

花生花青素合成相关基因的表达与种皮颜色关系

李海芬, 邱金梅[§], 陈小平, 洪彦彬, 梁炫强^{*}
(广东省农业科学院作物研究所, 广东省农作物遗传改良重点实验室, 广东 广州, 510640)

摘要:为了探讨花青素合成相关基因表达与种皮颜色的关系, 本文采用 HPLC 和实时荧光定量 PCR 技术, 分析 4 种不同种皮颜色的花生品种种皮花青素的种类和含量, 以及花青素合成相关基因在 4 个品种 5 个荚果发育关键时期的差异表达。结果表明: 花生种皮的花青素主要由飞燕草色素、矢车菊色素和天竺葵色素等三种色素组成; 花生种皮的外观颜色和深浅主要由飞燕草色素和矢车菊色素含量决定, 飞燕草色素和矢车菊色素含量越高, 种皮颜色越深。花青素合成相关基因主要在种子充实期(开花后约 40 ~ 50d)上调表达。花生种皮颜色的深浅与查耳酮合成酶基因(*CHS*)、查耳酮异构酶基因(*CHI*)、二氢黄酮醇 4-还原酶基因(*DFR*)、类黄酮-3'羟化酶基因(*F3'H*)和花色苷合成酶基因(*ANS*)等基因在种子充实期高表达显著相关。上述 5 个基因表达量愈高, 种皮颜色愈深。

关键词:花生品种; 种皮颜色; 花青素合成; 相关基因; 差异表达
中图分类号: S565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2017)05-0600-06

Differential expression of genes associated with anthocyanin synthesis in peanut cultivars with different testa color

LI Hai-fen, QIU Jin-mei[§], CHEN Xiao-ping, HONG Yan-bin, LIANG Xuan-qiang^{*}
(Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of Crops Genetics and Improvement, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The synthesis and accumulation of anthocyanin is related to testa color of peanut cultivars. To reveal the relationship between testa color and expression patterns of genes associated with anthocyanin synthesis in peanut, four peanut cultivars with different testa colors were selected to characterize the anthocyanin composition and expression patterns of seven genes (*PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *3GT*) related to the bio-synthesis of anthocyanin at 5 pod developmental stages, by HPLC and real-time quantitative PCR. The results showed that anthocyanin in peanut testa was consisted of delphinidin, cyanidin and pelargonidin. The color of peanut testa had positively correlation with the content of three pigmentations. The color of peanut testa was significantly correlation with high expression levels of chalcone synthase (*CHS*), chalcone isomerase (*CHI*), dihydroflavonol-4 reductase (*DFR*), flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) and anthocyanidin synthase (*ANS*) during the seed filling stage (40 – 50d after flowering).

Key words: peanut; testa color; isoflavone synthesis; related genes; differential expression

花青素广泛存在于植物的花、果实、种子或茎叶中,使其产生蓝色、紫色、红色和橙色等不同的颜色,帮助植物吸引传粉昆虫,防止植物免受紫外线损伤和病原体攻击^[1,2]。此外,花青素属黄酮类物质,具有高效的抗氧化活性,能提高视力^[3],减少炎症^[4]、

老龄退化性疾病^[5,6]、心血管疾病^[7]和癌症^[5,6]等发生。自然界中已发现 400 多种花青素,其中高等植物中普遍存在的有 6 种^[2]。花青素生物合成代谢途径是类黄酮途径的一个分支途径,在模式植物拟南芥、玉米、矮牵牛等植物中已经被清楚地解析^[8],其

收稿日期:2017-05-10
基金项目:国家自然科学基金(31501246);广东省科技计划项目(2015B020231006;2015A020209051;2016B020201003)
作者简介:李海芬(1985-),助理研究员,硕士,花生遗传育种,E-mail: lihaifen@gdaas.cn
[§]邱金梅为共同第一作者
^{*}通讯作者:梁炫强(1964-),研究员,博士,花生遗传育种,E-mail: liangxuanqiang@gdaas.cn

合成途径包括苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*),查耳酮合成酶基因(*CHS*),查耳酮异构酶基因(*CHI*),二氢黄酮醇4-还原酶基因(*DFR*),类黄酮-3'羟化酶基因(*F3'H*),花色苷合成酶基因(*ANS*)和类黄酮3-O-糖基转移酶基因(*3GT*)等关键酶基因。

花生是重要的油料作物和经济作物,在我国广泛种植。花生种质资源丰富,目前已收集一万多份,从种皮颜色来分,有白色、粉红、红色、深紫(黑色)以及花色(二种以上颜色)等,生产上大面积种植的品种均为粉红或浅红色。近年来,随着花青素食用和保健功能被进一步认可,我国食用花生的比例逐年增加,消费者对富含花青素的保健型花生品种,特别是对花青素含量较高的红或黑色种皮花生品种的需求日益增加。但目前有关花生种皮颜色与花青素合成相关基因的表达关系尚缺乏系统的研究报道,影响了黑色种皮花生品种的育种进程。鉴于此,本文以4种不同种皮颜色的花生品种为材料,采用高效液相色谱(HPLC)和实时荧光定量PCR方法,检测不同颜色花生种皮的花青素成分,探讨花青素生物合成相关基因的表达与种皮颜色的关系,旨在为阐明花生种皮颜色着色机理,培育富含花青素花生品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

花生品种包括金花39(白色种皮,W)、粤油7号(粉红色种皮,Y)、珍珠红(深红色种皮,R)以及珍珠黑(深紫色种皮,B),试验材料在广东省农业科学院白云试验基地按常规方法种植,3次重复,5行区,按常规方法进行田间管理。

1.2 样品准备

在花生开花后观察荚果生长情况,并在荚果膨大期Ⅰ(开花后约20d,R1),荚果膨大期Ⅱ(开花后约30d,R2),种子充实期Ⅰ(开花后约40d,R3),种子充实期Ⅱ(开花后约50d,R3)和种子成熟期(开花后约65d,R5)等5个时期分别选取新鲜种子,迅速液氮冷冻,-80℃保存备用。每个品种按照3个重复区组,每个重复选取相同部位发育进程相同的种子3份。

1.3 种皮花青素含量测定

花生植株成熟后,分3次重复分别收获种子,晒干,剥取种皮,采用岛津LC-6A HPLC高效液相色谱仪进行花青素种类和含量测定。紫外检测器为SPD-6AV,色谱柱为迪马公司C18反相柱(5μm,4.6mm×150mm),流动相为0.5%磷酸:乙腈=

82:18,流速1mL/min;柱温35℃;进样量10μL;波长扫描范围为190~600nm,检测波长为520nm。以标样出峰时间和峰高叠加定性,外标法峰面积定量。

1.4 总RNA提取及cDNA合成

花生种子种皮总RNA参照Plant RNA kit(Omega Bio-Tek)操作指南进行提取,并经琼脂糖凝胶电泳检测质量和浓度,cDNA的合成参照Prime-Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)使用说明进行。

1.5 花生花青素代谢途径相关基因实时定量PCR分析

依据花青素代谢途径^[9],选取苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*)、查耳酮合成酶基因(*CHS*)、查耳酮异构酶基因(*CHI*)、二氢黄酮醇4-还原酶基因(*DFR*)、类黄酮-3'羟化酶基因(*F3'H*)、花色苷合成酶基因(*ANS*)和类黄酮3-O-糖基转移酶基因(*3GT*)为研究对象,分别设计上述基因实时荧光定量PCR引物(表1),并通过扩增目的基因及测序技术确定引物的正确性,以花生18S rRNA为内参基因,Primer 5设计的上下游引物为:F18S 5'-cagctcgcgttgactacgtc-3'/R18S 5'-cgaacacttcaccggaccat-3',扩增产物长度为81bp。引物由上海Invitrogen公司合成。实时定量PCR参照SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒(TaKaRa)和LightCycler 480 instrument(Roche)的使用说明进行操作。计算公式如下:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{sample}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{calibrator}}$$

$$\text{Calibrator Normalized Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

式中: Ct_{target} 和 Ct_{ref} 分别是目的基因和内参基因的Ct值。Sample和calibrator分别为处理组样品和对照组样品。

1.6 数据分析方法

采用Microsoft Excel 2010对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同种皮颜色花生品种花青素种类与含量HPLC分析

分别提取金花39、粤油7号、珍珠红和珍珠黑等4种不同颜色的花生种皮色素,经滤膜过滤后上样,HPLC检测显示,除金华39(白色种皮)外,其他3个品种在520nm波段处均检测到花青素类物质。根据参考标样的滞留时间可以看出,花生种皮的花青素主要是由飞燕草色素、矢车菊色素和天竺葵色素等三种色素组成(表2),而且种皮的颜色和深浅

主要是由飞燕草色素和矢车菊色素含量决定,种皮颜色越深,这两种色素含量越高。在检测的 4 个品种中,珍珠黑(B)的飞燕草色素含量显著高于珍珠红(R)、粤油 7 号(Y)和金花 39(W)。

表 1 目标基因实时定量 RT-PCR 引物
Table 1 Primers for RT-PCR of targeted genes in peanut

目的基因 Targeted gene	引物编号 Marked primers	引物序列 Sequence of primer
PAL	PAL-F	5'-GCTGTCCTTGTCTCGAGGTTCTTTCGG-3'
	PAL-R	5'-ATCTCATGCAACTTCTTGGCGGCTT-3'
CHS	CHS-F	5'-GGCTATTGGCACAGCAACACC-3'
	CHS-R	5'-TAAGTTCGGTCATGTGTGGCTG-3'
CHI	CHI-F	5'-CTCCACCACATTGGCATTCTCTA-3'
	CHI-R	5'-GGAGCACAGTATGGGGTTCAGA-3'
DFR	DFR-F	5'-TTGTTGGAGTGTGTTGACTTCTG-3'
	DFR-R	5'-AGGCTAGGTGGCATTGTGG-3'
F3'H	F3'H-F	5'-TGTTTGGAGTGGCTAGACCTTC-3'/F3'
	H-R	5'-TTTGTGGGATCTTCTTGTGCTC-3'
ANS	ANS-F	5'-TGTTAGTTCACTCACTTTCCTCCTC-3'
	ANS-R	5'-ACTTTGCTGTGATCCATTTGCC-3'
3GT	3GT-F	5'-TCCTCTGTCTTGGTCTCTTCAATG-3'
	3GT-R	5'-ATGGGTTATTAGCCCGATCTAGTG-3'

表 2 四个花生品种种皮花青素种类和含量
Table 2 Types and content of anthocyanidin in 4 peanut cultivars with different testa color/(μg/g)

品种 Cultivar	颜色 Color	飞燕草色素 Delphinidin	矢车菊色素 Cyanidin	天竺葵色素 Pelargonidin
金花 39 Jinhua 39	白色 W	-	-	0.018
粤油 7 号 Yueyou 7	粉红 Y	0.066 5	0.157	0.394
珍珠红 Zhenzhuhong	深红 R	16.917 0	1.094	0.330
珍珠黑 Zhenzhuhei	深紫 B	128.367 0	1.920	0.273

2.2 花青素合成途径相关基因差异表达分析

采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测所提取 RNA 质量。结果表明,提取 RNA 的 28S rRNA 与 18S rRNA 带型清晰,A₂₆₀/A₂₈₀ 介于 1.8~2.0,表明总 RNA 质量高,无降解。以纯化后的各时期种子总 RNA 为模板,采用反转录试剂盒获得 cDNA;利用花生内参基因 18S rRNA 引物进行 RT-PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带清晰,证明 cDNA 质量满足实时定量 PCR 要求。分别采用表 1 中的 7 对实时定量 PCR 引物进行扩增,获得合适大小目的条带,回收目的条带后进行测序分析,结果发现与所扩增的目的基因相应片段序列一致,证明上述引物可用于 7 个基因的实时定量 PCR 分析。

2.2.1 苯丙氨酸解氨酶基因(PAL)差异表达 实时荧光定量 PCR 分析 4 个不同种皮颜色花生品种在荚果发育的 5 个关键时期 PAL 的表达情况,结果表明:珍珠红(R)各个时期 PAL 表达量显著高于其它三种不同种皮颜色的花生品种在同时期的表达量(P<0.01),其表达模式与粤油 7 号(Y)相同,与珍珠黑(B)、金花 39(W)不同。但粤油 7 号、珍珠红和珍珠黑 3 个品种的 PAL 表达量都在 R3 期达到峰

值,随后回落。由此可以推测,R3 期可能是 PAL 积累的关键时期。可见 PAL 的表达可能与花生种皮花青素的形成存在一定关系,但 PAL 表达量与种皮颜色深浅之间的关系尚不能确定。

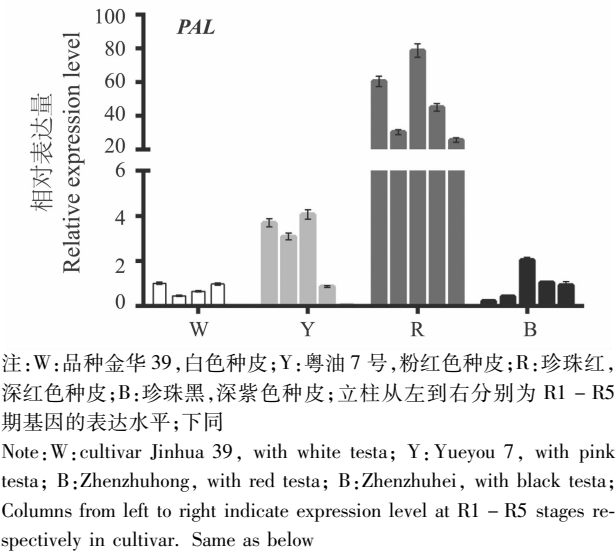


图 1 PAL 在 4 个不同种皮颜色花生品种中的差异表达分析
Fig. 1 Differential expression of PAL in 4 peanut cultivars with different testa color

2.2.2 查耳酮合成酶基因(CHS)差异表达 从图

2 可见,在种子发育过程中,金花 39 和粤油 7 号种皮中查耳酮合成酶基因(*CHS*)的表达量均较低,且无显著差别。珍珠红和珍珠黑的 *CHS* 基因在 R3、R4 期的表达量显著高于粤油 7 号和金花 39($P < 0.01$),差异至少达 30 倍,且表达量在 R1 - R4 逐渐增加,随后在 R5 期回落。故此推测,*CHS* 在花生种子发育的 R3、R4 期得到大量的表达,促进了花青素的合成。

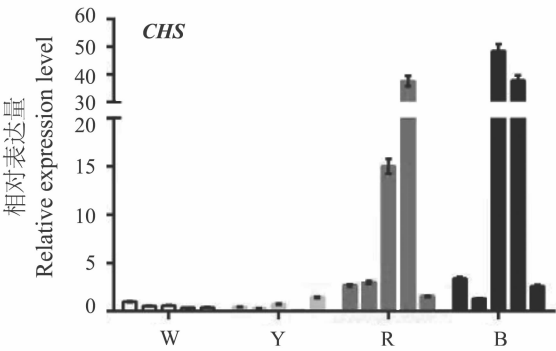


图 2 *CHS* 在 4 个不同种皮颜色花生品种中的差异表达分析

Fig. 2 Differential expression of *CHS* in 4 peanut cultivars with different testa color

2.2.3 查耳酮异构酶基因(*CHI*)差异表达 从图 3 可见,与 *CHS* 一样,在种子发育早期(荚果膨大期 I, R1),4 个不同种皮颜色品种的 *CHI* 的表达量无显著差别。随后,金花 39(W) *CHI* 基因表达量迅速下降,并保持极低水平。而其它 3 个品种中的 *CHI* 均有所增加。粤油 7 号(Y)与珍珠红(R)二者表达模式基本相同,在 R1 - R4 表达量逐渐增加,R4 期最高,随后回落。珍珠黑则是在 R3 期达到峰值,但三者的峰值差异显著($P < 0.05$),珍珠黑最高,珍珠红次之,然后是粤油 7 号。由此可见,同 *CHI* 一样,种皮颜色较深花生品种在种子发育的 R3、R4 期通过大量表达 *CHS*,完成花青素的合成。

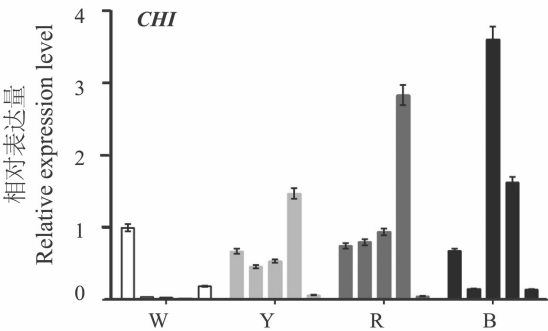


图 3 *CHI* 在 4 个不同种皮颜色花生品种中的差异表达分析

Fig. 3 Differential expression of *CHI* in 4 peanut cultivars with different testa color

2.2.4 二氢黄酮醇 4 - 还原酶基因(*DFR*)差异表

达 从图 4 可见,*DFR* 表达水平在 4 个花生品种中各不相同,珍珠红和珍珠黑 R3、R4 期的 *DFR* 表达量显著高于金花 39 和粤油 7 号。其中珍珠红的表达量在 R1 - R5 期一直保持在较高水平,在 R3 期达到峰值。珍珠黑则是在 R1、R2 较低,R3 期突增达到最高,随后回落。由此虽可推断,*DFR* 基因的表达量与种皮的颜色显著相关,*DFR* 基因的表达量越高,种皮颜色越深,但为何在深红色品种中 *DFR* 会一直保持较高水平仍然需要进一步研究。

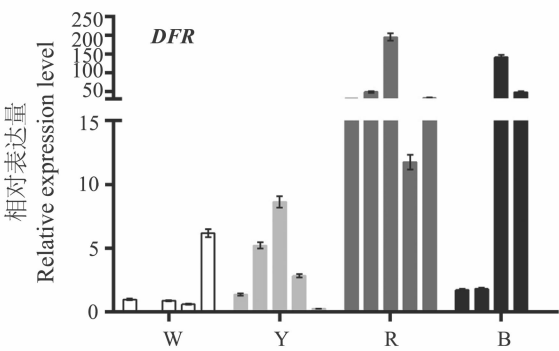


图 4 *DFR* 在 4 个不同种皮颜色花生品种中的差异表达分析

Fig. 4 Differential expression of *DFR* in 4 peanut cultivars with different testa color

2.2.5 类黄酮 - 3' 羟化酶基因(*F3'H*)差异表达 从图 5 可见,金花 39(W)中 *F3'H* 的表达量在种子发育的 5 个时期均很低,且没有显著差异。粤油 7 号、珍珠红和珍珠黑的 *F3'H* 表达模式基本相同,在种子发育过程中,3 个品种的 *F3'H* 均稳定升高,并在 R3 期达到峰值,随后逐渐回落。与 *DFR* 基因相同,*F3'H* 表达量在红色品种发育各期中一直保持较高水平。

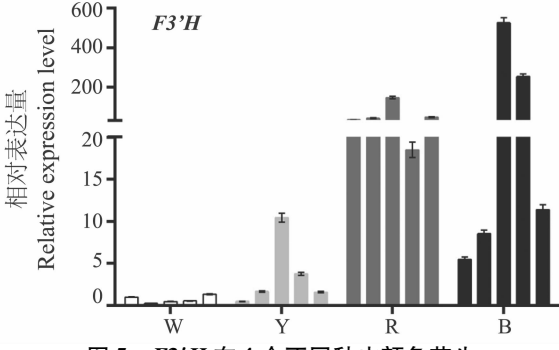


图 5 *F3'H* 在 4 个不同种皮颜色花生品种中的差异表达分析

Fig. 5 Differential expression of *F3'H* in 4 peanut cultivars with different testa color

2.2.6 花色苷合成酶基因(*ANS*)差异表达 由图 6 可见,在种子发育早期(R1 和 R2 期),4 个品种的花色苷合成酶基因(*ANS*)表达量均较低,其中珍珠红相对其它品种较高。粤油 7 号表达量在 R4 期显

形成后对碳骨架进行糖基化修饰^[20],对植物花青素的稳定性和可溶性起着重要作用。由此推测 3GT 的较少表达可能是造成深紫色花生品种种皮容易脱色的原因之一。可见,这 7 个基因在植物花青素生物合成过程中都起到了一定的作用。但植物花青素的合成代谢具有复杂的网络调控机制,相关转录调控机制还需要进一步研究,且不同的物种也可能存在部分甚至较大差异,这些都需要我们进一步研究,才能为作物遗传改良提供更有力的理论依据。

参考文献:

- [1] Aguilera Y, Diaz M F, Jimenez T, et al. Changes in nonnutritional factors and antioxidant activity during germination of nonconventional legumes[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(34): 8 120 – 8 125.
- [2] Winkel – Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. Plant Physiol, 2001, 126(2): 485 – 493.
- [3] Matsumoto H, Nakamura Y, Tachibana S, et al. Stimulatory effect of cyanidin 3 – glycosides on the regeneration of rhodopsin[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(12): 3 560.
- [4] Shin W H, Park S J, Kim E J. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats[J]. Life Sci, 2006, 79(2): 130 – 137.
- [5] Joseph J A, Shukitt – Hale B, Denisova N A, et al. Reversals of age – related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation[J]. Brookings Institution, 1999, 18(19): 8 047 – 8 055.
- [6] Wang L S, Stoner G D. Anthocyanins and their role in cancer prevention[J]. Cancer Letters, 2008, 269(2): 281 – 290.
- [7] Toufektsian M C, De Lorgeril M, Nagy N, et al. Chronic dietary intake of plant – derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia – reperfusion injury[J]. The Journal of Nutrition, 2008, 138(4): 747 – 52.
- [8] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. Plant Sci, 2011, 181: 219 – 229.
- [9] Gutierrez – Gonzalez J J, Guttikonda S K, Lam – Son Phan T, et al. Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits[J]. Plant Cell Physiol, 2010, 51(6): 936 – 948.
- [10] 孔令瑶,汪云,曹玉华,等. 黑米色素的组成与结构分析[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 25 – 29.
- [11] 程 琤,刘超,贺炜,等. 紫甘薯花青素的稳定性及抗氧化性研究[J]. 营养学报, 2011, 33(3): 291 – 296.
- [12] 胡济美,籍保平,周峰,等. 大兴安岭笃斯越橘花色苷成分鉴定研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 239 – 241.
- [13] 闫亚美,代彦满,冉林武,等. 黑果枸杞与 5 种果蔬中花色苷组成及体外抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2014, 35(16): 133 – 136.
- [14] 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 – 1 056.
- [15] Mauch – Mani B, Slusarenko A J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia – lyase in the resistance of Arabidopsis to *Pero-nospora parasitic*[J]. The Plant Cell, 1996, 8(2): 203 – 212.
- [16] Shadle G L, Wesley S V, Korth K L, et al. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L – phenylalanine ammonia – lyase[J]. Phytochemistry, 2003, 64(1): 153 – 161.
- [17] Kim D S, Hwang B K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia – lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid – dependent signalling of the defence response to microbial pathogens[J]. J Exp Bot, 2014, 65(9): 2 295 – 2 306.
- [18] 高燕会,黄春红,朱玉球,等. 植物花青素苷生物合成及调控的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(8): 94 – 99.
- [19] 宫 硇,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.
- [20] 张 宁,胡宗利,陈绪清,等. 植物花青素代谢途径分析及调控模型建立[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1): 97 – 105.

(责任编辑:王丽芳)