

基于转录组分析不同着色桃果皮花青苷表达模式与转录因子

何平, 李林光*, 王海波, 常源升

山东省果树研究所, 山东泰安271000

摘要: 桃(*Prunus persica*)是我国重要的果树树种之一, 其果皮色泽是重要的外观品质。本研究以同期成熟的红色桃‘秋雪’和白里‘肥桃’为试材, 基于Illumina HiSeq™ 2500高通量测序平台, 采用RNA-seq技术比较分析两个品种桃果实不同发育时期转录组数据。测序共产生16.59 Gb Clean Data测序数据, 基于有参或无参转录组序列组装法获得30 211个Unigene, 其中3 060个差异表达基因在Nr、Swissprot、GO、COG和KEGG数据库中得到功能注释。在这些注释的差异基因当中有6个KEGG通路得到显著富集, 其中包括类黄酮合成通路和光合通路。差异基因与植物转录因子数据库比对, 筛选到153个差异表达基因分属于32个转录因子家族, 其中包括已报道的参与调控花青苷合成的MYB和bHLH两类转录因子家族。进一步对花青苷代谢途径中的类黄酮合成通路中的关键酶基因进行q-PCR分析发现, *CHS*、*CHI*和*F3H*在‘肥桃’和‘秋雪’桃中表达方式很相似, 但*DFR*、*ANS*和*UFGT*表达模式上存在较大差别, 尤其是*UFGT*基因。通过果皮花青苷含量检测分析发现, ‘秋雪’桃与‘肥桃’果皮中花青苷含量变化趋势与*UFGT*基因的表达模式一致。本研究结果有助于阐明桃不同果皮色泽分子遗传差异, 为揭示其调控机制奠定基础。

关键词: 桃; 转录组; 转录因子; 果皮色泽; 花青苷

桃(*Prunus persica*)属于蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus*)植物, 是世界重要果树树种之一, 分布广泛, 栽培历史悠久。中国是世界上第一产桃大国, 桃种植面积和产量居世界首位。果皮色泽是桃重要的外观品质, 极大程度地决定了果实的商品价值, 改善果皮色泽, 提高着色程度, 一直是桃种植者和育种者共同追求的目标。果皮的着色程度与果皮花青苷含量密切相关, 同时花青苷也是果实重要的功能营养成分, 具有预防心脑血管疾病、抗氧化、延缓衰老等重要的保健功能(Halliwell等2005; Juriková等2013; Wolfe等2003)。因此, 果皮色泽的合成调控和遗传变异机理一直是国内外学者的研究热点。参与花青苷合成的结构基因(即编码催化花青苷合成的各种酶的基因)已经在多种植物中得到克隆, 如苹果(Honda等2002)、梨(俞波2012)、葡萄(Sparvoli等1994)等。影响花青苷合成的相关的酶主要包括: 苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase; EC: 4.3.1.24)、查尔酮合成酶(CHS, chalcone synthase; EC: 2.3.1.74)、查尔酮异构酶(CHI, chalcone isomerase; EC: 5.5.1.6)、黄烷酮羟化酶(F3H, flavanone-3-hydroxylase; EC: 1.14.20.6)、二氢黄酮醇还原酶(DFR, dihydroflavonol 4-reductase; EC: 1.1.1.219)、花色素合成酶(ANS, anthocyanidin

synthase; EC: 1.14.11.19)、类黄酮糖苷转移酶(UFGT, UDP glucose-flavonoid-3-O-glycosyltransferase; EC: 2.4.1.9)等(Koes等2005)。花青苷生物合成的调控机制已在多种植物上得到广泛的研究, 主要通过转录因子间的互相协调作用, 调节结构基因在时间和空间上的表达, 从而控制植物花青苷的积累(Davies和Schwinn 2003; Koes等2005; 刘晓芬等2013)。已经发现多种参与调控花青苷生物合成的转录因子, 其中研究较为广泛清楚的有三大类, 即MYB、bHLH和WD40转录因子(Hichri等2011)。许多研究者已经在拟南芥、矮牵牛等模式植物中对这三大类转录因子进行了分离、功能鉴定以及作用机制的分析(Davies和Schwinn 2003; Dubos等2010); 这三类转录因子也在多种果树中得到了克隆, 目前对其调控作用研究的比较深入的树种包括葡萄、苹果、梨、草莓等(刘晓芬等2013; Peng和Moriguchi 2013; 孟蕊2017)。Ravaglia等(2013)克

收稿 2018-12-13 修定 2019-01-23

资助 现代农业产业技术体系(CARS-30-Z-08)、山东省农业重大应用技术创新课题(2014-38)和山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2016B07)。

* 通讯作者(lig6536@163.com)。

隆到桃的MYB类转录因子, 研究发现桃果皮中的MYB10与bHLH3转录因子形成复合体, 上调基因*CHS*、*DFR*和*UFGT*表达, 促进花青苷生物合成(Rahim等2014; 周晖2015)。近年来在苹果、梨、葡萄等果实着色机理方面的研究不断深入, 但是桃果皮着色调控机理的研究报道还很少, 有待深入探索。本研究以深红色桃品种‘秋雪’和白里‘肥桃’为试材, 采用转录组技术分析了两个品种不同发育阶段基因表达的差异, 挖掘与花青苷合成相关的结构基因和转录因子, 并对花青苷生物合成关键结构基因进行了*q*-PCR分析。本研究旨在为阐明桃果皮花青苷生物合成和调控机制奠定基础, 为桃分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试桃[*Prunus persica* (L.) Batsch]品种为山东省果树研究所选育的红桃新品种‘秋雪’和生产栽培中白里‘肥桃’, 两个品种均为晚熟桃, 果实发育期140 d左右, 定植于山东省果树研究所天平湖试验示范基地(117°32'E, 36°225'N), 该基地属于暖温带半湿润大陆性季风气候, 每年平均降水量700~800 mm, 砂壤土。试材为五年生树, 株行距为1.5 m×4 m, 主干形整枝, 选择干周、冠径及树势等基本一致的作为试验材料。

试验为单株小区, 随机排列, 3次重复, 分别于果实发育期的60 d (S1)、90 d (S2)、120 d (S3)和140 d (S4)沿树冠外围距地面1.5~2 m处随机采收30个果实, 果皮组织液氮冷冻, -80℃保存备用。

1.2 样品的RNA提取和检测

采用天根TRNzol Universal总RNA提取试剂盒(DP424)提取桃果皮总RNA, Nanodrop、Qubit 2.0、Agilent 2100检测RNA样品的纯度、浓度和完整性。

1.3 cDNA文库构建、测序和数据处理

由北京百迈客生物科技有限公司完成, 利用Illumina HiSeq™ 2500平台进行高通量测序, 并采用TopHat2软件(ftp://ftp.bioinfo.wsu.edu/species/Prunus_persica/)进行序列比对, 以FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)值来反映基因的表达量, 将差异表达基因进行COG (clusters of orthologous groups of proteins)、GO (gene ontology)和KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)功能注释。

将差异表达基因比对至Plant Transcription Factor Database v3.0 (Plant TFDB v3.0) (Jin等2014)数据库, 筛选差异表达的转录因子基因。

1.4 差异表达基因荧光定量PCR分析

采用TransScript II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (北京全式金生物技术有限公司)试剂盒对1.2中提取的RNA进行反转录, 用SYBR-Green染料进行荧光定量PCR (*q*-PCR)分析, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的差异倍数。每个样品3次重复。选用*PpNI* (ppa009483m)为内参基因(Rahim等2014), 引物序列如表1所示。

1.5 果皮花青苷含量测定

参照杨兆艳(2007)的方法检测桃果皮中花青苷含量, 重复3次。

表1 用于*q*-PCR分析的基因及其引物

Table 1 The *q*-PCR primers for the selected genes

目标基因	NCBI登录号	引物序列(5'→3')	
		F	R
<i>CHS</i>	ppa008402m	GGACCAGGACTGACTGTTGAG	GCCCACACGTTTCCAAC
<i>CHI</i>	ppa011276m	TGAAGACCTCAAGGAACTTCTCAATGG	ACACAGGTGACAACGATACTGCCACT
<i>F3H</i>	ppa007636m	TCCGAGGGCAGAGCGAAGAAC	TTGTGGAGGCTTGTGAGGATTGG
<i>DFR</i>	ppa008069m	GGTCGTCCAGGTGAACATACTGCC	ATTTCTCATGCCATCCATGCCAC
<i>ANS</i>	ppa007738m	AAGTGGGTCAC TGCCAAGTGTGTTC	GTGGCTCACAGAAAAGTGCCCAT
<i>UFGT</i>	ppa005162m	CCGCTGCCTCTCCAACACTC	CCATCAGCCACATCAAACACCTTTAT
<i>PpNI</i>	ppa009483m	CCAGGAGAATCGGTGAGCAGAAAA	TCCGAGGGTGGAGGACTTGAGAATG

2 实验结果

2.1 测序数据质量分析

对‘秋雪’和‘肥桃’的4个果实发育的混合果皮样品进行RNA-seq检测,共得到16.59 Gb Clean Data测序数据,分别获得66 603 686和65 051 536个reads,GC含量分别为45.84%和45.61%,并且碱基百分比(Q₃₀)大于91%。测序数据与桃的参考基因组比对效率较高,2个样品分别有56 344 011和56 017 427个reads得到匹配,占总读数的84.60%和86.11%(表2)。

对测序数据进行FPKM值的分析(表3),结果表明2个样品的FPKM值在<5的基因占70%以上,而>100的基因只占4%,二者差异不显著。

2.2 差异表达基因功能注释

测序数据共获得30 211个unigene,使用IDEG6软件,将差异倍数(fold change)>2,显著水平 $P<0.05$ 定义为显著差异的表达基因,共获得3 569个差异表达基因,进一步将这些差异基因在数据库中进行注释,其中,Nr数据库注释到3 059个基因,Swiss-Prot数

据库注释到2 403个基因,GO数据库注释到2 407个基因,COG数据库注释到1 241个基因,KEGG数据库注释到528个基因。

在被注释到KEGG通路的528个差异表达基因中,显著富集通路($P<0.05$)有6个,主要参与到光合作用通路、类黄酮生物合成、苯丙素生物合成、植物病原菌互作等通路中(表4)。

2.3 差异表达转录因子分析

将差异表达基因比对到植物转录因子数据中(Plant TFDB v3.0),筛选到AP2、ARF、C3H、MYB、WRKY、bHLH等32个基因家族,共包括153个差异表达的转录因子基因(表5)。参与调控花青苷合成的转录因子筛选到MYB和bHLH两类,其中MYB类包括12个差异表达基因,上调表达11个,下调表达1个; bHLH类包括14个差异表达基因,上调表达5个,下调表达9个。由表5可知,同一转录因子家族不同成员间存在不同调节模式,说明同一转录因子家族成员间调控基因表达存在不同功能差异,也表明转录调控在果实着色中存在复杂机制。

表2 测序数据分析

Table 2 Summary statistics of the RNA-seq output

品种	总读数	碱基数/个	GC含量/%	碱基%≥Q ₃₀	比对数	比对率/%	单一比对数	单一比对率/%
‘秋雪’	66 603 686	8 392 064 436	45.84	91.41	56 344 011	84.60	54 733 515	82.18
‘肥桃’	65 051 536	8 196 493 536	45.61	91.57	56 017 427	86.11	54 670 887	84.04

表3 FPKM值分析

Table 3 FPKM values analysis

品种	0~1	1~5	5~10	10~100	>100
‘秋雪’	17 167 (56.82%)	4 160 (13.77%)	2 136 (7.07%)	5 447 (18.03%)	1 301 (4.34%)
‘肥桃’	17 570 (58.16%)	4 034 (13.35%)	2 113 (6.99%)	5 264 (17.43%)	1 230 (4.07%)

表4 显著富集的KEGG通路分析

Table 4 KEGG classification of the set of differentially transcribed genes

KEGG通路	Ko编号	差异基因/个	P值
光合作用	Ko00195	16	3.99E-05
类黄酮生物合成	Ko00941	14	0.000665992
苯丙素生物合成	Ko00940	22	0.0156762
植物病原菌互作	Ko04626	30	0.024477014
丙氨酸代谢	Ko00410	12	0.0327951536
萜类骨架生物合成	Ko00900	12	0.0433338298

表5 转录因子基因家族构成及其基因数量

Table 5 The family composition and gene number of differentially expressed TF genes

上调基因家族			下调基因家族		
基因家族	数量/个	基因ID	基因家族	数量/个	基因ID
AP2	3	ppa002612m, ppa005230m, ppa018704m	AP2	2	ppa007768m, ppa003783m
ARF	1	ppa002082m	ARF	2	ppa000479m, ppa002230m
B3	1	ppa019131m	ARR-B	2	ppa002408m, ppa004161m
C2H2	4	ppa009924m, ppa019308m, ppa020870m, ppa008361m	C2H2	4	ppa012762m, ppa1027229m, ppa004548m, ppa007860m
C3H	3	ppa002415m, ppa002251m, ppa008076m	C3H	3	ppa002526m, ppa018470m, ppa005813m
CO-like	2	ppa006303m, ppa006893m	FAR1	2	ppa002486m, ppa002952m
DBB	3	ppa010704m, ppa010493m, ppa009344m	LBD	1	ppa012322m
HD-ZIP	2	ppa009498m, ppa019198m	HD-ZIP	9	ppa008774m, ppa007421m, ppa009614m, ppa008984m, ppa010647m, ppa011006m, ppa011343m, ppa001436m, ppa001343m
HSF	2	ppa011804m, ppa008830m	GATA	2	ppa007038m, ppa013280m
TALE	1	ppa005361m	SRS	1	ppa017162m
RAV	1	ppa006243m	MYB-related	2	ppa001765m, ppa002636m
ZF-HD	1	ppa013998m	Dof	2	ppa007258m, ppa008850m
HB-other	1	ppa000565m	ERF	3	ppa007193m, ppa012385m, ppa009005m
MIKC-MADS	3	ppa026083m, ppa010714m, ppa010578m	G2-like	1	ppa007222m
MYB-related	1	ppa008539m	bZIP	3	ppa012507m, ppa007593m, ppa007645m
Dof	1	ppa008568m	NF-YC	1	ppa010147m
GRAS	9	ppa022653m, ppa003206m, ppa003702m, ppa003323m, ppa004136m, ppa014789m, ppa003310m, ppa002166m, ppa002472m	NAC	4	ppa010222m, ppa008828m, ppa007577m, ppa009628m
ERF	8	ppa024173m, ppa008514m, ppa011795m, ppa010186m, ppa008915m, ppa012014m, ppa009707m, ppa007892m	MYB	1	ppa007753m
G2-like	1	ppa008837m	TCP	1	ppa007243m
bZIP	2	ppa011967m, ppa004537m	Trihelix	3	ppa007968m, ppa023115m, ppa002848m
NF-YC	1	ppa010187m	WRKY	2	ppa012414m, ppa004905m
NAC	9	ppa009530m, ppa022043m, ppa007314m, ppa025263m, ppa026843m, ppa008801m, ppa009438m, ppa005770m, ppa009455m	bHLH	9	ppa002645m, ppa009578m, ppa010624m, ppa002762m, ppa006295m, ppa007656m, ppa008172m, ppa003350m, ppa004070m
MYB	11	ppa010846m, ppa008979m, ppa010735m, ppa009439m, ppa015973m, ppa010716m, ppa026640m, ppa019522m, ppa009103m, ppa008732m, ppa004560m			
TCP	5	ppa010032m, ppa007094m, ppa004612m, ppa018648m, ppa006389m			
Trihelix	3	ppa001238m, ppa003808m, ppa021097m			
WRKY	9	ppa009700m, ppa008566m, ppa007708m, ppa007986m, ppa009647m, ppa008573m, ppa021195m, ppa003333m, ppa004009m			
bHLH	5	ppa006134m, ppa002985m, ppa004680m, ppa009077m, ppa020972m			

2.4 不同着色桃果皮差异表达基因的荧光定量分析

对花青苷代谢途径中的类黄酮合成通路中的关键酶基因*CHS* (ppa008402m)、*CHI* (ppa011276m)、*F3H* (ppa007636m)、*DFR* (ppa008069m)、*ANS* (ppa007738m)和*UFGT* (ppa005162m)基因进行桃果实不同发育时期*q*-PCR荧光定量分析。结果如图1所示,关键酶基因*CHS*、*CHI*和*F3H*在‘肥桃’和‘秋雪’果皮组织中的表达方式很相似, S1期表达水平很高,随着果实发育表达下降,‘肥桃’在采收前达到最低值,而‘秋雪’桃采收前基因表达水平有所上调,并且采收前期(S4期)‘秋雪’桃的表达水平高于‘肥桃’。

‘肥桃’*DFR*和*ANS*基因的表达模式与前面几个基因相似,‘秋雪’*DFR*基因在S1至S2期表达水平极速下降, S3期有所缓和,采收前又回到较高水平,‘秋雪’*ANS*基因的表达模式在S2期达到最低水平, S3期又回到高位,直到采收前保持较高水平。‘肥桃’的*UFGT*基因在果实发育期一直保持较低水平,‘秋雪’桃在果实发育前期S1、S2期与‘肥桃’相似,但随着果皮着色程度的增加*UFGT*基因表达水平随之增加,在S3期到到最高值,采收前有所回降,但其表达水平仍是‘肥桃’的60多倍。暗示*UFGT*基因是果皮花色苷表现差异的关键基因。

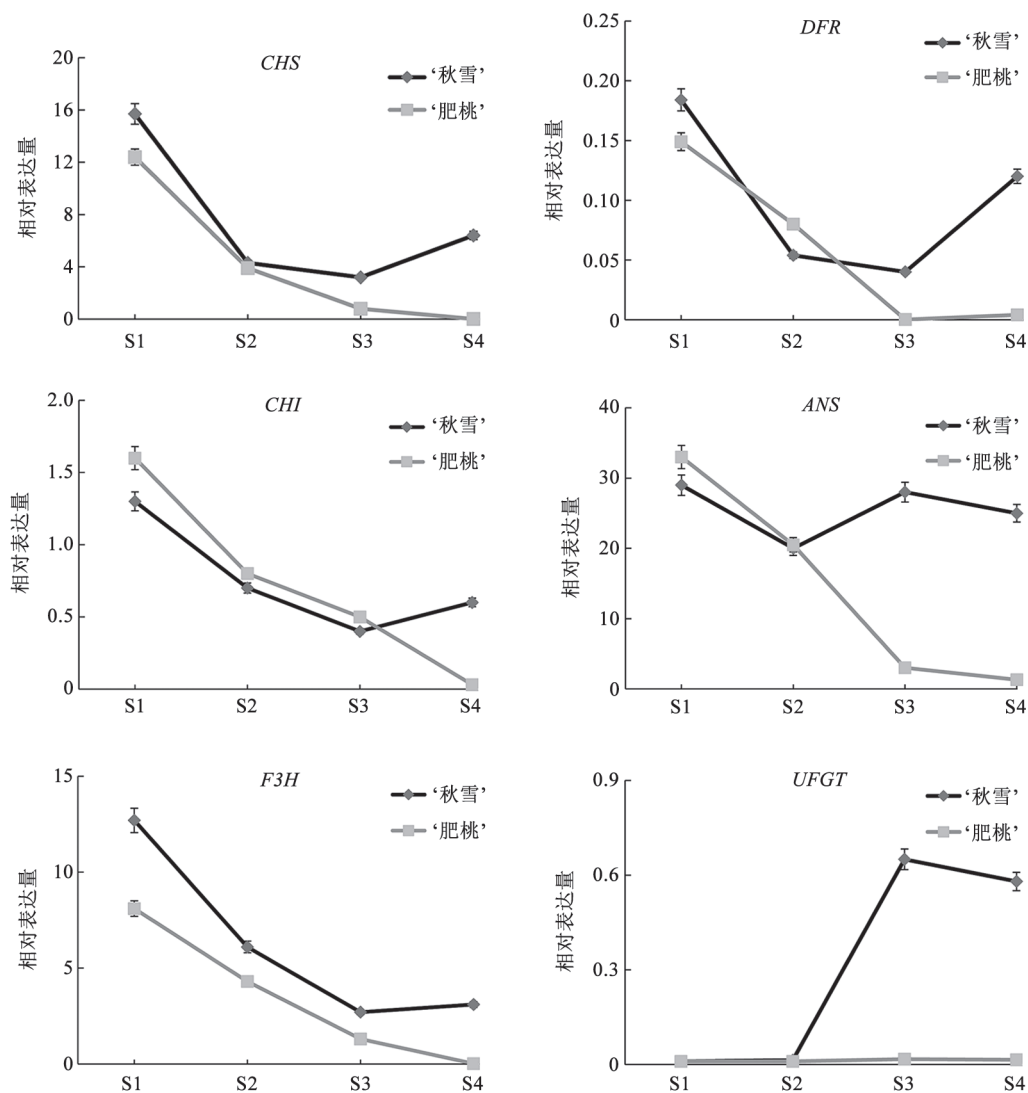


图1 不同着色桃果皮花色苷代谢途径中关键酶基因的荧光定量分析

Fig.1 Fluorescence quantitative analysis of key enzyme genes in anthocyanin metabolism pathway of different colored peach skins

2.5 不同着色桃果皮花青苷含量分析

由图2-A可以看出,‘秋雪’桃果皮在发育的S1和S2期是绿色的, S3期进入转色期, S4期着深红色, ‘肥桃’果实在S1、S2、S3期果皮均为浅绿色, 成熟前S4期转为浅黄色。不同时期果皮花青苷检测发现, ‘肥桃’果皮中花青苷含量从S1期至S4期均较低, 而‘秋雪’桃果皮中花青苷含量在果实不同发育期变化较大, 在前期S1和S2阶段与‘肥桃’花青苷含量相似, S2期后‘秋雪’桃随着果皮转色开始, 花青苷含量迅速增加, 到成熟前S4期比‘肥桃’高出8倍多(图2-B)。

3 讨论

桃是世界上重要果树树种, 得到广泛栽培, 桃果实的外观色泽极大程度地决定了果实的商品价值。本研究以同期成熟的红色桃‘秋雪’和白里‘肥

桃’为试材, 通过Illumina HiSeq™ 2500高通量测序技术来揭示桃不同果皮着色差异机制。测序获得16.59 Gb Clean Data数据量, 比对到桃参考基因组上的reads在84%以上, 测序数据共获得30 211个unigene, 分析出3 569个差异表达基因, 其中有3 060个基因获得注释。通过与植物转录因子数据中桃转录因子数据比对, 在差异表达基因中筛选到153个差异表达的转录因子基因, 属于32个不同转录因子家族, 其中包括调控花青苷生物合成相关基因表达的MYB和bHLH两类转录因子家族。

果实色泽是果实商品品质的重要因素之一, 果实成熟着色是由于叶绿素降解, 同时形成显现类胡萝卜素或花青苷的结果(王华等2015)。本研究在测序数据的KEGG分析中, 筛选出花青苷代谢途径中的类黄酮通路, 相关的14个基因被富集。前人在植物花青苷的代谢途径上已有深入研究(Springob等2003; Hichri等2011; Petroni和Tonelli 2011), 影响花色素苷代谢的基因分为结构基因和调节基因, 在果皮花青苷生物合成途径上游表达的关键酶基因包括PAL、CHS、CHI和F3H, 其表达与果实发育进程相关(Kumar和Ellis 2001; Muir等2001; Honda等2002)。在果皮花青苷生物合成途径下游表达的关键酶基因包括DFR、ANS和UFGT基因, 研究发现果实着色鲜艳时, 这些酶基因高效表达(Kobayashi等2001; Honda等2002; 程建徽等2009; Han等2012; 王甘等2012)。本研究对类黄酮通路中差异表达的6个关键酶基因进一步分析发现, 通路中上游的3个关键基因CHS、CHI和F3H在‘肥桃’和‘秋雪’桃中表达方式很相似, 但采收前期(S4期)‘秋雪’桃的表达量高于‘肥桃’; 下游的3个关键基因DFR、ANS和UFGT在‘肥桃’和‘秋雪’桃中表达模式上存在较大差别, 在采收前期‘秋雪’桃的这些基因表达量显著高出‘肥桃’, 尤其是UFGT基因。进一步检测果皮花青苷含量, 结果表明, ‘秋雪’桃与‘肥桃’果皮中花青苷变化趋势与UFGT基因的表达模式相似, 暗示UFGT基因是‘秋雪’桃花青苷合成的关键基因。Ravaglia等(2013)在对油桃‘Stark Red Gold’果实着色分析时发现UFGT基因的转录水平与果实中花青苷积累相关, Tuan等(2015)在‘Akatsuki’桃的成熟期检测到UFGT基因显著表

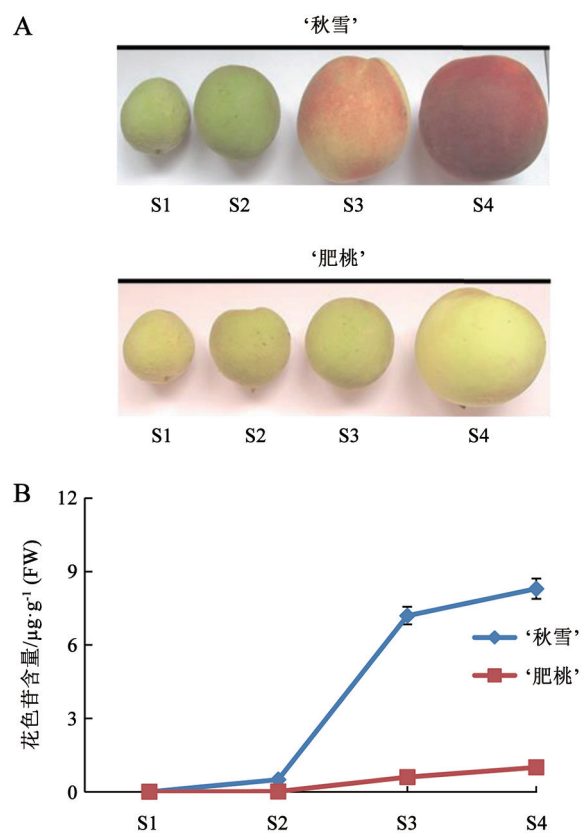


图2 桃果实着色分析

Fig.2 Pigmentation of the fruit skin

A: 不同时期果实图像; B: 果实花色苷含量。

达, 我们再次验证了 *UFGT* 基因在桃果皮着色上的功能。花青苷合成结构基因的表达主要受特定调节因子的作用, 主要的调节因子包括 MYB 转录因子、bHLH 转录因子和 WD40 重复蛋白 (Chiu 等 2010; Hichri 等 2011; Schaart 等 2013)。研究发现, 对于苹果 (*Malus domestica*) 而言, MYB 基因是栽培品种果实颜色差异的主要决定因素 (Ban 等 2007; Kui 等 2010), bHLH 转录因子参与葡萄多种生理过程, 调节葡萄果实花青苷的生物合成 (Hichri 等 2010; Park 等 2007), 而 WD40 蛋白在葡萄、苹果和石榴的花青苷合成途径中发挥着调控作用 (Brueggemann 等 2010; An 等 2012)。本研究中筛选到参与调控花青苷合成的转录因子 MYB 和 bHLH 两类, 共涉及 26 个差异表达基因, 其调节模式不尽相同, 即使同一转录因子家族不同成员间存在不同调节模式。暗示花青苷合成积累是一个复杂的调控网络, 尤其是在调节基因方面。另有研究花青苷的生物合成是依赖光照进行的反应过程 (Vimolmangkang 等 2014), 本研究的 KEGG 分析中同样富集到了光合通路。此外, 苯丙素生物合成、植物病原菌互作等通路也得到了显著富集, 这类代谢通路在果实着色上的作用尚不明确。差异表达基因 KEGG 通路分析表明光合与类黄酮生物合成通路调控着果实着色, 并受转录因子的调节, 但具体的调控机制还需要进一步更深入的研究。

参考文献(References)

- An XH, Tian Y, Chen KQ, et al (2012). The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation. *J Plant Physiol*, 169: 710–717
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, et al (2007). Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell Physiol*, 48: 958–970
- Brueggemann J, Weisshaar B, Sagasser M (2010). A WD40-repeat gene from *Malus × domestica* is a functional homologue of *Arabidopsis thaliana* *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*. *Plant Cell Rep*, 29: 258–294
- Cheng JH, Lei M, Yang FC, et al (2009). Anthocyanin accumulation and *UFGT* gene expression analysis by RT-PCR from cultivars belonging to *Vitis vinifera*. *J Fruit Sci*, 26: 808–812 (in Chinese with English abstract) [程建徽, 雷鸣, 杨夫臣等(2009). 欧亚种葡萄花色素苷的积累及 *UFGT* 基因的 RT-PCR 表达分析. *果树学报*, 26: 808–812]
- Chiu LW, Zhou X, Burke S, et al (2010). The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor. *Plant Physiol*, 154: 1470–1480
- Davies KM, Schwinn KE (2003). Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct Plant Biol*, 30: 913–925
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 15: 573–581
- Han Y, Vimolmangkang S, Soria-Guerra RE, et al (2012). Introduction of apple *ANR* genes into tobacco inhibits expression of both *CHI* and *DFR* genes in flowers, leading to loss of anthocyanin. *J Exp Bot*, 63: 2437–2447
- Halliwel B, Rafter J, Jenner A (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects antioxidant or not. *Am J Clin Nutr*, 81: 268–276
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, et al (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot*, 62: 2465–2483
- Hichri I, Heppel SC, Pillet J, et al (2010). The basic helix-loop-helix transcription factor *MYC1* is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Mol Plant*, 3: 509–523
- Honda C, Kotoda N, Wada M, et al (2002). Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. *Plant Physiol Biochem*, 40: 955–962
- Jin J, Zhang H, Kong L, et al (2014). Plant TFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 42: 1182–1187
- Juríková T, Balla S, Sochor J, et al (2013). Flavonoid profile of saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) and their health promoting effects. *Molecules*, 18: 12571–12586
- Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, et al (2001). Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (*UFGT*) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci*, 160: 543–550
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci*, 10: 236–242
- Kui LW, Bolitho K, Grafton K, et al (2010). An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biol*, 10: 50
- Kumar A, Ellis BE (2001). The phenylalanine ammonia-lyase

- gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol*, 127: 230–239
- Liu XF, Li F, Yin XR, et al (2013). Recent advances in the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis. *Acta Hort Sin*, 40: 2295–2306 (in Chinese with English abstract) [刘晓芬, 李方, 殷学仁等(2013). 花青苷生物合成转录调控研究进展. *园艺学报*, 40: 2295–2306]
- Meng R (2017). Analysis of genetics of apple skin color and expression of genes involved in anthocyanin synthesis (dissertation). Yangling: Northwest A & F University, 50–58 (in Chinese with English abstract) [孟蕊(2017). 苹果果皮色泽遗传特性及花青苷合成相关基因的表达分析(学位论文). 杨凌: 西北农林科技大学, 50–58]
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, et al (2001). Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nat Biotechnol*, 19: 470–474
- Park KI, Ishikawa N, Morita Y, et al (2007). A *bHLH* regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *Plant J*, 49: 641–654
- Peng T, Moriguchi T (2013). The molecular network regulating the coloration in apple. *Sci Hortic*, 163: 1–9
- Petroni K, Tomelli C (2011). Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Sci*, 181: 219–229
- Rahim MA, Busatto N, Trainotti L (2014). Regulation of anthocyanin biosynthesis in peach fruits. *Planta*, 240: 913–929
- Ravaglia D, Espley RV, Henry-Kirk RA, et al (2013). Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. *BMC Plant Biol*, 13: 68
- Schaart JG, Dubos C, Romero D, et al (2013). Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *New Phytol*, 197: 454–467
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, et al (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol*, 24: 743–755
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, et al (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep*, 20: 288–303
- Tuan PA, Bai S, Yaegaki H, et al (2015). The crucial role of *PpMYB10.1* in anthocyanin accumulation in peach and relationships between its allelic type and skin color phenotype. *BMC Plant Biol*, 15: 280
- Vimolmangkang S, Zheng D, Han Y, et al (2014). Transcriptome analysis of the exocarp of apple fruit identifies light-induced genes involved in red color pigmentation. *Gene*, 534: 78–87
- Wang H, Li MF, Yang Y, et al (2015). Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits. *Plant Physiol J*, 51: 29–43 (in Chinese with English abstract) [王华, 李茂福, 杨媛等(2015). 果实花青素生物合成分子机制研究进展. *植物生理学报*, 51: 29–43]
- Wang N, Yan JH, Zhang KC, et al (2015). Polymorphism of *DFR* gene intron 2 and intron 3 sweet cherry. *Sci Agric Sin*, 45: 320–329 (in Chinese with English abstract) [王廿, 鄢锦辉, 张开春等(2012). 甜樱桃*DFR*基因内含子2和内含子3的多态性. *中国农业科学*, 45: 320–329]
- Wolfe K, Wu XZ, Liu RH (2003). Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*, 51: 609–614
- Yang ZY (2007). Anthocyanin content in mulberry red pigment by pH-differential spectrophotometry. *Food Sci Technol*, 4: 201–203 (in Chinese with English abstract) [杨兆艳(2007). pH示差法测定桑椹红色素中花青素含量的研究. *食品科技*, 4: 201–203]
- Yu B (2012). Studies on isolation of anthocyanin biosynthesis related genes and their expression analysis in red Chinese sand pears (dissertation). Hangzhou: Zhejiang University, 70–89 (in Chinese with English abstract) [俞波(2012). 红色砂梨花青苷生物合成相关基因分离及表达研究(学位论文). 杭州: 浙江大学, 70–89]
- Zhou H (2015). Mechanisms underlying the regulation of anthocyanin coloration and proanthocyanidin synthesis in peach (dissertation). Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences, 5–19 (in Chinese with English abstract) [周晖(2015). 桃花青苷着色及原花青素合成的调控机制研究(学位论文). 武汉: 中国科学院大学(武汉植物园), 5–19]

Comparative analysis of anthocyanin expression patterns and transcription factors in different colored peach skins based on transcriptome data

HE Ping, LI Lin-Guang*, WANG Hai-Bo, CHANG Yuan-Sheng

Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000, China

Abstract: Peach (*Prunus persica*) is an economically valuable fruit and ornamental tree species. The pigmentation of the peach fruits' skin is an important consumer trait. In this study, we used Illumina RNA-seq technology to gain transcriptomic data from fruit samples at different developmental stages for red-skinned ('Qiuxue') and a non-skinned ('Feitao') peach cultivar. The results showed that 16.59 Gb transcriptome data were obtained and 30 211 unigenes were generated from *de novo* assembly. Among these unigenes, 3 060 differential genes were annotated by blast against Nr, Swissprot, GO, COG and KEGG databases. For these annotated differential genes, 6 biosynthesis pathways were significantly enriched by KEGG analysis, including photosynthesis signaling pathway and flavonoid biosynthesis. By mapping these differential genes to plant transcription factor database, 153 differentially expressed genes were screened to belong to 32 transcription factor families, including 12 unigenes predicted in MYB family and 14 unigenes in bHLH family. *q*-PCR analysis of key enzyme genes in anthocyanin metabolism pathway was further conducted. The result indicated that the expression pattern of the *CHS*, *CHI* and *F3H* genes was higher similarity, but *DFR*, *ANS* and *UFGT* existed larger distinction, especially *UFGT* gene. The change trend of anthocyanin content was consistent with the expression pattern of *UFGT* gene by anthocyanin content in pericarp detected. All these results will be useful for the elucidation of genetic differences in different colored peach skins and lay a foundation for revealing its regulation mechanism.

Key words: peach; transcriptome; transcription factors; fruit skin color; anthocyanin

Received 2018-12-13 Accepted 2019-01-23

This work was supported by the Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-30-Z-08), Major Applied Technology Innovation Projects in Agriculture of Shandong (2014-38), and Agricultural Science and Technology Innovation Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences (CXGC2016B07).

*Corresponding author (llg6536@163.com).