

# 花生红色种皮花青素生物合成转录-代谢组学联合分析

张利苹<sup>1</sup>, 王俊玲<sup>1</sup>, 李振华<sup>2</sup>, 李新畅<sup>3</sup>, 王梅<sup>1</sup>, 王红霞<sup>1</sup>, 杨鑫雷<sup>1</sup>, 穆国俊<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学农学院/华北作物种质资源教育部重点实验室/河北种质资源实验室, 保定 071001; <sup>2</sup>濮阳市农林科学院, 河南濮阳 457000; <sup>3</sup>承德市农林科学院, 河北承德 067000)

**摘要:**花生是我国重要的特色出口农产品,在农业发展中占有至关重要的地位。本研究以红珍珠(H)和白珍珠(B)两个花生品种为研究材料,进行转录组学-代谢组学联合分析。在开花后第30天和第45天,红珍珠种皮和白珍珠种皮色差值(L值、a值、b值)及其花青素含量在品种间均表现极显著差异。FPKM层次聚类分析结果表明,开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠和开花后第45天红珍珠相对于开花后第45天白珍珠独有基因分别为1847和1843个。GO分析注释结果表明,8条GO通路与花青素合成密切相关,其中GO:0055114和GO:0016207两个条目分别富集到8个和7个差异表达基因。KEGG富集分析结果表明,6条代谢途径与花青素生物合成显著相关。代谢组学结果表明,差异代谢物定位到了矢车菊素、原花青素、矮牵牛素、翠雀花素、锦葵素、牡丹素及其衍生物。转录组-代谢组联合分析结果表明,类黄酮生物合成途径(ko00941)是种皮颜色形成的关键途径,翠雀花素和矢车菊素为关键差异代谢物。11个差异表达基因qRT-PCR表达趋势基本与转录组测序结果一致。本研究结果对揭示花生种皮花青素生物合成调控机制具有一定的参考意义。

**关键词:**花生;花青素;转录组学;代谢组学

## Transcriptomics-Metabolomics Combined Analysis Highlight the Anthocyanin Biosynthesis Mechanism of Red Testa in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

ZHANG Liping<sup>1</sup>, WANG Junling<sup>1</sup>, LI Zhenhua<sup>2</sup>, LI Xinchang<sup>3</sup>, WANG Mei<sup>1</sup>,  
WANG Hongxia<sup>1</sup>, YANG Xinlei<sup>1</sup>, MU Guojun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Agronomy College, Hebei Agricultural University/North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Education Ministry/Hebei Germplasm Resources Laboratory, Baoding, 071000; <sup>2</sup>Puyang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Puyang 457000, Henan; <sup>3</sup>Chengde Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Chengde 067000, Hebei)

**Abstract:** Peanut is the important unique export agricultural product, which occupies a vital position in agricultural development of China. In this study, two peanut varieties, Hongzhenzhu (H) and Baizhenzhu (B, the control), were used as research samples for transcriptomic-metabolomics combined analysis. At 30 and 45 days after flowering, the testa color (L value, a value, b value) and anthocyanin content of Hongzhenzhu and Baizhenzhu were extremely significantly different between varieties. FPKM hierarchical cluster analysis showed

收稿日期: 2023-12-15 网络出版日期: 2024-07-31

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231215003>

第一作者研究方向为植物种质资源创制与利用, E-mail: 2734182026@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

杨鑫雷, 研究方向为花生遗传与分子育种, E-mail: peanut@hebau.edu.cn

**基金项目:**河北省现代农业产业技术体系建设专项资金(HBCT2024040201);河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2022069);河北省青年拔尖人才资助项目(0602015);河北省重点研发计划项目现代种业科技专项(19226363D);曲阳庄子河太行山农业创新驿站建设项目(903-311718001)

**Foundation projects:** Hebei Province Modern Agricultural Industrial Technology System Construction Special Fund(HBCT2024040201); Science and Technology Research Project of Colleges and Universities in Hebei Province(ZD2022069); Project of Youth Top Talent Funding in Hebei Province(0602015); Key Project of Science and Technology Research of Modern Seed Industry of the Department of Science and Technology in Hebei Province(19226363D); Project of the Construction of Zhuangzi River Taihang Mountain Agricultural Innovation Station in Quyang(903-311718001)

that compared with Baizhenzhu, there were 1847 and 1843 unique genes at 30 and 45 days after flowering in Hongzhenzhu, respectively. GO analysis annotation results showed there were 8 GO terms significantly related to anthocyanin synthesis. Among them, GO:0055114 and GO:0016207 had enriched with 8 (*C4H*, two *CHS*, *F3'H*, two *FLS*, *F3H* and *PAL*) and 7 (two *CHS*, *CHI*, *F3'H*, two *FLS* and *F3H*) differential expressed genes respectively. The results of KEGG enrichment analysis showed that 6 metabolic pathways were significantly related to anthocyanin biosynthesis, respectively. Metabolomics results showed that cyanidin, procyanidin, petunidin, delphinidin, malvidin, peony (peonidin) and their derivatives were differential accumulated metabolites (DAMs). The transcriptomics-metabolomics combined analysis showed that flavonoid biosynthesis (ko00941) is the key synthetic pathway and delphinin and centaurea are the key DAMs of testa color formation. The qRT-PCR result of 11 detected DEGs was consistent with the results of transcriptome sequencing. These results of this study have a certain reference significance for revealing the regulatory mechanism of anthocyanin synthesis in peanut testa.

**Key words:** peanut; anthocyanins; transcriptomics; metabolomics

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是豆科落花生属一年生双子叶草本植物<sup>[1]</sup>。花生是重要的油料作物,也是我国重要的特色出口农产品,在我国农业发展中占具有重要地位<sup>[2]</sup>。目前,我国花生种植面积已超过7000万亩,其种植面积和总产量在全球占据领先地位<sup>[3]</sup>。花生不仅营养丰富,而且富含生理活性物质,被誉为“十大长寿食品”之一<sup>[4]</sup>。花生种皮色彩多样,其中粉红色和红色最为常见<sup>[5]</sup>。花生种皮由珠被发育而成,其外层细胞富含花青素<sup>[6]</sup>。花青素不仅具有抗氧化、抗疲劳、抗衰老、抗炎以及抑菌等作用,同时有助于预防和治疗心血管疾病、眼部疾病、神经退行性疾病、血小板减少以及糖尿病<sup>[7-8]</sup>。

花青素生物合成从属于类黄酮生物合成途径,是通过植物内质网内膜上的苯基丙类途径合成的,起始于前体酚类,后经糖基化、甲基化和酰基化等不同修饰形成稳定花青素,最终被运输到液泡中进行积聚<sup>[9]</sup>。张惊宇等<sup>[10]</sup>通过对灰毡毛忍冬的代谢组及转录组学分析,发现湘蕾型与野生型花中的差异表达基因显著富集在苯丙烷生物合成和植物激素信号转导途径,茎中差异基因显著富集在苯丙烷生物合成和类黄酮生物合成途径;在湘蕾型与野生型两个品种的花、茎、叶对比中,黄酮类化合物生物合成相关途径均有显著富集。Shen等<sup>[11]</sup>通过对芸苔属植物RNA-seq分析,发现类黄酮生物合成的基因在不同种皮颜色的种子发育过程中基因表达模式存在差异。在类黄酮生物合成途径中,涉及多种结构基因编码的生物酶,包括苯丙氨酸解氨酶(*PAL*, Phenylalanine ammonia lyase)、肉桂酸4-羟化酶(*C4H*, cinnamate 4-hydroxylase)、4-肉桂酸辅酶A连接酶(*4CL*, 4-cinnamate-CoA ligase)、查尔酮合酶

(*CHS*, chalcone synthase)、查尔酮异构酶(*CHI*, chalcone isomerase)、黄烷酮3-羟化酶(*F3H*, flavanone 3-hydroxylase)、二氢黄酮醇-3'-氢化酶(*F3'H*, dihydroflavonol-3'-hydrogenase)、二氢黄酮醇-3'-5'-氢化酶(*F3'5'H*, dihydroflavonol-3'-5'-hydrogenase)、二氢黄酮醇4-还原酶(*DFR*, dihydroflavonol 4-reductase)、花青素合成酶(*ANS*, anthocyanidin synthase)以及花青素还原酶(*ANR*, Anthocyanidin reductase)等<sup>[12]</sup>。在花青素合成过程中*CHS*是参与类黄酮生物合成的关键反应酶<sup>[13]</sup>,可影响植物颜色深浅的形成。将猕猴桃中注入*CHS*-RNAi载体,*CHS*的表达量以及花青素含量显著降低,致使猕猴桃果肉颜色变浅<sup>[14]</sup>。在草莓成熟过程中*CHS*参与花青素的生物合成,使草莓颜色由绿变红<sup>[15]</sup>。在苍白曲霉花色的目视评价中,从白色到粉红色确定了5个种质材料,其中*CHS*和*ANS*是类黄酮表达的两个关键基因<sup>[16]</sup>。洋葱的*ANS*发生突变,果皮颜色会由紫色转黄色<sup>[17]</sup>。另外,MYB(V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)和HY5(ELONGATED HYPOCOTYL 5)转录因子均对植物花青素合成与积累起着至关重要的作用<sup>[18]</sup>。存在于花生种皮的花青素主要为飞燕草色素和矢车菊色素这2种色素,花生种皮颜色的深浅与飞燕草色素和矢车菊色素的含量成正比。*CHS*、*CHI*、*DFR*、*F3'H*和*ANS*等基因与花生种皮颜色的形成密切相关<sup>[19]</sup>。赵钰涵<sup>[20]</sup>通过QTL-seq等方法对花生种皮花青素积累关键基因进行定位并进行转录组测序,结果表明深色种皮花生的花青素含量显著高于浅色种皮花生,花青素合成过程中的*F3H*和*F3'H*与R2R3-MYB转录因子均影响花生种皮颜色的形成。

目前为止,尽管花青素的相关研究已被国内外食品健康学家以及植物育种家所关注,但对花生种皮花青素生物合成分子机理的研究鲜有报道。本研究以红珍珠和白珍珠为研究材料,旨在对花生红色种皮花青素合成途径中的差异表达基因(DEGs, differential expressed genes)以及差异代谢物(DAMs, differential accumulated metabolites)进行转录组学-代谢组学联合分析,为花生种皮花青素生物合成分子调控机制的揭示提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为红色种皮的红珍珠(H)和白色种皮的白珍珠(B),由河北农业大学花生育种研究室提供。红珍珠为河北省保定市易县农家品种,白珍珠来自酥珍珠×冀0607-17的杂交后代品系。采用两年一点田间设计,于2021年5月20日和2022年5月13日分别在保定易园太行山农业创新驿站试验基地种植(种植行数10行,行长3 m,穴距15 cm,1粒/穴)。采用果针挂牌方式确定果针入土的发育时间,挂牌位置为果柄和即将入土果针头部的中上部位。选择开花后第30天和开花后第45天作为花生样本的取样时期,其中红珍珠和白珍珠在开花后第30天、开花后第45天的样品分别标识为H1、H2和B1、B2。每个样本分别选取5棵单株,用消毒的解剖刀剥取新鲜种皮样品10 g,用锡箔纸包裹后置于液氮冷冻,-80℃保存,3次生物学重复,用于花青素含量检测、转录组测序、代谢组检测和qRT-PCR检测。

### 1.2 花生种皮色差值的测定及体式显微镜观察

采用色彩色差计(MINOLTA CR-300,柯尼卡美能达投资有限公司,日本)测定B1、B2、H1、H2种皮的L、a、b色度空间<sup>[21]</sup>,3次生物学重复。色值在L、a、b色度空间中,L表示亮度,取值为0~100,随着取值的增大,由黑色逐渐变为白色;a和b是色度坐标,有正负之分,取值均为-60~+60,a值从+a(+60)~-a(-60),颜色由红色到绿色;而b值从+b(+60)~-b(-60),颜色是由黄色到蓝色;当a、b取值为0(坐标原点),表现为无色。总色差 $\Delta E$ 的计算方式( $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$ )( $\Delta$ :颜色坐标的差异),当 $\Delta E \leq 2$ 时,人眼几乎无法观察到颜色变化;2< $\Delta E \leq 6$ 时,人眼可以观察到颜色变化,但是不明显; $\Delta E > 6$ 则人眼易观察到颜色变化。

采用体式显微镜(XDL-7000连续变倍体式显微镜,中国)对B1、B2、H1、H2花生种皮样本进行显

微观察。采用0.5%的香草醛溶液对花生横切剖面染色处理20 min,20×体视显微镜观察染色处理后的花生种皮,采用Adobe Photoshop 2020优化背景。

### 1.3 花青素含量测定方法

花青素含量的测定参考黄春兰等<sup>[22]</sup>的测定方法,分别称取B1、B2、H1、H2种皮样品各50 mg放入1.5 mL离心管中,冷冻干燥,采用研磨仪(MM400,莱驰有限公司,中国)30 Hz,1.5 min研磨成粉末,之后加入酸性甲醇(甲醇:HCl的体积比为99:1)700  $\mu$ L,用锡箔纸包好,4℃避光过夜。之后离心(4℃,12000 r/min)1 min,取600  $\mu$ L上清液置于新的离心管中,加入1 mL三氯甲烷,再加400  $\mu$ L蒸馏水,于4℃、12000 r/min离心10 min,上清液用于花青素含量测定,3次生物学重复。总花青素含量的测量使用分光光度法(UV-5800,元析仪器有限公司,中国),花青素含量=( $OD_{530} - 0.25 OD_{657}$ )/m,其中, $OD_{530}$ 为花青素在530 nm波长下的吸光值, $OD_{657}$ 为花青素在657 nm波长下的吸光值,m为样品质量。

### 1.4 转录组学分析

转录组测序由百迈客生物科技有限公司(北京)完成。总RNA提取采用的方法是Trizol沉淀法,RNA检测采用NanoDrop ND-1000紫外/可见分光光度计(赛默飞世尔科技,美国)和Agilent2100生物分析仪(安捷伦,美国)。

通过删除包含适配器和poy-N的读取以及低质量读取来获得干净数据并计算Q20、Q30和GC含量。在使用HISAT v2.1.0进行索引后,参考四倍体栽培花生基因组([https://v1.legumefederation.org/data/public/Arachis\\_hypo-gaea/Tifrunner.gnm1.arahy.CCJH/](https://v1.legumefederation.org/data/public/Arachis_hypo-gaea/Tifrunner.gnm1.arahy.CCJH/))用于对齐干净的读数。FeatureCounts v1.6.2用于计算映射到每个基因的读段数,并计算每百万碱基对测序的转录本序列每千碱基序列的片段数(FPKM, fragments per kilobase per million),用于表征基因转录本的丰度。

DESeq2 v1.22.1<sup>[8]</sup>用于分析两组间基因的差异表达,并使用Benjamini&Hochberg方法校正P值。GO和KEGG富集分析和差异表达基因的可视化分别通过使用clusterProfiler R软件包<sup>[8]</sup>和Sangerbox(<http://vip.sangerbox.com>)进一步实施。

基因集富集分析(GSEA, gene set enrichment analysis)根据组间差异的倍数对对照组内的所有基因进行排序,然后根据排序结果确定每个基因集的标准富集评分。根据归一化富集评分(NES, normalized enrichment score)>1和错误发现率(FDR,

false discovery rate)  $q$  值  $\leq 0.05$  选择显著富集的基因集。

### 1.5 代谢组学分析

利用 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、MoToDB (<http://www.ab.wur.nl/moto/>) 和 METLIN (<http://metlin.scripps.edu/index.php>) 作为代谢物结构分析的参照标准。使用 Analyst 1.6.3 软件<sup>[8]</sup>对检测数据进行定性和定量分析,3次生物学重复。采用偏最小二乘判别分析(PLS-DA, partial least squares discriminant analysis)进行多因素统计分析,检测不同组间代谢物的交替情况。采用  $\log_2 FC \geq 1$  的绝对值和投影中的可变重要性(VIP, variable importance projection)  $> 1.0$  进行差异代谢物筛选。

### 1.6 转录组与代谢组联合分析

采用 Pearson 相关性分析对差异表达基因和差异代谢物进行联合分析,以相关性系数阈值  $\geq 0.8$ ,

$P$  值  $< 0.05$  为标准,筛选与花生种皮花青素相关的差异表达基因。

### 1.7 qRT-PCR 验证

采用 Trizol 法提取花生种皮总 RNA,利用 Surescript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(易锦生物技术有限公司,中国)合成 cDNA,利用 Blaze Taq™ SYBR® Green qPCR mix 2.0 试剂盒(艾美捷科技有限公司,中国)进行 qRT-PCR,反应体系参考对应试剂盒说明书。采用三步法进行反应,95 °C 变性 10 s;60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 15 s,40 个循环。qRT-PCR 每一个反应都执行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。ACT7 基因被设置为内参基因,采用 Premier 5.0 software 设计相应的引物(表 1)。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[23]</sup>对 qRT-PCR 的数据进行统计,采用  $t$  检验进行相关表达量数据的显著性分析。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences information

引物名称 Primer name	正向序列(5'-3') Forward sequences (5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
AhACT7	TAAGAACAATGTTGCCATACAGA	GTTGCCCTTGGATTATGAGC
5051	ATCCGCTCTTGAATACATT	TCATCCAACCTCACTACGA
4WXU8P	CCTAATGCCTTGGTTATTC	CCTTCACTGTTGTTCTATG
5H4H17	AATGGTGCTCCTCTTCCT	ATCACACTCACTCTTAATGCTTA
79B99S	GCAATGGTAGGTTCAAGA	GAATGTGGCGATGGATAA
7JZ58T	AATGACTGGCTGGATGTA	GAGGTGGAATAATTGTGATGA
JV9T2X	AGAACTGGAACCTCATCA	GTGTTGTGGAGATTGTTATTG
X2F5F9	TTGTTGATGGCAATGATA	TCTTCTGAGATGGTAACT
TJ3PHW	TGATAGGTGAGGCAAGTT	AGTGAGTGAATGGAAGGA
UDJX6I	CCTTATGTCAAGCGTTAC	TTCTCAGCCAAATCTTTT
UQ0Z3E	CTACTTCTCCACCTTGT	CATACTCGCTTGTAACCT
AYA1A5	ATAGGACTTGTGTTGAT	ATGCCTTCTTCTATTCT

## 2 结果与分析

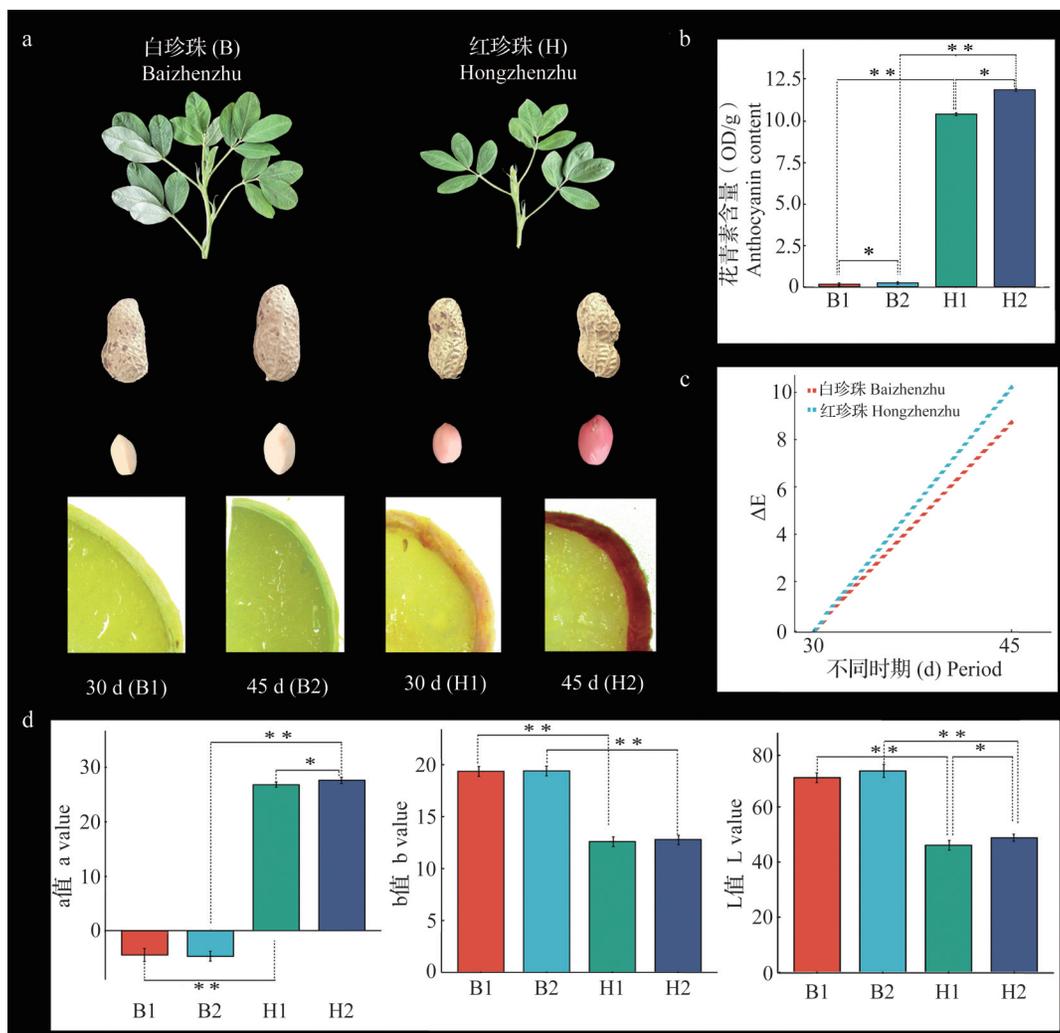
### 2.1 种皮颜色表型鉴定及总花青素含量测定

体视显微镜观察结果表明,从开花后第 30 天至开花后第 45 天,红珍珠的种皮颜色由浅红色变为深红色,白珍珠的种皮保持透明,内部白色子叶的光泽度变强(图 1a)。花青素含量测定结果表明,红珍珠和白珍珠在开花后第 30 天、开花后第 45 天的总花青素含量分别为 10.43 OD/g、11.90 OD/g 和 0.14OD/g、0.22 OD/g(图 1b)。开花后第 45 天相对开花后第 30 天的红珍珠和白珍珠花青素含量均表

现显著差异( $P < 0.05$ ),开花后第 30 天和开花后第 45 天的红珍珠相对于白珍珠花青素含量表现极显著差异( $P < 0.01$ )。色差值  $\Delta E$  的测定结果表明,随着种皮的发育, $\Delta E$  呈现上升趋势。以开花后第 30 天的  $\Delta E$  为对照,红珍珠和白珍珠在开花后第 45 天的  $\Delta E$  值分别为 10.20 和 8.72,均表现为  $\Delta E > 6$ (图 1c)。红珍珠和白珍珠在开花后第 30 天、开花后第 45 天的 L 值分别为 46.07、48.77 和 70.53、73.00;a 值分别为 26.80、29.33 和 -7.40、-7.60;b 值分别为 12.60、12.80 和 19.40、19.40(图 1d)。开花后第 45 天相对开花后第 30 天的白珍珠,L 值、a 值和 b 值均未表现出

显著差异;开花后第 45 天相对开花后第 30 天的红珍珠,a 值和 L 值均表现出显著差异;开花后第 30 天

和开花后第 45 天的红珍珠相对于白珍珠,a 值、b 值、L 值均表现极显著差异。



a: 4 个样品的植株表型及种皮颜色的体视显微镜观察图; b: 4 个样品的花青素含量; c: 4 个样品不同时期的  $\Delta E$  值; d: 4 个样品的色差值 L、a、b 值; 柱形图的横坐标为 4 个样品的名称。B1 和 H1 分别表示开花后第 30 天的白珍珠和红珍珠, B2 和 H2 分别表示开花后第 45 天的白珍珠和红珍珠; \* 表示生物学水平差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示生物学水平差异极显著 ( $P < 0.01$ )

a: Stereo microscope observation of plant phenotype and testa color of 4 samples; b: Anthocyanin content of 4 samples; c:  $\Delta E$  values of 4 samples in different periods; d: Color difference values a, b and L of 4 samples; The horizontal coordinates of the bar chart are the names of the four samples. B1 and H1 represent Baizhenzhu and Hongzhenzhu on the 30th day after flowering, respectively, B2 and H2 represent Baizhenzhu and Hongzhenzhu on the 45th day after flowering. \* indicates significant difference in biological level ( $P < 0.05$ ), \*\* indicates extremely significant difference in biological level ( $P < 0.01$ ); The same as below

图 1 花生种皮体式显微镜观察、吸光值测定及花青素含量变化

Fig. 1 Stereomicroscopic observation, determination of light absorption value and change of anthocyanin content of peanut testa

## 2.2 转录组学分析

**2.2.1 高通量测序结果** 对开花后第 30 天白珍珠 (B1)、开花后第 45 天白珍珠 (B2)、开花后第 30 天红珍珠 (H1) 和开花后第 45 天红珍珠 (H2) 4 份供试样品进行 cDNA 文库构建。转录组测序结果表明, 各样品 Clean data 均达到 5.91Gb, 共获得 95783970 条 Clean reads, 总碱基数有 28558837031 个。花生种皮 GC 含量在 44.49%~45.14% 之间, Q30 碱基百分比均

大于 92.80%。分别将各样品的 Clean reads 与参考基因组进行序列比对, 比对率为 85.10%~94.48% (表 2), 测序数据可靠。

**2.2.2 差异表达基因筛选** FPKM 层次聚类分析结果表明, 开花后第 45 天白珍珠相对于开花后第 30 天白珍珠 (B1 vs B2) 差异表达基因总数为 1538, 其中上调基因为 1147, 下调基因为 391; 开花后第 45 天红珍珠相对于开花后第 30 天红珍珠 (H1 vs H2)

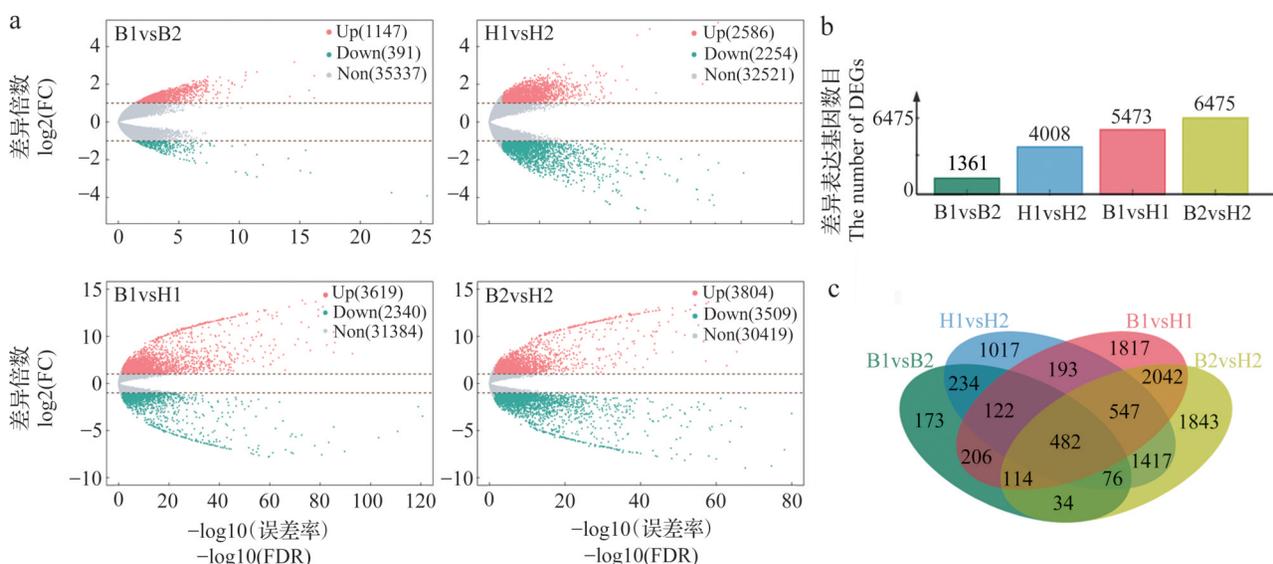
差异表达基因总数为4840,其中上调基因为2586,下调基因为2254;开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠(B1 vs H1)差异表达基因总数为5959,其中上调基因为3619,下调基因为2340;开花后第45天红珍珠相对于开花后第45天白珍珠(B2 vs H2)差异表达基因总数为7349,其中上调基因为3840,下调基因为3509(图2a)。重叠分析结果表

明,开花后第45天白珍珠相对于开花后第30天白珍珠、开花后第45天红珍珠相对于开花后第30天红珍珠、开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠和开花后第45天红珍珠相对于开花后第45天白珍珠的差异表达基因分别为1361、4008、5473和6475个(图2b),独有差异表达基因分别为173、1017、1847和1843个(图2c)。

表2 转录组测序质量分析

Table 2 Analysis of transcriptomic sequencing quality

样本ID Sample ID	干净数据(bp) Clean data	总序列 Clean reads	总碱基数 Clean bases	GC含量(%) GC percentage	Q30比例(%) Q30 percentage	比对率(%) Comparison rate
B1	7065231429	25468703	7588239214	45.14	92.80	94.48
B2	6259352471	25289975	7536265352	44.79	92.80	91.59
H1	6027831574	22589652	6740490641	44.49	92.86	93.64
H2	5915679326	22435640	6693841824	44.80	93.07	85.10



a: 表示比较组不同基因的表达,up表示上调,down表示下调,non表示无差异表达基因;b: 表示4个比较组之间的差异表达基因,数字表示每个比较组各自独有及其重叠的差异表达基因数目

a: Represents the expression of different genes in the comparison group, up represents up-regulation, down represents down-regulation, non represents no differentially expressed genes; b: Represents the differentially expressed genes among the 4 comparison groups, and the number represents the unique and overlapping number of differentially expressed genes in each comparison group

图2 不同发育时期不同部位花生种皮差异表达基因统计分析

Fig.2 Statistical analysis of DEGs in variegated peanut testa at different parts and different development stages

**2.2.3 GO 和 KEGG 富集分析** GO (Gene Ontology)注释系统是一个有向无环图,包含3个主要分支,即生物学过程(Biological process),分子功能(Molecular function)和细胞组分(Cellular component)。GO富集分析结果表明,在生物学过程、分子功能和细胞组分中,开花后第45天白珍珠相对于开花后第30天白珍珠分别注释到413、64和

260个GO条目;开花后第45天红珍珠相对于开花后第30天红珍珠分别注释到341、65和254个GO条目;开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠分别注释到923、653和162个GO条目;开花后第45天红珍珠相对于开花后第45天白珍珠分别注释到999、730和178个GO条目(图3)。

GO注释分析结果表明,8条GO条目与花青素

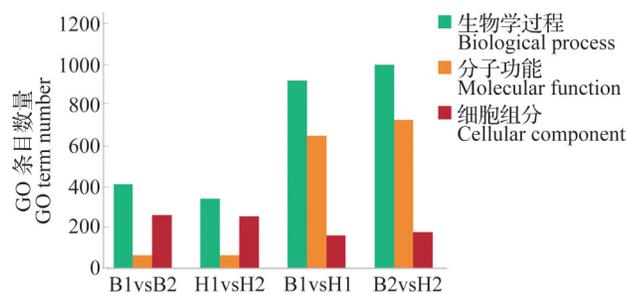


图3 比较组富集到的GO条目数量统计

Fig.3 Statistical analysis of GO term enriched by each comparison group

合成密切相关,在生物学过程、分子功能和细胞组分中均有分布。被注释到生物学过程中的GO条目为L-苯丙氨酸分解代谢过程(L-phenylalanine catabolic process, GO: 0006559)、UV-B反应过程(Response to UV-B, GO:0010224)、含花青素化合物生物合成过程(Anthocyanin-containing compound biosynthetic process, GO: 0009718)和肉桂酸生物合成过程(Innamic acid biosynthetic process, cGO: 0009800);被注释到分子功能中的GO条目为铁离子结合(iron ion binding, GO:0005506)、氧化还原酶活动(Oxidoreductase activity, GO: 0016207)和氧化还原过程(Oxidation-reduction process, GO:0055114);被注释到细胞组分中的GO条目为苯丙氨酸解氨酶活性(Phenylalanine ammonia-lyase activity, GO: 0045548),其中GO:0055114和GO:0016207条目富

集到的差异表达基因较多,分别为8和7个(图4)。

KEGG富集分析结果表明,黄酮和黄酮醇的生物合成(Flavone and flavonol biosynthesis)、类黄酮生物合成(Flavonoid biosynthesis)、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)、苯丙氨酸代谢(Phenylalanine metabolism)、植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)和异黄酮生物合成(Isoflavonoid biosynthesis)6条代谢途径与花青素生物合成显著相关。在开花后第45天白珍珠相对于开花后第30天白珍珠中,植物激素信号转导富集到的基因数量最多,为20个,富集因子为1.41。在开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠中,植物激素信号转导、类黄酮生物合成和苯丙氨酸代谢富集到的基因数量较多,分别为74、15和15个,富集因子分别为1.20、1.40和1.25;开花后第45天红珍珠相对于开花后第45天白珍珠中,植物激素信号转导、苯丙氨酸代谢和类黄酮生物合成富集到的基因数量较多,分别为90、30和23个,富集因子分别为1.33、2.55和1.74;在开花后第45天红珍珠相对于开花后第30天红珍珠中,植物激素信号转导、苯丙氨酸代谢、异黄酮生物合成、黄酮和黄酮醇的生物合成富集到的基因数量较多,分别为69、44、31和23个,富集因子分别为1.66、1.77、2.21和2.46(图5)。

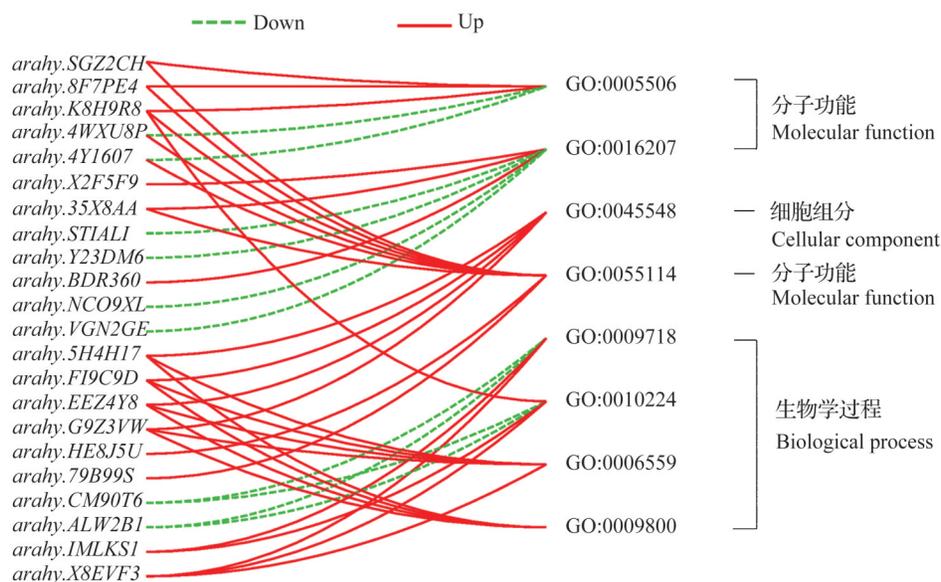


图4 花生种皮花青素生物合成差异表达基因与代谢通路关联分析

Fig.4 Correlation analysis of anthocyanin differentially expressed genes and metabolic pathways of anthocyanin biosynthesis in peanut testa

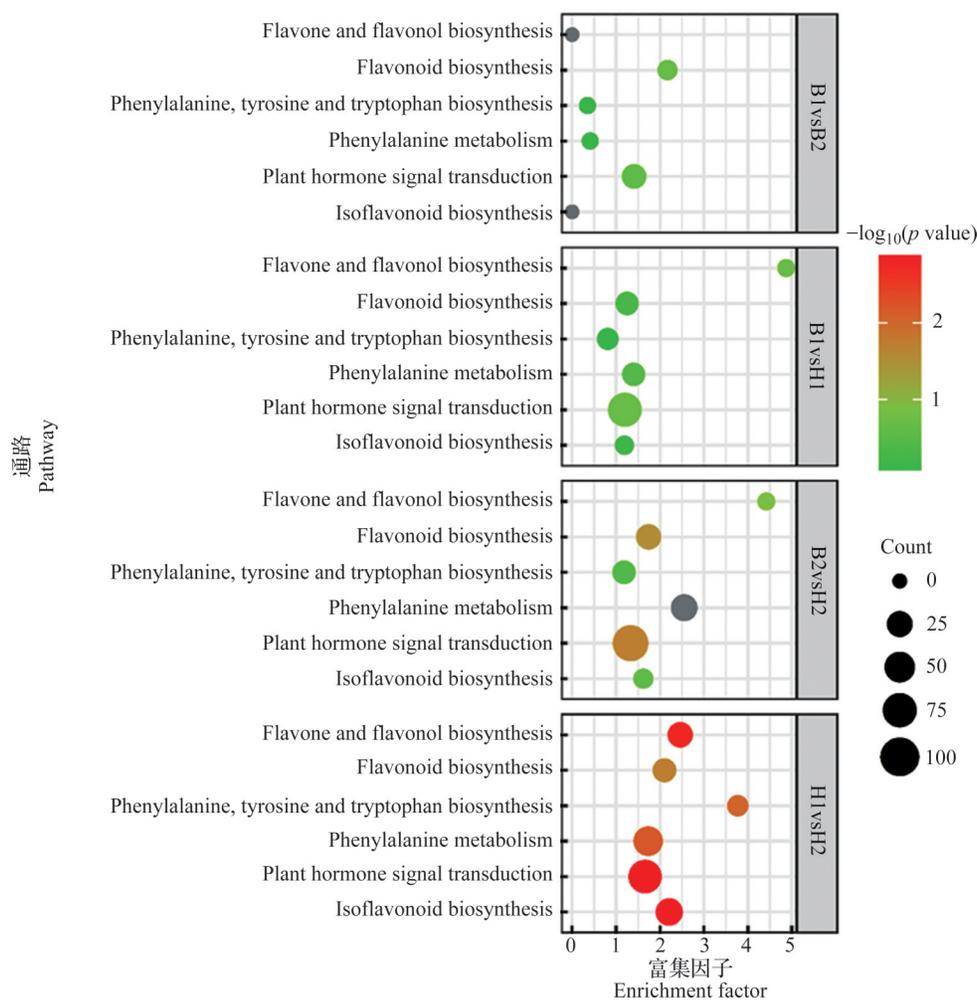


图5 差异表达基因KEGG富集分析

Fig.5 KEGG enrichment analysis of DEGs

### 2.3 代谢组学分析

代谢组学分析结果表明,在4个比较组的差异代谢物中定位到矢车菊素(Cyanidin)、原花青素(Procyanidin)、矮牵牛素(Petunidin)、翠雀花素(Delphinidin)、锦葵素(Malvidin)、牡丹素(Peonidin)及其衍生物(图6)。开花后第45天白珍珠相对于开花后第30天白珍珠,锦葵素3-O-葡萄糖苷(Malvidin 3-O-glucoside)下调,差异倍数为0.77。开花后第45天红珍珠相对于开花后第30天红珍珠,锦葵素3-O-半乳糖苷(Malvidin 3-O-galactoside)、锦葵素3-O-葡萄糖苷、牵牛素3-O-葡萄糖苷(Petunidin 3-O-glucoside)、原花青素A1(Procyanidin A1)和原花青素A2(Procyanidin A2)表现下调,差异倍数为0.11~0.37;翠雀花素和矢车菊素表现上调,差异倍数为0.04~0.82。开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠,锦葵素3-O-葡萄糖苷下调,差异倍数为4.7;原花青素A1、原花青素A2、原花青素B2、原

花青素B3、翠雀花素和矢车菊素表现上调,差异倍数为1.53~14.41。开花后第45天红珍珠相对于白珍珠,锦葵素3-O-半乳糖苷、锦葵素3-O-葡萄糖苷、牵牛素3-O-葡萄糖苷、牡丹素3-O-葡萄糖苷氯化物(Peonidin 3-O-glucoside chloride)和牡丹素3-槐苷-5-葡萄糖苷(Peonidin 3-sophoroside-5-glucoside)表现下调,差异倍数为3.71~5.60;翠雀花素、矢车菊素、原花青素A1、原花青素A2、原花青素B2和原花青素B3表现上调,差异倍数为3.36~14.39。通过对4个比较组差异代谢产物分析,结果表明,同一品种不同时期差异倍数变化较小,同一时期不同品种间差异倍数变化较大。在本研究中,差异表达代谢物的KEGG富集分析,均富集到花青素生物合成途径(Anthocyanin biosynthesis, ko00942)和类黄酮生物合成途径(Flavonoid biosynthesis, ko00941)2条富集通路上。

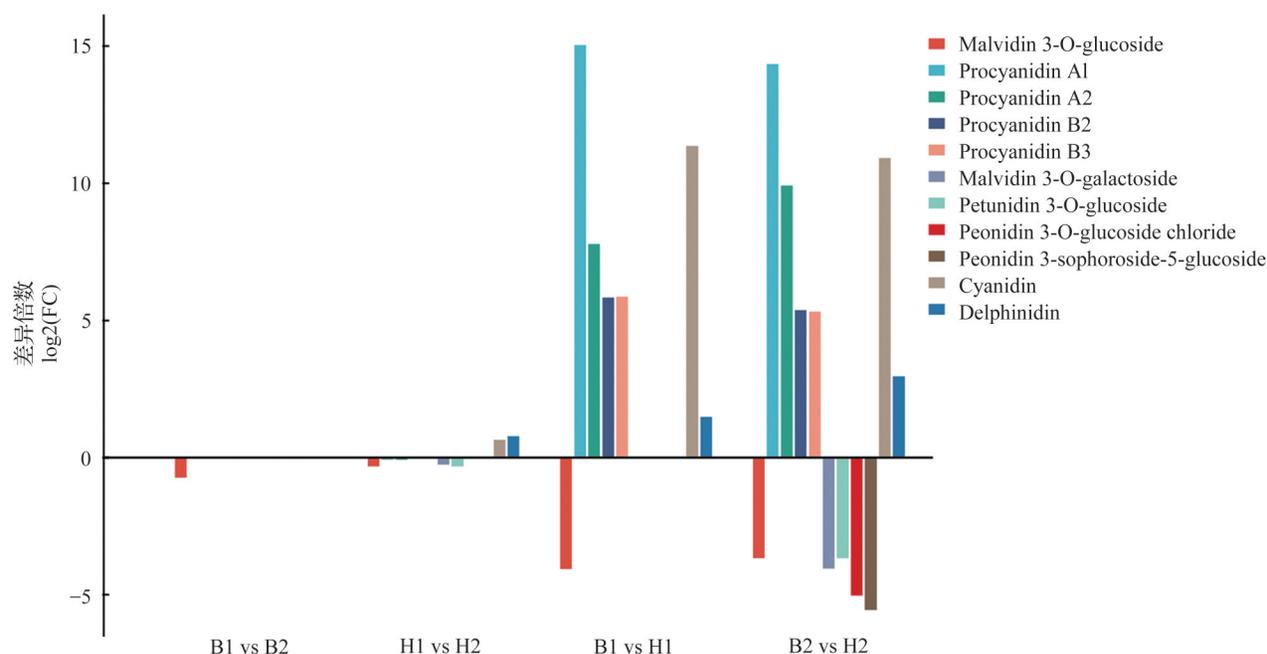


图6 不同比较组的差异代谢物表达调控

Fig. 6 Expression regulation of differential metabolite in different comparison groups

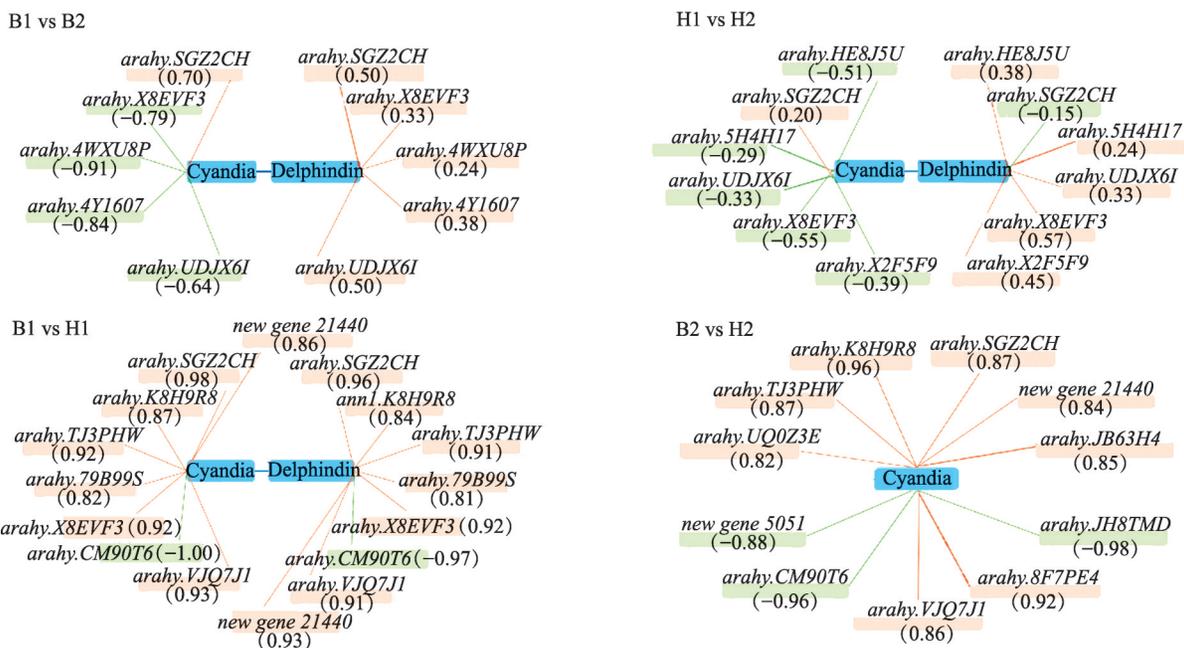
## 2.4 双组学联合分析

转录组和代谢组学联合分析结果表明,差异表达基因与差异代谢物在花青素生物合成途径和类黄酮生物合成途径中存在相关关系(图7)。开花后第45天白珍珠相对于开花后第30天白珍珠有1个 *C4H*、1个 *CHS*、1个 *DFR* 和2个 *FLS* 与矢车菊素和翠雀花素相关。开花后第45天红珍珠相对于开花后第30天红珍珠,1个 *C4H*、1个 *PAL*、1个 *DFR*、1个 *CHS*、1个 *4CL* 和1个 *F3H* 与矢车菊素和翠雀花素相关,其中有 *F3H*(*araby.HE8J5U*) 关键差异表达基因与翠雀花素正相关,与矢车菊素为负相关。开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠有1个 *C4H*、1个 *F3H*、1个 *DFR*、1个 *CHS*、1个 *CHI*、1个 *HCT-1* 和1个 *F3H* 与矢车菊素和翠雀花素相关,其中有 *CHI*(*araby.TJ3PHW*)、*F3H*(*araby.79B99S*) 和 *HCT-1*(*newGene.21440*) 3个关键差异表达基因均为正相关。开花后第45天红珍珠相对于开花后第45天白珍珠有1个 *C4H*、2个 *F3H*、2个 *CHS*、2个 *CHI*、1个 *C-COA*、1个 *HCT*、1个 *ANS* 和1个 *HCT-1* 与矢车菊素相关,其中有 *CHI*(*araby.TJ3PHW*)、*C-COA*(*araby.JB63H4*) 和 *HCT-1*(*newGene.21440*) 3个关键差异表达基因均为正相关。*4CL*(*araby.X2F5F9*)、*HCT*(*new Gene 5051*)、*DFR*(*araby.7JZ58T*)、

*ANS*(*araby.UQ0Z3E*)、*PAL*(*araby.5H4H17*)、*HCT-1*(*new Gene 21440*)、*CHS*(*araby.UDJX6I*)、*CHI*(*araby.TJ3PHW*)、*F3H*(*araby.79B99S*) 和 *FLS*(*araby.4WX8UP*) 等基因与差异代谢物相关系数较高,开花后第30天红珍珠相对于开花后第30天白珍珠 *bHLH*(*araby.VJQ7J1*) 高表达,影响早期花生种皮中花青素的积累,对这11个关键差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。

## 2.5 利用 qRT-PCR 验证关键差异表达基因

对转录组及代谢组筛选出的11个关键差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,结果表明, *4CL*(*araby.X2F5F9*)、*DFR*(*araby.7JZ58T*) 和 *HCT-1*(*new gene 21440*) 在红珍珠和白珍珠中呈线性上升趋势,与转录组学结果一致。*CHS*(*araby.UDJX6I*)、*CHI*(*araby.TJ3PHW*) 和 *ANS*(*araby.UQ0Z3E*) 在红珍珠和白珍珠中均呈线性下降趋势,与转录组学结果一致。*F3H*(*araby.79B99S*) 和 *bHLH*(*araby.JV9T2X*) 在红珍珠中呈线性下降趋势,在白珍珠中呈线性上升趋势,与转录组学结果一致。*PAL* 和 *HCT* 在开花后第45天白珍珠、*FLS* 在开花后第30天红珍珠的 qRT-PCR 验证结果与转录组学结果存在偏差(图8),但整体数据较为可靠。



红线、绿线分别表示两者之间存在正、负相关关系，蓝色长方形标注为相关的差异代谢物，红色长方形、绿色长方形分别标注为与代谢物正、负相关的差异基因，括号内数字表示差异表达基因和差异代谢物之间的相关性系数

The red line and green line indicate that there is a positive and negative correlation, respectively. The blue rectangle is labeled with related differential metabolites. The red rectangle and green rectangle were marked as differential genes that were positively correlated and negatively correlated with metabolites, respectively. The numbers in brackets indicate the coefficient of correlation between DEGs and DAMs

图7 与花青素生物合成相关的差异表达基因和差异代谢物的相关性

Fig. 7 Correlation of DEGs and DAMs related to anthocyanin biosynthesis

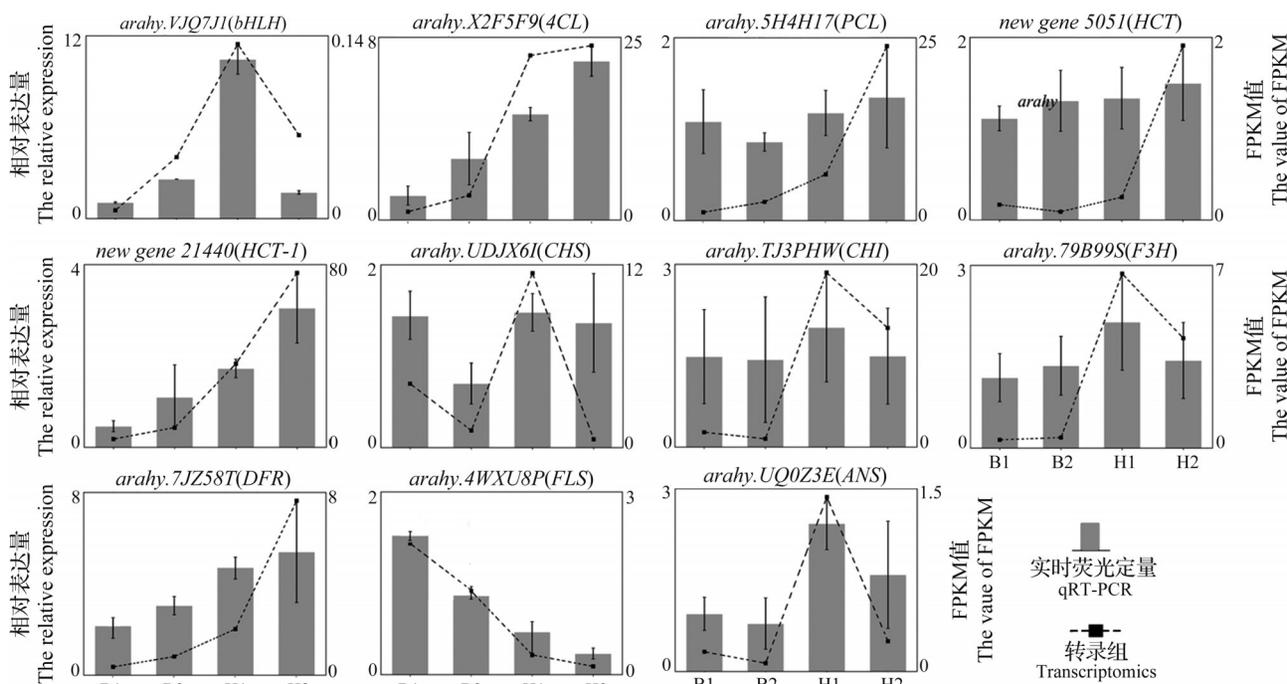


图8 11个关键基因的qRT-PCR检测

Fig.8 The qRT-PCR detection of 11 key differentially expressed genes

### 3 讨论

花青素是水溶性植物色素,其含量与颜色存在相关性<sup>[24]</sup>。类黄酮生物合成作为苯丙烷途径的一个分支,可以产生花青素、异黄酮和黄酮醇<sup>[25]</sup>。花青素具有较高医疗保健价值,广泛存在于花生种皮中。本研究对红色种皮花生进行转录组-代谢组学联合分析,初步表明花生红色种皮的颜色变化主要受矢车菊素、翠雀花素及其衍生物的控制。

通过籽仁表型识别以及总花青素含量对比,本研究发现红珍珠的种皮的花青素含量明显超过白珍珠,该结果与兰花<sup>[26]</sup>、高尔紫薇的花朵<sup>[27]</sup>以及菊花<sup>[28]</sup>的研究结果相吻合。在兰花、高尔紫薇以及菊花中花青素含量的升降均与器官颜色的深浅变化显著相关。色差值分析表明,红珍珠在开花后第30天种皮为浅红色, $\Delta E$ 为0(对照),在开花后第45天种皮变为深红色, $\Delta E > 6$ ,说明开花后第30天至开花后第45天是红珍珠种皮颜色变化的关键期。Li等<sup>[29]</sup>的结果表明菊花花青素生物合成基因的表达均集中在开花后40 d和45 d之间,该结果与本研究结果基本一致。

花青素是植物新陈代谢过程中产生的类黄酮类物质,与植物多种器官的呈色有关,对植物生长的各个阶段均有重要意义。苯丙烷代谢的类黄酮合成途径中包含了花青素合成的一部分过程,这一过程受到多重结构基因、转录因子以及环境信号刺激的影响。在花青素合成过程中 $4CL$ 是一个关键基因,可以将4-香豆酸、肉桂酸转化成香豆酰<sup>[30]</sup>。与开花后第30天白珍珠比较,红珍珠在相同时期 $4CL$ 表达上调,表明 $4CL$ 是决定种皮颜色早期发生显著改变的关键基因之一。Ma等<sup>[31]</sup>的研究证实 $4CL$ 的表达与果实着色程度和花青素积累程度成正比。Liu等<sup>[32]</sup>研究证明 $4CL$ 是光照条件下控制花青素积累的关键结构基因之一。

$CHI$ 能快速催化查尔酮形成异构。 $CHI$ 基因是一个多基因家族, $CHI$ 的表达程度对类黄酮的含量也有一定的影响<sup>[33]</sup>。 $CHI$ 基因隶属于一个由众多基因组成的家族, $CHI$ 的表达量对类黄酮的含量存在影响<sup>[33]</sup>。 $CHS$ 是在类黄酮和花青素的新陈代谢中处于首位的结构基因,促使苯丙氨酸转变为查耳酮,构建了类黄酮物质的基础碳骨架结构。 $CHS$ 基因属于多基因家族,它的编码区和结构都显示出高度的保守性,而且在各个科的植物中也表现出相似的保守特性。本研究证明, $CHS$ 是影响种皮颜色深

浅程度的关键基因之一, $CHS$ 在红珍珠中上调表达并积累大量底物。Saruta等<sup>[34]</sup>对大豆种皮进行测定,筛选出 $CHS$ 基因并证明其表达量与种皮颜色深浅呈正相关。李海芬等<sup>[19]</sup>证明 $CHS$ 是影响花生种皮颜色的深浅的关键基因,表达量越高,种皮颜色越深。

$F3H$ 是2-氧代戊二酸依赖性双加氧酶,可催化二氢山奈酚的合成。二氢山奈酚是三大类3-羟基黄酮类化合物、黄酮醇、花青素和原花青素的前体,是黄酮醇分支点的一个核心酶。研究发现, $F3H$ 与花青素的合成关系密切。 $F3'H$ 和 $F3'5'H$ 都属于细胞色素P450家族,可以催化类黄酮B环上羟基化反应, $F3'H$ 在二氢黄酮醇B环的3'部分进行羟基化反应,并将其转变为砖红色的花葵素糖苷; $F3'5'H$ 可以促进二氢黄酮醇B环3'与5'的羟基转变,从而产出紫色或者蓝色的翠雀素糖苷<sup>[35]</sup>。 $F3H$ 可以催化二氢山奈酚(DHK, dihydrokampferol)、二氢杨梅素(DHM, dihydromyricetin)、二氢槲皮素(DHQ, dihydroquercetin)最终分别生成天竺葵色素、飞燕草素糖苷和矢车菊素糖苷<sup>[36]</sup>。本研究中, $F3H$ 在红珍珠上调表达,为 $DFR$ 和 $FLS$ 积累大量的DHK、DHM、DHQ。Himi等<sup>[37]</sup>在发育中的红粒和白粒小麦品系中筛选到 $F3H$ 在红粒系的晶粒被层组织中高度上调,而在白粒系中无显著表达,该结果与本研究结果一致。

$FLS$ 是合成黄酮醇、槲皮素的关键基因<sup>[33]</sup>, $DFR$ 是决定类黄酮合成或类黄酮代谢途径中花青素合成的关键酶,与无色花青素形成关系十分密切<sup>[24]</sup>,两者均可以同时催化DHK、DHM、DHQ。在本研究中, $FLS$ 在白珍珠和红珍珠的两个时期均为下调表达, $DFR$ 在白珍珠和红珍珠的两个时期均为上调表达,导致DHK、DHM、DHQ的转化倾向于花青素途径,而白珍珠的转化倾向黄酮醇、槲皮素,这说明 $FLS$ 和 $DFR$ 的底物竞争作用对白珍珠的颜色展示起着决定性的影响<sup>[38]</sup>。Zhang等<sup>[39]</sup>对花色牡丹的实时荧光定量PCR结果验证了无色花瓣中 $FLS$ 基因的转录水平显著升高,大大降低了无色花瓣中的花青素含量。在无色花瓣中, $FLS$ 活性的显著增加可能导致底物二氢山奈酚的转移形成黄酮醇。

$ANS(LDOX)$ 是催化无色的花色素形成有色花青素,是类黄酮合成途径下游的关键酶,将无色花青素转变为有色花青素的关键基因之一<sup>[39]</sup>。类黄酮糖基转移酶(UFGT, UDP-glycose flavonoid glycosyltransferase)可以使花青素转变成花色素

苷,可以使其结构由不稳定转变成稳定,可以将无色的花青素转变为有色的花青素<sup>[35]</sup>。本研究中,*ANS*在开花后第30天显著上调,花青素含量大量积累,此时花生种皮开始显色,表明*ANS*是影响种皮显色的关键基因之一。*Wang*等<sup>[40]</sup>研究证明*ANS*是影响苦荞种皮颜色的关键基因之一,*ANS*的表达越高,种皮颜色越深。*Feng*等<sup>[41]</sup>研究证明*ANS*基因在草莓由绿变红的整个着色过程中均有表达,以果实色素快速积累时期表达量最高。

将花青素相关代谢物映射到KEGG数据库中,结果表明,ko00941和ko00942两条途径与花青素生物合成密切相关,这两条途径中的差异代谢物直接或间接地影响花生种皮颜色的形成。本研究中矢车菊素在B1 vs B2比较组中差异表达不显著,在H1 vs H2、B1 vs H1和B2 vs H2比较组中差异表达显著,表明花生种皮颜色变化与矢车菊素显著相关。*雷雨*<sup>[42]</sup>研究表明矢车菊类花青素在青花椒中不积累,而在红花椒中大量积累,在红花椒成熟期含量最高。双组学研究结果探明,矢车菊素是红珍珠种皮色泽变化的主要成因之一,是种皮呈现红色的决定性因素之一。

#### 参考文献

- [1] David J, Abernathy B, Seijo G, Clevenger J, Cannon S. Evaluating two different models of peanut's origin. *Nature Genetics*, 2020, 52(6): 557-559
- [2] Putra R, Rizkiyah N, Che A, Abdul H, Yasir H, Irianto I, Jumakir J, Waluyo W, Suparwoto S, Qomariyah L. Valorization of peanut skin as agricultural waste using various extraction methods: A review. *Molecules*, 2023, 28(11): 4325
- [3] Singh B, Singh U. Peanut as a source of protein for human foods. *Plant Foods For Human Nutrition*, 1991, 41(2): 165-77
- [4] 赵赓九, 胡晖, 刘红芝, 王强. 鲜食花生品质评价和贮藏加工研究进展. *食品科学*, 2023, 44(5): 314-320  
Zhao G J, Hu H, Liu H Z, Wang Q. Research progress on quality evaluation, storage and processing of fresh peanuts. *Food Science*, 2023, 44(5): 314-320
- [5] 朱树良, 赵昆昆, 高古腔, 屈成鑫, 马莹莹, 任锐, 巩方平, 李忠峰, 马兴立, 张苹果, 殷冬梅. 花生种皮颜色智能识别模型的建立与应用. *中国油料作物学报*, 2022, 44(2): 324-330  
Zhu S L, Zhao K K, Gao G Q, Qu C X, Ma Y Y, Ren R, Gong F P, Li Z F, Ma X L, Zhang X G, Yin D M. Establishment and application of intelligent model for peanut seed coat color recognition. *Chinese Journal of Oil Crops*, 2022, 44(2): 324-330
- [6] 鲁明闽, 徐艳, 王易平, 孔英珍, 胡瑞波, 周攻克. 拟南芥种皮粘液质形成及调控机制研究进展. *植物生理学报*, 2018, 54(8): 1288-1304  
Lu M M, Xu Y, Wang Y P, Kong Y Z, Hu R B, Zhou G K. Research progress on the formation and regulation mechanism of mucous in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(8): 1288-1304
- [7] Toomer T. Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(17): 3042-3053
- [8] 胡梦蝶, 李佳伟, 崔顺立, 侯名语, 杨鑫雷, 刘立峰, 蒋晓霞, 穆国俊. 花生花斑种皮花青素合成的转录组-代谢组联合分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(6): 1732-1745  
Hu M D, Li J W, Cui S L, Hou M Y, Yang X L, Liu L F, Jiang X Y, Mu G J. Transcriptome-metabolome analysis of anthocyanin synthesis in peanut specular seed coat. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(6): 1732-1745
- [9] Liu H, Liu Z, Wu Y, Zheng L, Zhang G. Regulatory mechanisms of anthocyanin biosynthesis in apple and pear. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8441
- [10] 张惊宇, 龙雨青, 曾娟, 付学森, 何佳蔚, 周日宝, 刘湘丹. 基于代谢组及转录组学研究灰毡毛忍冬不同品种黄酮类成分差异积累的转录调控机制. *中国中药杂志*, 2024, 12(6): 1-16  
Zhang J Y, Long Y Q, Zeng J, Fu X S, He J W, Zhou R B, Liu X D. Metabolic and transcriptomic studies on the transcriptional regulation mechanism of the differential accumulation of flavonoids in different cultivars of *Lonicera japonica*. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 12(6): 1-16
- [11] Shen S, Tang Y, Zhang C. Metabolite profiling and transcriptome analysis provide insight into testa color in *Brassica juncea*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(13): 7215
- [12] 刘淑华, 臧丹丹, 孙燕, 李金霞, 赵恒田. 花青素生物合成途径及关键酶研究进展. *土壤与作物*, 2022, 11(3): 336-346  
Liu S H, Zang D D, Sun Y, Li J X, Zhao H T. Research advances on biosynthesis pathway of anthocyanins and relevant key enzymes. *Soils and Crops*, 2022, 11(3): 336-346
- [13] 孙家旗, 唐维, 刘永胜. 猕猴桃*CHS*基因RNA干涉载体在果实中的瞬时表达可以有效影响花青素积累. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(5): 929-933  
Sun J Q, Tang W, Liu Y S. Transient expression of *CHS-RNVAi* effectively influences the accumulation of anthocyanin in fruit of kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2014, 20(5): 929-933
- [14] 汤努尔·瓦力拜. 三叶海棠叶色变化原因分析. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017  
Tonur W. Analysis on the causes of leaf color change of *Malus trifoliata*. Yangling: Northwest A&F University, 2017
- [15] Song C, Ring L, Hoffmann T, Huang F C, Slovin J, Schwab W. Acylphloroglucinol biosynthesis in strawberry fruit. *Plant*

- Physiology, 2015, 169(3): 1656-1670
- [16] Donoso A, Rivas C, Zamorano A, Peña Á, Handford M, Aros D. Understanding *alstroemeria pallida* flower colour: Links between phenotype, anthocyanins and gene expression. *Plants (Basel)*, 2020, 10(1): 55.
- [17] Yamazaki M, Nakajima J, Yamanashi M, Sugiyama M, Makita Y, Springob K, Awazuhara M, Saito K. Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 987-995
- [18] 赵亚男, 张会灵, 张中华, 刘菊, 张菊平. 转录因子 *HY5* 在植物花青素合成中的调控作用. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(3): 670-677
- Zhao Y N, Zhang H L, Zhang Z H, Liu J, Zhang J P. Regulation of transcription factor *HY5* in plant anthocyanin synthesis. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(3): 670-677
- [19] 李海芬, 邱金梅, 陈小平, 洪彦彬, 梁炫强. 花生花青素合成相关基因的表达与种皮颜色关系. *中国油料作物学报*, 2017, 39(5): 600-605
- Li H F, Qiu J M, Chen X P, Hong Y B, Liang X Q. Relationship between expression of genes related to anthocyanin synthesis and seed coat color in peanut. *Chinese Journal of Oil Crops*, 2017, 39(5): 600-605
- [20] 赵钰涵. 花生种皮花青素积累关键基因的定位和转录组分析. 济南: 山东师范大学, 2020
- Zhao Y H. Mapping and transcriptome analysis of key genes for anthocyanin accumulation in peanut seed skin. Jinan: Shandong Normal University, 2020
- [21] 孙奇泽. 彩色花生生理特性、产量品质及种皮色素沉积的差异研究. 泰安: 山东农业大学, 2016
- Sun Q Z. Study on difference of physiological characteristics, yield and quality and seed coat pigmentation of colored peanut. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2016
- [22] 黄春兰, 许文婷, 莫子燕, 陆强, 黄燕萍. 红心火龙果皮花青素提取工艺优化及花青素组成分析. *食品科技*, 2023, 48(9): 183-191
- Huang C L, Xu W T, Mo Z Y, Lu Q, Huang Y P. Optimization of anthocyanin extraction process and analysis of anthocyanin composition in pericarp of red *pitaya*. *Food Science and Technology*, 2023, 48(9): 183-191
- [23] Livak J, Schmittgen D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [24] Xia H, Zhu L, Zhao C, Li K, Shang C, Hou L, Wang M, Shi J, Fan S, Wang X. Comparative transcriptome analysis of anthocyanin synthesis in black and pink peanut. *Plant Signaling & Behavior*, 2020, 15(2): 1721044
- [25] Kuang Q, Yu Y, Attree R, Xu B. A comparative study on anthocyanin, saponin, and oil profiles of black and red seed coat peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in China. *International Journal of Food Properties*, 2017, 5(3): 131-140
- [26] Wang L, Albert W, Zhang H, Arathoon S, Boase R, Ngo H, Schwinn E, Davies M, Lewis H. Temporal and spatial regulation of anthocyanin biosynthesis provide diverse flower colour intensities and patterning in *Cymbidium orchid*. *Planta*, 2014, 240(5): 983-1002
- [27] Liu J, Chuang N, Chiou Y, Chin C, Shen Q, Yeh W. Methylation effect on chalcone synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium orchid* cultivars. *Planta*, 2012, 236(2): 401-409
- [28] Mekapogu M, Vasamsetti K, Kwon K, Ahn S, Lim H, Jung A. Anthocyanins in floral colors: Biosynthesis and regulation in chrysanthemum flowers. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6537
- [29] Li L, Zhai Y, Luo X, Zhan G Y, Shi Q. Comparative transcriptome analyses reveal genes related to pigmentation in the petals of red and white *Primula vulgaris* cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2019, 25(4): 1029-1041
- [30] Gang R, Lavid N, Zubieta C, Chen F, Beuerle T, Lewinsohn E, Noel P, Pichersky E. Characterization of phenylpropane O-methyltransferases from sweet basil: Facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 505-519
- [31] Ma Z H, Nan X T, Li W F, Mao J, Chen B H. Comprehensive genomic identification and expression analysis *4CL* gene family in apple. *Gene*, 2023, 8(58): 147197
- [32] Liu C Q, Yao X Q, Li G Q, Huang L, Xie Z J. Transcriptomic profiling of purple broccoli reveals light-induced anthocyanin biosynthetic signaling and structural genes. *PeerJ*, 2020, 8(3): 8870
- [33] 李佳伟. 紫色种皮高油酸花生品种选育及种皮色素 DEGs 组学分析. 保定: 河北农业大学, 2022
- Li J W. Breeding of peanut varieties with purple seed coat and high oleic acid and analysis of seed coat pigment DEGs. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2022
- [34] Saruta M, Ashina H, Matsumoto T, Okubo H, Hiraoka M, Kasai A, Ohnishi S, Funatsuki H, Kawasaki M, Sano T, Senda M. A major gene for tolerance to cold-induced seed coat discoloration relieves viral seed mottling in soybean. *Breeding Science*, 2020, 70(4): 449-455
- [35] 邵婉璐. 野生草莓花青素合成多样性及光照对红颜草莓花青素合成的影响. 杭州: 浙江理工大学, 2018
- Shao W L. Anthocyanin synthesis diversity of wild strawberry and effect of light on anthocyanin synthesis of red strawberry. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2018
- [36] Ohno S, Hori W, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase is involved in phenotypic lability in petals and leaves of bicolor *dahlia* (*Dahlia variabilis*) 'Yuino'. *Planta*, 2018, 247(2): 413-428
- [37] Himi E, Nisar A, Noda K. Colour genes (R and Rc) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Genome*, 2005, 48(4): 747-754

- [38] Lei T, Huang J, Ruan H, Qian W, Fang Z, Gu C, Zhang N, Liang Y, Wang Z, Gao L, Wang Y. Competition between FLS and DFR regulates the distribution of flavonols and proanthocyanidins in *Rubus chingii* Hu. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14(5): 1134993
- [39] Zhang Y, Cheng Y, Xu S, Ma H, Han J, Zhang Y. Tree peony variegated flowers show a small insertion in the *F3'H* gene of the acyanic flower parts. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 211
- [40] Wang D, Yang T, Li Y, Deng F, Dong S, Li W, He Y, Zhang J, Zou L. Light intensity-a key factor affecting flavonoid content and expression of key enzyme genes of flavonoid synthesis in *Tartary Buckwheat*. *Plants (Basel)*, 2022, 11(16): 2165
- [41] Feng Y, Yang S, Li W, Mao J, Chen B, Ma Z. Genome-wide identification and expression analysis of ANS family in strawberry fruits at different coloring stages. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(16): 12554
- [42] 雷雨. 转录组和代谢组联合分析鉴定花椒花青素生物合成关键基因. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023
- Lei Y. Identification of key genes in anthocyanin biosynthesis of *Zanthoxylum* L. by combined transcriptome and metabolome analysis. Yangling: Northwest A&F University, 2023