

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.10.015

梨 *PyTPL2* 基因调控果皮花青苷积累的功能研究

安欣, 姚改芳, 姚文杰, 刘志, 胡康康, 张华

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:红皮梨因富含花青苷且营养价值高,备受消费者青睐,成为我国特色梨产业发展的热点。据报道,具有 EAR motif 的转录因子与 TOPLESS/TOPLESS-related(TPL/TPR)结合对花青苷积累过程具有转录抑制作用,为进一步研究其功能,文章利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)克隆 *PyTPL2* 基因的编码序列(coding sequence,CDS)全长和特异区域沉默序列,连接至 pSAK277 瞬时表达载体,并将重组质粒转入表达菌株 GV3101,然后与具有 EAR motif 的转录因子 *PyMYB6* 共同注射早酥梨。研究发现,*PyMYB6* 与 *PyTPL2* 共同注射时可以抑制花青苷的合成,*PyMYB6* 与 *PyTPL2*-RNAi 共同注射时可以促进花青苷的合成。该结果为进一步探究梨 *PyTPL2* 基因在梨果皮花青苷中的作用提供参考。

关键词:梨;花青苷;*PyTPL2*;同源重组;瞬时表达

中图分类号:Q943.2

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2025)10-1397-05

Functional study on the regulation of anthocyanin accumulation in pear peel by *PyTPL2* gene

AN Xin, YAO Gaifang, YAO Wenjie, LIU Zhi, HU Kangdi, ZHANG Hua

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Because of its rich anthocyanins and high nutritional value, red-skinned pear is favored by consumers and has become a hot spot for the development of China's characteristic pear industry. It has been reported that the binding of transcription factors with EAR motif to TOPLESS/TOPLESS-related(TPL/TPR) has a transcriptional inhibitory effect on the accumulation process of anthocyanins. In order to further investigate its function, this paper uses polymerase chain reaction(PCR) to clone the coding sequence(CDS) full-length and specific region silencing sequence of the *PyTPL2* gene, which were connected to pSAK277 transient expression vector, and the recombinant plasmid was transferred into the expression strain GV3101, and then co-injected with the transcription factor *PyMYB6* with EAR motif. It was found that *PyMYB6* could inhibit the synthesis of anthocyanins when co-injected with *PyTPL2*, and *PyMYB6* could promote the synthesis of anthocyanins when co-injected with *PyTPL2*-RNAi. The results provide a reference for further exploration of the role of pear *PyTPL2* gene in pear peel anthocyanins.

Key words: pear; anthocyanin; *PyTPL2*; homologous recombination; transient expression

梨是我国重要的园艺作物之一,栽培面积和产量均居世界首位。红皮梨因其较高的果实品质和营养价值备受消费者青睐,具有广阔的市场前

景^[1]。目前已成为我国特色梨产业发展的热点^[2],我国栽培的红皮梨有2种着色模式:果实发育前期着色(如红茄梨、红早酥梨等)和果实发育

收稿日期:2023-06-27;修回日期:2023-08-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32170315;32272682)

作者简介:安欣(1998—),女,山西长治人,合肥工业大学硕士生;

姚改芳(1983—),女,河南平顶山人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:yaogaifang@hfut.edu.cn.

后期着色(如红香酥梨、南果梨等)。红皮梨在生产上经常出现果实发育后期花青苷积累减少甚至不积累的现象,严重影响其经济价值和产业推广^[3]。因此,探究红皮梨花青苷积累的机制,为红皮梨的遗传改良提供科学的理论依据至关重要。

花青苷是植物中广泛存在的一类重要的次生代谢产物,其赋予植物鲜艳的色彩,不但可以增强植物抵抗外界胁迫的能力^[4],而且在保护人类神经系统和预防心血管疾病等方面具有潜在的功能^[5]。红皮梨因其富含花青苷深受消费者青睐,花青苷形成的调控机制也被国内外学者重视并展开广泛研究。花青苷生物合成在一系列酶催化作用下完成^[6]。其中:苯丙氨酸裂解酶(PAL)、查儿酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)为上游代谢关键酶;二氢黄酮醇 4-还原酶(DFR)、无花色素双加氧酶(LDOX/ANS)和类黄酮-O-糖基转移酶(UFGT)是下游花青苷合成关键酶,编码这些代谢酶的结构基因受 MYB-bHLH-WD40 (MBW)复合体的调控。R2R3 MYB 是调控复合体的核心转录因子。在梨果实中,*P_yMYB10*、*P_yMYB10b* 和 *P_yMYB114*^[7-8]作为激活子促进花青苷积累,*P_pMYB140* 作为抑制子调控红皮梨花青苷合成^[9]。文献^[10-13]指出,具有 EAR motif 的转录因子与 TOPLESS(TPL)结合对花青苷积累过程具有转录抑制作用;文献^[14]表明 *SlERF.F12* 招募 co-repressor TPL 和组蛋白去乙酰化酶 HDA 抑制番茄果实色泽的转变;文献^[15]研究表明 EAR motif 是抑制花青苷积累的重要基序。结果表明,具有 EAR motif 的转录因子 *P_yMYB6* 能抑制红皮梨花青苷的积累。

目前研究结果表明,具有 EAR motif 的转录因子与 TPL 形成复合体调控花青苷积累。例如,在拟南芥中,EAR motif-Containing Adaptor Protein (ECAP)-TPR2 或 HD-ZIP II transcription factor (HAT)-TPL 分别与 MYB75 或者 MBW 复合体作用,干扰 MBW 复合形成,抑制花青苷的积累^[11-12]。

通过‘红茄’及其绿色芽变梨果皮的转录组数据挖掘发现 1 个 *P_yTPL2* (*Pbr012014.1*) 在红皮梨

中下调表达,暗示其可抑制花青苷的积累功能。为进一步研究其功能,本文构建了 *P_yTPL2* 的 pSAK277-*P_yTPL2*-RNAi 瞬时表达载体,并将质粒转入感受态 GV3101 中,然后将 *P_yTPL2*-pSAK277-*P_yTPL2*-RNAi 单独及分别与具有 EAR motif 的转录因子 *P_yMYB6* 共同注射早酥梨,并以 pSAK277 作为阴性对照,为研究梨 *P_yTPL2* 基因在梨果皮花青苷的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料及菌株

果实为发育接近成熟期的‘早酥梨’。大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、农杆菌感受态细胞 GV3101 均购置于上海唯地生物技术有限公司;pSAK277 菌株于本实验室-80 °C 冰箱进行保存。

1.1.2 实验试剂

普通 DNA 产物纯化试剂盒(DP204)、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209)、质粒提取试剂盒(DP103)均购于天根生化科技(北京)有限公司;Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase (P501-d1)、2 \times Taq Plus Master Mix(P212-01)、ClonExpress One Step Cloning(C112-01)试剂盒购于 Vazyme 生物科技有限公司;Prime Script[™] RT Master Mix(RR036A)试剂盒均购于 Takara 生物科技有限公司;Plant Total RNA Isolation(RE-05011)试剂盒购于 Foregene 生物技术有限公司;限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 购于 NEB 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

取 0.05 g 花后 40 d 红早酥梨果皮进行总 RNA 的提取,将提取出的 RNA 用反转录试剂盒合成为 cDNA。

1.2.2 引物设计与目的片段扩增、纯化

根据 NCBI 网站提供的 *P_yTPL2* 基因蛋白编码序列(coding sequence, CDS)和特异区域沉默序列,利用 CE Design 软件工具设计引物,获得瞬时表达引物序列,见表 1 所列。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>P_yTPL2</i> -PSAK277-F	ACTAGTGGATCCAAAGAATTCATGAAGATGCTAGTGGTGCCTTCTCC
<i>P_yTPL2</i> -PSAK277-R	TCATTAAAGCAGGACTCTAGATCATAAGACCGCGCTTTTC
<i>P_yTPL2</i> -RNAi-F	ACTAGTGGATCCAAAGAATTCATGATCCTAACGCTCTCCCTGTT
<i>P_yTPL2</i> -RNAi-R	TCATTAAAGCAGGACTCTAGATAAGACCGCGCTTTTCCA

1.2.3 *PyTPL2* 基因片段克隆与纯化

以红早酥梨果皮的 cDNA 为模板,进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR),扩增条件为:95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 7 min,进行基因克隆,35 个循环完成后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测克隆得到的核酸产物。将获得的基因片段利用 DNA 纯化试剂盒进行纯化回收。

1.2.4 *PyTPL2* 瞬时表达载体构建

用 Fast Pure Plasmid Mini Kit 试剂盒提取 pSAK277 载体质粒,并用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 在 37 °C 下进行酶切,纯化回收线性化载体。利用 Clon Express II One Step Cloning Kit C 112-01 试剂盒,将完成酶切的载体与纯化后的基因片段(*PyTPL2*)用 PCR 仪于 37 °C 连接 40 min,将连接产物转入到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,涂布至含有 SP⁺ 抗性的固体 LB 培养基上,37 °C 过夜倒置培养以筛选阳性克隆,挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定;提质粒并送测序,将测序正确的重组质粒命名为 *PyTPL2*-pSAK277、*PyTPL2*-RNAi。将测序正确的重组质粒转化至农杆菌感受态 GV3101 中,涂布至含有 SP⁺ 和 rif⁺ 抗性的固体 LB 培养基上,筛选阳性克隆,挑点鉴定正确后,保菌于 -80 °C 冰箱,进行后续实验。

1.2.5 梨果皮的瞬时转化实验

在含有抗生素 SP⁺ 和 rif⁺ 的固体 LB 培养基上,接种含有 pSAK277、*PyTPL2*-pSAK277、*PyTPL2*-RNAi、*PyMYB6*、瞬时表达重组载体的农杆菌,利用侵染液稀释培养菌液(含 10 mmol/L 的 2-吗啉乙磺酸(MES)、10 mmol/L 的 MgCl₂、200 μ mol/L 的丙酮,pH 值调至 5.6),低速孵育菌液 3~6 h 后用于后续基因功能验证试验。

将适量的农杆菌(pSAK277、*PyTPL2*-pSAK277、pSAK277-*PyTPL2*-RNAi、pSAK277-*PyMYB6*)按照 1:1 比例混合均匀,用一次性无菌注射器注入梨果皮中,过夜避光培养后放置于光强一致的光照下,光照 7 d 后记录侵染梨果皮部位的变化,并取梨果皮侵染部位用液氮急速冰冻后冷冻保存待用。转化实验的阴性对照组为含有 pSAK277 载体的侵染液注射的梨果皮。

1.2.6 花青苷测定

称取 0.05 g 冻存的梨果皮置于液氮预冷的研钵中,充分研磨后将粉末重悬混匀于 1 mL 的 0.1% 盐酸甲醇(以甲醇为溶剂,配制 0.1% 浓盐

酸)中,并于 4 °C 避光放置 24 h、12 000 r/min 离心 20 min 后取上层清液备用。利用酶标仪分别测定上清液在 530、620、650 nm 波长下的吸光度。根据 $(A_{530} - A_{620}) - 0.1(A_{650} - A_{620})$ 计算出果皮中含花青苷量。提取与测定均重复 5 次。

2 结果与分析

2.1 *PyTPL2* 目的片段的扩增与纯化分析

以花后 40 d 的红早酥梨果皮的 cDNA 为模板,扩增 *PyTPL2*-pSAK277、*PyTPL2*-RNAi 基因片段并用 DNA 纯化试剂盒进行片段纯化,结果如图 1 所示。图 1 中,M 为 DNA Marker。图 1a 中:泳道 1 为 *PyTPL2*-pSAK277 的 PCR 产物;泳道 2 为 *PyTPL2*-RNAi 的 PCR 产物。图 1b 中泳道 1、泳道 2 为目的基因片段纯化产物。由图 1 可知,在 1 500、300 bp 左右出现特异性条带,说明目的基因片段扩增且纯化成功。

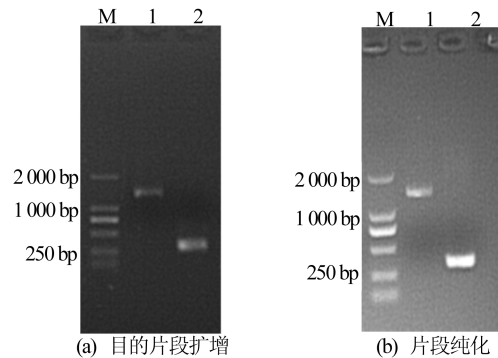


图 1 *PyTPL2*-pSAK277、*PyTPL2*-RNAi 基因 PCR 克隆及纯化

2.2 *PyTPL2* 瞬时表达载体构建及鉴定

将目的基因片段 *PyTPL2*-pSAK277、*PyTPL2*-RNAi 与线性化载体 pSAK277 重组反应获得的重组产物转化感受态细胞 DH5 α , 并进行菌落 PCR 鉴定,均为阳性单克隆菌落,并且条带位置正确。将鉴定正确的单克隆菌体扩大培养,提质粒并测序,鉴定结果如图 2 所示。

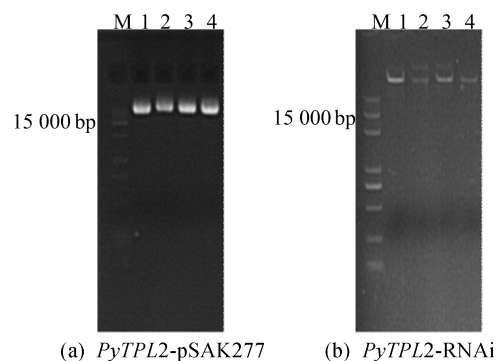


图 2 *PyTPL2*-pSAK277、*PyTPL2*-RNAi 质粒鉴定结果

图 2 中, M 为 15 kbp DNA Marker; 图 2a 中泳道 1~泳道 4 为 *P_yTPL2*-pSAK277 单阳性菌落质粒提取; 图 2b 中泳道 1~泳道 4 为 *P_yTPL2*-RNAi 单阳性菌落质粒提取。由图 2 可知, 在目的片段左右出现特异性条带, 说明目的基因质粒提取成功。

2.3 农杆菌转化

将测序成功的重组质粒转入到表达载体 GV3101 中, 于 28 °C 过夜培养并进行菌落 PCR 鉴定, 结果如图 3 所示。图 3 中, M 为 DNA Marker; 图 3a 中泳道 1~泳道 7 表示 *P_yTPL2*-pSAK277 转 GV3101 农杆菌鉴定结果; 图 3b 中泳道 1~泳道 7 表示 *P_yTPL2*-RNAi 转 GV3101 农杆菌鉴定结果。由图 3 可知, 在 1 500、300 bp 左右出现特异性条带, 说明 *P_yTPL2*-pSAK277、*P_yTPL2*-RNAi 已成功转入农杆菌感受态 GV3101 中。

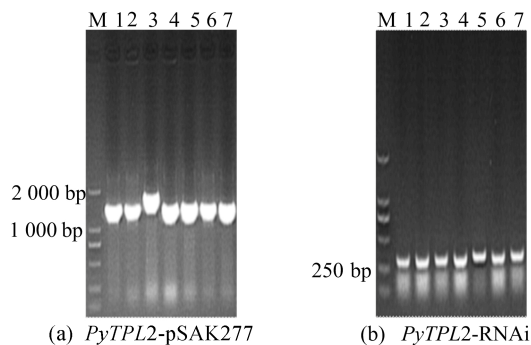


图 3 转 GV3101 农杆菌菌落 PCR 鉴定结果

2.4 梨果皮的瞬时转化实验结果

将适量的农杆菌株 pSAK277、*P_yMYB6*、*P_yTPL2*-pSAK277、*P_yTPL2*-RNAi、*P_yTPL2*-pSAK277 + *P_yMYB6*、*P_yTPL2*-RNAi + *P_yMYB6* (菌株编号依次为 1~6) 分别用一次性无菌注射器注入梨果皮中, 过夜避光培养后统一放置于光强一致的光照下, 光照 7 d 后用相机记录感染梨果皮部位的变化, 结果如图 4 所示。

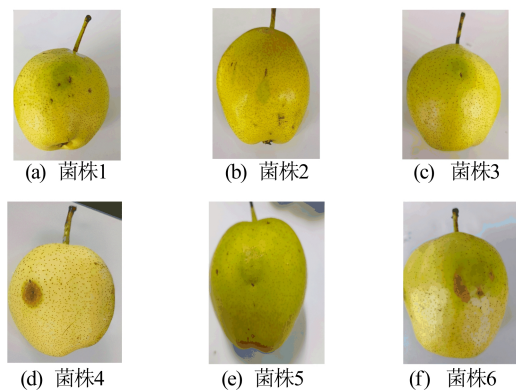


图 4 注射不同比例 *P_yTPL2* 与 *P_yMYB6* 梨果皮的表型

由图 4 可知, 发现 *P_yMYB6* 与 *P_yTPL2* 共注时可以抑制花青苷的合成、*P_yMYB6* 与 *P_yTPL2*-RNAi 共注时可以促进花青苷的合成。

2.5 含花青苷量分析

取梨果皮感染部位用液氮急速冰冻后冷冻保存待用。转化实验的阴性对照组为含有 pSAK277 载体的感染液注射的梨果皮, 测定其含花青苷量, 结果如图 5 所示。图 5 中: 数据是 3 个生物学重复的平均值 ± 标准差, * * 表示由 t 检验确定的 $P < 0.01$ 。

P_yMYB6、*P_yTPL2* 单独注射时均抑制花青苷的合成, *P_yTPL2*-RNAi 单独注射时明显促进花青苷的合成, 且 *P_yMYB6* 与 *P_yTPL2* 共注时可以抑制花青苷的合成、*P_yMYB6* 与 *P_yTPL2*-RNAi 共注时可以促进花青苷的合成, 与表型结果基本一致。

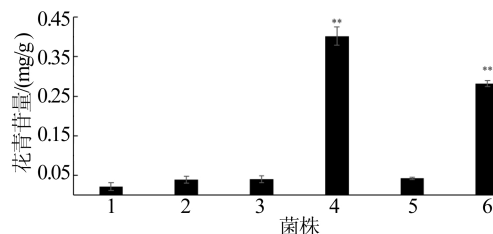


图 5 注射不同菌株梨果皮中含花青苷量

3 讨 论

具有 EAR motif 的转录因子与 TOPLESS (TPL) 结合对花青苷积累过程具有转录抑制作用, *SlERF.F12* 招募 co-repressor TPL 抑制番茄果实色泽的转变, EAR motif 是抑制花青苷积累的重要基序^[15], 实验结果表明, 具有 EAR motif 的转录因子 *P_yMYB6* 能抑制红皮梨花青苷积累, 本文首先利用 PCR、基因重组等技术成功构建 *P_yTPL2*-pSAK277、*P_yTPL2*-RNAi 的瞬时表达载体, 并将质粒成功转入农杆菌感受态 GV3101 中, 然后将 pSAK277、*P_yMYB6*、*P_yTPL2*-pSAK277、*P_yTPL2*-RNAi、*TPL2*-pSAK277 + *P_yMYB6*、*P_yTPL2*-RNAi + *P_yMYB6* 在早酥梨中做瞬时表达, 发现 *P_yTPL2* 具有 EAR motif 的 *P_yMYB6* 共注时抑制花青苷的合成、*P_yTPL2*-RNAi 与 *P_yMYB6* 共注时可以促进花青苷的合成。该结果为进一步研究梨 *P_yTPL2* 基因在梨果皮花青苷的分子机制提供参考。

(下转第 1410 页)

- based on the digital image processing technique[J]. Journal of Building Engineering, 2021, 44: 103292.
- [16] BAUDOUIN M A, HWANG S D, KHAYAT K H. Influence of aggregate characteristics on workability of super workable concrete [J]. Materials and Structures, 2016, 49(1/2): 597-609.
- [17] LARA D, MAIA R, BESSA I, et al. The influence of crushing processes and mineralogy of aggregates on their shape properties and susceptibility to degradation[J]. Construction and Building Materials, 2021, 284: 122745.
- [18] WU J, SHEN W, ZHAO D, et al. Particle characterization of manufactured sand and its influence on concrete properties[J]. Materials, 2022, 15(13): 4593.
- [19] FAN C, HUANG R, HWANG H, et al. Properties of concrete incorporating fine recycled aggregates from crushed concrete wastes[J]. Construction and Building Materials, 2016, 112: 708-715.
- [20] LIU Y, SUN W, NAIR H, et al. Quantification of aggregate morphologic characteristics with the correlation to uncompacted void content of coarse aggregates in virginias [J]. Construction and Building Materials, 2016, 124: 645-655.
- [21] 徐善华, 夏敏. 锈蚀钢材表面的分形维数与多重分形谱[J]. 材料导报, 2020, 34(16): 16140-16143.

(责任编辑 张 镗)

(上接第 1400 页)

[参 考 文 献]

- [1] 杜昱彤, 曲柏宏, 李润文. 我国红皮梨资源及果实着色机制研究进展[J]. 延边大学学报, 2021, 43(4): 98-107.
- [2] LI J, ZHANG M, LI X, et al. Pear genetics; recent advances, new prospects, and a roadmap for the future[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab040.
- [3] XUE H, SHI T, WANG F, et al. Interval mapping for red/green skin color in Asian pears using a modified QTL-seq method[J]. Horticulture Research, 2017, 4: 17053.
- [4] PENG M, SHAHZAD R, GUL A, et al. Differentially evolved glucosyltransferases determine natural variation of rice flavone accumulation and UV-tolerance [J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 1975.
- [5] BULGAKOV P, AVRAMENKO T V, TSITSIASHVILI G S. Critical analysis of protein signaling networks involved in the regulation of plant secondary metabolism; focus on anthocyanins[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(6): 685-700.
- [6] SCHAART J, DUBOS C, FUENTE I, et al. Identification and characterization of MYB-BHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria xananassa*) fruits[J]. New Phytologist, 2013, 197(2): 454-467.
- [7] ZHAI R, WANG Z, ZHANG S, et al. Two MYB transcription factors regulate flavonoid biosynthesis in pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd) [J]. Experimental Botany, 2016, 67(5): 1275-1284.
- [8] YAO G, MING M, ALLAN A C, et al. Map-based cloning of the pear gene MYB114 identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Journal, 2017, 92(3): 437-451.
- [9] NI J B, PREMATHILAKE A T, GAO Y H, et al. Ethylene-activated PpERF105 induces the expression of the repressor-type R2R3-MYB gene *PpMYB140* to inhibit anthocyanin biosynthesis in red pear fruit[J]. Plant Journal, 2021, 105(1): 167-181.
- [10] LAFOUNTAIN A M, YUAN Y. Repressors of anthocyanin biosynthesis [J]. New Phytologist, 2021, 231(3): 933-949.
- [11] ZHENG T, TAN W, YANG H, et al. Regulation of anthocyanin accumulation via MYB75/HAT1/TPL-mediated transcriptional repression[J]. PLoS Genet, 2019, 15(3): e1007993.
- [12] LI C, SHI L, WANG Y, et al. Arabidopsis ECAP is a new adaptor protein that connects JAZ repressors with the TPR2 co-repressor to suppress jasmonate-responsive anthocyanin accumulation[J]. Molecular Plant, 2020, 13(2): 246-265.
- [13] OH E, ZHU J, RYU H, et al. TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1 [J]. Nature Communications, 2014, 5: 4140.
- [14] DENG H, CHEN Y, LIU Z, et al. *SlERF. F12* modulates the transition to ripening in tomato fruit by recruiting the co-repressor Topless and histone deacetylases to repress key ripening genes[J]. Plant Cell, 2022, 34(4): 1250-1272.
- [15] LI L, WEI Z, ZHOU Z, et al. A single amino acid mutant in the EAR motif of *IbMYB44. 2* reduced the inhibition of anthocyanin accumulation in the purple-fleshed sweetpotato [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 167: 410-419.

(责任编辑 吴 亮)