

后 猛, 李 臣, 宋炜涵, 等. 紫肉甘薯及其突变体花青素积累差异的比较转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 313-325.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.004

紫肉甘薯及其突变体花青素积累差异的比较转录组分析

后 猛¹, 李 臣^{1,2}, 宋炜涵¹, 张允刚¹, 李 强¹

(1. 江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/中国农业科学院甘薯研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 徐州 221131; 2. 江苏师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116)

摘要: 紫肉甘薯因其块根中富含紫色花青素而得名。本研究以 2 组栽培种紫肉甘薯及其淡黄肉突变体为材料, 基于甘薯转录组测序(RNA-seq)数据进行生物信息学分析。以 $|\log_2 FC| \geq 1$ 且错误发现率(FDR) < 0.01 作为筛选标准, 鉴定差异表达基因(DEGs), 对 DEGs 进行 GO 功能分类和 KEGG 代谢通路分析, 并采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法对测序结果进行验证。样品经转录组测序后, 均获得超过 8 Gb 的高质量数据, 拼接组装共得到 164 427 条 Unigenes。在 2 组甘薯材料及其突变体中分别检测到 2 262 个和 1 546 个 DEGs, 其中有 244 个 DEGs 是 2 组甘薯材料共有的。GO 功能分析发现, DEGs 主要富集于苯丙氨酸解氨酶活性、着色、类黄酮生物合成过程、含花青素化合物生物合成过程等。KEGG 通路分析发现, DEGs 主要分布在苯丙素类生物合成、苯丙氨酸代谢、类黄酮生物合成和花青素生物合成等代谢通路。随机选择 27 个与花青素生物代谢相关的候选基因进行实时荧光定量 PCR 验证, 表达模式与测序结果一致。将 2 组材料中候选基因的表达水平与花青素含量进行相关性分析, 结果表明, 花青素生物合成相关的候选基因 *PAL-1*、*CHS*、*ANS*、*CCoAOMT*、*GST-2*、*ABC-1*、*bHLH* 和 *WRKY-2* 的相对表达量与花青素积累量的相关性达到显著或极显著水平。表明, 2 个甘薯突变体材料块根薯肉紫色的缺失是由花青素的合成、转运和相关转录因子表达水平的降低共同引起的。通过转录组测序可以从中挖掘一些与花青素代谢相关的候选基因, 为研究其在生物合成途径中的调控机制奠定基础。

关键词: 紫肉甘薯; 转录组测序; 花青素代谢; 差异表达基因

中图分类号: S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)02-0313-13

Comparative transcriptome analysis on anthocyanin accumulation differences in purple-fleshed sweetpotatoes and their mutants

KOU Meng¹, LI Chen^{1,2}, SONG Wei-han¹, ZHANG Yun-gang¹, LI Qiang¹

(1. Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuhuai District/Sweetpotato Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Breeding of Sweetpotato, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China; 2. School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Purple-fleshed sweetpotato (PESP) is famous for the rich storage of purple anthocyanins in its storage root. In this study, two groups of PFSP cultivated species and their mutants with light yellow flesh were used as materials, and bioinformatics analysis was conducted based on transcriptome sequencing (RNA-seq) data of sweetpotatoes. $|\log_2 FC| \geq 1$ and FDR (False discovery rate) < 0.01 were used as screening standards to identify differentially expressed genes (DEGs). Gene ontology (GO) functional classification and KEGG metabolic pathway analysis of DEGs were performed, and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) method was used to verify the sequencing results. After transcriptome sequencing of the samples, more than eight Gb data with high quality were obtained for each sample, and a total of 164 427 Unigenes were obtained by splicing and assembling. 2 262 and 1 546 DEGs were detected respectively in two groups of sweetpotatoes.

收稿日期: 2021-08-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1001300, 2019YFD1001304); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-10)

作者简介: 后 猛 (1981-), 男, 山东曹县人, 博士, 副研究员, 主要从事甘薯遗传育种研究。 (E-mail) koumeng2113@163.com

通讯作者: 李 强, (E-mail) instrong@163.com

tive PCR (qRT-PCR) method was used to verify the sequencing results. After transcriptome sequencing of the samples, more than eight Gb data with high quality were obtained for each sample, and a total of 164 427 Unigenes were obtained by splicing and assembling. 2 262 and 1 546 DEGs were detected respectively in two groups of sweetpotatoes.

to materials and their mutants, among which 244 DEGs were shared between two groups of sweetpotato materials. Results of GO functional analysis showed that, DEGs mainly enriched in phenylalanine ammonia-lyase activity, pigmentation, flavonoid biosynthesis process and anthocyanin-containing compound biosynthesis process. Results of KEGG pathway analysis showed that, DEGs mainly distributed in metabolic pathways such as phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism, flavonoid biosynthesis and anthocyanin biosynthesis. In addition, 27 candidate genes related to anthocyanin biological metabolism were selected randomly for real-time quantitative PCR verification, and their expression patterns were found to be consistent with the sequencing results. Results of correlation analysis on gene expression level and anthocyanin content revealed that, relative expression levels of anthocyanin biosynthesis related candidate genes such as *PAL-1*, *CHS*, *ANS*, *CCoAOMT*, *GST-2*, *ABC-1*, *bHLH* and *WRKY-2* were in significant or extremely significant correlation with anthocyanin accumulation. The results indicated that, the deficiency of purple color in the storage root flesh of two sweetpotato mutant materials was caused by the decrease of expression level of genes involved in anthocyanin synthesis, transport and related transcription factors. Some candidate genes related to anthocyanin metabolism can be found by transcriptome sequencing, which lays a foundation for study on their regulatory mechanism in biosynthesis pathways.

Key words: purple-fleshed sweetpotato; transcriptome sequencing; anthocyanin metabolism; differentially expressed genes

紫肉甘薯是一类特异的甘薯类型,除含有多种对人体有益的微量元素和矿物质外,还富含具有抗氧化能力、防癌抗癌等生理保健功效的天然花青素,因而受到越来越多消费者的欢迎^[1-3]。与其他同类色素相比,从紫肉甘薯中提取出的花青素具有更为稳定的理化性质^[1],是一种优质的天然食用色素,具有多种营养保健用途和药理功能^[2-3]。因此,探讨花青素在紫肉甘薯块根中代谢相关基因的差异表达及调控机制具有重要意义。植物体内的色素主要包括类黄酮、甜菜碱类色素和类胡萝卜素等^[4],其中花青素是属于类黄酮的一类天然水溶性色素,由特有的 C₆-C₃-C₆ 碳骨架结构和不同的取代基团构成,因其取代基数目和位置的不同而呈现出红、橙、粉和蓝等各种颜色^[4-5]。花青素的生物合成是被广泛研究的植物次生代谢途径之一,花青素的生物合成与代谢过程一般由多种结构基因编码的关键酶、相关转运蛋白质以及起调控作用的转录因子等多个成员参与,目前已在拟南芥、金鱼草和玉米等植物中被深入研究^[4-6]。甘薯是中国重要的粮食作物,也是一种重要的能源和保健作物。随着人们保健意识的增强和消费水平的提高,人们对自身健康问题越来越关注,日本、美国等发达国家已把甘薯视为营养全面而平衡的保健食品^[7]。尽管已有较多关于紫肉甘薯花青素合成和积累的研究,但这些研究多集中在合成关键酶编码基因方面,调控花青素代谢的分子机制仍不够清楚。本研究以 2 个紫肉甘薯品系及其淡黄肉自然突变体为材料,进行转录组分析,为进一步

挖掘花青素代谢相关基因及功能研究提供依据。

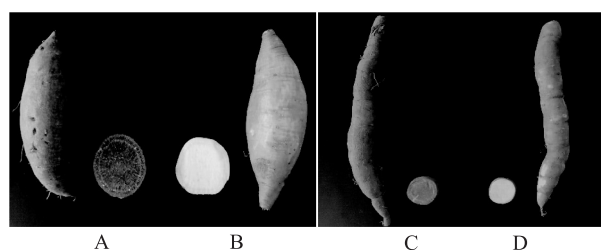
1 材料与方法

1.1 试验材料及 RNA 提取

本课题组在育种过程中发现 2 个甘薯肉色自然突变体,徐 1604(紫皮紫肉)的突变体徐 1604M(淡红皮淡黄肉),徐 0571(紫皮紫肉)的突变体徐 0571M(淡红皮淡黄肉)。经过多年田间鉴定,这 2 个突变体薯肉颜色等性状可以稳定遗传。将这两组栽培种及其突变体材料栽插在江苏徐淮地区徐州农业科学研究所试验田,于栽插后 130 d 收获薯块(图 1)。每个品种随机选取 12 个中等大小的薯块,将其中 4 个薯块作为一个生物学重复,共计 3 个重复,分别为:A1、A2 和 A3、B1、B2 和 B3、C1、C2 和 C3、D1、D2 和 D3。每个重复清洗擦干后去皮,切碎,混匀,锡箔纸包裹后迅速置于液氮中速冻,然后一部分样品放于超低温冰箱中-80℃保存,用于后续试验。另一部分样品提取总 RNA 后,使用 Nanodrop-1000 检测 RNA 的纯度(OD_{260}/OD_{280})和浓度,并用 Agilent 2100 生物分析仪(安捷伦科技有限公司产品)检测 RNA 的完整性。采用高闰飞^[8]的方法测定花青素含量。

1.2 cDNA 文库构建及转录组测序

样品检测合格后,构建 cDNA 文库,随后检测文库质量。检测结果合格后测序,并对原始数据(Raw data)进行数据过滤。获得高质量的测序数据后,使用 Trinity 软件将 Clean Data 进行序列组装,最终得到 Unigene 库。



A:徐 1604;B:徐 1604 突变体徐 1604M;C:徐 0571;D:徐 0571 突变体徐 0571M。

图 1 2 组栽培种及其突变体材料

Fig.1 Two groups of cultivated and mutant materials

1.3 Unigene 功能注释与分类

采用 BLAST 软件将本研究获得的甘薯 Unigene 序列与 NR(Non-redundant protein sequences in NCBI)、GO(Gene ontology)、Swiss-Prot(A manually annotated and reviewed protein sequence database)、KOG(eu Karyotic ortholog groups)、KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)等数据库对比,以获得 Unigene 的注释信息。

1.4 花青素代谢途径差异表达基因筛选

基因表达具有一定的时空特异性,不同条件下表达水平具有显著差异的基因或转录本,被称为差异表达基因(DEG),或差异表达转录本(DET)。根据样品间表达水平高低,DEG(或 DET)可以划分成上调基因和下调基因。通过比对 2 个甘薯材料的 Unigene 序列,我们筛选出与花青素代谢相关的 DEG(或 DET)。

1.5 花青素代谢途径差异表达基因验证

1.5.1 甘薯总 RNA 提取 采用多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒(北京华越洋生物科技有限公司产品)提取徐 1604、徐 1604M、徐 0571、徐 0571M 的块根总 RNA,具体操作参考试剂盒说明书进行。使用 1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳验证提取的 RNA 的完整性,用 NanoDrop-1000 微量分光光度计测定 RNA 的浓度和 OD_{260}/OD_{280} 。

1.5.2 cDNA 第一条链合成 cDNA 合成使用 RevertTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOYOBO 公司产品)试剂盒,操作按照试剂盒说明书进行。

1.5.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证 根据转录组测序数据,采用 Primer3Plus 在线软件(<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus>。

cgi)设计引物,引物序列见表 1。参照 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix(TOLOBIO 公司产品)试剂盒说明书,使用 QuantStudio 6 Flex 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 检测,反应体系为:2×Q3 SYBR qPCR Master Mix 10 μ l,模板 2 μ l,引物-F(10 mmol/L)和引物-R(10 mmol/L)各 1 μ l,ddH₂O 补足至 20 μ l。

反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。溶解曲线为:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s,并检测荧光信号值。以 *IbARF* 为内参基因^[9],用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[10]计算相对表达量,每 1 个样品均设置 3 个重复。

1.6 数据处理

采用 Microsoft Excel 进行数据的方差分析和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 不同甘薯材料总花青素含量的差异

由图 2 可以看出,每 100 g 紫肉甘薯材料徐 1604 和徐 0571 花青素含量分别为 (52.75 ± 0.08) mg 和 (19.91 ± 0.10) mg,而淡黄肉突变体材料徐 1604M 和徐 0571M 未检测出花青素。结果表明,2 组自然突变体与其紫肉栽培种薯块肉色的差异主要表现在花青素含量不同。

2.2 转录组测序与组装

采用 Illumina HiSeqTM2000 高通量测序技术对 2 个甘薯材料及其突变体块根进行转录组测序,从表 2 中可以看出,经过测序质量控制,徐 1604、徐 1604M、徐 0571、徐 0571M 分别获得超过 8.32 Gb、10.05 Gb、8.67 Gb 和 9.73 Gb clean data,*Q30*(碱基识别出错概率)分别达到 92.77%、90.56%、92.86% 和 93.27% 以上,所有样品 G+C 含量均不低于 46.42%,说明本研究获得的甘薯转录组序列数据充足且质量较高,能够满足后续试验的需要。

为避免低表达基因的测序量对构建完整转录本的影响,对低表达的转录本进行过滤,最终得到可靠的转录本。利用 Trinity 软件对测序序列进行拼接(表 3),获得 183 440 个转录本,总长度达 91 725 016 bp,平均长度为 500 bp,*N50* 为 604 bp;进一步组装共得到 164 427 条 Unigenes,总长度达 77 679 292 bp,平均长度为 472 bp,*N50* 为 544 bp,最大长度为 16 835 bp,最小长度为 201 bp,结果表明,该甘薯转录组测序和组装结果良好,可用于后续生物信息学研究。

表 1 花青素代谢相关候选基因 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers of anthocyanin metabolism-related candidate genes

引物名称	Unigenes 编号	引物-F(5'→3')	引物-R(5'→3')
<i>PAL-1</i>	TRINITY_DN139899_c2_g18	TGCCAGGCAATTGATCTGAG	AAAACGTATTCGCGGTCCAC
<i>C4H</i>	TRINITY_DN127042_c1_g8	ATCTTGCTGAACGCTTGGTG	TCTGAAGTCGTTGCCATTGG
<i>4CL</i>	TRINITY_DN137871_c0_g15	AAAGGATGCACGCACTTCTC	AGTCAACATCACGCCTTTTCG
<i>CHS</i>	TRINITY_DN135554_c0_g6	AGTGCTTGTTTCGAGGCTTTC	TGTGGCTCGGAGTTTTCAG
<i>CHI</i>	TRINITY_DN113691_c2_g1	AAGTGAACGGGAAAAGTGC	AATACTGCTTGCCGCTCAAC
<i>F3H</i>	TRINITY_DN93879_c8_g1	AAGGAAGCGTTGACCAAAGC	TGTTTTGCCGCCATCTTTGG
<i>F3'H</i>	TRINITY_DN136727_c0_g1	AAGGAAGCGTTGACCAAAGC	TGTTTTGCCGCCATCTTTGG
<i>DFR</i>	TRINITY_DN129724_c3_g1	TGAGCATCCCAAAGCAGAAG	ACCACAGGCAAGTCCTTTTC
<i>ANS</i>	TRINITY_DN133085_c1_g6	TAATGCTAGTGGGCAGCTTGAG	AATGCCCTCAGTTGCTTTGC
<i>UFGT</i>	TRINITY_DN138985_c0_g14	AGGATTTGCAAGCGCCATTC	ACACTTGCAGCTTTGATCGG
<i>CCoAOMT</i>	TRINITY_DN124453_c7_g2	GTCTGATGGCTACTGCACCA	TCGTATGCTTCTCGGTACAG
<i>GST-1</i>	TRINITY_DN128107_c8_g3	CGGCTATTGAGGACGGAGAC	CATTGATCCACCACGGCTCT
<i>GST-2</i>	TRINITY_DN134429_c6_g32	AGTACATCGGCACACGTAT	CTGAGCCTCGACTTCCATCC
<i>MATE</i>	TRINITY_DN118813_c0_g1	TTGTTTCAGCTGGGTACGAC	CCACCCATCCTTACACCACC
<i>ABC-1</i>	TRINITY_DN135734_c2_g2	AGCAACATAGACCCCGTTGG	CCGACGCTCCAGTTATCTCC
<i>ABC-2</i>	TRINITY_DN134923_c2_g1	AGCCCGACTTGGTGTGATT	CTTCCACAGGCAAGCCATAA
<i>MYB</i>	TRINITY_DN78368_c0_g1	ACGGAACACCGCTCCTTAG	TGGCGTTGTTTCTAGTGCTG
<i>bHLH</i>	TRINITY_DN140405_c1_g7	GAGGAGGGGAGGAGAACAT	TCCAAATCGGTGGAGGCATC
<i>NAC-1</i>	TRINITY_DN126684_c0_g4	AGGAAGACCGGAAGTGCAAG	TCCGGCAAAGATTCAGCAT
<i>NAC-2</i>	TRINITY_DN131121_c7_g25	GGTATTCTACCCGGGAAGG	CAACGTCGTTTGGTCCACC
<i>NAC-3</i>	TRINITY_DN125836_c0_g3	AAGGGTACTGGAAAGCCACG	TCCACTCCGCTTCTCTTCCA
<i>WRKY-1</i>	TRINITY_DN131403_c1_g11	CAGTTTCAGGTGCAACAGCC	CGGTGAAGGAGAACAGCACT
<i>WRKY-2</i>	TRINITY_DN140115_c2_g35	AAGGATTGGAGGCAGAAGGC	AATCCATCCCCCGTGGTTTC
<i>ERF-1</i>	TRINITY_DN125829_c0_g1	GCACCATCTTTACCGGGGAA	CGCCATTTCTGGAGTGAGGT
<i>ERF-2</i>	TRINITY_DN131240_c1_g4	GACACCTGTGTAGCCGGAAG	TCGCCGACTTTCTCGTTGAA
<i>ERF-3</i>	TRINITY_DN97917_c0_g1	TGACTTGGCCGCTTAAGGAGG	TCACAGCCGCTCAATTGAT
<i>LOB</i>	TRINITY_DN132670_c2_g1	CCGGTCATTTCTACTCCCTG	TGAACFTGAGGGGGTCCGTA

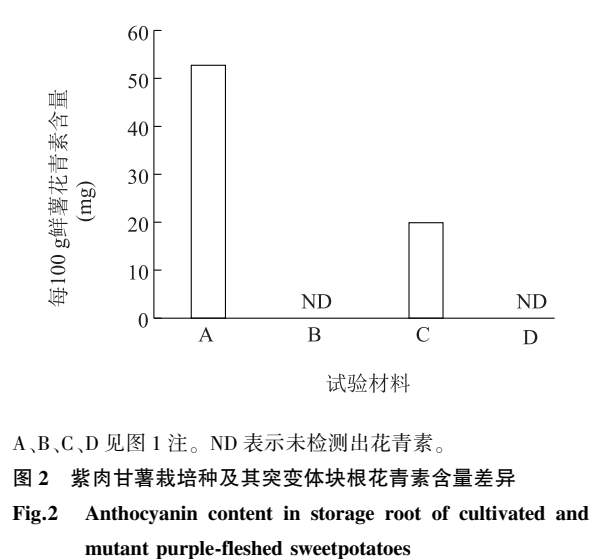


表 2 与参考序列比对后的测序结果

Table 2 Results of sequencing compared with reference sequences

样品编号	Reads 数量 (个)	碱基数量 (bp)	G+C 含量 (%)	Q30 (%)
A1	27 738 973	8 321 691 900	46.42	92.77
A2	30 277 853	9 083 355 900	46.48	92.88
A3	31 216 296	9 364 888 800	46.54	94.07
B1	33 846 627	10 153 988 100	47.32	90.56
B2	34 982 897	10 494 869 100	47.13	92.30
B3	33 518 659	10 055 597 700	47.99	93.04
C1	38 196 180	11 458 854 000	47.99	93.37
C2	28 924 428	8 677 328 400	47.61	92.86
C3	30 550 454	9 165 136 200	47.79	93.90
D1	38 146 049	11 443 814 700	47.31	93.74
D2	35 443 300	10 632 990 000	47.60	93.27
D3	32 453 742	9 736 122 600	47.40	93.47

A、B、C、D 见图 1 注。Q30: 碱基识别出错概率。

表 3 测序序列的组装结果

Table 3 Assembled results of sequences sequenced

类别	总转录本数量 (个)	总长度 (bp)	最大长度 (bp)	最小长度 (bp)	平均长度 (bp)	G+C 含量 (%)	N50 (bp)
非冗余基因	164 427	77 679 292	16 835	201	472	43.36	544
转录本	183 440	91 725 016	16 835	201	500	43.22	604

N50:按照长度将组装转录本从长到短排序,累加转录本的长度到总长度的 50%时,对应转录本的长度。

2.3 Unigene 的功能注释

通过 BLAST 程序将甘薯 Unigene 序列与 GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-Prot 和 NR 等公共数据库进行比对,结果(表 4)显示,注释到 GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-Prot、NR 数据库中的 Unigene 分别为 56 024 个(占 57.83%)、25 101 个(占 25.91%)、47 358 个(占 48.88%)、48 209 个(占 49.76%)、65 598 个(占 67.71%)、87 047 个(占 89.85%)。因此,在 NR 数据库中找到相似序列最多,其中 300 bp ≤ 长度 < 1 000 bp 的 Unigene 有 40 859 个(占 46.94%),长度 ≥ 1 000 bp 的 Unigene 有 12 874 个(占 14.79%);在 KEGG 数据库中找到相似序列最少,其中 300 bp ≤ 长度 < 1 000 bp 的 Unigene 有 11 632 个(占 46.34%),长度 ≥ 1 000 bp 的 Unigene 有 3 915 个(占 15.60%)。

表 4 Unigene 注释统计结果

Table 4 Annotated results of Unigenes

数据库	注释的 Unigene 数(个)(占总注 释数的比例)	Unigene 数(个)	
		300 bp ≤ 长 度 < 1 000 bp	长度 ≥ 1 000 bp
GO	56 024(57.83%)	27 519	9 423
KEGG	25 101(25.91%)	11 632	3 915
KOG	47 358(48.88%)	21 840	8 052
Pfam	48 209(49.76%)	19 740	10 662
Swiss-Prot	65 598(67.71%)	28 183	10 630
NR	87 047(89.85%)	40 859	12 874
总注释数目	96 882	41 699	12 904

2.4 差异表达基因的比较分析

以 $|\log_2 FC| \geq 1$ 且 $FDR < 0.01$ 作为筛选标准,我们对 2 个甘薯材料及其突变体间的差异表达基因进行聚类分析。其中差异倍数(FC)表示两样品(组)间表达量的比值。错误发现率(FDR)是通过差异显著性 P 值进行校正得到的。在徐 1604 vs 徐 1604M 和徐 0571 vs 徐 0571M 2 个比较组中分别检测到 2 262 个和 1 546 个差异表达基因。其中,

在徐 1604 vs 徐 1604M 对比组中,上调表达基因有 836 个,下调表达基因有 1 426 个;在徐 0571 vs 徐 0571M 对比组中,上调表达基因有 453 个,下调表达基因有 1 093 个;在徐 1604 vs 徐 1604M 和徐 0571 vs 徐 0571M 2 个组之间的比较中,共有 244 个差异表达基因,其中上调表达基因 12 个,下调表达基因 232 个(图 3)。

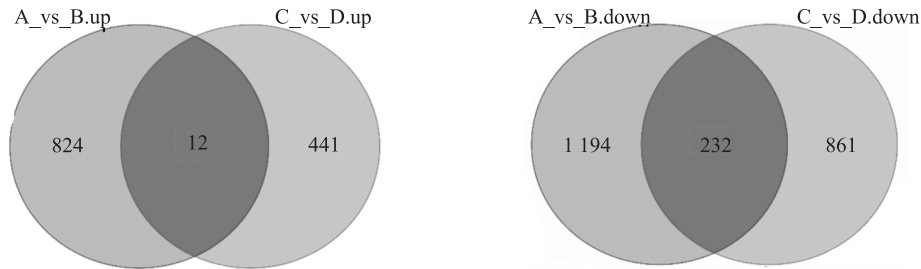
此外,我们还对 2 个对比组的 DEGs 进行了 GO 分类和 KEGG 路径分析。根据序列同源性,将 DEGs 分为生物学过程、细胞成分和分子功能 3 类。苯丙氨酸解氨酶活性是 2 个对比组中富集程度较高的 GO 项,其中与着色相关的 5 个基因在徐 1604 vs 徐 1604M 中表达差异尤为明显;与类黄酮生物合成过程相关的 22 个基因以及与含花青素化合物生物合成过程相关的 8 个基因在徐 0571 vs 徐 0571M 中表达差异尤为明显。选取排名前 20 位的差异表达基因的 KEGG 通路,确定了 4 条与块根肉色相关的通路,即苯丙素类生物合成、苯丙氨酸代谢、类黄酮生物合成和花青素生物合成。

2.5 花青素代谢途径差异表达基因筛选及验证

本研究共筛选出 11 个编码花青素生物合成途径相关的 10 种酶的 Unigenes(图 4)。这些假定的结构基因包括 *PAL*(2 Unigenes)、*C4H*(1 Unigene)、*4CL*(1 Unigene)、*CHS*(1 Unigene)、*CHI*(1 Unigene)、*F3H*(1 Unigene)、*F3'H*(1 Unigene)、*DFR*(1 Unigene)、*ANS*(1 Unigene)、*UFGT*(1 Unigene)。这 11 个 Unigenes 在 2 组甘薯材料及其突变体(徐 1604 vs 徐 1604M、徐 0571 vs 徐 0571M)中呈现出相似的表达模式。在淡黄肉突变体材料徐 1604M 和徐 0571M 的块根中,所有编码花青素生物合成的 DEGs 都比其紫肉栽培种甘薯材料(徐 1604 和徐 0571)中的表达水平明显降低。尤其是 *4CL*(Unigene 编号:TRINITY_DN137871_c0_g15)、*CHS*(Unigene 编号:TRINITY_DN135554_c0_g6)、*CHI*(Unigene 编号:TRINITY_DN113691_c2_g1)、*F3H*(Unigene 编号:TRINITY_DN93879_c8_g1)、*F3'H*

(Unigene 编号: TRINITY_DN136727_c0_g1)、*DFR* (Unigene 编号: TRINITY_DN129724_c3_g1)、*ANS* (Unigene 编号: TRINITY_DN133085_c1_g6) 和 *UFGT* (Unigene 编号: TRINITY_DN138985_c0_g14), 在徐 1604 vs 徐 1604M 和徐 0571 vs 徐 0571M 中的表达量

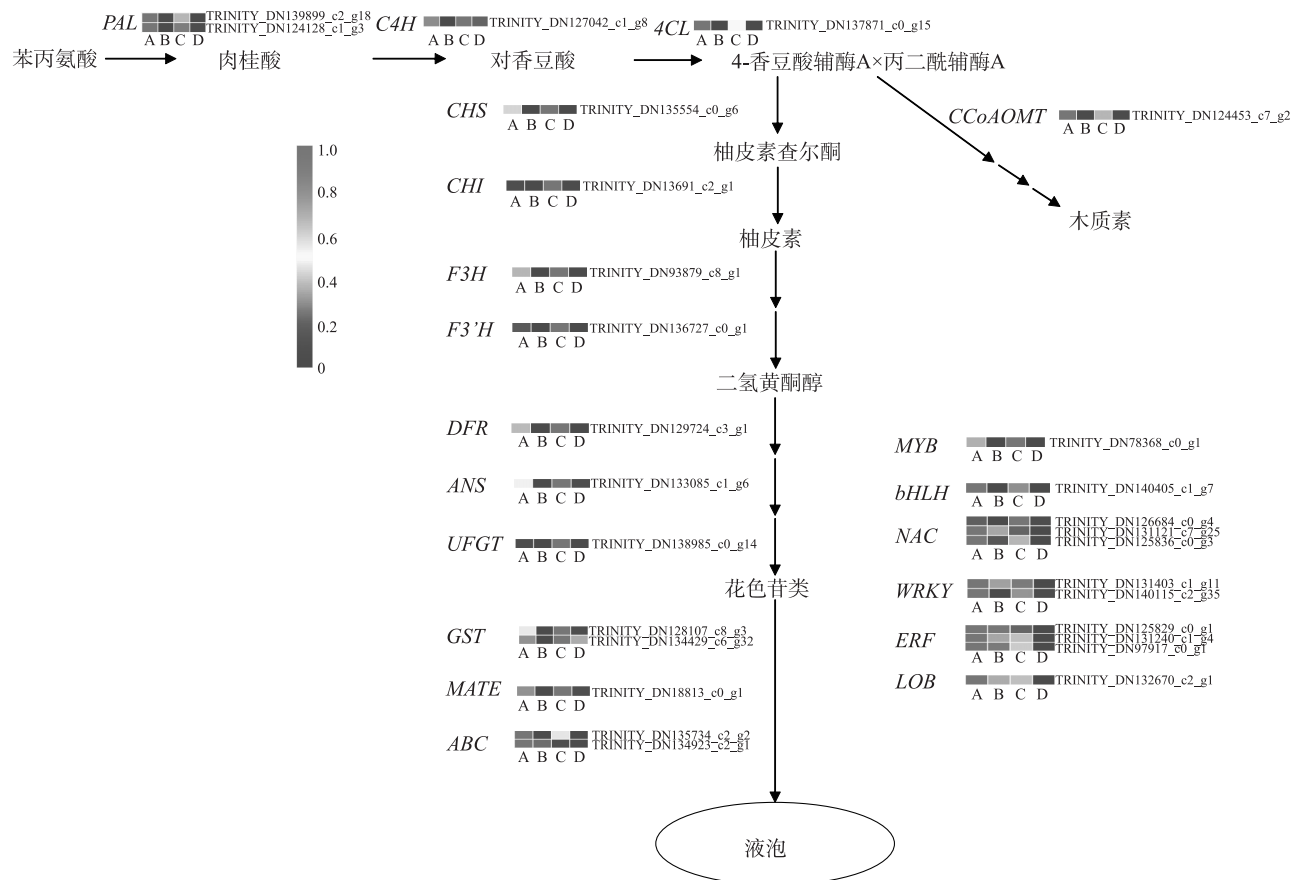
下降幅度更大。除此之外,在突变体材料徐 1604M 和徐 0571M 的块根中,还发现 1 个与木质素生物合成相关的基因,咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 (*CCoAOMT*) (TRINITY_DN124453_c7_g2) 编码基因的表达水平显著降低(图 4)。



A、B、C、D 见图 1 注。图中数据表示差异表达基因数。

图 3 2 个甘薯材料及其突变体间差异表达基因 (DEGs) 的韦恩图

Fig.3 Venn diagram of differentially expressed genes (DEGs) between two purple-fleshed sweetpotato materials and their mutants



A、B、C、D 见图 1 注。热图数字代表基因的相对表达水平,颜色越深代表表达水平越高。基因名称在热图框左侧,基因编号在热图框右侧。

图 4 花青素代谢相关基因相对表达水平的热图

Fig.4 Heat map diagram of relative expression levels of anthocyanin metabolism-related genes

为了筛选调控花青素生物合成的转录因子,从 2 组材料共有的 244 个 DEGs 中筛选到 104 个编码转录

因子(TFs)的候选 DEGs。由图 5 可知,筛选得到的转录因子中以 NAC、MYB、C2H2、bHLH 家族成员为主,其次是 AP2/ERF、B3、LOB 等转录因子家族成员。在 104 个 TFs 中,通过转录组注释分析,发现有 11 个 TFs 被注释为可能参与花青素生物代谢(图 4)。*MYB* (Unigene 编号:TRINITY_DN78368_c0_g1)在栽培种徐 1604 和徐 0571 中的转录水平,分别是突变体徐 1604M 和徐 0571M 的 453.68 倍和 35.24 倍,而 *bHLH* (Unigene 编号:TRINITY_DN140405_c1_g7)在栽培种徐 1604 和徐 0571 中的转录水平,分别是突变体徐 1604M 和徐 0571M 的 1 682.92 倍和 33.71 倍。此外,注释为 NAC、WRKY、ERF 和 LOB 的 TFs 在徐 1604 vs 徐 1604M 和徐 0571 vs 徐 0571M 2 个比较组中的表达也发生了显著下调。

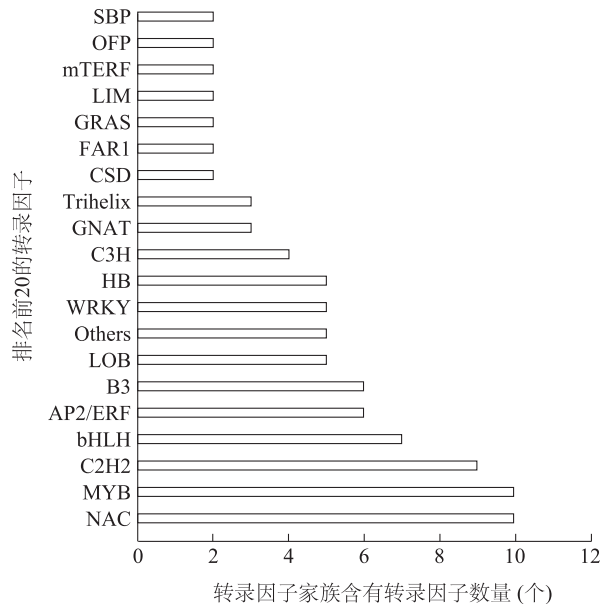


图 5 排名前 20 的转录因子家族中涉及的转录因子数量

Fig.5 Numbers of transcription factors involved in the top 20 transcription factor families

本研究鉴定到 5 个编码花青素转运的基因(图 4),分别为 2 个 *GST*、1 个 *MATE* 和 2 个 *ABC*,在紫肉甘薯材料徐 1604 和徐 0571 中的表达水平都分别高于其淡黄肉突变体徐 1604M 和徐 0571M,尤其是其中的 1 个 *GST* (Unigene 编号:TRINITY_DN128107_c8_g3)、1 个 *MATE* (Unigene 编号:TRINITY_DN118813_c0_g1) 和 1 个 *ABC* (Unigene 编号:TRINITY_DN135734_c2_g2),在徐 1604 vs 徐 1604M 和徐 0571 vs 徐 0571M 中的表达量下降幅度均较大。

以上结果表明,2 组甘薯材料及其突变体块根薯肉

颜色表型的差异是由花青素的合成、转运和转录因子调控共同引起的。为了验证转录组数据的可靠性,本研究选择了 27 个与花青素生物合成相关的候选 DEGs 进行 qRT-PCR 检测,结果表明,除 *4CL* 和 *MATE* 外,所选择的 DEGs 表达水平与转录组测序数据基本一致,包括 10 个花青素合成相关的结构基因(图 6),1 个木质素合成相关基因(图 7),5 个花青素合成转运蛋白质编码基因(图 8),以及 11 个花青素生物合成转录因子编码基因(图 9)。因此,本研究中的转录组测序数据是可信的,而 qRT-PCR 与 RNA-seq 之间的相关性也较高 ($R^2=0.624\ 4$) (图 10)。此外,将这 27 个候选基因的相对表达量与块根花青素含量进行相关性分析。结果显示,除 *MATE* 外,其他与花青素生物合成相关的候选基因的相对表达量均与花青素含量呈正相关,其中 *PAL-1*、*CHS*、*ANS*、*CCoAOMT*、*GST-2*、*ABC-1*、*bHLH* 和 *WRKY-2* 的相对表达量与花青素含量的相关性达到显著或极显著水平(表 5)。本研究结果证实了测序数据是可靠的,另一方面还可以从中挖掘一些新的与花青素代谢相关的候选基因,尤其是与花青素转运和积累相关的基因,如 *ABC-1* 和 *GST-2* 等。

3 讨论

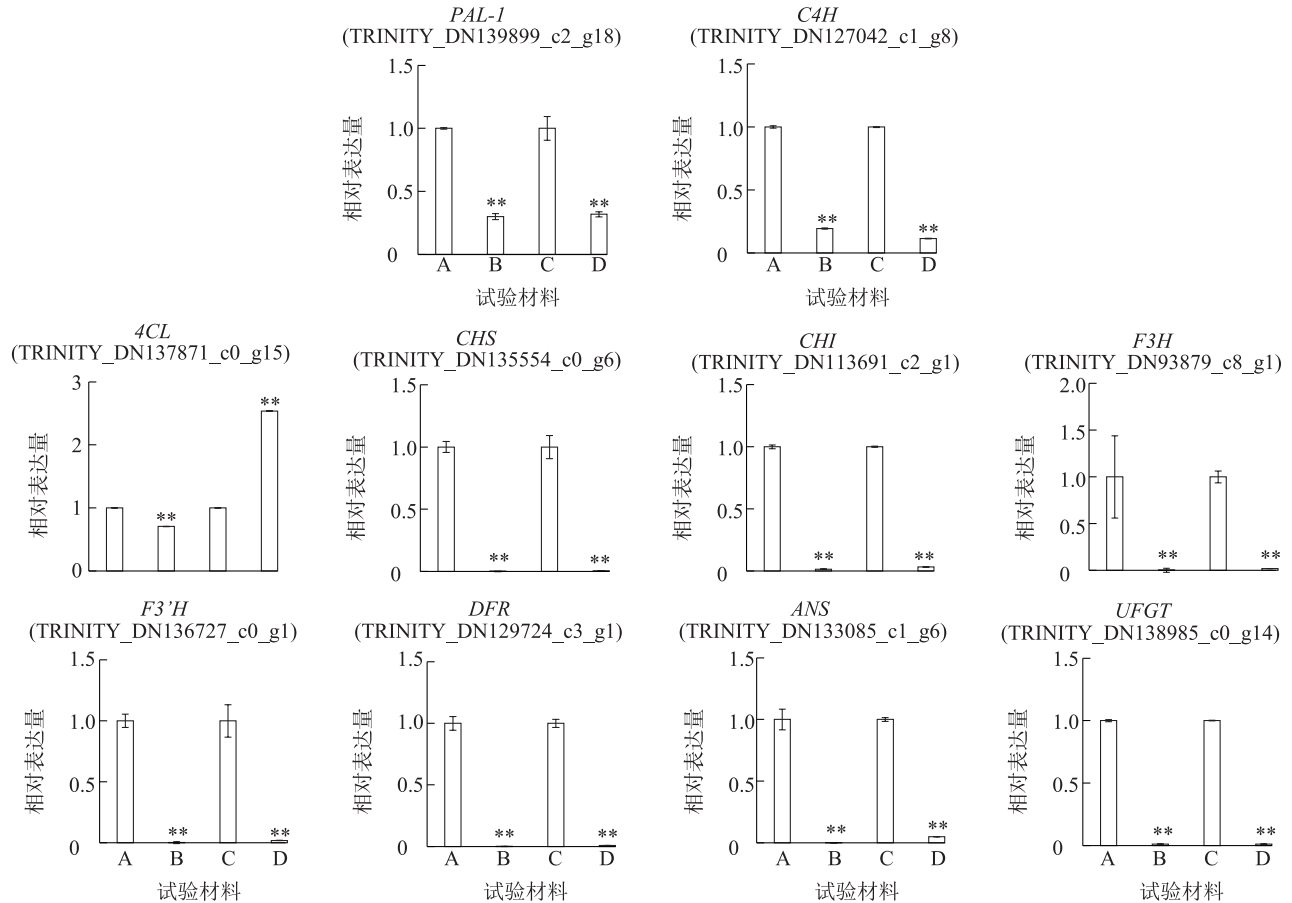
3.1 甘薯转录组测序及 Unigene 功能注释分析

甘薯是世界上最重要的粮食作物之一^[11-13]。由于其含有淀粉、膳食纤维、胡萝卜素等对人体有益的成分,因此被联合国粮农组织推荐为最健康的食物。随着保健意识的增强和消费水平的提高,人们对自身的健康问题越来越关注,紫肉甘薯因其块根富含花青素等具有生理保健功效的物质^[14-16],受到越来越多消费者的喜爱。

近些年来,伴随着高通量测序技术的不断改进和运用,植物基因组学研究得到迅猛发展。而转录组测序技术因其测序准确度高、通量大、速度快、运行成本较低以及不需要任何基因信息等优点,已在多种无参考序列物种中得到广泛应用^[17-19],尤其是在一些植物的颜色变化研究方面^[20-22]。本研究采用 Illumina 高通量测序技术对不同类型甘薯进行转录组测序,分别获得超过 8 G 的原始数据,经组装后得到 164 427 个 Unigenes,数量高于前人的测序结果^[23-25]。 $Q30(>90\%)$ 、G+C 含量($>46\%$)、N50(544 bp)等测序数据表明,测序结果较为可靠,可以满足后续转录组分析的要求。将本研究获取的甘薯 Uni-

gene 与 GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-Prot、NR 等数据库进行比对,分析可知共有 96 882 个 (58.92%) Unigenes 能够获得注释信息,但是仍有 67 545 个

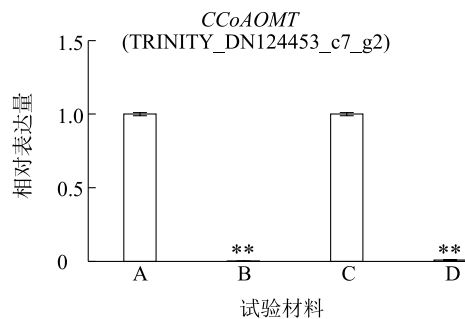
(41.08%) Unigenes 未能得到注释,这可能与相关数据库基因功能注释信息匮乏、所得 Unigene 序列长度较短、甘薯中存在特有新基因等因素有关。



A、B、C、D 见图 1 注。内参基因为 *lbaRF*。* 表示 A 组与 B 组或 C 组与 D 组间差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示 A 组与 B 组或 C 组与 D 组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 6 花青素生物合成结构基因的表达分析

Fig.6 Expression analysis of structural genes related to anthocyanin biosynthesis



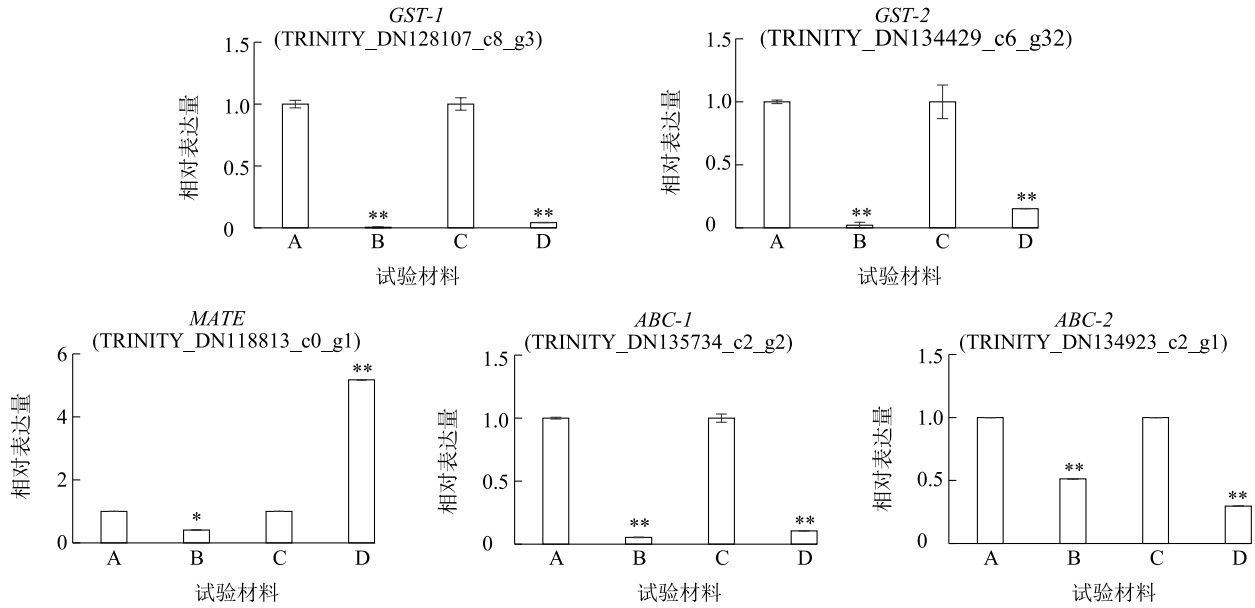
A、B、C、D 见图 1 注。内参基因为 *lbaRF*。** 表示 A 组与 B 组或 C 组与 D 组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 7 木质素生物合成相关基因的表达分析

Fig.7 Expression analysis of lignin biosynthesis-related genes

通过对 2 个甘薯材料的 DEGs 进行 GO 分类分

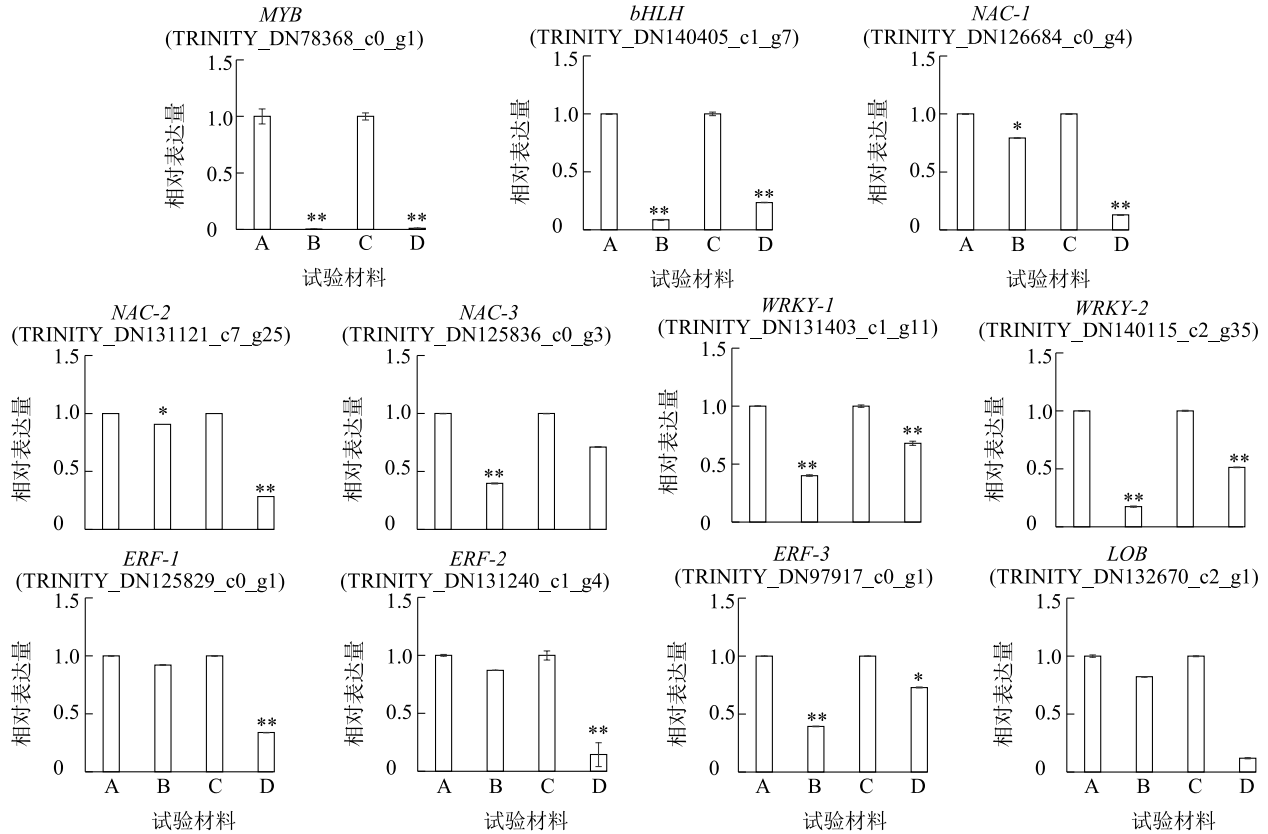
析,其功能主要分为生物学过程、细胞成分和分子功能 3 类,尤其是在苯丙氨酸解氨酶活性、类黄酮生物合成过程、与含花青素化合物生物合成过程相关等方面差异表达基因富集程度较高。甘薯块根花青素合成代谢涉及很多生化过程,本研究中 244 个差异表达基因参与多个 KEGG 代谢通路,主要包括苯丙素类生物合成、苯丙氨酸代谢、类黄酮生物合成、花青素生物合成、植物激素信号转导、淀粉和蔗糖代谢、植物-病原互作等。而参与到次生代谢生物合成通路的 DEGs 主要是与苯丙烷、类黄酮和花青素等生物合成相关的酶编码基因,本研究的测序结果将为发掘更多与花青素等黄酮类物质代谢相关的基因提供数据支撑。



A、B、C、D 见图 1 注。内参基因为 *IbARF*。** 表示 A 组与 B 组或 C 组与 D 组间差异极显著 ($P < 0.01$)；* 表示 A 组与 B 组或 C 组与 D 组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 花青素生物合成转运蛋白质编码基因的表达分析

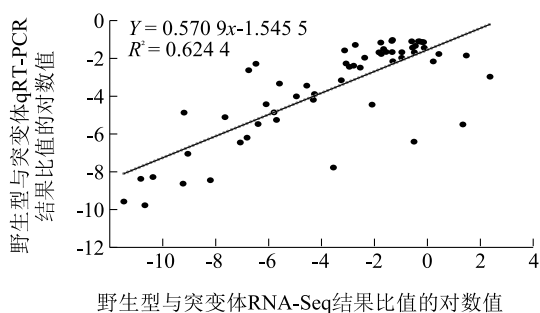
Fig.8 Expression analysis of transporter encoding genes related to anthocyanin biosynthesis



A、B、C、D 见图 1 注。内参基因为 *IbARF*。* 表示 A 组与 B 组或 C 组与 D 组间差异显著 ($P < 0.05$)；** 表示 A 组与 B 组或 C 组与 D 组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 9 花青素生物合成转录因子编码基因的表达分析

Fig.9 Expression analysis of genes encoding transcription factors related to anthocyanin biosynthesis



内参基因为 *IbARF*。

图 10 基于 qRT-PCR 和 RNA-seq 的花青素生物合成相关基因表达的相关性分析

Fig.10 Correlation analysis on expression of anthocyanin biosynthesis-related genes based on qRT-PCR and RNA-seq

表 5 花青素代谢相关候选基因相对表达量与块根花青素含量的相关系数

Table 5 Correlation coefficients between relative expression levels of candidate genes involved in anthocyanin metabolism and anthocyanin content

基因名称	相关系数
<i>PAL-1</i>	0.989 6 *
<i>PAL-2</i>	0.732 0
<i>C4H</i>	0.924 5
<i>4CL</i>	0.371 2
<i>CHS</i>	0.963 9 *
<i>CHI</i>	0.326 0
<i>F3H</i>	0.856 8
<i>F3'H</i>	0.923 3
<i>DFR</i>	0.886 9
<i>ANS</i>	0.990 8 **
<i>UFGT</i>	0.768 9
<i>CCoAOMT</i>	0.965 0 *
<i>GST-1</i>	0.883 7
<i>GST-2</i>	0.996 3 **
<i>MATE</i>	-0.442 0
<i>ABC-1</i>	0.997 5 **
<i>ABC-2</i>	0.754 3
<i>MYB</i>	0.946 0
<i>bHLH</i>	0.997 2 **
<i>NAC-1</i>	0.429 8
<i>NAC-2</i>	0.507 0
<i>NAC-3</i>	0.850 4
<i>WRKY-1</i>	0.860 7
<i>WRKY-2</i>	0.959 1 *
<i>ERF-1</i>	0.462 6
<i>ERF-2</i>	0.514 8
<i>ERF-3</i>	0.828 3
<i>LOB</i>	0.619 7

* 表示相关显著 ($P < 0.05$), ** 表示相关极显著 ($P < 0.01$)。

3.2 花青素合成相关差异表达基因的筛选及分析

了解块根花青素生物合成途径的分子机制,有助于辅助紫肉甘薯育种。前期研究结果表明,花青素含量与许多植物中花青素生物合成相关基因的表达有关,如山药^[20]、马铃薯^[26]、梨^[27]和甜樱桃^[28]。比较 RNA-seq 分析发现,与栽培种紫肉甘薯相比,突变体材料中有 11 个花青素合成相关结构基因 (*PAL* 2 个, *C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*DFR*、*ANS* 和 *UFGT* 各 1 个)下调表达,这些基因的表达模式与此前报道的结果相似。例如,在 5 个不同甘薯品种中, *IbANS* 和 *IbF3'H* 的表达水平与花青素的积累模式高度匹配^[29-30]; *IbCHI* 和其他花青素生物合成相关基因 (*IbCHS*、*IbF3H* 和 *IbDFR*) 的表达模式与不同品种甘薯成熟块根中的花青素积累有关^[31-32]。有趣的是,我们发现了不止 1 个注释为 *PAL* 的 Unigenes 与花青素生物合成相关,表明这些 Unigenes 代表了 1 个基因家族的不同成员或单个转录本的不同片段^[33]。另外,我们还发现 *4CL* 在徐 0571 vs 徐 0571M 中的表达水平与转录组测序结果不同,这可能是由于 *4CL* 是植物类黄酮类化合物等生物合成途径的一种关键酶,除参与花青素合成外,还可能在木质素等多种次生代谢物合成方面发挥重要作用。在苯丙烷类生物合成途径中,除花青素合成相关基因外,还有与木质素合成相关的关键基因。根据测序结果,本研究鉴定出 1 个参与木质化的 Unigene TRINITY_DN124453_c7_g2 (注释为 *CCoAOMT*),它在突变体块根中表达水平较低,其具体功能需要进一步研究。

3.3 花青素代谢调控转录因子差异表达基因的筛选及分析

花青素代谢途径是由 MYB-bHLH-WD40 (MBW) 转录因子复合物控制的^[34-35]。本研究中,我们从 DEG 数据中发现 1 个候选 *MYB* 基因,它在非紫肉突变体材料中明显下调表达,与已报道的 R2R3 *MYB* 转录因子编码基因 *IbMYB1* 最为相似。研究结果表明,在拟南芥^[36]、烟草^[37]和甘薯^[38]中过表达 *IbMYB1*,诱导了花青素结构基因的表达,进而增强了转基因植物的花青素色素沉积。此外,在紫肉甘薯块根中,发现 1 个 *bHLH* 上调表达,此基因表达量与花青素含量呈极显著正相关。然而,本试验中没有发现任何 *WD40* 的转录水平在紫肉甘薯品种及其突变体之间存在明显差异。

除 MBW 复合体外,其他 TFs 也被认为在控制花青素积累方面发挥了重要作用,如猕猴桃的 *SVP3* (一种 MADS 结构域 TF 的编码基因)^[39]、桃的 *BL* (一种 NAC TF 的编码基因)^[40]、苹果的 *MdHBI*^[41] (一种 HD-Zip TF 的编码基因)和 *MdERF1B*^[42] (一种 AP2/ERF TF 的编码基因)、番茄的 *SlHY5*^[43] (一种 bZip TF 的编码基因)。最后我们从 244 个 DEGs 中选出 3 个 NACs、2 个 WRKYs、3 个 ERFs 和 1 个 LOB,这些转录因子均在突变体材料中相对于紫肉甘薯下调表达,尤其是 WRKY-2 编码基因的表达水平与花青素的积累量呈显著正相关。因此,这些 TFs 可能被认为是调控花青素合成的新的候选基因,其功能值得进一步研究。

3.4 花青素转运差异表达基因的筛选及分析

花青素转运的分子机制已在多种植物中有所报道。在众多花青素转运体编码基因中,*GSTs* 在花青素运输和积累过程中发挥着关键作用,如荔枝 *LcGST4*^[44]、草莓 *FvRAP*^[45]、苹果 *MdGSTF6*^[46]、猕猴桃 *AcGST1*^[47]、桃 *PpRant1*^[48]。前人从葡萄中分离出 5 个 GST 编码基因 (*VviGST1* ~ *VviGST5*)^[49],结果显示,*VviGST4* 与花青素和原花青素 (PAs) 的积累均相关,而 *VviGST3* 仅参与 PAs 的转运^[50]。研究结果表明,与突变体相比,紫肉甘薯徐 1604 和徐 0571 中 2 个 GST 编码基因的转录水平上调,相关性分析结果也表明花青素含量与其中 1 个 GST 编码基因 (Unigene 号:TRINITY_DN134429_c6_g32) 的表达水平相关性极显著。此外,MATE 和 ABC 转运体也与花青素的转运有关^[51-52]。本研究还从 DEGs 中鉴定出 1 个 MATE 和 2 个 ABC,它们在紫肉品种中表达水平显著上调,尤其是 *ABC-1* (Unigene 号:TRINITY_DN135734_c2_g2) 的表达量与花青素含量呈极显著正相关。我们还发现 MATE 编码基因在徐 0571 vs 徐 0571M 中的表达模式与转录组数据有所不同,这可能是由于 MATE 是植物中一个重要的转运蛋白质,其除了转运花青素等类黄酮类化合物外,还在铁转运、铝脱毒和生物碱等次生代谢物转运方面起重要作用^[53]。目前仅有 1 个花青素相关转运蛋白 *lbGSTF4* 被报道^[54],因此,还需要进一步研究来揭示甘薯中花青素转运体及其功能。

参考文献:

[1] 王 玲,邓敏姬. 紫甘薯天然红色素的提取及其稳定性研究

- [J]. 食品科技, 2011, 36(4): 179-183.
- [2] SHAN Q, ZHENG Y L, LU J, et al. Purple sweet potato color ameliorates kidney damage via inhibiting oxidative stress mediated NLRP3 inflammasome activation in high fat diet mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 69:339-346.
- [3] SUN H N, MU T H, LIU X L, et al. Purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) anthocyanins: preventive effect on acute and subacute alcoholic liver damage and dealcoholic effect[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62:2364-2373.
- [4] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 733-749.
- [5] PETRUSSA E, BRAIDOT E, ZANCANI M, et al. Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(7): 14950-14973.
- [6] 宫 硢,薛 静,张晓东. 植物花青素合成途径中的调控基因研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(6):381-390.
- [7] 兰 岚,周婵媛,唐 乐,等. 甘薯营养价值及综合开发利用[J]. 现代化农业, 2016 (12): 27-30.
- [8] 高闰飞. 利用形态学和 SSR 标记分析中国紫心甘薯育成品种遗传多样性[D]. 北京:中国农业科学院,2019: 11-12.
- [9] PARK S C, KIM Y H, JI C Y, et al. Stable internal reference genes for the normalization of real-time PCR in different sweetpotato cultivars subjected to abiotic stress conditions [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51502.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] FU Y F, MA L L, QIU F, et al. A prenyltransferase gene confirmed to be a carotenogenic *CRTE* gene from sweet potato [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2014, 41(11): 613-616.
- [12] 李 臣,后 猛,马 猛,等. 甘薯块根熟化过程中麦芽糖变化及其影响因素研究进展[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(2): 539-544.
- [13] 周志林,唐 君,曹清河,等. 淀粉专用型甘薯品质形成规律及其与主要农艺性状的相关性[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 277-283.
- [14] HU Y J, DENG L Q, CHEN J W, et al. An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 46-54.
- [15] 吴 洁,沈学善,屈会娟,等. 紫肉食用型甘薯品种川紫薯 2 号优化栽培技术[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(16): 120-125.
- [16] 王 辉,牟 琴,聂 廷,等. 基于相关性分析与主成分分析法综合评价不同品种甘薯脆片加工适宜性[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(6): 173-179.
- [17] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644-652.

- [18] 韦丽君, 俞奔驰, 宋恩亮, 等. 基于转录组测序的木薯性别决定相关基因挖掘[J]. 南方农业学报, 2020, 51(8): 1785-1796.
- [19] 鞠 烨, 江建平, 尹增芳, 等. 孝顺竹笋箨全长转录组测序分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(6): 175-183.
- [20] WU Z G, JIANG W, MANTRI N, et al. Transcriptome analysis reveals flavonoid biosynthesis regulation and simple sequence repeats in yam (*Dioscorea alata* L.) tubers[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 346.
- [21] GONZÁLEZ M, SALAZAR E, CASTILLO J, et al. Genetic structure based on EST-SSR: a putative tool for fruit color selection in Japanese plum (*Prunus salicina* L.) breeding programs[J]. Molecular Breeding, 2016, 36(6): 68.
- [22] SHANGGUAN L F, MU Q, FANG X, et al. RNA-Sequencing reveals biological networks during table grapevine ('Fujiminori') fruit development[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170571.
- [23] WANG Z Y, FANG B P, CHEN J Y, et al. De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweetpotato (*Ipomoea batatas*) [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 726-740.
- [24] XIE F L, BURKLEW C E, YANG Y F, et al. De novo sequencing and a comprehensive analysis of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) transcriptome[J]. Planta, 2012, 236(1): 101-113.
- [25] LI R J, HONG Z, CHEN K, et al. De novo transcriptome sequencing of the orange-fleshed sweet potato and analysis of differentially expressed genes related to carotenoid biosynthesis[J]. International Journal of Genomics, 2015, 2015(13): 1-10.
- [26] LIU Y H, LIN-WANG K, DENG C, et al. Comparative transcriptome analysis of white and purple potato to identify genes involved in anthocyanin biosynthesis[J]. PLoS One, 2015, 10: e0129148.
- [27] YANG Y N, YAO G F, ZHENG D, et al. Expression differences of anthocyanin biosynthesis genes reveal regulation patterns for red pear coloration[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34: 189-198.
- [28] WEI H R, CHEN X, ZONG X J, et al. Comparative transcriptome analysis of genes involved in anthocyanin biosynthesis in the red and yellow fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.) [J]. PLoS One, 2015, 10: e0121164.
- [29] ZHOU W, GONG Y F, LU X, et al. Molecular cloning and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase gene from purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*) [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(1): 295-302.
- [30] ZHOU W, HUANG C T, GONG Y F, et al. Molecular cloning and expression analysis of an ANS gene encoding anthocyanidin synthase from purple-fleshed sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2010, 28(1): 112-121.
- [31] GUO J Y, ZHOU W, LU Z L, et al. Isolation and functional analysis of chalcone isomerase gene from purple-fleshed sweet potato [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33(5): 1451-1463.
- [32] WANG H X, FAN W J, LI H, et al. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78484.
- [33] SUN C, LI Y, WU Q, et al. De novo sequencing and analysis of the American ginseng root transcriptome using a GS FLX Titanium platform to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 262.
- [34] FELLER A, MACHEMER K, BRAUN E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors[J]. The Plant Journal, 2011, 66: 94-116.
- [35] ZHAO L, GAO L P, WANG H X, et al. The R2R3-MYB, bHLH, WD40, and related transcription factors in flavonoid biosynthesis[J]. Functional and Integrative Genomics, 2013, 13: 75-98.
- [36] CHU H, JEONG J C, KIM W J, et al. Expression of the sweet-potato R2R3-type *IbMYB1a* gene induces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* [J]. Physiologia Plantarum, 2013, 148: 189-199.
- [37] AN C H, LEE K W, LEE S H, et al. Heterologous expression of *IbMYB1a* by different promoters exhibits different patterns of anthocyanin accumulation in tobacco [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 89: 1-10.
- [38] PARK S C, KIM Y H, KIM S H, et al. Overexpression of the *IbMYB1* gene in an orange-fleshed sweet potato cultivar produces a dual-pigmented transgenic sweet potato with improved antioxidant activity[J]. Physiologia Plantarum, 2015, 153(4): 525-537.
- [39] WU R M, WANG T C, MCGIE T, et al. Overexpression of the kiwifruit *SVP3* gene affects reproductive development and suppresses anthocyanin biosynthesis in petals, but has no effect on vegetative growth, dormancy, or flowering time [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65: 4985-4995.
- [40] ZHOU H, LIN-WANG K, WANG H L, et al. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors[J]. The Plant Journal, 2015, 82: 105-121.
- [41] JIANG Y H, LIU C H, YAN D, et al. MdHB1 down-regulation activates anthocyanin biosynthesis in the white-fleshed apple cultivar 'Granny Smith' [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68: 1055-1069.
- [42] ZHANG J, XU H F, WANG N, et al. The ethylene response factor MDERF1B regulates anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in apple [J]. Plant Molecular Biology, 2018, 98: 205-218.
- [43] LIU C C, CHI C, JIN L J, et al. The bZip transcription factor HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin biosynthesis in tomato [J]. Plant Cell and Environment, 2018, 41: 1762-1775.
- [44] HU B, ZHAO J T, LAI B, et al. *LcGST4* is an anthocyanin-related glutathione *S*-transferase gene in *Litchi chinensis* Sonn [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(4): 831-843.
- [45] LUO H F, DAI C, LI Y P, et al. Reduced anthocyanins in petioles codes for a GST anthocyanin transporter that is essential for the foliage and fruit coloration in strawberry [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68: 1055-1069.

- tal Botany, 2018, 69:2595-2608.
- [46] JIANG S H, CHEN M, HE N B, et al. *MdGSTF6*, activated by *MdMYB1*, plays an essential role in anthocyanin accumulation in apple[J]. Horticulture Research, 2019, 6:40.
- [47] LIU Y F, QI Y W, ZHANG A L, et al. Molecular cloning and functional characterization of *AcGST1*, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. Plant Molecular Biology, 2019, 100:451-465.
- [48] ZHAO Y, DONG W Q, ZHU Y C, et al. *PpGST1*, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene, is essential for fruit coloration in peach[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18:1-12.
- [49] CONN S, CURTIN C, BÉZIER A, et al. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(13): 3621-3634.
- [50] PÉREZ-DÍAZ R, MADRID-ESPINOZA J, SALINAS-CORNEJO J, et al. Differential roles for VviGST1, VviGST3, and VviGST4 in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:1166.
- [51] FRANCISCO R M, REGALADO A, AGEORGES A, et al. ABC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-*O*-glucosides[J]. The Plant Cell, 2013, 25(5): 1840-1854.
- [52] GOMEZ C, TERRIER N, TORREGROSA L, et al. Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters[J]. Plant Physiology, 2009, 150(1): 402-415.
- [53] 吴远双,宋毅豪,吴宝尧,等. 植物多药和有毒化合物排出转运蛋白研究进展[J]. 广西植物, 2018, 38(11):128-138.
- [54] KOU MENG, LIU Y J, LI Z Y, et al. A novel *glutathione S-transferase* gene from sweetpotato, *IbGSTF4*, is involved in anthocyanin sequestration[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 135: 395-403.

(责任编辑:陈海霞)