

引用格式:

戴垚, 王瑾, 戴丽, 何长征, 刘峰. 辣椒绿茎突变体 *gh1* 转录组及候选基因表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(5): 567–574.

DAI Y, WANG J, DAI L, HE C Z, LIU F. Transcriptome and differential expression analysis of green stem mutant *gh1* in *Capsicum annuum*[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2023, 49(5): 567–574.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



辣椒绿茎突变体 *gh1* 转录组及候选基因表达分析

戴垚^{1,2,3}, 王瑾^{1,2,3}, 戴丽^{1,2,3}, 何长征^{1,2,3}, 刘峰^{1,2,3*}

(1.湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128; 2.园艺作物种质创新与新品种选育教育部工程研究中心, 湖南 长沙 410128; 3.蔬菜生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以 EMS 诱变的辣椒绿茎突变体 *gh1* 和紫茎野生型樟树港辣椒(ST-8)为材料, 测定茎中花青素含量; 采用转录组测序技术(RNA-seq)和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析与辣椒茎中花青素生物合成相关基因的表达水平。结果表明: 突变体 *gh1* 茎中的花青素含量极显著低于 ST-8 茎中的花青素含量; 与 ST-8 相比, *gh1* 共获得 1794 个差异表达基因, 包括 1003 个上调表达基因, 791 个下调表达基因; 与花青素生物合成途径相关的基因包括 9 个结构基因(*DFR*, *UF3GT*, *F3H*, *ANS*, *CHI*, *CHS*, *C4H*, *PAL*, *4CL*)和 3 个转录因子(*TT8*, *ANI*, *TTG1*); 对与花青素合成相关的差异表达基因进行转录组表达量分析和 qRT-PCR 分析, 筛选出 4 个结构基因(*CHS*, *CHI*, *DFR*, *UF3GT*)和 1 个转录因子(*ANI*), 推测这 5 个基因可能在辣椒茎中花青素生物合成途径中起重要作用。

关键词: 辣椒; 茎; 转录组; 差异表达基因; 花青素; 突变体

中图分类号: S641.3; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)05-0567-08

Transcriptome and differential expression analysis of green stem mutant *gh1* in *Capsicum annuum*

DAI Yao^{1,2,3}, WANG Jin^{1,2,3}, DAI Li^{1,2,3}, HE Changzheng^{1,2,3}, LIU Feng^{1,2,3*}

(1.College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.ERC for Germplasm Innovation and New Variety Breeding of Horticultural Crops, Changsha, Hunan 410128, China; 3.Key Laboratory for Vegetable Biology of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: EMS-induced pepper green stem mutant *gh1* and wild-type purple stem 'Zhangshugang' (ST-8) were used as materials in this study, and the anthocyanin content was determined. Transcriptome sequencing (RNA-seq) and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) were used to analyze the gene expression levels related to anthocyanin biosynthesis in pepper stems. The results showed that the anthocyanin content in the stem of mutant *gh1* was significantly lower than that in the stem of ST-8. Compared with ST-8, *gh1* obtained 1794 differentially expressed genes, including 1003 up-regulated genes and 791 down-regulated genes. Among them, genes related to anthocyanin biosynthesis pathway include 9 structural genes (*DFR*, *UF3GT*, *F3H*, *ANS*, *CHI*, *CHS*, *C4H*, *PAL*, *4CL*) and 3 transcription factors (*TT8*, *ANI*, *TTG1*). Transcriptome expression analysis and qRT-PCR analysis were performed on differentially expressed genes related to anthocyanin synthesis. The results of the two analyses were basically the same. Four structural genes (*CHS*, *CHI*, *DFR*, *UF3GT*) and one transcription factor (*ANI*) were screened. It is speculated that these five genes might play an important role in the anthocyanin biosynthesis pathway in pepper stems.

收稿日期: 2023-02-23

修回日期: 2023-10-09

基金项目: 岳麓山种业创新项目(2021NK1006); 特色蔬菜产业技术体系(CARS-24-A-15)

作者简介: 戴垚(1999—), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事辣椒分子遗传育种研究, 3501510879@qq.com; *通信作者, 刘峰, 博士, 研究员, 主要从事辣椒种质资源重要性状功能基因挖掘及新种质创制研究, liufengrich@126.com

Keywords: pepper; stem; transcriptome; differentially expressed genes; anthocyanins; mutant

辣椒(*Capsicum annuum* L.)原产于中南美洲,自16世纪后期传入中国后成为了中国重要的蔬菜和调味品,对中国的饮食文化产生了深刻影响^[1-2]。辣椒富含多种物质,具有抗氧化、降脂降糖、抗菌和抗癌等作用^[3],属于食、药两用资源^[4],在食品、医药和化妆品等方面都受到广泛关注。辣椒适应性强、经济效益高、种植范围广,已成为农民增收、农村发展的支柱产业^[5]。

花青素是一类常见的植物水溶性色素,属于类黄酮次生代谢物,具有多种生物学功能,如植物着色、促进花粉和种子传播、抵御紫外线伤害、抗低温等^[6]。此外,花青素还具有抗氧化、抗炎、保护视力、抗肿瘤等功能^[7]。花青素是以苯丙氨酸为直接合成前体,通过类黄酮途径合成的,涉及多种结构基因和转录因子的表达与调控。在植物细胞中,花青素通常不能以单体形式存在,而是在类黄酮糖基转移酶(UFGT)的催化下与糖苷结合形成稳定的花青素苷^[8],在谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的作用下从细胞质运输到液泡中储存起来^[9]。

转录因子可形成复合物,通过与结构基因的启动子结合或调控其他类型的转录因子,来抑制或促进花青素合成途径中结构基因的表达,影响花青素的积累。其中,由MYB、bHLH和WD40蛋白组成的MBW复合物受到广泛关注^[10]。MYB转录因子是植物中最大的转录因子家族之一,也是植物花青素生物合成过程中最重要的调控因子^[11]。在成熟的苹果果实中,MdMYB1的表达与果实红皮部分花青素的合成密切相关^[12]。bHLH转录因子是调控花青素合成的第二大类转录因子家族。辣椒中CabHLH1可直接与DFR启动子结合,激活类黄酮的表达^[13]。研究^[14]发现,WD40转录因子也参与调控花青素的合成。

近年来,有关辣椒花青素的研究报道较多,但主要集中在辣椒果实中^[15-17],对辣椒茎中花青素的相关报道较少。CHEN等^[18]研究发现,CaHY5直接调控花青素的生物合成与运输,控制辣椒下胚轴花青素的积累,可作为苗期形态鉴定的关键基因。为探究影响辣椒茎中花青素生物合成的关键基因及

调控机制,本研究中,以突变体 $gh1$ 和野生型辣椒ST-8的茎为材料进行转录组测序分析,以明确其关键基因及调控机制,旨在为辣椒茎中花青素合成相关基因的鉴定及功能分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

从樟树港辣椒(ST-8)的突变体库中筛选出1个稳定遗传的绿茎突变体 $gh1$,该突变体由EMS诱变获得,由湖南农业大学园艺学院提供。2021年2月,将野生型ST-8及突变体 $gh1$ 的种子播种于育苗穴盘中,在湖南农业大学的人工气候温室中培养,16h光照(25℃),8h黑暗(20℃),光照度为24000lx,相对湿度为65%。幼苗长至4叶1心后移至单个营养钵(直径17cm)于温室中常规栽培。分别采集ST-8和 $gh1$ 开花期植株的茎,3次生物学重复,液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,用于转录组测序和qRT-PCR分析。

1.2 花青素含量测定

分别采集 $gh1$ 及ST-8开花期植株的茎,采用植物花青素检测试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司出品)测定茎中花青素的含量。

1.3 转录组差异基因分析

分别采集 $gh1$ 及ST-8开花期植株的茎,使用TransZol试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司出品)提取RNA。利用Illumina HiSeq™ X-Ten平台进行PE双末端测序(由百迈克生物科技有限公司完成),每个样本设置3个生物学重复。利用FastQC(v0.11.5)^[19]和Trimmomatic(v0.36)^[20]过滤低质量读段,运用Tophat2(v2.1.1)^[21]将过滤后得到的读段比对到辣椒‘Zunla’参考基因组上,以获得高质量读段。采用DESeq2对高质量读段进行差异表达基因分析,筛选阈值设置为 $|\log_2 F| \geq 1$ (F 为差异倍数),错误发现率 $D < 0.05$,基因表达量用 K 值(每1000个碱基转录每百万映射读取的片段)表示^[22]。采用R语言ggplot2程序包进行差异表达基因主成分分析。

1.4 差异表达基因功能注释

将 *ghl* 和 ST-8 的差异表达基因蛋白序列提交到 Plant Transcriptional Regulatory Map online(<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/go.php>)进行差异表达基因 GO 富集注释, 利用 AgriGO(v2.0)^[23]和 WEGO 2.0^[24]软件进行分析。

将 *ghl* 和 ST-8 的差异表达基因蛋白序列提交到 KOBAS 3.0 (http://kobas.cbi.pku.edu.cn/anno_iden.php)在线软件进行 KEGG 通路富集分析, 利用 R 语言 ggplot2 程序包将分析结果可视化。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析(qRT-PCR)

使用 HiScript® IIQ RT SuperMix(+gDNAwiper)试剂盒(Vazyme Biotech Co. Ltd, 美国)将 ST-8 和 *ghl* 茎的 RNA 反转录为 cDNA, 再将 cDNA 样品稀释至 100 ng/μL, 用于 qRT-PCR 分析, 反应体系为: 10 μL SYBR qPCR Master Mix, 0.4 μL 引物, 7.2 μL ddH₂O 和 2 μL 稀释 cDNA。利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物, 以 *Actin* 为内参基因, 引物序列如表 1 所示。使用罗氏 LightCycle® 96 实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 分析, 设置 3 个重复, 采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

引物名称	引物序列(5'-3')	引物名称	引物序列(5'-3')
<i>CHS</i> -F	GCTTCGACCCTCAGTCAAAC	<i>ANS</i> -R	GCGGCCTCCAGGATTATAGA
<i>CHS</i> -R	CTTGGGCCACGGAAAGTAAC	<i>UF3GT</i> -F	CCCTATTGGTTGTGAAGCCA
<i>CHI</i> -F	TGGCACTGGGAATGCTGTTA	<i>UF3GT</i> -R	TTCCTCCTCTGCCTCTTTCA
<i>CHI</i> -R	CCGTGCTTGCCAATTATGGA	<i>GL3</i> -F	GTCGGCTGCATTATCTCCAG
<i>F3H</i> -F	AAGGCACACTGATCCTGGAA	<i>GL3</i> -R	CAACCCTTGCCAACATTGA
<i>F3H</i> -R	TGGCTTGAAGACCACCAACT	<i>ANI</i> -F	ACAAAGACGAACGCGACAAA
<i>F3'5'H</i> -F	TGAGCTAGGCCACATGCTAA	<i>ANI</i> -R	GTCGACGACGTTTCACTTGT
<i>F3'5'H</i> -R	CGCGAATGTCAACATGTCCT	<i>TTG1</i> -F	CCATCCGAATCCTTCTGGGT
<i>DFR</i> -F	GCACTGCAGACAAAGGACAT	<i>TTG1</i> -R	GAAGTCTCCCGAACTTCCCA
<i>DFR</i> -R	CCCATTCTCCTTGCCACTTG	<i>Actin</i> -F	AAGAAGGAGAAGCAGTTAGAGAGC
<i>ANS</i> -F	CGTGGAGCACAGAGTGATTG	<i>Actin</i> -R	GTCATTTTCTCTCTATTTGCCTTGGG

2 结果与分析

2.1 表型分析

观察突变体 *ghl* 和野生型 ST-8 的表型特征, 发现野生型 ST-8 的茎总体呈绿色, 带有紫色, 茎节间为明显的紫色, 而突变体 *ghl* 的茎为均匀的绿色。对花青素含量进行测定, ST-8 的茎中花青素含量为 188.04 μg/g, 突变体 *ghl* 花青素含量只有 17.19 μg/g, 二者差异极显著。

2.2 转录组测序数据质量控制

采用高通量测序技术对 *ghl* 绿茎和 ST-8 紫茎共 6 个样本(3 次重复)进行转录组测序。去除低质量读段后, 各样本过滤后平均读段为 21 277 448 个, 读段总碱基数为 5.99~6.80 Gbp, 平均为 6.37 Gbp。过滤后数据的 Q20 指标均大于 96%, Q30 指标均大于 91%, GC 含量为 42.64%~43.79%(表 2)。

表 2 RNA-seq 样本数据质量评估

Table 2 Quality assessment of RNA-seq sample data

样本	读段数	碱基数/bp	碱基 Q20/%	碱基 Q30/%	GC 含量/%
<i>ghl</i> -1	22 722 548	6 796 436 476	97.06	91.97	43.79
<i>ghl</i> -2	20 201 230	6 044 252 800	97.00	91.87	42.64
<i>ghl</i> -3	21 496 073	6 432 431 902	96.98	91.80	43.13
ST-8-1	21 875 449	6 545 503 092	96.84	91.54	43.04
ST-8-2	20 035 527	5 991 190 874	96.94	91.68	42.95
ST-8-3	21 333 862	6 383 072 946	96.77	91.36	43.19

为了明确各样本之间的相关性,对差异表达基因进行主成分分析,结果如图 1 所示。PC1、PC2 的方差百分比分别为 44.7%和 18.9%, *ghl* 和 ST-8 的组内聚集效果和组间分离趋势差异明显,说明该测序数据质量较高,可以满足转录组分析的要求。

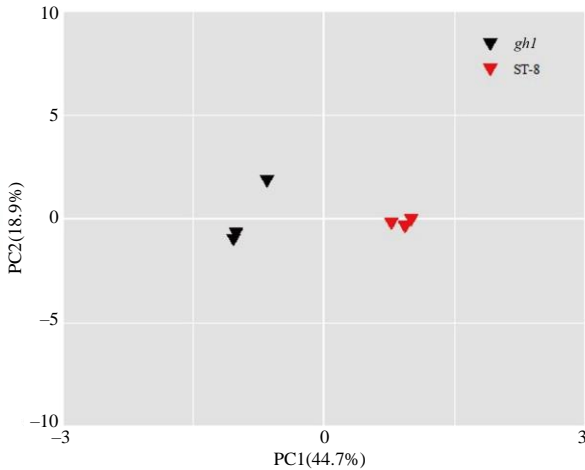


图 1 差异表达基因的主成分分析

Fig.1 Principal component analysis result of differentially expressed genes

2.3 差异表达基因的鉴定及功能富集分析

采用 DESeq2 软件,定义样本之间 $|\log_2 F| \geq 1$,错误发现率 $D < 0.05$ 的基因为差异表达基因,其中将 $\log_2 F \geq 1$ 的基因定义为上调表达基因, $\log_2 F \leq -1$ 的基因为下调表达基因。结果显示,突变体 *ghl* 与野生型相比,共获得 1794 个差异表达基因(DEGs),其中 1003 个(56%)上调表达,791 个(44%)下调表达。

将转录组测序获得的差异表达基因(DEGs)进行 GO 富集分析。由图 2 可知,DEGs 广泛富集在细胞组分、生物过程和分子功能 3 大类。在细胞组分类别中,有 269 个基因富集在细胞内,占总基因数量的 23.2%; 263 个(22.7%)基因存在于细胞内部分; 235 个(20.3%)基因存在于细胞内细胞器。在分子功能类别中,杂环化合物结合和有机环化合物结合均有 395 个(34.1%)基因富集,有 353 个基因(30.5%)富集于离子结合。在生物过程类别中,有 314 个基因(27.1%)富集在有机物代谢过程,287 个(24.8%)基因存在于初级代谢过程,259 个(22.4%)基因富集在细胞代谢过程。以上结果表明,*ghl* 和 ST-8 的差异表达基因在代谢过程中发挥着重要作用,推测其可能是造成 *ghl* 与 ST-8 茎颜色差异的原因之一。

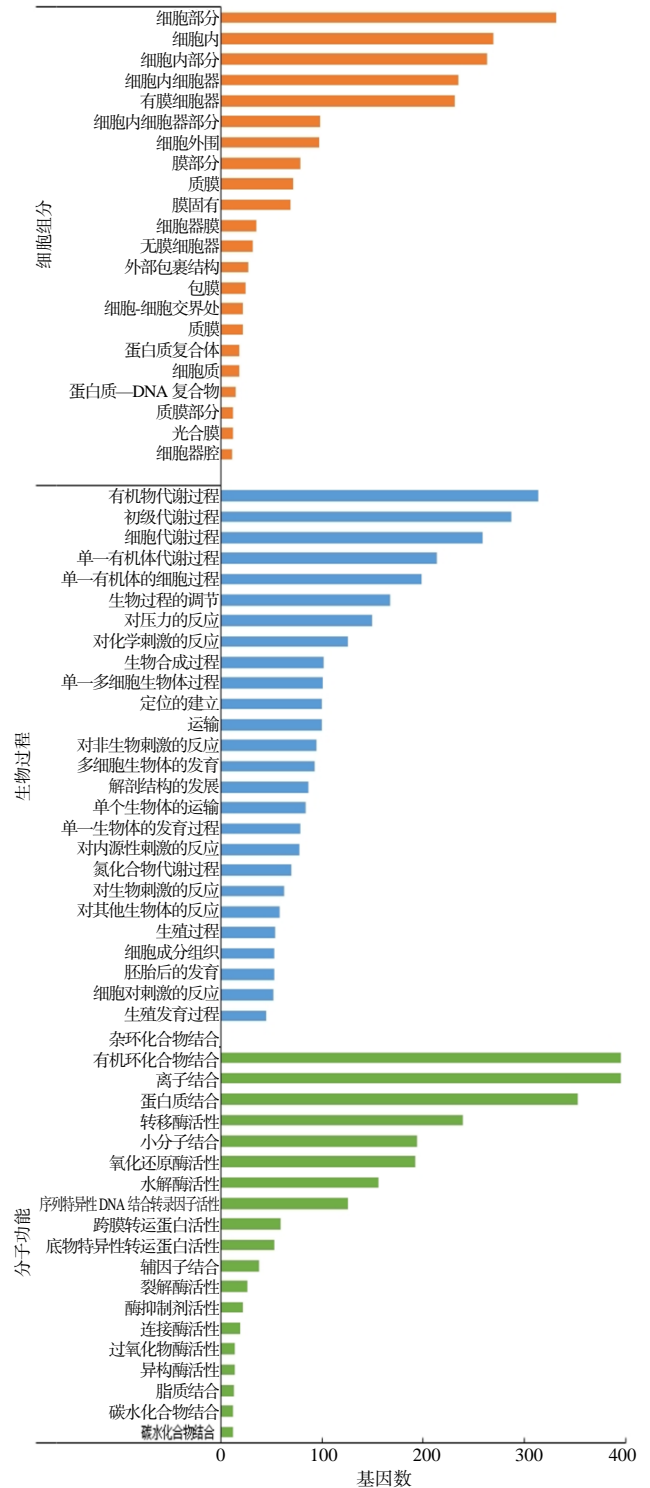


图 2 差异表达基因 GO 注释结果

Fig.2 GO annotation analysis result of differentially expressed genes

为了明确差异表达基因的代谢通路,将差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析。如表 3 所示,共有 780 个差异表达基因注释到 103 条代谢通路中。有 166 个差异表达基因富集在代谢途径中,占总基因数的 21.28%; 107 个(13.72%)差异表达基因富集于次生代谢物生物合成;少部分差异表达基因富集在 MAPK 信号途径-植物、植物-病原体互作、植物

激素信号转导、苯丙素生物合成、玉米素生物合成 富集通路(富集度>0.2), 分别为单萜生物合成、油和类黄酮生物合成等途径中。此外, 有 5 条特异性 菜素甾醇生物合成、类黄酮生物合成、不饱和脂肪

表 3 差异表达基因 KEGG 通路富集分析结果

Table 3 KEGG pathway analysis result of differentially expressed genes

代谢通路二级分类	基因数	富集度	代谢通路二级分类	基因数	富集度
代谢途径	166	0.07	抗坏血酸和醛酸代谢	3	0.06
次生代谢物生物合成	107	0.09	苯丙氨酸代谢	3	0.06
MAPK 信号途径-植物	30	0.14	β -丙氨酸代谢	3	0.05
植物-病原体互作	25	0.10	酪氨酸代谢	3	0.05
植物激素信号转导	24	0.08	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	3	0.05
苯丙酮的生物合成	23	0.12	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	3	0.04
玉米素生物合成	14	0.18	嘧啶代谢	3	0.04
类黄酮生物合成	13	0.24	肌醇磷酸盐代谢	3	0.04
脂肪酸代谢	12	0.12	RNA 降解	3	0.03
谷胱甘肽代谢	12	0.10	糖酵解/糖元生成	3	0.02
氨基酸和核苷酸糖代谢	12	0.09	核糖体	3	0.01
戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化	11	0.08	其他聚糖降解	2	0.15
淀粉和蔗糖代谢	11	0.07	烟酸和烟酰胺代谢	2	0.08
泛素介导的蛋白质分解	11	0.07	丁酸盐代谢	2	0.07
碳代谢	11	0.04	光合作用-触角蛋白	2	0.07
氨基酸的生物合成	10	0.04	氮代谢	2	0.05
不饱和脂肪酸的生物合成	9	0.24	错配修复	2	0.05
萜类骨架的生物合成	9	0.13	自噬-其他	2	0.05
木质素、亚木质素和蜡的生物合成	8	0.18	丙烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成	2	0.05
半乳糖代谢	8	0.14	基础转录因子	2	0.04
内吞作用	8	0.04	囊泡运输中的 SNARE 相互作用	2	0.04
光合生物的碳固定	7	0.09	DNA 复制	2	0.04
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	7	0.06	丙酸代谢	2	0.04
剪接体	7	0.03	脂肪酸降解	2	0.03
单萜生物合成	6	0.40	精氨酸和脯氨酸代谢	2	0.03
油菜素甾醇生物合成	6	0.29	柠檬酸循环(TCA 循环)	2	0.03
倍半萜生物合成和三萜生物合成	6	0.21	核苷酸切除修复	2	0.03
二萜生物合成	6	0.19	吞噬体	2	0.02
二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜酚的生物合成	6	0.17	mRNA 监控途径	2	0.02
脂肪酸伸长	6	0.15	氧化磷酸化	2	0.01
植物的昼夜节律	6	0.12	黄酮和黄酮醇的生物合成	1	0.20
α -亚麻酸代谢	6	0.11	咖啡因代谢	1	0.20
丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢	6	0.11	异黄酮的生物合成	1	0.17
ABC 转运体	5	0.16	酮体的合成和降解	1	0.13
卟啉和叶绿素代谢	5	0.09	牛磺酸和低牛磺酸代谢	1	0.07
乙醛酸和二羧酸代谢	5	0.06	次生代谢物的生物合成-未分类	1	0.06
甘油酯代谢	5	0.06	糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路	1	0.05
丙酮酸代谢	5	0.05	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	1	0.04
嘌呤代谢	5	0.05	硫胺素代谢	1	0.04
RNA 运输	5	0.03	叶酸的生物合成	1	0.04
内质网中的蛋白质加工	5	0.02	鞘磷脂代谢	1	0.03
类胡萝卜素的生物合成	4	0.10	泛酸和 CoA 的生物合成	1	0.03
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	4	0.08	硫代谢	1	0.03
2-氧代羧酸代谢	4	0.07	色氨酸代谢	1	0.02
蛋白酶体	4	0.06	泛醌和其他萜类醌的生物合成	1	0.02
磷脂酰肌醇信号系统	4	0.05	氨基酰-tRNA 生物合成	1	0.02
过氧化物酶体	4	0.04	脂肪酸的生物合成	1	0.02
亚油酸代谢	3	0.14	同源重组	1	0.02
异喹啉生物碱的生物合成	3	0.09	真核生物的核糖体生物合成	1	0.01
类固醇的生物合成	3	0.09	光合作用	1	0.01
精氨酸的生物合成	3	0.09	甘油磷脂代谢	1	0.01
氰基氨基酸代谢	3	0.06			

酸的生物合成、倍半萜生物合成和三萜生物合成途径。推测 *ghl* 和 ST-8 茎中的差异表达基因可能与次生代谢物的生物合成过程相关。

2.4 花青素合成相关基因的表达量分析

根据转录组分析结果,筛选出与花青素生物合成途径有关的结构基因和转录因子(图3),分别为

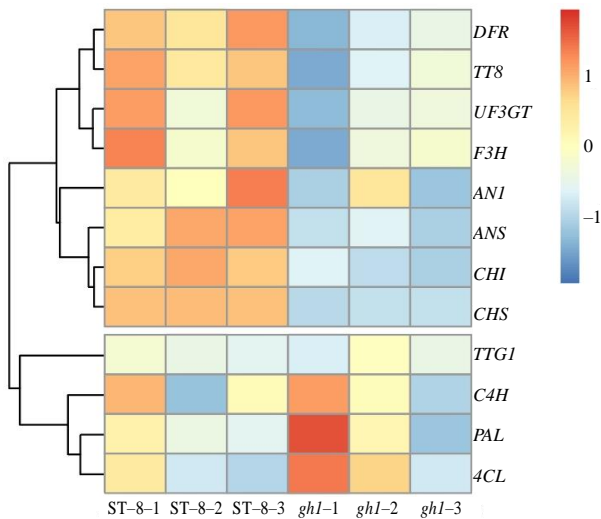


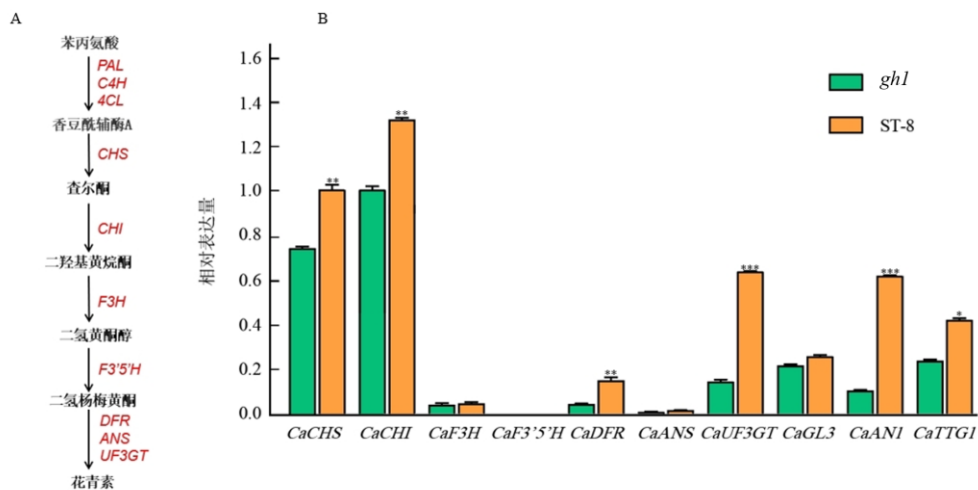
图3 参与花青素合成途径候选基因的表达量热图

Fig. 3 Heatmap of candidate gene expression involved in anthocyanin synthesis pathway

DFR、*TT8*、*UF3GT*、*F3H*、*ANI*、*ANS*、*CHI*、*CHS*、*TTGI*、*C4H*、*PAL*、*4CL*。其中,在 ST-8 紫茎中,*DFR*、*TT8*、*UF3GT*、*F3H*、*ANI*、*ANS*、*CHI*、*CHS* 的表达量均明显高于 *ghl* 绿茎中的表达量,而 *C4H*、*PAL*、*4CL* 的表达量均低于 *ghl* 的, *TTGI* 的表达量无明显差异。

2.5 qRT-PCR 验证与关键基因的筛选

为了验证测序结果的可靠性,采用 qRT-PCR 分析 ST-8 和 *ghl* 茎中与花青素合成相关的基因的相对表达量。如图4所示,花青素合成通路的上游基因(*CHS*、*CHI*)在 ST-8 茎中的表达量显著高于 *ghl* 的,花青素合成通路中间基因(*F3H*、*F3'5'H*)的表达量无显著差异,下游基因(*DFR*、*UF3GT*)在 ST-8 茎中的表达水平显著高于 *ghl* 的。此外,在 ST-8 茎中转录因子(*ANI*、*TTGI*)的表达水平也显著高于突变体。对比 qRT-PCR 的分析结果和转录组测序结果,二者趋势基本一致,说明测序结果可靠。推测至少有4个结构基因(*CHS*、*CHI*、*DFR*、*UF3GT*)和1个转录因子(*ANI*)是影响辣椒茎中花青素生物合成的关键基因。



A 植物花青素生物合成途径; B ST-8 与 *ghl* 茎中花青素通路基因的 qRT-PCR 分析结果。***、**、* 分别表示材料间的差异在 0.05、0.01、0.001 水平具有统计学意义。

图4 参与花青素合成途径的基因 qRT-PCR 分析结果

Fig. 4 qRT-PCR analysis results of genes involved in anthocyanin synthesis pathway

3 结论与讨论

基于基因测序技术的发展及公布的辣椒基因组序列,辣椒分子育种技术得到快速发展^[25]。使用

EMS 作为诱变剂,具有易操作、成本低、专一性强、产生点突变频率高、染色体畸变频率低等优势^[26]。YANG 等^[27]通过 EMS 诱变构建了辣椒突变体库,筛选出辣椒矮秆突变体。李月^[28]通过 EMS 诱变获

得辣椒突变群体, 筛选并培育了稳定的抗炭疽病辣椒品种。在辣椒分子育种中, 利用 EMS 诱变创制新种质是提高育种效率的有效方法^[29]。

颜色是辣椒的一个重要表型特征, 是辨识辣椒物种类别、成熟度和进化特征的重要指标^[9]。目前关于辣椒果实颜色的研究报道^[30-33]较多, 而对茎颜色的研究较少。本研究中, 从 EMS 诱变的 ST-8 突变体库中筛选出了 1 个稳定遗传的绿茎辣椒突变体材料, 对突变体的绿茎和野生型的紫茎进行花青素含量测定后发现, 二者的花青素含量具有极显著差异, 突变体的茎中几乎不含花青素, 说明野生型的茎所呈现的紫色与花青素的合成与积累有关。为了探究影响辣椒茎中花青素生物合成的关键基因, 采用转录组测序技术和 qRT-PCR 技术对突变体和野生型的茎进行差异表达基因分析。转录组测序结果显示, *DFR*、*TT8*、*UF3GT*、*F3H*、*ANI*、*ANS*、*CHI*、*CHS* 在野生型紫茎中的表达水平均显著高于突变体的, *C4H*、*PAL*、*4CL* 的表达水平均低于突变体的, 而 *TTG1* 的表达水平二者之间无明显差异。为验证转录组测序结果的可靠性, 进一步对 ST-8 和 *gh1* 茎中与花青素合成相关的基因进行 qRT-PCR 分析, 结果表明, 在野生型茎中 *CHS*、*CHI*、*DFR*、*UF3GT*、*ANI* 和 *TTG1* 的表达量均显著高于突变体, 分析结果与转录组测序结果基本一致。推测至少有 4 个结构基因(*CHS*、*CHI*、*DFR*、*UF3GT*)和 1 个转录因子(*ANI*)参与调控辣椒茎中花青素的生物合成。植物花青素的代谢调控机制复杂, 其结构基因与转录因子形成了一个庞大的调控网络, 且花青素的合成与积累易受环境因素的影响, 本研究筛选出的影响辣椒茎中花青素合成的关键基因, 还需进一步研究, 以验证其功能。

参考文献:

- [1] 邹学校, 马艳青, 戴雄泽, 等. 辣椒在中国的传播与产业发展[J]. 园艺学报, 2020, 47(9): 1715-1726.
- [2] 邹学校, 朱凡. 辣椒传入中国的途径与传播路径[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 629-640.
- [3] SALEH B K, OMER A, TEWELDEMEDHIN B. Medicinal uses and health benefits of chili pepper (*Capsicum* spp.): a review[J]. *MOJ Food Processing & Technology*, 2018, 6(4): 325-328.
- [4] 王维亮. 辣椒精深加工项目的探讨和介绍[J]. 辣椒杂志, 2009, 7(2): 34-37.
- [5] 刘莉. 辣椒干制及干燥过程模型的建立[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2018.
- [6] 王国栋. 蓝莓叶片响应低温转色的代谢和分子基础及关键转录因子 *VcMYB9a* 的调控功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [7] 乔廷廷, 郭玲. 花青素来源、结构特性和生理功能的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(2): 388-392.
- [8] 刘淑华, 臧丹丹, 孙燕, 等. 花青素生物合成途径及关键酶研究进展[J]. 土壤与作物, 2022, 11(3): 336-346.
- [9] LIU Y H, LV J H, LIU Z B, et al. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals the mechanism of color formation in pepper fruit (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Food Chemistry*, 2020, 306: 125629.
- [10] WANG J, LIU Y, TANG B Q, et al. Genome-wide identification and capsaicinoid biosynthesis-related expression analysis of the *R2R3-MYB* gene family in *Capsicum annuum* L.[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 598183.
- [11] 梁玉镯, 陈新娜, 陈东亮, 等. MYB 转录因子调控植物花青素生物合成研究进展[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(22): 55-64.
- [12] TAKOS A M, JAFFÉ F W, JACOB S R, et al. Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 1216-1232.
- [13] ZHANG Z S, LIU Y, YUAN Q L, et al. The bHLH1-DTX35/DFR module regulates pollen fertility by promoting flavonoid biosynthesis in *Capsicum annuum* L.[J]. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhac172.
- [14] 王刚. 红花 *WD40* 基因家族分析及 *CtWD40-1* 基因克隆与功能初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- [15] TANG B Y, LI L, HU Z L, et al. Anthocyanin accumulation and transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in purple pepper[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(43): 12152-12163.
- [16] FILYUSHIN M A, DZHOS E A, SHCHENNIKOVA A V, et al. Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes[J]. *Russian Journal of*

- Plant Physiology, 2020, 67(6): 1054–1062.
- [17] ZHOU Y, MUMTAZ M A, ZHANG Y H, et al. Response of anthocyanin accumulation in pepper (*Capsicum annuum*) fruit to light days[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8357.
- [18] CHEN R, YANG C, GAO H, et al. Induced mutation in *ELONGATED HYPOCOTYL5* abolishes anthocyanin accumulation in the hypocotyl of pepper[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135(10): 3455–3468.
- [19] BROWN J, PIRRUNG M, MCCUE L A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool[J]. Bioinformatics, 2017, 33(19): 3137–3139.
- [20] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [21] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions[J]. Genome Biology, 2013, 14(4): R36.
- [22] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [23] TIAN T, LIU Y, YAN H Y, et al. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W122–W129.
- [24] YE J, ZHANG Y, CUI H H, et al. WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W71–W75.
- [25] 王立浩, 张宝玺, 张正海, 等. “十三五”我国辣椒育种研究进展、产业现状及展望[J]. 中国蔬菜, 2021(2): 21–29.
- [26] 谢玲玲, 周火强, 弭宝彬, 等. EMS诱变技术研究概况及应用进展[J]. 湖南农业科学, 2020(6): 92–95.
- [27] YANG B Z, ZHOU S D, OU L J, et al. Construction of mutant population and analysis of dwarf mutants in “6421”(*Capsicum annuum* L.) through EMS mutagenesis[J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(6): 1322–1325.
- [28] 李月. 辣椒炭疽病原菌分离及辣椒突变体炭疽病抗性筛选[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- [29] ARISHA M H. 利用EMS诱变创制辣椒新种质的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [30] 刘宇华. 基于转录组学与靶向代谢组学解析辣椒果实颜色的形成[D]. 长沙: 湖南大学, 2020.
- [31] 霍瑞春. 不同辣椒品质检测及辣椒红素合成相关基因 *Ccs*、*Crtz* 表达分析[D]. 包头: 内蒙古科技大学, 2022.
- [32] 冯鹏龙. 辣椒不同果色类胡萝卜素相关基因的克隆及调控机理研究[D]. 西宁: 青海大学, 2022.
- [33] 周燕. 辣椒果实紫色性状的光响应及遗传研究[D]. 海口: 海南大学, 2021.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳正