

朱璐, 李淑顺, 闻婧, 等. 鸡爪槭 *ApMYB306* 基因克隆及功能分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(6): 1512-1520.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.06.022

## 鸡爪槭 *ApMYB306* 基因克隆及功能分析

朱璐<sup>1</sup>, 李淑顺<sup>1</sup>, 闻婧<sup>1</sup>, 马秋月<sup>1</sup>, 颜坤元<sup>1</sup>, 任杰<sup>2</sup>, 李倩中<sup>1</sup>

(1.江苏省农业科学院休闲农业研究所, 江苏 南京 210014; 2.安徽省农业科学院农业工程研究所, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** 采用基因克隆的方法获得鸡爪槭金陵黄枫 R2R3-MYB 转录因子基因, 经同源比对和生物信息学分析将其命名为 *ApMYB306*。通过组织表达特性分析发现 *ApMYB306* 在茎中表达量最高, 叶中表达量次之, 根中表达量最低。在洋葱表皮细胞中瞬时表达分析结果显示 *ApMYB306* 蛋白定位于细胞核中。*ApMYB306* 对于高温、低温、干旱和盐胁迫均有明显的响应, 受胁迫诱导后表达量显著上升。冷冻处理后, 转 *ApMYB306* 基因株系成活率较野生型升高。*ApMYB306* 超表达拟南芥株系较野生型开花延迟, 表明 *ApMYB306* 可能通过抑制拟南芥 *FT* 基因启动子的表达调控花期。

**关键词:** 鸡爪槭; *ApMYB306* 基因; 抗逆性

中图分类号: S687

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2020)06-1512-09

## Cloning and functional analysis of *ApMYB306* gene in *Acer palmatum*

ZHU Lu<sup>1</sup>, LI Shu-shun<sup>1</sup>, WEN Jing<sup>1</sup>, MA Qiu-yue<sup>1</sup>, YAN Kun-yuan<sup>1</sup>, REN Jie<sup>2</sup>, LI Qian-zhong<sup>1</sup>

(1. Institute of Leisure Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Agricultural Engineering, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

**Abstract:** In this study, the R2R3-MYB transcription factor gene was obtained from *Acer palmatum* Jinlinghuangfeng by gene cloning and named *ApMYB306* via homology comparison and bioinformatics analysis. Through the analysis of tissue expression characteristics, it was found that the expression level of *ApMYB306* was the highest in the stem, followed by leaves, and the expression level was lowest in the roots. The results of transient expression analysis in onion epidermal cells showed that *ApMYB306* protein was localized in the nucleus. *ApMYB306* had obvious response to high temperature, low temperature, drought and salt stress, and its expression level increased significantly after induction. After freezing treatment, the survival rate of *ApMYB306* transgenic lines was higher than that of the wild-type lines. The flowering time of *ApMYB306* overexpressing *Arabidopsis* lines was later than that of the wild-type lines, which indicated that *ApMYB306* might regulate the flowering time by inhibiting the expression of the *FT* gene promoter.

**Key words:** *Acer palmatum*; *ApMYB306* gene; stress resistance

鸡爪槭 (*Acer palmatum* Thunb.) 为槭树科槭属

植物, 其叶色丰富, 叶形优美, 是中国极为重要的彩叶树种, 具有很高的观赏价值, 在彩叶苗木生产中具有十分重要的地位<sup>[1]</sup>。在鸡爪槭苗木栽培和生产过程中, 干旱、盐胁迫、寒害和热胁迫等非生物胁迫是制约鸡爪槭生产和园林应用的关键因素, 因此挖掘鸡爪槭抗性基因, 解析其调控机制, 可为获得优良抗性的鸡爪槭品种及其分子遗传育种提供重要基础。

收稿日期: 2020-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31700628); 江苏省自然科学基金项目(BK20170602); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(17)1004]

作者简介: 朱璐(1987-), 女, 山东淄博人, 博士, 助理研究员, 研究方向为鸡爪槭遗传育种。(E-mail) luzhu@jaas.ac.cn

通讯作者: 李倩中, (E-mail) qianzhongli@jaas.ac.cn

MYB 转录因子大家族包括 3 个亚类,即 MYB1R、R2R3-MYB 和 MYB3R。其中,植物中最大的亚类是 R2R3-MYB 转录因子<sup>[2-3]</sup>。例如,模式植物拟南芥具有 126 个 R2R3-MYB 转录因子<sup>[3]</sup>,而玉米的基因组则具有 173 个<sup>[4]</sup>,苹果具有 222 个<sup>[5]</sup>,番茄具有 121 个<sup>[6]</sup>,黑杨木具有 192 个<sup>[7]</sup>。R2R3-MYB 转录因子功能繁多,参与调控植物初生和次生代谢反应、植物生长发育及生物和非生物胁迫等过程。例如,苹果 *MdMYB23* 受冷胁迫诱导。*MdMYB23* 超表达的转基因苹果愈伤组织和拟南芥耐寒性增强<sup>[8]</sup>。水稻 *OsMYB2* 在盐、冷和干旱胁迫下表达增强,超表达植株比野生型对盐、冷和干旱胁迫的耐受性更强<sup>[9]</sup>。而在拟南芥中,*AtMYB30*、*AtMYB60* 和 *AtMYB96*(亚家族 1)<sup>[10-12]</sup>,*AtMYB13* 和 *AtMYB15*(亚家族 2)<sup>[13]</sup>,*AtMYB102* 和 *AtMYB41*(亚家族 11)<sup>[14-15]</sup>,*AtMYB33* 和 *AtMYB101*(亚家族 18)<sup>[16]</sup>,*AtMYB2*、*AtMYB62* 和 *AtMYB108*(亚家族 20)<sup>[17]</sup>,*AtMYB44*、*AtMYB70*、*AtMYB73* 和 *AtMYB77*(亚家族 22)<sup>[18-19]</sup>等均参与调控生物和非生物胁迫响应途径。菊花 R2R3-MYB 转录因子 *CmMYB2* 不仅参与非生物胁迫应答,还参与调控菊花和拟南芥开花<sup>[19-20]</sup>。本研究根据转录组序列克隆鸡爪槭 R2R3-MYB 转录因子基因,并对其基因和编码的氨基酸序列进行比对分析,利用荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对其基因在不同组织和非生物胁迫下的表达进行分析,为进一步研究鸡爪槭 R2R3-MYB 转录因子响应非生物胁迫和开花机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及处理方式

供试鸡爪槭品种金陵黄枫种植于江苏省农业科学院槭树良种基地。取当年生新鲜枝条作为外植体,通过组织培养快繁获得无菌幼苗,将幼苗练苗并移栽到穴盘中培养。取生长一致的约 10 cm 左右的幼苗用于低温(4 °C)处理和高温(40 °C)处理。将组织培养获得的幼苗在 Hoagland's 营养液中水培,取生长一致的约 10 cm 左右的幼苗用于盐胁迫(200 mmol/L NaCl)处理和干旱(20% PEG6000)处理。4 种非生物胁迫处理均以上午 9:00 为 0 h,分别在 0 h、1 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h 取样。低温处理和高温处理取样部位为第 3 和第 4 片完全展开叶,盐胁迫处理和干旱处理取样部位为不定根,每个处理 3 个

重复。未处理的穴盘苗和水培小苗植株,取其根、茎和叶片,立即放入液氮中,-80 °C 冰箱保存备用,每个组织 3 个重复。将 3 周龄的转基因拟南芥株系置于光照培养箱(Sanyo, MIR-154)4 °C 处理 24 h,-9 °C 处理 6 h 后,转移到正常培养条件的光培箱培养 14 d,统计观察成活率。培养条件为光周期 16 h/8 h(光照/黑暗),温度 22 °C/18 °C,光照度 200  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,相对湿度为 70%。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

总 RNA 提取使用 Trizol(TaKaRa, Tokyo, Japan)提取法,使用 RNase-free DNase I(TaKaRa 公司产品)去除基因组 DNA。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA,利用反转录酶 *M-MLV* 反转录获得 cDNA 备用。

### 1.3 鸡爪槭金陵黄枫 *ApMYB306* 基因克隆及表达载体构建

从鸡爪槭转录组库(SRX833686 ULRs: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)中查找获得鸡爪槭 *ApMYB306* cDNA 全长序列,利用 Primer Premier 5.0 设计 *ApMYB306* 全长引物和 RT-PCR 引物。利用高保真酶 *Ex Taq*(TaKaRa 公司产品)进行 PCR 扩增获得 *ApMYB306* cDNA 全长序列,将扩增产物连接 pMD19-T 载体(TaKaRa 公司产品)进行测序,获得 *ApMYB306* 在鸡爪槭金陵黄枫中的 cDNA 全长序列。将 *ApMYB306* 开放阅读框(ORF)使用含有酶切位点 *BamH I* 和 *Not I* 序列的引物扩增,同时使用 *BamH I* 和 *Not I* 对扩增产物和 pENTR1A(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)进行双酶切。将酶切后的产物回收并利用连接酶 T4 DNA ligase(TaKaRa 公司产品)进行连接,获得载体 pENTR1A-*ApMYB306*。将该载体进行单酶切,使之线性化,通过 LR(LR Clonase™ II enzyme system, Invitrogen)重组构建到 pMDC43 载体<sup>[21]</sup>上,最终获得载体 pMDC43-*ApMYB306*,提取质粒-20 °C 保存备用。

### 1.4 *ApMYB306* 序列比对和系统进化树的构建

从 GenBank 下载 *ApMYB306* 同源蛋白质氨基酸序列,与 *ApMYB306* 氨基酸序列共同使用 ClustalW 软件进行多重比对分析<sup>[22]</sup>。使用 MEGA 7.0 软件,基于 Neighbor-joining 方法构建系统进化树。

### 1.5 *ApMYB306* 亚细胞定位

通过基因枪(PDS-100, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)轰击洋葱表皮细胞,将 2  $\mu\text{g}$  质粒 pMDC43-*ApMYB306* 和 pMDC43 空载(对照)分别瞬时

转入洋葱表皮细胞。将转化的洋葱表皮细胞在 MS (Murashige and Skoog) 培养基上 23 °C 暗培养 16 h, 通过激光共聚焦显微镜 (LSM800, Zeiss, Germany) 观察 GFP 蛋白的表达情况。

### 1.6 *ApMYB306* 基因表达分析

利用荧光定量 PCR 技术对 *ApMYB306* 基因进行表达分析, 使用 *ApActin* 基因 (MN026864) 作为内参基因。每个 qPCR 体系终体积为 20.0  $\mu$ l, 均由 10.0  $\mu$ l SYBR Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> (TaKaRa 公司产品), 0.4  $\mu$ l 上游和下游引物 (10  $\mu$ mol/L) (F: 5'-TGTC-CCCTGAAAAACCAAATA-3'; R: 5'-TTCCTCCCCAT-CAGCAA-3'), 5.0  $\mu$ l 模板 cDNA (1 ng/ $\mu$ l) 和 0.4  $\mu$ l ROX 组成。使用 Real Time PCR 荧光定量仪 (Applied Biosystems 7500, Carlsbad, CA, USA) 进行相对实时荧光定量 PCR。反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 35 s 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s<sup>[23]</sup>。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算相对表达量, 每个反应 3 个生物学重复。

### 1.7 转 *ApMYB306* 基因拟南芥

将构建好的质粒 pMDC43-*ApMYB306* 转化农杆菌 *EHA105*, 利用蘸花法侵染拟南芥花序, 在含有潮霉素 (Hygromycin) 的培养基上筛选获得转基因阳性株系。选择 2 个独立的转基因株系用于表型分析。

### 1.8 *ApMYB306* 与拟南芥 *AtFT* 启动子结合性试验

将 1.0 kb 的 *AtFT* 启动子构建到 pCAMBIA1381-LUC 载体, 与 pMDC43-*ApMYB306* 分别转化农杆菌 GV3101, 将含有阳性质粒的农杆菌和增强表达菌株 P19 培养至 OD 值 1.5 左右。然后离心, 收集菌体, 将菌体使用侵染缓冲液 [10 mmol/L 2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸 (MES)、50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 100  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮 (AS)] 重悬。根据试验要求将含有不同载体的菌液混合, 同时在每一个组合中添加菌株 P19。将混合后的菌液离心, 黑暗静止 3 h, 然后注射烟草叶片。注射后的烟草暗培养 1 d, 光培养 2 d 后摘下侵染叶片, 在背面喷施荧光素酶 (LUC) 底物甲虫荧光素 (Beetle luciferin), 暗处理 5 min, 使用天能化学发光仪器 5200Multi 进行曝光拍照。

### 1.9 数据分析

试验数据采用 Excel 2016 和 SPSS 19.0 进行统计整理及分析, 差异显著性采用 ANOVA 分析, Duncan's 检验 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ApMYB306* 基因碱基序列

根据转录组中的序列设计全长特异引物, 以鸡爪槭金陵黄枫 cDNA 为模板, 利用高保真酶 PCR 技术获得一个 R2R3-MYB 转录因子基因的全长序列, 通过同源比对和生物信息学分析将其命名为 *ApMYB306*。*ApMYB306* 开放阅读框 (ORF) 具有 1 065 bp, 编码一条 355 个氨基酸残基的多肽。推测蛋白质相对分子质量约为  $3.967 \times 10^4$ , 理论等电点为 6.35。将 *ApMYB306* 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 站点进行 BLASTp 比对, 发现 *ApMYB306* 编码的氨基酸序列与龙眼 (*Dimocarpus longan*) MYB22 基因 (Accession Number: QCH41134.1)、柑桔 (*Citrus macrophylla*) MYB60 基因 (Accession Number: ABK59039.1)、小柑桔 (*Citrus clementina*) MYB306 基因 (Accession Number: XP\_006431144.1)、葡萄 (*Vitis vinifera*) MYB306 基因 (Accession Number: XP\_002283575.1)、榴莲 (*Durio zibethinus*) MYB306 基因 (Accession Number: XP\_022751922.1)、哥伦比亚锦葵 (*Herrania umbratica*) MYB306 基因 (Accession Number: XP\_021297573.1) 和可可 (*Theobroma cacao*) MYB306 基因 (Accession Number: XP\_007032529.1) 编码的氨基酸序列进行比对 (图 1), 同源性依次为 78.99%、67.5%、65.57%、66.95%、65.66%、67.80%、67.80%。*ApMYB306* 蛋白分别在 14~63 aa 和 67~111 aa 处含有 2 个 MYB 结构域, 为典型的 R2R3-MYB 转录因子。另外将 *ApMYB306* 蛋白氨基酸序列与其他物种中的同源序列进行多重比较, 并进行聚类分析, 构建系统进化树。从系统进化树中可以看出 *ApMYB306* 与龙眼 DIMYB22 亲缘关系最近, 推测其可能具有类似的功能 (图 2)。

### 2.2 *ApMYB306* 基因组织表达特性及定位

取鸡爪槭幼苗根、茎和叶提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *ApMYB306* 基因在不同组织中的表达。结果表明, *ApMYB306* 基因在茎中表达量最高, 叶片次之, 根中表达量最低 (图 3)。

为了检测 *ApMYB306* 蛋白的亚细胞定位情况, 本研究在洋葱表皮细胞中瞬时表达了 p35S::GFP-*ApMYB306*。结果表明 *ApMYB306* 蛋白在细胞核中积累。同时, 在整个细胞中都观察到了阳性对照 p35S::GFP 瞬时表达产生的 GFP 信号 (图 4)。

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| ApMYB306 | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R L R W T N Y L R P C I K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| DIMYB22  | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R L R W T N Y L R P C I K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| CmMYB60  | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R L R W T N Y L R P C I K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| CcMYB306 | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R L R W T N Y L R P C I K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| VvMYB306 | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R I R W T N Y T R P C T K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| DzMYB306 | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R I R W T N Y T R P C T K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| HuMYB306 | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R I R W T N Y T R P C T K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| TcMYB306 | MGRPFCCDRVGVKKGFWTPEEDI I I VSYTCEHGPCNWRVAVPNTGLI R C S K S C R L R W T N Y L R P C I K R C N F T D E E E K V I I H L C A L I G N R W A A T A S Y L F O R T  | 100 |
| ApMYB306 | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C T G T F . . . G H R S K D D C T S S S A S . . . . . C S T S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A T C F A I S P F K P N T I F D C I N E T S N F G F M F A R S A                   | 193 |
| DIMYB22  | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C T G T F . . . K G C I R . . . . . R G I S S S A S . . . . . C S T S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A T C F A I S P F K P S F T F . . . . . A G F I N T S N A O               | 183 |
| CmMYB60  | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C T A A A C C S F E N S C Y R D F T A S A S S . . . . . C O I S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A T C A A I S P D K . A S T I S F T K F A . . . . . N G F I S Y T K F A         | 193 |
| CcMYB306 | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C T A A A C C S F E N S C Y R D F T A S A S S . . . . . C O I S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A T C A A I S P D K . A S T I S F T K F A . . . . . N G F I S Y T K F A         | 193 |
| VvMYB306 | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C T G S . . . . . S S D G H S R D . . . . . V S T A S . . . . . C S T S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A T F E A I S I E K P H S S S D C I N P T . . . . . N G V C I C T R E G | 188 |
| DzMYB306 | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C . . . . . G S E C Y F R E G I S S S S T S P K O I S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A I Y D A L S P E K . S S G L A E L K P S . . . . . I G Y I S Y A K F R                   | 190 |
| HuMYB306 | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C . . . . . G E C H S K D C I S S S . . . . . C O I S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A I S D A L S P E K . S I A L A C K E S . . . . . N G Y I S Y A K F G                     | 185 |
| TcMYB306 | D N C T K N Y W N T H I K K R I K R I C . . . . . G S E C H S R D G S S S S . . . . . C K I S R G C W F R R I Q T C T H V A K C A I S D A L S P E K . S S G L A E L K P S . . . . . N G Y I S Y A K F G                 | 185 |
| ApMYB306 | S C S S T T T Y A S S T E N I A R I I K G W R N S P K S A S S N S A V I C C S F N N N K F A D G G C T E S T S S E F T P S T K A D N K . . . . . N N N N C M E T F E A F E S I F G I F S F L S S N S .                   | 290 |
| DIMYB22  | S S S S S S S T Y A S S T E N I A R I I K G W R N S P K S A S S N S A A I S . . . . . K N F A R G C G T E S T S S E F T P S T K A N I N N N I N N H N G V F L P F Y F E S I F A L F S L C S S N S .                     | 276 |
| CmMYB60  | V C A F . . . . . Y A S S T E N I A R I I K G W R N A C S A S S N S G V I D C N S I N N N V N H I A G . A B S A S E F T P S K V A . . . . . S N S T G I F L S P A F E S I F G F S F L C S S N S T                       | 283 |
| CcMYB306 | V C A F . . . . . A Y A S S T E N I A R I I K G W R N A C S A S S N S G V I D C N S I N N N V N H I A G . A B S A S E F T P S K V A . . . . . S N S T G I F L S P A F E S I F G F S F L C S S N S T                     | 283 |
| VvMYB306 | C A S . . . . . S Y A S S T E N I A R I I E G W R N S P K C A R A S S A T I C N S F I N . . . . . T A G . T E S T S S E C T E S A . . . . . A N N E D I E L T E Y A F M L F G F D S L C S S N S .                       | 269 |
| DzMYB306 | . . . . . Q Y A S S T E N I A R I I K G W R N S P K P A S K N S A T I C C S F D N . . . . . V A G M T S A S K A C T P R K . . . . . E E T S S M M S P F F E S I F V F E S F L C S S N S .                               | 269 |
| HuMYB306 | . . . . . Q Y A S S T E N I A R I I K G W R N S P K F V S A N S A A I C I S F D N . . . . . M A G . T E S A S S E C T P S K . . . . . F F K S S R F V S F A F E S I F V I F S F L C S S N S .                           | 263 |
| TcMYB306 | . . . . . Q Y A S S T E N I A R I I K G W R N S P K F V S A N S A A I C I S F D N . . . . . M A G . T E S A S S E C T P S K . . . . . E E K S S R F V S F A F E S I F V L E S F L C S S N S .                           | 263 |
| ApMYB306 | F I R C S V S P F E S C S F R C I H H T H E C K C F .   | 353 |
| DIMYB22  | F I R C S V S P F E S . . . . . S F R C I H H H S K C Y .   | 338 |
| CmMYB60  | D I R C S V T P F E S S . . . . . T F C D Y F S K C I I T .   | 350 |
| CcMYB306 | D I R C S V T P F E S S . . . . . T F C D Y F S K C I I T .   | 336 |
| VvMYB306 | F I R C S K S P E A S . . . . . F F C F E S K P D I S .   | 326 |
| DzMYB306 | D I R C S V S P E A S . . . . . I F R D E S K P D I T .   | 327 |
| HuMYB306 | D F S C S M S P E A S . . . . . I F C D E S K P D I N .   | 320 |
| TcMYB306 | D F S C S M S P E A S . . . . . I F C D E S K P D I N .   | 320 |

各氨基酸来源及序列登录号为: DIMYB22 (龙眼 QCH41134.1)、CmMYB60 (柑桔 ABK59039.1)、CcMYB306 (小柑桔 XP\_006431144.1)、VvMYB306 (葡萄 XP\_002283575.1)、DzMYB306 (榴莲 XP\_022751922.1)、HuMYB306 (哥伦比亚锦葵 XP\_021297573.1)和 TcMYB306(可可 XP\_007032529.1)。

图 1 鸡爪槭 *ApMYB306* 氨基酸序列与其他物种 MYB 氨基酸序列比对

Fig.1 Amino acid sequence alignment of *ApMYB306* from *Acer palmatum* with MYB from other species

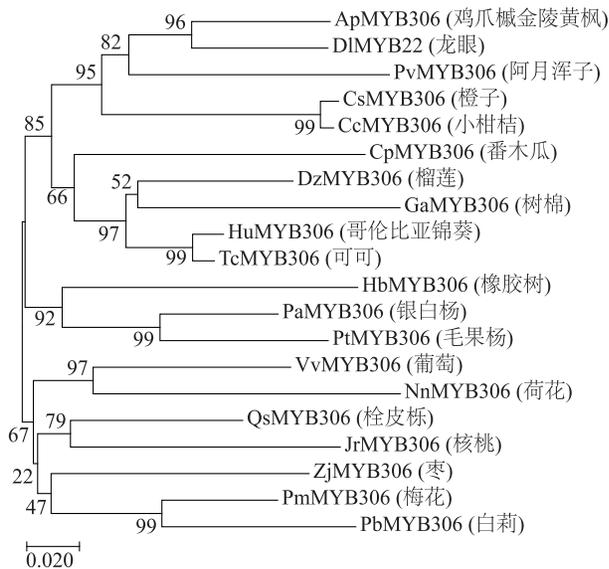
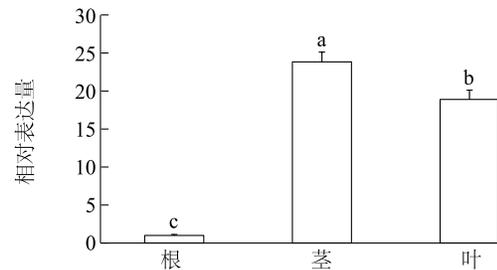


图 2 *ApMYB306* 与其他物种中同源蛋白质的系统进化树分析  
Fig.2 Phylogenetic tree analysis of *ApMYB306* and homologous proteins in other species



不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

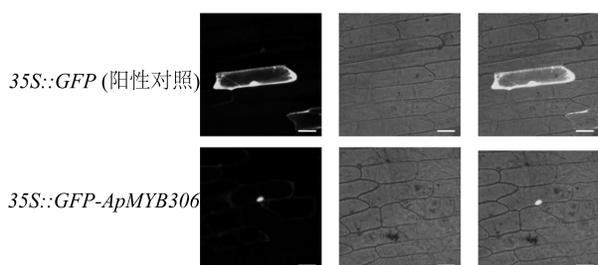
图 3 *ApMYB306* 在鸡爪槭金陵黄枫各组织中的表达

Fig.3 The expression of *ApMYB306* in various tissues of *Acer palmatum* Jinlinghuangfeng

### 2.3 *ApMYB306* 基因在不同胁迫处理下的表达

#### 2.3.1 *ApMYB306* 基因在低温和高温胁迫下的表达

如图 5 所示, *ApMYB306* 基因表达受低温 (4 °C) 和高温 (40 °C) 诱导。 *ApMYB306* 基因在低温和高温条件下, 表达量均在 24 h 内持续升高, 并在 24 h 表达量达到最高值, 分别是 0 h 表达量的 8.9 倍和



第1列为绿色荧光通道下图片,第2列为白光通道下图片,第3列为叠加图片,标尺=50 μm。

图4 ApMYB306在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization analysis of ApMYB306 in onion epidermal cells

5.8倍,表明 *ApMYB306* 基因受低温和高温胁迫显著诱导。

2.3.2 *ApMYB306* 基因在盐和干旱胁迫下的表达  
如图6所示,在200 mmol/L NaCl处理下,*ApMYB306* 基因被迅速诱导表达,在处理8 h后,*ApMYB306* 表达量达到最高值,是0 h表达量的3.1倍,随后表达量略有降低,但仍高于对照。*ApMYB306* 基因在20% PEG6000模拟干旱条件下,表达量迅速升高,并在处理8 h后 *ApMYB306* 表达量达到最高值,随后逐渐降低,表明 *ApMYB306* 基因受盐和干旱胁迫诱导显著。

## 2.4 *ApMYB306* 超表达拟南芥的抗冻性和开花期变化

将获得的 *ApMYB306* 超表达拟南芥阳性株系进行筛选和鉴定,选取表达量最高的2个独立株系用于后续功能鉴定。如图7所示,对野生型和 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系(35S::*ApMYB306*-1、35S::*ApMYB306*-2)进行冷冻处理后,*ApMYB306* 超表达拟南芥株系较野生型成活率明显升高。推测 *ApMYB306* 基因提高了拟南芥的抗冻性。

对 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系(35S::*ApMYB306*-1、35S::*ApMYB306*-2)进行表型观测发现,*ApMYB306* 超表达拟南芥较野生型拟南芥开花延迟(图8)。野生型拟南芥在播种后(36.6±1.2) d开花,而35S::*ApMYB306*-1、35S::*ApMYB306*-2则分别在播种后(42.3±1.5) d和(41.5±1.1) d开花(图8b)。测量野生型和 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系的莲座叶数量,发现野生型莲座叶数量为12.2±0.9,而35S::*ApMYB306*-1、35S::*ApMYB306*-2莲座叶数量多于野生型,分别为16.1±1.2和15.7±1.1

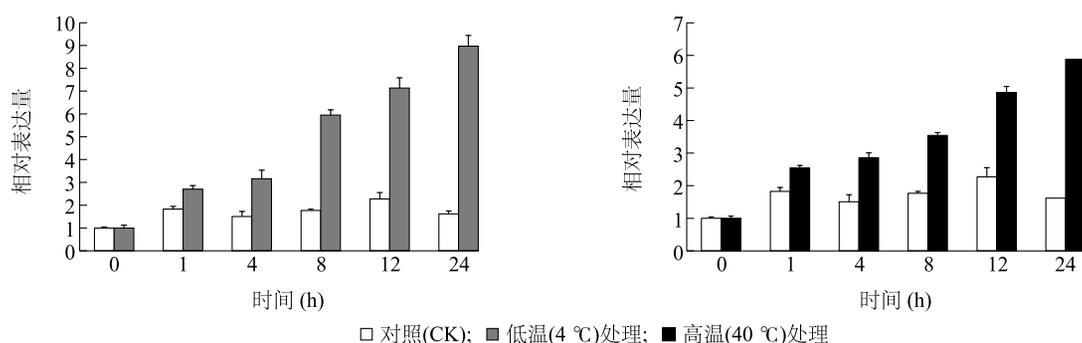
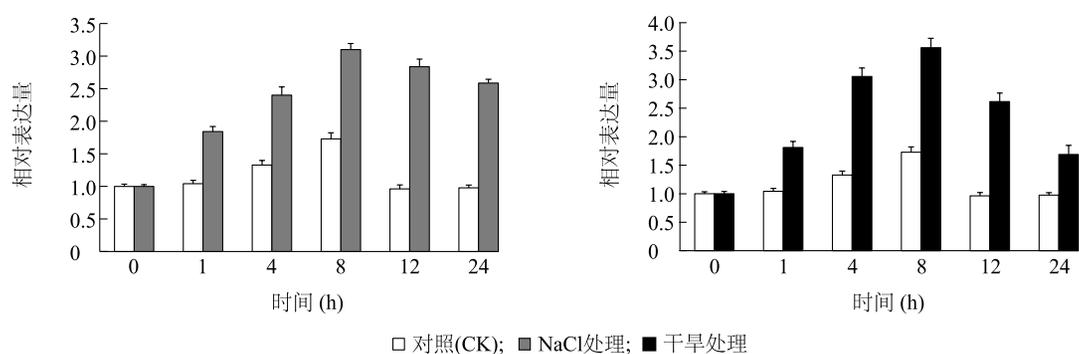
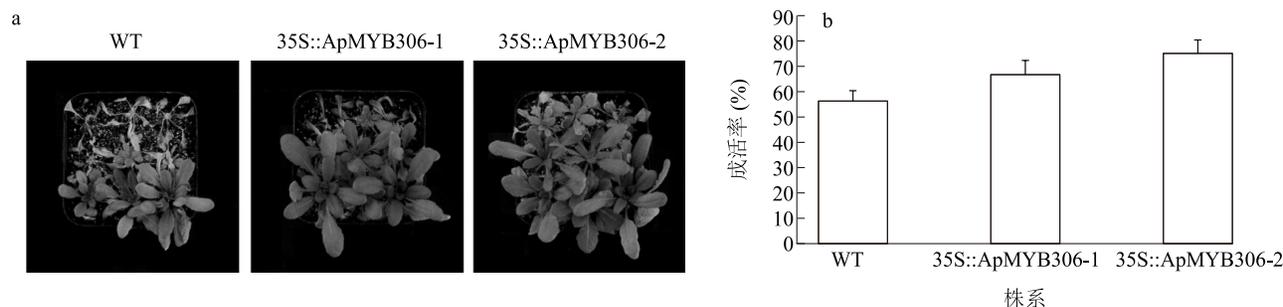
(图8c)。对开花关键基因 *AtFT* 和 *AtFLC* 的表达进行荧光定量PCR分析,发现 *AtFT* 的表达量在 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系中明显降低(图8d), *AtFLC* 的表达量则无明显变化(图8e)。

将拟南芥 *AtFT* 1.0 kb 长度的启动子序列构建到无启动子、下游具有 LUC 标签的载体上,转化农杆菌后,与 *ApMYB306* 共同侵染烟草叶片,暗培养1 d,光照培养2 d后喷施 LUC 底物,用 CCD 冷冻相机观察。结果表明,阴性对照(只加 *AtFTpro*)亮度较强,添加 *ApMYB306* 后,亮度变弱,说明 *ApMYB306* 与 *AtFT* 启动子结合,并抑制了其表达(图9)。推测 *ApMYB306* 可能通过抑制 *AtFT* 启动子表达使得 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系开花延迟,其调控机制还需进一步研究。

## 3 讨论

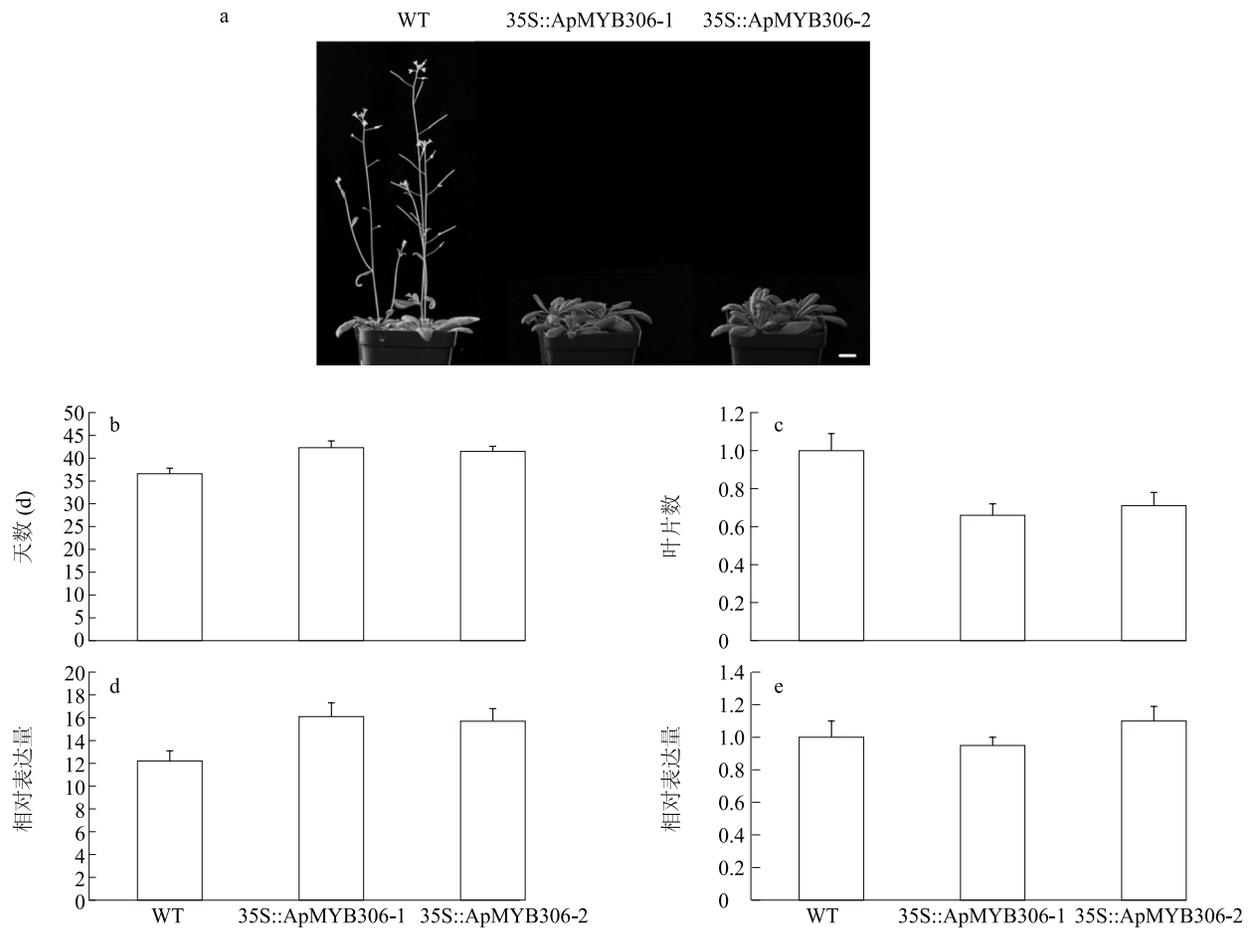
随着全球环境的不断恶劣,干旱、洪涝等极端天气频现。植物的生长受逆境胁迫影响越来越严重。因此寻找抗逆胁迫下的应答基因,解析其分子调控机制,是进行植物抗逆分子改良与育种的前提。本研究从鸡爪槭金陵黄枫中克隆获得了一个 MYB 转录因子基因,分析发现该基因编码的转录因子含有2个 MYB 保守结构域,属于 R2R3-MYB 类转录因子,经过蛋白质氨基酸序列比对和生物信息学分析将其命名为 *ApMYB306*。

研究表明,不同的 MYB 家族成员具有不同的组织表达特性,可能在不同的组织器官中发挥重要作用。如柳枝稷 *PvMYB4* 在根、茎、叶、叶鞘和花序中均有表达,但在叶和叶鞘中表达量最高<sup>[24]</sup>。大部分的番茄 R2R3MYB 转录因子基因在根、茎、叶和果实中均有表达,但表达水平不同,如 *SIMYB16* 在茎、叶和未成熟的果实中表达量都很高,但在根中表达量相对较低, *SIMYB2*、*SIMYB20*、*SIMYB29*、*SIMYB43*、*SIMYB45*、*SIMYB53*、*SIMYB58*、*SIMYB73*、*SIMYB74*、*SIMYB79*、*SIMYB92*、*SIMYB93* 和 *SIMYB102* 在根中的表达量则高于其他组织器官<sup>[6]</sup>。*ApMYB306* 在根、茎和叶中均有表达,但在茎和叶中的表达量远高于根中的表达量。转录因子可结合到靶基因的启动子部位,进而激活或抑制靶基因的表达,该过程发生于细胞核中,因此转录因子必须要进入细胞核中,才能发挥其转录调控的基本功能。我们通过瞬时表达洋葱表皮细胞,发现 *ApMYB306* 蛋

图 5 *ApMYB306* 基因在低温和高温处理下的表达Fig.5 The expression of *ApMYB306* gene under low temperature and high temperature treatments图 6 *ApMYB306* 基因在盐和干旱胁迫下的表达Fig.6 The expression of *ApMYB306* gene under salt and drought stressWT:野生型;35S::ApMYB306-1、35S::ApMYB306-2:*ApMYB306* 超表达拟南芥株系。a:野生型及 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系冷冻处理后的表型;b:野生型及 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系冷冻处理后的成活率。图 7 转 *ApMYB306* 基因拟南芥抗冻性分析Fig.7 Freezing tolerance analysis of *ApMYB306* transgenic *Arabidopsis*

白定位于细胞核中,具有调控转录的基本条件。越来越多的证据表明,MYB 转录因子家族在参与植物胁迫应答调控中起着关键作用<sup>[18,25-26]</sup>。水稻 *OsMYB55* 通过直接激活谷氨酸代谢途径基因 *GSI*、*GAT1* 和 *GADI* 提高对高温胁迫的抗性,超表达 *OsMYB55* 可提高在高温胁迫下的产量<sup>[25]</sup>。拟南芥 *AtMYB44* 负调控 *SOS2* 的基因 *ABI1*、*ABI2*、*PP2CA*、*HAB1* 和 *HAB2*,使得超表达拟南芥对干旱和盐胁迫的抗性增强<sup>[18]</sup>。小麦 *TaMYB33* 响应 ABA 调控的

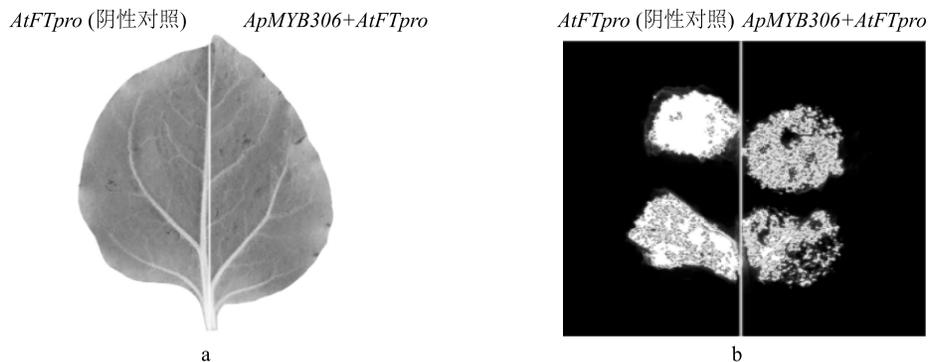
胁迫应答,超表达拟南芥株系耐旱性和耐盐性增强,这些是通过 *TaMYB33* 提高细胞活性氧的清除能力和积累渗透压调节物实现的<sup>[26]</sup>。桃 *PpMYB3* 的表达量变化则与温度的变化趋势一致,推测 *PpMYB3* 可能负调控桃的抗寒性<sup>[27]</sup>。小麦 *TaMYB165* 在小麦苗期和灌浆期均响应热胁迫,热胁迫处理后,过表达拟南芥株系较野生型成活率升高<sup>[28]</sup>。燕子花 *IlMYB306* 也参与了非生物胁迫的调控<sup>[29]</sup>。本研究通过荧光定量 PCR 技术分析了 *ApMYB306* 在不同胁迫



a: *ApMYB306* 超表达拟南芥株系较野生型开花延迟; b: *ApMYB306* 超表达拟南芥株系和野生型拟南芥播种至开花天数; c: *ApMYB306* 超表达拟南芥株系和野生型拟南芥开花时的莲座叶数目; d: 开花关键基因 *AtFT* 表达量; e: 开花关键基因 *AtFLC* 表达量分析。35S:: *ApMYB306*-1、35S:: *ApMYB306*-2: *ApMYB306* 超表达拟南芥株系; WT: 野生型。

图8 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系表型分析

Fig.8 Phenotype analysis of *ApMYB306* overexpressing *Arabidopsis*



a: 正常光照下的烟草叶片 (背面); b: CCD 冷冻相机拍摄的化学发光图片。

图9 烟草瞬时表达试验验证 *ApMYB306* 与拟南芥 *FT* 启动子的结合

Fig.9 The binding of *ApMYB306* to *Arabidopsis FT* promoter verified by tobacco transient expression experiment

迫下的反应,发现 *ApMYB306* 受高温、低温、干旱和盐胁迫诱导表达,在该4种胁迫诱导下表达量明显

上调,暗示 *ApMYB306* 参与了胁迫响应过程,但其响应机制还需进一步研究。

开花是高等植物生活史的重要过程<sup>[30-32]</sup>, 目前已知的调控植物开花的主要途径有: 光周期途径 (Photoperiod pathway)、春化途径 (Vernalization pathway)<sup>[33]</sup>、赤霉素途径 (Gibberellin pathway) 和自主途径 (Autonomous pathway)<sup>[34]</sup>。研究结果表明, 多个 MYB 转录因子参与了开花时间的调节。菊花 *CmMYB2* 超表达株系开花提前, *CmMYB2* 通过赤霉素途径调控菊花开花<sup>[20]</sup>。杨树 *PtrMYB192* 基因超表达拟南芥株系较野生型开花延迟, 其中春化途径关键基因 *FLC* 表达量升高, 而光周期途径关键基因 *CO* 表达量降低<sup>[35]</sup>。拟南芥 *MYB30* 通过直接调节 *FT* 基因的表达调控开花<sup>[36]</sup>。本研究 *ApMYB306* 超表达拟南芥株系较野生型开花延迟, 进一步研究发现 *ApMYB306* 可结合拟南芥 *FT* 的启动子序列, 并抑制其表达, *FT* 基因是开花途径的整合子, 推测 *ApMYB306* 通过抑制 *FT* 的表达调节拟南芥开花。相关研究结果为 *ApMYB306* 进一步的功能研究奠定了基础, 为培育鸡爪槭抗逆和不同花期新种质提供了候选基因。

#### 参考文献:

- [1] LI S S, LI Q Z, TANG L, et al. Pigment comparison and expression of chlorophyll metabolism genes in yellow and green *Acer palmatum* leaves[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2017, 97: 1-21.
- [2] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15:573-581.
- [3] STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B, The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4:447-456.
- [4] YILMAZ A, NISHIYAMA M Y J, FUENTES B G, et al. GRASSIUS: a platform for comparative regulatory genomics across the grasses[J]. Plant Physiology, 2009, 149:171-180.
- [5] CAO Z H, ZHANG S Z, WANG R K, et al. Genome wide analysis of the apple MYB transcription factor family allows the identification of *MdoMYB121* gene conferring abiotic stress tolerance in plants[J]. PLoS One, 2013, 8: e69955.
- [6] ZHAO P P, LI Q, LI J, et al. Genome-wide identification and characterization of R2R3MYB family in *Solanum lycopersicum* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2014, 289:1183-1207.
- [7] WILKINS O, NAHAL H, FOONG J, et al. Expansion and diversification of the Populus R2R3-MYB family of transcription factors [J]. Plant Physiology, 2009, 149:981-993.
- [8] AN J P, LI R, QU F J, et al. R2R3-MYB transcription factor *MdMYB23* is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple [J]. The Plant Journal, 2018, 96(3):562-577.
- [9] AN Y, DAI X, ZHANG W H. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7):2541-2556.
- [10] COMINELLI E, GALBIATI M, VAVASSEUR A, et al. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance[J]. Current Biology, 2005, 15:1196-1200.
- [11] OH J E, KWON Y, KIM J H, et al. A dual role for *MYB60* in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 77:91-103.
- [12] SEO P J, PARK C M. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. New Phytologist, 2010, 186:471-483.
- [13] AGARWAL M, HAO Y, KAPOOR A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281:37636-37645.
- [14] COMINELLI E, SALA T, CALVI D, et al. Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability[J]. The Plant Journal, 2008, 53:53-64.
- [15] LIPPOLD F, SANCHEZ D H, MUSIALAK M, et al. *AtMyb41* regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2009, 149:1761-1772.
- [16] REYES J L, CHUA N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination[J]. The Plant Journal, 2007, 49:592-606.
- [17] ABE H, URA T, ITO T, et al. *Arabidopsis AtMYC2 (bHLH)* and *AtMYB2 (MYB)* function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. The Plant Cell, 2003, 15: 63-78.
- [18] JUNG C, SEO J S, HAN S W, et al. Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2008, 146:623-635.
- [19] SHAN H, CHEN S M, JIANG J F, et al. Heterologous expression of the chrysanthemum R2R3-MYB transcription factor *CmMYB2* enhances drought and salinity tolerance, increases hypersensitivity to ABA and delays flowering in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Biotechnology, 2012, 51:160-173.
- [20] ZHU L, GUAN Y X, LIU Y N, et al. Regulation of flowering time in chrysanthemum by the R2R3 MYB transcription factor *CmMYB2* is associated with changes in gibberellin metabolism [J]. Horticulture Research, 2020, 7:96.
- [21] CURTIS M D, GROSSNIKLAUS UA. Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta [J]. Plant Physiol, 2003, 133:462-469.
- [22] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23:2947-2948.

- [23] ZHU L, MA Q Y, LI S S, et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analyses of acer palmatum under abiotic stress[J]. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 2020, 89:385-403.
- [24] SHEN H, HE X, POOVAIAH C R, et al. Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks[J]. *New Phytologist*, 2011, 193(1):121-136.
- [25] EL-KEREAMY A, BI Y M, RANATHUNGE K, et al. The rice R2R3-MYB transcription factor *OsMYB55* is involved in the tolerance to high temperature and modulates amino acid metabolism [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e52030.
- [26] QIN Y X, WANG M C, TIAN Y C, et al. Over-expression of *TaMYB33* encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39:7183-7192.
- [27] 申 晴,殷亚蕊,武军凯,等. 桃 MYB3 基因的克隆及表达分析 [J]. *河北果树*, 2020(2):8-10,18,67.
- [28] 李红霞,汪 好,郭泾奎,等. 小麦热胁迫响应基因 *TaMYB165* 的克隆与功能分析 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2019, 47(12):43-51.
- [29] 杨 娟. 燕子花 *MYB306* 基因克隆及其抗逆功能初探 [D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2019.
- [30] 周凤珏,郑金元,龚银花,等. 诱蜂剂中蔗糖浓度对罗汉果花器官和坐果的影响 [J]. *南方农业学报*, 2018, 49(10):2007-2012.
- [31] 孙金秋,任相亮,胡红岩,等. 农田杂草群落演替的影响因素综述 [J]. *杂草学报*, 2019, 37(2):1-9.
- [32] 杨为海,曾利珍,曾 辉,等. 湛江地区澳洲坚果种质开花生物学特性观测分析 [J]. *南方农业学报*, 2019, 50(5):1042-1048.
- [33] 赵 薇,王爱花,陆 慢,等. 不同春化处理对蚕豆开花结荚时间和产量的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(16):102-105.
- [34] MOUHU K, HYTONEN T, FOLTA K, et al. Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant [J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9:122.
- [35] LIU S D, WANG X P, LI E Y, et al. R2R3 MYB transcription factor PtrMYB192 regulates flowering time in *Arabidopsis* by activating *Flowering Locus C* [J]. *Journal of Plant Biology*, 2013, 56: 243-250.
- [36] LIU L Y, ZHANG J, ADRIAN J, et al. Elevated Levels of *MYB30* in the phloem accelerate flowering in *Arabidopsis* through the regulation of flowering locus T [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e89799.

(责任编辑:张震林)