

# 胡萝卜根中主要类胡萝卜素含量相关 QTL 的精细定位

欧承刚<sup>1</sup>, 孙婷婷<sup>1</sup>, 刘新艳<sup>1</sup>, 李成江<sup>2</sup>, 徐东辉<sup>1</sup>, 赵志伟<sup>1</sup>, 庄飞云<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>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; <sup>2</sup>宿州农业科学院, 安徽宿州 234000)

**摘要:** 以白色的野生胡萝卜‘松滋野生’(Ws)和橘色的栽培胡萝卜品种‘Amsterdam’(Af)为亲本构建的回交重组自交系(BIL)为试材, 基于低倍重测序技术开发 SNP 标记, 构建了由 1 976 个 Bin 标记组成, 包含 29 435 个 SNP 标记的遗传图谱。图谱总距离 834.28 cM, 平均图距 0.42 cM。通过对胡萝卜肉质根中类胡萝卜素含量相关 QTL 分析, 在连锁群 LG04 和 LG08 中检测到调控  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\zeta$ -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质和总类胡萝卜素含量的主效 QTL (M-QTL) 2、2、3、2、2 和 2 个, 表型贡献率为 11.47%~19.18%; 另检测到调控  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\zeta$ -胡萝卜素、玉米黄质和总类胡萝卜素含量的上位性 QTL (E-QTL) 1、1、2、1 和 1 个, 表型贡献率为 2.50%~3.66%。在 M-QTL 显著区间内共检索到 36 个有功能注释的预测基因, 其中 *Dck018297* 为  $\zeta$ -胡萝卜素脱氢酶 2 基因, 与调控  $\beta$ -胡萝卜素合成和总类胡萝卜素含量有关; *Dck008006* 为乙烯响应因子 2.2 的同源基因, 与调控  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\zeta$ -胡萝卜素合成有关; *Dck029898* 为转录因子 bHLH135 的同源基因, 与调控玉米黄质合成有关。

**关键词:** 胡萝卜; 类胡萝卜素; 遗传图谱; 精细定位; QTL

**中图分类号:** S 631.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 02-0288-09

## Fine Mapping of QTLs Related to Main Carotenoids in Carrot Root

OU Chenggang<sup>1</sup>, SUN Tingting<sup>1</sup>, LIU Xinyan<sup>1</sup>, LI Chengjiang<sup>2</sup>, XU Donghui<sup>1</sup>, ZHAO Zhiwei<sup>1</sup>, and ZHUANG Feiyun<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>The Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou, Anhui 234000, China)

**Abstract:** Based on whole-genome resequencing data, a high resolution genetic map was developed by using a set of backcross inbred lines (BILs) crossed by a wild species ‘Songzi’ with a cultivar ‘Amsterdam’, and used to map QTLs for main carotenoids in carrot root. Finally, the genetic map was consisted of 1 976 Bins which contained 29 435 SNPs. The total genetic distance of map was 834.28 cM with an average interval of 0.42 cM between Bin markers. There were 2, 2, 3, 2, 2 and 2 main-effect QTLs

**收稿日期:** 2016-12-08; **修回日期:** 2017-01-24

**基金项目:** 国家重点研发计划项目 (2016YFD0100204-04); 国家科技支撑计划项目 (2013BAD01B04); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 国家自然科学基金项目 (31272162)

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

(M-QTLs) associated with  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\zeta$ -carotene, lutein, zeaxanthin and total carotenoid contents, respectively, with 11.47% - 19.18% phenotypic variance. There were 1, 1, 2, 1 and 1 epistatic QTLs contributed to  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\zeta$ -carotene, zeaxanthin and total carotenoid contents, respectively, with 2.50% - 3.66% phenotypic variance. A total of 36 predicted genes with function annotations were detected in M-QTLs. Among these, gene *Dck018297* was  $\zeta$ -carotene desaturase and associated with  $\beta$ -carotene biosynthesis and total carotenoid contents; gene *Dck008006* homologous to *ERF2.2* was associated with  $\alpha$ -carotene and zeaxanthin biosynthesis; gene *Dck029898* homologous to *bHLH135* was associated with  $\zeta$ -carotene biosynthesis. These three candidate genes might play central roles in the carotenoid biosynthesis in carrot root.

**Keywords:** carrot; carotenoid; genetic map; fine mapping; QTL

胡萝卜是类胡萝卜素积累最为丰富的蔬菜作物之一。早期研究发现胡萝卜根中类胡萝卜素的合成积累与一些单基因位点有关, 如 *A* ( $\alpha$ -胡萝卜素积累)、*Or* (木质部颜色)、*Y* (抑制类胡萝卜素合成)、*Y<sub>1</sub>* 和 *Y<sub>2</sub>* ( $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素的合成) 等 (Umiel & Gabelman, 1972; Buishand & Gabelman, 1979; Goldman & Breitbach, 1996; Simon, 2000)。类胡萝卜素生物合成路径中的功能基因影响根中类胡萝卜素的合成与积累, 如八氢番茄红素合成酶基因 (*PSY*) 在橘色胡萝卜中的表达量高于黄色或白色类型 (Wang et al., 2014), 玉米黄质环氧化酶基因 (*ZEP*)、八氢番茄红素脱氢酶基因 (*PDS*) 和类胡萝卜素异构酶基因 (*CRTISO*) 的表达水平影响根中  $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素的积累 (Jourdan et al., 2015), 胡萝卜素羟化酶 *CYP97A3* 的过表达, 可以降低根中  $\alpha$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素含量 (Arango et al., 2014)。此外, 甲基赤藓醇-4-磷酸 (MEP) 途径中的脱氧木酮糖磷酸合成酶 (*DXS*) 通过控制下游类胡萝卜素合成路径的前体物质, 影响胡萝卜根和叶中类胡萝卜素的积累 (Simpson et al., 2016)。

关于胡萝卜肉质根中类胡萝卜素含量相关 QTL 定位早有报道, 但这些 QTL 并没有与类胡萝卜素合成途径中的功能基因建立直接关系 (Santos & Simon, 2002, 2006; 欧承刚 等, 2010)。利用高密度遗传图谱, 在大豆中定位到 1 个控制耐盐性的主效 QTL, 表型贡献率达到 54.61%, 并在该 QTL 区间内筛选出 1 个离子转运基因 *GmCHX1* 可以提高大豆的耐盐性 (Qi et al., 2014); 玉米中也定位到 1 个主效 QTL 控制植株形态, 在该 QTL 区间内筛选出 2 个调控植物细胞壁代谢的转录因子 (Zhou et al., 2016)。胡萝卜基因组数据的公布 (Xu et al., 2014; Iorizzo et al., 2016) 为胡萝卜重要农艺性状的精细定位及其调控基因的挖掘提供了重要前提, Iorizzo 等 (2016) 通过关联分析在 5 号染色体上定位到 1 个控制根中叶黄素合成的关键基因 *DCAR\_032551*。然而, 关于其他类胡萝卜素的精细定位及其调控基因的研究尚未见报道。本研究中以白色的野生胡萝卜 ‘松滋野生’ (Ws) 和橘色的栽培品种 ‘Amsterdam’ (Af) 为亲本构建的回交重组自交系 (Backcross inbred lines, BILs) 为试材, 基于低倍重测序技术构建高密度遗传图谱, 对主要类胡萝卜素进行精细定位, 深入挖掘调控胡萝卜根中主要类胡萝卜素合成积累的候选基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以 ‘松滋野生’ (Ws) 胡萝卜和 ‘Amsterdam’ (Af) 为亲本进行杂交, 其中 Ws 为来源于湖北

省松滋地区的野生胡萝卜, 白色木质化根, 不含类胡萝卜素; Af 为欧洲栽培品种, 橘色肉质根, 含有丰富的类胡萝卜素。以 Af 为轮回亲本回交 2 代, 再自交 6 代, 建立了一套含有 223 个株系的 BIL (BC<sub>2</sub>S<sub>6</sub>) 群体。2015 年 8 月初将各材料在中国农业科学院北京昌平综合试验基地进行露地播种, 选取 110 个株系, 于 11 月初每个株系随机选取 5 株, 分别对根和叶取样, 液氮速冻, 置于 -80 °C 超低温冰箱中贮存待用。

## 1.2 类胡萝卜素含量测定

参照王慧等(2014)的方法, 分别对根样品进行冷冻抽干, 称取 0.50 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。采用超高效液相色谱(Waters 公司, 美国)检测主要类胡萝卜素含量,  $\alpha$ 、 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄质的检测波长为 450 nm,  $\zeta$ -胡萝卜素的检测波长为 405 nm。 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素及玉米黄质的标样购自美国 Sigma 公司,  $\alpha$ 、 $\zeta$ -胡萝卜素含量的标定参照  $\beta$ -胡萝卜素标样。总类胡萝卜素含量为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\zeta$ -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄质含量之和。采用 SPSS 软件检验各类胡萝卜素含量的正态分布。

## 1.3 群体重测序及 SNP 检测

参照 Briard 等(2000)的 CTAB 法提取 Ws、Af 及 110 个 BIL 的叶片总 DNA, 采用 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序, 测序数据质量 Q30 > 85%; 通过去除接头序列、N > 10%的读长(reads)、质量值低于 10 的碱基超过 50%的读长, 获得过滤读长(clean reads)。以 Xu 等(2014)公布的基因组为参考基因组, 采用 BWA 软件(Li & Durbin, 2009)进行序列比对, 采用 GATK(Genome Analysis Toolkit)软件检测 SNP。上述基因组测序及 SNP 分析在北京百迈客生物科技有限公司进行。

## 1.4 群体遗传图谱的构建

参照 Huang 等(2009)的方法过滤 SNP, 以 10 kb 窗口大小为 Bin 确定分型; Bin 标记经卡方检测后以  $P < 0.005$  过滤偏分离标记。采用 JoinMap 4.0 软件(Van, 2006)构建遗传图谱, 以 LOD 值为 6.0 确定连锁群, 最大重组率为 0.45(系统默认值), 采用 Kosambi 函数计算遗传距离。利用 QTLNetwork 2.0 软件(Yang et al., 2005)中的混合线性模型的复合区间作图法(Mixed-model-based composite interval mapping, MCIM)检测主效 QTL (M-QTL)和上位性 QTL (E-QTL): 全基因组扫描窗口 10.0 cM, 扫描步长 1.0 cM, 置换测验(Permutation test) 1 000 次重复, 显著性  $P < 0.05$  作为判断 QTL 存在阈值, 并以 95%的置信区间作为 QTL 的显著性区间, 单维度和双维度全基因组扫描检测上位性 QTL。QTL 命名以性状英文缩写, 附属连锁群号及 QTL 顺序号表示。

# 2 结果与分析

## 2.1 类胡萝卜素含量表型

在白色 Ws 根中没有检测出类胡萝卜素(表 1)。Af 的根中  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\zeta$ -胡萝卜素、叶黄素和总类胡萝卜素含量分别是 156.6、182.3、28.4、6.5 和 373.8 mg · kg<sup>-1</sup>DW, 未检测出玉米黄质。BILs 群体中各种类胡萝卜素含量均呈连续变异分布, 偏度均大于 1.4, 为偏正态分布, 其中  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\zeta$ -胡萝卜素、叶黄素和总类胡萝卜素含量最大值分别达到 207.2、459.2、53.1、20.6 和 678.7 mg · kg<sup>-1</sup>DW, 为亲本 Af 的 1.3、2.5、1.9、3.2 和 1.8 倍, 玉米黄质含量最大值达到 4.6 mg · kg<sup>-1</sup>DW。

表 1 双亲及 BIL 根中类胡萝卜素含量比较

Table 1 Comparison of carotenoids contents between parents and BILs roots mg · kg<sup>-1</sup>DW

群体 Population	$\alpha$ -胡萝卜素 $\alpha$ -carotene	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	$\zeta$ -胡萝卜素 $\zeta$ -carotene	叶黄素 Lutein	玉米黄质 Zeaxanthin	总类胡萝卜素 Total carotenoid
Ws	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Af	156.6	182.3	28.4	6.5	ND	373.8
BIL	36.8 ± 5.7 (0 ~ 207.2)	81.9 ± 10.0 (0 ~ 459.2)	9.9 ± 1.2 (0 ~ 53.1)	3.7 ± 0.4 (0.1 ~ 20.6)	0.9 ± 0.1 (0 ~ 4.6)	129.2 ± 16.2 (0.1 ~ 678.7)

注: ND 表示没有检测出类胡萝卜素含量。

Note: ND means none of carotenoid was detected.

## 2.2 遗传图谱

亲本 Ws 和 Af 的测序数据量分别为 5.6 Gb 过滤碱基 (clean base), 样品平均深度 7.0 X, 基因组平均覆盖度为 82.6%; 110 个 BIL 总数据量为 77.5 Gb, 每个子代的平均深度 1.5 X, 基因组平均覆盖度为 48.6%, 每份样品的 Q30 值均大于 90%。GATK 软件分析检测到 4 332 203 个 SNP, 其中有 259 246 个 SNP 具有多态性。通过分型后共获得 8 076 个 Bin 标记, 其中 1 976 个 Bin 标记分配到 9 个连锁群 (LG) 上, 包含 SNP 标记 29 435 个, 平均每个 Bin 标记包含 32.1 个 SNP 标记; 图谱总距离 834.28 cM, 平均图距 0.42 cM。其中 LG03 的距离最长, 为 108.12 cM; LG09 的平均图距最小, 为 0.25 cM (表 2)。

表 2 胡萝卜 BIL 群体遗传图谱参数

Table 2 The parameters of genetic map of BILs

连锁群 Linkage group	SNP 数 Number of SNP	Bin 标记数 Number of Bin	连锁群距离/cM Distance	平均图距/cM Average distance	最大间距/cM Max gap
LG01	824	98	84.81	0.87	5.50
LG02	885	66	84.40	1.28	5.23
LG03	3 116	251	108.12	0.43	2.95
LG04	6 217	358	103.00	0.29	2.81
LG05	4 613	344	103.30	0.30	2.30
LG06	2 263	103	101.48	0.99	4.85
LG07	926	67	54.07	0.81	5.10
LG08	5 056	314	102.74	0.33	2.18
LG09	5 535	375	92.36	0.25	2.36
总计 Total	29 435	1 976	834.28	0.42	-

## 2.3 M-QTL 定位

如表 3 所示, 采用 MCIM 方法测到与  $\alpha$ 、 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质和总类胡萝卜素含量相关的 M-QTL 各 2 个, 表型贡献率分别为 11.67%和 12.08%、18.23%和 19.18%、13.18%和 14.56%、12.23%和 15.48%、16.94%和 18.88%; 与  $\zeta$ -胡萝卜素含量相关的 M-QTL 3 个, 表型贡献率为 11.47%~17.78% (表 3)。

上述 M-QTL 均位于连锁群 LG04 和 LG08 上, 其加性效应均为负值, 并形成 4 个 QTL 簇: 在 LG04 的 46.3 ~ 48.5 cM 区间有 2 个 (*bet4-1* 和 *Tca4-1*), 在 52.6 ~ 53.8 cM 区间有 4 个 (*alp4-1*、*bet4-2*、*zet4-2* 和 *Tca4-2*), 在 LG08 的 52.9 ~ 55.9 cM 区间有 2 个 (*zet8-1* 和 *lut8-1*), 在 67.6 ~ 68.0 cM 区间有 3 个 (*alp8-1*、*lut8-2* 和 *zea8-2*)。

**表 3 胡萝卜根中主要类胡萝卜素含量相关的 M-QTL**  
**Table 3 The M-QTL for carotenoids contents of carrot root**

性状 Trait	QTL	连锁群 Linkage	位置/cM Position	标记 <sup>a</sup> Closest marker	间距 <sup>b</sup> /cM Interval	范围/cM Range	加性效应 Additive	表型贡献率/% Phenotypic
$\alpha$ -胡萝卜素 $\alpha$ -carotene	<i>alp4-1</i>	4	53.8	bin6111	0.05	52.6 ~ 53.8	- 16.54	12.08
	<i>alp8-1</i>	8	68.0	bin3415	0.05	68.0 ~ 69.1	- 15.89	11.67
$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	<i>bet4-1</i>	4	46.9	bin3349	0	46.3 ~ 48.5	- 28.95	18.23
	<i>bet4-2</i>	4	53.8	bin6111	0.05	53.2 ~ 53.8	- 28.18	19.18
$\zeta$ -胡萝卜素 $\zeta$ -carotene	<i>zet4-1</i>	4	19.4	bin287	0.05	18.7 ~ 19.4	- 2.84	15.23
	<i>zet4-2</i>	4	53.8	bin6111	0.05	52.6 ~ 53.8	- 2.43	17.78
	<i>zet8-1</i>	8	54.7	bin8540	0.03	52.9 ~ 55.9	- 3.35	11.47
叶黄素 Lutein	<i>lut8-1</i>	8	54.7	bin8540	0.03	52.9 ~ 55.9	- 1.20	13.18
	<i>lut8-2</i>	8	67.6	bin3415	0.35	63.0 ~ 68.0	- 1.50	14.56
玉米黄质 Zeaxanthin	<i>zea8-1</i>	8	39.6	bin694	0.03	38.5 ~ 40.6	- 0.27	12.23
	<i>zea8-2</i>	8	68.0	bin3415	0.05	68.0 ~ 68.6	- 0.34	15.48
总类胡萝卜素 Total carotenoid	<i>Tca4-1</i>	4	46.9	bin3349	0	46.3 ~ 48.5	- 47.20	16.94
	<i>Tca4-2</i>	4	53.8	bin6111	0.05	53.2 ~ 53.8	- 45.98	18.88

注: a 标记为距 QTL 峰值距离最近的分子标记; b 间距为标记距离 QTL 峰值的距离。

Note: a: Closest marker means the marker was closed to the peak of QTL; b: Interval means the distance between closest marker and the peak of QTL.

## 2.4 E-QTL 定位

除叶黄素外, 分别检测到与  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、玉米黄质和总类胡萝卜素含量相关的 E-QTL 各 1 个, 表型贡献率分别为 3.08%、3.25%、3.66% 和 3.17%, 上位性效应分别为 15.85、27.60、0.26 和 46.36。检测到 2 个与  $\zeta$ -胡萝卜素含量相关的 E-QTL, 表型贡献率为 2.50% 和 3.11%, 上位性效应为 2.88 和 3.16 (表 4)。

**表 4 与主要类胡萝卜素含量相关的 E-QTL**  
**Table 4 The E-QTL for carotenoids contents of root**

性状 Trait	QTLi	标记 Closest marker	间距/cM Interval	位置/cM Position	QTLj	标记 Closest marker	间距/cM Interval	位置/cM Position	上位性效应 Epistatic	表型贡献率/% Phenotypic variance
$\alpha$ -胡萝卜素 $\alpha$ -carotene	<i>alp4-1</i>	bin6111	0.05	53.8	<i>alp8-1</i>	bin3415	0.05	68.0	15.85	3.08
$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	<i>bet4-1</i>	bin3349	0	46.9	<i>bet4-3</i>	bin6111	0.05	53.8	27.60	3.25
$\zeta$ -胡萝卜素 $\zeta$ -carotene	<i>zet4-1</i>	bin287	0.05	19.4	<i>zet4-2</i>	bin6111	0.05	53.8	2.88	2.50
	<i>zet4-2</i>	bin6111	0.05	53.8	<i>zet8-1</i>	bin8540	0.03	54.7	3.16	3.11
玉米黄质 Zeaxanthin	<i>zea8-1</i>	bin694	0.03	39.6	<i>zea8-2</i>	bin3415	0.05	68.0	0.26	3.66
总类胡萝卜素 Total carotenoid	<i>Tca4-1</i>	bin3349	0	46.9	<i>Tca4-2</i>	bin6111	0.05	53.8	46.36	3.17

注: QTLi 和 QTLj 具有上位性互作效应的两个 QTL。

Note: QTLi and QTLj means the QTLs with epistatic interaction.

## 2.5 候选基因预测

根据上述 13 个 M-QTL 显著性区间内的标记所在参考基因组 (Xu et al., 2014) 中的位置, 共检索到 78 个预测基因, 有 36 个预测基因获得功能注释 (表 5), 其中 3 个基因可能与类胡萝卜素合成相关 (Just et al., 2007; Lee et al., 2012; Endo et al., 2016): *Dck018297* 为  $\zeta$ -胡萝卜素脱氢酶 2 基因 (*ZDS2*), 一致性达到 100%, 与 *bet4-1* 和 *Tca4-1* 相关; *Dck008006* 与乙烯响应因子 (*ERF*) 2.2 为同源基因, 一致性为 67.41%, 与 *alp8-1* 和 *zea8-2* 相关; *Dck029898* 与转录因子 *bHLH135* 为同源基因, 一致性为 58.43%, 与 *zet4-1* 相关。

表 5 位于 M-QTL 显著性区间的 36 个预测基因  
 Table 5 36 predicted genes located at the M-QTLs

预测基因 Predict genes	连锁 QTL Associated QTL	功能注释 Annotated function	同源基因 ID Homologue	一致性/% Identity	E 值 E-value
Dck000108	zet4-1	双链 RNA 结合蛋白 4 Double-stranded RNA-binding protein 4-like	XP_002272597.2 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	51.18	3.0E-41
Dck000109	zet4-1	U-box 结构域蛋白 4 U-box domain-containing protein 4	XP_002273909.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	73.17	2.0E-138
Dck000260	alp4-1, bet4-2, zet4-2, Tca4-2	磷酸烯醇式丙酮酸/磷酸转运体 2 Phosphoenolpyruvate/phosphate translocator 2, chloroplastic	XP_002282424.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	64.85	3.0E-99
Dck002956	zea8-1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Nek8 Serine/threonine-protein kinase Nek8, putative	XP_002524221.1 蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	74.62	5.0E-111
Dck002958	zea8-1	HEAT 重复包含蛋白 5B HEAT repeat-containing protein 5B-like	XP_002279980.2 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	81.45	1.0E-52
Dck004805	alp4-1, bet4-2, zet4-2, Tca4-2	葡聚糖内糖基转移酶/水解酶 Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	ADO24299.1 棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	79.93	1.0E-142
Dck005126	zet8-1, lut8-1	$\beta$ - 香树脂合成酶 2 $\beta$ -amyrin Synthase 2	O82146.1 人参 <i>Panax ginseng</i>	87.94	0
Dck008006	alp8-1, zea8-2	乙烯响应因子 2.2 Ethylene response factor 2.2	CBJ55933.1 高氏柴胡 <i>Bupleurum kaoi</i>	67.41	3.0E-64
Dck010040	alp4-1, bet4-2, zet4-2, Tca4-2	转录因子 BIM2 Transcription factor BIM2-like	XP_002278322.2 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	44.67	1.0E-42
Dck010281	zet4-1	剪切因子 3B 亚基 4 Splicing factor 3B subunit 4-like	XP_003534692.1 大豆 <i>Glycine max</i>	83.39	2.0E-130
Dck010681	lut8-2	ACT 结构域包含蛋白激酶 ACT-domain-containing protein kinase	BA163585.1 百脉根 <i>Lotus japonicus</i>	63.64	8.0E-8
Dck010999	zet4-1	LOB 结构域蛋白 LOB domain-containing protein, putative	XP_002527399.1 蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	84.55	4.0E-50
Dck015774	zea8-1	核糖体蛋白 L11 蛋白甲基转移酶 Ribosomal protein L11 methyltransferase	XP_002282613.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	65.31	2.0E-94
Dck015775	zea8-1	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调控亚基 5 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5-like	XP_002285156.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	66.67	8.0E-85
Dck018243	bet4-1, Tca4-1	磷脂酶 D Phospholipase D beta, putative	XP_002511773.1 蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	79.41	6.0E-130
Dck018297	bet4-1, Tca4-1	$\zeta$ - 胡萝卜素脱氢酶 2 Putative zeta carotene desaturase 2	ABB52070.1 胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	100.00	6.0E-179
Dck021340	bet4-1, Tca4-1	F-box / Kelch 重复蛋白 SKIP4 PREDICTED: F-box/kelch-repeat protein SKIP4-like	XP_002274480.2 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	67.50	1.0E-139
Dck021936	alp8-1, zea8-2	Nudix 水解酶 19 Nudix hydrolase 19, chloroplastic-like	XP_002285069.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	68.72	2.0E-162
Dck028346	bet4-1, Tca4-1	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶家族蛋白 Phosphoenolpyruvate carboxylase family protein	NP_191712.1 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	86.03	2.0E-53
Dck029441	zet8-1, lut8-1	三角状五肽重复区包含蛋白 At5g56310 Pentatricopeptide repeat-containing protein At5g56310	XP_002283791.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	57.06	6.0E-158
Dck029898	zet4-1	转录因子 bHLH135 Transcription factor bHLH135	XP_002268291.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	58.43	1.0E-18
Dck029899	zet4-1	果胶/果胶酯酶抑制剂 26 Putative pectinesterase/pectinesterase inhibitor 26-like	XP_002275117.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	35.66	2.0E-11
Dck033605	lut8-2	ACC 氧化酶 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	XP_002263131.2 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	66.67	8.0E-102
Dck034943	zet8-1, lut8-1	病程相关蛋白 5 Pathogenesis-related protein 5-like	XP_003543788.1 大豆 <i>Glycine max</i>	68.66	3.0E-88
Dck034945	zet8-1, lut8-1	黄酮合成酶/黄烷酮 3-羟化酶 Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	Q7XZQ6.1 欧芹 <i>Petroselinum crispum</i>	91.69	0
Dck036361	zet4-1	羧基肉桂酰辅酶 A: 奎尼酸羧基肉桂酰转移酶 Hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyltransferase	AAZ80046.1 刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>	85.78	0
Dck046404	alp4-1, bet4-2, zet4-2, Tca4-2	吡啶乙酸酰胺合成酶 GH3.1 Probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1	XP_002283886.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	81.61	0
Dck054809	alp4-1, zet4-2	MADS-box 蛋白 12 MADS-box protein 12	AAQ72498.1 矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i>	66.79	8.0E-95
Dck061138	zet8-1, lut8-1	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 7 Serine/threonine-protein phosphatase 7-like protein	NP_175246.2 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	25.60	3.0E-10
Dck061859	zet4-1	DNA 复制复合 GINS 蛋白 PSF1 DNA replication complex GINS protein PSF1-like	XP_003632756.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	70.75	9.0E-57
Dck061860	zet4-1	泛素蛋白连接酶 Ubiquitin-protein ligase, putative	XP_002517599.1 蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	59.07	1.0E-119
Dck063377	lut8-2	ATFP4 蛋白 ATFP4-like protein	XP_003601491.1 苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	37.04	5.0E-12

续表 5

预测基因	连锁 QTL	功能注释	同源基因 ID	一致性/%	E 值
Predict genes	Associated QTL	Annotated function	Homologue	Identity	E-value
<i>Dck069142</i>	<i>alp4-1, zet4-2</i>	DNA 拓扑异构酶 1 DNA topoisomerase 1	P93119.1 胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	83.77	0
<i>Dck069143</i>	<i>alp4-1, bet4-2, zet4-2, Tca4-2</i>	次要变应原 Alt a 7 Minor allergen Alt a 7	XP_002280986.1 葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	72.00	2.0E-92
<i>Dck069378</i>	<i>bet4-1, Tca4-1</i>	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine protein kinase, putative	XP_002514387.1 蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	66.80	4.0E-86
<i>Dck077122</i>	<i>zet4-1</i>	锌指蛋白 Zinc finger protein, putative	XP_002527314.1 蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	45.05	4.0E-40

### 3 讨论

QTL 定位是挖掘功能基因, 解析作物农艺性状遗传调控机制的重要手段之一, 高密度遗传图谱有助于增加 QTL 检测效率, 提高 QTL 定位的精确性 (Wang et al., 2011; Zhou et al., 2016)。先期报道的胡萝卜遗传图谱, 多是利用 RAPD、RFLP、AFLP、SRAP、DArT (Diversity Arrays Technology) 和 SSR 等标记构建, 图谱密度低 (Vivek & Simon, 1999; Boiteux et al., 2000; Santos & Simon, 2006; 欧承刚 等, 2010; Cavagnaro et al., 2011; Grzebelus et al., 2014)。Cavagnaro 等 (2014) 和 Iorizzo 等 (2016) 先后采用 KASPar 技术构建分别由 894 个和 2 073 个 SNP 标记组成的遗传图谱, 平均图距分别为 1.3 cM 和 0.7 cM。利用群体重测序技术构建高密度 SNP 标记遗传图谱, 已经在水稻、大豆、辣椒、玉米等作物中获得成功应用 (Huang et al., 2009; Qi et al., 2014; Han et al., 2016; Zhou et al., 2016)。本研究中利用永久性的 BIL 群体, 基于胡萝卜基因组数据 (Xu et al., 2014), 采用重测序技术开发 SNP 标记, 构建了由 1 976 个 Bin 标记 (29 435 个 SNP 标记) 组成, 平均图距 0.42 cM 的高密度遗传图谱, 其密度优于前人的报道, 同时利用该群体还可深入开展目标性状的多次重复研究 (Mei et al., 2005)。本研究中共检测到 13 个 M-QTL 和 6 个 E-QTL 分别调控  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\zeta$ -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质和总类胡萝卜素含量, 形成 4 个 QTL 簇, 其中在 LG04 上的 52.6~53.8 cM 区间内聚集了 4 个 M-QTL, 分别调控  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\zeta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素含量; 在 LG08 上的 67.6~68.0 cM 区间内聚集了 3 个 M-QTL, 分别调控  $\alpha$ -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄质含量。前人报道也发现调控胡萝卜根中  $\beta$ -胡萝卜素和  $\zeta$ -胡萝卜素含量的多个 QTL 聚集现象 (Santos & Simon, 2002), 多性状 QTL 簇也存在于其他作物中, 可能是由于具有表型相关的性状受 1 个或少数几个多效基因调控, 在遗传上存在共分离现象, 可以有效提高基因的利用率, 并减少由于重组导致的基因丢失 (Santos & Simon, 2002; Liu et al., 2013, 2016)。

类胡萝卜素生物合成路径中的一系列功能基因表达水平与胡萝卜根中类胡萝卜素的合成积累密切相关, 可直接影响类胡萝卜素的组分组成及其含量 (Moreno et al., 2013; Arango et al., 2014; Wang et al., 2014; 王慧 等, 2014; Jourdan et al., 2015), 但没有建立与调控类胡萝卜素含量 QTL 之间的关系。而早期关于胡萝卜根中类胡萝卜素各组分含量相关 QTL 的研究中, 也未能获得相关功能基因 (Santos & Simon, 2002; 欧承刚 等, 2010)。本研究中根据基因组数据 (Xu et al., 2014), 在 M-QTL 显著区间内检索到 36 个有功能注释的预测基因。其中, 基因 *Dck018297* 为 *ZDS2*, 催化  $\zeta$ -胡萝卜素环化为番茄红素, Just 等 (2007) 将其定位在调控  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素单基因位点  $Y_2$  区间内, 本研究则位于 *bet4-1* 和 *Tca4-1* 区间内, 表明该基因对胡萝卜根中  $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素含量调控发挥着重要作用。*Dck008006* 为乙烯响应因子 2.2 的同源基因, 与拟南芥的乙烯响应转录因子 *RAP2.2* 和番茄的乙烯响应因子 *SIAP2a*、*SIERF6* 都具有 AP2/ERF 结构域。*RAP2.2* 与 *PSY* 启动子区上的 ATCTA 模体 (motif) 结合, 调节 *PSY* 的活性, 改变根愈伤组织中的类胡萝卜

素含量 (Welsch et al., 2007)。SLAP2a 和 SIERF6 可以调节番茄果实内 PSY1 和 LCYB 的表达量, 从而影响果实中番茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素的含量 (Chung et al., 2010; Lee et al., 2012)。本研究中发现 Dck008006 与 alp8-1 和 zea8-2 相关, 可能参与胡萝卜根中  $\alpha$ -胡萝卜素和玉米黄质合成的调控。Dck029898 与 bHLH135 同源, 与转录因子 CubHLHI 具有相同的螺旋-转角-螺旋 (bHLH) 结构域。过表达 CubHLHI 可以上调  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶和胡萝卜素裂解酶的表达, 可减少番茄红素的含量 (Endo et al., 2016)。Dck029898 与控制  $\zeta$ -胡萝卜素含量的 zet4-1 相关, 其中  $\zeta$ -胡萝卜素是番茄红素的上游底物, 表明该基因可能参与胡萝卜根中  $\zeta$ -胡萝卜素合成的调控。本研究基于高密度遗传图谱初步建立了部分类胡萝卜素含量相关的 QTL 与其合成途径关键候选基因之间的关联, 为深入探讨其合成调控机制提供了基础。

## References

- Arango J, Jourdan M, Geoffriau E, Beyer P, Welsch R. 2014. Carotene hydroxylase activity determines the levels of both  $\alpha$ -carotene and total carotenoids in orange carrots. *Plant Cell*, doi: 10.1105/tpc.113.122127.
- Boiteux L S, Belter J G, Roberts P A, Simon P W. 2000. RAPD linkage map of the genomic region encompassing the rootknot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. *Theor Appl Genet*, 100: 439 - 446.
- Briard M, Le Clerc V, Grzebelus D, Senalik D, Simon P W. 2000. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP™ analysis using silver stain or radioisotopes. *Plant Mol Biol Rep*, 18: 235 - 241.
- 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, Iorizzo 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.
- Cavagnaro P F, Iorizzo M, Yildiz M, Senalik D, Parsons J, Ellison S, Simon P W. 2014. A gene-derived SNP-based high resolution linkage map of carrot including the location of QTL conditioning root and leaf anthocyanin pigmentation. *BMC Genomics*, 15: 1118.
- Chung M Y, Vrebalov J, Alba R, Lee J, McQuinn R, Chung J D, Klein P, Giovannoni J. 2010. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SLAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant J*, 64: 936 - 947.
- Endo T, Fujii H, Sugiyama A, Nakano M, Nakajima N, Ikoma Y, Omura M, Shimada T. 2016. Overexpression of a citrus basic helix-loop-helix transcription factor (CubHLHI), which is homologous to *Arabidopsis* activation-tagged bri1 suppressor 1 interacting factor genes, modulates carotenoid metabolism in transgenic tomato. *Plant Science*, 243: 35 - 48.
- Goldman I L, Breitbach D N. 1996. Inheritance of a recessive character controlling reduced carotenoid pigmentation in carrot (*Daucus carota* L.). *J Hered*, 87: 380 - 382.
- Grzebelus D, Iorizzo M, Senalik D, Ellison S, Cavagnaro P F, Macko-Podgorni A, Heller-Uszynska K, Kilian A, Nothnagel T, Allender C, Simon P W, Baranski R. 2014. Diversity, genetic mapping, and signatures of domestication in the carrot (*Daucus carota* L.) genome, as revealed by Diversity Arrays Technology (DArT) markers. *Mol Breeding*, 33: 625 - 637.
- Han K, Jeong H J, Yang H B, Kang S M, Kwon J K, Kim S, Choi D, Kang B C. 2016. An ultra-high-density bin map facilitates high-throughput QTL mapping of horticultural traits in pepper (*Capsicum annuum*). *DNA Res*, doi: 10.1093/dnares/dsv038.
- Huang X, Feng Q, Qian Q, Zhao Q, Wang L, Wang A, Guan J, Fan D, Weng Q, Huang T, Dong G, Sang T, Han B. 2009. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res*, 19: 1068 - 1076.
- Iorizzo M, Ellison S, Senalik D, Zeng P, Satapoomin P, Huang J, Bowman M, Iovene M, Sanseverino W, Cavagnaro P, Yildiz M, Spooner D M, Simon P W. 2016. A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nature Genetics*, doi: 10.1038/ng.3565.
- Jourdan M, Gagné S, Dubois-Laurent C, Maghraoui M, Huet S, Suel A, Hamama L, Briard M, Peltier D, Geoffriau E. 2015. Carotenoid content and root color of cultivated carrot: a candidate-gene association study using an original broad unstructured population. *PLoS ONE*, 10 (1): e0116674.
- Just B J, Santos C A F, Fonseca M E N, Boiteux L S, Oloizia 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. *Theor Appl Genet*, 114: 693 - 704.



- Lee J M, Joung J G, McQuinn R, Chung M Y, Fei Z, Tieman D, Klee H, Giovannoni J. 2012. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor *SlERF6* plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *Plant J*, 70 (2): 191 - 204.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754 - 1760.
- Liu D, Zhang J, Liu X, Wang W, Liu D, Teng Z, Fang X, Tan Z, Tang S, Yang J, Zhong J, Zhang Z. 2016. Fine mapping and RNA-Seq unravels candidate genes for a major QTL controlling multiple fiber quality traits at the T1 region in upland cotton. *BMC Genomics*, 17 (1): 295.
- Liu T, Yu T, Xing Y. 2013. Identification and validation of a yield-enhancing QTL cluster in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 192: 145 - 153.
- Mei H W, Li Z K, Shu Q Y, Guo L B, Wang Y P, Yu X Q, Ying C S, Luo L J. 2005. Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two backcross populations. *Theor Appl Genet*, 110 (4): 649 - 659.
- Moreno J C, Pizarro L, Fuentes P, Handford M, Cifuentes V, Stange C. 2013. Levels of lycopene b-cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. *PLoS ONE*, 8 (3): e58144.
- Ou Cheng-gang, Deng Bo-tao, Bao Sheng-you, Zhao Zhi-wei, Hu Hong, Zhuang Fei-yun, Mao Shu-min. 2010. QTL mapping for contents of main carotenenes and lycopene in carrot (*Daucus carota* L.). *Hereditas*, 32 (12): 1290 - 1295. (in Chinese)
- 欧承刚, 邓波涛, 鲍生有, 赵志伟, 胡 鸿, 庄飞云, 茅淑敏. 2010. 胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 中主要胡萝卜素和番茄红素含量的 QTL 分析. *遗传*, 32 (12): 1290 - 1295.
- Qi X, Li M W, Xie M, Liu X, Ni M, Shao G, Song C, Yim K Y A, Tao Y, Wong F L, Isobe S, Wong C F, Wong K S, Xu C, Li C, Wang Y, Guan R, Sun F, Fan G, Xiao Z, Zhou F, Phang T H, Liu X, Tong S W, Chan T F, Yiu S M, Tabata S, Wang J, Xu X, Lam H M. 2014. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing. *Nat Commun*, 5: 4340.
- Santos C A F, Simon P W. 2002. QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenenes and lycopene in carrot roots. *Mol Genet Genomics*, 268: 122 - 129.
- Santos C A F, Simon P W. 2006. Heritabilities and minimum gene number estimates of carrot carotenoids. *Euphytica*, 151: 79 - 86.
- Simon P W. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. *Plant Breed Rev*, 19: 157 - 190.
- Simpson K, Quiroz L F, Rodriguez-Concepción M, Stange C R. 2016. Differential contribution of the first two enzymes of the MEP pathway to the supply of metabolic precursors for carotenoid and chlorophyll biosynthesis in carrot (*Daucus carota*). *Front Plant Sci*, 7: 1344.
- Umiel N, Gabelman W H. 1972. Inheritance of root color and carotenoid synthesis in carrot, *Daucus carota* L.: orange vs. red. *J Am Soc Hort Sci*, 97: 453 - 460.
- Van O J W. 2006. JoinMap 4.0: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Wageningen, Netherlands: Kyazma B.V.
- Vivek B S, Simon P W. 1999. Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*). *Theor Appl Genet*, 99: 58 - 64.
- Wang H, Ou C G, Zhuang F Y, Ma Z G. 2014. The dual role of phytoene synthase genes in carotenogenesis in carrot roots and leaves. *Mol Breed*, 34: 2065 - 2079.
- Wang Hui, Ou Cheng-gang, Zhuang Fei-yun, Zhao Zhi-wei, Ma Zhen-guo. 2014. Relationship of carotenoid accumulation and transcript of main genes in carotenoid biosynthesis in carrot. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (12): 2513 - 2520. (in Chinese)
- 王 慧, 欧承刚, 庄飞云, 赵志伟, 马振国. 2014. 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. *园艺学报*, 41 (12): 2513 - 2520.
- Wang L, Wang A, Huang X, Zhao Q, Dong G, Qian Q, Sang T, Han B. 2011. Mapping 49 quantitative trait loci at high resolution through sequencing-based genotyping of rice recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet*, 122 (2): 327 - 340.
- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P. 2007. Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol*, 145 (3): 1073 - 1085.
- Xu Z S, Tan H W, Wang F, Hou X L, Xiong A S. 2014. CarrotDB: a genomic and transcriptomic database for carrot. Database, doi: 10.1093/database/bau096.
- Yang J, Hu C C, Ye X Z, Zhu J. 2005. QTLNetwork 2.0. Institute of Bioinformatics, Zhejiang University, Hangzhou, China, Available: <http://ibi.zju.edu.cn/software/qltnetwork>.
- Zhou Z, Zhang C, Zhou Y, Hao Z, Wang Z, Zeng X, Di H, Li M, Zhang D, Yong H, Zhang S, Weng J, Li X. 2016. Genetic dissection of maize plant architecture with an ultra-high density bin map based on recombinant inbred lines. *BMC Genomics*, 17: 178.