

王海静,李晓颖,殷亚蕊,等.京红桃及其晚熟芽变晚京红果实差异表达转录因子的转录组分析[J].江苏农业科学,2022,50(22):1-10.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.22.001

# 京红桃及其晚熟芽变晚京红果实差异表达 转录因子的转录组分析

王海静,李晓颖,殷亚蕊,宋立琴,张立彬,武军凯

(河北科技师范学院园艺科技学院/河北省特色园艺种质挖掘与创新利用重点实验室,河北秦皇岛 066004)

**摘要:**为探究调控桃果实发育成熟的分子机制,以京红及其晚熟芽变晚京红为试验材料,基于转录组测序(RNA-seq)数据分析二者果实转录组中差异表达的转录因子基因,并分析其在果实发育成熟过程中的表达模式。结果表明,共鉴定出 302 个转录因子基因,其中 158 个差异表达,分属于 B3、MYB-related、NAC、WRKY、bHLH、MYB 和 HB-other 等转录因子家族。对京红和晚京红相同花后时间差异表达转录因子进行分析,发现一系列转录因子以不同的表达模式参与了桃果实发育成熟调控过程,进一步筛选到 17 个转录因子表达模式存在较大差异,表明与晚京红成熟期延长调控密切相关。试验结果为深入研究特定转录因子在桃果实成熟过程中的功能奠定了基础。

**关键词:**桃;晚熟芽变;转录组;转录因子;表达分析

**中图分类号:**S662.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)22-0001-10

桃(*Prunus persica*)是重要的核果类果树之一,对于其果实成熟期的研究也备受关注。果实的成熟是一个涉及多层次、多个代谢通路的复杂过程,是大量基因协同表达和调控的结果<sup>[1]</sup>。而转录因子作为调控因子在基因表达调控过程中发挥着重要作用,它们与靶基因上游的特定 DNA 元件相结合,激活或抑制靶基因的转录活性,从而调控靶基因的时空特异性表达<sup>[2-3]</sup>。多种转录因子(transcription factors, TFs)共同参与调控了果实成熟的复杂过程,包括参与植物激素合成及信号转导途径的 AP2/ERF 和 EIN3/EILs,以及 NAC、MYC、MYB、WRKY、bHLH、HSF、MADS-box、bZIP 等转录因子家族成员<sup>[4-12]</sup>。在桃果实发育过程中,许多转录因子编码基因也以特定的方式调控相应靶基因的表达。比如,bZIP 家族的一个转录因子基因在桃果实成熟初期有特异性高表达,在番茄中过表达该基因表现为果实成熟阶段的延长,表明该 bZIP 转录

因子参与了桃果实的成熟进程<sup>[4]</sup>。而 HD-ZIP homeobox 基因(*PpHB. G7*)可以通过与乙烯生物合成基因 *PpACS1* 和 *PpACO1* 的启动子区域互作而影响桃果实成熟过程<sup>[5]</sup>。NAC 转录因子对果实成熟同样至关重要,其主要通过结合启动子 NACRS(NAC recognition sequence)或 NACBS(NAC binding sequence)等元件,以实现对其靶基因的转录调控进而影响多种果树果实的成熟过程。如果 NAC 基因外显子中有碱基片段插入则可能导致桃果实早熟<sup>[6-8]</sup>。MADS-box 转录因子家族成员也参与了桃果实的成熟、软化和衰老进程<sup>[9-10]</sup>。乙烯转录因子(ethylene response factor, ERF)参与调控果树果实成熟过程也是近期研究热点之一。*PpeERF2* 通过与启动子结合进而抑制 2 个脱落酸(ABA)生物合成基因(*PpeNCED2* 和 *PpeNCED3*)和一个细胞壁降解基因(*PpePG1*)的表达以调控桃果实成熟<sup>[11]</sup>。而与番茄成熟相关 ERF 同源的桃 *PpERF. E2* 基因在整个果实发育过程中高表达,该因子能够激活 *PpACS1* 和 *PpACO1*,进而调控乙烯的生物合成。不同的 ERFs 可作为转录激活子或者转录抑制子与靶基因启动子作用,通过反馈调控乙烯合成相关基因的表达来影响乙烯生成,进而参与调控果实成熟<sup>[12]</sup>。

笔者所在课题组在前期研究中发现了京红的晚熟芽变晚京红,成熟期比京红晚 19 d。本试验以京红(W)和晚京红(M)为材料研究桃果实成熟期

收稿日期:2021-12-30

基金项目:河北省高层次人才资助项目(编号:A201901058);河北省重点研发计划(编号:16226313D)。

作者简介:王海静(1982—),女,河北乐亭人,硕士,实验师,主要从事桃种质资源与分子生物学研究工作。E-mail: chinahjwang@126.com。

通信作者:武军凯,博士,副教授,主要从事果树遗传育种、果树种质资源与分子生物学研究。E-mail: mans5@163.com。

调控的分子机制,通过分析 2 种果实发育及成熟阶段的差异表达转录因子及其表达模式,挖掘桃果实成熟过程中发挥重要作用的转录因子家族。该试验结果有助于提高对参与桃果实成熟调控的转录因子家族的认识,有利于更深入地理解桃果实成熟调控网络以及不同代谢通路之间的互作关系,以期为通过分子手段调控桃果实成熟期奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

供试桃品种京红及其晚熟芽变晚京红采自河北科技师范学院试验基地。在京红盛花(days after full bloom,简称 DAB)后 40、60、70 d 及其晚熟芽变晚京红盛花后 60、70、80 d 取果实进行转录组测序,对应样本名称分别为 W1、W2、W3 以及 M1、M2、M3。随机采收每个阶段果实,各重复 3 次,取样后分别将果皮与果肉切碎混匀,-80 ℃保存备用。

1.2 差异表达转录因子基因分析

基因表达量的计算采用 FPKM (fragments per kilobase per millionreads)方法。样本间差异表达基因的筛选及分析使用 DESeq2 软件,筛选阈值为 $|\log_2^{(\text{fold chang,FC})}| \geq 1$  并且校正  $P < 0.05$ 。同时,与桃基因组数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)进行 BLAST 比对,并结合 PlantTFDB 数据库(plant transcription factor database 3.0,<http://>

planttfdb.cbi.pku.edu.cn/)以筛选差异表达转录因子基因。设计以下 6 个比对方案 W1 vs W2、W1 vs W3、W2 vs W3 和 M1 vs M2、M1 vs M3、M2 vs M3 分别分析京红和晚京红在各自的发育及成熟过程中转录因子的表达情况,以及 2 个桃栽培种盛花后 60 d 比较组(W2 vs M1,60 DAB)和盛花后 70 d 比较组(W3 vs M2,70 DAB)用于分析京红和晚京红在相同的花后时间差异表达转录因子。

根据京红和晚京红果实转录组数据中各转录因子基因的 FPKM 值,分析差异表达转录因子的表达模式。 $\log_2^{(\text{FC})}$  值进行均一化后,对一些差异表达转录因子进行表达模式聚类分析。

1.3 实时荧光定量 PCR 验证

从 RNA-seq 数据中选取与果实成熟相关的 9 个具有不同表达模式的基因和转录因子,通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)进行验证。依据候选基因 ID 从数据库中检索得到对应的 cDNA 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件进行特异性引物设计,以 *TEF2* 为内参基因,引物序列见表 1,由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成。反应在伯乐 CF Connect 实时荧光定量 PCR 仪上运行,程序为 95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s,45 个循环。相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[13]</sup> 计算。每个样品各 3 次独立的生物学重复。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>ARF18</i>	TCTGCACATGGGATGCAAGT	GAGCCAAGAACCGAGAGGTC
<i>ERF034</i>	GTCAAGCTTCCCATGTCTCTCA	AGCCTGAATCCACTGTCTCAGC
<i>MYB75</i>	CAGGTGCTCATTGATTGCTGG	GCTTCGGGGTTGAGGCTTTAT
<i>MYB114</i>	ATCCACGGTCCAAAGAGGTG	TCCTAGGAGCCTATGAAGCC
<i>NAC29</i>	ACCTAACAGAGCCACCGTCT	AGCCCAAGTTGCTTGTTGG
<i>NAC25</i>	TAAGAGGAACTGATGGAGAGCAC	AGCTAGCTACAGATGATTC
<i>ABA4</i>	TTCCGTTCAACAGCTTGAGACA	GCCAGAACCATGAGGGGCATAA
<i>ETR2</i>	ATGTCAGCGAGTGAGCGATT	GGTGAGGGCCATAAGTCCAG
<i>COPI</i>	CTGGACGGACTGTGTCTCTCTC	ACCGCAGTTATGTCCTCCTTGA
<i>TEF2</i>	GGTGTGACGATGAAGAGTGATG	TGAAGGAGGGGAAGGTGAAAG

2 结果与分析

2.1 京红及晚京红果实转录因子统计分析

从转录组测序数据中共鉴定出 41 个转录因子家族的 302 个转录因子基因,转录因子家族中基因数目较多的有 B3 家族(34 个)、MYB-related(31

个)、NAC 家族(24 个)、HB-other 家族(19 个)、C3H 家族(18 个)、FAR1 家族(17 个)、MYB 家族(16 个)、bHLH 家族(15 个)、bZIP 家族(15 个)和 M-type MADS 家族(13 个),分别占鉴定转录因子基因总数的 11.26%、10.26%、7.95%、6.29%、5.96%、5.63%、5.30%、4.97%、4.97% 和 4.30%。

其中,差异表达的转录因子基因有 158 个,占鉴定总数的 52.3%,分属于 33 个转录因子家族,包括 B3 (17 个)、NAC(17 个)、MYB - related(15 个)、HB -

other(14 个)、bHLH(12 个)、MYB(11 个)、WRKY (10 个)、bZIP(7 个)和 C3H(7 个)等(图 1)。

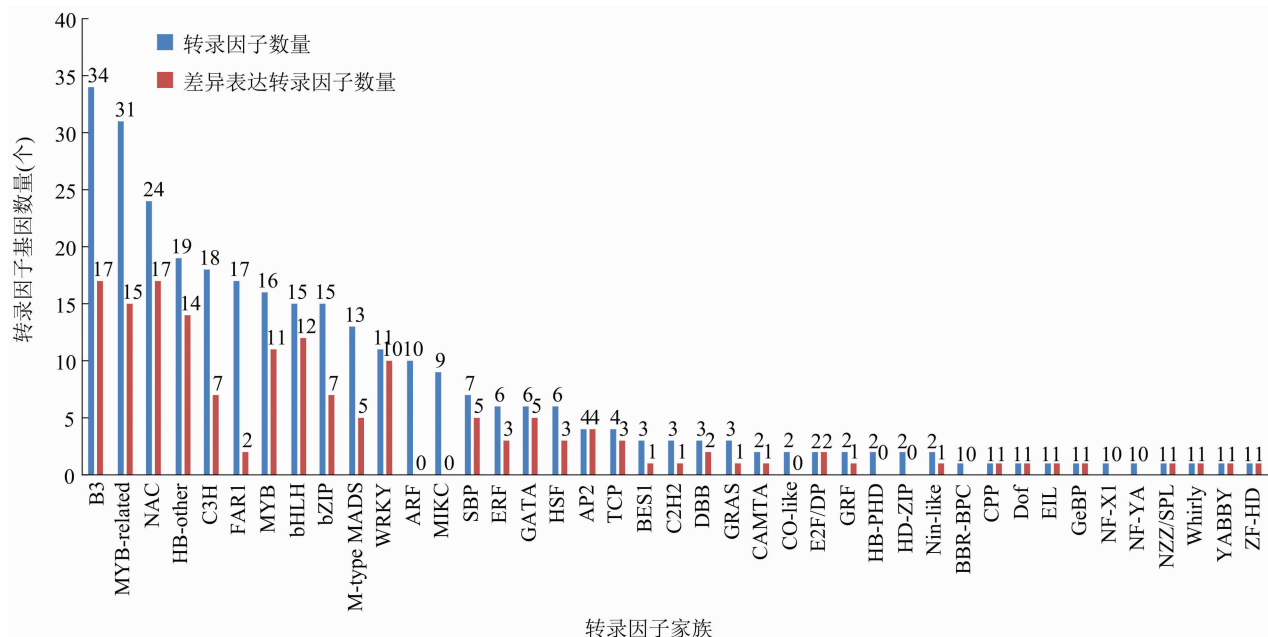


图1 鉴定得到及差异表达主要转录因子家族

## 2.2 京红和晚京红发育及成熟过程中差异表达转录因子分析

在京红发育成熟过程中,W1 vs W2 比较组中差异表达的转录因子基因 62 个(21 个 TFs 家族),上调表达 17 个,下调表达 45 个,基因数量较多的转录因子家族有 B3、MYB - related、NAC、WRKY、bHLH 和 MYB。W1 vs W3 比较组中,差异表达的转录因子基因 84 个(24 个 TFs 家族),上调表达 32 个,下调表达 52 个,基因数量较多的转录因子家族有 NAC、B3、MYB - related、bHLH、WRKY 和 MYB。在 W2 vs W3 比较组中,差异表达的转录因子基因 51 个(23 个 TFs 家族),其中上调表达 26 个,下调表达 25 个,基因数量较多的转录因子家族有 HB - other、MYB - related、MYB。对京红发育及成熟过程中 3 个阶段比较组的差异表达转录因子进行综合分析显示,大量差异表达转录因子集中在 B3、MYB - related、NAC、WRKY、bHLH、MYB 家族(表 2)。在晚京红发育成熟过程中,M1 vs M2 比较组中差异表达的转录因子基因 60 个(17 个 TFs 家族),其中上调表达 25 个,下调表达 35 个,在 M1 vs M3 比较组中,差异表达的转录因子基因 108 个(26 个 TFs 家族),上调表达 47 个,下调表达 61 个,在 M2 vs M3 比较组中,差异表达的转录因子基因 78 个(21 个

TFs 家族),上调表达 30 个,下调表达 48 个,对这 3 个发育及成熟阶段的差异表达转录因子进行综合分析发现,NAC、MYB - related、bHLH、HB - other、B3、MYB 等家族的转录因子较多参与到了晚京红发育及成熟的过程中(表 2)。

在京红 W1 vs W2、W1 vs W3 以及 W2 vs W3 比较组各有 10、17、5 个特异表达转录因子。而在晚京红中,M1 vs M2、M1 vs M3 以及 M2 vs M3 比较组分别有 6、23、9 个特异表达转录因子,晚京红 M1 vs M3 和 M2 vs M3 重叠部分包含 60 个转录因子,远高于京红中相应的数量。分析 2 个栽培种各自发育成熟阶段比较组的时期特异性表达转录因子,发现参与京红发育及成熟过程的 WRKY 家族基因数量高过晚京红中的数量。晚京红发育及成熟过程中 HB - other 家族转录因子数量较京红多(图 2,表 2)。

## 2.3 京红和晚京红 60 DAB 和 70 DAB 比较组共有和特异表达转录因子分析

为研究导致京红和晚京红果实发育成熟期差异的影响因素,对二者果实在 60 DAB 和 70 DAB 的差异表达转录因子进行分析,结果(表 3)表明,60 DAB 比较组中,京红和晚京红差异表达的转录因子基因 35 个(18 个 TFs 家族),27 个基因上调表达,

表 2 差异表达转录因子基因家族基本信息

个

转录因子 基因家族	家族 总数	京红			晚京红			京红 vs 晚京红	
		W1 vs W2	W1 vs W3	W2 vs W3	M1 vs M2	M1 vs M3	M2 vs M3	W2 vs M1	W3 vs M2
		总数 (上调/下调)	总数 (上调/下调)	总数 (上调/下调)	总数 (上调/下调)	总数 (上调/下调)	总数 (上调/下调)	总数 (上调/下调)	总数 (上调/下调)
AP2	4	3(0/3)	2(0/2)	3(1/2)	3(0/3)	3(0/3)	2(0/2)	2(2/0)	1(0/1)
ARF	10								
B3	34	8(2/6)	10(6/4)	3(3/0)	5(3/2)	12(4/8)	6(1/5)	4(3/1)	3(1/2)
BBR – BPC	1								
BES1	3						1(1/0)		
bHLH	15	5(1/4)	7(1/6)	2(0/2)	7(4/3)	7(1/6)	8(1/7)	3(3/0)	1(1/0)
bZIP	15	4(0/4)	4(1/3)	3(2/1)	2(1/1)	5(3/2)	2(2/0)	2(2/0)	2(1/1)
C2H2	3				1(1/0)	1(1/0)			
C3H	18		1(0/1)	2(1/1)	1(0/1)	4(2/2)	1(0/1)		1(1/0)
CAMTA	2	1(0/1)	1(0/1)						
CO – like	2								
CPP	1	1(1/0)	1(1/0)						
DBB	3		1(1/0)	2(1/1)		1(1/0)		1(1/0)	
Dof	1						1(0/1)		1(1/0)
E2F/DP	2	2(2/0)	1(1/0)		1(1/0)	1(1/0)		1(0/1)	
EIL	1					1(1/0)			
ERF	6	1(0/1)	1(1/0)	1(1/0)		2(0/2)	2(0/2)	1(1/0)	1(0/1)
FAR1	17	1(0/1)	1(0/1)	1(1/0)		1(0/1)			
GATA	6		2(0/2)	2(1/1)	1(0/1)	4(2/2)	3(2/1)		1(1/0)
GeBP	1						1(1/0)		
GRAS	3	1(0/1)		1(1/0)				1(1/0)	
GRF	2		1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)			
HB – other	19	2(0/2)	5(2/3)	6(4/2)	7(3/4)	9(4/5)	10(4/6)	2(2/0)	6(3/3)
HB – PHD	2								
HD – ZIP	2								
HSF	6	3(0/3)	3(0/3)	2(0/2)		3(3/0)	3(3/0)	1(0/1)	2(2/0)
M – type MADS	13	3(0/3)	2(0/2)	1(1/0)	2(0/2)	4(1/3)	4(1/3)	3(3/0)	1(1/0)
MIKC	9								
MYB	16	5(0/5)	6(3/3)	5(4/1)	5(4/1)	6(4/2)	6(1/5)	5(3/2)	3(3/0)
MYB – related	31	6(3/3)	8(4/4)	6(2/4)	9(4/5)	14(5/9)	7(3/4)	3(2/1)	3(3/0)
NAC	24	6(3/3)	11(4/7)	3(0/3)	11(4/7)	15(8/7)	12(6/6)	2(0/2)	1(1/0)
NF – X1	1								
NF – YA	1								
Nin – like	2					1(1/0)	1(1/0)		
NZZ/SPL	1	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(0/1)	1(1/0)	1(1/0)
SBP	7	1(0/1)	3(0/3)	1(0/1)	1(0/1)	4(0/4)	1(0/1)	1(1/0)	2(2/0)
TCP	4	1(0/1)	2(0/2)	1(0/1)		2(0/2)	2(0/2)	1(1/0)	1(1/0)
Whirly	1		1(1/0)	1(1/0)		1(1/0)			
WRKY	11	6(5/1)	7(6/1)	2(2/0)	2(0/2)	4(4/0)	3(3/0)	1(1/0)	
YABBY	1	1(0/1)	1(0/1)						1(1/0)
ZF – HD	1		1(0/1)	1(0/1)		1(0/1)	1(0/1)		1(1/0)
基因总数	302	62(17/45)	84(32/52)	51(26/25)	60(25/35)	108(47/61)	78(30/48)	35(27/8)	33(25/8)

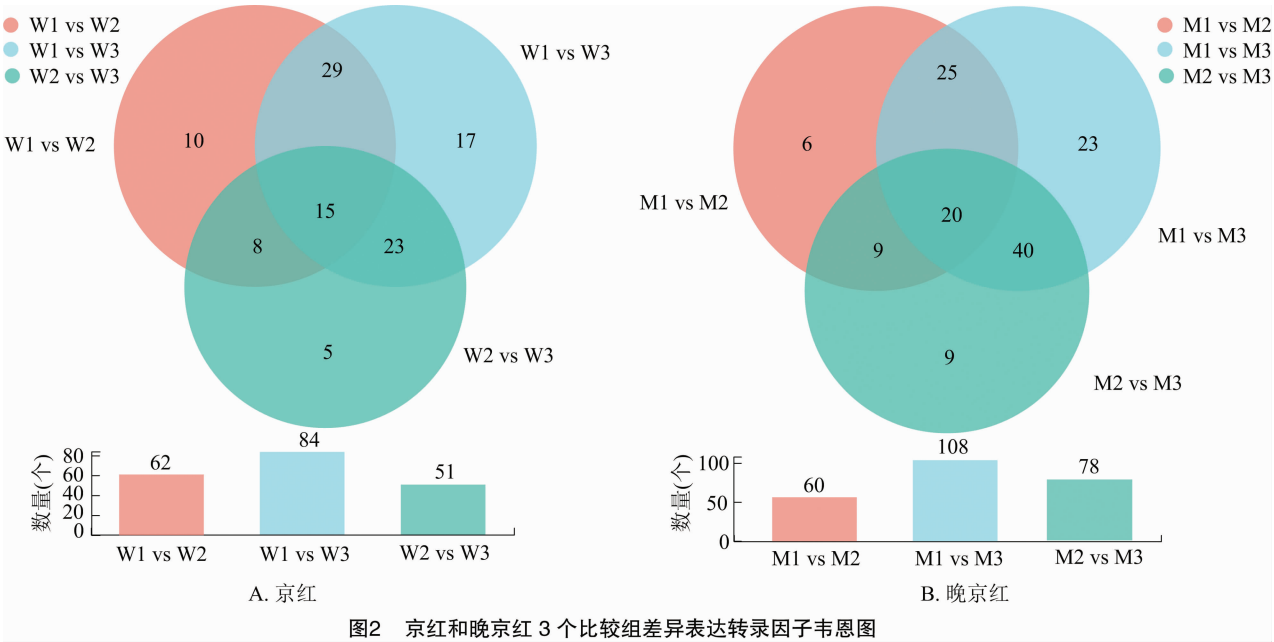


表 3 京红和晚京红 60 DAB 和 70 DAB 比较组差异表达转录因子基本信息

类别	转录因子家族	基因名称	基因描述	60 DAB	70 DAB
				log <sub>2</sub> (M1/W2)	log <sub>2</sub> (M2/W3)
60 DAB 和 70 DAB 共有差异 表达转录因子	bHLH	LOC18782264	转录因子 PIF4	2.14	1.91
	NZZ/SPL	LOC18781353	未知蛋白 LOC18781353	1.54	3.40
	MYB	LOC18777555	转录因子 MYB7	1.07	1.74
	MYB	LOC18773813	转录因子 MYB59	1.65	1.47
	bZIP	LOC18773097	光诱导蛋白 CPRF2	1.08	1.05
	B3	LOC18768867	生长素应答因子 ARF2	3.20	1.45
	M - type MADS	LOC18789032	Agamous - like MADS - box 蛋白 AGL11	2.03	1.05
	MYB - related	LOC18782484	蛋白 REVEILLE 1	1.09	1.25
	TCP	LOC18776591	转录因子 TCP5	1.39	2.65
	bZIP	LOC18780946	碱性亮氨酸拉链 34	1.56	-1.35
	B3	LOC18786825	生长素应答因子 ARF18	2.40	-1.05
	AP2	LOC18788684	AP2 - like 乙烯应答转录因子 ANT	1.01	-1.47
	MYB - related	LOC18772781	转录因子 RAX2	-2.60	1.53
	MYB	LOC18781909	MYB 相关蛋白 306	-1.08	1.42
	HSF	LOC18776384	热激转录因子 B - 2b	-1.03	2.34
60 DAB 特异表达转录因子	NAC	LOC18779876	NAC 结构域蛋白 73	-1.11	
	MYB	LOC18773068	转录因子 AS1	-1.13	
	NAC	LOC18770626	NAC 3	-1.29	
	E2F/DP	LOC18788614	转录因子 E2FC	-1.46	
	B3	LOC18788345	生长素应答因子 ARF19	-1.25	
	M - type MADS	LOC18783633	Agamous - like MADS - box 蛋白 AGL1	1.80	
	DBB	LOC18783553	锌指蛋白 CONSTANS - LIKE 9	1.04	
	B3	LOC18780702	B3 结构域蛋白 REM5	3.21	
	GRAS	LOC18780976	scarecrow - like 转录因子 PAT1	1.16	
	SBP	LOC18792130	squamosa 启动子结合蛋白 2	1.56	
	MYB	LOC18770134	转录因子 MYB6	4.09	

表 3(续)

类别	转录因子家族	基因名称	基因描述	60 DAB	70 DAB
				log <sub>2</sub> ( M1/W2)	log <sub>2</sub> ( M2/W3)
	WRKY	LOC18766660	可能的 WRKY 69	1.07	
	MYB – related	LOC18791957	MYB 转录因子 EFM	1.22	
	M – type	LOC18791711	花同源异型蛋白 DEFICIENS	1.54	
	HB – other	LOC18792762	BEL1 – like 同源结构域蛋白 11	1.35	
	HB – other	LOC18790228	同源异型域 – 亮氨酸拉链蛋白 ATHB – 6	1.51	
	bHLH	LOC18786993	转录因子 bHLH130	1.33	
	AP2	LOC18787732	乙烯应答转录因子 WR11	1.65	
	bHLH	LOC18786395	转录因子 bHLH13	1.15	
	ERF	LOC18791311	AP2 – like 乙烯应答转录因子 AIL5	1.04	
70 DAB 特异表达转录因子	ERF	LOC18772983	染色质修饰相关蛋白 ERF – 1		– 2.98
	B3	LOC18770820	—		– 1.12
	HB – other	LOC18769821	同源异型域 – 亮氨酸拉链蛋白 ATHB – 40		– 2.67
	HB – other	LOC18793312	同源异型域 – 亮氨酸拉链蛋白 HOX3		– 1.25
	HB – other	LOC18783218	同源异型域 – DDT 结构域蛋白 RLT3		– 1.05
	ZF – HD	LOC18782381	微型锌指蛋白 2		1.63
	YABBY	LOC18777454	蛋白 YABBY 4		1.20
	C3H	LOC18770387	CCCH 型锌指蛋白 37		1.13
	SBP	LOC18792702	squamosa 启动子结合蛋白 13A		1.00
	HB – other	LOC18768996	同源异型域蛋白 HAT3. 1		1.53
	HSF	LOC18767504	热激转录因子 A – 7a, 转录变体 X10		1.11
	GATA	LOC18766489	未知蛋白 LOC18766489		1.02
	SBP	LOC18790408	squamosa 启动子结合蛋白 6		1.09
	Dof	LOC109946797	Dof 锌指蛋白 DOF3. 4		1.47
	HB – other	LOC18789844	蛋白 OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3		1.07
	MYB – related	LOC18785550	LHY 蛋白, 转录变体 X1		2.59
	NAC	LOC18787477	NAC 结构域蛋白 60		1.13
	HB – other	LOC18781879	同源异型域 – 亮氨酸拉链蛋白 ROC8		1.57

8 个基因下调表达,主要包括了 MYB、B3、bHLH、M – type MADS 及 MYB – related 等转录因子家族基因,差异最大的转录因子是 MYB6 (LOC18770134), 下调最显著的是 MYB – related 家族 RAX2 基因 (LOC18772781) (表 3)。70 DAB 比较组中,差异表达的转录因子基因 33 个(20 个 TFs 家族),包括 25 个上调和 8 个下调,分属于 HB – other、B3、MYB 及 MYB – related 等转录因子家族。上调最显著的的是一个未知转录因子基因 (LOC18781353), 下调最显著的转录因子是 ERF 家族 EAF – 1 (LOC18772983)。在京红和晚京红 60 DAB 和 70 DAB 比较组有 15 个共同差异表达转录因子。转录因子呈现出不同的调节模式,既表现为同一转录因子在 2 个比较组中均上调表达,或在一个比较组上调表达而在另一个比较组下调表达,也表现为同一转录因子家族不同

成员在同一比较组内或不同比较组间呈现出不同的上调或下调表达 (表 3、图 3)。

在京红和晚京红果实发育成熟 60 DAB 比较组中,20 个特异表达转录因子基因中有 15 个上调表达,分属于 M – type MADS、DBB、B3、GRAS、SBP、MYB、WRKY、MYB – related、M – type、HB – other、bHLH、AP2 和 ERF 家族,5 个下调表达转录因子家族包括 NAC、MYB、E2F/DP 和 B3 家族。MYB6 (LOC18770134) 上调表达差异最显著,E2F/DP 家族 E2FC 转录因子 (LOC18788614) 下调表达差异最显著。而在京红和晚京红果实发育成熟 70 DAB 比较组中,18 个特异表达转录因子基因中有 5 个下调表达,包括 ERF、B3 和 HB – other 家族成员,13 个上调表达基因分属于 ZF – HD、YABBY、C3H、SBP、HB – other、HSF、GATA、SBP、Dof、MYB – related 和

NAC 家族。MYB - related 家族 LHY (LOC18785550) 和 ERF 家族 EAF - 1 (LOC18772983) 分别为上调和下调表达差异最显著基因(表 3)。

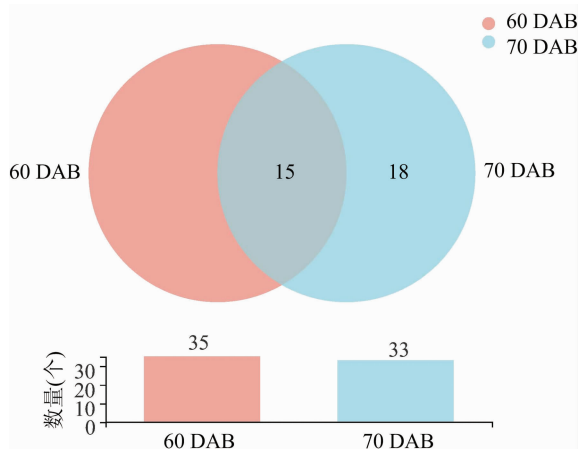


图3 京红和晚京红 60 DAB 和 70 DAB 比较组差异表达转录因子韦恩图

## 2.4 差异表达转录因子聚类分析

为分析京红和晚京红差异表达转录因子基因在整个发育成熟阶段的表达模式,对 60 DAB、70 DAB 比较组差异表达转录因子基因进行了聚类分析。表达模式主要分为 2 种类型,第 1 种类型转录因子基因表达水平随发育进程下调表达,而其中的 LOC18777555 (MYB7), LOC18782264 (PIF4), LOC18770134 (MYB6), LOC18776591 (TCP5), LOC18777454 (YABBY 4), LOC18768867 (ARF2) 和 LOC18766660 (WRKY69) 等在京红果实发育成熟过程的 W1 期有较高水平表达,而在晚京红整个发育成熟阶段表达量均不高(图 4)。第 2 种类型转录因子基因表达水平随发育进程上调表达,其中的 LOC18779876 (NAC73), LOC18791957 (MYB - related EFM), LOC18769821 (ATHB - 40), LOC18772781 (MYB - related RAX2), LOC19770626 (NAC3), LOC18766489 (未知转录因子), LOC18767504 (HSF) 以及 LOC18773097 (CPRF2) 在京红果实发育成熟整个阶段和晚京红发育 M1、M2 期表达量均不高,而在晚京红果实 M3 期有较高水平表达。此外, LOC18793312 (HOX3) 和 LOC18772983 (EAF - 1) 在京红果实 W3 期有较高水平表达,而在晚京红果实发育成熟整个阶段和京红发育 M1、M2 期表达量均不高(图 4)。

## 2.5 qRT - PCR 验证

为了进一步验证转录组测序结果的准确性,从 RNA - seq 测序数据中随机挑取差异表达的 9 个基

因,通过 qRT - PCR 对其基因表达量进行检验,如图 5 所示,9 个基因的相对表达水平与 RNA - seq 分析结果一致,表明了转录组数据的可靠性。

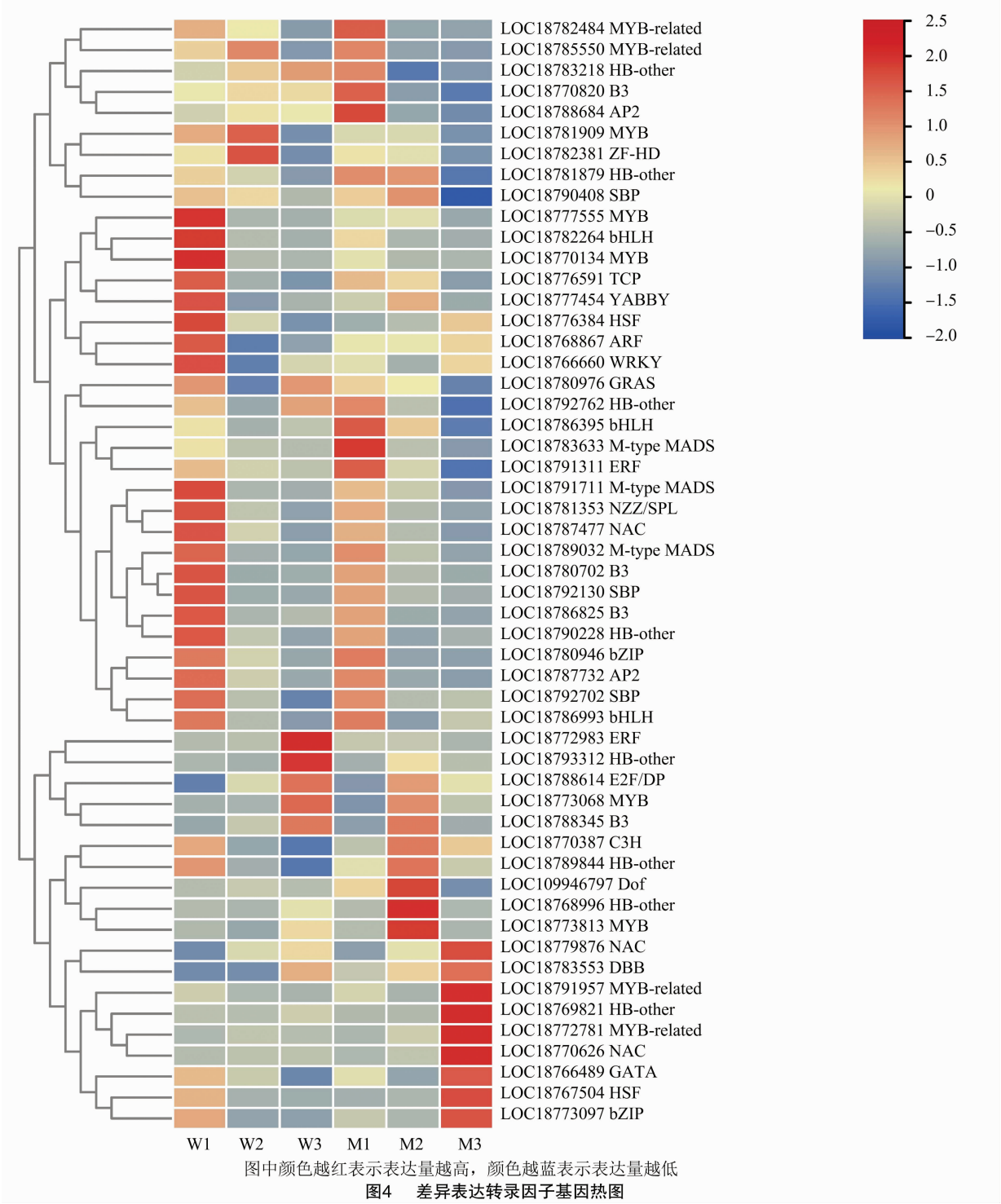
## 3 结论与讨论

桃果实成熟是一个复杂而有序的生理生化过程,涉及色泽、风味、香气、质地等品质指标的变化,直接影响果品的商品价值、上市时间、货架期和市场竞争力,因此,桃果实成熟机制研究对于桃产业发展有重要的意义。基于此,本研究以京红及其晚熟芽变晚京红为试验材料,对二者各自发育成熟过程以及二者之间的差异表达转录因子进行分析,共鉴定得到 41 个转录因子家族的 158 个差异表达转录因子,分属于 B3、MYB - related、NAC、HB - other、C3H、FAR1、MYB、bHLH、bZIP 和 M - type MADS 等转录因子家族。

转录因子在同一种质不同发育成熟阶段其转录表达水平具有时期特异性。通过比较 2 个栽培种在不同发育成熟阶段的差异表达转录因子,发现均有其特异性和共同性表达转录因子(图 2、表 2),表明这些转录因子以不同的转录调控方式参与了阶段性生理过程和生化代谢途径。不论是京红还是晚京红均有大量转录因子家族及转录因子随发育成熟进程的推进而表达,有些转录因子基因表达量变化幅度较大,并且转录因子在各成熟发育阶段的转录表达水平及表达模式具有种质特异性(表 3、图 4),这表明不同类型的转录因子发挥特定分子功能调控了果实发育成熟过程中不同的生物过程,也可以解释 2 个栽培种果实成熟期的差异性,这种差异性可能是晚京红通过转录因子的差异性表达促进或抑制某些生理代谢途径相关基因的表达,重新组织和调节了生理生化代谢活动,导致了成熟期的延长<sup>[5,8]</sup>。

表达模式分析显示,多个转录因子在晚京红发育过程中有显著的变化或在某阶段有较高水平的表达,而在京红果实发育的各个阶段表达水平不高、表达水平没有变化或者与晚京红表现出相反的表达趋势。综合分析表达量和表达模式发现,NAC 家族 (NAC73, LOC18779876; NAC3, LOC19770626)、MYB - related 家族 (EFM, LOC18791957; RAX2, LOC18772781)、HB - other 家族 (ATHB - 40, LOC18769821)、HSF (LOC18767504) 以及 bZIP 家族 (CPRF2, LOC18773097) 转录因子在晚京红果实成





熟启动前后变化明显,证实了这些家族的转录因子参与了芽变晚京红果实成熟的调控过程<sup>[14-17]</sup>,对果实的晚熟机制起到了重要的作用。MYB 家族 ( MYB7, LOC18777555; MYB6, LOC18770134 )、bHLH 家族 ( PIF4, LOC18782264 )、TCP 家族 ( TCP5, LOC18776591 )、YABBY 家 族 ( YABBY 4, LOC18777454 )、ARF 家族 ( ARF 2, LOC18768867 )

和 WRKY 家族 ( WRKY69, LOC18766660 ) 相应转录因子在京红果实发育成熟过程的 W1 期有较高水平表达,而 HB - other 家族 ( HOX3, LOC18793312 ) 和 ERF 家族 ( EAF - 1, LOC18772983 ) 仅在京红果实 W3 期有较高水平表达 ( 图 4 ),与晚京红中相应表达模式存在较大差异,同样可作为成熟期延长研究的候选基因<sup>[8,11,18]</sup>。



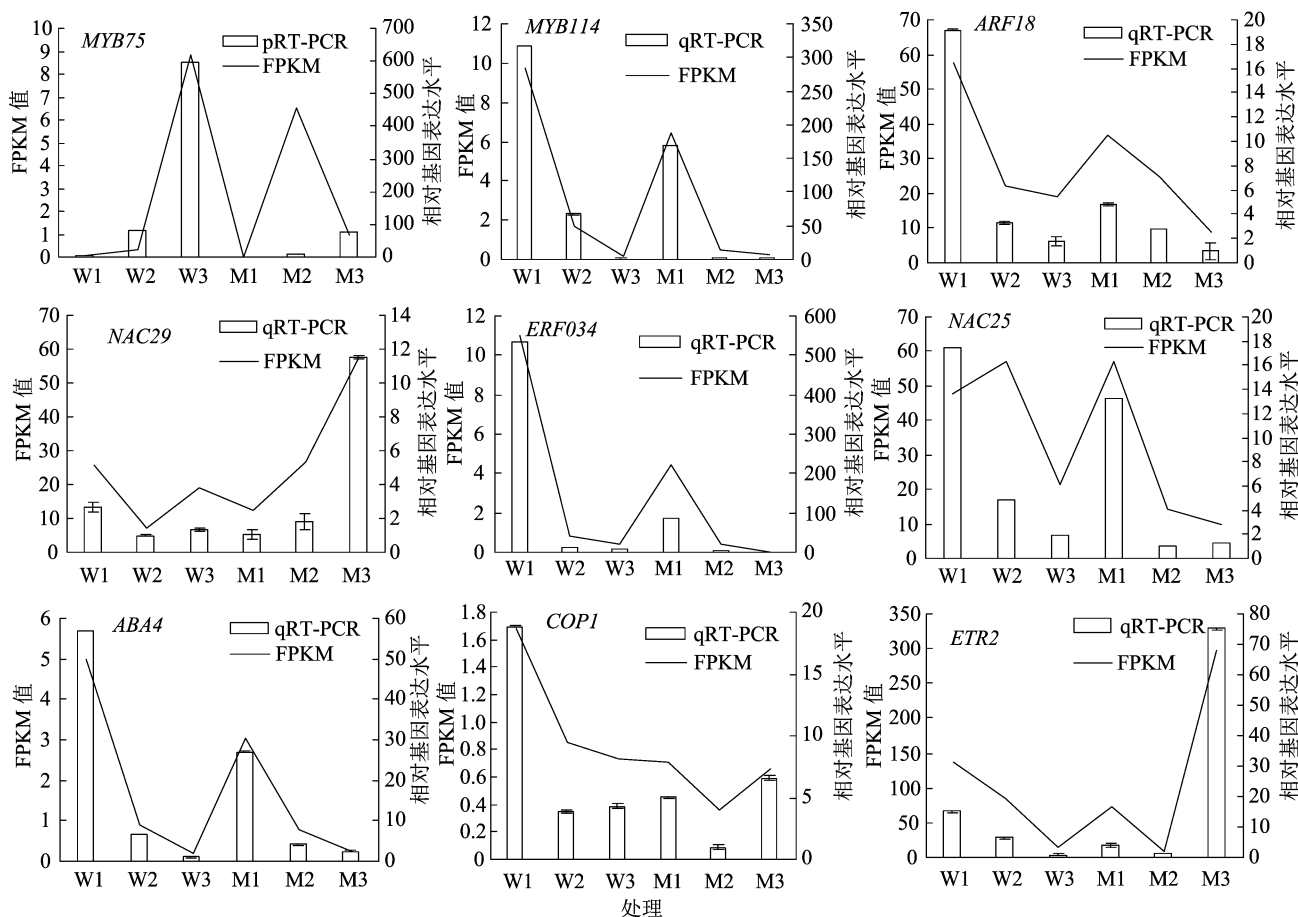


图5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

本研究发现晚京红发育成熟过程中 HB - other 家族转录因子数量较京红多。HB - other 家族转录因子在发育成熟过程中呈现不同的表达模式<sup>[18]</sup>, 如 LOC18769821 和 LOC18793312。ERF 转录因子为 PETALA2 (AP2)/ERF 基因超家族成员, 其特征是保守的 60 ~ 70 个氨基酸残基组成的 AP2/ERF DNA 结合结构域<sup>[19-20]</sup>。ERF 转录因子通过核心 AGCCGCC 序列直接结合到 GCC - box, 或者结合到下游基因的 DRE 基序, 反馈调控乙烯合成相关基因的表达来影响乙烯生成, 进而参与调控果实成熟<sup>[11-12, 21]</sup>。在桃基因组中推定的 ERF 转录因子有 116 个<sup>[22]</sup>, 已有研究对桃 ERF 的表达谱进行了报道<sup>[23-25]</sup>。Zhou 等也对成熟期油桃 ERF 转录因子表达进行分析, 发现了 12 个 ERF 转录因子表达量较高<sup>[12]</sup>, 但不含本研究关注的 ERF (LOC18772983)。ERF (LOC18772983) 基因在京红果实中表达量随果实发育成熟呈升高趋势, 果实成熟前的表达量显著上调至最高, 表达量在 60 DAB 较 40 DAB 增幅较小 (1.54 倍), 而在 70 DAB 表达量增幅达到 13.3 倍。在晚京红果实中, 该基因表达量呈逐渐降低趋势,

果实成熟前的表达量显著下调, 70 DAB 表达量与 60 DAB 相当 (-1.03 倍), 80 DAB 表达量较 70 DAB 降低幅度较大 (-6.25 倍)。

由一些转录因子基因在 2 个栽培种中相反的表达模式可推断其在京红和晚京红中可能分别作为转录激活子和转录抑制子调控乙烯合成基因的表达, 进而影响了京红和晚京红果实成熟过程<sup>[12]</sup>, 这也进一步说明了转录因子参与桃成熟调控网络的复杂性。由以上分析可知, 众多转录因子家族成员均参与到了桃成熟期相关的调控过程, 而在果树中转录因子调控果实发育成熟是一个极其复杂的动态网络<sup>[26-27]</sup>, 这些转录因子如何互作调控尚待进一步深入研究。

本研究基于京红及其晚熟芽变晚京红果实发育成熟过程的转录组数据, 鉴定出 158 个差异表达转录因子, 主要包括了 B3、MYB - related、NAC、WRKY、bHLH、MYB 和 HB - other 等转录因子家族基因。对 2 个栽培种在相同花后时间的差异表达转录因子进行了表达量和表达模式分析, 发现 NAC 家族 (NAC73, LOC18779876; NAC3, LOC19770626)、

MYB - related 家族 ( EFM, LOC18791957; RAX2, LOC18772781 )、HB - other 家族 ( ATHB - 40, LOC18769821; HOX3, LOC18793312 ), HSF ( LOC18767504 )、bZIP 家族 ( CPRF2, LOC18773097 )、MYB 家族 ( MYB7, LOC18777555; MYB6, LOC18770134 )、bHLH 家族 ( PIF4, LOC18782264 )、TCP 家族 ( TCP5, LOC18776591 )、YABBY 家族 ( YABBY 4, LOC18777454 )、ARF 家族 ( ARF 2, LOC18768867 )、WRKY 家族 ( WRKY69, LOC18766660 ) 以及 ERF 家族 ( EAF - 1, LOC18772983 ) 转录因子基因在晚京红成熟期延长的调控过程中发挥了作用。本研究结果可为桃特定转录因子家族基因在果实成熟过程中的功能研究提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Cherian S, Figueroa C R, Nair H. ‘Movers and shakers’ in the regulation of fruit ripening; a cross - dissection of climacteric versus non - climacteric fruit[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65 ( 17 ) : 4705 - 4722.
- [2] Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, et al. DNA - binding domains of plant - specific transcription factors; structure, function, and evolution [J]. Trends in Plant Science, 2013, 18 ( 5 ) : 267 - 276.
- [3] 王传增, 余贤美, 董庆龙, 等. 桃已知 MADS - box 转录因子的生物信息学及花发育表达分析[J]. 核农学报, 2015, 29 ( 5 ) : 849 - 858.
- [4] Lovisetto A, Guzzo F, Tadiello A, et al. Characterization of a bZIP gene highly expressed during ripening of the peach fruit[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 70: 462 - 470.
- [5] Gu C, Guo Z H, Cheng H Y, et al. A HD - ZIP II HOMEBOX transcription factor, PpHB. G7, mediates ethylene biosynthesis during fruit ripening in peach[J]. Plant Science, 2019, 278: 12 - 19.
- [6] Lindemose S, Jensen M K, van de Velde J, et al. A DNA - binding - site landscape and regulatory network analysis for NAC transcription factors in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42 ( 12 ) : 7681 - 7693.
- [7] Zhou H, Kui L W, Wang H L, et al. Molecular genetics of blood - fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors[J]. The Plant Journal, 2015, 82 ( 1 ) : 105 - 121.
- [8] Pirona R, Eduardo I, Pacheco I, et al. Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13 ( 1 ) : 166.
- [9] Liu J H, Xu B Y, Hu L F, et al. Involvement of a banana MADS - box transcription factor gene in ethylene - induced fruit ripening[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28 ( 1 ) : 103.
- [10] Li J J, Li F, Qian M, et al. Characteristics and regulatory pathway of the *PrupeSEPI SEPALLATA* gene during ripening and softening in peach fruits[J]. Plant Science, 2017, 257: 63 - 73.
- [11] Wang X B, Zeng W F, Ding Y F, et al. Peach ethylene response factor PpERF<sub>2</sub> represses the expression of ABA biosynthesis and

cell wall degradation genes during fruit ripening[J]. Plant Science, 2019, 283: 116 - 126.

- [12] Zhou H, Zhao L, Yang Q R, et al. Identification of EIL and ERF genes related to fruit ripening in peach[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21 ( 8 ) : 2846.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25 ( 4 ) : 402 - 408.
- [14] Chen X, Chen R H, Wang Y F, et al. Genome - wide identification of WRKY transcription factors in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and their involvement in fruit developing, ripening, and abiotic stress[J]. Genes, 2019, 10 ( 5 ) : 360.
- [15] Mori K, Lemaire - Chamley M, Asamizu E, et al. Comparative analysis of common genes involved in early fruit development in tomato and grape[J]. Plant Biotechnology, 2013, 30 ( 3 ) : 295 - 300.
- [16] Lin Q, Jiang Q, Lin J Y, et al. Heat shock transcription factors expression during fruit development and under hot air stress in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) fruit[J]. Gene, 2015, 559 ( 2 ) : 129 - 136.
- [17] Guo J, Cao K, Deng C, et al. An integrated peach genome structural variation map uncovers genes associated with fruit traits [J]. Genome Biology, 2020, 21 ( 1 ) : 258.
- [18] Ariel F D, Manavella P A, Dezar C A, et al. The true story of the HD - Zip family[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12 ( 9 ) : 419 - 426.
- [19] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome - wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. Plant Physiology, 2006, 140 ( 2 ) : 411 - 432.
- [20] 李慧峰, 董庆龙, 赵 强, 等. 14 个苹果 AP2/ERF 转录因子基因的克隆与表达分析[J]. 核农学报, 2020, 34 ( 5 ) : 921 - 931.
- [21] Xiao Y Y, Chen J Y, Kuang J F, et al. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64 ( 8 ) : 2499 - 2510.
- [22] Jin J P, Tian F, Yang D C, et al. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 45 ( 1 ) : 1040 - 1045.
- [23] Gong D D, Cao S F, Sheng T, et al. Effect of blue light on ethylene biosynthesis, signalling and fruit ripening in postharvest peaches [J]. Scientia Horticulturae, 2015, 197: 657 - 664.
- [24] Zhang C H, Shanguan L F, Ma R J, et al. Genome - wide analysis of the AP2/ERF superfamily in peach (*Prunus persica*) [J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11 ( 4 ) : 4789 - 4809.
- [25] Wang X B, Ding Y F, Wang Y, et al. Genes involved in ethylene signal transduction in peach (*Prunus persica*) and their expression profiles during fruit maturation[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 224: 306 - 316.
- [26] Cao K, Zhou Z K, Wang Q, et al. Genome - wide association study of 12 agronomic traits in peach[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13246.
- [27] Bianchi V J, Rubio M, Trainotti L, et al. *Prunus* transcription factors: breeding perspectives[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 443.