

·研究报告·

## 外源腐胺促进苹果果皮花青苷积累的效应

田义, 王强, 张利义, 康国栋, 杨玲, 郝红梅, 杨振英, 丛佩华\*

中国农业科学院果树研究所国家苹果育种中心, 兴城 125100

**摘要** 为了探讨外源施加腐胺对苹果果皮花青苷合成相关基因的调控效应和果实着色的影响, 摘袋当天对苹果品种红富士 (*Malus domestica* Borkh. 'Red Fuji') 果实喷施 50 mg·L<sup>-1</sup> 腐胺 (putrescine, Put), 利用分光光度计和高效液相色谱仪分别对苹果果皮花青苷含量及其组成进行了分析; 利用实时荧光定量 PCR 法检测了转录调节因子 *MYB1* 和 5 个花青苷合成结构基因的转录水平。结果表明: (1) 外源喷施 Put 对于苹果果皮中花青苷的积累具有明显的促进效应, 在果实采收时, 处理组果皮中的花青苷含量为对照组的 1.9 倍; (2) 处理果实的果皮中含有矢车菊素阿拉伯糖苷 (cyaniding-3-arabinoside, Cy-3-ara), 而在相同条件下, 对照组中未能检测到 Cy-3-ara; (3) Put 处理对于转录调节因子 *MYB1* 和类黄酮 3, 5-糖苷转移酶 (UDP-glycose: flavonoid 3-O-glycosyltransferase, UFGT) 基因的转录有明显的促进作用, 摘袋后第 1 天和第 3 天, Put 处理组的 *MYB1* 转录水平分别为对照组的 1.6 和 2.0 倍, *UFGT* 变化趋势与 *MYB1* 类似, 查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI)、花青素苷元还原酶 (anthocyanidin reductase, ANR) 和无色花青素加双氧酶 (leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) 等基因的转录水平在 Put 处理初期也表现为明显上升, 特别是 *LDOX* 基因, 其转录水平在处理后的第 1 天和第 3 天分别达到对照的 10.2 和 3.8 倍。在所研究的基因中, 二氢类黄酮还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 基因是唯一一个经 Put 处理后其转录水平受到强烈抑制的基因, 且这种抑制作用在摘袋后第 3 天最为明显, 对照组的 *DFR* 转录水平为 Put 处理组的 2.3 倍。

**关键词** 花青苷, 红富士苹果, 腐胺, 实时荧光定量 PCR, 转录水平

田义, 王强, 张利义, 康国栋, 杨玲, 郝红梅, 杨振英, 丛佩华 (2009). 外源腐胺促进苹果果皮花青苷积累的效应. 植物学报 44, 310-316.

苹果果皮红色主要源于花青苷 (anthocyanin) 的积累 (Honda et al., 2002; Ubi et al., 2006)。目前, 苹果果皮花青苷合成途径中的结构基因已被成功克隆 (Honda et al., 2002; Kim et al., 2003; Takos et al., 2006a), 花青苷合成途径已基本明确 (Takos et al., 2006a), 花青苷合成是在 *MYB* 转录因子调节下的花青苷合成结构基因协调表达的过程。由于果实色泽是市场果实外观品质的重要指标, 直接影响到消费者的喜好及其商品价值; 同时, 随着人们对花青苷健康功能的认识, 果实色泽还可能成为评价水果营养保健品质的指标。因此, 关于花青苷的代谢和调控成为了一个研究热点 (张学英等, 2004; Takos et al., 2006b; Espley et al., 2007; Allan et al., 2008)。

多胺是广泛存在于植物体内的具有生物活性的低分子量脂肪族含氮碱, 主要包括腐胺 (putrescine, Put)、

亚精胺 (spermidine, Spd) 和精胺 (spermine, Spm) 等。由于其生理效应浓度较高, 为植物生长调节剂, 而不属于植物激素类物质。多胺在延缓植物衰老和抗(耐)逆境以及植物的胚胎发育、花和果实的发育等过程中均发挥着重要作用 (Pandey et al., 2000; 李建勇等, 2005; Kusano et al., 2007)。植物多胺的生物合成途径已基本明确 (Kusano et al., 2007)。Martinez-Romero 等 (2002) 的研究表明, 对采后的杏 (*Prunus armeniaca*) 进行腐胺处理可以延迟果实的软化和色泽的改变, 从而延长货架期。对猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*) 进行多胺处理时发现, Put 能够抑制乙烯产生和果实成熟 (Petkou et al., 2004)。对桃 (*Prunus persica*) 的整个果实发育期进行内源 Put 含量分析时发现, 在果实成熟期其含量最低; 在桃的果实成熟过程中, 外源施加 Put 可使内源多胺含

收稿日期: 2008-08-14; 接受日期: 2008-12-30

基金项目: 863 计划 (No. 2006AA100108)、国家科技支撑计划项目 (No. 2006BAD01A1704)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 0820603-09) 和中国农业科学院科技经费项目 (No. 2007-50)

\* 通讯作者。E-mail: Congph@163.com

量降低,同时抑制乙烯的释放并延缓果实软化(Bregoli et al., 2002; Ziosi et al., 2003)。在李子(*Prunus salicina*)采前和采后对其进行腐胺处理均可减少乙烯生成并降低果实软化酶活性,延迟果实软化(Khan et al., 2007)。辣椒(*Capsicum annuum*)在成熟和衰老过程中Put含量呈下降趋势,但是,番茄(*Lycopersicon esculentum*)在成熟过程中Put含量却呈上升趋势(Yahia et al., 2001)。香蕉(*Musa spp.*)在成熟过程中内源Put含量也呈上升趋势(Takeda et al., 1997)。Yoshikawa等(2007)的研究表明,低温处理苹果幼果导致腐胺含量升高,查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)表达增强。外源喷施多胺对苹果花芽分化和坐果的影响已有许多报道(王世平等, 1996; 徐继忠等, 1998, 2001; 陈海江等, 1999),而有关多胺在苹果果实成熟和衰老过程中的作用却报道较少,关于腐胺对于苹果果实着色的影响目前尚未见报道。为了探讨外源施加腐胺对苹果果皮花青苷合成相关基因的调控效应和果实着色的影响,本研究以红富士苹果(*Malus domestica* Borkh. 'Red Fuji')为实验材料,结合高效液相色谱和实时定量PCR技术,对果皮中花青苷的组成和含量及其合成途径相关酶基因的转录水平进行了分析,旨在为阐明多胺调控苹果果实着色的机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及取样

田间实验在辽宁省兴城市南大乡果园进行,实验材料为长势良好的15年生红富士(*Malus domestica* Borkh. 'Red Fuji')苹果树,果园实行常规管理,单株小区,3次重复。盛花后35天进行果实套袋,纸袋为小林袋(内层红袋,外层袋内皮为黑色,外皮为灰色)。摘袋前20天(距离摘袋的天数记为-20)进行第1次取样,每株树在不同方位随机取24个果。然后,每株树选取大小中等、方位不同的32个果进行标记,摘袋后立即喷施50 mg·L<sup>-1</sup>腐胺。分别于摘袋后1、3、5和12天(10月20日,果实采收当天)进行取样,每次每株采集8个果(每个方位2个),同时在该株采摘8个未进行处理的果为对照,迅速带回实验室。用打皮器取每个果4个方位的果皮,面积

在1 cm<sup>2</sup>左右,边缘厚度小于0.01 mm,中心厚度约为0.5 mm。将多个果的果皮混合,加入液氮研磨成粉,于-80℃保存备用。150 mg·L<sup>-1</sup>腐胺处理和取样方法同上。

### 1.2 果皮的花青苷含量测定和组成分析

果皮花青苷总量测定参照李秀菊等(1998)的方法。1% HCl-甲醇浸提果皮粉24小时,利用分光光度计(Beckman coulter, DU530)于530 nm和657 nm下测定浸提液的吸光值,以每克果皮鲜重的 $\Delta A (A_{530} - A_{657})$ 表示花青苷总量。

花青苷组成分析:取0.4 g研磨好的果皮样品,溶解于2 mL的HCl/甲醇(1:99, v/v)中,4℃黑暗条件下,提取24小时。室温条件下,13 000×g离心20分钟。取400 μL上清液转移至自动进样瓶。仪器条件:高效液相色谱仪(岛津LC-10AVP plus),检测器(SHIMADZU SPD-10AVP),泵(LC-10ATVP),进样器(SIL-10ADVP),色谱柱(SHIMADZU VP-ODS 250 mm × φ4.6 mm);溶液A(10%甲酸)和溶液B(甲醇)。洗脱条件参照Takos等(2006a)的测定方法,略有改动。利用溶液B进行梯度洗脱:0分钟,17%;1分钟,17%;15分钟,35%;40分钟,37%;42分钟,100%;48分钟,100%;50分钟,17%;58分钟,17%。流动相速度:1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量20 μL。花青苷标准样品:矢车菊素-3-半乳糖苷(cyaniding-3-galactoside chloride, Cy-3-gal)、矢车菊素-3-葡萄糖苷(cyaniding-3-glucoside chloride, Cy-3-glu)和矢车菊素-3-阿拉伯糖苷(cyaniding-3-arabino-side chloride, Cy-3-ara)为Fluka产品。配制混合标样(Cy-3-gal浓度为100 mg·L<sup>-1</sup>, Cy-3-glu浓度为100 mg·L<sup>-1</sup>, Cy-3-ara浓度为500 mg·L<sup>-1</sup>)的倍比稀释液,制作标准曲线,计算果皮样品中的花青苷含量。

### 1.3 RNA拷贝数标准曲线的制作

将RNA标准样品(Promega公司)进行倍比稀释,配制浓度梯度为10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>和10<sup>2</sup> mol·L<sup>-1</sup>的标准品,按照SYBR<sup>®</sup> Prime-Script<sup>™</sup> RT-PCR试剂盒(Takara Code: DRR063A)的产品说明进行反转录,反转录反应体积为10 μL。然后取2.0 μL反转录产物进行

实时定量 PCR 反应, 反应体系 25  $\mu\text{L}$ 。将反应组分在 0.2 mL 的 PCR 管(MJ Research TSL-0851) 中混匀并用超净光盖(MJ Research TCS-0803) 封口。使用 Opticon Monitor™ 软件(2.03 版, MJ Research) 收集数据并分析反应结果, 重复 2 次。

#### 1.4 果皮 RNA 的提取和定量 PCR 分析

RNA 的提取和纯化: 将  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存的果皮粉末利用 Plantol 高效植物总 RNA 提取试剂盒(Innogen) 进行总 RNA 提取。利用核酸蛋白分析仪测定提取的 RNA 样品浓度, 以浓度最低的为参照, 加入 RNA 溶解液将所有样品的浓度调节一致。

反转录: 首先按照产品说明用 RQ1 RNase-free DNase(Promega) 去除 RNA 样品中的 DNA, 然后采用 SYBR® Prime-Script™ RT-PCR 试剂盒进行反转录, 10  $\mu\text{L}$  反应体系中含有 350 ng 总 RNA。

定量分析: 按照 SYBR® Prime-Script™ RT-PCR 试剂盒的说明, 取 2.0  $\mu\text{L}$  反转录产物进行 PCR 反应, PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 设 3 次重复。反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 秒;  $95^{\circ}\text{C}$  5 秒,  $60^{\circ}\text{C}$  30 秒, 读板(plate read) 1 秒, 共 40 个循环;  $60^{\circ}\text{C}$  延伸 5 分钟; 进行溶解曲线分析,  $60-95^{\circ}\text{C}$ , 每隔  $0.2^{\circ}\text{C}$  读板 1 次, 读板时间 1 秒。引物设计参考 Takos 等(2006a, 2006b) 所设计的引物序列(表 1), 由大连宝生物公司合成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 腐胺处理对苹果果皮花青苷含量和组成的影响

由于  $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  腐胺(Put) 处理会导致果皮出现药害, 故

未做进一步研究, 本实验中的腐胺处理浓度均为  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对处理组和对照组不同时期果皮中花青苷含量的变化趋势进行分析, 结果如图 1A 所示, Put 处理可以明显促进果皮中花青苷的积累。在处理第 1 天, 处理组和对照组果实果皮中花青苷含量均极低, 两者之间无差异, 但在处理后第 3 天, 处理组果皮中花青苷含量便明显高于对照组, 至果实采收时(处理后 12 天), 处理组的果皮花青苷含量为对照的 1.9 倍。进一步对果皮中花青苷的组成成分进行分析, 结果表明, 果皮中主要的花青苷为 Cy-3-gal, 其它花青苷相对于 Cy-3-gal 含量均极低(图 1C), 在采收当天 Cy-3-glu 与 Cy-3-gal 的含量比值不足 1%(数据未显示)。Put 处理的果实在采收时, 果皮中有 Cy-3-ara 出现, 而对照果实中则未检测到(由于 Cy-3-ara 含量极低, 在色谱图中无法显示)。腐胺处理下苹果果皮中 Cy-3-gal 的含量变化趋势如图 1D 所示。

### 2.2 腐胺处理对苹果果皮花青苷合成相关基因转录水平的影响

采用实时荧光定量 PCR 方法对苹果果皮多个花青苷合成相关基因的转录水平进行分析, 首先以已知拷贝数的标准 RNA 样品进行倍比稀释及定量分析, 获得了 RNA 分子数标准曲线(图 2)。然后提取苹果果皮总 RNA, 经核酸蛋白分析仪测定其  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  在 1.8 - 2.0 之间, 表明满足定量 PCR 实验的要求。

本实验调查了转录调节因子 MYB1 和 5 个花青苷合成结构基因的转录水平, 包括类黄酮 3- O-糖苷转移酶(UDP-glycose: flavonoid 3- O-glycosyltransferase, UFGT)、查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、花青素苷元还原酶(anthocyanidin reductase, ANR)、无色花青素加双氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase,

表 1 实时定量 PCR 中使用的引物序列(Takos et al., 2006a, 2006b)

Table 1 The sequences of primers used in real-time fluorescence quantitative PCR (Takos et al., 2006a, 2006b)

Target gene	Sequence No.	Forward	Reverse
MYB1	DQ886414	5'-AGACCAATGTGATAAGACCTCAG-3'	5'-AACCAAAAACCTTGTGAAGAGTTC-3'
LDOX	AF117269	5'-GAAGATCATCCTTAAGCCACTG-3'	5'-ATAATTTAGCACAAACCCGCTTC-3'
ANR	AY830130	5'-GCATCGAAGAAATATATGACCA-3'	5'-AATTTCAGGTAAGCCAGACAAT-3'
CHI	X68978	5'-GCTACAAATGCGGTGATAGAA-3'	5'-CCTTGGTTTCCAATTTTTTCAT-3'
DFR	AF117268	5'-CAAGTACAGCTTGAGGACAT-3'	5'-CCAAGCTGGTAAATGTAAAACA-3'
UFGT	AF117267	5'-AAGGTCTCTCCAATGTACGAAT-3'	5'-AGGAGTTTGTGACTTTGGACT-3'

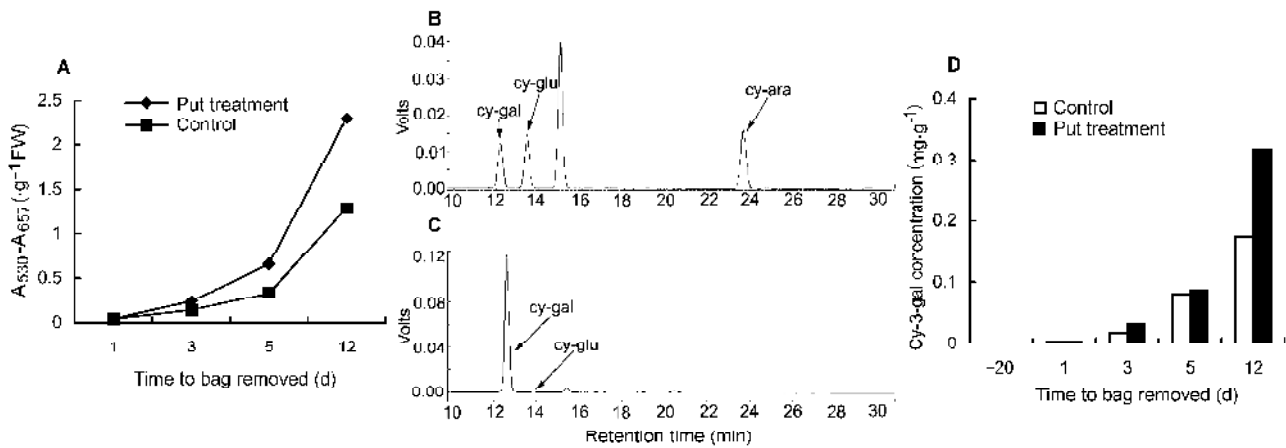


图1 腐胺(Put)处理对苹果果皮花青苷含量和组成成分的影响

(A) Put处理下果皮花青苷总量的变化趋势; (B) 花青苷混合标样色谱分析; (C) Put处理12天后, 果皮花青苷组成分色谱分析; (D) Put处理下果皮中Cy-3-gal含量的变化趋势

Figure 1 Effects of putrescine (Put) treatment on the total content and the ingredients of anthocyanin in apple skin

(A) The change of anthocyanin content in apple skin treated by Put; (B) The chromatogram of mixed standard anthocyanin samples; (C) The chromatogram of anthocyanin in apple skin after 12 days of Put treatment; (D) The change of Cy-3-gal content in apple skin treated by Put

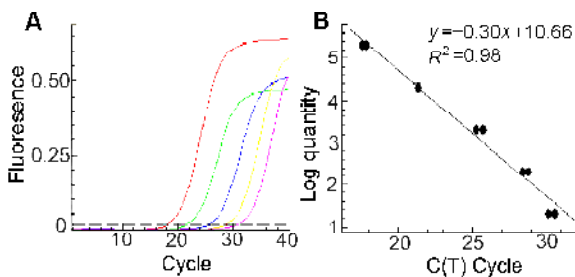


图2 倍比稀释RNA模板的扩增曲线和标准曲线

(A) 倍比稀释RNA模板的扩增曲线, (B) RNA模板的分子数标准曲线

Figure 2 The amplification and standard curves of a dilution series of the RNA template

(A) The amplification curves obtained from a dilution series of the RNA template; (B) The standard curve of a dilution series of the RNA template

LDOX)和二氢类黄酮还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)基因, 结果如图3和表2所示。调查的所有基因在摘袋后很短时间内(5天内)转录水平迅速上升, 并达到顶峰。在摘袋前20天, *MYB1*基因表达量极低, 相对于摘袋后基本检测不到。经Put处理的苹果果皮中, *MYB1*的转录水平相对于未处理对照显著提高,

在摘袋后第1天和第3天, Put处理组的果实果皮中*MYB1*转录水平分别为对照的1.6倍和2.0倍。摘袋5天后无论是处理组还是对照组的*MYB1*转录水平均急剧下降, 但Put处理组果皮中的*MYB1*转录水平始终高于对照。*LDOX*转录水平的变化趋势与*MYB1*高度类似, 摘袋后第1天和第3天, Put处理组的果皮中*LDOX*转录水平分别为对照的10.2倍和3.8倍。Put处理对于*UFGT*的转录也表现出明显的促进作用。摘袋后3天内Put处理对于*CH*和*ANR*的转录也有较好的促进作用, 但是在果实采收当天(摘袋后第12天), 对照的*ANR*转录水平明显高于Put处理组, 达到处理果的1.9倍。在所研究的基因中, *DFR*是唯一一个经Put处理后其转录水平受到抑制的基因, 且这种抑制作用在摘袋后第3天表现最为明显, 对照组的*DFR*转录水平为Put处理果的2.3倍。

本研究发现Put处理可以促进苹果果实着色, 同时处理后第1天和第3天, 果皮中*MYB1*转录水平分别达到未处理对照的1.6倍和2.0倍, 多个花青苷合成相关的结构基因转录水平也相应上升, 这与以往研究(Takos et al., 2006b; Espley et al., 2007)所得结论一致, 即花青苷的积累受*MYB*转录因子所调控, *MYB*通过调控花青

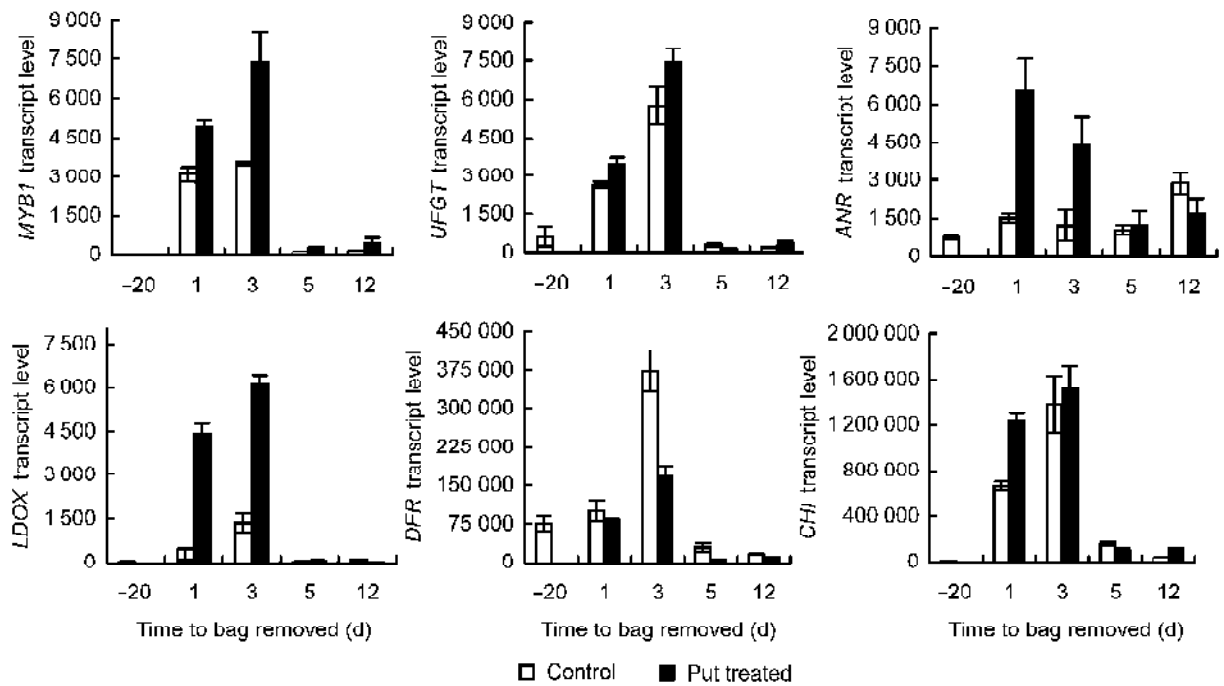


图3 腐胺(Put)处理的苹果果皮中MYB1、UFGT、ANR、LDOX、DFR和CHI基因的转录水平分析

Figure 3 Analysis of the transcriptional level of the MYB1, UFGT, ANR, LDOX, DFR and CHI genes in apple skin treated by putrescine (Put)

表2 腐胺处理的苹果果皮花青苷合成相关基因转录水平差异的显著性分析

Table 2 Analysis of the significance of the difference of transcriptional levels of anthocyanin synthesis-related genes in apple skin treated by putrescine

Sample	MYB1	UFGT	ANR	LDOX	DFR	CHI
-20	15 d	632 e	729 d	30 e	75 597 c	11 976 d
1CK	4 902 b	2 638 d	1 487 d	435 d	100 243 c	665 894 c
1T	3 086 c	3 482 c	6 311 a	4 415 b	79 362 c	1 234 330 b
3CK	3 540 c	5 757 b	1 233 d	1 356 c	373 016 a	1 382 205 ab
3T	7 371 a	7 396 a	4 334 b	6 102 a	165 475 b	1 509 481 a
5CK	67 d	285 e	1 018 d	24 e	29 450 d	159 384 d
5T	245 d	126 e	1 122 d	54 e	6 285 d	102 003 d
12CK	112 d	207 e	2 854 c	94 de	16 279 d	30 685 d
12T	469 d	344 e	1 599 d	21 e	10 970 d	103 308 d

样品栏中数字代表取样时距离摘袋的时间(天)。CK代表对照样品; T代表腐胺处理样品。表中数值后的字母表示采用邓肯氏新复极差法在P=0.05时检测到的差异显著水平

Numbers in column of sample stand for the days after the bags were removed. CK stand for control treatment; T stand for putrescine treatment. Different letters behind numerical values in the table showed the significance of difference by Duncans at P=0.05

苷合成结构基因的表达来影响花青苷的积累。但是, 在多个花青苷合成结构基因的转录被明显促进的同时, DFR基因的转录水平却受到抑制, 这一点与Kereamy等(2002)的研究结果类似, 乙醇促进葡萄(Vitis vinifera)果实中花青苷大量积累, 但DFR和LDOX的活性受到抑制

或没有变化, 而UFGT活性显著增强。Cominelli等(2008)在研究不同光质对花青苷合成相关基因的影响时发现, 过量表达PAP1(MYB因子)的转基因植株在UV-A下可以显著提高DFR的转录水平, 这与本实验所得结论相矛盾; 但过量表达PAP2(MYB因子)的转基因植株在

UV-A下, 其DFR转录水平则低于野生型, 这又与本实验的结论相符合, 可见MYB转录因子对花青苷合成结构基因的表达调控是一个极其复杂的过程。Honda等(2002)研究发现, 花青苷合成结构基因的少量表达可以使苹果红色果皮品种红玉的未成熟果(花后142天)着色, 而不能使其绿色果皮品种王林着色(花后168天), 从而认为某些关键基因的表达可能起到“开关”的作用, 并且除了基因表达的影响外, 还有其它因子控制着果皮着色。本实验中DFR的表达分析结果也支持这一观点。Kobayashi等(2002)的研究结果表明, 葡萄果实着色受转录因子MybA特异调控, 且调节的关键点位于包括UFGT基因在内的花青苷合成的最后阶段, 这一点也与本文的结论相一致。综合分析认为: 腐胺处理可以促进苹果果实着色相关的特异调控因子MYB1转录, 进而调节花青苷合成结构基因UFGT表达, 从而促进苹果果皮中花青苷的积累。如果进一步优化腐胺浓度, 有可能将其作为一种苹果果实着色调节剂应用于生产。此外, 鉴于外源施用腐胺在呼吸跃变型果实贮藏中的良好表现(Bregoli et al., 2002; Petkou et al., 2004; Khan et al., 2007), 其在促进苹果果实着色的同时, 可能对果实贮藏性的影响也具有重要意义, 有待进一步研究。

## 参考文献

- 陈海江, 徐继忠, 袁小乱, 邵建柱, 梁金铎 (1999). 不同时期喷施外源多胺对红星苹果坐果的影响. 河北农业大学学报 **22**(2), 47-49.
- 李建勇, 卢钢, 任彦 (2005). 多胺在果实生长发育中的作用研究进展. 果树学报 **22**, 256-260.
- 李秀菊, 刘用生, 束怀瑞 (1998). 红富士苹果套袋果实色泽与激素含量的变化. 园艺学报 **25**, 209-213.
- 王世平, 宋长冰, 李连朝, 张一鸣 (1996). 三种多胺在苹果开花及坐果初期的生理作用. 园艺学报 **23**, 319-325.
- 徐继忠, 陈海江, 邵建柱, 袁小乱, 马宝焜, 章文才 (1998). 外源多胺促进红富士苹果花芽形成的效应. 果树科学 **15**, 10-12.
- 徐继忠, 陈海江, 马宝焜, 章文才 (2001). 外源多胺对富士苹果花和幼果内源多胺与激素的影响. 园艺学报 **28**, 206-210.
- 张学英, 张上隆, 骆军, 叶正文, 李世诚 (2004). 果实花色素苷合成研究进展. 果树学报 **21**, 456-460.
- Allan AC, Hellens RP, Laing WA (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci* **13**, 99-102.
- Bregoli AM, Scaramagli S, Costa G, Sabatini E, Ziosi V, Biondi S, Torrigiani P (2002). Peach (*Prunus persica*) fruit ripening: aminoethoxyvinylglycine (AVG) and exogenous polyamines affect ethylene emission and flesh firmness. *Physiol Plant* **114**, 472-481.
- Cominelli E, Gusmaroli G, Allegra D, Galbiati M, Wade HK, Jenkins GI, Tonelli C (2008). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **165**, 886-894.
- Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC (2007). Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J* **49**, 414-427.
- Honda C, Kotoda N, Wada M, Kondo S, Kobayashi S, Soejima J, Zhang Z, Tsuda T, Moriguchi T (2002). Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. *Plant Physiol Biochem* **40**, 955-962.
- Kereamy AE, Chervin C, Souquet JM, Moutounet M, Monje MC, Nepveu F, Mondies H, Ford CM, Heeswijck R, Roustan JP (2002). Ethanol triggers grape gene expression leading to anthocyanin accumulation during berry ripening. *Plant Sci* **163**, 449-454.
- Khan AS, Singh Z, Abbasi NA (2007). Pre-storage putrescine application suppresses ethylene biosynthesis and retards fruit softening during low temperature storage in 'Angelino' plum. *Postharvest Biol Technol* **46**, 36-46.
- Kim SH, Lee JR, Hong ST, Yoo YK, An G, Kim SR (2003). Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin. *Plant Sci* **165**, 403-413.
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**, 924-933.
- Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y (2007). Advances in polyamine research in 2007. *J Plant Res* **120**, 345-350.
- Martinez-Romero D, Serrano M, Carbonell A, Burgos L, Riquelme F, Valero D (2002). Effects of postharvest putrescine treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot. *J Food Sci* **67**, 1706-1712.
- Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, Kumar N (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J Biosci* **25**, 291-299.

- Petkou IT, Pritsa TS, Sfakiotakis EM** (2004). Effects of polyamines on ethylene production, respiration and ripening of kiwifruit. *J Hortic Sci Biotechnol* **79**, 977-980.
- Takeda Y, Yoza KI, Nogata Y, Kusumoto KI, Voragen AGJ, Ohta H** (1997). Putrescine accumulation in banana fruit with ripening during storage. *Phytochemistry* **46**, 57-60.
- Takos AM, Ubi BE, Robinson SP, Walker AR** (2006a). Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Sci* **170**, 487-499.
- Takos AM, Jaffé FW, Jacob SR, Bogs J, Robinson SP, Walker AR** (2006b). Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiol* **142**, 1216-1232.
- Ubi BE, Honda C, Bessho H, Kondo S, Wada M, Kobayashi S, Moriguchi T** (2006). Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. *Plant Sci* **170**, 571-578.
- Yahia EM, Contreras-Padilla M, Gonzalez AG** (2001). Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. *LWT-food Sci Technol* **34**, 452-457.
- Yoshikawa H, Honda C, Kondo S** (2007). Effect of low-temperature stress on abscisic acid, jasmonates, and polyamines in apples. *Plant Growth Regul* **52**, 199-206.
- Ziosi V, Scaramagli S, Bregoli AM, Biondi S, Torrigiani P** (2003). Peach (*Prunus persica* L.) fruit growth and ripening: transcript levels and activity of polyamine biosynthetic enzymes in the mesocarp. *J Plant Physiol* **160**, 1109-1115.

## Promotion Effect of Exogenous Putrescine on Anthocyanin Accumulation in 'Red Fuji' Apple Fruits

Yi Tian, Qiang Wang, Liyi Zhang, Guodong Kang, Ling Yang, Hongmei Hao, Zhenying Yang, Peihua Cong\*

National Center for Apple Breeding, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, China

**Abstract** In order to explore the effect of exogenous putrescine (Put) on anthocyanin accumulation in apple skin, putrescine (50 mg·L<sup>-1</sup>) was applied to 'Red Fuji' apple fruits immediately after bags were removed from fruit. Anthocyanin accumulation was determined by spectrophotometer and high-performance liquid chromatography, and transcriptional levels of several anthocyanin synthesis-related genes including *MYB1* and genes encoding UDP-glycosyltransferase (UGT), chalcone isomerase (CHI), anthocyanidin reductase (ANR), leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and dihydroflavonol 4-reductase (DFR), were determined by real-time fluorescence quantitative PCR. Anthocyanin content was significantly promoted with Put treatment, to about 1.9-fold that with control treatment. Put treatment revealed cyanidin 3-arabinoxide content, although low, which was not revealed with control treatment. The transcriptional level of *MYB1* was increased 1.6-fold with 1-day Put treatment and two-fold with 3-day treatment. The changed transcriptional level of *UGT* gene was similar to that of *MYB1*; transcriptional levels of *CHI*, *ANR* and *LDOX* were increased as well. The transcriptional level of *LDOX* was 10.2- and 3.8-fold after 1- and 3-day Put treatment, respectively. Among six genes investigated in our study *DFR* was the only gene of which transcriptional level was inhibited with Put treatment. The strong effect of inhibition was revealed with 3-day treatment that the transcriptional level of *DFR* with control treatment was 2.3-fold of that with Put treatment.

**Key words** anthocyanin, *Malus domestica* Borkh. 'Red Fuji', putrescine, real-time fluorescence quantitative PCR, transcriptional level

**Tian Y, Wang Q, Zhang LY, Kang GD, Yang L, Hao HM, Yang ZY, Cong PH** (2009). Promotion effect of exogenous putrescine on anthocyanin accumulation in 'Red Fuji' apple fruits. *Chin Bull Bot* **44**, 310-316.

\* Author for correspondence. E-mail: Congph@163.com

