



紫背天葵叶和花中花青素合成 相关转录组基因分析

张少平^{1,2}, 郑开斌^{1,2}, 洪佳敏¹, 林宝妹¹, 张 帅¹, 邱珊莲^{1*}

(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(*Gynura bicolor* D C.)花青素合成代谢相关调控基因信息,该试验以紫背天葵叶片为材料,以其花朵为对照,进行转录组测序,并进行 *CHS*、*CHI*、*F3H* 等 8 类合成酶基因以及 *MYB*、*bHLH* 及 *WD40* 等 3 类转录因子检索,从中选取 8 个相关差异表达显著调控基因进行 qRT-PCR 验证分析。结果显示:(1)在紫背天葵中共获得 72 个花青素合成酶信息,其中差异表达明显的有 1 个 *F3'H* 和 2 个 *3GT* 下调,9 个 *F3H* 基因中有上调基因 4 个和下调基因 5 个。(2)在紫背天葵中获取到 238 个 *MYB*、113 个 *bHLH* 和 219 个 *WD40* 转录因子,这 3 类转录因子中差异表达明显的分别为 22 个、16 个和 7 个。(3)qRT-PCR 结果显示,所选取的 8 个花青素合成相关调控基因,在紫背天葵叶及花朵中的下调表达趋势与转录组测序结果完全一致,但不同基因差异表达趋势略有不同。研究表明,在紫背天葵叶片和花朵中所存在的大量花青素合成代谢调控基因中,只有少量差异表达显著,但转录因子相比合成酶的调控更为复杂。

关键词:紫背天葵;转录组基因;花青素;调控基因;合成酶;转录因子

中图分类号:Q786; Q789 **文献标志码:**A

Transcriptome Analysis of Anthocyanin Synthesis Genes in *Gynura bicolor* Leaves and Flower

ZHANG Shaoping^{1,2}, ZHENG Kaibin^{1,2}, HONG Jiamin¹,
LIN Baomei¹, ZHANG Shuai¹, QIU Shanlian^{1*}

(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 anthocyanin synthesis regulator genes in *Gynura bicolor*, we sequenced the transcriptomes of *G. bicolor* including leaf and flower in control by Illumina HiSeq 2 500 platform. Then, 8 kinds of synthases such as *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *3GT* and 3 kinds of transcription factors such as *MYB*, *bHLH* and *WD40* were retrieved. At the same time, 8 differential expressed genes were identified by the RT-PCR. The results showed that: (1) There were 72 unigenes related to anthocyanin synthases, in which 12 differential expressed genes including 1 down-regulated *F3'H*, 2 down-regulated *3GTs*, 5 down-regulated *F3Hs* and 4 up-regulated *F3Hs*. (2) There were 238 *MYBs*, 113 *bHLHs* and 219 *WD40s*. The differential expressed genes in these 3 kinds of transcription factors were 22,

收稿日期:2019-06-21;修改稿收到日期:2019-08-01

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(2019R1030-4);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:邱珊莲,博士,副研究员,主要从事植物天然产物相关研究。E-mail:slqiu79@163.com

16 and 7, respectively. (3) According to transcriptome sequencing, the down-expression trend of these 8 anthocyanin synthesis regulator genes agreed with the testing by the RT-PCR. But the trend multiples of these differentially expressed genes by these 2 kinds of approaches were different. So this study concluded that there are many anthocyanin synthesis regulator genes in *G. bicolor* including leaf and flower, but only a few of these genes are significantly different. At the same time, the regulation of transcription factors is more complex than that of synthases.

Key words: *Gynura bicolor*; transcriptome gene; anthocyanin; regulator gene; synthase; transcription factor

花青素不仅使植物器官呈现出橙、红、紫、蓝等颜色,同时能提高植物自身耐逆境胁迫以及吸引昆虫授粉和传播种子等作用^[1],此外,天然花青素对人体具有明目^[2-4]、抗氧化清除人体自由基^[5-7]、抗炎^[8-9]、抗癌^[10-11]等多种功效。目前,自然界已分离和鉴别的花青素有 600 多种,主要有 6 类花青素苷元衍生而来^[12],包括矢车菊素、天竺葵素、飞燕草素、芍药花素、矮牵牛素和锦葵素。这些花青素合成代谢所涉及的调控基因包括结构基因和转录因子。其中结构基因直接编码花青素合成代谢过程中所需要的酶^[13],主要包括查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)、类黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3' hydroxylase, F3' H)、类黄酮 3', 5'-羟化酶(flavonoid 3', 5' hydroxylase, F3'5' H)、二氢黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)及花青素 3-O-糖基转移酶(anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase, 3GT)。花青素合成代谢过程中的转录因子主要包括 *MYB*、*bHLH* 及 *WD40* 等 3 类^[14],这些转录因子单个或共同作用结合结构基因启动子中相应顺式元件,调节花青素生物合成过程中一个或多个基因的表达。

近年来,通过一些植物的突变体以及转基因等技术分析,已较为深入地了解了花青素生物合成途径及其分子调控机理。目前,已从大量植物中克隆、鉴定了许多与花青素合成代谢相关的合成酶^[15-16]和转录因子^[17-18],然而相关系统研究主要集中于少数模式植物^[19]。在许多高等植物中,花青素生物合成相关研究主要集中于个别及少量基因上^[20-23]。而这些高等植物花青素合成过程中,所涉及不同的合成酶及转录因子都存在大量家族基因^[24-25]。因此,本研究拟通过叶背面紫色紫背天葵(*Gynura bicolor* D C.)叶片为研究对象,以其黄色花朵为对照,利用二代高通量转录组测序技术分析,通过不同专有数据库注释后再进行花青素合成代谢相关合成

酶(CHS、CHI、F3H、F3' H、F3' 5' H、DFR、ANS、3GT)及转录因子(*MYB*、*bHLH*、*WD40*)等关键词检索,对差异表达显著相关基因进行 NR 数据库详细注释。同时挑选部分差异表达显著基因进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证分析,为进一步系统研究紫背天葵花青素合成代谢中重要的合成酶及转录因子打下良好基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料紫背天葵,于秋季种植于福建省农业科学院亚热带农业研究所种质资源圃内,第二年春季开出黄色花朵后,采取紫背天葵的紫色叶片(图 1)和黄色花朵(对照)各 3 份分别装入 DEPC 处理的 2.0 mL 离心管内,标号后装入泡沫箱中的干冰中,快递至北京百迈克生物科技有限公司进行 RNA 提取、转录组测序及相关基因 RT-PCR 验证等。

1.2 方法

1.2.1 转录组相关测序 采用 Trizol 法分别提取紫背天葵叶片和花朵共 2 个样本总 RNA,再各取等量混合组成 1 个 RNA 池,依次进行磁珠富集、mRNA 反转录、测序接头连接、测序文库构建以及样本 PCR 富集等。通过以上处理的待测样品采用 Illumina



图 1 开花期的紫背天葵(A)及紫背天葵叶片的反面和正面(B)

Fig. 1 The *G. bicolor* is in bloom (A) The abaxial and surface leaves from *G. bicolor* (B)

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 8 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
C31895.0	内参基因 <i>Actin</i>	GTAGAGGACCGAATCAATCAC	TCACCAGAGCAACAGTAGA
c23689.0	黄烷酮 3-羟化酶 <i>Flavanone 3-hydroxylase</i>	TGCCTCCATCATCAACTATT	GATACATCTCCGCCCTTCC
c21317.0	黄烷酮 3-羟化酶 <i>Flavanone 3-hydroxylase</i>	TAGTATGCGATGGTAACA	CAAGGAGTATATTGATATGATTG
c23278.0	黄烷酮 3-羟化酶 <i>Flavanone 3-hydroxylase</i>	ATTGAATCTTGAGGGTCTGA	CAACTCCATTCTTTCTATCTAC
c30540.0	类黄酮 3', 5'-羟化酶 <i>Flavonoid 3', 5'-hydroxylase</i>	GTCATTGTATTTCGGCAGTT	TGTGTCCAGGTATAGTCTA
c37714.0	花青素 3-O-糖基转移酶 <i>Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase</i>	CTACTCGCATTGGCTGAA	CCATTCGCACTCCTTCTT
c37699.0	转录因子 <i>MYB</i>	GCTCACTCTATTCAACAA	GTCTCTATCATACACTGC
c29036.0	转录因子 <i>bHLH</i>	ACTTCTACTCAACTCAACTTCTTC	GATGGATACTACAATGGCTCAAT
C36860.0	转录因子 <i>WD40</i>	CTTCAACAACAGACCGATTCT	ATAATGGCTCTTGCGACTT

HiSeqTM 2500 平台转录组测序,测序后对所获取的原始数据进行过滤,即剔除人工接头序列和低质量读序,所获取高质量干净读序再进行序列组装,从而获取紫背天葵叶片及花朵的单基因簇(unigene)库。

1.2.2 功能注释 对转录组测序获取的紫背天葵叶片和花朵中相关数据进行测序文库质量评估,即进行随机性和饱和度检验,合格的数据再进行单基因簇表达量(FPKM)分析以及核苷酸(Nucleotide)序列长度统计,同时采用 Blast 软件^[26]进行相关单基因簇序列的 8 个数据库^[27]功能注释分析。

1.2.3 基因检索 所有数据库获取紫背天葵叶片和花朵中单基因簇相关信息后,再进行花青素合成代谢相关合成酶(CHS、CHI、F3H、F3'H、F3'5'H、DFR、ANS、3GT)及转录因子(MYB、bHLH、WD40)等相关基因检索及统计。同时,根据紫背天葵叶片及花朵中 FPKM 值,统计差异表达显著相关基因核苷酸长度以及结合 NR 数据库注释相关植物。

1.2.4 相关基因 qRT-PCR 分析 根据紫背天葵叶片及花朵转录组测序结果,从中选取 8 个花青素合成代谢相关差异表达基因(表 1)进行 qRT-PCR 检测。所取 RNA 来自转录组测序样品,采用超微量核酸蛋白测定仪检测 RNA 的 OD 值,使用 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值。合格的 RNA 采用 Aidlab 公司反转录试剂盒(TUREscript 1st Stand cDNA Synthesis Kit)进行反转录操作合成 cDNA 第一链,同时进行引物合成(表 1)和 qRT-PCR 程序及体系构建。

2 结果与分析

2.1 花青素合成代谢相关转录组信息

2.1.1 调控相关基因统计 根据转录组测序所注释到相关信息,进一步通过花青素合成代谢具体调

控基因检索,共获取紫背天葵叶片及花朵中相关合成酶单基因簇 91 条(表 2),包括 2 条 CHS、2 条 CHI、27 条 F3H、7 条 F3'H、6 条 F3'5'H、5 条 DFR、1 条 ANS 和 22 条 3GT;转录因子单基因簇 570 条,包括 238 条 MYB、113 条 bHLH 和 219 条 WD40。比较紫背天葵叶片及花朵单基因簇 FPKM 值可知,分别有 9 条 F3H、1 条 F3'5'H、2 条 3GT、22 条 MYB、16 条 bHLH 和 7 条 WD40 差异表达的单基因簇。在紫背天葵花青素合成酶中,除 4 条 F3H 单基因簇为上调基因外,其他 5 条 F3H、1 条 F3'5'H 和 2 条 3GT 均为下调基因。在紫背天葵花青素合成相关 MYB、bHLH 和 WD40 等 3 类差异表达的转录因子中,上调基因分别为 10 条、10 条和 5 条,下调基因依次为 12 条、6 条和 2 条。

2.1.2 差异表达显著相关合成酶 在紫背天葵叶片及花朵中,差异表达显著的合成酶基因只有 F3H、F3'5'H 和 3GT 三类(表 3),其中 9 条差异表达明显的 F3H 核苷酸长度介于 336~1 431 bp,其叶片中的 FPKM 值为 1.68~41.59,花朵中的 FPKM 值为 0.07~32.15,这些 F3H 在 NR 数据库所匹配的物种包括莴苣(*Lactuca sativa*) (4 条单基因簇)、刺苞菜蓟(*Cynara cardunculus*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、旋蒴苣苔(*Dorcocheras hygrometricum*)、川红花(*Carthamus tinctorius*)和向日葵(*Helianthus annuus*)。差异表达明显的 1 条 F3'5'H,其核苷酸长度为 1 700 bp,叶片和花朵中的 FPKM 值分别为 26.05 和 2.69, NR 数据库所匹配的物种为向日葵。差异表达明显的 2 条 3GT 中,其核苷酸长度分别为 897 和 1 615 bp,叶片中 FPKM 值分别为 3.45 和 35.57,花朵中的 FPKM 值分别为 0 和 0.96, NR 数据库所匹配的物种为向日葵和刺苞菜蓟。

表 2 花青素合成代谢相关调控基因信息
Table 2 The information of anthocyanin synthesis regulator genes

基因类型 Gene type	基因名称 Gene name	基因总数 Gene total	差异显著基因数 Differential expressed genes	上调基因数 Up-regulated genes	下调基因数 Down-regulated genes
合成酶 Synthase	<i>CHS</i>	2	0	0	0
	<i>CHI</i>	2	0	0	0
	<i>F3H</i>	27	9	4	5
	<i>F3'H</i>	7	0	0	0
	<i>F3'5'H</i>	6	1	0	1
	<i>DFR</i>	5	0	0	0
	<i>ANS</i>	1	0	0	0
	<i>3GT</i>	22	2	0	2
转录因子 Transcription factor	<i>MYB</i>	238	22	10	12
	<i>bHLH</i>	113	16	10	6
	<i>WD40</i>	219	7	5	2

表 3 12 个差异表达显著的花青素合成酶信息
Table 3 The information of 12 differential expressed synthases in anthocyanin synthesis

基因名称 Gene name	编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide/bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库匹配物种 NR matching plant
			叶片 Leaf	花 Flower	
<i>F3H</i>	C23278.0	336	27.21	2.02	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>
	C22346.1	477	2.64	9.16	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
	C21317.0	554	41.59	0.25	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>
	C23689.0	681	11.62	0.16	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
	C22346.0	708	1.68	6.83	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
	C23689.1	817	7.47	0.07	旋蒴苣苔 <i>Doroceras hygrometricum</i>
	C20876.1	1 041	11.50	28.19	川红花 <i>Carthamus tinctorius</i>
	C26523.0	1 217	14.38	32.15	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
<i>F3'5'H</i>	C31518.0	1 431	25.10	2.13	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
	C30540.0	1 700	26.05	2.69	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
<i>3GT</i>	c25798.0	897	3.45	0	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
	c37714.0	1 615	35.57	0.96	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>

2.1.3 差异表达显著的转录因子 花青素合成代谢相关转录因子主要包括 *MYB*、*bHLH* 和 *WD40*。其中差异表达显著的 *MYB* 转录因子有 22 个(表 4),其核苷酸长度介于 502~1 876 bp,叶片和花中的 FPKM 值分别为 0~47.80 和 0~87.89,这些 *MYB* 在 NR 数据库所匹配的物种包括向日葵(10 条单基因簇)、莴苣(5 条单基因簇)、刺苞菜蓟(3 条单基因簇)、紫背天葵(2 条单基因簇)、非洲菊(*Gerbera*)和菊花(*Chrysanthemum*);差异表达显著的 *bHLH* 转录因子有 16 个(表 5),其核苷酸长度介于 535~2 010 bp,叶片和花中的 FPKM 值分别为 0~

38.13 和 0~56.47,这些 *bHLH* 在 NR 数据库所匹配的物种包括向日葵(7 条单基因簇)、莴苣(7 条单基因簇)和刺苞菜蓟(2 条单基因簇);差异表达显著的 *WD40* 转录因子有 7 个(表 6),其核苷酸长度介于 1 024~4 053 bp,叶片和花中的 FPKM 值分别为 0~7.43 和 0.23~16.21,这些 *WD40* 在 NR 数据库所匹配的物种包括向日葵(5 条单基因簇)、刺苞菜蓟和斑点小壶菌(*Spizellomyces punctatus*)。

2.2 相关差异显著基因 qRT-PCR 分析

所有差异表达显著的 8 个基因以及 *actin* 经引物 qRT-PCR 实验,通过扩增曲线和溶解曲线显示合

表 4 22 个差异表达显著的 MYB 转录因子信息

Table 4 The information of 22 differential expressed MYB transcription factors

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide/bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库匹配物种 NR matching plant
		叶片 Leaf	花 Flower	
c37699.0	502	47.80	0.29	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c27270.0	568	9.49	0.48	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c29397.0	777	0	5.36	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c26588.0	862	7	0.21	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c25517.0	892	0	56.53	非洲菊 <i>Gerbera</i>
c25238.0	929	1.67	6.77	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>
c21550.0	948	0.07	2.25	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c27570.0	977	16.54	1.13	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c33116.0	983	3.19	6.1	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c24227.0	990	5.93	21.42	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c28062.0	993	0	87.89	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c30984.0	1 019	31.34	0	紫背天葵 <i>Gynura bicolor</i>
c26346.0	1 025	3.40	0.06	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c23050.0	1 111	5.36	0	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c27880.0	1 129	1.11	5.49	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>
c28234.0	1 143	0.12	8.01	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c26662.0	1 190	34.28	3.87	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c27481.0	1 258	29.90	3.52	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>
c31886.3	1 284	15.93	43.65	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c19829.0	1 407	13.24	0.25	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c22266.1	1 618	8.53	0.76	菊花 <i>Chrysanthemum</i>
c36963.1	1 876	19.29	2.36	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>

表 5 16 个差异表达显著的 bHLH 转录因子信息

Table 5 The information of 16 differential expressed bHLH transcription factors

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide/bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库匹配物种 NR matching plant
		叶片 Leaf	花 Flower	
c24666.0	535	9.54	0.52	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>
c29034.0	825	0.29	4.54	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c27741.0	881	1.66	6.38	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c25164.0	941	8.34	17.32	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c29036.0	1 102	38.13	0.81	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c26127.0	1 124	0	14.98	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c33314.0	1 163	0	4.87	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c19501.0	1 225	1.17	4.99	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c23794.0	1 241	10.24	26.9	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c26964.0	1 250	4.16	0.27	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>
c26831.0	1 259	8.76	56.47	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c34976.0	1 279	11.64	0	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c27018.0	1 401	2.84	0.04	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c24733.0	1 653	2.21	0.1	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c33394.0	1 886	1.76	3.73	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>
c33480.0	2 010	6.29	14.31	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>

格后,每个基因 3 个重复数据利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达量。结果发现,所有 8 个基因在花中的表达量均显著低于叶片(图 2),且差异表达显著由大到小依次为: $F3H(C23689.0)>MYB(C37699.0)>3GT(C37714.0)>F3H(C21317.0)>bHLH(C29036.0)>WD40(C36860.0)>F3'5'H(C30540.0)>F3H(C23278.0)$ 。

2.3 8 个基因的 FPKM 值与 qRT-PCR 结果比较
 $F3H(C23689.0)$ 、 $F3H(C21317.0)$ 、 $F3H(C23278.0)$ 、 $F3'5'H(C30540.0)$ 、 $3GT(C37714.0)$ 、 $MYB(C37699.0)$ 、 $bHLH(C29036.0)$ 和 $WD40(C36860.0)$ 等 8 个基因,结合转录组测序中 FPKM 值及 qRT-PCR 检测结果进行比较分析,结果发现(表 7),上述调控基因在紫

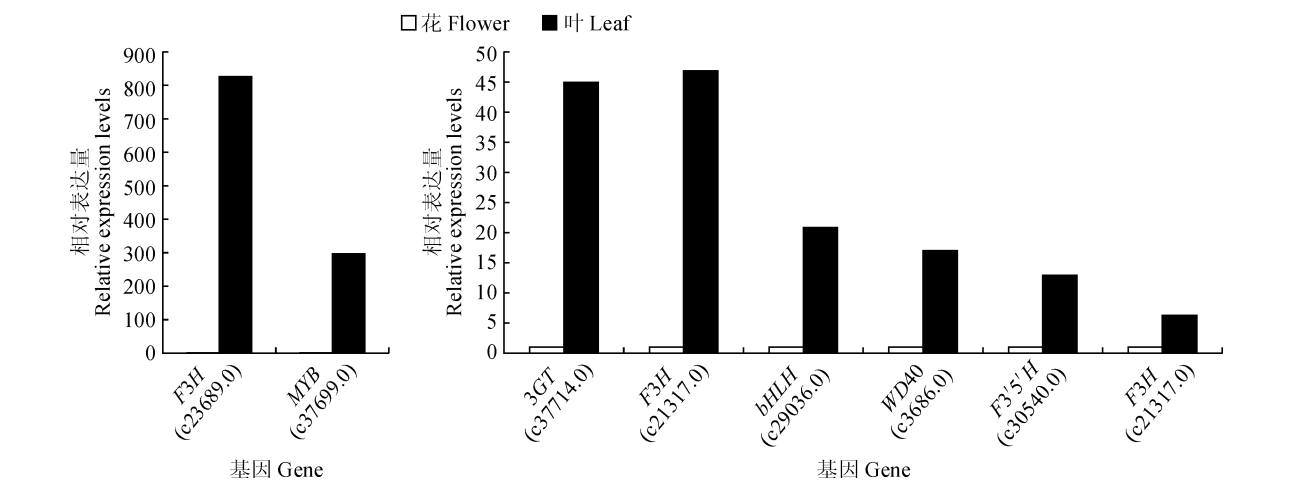


图 2 8 个差异表达基因在紫背天葵花和叶片中的表达趋势
Fig. 2 The expression trend of 8 differential genes in flower and leaf from *Gynura bicolor*

编码 ID	核苷酸长度 Nucleotide/bp	表达量 FPKM		非冗余蛋白数据库匹配物种 NR matching plant
		叶片 Leaf	花 Flower	
c24627.0	1 024	0	2.24	斑点小壶菌 <i>Spizellomyces punctatus</i>
c22753.0	1 145	0.27	1.58	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c33605.0	1 536	3.95	0.32	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c32368.1	1 353	3.09	7.51	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c34852.0	2 251	4.13	8.1	刺苞菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i>
c31876.0	2 945	7.43	16.21	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>
c36860.0	4 053	7.36	0.23	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>

表 7 8 个差异表达明显基因的荧光定量 PCR 分析
Table 7 qRT-PCR analysis of 8 differential expressed genes

基因 Gene	编码 ID	转录组测序 RNA-Seq			荧光定量 PCR 鉴定 qRT-PCR		
		叶 Leaf(A)	花 Flower(B)	A/B	叶 Leaf(A)	花 Flower(B)	A/B
<i>Actin</i>	C31895.0	11.33	11.99	1.01	21.49	19.99	1.08
<i>F3H</i>	C23689.0	7.47	0.07	106.71	161.63	0.08	2 020.38
<i>F3H</i>	C21317.0	41.59	0.25	166.36	4.62	0.11	42.00
<i>F3H</i>	C23278.0	27.21	2.02	13.47	0.49	0.10	4.90
<i>F3'5'H</i>	C30540.0	26.25	2.69	9.68	4.58	0.08	57.25
<i>3GT</i>	C37714.0	35.57	0.96	349.55	8.22	0.14	58.71
<i>MYB</i>	C37699.0	47.80	0.29	164.83	48.66	2.90	16.78
<i>bHLH</i>	C29036.0	38.13	0.81	47.07	2.25	0.10	22.50
<i>WD40</i>	C36860.0	7.36	0.23	31.74	2.90	0.18	16.11

背天葵叶片及花中的表达趋势(均下调)与转录组测序结果一致,但两种不同方法检测到的表达趋势差异倍数略有不同。

3 讨 论

采用转录组测序后进行紫背天葵花青素代谢相关合成酶及转录因子等调控基因统计,在获取的大量相关基因信息中,进一步进行其叶片及花中差异表达基因信息分析。在紫背天葵叶片及花中,所有 CHS、CHI、F3'H、DFR 和 ANS 等花青素相关合成酶均未有差异表达极显著基因,然而存在 1 条 *F3'5'H* 和 2 条 *3GT* 基因簇下调。根据前人研究结果^[28-29],*F3'5'H* 通过羟基化二氢黄酮醇 B 环上的 3' 和 5' 位置,从而生成紫色(或蓝色)飞燕草素糖苷;而 *3GT* 是催化促进花青素 3,5 位糖基化,使不稳定花青素转变为稳定的花色苷,从而使无色花青素转变为有色的花青苷。因此,本研究表明,紫背天葵叶片保持稳定的紫色,是因为富含高表达量的 1 个 *F3'5'H* 和 2 个 *3GT* 基因。相较于其他合成酶在紫背天葵叶片及花中差异表达基因数量少甚至缺失,*F3H* 合成酶差异表达显著基因达到 9 条,包括 5 条下调和 4 条上调。根据前人研究结果^[30],*F3H* 合成酶催化黄烷酮类底物产生二氢黄酮醇类产物,为黄酮醇、原花青素、花青素等类黄酮合成代谢支路提供前体物,是黄烷酮分支点的一个核心酶,*F3H* 与花青素合成代谢密切相关,其基因存在多拷贝数。本研究表明,紫背天葵不同拷贝 *F3H* 基因表达量及表达趋势差异明显,这与 *F3H* 基因催化不同成分的不同表达模式有关。

相较于紫背天葵大多数花青素相关合成酶未有差异表达极显著基因,其 *MYB*、*bHLH* 和 *WD40* 等 3 类转录因子不仅存在大量的不同拷贝数基因,且在紫背天葵叶片和花中存在差异表达显著基因繁多,而且都存在上调和下调两种模式。前人研究表明^[14],这些转录因子可以单一或多个转录因子形成复合体进行花青素合成的调控,即与结构基因启动子相结合,激活或者抑制花青素生物合成途径中一个或多个基因的表达。由于 *MYB*、*bHLH* 和 *WD40* 等 3 类转录因子对植物花青素合成代谢调控的复杂性,导致紫背天葵叶片和花朵中该 3 类转录因子不仅繁多,且差异表达显著并都存在上调与下调两种趋势。

在上述 56 条差异表达显著的花青素合成代谢相关调控基因中,根据 NR 数据库所匹配的物种主要包括向日葵(24 条单基因簇)、莴苣(17 条单基因簇)和刺苞菜薹(7 条单基因簇)等 3 种与紫背天葵亲缘关系较近的菊科植物,此外,在 *MYB* 基因中还注释到 2 条紫背天葵单基因簇。以上相关注释所匹配物种表明,上述 3 种菊科植物中花青素相关代谢调控基因与紫背天葵亲缘关系较近且进行了较为系统的研究。此外,关于紫背天葵 *MYB* 转录因子也有部分研究。

本研究选取 8 个紫背天葵叶片和花中差异表达显著的花青素合成代谢调控基因进行 qRT-PCR 分析,结果与转录组测序所获取的 FPKM 均值中的表达趋势一致。因此,本研究获取紫背天葵中大量花青素合成代谢调控的不同家族基因及其差异表达趋势,为进一步深入研究紫背天葵乃至其他特色植物中花青素生物合成等研究奠定了良好基础。

参考文献:

[1] 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.

[2] CHUANG L H, WU A L, WANG N K, *et al.* The intraocular staining potential of anthocyanins and their retinal biocompatibility: a preclinical study[J]. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 2018, **37**(4): 359-366.

[3] FERNANDES I, MARQUES C, ÉVORA A, *et al.* Pharmacokinetics of table and Port red wine anthocyanins: a crossover trial in healthy men[J]. *Food & Function*, 2017, **8**(5): 2 030-2 037.

[4] SANDOVAL-RAMIREZ B A, CATALAN U, FERNANDEZ-CASTILLEJO S, *et al.* Anthocyanin tissue bioavailability in animals: possible implications for human health. A systematic review[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, **66**(44): 11 531-11 543.

[5] TIAN X Z, PAENGKOUM P, PAENGKOUM S, *et al.* Short communication: Purple corn (*Zea mays* L.) stover silage with abundant anthocyanins transferring anthocyanin composition to the milk and increasing antioxidant status of lactating dairy goats[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, **102**(1): 413-418.

[6] LOPEZ-ANGULO G, MONTES-AVILA J, SANCHEZ-XIMELLO L, *et al.* Anthocyanins of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. fruit associated with high antioxidant and α -Glucosidase inhibitory activities[J]. *Plant Foods for Human*

Nutrition, 2018, **73**(4): 308-313.

[7] JANŠAKOVA K, BABÍČKOVA J, HAVRLENTOVA 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.

[8] PHAN M, BUCKNALL M P, ARCOT J. Interferences of anthocyanins with the uptake of lycopene in Caco-2 cells, and their interactive effects on anti-oxidation and anti-inflammation *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Food Chemistry*, 2019, **276** (3): 402-409.

[9] 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.

[10] VENANCIO V P, CIPRIANO P A, KIM H, *et al.* Cocolplum (*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.

[11] LIPPERT E, RUEMMELE P, OBERMEIER F, *et al.* Anthocyanins prevent colorectal cancer development in a mouse model[J]. *Digestion*, 2017, **95**(4): 275-280.

[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] 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.

[14] LLOYD A, BROCKMAN A, AGUIRRE L, *et al.* Advances in the MYB-bHLH-WD Repeat (MBW) pigment regulatory model: addition of a WRKY factor and co-option of an anthocyanin MYB for Betalain regulation[J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, **58**(9): 1 431-1 441.

[15] WANG H, WANG C, FAN W, *et al.* A novel glycosyltransferase catalyses the transfer of glucose to glucosylated anthocyanins in purple sweet potato[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**(22): 5 444-5 459.

[16] SUI X, ZHAO M, HAN X, *et al.* RrGT1, a key gene associated with anthocyanin biosynthesis, was isolated from *Rosa rugosa* and identified via overexpression and VIGS[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, **135**(11): 19-29.

[17] PASSERI V, MARTENS S, CARVALHO E, *et al.* The R2R3MYB VvMYBPA1 from grape reprograms the phenylpropanoid pathway in tobacco flowers [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2017, **58**(9): 1 431-1 441.

[18] ESCARAY F J, PASSERI V, PEREA-GARCIA A, *et al.* The R2R3-MYB TT2b and the bHLH TT8 genes are the major regulators of proanthocyanidin biosynthesis in the leaves of Lotus species[J]. *Planta*, 2017, **246**(2): 185-199.

[19] 谢 烨, 孙 毅, 黄继荣. 拟南芥中花青素的修饰[J]. 植物生理学报, 2013, **49**(2): 101-110.

XIE Y, SUN Y, HUANG J R. Anthocyanin modification in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, **49**(2): 101-110.

[20] 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.

[21] 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.

[22] 李 军, 赵爱春, 刘长英, 等. 桑树花青素合成相关 MYB 类转录因子的鉴定与功能分析[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(6): 1 110-1 116.

LI J, ZHAO A C, LIU C Y, *et al.* Identification and function analysis of anthocyanin biosynthesis related MYB genes in mulberry[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(6): 1 110-1 116.

[23] FENG K, LIU J X, DUAN A Q, *et al.* AgMYB2 transcription factor is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis in purple celery (*Apium graveolens* L.) [J]. *Planta*, 2018, **248**(5): 1 249-1 261.

[24] 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.

[25] 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.

[26] 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.

[27] 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.

[28] TAKESHI H, EIJIRO H, NAONOBU N, *et al.* Structural basis for acceptor-substrate recognition of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase from *Clitoria ternatea* [J]. *Protein Sci*, 2015, **24**(3): 395-407.

[29] CAROL M, MIKE J. AMBROSE, *et al.* The b gene of pea encodes a defective flavonoid 3',5'-hydroxylase, and confers pink flower color [J]. *Plant Physiol.*, 2012, **159** (2): 759-768.

[30] NAONOBU N. Recent advances in the research and development of blue flowers[J]. *Breed Sci*, 2018, **68**(1): 79-87.

(编辑:宋亚珍)