

# 紫背天葵叶片中花青素种类及合成调控基因转录组分析

张少平<sup>1,2</sup>, 邱珊莲<sup>1</sup>, 张 帅<sup>1</sup>, 洪佳敏<sup>1</sup>, 林宝妹<sup>1</sup>, 郑开斌<sup>1,2\*</sup>

(1 福建省农业科学院 亚热带农业研究所, 福建漳州 363005; 2 福建省农业科学院 作物研究所, 福州 350013)

**摘 要:** 为获取紫背天葵(*Cynura bicolor* DC.) 叶片中花青素种类及其合成调控基因等信息, 该试验以紫背天葵叶背面紫色以及经处理叶背面几乎全绿(对照)的叶片为材料, 进行转录组测序分析, 同时进行 6 个相关差异表达基因的 qRT-PCR 分析和 6 种花青素苷元的 HPLC 检测, 以揭示紫背天葵特有的花青素苷元及其合成调控关键基因信息。结果表明: (1) 在紫背天葵中共获得 14 个花青素苷元及 32 个花青素合成调控基因信息, 其中表达量差异显著下调的 4 个基因为 Pg(c11692)、Cy(c42112)、ANS(c38551) 和 3GT(c9064), 表达量差异显著上调的 2 个基因是 DFR(c35961) 和 3GT(c20283)。 (2) qRT-PCR 检测结果显示, 上述 6 个基因在 2 种紫背天葵叶中的表达趋势(上调或下调)与转录组测序结果完全一致, 但转录组测序检测到的表达趋势差异倍数比 qRT-PCR 检测结果更加明显。 (3) HPLC 分析显示, 紫背天葵叶中均未检测到 Dp、Pt、Pn 及 Mv 等 4 类花青素苷元, 但紫背天葵叶中富含 Cy 花青素苷元, 且背面紫色的叶中 Cy 类花青素苷元含量(62.21 mg/kg)显著高于绿色叶对照(6.86 mg/kg); 背面紫色和全绿叶中的 Pg 花青素苷元含量均低于 0.43 mg/kg。 研究推测, Cy 和 Pg 花青素苷元在绿叶紫背天葵(对照)中含量显著降低可能是因为在 1 个 ANS 和 1 个 3GT 正调控以及 1 个 DFR 和 1 个 3GT 负调控所致。

**关键词:** 紫背天葵; 转录组测序; 花青素; 花青素苷元; 调控基因

中图分类号: Q789

文献标志码: A

## Transcriptome Analysis of Anthocyanidins and Their Synthesis Regulatory Genes in *Gynura bicolor* Leaves

ZHANG Shaoping<sup>1,2</sup>, QIU Shanlian<sup>1</sup>, ZHANG Shuai<sup>1</sup>,  
HONG jiamin, LIN Baomei<sup>1</sup>, ZHENG Kaibin<sup>1,2\*</sup>

(1 Subtropical Agriculture Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China; 2 Crop Sciences Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

**Abstract:** In order to explore different anthocyanidins and their synthesis regulator genes in *Gynura bicolor* leaves, we sequenced the transcriptomes of 2 *G. bicolors* including the purple leaves and the green leaves in control by Illumina HiSeq 2500 platform. At the same time, previously reported 6 kinds of anthocyanidins were detected by HPLC and 6 differential expressed genes were identified by the RT-PCR. The aim is to reveal its unique anthocyanidins and key gene information for its synthesis and regulation in *G. bicolor*. The results showed that: (1) 14 unigenes related to anthocyanidins and 34 unigenes related to their synthesis

收稿日期: 2019-02-21; 修改稿收到日期: 2019-05-07

基金项目: 福建省农业科学院创新团队(STIT2017-2-11); 福建省公益类科研院所专项(2016R1012-4); 福建省农业科学院青年创新团队(STIT2017-3-4)

作者简介: 张少平(1975—), 男, 硕士, 高级农艺师, 主要从事功能性蔬菜相关研究。E-mail: zspnc@163.com

\* 通信作者: 郑开斌, 博士, 研究员, 主要从事作物品质育种相关研究。E-mail: 409119296@qq.com

regulator genes were obtained. There were 6 differential expressed genes from all of these genes between the 2 *G. bicolors* with purple and green leaves, which were 4 significant down-regulated genes including pelargonidin (c11692), cyanidin (c42112), anthocyanidin synthase (c38551), flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (c9064) and 2 significant up-regulated genes including dihydroflavonol (c35961), flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (c20283). (2) The up or down-expression trend of these 6 genes agreed very well with the testing by the RT-PCR. However, the expression trend by transcriptome sequencing was more significantly different than that by qRT-PCR. (3) According to the HPLC detection, the result showed that there were not 4 kinds of anthocyanidins such as delphinidin, peonidin, petunidin and malvidin in *G. bicolor*. However, the purple leaves had significantly higher content of cyanidin (62.21 mg/kg) than that in green leaves (6.86 mg/kg). At the same time, the content of pelargonidin was below 0.43 mg/kg in 2 *G. bicolors*. So this study inferred that the reason why the levels of the 2 kinds of anthocyanidins including cyanidin and pelargonidin were decreased significantly in green *G. bicolor* was the 4 anthocyanin synthesis regulator genes involved in positive regulatory genes like an anthocyanidin synthase and a flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, negative regulatory genes like a dihydroflavonol and a flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase.

**Key words:** *Gynura bicolor*; transcriptome sequence; anthocyanin; anthocyanidins; regulator genes

紫背天葵 (*Cynura bicolor* DC.) 俗称红凤菜、血皮菜、观音菜及紫背菜等, 属菊科三七草属草本植物, 起源于中国东南部及东南亚等地<sup>[1]</sup>。目前, 紫背天葵已作为一种半驯化野菜广泛种植。紫背天葵叶背面紫色, 因此富含花青素。花青素不仅使植物呈现出红、橙、黄、蓝、紫等丰富的颜色, 同时对植物自身具有抗逆境胁迫等作用<sup>[2]</sup>; 此外, 植物花青素作为天然色素, 对人体具有抗氧化和延缓衰老<sup>[3-5]</sup>以及护肝、防癌和预防心脑血管疾病等多种药理功效<sup>[6-8]</sup>。由于花青素的诸多作用, 近年来已在园艺、作物改良以及营养和药理等方面引起了广泛关注<sup>[9]</sup>。花青素是植物次生代谢产物, 属类黄酮<sup>[10]</sup>。自然条件下, 花青素不稳定, 常与各种糖苷键形成稳定的花青苷<sup>[11]</sup>。目前, 从自然界中分离鉴别的花青苷有 600 多种, 主要有 6 种花青素苷元衍生而来<sup>[12]</sup> (也有报道为 7 种花青素苷元<sup>[13]</sup>, 即包括报春花素: hirsutidin, Hs), 其分布情况为: 矢车菊素苷元 (cyanidin, Cy) 占 50% (衍生物为紫红色); 天竺葵素苷元 (pelargonidin, Pg) 占 12% (衍生物为砖红色)、飞燕草素苷元 (delphinidin, Dp) 占 12% (衍生物为蓝紫色); Cy 甲基化衍生而来的芍药花素苷元 (peonidin, Pn) 占 12%; Dp 甲基化衍生而来的矮牵牛素苷元 (petunidin, Pt) 和锦葵素苷元 (malvidin, Mv) 各占 7%。但不同植物所含花青素苷元种类及比列差异极显著<sup>[14]</sup>。

花青素合成代谢途径始于苯丙氨酸, 途径类黄酮代谢关键反应, 最后进入各种花青素的合成与修饰<sup>[15]</sup>。其中苯丙氨酸经过系列酶促反应生成 4-香豆酰辅酶 A 过程是许多植物次生代谢所共有<sup>[16]</sup>; 而类黄酮代谢关键反应起始于 4-香豆酰辅酶 A, 经过

查尔酮合酶、查尔酮异构酶及黄烷酮 3-羟化酶 (或继续进行黄烷酮 3'-羟化酶或黄烷酮 3'/5'-羟化酶反应) 等酶促反应生成二氢黄酮醇 (或进一步生成双氢槲皮素或二氢杨梅黄酮)<sup>[17]</sup>; 各种花青素的合成和修饰是植物根、茎、叶、花及果实等成色的最后关键因素, 其过程是由二氢黄酮醇 (或双氢槲皮素及二氢杨梅黄酮等) 经由无色花色素到有色花色素, 所涉及的酶包括二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol/flavone 4-reductase, DFR), 花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS) (也叫无色花青素双加氧酶: leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) 和类黄酮 3-葡萄糖基转移酶 (flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, 3GT) (也称为 UDP 葡萄糖: UDP glucose), 如果最终需产生 Pn、Pt 或 Mv 及其衍生物时还需转甲基酶 (methylferase, MT) 参与。目前, 关于花青素苷元种类及其生物合成途径已较为清楚, 但不同植物中花青素苷元种类不同<sup>[18-19]</sup>, 其生物合成最后阶段所涉及到的糖基化、甲基化、酰基化及羟基化等不同修饰过程中形成不同花青素还有待深入了解。

近年来, 关于紫背天葵花青素提取、营养及药理等都有较为详细的报道<sup>[20-21]</sup>, 而在紫背天葵分子生物学研究方面, Shimizu Y 等<sup>[22-23]</sup> 根据拟南芥、葡萄等植物花青素相关基因保守区核苷酸系列信息, 克隆出查尔酮合酶、查尔酮异构酶、DFR 及 ANS 等 4 个紫背天葵花青素合成调控基因以及 MYB 和 bHLH 共 2 个转录因子; 张少平等<sup>[24-26]</sup> 进行了紫背天葵叶片转录组测序, 获取紫背天葵中 29 个花青素相关基因以及 138 个花青素合成相关转录因子。但目前, 还未见关于紫背天葵花青素苷元种类及其合

成调控相关差异表达基因的分子生物学研究。因此,本研究将以叶背面为紫色的紫背天葵组培苗叶片为试验材料,通过高温及强光处理后紫背天葵叶片为绿色的叶片为对照,利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术进行转录组测序,通过不同数据库注释后再进行 6 种花青素苷元(Cy、Pg、Dp、Pn、Pt 和 Mv)及各种花青素合成修饰的调控基因(DFR、ANS、3GT 及 MT)等关键词搜索,进一步进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)及高效液相色谱(HPLC)检测,以期获得紫背天葵特有的花青素苷元及其合成调控关键基因信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料为福建省农业科学院亚热带农业研究所收集的紫背天葵野菜资源,采用不同方法获得 2 种紫背天葵组培苗<sup>[27]</sup>:一种为正常生长的紫背天葵组培苗;另一种为对照,是在组培生根培养期间,经过高温(32 ℃)和强光(6 000 Lx)处理几乎全绿叶紫背天葵组培苗。待该 2 种组培生根健壮瓶苗长至六叶一心(高约 8 cm),各取 1 瓶,每瓶 3 株,长势较为一致,洗净后装入自封袋标号,再放入泡沫箱中的干冰内,2 种共 6 个样品送至北京百迈克生物科技有限公司进行转录组测序。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 总 RNA 提取及转录组测序** 采用 Trizol 法分别提取 2 种紫背天葵叶片总 RNA,所有样本各取等量混合组成 1 个 RNA 池,依次进行富集磁珠、反转录 mRNA、连接测序接头、制备测序文库及

PCR 富集样本等。

采用 Illumina HiSeq<sup>TM</sup> 2500 测序平台,对待测样品进行转录组文库构建后测序,测序所得原始数据通过过滤,剔除接头序列和低质量读序以获得高质量干净读序。将干净读序再进行序列组装,最终获得目的紫背天葵的单基因簇(unigene)库。

**1.2.2 功能注释** 测序获取相关数据进行随机性检验及饱和度检验等测序文库质量评估,合格后再进行单基因簇核苷酸长度及表达量分析,同时使用 Blast 软件<sup>[28]</sup>对获取的单基因簇序列进行 6 大数据库功能注释分析。所用数据库包括蛋白质序列数据库(swiss-prot protein database, Swiss-Prot)、非冗余蛋白数据库(non-redundant protein database, Nr)、京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、蛋白质家族域数据库(protein families database, Pfam)、基因本体论数据库(gene ontology, GO)以及直系同源蛋白功能描述和分类(evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups, eggNOG)等。

**1.2.3 目的基因检索及分析** 以上数据库获取紫背天葵单基因簇相关信息后,进行主要花青素苷元(Cy、Pg、Dp、Pn、Pt 和 Mv)及其合成修饰关键酶(DFR、ANS、3GT 及 MT)等相关基因检索,获取的相关基因进行核苷酸长度和 FPKM 值统计,同时,结合 Swiss-Prot 和 Nr 两个数据库分析上述基因相关信息。

**1.2.4 表达差异显著 qRT-PCR 分析** 运用 qRT-PCR 检测 6 个基因(表 1)在 2 个样本中的相对表达量,各取 1 μg 在转录组测序时所提取的 2 个样本

表 1 荧光定量 PCR 分析的基因及所合成的引物  
Table 1 The qRT-PCR primers for the 7 selected genes

编码 ID	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	
		正向 Forward	反向 Reverse
C24593	内参基因 Actin	CGGAGGATAAGCGGGCATG	ACGTATCAGTCACTGCAACC
C11692	天竺葵素 3,5- <i>O</i> -丙二酰转移酶 Pelargonidin 3, 5- <i>O</i> -malonyltransferase	CGCTACTAGCAATCACAAACG	GTAAACTCAGCACCTTGGTC
C42112	矢车菊素 3,2- <i>O</i> -葡萄糖醛酸转移酶 Cyanidin 3, 2- <i>O</i> -glucuronosyltransferase	ATCGTGATCATTAGTTGGCTC	AACTGACTTGGCTAAGCTCC
C35961	二氢黄酮醇 4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase	ACCAGAAGAATTCGAAACAGC	AGCGTATGCAAGCATCAACG
C38551	无色花青素双加氧酶 Leucoanthocyanidin dioxygenase	AGGTATCATGGACCAAATCTC	ACTTCTCGAGCCTCATCAAG
C20283	类黄酮 3- <i>O</i> -糖基转移酶 Flavonoid 3- <i>O</i> -glucosyltransferase	ACCGATTGCCACATGGCCTC	ACACATCTCTCGACCTCATC
C9064	类黄酮 3- <i>O</i> -糖基转移酶 Flavonoid 3- <i>O</i> -glucosyltransferase	ACTGGTGTTGCAATCGGAGC	CAGCCTTGCACACATCTTCC

RNA,使用 *Transscript* II all-in-one first-strand cDNA synthesis supermix for qPCR(one-step gDNA removal,货号 AH341)进行反转录 cDNA,反转录反应体系及条件等详见试剂盒介绍。采用 SYBRGreen 染料进行 qRT-PCR 分析,每个基因在每个样品中设置 3 次技术重复。

**1.2.5 花青素苷元的检测** 选用上述 2 种紫背天葵叶片各 60 g,沸水煮 5 min,水溶液定容至 200 mL,送至青岛科创质量检测有限公司进行上述 6 类花青素苷元检测,所用仪器 HPLC 安捷伦 1 200;色谱柱 Aglinge C18(4.6 mm×250 mm×5 μm);柱温 35 ℃;进样量 10 μL;检测器:可见光波长 530nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序结果统计

通过对 2 个不同样本紫背天葵转录组测序分

析,共获取 6.70 Gb 干净读序,各样品干净读序均达到 2.28 Gb,碱基 Q30 百分比都在 89.65%及以上。经组装后共获得 54 733 条单基因簇,这些单基因簇长度在 1 kb 以上的有 12 961 条。所有单基因簇通过 Swiss-Prot、Nr、KEGG、Pfam、GO 和 eggNOG 等数据库比对,共有 31 538 条单基因簇注释到相关信息(表 2)。

### 2.2 花青素苷元相关信息

**2.2.1 Pg 相关信息** 所注释到信息的单基因簇通过 Pg 基因检索,共获得 11 条 Pg 相关单基因簇信息(表 3)。这些单基因簇核苷酸长度介于 225 ~ 1 633 bp,它们在叶背面紫色紫背天葵中 FPKM 值为 0~9.59,而对照为 0~33.10。在这 11 条单基因簇中,上调和下调基因各 4 个,其中 c11692 在叶背面紫色紫背天葵中的 FPKM 值为 2.31,而对照中为 0。以上单基因簇在 Swiss-Prot 数据库中均注释

表 2 不同数据库所注释到相关单基因簇信息分析

Table 2 Information analysis from annotated unigenes by anno databases

功能数据库 Anno_database	注释到单基因簇的条数 Annotated unigene number	单基因簇长度 Unigene length (300~1 000 bp)	单基因簇长度 Unigene length (≥1 000 bp)
蛋白质序列数据库注释 Swiss-prot annotation	21 072	8 976	8 848
非冗余蛋白数据库注释 Nr annotation	30 388	13 316	12 146
京都基因与基因组百科全书数据库注释 KEGG annotation	11 594	4 805	4 813
蛋白质家族域数据库注释 Pfam annotation	21 998	8 819	10 575
基因本体论数据库注释 GO annotation	18 194	7 756	7 198
直系同源蛋白功能描述和分类注释 eggNOG annotation	29 728	12 897	11 997
所有数据库注释总和 All annotated	31,538	13,868	12,22

表 3 11 个天竺葵色素信息分析

Table 3 Information analysis of 11 pelargonidins

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide /bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库 Nr	
		紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	对照 CK	基因 Gene	匹配物种 Matching plant
c31068	225	0	0	未知功能蛋白 Hypothetical protein	巨桉 <i>Erythranthe guttata</i>
c39380	308	0	0	未知功能蛋白 Hypothetical protein	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>
c45015	307	0	0	未命名蛋白 Unnamed protein	中粒咖啡 <i>Coffea canephora</i>
c4535	882	0.44	1.58	未命名蛋白 Unnamed protein	中粒咖啡 <i>Coffea canephora</i>
c20143	397	0.95	2.94	天竺葵素 3,5-O-丙二酰转移酶 Pelargonidin 3, 5-O-malonyltransferase	芝麻 <i>Sesamum indicum</i>
c49337	357	1.17	0	未知功能蛋白 Hypothetical protein	巨桉 <i>Erythranthe guttata</i>
c11692	313	2.31	0	未知功能蛋白 Hypothetical protein	巨桉 <i>Erythranthe guttata</i>
c33382	1 288	3.78	2.42	未命名蛋白 Unnamed protein	中粒咖啡 <i>Coffea canephora</i>
c29458	1 348	8.1	11.11	苯甲醇乙酰基转移酶 Acetyl-benzylalcohol acetyltransferase	土豆 <i>Solanum tuberosum</i>
c25225	1 633	9.3	6.95	未命名蛋白 Unnamed protein	中粒咖啡 <i>Coffea canephora</i>
c31068	1 514	9.59	33.10	未命名蛋白 Unnamed protein	中粒咖啡 <i>Coffea canephora</i>

到天竺葵素 3,5-*O*-丙二酰转移酶(pelargonidin 3,5-*O*-malonyltransferase),所匹配的物种都是一串红(*Salvia splendens*),而在 Nr 数据库中只有 c20143 注释到天竺葵素 3,5-*O*-丙二酰转移酶,所匹配物种是芝麻(*Sesamum indicum*)。

**2.2.2 Cy 相关信息分析** 所注释到信息的单基因簇通过 Cy 基因检索,共获得 3 条 Cy 相关单基因簇信息(表 4),这 3 条单基因簇核苷酸序列长度分别为 219、430 和 470 bp,它们在叶背面紫色紫背天葵中 FPKM 值分别为 0、0.41 和 1.06,而对照均为 0。从该结果可知,所有 3 条 Cy 相关单基因簇均为下调,尤其 c42112 差异表达极显著。此外,这 3 条单基因簇在 Swiss-Prot 数据库中均注释到矢车菊素 3,2-*O*-葡萄糖醛酸转移酶(cyanidin 3,2-*O*-glucuronosyltransferase),所匹配的物种都是雏菊(*Bellis perennis*),而在 Nr 数据库中只有 2 个注释到矢车

菊素 3,2-*O*-葡萄糖醛酸转移酶,所匹配物种也是雏菊。

### 2.3 花青素合成下游调控基因分析

**2.3.1 DFR 相关信息分析** 所注释到信息的单基因簇通过 DFR 基因检索,共获得 10 条 DFR 单基因簇信息(表 5),这 10 条单基因簇核苷酸长度介于 291~1 510 bp,它们在叶背面紫色紫背天葵中 FPKM 值为 0.32~39.58,对照为 0~59.08。在这 10 条单基因簇中,上调基因 8 个,下调基因 2 个,其中表达量差异明显的有上调基因 c3596,其在该 2 种紫背天葵中的 FPKM 值分别为 0.32 和 3.39。这 10 条单基因簇在 Swiss-Prot 数据库中有 2 条未注释到信息(c22302 和 c24512);1 条注释到 UDP-木糖合成酶(UDP-D-xylose synthase);7 条确定为 DFR 基因,所匹配的物种包括非洲菊(*Gerbera hybrida*)(2 条单基因簇)、苜蓿(*Medicago sativa*)、拟

表 4 3 个矢车菊素相关信息分析

Table 4 Information analysis of 3 cyanidins

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide /bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库 Nr	
		紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	对照 CK	基因 Gene	匹配物种 Matching plant
c7115	219	0	0	未命名蛋白 Unnamed protein	中粒咖啡 <i>Coffea canephora</i>
c44741	430	0.41	0	矢车菊素 3,2- <i>O</i> -葡萄糖醛酸转移酶 Cyanidin 3,2- <i>O</i> -glucuronosyltransferase	雏菊 <i>Bellis perennis</i>
c42112	470	1.06	0	矢车菊素 3,2- <i>O</i> -葡萄糖醛酸转移酶 Cyanidin 3,2- <i>O</i> -glucuronosyltransferase	雏菊 <i>Bellis perennis</i>

表 5 10 个二氢黄酮醇 4-还原酶信息分析

Table 5 Information analysis of 10 flavone 4-reductases

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide /bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库 Nr	
		紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	对照 CK	基因 Gene	匹配物种 Matching plant
c35961	501	0.32	3.39	未知功能蛋白 Hypothetical protein	巨桉 <i>Erythranthe guttata</i>
c8177	291	0.91	0	肉桂酰辅酶 A 还原酶 Cinnamoyl-CoA reductase	胡杨 <i>Populus euphratica</i>
c36355	466	1.08	0.76	未知功能蛋白 Hypothetical protein	川桑 <i>Morus notabilis</i>
c10296	1 287	1.26	2.63	未知功能蛋白 Hypothetical protein	巨桉 <i>Erythranthe guttata</i>
c13376	1 453	2.9	3.17	二氢黄酮醇 4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c22764	1 175	3.84	8.43	花青素还原酶 Anthocyanidin reductase	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
c22302	1 304	13.24	21.38	二氢黄酮醇 4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase	可可 <i>Theobroma cacao</i>
c24512	1 436	33.96	38.22	二氢黄酮醇 4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase	可可 <i>Theobroma cacao</i>
c26781	1 510	37.74	49.13	二氢黄酮醇 4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase	烟草 <i>Nicotiana tomentosiformis</i>
c18297	1 096	39.58	59.08	二氢黄酮醇 4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase	甘薯 <i>Ipomoea trifida</i>

南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 等植物各 1 条单基因簇。所有单基因簇在 Nr 数据库中有 6 条确定为 DFR 基因(包括 1 个花青素还原酶),所匹配的物种包括可可 (*Theobroma cacao*) 2 条单基因簇,紫背天葵 (*Gynura bicolor*)、葡萄、烟草 (*Nicotiana tomentosiformis*) 和甘薯 (*Ipomoea trifida*) 等植物各 1 条单基因簇。

**2.3.2 ANS 相关信息分析** 所注释到信息的单基因簇通过 ANS 基因检索,共获得 5 条 ANS 单基因簇信息(表 6),这 5 条单基因簇核苷酸长度介于 333~1 861 bp,其在叶背面紫色紫背天葵中的 FPKM 值为 1.35~15.76,对照为 0~13.07。在这 5 条单基因簇中,下调基因有 4 个,其中表达量差异明显的只有下调基因 c38551,其在该 2 种紫背天葵中的 FPKM 值分别为 1.35 和 0。这 5 条单基因簇在 Swiss-Prot 数据库中除 c38551 注释为 SRG1 蛋白 (Protein SRG1) 外,其他 4 条确定为 ANS 基因,所匹配的物种包括苹果 (*Malus domestica*) (3 条单基因簇) 和矮牵牛 (*Petunia hybrida*) (1 条单基因簇) 2 种植物。所有单基因簇在 Nr 数据库中有 3 条确定为 DFR 基因,所匹配的物种包括紫背天葵 (2 条单基因簇) 和胡杨 (*Populus euphratica*) (1 条单基因簇) 这 2 种植物。

**2.3.3 3GT 相关信息分析** 所注释到信息的单基因簇通过 3GT 基因检索,共获得 17 条 3GT 单基因簇信息(表 7),这 17 条单基因簇核苷酸长度介于 218~1 659 bp,其在叶背面紫色紫背天葵中 FPKM 值为 0~75.86,对照为 0~116.88。在这 17 条单基因簇中,上调基因 8 个,下调基因 6 个,其中表达量差异明显的有 c20283 上调基因以及 c9064 下调基因,其中 c20283 在该 2 种紫背天葵中的 FPKM 值

分别为 0.22 和 5.13,而 c9064 的 FPKM 值分别为 1.45 和 0。这 17 条相关 3GT(包括 2 个 UDP 糖基转移酶 c11302、c9064 和 2 个山柰酚 3-O-半乳糖基转移酶 c34208、c18390) 在 Swiss-Prot 数据库中所匹配的物种包括草莓 (*Fragaria ananassa*) (13 条单基因簇)、拟南芥 (2 条单基因簇) 和矮牵牛 (2 条单基因簇) 等 3 种植物;在 Nr 数据库中有 16 条确定为 3GT(包括 3 个花青素 3-O-糖基转移酶和 1 个 UDP-糖基转移酶),所匹配的物种包括向日葵 (*Helianthus annuus*) (6 条单基因簇)、紫背天葵 (3 条单基因簇) 和雪莲花 (*Saussurea involucreta*) (2 条单基因簇) 等 7 种植物。

## 2.4 表达差异显著基因 qRT-PCR 分析

对紫背天葵花青素苷元及其合成调控基因中差异表达明显基因,如 Pg 相关苷元 (c11692)、Cy 相关苷元 (c42112)、DFR (c35961)、ANS (c38551) 以及 3GT (c20283 和 c9064) 进行 qRT-PCR 分析,结果发现(表 8),上述基因在 2 种紫背天葵中的表达趋势(上调或下调)与转录组测序结果完全吻合,但转录组测序检测到的表达趋势差异倍数比 qRT-PCR 检测结果更明显。

## 2.5 花青素苷元的 HPLC 检测

采用 HPLC 进行紫背天葵中 Cy、Pg、Dp、Pt、Pn 及 Mv 等 6 类花青素苷元测定,结果未检测到 Dp、Pt、Pn 及 Mv 等 4 类花青素苷元。同时,检测 Pg 含量低于 0.43 mg/kg,而检测结果富含 Cy,且叶背面紫色紫背天葵的含量显著高于对照(表 9)。此检测结果与转录组测序后关键词检索结果完全吻合。

## 3 讨论

适宜生长环境下,紫背天葵叶片富含花青素,因此其叶背为紫色。逆境胁迫如高温、干旱、强光直射、病毒感染甚至某些化学药剂处理都将导致其叶片花

表 6 5 个花青素合成酶信息分析

Table 6 Information analysis of 5 anthocyanidin synthases

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide /bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库 Nr	
		紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	对照 CK	基因 Gene	匹配物种 Matching plant
c38551	333	1.35	0	无色花青素双加氧酶 Leucoanthocyanidin dioxygenase	胡杨 <i>Populus euphratica</i>
c20414	783	1.62	1.1	花青素合酶 Anthocyanidin synthase	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c20414	372	5.17	2.57	花青素合酶 Anthocyanidin synthase	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c30532	1 861	8.97	12.63	未知功能蛋白 Hypothetical protein	麻风树 <i>Jatropha curcas</i>
c27150	1 344	15.76	13.07	未命名蛋白 Unnamed protein	中粒咖啡 <i>Coffea canephora</i>

表 7 17 个类黄酮 3-O-糖基转移酶信息分析

Table 7 Information analysis of 17 flavonoid 3-O-glucosyltransferases

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide /bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库 Nr	
		紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	对照 CK	基因 Gene	匹配物种 Matching plant
c11571	218	0	0	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	雪莲花 <i>Saussurea involucreta</i>
c11649	371	0	1.10	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c43683	259	0	0	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c9535	267	0	0	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c20283	1 036	0.22	5.16	未知功能蛋白 Hypothetical protein	克莱门柚 <i>Citrus clementina</i>
c33906	457	1.11	0.78	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c11302	692	1.38	6.04	类黄酮 3-O-糖基转移酶 Flavonoid 3-O-glucosyltransferase	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c9064	241	1.45	0	类黄酮 3-O-糖基转移酶 Flavonoid 3-O-glucosyltransferase	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>
c34208	842	1.82	3.69	类黄酮 3-O-糖基转移酶 Flavonoid 3-O-glucosyltransferase	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c2197	933	1.86	0.59	花青素 3-O-糖基转移酶 Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	芝麻 <i>Sesamum indicum</i>
c16831	1 491	3.95	8.03	花青素 3-O-糖基转移酶 Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>
c13657	445	4.11	3.14	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c18390	1 659	4.16	23.23	类黄酮 3-O-糖基转移酶 Flavonoid 3-O-glucosyltransferase	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c20824	1 036	4.56	3.65	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	雪莲花 <i>Saussurea involucreta</i>
c26561	1 570	6.29	16.29	UDP 糖基转移酶 UDP-glycosyltransferase	甜叶菊 <i>Stevia rebaudiana</i>
c22258	1 630	16.24	10.67	花青素 3-O-糖基转移酶 Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	芝麻 <i>Sesamum indicum</i>
c32631	1 327	75.86	116.88	UDP 葡萄糖 UDP-glucose	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>

表 8 6 个差异表达明显基因的荧光定量 PCR 分析

Table 8 qRT-PCR analysis of 6 differential expressed genes

方法 Method	样品 Sample	内参基因 Actin	编码 ID C11692	编码 ID C42112	编码 ID C35961	编码 ID C3855	编码 ID C20283	编码 ID C9064
RNA-Seq	紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	8.08	2.31	1.06	0.32	1.35	0.22	1.45
	对照 CK	8.67	0	0	3.39	0	5.16	0
	表达趋势 Expression trend	稳定 Stable	下调 Down	下调 Down	上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down
qRT-PCR	紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	1.95	10.2	5.29	8.26	0.71	3.00	18.61
	对照 CK	1.95	7.7	1.78	14.86	0.14	10.49	6.73
	表达趋势 Expression trend	稳定 Stable	下调 Down	下调 Down	上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down

表 9 花青素苷元的高效液相色谱检测结果

Table 9 The results of HPLC detection to anthocyanidins/(mg/kg)

样品 Sample	矢车菊素 Cy	天竺葵素 Pg
紫背天葵 <i>G. bicolor</i>	62.21±0.88	<0.43
对照 CK	6.86±0.14	<0.43

与其正常生长叶片一起进行转录组测序,以期了解哪些花青素苷元含量降低导致紫背天葵叶片变色,同时,了解哪些重要调控基因导致这些花青素苷元含量降低。

首先,在进行紫背天葵花青素苷元种类研究方面,根据转录组测序数据,检索在其他植物中已报道的 6 种花青素苷元基因<sup>[12]</sup>,结果只获得 Pg 及 Cy 这 2 类花青素苷元衍生物,且其中各有 1 个基因在绿

青素退变<sup>[24]</sup>。因此,本研究通过高温及强光处理紫背天葵组培苗,在所获取的叶片花青素退变材料后,

叶紫背天葵中的表达量显著降低。同时,本转录组测序并未获取到紫背天葵中的 MT 基因,而 MT 是将 Cy、Dp 以及 Pg 分别转化为 Pn、Pt 以及 Mv,由于紫背天葵中不含 Dp 以及 MT,所以也不含 Pt、Pn 以及 Mv,而本测序结果通过相关基因检索也未从紫背天葵中获得上述基因。进一步采用 HPLC 进行 6 中花青素苷元测试,结果只检测到高含量的相关 Cy,且其在叶背面紫色紫背天葵中的含量明显大于绿叶紫背天葵,但 Pg 在 2 种紫背天葵的含量很低,同时,未检测到其他种类的花青素,这与转录组测序中相关基因检索结果一致。因此,从以上结果可知,紫背天葵只含 Pg 及 Cy 这 2 类花青素苷元衍生物,且其中 2 个基因(编号 c11692 和 c42112)表达量显著降低导致叶背面紫色紫背天葵退变为绿色。

其次,在进行紫背天葵该 2 种花青素苷元重要的合成代谢调控基因研究方面,根据转录组测序数据,检索已报道的植物各种花青素的合成和修饰所涉及的 DFR、ANS 和 3GT 这 3 类关键酶基因<sup>[11]</sup>,同时结合 qRT-PCR 验证。结果在获得的这 3 个家族酶基因中,有 1 个 ANS、2 个 3GT 和 1 个 DFR 等 4 个花青素合成代谢调控基因显著差异表达。因此该研究表明,紫背天葵中 1 个 ANS 和 1 个 3GT 正

调控以及 1 个 DFR 和 1 个 3GT 负调控导致了紫背天葵中 Pg 含量显著降低,从而进一步导致其叶片在高温和强光环境下退变为绿色。

然而,植物叶色变化机理复杂,其叶色变化的分子调控与叶绿素、类胡萝卜素以及花青素等相关基因参与外,还与 miRNA 及其靶基因参与有关<sup>[2]</sup>。即使在有关花青素相关基因参与叶色变化的调控方面,本研究仅从各种花青素的合成和修饰所涉及的 DFR、ANS 和 3GT 等 3 类下游调控基因进行分析,而花青素合成还涉及到早期的苯丙氨代谢途径以及花青素合成上游调控等一系列调控基因,此外,花青素合成的一系列调控基因还受 MYB、bHLH 及 WD40 等转录因子的影响<sup>[12]</sup>。因此,关于紫背天葵叶色变化的机理还有待于进一步深入研究。总之,随着转录组测序的发展,许多重要功能基因被发掘并加以利用<sup>[29-31]</sup>,本研究通过该技术进行紫背天葵转录组测序分析,初步了解了紫背天葵叶片在高温及强光环境下花青素退变机理,同时获得与紫背天葵花青素合成代谢相关的 6 个重要基因,因此通过进一步进行这 6 个基因全长克隆及功效验证,可进一步深入了解紫背天葵花青素退变机理,同时为改良作物提供重要基因资源。

## 参考文献:

- [1] 张少平, 赖正锋, 吴水金, 等. 药食同源植物紫背天葵研究现状与展望[J]. 中国农学通报, 2014, **30**(4): 58-61.  
ZHANG S P, LAI Z F, WU S J, *et al.* Research advances on *Gynura bicolor* from the medicinal and edible plant[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, **30**(4): 58-61.
- [2] 李卫星, 杨舜博, 何智冲, 等. 植物叶色变化机制研究进展[J]. 园艺学报, 2017, **44**(9): 1 811-1 824.  
LI W X, YANG S B, HE Z C, *et al.* Research advances in the regulatory mechanisms of leaf coloration[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, **44**(9): 1 811-1 824.
- [3] JANSÁKOVA K, BABÍČKOVA J, HAVRLETOVA M, *et al.* The effects of anthocyanin-rich wheat diet on the oxidative status and behavior of rats[J]. *Croatian Medical Journal*, 2016, **57**(2): 119-129.
- [4] FERNANDES I, MARQUES C, ÉVORA A, *et al.* Pharmacokinetics of table and Port red wine anthocyanins: A cross-over trial in healthy men[J]. *Food & Function*, 2017, **8**(5): 2 030-2 037.
- [5] GULDIKEN B, GIBIS M, BOYACIOGLU D, *et al.* Impact of liposomal encapsulation on degradation of anthocyanins of black carrot extract by adding ascorbic acid[J]. *Food & Function*, 2017, **8**(3): 1 085-1 093.
- [6] LIPPERT E, RUEMMELE P, OBERMEIER F, *et al.* Anthocyanins prevent colorectal cancer development in a mouse model[J]. *Digestion*, 2017, **95**(4): 275-280.
- [7] CHEN T, HU S H, ZHANG H W, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Dioscorea alata* L. anthocyanins in a TNBS-induced colitis model[J]. *Food & Function*, 2017, **8**(2): 659-669.
- [8] VENANCIO V P, CIPRIANO P A, KIM H, *et al.* *Cocoplum* (*Chrysobalanus icaco* L.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells[J]. *Food & Function*, 2017, **8**(1): 307-314.
- [9] KAMILOGLU S, CAPANOGLU E, GROOTAERT C, *et al.* Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal caco-2 cells—A review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(9): 21 555-21 574.
- [10] LIU S, LIU L, TANG Y, *et al.* Comparative transcriptomic analysis of key genes involved in flavonoid biosynthetic pathway and identification of a flavonol synthase from *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 2017, **19**(4): 618-629.
- [11] 贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 等. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(7): 1 496-1 506.  
JIA Z D, MA P Y, BIAN X F, *et al.* Biosynthesis metabolic



- pathway and molecular regulation of plants anthocyanin[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, **34**(7): 1 496-1 506.
- [12] 戴思兰, 洪艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学, 2016, **49**(3): 529-542.
- DAI S L, HONG Y. Molecular breeding for flower colors modification on ornamental plants based on the mechanism of anthocyanins biosynthesis and coloration[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, **49**(3): 529-542.
- [13] FILIPPINI R, CANIATO R, PIOVAN A, *et al.* Production of anthocyanins by *Catharanthus roseus* [J]. *Fitoterapia*, 2003, **74**(1-2): 62-67.
- [14] LI X G, WANG J, YU Z Y. Cloning of an anthocyanidin synthase gene homolog from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and its expression at different fruit stages[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, **14**(1): 2 726-2 734.
- [15] 孙玉燕, 段蒙蒙, 邱杨, 等. 心里美萝卜花青素合成酶基因 RsANS 克隆及花青素生物合成相关基因表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, **17**(5): 889-896.
- SUN Y Y, DUAN M M, QIU Y, *et al.* Anthocyanidin synthase gene cloning and expression analysis of anthocyanidin biosynthesis related genes in 'Xinlimei' Radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *Journal of Genetic Resources*, 2016, **17**(5): 889-896.
- [16] 葛翠莲, 黄春辉, 徐小彪. 果实花青素生物合成研究进展[J]. 园艺学报, 2012, **39**(9): 1 655-1 664.
- GE C L, HUANG C H, XU X B. Research on anthocyanins biosynthesis in fruit[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, **39**(9): 1 655-1 664.
- [17] CARLETTI G, LUCINI L, BUSCONI M, *et al.* Insight into the role of anthocyanin biosynthesis-related genes in *Medicago truncatula* mutants impaired in pigmentation in leaves[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, **70**(9): 123-132.
- [18] SPRINGOB K, NAKAJIMA J, YAMAZAKI M, *et al.* Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. *Natural Product Reports*, 2003, **20**(3): 288-303.
- [19] CHEN G J, LIU H P, WEI Q, *et al.* The acyl-activating enzyme PhAAE13 is an alternative enzymatic source of precursors for anthocyanin biosynthesis in petunia flowers [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, **68**(3): 457-467.
- [20] 张少平, 邱珊莲, 邓源, 等. 紫背天葵花青素相关研究与应用[J]. 中国农学通报, 2015, **31**(22): 157-162.
- ZHANG S P, QIU S L, DENG Y, *et al.* Study and application of the anthocyanin from *Gynura bicolor* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, **31**(22): 157-162.
- [21] MIYAZAWA M, NAKAHASHI H, USAMI A, *et al.* Chemical composition, aroma evaluation, and inhibitory activity towards acetylcholinesterase of essential oils from *Gynura bicolor* DC [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2016, **70**(2): 282-289.
- [22] SHIMIZU Y, MAEDA K, KATO M, *et al.* Isolation of anthocyanin-related MYB gene, GbMYB2, from *Gynura bicolor* leaves [J]. *Plant Biotechnology*, 2010, **27**(5): 481-487.
- [23] SHIMIZU Y, MAEDA K, KATO M, *et al.* Co-expression of GbMYB1 and GbMYC1 induces anthocyanin accumulation in roots of cultured *Gynura bicolor* DC. plantlet on methyl jasmonate treatment [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, **49**(2): 159-167.
- [24] 张少平, 洪建基, 邱珊莲, 等. 紫背天葵高通量转录组测序分析[J]. 园艺学报, 2016, **43**(5): 935-946.
- ZHANG S P, HONG J J, QIU S L, *et al.* Sequencing and analysis of the transcriptome of *Gynura bicolor* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(5): 935-946.
- [25] 张少平, 张少华, 邱珊莲, 等. 基于转录组测序的紫背天葵花青素相关基因分析[J]. 核农学报, 2018, **32**(4): 639-645.
- ZHANG S P, ZHANG S H, QIU S L, *et al.* The *Gynura bicolor* transcriptome as a source for anthocyanidin gene sequence analysis [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, **32**(4): 639-645.
- [26] 张少平, 赖正锋, 练冬梅, 等. 紫背天葵 MBW 相关调控因子转录组测序分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2018, **26**(2): 125-132.
- ZHANG S P, LAI Z F, LIAN D M, *et al.* Sequence analysis of MBW related genes transcriptome in *Gynura bicolor* [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2018, **26**(2): 125-132.
- [27] 张少平, 张帅, 郑开斌, 等. 紫背天葵种苗组培快繁技术[J]. 福建农业科技, 2017, **48**(9): 32-33.
- ZHANG S P, ZHANG S, ZHENG K B, *et al.* Seedling production to the *Gynura bicolor* by tissue culture and rapid propagation [J]. *Fujian Agriculture Science and Technology*, 2017, **48**(9): 32-33.
- [28] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(17): 3 389-3 402.
- [29] KAYMAZ Y, ODUOR C I, YU H B, *et al.* Comprehensive transcriptome and mutational profiling of endemic burkitt lymphoma reveals EBV type-specific differences [J]. *Molecular Cancer Research*, 2017, **15**(5): 563-576.
- [30] OCKENDON N F, OCONNELL L A, BUSH S J, *et al.* Optimization of next-generation sequencing transcriptome annotation for species lacking sequenced genomes [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, **16**(2): 446-458.
- [31] XU L F, YANG P P, YUAN S X, *et al.* Transcriptome analysis identifies key candidate genes mediating purple ovary coloration in asiatic hybrid lilies [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, **17**(11): 1 881-1 888.