园艺学报，2020，47 (10)：1999 – 2008.
Acta Horticulturae Sinica
doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2019-0996；http：//www. ahs. ac. cn

‘越心’草莓组培突变体着色差异的分子机理初探

杨肖芳[1]，张祖瑛[2]，苗立祥[1]，张豫超[1]，沈　岚[3]，秦巧平[4,*]，蒋桂华[1,*]

（[1]浙江省农业科学院园艺研究所，杭州 310021；[2]浙江大学园艺系，杭州 310058；[3]宁波市农业科学研究院，浙江宁波 315040；[4]上海应用技术大学生态技术与工程学院，上海 201418）

摘　要：初步探讨了在‘越心’草莓（*Fragaria* × *ananassa*‘Yuexin’）茎尖离体培养再生植株中发现的稳定变异突变体着色差异的分子机理。分析结果显示，突变体与‘越心’在植株形态、始花期、始果期、始熟期、单果质量、平均株产、果形、风味等方面均无明显差异；而突变体外果皮色泽较淡，L^*值较高，a^*值较低，*H* 色度角值较大，颜色指数 *CIRG* 显著小，且果肉不着色（‘越心’果肉红色）。突变体果实总花青苷含量为‘越心’的 13.2%，其中以天竺葵素 – 3 – *O* – 葡萄糖苷（Pg3G）含量差异最大，突变体 Pg3G 含量仅为‘越心’的 12.9%。花青苷合成途径结构基因 *FaF3H*、*FaCHS*、*FaDFR*、*FaANS*、*FaCHI*、*Fa3GT* 的表达水平在突变体中显著降低，这可能是突变体成熟果实花青苷水平显著低于‘越心’的直接原因。*FaMYB10* 和 *FaMYB1* 在突变体中的表达水平显著下降，且 *FaMYB10* 在几个主成分中的特征向量绝对值均显著较高，进一步证实了 *MYB10* 是草莓成熟过程中花青苷合成的类黄酮或苯丙烷类化合物途径主要调节因子之一。提取叶片基因组 DNA 进行基于 KASP 标记的基因分型结果显示，74 对 KASP 引物在‘越心’草莓及其突变体中的基因分型不存在差异。本结果初步证实突变导致参与调控花青苷合成途径的关键基因表达发生显著下调从而使花青苷积累显著减少，果实着色变淡。

关键词：草莓；组培；突变体；花青苷；果实品质

中图分类号：S 668.4　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0513-353X（2020）10-1999-10

Preliminary Analysis on the Molecular Differences of Fruit Colouring Between Yuexin Strawberry and Its Somaclonal Mutation

YANG Xiaofang[1]，ZHANG Zuying[2]，MIAO Lixiang[1]，ZHANG Yuchao[1]，SHEN Lan[3]，QIN Qiaoping[4,*]，and JIANG Guihua[1,*]

（[1]*Institute of Horticulture*，*Zhejiang Academy of Agricultural Sciences*，*Hangzhou* 310021，*China*；[2]*Department of Horticulture*，*Zhejiang University*，*Hangzhou* 310058，*China*；[3]*Ningbo Academy of Agricultural Sciences*，*Ningbo*，*Zhejiang* 315040，*China*；[4]*School of Ecological Technology and Engineering*，*Shanghai Institute of Technology*，*Shanghai* 201418，*China*）

Abstract：*Fragaria* × *ananassa*‘Yuexin’is a new strawberry cultivar selected by our group. The *Yuexin mutant* is a stable somaclonal variation from Yuexin found in the regeneration plants differentiated

收稿日期：2020 – 03 – 20；**修回日期：**2020 – 07 – 16

基金项目：浙江省科技厅重点研发计划项目（2016C02052-8）；浙江省团队特派员项目；浙江省公益技术研究计划项目（LGN20C150008）；宁波市“科技创新 2025”重大专项（2019B10021）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：jgh2004267@sina.com，qinqp@sit.edu.cn）

stem apex. The results showed that there were no significant differences between Yuexin and its mutant in plant morphology，onset of blooming and fruit，onset of fruit ripening，average fruit weight and plant yield，fruit shape and fruit flavor，etc. However，compared with Yuexin，the pricarp of its mutant was brighter with higher L^* and lower a^*，greater *H* and less *CIRG* index，and the mutant had colorless pulp. The total content of anthocyanin in the mutant was only 13.2% of Yuexin，of which the largest difference was the content of geranium-3-*O*-glucoside（Pg3G），the content of Pg3G in the mutant was only 12.9% of Yuexin. The expression levels of the structural genes *FaF3H*，*FaCHS*，*FaDFR*，*FaANS*，*FaCHI* and *Fa3GT* involved in the anthocyanin synthesis pathway were significantly reduced in the mutant fruit，indicating the possible direct factors that resulting in the lower levels of anthocyanin in the mutant. The expression levels of the transcription factors *FaMYB10* and *FaMYB1* in Yuexin mutant were decreased significantly，and the eigenvector absolute values of *FaMYB10* in several principal components were significantly higher than other factors，which further proved that *MYB10* was one of the main regulating factors involved in flavonoids/phenylpropanoids of anthocyanin pathway during strawberry maturation. KASP analysis using leaf genomic DNA showed that there was no genotype differentiation between Yuexin and its mutant based on 74 primer pairs amplification. The results in this study confirmed that the Yuexin mutant was genetically stable，and the mutation caused the significant decrease in the expression of key genes involved in the regulation of anthocyanin synthesis，resulting in decreasing of anthocyanin accumulation and reducing fruit coloration.

Keywords：strawberry；tissue culture；somaclonal mutation；anthocyanin；fruit quality

草莓（*Fragaria* × *ananassa*）生产中利用组培手段进行育苗已经广泛应用（崔孟媛，2017）。体细胞变异最早由美国科学家 Armin C. Braun 于 1959 年在烟草组培中发现，此后发现多种植物组培中均存在体细胞变异（Bairu et al.，2011）。研究发现，在草莓组培过程中即使不使用特殊诱导处理，也会发生体细胞变异，也称为组培变异（冯建荣 等，2001；张馨宇 等，2006；韩柏明 等，2010；Bairu et al.，2011；Neelakandan & Wang，2012；胡盼盼 等，2016）。组培变异具有两面性，有的导致植株性状变差，有的可以培育抗病性好、品质有改进的新品种（Krishna et al.，2016）。

影响草莓组培变异的原因很多，如外植体类型、培养基中植物生长调节剂种类与配比、继代时间和次数等，组培变异产生的内在机理可能与染色体异常、转座子活化等有关（Boxus et al.，2000）。组培体细胞变异常常引起果实品质变化，如色素、糖酸组成、香气组成等。深入了解再生植株的遗传稳定性和变异特点，分析各因子之间的关系，可为栽培及种质创新提供参考。韩柏明等（2010）的研究表明，草莓组培会导致 DNA 甲基化水平下降，甲基化模式的变异以去甲基化为主，在田间草莓组培苗的花序数、花数和结果数显著高于普通苗，这些表型变异与组培苗 DNA 甲基化水平和模式的变异之间具有一定相关性。梁烨等（2012）比较了‘幸香’草莓白肉突变体与野生型的生物学特性和品质，发现白肉突变体的果肉中花色素苷含量仅为野生型的 13.7%，而可溶性糖含量显著高于野生型，酚类物质含量也较高，香气物质含量增加，但植株在光合特性等方面没有明显差异。

2015 年本课题组在‘越心’草莓茎尖离体培养愈伤组织分化再生植株中发现 1 个果实着色变浅的变异，多年多点种植其表现稳定，植株长势、叶片大小、花序、始采期、果实大小与‘越心’基本一致，但是成熟果实果皮颜色浅，果肉不着色。本研究对比分析了‘越心’及其突变体植株形态、物候期、果实的色泽、花青苷等的差异，应用竞争性等位基因特异性 PCR 技术（Semagn et al.，2014），

即 KASP（KompetitiveAllele-Specific PCR）进行了分子生物学水平的探索，以期为草莓栽培及遗传育种提供更多理论支撑。

1　材料与方法

1.1　供试试验材料及形态学和物候期调查

‘越心’草莓及其突变体均种植于浙江省农业科学院杨渡科研创新基地。试验于 2018—2019 年进行，2018 年秋季移栽。每种材料选取长势健壮的 50 株于 2018 年秋冬—2019 年春进行物候期调查和形态学指标采集。采集幼嫩叶片用液氮冷冻后置于－80 ℃超低温冰箱中保存，用于基因组 DNA 提取。采集成熟果实（发育天数约 35 d，果面蒂部以上全部成红色）用于花青苷等指标和基因表达水平分析，采样后带回实验室，一部分立即测定鲜果色差值、糖、酸含量等，其余样品迅速切分、液氮冷冻后置于－80 ℃超低温冰箱中保存，用于其他指标分析。

1.2　色差指标测定及计算

用全自动测色色差计（ADCI-60-C，北京）对成熟果实进行色差测定，基于 CIE*Lab* 颜色系统进行色差值分析。测定时沿成熟果实的赤道部位分别从 4 个不同方向进行测定，读取果皮的亮度值（L^*）、红绿色差（a^*）、黄蓝色差（b^*）值，果皮测定结束后，沿果实最大纵径处切开，一分为二，测定果心周围的 L^*、a^*和 b^*值。测定结束后参照 Carreño 等（1995）的方法计算色度角（*H*）、色饱和度（*C*）、颜色指数（*CIRG*）。每种处理测定 20 个果实。

1.3　花青苷含量测定分析

将样品研磨成粉末，取 1 g 粉末，加入 5 mL 0.05%的盐酸—甲醇溶液中，置于 4 ℃黑暗条件下萃取 12 h，12 000 r · min^{-1} 离心 10 min，收集上清液。沉淀中再加入 5 mL 0.05%的盐酸—甲醇溶液，4 ℃萃取 6 h，合并两次上清液。收集的上清液用 0.22 μm 有机膜进行过滤，滤液 30 ℃蒸干，残渣用 1 mL 1 mmol · L^{-1} 盐酸—甲醇溶解后，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进行花青苷含量 HPLC 检测（王玲 等，2017）。

1.4　果实糖酸含量及组分分析

总可溶性固形物含量（Total soluble solids，TSS）采用手持式折光仪 ATAGO N-50E（ATAGO，日本）进行测定。采用酸碱滴定法进行可溶性酸（TA）含量测定；以苹果酸（毫克当量为 0.067 g）进行可滴定酸含量计算。每样品重复滴定 3 次。每处理测 10 个果实。果实糖组分采用高效液相色谱法（HPLC）测定（Qin et al.，2013）。

1.5　总 RNA 提取及基因表达定量分析

果实总 RNA 参照改良的 CTAB 方法进行提取（Chang et al.，1993），检测符合要求后，取 1 μg 总 RNA 进行逆转录及 Quantitative Real-time PCR（qRT-PCR，PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time，TaKaRa）。所用引物见表 1，内参为 *18S rRNA*。试验设置 3 次生物学重复。

表 1 本研究中所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

名称 Name	正向引物（5′－3′） Forward primer sequence	反向引物（5′－3′） Reverse primer sequence
CHS（查尔酮合成酶 Chalcone synthase 1-like）	GGCTCACCGTCGAGACCG	GGAGAAGATCACTCGAATCA
CHI（查尔酮黄烷酮异构酶 Chalcone-flavonone isomerase 1）	GCCGGAAATGGGAAAGTG	GCTCAGTTTCATGCCTTGAC
F3H（黄烷酮－3－羟化酶 Flavanone 3-hydroxylase）	CCCTAAGGTGGCCTACAACCAAT	CTTCTTGCAAATCTCAGCGC
DFR（二氢黄酮醇还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase）	CACGATTCACGACATTGCGAAATT	GAACTCAAACCCCATCTCTTTCAGCTT
ANS（花色素合成酶 Anthocyanidin synthase）	GAAGTGCGTACCCAACTCCATCGT	ACCTTCTCCTTGTTGACGAGCCC
3GT（类黄酮－3－*O*－葡萄糖基转移酶 UDP glucose：flavonoid-3-*O*-glucosyltransferase）	CCTGGCGCATGGTTCAGT	CGAGTTCCAACCGCAATGT
MYB10	AGACGGCTTCATACGCAAAGA	ATGAAGGTTCGTGGTCGAGG
MYB1	GGTCTCATCAGCCGATTCTG	GCAACTTGAGGATCAGCCAT
18S rRNA（*FaRIB413*）	ACCGTTGATTCGCACAATTGGTCATCG	TACTGCGGGTCGGCAATCGGACG

1.6 绝对定量转录组分析

采用 UMI 标记技术进行果实样品的绝对定量转录组测序（UMI-RNA-Seq）（Shiroguchi et al.，2012），测序读长为 PE150（Illumina HiSeq 4000，杭州联川生物技术股份有限公司）。获得测序原始数据后进行过滤后得到 valid data，将 valid data 比对到本物种的参考基因组上，利用基因组位置及其 UMI 标签进行结果去重与校正，获取转录本信息并进行基因表达定量分析，基因表达丰度采用 FPKM（Fragments Per Kilobase Million）方法进行标准化处理。设置 3 个生物学重复。

1.7 KASP 标记检测

采用 CTAB 法提取草莓叶片基因组 DNA。利用本课题组前期筛选的 KASP 标记进行基因分型检测。PCR 反应体系为 KASP Master mix 5 μL，KASP Primer mix 0.14 μL，模板 DNA 5 μL（20 ng · μL^{-1}）。PCR 反应条件为第 1 轮 94 ℃ 15 min；94 ℃ 20 s，61～55 ℃ 60 s，10 个 Touch Down 循环（每个循环降低 0.6 ℃）；第 2 轮 94 ℃ 20 s，55 ℃ 60 s，26 个循环。使用荧光微孔板检测仪检测 PCR 产物，通过 SNP Viewer 软件读取检测数据。

1.8 数据统计分析

统计分析采用 SPSS 22.0 进行。采用 *t* 检验法进行差异显著性假设测验。基因表达谱的主成分分析采用 SPSS 22.0 的降维—因子分析功能进行。

2 结果与分析

2.1 ‘越心’草莓与其突变体植株形态及物候期比较

植株形态调查结果（表 2）显示，种植在相同条件下的‘越心’草莓和其组培突变体的平均株高、叶面积、第 1 花序平均花朵数、花序梗长度均无显著差异，其外观及长势基本一致。物候期调查显示，两份材料的始花期均在 10 月 19、20 日，果实始熟期在 11 月下旬，果实发育天数约 35 d，无显著差异。成熟果实对比显示，二者果形均为短圆锥形，风味基本一致。糖组分分析显示，‘越心’与其突变体的果糖、蔗糖和葡萄糖含量差异不显著，可溶性固形物和总酸含量的差异也未达到显著水平。

表 2‘越心’与其突变体植株形态和物候期比较

Table 2　Comparison of plant and phenophase characters between Yuexin and *Yuexin mutant*

材料 Material	平均株高/cm Average plant height	叶长 × 叶宽/cm Leaf length × width	第 1 花序平均花朵数 Average number of flowers in the first inflorescence	花序梗长/cm Inflorescence stem length	始花期/d Oneset of blooming	始熟期/d Onset of ripening	平均株产/g Yield per plant	单果质量/g Average fruit weight
越心 Yuexin	20.3	8.6 × 7.7	14.0	23.0	10.19	11.22	415.9	14.7
越心突变体 *Yuexin mutant*	20.1	8.5 × 7.7	14.2	22.8	10.20	11.23	410.6	14.6

材料 Material	果形 Fruit shape	果色 Fruit color	风味 Flavor	可溶性固形物/% Total soluble solids	蔗糖含量/% Sucrose content	葡萄糖含量/% Glucose content	果糖含量/% Fructose content	总酸含量/% Total acid content
越心 Yuexin	短圆锥形 Short conical	浅红色 Light red	甜 Sweet	12.2	1.36	1.93	2.00	0.58
越心突变体 *Yuexin mutant*	短圆锥形 Short conical	浅红带黄 Light red with light yellow	甜 Sweet	11.9	1.55	1.82	1.88	0.57

注：材料间差异不显著。

Note：The difference is not significant.

2.2　果实色差指标对比分析与成熟果实花青苷含量及组分比较

观察果实着色情况（图 1），结合色差指标（图 2，A）分析可知，果皮 L^*值突变体 >‘越心’，即突变体果皮明亮，颜色偏浅，而‘越心’偏红色；b^*值二者差异不显著；*H* 值二者均 <50，且突变体 >‘越心’，即‘越心’红色显著深于其突变体；‘越心’*C* 值显著高于其突变体，即‘越心’果皮色彩较鲜明；‘越心’颜色指数 *CIRG* 显著高于其突变体。果肉部分的色差分析显示，突变体果肉明亮度显著大于‘越心’，果肉不着色，而‘越心’果肉红色（图 1；图 2，A）。

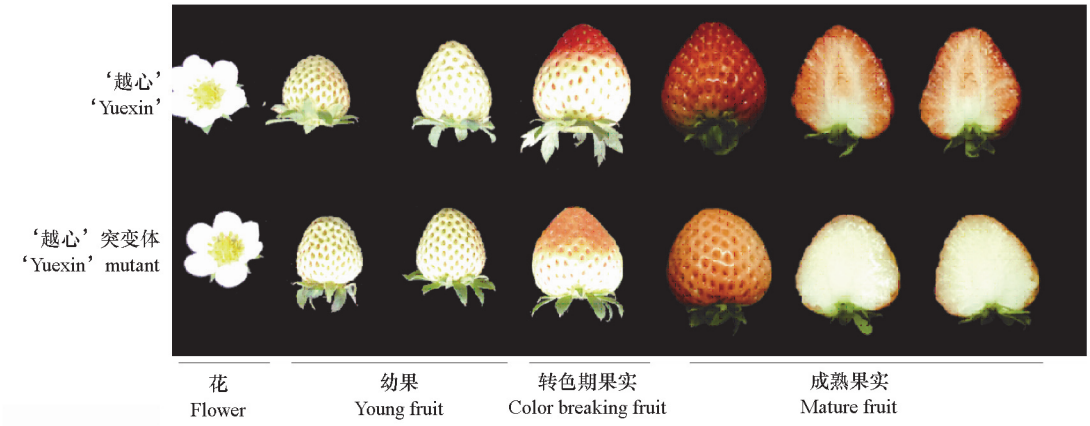

图 1　‘越心’草莓及其突变体果实着色比较

Fig. 1　Comparison of fruit coloring between‘Yuexin’strawberry and its mutant

成熟果实花青苷含量分析显示，突变体果实总花青苷含量 9.8 μg · g^{-1} FW，为‘越心’的 13.2%；突变体和‘越心’果实花青苷均以 Pg3G（天竺葵素－3－*O*－葡萄糖苷（Pelargonidin-3-*O*-glucoside）

为主，占总花青苷含量的 85.7%～87.8%；突变体 Pg3G 含量仅为‘越心’的 12.9%；两份材料均含有少量的 Pg3MG（天竺葵素－3－*O*－丙二酰葡萄糖苷，Pelargonidin-3-*O*-glucoside chloride）和 Cy3G（矢车菊素－3－葡萄糖苷，Cyanidin 3-glucoside），差异也达显著水平（图 2，B）。

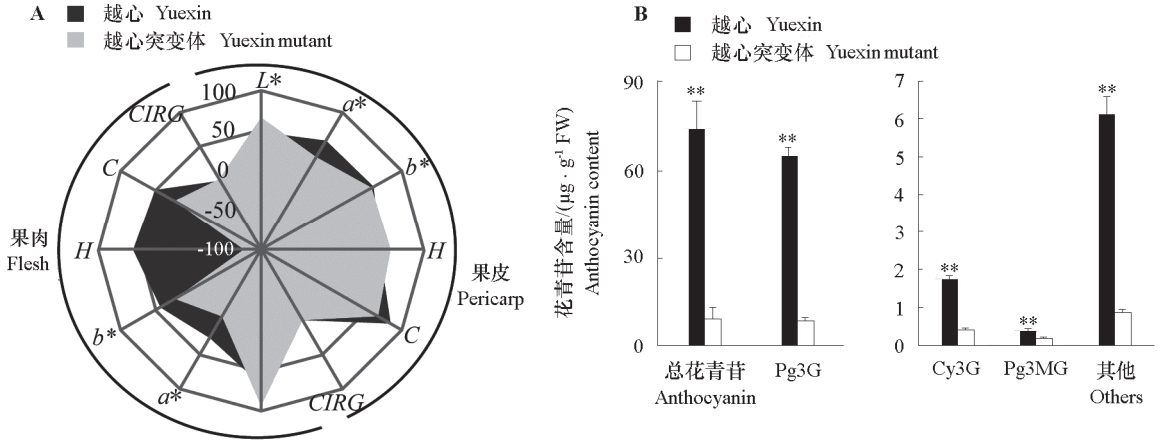

图 2 ‘越心’草莓和其组培突变体成熟果实的色度（A）及花青苷含量（B）比较

Fig. 2 Comparison of mature fruit chromaticity（A）and anthocyanin contents（B）in Yuexin strawberry and its mutant

* $\alpha = 0.05$；** $\alpha = 0.01$.

2.3 花青苷途径结构基因及调节基因差异表达分析

如图 3 所示，qRT-PCR 分析表明，花青苷途径结构基因 *FaCHS*、*FaCHI*、*FaF3H*、*FaDFR*、*FaANS* 和 *Fa3GT* 在‘越心’果实中的表达水平均显著或极显著高于其突变体；UMI-RNA-Seq 结果与 qRT-PCR 结果基本一致，*FaCHS*、*FaDFR*、*FaANS*、*FaCHI* 在两组样品中的表达水平差异达 5 倍以上。qRT-PCR 结果显示花青苷途径调节基因 *FaMYB10* 和 *FaMYB1* 的表达在两组样品中存在显著差异，而在 UMI-RNA-Seq 结果中 *FaMYB1* 差异未达显著水平，*FaMYB10* 差异超过 5 倍，突变体显著低于‘越心’。

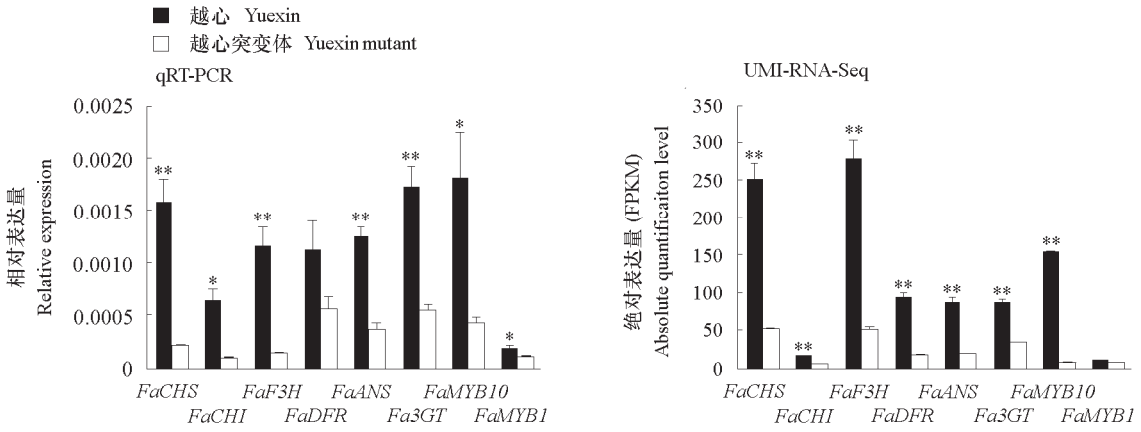

图 3 ‘越心’草莓和其突变体花青苷途径结构基因及调节基因的表达

Fig. 3 Expression of structural genes and regulatory genes involved in anthocyanin pathway in Yuexin strawberry and its mutant

* $\alpha = 0.05$；** $\alpha = 0.01$.

对基因表达谱进行主成分分析，结果（图 4）显示，在第 1 主成分中（PC1），*FaMYB10*、*FaCHS* 特征向量绝对值较高，其次为 *Fa3GT*；在第 2 主成分中（PC2），*FaMYB10* 特征向量绝对值最高，其次为 *FaF3H* 和 *FaDFR*；在第 3 主成分中（PC3）*FaDFR* 绝对值最高，其次为 *FaMYB10*，其他因子特征向量值均较低。

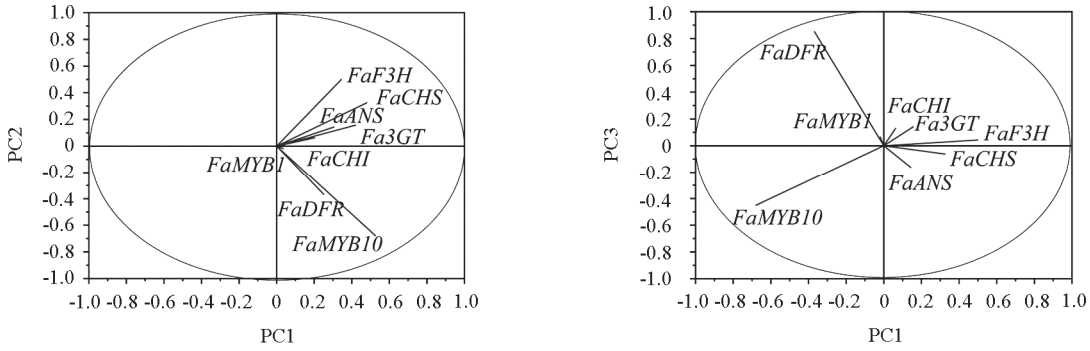

图 4　花青苷途径结构基因及调节基因的主成分分析分析

Fig. 4　PCA analysis of structural genes and regulatory genes involved in anthocyanin pathway

2.4　KASP 基因分型分析

为了从分子水平鉴定不同品种，本课题组前期开发了用于鉴定不同品种的 74 对 KASP 标记。本研究中，利用这些 KASP 标记对‘越心’及其突变株进行基因分型检测，结果（表 3）显示，两份材料检测位点中均未出现分型。

表 3　KASP 标记在‘越心’草莓和其组培突变体中的检测结果

Table3　KASP results from Yuexin strawberry and its mutant

KASP No.	越心 Yuexin	突变体 Mutant	KASP No.	越心 Yuexin	突变体 Mutant	KASP No.	越心 Yuexin	突变体 Mutant	KASP No.	越心 Yuexin	突变体 Mutant	KASP No.	越心 Yuexin	突变体 Mutant
216	TT	TT	294	CG	CG	347	GG	GG	417	AG	AG	456	AC	AC
222	GG	GG	298	TT	TT	348	CC	CC	421	AG	AG	459	TC	TC
236	AG	AG	301	TC	TC	351	GG	GG	423	AT	AT	461	TT	TT
240	AT	AT	307	AT	AT	358	TC	TC	424	TT	TT	466	AC	AC
246	TC	TC	309	TC	TC	364	TC	TC	425	CG	CG	469	AG	AG
250	AA	AA	312	TC	TC	366	CG	CG	427	AC	AC	470	TC	TC
252	CC	CC	313	TC	TC	367	CG	CG	428	AG	AG	472	TC	TC
253	GG	GG	315	AT	AT	376	AG	AG	438	AG	AG	473	AG	AG
257	GG	GG	317	GG	GG	381	AC	AC	442	CG	CG	474	CC	CC
264	GG	GG	319	AC	AC	384	TT	TT	443	AC	AC	479	AC	AC
269	TC	TC	328	AT	AT	387	TC	TC	444	AC	AC	481	TC	TC
280	AT	AT	331	GG	GG	391	AG	AG	447	AG	AG	484	TC	TC
288	AG	AG	333	AT	AT	393	TC	TC	450	TG	TG	488	TC	TC
290	TC	TC	342	AG	AG	406	AG	AG	451	AG	AG	496	AC	AC
292	TC	TC	344	AC	AC	415	TC	TC	454	TC	TC			

3　讨论

草莓组培中变异经常发生，但是多数变异对果实性状并不造成影响。本课题组 2015 年发现了 1 个可以稳定遗传的‘越心’草莓组培突变体，多年多点种植表现稳定，其在植株形态、物候期、单

果质量、株产、果形、风味等方面与‘越心’均无明显差异，而在果色方面，外果皮色泽较浅，果肉几乎不着色，这为研究草莓着色机理及果实品质形成规律提供了理想材料。本研究中对比分析了‘越心’和其突变体在果实色泽、糖、酸、花青苷、相关途径关键基因表达等方面的差异，初步探索了组培突变引起果实品质变化的原因。颜色指数对比显示，‘越心’着色程度明显好于其突变体，而突变体色泽亮度较高、外果皮偏浅，着色均匀。果肉部分，‘越心’除果心部分为白色外其余部分均呈偏红色，而其突变体除接近外果皮部分略带粉色外其余部分均为白色。色素含量的不同是造成果实色泽差异的直接原因，草莓果实中的色素主要是 Pg3G，其次是 Cy3G、Pg3MG（Lopes da Silva et al.，2007）。本研究中，突变体果实总花青苷含量是‘越心’的 13.2%，Pg3G、Cy3G、Pg3MG 含量分别是‘越心’的 12.9%、22.2%和 52.6%，这与梁烨等（2012）在‘幸香’草莓白肉突变体中的研究结果基本一致，‘幸香’草莓白肉突变体的花色素苷含量仅为野生型的 13.7%（梁烨 等，2012）。

果实色泽变化是‘越心’草莓组培突变体最明显的表观改变。植物脂溶性色素主要为叶绿素、叶黄素与胡萝卜素，水溶性色素主要为花青苷，花青苷是源自苯丙烷代谢（phenylpropanoid metabolism）的类黄酮合成途径的一个分支，多个结构基因、调节因子和环境信号刺激等共同调控其合成（杨琳 等，2014）。定量表达分析显示，*FaF3H*、*FaCHS*、*FaDFR*、*FaANS*、*FaCHI* 和 *Fa3GT* 的表达水平在‘越心’突变体中显著下调，且变化呈现协同趋势，这几种酶都是直接参与花青苷合成的酶，这可能是突变体成熟果实花青苷水平显著低于‘越心’的直接原因。MYB 转录抑制因子是较为庞大的转录因子家族，草莓 *FaMYB1*、拟南芥 *AtMYB3*、*AtMYB7*、*AtMYB32*、*AtMYB60*、苹果 *MdMYB6*、野生型芜菁 *BrMYB4* 等已被证明参与花青苷积累的负调控（杨琳 等，2014）。本研究中发现 *FaMYB10* 和 *FaMYB1* 在‘越心’草莓突变体中的表达水平显著下降，且 *FaMYB10* 在几个主成分中的特征向量绝对值均显著较高，进一步证实了 *MYB10* 是草莓成熟过程中花青苷合成的类黄酮或苯丙烷类化合物途径的主要调节因子之一（Medina-Puche et al.，2014；Pillet et al.，2015）。但是，本研究中仅对 *FaMYB10* 的表达水平进行了对比分析，未对‘越心’突变体中该基因的 DNA 序列进行分析，特别是该基因的启动子序列是否与‘越心’存在差异，以及该差异与基因表达水平的关系、对花青苷的调控作用等机制均有待深入研究。此外，花青苷合成结构基因间的表达受 MYB、bHLH、W40 转录因子形成的转录复合体 MBW 的协同调控，其协同调控机制有待于进一步研究（刘晓芬 等，2013；Schaart et al.，2013；张映 等，2019）。Li 等（2013）利用基因芯片分析发现 4 个 miRNA 表达水平在草莓白肉突变普通匍匐茎苗与微繁殖原种苗间存在显著差异，其中 miR169a 和 miR169d 在微繁殖原种苗中表达上调，而 miR535 和 miR390 表达下调。韩柏明等（2010）发现组培苗 DNA 甲基化水平和模式的变异与表型变异有关。本研究中发现，突变导致参与调控花青苷合成途径的关键基因表达发生显著下调从而使花青苷积累显著减少，果实着色变淡，‘越心’组培突变体果实花青苷积累显著下降是否与 miRNA 表达水平或 DNA 甲基化水平的变化有关还有待深入研究。

References

Bairu M W，Aremu A O，Staden J V. 2011. Somaclonal variation in plants：causes and detection methods. Plant Growth Regulation，63 (2)：147－173.

Boxus P，Jemmali A，Terzi J M，Arezki O. 2000. Drift in genetic stability in micropropagation：the case of strawberry. Acta Horticulturae，530：155－162.

Carreño J，Martinez A，Almela L，Fernández-López J A. 1995. Proposal of an index for the objective evaluation of the colour of red table grapes. Food Research International，28 (4)：373－377.

Chang S，Puryear J，Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter，11：113－116.

Cui Meng-yuan. 2017. Comparative study of the growth and quality of different breeding strawberry（*Fragaria vesca*）Plants［M. D. Dissertation］. Yangling：Northwest A & F University. (in Chinese)

崔孟媛. 2017. 不同繁殖类型草莓苗生长发育与品质比较研究［硕士论文］. 杨凌：西北农林科技大学.

Feng Jian-rong，Fan Xin-min，Ma Bing-gang，Jiang Di-jun. 2001. Studies on chromosome variations of strawberry generated by callus induction. Journal of Shihezi University（Natural Science），5 (1)：27－29. (in Chinese)

冯建荣，樊新民，马兵刚，蒋迪军. 2001. 草莓愈伤组织诱导苗染色体行为变异的研究. 石河子大学学报（自然科学版），5 (1)：27－29.

Han Bai-ming，Zhao Kai，Li He，Gao Xiu-yan，Zhang Zhi-hong. 2010. DNA methylation variation induced by tissue culture in *Fragaria ananassa* Duch. Plant Physiology Communications，46 (8)：797－802. (in Chinese)

韩柏明，赵　恺，李　贺，高秀岩，张志宏. 2010. 组织培养导致的草莓 DNA 甲基化变异. 植物生理学通讯，46 (8)：797－802.

Hu Pan-pan，Zhao Xia，Li Gang，Li Liang-jie，Qin Bao，Peng Zhuo，Zhou Hou-cheng. 2016. Strawberry plantlets somaclonal variation. Chinese Agricultural Science Bulletin，32 (16)：77－82. (in Chinese)

胡盼盼，赵　霞，李　刚，李亮杰，秦　豹，彭　卓，周厚成. 2016. 草莓组培苗体细胞无性系变异研究. 中国农学通报，32 (16)：77－82.

Krishna H，Alizadeh M，Singh D，Singh U，Chauhan N，Eftekhari M，Sadh R K. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. Biotech，6：54.

Li H，Mao W，Liu W，Dai H，Liu Y，Ma Y，Zhang Z. 2013. Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in wild type and a white-flesh mutant strawberry. Planta，238 (4)：695－713.

Liang Ye，Li He，Ma Yue，Cao Fei，Dou Yu-juan，Zhang Zhi-hong. 2012. Comparative analysis of biological characteristics and quality in a white-flesh strawberry mutant‘Sachinoka’and its wild type. Scientia Agricultura Sinica，45 (15)：3115－3123. (in Chinese)

梁　烨，李　贺，马　跃，曹　飞，豆玉娟，张志宏. 2012.‘幸香’草莓白肉突变体与野生型的生物学特性和品质比较. 中国农业科学，45 (15)：3115－3123.

Liu Xiao-fen，Li Fang，Yin Xue-ren，Xu Chang-jie，Chen Kun-song. 2013. Recent advances in the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis. Acta Horticulturae Sinica，40 (11)：2295－2306. (in Chinese)

刘晓芬，李　方，殷学仁，徐昌杰，陈昆松. 2013. 花青苷生物合成转录调控研究进展. 园艺学报，40 (11)：2295－2306.

Lopes da Silva F，Escribano-Bailón M T，Pérez Alonso J J，Rivas-Gonzalo J C，Santos-Buelga C. 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. LWT-Food Science and Technology，40 (2)：374－382.

Medina-Puche, L，Cumplido-Laso G，Amil-Ruiz F，Hoffmann T，Ring L，Rodriguez-FrancoA，Caballero J L，Schwab W，Muñoz-Blanco J，Blanco-Portales R. 2014. *MYB10* plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria* × *ananassa* fruits. Journal of Experimental Botany，65 (2)：401－417.

Neelakandan A K，Wang K. 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Reports，31 (4)：597－620.

Pillet J，Yu H W，Chambers A H，Whitaker V M，Folta K M. 2015. Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry（*Fragaria* × *ananassa*）fruits. Journal of Experimental Botany，66：4455－4467.

Qin Q，Kaas Q，Zhang L，Xu K，Li N，Zheng W，Lai Q. 2013. Isolation and characterization of a cytosolic pyruvate kinase cDNA from loquat（*Eriobotrya japonica* Lindl.）. Plant Molecular Biology Reporter，31：109－119.

Schaart J G，Dubos C，Romero de la Fuente I，van Houwelingen A M，de Vos R C，Jonker H H，Xu W，Routaboul J M，Lepiniec L，Bovy A G. 2013. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry（*Fragaria* × *ananassa*）fruits. New Phytologist，197 (2)：454－467.

Semagn K，Babu R，Hearne S，Olsen M. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR（KASP）：overview of the technology and its application in cropimprovement. Molecular Breeding，33：1－14.

Shiroguchi K，Jia T Z，Sims P A，Xie X S. 2012. Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes. Proc Natl Acad Sci USA，24，109 (4)：1347－1352.

Wang Ling，Tang Haoru，Wang Xiaorong，Chen Qing，Jiang Leiyu，Lin Yuanxiu. 2017. Virus-induced gene silencing as a tool for *FaMYB5* gene functional studies in strawberry. Acta Horticulturae Sinica，44 (1)：33－42. (in Chinese)

王　玲，汤浩茹，王小蓉，陈　清，江雷雨，林源秀. 2017. 利用 VIGS 技术研究草莓 *FaMYB5* 的功能. 园艺学报，44 (1)：33－42.

Yang Lin，Wang Yu，Yang Jian-fei，Li Yu-hua. 2014. Research advances on negative regulators of anthocyanin accumulation. Acta Horticulturae Sinica，41 (9)：1873－1884. (in Chinese)

杨 琳，王　宇，杨剑飞，李玉花. 2014. 花青素积累相关负调控因子的研究进展. 园艺学报，41 (9)：1873－1884.

Zhang Xin-yu，Zhang Zhi-hong，Gao Xiu-yan，Li He，Du Guo-dong. 2006. Epigenetic variation in characteristics of the micro propagated strawberry plants and their offsprings. Journal of Fruit Science，23 (4)：542－546. (in Chinese)

张馨宇，张志宏，高秀岩，李　贺，杜国栋. 2006. 草莓微繁殖苗及其后代性状表观遗传变异研究. 果树学报，23 (4)：542－546.

Zhang Ying，Zhao Yueqi，Chen Yuhui，Lian Yong，Liu Fuzhong. 2019. Progress in molecular research on purple formation of eggplant. Acta Horticulturae Sinica，46 (9)：1779－1796. (in Chinese)

张　映，赵悦琪，陈钰辉，连　勇，刘富中. 2019. 茄子紫色形成的分子研究进展. 园艺学报，46 (9)：1779－1796.

征订

欢迎订阅 2021 年《河北果树》

《河北果树》是河北省果树学会主办的果树专业技术期刊，中国核心期刊（遴选）数据库、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、中国期刊全文数据库、中文科技期刊数据库收录期刊、河北省优秀科技期刊。主要刊登落叶果树的品种资源、栽培管理、病虫防治、储藏加工等方面的新成果、新技术、新知识和新信息，开设栏目有专题论述、试验研究、经验交流、百花园、工作历、广告与信息。本刊特色是通俗易懂、科学实用、技术先进、内容丰富、信息量大、可读性强、发行面广。读者对象为果树科研和推广人员、农林院校师生、各级涉农领导和广大果农。本刊国内外公开发行，季刊，每季首月 15 日出版，国际标准大 16 开 64 页，彩色四封，每期定价 5.00 元，全年 4 期共 20.00 元。欢迎广大果农和果树科技工作者订阅，同时真诚欢迎投稿和发布广告。可到当地邮局（所）订阅，邮发代号 18-247。未能从邮局订上本刊的读者，全年都可随时直接汇款至编辑部订阅，免费邮寄。编辑部尚有 2004—2020 年期刊可邮购。

地址：河北省昌黎果树研究所《河北果树》编辑部，邮编：066600；

联系电话：0335-2987632（兼传真），QQ：2567147533；

电子邮箱：hbgsbjb@sohu.com；2567147533@qq.com。