

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2018.60812

杨捷, 张星, 彭梦笛, 贾桂霞, 何恒斌. 百合转录因子 *MYB12* 的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 2018, 36(6): 812-823

Yang J, Zhang X, Peng MD, Jia GX, He HB. Cloning and expression analysis of *MYB12* in *Lilium* oriental hybrid 'Sorbonne' [J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(6): 812-823

百合转录因子 *MYB12* 的克隆与表达分析

杨捷, 张星, 彭梦笛, 贾桂霞, 何恒斌*

(北京林业大学园林学院, 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 国家花卉工程技术研究中心,
城乡生态环境北京实验室, 北京 100083)

摘要: 以东方百合‘索邦’(*Lilium* oriental hybrid ‘Sorbonne’)为材料, 克隆获得花青素苷生物合成通路中的关键转录因子 *LhsorMYB12* 基因。序列分析结果显示, *LhsorMYB12* 最大开放阅读框长 720 bp, 编码 239 个氨基酸, 具有 2 个典型的 DNA 结合结构域; 该基因包括 3 个外显子和 2 个内含子。该基因的氨基酸序列与郁金香 (*Tulipa fosteriana* W. Irving) 中的 MYB 氨基酸序列相似性最高。系统进化分析结果表明, *LhsorMYB12* 在 MYB 基因家族中与已报道的控制花青素苷合成的基因形成一簇。进一步采用染色体步移技术, 获得了 *LhsorMYB12* 基因起始密码子上游 2143 bp 的启动子序列, 顺式作用元件预测结果显示, 该序列中除核心启动子元件 (TATA box) 外, 还包含有 MYB 蛋白的绑定位点、光反应元件以及参与昼夜节律等反应的相关元件。基因表达分析结果表明, *LhsorMYB12* 仅在‘索邦’花丝、花柱和花被片中表达; 且在花蕾发育过程中表达量逐渐增高, 花蕾盛开时表达量最大, 但内、外花被的表达起始阶段不同。黑暗处理可导致 *LhsorMYB12* 表达水平降低; 光照条件下该基因的表达水平随处理时间的延长表现出先上升后下降再持续上升的趋势。研究结果提示 *LhsorMYB12* 的表达变化规律可能与其启动子中相应的顺式作用元件相关。

关键词: 东方百合‘索邦’; *MYB* 基因; 花青素苷; 克隆; 启动子; 基因表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)06-0812-12

Cloning and expression analysis of *MYB12* in *Lilium* oriental hybrid ‘Sorbonne’

Yang Jie, Zhang Xing, Peng Meng-Di, Jia Gui-Xia, He Heng-Bin*

(Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation and Molecular Breeding, National Engineering Research Center for Floriculture and Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: To reveal the regulatory mechanism of the anthocyanin synthesis pathway in *Lilium*, we isolated cDNA, gDNA, and the *MYB12* gene promoter from the petals of the *L.* oriental hybrid ‘Sorbonne’. Results showed that the cDNA sequence contained a 720 bp open reading frame (ORF) encoding a 239 amino acid polypeptide with two typical DNA-binding domains. The 863 bp nucleotide sequence was amplified from the extracted DNA and the gene consisted of three exons and two introns. Furthermore, the amino acid sequence had highest similarity with *MYB* transcription factors in *Tulipa fosteriana* W. Irving. Phylogenetic analysis showed that the phylogenetic evolution of the transcription factor was in accordance with

收稿日期: 2018-04-27, 退修日期: 2018-06-22。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31672191); 中央高校基本科研业务费专项 (YX2015-16)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31672191) and Fundamental Research Funds for the Central Universities (YX2015-16)。

作者简介: 杨捷 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为花卉分子生物学 (E-mail: jieyang@bjfu.edu.cn)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: hengbinhe_1220@bjfu.edu.cn)。

taxonomic classification, and it could be grouped with genes that regulate anthocyanin biosynthesis in the *MYB* gene family. The 2143 bp promoter sequence of the *LhsorMYB12* gene was obtained using chromosome walking technology. The promoter element prediction results showed the existence of a core promoter element (TATA box), *MYB* protein binding sites, photoreactive elements, and other regulation motifs (e.g., circadian rhythm response motif). RT-PCR analysis indicated that the expression of *LhsorMYB12* could be detected in the tepals, filaments, stigmas, and styles. qRT-PCR analysis showed that the relatively high expression occurred in blooming period (12 cm) tepals, and then began to decrease. However, there was a difference between the initial stage of expression in the inner and outer perianths. Moreover, dark treatment resulted in a reduction in the expression of *LhsorMYB12*, with the lowest expression found after an hour of treatment. Under light conditions, the expression level of the gene increased at first, then decreased, and then continued to rise with increasing treatment time. The *LhsorMYB12* expression pattern results might relate to the corresponding cis-acting elements in its promoter.

Key words: *Lilium* oriental hybrid ‘Sorbonne’; *MYB* gene; Anthocyanins; Cloning; Promoter; Gene expression

百合科百合属(*Lilium* L.)植物,在世界观赏植物中占有重要地位^[1]。花色是观赏花卉的重要品质性状,直接影响其观赏价值和经济价值,花色改良是百合重要的育种目标之一。花青素苷(Anthocyanins)是一种广泛存在于植物中的天然色素,能形成多种颜色,属于水溶性类黄酮化合物^[2],其合成是一个复杂的过程,涉及一系列结构基因与转录因子的表达^[3]。目前植物花青素苷合成通路的研究已较为成熟,其中主要的结构基因包括苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL*、查尔酮合成酶基因 *CHS*、查尔酮-黄烷酮异构酶基因 *CHI*、黄烷酮-3'-羟化酶基因 *F3'H*、黄烷酮-3-羟化酶 *F3H*、二氢黄酮醇-4-还原酶基因 *DFR*、花青素苷合成酶基因 *ANS* 等^[4]。这些结构基因主要由 *R2R3-MYB*、*bHLH*、*WD40* 组成的转录复合体调控其表达,最终影响植物器官的着色过程^[5]。

目前,关于百合花色的研究主要集中在花色表型、成色物质、遗传规律、遗传图谱构建、花青素苷合成通路及花色转录因子研究等方面^[6]。随着国内外对花青素苷生物合成通路的了解,转录因子日益成为研究重点。百合花青素苷合成通路中报道较多的基因是 *CHS* 等结构基因^[7],现已证明该基因的遗传转化可调控百合花色^[8-12]。此外,东方百合‘索邦’(*L. oriental* hybrids ‘Sorbonne’)中

的 *LhCHI* 和东方百合‘Justina’中 *ANS* 基因的克隆和时空特异性表达模式已有研究^[5, 13],且垂花百合(*L. cernuum* Komar.)中 *ANS* 基因的启动子序列已成功转入拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)中获得了 T_2 代转基因植株^[14]。研究发现,在亚洲百合(*L. asiatica* hybrida)中 *MYB12* 基因可调控花被片、花被片斑点和叶片中花青素的合成^[15-17]。但是,东方百合中 *MYB12* 同源基因与花被片成色间的关系及其时空表达研究尚未见报道。

MYB 基因家族是植物转录因子中最大的家族之一^[18]。Du 等^[19]对 *R2R3-MYB* 蛋白进行了系统进化研究,将 *MYB* 蛋白划分为 37 个亚组。该蛋白广泛参与调控植物的生长发育和响应外界环境的过程^[20-22]。研究发现, *G6* 亚组 *MYB* 转录因子是调控植物花青素苷合成的关键^[19],其高度保守的 *R2R3-DNA* 结合结构域在花青素苷合成通路中具有重要的转录调控作用^[23, 24]。近年来,在金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)^[25]、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)^[26]、苹果(*Malus pumila* Mill.)^[27]、矮牵牛(*Petunia axillaris* Lam.)^[28]、拟南芥^[29]等多个物种中已对 *MYB* 基因在花青素苷合成通路中的调控功能进行了研究。

本研究以东方百合‘索邦’为材料,通过克隆

获得 *LhsorMYB12* 基因; 进一步采用染色体步移技术获得该基因起始密码子上游的启动子序列, 分析其顺式作用元件, 研究该基因在植物各组织部位、不同发育阶段及光照处理后的表达差异, 以期为东方百合花青素苷合成通路的调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料东方百合‘索邦’购于北京市百合合作社。根据花被片花色积累的变化, 对花蕾的 9 个发育时期(长度分别为 5、6、7、8、9、10、11、12、13 cm)花蕾长 11 cm 时的 11 个组织部位(包括: 外花被、内花被、花丝、花药、柱头、花柱、子房、上部叶、中下部叶、嫩茎和茎生根)(图 1)及 10 种光照处理(分别为黑暗处理: 1、2、4、8 h 和光照处理: 1、2、4、8、12、16 h)后的花蕾

进行取样。样品均设置 3 个重复, 采集后保存于 - 80℃ 冰箱备用。

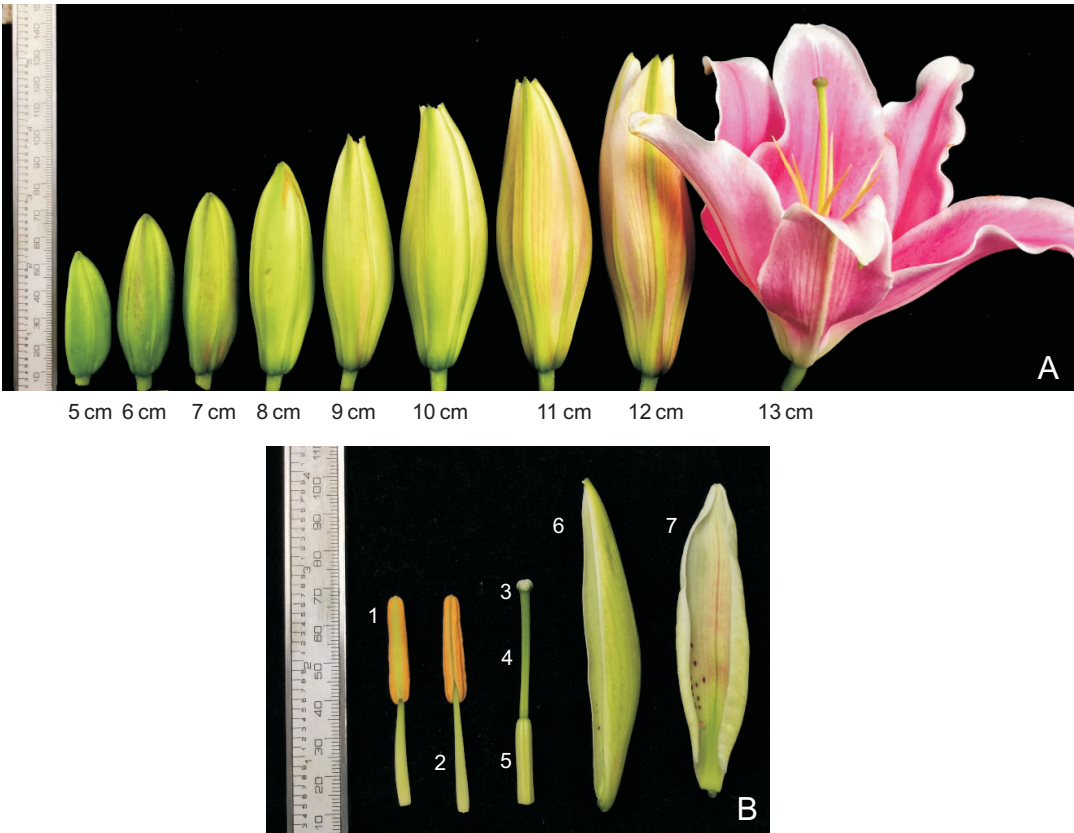
1.2 实验方法

1.2.1 *MYB12* 基因的克隆及序列分析

分别取 9 个发育时期的‘索邦’花被片在液氮条件下充分研磨, 然后用 EASY Spin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱, 北京)提取花被片及各器官组织总 RNA, 并反转录成 cDNA, 置于 -20℃ 冰箱保存、备用。

引物的设计与合成根据‘索邦’花蕾转录组数据设计引物 MYB12(Clone) F 和 MYB12(Clone) R, 根据获得的 *LhsorMYB12* 基因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计半定量 PCR 引物 MYB12(RT-PCR) F 和 MYB12(RT-PCR) R(表 1)。

以‘索邦’cDNA 第一链为模板, 对 *MYB12* 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL, 包括: cDNA 模板 1 μL, KOD -Plus- Neo 1 μL, 10 ×



A: 花蕾 9 个发育时期; B: 花部组织。1: 花药; 2: 花丝; 3: 柱头; 4: 花柱; 5: 子房; 6: 外花被; 7: 内花被。
A. Development stages of buds in ‘Sorbonne’; B. Flower tissue of ‘Sorbonne’. 1: Anther; 2: Filament; 3: Stigma; 4: Style; 5: Ovary; 6: Outer perianth; 7: Internal perianth.

图 1 植物材料百合‘索邦’
Fig. 1 Plant materials of *Lilium* oriental hybrid ‘Sorbonne’

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
Actin (F)	CCCATTGAGCACGGCATTGTC
Actin (R)	GGATTGAGAGGAGCTTCGGTGAGA
CLA (F)	GATGAGATTCTGATTGCTGGTGAG
CLA (R)	CCTGCTCTTTGGCTGTTTCC
MYB12(Clone)F	ATGTTTCAAACGTTTATTGCCTC
MYB12(Clone)R	TGGAGTGATTCCGAAGTTGAATAG
MYB12(qRT-PCR)F	TGTTCCCAAATTGGCTGGTC
MYB12(qRT-PCR)R	TCCTCCTCATCCTCGCTGAA
MYB12(RT-PCR)F	CTATCAGACCACAACCTGTAACC
MYB12(RT-PCR)R	ATGGAGTTGGAGGAGAAGAGTC
SP1	TCTGAACAGATGCCGTAAGAGCTGCC
SP2	CCGTGTTCCCAAATTGGCTGGTAACG
SP3	AGCAGTGGCAGTACAGGAGCTAGGAA
SP1'	TGGTTGGTGAGAGTGTGGCTGTTAGT
SP2'	CAACACCAACGACCCACGACACCTAA
SP3'	CGCTTGTCTTGTGAAGTCCCATAC
TIP(F)	CGAAGCCGAAACGGAGAAGAAT
TIP(R)	GGGTAGGGTGATTGGGAAGA

PCR Buffer 5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, 25 mmol/L $MgSO_4$ 3 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, ddH₂O 33 μ L。PCR 程序为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s, 55℃退火 30 s, 68℃延伸 30 s, 共 40 个循环; 最后 68℃延伸 10 min。扩增产物经回收、转化后送测序。测序结果利用 ExPASy-Translate tool (<http://web.expasy.org/translate>) 在线工具翻译成氨基酸序列, 采用 MEGA 5.1 软件与 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线工具将本研究获得的基因序列与已报道的来自不同亚组的 29 个 MYB 基因编码区序列进行比对, 并构建系统发生树(表 2); 运用软件 DNAMAN 进行 MYB 基因的氨基酸序列分析(表 2)。

采用 DNA 提取试剂盒提取‘索邦’花被片 DNA, 并以此为模板对 *LhsorMYB12* 基因进行 PCR 扩增, PCR 体系和程序同上。扩增测序后采用 Clustal Omega(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)在线工具进行序列比对, 确定外显子和内含子的数目、片段大小及基因结构。采用 BLAST 在线工具搜索已报道的单、双子叶植物的 MYB 基因序列, 获取对应基因的信息并绘制各基因的结构图。

1. 2. 2 *LhsorMYB12* 转录因子启动子的克隆

以‘索邦’花被片总 DNA 为模板, 根据 MYB12

核苷酸序列设计染色体步移引物 SP1~SP3 及第 2 轮步移引物 SP1'~SP3'(表 1)。采用 Genome Walking Kit 试剂盒 (TaKaRa) 对 *LhsorMYB12* 基因的启动子进行克隆。采用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 在线数据库对启动子序列进行分析, 并预测顺式作用元件。

1. 2. 3 半定量 RT-PCR 表达分析

以百合看家基因 *TIP* 作为内参, 设计内参引物(表 1), 并根据本研究获得的 *LhsorMYB12* 序列设计引物, 进行半定量 RT-PCR。PCR 反应体系为 20 μ L, 包括: cDNA 0.5 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物各 0.4 μ L, ddH₂O 8.7 μ L。扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 53℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 5 min。

1. 2. 4 实时荧光定量 PCR 表达分析

从‘索邦’中筛选出肌动蛋白基因 *Actin* 和网格蛋白基因 *Clathrin*, 分别作为 qRT-PCR 测定基因相对表达量的内参基因。以花被片各样品的 cDNA 为模板, 利用 Primer 3 软件设计荧光定量引物(表 1)。根据 SYBR® Premix Ex Taq TM II (TaKaRa) 试剂盒说明书, 使用 CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad) 进行扩增, 反应体系为 20 μ L, 扩增程序为: 95℃变性 30 s, 60℃退火和延伸 30 s, 共 39 个循环, 95℃变性 5 s, 60℃退火和延伸 30 s。每份样品重复 3 次。

2 结果与分析

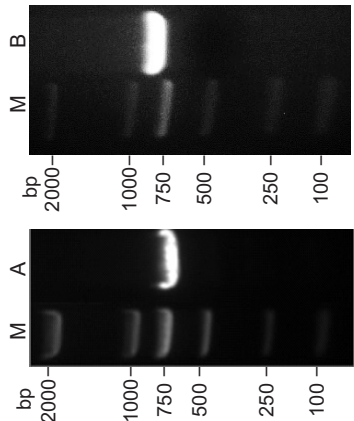
2. 1 ‘索邦’花青素苷合成转录因子 *LhsorMYB12* 的克隆与序列分析

研究结果显示, ‘索邦’花青素苷合成转录因子 *LhsorMYB12* 编码区序列长 720 bp, 核苷酸序列长 863 bp(登录号: MG593164), 共编码 239 个氨基酸(图 2)。

研究表明, 植物中大多数 MYB 蛋白具有 2 个重复的 MYB 结构域(R2R3)。本研究经过序列比对发现, *LhsorMYB12* 基因序列中存在 R2、R3 结构域, 与其他物种的 MYB 转录因子结构域具有高度同源性(图 3)。另外, R3 结构域中还存在 MYB

表 2 物种和基因信息
Table 2 Gene information of phylogenetic tree

物种 Species	基因名 Gene name	序列号 Accession No.
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>AtMYB75</i>	AT1G56650
	<i>AtMYB113</i>	AT1G66370
	<i>AtMYB90</i>	AT1G66390
	<i>AtMYB82</i>	AT5G52600
	<i>AtMYB111</i>	AT5G49330
	<i>AtMYB11</i>	AT3G62610
	<i>AtMYB12</i>	AT2G47460
金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i> L.	<i>AmROSEA1</i>	KP311682.1
芦笋 <i>Asparagus officinalis</i> L.	<i>AoMYB114</i>	XM_020400904.1
酒饼簕 <i>Atalantia buxifolia</i> (Poir.) Oliv.	<i>AbMYB</i>	ANI87843.1
花椰菜 <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>botrytis</i> L.	<i>BoMYB2</i>	GU219987.1
木豆 <i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	<i>CcMYB113</i>	XP_020209552.1
土瓶草 <i>Cephalotus follicularis</i> Labill.	<i>CfMYB</i>	GAV87101.1
桔梗 <i>Citrus micrantha</i> Wester.	<i>CmMYB</i>	ANI87839.1
油棕 <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	<i>EgMYB1</i>	XM_010932909.2
	<i>EgMYB1</i>	XP_010931211.1
巨桉 <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden	<i>EgMYB114</i>	XP_010064838.2
非洲菊 <i>Gerbera hybrid</i>	<i>GhMYB10</i>	AJ554700.1
大豆 <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	<i>GmMYB113</i>	XP_003529126.1
棉花 <i>Gossypium arboreum</i> L.	<i>GaMYB114</i>	NP_001316982.1
红薯 <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	<i>IbMYB1</i>	AB258984.1
岷江百合 <i>Lilium regale</i> E. H. Wilson	<i>LrMYB15</i>	LC021383.1
荔枝 <i>Litchi chinensis</i> Sonn.	<i>LcMYB1</i>	APP94121.1
苹果 <i>Malus × domestica</i> Borkh.	<i>MdMYB10</i>	EU518249.2
蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	<i>MtMYB1</i>	XP_013442371.1
葡萄风信子 <i>Muscari armeniacum</i> H. J. Veitch	<i>MaAN2</i>	KY781168.1
野生烟草 <i>Nicotiana attenuate</i> Torr. ex S. Watson	<i>NaMYB113</i>	XP_019240653.1
	<i>NaMYB113</i>	XM_019385108.1
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L.	<i>NtAn2</i>	FJ472647.1
矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i> E. Vilm	<i>PhAN2</i>	AB982128.1
	<i>PhMYB</i>	ADW94951.1
	<i>PhPHZ</i>	HQ116170.1
海枣 <i>Phoenix dactylifera</i> L.	<i>PdMYB</i>	XP_008779039.1
	<i>PdMYB114</i>	XP_008780817.1
沙梨 <i>Pyrus pyrifolia</i> (Burm.) Nak.	<i>PpMYB10</i>	GU253310.1
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	<i>RcMYB</i>	EEF28373.1
<i>Silene littorea</i> L.	<i>SIMYB6</i>	AMQ23631.1
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>SIANT1</i>	NM_001247488.1
台湾油点草 <i>Tricyrtis formosana</i> Baker.	<i>TfMYB</i>	BAW85722.1
<i>Tricyrtis</i> sp. ‘Shinonome’	<i>TrMYB1</i>	AB856412.1
	<i>TrMYB</i>	LC213902.1
郁金香 <i>Tulipa fosteriana</i> W. Irving	<i>TfMYB4</i>	AHY20035.1
	<i>TfMYB5</i>	KF990612.1
	<i>TfMYB3</i>	KF990610.1
绿豆 <i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i> (L.) R. Wilczek	<i>VrMYB113</i>	XP_014492680.1
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	<i>VvMYBA1</i>	AB097923.1
	<i>VvMYBA2</i>	AB097924.1
	<i>VvMYB90</i>	XP_002274992.2



M: DNA marker。A: *LhsorMYB12* 的扩增产物; B: *LhsorMYB12* 核苷酸序列扩增结果。
A: Product of *LhsorMYB12* amplification in cDNA; B: Product of *LhsorMYB12* nucleotide sequence.

图2 *LhsorMYB12* 基因的编码区序列和核苷酸序列扩增片段
Fig.2 PCR products of cDNA and gDNA of *LhsorMYB12*

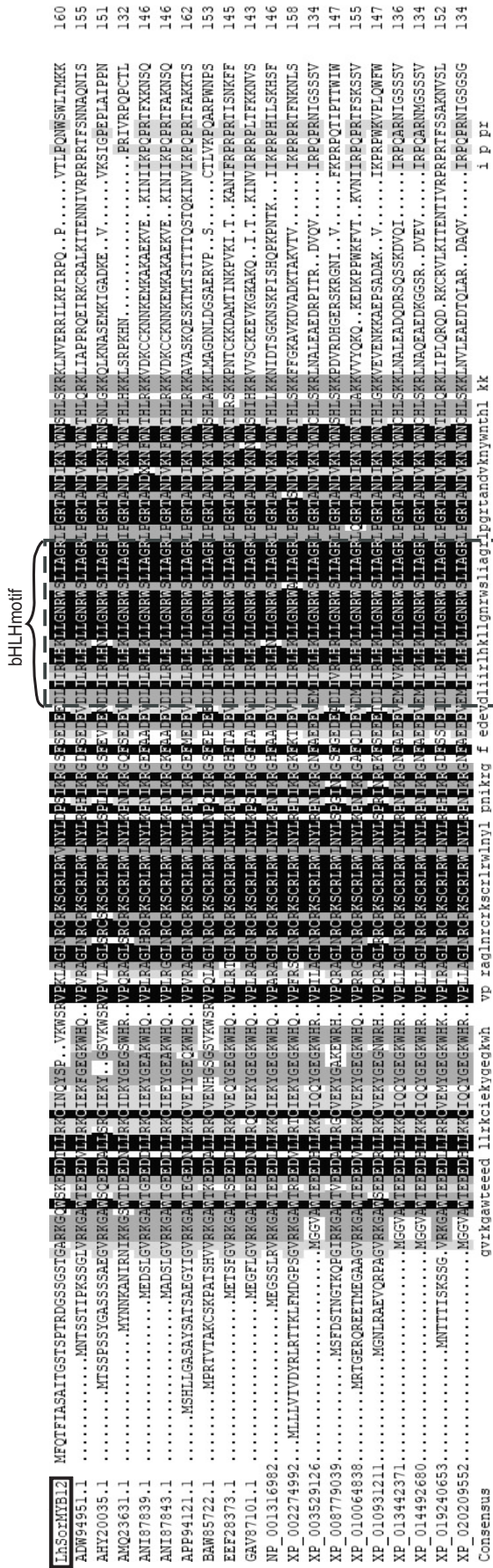


图3 R2R3-MYB结构域序列比对
Fig.3 Comparison of the deduced amino acid sequences of the R2 and R3 DNA-binding sites

和 bHLH 蛋白相互作用的特异性标签基序^[24]。基因结构分析表明, *LhsorMYB12* 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 与拟南芥、苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.)、葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 的 *MYB* 基因结构类似(图 4)。

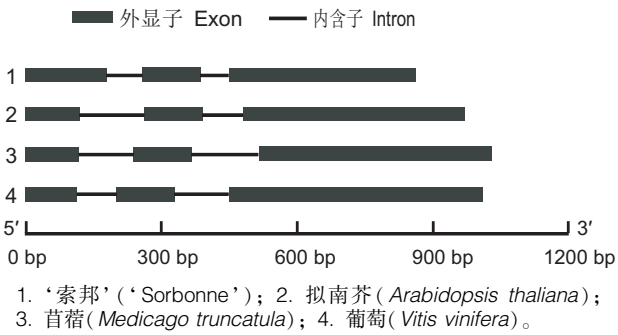


图 4 *LhsorMYB12* 基因结构
Fig. 4 Gene structure of *LhsorMYB12*

将克隆得到的 *LhsorMYB12* 测序结果与已报道的 29 个 *R2R3-MYB* 基因的氨基酸序列进行比对, 结果表明, *LhsorMYB12* 与 *MYB* 基因家族 G6 组中调控花青素苷合成的基因聚为一簇(图 5), 与 *MYB* 基因家族成员中调控类黄酮生物合成的 G7 组及细胞分化的 G15 组关系较远^[19], 说明 *LhsorMYB12* 基因在百合的花青素苷合成中可能起重要作用。在 G6 组中, 单子叶和双子叶植物分别聚为一簇, 单子叶植物中 *LhsorMYB12* 与百合科植物郁金香 (KF990612.1) 相似度最高, 亲缘关系较近。

2.2 *LhsorMYB12* 启动子的克隆与分析

本研究采用染色体步移技术获得了长度为 2143 bp 的 *LhsorMYB12* 基因启动子序列(图 6), 并将其与该基因的核苷酸序列进行拼接(图 7), 提

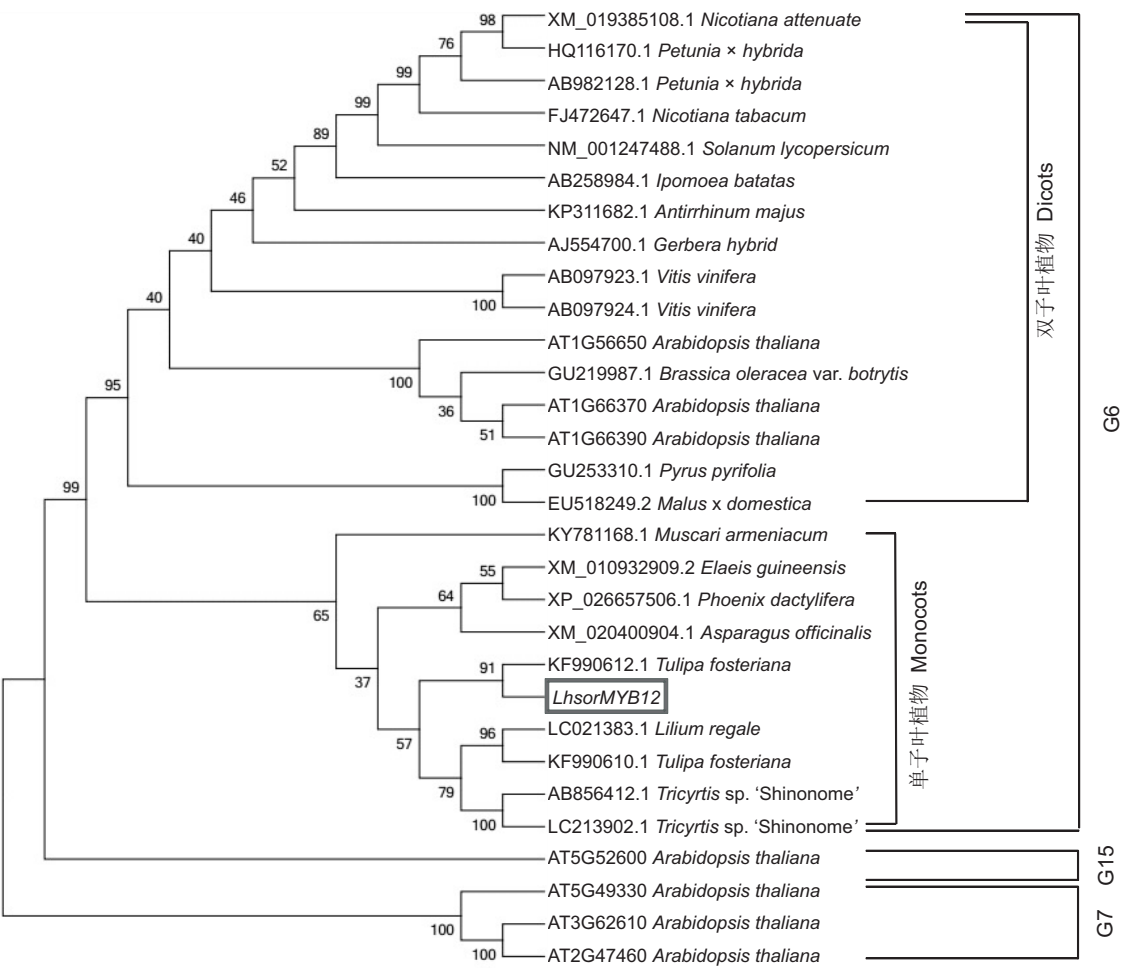


图 5 *LhsorMYB12* 基因系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of *LhsorMYB12*

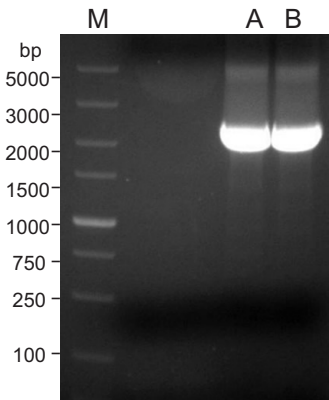


图 6 *LhsorMYB12* 启动子的扩增条带
Fig. 6 Amplification band of the *LhsorMYB12* promoter

交至 GenBank 数据库(登录号: MG593164)。顺式作用元件分析结果表明, 该基因启动子区内不仅含有核心启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box, 还包含多个与光响应相关的顺式元件、昼夜节律调控元件和 MYB 蛋白的识别与结合位点等(表 3)。

2.3 *LhsorMYB12* 转录因子的表达分析

分别选取‘索邦’花蕾 9 个不同发育时期的内、外花被片、花蕾的 11 个组织部位及 10 种光照处理后的花被片, 进行 *LhsorMYB12* 基因表达分析。半定量 PCR 实验结果显示(图 8), *LhsorMYB12* 基因仅在部分花部组织(外花被、内花被、花丝及花

GACAGAAGCCGAGCATAAGTATATGGCATGTGTACCTTATACATCAGTGATCGGTAGCTTGATATACACAATGGTTT
ATATGTGGCGTACATAGCCCCAGCTGTGGGGTTATCAGTCGGTACATGAGCAATTGGGAAAGATGTATGGGA
AGTTATAAAGTGGATTTTGTGCTACTTACGTAGGACTACAAAGAAGTGCTGGTATTGAGCAATTGACAGTATGGAA
CTACATTGTTATGTGGATGCTAATATGGGAGGAGATCTGAATCGGCGGAAGAGTACCATTGGCTACGTGTATATATT
TGGTAAACTGCTATGAGTTGGGCTTCTAAGTTACAGAAAATAGTTACATTATCAACGACGGAAGTAGAGTACGTA
GTGATCACGGAATAAGTAAATAAATAGTATGGCTATAGAATT TATGAAGGAAGTGGGAGTGGAGATGAGATACGGAAG
AGGACGTTGCATAGCGATAGCCAAAT TGTGATACATCTGGCTCAGAATTCGGTGTTTCATTGAGAACCAACAC
ATCTAGATCATGTACCATT TATCCGTTATT TGTCTGAGAAGAAGGTACTACAAC TAGTGAAGATTGTCGATATGAA
AAACCAAGCAGACATATTCTAAGGGAGTTCCTTTGGAGAAGCTTGGACTGGGATGATTGAGAAAACCCATAT
CAGGAGCCTCTAGTTAGGCTCTATAGTTTATTTATTTATTTCTTTTGAATAAATAAT TGGAGCAGATTACATC
CACATATTCAAATAAGTTCCTCAGTTACACTGGAACCTAGTATAGGACTCGTCTGTAGTAAAGTGATTGGTTGGA
CGCTTGTCTTGTGAAGTCCCATTACACCCCGTCAACCCATCGGATTGATGGAATAACAAAACAATCTTATTTTCT
TCTCTGCCCAACCATTTTACTGTATGGTTTCTGGATT TTTTCTTTTGGTTTAAAGCAGGGCCAAAAGGCAACATG
AAGTGAGTTGGAGGTGTCCATCTCACTACACAGATCCCCATTGTAGTTGAACAAAACAAAAGGCCACAACCTC
ATCTCCTTCAGTTGCTAATATAGCCACGAGAATTATCCCTTCTGCCTTATTCCTCTTAATTTAT TGGAGGTTTCAA
ACACCAACGACCCACGACACCTACTGTCTTTCAGCATTTATCAGTGGTCCATCATCGTAAGCGGTTGTGGACCAC
CGGATGGTCATAAATATATGGATCTGTTATGATAGTATGGAATGGTTGTAGAGTAATAATAGATGAAGCTACGACCT
TTGTAATCTCCACCAGTAGTCACTAATCTAACATCAATTTGGTTAGGAGAAAAATGTTGGGAGATTGCATGAAAA
TGTTGGGAAATATCGGACATTTGTAGAGAATGTGTTTGGGAACAAAGGTTCAATTACAATCTTGCACCCCAT
GGTTGGTGAGAGTGTGGCTGTTAGTTAGTGGGTGCTCTTTAAATAAATTATATTATGTTCTAATAAAATGAGCGAG
ATTTGCTTTCAAATGATGTTGTAGTGAGTGTCTCATGCATGGGGAGGAAGGAGACCACCAATGTTATATCAGATAT
TCTAAATTTGCTTCATGGAGCAAACTCCCTTCAAATGAAAGGAGCAAAAGAAAATCTCTAAAGAGTCTTTGGGTG
AGGTTGCTTATGGTGTGGCTTTACGGTGTTCTTCTTAGAGGAAGTAAATGCATATAGAGATTGGTGATGTTT
AATGGAGAGTATACAACATCTCTAGAACCTTGGTGGAATACATCATGTATATCTTTGACGATACAATATAGTTC
TACCCGTTAAGGGCATTATCATTGTGAAGTTCGTAACAATGGGCTAAAATGAGTATGTGCAACATAATATTGATGT
AAGTTGGTATCTATGAAAAAGTTGTAAATGTTATTATGAAAGCGACAGAGATTTCAGTTGGTAATGGTCTTAC
ATAAGAATCTTTGCGTTAAACATATATTTTCAGGTACGTGTACAGACAACCTTTGTGTAATGATCATGTTTATGAT
TTAATTTCTCATATACCTTTAGAGTCTGCCAAACCTTATCTCTATATATTTAAATCCTGGACAATGATAGAATCTATT
ACAATGTTTCAAACGTTTATGCTCCGCAATTACGGGCAGCACTTCACCCAAGAGATGTTAGCAGTGGCAGT
M F Q T F I A S A I T G S T S P T R D G S S G S
ACAGGAGCTAGGAAAGGTCAATGGAGCAAAAGAGAAGACACCCCTCTTCGCAATGCATCAACAGTACAGCC
T G A R K G Q W S K E E D T L L R K C I N Q Y S
CAGTGAAGTGGAGCGGTGTTCCCAAATTGGCTGTAAACGCTAGACGAGTTGTTTCTTTGACTTCTGGATAACA
P V K W S R V P K L A
ATGTTGATGATCGACTATAATTTAAACCTACTTTTAAAGGTCGTAACAGATGCCGTAAGAGCTGCCGGCTGCGATGG
G L N R C R K S C R L R W
GTCAACTATCTGGACCTAGCATAAAGCGAGGAGCTTCAGCGAGGATGAGGAGGACCTCATTACAGGCTTCAC
V N Y L D P S I K R G S F S E D E E D L I R L H
AAACTCTTGGGAAACAGGTGAGCTCTCATTAGATTACCAATTTTACATCAGCCCCGTCTACTAACTTACTAATGC
K L L G N
TCAGGTGGTCTTGATCGCTGCGGACTTCCCGGTGCGACGGCTAATGATATCAAGAACTACTGGAATTCACATT
R W S L I A G R L P G R T A N D I K N Y W N S H L
GAGTAAGAGAAAATTGAATGTTGAACGGAGAATTCTGAAACCTATCAGACACAACTGTAAACCTACCTCAAA
S K R K L N V E R R I L K P I R P Q P V T L L P Q N
ACTGGAGCTGGTTGACGATGAAGAAACAGGGTGAAGCTGAACCAAAAATGGAAGTAAGTACCATGAGTGAAGA
W S W L T M K K Q G E A E P K M E T K V P D E E
GGAGCATGATCAGTGGTTGATGATGATCAACGATTACAACCTTGAACGACCAAAATGGCTTCGAATCAGCATGCAGA
E H D Q W L M I N D Y N L N D Q M A S N Q H A D
TTTCGGGTTTGAATGTGCTTATGGAGTTGGAGGAGAAGAGTCCACTGTGGATGCAATTCCTCAATGGGACG
F G F E C A Y G V G G E E S T V D A I L Q W D
GTTTGCTTCTGATATTAGACTTTGGAGTGATTCCGAAGTTGAATAA
G L L S D I R L W S D S E V E

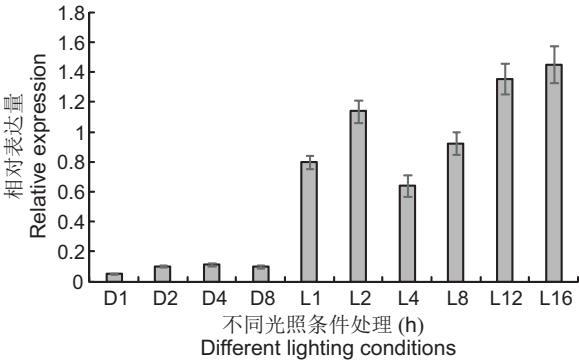
图 7 *LhsorMYB12* 启动子和核苷酸序列
Fig. 7 *LhsorMYB12* promoter and nucleotide sequence

表 3 *LhsorMYB12* 启动子顺式作用元件与功能分析
Table 3 *LhsorMYB12* promoter cis-acting elements and functional analysis

位点名称 Site name	核心序列 (5'-3') Sequence	数量 No.	功能 Function
ABRE	TACGTG	1	与脱落酸反应相关的顺式作用元件
ARE	TGGTTT	2	厌氧诱导所必须的顺式作用元件
AuxRR-core	GGTCCAT	1	参与生长素反应的顺式作用调控元件
Box 4	ATTAAT	1	参与光响应的保守 DNA 组件
Box I	TTTCAAA	2	光响应元件
CAAT-box	CAAAT, CAAT, CAATT, CCAAT	12	在启动子和增强子中常见的顺式作用元件
CE3	GACGCGTGTG	1	与 ABA 和 VP1 响应相关的顺式作用元件
G-box	CACGAC, TACGTG, GTACGTG	3	光响应相关的顺式作用元件
P-box	CCTTTTG	2	赤霉素反应元件
TATA-box	TATA, TTTTA, TAATA, TTTTA, ATATAT, ATTATA	15	转录起始位点-30 区的核心启动子元件
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	1	抗胁迫响应的顺式作用元件
TGA-element	AACGAC	1	生长素反应元件
circadian	CAANNNNATC	2	参与昼夜节律控制的顺式作用元件
MYBCORE	CNGTTR	5	MYB 蛋白结合位点
MYB1AT	WAACCA	1	脱水反应的 MYB 识别位点
MYCCONSSENSUSAT	CANNTG	1	MYC 的绑定位点
CURECORECR	GTAC	6	氧反应的顺式作用元件
POLLEN1LELAT52	AGAAA	3	花粉特异性激活调控元件



图 8 百合各组织 *LhsorMYB12* 的半定量 PCR 分析
Fig. 8 RT-PCR expression of *LhsorMYB12*
in different tissues



D: 黑暗处理; L: 光照处理。
7D: Dark treatment; L: Light treatment.

图 10 *LhsorMYB12* 在不同光照条件下的表达量
Fig. 10 Expression of *LhsorMYB12* under
different lighting conditions

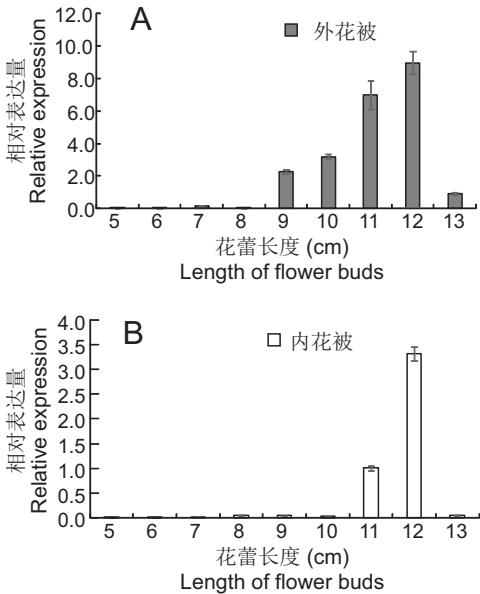


图 9 *LhsorMYB12* 在花蕾不同发育阶段的表达
Fig. 9 Expression of *LhsorMYB12* in different
development stages of flower buds

柱)中表达,且在表达量上具有差异,花被片中的表达量高于花丝和花柱。在花蕾发育过程中该基因的表达量逐渐增加,该基因在外花被(图 9: A)和内花被(图 9: B)中的表达量均在花蕾发育至 12 cm 时达到最高,之后开始降低,但在外花被中的表达起始时期早于内花被。本研究还发现,光处理会影响 *LhsorMYB12* 的表达(图 10),黑暗处理后该基因的表达水平开始降低,黑暗处理 1 h 时表达量最低,黑暗处理 2~8 h 后表达量上调;而光照处理下该基因的表达水平在处理 1~2 h 时逐渐上升,4 h 后开始下降,8~16 h 时又持续上升。

3 讨论

MYB 蛋白是一个包含植物转录因子的大家族,其家族成员在植物生长发育过程中发挥着各种功能^[19]。目前已从矮牵牛^[30]、非洲菊^[31]、金鱼草^[32]、红薯^[33]、拟南芥^[34]、烟草^[35]、葡萄^[36]、花椰菜^[37]等多种植物中克隆得到 *R2R3-MYB* 基因。功能分析结果表明 G6 组 *MYB* 基因均能调控花青素苷的合成和积累。本研究从东方百合‘索邦’中克隆得到 *LhsorMYB12* 基因,并对其序列及基因结构进行了生物信息学分析。与其他植物 *MYB* 相比, *LhsorMYB12* 包含 3 个外显子和 2 个内含子,其氨基酸序列具有 2 个 MYB 特有的结构域(R2 和 R3),且与已报道的 *MYB* 基因序列相似性较高^[23]。聚类分析结果表明,该基因与百合科植物郁金香亲缘关系最近,并与本研究选取的其他单子叶植物聚为一支。*LhsorMYB12* 基因与已报道的 *MYB* 基因 G6 组成员聚为一簇,说明该基因可能是花青素苷合成的重要调控基因。

基因表达实验结果显示,该基因在植物的花被片、花丝、花柱等花部组织中表达量较高,而在其他部位几乎不表达,表现出一定的组织特异性,研究结果与前人^[6]对其他百合品种该基因的表达分析结果一致。*LhsorMYB12* 在花蕾发育过程中表达量逐渐升高,花蕾发育至 12 cm 时表达量最高,之后开始降低,郁金香的 *TfMYB1* 基因在花朵发育过程中的表达水平呈先上升后下降的趋势,与 *LhsorMYB12* 具有相似的表达模式^[38]。这种基因表达量的变化与花被片的花色性状变化一致,提示 *LhsorMYB12* 的表达与‘索邦’花青素苷的积累呈正相关。

研究发现, *MYB* 基因的表达可受多种非生物胁迫诱导而出现节律性的昼夜变化^[39],如遮光处理会抑制花青素苷合成通路中结构基因的表达,影响花被片着色^[40]。光照处理后,‘索邦’花蕾中 *LhsorMYB12* 的表达量明显高于黑暗处理,说明该基因的表达受到光照调节。启动子分析结果显示, *LhsorMYB12* 序列上存在多个光响应元件,推测这些光响应元件可能与光照诱导 *LhsorMYB12* 表达上调相关。此外,光照处理 4 h 后 *LhsorMYB12*

的表达量低于处理 2 h 和 8 h 时的表达量,说明该基因的表达可能还受到其他因子的调控,其启动子中存在的参与昼夜节律调控的元件可能与 *LhsorMYB12* 表达量的变化相关。

参考文献:

- [1] 王秀刚. 百合种质资源的花色评价及形成的分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [2] Wang ZG, Meng D, Wang AD, Li T, Jiang S, *et al.* The methylation of the *PcMYB10* promoter is associated with green-skinned sport in Max Red Bartlett pear[J]. *Plant Physiol*, 2013, 162: 885–896.
- [3] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(5): 236–242.
- [4] 戴思兰, 洪艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3): 529–542.
- [5] Dai SL, Hong Y. Molecular breeding for flower colors modification on ornamental plants based on the mechanism of anthocyanins biosynthesis and coloration[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(3): 529–542.
- [6] 王瑜, 崔金腾, 张克中, 贾月慧. 百合花青素苷合成酶基因片段的克隆及表达分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 162–166.
- [7] Wang Y, Cui JT, Zhang KZ, Jia YG. Molecular cloning and expression analysis of anthocyanidin synthase gene fragment in *Lilium*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(10): 162–166.
- [8] 孔滢, 窦晓莹, 包放, 郎利新, 白锦荣. 百合花色机理研究进展[J]. 园艺学报, 2015, 42(9): 1747–1759.
- [9] Kong Y, Dou XY, Bao F, Lang LX, Bai JR. Advances in flower color mechanism of *Lilium*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(9): 1747–1759.
- [10] 黄洁, 刘晓华, 管洁, 吕英民. 百合分子育种研究进展[J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1793–1808.
- [11] Huang J, Liu XH, Guan J, Lü YM. Progress in molecular breeding of lily[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(9): 1793–1808.
- [12] 杨丽. 百合查尔酮合成酶基因(*CHS*)及其启动子的克隆与分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [13] 常小丽. 百合查尔酮合成酶基因花特异启动子的功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [14] 化占勇. 百合查尔酮合成酶(*CHS*)基因对花色调控影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [15] 娄倩. 百合花色形成关键基因(*CHS*)启动子功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.

- [12] 陈洁, 安利清, 王涛, 姚娜, 李璐滨, 等. 百合查尔酮合成酶基因克隆及其转化烟草的花色表达分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(8): 1511–1517.
Chen J, An LQ, Wang T, Yao N, Li LB, *et al.* Cloning of chalcone synthase gene in *Lilium* and expression analysis of flower colour changes in transgenic tobacco[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(8): 1511–1517.
- [13] 窦晓莹, 郎利新, 包放, 孔滢, 尚宏忠, 等. 东方百合查尔酮异构酶基因 *LhCHI* 的克隆及表达[J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(9): 6–11.
Dou XY, Lang LX, Bao F, Kong Y, Shang HZ, *et al.* Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene *LhCHI* in oriental hybrid lily (*Lilium* spp.)[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2015, 43(9): 6–11.
- [14] 阴婷. 垂花百合花青素基因 *ANS* 启动子的克隆及功能分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [15] Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K. Two *R2R3-MYB* genes, homologs of petunia *AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of Asiatic hybrid lily[J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 463–474.
- [16] Yamagishi M, Yoshida Y, Nakatsuka M. The transcription factor *LhMYB12* determines anthocyanin pigmentation in the tepals of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) and regulates pigment quantity[J]. *Mol Breeding*, 2012, 30: 913–925.
- [17] Yamagishi M, Toda S, Tasaki K. The novel allele of the *LhMYB12* gene is involved in splatter-type spot formation on the flower tepals of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.)[J]. *New Phytol*, 2014, 201(3): 1009–1020.
- [18] 马春雷, 姚明哲, 王新超, 金基强, 陈亮. 茶树 2 个 *MYB* 转录因子基因的克隆及表达分析[J]. 林业科学, 2012, 48(3): 31–37.
Ma CL, Yao MZ, Wang XC, Jin JQ, Chen L. Cloning and expression of two *MYB* transcription factors in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2012, 48(3): 31–37.
- [19] Du H, Feng BR, Yang SS, Huang YB, Tang YX. The *R2R3-MYB* transcription factor gene family in maize[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e37463.
- [20] Chen YH, Yang XY, He K, Liu MH, Li JG, *et al.* The *MYB* transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice *MYB* family[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 107–124.
- [21] Baumann K, Perez-Rodriguez M, Bradley D, Venail J, Bailey P, Jin H, *et al.* Control of cell and petal morphogenesis by *R2R3 MYB* transcription factors[J]. *Development*, 2007, 134(9): 1691–1701.
- [22] 曲丰佳, 安建平, 姚继芳, 李浩浩, 李媛媛, 等. 苹果 *MdMYB2* 基因的克隆及功能鉴定[J]. 园艺学报, 2017, 44(12): 2245–2254.
Qu FJ, An JP, Yao JF, Li HH, Li YY, *et al.* Gene cloning and functional identification of an apple *MdMYB2* gene[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(12): 2245–2254.
- [23] Allan AC, Hellen RP, Laing WA. MYB transcription factors that colour our fruit[J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(3): 99–102.
- [24] Feng SQ, Wang YL, Yang S, Xu YT, Chen XS. Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a *R2R3-MYB* transcription factor *PyMYB10*[J]. *Planta*, 2010, 232(1): 245.
- [25] Jackson D, Culianez-macia F, Prescott AG, Roberts K, Martin C. Expression patterns of *myb* genes from *Antirrhinum* flowers[J]. *Plant Cell*, 1991, 3(2): 115.
- [26] Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, Liu XL, Connors K, *et al.* Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1689–1703.
- [27] Espley RV, Hellen RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, *et al.* Red colouration in apple fruit is due to the activity of the *MYB* transcription factor, *MdMYB10*[J]. *Plant J*, 2007, 49(3): 414.
- [28] Schwinck KE, Boase MR, Bradley JM, Lewis DH, Derolles SC, *et al.* *MYB* and *bHLH* transcription factor transgenes increase anthocyanin pigmentation in petunia and lisianthus plants, and the petunia phenotypes are strongly enhanced under field conditions[J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5(603): 1–11.
- [29] Lotkowska ME, Tohge T, Fernie AR. The *Arabidopsis* transcription factor *MYB112* promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress[J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(3): 1862–80.
- [30] Quattrocchio F, Wing J, Woude K, Souer E, De VN, *et al.* Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1433–1444.
- [31] Elomaa P, Uimari A, Mehto M, Albert VA, Laitinen RA, *et al.* Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrid* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots[J]. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1831–1842.
- [32] Schiwinck K, Venail J, Shang YJ, Mackay S, Alm V,

- et al.* A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 831–851.
- [33] Mano H, Ogasawara F, Sato K, Higo H, Minobe Y. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1252–1268.
- [34] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant J*, 2008, 53: 814–827.
- [35] Pattanaik S, Yuan L. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco [J]. *Planta*, 2010, 231: 1061–1076.
- [36] Fournier-level A, Lacombe T, Le CL, Boursiquot JM, This P. Evolution of the *VvMybA* gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Heredity*, 2010, 104: 351–362.
- [37] Chiu LW, Zhou XJ, Burke S, Wu X, Prior RL, *et al.* The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1470–1480.
- [38] 袁媛. 郁金香花色苷合成基因的克隆及其表达差异与花色变化的关系 [D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [39] 韩晓敏, 邢丹丹, 杨杞, 李国婧, 王瑞刚. 中间锦鸡儿 *CiMYB177* 的克隆及表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2016, 52(5): 635–644.
- Han XM, Xing DD, Yang Q, Li GJ, Wang RG. Cloning and expression analysis of *CiMYB177* from *Caragana intermedia* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2016, 52(5): 635–644.
- [40] Li KT, Zhang J, Kang YH, Chen MC, Song TT. *McMYB10* modulates the expression of a ubiquitin ligase, *McCOP1* during leaf coloration in crabapple [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9(704): 1–14.

(责任编辑: 周媛)