网络出版时间:2025-08-07 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.02.016

芜菁肉质根叶绿素和叶黄素代谢相关基因挖掘

王艳彩[1,2],王江艳[1,2],徐焕文[2],王忠红[1],冯西博[1]

(1 西藏农牧学院 植物科学学院,西藏 林芝 860000;
2 温州科技职业学院(温州市农业科学研究院) 浙南作物育种重点实验室,浙江 温州 325006)

[摘 要] 【目的】挖掘芜菁叶绿素和叶黄素代谢关键基因,为解析芜菁果皮颜色性状的形成机制奠定基础。【方法】以白芜菁和绿芜菁肉质根果皮为材料,测定其叶绿素含量,提取芜菁肉质根果皮总 RNA,构建 cDNA 文库,进行转录组 Illumina 测序,筛选差异表达基因(DEGs),进行 GO 和 KEGG 分析。提取芜菁基因组 DNA,构建 DNA 文库,利用 Hiseq X10 PE150 测序平台进行测序,分析 DEGs 的序列变异。随机选取 6 个 DEGs,采用 RT-qPCR 法对其表达水平进行验证。【结果】与白芜菁相比,绿芜菁叶绿素 a 和叶绿素 b 含量较高。转录组测序共得到 2.40×10^8 条高质量片段(reads);与白芜菁相比,绿芜菁有 2 475 个上调 DEGs,有 4 496 个下调 DEGs。DEGs 显著富集到 4 264 个生物过程,712 个细胞组成,1 987 个分子功能的 GO 条目数;KEGG 通路富集结果显示,差异基因显著富集到 28 个代谢通路中,包含代谢途径、次生代谢物生物合成、光合作用、光合作用-天线蛋白和植物激素信号转导等。与白芜菁相比,绿芜菁叶绿素代谢途径共有 16 个 DEGs,其中尿卟啉原Ⅲ合酶(hemD)、镁螯合酶亚基 H(CHLH)、联乙烯还原酶(DVR)、原叶绿素酸酯还原酶(POR)、叶绿素酶(CLH)和叶绿素 a 合成酶(clhG)相关基因表达上调,而共卟啉原Ⅲ氧化酶(CPX)、镁脱螯酶(SGR)、嗜铬酶(PPD)相关基因表达下调;叶黄素合成途径共鉴定到 4 个 DEGs,其中 *LCYE*(BraA01g027340E、BraA10g046272E)、*CYP97C1*(BraA07g035488E)表达量上调,而 *BETA-OHASE*(BraA03g012433E)表达量下调。2 种芜菁在叶绿素代谢通路中,有 5 个 DEGs(*NOL*、*chlH*、*POR*、*chlG* 和 *CPX*)有序列差异;在叶黄素合成途径中,有 3 个 DEGs(*LCYE*、*BETA-OHASE* 和 *CYP97C1*)存在序列差异。6 个 DEGs(*SGR*(BraA01g025078E)、*CPX*(BraA09g007096E)、*POR*(BraA01g025517E)、*chlG*(BraA09g004947E)、*chlH*(BraA03g011972E)和 *POR*(BraA10g044962E))表达水平的 RT-qPCR 结果与转录组测序结果相同。【结论】白芜菁和绿芜菁之间有 16 个叶绿素代谢途径相关 DEGs,其中 5 个基因有序列差异;有 3 个叶黄素合成途径相关 DEGs。

[关键词] 芜菁;肉质根;转录组测序;叶绿素代谢;叶黄素代谢
[中图分类号] S631.3 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)02-0152-10

Investigation of genes related to chlorophyll and lutein metabolism in the fleshy root of turnip

WANG Yancai[1,2], WANG Jiangyan[1,2], XU Huanwen[2],
WANG Zhonghong[1], FENG Xibo[1]

(1 *College of Plant Science, Xizang Agricultural and Animal Husbandry University, Linzhi, Xizang* 860000, *China*;
2 *Southern Zhejiang Key Laboratory of Crop Breeding, Wenzhou Vocational College of Science and Technology (Wenzhou Academy of Agricultural Sciences), Wenzhou, Zhejiang* 325006, *China*)

Abstract: 【Objective】 This research aimed to investigate the key genes of chlorophyll and lutein me-

[收稿日期] 2024-10-09 [修回日期] 2024-11-27
[基金项目] 西藏自治区重点研发项目"高海拔庭院蔬菜立体无土栽培设施研发与应用示范"(XZ202401ZY0088);中央支持地方建设项目(533323003);温州市基础性公益科研项目(N2023014)
[作者简介] 王艳彩(2000—),女,山东潍坊人,在读硕士,主要从事高原植物研究。E-mail:15095097521@163.com
[通信作者] 冯西博(1973—),男,山东临沂人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事高原植物研究。E-mail:fxb750217@126.com
王忠红(1980—),男,宁夏固原人,教授,硕士生导师,主要从事蔬菜种质资源创新利用研究。
E-mail:wzhong2008bj@126.com

tabolism pathway, to lay a foundation for the analysis of the formation mechanism of turnip pericarp colour traits.【Method】With white turnip and green turnip fleshy root pericarps as materials, the chlorophyll content was determined, total RNA was extracted, and a cDNA library was constructed. Illumina sequencing of the transcriptome was carried out to screen differentially expressed genes (DEGs), and GO and KEGG analyses were performed. Turnip genomic DNA was extracted, and a DNA library was constructed. The Hiseq X10 PE150 sequencing platform was used for DNA sequencing to analyze the sequence variation of DEGs. Six DEGs were randomly selected and their expression levels were verified by RT-qPCR.【Result】Green turnips had higher chlorophyll a and chlorophyll b content compared to white turnips. A total of 2.40×10^8 high-quality reads were obtained by transcriptome sequencing. Compared with white turnip, green turnip had 2 475 up-regulated DEGs and 4 496 down-regulated DEGs. DEGs were significantly enriched to GO terms of 4 264 biological processes, 712 cellular components, and 1 987 molecular functions. KEGG pathway enrichment results showed that the DEGs were significantly enriched to 28 metabolic pathways containing metabolic pathways, secondary metabolite biosynthesis, photosynthesis, photosynthesis-antenna proteins and phytohormone signal transduction. Compared with white turnip, 16 DEGs in the chlorophyll metabolic pathway were screened in green turnip, including up-regulated expression genes (uroporphyrinogen Ⅲ synthase(hemD), magnesium chelatase subunit H(CHLH), diphenylethylene reductase(DVR), protochlorophyllinic acid lipids reductase(POR), chlorophyllotoxin lyase(CLH), and chlorophyll a synthase (clhG)) and down-regulated expression genes(coproporphyrinogen Ⅲ oxidase (CPX), magnesium dechelatase, magnesium deglutaminase (SGR), and chromophore enzyme(PPD)-related gene expression). A total of four DEGs were identified in the lutein synthesis pathway, of which *LCYE* (BraA01g027340E, BraA10g046272E), and *CYP97C1* (BraA07g035488E) expression were up-regulated, and *BETA-OHASE* (BraA03g012433E) expression was down-regulated. The two turnip species showed sequence differences in five DEGs (*NOL*, *chlH*, *POR*, *chlG*, and *CPX*) in the chlorophyll metabolic pathway, and three DEGs (*LCYE*, *BETA-OHASE*, and *CYP97C1*) in the lutein synthesis pathway. The RT-qPCR results of the expression level of six DEGs (*SGR* (BraA01g025078E), *CPX* (BraA09g007096E), *POR* (BraA01g025517E), *chlG* (BraA09g004947E), *chlH* (BraA03g011972E), and *POR* (BraA10g044962E)) were consistent with the transcriptome sequencing results.【Conclusion】There are 16 DEGs related to chlorophyll metabolism pathway between white turnip and green turnip, among which 5 genes show genome sequence differences. There are 3 DEGs related to lutein synthesis pathway.

Key words: turnips; fleshy roots; transcriptome sequencing; chlorophyll metabolism; lutein metabolism

芜菁(*Brassica rapa* L. spp. *rapifera*)是十字花科芸薹属二年生蔬菜，在我国华北、西北、云贵高原和江浙等地有 1 000 多年的栽培历史[1]。芜菁肉质根含有丰富的蛋白质、氨基酸和总皂苷等营养成分，具有抗氧化、补肾生精和健胃消食等功效，因此芜菁作为药食同源蔬菜深受人们的喜爱[2-5]。植物食用器官的颜色影响其商业价值和营养价值[6]。叶绿素是赋予植物特有绿色外观的重要色素，对人类身体健康具有重要的保健作用，如抗氧化和抗突变等。叶黄素是光合作用的主要辅助色素，能捕获光能供叶绿素进行光合代谢，并且还与叶绿素等其他色素共同作用，丰富植物的色彩。谷氨酸盐在一系列酶的催化下，历经叶绿素 a 合成、叶绿素循环和叶绿素降解过程，最终决定植物体内的叶绿素含量，涉及的蛋白主要包括原叶绿素酸酯还原酶(protochlorophyllide oxidoreductase, POR)、联乙烯还原酶(divinyl chlorophyll(ide), DVR)、叶绿素 a 加氧酶(chlorophyll a oxygenase, CAO)、叶绿素酶(chlase, CLH)、羟基羧酸受体(hydroxycarboxylic acid receptor, HCAR)和植物滞绿蛋白(stay-green, SGR)、叶绿素 a 合成酶(chlorophyll/bacteriochlorophyll a synthase, CHLG)、镁螯合酶亚基 H(magnesium chelatase subunit H, chlH)、叶绿素 b 还原酶(chlorophyll b reductase, NOL)、CHLM、CHLE、CHLP、hemA ～ hemG 等[7-10]。研究报道，白菜 *chlH* 基因突变后导致类囊体颗粒堆积不良，叶绿素

含量降低,叶片呈现黄色[11];白菜 *DVR* 基因突变,会导致联乙烯还原酶蛋白活性降低,叶片呈现浅绿色[12];连翘 *hemF* 基因启动子区域光响应顺式作用元件 G-box 会影响叶片颜色[13]。近几年,转录组学测序技术已广泛应用于蔬菜颜色的相关研究中[14-17]。如 TAO 等[18]对白茄子和绿茄子果肉进行转录组测序,发现叶啉和叶绿素代谢途径在茄子果肉颜色形成中发挥着重要作用;SONG 等[19]通过转录组学和代谢组学联合分析,深入解析了小白菜叶片黄化的分子机制;高浩然等[20]通过转录组学分析发现,MYB(vmyb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)和 bHLH(basic helix-loop-helix)转录因子在甘蓝型红花油菜花青素合成途径中发挥作用。腾守连等[21]将转录组和代谢组分析结合,探究不同光照下甘蓝型油菜幼苗的差异表达基因和差异代谢物。目前,人们对芜菁肉质根颜色的研究仅限于绿芜菁和紫芜菁花青素合成通路的差异调控方面[22],关于白芜菁和绿芜菁的差异表达基因及叶绿素和叶黄素代谢通路方面的研究尚未见报道。为此,本研究对白芜菁和绿芜菁的果皮进行转录组测序,分析差异表达基因,对其进行 GO 和 KEGG 富集,挖掘叶绿素和叶黄素代谢相关差异基因,旨在为解析芜菁果皮颜色性状的形成机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

选取 2023 年 10 月种植于浙江省温州市温州种子种苗科技园的白芜菁和绿芜菁为试验材料,采集收获期的芜菁肉质根果皮,迅速置于液氮中速冻,−80 ℃冰箱保存,用于转录组测序。白芜菁和绿芜菁每个样品设置 3 个生物学重复,共 6 个样品,分别命名为 GPB-1、GPB-2、GPB-3 和 GPL-1、GPL-2、GPL-3。

1.2 芜菁肉质根叶绿素含量的测定

参照 NY/T 3082−2017 标准测定 GPB 和 GPL 肉质根果皮中的叶绿素含量。

1.3 芜菁肉质根果皮总 RNA 提取及 cDNA 文库构建

采用植物总 RNA 提取试剂盒提取 GPB 和 GPL 肉质根果皮的 RNA,检测 RNA 质量。选取质量合格的 RNA 样品,利用 Oligo(dT)的磁珠特异性结合 mRNA,去除 rRNA,随后加入 fragmentation buffer 随机打断 mRNA。在逆转录酶体系中,以片段化的 mRNA 为模板,用六碱基随机引物合成 cDNA 第 1 条链。随后在 DNA 聚合酶体系下,以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第 2 条链。纯化后的双链 cDNA 加 poly A 尾并连接测序接头,用 AMPure XP beads 筛选 200 bp 左右的 cDNA,进行 PCR 扩增,使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,最终获得 cDNA 文库。

1.4 cDNA 文库 Illumina 测序

质检合格后的 cDNA 文库样品利用 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序,采用 fastp 过滤下机数据,剔除含接头、含 N、全部都是 A 碱基的片段(reads)和低质量片段(质量值(Q)≤20 碱基占整个片段碱基数 50%以上的片段),获取高质量测序数据,然后计算质量值≥20(Q20)、质量值≥30(Q30)碱基和 GC 碱基含量[23]。

1.5 差异表达基因筛选与 GO 和 KEGG 分析

使用 HISAT2 软件将高质量测序数据比对芜菁 ECD04 参考基因组(http://yanglab.hzau.edu.cn/BnIR/germplasm_info? id=ECD04.v0),利用 Stringtie 重构转录本,并利用 RSEM 计算每个样本中所有基因的片段数和 FPKM(fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)值[24-25]。用 DESeq2 软件分析 GPB 和 GPL 之间的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),筛选标准为基因表达变化倍数的绝对值(|FoldChange|)≥2,且错误发现率(false discovery rate,FDR)<0.05[26]。

采用 R 脚本对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析,以 $P<0.05$ 为阈值,满足此条件说明该 GO 功能注释条目或 KEGG 通路显著富集。

1.6 基因序列变异分析

采用 CTAB 法提取 GPB 和 GPL 肉质根果皮基因组 DNA,用酶随机打断成短 DNA 片段,进行平末端修复。在 DNA 片段两端连接 dA 尾和测序接头。利用 AMPure XP 磁珠纯化 DNA 片段,PCR 扩增 300～400 bp 片段,构建 DNA 文库。建好的 DNA 文库经纯化和库检后,由广州基迪奥生物科技有限公司利用 Hiseq X10 PE150 测序平台进行测序。测序完成后,利用 bwa 软件将测序获得的片段比对到芜菁 ECD04 参考基因组上,分析 2 种芜菁之间单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)和插入缺失突变(insertion-deletion,InDel)[27]。根据测序结果,初步分析 GPB 和 GPL 叶绿素、叶黄素代谢通路上 DEGs 启动子、外显子和内含子区域的序列差异。

1.7　芜菁 DEGs 的 RT-qPCR 验证

随机选取 6 个 DEGs，以芜菁 *β-actin* 为内参基因，采用 RT-qPCR 法对其表达水平进行验证。采用植物总 RNA 提取试剂盒提取 GPB 和 GPL 肉质根果皮的 RNA，再根据南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产的 HiScript Ⅱ Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)产品说明书进行反转录，获得 cDNA。利用 NCBI 进行引物设计，引物序列见表 1。参考南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产的 AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix 建立 PCR 体系和程序，使用 CFX Connect 实时荧光定量 PCR 系统进行 RT-qPCR。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量[28]。

表 1　白芜菁(GPB)和绿芜菁(GPL)肉质根中部分 DEGs RT-qPCR 验证试验引物

Table 1　DEGs RT-qPCR validation primers in fleshy roots from white turnip (GPB) and green turnip (GPL)

基因名称 Gene name	正向引物(5′→3′) Forward primer(5′→3′)	反向引物(5′→3′) Reverse primer(5′→3′)
β-actin	GGAATCCACGAGACGACTTAC	GCTCATACGGTCCGCAATAC
SGR(BraA01g025078E)	TAGAAGACGACCCAAGAGGAAG	TTCTCGTCAACCCCTAAAAACA
POR(BraA01g025517E)	AGCACATTCCGCTTTTCCG	AGCCTTGTTCCAGCTCCAGT
chlG(BraA09g004947E)	GCTGGAACTTTAGATGTGTGGG	CTTGTCCAGCCCACTGATGTA
chlH(BraA03g011972E)	GAGAGCAGGTTCCCGTCATC	ACAGACCAGGCTCAAAGGCT
CPX(BraA09g007096E)	TTTGGTGGTGGCACTGACTT	CCACTTCTTGAACCGAGGATAG
POR(BraA10g044962E)	GCCGATAAAATCTCCACCCT	TCTGCGTCTTCTTTTGCTCC

2　结果与分析

2.1　2 种芜菁肉质根果皮叶绿素含量测定

GPB 和 GPL 叶绿素含量测定结果表明，GPB 中的叶绿素 a 含量仅有 0.25 mg/kg，不含叶绿素 b；GPL 中叶绿素 a 含量高达 70.30 mg/kg，叶绿素 b 含量为 20.97 mg/kg。

2.2　芜菁果皮转录组测序数据质量评估

本研究构建了 3 个白芜菁果皮和 3 个绿芜菁果皮的 cDNA 文库，经过 Illumina HiSeq 2500 平台测序后共获得 2.41×10^8 条原始片段。去除原始片段数据中的接头序列和低质量的片段，共获得 2.40×10^8 条高质量片段，每个样本的高质量片段数目在 36 482 640～43 248 912 条，过滤比例均在 99.45%以上(表 2)。6 个样品过滤后的碱基组成平衡，Q20 碱基含量大于 97.73%，Q30 碱基含量大于 93.49%，GC 含量均在 46.43%以上，表明测序数据质量较高，可以满足转录组数据分析的要求。将质控后的高质量数据比对参考基因组，比对率为 85.65%～86.92%(表 2)，表明所选参考基因组合适，可用于后续基因分析。

表 2　白芜菁(GPB)和绿芜菁(GPL)转录组测序数据质量分析

Table 2　Quality analysis of GPB and GPL transcriptome sequencing data

样本名称 Sample	原始片段数目/条 Number of raw reads	高质量片段数目/条 Number of high quality reads	Q20 碱基含量/% Q20 Base content	Q30 碱基含量/% Q30 Base content	GC 碱基含量/% GC Base content	总比对数 Total mapped reads	比对率/% Mapping rate
GPB-1	39 992 782	39 796 424	97.96	93.97	46.64	39 686 276	86.82
GPB-2	36 685 608	36 482 640	97.73	93.49	46.56	36 378 256	86.46
GPB-3	41 739 418	41 519 312	97.78	93.59	46.43	41 398 336	86.34
GPL-1	40 472 616	40 259 878	98.01	94.18	46.79	40 134 628	86.92
GPL-2	43 489 484	43 248 912	97.75	93.55	46.60	43 115 496	85.65
GPL-3	38 721 024	38 526 150	97.92	93.93	46.55	38 410 456	86.64

2.3　DEGs 筛选

以|FoldChange|≥2 且 FDR<0.05 为标准，筛选 GPB 和 GPL 间的 DEGs。结果显示，与 GPB 相比，GPL 有 2 475 个上调表达 DEGs，有 4 496 个下调表达 DEGs。

2.4　DEGs 的 GO 和 KEGG 富集分析

为探究 GPB 与 GPL 之间差异基因功能富集情况，DEGs 被注释到 GO 数据库的生物过程(biological process，BP)、细胞组分(cellular component，CC)和分子功能(molecular function，MF)3 大类，其富集的通路分别有 4 264，712 和 1 987 个。富集 DEGs 数排名前 10 的通路见表 3。由表 3 可知，碳水化合物代谢过程、光合作用、几丁质响应、多聚糖代谢过程和以 DNA 为模板的转录调控过程是 BP

中显著富集的前 5 个通路;类囊体、光合作用膜、光合系统、类囊体膜和细胞壁是 CC 中显著富集的前 5 个通路;DNA 结合转录因子活性、转录调控活性、环四吡咯结合、亚铁血红素结合和氧化还原酶活性是 MF 中显著富集的前 5 个通路。

表 3 白芜菁(GPB)和绿芜菁(GPL)DEGs 的 GO 显著富集基因数

Table 3 Number of genes significantly enriched in GO analysis for DEGs from GPB and GPL

类别 Category	富集通路 Enrichment pathway	基因数 Gene number
生物过程 Biological process	碳水化合物代谢过程 Carbohydrate metabolic process(GO:0005975)	534
	光合作用 Photosynthesis(GO:0015979)	115
	几丁质响应 Response to chitin(GO:0010200)	31
	多聚糖代谢过程 Polysaccharide metabolic process(GO:0005976)	205
	以 DNA 为模板的转录调控过程 Regulation of transcription,DNA-templated(GO:0006355)	640
	调控核酸模板转录 Regulation of nucleic acid-templated transcription(GO:1903506)	640
	调节 RNA 生物合成过程 Regulation of RNA biosynthetic process(GO:2001141)	640
	细胞氨基酸生物合成过程 Cellular amino acid biosynthetic process(GO:0008652)	253
	α-氨基酸生物合成过程 Alpha-amino acid biosynthetic process(GO:1901607)	220
	调控 RNA 代谢过程 Regulation of RNA metabolic process(GO:0051252)	650
细胞组成 Cell composition	类囊体 Thylakoid(GO:0009579)	130
	光合作用膜 Photosynthetic membrane(GO:0034357)	106
	光合系统 Photosystem(GO:0009521)	56
	类囊体膜 Thylakoid membrane(GO:0042651)	82
	细胞壁 Cell wall(GO:0005618)	110
	膜 Membrane(GO:0016020)	1 256
	光系统Ⅱ Photosystem Ⅱ(GO:0009523)	36
	载体 Apoplast(GO:0048046)	69
	叶绿体内囊体 Chloroplast thylakoid(GO:0009534)	80
	细胞外围 Cell periphery(GO:0071944)	568
分子功能 Molecular function	DNA 结合转录因子活性 DNA-binding transcription factor activity(GO:0003700)	387
	转录调控活性 Transcription regulator activity(GO:0140110)	414
	环四吡咯结合 Tetrapyrrole binding(GO:0046906)	168
	亚铁血红素结合 Heme binding(GO:0020037)	154
	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity(GO:0016491)	689
	水解酶活性,作用于糖基键 Hydrolase activity,acting on glycosyl bonds(GO:0016798)	200
	水解酶活性,水解 O-糖基化合物 Hydrolase activity,hydrolyzing O-glycosyl compounds(GO:0004553)	181
	序列特异性 DNA 结合 Sequence-specific DNA binding(GO:0043565)	199
	糖基转移酶活性 Glycosyltransferase activity(GO:0016757)	240
	氧化还原酶活性作用于配对供体,结合或还原分子氧 Oxidoreductase activity,acting on paired donors,with incorporation or reduction of molecular oxygen(GO:0016705)	172

为了解差异基因参与的通路过程,对 DEGs 进行 KEGG 功能富集分析,结果显示 DEGs 显著富集到 28 个代谢通路中,对富集基因较多的代谢途径、次生代谢物生物合成、光合作用、光合作用-天线蛋白和植物激素信号转导、淀粉和蔗糖代谢、亚油酸代谢、α-亚麻酸代谢、植物-病原体相互作用、苯丙烷生物合成等前 10 种 KEGG 通路进行进一步分析,结果显示,显著富集的前 5 个条目是代谢途径、次生代谢物生物合成、光合作用、光合作用-天线蛋白和植物激素信号转导。

2.5 叶绿素和叶黄素代谢途径相关 DEGs 表达差异分析

由表 4 可知,GPB 与 GPL 叶绿素代谢通路(MapID:map00860)共鉴定到 16 个 DEGs;与 GPB 相比,GPL 有 12 个基因表达上调,分别是 *hemD*(BraA09g005896E)、*chlH*(BraA03g007758E、

BraA02g031887E、BraA03g011972E）、*DVR*（BraA10g046870E）、*POR*（BraA03g012537E、BraA10g044962E、BraA01g025517E）、*CAO*（BraA10g045480E）、*NOL*（BraA04g042268E）、*CLH*（BraA06g020301E）和 *chlG*（BraA09g004947E）；有 4 个基因表达下调，分别是 *CPX*（BraA09g007096E）、*NOL*（BraA03g007382E）、*SGR*（BraA01g025078E）、*PPD*（BraA01g025687E）。其中，*hemD*、*CPX*、*chlH*、*DVR* 和 *POR* 参与叶绿素生物合成途径，*CAO*、*NOL*、*CLH* 和 *chlG* 参与叶绿素循环途径，SGR 和 PPD 参与叶绿素降解途径。

叶黄素合成通路（Map ID：map00906）在 GPB 和 GPL 中共鉴定到 4 个 DEGs，其中 *LCYE*（BraA01g027340E、BraA10g046272E）、*CYP97C1*（BraA07g035488E）在 GPL 中表达上调，*BETA-OHASE*（BraA03g012433E）在 GPL 中表达下调。*LCYE* 编码番茄红素环化酶，催化番茄红素转化为 δ 胡萝卜素，*BETA-OHASE* 和 *CYP97C1* 催化 α 胡萝卜素转化为叶黄素。

表 4　白芜菁（GPB）和绿芜菁（GPL）肉质根叶绿素和叶黄素代谢途径相关 DEGs 分析

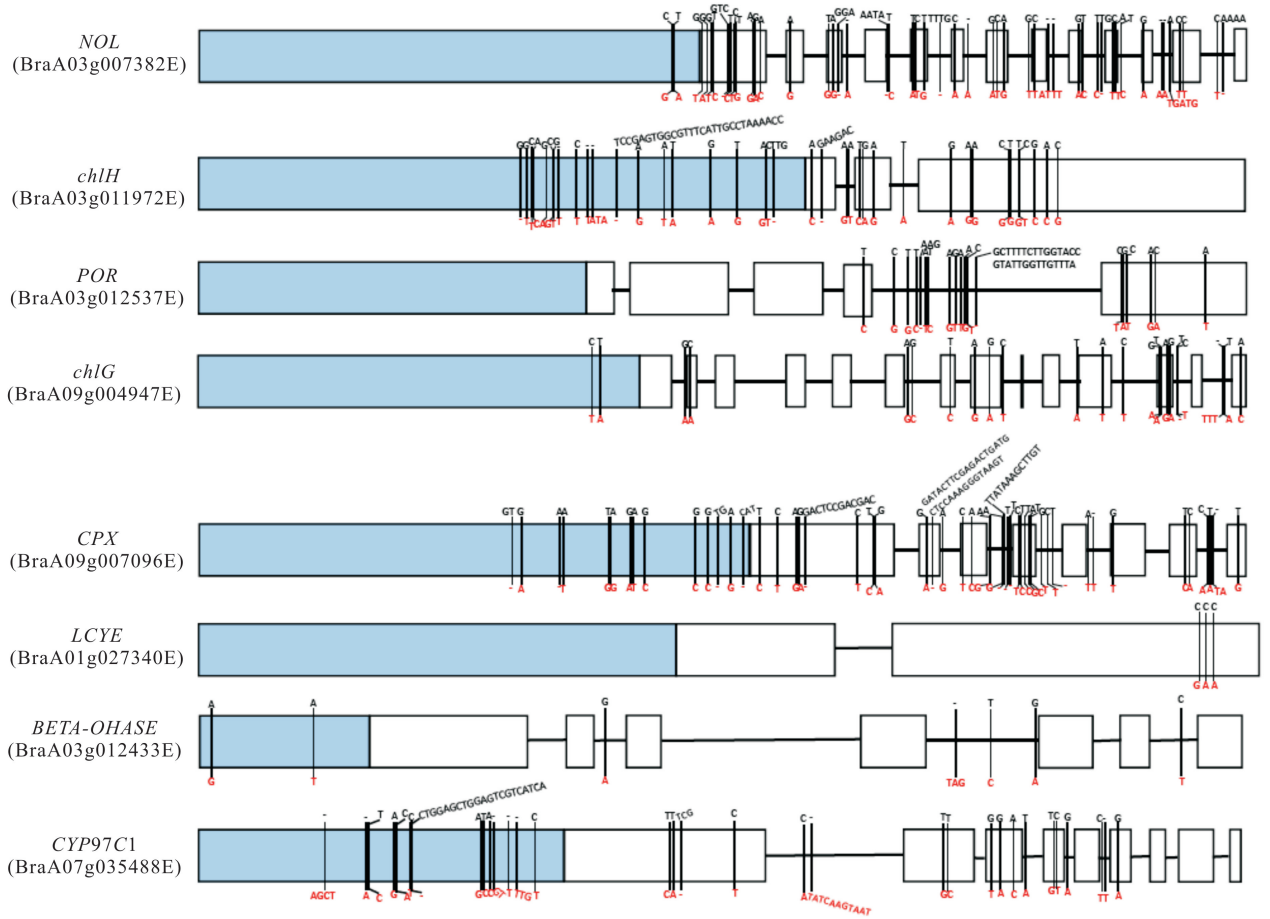
Table 4　Analysis of DEGs related to chlorophyll and lutein metabolic pathways in fleshy roots from GPB and GPL

通路 Pathways	基因简称 Gene abbreviation	基因 ID Gene ID	在 GPL 中表达量变化 Expression changes in GPL
叶绿素代谢途径 Chlorophyll metabolic pathway	*hemD*	BraA09g005896E	上调 Up
	CPX	BraA09g007096E	下调 Down
	chlH	BraA03g007758E	上调 Up
		BraA02g031887E	上调 Up
		BraA03g011972E	上调 Up
	DVR	BraA10g046870E	上调 Up
	POR	BraA03g012537E	上调 Up
		BraA10g044962E	上调 Up
		BraA01g025517E	上调 Up
	CAO	BraA10g045480E	上调 Up
	NOL	BraA04g042268E	上调 Up
		BraA03g007382E	下调 Down
	CLH	BraA06g020301E	上调 Up
	chlG	BraA09g004947E	上调 Up
	SGR	BraA01g025078E	下调 Down
	PPD	BraA01g025687E	下调 Down
叶黄素合成途径 Chlorophyll metabolic pathway	*LCYE*	BraA01g027340E	上调 Up
		BraA10g046272E	上调 Up
	BETA-OHASE	BraA03g012433E	下调 Down
	CYP97C1	BraA07g035488E	上调 Up

2.6　叶绿素和叶黄素代谢途径中 DEGs 序列分析

比对分析叶绿素代谢通路中 16 个 DEGs 在白色芜菁和绿色芜菁之间的序列，发现 11 个基因无序列差异，5 个基因（*NOL*、*chlH*、*POR*、*chlG* 和 *CPX*）有序列差异（图 1）。在 5 个序列存在差异的 DEGs 中，*NOL* 有 13 个外显子和 12 个内含子，共有 48 个序列变异位点，其中包含 36 个 SNPs 和 12 个 InDels。*chlH* 有 3 个外显子和 2 个内含子，包含 38 个序列变异位点，其中包括 31 个 SNPs 和 7 个 InDels。*POR* 有 5 个外显子和 4 个内含子，共有 19 个变异位点，其中包含 17 个 SNPs 和 2 个 InDels。*chlG* 有 14 个外显子和 13 个内含子，共有 22 个变异位点，其中包含 20 个 SNPs 和 2 个 InDels。*CPX* 有 8 个外显子和 7 个内含子，共有 49 个变异位点，其中包含 37 个 SNPs 和 12 个 InDels。

比对分析叶黄素合成途径中 4 个 DEGs 的序列，其中 *LCYE*、*BETA-OHASE* 和 *CYP97C1* 在白色芜菁和绿色芜菁之间存在序列差异（图 1）。*LCYE* 包含 2 个外显子和 1 个内含子，共有 3 个 SNPs；*BETA-OHASE* 包含 7 个外显子和 6 个内含子，共有 6 个 SNPs 和 1 个 InDels，均位于内含子上；*CYP97C1* 包含 9 个外显子和 8 个内含子，共有 23 个 SNPs 和 9 个 InDels。



横线、白色矩形框和蓝色矩形框分别代表内含子、外显子和非编码区;-表示缺失;红色碱基表示 GPL 的序列;黑色碱基表示 GPB 的序列

Lines, white boxes and blue boxes represent introns, exons and untranslated regions in the gene, respectively. -represents deletion. Red bases indicate the sequence of GPL, black bases indicate the sequence of GPB.

图 1 白芜菁(GPB)和绿芜菁(GPL)肉质根叶绿素和叶黄素代谢通路中 8 个 DEGs 的序列差异示意图

Fig. 1 Sequence differences of eight DEGs in chlorophyll and lutein metabolic pathways in fleshy roots from GPB and GPL

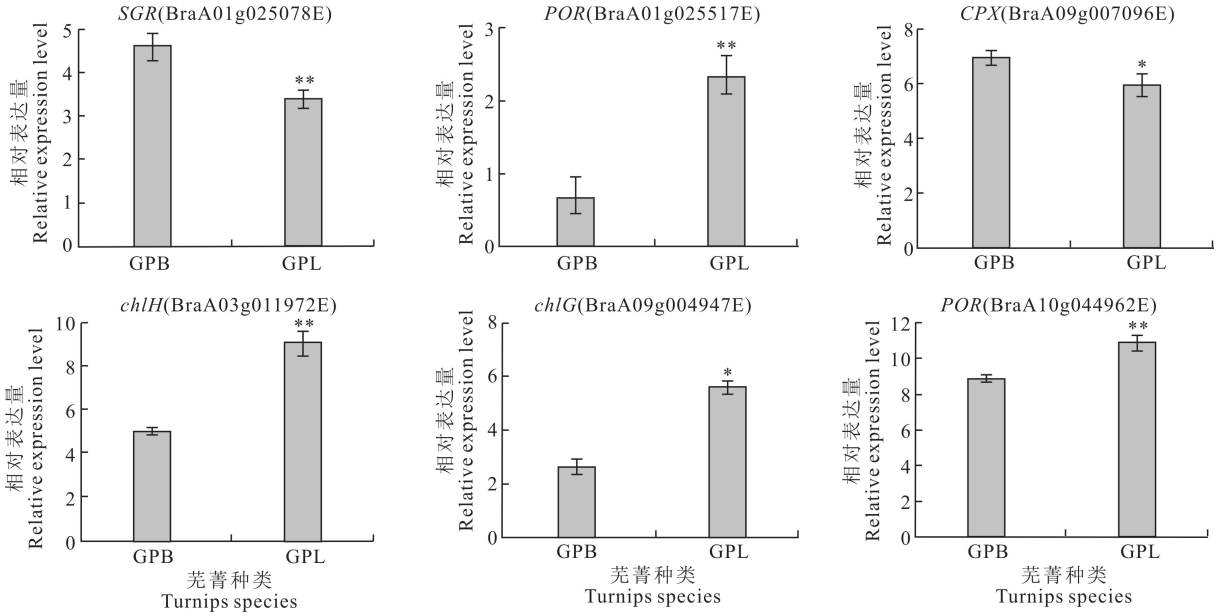
2.7 DEGs 的 RT-qPCR 验证

为验证转录组数据的准确性,随机挑选 *SGR*(BraA01g025078E)、*CPX*(BraA09g007096E)、*POR*(BraA01g025517E)、*chlG*(BraA09g004947E)、*chlH*(BraA03g011972E)和 *POR*(BraA10g044962E)等 6 个基因进行 RT-qPCR 验证。结果(图 2)表明,*SGR*(BraA01g025078E)和 *CPX*(BraA09g007096E)在 GPB 中的相对表达量显著或极显著高于 GPL,*POR*(BraA01g025517E)、*chlG*(BraA09g004947E)、*chlH*(BraA03g011972E)和 *POR*(BraA10g044962E)在 GPL 中的相对表达量显著或极显著高于 GPB,该结果与转录组测序结果完全吻合。

3 讨 论

本研究采集白芜菁(GPB)和绿芜菁(GPL)的果皮进行转录组测序,获得 2.40×10^8 条高质量片段。与 GPB 相比,GPL 有 2 475 个基因显著上调,有 4 496 个基因显著下调,其中 534 个差异基因被富集在碳水化合物代谢通路中,这些基因可能协调控制芜菁肉质根生长发育过程中能量供应;有 374 个差异基因被注释到类囊体、光合作用膜、类囊体膜和光合系统这 4 个细胞组成条目中,可能参与芜菁肉质根光合作用;有 168 个差异基因显著富集在环四吡咯结合通路,该通路在叶绿素合成和酶活化等多种生物过程发挥重要作用[29];有 154 个差异基因显著富集在亚铁血红素结合通路,血红素与叶绿素合成均来源于环四吡咯生物合成通路,而且血红素合成是促进叶绿体到细胞核的逆行信号[30-31]。KEGG 通路富集结果显示,差异基因显著富集到 28 个代谢通路中,包含代谢途径、次生代谢物生物合成、光合作用、光合作用-天线蛋白和植物激素信号转导等。在不同颜色的芜菁中,代谢途径和次生代谢物生物合成途径的富集可能影响肉质根的生长发育和对环

境压力的适应。光合作用-天线蛋白捕获光能，为光反应中心提供能量，说明富集于光合作用-天线蛋白通路的 DEGs(28 个)在光能捕获和光保护效率方面发挥重要作用[32-33]。



*. 代表差异显著($P<0.05$)；**. 代表差异极显著($P<0.01$)。

*. Represents significant differences ($P<0.05$); **. Represents very significant differences ($P<0.01$).

图 2　白芜菁(GPB)和绿芜菁(GPL)肉质根 6 个 DEGs 的表达模式验证

Fig. 2　Validation of expression patterns of six DEGs in fleshy roots from GPB and GPL

叶黄素是光合作用的主要辅助色素，能捕获光能供叶绿素进行光合代谢。据报道，*LCY* 转基因拟南芥叶黄素含量增加，说明 *LCY* 基因在叶黄素的积累方面发挥正向调节作用[34]。芜菁 *LCY*(BraA01g027340E)和 *LCY*(BraA10g046272E)是同源基因，在 GPL 中表达量显著高于 GPB，其中 *LCY*(BraA01g027340E)仅在内含子区域有 3 个 SNPs，*LCY*(BraA10g046272E)在 GPB 和 GPL 之间不存在序列变异，推测这 2 个基因在 GPB 和 GPL 之间表达量的差异可能是由于上游转录因子的调控差异引起的。*CYP97C1*(BraA07g035488E)是番茄 *CYP97C11* 的同源基因，番茄 *CYP97C11* 可正调控叶黄素含量[35]。*CYP97C1*(BraA07g035488E)启动子区域有 13 个变异位点，在 GPL 中表达量显著高于 GPB。因此推测 *CYP97C1*(BraA07g035488E)表达差异可能是由于启动子区域序列差异造成的，但这需要通过后续启动子转录活性分析试验来证实。

叶绿素是一种主要的光合作用色素，在光能吸收和能量传递方面发挥重要作用，其含量差异影响光合作用。本研究 GPL 的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均比 GPB 高，这与差异基因在 GO 和 KEGG 分析中均富集到光合作用条目吻合。叶绿素代谢过程由一系列结构基因和转录因子参与，其中结构基因编码参与叶绿素代谢的各种酶，催化代谢物的转化与合成。POR 是叶绿素合成途径中的关键调控酶，可催化原叶绿素内酯还原成叶绿素[36]。研究表明，拟南芥有 3 个 *POR* 基因(*AtPORA*、*AtPORB* 和 *AtPORC*)[37]，大麦、大豆、烟草和水稻均有 2 个 *POR* 基因(*PORA* 和 *PORB*)。水稻 *PORB* 突变体 fgl 呈现叶片病斑和坏死[9]。牡丹 *POR* 基因沉默会导致叶绿体结构变为圆形和叶片白化[10]。本研究在芜菁中鉴定到 3 个 *POR* 同源基因(BraA03g012537E、BraA10g044962E 和 BraA01g025517E)，其在 GPL 中均上调表达。番茄 *ZHD17* 通过结合 *POR* 启动子区域，抑制 *POR* 表达，进而抑制叶绿素 a 合成[38]。本试验通过同源比对和基因注释发现，芜菁 BraA09g000349E 是番茄 *ZHD17* 的同源基因，编码锌指同源结构域蛋白，在 GPL 中下调表达。因此，推测芜菁 BraA09g000349E 通过抑制 *POR* 基因表达负调控叶绿素含量，但这需要进一步的研究证实。

chlH(BraA03g011972E)、*POR*(BraA03g012537E)、*CPX*(BraA09g007096E)、*chlG*(BraA09g004947E)和 *NOL*(BraA03g007382E)等 5 个基因表达存在差异，原因可能与其序列在 GPB 和 GPL 之间存在差异有关。*chlH*(BraA03g011972E)编码镁

螯合酶 CHLH 亚基,研究表明在 CHLD 和 CHLI 亚基表达相对稳定的条件下,编码 CHLH 亚基的基因突变会导致番茄的叶绿素含量降低[36]。本研究 GPB 中 *chlH*(BraA03g011972E)表达量低,其编码蛋白 CHLH 含量降低,GPB 的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均比 GPL 低,基因表达量与叶绿素含量的关系和前人的研究结果[36]吻合。*chlH*(BraA03-g011972E)在 GPB 和 GPL 之间有 38 个变异位点,其中启动子区域有 20 个变异位点,包含 16 个 SNP 位点和 4 个 InDel 位点,其启动子区域的变异是否是该基因表达差异的原因值得进一步研究。

[参考文献]

[1] 吴征镒. 西藏植物志-第二卷[M]. 北京:科学出版社,1985.
WU Z Y. Flora of Tibet-volume Ⅱ[M]. Beijing:Science Press,1985.

[2] LIU M Y,BASSETTI N,PETRASCH S,et al. What makes turnips:anatomy,physiology and transcriptome during early stages of its hypocotyl-Tuber development[J]. Horticulture Research,2019,6:38.

[3] 马龙,屈卫东,邓淑文,等. 新疆芜菁抗衰老作用的实验研究[J]. 新疆医科大学学报,1998,21(1):36-39.
MA L,QU W D,DENG S W,et al. Experimental research on the antiaging effects of Xinjiang turnip[J]. Journal of Xinjiang Medical University,1998,21(1):36-39.

[4] 任延靖,赵孟良,韩睿. 不同芜菁种质资源营养成分分析及评价[J]. 中国食品学报,2021,21(11):159-173.
REN Y J,ZHAO M L,HAN R. Analysis and evaluation of nutrient components of different *Brassica rapa* L. ssp. rapa resources[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2021,21(11):159-173.

[5] 谭亮,周洛,尕玛确加,等. 不同产区青海玉树芜菁中营养成分分析与比较[J]. 食品工业科技,2018,39(5):307-312.
TAN L,ZHOU L,GAMA Q J,et al. Analysis and comparison of nutritional compositions in Yushu turnip(*Brassica rapa* L.) from different producing areas[J]. Science and Technology of Food Industry,2018,39(5):307-312.

[6] AMAGAI Y,LU N,HAYASHI E,et al. External green light as a new tool to change colors and nutritional components of inner leaves of head cabbages[J]. Journal of Food Measurement and Characterization,2022,16(1):269-280.

[7] JIAO B Z,MENG Q W,LV W. Roles of stay-green (SGR) homologs during chlorophyll degradation in green plants[J]. Botanical Studies,2020,61(1):25.

[8] LI Y Y,HAN M,WANG R H,et al. Comparative transcriptome analysis identifies genes associated with chlorophyll levels and reveals photosynthesis in green flesh of radish taproot[J]. PLoS One,2021,16(5):e0252031.

[9] SAKURABA Y,RAHMAN M L,CHO S H,et al. The rice faded green leaf locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions[J]. Plant Journal,2013,74(1):122-133.

[10] ZHANG J Y,SUI C H,LIU H M,et al. Effect of chlorophyll biosynthesis-related genes on the leaf color in Hosta (*Hosta plantaginea Aschers*) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. BMC Plant Biology,2021,21(1):45.

[11] FU W,YE X L,REN J,et al. Fine mapping of lcm1,a gene conferring chlorophyll-deficient golden leaf in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)[J]. Molecular Breeding,2019,39(4):52.

[12] ZHANG X L,ZHAO Z T,ZHANG M,et al. FsHemF is involved in the formation of yellow *Forsythia* leaves by regulating chlorophyll synthesis in response to light intensity[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2023,200:107746.

[13] ZHAO Y H,HUANG S N,ZHANG M D,et al. Mapping of a pale green mutant gene and its functional verification by allelic mutations in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)[J]. Frontiers in Plant Science,2021,12:699308.

[14] JING X J,CHEN P R,JIN X J,et al. Physiological,photosynthetic,and transcriptomics insights into the influence of shading on leafy sweet potato[J]. Genes,2023,14(12):2112.

[15] MOU Z L,WANG L,ZENG Z X,et al. Metabolomics integrated with transcriptomics unveil the regulatory pathways of modified atmosphere packaging-maintained leaf quality of Chinese flowering cabbage[J]. Food Chemistry,2023,405:134910.

[16] SONG X M,LI N,ZHANG Y C,et al. Transcriptomics and genomics analysis uncover the differentially expressed chlorophyll and carotenoid-related genes in celery[J]. International Journal of Molecular Sciences,2022,23(16):8986.

[17] ZHAO K Y,ZHU X Q,YUAN S Z,et al. Transcriptomic,metabolomic,and physiological analysis of two varieties of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) that differ in their storability[J]. Postharvest Biology and Technology,2024,210:112750.

[18] TAO T,HU W,YANG Y,et al. Transcriptomics reveals the molecular mechanisms of flesh colour differences in eggplant (*Solanum melongena*)[J]. BMC Plant Biology,2023,23(1):5.

[19] SONG L L,LUO H B,JIANG L,et al. Integrative analysis of transcriptome and metabolome reveals the possible mechanism of leaf yellowing in pak choi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) with 1-methylcyclopropene treatment during storage at 20 ℃[J]. Postharvest Biology and Technology,2020,169:111300.

[20] 高浩然,滕守连,罗玉秀. 不同花色甘蓝型油菜花瓣转录组初步分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2024,52(9):51-61.
GAO H R,TENG S L,LUO Y X. Preliminary analysis of transcriptomes of different *Brassica napus* petals[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition),2024,52(9):51-61.

[21] 滕守连,李番,祁丽娟,等. 不同光照处理甘蓝型油菜幼苗花青

素合成的转录组和代谢组分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2021，49(11)：134-146.
TENG S L，LI P，QI L J，et al. Analysis of transcriptome and metabolome of light-induced anthocyanin synthesis in *Brassica napus* L. seedling[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)，2021，49(11)：134-146.

[22] ZHUANG H M，LOU Q，LIU H F，et al. Differential regulation of anthocyanins in green and purple turnips revealed by combined de novo transcriptome and metabolome analysis [J]. International Journal of Molecular Sciences，2019，20(18)：4387.

[23] CHEN S F，ZHOU Y Q，CHEN Y R，et al. Fastp：an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics，2018，34(17)：i884-i890.

[24] KIM D，LANGMEAD B，SALZBERG S L. HISAT：a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods，2015，12(4)：357-360.

[25] PERTEA M，PERTEA G M，ANTONESCU C M，et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nature Biotechnology，2015，33(3)：290-295.

[26] ROBINSON M D，MCCARTHY D J，SMYTH G K. edgeR：a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics，2010，26(1)：139-140.

[27] LI H，DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics，2009，25(14)：1754-1760.

[28] DU J C，HU S M，YU Q，et al. Genome-wide identification and characterization of *BrrTCP* transcription factors in *Brassica rapa* ssp. *rapa*[J]. Frontiers in Plant Science，2017，8：1588.

[29] LARKIN R M. Tetrapyrrole signaling in plants[J]. Frontiers in Plant Science，2016，7：1586.

[30] LIU M Y，MA W，SU X J，et al. Mutation in a chlorophyll-binding motif of *Brassica* ferrochelatase enhances both heme and chlorophyll biosynthesis[J]. Cell Reports，2022，41(10)：111758.

[31] PAGE M T，GARCIA-BECERRA T，SMITH A G，et al. Overexpression of chloroplast-targeted ferrochelatase 1 results in a *genomes uncoupled* chloroplast-to-nucleus retrograde signalling phenotype[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B，Biological Sciences，2020，375(1801)：20190401.

[32] PI X，ZHAO S H，WANG W D，et al. The pigment-protein network of a diatom photosystem II-light-harvesting antenna super complex[J]. Science，2019，365(6452)：eaax4406.

[33] WANG W D，YU L J，XU C Z，et al. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms[J]. Science，2019，363(6427)：eaav0365.

[34] YIN L，LIU J X，TAO J P，et al. The gene encoding lycopene *Epsilon cyclase* of celery enhanced lutein and β-carotene contents and confers increased salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry，2020，157：339-347.

[35] STIGLIANI A L，GIORIO G，D'AMBROSIO C. Characterization of P450 carotenoid beta-and *Epsilon*-hydroxylases of tomato and transcriptional regulation of xanthophyll biosynthesis in root，leaf，petal and fruit[J]. Plant & Cell Physiology，2011，52(5)：851-865.

[36] MENG L H，FAN Z Q，ZHANG Q，et al. BEL1-LIKE HOMEODOMAIN 11 regulates chloroplast development and chlorophyll synthesis in tomato fruit[J]. The Plant Journal，2018，94(6)：1126-1140.

[37] OOSAWA N，MASUDA T，AWAI K，et al. Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*[J]. FEBS Letters，2000，474(2/3)：133-136.

[38] SHI Y，PANG X Q，LIU W J，et al. SlZHD17 is involved in the control of chlorophyll and carotenoid metabolism in tomato fruit[J]. Horticulture Research，2021，8(1)：259.

（责任编辑：马秋明）