

DOI:10.16861/j.cnki.zggc.2025.0251

干扰转录因子 *StMYB90-like* 对彩色马铃薯花青素合成的影响

潘 阳¹, 王立春¹, 付学鹏², 田国奎¹, 王海艳¹, 李凤云¹, 庞 泽¹, 李明雪¹

(1. 黑龙江省农业科学院克山分院·黑龙江省马铃薯种质资源与遗传改良工程技术研究中心·农业农村部马铃薯生物学与遗传育种重点实验室 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:为明确转录因子 *StMYB90-like* 在花青素合成代谢中的调控机制,以彩色马铃薯黑金刚为研究对象,基于前期生物信息学筛选的转录因子 *StMYB90-like*,通过干扰载体构建、遗传转化、荧光定量分析、花青素含量的测定,对转基因马铃薯进行检测和分析。结果表明,干扰彩色马铃薯黑金刚中转录因子 *StMYB90-like* 的表达后,其自身表达量显著降低,且马铃薯叶片中的花青素含量极显著降低了 47.94%,马铃薯块茎颜色变浅,马铃薯块茎中的花青素含量显著降低了 9.79%。说明转录因子 *StMYB90-like* 能够正向调控彩色马铃薯中花青素的合成,推测其可能通过上调花青素生物合成相关结构基因的方式调控马铃薯花青素的合成和积累。

关键词:彩色马铃薯;花青素;遗传转化;转录因子;*StMYB90-like*

中图分类号:S532 文献标志码:A 文章编号:1673-2871(2025)10-056-05

Effects of interfering transcription factor *StMYB90-like* on anthocyanin synthesis in colored potato

PAN Yang¹, WANG Lichun¹, FU Xuepeng², TIAN Guokui¹, WANG Haiyan¹, LI Fengyun¹, PANG Ze¹, LI Mingxue¹

(1. Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Heilongjiang Province Potato Germplasm Resources and Genetic Improvement Engineering Technology Research Center/Key Laboratory of Potato Biology and Genetics Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China; 2. College of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: To clarify the regulatory mechanism of the transcription factor *StMYB90-like* in anthocyanin synthesis and metabolism, this study used the colored potato Heijingang as the material. Based on the previously identified *StMYB90-like* gene through bioinformatics screening, an interference vector was further constructed and genetically transformed. Through fluorescence quantitative analysis, anthocyanin content determination, and performance observation of transgenic plants, it was found that interference with *StMYB90-like* expression significantly reduced their transcription levels. At the same time, the anthocyanin content in leaves decreased by 47.94%, the color of tubers became lighter, and the anthocyanin content in tubers decreased by 9.79%. The above results indicate that the gene *StMYB90-like* positively regulates anthocyanin synthesis in colored potatoes, likely by upregulating the expression of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis, thereby modulating the synthesis and accumulation of anthocyanins in potato tissues.

Key words: Colored potato; Anthocyanin; Genetic transformation; Transcription factor; *StMYB90-like*

马铃薯种质资源非常丰富^[1]。在丰富的马铃薯资源中,马铃薯的皮色和肉色有白色、黄色、红色、紫色等,其中紫色马铃薯比白肉马铃薯花青素含量

高 3~4 倍^[2]。花青素具有抗氧化活性,彩色马铃薯因独有的花青素含量高的特性,使其具有较高的营养价值和较好的保健作用。

收稿日期:2025-03-28;修回日期:2025-06-16

基金项目:黑龙江省农业科技创新跨越工程农业科技基础创新优青项目(CX23YQ12);黑龙江省省属科研院所科研业务费资助项目(CZKYF2024-1-C003);黑龙江省农业科学院克山分院 2023 年度先导培育项目(XDZDA2023-01);黑龙江省农业科技创新跨越工程项目(CX23GG02);黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目(2022ZXJ06B02-02a, 2022ZXJ06B01-03);国家马铃薯产业技术体系齐齐哈尔综合试验站项目(CARS-09-ES37);齐齐哈尔市科技计划联合引导项目(LNYGG-2024005)

作者简介:潘 阳,女,助理研究员,主要从事马铃薯遗传育种及分子生物学研究。E-mail:1762480948@qq.com

通信作者:王立春,男,研究员,主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail:potato2008@126.com

花青素是一种天然的抗氧化剂,花青素的富集使得紫马铃薯具有抗氧化、抗衰老、降脂、增强体质等保健功能^[3]。花青素还是一种天然的色素,在酸碱不同的条件下呈现不同的颜色,可以用来作为天然的染料,用于纺织业染色和食品行业的颜色添加剂^[4]。

花青素合成代谢由众多编码生物酶的结构基因调控,如 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*UFGT* 等^[5]。这些结构基因的转录由 R2R3-MYB、bHLH 和 WD40 蛋白复合调控,在拟南芥中,R2R3 结构的 MYB 蛋白 MYB113、MYB114,和 R3 结构的 MYB-L2 蛋白与 bHLH 转录因子 TT8、GL3 和 EGL3 以及 WD40 蛋白 TTG1 均参与花青素合成代谢^[6-9]。

MYB (V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 转录因子的转录激活通常会导致植物叶片或果实中花青素的积累^[10]。MYB 家族转录因子含有众多成员,Liu 等^[11]研究了与马铃薯花青素合成激活相关的 R2R3-MYB 转录因子 AN1 的功能分化,发现 AN1 的 C 端 10 个氨基酸的双拷贝有助于激活花青素积累。本实验室(黑龙江省农业科学院克山分院马铃薯育种研究所)前期研究也发现,马铃薯转录因子 *StMYB90-like* (又名 *an1*) 可能参与花青素合成的调控(未发表),因此笔者在彩色马铃薯黑金刚中干扰 *StMYB90-like*,以分析 *StMYB90-like* 基因的功能及其调控,为 *StMYB90-like* 的功能研究提供良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2024 年 3—10 月在克山试验基地进行。供试马铃薯品种为紫色黑金刚脱毒组织培养苗,由黑龙江省农业科学院克山分院马铃薯育种研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 RNA 干扰靶序列的克隆 在 *StMYB90-like* 基因 ORF 区内挑选 3 个区段,设计 3 对引物,对 *StMYB90-like* 基因 RNA 干扰靶序列进行 PCR 扩增。引物设计序列如表 1 所示。

取 3 个 50 μL 体系并按照以下程序在基因扩增仪中进行扩增反应: Biorun Pfu PCR Mix 25 μL , 正反向引物各 2 μL , 补足 ddH₂O 至 50 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 30 个循环; 50 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 12 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 16 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 5 V $\cdot\text{cm}^{-1}$

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称 Name	序列 Sequence
tgtF(+)	cagtGGTCTCacaacaggaattaactagtagctctcaaccac
tgtF(-)	cgatGGTCTCacaggctcagtagtattgccaccattgcatatcg
loop(+)	cgatGGTCTCacctgcaggctagttttctccttcatttc
loop(-)	cgatGGTCTCagcccggtctgtaactatcatc
tgtR(+)	cagtGGTCTCagggtccagtagtattgccaccattgcatatcg
tgtR(-)	cagtGGTCTCatacaggaattaactagtagctctcaaccac

电压 20 min, 使用凝胶成像分析系统 (Thermo Fisher) 进行条带分析。

1.2.2 干扰载体的构建及鉴定 将 tgtF (204 bp)、loop (200 bp)、tgtR (204 bp) 的电泳片段在紫外灯下切取出来, 放在一个体系中用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen) 进行溶胶回收。用总体积 30 μL 的水溶解回收 DNA, 回收产物标记为 rDNA_{At}3。将空载 pBWA (V) KS-ccDB 质粒与回收片段 rDNA_{At}3 分别进行酶切反应, 按以下程序 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 1 h: 10 \times Buffer 2 μL , BsaI 1 μL , 质粒 4 μL , 加 ddH₂O 至 20 μL 。

将载体酶切物和回收片段酶切产物合并一起用 PCR 纯化试剂盒 (翌圣生物) 纯化, 纯化产物标记为 P-rDNA_{At}3, 用于下一步的连接反应。按以下程序 20 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h: 10 \times Buffer 1 μL , T4-ligase 1 μL , P-rDNA_{At}3 2.5 μL , 加 ddH₂O 至 20 μL 。将 5~10 μL 连接产物转化大肠杆菌感受态, 转化涂 Kan 抗性平皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 进行菌斑 PCR 鉴定。挑取 10 个菌斑同时进行 1.5 mL EP 管接菌和 PCR 鉴定, 引物设计如表 2 所示。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

名称 Name	序列 Sequence
35S-seq	TTCATTTGGAGAGAACACGGGGGAC
NOSseq-R	CAAGACCGCAACAGGATTCAATC

取 10 个 25 μL PCR 反应体系: Biorun Magic PCR Mix 12.5 μL , 上下游引物各 1 μL , 模板 1 μL , 加 ddH₂O 至 25 μL , 按以下程序进行反应: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 30 个循环; 50 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 12 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 16 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。取 1~3 个阳性条带对应的菌液进行测序, 对测序正确的菌液提取质粒, 质粒命名为 pBWA (V) KS-StMYB90-like。

1.2.3 转基因株系的获得 将重组载体 pBWA (V) KS-StMYB90-like 转化至 GV3101 农杆菌中用于后

续茎段的转化。采用农杆菌介导的遗传转化法转化马铃薯^[12]。将转化完成后的马铃薯株系采用CTAB法提取基因组DNA,进行PCR检测,抽检植株总数量42株,3次重复。

1.2.4 qRT-PCR检测 *StMYB90-like* 基因相对表达量 (1)使用翌圣 MolPure® Plant RNA Kit 植物RNA提取试剂盒提取马铃薯叶片RNA,再用NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge)试剂盒将RNA反转录成cDNA。

(2) qPCR反应体系: 2× SYBR qPCR Master Mix 10μL, 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.4 μL, 模板 1 μL, ROXII 0.4 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL, 按以下程序进行反应: 95 °C, 1 min; 95 °C, 20 s, 60 °C, 45 s, 40 个循环; 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s, 95 °C, 0.05 °C·s⁻¹。

引物设计如表3所示。

表3 引物序列
Table 3 Primer sequence

名称 Name	序列 Sequence
MYB90-like Forward Primer	TGCTCCTCAACCACAAGAAG
MYB90-like Reverse Primer	TGGCTTGCCACACTTAAT

1.2.5 花青素含量检测 用可见分光光度法检测马铃薯组织中花青素含量^[13],所需试剂均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 数据处理

试验数据均使用 GraphPad Prism 5 分析处理,用平均数±标准差表示。

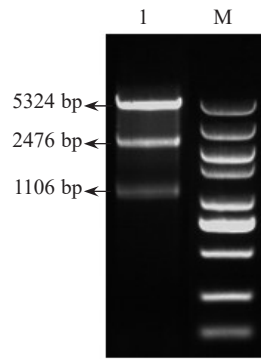
2 结果与分析

2.1 干扰载体构建

将构建的 *StMYB90-like* 基因的干扰载体质粒进行酶切鉴定,如图1所示,电泳条带清晰,且与目的基因片段及载体序列大小一致,初步确定干扰载体构建成功。经测序后,所测得的序列与目的基因片段序列吻合,说明已成功构建了干扰载体 pBWA (V)KS-StMYB90-like,结构图如图2所示。

2.2 转基因植株鉴定

将构建成功的干扰载体 pBWA (V) KS- *StMYB90-like* 转化至 GV3101 农杆菌,使用PCR检测卡那抗性基因 *KAN*,大小为600 bp左右,如图3所示,检测结果均为阳性。干扰载体转化马铃薯品种黑金刚,PCR检测挑选阳性植株,如图4所示,检测植株均为阳性。



注: M. Marker; 泳道 1. 酶切条带。

Note: M. Marker; Lane 1. Enzyme-digested bands.

图1 *StMYB90-like* 基因干扰载体酶切电泳图
Fig. 1 *StMYB90-like* gene interference vector enzyme digestion electrophoresis chart

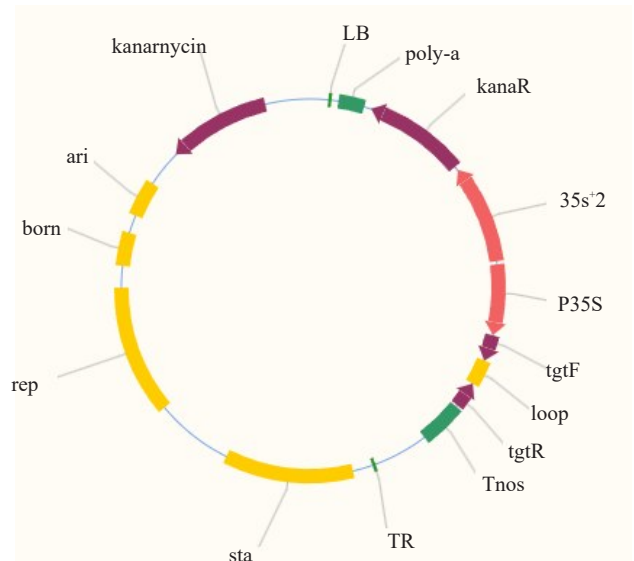
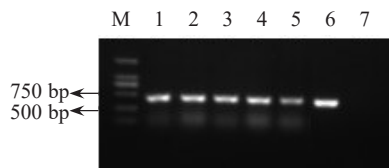


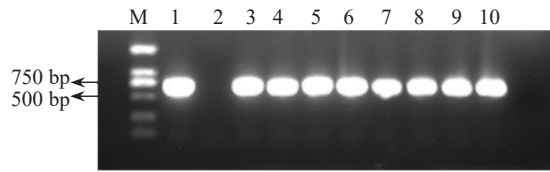
图2 pBWA(V)KS-*StMYB90-like* 干扰载体结构
Fig. 2 Schematic diagram of the interference vector pBWA (V) KS-*StMYB90-like*



注: M. Marker; 泳道 1~5. PCR 鉴定条带(部分); 泳道 6. 阳性对照; 泳道 7. 阴性对照(清水)。

Note: M. Marker; Lanes 1-5. PCR identification bands (Partial); Lane 6. Positive control; Lane 7. Negative control (Water).

图3 载体质粒转化农杆菌检测结果
Fig. 3 The results of *Agrobacterium tumefaciens* detection of the vector plasmid



注: M. Marker; 泳道 1. 阳性对照; 泳道 2. 阴性对照(清水); 泳道 3~10. PCR 鉴定条带(部分)。
Note: M. Marker; Lane 1. Positive control; Lane 2. Negative control(Water); Lane 3-10. PCR identification bands (Partial).

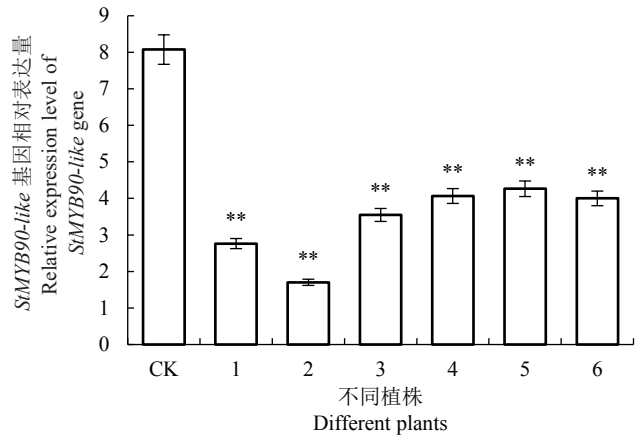
图 4 载体质粒转化马铃薯再生苗检测结果
Fig. 4 The results of the detection of the vector plasmid transformed potato regenerated seedlings

2.3 干扰 *StMYB90-like* 基因马铃薯鉴定

用 qRT-PCR 方法对获得的阳性植株进行 *StMYB90-like* 基因相对表达量的分析, 结果如图 5 所示, 与对照植株相比, 阳性植株中 *StMYB90-like* 基因的表达量均极显著降低。

2.4 干扰 *StMYB90-like* 基因对马铃薯花青素含量的影响

如图 6-A 所示, 与对照相比, 干扰 *StMYB90-like*

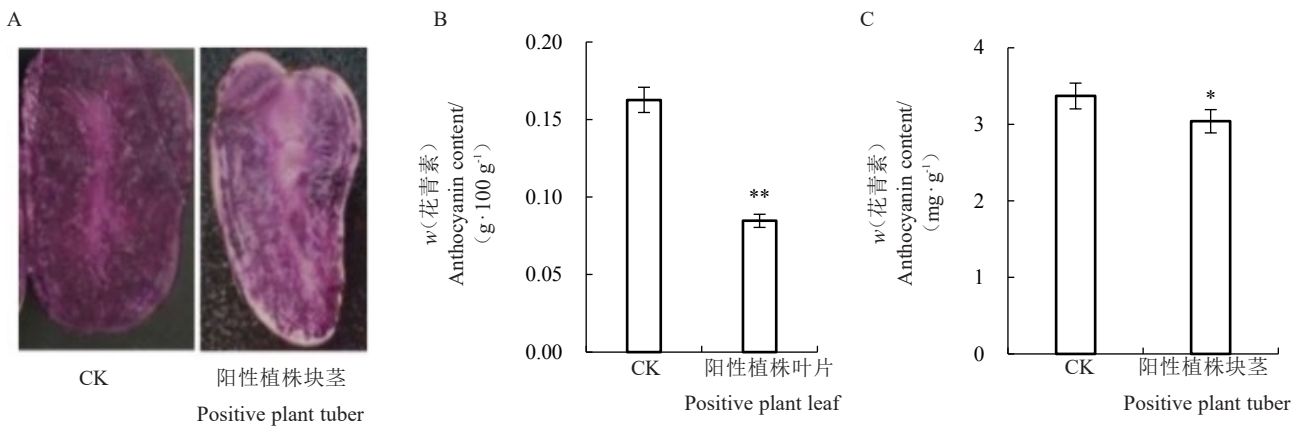


注: **表示与 CK 在 0.01 水平差异极显著。下同。

Note: ** indicate extremely significant difference at 0.01 level with CK. The same below.

图 5 *StMYB90-like* 基因相对表达量
Fig. 5 Relative expression level of *StMYB90-like* gene

基因后, 马铃薯块茎颜色变浅; 如图 6-B 所示, 干扰 *StMYB90-like* 基因后, 马铃薯叶片中的花青素含量比对照组极显著降低了 47.94%; 马铃薯块茎中的花



注: *表示与 CK 在 0.05 水平差异显著。

Note: * indicates significant difference with CK at 0.05 level.

图 6 干扰 *StMYB90-like* 基因后马铃薯中花青素含量
Fig. 6 Anthocyanin content in potato after interference of *StMYB90-like* gene

青素含量比对照组显著降低了 9.79%(图 6-C)。

3 讨论与结论

马铃薯是我国重要的粮菜兼用型作物^[14], 而彩色马铃薯中多酚等抗氧化活性物质可以预防心脑血管疾病、糖尿病等多种重大疾病^[15]。花青素作为糖基化的多酚类化合物, 在彩色马铃薯中大量积累^[16]。

花青素的合成途径主要受结构基因和调控基

因的调控, 调控基因的编码产物为转录因子, 能够调控结构基因的表达^[17]。调控花青素合成的转录因子大部分属于 R2R3-MYB 类, 且对花青素的生物合成成为正向调控^[18]。如番茄中 AN1 的过量表达会导致番茄果实中的花青素大量积累^[19]。

本研究结果表明, 干扰 *StMYB90-like* 基因后马铃薯植株中的 *StMYB90-like* 基因含量显著降低, 且该植株与块茎中的花青素含量比野生型马铃薯显著降低。这与以下研究结果相似, 郭琦^[20]研究发现,

百合 *LvABI5* 基因的瞬时沉默抑制了花青素的积累, An 等^[21]研究发现, 干扰 *MdABI5* 的表达后苹果花青素含量降低, Song 等^[22]研究发现, 干扰 ABA 生物合成基因 *ABA2* 会显著减少 LP 诱导的花青素积累。本研究结果证明转录因子 *StMYB90-like* 具有参与马铃薯花青素合成的正调控功能, 推测其可能通过上调花青素生物合成相关结构基因的方式调控马铃薯花青素的合成和积累。

笔者成功构建了 pBWA(V)KS-*StMYB90-like* 干扰载体, 并采用农杆菌介导法遗传转化到马铃薯中。通过 qRT-PCR 技术对获得的 *StMYB90-like* 基因敲低表达的转基因马铃薯进行表达量验证。干扰 *StMYB90-like* 基因后马铃薯植株与块茎中的花青素含量均比野生型马铃薯花青素含量显著降低, 表明该基因可正向调控马铃薯花青素含量。

参考文献

- [1] 曹斌, 丁学海. 马铃薯中色素提取的工艺研究[J]. 饮料工业, 2011, 2(14): 22-25.
- [2] 陈文红, 王晓琴, 万年鑫, 等. 不同时期喷施氮肥对紫色马铃薯块茎晒、花青素含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(21): 92-94.
- [3] COOKE D, STEWARD W P, GESCHER A J, et al. Anthocyanins from fruits and vegetables--does bright colour signal cancer chemopreventive activity?[J]. European Journal of Cancer, 2005, 41(13): 1931-1940.
- [4] 王华印, 胡志华, 周文龙. 花青素类天然染料研究现状及展望[J]. 现代纺织技术, 2013, 21(6): 55-58.
- [5] 马旭. miR159-MYB65-DFR 参与番茄花青素合成调控分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023.
- [6] MAIER A, SCHRADER A, KOKKELINK L, et al. Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in arabidopsis [J]. Plant Journal, 2013, 74(4): 638-651.
- [7] MATSUI K, UMEMURA Y, OHME-TAKAGI M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2008, 55(6): 954-967.
- [8] LI S T. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: Fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex[J]. Plant Signaling & Behavior, 2014, 9(1): e27522.
- [9] TOMINAGA-WADA R, WADA T. Analysis of *TTG1* and CPC-like MYB genes during *Arabidopsis* epidermal cell differentiation [J]. Plant Biotechnology, 2016, 33(3): 201-206.
- [10] 罗香怡, 李云, 曹东, 等. 枸杞 MYB 转录因子 LrAN2 在番茄中的过量表达分析[J]. 西北农业学报, 2021, 30(9): 1374-1381.
- [11] LIU Y H, LIN-WANG K, ESPLEY R V, et al. Functional diversification of the potato R2R3 MYB anthocyanin activators AN1, MYBA1, and MYB113 and their interaction with basic helix-loop-helix cofactors[J]. Journal of Experimental Botany, 2016(8): 2159-2176.
- [12] BOUAZIZ D, MALIKA A, BIDANI A, et al. A stable cytosolic expression of VH antibody fragment directed against PVY N1a protein in transgenic potato plant confers partial protection against the virus[J]. Plant Science, 2009, 176(4): 489-496.
- [13] 张之为, 范俊臣, 康立茹, 等. *StRab5b* 基因对马铃薯花青素合成的影响[J]. 华北农学报, 2022, 37(4): 28-33.
- [14] 聂腾坤. 基于全长转录组测序与广泛靶向代谢组探究彩色马铃薯的花青素合成机制[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [15] FERNANDES I, FARIA A, CALHAU C, et al. Bioavailability of anthocyanins and derivatives[J]. Journal of Functional Foods, 2014(7): 54-66.
- [16] 仇菊, 朱宏, 刘鹏, 等. 我国彩色马铃薯主栽品种的营养成分分析[J]. 中国食物与营养, 2018, 24(11): 10-14.
- [17] 吕英奇, 童海翔, 姚峥嵘, 等. 彩色马铃薯花色苷研究进展[J]. 中国马铃薯, 2017, 31(3): 165-177.
- [18] 梁玉镯, 陈新娜, 陈东亮, 等. MYB 转录因子调控植物花青素生物合成研究进展[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(22): 55-64.
- [19] 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]. Plant Cell, 2003, 15(8): 1689-1703.
- [20] 郭琦. 转录因子 *LvABI5* 参与百合花青素合成调控的功能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2024.
- [21] AN J P, ZHANG X W, LIU Y J, et al. ABI5 regulates ABA-induced anthocyanin biosynthesis by modulating the MYB1-bHLH3 complex in apple[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(4): 1460-1472.
- [22] SONG R F, HU X Y, LIU W C, et al. ABA functions in low phosphate-induced anthocyanin accumulation through the transcription factor ABI5 in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2024, 43(2): 55.