

PpMYB10.1 启动子 483bp 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。应用 GUS 染色测定桃果肉花色素苷重要基因 *PpMYB10.1* 的启动子活性; 用 DNA-pulldown 鉴定结合于 *PpMYB10.1* 启动子上的转录抑制因子; 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, 深红、红、浅红对应的 *PpMYB10.1* 表达量及花色素苷含量依次下降; 具有 483bp 序列的 *PpMYB10.1* 启动子, 其启动活性弱于缺失该序列的启动子; 利用该 483bp 序列鉴定到的转录抑制子基因 *Prupe.2G302800*, 能够结合花色素苷合成的主效基因 *PpBL*, 并抑制其转录活性, 对降低 *PpMYB10.1* 表达具有一定功能。本研究所鉴定到转录抑制子 *Prupe.2G302800*, 虽然不是红肉变浅的直接因素, 但通过结合 *PpBL*, 抑制 *PpMYB10.1* 转录, 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 483bp 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 expression of *PpMYB10.1* and anthocyanin content in flesh peaches with deep-red, red and light-red were gradually decreasing. Activity of *PpMYB10.1* promoter with a 483bp deletion was weaker than that without the sequence. 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 by inhabiting *PpMYB10.1* transcription through interacting with *PpBL*.

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

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]。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、防止心血管硬化等功效^[2]。另外, 不同红肉桃品种, 花色素苷含

¹ 收稿日期: 2022-09-09

修回日期:

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)

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。

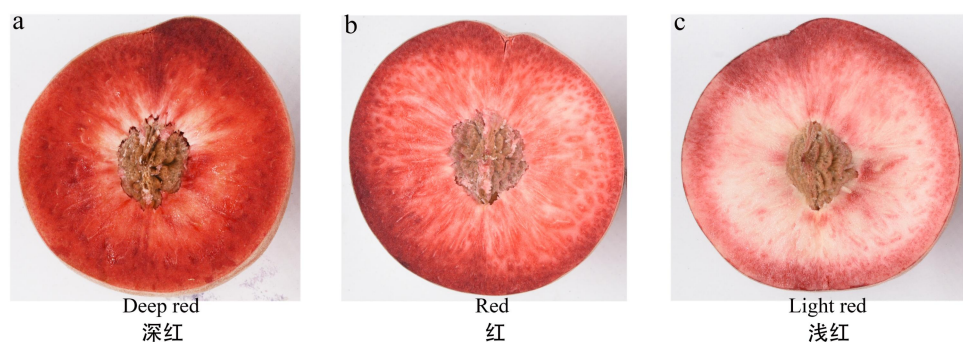
红肉桃根据花色素苷大量积累时间，可以划分成两种类型。第一种是成熟期积累型，代表品种有大红袍、天津水蜜等^[4]；第二种是发育中期积累型，代表品种有大果黑桃、哈露红等。成熟期积累型的红肉桃，广泛应用于栽培及育种中，如湖北省农业科学院利用‘曙光’（黄肉）与‘红肉桃 18’（红肉）作为亲本，选育出早熟红肉桃品种‘早仙红’^[5]。该类型的红肉，由主效基因 *PpBL* 控制，存在于其启动子上的 6688bp 转座子插入，是该类型红肉形成的关键变异^[6]。*PpBL* 与 *PpNAC1* 形成二聚体，上调调控基因 *PpMYB10.1* 转录因子的表达，之后 *PpMYB10.1* 又与另外一个转录因子 *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，极大的丰富了红肉桃的供应类型。Hara-Kitagawa 等认为 *PpMYB10.1* 启动子上游的 5243bp 转座子插入，对红肉桃果肉颜色变浅具有一定作用^[6]。*PpMYB10.1* 启动子上还存在一段 483bp 缺失序列，另外，*PpBL* 是 *PpMYB10.1* 转录的直接调控基因，其启动子上也存在一个 6688bp 的转座子插入^{[6][7]}。这些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。本文以红色深浅不同的红肉桃为材料，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，其中‘天津水蜜’果肉颜色深红，花色素苷含量 69.96 mg/100 g；‘园春白’、‘武汉大红袍’、‘微尖红肉’、‘万州酸桃’、‘红桃’果肉颜色红，花色素苷含量 8.501-16.003 mg/100 g；‘大红袍’、‘谷城大红袍’、‘望谟小米桃’、‘武汉 2 号’果肉颜色浅红，花色素苷含量 1.886-5.769 mg/100 mg。（图 1），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℃ 冰箱。



注：a、b 及 c 分别代表‘天津水蜜’、‘万州酸桃’及‘大红袍’。

Note: a, b and c represent ‘Tianjin Shui Mi’, ‘Wanzhou Suan Tao’ and ‘Da Hong Pao’, respectively.

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

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

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

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

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

两段 *PpMYB10.1* 启动子序列（1126bp、1609bp）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 MCS 区，该区域位于报告基因 GUS 上游。CaMV35S 启动子作为阳性对照^[9]。将 *PpMYB10.1* 两段启动子（1126 bp 与 1609 bp）序列合成（北京六合华大基因科技有限公司，北京，中国）并连接到 pGreenII0800LUC 载体上，连接位置位于报告基因 LUC 上游^{[10][11]}。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，引物见表 1。带有 CaMV35S 的报告基因 GUS 为阴性对照^[7]。

1.4 桃果肉 GUS 染色

为了明确 483bp 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 1.0mL LB 培养基中（含 50mg/mL 卡那霉素），28℃ 培养 10 h。从中吸取 10μL，转移到 15mL 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 10min，收集菌体，并用侵染缓冲液（0.5 M MES, 1.0 mM MgCL₂, 1.0 uMAs）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

为了鉴定结合于 483bp 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）。首先，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，再与海里磁珠一起孵育 1h，磁力架上磁力分离吸取上清液，以用于后续挂珠效率检测。其次，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。第三，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。第四，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。第五，加入 100 μL 蛋白洗脱液，95℃ 水浴 5 min，12000 rpm 离心 5 min，吸取上清液。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

为了验证鉴定到的转录因子对 *PpMYB10.1* 的抑制活性，将重组载体的构建及侵染缓冲液的制备同 1.2。携带有 pGreenII0800LUC 重组载体的侵染液，OD 值调至 0.6，携带有 Pbi121 重组载体的侵染液，OD 值调至 1.1，之后，将二者以 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 *Prupe.2G302800* 之间是否存在互作，将 *PpBL* 的 CDS 序列克隆并连接到 pGBDT7 的 MCS 区，引物见表 1。重组载体利用 PEG/LiAc 法转入 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 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 pGBDT7 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 μL 1 x TE /LiAc/PEG，混匀；30℃水浴 30 min，每 10 min 摇匀一次；每管加入 20 μL DMSO，轻轻混匀；42℃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℃，250 rpm 复苏 1 h；高速离心 15 s，弃上清；100 μL NaCl(0.9%)重悬菌体，涂布于 SD/-Ade-His-Leu-Trp/X-α-Gal/3AT 平板上；30℃培养箱培养 3-5d。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 μL，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 μL 稀释倍数为 10×的 cDNA，0.5 μL 上下游引物，10 μL SYBR mix，7 μL 的 ddH₂O。扩增体系包含如下步骤：95℃ for 30 s, 45 cycles of 95℃ for 15 s, 58℃ for 15 s and 72℃ for 15 s。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。

表 1 双荧光素酶及酵母双杂交试验用到的引物

Table1 Primers used in dual luciferase and Yeast two-hybrid assay

引物名称	引物序列（5'-3'）	应用
Primer name	Primer sequence	Applicaton
PpBL F	acgggggactctagaggatccATGTTGGAATGGAAGACGCA	Vector construction (pBI121)
PpBL R	cgatcggggaaattcgagctcTACTTAGCATCCATGATATAATCCA	Vector construction (pBI121)
PpNAC1 F	acgggggactctagaggatccATGGAGAGCACCGACTCCTC	Vector construction (pBI121)
Pp NAC1 R	cgatcggggaaattcgagctcCTATCCCAAATTGGACTCAG	Vector construction (pBI121)
Prupe.2G302800 F	acgggggactctagaggatccATGGCTTCCGATCTCGAAAA	Vector construction (pBI121)
Prupe.2G302800 R	cgatcggggaaattcgagctcTTAGTACTCCCATTTCTTCA	Vector construction (pBI121)
PpBL F1	tggccatggaggccgaattcATGTTGGGAATGGAAGACGCA	Vector construction (pGBDT7)
PpBL R1	ccgctcgagtcgacggatccTACTTAGCATCCATGATATAATCCA	Vector construction (pGBDT7)
Prupe.2G302800 F1	ggccatggaggccagtgaaattcATGGCTTCCGATCTCGAAAA	Vector construction (pGADT7)
Prupe.2G302800 R1	ctcgagctcgatggatcccgTTAGTACTCCCATTTCTTCA	Vector construction (pGADT7)
PpMYB10.1F	GAAATGATTGGTGGGAAACC	Real time quantification
PpMYB10.1R	GTCCTTCTTCTGAAACATTGGT	Real time quantification

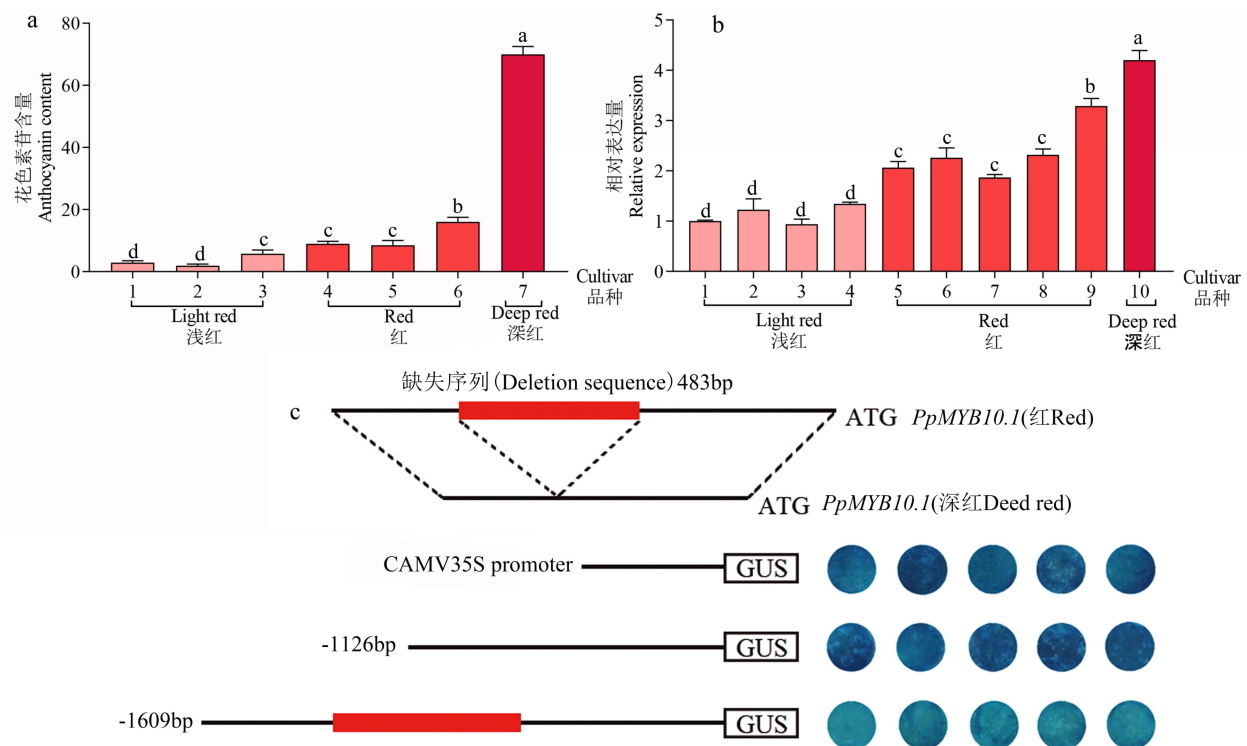
2. 结果与分析

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 483bp 的缺失, 距离 ATG 约 554bp, 另一个是 5243bp 的转座子插入, 距离 ATG 约 1609bp^[14]。在之前‘基因组组装揭示红肉及果实提前成熟形成机制’一文中, 我们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‘0bp/0bp’与‘0bp/0bp’时, 果肉呈现深红色, 当分别为‘0bp/483bp’与‘0bp/0bp’时, 果肉呈现红色, 当分别为‘483bp/483bp’与‘0bp/0bp’时, 果肉呈现浅红色, 当分别为‘483bp/483bp’与‘5243bp/0bp’或‘5243bp/5243bp’时, 果肉颜色为浅白色或白色。

为了进一步探究两处变异对红肉桃红色深浅的影响, 我们首先对深红、红、浅红对应的 *PpMYB10.1* 表达量及花色素苷含量进行测定。结果表明, 深红果肉对应的 *PpMYB10.1* 表达量及花色素苷含量最高, 红色果肉次之, 浅红果肉第三, (图 2a、b), 表明两处变异可能改变了 *PpMYB10.1* 启动子活性。

随后, 我们对其中之一的 483bp 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 483bp 缺失序列, 长度为 1126bp (图 2c), 另一段包含 483bp, 长度为 1609bp (图 2c)。两段序列分别替换 pBI121 表达载体 GUS 上游的 35S 启动子序列, 构建 2 个携带 GUS 的表达载体 *proPpMYB10.1(1126):GUS* 与 *proPpMYB10.1(1609):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):GUS* 的果肉, 染色蓝色明显弱于 *proPpMYB10.1(1126):GUS* (图 2c), 表明不包含 483bp 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。



a、b: 红色深浅不一的红肉桃果肉花色素苷含量及 *PpMYB10.1* 表达量测定; c: 483bp 缺失序列对 *PpMYB10.1* 启动子活性影响检测。果盘蓝色越深, 表明启动子活性越强。

a, b: Detection of anthocyanin content and relative expression of *PpMYB10.1* in different intensities of the red-flesh color. c: Detection of influence of 483bp deletion in *PpMYB10.1* promoter on its priming activity.

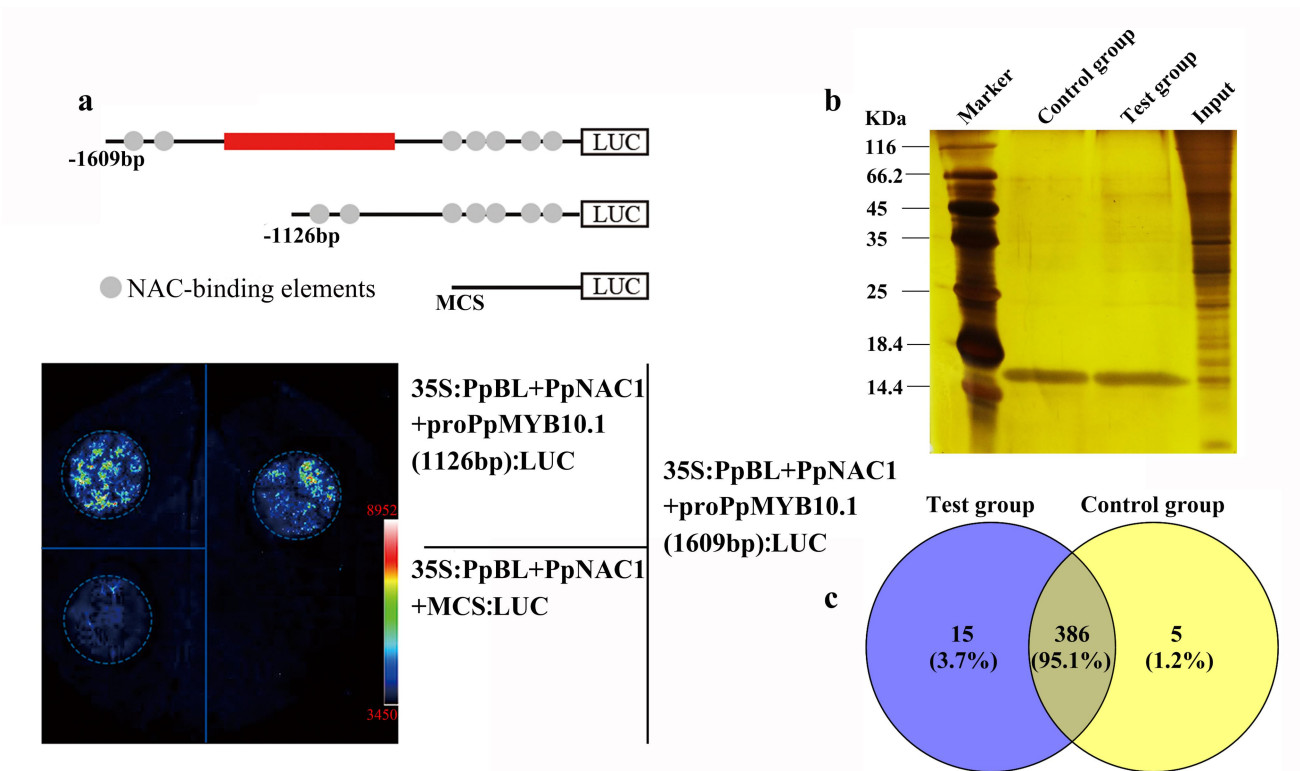
图 2 *PpMYB10.1* 启动子上两处突变对其启动活性影响检测

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

2.2 483bp 序列影响 *PpMYB10.1* 启动子活性机制分析

PpBL 与 PpNAC1 形成二聚体，上调 *PpMYB10.1* 转录^[7]，推测 483bp 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 35S 下游的 GUS 序列，以构建重组载体 *35S:PpBL* 及 *35S:PpNAC1*。携带及未携带 483bp 的 1126bp 及 1609bp 的序列分别与 pGreen0800LUC 报告基因 LUC 连接，构建重组载体 *proPpMYB10.1(1609):LUC* 与 *proPpMYB10.1(1126):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 ‘PpBL+PpNAC1+*proMYB10.1(1126bp)*’ 的注射位点，LUC 活性几乎与 ‘PpBL+PpNAC1+*proMYB10.1(1609bp)*’ 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，以此也可以推断，483bp 序列的存在与否，可能对 PpBL/PpNAC1 结合 *PpMYB10.1* 启动子影响甚微。

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 483bp 序列的存在，能够导致启动子活性减弱，表明在果肉中，该段序列可能结合有转录抑制因子。为了验证该猜测，我们将 483bp 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，与探针结合的蛋白复合物，经过质谱鉴定分析，共获得 15 个目标蛋白（图 3b、c），其中一个为 WRKY 转录因子（Prupe.4G232600），另外 2 个（Prupe.2G302800 及 Prupe.6G284800）（表 2），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。



a: PpBL/PpNAC1 对 *PpMYB10.1* 启动子（携带与未携带 483bp）激活能力检测；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

a: Detection of PpBL/PpNAC1 activation to PpMYB10.1 promoter (with and without 483bp sequence), b: Polyacrylamide gel diagram of fruits nuclear protein in

test and control groups, c: Fruit nuclear proteins identified through mass spectrometry

图 3 483bp 序列影响 *PpMYB10.1* 转录机制分析

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

表 2 通过 DNA-pulldown 鉴定到的果实核蛋白

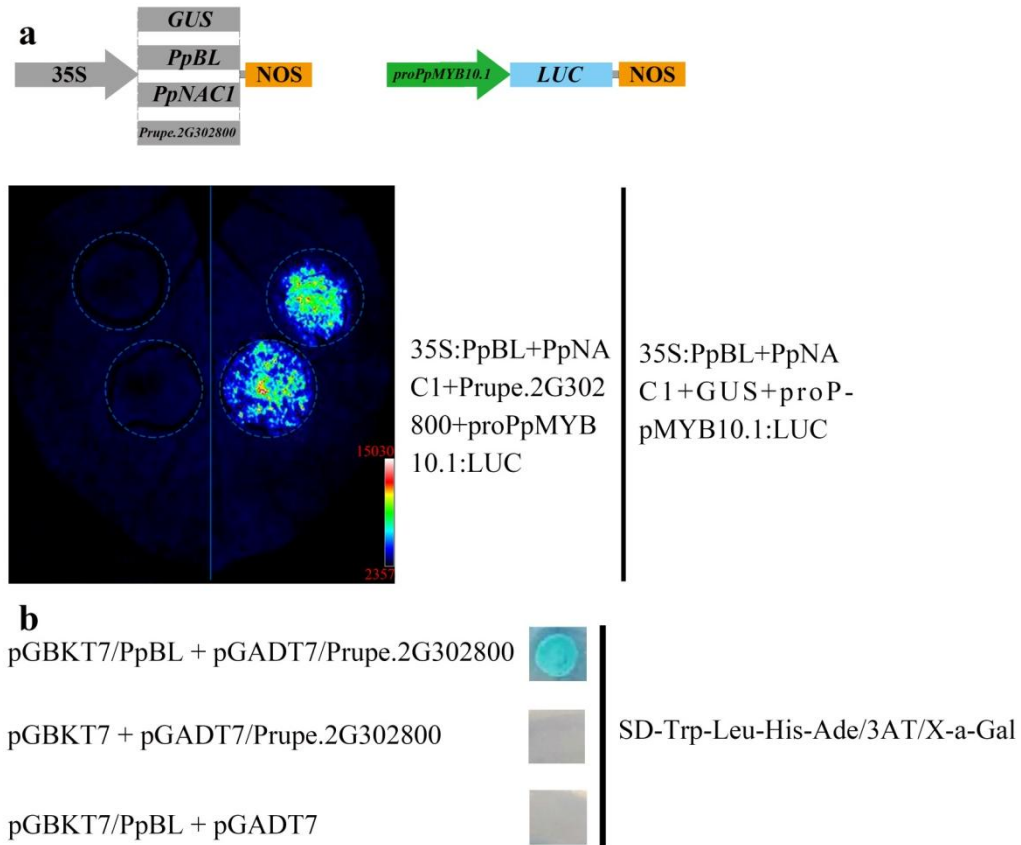
Table2 Fruit nuclear proteins captured through DNA-pull down assay

蛋白质登录号	基因编号	蛋白质分子量	注释信息
Accession	Gene ID	MW [kDa]	Description
A0A251MZG7	<i>Prupe.8G176700</i>	38.8	Uncharacterized protein
M5XHN6	<i>Prupe.1G253600</i>	15.1	Uncharacterized protein At4g28440
M5W271	<i>Prupe.7G227300</i>	45.9	Uncharacterized protein
A0A251R8E8	<i>Prupe.1G360400</i>	22.1	Uncharacterized protein
M5X1T4	<i>Prupe.2G232500</i>	38.5	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein
A0A251PT15	<i>Prupe.4G232600</i>	59.4	Probable WRKY transcription factor 20
M4QFW7	<i>Prupe.2G162400</i>	28.1	Phosphomannomutase
M5W5T0	<i>Prupe.6G284800</i>	12.1	Macrophage migration inhibitory factor homolog
M5X2Q0	<i>Prupe.4G074900</i>	19.5	Coatomer subunit zeta
A0A251R812	<i>Prupe.1G352200</i>	43.5	Alpha-galactosidase
M5WTZ0	<i>Prupe.4G038700</i>	34.9	PKS_ER domain-containing protein
M5X1L2	<i>Prupe.2G302800</i>	40.7	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog
A0A251NBV4	<i>Prupe.7G153600</i>	59.2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
Q38JC5	<i>Prupe.7G259600</i>	21.5	Temperature-induced lipocalin
M5VZS0	<i>Prupe.6G076300</i>	27.3	Uncharacterized protein

2.3 候选基因的功能验证

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)*: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 ‘*Prupe.4G232600+proMYB10.1(1609)*’ 及 ‘*Prupe.2G302800+proMYB10.1(1609)*’ 的注射位点，其 LUC 活性高于对照 ‘GUS+*proMYB10.1(1609)*’。而具有 ‘*Prupe.6G284800+proMYB10.1(1609)*’ 注射位点，LUC 活性几乎与对照 ‘GUS+*proMYB10.1(1609)*’ 相当（附表 1a、b 及 c）。这些表明，3 个候选基因对 *PpMYB10.1* 启动子不具有抑制活性。

有意思的是，在烟草叶片中，具有 ‘*Prupe.2G302800+PpBL+PpNAC1+proMYB10.1(1609)*’ 的农杆菌注射位点，LUC 活性明显低于 ‘GUS+*PpBL+PpNAC1+proMYB10.1(1609)*’，这表明 *Prupe.2G302800* 可能对 *PpBL* 或 *PpNAC1* 具有抑制作用（图 4a）。之后，*Prupe.2G302800* 克隆并连接到载体 pGADT7 上，*PpBL* 连接到 pGBDT7 上，二者共转化 Y2HGOLD。结果表明，携带此二者的酵母菌株，在 SD/-Ade-His-Leu-Trp/X- α -Gal/3AT 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 4b）。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，我们推测 *Prupe.2G302800* 可以与 *PpBL* 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。



a: 在携带与未携带 *Prupe.2G302800* 表达产物的注射位点, *PpBL*/*PpNAC1* 对 *PpMYB10.1* 启动子激活能力检测; b: *Prupe.2G302800* 与 *PpBL* 互作分析。
a: 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 4 *Prupe.2G302800* 功能分析

Fig. 4 *Prupe.2G302800* functional analysis

3. 讨论

花色素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 (UGT) [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]。这些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 TLLLFR, 下调花色素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原件, 以形成负反馈调节 [19][20]。

桃果肉中主要花色素苷为矢车菊-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* [22][15]。其中 *PpMYB10.1* 与 *PpbHLH3* 形成二聚体, 结合花色素苷主要结构基因 *PpDFR* 及 *PpUGT* 启动子序列, 正向调控其转录, 使果肉中花色素苷大量积累 [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 *PpUGT* 启动子, 抑制其转录 [15]。本研究表明, 携带 483bp 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。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]，它们可以与 HSP90 及 RAR1 结合成聚合物，提高植物的抗逆性^[24]。同样地，本研究也表明，Prupe.2G302800 可以与 PpBL 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。基于此，我们认为该基因可能通过间接地抑制 *PpMYB10.1* 表达，对桃果肉中花色素苷含量降低具有一定作用。另外，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*），这些成员是否在转录水平上对 *PpMYB10.1* 具有抑制作用，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*). China Agriculture Press, Beijing. 2005, 74-75
- [2] Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -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. 桃果肉花色素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: 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: 167-172
- [4] 丁体玉, 曹珂, 方伟超, 朱更瑞, 陈昌文, 王新卫, 王力荣. 红肉桃两类花色素苷积累模式与相关基因表达差异. *中国农业科学*, 2017, 50: 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: 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.
- [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, 阎连飞, 吴文龙, 李维林. 黑莓果实中花色素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, Karunairatnam S, Gleave AP, 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, Hellens RP, 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 AM. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 2008, 53: 814–827
- [17] Grotebold 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 KS, 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, et al. 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