

乙烯利处理菠萝不同成熟期果实中 *AcMYB103* 基因表达规律研究

韦巧云, 张秀芬, 韩 骁, 赵 静, 周彩霞, 蒋娟娟, 徐 健*

广西南亚热带农业科学研究所, 广西龙州 532415

摘 要: 菠萝属于凤梨科 (Bromeliaceae) 凤梨属 (*Ananas* Merr.) 的一种重要热带水果, 其花果发育理论与转录调控技术研究是菠萝产业的热点之一。乙烯是调控菠萝催花和果实发育的重要激素之一。菠萝基因组测序鉴定出 94 个菠萝 R2R3-MYB 转录因子, 分为 26 亚族, 其中 S19 亚族的 MYB103 与拟南芥等植物花药和叶片发育调控相关。为证明菠萝 MYB103 转录因子调控菠萝果实发育的潜在功能, 从菠萝台农 17 号果实中克隆了 1 个 MYB 转录因子 *AcMYB103*, 全长 1204 bp, 编码区 1038 bp, 编码 345 个氨基酸。该基因编码蛋白含有 2 个典型的 SANT 结构域, 定位在细胞核, 无跨膜结构域和信号肽, 是植物 R2R3 型 MYB 转录因子家族的一员。将菠萝和拟南芥 MYB 家族成员进行聚类分析发现, *AcMYB103* 与拟南芥 *AtMYB103* 序列相似度最高, 并与 *AtMYB80* 和 *AtMYB35* 聚类于 S19 亚族, 据此命名为 *AcMYB103*。进一步采用体积分数为 0%、0.5%、1.0% 和 1.5% 共 4 个乙烯利浓度处理台农 17 号、小目手撕和大目手撕 3 个品种小果期、膨大期和成熟期果实, 并分析 *AcMYB103* 的表达量。结果表明, 在小果期, 随着乙烯利浓度的增加, 台农 17 号 *AcMYB103* 表达规律呈下调模式, 在小目手撕和大目手撕中呈上调模式。在膨大期, 在台农 17 号和小目手撕品种中均呈现下调模式, 在大目手撕果实中呈现上调模式。在成熟期果实中 *AcMYB103* 不表达, 说明 *AcMYB103* 基因表达在乙烯利处理的品种和果实发育时期具有特异性, 在果实发育早期起到差异化调控作用。本研究为深入研究 *AcMYB103* 基因在菠萝果实生长发育的调控机制奠定基础。

关键词: 菠萝; *AcMYB103*; 乙烯利; 表达; 成熟期

中图分类号: S668.3 文献标志码: A

AcMYB103 Gene Expression Pattern Treated with Ethephon in Different Ripening Stages of *Ananas comosus*

WEI Qiaoyun, ZHANG Xiufen, HAN Xiao, ZHAO Jing, ZHOU Caixia, JIANG Juanjuan, XU Jian*

Guangxi South Subtropical Agricultural Research Institute, Longzhou, Guangxi 532415, China

Abstract: Pineapple, an important tropical fruit, belongs to the family Bromeliaceae (*Ananas* Merr.), and its flower and fruit development theory and transcriptional regulation technology are one of the hot spots in the pineapple industry. Ethylene is one of the important hormones that regulate the flowering and fruit development of pineapple. In the study of watercore disorder in Bali pineapple varieties, it was found that two MYB transcription factors, *AcMYB68* and *AcMYB109*, played an important role in fruit development. With the completion of pineapple genome sequencing, 94 pineapple R2R3-MYB transcription factors have been identified in the pineapple genome, which are divided into 26 sub-families, and are differentially expressed by salt and other stresses and ABA hormones. In this study we proposed a scientific hypothesis that ethylene mediated MYB transcription factors to regulate the development of pineapple fruits. In order to elucidate the molecular regulatory mechanism, a MYB transcription factor *AcMYB103* was cloned from the

收稿日期 2024-03-10; 修回日期 2024-03-16

基金项目 广西农业科学院基本科研业务费专项 (桂农科 2023YM128); 广西农业科学院稳定资助科研团队项目 (桂农科 2021YT166)。

作者简介 韦巧云 (1988—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 菠萝遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 徐 健 (XU Jian), E-mail: 56094599@qq.com。

fruit of pineapple Tainong 17, with a total length of 1204 bp, a coding region of 1038 bp, and encoding 345 amino acids. The protein contains two typical SANT domains, localized to the nucleus, without transmembrane domain and signal peptide, and was a member of the plant R2R3 MYB transcription factor family. Cluster analysis of pineapple and *Arabidopsis* MYB family members showed that *AcMYB103* had the highest similarity with *Arabidopsis AtMYB80*, *AtMYB103* and *AtMYB35*, and belonged to the S19 subfamily. Furthermore, four ethephon concentrations (volume fraction) of 0%, 0.5%, 1.0% and 1.5% were used to treat the fruits at the small fruit stage, expansion stage and ripe stage of the three cultivars Tainong 17, Xiaomushousi and Damushousi, and the expression level of *AcMYB103* was analyzed. The results showed that with the increase of ethephon concentration at the small fruit stage, the expression of *AcMYB103* in Tainong 17 showed a down-regulated pattern, and upregulated in the Xiaomushousi and Damushousi mode. In the expansion stage, the downward adjustment pattern was shown in the Tainong 17 and Xiaomushousi varieties, and the upward pattern was shown in the fruit of Damushousi. *AcMYB103* was not expressed in fruits at the ripening stage, indicating that the expression of *AcMYB103* gene was specific in ethephon-treated varieties and fruit development periods, and played a differentiated regulatory role in the early stage of fruit development. This study would lay a foundation for in-depth study of the mechanism of *AcMYB103* gene in the regulation of growth and development of pineapple fruit.

Keywords: *Ananas comosus*; *AcMYB103*; ethephon; expression; ripening stages

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.005

菠萝 (*Ananas comosus*) 属于凤梨科 (Bromeliaceae), 其花果发育理论与技术研究是菠萝产业的热点之一^[1]。植物激素在菠萝产业中具有重要作用。早在 20 世纪 40 年代就发现夜间低温、生产类激素 2,4-D 等具有促进菠萝花形成的作用。为了深入研究菠萝中植物激素转录调控的机制,生长素信号途径基因 *AcAUX* 和 *AcPIN* 等先后被克隆并证明其在抗逆中的作用^[2]。除了生长素类激素之外,乙烯也是菠萝花发育影响激素之一。在乙烯信号转导途径中,乙烯响应因子 AP2/ERF 在花发育中具有重要作用^[3]。然而,在菠萝果实发育分子机制研究较少。已经证明,植物 MYB 转录因子在多种植物果实发育过程中均有重要作用。例如,大麦 *HvGAMYB* 通过调控抽穗期进而调控产量^[4]。在枣果实颜色的调控过程中,发现 MYB 基因家族成员是通过调控黄酮合成起到调控作用的^[5]。鉴定出枣中的 R2R3-MYB 亚家族成员有 118 个,进一步筛选出了可能与果实膨大和色泽发育相关的候选基因 *ZjMYB59* 和 *ZjMYB104*^[6]。最新研究表明,矮牵牛花 R2R3-MYB 转录因子 SG19 既在花发育过程中的气味释放中具有特异性作用,又通过抑制乙烯的产生来抑制花蕾衰老^[7]。其中,MYB103 转录因子在菠萝、水稻、玉米等 6 种植物 MYB 基因家族中保守,其在植物花药发育、绒毛层形成和根毛形成中具有重要作用^[8-9]。*OsMYB103L* 的下调明显改变了 β -1,4-葡聚糖聚合和纤维素微纤维的组装,从而增强了水稻生物质酶解糖化^[10]。另一个在植物中功能保守的 MYB80 转录因子在绒毡层和花粉发

育中具有重要作用^[11]。芦笋的 MYB35 转录因子在雄花发育早期雄蕊中表达量高^[12]。可见,MYB103 的研究在拟南芥中主要是调控花药和根毛合成为主。在水稻中进一步发现 MYB103 具有调控叶片的机械强度和纤维强度的功能,但尚未发现其直接调控果实的研究报道。此外,乙烯作为重要的植物激素,其信号转导途径与 MYB 转录因子密切相关。例如,PI-MYB308 通过调控牡丹乙烯合成调控花的衰老。R2R3-MYB 转录因子 RhMYB108 参与乙烯和茉莉酸诱导的玫瑰花瓣衰老过程。乙烯激活的 PpERF105 诱导抑制型 R2R3-MYB 基因 *PpMYB140* 的表达,抑制红梨花青素的生物合成。

在菠萝中,也初步开展了 R2R3-MYB 基因家族鉴定研究,发现菠萝顶端分生组织中多个 MYB 基因的表达受到乙烯利的诱导或抑制^[13]。其中的 S20 亚族基因与逆境胁迫响应相关,且受到乙烯诱导,*AcMYB108a* 在果实中的表达水平最高^[14]。基于前期研究结果,本研究提出乙烯介导 MYB 转录因子调控菠萝果实发育的科学假设。揭示菠萝中 MYB103 基因的结构与功能将有助于解析其在乙烯利催花菠萝果实发育过程中的功能。据此,本研究拟从广西南亚热带农业科学研究所引进的台农 17 果实中克隆菠萝转录因子 *AcMYB103*,采用生物信息学分析其编码蛋白结构并预测其功能;分析不同浓度梯度乙烯利处理菠萝品种果实后 *AcMYB103* 的表达规律,揭示 *AcMYB103* 在菠萝果实发育中的调控作用机制,为研发新型栽培调控技术打下坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 菠萝品种台农 17 号、小目手撕和大目手撕菠萝由广西南亚热带农业科学研究所(106°79'85"E, 22°34'12"N)提供。选取 3 个品种在体积分数为 0%、0.5%、1.0%和 1.5%乙烯利处理后的小果期、膨大期和成熟期的果实用于 *AcMYB103* 基因的表达分析。

1.1.2 菌株和试剂 基因克隆与表达分析所需的大肠杆菌 (*E. coli*) DH5- α 感受态、反转录试剂盒, SYBR 荧光染料等均购自南京诺唯赞公司^[15]。

1.2 方法

1.2.1 提取总 RNA 和 cDNA 的合成 菠萝果实 RNA 的提取参考天根多糖多酚试剂盒 (RNAprep pure Plant Kit) 说明书, 反转录及浓度测定参考徐健等^[15]的方法。提取 RNA 浓度与纯度采用微量核酸蛋白分析仪测定。

1.2.2 菠萝 *AcMYB* 转录因子家族系统进化树分析 基于菠萝基因组数据库, 使用 HMMER 3.1 对 MYB DNA 结合域 PF00249 进行隐马尔可夫模型 (Hidden Markov Model, HMM) 搜索。所有候选 *AcMYB* 采用 NCBI 在线分析和 DNAMAN 软件进行评估, 去除冗余序列。将鉴定出的菠萝 *AcMYB* 与拟南芥 *AtMYB* 采用最大简约法 (maximum parsimony)、泊松校正模型和 1000 个重复的自举检验 (bootstrap test), 利用 MEGA 11 软件进行系统发育分析。

1.2.3 克隆菠萝 R2R3-MYB 家族 *AcMYB103* 基因全长 利用 Primer primer6.0 软件设计克隆引物 *AcMYB103*-F: 5'-ACCCACCAACTTAGTTTCATCTCA-3', *AcMYB103*-R: 5'-TGGTCCTCCTACAGGTTGCT-3'; 设计荧光定量引物 *AcMYB103*-QF1: 5'-TACCGCCGATCATCTCAACG-3', *AcMYB103*-QR1: 5'-TTGCGAAGGTGAGCAGAGAG-3'。内参基因引物序列为 β -actin-QF1: 5'-CTGGCCTACGTGGCACTTGACTT-3', β -actin-QR1: 5'-CACTTCTGGGCAGCGGAACCTTT-3'。以反转录得到的菠萝品种健康果实 cDNA 为模板, 按照高保真酶 2 $\times$ Phanta Flash Master Mix 试剂盒说明书进行 PCR 扩增, 将 *AcMYB103* 目的条带按照 Omega Biotek(美国)胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 进行切胶回收, 回收产物连接零背景 pESI-Blunt 平末端载体, 后通过热击法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 经 PCR 检测后挑取阳性单

克隆测序验证。在 NCBI 中利用 Blast 的功能进行比对后命名^[15]。

1.2.4 *AcMYB103* 生物信息学分析和表达分析 对 *AcMYB103* 进行生物信息学预测分析, 利用 DNAMAN 多序列比对工具进行同源序列比对和相似性分析。表达分析以菠萝 β -actin 为内参基因, 采用染料法荧光定量 PCR 分析 *AcMYB103* 基因的表达模式。每个处理均进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

1.3 数据处理

AcMYB103 基因在不同菠萝品种和果实发育时期的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析计算, 使用单因素方差分析 ANOVA 和图基检验分析差异显著性, 使用 OriginPro2018 (Origin Lab Corporation, Massachusetts, USA) 软件制图^[15]。

2 结果与分析

2.1 菠萝 *AcMYB103* 基因的克隆

提取菠萝品种台农 17 号小果期健康果实的 RNA 反转录成的 cDNA 为模板, 采用引物 *AcMYB103*-F(5'-ACCCACCAACTTAGTTTCATCTCA-3') 和 *AcMYB103*-R(5'-TGGTCCTCCTACAGGTTGCT-3') 扩增出 *AcMYB103* 基因。基因全长为 1204 bp, 开放阅读框 (ORF) 长度为 1038 bp, 编码 345 个氨基酸, 其 5'端长度为 120 bp, 3'端长度为 46 bp。在第 67~114 位氨基酸位置有 2 个典型的 SANT 结构域, 与刺子莞 RpMYB 和椰子 CnMYB 等相似, 属于植物典型的 R2R3-MYB 转录因子 (图 1)。

2.2 菠萝 R2R3-MYB 转录因子家族的系统进化分析

利用 HMMER 3.1 软件对菠萝基因组进行 MYB 结构域基因的搜索, 经 SMART 和 Pfam 去除不具 MYB 转录因子保守结构域和冗余序列, 在菠萝中共鉴定出 103 个菠萝 R2R3-MYB 家族基因。将所获得属于 R2R3-MYB 家族的 103 个菠萝 *AcMYB* 转录因子与已知的 126 个拟南芥 *AtMYB* 转录因子进行进化树分析。根据拟南芥 MYB 家族对菠萝 MYB 家族进行分类, 结果显示, 将 103 个 *AcMYB* 家族基因分为 S1、S2、S3、S4、S6、S7、S10、S11、S12、S13、S14、S15、S16、S18、S19、S20、S22、S24、S25 19 个亚族 (图 2)。*AcMYB103* 与拟南芥 *AtMYB103* 相似度最高, 且与 *AtMYB80* 和 *AtMYB35* 共同聚为 S19 亚族。因

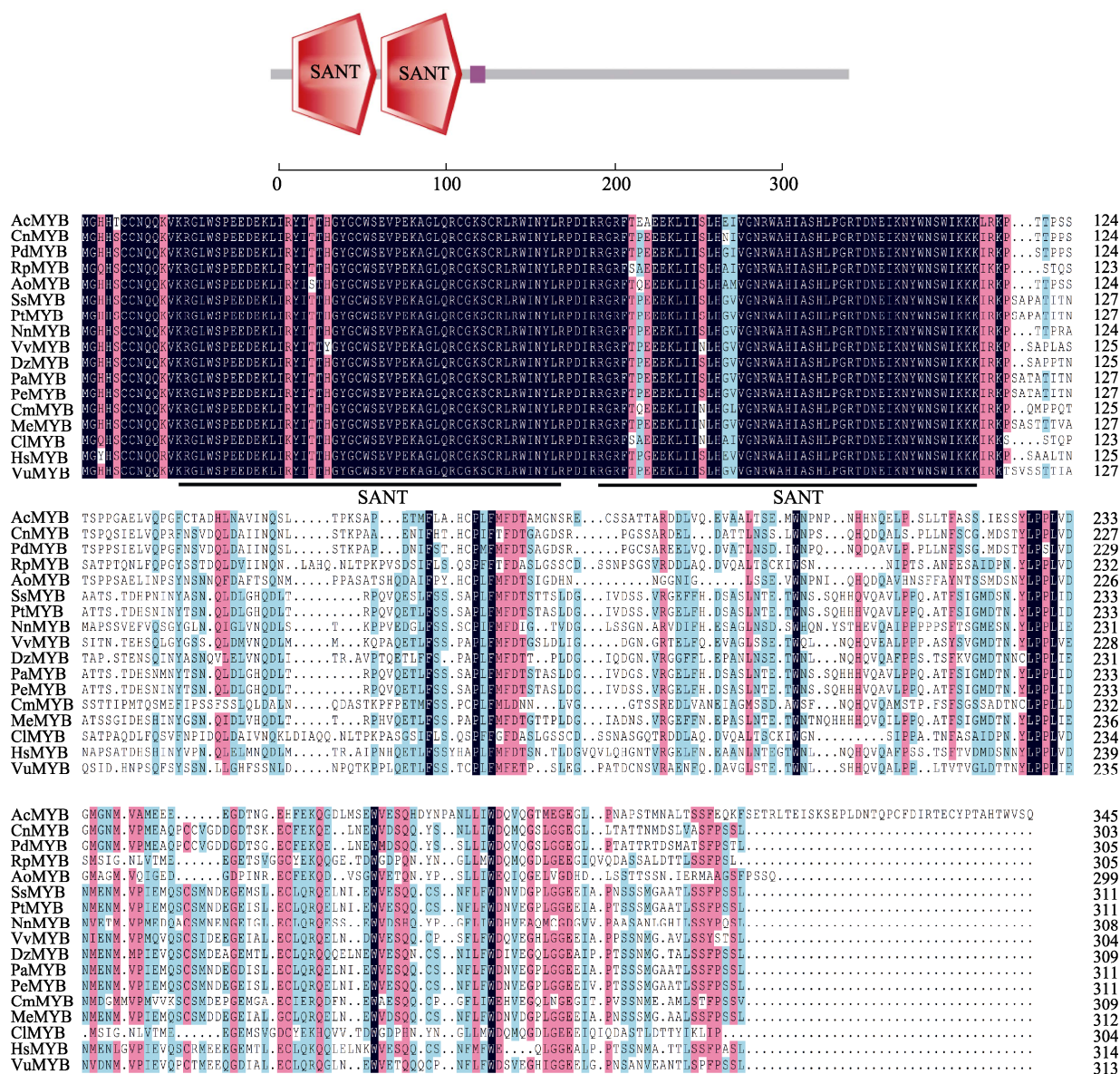


图 1 AcMYB103 蛋白与其他植物 MYB 蛋白序列聚类分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of AcMYB103 and other plant MYB proteins

相同基因家族的 MYB 转录因子具有相似的结构与功能。除了 AtMYB103 具有调控花药和根毛发育的功能外。MYB80 转录因子是拟南芥花粉发育和绒毡层程序性细胞死亡调控所必需的转录因

子,且在作物中功能保守。目前,已经在拟南芥、棉花和油菜中均证明了其功能。AtMYB35 功能尚未见报道,但在芦笋中推测其是一个决定芦笋性别的候选基因。推测 AcMYB103 在果实发育中具

CnMYB: 椰子-KAG1359284.1; PdMYB: 海枣-XP_008797178.1; RpMYB: 刺子莞-KAJ4733963.1; AoMYB: 芦笋-XP_020241891.1; SsMYB: 簸箕柳-KAG5249367.1; PtMYB: 毛果杨-XP_002304517.1; NnMYB: 大紫玉-XP_010261333.1; VvMYB: 葡萄-XP_002273004.1; DzMYYB: 榴莲-XP_022773261.1; PaMYB: 银白杨-XP_034887886.1; PeMYB: 胡杨-XP_011022623.1; CmMYB: 沉水樟-RWR87806.1; MeMYB: 木薯-XP_021622927.1; CIMYB: 康藏蒿草-KAF3325127.1; HsMYB: 木槿-XP_039068173.1; VuMYB: 豇豆-QCD85070.1。黑色、粉色、蓝色区域分别表示氨基酸序列相似度 100%、75%、50%。

CnMYB: *Cocos nucifera*-KAG1359284.1; PdMYB: *Phoenix dactylifera*-XP_008797178.1; RpMYB: *Rhynchospora pubera*-KAJ4733963.1; AoMYB: *Asparagus officinalis*-XP_020241891.1; SsMYB: *Salix suchowensis*-KAG5249367.1; PtMYB: *Populus trichocarpa*-XP_002304517.1; NnMYB: *Nelumbo nucifera*-XP_010261333.1; VvMYB: *Vitis vinifera*-XP_002273004.1; DzMYYB: *Durio zibethinus*-XP_022773261.1; PaMYB: *Populus alba*-XP_034887886.1; PeMYB: *Populus euphratica*-XP_011022623.1; CmMYB: *Cinnamomum micranthum f. kanahirae*-RWR87806.1; MeMYB: *Manihot esculenta*-XP_021622927.1; CIMYB: *Carex littledalei*-KAF3325127.1; HsMYB: *Hibiscus syriacus*-XP_039068173.1; VuMYB: *Vigna unguiculata*-QCD85070.1. The black, pink and blue parts indicate that the amino acid sequences have 100%, 75% and 50% similarity, respectively.

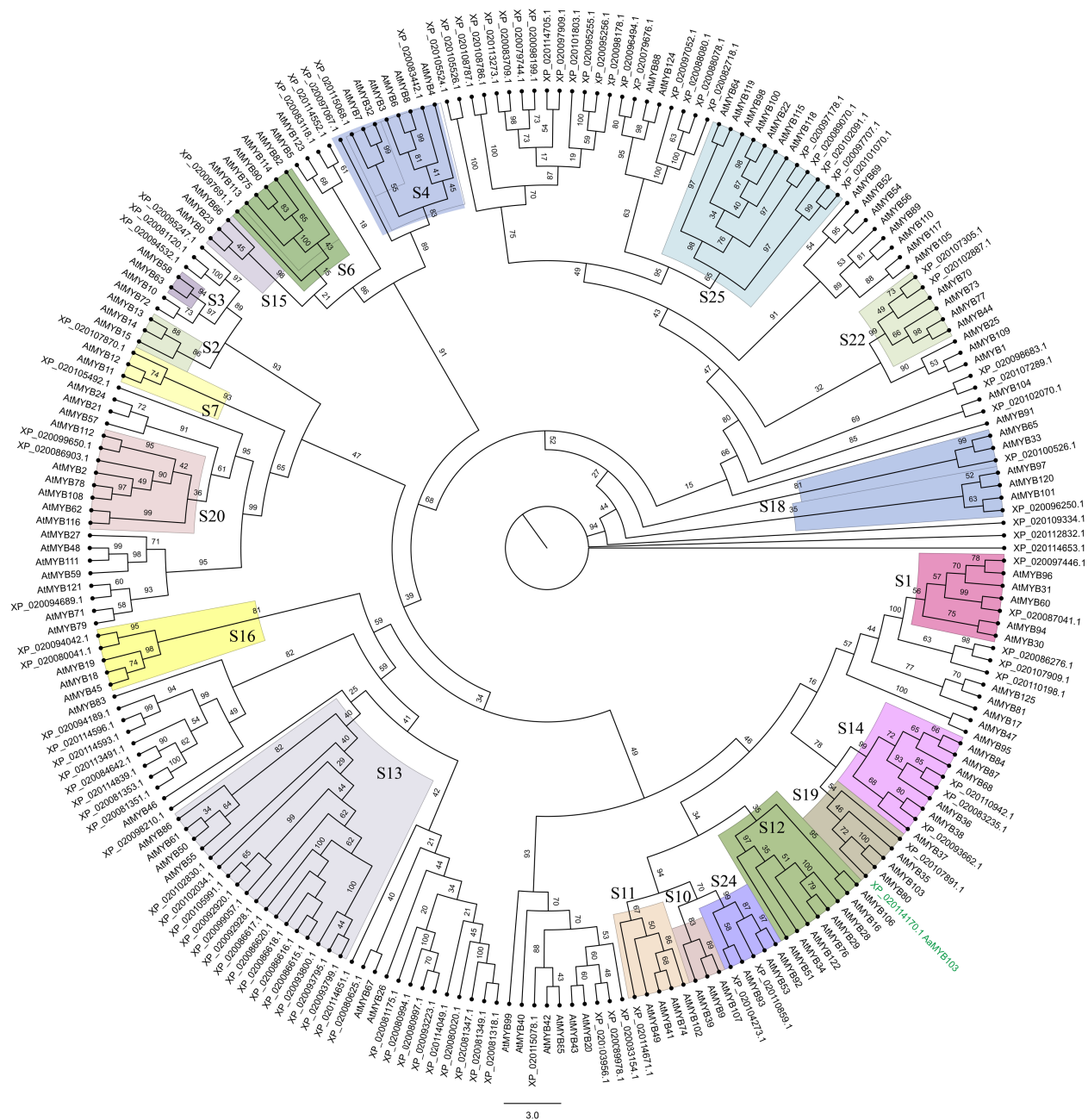


图 2 菠萝和拟南芥 R2R3-MYB 转录因子家族系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of pineapple and *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factor family

有调控作用。

2.3 *AcMYB103* 蛋白的同源性分析

从图 3 可以看出，其他植物的 MYB 蛋白一般具有 6 个特异性基序，即基序 1：EDEKLIRY-ITTHGYGCWSEVPEKAGLRQCGKSCRLRWINYLRPDIRRGFR，基序 2：TPEEEKLIISLHGVVGNR-WAHIASHLPGRTDNEIKNYWNSWIKKKIRKPS，基序 3：MGHHSCCNQQKVKRG，基序 4：HHQQ-AVLPPQATFSSGMDTNY，基序 5：NMENMVPIE-VQSCSMBDEGEISLECLRQ，基序 6：WVESQQ-

CSNFLFWQVZGPLG。菠萝 *AcMYB103* 与刺子莞 *RpMYB*、康藏嵩草 *CIMYB* 和芦笋 *AoMYB* 聚在一起，缺少基序 5 结构域，说明其是 R2R3-MYB 家族成员之一（图 3）。

2.4 *AcMYB103* 基因编码氨基酸生物信息学分析

利用 ProtParam 工具在线分析 *AcMYB103* 编码蛋白的理化性质：分子式 $C_{1702}H_{2622}N_{478}O_{534}S_{21}$ ，总原子数 5357，分子量为 38 997.68 Da，等电点为 5.33，总平均亲水性为 -0.644，不稳定系数为 52.35，推测 *AcMYB103* 蛋白是一个不稳定的疏

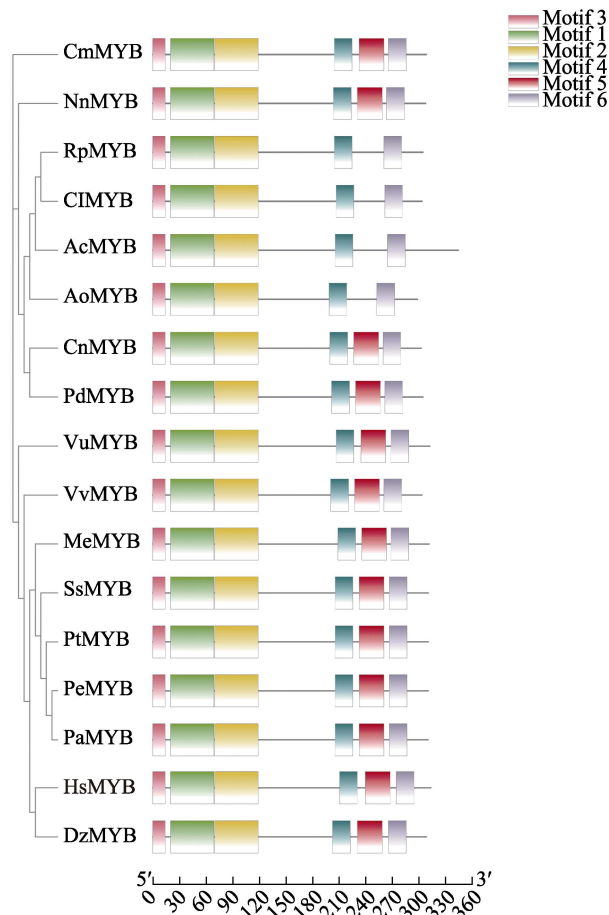


图 3 *AcMYB103* 与其他植物 MYB 蛋白氨基酸序列进化分析和基序分析

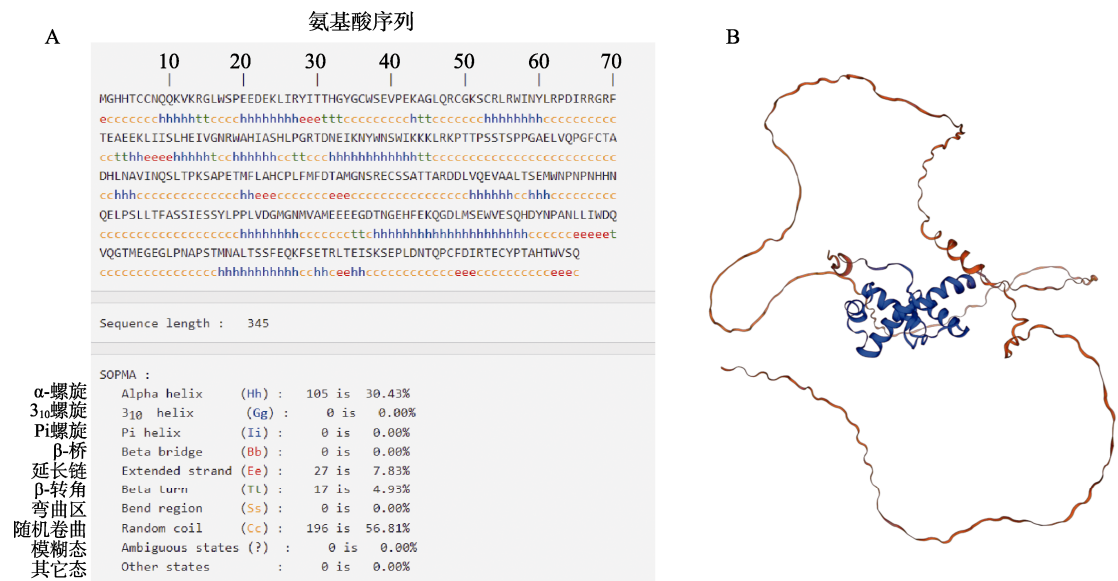
Fig. 3 Amino acid sequence evolutionary analysis and motif analysis of *AcMYB103* and other plant MYB proteins

水性蛋白。利用 SOPMA 分析 *AcMYB103* 蛋白的二级结构富含 α -螺旋和随机卷曲结构 (图 4A)。利用 PHYRE 预测 *AcMYB103* 的三级结构与其二级结构相符合 (图 4B), 属于典型的 R2R3-MYB 转录因子。

利用 TMHMM-2.0 在线工具分析预测表明 *AcMYB103* 蛋白无跨膜结构 (图 5A)。利用 ProtScale 工具证明它是疏水性蛋白 (图 5B)。利用 SignalP-5.0 Server 分析预测 *AcMYB103* 存在信号肽的概率是 0.0009, 无信号肽 (图 5C)。NetPhos 3.1 磷酸化位点分析结果发现 *AcMYB103* 蛋白共有 35 个可能发生磷酸化的位点, 表明 *AcMYB103* 蛋白在细胞信号转导过程中起重要作用 (图 5D)。DeepLoc-1.0 预测 *AcMYB103* 蛋白定位于细胞核中, 证明 *AcMYB103* 是定位在细胞核中的转录因子蛋白。

2.5 乙烯利处理菠萝果实中 *AcMYB103* 表达分析

乙烯利是乙烯商用的释放剂, 其在菠萝催花过程中具有明显的剂量效应。例如, 台农 17 的夏季催花的最佳配方是 1.0%~2.0% 电石 2 次+0.6% 乙烯利 1 次。台农 16 的乙烯利安全使用浓度为 1.0%~1.5%。为了解析不同浓度梯度乙烯利处理广西 3 个栽培品种的 3 个时期的菠萝果实中 *AcMYB103* 基因表达规律, 采用 RT-qPCR 技术进行表达模式分析。从图 6 中可以看出, 在小果期

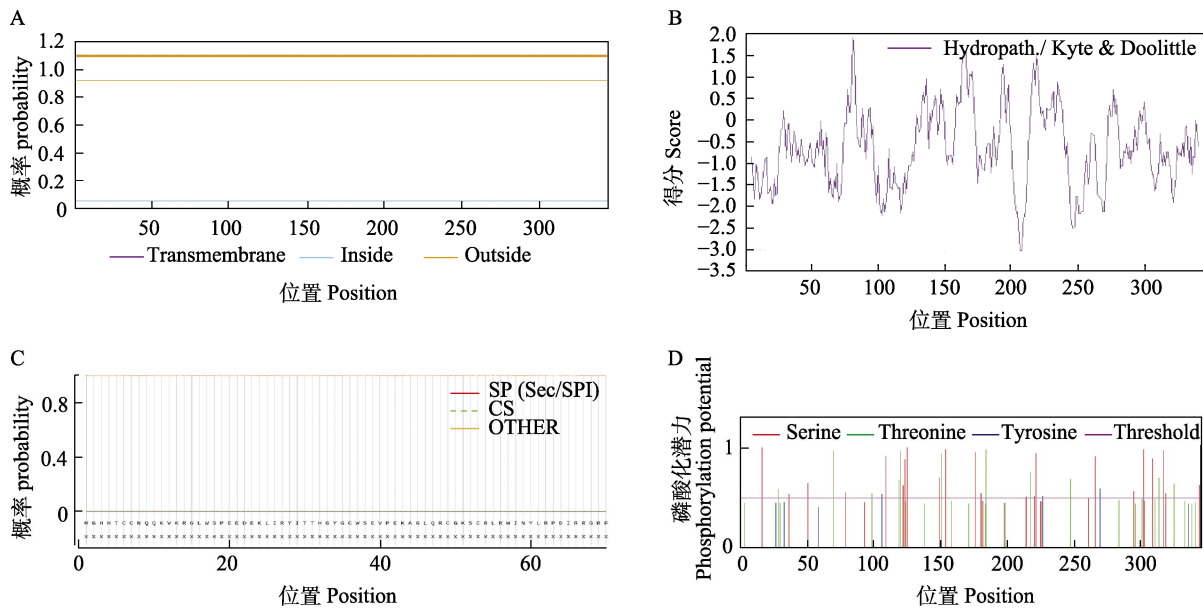


A: 二级结构预测; B: 三级结构预测。

A: Prediction for the secondary structure; B: Prediction for the tertiary structure.

图 4 *AcMYB103* 结构和保守结构域分析

Fig. 4 Structural analysis and the conserved domains of *AcMYB103*

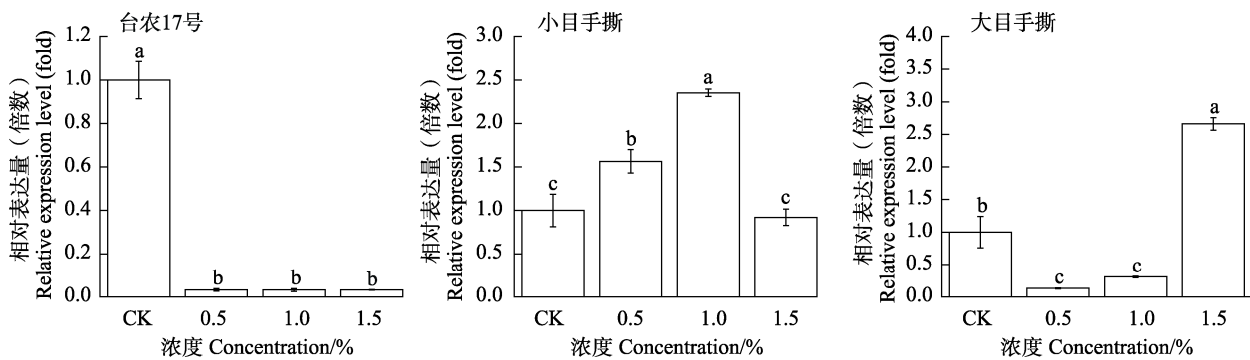


A: 跨膜分析; B: 亲水性分析; C: 信号肽分析; D: 磷酸化分析。
A: Transmembrane analysis; B: Hydrophilic analysis; C: Signal peptide analysis; D: Phosphorylation analysis.
图 5 *AcMYB103* 蛋白特性分析

Fig. 5 Analysis of the *AcMYB103* protein properties

随着乙烯利处理浓度提高, 台农 17 号菠萝品种 *AcMYB103* 基因表达呈下调规律。小目手撕品种呈先上升后下降的规律, 在 1% 乙烯利浓度下表达量是 CK 的 2.35 倍 ($P<0.05$)。大目手撕品种则是 1.5% 乙烯利浓度下表达最高, 是 CK 的 2.66 倍 ($P<0.05$) (图 6)。而在膨大期随着乙烯利处理浓度的提高, 台农 17 号菠萝品种 *AcMYB103* 基因

表达呈下调规律。小目手撕品种中 *AcMYB103* 基因表达也呈现下降的规律。大目手撕品种则是 1% 乙烯利浓度下表达最高, 是 CK 的 8.13 倍 ($P<0.05$) (图 7)。成熟期果实中, 3 个品种的 *AcMYB103* 基因均无表达。说明 *AcMYB103* 基因表达在乙烯利处理的品种和果实发育时期具有特异性。



不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

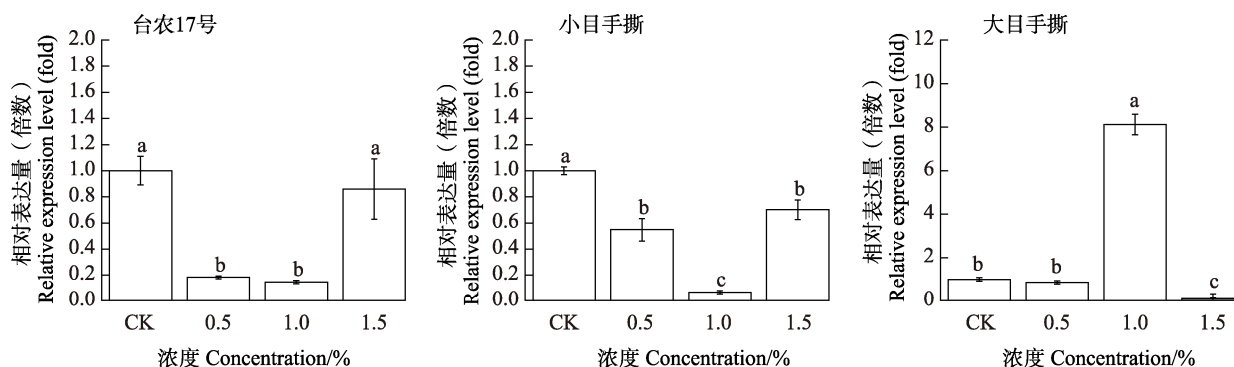
图 6 *AcMYB103* 在乙烯利处理下 3 个品种小果期的表达规律

Fig. 6 Expression patterns of *AcMYB103* at small fruit stage of 3 pineapple varieties under ethephon treatment

3 讨论

菠萝水心病是近几年随着栽培技术和环境改变而产生的菠萝果实新病害, 在苹果和梨中已有报道^[16-17]。在菠萝中发现这个病害具有明显的品

种特异性。例如, 台农 17 号菠萝果实水心病发病率明显高于其他品种, 同时不同年份果实的发病程度也存在差异。研究表明, 菠萝品种巴厘水心病果中内源激素玉米素 (ZT)、茉莉酸 (JA) 和脱



不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 7 *AcMYB103* 在乙烯利处理下 3 个品种膨大期的表达规律

Fig. 7 Expression patterns of *AcMYB103* at expansion fruit stage of 3 pineapple varieties under ethephon treatment

落酸 (ABA) 含量均比对照显著下降, 且随着发病程度的加深下降幅度增加^[18]。目前, 在梨和苹果中也尚处在初步研究阶段。在梨品种 Akibae 水心病果的转录组研究中, 发现参与乙烯合成的 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 (ACO) 基因、1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶 (ACS) 和脱落酸合成的短链醇脱氢酶 (SDR) 和醛氧化酶 (AAO) 基因表达显著上调^[19]。施用硼处理梨水心病感病品种, 发现施用硼增加了梨果实淀粉降解、脂肪酸合成、IAA (吲哚-3-乙酸) 降解和 GA (赤霉素) 合成基因的表达, 抑制了乙烯合成基因的表达^[20]。可见, 果实内乙烯合成与水心病发病呈正相关。由于乙烯是菠萝有效的催花和座果剂^[3, 21], 因此有必要深入解析乙烯对菠萝果实发育的调控机制, 阐明菠萝水心病发病机制。

R2R3-MYB 转录因子在植物生长发育和转录调控中具有重要作用, 并与乙烯信号转导机制紧密相关^[22-23]。其中, *AtMYB103/AtMYB80* 在植物生长发育过程中具有重要作用, 且该基因功能多样。早期发现其调控绒毡层发育、胼胝质溶解和外界形成^[9]。随后, 又证明它和 MYB85、MYB52、MYB54 诱导次生壁生物合成基因表达有关。其功能贯穿于花药发育过程中的细胞壁修饰、脂质代谢途径和信号转导途径, 还可能与小孢子发生有关。除了拟南芥, 相继在棉花^[24]、烟草^[25]和水稻^[10]等植物中证明了其功能。本研究从菠萝果实中克隆的 *AcMYB103* 基因含有特征性的 SANT 结构域, 与其他植物 MYB 家族成员高度同源, 是典型的 R2R3-MYB 转录因子。前期研究表明, 菠萝基因组含有 103 个 R2R3-AcMYB 转录因子, *AcMYB10* 属于 S22 亚族^[13]这与本研究结果不一

致, 因为本研究从基因组中克隆该基因, 与多种植物基因进行对比, 然后与拟南芥 R2R3-MYB 家族成员进行对比, 最终重新命名为 *AcMYB103*。该命名更加准确, 便于进一步深入研究。在乙烯利处理的不同菠萝品种 3 个时期的表达规律表明, 其在水心病敏感品种台农 17 中受乙烯利诱导下调表达, 在小目手撕和大目手撕品种中上调表达, 说明其在菠萝果实发育中具有重要作用。此外, *AcMYB103* 基因在果实发育早期表达, 而在成熟期完全不表达, 说明其是早期调控果实发育的转录因子。这与前人在油菜中的研究结果相符, 将油菜 MYB80 与 EAR 融合后, 转基因油菜表现出绒毡层过早降解和花粉败育^[26]。5 个 MYB80 同源物都共享一个氨基酸序列, 紧邻 R2R3 结构域, 证明其在多种作物中结构和功能保守^[11, 25]。本研究发现 *AcMYB103* 与拟南芥 *AtMYB80*、*AtMYB103* 和 *AtMYB35* 相似度最高, 说明 *AcMYB103* 基因表达在乙烯利处理的品种和果实发育时期具有时空特异性, 与其家族成员在植物发育调控中功能保守的结果一致^[27-28]。本研究为深入探讨 *AcMYB103* 基因在菠萝果实生长发育调控机制中奠定基础, 也为菠萝水心病的防控提供技术指导。

参考文献

- [1] YI W, LUAN A, LIU C, WU J, ZHANG W, ZHONG Z, WANG Z, YANG M, CHEN C, HE Y. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of GRF transcription factors in pineapple (*Ananas comosus*)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1159223.
- [2] ZHAO H, MAOKAI Y, CHENG H, GUO M, LIU Y, WANG L, CHAO S, ZHANG M, LAI L, QIN Y. Characteri-

- zation of auxin transporter AUX, PIN and PILS gene families in pineapple and evaluation of expression profiles during reproductive development and under abiotic stresses[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11410.
- [3] ZHANG H, PAN X, LIU S, LIN W, LI Y, ZHANG X. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors in pineapple reveals functional divergence during flowering induction mediated by ethylene and floral organ development[J]. *Genomics*, 2021, 113(2): 474-489.
- [4] OGRODOWICZ P, KUCZYŃSKA A, KRAJEWSKI P, KEMPA M. The effects of heading time on yield performance and *HvGAMYB* expression in spring barley subjected to drought[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2023, 64(2): 289-302.
- [5] MUHAMMAD N, LUO Z, ZHAO X, YANG M, LIU Z G, LIU M J. Transcriptome-wide expression analysis of *MYB* gene family leads to functional characterization of flavonoid biosynthesis in fruit coloration of *Ziziphus* Mill[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1171288.
- [6] 李世佳, 吕紫敬, 赵锦. 枣 R2R3-MYB 亚家族基因鉴定及其在果实发育中的表达分析[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(6): 1199-1212.
- LI S J, LYU Z J, ZHAO J. Identification of R2R3-MYB subfamily in Chinese jujube and their expression pattern during the fruit development[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(6): 1199-1212. (in Chinese)
- [7] CHOPY M, BINAGHI M, CANNAROZZI G, HALITSCHKE R, BOACHON B, HEUTINK R, BOMZAN D P, JAGGI L, VAN GEEST G, VERDONK J C, KUHLEMEIER C. A single MYB transcription factor with multiple functions during flower development[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(5): 2007-2025.
- [8] LIU C, XIE T, CHEN C, LUAN A, LONG J, LI C, DING Y, HE Y. Genome-wide organization and expression profiling of the R2R3-MYB transcription factor family in pineapple (*Ananas comosus*)[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 503.
- [9] ZHANG Z B, ZHU J, GAO J F, WANG C, LI H, LI H, ZHANG H Q, ZHANG S, WANG D M, WANG Q X, HUANG H, XIA H J, YANG Z N. Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2007, 52(3): 528-538.
- [10] WU L, ZHANG M, ZHANG R, YU H, WANG H, LI J, WANG Y, HU Z, WANG Y, LUO Z, LI L, WANG L, PENG L, XIA T. Down-regulation of OsMYB103L distinctively alters beta-1,4-glucan polymerization and cellulose microfibrils assembly for enhanced biomass enzymatic saccharification in rice[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 245.
- [11] PHAN H A, LI S F, PARISH R W. MYB80, a regulator of tapetal and pollen development, is functionally conserved in crops[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(1/2): 171-183.
- [12] TSUGAMA D, MATSUYAMA K, IDE M, HAYASHI M, FUJINO K, MASUDA K. A putative MYB35 ortholog is a candidate for the sex-determining genes in *Asparagus officinalis*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 41497.
- [13] 陈哲, 胡福初, 阮城城, 范鸿雁, 郭利军, 张治礼. 菠萝 R2R3-MYB 基因家族鉴定与表达分析[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(10): 1958-1971.
- CHEN Z, HU F C, RUAN C C, FAN H Y, GUO L J, ZHANG Z L. Bioinformatics and gene expression analysis of pineapple R2R3-MYB gene family[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(10): 1958-1971. (in Chinese)
- [14] 贺涵, 刘传和, 邵雪花, 赖多, 匡石滋, 肖维强. 菠萝 R2R3-MYB 基因家族 S20 亚族的鉴定[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(12): 117-127.
- HE H, LIU C H, SHAO X H, LAI D, KUANG S Z, XIAO W Q. Identification of S20 subgroup of R2R3-MYB superfamily of *Ananas comosus* L. Merr[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2022, 50(12): 117-127. (in Chinese)
- [15] 徐健, 韦巧云, 赵静, 樊松乐, 黄丽君, 罗晟昇, 蒋娟娟. 菠萝 *AcMYB44* 基因的克隆及植物表达载体构建[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(22): 7453-7460.
- XU J, WEI Q Y, ZHAO J, FAN S L, HUANG L J, LUO S S, JIANG J J. Cloning and expression vector construction of *AcMYB44* gene from *Ananas comosus*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(22): 7453-7460. (in Chinese)
- [16] WADA H, NAKATA K, NONAMI H, ERRA-BALSELLS R, TATSUKI M, HATAKEYAMA Y, TANAKA F. Direct evidence for dynamics of cell heterogeneity in watercored apples: turgor-associated metabolic modifications and within-fruit water potential gradient unveiled by single-cell analyses[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 187.
- [17] LIU X, LIU D H, SHEN Y, LIU J, WEI J, WANG C L. Transcriptome changes associated with boron applications in fruits of watercore-susceptible pear cultivar[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(12): 12055-12061.
- [18] 姚艳丽, 付琼, 周迪, 朱祝英, 杨玉梅, 张秀梅. 水心病菠萝果实生理指标和内源激素含量变化[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(9): 2587-2593.
- YAO Y L, FU Q, ZHOU D, ZHU Z Y, YANG Y M, ZHANG X M. Changes of physiological indexes and endogenous hormone content of watercore pineapple fruit[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(9): 2587-2593. (in Chinese)
- [19] LIU X, FAN H M, LIU D H, LIU J, SHEN Y, ZHANG J,

- WEI J, WANG C L. Transcriptome and metabolome analyses provide insights into the watercore disorder on “Akibae” pear fruit[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4911.
- [20] LIU X, LIU D H, CHEN T, ZHANG J, WANG C L. Watercore pear fruit respiration changed and accumulated γ -aminobutyric acid (GABA) in response to inner hypoxia stress[J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(6): 977.
- [21] RUAN C C, CHEN Z, HU F C, FAN W, WANG X H, GUO L J, FAN H Y, LUO Z W, ZHANG Z L. Genome-wide characterization and expression profiling of B3 superfamily during ethylene-induced flowering in pineapple (*Ananas comosus* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 561.
- [22] XING G, LI J, LI W, LAM S M, YUAN H, SHUI G, YANG J. AP2/ERF and R2R3-MYB family transcription factors: potential associations between temperature stress and lipid metabolism in *Auxenochlorella protothecoides*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 22.
- [23] LIU M Y, YANG H, FAN S L, GUO B B, DAI L J, WANG L F, WANG M. Genome-wide identification and expression analysis of the R2R3-MYB gene family in rubber trees[J]. *Forests*, 2023, 14(4): 710.
- [24] MACMILLAN C P, BIRKE H, CHUAH A, BRILL E, TSUJI Y, RALPH J, DENNIS E S, LLEWELLYN D, PETTOLINO F A. Tissue and cell-specific transcriptomes in cotton reveal the subtleties of gene regulation underlying the diversity of plant secondary cell walls[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 539.
- [25] VERMA N, BURMA P K. Regulation of tapetum-specific A9 promoter by transcription factors AtMYB80, AtMYB1 and AtMYB4 in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*[J]. *Plant Journal*, 2017, 92(3): 481-494.
- [26] XU Y, IACUONE S, LI S F, PARISH R W. MYB80 homologues in *Arabidopsis*, cotton and *Brassica*: regulation and functional conservation in tapetal and pollen development[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 278.
- [27] HIGGINSON T, LI S F, PARISH R W. AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2003, 35(2): 177-192.
- [28] ZHU J, ZHANG G, CHANG Y, LI X, YANG J, HUANG X, YU Q, CHEN H, WU T, YANG Z. AtMYB103 is a crucial regulator of several pathways affecting *Arabidopsis* anther development[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(9): 1112-1122.