

PpMYB10.1 启动子 483 bp 缺失与红肉桃果肉颜色形成关系的研究

王 蛟, 曹 珂, 王玲玲, 王力荣
(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要: 以红色深浅不一的红肉桃种质为材料, 探讨影响其花色素苷含量的分子机理, 为高效选育红色深浅不等的红肉桃品种提供理论依据。利用 GUS 染色测定桃果肉花色素苷重要基因 *PpMYB10.1* 的启动子活性, 利用 DNA-pulldown 鉴定结合于 *PpMYB10.1* 启动子上的转录抑制因子, 利用双荧光素酶及酵母双杂交验证转录抑制因子的功能。结果表明: (1) 具有深红、红、浅红的桃果肉, 其对应的 *PpMYB10.1* 表达量及花色素苷含量依次下降。(2) 具有 483 bp 序列的 *PpMYB10.1* 启动子, 其启动活性弱于缺失该序列的启动子。(3) 利用该 483 bp 序列鉴定到的转录抑制子基因 *Prupe.2G302800*, 虽然不能直接抑制 *PpMYB10.1* 的转录, 但能够结合花色素苷合成的主效基因 *PpBL*, 并抑制其转录活性, 可能对降低 *PpMYB10.1* 表达具有一定功能。本研究通过 483 bp 缺失序列鉴定到的转录抑制子 *Prupe.2G302800*, 虽然不是红肉变浅的直接因素, 但通过抑制 *PpBL* 转录活性, 对于红肉桃红色变浅, 可能具有一定作用。

关键词: 红肉桃; *PpMYB10.1*; 红色深浅; 启动子活性

Deciphering the Genetic Effect of a 483 bp Deletion in the *PpMYB10.1* Promoter to Determine Intensities of the Red-colored Flesh Peach

WANG Jiao, CAO Ke, WANG Ling-ling, WANG Li-rong

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

Abstract: Based on the red-flesh color peaches showing different intensities, this study attempted to decipher their formation mechanism in order to provide theoretical basis for efficient breeding of red peach varieties. The promoter activity of *PpMYB10.1* was detected via GUS staining, and the candidate transcription repressors binding on its promoter were captured through DNA-pull down assay. The function of these candidate genes were determined by double luciferase and yeast two-hybrid assay. The results showed that: (1) The expression of *PpMYB10.1* and anthocyanin content in flesh peaches with deep-red, red and light-red were gradually decreasing. (2) Activity of *PpMYB10.1* promoter with a 483 bp deletion was weaker than that without the sequence. (3) Interestingly, we identified a candidate transcription repressor *Prupe.2G302800* based on the 483bp deletion. The protein strongly interacted with *PpBL*, a major factor in anthocyanin synthesis and resulted in a reduction on the transcription of *PpMYB10.1*. *Prupe.2G302800* is unlikely the direct factor modulating the red flesh of peach, whereas it might play an important role in decreasing red-flesh color by inhabiting *PpBL* transcription activity.

Key words: red flesh peach; *PpMYB10.1*; different intensities of red-flesh color; promoter activity

收稿日期: 2022-09-09 修回日期: 2023-01-06 网络出版日期: 2023-01-18

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220909001>

第一作者研究方向为桃种质资源评价与利用, E-mail: wangjiaolingling@163.com

通信作者: 王力荣, 研究方向为桃种质资源与遗传育种研究, E-mail: wanglirong@caas.cn

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项经费项目 (CAAS-ASTIP-2021-ZFRI-01)

Foundation project: The Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ASTIP-2021-ZFRI-01)

红肉桃是一类特殊的桃种质资源,因果肉呈红色或紫红色,故也称血桃^[1]。红肉桃富含花色素苷等抗氧化成分,具有清除体内自由基、抗肿瘤、防止心血管疾病等功效^[2]。另外,不同红肉桃品种,花色素苷含量也表现出高低差异^[3]。诸如此类特性,红肉桃被众多消费者所青睐,亦被育种专家作为重点选育对象。

红肉桃根据花色素苷大量积累时间,可以划分成两种类型。第一种是成熟期积累型,代表品种有大红袍、天津水蜜等^[4];第二种是发育中期积累型,代表品种有大果黑桃、哈露红等。成熟期积累型的红肉桃,广泛应用于栽培及育种中,如湖北省农业科学院利用曙光(黄肉)与红肉桃 18(红肉)作为亲本,选育出早熟红肉桃品种早仙红^[5]。该类型的红肉,由主效基因 *PpBL* 控制,其启动子上的 6688 bp 转座子插入,是该类型红肉形成的关键变异^[6]。*PpBL* 与 *PpNAC1* 形成二聚体,上调调控基因 *PpMYB10.1* 转录因子的表达,之后 *PpMYB10.1* 又与另外一个转录因子 *PpbHLH3* 形成二聚体,上调花色素苷合成通路上的关键结构基因 *PpDFR* 与 *PpGUGT*,最终导致花色素苷含量上升,果肉呈现红色^[7]。

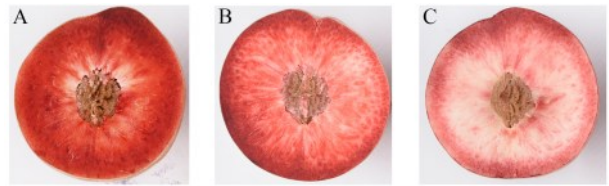
成熟期积累型的红肉桃,根据花色素苷含量,又可分为深红、红及浅红等不同梯度,极大地丰富了红肉桃的供应类型。Hara-Kitagawa 等^[6]认为 *PpMYB10.1* 启动子上游的 5243 bp 转座子插入,对红肉桃果肉颜色变浅具有一定作用。*PpMYB10.1* 启动子上还存在一段 483 bp 缺失序列^[7],该变异是否也参与红肉桃红色深浅形成,以及它们具有什么样的调控机制,目前尚不明确。本研究以红色深浅不等的红肉桃为材料,利用分子生物学手段,研究其形成机制,为高效选育红色深浅不同的红肉桃品种提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

用于试验的红色深浅不同的 10 份红肉种质,均属于成熟期大量积累花色素苷的红肉桃,分别为天津水蜜、园春白、武汉大红袍、微尖红肉、万州酸桃、红桃、大红袍、谷城大红袍、望谟小米桃、武汉 2 号,以上材料树龄 14 年,定植于中国农业科学院郑州果树研究所国家桃种质资源圃(郑州)。果肉拍照及样品采集于果实完全成熟时进行,具体为挑选树冠外围 3~5 个果实,横切拍照,并切取果皮与果核之间的果肉,迅速置于液氮,完全冷冻后用锡箔纸包裹,

置于 -80 °C 冰箱。



A: 天津水蜜; B: 万州酸桃; C: 大红袍

A: Tianjin Shui Mi; B: Wanzhou Suan Tao; C: Da Hong Pao

图 1 红肉桃不同红色深浅

Fig.1 Different intensities of the red-flesh color

1.2 桃果肉花色素苷提取与测定

花色素苷提取与测定参考赵慧芳等^[8]方法。将冷冻的桃果肉样品研磨成粉末,称取 2.0 g,以 1:4 的料液比例,加入 1% 的 HCL-乙醇溶液($V_{\text{盐酸}}:V_{\text{无水乙醇}}=1:99$),于 25 °C 提取 2 次,每次提取时间为 60 min。提取液 4000 r/min 离心 10 min,取上清液定容至 100 mL,以测定花色素苷含量。

花色素苷含量采用示差法测定。吸取 2 mL 上述上清液,分别用 pH=1.0(0.2 mol/L KCL:0.2 mol/L HCl=25:67)与 pH=4.5(0.2 mol/L NaAc·3H₂O:0.2 mol/L HAc=1:1)的缓冲液稀释至 20 mL,20 mL (2 mL 1% HCl-乙醇+18 mL 缓冲液)作为空白对照。缓冲液分别在 510 nm 与 700 nm 处测定吸光值 A_{510} 、 A_{700} ,利用以下公式计算花色素苷含量。

$$A = [(A_{510} - A_{700})_{\text{PH1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{PH4.5}}]$$

$$\text{ACY} = [(A \times 449.2 \times 10 \times V) / 26900 \times m] \times 100$$

A: 吸光值; ACY: 花色素苷总含量; V: 提取液的总体积; m: 取样量; 449.2: 矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔分子质量; 26900: 矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数。

1.3 载体构建

为了检测启动子活性,两段 *PpMYB10.1* 启动子序列(1126 bp、1609 bp)合成(北京六合华大基因科技有限公司,北京,中国)并连接到 pBI121 表达载体多克隆位点(MCS)区,以构建重组载体:*proPpMYB10.1* (1126 bp): GUS 及 *proPpMYB10.1* (1609 bp): GUS, CaMV35S: GUS 为阳性对照^[9]。为了检测转录因子与下游基因启动之间的互作关系,首先将 *PpMYB10.1* 两段启动子(1126 bp 与 1609 bp)序列合成并连接到 pGreenII0800LUC 载体上,连接位置位于报告基因 LUC 上游^[10-11],以构建重组载体:*proPpMYB10.1* (1126 bp): LUC 及 *proPpMYB10.1* (1609 bp): LUC, MCS: GUS 为阴性对照;之后将 *PpBL*、*Prupe.2G302800*、*PpNAC1* 的 CDS 区克隆并

连接到pBI121载体上,连接位置位于CaMV35S启动子下游,以构建重组载体:CaMV35S:PpBL, CaMV35S:Prupe.2G302800, CaMV35S:PpNAC1,

CaMV35S:GUS为阳性对照。克隆基因CDS区需要的引物见表1。

表1 双荧光素酶及酵母双杂交试验用到的引物

Table 1 Primers used in dual luciferase and Yeast two-hybrid assay

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	应用 Applicaton
PpBL F	acgggggactctagaggatccATGTTGGGAATGGAAGACGCA	载体构建(pBI121)
PpBL R	cgatcggggaaattcgagctcTTACTTAGCATCCATGATATAATCCA	载体构建(pBI121)
PpNAC1 F	acgggggactctagaggatccATGGAGAGCACCGACTCCTC	载体构建(pBI121)
PpNAC1 R	cgatcggggaaattcgagctcCTATCCCAAATTGGACTCAG	载体构建(pBI121)
Prupe.2G302800 F	acgggggactctagaggatccATGGCTTCCGATCTCGAAAA	载体构建(pBI121)
Prupe.2G302800 R	cgatcggggaaattcgagctcTTAGTACTCCCATTTCTTCA	载体构建(pBI121)
PpBL F1	tgccatggaggccgaattcATGTTGGGAATGGAAGACGCA	载体构建(pGBDT7)
PpBL R1	ccgctgcaggtcgacggatccTTACTTAGCATCCATGATATAATCCA	载体构建(pGBDT7)
Prupe.2G302800 F1	ggccatggaggccagtgaaattcATGGCTTCCGATCTCGAAAA	载体构建(pGADT7)
Prupe.2G302800 R1	ctcgagctcgatgagatccctTTAGTACTCCCATTTCTTCA	载体构建(pGADT7)
PpMYB10.1 F	GAAATGATTGGTGGGAAACC	实时定量PCR
PpMYB10.1 R	GTCCTTCTTCTGAAACATTGGT	实时定量PCR
PpTEF ₂ F	GATTCCGGTGCCAGAAAGT	实时定量PCR
PpTEF ₂ R	CCAGCAGCTTCCATTCCA	实时定量PCR

引物中小写字母代表载体上的序列,大写字母代表基因上的序列

The small letters represent sequences on the vector and the capital letters represent sequences on the genes

1.4 桃果肉GUS染色

为了明确启动子上的483 bp缺失对*PpMYB10.1*转录活性的影响,将构建好的过表达载体转化到农杆菌感受态细胞GV3101中,28℃培养2 d。从平板上挑取单菌落,悬浮于1.0 mL LB培养基中(含50 mg/mL卡那霉素),28℃培养10 h。从中吸取10 μL,转移到15 mL LB培养基中(含50 mg/mL卡那霉素),28℃摇床培养8~12 h。之后,5000 rpm离心10 min,收集菌体,并用侵染缓冲液(0.5 mol/L MES, 1.0 mmol/L MgCl₂, 1.0 μmol/L As)将菌体OD值调到0.4~0.6。调好的菌液悬浮物于室温静置2~3 h,用真空离心浓缩器压入新鲜桃果肉。暗处理16~24 h,见光培养24 h后,用GUS试剂盒(华越洋生物科技有限公司,北京,中国)染色。

1.5 DNA-Pulldown 试验

为了鉴定结合于483 bp上的转录抑制因子,将该序列设计为探针,并在河南瑞英生物技术有限公司(河南,中国)合成。果实核蛋白用蛋白提取试剂盒提取(生工生物工程股份有限公司,上海,中国)。(1)将200 pmol生物素标记的探针DNA与核酸孵育液混合,配置成500 μL的体系,再与链霉亲和磁珠一起孵育1h,磁力架上磁力分离吸取上清液,用于后续挂珠效率检测。(2)用预冷的核酸孵育缓冲液洗涤2次,蛋白孵育缓冲液洗涤2次,放置磁力架上分离,并提取上清液。(3)将蛋白提取物与蛋白

孵育缓冲液配置成500 μL体系,与DNA-磁珠复合物4℃孵育过夜,以形成蛋白-DNA-磁珠复合物。(4)将该复合物放置磁力架上磁力分离,以尽可能去除上清,用预冷的蛋白孵育缓冲液冲洗磁珠6~7次,收集沉淀。(5)加入100 μL蛋白洗脱液,95℃水浴5 min,12000 r/min离心5 min,吸取上清液。从上清液中吸取5~10 uL,置于聚丙烯酰胺凝胶点样孔中,电泳检测试验组与对照组中蛋白种类差异(试验组是蛋白-DNA-磁珠复合物,对照组是蛋白-磁珠复合物)。之后,上清液用于质谱鉴定,以确定蛋白液中蛋白质数量及理化性质。

1.6 双荧光素酶试验

为了验证质谱鉴定到的转录因子对*PpMYB10.1*的抑制活性,将上述1.3构建的重组载体*proPpMYB10.1*(1126):LUC及*proPpMYB10.1*(1609):LUC侵染*A.tumefaciens* GV3101,其OD值经检测并调至0.6;将重组载体CaMV35S:PpBL, CaMV35S:Prupe.2G302800, CaMV35S:PpNAC1, CaMV35S:GUS也侵染*A.tumefaciens* GV3101,其OD值经检测并调至1.1。之后,将上述两类重组载体以1:5的体积比混匀,静置30 min,用注射器注入烟草叶片中。暗处理16~24 h,见光培养24 h,之后,将叶片浸入双荧光素钠盐缓冲液(生工生物工程股份有限公司,上海,中国),10 min后取出,放入成像系统(上海天能科技有限公司,上海,中国)获取LUC强度值。

1.7 酵母双杂交试验

为了检测 *PpBL* 与质谱鉴定到的转录因子 *Prupe. 2G302800* 之间是否存在互作, 将 *PpBL* 的 CDS 序列克隆并连接到 pGBKT7 的 MCS 区, 引物见表 1。重组载体利用 PEG/LiAc 法转入酵母菌株 Y2HGOLD (上海唯地生物技术有限公司, 上海, 中国), 涂布于 3-AT 浓度梯度的酵母缺陷型培养基 SD-Trp/X-a-GAL 上, 以检测 *PpBL* 的自激活活性, 并确定抑制自激活的最终 3-AT 浓度。同样的方法, 将 *Prupe. 2G302800* 的 CDS 序列连接到 pGADT7 的 MCS 区。重组的 pGBKT7 及 pGADT7 载体以质量比 1:2 连同变性的 Carrier DNA, 转入 Y2HGOLD, 轻轻混匀; 之后加入 300 μ L 1 \times TE /LiAc/PEG, 混匀; 30 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 每 10 min 摇匀一次; 每管加入 20 μ L DMSO, 轻轻混匀; 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 15 min, 每 5 min 上下颠倒混匀一次; 高速离心 15 s, 弃上清。用 1 mL YPD Plus 重悬菌体, 30 $^{\circ}$ C, 250 r/min 复苏 1 h; 高速离心 15 s, 弃上清; 100 μ L NaCl (0.9%) 重悬菌体, 涂布于酵母缺陷型培养基 SD-Trp-Leu-His-Ade/3AT/X-a-Gal 上; 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养 3~5 d。预计有蓝色阳性克隆长出。

1.8 实时荧光定量 PCR

果实 RNA 用快速试剂盒提取 (北京艾德莱生物科技有限公司, 北京, 中国)。质检后的 RNA, 取 1.5 μ L, 用反转录试剂盒反转录成 cDNA (天根生化科技有限公司, 北京, 中国)。反应体系包含: 2.0 μ L SYBR mix, 7 μ L 的 ddH₂O。扩增体系包含如下步骤: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 45 个循环。内参引物基于 *PpTEF2* 设计, 扩增包含 3 个技术重复^[12], 引物见表 1。

1.9 数据分析

利用 NCBI 在线软件 Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) 进行引物设计; 利用 Excel2007 对定量数据进行处理; 利用 Prism 软件做柱形图及韦恩图; 利用 PhotoshopCS6 对不同类型的图片进行组合。

2 结果与分析

2.1 *PpMYB10.1* 启动子活性截短检测

与参考基因组相比^[13], *PpMYB10.1* 启动子上存在两个变异, 一个是 483 bp 的缺失, 位于 ATG 上游 -554 bp 的位置, 另一个是 5243 bp 的转座子插入, 位

于 ATG 上游 -1609 bp 的位置^[14]。前期发现这两处变异的基因型与果肉红色深浅具有很好的对应性, 如当这两处变异分别表现为 D1D1 与 T1T1 时, 果肉呈现深红色, 当分别为 D1D2 与 T1T1 时, 果肉呈现红色, 当分别为 D2D2 与 T1T1 时, 果肉呈现浅红色, 当分别为 D2D2 与 T1T2 或 T2T2 时, 果肉颜色为浅白色或白色 (结果未发表)。其中, 单倍型 D1 表示有 483 bp 缺失, 单倍型 D2 表示没有 483 bp 缺失, 单倍型 T1 表示没有 5243 bp 插入, 单倍型 T2 表示有 5243 bp 插入。

为了进一步探究两处变异对红肉桃红色深浅的影响, 首先对深红、红、浅红对应的 *PpMYB10.1* 表达量及花色苷含量进行测定。结果表明, 深红果肉对应的 *PpMYB10.1* 表达量及花色苷含量最高, 分别为 4.20 及 69.960 mg/100 g, 红色果肉次之, 分别为 1.87~3.29 及 8.501~16.003 mg/100 g, 浅红果肉第三, 分别为 0.94~1.34 及 1.886~5.769 mg/100 g (图 2A、B)。

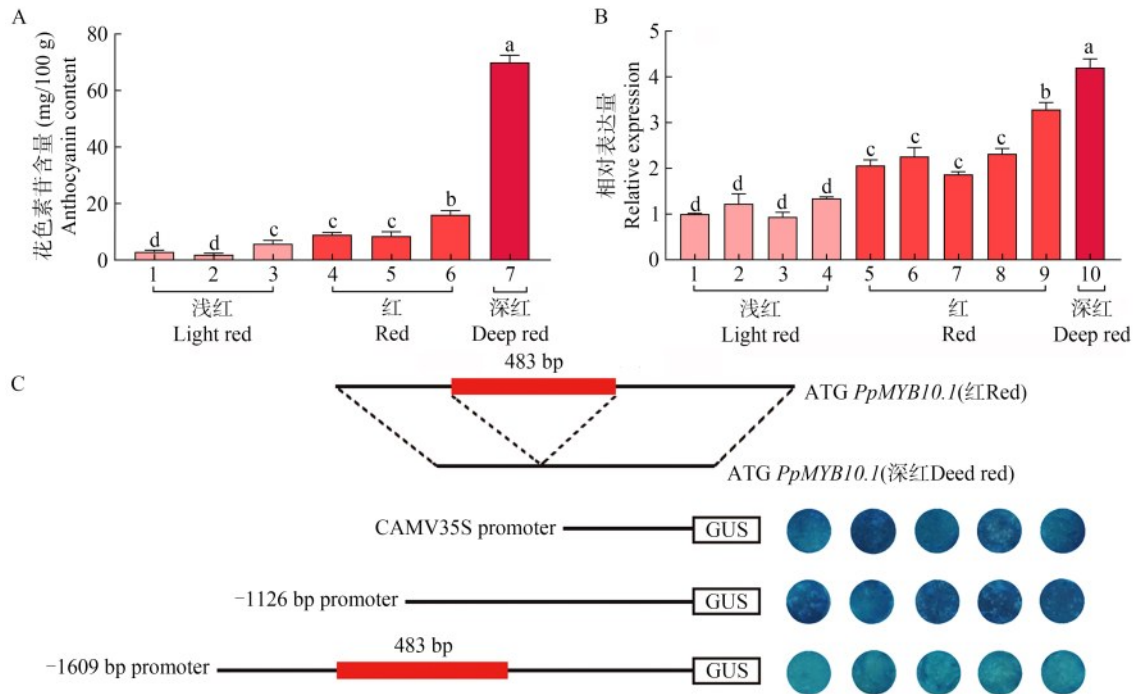
随后, 对其中之一的 483 bp 的缺失序列进行了验证。共设计了两段启动子序列, 第一段不包含 483 bp 缺失序列, 长度为 1126 bp (图 2C), 另一段包含 483 bp, 长度为 1609 bp (图 2C)。两段序列分别替换 pBI121 表达载体 GUS 上游的 CAMV35S 启动子序列, 构建 2 个携带 GUS 的表达载体 *proPpMYB10.1* (1126 bp): GUS 与 *proPpMYB10.1* (1609 bp): GUS, 并瞬时转化桃果肉, 以鉴定两段序列的启动活性。结果表明, 携带有 *proPpMYB10.1* (1609 bp): GUS 的果肉, 染色蓝色明显弱于 *proPpMYB10.1* (1126 bp): GUS (图 2C), 表明不包含 483 bp 的启动子序列具有较强的启动活性, 而包含该缺失序列的启动子, 其启动活性较弱。

2.2 483 bp 序列影响 *PpMYB10.1* 启动子活性分析

PpBL 与 *PpNAC1* 形成二聚体, 上调 *PpMYB10.1* 转录^[7], 以此推测 483 bp 序列的存在可能影响二聚体结合启动子的性能, 导致转录活性下降, 使 *PpMYB10.1* 表达量降低。为了验证该猜测, 将 *PpBL* 与 *PpNAC1* 的 CDS 序列连接到 pBI121 表达载体上, 替换 CAMV35S (为了便于表述, 下文 CAMV35S 简称为 35S) 下游的 GUS 序列, 以构建重组载体 35S:*PpBL* 及 35S:*PpNAC1*。将携带及未携带 483 bp 的 1126 bp 及 1609 bp 的启动子序列分别与 pGreen0800LUC 报告基因 LUC 连接, 构建重组载体 *proPpMYB10.1* (1609 bp): LUC 与 *proPpMYB10.1* (1126 bp): LUC。重组载体分别转化农杆菌 GV3101, 之后共侵染烟草。结果表明, 具有 35S:*PpBL*+35S:

PpNAC1+*proMYB10.1* (1126 bp):LUC的注射位点的LUC活性几乎与35S:PpBL+35S:PpNAC1+*proMYB10.1*

(1609 bp):LUC相当(图3A),初步表明PpBL/PpNAC1对两段启动子的激活能力几乎一样。



A: 红色深浅不一的红肉桃果肉中花色苷含量测定,不同小写字母表示不同品种花色苷含量在 $P<0.05$ 水平上差异显著,1:大红袍;2:谷城大红袍;3:望谟小米桃;4:园春白;5:武汉大红袍;6:红桃;7:天津水蜜;B:红色深浅不一的红肉桃果肉中*PpMYB10.1*表达量测定,不同小写字母表示不同品种*PpMYB10.1*表达量在 $P<0.05$ 水平上差异显著;1:大红袍;2:谷城大红袍;3:望谟小米桃;4:武汉2号;5:园春白;6:武汉大红袍;7:微尖红肉;8:万州酸桃;9:红桃;10:天津水蜜;C:483 bp缺失序列对*PpMYB10.1*启动子活性影响检测,黑色直线表示不同长度的*PpMYB10.1*启动子,CAMV35S启动子为阳性对照,红色方框代表483 bp缺失序列,果盘蓝色越深,表明启动子活性越强

A: Detection of anthocyanin content in different intensities of the red-flesh color peach, different small letters indicate the significant differences of anthocyanin content in different varieties at $P<0.05$ level, 1: Da Hong Pao; 2: Gucheng Da Hong Pao; 3: Wangmo Xiao Mi Tao; 4: Yuan Chun Bai; 5: Wuhan Da Hong Pao; 6: Hong Tao; 7: Tianjin Shui Mi; B: Relative expression of *PpMYB10.1* in different intensities of the red-flesh color peach, different small letters indicate the significant differences of *PpMYB10.1* expression in different varieties at $P<0.05$ level, 1: Da Hong Pao; 2: Gucheng Da Hong Pao; 3: Wangmo Xiao Mi Tao; 4: Wuhan 2; 5: Yuan Chun Bai; 6: Wuhan Da Hong Pao; 7: Wei Jian Hong Rou; 8: Wanzhou Suan Tao; 9: Hong Tao; 10: Tianjin Shui Mi; C: Detection of influence of 483 bp deletion in *PpMYB10.1* promoter on its priming activity, black lines indicate different length promoter sequence of *PpMYB10.1*, CAMV35S promoter is used as a positive control, red rectangle indicates 483 bp deletion, promoter activity increases with increasing blue color intensity of peach fruit discs

图2 *PpMYB10.1*启动子上两处变异对其启动活性影响检测

Fig.2 Validation of influence of two variations in *PpMYB10.1* promoter on priming activity

启动子的低启动活性,一般与结合其上的转录抑制子密切相关^[15]。上文中483 bp序列的存在,能够导致启动子活性减弱,表明在果肉中,该段序列可能有转录抑制因子结合。为了验证该猜测,将483 bp序列设计成探针,并标记上脱硫生物素标记,与红肉桃果肉核蛋白孵育,以鉴定结合其上的调控蛋白。结果表明,在蛋白洗脱液处理的蛋白上清液中,试验组在蛋白分子量为45~66.2 KDa及25~35 KDa的区间内,较对照组有明显条带,说明483 bp的DNA探针捕获了与之结合的蛋白。之后,将蛋白上清液经过质谱鉴定分析,共获得15个目标蛋白(图3、表2),其中*Prupe.4G232600*(WRKY转录因子)、

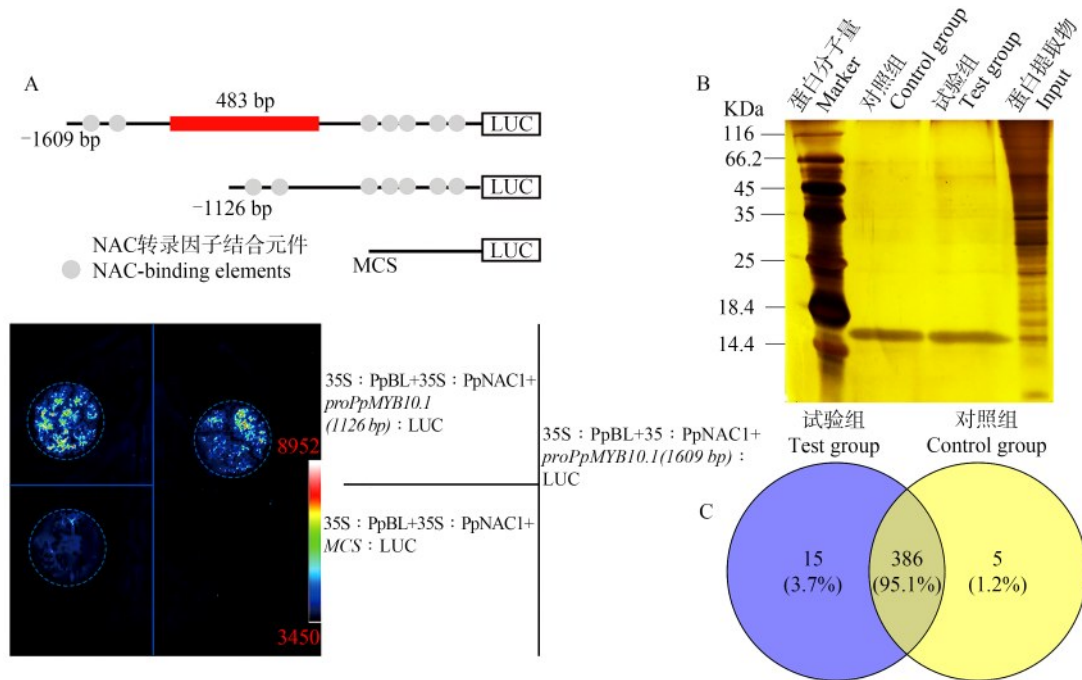
*Prupe.2G302800*及*Prupe.6G284800*根据功能注释,可能具有抑制功能,三者被用于之后的功能验证。

2.3 候选基因功能验证

双荧光素酶试验被用来验证3个候选基因的转录抑制活性。*Prupe.4G232600*、*Prupe.2G302800*及*Prupe.6G284800*的CDS替换pBI121表达载体的GUS序列,由35S启动子调控(35S:*Prupe.4G232600*、35S:*Prupe.2G302800*及35S:*Prupe.6G284800*)。重组载体与*proPpMYB10.1* (1609 bp):LUC分别转化农杆菌GV3101,之后共侵染烟草。结果表明,在烟草叶片中,具有35S:*Prupe.4G232600*+*proMYB10.1* (1609 bp)及35S:*Prupe.2G302800*+*proMYB10.1*

(1609 bp) 的注射位点, 其 LUC 活性高于对照 35S: GUS+*proMYB10.1* (1609 bp)。而具有 35S: Prupe. 6G284800+*proMYB10.1* (1609 bp) 注射位点的 LUC

活性几乎与对照 35S: GUS+*proMYB10.1* (1609 bp) 相当(图 4)。这些表明, 3 个候选基因对 *PpMYB10.1* 启动子不具有抑制活性。



A: PpBL/PpNAC1 对 *PpMYB10.1* 启动子 (携带与未携带 483 bp) 激活能力检测, 黑色直线表示不同长度的 *PpMYB10.1* 启动子, MCS 序列为阴性对照, 红色方框代表 483 bp 缺失序列; B: 果实核蛋白聚丙烯酰胺凝胶图; C: 质谱分析鉴定到的果实核蛋白, 15 及 5 分别是试验组及对照组鉴定到的核蛋白数量, 386 是试验组与对照组共有的核蛋白数量

A: Detection of PpBL/PpNAC1 activation to *PpMYB10.1* promoter (with and without 483 bp sequence), black lines indicate different length promoter sequence of *PpMYB10.1*, MCS sequence is used as negative control, red rectangle indicates 483 bp deletion; B: Polyacrylamide gel diagram of fruits nuclear protein in test and control groups; C: Fruit nuclear proteins identified through mass spectrometry, 15 and 5 are the number of nuclear proteins identified by the test group and the control group, respectively, 386 is the number of nuclear proteins shared by the test group and the control group

图 3 483 bp 序列影响 *PpMYB10.1* 转录机制分析

Fig.3 Influence of 483 bp deletion on *PpMYB10.1* transcription

表 2 通过 DNA-pulldown 鉴定到的果实核蛋白

Table 2 Fruit nuclear proteins captured through DNA-pull down assay

蛋白质登录号 Accession	基因编号 Gene ID	蛋白质分子量 (kDa) MW	注释信息 Description
A0A251MZG7	<i>Prupe.8G176700</i>	38.8	未知特征的蛋白
M5XHN6	<i>Prupe.1G253600</i>	15.1	未知特征的蛋白
M5W271	<i>Prupe.7G227300</i>	45.9	未知特征的蛋白
A0A251R8E8	<i>Prupe.1G360400</i>	22.1	未知特征的蛋白
M5X1T4	<i>Prupe.2G232500</i>	38.5	具有还原型辅酶II dom 结构域的蛋白质
A0A251PT15	<i>Prupe.4G232600</i>	59.4	WRKY20 转录因子
M4QFW7	<i>Prupe.2G162400</i>	28.1	磷酸甘露糖变位酶2
M5W5T0	<i>Prupe.6G284800</i>	12.1	巨噬细胞移动抑制因子同源物
M5X2Q0	<i>Prupe.4G074900</i>	19.5	COPZ1 蛋白
A0A251R812	<i>Prupe.1G352200</i>	43.5	α -半乳糖苷酶
M5WTZ0	<i>Prupe.4G038700</i>	34.9	具有 PKS_ED 结构域的蛋白质
M5X1L2	<i>Prupe.2G302800</i>	40.7	SPK1 的 G2 等位基因抑制因子
A0A251NBV4	<i>Prupe.7G153600</i>	59.2	琥珀酸脱氢酶(辅酶Q)黄素蛋白亚基
Q38JC5	<i>Prupe.7G259600</i>	21.5	受温度诱导的脂质运载蛋白
M5VZS0	<i>Prupe.6G076300</i>	27.3	未知特征的蛋白

加粗的条目表示用于之后验证的候选基因

The terms bold represent candidate genes for further validation

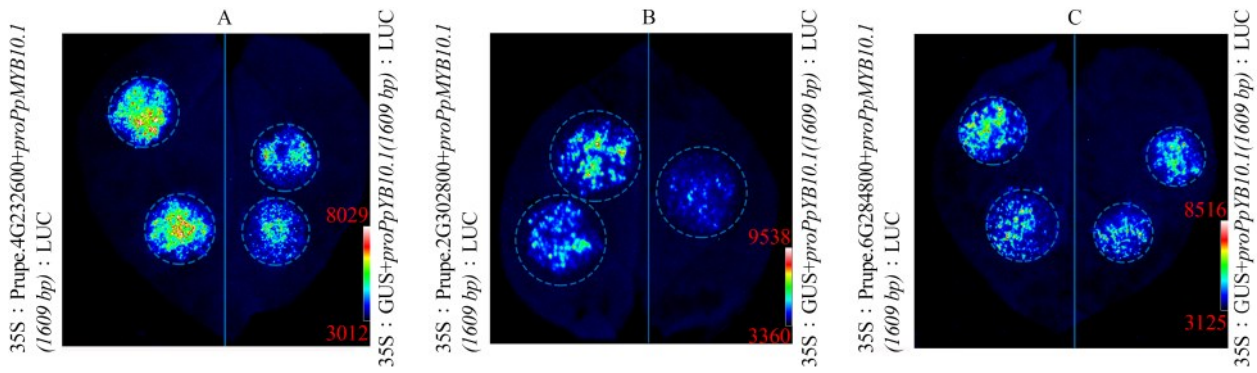
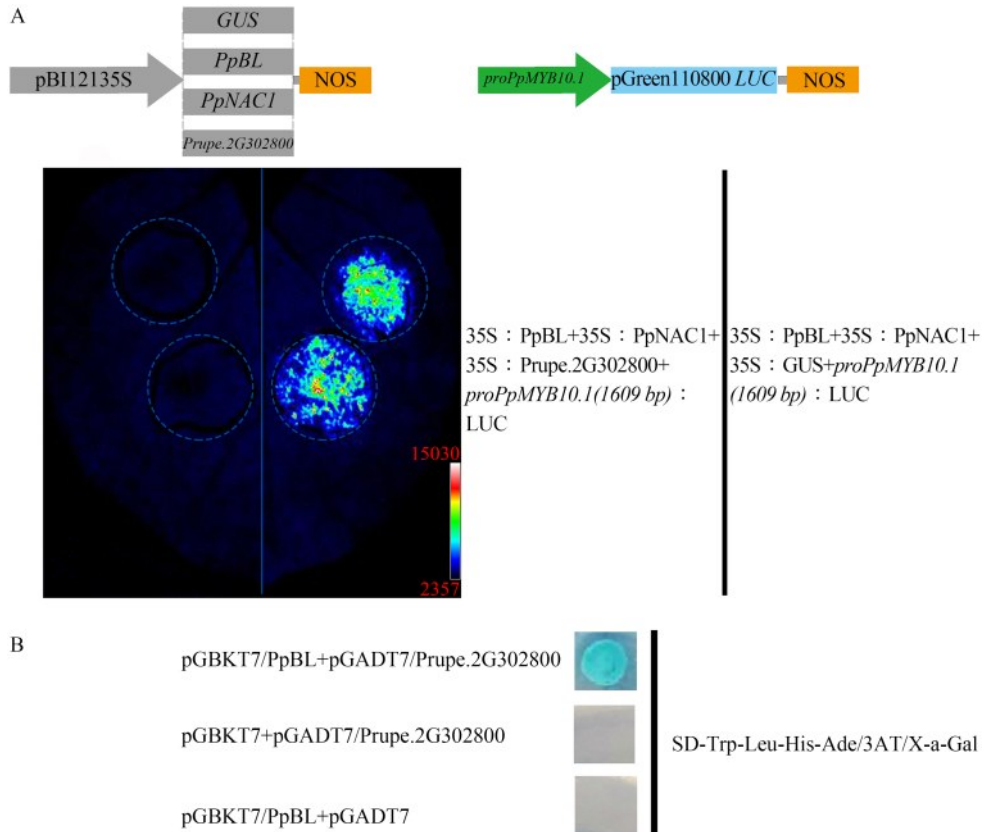


图4 3个候选基因对 *PpMYB10.1* 抑制活性检测

Fig.4 Suppression of three candidate genes to *PpMYB10.1* transcription

在烟草叶片中,具有35S:Prupe. 2G302800+35S:PpBL+35S:PpNAC1+*proMYB10.1* (1609 bp)的农杆菌注射位点, LUC活性明显低于35S:GUS+35S:PpBL+35S:PpNAC1+*proMYB10.1* (1609 bp),这表明Prupe.2G302800可能对PpBL或PpNAC1具有抑制作用(图5A)。之后,将Prupe.2G302800克隆并连接到载体pGADT7上, PpBL连接到pGBKT7上,二者共转化Y2HGOLD。结果表明,携带此二者的酵母

菌株,在SD-Trp-Leu-His-Ade/3AT/X-a-Gal缺失培养基上长出蓝色菌斑,表明Prupe.2G302800可以与PpBL发生互作(图5B, 详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220909001>, 附图1)。因为PpBL是红肉桃形成的关键基因,也是上调*PpMYB10.1*的主要转录因子,所以结合以上结果,推测Prupe.2G302800可以与PpBL结合,并抑制其转录活性,进而减弱PpBL/PpNAC1对*PpMYB10.1*的转录激活能力。



A: pBI121及pGreenII0800LUC重组载体构建及PpBL/PpNAC1对*PpMYB10.1*启动子激活能力检测; B: Prupe.2G302800与PpBL互作分析
A: Recombinant vector construction of pBI121 and pGreenII0800LUC, and detection of PpBL/PpNAC1 activation ability to *PpMYB10.1* promoter at injection sites with and without Prupe.2G302800 products; B: Detection of interaction between Prupe.2G302800 and PpBL

图5 *Prupe.2G302800* 功能分析

Fig.5 *Prupe.2G302800* functional analysis

3 讨论

花色苷是黄酮类合成途径的终产物,由许多酶催化合成,如苯丙氨酸 3 裂解酶(PAL),肉桂酸-4-羟化酶(C4H),查尔酮合成酶(CHS),查尔酮异构酶(CHI),黄酮醇-3'羟化酶(F3'H),二羟基黄酮醇还原酶(DFR)及类黄酮-3-O-糖基转移酶(UFGT)^[16]。编码这些酶的基因,在转录水平上受到转录激活因子与抑制因子调控^[17]。转录因子通常具有特殊的结构域,结合下游结构基因的启动子,进而启动转录调控。例如,拟南芥中的转录抑制子 MYBL2 及矮牵牛中的 MYBx,在碳末端均具有抑制结构域 TLLFR,下调花色苷主要结构基因表达^[18]。AtMYB4 不仅可以结合自己的启动子序列,以抑制自身表达,而且能够与 AtMYB12 竞争性结合黄酮醇途径基因启动子上的顺式作用元件,以形成负反馈调节^[19-20]。

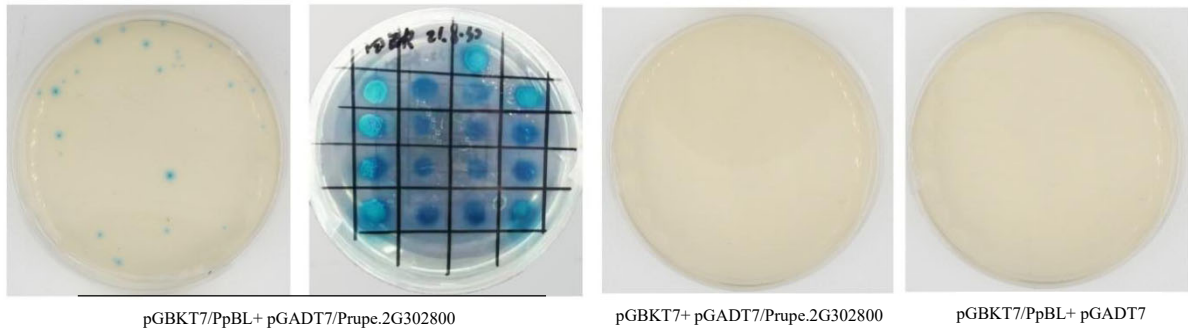
桃果肉中主要花色苷为矢车菊-3-葡萄糖苷,个别品种也有矢车菊-3-芸香糖苷^[3,21]。调控基因主要有 *PpMYB10.1*、*PpbHLH3*、*PpNAC1*、*PpBL* 及 *PpMYB18*^[15,22]。其中 *PpMYB10.1* 与 *PpbHLH3* 形成二聚体,结合花色苷主要结构基因 *PpDFR* 及 *PpUFGT* 启动子序列,正向调控其转录,使果肉中花色苷大量积累^[7]。*PpBL* 及 *PpNAC1* 位于 *PpMYB10.1*、*PpbHLH3* 上游,以二聚体的形式结合 *PpMYB10.1* 启动子序列,上调其表达^[7]。*PpMYB18* 是转录抑制子,结合主要结构基因 *PpDFR* 与 *PpUFGT* 启动子,抑制其转录^[15]。本研究表明,携带 483 bp 序列的启动子,启动活性明显弱于未携带该序列的启动子,表明该段序列上可能结合有转录抑制子。之后,将 483 bp 序列设计成探针,通过 Pull-down 筛库,鉴定到 3 个候选基因,其中 *Prupe.2G302800*,注释信息为 SPK₁ 的 G₂ 等位基因抑制因子。该基因翻译的蛋白质,具有 3 个重要的功能结构域^[23],能够结合其他蛋白,例如它们可以与 HSP90 及 RAR1 结合成聚合物,提高植物的抗逆性^[24]。本研究也表明,在瞬时转化的烟草叶片及转化的酵母细胞中,*Prupe.2G302800* 可以与 *PpBL* (NAC 家族转录因子)结合,并抑制其转录活性,进而减弱 *PpBL* 对 *PpMYB10.1* 的转录激活能力。但 *Prupe.2G302800* 结合 *PpMYB10.1* 启动子上的 483 bp 序列后,并不能抑制该基因转录。基于此,本研究认为 *Prupe.2G302800* 可能通过间接地抑制 *PpMYB10.1* 表达,进而降低桃果肉中花色苷含量。此外,在筛选到的 15 个候选基因里面,有 5 个

注释信息未知(*Prupe.8G176700*、*Prupe.1G253600*、*Prupe.7G227300*、*Prupe.1G360400* 及 *Prupe.6G076300*),这些成员是否能够结合 483 bp 序列,进而直接抑制 *PpMYB10.1* 转录还有待进一步验证。

参考文献

- [1] 王力荣,朱更瑞.桃种质资源描述规范和数据标准.北京:中国农业出版社,2005:74-75
Wang L R, Zhu G R. Descriptors and data standard for peach (*Prunus persica*). Beijing: China Agriculture Press, 2005: 74-75
- [2] Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 850-857
- [3] 赵玉,王力荣,曹珂,朱更瑞,方伟超,陈昌文,彭福田.桃果肉花色苷遗传多样性及红肉桃判定指标的探讨.植物遗传资源学报,2013,14(1):167-172
Zhao Y, Wang L R, Cao K, Zhu G R, Fang W C, Chen C W, Peng F T. Genetic diversity of anthocyanin in peach fruit and the evaluating criterion of red-flesh peach. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(1): 167-172
- [4] 丁体玉,曹珂,方伟超,朱更瑞,陈昌文,王新卫,王力荣.红肉桃两类花色苷积累模式与相关基因表达差异.中国农业科学,2017,50(13):2553-2563
Ding T Y, Cao K, Fang W C, Zhu G R, Chen C W, Wang X W, Wang L R. The difference of anthocyanin accumulation pattern and related gene expression in two kinds of red flesh peach. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50 (13): 2553-2563
- [5] 王富荣,龚林忠,王会良,刘勇,艾小艳,顾霞,刘模发,何华平.特早熟红肉桃新品种‘早仙红’.园艺学报,2018,45(1):193-194
Wang F R, Gong L Z, Wang H L, Liu Y, Ai X Y, Gu X, Liu M F, He H P. A new early-maturing red-flesh peach cultivar ‘Zaoxianhong’. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45 (1): 193-194
- [6] Hara-Kitagawa M, Unoki Y, Hihara S, Oda K. Development of simple PCR-based DNA marker for the red-fleshed trait of a blood peach ‘Tenshin-suimitsuto’. *Molecular Breeding*, 2020, 40:5
- [7] Zhou H, Lin-Wang K, Wang H, Gu C, Dare A, Espley R V, He H, Allan A C, Han Y. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *The Plant Journal*, 2015, 82: 105-121
- [8] 赵慧芳,王小敏,闫连飞,吴文龙,李维林.黑莓果实中花色苷的提取和测定方法研究.食品工业科技,2008,29(5):176-179
Zhao H F, Wang X M, Lv L F, Wu W L, Li W L. Study on the extraction and assay method of anthocyanin in blackberry fruits. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 29(5): 176-179
- [9] Huang M, Roose M L, Yu Q, Du D, Yu Y, Zhang Y, Deng

- Z, Stover E, Gmitter F G. Construction of high-density genetic maps and detection of QTLs associated with huanglongbing tolerance in citrus. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1694
- [10] Hellens R P, Allan A C, Friel E N, Bolitho K, Grafton K, Templeton M D, Karunairetnam S, Gleave A P, Laing W A. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 2005, 1: 13
- [11] Ravaglia D, Espley R V, Henry-Kirk R A, Andreotti C, Ziosi V, Hellens R P, Costa G, Allan A C. Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 68
- [12] Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 71
- [13] Verde I, Abbott A G, Scalabrin S, Jung S, Shu S, Marroni F, Zhebentyayeva T, Dettori M T, Grimwood J, Cattonaro F, Zuccolo A, Rossini L, Jenkins J, Vendramin E, Meisel L A, Decroocq V, Sosinski B, Prochnik S, Mitros T, Policriti A, Cipriani G, Dondini L, Ficklin S, Goodstein D M, Xuan P, Del Fabbro C, Aramini V, Copetti D, Gonzalez S, Horner D S, Falchi R, Lucas S, Mica E, Maldonado J, Lazzari B, Bielenberg D, Pirona R, Miculan M, Barakat A, Testolin R, Stella A, Tartarini S, Tonutti P, Arús P, Orellana A, Wells C, Main D, Vizzotto G, Silva H, Salamini F, Schmutz J, Morgante M, Rokhsar D S. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics*, 2013, 45: 487-494
- [14] Tuan P A, Bai S L, Yaegaki H, Tamura T, Hihara S, Moriguchi T, Oda K. The crucial role of PpMYB10.1 in anthocyanin accumulation in peach and relationships between its allelic type and skin color phenotype. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 1-14
- [15] Zhou H, Lin-Wang K, Wang F, Espley R V, Ren F, Zhao J B, Ogutu C, He H P, Jiang Q, Allan A C, Han Y P. Activator-type R2R3-MYB genes induce a repressor-type R2R3-MYB gene to balance anthocyanin and proanthocyanidin accumulation. *New Phytologist*, 2018, 221: 1919-1934
- [16] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 2008, 53: 814-827
- [17] Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 761-780
- [18] Matsui K, Umemura Y, Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2008, 55: 954-967
- [19] Zhao J, Zhang W, Zhao Y, Gong X, Guo L, Zhu G, Wang X, Gong Z, Schumaker K S, Guo Y. SAD2, an importin-like protein, is required for UV-B response in *Arabidopsis* by mediating MYB4 nuclear trafficking. *Plant Cell*, 2007, 19: 3805-3818
- [20] Schenke D, Böttcher C, Scheel D. Crosstalk between abiotic ultraviolet-B stress and biotic (flg22) stress signalling in *Arabidopsis* prevents flavonol accumulation in favor of pathogen defence compound production. *Plant, Cell & Environment*, 2011, 34: 1849-1864
- [21] 沈志军, 马瑞娟, 俞明亮, 许建兰, 蔡志翔, 倪林箭, 颜少宾. 桃三种肉色类型果实抗氧化因子的比较评价. *中国农业科学*, 2012, 45(11): 2232-2241
- Shen Z J, Ma R J, Yu M L, Xu J L, Cai Z X, Ni L J, Yan S B. Evaluation of antioxidant factors in peach with three types of flesh color. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45 (11) : 2232-2241
- [22] Ravaglia D, Espley R V, Henry-Kirk R A, Andreotti C, Ziosi V, Hellens R P, Costa G, Allan A C. Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 68
- [23] Taube M, Pienkowska J R, Jarmolowski A, Kozak M. Low-resolution structure of the full-length barley (*Hordeum vulgare*) SGT1 protein in solution, obtained using small-angle X-ray scattering. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e93313
- [24] Pei H, Sun Q X, Hao Q, Lv B, Wu J J, Fu D L. The HSP90-RAR1-SGT1 based protein interactome in barley and stripe rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2015, 91: 11-19



附图 1 利用酵母双杂交试验验证 PpBL 与 Prupe.2G302800 之间互作

Fig. S1 Detection of interaction between PpBL and Prupe.2G302800 based on yeast two-hybrid assay

收稿日期: 2022-09-09

修回日期: 2023-01-06

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为桃种质资源评价与利用, E-mail: wangjiaolingling@163.com

通信作者: 王力荣, 研究方向为桃种质资源与遗传育种研究, E-mail: wanglirong@caas.cn

项目基金: 中国农业科学院科技创新工程专项经费项目 (CAAS-ASTIP-2021-ZFRI-01)

Foundation project: the Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ASTIP-2021-ZFRI-01)