

‘红阳’猕猴桃 MYB 基因的克隆与表达

满玉萍¹ 李刚¹ 刘虹¹ 王彦昌² 覃瑞¹

1. 中南民族大学生命科学学院, 武汉 430074; 2. 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074

摘要 为探讨 MYB 基因在‘红阳’(Actinidia chinensis ‘Hongyang’)猕猴桃果实着色过程中的重要作用, 利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)结合快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术克隆了‘红阳’猕猴桃的一个 MYB 转录因子基因。该基因的 cDNA 全长 962 bp, 序列包含一个 666 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 221 个氨基酸残基的蛋白质, 其 N 端具有 2 个典型的 MYB DNA 结合域。同源性分析显示, 该酶的氨基酸序列与矮牵牛、葡萄、番茄、金鱼草等植物中花青素途径相关的 MYB 转录因子基因的相似性都达到 80% 以上。实时荧光定量 PCR 分析结果显示, AcMYB 在‘红阳’猕猴桃中的表达量与花青素含量呈正相关, 二者均在果实转色主要阶段维持较高水平, 推测该基因在调控花青素合成的过程中起着重要作用。

关键词 花青素; 猕猴桃; MYB; 基因克隆; 表达分析

中图分类号 S 663.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)06-0679-07

猕猴桃是一种兼具营养与保健双重功能的水果, 果肉颜色是猕猴桃的重要经济性状, 现有猕猴桃主栽品种的果肉多为绿色和黄色, 相比之下, 红肉品种非常稀少。‘红阳’是世界上第一个红肉猕猴桃品种^[1], 内果皮红黄相间呈漂亮的放射状, 甜度高, 风味好, 受到国内外消费者的普遍欢迎, 在我国四川已有较大面积栽培。红色是‘红阳’猕猴桃推向国内外市场并倍受欢迎的关键特性, 但在不同地区及不同海拔条件下栽培的‘红阳’着色程度都不同: 如在四川苍溪栽培的‘红阳’着色深, 而在武汉、长沙等地区栽培时几乎没有红色。‘红阳’的呈色稳定性受环境因素的影响极大, 目前选育的红肉猕猴桃其他品种均存在类似问题, 这对红肉猕猴桃栽培是个巨大的挑战。

红肉猕猴桃之所以呈现红色, 是因为含有下面 4 类花青素中的 1~2 种: 矢车菊素-3-O-[2-O-β-(xylo-syl)-半乳糖苷]、矢车菊素-3-O-半乳糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷及飞燕草素-3-O-[2-O-β-(xylosyl)-半乳糖苷]^[2-3]。

在高等植物中, 多数的花青素生物合成的调控发生在结构基因的转录水平上, 受多种转录因子在不同时空上的组合调控。研究发现, MYB 类型转录

因子是参与花青素生物合成的关键转录因子之一^[4]。如葡萄浆果中 *VvMYBPA1* 调控 *CHI* 基因的表达, *VvMYBA2* 促进 *UFGT* 基因表达^[5]; 番茄 *ANT1* 编码的 MYB 基因过量表达, 提高 *CHS*、*CHI*、*DFR* 和 *UFGT* 基因的转录水平^[6]; 拟南芥 *PAP1* 与紫色花青素苷的形成相关, *MYB12* 促进 *CHS*、*CHI* 和 *F3H* 的表达^[7]; 番薯 *IbMYB1* 特异调控块根的 *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *ANS* 基因的表达^[8]; 苹果中 *R2R3* MYB 类型的 *MdMYB10* 调控整个花青素合成途径中所有结构基因的协同表达^[9]; 梨 *P_yMYB10* 参与并调控花青素生物合成途径基因的表达^[10]; 烟草 *NtAn2* 调控花青素生物合成途径结构基因的协同表达^[11]。

近年来果树花青素合成途径的研究取得了较大进展, 但是关于猕猴桃果肉着色稳定性的研究迄今为止仅报道了 *DFR*^[12]、*F3H*^[13]、*F3GT1* 和 *F3GGT1*^[14] 这几个结构基因, 尚未见到关于猕猴桃花青素生物合成相关转录因子的报道。‘红阳’在不同地区表现的相对稳定的差异归根结底是环境的不同导致基因差异表达的结果。本研究拟通过分析‘红阳’在武汉、苍溪中海拔地区这 2 个栽培区 MYB 转录因子基因的差异表达情况, 逐步揭示该优良品

收稿日期: 2012-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(3067143, 31171945)

满玉萍, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子遗传学。E-mail: manyuping2006@yahoo.com.cn

通讯作者: 覃瑞, 博士, 教授, 研究方向: 植物细胞遗传。E-mail: qinrui19722003@yahoo.com.cn

王彦昌, 博士, 副研究员, 研究方向: 园艺植物分子遗传学。E-mail: kiwifruit@wbgeas.cn

种在不同栽培区着色不稳定的内在原因;同时,通过研究‘红阳’不同组织部位中 *AcMYB* 的表达差异,明确红肉猕猴桃果实发育过程中花青素途径转录因子基因表达的变化规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘红阳’猕猴桃取样点分别为四川苍溪和武汉植物园。每个取样点设置 3 个单株作为重复,于开花后 30、50、65、80、120、150 d 进行采样,取内果皮部位以及开花期子房、花瓣、幼叶、嫩茎。采样后立即在冰上切成小块,迅速于液氮中深冻后置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 ‘红阳’猕猴桃 MYB 转录因子基因 cDNA 核心片段的克隆

参照改良的氯化锂沉淀法^[13]提取‘红阳’猕猴桃的总 RNA,以适量无 RNase 的水溶解,并用 Dnase I 处理,置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

利用同源克隆法设计 PCR 引物,上、下游引物分别为 MYB1-F、MYB1-R(序列见表 1)。以总 RNA 为模板,反转录合成第一链 cDNA,以得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系及反应条件参照 Invitrogen 公司的 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书进行。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的带并克隆测序,所得序列用 Blast 搜索引擎在 NCBI 数据库中进行同源性查找。

1.3 MYB 转录因子基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

根据已获得的该基因的 cDNA 核心片段,设计用于克隆 5' cDNA 片段和 3' cDNA 片段的基因特异引物(表 1)。

5'RACE 流程参照 Invitrogen 公司的 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends 试剂盒说明书进行。3' RACE 流程参照 clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行。

通过特异引物 MYB-F、MYB-R(表 1)扩增含 ORF 的全长片段,测序验证 RACE 的结果。所得序列用 Blast X 搜索引擎在 NCBI 数据库中进行同源性查找,用 CDD 在线程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析功能结构域,并用 DNAtools 6 分析软件和欧洲生物信

息研究所的 Clustal W 在线工具进行序列比较和分析。

1.4 花青素的提取与测定

利用 HPLC 法测定不同发育期猕猴桃果实中的主要花青素(即矢车菊素-3-O-xylo(1-2)-半乳糖苷)含量,仪器型号为 Agilent1100 型高效液相色谱仪;色谱柱 Agilent TC-C18, 25 mm×4.6 mm;柱温:28 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.6 mL/min;波长:450 nm。具体操作参照杨红丽^[15]的方法。

1.5 MYB 转录因子基因的表达分析

采用 Real-time PCR 定量法对目的基因的表达模式进行分析。分别提取不同样品总 RNA,Dnase I 处理后,用 MMLV 酶(promega)反转录合成 cDNA 第一链。以组成型表达的细胞肌动蛋白(*actin*)基因作为内参基因,内参基因引物 Actin-F、Actin-R 及基因特异引物 qMYB-F、qMYB-R 序列见表 1,在 Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应体系及程序参照 Roche 的 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)试剂盒说明书,每个样品做 3 个重复。反应完成后,用仪器自带的软件 rotor-gene1.7 计算 Ct 值,最后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[16]进行相对表达量的分析。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primer pairs used in this study

引物 Primers	序列 Sequence(5'-3')
MYB1-F	GCATGGACTGAGGAAGAGGA
MYB1-R	AGGTTGGGCTCTGTACCTT
GSP-1	TCGTTTGATGTTCTTCC
GSP-2	CTTCATCAGCAGTAAAGTTTCCTC
GSP-3	AGTTTAACCATCGCATTCTACAGCT
3'GSP	CACGGCCATCACCACCATCCAACAAT
MYB-F	ATGGAAAAGTGTTACTTTAGGAGTG
MYB-R	AAATGGCCTGCAGACTCAAC
qMYB-F	AGAAGGAAAGTGGCACCAA
qMYB-R	GTCTACCCGCAATTAATGACC
Actin-F	TGCATGAGCGATCAAGTTTCAAG
Actin-R	TGTCCCATGCTCGTTGATGACT

2 结果与分析

2.1 MYB 转录因子基因 cDNA 全长的克隆及序列分析

以不同物种 MYB 基因核苷酸的保守区搜索猕猴桃 EST 数据库,根据所得序列设计引物扩增出猕猴桃 MYB 基因 cDNA 的核心片段,测序表明该片段长 416 bp。经 Blast 查询,证实此片段为 MYB 基因的部分同源分子。根据此片段设计基因特异引物,

```

1      GGAGGGGAGAAGCAGCTTTTTGTTGAACCTTTCACGTA
39     GGTGCTAAACTATAGAATGTAGTAGTCTATTGAGTAGACACAGAA
84     ACAGAATACAAATTACATAATAATTACTTGGTGTAGTGTAGGATT
129    ATGGAAAGTGTTACTTTAGGAGTGAGAAAGGGTGCATGGACTGAG
      M E S V T L G V R K G A W T E
174    GAAGGGGATAAGCTTCTCAAGAAGTGCATTGAGAAGTATGGAGAA
      E G D K L L K K C I E K Y G E
219    GGAAAGTGGCACCAAGTTCCTCTCAGATCAGGATTGAACAGATGC
      G K W H Q V P L R S G L N R C
264    AGAAAAAGCTGTAGAATGCGATGGTTAAACTATCTGAGGCCAAAT
      R K S C R M R W L N Y L R P N
309    ATAAATAGAGGAAACTTTACTGCTGATGAAGTTGATCTCATTATC
      I N R G N F T A D E V D L I I
354    AGACTTCACAAGTTGTTAGGCAACAGATGGTCATTAATTGCGGGT
      R L H K L L G N R W S L I A G
399    AGACTTCCGGGAAGAACATCAAACGATGTCAAAAATTATTGGAAT
      R L P G R T S N D V K N Y W N
444    ACCCACCTCCAGAAGAACTGATCACATATCCAAGAGCACAGCCG
      T H L Q K K L I T Y P R A Q P
489    ATACCCAAAACCCAAAAGACGATCGTACCCAAAGGTACAGAGGCC
      I P K T Q K T I V P K G T E A
534    CAACCTCGGGCCCACCCCAAGTCACCGCCACGGCCATCACCACCA
      Q P R A H P K S P P R P S P P
579    TCCAACAATGAAATATTGTGGTGGGACAACAAGACTGTGAGCCCA
      S N N E I L W W D N K T V S P
624    CAAATTGACAATATTGGAATCCATTGGTCAATTGATGGATCAATA
      Q I D N I G I H W S I D G S I
669    TTTGAGGAGCCAATTTTGGGGAATTTACAGTCACCTGGTGACAGT
      F E E P I L G N L Q S P G D S
714    TTTCTTCAACAAAATCAAAGTGATTGGAGTGATATATTTTTAGAA
      F L Q Q N Q S D W S D I F L E
759    GATGTTAACCTTTGGGATCTCTTAGGTGATGATTAAGATGCAGTT
      D V N L W D L L G D D *
804    ATGTAATAACATTTTCTAATATAAATATTAGATGGAGTTGAGTCT
849    GCAGGCCATTTTTGCTTTTGTATTATTGGGTTATTTTGTCTTTT
894    TCAAGGTGATTAATATTATATATATTTTCGGATGTGGCTTCGAAAA
939    AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 ‘红阳’猕猴桃 *MYB* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

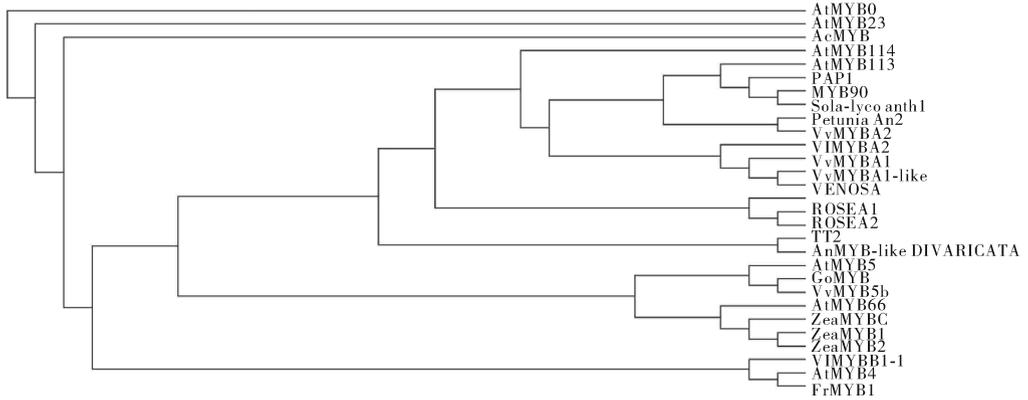
Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *MYB* cDNA from *Actinidia chinensis* ‘Hongyang’

用 RACE 技术扩增得到 *MYB* 基因的 5' 和 3' 末端, 对测序所得的 5' 和 3' cDNA 末端的核苷酸序列进行拼接, 得到 *MYB* 基因的全长 cDNA, 命名为 *Ac-MYB*, 经过全长再次扩增和比对, 证明 RACE 拼接

所得序列正是 *MYB* cDNA 全长序列, 其长度为 962 bp。在该 cDNA 的 5' 端存在 128 bp 的非翻译区 (UTR), 中间为 666 bp 的开放阅读框 (ORF), 3' 端非翻译区 (UTR) 长度为 168 bp (图 1)。由全长

cDNA预测的 *AcMYB* 含有 221 个氨基酸残基。序列经 Blast X 搜索、同源性分析,该酶的氨基酸序列与矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm.)、葡萄 (*Vitis* spp.)、番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 等植物中花青素途径相关的 *MYB* 转录因子基因的相似性都达到 80% 以上。对其功能结构进行分析,发现 N 端具有 2 个典型的 *MYB* DNA 结合域,为典型的 R2R3*MYB* 转录因

子。在 GenBank 中做同源性分析表明, *AcMYB* 基因氨基酸序列与其他 *MYB* 转录调控因子的同源区域都集中在 N 端 R2R3 DNA 结合结构域,在 C 端同源性极低。将 *AcMYB* 与其他植物的 28 种 *MYB* 类型的转录因子的氨基酸序列进行同源性比较,结果表明, *AcMYB* 与其他重要的调控因子(如拟南芥中的 PAP1, MYB113, MYB114 及葡萄中的 VvMYBA1 等)具有很高的同源性。



MYB 来源及登录号如下: Sequences used and their GenBank accession number: c-myb, AAA52031 [*Homo sapiens*]; ROSEA1, ABB83826, ROSEA2, ABB83827, VENOSA, ABB83828, AnMYB, AAL78741, [*Antirrhinum majus*]; VvMYBA2, BAD18978 [*Vitis vinifera*]; VvMYBA1, BAD18977, VIMYBA2, BAC07540, VIMYBB1-1, BAC0754, VvMYB5b, AAX51291 [*Vitis vinifera*]; FaMYB1, AAK84064 [*Fragaria × ananassa*]; PeAn2 protein, AAF66727 [*Petunia × hybrida*]; So-Ly-anth 1, AAQ55181 [*Solanum lycopersicum*]; GoMYB, AAK19611 [*Gossypium hirsutum*]; AtMYB23, NP_198849, ATMYB0, NP_189430, AtMYB113, NP_176811, AtMYB114, NP_176812, AtMYB90, NP_176813, AtMYB4, BAA21619, AtMYB5, NP_187963, AtMYB66, NP_196979, PAP1, NP_176057, TT2, NP_198405, [*Arabidopsis thaliana*]; ZeaMYB1, AAA19821, ZeaMYB2, NP_001105885, ZeaMYBC, P10290, ZeaMYBC, P10290, [*Zea mays*].

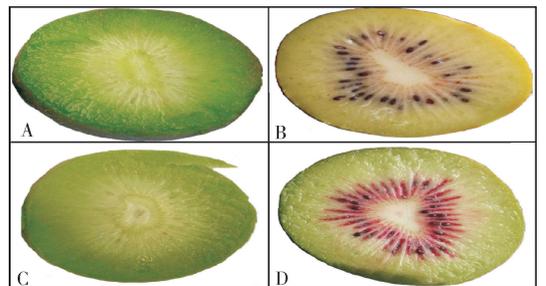
图 2 MYB 的分子系统树

Fig. 2 Phylogenetic trees of the deduced MYB amino acid sequence

2.2 不同栽培区 ‘红阳’ 猕猴桃中花青素含量的变化

‘红阳’果实在武汉及四川苍溪中海拔地区栽培过程中,其果实横切面着色存在明显差异(图 3)。开花后坐果初期 50 d 内,两地果实横切面着色无差异,此后内果皮隔区内红色逐渐出现着色差异,随着果实发育更加明显,在果实采收阶段差异最大。

‘红阳’猕猴桃花青素含量因种植区域不同呈现不同的变化规律(图 4)。转色期(65 d)前 2 个不同栽培区栽培的 ‘红阳’猕猴桃果实中花青素含量很低,甚至检测不到。转色期之后持续到采收期,苍溪栽培的 ‘红阳’猕猴桃果实花青素含量一直迅速增长。而武汉栽培的 ‘红阳’猕猴桃果实花青素含量在不同发育期始终维持在较低水平。



A: 武汉地区栽培时开花后 30 d 30 d after anthesis in Wuhan; B: 武汉栽培时开花后 150 d 150 d after anthesis in Wuhan; C: 四川苍溪栽培时开花后 30 d 30 d after anthesis in Cangxi of Sichuan; D: 四川苍溪栽培时开花后 150 d 150 d after anthesis in Cangxi of Sichuan.

图 3 不同地区栽培时 ‘红阳’ 果实着色差异比较
Fig. 3 Pigmentation divergence between ‘Hongyang’ fruits cultivated in different regions

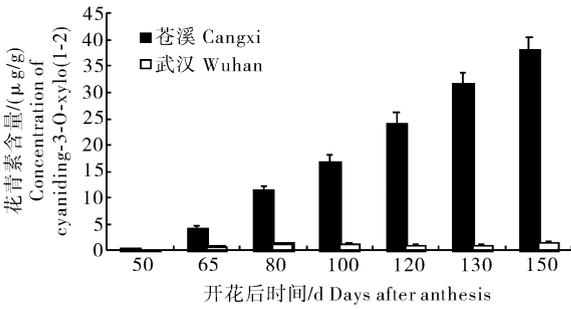


图 4 花青素动态

Fig. 4 Changes of the main anthocyanin concentration

2.3 AcMYB 在不同栽培区栽培的‘红阳’猕猴桃中的表达

在‘红阳’猕猴桃果实中,子房(用 0 d 表示)呈现红色,接着,红色褪去,花后 30 d 的果实完全不显红色;然后随着发育过程,果肉又开始逐渐呈现红色,从转色后期一直到成熟期,果肉颜色均较深。AcMYB 基因随着‘红阳’猕猴桃果实的发育,其表达水平呈先上升后下降的趋势,在开花后 30 d 的果实中表达量最低,在花后 80 d 到花后 120 d 的表达量较高。比较不同栽培区不同发育阶段 AcMYB 的表达情况,发现苍溪中海拔地区栽培的果实中,AcMYB 的转录水平明显高于武汉栽培区的,这与果实的颜色密切相关,表明 AcMYB 在花青素的合成中起着重要作用。

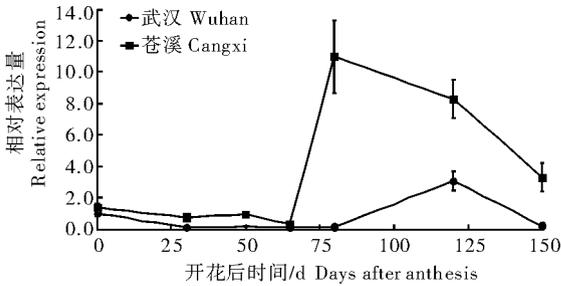


图 5 AcMYB 在不同地区栽培的‘红阳’猕猴桃内果皮中的表达变化

Fig. 5 Expression of AcMYB in fruits at different developmental stages of ‘Hongyang’ that grow at different regions

2.4 AcMYB 在‘红阳’猕猴桃不同组织器官中的表达

苍溪中海拔地区栽培的‘红阳’猕猴桃的嫩茎、幼叶略带红色,花瓣黄白色,子房红色,转色后期猕猴桃内果皮部位(即花后 120 d 猕猴桃果实的内果皮部位)着色最深;武汉栽培区对应组织着色均比苍溪栽培的浅,嫩茎基本不着色。

以苍溪中海拔地区和武汉植物园栽培的‘红阳’

猕猴桃为试验材料,探索 AcMYB 在其嫩茎、花瓣、幼叶、子房及转色后期猕猴桃果实的呈色部位的表达差异。在苍溪中海拔地区栽培的‘红阳’猕猴桃,AcMYB 在各呈色组织均有较高的表达,其中以转色后期内果皮部位(120 d)表达量最高,而在花瓣中基本上不表达;而在武汉栽培的‘红阳’猕猴桃,AcMYB 在不同组织器官中的表达也有类似的趋势,不同的是,嫩茎中 AcMYB 的表达量极低。对比 2 个不同栽培区不同组织中 AcMYB 的表达差异,发现苍溪中海拔地区的‘红阳’猕猴桃不同组织器官中 AcMYB 的表达均高于武汉栽培区。AcMYB 在这些不同栽培区不同组织中的表达水平与各组织器官的颜色呈正相关,在颜色最深的组织中转录水平最高。

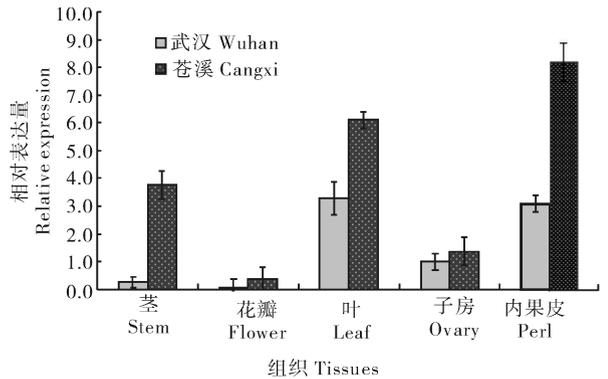


图 6 AcMYB 在‘红阳’猕猴桃不同组织器官中的表达

Fig. 6 Expression of AcMYB in different tissues of ‘Hongyang’

3 讨论

植物花青素合成主要受两类基因控制,一类是结构基因,另一类是调节基因。调节基因编码的转录因子可以调控结构基因的时空表达,MYB 蛋白是植物花青素合成涉及的最广泛的调节因子,它是一类 DNA 结合蛋白,含有一段保守的 DNA 结合结构域。植物中大多数的 MYB 蛋白是 R2R3 型。本研究通过同源克隆及 RACE 技术,克隆了‘红阳’猕猴桃的一个 MYB 转录因子基因,序列分析发现它与其他植物中花青素途径相关的 MYB 蛋白的氨基酸序列具有较高的同源性,而且其 N 端具有 2 个典型的 DNA 结合域,可见新克隆的 AcMYB 是一个 R2R3 型的转录因子,它可能对‘红阳’猕猴桃的着色起着重要作用。

刘仁道等^[17]利用分光光度计的检测表明,花青素在‘红阳’猕猴桃开花后 65 d 左右开始就能检测

到,本研究结果与其相似,实际上笔者可检测的花青素形成时间更早,为花后 50 d。本研究中,从开始转色到开花后 150 d(9 月 15 日左右),苍溪栽培区不同发育期的‘红阳’猕猴桃中,果实花青素含量持续上升,并未监测到花青素下降的趋势,这可能是与花青素种类或试验的不同年份间的重复性有关。*AcMYB* 在‘红阳’各发育期的表达水平随着发育期的进行先上升后下降,后期表达水平下降可能是由于糖浓度升高,维持了花青素的继续合成或者糖苷化,但不需要继续活化合成催化酶。武汉栽培区不同发育期的‘红阳’猕猴桃中,花青素的含量及*AcMYB*的表达均维持在较低水平。这与花青素含量的变化趋势一致,表明所克隆的*AcMYB*在调控花青素合成的过程中可能起着重要作用,*AcMYB*在‘红阳’不同组织中的表达模式也证明了这一点。

果肉颜色是品质的重要指标之一,不同地区及不同海拔条件下栽培的‘红阳’着色程度差异很大,这对红肉猕猴桃栽培是个巨大的挑战。‘红阳’猕猴桃着色不稳定的主要原因可能为光照(包括光强、光质)^[18]和温度(包括昼温、夜温及昼夜温差)^[19-20]两方面的因素。比较武汉与四川苍溪 2 个红阳栽培区的气候条件,发现 2 个地区均属于亚热带湿润季风气候,年平均温度、降雨量及无霜期相近,但是昼夜温差差异较大。而且武汉地区栽培的‘红阳’猕猴桃在果实发育过程中,正值该地区的高温季 6—9 月。为探索温度影响‘红阳’猕猴桃着色不稳定的分子基础,本研究分析了‘红阳’在武汉、苍溪中海拔地区这 2 个栽培区*AcMYB*的差异表达情况,结果显示低温环境下(苍溪中海拔)*AcMYB*的表达量明显高于高温环境(武汉),表明低温可能通过信号通路实现对*AcMYB*的上调表达来促进花青素的合成。

呈色问题是一个复杂的问题,现已查明的影响植物器官着色的因素存在多个层次。从分子调控的角度,发现了三类花青素途径的调控因子:MYB, bHLH 及 WD40,它们相互作用,调控结构基因的表达水平,从而连接着分子调控到器官着色的基本过程^[21]。所以,关于低温下 MYB 如何调控着色,是否通过调节使合成途径的结构基因表达上调,从而合成花青素浓度上升?需要进一步调查 MYB 与结构基因之间的表达模式才可得到阐明。

参 考 文 献

[1] 王明忠. 红肉猕猴桃可持续育种研究[J]. 资源开发与市场,

2003,19(5):309-310.

- [2] COMESKEY D J, MONTEFIORI M, EDWARDS P J B, et al. Isolation and structural identification of the anthocyanin components of red kiwifruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(5):2035-2039.
- [3] MONTEFIORI M, COMESKEY D J, WOHLERS M, et al. Characterization and quantification of anthocyanins in red kiwifruit(*Actinidia* spp.) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 57(9):2519-2523.
- [4] ALLAN A C, HELLENS R P, LAING W A. MYB transcription factors that colour our fruit[J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(3):99-102.
- [5] BOGS J, JAFFÉ F W, TAKOS A M, et al. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3):1347-1361.
- [6] MATHEWS H, CLENDENNEN S K, CALDWELL C G, et al. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport [J]. *The Plant Cell Online*, 2003, 15(8):1689-1703.
- [7] MEHRTENS F, KRANZ H, BEDNAREK P, et al. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2):1083-1096.
- [8] MANO H, OGASAWARA F, SATO K, et al. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3):1252-1268.
- [9] RICHARD V E, HELLENS R P, PUTTERILL J, et al. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, *MdMYB10* [J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(3):414-427.
- [10] FENG S, WANG Y, YANG S, et al. Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a *R2R3-MYB* transcription factor *PyMYB10* [J]. *Planta*, 2010, 232(1):245-255.
- [11] PATTANAIK S, KONG Q, ZAITLIN D, et al. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific *R2R3 MYB* regulator from tobacco [J]. *Planta*, 2010, 231(5):1061-1076.
- [12] 杨俊, 姜正旺, 王彦昌. 红肉猕猴桃 *DFR* 基因的克隆及表达分析[J]. *武汉植物学研究*, 2010, 28(6):673-681.
- [13] 杨红丽, 王彦昌, 姜正旺, 等. ‘红阳’猕猴桃 cDNA 文库构建及 *F3H* 基因的表达初探[J]. *遗传*, 2009, 31(12):1265-1272.
- [14] MONTEFIORI M, ESPEY R V, STEVENSON D, et al. Identification and characterisation of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. 2011, 65(1):106-118.
- [15] 杨红丽. 红阳猕猴桃果肉着色的分子机理研究[D]. 武汉:中国科学院武汉植物园, 2009.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$

- method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [17] 刘仁道, 黄仁华, 吴世权, 等. ‘红阳’猕猴桃果实花青素含量变化及环剥和 ABA 对其形成的影响[J]. *园艺学报*, 2009, 36(6):793-798.
- [18] 孟祥春, 彭建宗, 王小菁. 光和糖对非洲菊花色素苷积累及 *CHS*, *DFR* 基因表达的影响[J]. *园艺学报*, 2007, 34(1):227-230.
- [19] MORI K, GOTO-YAMAMOTO N, KITAYAMA M, et al. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(8):1935.
- [20] LIN-WANG K, MICHELETTI D, PALMER J, et al. High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2011, 34(7):1176-1190.
- [21] 郭凤丹, 王效忠, 刘学英, 等. 植物花青素生物代谢调控 [J]. *生命科学*, 2011, 23(10):938-944.

Cloning and expression analysis of *MYB* in *Actinidia chinensis* ‘Hongyang’

MAN Yu-ping¹ LI Gang¹ LIU Hong¹ WANG Yan-chang² QIN Rui¹

1. *School of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;*

2. *Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China*

Abstract To elucidate the function of *MYB* in *Actinidia chinensis* ‘Hongyang’ pigmentation, a novel *MYB* gene (*AcMYB*) was isolated from that cultivar by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA of *AcMYB* is 962 bp with an open reading frame (ORF) of 666 nucleotides encoding a protein of 221 amino acids with two typical *MYB* DNA binding domains at its N-terminal. The result of Blast X showed that *AcMYB* had high similarity with *MYB* transcription factors in *Petunia hybrida* Vilm., *Vitis* spp., *Solanum lycopersicum* L., *Antirrhinum majus* L. and sequences from other plant species related to the elevation of anthocyanin pigmentation. Real-time PCR analysis indicated that the expression of *MYB* was positively correlated with the main anthocyanin concentration in *Actinidia chinensis* ‘Hongyang’ and both of them maintained high levels at the stage of pigmentation, suggesting that *AcMYB* may play an important role in regulating anthocyanin biosynthesis.

Key words anthocyanin; kiwifruit; *MYB*; gene cloning; expression analysis

(责任编辑:张志钰)