

番茄 *SIMYB12* RNAi 表达载体构建及功能的初步研究

刘琳琳¹ 田荣荣² 郭萧¹ 廖雄¹ 王爽¹

姚丽萍¹ 赵迪¹ 王彦涛¹ 李天红^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100194)

摘要 以 Micro-Tom 番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 为材料, 构建 *SIMYB12* RNAi 载体, 利用农杆菌介导法导入番茄; 对转基因植株评价发现, *SIMYB12* 基因被干扰后植株出现了植株矮化、果实变小、种子数减少和转色期提前等变化; 实时荧光定量 PCR 检测表明干扰植株果实中类黄酮路径相关基因 *SICH5*、*SIF3H*、*SIF3'H* 表达量下降, *SICHI* 基因表达量上升。

关键词 番茄; 类黄酮; *SIMYB12*; RNAi; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S 641.2

文章编号 1007-4333(2015)06-0117-07

文献标志码 A

Construction of *SIMYB12* RNAi expression vector and functional analysis in tomato

LIU Lin-lin¹, TIAN Rong-rong², GUO Xiao¹, LIAO Xiong¹, WANG Shuang¹,

YAO Li-ping¹, ZHAO Di¹, WANG Yan-tao¹, LI Tian-hong^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. School of Biomedicine, Beijing City University, Beijing 100194, China)

Abstract Micro-Tom tomato (*Solanum lycopersicum* L.) was used as material in this study. The *SIMYB12* RNAi expression vector was constructed, and introduced into tomato via *Agrobacterium tumefaciens* mediated method. PCR results showed that the gene was integrated in tomato. The transgenic lines exhibited dwarf phenotype, smaller fruits and advanced mature period. The results of qRT-PCR showed that the expression of flavonoid biosynthesis-related genes *SICH5*, *SIF3H*, *SIF3'H* were decreased in transgenic lines, while the expression of *SICHI* gene was increased. These results provided an important basis for further study of SIMYB family genes function.

Key words tomato; flavonoid; *SIMYB12*; RNA interference; qRT-PCR

类黄酮作为人类膳食的组成成分, 广泛存在于水果、蔬菜、坚果、种子、花和茎皮中^[1-3], 并可作为抗氧化剂、自由基清除剂和二价阳离子螯合剂, 呈现广泛的生物学效应, 如抗菌、抗病毒、消炎以及抑制环加氧酶和脂肪氧合酶活性等^[4]。同时, 类黄酮化合物的积累还可提高植物对于干旱、低温和盐胁迫等非生物逆境的抗性^[5-6], 并在植物组织的分化和发育过程中有着重要的作用^[7-8]。当前, 对于植物类黄酮的

合成途径已进行了深入的研究^[9], 而相关的转录因子因其可以激活或抑制合成途径中多个基因的协同表达, 日益受到研究者的关注^[10]。

MYB 蛋白作为类黄酮合成途径中涉及最广泛的一类调节因子, 对类黄酮合成途径中查尔酮合成酶 (Chalconesynthase, CHS), 查尔酮异构酶 (Chalcone isomerase, CHI), 黄烷酮-3-羟化酶 (Flavanone 3-hydroxylase, F3H) 和黄烷酮-3', 5'-羟

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 国家自然科学基金(31171938); 公益性行业(林业)科研专项经费(201404720)

第一作者: 刘琳琳, 硕士研究生, E-mail: 632069775@qq.com

通讯作者: 李天红, 教授, 主要从事果树逆境生理与分子生物学研究, E-mail: lith@cau.edu.cn

化酶(Flavanone 3'-5'-hydroxylase, F3'5'H)等的合成均有明显的调控作用,从而控制植物体内类黄酮的积累。研究表明,葡萄中过量表达 *VvMYBP5b* 可以上调花色苷合成途径的关键酶基因的表达量,如 *VvANR* 和 *VvCHI* 表达量分别上调了 8 和 4 倍,而 *VvANS* 和 *VvF3'5'H* 表达量分别提高了 14 和 12 倍^[11];苹果 *MdMYB110a-JP* 基因过表达可使苹果组培苗的叶和茎呈现紫色^[12]。目前,已有的报道同时表明 MYB 因子并非全部表现为正向调控,如葡萄根毛中过量表达 *VvMYBC2-L1* 会下调原花青素途径中的结构基因的表达,导致原花色素积累量减少^[13]。

MYB12 作为 MYB 蛋白家族的一员,首次于拟南芥中得以克隆,且在拟南芥、烟草、葡萄等中研究发现其对类黄酮合成途径的关键酶基因均有明显的调节作用^[14-17]。过表达番茄 *SlMYB12* 转录因子可以引起烟草花色和植株高度的变化,且 2010 年 Ana-Rosa 等^[18] 也发现利用 VIGS 技术瞬时沉默 *SlMYB12* 转录因子的番茄果实中类黄酮含量减少,使得果实表皮呈粉色。与 VIGS 技术相比, RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术可以高效、专一的沉默内源基因,并且利用干扰表达载体可以获得稳定的转基因植株,从而有利于从反向遗传学角度研究靶基因的功能。因此,本研究拟构建反向重复序列的 *SlMYB12* RNAi 载体,通过农杆菌介导转化番茄,观察阳性植株生长和果实发育情况,并检测类黄酮及其代谢路径中的关键酶基因表达变化,以期为全面解析该基因在番茄生长发育、特别是果实类黄酮物质积累中的调控作用提供依据和材料。

1 材料与方法

1.1 材料

Micro-Tom 番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 种子购买于北京园艺公司,番茄种植在组培室内,温度 25 °C/20 °C,光照 16 h/8 h,土壤为营养土与蛭石 1:1 混合,每 3 d 浇水一次。大肠杆菌感受态细胞 (*Escherichia coli*.) DH5 α 购自北京全式金公司;克隆载体 pMD18-T simple 购自 Takara 公司;二元转化载体 pBI121 和农杆菌菌株 EHA105 由本实验室保存。使用的逆转录酶为 Promega 公司的 M-MLV Reverse Transcriptase;质粒小提试剂盒和普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根公司;Axygen 小量 DNA 快速提取试剂盒、KOD 酶

(Takara) 和 2 \times Taq PCR MaserMix 购于中科瑞泰公司;氨基青霉素,卡那霉素和头孢霉素等其他试剂均为上海生工公司的国产分析纯产品。引物合成和测序均由华大基因(北京)完成。

1.2 方法

1.2.1 番茄 *SlMYB1* cDNA 的获取

采用热硼酸法^[19]提取正常生长条件下 Micro-Tom 番茄果实的总 RNA, cDNA 的合成参照 M-MLV 逆转录酶说明书。利用 Micro-Tom *SlMYB12* 的 cDNA 序列(Genbank: EU418748)^[17],设计特异引物,以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增(上游引物: 5'-ATGGGAAGAACACCTTGTTG-3';下游引物: 5'-CTAAGACAAAAGCCAAGATACAA-3'),反应体系参照 KOD 酶说明书,反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 57.5 °C 30 s, 68 °C 1 min, 35 个循环; 68 °C 10 min。将获得的目的基因和 pMD18-T 载体连接,并转化大肠杆菌 DH5 α ,经 PCR 和测序鉴定后,得到 *SlMYB12* cDNA 全长。

1.2.2 番茄 *SlMYB12* RNAi 载体的构建

参照 Ana-Rose 等^[18]所使用的 VIGS 片段,选择 *SlMYB12* 基因开放阅读框内 400 bp 片段做回文序列,由于植物表达载体 pBI121 中无 intron,因此将反向片段 5 端延伸 400 bp,以使该 RNAi 载体转录后能形成稳定的二级发卡结构。反向片段和正向片段分别命名为 *MYB12A* (800 bp) 与 *MYB12S* (400 bp),在 2 个片段的特异性引物前加上用来定向的酶切位点,以上述 *SlMYB12* cDNA 全长为模板进行 PCR 扩增,反应体系和条件同上。引物序列如下:

MYB12A: 上游引物: 5'-GGATCCTCTAGAT-TTTCATTGCCTTTTGCTTCTC-3';

下游引物: 5'-TCTAGAGGATCCGGAAGCC-TTAGTTCAGATAGTGA-3';

MYB12S: 上游引物: 5'-GGATCCGGTACCT-GGAACTCTCATCTAAGTCGAAAAG-3';

下游引物: 5'-CCCGGGGGCCCGAGATTA-TGCCAGACGTGGTGA-3'。

下划线碱基分别表示 *Bam* HI、*Xba* I、*Bam* HI 和 *Sma* I 限制性酶切位点。

将得到的 *MYB12A* 与 *MYB12S* 与 pBI121 载体连接,以获得 *SlMYB12* RNAi 载体,并转化大肠杆菌 DH5 α ,经酶切和测序验证后,通过冻融法导入农杆菌 EHA105 感受态中。

1.2.3 番茄的遗传转化及分子生物学鉴定

参照改进的遗传转化方法^[20-21]获得转基因番茄。用 Axygen 基因组 DNA 小量试剂盒提取转基因番茄叶片 DNA, 野生型番茄 (WT) 基因组 DNA 为阴性对照, 以 *SIMYB12*-RNAi 重组质粒为阳性对照, 用 *MYB12A* 特异性引物对转基因番茄 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 800 bp。选择 PCR 阳性的转基因植株进行单株收种, 再用卡那霉素进行筛选, 以获得纯合的 T₂ 代转基因株系。

对上述转基因株系成熟番茄果实中 *SIMYB12* 基因转录水平进行分析。番茄果实总 RNA 提取, cDNA 第一链的合成方法同上, 以稀释 5 倍的 cDNA 作为反应模板, 引物如表 1 所示, 以番茄的 18S rRNA 做内参基因。qRT-PCR 实验仪器为 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪, 反应体系参照康为公司的 SYBR Green Mix 说明书, 反应程序为 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 31 s, 40 个循环; 72 °C 20 s, 每次试验设 3 次重复。

1.2.4 转基因番茄性状调查

在组培室种植转基因和 WT, 每个材料种 10 株, 参照何琳等^[22]果实成熟度划分, 记录从花蕾期到绿果期、转色期和红熟期的天数。用游标卡尺测量花后 50 d 番茄果实的直径, 天平测量其单果重, 观察番茄果实颜色并统计果实种子数量。

1.2.5 番茄果实类黄酮含量检测

精确称量 0.007 7 g 芦丁标准样溶于 30% 乙醇中, 定容至 50 mL, 分别取 1、2、3、4、5、6、8、10 mL 标准样, 30% 乙醇定容至 10 mL。UV-2102 PC 型紫外分光光度计在 345 nm 下测量其吸光值并制作回归曲线。

取成熟果实液氮研磨粉碎后 55 °C 烘干, 精确称量 0.08 g 鲜样, 加入 20 mL 95% 乙醇, 55 °C, 100 Hz 超声波震荡 30 min 浸提, 取上清液。之后在加入 20 mL 70% 乙醇, 55 °C, 100 Hz 超声波震荡 30 min 浸提。合并 2 次浸提液, 30% 乙醇定容至 50 mL。取其中 20 mL 浸提液, 3 500 r/min, 离心 10 min。取上清液 1 mL, 30% 乙醇定容至 10 mL。在 345 nm 下测量其吸光值。利用回归方程 $Y_{345} = 28.141 0X - 0.013 4$, 得到样品量, 根据 $C = (Y \times \text{定容体积} \times \text{稀释倍数}) / \text{样品重量}$, 得到番茄果实中类黄酮用芦丁含量, mg/g。

1.2.6 转基因番茄果实中花色苷合成途径关键基因表达水平分析

根据 NCBI 上已公布的番茄花色苷合成途径关键基因的开放阅读框设计特异性引物 (表 1), 用于 qRT-PCR 分析转基因和 WT 中花色苷合成途径关键酶基因转录水平差异。番茄果实总 RNA 提取, cDNA 第一链的合成以及 qRT-PCR 方法同上。

表 1 qRT-PCR 反应的特异性引物

Table 1 Specific primers used in qRT-PCR reaction

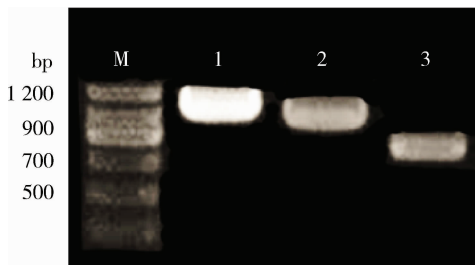
引物 Primer	基因 Gene	序列(5'-3') Sequence
SIMYB12_F	<i>SIMYB12</i>	AGGCTCTTGGAGGTCGTTACC
SIMYB12_R	<i>SIMYB12</i>	CAACTCTTTCCGCATCTCAATAATC
CHS_F	<i>CHS</i>	TGGTCACCGTGGAGGAGTATC
CHS_R	<i>CHS</i>	GATCGTAGCTGGACCCTCTGC
CHI_F	<i>CHI</i>	GTTTTTCACAAACCAACAGTTCTGAT
CHI_R	<i>CHI</i>	GAAGCAGTGCTCGATTCCATAAT
F3H_F	<i>F3H</i>	CACACCGATCCAGGAACCAT
F3H_R	<i>F3H</i>	GCCCACCAACTTGGTCTTGTA
F3'H_F	<i>F3'H</i>	GCACCACGAATGCACTTGC
F3'H_R	<i>F3'H</i>	CGTTAGTACCGTCGGCGAAT
18SrRNA_F	18SrRNA	GGTGATTTGATGCTGGGTGAC
18SrRNA_R	18SrRNA	TTTCCGTTTCCCTCCCTGAC

2 结果与分析

2.1 番茄 *SIMYB12* 基因 RNAi 载体构建

2.1.1 番茄 *SIMYB12* cDNA 全长及 RNAi 正、反向片段的获取

据 GenBank 数据库中的 Micro-Tom 番茄 *SIMYB12* 基因序列,设计引物,在番茄果实中扩增得到 *SIMYB12* 基因 1 071 bp 的 cDNA 全长。依据番茄 *SIMYB12* 基因序列的同源性与其特异性,参照 Ana-Rose 等^[18]所使用的 VIGS 片段,设计番茄 RNAi 正、反向片段引物,在番茄果实中分别扩增获得 400 bp *SIMYB12A* 以及 800 bp *SIMYB12S* 片段,如图 1 所示。



M: Marker II; 1: *SIMYB12* PCR 产物; 2: *SIMYB12A* PCR 产物; 3: *SIMYB12S* PCR 产物。

M: Marker II; 1: PCR product of *SIMYB12*; 2: PCR product of *SIMYB12A*; 3: PCR product of *SIMYB12S*.

图 1 *SIMYB12*, *SIMYB12A* 和 *SIMYB12S* 基因的 PCR 电泳图

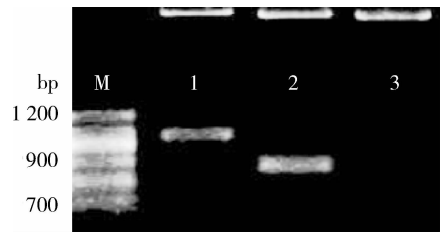
Fig. 1 Electrophoresis of PCR amplified products of *SIMYB12*, *SIMYB12A* and *SIMYB12S*

2.1.2 RNAi 表达载体构建

在植物表达载体 pBI121 的 35S 启动子后插入 *SIMYB12A* 和 *SIMYB12S* 目的片段,获得番茄 *SIMYB12* RNAi 载体。利用 *Bam* HI、*Xba* I 和 *Bam* HI、*Sma* I 双酶切 *SIMYB12* RNAi 载体,由图 2 所示,酶切后在 800 和 400 bp 处均可获得清晰的条带,表明酶切得到了 *SIMYB12A* 和 *SIMYB12S* 片段,证明该 RNAi 表达载体构建成功。

2.2 转基因番茄鉴定及表达分析

利用农杆菌介导法获得 *SIMYB12* RNAi 转基因番茄,提取转基因番茄叶片的基因组 DNA,进行 PCR 鉴定,如图 3 所示,共得到 7 株阳性转基因番茄。利用卡那霉素进行筛选后得到 5 个纯合的 T_2 转基因株系,对上述转基因株系成熟番茄果实中 *SIMYB12* 的表达量进行分析,发现 line2 和 line6 中



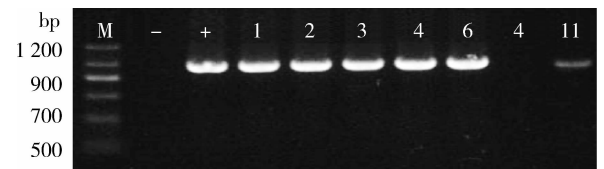
M: Marker II; 1: *Bam*HI-*Xba*I 酶切鉴定 RNAi 表达载体; 2: *Bam*HI-*Sma*I 酶切鉴定 RNAi 表达载体; -: RNAi 表达载体。

M: Marker II; 1: *Bam*HI-*Xba*I analysis of the RNAi vector; 2: *Bam*HI-*Sma*I analysis of the RNAi vector; -: RNAi vector.

图 2 pBI121 连接目的基因的酶切检测

Fig. 2 Identification of restriction map for pBI121vector

SIMYB12 的表达受到显著干扰,分别下降了 80% 与 60% (图 4),而其他转基因株系中 *SIMYB12* 的表达水平仅略有下降,因此选择 line2 和 line6 用于后续试验。



M: Marker II; -: 阴性对照; +: 阳性对照; 1-11: 转基因植株。

M: Marker II; -: Negative control; +: Positive control; 1-11: Transgenic plants.

图 3 转基因番茄的 PCR 检测

Fig. 3 Identification of transgenic tomato by PCR

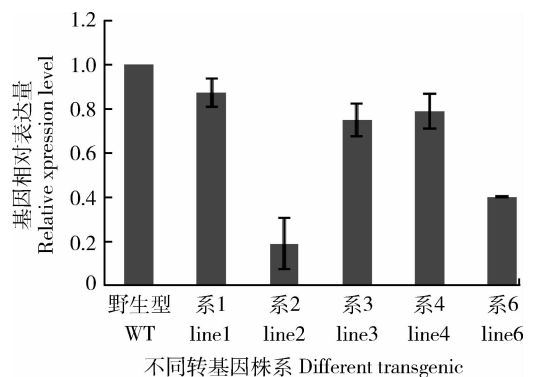


图 4 qRT-PCR 分析不同转基因株系 *SIMYB12* 基因表达水平

Fig. 4 qRT-PCR analysis of the expression of *SIMYB12* in different transgenic tomato lines

2.3 转基因番茄植株性状调查

将 line2 和 line6 与 WT 种植在组培室内,花蕾期开始观察并记录番茄果实成长发育状态,如表 2

所示,转基因植株果实绿果期、转色期和红熟期均早于 WT,其转色期和红熟期均比 WT 提前近 10 d。

另外,与 WT 相比(图 5),line2 和 line6 番茄植株主茎茎节变少,植株高度明显低于对照,且 line2 果实颜色变深。统计结果表明(图 6),转基因 line2

和 line6 果实的直径及重量均显著低于 WT。此外,转基因果实中还存在发育不良、果实内部纤维多和心皮内部软化程度低等现象。同时,转基因系果实种子数也显著低于 WT,仅为对照的 30%和 25%。以上试验结果表明 *SlMYB12* 基因表达量的下降会显著影响植株的正常生长。

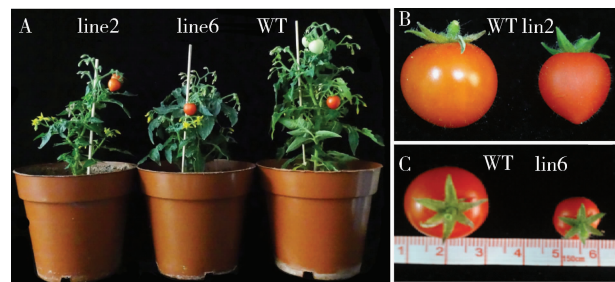
表 2 转基因番茄果实发育动态

Table 2 Developmental process of transgenic tomato fruits

类别		花蕾期	盛花期	坐果期	绿熟期	转色期	红熟期
Class		Budding flower	Blossom	Fruit set	Mature green	Turning	Red and ripening
系 2	line2	1	5.9±0.1	11.6±0.3 c	14.9±0.4 c	41.6±0.5 b	49.5±0.6 c
系 6	line6	1	5.9±0.2	12.6±0.2 b	17.2±0.3 b	43.1±0.5 b	51.9±0.4 b
野生型	WT	1	5.9±0.1	15.2±0.2 a	21.6±0.4 a	51.7±0.8 a	60.8±0.5 a

注:表中数字表示从花蕾期开始,line2,line6 和 WT 植株发育到不同时期所用的天数。同列数字后小写字母不同表示差异达 0.05 显著水平。

Note:Numbers in the table mean the days that line2,line6 and WT plants grown in different periods,and the budding flower stage as the first day. Different small letter indicate that the days of these plants grown in different periods is significant at 0.05 level.



A: 植株生长发育情况;B、C: 果实生长发育情况。

A: Plant growth phenotype; B and C: Fruit growth phenotype.

WT: 野生型; line2, line6: 转基因株系

WT: Wild type; line2 and line6: Transgenic tomato

图 5 转基因番茄植株表型观察

Fig. 5 Phenotypes of transgenic tomato plants

2.4 转基因番茄果实类黄酮合成路径关键酶基因的表达以及类黄酮含量分析

本研究中利用 RNAi 转基因植株,分析类黄酮合成途径关键酶基因的表达水平以及类黄酮含量,以期通过稳定的遗传体系从反向遗传学角度研究 *SlMYB12* 的功能。如图 7 所示,与 WT 果实相比,转基因植株中 *SlCHS*、*SlF3H* 和 *SlF3'H* 表达量均下降,而 *SlCHI* 基因表达量显著上升;其中, *SlCHS* 基因表达量变化最为显著,转基因系 *SlCHS* 的表达量分别下降 84%与 50%。

与 WT 果实中的总类黄酮含量(FW)2.4 mg/g 相比,转基因 line2 和 line6 果实中总类黄酮含量均显著低于 WT,分别为(FW)0.5 和 1.44 mg/g

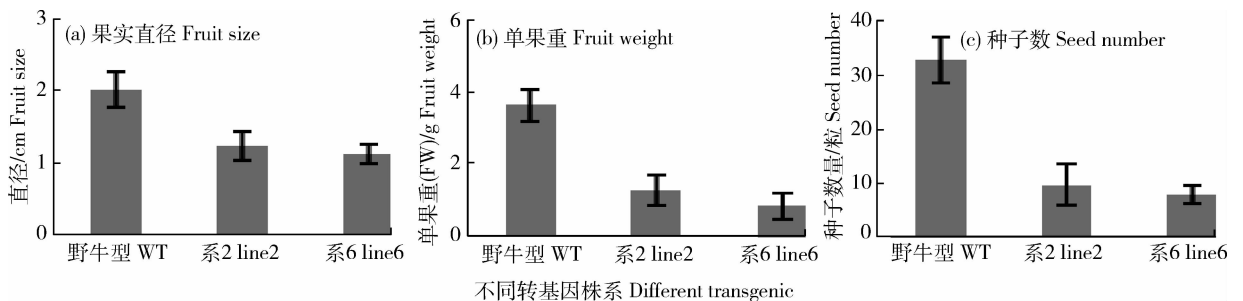


图 6 转基因番茄果实性状分析

Fig. 6 The statistics of transgenic tomato fruits

(图8)。转基因番茄中类黄酮含量与 *SiMYB12*、*SiCHS* 基因表达水平变化趋势一致, *SiMYB12* 基因表达量的下降, 会显著下调 *SiCHS* 基因的表达水平, 从而最终影响类黄酮含量。

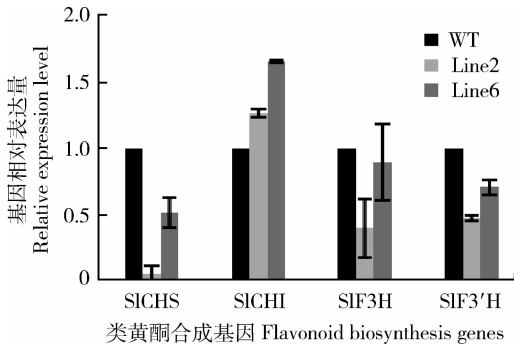


图7 qRT-PCR分析转基因番茄类黄酮合成途径关键酶基因表达水平

Fig. 7 qRT-PCR analysis of the expression of flavonoid biosynthesis genes in transgenic tomato

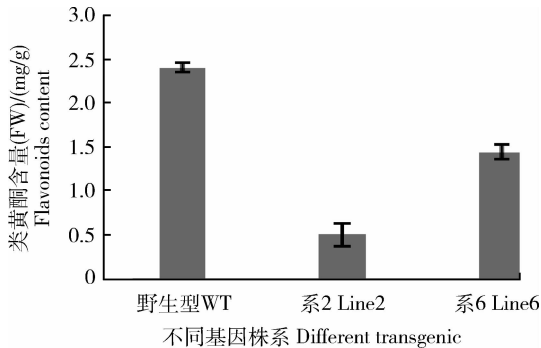


图8 转基因番茄果实类黄酮含量变化

Fig. 8 Transgenic tomato fruits flavonoids contents

3 讨论

近年来, 研究发现 R2R3 类 MYB 转录因子能与 bHLH 和 WD40 形成复合物, 参与植株类黄酮合成以及花和果实着色。拟南芥中的 *AtMYB12* 转录因子能调控 *CHS* 和 *FLS*, 从而影响类黄酮合成^[14]。番茄 *y* 突变体中 *SiMYB12* 能够调控 *SiCHS* 与 *SiCHI* 基因表达继而调控类黄酮合成^[18,23]。而本研究中 *SiMYB12* RNAi 转基因番茄的类黄酮含量显著降低, 同样证实 *SiMYB12* 直接调控类黄酮合成。

此外, 本研究还发现转基因番茄中除 *SiCHI* 外, 类黄酮合成的关键酶基因 *SiCHS*、*SiF3H*、*SiF3'H* 等表达量均有所下降, 其中 *SiCHS* 变化最

为显著, 这说明 *SiMYB12* 主要通过下调 *SiCHS* 的表达水平来改变类黄酮含量, 但同时类黄酮途径中其他关键酶基因的表达也受其一定程度的影响。Muir 等^[24] 和 Colliver 等^[25] 发现超表达 *CHI* 基因会导致类黄酮途径的不平衡, 同时 *CHS* 的表达和果实着色受到抑制, 而本研究同样发现 *CHS* 和 *CHI* 基因的表达存在负相关, 但该机理有待深入研究。

番茄的颜色主要由类胡萝卜素和类黄酮含量决定。Ana-Rosa 等^[18] 利用 VIGS 技术瞬时沉默 *SiMYB12* 转录因子后番茄果实中类黄酮含量减少, 使得果实表皮呈粉色。Lin 等^[26] 利用 GWAS 技术发现 *SiMYB12* 上游 603 bp 的缺失与番茄果皮呈粉色密切相关。本研究发现转基因果实颜色变深, 但其类黄酮的含量显著低于野生型。推测可能是 *SiMYB12* RNAi 载体整合到植株基因组的位点不同, 可能影响类胡萝卜素等其他次级代谢物的合成, 从而一定程度上掩盖了类黄酮的呈色效果。

MYB 转录因子除参与调控类黄酮合成途径外, 其还广泛参与植物的生长、发育以及对逆境的应答等。本研究中转基因番茄呈现出植株矮小, 果实变小, 转色期提前, 且果实发育不良等现象; Elio 等^[27] 的研究则表明通过 RNAi 沉默查尔酮合成酶基因 *SiCHS* 可导致番茄单性结实, 出现果实变小, 种子数量少且发育不良等与本研究类似的现象; Wang 等^[28] 研究发现香梨的 *MYB12* 基因与花萼脱落相关, 由此可推测 RNAi 沉默 *SiMYB12* 转录因子是通过抑制类黄酮代谢过程关键酶基因的表达, 从而调节类黄酮含量进而对果实的生长发育起调节作用。与此前对 *SiMYB12* 功能的研究集中在利用过量表达和 VIGS 技术相比, 本研究首次利用 RNAi 技术获得了稳定的 *SiMYB12* 沉默转基因番茄, 后续可利用该转基因深入研究 *SiMYB12* 在番茄生长发育过程中以及类黄酮合成中的调控作用及其调控机理。

4 结论

以 Micro-Tom 番茄为试材, 获得了 *SiMYB12* RNAi 转基因番茄。转基因阳性植株出现了植物矮小, 果实变小且发育不良, 种子数减少, 成熟期提前等变化, 且转基因株系中 *SiMYB12* 基因表达量下降, 引起类黄酮合成路径关键酶 *SiCHS* 等基因表达量显著下降, 从而使果实中类黄酮的含量也显著

降低。相关研究结果为全面验证 *SIMYB12* 基因功能提供了重要的技术支持和材料。

参 考 文 献

- [1] Hackett A M. Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships [M]. New York: Alan R Liss, 1986: 177-194
- [2] Ratty A K, Das N P. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship [J]. *Biochem Medica*, 1988, 39: 69-79
- [3] Middleton E J, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer [M]. London: Chapman and Hall, 1994, 32: 619-652
- [4] Cook N C, Samman S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources [J]. *J Nutr Biochem*, 1996, 7: 66-76
- [5] Ma D, Sun D, Wang C, et al. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2014, 80: 60-66
- [6] Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, et al. Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by over accumulation of antioxidant flavonoids [J]. *Plant J*, 2014, 77(3): 367-379
- [7] Qi T, Song S, Ren Q, et al. The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(5): 1795-1814
- [8] Li S, Zachgo S. TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2013, 76(6): 901-913
- [9] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 485-493
- [10] Laura Jaakola. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits [J]. *Trends Plant Sci*, 2013, 18(9): 477-483
- [11] Deluc L, Bogs J, Walker A R, et al. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin in biosynthesis in developing grape berries [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 2041-2053
- [12] Umemura H, Otagaki S, Wada M, et al. Expression and functional analysis of a novel MYB gene, MdMYB110a-JP, responsible for red flesh, not skin color in apple fruit [J]. *Planta*, 2013, 238: 65-76
- [13] Huang Y F, Vialet S, Guiraud J L, et al. A negative MYB regulator of proanthocyanidin accumulation, identified through expression quantitative locus mapping in the grape berry [J]. *New Phytol*, 2014, 201(3): 795-809
- [14] Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, et al. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1083-1096
- [15] Stracke R, Ishihara H, Huep G, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling [J]. *Plant J*, 2007, 50: 660-677
- [16] Luo J, Butelli E, Hill L, et al. AtMYB12 regulates caffeoylquinic acid and flavonol synthesis in tomato; Expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol [J]. *Plant J*, 2008, 56: 316-326
- [17] Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, et al. The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1F regulates flavonol synthesis in developing grape berries [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1513-1530
- [18] Ballester A R, Molthoff J, de Vos R, et al. Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes; Deregulated expression of the gene encoding transcription factor SIMYB12 leads to pink tomato fruit color [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(1): 71-84
- [19] Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L) [J]. *Anal Biochem*, 1994, 223(1): 7-12
- [20] 李辰, 范意娟, 计文龙, 等. *SIDREB1B* 过量表达可促进番茄果实发育及成熟 [J]. *中国农业大学学报*, 2014, 19(3): 73-79
- [21] 马杰, 邱栋梁. 番茄组培再生体系优化研究 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(8): 185-198
- [22] 何琳, 朱本忠, 罗云波. 转反义 *LeEIL2* 基因番茄果实采后部分生理特性 [J]. *中国农业大学学报*, 2006, 11(1): 57-60
- [23] Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, et al. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(12): e1000777
- [24] Muir S R, Collins G J, Robinson S, et al. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(5): 470-474
- [25] Colliver S, Bovy A, Collins G, et al. Improving the nutritional content of tomatoes through reprogramming their flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Phytochem Rev*, 2002, 1(1): 113-123
- [26] Lin T, Zhu G, Zhang J, et al. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(11): 1220-1226
- [27] Elio G W, Schijlen C H, Ric V, Stefan Martens et al. RNA interference silencing of chalcone synthase the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1520-1530
- [28] Wang B H, Sun X X, Dong F Y, et al. Cloning and expression analysis of an MYB gene associated with calyx persistence in Korla fragrant pear [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(8): 1333-1341