

基于RNA-seq的套袋对‘天源红’猕猴桃果实花色苷合成关键结构基因表达的影响

李玉阔,方金豹,林苗苗,李志,孙世航,齐秀娟*

(中国农业科学院郑州果树研究所·中国农业科学院果树生长发育与品质控制重点开放实验室,郑州 450009)

摘要:【目的】探讨套袋对红肉猕猴桃果实生长发育过程中不同部位花色苷合成关键结构基因表达的影响,为解析光照对花色苷合成分子机制的影响提供依据。【方法】以全红型软枣猕猴桃‘天源红’为试材并对其进行套袋处理,在RNA-seq的基础上,筛选候选基因,利用实时荧光定量PCR对这些候选基因在‘天源红’盛花后7个时期的果肉样品中的表达量进行相对定量。根据荧光定量结果和聚类分析,最终确定关键候选基因,利用实时荧光定量PCR对关键候选基因在‘天源红’不同处理、不同时期、不同果实部位中的表达量进行相对定量分析,并对关键候选基因的表达量和花色苷含量进行相关性分析。【结果】12个候选基因在盛花后7个时期中的表达具有一定的规律,且各自的表达规律不尽相同。在果肉颜色明显变为红色的盛花后110 d, F3H、LDOX和F3GT的表达量较其他时期高。聚类分析结果显示, LDOX和F3GT分别聚为一类,且与其他的基因明显分开。LDOX在处理1和处理2的果肉以及处理3的果心中的表达量与花色苷含量呈极显著相关,而F3GT在处理1的果肉和处理3的果心中的表达量与花色苷含量呈极显著相关。【结论】LDOX和F3GT可能是‘天源红’果实花色苷生物合成途径中的关键结构基因。套袋抑制LDOX在‘天源红’外果皮、果肉中的表达,而一直套袋促进其在果心中的表达。套袋抑制了F3GT在果肉中的表达,而对果心中F3GT的表达无明显影响。

关键词: ‘天源红’猕猴桃;红肉;套袋;花色苷;结构基因;基因表达

中图分类号: S663.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)12-1509-11

Effect of bagging on expression of crucial structural genes of anthocyanin biosynthesis in ‘Tianyuanhong’ kiwifruit based on RNA-seq

LI Yukuo, FANG Jinbao, LIN Miaomiao, LI Zhi, SUN Shihang, QI Xiujuan*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences·Key Laboratory for Fruit Tree Growth, Development and Quality Control, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】The aim of this survey is to explore the effect of bagging on expression of crucial structural genes of anthocyanin biosynthesis of different parts of kiwifruit fruits in different stages of growth and development and provide evidence for the impacts of illumination on anthocyanin synthesis. 【Methods】Full red-flesh fruits of kiwifruit ‘Tianyuanhong’ were selected as materials for bagging treatments. According to the RNA-seq, 12 differential expression genes (DEGs) were screened. These 12 selected DEGs were conducted to analysis on the expression rule in the seven stages using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Finally, the crucial candidate genes were confirmed based the results of qRT-PCR and cluster analysis. And then the relative quantitative analysis of expression level of the crucial candidate genes in different treatments, different periods and different parts of fruits was

收稿日期: 2017-04-24 接受日期: 2017-08-12

基金项目: 国家自然科学基金(31401825);中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2016-ZFRI);河南省大宗水果产业技术体系(S2014-11)

作者简介: 李玉阔,男,在读博士研究生,研究方向为果树生理与栽培技术。Tel: 15225051312, E-mail: 461827234@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371-55906990, E-mail: qixiujuan@caas.cn

conducted by the qRT-PCR, and furthermore, the correlation analysis between expressions of genes and anthocyanin contents was also conducted.【Results】The expressions of 12 structural genes presented regular change rules although their expressions were different. The expression levels of *F3H*, *LDOX* and *F3GT* 110 days after full bloom (DAFB) when the flesh turned to be red were higher than those in other stages. The results of cluster analysis showed that *LDOX* and *F3GT* were respectively clustered into one class and were obviously separated from other genes. The expression level of *LDOX* of epicarp of treatment 1 displayed an increase trend and reached peak on 110 d during the growth and development of fruits. While the levels of *LDOX* of epicarp of treatment 2 and treatment 3 were lower than that of treatment 1, especially on 100 d and 110 d. This indicated that bagging treatment and bagging-debagging treatment could decrease the expression level of *LDOX* in epicarp when the flesh turned to be red. The changing rule of *LDOX* expression level of sarcocarp of treatment 1 was similar to the trend of epicarp. As the developing of fruit, the expression level of *LDOX* increased and reached its maximum value on 110 d and it was evidently higher than those in other stages. While the expression level of expression *LDOX* of treatment 2 and treatment 3 was obviously lower than that of treatment 1. This phenomenon suggested that bagging treatment and bagging-debagging treatment could decrease the expression level of *LDOX* in sarcocarp. There was no obvious changing rule for the expression of *LDOX* of columella of treatment 1 and treatment 2. However, the expression level of *LDOX* of treatment 3 was higher than that of treatment 1 and treatment 2 on 110 d, which hinted that bagging treatment promoted the expression of *LDOX* in columella. The expression level of *F3GT* in epicarp of treatment 1, treatment 2 and treatment 3 displayed a similar changing rule during the period of growth and development of fruit. The expression level of *F3GT* increased from 90 d to 110 d, but the expression level of *F3GT* of treatment 1 was higher than that of treatment 2 and treatment 3, especially on 110 d. And the expression level of *F3GT* of treatment 2 was higher than that of treatment 3. These phenomenon indicated that bagging-debagging treatment could increase the level of *F3GT* in epicarp. The expression level of *F3GT* in sarcocarp of treatment 1 displayed an increase trend and reached peak on 100 d, which was the same as the expression level of *LDOX* in sarcocarp. The expressing of *F3GT* in columella of treatment 1, treatment 2 and treatment 3 had no obvious rule. The expression level of *LDOX* in sarcocarp of treatment 1 and treatment 2 and the expression level of *LDOX* in columella of treatment 3 had a very significant correlation with anthocyanin content. And the correlation between expression level of *LDOX* in epicarp and sarcocarp of treatment 3 and anthocyanin content was statistically significant. The expression level of *F3GT* in sarcocarp of treatment 1 and the expression level of *LDOX* in columella of treatment 3 had a very significant correlation with anthocyanin content. And the correlation between expression level of *LDOX* in epicarp of treatment 3 and the expression level of *LDOX* in sarcocarp of treatment 2 and anthocyanin content were also statistically significant.【Conclusion】*LDOX* and *F3GT* might be the crucial structural genes of anthocyanin biosynthesis in the fruits of ‘Tianyuanhong’ kiwifruit. Bagging treatment inhibited the expression of *LDOX* in epicarp and sarcocarp, while it promoted the expression of *LDOX* in columella. Bagging-debagging treatment promoted the expression of *F3GT* in epicarp while it suppressed the expression of *F3GT* in sarcocarp, which was consistent with the expression rule of *LDOX* in sarcocarp. Bagging treatment had no obvious impact on expression of *F3GT* in columella.

Key words: ‘Tianyuanhong’ kiwifruit; Red-flesh; Bagging; Anthocyanin; Structural genes; Gene expression

猕猴桃隶属于猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属,该属植物约有75个分类群,包含54个种,21个变种,分布于我国的有52个种^[1]。果肉颜色作为果

实的品质特征之一,对水果的商品价值起着重要作用。猕猴桃果肉颜色多种多样,但生产上的栽培品种多为选自绿色果肉的美味猕猴桃(*A. chinensis* var.

deliciosa A. Chevalier)和黄色或仅内果皮为红色果肉的中华猕猴桃(*A. chinensis* Planchon)^[2]。关于猕猴桃维生素C、类胡萝卜素及类黄酮类物质代谢方面的研究已有相关报道^[3-11],但大多数的试验材料都选自大果类型的猕猴桃,并且在花色苷合成与积累方面的研究也较多地以‘红阳’为试验材料^[12],鲜有报道以全红型猕猴桃为试材进行相关着色方面的研究^[13],而关于套袋对红肉猕猴桃花色苷合成分子机制影响的相关研究更是少之又少。‘天源红’是从野生软枣猕猴桃中经过自然选种选育出的全红型猕猴桃新品种,成熟时果皮、果肉和果心均为红色,因其独特的果实颜色特征深受猕猴桃育种者的青睐。

转录组是特定组织或细胞在某一发育阶段或功能状态下转录出来的所有RNA的集合,RNA-Seq利用高通量测序技术对组织或细胞中所有RNA反转录而成的cDNA文库进行测序,通过统计相关reads数计算出不同RNA的表达量,发现新的转录本^[14]。RNA-Seq作为植物功能基因组学研究的重要手段,近年来在果树上已有不少成功的应用,如在果实发育与品质形成、芽发育及其调控、果树胁迫响应等方面都有RNA-Seq的应用报道^[15]。

作为影响花色苷合成最重要的环境因子之一,光照能够刺激花色苷合成途径中关键基因的表达来增加花色苷的积累量^[16-17]。套袋是人工干预果实接受光照的一种技术手段,通过有效调控果实生长发育过程中花色苷的生物合成,来调节果实表观色泽的形成^[18]。因此,在生产应用上,各类水果的套袋技术大都集中在改善果实外观品质上,例如在苹果、桃、梨上的套袋技术主要集中在改善果皮颜色上。在科学研究当中,套袋对果皮的影响已有相关报道,如‘红富士’苹果遮光处理之后其果皮不能合成花色苷^[19],水蜜桃套袋遮光会强烈抑制其果皮花色苷的积累^[20]等。随着研究不断深入,套袋对果肉的着色也有相关报道,如Espley等^[21]研究了光照对红肉苹果着色的影响,柳蕴芬等^[22]研究了套袋处理对红肉桃果肉红色形成的影响。笔者前期研究了套袋对2种不同类型红肉猕猴桃果实着色的影响,最终发现套袋处理对‘天源红’果实的影响主要集中在外果皮,果肉次之,对果心的影响较小^[23],除此之外,笔者还发现,套袋果实解袋能够促进‘天源红’猕猴桃果实外果皮、果肉更多地积累花色苷,甚至高于非套袋

果实,可以促进外果皮和果肉更好的着色。一直套袋阻碍‘天源红’果实花色苷的合成积累,影响着色。这些研究结果的获得依赖于对不同处理、不同部位及不同发育时期果实生理指标(色泽比、色度角、花色苷含量)的测定及分析,尽管这些研究结果对于解析光照对‘天源红’果实着色的影响提供了必要的生理依据支撑,但对于解析光照对花色苷合成分子机制的影响还存在一定的局限性,因此,笔者以‘天源红’为试材,依据转录组测序结果,筛选出候选基因,研究不同遮光处理对其果实不同部位候选基因的表达影响,为解析光照对猕猴桃红肉性状形成分子机制的影响提供有力证据。

1 材料和方法

1.1 样品采集和处理

试验材料采集于河南省栾川县大清沟乡‘天源红’猕猴桃生产基地。果园为水平大棚架整形,树龄7 a(年),砧木为野生软枣实生砧木,管理水平中等。选择6株盛果期树,各个树体树势基本一致,2株为1个小区,3次重复。分别进行如下处理:处理1,不套袋(对照);处理2,花后30 d进行单果套袋,花后70 d解袋;处理3,花后30 d进行单果套袋,直至采收不去袋。纸袋采用里黑外黄的双层不透光纸袋(中国农业科学院郑州果树研究所,郑果纸袋)。设置如下动态采样时期:处理1为盛花后30、50、70、80、90、100、110 d共7个时期;处理2和处理3为盛花后70、80、90、100、110 d共5个时期。每次采集均在每个小区架面的下部东、南、西、北4个方向各取3个果实共计12个果实,用装有生物冰的保温箱贮存,迅速带回实验室进行取样分析。

根据着色部位的不同,用刀片分别切取‘天源红’的外果皮、果肉(中果皮+内果皮)、果心,整个采样过程中,所有样品共计51份(处理1为21份,处理2为15份,处理3为15份)。将各部位切碎后立即用液氮冷冻,保存于-80℃冰箱供后期花色苷提取和分析使用。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取 总RNA提取采用改良的氯化锂沉淀法^[24]。具体操作流程为:事先配制CTAB溶液、8 mol·L⁻¹ LiCl溶液、体积比为24:1的氯仿/异戊醇。CTAB配方:2 g CTAB、2 g PVP、1.211 g Tris、0.931 g EDTA(Na₂)、11.7 g NaCl,DEPC水定容至100

mL; 8 mol·L⁻¹ LiCl 配方: 33.912 g LiCl, DEPC 水定容至 100 mL。(1)用液氮研磨样品为粉末, 研磨的越细越好, 将磨好的样品转移至 2 mL 无 RNA 酶的离心管中; (2)加入 1 000 μL CTAB 和 50 μL β-巯基乙醇, 振荡摇匀 3~5 min; (3)65 ℃水浴 15 min, 期间振荡摇匀 3 次; (4)水浴后取出加入 600 μL 氯仿/异戊醇, 振荡摇匀 1~2 min; (5)4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取 800 μL 上清液于另一干净的 1.5 mL 离心管中, 操作要谨慎, 尽量不要吸到中间的蛋白层, 加入 500 μL 氯仿/异戊醇, 振荡摇匀 1~2 min; (6)4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取 550 μL 上清于一干净的 1.5 mL 离心管中, 加入 150 μL LiCl 混匀, -20 ℃沉淀 8~16 h; (7)4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 弃掉上清液, 注意不要将沉淀倒出; (8)加入 500 μL 75% 乙醇洗涤, 4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后倒掉, 重复洗涤 1 次; (9)4 ℃, 12 000 r·min⁻¹, 空离心 1 min 后将管底的剩余液体吸取干净, 晾干沉淀 8~10 min, 使乙醇完全挥发; (10)加入 44 μL DEPC 水溶解约 5 min; (11)使用 TaKaRa 公司的 DNase I 进行 RNA 的纯化, 将前面溶好的 RNA 转移至 PCR 管中, 加入 5 μL 10× RNase-Free DNase Buffer、1 μL DNase I (RNase-free), 轻微振荡混匀, 并稍稍离心; (12)PCR 仪中 37 ℃ 30 min; (13)将样品转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 550 μL DEPC 水, 轻微混匀, 加入 600 μL 氯仿/异戊醇, 振荡摇匀 1~2 min; (14)4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取 400 μL 上清液, 由于此步为提取过程中的最后一次抽提, 因此吸取上清时需格外小心, 避免吸到中间的蛋白层, 加入 800 μL 无水乙醇, 颠

倒混匀, -80 ℃沉淀 3~4 h; (15)4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃掉上清, 沉淀用 75% 乙醇洗涤, 4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后倒掉, 重复洗涤 1 次; (16)4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 空离心 1 min 后将管底的剩余液体吸取干净, 晾干沉淀 8~10 min, 使乙醇完全挥发; (17)加入 20 μL DEPC 水溶解约 5 min; (18)琼脂糖凝胶电泳检测提取效果、微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific, NANO, DROP2000) 测定浓度。

1.2.2 反转录和荧光定量 PCR 根据已有报道^[25], 取 1 μg RNA 按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) 试剂盒操作指南进行反转录。12 个差异结构基因的序列根据转录组数据获得, 表 1 为 12 个结构基因的注释信息。利用 NCBI 里的 Primer-BLAST 在线设计引物 (由上海英骏生物技术有限公司合成), 以猕猴桃 Actin^[3] 作为内参基因, 上游引物为 TGCATGAGCGAT-CAAGTTTCAAG, 下游引物为 TGTCCCATGTCTG-GTTGATGACT。参照已有报道^[26], 确定荧光定量 PCR 反应体系及程序。10 μL 荧光定量 PCR 反应体系为: 2.5 μL ddH₂O, 5 μL SYBR Green I Master (As-bio Technology, Inc.), 0.5 μL 上游引物, 0.5 μL 下游引物, 1.5 μL cDNA。PCR 反应程序为: 95 ℃预变性 5 min, 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 20 s, 72 ℃ 20 s, 45 个循环。每次反应均以猕猴桃肌动蛋白 Actin 为内参基因, 3 次重复。使用 LightCycler480 Software release 1.5.0 对数据进行相对定量分析。采用 Excel 2010 进行绘图。

表 1 与花色苷合成相关差异基因的注释

Table 1 Annotation of differentially expressed genes on anthocyanin biosynthesis

基因 ID Gene id	Nr 注释 Nr-annotation
c130230_g1	Phenylalanine ammonia-lyase [<i>Daucus carota</i>]
c126583_g2	Cinnamic acid 4-hydroxylase [<i>Camellia chekiangoleosa</i>]
c123355_g1	4-coumarate:CoA ligase [<i>Petunia×hybrida</i>]
c114683_g2	Chalcone isomerase [<i>Camellia nitidissima</i>]
c110715_g4	Flavanone 3-hydroxylase [<i>Actinidia chinensis</i>]
c120031_g4	Leucoanthocyanidin dioxygenase [<i>Actinidia chinensis</i>]
c117486_g2	Flavonol synthase [<i>Camellia sinensis</i>]
c118500_g1	Flavonoid 3'-hydroxylase 2 [<i>Camellia sinensis</i>]
c128188_g2	Unnamed protein product [<i>Coffea canephora</i>]
c120091_g5	Hypothetical protein JCGZ_10726 [<i>Jatropha curcas</i>]
c130006_g1	PREDICTED: probable caffeoyl-CoA O-methyltransferase At4g26220 isoform X1 [<i>Vitis vinifera</i>]
c108941_g2	Flavonoid 3-O-galactosyltransferase [<i>Actinidia chinensis</i>]

1.2.3 确定关键结构基因 根据1.2.2的荧光定量结果,确定候选关键结构基因,并对候选基因在45份不同部位样品中的表达量进行相对定量分析,从而得出套袋对花色苷合成关键结构基因表达影响的结果。利用PermutMatrix-1.9.3对‘天源红’果肉花色苷合成相关结构基因在不同发育时期的差异表达进行聚类分析^[27]。

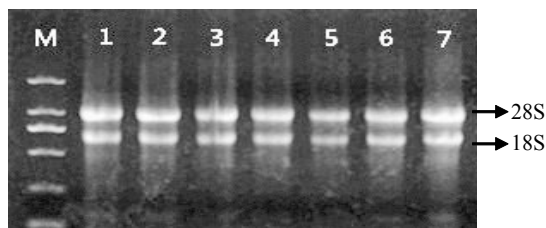
1.3 统计分析

试验所得数据采用SPSS 17.0 统计软件和Excel 2010 进行处理分析, $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 部分样品RNA提取

RNA提取纯化后经微量紫外分光光度计检测,样品质量浓度均在 $400 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上, $\text{OD}_{260/280}$ 为2.0~2.1, $\text{OD}_{260/230}$ 在2.0以上,经1%琼脂糖凝胶电泳检测(图1),28S和18S 2条主带清晰,表明RNA完整性好无明显降解,无蛋白质和DNA污染,可以用于后续反转录试验。



M. Marker 2000; 1~7. ‘天源红’处理1盛花后7个时期(30、50、70、80、90、100、110 d)样品RNA。

M. Marker 2000; 1~7. RNA of samples for 7 stages of treatment 1(30, 50, 70, 80, 90, 100, 110 d).

图1 RNA琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agrosegel electrophoresis of RNA

2.2 12个差异结构基因的表达分析

以猕猴桃Actin为内参基因,利用实时荧光定量PCR分析12个差异结构基因在‘天源红’果肉中不同发育时期的表达量变化。内参基因以及各差异结构基因的溶解曲线为单峰,引物特异性好,扩增曲线为标准的S型曲线,且3个重复的Ct值基本保持一致,相差不超过0.5个Ct值,扩增效果良好。

12个结构基因在‘天源红’处理1盛花后7个时期都有所表达,但各自的表达规律不尽相同(图2)。PAL、C4H、4CL、HCT和C3’H在生长发育前期即盛花后30、50 d呈现高水平表达,但随着果实的生长发育呈现低水平表达,而且4CL和HCT在后期的表

达量几乎为0;CHI、FLS和F3’H除了在盛花后30 d有较高水平的表达之外,其他各个时期的表达量均较低且彼此之间的差异不大;CCOMT在果实的整个发育过程中表达量呈现逐渐降低的趋势;LDOX在盛花后30和110 d有较高表达,在其余的各个时期表达量几乎为0。F3H和F3GT在后期的表达量明显高于前期,且2者在盛花后110 d较其他时期呈现明显的高水平表达。

2.3 12个差异结构基因的聚类分析

对‘天源红’果肉花色苷合成相关结构基因在不同发育时期的差异表达进行聚类分析,结果(图3)显示,LDOX、F3GT各单独聚为一类,与其他基因明显分开,说明2者的表达模式彼此不同并且与其他各基因也不相同,由此推测,LDOX和F3GT可能是‘天源红’果肉花色苷生物合成途径中起关键作用的结构基因。

2.4 候选关键结构基因在45份不同样品中的表达分析

根据之前的研究可以得知,‘天源红’处理1果肉花色苷含量在盛花后7个时期呈现逐渐升高的趋势,至花后110 d达到最大^[20]。而由上述2.2和2.3的结果,笔者推测,LDOX和F3GT的高水平表达促进了‘天源红’果肉花色苷的合成与积累,最终使果肉显现红色。从而确定LDOX和F3GT作为2个候选关键结构基因,并对其在不同时期、不同处理、不同部位(从盛花后70~110 d,共5个时期,3个部位,3个处理,共计45份)‘天源红’样品中的表达量进行分析(图4~5)。

LDOX在处理1外果皮中的表达量随果实的生长发育逐渐升高,至盛花后110 d达到最高,而处理2和处理3的表达量明显低于处理1,在生长发育后期的盛花后100 d和110 d尤为明显,说明在果实转变时期,套袋后解袋和一直套袋都能够明显降低LDOX在‘天源红’外果皮中的表达;LDOX在处理1果肉中的表达量变化趋势与在外果皮中的表达规律相一致,表现为随着果实的生长发育,LDOX的表达量逐渐升高,至盛花后110 d达到最大,且明显高于之前各个时期,而其在处理2和处理3的表达量明显低于处理1,说明在果实变为红色的关键期,套袋后解袋和一直套袋能够明显降低LDOX在‘天源红’果肉中的表达;LDOX在处理1、处理2果心中的表达并无明显的规律,但其在处理3中的表达量在盛花后

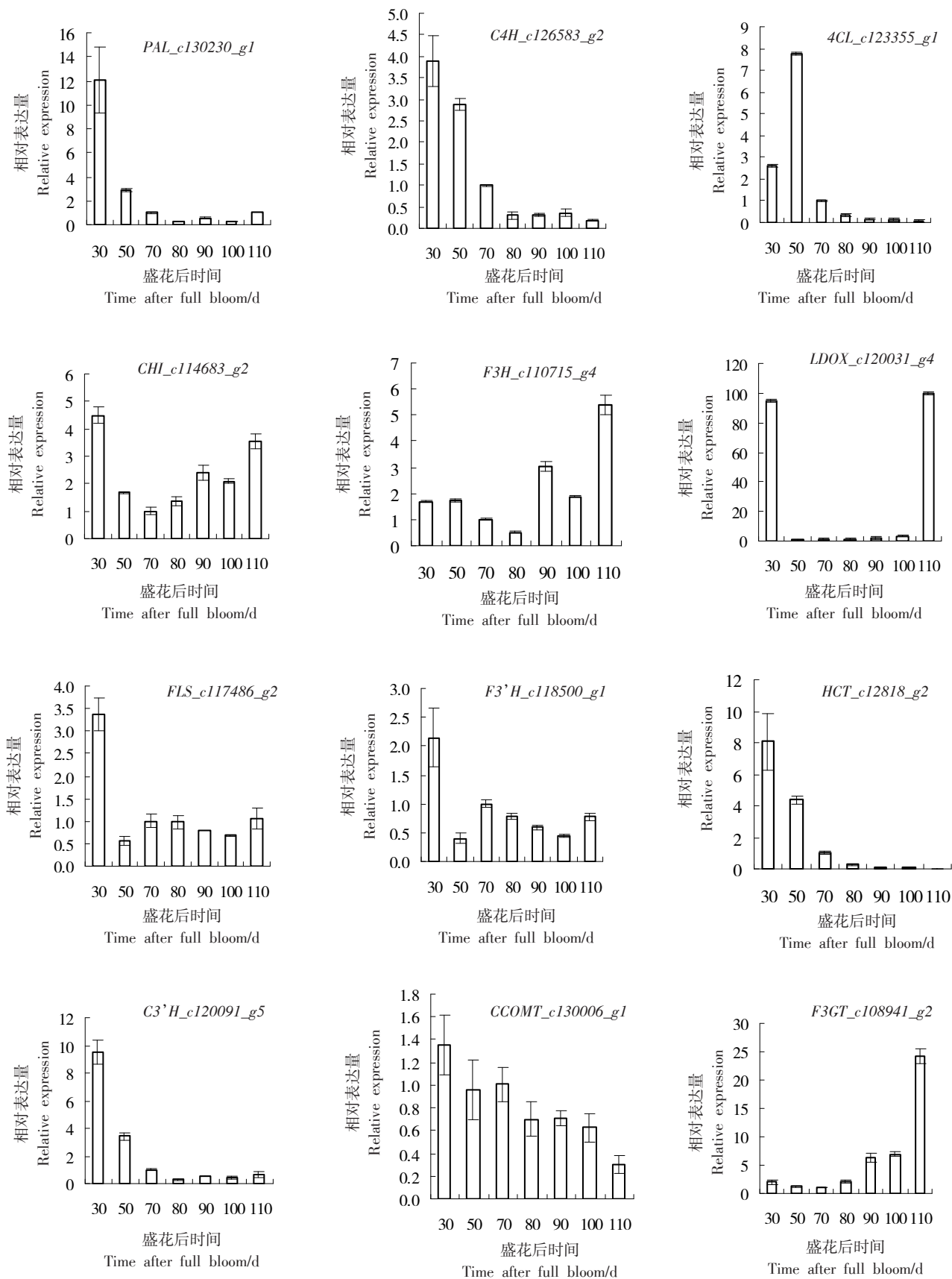
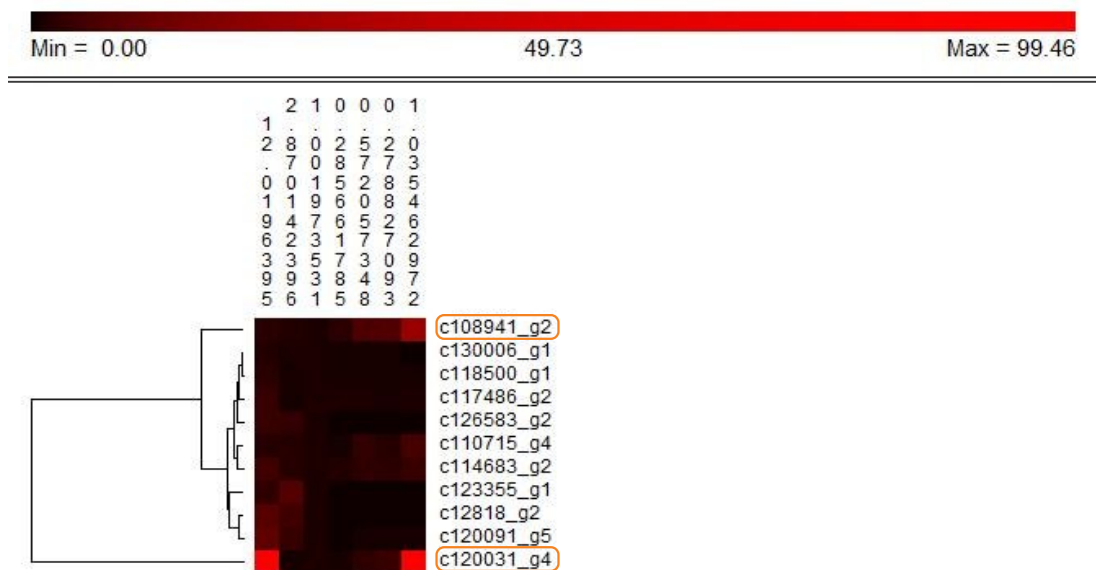


图 2 12 个结构基因荧光定量 PCR
Fig. 2 qRT-PCR for 12 structural genes



红色框表示高水平表达,黑色框表示低水平表达。

Red boxes indicate higher expression level, and black boxes indicate low expression level.

图 3 12 个结构基因的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 12 structural genes

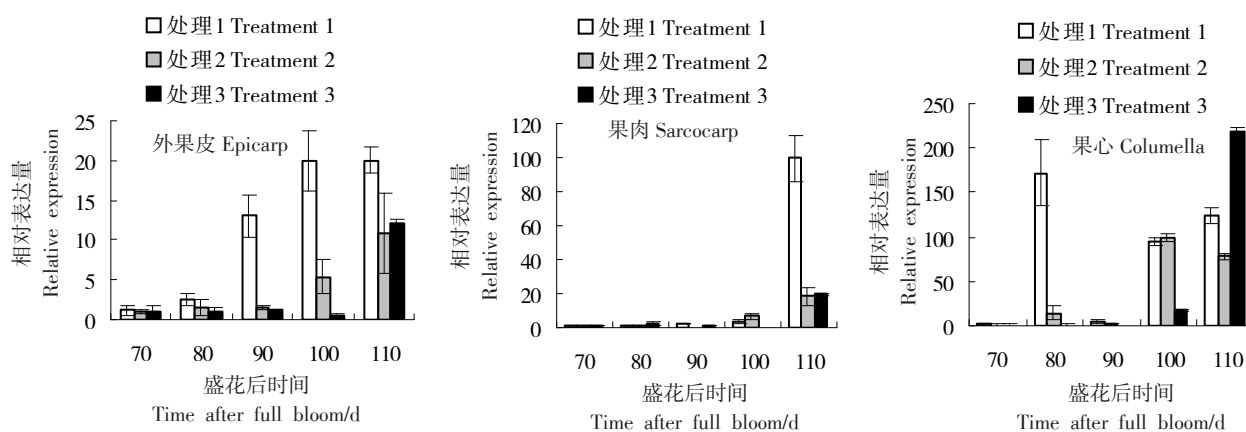


图 4 *LDOX* 在‘天源红’不同部位中的差异表达情况

Fig. 4 Differential expression of *LDOX* in different tissues of ‘Tianyuanhong’

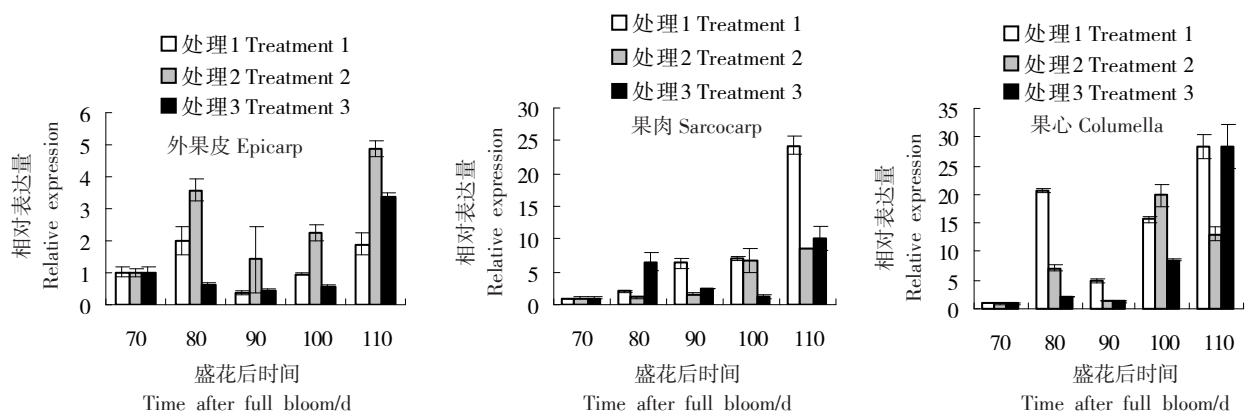


图 5 *F3GT* 在‘天源红’不同部位中的差异表达情况

Fig. 5 Differential expression of *F3GT* in different tissues of ‘Tianyuanhong’

110 d较处理1、处理2高,说明一直套袋对*LDOX*的表达起到了一定的促进作用(图4)。

在‘天源红’果实生长发育过程中,*F3GT*在处理1、处理2、处理3外果皮中的表达量具有相似的变化规律,从盛花后90 d开始至盛花后110 d,其表达量逐渐升高,但在处理1当中的表达水平低于处理2和处理3,特别是在果实颜色变为红色的盛花后110 d,*F3GT*的表达水平明显低于处理2和处理3,而处理3又低于处理2,说明套袋后解袋能够提高*F3GT*在外果皮中的表达水平;*F3GT*在处理1果肉中的表达量随着果实的生长发育逐渐升高,至盛花后110 d达到最大,并且显著高于处理2和处理3,表明在果实变为红色的关键期,套袋后解袋和一直套袋能够明显降低*F3GT*在‘天源红’果肉中的表达,这与*LDOX*在果肉中的表达现象保持一致;*F3GT*在处理1、处理2、处理3果心中的表达量出现交替增长的现象,且彼此之间的表达规律无明显趋势,说明套袋处理对果心中*F3GT*的表达水平无明显影响(图5)。

经多因素方差分析可知,外果皮中,*LDOX*的表达量在盛花后70、80、90与110 d之间具有显著性差异,在处理2、处理3与处理1之间具有显著性差异;*F3GT*的表达量在盛花后70、80、90、100与110 d之间具有显著性差异,在处理1、处理3和处理2之间具有显著性差异。果肉中,*LDOX*的表达量在盛花后70、80、90、100与110 d之间具有显著性差异,而在各处理间无显著性差异;*F3GT*的表达量在盛花后70、80、90、100与110 d之间具有显著性差异,而在各处理间无显著性差异。果心中,*LDOX*的表达量在盛花后70、90与110 d之间具有显著性差异,而在各处理间无显著性差异;*F3GT*的表达量在70、80、90与110 d之间及70、90与100 d之间具有显著性差异,而在各处理间无显著性差异。

2.5 花色苷含量与基因表达量的相关性分析

在‘天源红’整个发育过程中,*LDOX*和*F3GT*在‘天源红’不同处理、不同部位、不同生长发育时期的表达情况与花色苷含量的相关性如表2和表3所

表2 花色苷含量与*LDOX*表达量的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between anthocyanin content and expression level of *LDOX*

	<i>LDOX</i> 1	<i>LDOX</i> 2	<i>LDOX</i> 3	<i>LDOX</i> 4	<i>LDOX</i> 5	<i>LDOX</i> 6	<i>LDOX</i> 7	<i>LDOX</i> 8	<i>LDOX</i> 9
花色苷含量 The anthocyanin content	0.656	-0.52	0.958*	0.998**	0.998**	0.926*	0.365	0.814	0.979**

注:*表示在0.05水平上显著;**表示在0.01水平上显著。1~3表示处理1~3外果皮中的表达水平,4~6表示处理1~3果肉中的表达水平,7~9表示处理1~3果心中的表达水平。下同。

Note: * indicates significant difference at 0.05 probability level, while ** indicates at 0.01. 1-3 indicate the expression level of in epicarp of treatment 1-3, 4-6 indicate the expression level of in sarcocarp of treatment 1-3, 7-9 indicate the expression level of in columella of treatment 1-3. The same below.

表3 花色苷含量与*F3GT*表达量的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between anthocyanin content and expression level of *F3GT*

	<i>F3GT</i> 1	<i>F3GT</i> 2	<i>F3GT</i> 3	<i>F3GT</i> 4	<i>F3GT</i> 5	<i>F3GT</i> 6	<i>F3GT</i> 7	<i>F3GT</i> 8	<i>F3GT</i> 9
花色苷含量 The anthocyanin content	-0.522	0.781	0.989*	0.977**	0.919*	0.839	0.802	0.689	0.999**

示。花色苷含量数据来源于之前的研究结果^[23]。

由表2和表3可以看出,*LDOX*在处理1和处理2的果肉以及处理3的果心中的表达量与花色苷含量呈极显著相关,在处理3的外果皮和处理3的果肉中的表达量与花色苷含量呈显著相关;*F3GT*在处理1的果肉以及处理3的果心中的表达量与花色苷含量呈极显著相关,在处理3的外果皮和处理2的果肉中的表达量与花色苷含量呈显著相关。

3 讨 论

笔者依据前期转录组测序结果,筛选得到12个

与花色苷合成相关的差异候选基因,并应用实时荧光定量PCR技术检测了这12个基因在全红型软枣猕猴桃‘天源红’果实生长发育过程中果肉中的相对表达量。这12个候选基因在盛花后7个时期中的表达水平具有一定的规律,但各自的规律不尽一致。在果肉颜色明显转变为红色的盛花后110 d,*F3H*、*LDOX*和*F3GT*的表达量较其他时期明显升高,而通过聚类分析结果可以得知,*LDOX*和*F3GT*分别聚为一类,且与其他基因明显分开,因此笔者推测,*LDOX*和*F3GT*可能是‘天源红’果实花色苷合成途径中起关键作用的结构基因。本研究结果与在其他物种当

中的研究结果不一致,例如在葡萄果实成熟过程中,其果实花色苷的积累与 *F3H* 和 *UFGT* 这2个结构基因的的表达有密切联系^[28];在葡萄果皮中, *UFGT* 是花色苷生物合成的关键控制位点^[29];苹果果实发育过程中,其花色苷合成与积累情况与 *CHS*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 和 *UFGT* 5个结构基因的表达水平呈现正相关的现象^[30];在红色桃和油桃果实花色苷生物合成过程中起关键作用的基因是 *CHS* 和 *DFR*^[31]。 *DFR* 对草莓果实花色苷的合成起主导作用^[32];这些研究结果表明不同物种不同部位花色苷合成的控制位点不尽相同。目前,大多数关于红肉猕猴桃着色方面的研究都以红心品种如‘红阳’作为试验材料。研究显示,猕猴桃红肉性状的形成由多基因调控,但关于结构基因的相关研究主要集中在3个控制位点上,分别为 *F3H*、*DFR* 和 *UFGT*^[33]。 *CHS* 和 *LDOX*^[34]、*F3H*^[35]、*DFR*^[24]等基因都已在中华猕猴桃的红心品种‘红阳’中克隆得到。以‘红阳’猕猴桃突变体和‘FM-2’(一种野生红心猕猴桃)作为试材,进行花色苷相关分析研究,最终得知花色苷合成的关键结构基因很可能是 *F3H2* 和 *F3GT1*^[36-37]。在以上所有这些前人的研究当中,有的以不同树种如葡萄、苹果、草莓、桃、等为试验材料,有的以同一树种不同品种如‘红阳’‘FM-2’等为试验材料,有的以果实不同部位如葡萄果皮、苹果果皮等为试验材料,分别进行花色苷方面的相关研究,为探明各自树种的果实着色机制或果实不同部位的着色机制奠定了一定的分子基础。最终各自的研究结果并不一致,说明了不同树种、不同果实部位的花色苷生物合成的关键控制位点并不相同,且起关键作用的基因也存在差异;同一树种不同品种的果实花色苷合成过程中起关键作用的基因也不尽相同。

套袋果实由于其周围微环境的改变,其果实发育特性和果实品质都受到影响^[38-39]。光照是果实合成花色苷的必要前提,花色苷合成路径中的结构基因大多数为光诱导基因。本研究结果表明,套袋后解袋和一直套袋处理都能够明显降低 *LDOX* 在‘天源红’外果皮和果肉中的表达,而一直套袋促进其在果心中的表达,其表达水平在花后110 d甚至高于非套袋及套袋后解袋果实;套袋后解袋能够提高 *F3GT* 在外果皮中的表达,而明显降低在果肉中的表达,这与套袋后解袋能够明显降低 *LDOX* 在‘天源红’果肉中表达的结果相一致,而套袋处理对果心中的 *F3GT*

的表达水平并无明显影响。以上结果表明,套袋处理对 *LDOX* 和 *F3GT* 的表达规律影响有相似性,但同时也存在差异。例如一直套袋促进 *LDOX* 在果心中的表达,但对 *F3GT* 在果心中的表达并无明显影响。说明2者在不同部位的表达规律并不相同,至于造成这种差异的根本原因还需要进一步的深入研究。根据前人的研究,猕猴桃果肉不同组织区域感光量不同,中轴胎座的感光量只有表面的1/30,所以从果实表面到内部光照的剧烈梯度差异会导致果实花色苷含量分布的差异^[40-41]。本研究的试验结果为解释这些现象提供了分子水平的知识支撑,为解析光照对‘天源红’猕猴桃果实花色苷合成分子机制的影响提供了试验依据,为进一步的深入研究奠定可行性基础。

果实着色作为一种数量性状受多基因控制,并且易受多种环境因素的影响,除光照外,糖含量、温度、物理措施等因素均能够影响果实着色。因此,‘天源红’猕猴桃红色性状的形成及其调控机制是一个非常复杂的过程,单从结构基因和光照影响作为切入点进行其性状研究不足以解释其红色性状形成的根本机制。随着研究的不断深入,各种关键基因的克隆、内源激素水平的测定及相关组学方面的协同研究可以为揭示果实红色性状形成的根本原因提供充分依据。

参考文献 References:

- [1] 黄宏文. 猕猴桃属分类 资源 驯化 栽培[M]. 北京:科学出版社,2013.
HUANG Hongwen. Classification, resources, domestication and cultivation of *Actinidia*[M]. Beijing: Science Press, 2013.
- [2] 齐秀娟,徐善坤,林苗苗,李玉阔,孙雷明,方金豹. 红肉猕猴桃果实着色机制研究进展[J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1232-1240.
QI Xiujuan, XU Shankun, LIN Miaomiao, LI Yukuo, SUN Leiming, FANG Jinbao. Research advances on fruit coloring mechanism in red-fleshed kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1232-1240.
- [3] AMPOMAH- DWAMENA C, MCGHIE T, WIBISONO R, MONTEFIORI M, HELLENS R, ALLAN A. The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(13): 3765-3779.
- [4] LAING W, BULLEY S, WRIGHT M, COONEY J, JENSEN D, BARRACLOUGH D, MACRAE E. A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(48): 16976-16981.

- [5] LAING W, WRIGHT M, COONEY J, BULLEY S. The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanylttransferase, increases leaf ascorbate content[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(22):9534-9539.
- [6] LEDGER S, JANSSEN B, KARUNAIRETNAM S, WANG T, SNOWDEN K. Modified CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 expression correlates with altered branching in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. New Phytologist, 2010, 188 (3) : 803-813.
- [7] MONTEFIORI M, ESLEY R, STEVENSON D, COONYE J, DATSON P, SAIZ A, ATKINSON R, HELLENS R, ALLAN A. Identification and characterisation of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. Plant Journal, 2011, 65(1):106-118.
- [8] PARK Y, IM M, HAM K, KANG S, PARK Y, NAMIESNIK J, LEONTOWICZ H, LEONTOWICZ M, KATRICH E, GORINSTEIN S. Nutritional and pharmaceutical properties of bioactive compounds in organic and conventional growing kiwifruit[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2013, 68(1):57-64.
- [9] PILKINGTON S, MONTEFIORI M, JAMESON P, ALLAN A. The control of chlorophyll levels in maturing kiwifruit[J]. Planta, 2012, 236(5):1615.
- [10] TORABINEJAD J, DONAHUE J, GUNSEKERA B, MATTHEW J, ALLEN D, GILLASPY G. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants[J]. Plant Physiology, 2009, 150(2):951-961.
- [11] ZUO L, WANG Z, FAN Z, TIAN S, LIU J. Evaluation of antioxidant and antiproliferative properties of three *Actinidia* (*Actinidia kolomikta*, *Actinidia arguta*, *Actinidia chinensis*) extracts *in vitro* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13 (5) : 5506-5518.
- [12] LI W, LIU Y, ZENG S, XIAO G, WANG G, WANG Y, PENG M, HUANG H. Gene expression profiling of development and anthocyanin accumulation in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) based on transcriptome sequencing[J]. PLoS One, 2015, 10(8):e0136439.
- [13] 刘颖, 赵长竹, 吴丰魁, 陈锦永, 刘杰超, 顾红, 杨晓红, 方金豹. 红肉猕猴桃花色苷组成及浸提研究[J]. 果树学报, 2012, 29 (3):493-497.
LIU Ying, ZHAO Changzhu, WU Fengkui, CHEN Jinyong, LIU Jiechao, GU Hong, YANG Xiaohong, FANG Jinbao. Identification and extraction of anthocyanins in red-fleshed kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(3):493-497.
- [14] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用[J]. 遗传, 2011, 33(11):1191-1202.
QI Yunxia, LIU Yongbin, RONG Weiheng. RNA-Seq and its application: a new technology for transcriptomics[J]. Hereditas, 2011, 33(11):1191-1202.
- [15] 冯超, 朱长青, 徐昌杰, 陈昆松. RNA-Seq 在果树学研究中的应用[J]. 果树学报, 2014, 31(1):115-124.
FENG Chao, ZHU Changqing, XU Changjie, CHEN Kunsong. RNA-Seq technology and its application in fruit research[J]. Journal of Fruit Science, 2014, 31(1):115-124.
- [16] GUO J, HAN W, WANG M H. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: a review[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(25):4966-4972.
- [17] 胡可, 韩科厅, 戴思兰. 环境因子调控植物花青素苷合成及呈色的机制[J]. 植物学报, 2010, 45(3):307-317.
HU Ke, HAN Keting, DAI Silan. Regulation of plant anthocyanin synthesis and pigmentation by environmental factors[J]. Bulletin of Botany, 2010, 45(3):307-317.
- [18] 蔡金术, 王中炎. 套袋对‘楚红’猕猴桃果实品质的影响[J]. 湖南农业科学, 2009(1):118-121.
CAI Jinshu, WANG Zhongyan. Effects of fruit bagging on quality of ‘Chuhong’ kiwifruit[J]. Hunan Agricultural Science, 2009(1):118-121.
- [19] JU Z, YUAN Y, CHENG L, SHI H. Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple[J]. Science Horticulturae, 1995, 61:215-226.
- [20] 杜纪红, 叶正文, 张学英, 张绍铃. 套袋对水蜜桃‘红凤’和‘清水’果实着色的影响[J]. 上海农业学报, 2007, 23(2):72-76.
DU Jihong, YE Zhengwen, ZHANG Xueying, ZHANG Shaoling. Effects of bagging on the pericarpial coloration of juicy peach cultivars ‘Hongfeng’ and ‘Qingshui’ [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2007, 23(2):72-76.
- [21] ESLEY R, HELLENS R, PUTTERILL J, STEVENSON D, KUTTY-AMMA S, ALLAN A. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10[J]. The Plant Journal, 2007, 49(3):414-427.
- [22] 柳蕴芬, 刘莉, 段艳欣, 樊连梅, 刘更森, 刘成连, 原永兵. 光对红肉桃果肉红色形成的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(13):308-311.
LIU Yunfen, LIU Li, DUAN Yanxin, FAN Lianmei, LIU Gengsen, LIU Chenglian, YUAN Yongbing. Effects of sunlight on red color formation in the flesh of red-fleshed peach (*Prunus persica* L.) [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26 (13) : 308-311.
- [23] 李玉阔, 齐秀娟, 林苗苗, 李志, 方金豹. 套袋对 2 种类型红肉猕猴桃果实着色的影响[J]. 果树学报, 2016, 33(12):1492-1501.
LI Yukuo, QI Xiujuan, LIN Miaomiao, LI Zhi, FANG Jinbao. Effect of bagging on fruit pigmentation in two types of red-fleshed kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(12):1492-1501.
- [24] 杨俊, 姜正旺, 王彦昌. 红肉猕猴桃 DFR 基因的克隆及表达分析[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(6):673-681.
YANG Jun, JIANG Zhengwang, WANG Yanchang. Cloning and expression of dihydroflavonol 4-reductase in *Actinidia chinensis* var. *rufopulpa*[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2010, 28 (6):673-681.
- [25] 王晨, 刘洪, 房经贵, 宋长年, 曹雪, 杨光, 章镇. 基于 EST 数据库的葡萄 APETALA2 基因 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 果树

- 学报,2010,27(2):207-212.
- WANG Chen, LIU Hong, FANG Jingui, SONG Changnian, CAO Xue, YANG Guang, ZHANG Zhen. Cloning and expression analysis of APETALA2 gene from grapevine (*Vitis vinifera*) based on EST database[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(2): 207-212.
- [26] 王剑, 李炳锐, 李晓鹏, 朱旭东, 朱传根, 贾海锋. 利用葡萄糖代谢基因的表达评价不同氮肥肥效[J]. 园艺学报, 2016, 43(1): 1-14.
- WANG Jian, LI Bingrui, LI Xiaopeng, ZHU Xudong, ZHU Chuan-gen, JIA Haifeng. Evaluation of N fertilizers effects based on the expression of N metabolic genes[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(1): 1-14.
- [27] CARAUX G, PINLOCHE S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order [J]. Bioinformatics, 2005, 21(7): 1280-1281.
- [28] CASTELLARIN S D, DI G G. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines[J]. BMC Plant Biology, 2007, 7(1): 46-53.
- [29] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, DING C K, YAKUSHIJI H, GOTO N. Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-o-glucosyl-transferase (UGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin[J]. Plant Science, 2001, 160(3): 543-550.
- [30] KONDO S, HIRAOKA K, KOBAYASHI S, HONDA C, TERAHARA N. Changes in the expression of anthocyanin biosynthetic genes during apple development[J]. Journal of the American Society for Horticulture Science, 2002, 127(6): 971-976.
- [31] TSUDA T, YAMAGUCHI M, HONDA C. Expression of anthocyanin biosynthesis genes in the skin of peach and nectarine fruit [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(6): 857-862.
- [32] LI Y H, RYOZO S, HIROBUMI M, SANEYUKI K. Regulation of anthocyanin biosynthesis during fruit development in ‘Nyoho’ strawberry[J]. Engei Gakkai Zasshi, 2001, 70(1): 28-32.
- [33] 文欢, 刘永立. ‘红阳’猕猴桃全基因组 NBS-LRR 类基因家族的生物信息学分析[J]. 果树学报, 2015, 32(2): 413-419.
- WEN Huan, LIU Yongli. Bioinformatic analysis of the NBS-LRR gene family in kiwifruit ‘Hongyang’ [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(2): 413-419.
- [34] 张亮, 满玉萍, 姜正旺, 王彦昌. 猕猴桃花青素合成途径基因 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(11): 2124-2132.
- ZHANG Liang, MAN Yuping, JIANG Zhengwang, WANG Yan-chang. Cloning and expression of anthocyanin pathway genes, *AcCHS* and *AcLDOX*, in *Actinidia chinensis*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(11): 2124-2132.
- [35] 杨红丽, 王彦昌, 姜正旺, 黄宏文. ‘红阳’猕猴桃 cDNA 文库构建及 *F3H* 基因的表达初探[J]. 遗传, 2009, 31(12): 1265-1272.
- YANG Hongli, WANG Yanchang, JIANG Zhengwang, HUANG Hongwen. Construction of cDNA library of ‘Hongyang’ kiwifruit and analysis of *F3H* expression[J]. Hereditas, 2009, 31(12): 1265-1272.
- [36] 黄春辉, 葛翠莲, 张晓慧, 吴寒, 曲雪艳, 徐小彪. ‘红阳’猕猴桃突变体果实花青苷合成相关结构基因的表达分析[J]. 果树学报, 2014, 31(2): 169-174.
- HUANG Chunhui, GE Cuilian, ZHANG Xiaohui, WU Han, QU Xueyan, XU Xiaobiao. Expression analysis of structural genes related to anthocyanin synthesis in a mutant of ‘Hongyang’ kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science, 2014, 31(2): 169-174.
- [37] 黄春辉, 葛翠莲, 高洁, 张晓慧, 曲雪艳, 辜青青, 徐小彪. 红心猕猴桃果肉色泽变化及花青苷合成相关基因的表达[J]. 园艺学报, 2013, 40(增刊): 2597.
- HUANG Chunhui, GE Cuilian, GAO Jie, ZHANG Xiaohui, QU Xueyan, GU Qingqing, XU Xiaobiao. Changes of flesh color and Expression of genes related to anthocyanin synthesis in red kiwifruit[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(Suppl.): 2597.
- [38] 李秀菊, 刘用生, 束怀瑞. 红富士苹果套袋果实色泽与激素含量的变化[J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 209-213.
- LI Xiuju, LIU Yongsheng, SHU Huairui. Changes of fruit color and hormone content with bagging on *Malus pumila* Mill[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1998, 25(3): 209-213.
- [39] 卜万锁, 牛自勉, 赵红钰. 套袋处理对苹果芳香物质含量及果实品质的影响[J]. 中国农业科学, 1998, 31(6): 1-5.
- BU Wansuo, NIU Zimian, ZHAO Hongyu. Effect of Fruit-bagging treatment on the content of volatile aroma compounds and flesh quality of apple[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1998, 31(6): 1-5.
- [40] POSSINGHAM J V, COOTE M, HAWKER J S. The plastids and pigments of fresh and dried Chinese gooseberries (*Actinidia chinensis*) [J]. Annals of Botany, 1980, 45(5): 529-533.
- [41] 杨刚. 红阳猕猴桃果实色素变化规律和影响因素的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- YANG Gang. Studies on variation of the fruit pigments and its affecting factors in the ‘Red-sun’ kiwifruit[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2011.