

玉露香梨花青苷调控基因 *PbrMYB19* 的克隆及功能分析

高歌, 刘慧芳, 贾伊娜, 冯新新, 宋宇琴, 李六林

(山西农业大学园艺学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 花青苷含量决定了果实色泽, 是衡量果实商品价值的重要指标之一, 其生物合成受到 MYB 转录因子的调控, 然而关于 MYB 负调控梨果实花青苷合成的机制尚未完全明确。基于前期转录组学数据的差异表达基因中筛选到 1 个 MYB 基因家族成员 *PbrMYB19*, 暗示其可能参与调控果实花青苷生物合成。为明确其结构和功能, 为进一步解析 *PbrMYB19* 对果实花青苷的调控机制奠定基础, 试验以玉露香梨果皮 cDNA 为模板, 克隆 *PbrMYB19* 全长, 利用生物信息学软件对该基因的结构、亲缘关系、保守结构域及顺式作用元件进行预测, 采用 qRT-PCR 对不同颜色果皮中 *PbrMYB19* 基因表达水平进行分析, 并通过果实瞬时表达系统验证其功能。结果表明, *PbrMYB19* 基因开放阅读框为 714 bp, 编码 237 个氨基酸, 分子质量为 26.85 ku, 预测亚细胞定位于细胞核。系统发育树分析结果表明, *PbrMYB19* 与已报道花青苷转录抑制子 FaMYB1 和 PbrMYB120 在同一个进化分支上, 且其蛋白 C 端存在 EAR 类似抑制序列。*PbrMYB19* 基因启动子序列包含光调控元件、植物激素响应元件。通过 qRT-PCR 分析发现, 红色和黄色果皮中 *PbrMYB19* 基因的表达水平显著高于绿色果皮。构建过表达载体和瞬时转化果实结果表明, *PbrMYB19* 过表达显著抑制果皮花青苷积累。

关键词: 梨; *PbrMYB19* 基因; 克隆; 系统发育树; 功能验证

中图分类号: S661.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-2481(2024)02-0036-08

Cloning and Functional Analysis of Anthocyanin Regulatory Gene *PbrMYB19* in Yuluxiang Pear

GAO Ge, LIU Huifang, JIA Yina, FENG Xinxin, SONG Yuqin, LI Liulin

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Anthocyanin content determines fruit color, which serves as a significant indicator for assessing the commercial value of fruits. The biosynthesis of anthocyanin is regulated by MYB transcription factors, however, the precise mechanism underlying the negative regulation of MYB on anthocyanin synthesis in pear fruit remains to be fully elucidated. Based on the previous transcriptomic data, a member of the MYB gene family, *PbrMYB19*, was screened out from the differentially expressed genes, suggesting that it may be involved in the regulation of fruit anthocyanin biosynthesis. To clarify its structure and function, and lay the foundation for further elucidating the regulatory mechanism of *PbrMYB19* on fruit anthocyanins, in this study, the full-length *PbrMYB19* was cloned by using the cDNA of Yuluxiang pear peel as a template. The structure, genetic relationship, conserved domain, and cis-acting elements of this gene were predicted via bioinformatics software. The expression level of *PbrMYB19* gene in peels with different colors was analyzed by fluorescence quantitative PCR, and its function was verified by the fruit transient expression system. The results showed that the open reading frame of *PbrMYB19* gene was 714 bp, encoding 237 amino acids, with a relative molecular weight of 26.85 ku, and the subcellular localization was predicted in the nucleus. Phylogenetic tree analysis showed that *PbrMYB19* was on the same evolutionary branch as the reported anthocyanin transcription inhibitors FaMYB1 and PbrMYB120, and there was an EAR-like inhibitory sequence at the C-terminal of its protein. In addition, the promoter sequence of *PbrMYB19* gene contained light regulation elements and plant hormone response elements. QRT-PCR analysis showed that the expression level of *PbrMYB19* gene in red and yellow peels was significantly higher than that in green peels. Overexpression vector of *PbrMYB19* gene was constructed, and the fruit was transiently transformed. It was found that *PbrMYB19* overexpression significantly inhibited anthocyanin accumulation in peels.

Key words: pear; *PbrMYB19* gene; cloning; phylogenetic tree; functional verification

花青苷是一类重要的次生代谢产物, 其含量决定多种水果颜色, 是果实外观品质的重要指标之

收稿日期: 2023-05-22

基金项目: 山西省高等学校科技创新项目(2021L101); 山西农业大学科技创新基金项目(2017YJ45); 山西农业大学大学生创新创业训练项目(20-100)

作者简介: 高歌(1996-), 女, 内蒙古乌兰察布人, 在读硕士, 研究方向: 果树栽培与生理。

通信作者: 李六林(1970-), 男, 山西晋中人, 教授, 主要从事果树栽培与生理研究工作。

一^[1-2]。研究证明,花青苷具有较强的抗氧化活性,在生物和非生物胁迫中发挥着重要作用^[3]。此外,花青苷能清除自由基、抗肿瘤,有益于人体健康^[4]。果实花青苷的积累过程受激素、低温、高温、强光、UV-B 辐射等因素的影响^[5]。目前,果实花青苷分子调控机制解析已成为植物次生代谢研究热点。

花青苷的生物合成途径在高等植物中高度保守^[6-8]。研究发现,苯丙氨酸氨解酶(*PAL*)、4-香豆基-辅酶 A 连接酶(*4CL*)、查尔酮合成酶(*CHS*)、查尔酮异构酶(*CHI*)、类黄酮-3'-羟基酶(*F3'H*)、类黄酮-3', 5'-羟基酶(*F3'5'H*)、黄烷酮 3-羟基酶(*F3H*)、二氢黄酮醇 4-还原酶(*DFR*)、花青素合成酶(*ANS*)和 UDP-葡萄糖-类黄酮类 3-O-葡萄糖基转移酶(*UGT*)等参与花青苷的生物合成^[9-10],而这些结构基因的表达受转录因子在转录水平上的调控,尤以 R2R3-MYB、碱性-螺旋-环-螺旋和 WD40 蛋白组成的转录激活复合体(称为 MBW 复合体)研究最多^[11]。其中,MYB 对花青苷的合成起到关键的调控作用^[12]。根据 MYB 所含的 R 基序不同,可以分为 4 类:R1-MYB、R3-MYB、R4-MYB 和 R2R3-MYB,其中隶属于第 6 亚族 SG6 的 R2R3-MYB 类参与激活花青苷的生物合成途径,例如苹果 MdMYB10、MdMYB1 和 MdMYB110a,草莓 FaMYB10,杨梅 MrMYB1,梨 PyMYB10、PyMYB114^[13-16]参与 MBW 复合体的形成,进而上调花青苷结构基因的表达水平^[17-19]。此外,也存在 2 类对花青苷生物合成起负调控的 MYB 抑制子:第 1 类是 R3-MYB 抑制子,当 R3-MYB 结合 bHLH 蛋白时,竞争性限制了 MBW 复合体的形成,造成了花青苷结构基因的转录活性的被动抑制^[20-21]。其已在番茄、越桔和沼泽越桔中鉴定出抑制果实花青苷积累的 R3-MYB^[22-23]。第 2 类抑制子属于 SG4 的 R2R3-MYB,能够直接抑制花青苷结构基因的表达,主要因为它们具有乙烯响应元件结合因子相关的两亲性抑制(EAR)基序^[21]。据报道,SG4 MYB 在包括苹果、葡萄、桃子和草莓在内的许多水果品种中抑制果实花青苷的产生^[24-28]。

前期针对梨果实色泽变化的转录组数据研究发现,MYB 家族成员基因 *PbrMYB19* 在果实色泽变化期间差异表达,但具体功能尚不清楚。本研究以玉露香梨果皮 cDNA 为模板,克隆调控果实花青苷的 MYB 转录因子基因 *PbrMYB19*(*Pbr013413*),并对其结构、编码蛋白的理化性质进行生物信息学分析,同时构建过表达载体后在苹果果实上进行瞬

时表达验证观察表型,以期为进一步解析和丰富梨果实中 MYB 类转录因子对花青苷合成的调控模式研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试梨品种为玉露香梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Yuluxiang),于 2020 年 8 月开始在山西农业大学园艺学院试验站收集转色期果实,立即运回实验室后用削皮刀削取果皮,液氮处理后储存至 -80 °C 冰箱,用于 RNA 的提取。未着色的红星苹果(*Malus domestica* L. cv. Delicious)购于山西太谷农家果园。完成瞬时转化和花青苷诱导后,仔细削取菌液处理的果皮,用于花青苷含量测定。

1.2 玉露香梨 *PbrMYB19* 基因的克隆

用液氮将果皮研磨成粉末,运用改良 CTAB 法^[29-30]提取果皮的总 RNA,按照 cDNA 试剂盒(TaKaRa)说明书将总 RNA 反转录为 cDNA 后备用。

通过白梨基因组数据库(<http://peargenome.njau.edu.cn/>)获得 *PbrMYB19* 基因 CDS 序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),PCR 克隆目的基因。PCR 反应体系:模板 cDNA 2 μL,上下游引物(10 mol/L)各 1 μL,2×Taq Master Mix 10 μL,加 DEPC 水至 20 μL。PCR 反应程序:94 °C 预热 6 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环。之后,PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,将回收纯化后的电泳产物与入门克隆载体 PNC-AEnTopo 连接,筛选阳性克隆后送至通用生物(安徽)股份有限公司,利用 SnapGene 4.1.9 软件对测序得到的 *PbrMYB19* 编码区序列进行比对。

表 1 引物序列
Tab.1 The sequences of the primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'-3')	用途 Application
<i>PbrMYB19</i> -F	ATGAGGAAACCTGCTGCG	克隆全长
<i>PbrMYB19</i> -R	TTATCTGAAGAGAGGAAGGATG	
<i>Actin</i> -F	ACAACCTGGTATTGTGCTGGAC	内参基因 <i>Actin</i>
<i>Actin</i> -R	CATATGCAAGCTTCTCCTTC	
q <i>PbrMYB19</i> -F	TTGTTGGCGTACCCTTCCTC	荧光定量 PCR
q <i>PbrMYB19</i> -R	TGCCTAGGAGTGCATGAAGC	

1.3 *PbrMYB19* 基因的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件对 *PbrMYB19* 基因进行氨基酸翻译和多重序列比对,利用在线分析工具

ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白特性分析, 利用在线分析工具 Protscale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 进行亲疏水性分析, 利用在线分析工具 NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行磷酸化位点预测, 利用在线分析工具 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 进行信号肽分析, 利用 NCBI 网站 CCD 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白保守结构域分析, 利用在线分析工具 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 进行蛋白二级结构预测, 利用在线分析工具 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行蛋白三级结构预测, 利用在线分析工具 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 进行亚细胞定位预测分析, 利用 MEGA.07 进行系统进化树构建, 利用在线分析工具 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析顺式作用元件^[31]。

1.4 *PbrMYB19* 在苹果果实中瞬时表达

利用 Nimble Cloning (NC) 克隆方法^[32], 将连接入门载体 PNC-AEnTopo 的 *PbrMYB19* 基因导入 PNC-Cam2304 过表达载体, 重组载体命名为 *PbrMYB19-OE*。之后将过表达载体导入农杆菌 EHA105 并划线培养, 挑取单菌落加入 1 mL LB 液体培养基 (含抗生素) 在 28 °C、180 r/min 摇床中培养, 随后将 1 mL 菌液倒入 50 mL 液体培养基中在

28 °C、180 r/min 摇床中培养 12~16 h。离心收集菌体, 弃去培养基, 利用重悬液将菌体重悬, 调节 OD₆₀₀ 至 0.3 左右, 遮光室温培养 3 h。用 5 mL 注射器吸取重悬菌液, 将针头缓慢插入苹果表皮注射重悬菌液, 后将苹果放入光照培养箱中诱导 3~5 d。

1.5 基因的表达分析

分别在果实成熟前期、成熟后期和贮藏期收集玉露香梨果皮, 分别呈现绿色、红色、黄色。利用试剂盒 SYBR Premix Ex Taq II kit (Vazyme) 进行实时荧光定量 PCR。利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 (表 1), 对荧光值变化曲线和熔解曲线进行分析后, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *PbrMYB19* 在不同处理时期的相对表达量。每个处理重复 3 次, 每个重复有 5~7 个果实。

1.6 花青苷含量测定

参考 UBI 等^[33]的方法, 盐酸-甲醇溶液 (V: V=1: 99) 浸提, 使用分光光度计在 530、620、650 nm 处测定吸光度值。

1.7 数据处理

采用 Microsoft Excel 2017 进行数据整理和图表制作, 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 采用 AVONA 进行各处理间的显著性检验 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 玉露香梨 *PbrMYB19* 基因的克隆与理化性质分析

PbrMYB19 基因序列与氨基酸序列如图 1 所示。

```

1      ATGAGGAAACCCTGCTGCGATAAGCAGGACACGAACAAGGAGCTTGGTCCAAGCAAGAA
1      M R K P C C D K Q D T N K G A W S K Q E
61     GACCTGAAGCTCATTGAATACATTGTAATAATGGCGAGGGTGTGGCGTACCCTTCCT
21     D L K L I E Y I R K N G E G C W R T L P
121    CAGGCTGCCGGCCTACTTCGTTGGTAAAGTTGTAGGCTGAGATGGATAAACTATCTA
41     Q A A G L L R C G K S C R L R W I N Y L
181    CGACCAGACCTTAAAGAGGCAACTTGTGCTGAAGATGAAGAAGATCTTATCATCAAGCTT
61     R P D L K R G N F A E D E E D L I I K L
241    CATGCACTCCTAGGCAACCGGTGGTTCATTGATTGCTGGGAGATTGCCAGGACGTACAGAC
81     H A L L G N R W S L I A G R L P G R T D
301    AATGAAGTGAATACTACTGGAACCTCATTGAGAAAGCTTATGAACATGGGTATA
101    N E V K N Y W N S H L R R K L M N M G I
361    GATCCAAATAATCATCGACCGAACACGTCATCTCCCTCGTCTTCATCATCAAATTCA
121    D P N N H R P N N V N L P R L H H Q N S
421    CAAACTGTCACTAGTACTGCAACATTGCTGCGGCTTAAAAAACCTACCAATTATCAG
141    Q T V S S T A T L S A A L K N P T N Y Q
481    CTGCAAGCAAGATCCGGTGGTAATAATAATTGTGACCATGAATCGGACGGGTACAAGTGC
161    L Q A R S G G N N N C D H E S D G T S C
541    TTAGAGGATGATTCCTGTGGCCGGCTGCCTGATTTAAACCTAGACCTCACAATAACTGCT
181    L E D D S C G R L P D L N L D L T I T A
601    CCTTTGTCTAATCCAGTTCCTGATAACCTCAAGGAGGAGCAAAATTCGAGTCAAGTG
201    P L S N P V P D N L K E E Q N F E S K V
661    TCAAAGAAGTCATCAGAATTTGCTTCATCTACCATCCTTCCTCTTCAGATAA
221    S K K S S E F A S S T I L P L F R *

```

图 1 *PbrMYB19* 基因序列与氨基酸序列
Fig.1 *PbrMYB19* gene sequence and amino acid sequence

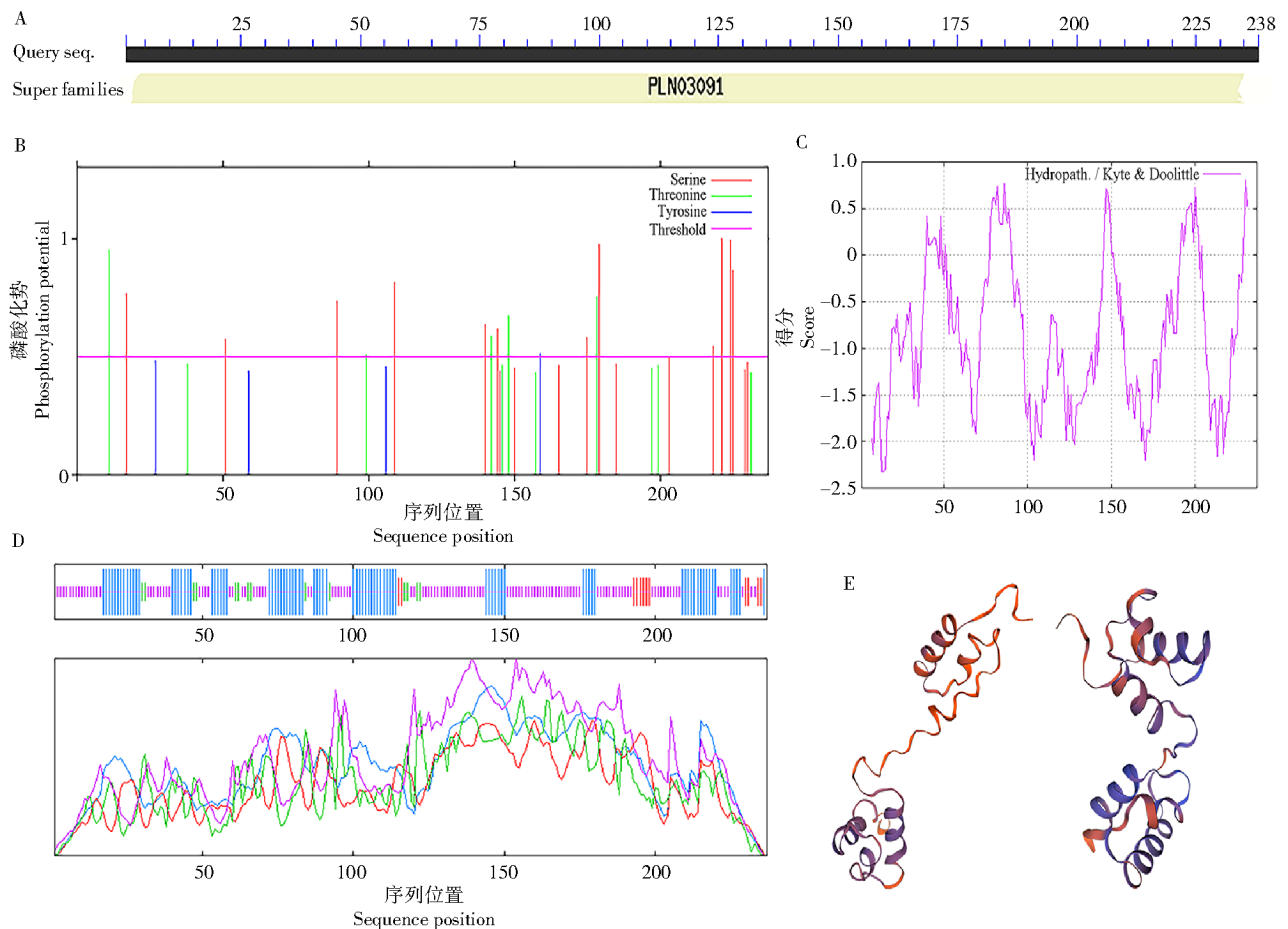
以玉露香梨果皮 cDNA 为模板,PCR 扩增并进行亚克隆测序,结果显示(图 1),*PbrMYB19* 基因完整的开放阅读框长度为 714 bp,共编码 237 个氨基酸,与梨基因组数据库中序列对比一致。理化性质分析表明,*PbrMYB19* 分子质量为 26.85 ku,分子式为 $C_{1156}H_{1854}N_{356}O_{360}S_{11}$,总原子数为 3 737 个,理论等电点 pI 为 8.90;不稳定指数为 49.13,被归类为不稳定蛋白。*PbrMYB19* 编码蛋白含有带正电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)28 个,含有带负电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)34 个。

2.2 *PbrMYB19* 蛋白的结构分析

通过 Conserved Domain Search 对 *PbrMYB19* 基因编码的蛋白保守结构域进行分析,结果显示,其属于 PLN03091 超基因家族(图 2-A)。对 *PbrMYB19* 基因编码蛋白进行磷酸化位点预测,结

果表明(图 2-B),*PbrMYB19* 基因含有 7 个 Thr 位点,1 个 Tyr 位点,19 个 Ser 位点。信号肽分析结果显示,该蛋白不存在信号肽。亲疏水性分析结果表明,该基因编码蛋白亲水的氨基酸(负值)多余疏水的氨基酸(正值),属于亲水蛋白,其中,第 80 位分值最高,为 2.100,疏水性最强;第 125 位分值最低,为 -3.156,亲水性最强(图 2-C)。

对 *PbrMYB19* 基因编码的蛋白进行二级结构预测,结果显示(图 2-D),该蛋白 α -螺旋占比为 36.71%,延伸链占比为 5.06%, β -转角占比为 5.91%,自由卷曲占比为 52.32%。*PbrMYB19* 基因编码的蛋白含有多个 $\beta/\alpha/\beta$ 类 Rossmann 折叠区域(图 2-E)。此外,利用在线分析工具 Plant-mPLoc 进行亚细胞定位预测分析,结果表明,*PbrMYB19* 基因编码的蛋白位于细胞核中。



A. 基因序列保守域; B. 蛋白质磷酸化分析; C. 蛋白质亲/疏水性分析; D. 二级结构预测(紫色代表无规则卷曲;蓝色代表 α -螺旋;红色代表延伸链;绿色代表 β -转角); E. 三级结构预测
 A. Conserved domain of gene sequences; B. Phosphorylation analysis of proteins; C. Affinity/hydrophobicity analysis of proteins(The purple part indicated random coil; the blue part indicated alpha helix; the red part indicated extended strand; the green part indicated beta turn); D. Secondary structure prediction; E. Tertiary structure prediction

图 2 *PbrMYB19* 序列的结构分析
 Fig.2 Structure analysis of *PbrMYB19* sequence

系统进化树分析表明(图 3-A),梨 *PbrMYB120* 和草莓 *FaMYB1* 对花青苷的生物合成起负向调控

的作用^[18,26],而梨 PbrMYB19 也聚类于这一进化分支,推测 PbrMYB19 具有相似的功能。PbrMYB19 的氨基酸序列与拟南芥 AtMYB4、草莓 FaMYB1、

马铃薯 PhMYB4、白梨 PbrMYB120 进行多重序列比对,结果显示(图 3-B),PbrMYB19 的 C 端有与 FaMYB1、PbrMYB120 等相似的 EAR 抑制序列。

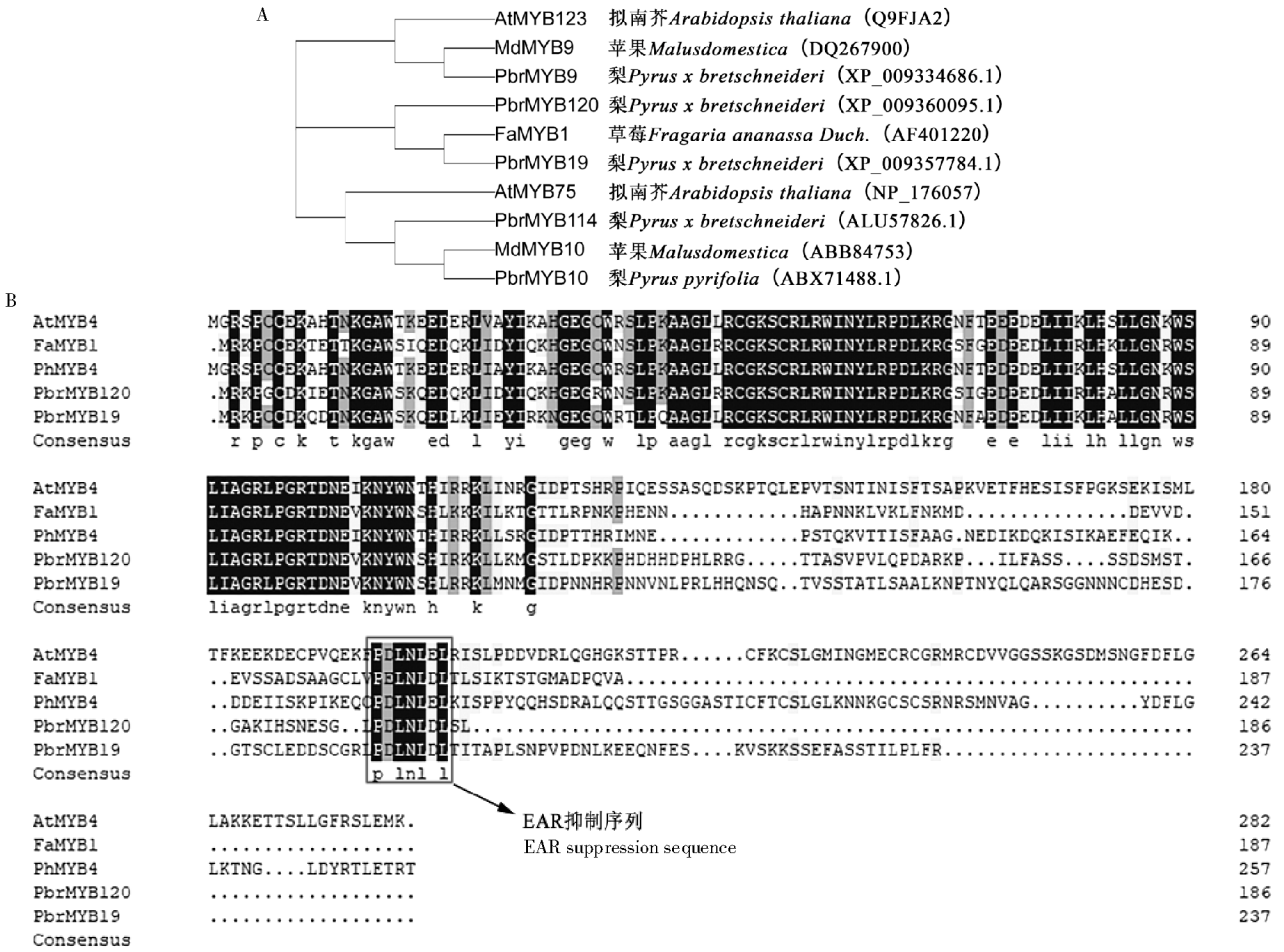


图 3 PbrMYB19 与其他 MYB 蛋白的系统进化分析 (A) 和氨基酸序列比对 (B)
Fig.3 Phylogenetic analysis (A) and amino acid sequence alignment (B) of PbrMYB19 and other MYB proteins

2.3 PbrMYB19 基因启动子顺式元件分析

对 PbrMYB19 基因起始密码子前 2 000 bp 序列顺式元件预测分析,结果发现(表 2),PbrMYB19 基因启动子除含有典型的 TATA-box 和 CAAT-box 核心启动子元件外,还含有 4 个光响应元件

GT1-motif、2 个脱落酸反应顺式作用元件 ABRE、1 个厌氧诱导所需元件 ARE、1 个分生组织表达调控元件 CAT-box、1 个赤霉素响应元件 P-box 和 1 个 MYB 结合位点 MYB-binding site。

表 2 PbrMYB19 基因启动子顺式元件分析
Tab.2 Analysis of cis-acting elements in the promoter regions of PbrMYB19 gene

元件名称 Element name	序列 Sequence	功能 Function	数量/个 Number
CAAT-box	CCAAT/CAAAAT/CCCAATTT	启动子和增强子共有顺式元件	46
TATA-box	ATTATA/TATAA/TATA/TATACA	核心启动子元件	42
GT1-motif	GGTTA	光响应元件	4
ABRE	CACGTG/ACGTG	脱落酸反应的顺式作用元件	2
ARE	AAACCA	厌氧诱导所需元件	1
CAT-box	GCCACT	分生组织表达调控元件	1
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件	1
MYB-binding site	CAACAG	MYB 结合位点	1

2.4 *PbrMYB19* 基因的表达分析

PbrMYB19 基因的相对表达量情况如图4所示。

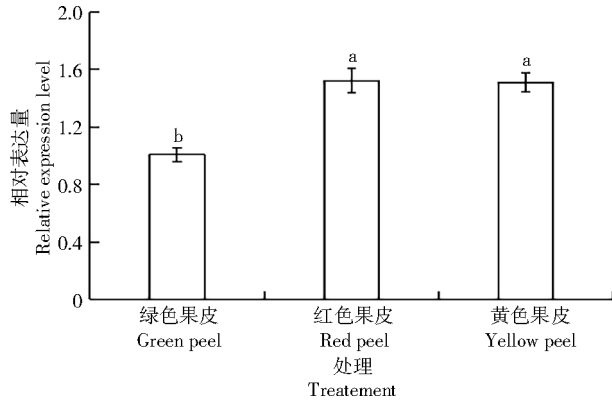


图4 *PbrMYB19* 基因的相对表达量
Fig.4 The relative expression level of *PbrMYB19* gene

从图4可以看出, *PbrMYB19* 基因在绿色、红

色、黄色果皮中均有表达,但在绿色果皮中的表达量明显低于在红色和黄色果皮中,在红色和黄色果皮中表达量无明显差异。

2.5 *PbrMYB19* 基因功能验证

为了进一步验证 *PbrMYB19* 基因的功能,构建了该基因的过表达载体,导入农杆菌 EHA105。之后,将农杆菌用重悬液悬浮注射苹果表皮,以含有空载体的农杆菌作为对照,经过在光照培养箱内诱导花青苷,结果发现,苹果表皮注射 *PbrMYB19* 过表达载体部位没有红色产生,而对照仍然变红(图5-A)。其中, *PbrMYB19* 过表达处理后花青苷含量是对照的 27.99% (图5-B); 与之相反, *PbrMYB19* 基因在过表达部位表达量明显高于对照(图5-C)。可见,过表达 *PbrMYB19* 对果实中花青苷的生物合成起到抑制作用。

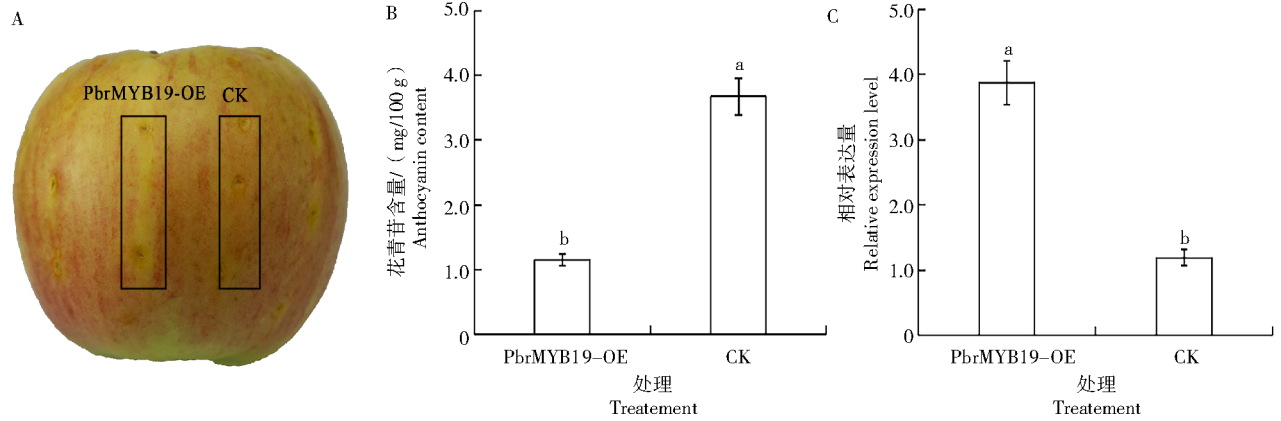


图5 *PbrMYB19* 瞬时表达与相关变化
Fig.5 Transient expression of *PbrMYB19* and related changes

3 结论与讨论

衡量玉露香梨果皮着色的一个重要的指标是花青苷的含量多少,而 MYB 转录因子通过转录调控酶的表达进而影响花青苷的合成。本研究从玉露香梨果皮中克隆了 *PbrMYB19* 基因,通过对其生物信息分析显示, *PbrMYB19* 开放阅读框有 714 bp, 编码 237 个氨基酸,属于转录因子 MYB 基因家族 R2R3-MYB 类中的一员。前人的研究已表明, *PbrMYB120* 和 *FaMYB1* 是花青苷合成调控的转录抑制子^[18,26], 预测进化树同为一支的 *PbrMYB19* 可能对花青苷合成起抑制的作用。序列比对发现, *PbrMYB19* 在 C 端存在 1 个 EAR 抑制基序,结合已发现的苹果 *MdMYB32* 的 EAR 基序可以影响 ANS 的表达水平^[34], *MdMYB16* 的 EAR 基序可以影响 *UFGT* 和 ANS 的启动子活性^[35], 进一步说明

PbrMYB19 具有花青苷抑制子功能。更重要的是, qRT-PCR 分析发现, *PbrMYB19* 基因在绿色果皮与红色和黄色果皮中的表达差异显著,而果皮从绿色转变为红色和黄色又是由光照引起的,且 *PbrMYB19* 基因的启动子序列中存在光响应元件,说明 *PbrMYB19* 基因的表达可能与光照有关。此外 *PbrMYB19* 基因的启动子区域还存在多种植物激素响应元件,说明 *PbrMYB19* 基因的表达可能也受到了激素的影响。

利用果实瞬时表达技术验证花青苷调控基因的功能已有广泛报道^[36]。本研究尝试用转色期玉露香梨果实注射过表达载体,以期获得抑制果实花青苷积累的表型。然而,玉露香梨果实含水量较高,果实注射孔腐烂严重,导致同源表达试验失败。对于遗传转化体系较困难的木本植物,异源表达验证基因功能也是常用的手段之一。例如,LI 等^[37]利

用烟草和草莓花托,通过瞬时表达系统验证了梨花青苷调控基因 PyWRKY31 或 PyWRKY26 与其伴侣 PyMYB10、PyMYB114 和 PybHLH3 共转化后促进花青素的积累效果。所以,本研究选择较易着色的苹果果实异源过表达 *PbrMYB19* 基因,结果发现,该基因参与果实着色和花青苷负调控作用。总之,*PbrMYB19* 基因过表达能够抑制果实花青苷积累,具体调控机制还需进一步验证。

本研究通过克隆和生物信息学分析玉露香梨果皮的 *PbrMYB19* 基因,结果发现,其编码的蛋白质具有 MYB 转录因子家族的特征,并在进化上与已知的花青苷合成抑制子 *PbrMYB120* 和 *FaMYB1* 密切相关。进一步的 qRT-PCR 分析揭示了 *PbrMYB19* 在不同色泽果皮中的表达差异,以及其启动子中光响应元件的存在,暗示了光照和植物激素可能对其表达有影响。通过在苹果果实中的异源过表达试验,研究证实了 *PbrMYB19* 基因能够抑制花青苷的积累。研究结果为深入理解 *PbrMYB19* 在梨果着色过程中的调控机制奠定了基础,并为未来梨果品质改良提供了分子层面的参考。

参考文献:

- [1] JIMENEZ-GARCIA S N, GUEVARA-GONZALEZ R G, MIRANDA-LOPEZ R, et al. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics[J]. Food Research International, 2013, 54(1): 1195-1207.
- [2] DAVIES K M, ALBERT N W, SCHWINN K E. From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning[J]. Functional Plant Biology:FPB, 2012, 39(8): 619-638.
- [3] YU B, ZHANG D, HUANG C H, et al. Isolation of anthocyanin biosynthetic genes in red Chinese sand pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) and their expression as affected by organ/tissue, cultivar, bagging and fruit side[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 136: 29-37.
- [4] 张雪,王荔,瞿飞,等. 引种红梨花青苷合成及相关因子变化[J]. 西南农业学报, 2017, 30(5): 1162-1167.
ZHANG X, WANG L, QU F, et al. Relationship between anthocyanin biosynthesis and related factors in red pear varieties introduced from Yunnan[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(5): 1162-1167.
- [5] LI G, MENG X Q, ZHU M K, et al. Research progress of betalain in response to adverse stresses and evolutionary relationship compared with anthocyanin[J]. Molecules, 2019, 24(17): 3078.
- [6] NAING A H, KIM C K. Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants[J]. Plant Molecular Biology, 2018, 98(1): 1-18.
- [7] LLOYD A, BROCKMAN A, AGUIRRE L, et al. Advances in the MYB-bHLH-WD repeat(MBW) pigment regulatory model: addition of a WRKY factor and co-option of an anthocyanin MYB for betalain regulation[J]. Plant and Cell Physiology, 2017, 58(9): 1431-1441.
- [8] HICHRI I, BARRIEU F, BOGS J, et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(8): 2465-2483.
- [9] SAITO K, YONEKURA-SAKAKIBARA K, NAKABAYASHI R, et al. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity[J]. Plant Physiology and Biochemistry:PPB, 2013, 72: 21-34.
- [10] 王川艺,黄红涛,陈发波,等. 胭脂萝卜 *RsCHS1* 基因克隆及表达分析[J]. 河南农业科学, 2023, 52(9): 122-132.
WANG C Y, HUANG H T, CHEN F B, et al. Cloning and expression analysis of *RsCHS1* gene in red radish (*Raphanus sativus* L.)[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(9): 122-132.
- [11] XU W J, DUBOS C, LEPINIEC L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(3): 176-185.
- [12] AN X H, TIAN Y, CHEN K Q, et al. The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(7): 710-717.
- [13] ESPEY R V, HELLENS 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: for Cell and Molecular Biology, 2007, 49(3): 414-427.
- [14] LI Y Y, MAO K, ZHAO C, et al. MdCOP1 ubiquitin E3 ligases interact with MdMYB1 to regulate light-induced anthocyanin biosynthesis and red fruit coloration in apple[J]. Plant Physiology, 2012, 160(2): 1011-1022.
- [15] UMEMURA H, OTAGAKI S, WADA M, et al. Expression and functional analysis of a novel MYB gene, MdMYB110a₁, responsible for red flesh, not skin color in apple fruit[J]. Planta, 2013, 238(1): 65-76.
- [16] YAO G F, MING M L, ALLAN A C, et al. Map-based cloning of the pear gene *MYB114* identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2017, 92(3): 437-451.
- [17] AN J P, WANG X F, LI Y Y, et al. EIN3-LIKE1, MYB1, and ETHYLENE response factor3 act in a regulatory loop that synergistically modulates ethylene biosynthesis and anthocyanin accumulation[J]. Plant Physiology, 2018, 178(2): 808-823.
- [18] SONG L Y, WANG X L, HAN W, et al. PbMYB120 negatively regulates anthocyanin accumulation in pear[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1528.
- [19] NI J B, PREMATHILAKE A T, GAO Y H, et al. Ethylene-activated PpERF105 induces the expression of the repressor-type R2R3-MYB gene PpMYB140 to inhibit anthocyanin biosynthesis in red pear fruit[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2021, 105(1): 167-181.
- [20] ZHANG W, NING G G, LV H Y, et al. Single MYB-type transcription factor AtCAPRICE: a new efficient tool to engi-

- neer the production of anthocyanin in tobacco[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 388(4): 742-747.
- [21] ALBERT N W, DAVIES K M, LEWIS D H, et al. A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(3):962-980.
- [22] PRIMETTA A K, KARPPINEN K, RIIHINEN K R, et al. Metabolic and molecular analyses of white mutant *Vaccinium* berries show down-regulation of MYBPA1-type R2R3 MYB regulatory factor[J]. *Planta*, 2015, 242(3):631-643.
- [23] ZORENC Z, VEBERIC R, SLATNAR A, et al. A wild 'albino' bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) from Slovenia shows three bottlenecks in the anthocyanin pathway and significant differences in the expression of several regulatory genes compared to the common blue berry type[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0190246.
- [24] ZHOU H, KUI L W, WANG F R, et al. Activator-type R2R3-MYB genes induce a repressor-type R2R3-MYB gene to balance anthocyanin and proanthocyanidin accumulation[J]. *The New Phytologist*, 2019, 221(4):1919-1934.
- [25] ZHU Z G, LI G R, LIU L, et al. A R2R3-MYB transcription factor, VvMYBC2L2, functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.)[J]. *Molecules*, 2018, 24(1):92.
- [26] AHARONI A, DE VOS C H, WEIN M, et al. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2001, 28(3):319-332.
- [27] GAO J J, SHEN X F, ZHANG Z, et al. The myb transcription factor MdMYB6 suppresses anthocyanin biosynthesis in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 106(2):235-242.
- [28] PÉREZ-DÍAZ J R, PÉREZ-DÍAZ J, MADRID-ESPINOZA J, et al. New member of the R2R3-MYB transcription factors family in grapevine suppresses the anthocyanin accumulation in the flowers of transgenic tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(1):63-76.
- [29] 周菲. 改良CTAB法提取油用向日葵成熟叶片的总RNA[J]. *黑龙江农业科学*, 2013(7):8-10.
- ZHOU F. An improved CTAB method for extraction of total RNA from mature leaves in oil sunflower[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2013(7):8-10.
- [30] 闫冬梅, 薛美昭, 仪慧兰, 等. 成熟葡萄果实高质量总RNA提取方法的建立[J]. *山西农业科学*, 2022, 50(1):9-14.
- YAN D M, XUE M Z, YI H L, et al. Establishment of extraction methods for high quality rna from mature grape berry[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2022, 50(1):9-14.
- [31] 杨翠凤, 滕峥, 韦春, 等. 百香果苯丙氨酸解氨酶基因 *PePAL* 克隆及表达分析[J]. *河南农业科学*, 2023, 52(10):100-108.
- YANG C F, TENG Z, WEI C, et al. Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene *PePAL* in passion fruit[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2023, 52(10):100-108.
- [32] YAN P, TUO D C, SHEN W T, et al. A Nimble Cloning-compatible vector system for high-throughput gene functional analysis in plants[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(2):100471.
- [33] UBI B E, HONDA C, BESSHO H, et al. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature[J]. *Plant Science*, 2006, 170(3):571-578.
- [34] 许海峰, 杨官显, 王意程, 等. 苹果 MdMYB32 通过自身 EAR 抑制序列抑制花青苷的生物合成[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(24):4690-4699.
- XU H F, YANG G X, WANG Y C, et al. Apple MdMYB32 inhibits the anthocyanin biosynthesis by its own EAR inhibitory sequence[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(24):4690-4699.
- [35] XU H F, WANG N, LIU J X, et al. The molecular mechanism underlying anthocyanin metabolism in apple using the MdMYB16 and MdbHLH33 genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 94(1):149-165.
- [36] LIU H N, SHU Q, KUI L W, et al. The PyPIF5-PymiR156a-PySPL9-PyMYB114/MYB10 module regulates light-induced anthocyanin biosynthesis in red pear[J]. *Molecular Horticulture*, 2021, 1(1):14.
- [37] LI C, WU J, HU K D, et al. PyWRKY26 and PybHLH3 cotargeted the PyMYB114 promoter to regulate anthocyanin biosynthesis and transport in red-skinned pears[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7:37.