

花生花斑种皮花青素生物合成相关 miRNA 及其靶基因鉴定与分析

胡梦蝶¹, 李佳伟¹, 王 梅¹, 刘 彬¹, 马钰聪¹, 赵雨露¹, 杨鑫雷¹,
崔顺立¹, 侯名语¹, 蒋晓霞², 穆国俊¹

(¹ 河北农业大学农学院 / 华北作物种质资源研究与利用教育部重点实验室 / 河北省种质资源实验室, 保定 071001;

² 河北易园生态农业科技有限公司, 保定 071000)

摘要: 花生在世界粮油食品中占有重要地位, 其种皮颜色有白色、红色、紫色、粉红色及花斑等多种颜色, 花斑种皮花生是其独特的成员之一, 具有便于区分的优良性状。本研究以花斑种皮花生 VG-02 为研究材料, 结果表明与花斑种皮颜色合成相关差异表达的 miRNA 富集的代谢途径有苯丙烷生物合成、类黄酮生物合成、异黄酮的生物合成、昼夜节律植物。miRNA 测序结果中共筛选出 86 个差异表达 miRNA, 其中 20 个差异表达的 miRNA 与花生花斑种皮颜色合成相关。其中包括 4 个共同靶向花青素、类花青素和 *IFS2* 靶基因的 miRNA, 即 miR_8、miR_50、miR_51 和 miR_239; 5 个靶向花青素生物合成中结构基因的 miRNA, 即调控 *CHS* 靶基因的 miR_398-x, 调控 *4CL* 靶基因的 miR_482-z, 调控 *F3'H* 靶基因的 miR_266 和 miR_182 以及调控花青素 3-O-葡萄糖苷-6 靶基因的 miR_5; 1 个靶向花青素生物合成调节基因的 miRNA, 即 miR858-y 靶向调控 *MYB2* 和 *MYB3*; 10 个靶向 *CYP450* 靶基因的 miRNA, 即 miR_10、miR_15、miR_61、miR_72、miR_102、miR_116、miR_123、miR_193、miR_256 和 miR_862-z。miRNA 测序与转录组联合分析 KEGG 代谢通路表明类黄酮生物合成成为花生种皮花斑形成最直接的代谢途径。本研究对于全面揭示花斑花生种皮花青素合成的分子机制有重要意义。

关键词: 花生; 花斑种皮; 花青素生物合成; miRNA; 靶基因

Identification and Analysis of miRNA and Its Target Genes Related to Anthocyanin Biosynthesis in Variegated Testa of Peanut

HU Meng-die¹, LI Jia-wei¹, WANG Mei¹, LIU Bin¹, MA Yu-cong¹, ZHAO Yu-lu¹, YANG Xin-lei¹,
CUI Shun-li¹, HOU Ming-yu¹, JIANG Xiao-xia², MU Guo-jun¹

(¹ College of Agronomy, Hebei Agricultural University/National Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation / Hebei Crop Germplasm Resources Laboratory, Baoding 071001;

² Hebei Yiyuan Ecological Agriculture Technology Co., Ltd, Baoding 071000)

Abstract: Peanuts are an important product as part of the world's cereals, oils and foods. Peanut testa are white, red, purple, pink, and variegated. Variegated peanut testa is unique and can be distinguished from other types. In this study, the variegated testa peanut VG-02 was used as the research material. The study revealed that the differentially expressed miRNA-enriched metabolic pathways related to the color synthesis included phenylpropane biosynthesis, flavonoid biosynthesis, isoflavone biosynthesis and circadian rhythm-plant.

收稿日期: 2021-05-19 修回日期: 2021-07-06 网络出版日期: 2021-07-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210519001>

第一作者研究方向为花生种质资源创制与利用, E-mail: 304668586@qq.com

通信作者: 穆国俊, 研究方向为花生种质资源创制与利用, E-mail: mgj99999@126.com

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2019051); 河北省重点研发计划项目现代种业科技专项 (19226363D); 易县易园农业科技园区建设 (2111N004)

Foundation projects: Key Project of Science and Technology Research in Colleges and Universities of the Department of Education in Hebei Province (ZD2019051), Key Project of Science and Technology Research of Modern Seed Industry of the Department of S&T in Hebei Province (19226363D), Construction of Modern Agricultural Garden in Yixian County (2111N004)

Sequencing results showed that 86 miRNAs were differentially expressed, among which 20 miRNAs were related to the color synthesis in variegated testa peanut. Twenty differentially expressed miRNAs related to anthocyanin synthesis in variegated testa peanut included miR_8, miR_50, miR_51 and miR_239, which jointly targeted at anthocyanins, anthocyanidins and *IFS2* target genes. Five miRNAs were found to target at structural genes in the anthocyanin biosynthesis: miR_398-x which regulates *CHS* target genes, miR_482-z which regulates *4CL* target genes, miR_266 and miR_182 which regulate *F3'H* target genes, and miR_5 which regulates the anthocyanin 3-O-glucoside target gene. MiR858-y is a miRNA targeting at anthocyanin biosynthesis regulation gene, which targets at and regulates *MYB2* and *MYB3*. MiR_10, miR_15, miR_61, miR_72, miR_102, miR_116, miR_123, miR_193, miR_256 and miR_862-z target at CYP450 target genes. The joined analysis of KEGG metabolic pathways by miRNA sequencing and transcriptome analysis indicated that flavonoid biosynthesis is the most direct metabolic pathway for the synthesis of testa variegation. This study furthers our understanding of the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in variegated testa peanut.

Key words: peanut; variegated testa; anthocyanin biosynthesis; miRNA; target gene

花生广泛种植在 100 多个国家,在世界粮油占有重要地位,在我国的种植面积有 5400000 hm²^[1]。花生种皮含有多种生物活性物质,不仅美味可口而且是化妆品及保健品的重要原材料^[2]。花青素广泛存在于植物中,具有重要生理作用和医疗保健功能^[3]。花青素具有抗氧化、清除自由基、抗突变、抗癌、延缓衰老、皮肤保健和美容等众多功效^[4-7]。花青素因种类和含量高低不同,可以使植物的花瓣、果实、种皮、叶片等不同的器官呈现不同的颜色^[8]。花生品种间种皮颜色有白色、红色、紫色、粉红色以及花斑等多种颜色且品种间差异显著。影响花生种皮颜色的原因很多,除涉及多个代谢通路的结构基因差异表达外,miRNA 同样会对其产生重要影响。花生花斑种皮在花生家族中别具一格,由于该类型种皮着色区和非着色区具有相同遗传背景,因此成为花生种皮花青素生物合成相关 miRNA 及其靶基因鉴定与分析的理想材料。

植物花青素合成除结构基因、转录因子参与调控植物花青素生物合成,miRNA 对于植物花青素合成也具有一定的调控作用。miRNA (microRNA) 是一类长度为 19~25 nt 的内源性非编码单链小分子 RNA,广泛存在于真核生物体内,可在转录水平、转录后水平及表观遗传水平方面调控基因的表达^[9]。miRNA 起着重要的调控作用,参与很多重要的生命过程,在进化中高度保守,所以在碱基序列和生物功能上具有高度同源性^[10]。有研究表明,国内外已经在动植物等多种生物中鉴别出来了数百个 miRNAs,例如在秀丽新小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 发现的第一个 miRNA,用于可时序调控胚胎后期发育^[11]。植物中的 miRNA 的合成起源于

细胞核,首先形成的是 miRNA 的初级转录本 Pri-miRNA, 其次经过 RNA 聚合酶 III (RNaseIII) 的同源蛋白剪切生成 miRNA 的前体 Pre-miRNA^[12], Pre-miRNA 经过一种 RNaseIIIDCL1 蛋白识别剪切成双链的 miRNA 复合体,最后经过甲基化修饰最终形成 21~23 nt 成熟的单链 miRNA^[13]。成熟的单链 miRNA 经过一些辅助因子组配到蛋白质中,形成蛋白复合体,最终形成具有生物学功能的 miRNA 沉默复合体,在一定的条件下去行使一定的调节功能^[14]。形成 miRNA 沉默复合体后,miRNA 沉默复合体通过抑制靶基因 mRNA 的翻译或者直接降解靶基因 mRNA 来行使调节功能。

现在越来越多的研究利用高通量测序技术分析和挖掘新的 miRNA,同时应用于挖掘花青素相关的 miRNA。miRNA 沉默复合体能够参与植物生长发育、信号传导、环境胁迫响应等众多生理过程,有些 miRNA 复合体能够通过靶向植物花青素合成过程中的转录因子来调控植物花青素的生物合成^[15]。在拟南芥中 miR156 对花青素有正调控作用,通过靶向 *SPL9* 转录因子,影响 *MBW* 复合物的稳定性,从而降低花青素合成过程中的结构基因 *DFR* 的表达,在植株中超表达 miR156,能够通过抑制 *SPL9* 的表达而上调结构基因 *DFR*,从而促进花青素的积累^[16]。番茄的 miR828 可以直接作用于靶基因 *SIMyb7-like*,通过阻碍 *MBW* 转录复合物的稳定性,负调控缺磷胁迫诱导的番茄植株中花青素的生物合成。番茄的 miR858 可以靶向抑制 *SIMyb7-like* 和 *SIMyb7-like* 基因的表达,负调控花青素的生物合成^[17]。有关花生种皮花青素合成的分子机理相关报道较少,花青素生物合成又是一个复杂的生物

过程。有研究表明 miRNA 在植物花青素合成过程中有重要的调节作用,但是 miRNA 在花生花青素合成过程中的调节作用原理尚不清晰,关于花生中有关 miRNA 参与花生花青素合成的研究还未见报道。所以探究清晰 miRNA 在花生花青素合成过程中的调控作用,对于全面揭示花生花斑种皮花青素合成的分子调控机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

VG-02 花生品系由河北农业大学花生育种室提供。2018 年 5 月 6 日采用挂线法标记果针,试验取材为 VG-02 下针后 30 d 和 45 d 非着色区(白色)与着色区(红色)两部分的种皮组织。用于 RNA 提取的花斑种皮部位为下针后 30 d 着色区及非着色区、下针后 45 d 着色区及非着色区,重复 2 次。

1.2 样品总花青素含量测定

对 VG-02 花生种皮采用紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司)进行总花青素含量的测定。设置 3 次生物学重复,求平均值。参照 Huang 等^[18]的方法提取 30 d 和 45 d 着色区和非着色区花生种皮样品的花青素,花青素含量 = $(OD_{530} - 0.25 \times OD_{657})/m$, 其中, OD_{530} : 花青素在 530 nm 波长的光密度, OD_{657} : 花青素在 657 nm 波长的光密度, m : 样品鲜重质量(g)。

1.3 样品 RNA 的提取与质量评估

对 RNA 进行纯度、浓度和完整性的检测,分别采用 Nanodrop/ubit2.0 和 Agilent 2100 bioanalyzer 等方法。将吸光度值 $OD_{260/280} \geq 1.8$, $OD_{260/230} \geq 1.3$, 总 RNA ≥ 250 ng/ μ L, RIN 值 ≥ 8.0 , 28S/18S ≥ 1.5 , 图谱基线无上抬, SS 峰正常的 RNA 样品用于文库构建。

1.4 RNA 文库构建与测序

用 TRIZOL 从下针后 30 d 着色区、下针后 45 d 着色区、下针后 30 d 非着色区、下针后 45 d 非着色区样本中提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳切胶选择 18~30 nt 的片段。分别连接 3' 接头和 5' 接头,然后对连接了两侧接头的 miRNA 进行反转录和 PCR 扩增。最后琼脂糖凝胶电泳回收并纯化约 140 bp 的条带,完成文库构建。构建好的文库使用 Agilent 2100 以及 qRT-PCR 进行质控,进行测序分析。

测序得到的原始图像数据经 base calling^[19]转化为序列数据,采用 Illumina HiSeq 测序仪进行测序,选取 GenBank 和 Rfam 数据库中的 rRNA、scRNA、snoRNA、snRNA、tRNA 来注释测序得到的

tag 序列,利用 blastall 2.2.25 (blastn) 软件,确定大于 97% 的即为筛选出来的比对上 rRNA、scRNA、snoRNA、snRNA、tRNA 的 tags。利用 Bowtie (version 1.1.2) 软件,选定 -v0--best--strata-a 参数,通过 tag 序列比对基因组,确定测序得到 tag 来自基因组的位置。

1.4.1 保守 miRNA 和新的 miRNA 识别及其靶基因预测 将 Clean Reads 利用 Bowtie 软件,分别与 Silva、GtRNAdb、Rfam 和 Rfam 数据库进行序列比对,过滤核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA)、核小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA (snoRNA) 等 ncRNA^[20]以及重复序列,获得包含 miRNA 的 Unannotated reads。利用 miRDeep2 软件将未注释的片段与参考基因组进行序列比对,进行新 miRNA 的预测并进行后续分析。

1.4.2 差异表达 miRNA 筛选 对各样本中 miRNA 进行表达量的统计,并用 TPM 算法对表达量进行归一化处理。利用 DESeq 软件进行差异基因表达分析。在差异表达基因检测过程中,将 Fold Change ≥ 2 且错误发现率 (FDR, false discovery rate) < 0.05 作为筛选标准。采用了公认的 Benjamini-Hochberg 校正方法对原有假设检验得到的显著性 P 值 (P -value) 进行校正,以减少假阳性率,并最终采用 FDR 作为差异表达基因筛选的关键指标。

1.4.3 靶基因注释和功能富集分析 利用 BLAST 软件将预测靶基因序列与 NR (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/>)、Swisspro (<http://us.expasy.org/sprot/>)、GO (<http://www.geneontology.org/>)、COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)、KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 和 KOG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/KOG/>) 数据库比对,获得靶基因的注释信息。利用 clusterProfiler 软件对样品组间差异基因进行富集分析,分析差异表达 miRNA 靶基因在某一通路是否出现过 (over-presentation),即差异表达 miRNA 靶基因的 Pathway 富集分析。利用富集因子 (Enrichment factor) 分析通路的富集程度,并利用 Fisher 精确检验方法计算富集显著性。

1.5 qRT-PCR 验证

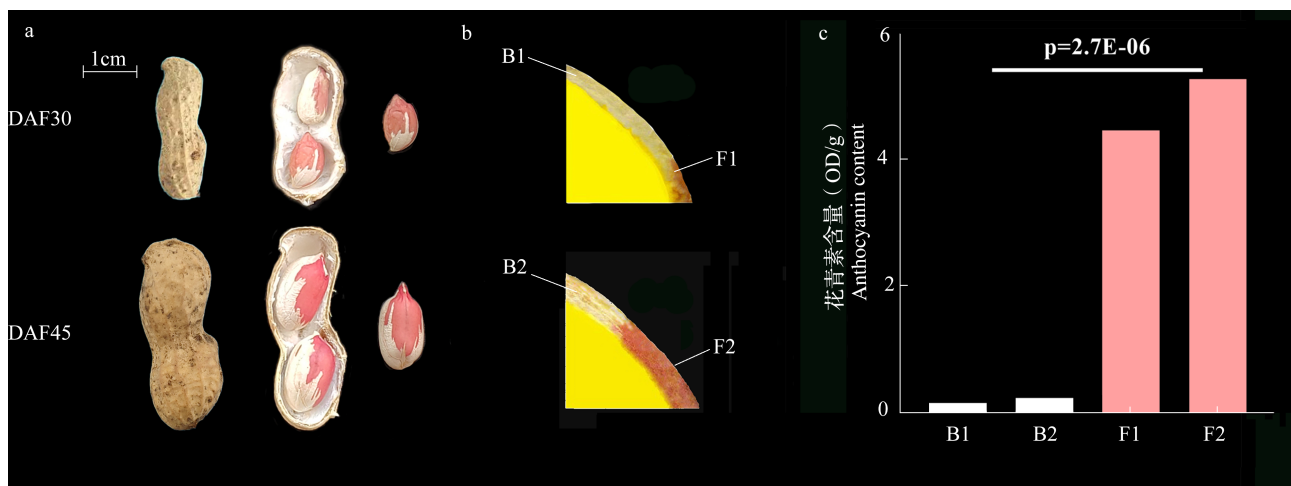
筛选出的与种皮颜色差异相关的结构基因全部进行实时定量 PCR 验证。采用 TRIZOL 法提取总 RNA,合成相应的 cDNA。依据测序所需序列库对应的代表序列,用 Premier5.0 software 设计荧光实时定量 PCR 引物,以花生肌动蛋白 ACT7 基因作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量^[21],对照为下针后 30 d 非着色区、下针后 45 d 非着色区,各目标基因中的表达量为 1,进行 2 次重复。

2 结果与分析

2.1 花斑种皮表型观察

花生花斑种皮着色区色素形成始于下针后 30 d, 是色素形成相关基因表达的活跃期, 下针后 45 d 后, 种皮颜色趋于稳定, 变化不明显(图 1a)。对花

生切片进行体视显微镜观察, 表明下针后 45 d 相对于下针后 30 d 着色区颜色加深(图 1b)。同时对花生种皮进行色差值和总花青素含量测定, 结果表明, 着色区花青素含量是非着色区的 33.69~59.50 倍, 差异显著性 $P=2.7 \times 10^{-6}$, 在相同品种中, 下针后 45 d 的花青素含量略高于下针后 30 d(图 1c)。



b: 体视显微镜下放大 20 倍的观察结果。DAF30: 下针后 30 d, DAF45: 下针后 45 d, F1 和 F2 分别代表 DAF30 和 DAF45 着色区, B1 和 B2 分别代表 DAF30 和 DAF45 非着色区, 下同

b: observation results of stereo microscope at 20 times magnifications. DAF30: day at needling 30 day, DAF45: day at needling 45 day, F1 and F2 represent the sample names of the pigmented areas at DAF30 and DAF45, respectively, B1 and B2 represent the sample names of the non-pigmented areas at DAF30 and DAF45, respectively, the same as below

图 1 VG-02 花生下针后 30 d 和 45 d 着色区及非着色区表型变化
Fig.1 Phenotypic variation between pigmented and nonpigmented regions of peanut VG-02 after needle insertion 30 d and 45 d

2.2 转录组测序结果

2.2.1 测序数据质量评估 VG-02 花生品种下针后 30 d 着色区及非着色区、下针后 45 d 着色区及非着色区 4 个样品的 miRNA 测序共得到 51.01 Mb Clean Reads, 各样品不少于 11.71 Mb Clean Reads。去除未知碱基 N(N 为无法识别的碱基) 含量 $\geq 10\%$ 的 Reads, 去除没有 3' 接头序列的 Reads, 去除剪切掉 3' 接头序后短于 18 或长于 30 个核苷酸的序列后, Q30% 均在 93.25% 以上。

2.2.2 miRNA 长度分布 测序结果表明, 4 个样品 miRNA 的整体分布相似, 均集中分布在 21 nt 和 24 nt。着色区及非着色区在下针后 30 d 和下针后 45 d 对比 miRNA 长度丰度分布不同, 下针后 30 d 非着色区、下针后 30 d 着色区、下针后 45 d 非着色区、下针后 45 d 着色区这 4 个样品在 21 nt 长度的 miRNA 分别占比 12.36%、14.95%、28.35% 和 31.16%。下针后 30 d 非着色区、下针后 30 d 着色区、下针后 45 d 非着色区、下针后 45 d 着色区这 4 个样品在

24 nt 长度的 miRNA 分别占比 10.17%、15.33%、27.76% 和 23.75%(图 2), 测序结果符合要求, 可进一步分析比较。

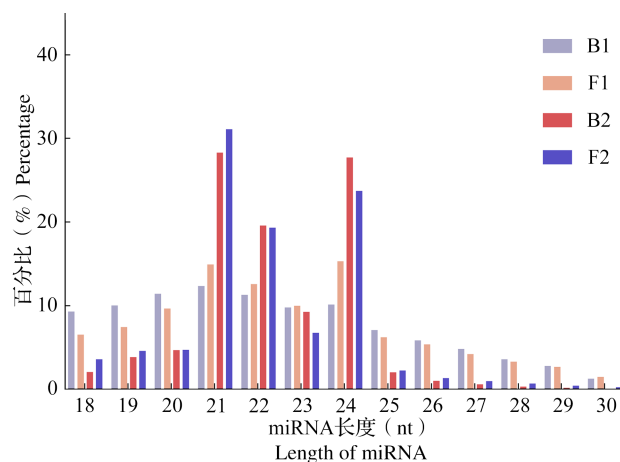
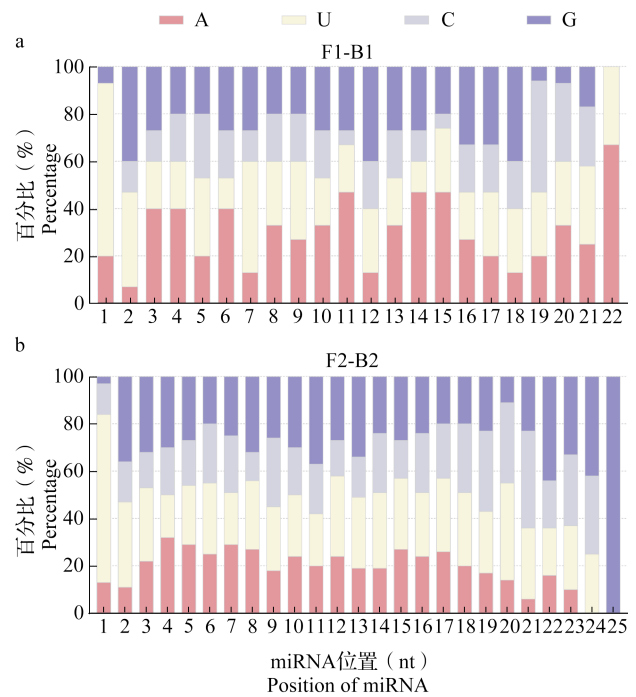


图 2 花斑花生不同部位 miRNA 长度分布
Fig.2 miRNA length distribution in different parts of variegated peanut

2.2.3 已知 miRNA 与新预测 miRNA 的鉴定 共检测到 1037 个 miRNA, 已知的 miRNA 358 个, 新预测的 miRNA 679 个其长度丰度分布相同, 均集中分布在 21 nt。但已知 miRNA 和新预测 miRNA 的首位碱基分布偏好不同, 下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组即着色区下针后 30 d 着色区为对照组, 非着色区下针后 30 d 非着色区为实验组, 下针后 30 d 非着色区的结果相对于下针后 30 d 着色区结果而言已知 miRNA 的首位碱基均偏向于 A, 而新预测的 miRNA 首位碱基偏向于 U; 下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组中已知和预测的 miRNA 的首位碱基均偏向于 G (图 3)。

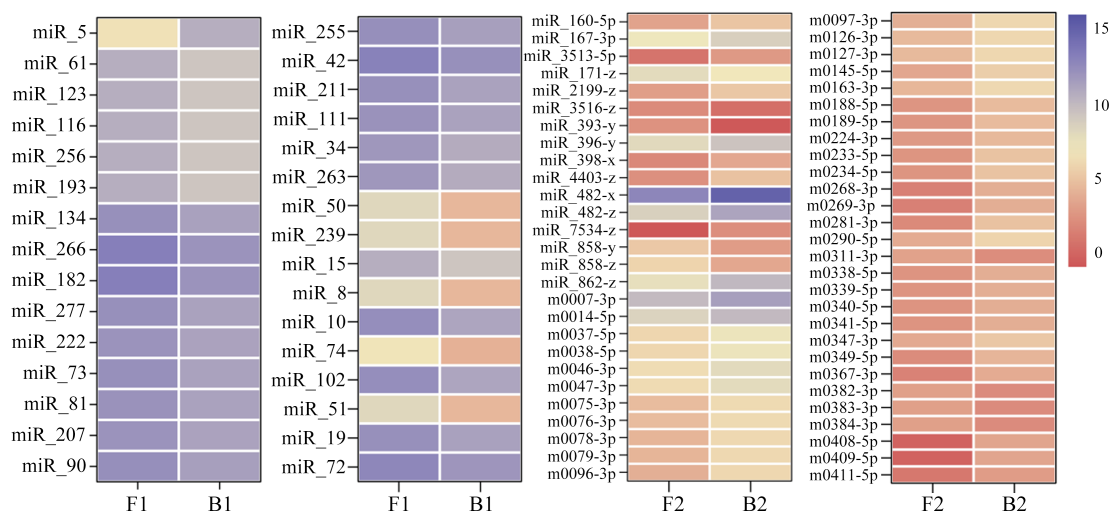
2.2.4 差异表达 miRNA 统计分析 为了更好地了解与花生花斑种皮颜色差异表达的 miRNA, 从鉴定出的 1037 个 miRNA 筛选出 86 个差异表达 miRNA。为了更清楚地了解花生花斑种皮差异表达 miRNA 表达量的差异情况, 对筛选出来的 miRNA 进行热图聚类分析 (图 4)。结果表明下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组共有 31 个差异表达基因, 1 个在非着色区上调 (miR_5), 30 个在非着色区下调; 下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组共有 55 个差异表达基因, 9 个在非着色区上调, 46 个在非着色区下调 (图 4)。其中下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组筛选出来



F1-B1: 下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组, F2-B2: 下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组, 下同
F1-B1: the preference analysis of the first base in the pigmented area 30 d after the needle-the non-pigmented area 30 d after the needle, F2-B2: the preference analysis of the first base in the pigmented area 45 d after the needle-the non-pigmented area 45 d after the needle, the same as below

图 3 miRNA 首位碱基偏好分析

Fig.3 Analysis of miRNA first base preference



以颜色表示 miRNA 的表达量, 表达量越高, 颜色越红; 表达量越低, 颜色越蓝

The expression level of miRNA is expressed by color. The higher the expression level, the redder the color;

the lower the expression level, the bluer the color

图 4 花斑花生种皮不同比较组差异表达 miRNA 聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of differentially expressed miRNAs in different comparison groups of variegated testa peanut

16 个与花生种皮颜色相关的差异表达 miRNA, 1 个在非着色区上调(miR_5), 15 个在非着色区下调(miR_61、miR_123、miR_116、miR_256、miR_193、miR_134、miR_266、miR_182、miR_277、miR_51、miR_72、miR_102、miR_182、miR_239 和 miR_266), 下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组筛选出来 4 个与花生种皮颜色相关的差异表达 miRNA, 1 个在非着色区上调(miR_858-y), 3 个在非着色区下调(miR_398-x、miR_482-z 和 miR_862-z)。

2.2.5 差异表达 miRNA 靶基因预测 86 个差异 miRNA 对应预测到 2352 个靶基因, 1 个 miRNA 可对应多个靶基因。下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组中有 31 个差异表达的 miRNA, 对应预测到 1754 个靶基因, 其中差异表达 miR_5 基因对应预测到 500 个靶基因, 其次是 miR_72 对应预测到 199 个靶基因, miR_42 预测到的靶基因最少, 只有 14 个; 下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组中有 55 个差异表达的 miRNA, 对应预测到 598 个靶基因, 其中差异表达 miR_862-z 基因对应预测到 152 个靶基因, 其次是 miR_482-z 对应预测到 132 个靶基因, m0311-3p 预测到的靶基因最少, 只预测到 1 个靶基因。

2.2.6 差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集分析 经过与 GO 数据库比对 86 个差异 miRNA 对应的 2352 个靶基因, 结果表明下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组中在生物过程条目中, 集中富集在氧化还原过程(Oxidation-reduction process)和蛋白质磷酸化(Protein phosphorylation)。细胞结构条目中, 集中富集在叶绿体(Chloroplast)、胞外区(Extracellular region)。分子功能条目中, 集中富集在蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(Protein serine/threonine kinase activity)、金属离子结合(Metal ion binding)。下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组中在生物过程条目中, 集中富集在细胞成分组织或生物发生(Cellular component organization or biogenesis)和细胞过程(Cellular process), 细胞结构条目中集中富集在细胞部分(Cell part)。分子功能条目中, 集中富集在催化活性(Catalytic activity)和捆绑蛋白(Binding)上(图 5)。

2.2.7 差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 分析 KEGG 通路富集结果表明下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组筛选出来的与花青素生物合成相关的途径有异黄酮的生物合成(Isoflavonoid

biosynthesis)、昼夜节律植物(Circadian rhythm-plant)、植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)和苯丙烷生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis); 下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组筛选出来的与花青素生物合成相关的途径有异黄酮的生物合成(Isoflavonoid biosynthesis)、黄酮类生物合成(Flavonoid biosynthesis)、苯丙烷生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)和植物昼夜节律(Circadian rhythm-plant)(图 6)。

KEGG 通路富集结果表明下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组有 31 个差异表达 miRNA, 预测到 1754 个靶基因, 其中差异表达的靶基因在植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)中富集最多, 有 13 个差异表达靶基因, 其次是剪接体(Spliceosome), 有 8 个差异表达靶基因; 下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组有 55 个差异表达 miRNA, 预测到 598 个靶基因, 其中差异表达的靶基因在代谢途径(Metabolic pathways)中富集最多, 有 40 个差异表达靶基因, 其次是次生代谢产物的合成(Biosynthesis of secondary metabolites), 有 32 个差异表达靶基因。

对检测出的 86 个差异表达的 miRNA 进一步分析, 结果表明下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组筛选出 15 个与花生种皮颜色相关的差异表达靶基因, miR_51、miR_8、miR_239 和 miR_50 均在非着色区下调表达, 且同时调控 4 个相同的靶基因, 分别为 2 个花青素靶基因(09EZ08 和 98HCYL)、1 个类花青素靶基因(G2VN3Q)和 1 个 2-羟基异黄酮酮合酶靶基因(B6E5H4)。miRNA_266 和 miRNA_182 共同在非着色区下调表达, 靶向 1 个二氢黄酮醇-3'-氢化酶靶基因(MCM1YY)。miR_10、miR_15、miR_61、miR_72、miR_102、miR_116、miR_123、miR_193 和 miR_256 均在非着色区下调表达且共同靶向 5 个细胞色素 P450 CYP82D47、CYP82D9X1 和 CYP82D81E8 靶基因(4UMK2V、D1QJXV、77LVUR、BH9RMT、IYR592)。miR_5 在非着色区上调表达靶向 2 个肉桂酰基-CoA 还原酶样 SNL6 亚型 X2(2G52ND 和 JF7ZHE), 2 个细胞色素 b561 结构域蛋白 At2g30890 亚型 X1(CYPb561: URG6V2 和 Z6T6TW), 1 个花青素 3-O-葡萄糖苷-6(UUNZ1L)。

下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组筛选出 19 个与花生种皮颜色相关的差异表达

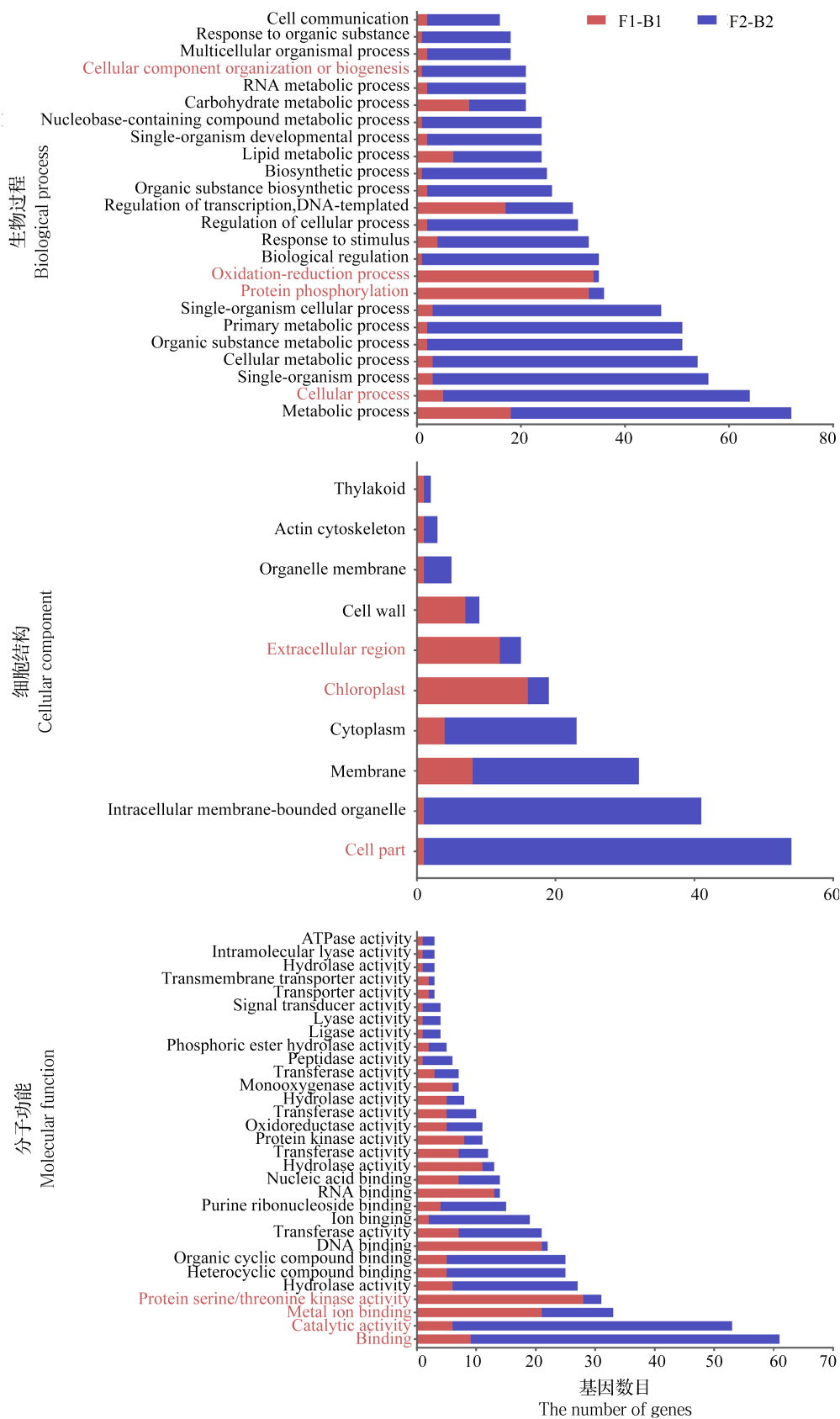
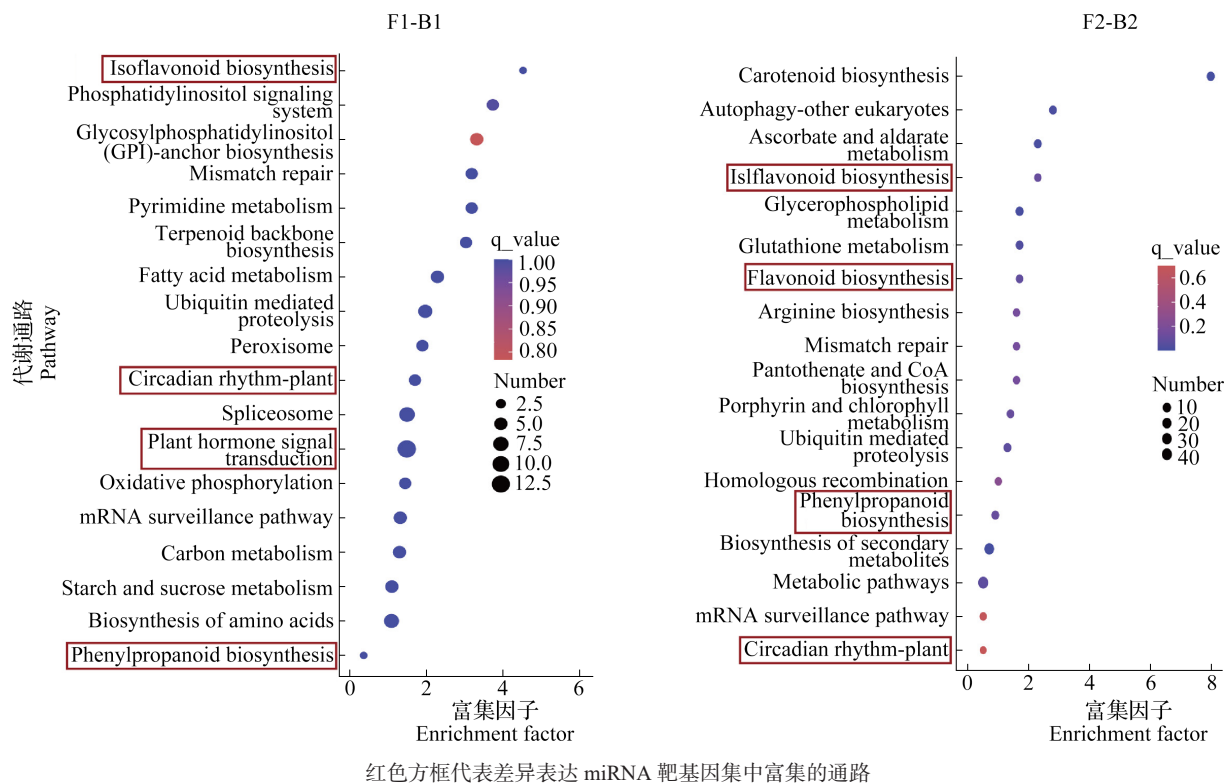


图 5 花斑花生种皮不同比较组差异 GO 富集分析

Fig.5 GO enrichment analysis in different comparison groups of variegated peanut testa



The red boxes represent the pathways that are enriched in differentially expressed miRNA target genes

图 6 不同比较组 KEGG 富集通路

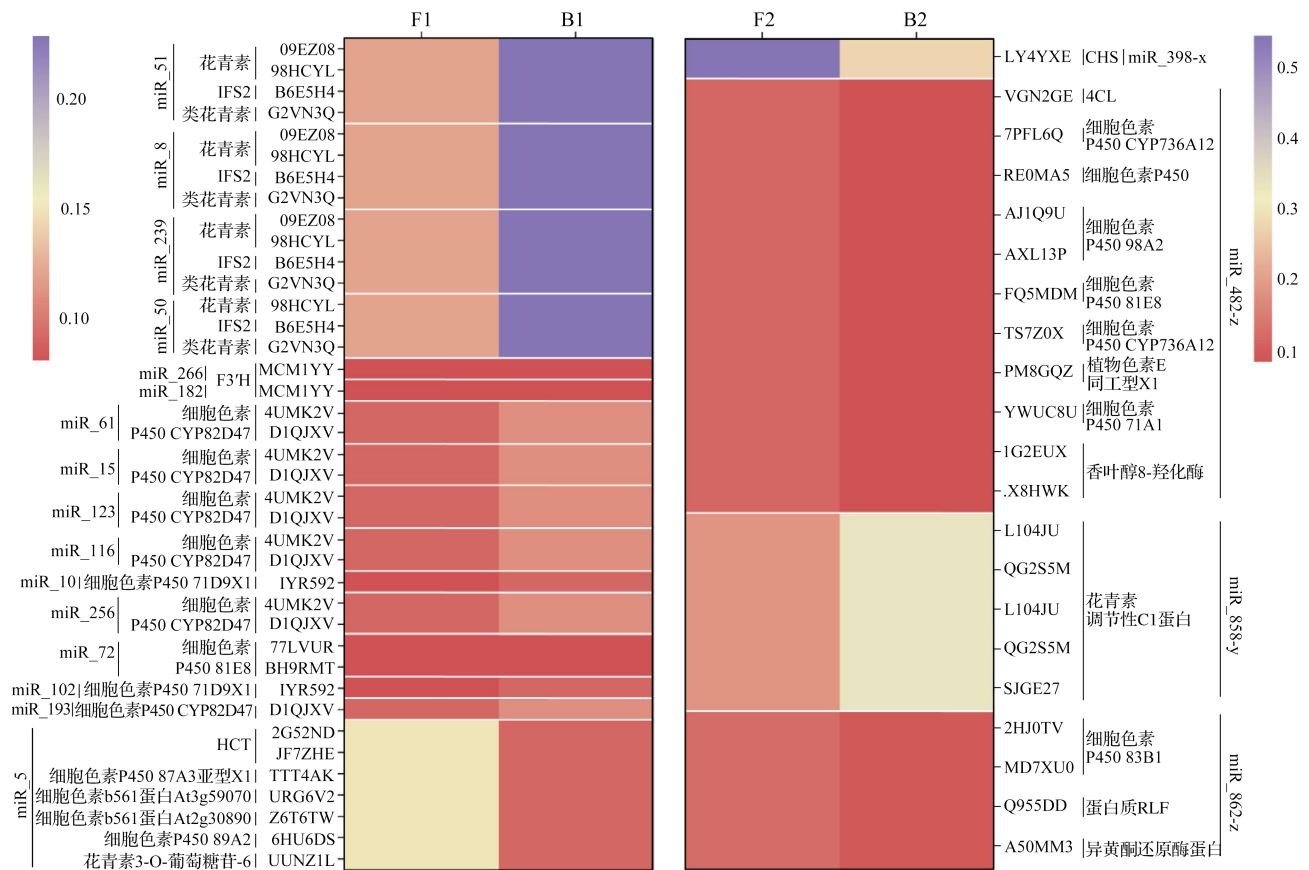
Fig.6 KEGG enrichment pathways in different comparison groups

靶基因, 结果表明 miRNA_398-x 在非着色区上调表达, 靶向 1 个查尔酮合成酶靶基因 (LY4YXE), miR_482-z 在非着色区上调表达, 靶向 1 个 4- 香豆酸-CoA 连接酶 (VGN2GE), 细胞色素 P450 CYP736A12、CYP81E8、CYP98A2 和 CYP71A1 的 7 个靶基因 (7PFL6Q、RE0MA5、AJ1Q9U、AXL13P、FQ5MDM、TS7Z0X 和 YWUC8U), 1 个植物色素 E 同工型 X1 (PM8GQZ), 2 个香叶醇 8- 羟化酶 (1G2EUX 和 X8HWK)。miR_858-y 在非着色区下调表达且靶向 5 个花青素调节性 C1 样蛋白, 其中 3 个为 MYB (V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 靶基因 (MYB2: L104JU、QG2S5M, MYB3: SJGE27)。miR_862-z 在非着色区上调表达, 靶向 2 个细胞色素 P450 83B1 (2HJ0TV 和 MD7XU0); 1 个含细胞色素 b5 结构域的蛋白质 RLF (Q955DD); 1 个异黄酮还原酶样蛋白 (A50MM3) (图 7)。

2.3 转录组与 miRNA 测序联合分析

2.3.1 转录组筛选与花生种皮颜色相关差异表达结构基因 将转录组测序结果与 miRNA 测序结果进行联合分析, 筛选出来的与花生种皮颜色合

成相关的差异表达 miRNA 涉及花青素代谢途径的多个结构基因和调节基因。之前的研究中代谢组与转录组联合分析表明, 黄酮生物合成代谢途径中的差异基因与代谢产物花翠素和矢车菊素的合成直接相关。参与花生种皮颜色形成的结构基因共包括 3 个苯丙氨酸解氨酶 (PAL, phenylalanine ammonia lyase), 1 个肉桂酸-4- 羟化酶 (C4H, cinnamic acid-4-hydroxylase), 2 个查尔酮合成酶 (CHS, chalcone synthase), 1 个二氢黄酮醇-3- 氢化酶 (F3H, dihydroflavonol-3-hydrogenase), 1 个二氢黄酮醇-3'- 氢化酶 (F3'H, dihydroflavonol-3'-hydrogenase), 2 个二氧黄酮醇-4- 还原酶 (DFR, dioxanonol-4-reductase), 2 个无色花青素还原酶 (LAR, leucoanthocyanidin reductase) 的对应基因。下针后 30 d 发育过程中 3 个 PAL, 1 个 C4H, 2 个 CHS, 非着色区较着色区均下调表达; 下针后 45 d, 仅 1 个 PAL 在非着色区较着色区下调表达, 2 个 DFR、2 个 LAR、1 个 F3'H 和 F3H 非着色区较着色区均上调表达, 涉及花青素代谢途径关键酶对应基因的整个代谢途径 (表 1)。



IFS2: 2- 羟基异黄酮酮合酶, F3'H: 二氢黄酮醇 -3'- 氢化酶, HCT: 肉桂酰基 -CoA 还原酶, CHS: 查尔酮合成酶, 4CL: 4- 香豆酸 -CoA 连接酶, RLF: 细胞色素 b5 结构域的蛋白质 RLF, 下同
IFS2: 2-hydroxyisoflavanone synthase, F3'H: dihydroflavonol-3'-hydrogenase, HCT: hydroxycinnamoyl transferase, CHS: chalcone synthase, 4CL: 4-coumarate-CoA ligase, RLF: cytochrome b5 domain-containing protein RLF, the same as below

图 7 花斑花生种皮颜色合成差异基因聚类分析

Fig.7 Cluster analysis of differential expressed genes in variegated testa peanut

表 1 与花生花斑种皮花青素合成相关结构基因分析

Table 1 Analysis of structural genes related to anthocyanin synthesis in variegated testa peanut

分组 Group	基因 ID Gene ID	F1 FPKM	B1 FPKM	FDR	log ₂ FC	调控 Regulated	注释 Note
F1-B1	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.0B4MFB	9.054759	1.449418	7.31×10^{-4}	-2.718222922	下调	PAL ₁
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.NB2RRK	9.630893	0.917825	8.56×10^{-11}	-3.465122425	下调	PAL ₂
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.PUMP6L	12.603869	3.956659	4.95×10^{-3}	-1.736346256	下调	PAL ₃
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.AYA1A5	2.3203895	0.26419	5.477×10^{-3}	-3.06931628	下调	C4H
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.6J3HHE	10.014363	0.6830215	5.04×10^{-3}	-3.917616027	下调	CHS ₁
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.UDJX6I	91.9906315	20.076782	1.65×10^{-10}	-2.256203498	下调	CHS ₂
F2-B2	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.NB2RRK	5.903561	0.920466	8.56×10^{-11}	-3.465122425	下调	PAL ₄
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.K8H9R8	11.108361	26.2737925	5.59×10^{-3}	1.202514755	上调	F3'H
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.HE8J5U	27.034563	62.0989035	9.35×10^{-3}	1.160958266	上调	F3H
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.7JZ58T	11.6955015	144.9762875	4.15×10^{-8}	3.60358824	上调	DFR ₁
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.X8EVF3	29.294177	152.0960005	1.81×10^{-5}	2.334863116	上调	DFR ₂
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.M05HM0	0.8104485	8.8487325	8.14×10^{-13}	3.265464934	上调	LAR ₁
	arahy.Tifrunner.gnm1.ann1.T1J2UZ	1.2703215	18.3464365	2.87×10^{-8}	3.848946241	上调	LAR ₂

FPKM: 每个千碱基的转录每百万映射读取值; FDR: 错误发现率
FPKM: fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FDR: false discovery rate

Fig.8 Transcriptome combined with miRNA sequencing to analyze the pattern of anthocyanin synthesis in variegated testa peanut

代谢途径为类黄酮生物合成和异黄酮生物合成,与转录组联合紧密,最终影响到 2 个花翠素类、4 个原花青素类和 4 个矢车菊素类物质不同的表达调控模式,从而使花生种皮产生颜色差异,调控模式如图 8。

2.3.3 qRT-PCR 分析差异基因表达水平 对花青素代谢相关结构基因进行荧光定量 qRT-PCR 验证。结果表明,下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组中有 7 个结构基因得到验证(图 9a),下针后 45 d 着色区 - 下针后 45 d 非着色区比较组有

8 个结构基因得到验证(图 9b)。筛选出来的基因在 2 个比较组中 qRT-PCR 表达趋势和转录组检测结果差异倍数相近。同时 miRNA 测序结果表明,miR_398-x、miR_482-z、miR_5、miR_266 和 miR_182 调控花青素生物合成中的结构基因。转录组测序结果和 miRNA 测序结果与 qRT-PCR 表达趋势一致,说明 miR_398-x、miR_482-z、miR_5、miR_266 和 miR_182 是调控花斑花生种皮花青素合成中结构基因的关键 miRNA。

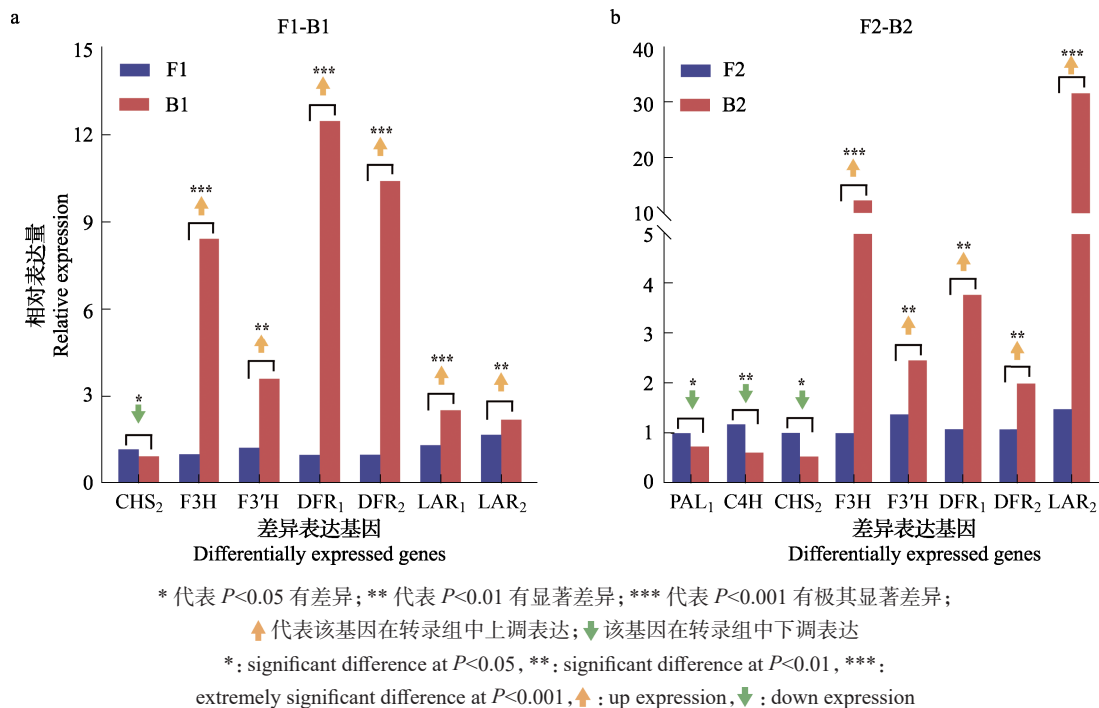


图 9 差异基因 qRT-PCR 验证结果图

Fig.9 Verification results of qRT-PCR of differentially expressed genes

3 讨论

花生在中国的种植面积居世界第二,但是产量居世界第一,是重要的经济油料作物,在我国粮油生产中占据重要地位。花生的种皮颜色多种多样,有黑色、紫色、红色、粉色和白色,花斑花生种皮也是花生中独特的一种。花青素是使植物显现不同颜色的物质,属于类黄酮化合物,是植物在新陈代谢中形成的次级代谢产物^[22-23]。花色苷由花青素与不同的单糖结合形成,吸光后可以呈现红色、蓝色和紫色等多种颜色^[24]。花斑花生种皮更具有易于区分的农艺性状,为育种工作者在后期的选育过程中提供了方便,但是有关花斑花生种皮花青素合成的分子机制尚不明确。本研究选用相同遗传背景的花生种皮 VG-02 为研究材料,分别测定了花生下针后 30 d 着

色区与非着色区和下针后 45 d 着色区与非着色区的 miRNA 的表达情况,旨在探讨 miRNA 对花斑花生种皮花青素合成的影响。

本研究检测出的这 1037 个 miRNA 共检测到 48117 个靶基因,说明 1 个 miRNA 对应多个靶基因,且同一个靶基因同时受多个 miRNA 调控。邓素芳^[25]对同一果皮上不同颜色的野生蕉的研究也得到相同的结果。本研究中共筛选出 86 个差异 miRNA,20 个与花生种皮花青素的合成相关。其中发现下针后 30 d 着色区 - 下针后 30 d 非着色区比较组中 miR_8、miR_50、miR_51 和 miR_239 都在非着色区下调表达,并同时调控 4 个相同的靶基因。这 4 个靶基因分别为 2 个花青素靶基因(09EZ08 和 98HCYL)、1 个类花青素靶基因(G2VN3Q)和 1 个 2-羟基异黄酮合酶靶基

因(B6E5H4)。推测 miR_8、miR_50、miR_51 和 miR_239 很有可能是在早期促进花生种皮花青素合成的关键 miRNA。但是并未看到与这 4 个 miRNA 相关的研究报道,所以这 4 个 miRNA 的相关功能有待进一步研究。

植物花青素生物合成中的结构基因对植物花青素的合成有决定性的作用,同时结构基因受到 miRNA 的调节。本研究筛选出 5 个 miRNA 对应靶向调节花青素合成途径中的结构基因,其中 miR_266 和 miR_182 共同在着色区正向调控 *F3'H*, miR_398-x 负向调控 *CHS*, miR_482-z 负向调控 *4CL*, miR5 负向调控花青素 3-O-葡萄糖苷靶基因。有研究表明 miR398 通过调控对应靶基因 *AP2* 和 *SPL3* 来参与植物花青素生物合成过程^[26-28]。miR482-z 通过靶向调节 *MYB* 基因来参与植物花青素生物合成^[24]。但是未看到有关 miR_266、miR_182 和 miR_5 参与植物花青素生物合成过程的报道。其中本研究与前人研究不同的是 miR_398-x 和 miR_482-z 分别对应靶向花青素生物合成过程中的结构基因 *F3'H* 和 *CHS*,而前人研究的 miRNA 对应靶向转录因子。同时将 miRNA 测序结果与转录组测序结果联系分析发现,在花斑花生花青素生物合成过程中,同样是在下针后 45 d 时,检测到一个 *F3'H* 在着色区上调表达。所以推测 miR_398-x 通过正向调节 *F3'H* 靶基因来促进花斑花生花青素的生物合成的关键调节基因。因此本研究中 miR_398-x、miR_482-z、miR_266、miR_182 和 miR_5 对结构基因在花生种皮花青素合成过程中有重要的调控作用。

有研究表明 miR858 可以通过对靶基因的间接调控作用来调控花青素的生物合成,miR858 在番茄中可以通过靶向调控 MYB12 来调控花青素的合成^[29],同样在拟南芥中 MYB12 也受 miR858 的调控来参与调控黄酮醇生物合成的查尔酮合酶和黄酮醇合酶^[30]。在下针后 45 d 着色区-下针后 45 d 非着色区比较组中,筛选出来一个 miR_858-y 未注释到明确的代谢途径中。但是本研究筛选出来的 miR_858-y 着色区与非着色区比较上调表达,对应 3 个花青素调节性 C1 蛋白的靶基因也是上调表达(L104JU 和 QG2S5M 为 MYB2, SJGE27 为 MYB3)。从而推测 miR_858-y 是通过对花斑花生靶基因的间接调控而促进花青素的合成。Cho 等^[31]发现在马铃薯的各个组织中 miR_858 均有所表达,其中在华颂 66 号和黑金刚中 miR858 的表达与

花青素合成正向相关。Yang 等^[32]在拟南芥中发现 MYBL2 被 miR858 调控来促进花青素的合成。石晓雯^[33]利用转录组与降解组测序技术分析发现 ib-miRNA858、ib-miRNA319、ib-miRNA159 和 ib-miRNA156 通过剪切 MYB 转录因子参与甘薯块茎中的花青素的合成。本研究筛选出来的 MYB2 和 MYB3 基因受 miR_858-y 的正向调控,从而促进花斑花生种皮花青素的合成,这与前人研究一致。

细胞色素 P450 对花斑花生花青素生物合成有复杂的调控模式,有研究表明在苯丙烷类、生物碱、萜类、生萜糖苷类、植物激素等的合成中 P450 都能起重要作用。苯丙烷代谢途径中,18 个已知的 P450 家族中有超过 16 个在参与催化酶的合成中发挥重要作用,例如木质素中间物、黄酮、类黄酮、呋喃香豆素等物质^[34-37]。目前,发现了多种经常出现在苯丙烷类代谢分支途径中关键步骤里的细胞色素 P450,包括 *C4H*、*F3'H*、*F3'5'H*、*IFS2*、*F2H*、*FNS II* 等^[38]。本研究筛选出来 12 个与花青素生物合成相关的 CYP450 靶基因, CYP82D47、CYP82D81E8、CYP82D9X1、CYP71AU50、CYP81E8、CYP98A2、CYP71AN24 和 CYP76B6 在着色区上调表达; CYP87A3、CYPb561、CYP82D9X1 和 CYP83B1 在着色区下调表达。其中 CYP98A2 在苯丙氨酸生物合成和黄酮生物合成途径上调表达促进咖啡酰 CoA 的合成, CYP81E8 在异黄酮生物合成途径促进紫檀素的合成。李翔宇等^[39]分析了不同植物不同的 CYP450 在苯丙氨酸合成途径中的作用,指出在刺甘草和百脉根植物中, CYP81E1/ E6/ E7/ E9 作用于异黄酮 2-羟化酶,与本研究筛选出来的 CYP81E8 有相同的作用。同时在长春花、水稻、拟南芥、矮牵牛花中 CYP75B1/ B2/ B3/ B4 作用于类黄酮 3-羟化酶^[40];在长春花、拟南芥、水稻、朝鲜薊、紫花苜蓿中 CYP73A1-A41 作用于肉桂酸-4-羟化酶^[41]。本研究筛选出的 miR_10、miR_15、miR_61、miR_72、miR_102、miR_116、miR_123、miR_193、miR_256 和 miR_862-z 共同靶向 CPY450,且确定参与花青素合成,但其表达量存在不同的表达情况,该调控机制有待深入研究。

参考文献

- [1] 林茂,赵景芳,郑秀艳,孟繁博,李国林,黄道梅,陈曦,蒋力,不同颜色花生种皮色素提取工艺研究. 花生学报, 2018, 47 (3): 32-39
Lin M, Zhao J F, Zheng X Y, Meng F B, Li G L, Huang D M, Chen X, Jiang L. Study on the extraction technology of different

- color peanut testa pigment. *Journal of Peanut Science*, 2018, 47 (3): 32-39
- [2] 孙奇泽, 高波, 刘辰, 孙莲强, 顾学花, 张倩, 崔莎莎, 李向东. 彩色花生种皮色泽变化及色素沉积规律. *花生学报*, 2015, 44 (2): 1-6
Sun Q Z, Gao B, Liu C, Sun L Q, Gu X H, Zhang Q, Cui S S, Li X D. Regulation of color formation and pigment deposition in skin development process of colored peanut cultivars. *Journal of Peanut Science*, 2015, 44 (2): 1-6
- [3] 王少青. 紫色甘薯块根花青素积累的分子生理机制研究. 福州: 福建农林大学, 2016
Wang S Q. Study on the molecular and physiological mechanism of anthocyanin accumulation in purple sweet potato tubers. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016
- [4] Yoshimoto M, Okuno S, Yoshinaga M, Yamakawa O, Yamaguchi M, Yamada J. Antimutagenicity of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63 (3): 537-541
- [5] Roobha J J, Saravanakumar M, Aravindhan K M, Suganyadevi P. *In vitro* evaluation of anticancer property of anthocyanin extract from *Musa acuminata* bract. *Research in Pharmacy*, 2011, 1 (4): 17-21
- [6] Sschini-Kerth V. 富含花青素天然产物延缓血管衰老的潜力: 内皮衰老作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29 (S1): 20
Sschini-Kerth V. The potential of natural products rich in anthocyanins to delay vascular aging: endothelial aging effect. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2015, 29 (S1): 20
- [7] 段玉清, 刘睿, 谢笔钧. 莲房原花青素对络氨酸酶活力和黑色素生物合成影响的初步研究. *食品科学*, 2004, 25 (3): 169-174
Duan Y Q, Liu R, Xie B J. Preliminary study on the effect of lotus plant proanthocyanidins on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Science of Food*. 2004, 25 (3): 169-174
- [8] 元希武. 桑树花青素生物合成相关基因的鉴定及功能研究. 重庆: 西南大学, 2014
Yuan W X. Identification and function study of mulberry anthocyanin biosynthesis-related genes. Chongqing: Southwest University, 2014
- [9] Katiyar A S, Gao S, Vivian S A, Jin H. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 2007, 21 (23): 3123-3134
- [10] Kim V N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6 (5): 376-385
- [11] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75 (5): 843-854
- [12] Ren G, Xie M, Dou Y, Zhang S, Zhang C, Yu B. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (31): 12817-12821
- [13] Fabian M R, Sundermeier T R, Hurschler B A, Ding X C, Yu B, Wang H. miRNA regulation of the translational machinery. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2010, 50 (4): 5
- [14] Naqvi A R, Sarwat M, Hasan S, Roychodhury N. Biogenesis, functions and fate of plant micro RNAs. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227 (9): 3163-3168
- [15] Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 2013, 18 (9): 477-483
- [16] Gou J, Felippes F, Liu C, Weigel D, Wang J. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor. *The Plant Cell*, 2011, 23 (4): 1512-1522
- [17] 贾小云, 刘慧, 沈洁, 李芳, 丁娜, 孙岩, 高昌勇, 李润植. Micro RNA828 负调控缺磷胁迫诱导的番茄花青素生物合成. *中国农业科学*, 2015, 48 (15): 2911-2924
Jia X Y, Liu H, Shen J, Li F, Ding N, Sun Y, Gao C Y, Li R Z. Micro RNA828 negatively regulates tomato anthocyanin biosynthesis induced by phosphorus deficiency stress. *Scientia Agricultura Sinica*. 2015, 48 (15): 2911-2924
- [18] Huang W, Khaldun A B, Chen J, Zhang C, Lv H, Yuan L, Wang Y. A R2R3-MYB transcription factor regulates the flavonol biosynthetic pathway in a traditional chinese medicinal plant, *epimedium sagittatum*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 21 (7): 1089
- [19] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 2010, 26 (1): 139-140
- [20] Cui X, Xu S M, Mu D S, Mu D S, Yang Z M. Genomic analysis of rice microRNA promoters and clusters. *Gene*, 2008, 431 (1-2): 61-66
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408
- [22] Huits H S M, Gerats A G M, Kreike M M, Mol J N M, Koes R E. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal*, 1994, 6 (3): 295-310
- [23] 李金星, 胡志和. 蓝莓花青素的研究进展. *核农学报*, 2013, 27 (6): 817-822
Li J X, Hu Z H. Research progress of blueberry anthocyanins. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2013, 27 (6): 817-822
- [24] 刘仕芸. 马铃薯花青素候选转录激活基因的克隆与分析. 海口: 华南热带农业大学, 2007
Liu S Y. Cloning and analysis of potato anthocyanin candidate transcriptional activation genes. Haikou: South China University of Tropical Agriculture, 2007
- [25] 邓素芳. 基于 RNA-Seq 的野生蕉 (*Musa itinerans*) 果皮颜色差异形成的分子机制研究. 福州: 福建农林大学, 2018
Deng S F. Study on the molecular mechanism of color difference synthesis of wild banana peel based on RNA seq. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018
- [26] Alonso-Peral M M, Li J, Li Y, Allen R S, Schnippenkoetter W, Ohms S, White R G, Millar A A. The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2010, 154 (2): 757-771
- [27] Li S, Liu L, Zhuang X, Yu Y, Liu X, Cui X, Ji L, Pan Z, Cao X, Mo B, Zhang F, Raikhel N, Jiang L, Chen X. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic

- reticulum in *Arabidopsis*. *Cell*, 2013, 153 (3): 562-574
- [28] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto Y Y, Sieburth L, Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 2008, 320 (5880): 1185-1190
- [29] 沈洁. 番茄 miRNA858 的克隆与干旱应答及其对花青素生物合成的负调控机制研究. 晋中: 山西农业大学, 2015
Shen J. The cloning and drought response of tomato miRNA858 and its negative regulation mechanism on anthocyanin biosynthesis. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2015
- [30] Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 2005, 138 (2): 1083-1096
- [31] Cho K, Cho K S, Sohn H B, Ha I J, Hong S Y, Lee H, Kim Y M, Nam M H. Network analysis of the metabolome and transcriptome reveals novel regulation of potato pigmentation. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67 (5), 1519-1533
- [32] Yang F, Cai J, Yang Y, Liu Z. Overexpression of microRNA828 reduces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2013, 115 (2): 159-167
- [33] 石晓雯. 甘薯逆境胁迫和花青素合成相关 microRNA 及其靶基因的鉴定和分析. 晋中: 山西农业大学, 2018
Shi X W. Identification and analysis of microRNA and its target genes related to sweet potato stress and anthocyanin synthesis. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2018
- [34] Ehrling J, Hamberger B, Million-Rousseau R, Werck-Reichhart D. Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 2006, 5: 239
- [35] Tanaka Y. Flower colour and cytochromes P450. *Phytochemistry Review*, 2006, 5: 283
- [36] Ralston L, Yu O. Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Review*, 2006, 5: 459
- [37] Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, Matern U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Review*, 2006, 5: 293-308
- [38] 汪思远, 蒋世翠, 王康宇, 王义, 张美萍. 植物细胞色素 P450 的研究进展. *吉林蔬菜*, 2014 (4): 41-45
Wang S Y, Jiang S C, Wang K Y, Wang Y, Zhang M P. Research progress of plant cytochrome P450. *Jilin Vegetables*, 2014 (4): 41-45
- [39] 李翔宇, 王助乾, 孙春玉, 张美萍, 王义. 植物细胞色素 P450s 及其在植物新陈代谢中的作用. *安徽农业科学*, 2016, 44 (13): 129-134
Li X Y, Wang Z Q, Sun C Y, Zhang M P, Wang Y. Plant cytochrome P450s and its role in plant metabolism. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44 (13): 129-134
- [40] Ayabe S I, Akashi T. Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochemistry Review*, 2006, 5: 271
- [41] Hotze M, Schröder G, Schröder J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 1995, 374 (3): 345-350