

‘中油蟠9号’桃套袋果实花色苷合成的 转录组-代谢组联合分析

丁体玉¹, 马欣欣¹, 于雪丽¹, 周瑞金¹, 王力荣², 赵亚林¹

(¹河南科技学院园艺园林学院/河南省特色园艺植物开发利用工程技术研究中心/新乡市果树种质资源与
遗传育种重点实验室, 新乡 453003; ²中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450000)

摘要: 油蟠桃‘中油蟠9号’果实套袋后外果皮有花色苷合成呈现色泽微红, 此类型桃适宜套袋栽培, 满足消费者对色泽品相的追求。本研究以‘中油蟠9号’盛花后89 d和102 d套袋果实外果皮为试验材料, 对‘中油蟠9号’果实套袋后色泽形成原因进行转录组、代谢组以及双组学联合分析。结果表明, 转录组分析共鉴定2652个显著差异表达基因, 其中与花色苷合成相关的差异表达基因有16个, 如花色苷合成途径早期结构基因 *PpPAL*, *PpC4H*, *Pp4CLs*, *PpCHSs*, *PtpCHIs*, *PpF3H*, *PpF3'H*, 花色苷合成途径晚期结构基因 *PpDFR*, *PpANS*, *PpUFGT*, *PpGST*, 以及56个特异性上调表达的转录因子和光受体基因 *PpCRY3* 和 *PpUVR8.3*, 这些基因均上调表达, 表达模式与花色苷含量相关。利用高效液相串联质谱法检测发育阶段外果皮中类黄酮代谢物的相对含量变化, 共检测到112种显著差异代谢物, 其中矢车菊素-3, 5-二-O-葡萄糖苷显著上调, Log₂FC差异倍数最高为16.8。矢车菊素-3, 5-二-O-葡萄糖苷是‘中油蟠9号’套袋果实外果皮呈现红色的主要代谢物。结合双组学联合分析和转录因子结果, 推测套袋遮光下 *PpBL*、*PpNAC1* 上调表达激活花色苷调节基因 *PpMYB10.1* 的表达, 促进花色苷结构基因催化合成矢车菊素-3, 5-二-O-葡萄糖苷, 使‘中油蟠9号’外果皮呈现红色。研究结果有助于分析遮光下桃果实花色苷合成模式, 为筛选更多适宜套袋栽培的优质蟠桃品种提供理论依据。

关键词: 套袋; ‘中油蟠9号’; 花色苷; 转录组-代谢组联合分析; qRT-PCR

Combined Transcriptome-Metabolome Analysis of Anthocyanin Synthesis in ‘Zhongyoupan 9’ Peach Fruits under Bagging Condition

DING Tiyu¹, MA Xinxin¹, YU Xueli¹, ZHOU Ruijin¹, WANG Lirong², ZHAO Yalin¹

(¹School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology / Henan Engineering Research
Center of the Development and Utilization of Characteristic Horticultural Plants / Xinxiang Key Laboratory of Germplasm
Resources and Genetic Breeding in Pomology, Xinxiang 453003; ²Zhengzhou Fruit Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450000)

Abstract: Bagging-produced flat peaches have gained increasing consumer preference due to their reduced fruit cracking, enhanced visual appeal, and golden to slightly reddish fruit surface. The cultivar ‘Zhongyoupan 9’ shows a distinctive reddish coloration under bagging conditions, attributed to anthocyanin synthesis. This characteristic makes it particularly suitable for bagging cultivation, aligning with consumer preferences for optimal color and appearance. In this study, we investigated the exocarp of bagged fruits of ‘Zhongyoupan 9’ at 89 and 102 days after blooming (DAFB), through an integrated approach combining transcriptomic,

收稿日期: 2024-07-05 网络出版日期: 2024-12-11

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240705002>

第一作者研究方向为桃果实色泽形成机理解析, E-mail: dingtiyu@hist.edu.cn

通信作者: 赵亚林, 研究方向为桃芽休眠和果实色泽形成机理解析, E-mail: zhaoyalin@hist.edu.cn

基金项目: 河南省科技攻关项目(222102110440, 232102111083, 232102111087)

Foundation project: Science and Technology Program of Henan Province (222102110440, 232102111083, 232102111087)

metabolomic, and bi-histological analyses to elucidate the coloration mechanism. Transcriptome analysis identified 2652 significant differential genes, including 16 genes associated with anthocyanin biosynthesis (*PpPAL*, *PpC4H*, *Pp4CLs*, *PpCHSs*, *PpCHIs*, *PpF3H*, *PpF3'H*, *PpDFR*, *PpANS*, *PpUFGT*, *PpGST*), 56 specifically up-regulated transcription factors, and phyto receptors *PpCRY3*, *PpUVR8.3*. These genes were up-regulated and expressed correlating with anthocyanin content. Metabolomic profiling using high performance liquid tandem mass spectrometry detected 112 significantly differential metabolites, with cyanidin-3, 5-O-diglucoside showing the most substantial up-regulation ($\text{Log}_2\text{FC} = 16.8$). This metabolite was identified as the primary contributor to the red coloration in the exocarp after bagging. Integrative analysis of transcriptomic and metabolomics data, combined with transcription factor profiling, revealed that *PpBL* and *PpNAC1* up-regulated and activated the anthocyanin regulatory gene *PpMYB10.1*. This activation promoted the catalytic synthesis of cyanidin-3, 5-O-diglucoside by anthocyanin structural genes under bagging conditions, ultimately resulting in the characteristic red coloration of 'Zhongyoupan 9'. These findings advance our understanding of anthocyanin accumulation patterns in bagged peach fruits and provide a theoretical basis for selecting optimal peach varieties for bagging cultivation practices.

Key words: bagged; 'Zhongyoupan 9'; anthocyanin; transcriptomics-metabolomics combined analysis; qRT-PCR

桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 是世界温带地区栽培的重要果树之一, 起源于中国, 是我国重要落叶果树。作为一种鲜食水果, 桃果皮及果肉颜色是影响消费者选择和反映其营养成分的重要指标^[1]。近年来, 随着桃产业不断升级, 桃品种更新换代加速, 油蟠桃进入人们的视野。自然生长的蟠桃果实外观粗糙、易裂果、售价低, 生产上多采用套袋提高果实品相。套袋后的优质蟠桃品种‘中蟠桃 11 号’、‘中油蟠 7 号’和‘中油蟠 9 号’深受消费者喜爱^[2-3]。花色苷是决定果实色泽的关键次生代谢物, 提高果实花色苷含量可显著影响果实色泽^[4]。Kapoor 等^[5]发现花色苷属于水溶性色素的一种, 是广泛存在于植物体内的次生代谢产物, 在植物体内主要以糖苷形式积累于细胞液泡中, 是花、茎、叶、果实等植物组织呈现颜色的主要原因之一。此外, 花色苷还具有抗炎、抗癌、抗老、抗肥胖等功能^[6], 是一种具有高营养价值和潜在健康益处的天然抗氧化剂^[7-8]。在自然界中, 花色苷至少分为 20 多种, 其中常见的有 6 种 (矮牵牛色素、芍药色素、矢车菊色素、飞燕草色素、天竺葵色素和锦葵色素), 这 6 种花色苷及其衍生物约占自然界花色苷总量的 95%^[4,9]。花色苷生物合成过程分为两个阶段, 一是苯丙烷生物合成, 二是类黄酮生物合成, 参与花色苷生物合成的结构酶基因已经被鉴定, 包括苯丙氨酸解氨酶 (PAL, phenylalanine ammonia-lyase)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL, 4-Coumarate: coenzyme A ligase)、查耳酮合酶 (CHS, chalcone synthase)、查耳酮异构酶 (CHI,

chalcone isomerase)、二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR, dihydroflavonol 4-reductase)、黄烷酮 3-羟化酶 (F3H, flavanone 3-hydroxylase)、花色素合酶/无色花色素双加氧酶 (ANS, anthocyanidin synthase) 和 UDP-葡萄糖-类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶 (UFGT, UDP-glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase)。花色苷生物合成通过 MYB、bHLH 和 WD40 形成不同的 MBW 复合物在花色素和其他类黄酮生物合成途径的调节中发挥着重要作用^[10]。

目前桃果实中花色苷组成、分布以及生物合成代谢途径已基本清楚^[11]。Tsuda 等^[12]研究发现 *PpCHS*、*PpDFR*、*PpUFGT* 是桃花色素生物合成过程中的关键结构基因。Zhao 等^[13]研究发现, 编码花色苷转运蛋白谷胱甘肽 S-转移酶的 *PpGST1* 基因不仅参与桃果实花色苷的积累, 其第 3 个外显子上发现两个功能等位基因缺失还可导致桃白花的形成。Zhao 等^[14]发现调控桃花色素合成的转录因子主要集中在 MYB、bHLH 和 WD40 这 3 类蛋白质组成的 MBW 蛋白复合体上, 参与花色苷合成基因的转录调控。

果实套袋积累花色苷这一现象不仅在桃中存在, 其他植物中也有发现。如‘京艳’葡萄中发现 COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1) 蛋白无论在光下还是黑暗中均定位于细胞质中, 不能介导 HY5 靶蛋白在黑暗中的降解, 因此即使套袋仍然积累花色苷^[15]。樱桃^[16]、梨^[17]和芒果^[18]的果实, 辣椒^[19]、茄子^[20]、芸豆^[21]的可食用部位和经过

T-DNA插入或EMS诱变的芜菁地下膨大肉质根^[22-23],以及菊花^[24]和百合^[25]的观赏部位在套袋后均积累花色苷,但对上述植物的花色苷合成相关基因、光受体蛋白(PHYB、URV8等)和光信号途径关键转录因子(COP1、HY5等)等进行转录水平的表达分析,并没有发现规律性的变化。也有研究表明,拟南芥AtPHYB蛋白第276个氨基酸由缬氨酸突变为组氨酸后,形成的显性错义等位基因AtYHB异源过表达番茄幼苗黑暗生长的下胚轴积累了大量的花色苷^[26]。

为了解套袋桃果实果皮色泽形成原因,本研究以‘中油蟠9号’套袋果实为材料,利用转录组学结合代谢组学的方法分析与套袋果实外果皮颜色相关的差异表达基因及显著差异代谢物,同时利用qRT-PCR进行验证。研究结果有助于理解套袋下桃果实花色苷合成模式,为筛选更多适宜套袋栽培的优质蟠桃品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用材料种植于中国农业科学院郑州果树研究所新乡基地。盛花后40 d,采用内黑外棕的双层不透明纸袋(150 mm×180 mm)对3棵长势一致的‘中油蟠9号’桃果实进行套袋遮光处理,分别于盛花后89 d和102 d观察套袋果实表型、测定果实外果皮色泽、取样。外果皮液氮速冻-80℃保存,用于后续转录组学和代谢组学分析。

1.2 试验方法

1.2.1 果实外果皮色泽测定 选3棵长势健壮的果树,每棵树都取结果部位相同的5个果实。色差仪CR-400在果实赤道位置测定色差值L*(明亮度值)、a*(红绿偏值)、b*(蓝黄偏值)^[4]。以a*/b*比值表示桃果实外果皮的颜色变化^[27]。数据为5个果实的6个着色区域a*/b*的平均值。

1.2.2 转录组学分析 总RNA提取、文库构建与质检、测序工作由北京诺和致源科技股份有限公司参与完成。每个时期使用2个生物学重复,盛花后89 d的‘中油蟠9号’桃外果皮组织分别命名为ZYP9_89_DAFB_1和ZYP9_89_DAFB_2,盛花后102 d的‘中油蟠9号’桃外果皮组织命名为ZYP9_102_DAFB_1和ZYP9_102_DAFB_2,其中DAFB表示盛花后天数。

经数据质控得到高质量 clean reads,使用

HISAT2将测序结果与参考基因组 *Prunus persica* whole genome assembly v2.0&annotation v2.1 (<https://www.rosaceae.org/>)^[4]进行比对。Feature Counts过滤掉比对质量低于10的reads后统计比对到参考基因组上的reads数目。随后根据基因长度计算每个基因的FPKM(Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments),DeSeq2筛选比较组合之间的差异表达基因,采用校正后 $P < 0.05$ 值以及 $|\log_2FC| \geq 1$ 作为筛选显著差异表达基因的条件。使用GO和KEGG数据库对 $P < 0.05$ 的差异表达基因进行功能注释和代谢通路富集分析。

1.2.3 代谢组学分析 取‘中油蟠9号’盛花后89 d和102 d套袋桃果实外果皮样品,冻干机真空冷冻干燥后研磨至粉末状,称取50 mg粉末溶解于1.2 mL 70%甲醇提取液中,30 min涡旋一次,每次30 s,共6次,12000 r/min离心3 min后,吸取上清,用微孔滤膜(0.22 μm)过滤后保存,用于后期超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)分析。采用UPLC-MS/MS进行数据采集。基于迈维自建数据库MWDB,根据二级谱信息进行物质定性分析;基于本地代谢数据库HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)、MoToDB(<http://www.ab.wur.nl/moto/>)和METLIN(<http://metlin.scripps.edu/index.php>)对其共同一代代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正^[28-29]。以 $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$ 作为显著差异代谢物的筛选标准。以每个色谱峰的峰面积(Area)代表对应花色苷物质的相对含量。

1.2.4 转录组和代谢组关联性分析 分别将转录组和代谢组学筛选出的差异表达基因与显著差异代谢物进行KEGG注释(富集)分析,找出共同富集通路,并绘制与外果皮颜色相关的关键基因和代谢物之间的网络图。

1.2.5 qRT-PCR验证 为验证数据准确性,对外果皮花色苷合成相关的9个显著差异表达基因进行实时定量PCR验证。以PpActin作为内参基因^[30],NCBI中Primer blast设计引物,2^{-ΔΔCt}法进行相对表达量计算,引物见表1。总RNA提取参照天根RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(DP441),反转录参照天根FastKing cDNA第一链合成试剂盒(KR116)合成。以稀释10倍的cDNA溶液为模板,qRT-PCR反应体系与程序参照天根Talent荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)(FP209)的说明书。

表1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

引物名称 Primer name	基因名称 Gene ID	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>PpActin</i>	Prupe.8G132000	TGCCATTGAAATCCTGAAAC	ACCAATTGGATCATCCTCCT
<i>PpPAL</i>	Prupe.6G235400	CAGAGCAGCACAAACCAAGACG	CTCCAAATGCCTCAAATCAATG
<i>PpC4H</i>	Prupe.6G040400	GGACGCTCAGCAGAAGGGA	TGGATCTCAGGGTGGTTCACA
<i>Pp4CL</i>	Prupe.2G326300	AGATGAGGCTGCTGGTGAAGT	TTGGAATGGCATGGATGAAGT
<i>PpCHS</i>	Prupe.1G002900	AACAAGGGTGCTCGTGTTC	GCTGCACCATCACCGAATAAG
<i>PpCHI</i>	Prupe.2G225200	GAGATCGTTACAGGTCCATTG	GTGGGAAGTTTGTATCCTTGA
<i>PpF3H</i>	Prupe.7G168300	GGACTGGACACAGAGGCATT	AATTGTGCCTGGGTCAGTGT
<i>PpF3'H</i>	Prupe.5G203600	CTCTCGCTCAAAGAGGATGC	CCATTCCACTGTGCTTGATG
<i>PpDFR</i>	Prupe.1G376400	CGCCTCCAAGACTCTAGCTG	CCAGTGAGTGGGGAAAGTCC
<i>PpANS</i>	Prupe.5G086700	AGGAGTTGAAGAAGGCAGCA	GCCTGGTCATTGGCATACTT

2 结果与分析

2.1 ‘中油蟠9号’套袋果实外果皮着色表现

盛花后 89 d‘中油蟠 9 号’果实外果皮色泽开始变红,至盛花后 102 d(成熟期)着色稳定,说明套袋遮光后果实外果皮依然有花色苷合成(图 1A)。代

谢物检测也显示桃中主要花色苷(矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷)在盛花后 102 d 的含量显著高于盛花后 89 d(图 1B)。此外,色差仪测定套袋果实外果皮色泽发现盛花后 102 d 的 a^*/b^* 比值高于盛花后 89 d (图 1B),与外果皮色泽变化和花色苷含量表现出类似的趋势。

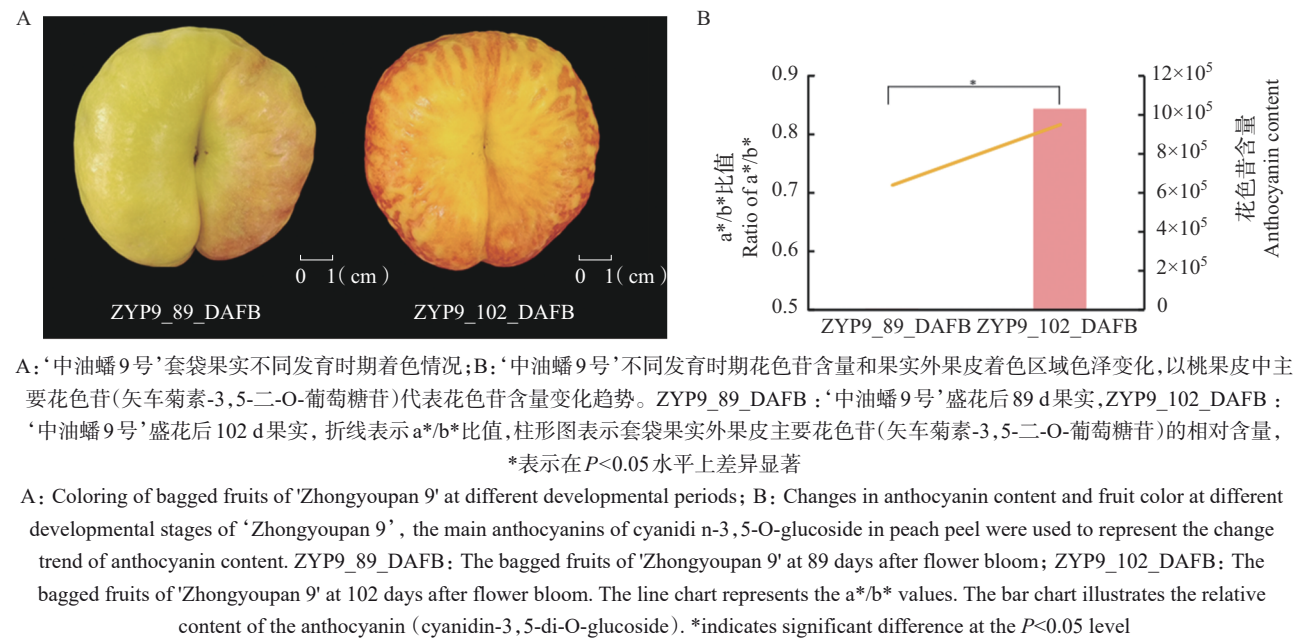


图1 ‘中油蟠9号’套袋果实外果皮着色和花色苷含量分析

Fig. 1 Analysis of exocarp coloring and anthocyanin content of 'Zhongyoupan9' under bagging conditions

2.2 转录组学分析

2.2.1 测序质量分析 对盛花后 89 d 和盛花后 102 d ‘中油蟠 9 号’套袋果实外果皮 RNA 样品进行 cDNA 文库构建并测序,raw data 经过滤后共获得 26.51Gb clean data,各样品 clean data 均在 5.88Gb 以

上(表 2)。样本错误率 $\leq 0.03\%$,Q20 均大于 97%、Q30 的均大于 93%。2 个时期的 clean data 与参考基因组的特异比对率在 95% 左右,表明测序数据与参考基因组匹配度高,适合进一步分析。

表2 转录组测序数据统计

Table 2 Statistics of transcriptome sequencing datasets

样本ID Sample ID	干净读数(Gb) Clean data	Q20(%)	Q30(%)	GC含量(%) GC content	错误率(%) Error rate	总比对率(%) Total map	特异比对率(%) Unique map
ZYP9_89_DAFB_1	6.83	98.08	94.12	45.56	0.02	97.57	95.41
ZYP9_89_DAFB_2	6.77	97.99	93.91	45.39	0.03	97.35	95.17
ZYP9_102_DAFB_1	7.03	98.00	93.95	45.28	0.03	97.89	95.46
ZYP9_102_DAFB_2	5.88	98.21	94.34	45.65	0.02	97.85	94.94

_1、_2表示2份重复

_1、_2 represents 2 repetitions

2.2.2 差异表达基因筛选 以校正后 $P < 0.05$ 值以及 $|\log_2 FC| \geq 1$ 为筛选标准,共筛选到2652个显著差异表达基因,包括上调差异表达基因1153个,下调差异表达基因1499个(图2A)。对2652个显著差异表达基因进行聚类分析,热图显示这些基因聚为2类(图2B)。经注释,差异比较组合中共筛选出16个与花色苷合成相关的结构基因和转录因子(表3),花色苷合成途径早期结构基因*PpPAL*(Prupe.6G235400),*PpC4H*(Prupe.6G040400),*Pp4CLs*(Prupe.2G326300、Prupe.5G154100),*PpCHSs*(Prupe.1G002900、Prupe.1G003000、Prupe.I005800、Prupe.I005700),

PpCHIs(Prupe.2G225200、Prupe.2G263900),*PpF3H*(Prupe.7G168300),*PpF3'H*(Prupe.5G203600),花色苷合成途径晚期结构基因*PpDFR*(Prupe.1G376400),*PpANS*(Prupe.5G086700),*PpUFGT*(Prupe.2G324700),*PpGST*(Prupe.3G013600)等16个基因均上调表达,表达模式与花色苷含量相关,其中*PpGST*盛花后102 d表达量在所有结构基因中最高(FPKM>750),极显著高于盛花后89 d($\log_2 FC$ 为9.38)。上述基因均是花色苷合成通路中的结构基因,表明‘中油蟠9号’果实套袋遮光后花色苷生物合成相关酶依然发挥功能,促进外果皮呈现红色。

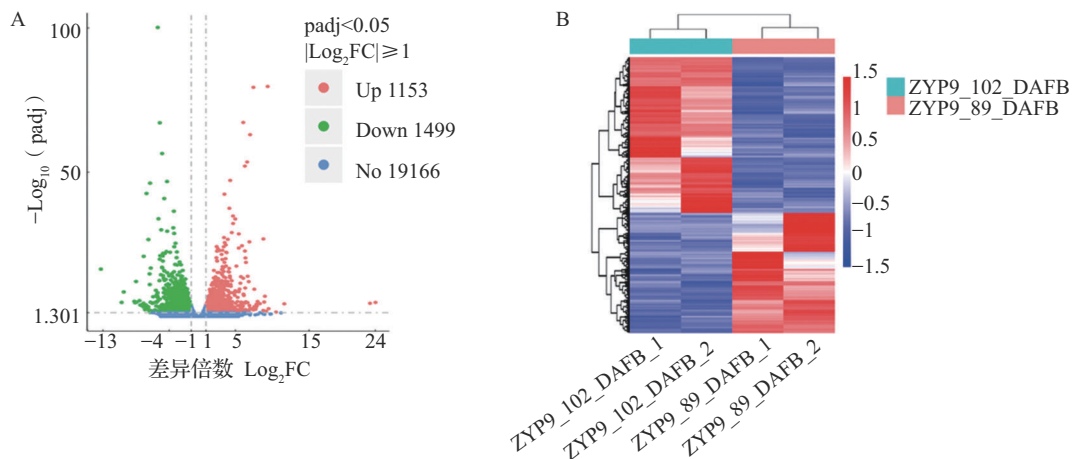


图2 ‘中油蟠9号’不同发育时期套袋果实差异表达基因分析
Fig. 2 Analysis of differentially expressed genes of ‘Zhongyoupan 9’ at different developmental stages under bagging conditions

表3 花色苷合成相关结构基因和转录因子表达情况

Table 3 Transcriptional profiles of structural genes and transcription factors related to anthocyanin biosynthesis

关键差异 表达基因 The major DEGs	基因名称 Gene ID	注释 Annotation	ZYP9_102_DAFB (FPKM)	ZYP9_89_DAFB (FPKM)	$\log_2 FC$	类型 Type
结构基因 Structural genes	Prupe.6G235400	<i>PpPAL</i> (Phenylalanine ammonia-lyase)	20.47	0.66	4.98	上调*
	Prupe.6G040400	<i>PpC4H</i> (Cinnamic acid 4-hydroxylase)	53.81	10.19	2.42	上调*
	Prupe.2G326300	<i>Pp4CL</i> (4-Coumarate:coenzyme A ligase)	35.38	2.84	3.66	上调*

表3 (续)

关键差异 表达基因 The major DEGs	基因名称 Gene ID	注释 Annotation	ZYP9_102_DAFB (FPKM)	ZYP9_89_DAFB (FPKM)	Log ₂ FC	类型 Type
结构基因 Structural genes	Prupe.5G154100	<i>Pp4CL</i> (4-Coumarate:coenzyme A ligase)	43.91	20.45	1.12	上调*
	Prupe.1G002900	<i>PpCHS</i> (Chalcone Synthase)	287.41	1.67	7.45	上调*
	Prupe.1G003000	<i>PpCHS</i> (Chalcone Synthase)	91.15	2.10	5.46	上调*
	Prupe.I005800	<i>PpCHS</i> (Chalcone Synthase)	248.57	3.07	6.36	上调*
	Prupe.I005700	<i>PpCHS</i> (Chalcone Synthase)	23.86	0.28	6.43	上调*
	Prupe.2G225200	<i>PpCHI</i> (Chalcone isomerase)	174.85	85.38	1.06	上调*
	Prupe.2G263900	<i>PpCHI</i> (Chalcone isomerase)	14.22	2.34	2.62	上调*
	Prupe.7G168300	<i>PpF3H</i> (Flavanone 3-hydroxylase gene)	174.67	66.19	1.42	上调*
	Prupe.5G203600	<i>PpF3'H</i> (Flavonoid 3'-hydroxylase)	461.93	144.53	1.70	上调*
	Prupe.1G376400	<i>PpDFR</i> (Dihydroflavonol 4-reductase)	373.64	8.62	5.46	上调*
	Prupe.5G086700	<i>PpANS</i> (Anthocyanidin synthase)	912.98	103.04	3.17	上调*
	Prupe.2G324700	<i>PpUGT</i> (UDP-glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase)	337.62	5.12	6.07	上调*
	Prupe.3G013600	<i>PpGST</i> (Glutathione S-transferase)	764.23	1.16	9.38	上调**
	Prupe.3G163100	<i>PpMYB10.1</i>	45.57	4.07	3.51	上调*
转录因子 Transcription factors	Prupe.5G006200	<i>PpBL</i> (BLOOD)	6.43	0.58	3.51	上调*
	Prupe.4G187100	<i>PpNAC</i> (NAM, ATAF1/2, CUC1/2)	769.33	279.90	1.48	上调*

*表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著,**表示在 $P<0.01$ 水平上差异极显著;下同
*indicates significant difference at the $P<0.05$ level, ** indicates extremely significant difference at the $P<0.01$ level; The same as below

转录因子在花色苷生物合成中起重要调控作用。差异表达基因中筛选出与桃花色苷合成相关的调节基因仅有 *PpMYB10.1* (Prupe. 3G163100), Log_2FC 约为 3.51,表明套袋后仅 *PpMYB10.1* 被诱导上调表达(表 3)。除此之外,通过相关性分析筛选与花色苷合成相关基因共表达的差异转录因子,发现共有 56 个转录因子套袋后特异性上调表达,分别属于 MYB、bHLH、WD40、bZIP、C2H2、COP1、ERF、NAC、BL、WRKY 转录因子家族。已有报道 NAC 家族中 *PpNAC1* (Prupe.4G187100)与 *PpBL* (Prupe.5G006200)蛋白形成二聚体诱导 *PpMYB10.1* 的表达,促进桃果肉中花色苷积累并导致血桃性状的形成^[25]。

据此推测 *PpBL* 可能通过与 *PpNAC1* 互作上调 *PpMYB10.1* 的表达促进套袋果实外果皮花色苷生物合成。

套袋遮光影响果实花色苷合成,从差异表达基因中筛选出 4 个与光受体和光信号转导相关的基因(表 4),其中与盛花后 89 d 相对比,光受体 *PpPHYE* (Phytochrome E)和 *PpPIF* (Phytochrome interacting factor)在盛花后 102 d 表达模式均呈下降趋势,而光受体 *PpCRY3* (Cryptochrome)和 *PpUVR8.3* (UV Resistance locus8)表达量却有不同程度的增加,表明 *PpCRY3* 和 *PpUVR8.3* 可能在‘中油蟠 9 号’果实套袋后对果皮花色苷的积累起到了重要作用。

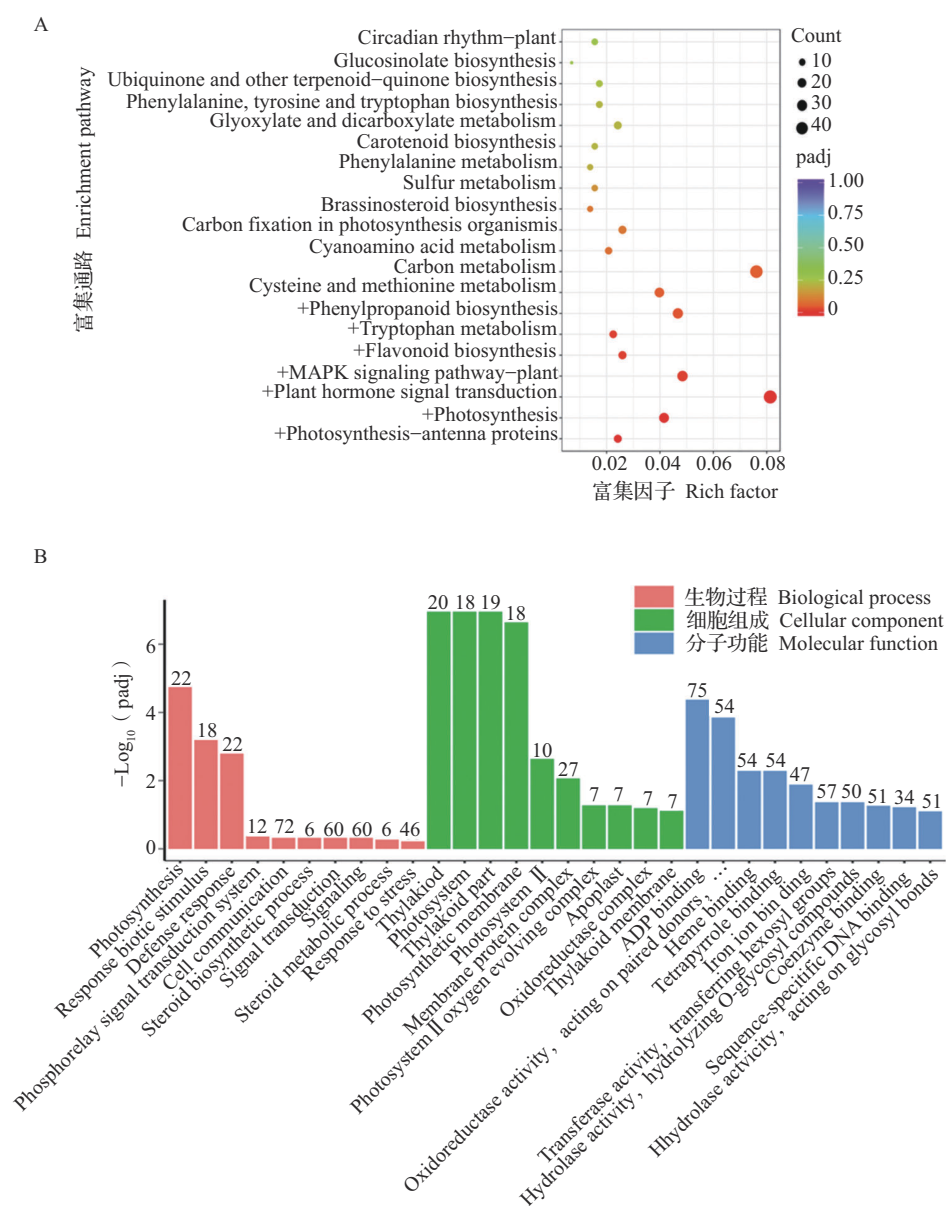
表4 光受体相关基因的表达情况
Table 4 Transcriptional profile of genes associated with light receptors

基因名称 Gene ID	注释 Annotation	ZYP9_102_DAFB (FPKM)	ZYP9_89_DAFB (FPKM)	Log ₂ FC	类型 Type
Prupe.3G179800	<i>PpPIF</i> (Phytochrome interacting factor)	0.21	2.82	-3.40	下调**
Prupe.4G073900	<i>PpPHYE</i> (Phytochrome E)	5.30	19.42	-1.82	下调**
Prupe.1G462400	<i>PpCRY3</i> (Cryptochrome)	7.92	3.45	1.07	上调**
Prupe.1G239800	<i>PpUVR8.3</i> (UV Resistance locus8)	117.99	51.50	1.15	上调**

2.2.3 KEGG 和 GO 富集分析 对 2652 个差异表达基因进行 KEGG 富集分析,共富集到 108 条通路,对显著富集通路进行分析。分别为光合作用天线蛋白(Photosynthesis - antenna proteins)、光合作用(Photosynthesis)、植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway-plant)、类黄酮生物合成(Flavonoid biosynthesis)、色氨酸代谢(Tryptophan metabolism)、苯丙烷类生物合成(Phenylpropanoid

biosynthesis)(图 3A),基因数目分别为 14 个、24 个、47 个、28 个、15 个、13 个和 27 个。其中植物激素信号转导通路富集到的基因最多。

为进一步分析差异表达基因的生物学功能,对 2652 个差异表达基因进行 GO 富集分析,通过 Nr 注释得到与花色苷生物合成有关基因并将其与 GO 条目进行对应(图 3B)。结果表明,5 条 GO 条目富集到与花色苷生物合成相关的基因,其中已糖基转移酶活性(GO:0016758, Transferase activity, transferring



A: KEGG 前 20 条富集通路, + 代表显著富集到的 KEGG 通路, 下同; B: GO 注释前 30 个富集结果, 数值代表注释到 GO 编号上的差异表达基因数

A: The top 20 enriched of KEGG pathways, + represents the significant KEGG pathways, the same as below;

B: GO annotated of the top 30 biological processes

图 3 ‘中油蟠9号’不同发育时期套袋果实差异表达基因富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of differentially expressed genes of ‘Zhongyoupan 9’ at different developmental periods under bagging conditions

hexosyl groups)、氧化还原酶活性,作用于成对供体,并结合或还原分子氧(GO: 0016705, Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen)、辅酶结合(GO: 0050662, Coenzyme binding)富集到的差异表达基因最多,分别为57个、54个、51个。其中花色苷合成相关基因7个,分别为 *PpC4H* (Prupe. 6G040400), *PpCHIs* (Prupe. 2G225200, Prupe. 2G263900), *PpF3'H* (Prupe. 5G203600), *PpDFR* (Prupe. 1G376400), *PpUFGT* (Prupe. 2G324700), *PpSPL* (Prupe. 4G050400)。

2.3 代谢组学分析

相对于盛花后89 d,盛花后102 d果实共检测到514种差异代谢物,其中显著差异代谢物112种。热图显示上调差异代谢物53种,下调差异代谢物59

种(图4A)。按照黄酮类物质不同合成路径,112种代谢物分为查耳酮、二氢黄酮、二氢黄酮醇、酚酸类、花色苷、黄酮、黄酮醇、黄烷醇类等13大类(图4B)。对112种差异表达代谢物进行KEGG富集分析,共富集到15条通路(图4C),其中显著富集到花色苷生物合成途径(ko00942, Anthocyanin biosynthesis)和类黄酮生物合成途径(ko00941, Flavonoid biosynthesis)。涉及代谢物有矢车菊素-3-O-芸香糖苷、矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-芸香糖苷、天竺葵素-3-O-葡萄糖苷、柚皮素、柚皮素查耳酮、根皮素、5-O-对香豆酰奎宁酸、表没食子儿茶素、花旗松素(二氢槲皮素)、槲皮素、表阿夫儿茶精、3,4,2',4',6'-五羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷、香橙素(二氢山柰酚)、没食子儿茶素共16种(表5)。

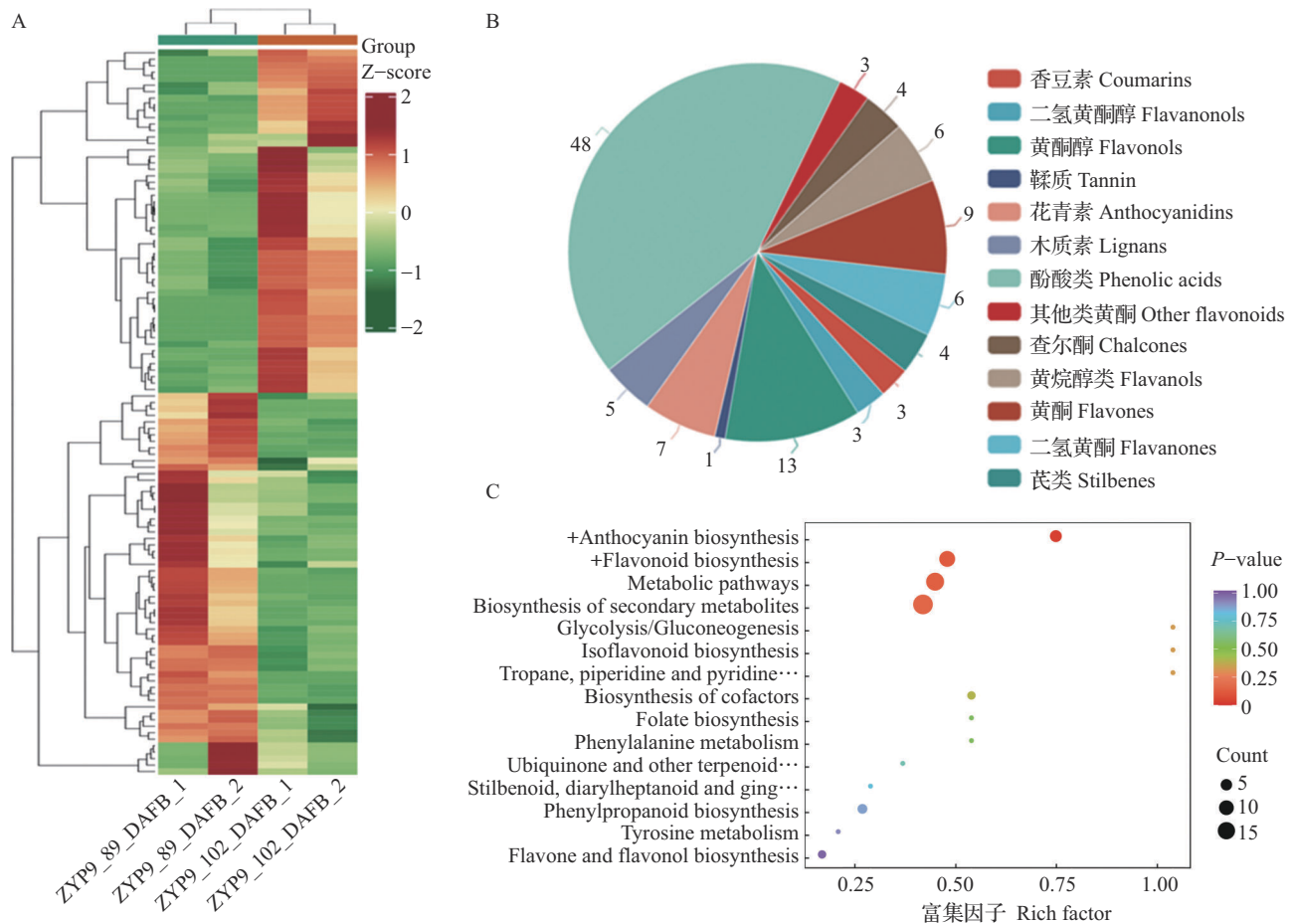


图4 ‘中油蟠9号’不同发育时期套袋果实显著差异代谢物分析
Fig. 4 Analysis of differential metabolites of 'Zhongyoutan 9' at different developmental periods under bagging conditions

表5 KEGG显著富集到的花色苷和类黄酮合成通路代谢物
Table 5 Metabolites of the anthocyanin and flavonoid biosynthesis pathways significantly enriched by KEGG

KEGG通路 KEGG pathway	代谢物名称 Metabolite name	Log ₂ FC	P-value	类型 Type
花色苷合成 Anthocyanin biosynthesis	矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷	16.80	0.040	上调**
	矢车菊素-3-O-芸香糖苷	-1.29	0.085	下调*
	飞燕草素-3-O-葡萄糖苷	1.09	0.018	上调*
	飞燕草素-3-O-芸香糖苷	-1.14	0.299	下调*
	天竺葵素-3-O-葡萄糖苷	1.55	0.017	上调**
类黄酮合成 Flavonoid biosynthesis	柚皮素	-1.70	0.597	下调
	柚皮素查耳酮	-1.42	0.625	下调
	根皮素	2.36	0.094	上调
	5-O-对香豆酰奎宁酸	-1.22	0.390	下调
	表没食子儿茶素	-1.36	0.112	下调
	花旗松素(二氢槲皮素)	1.60	0.078	上调
	槲皮素	-1.11	0.175	下调
	表阿夫儿茶精	1.07	0.546	上调
	3,4,2',4',6'-五羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷	4.06	0.151	上调
	香橙素(二氢山柰酚)	-1.38	0.632	下调
	没食子儿茶素	2.03	0.187	上调

结合 KEGG 通路富集结果,5 种花色苷被显著富集(图 5)。其中矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷作为桃中主要的花色苷^[26],在盛花后 102 d 套袋果实中的含量显著高于盛花后 89 d 约 16.8 倍。飞燕草素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-葡萄糖苷含量也显著上调,上调倍数分别为 1.09、1.55。而矢车菊素-3-O-芸香糖苷和飞燕草素-3-O-芸香糖苷含量显著下调,下调倍数分别为 1.29、1.14。结合‘中油蟠 9 号’套袋果实外果皮红色表型,表明下调积累的花色苷并未影响‘中油蟠 9 号’套袋果实着色,因此推测外果皮中矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷的持续积累是其呈现红色的主要原因。

2.4 转录组与代谢组的联合分析

转录组与代谢组联合分析共同富集到了类黄酮通路(ko00941)和苯丙烷生物合成(ko00940),包含 14 个差异表达基因和 13 个显著差异代谢物(图 6A)。其中 13 个差异表达基因均上调表达参与花色苷合成(图 6B),如花色苷合成早期结构基因 *PpPAL*(Prupe.6G235400)、*PpC4H*(Prupe.6G040400)、*Pp4CL*(Prupe.2G326300)、*PpCHS*(Prupe.1G002900、Prupe.1G003000、Prupe.I005800、Prupe.I005700)、*PpCHI*(Prupe.2G225200、Prupe.2G263900)、*PpF3H*(Prupe.7G168300)、*PpF3'H*(Prupe.5G203600)和花色

苷合成途径晚期结构基因 *PpDFR*(Prupe.1G376400)、*PpANS*(Prupe.5G086700)。这些基因上调表达与显著富集到差异代谢物矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷上调积累结果一致,表明‘中油蟠 9 号’套袋果实中花色苷合成相关结构基因上调表达,促进花色苷积累,外果皮颜色呈现红色。

结合转录组数据分析中的转录因子结果,推测套袋遮光下 *PpBL*、*PpNAC1* 上调表达激活花色苷调节基因 *PpMYB10.1* 的表达,促进花色苷结构基因催化合成矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷,使‘中油蟠 9 号’外果皮呈现红色。

2.5 qRT-PCR 验证关键差异表达基因

选择联合分析富集到的花色苷合成通路中的 9 个基因进行 qRT-PCR 验证。发现花色苷合成途径早期结构基因 *PpPAL* (Prupe. 6G23540)、*PpC4H* (Prupe. 2G326300)、*Pp4CL* (Prupe. 6G040400)、*PpCHS*(Prupe.1G002900)、*PpCHI*(Prupe.2G225200)和晚期结构基因 *PpF3H*(Prupe.7G168300)、*PpF3'H* (Prupe. 5G203600)、*PpDFR* (Prupe. 1G376400)、*PpANS*(Prupe.5G086700)在‘中油蟠 9 号’盛花后 102 d 均上调表达,qRT-PCR 结果与转录组数据表现出相似的表达趋势(图 7)。

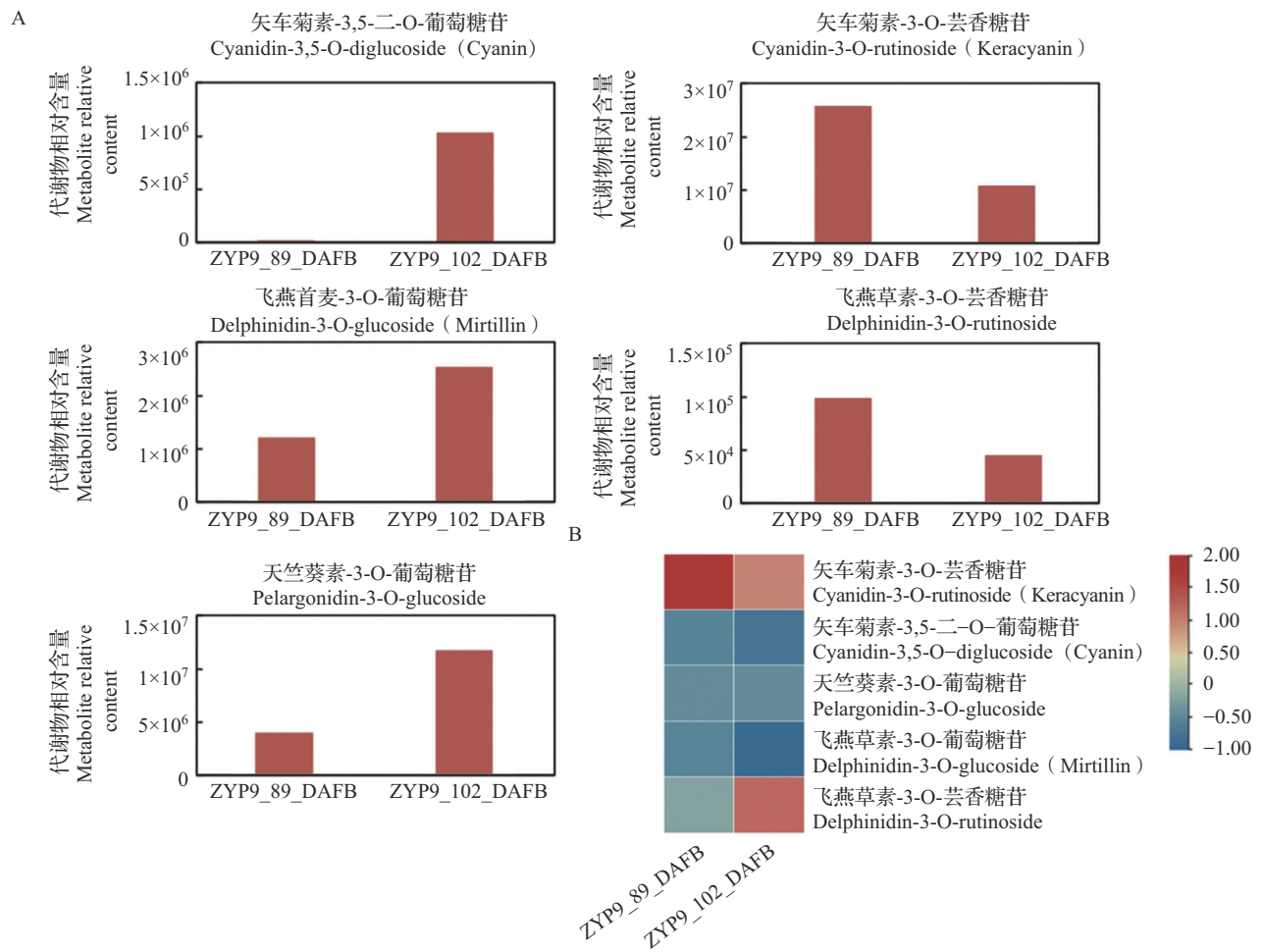
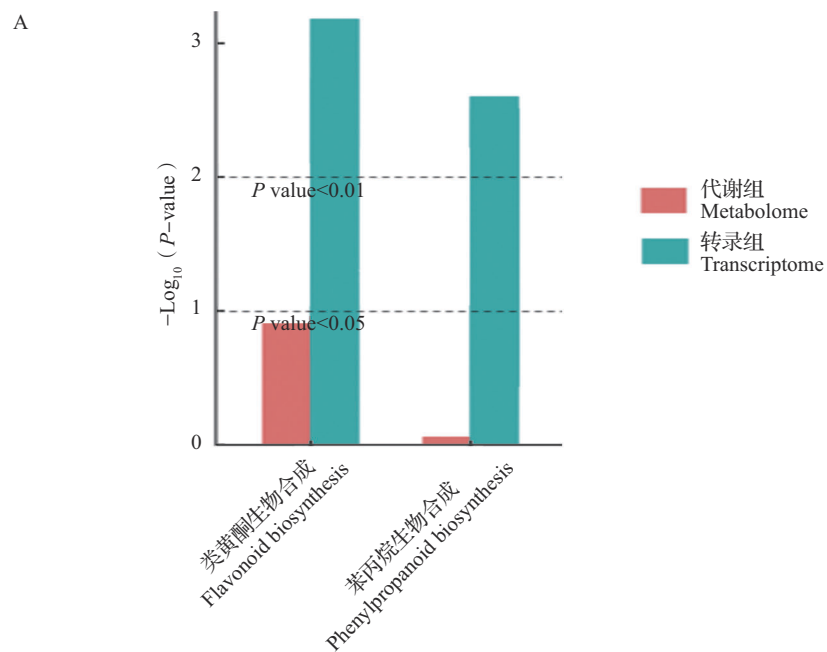
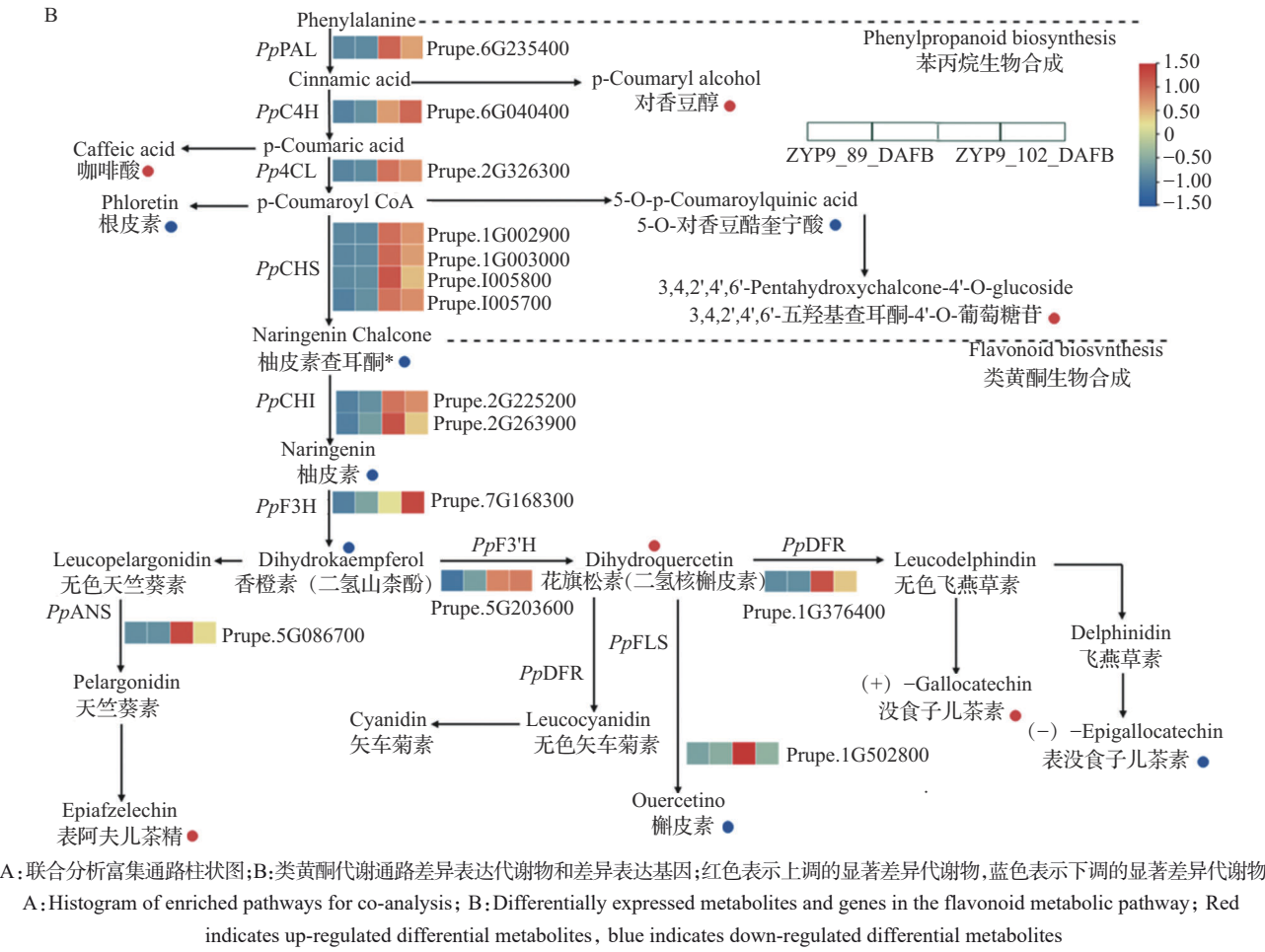


图5 ‘中油蟠9号’不同发育时期套袋果实花色苷显著差异代谢物分析

Fig. 5 Analysis of differential metabolites of anthocyanin of 'Zhongyoupan 9' at different developmental periods under bagging conditions



(图6)



A: 联合分析富集通路柱状图; B: 类黄酮代谢通路差异表达代谢物和差异表达基因; 红色表示上调的显著差异代谢物, 蓝色表示下调的显著差异代谢物
A: Histogram of enriched pathways for co-analysis; B: Differentially expressed metabolites and genes in the flavonoid metabolic pathway; Red indicates up-regulated differential metabolites, blue indicates down-regulated differential metabolites

图6 转录组与代谢组联合分析

Fig. 6 Integrated analysis of transcriptomic and metabolomics data

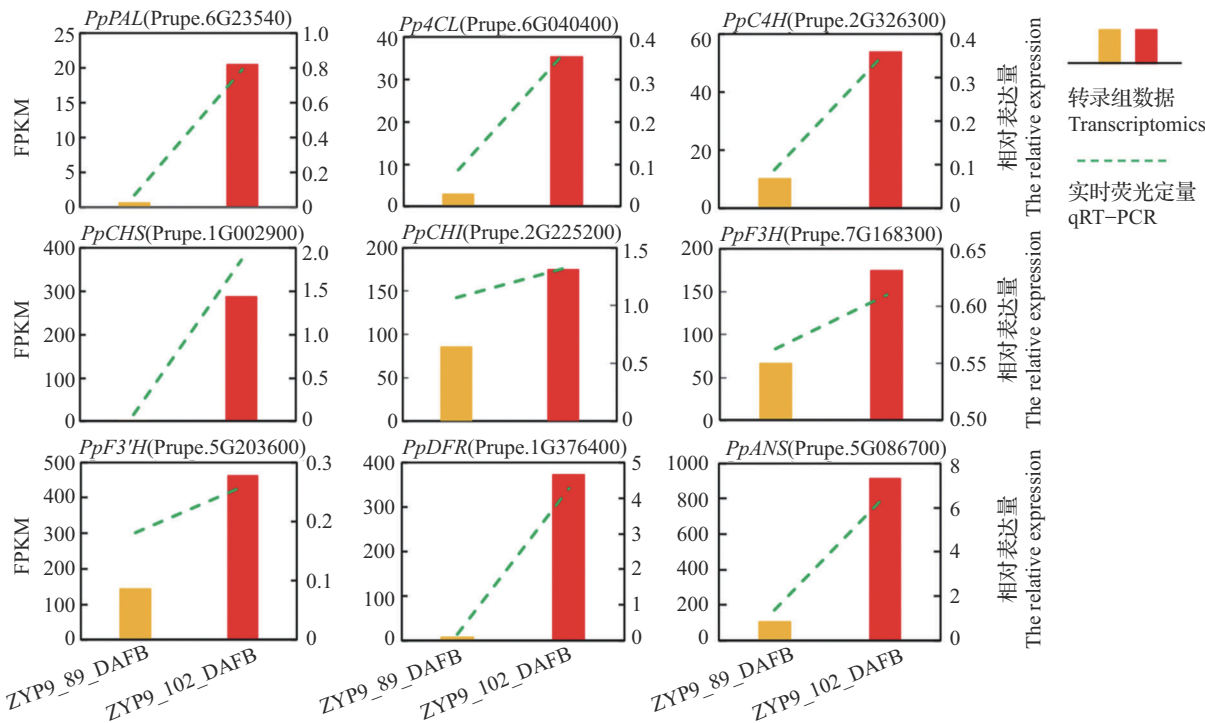


图7 9个关键基因的qRT-PCR验证

Fig. 7 qRT-PCR validation of nine key genes

3 讨论

近年来,随着产业不断升级,桃品种更新换代加速,蟠桃、油蟠桃备受青睐。自然生长的蟠桃果实外观粗糙、易裂果、售价低,套袋后的蟠桃果面干净、食用方便、风味绝佳、品质高端。本研究选择的品种‘中油蟠9号’套袋后果皮色泽微红,有花青素合成,风味更好,但此种现象还未得到深入研究。研究结果表明‘中油蟠9号’果实套袋积累花色苷现象主要受矢车菊素、天竺葵素和飞燕草素及其衍生物的影响。

3.1 ‘中油蟠9号’果实套袋积累花色苷的原因

很多园艺植物在遮光条件下可以积累花色苷。如茄子中发现套袋条件下依然有花色苷合成的材料‘145’,通过比较转录组分析,鉴定出22个转录因子和4个参与光信号转导的基因可能是调控非光敏感茄子花色苷合成的关键因素,但并未解析这些基因是怎样相互作用影响茄子的光不敏感性^[20]。樱桃和葡萄中也发现套袋后果皮依然着色的现象^[15-16]。本研究材料‘中油蟠9号’套袋果实在盛花后89 d果实外果皮色泽开始变红,至盛花后102 d(成熟期)着色稳定。色差值结果表明盛花后102 d的 a^*/b^* 比值高于盛花后89 d,与‘中油蟠9号’外果皮色泽变化表现出类似的趋势。类黄酮显著差异代谢物分析发现‘中油蟠9号’套袋果实发育过程中矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-葡萄糖苷显著上调积累。因此推测遮光下主要是由于花色苷的不断积累使‘中油蟠9号’外果皮呈现红色。

3.2 花色苷代谢途径基因上调表达促进‘中油蟠9号’套袋果实花色苷的积累

桃果实花色苷的合成受多个基因控制。‘中油蟠9号’果实套袋后,花色苷代谢途径中早期结构基因 *PpPAL*、*PpC4H*、*Pp4CL*、*PpCHS*、*PpCHI* 和晚期结构基因 *PpF3H*、*PpF3'H*、*PpDFR*、*PpFLS*、*PpANS* 均上调表达,并与其代谢物含量检测结果一致(图7),为花色苷合成提供了前期产物积累。而其他遮光积累花色苷园艺植物关键基因与之不同。深入分析转录组结果发现‘中油蟠9号’果实套袋后花色苷合成相关通路基因整体表达水平发生变化,进一步显示关键调节基因应该是存在于花色苷合成途径的上游信号通路中,从而使遮光条件下的桃果实积累花色苷。分析发现共有56个转录因子套袋后特异性上调表达,分别属于 MYB、bHLH、WD40、bZIP、C2H2、COP1、ERF、NAC、WRKY 转录因子家

族。其中仅有 NAC 家族中 *PpNAC1* 被 Zhou 等^[31]报道与 *PpBL* 蛋白形成二聚体诱导 *PpMYB10.1* 的表达,促进桃果肉中花色苷积累并导致血桃性状的形成。除此之外,差异表达基因中光敏色素蛋白 *PpPHYE*、隐花色素蛋白 *PpCRY3* 和 UV-B 受体蛋白 *PpUVR8.3*,以及光信号转导因子 *PpSPA3* (SUPPRESSOR OF PHYA)、*PpPIF2*、*PpHY5* 在‘中油蟠9号’中均上调表达,作为后续研究的关键转录因子,这部分内容还需要深入研究。

以上结果表明,套袋遮光下 *PpBL* 可能与 *PpNAC1* 互作上调表达激活花色苷调节基因 *PpMYB10.1* 的表达,促进花色苷结构基因催化合成矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷,使‘中油蟠9号’套袋果实果皮呈现红色。本研究中检测到的花色苷及其相关基因为花色苷生物合成途径在油蟠桃果皮着色中发挥重要的代谢和功能作用提供了依据。研究结果将有助于分子育种工作者改良油蟠桃果实品质。

参考文献

- [1] 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(1):5
- [2] 王力荣. 我国桃产业现状与发展建议. *中国果树*, 2021, 216(10):1-5
Wang L R. Current situation and development suggestions of peach industry in China. *China Fruit Trees*, 2021, 216(10):1-5
- [3] 王力荣. 中国桃品种改良历史回顾与展望. *果树学报*, 2021, 38(12):2178-2195
Wang L R. Historical review and prospect of peach variety improvement in China. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(12):2178-2195
- [4] 赵云. 两品种桃外果皮花色苷积累差异及光照调控机制. 杭州:浙江大学, 2019
Zhao Y. Differences in anthocyanosides' accumulation in peach pericarp of two varieties and light regulation mechanism. Hangzhou: Zhejiang University, 2019
- [5] Kapoor L, Simkin A J, George Priya Doss C, Siva R. Fruit ripening: Dynamics and integrated analysis of carotenoids and anthocyanins. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1):27
- [6] Li Y X, Lu Y P, Tang D G, Hu B, Zhang Z Y, Wu H W, Fan L J, Cai K W, Tang C, Zhang Y Q, Hong L, Dong J J, Guan B Z, Yin L H, Dai Y, Bai W B, Zheng Z H, Zhu T. Anthocyanin improves kidney function in diabetic kidney disease by regulating amino acid metabolism. *Journal of Translational Medicine*, 2022, 20(1):510
- [7] Zhang Y, Butelli E, Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014,

- 19:81-90
- [8] Chen L, Wang X S, Cui L, Li Y B, Liang Y H, Wang S S, Chen Y B, Zhou L, Zhang Y B, Li F. Transcriptome and metabolome analyses reveal anthocyanins pathways associated with fruit color changes in plum (*Prunus salicina* Lindl.). *PeerJ*, 2022, 10:e14413
 - [9] Zhao Y, Dong W Q, Wang K, Zhang B, Allan A C, Lin-Wang K, Chen K S, Xu C J. Differential sensitivity of fruit pigmentation to ultraviolet light between two peach cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:282287
 - [10] Ma C Q, Liang B W, Chang B, Yan J Y, Liu L, Wang Y, Yang Y Z, Zhao Z Y. Transcriptome profiling of anthocyanin biosynthesis in the peel of 'Granny Smith' apples (*Malus domestica*) after bag removal. *BMC Genomics*, 2019, 20:353
 - [11] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126(2):485-493
 - [12] Tsuda T, Yamaguchi M, Honda C, Moriguchi T. Expression of anthocyanin biosynthesis genes in the skin of peach and nectarine fruit. *Journal of The American Society for Horticultural Science*, 2004, 129(6):857-862
 - [13] Zhao Y, Dong W Q, Zhu Y C, Allan A C, Wang L K, Xu C J. *PpGST1*, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene, is essential for fruit coloration in peach. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(5):1284-1295
 - [14] Zhao L, Sun J L, Cai Y M, Yang Q R, Zhang Y Q, Ogutu C O, Liu J J, Zhao Y, Wang F R, He H Q, Zheng B B, Han Y P. *PpHYH* is responsible for light-induced anthocyanin accumulation in fruit peel of *Prunus persica*. *Tree Physiology*, 2022, 42(8):1662-1677
 - [15] 郭少剑. 去光条件下葡萄果皮中 VvHY5 和 VvCOP1 的转录和蛋白表达分析. 武汉:中国科学院研究生院(武汉植物园), 2016
 - Guo S J. Transcription and protein expression analysis of VvHY5 and VvCOP1 in grape peel under light-removing conditions. Wuhan: Graduate University of Chinese Academy of Sciences(Wuhan Botanical Garden), 2016
 - [16] Guo X, Wang Y T, Zhai Z F, Huang T J, Zhao D, Peng X, Feng C, Xiao Y H, Li T H. Transcriptomic analysis of light-dependent anthocyanin accumulation in bicolored cherry fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130:663-677
 - [17] Zhu Y F, Su J, Yao G F, Liu H N, Gu C, Qin M F, Bai B, Cai S S, Wang GM, Wang R Z, Shu Q, Wu J. Different light-response patterns of coloration and related gene expression in red pears (*Pyrus L.*). *Scientia Horticulture*, 2018, 229:240-251
 - [18] Shi B, Wu H X, Zheng B, Qian M J, Gao A P, Zhou K B. Analysis of light-independent anthocyanin accumulation in mango (*Mangifera indica* L.). *Horticulturae*, 2021, 7(11):423
 - [19] Tang B Y, L L, Hu Z L, Chen Y N, Tan T T, Jia Y H, Xie Q L, Chen G P. Anthocyanin accumulation and transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in purple pepper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (43): 12152-12163
 - [20] He Y J, Chen H, Zhou L, Liu Y, Chen H Y. Comparative transcription analysis of photosensitive and non-photosensitive eggplants to identify genes involved in dark regulated anthocyanin synthesis. *BMC Genomics*, 2019, 20:1-14
 - [21] Hu J T, Chen G P, Zhang Y J, Cui B L, Yin W C, Yu X H, Zhu Z G, Hu Z L. Anthocyanin composition and expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in kidney bean pod. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 97:304-312
 - [22] Wang X Z, Wang Y, Chen B W, Kawabata S, Fang Z Y, Li Y H. Construction and genetic analysis of anthocyanin-deficient mutants induced by T-DNA insertion in 'Tsuda' turnip (*Brassica rapa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 131: 431-443
 - [23] Yang J F, Chen Y Z, Saneyuki K, Li Y H, Yu W. Identification of light-independent anthocyanin biosynthesis mutants induced by ethyl methane sulfonate in turnip "Tsuda" (*Brassica rapa*). *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7):1288
 - [24] Huang H, Li Y, Dai S. Investigation of germplasm in chrysanthemum cultivars with light-independent coloration. *Acta Horticulturae*, 2016, 1185(9):55-64
 - [25] Nakatsuka A, Yamagishi M, Nakano M, Tasaki K, Kobayashi N. Light-induced expression of basic helix-loop-helix genes involved in anthocyanin biosynthesis in flowers and leaves of Asiatic hybrid lily. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121(1):84-91
 - [26] Hu W, Figueroa-Balderas R, Chi-Ham C, Lagarias J C. Regulation of monocot and dicot plant development with constitutively active alleles of phytochrome B. *Plant Direct*, 2020, 4(4):e00210
 - [27] Yao G F, Ming M L, Allan A C, Gu C, Li, L T, Wu X, Wang R Z, Chang Y J, Qi K J, Zhang S L, Wu J. Map-based cloning of the pear gene MYB 114 identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis. *The Plant Journal*, 2017, 92(3):437-451
 - [28] Daccord N, Celton J, Linsmith G, Becker C, Choisne N, Schijlen E, Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Erica Adele Di Piero E, Gouzy J, D J G, Guérif P, Muranty H, Durel C, Laurens F, Lespinasse Y, Gaillard S, Aubourg S, Quesneville H, Weigel D, Weg E, Troggio M, Bucher E. High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics*, 2017, 49 (7):1099-1106
 - [29] Fraga C G, Clowers B H, Moore R J, Zink E M. Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (10):4165-4173
 - [30] Zhao L, Zhang Y Q, Sun J L, Yang Q R, Cai Y M, Zhao C P, Wang F R, He H P, Han Y P. *PpHY5* is involved in anthocyanin coloration in the peach flesh surrounding the stone. *The Plant Journal*, 2023, 114(4):951-964
 - [31] Zhou H, Wang K L, Wang H L, Gu C, Dare A P, Espley R V, He H P, Allan A C, Han Y P. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *The Plant Journal*, 2015, 82 (1): 105-121