

DOI:10.11937/bfyy.201605030

苹果梨果皮花色素苷合成相关基因 *PyANS* 的克隆与表达分析

王 雪, 曲柏宏, 鹿艳新, 杨宏霞

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:以延边地区苹果梨为试材,采用同源克隆及实时荧光定量 PCR 的试验方法,研究 *PyANS* 基因在苹果梨解袋前后果实着色过程中的表达特性及与花青苷积累的关系。结果表明:*PyANS* 的全长 cDNA 为 1 075 bp,其开放阅读框(ORF)编码 358 个氨基酸,分子量约为 40 kDa,理论等电点 pI 为 5.38。同源性分析表明与同属的砂梨相似性高达 99%,实时荧光定量 PCR 分析表明 *PyANS* 基因受到光诱导表达量迅速上升,去袋 1 d 后表达量迅速增加,第 10 天时达到最大值,随后迅速下降,最终稳定在同一表达水平,与果实着色和花色素苷含量测定的结果相对应,表明 *PyANS* 基因对果实花色素苷积累有一定的促进作用。

关键词:苹果梨;花色素苷合成相关基因;基因克隆;序列分析;表达分析

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0108-05

苹果梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. 'Pingguoli')属蔷薇科梨属植物,最初由朝鲜引入我国延边地区,因其具有果大、抗寒、果皮阳面着红晕、口感甘甜、酥脆、多汁等诸多优点,在市场上受到广泛青睐,具有很高的经济价值^[1]。近年来,红皮梨得到了越来越多的消费者的追捧。因此开发红梨资源,培育红梨新品种成为我国梨树育种研究的重要方向。

目前,延边大学农学院课题组在套袋苹果梨解袋前后果皮着色相关基因研究方面已经取得了许多成绩,孙百灵等^[2]利用 RT-PCR 技术对套袋苹果梨果实着色关键酶 *PAL*、*CHI*、*UFGT* 基因片段进行了克隆同时进行表达分析;王旭^[3]以套袋苹果梨为试材,克隆了影响苹果梨着色相关酶 *PAL*、*CHS* 基因全长,并构建了 *PAL* 基因的植物表达载体;刘振坤^[4]采用 RT-PCR 技术成功克隆出了影响苹果梨果皮着红色的关键酶基因 *CHI* 和 *F3H* 并做了相关生物信息学分析。

花色素合成酶(ANS)是花色素苷生物合成途径后期的关键酶之一,它依赖 2-酮戊二酸离子和 Fe^{2+} 催化无

色花色素转化成有色花色素^[5],即催化无色翠雀素、无色矢车菊色素和无色天竺葵色素生成翠雀素、矢车菊色素和花葵素^[6],对植物的色泽形成至关重要^[7]。

该试验首先对苹果梨 ANS 基因 cDNA 全长序列进行克隆,并对其表达模式和表达产物进行了分析,此外结合荧光定量 PCR 技术分析不同处理下以及不同采收时期,苹果梨果皮中 ANS 的表达模式及其生物信息学特性,旨在研究 ANS 表达情况与在果皮着色中起重要作用的花色素苷的关系,为以后的苹果梨果皮着色的分子角度提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为延边苹果梨果实,定植于吉林省龙井市延边华龙集团果树农场绿色苹果梨示范基地,常规管理。

1.2 试验方法

试验于 2014 年在延边大学农学院园艺植物栽培学实验室进行,选择树势基本一致、挂果量均等的盛果期苹果梨树 10 株为试验树,每个小区 5 株。于盛花后 6 周(2014 年 6 月 24 日)采用双层蜡质纸袋,按常规套袋技术要求进行果实套袋处理,以未套袋果实作为对照(CK)。

试验于 2014 年 9 月 18 日解掉套袋果实的外袋,9 月 22 日进行解内袋处理。取样品时期分别为解袋前 1 d

第一作者简介:王雪(1990-),女,硕士研究生,研究方向为果树生理与分子研究。E-mail:18643165303@163.com.

责任作者:曲柏宏(1963-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事园艺植物栽培与生理等研究工作。E-mail:bhqu211@ybu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160389)。

收稿日期:2015-09-24

(9月21日,记作-1 d)、解袋当天(9月22日,记作0 d),之后取样时期记作方法同上,共取样7次。每次取样均分别从样树的东南西北方向随机采取处理及对照果实,采果后迅速带回实验室后削取样品果赤道部位的果皮并用锡箔纸包好,液氮速冻后放-80℃超低温保存。

1.2.1 苹果梨果皮总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 为了获得高纯度无污染的总 RNA,使得目的基因的克隆更精准无误,该试验采用改良的 CTAB 法^[8]提取苹果梨果皮的总 RNA。实时荧光定量 PCR 模板 cDNA 第一链的合成方法参照 TaKaRa 的反转录试剂盒(PrimeScript™ RT-PCR Kit)说明书进行。

1.2.2 *PyANS* 目的基因全长的获取 根据 GenBank 中已登录的梨属植物 *ANS*(GU390546.1, KC460397.1, JX403954.1)的核苷酸序列的保守序列,设计一对特异引物,并委托上海英俊生物技术有限公司合成。以合成的苹果梨果皮 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。引物序列为:上游引物:5'-ATGGTGAGTTCTGATTCACTGA-3';下游引物:5'-TCACTTGGGGAGCAAAGCCTCTT-3'。PCR 扩增体系如下:10×PCR Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L)1.5 μL, DFR-F1/*ANS*-F1(20 μmol/L)1.0 μL, DFR-R1/*ANS*-R1(20 μmol/L)1.0 μL, cDNA 模板 1.0 μL, Ex Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL, ddH₂O 补至 25.0 μL。PCR 扩增反应结束后,产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,稳压 80 V,电泳约 60 min。参照 Omega 公司的 E. Z. N. A. TM Gel Extraction Kit(D2500-01)的说明书进行切胶回收,将回收的目的 DNA 与 TaKaRa 公司的 pMD18-T Vector 连接,将其转化到 DH5α 感受态中,筛选阳性克隆,菌液 PCR 验证后送至上海英俊生物技术有限公司测序。

1.2.3 *PyANS* 基因的表达分析 根据已获得的目的基因序列与实时荧光定量 PCR 引物的设计原则,利用 Oligo6 软件,设计 *PyANS* 的引物为 *PyANS*-F: CATGCACCTTGTGAACCATGGCATC; *PyANS*-R: CTGGTCAATTGGCATACTTCTCCTTC, 根据宝生物(大连)有限公司(TaKaRa)SYBR® Green I 试剂盒说明书冰上配置实时荧光定量 PCR 的反应体系。反应体系如下:SYBR premix Ex Taq™ I 10.0 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 模板 cDNA 2.0 μL, RNase free ddH₂O 补至 20.0 μL。反应程序为 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环;最后 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s。反应结束进行溶解曲线分析。

1.3 项目测定

1.3.1 果实着色指数测定 首先将处理组(10个)果实

按果实着色百分率分成4级:一级着色(0%~30%),二级着色(30%~60%),三级着色(60%~90%),四级着色(90%~100%),然后按下列公式进行果实着色指数的估量。着色指数 = $\sum(\text{各级果实个数} \times \text{相应级数}) / (\text{处理组果实总数} \times 4)$ 。

1.3.2 花色素苷含量测定 花色素苷含量参照 KOBAYASHI^[9]方法(略有改动)测定。以小区为试验单元,削取各处理组(10个)果实赤道部果皮切碎并充分混合。准确称取 0.5 g 鲜样放入 10 mL 1% HCl/甲醇混合溶液室温黑暗中浸提 2 h。利用紫外分光光度仪分别测定提取液在 553 nm 和 600 nm 波长处的吸光值。以 1 g 果皮鲜样的浸提液的光密度变化值 $D_{553nm} - D_{600nm} = 0.01$ 作为 1 个花色素苷单位(U),即花色素苷的相对含量。每个样品均设 3 次取样重复。

2 结果与分析

2.1 *PyANS* 的全长 cDNA 克隆及序列分析

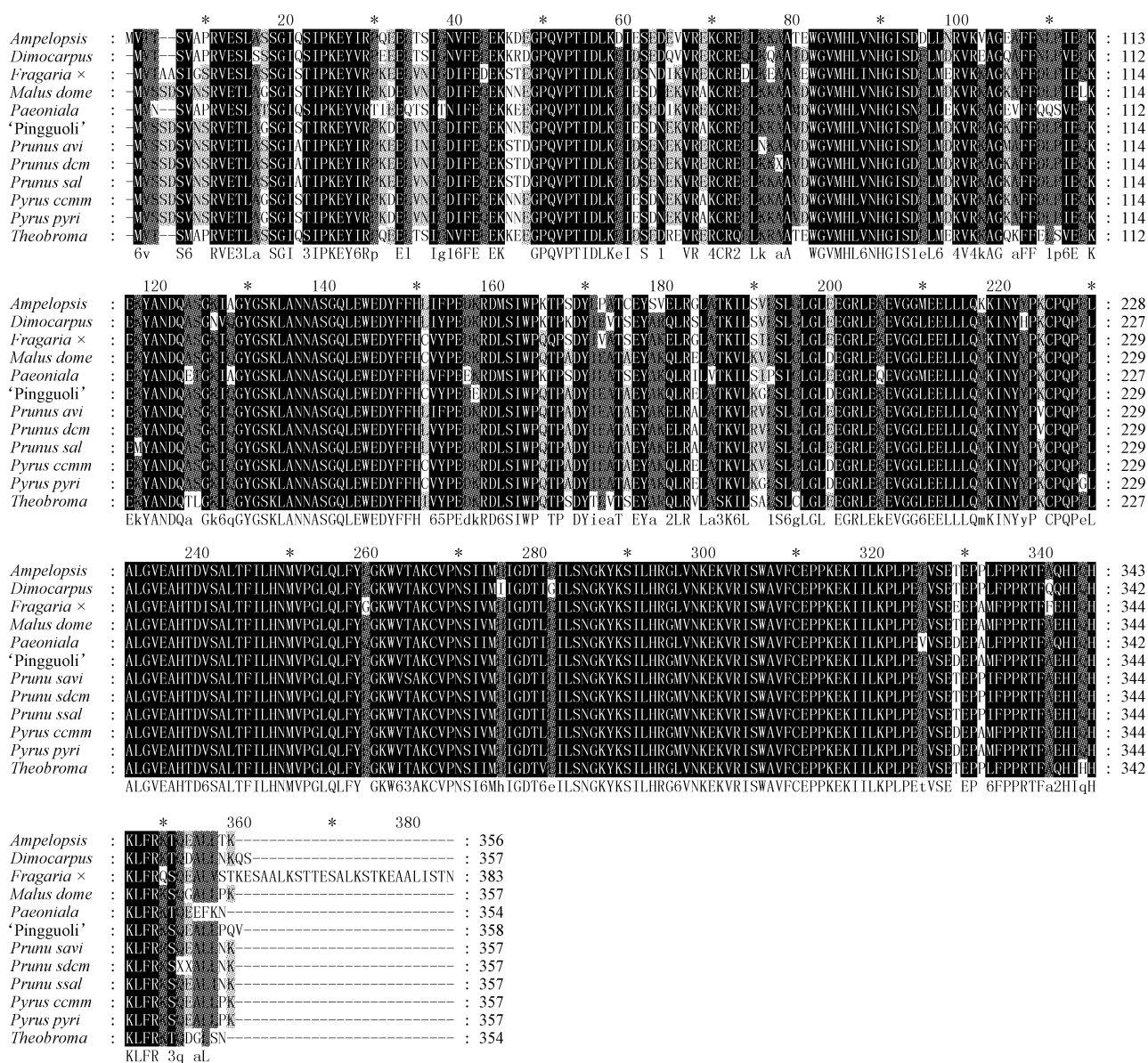
根据合成的目的基因引物的说明书进行引物稀释,分装保存。分别以苹果梨果皮 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增,结果均出现单一且与预期大小一致的条带。将目的条带切胶回收、与 PMD18-T Vector (TaKaRa)连接、转化到 DH5α 并菌液 PCR 鉴定后测序。结果表明这种酶基因序列全长为 1 075 bp,命名为 *PyANS*, GenBank 登录号为 KM588895。利用 DNAMAN 序列分析软件和 ORF Finger 等在线分析软件分别对 *PyDFR* 和 *PyANS* 全长 cDNA 序列进行分析。结果表明 *PyANS* 的全长 cDNA 为 1 075 bp,其开放阅读框(ORF)编码 358 个氨基酸,分子量约为 40 kDa,理论等电点 pI 为 5.38。

登录 NCBI 对其核苷酸序列进行多序列比对分析,结果表明,西洋梨(*Pyrus communis*, KC460397.1)和苹果(*Malus domestica*, AF117269.1) *ANS* 的核苷酸序列相似性均高达 99%;与可可(*Theobroma cacao*, GU324350.1)的相似性相对较低,为 78%。

2.2 *PyANS* 基因氨基酸序列分析与系统进化树的构建

登录 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),对 *PyANS* 氨基酸序列进行 Blastp 同源性搜索,下载具代表性植物的氨基酸序列应用 MegAlign 程序对其进行相似性比对分析,由图 1 可知, *PyANS* 与其它植物 *ANS* 均具有较高的相似性,特别是与同属的砂梨相似性高达 99%,与其它梨属和苹果属植物的西洋梨、苹果等的相似性均达到 95% 以上,说明该试验已成功地克隆出 *PyANS* 基因序列。

由图 2 可知, *PyANS* 氨基酸序列与沙梨 *ANS* 基因的氨基酸序列聚成一类,说明 *PyANS* 基因的氨基酸序



注:由上至下依次是显齿蛇葡萄(AGO02175.1)、龙眼(ACK76231.1)、草莓(AAU12369.1)、苹果(AAZ79374.1)、芍药(AFI71900.1)、苹果梨(KM588895)、甜桃(AEO79983.1)、油奈(AEN19292.1)、西洋梨(AGL50919.1)、砂梨(ADP09379.1)、可可(ADD51356.1)。

Note: Up to down, *Ampelopsis grossedentata* (AGO02175.1), *Dimocarpus longan* (ACK76231.1), *Fragaria* × *ananassa* (AAU12369.1), *Malus domestica* (AAZ79374.1), *Paeonia lactiflora* (AFI71900.1), 'Pingguoli' (KM588895), *Prunus avium* (AEO79983.1), *Prunus salicina* var. *cordata* (AEN19292.1), *Pyrus communis* (AGL50919.1), *Pyrus pyri* (ADP09379.1), *Theobroma cacao* (ADD51356.1).

图1 苹果梨和其它植物 ANS 的氨基酸序列比对分析

Fig. 1 Amino acids sequence alignment of ANS between 'Pingguoli' and other plants

列在沙梨进化上亲缘关系最近; *P_y*ANS 基因的氨基酸序列与西洋梨、苹果的氨基酸序列虽然没有单独聚成一类但它们处于一个亚类,说明 *P_y*ANS 基因与其亲缘关系较近; *P_y*ANS 与龙眼、可可和芍药等的 ANS 进化亲缘关系较远。

2.3 *P_y*ANS 基因的表达分析

2.3.1 苹果梨果实着色过程中果皮花青苷含量的变化
由表 1 可知,经过套袋处理的苹果梨果实的着色指数呈逐渐上升的趋势,而未套袋(CK)果实的着色指数则无

明显变化。从表 1 可以看出,套袋苹果梨解袋后果实着色指数逐渐增加。由图 3 可知,套袋苹果梨果皮花色素苷含量在解袋前 1 d 及解袋当天均处于较低水平,且低于未套袋果实。解袋之后花色素苷迅速积累,表现为解袋后第 1 天增长速率最快,上升幅度为 24.4 U/g FW,占了果实商业采收时(10 d)花色素苷总量的 35.2%。套袋苹果梨果皮花色素苷含量随着果实着色一直迅速增长,至解袋后 10 d 达到最高值,而在果实成熟后期(15 d)含量呈现下降的趋势。苹果梨果实解袋后在光诱导下开

始迅速积累花色素苷,使果实发育红色且愈来愈深,而未套袋苹果梨果皮的花色素苷含量在果实着色期间则处于较低水平,色泽也无明显变化。

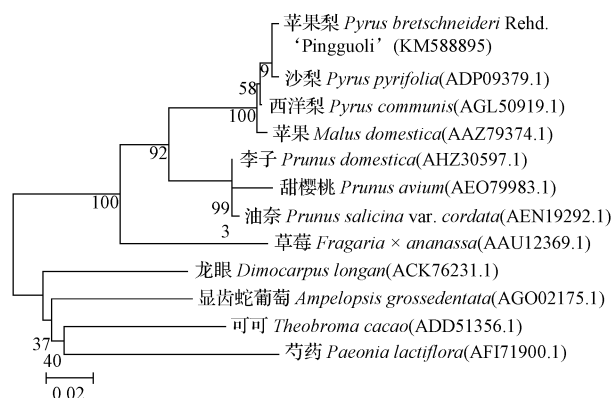


图2 苹果梨和其它植物 ANS 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequences of ANS between 'Pingguoli' and other plants

表1 不同处理的苹果梨果实着色指数的测定

Table 1 The color index of 'Pingguoli' was determined in different treatments

解袋天数 Debagging days/d	解袋果实着色指数 Color index of debagging treatment	对照 CK
-1	0.250	0.250
0	0.250	0.250
1	0.300	0.250
3	0.525	0.325
5	0.560	0.350
10	0.650	0.350
15	0.850	0.350

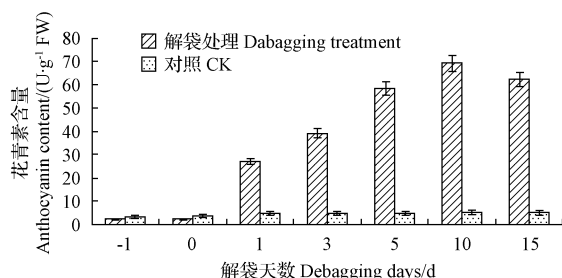


图3 不同处理苹果梨果实花色素苷含量的变化

Fig. 3 Variation of the content of anthocyanins in 'Pingguoli' in different treatments

2.3.2 实时荧光定量 RT-PCR 果皮总 RNA 提取 应用 OMEGA 公司小型植物 RNA 提取试剂盒提取的不同样品的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳和核酸定量检测显示,各样品 RNA 电泳图谱带型清晰,无蛋白等杂带污染,且 28S 条带亮度约为 18S 条带亮度的 2 倍,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.8~2.0,说明所提样品总 RNA 的完整性较好,无明显降解,满足实时荧光定量 PCR 的试验要求。

2.3.3 引物扩增特异性检测结果 对各基因实时荧光定量 PCR 引物进行常规 PCR 扩增,分别得到了 2 条与

预期大小相一致的条带,切胶回收测序结果显示所得基因序列正是目的基因序列的片段,可以进行下一步试验。

2.3.4 *PyANS* 实时荧光定量表达结果分析 应用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *PyANS* 在解袋处理与未套袋处理的苹果梨果实着色过程中的表达模式,分析结果发现,*PyANS* 在套袋果实解袋前和解袋当天的表达量均较微弱,且低于对照;果实解袋后第 1 天其表达量均迅速增加,*PyANS* 的表达量约是对照的 3 倍,达到了较高的表达水平;解袋后第 3 天检测发现其表达量均呈现出下降的趋势,但随后伴随着果实色泽的形成,*PyANS* 的表达量逐渐增加至最高表达水平(10 d),约为对照的 7 倍,果实成熟后期(15 d)略有下降,同最高表达水平相比 25.6%;而未套袋果实中 *PyANS* 基因的表达量却始终处于较低且稳定的表达水平。

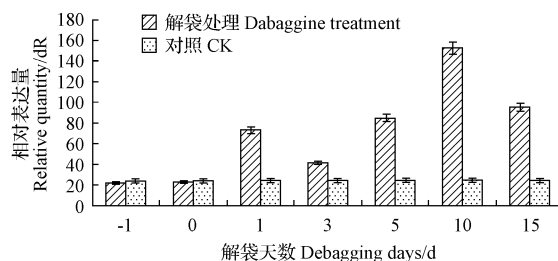


图4 苹果梨果实着色过程中 *PyANS* 的表达变化

Fig. 4 Variation of expression about *PyANS* in 'Pingguoli' during the pigmentation

3 讨论

大量研究试验证实,植物花色素苷的代谢和调控已成为当前科学研究的热点,红梨果皮花色素苷合成途径中大部分的结构基因及转录因子已成功被分离出来^[10-13],花色素苷合成途径已基本明确^[14]。*ANS* 在许多果树上已得到克隆并证明其是花色素苷生物合成的重要结构基因^[15-16]。该试验通过同源克隆技术从苹果梨果皮中分离得到 *PyANS* 的全长 cDNA 序列,并对其进行生物信息预测分析,结果发现 *PyANS* 与梨属和苹果属的物种相似性很高,与西洋梨、沙梨、苹果等的 *ANS* 在进化上亲缘关系很近,说明已成功克隆得到苹果梨的 *ANS* 基因。

该试验利用实时荧光定量 PCR 技术检测了苹果梨果皮花色素苷合成途径中 *PyANS* 的表达模式。分析结果发现,套袋苹果梨果皮 *PyANS* 的表达量在解袋前 1 d 和解袋当天均处于较低且低于对照水平,与同一时期花色素苷含量相对应。说明幼果期果实套袋能够有效抑制 *PyANS* 的表达和花色素苷的生物合成;套袋果实解袋后第 1 天,*PyANS* 表达量均迅速上升至较高水平,并且显著高于对照;解袋后第 3 天检测发现其表达

量略有下降,但很快伴随着果实成熟其表达量又逐渐上升至较高水平,这一结果可能是果实解袋后经曝光诱导而导致的,在砂梨^[17]、苹果^[18]等的相应基因的表达研究中也发现相似的结果。同时发现套袋苹果梨解袋后第1天 *PyANS* 的表达量迅速上升时,花色素苷合成速率也是最快的,随后逐渐积累至解袋后第10天达到最大值。而有研究发现基因的表达高峰却早于这个时间,解袋后第1天便达到最高表达水平^[19],苹果梨 *ANS* 这种基因的表达现象在苹果等植物上已有发现,即花色素苷通过调控相关基因表达来影响果实着色,基因表达量较高时,花色素含量不断增加,果实颜色逐渐加深,故初步推测 *PyANS* 基因的表达情况可能与苹果梨花色素的合成相关联,但是其是否能直接决定苹果梨果实色泽的形成仍需要进一步探究。

参考文献

- [1] 曲柏宏. 苹果梨优质丰产栽培技术[M]. 延边:延边大学出版社, 2004.
- [2] 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.
- [3] 王旭. 苹果梨果实 *PAL* 和 *CHS* 基因克隆与分析及 *PAL* 基因植物表达载体的构建[D]. 延吉:延边大学, 2013.
- [4] 刘振坤. 苹果梨 *CHI* 和 *F3H* 基因克隆与解袋前后果皮中的表达规律研究[D]. 延吉:延边大学, 2014.
- [5] HELLER W, FORKMANN G, BRITSCH L, et al. Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis[J]. *Planta*, 1985, 165: 284-287.
- [6] 许志茹,李春雷,崔国新,等. 茺菁花色素苷合成酶基因的克隆,序列分析及表达[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(1): 66-68.
- [7] WILMOUTH R C, TURNBULL J J, WELFORD R W, et al. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Structure (Camb)*, 2002, 10: 93-103.
- [8] 韩振云,宋婷婷,田信,等. 苹果属观赏海棠 *McUFGT* 的克隆及其在不同叶色品种间的表达差异分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 301-310.
- [9] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, DING C K, et al. Comparison of UDP-glucose:flavo-moid 3-O-glucosyl transferase (UGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin[J]. *Plant Science*, 2001, 160: 543-550.
- [10] 黄春辉,俞波,苏俊. ‘美人酥’和‘云红梨1号’红皮砂梨果实的着色生理[J]. 中国农业科学, 2010, 43(7): 1433-1440.
- [11] 冯守干,陈学森,张春雨,等. 砂梨品种‘满天红’及其芽变品种‘奥冠’花色素苷合成与相关酶活性研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3184-3190.
- [12] 肖长城,李甲明,王德孚,等. 不同栽培区域和年份的红皮砂梨果皮着色特性[J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2432-2440.
- [13] 崔道雷. 云南红梨果皮转录因子 *MYB*, *bHLH* 和 *WD40* 互作及调控果皮着色机理研究[D]. 昆明:昆明理工大学, 2013.
- [14] 周兰,张利义,张彩霞,等. 苹果实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J]. 果树学报, 2012, 29(6): 965-970.
- [15] 董娇. 云南红皮梨 *PpCHS*, *PpDFR* 及 *PpPAL* 基因的克隆及其表达分析[D]. 重庆:西南林业大学, 2012.
- [16] 冯文亭. 红早酥梨花色素苷合成相关基因克隆及功能分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- [17] 俞波. 红色砂梨花色素苷生物合成相关基因分离及表达研究[D]. 杭州:浙江大学, 2012.
- [18] FENG F, LI M, MA F, et al. Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 69: 54-61.
- [19] KIM S H, LEE J R, HONG S T, et al. Molecular cloning and analysis of Anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skins[J]. *Plant Science*, 2003, 165: 403-413.

Molecular Cloning and Expression of *PyANS* in ‘Pingguoli’ During the Pigmentation

WANG Xue, QU Baihong, LU Yanxin, YANG Hongxia
(College of Agronomy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: With the ‘Pingguoli’ debagged and not sack as test material, the full-length cDNA sequences of *PyANS* was cloned by homologous cloning technology and real-time fluorescent quantitative PCR technique, then to analyze the relationship between the expression and the accumulation of anthocyanin during the pigmentation of ‘Pingguoli’. Sequence analysis showed that the cDNA of *PyANS* was 1 075 bp in length, encoded 358 amino acids with a calculated molecular weight (MW) of 40 kDa and isoelectric point (pI) of 5.38. Homology analysis revealed that the similarity between these cDNA fragments and the genes of other rosaceous plants was up to 99%. Real-time fluorescent quantitative PCR indicated the expression levels of *PyANS* was markedly enhanced in the sunlit side, increased rapidly on the first day after bagging, then reached a maximum value at 10th day and started to decline quickly, however, expressed stably in the same level finally. The color code and anthocyanins content produced results essentially in agreement with these figures. In addition that the *PyANS* had a certain role in promoting the accumulation of fruit anthocyanin.

Keywords: ‘Pingguoli’; *PyANS*; gene cloning; sequence analysis; expression patterns