

刘 帅, 马佩勇, 郭 可, 等. 紫色甘薯突变体形成的表观调控机制[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(3): 432-444.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.03.002

紫色甘薯突变体形成机制

刘 帅, 马佩勇, 郭 可, 贾赵东, 禹 阳, 张 铅, 边小峰
(江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 紫色甘薯因富含花青素而备受消费者喜爱, 然而其高频的突变却严重影响了品种的稳定性和产量。本研究以宁紫薯 4 号及其突变体为研究对象, 通过对其表型、理化特性进行分析发现, 宁紫薯 4 号突变体中的花青素、 β -胡萝卜素及淀粉含量发生了明显变化, 而产量和大多数表型没有发生显著变化。通过转录组测序分析, 共发现 313 个差异表达基因, 突变体中参与花青素合成的相关基因 (*IbCHS*、*IbCHI*、*IbDFR*、*IbANS* 和 *IbC4H*) 和转录因子编码基因 (*IbMYB R2R3*、*IbbHLH2* 和 *IbWD40*) 的相对表达量均较宁紫薯 4 号明显降低, 而突变体中参与淀粉合成的相关基因 (*IbAGPL2*) 的相对表达量较宁紫薯 4 号明显升高。突变体中预测功能为 DNA 甲基转移酶的基因 *IbCMT2* 和预测功能为组蛋白去甲基化酶的基因 *IbJMJ25* 的相对表达量均较宁紫薯 4 号表现为上调。通过 N6-甲基腺嘌呤斑点印迹 (6mA) 分析全基因组甲基化水平的变化发现, 突变体的 DNA 甲基化水平较宁紫薯 4 号明显提高; 利用亚硫酸氢盐处理后测序法 (BSP) 进一步分析发现, 突变体中转录因子 MYB2 编码基因的 DNA 甲基化水平提高; 蛋白质印迹 (Western blot) 结果显示, 突变体中 H3K9me2、H3K27me2 的修饰水平明显下降。上述结果表明, 紫色甘薯呈现的表型是由于表观修饰的变化导致花青素合成受到抑制, 从而产生了相应突变。本研究首次从表观调控的角度解析甘薯突变的机制, 不仅可为甘薯表观遗传研究提供新思路, 还有望基于表观调控开创甘薯定向育种的新方法。

关键词: 紫色甘薯; 突变体; 花青素; 表观遗传; DNA 甲基化; 组蛋白修饰

中图分类号: S531.032 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)03-0432-13

Epigenetic regulatory mechanisms of purple sweetpotato mutant formation

LIU Shuai, MA Peiyong, GUO Ke, JIA Zhaodong, YU Yang, ZHANG Qian, BIAN Xiaofeng
(*Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: Purple sweetpotatoes are highly valued by consumers due to their rich content of anthocyanins. However, their frequent mutations seriously affect the stability of purple sweetpotato varieties. In this study, Ningzishu 4 and its mutant were used as research objects. The analysis of their phenotypes and physicochemical properties revealed that the mutant had significant changes in anthocyanin, β -carotene, and starch content, while there were no significant changes in yield and most phenotypes. Through transcriptome sequencing analysis, a total of 313 differentially expressed genes were identified. The relative expression levels of genes (*IbCHS*, *IbCHI*, *IbDFR*, *IbANS*, and *IbC4H*) involved in anthocyanin synthesis and transcription factor-encoding genes (*IbMYB R2R3*, *IbbHLH2*, and *IbWD40*) in the mutant were significantly lower than those in Ningzishu 4. In contrast, the relative expression level of the gene (*IbAGPL2*) involved in starch synthesis in the mutant was significantly higher than that in Ningzishu 4. The relative expression levels of the gene *IbCMT2*, predicted to be a DNA methyltransferase, and the

收稿日期: 2025-01-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFE0111700); 国家自然科学基金项目 (32101787); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目 [JBGS(2021)010]; 国家甘薯产业技术体系项目 (CARS-10)

作者简介: 刘 帅 (1992-), 男, 江苏盐城人, 博士, 助理研究员, 主要从事甘薯遗传育种研究。(Tel) 025-84390309; (E-mail) 598045053@qq.com

通讯作者: 边小峰, (Tel) 025-84390309; (E-mail) 43537920@qq.com

gene *IbJMJ25*, predicted to be a histone demethylase, in the mutant were both upregulated compared with Ningzishu 4. By analyzing the changes in global methylation levels using N6-methyladenine dot blot (6mA), it was found that the DNA methylation level in the mutant was significantly higher than that in Ningzishu 4. Further analysis using bisulfite sequencing (BSP) revealed that the DNA methylation level of the transcription factor MYB2 in the mutant was increased. The results of Western blot showed that the modification levels of H3K9me2 and H3K27me2 in the mutant were significantly lower. The above results indicate that the phenotype of purple sweetpotato is due to changes in epigenetic modifications that inhibit anthocyanin synthesis, thereby causing the corresponding mutations. This study is the first to elucidate the mechanism of sweetpotato mutation from the perspective of epigenetic regulation. It not only provides new ideas for the epigenetic research of sweetpotato but also holds promise for developing new methods of directed breeding in sweetpotato based on epigenetic regulation.

Key words: purple sweetpotato; mutant; anthocyanins; epigenetics; DNA methylation; histone modification

甘薯是重要的粮食作物、经济作物和能源作物^[1],不仅富含人们所需的各种营养成分,还含有大量功能性成分,包括花青素、微量元素、维生素、蛋白质、类胡萝卜素和多糖等^[2-5]。其中,花青素是一种天然食用色素,具有抗氧化、抗衰老、抗突变、降血脂、降血糖和清除氧自由基等作用^[6-11]。紫色甘薯作为栽培型甘薯的一种新类型,其薯肉呈紫色,除了具有普通甘薯所具有的营养物质外,还富含花青素,在工业原料、食品添加剂生产及生物制药领域具有非常重要的药用价值。近年来的研究发现,参与花青素生物合成的结构基因的表达主要受到 WD40、MYB 和 bHLH 等转录因子的调控^[12],这些转录调节因子被证明存在于 1 个三联复合体 (MYB-bHLH-WD40, MBW) 中^[13-14],它们通过激活花青素生物合成基因如 *DRF*、*LDOX*、*ANS* 和 *UF3GT* 的表达来调节花青素的积累^[15-16]。目前,有关甘薯中花青素合成和表达的研究还很少,关于自然界中紫薯形成的机制也仍未知。

表观遗传学可以在不改变基因组序列的情况下调控基因表达量的水平,最终导致表型变化,并且这种变化是可以稳定遗传的^[17-18]。近年来,表观遗传学被证明在花青素代谢的调节过程中发挥关键作用,使植物在不改变 DNA 序列的情况下,发生花色、叶色、果皮色和果肉色等可遗传性改变。例如,牡丹花中影响花青素合成的基因 *PrANS*、*PrF3H* 启动子区域甲基化水平的变化是影响牡丹花瓣斑点形成的关键^[15];梅花的白花与红花嵌合体表型是由花青素合成途径相关基因受到的甲基化及部分基因中转座子的插入造成的^[19]。有研究发现,苹果果皮由红变黄是由于 MBW 复合物中启动子区的甲基化抑制了 *MdMYB10* 等基因的表达^[20]。不同于 DNA 的甲基化,不同组蛋白修饰在调控花青素合成过程中起到的作用也不同。例如,在强光照或干旱胁迫下,

H3K4me3 可以促进拟南芥中花青素含量的累积^[21];H3K9ac 的上调可以激活拟南芥花青素合成激活因子 HY5 的表达,促使花青素含量升高^[22]。另外,在光或细胞分裂素诱导下,花青素合成通路上负调控因子 MYBL2 的启动子区域 H3K9ac 的修饰水平下调,会使基因表达量下降,花青素合成得到加强^[23]。此外,有一些植物的花青素表达由 DNA 甲基化与组蛋白修饰共同调控。例如,杨树中组蛋白 H3K9 去甲基化酶基因 *JMJ25* 通过改变其染色质的组蛋白甲基化水平、DNA 甲基化程度来影响 *MYB182* 的表达,从而抑制花青素的积累^[24]。

甘薯的栽培方式以无性繁殖为主,无性繁殖能保持甘薯品种的遗传特性,但是体细胞在外界条件影响下也会发生变异。紫薯栽培品种在繁殖过程中经常会出现可以稳定遗传的白皮黄心突变体^[25-27]。然而,目前有关紫色甘薯突变成黄心甘薯的机制的报道还很少。但是,高频的突变并不符合孟德尔遗传定律。笔者通过多年观察发现,紫薯突变的概率在不同年份、不同种植地区都不相同,提示紫薯的突变可能受到环境的影响。通常情况下,植物响应外界环境变化主要通过改变某些代谢途径和相关基因的表达,表观遗传在这个机制中起着十分重要的作用。在甘薯栽培过程中,会受到机械损伤、营养不充分及生长环境改变等诸多外界因素的影响,这些因素可能会促进甘薯表观修饰的变化。因此我们推测,紫薯突变成白皮黄心的甘薯极有可能与其表观调控机制有关。

目前,已经有研究者借助表观遗传机制改良农作物。例如,通过多次干旱诱导,水稻出现表观突变,进而形成了稳定的抗旱突变株^[28]。然而,目前尚未见表观遗传学在甘薯中研究和应用的报道。因此,本研究拟使用江苏省农业科学院培育的紫薯品种宁紫薯 4 号 (2016 年通过审定) 及其突变体作为研究对象,通过表

型组学、转录组学的联合分析,挖掘引起突变的关键差异表达基因,并通过逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)进行验证。借助 N6-甲基腺嘌呤斑点印迹(6mA)和亚硫酸氢盐处理后测序法(Bisulfite sequencing PCR, BSP)分析野生型与突变体之间的 DNA 甲基化差异;利用蛋白质印迹(Western blot)等试验分析野生型与突变体之间组蛋白修饰水平的差异;通过综合分析得出使紫色甘薯发生突变可能存在的表观调控机制,以期为今后甘薯的定向育种提供新思路、新方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为江苏省农业科学院培育的宁紫薯 4 号(编号为 NY4,品种权号:CNA20160400.4)及其突变体 W4。在江苏省多个地区(南京市六合区、南京市溧水区、连云港市赣榆区、泰兴市根思乡、宿迁市泗洪县、淮安市涟水县等)进行种植、性状调查和取样。

1.2 甘薯表型和生理生化指标的测定

甘薯的叶型、叶色、薯肉色、薯皮色及产量等性状均在甘薯生长 110 d 时进行测定。

β -胡萝卜素含量测定方法:称取 1.0 g 薯块样品于研钵中,加入少量丙酮研磨,反复研磨 3~5 次,至残渣变白、提取液无色。将提取液和残渣全部收集于 25 mL 容量瓶中,用丙酮定容至 25 mL,8 000 r/min 离心 5 min;取上清液,用分光光度计在 454 nm 波长下测定吸光度,光程为 1 cm,重复 3 次,取平均值。计算公式: β -胡萝卜素含量(mg/kg) = $E \times V \times 1\,000 \times 1/E_1 \times 1/W \times 10$ 。式中, E 为样品在 454 nm 波长下的吸光度; E_1 为含量为 1% 的 β -胡萝卜素丙酮溶液在 454 nm 波长下的吸光度; V 为样品中测定液的定容体积(mL); W 为样品重量(g)。

甘薯中花青素含量的测定方法:称取 1~2 g 鲜甘薯分析样本,在研钵中加入 20 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值 3.0)并进行研磨破碎。将上部含有色素的缓冲液移入 100 mL 的容量瓶中,重复 3~5 次,至残渣变白,最后用缓冲液定容至 100 mL。取 4 mL 上清液于 12 000 r/min 离心 5 min。将离心的上清液置于分光光度计上,测定其在 530 nm 处的吸光度(花青素的吸收光谱为 530 nm)。花青素含量(C)计算公式: $C = 1/958 \times V/1\,000 \times 1/M \times ABS \times 100\,000$ 。式中, ABS 为分光光度计的吸光度;958 为 ABS 转换为重量体积比的经验系数; C 为花青素含

量,单位为 mg/kg(鲜薯); V 为定容体积(mL); M 为样品重量(g);100 000 为单位转换系数。

淀粉、直链淀粉、支链淀粉及可溶性糖含量的测定参照参考 Guo 等^[29]的方法,每个试验均设 3 个生物学重复。

1.3 转录组测序

转录组测序委托北京百迈客生物科技有限公司(BioMarker)完成,试验设 3 个生物学重复,每个样品测序产出不少于 4 Gb 的有效数据(Clean data),质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比(Q_{30})达到 85%。

1.4 RNA 提取与 qPCR 分析

收集 NY4、W4 的薯块后进行 RNA 的提取。RNA 的提取使用 RNeasy Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(货号:DP441, TIANGEN 公司产品),在通风橱下进行操作,具体操作步骤见说明书。在 RT-qPCR 操作过程中,使用 FastKing 一步法去除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂(货号:KR118, TIANGEN 公司产品)配制反应体系,用 ThermoFisher 的 Applied Biosystems 荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 分析,以甘薯的 *IbTublin* 基因作为内参基因。

1.5 引物设计

转录组序列的组装参考网站 Ipomoea batatas Genome Browser Gateway (<http://public-genomes-ngs.molgen.mpg.de/cgi-bin/hgGateway?db=ipoBat4>)提供的泰中 6 号基因组序列。通过 BLAST 在 Sweetpotato GARDEN (<https://sweetpotato-garden.kazusa.or.jp/>)中找到对应的完整编码序列(CDS),最后在美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 BLAST 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)上设计引物,引物长度为 70~150 bp,解链温度(T_m 值)为 50~60 °C。所用基因为 *IbMYB-R2R3*(Tai6.51885, Itr_sc000228.1_g00009.1)、*IbbHLH2*(Tai6.28734, Itr_sc000073.1_g00007.1)、*IbWD40*(Tai6.49295, Itr_sc000023.1_g00011.1)、*IbCHS*(Tai6.46186, Itr_sc0009821.1_g000001.1)、*IbAGPI2*(Tai6.1402, Itr_sc000127.1_g00037.1)、*IbJMJ25*(Ipomoea_batatas_newGene_9183, Itr_sc001123.1_g00016.1)、*IbPMT13*(Tai6.40366, Itr_sc000071.1_g00024.1)、*IbPMT26*(Tai6.48835, Itr_sc0001516.1_g000005.1)、*IbCMT2*(Tai6.7118, Itr_sc001106.1_g00003.1),上述基因名称后括号内的编号分别来自泰中 6 号数据库、Sweetpotato GARDEN 数据库。

1.6 亚硫酸氢盐处理后的测序分析

使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(货号为 TSP101, TSINGKE 公司产品)提取 DNA,使用 EpiTect Fast DNA Bisulfite 试剂盒[货号为 59824,凯杰生物工程(深圳)有限公司产品]对提取的 DNA 进行重亚硫酸盐处理。转化用的 DNA 量为 800 ng,具体步骤参考相关说明书。使用 MethPrimer 网站提供的基因组 DNA 序列 CpG 岛分析软件(<http://urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)对需要检测的目的序列区域进行在线分析。用 Methyl Primer Express v1.0 软件设计引物(表 1),用擎科生物科技有限公司的 2×TSINGKE Master Mix (blue)聚合酶进行巢式 PCR 反应,扩增目的区域的 CG 岛片段。通

过琼脂糖凝胶电泳对扩增好的 PCR 产物进行分析(2 μL 样品+6 μL 溴酚蓝),在 300 V 条件下电泳 12 min 后,鉴定是否扩增出预期片段大小的目的条带。通过切胶回收 PCR 扩增产物后,用 TA 克隆试剂盒将其连接到 T 载体上。用连接产物转化大肠杆菌后涂抹在 LB 培养基上,再将长出的单克隆菌斑送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序部测序,每个平板挑取 10 个单克隆进行测序。具体步骤参考 DNA 凝胶回收试剂盒(货号为 GE0101,南京擎科生物科技有限公司产品)和 pClone007 Versatile Simple Vector 试剂盒(货号为 TSV-007VS,南京擎科生物科技有限公司产品)的说明书。TA 克隆测序结果用 BiQAnalyzer 软件进行分析,统计甲基化等情况。

表 1 实时荧光定量逆转录 PCR 检测引物序列和亚硫酸氢盐处理后测序法(BSP)的引物序列

Table 1 Primers for real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) and bisulfite sequencing (BSP)

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>IbTublin</i>	CAACTACCAGCCACCAACTGT	CAAGATCCTCACGAGCTTCAC
<i>IbMYB-R2R3</i>	CTCGGACGACTCCATTGACC	GCAAGTCCGACGTTGTTC
<i>IbHLH2</i>	ACGGACTCCGAGTGGTTCTA	ATTTGCACCGGTGAGCCATA
<i>IbWD40</i>	GCTCCAGGCACATTTCTCT	GCTCCAGGCACATTTCTCT
<i>IbCHS</i>	TCCTCTCGGGATTTCCGACT	TCCACTTGGTCCAGAATCGC
<i>IbAGP12</i>	CGCTTCTCTACTAGCCACCG	GTCTGTCTGTCTCAGTTCGT
<i>IbJMJ25</i>	AGGAGCAAATGGTGGAGTGG	TTTCTCTGTCTCGAAGGGTGC
<i>IbPMT13</i>	AGAATGTTGCGACCAGAGGG	CAGGTGTCCCGGACTCTTTC
<i>IbPMT26</i>	GCTTTGCGTGCAGAAGACAA	CTCTTCGGCGGCATCAAATG
<i>IbCMT2</i>	AATCGGACGATGTTGCTGGT	GACGTTAGTGGTGACCCGTT
MYB-BSP-1	TTAGAAGAAGGTGTTTGTATG	TTAAAAATTTCCATTAACAAA
MYB-BSP-2	GATGTGAAGAATTTTGAATA	CTAATACTAACGACAAAATAATA
<i>bHLH2</i> -BSP-1	GTTACGTAAATTTGTGTTTTATT	AACTATAAATCCACTAAACAA
<i>bHLH2</i> -BSP-2	TGTAATTTTAAATTTTATATGT	CATTATATAAACAACACTTCCAA

1.7 6mA 斑点印迹试验

6mA 斑点印迹试验参照 Wang 等^[30]的方法,并做一些修改。先将 DNA 样品添加到尼龙膜上,再通过紫外线交联到膜上,然后用 0.02%亚甲基蓝^[31]染色(溶解在 0.3 mol/L 醋酸钠溶液中,用醋酸调节 pH 值至 5.5)。染色后,用 0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)和 TBST(含有 Tris-HCl 缓冲盐和 Tween 的溶液)洗涤膜,然后用 5%脱脂奶粉(1×TBST)封闭 1 h,再然后与特异性抗 6mA 抗体(批号为 ab151230,购自 Abcam 公司,按 1:5 000 稀释)在 4 °C 孵育过夜。将膜用 TBST 洗涤后,放入羊抗兔免疫球蛋白(IgG)(购自 Santa Cruz Biotechnology 公司)溶液中,室温下孵育 1 h,再用 Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent(批号为 GERPN2236,购自

Milipore 公司)对膜进行染色。

1.8 组蛋白的提取

收集干净的甘薯样品(4 g),在液氮中研磨。将磨好的样品转移到 50 mL 离心管中,加入提取缓冲液 A [含有 0.4 mol/L 蔗糖、10 mmol/L pH 值为 8.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、10 mmol/L 氯化镁、1% Triton-100、5 mmol/L β-巯基乙醇、100 mmol/L 蛋白酶抑制剂]。将上述混合液体于 13 000 r/min、4 °C 离心 10 min 后去除上清液,再加入等体积核裂解液[含有 50 mmol/L pH 值为 8.0 的 Tris-HCl、10 mmol/L 钙离子指示剂(EGTA)、1% 十二烷基硫酸钠(SDS)、10 mmol/L 蛋白酶抑制剂],用超声波反复破碎(10 s 开,10 s 关,功率为 300 W),置于冰上静止 10 min。随后,加入提取液 B(0.2 mol/L 盐酸),在冰上放置 30 min 后去除上清液,

用预冷的丙酮至少洗涤 3 次沉淀,最后将样品溶解在超纯水(ddH₂O)中,于-80 ℃保存。

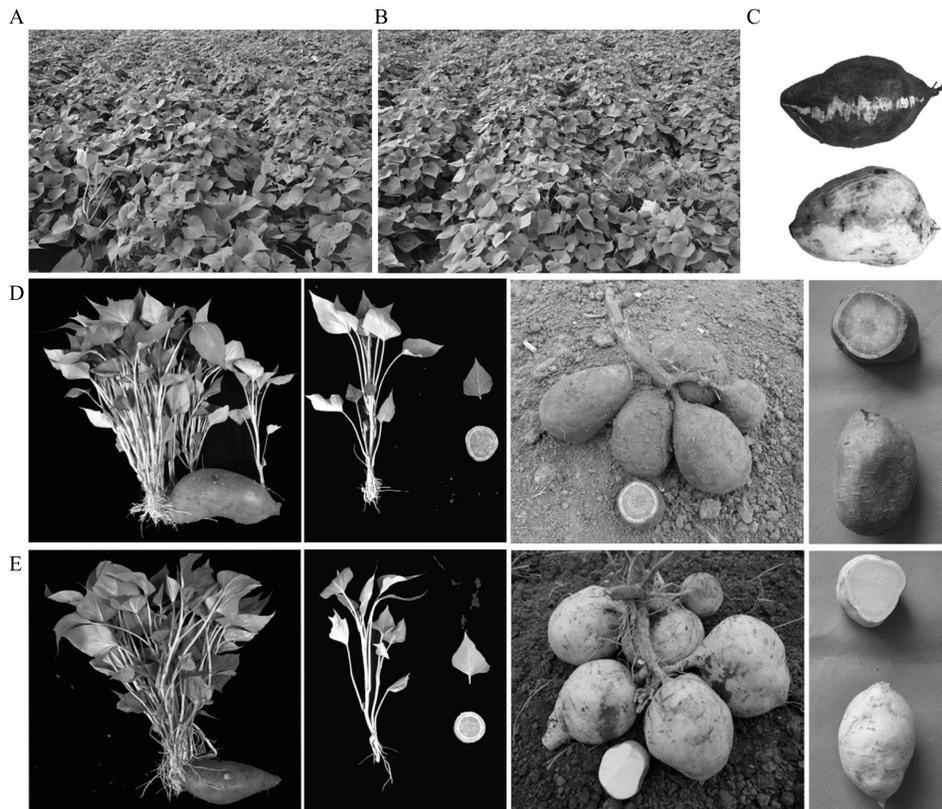
1.9 Western blot

Western blot 试验参照 Liu 等^[32]的方法。在蛋白质样品中加入 1/4 体积的蛋白质上样缓冲液,用沸水浴变性 10 min,再进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺含量为 5%~12%。1 h 后,将电泳胶和用乙醇活化的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜在转印液中浸泡 10 min,然后用半干转印槽将蛋白质从胶转印到 PVDF 膜(Millipore)上。用 5% 脱脂乳在摇床上常温孵育 1.5 h。初级抗体在 4 ℃摇床上进行过夜孵育,初级抗体使用 anti-H3K9me2 (PTM-615)、anti-H3K27me2 (PTM-5312)和 anti-Kac(PTM-102),以 anti-H3 作为内参对照。用 1×TBST 清洗 3 次,每次 10 min,用对应抗原的二抗孵育 1.5 h,再用 1×TBST 清洗 3 次,每次 10 min,最后添加化学发光液进行机器曝光处理。

2 结果与分析

2.1 宁紫薯 4 号及其突变体的表型和理化特性分析

在多年种植宁紫薯 4 号的过程中,试验人员常发现其薯块发生突变,这些突变体有的表现为薯块由紫皮紫心完全突变成白皮黄心,有的表现为薯块只有极小部分区域发生突变,但是最终宁紫薯 4 号的突变体经过育苗阶段后都能形成 1 个可以稳定遗传的新品种苏薯 38(W4)(图 1)。对生长 110 d 的宁紫薯 4 号(NY4)及其突变体(W4)的田间表型进行了调查,表 2 结果显示,NY4、W4 的地上部表型基本一致,如叶片都呈心形且带齿、成熟叶片的叶色为绿色等,不同之处只有 W4 的顶叶颜色由紫色变成了绿色。此外,与产量相关的性状也没有发生显著变化,包括薯型(纺锤形)、单株结薯数(4~5 个)等。但是与 NY4 相比,W4 的薯皮颜色由紫红色变成了白色,薯肉颜色由紫色变成了黄色。



A: 甘薯苗封垄期 NY4 地上部分的田间表型;B: 甘薯苗封垄期 W4 地上部分的田间表型;C: 甘薯收获期间 NY4 在田间的突变体类型;D: 不同阶段 NY4 的表型(从左到右依次是育苗期整株甘薯、育苗期种苗与种薯切面、收获阶段的整株甘薯、单个甘薯块根及其切面);E: 不同阶段 W4 的表型(从左到右依次是育苗期整株甘薯、育苗期种苗与种薯切面、收获阶段整株甘薯、单个甘薯块根及其切面)。

图 1 宁紫薯 4 号(NY4)及其突变体 W4 的田间表型

Fig.1 The field phenotypes of Ningzishu 4 (NY4) and its mutant W4

表 2 宁紫薯 4 号(NY4)及其突变体 W4 的性状调查

Table 2 Investigation of characters of Ningzishu 4 (NY4) and its mutant W4

品种	叶型	顶叶色	完全叶叶色	薯皮颜色	薯肉颜色	产量(kg/hm ²)
NY4	心形,带齿	紫色	绿色	紫红色	紫色	3 465.5±13.6
W4	心形,带齿	绿色	绿色	白色	黄色	3 450.4±10.3

为了进一步了解 NY4、W4 品质成分的差异,对 NY4、W4 的花青素含量、 β -胡萝卜素含量、淀粉含量及可溶性糖含量等进行了检测。表 3 显示,NY4、W4 的干物质含量没有显著差异,但是 W4 的花青素含量较 NY4 极显著降低($P < 0.01$),由 NY4 的 207.2 mg/kg 变成 16.8 mg/kg; W4 的 β -胡萝卜素含

量较 NY4 极显著升高($P < 0.01$),从 40.0 mg/kg 提升到 60.0 mg/kg;与 W4 相比,NY4 突变体的淀粉含量、可溶性糖含量极显著提高($P < 0.01$),直链淀粉含量显著提高($P < 0.05$),而支链淀粉的含量没有显著改变。上述结果表明,突变体的形成主要与花青素合成及淀粉合成相关。

表 3 宁紫薯 4 号(NY4)及其突变体 W4 的理化特性

Table 3 Physicochemical properties of Ningzishu 4 (NY4) and its mutant W4

品种	干物质含量 (%)	花青素含量 (mg/kg)	β -胡萝卜素含量 (mg/kg)	淀粉含量 (%)	直链淀粉含量 (%)	支链淀粉含量 (%)	可溶性糖含量 (%)
NY4	28.98	207.2±3.0	40.0±1.0	54.1±0.3	24.2±0.7	30.30±0.20	13.2±0.6
W4	28.50	16.8±0.2**	60.0±1.0**	60.5±0.5**	28.5±0.6*	31.90±0.40	19.9±0.6**

*、** 分别表示 W4 与 NY4 相比差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。

2.2 宁紫薯 4 号及其突变体的转录组分析

为了进一步分析 NY4 突变的机制,对 NY4、W4 的薯块进行转录组分析。结果显示,各样品组装(Mapping)到参考基因组上的序列片段(Read)比例均大于 70.00%,且有效数据(Clean data)质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比均不小于 93.31%,表明本次测序数据的质量良好。选择部分基因进行实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)的验证,验证结果与转录组数据相符(图 2A),可以用于进一步分析。

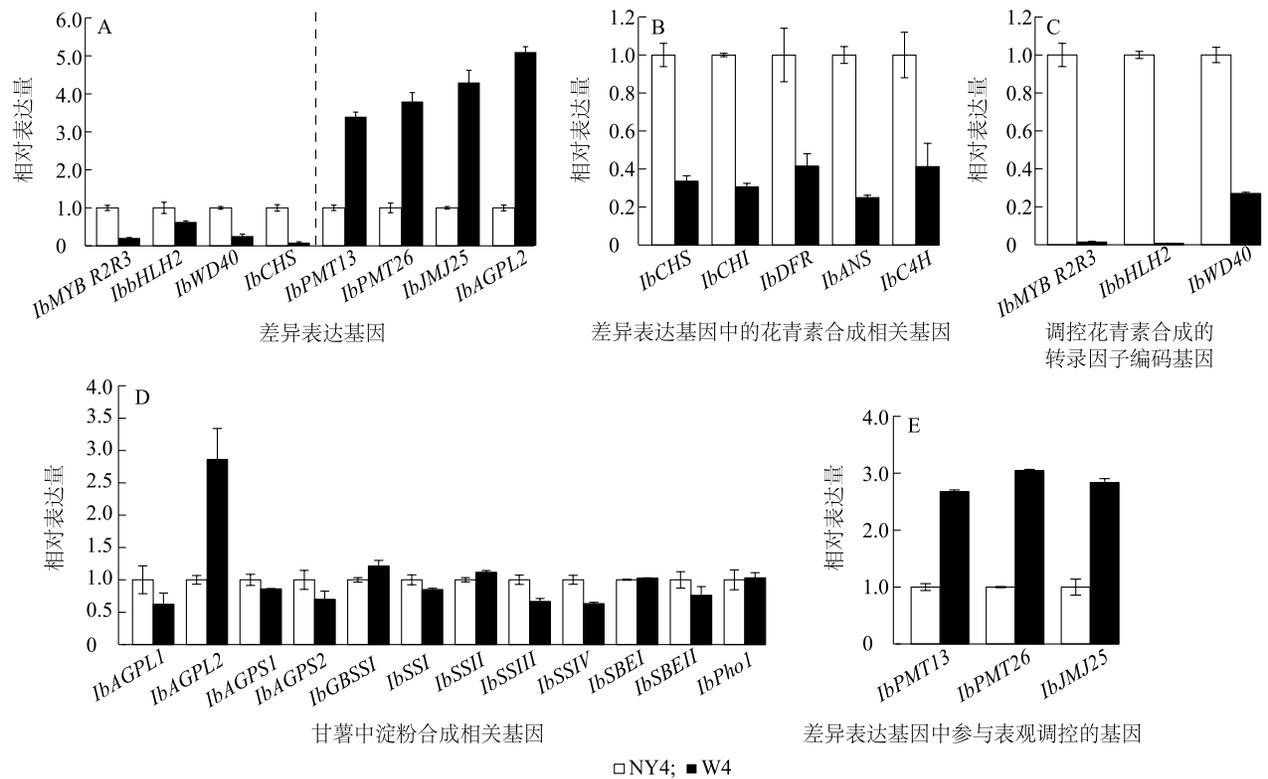
转录组测序共发现 313 个差异表达基因,其中 175 个表达量上调,138 个表达量下调。理化特性分析结果显示,W4 的淀粉含量、直链淀粉含量均较 NY4 显著或极显著提高,而花青素的含量降低到 16.8 mg/kg。因此,我们重点关注花青素合成相关基因及淀粉合成通路上的相关基因。

转录组数据显示,花青素合成相关基因 *IbCHS*、*IbCHI*、*IbDFR*、*IbANS* 及 *IbC4H* 的相对表达量在 W4 中都较 NY4 中明显降低(图 2B),参与花青素合成调控的转录因子编码基因 *IbMYB R2R3*、*IbbHLH2* 和 *IbWD40* 的相对表达量也较 NY4 明显降低,尤其是 *IbMYB R2R3*(图 2C)。由此推测,紫薯突变可能是由于上述转录因子的表达受到抑制,从而影响了花

青素的合成。在 12 个参与淀粉合成的相关基因中,*IbAGPL2* 的相对表达量明显提高(图 2D)。值得注意的是,在差异表达基因中,共发现 3 个参与蛋白质甲基化修饰的基因,它们分别是磷酸乙醇胺 *N*-甲基转移酶 *IbPMT13*、*IbPMT26* 以及组蛋白去甲基化酶 *IbJM25*(图 2E)。综上,推测 NY4 的突变可能由于表观修饰的变化影响了相关转录因子的表达,进而影响了花青素、淀粉的合成。

2.3 宁紫薯 4 号及其突变体 DNA 甲基化水平的变化

为了进一步分析 NY4 的突变与表观修饰的关系,对 NY4、W4 的 DNA 甲基化水平进行分析。通过 6mA 斑点印迹对 NY4、W4 的全基因组甲基化情况进行分析。结果显示,突变体 W4 的 DNA 甲基化水平与 NY4 相比明显提高(图 3A)。此外,我们在转录组数据中发现 1 个功能预测为 DNA 甲基转移酶的基因 *IbCMT2*,该基因在 W4 中的相对表达量与 NY4 相比也明显提高,通过实时荧光定量逆转录 PCR 进一步验证了这一结果(图 3B)。通过对该基因进行结构域分析,发现其具有完整的 DNA 甲基转移酶结构域(图 3C)。同源进化树分析结果表明,该基因与辣椒中已知功能的 DNA 甲基转移酶 *CaCMT3* 的同源关系较近(图 3D),表明 *IbCMT2* 在甘薯中可能也具有 DNA 甲基转移酶的功能。



A: 对部分差异表达基因进行实时荧光定量逆转录 PCR 验证的结果,内参基因为 *IbTublin*; B: NY4 与 W4 中参与花青素合成相关差异表达基因的相对表达量; C: NY4 与 W4 中参与花青素合成调控的转录因子编码基因的相对表达量; D: NY4 与 W4 中参与淀粉合成相关基因的相对表达量; E: NY4 与 W4 中有关调控蛋白质甲基化修饰基因的相对表达量。在 B、C、D、E 图中,将转录组数据中 NY4 基因的表达量设为 1.0,计算相对表达量。

图 2 转录组数据中部分差异表达基因及其实时荧光定量逆转录 PCR 验证

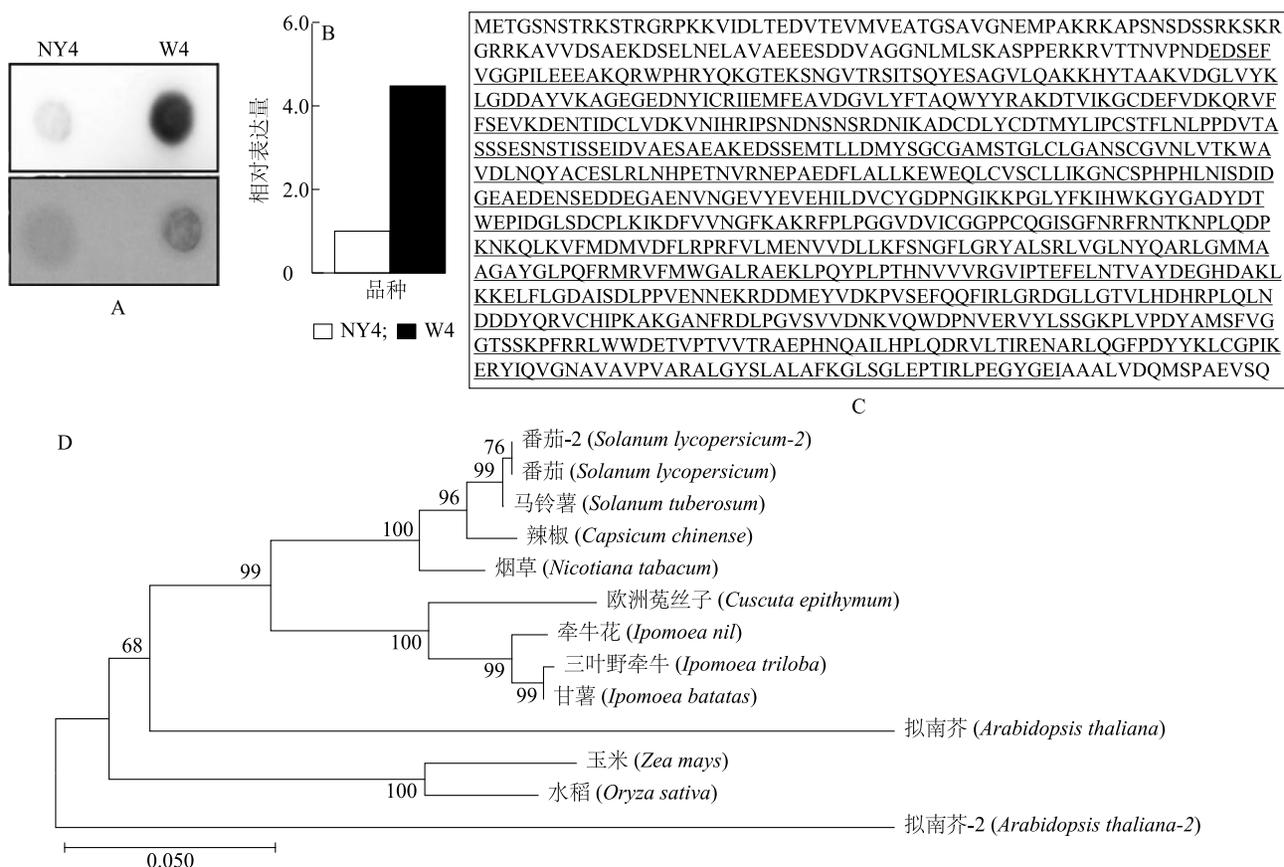
Fig.2 Some differentially expressed genes in the transcriptome data and their validation by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

DNA 甲基转移酶可以促进 DNA 甲基化,从而影响基因的表达。而在本研究中,W4 中的全基因组的甲基化水平以及 *IbCMT2* 的相对表达量都比 NY4 要高。*MYB*、*bHLH2* 和 *WD40* 是调控花青素合成的主要转录因子,这些转录因子编码基因在突变体 W4 中的相对表达量与 NY4 相比明显降低。因此,推测这些转录因子编码基因相对表达量的降低是导致花青素合成受到抑制,最终使薯肉颜色由紫色变为黄色的主要原因。转录因子相对表达量的降低可能与 DNA 甲基化有关,因此进一步通过 MethPrimer 网站分析 *IbMYB R2R3*、*IbbHLH2* 的基因组序列,发现这 2 个基因中存在 CpG 岛,且主要分布在外显子区域(图 4A、图 4B)。分别选取 *IbMYB R2R3*、*IbbHLH2* 的某一段含有 CpG 岛的序列(CpG-m 和 CpG-b)进行亚硫酸氢盐处理后测序法(BSP)分析。结果显示,NY4 的 2 段序列上均未发生甲基

化,而突变体 W4 的 CpG-m 上发生了一定程度的甲基化,CpG-b 上未发生甲基化(图 4C、图 4D)。这一结果暗示,由于调控花青素合成的转录因子 *IbMYB* 的编码基因组序列发生甲基化,导致相对表达量降低、花青素合成受到抑制,进而导致突变。

2.4 宁紫薯 4 号及其突变体组蛋白修饰水平的变化

前人研究发现,组蛋白去甲基化酶 *JMJ25* 通过改变组蛋白甲基化水平、DNA 甲基化程度来影响 *MYB* 基因的表达,从而调控花青素的合成^[24]。而在本研究中,转录组分析结果显示,W4 中功能预测为组蛋白去甲基化酶的基因 *IbJM25* 相对表达量与 NY4 相比明显提高(图 2E)。同源进化树分析发现,*IbJM25* 与马铃薯(*Solanum tuberosum*)的 *JMJ25* 同源关系较近。对该基因进行表达量分析和结构分析发现,其在花、茎、叶和薯块中均有表达,且该基因



A: N6-甲基腺嘌呤斑点印迹(6mA)分析宁紫薯4号(NY4)及其突变体W4全基因组的甲基化变化结果;B:实时荧光定量逆转录PCR在NY4、W4中验证 *IbCMT2* 相对表达量的结果(内参基因为 *IbTublin*);C: *IbCMT2* 的蛋白质序列(下划线标注部分为DNA甲基转移酶结构域);D: *IbCMT2* 的同源进化树分析结果。

图3 NY4突变与DNA甲基化变化的关系

Fig.3 The relationship between NY4 mutation and DNA methylation changes

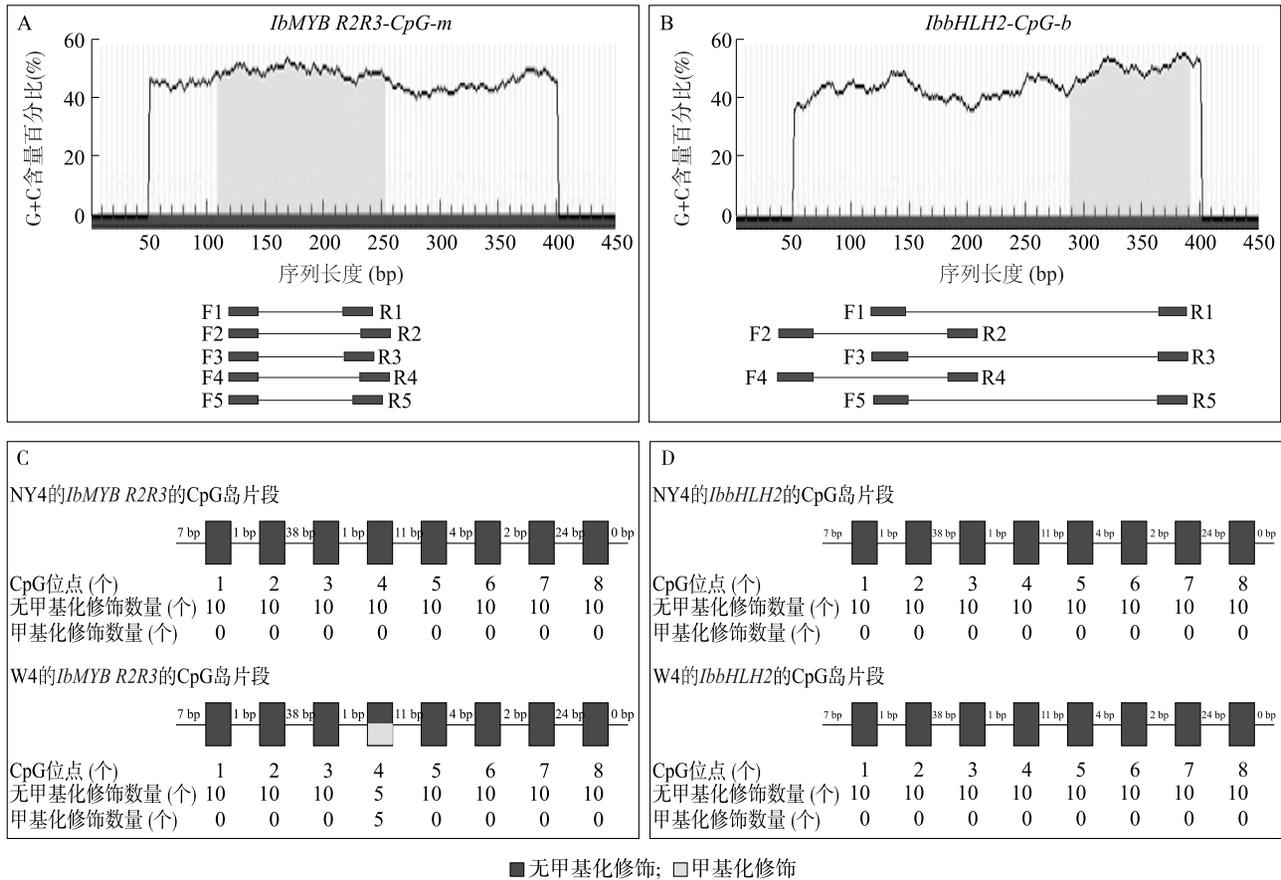
编码的蛋白质序列具有保守的组蛋白去甲基化酶结构域(Lysine-specific demethylase domain)。组蛋白去甲基化酶的JMJ家族通常调控组蛋白H3上K9、K27的甲基化修饰。因此,本研究通过H3K9me₂、H3K27me₂的抗体进行蛋白质印迹分析,图5显示,突变体W4中H3K9me₂、H3K27me₂的修饰水平较NY4明显降低,表明 *IbJMJ25* 可能具有组蛋白去甲基化酶的功能。组蛋白乙酰化修饰通常具有促进基因表达的功能,而通过赖氨酸乙酰化的泛素化抗体进行分析发现,H3上的乙酰化修饰水平提高,推测差异表达基因中相对表达量上调的基因可能是受到乙酰化修饰影响的。

3 讨论

甘薯是世界卫生组织推荐的健康食品,其营养均衡且丰富,可以为人体提供碳水化合物、纤维、β-

胡萝卜素、硫胺素、核黄素、烟酸、矿物质、维生素A、维生素C以及优质蛋白质^[33]。花青素是紫色甘薯中具有营养价值的成分之一,而可溶性糖与淀粉的合成代谢是决定鲜食型甘薯食味品质较为关键的2个因素^[34-38]。在本研究中,NY4突变后会使花青素合成受到抑制,而使淀粉含量、可溶性糖含量明显提高。紫色甘薯的甜度往往不够高,甚至有苦味,如果能了解并掌握紫色甘薯突变的机制,将有望在不降低其花青素含量的基础上,提高可溶性糖含量,进一步提高紫色甘薯的品质。

目前,有关DNA甲基化影响花青素合成的报道有很多。DNA甲基化通过影响花青素合成基因及相关转录因子的表达,从而调控花青素的合成。例如,影响牡丹花花青素合成的基因 *PrANS*、*PrF3H*^[15],甜橙中参与花青素合成的基因 *DFR* 和转录因子编码基因 *Ruby* (*MYB-R2R3*)^[39],以及海棠的



A:使用 MethPrimer 网站分析 *IbMYB R2R3* 的 CpG 岛序列 *CpG-m* (144 bp), 并设计 BSP 测序引物;B:使用 MethPrimer 网站分析 *IbbHLH2* 的 CpG 岛序列 *CpG-b* (104 bp), 并设计 BSP 测序引物;C:使用 MethPrimer 网站分析 *IbMYB R2R3* 的 CpG 岛序列 *CpG-m* (144 bp) 的 BSP 测序结果;D:使用 MethPrimer 网站分析 *IbbHLH2* 的 CpG 岛序列 *CpG-b* (104 bp) 的 BSP 测序结果。引物序列见表 1。

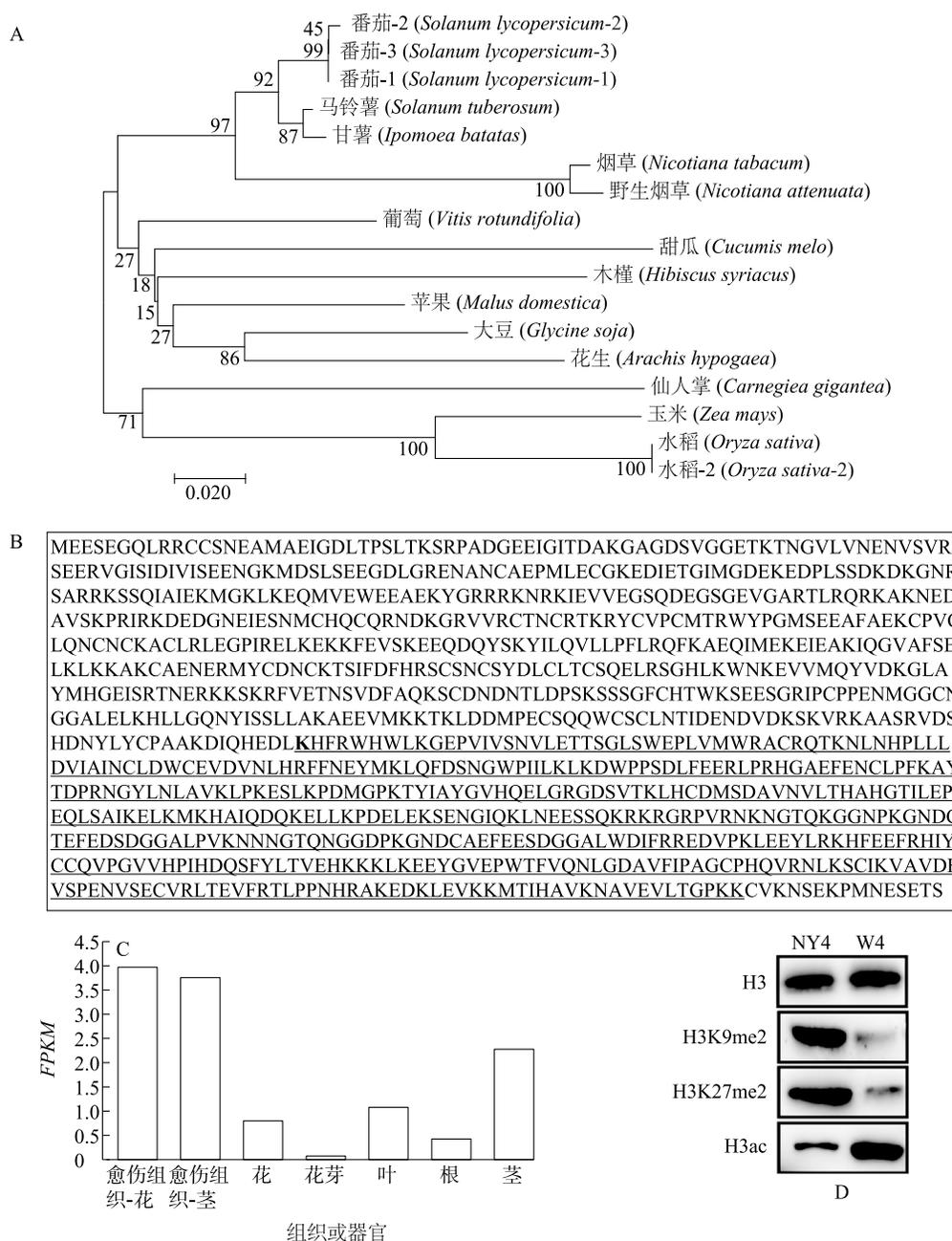
图 4 亚硫酸氢盐处理后测序法 (BSP) 分析 *IbMYB R2R3* 和 *IbbHLH2* 某一段 CPG 岛序列的 DNA 甲基化变化

Fig.4 DNA methylation changes of CPG island sequences of *IbMYB R2R3* and *IbbHLH2* analyzed by bisulfite sequencing (BSP)

转录因子编码 *McMYB10*^[40], 这些基因启动子区域的甲基化水平降低, 基因表达量升高, 最终引起花青素含量增高。然而, 苹果中的转录因子编码基因 *MdMYB10*^[20]、欧洲梨的转录因子编码基因 *PcMYB10*^[41] 和露地菊的转录因子编码基因 *CmMYB6*^[42] 启动子区域的甲基化水平升高, 基因表达量降低, 使得花青素合成受到抑制。本研究通过转录组测序发现, 突变体中 3 个参与花青素合成的转录因子编码基因 (*IbMYB R2R3*、*IbbHLH2* 和 *IbWD40*) 的相对表达量较 NY4 升高, 尤其是 *IbMYB R2R3*, 因此我们进一步分析基因 *IbMYB R2R3* 上的甲基化水平。然而受甘薯测序条件的影响, 我们没有获得 *IbMYB R2R3* 完整的启动子序列, 因此分析了基因的 body 区域。BSP 的结果显示, *IbMYB R2R3* 的基因 body 区域甲基化水平提高, 而基因的 body

区域发生甲基化也会导致基因的表达量受到抑制。此外, W4 中功能预测为 DNA 甲基转移酶的 *IbCMT2* 基因的相对表达量上升。对 NY4、W4 进行全基因组甲基化水平分析发现, W4 的甲基化水平明显提高。根据上述结果, 我们推测紫色甘薯的突变是由于 *IbMYB R2R3* 的表达受到 DNA 甲基化的影响, 导致花青素合成受到抑制, 最终形成黄心品种。有趣的是, 块根类作物红肉萝卜^[43]、块茎类作物马铃薯^[44] 在种植过程过也出现了因为花青素合成被抑制而产生的突变。此外有研究发现, 红肉萝卜突变成白肉品系是由于基因 *RsMYB1* 的启动子区域发生 DNA 甲基化, 使得基因表达被抑制, 进而影响花青素合成^[43]。上述研究结果与笔者的猜想不谋而合。

紫薯的突变也可能是组蛋白修饰造成的。前人研究发现, 拟南芥在光或细胞分裂素的诱导下,



A: *IbJM25* 基因的同源进化树分析结果; B: *IbJM25* 的蛋白质序列, 加下划线的区域为组蛋白去甲基化酶结构域序列(Lysine-specific demethylase domain); C: Sweetpotato GARDEN 中 *IbJM25* 在各组分中的每百万映射片段的外显子模型的外显子模型的每千碱基片段数 (FPKM); D: 通过蛋白质印迹分析 H3K9me2、H3K27me2 以及 H3ac 修饰水平在 NY4 与 W4 之间的变化, 组蛋白 H3 为内参蛋白。

图 5 NY4 突变与组蛋白修饰水平变化的关系分析

Fig.5 Analysis of the relationship between NY4 mutation and changes in histone modification levels

H3K9ac 的修饰水平降低, 花青素的合成被促进^[22]; 在强光照和干旱胁迫下, H3K4me3 的修饰水平升高, 花青素合成也能被促进^[21]。脱袋处理后, 苹果的 H3K4me3 的修饰水平提高, H3K27me3 的修饰水平降低, *MdMYB1-2/3* 的相对表达量上升, 花青素合

成被促进^[45]。在差异表达基因中, 我们发现了 1 个功能预测为组蛋白去甲基化酶的基因 *JMJ25*, 通过 SWISS MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 分析发现, 该基因具有组蛋白去甲基化酶结构域。拟南芥中同样具有该结构域的基因

IBM1,通过改变 H3K9 上的甲基化水平进而调控花青素的积累^[46]。而在本研究中,W4 的 *IbJMJ25* 相对表达量较 NY4 提高,W4 的 H3K9、H3K27 上的二甲基化修饰水平较 NY4 明显降低,W4 的 H3 上的乙酰化修饰水平较 NY4 提高。上述结果表明,组蛋白修饰可能也参与紫薯突变。组蛋白去甲基化酶基因 *IbJMJ25* 的高表达降低了 H3K9me2、H3K27me2 的修饰水平,导致花青素合成被抑制。Fan 等^[24] 的研究也发现,杨树中的 *JMJ25* 通过改变 H3K9me2 的修饰水平和 DNA 甲基化的修饰程度来调控转录因子编码基因 *MYB182* 的表达,从而抑制花青素的合成。

除花青素外,突变体 W4 中的淀粉、可溶性糖含量较 NY4 极显著增加,并且淀粉合成关键基因 *AG-PL2* 的相对表达量明显提高。莲子中的 *AGPL2* 被发现对淀粉、直链淀粉含量具有重要的调控作用^[47]。本研究中 *AGPL2* 基因相对表达量的提高有 2 个假设,一是花青素的合成与淀粉、可溶性糖合成之间存在拮抗作用,即当花青素合成受到抑制时,淀粉、可溶性糖的合成就会被促进;二是当组蛋白 H3 上的乙酰化修饰水平提高时,由于乙酰化修饰往往能够促进基因表达,因此推测 *AGPL2* 的表达受到乙酰化修饰的促进作用。综上所述,突变体的产生可能是由表观修饰的变化引起的,但是引起表观突变的具体条件及产生突变体的机制仍需要进一步探究,尤其是 DNA 甲基转移酶编码基因 *IbCMT2* 和组蛋白去甲基化酶编码基因 *IbJMJ25* 在甘薯中的功能有待进一步验证。研究甘薯 DNA 甲基化修饰对甘薯育种、品种改良具有重要意义,如果能够明确紫色甘薯突变成黄心品种的机制,掌握表观调控对花青素合成、淀粉合成及可溶性糖含量的影响,我们就能通过改变外界条件或者基因编辑的手段对甘薯进行定向育种,这不仅能够大大提高甘薯的育种效率,同时也能为其他无性繁殖的作物或块根类作物的育种工作提供新思路。

4 结论

本研究通过表型组学分析,检测到宁紫薯 4 号突变体中花青素含量、 β -胡萝卜素含量、可溶性糖含量及淀粉含量等指标较宁紫薯 4 号发生了明显变化。转录组测序结果显示,共有 313 个差异表达基因,其中包括参与花青素合成、转录因子合成、淀粉

合成的相关基因及 2 个可能参与表观调控的基因 (*IbCMT2* 和 *IbJMJ25*)。进一步研究发现,突变体中的 DNA 甲基化水平明显提高,而组蛋白 H3K9、H3K27 上的甲基化修饰程度明显降低,由此推测,紫薯的高频突变是由于表观修饰的变化影响了花青素、淀粉的合成。

参考文献:

- [1] ALAM M K. A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): revisiting the associated health benefits[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 115: 512-529.
- [2] ZHANG X, YANG Y, WU Z F, et al. The modulatory effect of anthocyanins from purple sweet potato on human intestinal microbiota *in vitro* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(12): 2582-2590.
- [3] YONG H M, WANG X C, SUN J, et al. Comparison of the structural characterization and physicochemical properties of starches from seven purple sweet potato varieties cultivated in China [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1632-1638.
- [4] TANG C, SUN J, ZHOU B, et al. Effects of polysaccharides from purple sweet potatoes on immune response and gut microbiota composition in normal and cyclophosphamide treated mice [J]. Food & Function, 2018, 9(2): 937-950.
- [5] TORRES A, NORIEGA L G, DELGADILLO-PUGA C, et al. Caffeoylquinic acid derivatives of purple sweet potato as modulators of mitochondrial function in mouse primary hepatocytes [J]. Molecules, 2021, 26(2): 319.
- [6] ZHOU L, ZHANG C Q, QIANG Y, et al. Anthocyanin from purple sweet potato attenuates lead-induced reproductive toxicity mediated by JNK signaling pathway in male mice [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 224: 112683.
- [7] DE AGUIAR CIPRIANO P, KIM H, FANG C, et al. *In vitro* digestion, absorption and biological activities of acylated anthocyanins from purple sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) [J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131076.
- [8] YANG Y, ZHANG Z C, ZHOU Q, et al. Hypouricemic effect in hyperuricemic mice and xanthine oxidase inhibitory mechanism of dietary anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 73: 104151.
- [9] YANG Y, ZHANG J L, SHEN L H, et al. Inhibition mechanism of diacylated anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) against α -amylase and α -glucosidase [J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129934.
- [10] LIU D, JI Y L, WANG K X, et al. Purple sweet potato anthocyanin extract regulates redox state related to gut microbiota homeostasis in obese mice [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(5): 2133-2146.

- [11] CAI Z, SONG L H, QIAN B J, et al. Understanding the effect of anthocyanins extracted from purple sweet potatoes on alcohol-induced liver injury in mice [J]. Food Chemistry, 2018, 245 : 463-470.
- [12] CUI D L, ZHAO S X, XU H N, et al. The interaction of MYB, bHLH and WD40 transcription factors in red pear (*Pyrus pyrifolia*) peel [J]. Plant Molecular Biology, 2021, 106(4/5) : 407-417.
- [13] YAMAGISHI M, TODA S, TASAKI K. The novel allele of the *Lh-MYB12* gene is involved in splatter-type spot formation on the flower tepals of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) [J]. The New Phytologist, 2014, 201(3) : 1009-1020.
- [14] LI X L, XUE C, LI J M, et al. Genome-wide identification, evolution and functional divergence of MYB transcription factors in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. Plant & Cell Physiology, 2016, 57(4) : 824-847.
- [15] ZHU J, WANG Y Z, WANG Q Y, et al. The combination of DNA methylation and positive regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB and bHLH transcription factors contributes to the petal blotch formation in Xibei tree peony [J]. Horticulture Research, 2023, 10(6) : uhad100.
- [16] RAUSHER M D, MILLER R E, TIFFIN P. Patterns of evolutionary rate variation among genes of the anthocyanin biosynthetic pathway [J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16(2) : 266-274.
- [17] CHEN J B, SHU Y C, CHEN Y H, et al. Evaluation of antioxidant capacity and gut microbiota modulatory effects of different kinds of berries [J]. Antioxidants, 2022, 11(5) : 1020.
- [18] HARVEY MILLAR A, HEAZLEWOOD J L, GIGLIONE C, et al. The scope, functions, and dynamics of posttranslational protein modifications [J]. Annual Review of Plant Biology, 2019, 70 : 119-151.
- [19] MA K F, ZHANG Q X, CHENG T R, et al. Substantial epigenetic variation causing flower color chimerism in the ornamental tree *Prunus mume* revealed by single base resolution methylome detection and transcriptome sequencing [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8) : 2315.
- [20] EL-SHARKAWY I, LIANG D, XU K N. Transcriptome analysis of an apple (*Malus × domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(22) : 7359-7376.
- [21] CAI H Y, ZHANG M, CHAI M N, et al. Epigenetic regulation of anthocyanin biosynthesis by an antagonistic interaction between H2A.Z and H3K4me3 [J]. New Phytologist, 2019, 221(1) : 295-308.
- [22] NGUYEN N H, JEONG C Y, KANG G H, et al. MYBD employed by HY5 increases anthocyanin accumulation via repression of MYB12 in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2015, 84(6) : 1192-1205.
- [23] CHARRON J F, HE H, ELLING A A, et al. Dynamic landscapes of four histone modifications during deetiolation in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2009, 21(12) : 3732-3748.
- [24] FAN D, WANG X Q, TANG X F, et al. Histone H3K9 demethylase *JMJ25* epigenetically modulates anthocyanin biosynthesis in poplar [J]. The Plant Journal, 2018, 96(6) : 1121-1136.
- [25] 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.
- [26] 雷 艳, 汤琳菲, 董 文, 等. 紫甘薯与黄肉突变体生物学特征及块根品质的比较分析 [J]. 湖南农业科学, 2022(2) : 5-9.
- [27] DONG W, TANG L F, PENG Y L, et al. Comparative transcriptome analysis of purple-fleshed sweet potato and its yellow-fleshed mutant provides insight into the transcription factors involved in anthocyanin biosynthesis in tuberous root [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13 : 924379.
- [28] ZHENG X G, CHEN L, XIA H, et al. Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition [J]. Scientific Reports, 2017, 7 : 39843.
- [29] GUO K, BIAN X F, JIA Z D, et al. Effects of nitrogen level on structural and functional properties of starches from different colored-fleshed root tubers of sweet potato [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164 : 3235-3242.
- [30] WANG S, WANG H Y, XU Z H, et al. m6A mRNA modification promotes chilling tolerance and modulates gene translation efficiency in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2023, 192(2) : 1466-1482.
- [31] MILNE L, XU Y, PERRIN D M, et al. An approach to gene-specific transcription inhibition using oligonucleotides complementary to the template strand of the open complex [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(7) : 3136-3141.
- [32] LIU S, XUE C, FANG Y, et al. Global involvement of lysine crotonylation in protein modification and transcription regulation in rice [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2018, 17(10) : 1922-1936.
- [33] EL SHEIKHA A F, RAY R C. Potential impacts of bioprocessing of sweet potato: review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(3) : 455-471.
- [34] 蒋汉蓉, 贺立红, 王 玲, 等. 常温下不同包装方式对甘薯抑芽作用及品质的影响 [J]. 南方农业学报, 2024, 55(6) : 1744-1752.
- [35] 侯 会, 苏 涵, 王 维, 等. 外源施用 6-磷酸海藻糖生物制剂对甘薯营养品质和产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2024, 52(18) : 105-113.
- [36] 秦广利, 陈玉琴, 崔保伟. 长期添加外源不同有机物对土壤性状和甘薯产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51(17) : 98-104.
- [37] 李永鹏, 龚凡婷, 冉腾飞, 等. 遮荫及复光对不同类型甘薯产量形成和糖类物质的影响 [J]. 南方农业学报, 2024, 55(11) : 3242-3254.

- [38] 许仙菊,姜晓蕊,陈丹艳,等. 耐连作甘薯品种的筛选及薯块氮、磷、钾营养状况分析[J]. 江苏农业学报,2023,39(3):657-664.
- [39] SICILIA A, SCIALÒ E, PUGLISI I, et al. Anthocyanin biosynthesis and DNA methylation dynamics in sweet orange fruit [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)] under cold stress[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2020,68(26):7024-7031.
- [40] PENG Z, TIAN J, LUO R L, et al. MiR399d and epigenetic modification comodule anthocyanin accumulation in *Malus* leaves suffering from phosphorus deficiency[J]. Plant, Cell & Environment, 2020,43(5):1148-1159.
- [41] WANG Z G, MENG D, WANG A D, et al. The methylation of the PcMYB10 promoter is associated with green-skinned sport in Max Red Bartlett pear[J]. Plant Physiology,2013,162(2):885-896.
- [42] TANG M W, XUE W J, LI X Q, et al. Mitotically heritable epigenetic modifications of CmMYB6 control anthocyanin biosynthesis in *Chrysanthemum*[J]. New Phytologist,2022,236(3):1075-1088.
- [43] WANG Q B, WANG Y P, SUN H H, et al. Transposon-induced methylation of the RsMYB1 promoter disturbs anthocyanin accumulation in red-fleshed radish[J]. Journal of Experimental Botany,2020,71(9):2537-2550.
- [44] D'AMELIA V, VILLANO C, BATELLI G, et al. Genetic and epigenetic dynamics affecting anthocyanin biosynthesis in potato cell culture[J]. Plant Science,2020,298:110597.
- [45] BAI S L, TUAN P A, SAITO T, et al. Epigenetic regulation of MdMYB1 is associated with paper bagging-induced red pigmentation of apples[J]. Planta,2016,244(3):573-586.
- [46] FAN D, WANG X Q, LIU T T, et al. Epigenetic regulation of high light-induced anthocyanin biosynthesis by histone demethylase *IBM1* in *Arabidopsis* [J]. New Phytologist, 2024, 242 (6) : 2570-2585.
- [47] SUN H, LI J J, SONG H Y, et al. Comprehensive analysis of *AG-Case* genes uncovers their potential roles in starch biosynthesis in *Lotus* seed[J]. BMC Plant Biology,2020,20(1):457.

(责任编辑:徐 艳)