

网络出版时间:2025-05-29

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20250528.1443.008

蓝粒小麦籽粒灌浆期表达谱构建及粒色相关基因分析

李祖春,黄晨曦,范京鑫,王浩,赵嘉宁,管悦,赵肖琦,王长有,
刘新伦,赵继新,李停栋,陈春环,邓平川,吉万全

(西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100)

摘要:蓝粒小麦的籽粒糊粉层中富含大量的花青素,对人类健康具有多种益处。为了解析其糊粉层中花青素的合成与调控的分子机制,利用农艺性状评估、分子标记、液相芯片技术及转录组分析等方法对蓝粒材料 E10-2B 与白粒材料 E10-2W 进行了比较。结果表明,相较于 E10-2W, E10-2B 的株高、穗长、千粒重和粒长分别降低了 15.31%、17.93%、5.99% 和 4.40%。从分子标记和液相芯片分析结果看, E10-2B 不仅含有完整的普通小麦染色体组,还附加了十倍体长穗偃麦草的 4E 染色体。E10-2B 籽粒颜色在花后 20~25 d 间发生转变,花后 25 d 是花青素积累的关键时间点。通过转录组测序分析,花后 20 和 25 d 在 E10-2B 中分别出现了 748 和 5 246 个差异基因。经 KEGG 富集分析,花后 25 d 的差异基因富集到苯丙烷、类黄酮、花青素生物合成途径等通路,花青素合成通路此时被激活。通过参考公共数据库中蓝粒小麦材料 Blue 1 及其白粒对照 White 1 的转录组数据,两个蓝粒材料(B10-2B 和 Blue 1)中分别有 77 和 21 个花青素合成相关基因上调表达,涉及查尔酮合酶(CHS)、黄酮酮 3-羟化酶(F3H)、MYB 转录因子等。值得注意的是,两个蓝粒材料中有 15 个基因共同上调表达,占 B10-2B 上调基因的 19.48%,其中 3 个 *F3'5'H* 基因(类黄酮 3',5'-羟化酶基因)和 3 个 *UFGT* 基因(类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶基因)在两个蓝粒材料中均表现出高表达。这些共同上调的基因可能在蓝粒与白粒小麦的花青素积累差异中起关键作用。

关键词: 蓝粒小麦;花青素;农艺性状;差异表达基因

中图分类号:S512.1;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2026)02-0141-13

Construction of Expression Profiling during Grain Filling Stage and Analysis of Grain Color-Related Genes in Blue-Grained Wheat

LI Zuchun, HUANG Chenxi, FAN Jingli, WANG Hao, ZHAO Jianing, GUAN Yue,
ZHAO Xiaoqi, WANG Changyou, LIU Xinlun, ZHAO Jixin, LI Tingdong,
CHEN Chunhuan, DENG Pingchuan, JI Wanquan

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The aleurone layer of blue-grained wheat is rich in anthocyanins, which offer numerous health benefits to humans. To elucidate the molecular mechanisms underlying anthocyanin synthesis and regulation in the aleurone layer, this study compared the blue-grained wheat material E10-2B with its white-grained counterpart E10-2W using agronomic trait evaluation, molecular markers, liquid array technology, and transcriptome analysis. The results showed that compared to E10-2W, E10-2B exhibited a 15.31% reduction in plant height, indicating a dwarfing trait. However, its panicle length, 1 000-grain weight, and grain length decreased by 17.93%, 5.99%, and 4.40%, respectively. Molecular marker and liquid chip analyses revealed that E10-2B contains the complete genome of common wheat, along with the 4E chromosome from *Thinopyrum ponticum*. The grain color of E10-

收稿日期:2025-03-12

修回日期:2025-04-02

基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目(2022JQ-172)

第一作者 E-mail:2022050128@nwafu.edu.cn(李祖春)

通讯作者 E-mail:jiwanquan2008@126.com(吉万全)

2B undergoes a transformation between 20 and 25 days post-anthesis, with 25 days post-anthesis identified as the critical time point for anthocyanin accumulation. Transcriptome sequencing analysis identified 748 and 5 246 differentially expressed genes at 20 and 25 days post-flowering, respectively. KEGG enrichment analysis indicated that the differentially expressed genes at 25 days post-flowering were significantly enriched in pathways related to phenylpropanoid, flavonoid, and anthocyanin biosynthesis, suggesting activation of the anthocyanin synthesis pathway at this stage. To further identify key genes in the anthocyanin synthesis pathway, we analyzed transcriptome data from the blue-grained wheat material Blue 1 and its white-grained control White 1, available in public databases. Comparative analysis focused on the expression patterns of anthocyanin synthesis-related genes in the two blue-grained materials(E10-2B and Blue 1). A total of 77 and 21 up-regulated anthocyanin synthesis-related genes were identified in E10-2B and Blue 1, respectively, including chalcone synthase (CHS), flavanone 3-hydroxylase(F3H), and MYB transcription factors. Notably, 15 genes showed shared up-regulation in both blue-grained materials, accounting for 19.48% of the up-regulated genes in E10-2B. Among these, three flavonoid 3',5'-hydroxylase genes(*F3'5'H*) and three flavonoid 3-O-glucosyltransferase genes(*UFGT*) exhibited high expression levels in both materials. These co-upregulated genes likely play a pivotal role in the differential anthocyanin accumulation between blue and white wheat.

Keywords: Blue-grained wheat; Anthocyanin; Agronomic traits; Differentially expressed genes

小麦在人们日常饮食中占据重要地位,其营养品质直接关系到人的健康水平,因而备受关注^[1]。籽粒颜色作为重要的农艺性状,与小麦营养品质相关^[2]。蓝粒小麦富含花青素,其花青素含量可达普通小麦的5~8倍,同时富含锌、铁等必需微量元素及优质蛋白组分^[3]。这种天然色素不仅具有抗氧化、抗炎等保健功能,而且在功能食品和医药领域具有重要应用价值^[4]。通过分子标记辅助育种改良粒色性状,可以提升小麦营养品质,解决微量营养摄入不足的问题^[5]。另一方面蓝粒性状大多与其他优异性状连锁,可作为一种遗传选择标记来筛选后代,缩短育种周期。

十倍体长穗偃麦草(*Thinopyrum ponticum*)作为小麦的重要近缘物种、三级基因库,具有抗病、抗旱、耐盐等特性,而且与普通小麦的A、B、D染色体组存在密切的亲缘关系^[6-8]。十倍体长穗偃麦草与普通小麦具有良好的杂交亲和性及杂种可育性,在小麦遗传改良中发挥着重要作用。在小麦育种中少数骨干亲本的频繁使用已经导致育成品种遗传背景出现单一化趋势,引起遗传多样性减少,限制品种改良潜力^[9]。在此背景下,通过远缘杂交技术将十倍体长穗偃麦草的优异基因转入普通小麦,不仅可有效提升小麦的抗病性、抗逆性和环境适应性,还能丰富小麦的遗传基础^[10]。

值得关注的是,该物种的4E染色体被确认为蓝粒基因*Ba1*的主要来源。李振声院士团队通过小麦-长穗偃麦草远缘杂交结合多代回交技术,率先创制了蓝粒小麦品种Blue 58^[11],后续又衍生出一系列的蓝粒易位系材料^[12],为功能型小麦育种提供了新的种质资源。

谷物的籽粒颜色形成机制主要与花青素的生物合成途径有关。作为类黄酮次生代谢网络的重要分支,花青素的合成起始于细胞质中酶促反应合成前体物质,随后经过内质网中的甲基化、糖基化、酰基化等修饰,形成不同的花青素,最后由转运蛋白将其转运至液泡中^[13-14]。这一代谢过程主要受结构基因和转录因子的调控,光照、温度、糖类、植物激素、金属离子等因素也对花青素的合成有影响^[15]。目前针对小麦中花青素生物合成途径相关基因的表达模式多聚焦于单一时期或遗传背景。本研究以白粒材料为对照,通过观察蓝粒材料E10-2B在花后籽粒颜色变化,发现籽粒颜色转变发生在花后20~25 d。在此基础上,利用转录组测序技术,分析蓝粒与白粒在花青素积累关键时期的基因表达动态,同时比较分析公共数据库中的蓝粒小麦转录组数据,筛选参与颜色决定的核心候选基因,以为蓝粒小麦籽粒颜色分子机制解析、彩色小麦品种改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为从普通小麦与十倍体长穗偃麦草远缘杂交后代中选出的蓝粒小麦 E10-2B 和白粒小麦 E10-2W,由西北农林科技大学农学院小麦远缘杂交与染色体工程团队创制,种植于西北农林科技大学北校区试验田,每份材料种植 10 行,行长 1 m,每行播种 10 粒。

1.2 农艺性状调查

籽粒颜色观察:在田间以主穗中部小花开放时间为基准,精确记录 E10-2B 和 E10-2W 的开花时间(标记为 0 d),分别于花后 5、10、15、20、25 和 30 d,每份材料每次选择 5 株,对主穗中部籽粒进行取样,并在室内用相机拍照观察 E10-2B 和 E10-2W 籽粒颜色动态变化。

农艺性状调查:在成熟期,每份材料随机选择

10 株,调查株高、分蘖数、穗长、小穗数、小穗粒数和芒性;籽粒收获后自然风干,用 SC-G 型自动考种分析仪(杭州万深)测量籽粒长度、宽度和千粒重,每份材料测量 300 粒以上完整籽粒,重复 5 次。

1.3 特异分子标记和液相芯片分析

使用 CTAB 法^[16]提取 E10-2B、E10-2W、十倍体长穗偃麦草、中国春、7182 和阿勃的基因组 DNA,采用 Liu 等^[17]开发的十倍体长穗偃麦草 4E 染色体上的特异分子标记(表 1),引物由杨凌天润奥科合成。按照 2×Magic Green Taq SuperMix(吐露;上海)产品配置 PCR 反应体系和反应程序对上述材料进行 PCR 扩增,扩增产物在 1.2%琼脂糖凝胶中电泳。提取 E10-2B 基因组 DNA,由博瑞迪生物公司,采用普通小麦-二倍体长穗偃麦草液相芯片(GenoBaits®WheatplusEE)^[18]进行基因分型,确定 E10-2B 的外源染色体的部分同源群归属。

表 1 十倍体长穗偃麦草 4E 染色体上的特异分子标记
Table 1 Specific molecular markers on chromosome 4E of *Thinopyrum ponticum*

标记 Marker	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')	退火温度 T _m /℃
4Ag-802	AGTGGATGCATGAGGTTGGT	TCGCTCGATCACACGTATAGCTA	58
4Ag-828	TCAGTATAAAAAATTCATATATTTG	ATATATGATTTTTACAGCTGCAAG	58
4Ag-1084	GCTCGTATGAGCTTACGAAC TG	AGGTTCTGTTGTATGGTGT TGC	58
4Ag-1689	GGTCGGATGTTTCATCCATTT	GTTTTATTTTGATTAGGGGCA	58
4Ag-1767	AGGTTCTGTTGTATGGTGT TGC	ATCAATCCATACTGCTCGTATGA	58
4Ag-1860	TTGTAGAATGATAATATACATTGC	TAATAGATATGTAAATTAGCTGGC	58

1.4 转录组测序(RNA-seq)与数据分析

针对 E10-2B 籽粒变色前后的发育阶段,取 E10-2B 和 E10-2W 的籽粒,根据制造商关于 mR-NA-Seq 样品制备的说明书(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA),构建蓝粒、白粒糊粉层 cDNA 文库。通过百迈客生物科技有限公司(中国北京)的 Illumina HiSeq 2500 仪器上的读取长度为 100 bp 的 Illumina 配对末端测序技术对 cDNA 文库产物进行测序。

蓝粒小麦 Blue 1 和白粒小麦 White 1 糊粉层的一组转录组数据来自美国国立生物技术信息中心(NCBI)的 SRA 数据库中(www. ncbi. nlm. nih. gov/sra),登录号为 SRP107065,数据格式为 sra 文件。蓝粒小麦材料 Blue 1 是在普通小麦 White 1 的染色体组基础上,引入了长穗偃麦草的 4E 染色体的附加系^[19]。

在 Linux 系统下,利用 FastQC 对质量进行评

估并运行 Trimmomatic-0.39 过滤低质量 reads,得到 Clean data 数据,将其比对到小麦(IWGSC Ref-Seq v1.1)和二倍体长穗偃麦草(*Thinopyrum elongatum* REFERENCE-SDAU-1.0)的参考基因组(HISAT2),之后将比对文件进行排序(Samtools);利用 featureCounts 程序和 R 脚本进行基因的表达定量分析,以 FPKM 值(每千个碱基的转录每百万映射读取的 Fragments 数)标准化基因表达量。用迈维代谢网站的 edgeR 3.24.3 包(https://cloud. metware. cn),对 count 数据进行 cpm 过滤,并采用 FDR 校正,设置|log₂FoldChange|>1.0 和 P<0.01 来筛选差异基因。最后使用基迪奥的生物数据分析与可视化平台(https://www. omicshare. com/tools),对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证

为了验证转录组数据的准确性,随机选择 6

个差异表达基因,依据其 cDNA 序列,从 qPrimer-DB 数据库中 (<https://qprimerdb.biodb.org/>)^[20] 下载合适引物(表 2),以小麦 *Actin* 基因为内参基因进行 qRT-PCR 验证分析。参照 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMixs(天根;北京)试剂盒对样品 RNA 进行反转录,使用 Lightcycler480 II 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增反应,反应体系和程序参照 FastReal qPCR PreMix(天根,北京)试剂盒说明书,每个样品 3 次重复,各样品目的基因相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算^[21]。

表 2 qRT-PCR 验证所用到的引物
Table 2 Primers used for qRT-PCR validation

基因 Gene	正向引物 Forward primer(5'—3')	反向引物 Reverse primer(5'—3')
TraesCS7B02G088600	GGTAGCATATCTGTCTCGTGGG	CTTTGTCGTTCTCATGCCAGTC
TraesCS7A02G155400	TAGTTTCTCGGGTGTGATCGTG	CGTGAAAAAGTGGCAGGGATTC
TraesCS3D02G237400	TGATCTGGGTCTGTCTGTGG	GCTCACACGCAGACTCTTTTAC
TraesCS6D02G004300	AGAGGAGGAGAAGGAGGTTGTT	CGTACAGTTACCCCATGTGAGT
TraesCS6A02G001500	GATCAACAGGAGGAGGAGGTTG	TTCACTCTGCTCCTTCTTCACC
TraesCS1A02G104500	TGGGCAAGATGTATTCCCGAAA	TTGTTACCTTTCTGTTGCAGCG
<i>TaActin</i>	AGCCATACTGTGCCAATC	GCAGTGGTGGTGAAGGAGTAA

表 3 E10-2B 和 E10-2W 的农艺性状
Table 3 Agronomic traits of E10-2B and E10-2W

材料 Material	株高 Plant height/cm	单株分蘖数 Tillers per plant	穗长 Spike length/cm	单穗小穗数 Spikelet number per spike	小穗粒数 Floret spikelet	千粒重 Thousand- kernel- weight/g	粒长 Kernel length/mm	粒宽 Kernel weight/mm	芒性 Awned ness
E10-2B	92.70±3.50b	13±1a	11.40±0.88b	22±2a	4±1a	30.02±1.13b	6.08±0.07b	2.84±0.04a	无芒 Aweless
E10-2W	109.45±6.37a	12±2a	13.89±1.80a	23±2a	4±1a	31.87±0.95a	6.36±0.07a	2.90±0.04a	无芒 Aweless

数据后小写字母表示材料间在 0.05 水平上差异显著。
The letters following the data indicate significant differences between materials at 0.05 level.

2.2 E10-2B 的外源染色体检测结果

采用 4Ag-802、4Ag-828、4Ag-1084、4Ag-1689、4Ag-1767 和 4Ag-1860 等 6 个长穗偃麦草 4E 染色体的特异性标记,对 E10-2B、E10-2W、十倍体长穗偃麦草、中国春、7182 和阿勃的基因组 DNA 进行扩增。结果显示,这 6 个特异标记均能在 E10-2B 和十倍体长穗偃麦草上检验出特异的条带,但不能从 E10-2W、中国春、7182 和阿勃中扩增出条带(图 3a)。进一步采用 GenoBaits®Wheatplus EE 液相芯片对 E10-2B 进行分析,结果发现,E10-2B 的普通小麦染色体组上均能捕获到密集的信号,

2 结果与分析

2.1 两种粒色小麦的农艺性状及粒色差异

与白粒材料 E10-2W 相比,蓝粒材料 E10-2B 的株高、穗长、千粒重和粒长分别降低 15.31%、17.93%、5.99% 和 4.40%,分蘖数、小穗数、小穗粒数和粒宽无显著差异(表 3 和图 1)。在花后 0~20 d,E10-2B 籽粒颜色与 E10-2W 没有显著的差异,花后 20~25 d 籽粒由胚部开始逐渐变蓝,直至花后 30 d 整个籽粒完全变蓝(图 2)。E10-2W 在籽粒的整个灌浆期未出现蓝色性状。

在十倍体长穗偃麦草的 4E 染色体组上也检测出明显的信号(图 3b)。这表明 E10-2B 不仅含有完整的普通小麦染色体组,而且附加了十倍体长穗偃麦草的 4E 染色体。

2.3 转录组测序数据与质量评估

取 E10-2B 和 E10-2W 花后 20 d(籽粒变色前)和 25 d(籽粒变色中)的籽粒,进行转录组测序分析,样本编号分别为 B20、B25、W20 和 W25。样品过滤后的 Clean Reads 数介于 25 542 661 至 33 447 551 之间,与二倍体长穗偃麦草和中国春参考基因组的比率为 86.37%~90.19%;GC



图 1 E10-2B 和 E10-2W 的植株、穗子、小花和籽粒表型

Fig. 1 Phenotypes of plants, spikes, florets, and grains of E10-2B and E10-2W

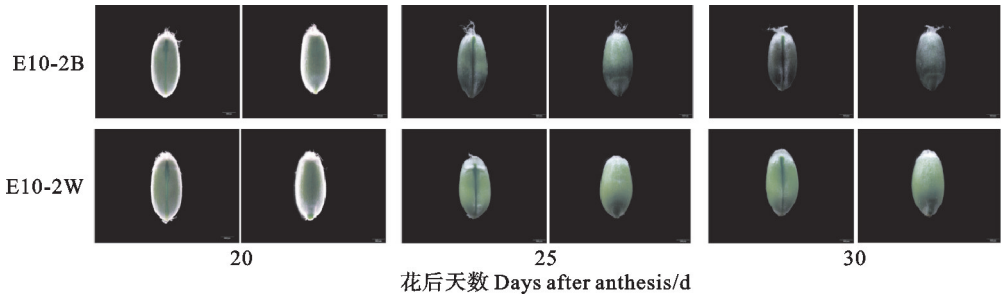


图 2 小麦籽粒发育过程中色素积累的表型观察

Fig. 2 Phenotype observation of pigment accumulation during wheat grain development

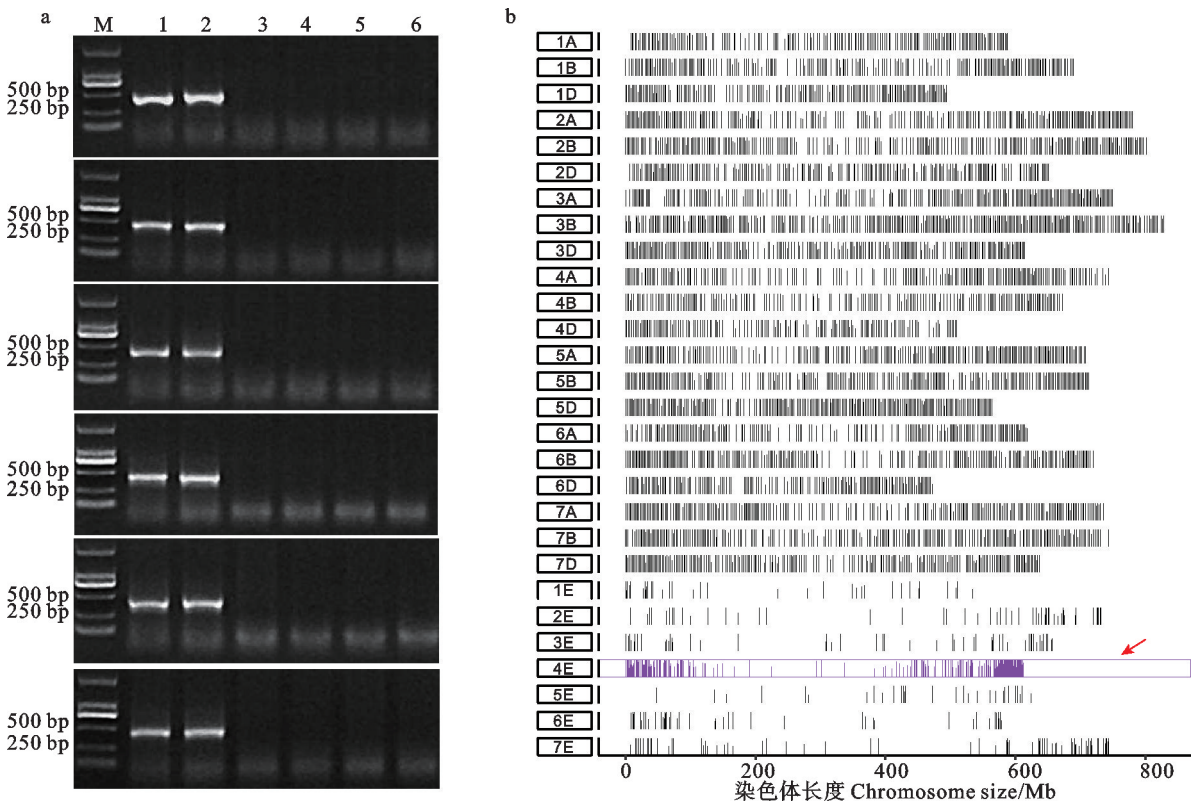
含量为 51.16%~53.67%、Q20 和 Q30 基本都在 90%以上,说明测序数据质控良好,可用于下一步分析。Blue 1 和 White 1 过滤后的 Clean Reads 与参考基因组的比率为 85.31%和 79.66%。

2.4 qRT-PCR 验证结果

为了确定转录组测序的可靠性,对随机选择的 6 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。6 个基因中包括 3 个花青素生物合成通路上的基因: TraesCS7A02G155400 (UFGT)、TraesCS6D02G004300 (ANS)和 TraesCS6A02G001500(ANS)。这 6 个基因在 B20、B25、W20 和 W25 时期的 qRT-PCR 的结果与 RNA-seq 的趋势基本一致(图 4),表明转录组测序结果是可靠的,可以进行后续分析。

2.5 差异表达基因筛选与 KEGG 富集分析

分别以白粒小麦为对照(W20、W25 和 White 1),筛选与统计蓝粒小麦花后 20 d(B20)、25 d(B25)和 Blue 1 的差异基因(图 5a)。花后 20 d,B20 与 W20 相比共有 748 个差异基因,其中上调基因有 591 个,下调基因有 157 个。花后 25 d,蓝粒小麦与白粒小麦之间共鉴定到 5 246 个差异基因,其中 4 222 个基因上调表达,其余基因下调表达。籽粒糊粉层逐渐转为蓝色期间,差异基因数量显著高于颜色未发生转变的时期。Blue 1 与 White 1 间差异基因最多,共有 10 199 个,其中下调基因有 7 203 个(占比 71.18%),上调表达基因有 2 916 个。花后 25 d 上调表达的基因数要明显



M:DL2000;1:E10-2B;2:十倍体长穗偃麦草;3:E10-2W;4:中国春;5:7182;6:阿勃。
M:DL2000; 1:E10-2B; 2:*Thinopyrum ponticum*; 3:E10-2W; 4:Chinese Spring; 5:7182; 6:Abbondanza.

图 3 E10-2B 的分子标记分析(a)和液相芯片分析(b)
Fig. 3 Molecular markers analysis(a) and liquid array analysis(b) of E10-2B

表 4 转录组测序数据统计结果
Table 4 Statistical analysis results of transcriptome sequencing data

材料 Materials	过滤后 Reads Clean Reads	过滤后碱基 Clean Base	比对到基因组的 片段数目 Mapped reads	比对百分比 Mapped ratio/%	Q20/%	Q30/%	GC/%
B20	25 542 661	7 441 549 972	22 132 716	86.65	95.84	90.71	51.59
B25	28 528 564	8 358 985 228	25 729 912	90.19	96.78	92.41	53.67
W20	25 788 493	7 506 313 090	22 273 521	86.37	95.78	90.69	51.89
W25	33 447 551	9 674 717 632	29 072 611	86.92	94.83	89.09	51.16
Blue 1	8 956 033	2 559 048 688	7 640 392	85.31	91.02	86.56	59.93
White 1	19 367 436	5 756 742 776	15 428 099	79.66	98.77	96.38	59.61

B20 和 B25 分别指花后 20 和 25 d 的 E10-2B 籽粒;W20 和 W25 分别指花后 20 和 25 d 的 E10-2W 籽粒。下同。

B20 and B25 refer to the grains of E10-2B at the 20 th and 25 th day after anthesis, respectively; W20 and W25 refer to the grains of E10-2W at the 20 th and 25 th day after anthesis, respectively. The same in ttthe following figures.

高于花后 20 d,可能是因为花后 25 d 籽粒颜色转变的关键阶段。通过对上调表达基因的韦恩分析,B20 vs W20 与 Blue 1 vs White 1 间以及 B25 vs W25 与 Blue 1 vs White 1 间共有的差异基因分别有 130 和 241 个,分别占上调基因总数的 1.8% 和 3.4%,三组中共有的 89 个差异基因(占比 1.2%) (图 5b)。另外,分别有 255 个(占比 3.6%)和 3 775(占比 52.8%)个基因在 E10-2B 的花后 20 和 25 d 中特异表达,在 Blue1 的特异上调表达的

基因有 2 634 个(占比 36.8%)。

对籽粒颜色转变前后的差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析,结果显示,在籽粒变色前阶段(B20 vs W20),差异基因主要富集于基础代谢相关通路,包括代谢相关通路(metabolic pathways)、次生代谢物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)、碳代谢(carbon metabolism)、角质、木栓质和蜡质生物合成(cutin, susterine and wax biosynthesis)和 DNA 复制(DNA

replication)等通路(图 6a)。在变色关键期(B25 vs W25),与变色前阶段相比,差异基因显著转向次生代谢调控网络,比如次生代谢物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)、苯丙烷生物合成(phenylpropanoid biosynthesis)、DNA 复制(DNA replication)、同源重组(homologous recombination)、错配修复(mismatch repair)、植物激素信号转导(plant hormone signal transduction)和类黄酮生物合成(flavonoid biosynthesis)等通路。值得注意的是,苯丙烷生物合成(ko00940)作为类黄酮代谢的上游通路,其显著富集为花青素合成提供前体物质;而花青素生物合成通路(ko00942)的特异性富集(图 6b),直接揭示了该阶段蓝粒性状形成的分子机制。

2.6 差异基因的表达模式分析

为解析籽粒发生颜色改变前后过程中的基因

表达模式,对 E10-2B、E10-2W 的两个发育时期以及 Blue 1 和 White 1 的差异基因进行 K-means 聚类分析,结果显示,这些差异基因共划分为 12 类(Cluster 1~Cluster 12)(图 7)。经过 KEGG 富集分析,与花青素合成的相关通路在花后 25 d 被激活,其中 Cluster 3、Cluster 4 和 Cluster 10 显示花后 25 d 蓝粒材料中的基因表达变化相对剧烈,因此针对这三个 Cluster 进行展开分析(图 8)。Cluster 3 中的差异基因在蓝粒材料(包括本研究材料及 Blue 1)中呈现显著上调趋势,其表达水平高于白粒材料;GO 富集分析显示,这些基因主要参与细胞对 DNA 损伤刺激的反应(cellular response to DNA damage stimulus)、细胞对应激的反应(cellular response to stress)和细胞氨基酸代谢过程(cellular amino acid metabolic process)。另外,将近 50% 的差异基因聚类于 Cluster 4 和 Cluster 10,

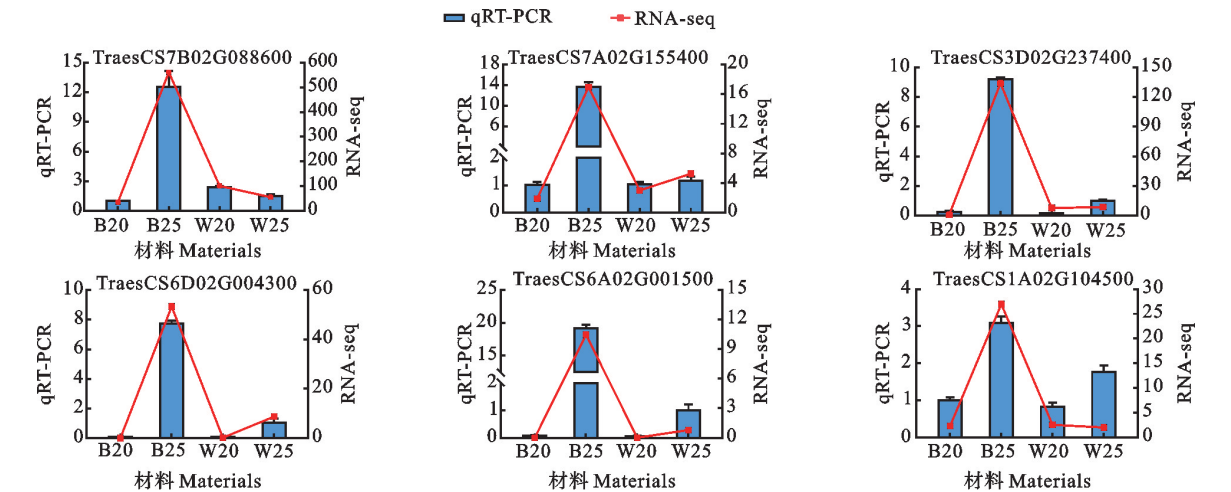


图 4 6 个差异基因的 qRT-PCR 与 RNA-seq 结果对比

Fig. 4 Comparison of qRT-PCR and RNA-seq results of six differentially expressed genes

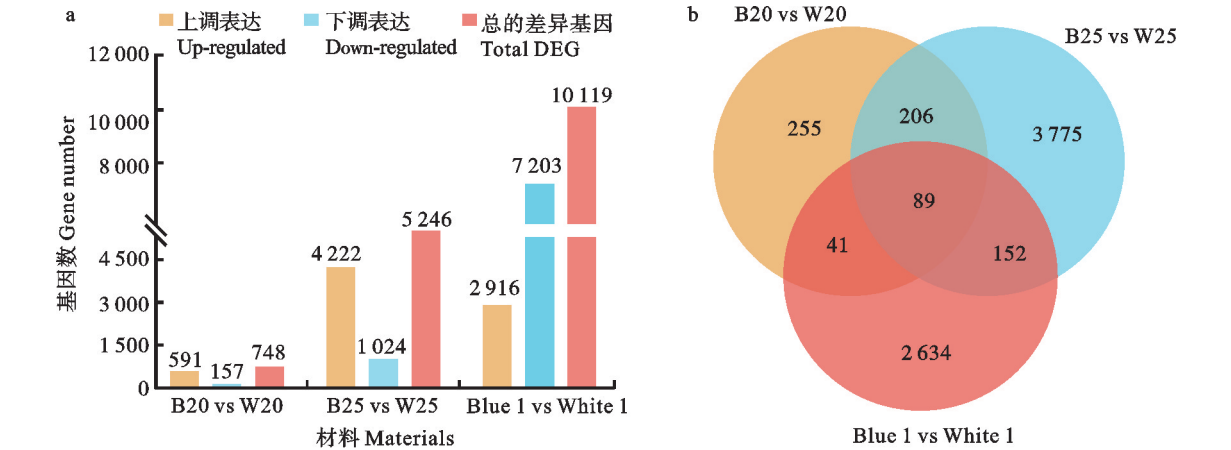


图 5 差异表达基因统计(a)与上调表达基因韦恩分析(b)

Fig. 5 Statistics of differentially expressed genes(a) and Venn analysis of up-regulated expressed genes(b)

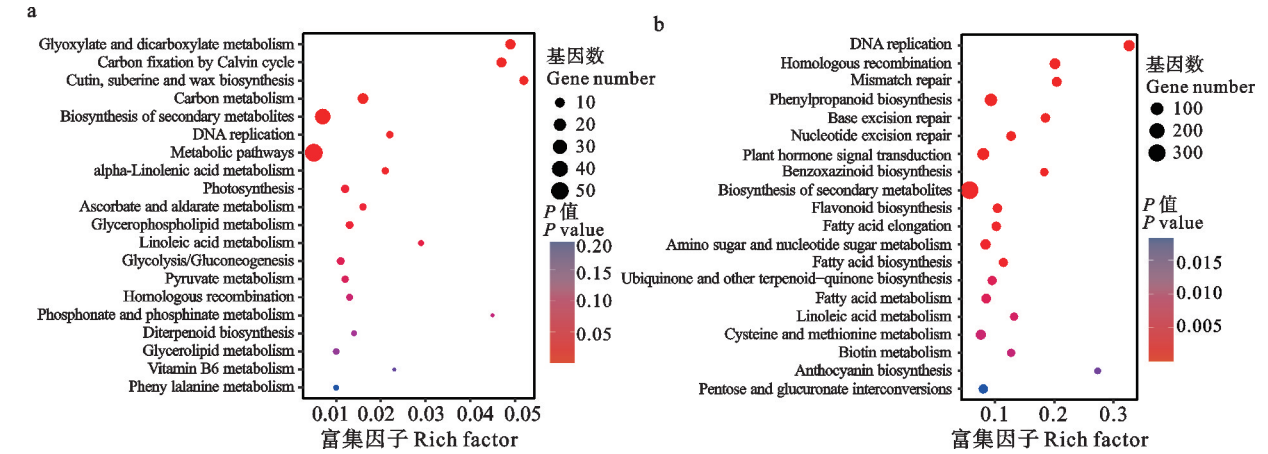


图 6 蓝白粒差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in blue and white grains

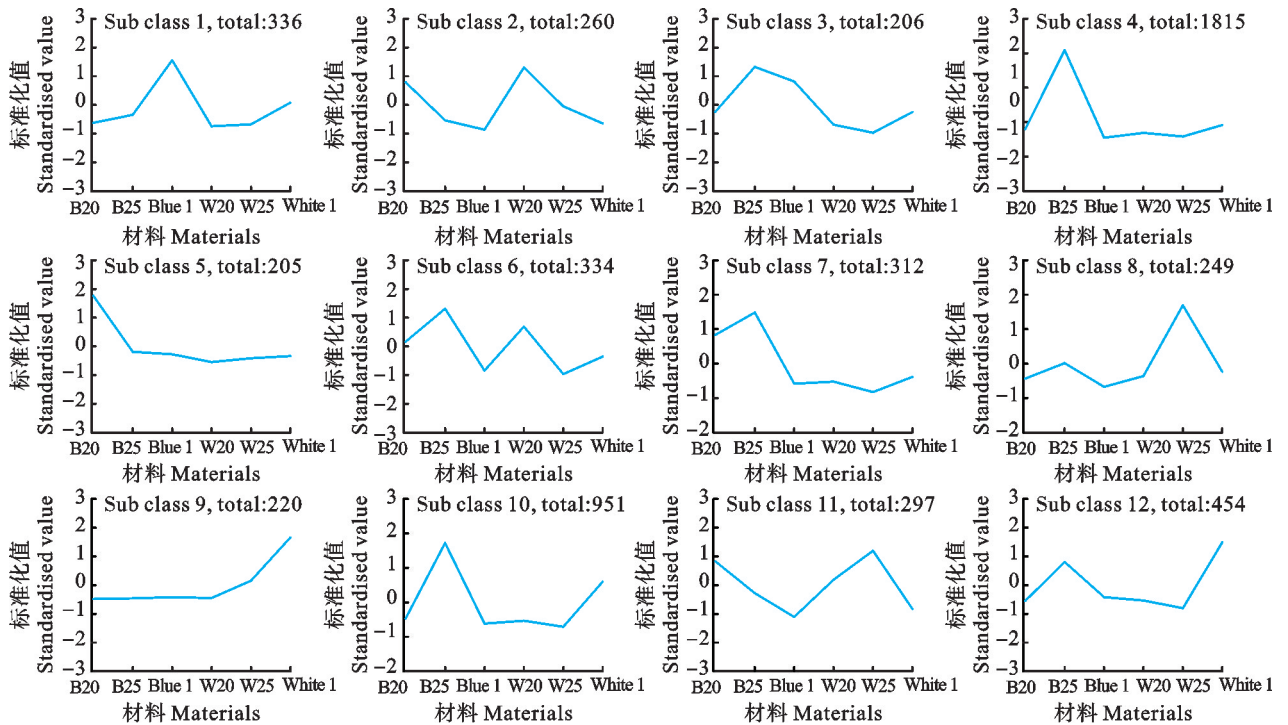
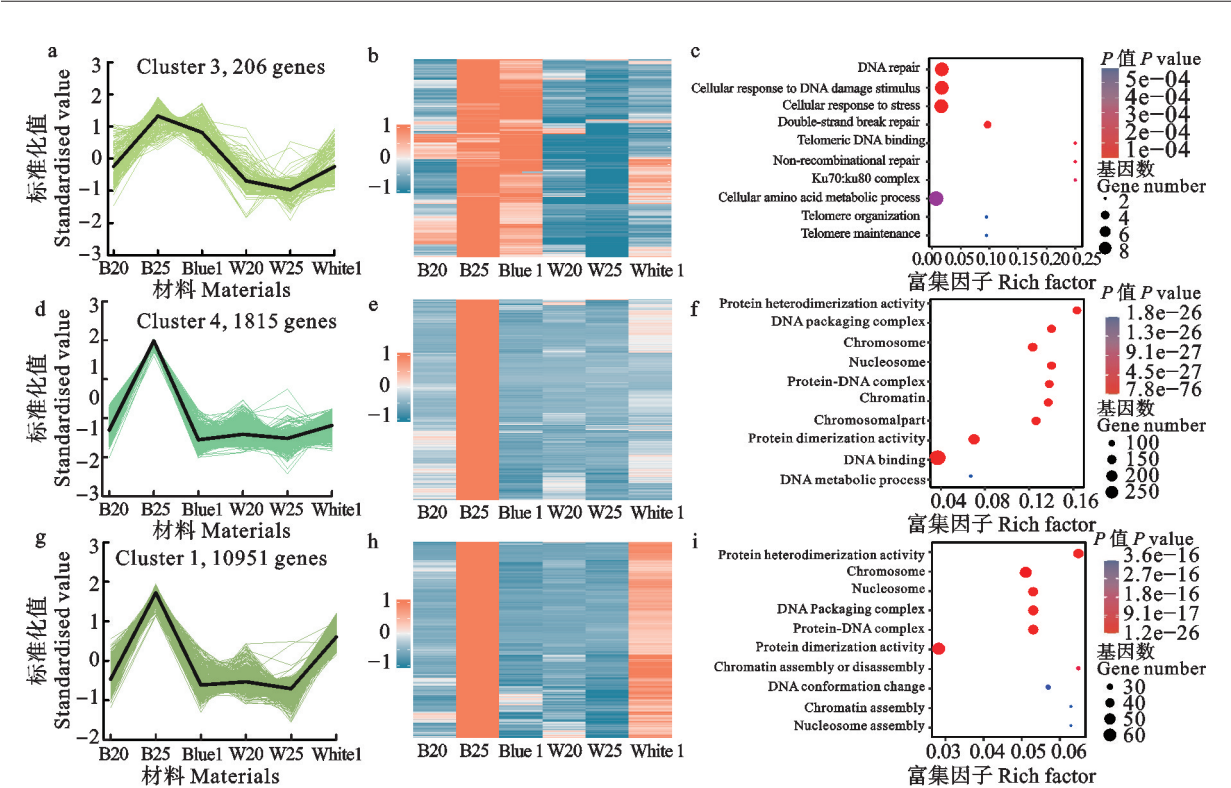


图 7 K-means 聚类结果

Fig. 7 Results of K-means clustering

这部分基因在供试材料中表达模式近似,蓝粒小麦中基因表达变换剧烈,而白粒小麦中相对平缓;不同的是在材料 Blue 1 和 White 1 间, Cluster 4 中的蓝粒与白粒基因表达差异较小,而 Cluster 10 中白粒基因的表达量要高;GO 富集结果显示,两者相同的是都围绕与蛋白质相互作用、DNA 和染色体相关的功能和结构方面:染色体(chromosome)、蛋白质异源二聚化活性(protein heterodimerization activity)和蛋白质-DNA 复合物(protein-DNA complex);不同的地

方是一些具体的生物学过程和功能方面:Cluster 4 侧重于 DNA 的结合和代谢功能方面:染色质(chromatin)、染色体部分(chromosomal part)、DNA 结合(DNA binding)和 DNA 代谢过程(DNA metabolic process);而 Cluster 10 体现在染色质和核小体的组装过程:染色质组装或解聚(chromatin assembly or disassembly)、核小体组装(nucleosome assembly)和染色质组装(chromatin assembly);具体的生物学过程和功能侧重点上存在差异。



a, d, g: K-means 聚类分析; b, e, h: 基因表达相对水平热图; c, f, i: GO 富集气泡图。在热图中, 颜色标尺代表每个基因的表达水平经过行标准化(Z-score)后的值。
a, d, g: K-means clustering analysis; b, e, h: Heatmap of relative gene expression levels; c, f, i: GO enrichment bubble chart. In the heatmap, the colored scale represents row-wise Z-score normalized expression levels for each gene.

图 8 差异表达基因表达模式及 GO 富集分析

Fig. 8 Expression patterns and GO enrichment analysis of the differentially expressed genes

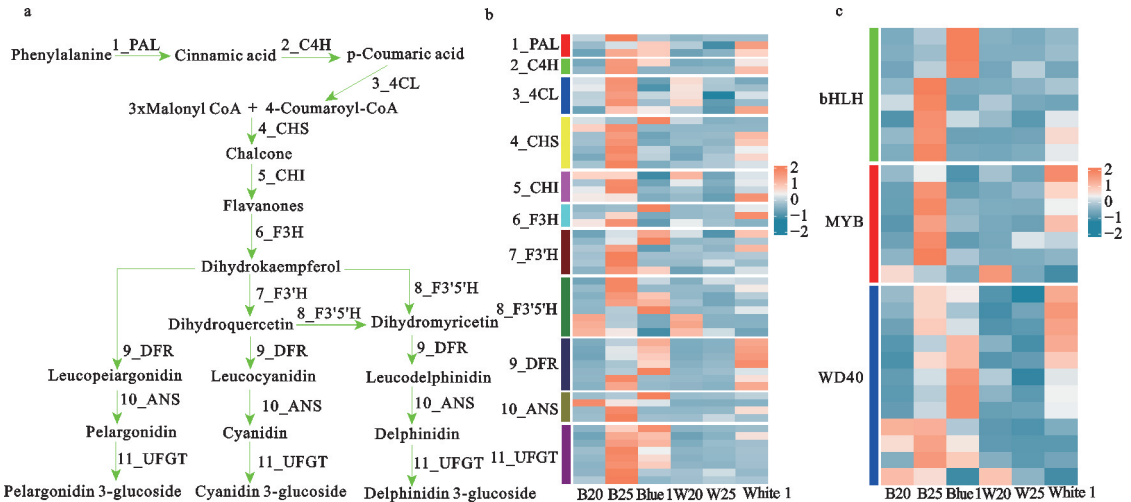
2.7 参与花青素合成的基因表达模式分析

小麦蓝粒性状与花青素合成与积累密切相关。参考中国春小麦和二倍体长穗偃麦草基因组,从供试材料的差异基因中共鉴定到 58 个花青素生物合成途径基因。它们包括参与苯丙氨酸途径中的 *PAL*、*C4H* 和 *4CL*; 花青素代谢途径中的 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H* 和 *F3'5'H*, 花青素合成阶段中的 *DFR*、*ANS* 和 *UFGT* (图 9a)。从这些基因的表达热图 (图 9b) 看,在花后 20 d,部分基因在蓝粒小麦中已经开始表达,但 B20 和 W20 之间的基因表达水平没有显著差异;在花后 25 d,相较于 W25, B25 中约 95% (54 个) 的基因呈现上调趋势,而且籽粒变色期 (B25) 的表达水平要明显高于籽粒变色前 (B20),因此花青素合成通路在花后 25 d 被明显激活。与本研究材料不同, Blue 1 材料中上游基因 (*PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI* 和 *F3H*) 约 50% 表达水平低于白粒材料,而下游基因 (*F3'5'H*、*ANS*、*UFGT*) 表现出与本研究一致的上调趋势。

研究发现 *bHLH*、*MYB* 和 *WD40* 这三类转

录因子也参与调控花青素的合成^[15]。在本研究材料的差异表达基因中鉴定到 28 个关键转录因子,包括 8 个 *bHLH*、7 个 *MYB* 和 12 个 *WD40* 家族成员。热图结果 (图 9c) 显示,这些基因在 B25 中的表达水平要高于 B20、W20 和 W25。同样是这些基因,在材料 Blue 1 和 White 1 之间的表达模式也有所不同。7 个 *MYB* 成员中有 5 个在 Blue 1 中下调表达; 8 个 *bHLH* 成员中 3 个表达水平高于白粒小麦, 3 个表达水平低于白粒小麦; 12 个 *WD40* 成员中 6 个表达量显著增加, 3 个基因表达量显著减少。

图 10a 展示不同比较组合中上调表达的花青素合成途径基因分布情况。在不同蓝粒材料中共鉴定到 83 个上调表达基因。籽粒变色前阶段 (B20 vs W20) 上调表达的基因有 8 个,籽粒变色关键期 (B25 vs W25) 有 77 个上调表达基因, Blue 1 vs White 1 中上调表达基因共有 9 个。本研究材料 (E10-2B) 与已发表材料 (Blue 1) 存在显著差异; 共同上调表达的基因有 15 个 (占比 18%); 本研究特异上调表达基因有 62 个 (占比 75%); 在

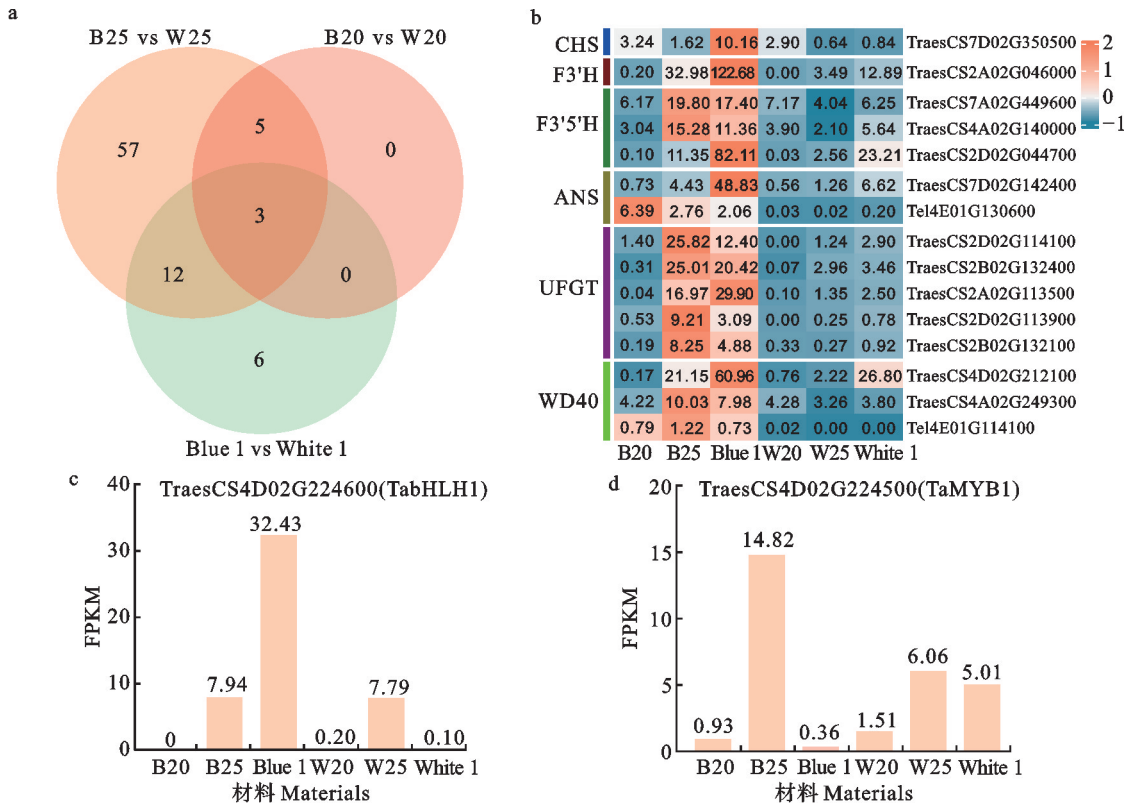


a: PAL: 苯丙氨酸裂解酶; C4H: 肉桂酸羟化酶; 4CL: 4-香豆酸辅酶 A 连接酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3H: 黄酮 3-羟化酶; F3'H: 类黄酮 3-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮 3',5'-羟化酶; DFR: 二氢黄酮醇 4-还原酶; ANS: 花青素合成酶; UFGT: 类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶。b 和 c: 结构基因和转录因子表达水平热图, 颜色标尺代表每个基因的表达水平经过行标准化(Z-score)后的值。

a: PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; C4H: Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL: 4-coumarate:CoA Ligase; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; F3H: Flavanone 3-hydroxylase; F3'H: Flavonoid 3-hydroxylase; F3'5'H: Flavonoid 3',5'-hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol 4-reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; UFGT: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase. b and c: Heatmap of expression levels of structural genes and transcription factors. The colored scale represents row-wise Z-score normalized expression levels for each gene.

图 9 花青素合成通路图及其相关结构基因与转录组因子的热图

Fig. 9 Anthocyanin synthesis pathway map and heat map of related structural genes and transcriptome factors



a: 韦恩分析图; b: 差异基因热图, 热图中的数值标签显示基因的原始表达水平 (FPKM 值), 颜色标尺代表每个基因的表达水平经过行标准化(Z-score)后的值; c 和 d: *TabHLH1* 和 *TaMYB1* 在不同材料中的表达分析, y 轴和柱子上的数字表示 FPKM 值。

a: Wayne analysis diagram; b: Differential gene heatmap. The numeric labels in the heatmap show the raw expression levels of genes (FPKM values). The color scale represents row-wise Z-score normalized expression levels for each gene; c and d: Expression analysis of *TabHLH1* and *TaMYB1* in different materials. The numbers on the y-axis and columns represent the FPKM values.

图 10 不同比较组合上调表达差异基因的韦恩和热图分析以及蓝粒基因的表达

Fig. 10 Venn diagram and heatmap of up-regulated differentially expressed genes in different comparison combinations, and expression of the blue-grain gene

Blue1 材料中特异表达的基因有 6 个(占比 7%)。在 15 个共有上调基因中(图 10b),基因 *F3'H* (类黄酮 3' 羟化酶基因)、*F3'5'H* (类黄酮 3',5'-羟化酶基因)和 *UFGT* (类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶基因)在两个蓝粒材料中表达水平都相对较高。*ThbHLH1* 和 *ThMYB1* 参与糊粉层中花青素的合成和积累^[22],其普通小麦同源基因分别是 *TabHLH1* (TraesCS4D02G224600)和 *TaMYB1* (TraesCS4D02G224500)。基因表达分析显示,本研究材料中 *TabHLH1* 表达量为 7.94(B25)和 7.79(W25),表达水平无显著变化(图 10c 和 d),而在 Blue 1 材料中高表达(32.43)于 White 1(0.10)。*TaMYB1* 在 B25 中的表达量(14.82)是 W25(6.06)的 2.45 倍,但在 Blue 1(0.36)中几乎不表达。

3 讨论

小麦籽粒蓝色特征是通过远缘杂交技术从近缘种(如长穗偃麦草)导入的典型性状,在育种工作中,可作为一种遗传标记,而携带 4E 染色体的异附加系又是非常重要的中间材料,被广泛应用于小麦遗传育种工作中^[23]。此外,蓝粒小麦本身具有较高的营养价值,是功能型小麦选育的很好资源材料。本研究对携带十倍体长穗偃麦草 4E 染色体的蓝粒附加系(E10-2B)的农艺性状进行统计分析,发现其除呈现蓝粒特征外,还表现出株高降低的有利性状,但同时也伴随着一些不利的性状(如穗长、粒长和千粒重的下降)。有研究指出,整条外源染色体的导入不仅会引入不利基因,还可能因外源基因与小麦基因组基因互作引发不利性状^[24-25]。针对 E10-2B 的表型,猜测 4E 染色体附加一方面激活了花青素的生物合成通路,导致植物碳氮资源向次生代谢倾斜,间接抑制籽粒的发育;另一方面携带的不利基因可能干扰了内源生长调控网络。

对 E10-2B 籽粒颜色动态观察发现,蓝色性状出现于花后 20~25 d 间。本研究通过转录组测序,分析了籽粒变色前后阶段的差异基因的表达模式,B25 vs W25 间的上调表达基因数量要明显高于 B20 vs W20,并且 KEGG 富集分析差异基因显著富集到苯丙烷、类黄酮和花青素生物合成途径。前人研究发现,花青素途径的早期结构基因 *PAL*、*CHS*、*CHI* 和 *F3H* 与花青素合成呈正相关^[26]。此外,植物组织蓝色性状的形成,需要飞燕草色素(delphinidin)的积累,而这一过程

受到特殊结构基因 *F3'5'H* 的调控^[19]; *DFR*、*ANS* 和 *UFGT* 是晚期结构基因,与花青素积累密切相关^[27-28]。在本研究中这些基因从籽粒变色前阶段(B20)到色素积累的关键阶段(B25)的表达水平呈现上升趋势,并且相较于白粒小麦显著上调表达,这与先前的研究结果一致^[29]。因此,花后 25 d 的 E10-2B 的花青素相关代谢和合成通路被显著激活,蓝色性状可能是由花青素的合成与积累造成的。另外,bHLH、MYB 和 WD40 这三类转录因子也被证明参与花青素合成^[30-31],本研究在差异基因中共鉴定到有 27 个基因的表达水平明显要高于白粒,可能在花青素途径中发挥正向调控作用。

Pei 等^[22]研究表明,*ThbHLH1* 和 *ThMYB1* 是普通小麦-长穗偃麦草异附加系中控制蓝色籽粒的基因,在蓝色籽粒的糊粉层中都上调表达,*TaMYB1* 在普通小麦中的表达模式与 *ThMYB1* 非常相似,而 *TabHLH1* 在普通小麦中不表达。本研究中,这两个基因在 E10-2B 与 Blue 1 两个蓝粒材料中的表达模式存在着差异,如基因 *TaMYB1* 在我们的材料中上调表达,而在 Blue 1 材料中却下调表达;基因 *TabHLH1* 在供试材料中的表达水平差异不显著,但是在 Blue 1 表达上调。由此可见不同的蓝粒材料中,控制蓝粒性状或花青素合成的基因的表达模式确实存在着差异,主要是因为蓝粒性状不仅受到剂量效应和母本效应的影响,而且其遗传方式可能因基因来源、杂交组合方式以及环境因素的影响而有所差异^[32-33],因此有必要分析在不同背景下,存在共性的、与花青素合成有关的基因。

在本研究中,通过比较不同遗传背景下的 4E 染色体附加系 E10-2B 和 Blue 1 的转录组数据,深入分析了调控花青素生物合成的结构基因和转录因子在不同背景材料中的表达差异。结果发现,花青素合成相关基因的表达模式存在显著差异。例如,*PAL*、*C4H*、*ACL* 等结构基因以及转录因子 bHLH 和 WD40 在 E10-2B 中呈现上调趋势,而在 Blue 1 中则表达水平降低或保持相对平稳。这种表达差异可能与两个蓝粒材料的遗传背景、发育阶段和环境条件的多重因素有关。而 Blue 1 和 E10-2B 这两个蓝粒材料的籽粒糊粉层均呈现蓝色表型,表明它们在花青素合成通路中存在相似的机制;经过筛选,在这两个材料中有 15 个共同显著上调表达的基因,这些基因可能在

花青素合成过程中发挥重要作用。特别是 $F3'H$ (类黄酮 3'-羟化酶基因)、 $F3'5'H$ (类黄酮 3', 5'-羟化酶基因) 和 $UFGT$ (黄酮类 UDP-葡萄糖基转移酶基因) 这三类基因在两个蓝粒材料中的表达水平显著高于白粒材料。研究表明, $F3'5'H$ 通过催化羟基化反应决定花青素类型, 是合成蓝色飞燕草素 (delphinidin) 类花青素苷元的关键步骤^[19]。 $UFGT$ 则负责催化花青素苷元的糖基化修饰, 直接影响花青素的稳定性、颜色表现及在细胞中的积累位置^[34]。

本研究对不同蓝粒材料的转录组数据进行了系统分析, 揭示了花青素合成通路中关键基因的表达模式及其潜在调控机制。由于不同蓝粒材料的取样时间存在差异, 这些基因是否真正介导小麦籽粒蓝色花青素的合成, 仍需借助功能基因组学手段进一步验证。

参考文献:

- [1] MCLEAN E, COGSWELL M, EGLI I, *et al.* Worldwide prevalence of anaemia, WHO vitamin and mineral nutrition information system, 1993–2005 [J]. *Public Health Nutrition*, 2009, 12(4): 444.
- [2] OLSEN K M, WENDEL J F. A bountiful harvest: Genomic insights into crop domestication phenotypes [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 47.
- [3] 宗学风, 张建奎, 李帮秀, 等. 小麦籽粒颜色与抗氧化作用[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 237.
ZONG X F, ZHANG J K, LI B X, *et al.* Relationship between antioxidation and grain colors of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(2): 237.
- [4] DE MEJIA E G, ZHANG Q Z, PENTA K, *et al.* The colors of health: Chemistry, bioactivity, and market demand for colorful foods and natural food sources of colorants [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2020, 11: 145.
- [5] ZHANG Q F. Purple tomatoes, black rice and food security [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22(7): 414.
- [6] DVOŘÁK J, CHEN K C. Phylogenetic relationships between chromosomes of wheat and chromosome 2E of *Elytrigia elongata* [J]. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1984, 26(2): 128.
- [7] ZHANG X, DONG Y, WANG R R. Characterization of genomes and chromosomes in partial amphiploids of the hybrid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* by *in situ* hybridization, isozyme analysis, and RAPD [J]. *Genome*, 1996, 39(6): 1062.
- [8] LIU Z, LI D Y, ZHANG X Y. Genetic relationships among five basic genomes st, E, A, B and D in triticeae revealed by genomic southern and *in situ* hybridization [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(7): 1080.
- [9] 万安民, 赵中华, 吴立人. 2002 年我国小麦条锈病发生回顾 [J]. 植物保护, 2003, 29(2): 5.
WAN A M, ZHAO Z H, WU L R. Reviews of occurrence of wheat stripe rust disease in 2002 in China [J]. *Plant Protection*, 2003, 29(2): 5.
- [10] FEDAK G, HAN F. Characterization of derivatives from wheat-*Thinopyrum* wide crosses [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, 109(1-3): 360.
- [11] LI Z S, MU S M, JIANG L X, *et al.* Cytogenetic study of blue-grained wheat [J]. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 1983, 90: 265.
- [12] 英加, 李滨, 穆素梅, 等. 蓝粒小麦易位系的荧光原位杂交鉴定 [J]. 植物学报, 2001, 43(2): 164.
YING J, LI B, MU S M, *et al.* Identification of blue-grained wheat translocation lines using fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2001, 43(2): 164.
- [13] ZHAO J, DIXON R A. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(8): 2323.
- [14] HUANG W Y, SUI Z Q, ZHANG W M. Editorial: Advances in anthocyanins: Sources, preparation, analysis methods, bioavailability, physiochemical properties, and structural features [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1148051.
- [15] 牛钰, 李晶, 王俊文, 等. 高等植物花青素生物合成、调控、生物活性及其检测的研究进展 [J]. 浙江农业学报, 2024, 36(4): 978.
NIU Y, LI J, WANG J W, *et al.* Research progress of anthocyanin biosynthesis, regulation, bioactivity and detection in higher plants [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2024, 36(4): 978.
- [16] 张晓祥, 王玲, 寿路路. 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(36): 46.
ZHANG X X, WANG L, SHOU L L. A rapid modified CTAB method of extracting genomic DNA from wheat leaf [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(36): 46.
- [17] LIU L Q, LUO Q L, LI H W, *et al.* Physical mapping of the blue-grained gene from *Thinopyrum ponticum* chromosome 4Ag and development of blue-grain-related molecular markers and a FISH probe based on SLAF-seq technology [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(11): 2359.
- [18] DENG P C, DU X, WANG Y Z, *et al.* GenoBaits®Wheatplu-see: A targeted capture sequencing panel for quick and accurate identification of wheat-*Thinopyrum* derivatives [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2024, 137(2): 36.
- [19] LI N, LI S M, ZHANG K P, *et al.* *ThMYC4E*, candidate Blue aleurone 1 gene controlling the associated trait in *Triticum aestivum* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181116.
- [20] LI X D, MENG B Y, ZHANG Z, *et al.* qPrimerDB 2.0: An updated comprehensive gene-specific qPCR primer database

- for 1172 organisms [J]. *Nucleic Acids Research*, 2025, 53 (D1):D205.
- [21]SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6):1101.
- [22]PEI J W, WANG Z, HENG Y F, *et al.* Selection of dysfunctional alleles of bHLH1 and MYB1 has produced white grain in the tribe triticeae [J]. *Plant Communications*, 2025, 6 (1):101265.
- [23]ZHENG Q, LI B, MU S M, *et al.* Physical mapping of the blue-grained gene(s) from *Thinopyrum ponticum* by GISH and FISH in a set of translocation lines with different seed colors in wheat [J]. *Genome*, 2006, 49(9):1109.
- [24]BUŁOŃCHIK A A, BORZIAK V S, VOLUEVICH E A. The effects of alien chromosomes on common wheat resistance to biotrophic fungal pathogens [J]. *TSitologičeskaia Genetika*, 2008, 42(1):13.
- [25]刘彩云. 普通小麦异附加系重要性状的评价与鉴定及六倍体小黑麦与普通小麦杂交后代的鉴定 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2015.
- LIU C Y. Evaluation and screening on important traits of common wheat alien chromosome addition lines and identification of lines derived from hexaploid triticale and common wheat [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015.
- [26]AWASTHI P, MAHAJAN V, JAMWAL V L, *et al.* Cloning and expression analysis of chalcone synthase gene from *Coleus forskohlii* [J]. *Journal of Genetics*, 2016, 95(3):647.
- [27]LIU Y, TIKUNOV Y, SCHOUTEN R E, *et al.* Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: A review [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6:52.
- [28]SHI Q Q, DU J T, ZHU D J, *et al.* Metabolomic and transcriptomic analyses of anthocyanin biosynthesis mechanisms in the color mutant *Ziziphus jujuba* cv. Tailihong [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(51):15186.
- [29]LIU X T, LIU H F, TIAN B M, *et al.* Metabolome and transcriptome analyses of anthocyanin biosynthesis reveal key metabolites and candidate genes in purple wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Physiologia Plantarum*, 2023, 175(3):e13921.
- [30]DENG J, LI J J, SU M Y, *et al.* A bHLH gene *NnTT8* of *Nelumbo nucifera* regulates anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 158:518.
- [31]JIANG W H, LIU T X, NAN W Z, *et al.* Two transcription factors TaPpm1 and TaPpb1 co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(10):2555.
- [32]李红艳, 姚晓华, 姚有华, 等. 麦类作物蓝粒性状遗传与调控机制研究进展 [J]. 作物杂志, 2024(2):9.
- LI H Y, YAO X H, YAO Y H, *et al.* Advances in genetic and regulatory mechanisms of blue grain traits in wheat crops [J]. *Crops*, 2024(2):9.
- [33]王燕, 姚晓华, 安立昆, 等. 麦类作物粒色形成机制及基因定位研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2023, 51(9):1.
- WANG Y, YAO X H, AN L K, *et al.* Progress on the mechanism of grain colour formation and gene localization in wheat crops [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2023, 51(9):1.
- [34]李俊才, 李天忠, 王志刚, 等. ‘红巴梨’果皮 UFGT 基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(1):30.
- LI J C, LI T Z, WANG Z G, *et al.* Cloning and expression of UFGT gene in skin of max red bartlett [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(1):30.