

文章编号: 1674-7054(2017)02-0153-06

火龙果果肉颜色相关 MYB 转录因子的表达分析

曾灿彬, 徐 敏, 齐 钊, 闫 臻, 熊 睿, 程 玉, 阮云泽, 汤 华

(海南大学 热带农林学院/海南热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地, 海口 570228)

摘 要: 对红肉与白肉火龙果的果实进行转录组测序, 通过数据的分析与筛选, 得到 30 个差异表达的 MYB 类转录因子。运用生物信息学进行了 MYB 转录因子序列的比对、基因注释分析、进化树分析、基因表达情况分析等, 通过 qRT-PCR 验证, 探究红肉与白肉火龙果果实颜色的代谢差异与 MYB 转录因子之间的调控关系。结果表明: 火龙果果肉颜色差异可能受 MYB 转录因子家族部分成员的调控。

关键词: 火龙果; 果肉颜色; 转录组测序; MYB 转录因子; 生物信息分析

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.02.004

火龙果属仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereus undatus*)植物。根据果实颜色可区分为红肉火龙果和白肉火龙果^[1]。红肉火龙果内含丰富的甜菜色素, 同时含有丰富的花青素, 具有很好的抗氧化作用^[2], 白肉火龙果则不含这些色素。火龙果果实发育过程中, 果实颜色的差异与转录因子的参与有关^[3-4]。MYB 类转录因子是一个超大家族, 植物 MYB 转录因子数量巨大, 功能多样, 它们在植物的代谢调控、生长发育和抗逆境胁迫等发挥着至关重要的作用, 同时也广泛参与植物色素合成^[5-6]。科研人员从甜菜植物中获得了 70 个 R2R3-MYB 基因, 其中有可能调控甜菜红素相关的代谢的含有多个 MYB 重复序列的 MYB 转录因子^[7-9]。还有研究表明, MYB 转录因子在调控花青素代谢方面发挥重要作用^[10-12]。但目前尚未有研究证实 MYB 转录因子是否参与了调控甜菜色素代谢; 是否参与了调控火龙果果实色素代谢差异。笔者对红肉和白肉火龙果进行转录组测序, 通过一系列生物信息学方法分析和实验验证去探究 MYB 转录因子在火龙果果实色素代谢上的分子机理, 为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 生物材料 实验用红肉火龙果和白肉火龙果样品均采自海南省东方市利国镇的火龙果种植果园, 树龄为 5 a。分别选取绿熟期和成熟期的火龙果取样, 每种样品分别采集 6 个鲜果备用。采下的果实带回实验室立即切碎分装于 50 mL 试管中, 并置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 火龙果果肉总 RNA 提取 根据火龙果果实水分和多糖含量多的特点, 本实验通过改良 CTAB 法提取火龙果总 RNA^[13]。用 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。将合格的 RNA 置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.3 火龙果果肉的转录组测序及分析 对红肉和白肉火龙果果实的绿熟期和成熟期分别取样后, 液氮速冻, 通过干冰运输至广州基迪奥生物科技有限公司, 进行转录组测序, 并得到转录组数据。运用生物信息学技术和方法, 对测序数据进行前期处理、序列比对、基因及基因组的注释、进化树分析、基因表达分析等。通过对测序数据的分析, 在红、白肉火龙果样品间筛选出表达差异达 2 倍以上的 MYB 转录因子, 同

收稿日期: 2017-01-06

修回日期: 2017-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31360364); 海南省重大科技项目(ZDZX2013023)

作者简介: 曾灿彬(1989-), 男, 海南大学热带农林学院 2014 级硕士研究生. E-mail: zengcanb@126.com

通信作者: 汤华(1974-), 男, 海南大学热带农林学院教授. 研究方向: 作物遗传育种与分子生物学. E-mail: th-tiger@163.com

时对得到的 MYB 转录因子进行更深入的生物信息学分析。

1.4 火龙果果肉颜色差异表达的 MYB 转录因子的热图和进化树构建 通过广州基迪奥生物科技有限公司提供的 OmicShare 网站(<http://www.omicshare.com>) 服务支持,对筛选得到的差异表达 MYB 转录因子进行热图绘制。用 MEGA7.0 软件的 Neighbor-Joining 算法,选择甜菜植物 BvMYB1 转录因子进行对比,对筛选得到的差异表达 MYB 转录因子进行进化树构建,用 Bootstrap 检验,自展重复抽样 1 000 次。

1.5 火龙果果肉 MYB 转录因子基因的 qRT-PCR 验证 选取部分差异表达的 MYB 转录因子基因,通过荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR) ,验证转录组测序数据的准确性和目标基因表达的差异性。为避免实验操作误差,本实验设置 3 个生物学重复,每个反应孔做 3 个复孔。选择火龙果的肌动蛋白基因(Actin) 作为内参基因;使用 Primer5.0 软件设计 qRT-PCR 实验所需引物;使用 TAKARA 反转录试剂盒(RR047A) 和荧光定量 PCR 试剂盒(RR820A) ;qRT-PCR 实验使用的仪器为 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems,CA,USA) ;qRT-PCR 实验结果通过 Livak 法(即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,以参考基因作为标准进行待测样品的相对定量检测) 计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 火龙果果肉转录组测序分析 火龙果果实的转录组测序数据转录因子的筛选结果发现,火龙果不同颜色之间,差异显著的转录因子分别有 bHLH,MYB,NAC 等类型(图 1) ,这些都是参与植物色素代谢调控的有关转录因子。对红肉和白肉火龙果样品在绿熟期和成熟期之间进行数字基因表达谱的差异表达分析和筛选。在白肉和红肉火龙果各自对应的发育时期,以基因表达差异达 2 倍以上为条件,筛选出有关 MYB 转录因子 30 个,MYB 转录因子的 Gene ID 及各个时期的表达情况见表 1。从表 1 可见这些差异表达 MYB 转录因子基因,在白肉和红肉火龙果中存在一致的上调或下调表达趋势,也存在表达趋势相反的过程。

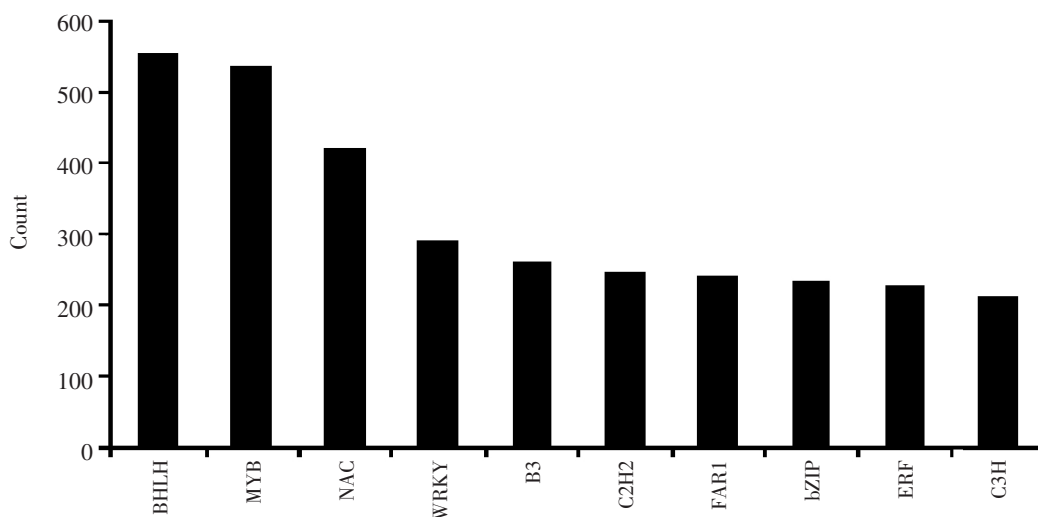


图 1 火龙果转录组测序筛选得到的转录因子差异表达排名前 10 的转录因子类型统计

Fig.1 The statistics for the top ten transcription factors related to flesh color of pitaya by transcriptome sequencing

通过对 30 个火龙果 MYB 转录因子进行差异表达热图分析(图 2) 可知,热图主要可分为 3 类表达模式,第 1 类是在红肉火龙果成熟期(R3) 中表达水平显著高于白肉火龙果绿熟期(W1) 、白肉火龙果成熟期(W3) 、红肉火龙果绿熟期(R1) ;第 2 类主要是在白肉火龙果成熟期(W3) 表达水平显著高于白肉火龙果绿熟期(W1) 、红肉火龙果绿熟期(R1) 、红肉火龙果成熟期(R3) ;第 3 类主要为在红肉火龙果成熟期(R3) 中表达水平显著低于白肉火龙果绿熟期(W1) 、红肉火龙果绿熟期(R1) 、白肉火龙果成熟期(W3) 。

表 1 火龙果果肉颜色相关差异表达的 MYB 转录因子的 RPKM 值统计

Tab. 1 RPKM value statistics for MYB transcription factors differentially expressed in relation to flesh color of pitaya

基因编号 Gene-ID	序列长度 Length	白肉火龙果 White-flesh pitaya			红肉火龙果 Red-flesh pitaya		
		绿熟期	成熟期	表达趋势	绿熟期	成熟期	表达趋势
		(W1)	(W3)	Trend	(R1)	(R3)	Trend
Unigene0007069	1 322	5.314 7	8.852 3	UP	9.141 5	20.554 4	UP
Unigene0007665	567	1.588 7	2.948 5	UP	0.404 7	8.048 3	UP
Unigene0016752	4 284	13.246 6	44.204 5	UP	9.909 2	20.045 4	UP
Unigene0040676	1 117	4.354 7	15.307 3	UP	2.191 2	4.828 2	UP
Unigene0050903	1 201	1.65	18.729 1	UP	0.382 1	1.727 1	UP
Unigene0021844	547	29.970 8	14.031 4	Down	6.711 9	48.159 3	UP
Unigene0028498	489	6.263	3.885 1	Down	5.943 9	13.998 1	UP
Unigene0032395	1 965	5.500 9	5.143 5	Down	5.760 9	21.112 1	UP
Unigene0032512	1 208	43.547 2	20.004 5	Down	20.831 6	55.290 8	UP
Unigene0034590	988	2.552 8	1.922 9	Down	1.316 1	9.027 7	UP
Unigene0036816	628	3.729 3	3.267 2	Down	4.019 3	10.239 2	UP
Unigene0038620	593	10.025 4	7.945 2	Down	1.418 8	24.135 6	UP
Unigene0039638	931	45.667 4	21.059	Down	3.286 3	265.577 0	UP
Unigene0042307	590	0.610 7	0.515 2	Down	0.648 2	19.687 9	UP
Unigene0047443	1 191	51.278 1	30.116 1	Down	38.854 2	89.344 9	UP
Unigene0005269	843	1.709 6	12.620 3	UP	3.538 6	0.492 1	Down
Unigene0010156	4 216	14.571 3	40.375 3	UP	18.196 8	6.002 4	Down
Unigene0021378	1 023	1.408 8	4.234 2	UP	3.962 7	1.216 6	Down
Unigene0035420	1 380	4.569 1	7.819 5	UP	4.212 4	0.751 5	Down
Unigene0035947	1 340	6.184 4	8.279 7	UP	6.050 6	2.941 1	Down
Unigene0050484	1 098	6.727 1	20.486	UP	7.244 8	1.889 1	Down
Unigene0010271	1 283	4.352 9	2.132 3	Down	3.398 1	0.485 0	Down
Unigene0014837	942	2.868 7	2.742 8	Down	3.897 5	0.440 4	Down
Unigene0020678	2 462	52.319 3	15.155 2	Down	69.901 8	33.700 5	Down
Unigene0022454	1 195	13.718 8	5.850 4	Down	11.969 3	1.041 5	Down
Unigene0027949	750	13.451 5	1.317 2	Down	9.892 5	4.148 5	Down
Unigene0031268	1 578	18.494 9	17.866 3	Down	18.467 7	4.469 3	Down
Unigene0041485	1 205	4.784 2	4.288 3	Down	3.364 2	0.688 6	Down
Unigene0041498	919	36.462 1	27.122 3	Down	10.237 3	0	Down
Unigene0052225	1 530	4.238 9	3.675 4	Down	6.798 9	1.626 9	Down

注: W1,W3 分别代表白肉火龙果的绿熟期和成熟期; R1,R3 分别代表红肉火龙果的绿熟期和成熟期; RPKM 表示测序得到的基因表达量

Note: W1,W3 are green stage and ripe stage of white pitaya fruit respectively; R1,R3 are green stage and ripe stage of red pitaya fruit respectively; RPKM means the gene expression value by sequencing

30 个火龙果的 MYB 转录因子进行 GO 功能富集分析的结果见图 3。由图 3 可见,功能富集主要分为生物过程、分子功能和细胞成分 3 个类型,其中生物过程主要富集在代谢过程和细胞过程; 分子功能集中富集在结合调控上; 细胞成分也主要富集在细胞组分。

30 个火龙果 MYB 转录因子进行进化树分析的结果见图 4。由图 4 可见,与甜菜植物 BvMYB1 转录因子同源性较接近的基因有 3 个: Unigene0021844,Unigene0027949 和 Unigene0010156。从整个进化树分布上看,除小部分同源关系较远外,其余均表现为较近的同源关系。

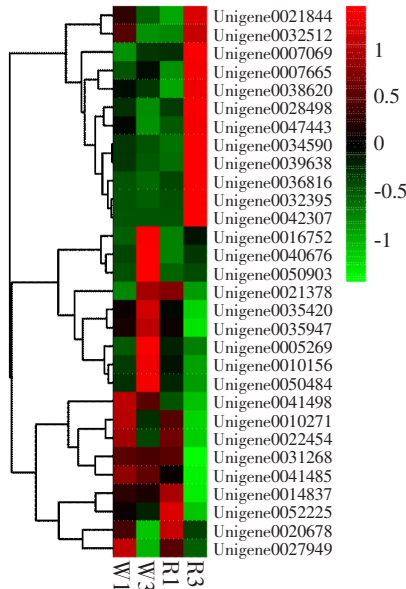


图 2 火龙果果肉颜色差异表达的 MYB 转录因子的 RPKM 值热图
Fig.2 RPKM heatmap of MYB transcription factors related to flesh color of pitaya fruit

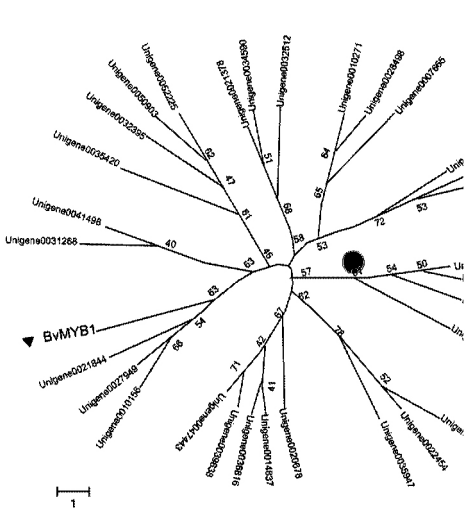


图 4 火龙果果肉颜色差异表达的 MYB 转录因子进化树分析
Fig.4 Phylogenetic tree analysis of MYB transcription factors related to flesh color of pitaya fruit

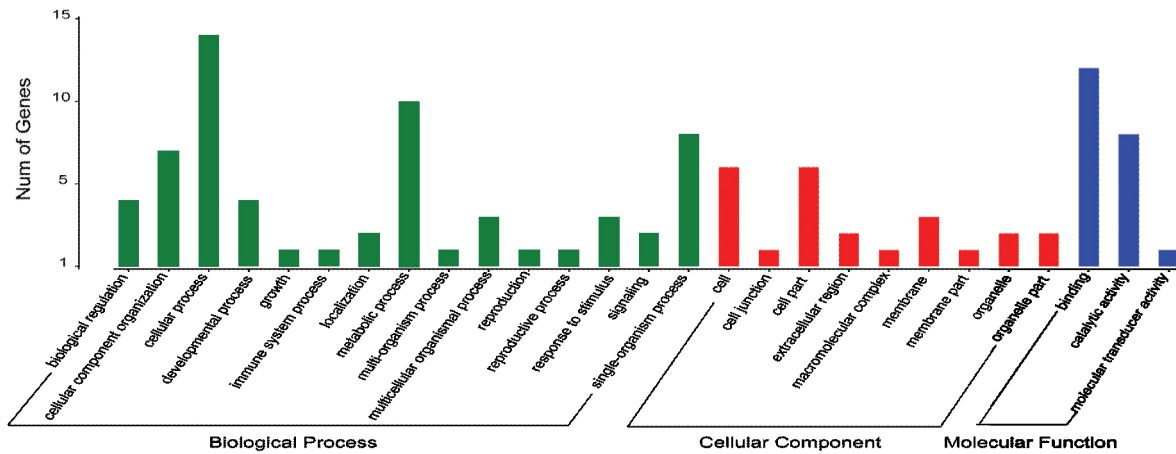


图 3 火龙果果肉颜色差异表达的 MYB 转录因子的 GO 富集分析
Fig.3 GO enrichment of MYB transcription factors related to flesh color of pitaya fruit

2.2 火龙果果肉总 RNA 提取 分别提取白肉火龙果和红肉火龙果在绿熟期与成熟期的总 RNA，电泳检测结果(图 5)所示，28s 和 18s 条带清晰，基本无拖带情况。紫外分光光度计测定 RNA 浓度， OD_{260}/OD_{280} 在 2.0 左右，纯度较高，可用于后续的 qRT-PCR 实验。

2.3 火龙果 MYB 基因的 qRT-PCR 验证 设置 3 个生物学重复，每个反应做 3 个复孔。选择火龙果的肌动蛋白基因 Actin 作为内参基因，对筛选出的火龙果 MYB 转录因子基因 Unigenes0036816, Unigenes0032395, Unigenes0034590 进行 qRT-PCR 验证。通过 MYB 转录因子的 qRT-PCR 结果(图 6) 与其对应转录组测序 RPKM 值的比较来看，它们表现出相同的表达变化趋势，这说明转录组测序数据较准确。实验发现这 3 个 MYB 转录因子在红肉火龙果成熟期的表达水平显著高于其绿熟期，同时，这 3 个转录因子在红肉火龙果成熟期的表达水平显著高于白肉火龙果的。

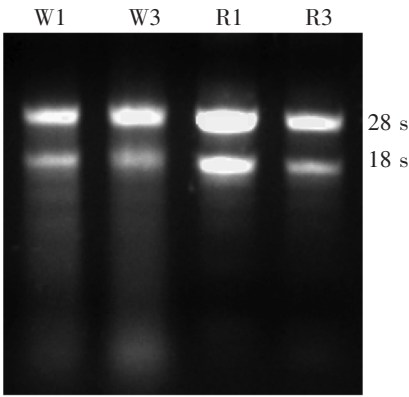


图 5 火龙果果实总 RNA 的电泳检测图
Fig.5 Agarose electrophoresis detection of total RNA extracted from pitaya fruit flesh

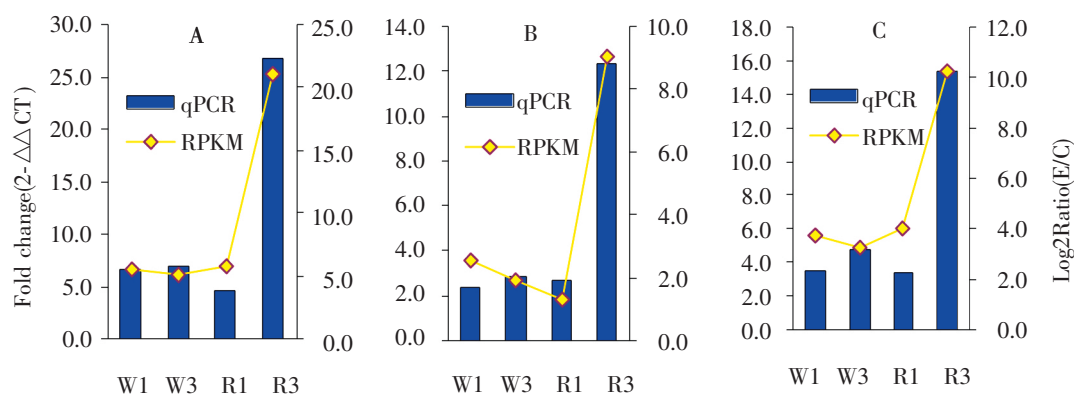


图6 火龙果果肉颜色差异表达的部分 MYB 转录因子 qRT-PCR 验证

Fig.6 qRT-PCR validation of MYB transcription factors related to flesh color of pitaya fruit

A: Unigene0036816; B: Unigene0032395; C: Unigene0034590

3 讨论

从果肉颜色上看,火龙果主要有红色和白色 2 种类型,颜色不同营养成分和风味口感也有差别。火龙果果实颜色的差异是由色素代谢的差异引起的,从遗传的角度看,其可能是色素代谢过程中相关基因发生了突变,也可能是相关转录因子的调控作用,调控上游或下游色素代谢相关基因的表达差异^[4]。研究表明,大部分植物的花色苷都是由 bHLH,MYB,WD40 这 3 类转录因子复合而成的复合蛋白直接调控激活^[5]的。在单子叶植物中(如玉米),主要由 2 类转录因子调控花青素合成,一类是 MYB 相关的转录因子,另一类是 bHLH 相关的转录因子,它们之间相互作用激活调控整个花色苷合成途径中的酶^[1]。本研究通过对火龙果果实的转录组测序数据进行转录因子的筛选,得到不同颜色火龙果果实在发育过程中显著差异表达的转录因子分别有 BHLH,MYB,NAC 等类型,这说明,火龙果果实在生长发育的过程中可能有多种转录因子参与调控。

MYB 类转录因子广泛存在于植物中,几乎参与了植物发育和代谢的各个方面^[6]。基因表达的调控方式有多种,其中组合调控是真核生物基因表达调控的重要方式,主要通过多种转录因子或是一类转录因子家族的多个成员的相互作用来实现对靶基因的精确调控^[6]。本研究对筛选出的 30 个 MYB 转录因子进行进化树分析,发现除小部分同源关系较远外,其余都表现较近的同源关系。同时,对筛选出的 30 个 MYB 转录因子进行样本间的热图分析,发现这些 MYB 转录因子在白肉和红肉火龙果中存在上调或下调表达趋势一致的基因,也有表达趋势不一致的基因。这说明了在火龙果果肉颜色差异表达的过程中,MYB 转录因子参与调控的复杂性。火龙果果肉的主要色素是甜菜色素^[1,14],研究报道,MYB1(BvMYB1)转录因子参与调控甜菜红素的代谢通路^[7],已从甜菜植物中获得了 70 个 R2R3-MYB 基因,通过对这些 R2R3-MYB 基因的功能分类,发现在 R3 的结构域有 1 个特异氨基酸组成,预测其可能参与调控甜菜红素代谢^[3,8-9,17]。笔者通过对筛选出的 MYB 转录因子进行进化树分析,发现与甜菜 BvMYB1 转录因子同源性较高的基因有 3 个,分别为 Unigene0021844 基因、Unigene0027949 基因和 Unigene0010156 基因。这 3 个转录因子是否对火龙果果肉色素代谢有调控作用,它们的具体调控的模式如何,还有待进一步研究。

火龙果果肉转录组测序得到大量的数据,但参与植物色素代谢调控的转录因子较为复杂,笔者只针对 MYB 转录因子对火龙果果肉色素代谢差异进行探究,而未探讨其他转录因子对火龙果果肉色素代谢差异影响。因此,在后续的研究中,可以通过相关生物信息方法,qRT-PCR 验证及组织特异性实验,对测序得到的其他转录因子进行深入挖掘,同时对筛选得到的 MYB 转录因子进行组织特异检测及基因克隆。

参考文献:

[1] 申世辉,马玉华,蔡永强. 火龙果研究进展 [J]. 中国热带农业,2015(1):48-52.

[2] Wang z,Wang L,Cai Y,et al. Research Progress on nutrition and functional material of Pitaya [J]. South China Fruits,2014

- (5): 25–29.
- [6] Stracke R, Holtgrawe D, Schneider J, et al. Genome-wide identification and characterisation of R2R3-MYB genes in sugar beet (*Beta vulgaris*) [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 249.
- [7] Qingzhu H, Chengjie C, Zhe C, et al. Transcriptomic analysis reveals key genes related to betalain biosynthesis in pulp coloration of *Hylocereus polyrhizus* [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 1179.
- [8] 陈清. 植物 Myb 转录因子的研究进展 [J]. 植物组学与运用生物学报, 2009, 28(2): 365–372.
- [9] 勒进朴, 郭安源, 何坤. 植物转录因子分类、预测和数据库构建 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(11): 68–77.
- [10] Hatlestad G J, Akhavan N A, Sunnadeniya R M, et al. The beet Y locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway [J]. Nat Genet, 2015, 47: 92–96.
- [11] Feng S, Xu Y, Yang L, et al. Genome-wide identification and characterization of R2R3-MYB transcription factors in pear [J]. Scientia Horticulturae, 2015, 197: 176–182.
- [12] Shin D H, Choi M G, Kang C S, et al. A wheat R2R3-MYB protein PURPLE PLANT1 (TaPL1) functions as a positive regulator of anthocyanin biosynthesis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 469: 686–691.
- [13] Gou F, Wang X, Liu X, et al. Regulation of biological metabolism of plant anthocyanin [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23: 10.
- [14] Zhang X, Xue J, Gong X. Research Progress on the regulatory genes in the biosynthesis pathway of anthocyanin biosynthesis in plants [J]. Current Biotechnology, 2011, 6: 381–390.
- [15] 葛翠莲, 黄春辉, 徐晓彪. 果实花青素生物合成研究进展 [J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1655–1664.
- [16] Zhao L, Ding Q, Zeng J, et al. An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton [J]. Phytochemical Analysis, 2012, 23: 647–650.
- [17] 陈云云, 罗静瑶, 赵慧. 番茄果实颜色相关 MYB 转录因子的基因表达研究 [J]. 广东农业科学, 2013(18): 127–129.
- [18] Chezem W R, Clay N K. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs [J]. Phytochemistry, 2016, 131: 26–43.
- [19] 赵珍珍. 红肉火龙果色素提取工艺优化及其化学成分分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [20] Meng X, Yang D, Li X, et al. Physiological changes in fruit ripening caused by overexpression of tomato SIAN2, an R2R3-MYB factor [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 89: 24–30.

Expression Analysis of MYB Transcription Factors Related to Flesh Color of Pitaya Fruit

ZENG Canbin, XU Min, QI Zhao, YAN Zhen, XIONG Rui, CHENG Yu, RUAN Yunze, TANG Hua

(College of Tropical Agriculture and Forestry/Hainan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Tropical Biological
Resources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Transcriptome sequencing of red-flesh and white-flesh pitaya fruit was conducted, and the data of the sequences were analyzed, from which 30 MYB transcription factors differentially expressed were selected. The MYB transcription factors were analyzed by using bioinformatics such as alignment, gene annotation analysis, phylogenetic analysis, gene expression analysis, etc. The bioinformatic analysis was verified by qRT-PCR to explore the regulatory relationships between metabolism difference and MYB transcription factors of white-or red-flesh pitaya fruit. The results showed that the differences in pitaya flesh color may be regulated by some members of the MYB family of transcription factors.

Keywords: Pitaya; fruit colour; transcriptome sequencing; MYB transcription factor; bioinformatics