

光处理对套袋苹果梨果实着色相关调节基因的影响

白金月, 曲柏宏*, 杜昱彤, 王 玥

(延边大学农学院, 吉林 延吉 133000)

摘要: 红色梨备受青睐, 具有广阔的市场价值。红梨着色主要取决于花青苷合成与积累, 影响花青苷生物合成的因素有很多, 其中光照是最主要的因素之一。本实验对苹果梨进行不同的光处理, 基于前期实验室的转录组学分析与相关合成花青苷合成调控关键基因的克隆分析, 进一步挑选 *Myb4-like1*、*bHLH130-like*、*myb-related protein 306*、*bHLH96-like*、*Myb4-like2*、*MYB1R1*、*bHLH113-like*(*pyrus_GLEAN_10011886*)、*WDR*、*bHLH147*、*bHLH113-like*(*pyrus_GLEAN_10005548*)、*bHLH57-like* 共 11 个差异基因在不同的光处理下进行 PCR 鉴定, 结果发现 *Myb4-like1*、*bHLH130-like* 等基因呈现明显上调的趋势, *WDR* 基因差异表达明显且与花青苷含量趋势相同, 这可能是由于在光的调控下改变光周期从而改变基因的表达量, 进而影响苹果梨花青苷合成与着色。

关键词: 光照; 调节基因; 花青苷; 实时定量 PCR

中图分类号: S661.2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)06-0070-04

Effect of Light Treatment on the Color Related Regulatory Genes of Bagged Pinguoli Pear

BAI Jinyue, QU Baihong*, DU Yutong, WANG Yue

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: Red pears are favored by people and have a broad market value. The color of red pear mainly depends on the synthesis and accumulation of anthocyanin, and there are many factors affecting the biosynthesis of anthocyanin, among which light is one of the most important factors. In this study, different light treatments were carried out on the Pinguoli pear. Based on the transcriptomics analysis in the previous laboratory and the cloning analysis of the key genes regulating the synthesis of related synthetic pear anthocyanin, further select *Myb4-like1*, *bHLH130-like*, *myb-related protein 306*, *bHLH96-like*, *Myb4-like2*, *MYB1R1*, *bHLH113-like*(*pyrus_GLEAN_10011886*), *WDR*, *bHLH147*, *bHLH113-like*(*pyrus_GLEAN_10005548*), *bHLH57-like* genetic variations in different PCR identification of light treatment, the results found *Myb4-like1*, *bHLH130-like* gene significantly increase trends, such as *WDR* differentially expressed genes and the same as the contents cyanine trend obviously. This may change the photoperiod under the regulation of light, thus changing the expression level of the gene, and thus affecting the synthesis and coloring of Pinguoli pear anthocyanin.

Key words: Illumination; Regulatory gene; Anthocyanin; Real-time quantitative PCR

梨(*Pyrus*)属于蔷薇科梨亚科梨属植物, 我国是梨的原产地之一。苹果梨是能大面积着色的品种之一, 近几年通过套袋处理, 果实能明显着色^[1]。研究发现外界环境因素影响花青苷合成途径中的相关基因表达从而促使植物中花青素积累^[2]。光合作用是植物利用光制造有机物的过程。光影响花

青苷合成的作用机理主要有两个方面。一方面光照通过调节有关酶的活性来调节花青苷; 另一方面光照通过光合作用影响苯丙氨酸底物的合成来产生花青苷^[3]。MYB 是一类重要的转录基因家族并且具有高度保守的结构域, 根据结构域包含重复序列的不同可将 MYB 分为四类, R₂R₃MYB 是主要合成花青苷的转录因子^[4]。在拟南芥中四类分别为: 1R-MYB、2R-MYB、3R-MYB、4R-MYB。以红皮梨‘奥冠’为试材克隆到基因 *P_yMYB10.1* 和 *MYB108* 基因并进行生物学分析等实验, 为后期的 MYB 转录因子提供相应的理论依据^[5]。早期实验

收稿日期: 2020-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(31160389)

作者简介: 白金月(1996-), 女, 在读硕士, 从事果树栽培与生理研究。

通讯作者: 曲柏宏, 男, 博士, 教授, E-mail: bhqu211@ybu.edu.cn

中 MYB 调节基因 *MdMYB1* 及 *MdMYB10* 在苹果中得以分离,且受光照的诱导^[6]。拟南芥中也存在 MYB 转录因子 MYB10 类基因如: *AtPAP1*、*AtPAP2* 和 *AtTT2* 等,这类基因参与果实色泽花青苷的合成调控的过程^[7]。BHLH 是另一类重要的转录基因家族,具有碱性-螺旋-转角-螺旋独特的结构^[8],主要与 MYB 和 WD₄₀ 形成蛋白复合体来调节果实的花青苷含量。苹果中的 *MdbHLH3* 可以与 *MdMYB10* 共同作用来完成花青苷的合成。研究发现 *MYB10* 和 *BHLH33* 在西洋梨中对花青苷的合成有明显的作^[9]。WD₄₀ 同 MYB 和 BHLH 转录因子一样具有独特的结构域,可与多种蛋白结合来发挥作用,不过自身并无催化作用^[10]。最早在矮牵牛中发现此类蛋白^[11],后期相继在拟南芥、苹果、玉米中均有实验证明可以分离得到 WD₄₀ 转录因子。东方梨中 WD₄₀ 蛋白与花青苷含量呈正向促进的作用,而西洋梨中对花青苷的含量有相反的作用^[12]。目前调节基因影响花青苷生物合成的相关研究已经很多,但光对梨花青苷合成方面还尚未报道,本实验根据转录组筛选出相关合成苹果梨花青苷的关键基因进行 PCR 定量分析,初步探究在不同光处理下基因的表达量与花青苷含量的变化趋势是否一致,为探究光与花青苷之间的联系提供数据基础。

1 材料及方法

1.1 材料及处理

试验在吉林省延吉市延边龙渊七队果树农场进行。套袋时期为盛花期后 6 周(2019 年 6 月 23 日),采用双层蜡质纸袋(外袋为黄色,内袋为红色),按常规套袋技术要求进行果实套袋处理。于盛花期后 129 d 解袋,并设置 3 个处理。分别为解袋后正常(自然)光照、解袋后遮光、解袋后夜晚照光,重复 3 次。具体处理方法为随机选择一棵树上 3 个主枝,每个主枝保证有 10 个果实以上,其中一个主枝做正常光照处理,即套袋果实解袋后不做任何处理,保持自然光照(CK);另一个主枝做遮光处理(ZG),即用遮光布覆盖该主枝;第三个主枝做夜晚照光处理(DZ),即在主枝上覆盖遮光布后,树盘铺上反光膜,晚间用白炽灯照射(LED 白炽灯,距离地面高度为 2 m,功率为 3 000 W,灯照强度约为 3 768 Lx,照射时间为 20:00 至次日 4:00,约为 8 h)。果实于盛花期后 139 d 统一取样(每个处理 30 个果实),采样后削取果皮(约 0.5 mm),保存于 -80 °C 冰箱中。

1.2 实验所需试剂耗材

TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMIX for qPCR、PerfectStart™ Green qPCR SuperMix 购置于全式金;0.2 mL PCR 管、0.6 mL EP 管,1.5 mL EP 管,384 孔板及贴膜,10 μL、200 μL、1 mL tips 购置于 Axygen;Primers 购置于北京擎科新业生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 总花青苷含量测定

参照王惠聪等^[13]提取和测定花青苷的方法,稍做改动。取 0.5 g 在液氮中研磨成粉的果皮加入 1% 盐酸/甲醇溶液。密封摇匀后使果皮和混合液充分接触后放入黑暗条件下的恒温箱中,25 °C 条件下浸提 2 h。取出试管摇匀,用紫外分光光度计测定混合液在 553 nm 和 600 nm 下吸光值,以缓冲液作为空白对照。实验重复 3 次,按照下面公式计算花青苷含量: $D_{553nm} - D_{600nm} = 0.01(U)$ 。

1.3.2 RNA 提取及 cDNA 合成

提取总 RNA,利用 NanoDrop 2 000 分光光度计(Thermo Scientific, USA)测定浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。利用 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMIX for qPCR 试剂盒将待测 RNA 逆转录成 cDNA。

1.3.3 引物设计及荧光定量 PCR 检测

依据转录组测序以及 NCBI 已登录的梨属基因,使用 NCBI 与 Oligo 7 软件设计基因特异引物。引物设计见表 1。

PCR 扩增体系:9 μL,其中 2×PerfectStart™ Green qPCR SuperMix 5 μL;Forward primer 0.2 μL;Reverse primer 0.2 μL;Nuclease-free H₂O 3.6 μL。

PCR 反应程序:94 °C 30 s;94 °C 5 s,60 °C 30 s,(45 个循环);从 60 °C 缓慢升温至 97 °C,反应结束后导出数据进行后续的表达量计算及溶解曲线分析。

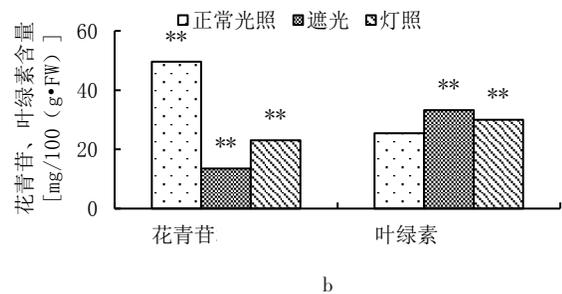
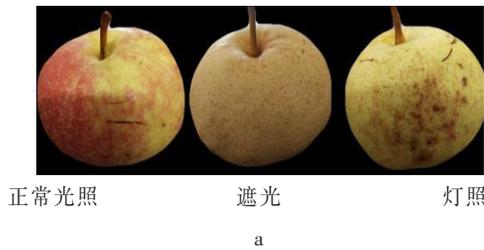
2 结果与分析

2.1 不同处理花青苷含量变化

从图 1a 可以看出,解袋后正常光照处理的苹果梨果实颜色鲜艳,果实全面着色,着色指数为 0.75。遮光处理的苹果梨果实几乎没有着色,着色指数为 0.25,照光处理的苹果梨果实着色异常,果面形成很多红色的斑点。套袋苹果梨解袋后果皮花青苷含量迅速增加,正常光照处理的果皮花青苷含量最高达到 40~50 mg/100(g·FW),而遮光处理显著抑制花青苷的合成,含量最低为 12~15

表1 引物序列设计

Gene Symbol	Forward primer(5→3)	Reverse primer(5→3)
GAPDH	TCTTCGGTGAGAAGCCTGTT	CGTTCACACCAACAACGAAC
Myb4-like1	ATTACCAGAACCGGATGATAG	CCTGAAACTCATTACCCTGC
bHLH130-like	GATGAGAAGGATCGGATTAG	ATTTCAAGCATTCAAGACAACG
myb-related protein 306	ACTCATCTAGTGAGGGAACC	CCGAACAGAGACTCAAACG
bHLH96-like	AATCCAAACCCAGTTGGC	CGCTAGATACGTTGATTGTGT
Myb4-like2	GCATTAAGTACCGATCAGGAC	GTTGAAAAGTGCCTCTGACC
MYB1R1	TATCCATGCAGTTTAGAGGGC	AAACCCACGGAGATATAACTCA
bHLH113-like	GAAGGATTGCCACGCCATA	AATTCGTTGAGAGATGTTCTGT
WDR	TGGAAGCCTCAAAGGTCA	CATAACCTGCAAGTGCTGT
bHLH147	CTAAGGCTAAGACCCGCT	CGGATCTCTGCCGTTTATG
bHLH113-like	TGTTTAGGCTGGAGAGGTGAA	ATGCGTTGTGTACTCCATT
bHLH57-like	ACCAGGGAGAGGAGAAAG	TCATTTCATCTGGCGCGCA



注:a为不同光处理果实颜色的变化,b为不同光处理花青苷、叶绿素含量变化($P<0.05$)

图1 果实不同处理下色泽和花青苷、叶绿素含量的变化

mg/100(g·FW),照光处理的果皮花青苷含量居中,为20~25 mg/100(g·FW)。处理果实果皮叶绿素含量与花青苷相对含量呈相反的趋势,遮光处理的果实果皮叶绿素含量最高(图1b)。

2.2 花青苷合成调节基因的表达水平

从图2可以看出,光处理的苹果梨果实着色相关11个基因的表达可以分成3组,第1组是光

处理后表现上调的基因(图2a)有 *Myb4-like1*、*bHLH130-like*、*bHLH96-like* 共3个基因,其中,遮光处理的 *Myb4-like1*、*bHLH130-like* 共2个基因显著上调($P<0.05$,见表2),同时照光处理的基因表达低于遮光处理,其他基因基本与对照表达相近。第二组是光处理后表现下调的基因(图2b)有 *bHLH113-like*(*pyrus_GLEAN_10011886*)、*WDR* 2

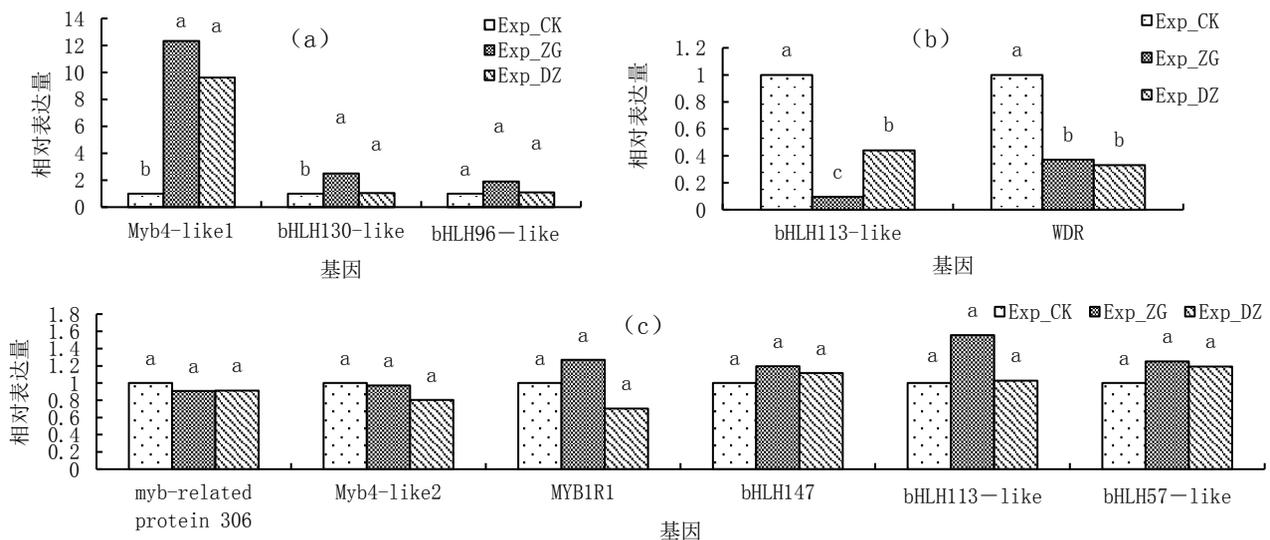


图2 3组不同处理不同基因的表达量

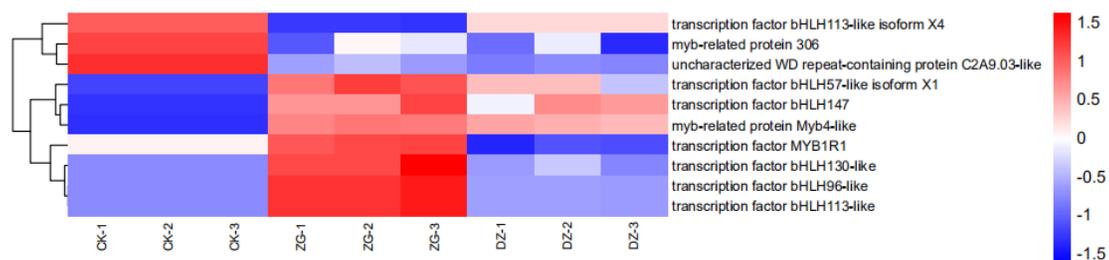
表2 3组不同处理的基因表达量

gene	Exp_CK	Exp_DZ	Exp_ZG	p_val(ZG vs CK)	p_val(DZ vs CK)	SD_CK	SD_DZ	SD_ZG
pyrus_GLEAN_10023935	1	9.616	12.333	0.014	0.061	0.039	6.042	6.894
pyrus_GLEAN_10036156	1	1.046	2.494	0.02	0.863	0.035	0.235	0.604
pyrus_GLEAN_10017919	1	0.913	0.907	0.84	0.78	0.42	0.391	0.132
pyrus_GLEAN_10021901	1	1.095	1.907	0.557	0.817	0.466	0.484	5.009
pyrus_GLEAN_10010298	1	0.804	0.973	0.982	0.51	0.359	0.525	0.21
pyrus_GLEAN_10041261	1	0.703	1.269	0.366	0.301	0.4	0.105	0.305
pyrus_GLEAN_10011886	1	0.441	0.095	0.002	0.188	0.408	0.413	0.029
pyrus_GLEAN_10023767	1	0.331	0.372	0.002	0.032	0.159	0.155	0.059
pyrus_GLEAN_10012745	1	1.116	1.194	0.379	0.705	0.298	0.348	0.188
pyrus_GLEAN_10005548	1	1.028	1.554	0.007	0.909	0.128	0.429	0.118
pyrus_GLEAN_10026274	1	1.191	1.25	0.389	0.731	0.105	0.488	0.356

个基因,其中 *WDR* 基因遮光处理与光照处理的均表现显著下调,基因表达均显著低于对照。第3组是光处理后表现无差异的基因(图2c)有 myb-related protein 306、*Myb4-like2*、*MYB1R1*、*bHLH147*、*bHLH113-like*(pyrus_GLEAN_10005548)、*bHLH57-like* 共6个基因,表达差异不显著。

2.3 差异表达层次聚类分析

对筛选出的差异表达基因做层次聚类分析



注:横坐标表示样品名称及聚类结果,纵坐标表示差异基因聚类结果。图中列代表样品,行代表基因。颜色代表基因在样品中表达趋势(深色为上调,浅色为下调)

图3 差异表达基因聚类图

3 讨论

对红色果实起决定性作用的是花青苷的含量^[14]。套袋提高果皮对光的反应敏感性,去袋后果皮光敏色素升高,促进花青苷的形成与积累,果实色泽更加鲜艳^[15]。叶绿素可以吸收阳光中的红光,而光敏色素是花青苷合成的光受体之一,从而达到抑制花青苷的合成的效果。不同光周期处理苹果梨,花色苷组分并未发生改变,在本实验中改变光周期,部分基因的表达量发生显著性的差异,花青苷的含量也发生改变,初步推断光周期可能对果实着色有影响,具体机制需要进一步研究。不同光质中白光、红光、蓝光、绿光均能影响花青苷

(图3),结果表明:在遮光处理下 *bHLH57-like*、*bHLH147*、*Myb4-like1*、*MYB1R1*、*bHLH130-like*、*bHLH96-like*、*bHLH113-like* 共7个基因有上调的趋势,*bHLH113-like*、*WDR* 这两个基因有下调的趋势;在光照处理下,*bHLH113-like*(pyrus_GLEAN_10011886)、*bHLH147*、*bHLH57-like*、*Myb4-like1* 共4个基因有上调的趋势,其余的基因略微有下调的趋势。

组分,但蓝光最为明显^[16]。果树可以在完全遮光的条件下成熟,但不能合成花青苷,这更说明光对花青苷合成的影响^[17]。大多数MYB是以转录因子的形式对花青苷起调控作用,不同的MYB结构域重复序列致使他们有结合DNA的能力^[18]。刘冰雁对转录组中表达差异基因 *Myb4-like1*、*MYB1R1* 等进行克隆等相关实验,发现其中 *MYB1R1* 在瞬时转化番茄之后果实的花青苷含量有变化^[19]。而本实验中 *MYB1R1* 在不同的光处理下表达量有一定的变化趋势,可能由于遮光的时间不长或者照光的时长不够长导致,具体原因需要进一步实验证明。拟南芥中BHLH转录因子家族包括光敏色素因子(phytochrome-interacting factors, PIFs)^[20]。(下转第82页)

- 2017, 8(10): 2474-2482.
- [50] 高昌勇, 尚宏芹. 大蒜脱毒及病毒检测技术研究进展[J]. 蔬菜, 2004(10): 24-25.
- [51] Hu G, Dong Y, Zhang Z, et al. Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2015, 121(2): 435-443.
- [52] 董伟清, 闭志强, 何铁光. 玉林大蒜茎尖脱毒与繁殖技术研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(10): 1289-1291.
- [53] 宋淑敏, 刘伟伟, 王云云, 等. 大蒜茎尖离体再生体系的建立[J]. 黑龙江科学, 2013(9): 38-41.
- [54] 聂园军, 李瑞珍, 张春芬, 等. 草莓茎尖脱毒技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2019(3): 29-32, 35.
- [55] 刘艳妮. 香水百合脱毒技术研究[J]. 宁夏农林科技, 2015, 56(11): 12-14.
- [56] 黄晓梅, 陈典, 梁艳, 等. 热处理对大葱茎尖脱毒效果的影响[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(3): 306-309.
- [57] 王健鹏, 张悦, 王秀峰, 等. 不同培养条件对分蘖洋葱茎尖脱毒效果的影响[J]. 辣椒杂志, 2017, 15(4): 31-35.

(责任编辑: 王 昱)

(上接第73页) BHLH家族基因近几年研究发现可以直接调控花青苷结构基因的蛋白复合体, 确认该蛋白是由MYB、BHLH转录因子及WD₄₀蛋白形成, 在苹果中*MdbHLH3*、*MdbHLH33*与*MdMYB10*共同作用诱导花青苷的积累^[21], 也有相关基因抑制着花青苷合成^[22]。本实验中*Myb4-like1*、*bHLH130-like*在遮光的条件下表达量明显增加, 而*Myb4-like1*基因转化到番茄中花青苷的含量并无明显差异, 一方面可能因为*Myb4-like1*基因受其他条件的影响或者与其他的相关蛋白共同来调节花青苷的含量, 另一方面可能与光敏色素有关。*WDR*基因表达量在光的诱导下出现先下降后增加的状态, 在梨的转录组分析该基因为上调基因, 可能光照对该基因有直接作用从而促进花青苷的合成, 有待于进一步研究验证。

参考文献:

- [1] 王甜元, 曲柏宏, 孟义淳, 等. 套袋苹果梨解袋后果皮花色苷组分及含量的变化[J]. 东北农业科学, 2020, 45(1): 35-38.
- [2] David W. Regulation of flower Pigmentation and growth: Multiple signaling Pathways Control anthocyanin synthesis in expanding petals [J]. *physiologia-plantarum*, 2000, 110(2): 152-157.
- [3] 崔道雷. 云南红梨果皮转录因子MYB、bHLH和WD40互作及调控果皮着色机理研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.
- [4] 孟义淳. 苹果梨MYB108基因的克隆与序列分析[J]. 东北农业科学, 2020, 45(2): 60-63.
- [5] 王智敏. 红梨果皮着色相关R₂R₃型MYB转录因子基因功能分析[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- [6] Takos A M, Jaffe F W, Jacob S R, et al. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 1216-1232.
- [7] Gonzalez A. Pigment loss in response to the environment: a new role for the WD/bHLH/MYB anthocyanin regulatory complex[J]. *New Phytologist*, 2009: 182: 1-3.
- [8] 孟富宣. 云南红皮梨bHLH转录因子的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2013: 32(5): 652-659.
- [9] 冯守千. 红梨着色机理的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [10] LI Xiaofen, LIU Fang, YIN Xueren, et al. Recent advances in the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(11): 2295-2306.
- [11] De Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, et al. The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals[J]. *Genes & Development*, 1997, 11: 1422-1434.
- [12] YANG Yanan, YAO Gaifang, ZHENG Danman, et al. Expression differences of anthocyanin biosynthesis genes reveal regulation patterns for red pear coloration[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(2): 189-198.
- [13] 王惠聪, 黄旭明, 胡桂兵, 等. 惠枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2028-2032.
- [14] 孙百灵, 曲柏宏, 杨宏霞, 等. 苹果梨果实CHI基因cDNA克隆及表达分析[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(34): 12043-12045.
- [15] 杨林先, 李伟, 曲柏宏. 不同时期解袋对苹果梨果实着色的影响[J]. 河南农业科学, 2010(1): 106-107.
- [16] 宁云山. 光照对着色期苹果梨果实花色苷组分含量的影响[D]. 延吉: 延边大学, 2018.
- [17] 柯凡君. 不同皮色梨品种果袋筛选和套袋对果实品质及糖积累相关酶活性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [18] Kanei-Ishii C, Sarai A, Sawazaki T, et al. The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the myb proto oncogene product[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(32): 19990-19995.
- [19] 刘冰雁. 苹果梨果实解袋后花青苷生物合成相关基因的挖掘与分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [20] Leivar P, Quail P H. PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16: 1-28.
- [21] Espley R V, Helliens R P, Putterill J, et al. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor MdMYB10[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(3): 414-427.
- [22] 薛华柏, 王芳芳, 杨健, 等. 红皮梨研究进展[J]. 果树学报, 2016, 33(S1): 24-33.

(责任编辑: 王 昱)