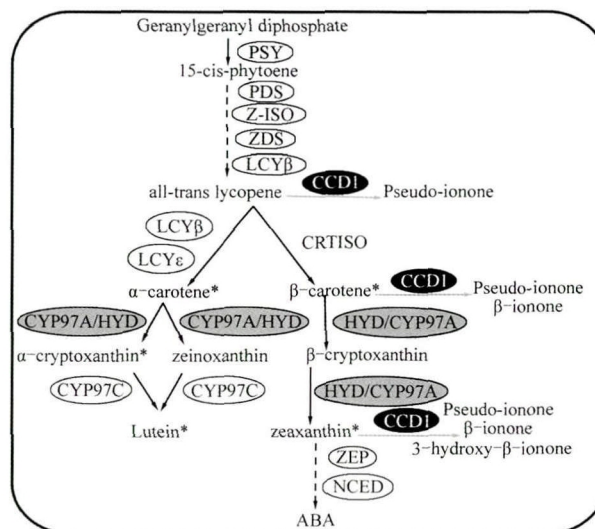


图 1 植物类胡萝卜素生物合成途径

Figure 1 Carotenoid biosynthetic pathway in plants

现出明显的品种差异, 整体趋势为黄色最高, 绿色次之, 白色最低, 可有效对不同品种米色性状进行鉴定。

1.2 不同品种小米总类胡萝卜素和 β -胡萝卜素含量分析

使用 Eppendorf 紫外分光光度计对类胡萝卜素提取液在 350~700 nm 波长范围内进行光谱扫描, 发现类胡萝卜素最大特征吸收峰出现在 449 nm 处, 且随小米色泽变浅, 吸收峰峰值降低, 即类胡萝

表 2 不同品种小米总类胡萝卜素含量及 β -胡萝卜素含量

Table 2 The contents of total carotenoid and β -carotene in different varieties of foxtail millets

感官评价 - 谷子品种 Sensory evaluation-foxtail millet cultivar	总类胡萝卜素含量($\mu\text{g/g}$) Total carotenoid content ($\mu\text{g/g}$)	β -胡萝卜素含量($\mu\text{g/g}$) β -carotene content ($\mu\text{g/g}$)
深黄 -JG21 Dark yellow-JG21	25.946 \pm 0.120	2.579 \pm 0.038
深黄 -CN35 Dark yellow-CN35	15.576 \pm 0.075	1.939 \pm 0.051
浅黄 -JG36 Light yellow- JG36	17.296 \pm 0.093	2.239 \pm 0.016
白色 -ZSG White- ZSG	2.529 \pm 0.002	0.017 \pm 0.001
白色 -NMB White-NMB	1.445 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001
绿色 -DQG Green-DQG	13.027 \pm 0.134	1.804 \pm 0.002
绿色 -LMQG Green-LMQG	12.559 \pm 0.142	1.979 \pm 0.021

胡萝卜素含量降低。通过 8 个米色品种小米总类胡萝卜素含量与 β -胡萝卜素含量的测定(表 2)发现深黄品种 JG21 的总类胡萝卜素含量与 β -胡萝卜素含量均为最高,分别为 25.946 $\mu\text{g/g}$ 和 2.579 $\mu\text{g/g}$,最低为白色品种 NMB,分别为 1.445 $\mu\text{g/g}$ 和 0.013 $\mu\text{g/g}$,而两个绿米品种总类胡萝卜素含量与 β -胡萝卜素含量也较高,可能由于其含有较多的叶绿体。有研究表明:叶绿体参与质体分化,在一定条件下可以向有色体转变,转变过程中质体小球的大小和数量会明显增加,进而参与类胡萝卜素的富集与固定,使类胡萝卜素含量增加(Bréhelin and Kessler, 2008; Egea et al., 2010)。

用 DPS 7.05 软件对 β -胡萝卜素含量、总类胡萝卜素含量、米色 CCI 指数、色差参数 b^* 四项指标进行相关性分析,发现米色 CCI 指数与总类胡萝卜素含量的 Pearson 相关系数为 0.770,呈显著正相关,与 β -胡萝卜素含量的相关系数为 0.844,呈极显著正相关;而表示黄度的米色参数 b^* 与其余三项指标均没有表现出显著相关性。虽然 Shen 等(2015)认为在小米色泽的评价上,色差参数 b^* 值作为小米黄度指标可以表征小米的米色差异。而从本试验可看出, b^* 值虽与小米黄度存在相关性,但不能较为准确地反映小米色差,而 CCI 指数可以较为准确地反映这一差异,因此 b^* 值可作为辅助指标并结合 CCI 指数对不同品种小米色差进行综合评定。

1.3 不同品种 *SiLCYB* 基因组 DNA 克隆

由于不同品种小米 β -胡萝卜素含量差异显著,

特别是白米与其他米色小米相比 β -胡萝卜素含量几乎为零,因此,对 β -胡萝卜素合成酶基因 *SiLCYB* 进行克隆与序列比对,以期获得米色差异的原因。通过不同品种 *SiLCYB* 克隆及基因序列比对发现:*SiLCYB* 基因在不同品种中高度保守,只发现 2 处单核苷酸变异,均位于深黄品种 JG21,第 1 处位于 CDS 区 234 bp 处,为 C/G 替换,第 2 处位于 1 466 bp 处,为 A/G 颠换,进一步对 8 个品种蛋白序列比对(图 2)发现:第 2 处核苷酸差异使其对应氨基酸由谷氨酰胺(Q)变为精氨酸(R)。通过生物信息学对 JG21 和参考物种豫谷 1 号(YG1)的 *LCYB* 蛋白序列进行理化性质分析及二级结构预测发现:JG21 的 *LCYB* 由 493 个氨基酸残基组成,较 YG1 少两个氨基酸;*LCYB* 在 YG1 和 JG21 的理论等电点分别为 7.18 和 6.87,蛋白质由中性变为弱酸性。碱基序列差异导致了氨基酸序列差异,并引起蛋白质理化性质及二级结构发生变化,推测 *LCYB* 序列差异可能通过影响空间构象而对蛋白功能产生影响,进而影响 β -胡萝卜素积累,使 JG21 表现出有别于其他品种的米色性状。

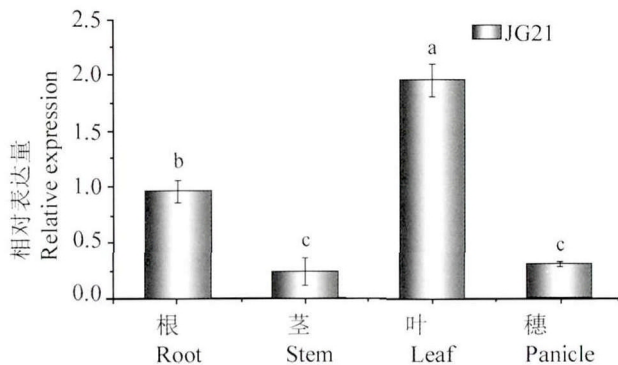
1.4 JG21 灌浆前期 *SiLCYB* 基因在不同组织中的表达模式

为探究 *SiLCYB* 灌浆前不同组织的表达是否具有特异性,对其在 JG21 根、茎、叶、穗 4 种不同组织的表达进行了分析(图 3),发现 *SiLCYB* 在这几种组

CN35-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G
DQG-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G
GS4-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G
JG21-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	R	D	R	D	G
JG36-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G
LMQG-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G
NMB-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G
YG1-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G
ZSG-LCYB	F	F	D	A	F	F	D	L	E	P	H	Y	W	H	G	F	L	S	S	R	L	F	L	P	E	L	L	M	F	G	L	T	L	F	G	N	A	S	N	T	L	E	I	M	A	K	G	T	V	P	L	G	K	M	I	G	N	L	I	Q	D	R	D	G

图2 八个品种与参考物种豫谷1号(YG1)的 *SiLCYB* 蛋白序列比对Figure 2 The protein sequence alignment of *SiLCYB* among the eight foxtail millet cultivars and the reference species YG1

织中均有表达,不存在组织特异性,但在表达水平上差异显著,叶中表达量最高,显著高于根中表达水平,可能与灌浆前叶片主要合成类胡萝卜素用来进行光保护有关。而根中表达量又显著高于茎和穗,在茎中表达最低。该结果与 Moreno 等(2013)对胡萝卜中 *DcLCYB* 的表达模式的研究一致,即在胡萝卜的生长阶段 *DcLCYB* 在叶中表达并积累于根中,其表达不存在组织特异性。而在禾谷类作物的相关研究中,也有类似结果 Zeng 等(2015)通过研究小麦根、茎、叶、穗、雄蕊和不同发育阶段籽粒等组织中 *TaLCYB* 的表达及其与类胡萝卜素含量关系,表明 *TaLCYB* 表达无组织特异性,在叶中表达受强光诱导,且 β -胡萝卜素积累量随 *TaLCYB* 表达水平变化而变化。这些研究结果与本试验结果的一致性为进一步研究不同灌浆阶段籽粒 *SiLCYB* 的表达与总类胡萝卜素、 β -胡萝卜素含量间的关系提供依据,并为米色形成机制的探究提供可能。

图3 *SiLCYB* 在 JG21 灌浆前期根、茎、叶、穗不同组织中的表达模式注:不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著Figure 3 The expression patterns of *SiLCYB* during the early filling stage in different tissues including root, stem, leaf and panicle of JG21Note: The different small letters mean significant difference ($p < 0.05$ level)

1.5 *SiLCYB* 与 β -胡萝卜素代谢相关基因在不同灌浆阶段的表达模式

为探究不同品种总类胡萝卜素和 β -胡萝卜素积累差异是否由 *LCYB* 转录水平的特异调控引起,对影响 β -胡萝卜素生物合成的 *SiLCYB* 基因以及另外 3 个 β -胡萝卜素代谢相关基因 (*SiLCYE*, *SiHYD*, *SiCCD1*) 的表达进行了定量分析。

1.5.1 *SiLCYB* 在籽粒不同灌浆阶段的表达模式

SiLCYB 在各品种籽粒不同灌浆阶段的表达情况除在 LMQG (绿色) 中显著高表达外,在其余品种中表达基本恒定(图 4A),将深黄品种与其余米色品种分别比较发现:在灌浆期籽粒发育的不同阶段, *SiLCYB* 无论在白色籽粒还是绿色籽粒中的表达均高于深黄色籽粒;而对于浅黄品种只有 S2 和 S4 阶段高于深黄品种,其余阶段表达相近。可见,不同品种不同灌浆阶段 *SiLCYB* 表达与 β -胡萝卜素含量间没有表现出显著正相关。

1.5.2 *SiLCYE* 在籽粒不同灌浆阶段的表达模式及其与 *SiLCYB* 表达模式间的关系

由于 *SiLCYB* 与 *SiLCYE* 在类胡萝卜素环化过程中相互依存、相互影响,对 *SiLCYE* 表达模式的分析有助于进一步认识 *SiLCYB* 在 β -胡萝卜素积累甚至是米色形成中的作用。

通过每个品种 *SiLCYB* 与 *SiLCYE* 表达模式的比较(图 4B; 图 5)发现, *SiLCYE* 在大多数品种中表现出与 *SiLCYB* 同增同减的表达趋势,根据这两个基因表达水平达到峰值时所处的灌浆阶段以及峰值的个数,可以看出不同品种表达模式间的差异,单峰值型即表达通常先增后减,呈倒“V”型,双峰值型即除 S2 阶段出现首个峰值外,在 S4 或 S5 阶段还会出现第 2 个峰值,从而使这 2 个基因在整个灌浆期的表达分别呈现出“M”型或“N”型表达模式。“M”型表达模式

在 NMB (白色)和 DQG (绿色)中较为典型,而“N”型在 CN35 (浅黄)和 LMQG (绿色)中较为典型。可见,不同品种相同基因表达模式存在差异,同时,即使米色一致的品种,如 DQG 和 LMQG 均为绿色,相同基因的表达模式也存在差异。

由于 LYCB/LYCE 两种环化酶表达丰度的相对强弱决定了底物转化为 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的比例,因此进一步对不同品种不同灌浆阶段的 LCYB/LCYE 表达比率进行分析(图 6):发现 CN35 (深黄)和 GS4 (浅黄)谷子品种中 LCYB/LCYE 比率远远高于其他 6 个品种,CN35 中 LCYB/LCYE 比值达 14,而 GS4 中 LCYB/LCYE 比值可达到 25 左右。

1.5.3 β -胡萝卜素降解相关基因在籽粒不同灌浆阶段的表达模式

本试验对 *SiHYD* 和 *SiCCD1* 的在籽粒灌浆不同阶段的表达模式进行分析(图 4C; 图 D),发现 *SiHYD* 在 S4 阶段的表达变化较为显著。尤其是 2 个白色品种, S4 阶段 *SiHYD* 表达量约为同阶段其他品

种中表达量的 6~8 倍,而其余阶段 *SiHYD* 表达水平在品种间的差异最大才达 2.2 倍。同时, *SiCCD1* 在白色品种中的表达水平也表现出了明显高于其他米色品种的表达差异。

1.5.4 β -胡萝卜素代谢相关基因与 β -胡萝卜素、总类胡萝卜素含量及米色指数的相关性分析

为了更好地反映米色与类胡萝卜素代谢相关基因表达的关系,将不同时期各基因表达水平与宏观表型数据进行相关性分析,发现 β -胡萝卜素含量与其合成基因 *SiLCYB* 的表达不呈正相关,但与 2 个降解基因呈现出不同程度的负相关。其中, β -胡萝卜素含量与 S3 时期 *SiCCD1* 和 S3 和 S4 时期 *SiHYD* 的表达呈显著负相关,相关系数分别为 -0.838 和 -0.819;总类胡萝卜素含量与 S4、S5 时期的 *SiCCD1* 表达呈显著负相关,相关系数分别为 -0.709 和 -0.743,而与 S3 时期 *SiHYD* 的表达呈极显著负相关(-0.861)等。进一步表明 *SiCCD1* 与 *SiHYD* 在 β -胡萝卜素积累中的作用也不可忽视,推测,尽管 *SiLCYB*

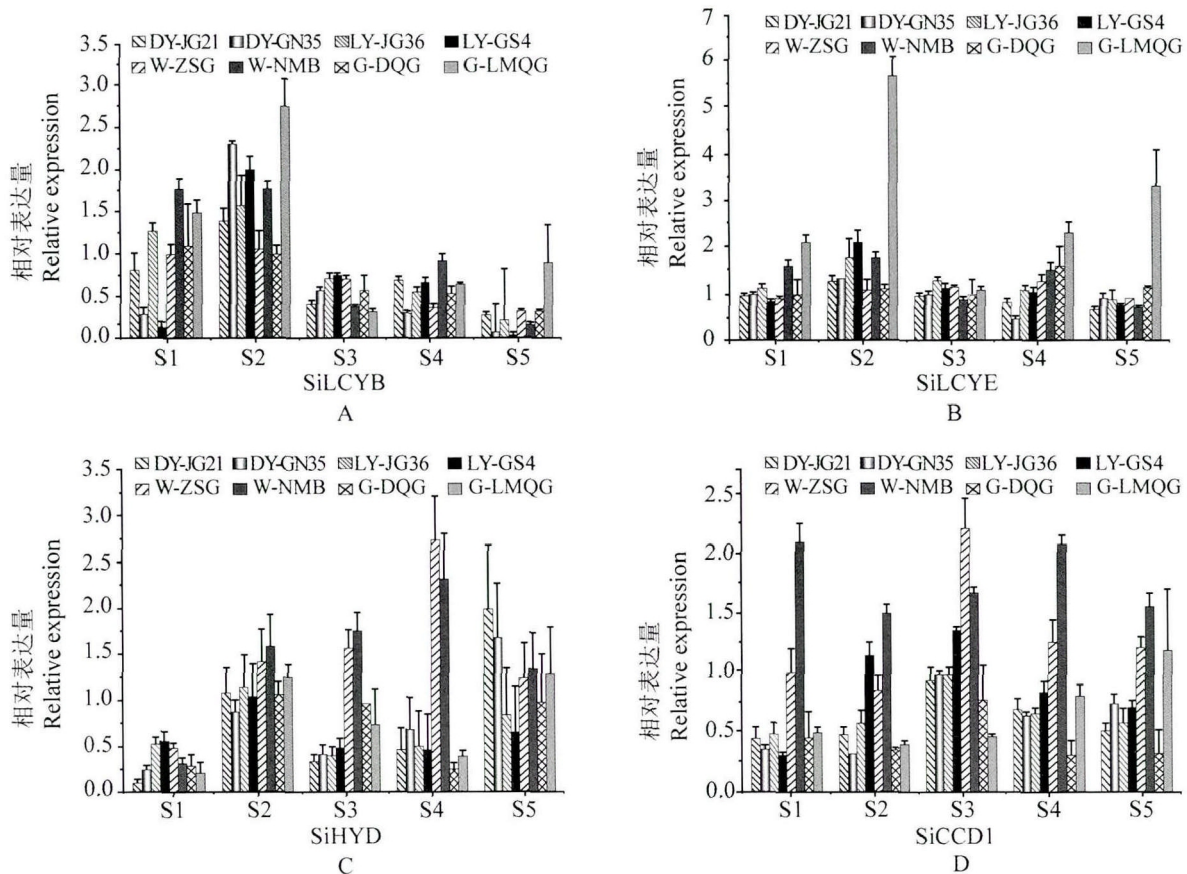


图 4 β -胡萝卜素代谢相关基因在不同品种不同籽粒灌浆阶段的表达模式
注: DY 表示深黄; LY 表示浅黄; W 表示白色; G 表示绿色(下图同)

Figure 4 The expression patterns of genes related to β -carotene metabolism at different filling stages of different foxtail millet varieties
Note: DY means dark yellow; LY means light yellow; W means white; G means green; The same as below

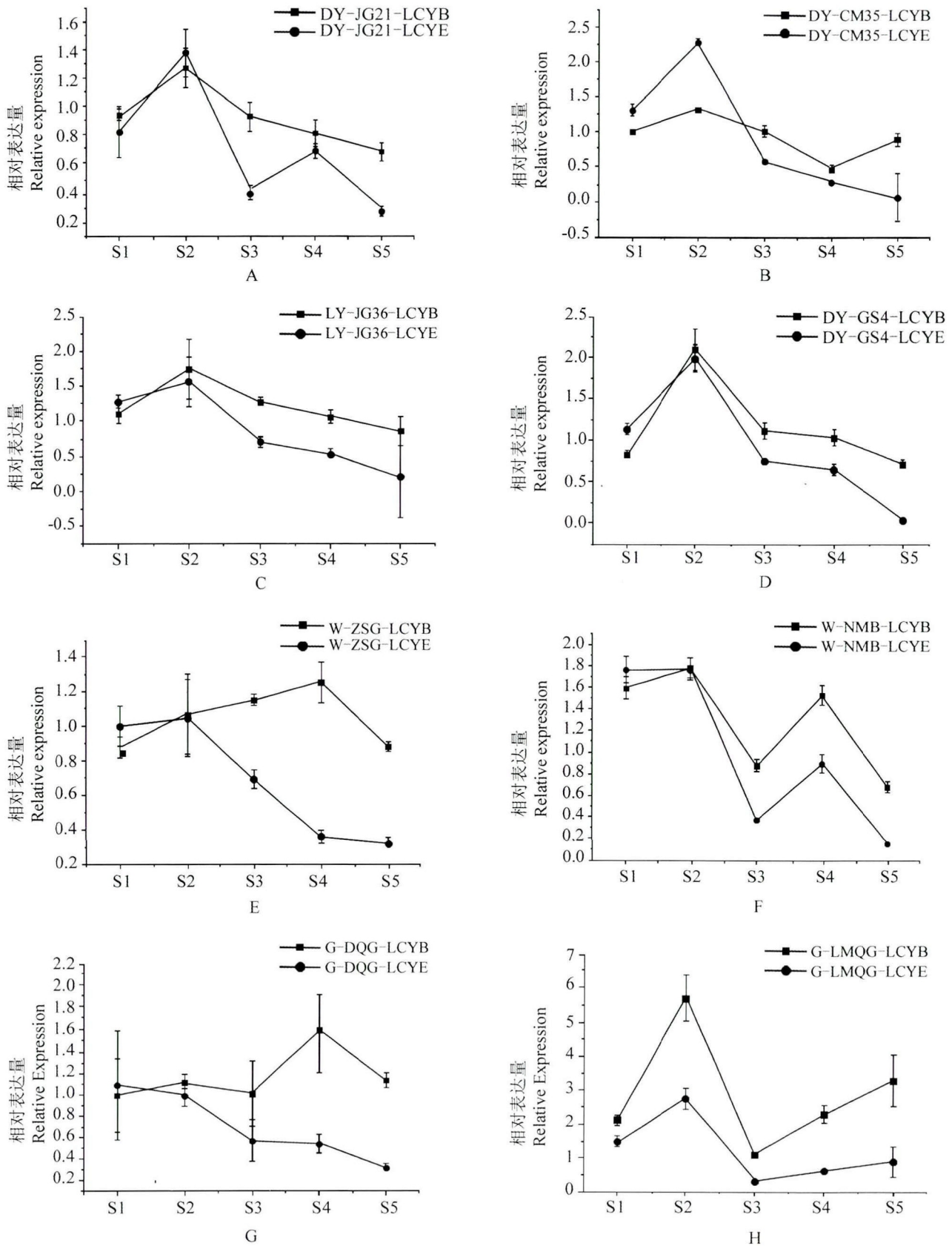


图 5 不同品种 5 个籽粒发育阶段 *SiLCYB* 与 *SiLCYE* 的表达模式比较

Figure 5 The expression patterns comparison of *SiLCYB* and *SiLCYE* of grains at 5 different developmental stages in different foxtail millet cultivars

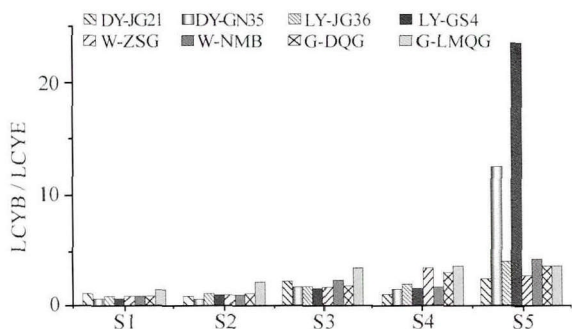


图 6 不同品种籽粒不同灌浆阶段 *LCYB/LCYE* 表达比值
Figure 6 The expression ratio of *SiLCYB/SiLCYE* at different filling stages of different foxtail millet varieties

在整个灌浆期表达较为恒定,但可能 *SiCCD1* 与 *SiHYD* 对 β -胡萝卜素降解作用要高于 *SiLCYB* 对其合成作用,而使不同谷子品种表现出了不同米色性状。

2 讨论

2.1 总类胡萝卜素及 β -胡萝卜素含量与米色相关性分析

小米类胡萝卜素含量是表征小米营养价值的重要指标之一,且和米色性状有密切关系。本研究通过 CCI 指数和黄色度 b^* 揭示了不同谷子品种之间的米色差异,且 CCI 指数分别与总类胡萝卜素含量与 β -胡萝卜素含量呈显著与极显著正相关,表明类胡萝卜素含量是米色形成的重要因素之一。这与杨延兵等(2012)在不同地区谷子小米黄色素含量与外观品质研究中得到的结论一致,小米黄色素(主要为类胡萝卜素)含量与外观品质呈显著正相关,黄色素含量在黄米、青米、白米中的含量分别为 5.40~19.55 mg/kg、10.14~16.44 mg/kg 和 1.10~2.49 mg/kg。同时也类似于 da Silva Messias 等(2014)在玉米籽粒研究中得到的结果,白色品种具有最低的类胡萝卜素含量,随品种籽粒越趋于橙黄色,其总类胡萝卜素含量越高,且不同组分的类胡萝卜素在不同品种的含量也存在差异。

2.2 *SiLCYB* 基因与米色形成的关系

由于不同品种小米 β -胡萝卜素含量差异显著,因此,分别在 DNA 水平对不同品种 β -胡萝卜素合成基因 *SiLCYB* 进行克隆,并在转录水平对其表达模式进行分析,来探讨 *SiLCYB* 与米色形成的关系。首先, *SiLCYB* 基因序列在不同品种中高度保守,且在深黄品种 JG21 中存在 2 处 SNP 位点。其中一处导致了氨基酸序列差异,最终使 LCYB 蛋白理论等电

点发生变化,由中性变为弱酸性,进而推测 *LCYB* 序列差异可能影响其空间构象而对蛋白功能产生影响,使该酶在 JG21 中表现出高于其他品种的酶活性,进而影响 β -胡萝卜素积累,使 JG21 表现出有别于其他品种的米色性状。其次,在转录水平,由于类胡萝卜素积累受整个代谢途径基因的共同调控,不仅受合成途径酶的调控,也与其分解代谢紧密相关。在籽粒灌浆阶段, *SiLCYB* 的表达虽存在品种间差异,包括“M”型、“N”型模式等,但在各品种中表达基本恒定,且与 β -胡萝卜素含量没有明显相关性。同时发现 2 个降解相关基因(*SiHYD*, *SiCCD1*)的表达与 β -胡萝卜素积累在灌浆特定阶段表现出了显著极显著负相关。如白米品种中 *SiLCYB* 表达并不低,但其成熟籽粒 β -胡萝卜素含量却接近于零,可能与该品种籽粒中高水平的 *SiCCD1* 与 *SiHYD* 表达有关。这与 Zeng 等(2015)在小麦成熟籽粒类胡萝卜素含量与 *TaLCYB* 表达关系研究中得到的结论一致,尽管在灌浆后期 *TaLCYB* 的表达量很高,但 β -胡萝卜素积累却减少,即及内源 *TaLCYB* 的表达水平与 β -胡萝卜素积累并不是正相关的。同时也类似于与 da Silva Messias 等(2014)在不同玉米品种籽粒发育中类胡萝卜素含量及其基因表达的研究中得到的结论, *ZmHYD3* 的表达与 β -胡萝卜素含量呈负相关,与其下游产物 β -隐黄素和玉米黄质的含量呈正相关;而 *ZmCCD1* 的表达与总类胡萝卜素、 α - β -胡萝卜素等的含量呈负相关。综合以上两个因素,推测米色差异的原因一方面是因为 *SiLCYB* 序列差异导致其酶蛋白活性发生改变,调控了类胡萝卜素积累;另一方面 *SiLCYB* 表达水平虽未发现与类胡萝卜素积累呈正相关,表达量也没有表现出明显的品种间差异,但由于类胡萝卜素积累还受到降解基因 *SiHYD* 和 *SiCCD1* 的作用,共同影响 β -胡萝卜素和总类胡萝卜素在籽粒中的积累而使谷子籽粒呈现出不同的米色。

3 材料与方法

3.1 试验材料

本试验在山西农业大学科研试验田进行,供试的 8 个不同米色谷子品种均来自山西,分别为晋谷 21(深黄)、长农 35(深黄)、晋谷 36(浅黄)、公穗 4 号(浅黄)、支生谷(白色)、牛毛白(白色)、大青谷(绿色)、露米青谷(绿色)。2014 年 5 月中旬将各谷子品种种植于大田,3 次生物重复,10 月上旬收获。对灌浆前晋谷

21 根、茎、叶、穗组织进行取材;对 8 个品种灌浆期五个发育阶段的籽粒进行取材(S1: 10 DAFB (days after full bloom), 内含物呈乳状; S2: 17 DAFB, 胚形成; S3: 24 DAFB, 胚处于固化乳状物中; S4: 31 DAFB, 籽粒质地硬化; S5: 38 DAFB, 籽粒成熟) 取材后立即放入液氮冷冻, 后转移至 -80°C 超低温冰箱保存待用。

3.2 米色色差测定

将收获的成熟谷子脱壳得到小米, 使用非接触式色差仪及光泽仪(X-Rite (American) VS450 colorimeter) 测定其米色, 采用 CIE $L^*a^*b^*$ 色度仪系统 (Fu et al., 2012), 测定 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 H_0 各个数值并计算得到 CCI 橘色指数这一综合指标, 即 $CCI=1000 \times a^*/(L^* \times b^*)$, 其中 L^* 表示亮度, a^* 表示红色/绿色度, b^* 表示黄色/蓝色度, CCI 正值表示红色, 负值表示蓝绿色, 为 0 则表示红、黄、蓝绿色的混合色。每个品种 3 次生物重复, 每次测量重复 3 次, 取平均值。

3.3 总类胡萝卜素提取, 定量及 HPLC 分析

3.3.1 总类胡萝卜素提取及含量测定

将米色色差分析后的小米重新收集, 参照 AACC 法, 选用水饱和正丁醇提取总类胡萝卜素 (Shen et al., 2015), 整个过程避光操作。取研磨充分的小米粉 2 g 于 50 mL 洁净离心管中, 加入 20 mL 水饱和正丁醇, 快速振荡使其充分混匀, 放置在 HY-4 型调速多用振荡器上室温振荡 2 h 后 4000 r/min 4°C 离心 10 min, 转移上清并用水饱和正丁醇定容至 25 mL, 用直径 0.45 μm 的滤器进行过滤。以水饱和正丁醇为参比, 使用紫外/可见光/荧光分光光度计 (Eppendorf BioSpectrometer Fluorescence) 扫描 350~700 nm 范围内的吸收峰, 记录相应吸光值 A 。根据公式计算总类胡萝卜素含量, 即总类胡萝卜素 (mg/kg) = $(A/0.250) \times V/m$, 其中 A 为 447 nm 处吸光值, V 为加入提取液体积, 单位 mL, m 为样品质量, 单位 g, 0.250 为转换系数。

3.3.2 β -胡萝卜素的 HPLC 分析

取 1 mL 类胡萝卜素提取液经 0.45 μm 过滤器过滤置于液相色谱瓶中上机测定。色谱条件为: 色谱柱: Sartorius C18 柱 (150 nm \times 4.6 \times 5 μm ; Thermo Fisher, 美国); 流动相: 甲醇 - 乙腈 (90:10); 流速: 1.2 mL/min; 进样量: 5 μL ; 柱温: 30°C ; 检测波长: 448 nm, 保留时间 8 min。根据 β -胡萝卜素标准曲线计算样品中 β -胡萝卜素含量, 并与色

差指数 b^* , CCI 指数和总类胡萝卜素含量进行相关性分析。

3.4 *SiLCYB* 基因克隆

3.4.1 引物来源

在 Phytozome v11.0 中同源比对得到 *SiLCYB* 序列 (Si020188m), 用 Primer Primer 5.0 设计合适引物, Forward primer: ACATTTGAGGTGCTTTGGGT; Reverse primer: GTTTCGTGAATCTTTGTTTGC。由北京华大基因科技有限公司合成。

3.4.2 谷子叶片 DNA 提取

对 8 个品种幼叶进行取材, 用植物基因组提取试剂盒 (北京天恩泽) 进行 DNA 提取。采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 上样量为 5 μL 。紫外凝胶系统观察并拍照, λ -spect 蛋白核酸分析仪检测其浓度, 上样量为 1 μL 。得到浓度后统一稀释至 50 ng/ μL , PCR 待用。

3.4.3 *SiLCYB* 基因 PCR 扩增

PCR 反应体系为 50 μL 体系: 25 μL 2 \times GC Buffer、8 μL dNTP Mixture、0.5 μL LA *Taq*、2 μL 模板 DNA、2 μL 引物 F (10 mmol/L)、2 μL 引物 R (10 mmol/L) 和 10.5 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 1 min, 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 进行 35 个循环, 72°C 延伸 5 min, 最后 4°C 保存。

PCR 纯化体系: 0.3 μL ExoI、2 μL SAP/FastSAP、1.2 μL 10 \times Exo Buffer、8.5 μL ddH₂O。纯化反应程序为: 37°C 60 min, 85°C 15 min。将成功的纯化产物递交华大基因测序, 并对测序结果进行序列比对, 参考物种选用豫谷 1 号 (YG1)。

3.5 *SiLCYB* 在 JG21 不同组织的表达及 β -胡萝卜素代谢相关基因在各品种籽粒不同阶段的表达

3.5.1 引物来源

本试验选用两个内参基因 *Actin* 和 *Tublin*。各基因定量引物信息 (表 3)。

3.5.2 RNA 提取、反转录及定量

JG21 根、茎、叶、穗不同组织的 RNA 提取: 液氮研磨不同组织样, 取 0.1 g 于 RNase-free 离心管, 并用 RNAiso Plus 植物 RNA 提取试剂盒 (大连宝生物 TaKaRa) 进行提取, 并检测其完整性及浓度。

籽粒灌浆期 5 个发育阶段的 RNA 提取: 对于灌浆 S1 与 S2 时期的谷子籽粒, 因籽粒组织幼嫩, 果皮、种皮与果肉难以分离, 所以直接进行液氮研磨;

表 3 内参基因 *SiActin*, *SiTublin* 与 β -胡萝卜素代谢相关基因定量引物信息

Table 3 The primers information of *SiActin*, *SiTublin* and genes related to β -carotene metabolism for qRT-PCR

基因名称	序列号	引物序列(5'-3')
Name	Sequence number	Primer sequence (5'-3')
<i>qSiActin</i>	Si004277m	F: TGCTCAGTGGAGGCTCAACA; R: CCAGACACTGTACTTGCGCTC
<i>qSiTublin</i>	Si029822m	F: CCGTGGTGATGTTGTTCCC; R: GGGACAACAGATGGTGGCT
<i>qSiLCYB</i>	Si020188m	F: ATGTTCCGGGCTCACGCTG; R: TCACCCATCTCTGTCCTGTATCA
<i>qSiLCYE</i>	Si000944m	F: AAGGAAACGGCAACGCTC; R: AACCTCGCCACATCCATT
<i>qSiHYD</i>	Si016635m	F: CACGGCAGAAGAAGGTCAAT; R: GCGGAGTTGCTTACTGGAAA
<i>qSiCCD1</i>	Si021680m	F: TTTGGTATTCTCCCACGCTAT; R: AACTTCGTACCCTCTTCCC

注: 引物名称中“q”表示定量 quantity

Note: “q” before the name of primers represents quantity

而对于灌浆 S3、S4、S5 时期的籽粒,需在液氮中快速剥离种皮再进行研磨提取。

为避免基因组 DNA 的对后续试验的影响,需 DNA 消化后再进行反转录,得到的 cDNA 模板稀释 10 倍后供定量试验使用。具体步骤参见 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书。

使用 SYBR Premix Ex *Taq* (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行 qRT-PCR 反应,反应体系为 10 μ L 体系: 5 μ L SYBR Premix Ex *Taq*、3 μ L dH₂O、1 μ L 上下游混合引物(10 μ mol/L)及 1 μ L cDNA 模板。采用 Bio-Rad CFX96™ Real Time System 进行定量试验。通过 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件获得相对表达量,并用 OriginPro 9.0 软件作图。

作者贡献

张耀元和路阳是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成数据分析和论文初稿的写作;张彬和禾璐参与数据分析;刘龙龙和王兴春负责文稿的校对;李红英参与摘要的修改;韩渊怀是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31371693; 31471556; 31471502)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20131403110001)和山西农业大学科技创新基金(20142-07)共同资助。

参考文献

Bai L., Kim E.H., DellaPenna D., and Brutnell T.P., 2009, Novel

lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis, *The Plant Journal*, 59(4): 588-599

Bréhélin C., and Kessler F., 2008, The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks, *Photochem. Photobiol.*, 84(6): 1388-1394

da Silva Messias R., Galli V., dos Anjos e Silva S.D., and Rombaldi C.V., 2014, Carotenoid biosynthetic and catabolic pathways: gene expression and carotenoid content in grains of maize landraces, *Nutrients*, 6(2): 546-563

Egea I., Barsan C., Bian W.P., Purgatto E., Latché A., Chervin C., Bouzayen M., and Pech J.C., 2010, Chromoplast differentiation: current status and perspectives, *Plant Cell Physiol.*, 51(10): 1601-1611

Fu X.M., Kong W.B., Peng G., Zhou J.Y., Azam M., Xu C.J., Grierson D., and Chen K.S., 2012, Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits, *J. Exp. Bot.*, 63(1): 341-354

He J.H., Yang T.Y., and Wu G.Z., 2002, Evaluation on nutritive quality of local varieties for foxtail millet in Gansu province, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 3(1): 41-44 (何继红, 杨天育, 吴国忠, 2002, 甘肃省谷子地方品种营养品质的分析与评价, *植物遗传资源学报*, 3(1): 41-44)

He L., 2015, Research on the mechanism of green foxtail millet colour of Daqinggu, Thesis for M.S., College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Supervisor: Han Y.H., pp. 1-3 (禾璐, 2015, 绿色小米品种大青谷米色形成机制研究, 硕士学位论文, 山西农业大学农学院, 导师: 韩渊怀, pp.1-3)

Jia P.Y., Li C.Y., Cao L.K., Li L.Y., Li H.F., and Zhang L.P., 2015, Determination of yellow pigment in foxtail millet by HPLC, *Heilongjiang Bayi Nongke Daxue Xuebao (Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University)*, 27(5): 111-115 (贾鹏禹, 李朝阳, 曹龙奎, 李良玉, 李洪飞, 张丽萍, 2015, 高效液相色谱法测定小米中黄色素的含量, 黑龙江八一

- 农垦大学学报, 27(5): 111-115)
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M., Hyodo H., and Yano M., 2004, Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in Citrus fruit, *Plant Physiol.*, 134(2): 824-837
- Li G.Y., 2009, A study on quality and genetic diversity in primary core-collection of foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.), Thesis for M.S., Chinese Academy of Agricultural Sciences, Supervisor: Zhu Z.H., pp.1-2 (李国营, 2009, 谷子初级核心种质的品质性状及其遗传多样性研究, 硕士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 朱志华, pp.1-2)
- Meng F.L., Zhao C.L., Duan L.B., and Xu X., 2013, The progress of biodegradation pathways of the carotenoids in higher plants, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 29(24): 143-150 (孟凡来, 赵昶灵, 段丽斌, 徐洵, 2013, 高等植物类胡萝卜素的生物降解途径研究进展, *中国农学通报*, 29(24): 143-150)
- Moreno J.C., Pizarro L., Fuentes P., Handford M., Cifuentes V., and Stange C., 2013, Levels of lycopene β -cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*, *PLoS One*, 8(3): 58144
- Ronen G., Carmel G.L., Zamir D., and Hirschberg J., 2000, An alternative pathway to β -carotene formation in plant chloroplasts discovered by map-based cloning of Beta and *old-gold* color mutations in tomato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(20): 11102-11107
- Shen R., Yang S.P., Zhao G.H., Shen Q., and Diao X.M., 2015, Identification of carotenoids in foxtail millet (*Setaria italica*) and the effects of cooking methods on carotenoid content, *Journal of Cereal Science*, 61: 86-93
- Wang Y.P., Liu Q.C., and Zhai H., 2006, Expression and regulation of genes related to plant carotenoid biosynthesis and their application in plant gene engineering, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 4(1): 103-110 (王玉萍, 刘庆昌, 翟红, 2006, 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在基因工程中的应用, *分子植物育种*, 4(1): 103-110)
- Wang Y.W., Li H.X., Tian G., Sun M.R., Shi Q.X., and Guo E.H., 2008, Relationship between cooked foxtail millet palatability and both visual quality and RVA profile Character of starch, *Shanxi Nongye Kexue* (Journal of Shanxi Agricultural Sciences), 36(7): 34-39 (王玉文, 李会霞, 田岗, 孙美荣, 史琴香, 郭二虎, 2008, 小米外观品质及淀粉 RVA 谱特征与米饭适口性的关系, *山西农业科学*, 36(7): 34-39)
- Yang Y.B., Guan Y.A., Qin L., Shi H., Wang H.L., and Zhang H.W., 2012, The studies on yellow pigment content and appearance quality of foxtail millet from different regions, *Zhongguo Liangyou Xuebao* (Journal of the Chinese Cereals and Oils Association), 27(1): 14-19 (杨延兵, 管延安, 秦岭, 石慧, 王海莲, 张华文, 2012, 不同地区谷子小米黄色素含量与外观品质研究, *中国粮油学报*, 27(1): 14-19)
- You S.Z., and Yang H.Q., 2008, Carotenoid cleavage dioxygenases and their physiological function, *Xibei Zhiwu Xuebao* (Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.), 28(3): 630-637 (由淑贞, 杨洪强, 2008, 类胡萝卜素裂解双加氧酶及其生理功能, *西北植物学报*, 28(3): 630-637)
- Zeng J., Wang C., Chen X., Zang M.L., Yuan C.H., Wang X.T., Wang Q., Li M., Li X.Y., Chen L., Li K.X., Chang J.L., Wang Y.S., Yang G.X., and He G.Y., 2015, The lycopene β -cyclase plays a significant role in provitamin a biosynthesis in wheat endosperm, *BMC Plant Biol.*, 15(1): 112
- Zhang B., Liu C., Wang Y.Q., Yao X., Wang F., Wu J.S., King G.J., and Liu K.D., 2015a, Disruption of a CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 4 gene converts flower colour from white to yellow in Brassica species, *New Phytol.*, 206(4): 1513-1526
- Zheng X.J., Xie Z.Z., Zhu K.J., Xu Q., Deng X.X., and Pan Z.Y., 2015b, Isolation and characterization of *carotenoid cleavage dioxygenase 4* genes from different citrus species, *Mol. Genet. Genomics*, 290(4): 1589-1603