

DOI:10.11937/bfyy.201507050

苹果花色素苷生物合成及调控的研究现状

孟富宣^{1,2}, 周军^{1,2}, 辛培尧^{1,2}, 董娇^{1,2}, 徐世宏^{1,2}, 段淋渊^{1,2}

(1. 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南 昆明 650224; 2. 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224)

摘 要: 苹果果实颜色是影响消费者需求重要的品质性状, 苹果的红色是由花色素苷积累水平决定的, 花色素苷是次生代谢产物黄酮类化合物中的一类。文章综述了花色素苷合成过程中结构基因、调控基因、环境因素、管理措施和组织机构对花色素苷积累的影响, 目的是为实现优质果实品质提供新的方法, 包括视觉上的吸引力和营养价值的提升。

关键词: 苹果; 花色素苷; 生物合成; 基因调控; 环境因素

中图分类号: S 661.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2015)07-0180-08

苹果是世界四大水果之一, 2012 年世界苹果产量为 0.76 亿 t, 相当于 319 亿美元(粮农组织, 2012)。2012 年中国苹果总产量 0.37 亿 t, 占世界总产量的 48.68%。中国苹果的栽培面积及产量均居世界首位, 但出口比重太小, 这与苹果的品质特性密切相关, 而苹果果皮颜色是关键的品质特性之一, 能影响消费者喜好。与果皮红

色密切相关的花色素苷有丰富的营养价值和抗氧化性能, 花色素苷的积累受环境条件 and 生产实践的影响^[1]。近年来, 在了解苹果中基因调控花色素苷积累方面已取得重大进展。现对苹果花色素苷生物合成调控的研究现状进行了总结。

1 苹果果实颜色

1.1 花色素苷的价值

苹果属蔷薇科植物, 是自交不亲和高度杂合二倍体, 单倍体染色体数目为 17^[2]。苹果深受世界各地消费者的喜爱。与其它水果、蔬菜、甚至茶相比, 苹果含有很高的抗氧化剂^[3]。苹果果皮颜色是最重要的经济性状之一, 是决定苹果市场接受度的重要因素, 强烈地影响着消费者的购买欲望。红苹果, 尤其是鲜红类型是购买者的首选^[4], 消费者会把成熟、美味与之联系到一起^[5]。此外, 不同国家和地区消费者对果皮颜色的偏好不一样。

第一作者简介: 孟富宣(1989-), 女, 硕士研究生, 现主要从事植物分子生物技术等研究工作。E-mail: 616967560@qq.com.

责任作者: 周军(1962-), 男, 博士, 教授, 现主要从事果树分子生物学及林木遗传育种等研究工作。E-mail: zhoujunbo@163.com.

基金项目: 国家林业局“948”资助项目(2013-4-44); 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目(BC2010F08); 西南林业大学森林培育与经营教学团队建设经费资助项目(500961); 国家林业局重点实验室开放基金资助项目(BC2010F08); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2012J050)。

收稿日期: 2014-11-25

Research Progress on Freeze Injury and Antifreeze Cultivation of Loquat

FAN Mei-li, ZHANG Ren-fan, WANG Jin-tao, CHEN Xian-shuang, LU Zhou-min
(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Loquat is a subtropical fruit tree, blooming in fall and winter, fruit ripening in early summer, frost resistance is poor, when encounters the cold snap in winter and spring, flower and young fruit endures the cold easily, when freeze injury happens seriously will greatly affect the loquat production and economic benefits. Now by analyzing the causes of loquat freezing injury, combined the cold injury survey of loquat flowers and fruits, expounded the research progress of loquat antifreeze cultivation and analyzed the physiological indexes related to the frost resistance in detail. Aimed at through comprehensive analysis and summary, providing theoretical guidance to establish the system of cultivation techniques for loquat antifreeze, so as to take appropriate measures to reduce the loquat freeze injury, to improve the economic benefits.

Keywords: loquat; flowers and fruits; freeze injury; freezing resistance; physiology and biochemistry

果皮颜色是辨别栽培品种的主要特征之一,人们对改变颜色的育种材料越来越感兴趣。在新西兰^[6]和欧洲,研究人员正致力于培育一个红色果肉的苹果栽培种,2012年瑞士公布了第一个栽培的红肉苹果品种,该品种含有丰富的具有抗氧化性能的红色色素,因此果肉切成薄片时不会变褐^[7]。花色素苷能大大降低叶片病变和坏死^[8],使得花、果等不同植物器官拥有艳丽的色彩,具有美学价值,还能吸引实现授粉和种子散布的昆虫或其它动物^[9],可充当保护植物免受多种病原微生物危害的饲喂忌避剂^[10],可作为保护 DNA 和光合机构不被强紫外辐射破坏的抗紫外辐射的保护剂^[11],是一种调节种间关系的活性代谢物。特定的植物中花色素苷还有抗冷、抗旱等功能。在医药、食品工业中,花色素苷既有药用价值又有营养价值。具备抗氧化活性,可作为潜在的抗癌、抗动脉硬化化合物。根据花色素苷果实或者叶片所呈现的颜色可进行品种分类^[12]。

花色素苷已经被作为以创造新的或改造现存有色化合物为目的的植物代谢工程的目标之一,因此,研究苹果花色素苷的合成调控机制,对品质改善、新品种培育、病虫害防治等方面均有重要价值。

1.2 苹果中的黄酮类

黄酮类化合物主要包括查尔酮、花色素、黄酮、黄酮醇、黄酮、异黄酮。苹果的红色色素主要存在于花和果皮中,许多苹果树的叶也是红色的。苹果中总多酚含量和个体水平表现出不同的重要意义,一般来说,果皮中的多酚类物质浓度高于果肉。多酚化合物是苹果果皮中的主要群体,果肉中是无色花色素,其次是在果皮和果肉中的羟基酯及无色或黄色槲皮素甙,苹果果皮中的花色素苷主要是矢车菊素 3-半乳糖苷,而矢车菊素 3-葡萄糖苷含量很低^[13]。

黄烷酮和原花色素是苹果离体抗氧化活性最重要的活性物质,而原矢车菊素 B 和表儿茶素是苹果内最重要的抗氧化剂。此外,羟基肉桂酸可能果肉中重要的抗氧化剂^[14]。研究表明适当的吃水果具有保护效应,在日常生活中人们经常食用丰富多样的水果,能降低患肺癌、心血管疾病、哮喘、糖尿病、肥胖和中风的风险,尤其是苹果,苹果中的多酚是抗氧化剂的主要来源。在美国和欧洲日常饮食中水果是黄酮类化合物非常重要的来源。在美国,消耗的酚类物质 22% 来自苹果,是这些化合物的最大来源。这些作用是由于水果的抗氧化活性、抗恶性细胞增殖的活性、抑制脂质氧化及降低胆固醇的效应^[15]。苹果果皮是抗氧化剂最集中的地方,但在品种间抗氧化剂表现出较多的差异和分布模式^[16],因此,研究黄酮类化合物的分子调控机制是今后工作的重点。

1.3 花色素苷的积累

苹果果皮着色最常见的方式是条纹,有时呈现出片

红。从外观很难区分片红果生长发育过程中是否有良好的光照条件,生长过程中没有良好的着色条件时,果实呈现出一系列明显的条纹。分子标记结果显示 2 个品种没有差异^[17],表明该差异可能是由极少数的 DNA 序列发生突变,或者仅仅是一个单一位点发生突变造成的。在“蜜脆”中条红果和片红果出现在同一植株,甚至同一短枝上,这是一个非常特别的现象。苹果表皮没有色素,果皮颜色强度取决于每个表皮层细胞所含色素的比例。条纹和邻近区域颜色差异与皮下组织层色素含量有关,是由于花色素苷的积累^[18]。用光学显微镜和电子显微镜观察“富士”苹果,红色成熟果皮含花色素苷的细胞层数多于绿色品种,果皮外层细胞花色素苷含量比内层细胞高^[19]。在苹果黄酮类化合物的生物合成中,黄烷-3-醇、儿茶素和表儿茶素是 PA 聚合物合成最活跃的起始物质^[20]。

红色色素沉积可以采用不同的方式,从红色小斑点到大片的条纹,从浅红到深红。这些性状的表达可能受环境、营养、果园管理措施、果实成熟阶段、大棚微环境和花色素苷合成调控机制的影响。

2 花色素苷积累的基因调控

2.1 遗传性

2 类基因对花色苷生物合成有影响(表 1)。第一类是已被广泛研究了苹果中的编码色素合成的必需酶类(结构基因)^[21]。另一类是由转录因子组成的调控基因,能影响花青素积累强度和模式,并且广泛控制许多不同的生物合成基因的表达^[22]。

表 1 苹果花色素生物合成途径中的结构基因和调节基因

Table 1 Structural and regulatory genes in the anthocyanin biosynthetic pathway in apple

基因名称	相关基因
结构基因	<i>PAL</i> 、 <i>CHS</i> 、 <i>CHI</i> 、 <i>F3H</i> 、 <i>DFR</i> 、 <i>LDOX</i> 、 <i>UFGT</i>
调节基因	<i>MdMYB10</i> 、 <i>MdMYB1</i> 、 <i>MdMYBA</i> 、 <i>MdbHLH3</i> 、 <i>MdbHLH33</i>

2.2 结构基因

花色苷生物合成的编码基因 *CHS*、*F3H*、*DFR*、*LDOX* 和 *UFGT*,在苹果果实发育过程中协同表达,其转录水平与花色苷浓度呈显著正相关关系^[23]。它们在不同品种中的表达,可能受调控基因的控制,环境因素则通过调控基因影响花色素苷的合成。“奥林”苹果果实成熟是盛花期 168 d 后,但盛花期 142 d 后,未成熟的“乔纳金”会不断积累花色素苷,该时期花色素苷的积累除了受基因表达调控,还有很多机制控制着果实成熟过程中的着色^[24]。*PAL* 是调节苹果中类黄酮合成的关键酶^[4],但在 *PAL* 催化产生花色素苷合成前体时,花色素苷积累量的改变,与充分的前体条件下酶活性的改变无关^[25]。苹果皮中的矢车菊素-3-半乳糖甙与矢车菊素-3-

葡萄糖苷的充分比较显示 UFGT 是一个功能酶,这是由于半乳糖转移到黄酮类化合物 3-O 位置。但目前还不能判定部分半乳糖基转移到矢车菊素是 UFGT 的功能,还是与 UFGT 直接相关^[24]。研究发现,发育过程中没有花色苷合成时无法检测到 UFGT 转录。但是, *MdCHS*、*MdF3H*、*MdDFR*、*MdLDOX* 和 *MdUFGT* 的转录在盛花期 20 d 后能被检测到,但喜阴水果没有花色苷积累,而喜光水果有积累^[27]。UDOP-葡萄糖-4-异构酶(UGE),一种催化 UDP-葡萄糖可逆异构化成为 UDP-半乳糖的酶,UDP-半乳糖可能有利于红色的着色^[28]。UFGT 在果实发育过程中可能改变,花色苷合成取决于矢车菊素的参与,与 UFGT 活性无关。

苹果中类黄酮生物合成由时间和空间共同调控。已有研究表明 *MdF3'H* 基因家族在红皮品种“蛇果”的表达水平高于黄皮品种“金冠”。苹果果实花色苷生物合成途径中该基因家族与其它结构基因协同表达。*MdF3'H* 的表达与苹果果实中黄酮类化合物的生物合成相关。基因表达研究和生物信息学分析表明,“金冠”苹果花色苷量少,是由于缺少花色苷生物合成途径中的最后一步。*MdF3'H* 的异源表达研究,发现该基因在黄酮类化合物的生物合成中发挥重要作用^[29]。

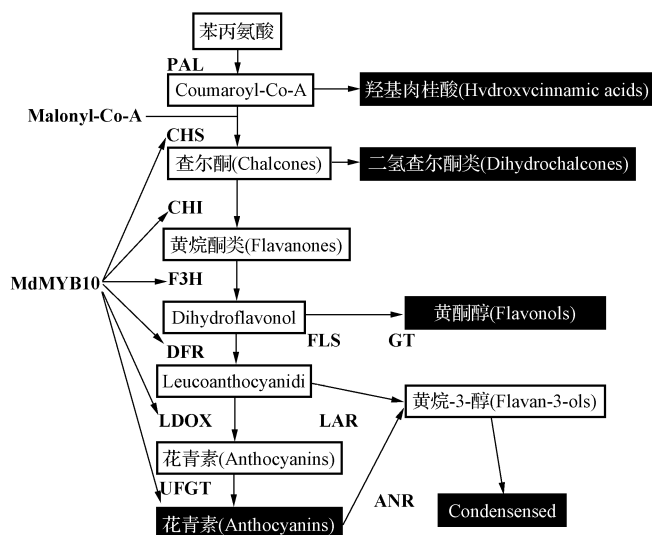
苹果中有 3 个编码 ANR 的基因,即 *MdANR1*、*MdANR2a* 和 *MdANR2b*,3 个基因均已克隆和表达分析,*MdANR1* 编码的 DNA 序列与 *MdANR2a* 和 *MdANR2b* 的同源性是 91%,*MdANR2a* 和 *MdANR2b* 是等位基因,编码区 99% 的核苷酸序列同源,*MdANR1* 和 *MdANR2* 分别位于连锁群 10 和 5 上,*MdANR1* 和 *MdANR2* 在黄色果皮“金冠”中的表达水平普遍高于红色果皮的“红元帅”,在果实发育过程中 *MdANR1* 和 *MdANR2* 的转录表达逐渐降低^[30]。

2.3 调控基因

苹果中丰富的花色苷和原花色苷由转录因子 MYB、bHLH 和 WD40 蛋白协同调控,调控机制只有部分被确定。研究发现苹果的 WD40 蛋白(*MdTTG1*)能促进花色素苷积累。检测不同器官中该基因的表达模式,发现它们与苹果中花色苷的积累呈正相关。酵母双杂交和双分子荧光互补试验证明,*MdTTG1* 与 bHLH 转录因子(TFS)相互作用,但不与 MYB 蛋白互作;即苹果中的 bHLH 与 MYB 蛋白相互作用。芯片检测表明,*MdTTG1* 与花色苷生物合成基因 *MdDFR* 和 *MdUFGT* 的促进无关。总之,苹果的 WD40 蛋白 *MdTTG1* 与 bHLH 相互作用调节花色苷积累,但与 MYB 蛋白无关^[31]。

调节基因在许多植物物种中已被确定,它控制着花色苷基因的表达方向,影响着花色苷生物合成强度和方式,通常还控制着许多不同的结构基因的表达^[32]。3 个

基因家族能独立调控一个苹果 R2R3MYB 转录因子合成并积累花色苷^[23]。*MdMYB1* 和 *MdMYB10* 对几个花色苷合成基因的表达有调节作用^[23](图 1)。*MdMYB1* 是一个花色苷调控基因,喜阴苹果一旦暴露在光下 *MdMYB1* 转录即增加^[33],转录水平与红皮水果的红色部位及红色果皮的花色素苷合成相关,这在“克里普斯红”和“嘎啦”红色品种比绿皮部位或非红色的“金冠”、“青苹果”中非常明显。*MdMYB10* 转录水平与果皮花色苷水平高低相关,并且该基因能诱导同源与异源体系的花色素苷积累^[23]。此外,共分离的 Rni 位点是红色植物和苹果果实鲜艳的颜色主要遗传决定因素^[6]。*MdMYBa* 和 *MdMYB1* 控制红色苹果品种花色苷的合成,而 *MdMYB10* 控制果皮、果肉和叶片红色素沉积^[34]。在具有红条纹的“蜜脆”和“皇家嘎拉”中 *MdMYB10* 和 *MdMYB17* 的转录水平与花色苷合成密切相关,与绿



注:类黄酮中间产物(白色框)和最终产物(黑色框)被标识出来了,每一步所需的酶都以粗体大写显示。PAL:苯丙氨酸解氨酶;CHS:查尔酮合成酶;CHI:查尔酮异构酶;F3H:二氢黄酮-3-羟化酶;FLS:黄酮醇合成酶;GT:未经确认的一种编码糖基转移合成黄酮醇的酶;DFR:二氢黄酮-4-还原酶;LAR:无色花色苷还原酶;LDOX:无色花色苷双加氧酶;UFGT:UDP-葡萄糖:黄酮类 3-O-糖基转移酶。来源:Takos 等^[26]。

Note: Flavonoid intermediates (gray boxes) and end products (black boxes) are indicated. Enzymes required for each step are shown in bold uppercase letters. PAL: phenyl-lalanine ammonia lyase; CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone isomerase; F3H: flavanone-3 b-hydroxylase; FLS: flavonol synthase; GT: unidentified enzyme encoding a glycosyl transferase for flavonol glycone synthesis; DFR: dihydroflavonol-4- reductase; LAR: leucoanthocyanidin reductase; LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase; ANR: anthocyanidin reductase; UFGT: UDP-glucose: flavonoid-3-O- glycosyltransferase. Source: Adapted from Takos et al^[26].

图 1 苹果 MbMYB10 调控因子类黄酮生物合成过程

Fig. 1 The flavonoid biosynthetic pathway in apple regulated by MdMYB10

条纹相比红条纹果实 mRNA 水平更高。MdMYB10 和 MdMYB17 转录产物水平遵循的模式与其它基因相同,这表明,条纹的存在与 MdMYB10 和 MdMYB17 转录产物积累的差别有关系。在红色和绿色条纹中 MdbHLH3 和 MdbHLH33 的转录产物水平没有区别,因此与花色苷积累量关系不显著^[18]。

MdMYBa 在深红色果皮和颜色较深的品种能更高效表达,如“乔纳金”;而在浅色品种表达水平相对低,如“津轻”;MdMYBa 转录受紫外光和低温诱导。MdMYB1 编码区域与 MYBA 和 MYB10 的同源性分别是 100%和 98%。MYBA 和 MYB10 被定位到同一区域的 9 个连锁群,表明这 3 个基因与其它等位基因之间最大的不同和相同之处^[34]。对 MdMYB10 高效诱导花色苷的合成进行瞬态分析,发现该过程依赖于 2 种截然不同的 bHLH 蛋白、MdbHLH3 和 MdbHLH33 的共表达^[23]。近年,一个能够补充拟南芥突变体 TTG1 的苹果 WD40 蛋白 MdTTG1 被确定,但其与苹果中 MYB 和 bHLH 蛋白的互作方式仍未确定^[36]。MYB10 的自动调节机制使得很多苹果品种具有红色果肉和红色叶子的表型,序列分析结果表明,品种中携带有 23 bp 的重复序列和 MdMYB10 自动调节系统,MdbHLH3 对 MdMYB10 转录的影响甚微^[36]。MdbHLH3 和 MdbHLH33 的转录产物水平在苹果果实整个发育过程是恒定的,不可作为相同的生物合成基因模式^[23]。MdCibHLH1 编码的冰状蛋白能引起果树对外界冷刺激的应急反应,MdCibHLH1 与 AtCBF3 启动区的 MYC 识别序列特异结合,MdCibHLH1 的过量表达能增强转基因拟南芥的抗寒性,MdCibHLH1 与 MdCBF2 启动区的特异结合,通过 CBF (C-repeat-binding factor)途径上调 MdCBF2 的表达,从而提高苹果转基因植株的抗寒性;不同物种在逆境胁迫时 MdCibHLH1 的功能显示,MdCibHLH1 异位表达提高转基因烟草的耐冷性;冷诱导引起苹果 MdCibHLH1 的降解,进而导致泛素化和 SUMO 化^[37]。

抑制花色苷产生的转录因子类已经在 MYB 上被确定,包括草莓中的 FaMYB1 和拟南芥中的 AtMYB12^[38]。苹果基因 MdMYB17 与 AtMYB4 高度同源,是拟南芥中芥子酸酯类产生的阻遏物。AtMYB4 表达受紫外线的强刺激,这表明解阻遏是物种适应紫外环境的一个重要机制^[39]。

3 影响花色苷积累的因素

3.1 光

苹果果皮花色苷的产生对光有很强的依赖性,光的强度和质量都影响花色苷形成^[4]。光敏色素和特殊紫外线感受器协同参与激活花色苷合成。树上果实的位置对黄酮和绿原酸含量影响的研究表明,花色苷

和槲皮素-3-糖苷浓度与光照强度密切相关。远红光/红光的比值约为 1,低于这个临界值后没有花色苷形成,只形成很少量的槲皮素-3-糖苷。此外,光合作用是这些反应充分进行的必要因素。在 20℃ 时紫外光处理比 10℃ 下处理更能增加果皮中花色苷含量。光反应能控制发育,采后光照能有效提高果实红色,这仅适用于商品期苹果,前期不适用^[40]。

果实暴露在光下时,MdCHI 转录增加 240 倍,其次是 MdCHS 和 MdLDOX 分别增加 80 倍和 60 倍^[21]。MdMYB1 被确定为光反应中控制苹果黄酮类基因转录的调节因子^[33]。不同的研究发现,苹果果皮中 MdMYBA、MdCHS、MdDFR、MdLDOX 和 MdUFGluT 的转录也受光调控,尤其是紫外光^[34],然而,缩合单宁的产生不受光诱导^[26]。黑暗条件下生长的苹果果实暴露光下,几天后 MdMYB1 的转录水平便增加。苹果果皮中黄酮类化合物积累过程能适应强光,可有效防御紫外线。果实背光面比向光面具有更大的积累花色苷和槲皮素苷的潜能^[41]。对光照对苹果果肉切片中酚类化合物积累作用进行研究发现,随着光照增强,酚酸、花色苷和黄酮醇迅速增加,而原花色苷、黄烷醇和二氢查尔酮的水平保持不变^[42]。树上果实的位置可影响花色苷的积累方式,西南方向枝条上的果实红色条纹多余光照较少的东北分枝上的果实。光照强度、萌芽温度、结实量与苹果果实红色条纹强度相关^[43]。

3.2 温度

秋天低温促进苹果果实花色苷合成,高温则抑制其合成^[40]。低温促进 MdCHS、MdLDOX 和 MdUFGluT 转录^[44]。果实色素总量与平均夜温相关性强于平均日温。果实转色前期苹果组织花色苷积累最佳温度是 25℃,当果实完全进入成熟的关键阶段,花色苷形成能力显著下降,延迟收获期是为了增加花色苷积累含量;然而,在成熟阶段任何苹果品种合成酚酸、花色苷和黄酮醇的最大值在 24℃^[42],2 或 3 个晚上温度范围持续在 2~5℃ 以及在温暖晴天能促进果实红色形成。

冷诱导苹果树上分离出的 bHLH 转录因子 Md-bHLH3,能与 MdMYB1 的 N 端的 2 个区域(氨基酸 1-23 和 186-228)互作。MdbHLH3 属于花色苷生物合成基因 MdDFR、MdUFGT 和调节基因 MdMYB1 的诱导基因,能激活它们的表达。此外,MdbHLH3 蛋白翻译后修饰,可能涉及磷酸化,并以此来提高其启动子结合能力和转录活性^[45]。秋季花色苷增加与成熟密切相关,应增加乙烯并降低温度。低温环境促进花色苷积累和果实着色,是由于花色苷生物合成及调控相关基因的高度表达。然而,低温如何调控果树这一过程的分子机制仍是未知的。

3.3 矿质营养

尿素的使用增加了果皮中叶绿素和类胡萝卜素的浓度,在水果成熟期红色一面的花色素苷浓度会降低^[41],这与氮肥过量与收获期果实着色比例下降有关。有研究指出果实中氮浓度与成熟期花色素和类黄酮合成总量呈负相关性。氮可能抑制黄酮类化合物,对酶系统中参与生物合成的酚类物质产生负面影响^[46]。学者研究了氮对花色素苷生物合成酶活性的影响,发现在高氮水平下苯丙氨酸转氨酶活性被抑制^[47]。西红柿叶片缺氮时,花色素苷和黄酮浓度增加2~3倍,产量增加,而CHS和DFRmRNA水平恒定,同时CHI水平下降。拟南芥缺氮时花色素苷积累是一个早期衰老反应,受NLA基因控制^[48]。而钾对苹果中花色素苷的形成有积极作用^[4]。最近发现单磷酸能增加“艾尔斯塔”苹果果实花色素苷含量^[49]。因此,找出合理的施肥配方也能改善果实的品质。

3.4 碳水化合物

PAP1是拟南芥中调控花色素苷生物合成的MYB转录因子,高蔗糖条件下,花色素苷含量上升^[50]。此外,光、氮以及缺磷能诱导PAP1表达,因此认为缺磷是花色素苷生物合成环境调控中的一个关键因素^[51]。苹果中,糖参与花色素苷积累,果实中糖浓度较低时果实色泽与条纹苹果类似,令人不甚满意。糖也可能参与花色素苷的降解反应,收获之前半乳糖增加可以使花色素苷积累形成糖苷。糖含量和果实成熟期颜色发育无关。果实套袋处理后糖含量降低,却能明显促进果实着色。

3.5 生长调节剂

乙烯是调控花色素苷生物合成和苹果颜色发育的一个关键因素,乙烯与花色素苷总量之间呈正相关关系,但与其它黄酮类化合物含量无关^[52]。苹果成熟期乙烯能增加PAL水平,从而快速启动花色素苷积累。研究转基因苹果“皇家嘎啦”时,果实发育过程中没有检测到乙烯的产生。乙烯的调节,使得苯丙烷类生物合成途径中的17个基因上调,包括PAL。苹果果皮中花色素苷形成是由于乙烯释放剂乙烯利的刺激和ABG-3168(一种乙烯合成抑制剂)的延迟,这不仅是一个与成熟相关的现象,而是受发育信号和乙烯信号联合调控的^[53]。Whale等^[54]的研究指出,在收获前35d使用乙烯合成抑制剂AVC,14d使用乙烯利,能获得最佳的果实颜色和硬度。乙烯利和翠康生力液(Seniphos;磷和钙的混合物)使得果皮颜色变红和黄酮类化合物浓度增加^[55]。在这些试验中,PAL和UFGT活性与乙烯浓度的增加没有密切关系,CHI浓度的增加可能是由于乙烯浓度的增加,由于光照、温度、套袋等原因,乙烯不参与显色反应。

使用赤霉素抑制剂、矮壮素和环腺苷酸钙,对花色

素苷的形成或果实的成熟没有显著影响。在其它研究中,Mata等^[56]发现环腺苷酸钙的应用能增加“富士”的红色,而对“皇家嘎啦”没有影响。茉莉酸能增加苹果中花色素苷浓度^[57],在苹果果皮色素合成途径中还发现乙烯和茉莉酸甲酯的协同作用和附加反应^[58]。脱落酸、生长素和细胞分裂素对花青素的调节作用尚未明确^[4]。各生长调节剂之间的协同及抑制机制还未明确,需进一步进行更深入的研究。

3.6 果园管理措施

日本有的品种在成熟期也不着色,套袋就作为一种有效的诱导颜色发生的措施被广泛应用。一旦果实套袋,没有光照,花色素苷积累会被抑制。去袋后,果实红色迅速发育,几天后,着色超过未套袋果实。然而,收获期却没有明显差异,尤其是由于降温促进了未处理的红色品种果实颜色的形成^[4]。果实套袋后在未成熟和成熟初期产生的花色素苷多于暴露在白光和紫外光下的对照果实。邻近收获期花色素苷合成迅速降低,而对照果实不同的时间段进一步增加。套袋也是研究苹果花色素苷合成和基因表达有用模型。当套袋果实恒定冷藏5个月,再暴露在光下花色素苷合成的潜力保持不变。套袋抑制PAL、CHI和UFGT酶基因的表达,去袋后3种酶基因的表达量明显增加^[59]。

在果园地面覆盖反光膜也能增加花色素苷浓度。这些膜刺激内部乙烯合成以提高UFGT活性^[60]。使用白色聚丙烯覆盖地面(ExtendayTM)、镀铝塑料薄膜和反射箔均能增加苹果果皮红颜色^[61]。疏果能增加“蜜脆”果实果皮红色总量^[62],因为树体负载量能影响色素积累方式,较高的树体负载量使得果实红色百分比较低^[43],无论是贫瘠还肥沃的土地,苹果果园行间使用反光膜促进果实着色,并不降低果实品质。通过叶片修剪和果实转向,也能改善果实品质和着色强度^[63]。收获后使用的储存条件会影响果实中的黄酮类含量。如果水果储存90d,气调储藏比普通冷藏能更有效的保持果实的抗氧化性^[64]。如何贮藏能获得品质更好的果实有待进一步摸索。

4 影响花色素苷积累的机制和途径

4.1 嵌合体

嵌合体是一个包含不同组织基因的有机体。苹果生产中,带有嵌合体的新材料起源于果实或植株特征的改良和选择。许多苹果在色泽方面产生的突变已被发现并鉴定,如普通富士及“乔纳金”中的红色芽变等。品种的红色突变对果实不同区域色素沉积强度的影响不同。突变通常局限于顶端分生组织的单细胞层;因此,植物很可能形成一个周缘嵌合体。根据研究,“旭”的许多条纹果树突变植株,是由于原始的“旭”颜色的不良突

变。“嘎拉”和“皇家嘎啦”的纯红色或纯绿色果实组培苗无法从叶片外植体获得,而是通过叶片组织培养获得,被归为红色还是绿色取决于茎和叶片的颜色,因此条纹品种颜色模式与嵌合体无关^[65]。

研究“蜜脆”果树增殖的发生源自条红果还是片红果,是为了进一步研究片红苹果和全红苹果的稳定性。片红苹果树不仅产生相当高比例的片红果,也产生与全红果树相比条纹强度较高的片红果。任何果树分枝上的全红果百分比每年都在变化,所以在这样的情况下“蜜脆”色素变化方式不是嵌合体的原始来源^[43]。

4.2 转座子

转座子的激活和抑制可能会导致一些遗传变异发生。苹果上反转录转座子,包括 TRIM 反转录转座子^[66]、copia-like 反转录转座子以及 dem1 逆转录因子。转座因子 Ars1 和 Ars2 在苹果中已确定,是苹果基因组中数量很多的 2 个短重复序列。Ars1 被认为是小型倒重复转座因子的代表(MITEs),而 Ars2 被认为是一种转座因子,但尚未确定^[67]。苹果中还存在 Spring 转座子^[68]。尽管有大量证据显示转座因子的存在,但还未证明转座因子与苹果果皮色素调控之间的关系。

使用 RAPD 标记已弄清苹果中一个简单的红/黄果皮颜色多态性的遗传基础。 A^1 标记与红颜色共同分离,而 a^1 和 a^2 标记与黄色果皮颜色的关系^[69]。随后的研究证明,除了各自的插入片段 a^1 和 a^2 片段的序列信息与 A^1 几乎是相同的。76 bp 的 a^1 是一个反向重复序列,而在 163 bp 的 a^2 是一个包含 10 bp 目标位点的重复。163 bp 的 a^2 被称为 Majin,它以一个可移动元件作为特点,单倍体苹果基因组大约有 6 000 份 Majin^[70]。序列特异性多态性扩增(S-SAP)已经确定,显性标记检测 DNA 一侧的反转录转座子插入位点的变异,可用来区分“嘎拉”和“布瑞本”等几个无性系品种。芽突变使它们产生了各自新的专利品种,该突变来自反转录转座子插入^[71]。高度同源的 TRIM2 序列,是一个微型逆转录转座子的重复末端^[66],存在于 MdMYB10 翻译起始位点 2.5 bp 上游,它在几个品种中的总水平和花色苷积累方式不同,因此存在单一转座子并不能解释品种间色素差异。这一转座子并没有插入新的转录起始位点,在品种检测中观察到位于下游的转座子 MdMYB10 基因没有转录^[18]。

4.3 其它机制

其它机制可能是由于苹果果实颜色的变异,包括副突变、经常性的体细胞突变以及特异性基因位点对色素积累模式的调控作用。这些现象都没有包含在苹果花色苷调控中,但对植物物种整个花色苷合成途径有保护作用。

5 结论

苹果果实颜色是影响消费者需求的重要性状之一。苹果的红色是由花色苷水平和次生代谢产物黄酮类化合物共同决定的。鉴于黄酮类化合物水平对抗氧化活性的影响不同,了解调节类黄酮生物合成成为改善水果营养价值优先考虑的事。苹果果皮中色素积累是由果实发育过程中植物基因组成和环境条件决定的,包括光和温度,多种农艺措施,如套袋,使用反光膜,应用生长调节剂和疏果,这些措施的使用使得世界各地的种植者获得更红更具吸引力的果实。现代图像处理工具能更精确的进行色彩测量,这对研究人员和水果加工都非常有价值。在遗传学领域,最近的重要发现包括 MdMYB10 的确定,MdMYB10 是苹果中一个重要的调节花青素合成的转录调控因子,还发现一个新的 MdMYB10 自动调节机制,控制苹果果皮、果肉和苹果中其它的红色品种花青素积累水平。这些自然发生的基因变异应用到育种计划,培育适销对路的红肉苹果品种,这将影响 21 世纪苹果产业。在试验胚胎学领域,研究表明 MdMYB10 启动子甲基化水平与花青素在果皮中的分布模式有密切联系。这些发现将拓宽对植物中花青素生物合成的调控及其积累的理解。这些新研究,再加上更好地了解光、温度和其它环境因素、管理措施和组织机构的作用的影响,这将为实现优质果实品质提供新的方法,包括视觉上的吸引力和营养价值的提升。

参考文献

- [1] Adriana T,Bradeen J M,Luby J J,et al.Regulation of anthocyanin accumulation in apple peel[J]. Horticultural Reviews,2011,38:357-391.
- [2] Korban S S,Wannarat W,Rayburn C M,et al.Genome size and nucleotypic variation in *Malus* germplasm[J]. Genome,2009,52:148-155.
- [3] Chinnici F,Bendini A,Gaiani A,et al.Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition[J]. J Agric Food Chem,2004,52:4684-4689.
- [4] Saure M C.External control of anthocyanin formation in apple:A review[J]. Sci Hort,1990,42:181-218.
- [5] King M C,Cliff M A.Development of a model for prediction of consumer liking from visual attributes of new and established apple cultivars[J]. J Am Pom Soc,2002,56:223-229.
- [6] Chagne D,Carlile C M,Blond C,et al.Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple[J]. BMC Genomics,2007,8:212-222.
- [7] Geraldine Wamer. New apple varieties developed by Swiss breeder Markus Kobelt are red from the skin to the core[EB/OL]. <http://www.goodfruit.com/Good-Fruit-Grower/Oct-ober-2010/To-tally-RED/>, Good Fruit Grower,2010.
- [8] Iris S,Henryk F,Li H H,et al.Shift in polyphenol prowler and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple[J]. Planta,2009,229(3):681-692.
- [9] Grot E E.The genetics and biochemistry of floral pigments[J]. Annu Rev Plant Biol,2006,57:761-780.

- [10] Martens S, Knott J, Seitz C A, et al. Impact of biochemical prestudies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues[J]. *Biochemical Engineering J*, 2003, 14: 227-235.
- [11] Gould K S. Nature's swissarmy knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2004, 314-320.
- [12] 高龙燕, 罗轩, 范飞, 等. 不同芒果品种嫩叶叶色的聚类分析[J]. *中国南方果树*, 2012, 41(5): 57-59.
- [13] Tsao R, Yang R, Young J C, et al. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC)[J]. *J Agr Food Chem*, 2003, 51: 6347-6353.
- [14] Tsao R, Yang R, Xie S, et al. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53: 4989-4995.
- [15] Boyer J, Liu R H. Apple phytochemicals and their health benefits[J]. *Nutr J*, 2004, 3: 5.
- [16] Lata B. Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: Year and cultivar variation[J]. *J Agr Food Chem*, 2007, 55: 663-671.
- [17] Cabe P R, Baumgarten A, Onan K, et al. Using microsatellite analysis to verify breeding records; a study of 'Honeycrisp' and other cold-hardy apple cultivars[J]. *Hort Science*, 2005, 40: 15-17.
- [18] Telias A. Studies on apple peel color regulation[D]. University of Minnesota, 2009: 55.
- [19] Bae R, Kim K. Anatomical observations of anthocyanin rich cells in apple skins[J]. *Hort Science*, 2006, 41: 733-736.
- [20] Rebecca A, Henry-Kirk, Tony K, et al. Transcriptional analysis of apple fruit proanthocyanidin biosynthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5437-5450.
- [21] Takos A M, Robinson S P, Walker A R. Transcriptional regulation of the flavonoid pathway in the skin of dark grown 'Cripps' Red' apples in response to sunlight[J]. *J Hort Sci Biotechnol*, 2006b, 81: 735-744.
- [22] Allan A C, Hellens R P, Laing W A. MYB transcription factors that colour our fruit[J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13: 99-102.
- [23] Espley 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]. *Plant J*, 2007, 49: 414-427.
- [24] Honda C, Kotoda N, Wada M, et al. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 955-962.
- [25] Ju Z, Yuan Y, Liou C, et al. Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple[J]. *Sci Hort*, 1995b, 61: 215-226.
- [26] Takos M, Jaffe F W, Jacob S R, et al. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. *Plant Physiology*, 2006, 142: 1216-1232.
- [27] Kondo S, Hiraoka K, Kobayashi S, et al. Changes in the expression of anthocyanin biosynthetic genes during apple development[J]. *J Am Soc Hort Sci*, 2002, 127: 971-976.
- [28] Ban, Y, Honda C, Bessho H, et al. Suppression subtractive hybridization identifies genes induced in response to UV-B irradiation in apple skin; Isolation of a putative UDP-glucose 4-epimerase[J]. *J Expt Bot*, 2007a, 58: 1825-1834.
- [29] Han Y P, Vimolmangkang, Soria-Guerra R E, et al. Ectopic expression of apple F3'H genes contributes to anthocyanin accumulation in the arabidopsis tt7 mutant grown under nitrogen stress[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153: 806-820.
- [30] Han Y P, Vimolmangkang, Soria-Guerra R E, et al. Introduction of apple ANR genes into tobacco inhibits expression of both CHI and DFR genes in flowers, leading to loss of anthocyanin[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2437-2447.
- [31] An X, Tian Y, Chen K, 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): 710-718.
- [32] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J, et al. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the ttg1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings[J]. *Plant J*, 2008, 53: 814-827.
- [33] Takos A M, Jaffe F W, Jacob S R, et al. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. *Plant Physiol*, 2006a, 142: 1216-1232.
- [34] Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, et al. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin[J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 958-970.
- [35] Brueggemann J, Weisshaar B, Sagasser M. A WD40-repeat Gene from *Malus × Domestica* is a functional homologue of Arabidopsis thaliana transparent testa glabra1[J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 285-294.
- [36] Espley R, Brendolise C, Chagne D, et al. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples[J]. *Plant Cell*, 2009, 10: 1105.
- [37] Feng X M, Zhao Q, Zhao L L, et al. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdC1bHLH1 encodes an ICE-like protein in apple[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(22): 1-14.
- [38] Matsui K, Umemura Y, Ohme-Takagi M. AtMYB12, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis[J]. *Plant J*, 2008, 55: 954-967.
- [39] Jin H E, Cominelli P, Bailey A, et al. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis[J]. *Embo J*, 2000, 19: 6150-6161.
- [40] Marais E, Jacobs G, Holcroft D M. Colour response of 'Cripps' Pink' apples to postharvest irradiation is influenced by maturity and temperature[J]. *Sci Hort*, 2001, 90: 31-41.
- [41] Reay P F, Lancaster J E. Accumulation of anthocyanins and quercetin glycosides in 'Gala' and 'Royal Gala' apple fruit skin with UV-B-Visible irradiation; Modifying effects of fruit maturity, fruit side, and temperature[J]. *Sci Hort*, 2001, 90: 57-68.
- [42] Bakhshi D, Arakawa O. Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples[J]. *J Appl Hort*, 2007, 9: 101-104.
- [43] Telias A, Rother D, Hoover E. Plant and environmental factors influencing the pattern of pigment accumulation in 'Honeycrisp' apple peels, using a novel color analyzer software tool[J]. *Hort Science*, 2008, 43: 1321-1327.
- [44] 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 Sci*, 2006, 170: 571-578.
- [45] Xie X B, Li S, Zhang R F. The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2012, 35: 1884-1897.
- [46] Awad M A, De Jager A. Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin[J]. *Sci*

Hort,2002b,92:265-276.

[47] Strissel T, Halbwirth H, Hoyer U, et al. Growth promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves [J]. Plant Biol, 2005, 7: 677-685.

[48] Peng M, Hudson D, Schofield A, et al. Adaptation of Arabidopsis to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene [J]. J Exp Bot, 2008, 59: 2933-2944.

[49] Funke K, Blanke M. Monophosphate and extenday improved apple colouration and firmness [J]. Erwerbsobstbau, 2006, 48: 121-129.

[50] Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, et al. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis requires the MYB75/PAP1 gene [J]. Plant Physiol, 2005, 139: 1840-1852.

[51] Rowan D D, Cao M, Linwang K, et al. Environmental regulation of leaf colour in red 35S: PAP1 *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytologist, 2009, 182: 102-115.

[52] Whale S K, Singh Z. Endogenous ethylene and color development in the skin of 'Pink Lady' apple [J]. J Am Soc Hort Sci, 2007, 132: 20-28.

[53] Awad M A, Anton de J. Formation of flavonoids, especially anthocyanin and chlorogenic acid in 'Jonagold' apple skin: Influences of growth regulators and fruit maturity [J]. Sci Hort, 2002a, 93: 257-266.

[54] Whale S K, Singh Z, Behboudian M H, et al. Fruit quality in 'Cripp's Pink' apple, especially colour, as affected by preharvest sprays of aminothoxyvinylglycine and ethephon [J]. Sci Hort, 2008, 115: 42-351.

[55] Li Z, Gemma H, Iwahori S. Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus-calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis [J]. Sci Hort, 2002, 94: 193-199.

[56] Mata A P, Val J, Blanco A. Differential effects of prohexadione-calcium on red colour development in 'Royal Gala' and 'Fuji' apples [J]. J Hort Sci Biotechnol, 2006, 81: 84-88.

[57] Kondo S. The roles of jasmonates in fruit color development and chilling injury [J]. Acta Hort, 2006, 727: 45-53.

[58] Rudell D R, Mattheis J P. Synergism exists between ethylene and methyl jasmonate in artificial light-induced pigment enhancement of 'Fuji' apple [J]. Postharvest Biol Technol, 2007, 47: 136-140.

[59] 孙百灵, 曲柏宏, 李伟, 等. 苹果梨果实着色相关酶基因片段克隆及

表达分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(4): 423-427, 442.

[60] Ju Z, Duan Y. Effect of covering the orchard floor with reflecting films on pigment accumulation and fruit coloration in 'Fuji' apples [J]. Sci Hort, 1999a, 82: 47-56.

[61] Jakopic J, Veberic R, Stampar F. The effect of reflective foil and hail nets on the lighting, color and anthocyanins of 'Fuji' apple [J]. Sci Hort, 2007, 115: 40-46.

[62] Delong J M, Prange R K, Harrison P A, et al. The influence of crop-load, delayed cooling and storage atmosphere on post-storage quality of 'Honeycrisp' apples [J]. J Hort Sci Biotechnol, 2006, 81: 391-396.

[63] Yonemori K. Japanese pomological magic: Producing fruits for gifts [J]. Chron Hort, 2009, 49: 15-18.

[64] Lata B. Apple peel antioxidant status in relation to genotype, storage type and time [J]. Sci Hort, 2008, 117: 45-52.

[65] McMeans O, Skirvin R M, Otterbacher A, et al. Assessment of tissue culture-derived 'Gala' and 'Royal Gala' apples (*Malus domestica* Borkh.) for somaclonal variation [J]. Euphytica, 1998, 103: 251-257.

[66] Antonius-Klemola, Kalendar K R, Schulman A H. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 999-1008.

[67] Hadanou A M, Gittins J R, Hiles E R, et al. Two apple repetitive sequence elements: Characterisation and potential use as genetic markers [J]. Euphytica, 2003, 131: 177-187.

[68] Han Y, Korban S S. Spring: A novel family of miniature inverted-repeat transposable elements is associated with genes in apple [J]. Genomics, 2007, 90: 195-200.

[69] Cheng F S, Weeden N F, Brown S K. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 222-227.

[70] Wakasa Y, Ishikawa R, Niizeki M, et al. Majin: A miniature DNA element associated with the genomes of pome fruit trees [J]. Hortscience, 2003, 38: 17-20.

[71] Venturi S, Dondini L, Donini P, et al. Retrotransposon characterization and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers [J]. Theor Appl Genet, 2005, 112: 440-444.

The Research Status of Anthocyanin Biosynthesis and Regulation in Apple

MENG Fu-xuan^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, XIN Pei-rao^{1,2}, DONG Jiao^{1,2}, XU Shi-hong^{1,2}, DUAN Lin-yuan^{1,2}

(1. Key Laboratory for Forest Resource Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650224; 2. Forestry Institute, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: The color of apple is an important quality characters could affect consumer demand. The red of apple peel is determined by the anthocyanin accumulation level, and the anthocyanin belong to flavonoids is a kind of metabolites. This article summraized the factors in anthocyanin synthesis accumulated which was included structural genes, regulatory genes, environmental factor, management and organization measure, and the purpose was to increase the visual appeal of apple, and provide a new method for improving the nutritional value.

Keywords: apple; anthocyanin; biosynthesis; gene regulation; environmental factors