

苹果 *PRE6-like* 基因的克隆及其在花青素合成中的功能分析

黄娟娟, 黄亚萍, 李文芳, 毛娟, 陈佰鸿*

(甘肃农业大学 园艺学院, 兰州 730070)

摘要:【目的】本研究拟通过验证苹果非典型成员多效唑抗性蛋白基因 (*PRE6-like*) 的功能, 探索其在花青素生物合成中的调控作用。【方法】基于‘俄矮2号’芽变枝条果皮转录组测序结果, 筛选获得花青素合成相关调节基因 *MdPRE6-like*, 对其进行生物信息学分析, 克隆 CDS 区并构建过表达载体, 瞬时表达‘金冠’苹果果实, 遗传转化苹果愈伤和拟南芥进行功能验证。【结果】*MdPRE6-like* cDNA 全长为 279 bp, 编码 92 个氨基酸, 相对分子量 10450.75 Da, 理论等电点 (pI) 为 6.41, 含有 HLH 结构域, 亚细胞定位预测结果为细胞核。组织特异性表达分析显示, *MdPRE6-like* 基因在花、果皮中的表达量显著高于根和叶。瞬时表达‘金冠’苹果显示, *MdPRE6-like* 显著促进了‘金冠’苹果果皮注射部位花青素的积累, 并显著提高了花青素合成通路相关结构基因的表达水平。*MdPRE6-like* 基因在苹果愈伤组织和拟南芥过表达发现, 转基因苹果愈伤组织和拟南芥叶脉中的花青素含量显著高于野生型, 且花青素合成通路结构基因表达水平上调。【结论】*Mdpre6-like* 基因能够正向调控花青素的合成和积累, 为后续 *MdPRE6-like* 基因参与改良苹果果实品质提供理论参考。

关键词: 苹果; *MdPRE6-like*; 花青素合成; 遗传转化; 表达水平

中图分类号: S661.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)05-0001-08

Cloning of the apple *PRE6-like* gene and analysis of its function in anthocyanin synthesis

HUANG Juanjuan¹, HUANG Yaping¹, LI Wenfang¹, MAO Juan¹, CEHN Baihong^{1*}

(¹College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: 【Objective】The *PREs* gene, also known as the polyoxazole resistance gene, belongs to the basic/helix-loop-helix (bHLH) transcription factor family. It lacks a DNA binding domain and typically forms homodimers or heterodimers to regulate the expression of target genes, thereby influencing plant morphology, cell size, pigment metabolism, and response to abiotic stress. This study aims to verify the function of the atypical member of the polyoxazole resistance protein gene (*PRE6-like*) in apple and explore its regulatory role in anthocyanin biosynthesis.

【Methods】The ‘Oregon Spur II’, which is highly prone to bud mutation, exhibits significantly improved fruit color compared to the original variety. A new mutant strain of the ‘Oregon Spur II’ apple was discovered, which exhibits early and intense coloring, with a reddish fruit surface at maturity, and stable variation traits. Based on transcriptome sequencing of bud mutation branch fruits’ skin from the ‘Oregon Spur II’ apple, a flower pigment synthesis-related regulatory gene,

收稿日期: 2024-01-31

接受日期: 2024-02-29

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD1602106); 甘肃省教育厅“双一流”重点科研项目(GSSYLXM-02); 甘肃省科技重大专项(22ZD6NA045)

作者简介: 黄娟娟, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树栽培技术与调控机理研究, E-mail: 2645265817@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13893210816, E-mail: bhch@gsau.edu.cn

MdPRE6-like was identified. The coding sequence (CDS) of the *MdPRE6-like* gene (MD14G1197600) was obtained from the apple genome website, and primers were designed using Primer5.0 to amplify the cDNA from 'Oregon Spur II' bud mutation branch fruit skin tissue. Bioinformatics analysis software was used for biological information analysis, and tissue-specific expression was analyzed using fluorescence quantitative PCR. The CDS region was cloned and ligated into the linearized expression vector pCambia1301-GFP. *Escherichia coli* DH5 α was heat-shock transformed, and *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 was transformed to construct the overexpression vector. Transient expression was performed in 'Golden Delicious' apple fruit, and the color changes of the skin under strong light conditions (12000 lx) were observed to preliminarily identify the gene's role in anthocyanin synthesis. Further functional validation was conducted through *Agrobacterium*-mediated transformation of apple callus and by the floral dip method in *Arabidopsis*.

【Results】 The *MdPRE6-like* is located on chromosome 14, with an open reading frame of 279 bp, encoding 92 amino acids. The molecular formula is C₄₄₄H₇₄₅N₁₃₇O₁₄₉S₂, with a relative molecular weight of 10450.75 Da and a theoretical isoelectric point (pI) of 6.41; The total hydrophobicity is -0.654, which is a hydrophilic protein with a lipid solubility index of 97.50 and an instability index of 85.86. It belongs to an unstable protein, and its secondary structure shows that the protein α Spiral structure accounts for 66.30%, irregular curls account for 32.61%, and extended chains account for 1.09%, so there are three α - The atypical bHLH protein composed of a spiral structure is consistent with the protein's tertiary structure. The subcellular localization prediction results of *MdPRE6-like* protein indicate that it may be localized in the nucleus. Multiple sequence alignment of its conserved domains with similar species revealed that the *MdPRE6-like* protein is an atypical bHLH protein containing an HLH domain. Organizational specific expression analysis showed that the expression level of *MdPRE6-like* gene in flowers and fruit peel was significantly higher than that in roots and leaves, indicating that this gene has a certain impact on the growth and development of apple fruit. Instantaneous expression of the 'Golden Delicious' apple showed that *MdPRE6-like* significantly promoted the accumulation of anthocyanins at the injection site of the 'Golden Delicious' apple peel, and increased the expression level of structural genes related to the anthocyanin synthesis pathway. The *UFGT* gene, also known as the 3-O-flavonoid glucosyltransferase gene, was significantly different from the control ($P \leq 0.001$); The overexpression of *MdPRE6-like* gene in apple callus and *Arabidopsis thaliana* revealed a significant increase in anthocyanin content in transgenic apple callus compared with the control. The expression level of *MdPRE6-like* gene was 5.22 times higher than that of the control, and the relative expression level of structural genes in the anthocyanin synthesis pathway was increased. The differences in *CHI*, *DFR*, and *F3H* compared to the control were extremely significant ($P < 0.001$), 5.22, 18.40, and 8.96 times higher, respectively; The accumulation effect of total anthocyanin content in the leaf veins of transgenic *Arabidopsis* is significant, and the expression level of *MdPRE6-like* gene in OE₁ and OE₃ strains is 9.22 and 7.14 times higher than the control, with extremely significant differences compared to the control.

【 Conclusion 】

MdPRE6-like gene can positively regulate the synthesis and accumulation of anthocyanins, promote the expression levels of structural genes in the anthocyanin synthesis pathway, and provide theoretical reference for the *MdPRE6-like* gene to participate in improving the quality of apple fruit in the future.

Keywords: *Mdpre6-like* gene; total anthocyanin content; expression level

苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 是温带地区最广泛生产经济水果作物之一, 也是全球营养水平最高和消费最广泛的水果之一^[1]。在苹果栽培中, 利用基因技术培育新品种, 改良苹果外观品质 (如色泽) 以提高经济效益, 推动苹果产业的发展。然而, 目前苹果产业面临气候变化、遗传基础缩小、营养质量下降等挑战^[2]降低苹果市场竞争力。因此, 提高果实竞争与适应能力、获取优质资源、确保产业可持续发展尤为重要。‘元帅’系苹果作为现今世界上最易发生芽变的苹果品种之一, 迄今已有 200 余种, 且芽变品系已发展到了第五代^[3]。俄矮 2 号 (*Oregon Spur II*) 是‘元帅’第四代芽变品种‘俄矮红’ (*Oregon Spur Del.*) 的芽变品种, 8 月下旬可着满色, 提早上市^[4]。

碱性/螺旋环-螺旋 (bHLH) 转录因子是调控植物对激素和逆境反应的大家族^[5]。在这类因子中, 其保守结构域能与其它转录因子和共激活或共抑制蛋白形成复合物, 调控花青素合成通路中结构基因转录活性, 进而影响花青素生物合成。在水稻^[6]中, S1 (bHLH) 作为主基因通过激活 C1 (MYB) 的表达, 然后 C1 激活 WA1 (WD40) 的表达, 以 MYB-bHLH-WD40 复合体的形式, 协同调节花青素生物合成基因; 拟南芥^[7]中, R 蛋白同源 bHLH 转录因子 TT8 蛋白是类黄酮后期生物合成基因 DFR 在拟南芥中正常表达所必需的。非典型成员多效唑抗性蛋白基因 (PREs), 作为 bHLH 家族成员, 含 HLH 结构域, 通常参与同源或异源二聚体的形成以调控目标基因的表达, 进而调节植物形态、细胞大小、色素代谢和非生物胁迫^[9]。PREs 基因的功能在多个物种中已被报道。在拟南芥中, 初步研究揭示了 *AtPREs* 参与赤霉素 (GA)、油菜素类固醇 (BR) 和光信号通路, 通过与 bHLH 蛋白的相互作用来调节植物的生长^[10]。Zheng 等^[11]研究中 *PRE6* 表达直接受 *ARF5* 和 *ARF8* 调节, 而 *PRE6* 是一种转录抑制因子, 对拟南芥中的生长素应答产生负调控; 拟南芥 *BNQ3* (*PRE4*) 基因在调节光反应中起作用, *BNQ3* 突变改变萼片和心皮颜色、降低叶绿素水平, 使花茎色泽变紫, 且能通过下调 *BNQ* 依赖性光形态发生和发育信号通路来调节花瓣生长发育^[12]; 番茄中, *SIPRE2* 与光形态的建成、赤霉素的响应及果实细胞发育有关, *SIPRE6-like* 蛋白与光形态建成相关因子 *SIPAR1* 互作, 进而调节细胞生长^[13]。

课题组在 2019 年于天水市麦积区的苹果主栽区发现了一株‘俄矮 2 号’苹果芽变枝条, 其突出特点是幼果期就能着色且着色良好、稳定, 成熟时果面出现晕红, 色泽艳丽。这可能暗示了该突变体具备提前合成和积累花青素的能力, 为探究该品种芽变是否为基因突变引起的调控异常, 本研究以‘俄矮 2 号’芽变苹果为材料, 利用前期转录组学分析获得的苹果花青素合成调控关键基因 *MdPRE6-like*, 对其进行生物信息学分析, 克隆其 CDS 序列并构建 *MdPRE6-like* 过表达载体。同时对‘金冠’苹果果实表皮瞬时表达分析进行了初步功能验

证，并通过遗传转化‘王林’愈伤组织和拟南芥，检测转基因植株中的花青素含量及花青素合成相关功能基因的表达水平，为深入研究花青素合成调控机制及应用基因工程改良苹果品质提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

‘俄矮2号’（*Oregon Spur II*）苹果种植于天水市麦积区苹果主栽区，‘金冠’（*Golden Delicious*）苹果由平凉市静宁果树果品研究所提供，拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、‘王林’（*Orin*）愈伤组织为甘肃农业大学园艺学院实验室所保存。

1.2 试验方法

1.2.1 *MdPRE6-like* 基因生物信息学分析

利用 EXPASY-Proparam tool（<https://web.expasy.org/protparam/>）预测 *MdPRE6-like* 蛋白的分子量和理论等电点。Portscale（<https://web.expasy.org/protscale/>）进行蛋亲疏水性分析，Signaip（<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>）进行信号肽的预测，利用 GSDS 2.0（<http://gsds.gao-lab.org/>）进行基因结构图谱构建，TMHMM（<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>）进行蛋白跨膜预测，WOLF PSORT（<https://wolfsort.hgc.jp/>）进行亚细胞定位预测，蛋白二级结构的预测用 SOPMA（https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html），利用 SWISS-MODEL（<https://swissmodel.expasy.org/>）进行蛋白三级结构预测。

1.2.2 *Mdpre6-like* 基因 CDS 克隆

苹果基因组网站（<https://iris.angers.inra.fr/gddh13/>）下载 *MdPRE6-like* 基因（MD14G1197600）的 CDS 序列，primer5.0 设计引物（表 1），以‘俄矮2号’芽变枝条果皮组织的 cDNA 为模板进行扩增，将扩增产物在琼脂糖凝胶电泳（1%）中分离后使用 SteadyPure(艾科瑞生物)试剂盒回收纯化。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences		
基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>O-MdPRE6-like</i>	ATGTCAAGCAGAAGATCATCATCATC	ATGCTGCAAAAGTCTTCTAATAAGCT
<i>Q-PRE6-like</i>	ACAACCTCTTCTTCTCAGCTT	TGCAGAATCCAGGAGTTGAGAT
<i>Q-MdCHI</i>	TTCCACCGTCCGTCAAACCT	CGGCGTTATCTCCAAGTACAC
<i>Q-MdCHS</i>	ATCACCAACAGCGAGCACAAAG	CTTCCACAACCACCATGTCCTG
<i>Q-MdDFR</i>	ATCGGCTCTTGGCTCGTCAT	CCTTCGGCAAGTCCAACAGATG
<i>Q-MdF3H</i>	ATGGCTCCTCTGCTACTACG	GGCAAGCGAGATGATCGGAAT
<i>Q-MdANS</i>	GAGGAAGTTCGCAAGGCTCAA	CTTGTGCTCGCTGTTGGTGAT
<i>Q-MdUFGT</i>	GCTCCATCCTCCGTCGTGTA	GCCTCCGCTATTGCCATCTG
<i>Q-MdMDH</i>	CGTGATTGGGTACTTGGAAC	TGGCAAGTGACTGGGAATGA
<i>Q-AiCHI</i>	TTTGTACCGTCCGTCAAGTC	CAATGACGGTGAAGATCACG
<i>Q-AiCHS</i>	TGAGAACCATGTGCTTCAGG	CAGATGCATGTGACGTTTCC
<i>Q-AiDFR</i>	GTCGGTCCATTATCACAAC	TGAGCGTTGCATAAGTCGTC

<i>Q-AiF3H</i>	TCAGATCGTTGAGGCTTGTC	ATGTCGAAACGGAGCTTGTC
<i>Q-AiANS</i>	TCAAGAAAGCCGGAAGAG	TTGTCCACTCGCGTTGTTAG
<i>Q-AiUFGT</i>	ACTTGCCGTGAGACAGAAGG	GGAGGGCTGATTAGGTTGGG
<i>Q-Atactin</i>	CCGCTTAATCCGAAGGCTAACCG	TGGCTCACACCATCTCCAGAGTC
<i>Hyg</i>	ATGAAAAAGCCTGAACTCACCG	CTATTCTTTGCCCTCGGACGA

注: *O-MdPRE6-like* 为 *MdPRE6-like* 基因 CDS 区克隆及过表达载体构建所用到的引物, *Q-MdPRE6-like* 为 *PRE6-like* 基因定量所用到的引物, *Q-Md* 为苹果表皮、苹果愈伤组织花青素合成通路中基因表达量检测所用引物, *Q-At* 为拟南芥中的花青素合成通路结构基因表达量检测所用引物, *Q-MdMDH* 表示苹果内参基因引物, *Atactin* 是拟南芥内参引物, *Hyg* 为潮霉素鉴定引物。

Note: *O-MdPRE6-like* is the primer used for cloning the CDS region of the *MdPRE6-like* gene and constructing overexpression vectors. *Q-MdPRE6-like* is the primer used for quantifying the *PRE6-like* gene. *Q-Md* is the primer used for detecting gene expression levels in the anthocyanin synthesis pathway of apple epidermis and apple callus. *Q-At* is the primer used for detecting gene expression levels in the anthocyanin synthesis pathway structure of Arabidopsis. *Q-MdMDH* is the primer used for detecting apple reference genes, *Atactin* is an Arabidopsis reference primer, while *Hyg* is a hygromycin identification primer.

1.2.3 *MdPRE6-like* 过表达载体构建

将纯化回收后的产物连接到线性化载体 pCAMBIA1301-GFP (实验室保存、BamHI 酶切) 上。热激转化大肠杆菌 DH5 α , 涂板过夜、挑取平板菌落至 1.5mL 离心管 (Lb 液体培养基+卡那), 大肠菌液 PCR, 挑选条带合适且亮的菌液送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序分析, 最后通过 DNAMAN 软件对测序数据进行比对分析测序。测序合适的大肠菌液利用质粒小提试剂盒 (北京天根) 提取质粒。

1.2.4 ‘金冠’苹果瞬时表达

通过热激法将构建好的 pCAMBIA1301-GFP 过表达载体转化到农杆菌感受态 GV3101 (北京博迈德基因技术有限公司) 中用于 ‘金冠’ 苹果果皮的瞬时表达。利用 10 mM 的 MES (水吗啉乙磺酸)、200 μ M 的 AS (乙酰丁香酮)、10 mM 的 MgCl₂ (氯化镁) 配制缓冲液, 重悬菌体后使用 2 mm 注射器注射苹果表皮, 每个注射孔 200 μ L, 完全黑暗条件 1 d, 之后转移至 12000 lx 强光条件, 持续照射 3-5 d, 观察并拍照记录着色部位后, 取样、速冻, 并于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.5 ‘王林’苹果愈伤组织和拟南芥的遗传转化

利用农杆菌转化法侵染 ‘王林’ 苹果愈伤组织^[14], 含 *MdPRE6-like* 的过表达农杆菌菌液活化离心后, 用 MS 液体培养基重悬菌体至 OD₆₀₀=0.5, 同时将愈伤悬浮 2-3 h, 复苏后菌液侵染 10-12 min, 纱布过滤、滤纸吸干平铺愈伤至 MS+3%蔗糖+6 g/L 琼脂的固体培养基, 暗培养 1.5 d, 洗菌, 转至筛选培养基 (筛选条件: 头孢 0.15g/L, 潮霉素 1 mg/L) 24 $^{\circ}$ C 暗培养一周, 之后转至光照培养箱 (16 h / 8 h 的光照/黑暗), 于筛选培养基上继代 3-5 次后观看愈伤表型, 愈伤表面着色后 Hyg (潮霉素) 鉴定, CTAB 法提取愈伤组织 DNA, 潮霉素进行 PCR 鉴定并将阳性愈伤组织进行扩繁。

拟南芥遗传转化采用花序浸蘸法, 热激转化合适的农杆菌液利用 Lb 液体培养基 (含 25 mg/L 卡那、25 mg/L 利福平) 于摇床 (28 $^{\circ}$ C、165 rpm) 培养, 离心, 利用现配侵染液 (1/2

MS+5%蔗糖+0.05% Siwet) 重悬至 $OD_{600}=0.8$, 复苏 2-3 h, 花序侵染 2 min, 侵染后黑暗条件 1 d 后转至自然光下室温培养。将收获的 T0 代种子 4℃ 春化后种于含 Hyg 的 MS 培养基 (MS+3%蔗糖+6g/L 琼脂+12.5 mg/L Hyg) 抗性筛选, 进行阳性植株初步的鉴定, 待拟南芥移栽至土壤基质 2 周后, CTAB 法提取植株幼叶 DNA, 潮霉素进行 PCR 鉴定, 将对应阳性植株标注, 种子单独收取, 得到 T1 代拟南芥, 重复以上步骤获得 T2 代, 最终获得纯合的 T3 代拟南芥。

1.2.6 总花色苷含量的测定

采用苏州梦犀生物医药科技试剂盒, 设置 3 个重复, 每个重复 0.2 g 鲜样, pH 示差法分别测定对照管和测定管于 530、700 nm 处吸光值, 利用计算公式测定花青苷含量, Spark 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司) 测定。

1.2.7 qRT-PCR

采集‘俄矮 2 号’芽变枝条在盛花期的根、茎、叶、花、成熟期的果实果皮用于 *MdPRE6-like* 基因的组织特异性表达分析; 瞬时表达着色部位的苹果果皮、转基因愈伤组织及转基因拟南芥用于测定 *MdPRE6-like* 基因及花青素合成通路中结构基因 (*CHI*、*CHS*、*DFR*、*F3H*、*ANS*、*UFGT*) 的表达水平。使用 RNA 提取试剂盒 (OMEGA 试剂盒) 提取以上组织中总 RNA, 超微量分光光度计测浓度检验 RNA 提取质量, 利用 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒 II 将 RNA 反转录为 cDNA, 测浓度, -20℃ 冰箱备用; 用荧光定量 PCR 仪 (罗氏诊断产品有限公司) 进行 PCR 反应, 反应体系及反应程序参考 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒。利用 primer5.0 软件进行引物设计 (表 1), 分别以苹果 *Q-MdMDH* 和拟南芥 *Atactin* 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

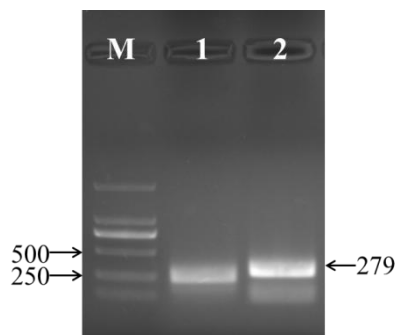
1.2.8 数据处理

利用 Excel 2010 数据处理, 利用 IBM SPSS Statistics 24 差异显著性分析, 利用 Origin 2022、插件 Paired Coparison Plot 多重配对比较进行显著性差异分析及作图。

2 结果与分析

2.1 *MdPRE6-like* 基因的克隆鉴定及生信分析

以‘俄矮 2 号’芽变枝条的果实 cDNA 为模板, 成功克隆到 *MdPRE6-like* 基因。电泳结果显示, 在 250~500 bp 之间出现了一条明亮条带 (图 1), 与目的基因预测结果 279 bp 相符合。



A: *MdPRE6-like* 基因克隆; M: Trans2K DNA Marker; 1~2 表示克隆所得目的条带。

A: *MdPRE6-like* gene cloning; M: Trans2K DNA Marker; 1~2 denotes the target bands obtained from cloning.

图 1 *MdPRE6-like* 基因扩增图谱

Fig. 1 *MdPRE6-like* gene amplification map

通过 PCR 技术克隆该基因后，对克隆到的基因利用软件进行生信分析，基因结构分析表明，*MdPRE6-like* 全长 723 bp，两段 CDS 序列被非编码区隔开，且在 CDS 序列两端还存在较长的非翻译区（图 2-A）。对 *MdPRE6-like* 蛋白理化性质分析，*MdPRE6-like* 位于 14 号染色体，开放阅读框 279 bp，编码 92 个氨基酸，分子式为 $C_{444}H_{745}N_{137}O_{149}S_2$ ，相对分子量为 10450.75 Da，理论等电点为 6.41，总疏水性为 -0.654，表明为亲水性蛋白（图 2-B），脂溶指数为 97.50，且蛋白不稳定指数 85.86，属于不稳定蛋白；跨膜预测结果显示该蛋白无跨膜区（图 2-C），因此是在细胞核中调控基因转录。

蛋白二级结构显示（图 2-D），该蛋白 α 螺旋结构占比 66.30%，无规则卷曲占比 32.61%，延伸链占 1.09%，因此是有三个 α -螺旋结构构成的非典型 bHLH 蛋白，这与蛋白三级结构相符合（图 2-E）。*MdPRE6-like* 蛋白亚细胞定位预测结果表明，其可能定位于细胞核。

将 *MdPRE6-like* 编码的氨基酸序列与相近物种的保守结构域进行多序列比对（图 3），结果分析发现，它们没有碱性区域，只含有 HLH 结构域。

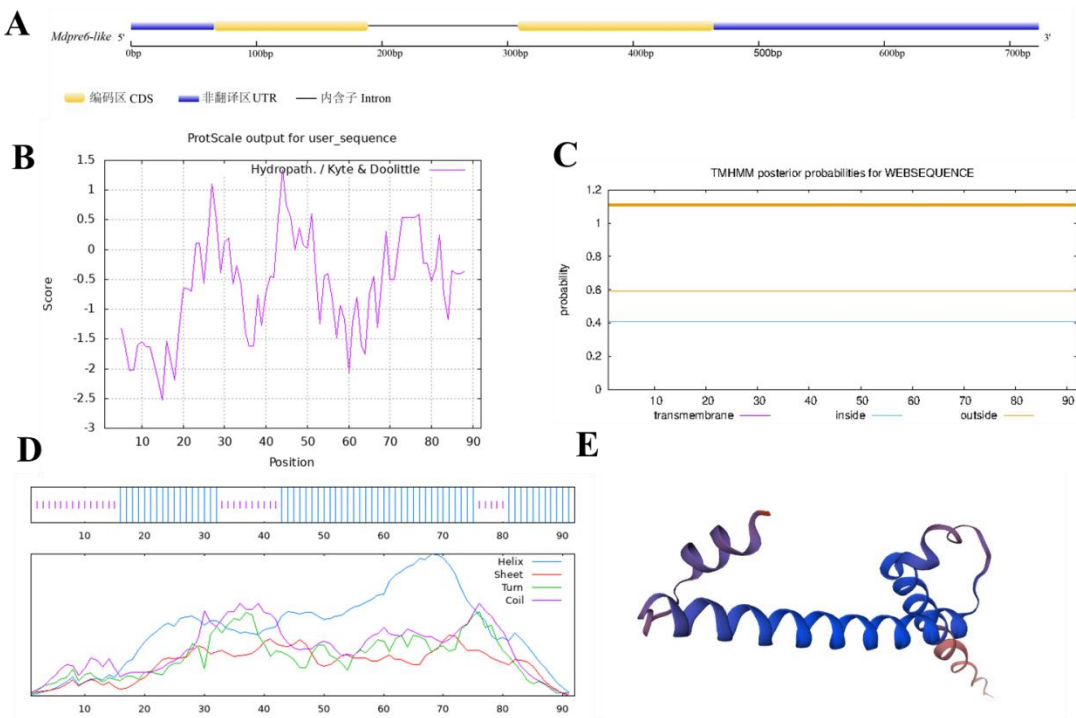


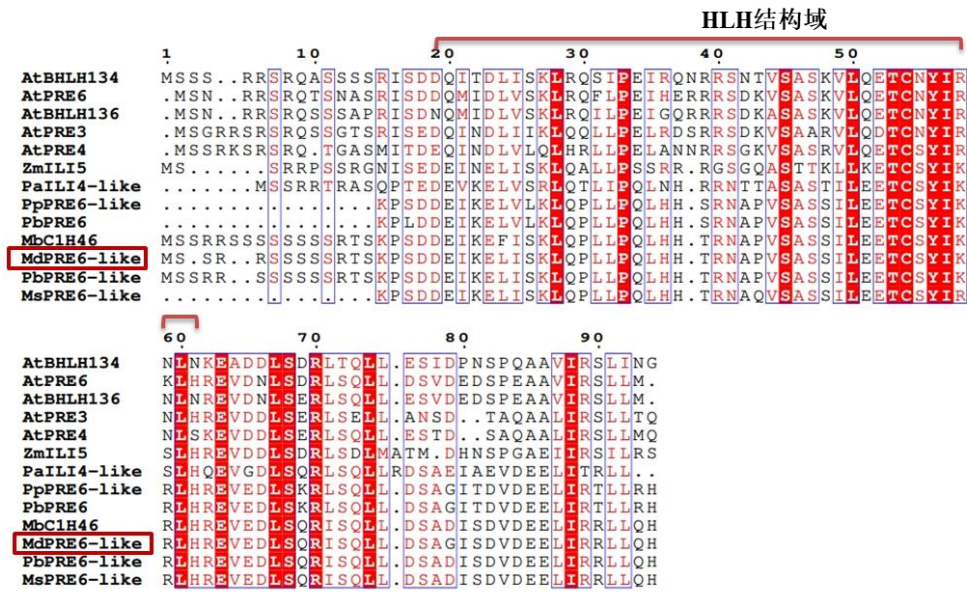
图 D 中蓝色的是（螺旋）Helix，紫色表示无规则卷曲。

Figure D shows the (Spiral) Helix in blue, purple indicates irregular curls.

图 2 苹果 *PRE6-like* 基因结构 (A)、蛋白亲水性 (B)、跨膜结构域 (C)、二三级结构 (D、E) 的预测分析

Fig. 2 Prediction of apple *PRE6-like* gene structure (A), protein hydrophilicity (B),

transmembrane structural domains (C), and secondary and tertiary structure (D, E)



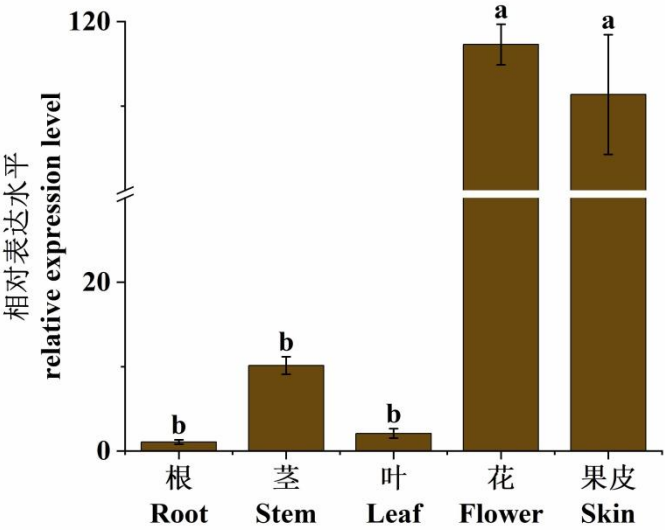
MdPRE6-like(XP_008393138.2); 其他蛋白的序列号为: AtbHLH134(Q9LXG5.1); AtPRE6(Q8GW32); AtbHLH136(Q9FLE9.1) ; AtPRE3(Q9CA64.1) ; AtPRE4(F4JCN9) ; ZmIL15(NP_001152510.1) ; PAILI4-like(XP_050378613.1) ; PpPRE6-like(KAB2633469.1) ; PbPRE6(XP_009369317.1) ; MbC1H46(TQD92014.1); PbPRE6-like(XP_048443949.1); MsPRE6-like(XP_050120653.1)

图 3 *MdPRE6-like* 的氨基酸序列比对

Fig.3 Sequences alignment of the *MdPRE6-like* protein

2.2 *MdPRE6-like* 基因组织特异性表达分析

将‘俄矮2号’突变材料所提取 RNA 反转录为 cDNA，以苹果 *Q-PRE6-like-F*、*Q-PRE6-like-R* 为引物（表 1），qRT-PCR 检测 *MdPRE6-like* 基因在苹果不同组织中的表达情况，结果表明，*MdPRE6-like* 在苹果花和果实中的表达量最高，其次是茎和叶，根系表达量最低（图 4）。表明该基因对苹果果实生长发育有一定的影响。



不同小写字母代表差异显著 ($p<0.05$)。

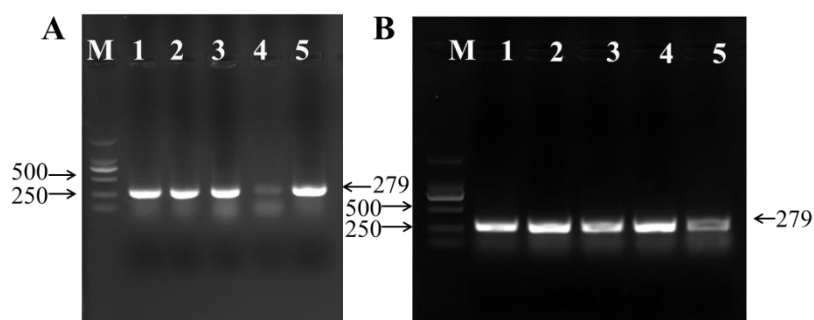
Different small letters represent significant difference ($p<0.05$).

图 4 *MdPRE6-like* 基因在苹果不同组织中的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *MdPRE6-like* gene in different tissues of apple

2.3 *MdPRE6-like* 基因过表达载体构建

对 PCR 产物进行纯化和回收，并连接表达载体 pCAMBIA1301 上，转染到大肠杆菌感受态 DH5 α 中，测序结果与目的序列结果一致，过表达载体构建成功（图 5-A）。将测序结果正确的大肠杆菌质粒转化农杆菌感受态 GV3101，农杆菌转化结果合适（图 5-B）。



A: *MdPRE6-like* 基因表达载体大肠杆菌菌液 PCR 结果; M: Trans2K DNA Marker; 1~5 表示 *MdPRE6-like* 基因表达载体大肠杆菌菌液 PCR 条带; B: *MdPRE6-like* 基因农杆菌菌液 PCR 结果; M: Trans2K DNA Marker。

A: *MdPRE6-like* gene expression vector *E. coli* bacteriophage PCR results; M: Trans2K DNA Marker; 1~5 denotes *MdPRE6-like* gene expression vector *E. coli* bacteriophage PCR bands; B: *MdPRE6-like* gene *Agrobacterium tumefaciens* PCR results; M: Trans2K DNA Marker.

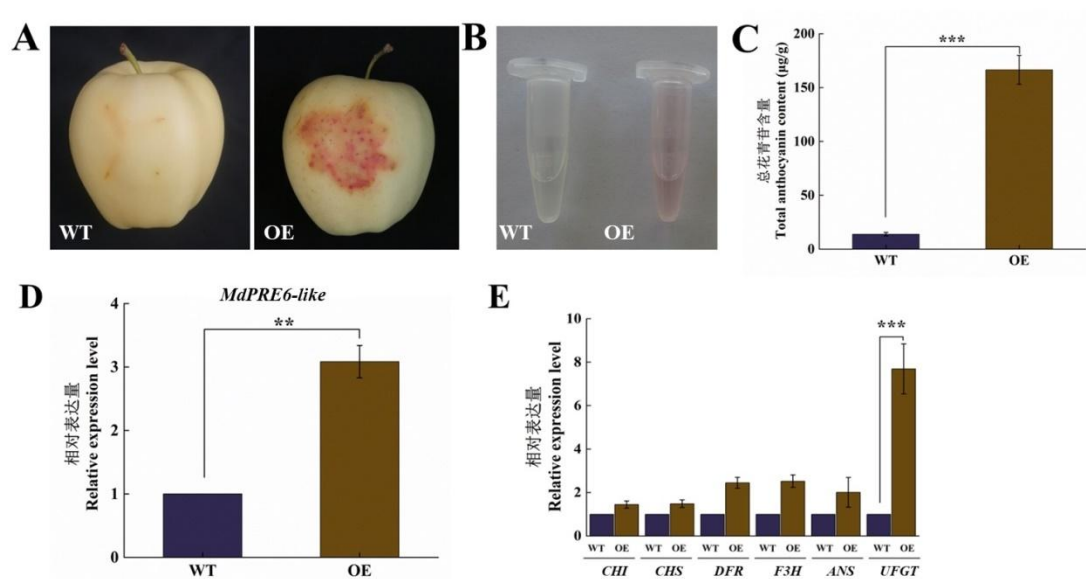
图 5 苹果 *MdPRE6-like* 基因 PCR 图谱

Fig. 5 PCR map of *MdPRE6-like* gene in apples

2.4 *MdPRE6-like* 基因的生物学功能分析

2.4.1 ‘金冠’苹果果皮瞬时注射

通过瞬时注射‘金冠’苹果果皮，结果显示，过表达 *Mdpre6-like* (OE) 显著提高了果皮注射部位的着色和总花青苷的含量（图 6A-C），且过表达部位总花青苷含量是对照 (WT) 的 10 倍，*OE-Mdpre6-like* 基因的相对表达量与 WT 差异显著（图 6D）。利用 qRT-PCR 进一步分析果皮中花青素合成通路中相关酶基因的转录水平，发现 *OE-UFGT* 基因的相对表达量与 WT 差异显著，*OE-DFR*、*OE-F3H* 表达量是 WT 的 2-3 倍，其它基因也上调，但差异不显著（图 6E）。因此，我们可以推断，果皮中 *Mdpre6-like* 基因表达量的上升影响到花青素的积累及花青素合成通路酶基因转录水平的提高。



A: 对照及过表达 *MdPRE6-like* 苹果表皮表型观察; B: 果皮总花青苷提取液对照图; C: 过表达果皮总花青苷含量; D: 过表达 *MdPRE6-like* 基因相对表达量; E: qRT-PCR 分析。WT: 空载作为对照, OE: 过表达; *代表 $p<0.05$, **代表 $p<0.01$, ***代表 $p<0.001$; 下同。

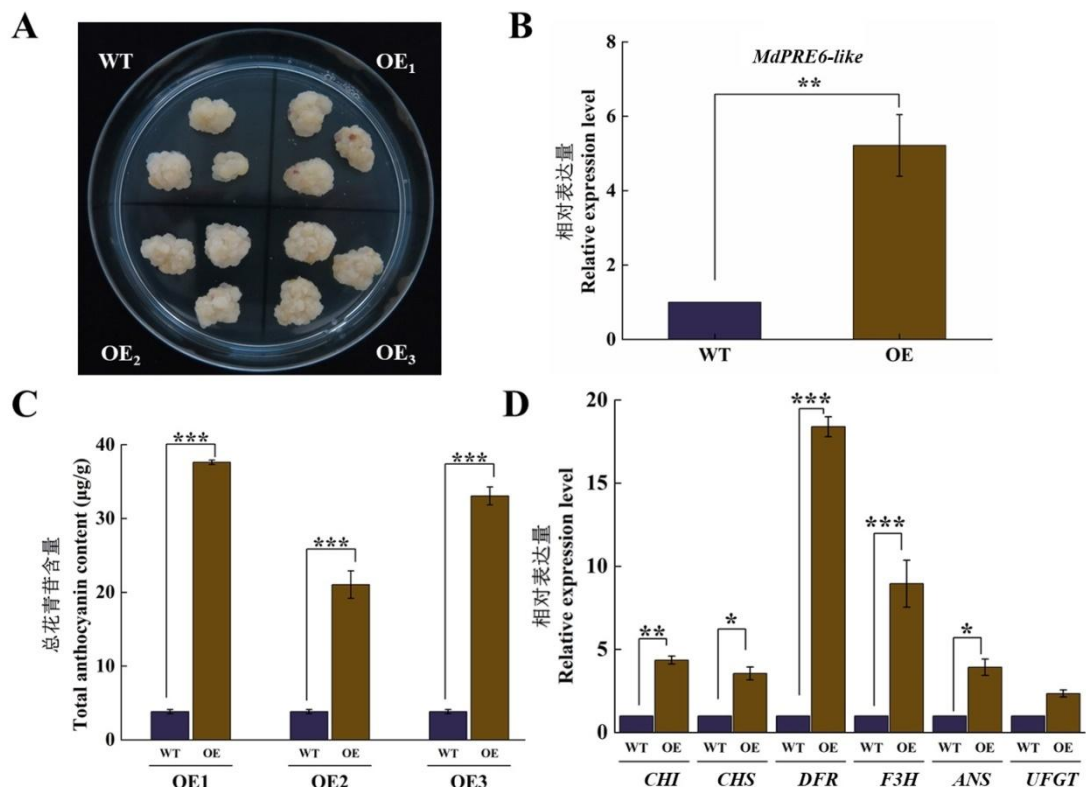
A: Control(WT) and overexpression(OE) of *MdPRE6-like* apple epidermal phenotype observation; B: Comparison diagram of total anthocyanin extract from fruit peel; C: Overexpression of total anthocyanin content in fruit peel; D: Overexpression of *MdPRE6-like* gene relative expression level; E: qRT-PCR analysis. WT: Empty as a reference, OE: overexpression; * represents $p<0.05$, * * Represents $p<0.01$, * Representing $p<0.001$;the same below.**

图 6 *MdPRE6-like* 基因在苹果果皮中的瞬时表达分析

Fig. 6 Transient expression analysis of *MdPRE6-like* gene in apple peel

2.4.2 *MdPRE6-like* 基因在苹果愈伤组织中的过表达

MdPRE6-like 基因在苹果愈伤组织中的过表达结果如图 7-A 所示,愈伤组织中点状红色色素明显积累,这说明 *OE-MdPRE6-like* 能够促进总花青苷含量的积累。为了验证这一表征,我们对愈伤组织中红色组织扩繁后进行总花色苷含量的测定,结果证实过表达愈伤组织中的 *MdPRE6-like* 基因表达量显著升高,是 WT 的 5.22 倍,且总花色苷含量极显著高于 WT (图 7-B、C)。为了进一步说明苹果 *MdPRE6-like* 能够调控花青素合成,对过表达 *OE-MdPRE6-like* 系进行花青素合成通路中相关酶基因测定,所有合成基因都出现了上调,其中, *DFR*、*F3H* 基因相对表达量极显著上调 (图 7-D)。



A: 转基因愈伤表型图; B: 过表达愈伤组织 *MdPRE6-like* 基因表达量; C: 过表达愈伤组织总花青苷含量测定; D: qRT-PCR 分析。

A: Transgenic callus phenotype map; B: Overexpression of *MdPRE6-like* gene expression in callus tissue; C: Determination of total anthocyanin content in transgenic callus tissue; D: qRT-PCR analysis.

图 7 *MdPRE6-like* 基因在苹果愈伤中花青素合成的功能分析

Fig. 7 Functional analysis of *MdPRE6-like* gene on anthocyanin synthesis in apple callus

2.4.3 *MdPRE6-like* 基因在拟南芥中的过表达

为了验证 *MdPRE6-like* 基因在拟南芥花青素合成中的功能，将收获的 T0 代种子经过抗性筛选及阳性植株鉴定（图 8-A），发现抗潮霉素的植株长势好，对潮霉素无抗性的几乎不生长，保持发芽时幼小状态。取阳性苗幼叶提取 DNA 鉴定发现，有部分条带较亮，部分无条带，T2 代拟南芥（图 8-B）鉴定结果显示，抗性苗和非抗性苗比例达到 3: 1，选取对应条带较亮的拟南芥幼苗扩繁，得到纯合 T3 代拟南芥植株。图 8-C 显示了过表达株系和野生植株的表型对照，观察可见，过表达株系的叶片叶脉部位明显较野生型深，且表现出紫红色。进一步的数据分析发现，三株过表达植株的花青素含量显著高于野生型（图 8-D），其中，*MdPRE6-like* 基因表达量分别达到 9.2、4.7、7.1，与 WT 差异显著（图 8-E）。对 *MdPRE6-like* 转基因拟南芥花青素合成相关酶基因的转录水平进行测定发现，除 *CHI*、*UFGT* 基因上调但与 WT 无显著性差异，其他的合成基因包括 *CHS*、*F3H* 均被显著上调，其中 *DFR* 与 *ANS* 极显著上调（图 8-F）。

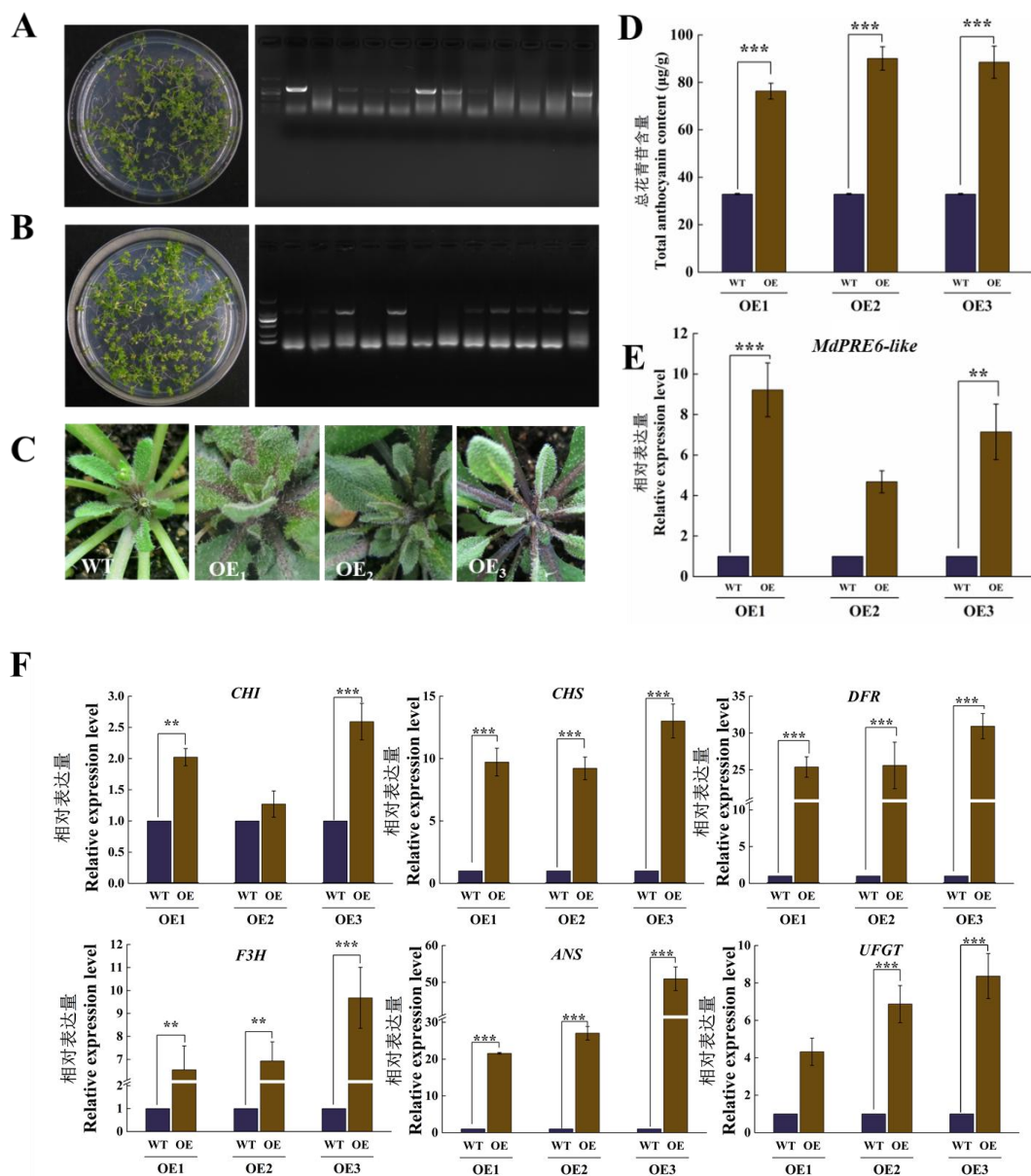


图 8 *MdPRE6-like* 在拟南芥花青素合成中的功能分析

Fig. 8 Functional analysis of *MdPRE6-like* in anthocyanin synthesis in Arabidopsis

3 讨论

基因在植物组织中的差异性表达是植物适应多样化环境和实现不同功能的重要机制之

一。例如，某些基因可能在根部中高度表达，而在叶片中表达较低。这种差异性表达可以导致根部和叶片在形态和功能上的差异^[15]。此外，植物基因的差异性表达还可以通过组织特异性启动子和转录因子结合位点的存在来实现，这些启动子和结合位点可以在特定组织或细胞类型中被激活，从而调控特定基因的表达^[16]。通过组织特异性表达分析，我们发现 *PRE6-like* 基因在苹果不同组织中表现出不同的表达模式。在苹果花和果实中的表达水平高，而花青素是一种常见的存在于植物花朵和果实中的色素，预测它在果实色泽形成过程中，通过光来实现果皮花青素的积累。

PREs 基因 (*Paclobutrazol Resistance genes*)，又名多效唑抗性基因，植物对多效唑具有抵抗能力，可调节植物形态、细胞大小、色素代谢并响应不同植物激素的非生物胁迫。目前对于 *PREs* 基因的研究大都集中于光合与激素信号传导，韩金秀等^[17]研究表明，在烟草中过表达 *bHLHI* 基因能够影响光合色素含量，进而影响到植物的光和能力；王丽霞等^[18]研究中，发现光激活的蓝光受体隐色体或红光受体与 *COP1-SPA* 相互作用，介导蓝光或红光/远红光的转导，从而抑制 *COP1-SPA* 对下游光形态发生转录因子 *HY5* 的降解，促进植物光形态发生的 *HY5* 的积累。在 Yu 等^[19]研究中，*MdLNC610* 通过作为促进 *MdACO1* 表达和乙烯生物合成的正向调节剂参与高光诱导花青素产生的调节。本研究结果显示，‘金冠’苹果处于高强白光状态下，果皮注射 *MdPRE6-like* 基因的部位呈现明显色素沉着，且 *MdPRE6-like* 基因表达量上升，表明强光诱导 *MdPRE6-like* 基因的上升，植物通过花青素的积累以对抗光胁迫引起的氧化压力。且在强光照射下，这些转基因愈伤组织中的外源基因更活跃地表达，激活植物体内的一系列代谢途径，使得愈伤组织中花青素的积累增加。齐方婷等^[20]研究中，转录因子直接或间接调节结构基因表达，控制植物花斑形成，而结构基因通过时间空间特异性表达以及基因间竞争机制，促进了色素在花瓣间差异积累形成花斑。拟南芥作为一种常用模式植物，对于研究植物的次生代谢和基因调控具有重要意义；本试验转化拟南芥结果显示，*MdPRE6-like* 基因的过表达促进拟南芥叶脉部位花青素的积累，而在叶片部位积累不明显，猜测花青素合成途径中的某些关键酶类基因受到了特定组织中其他基因的调控，使得花青素只在叶脉中积累^[21]；也可能与叶脉组织中的代谢调控网络相关，叶脉组织内的物质运输机制促进了花青素在该位置的积累，而其他组织则可能存在限制花青素运输或稳定性的因素^[22-23]；导致其他组织中存在更多的花青素降解酶或者竞争性代谢途径，使得花青素在这些组织中无法有效积累^[24]。

花青素合成通路上的结构基因在植物体内编码着关键的酶类，这些酶在花青素的生物合成过程中发挥着重要的功能^[25]，它们在花青素合成途径中扮演着不同但相互关联的角色，通过催化特定的化学反应，使得前体物质逐步合成为最终的花青素类化合物^[26]。而调控这些基因的表达水平可以影响植物体内花青素的合成水平和种类。花青素合成的早期两个限速酶 *CHS*、*CHI* 催化 4-香豆素辅酶 A 碳骨架化，分子内环化，*F3H* 依赖双加氧酶催化脱氧黄酮 C-3 位置形成二氢黄酮醇；*DFR* 和 *ANS*、*UFGT* 作为花青素合成后期限速酶和关键酶，

促成 C-4 位羟基形成、将无色花青素转为有色花青素同时糖基化为稳定花青素。在 Singh、Sunil^[27-28]研究中,控制 *F3H* 的表达来调节 *DFR* 不受抑制地发挥作用。本研究结果表明,在果皮瞬时注射结果中, *UFGT* 基因转录水平显著,证明在果皮受到强光刺激后,在后期基因 *UFGT* 作用下,糖基化催化 UDP 葡萄糖向花青素前体转移。其中 *F3H*、*DFR* 基因转录水平相当,猜测可能原因是在合成过程的时间阶段上 *F3H* 与 *DFR* 存在反馈调节机制,以确定合成通路上的平衡稳定性^[29]。对拟南芥和愈伤组织结构通路酶基因转录水平比较发现, *DFR* 转录水平始终维持在较高水平,且 *F3H* 转录水平和 *MdPRE6-like* 基因表达水平差异不大, *MdPRE6-like* 可能对 *F3H* 基因的表达起到直接的调节作用。在 Hou 等^[30]的研究中,发现与 *IBH1* 相关的新参与者 *HLH4*,其过表达造成矮化和深绿色表型,并造成参与花青素生物合成途径的许多关键调节酶基因下调。*HLH4* 干扰 *CIB5* 的活性,从而抑制 *CIB5* 调控的细胞伸长相关基因的转录, *HLH4* 对 *CIB5* 的干扰被 *PRE1* 抵消,其中这些 bHLH 蛋白形成了一个新的三拮抗系统。本研究中是否有其他基因参与花青素合成或者是否该基因在果实不同阶段表达模式有所变化还有待进一步探究。

4 结论

苹果中克隆得到多效唑抗性蛋白基因 (*PRE6-like*),通过同源转化苹果愈伤及异源转化拟南芥证明 *MdPRE6-like* 基因能够激活花青素生物合成及花青素合成通路结构基因的表达,为 *MdPRE6-like* 基因参与苹果种质的创新奠定基础。

参考文献 References:

- [1]孙子涵.可见光和UV-B诱导下苹果MdMYB25基因调控花青素合成的分子机制[D]. 山东农业大学, 2023. SUN Zihan. Molecular mechanism of apple MdMYB25 gene regulating anthocyanin synthesis induced by visible light and UV-B[D]. Shandong Agricultural University, 2023.
- [2]陈学森, 王楠, 张宗营, 毛志泉, 尹成苗. 关于果树种质资源与遗传育种若干问题的理解与思考[J]. 中国农业科学, 2022, 55(17): 3395-3410. CHEN Xuesen, WANG Nan, ZHANG Zongying, MAO Zhiquan, YIN Chengmiao. Understanding and thinking about some problems offruit tree germplasm resources and genetic breeding[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(17):3395-3410.
- [3]杨有龙.美国元帅系苹果品种(系)介绍[J]. 北方果树, 1987(Z1): 84-88. YANG Youlong. Introduction of apple varieties (lines) of Red Delicious line in the United States[J]. Northern Fruits, 1987(Z1):84-88.(in Chinese)
- [4]SHARMA D P, SHARMA H R, SHARMA N. Evaluation of apple cultivars under sub-temperate mid hill conditions of Himachal Pradesh[J]. Indian Journal of Horticulture, 2017, 74(2): 162-167.
- [5]李欣, 李影, 曲子越, 孙璐, 王思瑶, 詹亚光, 尹静. bHLH转录因子在茉莉酸信号诱导植物次生产物合成中的作用及分子机制[J]. 植物生理学报, 2017, 53(1): 1-8. LI Xin, LI Ying, QU Ziyue, SUN Lu, WANG Siyao, ZHAN Yaguang, YIN Jing. bHLH transcription factors in the role of jasmonic acid signal induced plant secondary synthesis and molecular mechanism[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(1):1-8.
- [6]SUN X, ZHANG Z, LI J, ZHANG H, PENG Y, LI Z. Uncovering hierarchical regulation among MYB-bHLH-WD40 proteins and manipulating anthocyanin pigmentation in rice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8203.

- [7] NESI N, DEBEAUJON I, JOND C, PELLETIER G, CABOCHE M, LEPINIEC L. The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in Arabidopsis siliques[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(10): 1863-78.
- [8] SONG S S, LIU B, SONG J Q, PANG S H, SONG T X, GAO S, ZHANG Y, HUANG H, QI T C. A molecular framework for signaling crosstalk between jasmonate and ethylene in anthocyanin biosynthesis, trichome development, and defenses against insect herbivores in Arabidopsis[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(9): 1770-1788.
- [9] ZHU Z G, LUO M L, LI J L, CUI B L, LIU Z X, FU D P, ZHOU H W, ZHOU A P. Comparative transcriptome analysis reveals the function of SIPRE2 in multiple phytohormones biosynthesis, signal transduction and stomatal development in tomato[J]. *Plant cell reports*, 2023, 42(5): 921-937.
- [10] BAI M Y, FAN M, EUNKYOO O, WANG Z Y. A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in Arabidopsis[J]. *The Plant cell*, 2012, 24(12): 4917-4929.
- [11] ZHENG K J, WANG Y T, ZHANG N, JIA Q M, WANG X T, HOU C J, CHEN J G, WANG S C. Involvement of PACLOBUTRAZOL RESISTANCE6/KIDARI, an Atypical bHLH Transcription Factor, in Auxin Responses in Arabidopsis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1813.
- [12] MARA C D, HUANG T, IRISH V F. The Arabidopsis floral homeotic proteins APETALA3 and PISTILLATA negatively regulate the BANQUO genes implicated in light signaling[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 690-702.
- [13] 龚俊. 番茄非典型bHLH转录因子SIPRE6-like在植株生长发育中的功能研究[D]. 重庆大学, 2021.
- GONG J. Functional study of tomato atypical bHLH transcription factor SIPRE6-like in plant growth and development[D]. Chongqing University, 2021.
- [14] 张淑辉. MdWRKY9-MdSWEET9b响应ABA信号调控苹果果实糖积累的机理研究[D]. 山东农业大学, 2023.
- ZHANG S H. Mechanisms of MdWRKY9-MdSWEET9b regulating sugar accumulation in apple fruits in response to ABA Signal[D]. Shandong Agricultural University, 2023.
- [15] 李贺, 毛健鑫, 董向向, 张志宏, 纪明山. 果树microRNA研究进展[J]. *果树学报*, 2015, 32(3): 502-510.
- LI He, MAO Jianxin, DONG Xiangxiang, ZHANG Zhihong, JI Mingshan. Recent research advances in microRNA of fruit crops[J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32(3):502-510.
- [16] 陈建琦, 赵明珠, 王义, 张美萍. 植物中组织特异性启动子的研究进展[J]. *北方园艺*, 2023(19): 128-134.
- CHEN Jianqi, ZHAO Mingzhu, WANG Yi, ZHANG Meiping. Research Progress on Tissue Specific Promoters in Plant[J]. *Northern Horticulture*, 2023(19): 128-134.
- [17] 韩金秀, 陈斌, 刘晏廷, 孟儒, 金利妍, 何淼. 神农香菊CibHLH1的鉴定及对光合特性的影响[J]. *草业学报*, 2024, 33(1): 89-101.
- HAN Jinxiu, CHEN Bin, LIU Yanting, MENG Ru, JIN Liyan, HE Miao. Identification of CibHLH1 and its effect on photosynthetic characteristics in Chrysanthemum indicum var. aromaticum[J]. *Acta Prataculturae Sinica*. 2024, 33(1):89-101.
- [18] 王丽霞. 植物紫外光受体UVR8介导UV-B信号转导的分子机制研究[D]. 华中农业大学, 2023.
- WANG L X. Molecular Mechanism of UV-B Signal Transduction Mediated by the Plant UV-B Photoreceptor UVR8[D]. Huazhong Agricultural University, 2023.
- [19] YU J X, QIU K N, SUN W J, YANG T, WU T, SONG T T, ZHANG J, YAO Y C, TIAN J. A long noncoding RNA functions in high-light-induced anthocyanin accumulation in apple by activating ethylene synthesis[J]. *Plant Physiol*, 2022, 189(1): 66-83.
- [20] 齐方婷, 黄河. 观赏植物花斑形成调控机制的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(10): 17-28.
- QI Fangting, HUANG He. Research advance in the regulation mechanism of flower spots formation in ornamental

Plant[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(10):17-28.

[21]黄贝, 王鹏, 温明霞, 等. 柑橘果实色素一类胡萝卜素的研究进展[J]. 果树学报, 2019, 36(06): 793-802.
HUANG Bei, WANG Peng, WEN Mingxia, Wu Shaohui, GAO Weiqin, XU Jianguo, XIA Renxue. Advance study of pigment-carotenoids in Citrus fruits[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(06):793-802.

[22]杨静文. 中国水仙花色代谢途径及其结构基因和代谢产物的研究[D]. 福建农林大学, 2016.
YANG Jingwen. The molecular metabolic pathways of flower color of *Narcissus tazetta* var. *Chinensis*. [D]. Fujian Agriculture and Forestry University, 2016.

[23]祝钦泷. 彩叶草 (*Solenostemon scutellarioides*) 叶色形成相关的花色素苷生物合成途径的分子调控研究[D]. 西南大学, 2007.

Zhu Qinlong. Studies on the molecular regulation of the anthocyanin biosynthesis related to leaf color of *Solenostemon scutellarioides*[D]. Southwest University, 2007.

[24]黎洁, 李霆格, 王童欣, 王健. 植物花青素和甜菜色素互斥机理研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(6): 1515-1526.

Li Jie, LI Tingge, WAN Tongxin, WANG Jian. Review of the mutually exclusive mechanism between the anthocyanins and betalains pigments in plants[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(6):1515-1526.

[25]宿子文, 蔡志翔, 孙朦, 沈志军, 马瑞娟, 俞明亮. 植物中绿原酸生物合成研究进展[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(6): 1414-1426.

SU Ziwen, CAI Zhixiang, SUN Meng, SHEN Zhijun, MA Ruijuan, YU Mingliang, YAN Juan. Research progress on biosynthesis of chlorogenic acid in plants[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2023, 39(6):1414-1426.

[26]朱晨. 非编码RNA与RNA甲基化介导的乌龙茶萎凋过程中类黄酮与萜类代谢调控机制研究[D]. 福建农林大学, 2022.

ZHU Cheng. Metabolic regulatory mechanism of flavonoid and terpenoid mediated by non-coding RNA and RNA methylation in oolong tea during withering process[D]. Fujian Agriculture and Forestry University, 2022.

[27]SINGH P K, RAWAL H C, PANDA A K, ROY J, MONDAL T K, SHARMA T R. Pan-genomic, transcriptomic, and miRNA analyses to decipher genetic diversity and anthocyanin pathway genes among the traditional rice landraces[J]. Genomics, 2022, 114(5): 110436.

[28]SUNIL L, SHETTY N P. Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106(5-6): 1783-1798.

[29]徐新翔. 氮钾配施调节苹果碳氮代谢和果实花青苷合成的生理机制研究[D]. 山东农业大学, 2023.
XU Xinxiang. Physiological Mechanism of Combined Nitrogen and Potassium Regulating Carbon and Nitrogen Metabolism and Anthocyanin Biosynthesis in Apple Fruits[D]. Shandong Agricultural University, 2023.

[30]HOU Q C, ZHAO W, Lu L, WANG L L, ZHANG T Y, HU B B, YAN T W, QI Y C, ZHANG F, CHAO N, BARTELS D, WAN X Y. Overexpression of HLH4 Inhibits Cell Elongation and Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. Cells, 2022, 11(7): 1087-1087.