

田 鹏, 苏艳丽, 康保珊, 等. 两个红梨品种花色苷合成相关基因及转录因子 *MYB10* 表达模式分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 166-171.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.026

两个红梨品种花色苷合成相关基因及转录因子 *MYB10* 表达模式分析

田 鹏, 苏艳丽, 康保珊, 魏闻东

(中国农业科学院郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

摘要: 为研究不同红色梨品种着色差异的原因, 以西洋梨品种红星和砂梨品种满天红为试材, 通过荧光定量 PCR 方法, 分析果皮中花色苷合成基因 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*F3GT* 和转录因子 *MYB10* 基因在果实不同发育期的转录特性。结果表明, 在红星中除 *PAL* 外, 花色苷合成基因表达量与果皮花色苷含量变化一致, 先升高后降低; 在满天红中, *PAL* 和 *F3GT* 在果实转色期表达量最高, 其他基因表达量随果实发育而下降。转录因子 *MYB10* 在红星整个果实发育期表达水平都很低, 在满天红转色期呈现峰值, 且表达量是红星的 50 倍以上。红星着色程度可能由多个基因协同作用, 而满天红着色可能受关键基因 *F3GT* 的影响, *MYB10* 可能通过调控 *F3GT* 的表达从而调控满天红的着色。

关键词: 红梨; 花色苷; 表达; *MYB10*; 荧光定量 PCR

中图分类号: S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)01-0166-06

Analyses of expression patterns of transcription factor *MYB10* and anthocyanin synthesis genes in two red skin pear varieties

TIAN peng, SU Yan-li, KANG Bao-shan, WEI Wen-dong

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: The objective of this study is to reveal the difference of the coloration mechanism between two red skin pear varieties by analyzing the expression of anthocyanin synthesis related genes. Expression of the genes encoding seven enzymes (*PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*, *F3GT*) and transcription factor *MYB10* gene were examined by real-time PCR for fruit skin of two pear varieties, Starkrimson and Mantianhong, at three fruit development stages. In Starkrimson, the expression of the anthocyanin synthesis related genes except for *PAL* increased and then decreased, in agreement with anthocyanin content changes, during the whole stage of fruit development. However, in Mantianhong, the expressions of *PAL* and *F3GT* were the highest at fruit color turning and other genes decreased gradually along with fruit development. *MYB10* gene were lowly expressed during the whole fruit development in Starkrimson, and reached the highest at fruit color

turning in Mantianhong, 50 times higher than in Starkrimson. The coloration degree of Starkrimson could be controlled through the coordinated expression of the structural genes. *MYB10* might control the coloration in Mantianhong through regulating the expression of key gene *F3GT*.

Key words: red pear; anthocyanin; expression; *MYB10*; quantitative real-time PCR

收稿日期: 2014-06-05

基金项目: 郑州市创新型科技人才队伍建设工程——科技创新团队项目(10CXTD149); 河南省重大科技攻关计划项目(092101110400)

作者简介: 田 鹏 (1979-), 男, 山西阳城人, 硕士, 助理研究员, 主要从事梨新品种选育及栽培技术研究; (Tel) 0371-65330961; (E-mail) tianpeng@caas.cn

红色梨品种因属种差异而表现出不同的着色模式。其中,西洋梨红星(*Pyrus communis* CV. Starkrimson)和东方砂梨(*P. pyrifolia*)杂交种满天红^[1]即是如此。红星果实在整个发育期都保持全红色,满天红幼果为绿色,后期经光照果实阳面着红色。可见,2个品种最突出的差异在于着色的时间不同。梨果皮颜色主要由花色苷的组成和含量决定^[2]。花色苷是类黄酮代谢的终产物之一,其生物合成途径已基本明确^[3]。其中涉及多个参与编码花色苷合成酶蛋白的基因 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*F3GT*,这些基因的表达与花色苷的积累密切相关^[3]。因此,研究不同着色模式的红色梨果皮花色苷合成相关基因表达及转录调控有利于揭示红色梨的着色形成机制,进而为红色梨新品种选育和改良提供理论依据。目前,参与花色苷合成的结构基因在梨属植物中已经得以分离克隆^[4],并研究了这些基因在红巴梨(Max Red Bartlett)和巴梨(Williams)^[5]、满天红和奥冠红梨^[6]、早白蜜和云红1号^[7]、红星和满天红^[8]中的表达特性,普遍认为,红色梨品种果皮花色苷的积累由各结构基因协同控制。在花色苷合成调控因子方面,编码转录因子 MYB10 的基因已在红色梨中分离克隆^[9],研究证实,它的表达水平与结构基因的转录以及花色苷积累密切相关^[5-6]。然而,前人的研究多在西洋梨或砂梨单属种内进行,种间比较尤其是着色模式存在显著差异的品种间比较几乎很少涉及。红色砂梨的研究多集中于套摘袋条件下,光照对花色苷合成基因表达变化的影响^[6-7],而果实在自然条件下的不同发育阶段各基因的转录特性尚未见报道。鉴于此,本试验着重研究西洋梨红星和东方砂梨杂交种满天红两种不同着色模式品种的果皮在果实的不同发育阶段,参与编码花色苷合成的酶蛋白基因 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*F3GT* 以及转录因子 MYB10 编码基因的转录特性。通过比较,以期得出不同类型的红色梨品种随着果实发育和着色变化,及相关基因在转录水平上的差异,并探讨转录因子 MYB10 对结构基因表达和果皮花色苷含量累积的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

红星梨(*P. communis* cv. Starkrimson)系中国农业科学院郑州果树研究所 1988 年由新西兰引入国

内的优秀的全红色西洋梨品种;满天红梨(*P. pyrifolia* CV. Mantianhong)是本所于 1989 年选用日本幸水梨(Kosui)为母本,云南火把梨为父本人工杂交培育而成红色梨优良品种^[1]。2个品种成熟期不同,红星为早熟品种,果实发育期约 85 d,满天红为晚熟品种,果实发育期约 136 d。

2个梨品种的果实采自本所品种保存圃。在郑州地区,红星盛花期 4 月 10 日,满天红 4 月 5 日,每个品种在各发育期的 3 个不同阶段进行采摘,共 6 个处理。2个品种的采摘时间:红星为花后 25 d(5 月 5 日)、58 d(6 月 7 日)和 78 d(6 月 27 日);满天红为花后 30 d(5 月 5 日)、102 d(8 月 15 日)和 126 d(9 月 8 日)。每个处理采 30 个样品果,10 个果为 1 次重复,设 3 次重复,采后削取果实着色部位最好的果皮(尽量不含果肉),液氮冷冻,-80℃保存。

1.2 果皮花色苷的提取和含量测定

花色苷含量的测定在马志本等^[10]的方法上稍作改进。果皮称质量后,加入 1.0 ml 盐酸甲醇(1%)提取液置于冰上进行研磨;当果皮呈匀浆状时,再加入 1.0 ml 提取液,在 4℃ 的黑暗条件下浸提 1 h;然后转入 1.5 ml 的离心管中,10 000 r/min 离心 5 min。最后取 1.0 ml 上清液,稀释至 3 ml 测定 D_{530} 、 D_{620} 和 D_{650} 值。计算花青苷的含量,以 $\mu\text{g/g}$ (鲜质量)为单位表示。

1.3 总 RNA 提取及反转录

样品果皮总 RNA 的提取方法参照李继刚等^[11]的改良热硼酸法,DNase I 消化后,用 RevertAid premium first strand cDNA synthesis kit (Fermentas) 按照试剂操作指南进行反转录。

1.4 荧光定量分析

利用荧光染料法进行 RT-PCR 和荧光定量分析,反应体系采用 Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) 按照试剂盒操作指南配置。PCR 反应和荧光信号检测在 LightCycler 480 (Roche) 荧光定量 PCR 仪上进行,程序:95℃ 10 min,然后 95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。每个样设置 3 个平行,重复 2 次试验,以 *Actin* 为内参基因对目的基因(*PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*F3GT* 和 MYB10)进行相对定量分析,方法参考 Pfaffl^[12],引物参照已公布的基因序列设计(表 1)。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列^[4-6]Table 1 The primer sequence of qRT-PCR^[4-6]

基因	上游引物(5'→3')	下游序列(5'→3')	登录号
<i>PAL</i>	ATCGCCATGGCATCTTATTGTTTC	GCTCCCCATTTACCCAGTTGTTA	DQ230992
<i>CHS</i>	AAGCCGGAGAACTAGAACCAACA	GGCCCAAATCCGAAAAGCACA	AY786998
<i>CHI</i>	TTACACTGATGCAGAAGGCAAAG	TGGAGAAGCAAATCCTGAGTG	EF446163
<i>F3H</i>	CGGAGGCATGGAGGGAGGTC	GGGCTGAGGGCATTTTGGGTAG	AY965342
<i>DFR</i>	CCCCGAGTACAATATACCCACAA	GAAGTCAAACCCTATCTCCCTCAA	AY227731
<i>ANS</i>	GGGCAGCTTGACTGGGAGGAC	GGCTGAGGGCATTTTGGGTAGTAG	DQ230994
<i>F3GT</i>	CCCCGTAACAAACGACCTAA	TTGCTAGCAGCTCCTTCTCC	GQ325589
<i>MYB10</i>	CAGCAGAAGATTTAAGTACGCCATC	TTCTAACAAGGTCTCCACCAATC	EU153576
<i>Actin</i>	TCCAGAAGAGCATCCAGTCC	GCCAGGTCCAAACGAAGG	AF386514

1.5 数据分析

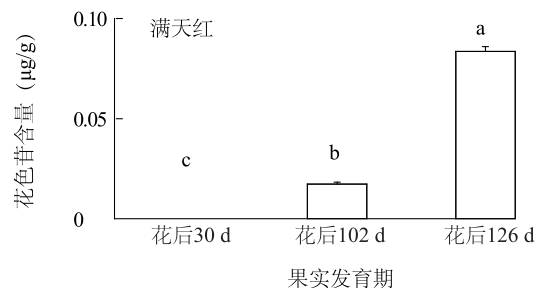
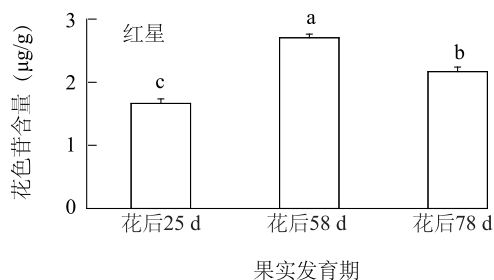
用 SPSS11.0 和 Excel 2003 软件进行数据统计分析,用 Origin 6.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 2 个梨品种果实花色苷含量分析

由于遗传背景不同,2 个品种着色程度存在很大差异。红星果实全红,颜色深紫;满天红果实阳面着色,色泽鲜红。在果实发育的整个阶段,红星果皮的花色苷含量均远远高于满天红。两个品种在着色模

式方面最明显的区别在于:红星幼果期时(花后 25 d)全面着红色,肉眼很难区分 3 个发育阶段果实外观着色程度;而满天红幼果时(花后 30 d)为绿色,着色过程存在一个转色期(花后 102 d 左右),3 个发育阶段外观着色程度变化明显。测定两个品种果实 3 个发育时期果皮中花色苷含量变化后发现,花色苷含量与果实外观着色程度相一致。红星花色苷含量在花后 58 d 时最高,变化趋势为先升高后降低;满天红则幼果时几乎检测不到花色苷,随着发育,含量呈逐渐升高,在花后 126 d 时最高(图 1)。



不同小写字母表示同一品种不同发育期的差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 2 个梨品种不同果实发育期果皮花色苷含量变化

Fig. 1 Changes of anthocyanin contents in the skin of two pear varieties during fruit development

2.2 2 个梨品种果皮中花色苷合成基因的转录特性

2 个梨品种由于果皮花色苷含量不同,果实色泽表型差异显著。为探明花色苷合成途径与果实着色发生及程度的关系,本试验对参与花色苷合成的 7 个结构基因 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*F3GT* 进行了实时荧光定量分析。结果(图 2)显示,红星

果实发育期间,除 *PAL* 外,其他基因都是在花后 58 d 时表达量最高,基因表达量的变化趋势与果皮花色苷含量的变化相一致,升高后降低,尤其下游基因 *DFR*、*ANS*、*F3GT*,花后 58 d 的表达量达到花后 25 d 的 4~5 倍。满天红的基因表达量与果皮花色苷含量变化并不一致,除 *PAL* 和 *F3GT* 在花后 102 d 时

最高,呈升高后降低外,其他基因的表达量都随果实的发育而逐渐降低,下游基因 *F3H*、*DFR* 和 *ANS* 在接近果实成熟时降到极低,而果实花色苷含量此时最高。比较 2 个品种,整个果实发育期间,*CHS* 表达量满天红是红星的 10 倍以上。此外,果实发育初期,除 *PAL* 和 *F3GT* 外,其他基因的表达量满天红均高于红星,而此时红星着红色,满天红为绿色。果实接近成熟时,满天红花色苷合成上游基因 *CHS*、*CHI* 的表达量高于红星,而下游基因 *F3H*、*DFR*、*ANS* 正好相反,这与我们以前的结果一致^[8]。

2.3 2 个梨品种果皮中转录因子 *MYB10* 的转录特性及对花色苷合成基因表达量的影响

2 个品种果皮中 *MYB10* 基因在不同果实发育期的表达量测定结果(图 2)显示:红星果皮中,*MYB10* 转录水平在整个发育期都很低,不随结构基因表达量和花色苷含量的变化而不同;满天红果皮中,*MYB10* 基因表达量在转色期(花后 102 d)时最高,幼果期和接近果实成熟期差异不显著,变化趋势为升高后降低,与 *PAL* 和 *F3GT* 的变化趋势相同。2 个品种比较,*MYB10* 基因表达量满天红是红星的 50 倍以上。

3 讨论

3.1 不同红色梨品种的着色模式差异

由于遗传背景不同,红色梨因种属差异呈现出不同的着色模式,其中最显著的差异之一就在于着色的时间不同。西洋红色梨多花后幼果期着色,例如红巴梨、早红考蜜斯、红星、Red d' Anjou、Bon Rouge 等;红色砂梨幼果期为绿色,果实发育中后期着色,例如火把梨、满天红、奥冠、云红 1 号等。本研究的主要目的就在于探讨红星和满天红果实着色时间差异的分子机理,所以选择 3 个代表性果实发育期以简化研究过程。之所以选择满天红,是因为满天红为火把梨的后代,继承了亲本的着色特征且克服了红色砂梨品质差不适推广的缺陷,在生产中被广泛应用,以满天红为研究对象更具应用价值。

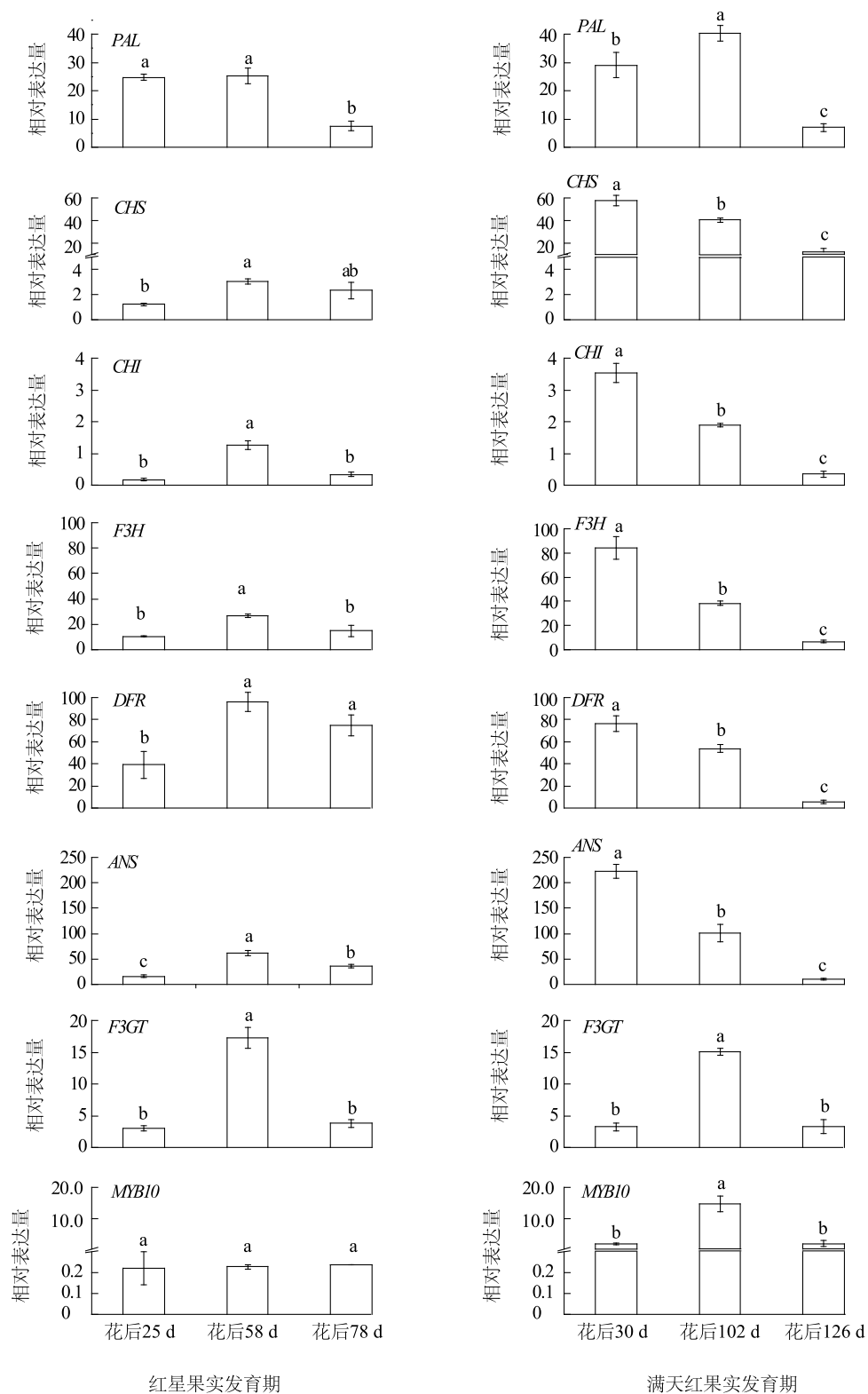
3.2 2 个梨品种花色苷合成相关结构基因的表达差异

西洋梨红星在果实发育期着色程度变化的本质是果皮花色苷含量的改变。本试验结果表明,红星的花色苷含量随果实发育先升高后降低,花色苷合成结构基因表达量除 *PAL* 外与其呈相同的变化趋

势。这一结果与红巴梨果皮中花色苷生物合成相关基因(*CHS*、*CHI*、*DFR*、*F3H*、*ANS*、*F3GT*)的表达量分析结果相一致^[5]。因此,推测此类品种的果实着色程度由多基因协同作用。

红色砂梨满天红着色时间在果实发育中后期,与西洋红梨不同,存在一个从无到有的转色过程,探讨转色期的成因对于揭示果实着色机理有重要意义。本研究发现,满天红果实着色转色期的一个显著特征是在其他花色苷合成基因表达量都下降的情况下,*PAL* 和 *F3GT* 基因的表达量升高,这 2 个基因对满天红的果实转色异常重要。*PAL* 是花色苷合成代谢的第一个酶,前人研究结果表明^[13],在花色苷合成过程中,只有在缺少前体的条件下,花色苷合成才与 *PAL* 活性有关。因此推测满天红果实着色转变期 *PAL* 表达量的升高可能是由于果实发育前期花色苷合成前体不足所致。*F3GT* 在不同着色苹果中的表达分析结果表明^[14],它的表达量与苹果颜色呈正相关,*F3GT* 是苹果果皮红色的关键基因之一。这与本文结果相一致,我们认为 *F3GT* 的表达对于满天红果皮着色与否非常关键。除了自然条件下的果实转色,研究者也采用套摘袋技术,人为创造果实转色。在套摘袋条件下,红色砂梨品种满天红、奥冠、云红 1 号果皮花色苷合成结构基因转录特性的研究已有报道^[6-8],它们的着色以及基因表达量变化与光照密切相关。对奥冠^[6]和云红 1 号^[7]的研究结果表明,果实去袋后,光照诱导 *DFR* 和 *ANS* 转录增多与花色苷含量升高一致。葡萄中也证实^[15],*DFR* 和 *ANS* 启动子序列中存在特定的结构域,可受光照的诱导。这些结果在本试验中并未发现,可见,自然生长条件和套摘条件下的转色存在不同的分子机制,除了光照是果实着色的调控因素外,还存在其他因素调控红色砂梨满天红果皮颜色的转变。

比较 2 个品种,*CHS* 在满天红中的表达量明显高于在红星中的表达量。Zhang 等^[7]在砂梨品种云红 1 号与早白蜜构建的差减 cDNA 文库中发现的唯一一个花色苷合成基因就是 *CHS*。可见,*CHS* 在红色砂梨品种果皮花色苷累积中可能具有重要作用。此外,果实发育初期,除 *PAL* 和 *F3GT* 外,其他基因都是满天红高于红星;果实接近成熟时,满天红花色苷合成上游基因 *CHS*、*CHI* 的表达量高于红星,而下游基因 *F3H*、*DFR*、*ANS* 正好相反。这些基因在品种间的表达差异可能是导致不同着色模式的重要原因。



不同小写字母表示同一品种不同发育期的差异显著 ($P < 0.05$)。

图2 2个梨品种果皮花色苷合成基因和编码转录因子 *MYB10* 基因的荧光定量检测

Fig. 2 Relative expression levels of anthocyanin synthesis genes and transcription factor *MYB10* genes in the fruit skin of two pear varieties by real-time PCR

3.3 2个梨品种中 *MYB10* 基因的表达差异及对花色苷合成的影响

大量研究结果表明^[16],植物通过转录因子调控花色苷的生物合成,*MYB* 家族是与花色苷合成相关的重要转录因子之一,且不同作物涉及的 *MYB* 家族成员不同,例如苹果有 3 个与花色苷合成相关的转录因子 *MdMYB10*、*MdMYBA*、*MdMYB1*^[9]。目前,梨中仅发现 *MYB10* 转录因子与梨果实花色苷合成基因的转录相关^[5-6,9],因此,本研究测定了 2 个品种果皮中 *MYB10* 基因在不同果实发育期的表达量,发现满天红中 *MYB10* 基因表达量在果实转色时最高,并与 *F3GT* 的变化趋势一致。有报道^[16]认为,*MYB-bHLH-WD40* 复合体调控花色苷合成下游基因的表达,控制花色苷的合成。比较红星和满天红中 *MYB10* 基因的转录特性,除了果实发育期间变化趋势不同外,满天红中表达量远高于红星,这种差异是否说明品种间调控机制的差异还需深入探讨。事实上,对红巴梨的研究结果表明^[5],*MYB10* 基因的表达虽与花色苷合成有关,但 *MYB10* 基因在连锁群上的定位并未与决定果皮颜色的位点相连锁,说明西洋红梨的着色还存在其他决定因素。红色砂梨尚未有类似的研究报道。从本研究的结果看,相对于红星来说,*MYB10* 可能对满天红的着色更为重要,在满天红中 *MYB10* 可能通过调控 *F3GT* 的表达调控满天红花色苷的合成。

综上所述,红星果实着色程度可能由多个基因协同作用,满天红着色与否受关键基因 *F3GT* 影响。对于满天红,除光照是着色的调控因素外,可能还存在其他因素调控转色。*MYB10* 可能通过调控 *F3GT* 的表达从而调控满天红的着色。

参考文献:

- [1] 魏闻东,田 鹏,苏艳丽. 红梨新品种“满天红”[J]. 园艺学报, 2009, 36(2): 303.
- [2] STEYN W, WAND S, HOLCROFT D M, et al. Red colour development and loss in pears[J]. Acta Hort, 2005, 671: 79-85.
- [3] WINKEL-SHIRLEY B. Flavonoid biosynthesis, A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiol, 2001, 126 (2): 485-493.
- [4] FISCHER T, GOSCH C, PFEIFFER J, et al. Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*) [J]. Trees Structure and Function, 2007, 21 (5): 521.
- [5] PIERANTONI L, DONDINI L, DE FRANCESCHI P, et al. Mapping of an anthocyanin-regulating MYB transcription factor and its expression in red and green pear, *Pyrus communis* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48 (12): 1020-1026.
- [6] FENG S Q, WANG Y L, YANG S, et al. Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a *R2R3-MYB* transcription factor *Py-MYB10*[J]. Planta, 2010, 232 (1): 245.
- [7] ZHANG X D, ALLAN A C, YI Q, et al. Differential gene expression analysis of Yunnan Red Pear, *Pyrus pyrifolia*, during fruit skin coloration[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011, 29 (2): 305-314.
- [8] 田 鹏,康保珊,魏闻东,等. 不同红梨果皮类黄酮合成基因表达模式分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(12): 2437-2442.
- [9] LIN-WANG K, BOLITHO K, GRAFTON K, et al. An *R2R3 MYB* transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 50.
- [10] 马志本,程玉娥. 关于苹果果实表面花青素含量的化学测定方法[J]. 中国果树,1984 (4): 49-51.
- [11] 李继刚,郭三堆. 棉花高质量 RNA 的提取及 MADS-box 基因保守区段的克隆[J]. 棉花学报, 2004,16(1): 3-7.
- [12] PFAFEL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29 (9): 45.
- [13] JU Z G, YUAN Y B, LIOU C L, et al. Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple[J]. Scientia Horticulturae, 1995, 61(3):215- 226.
- [14] HONDA C, KOTADA N, WADA M, et al. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002,40(11): 955- 962.
- [15] HE F, MU L, YAN G L, et al. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes[J]. Molecules, 2010, 15(12): 9057-9091.
- [16] HICHRI I, BARRIEU F, BOGS J, et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway[J]. J Exp Bot, 2011, 62 (8): 2465-2483.

(责任编辑:张震林)