

彭佳佳,刘克林,刘丽娅,等.红掌佛焰苞数字基因表达谱及关键基因表达水平分析[J].江苏农业科学,2016,44(3):48-52.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.012

# 红掌佛焰苞数字基因表达谱及关键基因表达水平分析

彭佳佳<sup>1,2</sup>,刘克林<sup>3</sup>,刘丽娅<sup>4</sup>,吕学华<sup>4</sup>,杨哲<sup>2</sup>,李佩瑜<sup>2</sup>,刘春<sup>2</sup>,明军<sup>2</sup>,袁素霞<sup>2</sup>,平吉成<sup>1</sup>,张黎<sup>1</sup>

(1.宁夏大学农学院,宁夏银川 750001;2.中国农业科学院蔬菜花卉研究所,北京 100081;

3.北京市大东流苗圃,北京 102211;4.河北省平泉县林木种苗管理站,河北平泉 067000)

**摘要:**以红掌佛焰苞 S5(盛花期:红色)、S8(衰老期:绿色)时期为试验材料进行数字基因表达谱(digital gene expression profiling,DGE)测序,分别得到 12 766 374 条(1.28 G)、18 583 390 条(1.86 G)可分析序列(clean reads),被成功注释有差异表达的基因序列 2 316 条。为探究红掌佛焰苞颜色变化过程中关键基因的表达水平,将差异基因定位在花青素生物合成途径 11 条表达量变化的序列上,并通过实时荧光定量 PCR 对其中的 4 条序列进行检验,验证了 DGE 测序结果的准确性。同时研究这 4 个序列在红掌佛焰苞生长过程中的表达水平,结果表明:在佛焰苞发育初期,3 条序列相对表达量逐渐增高,1 条在 S2 时期降低,但均在 S3 时期达到最高或较高值;在 S4、S5、S6、S7、S8 时期,随着佛焰苞的成熟,4 条序列表达量大体上均逐渐下降,在 S8 衰老期表达量最低。研究结果证明了这 4 条基因序列是红掌佛焰苞花色形成中的关键基因,S3 时期是花青素生物合成的高峰期。

**关键词:**数字基因表达谱;红掌佛焰苞;花青素;基因表达水平;基因序列;关键基因;花色变化;关键酶

**中图分类号:** S682.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0048-05

红掌(*Anthurium andraeanum*)为天南星科花烛属多年生常绿草本植物,原产于中美洲、南美洲热带地区<sup>[1]</sup>,以其花色丰富艳丽的心形佛焰苞片和持久的花期广受消费者喜爱。花

色是花卉重要的观赏性状,花色的形成主要是由不同类型花色素在花瓣中的积累决定的<sup>[2]</sup>。Iwata 等研究表明,红掌花青素主要有花色苷、花葵苷 2 种,并且花色与这 2 种色素苷的比例有关<sup>[3]</sup>。花青素在花瓣的生长发育过程中会发生一系列变化,其合成也受相关合成酶基因的转录水平所控制<sup>[4-6]</sup>。

数字基因表达谱(DGE)是利用新一代高通量测序技术对某物种的特定组织在特定状态下基因的表达量变化情况进行检测的结果,现已被广泛应用于基础科学研究、医学研究和药物研发等领域。通过 DGE 可以筛选出有差异表达的基因序列信息,研究基因表达量的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制<sup>[7]</sup>。

红掌佛焰苞在生长发育过程中会由红色逐渐变为绿色,

收稿日期:2015-01-19

基金项目:农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室资助项目;中国农业科学院与北京市大兴区科技合作项目(编号:20130109);北京市科技计划研发攻关项目(编号:YLHH201400111)。

作者简介:彭佳佳(1990—),女,宁夏银川人,硕士研究生,主要从事红掌花卉育种栽培研究。E-mail:pengjiajia1990@163.com。

通信作者:张黎,教授,主要从事花卉育种栽培研究,E-mail:zhang\_li9988@163.com;刘春,研究员,主要从事红掌花卉育种栽培研究,E-mail:liuchun@caas.cn。

[16] Page M R D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. Computer Applications in the Biosciences, 1996, 12(4): 357-358.

[17] Choisy M, Woelk C H, Gue G J, et al. Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtype [J]. Journal of Virology, 2004, 78(4): 1962-1970.

[18] Zhang C Y, Ding N, Chen K P, et al. Complex positive selection pressures drive the evolution of HIV-1 with different co-receptor tropisms [J]. Science China: Life Sciences, 2010, 53(10): 1204-1214.

[19] 许慧琳, 张文彤, 赵耐青, 等. H2N2 亚型人甲型流感病毒 HA1 序列进化正选择位点研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(4): 385-389.

[20] Nielsen R, Yang Z. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and application to the HIV-1 envelope gene [J]. Genetics, 1998, 148(3): 929-936.

[21] Yang Z. Maximum likelihood estimation on large phylogenies and analysis of adaptive evolution in human influenza virus A [J]. Journal of Molecular Evolution, 2000, 51(5): 423-432.

[22] 吕雪梅, 王应祥, 张亚平. 蜂猴线粒体细胞色素 b 基因变异特点及系统发育分析 [J]. 动物学研究, 2001, 22(2): 93-98.

[23] 梁国明, 刘桂琼, 姜勋平. 反刍动物 PRNP 基因进化机制研究 [C]//中国畜牧兽医学会养羊学分会全国养羊生产与学术研讨会论文集, 2010.

[24] 姬广超, 王明辉, 高会江, 等. 哺乳动物 MT 基因的进化选择与功能分歧 [J]. 东北农业大学学报, 2010(9): 82-88.

[25] Yang Z H. Inference of selection from multiple species alignments [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2002, 12(6): 688-694.

[26] Yang Z. Computational molecular evolution [M]. New York: Oxford University Press, 2006.

[27] Schmutz S M, Moker J S, Berryere T G, et al. An SNP is used to map MC1R to dog chromosome 5 [J]. Animal Genetics, 2001, 32(1): 43-44.

[28] Newton J M, Wilkie A L, He L, et al. Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog [J]. Mammalian Genome, 2000, 11(1): 24-30.

这与其花青素生物代谢合成过程中关键基因的表达量存在一定的关系。本试验通过对红掌佛焰苞 S5、S8 时期进行 DGE 测序,得到在红掌颜色变化过程中存在差异表达的基因序列,并选择有关基因探究其在红掌佛焰苞生长发育过程中的表达水平,为红掌花色基因全长克隆、分子标记,及改良育种等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料来自北京大兴苗圃 2 年生火焰 (*Dakota*) 2 个生长期: S5(盛花期),佛焰苞全部展开,肉穗上部黄色,下部白色(此时为商品最佳观赏期); S8(衰老期),佛焰苞全部转为绿色,肉穗变为深绿色(图 1)。采取健康佛焰苞于  $-80^{\circ}\text{C}$  贮存备用。



S1—佛焰苞从保护叶鞘突出,红色部分占整个佛焰苞的75%; S2—佛焰苞完全从保护叶鞘露出,颜色全红; S3—佛焰苞片仅仅收拢,与花梗成 $270^{\circ}$ ; S4—佛焰苞展开1/2,露出嫩黄色肉穗花序; S5—佛焰苞全部展开,肉穗上部黄色,下部白色(此时为商品最佳观赏期,即对照期); S6—佛焰苞进入衰老期,转绿部分占佛焰苞面积的1/3,肉穗花序变浅绿色; S7—佛焰苞绿色面积达2/3,此时肉穗花序颜色与佛焰苞相同; S8—佛焰苞全部转为绿色,肉穗变为深绿色。下同

图1 红掌佛焰苞各发育时期

### 1.2 试剂与仪器

总 RNA 提取采用植物 RNA 提取试剂盒 Esayspin,购自北京艾德莱生物科技有限公司;反转录试剂盒: SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR,购自 invitrogen 公司;荧光定量试剂盒: FastStart Universal SYBR Green Master (ROX),购自 Roche 公司; Taq DNA 聚合酶,由天根生化科技(北京)有限公司提供。试验用到的主要仪器有 PCR 仪、ABI7900HT 荧光定量 PCR 仪、台式离心机、超低温高速离心机、恒温水浴锅、制冰机、电泳仪、凝胶成像系统及超净工作台等。引物由深圳华大基因科技服务有限公司合成。试验对红掌的 S5(盛花期:红色)、S8(衰老期:绿色)进行的 DGE 测序,由北京诺禾致源科技有限公司完成。

### 1.3 植物总 RNA 提取

植物总 RNA 提取方法按照 Esayspin 试剂盒说明书进行,提取结果用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。条带 28 S : 18 S 亮度比约为 2 : 1,说明 RNA 无降解;用 Biodrop 超微量蛋白核酸分析仪测得  $D_{260\text{nm}/280\text{nm}}$  在 1.8 ~ 2.2 之间,则说明 RNA 质量合格,可进行后续测序试验。

### 1.4 红掌佛焰苞 DGE 测序

样品检测合格后,用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集 mRNA

后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段,以 mRNA 为模板,用 6 碱基随机引物 (random hexamers) 合成 1 链 cDNA; 然后加入缓冲液、dNTPs 和 DNA polymerase I 合成 2 链 cDNA; 随后用 AMPure XP beads 试剂盒纯化双链 cDNA。将纯化的双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后用 AMPure XP beads 进行片段大小选择,最后进行 PCR 富集得到最终的 cDNA 文库。测序工作由北京诺禾致源生物科技有限公司利用 Illumina HiSeq<sup>™</sup> 2000/Miseq<sup>™</sup> 平台完成。

### 1.5 DGE 测序结果分析

测序得到原始测序序列 (raw reads), 为保证信息分析质量,必须对原始测序序列过滤去除里面含有带接头的、低质量的 reads (质量值  $sQ \leq 5$  的碱基数占整个 reads 50% 以上的 reads), 得到 clean reads (指过滤去除里面含有带接头的、低质量的 reads 后,可以进行后续分析的可用序列), 后续分析基于 clean reads 进行。以红掌转录组测序结果为参考序列,基因表达水平以 RPKM (reads per kilo bases per million mapped reads)<sup>[8]</sup> 为评估方法。以 Audic 等方法<sup>[9]</sup> 对 2 个时期的样本进行差异基因筛选,后续对样本间差异基因功能上的基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析<sup>[10]</sup> 和这些基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径的 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析<sup>[11]</sup> 都基于差异基因。筛选出与红掌佛焰苞颜色变化有关的差异基因,验证 DGE 测序结果并探究这些差异基因在红掌佛焰苞整个发育过程中的表达水平。

### 1.6 实时荧光定量 PCR 验证

根据测序结果得到红掌佛焰苞颜色变化的关键差异基因序列,用 Primer 5.0 设计特异引物。分别提取红掌佛焰苞 S1 至 S8 整个发育时期 (图 1) 的总 RNA, 反转成 cDNA 进行荧光定量试验, PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  10 min,  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $55^{\circ}\text{C}$  60 s,  $72^{\circ}\text{C}$  20 s, 40 个循环。用 RQ manager 软件进行  $C_T$  值分析,用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算基因的表达水平。以 S5 (盛花期:红色) 作为对照时期、红掌 *CYP* (登陆号: JN602201, *CYP-F*: 5' - TTGCA-CATGRMRRTCGCGGC - 3'; *CYP-R*: 5' - CGACRTGCTTSC-CRTCRAGCC - 3') 作为内参基因<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DGE 测序结果分析

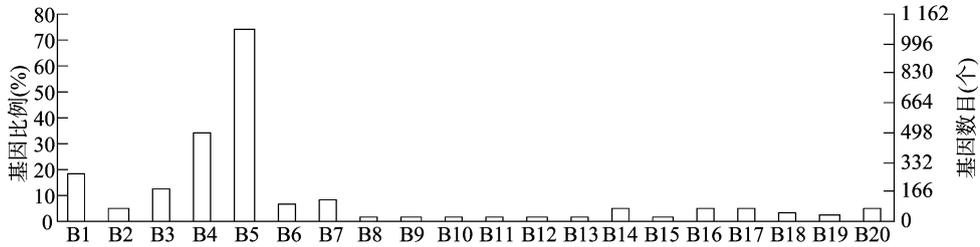
通过 DGE 测序,样本 S5、S8 分别得到 12 766 374 条 (1.28 G)、18 583 390 条 (1.86 G) clean reads, 分别占原始数据的 98.2%、98.1%, 碱基错误率均为 0.04%, GC 含量分别为 50.1%、52.1%。在 S5、S8 时期被成功注释有差异表达的基因序列 2 316 条,其中在 S8 时期中表达量下调的基因序列有 925 条 (39.9%), 上调的有 1 392 条 (60.1%)。

### 2.2 差异表达基因的 GO 富集分析

差异基因 GO 富集分析中共有 1 656 条差异基因,以生物学过程 (biological process, BP; 图 2)、细胞组分 (cellular component, CC; 图 3) 及分子功能 (molecular function, MF; 图 4) 三大类的 60 个亚类 (各 20 个亚类) 进行功能注释,共得到 2 626 个 GO 注释结果,以富集程度最高的 60 个 GO 注释作图。其中生物学过程中,代谢过程 (metabolic process GO:0008152) 被注释到的差异基因序列最多,达 1 082 条 (67.87%); 其次

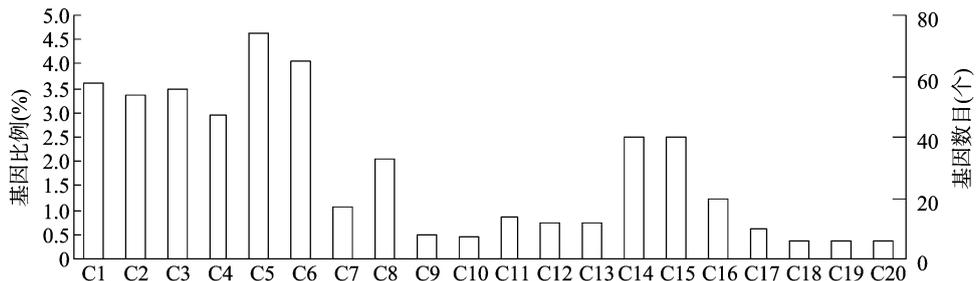
是单细胞代谢过程 (single-organism metabolic process GO:0044710), 有 501 条 (32.72%) 有表达量变化。在细胞组功能分类中的差异基因数量相对较少, 质体 (plastid GO:0009536)、叶绿体 (chloroplast GO:0009507)、类囊体 (thylakoid GO:0042651) 及光合作用膜上 (photosynthetic membrane

GO:0034357) 的差异基因数量在该功能分类中相对较多。在分子功能的分类中, 催化活性 (catalytic activity GO:0003824) 和氧化还原酶活力 (oxidoreductase activity GO:0016491) 注释到的差异基因数量最多, 分别为 927 条 (56.9%)、252 条 (15.2%)。



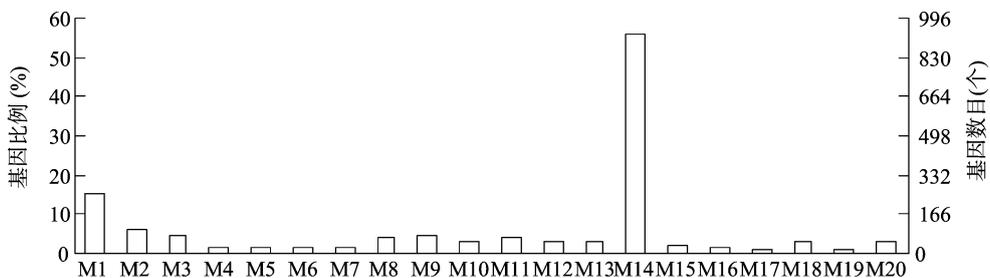
B1—氧化还原过程; B2—光合作用; B3—碳水化合物代谢; B4—单细胞代谢; B5—代谢过程; B6—细胞碳水化合物代谢过程; B7—单体碳水化合物代谢过程; B8—类固醇激素代谢过程; B9—雄性激素代谢过程; B10—雌性激素代谢过程; B11—激素代谢过程; B12—激素调节水平; B13—细胞激素代谢; B14—细胞多糖代谢; B15—核糖代谢; B16—多糖代谢; B17—电子载体; B18—二糖代谢; B19—蛋白质折叠; B20—碳水化合物合成

图2 S5与S8 GO分类注释的生物学过程统计结果



C1—类囊体; C2—光合作用膜; C3—类囊体部分; C4—光合体系; C5—质体; C6—叶绿体; C7—放氧复合物; C8—光系统 II; C9—光系统 I 反应中心; C10—质体球; C11—光系统 I; C12—叶绿体基质; C13—质体间质; C14—叶绿体的部分; C15—质体部分; C16—外在膜; C17—类囊体膜; C18—叶绿体类囊体; C19—叶绿体类囊体膜; C20—质体类囊体

图3 S5与S8 GO分类注释的细胞组分统计结果



M1—氧化还原酶活性; M2—辅因子绑定; M3—辅酶绑定; M4— $3\beta$ 羟基- $5\sigma$ 类固醇脱氢酶活性; M5—类固醇脱氢酶活性; M6—类固醇脱氢酶活性, 作用于CH-OH群供体, 为NAD或NADP受体; M7—抗氧化活性; M8—水解酶活性, 水解 *O*-glycosyl 化合物; M9—水解酶活性, 作用于糖基键; M10—铁离子结合; M11—电子载体活性; M12—吡咯绑定; M13—血红素结合; M14—催化活性; M15—钙离子结合; M16—热激因子结合蛋白; M17—2Fe-2S 簇集群结合; M18—氧化还原酶活性作用成对供体, 结合或减少氧气分子; M19—dTDP-4-脱氢鼠李糖还原酶活性; M20—NAD或NADP受体, 氧化还原酶活性, 作用于CH-OH群供体。

图4 S5与S8 GO分类注释的分子功能统计结果

### 2.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析

对差异基因进行 KEGG 富集分析, 得到差异基因所参与的主要代谢途径有 170 条, 主要富集在次生代谢产物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites)、不同环境微生物代谢 (microbial metabolism in diverse environments)、内质网蛋白加工 (protein processing in endoplasmic reticulum) 等途径 (表

1), 本研究主要研究在红掌佛焰苞颜色变化过程中关键基因的表达情况, 注释得到在类黄酮生物合成途径 (flavonoid biosynthesis) 中差异表达的基因数量有 11 条, 通过代谢路径分析, 该 11 条基因序列参与花青素生物合成途径, 与 S5 时期 (盛花期) 相比, S8 时期 (衰老期) 均表现为表达量下调。预测该 11 条基因序列为控制红掌佛焰苞颜色变化的关键基因,

通过 NCBI 序列比对,被注释为 8 种基因,分别为 *C4H*(肉桂酸-4-羟化酶)、*CHS*、*CHI*、*DFR*、*F3'H*、*F3H*、*ANS*、*LAR*。选其中感兴趣的 4 个基因序列,同时设计其特异扩增引物进行后续分析(表 2)。

2.4 实时定量 PCR 验证结果

对筛选出的 4 个关键基因,在红掌佛焰苞的 S5、S8 时期进行实时定量 PCR 验证其基因表达水平。图 5 结果表明, *comp52649\_c2* (*C4H*)、*comp46425\_c0* (*CHI*)、*comp53291\_c0* (*DFR*)、*comp41735\_c0* (*F3H*) 这 4 条基因在 S8 时期中表达量均有不同程度下调,每条序列表达量下调倍数都高于 DGE 测序结果,其中 *comp41735\_c0* 下调倍数较多。分析原因可能是因为荧光定量扩增的是特异片段且具有较高的灵敏性,同时也与材料的选择时期偏差有关。荧光定量结果与 DGE 测序结果趋势基本一致,说明测序结果有较好的准确性。

2.5 花青素代谢途径中关键基因在红掌佛焰苞各时期表达水平分析

通过实时荧光定量 PCR 检测 4 个关键基因在红掌佛焰苞发育时期的表达水平。图 6 结果表明:*CHI* 在佛焰苞发育初期表达量规律不稳定,在 S3 时期中表达量最高,其次是 S1 时期,在 S2 时期中表达量下降明显,在 S5、S6、S7、S8 时期中,随着佛焰苞的衰老,其表达量逐渐降低;*C4H*、*F3H*、*DFR* 基因在佛焰苞初期相对表达量随着佛焰苞的生长逐渐增高,其中 *C4H*、*F3H* 在 S3 时期达到最高,*DFR* 在 S4 时期中表达量最高;S4 时期之后,4 个基因均随着佛焰苞的成熟,表达量逐渐

表 1 KEGG 富集分析结果

通路	富集程度	q 值	基因数 (个)
光合作用	0.738 095 238	0	31
卟啉和叶绿素代谢	0.512 195 122	0.000 001 090	21
光合作用固碳	0.351 351 351	0.000 162 834	26
乙醛酸盐和二羧酸根阴离子代谢	0.344 827 586	0.001 680 817	20
安沙霉素类生物合成	1.000 000 000	0.001 680 817	5
类黄酮生物合成	0.500 000 000	0.001 680 817	11
类胡萝卜素生物合成	0.444 444 444	0.002 808 327	12
次生代谢物生物合成	0.182 068 966	0.005 573 129	132
磷酸戊糖途径	0.326 530 612	0.012 099 827	16
代谢途径	0.164 040 115	0.017 993 378	229
丝裂原活化蛋白激酶信号通路	0.379 310 345	0.017 993 378	11
氨酰生物合成	0.297 872 340	0.052 906 89	14
抗坏血酸盐和醛糖代谢	0.323 529 412	0.065 600 656	11
多样性环境微生物代谢	0.189 873 418	0.065 600 656	60
谷胱甘肽代谢	0.258 064 516	0.103 402 481	16
核黄素代谢	0.571 428 571	0.103 402 481	4
抗原的加工提呈	0.285 714 286	0.103 402 481	12
细菌分泌系统	0.454 545 455	0.120 928 401	5
亚麻酸代谢	0.270 270 270	0.250 781 047	10
内质网蛋白加工	0.188 571 429	0.329 612 152	33

注:富集程度值越大,表示富集程度越高。*q* 值为经过多重校验的 *P* 值,取值范围[0,1],*q* 值越小,富集越明显。

表 2 4 个关键基因注释结果及特异引物

基因序列号	下调倍数	注释	引物
<i>comp52649_c2</i>	1.206 9	<i>C4H</i>	F:5' - AGAACCAACCAGGGGATA - 3'; R:5' - CGTCACCGCCACAAAG - 3'
<i>comp46425_c0</i>	2.330 5	<i>CHI</i>	F:5' - AAGCCACAAGACAAAATC - 3'; R:5' - CACCCGAAGGAGACAC - 3'
<i>Comp53291_c0</i>	3.764 4	<i>DFR</i>	F:5' - CAAGGTGGGGATGAT - 3'; R:5' - CGTGAAGAGCCACAG - 3'
<i>comp41735_c0</i>	3.764 4	<i>F3H</i>	F:5' - GCCTGGCATACTTGAGA - 3'; R:5' - GAAGATGAGCCGAGACC - 3'

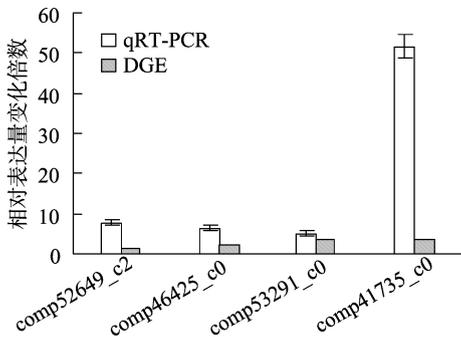


图 5 实时荧光定量验证 DGE 测序结果(S8与S5相比下调倍数)

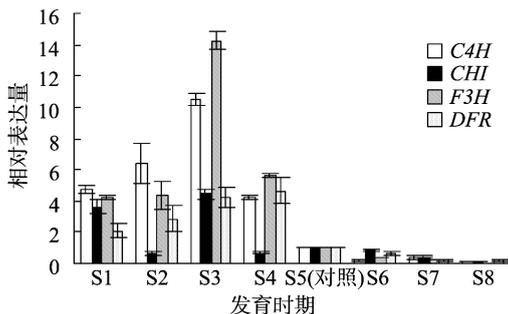


图 6 红掌佛焰苞不同发育时期 4 个基因相对表达水平

下降;在 S8 衰老期,相对表达量均达到最低水平。由结果可知,S3 时期是红掌花青素合成的高峰期,随着佛焰苞生长,花青素含量下降是导致佛焰苞颜色变绿的原因。

3 讨论与结论

类黄酮类物质具有生物功能多样性,包括抗植物病原体、参与植物激素调节反应等<sup>[13-14]</sup>;同时使植物花瓣呈现出红色、蓝色、紫色和橙色,这种进化可以吸引传粉者并利于种子的传播,也可以对自身进行保护<sup>[15]</sup>。黄酮类物质中的花青素是红掌佛焰苞呈色的主要物质。目前,花青素生物合成途径在其他花卉中研究的较为清楚,经过该途径合成的天竺葵色素苷、矢车菊色素苷和飞燕草色素苷是形成有色花的主要色素物质<sup>[16]</sup>。

本研究中得到在红掌佛焰苞花青素生物合成途径中表达量变化的 11 条基因序列,通过 NCBI 数据库比对注释为 8 种基因,分别为 *C4H*、*CHS*、*CHI*、*DFR*、*F3H*、*F3'H*、*ANS* 和 *LAR*,总结出这 8 种基因是控制该途径的关键基因。选出重要的 4 条基因序列 *comp52649\_c2* (*C4H*)、*comp46425\_c0* (*CHI*)、*comp41735\_c0* (*F3H*) 和 *comp53291\_c0* (*DFR*),探究其在红掌佛焰苞发育过程中基因表达水平。其中 *C4H* 是催化花青素生物合成途径第 1 阶段第 2 步反应的关键酶<sup>[17-18]</sup>; Millar 等

研究表明,*CAH*的表达丰度对黄酮类化合物的生物合成量有一定影响<sup>[19]</sup>。本研究表明,随着红掌佛焰苞的生长,*CAH*先升高再降低,表明红掌黄酮类物质在此过程中的含量变化是导致红掌颜色变化的主要原因之一。*CHI*是查尔酮生成4',5,7-三羟基黄酮过程的催化酶,可将该反应效率提高7~10倍<sup>[20]</sup>,*CHI*与黄酮类物质合成密切相关,通过调节*CHI*表达量可进行花色改良,如利用RNA干扰技术抑制烟草的*CHI*合成,得到黄色花瓣;在康乃馨中的*CHI*、*DFR*插入转座子得到黄色品种。在本研究中红掌佛焰苞由红色变为绿色过程中,*CHI*表达量下降明显,表明该基因的表达丰度下降与佛焰苞颜色变化有关,而在佛焰苞前期发育时期表达量变化不稳定,具体原因有待进一步验证。*F3H*属氧化戊二酸依赖型加氧酶,具有底物特异性,反应需依赖 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{O}_2^-$ 、2-酮戊二酸等作为辅助因子,在植物类黄酮生物合成调控中起着关键的作用<sup>[21]</sup>。在本试验中,*F3H*在佛焰苞S3时期高表达,说明S3时期是红掌花青素合成的旺盛时期;*DFR*是ADPH依赖性短链还原酶家族成员<sup>[22]</sup>,Collette等对红掌的研究中发现,*DFR*的转录水平在不同的发育阶段有显著差异,在佛焰苞发育过程中*DFR*是一个关键基因<sup>[23]</sup>。在本试验中,*DFR*基因表达量在红掌佛焰苞发育初期逐渐升高,在S3时期达到最高值,随着佛焰苞的成熟和衰老,表达量逐渐降低,S8时期达到最低值,这与Collette等研究结果<sup>[23]</sup>一致,说明*DFR*是红掌佛焰苞发育过程中花色变化的关键酶。

本研究利用DGE测序技术得到红掌在S5、S8时期的差异基因信息,为后续研究红掌佛焰苞花色基因功能等奠定基础;测序结果结合实时荧光定量PCR试验,得到控制红掌佛焰苞花青素生物合成途径中的11条关键基因序列,并对其中的4条基因进行表达量分析,得到*CAH*、*CHI*、*DFR*、*F3H*是控制红掌佛焰苞颜色变化的关键基因,S3时期是红掌花青素合成的高峰期,为红掌佛焰苞花色基因定位、全长克隆及相关基因转录因子的研究打下基础。

#### 参考文献:

- [1] Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S, et al. *In vitro* mass multiplication with pure genetic identity in *Anthurium andraeanum* Lind [J]. *Plant Tissue Cult Biotech*, 2008, 18(2): 113 - 122.
- [2] 戴思兰. 园林植物遗传学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 179 - 186.
- [3] Iwata R Y, Tang C S, Kamemoto H. Concentration of anthocyanins affecting spathe colour in *Anthuriums* [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1985, 110(3): 383 - 385.
- [4] Martin C, Gerats T. Control of pigment biosynthesis genes during petal development [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5(10): 1253 - 1264.
- [5] Martin C, Jin H, Schwinn K. Regulation of phytochemicals by molecular techniques [M] // Romeo J T, Saunders J A, Matthews B F. Beltsville, Maryland, USA: Pergamon, 2001: 155 - 169.
- [6] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071 - 1083.
- [7] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257(572): 967 - 971.
- [8] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [9] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles [J]. *Genome Research*, 1997, 7(10): 986 - 995.
- [10] Young M D, Wakefield M J, Smyth G K. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias [J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): r14.
- [11] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (Database issue): D480 - D484.
- [12] Gopaulchan D, Lennon A M, Umaharan P. Identification of reference genes for expression studies using quantitative RT-PCR in spathe tissue of *Anthurium andraeanum* (Hort.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 153: 1 - 7.
- [13] Mol J, Grotewold E, Koes R. How genes paint flowers and seeds [J]. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 212 - 217.
- [14] Winkel - Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(3): 218 - 223.
- [15] To K Y, Wang C K. Floriculture, ornamental and plant biotechnology advances and tropical issues [M]. Isleworth, UK: Global Science Books, 2006: 300 - 310.
- [16] 韩科厅, 胡可, 戴思兰. 观赏植物花色的分子设计 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 16 - 24.
- [17] Barber M S, Mitchell H J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants [J]. *Int Rev Cytol*, 1997, 172: 243 - 293.
- [18] 李波, 梁颖, 柴友荣. 植物肉桂酰辅酶A还原酶(CCR)基因的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(增刊1): 55 - 65.
- [19] Millar D J, Long M, Donovan G, et al. Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(11): 1497 - 1509.
- [20] Li F, Jin Z, Qu W, et al. Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(7/8/9): 455 - 461.
- [21] Owens D K, McIntosh C A. Biosynthesis and function of *Citrus* glycosylated flavonoids [M]. New York: Springer, 2011: 67 - 95.
- [22] Martens S, Teeri T, Forkmann G. Heterologous expression of dihydronavonol 4-reductases from various plant [J]. *Febs Letters*, 2002, 531(3): 453 - 458.
- [23] Collette V E, Jameson P E, Schwinn K E, et al. Temporal and spatial expression of flavonoid biosynthetic genes in flowers of *Anthurium andraeanum* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2004, 122(3): 297 - 304.