

穗醋栗 *MYB10* 基因克隆结构分析及功能验证

冯秋影, 刘学, 杨琳琳, 付泽元, 徐启江

东北林业大学 生命科学学院 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

冯秋影, 刘学, 杨琳琳, 付泽元, 徐启江. 穗醋栗 *MYB10* 基因克隆结构分析及功能验证. 生物工程学报, 2022, 38(1): 275-286.
FENG QY, LIU X, YANG LL, FU ZY, XU QJ. Cloning, structure analysis and functional verification of *MYB10* in *Ribes* L.. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 275-286.

摘要: 为探究花色苷合成相关转录因子 *MYB10* 在不同颜色穗醋栗果实着色差异的分子机理, 通过 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 法从果实花青素含量有较大差异的黑穗醋栗 (*Ribes nigrum* L.)、红穗醋栗 (*Ribes rubrum* L.) 和白穗醋栗 (*Ribes album* L.) 中分别克隆出 *MYB10* 基因, 分别命名为 *RnMYB10* (KY786107)、*RrMYB10* (KY786108) 和 *RaMYB10* (MW660848)。系统发育分析表明, *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 在进化上具有同源性。实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 结果表明: 黑穗醋栗各时期果实中 *MYB10* 表达量均高于红穗醋栗且远远高于白穗醋栗。随着果实直径加大颜色加深, *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 表达量呈现先上升后下降的趋势 (在果实转色程度 75% 时达到最大值), *RaMYB10* 表达量极低, 几乎无表达。过表达 *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 的拟南芥呈现紫色叶柄和叶片, 过表达 *RaMYB10* 的拟南芥无明显变化。说明 *MYB10* 基因在穗醋栗果实呈色中发挥重要作用。

关键词: 穗醋栗; *MYB10*; 基因克隆; 表达量; 功能验证

Cloning, structure analysis and functional verification of *MYB10* in *Ribes* L.

FENG Qiuying, LIU Xue, YANG Linlin, FU Zeyuan, XU Qijiang

Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration (Northeast Forestry University), Ministry of Education, Harbin 150040, Heilongjiang, China

Abstract: This study aims to investigate the molecular mechanism of the transcription factor *MYB10*,

Received: February 4, 2021; **Accepted:** March 26, 2021; **Published online:** April 2, 2021

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (2572020DY15); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China (C2018002)

Corresponding author: XU Qijiang. Tel: +86-451-82191783; E-mail: qijiangxu@nefu.edu.cn

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (2572020DY15); 黑龙江省自然科学基金 (C2018002)

which is involved in anthocyanin biosynthesis, in different colors of *Ribes* L. fruitification. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) was used to clone the *MYB10* genes from *Ribes nigrum* L. (*RnMYB10*), *Ribes rubrum* L. (*RrMYB10*), and *Ribes album* L. (*RaMYB10*), respectively. Phylogenetic analysis showed that *RnMYB10* and *RrMYB10* were evolutionarily homologous. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) showed that the expression of *MYB10* in the fruits of *Ribes nigrum* L. was higher than that of *Ribes rubrum* L. and much higher than that of *Ribes album* L. The expression of *RnMYB10* and *RrMYB10* increased at first and then decreased as the fruit diameter increased and the fruit color deepened (the maximum expression level was reached at 75% of the fruit color change), while the expression level of *RaMYB10* was very low. Overexpression of *RnMYB10* and *RrMYB10* in *Arabidopsis thaliana* resulted in purple petioles and leaves, whereas overexpression of *RaMYB10* resulted in no significant color changes. This indicates that *MYB10* gene plays an important role in the coloration of *Ribes* L. fruit.

Keywords: *Ribes* L.; *MYB10*; gene cloning; expression level; functional verification

花青素属类黄酮化合物, 赋予植物果实、花和营养组织多种颜色 (从橙色、黄色、紫色到蓝色)^[1-2]。花青素由多种酶催化合成, 这些酶在细胞质内催化花青素的生物合成。首先, 苯丙氨酸被苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate-4-hydroxylase, C4H) 和 4-香豆酸-CoA 连接酶 (4-coumarate: coenzyme A ligase, 4CL) 转化为香豆酸酯-CoA。然后, 通过查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 和查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 将香豆酸酯-CoA 催化为黄烷酮。黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 和类黄酮 3'-单加氧酶 (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) 催化各种二氢黄酮醇的形成。最后, 花色苷是由二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol-4-reductase, DFR) 和花色苷合酶 (anthocyanin synthase, ANS) 合成的^[3-4]。合成的花色苷并不稳定, 通过 UDP-葡萄糖转移酶 (UDP-glucosyltransferase, UGT) 催化修饰形成稳定的花色苷^[5-6]。

花青素在植物组织中的积累取决于花青素生物合成相关基因在苯丙烷途径的类黄酮分支中的协同表达。该协调表达通常由 MYB-bHLH-

WD40 (MBW) 转录复合物控制。即 R2R3-MYB 结构域、基本螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 结构域和保守的 WD40 重复序列 (WD40 repeat proteins, WDR) 三者组装的复合物^[7-9]。R2R3-MYB 通常是花色苷生物合成中自然变异的主要决定因素^[10], 也是花色苷途径调控中研究最多的基因, 其通过正调节或负调节调控花色苷的生物合成^[11]。苹果中 3 个等位基因 *MdMYBA*、*MdMYB1* 和 *MdMYB10* 编码参与花色苷生成和果实着色的调节蛋白, 其表达的上调可促进花色苷的积累^[12-13]。此外, *MdMYB10* 的转录本差异积累导致苹果的红色和绿色条纹之间的花色苷含量差异^[14]。*LhMYB12* 和 *VvMYB1a* 分别负责亚洲杂交百合和葡萄中的花色苷积累^[15-16]。拟南芥 *MYB4* 及其同源物 *MYB7* 和 *MYB32* 与 bHLH 转录因子 TT8、GL3 和 EGL3 相互作用, 从而干扰 MBW 复合物的转录活性, 在苯丙烷代谢途径中起阻遏作用^[17]。*MYB3* 对 C4H 表达的抑制作用是由于核心抑制因子 LNK1 和 LNK2 可以促进 *MYB3* 与 C4H 的结合^[18]。*FaMYB1* 在调节草莓花色苷和黄酮醇的生物合成中起到抑制转录的作用, 以平衡草莓果实成熟后期所产生的花色苷色素水平^[19]。

穗醋栗是虎耳草科 (Saxifragaceae) 茶藨子 (*Ribes* L.) 属植物, 按其农艺性状分为黑穗醋栗 (*Ribes nigrum* L.)、红穗醋栗 (*Ribes rubrum* L.) 和白穗醋栗 (*Ribes album* L.)。其果实中含多种维生素、糖、酸等营养物质, 可鲜食也可加工成果酱果酒, 具有很高的营养保健功能^[20]。

迄今为止, 虽有穗醋栗花色苷合成的相关研究^[21], 但穗醋栗中 MYB 转录因子的结构与功能信息研究较少。MYB 转录因子在植物花青素生物合成途径中发挥着重要的调控作用。本研究对黑、红、白 3 种醋栗的 MYB10 直系同源基因进行基因结构、时空表达模式和功能的比较研究, 有助于解析 MYB10 转录因子在醋栗花青素生物合成途径中的功能, 为深入分析黑、红、白 3 种醋栗花青素合成差异是源于 MYB10 的基因结构变化、表达模式变化还是其他基因的作用? 为揭示醋栗品质资源丰度和遗传改良提供科学依据, 对于进一步了解醋栗花青素生物合成的复杂调控过程、培育高花青素合成品种具有重要理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑穗醋栗、红穗醋栗和白穗醋栗取材于东北农业大学。选取 3 种穗醋栗 5 个发育时期的果实 (果径 ≤ 5.0 mm、5.1–7.0 mm、7.1–9.0 mm、9.1–11.0 mm、 ≥ 11.1 mm) 为样本 (图 1)。采样后立即放入液氮中速冻, 随后储存于本实验室 -80 °C 冰箱。每个样本独立取样 3 次。

1.2 花色苷含量测定

用 pH 示差分光光度法进行穗醋栗花色苷含量测定^[22]。用镊子和手术刀片分别取 3 种穗醋栗 5 个发育时期果实的果皮, 各 0.5 g, 放到 HCl 甲醇缓冲液 (1%) 中, 黑暗条件下抽提 2 h。

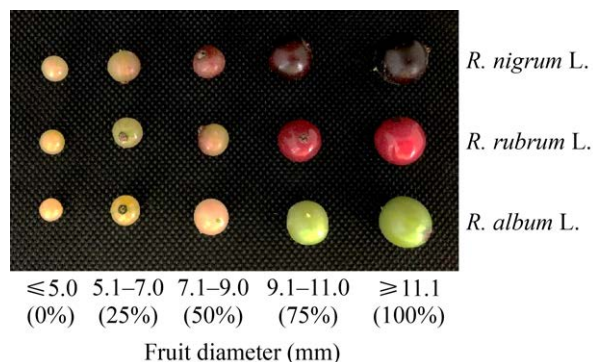


图 1 三种穗醋栗不同生长发育时期的果实
Figure 1 The fruits of three varieties of *Ribes* L. at different growth stages.

各提取液在 553 nm 和 600 nm 处的吸光值用分光光度计测定, 花色苷相对含量 = $OD_{553} - OD_{600}$ 。每个样品进行 3 次重复测定。

1.3 RNA 提取和 MYB 基因克隆

使用植物通用总 RNA 提取试剂盒 (Biotek) 分别提取 3 种穗醋栗的总 RNA, 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, 用 NanoDrop 2 000 微型紫外分光光度计 (Thermo Scientific) 测定 RNA 的浓度。使用 TransScript First Strand cDNASynthesis kit 反转录试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 和 P19E 进行反转录反应。

在 NCBI 数据库中找到已发表的葡萄、梨、苹果等物种的 MYB 基因 cDNA 序列, 设计 3' RACE 引物 (表 1)。20 μ L 反应体系如下: 10 \times HiFi 缓冲液 II 2 μ L, dNTPs (250 μ mol/L) 1.6 μ L, 1 μ L 反转录产物 cDNA 为模板, *TransTaq*TM HiFi DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物 MYB-3' RACE 和 P18E 各 0.4 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。反应程序: 预变性 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物进行电泳检测 (120 V, 20 min), 使用

全自动凝胶成像系统成像，确定目的条带。回收纯化的目的片段与 pEASY-T5 Cloning Kit 载体进行连接转化，阳性克隆菌株菌液送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。

再依据测序所得 3'端序列设计 5' RACE 引

物用于巢式 PCR。5' Outer PCR 以加 dA 尾的 cDNA 为模板，Anchor 和 MYB-5' RACE-GSP1 为引物；用 Adaptor 和 MYB-5' RACE-GSP2 进行 5' Inner PCR，克隆 MYB 5' RACE 序列，所需实验步骤与方法同 3' RACE (表 1)。

表 1 穗醋栗 MYB 基因克隆、表达分析和载体构建引物

Table 1 Primers used for cloning, expression analysis and vector construction of *Ribes L. MYB* genes

| Primer names | Primer sequences (5'→3') | Size (bp) |
|-----------------|--|-----------|
| P19E | GACTCGAGTGCACATCG (T) ₁₇ | 34 |
| P18E | GACTCGAGTGCACATCG | 17 |
| MYB-3'RACE | CATCTTCACCGTTGTTGTTGTC | 22 |
| Anchor | GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T) ₁₇ | 37 |
| Adaptor | GGCCACGCGTCGACTAGTAC | 20 |
| MYB-5'RACE-GSP1 | GACGATGAATCACGAGGC | 18 |
| MYB-5'RACE-GSP2 | TCGTTTCCTCTTCCTCCA | 18 |
| RnMYB-RT-F | CCTGGAAGAACAGCAAATG | 19 |
| RnMYB-RT-R | CCGAGGAAGAGGTCTAATGA | 20 |
| RrMYB-RT-F | CCTGGAAGAACAGCAAATG | 19 |
| RrMYB-RT-R | CCGAGGAAGAGGTCTAATGA | 20 |
| RaMYB-RT-F | TGAGGACACCAAATCTCATTC | 22 |
| RaMYB-RT-R | TCAAGAGGCTTCGACAACAA | 20 |
| Actin-F | CCGTCTCCAGAGTCCAGAACAATAC | 25 |
| Actin-R | CTCACTGAAGCTCCTCTCAACCCAAAG | 27 |
| MYB10-F | TGCCCCTTTTCTTCGTAA | 18 |
| MYB10-R | AAATCAGGCCACCATTTCTT | 20 |
| attB-MYB10-F | AAAAAAGCAGGCTTGCCCCTTTTCTTCGTAA | 30 |
| attB-MYB10-R | AGAAGCTGGGTAAATCAGGCCACCATTTCTT | 31 |
| attB-adaptor-F | GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT | 28 |
| attB-adaptor-R | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT | 29 |
| AtCHS-RT-F | CTCACCTTCCATCTCCTTAAAGAC | 24 |
| AtCHS-RT-R | ATATAAACAACACACATGCACTCG | 24 |
| AtCHI-RT-F | GCTTCTCCAAGGATTCTTCTATA | 23 |
| AtCHI-RT-R | GTCAAGTTGCTTCAACAAGTCTG | 23 |
| AtF3H-RT-F | TTTCTGAAATGAATCGTCTTGCT | 23 |
| AtF3H-RT-R | TTCTCACTGTACACCTCTGTGGT | 23 |
| AtDFR-RT-F | CCCCGAGAACGAAGTTATCAAGC | 23 |
| AtDFR-RT-R | GACACAAAATACATCCAGGCAGT | 23 |
| AtANS-RT-F | TATTTCTTCCACCTTGCTATCCT | 24 |
| AtANS-RT-R | TCTTCTAGTCCTCCAACCTTCTTTC | 24 |
| AtUFGT-RT-F | GCTGAAGCTCTAGAATCAAGTGGA | 24 |
| AtUFGT-RT-R | TCTCAAAGAAGGGTCTGCAGATC | 24 |

1.4 生物信息学分析

使用 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) 网站对 3 种 MYB10 基因编码蛋白的理化性质进行预测。用 NCBI 中 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 数据库对其结构域进行预测。用在线软件 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白的二级结构。用软件 DNAMAN 8 进行多序列比对, 用 MEGA7^[23]进行系统进化树的构建。

1.5 实时荧光定量分析

分别提取 3 种穗醋栗 5 个发育时期果实的 RNA, 使用试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa), 将 1 μg RNA 反转录成 cDNA。使用 LightCycler®480 II 实时荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR (Roche), 15 μL 反应体系如下: 7.5 μL SYBR®Green PCR Master 酶, 1.5 μL cDNA 模板 (20 μL 反转录产物加 200 μL ddH₂O 稀释), 上下游引物各 0.6 μL, 4.8 μL ddH₂O。反应程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 反应 40 个循环。Actin 作为本实验的内参基因, 通过 2^{-ΔΔC_t}法分析基因的相对表达水平。每个样品进行 3 次生物学重复和 3 次试验重复。

1.6 过表达载体构建

依据所获得 RnMYB10、RrMYB10 和 RaMYB10 基因的 cDNA 序列, 用基因特异性引物进行 PCR 获得目的片段。将目的片段连接到 pEASY-T5 克隆载体, 转化感受态细胞。以测序正确的阳性克隆质粒为模板, 利用 Gateway 技术, 通过 BP 和 LR 两个反应完成 RnMYB10、RrMYB10 和 RaMYB10 的过表达载体构建。采用三亲杂交法将构建的 3 种 MYB10 植物过表达载体转入 LBA4404 农杆菌中。

1.7 拟南芥转化, 筛选和鉴定

用蘸花法转化拟南芥 (Col-0), 收取 T1 代种子。T1 代种子放在 20 mg/L 潮霉素筛选培养基上筛选, 待存活植株长出 2-4 片叶子后, 移到混合土中 (土: 珍珠岩=2: 1)。待拟南芥叶片稍大时, 用十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法提取拟南芥叶片基因组 DNA, 用 TransZol 试剂盒提取拟南芥叶片的 RNA, 对目的基因分别进行 PCR 和反转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测。同时, 用体视显微镜记录转 RnMYB10、RrMYB10 和 RaMYB10 拟南芥的表型变化。最后, 通过 RT-qPCR 技术, 分析花色苷合成相关基因 (AtCHS、AtCHI、AtF3H、AtDFR、AtANS 和 AtUGT) 在野生型和转基因拟南芥中的表达情况。

2 结果与分析

2.1 RnMYB10、RrMYB10 和 RaMYB10 基因克隆及序列分析

采用 RACE 法分别克隆出 RnMYB10、RrMYB10 和 RaMYB10 基因, 测序结果显示, RnMYB10 全长 969 bp, 开放阅读框长 819 bp, 编码 272 个氨基酸; RrMYB10 全长 965 bp, 开放阅读框长 819 bp, 编码 272 个氨基酸; RaMYB10 全长 927 bp, 开放阅读框长 402 bp, 编码 133 个氨基酸。由于 RaMYB10 基因的核苷酸序列缺少 39 个碱基且存在 7 个碱基突变位点, 进而使得其编码的氨基酸序列只有 133 个氨基酸。

通过 ExPASy 网站预测, RnMYB10、RrMYB10 和 RaMYB10 的分子量分别为 31.40 kDa、31.52 kDa 和 15.06 kDa, GRAVY 分别为 -0.834、-0.803 和 -0.803, pI 分别为 8.37、8.38 (>7) 和 5.00 (<7), 推测 RnMYB10 和 RrMYB10 为亲水

碱性蛋白, *RaMYB10* 为酸性蛋白。SOPMA 对 3 种 *MYB10* 基因编码蛋白二级结构的预测结果可知, *RnMYB10*、*RrMYB10* 和 *RaMYB10* 编码的氨基酸残基中, α 螺旋分别占 27.94%、28.31% 和 10.53%, 延伸链分别占 14.71%、16.18% 和 27.82%, β 转角分别占 5.15%、4.04% 和 3.76%, 不规则卷曲分别占 51.21%、51.47% 和 57.89%。

2.2 多序列比对和系统进化分析

穗醋栗 *MYB10* 多序列比对结果表明 (图 2), *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 氨基酸序列相似性高达 100%。在 *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 氨基酸序列 N 端都具有 R2 和 R3 结构域, 属于典型的 R2R3-MYB 转录因子。在 R3 结构域内还存在一个 bHLH 结合结构域, 又称 ID 结构域; 而 *RaMYB10* 缺失 R2 和 R3 结构域。

采用邻接法构建系统进化树, 进一步对穗醋栗 *MYB10* 与其他植物 *MYB* 之间的进化关系进行分析, 结果表明 (图 3), 该系统发育树分成 3 个进化分支, 烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、矮牵牛 (*Petunia integrifolia* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 和 3 种穗醋栗等 14 个物种聚为一支, 其中, 黑穗和红穗醋栗之间的亲缘关系更近, 与白穗醋栗较远。草莓 (*Fragaria × ananassa* L.)、桃 (*Prunus persica* L.)、栽培苹果 (*Malus domestica* L.) 和梨 (*Pyrus pyrifolia* var. *culta* L.) 聚为一个分支。双子叶植物三枝九叶草 (*Epimedium sagittatum* L.)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 和苦荞麦 (*Fagopyrum tataricum* L.) 与玉米 (*Zea mays* L.)、高粱 (*Sorghum bicolor* L.)、谷子 (*Setaria italica* L.) 和甘蔗 (*Saccharum hybrid* L.) 等 9 个单子叶植物聚为一个分支。

2.3 *RnMYB10*、*RrMYB10* 和 *RaMYB10* 基因在穗醋栗果实 5 个发育时期的表达模式分析

分析 3 种穗醋栗果实 5 个发育时期的花色

苷含量及 *MYB10* 基因的相对表达量。花色苷测定结果如表 2 所示, RT-qPCR 结果如图 4 显示, 在黑穗醋栗中, *RnMYB10* 基因表达量随着果径增大逐渐升高, 在转色程度接近 75% 时达到最大, 随后呈现下降趋势。*RnMYB10* 基因最大表达量是转色 50% 时期的 4 倍左右, 随后果实完全成熟呈现小幅下降。此过程花色苷的含量仍在增加。

在红穗醋栗中, *RrMYB10* 基因的表达量也呈现为先上升后下降, 与 *RnMYB10* 表达模式相同。转色 75% 时期的 *RrMYB10* 表达量是转色 50% 时期的 4.5 倍左右。红穗醋栗中花色苷含量持续积累。

白穗醋栗果实花色苷含量极低, 在果实发育初期含量稍高, 约为完全成熟时花色苷含量的 4 倍, 尽管在果径为 9.1–11.0 mm 时花色苷含量出现小幅度上升, 但整个果实发育时期花色苷含量整体呈现下降趋势。*RaMYB10* 基因表达量极低, 几乎无表达。说明 *MYB10* 基因在穗醋栗果实着色过程中发挥重要作用。

2.4 *RnMYB10*、*RrMYB10* 和 *RaMYB10* 基因的功能分析

2.4.1 转基因拟南芥的 PCR 检测结果

在过表达 *RnMYB10*、*RrMYB10* 和 *RaMYB10* 基因的拟南芥 T1 代植株中, 各选取 2 株进行基因组 DNA 的提取, 并用 *MYB10* 基因特异性引物进行 PCR 验证, PCR 结果显示这 6 个株系中目的基因已经整合到拟南芥基因组中 (图 5)。

2.4.2 转基因拟南芥的 RT-PCR 检测结果

取上述株系拟南芥嫩叶提取 RNA 进行 RT-PCR 检测, 以此来验证穗醋栗 *MYB10* 基因是否在植物体内表达。如图 6 所示, 结果表明外源基因确实已经转入到拟南芥基因组 DNA 中, 并且在转录水平得到表达。

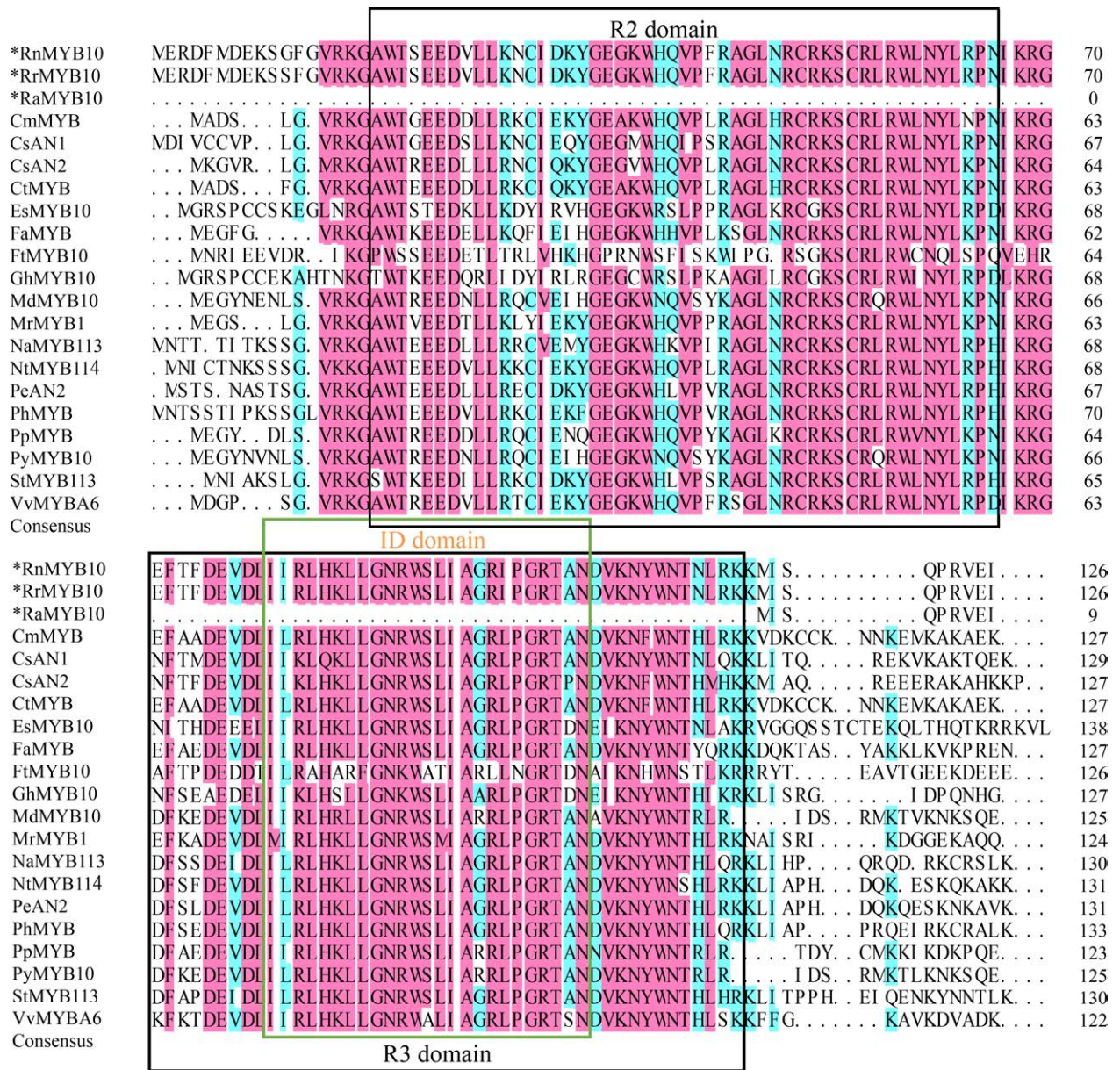


图 2 穗醋栗 MYB10 与其他物种 MYB 氨基酸多序列比对

Figure 2 Alignment of the predicted amino acid sequences of RnMYB10, RrMYB10 and RaMYB10 in *Ribes L.* and those of several other plants. The black frame represent R2R3 domain, the green frame represent ID domain. MYB related genes in other species include: NtMYB114 (NP_001306786.1, *Nicotiana tomentosiformis L.*), PeAN2 (ABO21072.1, *Petunia integrifolia L.*), VvMYBA6 (ACL97979.1, *Vitis vinifera L.*), CsAN2 (AOY10781.1, *Camellia sinensis L.*), PhMYB (ADW94951.1, *Petunia × hybrida L.*), StMYB114 (ALA13583.1, *Solanum tuberosum L.*), MdMYB10 (ACQ45201.1, *Malus domestica L.*), FtMYB10 (ALT31509.1, *Fagopyrum tataricum L.*), GhMYB10 (ABR01222.1, *Gossypium hirsutum L.*), EsMYB10 (AFH03062.1, *Epimedium sagittatum L.*), PpMYB (AKI23599.1, *Prunus persica L.*), FaMYB (ABX79947.1, *Fragaria x ananassa L.*), PyMYB10 (ADN26574.1, *Pyrus pyrifolia var. culta L.*), CsAN1 (AOM63231.1, *Camellia sinensis L.*), CtMYB (ANI87841.1, *Citrus trifoliata L.*), MrMYB1 (ADG21957.1, *Morella rubra L.*), NaMYB113 (OIS96677.1, *Nicotiana attenuata L.*), CmMYB (ANI87835.1, *Citrus maxima L.*).

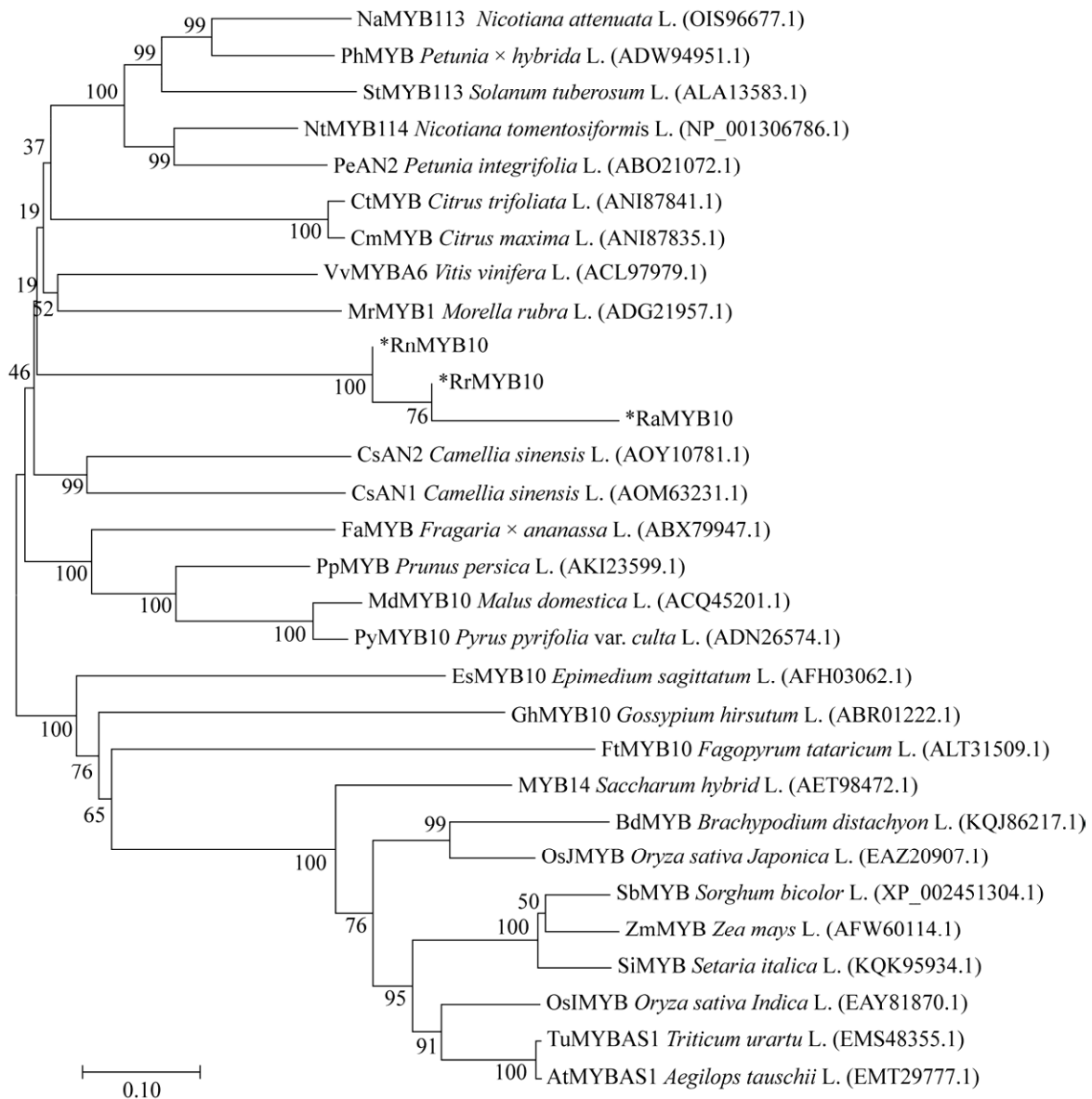


图3 穗醋栗 MYB10 与其他物种 MYB 系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of MYB10 in *Ribes L.* and MYB transcription factors from other plants. The phylogenetic tree was constructed with MEGA 7.0 using the neighbor-joining (NJ) method and 1 000 bootstrap replicates.

表2 三种穗醋栗果皮花色苷含量 (U/g FW)

Table 2 Anthocyanin content of three varieties of *Ribes L.*

| Fruit diameter (mm) | ≤5.0 (0%) | 5.1–7.0 (25%) | 7.1–9.0 (50%) | 9.1–11.0 (75%) | ≥11.1 (100%) |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>R. nigrum</i> L. | 0.044 0±0.002 1 ^a | 0.262 0±0.081 0 ^a | 1.593 0±0.304 4 ^a | 11.068 0±1.312 0 ^a | 31.190 0±2.247 8 ^a |
| <i>R. rubrum</i> L. | 0.034 0±0.009 1 ^b | 0.151 0±0.085 0 ^b | 0.903 0±0.156 0 ^b | 5.156 0±0.577 5 ^b | 12.760 0±1.102 6 ^b |
| <i>R. album</i> L. | 0.014 0±0.001 7 ^c | 0.007 3±0.001 2 ^c | 0.004 1±0.001 0 ^c | 0.006 0±0.001 3 ^c | 0.002 9±0.000 7 ^c |

Note: lowercase letters indicate significant difference between varieties of *Ribes L.* at 0.05 level.

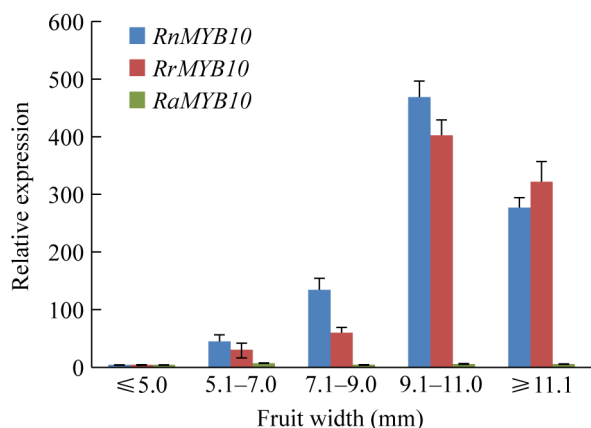


图 4 穗醋栗 *MYB10* 的相对表达量

Figure 4 Relative expression levels of *RnMYB10*, *RrMYB10* and *RnMYB10* in *Ribes L.*

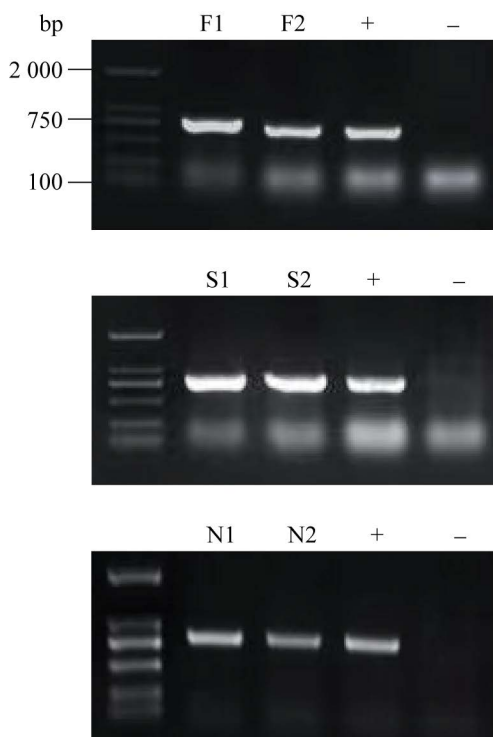


图 5 过表达 *MYB10* 拟南芥 PCR 检测

Figure 5 PCR analysis of transgenic *Arabidopsis*. F1: overexpressing of *RnMYB10 Arabidopsis* strain (OE *RnMYB10-1*), F2: OE *RnMYB10-2*, S1: OE *RrMYB10-1*, S2: OE *RrMYB10-2*, N1: OE *RaMYB10-1*, N2: OE *RaMYB10-2*, +: positive control, -: negative control.

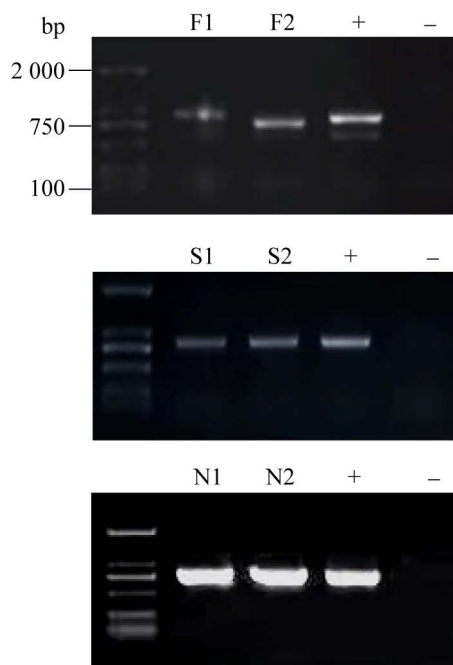


图 6 过表达 *MYB10* 拟南芥 RT-PCR 检测

Figure 6 RT-PCR analysis of transgenic *Arabidopsis*.

2.4.3 转基因拟南芥表型观察结果

通过体视显微镜分别观察 3 种转 *MYB10* 基因拟南芥的表型变化, 结果如图 7 所示, 同样生长条件下, 与野生型拟南芥相比, 过表达 *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 基因的拟南芥呈现出紫色的叶柄, 过表达 *RrMYB10* 基因的拟南芥呈现出紫色的叶片, 而过表达 *RaMYB10* 的拟南芥无明显颜色变化。

2.4.4 转基因拟南芥中合成花色苷相关结构基因的表达模式

通过 RT-qPCR 技术, 对 T1 代转基因拟南芥中合成花色苷相关基因的表达进行检测, 结果表明 (图 8), 在转 *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 的拟南芥中, 花色苷合成相关结构基因 *AtCHS*、*AtCHI*、*AtF3H*、*AtDFR*、*AtANS* 和 *AtUFGT* 的表达量显著提高, 且 *RnMYB10-1* 和 *RrMYB10-1* 株系中 6 个基因的表达量高于 *RnMYB10-2* 和

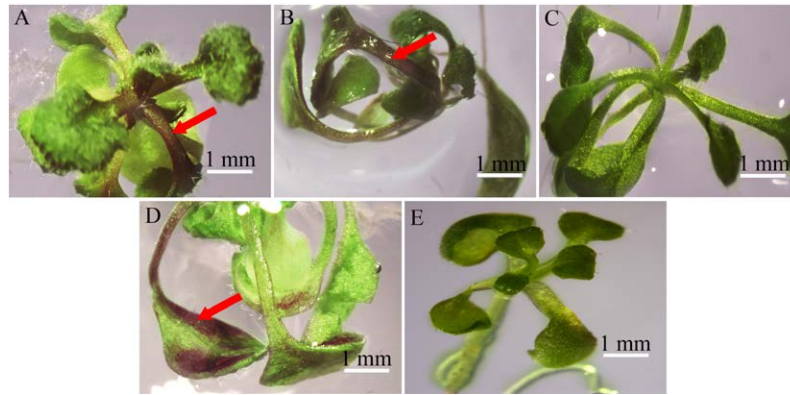


图 7 过表达 *MYB10* 拟南芥

Figure 7 Transgenic *Arabidopsis* overexpressing *RnMYB10* (A), *RrMYB10* (B), and *RaMYB10* (C). (D) The leaves of transgenic *Arabidopsis*. (E) Wild type *Arabidopsis*. Bar=1 mm, red arrows indicate purple leaves and petioles.

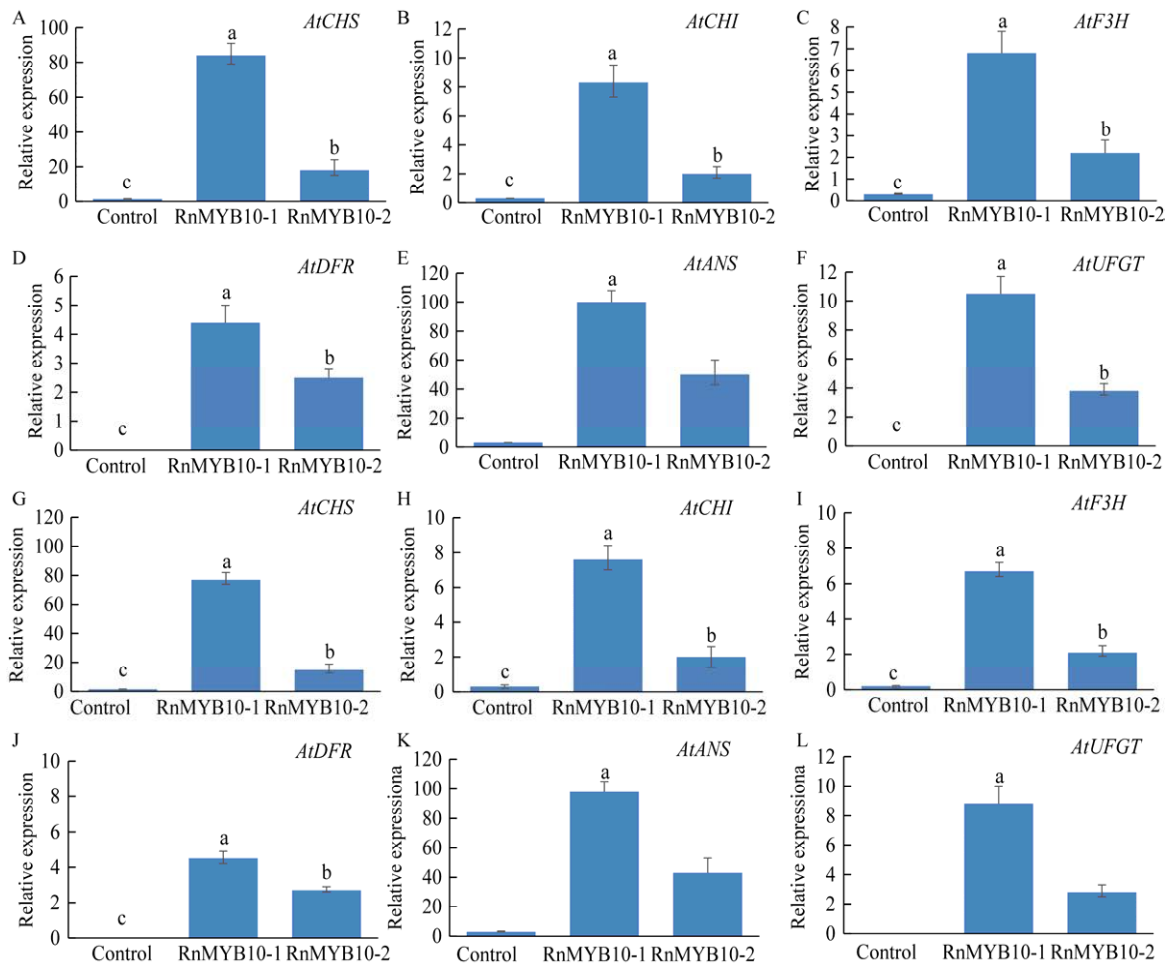


图 8 过表达 *MYB10* 拟南芥中花色苷合成相关结构基因的表达水平

Figure 8 The expression level of structural genes related to anthocyanin synthesis in transgenic *Arabidopsis*. RnMYB10-1 and RnMYB10-2: *Arabidopsis* strains overexpressing *RnMYB10*. RrMYB10-1 and RrMYB10-2: *Arabidopsis* strains overexpressing *RrMYB10*. Control: wild type *Arabidopsis*.

RrMYB10-2 株系。说明 *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 基因已经成功整合到转基因拟南芥的染色体上。

3 讨论

MYB 转录因子或 MBW 复合物调控花青素的生物合成, 其中 R2R3-MYB 家族转录因子在植物生长发育过程中起着至关重要的作用^[24-26]。本研究利用 RACE 技术克隆出 *RnMYB10*、*RrMYB10* 和 *RaMYB10* 基因, 将 *RnMYB10*、*RrMYB10* 和 *RaMYB10* 编码氨基酸序列与其他物种的 MYB 进行多序列比对和系统进化分析, 发现 *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 同源性 100%, 且属于典型的 R2R3-MYB 转录因子, 在 R3 结构域中存在的 ID 结构域为形成 MBW 复合物提供 bHLH 转录因子结合位点^[27-29]。而 *RaMYB10* 氨基酸序列仅有 133 个氨基酸, 缺失 R2R3 结构域, 推测其不具备 *MYB10* 转录因子的正常功能, 进而导致穗醋栗无法合成花色苷, 使其果实呈现白色。且进化分析发现白穗醋栗进化与黑穗和红穗醋栗相差较远。

紫色胡萝卜中 *DcMYB6* 基因的表达水平显著高于非紫色胡萝卜^[30], 类似地, *MYB10* 基因在黑穗醋栗中的表达量最高, 红穗醋栗次之, 在白穗醋栗中的表达量极低。研究表明, *MYB* 基因的表达量与花色苷的合成呈正相关, 但在我们的研究中, 果实在转色程度为 75% 时, *MYB10* 基因的表达量开始下降, 此时花色苷含量在积累, 证明果实成熟的过程中, 果实中花色苷的形成受其他结构基因和转录因子的共同调控。

MYB 转录因子在植物中具有多重生物学功能, R2R3-MYB 转录因子的过表达可诱导花青素生物合成结构基因的表达, 并提高植物组织中的花青素含量。仅 *MYB* 的过表达已用于增强几种植物物种中的花色苷含量。过表达 MYB 转录因子 *NtAn2* 可以增强烟草中花色苷生物合

成结构基因的表达水平和花色苷积累^[31], 而 *PttMYB119* 的过表达在许多杂交杨树组织中也具有相同作用^[32]。本实验将 *RnMYB10*、*RrMYB10* 和 *RaMYB10* 通过农杆菌介导的遗传转化转入拟南芥, 过表达 *RnMYB10* 和 *RrMYB10* 的拟南芥叶片和叶柄呈现出不同程度的紫色变化, 而过表达 *RaMYB10* 的拟南芥无明显变化。说明黑穗醋栗和红穗醋栗中 *MYB10* 基因对花色苷的生物合成具有促进作用, 且呈现出明显的颜色变化。该结果为进一步了解穗醋栗花色苷的生物合成和积累提供了新的证据。

REFERENCES

- [1] Zong Y, Li SM, Xi XY, et al. Comprehensive influences of overexpression of a MYB transcriptor regulating anthocyanin biosynthesis on transcriptome and metabolome of tobacco leaves. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5123.
- [2] Han ML, Yin J, Zhao YH, et al. How the color fades from *Malus halliana* flowers: transcriptome sequencing and DNA methylation analysis. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 576054.
- [3] Xu W, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(3): 176-185.
- [4] 李慎昌, 孙磊, 樊秀彩, 等. 刺葡萄 R2R3-MYB 转录因子 VdMYB14 调控类黄酮合成功能解析. *果树学报*, 2020, 37(6): 783-792.
Li SC, Sun L, Fan XC, et al. Functional analysis of *Vitis davidii* R2R3-MYB transcription factor VdMYB14 in the regulation of flavonoid biosynthesis. *J Fruit Sci*, 2020, 37(6): 783-792 (in Chinese).
- [5] 徐智慧, 高作利, 任邵琦, 等. 彩色水稻花色苷的研究进展. *分子植物育种*, 2021: 1-13.
Xu ZH, Gao ZL, Ren SQ, et al. Research progress in anthocyanin of colored rice. *Mol Plant Breed*, 2021: 1-13.
- [6] 李慎昌. VdMYB14 调控刺葡萄果实花色苷的合成[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
Li SC. VdMYB14 regulates the anthocyanin synthesis in *Vitis davidii*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese).
- [7] Ramsay NA, Glover BJ. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 63-70.

- [8] Xie Y, Tan H, Ma Z, et al. DELLA proteins promote anthocyanin biosynthesis via sequestering MYBL2 and JAZ suppressors of the MYB/bHLH/WD40 complex in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 2016, 9(5): 711-721.
- [9] Arlotta C, Puglia GD, Genovese C, et al. MYB₅-like and bHLH influence flavonoid composition in pomegranate. *Plant Sci*, 2020, 298: 110563.
- [10] Cristina C, Veronika W, Henning W, et al. Allelic variation of MYB10 is the major force controlling natural variation in skin and flesh color in strawberry (*Fragaria* spp.) fruit. *Plant Cell*, 2020, 32(12): 3723-3749.
- [11] Chen G, Xu P, Pan J, et al. Inhibition of FvMYB10 transcriptional activity promotes color loss in strawberry fruit. *Plant Sci*, 2020, 298: 110578.
- [12] Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, et al. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 958-970.
- [13] Takos AM, Jaffé FW, Jacob SR, et al. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiol*, 2006, 142(3): 1216-1232.
- [14] Teliás A, Lin-Wang K, Stevenson DE, et al. Apple skin patterning is associated with differential expression of MYB10. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 93.
- [15] Kobayashi S. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 2004, 304(5673): 982.
- [16] Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, et al. Two R2R3-MYB genes, homologs of *Petunia* AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of Asiatic hybrid lily. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(3): 463-474.
- [17] Wang XC, Wu J, Guan ML, et al. *Arabidopsis* MYB₄ plays dual roles in flavonoid biosynthesis. *Plant J*, 2020, 101(3): 637-652.
- [18] Zhou ML, Zhang KX, Sun ZM, et al. LNK₁ and LNK₂ corepressors interact with the MYB₃ transcription factor in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol*, 2017, 174(3): 1348-1358.
- [19] Aharoni A, de Vos CHR, Wein M, et al. The strawberry FaMYB₁ transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J*, 2001, 28(3): 319-332.
- [20] 顾云娇. 穗醋栗种质资源表型多样性分析及鲜食果实复合保鲜技术研究[D]. 延吉: 延边大学, 2019.
- Gu YJ. Phenotypic diversity analysis of currant germplasm resources, their evaluation for fresh eating and studies on compound controlled atmosphere technology of fresh berries[D]. Yanji: Yanbian University, 2019 (in Chinese).
- [21] 刘学, 冯秋影, 杨琳琳, 等. 穗醋栗 *dfr* 的克隆及其在果实成熟过程中的表达. *生物工程学报*, 2020, 36(8): 1620-1628.
- Liu X, Feng QY, Yang LL, et al. Cloning and expression of *dfr* in *Ribes* L. during fruit maturation. *Chin J Biotech*, 2020, 36(8): 1620-1628 (in Chinese).
- [22] 霍琳琳, 苏平, 吕英华. 分光光度法测定桑葚总花色苷含量的研究. *酿酒*, 2005, 32(4): 88-89.
- Huo LL, Su P, Lv YH. Measurement of total anthocyanins in mulberry by UV-visible spectroscopy. *Liquor-making*, 2005, 32(4): 88-89 (in Chinese).
- [23] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [24] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573-581.
- [25] Xie Y, Chen P, Yan Y, et al. An atypical R2R3 MYB transcription factor increases cold hardiness by CBF-dependent and CBF-independent pathways in apple. *New Phytol*, 2018, 218(1): 201-218.
- [26] Jiang CK, Rao GY. Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants. *Plant Physiol*, 2020, 183(2): 637-655.
- [27] Du H, Yang SS, Liang Z, et al. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 106.
- [28] Zhou X, Liao Y, Kim SU, et al. Genome-wide identification and characterization of bHLH family genes from *Ginkgo biloba*. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13723.
- [29] Goossens J, Mertens J, Goossens A. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *J Exp Bot*, 2017, 68(6): 1333-1347.
- [30] Xu ZS, Feng K, Que F, et al. A MYB transcription factor, DcMYB₆, is involved in regulating anthocyanin biosynthesis in purple carrot taproots. *Sci Rep*, 2017, 7: 45324.
- [31] Pattanaik S, Kong Q, Zaitlin D, et al. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco. *Planta*, 2010, 231(5): 1061-1076.
- [32] Cho JS, Nguyen VP, Jeon HW, et al. Overexpression of PtrMYB119, a R2R3-MYB transcription factor from *Populus trichocarpa*, promotes anthocyanin production in hybrid poplar. *Tree Physiol*, 2016, 36(9): 1162-1176.

(本文责编 陈宏宇)