

朱砂根及其变种红凉伞叶片转录组测序特征分析

胡菊¹ 杨秀玲¹ 张恒² 温家敏³ 王丽秋¹ 廖杰林¹
凌朝宁¹ 陈欣怡¹ 张清艳¹ 吴代妃¹ 梁芳¹

(1. 玉林师范学院智慧农业学院, 广西 玉林 537000; 2. 甘肃农业大学林学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 广西大学林学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 为丰富朱砂根和红凉伞的基因组信息, 以2年生成熟叶片为材料, 进行色差值和色素含量测定及转录组测序特征分析。结果表明: 2种植物叶色存在明显差异, 朱砂根叶片中的叶绿素和类胡萝卜素含量均高于红凉伞, 而红凉伞叶片中的花青素和总黄酮(除花青素外)含量则显著高于朱砂根; 测序获得549625354条原始序列, 组装获得84070条 unigenes, 共注释44304条 unigenes, 其中Nr、KEGG、KOG和SwissProt数据库分别注释40409条、39034条、27949条和32882条 unigenes; 共检测到1558个显著差异表达基因(DEGs), 其中610个上调、948个下调; 4条通路, 即花青素生物合成通路(ko00942)、黄酮和黄酮醇生物合成通路(ko00944)、类黄酮生物合成通路(ko00941)及类胡萝卜素生物合成通路(ko00906)与叶色形成密切相关; 转录因子注释发现ERF和bHLH家族数量最多, 分别为117、104个; 搜索出SSR位点15282个, 并对所有的SSR位点成功设计出39867对引物。因此, 4条通路中C12RT1、CYP98A2、CHS、CCOAOMT1、CHS2、AOG、CYP707A1表达量的显著下调, 而At4g26220、TAT、CCOAOMT、Z-ISO、CYP707A2表达量的显著上调, 可能影响了红凉伞叶色形成。

关键词: 色差值; 色素含量; 转录组测序; 差异表达基因; 转录因子; SSR

中图分类号: Q812; S688.9

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2025)06-0001-13

引文格式: 胡菊, 杨秀玲, 张恒, 等. 朱砂根及其变种红凉伞叶片转录组测序特征分析[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2025, 45(6): 1-13. HU J, YANG X L, ZHANG H, et al. Transcriptome sequencing characteristic analysis of leaves of *Ardisia crenata* and *Ardisia crenata* var. *bicolor* plants[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2025, 45(6): 1-13. DOI: [10.11929/j.swfu.202407016](https://doi.org/10.11929/j.swfu.202407016)



Transcriptome sequencing characteristic analysis of leaves of *Ardisia crenata* and *Ardisia crenata* var. *bicolor* plants

HU Ju¹, YANG Xiu-ling¹, ZHANG Heng², WEN Jia-min³, WANG Li-qiu¹, LIAO Jie-lin¹,
LING Chao-ning¹, CHEN Xin-yi¹, ZHANG Qing-yan¹, WU Dai-fei¹, LIANG Fang¹

(1. College of Intelligent Agriculture, Yulin Normal University, Yulin 537000, Guangxi, China; 2. College of Forestry, Guansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Guansu, China; 3. College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract: *Ardisia crenata* and *Ardisia crenata* var. *bicolor* plants have great ornamental value. To enrich the genomic information of the two plants, mature leaves of 2-year-old of potted plants were used as materials. The chromaticity value and pigment content were determined, and transcriptome sequencing analysis was conducted. The results showed that there were significant differences in leaf color between *A. crenata* and *A. crenata* var.

收稿日期: 2024-07-07; 修回日期: 2025-03-20

基金项目: 广西高校中青年教师基础能力提升项目(2022KY0583, 2023KY05607)资助; 广西自然科学基金项目(2022GXNSFBA035540)资助。

第1作者: 胡菊(1986—), 女, 博士, 讲师。研究方向: 园林植物与应用。Email: 1029191614@qq.com。

通信作者: 梁芳(1984—), 女, 硕士, 教授。研究方向: 园林植物抗逆生理。Email: liangfang360@ylu.edu.cn。

bicolor. The content of chlorophyll and carotenoids in the leaves of *A. crenata* were higher than that of *A. crenata* var. *bicolor*, while the content of anthocyanins and total flavonoids (except anthocyanins) in the leaves of *A. crenata* were significantly higher than that in *A. crenata*. 549 625 354 original sequences were obtained with transcriptome sequencing, 84 070 unigenes were assembled, and 44 304 unigenes were annotated. Among them, 40 409, 39 034, 27 949, and 32 882 unigenes were annotated in the Nr, KEGG, KOG, and SwissProt database, respectively. A total of 1 558 significantly differentially expressed genes (DEGs) were identified, 610 were upregulated and 948 were downregulated. Four pathways, anthocyanin biosynthesis pathway (ko00942), flavonoid and flavonol biosynthesis pathway (ko00944), flavonoid biosynthesis pathway (ko00941), and carotenoid biosynthesis pathway (ko00906), are closely related to leaf color formation. The transcription factor annotation results showed that the highest number of families were ERF (117 families) and bHLH (104 families). A total of 15 282 SSR loci were identified, and 39 867 pairs of primers were successfully designed for all SSR loci. Therefore, the expression levels of *CI2RT1*, *CYP98A2*, *CHS*, *CCOAOMT1*, *CHS2*, *AOG* and *CYP707A1* were significantly down-regulated, while *At4g26220*, *TAT*, *CCOAOMT*, *Z-ISO* and *CYP707A2* were significantly up-regulated in the four pathways, with may affect the color formation of *A. crenata* var. *bicolor* leaves.

Key words: chromaticity value; pigment content; transcriptome sequencing; differential expression genes; transcription factor; SSR

随着城市人口的增长以及环境污染问题的日益突出,人们对城市园林绿化建设中的植物提出了更高的质量要求^[1-2];同时,随着生态文明理念深入人心,彩叶植物在城市生态园林造景中越来越重要^[3]。因此,植物叶色研究显得尤为重要。色差值及色素含量是分析叶色的重要指标。Li等^[2]发现3个甜菜(*Alternanthera bettzickiana*)品种的形态基本相同,但叶片色差值及叶绿素和花青素含量存在明显差异,为后续转录组测序奠定了良好的生化基础。转录组测序是重要的分子生物学方法,在植物叶色研究中得到了广泛应用^[4-6],为研究叶色形成的遗传机制提供了有价值的信息。

朱砂根(*Ardisia crenata*)在我国长江流域以南区域均有分布,在广西为广布种植物,是我国传统的观赏药用植物^[7-9];红凉伞(*Ardisia crenata* var. *bicolor*)是朱砂根的变种,地理分布、观赏药用价值基本与朱砂根相同^[10-11];两种植物同为报春花科(Primulaceae)紫金牛属(*Ardisia*)小灌木,主要区别在于叶色的过渡,其余形态无太大的差异性^[12-13]。目前,两种植物的研究主要集中在药理特性^[14-15]、次生代谢产物^[9, 11, 8]、遗传多样性^[16]、生长繁殖及生理响应^[17-18]等方面。关于两种植物的转录组测序,仅见刘雄伟等^[10]对二者叶绿体全基因组的测序,从分子水平为红凉伞作为朱砂根的变种提供了科学解释;杨君^[19]、路

艳等^[20]基于转录组测序探索了朱砂根药用活性成分三萜皂苷的合成;Yan等^[13]对朱砂根进行叶绿体全基因组测序,获得cp基因组156 876 bp,总GC含量37.10%。然而,关于两种植物叶片转录组测序特征的分析还尚未见报道。此外,前期物候观察发现,两种植物的成熟叶片有较稳定的叶色差异,且不随季节而变化。基于此,本研究拟以2年生朱砂根及红凉伞成熟叶片为实验材料,在色差值及色素含量测定的生化基础之上,进行转录组测序(Denovo_RNAseq)分析。旨在探究两种植物叶片的转录组特征,为后续深入挖掘叶色相关功能基因、分子标记辅助育种和遗传多样性研究等提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

基于刘雄伟等^[11]研究,选取2年生朱砂根(图1a)和红凉伞(图1b)叶片作为试验材料。盆栽养护管理于玉林师范学院智慧农业学院温室大棚(110°20'E, 22°68'N),土壤基本理化条件一致,园土为同一土块提供。 $V(\text{园土}):V(\text{蛭石}):V(\text{珍珠岩})=1:1:1$ 。前期物候观察发现,一年中2种植物在10月中旬趋于稳定生长,当年新生叶片基本达到成熟状态,叶色相对稳定,且不随季节而变化,待第二年春继续发新

梢、新芽和新叶，因此于10月中旬进行取样。首先，随机选取生长基本一致、健壮、无病虫害的朱砂根和红凉伞盆栽各9株。试验设3个重复，每重复从3株朱砂根和3株红凉伞盆栽植株的相同位置，摘取生长状态一致的成熟叶片，擦净，

朱砂根叶片混合成样品S1，红凉伞叶片混合成样品S2。各样品再分成两份，一份用于色差值和色素含量测定，另一份液氮速冻1 min后干冰寄样至广州基迪奥生物科技有限公司在Illumina NovaSeq 6000测序平台上完成转录组测序。

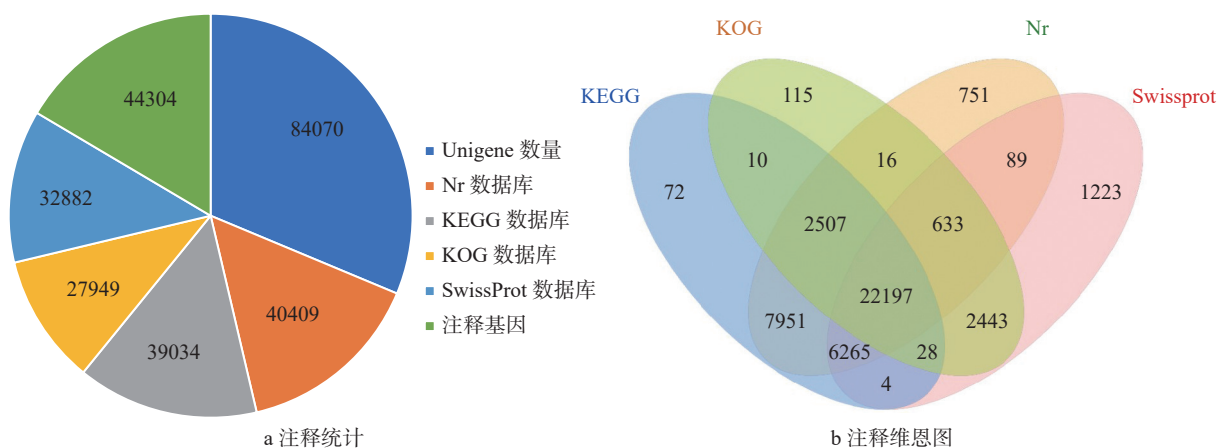


图1 四大数据库注释统计 (a) 及维恩图 (b)

Fig. 1 Annotation statistics (a) and Venn diagram (b) of the four major databases

1.2 实验方法

1.2.1 叶片色差值测定

参照Li等^[2]方法，用EOS 70D (W)相机拍摄叶片后，随机选取各叶片上的12个点（叶正面、叶背面各6个），避开叶柄和叶脉，用分光测色仪CS-660进行色差值测量。参照国际照明委员会提出的CELLAB测色标准^[21]， L^* 值表示亮度（0~100，黑色到白色），值越大亮度越高； a^* 值表示红/绿（-80~100，绿色到红色），负值偏绿且值越小绿色越深，正值偏红且值越大红色越深； b^* 值表示黄/蓝（-80~100，蓝色到黄色），负值偏蓝且值越小蓝色越深，正值偏黄且值越大黄色越深； C^* 值表示彩度值，值越高颜色越纯、越艳， $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ 。

1.2.2 色素含量测定

1) 叶绿素 (Chl) 及类胡萝卜素 (Car) 含量测定。参照孙健等^[22]方法，叶片样品在95%乙醇溶液中室温避光浸提24 h后，在分光光度计 (UV1800) 中测定665、649、470 nm处吸光值 (OD)，重复3次。按如下公式计算色素浓度 (mg/L)：

$$\text{Chla} = 13.95\text{OD}_{665} - 6.88\text{OD}_{649} \quad (1)$$

$$\text{Chlb} = 24.96\text{OD}_{649} - 7.32\text{OD}_{665} \quad (2)$$

$$\text{Chl} = \text{Chl a} + \text{Chl b} \quad (3)$$

$$\text{Car} = (1\,000\text{OD}_{470} - 2.05\text{Chla} - 114.8\text{Chlb})/245 \quad (4)$$

按如下公式计算色素含量 (mg/g)：

$$A = (C \times V) / (1\,000 \times m) \quad (5)$$

其中， C 为色素浓度 (mg/L)， V 为提取液总体积 (L)， m 为样品鲜质量 (g)。

2) 花青素含量测定。参照赵宇瑛等^[23]方法，叶片样品粉末经2次0.1 mol/L盐酸乙醇溶液离心后，合并上清液，并在分光光度计中测定530 nm、620 nm、650 nm处OD值。按如下公式计算花青素含量 (mg/g)：

$$\text{花青素含量} = (\text{OD}_\lambda \times V_t \times M \times 10^6) / (\varepsilon \times m) \quad (6)$$

其中， $\text{OD}_\lambda = (\text{OD}_{530} - \text{OD}_{620}) - 0.1 \times (\text{OD}_{650} - \text{OD}_{620})$ ， ε 是花青素摩尔消光系数 4.62×10^4 ， V_t 是提取液总体积 (mL)， m 是取样质量 (g)， M 为分子质量。

3) 黄酮 (除花青素外) 含量测定。参照权春梅等^[24]方法，制备芦丁标曲 $y = 3.6192x - 0.0852$ ($R^2 = 0.9984$)，其中 x 为芦丁对照品溶液浓度， y 为吸光度。称取1 g待测样品，用60 mL 70%乙醇溶液浸泡20 min，超声波处理35 min后室温浸泡30 min，过滤，滤液定容至100 mL。精密吸取样品溶液1.0 mL，分别加入1% AlCl_3 溶液4.0 mL，并用70%乙醇定容至25 mL摇匀，测定273 nm处吸光度。按如下公式计算黄酮含量 (mg/g)：

$$\text{黄酮含量} = C \times N \times (V_t / V_s) / m \quad (7)$$

其中, C 是标曲中查得黄酮的含量 ($\mu\text{g/g}$), N 是稀释倍数, V_t 是提取液总体积 (mL), V_s 为测定取液量 (mL), m 为样品称重量。

1.2.3 转录组测序

参照试剂盒说明进行样品总 RNA 提取及去除 rRNA。通过 NanoPhotometer spectrophotometer、Qubit 2.0 Fluorometer 及 Agilent 2100 bioanalyzer 分别检测 RNA 纯度、精确定量 RNA 浓度及检测 RNA 完整性。通过带有 Oligo (dT) 的磁珠富集具有 polyA 尾巴的真核 mRNA 后, 用超声波把 mRNA 打断。以片段化的 mRNA 为模版, 随机寡核苷酸为引物, 在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链, 随后用 RNaseH 降解 RNA 链, 并在 DNA polymerase I 体系下, 以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第 2 条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 用 AMPure XP beads 筛选 200 bp 左右的 cDNA, 进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 最终获得上机文库, 并上机测序。

1.2.4 转录组测序分析

利用 fastp 对下机 reads 进行过滤, 并通过 Trinity 软件对 reads 完成数据组装。随后, 通过 BLAST 软件将 unigene 序列比对到数据库 Nr、Swiss-Prot、GO、KOG 和 KEGG, 得到跟给定 unigene 具有最高序列相似性的蛋白, 从而得到该 unigene 的蛋白功能注释信息。同时, 将预测的蛋白序列同相应的转录因子数据库 plant TF-db 进行 hmmscan 比对。

1.2.5 SSR 分析

使用软件 MISA 对转录组的所有 unigene 进行

搜索, 寻找 unigene 中的 SSR 位点。同时, 根据找到的 SSR 信息使用 primer3 在 SSR 序列两侧进行引物设计。

1.3 数据分析

数据为平均值 $\pm$ 标准差, 采用 IBM SPSS Statistics 24 (SPSS Inc., Chicago, USA) 软件进行统计分析, 并采用 Excel 2016 软件制表作图。

2 结果与分析

2.1 色差值分析

肉眼观察发现, 2 种植物叶片总体形态基本一致, 但呈现出明显的叶色特征, 朱砂根叶片为绿色, 而红凉伞叶片叶正面为绿色、叶背面为 (紫) 红色。Lab 颜色空间值分析显示 (表 1), 朱砂根叶正面 a^* 值为 -6.55、 b^* 值为 13.20, 叶背面 a^* 值为 -5.28、 b^* 值为 16.99, 叶片为绿色; 红凉伞叶正面 a^* 值为 -4.46、 b^* 值为 10.90, 叶背面 a^* 值为 10.72, 显著高于其他叶面 ($P < 0.05$), 而 b^* 值为 3.49, 显著低于其他叶面 ($p < 0.05$), 即红凉伞叶片叶正面为绿色、叶背面为红色; 2 种植物叶片叶正面亮度 (L^* 值) 均小于叶背面, 且朱砂根叶片叶正面亮度显著小于叶背面 ($P < 0.05$), 同时朱砂根叶片叶背面亮度显著高于红凉伞 ($P < 0.05$); 两种植物各自叶片叶正面和叶背面彩度值 (C^* 值) 无显著性差异, 朱砂根叶片叶背面彩度值显著高于红凉伞的叶正面和叶背面 ($P < 0.05$)。结果表明, 肉眼观察结果与色差仪测定的叶片 Lab 颜色空间值一致, 朱砂根叶片为绿色, 而红凉伞叶片叶正面为绿色、叶背面为 (紫) 红色。

表 1 2 种植物叶片 Lab 颜色空间值

Table 1 Lab color space values of leaves in two plants

样本	亮度值 (L^*)	红/绿值 (a^*)	黄/蓝值 (b^*)	彩度值 (C^*)
朱砂根 (正面)	29.61 ± 2.21^b	-6.55 ± 1.53^b	13.20 ± 4.74^a	14.73 ± 4.86^{ab}
朱砂根 (背面)	42.99 ± 0.94^a	-5.28 ± 0.31^b	16.99 ± 1.23^a	17.81 ± 1.11^a
红凉伞 (正面)	29.82 ± 2.12^b	-4.46 ± 1.48^b	10.90 ± 2.91^a	11.78 ± 3.25^b
红凉伞 (背面)	30.66 ± 3.74^b	10.72 ± 1.92^a	3.49 ± 3.35^b	11.76 ± 0.40^b

注: 同列不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 色素含量分析

由表 2 可知, 朱砂根叶片中的 Chla、Chlb、Chl 和 Car 含量均高于红凉伞, 但无显著差异, 而红凉伞叶片中的花青素和总黄酮 (除花青素外) 含量

则显著高于朱砂根中 ($P < 0.05$), 其中红凉伞叶片中花青素的含量几乎是朱砂根中的 3 倍。结果表明, 两种植物叶片在叶色生理指标 (色素含量) 上表现出差异, 可为后续转录组测序分析奠定基础。

表 2 2 种植物叶片中色素含量

Table 2 The pigment content of the leaves in two plants

样本	Chl a/ (mg. g ⁻¹)	Chl a/ (mg. g ⁻¹)	Chl/ (mg. g ⁻¹)	Car/ (mg. g ⁻¹)	花青素/ (mg. g ⁻¹)	黄酮 (除花青素外) (mmol. g ⁻¹)
朱砂根	0.39 ± 0.17	0.18 ± 0.08	0.57 ± 0.25	0.07 ± 0.05	0.049	0.190
红凉伞	0.19 ± 0.08	0.11 ± 0.03	0.30 ± 0.12	0.04 ± 0.02	0.146	0.210
t值	1.768	1.56	1.705	1.163		
z值					-1.993	-2.121
P值	0.152	0.194	0.163	0.31	0.046	0.034

注：花青素和黄酮指标数据为中位数。

2.3 测序及数据组装分析

本次测序获得原始序列 549 625 354 条，过滤后得到高质量序列 528 890 566 条，且各样品高质量序列均在 99.30% 以上；获得高质量碱基 38 941 295 882 个，占原始碱基数量（39 479 443 800 个）的 98.64%；质量值 Q20 在 97.33% ~ 97.55% 范围内，Q30 为 92.79% ~ 93.40%，GC 含量为 45.42% ~ 45.70%。综合来看，该测序得到的数据数量和质量都较好，可用于进一步的组装。通过 Trinity 软件对过滤后的高质量序列进行组装，获得 84 070 条 unigenes，总碱基数量为 80 300 451，其中 GC 含量百分比为 40.69%，N50 数量为 11 407 条，N50 长度为 1952 bp，最大长度为 16 884 bp，平均长度 955 bp。结果表明，本次转录组测序数据组装的质量较好，可用于后续分析。对组装后的 unigenes 进行长度分布统计，201 ~ 300 bp 的短序列最多，共 24 881 条，占比 29.60%，其次为 301 ~ 400 bp 的短序列，共 12 890 条，占比 15.33%。结果表明，本次转录组测序质量可靠，可用于后续分析。

2.4 Unigene 功能注释分析

本次转录组测序数据经过滤组装后获得 84 070 条 unigenes，共注释 44 304 条，其中 Nr 数据库注释 40 409 条、KEGG 数据库注释 39 034 条、KOG 数据库注释 27 949 条、SwissProt 数据库注释 32 882 条，还有 39 766 条未注释（图 1a）。韦恩图（图 1b）显示，4 个数据库均有注释的 unigenes 数量为 22 197 条。进一步用 DESeq 软件对朱砂根和红凉伞 2 个样本进行比较分析，显著 DEGs 筛选条件设置为 FDR < 0.05 且 |log₂FC| > 1，共检测到 1 558 个显著 DEGs，其中 610 个上调，948 个下调。结果表明，朱砂根与红凉伞叶片基因信息丰富，unigenes 功能注释数据可用于下一步分析。

在 Nr 数据库注释的 40 409 条 unigenes 中，同源性最高的 3 个物种为茶（*Camellia sinensis*）、

中华猕猴桃（*Actinidia chinensis*）和圆锥小麦（*Triticum turgidum*）（图 2）。GO 数据库注释的 unigenes 被分到生物过程、细胞组分、分子功能三大类，unigenes 数量分别为 102 051、69 262、42 248 条，亚类分别为 26、23、16 个。其中，生物过程中 unigenes 数量前 3 的亚类是细胞过程、代谢过程和单有机体过程，分别为 21 489、20 055、15 428 条；细胞组分中 unigenes 数量前 3 的亚类是细胞、细胞组件和细胞器，分别为 14 413、14 408、10 469 条；分子功能中 unigenes 数量前 3 的亚类是结合因子、催化活性和转运活性，分别为 18 295、16 094、2 575 条（图 3）。基于 KOG 数据库预测，将获得注释的 34 004 条 unigenes 划分为 25 个功能类别。其中，主要功能预测数目最多，共 6 869 条；其次是翻译后修饰，蛋白质折叠和伴侣蛋白，共 3 696 条；而细胞运动数目最少，仅 26 条。此外，还有 1 546 条 unigenes 为未知功能蛋白（图 5）。值得一提的是，有 852 条 unigenes 参与次生代谢物合成，转运和代谢。结果表明，朱砂根和红凉伞与茶的进化关系较近，叶片代谢旺盛，unigenes 涉及的生物学过程较多，unigenes 的功能分类较为全面。

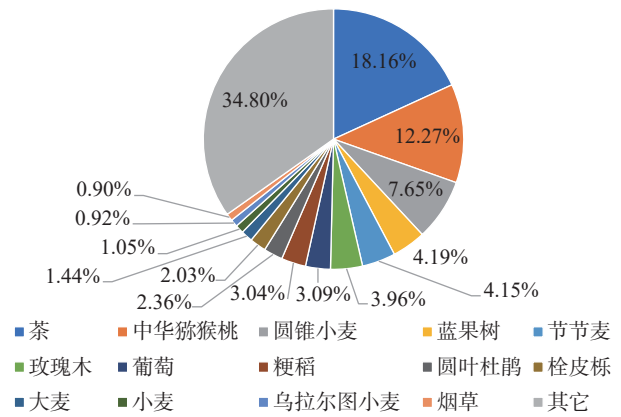


图 2 Nr 数据库注释物种分布统计

Fig. 2 Statistics of Nr database annotated species distribution

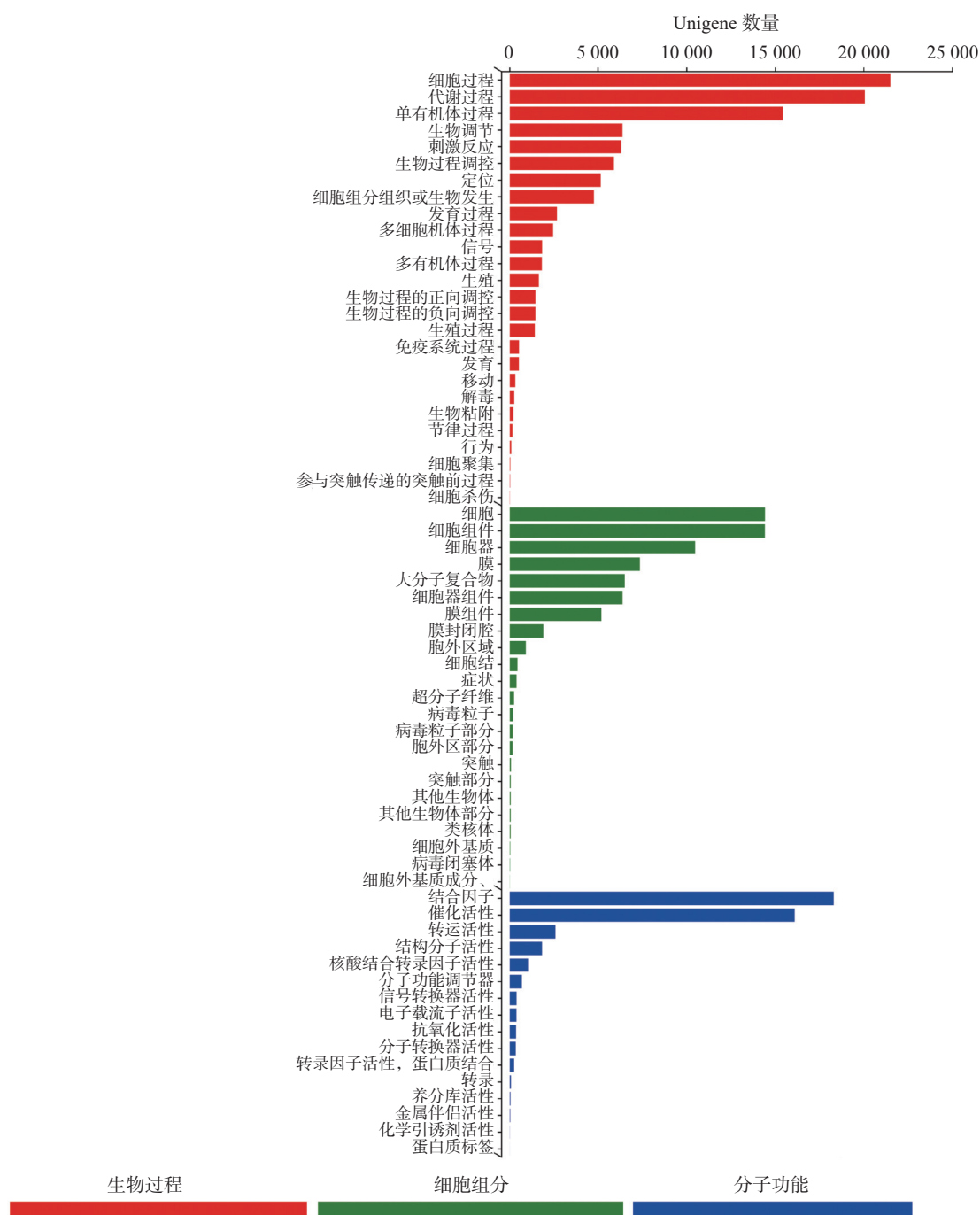


图3 GO二级分类统计

Fig. 3 GO secondary classification statistics

2.5 KEGG 功能注释分析

如图5所示, 共有19339条unigenes富集在138条通路中, 在Level 1层级上可划分为代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程和生物系统5个大类。其中, 代谢类共注释11986条unigenes, 分别富集在107条通路上, 其中以全局和总览图通路数目最多, 为4959条; 遗传信息

处理类共注释5172条unigenes, 分别富集在21条通路上, 以翻译通路数目最多, 为2340条; 环境信息处理类共注释665条unigenes, 分别富集在4条通路上; 细胞过程类和生物系统类分别注释1029、487条unigenes, 且分别富集在4、2条通路上。结果表明, 朱砂根和红凉伞具有旺盛的代谢活动。

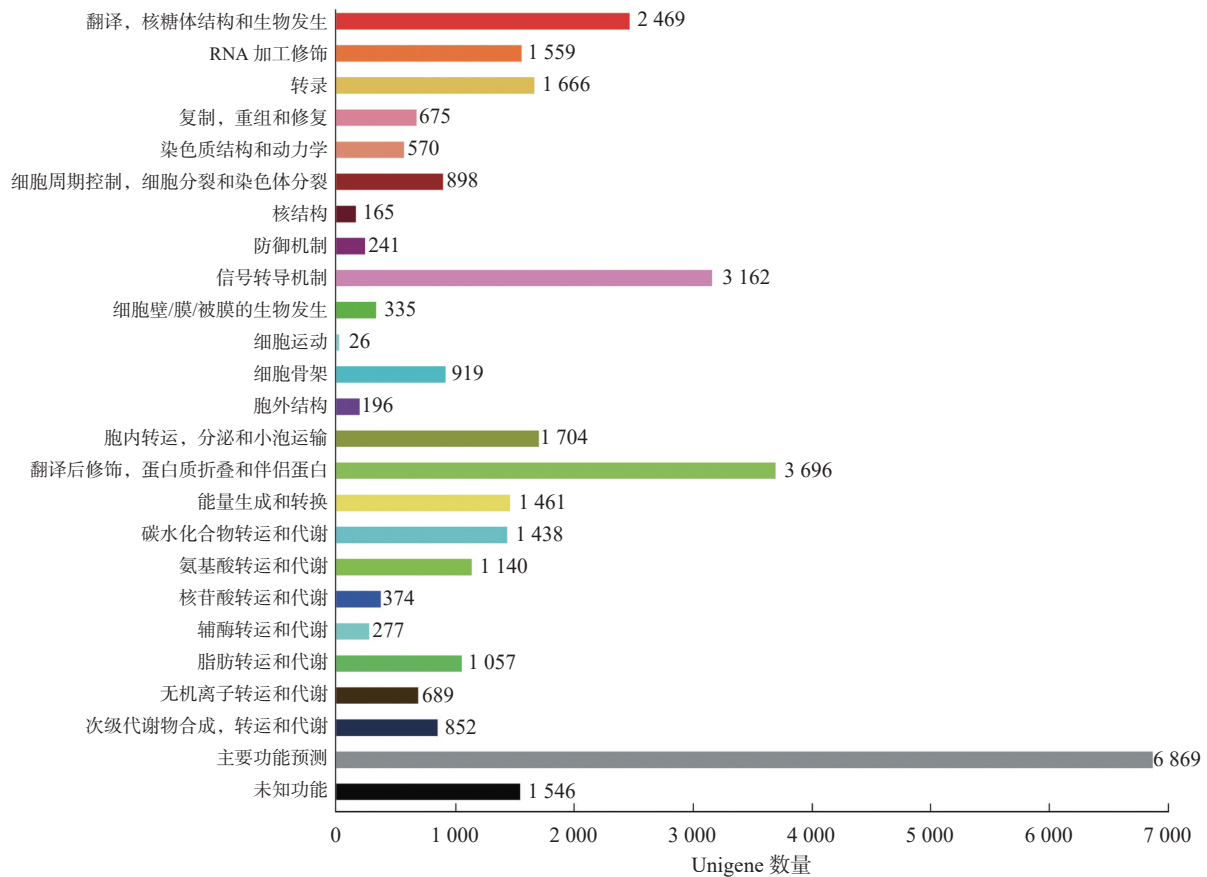


图 4 KOG 分类统计

Fig. 4 The KOG taxonomic term

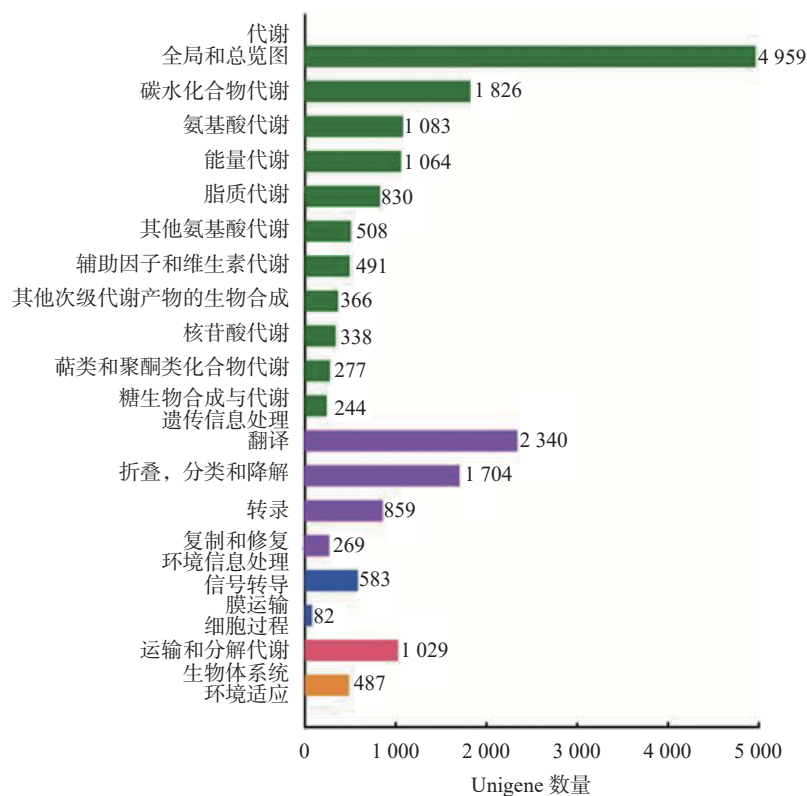
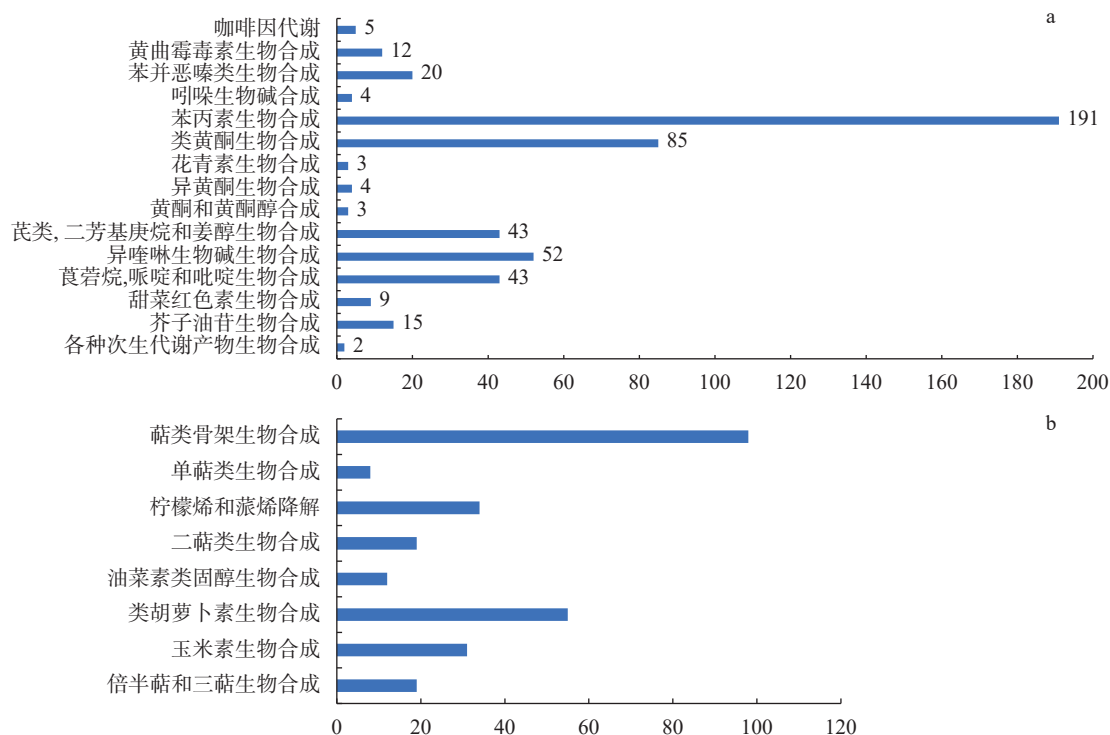


图 5 KEGG 注释 Pathway 结果统计

Fig. 5 Result statistics of KEGG annotation pathway

本研究重点关注了可能与叶色等形成密切相关的其他次生代谢产物生物合成及萜类和聚酮类化合物代谢两条通路（图 6）。在 Level 3 层级上统计分析发现，在其他次生代谢产物生物合成通路中，共富集到苯丙素生物合成、异喹啉生物碱生物合成、类黄酮生物合成、花青素生物合成及黄酮和黄酮醇生物合成等 15 条通路，其中苯丙素生物合成通路中富集的 unigenes 数量最多（191 条），其次为类黄酮生物合成通路（85 条），

而花青素生物合成通路及黄酮和黄酮醇生物合成通路分别仅有 3 条 unigenes。在萜类和聚酮化合物代谢通路中，共富集到萜类骨架生物合成、类胡萝卜素生物合成和倍半萜和三萜生物合成等 8 条通路，其中萜类骨架生物合成通路上富集的 unigenes 数量最多（98 条），其次为类胡萝卜素生物合成通路（55 条）。以上结果表明，存在多种潜在的与叶色形成物质相关的生物合成途径。



a. 其他次生代谢产物生物合成通路 b. 类和聚酮化合物代谢通路。

图 6 与叶色形成相关的 KEGG 通路分析

Fig. 6 Analysis of the KEGG pathway related to leaf color formation

其中，花青素生物合成通路（ko00942）的 3 条 unigenes、黄酮和黄酮醇生物合成通路（ko00944）的 3 条 unigenes、类黄酮生物合成通路（ko00941）的 85 条 unigenes 以及类胡萝卜素生物合成通路（ko00906）的 55 条 unigenes 与叶色形成相关。这些通路中的 Unigene0018449、Unigene0022295、Unigene0001397、Unigene0006

190、Unigene0007047 为显著上调 DEGs，Unigene0005763、Unigene0077302、Unigene0061209、Unigene0017355、Unigene0047031、Unigene0073357、Unigene0077136 为显著下调 DEGs（表 3），推测这些基因的上调或下调表达影响了红凉伞叶色的形成。

表 3 与叶色形成相关的 unigenes

Table 3 Unigene related to leaf color formation

Unigene ID	Pathway	K_ID	基因名称	朱砂根中的表达量	红凉伞中的表达量	显著上调/下调DEGs
Unigene0001397	ko00941	K00588	<i>At4g26220</i>	0.07	34.21	上调
Unigene0005763	ko00906	K14595	<i>AOG</i>	13.84	4.68	下调
Unigene0006190	Ko00941	K13065	<i>TAT</i>	1.16	4.19	上调

续表 3

Unigene ID	Pathway	K_ID	基因名称	朱砂根中的表达量	红凉伞中的表达量	显著上调/下调DEGs
Unigene0007047	Ko00941	K00588	<i>CCOAOMT</i>	0.03	2.02	上调
Unigene0017355	Ko00941	K09754	<i>CYP98A2</i>	4.80	0.79	下调
Unigene0018449	ko00906	K15744	<i>Z-ISO</i>	6.57	21.02	上调
Unigene0022295	ko00906	K09843	<i>CYP707A2</i>	0.53	2.58	上调
Unigene0047031	Ko00941	K00660	<i>CHS</i>	7.99	0.46	下调
Unigene0061209	Ko00944	K13080	<i>C12RT1</i>	2.03	0.28	下调
Unigene0073357	Ko00941	K00588	<i>CCOAOMT1</i>	29.19	2.67	下调
Unigene0077136	Ko00941	K00660	<i>CHS2</i>	2.24	0.11	下调
Unigene0077302	ko00906	K09843	<i>CYP707A1</i>	7.27	2.12	下调

2.6 Unigene 转录因子分析

本研究共 1 129 个基因被注释为转录因子 (TF)，分布在 55 个 TF 家族，其中 unigenes 数目大于 10 条的家族共计 29 个 (图 7)。排名前十的 TF 家族依次是 ERF、bHLH、C2H2、WRKY、NAC、MYB、MYB_related、bZIP、GRAS、C3H、

NAC、MYB、MYB_related、bZIP、GRAS、C3H。结果表明，2 种植物叶片中的 TF 类型丰富，可能在其叶色形成相关代谢活动中发挥重要作用。

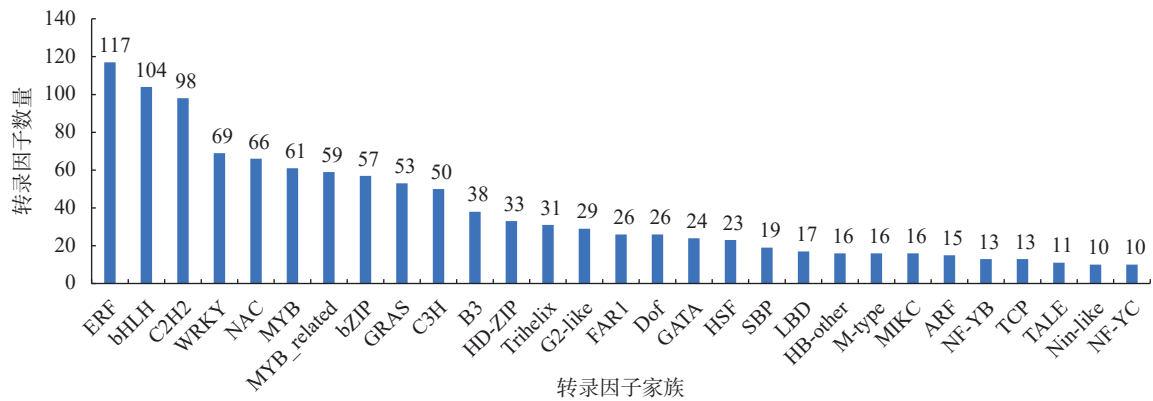


图 7 转录因子各家族 unigenes 数量
Fig. 7 Unigene number of each TF family

2.7 SSR 位点分析及引物设计与筛选

本研究对测序组装后所获得的 84 070 条 unigenes 进行 SSR 位点搜索，共 12 682 条 unigenes (占比 15.09%) 搜索到了 SSR 位点，共计 15 282 个，包括从二核苷酸到五核苷酸的重复位点类型 (图 8)。其中，二核苷酸重复位点最多，占比频率为 73.08%，包括 AC/GT (7.66%)、AG/CT (45.83%)、AT/AT (19.59%) 3 种重复基序；其次为三核苷酸重复位点，占比频率为 14.62%，包括 AAC/GTT (0.62%)、AAG/CTT (2.53%)、AAT/ATT (3.04%)、ACC/GGT (1.06%)、AGC/CTG (1.60%)、AGG/CCT (1.69%)、ATC/ATG (1.99%)、CCG/CGG (2.09%) 8 种重复基序；再次为四核苷酸重复位点，占比频率为 4.71%，包括 AAAG/CTTT (0.56%)、AAAT/ATTT (2.25%)、ACAT/AT-

GT (1.90%) 3 种重复基序；五核苷酸重复位点占比频率仅为 0.39%，含 AAAAT/ATTTT 一种重复基序；7.2% 为其他类型重复基序。在检测到的所有重复基序中，SSR 位点占比最多的 3 种基序依次为 AC/GT (7.66%)、AG/CT (45.83%)、AT/AT (19.59%)。说明本次转录组测序所包含的 SSR 类型较为丰富，分布较为广泛。

本研究为进一步开发利用朱砂根及其变种的 SSR，采用 Primer3 对检测出的 SSR 位点设计引物。共计 9 798 条 unigenes 成功设计出 39 867 对引物，扩增产物的预测大小在 100 ~ 285 bp 之间 (表 6)。同时，选择重复序列 GATCT (5*5) (265 bp)、GA (2*9) (212 bp)、GCATAA (6*9) (171 bp)、ATT (3*10) (164 bp)、AGCT (4*6) (157 bp)、GGCTC (5*6) (142 bp)、AG (2*12) (117 bp) 和 GAA (3*7) (112 bp)

的引物，在红凉伞中进行了 PCR 验证。如图 9 所示，除序列 TC（2*7）外，其余引物均为可用

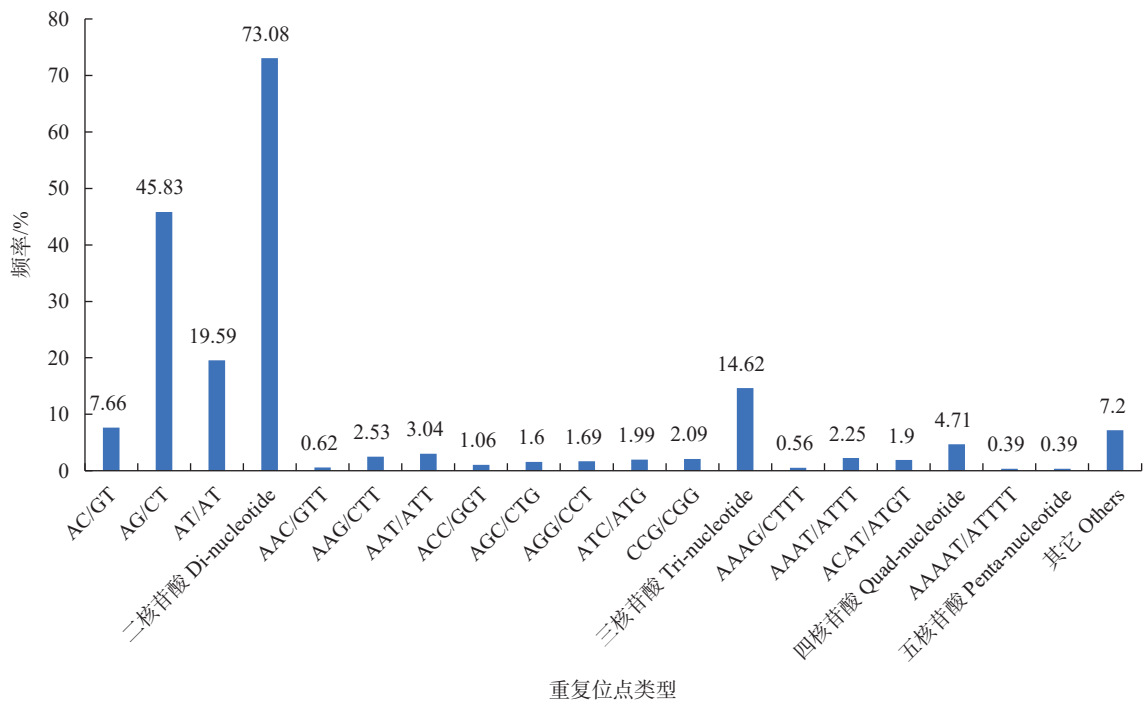


图 8 不同重复类型基序 SSR 位点分布频率
Fig. 8 The frequency distribution of different repeating types for SSR loci

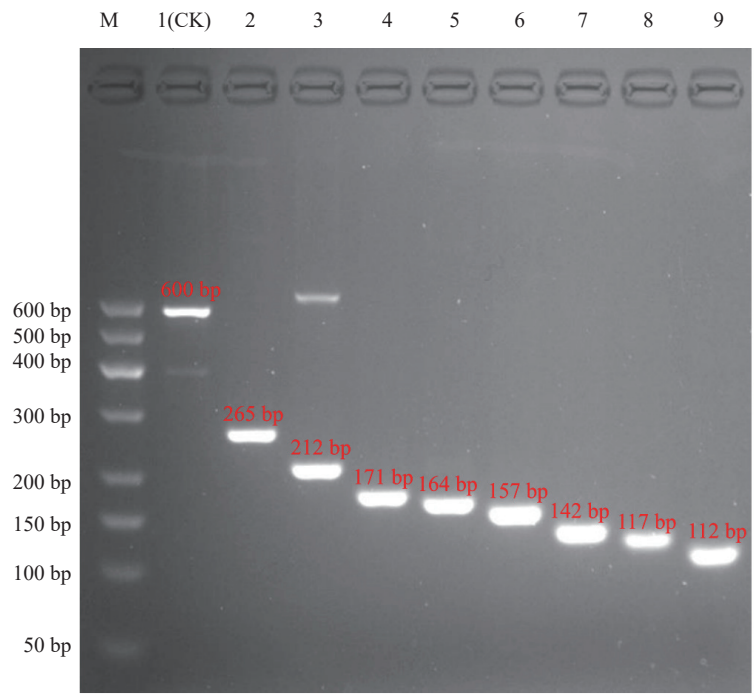


图 9 红凉伞 PCR 验证
Fig. 9 PCR validation of *A. crenata* var. *bicolor*

表 4 朱砂根与红凉伞叶片 SSR 引物序列（部分示例）

Table 4 SSR primer sequences in leaf of *A. crenata* and *A. crenata* var. *bicolor* (partial examples)

重复基元与类型	上游引物（5'-3'）	下游引物（5'-3'）	产物长度
TC（2*7）	TTCAACCTCTCTCTCCTCACC	AGGTTGGGGTTGCACAGC	280
GCT（3*5）	AGATTCGGATGAAATCGTCG	CCAATTTCTCTCCTCCTCC	278
GATCT（5*5）	TGTATCCTCCTCTGTGCT	CAGAAGGCAGACACCCTACC	265
TTTTTG（6*4）	CCAACCACCTGGTTTGGTAG	GGTTGGACCCATATCCCTCT	259
TTTC（4*4）	TTTGTGGAGGAGTAGGGTGG	GGACAATTTTCTCTCTCTCTCTC	242
TGC（3*6）	AGGCATCATCAGAGCCTTGT	TGGCTATACTAGCGCCACCT	233
ATTTT（5*4）	TATGGGGGCATTGTCTAAG	TTGTGCACCAGCTACTCACC	229
GA（2*9）	GGGCCAGAGAAAGACAGAGA	TCGTCTCCCCTTATTTACG	212
GGC（3*5）	TCGGACCAACACATTACCCT	TCAGTTCTTTCAACGGGGTC	207
GGAAGA（6*5）	TCCATTACGAGGCACTCCTT	CACCAACATCATGGACAAGC	196
AT（2*5）	AAGGGCCAATAAGCTCGAT	GGGTTGTTTCGTAGTTCGGA	183
GCATAA（6*9）	CGCTATACATAGCTGTGCCG	TGCTCGTTTAGGAAGGGAGA	171
ATT（3*10）	AATATGCTGCCGACAACCTCC	CCCGAGATTTGTAAGGAACG	164
AGCT（4*6）	GGGTAAAGGGTGGTTTTGA	ATATCCGTTTCAAGTGCCG	157
GGCTC（5*6）	GCCGAGGGTGTATAGCATGT	TTGTGTTCTGGGTGCACAAT	142
AAAGAA（6*4）	GTGCGCTCACCTTTACCTA	TGTCGTTCTTTTCTTTTCTTTCTT	138
AG（2*12）	AGGCTGCTGCAGAGAGAGTC	ATTCGCAATTGGCTACAAGC	127
GAA（3*7）	AAATCGAAGGATGGGGAAAG	GAATTTGACAACGGGAGTGG	112
TAAA（4*5）	CGGTTGCTATAGTGACGCAA	TTAGGTCCCGTGTGAAATCC	105
TCACC（5*5）	AAGGGTAAAGTTGGGCGTCT	AGAATCGGGACCAAAGACAA	100

3 结论与讨论

叶片色泽是决定观叶植物品质的重要因素之一。色差仪结合 Lab 颜色空间值分析，不仅拟合度更高，同时更能区分日本红枫（*Acer* spp.）相近颜色属性的品种，还可更直观地观察叶片的色彩变化^[25]。本研究中两种植物叶片存在显著的叶色差异（图 1、表 1），肉眼观察结果与色差仪测定的叶片 Lab 颜色空间值一致。叶片中的主要显色成分包括 Chl、Car 和花青素等，其中绿色叶片的主要呈色物质是叶绿素，黄色叶片的主要呈色物质是类胡萝卜素和部分类黄酮，而红色叶片的主要呈色物质为花青素^[2, 26]。本研究中两种植物叶片呈现叶色差异是色素含量不同引起的，实验结果从生理水平上证实了此观点，其中朱砂根叶片中的 Chl a、Chl b、Chl 和 Car 含量均高于红凉伞，而红凉伞叶片中的花青素和总黄酮（除花青素外）含量则显著高于朱砂根（ $p < 0.05$ ），这为后续转录组测序分析奠定了良好的生化基础。

虽然朱砂根与红凉伞的地理分布、药用功效

和观赏价值基本相同，但二者的叶色存在明显差异^[12]。通过分子生物学手段是认识和解释二者叶色过渡性状差异的有效途径。本研究对二者叶片进行转录组测序，获得了大量的生物学信息，可为后续二者叶片叶色相关活性物质合成及调控机制的研究、功能基因挖掘、遗传多样性分析及开发利用等提供理论基础。然而，功能注释中还有 39 766 条 unigene 未注释，推测可能是特异性新基因、非编码 RNA (ncRNA) 序列、或不含蛋白质功能域短序列^[27]，也可能是因组装的 unigene 序列太短而缺乏保守区域，或测序过程中产生的偶然误差导致注释不完全^[28]。

研究表明，花椒 (*Zanthoxylum bungeanum*) 转色期，花青素生物合成关键基因 ANS 表达量升高^[29]；类黄酮化合物在植物呈色中起重要作用^[30]；黄酮类化合物可能是决定金花茶 (*Camellia peti- loti*) 花色差异的主要因素^[31]；类胡萝卜素的积累可使叶片呈黄色、橙色等^[32]。与上述研究类似，本研究分析发现，朱砂根和红凉伞叶色形成与 KEGG 中的这 4 条通路（图 9）密切相关，其中

黄酮和黄酮醇生物合成通路的 *C12RT1*，类黄酮生物合成通路的 *CYP98A2*、*CHS*、*CCOAOMT1*、*CHS2* 及类胡萝卜素生物合成通路的 *AOG*、*CYP707A1* 表达量均显著下调，而类黄酮生物合成通路的 *At4g26220*、*TAT*、*CCOAOMT* 及类胡萝卜素生物合成通路的 *Z-ISO*、*CYP707A2* 表达量均显著上调（表5）。推测这些基因的上调或下调表达影响着红凉伞叶色的形成，这些基因的获得，可为深入研究朱砂根及红凉伞叶色提供基因资源，有利于从分子水平对叶色形成的多种代谢及信息加工途径进行分析，但各基因的具体功能还有待进一步验证。

转录因子在转录水平上调控基因表达，广泛参与植物生长发育、器官形态建成、逆境胁迫和激素信号应答等^[33]。研究表明，ERF 转录因子主要通过调控下游生长发育调节基因（如 *GRF5*）来调控杨树（*Populus tremula*）的叶片形态建成^[34]；bHLH 是杂交兰（*Hybrid Cymbidium*）叶色相关的转录因子之一^[33]；NAC 和 MYB 是杂交兰叶色相关的转录因子^[33]；MYB-related 转录因子 *RADIALIS-LIKE3*（*OsRL3*）可促进水稻（*Oryza sativa*）深绿色叶片诱导^[35]；转录因子 WRKY32 通过与乙烯信号转导的重要组分 *YFT1* 基因的启动子调控区 W-box 和 W-box-like 基序结合，可调控番茄（*Solanum lycopersicum*）果实颜色的形成^[36]；bZIP 转录因子 *HY5* 可介导番茄中 *CRY1a* 诱导的花青素生物合成^[37]；C2H2 锌指转录因子 *OBV* 可正向调节番茄叶脉中叶绿体发育和束鞘延伸^[38]；转录因子 MYB（*VvMYBA1* 和 *VvMYBA2*）、bHLH、GRAS、NAC 和 bZIP 可能对葡萄（*Vitis vinifera*）果实中花色苷积累具有重要的调控作用^[39]；C3H 转录因子是细胞色素 P450 中的一员，与木质素生物合成途径密切相关^[40]。上述转录因子在本研究结果中数量居前十，其中 ERF 和 bHLH 家族最多（图10），推测这些转录因子可能参与叶色形成相关代谢物质的生物合成及基因调控，但具体的生物学功能还有待进一步研究。

此外，本研究搜索出了 15282 个 SSR 位点，与伊丽莎白安格斯三角梅（*Bougainvillea glabra* 'Elizabeth Angus'）^[41] 等植物叶片转录组分析结果类似，即 SSR 位点类型较为丰富且分布较为广泛，具有一定的分子标记开发价值和潜能。同时，对所有的 SSR 位点成功设计出 39867 对引物（表2），并进行了部分验证（图11），为进一步开展连锁图谱构建、遗传多样性分析、分子鉴

别、分子辅助育种以及谱系分析等，积累基础并提供分子手段。同时为深入挖掘叶色相关功能基因、分子标记辅助育种和遗传多样性研究等提供理论基础，然而具体的研究机制还需进一步探索。

[参 考 文 献]

- [1] Hanson H I, Eckberg E, Widenberg M, et al. Gardens' contribution to people and urban green space [J]. *Urban Forestry & Urban Greening*, 2021, 63: 127198.
- [2] Li W J, Li H G, Shi L S, et al. Leaf color formation mechanisms in *Alternanthera bettzickiana* elucidated by metabolite and transcriptome analyses [J]. *Planta*, 2022, 255(3): 59.
- [3] 钟乐, 章政, 张婧雅. 城市与自然共生的新理念: 伦敦国家公园城市建设的启示 [J]. *北京林业大学学报 (社会科学版)*, 2021, 20(3): 17-23.
- [4] 王平松, 贾睿吏, 喻奇伟, 等. 基于转录组测序的烟草黄叶突变体叶色黄化相关基因挖掘 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(8): 2534-2544.
- [5] 尹潇雪, 范小青, 吕晓娜, 等. 基于转录组测序的紫叶李叶色相关基因分析 [J]. *分子植物育种*, 2024, 22(12): 3885-3894.
- [6] 王玉书, 王欢, 范震宇, 等. 基于转录组测序的羽衣甘蓝叶色相关基因分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(1): 200-206.
- [7] 毛世忠, 唐文秀, 骆文华, 等. 广西紫金牛属药用植物资源及可持续利用初探 [J]. *福建林业科技*, 2010, 37(2): 119-126.
- [8] 胡菊, 毛美琴, 杨君, 等. 4 种发根农杆菌对朱砂根组培无菌叶片毛状根诱导的影响 [J]. *西北植物学报*, 2016, 36(2): 411-418.
- [9] Hu J, Liu S L, Cheng Q S, et al. Novel method for improving ardicrenin content in hairy roots of *Ardisia crenata* Sims plants [J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 311: 12-18.
- [10] 刘雄伟, 刘畅, 曾宪法, 等. 朱砂根叶绿体全基因组解析及系统发育分析 [J]. *生物技术通报*, 2023, 39(1): 232-242.
- [11] Lin Z, Yang X L, Li L, et al. A rapid and effective method for obtaining ardicrenin from *Ardisia crenata* Sims var. *bicolor* plants [J]. *Brazilian Journal of Botany*, 2023, 46(3): 505-512.
- [12] 艾星梅, 赵财宝, 刘昕岑, 等. 朱砂根和红凉伞花器官的形态补充描述 [J]. *热带作物学报*, 2022, 43(5): 1001-1009.
- [13] Yan X K, Yan H F, Hao G. The complete chloroplast genome of *Ardisia crenata* Sims (Primulaceae): a pop-

- ular ornamental plant in China [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2019, 4(1): 1790–1791.
- [14] Podolak I, Mynarski A, Wróbel D, et al. Bioactive benzoquinones content variability in red-berry and white-berry varieties of *Ardisia crenata* Sims. and assessment of cytotoxic activity [J]. *Natural Product Research*, 2021, 35(1): 157–161.
- [15] 魏江存, 陈勇, 康梦莹, 等. 瑶药红凉伞的质量标准初步研究 [J]. 广西中医药大学学报, 2016, 19(4): 62–64.
- [16] 骆亮, 张文春, 李龙, 等. 不同居群朱砂根 (*Ardisia crenata*) 的荧光 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(18): 6235–6247.
- [17] 张建新, 郇枫, 马丽, 等. 镉胁迫下朱砂根和虎舌红生理响应及其镉抗性 [J]. 水土保持学报, 2017, 31(5): 321–327.
- [18] 熊静, 王臣, 邢文黎, 等. 朱砂根幼苗在不同光照强度下的形态和生理响应 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(5): 736–744.
- [19] 杨君. 朱砂根的转录组测序及与三萜皂苷合成相关基因的差异分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [20] 路艳, 马明东, 曹慧, 等. 水杨酸诱导下朱砂根转录组分析及三萜皂苷生物合成途径关键酶基因挖掘 [J]. 华北农学报, 2023, 38(2): 106–119.
- [21] Blattner P. the international commission on illumination (CIE) and aspects of measurement uncertainty in photometry [J]. *SID Symposium Digest of Technical Papers*, 2021, 52(1): 698–701.
- [22] 孙健, 张鸿翎, 韩涛. 4 种彩叶树春季叶片转色期色素含量变化研究 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2022, 42(6): 158–163.
- [23] 赵宇瑛, 吴广宇, 李婷婷. 红叶李不同方位枝和叶花青素含量的比较 [J]. 长江大学学报 (自然科学版), 2011, 8(3): 218–219, 2.
- [24] 权春梅, 李金富, 马省委, 等. 葛花菊花水煎液中总黄酮含量的测定方法研究 [J]. 山东化工, 2023, 52(22): 158–160.
- [25] 沈星诚, 周婷, 范俊俊, 等. 日本红枫春季叶片色彩评价 [J]. 南京林业大学学报, 2020, 44(6): 213–220.
- [26] Song L B, Ma Q P, Zou Z W, et al. Molecular link between leaf coloration and gene expression of flavonoid and carotenoid biosynthesis in *Camellia sinensis* cultivar 'huangjinya' [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 803.
- [27] 武悦, 单飞彪, 闫文芝, 等. 基于高通量测序的瞿麦叶片转录组分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(5): 1522–1529.
- [28] 廖初琴, 胡小康, 郭小华, 等. 赣南油茶转录组分析 [J/OL]. 分子植物育种, 2023: 1–10. (2023–04–25). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230424.1708.012.html>.
- [29] 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 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [30] Agati G, Azzarello E, Pollastri S, et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance [J]. *Plant Science*, 2012, 196: 67–76.
- [31] 王业, 闫亚丹, 陶依玲, 等. 色素成分与理化因子对金花茶花瓣呈色的影响 [J]. 中南林业科技大学学报, 2023, 43(9): 40–52.
- [32] 董书琦, 陈达, 秦巧平, 等. 高等植物叶绿素和类胡萝卜素代谢研究进展 [J]. 植物生理学报, 2023, 59(5): 793–802.
- [33] 张晓莹, 傅巧娟, 赵福康, 等. 杂交兰叶色相关转录因子生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(13): 4251–4260.
- [34] 王升级, 周猎鼎, 胡佳, 等. ERF 转录因子调控杨树叶片形态构建的功能分析 [J]. 植物生理学报, 2023, 59(6): 1157–1168.
- [35] Park D Y, Shim Y, Gi E, et al. The MYB-related transcription factor RADIALIS-LIKE3 (OsRL3) functions in ABA-induced leaf senescence and salt sensitivity in rice [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2018, 156: 86–95.
- [36] Zhao W H, Li Y H, Fan S Z, et al. The transcription factor WRKY32 affects tomato fruit colour by regulating YELLOW FRUITED-TOMATO 1, a core component of ethylene signal transduction [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(12): 4269–4282.
- [37] Liu C C, Chi C, Jin L J, et al. The bZip transcription factor HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin biosynthesis in tomato [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2018, 41(8): 1762–1775.
- [38] Lu J H, Pan C Y, Li X, et al. OBV (obscure vein), a C₂H₂ zinc finger transcription factor, positively regulates chloroplast development and bundle sheath extension formation in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaf veins [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 230.
- [39] Sun L, Li S C, Jiang J F, et al. New quantitative trait locus (QTLs) and candidate genes associated with the grape berry color trait identified based on a high-density genetic map [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 302.
- [40] 朱冉冉, 吉雪花, 张中荣, 等. 辣椒 C3H 转录因子家族的生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(6): 1784–1791.
- [41] 孙利娜, 林茂, 黄旭光, 等. 伊丽莎白安格斯三角梅转录组的 SSR、SNP 和 InDel 特征分析 [J]. 南方农业学报, 2024, 55(3): 745–753.

(责任编辑 张 坤)