

甘薯 *Tai6.33665* 基因生物信息学、亚细胞定位及表达分析

熊 军, 唐秀桦*, 韦民政*

广西壮族自治区农业科学院经济作物研究所, 广西南宁 530007

摘 要: 甘薯 (*Ipomoea batatas*) 作为全球重要的粮食与功能作物, 其紫肉品种因富含花青素而备受关注。花青素不仅赋予块根鲜明的色泽, 更具有抗氧化、抗炎及预防慢性疾病的生理功能, 因此在健康食品开发中具有重要价值。然而, 花青素的生物合成受多层级调控网络影响, 其中 bHLH 转录因子的功能尚未在甘薯中被充分解析。本研究聚焦甘薯基因 *Tai6.33665*, 旨在阐明其分子特性、亚细胞定位模式及其在花青素积累中的调控作用, 为高花青素甘薯品种的分子育种提供理论依据。本研究以紫肉甘薯 (PFSP) 和白肉甘薯 (WFSP) 为材料, 通过生物信息学分析 *Tai6.33665* 蛋白的结构与进化关系, 利用 qRT-PCR 检测基因表达模式, 构建 *Tai6.33665*-GFP 融合载体进行烟草瞬时转化, 结合激光共聚焦显微镜明确亚细胞定位, 分析基因表达与花青素含量的相关性及其 miRNA 互作机制。结果表明: *Tai6.33665* 编码的蛋白具有典型 bHLH 结构域, 与花青素合成调控因子高度同源, 其表达量与花青素积累呈显著负相关 ($P<0.05$), 且受 *ib-miR52* 靶向抑制; 亚细胞定位显示该蛋白定位于内质网, 推测其可能通过翻译后修饰或内质网通路间接调控代谢。本研究证实了 *Tai6.33665* 作为负调控因子抑制甘薯花青素生物合成, 其功能实现依赖于亚细胞定位特异性及 miRNA 介导的转录后调控网络。这一发现不仅丰富了植物次生代谢调控的理论框架, 更为分子育种提供了双轨策略: 通过 CRISPR/Cas9 靶向敲除 *Tai6.33665* 或过表达 *ib-miR52*, 可突破花青素积累的遗传限制, 培育高花青素含量甘薯新品种。未来工作将聚焦于解析该基因与 MYB/WD40 蛋白的互作机制, 以及内质网定位对其转录活性的调控路径。

关键词: 甘薯; *Tai6.33665*; 生物信息学; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S531 文献标志码: A

Bioinformatics, Subcellular Localization and Expression Analysis of Gene *Tai6.33665* in Sweet Potato

XIONG Jun, TANG Xiuhua*, WEI Minzheng*

Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract: Sweet potato (*Ipomoea batatas*) is a globally significant food and functional crop, with its purple-fleshed varieties drawing particular attention due to the high anthocyanin content. Anthocyanins not only give the tubers distinct color but also possess antioxidant, anti-inflammatory, and disease-preventive physiological functions, making them highly valuable in the development of health foods. However, the biosynthesis of anthocyanins is regulated by a multi-level network, and the role of bHLH transcription factors in sweet potatoes has not been fully elucidated. This study focused on the sweet potato gene *Tai6.33665*, aiming to clarify its molecular characteristics, subcellular localization pattern, and regulatory role in anthocyanin accumulation, providing a theoretical basis for molecular breeding of high-anthocyanin sweet potato varieties. Using purple-fleshed sweet potato (PFSP) and white-fleshed sweet potato (WFSP) as materials, the study analyzed the protein structure and evolutionary relationship of *Tai6.33665* through bioinformatics, detected the gene expression pattern using qRT-PCR, constructed a *Tai6.33665*-GFP fusion vector for transient transformation in tobacco, determined the subcellular localization using laser confocal microscopy, and analyzed

收稿日期 2025-06-19; 接受日期 2025-08-05

基金项目 广西重点研发计划项目 (桂农科 AB241484015); 广西农业科学院基本科研业务专项 (桂农科 2022JM37, 桂农科 2021YT060)。

作者简介 熊 军 (1978—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 作物育种和栽培技术。*通信作者 (Corresponding author): 韦民政 (WEI Minzheng), E-mail: 107856927@qq.com; 唐秀桦 (TANG Xiuhua), E-mail: Tang6008@126.com。

the correlation between gene expression and anthocyanin content and the miRNA interaction mechanism. The results showed that the protein encoded by *Tai6.33665* had a typical bHLH domain and was highly homologous to anthocyanin synthesis regulatory factors. Its expression level was significantly negatively correlated with anthocyanin accumulation ($P < 0.05$), and it was targeted and inhibited by *ib-miR52*. Subcellular localization indicated that the protein was located in the endoplasmic reticulum, suggesting that it might indirectly regulate metabolism through post-translational modification or the endoplasmic reticulum pathway. This study confirmed that *Tai6.33665* acted as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in sweet potatoes, and its function depended on subcellular localization specificity and miRNA-mediated post-transcriptional regulatory networks. This discovery not only enriches the theoretical framework of plant secondary metabolism regulation but also provides a dual-track strategy for molecular breeding by targeting knockout of *Tai6.33665* or overexpression of *ib-miR52* using CRISPR/Cas9, the genetic limitations of anthocyanin accumulation could be overcome, and new high-anthocyanin sweet potato varieties could be developed. Future work would focus on elucidating the interaction mechanism between the gene and MYB/WD40 proteins, as well as the regulatory pathway of its transcriptional activity by endoplasmic reticulum localization.

Keywords: sweet potato; *Tai6.33665*; bioinformatics; subcellular localization; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.11.001

花青素是一类广泛存在于植物中的水溶性类黄酮化合物, 具有抗氧化、抗炎及抗癌等多种生理活性, 在食品工业和人类健康领域具有重要价值^[1]。甘薯 (*Ipomoea batatas*) 作为全球重要的粮食作物, 其紫肉品种因富含花青素而备受关注。然而, 花青素的生物合成受多基因调控网络控制, 其中 bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 转录因子在调控花青素合成途径中起关键作用^[2]。明确甘薯中 bHLH 家族基因的功能及其调控机制, 不仅有助于解析花青素合成的分子基础, 还可为高花青素甘薯品种的分子育种提供理论依据。

前人在植物花青素合成途径及其调控机制的研究方面取得了显著进展。在模式植物中, 花青素生物合成的调控机制研究较为深入, 该过程主要由编码相关酶的结构基因以及关键的转录调控因子 (MYB、bHLH 和 WD40 蛋白) 协同控制^[3], bHLH 转录因子通过与 MYB 和 WD40 蛋白形成 MBW 复合体, 激活结构基因 (如 *DFR*、*ANS* 等) 的表达, 进而调控花青素的积累^[4-6]。在甘薯中, 多个 bHLH 家族基因已被鉴定, 如 *IbMYC1* 和 *IbMYC2* 被证实参与花青素合成的正调控^[7]; 在紫心甘薯块根中, *IbbHLH2* 的表达量与花青素合成酶基因 (*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*3GT*) 呈正相关, 且与块根着色程度一致, 表明其直接调控花青素途径, 而 *IbbHLH1* 无此关联^[8]。此外, 亚细胞定位分析表明, 部分 bHLH 蛋白定位于细胞核或内质网, 其定位特性可能影响其转录活性^[9]。然而, 甘薯中多数 bHLH 的基因功能尚未明确, 尤其是不同品种间基因表达差异与花青素含量变化的关联机制仍有待探索。

尽管已有研究揭示了 bHLH 家族基因在花青素合成中的重要性, 但甘薯 *Tai6.33665* 基因的具体功能及其调控机制尚未明确。前期生物信息学分析显示, *Tai6.33665* 编码的蛋白具有典型的 bHLH 结构域, 并与花青素合成相关转录因子高度同源 (NCBI 数据库注释号 QMP81308.1)。然而, 该基因是否直接参与花青素合成调控、其亚细胞定位特性以及与 miRNA 的相互作用仍缺乏实验证据。

本研究以紫肉甘薯和白肉甘薯为材料, 结合生物信息学、亚细胞定位及表达分析, 初步解析 *Tai6.33665* 基因的功能及其在花青素积累中的调控作用。通过生物信息学分析明确 *Tai6.33665* 基因编码蛋白的结构、理化性质及进化关系; 探究 *Tai6.33665* 蛋白的亚细胞定位, 揭示其潜在作用位点; 分析 *Tai6.33665* 在不同品种和发育阶段的表达差异, 阐明其与花青素积累的负调控关系; 验证 *Tai6.33665* 是否受 *ib-miR52* 靶向调控; 以期后续解析其在花青素合成通路中的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为广西农业科学院经济作物研究所选育的紫肉甘薯 (purple-fleshed sweet potato, PFSP, 桂经薯 8 号) 和白肉甘薯 (white-fleshed sweet potato, WFSP, 桂经薯 8 号的自然突变品系 118)。2 个品种 (系) 种植于广西农业科学院院部基地 (22°51'11"N, 108°14'45"E, 海拔: 55.59 m)。主要试剂: 难提取植物总 RNA 试剂盒

(HiPure HP Plant RNA Mini Kit, 美基生物), 反转录试剂盒[HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper), 南京诺唯赞生物科技有限公司], 高保真 DNA 聚合酶 (Vazyme 公司), 重组试剂盒 (ONE STEP CLONG KIT, Vazyme 公司)。

1.2 方法

本课题组前期通过对 2 个品种 (PFSP 和 WFSP) 花青素含量高、低 2 个时期进行全长转录组和 miRNA 测序, 并进行联合分析, 推测出 *novel_miR_52* (命名为 *ib-miR52*) 与靶基因 *Tai6.33665* 存在互作关系, 共同调控甘薯块根花青素的生物合成, 因此, 本研究针对靶基因 *Tai6.33665* 进行生物信息学分析、亚细胞定位和表达模式分析。

1.2.1 生物信息学分析 从 NCBI 数据库中检索得到目标基因 *Tai6.33665* 的功能注释和蛋白质序列; 利用 Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件分析蛋白质的一级结构; 利用 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线软件预测蛋白质的二级结构; 利用 SWISS-MODE (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件预测蛋白质的三级结构; 通过 SignalP 4.1 软件分析信号肽特征; 通过 TMHMM 2.0 软件预测蛋白质的跨膜特性; 利用 ProtScale 软件分析其亲水性和疏水性; 通过 InerPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) 在线软件分析蛋白质功能性结构域。为了解靶基因家族在甘薯和其他物种之间的进化关系, 本研究从 NCBI 数据库中提取该家族其他成员的蛋白序列, 并使用 MEGA 5.0 软件进行全长蛋白序列的详尽比较, 采用邻接法构建系统进化树。利用 DNAMAN 软件进行多序列比对。

1.2.2 *Tai6.33665* 蛋白亚细胞定位 从甘薯块根中提取 RNA, 反转录成 cDNA。根据 *Tai6.33665* 开放阅读框 (ORF) 基因序列设计克隆引物 (CZ-*Tai6.33665*-101SalI-F: 5'-CTTCACTGTTGATACATATGGCGGCGGAAACTCT-3'; CZ-*Tai6.33665*-101SalI-R: 5'-ATCCGGTACCCCCGGGAAACTGAGGAATTATACTATGAATTG-3', 下划线区域为载体同源重组序列), 引物退火温度为 47 °C。采用先前提取的 cDNA 作为模板, 使用 Vazyme 公司的 Phanta Max 超高保真度 DNA 聚合酶进行 PCR。PCR 扩增的具体步骤如下: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 47 °C 退火 15 s, 72 °C

延伸 60 s, 39 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 产物通过 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析, 并将目标 DNA 条带 (在预期的 2 000 bp 目标位置有一条单一条带) 用 Axygen 割胶回收试剂盒切胶回收, 并构建到载体上进行单克隆测序。

用 *Sal* I (TaKaRa 公司: No.1080S) 内切酶酶切载体 pRI101-GFP 线性化。将纯化后的酶切片段与 *Tai6.33665* 基因的 PCR 扩增产物进行重组 (所用重组试剂盒是 Vazyme 公司的 ClonExpress II 一步克隆试剂盒)。将重组反应所获得的产物转化大肠杆菌 DH5 α 细胞, 从 PCR 结果显示为阳性的转化菌株中提取质粒 DNA, 将获得的 DNA 扩增产物测序, 以验证插入基因正确性。使用的扩增和序列分析引物为目标基因两侧的载体序列 (35S-F: 5'-GACGCACAATCCCCTATCC-3'; GFP-J-R: 5'-GGGTGAGCTTGCCGTAGGTG-3'), 因基因较长, 另设计中间引物 (*Tai6.33665*-Z-F: 5'-CCCCATCCCCACCACCAT-3') 用于加测, 以获得基因全长。

烟草种植约 1 个月后, 将构建好的 *Tai6.33665* 定位载体质粒转入农杆菌 GV3101, 瞬时转化到烟草叶片, 将烟草置于低光照条件下培养 2 d, 第 3 天之后, 将烟草叶片中已接种的部分剪下, 制作成显微镜玻片, 在激光共聚焦显微镜下进行细致观察并记录图片。使用未携带有效载体的农杆菌转化样本, 执行相同的步骤进行对照试验。

1.2.3 *Tai6.33665* 的表达模式分析 使用难提取植物总 RNA 试剂盒提取紫肉和白肉甘薯花青素含量高、低 2 个时期的甘薯块根 (8H、118H 和 8L、118L) 总 RNA。按照 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒操作流程对 *Tai6.33665* 进行反转录。以反转录合成的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析。以 *IbActin* 为内参基因, 通过 Primer Premier 5 设计引物 (*IbActin*: 5'-GACTACCATGTTCCCCGGTA-3'/5'-TTGTATGCCACGAGCATCTT-3'; *Tai6.33665*: 5'-CCACCACCATCATCATATCCA-3'/5'-CCTCCTCCTCGTCTTCCTCTT-3')。qRT-PCR 反应体系 (20.0 μ L): 2 $\times$ Universal SYBR qPCR Master Mix 10.0 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, Template cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 10 s, 56 °C/59 °C 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。完成上述步骤后, 把加好样品的 96 孔板置于德国 Analytik Jena

qTOWERE 2.2 荧光定量 PCR 仪中进行 qRT-PCR。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量。

1.3 数据处理

所有试验数据均通过 3 次重复试验。使用 Excel、GraphPad Prism 9.5 软件进行数据整理、分析及图表的制作,使用 DPS 7.05 软件进行方差分析和差异显著性检验,使用 PowerPoint 软件对图表进行合并和整理。

2 结果与分析

2.1 甘薯 *Tai6.33665* 基因的生物信息学分析

2.1.1 *Tai6.33665* 基因结构预测和功能注释 利用 softberry 平台的 FGENESH 2.6 分析工具预测甘薯基因组 DNA 中 *Tai6.33665* 基因结构,其序列长度为 2 491 nt,该基因来自正链。使用 NCBI 中的 Blastx 工具对 *Tai6.33665* 进行基因功能注释,共得到显著相关的注释 100 条,其中 Max score 得分前 10 的注释结果见表 1。从表 1 中可知,Percent identity 最高(99.85%)的注释结果为 anthocyanin bHLH transcriptional regulator (*Ipomoea batatas*, QMP81308.1),推测其是调控甘薯花青素生物合成的 bHLH 转录因子。

2.1.2 *Tai6.33665* 蛋白结构域预测 通过 InerPro 软件分析蛋白质结构域,对 *Tai6.33665* 所编码的

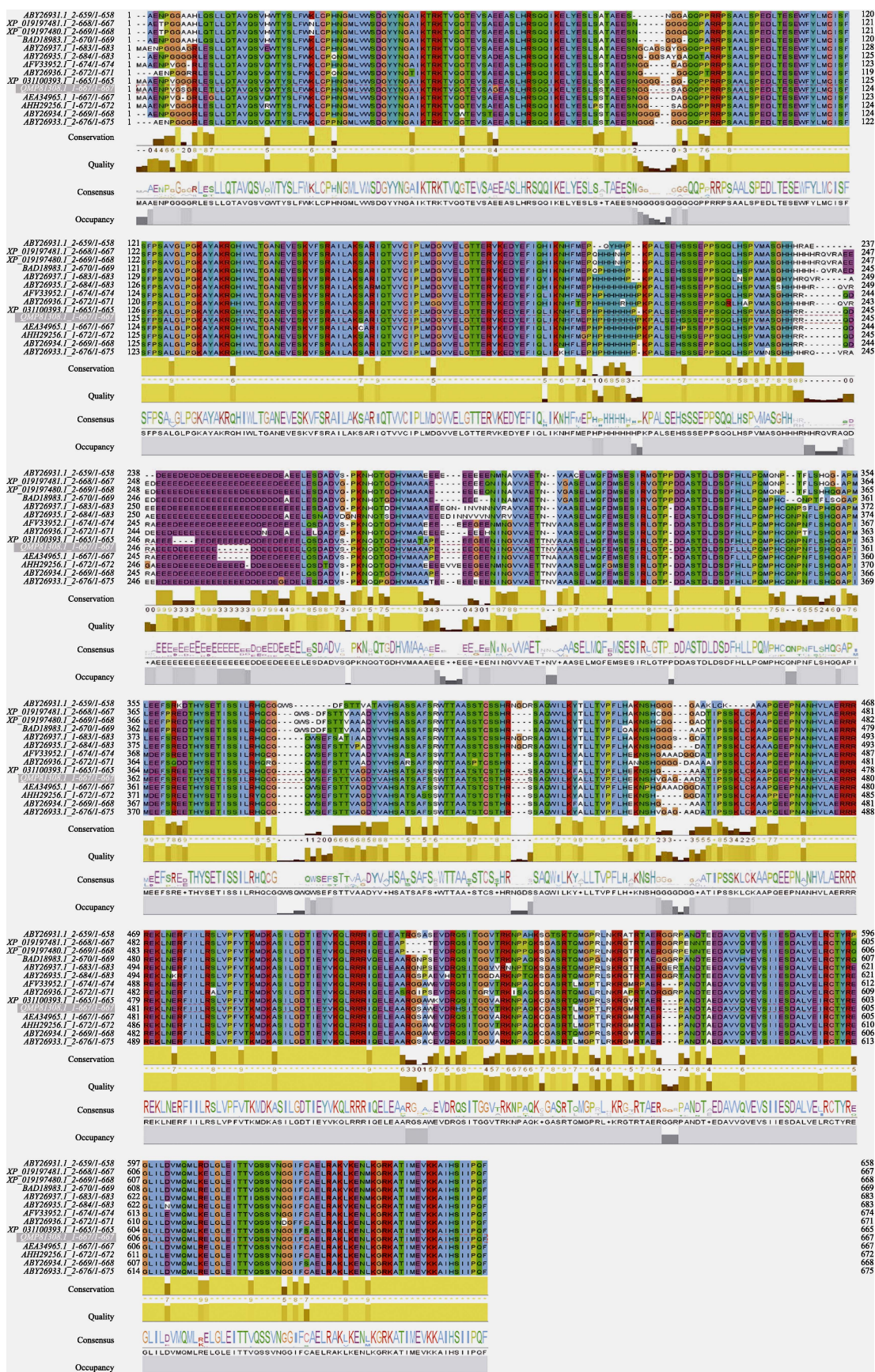
氨基酸序列进行详细分析,发现该氨基酸在 12~202 位置有 bHLH-MYC and R2R3-MYB transcription factors N-terminal 结构域,在 468~523 位置有 MYC-type, basic helix-loop-helix (bHLH) 结构域。

2.1.3 *Tai6.33665* 氨基酸的多重序列比对 利用 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 在线工具,结合 Jalview 软件,对 *Tai6.33665* 氨基酸序列(QMP81308.1)及其同源蛋白序列(percent identity>85%)进行多重序列比对分析。结果显示,这些序列存在较多的保守区间、比对质量较高及大量的共有序列(图 1)。同时使用 MEGA 11.0 软件构建系统进化树(图 2),结果表明:QMP81308.1[anthocyanin bHLH transcriptional regulator (*Ipomoea batatas*)]与 AEA34965.1[putative transcription factor bHLH2 (*Ipomoea batatas*)]聚在一起,均属于 bHLH 转录因子家族。

2.1.4 *Tai6.33665* 蛋白的理化性质分析 理化性质分析结果显示,*Tai6.33665* 蛋白由 667 个氨基酸组成,分子式为 C₃₂₂₀H₅₀₅₈N₉₂₅O₁₀₃₃S₂₇,分子质量约为 74 150。*Tai6.33665* 蛋白含有全部 20 种氨基酸,其中谷氨酸(Glu)含量最高,占 10.8%;丙氨酸(Ala)占 9.1%;色氨酸(Trp)含量最低,

表 1 *Tai6.33665* 的基因功能注释
Tab. 1 Gene function annotation of *Tai6.33665*

功能描述 Function description	学名 Scientific name	最大得分 Max score	总得分 Total score	查询覆盖率 Query cover/%	期望比对 Evalue	匹配百分比 Percent identity	访问号长度 Accession length	访问号 Accession
Anthocyanin bHLH transcriptional regulator	<i>Ipomoea batatas</i>	1169	1169	80	0	99.85	667	QMP81308.1
Putative transcription factor bHLH2	<i>Ipomoea batatas</i>	1129	1129	80	0	97.46	667	AEA34965.1
bHLH2 transcription factor	<i>Ipomoea batatas</i>	1110	1110	80	0	93.93	674	AFV33952.1
Transcriptional regulator bHLH2	<i>Ipomoea batatas</i>	1095	1095	80	0	92.9	672	AHH29256.1
Putative anthocyanin transcriptional regulator	<i>Ipomoea lacunosa</i>	1070	1070	80	0	93.31	669	ABY26934.1
Basic helix-loop-helix protein A	<i>Ipomoea triloba</i>	1067	1067	80	0	93.73	665	XP_031100393.1
Putative anthocyanin transcriptional regulator	<i>Ipomoea trifida</i>	1059	1059	80	0	92.61	676	ABY26933.1
Putative anthocyanin transcriptional regulator	<i>Ipomoea hochstetteri</i>	1011	1011	80	0	83.70	683	ABY26937.1
Putative anthocyanin transcriptional regulator	<i>Ipomoea violacea</i>	980	980	80	0	82.82	684	ABY26935.1
Putative anthocyanin transcriptional regulator	<i>Ipomoea quamoclit</i>	971	971	80	0	81.33	659	ABY26931.1

图 1 *Tai6.33665* 及其同源蛋白氨基酸序列比对Fig. 1 Amino acid sequence alignment of *Tai6.33665* and its homologous proteins

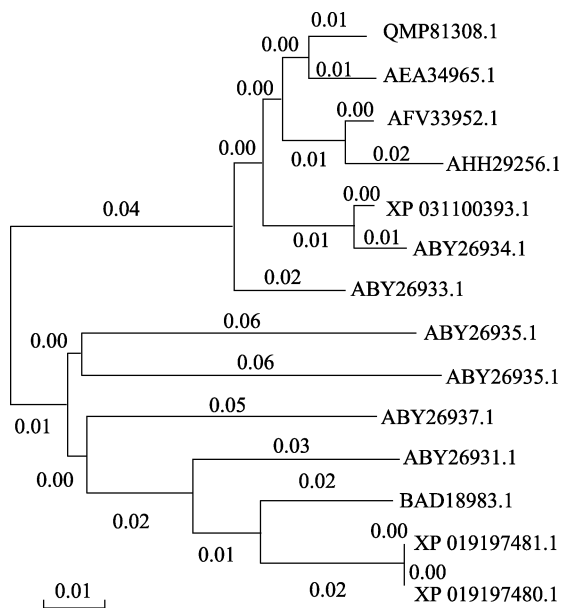
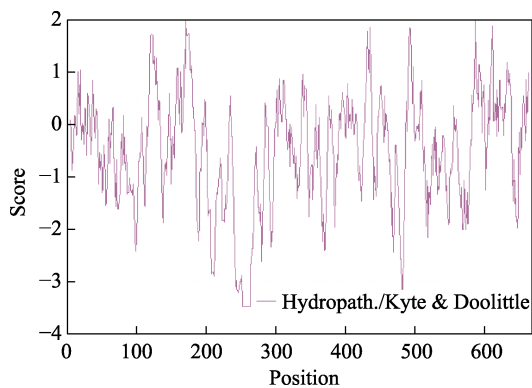


图 2 Tai6.33665 及其同源蛋白氨基酸的系统发育进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acids of Tai6.33665 and its homologous proteins

仅占 1.3%。该蛋白中带负电的氨基酸 (Asp 和 Glu) 共有 98 个, 而带正电的氨基酸 (Arg 和 Lys) 有 67 个。该蛋白的理论等电点为 5.36, 表明其为酸性蛋白。其不稳定系数为 58.39, 高于 50, 推测该蛋白具有不稳定性。脂溶指数为 75.37, 而总平均亲水性 (GRAVY) 为-0.511, 表明该蛋白质具有亲水性。进一步通过 ExPASy-ProtScale 软件分析蛋白的亲疏水性, 依据 Hphob./Kyte & Doolittle 标准打分, 并使用线性加权法进行预测。如图 3 所示, 亲水部分明显优于疏水部分, 表明这是一种亲水性的可溶蛋白, 与之前的预测结果相符。



负数值表示亲水性, 正数值表示疏水性。
Negative values indicate hydrophilic substances and positive values indicate hydrophobicity.

图 3 Tai6.33665 氨基酸亲疏水性分析

Fig. 3 Amino acid hydrophilic analysis of Tai6.33665

2.1.5 Tai6.33665 蛋白信号肽、跨膜结构、磷酸化位点预测 通过 SignalP 4.1 软件对 Tai6.33665 蛋白质的信号肽进行了预测分析, 结果如表 2 所示, 该蛋白的 C-score 值为 0.129, Y-score 值为 0.133, S-score 值为 0.197, 信号肽平均值为 0.140, 加权平均值为 0.137, 该蛋白不存在信号肽, 说明其是非分泌蛋白, 在细胞内起作用。

表 2 Tai6.33665 蛋白的信号肽预测
Tab. 2 Prediction of signal peptide of Tai6.33665 protein

项目 Item	位置 Position	分值 Value	剪切位点 Cut off	信号肽 Signal peptide
最大原始剪切 (C)	29	0.129		
最大综合剪切 (Y)	12	0.133		
信号肽最大值 (S)	38	0.197		
信号肽平均值	1-11	0.140		
加权平均值	1-11	0.137	0.450	NO

Tai6.33665 蛋白的跨膜结构预测结果 (图 4) 显示, 在该蛋白中未检测到任何跨膜结构区域 (TMHs 数量为零), 表明其不具备跨膜区域, 因此不是跨膜蛋白。

通过 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 在线软件预测 Tai6.33665 蛋白的潜在磷酸化点, 蛋白的潜在磷酸化点预测标准设定为当一个位点的纵轴预测值超过 0.5 时, 该位点被认为是磷酸化位点。该蛋白在丝氨酸 (Ser) 上拥有 42 个磷酸化位点, 在苏氨酸 (Thr) 上有 23 个, 在酪氨酸 (Tyr) 上有 5 个 (图 5)。这表明 Tai6.33665 编码的蛋白质主要受到丝氨酸的磷酸化修饰, 而苏氨酸和酪氨酸则起到辅助修饰的作用。

2.1.6 Tai6.33665 蛋白二级、三级结构预测 通过 SOPMA 软件分析 Tai6.33665 蛋白的二级结构,

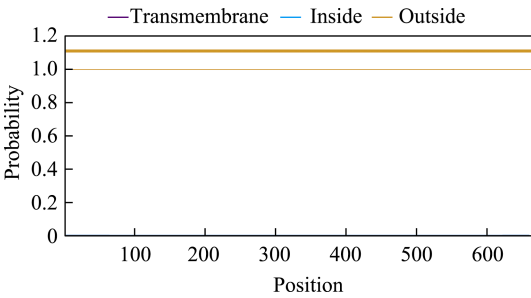


图 4 Tai6.33665 蛋白的跨膜结构预测
Fig. 4 Prediction of transmembrane structure of Tai6.33665

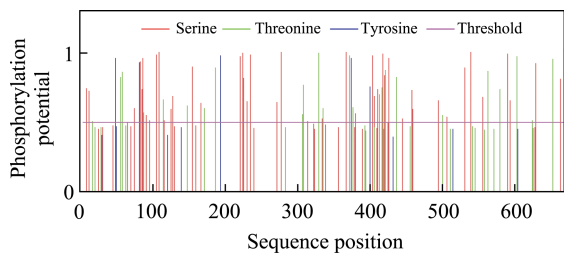


图 5 *Tai6.33665* 蛋白的磷酸化位点预测
Fig. 5 Prediction of phosphorylation sites of *Tai6.33665*

结果如表 3 所示，该蛋白质主要存在 4 种类型的二级结构，其中数量最多的是 α -螺旋（alpha helix），有 286 个，占比 42.88%；无规则卷曲（random coil）277 个，占比 41.53%；延伸链（extended strand）74 个，占比 11.09%； β -折叠（beta turn）30 个，占比 4.5%。*Tai6.33665* 蛋白的结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成。

表 3 *Tai6.33665* 蛋白的二级结构预测
Tab. 3 Secondary structure prediction of *Tai6.33665*

结构 Structure	数量 Number	比例 Percentage/%
Alpha helix (Hh)	286	42.88
3_{10} helix (Gg)	0	0
Pi helix (Ii)	0	0
Beta bridge (Bb)	0	0
Extended strand (Ee)	74	11.09
Beta turn (Tt)	30	4.50
Bend region (Ss)	0	0
Random coil (Cc)	277	41.53
Other states	0	0

利用 SWISS-MODE 软件预测 *Tai6.33665* 蛋白的三级结构，共搜索出 50 个模板（Templates），构建出 4 个模型（models）（图 6A~图 6D），构建的 4 个模型的蛋白未形成多聚体，均为单体（monomer）结构，且均无配体（ligands），其中 model 01 的 GMQE 值 0.61 最接近 1，表明其一致性最好，可信度最高，其序列一致性（seq identity）达 96.83%，覆盖度（coverage）为 0.99，该模型描述为 putative anthocyanin transcriptional regulator，其三维结构如图 6E 所示。

2.2 *Tai6.33665* 编码蛋白的亚细胞定位分析

为了确定 *Tai6.33665* 蛋白的亚细胞定位，将已构建好的 *Tai6.33665*-GFP 载体质粒转入农杆菌 GV3101，瞬时转化至本氏烟草叶片组织中，制作玻片，在激光共聚焦显微镜下观察、拍照，以空

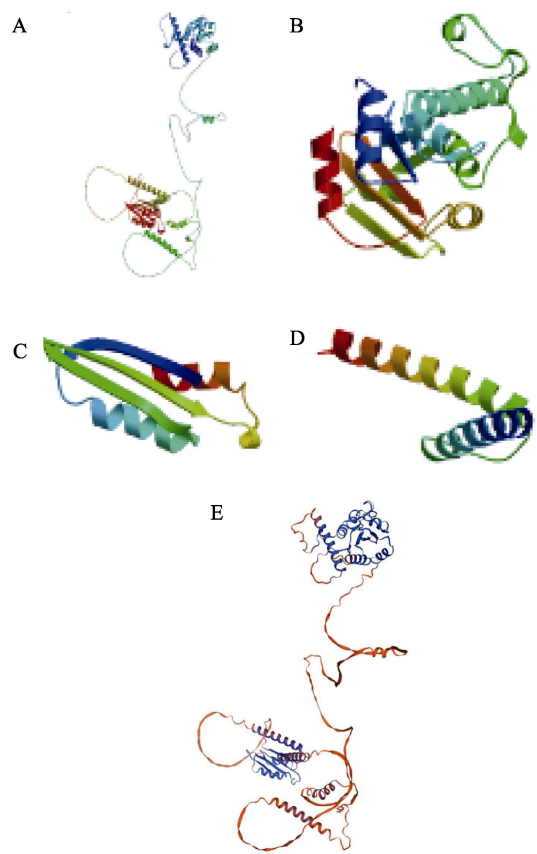


图 6 *Tai6.33665* 蛋白的三级结构预测
Fig. 6 Prediction of tertiary structure of *Tai6.33665* protein

载体转化的农杆菌作为对照。结果如图 7 所示，烟草叶片亚细胞器内质网区域出现了绿色的荧光（荧光的线条并不是完全光滑的曲线，有模糊的边缘和毛刺，不认为定位于细胞膜上；细胞核并不是完全亮的，核膜一圈更亮一些，这种围绕细胞核亮的情况极大可能是定位在内质网上），与仅含 GFP 的空载体相比，荧光强度略强。据此推断，*Tai6.33665* 蛋白可能定位于内质网。

2.3 *Tai6.33665* 和 *ib-miR52* 的表达模式分析

使用植物总 RNA 提取试剂盒提取甘薯块根总 RNA，12 个样品的 RNA 浓度在 686.86~1 394.47 ng/ μ L 之间， A_{260}/A_{280} 在 2.15~2.19 之间。对所有样品进行荧光定量检测获得 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据分析并作图。结果显示，*ib-miR52* 的表达量与甘薯块根花青素的含量呈正相关关系；*Tai6.33665* 的表达量与 *ib-miR52* 恰好相反，与甘薯块根花青素的含量呈负相关关系（图 8）。推测 *ib-miR52* 通过靶向 *Tai6.33665* 正调控甘薯块根中花青素的积累，*Tai6.33665* 负调控甘薯块根中花青素的积累。

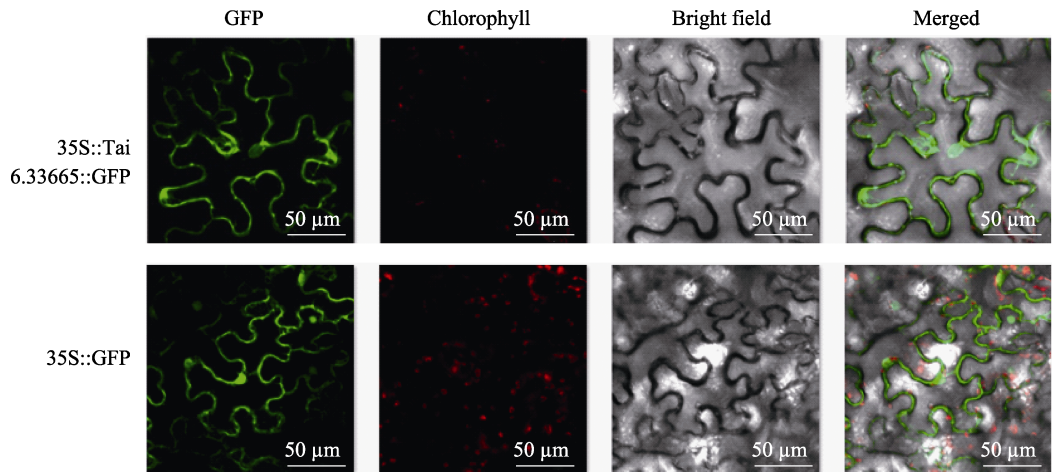
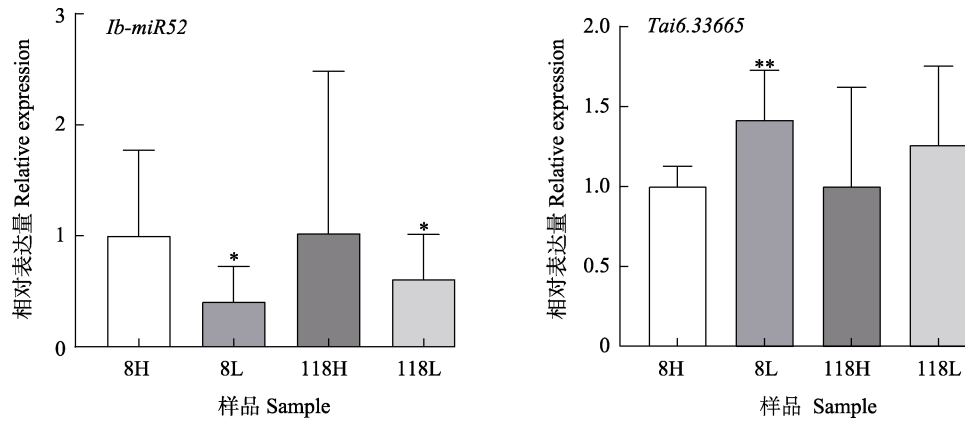


图 7 *Tai6.33665* 蛋白亚细胞定位
Fig. 7 Subcellular localization of *Tai6.33665* protein



*表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)。
* indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 8 *ib-miR52* 和 *Tai6.33665* 基因的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *ib-miR52* and *Tai6.33665* gene

3 讨论

本研究通过整合生物信息学、亚细胞定位及表达分析,初步解析了甘薯 *Tai6.33665* 基因在花青素合成中的功能与调控作用。生物信息学分析显示, *Tai6.33665* 编码的蛋白具有典型的 bHLH 结构域,并与花青素合成相关的转录因子(如 QMP81308.1)高度同源。bHLH 转录因子在植物次生代谢调控中具有高度保守性,如在番茄中, SIAN2-like 通过结合 MYB 蛋白激活花青素合成基因 (*DFR*、*ANS*) 的表达^[10]。然而,本研究发现 *Tai6.33665* 的表达量与花青素积累呈显著负相关,这一现象提示其可能作为负调控因子抑制花青素合成。类似地,拟南芥中的 MYC2 通过竞争性结合 MYB 蛋白抑制花青素合成^[11],表明负调控机制在植物中具有普遍性。

亚细胞定位试验表明, *Tai6.33665* 蛋白可能定位于内质网。内质网不仅是蛋白质合成的场所,还参与信号转导和胁迫响应^[12]。如拟南芥中的内质网定位蛋白 BIP3 通过调控未折叠蛋白反应 (UPR) 影响次生代谢^[13]。 *Tai6.33665* 的定位特性可能表明其通过内质网相关通路间接调控花青素合成,如通过调控内质网应激信号或蛋白修饰(如磷酸化)。此外,内质网与细胞核之间的膜接触位点 (MCSs) 可能介导转录因子的快速转运^[14],未来需进一步验证其定位与功能关联。

本研究发现 *Tai6.33665* 的表达与花青素含量呈负相关,支持其负调控作用的假设。然而,在 118L 组中 *Tai6.33665* 的表达变化未达到显著水平。因白肉甘薯 (118L) 花青素含量极低,其块根细胞中花青素合成相关的基因网络可能整体表

达水平很低或变异较大。这可能导致: (1) *Tai6.33665* 本身在白肉中的基础表达模式与紫肉品种存在差异, 其变化幅度相对较小; (2) 低表达背景下, 技术检测(如 qPCR)的变异相对增大, 使得较小的表达差异更难达到统计显著性; (3) 其调控的下游基因可能在白肉中本就不表达或表达量极低, 使得 *Tai6.33665* 的调控作用失去了‘着力点’, 导致其表达变化在统计学和生物学意义上均显得不突出。

本研究发现 *ib-miR52* 与 *Tai6.33665* 的表达呈负相关。*miRNA* 通过靶向降解 mRNA 或抑制翻译参与基因表达调控^[15]。如苹果中的 *miR858* 靶向 MYB 转录因子调控花色苷积累^[16], 而甘薯中 *ib-miR52* 可能通过类似机制抑制 *Tai6.33665* 的转录活性。此外, *miRNA* 与转录因子的互作网络具有物种特异性, 如水稻中的 *miR529* 通过靶向 *OsSPL14* 调控分蘖^[17], 提示需通过试验验证 *ib-miR52* 与 *Tai6.33665* 的直接靶向关系。

负调控基因的发现为分子育种提供了新策略。如 CRISPR/Cas9 技术已被成功用于敲除甘薯中的淀粉合成抑制基因, 显著提高块根淀粉含量^[18]。若 *Tai6.33665* 被证实为花青素合成的负调控因子, 其敲除或表达抑制可能显著提升紫肉甘薯的花青素含量。此外, 基于 *miRNA* 的调控技术(如人工 *miRNA* 设计)也可用于定向调控目标基因表达^[16]。在葡萄中, *VvMYC1* 通过与 *VvMYBA* 形成复合体激活花青素合成^[19], 而甘薯中的 *IbMYC1* 则显示正调控作用^[7]。本研究发现 *Tai6.33665* 的负调控功能, 同一基因家族成员在不同物种或组织中的功能分化。这种功能多样性可能源于基因复制后的亚功能化或新功能化^[4], 需通过比较基因组学进一步解析。

4 结论

本研究揭示了甘薯 *Tai6.33665* 基因作为 bHLH 转录因子家族成员, 通过保守的蛋白结构域参与花青素合成的负调控机制: 其表达量与花青素积累呈显著负相关, 且受 *ib-miR52* 靶向抑制; 亚细胞定位分析表明该蛋白定位于内质网, 推测其可能通过内质网相关通路调控翻译后修饰或信号转导。这些发现不仅拓展了植物次生代谢调控网络的分子机制认知, 也为利用基因编辑技术(如 CRISPR/Cas9)靶向调控 *Tai6.33665* 或 *ib-miR52*、培育高花青素甘薯品种提供理论依据

和应用方向。

参考文献

- [1] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 733-749.
- [2] PETRONI K, TONELLI C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. *Plant Science*, 2011, 181(3): 219-229.
- [3] 侯泽豪, 王书平, 魏淑东, 刘志雄, 方正武. 植物花青素生物合成与调控的研究进展[J]. *广西植物*, 2017, 37(12): 1603-1613.
HOU Z H, WANG S P, WEI S D, LIU Z X, FANG Z W. Anthocyanin biosynthesis and regulation in plants[J]. *Guizhou*, 2017, 37(12): 1603-1613. (in Chinese)
- [4] FELLER A, MACHEMER K, BRAUN E L, GROTEWOLD E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(1): 94-116.
- [5] 刘晓芬, 李方, 殷学仁, 徐昌杰, 陈昆松. 花青素生物合成转录调控研究进展[J]. *园艺学报*, 2013, 40(11): 2295-2306.
LIU X F, LI F, YIN X R, XU C J, CHEN K S. Recent Advances in the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(11): 2295-2306. (in Chinese)
- [6] 刘恺媛, 王茂良, 辛海波, 张华, 丛日晨, 黄大庄. 植物花青素合成与调控研究进展[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(14): 41-51.
LIU K Y, WANG M L, XIN H B, ZHANG H, CONG R C, HUANG D Z. Anthocyanin biosynthesis and regulate mechanisms in plants: a review[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(14): 41-51. (in Chinese)
- [7] MANO H, OGASAWARA F, SATO K, HIGO H, MINOBE Y. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3): 1252-1268.
- [8] 惠亚可, 胡敏伦, 郭晋雅, 高峰. 紫心甘薯转录因子 bHLH 的基因克隆及功能研究[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 52(4): 63-70.
HUI Y K, HU M L, GUO J Y, GAO F. The cloning and functional analysis of the transcription factor bHLH in purple-fleshed sweet potato[J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2020, 52(4): 63-70. (in Chinese)
- [9] PIREYRE M, BUROW M. Regulation of MYB and bHLH transcription factors: a glance at the protein level[J]. *Mo-*

- lecular Plant, 2015, 8(3): 378-388.
- [10] SUN C, DENG L, DU M, ZHAO J, CHEN Q, HUANG T, JIANG H, LI C-B, LI C. A Transcriptional network promotes anthocyanin biosynthesis in tomato flesh[J]. Molecular Plant, 2020, 13(1): 42-58.
- [11] YANG J, CHEN Y, XIAO Z, SHEN H, LI Y, WANG Y. Multilevel regulation of anthocyanin-promoting R2R3-MYB transcription factors in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1008829.
- [12] KØRNER C, DU X, VOLLMER M, PAJEROWSKA-MUKHTAR K. Endoplasmic reticulum stress signaling in plant immunity-at the crossroad of life and death[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(11): 26582-26598.
- [13] LIU J X, HOWELL S H. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants[J]. The Plant Cell, 2010, 22(9): 2930-2942.
- [14] PÉREZ-SANCHO J, TILSNER J, SAMUELS A L, BOTELLA M A, BAYER E M, ROSADO A. Stitching organelles: organization and function of specialized membrane contact sites in plants[J]. Trends in Cell Biology, 2016, 26(9): 705-717.
- [15] VALINEZHAD ORANG A, SAFARALIZADEH R, KAZE-MZADEH-BAVILI M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation[J]. International Journal of Genomics, 2014, 2014(1): 1-15.
- [16] LI Z, LIU W, CHEN Q, ZHANG S, MEI Z, YU L, WANG C, MAO Z, CHEN Z, CHEN X, WANG N. Mdm-miR858 targets *MdMYB9* and *MdMYBPA1* to participate anthocyanin biosynthesis in red-fleshed apple[J]. The Plant Journal, 2023, 113(6): 1295-1309.
- [17] LI Y, HE Y, QIN T, GUO X, XU K, XU C, YUAN W. Functional conservation and divergence of *miR156* and *miR529* during rice development[J]. The Crop Journal, 2023, 11(3): 692-703.
- [18] WANG H, WU Y, ZHANG Y, YANG J, FAN W, ZHANG H, ZHAO S, YUAN L, ZHANG P. CRISPR/Cas9-based mutagenesis of starch biosynthetic genes in sweet potato (*Ipomoea batatas*) for the improvement of starch quality[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4702.
- [19] HICHRI I, HEPPEL S C, PILLET J, LÉON C, CZEMMEL S, DELROT S, LAUVERGEAT V, BOGS J. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine[J]. Molecular Plant, 2010, 3(3): 509-523.