

# 胡萝卜 *FLC* 同源基因对低温及光周期响应

毛笈华, 庄飞云\*, 欧承刚, 赵志伟, 王 慧, 马振国

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

**摘 要:** 基于‘松滋野生’(Ws)和‘Amsterdam’(Af)胡萝卜转录组测序, 挖掘胡萝卜 *FLC* 同源基因 (*DcFLCs*), 深入研究其对低温及光周期响应规律。结果表明, 胡萝卜中存在 3 个具有完整 MADS-box 和 K-box 保守结构域的 *FLC* 同源基因 *DcFLC1*、*DcFLC2*、*DcFLC3*, 分别编码 209、212、219 个氨基酸残基蛋白, 进化树显示与其它植物 *FLC* 亲缘关系较远。RT-PCR 表明 *DcFLC1* 和 *DcFLC2* 在供试材料中均表达, 而 *DcFLC3* 仅在部分材料中表达。qPCR 结果显示低温能促进 *DcFLC1* 和 *DcFLC3* 在耐抽薹品种 Af 幼苗叶片和种根中表达, 而 *DcFLC2* 仅在 Af 种根中表达显著, 在幼苗叶片中表达不显著。*DcFLC1* 和 *DcFLC2* 在抽薹敏感的 Ws 幼苗叶片和种根春化过程中表达规律不同, 低温能促进 *DcFLC1* 在幼苗叶片以及 *DcFLC2* 在种根中表达。连续光照能促进 *DcFLC1*、*DcFLC2* 在 Af 幼苗叶片中表达, 但在 Ws 中则不同。

**关键词:** 胡萝卜; *DcFLCs*; 低温; 光周期; 基因表达

**中图分类号:** S 631.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 12-2453-10

## Expression Analysis of *FLC* Homologues Responding to Low Temperature and Photoperiod in Carrot

MAO Ji-hua, ZHUANG Fei-yun\*, OU Cheng-gang, ZHAO Zhi-wei, WANG Hui, and MA Zhen-guo  
(Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Carrot (*Daucus carota* L.) is a biennial species and requires vernalization for flowering. The premature bolting of carrot occurs in winter-spring plastic tunnel and spring cultivation, and results in a complete loss of commercial value, but limited progress reported on the control of bolting and flowering in carrot. Basis on the transcriptome sequences, carrot *FLOWERING LOCUS C* homologues (*DcFLCs*) were screened. Cultivar ‘Amsterdam’ (Af) tolerance to premature bolting and wild sensitive species ‘Songzi’ (Ws) were selected to study the relative expression of *DcFLCs* under cold and photoperiod treatment examined by real-time qPCR. Three *FLC* homologues (*DcFLC1*, *DcFLC2* and *DcFLC3*) were annotated with complete ORFs, MADS-box and K-box conserved regions, which encoded 209, 212 and 219 amino acids, respectively. Phylogenetic analysis showed that *DcFLCs* were clustered with other plants *FLC* homologous. *DcFLC1* and *DcFLC2* were confirmed to express in all species by RT-PCR, but *DcFLC3* only in some. The relative expression of *DcFLC1* and *DcFLC3* were improved in Af young plants and roots during vernalization, while *DcFLC2* was only improved in roots but no significance in young

**收稿日期:** 2013-09-12; **修回日期:** 2013-11-15

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31272162); 国家科技支撑计划项目 (2012BAD02B04, 2013BAD01B04); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903016)

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

plants. *DcFLC1* were improved in *Ws* young plants but no significance in roots during vernalization, while *DcFLC2* in contrary. Both of the relative expression of *DcFLC1* and *DcFLC2* were improved in *Af* young plants under continuous illumination, but different in *Ws*.

**Key words:** carrot; *DcFLCs*; low temperature; photoperiod; gene expression

胡萝卜 (*Daucus carota* L. var. *sativa*) 栽培中通常需要达到一定植株大小并经过 2~3 个月 10 °C 以下低温春化才能抽薹开花 (Dickson & Peterson, 1958)。胡萝卜春化后抽薹以显性基因控制为主, 早开花品种或一年生胡萝卜品种受 1 个显性春化基因 *vrn1* 控制 (Dickson & Peterson, 1958; Alessandro & Galmarini, 2007; Alessandro et al., 2013)。近年来冬春大棚及早春露地栽培已经成为中国胡萝卜生产重要模式, 先期抽薹问题已成为生产上关键瓶颈。抽薹后肉质根韧皮部和木质部木栓化, 完全失去商品价值 (Rubatzky et al., 1999)。胡萝卜先期抽薹的发生除了受低温影响外, 还受到光周期影响, 这与正常抽薹开花调控机制不尽相同 (鲍生有 等, 2010; 毛笈华 等, 2013)。

光周期途径是植物成花诱导的原始途径, 而春化途径则是植物在进化过程中对不同环境的适应 (Amasino & Michaels, 2010)。MADS-box 类的转录因子 *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) 是拟南芥春化诱导途径中的关键基因, 直接作用于成花信号的整合因子 *SOC1* 和 *FT*, 低温通过 *VIN3* 抑制 *FLC* 转录表达, 进而解除对下游基因的抑制, 启动成花 (Michaels & Amasino, 1999)。可变剪接是调控基因功能的重要方式 (Evgenia et al., 2003), 白菜中有 4 个 *FLC* 拷贝, *BrFLC1* 和 *BrFLC2* 为决定开花时间的两个候选基因 (Schranz et al., 2002; Yuan et al., 2009; Zhao et al., 2010), 菜用白菜 (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, ssp. *chinensis* 和 ssp. *rapa*) 的开花时间主要受 *BrFLC1* 可变剪接的影响, 而 *BrFLC2* 的 InDel 突变是油菜 (*B. rapa* ssp. *oleifera* 和 ssp. *tricoloris*) 开花时间变异的原因 (Wu et al., 2012)。甜菜中 *BvFL1* 的表达受春化作用抑制, 存在 4 种可变剪接形式 (Reeves et al., 2007)。Zhang 等 (2009) 获得了 5 个枳 (*Poncirus trifoliata*) 的 *PtFLC* 可变剪接, 分别在幼年期和成年期发挥作用, 这些基因在冬季表达量高于春季和夏季, 与拟南芥 *FLC* 表达模式相反。本试验基于前期胡萝卜品种资源先期抽薹发生 (鲍生有 等, 2010; 毛笈华 等, 2013) 及转录组测序结果, 分别对抽薹敏感的松滋野生胡萝卜和耐抽薹的 Amsterdam 栽培品种进行 *FLC* 同源基因 (*DcFLCs*) 克隆, 并利用 Real-time qPCR 分析 *DcFLCs* 对低温及光周期响应规律, 为深入开展胡萝卜开花调控研究及耐抽薹材料选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用春季栽培抽薹敏感的‘松滋野生’ (*Ws*, 野生资源, 白色木质根), 耐抽薹的‘Amsterdam’品种 (*Af*, 短圆柱形, 橘红色) 及其 10 个回交重组自交系 (BILs, BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 代, 以 *Af* 作为轮回亲本): E01051、E02032、E0601、E2003、E52081、E36082、E36093、E4506、E45032 和 E52014 进行 *DcFLCs* 基因验证。选用 7 个代表性的地方品种资源或自交系: ‘北京鞭杆红’ (B008, 红色)、‘仁怀胡萝卜’ (B287, 红色)、‘佳县胡萝卜’ (B223, 黄色)、‘小圆顶红胡萝卜’ (B164, 黄色)、‘奉节野生胡萝卜’ (B388, 白色木质根)、‘12P39’ (橘红色, 黑田类型自交系)、‘3080’ (橘红色, 皇帝类型自交系) 进行 *DcFLCs* 的多态性分析。

### 1.2 *DcFLCs* 基因 RT-PCR

2012 年 8 月初, 将上述材料播种于中国农业科学院南口综合试验基地, 每份材料株数不少于

150 株, 常规管理。10 月底进行取样, 对 Ws 和 Af 的叶片和根均取样, BILs、品种资源及自交系只取幼嫩叶片, 液氮速冻后保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

根据胡萝卜转录组测序结果, 共有 8 个 Unigene 注释为拟南芥 *FLC* 同源基因, 其中 3 个 Unigene 具有完整的 ORF, 分别是 ATLD.42921 (*DcFLC1*)、WTLD.7570 (*DcFLC2*) 和 ATLD.1765 (*DcFLC3*)。使用 Primer 5 软件在目标序列的 3'-UTR 和 5'-UTR 分别设计特异引物 (表 1)。样品 RNA 提取使用植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生物技术公司), 采用 PrimeScript<sup>®</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 公司) 反转录成 cDNA, 使用 *Ex Taq* HS 酶 (TaKaRa 公司) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系  $20\text{ }\mu\text{L}$ : cDNA ( $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $2\text{ }\mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各  $1\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10\times$  PCR buffer  $2\text{ }\mu\text{L}$ , dNTP mixture ( $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $0.8\text{ }\mu\text{L}$ , *Ex Taq* HS 酶 ( $2.5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.2\text{ }\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $13\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $3\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $3.5\text{ min}$ , 35 个循环后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ 。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。采用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (天根生物技术公司) 回收目的条带, 连接到 pGM-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞 (天根生物技术公司), 筛选阳性克隆, PCR 检测后送中国农业科学院作物科学研究所重大工程楼进行测序。

表 1 胡萝卜 *DcFLC* 基因 RT-PCR 及 Real-time qPCR 分析引物  
Table 1 The primers of *DcFLCs* for RT-PCR and Real-time qPCR analysis

用途 Use	基因 Gene	序列 Unigene	正向引物 Forward primer (5' - 3')	反向引物 Reverse primer (5' - 3')	片段大小/bp Size of the fragments
RT-PCR	<i>DcFLC1</i>	ATLD.42921	TTGACAGAAGGATGGGGAGGAAGAA	CATAATGGAGCCAGAACATC	976
	<i>DcFLC2</i>	WTLD.7570	CCTAAATICTCCCGTACTATCC	CTGAAGTCATTATIGCCACC	1 043
	<i>DcFLC3</i>	ATLD.1765	AGACAAACCTAACAAAAATGGGGAG	CGTGGCTACCAAACAAGAAC	860
qPCR	<i>DcFLC1</i>	ATLD.42921	GGACTCCTGGAAGTAGACAA	GTCATAATGGAGCCAGAACA	111
	<i>DcFLC2</i>	WTLD.7570	GATGGCACCATAACAACACTC	CTGCAACGGTGAATGATTG	127
	<i>DcFLC3</i>	ATLD.1765	AGTTCTCTGTGGCTGATCTTG	CTTTTCTCTCTTGGCTATGT	140
参照基因 Reference gene	<i>Tublin</i>		GAATACCAGCAGTACCAAGA	CATTACATATCTTGATGAGCC	88

### 1.3 *DcFLCs* 基因的生物信息学分析

通过在线比对搜索 NCBI 蛋白质数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 将注释为胡萝卜 *FLC* 的 Unigene 核酸序列与其进行相似性分析, 利用 Bioedit 软件进行序列比对和编辑, 使用 SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对氨基酸保守结构域进行预测。选取拟南芥 (NP\_001190272.1)、荠菜 (AFV28916.1)、油菜 (Q8W005)、白芥 (ABP96967.1)、甘蓝 (Q84LM9)、菜薹 (A1YV74)、萝卜 (F8WQU4)、甜菜 (ABN04208.1)、咖啡 (E9JPX8)、沙梨 (BAI99733.1)、枳 (B2LBE1)、蜜橘 (ACB72865.1)、山核桃 (AFM31223.1)、葡萄 (D1MDP4) 等植物 *FLC* 氨基酸序列和拟南芥其它 MADS-box 基因家族成员 *API* (P35631.2)、*AP3* (AEE79216.1)、*SOCI* (AEC10583.1)、*SVP* (NP\_179840.2), 及 *DcFLCs* 推导的氨基酸序列构建系统进化树, 使用 MEGA 5 软件中 Neighbor- Joining 模型、p-distance 算法 (Tamura et al., 2011), 1 000 次 bootstrap 对进化树检验, 显示各分支长度。

### 1.4 种根 *DcFLCs* 在春化过程中的响应

以 Ws 和 Af 为试材, 2012 年 4 月底播种于中国农业科学院蔬菜花卉研究所玻璃温室, 采用  $20\text{ cm}\times 60\text{ cm}\times 20\text{ cm}$  花盆, 基质采用蛭石: 草炭: 园土 =  $1:1:1$ ,  $2\sim 3$  片叶间苗,  $4\sim 5$  片叶定株, 株距  $1\sim 2\text{ cm}$ , 每材料 3 盆, 总数不少于 120 株。昼/夜生长温度  $35\text{ }^{\circ}\text{C}/25\text{ }^{\circ}\text{C}$  左右, 自然光照。8 月 25 日分别选取 60 根 Ws 和 Af 种根进行春化处理, 保留  $2\text{ cm}$  左右叶柄, 假植于蛭石中, 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中黑暗

春化。处理期间植株有嫩叶长出，春化后种根重新定植于玻璃温室，生长条件同上。根据前期试验结果（毛笈华等，2013），Af至少需要84 d低温才能通过春化，而Ws仅需28 d，所以Af分别于处理前（0 d）、春化28、56、84 d和春化结束后（11月17日）在温室生长14 d（昼/夜生长温度25 °C/15 °C左右）进行叶片取样，Ws分别于处理前（0 d）、春化14、28、42 d和春化结束后（10月6日）在温室生长7 d（昼/夜生长温度25 °C/15 °C左右）进行叶片取样，液氮速冻后-80 °C冰箱保存。

RNA提取方法同上，使用PrimeScript™ RT reagent Kit（TaKaRa公司）合成第一链cDNA。根据*DcFLCs*序列设计荧光引物（表1），目的片段长度100~200 bp，通过绘制标准曲线和溶解曲线确定引物扩增效率和特异性。以稀释20倍的cDNA（约50 ng·μL<sup>-1</sup>）为模板、*Tublin*为内参（Zagon et al., 2010），在StepOnePlus Real-time PCR system实时定量PCR仪（ABI公司）上，使用SYBR® *Premix Ex Taq*™ II试剂盒（TaKaRa公司）进行试验，重复3次。采用20 μL反应体系：cDNA（50 ng·μL<sup>-1</sup>）2 μL，上下游引物（10 μmol·L<sup>-1</sup>）各0.8 μL，SYBR Green Master Mix 10 μL，ROX 0.4 μL，补ddH<sub>2</sub>O至20 μL。选用三步法反应程序：95 °C变性5 s，56 °C退火30 s，72 °C延伸30 s，40个循环，反应结束后增加60~95 °C溶解曲线分析，2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算相对表达量（Livak & Schmittgen, 2001）。

### 1.5 幼苗植株*DcFLCs*在春化过程中的响应

以Ws和Af为试材，2012年8月初播种于玻璃温室，栽培方法和生长条件同1.4，每材料4盆，总数不少于160株。2013年1月20日开始对试材（保留3~4片新叶）进行春化处理，处理温度为昼夜7°C/2°C左右，自然光照。分别在处理前（0 d）、春化14、28和42 d后，下午14:00对材料嫩叶取样。3月3日春化后将材料搬回温室生长7 d后（昼/夜生长温度25 °C/15 °C左右）再取样，所有样品液氮速冻后-80 °C冰箱保存。*DcFLCs*的qPCR检测方法同1.4。

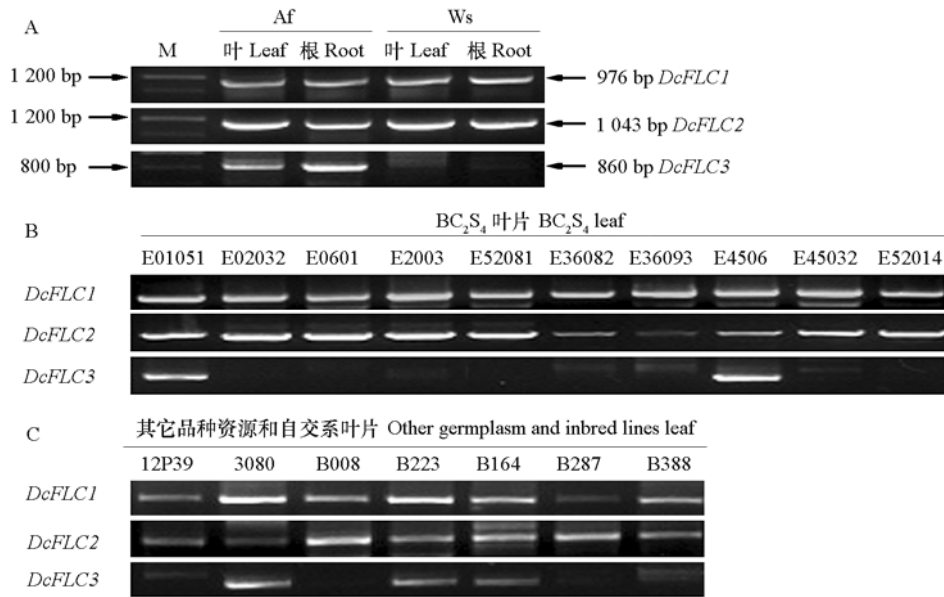
### 1.6 幼苗植株*DcFLC1*和*DcFLC2*对光周期的响应

以Ws和Af为试材，2012年8月初播种于玻璃温室，栽培方法和生长条件同1.4，每材料3盆，总数不少于120株。10月20日将植株先进行8 h短日照预处理7 d（下午16:00至翌日8:00之间采用遮光布覆盖），再进行光周期试验。10月28日为8 h短日照处理（方法同上），10月29日为24 h连续光照处理（下午16:00至翌日8:00之间采用高压钠灯补光，光照强度约500 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>）。取样时间点分别是10月28日11:00和14:00，10月29日2:00、5:00、8:00、11:00、14:00和23:00，10月30日2:00和5:00，共计10个点。每次选5株幼嫩叶片混合取样，液氮速冻后于-80 °C冰箱保存。*DcFLC1*和*DcFLC2*的qPCR检测方法同1.4。

## 2 结果与分析

### 2.1 *DcFLCs*基因RT-PCR

RT-PCR显示在耐抽薹品种Af叶片和根中均扩增出目的条带，分别是*DcFLC1*（976 bp）、*DcFLC2*（1043 bp）和*DcFLC3*（860 bp），而抽薹敏感的野生资源Ws叶片和根中只有*DcFLC1*和*DcFLC2*，没有*DcFLC3*（图1，A）。随机筛选10个回交重组自交系（BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>）株系进行验证，*DcFLC1*和*DcFLC2*在所有后代材料叶片中均表达，而*DcFLC3*仅在E01051和E4506株系中表达，其它株系均未表达（图1，B），呈现分离。*DcFLC1*和*DcFLC2*在7份其它品种资源及自交系中均表达，而*DcFLC3*仅在3080、B233和B164中表达，在12P39、B008、B287和B388中未表达，呈现多态性（图1，C）。

图1 *DcFLCs* 基因的 RT-PCR

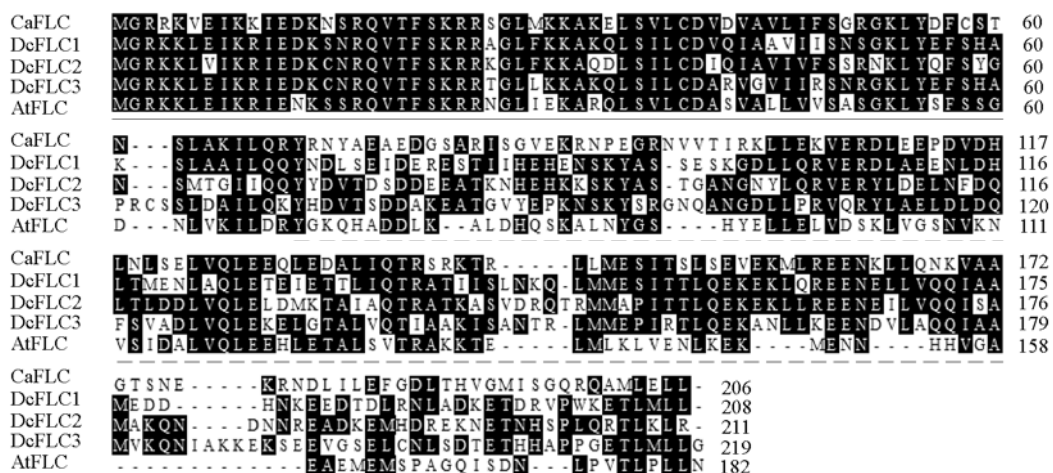
Af: 耐抽薹品种 ‘Amsterdam’; Ws: 抽薹敏感的 ‘松滋野生’。

Fig. 1 RT-PCR analysis of *DcFLCs*

Af: Tolerance to premature bolting cultivar ‘Amsterdam’; Ws: Wild sensitive species ‘Songzi’.

## 2.2 *DcFLCs* 基因的生物信息学分析

*DcFLC1*、*DcFLC2* 和 *DcFLC3* 开放阅读框长度分别为 630 bp、639 bp 和 660 bp，编码 209、212 和 219 个氨基酸残基的蛋白。氨基酸保守结构域预测和序列比对结果显示 *DcFLCs* 属于 MADS-box 基因家族 (图 2, 图 3)，第 1~60 个氨基酸为 MADS-box 结构域，相似性高，而 K-box 结构域分别位于 70~175、71~176、76~179 个氨基酸位置，表现出较大差异。BLAST 分析表明 *DcFLC1*、*DcFLC2*、*DcFLC3* 与咖啡 *CaFLC* 氨基酸相似度较高，分别为 52%、45% 和 49%，而与拟南芥 *AtFLC* 氨基酸相似度分别只有 39%、37% 和 36% (图 2)。

图2 胡萝卜 *DcFLCs* 与咖啡 *CaFLC*、拟南芥 *AtFLC* 同源基因氨基酸序列比对

实线代表 MADS-box 结构域，虚线代表 K-box 结构域。

Fig. 2 Alignment analysis of the putative protein sequences of carrot *DcFLCs* with coffee *CaFLC* and *Arabidopsis AtFLC* homologous. Solid line showed the MADS-box domain, and dotted line showed the K-box domain.

系统进化树显示不同植物的 *FLC* 同源基因聚为一类，而其它拟南芥 MADS-box 家族成员 *API1*、*SOC1*、*SVP*、*AP3* 形成一个分支聚在最外围（图 3）。亲缘关系近的植物 *FLCs* 遗传距离较小，如枳 *PtFLC* 和蜜橘 *CtFL-1* 遗传距离最小，拟南芥、芥菜、油菜、白芥、黑芥、甘蓝、萝卜等十字花科植物的 *FLCs* 聚为一类。其它植物的 *FLCs* 之间亲缘关系相对较远，其中 *DcFLCs* 单独形成一支位于十字花科和其它植物之间，而且三者之间遗传距离较远，其中 *DcFLC1* 和 *DcFLC3* 之间相对较近，这也表明三者功能上可能存在差异。

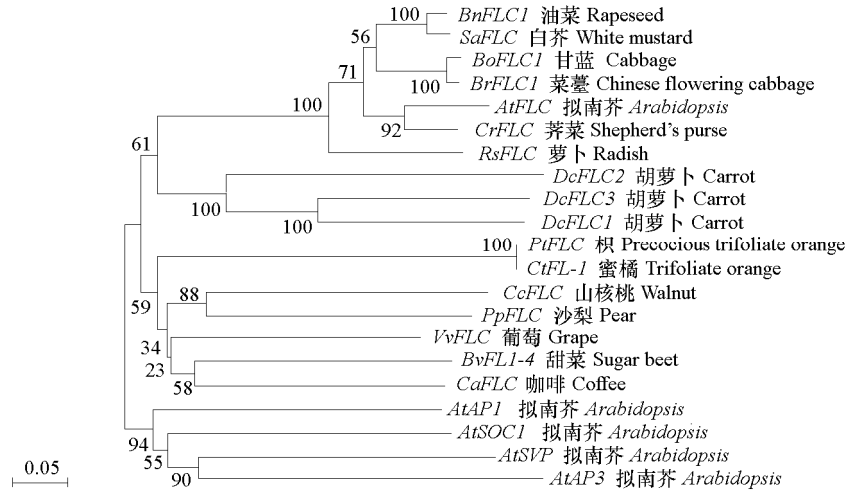


图 3 胡萝卜 *DcFLCs* 与拟南芥 MADS-box 基因家族及其它植物 *FLC* 同源基因氨基酸序列的进化树构建  
 Fig. 3 Phylogenetic analysis of the putative protein sequences of carrot *DcFLCs* with *Arabidopsis* MADS-box genes family and other plants *FLC* homologous

### 2.3 种根 *DcFLCs* 对低温的响应

*DcFLC1*、*DcFLC2* 和 *DcFLC3* 在耐抽薹品种 Af 种根低温处理过程中呈上调表达，处理 84 d 表达量最高，分别为处理前的 3.5、12 和 13 倍，回到室温后恢复到处理前水平（图 4）。

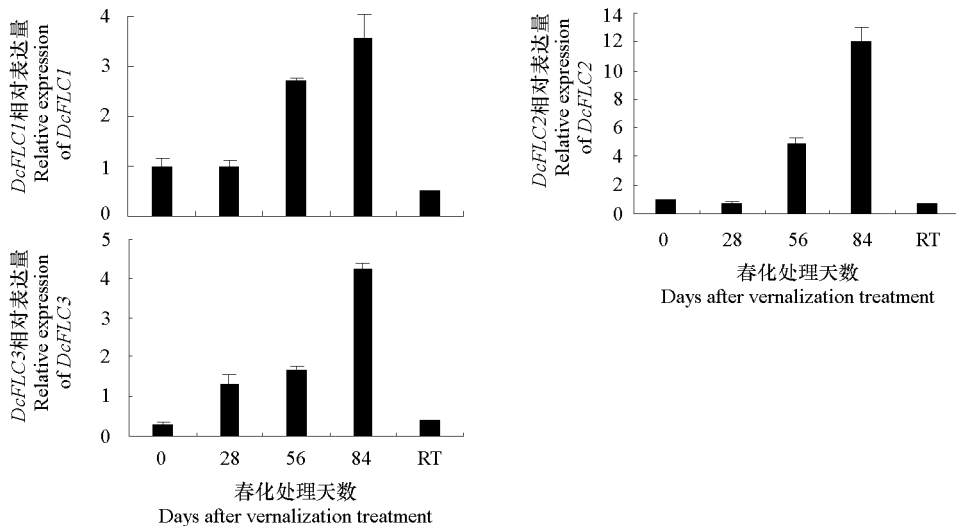


图 4 *DcFLCs* 在耐抽薹品种 Af 种根春化过程中的表达差异

RT: 春化后材料回到温室生长，昼/夜生长温度 25 °C/15 °C 左右。下同。

Fig. 4 Expression level of *DcFLCs* during and after Af and Ws roots vernalization

RT: The vernalized materials were moved to the greenhouse, and day/night temperature was about 25 °C/15 °C. The same below.

*DcFLC1* 在抽薹敏感的 Ws 种根低温处理过程中呈下调趋势, 回到室温后依然保持低水平表达 (图 5, A)。 *DcFLC2* 在 Ws 种根低温处理中与 Af 相似, 随低温处理时间延长而表达量上升, 42 d 达到最高, 为处理前的 3 倍 (图 5, B)。 *DcFLC3* 在 Ws 种根中未检测到, 同幼苗植株处理结果一致。

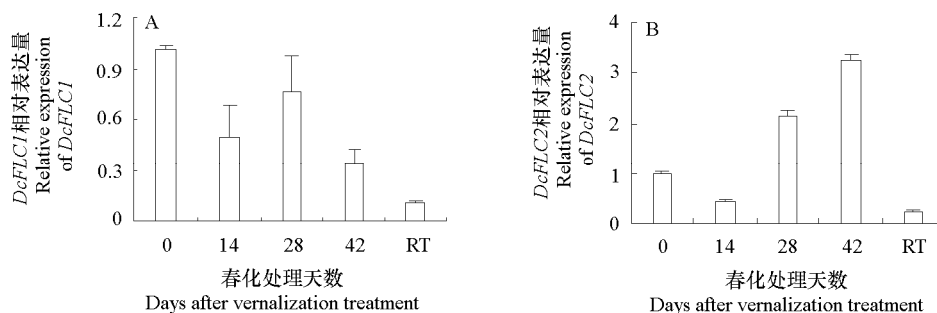


图 5 *DcFLCs* 在抽薹敏感的 Ws 种根春化过程中的表达差异

Fig. 5 Expression level of *DcFLCs* during and after Af and Ws roots vernalization

## 2.4 幼苗植株 *DcFLCs* 对低温的响应

*DcFLC1* 在耐抽薹品种 Af 和抽薹敏感的 Ws 幼苗植株低温处理中均呈上调, 回到室温后表达量下降, 但到达峰值时间不同, Af 在 42 d 仍呈上升趋势, 而 Ws 在 14 d 达到最高水平 (图 6, A)。 *DcFLC2* 在 Af 春化过程中表达差异不显著, 但在 Ws 中呈上下波动, 回到室温后呈低水平表达 (图 6, B)。 *DcFLC3* 在 Af 中低温处理 14 d 后表达量达到最高水平, 随后则下降, 但在 Ws 中未检测到 (图 6, C)。

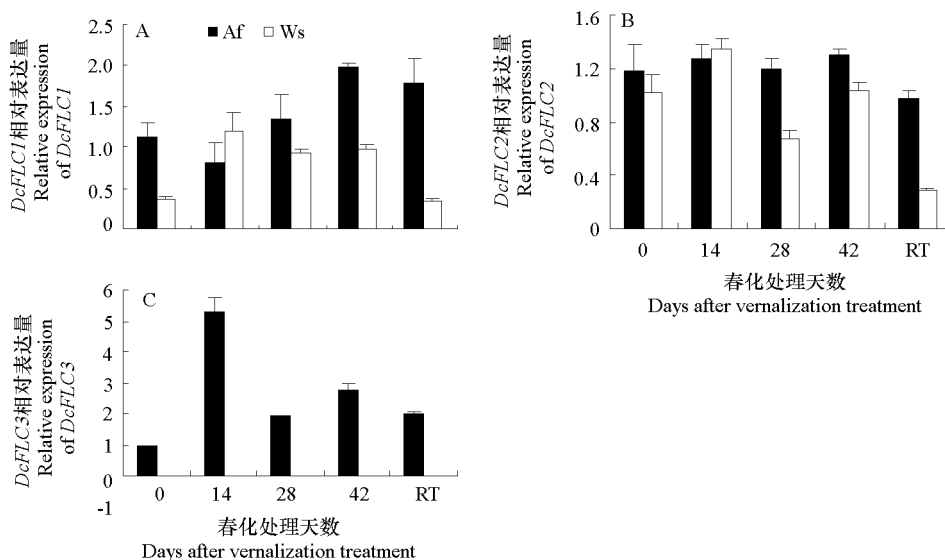


图 6 *DcFLCs* 在耐抽薹品种 Af 和抽薹敏感的 Ws 幼苗植株春化过程中的表达差异

Fig. 6 Expression level of *DcFLCs* during and after Af and Ws young carrot plants vernalization

## 2.5 幼苗植株 *DcFLC1* 和 *DcFLC2* 对光周期的响应

*DcFLC1*、*DcFLC2* 在耐抽薹品种 Af 和抽薹敏感的 Ws 光周期处理中表达规律不同。*DcFLC1* 在 Af 和 Ws 短日照处理中表达峰值均在夜间黑暗, 连续光照能提高其在 Af 中的表达水平, 但在 Ws 中则受到抑制 (图 7, A)。*DcFLC2* 在 Af 短日照处理中表达峰值在黑暗, 连续光照能显著提高其表达水平, 但在 Ws 中短日照和连续光照处理表达规律基本相似, 峰值均在白天 (图 7, B)。

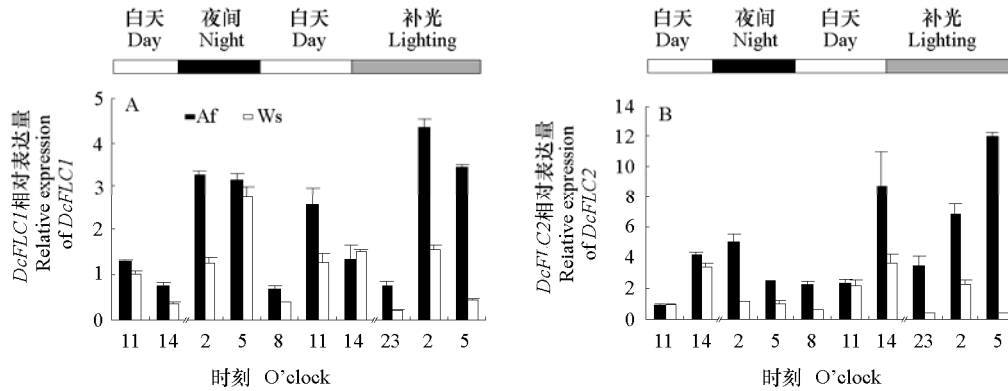


图 7 耐抽薹品种 Af 和抽薹敏感的 Ws 中 *DcFLC1* (A) 和 *DcFLC2* (B) 在短日照和连续光照处理下表达差异  
Fig. 7 Expression level of *DcFLC1* (A) and *DcFLC2* (B) of Af and Ws young plants under short day and continuous illumination

## 3 讨论

胡萝卜肉质根通常需要过冬后, 在第 2 年适宜温度下抽薹开花, 因此抽薹开花易受众多不确定因素影响, 导致相关研究进展十分缓慢 (毛笈华 等, 2013)。春化是胡萝卜抽薹开花的必要条件, 胡萝卜幼苗要求 8~12 片真叶, 肉质根直径达到 4~8 mm 才能感受低温 (Rubatzky et al., 1999; Alessandro & Galmarini, 2007; 毛笈华 等, 2013), 种根一般需要 10 °C 以下低温处理 2~3 个月才能完成春化过程 (Dickson & Peterson, 1958)。但有的品种对低温要求不严格, 如 ‘French Foring’ 在 4.5 °C 下处理 15 d 即可开花, ‘Brasilia’ 品种 7 °C 春化 5 d 即可发生抽薹 (Dias-Tagliacozzo & Válio, 1994)。对抽薹敏感的 Ws、耐抽薹品种 Af 及其杂交后代在早春栽培发生先期抽薹遗传分析, 表明抽薹开花时间是受多基因控制的 (毛笈华 等, 2013), 与 Alessandro 等 (2013) 提出一个显性春化基因 *vrn1* 控制胡萝卜正常发育过程中早开花性状不同, 这也表明两者抽薹开花调控机制不尽相同。

本研究对 3 个具有完整的 MADS-box 和 K-box 保守结构域的 Unigene 氨基酸序列比对和进化树分析, 结果表明与拟南芥、萝卜、甜菜、沙梨、葡萄等植物的 *FLC* 同源基因较为接近, 而与拟南芥 *SOC1*、*SVP*、*API* 等进化关系较远 (图 2, 图 3), 初步认为是胡萝卜的 *FLC* 同源基因。甘蓝和油菜均存在 5 个 *FLC* 同源基因 (*BoFLC* 和 *BnFLC*) (Tadege et al., 2001; Okazaki et al., 2007), 白菜中目前发现 4 个 *FLC* (*BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3* 和 *BrFLC5*) (Schrantz et al., 2002; Zou et al., 2012), 其中 *BrFLC1*、*BrFLC2* 和 *BoFLC2* 与开花时间变异有关 (Yuan et al., 2009; Zhao et al., 2010)。这些等位基因的存在和功能分化不仅反映了基因的进化关系, 也是植物与环境相互作用的结果。虽然 *DcFLCs* 在一个分支上, 但进化不同步, 氨基酸一致性为 53%~57%, 尤其是在 K-box 区域差异较大 (图 2), 而 K-box 是调节蛋白质相互作用的关键区域 (Kaufmann et al., 2005)。*DcFLC1* 和 *DcFLC3* 间的分化晚于 *DcFLC2*, 而且 *DcFLC3* 在胡萝卜品种资源中呈现多态性, 这说明胡萝卜在长期进化和人工选择中, *DcFLCs* 表达模式和功能可能发生了变化。



多数有春化需要的植物必需经历一定时间的低温过程, 有利于植物本身避免冬季严寒对生殖生长阶段的影响 (Amasino & Michaels, 2010)。拟南芥中春化作用的主要靶基因是开花抑制基因 *FLC* (Michaels & Amasino, 1999), 但在麦类作物中并没有发现 *FLC* 的同源基因, 而是与春化相关的开花促进基因 *VRN1* (与拟南芥 *API* 同源)、*VRN3* (*FT*) 和开花抑制基因 *VRN2* (Trevaskis et al, 2007), 其中 *VRN1* 对开花作用方式与 *FLC* 完全相反, 而且其叶中的转录水平还受光周期影响, 短日照具有抑制作用, 长日照则反之 (安艳荣 等, 2011)。胡萝卜 *DcFLCs* 表达也受到低温影响, 但在 Af 和 Ws 幼苗植株、种根中表达规律不一致 (图 4, 图 5)。*DcFLC1*、*DcFLC3* 在 Af 幼苗植株和种根中表达规律相似, 呈上调趋势。*DcFLC2* 在 Af 种根中上调, 但在幼苗植株中表达差异不显著。*DcFLC1* 在 Ws 幼苗植株和种根表达趋势相反, 但 *DcFLC2* 在 Ws 种根中上调, 而在幼苗植株中表达差异不显著。而且 *DcFLC1*、*DcFLC2* 也受到光周期影响, 连续光照能提高两者在 Af 中的表达, 但在 Ws 中相反 (图 6)。这与拟南芥、白菜、白芥、甜菜等 *FLC* 受低温下调表达规律不同 (Michaels & Amasino, 1999; Tadege et al., 2001; Reeves et al., 2007; Maria et al., 2008), 而与麦类作物中 *VRN1* 具有相似的表达方式 (Trevaskis et al, 2007; 安艳荣 等, 2011), 但相关作用机理还需深入研究。

## References

- Alessandro M S, Galmarini C R, Iorizzo M I, Simon P W. 2013. Molecular mapping of vernalization requirement and fertility restoration genes in carrot. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 415 - 423.
- Alessandro M S, Galmarini C R. 2007. Inheritance of vernalization requirement in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132: 525 - 529.
- Amasino R M, Michaels S D. 2010. The time of flowering. *Plant Physiology*, 154: 516 - 520.
- An Yan-rong, Xu Jian-bin, An Hai-long. 2011. Polycomb group protein complex involved in plant vernalization. *Hereditas*, 33 (3): 207 - 212. (in Chinese)
- 安艳荣, 徐建斌, 安海龙. 2011. Polycomb Group 蛋白复合体与植物春化作用. *遗传*, 33 (3): 207 - 212.
- Bao Sheng-you, Ou Cheng-gang, Zhuang Fei-yun, Chen Jin-feng, Zhao Zhi-wei. 2010. Study of premature bolting of carrot in spring cultivation. *China Vegetables*, (6): 38 - 42. (in Chinese)
- 鲍生有, 欧承刚, 庄飞云, 陈劲枫, 赵志伟. 2010. 胡萝卜春季栽培前期抽薹的调查与分析. *中国蔬菜*, (6): 38 - 42.
- Dias-Tagliacozzo G M, Válio I F M. 1994. Effect of vernalization on flowering of *Daucus carota* (cv. Nantes and Brasília). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 6 (1): 71 - 73.
- Dickson M H, Peterson C E. 1958. Hastening greenhouse seed production for carrot breeding. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, (71): 412 - 415.
- Evgenia V, Koch I K, Apweiler R, Vingron M, Bork P, Gelfand S M, Sunyaev S. 2003. Increase of functional diversity by alternative splicing. *Trends in Genetics*, 19: 125 - 128.
- Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: Structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, 347: 183 - 198.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Mao Ji-hua, Mao Shu-min, Zhuang Fei-yun, Ou Cheng-gang, Zhao Zhi-wei, Bao Sheng-you. 2013. Heredity and environmental regulation of premature bolting in carrot. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 28 (3): 67 - 72. (in Chinese)
- 毛笈华, 茅淑敏, 庄飞云, 欧承刚, 赵志伟, 鲍生有. 2013. 胡萝卜先期抽薹遗传及环境调控研究. *华北农学报*, 28 (3): 67 - 72.
- Maria D A, Pierre T, Claire P. 2008. Vernalization induced repression of *FLOWERING LOCUS C* stimulates flowering in *Sinapis alba* and enhances plant responsiveness to photoperiod. *New Phytology*, 178: 755 - 765.
- Michaels S D, Amasino R M. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11: 949 - 956.

- Okazaki K, Sakamoto K, Kikuchi R, Saito A, Togashi E, Kuginuki Y, Matsumoto S, Hirai M. 2007. Mapping and characterization of *FLC* homologs and QTL analysis of flowering time in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 595 - 608.
- Reeves P A, He Y, Schmitz R J, Amasino R M, Panella L W, Richards C M. 2007. Evolutionary conservation of the *FLC*-mediated vernalization response: Evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics*, 176: 295 - 307.
- Rubatzky V E, Quiros C F, Simon P W. 1999. Carrots and related vegetable Umbelliferae. New York: CABI Publishing.
- Schranz M E, Quijada P, Sung S B, Lukens L, Amasino R, Osborn T C. 2002. Characterization and effects of the replicated flowering time *FLC* in *Brassica rapa*. *Genetics*, 162: 1457 - 1468.
- Tadege M, Sheldon C C, Helliwell C A, Stoutjesdijk P, Dennis E S, Peacock W J. 2001. Control of flowering time by *FLC* orthologues in *Brassica napus*. *The Plant Journal*, 28: 545 - 553.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731 - 2739.
- Trevaskis B, Hemming M N, Dennis E S, Peacock W J. 2007. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Science*, 12: 352 - 357.
- Wu J, Wei K Y, Cheng F, Li S K, Wang Q, Zhao J J, Bonnema G, Wang X W. 2012. A naturally occurring InDel variation in *BraA.FLC.b(BrFLC2)* associated with flowering time variation in *Brassica rapa*. *BMC Plant Biology*, 12: 151 - 160.
- Yuan Y X, W J, Sun R F, Zhang X W, Xu D H, Bonnema G, Wang X W. 2009. A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa FLC1* gene is associated with variation in flowering time. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1299 - 1308.
- Zagon J, Jansen B, Knoppik M, Ehlers A, Kroh L W, Holzhauser T, Vieths S, Broll H. 2010. Gene transcription analysis of carrot allergens by relative quantification with single and duplex reverse transcription real-time PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 483 - 493.
- Zhang J Z, Li Z M, Mei L, Yao J L, Hu C G. 2009. *PtFLC* homolog from trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) is regulated by alternative splicing and experiences seasonal fluctuation in expression level. *Planta*, 299: 847 - 859.
- Zhao J J, Kulkarni, Liu N N, Del C D P, Bucher J, Bonnema G. 2010. *BrFLC2* (*FLOWERING LOCUS C*) as a candidate gene for a vernalization response QTL in *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany*, 61: 1817 - 1825.
- Zou X, Suppanz I, Raman H, Hou J, Wang J, Long Y, Jung C, Meng J L. 2012. Comparative analysis of *FLC* homologues in Brassicaceae provides insight into their role in the evolution of oilseed rape. *PLoS One*, 7: e45751. doi: 10.1371/journal.pone.0045751.

征 订

## 欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊，创刊于1962年，刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息，适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊，被英国《CAB文摘数据库》、美国CA化学文摘、日本CBST科学技术文献速报、俄罗斯AJ文摘杂志、CSCD中国科学引文数据库等多家数据库收录。《园艺学报》荣获第三届国家期刊奖及“中国精品科技期刊”、“中国权威学术期刊”、“新中国60年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”等称号。

《园艺学报》为月刊，每月25日出版。每期定价40元，全年480元。国内外公开发行，全国各地邮局办理订阅，国内邮发代号82-471，国外发行由中国国际图书贸易总公司承办，代号M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。

编辑部地址：北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部；

邮政编码：100081；电话：(010) 82109523。

E-mail: [yuanyixuebao@126.com](mailto:yuanyixuebao@126.com)。

网址: <http://www.ahs.ac.cn>。