

# 苹果 *MdNAC9* 的克隆及其调控黄酮醇合成功能的鉴定

孙庆国, 姜生辉, 房鸿成, 张天亮, 王楠, 陈学森\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘要:** 为了探究红肉苹果黄酮醇合成机理, 分析通路相关基因, 从成熟期红肉苹果中克隆了 1 个 NAC 转录因子基因 *MdNAC9*。通过 Real-Time PCR、酵母单杂交和荧光素酶报告试验, 探究 *MdNAC9* 与苹果黄酮醇积累的相关性。结果表明, 在苹果果实和过表达 *MdNAC9* 的愈伤组织 (OENAC9) 中 *MdNAC9* 表达量变化与黄酮醇合成相关基因 *MdFLS* 表达量变化趋势一致。酵母单杂交试验证明, *MdNAC9* 具有转录激活功能, 能够特异结合 *MdFLS* 基因启动子。荧光素酶报告试验显示, *MdNAC9* 对 *MdFLS* 的启动子有激活作用, 促进 *MdFLS* 的表达。*MdNAC9* 可能通过激活 *MdFLS* 促进苹果黄酮醇积累。

**关键词:** 苹果; NAC 转录因子; 酵母单杂交; 荧光素酶报告; 亚细胞定位; 黄酮醇

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2019) 11-2073-09

## Cloning of *MdNAC9* and Functional of Its Regulation on Flavonol Synthesis

SUN Qingguo, JIANG Shenghui, FANG Hongcheng, ZHANG Tianliang, WANG Nan, and CHEN Xuesen\*

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** In order to explore the mechanism of flavonol synthesis in red flesh apple, we analyzed the pathway-related genes using mature red flesh apples, and cloned a transcription factor gene *MdNAC9*. The correlation between *MdNAC9* and flavonol accumulation was explored by Real-Time PCR, yeast one-hybrid and luciferase reporter assay. The results showed that the expression of *MdNAC9* was positively correlated with *MdFLS*, a key gene in flavonol synthesis, in fruit and over-expressed callus (OENAC9). Yeast one-hybrid showed that *MdNAC9* could specifically bind to *MdFLS* promoter. Luciferase reporter assay proved that *MdNAC9* could promote the expression of *MdFLS*. *MdNAC9* may promote flavonol accumulation by activating *MdFLS*.

**Keywords:** apple; NAC transcription factor; yeast one-hybrid; luciferase reporter assay; subcellular localization; flavonol

收稿日期: 2019-04-01; 修回日期: 2019-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31730080, 31701892); 国家重点研究开发项目 (2016YFC0501505)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chanyetixi@163.com)

类黄酮物质种类繁多, 包括花青素、黄酮醇、黄烷醇等, 具有丰富的生物活性和药理作用, 不仅能清除人体内的自由基, 还能解毒抗炎, 对人类许多疾病具有治疗作用 (Amado et al., 2011; de Souza et al., 2011; Yang et al., 2013)。

苹果中含有较多的易于被人体吸收的类黄酮物质 (陈学森 等, 2010)。近年来, 围绕苹果黄酮类代谢机理的研究取得较大进展, 其中黄酮醇是类黄酮化合物中数量最多、分布最广泛的一类 (聂继云 等, 2009; Liu et al., 2016)。R2R3-MYB 转录因子首次在拟南芥中报道参与黄酮醇合成代谢 (Stracke et al., 2007; Mehrtens et al., 2015)。随后, 在葡萄中分离到调控葡萄果实黄酮醇积累的基因 *VvMYB1* (Czemmel et al., 2009)。在海棠中, *McMYB4* 和 *McMYB7* 在不同环境条件下对黄酮醇合成过程至关重要 (Wang et al., 2015, 2017)。在植物中, 转录因子对类黄酮生物合成至关重要 (Wang et al., 2017)。已有报道 NAC 转录因子参与了类黄酮途径的调控。有研究报道, 当血橙遭遇冷害时, NAC 转录因子在应激过程中参与了花青苷的积累 (Crifò et al., 2012)。在桃中, NAC 转录因子促进花青苷代谢相关基因的表达, 并能够激活 *PpMYB10.1*, 进而促进花青苷积累着色 (周晖, 2015)。在拟南芥中, NAC 转录因子可以作为花青素合成途径关键酶基因的转录调节因子, 也可以与 MBW 复合物相互作用 (Zhou et al., 2015)。除此之外, NAC 转录因子在其他代谢领域还具有复杂的生物学功能, 在拟南芥中 NAC 可以参与子叶边界以及茎分生组织的构建 (Vroemen et al., 2003)。近期有研究发现, 在拟南芥中过表达 NAC 基因 (*ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072*), 可以显著提高转基因植株的抗旱性 (Tran et al., 2004)。在结构上, NAC 转录因子在 N 端含有保守的结构域, 有些在 C 端还含有非保守的转录激活域 (Xie et al., 2000; Shan et al., 2012)。一些 NAC 蛋白可以与自身或其他 NAC 相互作用, 形成同源或者异源二聚体, 发挥转录调控作用 (Olsen et al., 2003), 这些同源或者异源二聚体可以与 TCP 转录因子相互作用以此发挥转录因子之间的活性组合调控 (Singh, 1998)。

本课题组前期通过对苹果果肉转录组测序分析, 发现 1 个在红肉组织中下调明显的转录因子 NAC9 (Wang et al., 2018) 基因, 暂将其命名为 *MdNAC9*。根据前人的报道, NAC 转录因子参与类黄酮代谢途径。陈学森等 (2014) 探讨了红肉苹果与栽培苹果品种杂种分离群体类黄酮含量等性状遗传变异特点, 得到杂交分离群体的回交一代 (轮回亲本为红肉苹果)。本研究中以红肉苹果回交后代成熟果实为试材, 进行 *MdNAC9* 的克隆与分析, 并测定黄酮醇组分含量及相关基因的表达量, 旨在为下一步鉴定 *MdNAC9* 与黄酮醇代谢机理的关系奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 植物材料与菌株

试验于 2017—2018 年在山东农业大学作物生物学国家重点实验室及山东省聊城市冠县果树育种基地进行。8 月底从 ‘嘎拉’ × ‘紫红 1 号’ 的回交群体中选取 3 个优株 (图 1), 分 3 次采样, 每次每株采摘 10 个果实, 每个优株共采 30 个果实。果肉用液氮迅速冷冻, 分装成 3 份作为重复, 于 -80 °C 保存备用。

用于遗传转化的 ‘王林’ 苹果愈伤组织以 14 d 为周期继代到含有 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 和 1 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D 的 MS 培养基上, 24 °C 黑暗培养。

总 RNA 提取试剂盒购自康为世纪公司; phusion 高保真 DNA 扩增酶、零背景快速克隆试剂盒、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞购自天根生化科技北京有限公司; 反转录试剂盒、SYBR

染料、琼脂糖凝胶回收试剂盒、*E. coli* BL21 (DE3) 购自全式金公司。



图1 苹果‘嘎拉’×‘紫红1号’的3个后代株系的成熟果实

Fig. 1 Cross section diagram of mature fruit of three progenies of apple ‘Gala’ × ‘Zihong 1’

## 1.2 UPLC 测定苹果 3 个优株果实黄酮醇组分

取约 0.3 g 果肉组织在液氮中研磨成粉末, 加入 2 mL 甲醇, 然后在 4 °C 下黑暗中放置 6 h。混合液在转速 6 000 r · min<sup>-1</sup>、4 °C 条件下离心 30 min。上清液经 0.45 μm 微孔膜过滤后, 用 Waters Acquity UPLC (英国曼彻斯特, Waters) 进行分析。流动相为乙腈 (溶剂 A) 和 1% 甲烷酸 (溶剂 B), 流速为 0.3 mL · min<sup>-1</sup>。采用 C18 液相色谱柱进行分离。B 相的线性梯度: 0 ~ 0.1 min, 95%; 0.1 ~ 8 min, 95% ~ 85%; 8 ~ 12 min, 85% ~ 79%; 12 ~ 15 min, 79% ~ 40%; 15 ~ 17 min, 40% ~ 10%; 17 ~ 17.1 min, 10% ~ 95%; 17.1 ~ 20 min, 95%。于紫外—可见光检测器波长为 350 nm 处检测黄酮醇。参照 Wang 等 (2017) 的试验方法稍加改动, 采用金丝桃苷、异槲皮苷、根皮苷、番石榴苷 (Sigma, St.Louis, mo, USA) 作为标准品。

## 1.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析相关基因表达量

实时荧光定量使用伯乐 CFX96 定量仪器, 总反应体系依照 SYBR Green PCR Master Mix 说明书, 包括 10.0 μL 2.5 × Real Master Mix/20 × SYBR Solution, 7 μL ddH<sub>2</sub>O, 1 μL 模板 cDNA (50 ng · μL<sup>-1</sup>), 上、下游引物各 1 μL (5 μmol · L<sup>-1</sup>), 共计 20 μL。运行条件: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 15 s; 58 °C 退火 15 s; 72 °C 延伸 10 s, 此过程 45 个循环。每个样品设置 3 个平行。以苹果 *MdActin* 作为内参。*MdNAC9* 相对表达量利用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法 (Livak & Schmittgen, 2001) 进行计算分析。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>MdNAC9</i>	F: CGAATGTGATCCTACTACCT R: CTGAAGAAGAACCCTCT
<i>MdFLS</i>	F: AACCACTGTGAACAAGGATA R: CATAGTCGIACCTCTT
<i>MdLAR</i>	F: CACCGTCAAGTCCTTCAA R: ACCTCTTAACTGTACCAACTG
<i>MdANR</i>	F: CCTGACAACCACAAGAAG R: GATCACAGCCTGCTATTG
<i>MdActin</i>	F: TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT R: TACTCAGCTTGGCAATCCACATC

## 1.4 *MdNAC9* 克隆及‘王林’苹果愈伤组织的转化

利用带有 *Sal* I、*Bam*H I 酶切位点的引物, 以红肉苹果 cDNA 为模板, phusion 高保真酶扩增

*MdNAC9* (登录号: LOC103410856) 的编码框序列 (去掉终止密码子)。经琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带, 根据零背景操作说明进行载体 (VT205) 的连接, 测序比对。分别对 PCR 产物和表达载体 pRI101 进行双酶切, 以此构建重组表达载体 pRI101-*MdNAC9*。将重组质粒转化进农杆菌感受态细胞 (LBA4404), 用含有  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  利福平和  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  卡那霉素的 YEP 液体培养基 30 mL 培养转化的农杆菌重组质粒, 待  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  达到 0.6 时,  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心, 加入 30 mL  $\text{ddH}_2\text{O}$ , 悬浮菌体。

将 ‘王林’ 苹果愈伤组织浸没到含有  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰丁香酮的农杆菌重组质粒侵染液中, 于室温振荡反应 30 min。将愈伤组织平铺于含有  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 的 MS 培养基上黑暗处放置 2 d, 后转移至添加有  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  卡那霉素和  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  羧苄青霉素的 MS 固体培养基上。

### 1.5 *MdNAC9* 亚细胞定位

将预培养过的洋葱内表皮浸没到含有  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰丁香酮的侵染液中, 于室温振荡反应 30 min。将洋葱内表皮平铺于 MS 培养基上黑暗处放置 1 ~ 2 d。采用共聚焦显微镜观察。

将 2 g 转基因 ‘王林’ 苹果愈伤组织溶于 10 mL 细胞酶解液中, 避光抽真空 30 min, 放于室温黑暗环境中 12 h, 轻轻摇动释放原生质体, 加入等体积 W5 Solution ( $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MES 1.333 mL;  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl 1 mL;  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 6.16 mL;  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  25 mL), 尼龙布 ( $75 \mu\text{m}$  孔径) 过滤原生质体。得到的滤液经  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清液, 用 10 mL W5 Solution 溶解沉淀, 置于冰上 30 min, 等其自然沉淀后, 加入 2 mL MMg Solution ( $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇 100 mL;  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  3 mL;  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MES 2.667 mL) 溶解, 放于冰上备用。

### 1.6 *MdNAC9* 酵母单杂交试验

根据 *MdNAC9* 的编码序列设计一对引物 5'-ATGAGCAGCAGCAGCAGC-3'、5'-TTAATTAAGCAATACTTACTAGAGATCAGAGT-3'。在引物两端正向和反向分别引入 *Nde* I、*Bam*H I 酶切位点, 对其编码框进行 PCR 扩增。对扩增产物和 pGADT7 分别进行双酶切, 以此构建 pGADT7-*MdNAC9* 重组载体。将重组载体分别与实验室已经构建的重组质粒 pHIS-FLS、pHIS-LAR、pHIS-ANR 共同转化到酵母 Y187 感受态细胞中, 空 pGADT7 作为阴性对照。筛选出具有抑制 pHIS2 载体自身生长的 3-AT (3-氨基-1,2,4 三唑) 浓度, 分别在含有 3-AT ( $100$ 、 $120$  和  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 SD/-His-Leu-Trp (缺乏组氨酸、亮氨酸、色氨酸) 选择性培养基上培养, 把获得的阳性克隆转移到含有 X- $\alpha$ -gal 显色剂和 3-AT 的 SD/-His-Leu-Trp 平板上检测。

### 1.7 *MdNAC9* 荧光素酶报告试验

将 *MdNAC9* 完整的 CDS 序列连接到 pHBT-AvrRpm 1 载体上, 作为效应子, 克隆的 *MdFLS* 启动子 PCR 产物插入 pFRK1-LUC-nos 载体上, 作为报告因子。将  $1 \mu\text{L}$  UBQ-GUS 内参、 $3 \mu\text{L}$  pFRK1-LUC-nos 重组报告因子、 $6 \mu\text{L}$  重组效应子共同转化进预先分离的 ‘王林’ 愈伤组织的原生质体中, 在 40% 聚乙二醇环境中, 对原生质体进行瞬时转化。在  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  下反应 6 h 后, 用多模平板阅读器测试 LUC 和 GUS 的活性 (Victor X4, PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com/>)。利用 LUC 与 GUS 活性的比值来计算启动子活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 3 个株系间黄酮醇组分与 *MdNAC9* 表达量的分析

UPLC 测定 3 个苹果株系 B8、B32 和 A19 果实的黄酮醇组分, A19 株系各组分含量和总量较多; 而 B8 株系含量最低 (图 2, 表 2)。

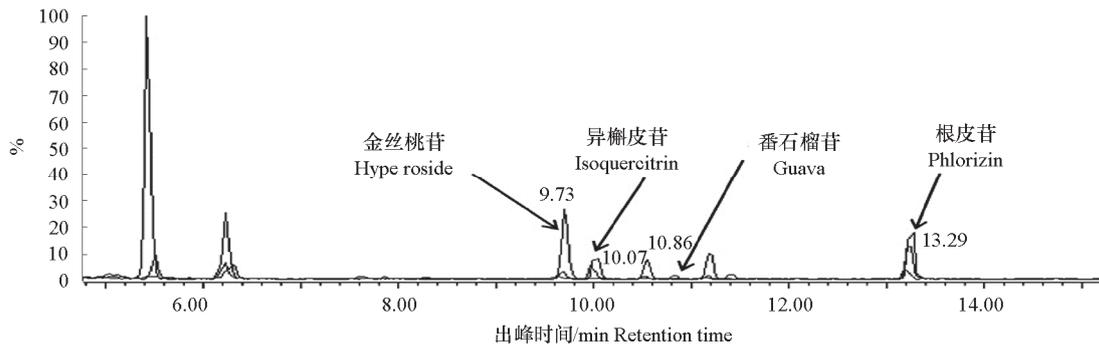


图 2 苹果黄酮醇组分 UPLC 液相图

Fig. 2 UPLC liquid chromatogram of flavonol components of apple

表 2 苹果 3 个株系黄酮醇组分含量

Table 2 Content of flavonols in three strains of apple

株系 Strain	金丝桃苷 Hyperoside	异槲皮苷 Isoquercitrin	根皮苷 Phlorizin	番石榴苷 Guava	总含量 Total content
B8	6.71 ± 1.62 b	1.80 ± 0.57 b	9.65 ± 2.82 b	0.35 ± 0.30 b	18.51 ± 3.30 c
B32	10.45 ± 4.16 b	3.24 ± 0.96 b	29.72 ± 2.44 a	0.63 ± 0.59 b	44.04 ± 3.28 b
A19	61.87 ± 5.59 a	21.00 ± 4.46 a	33.38 ± 8.54 a	1.58 ± 0.24 a	117.82 ± 8.12 a

注: 同列中不同小写字母表示 UPLC 测定结果下黄酮醇组分含量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences in flavonol content under UPLC measurements ( $P < 0.05$ ).

在黄酮醇含量较高的 A19 株系中 *MdNAC9* 与 *MdFLS* 均有较高的表达量 (图 3), 而在黄酮醇含

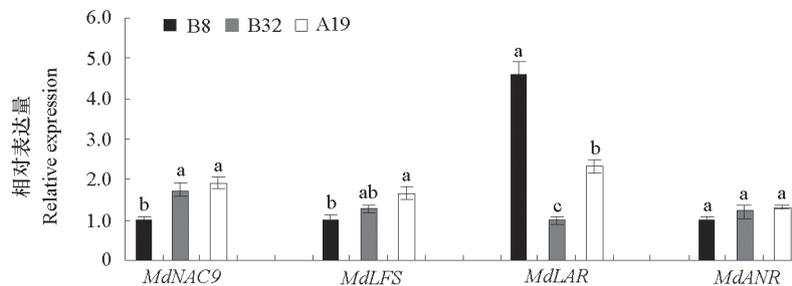


图 3 3 个苹果株系果实成熟期相关转录因子基因和黄酮醇合成结构基因表达量

同一基因不同小写字母表示差异显著  $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Expression of transcription factors and flavonol synthetic structural genes in 3 apple strains during fruit maturity

Different lowercase letters of the same gene indicate significant difference at  $P < 0.05$  level.

量较低的 B8 株系中其表达量相对较低, *MdLAR* 在 B8 株系中表达量较高, 这说明 *MdNAC9*、*MdFLS* 表达趋势与株系中含有的黄酮醇总量趋势一致, 而 *MdLAR* 与之不一致。*MdANR* 的表达在 3 个株系中差异不显著。

## 2.2 ‘王林’苹果愈伤组织过表达 *MdNAC9* 对黄酮醇合成的影响

如表 3 所示, 对比 ‘王林’愈伤组织 (WT) 和过表达 *MdNAC9* 的愈伤组织 (OE) 中 *MdFLS*、*MdLAR*、*MdANR* 的表达量, 过表达愈伤组织中 *MdNAC9* 的相对表达量是野生型的 18.91 倍, *MdFLS* 是 4.29 倍, 而 *MdLAR* 和 *MdANR* 与野生型没有显著差异。

表 3 ‘王林’苹果愈伤组织野生型 (WT) 和过表达 *MdNAC9* (OE) 基因表达量分析

Table 3 Analysis of gene expression of wild-type (WT) and over-expressed *MdNAC9* (OE) in ‘Orin’ apple callus

愈伤组织 Callus	<i>MdNAC9</i>	<i>MdFLS</i>	<i>MdLAR</i>	<i>MdANR</i>
WT	1.00 ± 0.17 b	1.00 ± 0.16 b	1.00 ± 0.14 a	3.06 ± 0.22 a
OE	18.91 ± 1.24 a	4.29 ± 0.27 a	1.21 ± 0.15 a	1.00 ± 0.13 a

注: 同一基因不同小写字母表示差异显著  $P < 0.05$ 。

Note: Different lowercase letters of the same gene indicate significant difference at  $P < 0.05$  level.

过表达 *MdNAC9* 的愈伤组织 (OE) 中, 黄酮醇含量显著高于野生型, 总量是野生型的 30 倍, 其中金丝桃苷和根皮苷分别是野生型的 19 倍和 34 倍 (表 4)。

表 4 ‘王林’苹果愈伤组织野生型 (WT) 和过表达 *MdNAC9* (OE) 黄酮醇含量分析

Table 4 Analysis of flavonol content in wild-type (WT) and over-expressed *MdNAC9* (OE) in ‘Orin’ apple callus  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

愈伤组织 Callus	金丝桃苷 Hyperoside	异槲皮苷 Isoquercitrin	番石榴苷 Guava	根皮苷 Phlorizin	总含量 Total content
WT	0.02 ± 0.25 b	0	0	0.06 ± 0.24 b	0.08 ± 0.23 b
OE	0.39 ± 0.40 a	0.10 ± 0.47	0.03 ± 0.49	2.06 ± 0.07 a	2.58 ± 0.16 a

注: 同列中不同小写字母表示两种愈伤组织黄酮醇含量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicated that the flavonol content of the two callus was significantly difference at  $P < 0.05$ .

## 2.3 *MdNAC9* 结合特异性和转录活性分析

利用酵母单杂交试验, 验证 *MdNAC9* 编码的蛋白和 *MdFLS*、*MdLAR*、*MdANR* 在酵母体内是否具有结合特异性和转录激活活性。把 pGADT7-*MdNAC9* 重组质粒分别和重组质粒 pHIS-*FLS*、pHIS-*LAR*、pHIS-*ANR* 共转酵母菌株 Y187, 将选择培养基上获得的转化子转移到含有 X- $\alpha$ -gal 显色剂平板上培养, 观察酵母的生长状况。

结果 (图 4) 显示, pGADT7-*MdNAC9* 分别与 pHIS-*FLS*、pHIS-*LAR* 共同转化酵母时, 可以观察到酵母在含有显色剂的培养基上形成明显的蓝色菌斑; pGADT7-*MdNAC9* 和 pHIS-*ANR* 共转化时, 能够观察到酵母生长,

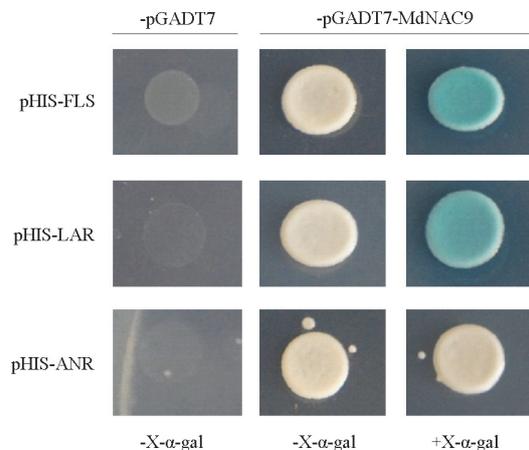


图 4 *MdNAC9* 酵母单杂交

Fig. 4 Yeast one-hybrid in *MdNAC9*

却未形成蓝色菌斑; 而空载体 pGADT7 分别与 pHIS-FLS、pHIS-LAR、pHIS-ANR 共同转化酵母时, 在 SD/-His-Leu-Trp 选择性培养基上不能形成转化子。

为了探究 *MdNAC9* 对 *MdFLS* 的影响, 构建 35S:*MdNAC9* 和 pro*MdFLS*:LUC 两种重组质粒, 两种质粒共转化 ‘王林’ 苹果愈伤组织的原生质体, 利用酶标仪测定 LUC 和 GUS 酶活, 发现在加有 *MdNAC9* 重组质粒的一组相较于对照对 pro*MdFLS* 的活性有明显促进作用, 结果 (图 5) 表明 *MdNAC9* 对 *MdFLS* 基因的启动子有激活作用。

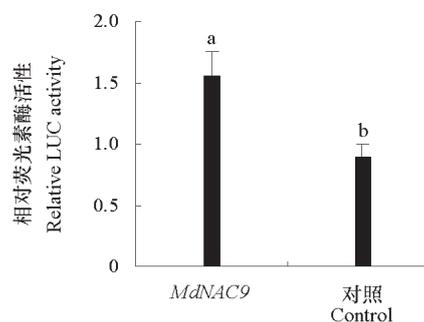


图 5 *MdNAC9* 相对荧光素酶活性分析

Fig. 5 Analysis of relative luciferase activity of *MdNAC9*

## 2.4 *MdNAC9* 的亚细胞定位

由图 6, A 可以看出, 空 GFP 对照组在整个洋葱细胞中均能观察到绿色荧光; *MdNAC9*-GFP 融合表达载体只能在细胞核中观察到绿色荧光, 其定位于细胞核中。

分离 ‘王林’ 苹果愈伤组织的原生质体, 对 *MdNAC9* 进行亚细胞定位分析, 由图 6, B 可见, 空 GFP 在整个原生质体均能观察到绿色荧光; *MdNAC9*-GFP 只能在细胞核中观察到荧光, 这与上述利用洋葱亚细胞定位结果一致。

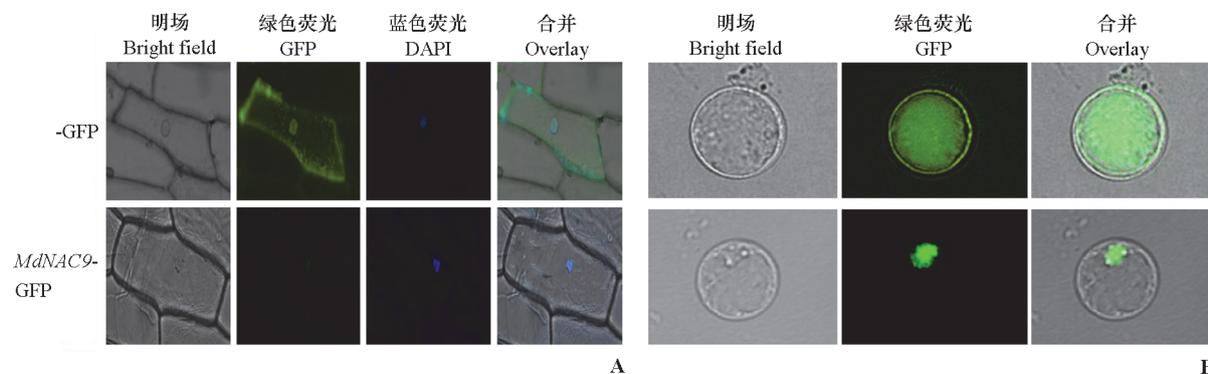


图 6 *MdNAC9* 在洋葱细胞 (A) 和苹果原生质体 (B) 中的亚细胞定位

Fig. 6 Sub-cellular localization of *MdNAC9* in onion cells (A) and apple protoplasts (B)

## 3 讨论

黄酮化合物是具有 C6-C3-C6 基本骨架、大部分与糖类物质结合为苷的一类化合物, 它们在自然界广泛存在, 主要分布于蔬菜、水果和药用植物中, 可分为总黄酮、异黄酮、黄酮醇和花青素 (周明等, 2016)。在植物中, 黄酮醇的合成代谢需要一系列结构基因和众多的转录因子共同调控 (朱婷婷等, 2016)。本研究中分离鉴定了 1 个 NAC 类转录因子基因 *MdNAC9*, 根据洋葱中的异位表达和在苹果原生质体中的定位分析, 该转录因子定位于细胞核。通过酵母单杂交和荧光素酶报告试验, 发现 *MdNAC9* 直接结合并激活 *MdFLS* 启动子来正向调控黄酮醇积累, 过表达 *MdNAC9* 的苹

果愈伤组织, 其黄酮醇含量显著高于对照。

### 3.1 黄酮醇含量与 *MdNAC9* 表达量分析

在黄酮醇含量较高的株系果实中, 转录因子基因 *MdNAC9* 和黄酮醇合成结构基因 *MdFLS* 的表达量均较高; 而在黄酮醇含量较低的果实中, 两者表达量也较低, 这说明 *MdNAC9* 与 *MdFLS* 有一致的表达趋势且与黄酮醇含量趋势相一致。通过以上试验分析, 推测 *MdNAC9* 可能参与黄酮醇代谢。因此, 通过农杆菌介导获得 *MdNAC9* 转基因愈伤组织, 对 *MdNAC9* 过表达的愈伤组织黄酮醇含量以及相关基因表达量分析, 结果 OE *NAC9* 愈伤组织相比于野生型 *MdFLS* 相对表达量显著提高, 并且过表达愈伤组织中黄酮醇含量是野生型的 30 倍。综上, *MdNAC9* 可能通过 *MdFLS* 参与黄酮醇代谢。

### 3.2 *MdNAC9* 对 *MdFLS* 的特异性结合

*FLS* 是苹果黄酮醇合成途径的关键结构基因 (Wang et al., 2017)。Wang 等 (2017) 研究发现 *MYB22* 与 *MdFLS* 启动子直接结合, 可激活黄酮醇代谢途径。拟南芥中, *AtMYB12* 最初被鉴定为黄酮醇特异性转录激活因子, 并且这一结论在烟草中的异位表达也被证实 (Luo et al., 2008)。葡萄中的瞬时转化试验表明 *VvMYBF1* 是黄酮醇合成酶 1 (*VvFLS1*) 的特异性激活剂, 并与黄酮醇合成相关基因的启动子有关 (Czemmel et al., 2009)。为进一步研究 *MdNAC9* 与 *MdFLS* 的调控关系, 本研究利用酵母单杂交, 共转化重组质粒 pGADT7-*MdNAC9* 和 pHis-*FLS* 的酵母转化子可以在含有 X- $\alpha$ -gal 的 SD/-His-Leu-Trp 选择性培养基上形成蓝色菌斑, 说明 *MdNAC9* 可以结合到 *MdFLS* 基因的启动子上。为了进一步探究 *MdNAC9* 对 *MdFLS* 基因启动子活性的影响, 利用荧光素酶报告证明 *MdNAC9* 对 *MdFLS* 的表达有激活作用。综上所述, *MdNAC9* 转录因子能够直接结合 *MdFLS* 基因的启动子, 并且促进 *MdFLS* 基因的表达, 从而促进黄酮醇的合成。

## References

- Amado N G, Fonseca B F, Cerqueira D M, Neto V M, Abreu J G. 2011. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sciences*, 89 (15 - 16): 545 - 554.
- Chen Xue-sen, Han Ming-yu, Su Gui-lin, Liu Feng-zhi, Guo Guo-nan, Jiang Yuan-mao, Mao Zhi-quan, Peng Fu-tian, Shu Huai-rui. 2010. Development trend of apple industry in the world and suggestions on high quality and high efficiency development of apple industry in China. *Journal of Fruit Science*, 27 (4): 598 - 604. (in Chinese)
- 陈学森, 韩明玉, 苏桂林, 刘凤之, 过国南, 姜远茂, 毛志泉, 彭福田, 束怀瑞. 2010. 当今世界苹果产业发展趋势及我国苹果产业质高效发展意见. *果树学报*, 27 (4): 598 - 604.
- Chen Xue-Sen, Zhang Jing, Liu Da-liang, Ji Xiao-hao, Zhang Zong-ying, Zhang Rui, Mao Zhi-quan, Zhang Yan-min, Wang Li-xiao, Li Min. 2014. Genetic variation of hybrid generation of Xinjiang red meat apple and evaluation of functional apple excellent plant. *Scientia Agricultura Sinica*, 47 (11): 2193 - 2204. (in Chinese)
- 陈学森, 张晶, 刘大亮, 冀晓昊, 张宗营, 张芮, 毛志泉, 张艳敏, 王立霞, 李敏. 2014. 新疆红肉苹果杂种一代的遗传变异及功能型苹果优株评价. *中国农业科学*, 47 (11): 2193 - 2204.
- Crifò T, Petrone G, Lo L C, Lo A P. 2012. Short cold storage enhances the anthocyanin contents and level of transcripts related to their biosynthesis in blood oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (1): 476 - 481.
- Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris N N, Walker A R, Robinson S P, Bogs J. 2009. The grapevine R2R3-MYB transcription factor *VvMYBF1* regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 151 (3): 1513 - 1530.
- de Souza dos Santos M C, Gonçalves C F L, Vaisman M, Ferreira A C F, de Carvalho D P. 2011. Impact of flavonoids on thyroid function. *Food & Chemical Toxicology*, 49 (10): 2495 - 2502.
- Liu L B, Xiong L J, An Y Y, Zheng J, Wang L J. 2016. Flavonols induced by 5-aminolevulinic acid are involved in regulation of stomatal opening in apple leaves. *Horticultural Plant Journal*, 2 (6): 323 - 330.

- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Luo J, Butelli E, Hill L, Parr A, Niggeweg R, Bailey P, Weisshaar B, Martin C. 2008. AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol. *The Plant Journal*, 56 (2): 316 - 326.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. 2005. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 138 (2): 1083 - 1096.
- Nie Ji-yue, Lü De-guo, Li Jing, Liu Feng-zhi, Li Ping. 2009. Research progress on flavonoids in apple fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (9): 1390 - 1397. (in Chinese)  
聂继云, 吕德国, 李静, 刘凤之, 李萍. 2009. 苹果果实中类黄酮化合物的研究进展. *园艺学报*, 36 (9): 1390 - 1397.
- Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, Johansson E, Larsen S, Skriver K. 2003. Preliminary crystallographic analysis of the NAC domain of ANAC, a member of the plant-specific NAC transcription factor family. *Acta Crystallographica*, 60 (1): 112 - 115.
- Shan W, Kuang J F, Chen L, Xie H, Peng H H, Xiao Y Y, Li X P, Chen W X, He Q G, Chen J Y, Lu W J. 2012. Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 63 (14): 5171 - 5187.
- Singh K B. 1998. Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiology*, 118 (4): 1111 - 1120.
- Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, Weisshaar B. 2007. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal*, 50 (4): 660 - 677.
- Tran L S P, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson S D, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Shinozaki K Y. 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a droughtresponsive *cis*-element in the EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1 promoter. *Plant Cell*, 16: 2481 - 2498.
- Vroemen C W, Mordhorst A P, Albrecht C, Kwaaitaal M A, Vries S C. 2003. The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15 (7): 1563 - 1577.
- Wang N, Liu W J, Zhang T L, Jiang S H, Xu H F, Wang Y C, Zhang Z Z, Wang C Z, Chen X S. 2018. Transcriptomic analysis of red-fleshed apples reveals the novel role of *MdWRKY11* in flavonoid and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (27): 7076 - 7086.
- Wang N, Xu H F, Jiang S H, Zhang Z Y, Lu N L, Qiu H R, Qu C Z, Wang Y C, Wu S J, Chen X S. 2017. MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 90 (2): 276 - 292.
- Wang Y R, Lu Y F, Hao S X, Zhang M L, Zhang J, Tian J, Yao Y C. 2015. Different coloration patterns between the red- and white-fleshed fruits of *Malus crabapples*. *Scientia Horticulturae*, 194: 26 - 33.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Namhai C. 2000. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development*, 14 (23): 3024 - 3036.
- Yang L J, Lu D, Guo J J, Meng X L, Zhang G L, Wang F. 2013. Icarin from *Epimedium brevicornum* Maxim promotes the biosynthesis of estrogen by aromatase (CYP19). *Journal of Ethnopharmacology*, 145 (3): 715 - 721.
- Zhou H, Wang K L, Wang H L, Gu C, Dare A P, Espley R V, He H P, Allan A C, Han Y P. 2015. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *Plant Journal*, 82 (1): 105 - 121.
- Zhou Hui. 2015. Study on the regulation mechanism of peach anthocyanin coloring and proanthocyanidin synthesis [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: The Wuhan Botanical Garden of the Chinese Academy of Sciences. (in Chinese)  
周晖. 2015. 桃花青苷着色及原花青素合成的调控机制研究 [博士学位论文]. 武汉: 中国科学院武汉植物园.
- Zhou Ming, Shen Yong-Gen, Zhu Li-qin, Ai Xiao-wei, Zeng Jing, Yang Hong-ye. 2016. Advances in biosynthesis, accumulation and regulation of plant flavonoids. *Food Research and Development*, 37 (18): 216 - 221. (in Chinese)  
周明, 沈勇根, 朱丽琴, 艾啸威, 曾璟, 杨洪烨. 2016. 植物黄酮化合物生物合成、积累及调控的研究进展. *食品研究与开发*, 37 (18): 216 - 221.
- Zhu Ting-ting, Liang Dong, Xia Hui. 2016. Progress in the regulation of anthocyanin synthesis by R2R3-MYB. *Genomics and Applied Biology*, 35 (4): 985 - 991. (in Chinese)  
朱婷婷, 梁东, 夏惠. 2016. R2R3-MYB 调控果实花色苷合成的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 35 (4): 985 - 991.