

紫色与非紫色芹菜花青素和芹菜素含量及合成基因表达分析

谭国飞, 王 枫, 马 静, 张馨月, 熊爱生*

(南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京 210095)

摘 要: 高等植物中花青素合成与芹菜素合成之间存在共同的前体物质。利用非紫色芹菜‘六合黄心芹’和紫色芹菜‘南选六合紫芹’(从‘六合黄心芹’中选择而来)的叶柄为花青素和芹菜素代谢研究材料, 利用荧光定量 PCR 方法检测花青素和芹菜素合成相关基因的表达水平。研究结果表明, ‘六合黄心芹’叶柄中未检测到花青素积累, 而‘南选六合紫芹’叶柄中的花青素含量呈现较高水平($0.0523 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$)。‘六合黄心芹’叶柄芹菜素含量($0.0172 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$)显著高于‘南选六合紫芹’($0.0124 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$)。荧光定量 PCR 结果表明, 除了 *AgFNS* 之外, 其余花青素和芹菜素代谢相关基因(*AgPAL*、*AgC4H*、*AgCHS*、*AgCHI*、*AgFNS*、*AgF3H*、*AgF3'H*、*AgDFR*、*AgANS* 和 *Ag3GT*) 在‘南选六合紫芹’叶柄中的表达量显著或者极显著高于‘六合黄心芹’; 黄酮合成酶基因 *AgFNS* 在‘六合黄心芹’叶柄中的表达量为‘南选六合紫芹’的 11.69 倍。

关键词: 芹菜; 花青素; 芹菜素; 合成基因; 表达分析

中图分类号: S 636.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 07-1327-08

Analysis of Anthocyanin and Apigenin Contents and the Expression Profiles of Biosynthesis-related Genes in the Purple and Non-purple Varieties of Celery

TAN Guofei, WANG Feng, MA Jing, ZHANG Xinyue, and XIONG Aisheng*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In higher plant, biosynthesis of anthocyanin and apigenin share common precursor. In this study, petioles of non-purple celery, ‘Liuhe Huangxin Qin’ and purple celery, ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’ (selected from ‘Liuhe Huangxin Qin’) were used as materials for anthocyanin and apigenin biosynthesis research. The expression levels of anthocyanin and apigenin biosynthesis related genes (*AgPAL*, *AgC4H*, *AgCHS*, *AgCHI*, *AgF3H*, *AgF3'H*, *AgDFR*, *AgANS* and *Ag3GT* genes) were also detected using qRT-PCR. The results showed that anthocyanins could not be detected in the petioles of ‘Liuhe Huangxin Qin’, and

收稿日期: 2017-05-08; **修回日期:** 2017-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272175); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-11-0670); 江苏省自然科学基金杰出青年基金项目 (BK20130027); 江苏高校优势学科建设项目 (PAPD)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xiongaisheng@njau.edu.cn)

0.0523 mg · g⁻¹ FW in ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’. Amounts of 0.0172 mg · g⁻¹ FW apigenin in ‘Liuhe Huangxin Qin’ and 0.0124 mg · g⁻¹ FW apigenin in ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’ were detected each per gram fresh materials. qRT-PCR results showed that except for *AgFNS* gene, the expression levels of *AgPAL*, *AgC4H*, *AgCHS*, *AgCHI*, *AgF3H*, *AgF3'H*, *AgDFR*, *AgANS* and *Ag3GT* genes were significant or very significant higher in the petioles of ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’ than that in the petioles of ‘Liuhe Huangxin Qin’. The expression level of *AgFNS* gene in the petioles of ‘Liuhe Huangxin Qin’ was 11.69 times than that in the petioles of ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’.

Keywords: celery; anthocyanin; apigenin; biosynthesis gene; expression analysis

花青素和芹菜素均为植物中重要的次级代谢产物，在植物中的合成均开始于苯丙氨酸 (Shi & Xie, 2014)。苯丙氨酸经过苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (C4H)、4-香豆酰基辅酶 A: 连接酶 (4CL)、查尔酮合酶 (CHS) 和查尔酮异构酶 (CHI) 催化，形成柚皮素 (Naringenin)。当柚皮素经过黄酮合成酶 (FNS) 催化，合成芹菜素；当柚皮素由黄烷酮 3-羟化酶 (F3H) 催化，合成二氢山柰酚 (Dihydrokaempferol)，再经过黄烷酮 3'-羟化酶 (F3'H)、二氢黄酮醇还原酶 (DFR)、花青素合成酶 (ANS) 和矢车菊 3-O-半乳糖基转移酶 (3GT) 的催化，最终合成花青素 (Rahim et al., 2014; Wang et al., 2014; 杨琳 等, 2014; Zeng et al., 2014; Zhang et al., 2014)。从代谢途径上看，花青素和芹菜素的合成，存在对底物竞争关系。

芹菜素合成关键基因黄酮合成酶基因 *FNS* 高表达，黄酮合成酶 (flavone synthase, *FNS*) 活性增强，最终导致芹菜素在植物体内含量增加，而花青素含量在有色植物中减少。相反，如果 *FNS* 低表达或者表达被抑制，*FNS* 活性降低或者被抑制，花青素含量则升高，芹菜素含量降低 (Martens & Forkmann, 1998; Gebhardt et al., 2005)。芹菜是重要的伞形科蔬菜作物 (Li et al., 2017)，目前为止，还未见芹菜中花青素和芹菜素之间代谢关系的研究报告，原因之一是由于彩色芹菜种质资源相对较缺乏。目前，中国作物种质信息网中 (<http://icgr.caas.net.cn/>) 尚无紫色芹菜种质资源的信息。美国农业部 (USDA, <http://icgr.caas.net.cn/>) 5 份紫色芹菜种质公布，分别为原产马其顿的 3 份，保存编号为 PI357331、PI379084 和 PI379085，原产伊朗的 2 份，保存编号为 PI222702 和 PI229526。5 份材料均有少量的花青素积累于叶柄中。

本研究中，以‘六合黄心芹’以及本课题组从中筛选获得的紫色芹菜‘南选六合紫芹’为研究材料，探索芹菜叶柄中花青素与芹菜素合成之间的关系。‘南选六合紫芹’能在叶柄中积累丰富的花青素，叶片及其他组织花青素含量少或者几乎无。‘六合黄心芹’为南京六合地区广泛种植的本芹品种，植株各部分均无明显花青素物质积累。根据芹菜转录组数据设计芹菜花青素和芹菜素合成相关基因表达检测引物，利用荧光定量 PCR 的方法，检测紫色和非紫色芹菜中花青素和芹菜素合成相关基因的表达水平，为进一步培育富含花青素和芹菜素的芹菜新品种 (系)，提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

紫色芹菜为本课题组 (南京农业大学伞形科蔬菜作物遗传与种质创新实验室) 培育的‘南选六合紫芹’；非紫色芹菜‘六合黄心芹’为‘南选六合紫芹’的原始品种，由本课题组提纯和保存 (图 1)。两种芹菜种子分别播种于花盆 (20 cm × 40 cm × 50 cm) 中，培养土为有机质: 蛭石 = 3: 1，

种植在南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室人工气候室培养。培养条件为 25 °C 光照 12 h/20 °C 黑暗 12 h, 光密度为 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

分别选取‘南选六合紫芹’与‘六合黄心芹’叶柄, 用锡纸包好后及时放入液氮中速冻, 于 -80 °C 超低温冰箱中保存。叶柄材料经过液氮处理后研磨成粉末, 每个样品分成 2 份, 一份用于提取植物总 RNA, 另外一份用于花青素含量的测定。

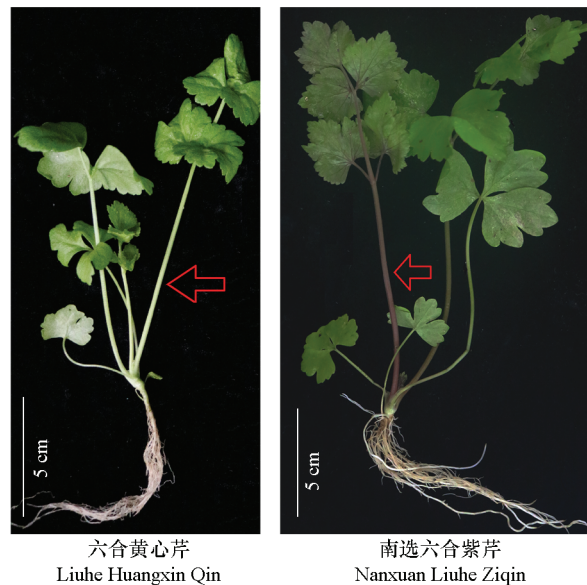


图 1 ‘六合黄心芹’和‘南选六合紫芹’植株形态
红色箭头标注的叶柄用于定量表达分析。

Fig. 1 The phenotype of ‘Liuhe Huangxin Qin’ and ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’
The petioles of marked by red arrow were used for qRT-PCR.

1.2 花青素的提取和含量测定

用液氮将图 1 标注的 2 种芹菜材料叶柄磨成粉末, 约 2 g 放入 0.1% 甲醇中, 室温黑暗放置 8 h。用 $0.25 \mu\text{m}$ 膜过滤后, 使用紫外分光光度计 (Alpha-1860, 上海谱元仪器有限公司) 分别在 530、620 和 650 nm 的波长检测吸光度。依据: $\text{OD} = (\text{OD}_{530} - \text{OD}_{620}) - 0.1 (\text{OD}_{650} - \text{OD}_{620})$ 公式, 算出花青素吸光度, 按照 0.1 个吸光度为 1 个花青素单位, 计算出花青素含量 (Li et al., 2012a)。设置 3 次独立生物学重复。

1.3 芹菜素的提取和含量测定

取 50 g 新鲜的芹菜叶柄洗净后, 于 40 °C 烘箱烘干。烘干到质量不发生变化时, 将其研磨成细小的粉末, 用 80% 甲醇溶解 8 h 后, 使用 $0.45 \mu\text{m}$ 聚四氟乙烯膜过滤。用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 叔丁基对苯二酚的 50% 甲醇水溶液中 (体积比) 滤液过滤蒸发后, 溶解在 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 叔丁基对苯二酚的 50% 甲醇水溶液中 (体积比)。100 °C 的密封瓶中加热, 冷却至室温 1 h。滤液蒸发后, 溶于甲醇。最后, 将该提取物经 $0.22 \mu\text{m}$ 聚四氟乙烯膜过滤后, 取 20 μL 注入 HPLC (岛津 LC-20A 型 HPLC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), 参照前人 (Kim et al., 2008; Yan et al., 2014) 的方法进行测定。HPLC 分析柱为 ODS-2 C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm nominal particle size), 流动相为甲醇与水 (1:1, 用三氟乙酸调节到 pH 2.5) 组成的混合物质。柱温 40 °C, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,

检测系统为岛津二极管阵列检测器，检测波长为 365 nm。使用标准芹菜素样品（纯度 $\geq 98\%$ ，上海源叶生物科技有限公司）做出标准曲线后，求出芹菜素的含量。设置 3 次独立生物学重复。

1.4 芹菜总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

采用 RNA Simple Total RNA Kit (Tiangen, 北京) 试剂盒提取总 RNA。采用浓度为 1.2% 琼脂糖凝胶检测总 RNA 的完整性。用微量分光光度计 Nanodrop ND-100 (Nanodrop Technologies Inc., DE, USA) 检测总 RNA 的浓度。使用反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit with a DNA Eraser Kit (Perfect Real-Time) (TaKaRa, 大连) 按照说明书将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。cDNA 用 ddH₂O 稀释 15 倍后，于 -20 °C 冰箱保存，用于荧光定量 PCR 分析。

1.5 荧光定量 PCR 分析

根据本课题组建立的芹菜转录组数据库 (Jia et al., 2015)，获得芹菜花青素和芹菜素合成相关基因，包括 *AgPAL*、*AgC4H*、*AgCHS*、*AgCHI*、*AgFNS*、*AgF3H*、*AgF3'H*、*AgDFR*、*AgANS* 和 *Ag3GT* 的序列。据此设计荧光定量 PCR 引物 (表 1)。

荧光定量 PCR 采用 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒 (TaKaRa, 大连)。荧光定量 PCR 为 20 μ L 体系 (SYBR Premix *Ex Taq* 10 μ L, 正向、反向引物各 0.5 μ L, 稀释的模板 2 μ L, 灭菌的 ddH₂O 7 μ L)。使用 iQ5 software 和 iQ5 Real-time PCR System 完成荧光定量 PCR。以芹菜 *ACTIN* (表 1) 为内参基因 (Chen et al., 2015)，与目的基因一起扩增。荧光定量 PCR 程序为：95 °C 预变性 30 s；95 °C 5 s，60 °C 30 s，65 °C 10 s，40 个循环；72 °C 2 min，4 °C 保存。相对定量使用参照基因 ΔC_T 法，表达差异等于 $2^{-\Delta C_T}$ ， $\Delta C_T = C_{T \text{ 目标基因}} - C_{T \text{ actin}}$ 。相对定量是基于处理和对照之间，目标基因对参考基因的表达量的比较 (Pfaffl, 2001)。

表 1 芹菜花青素和芹菜素合成相关基因荧光定量 PCR 检测引物

Table 1 Primers sequences used for qRT-PCR of anthocyanin and apigenin biosynthesis related genes in celery

基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer	片段/bp Size of the fragment
<i>AgPAL</i>	TGATGCAGGGGAAGCCTGAATTTA	TGAGGACCAAGCCACTGAGGAGAT	211
<i>AgC4H</i>	TATCCCTATTCTTCGCCCTTTCTT	CTCGTTGATTTCCTTTTTCCTG	199
<i>AgCHS</i>	GGCCCTTACCTTCCATCTTCTTAA	GGTCGCTCGCAATTTTTCCTT	199
<i>AgCHI</i>	CACTGTGTCATTCTTCTTCTTGC	AACTGGTCTGCCGCTTGCCCTTC	153
<i>AgFNS</i>	AAGGCGGCTTTACTATCTCCACTC	CACCTAGCACCATTAACCTTCTCAC	177
<i>AgF3H</i>	AGGCGTGTGTGGACATGGATCAGA	CCTCCACAGGCTGAACAGTGATCCA	192
<i>AgF3'H</i>	AGATGTTGTTGATAGCGAAGGTGG	CTTGAAGGTAGGGTAGTCGTGGAA	233
<i>AgDFR</i>	GGAATGAAGAAATAGACTCAACAA	GCATAAATCAACGTAGACCAAAG	179
<i>AgANS</i>	CTCTTCTCTCTCGTACCTTTGCT	CTTCGGTGTCTTATGTTCCCTG	151
<i>Ag3GT</i>	TGTTTGGGAACCTAGAGTCTCCTT	TATTGTAATGCTGGTGGTGATGTA	193
<i>AgACTIN</i>	CTTCCTGCCATATATGATTGG	GCCAGCACCTCGATCTTCATG	210

1.6 数据分析

使用 Microsoft Excel 2007 进行定量数据和物质含量显著性分析，显著水平为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 两种芹菜叶柄花青素和芹菜素含量的比较

‘六合黄心芹’叶柄检测不到花青素，而‘南选六合紫芹’叶柄花青素含量为 $0.0523 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ；

‘六合黄心芹’和‘南选六合紫芹’叶柄中芹菜素含量分别为 0.0172 和 0.0124 mg · g⁻¹ FW (表 2)。

表 2 花青素和芹菜素在‘六合黄心芹’和‘南选六合紫芹’叶柄中含量

Table 2 Anthocyanins and apigenin contents in the petioles of ‘Liuhe Huangxin Qin’ and ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’

芹菜 Celery	花青素/ (mg · g ⁻¹ FW) Anthocyanins	芹菜素/ (mg · g ⁻¹ FW) Apigenin
六合黄心芹 Liuhe Huangxin Qin	0	0.0172 ± 0.0013*
南选六合紫芹 Nanxuan Liuhe Ziqin	0.0523 ± 0.0024**	0.0124 ± 0.0015

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

2.2 芹菜花青素和芹菜素合成相关基因检索

通过芹菜转录组数据检索获得 *AgPAL*、*AgC4H*、*AgCHS*、*AgCHI*、*AgFNS*、*AgF3H*、*AgF3'H*、*AgDFR*、*AgANS* 和 *Ag3GT* 等 10 个与花青素和芹菜素合成相关基因。表 3 显示, 检索到的花青素和芹菜素合成相关基因推导的氨基酸序列, 与其他伞形科物种对应的氨基酸序列比对具有很高的一致性 (Identity $\geq 80\%$) 和很低的 E 值 (E-value $\leq 3e^{-138}$)。

表 3 芹菜花青素和芹菜素代谢途径的氨基酸序列与其他伞形科物种氨基酸序列比较

Table 3 Comparison of celery anthocyanins and apigenin metabolism amino acid with other species of Apiaceae

芹菜 Celery			伞形科植物 Apiaceae			一致性/% Identity	E-值 E-value
基因 Gene	长度/bp Length	氨基酸/aa Amino acid	物种 Species	氨基酸登录号 Amino acid No.	氨基酸/aa Amino acid		
<i>AgPAL</i>	2 151	716	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	BAG31930.1	715	96	0
			当归 <i>Angelica sinensis</i>	AJW77399.1	718	95	0
			欧芹 <i>Petroselinum crispum</i>	1W27-A	714	94	0
			朝鲜当归 <i>Angelica gigas</i>	AEA72280.1	699	94	0
<i>AgC4H</i>	1 521	506	阿米芹 <i>Ammi majus</i>	AAO62904.1	506	97	0
			欧芹 <i>Petroselinum crispum</i>	Q43033.1	506	97	0
			白芷 <i>Angelica dahurica</i>	AJD22263.1	505	95	0
			朝鲜当归 <i>Angelica gigas</i>	AEA7228.1	505	94	0
<i>AgCHS</i>	648	215	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	XP017252948.1	506	92	0
			欧芹 <i>Petroselinum crispum</i>	D16107.1	398	97	0
<i>AgCHI</i>	795	264	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	XP017244106.1	391	96	0
			胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	AIT52345.1	244	89	3e ⁻¹³⁸
<i>AgFNS</i>	1 068	355	犬毒芹 <i>Aethusa cynapium</i>	ABG78791.1	355	94	0
			欧毒芹 <i>Conium maculatum</i>	ABG78795.1	365	93	0
			欧芹 <i>Petroselinum crispum</i>	Q7XZQ8.1	365	93	0
			胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	XP017240664.1	357	92	0
<i>AgF3H</i>	1 110	360	孜然 <i>Cuminum cyminum</i>	ABG78790.1	365	92	0
			圆叶当归 <i>Angelica archangelica</i>	ABG78793.1	364	92	0
			阿米芹 <i>Ammi majus</i>	AAZX21539.1	368	90	0
			欧芹 <i>Petroselinum crispum</i>	Q7XZ7.1	368	89	0
<i>AgF3'H</i>	1 578	525	茴芹 <i>Pimpinella anisum</i>	AAAX21535.1	365	89	0
			胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	XP017240662.1	366	88	0
			莨菪 <i>Anethum graveolens</i>	AAAX21540.1	366	87	0
			犬毒芹 <i>Aethusa cynapium</i>	ABG78792.1	368	89	0
<i>AgDFR</i>	996	331	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	AIT52346.1	524	85	0
<i>AgANS</i>	1 278	425	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	AAD56579.1	332	80	0
<i>Ag3GT</i>	1 359	452	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	AAD56580.1	402	87	0
			胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	AKI23632.1	452	87	0

2.3 两种芹菜叶柄中花青素和芹菜素合成相关基因表达分析

荧光定量 PCR 结果表明, 除了 *AgFNS* 外, *AgPAL*、*AgC4H*、*AgCHS*、*AgCHI*、*AgF3H*、*AgF3'H*、

AgDFR、*AgANS* 和 *Ag3GT* 在 ‘南选六合紫芹’ 叶柄中的表达量高于 ‘六合黄心芹’ (图 2)。然而，芹菜素合成关键基因 *AgFNS*，在 ‘六合黄心芹’ 叶柄中的表达量更高，是 ‘南选六合紫芹’ 的 11.69 倍 (图 2)。上述结果表明，芹菜 ‘南选六合紫芹’ 和 ‘六合黄心芹’ 叶柄中花青素和芹菜素含量差异，与合成相关基因的表达水平有关。

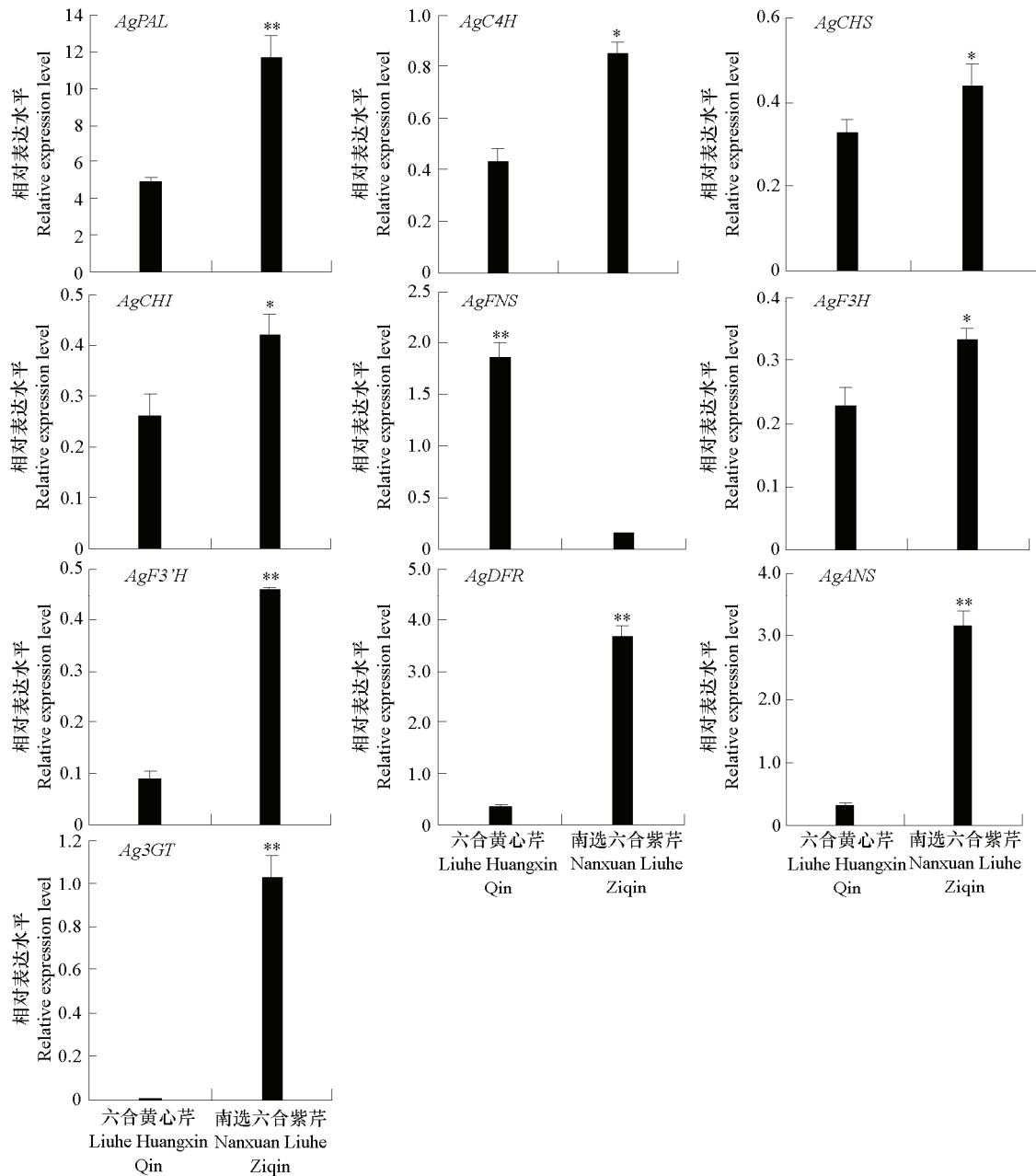


图 2 ‘六合黄心芹’ 和 ‘南选六合紫芹’ 叶柄中花青素和芹菜素合成相关基因的表达分析

Fig. 2 Expression profiles of the biosynthesis-related genes of anthocyanin and apigenin biosyntheses in the petioles of ‘Liuhe Huangxin Qin’ and ‘Nanxuan Liuhe Ziqin’

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论

创制和培育富含花青素的农作物, 可以进一步满足市场和消费者对农产品多样化的需求。从物质合成代谢的角度, 研究花青素合成代谢途径所涉及的基因, 是为了更好地利用基因工程手段, 创制和培育富含花青素的品种 (Nakatsuka et al., 2010; Kumar & Yadav, 2013; Noda et al., 2013)。本研究获得的‘南选六合紫芹’芹菜花青素主要积累在叶柄中, 其他部位花青素的积累很少, 很可能芹菜叶柄相对其它组织, 易于花青素合成和积累。两种芹菜叶柄中的花青素和芹菜素含量研究结果与前人对非洲菊和大丽花的研究结果 (Martens & Forkmann, 1998; Gebhardt et al., 2005) 相似。

通过非紫色芹菜转录组数据 (Jia et al., 2015) 能搜索到芹菜中花青素合成相关基因, 且这些基因在非紫色芹菜转录组数据中存在一定的表达水平。可能由于上述基因的表达量水平相对较低, 导致非紫色芹菜中无花青素的合成和积累。本试验通过荧光定量 PCR 方法, 也验证了芹菜花青素合成相关基因在非紫色芹菜‘六合黄心芹’叶柄中存在表达, 但表达水平显著或者极显著低于紫色芹菜, 尤其是 *Ag3GT* 在非紫色芹菜叶柄中表达量远低于紫色芹菜。

前人对 *3GT* 的研究表明, 该基因翻译的酶, 能将不稳定的花色苷催化形成稳定的花青素 (Ban et al., 2009; Liu et al., 2009; Chen et al., 2011)。该基因已经在葡萄 (Kobayashi et al., 2002)、黑豆 (Kovinich et al., 2010)、红苹果 (Ban et al., 2009)、紫色马铃薯 (Wei et al., 2012) 和红肉猕猴桃 (Montefiori et al., 2011) 等植物中得到验证。花青素代谢的其他基因 (如 *CHI*、*DFR* 和 *ANS* 等), 通过转基因手段, 也能使植物体中合成和积累更多的花青素 (Nakatsuka et al., 2010; Wei et al., 2012; Noda et al., 2013)。本研究中, 芹菜 *3GT* 基因表达量在紫色芹菜‘南选六合紫芹’叶柄中相对高, 但其他花青素代谢途径的基因 (*AgPAL*、*AgC4H*、*AgCHS*、*AgCHI*、*AgF3H*、*AgF3'H*、*AgDFR* 和 *AgANS*) 表达量在‘南选六合紫芹’叶柄中也较高。‘南选六合紫芹’叶柄中能够合成和积累花青素, 可能是花青素代谢途径基因相互作用的结果。

随着人们生活水平的提高, 保健性农产品开发已成为研究方向之一。将含有保健成分的植物开发作为蔬菜或者食品直接食用, 越来越成为农产品开发的热点。芹菜素是芹菜中主要药用成分之一 (Yan et al., 2014), 广泛用于治疗各种疾病等 (Han & Row, 2011; Li et al., 2012b)。前人的研究表明, *AgFNS* 编码黄酮合成酶, 是编码催化芹菜素合成的关键基因, 在芹菜中的表达量相对较高 (Gebhardt et al., 2005; Yan et al., 2014)。芹菜素合成与花青素合成存在对代谢底物的竞争关系 (Martens & Forkmann, 1998; Gebhardt et al., 2005)。可能由于 *AgFNS* 在非紫色芹菜中相对紫色芹菜表达水平相对较高, *AgFNS* 酶活相对较高, 使芹菜素在非紫色芹菜叶柄中比紫色芹菜叶柄中含量高。本研究结果证明, 芹菜素合成关键基因 *AgFNS*, 在非紫色芹菜‘六合黄心芹’叶柄中的表达量显著高于紫色芹菜‘南选六合紫芹’。

References

- Ban Y, Kondo S, Ubi B E, Honda C, Bessho H, Moriguchi T. 2009. UDP-sugar biosynthetic pathway: contribution to cyanidin 3-galactoside biosynthesis in apple skin. *Planta*, 230 (5): 871 - 881.
- Chen W H, Hsu C Y, Cheng H Y, Chang H, Chen H H, Er M J. 2011. Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports*, 30 (6): 1007 - 1017.
- Chen Y Y, Li M Y, Li Y, Wang F, Xu Z S, Xiong A S. 2015. Isolation and characterization of the *Agmt2* gene and its response to abiotic and metalstress in *Apium graveolens*. *Scientia Horticulturae*, 186 (12): 1 - 6.
- Gebhardt Y, Witte S, Forkmann G, Lukacin R, Matern U, Martens S. 2005. Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae.

- Phytochemistry, 66 (11): 1273 - 1284.
- Han D, Row K H. 2011. Determination of luteolin and apigenin in celery using ultrasonic-assisted extraction based on aqueous solution of ionic liquid coupled with HPLC quantification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (15): 2888 - 2892.
- Jia X L, Wang G L, Xiong F, Yu X R, Xu Z S, Wang F, Xiong A S. 2015. *De novo* assembly, transcriptome characterization, lignin accumulation, and anatomic characteristics: novel insights into lignin biosynthesis during celery leaf development. *Scientific Reports*, 5: 1 - 13.
- Kim J H, Cheon Y M, Kim R G, Ahn J H. 2008. Analysis of flavonoids and characterization of the *OsFNS* gene involved in flavone biosynthesis in rice. *Journal of Plant Biology*, 51 (2): 97 - 101.
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C. 2002. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215 (6): 924 - 933.
- Kovinich N, Saleem A, Arnason J T, Miki B. 2010. Functional characterization of a UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase from the seed coat of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Phytochemistry*, 71 (11 - 12): 1253 - 1263.
- Kumar V, Yadav S K. 2013. Overexpression of *CsANR* increased flavan-3-ols and decreased anthocyanins in transgenic tobacco. *Molecular Biotechnology*, 54 (2): 426 - 435.
- Li M Y, Hou X L, Wang F, Tan G F, Xu Z S, Xiong A S. 2017. Advances in the research of celery, an important Apiaceae vegetable crop. *Critical Reviews in Biotechnology*, DOI: 10.1080/07388551.2017.1312275.
- Li S, Tian M, Row K H. 2012b. Optimization of mobile phase condition by using HCl program for extracting luteolin and apigenin from celery. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7 (3): 337 - 342.
- Li Y Y, Mao K, Zhao C, Zhao X Y, Zhang H L, Shu H R, Hao Y J. 2012a. MdCOP1 ubiquitin E3 ligases interact with MdMYB1 to regulate light-induced anthocyanin biosynthesis and red fruit coloration in apple. *Plant Physiology*, 160 (2): 1011 - 1022.
- Liu H F, Yang C J, Yu M, Wang J. 2009. The cDNA cloning and analysis of UDP-glucose:flavonoids 3-*O*-glucosyltransferase (3GT) in *Vitis amurensis*. *Plant Physiology Communications*, 45 (8), 748 - 752.
- Martens S, Forkmann G. 1998. Genetic control of flavone synthase II activity in flowers of *Gerbera hybrids*. *Phytochemistry*, 49 (7): 1953 - 1958.
- Montefiori M, Easley R V, Stevenson D, Cooney J, Datson P M, Atkinson R G, Hellens R P, Allan A C. 2011. Identification and characterisation of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Plant Journal*, 65 (1): 106 - 118.
- Nakatsuka T, Mishiba K, Kubota A, Abe Y, Yamamura S, Nakamura N, Tanaka Y, Nishihara M. 2010. Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in *Gentian*. *Journal of Plant Physiology*, 167 (3): 231 - 237.
- Noda N, Aida R, Kishimoto S, Ishiguro K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Ohmiya A. 2013. Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant and Cell Physiology*, 54 (10): 1684 - 1695.
- Pfaffl M W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): e45.
- Rahim M A, Busatto N, Trainotti L. 2014. Regulation of anthocyanin biosynthesis in peach fruits. *Planta*, 240 (5): 913 - 929.
- Shi M Z, Xie D Y. 2014. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Patents on Biotechnology*, 8 (1): 47 - 60.
- Wang L, Albert N W, Zhang H B, Arathoon S, Boase M R, Ngo H, Schwinn K E, Davies K M, Lewis D H. 2014. Temporal and spatial regulation of anthocyanin biosynthesis provide diverse flower colour intensities and patterning in *Cymbidium orchid*. *Planta*, 240 (5): 983 - 1002.
- Wei Q, Wang Q Y, Feng Z H, Wang B, Zhang Y F, Yang Q. 2012. Increased accumulation of anthocyanins in transgenic potato tubers by overexpressing the *3GT* gene. *Plant Biotechnology Reports*, 6 (1): 69 - 75.
- Yan J, Yu L, Xu S, Gu W H, Zhu W M. 2014. Apigenin accumulation and expression analysis of apigenin biosynthesis relative genes in celery. *Scientia Horticulturae*, 165 (3): 218 - 224.
- Yang Lin, Wang Yu, Yang Jian-Fei, Li Yu-Hua. 2014. Research advances on negative regulators of anthocyanin accumulation. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (9): 1873 - 1884. (in Chinese)
- 杨琳, 王宇, 杨剑飞, 李玉花. 2014. 花青素积累相关负调控因子的研究进展. *园艺学报*, 41 (9): 1873 - 1884.
- Zeng S H, Wu M, Zou C Y, Liu X M, Shen X F, Hayward A, Liu C Z, Wang Y. 2014. Comparative analysis of anthocyanin biosynthesis during fruit development in two *Lycium* species. *Physiologia Plantarum*, 150 (4): 505 - 516.
- Zhang Y, Butelli E, Martin C. 2014. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 19: 81 - 90.