

# 换锦花*LsMYB4* 基因的克隆与表达分析

许振渊, 高燕会\*, 周芬静, 李国庆, 熊 艳, 童再康

(浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江临安 311300)

**摘 要:** 以换锦花 (*Lycoris sprengeri*) 为材料, 采用 RT-PCR 方法和 RACE 技术相结合的方法, 从花瓣中克隆了 *MYB* 基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *LsMYB4*。该序列全长 793 bp, 包含 606 bp 完整开放阅读框, 编码 201 个氨基酸, 具有明显的 R2R3-MYB 结构域, 与中国水仙 *NtMYB* 相似性达 96%。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *LsMYB4* 在换锦花不同组织和不同花期均有表达, 其中在花瓣中的相对表达量比叶中多 9~10 倍, 在盛花期的相对表达量比花苞期多 20 倍。不同花色无性系花瓣中表达量存在差异, 花色较浅的无性系高于其它无性系, 推测 *LsMYB4* 在调控换锦花花色形成的过程中起着负调控作用。

**关键词:** 换锦花; *MYB* 基因; 克隆; 表达分析

**中图分类号:** S 68

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 11-2281-10

## Cloning and Expression Analysis of *LsMYB4* Gene in *Lycoris sprengeri*

XU Zhen-yuan, GAO Yan-hui\*, ZHOU Fen-jing, LI Guo-qing, XIONG Yan, and TONG Zai-kang

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

**Abstract:** A MYB gene named *LsMYB4* was cloned by RT-PCR and RACE methods from petals of *Lycoris sprengeri*. Sequences analysis showed that the full-length *MYB* cDNA was 793 bp and contained a ORF of 606 bp encoding 201 amino acids. The *LsMYB4* protein had a conserved R2R3-MYB domain and the amino acids sequence shared up to 96% homologies with anthocyanin biosynthesis-related R2R3-MYB transcription factor in *Narcissus tazetta*. The expression analysis by real time qRT-PCR showed that *LsMYB4* was expressed in different tissues and flowering periods. The expression level in petal was almost ten times higher than in leaf. And in florescence period the expression of *LsMYB4* was twenty times higher than in early budding period. The *LsMYB4* expressed discrepantly in four clones of *L. sprengeri*, and results of it implicated that the lighter flower color, the higher expression level. This showed that *LsMYB4* played a possibly negative role in anthocyanin biosynthesis of *Lycoris sprengeri*.

**Key words:** *Lycoris sprengeri*; *MYB*; cloning; expression analysis

石蒜属 (*Lycoris*) 植物花形及花色丰富 (秦卫华 等, 2003), 又因为开放在少花的夏末秋初闷热时节, 而被广泛应用于园林绿化等 (刘志高 等, 2008; 黄春红 等, 2013)。换锦花 (*Lycoris sprengeri*) 为石蒜属植物的一种, 其花为喇叭状, 花色多为红色、紫红色 (时剑 等, 2011), 其中花被裂片顶

收稿日期: 2014-06-03; 修回日期: 2014-09-12

基金项目: 浙江省花卉新品种选育重大科技专项重点项目 (2012C12909-14)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gaoyanhui408@126.com)

端的蓝紫色非常少有, 因此研究换锦花花色形成的分子机理以期能辅助石蒜属植物的分子育种。

研究表明, 花青素生物合成的调控作用发生在结构基因的转录水平上, 受多种转录因子 (MYB、WD40 和 bHLH) 的协同作用在不同时空上的组合调控 (Ma et al., 2012; 刘晓芬等, 2013; 尚啸 等, 2014)。MYB 蛋白家族是植物中最为庞大的转录因子家族之一, 该家族主要编码蛋白中含有高度保守的 DNA-结合结构域, 即 MYB 结构域。其中含有 2 个 MYB 结构域的 R2R3, 在拟南芥中就有大约 125 个, 分为 25 个亚群 (Stracke et al., 2001), 它们参与调控植物发育、代谢和对生物与非生物胁迫的反应生理过程 (郭弘光和吴繁花, 2012)。而 R2R3-MYB 的作为植物重要的转录因子, 在序列上的保守性很强, 尤其是 R2R3-MYB DNA 结构域。有大量研究表明 R2R3-MYB 蛋白在调控植物的初生和次生代谢过程尤其在花色素生物合成途径中起着重要的调控作用 (Ralf et al., 2007; 吴春霞, 2009; Petroni & Tonelli, 2011; Ma et al., 2012; Gatica-Arias et al., 2013; Lai et al., 2013), 如 *RuMYB10* 基因具有 MYB 转录因子家族结构特征和 bHLH 因子结合域, 在黑莓果实花青素积累高峰期表达量最高 (陈清 等, 2009); 茄子 *SmMYB* 能够正向调控花青素的合成 (邵文婷 等, 2013); *AcMYB* 在 ‘红阳’ 猕猴桃中的表达量与花青素含量呈正相关, 在果实转色主要阶段维持较高水平, 金鱼草 *AmMYB308* 基因在烟草中的超表达可以抑制花青素上游结构基因 *C4H*、*4CL* 的表达, 而沉默拟南芥 *AtMYB4* 基因, 其上游结构基因 *C4H* 表达量上升, 因此表明 R2R3-MYB 转录因子在花青素生物合成中起着重要作用。

虽然已有研究表明 R2R3-MYB 转录因子在花色素生物合成中起着重要作用, 但 R2R3-MYB 转录因子在石蒜属植物花色素生物合成的研究至今未见相关报道。由于换锦花花色的特殊性, 本研究中以花瓣为材料, 设计 R2R3-MYB 简并引物, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术相结合克隆换锦花 R2R3-MYB 基因的 cDNA 全长序列, 并对其进行分子生物信息学及其表达特性分析, 旨在为进一步探讨换锦花花色素生物合成调控机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2012 年将本课题组收集的换锦花 (*Lycoris sprengeri*) 种质资源种植于浙江农林大学遗传学科石蒜属植物种质资源圃, 从中筛选出 4 个 (A, B, C, D) 不同花色的无性系, 于 2013 年 8 月分别采集花苞期、花蕾期、盛花期和谢花期的花瓣, 同时于盛花期采集花萼、花瓣、叶片和花丝, 取样后立即用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱中备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 换锦花总 RNA 的提取及反转录

采用 RNAiso Plus 试剂盒 (TaKaRa) 提取换锦花总 RNA (参照试剂盒说明书), 用紫外分光光度计 (Nano drop 2000) 检测其纯度和浓度, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性, 用 PrimeScript 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (TaKaRa) 对 RNA 进行反转录合成 cDNA 第 1 链。

#### 1.2.2 换锦花 *LsMYB4* 基因 cDNA 全长克隆

根据在 GenBank 上已登录的和石蒜属植物亲缘关系较近物种的 R2R3-MYB 基因序列, 利用 DNAMAN 进行多序列比对, Premier5.0 选择保守区设计简并引物 MYB-F 和 MYB-R (表 1), 以换锦花 cDNA 第一链为模板扩增 MYB 基因的中间片段, PCR 扩增反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 5 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经

1%琼脂糖凝胶电泳检测,利用凝胶回收试剂盒回收预期目标基因片段,连接到 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株中,经蓝白斑筛选、菌液 PCR 鉴定为阳性克隆后送交生工生物工程(上海)技术服务有限公司测序。根据 *LsMYB4* 目标片段测序结果,分别设计 *LsMYB-3'*GSP 和 *LsMYB-5'*GSP(表 1),并参照 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)说明书进行 cDNA 末端快速扩增,目的片段回收、检测和测序同上。

### 1.2.3 *LsMYB4* cDNA 全长拼接与 PCR 验证

利用 DNAMAN 将已获得 *LsMYB4* 序列和 RACE 技术获得的末端序列进行拼接,根据拼接得到的 cDNA 全长序列设计全长引物(表 1),利用反转录的 cDNA 第一链为模板,进行 *LsMYB4* 基因全长的 PCR 扩增。PCR 反应体系 20  $\mu$ L,其中 cDNA 模板 50 ng,  $1 \times$  PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus), 0.2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP, 引物 0.2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 高保真 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U; PCR 扩增的反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物进行凝胶电泳检测及回收目的片段,连接到 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌,经验证后送交生工生物工程(上海)技术服务有限公司测序,测序结果利用软件 DNAMAN 检验其准确性。

### 1.2.4 换锦花 *LsMYB4* 基因序列的生物信息学分析

通过 NCBI 中的 Vecscreen 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>)对所测序列去除载体序列,再通过 DNAMAN 6.0 进行 *LsMYB4* cDNA 全长序列拼接,用 ORF Finder 查找开放阅读框并翻译成氨基酸序列。利用 NCBI 的 BLASTn 和 BLASTp 程序分别从 NCBI 核苷酸数据库和氨基酸数据库中检索近缘物种的 *LsMYB4* 序列信息,并进行系统进化分析。通过 DNAMAN 6.0 和在线软件 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构,对 *LsMYB4* 全长 cDNA 序列及其氨基酸序列进行比对;用 DNAMAN 软件进行多序列比对,进而通过 MEGA5.2 软件构建系统进化树。

### 1.2.5 *LsMYB4* 的表达分析

用 PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time (TaKaRa) 试剂盒对换锦花花发育过程 4 个时期的花瓣(花苞期、花蕾期、盛花期和谢花期)和盛花期花萼、花瓣、叶片、花丝,不同花色无性系的总 RNA 反转录合成 cDNA 备用,按时荧光定量 PCR 引物设计的原则分别以换锦花 *Actin* 和 *LsMYB4* 基因为基础设计内参引物 *Actin-F*、*Actin-R* 及特异引物 *LsMYBRT-F* 和 *LsMYBRT-R*(表 1)。试验参照 SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>TM</sup> II (Perfect Real Time)(TaKaRa)试剂盒的说明书,在 CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System 实时定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD)上完成。荧光定量 PCR 扩增的反应体系为 10  $\mu$ L,用两步法标准程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 复性 34 s, 共 40 个循环;每个循环第 3 步(60  $^{\circ}$ C 时)采集荧光;最后 95  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 退火至 60  $^{\circ}$ C, 保温 1 min 后以 0.2  $^{\circ}$ C  $\cdot$  s<sup>-1</sup> 的速度逐渐升温至 95  $^{\circ}$ C, 在此过程中连续检测其荧光值绘制熔解曲线;每个试验设 3 次重复。数据采用 2 <sup>$\Delta\Delta$ CT</sup> 方法(Livak & Schmittgen, 2001)处理并利用 Excel 进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *LsMYB4* 基因 cDNA 全长序列克隆

设计简并引物 MYB-F 和 MYB-R(表 1),以换锦花盛花期花瓣 cDNA 为模板,扩增出 1 条约

表 1 换锦花 *LsMYB4* 的克隆及表达分析所用的引物  
Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of *LsMYB* in *Lycoris sprengeri*

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
MYB-F	kATGATrrksTsbTCCTCsTsC
MYB-R	AArGGbvvrTGGACsmvrGArGA
<i>LsMYB-3'</i> GSP1	ATAGGCTCATTGCTCACATCAGGGC
<i>LsMYB-3'</i> GSP2	TGGGAAGAGTTGCAGGCTTAGATGG
<i>LsMYB-5'</i> GSP1	AAGCTGCAACTCTTCCCACACCTA
<i>LsMYBRT-F</i>	CTCATCATCAAACCTCCATAGCCTC
<i>LsMYBRT-R</i>	ATCTCGTTGTCTGTTCTACCCG
<i>ACTINRT-F</i>	AGACTTTCAATGTGCCCGC
<i>ACTINRT-R</i>	CACCATCACCAGAATCCAGC

250 bp 的预期片段 (图 1)。经 BLAST 发现该片段与其他物种的同源性较高, 其中与水仙的 MYB 转录因子同源性达 94%, 初步确定该片段为换锦花的 MYB 基因一部分。分别采用 5'RACE 和 3'RACE 方法进行扩增, 得到长度为 257 bp 的 5'末端和 695 bp、620 bp 的 3'末端。利用 DNAMAN 软件将其与原有片段拼接成一条长约 793 bp 的序列 (图 2), 将其基因片段命名为 *LsMYB4*。

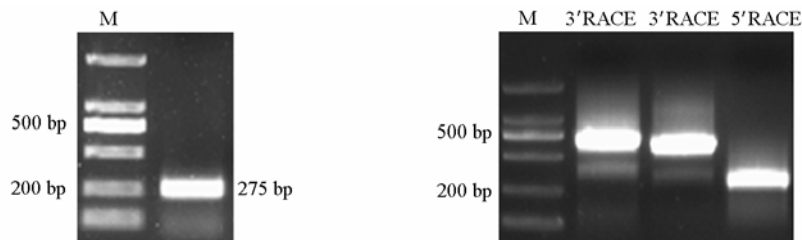


图 1 *LsMYB* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of *LsMYB4* gene fragments

```

1  CCAACAACAATCAAAATCTATTTCCTTTCAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAG
61  AAAATTATGGTAGGTCTCCATGCTGTGAGAAAGCCACACCAACAAAGGTCATGGACC
    M G R S P C C E K A H T N K G A W T
121 AAAGAAGAAGATGATAGGCTCATTGCTCACATCAGGGCTCATGGTGAGGGGTGTGGAGA
    K E E D D R L I A H I R A H G E G C W R
181 TCTTTACCTAAAGCAGCTGGCCTTCTTAGGTGTGGGAAGAGTTGCAAGCTTAGATGGATC
    S L P K A A G L L R C G K S C R L R W I
241 AATTACCTTAGGCCTGATCTTAAGAGGGGTAACCTTCACTGAGGAAGAGGATGATCTCATC
    N Y L R P D L K R G N E T E E E D D L I
301 ATCAAACCTCCTAGCCTCCTTGGTAACAAATGGTCATTAATTGCGGGCAGATTACCGGT
    I K L H S L L G N K W S L I A G R L P G
361 AGAACAGACAACGAGATCAAGAACTACTGGAACACCCACATAAGAAAGAAAGCTATTGAGC
    R T D N E I K N Y W N T H I R R K L L S
421 CGCGGAGTGGATCCCAACATCACCAGGCAATAGCAGAGACTATCTCTTCCAAACATAACT
    R G V D P N T H R P I A E T I S S N I T
481 ACAATCTCCTTTGAGAGAAAAGAAAGAGAGAGAGTAGTAGTGAAGAAATCAACCTCTTGG
    T I S F E R K E E E K S S S E E S T S W
541 TCTAACAGCGATTTCGGGTTCTGATCTCAATTGAGAGCTCCGAATCAGCCACCGTTT
    S N Q R F R V P D L N L E L R I S P P F
601 CAAACAGAACCCGTTAAGAGGGAAGTTGGGTTCTATGGAAGTGGGTATTGGACTTTAGA
    Q T E P V K R E V G F Y G S G L L D F R
661 AGTAGTGTTTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
    S S V -
721 AAAGTGACCTTTGTAGCATATGATTATCAATTATTTGGGACACAAATAGATGCAAAAAAA
781 AAAAAAAAAAAAA
  
```

图 2 *LsMYB4* 的全长 cDNA 序列以及推测的氨基酸序列

黑框表示起始密码子和终止密码子, 下划线表示 MYB 结构域, 阴影表示保守色氨酸。

Fig. 2 Nucleotide and putative amino acid sequences of the *LsMYB4* cDNA full-length

The start codon and stop codon are framed, MYB domains are underlined, and the conservative tryptophan marked in shadow.

## 2.2 换锦花 *LsMYB4* 基因的序列及同源性分析

*LsMYB* 通过 DNAMAN 搜索 ORF, 最大为 606 bp, 编码 201 个氨基酸 (aa), 预测其蛋白分子量为 23 126.2, 理论等电点 9.59。将序列通过网上在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白结构 (图 3), 表明 *LsMYB4* 属于 R2R3-MYB, 该编码蛋白的 N 端都具有 2 个典型的 MYB-DNA 结合域: R2 (13~63 aa) 和 R3 (66~114 aa)。R2 结构域自第 17 个 aa 开始, 每间隔 19 个 aa 有 1 个保守的疏水氨基酸色氨酸 (W, 17 aa, 37 aa, 57 aa); R3 结构域中自第 70 个 aa 开



与 *AtMYB4* (NP\_195 574.1) 同源性最高 (69%), 此外同 *AtMYB7* (XM\_002886022.1)、*AtMYB32* (NM\_119665.2), 均属于 R2R3 MYB 蛋白的第 4 亚群, 该亚群有 1 个保守基序(EAR)pdLNL<sup>E</sup>/dLxi<sup>G</sup>/s (图 3), 该结构具有抑制性, 赋予融合蛋白的沉默活性 (Kazan, 2006; Dubos et al., 2010), 因此该将基因命名为 *LsMYB4*。

*LsMYB4* 与拟南芥 MYB 转录因子以及其他植物的系统进化树分析表明, 换锦花、水仙、水稻、玉米聚在单子叶植物分支, 而与双子叶植物分支的矮牵牛、丹参、可可树、棉花、苹果和樱桃等的遗传距离相对较远 (图 4), 总体而言, 该分类基本符合植物分类学的规律。拟南芥 MYB 家族中, *AtMYB4*、*AtMYB6*、*AtMYB3*、*AtMYB7*、*AtMYB32* 均归属于拟南芥 MYB 家族第 4 亚群, 而 *LsMYB4* 与 *AtMYB4* 较为接近, 说明 *LsMYB4* 与拟南芥 MYB 家族第 4 亚群亲缘关系较近, 预测 *LsMYB4* 具有和 *AtMYB4* 相似的调控功能。

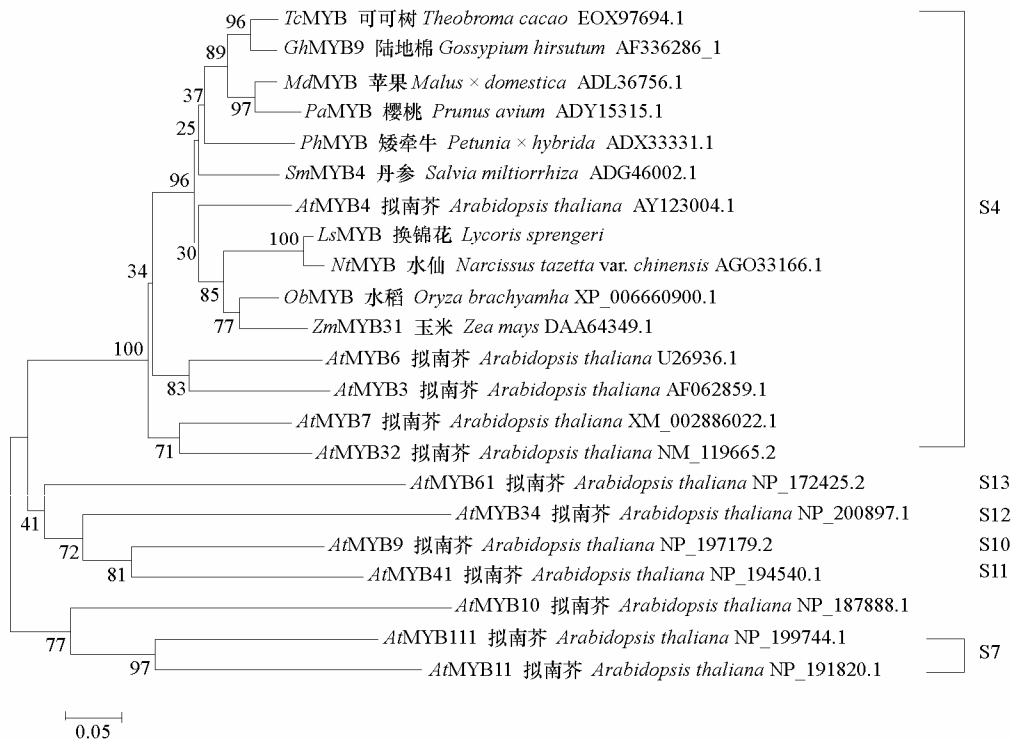


图 4 *LsMYB* 与拟南芥 MYB 转录因子以及其他植物的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic relationships of *LsMYB* and *Arabidopsis* MYB transcription factors and other species

## 2.4 换锦花 *LsMYB4* 基因的表达分析

### 2.4.1 组织特异性表达

如图 5 所示, *LsMYB4* 基因在换锦花的叶、花萼、花瓣和花丝中均有表达, 但表达水平具有明显差异。

在花色素大量积累的花瓣中的表达量最高, 比叶中的表达量高 9~10 倍, 在花萼中的表达量最低, 说明 *LsMYB4* 主要在花瓣中表达。

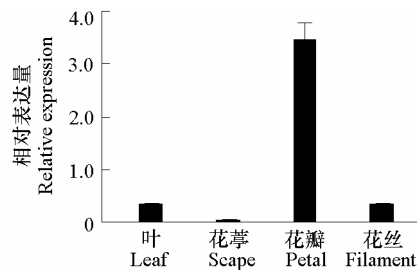


图 5 换锦花 *LsMYB4* 基因在不同组织器官的表达

Fig. 5 Expression of *LsMYB4* in different tissue of *L. sprengeri*

### 2.4.2 不同发育时期花中的表达

根据换锦花花发育过程中花蕾和花瓣的长度及开放程度,采集4个阶段(即花苞期、花蕾期、盛花期、谢花期)的花瓣,采用实时荧光定量 qRT-PCR 的方法检测 *LsMYB4* 的表达差异(图6,图7)。结果表明在花发育的各个阶段都能检测到 *LsMYB4* 基因的表达,而且随着花蕾的增大,其表达量也增加,到花朵盛花期表达量最高;之后随着花开始萎蔫,表达量也开始下降;从相对表达量来看, *LsMYB4* 在盛花期花瓣中的表达量为花苞期的20倍(图7)。

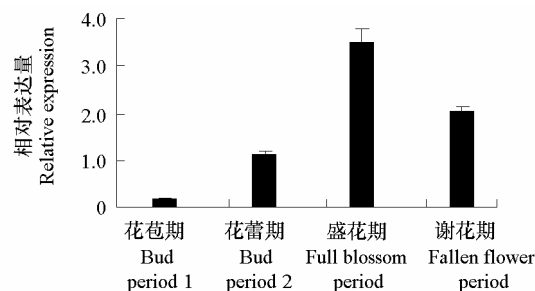


图6 *LsMYB4* 基因在换锦花不同花发育阶段的表达

Fig. 6 Expression of *LsMYB4* in different flower development periods of *L. sprengeri*



图7 换锦花花发育的不同阶段

Fig. 7 Phenotype of different developing stages in *L. sprengeri*

### 2.4.3 *LsMYB4* 在不同花色无性系的表达分析

*LsMYB4* 在换锦花不同花色无性系的花瓣中的表达有一定差异(图8和图9),其中在颜色较淡的无性系D中的表达量最高,比其他无性系高出3~5倍,说明在换锦花花色素合成的过程中, *LsMYB4* 与花色深浅有关,起着一定的负调控作用。这与金鱼草 *AmMYB308* 和拟南芥 *AtMYB4* 在抑制花青素途径的上游结构基因的研究结果是一致的。

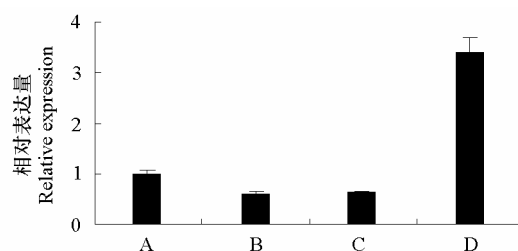


图8 *LsMYB4* 在换锦花 A, B, C, D 不同花色无性系中的表达

Fig. 8 Four different clone of *Lycoris sprengeri* and expression of *LsMYB4*



图9 换锦花不同花色无性系

Fig. 9 Different clone of *Lycoris sprengeri*



### 3 讨论

植物的 MYB 蛋白家族虽然在序列上存在一定的保守性,但不同物种、不同个体、甚至同一植株不同组织器官之间,MYB 蛋白的功能也在存在着较大差异(陈俊和王宗阳,2002;陈清等,2009;Dubos et al.,2010)。植物 MYB 家族中 R2R3-MYB 类转录因子具有完整的 R2R3 重复结构域,在植物的次生代谢产物的调控(Li et al.,2012)、抗逆胁迫应答(曹忠慧等,2013)和调节植物生物钟(吴春霞,2009)过程中起作用。

本研究中利用 RT-PCR 同源克隆和 RACE 技术相结合的方法,从换锦花的花瓣中克隆得到 MYB 转录因子基因 *LsMYB4* cDNA 全长,并对其编码的蛋白质进行生物信息学分析,结果表明 *LsMYB4* 中存在完整的 R2R3 重复结构域,属于典型的 R2R3-MYB 转录因子基因(宿红艳等,2010)。系统进化分析表明,*LsMYB4* 和石蒜科的中国水仙的亲缘关系较近,而与双子叶植物的棉花、苹果和樱桃等的亲缘关系较远,表明 *LsMYB4* 基因的进化具有明显的种属特性。

本研究中对换锦花花发育不同时期的花瓣、不同器官以及不同花色的无性系的 *LsMYB4* 荧光定量检测表明,在整个花发育过程中均能检测到 *LsMYB4* 基因的表达,从花苞期到盛花期表达量逐渐增加,盛花期时表达量达最高,之后下降的趋势;而在不同花色的无性系花瓣中,以颜色较淡的无性系 D 的表达量最高,说明 *LsMYB4* 特异地调节花青素生物合成途径中关键酶基因(*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*等)的表达,可以推测 *LsMYB4* 在换锦花花色素生物合成的过程中起着一定的负调控作用。以往的研究表明拟南芥 *AtMYB32* 在花青素生物合成中起抑制作用(Preston et al.,2004),*AtMYB4* 的超表达会使 *C4H* 基因表达减少,而 *AtMYB4* 缺失的突变型拟南芥,在 R3 识别螺旋结构中,突变的色氨酸残基会停止 DNA 结合,从而抑制 *C4H* 启动子的能力(Jin et al.,2000)。在矮牵牛中,与 *AtMYB4* 同源的 *PhMYB4* 在整个花期和开花阶段处于很高的转录水平(Colquhoun et al.,2011),证明了 *PhMYB4* 对花色基因的负调控作用;此外 Colquhoun 等(2011)还证明了 *PhMYB4* 可以抑制 *C4H* 基因的表达,能够间接地控制矮牵牛 FVBP(floral volatile benzenoid/phenylpropanoid)生物合成的平衡。

R2R3-MYB 在花色素的生物合成过程中起着重要的调节作用,可以通过导入外源基因、共抑制、反义抑制或 RNAi 等技术上调或抑制 *LsMYB4* 的表达,从而改变花色素苷的含量或成分,引起植物花色的变化。Takashi 等(2012)将龙胆 *GtMYBP3* 和 *GtMYBP4* 转基因烟草的花青素水平下降,结果得到了白色花,说明导入外源 R2R3 基因可以改变花青素的水平,进而改变植物的颜色。因此本课题组今后拟通过转基因技术对 *LsMYB4* 基因进行功能验证,并进一步阐明 *LsMYB4* 基因在换锦花花色形成过程中的作用机制,进而为石蒜属植物花色改良提供新的途径。

### References

- Cao Zhong-hui, Wang Rong-kai, Hao Yu-jin. 2013. Ectopic expression of *MdMYB121* gene enhances tolerance to abiotic stress in tobacco. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (6): 1033 - 1042. (in Chinese)
- 曹忠慧, 王荣凯, 郝玉金. 2013. 苹果 *MdMYB121* 基因异位表达提高烟草的抗逆性. *园艺学报*, 40 (6): 1033 - 1042.
- Chen Qing, Tang Hao-ru, Dong Xiao-li, Hou Yan-xia, Luo Ya, Jiang Yan, Huang Qiong-yao. 2009. Progress in the study of plant Myb transcription factors. *Genomics and Applied Biology*, 28 (2): 365 - 372. (in Chinese)
- 陈清, 汤浩茹, 董晓莉, 侯艳霞, 罗娅, 蒋艳, 黄琼瑶. 2009. 植物 Myb 转录因子的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 28 (2): 365 - 372.
- Chen Jun, Wang Zong-yang. 2002. Progress in the study of plant MYB transcription factors. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 28 (2): 81 - 88. (in Chinese)



- 陈俊, 王宗阳. 2002. 植物 MYB 类转录因子研究进展. 植物生理与分子生物学学报, 28 (2): 81 – 88.
- Colquhoun T A, Kim J Y, Wedde A E, Levin L A, Schmitt K C, Schuurink R C, Clark D G. 2011. *PhMYB4* fine-tunes the floral volatile signature of *Petunia × hybrida* through *PhC4H*. J Exp Bot, 62 (3): 1133 – 1143.
- Dubos C, Le Gourrierc J, Baudry A, Huep G, Debeaujon I, Routaboul J M, Alboresi A, Weisshaar, Lepiniec. 2008. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 55 (6): 940 – 953.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci, 15 (10): 573 – 581.
- Gatica-Arias A, Stanke M, Häntzschel K, Matoušek J, Weber G. 2013. Over-expression of the transcription factor HIMYB3 in transgenic hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettmanger) modulates the expression of genes involved in the biosynthesis of flavonoids and phloroglucinols. Plant Cell Tiss Organ Cult, 113 (2): 279 – 289.
- Guo Hong-guang, Wu Fan-hua. 2012. Advance in the studies on the regulation and functions of plant MYB transcription factors. Journal of Anhui Agri Sci, 40 (20): 10381 – 10383, 10516. (in Chinese)
- 郭弘光, 吴繁花. 2012. MYB 转录因子功能与调控研究进展. 安徽农业科学, 40 (20): 10381 – 10383, 10516.
- Guo Jin-long, Li Guo-yin, Su Ya-chun, Wang Heng-bo, Que You-xiong, Xu Jing-sheng, Xu Li-ping. 2012. Cloning and expression analysis of a R2R3-MYB-like gene *Sc2RMyb1* from sugarcane (*Saccharum complex*). Journal of Agricultural Biotechnology, 20 (9): 1009 – 1017. (in Chinese)
- 郭晋隆, 李国印, 苏亚春, 王恒波, 阙友雄, 徐景升, 许莉萍. 2012. 甘蔗 R2R3-MYB 类似基因 *Sc2RMyb1* 的克隆及表达特性分析. 农业生物技术学报, 20 (9): 1009 – 1017.
- Jin H L, Cominelli E, Baiey P, Parr A, Mehrtens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B, Martin C. 2000. Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. The EMBO Journal, 19 (22): 6150 – 6161.
- Huang Chun-hong, Gao Yan-hui, Zhu Yu-qiu, Tong Zai-kang, Jiang Xiao-feng. 2013. Cloning and expression analysis of flavanone 3-hydroxylase gene *LrF3H* from *Lycoris radiata*. Acta Horticulturae Sinica, 40 (5): 960 – 970. (in Chinese)
- 黄春红, 高燕会, 朱玉球, 童再康, 姜小凤. 2013. 石蒜黄酮 3-羟化酶基因 *LrF3H* 的克隆及表达分析. 园艺学报, 40 (5): 960 – 970.
- Kazan K. 2006. Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. Trends Plant Sci, 11 (3): 109 – 112.
- Lai Yunsong, Li Huanxiu, Yamagishi Masumi. 2013. A review of target gene specificity of flavonoid R2R3-MYB transcription factors and a discussion of factors contributing to the target gene selectivity. Frontiers in Biology, 8 (6): 577 – 598.
- Li Zhijian T, Frederick G Gmitter Jr, Jude W Grosser, Chen Chun-xian, Dennis J Gray. 2012. Isolation and characterization of a novel anthocyanin-promotive MYB a gene family in *Citrus*. Tree Genetics & Genomes, 8: 675 – 685.
- Liu Zhi-gao, Shao Wei-li, Huang Hua-hong. 2008. Application of *Lycoris* plants in landscape garden. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 12 (3): 52 – 54. (in Chinese)
- 刘志高, 邵伟丽, 黄华宏. 2008. 石蒜属植物的园林应用. 河北农业科学, 12 (3): 52 – 54.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods, 25 (4): 402 – 408.
- Liu Xiao-fen, Li Fang, Yin Xue-ren, Xu Chang-jie, Chen Kun-song. 2013. Recent advances in the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis. Acta Horticulturae Sinica, 40 (11): 2295 – 2306. (in Chinese)
- 刘晓芬, 李方, 殷学仁, 徐昌杰, 陈昆松. 2013. 花青苷生物合成转录调控研究进展. 园艺学报, 40 (11): 2295 – 2306.
- Ma T, Zhang J, Liang H, Liu Y. 2012. Plant anthocyanin synthesis and gene regulation. Agricultural Science & Technology, 13 (3): 507 – 551, 540.
- Petroni K, Tonelli C. 2011. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. Plant Sci, 181 (3): 219 – 229.
- Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, Li S F, Parish R W. 2004. *AtMYB32* is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 40 (6): 979 – 995.
- Qin Wei-hua, Zhou Shou-biao, Wang Heng-ying, Wang Hui. 2003. Advances in *Lycoris* herb. Journal of Anhui Normal University: Natural Science Edition, 26 (4): 385 – 390. (in Chinese)
- 秦卫华, 周守标, 汪恒英, 王晖. 2003. 石蒜属植物的研究进展. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 26 (4): 385 – 390.

- Ralf Stracke, Hirofumi Ishihara, Gunnar Huep, Aiko Barsch, Frank Mehrtens, Karsten Niehaus, Bernd Weisshaar. 2007. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. The Plant Journal, 50: 660 - 677.
- Shang Xiao, Wang Jian, Li Qin, Gong Sheng, Sun Hai-yan, Zhang Xuan-bing. 2014. Research advance in the molecular mechanisms of plant flower blotch formation. Acta Horticulturae Sinica, 41 (7): 1485 - 1494. (in Chinese)
- 尚 啸, 王 健, 李 琴, 龚 胜, 孙海燕, 张玄兵. 2014. 植物花斑形成分子机理研究进展. 园艺学报, 41 (7): 1485 - 1494.
- Shao Wen-ting, Liu Yang, Han Hong-qiang, Chen Huo-ying. 2013. Cloning and expression analysis of an anthocyanin-related transcription factor gene *SmMYB* in eggplant. Acta Horticulturae Sinica, 40 (3): 467 - 478. (in Chinese)
- 邵文婷, 刘 杨, 韩洪强, 陈火英. 2013. 茄子花青素合成相关基因 *SmMYB* 的克隆与表达分析. 园艺学报, 40 (3): 467 - 478.
- Shi Jian, Tong Zai-kang, Liu Zhi-gao, Gao Yan-hui, Jiang Xiao-feng, Huang Hua-hong. 2011. Tissue culture of leaves and embryo in *Lycoris sprengeri*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 33 (4): 665 - 669. (in Chinese)
- 时 剑, 童再康, 刘志高, 高燕会, 姜小凤, 黄华宏. 2011. 换锦花种胚和叶片的组织培养研究. 江西农业大学学报, 33 (4): 665 - 669.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. Curr Opin Plant Biol, 4 (5): 447 - 456.
- Su Hong-yan, Wang Lei, Wang Zhong-li, Feng Pei-yong, Zhang Ye. 2010. Cloning and characterization of *PeMYBL1*, an R2R3 MYB gene from poplar. Scientia Silvae Sinicae, 46 (1): 142 - 146. (in Chinese)
- 宿红艳, 王 磊, 王仲礼, 冯培勇, 张 晔. 2010. 杨树 R2R3 MYB 基因 *PeMYBL1* 的克隆及表达. 林业科学, 46 (1): 142 - 146.
- Takashi Nakatsuka, Misa Saito, Eri Yamada, Kohei Fujita, Yoko Kakizaki, Masahiro Nishihara. 2012. Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers. Journal of Experimental Botany, 63 (18): 6505 - 6517.
- Wu Chun-xia. 2009. Research development of MYB genes in plants. Journal of Anhui Agri Sci, 37 (20): 9372 - 9374. (in Chinese)
- 吴春霞. 2009. 植物 MYB 基因研究进展. 安徽农业科学, 37 (20): 9372 - 9374.

## 信 息

## 2014 年度华耐园艺科技奖 在中国园艺学会学术年会上隆重颁发

2014 年 10 月 23 日, 2014 年度华耐园艺科技奖在中国园艺学会学术年会上 (南昌) 隆重颁发。

根据 2014 年华耐园艺科技奖管理办法的有关规定, 共评选出 7 名获奖成果: 1. 梨省力高效现代栽培模式与技术 (河北农业大学、河北天丰农业集团有限公司, 张玉星等); 2. 梨优异矮化种质创制与矮化砧木品种培育利用 (中国农科院果树所, 姜淑苓等); 3. 东农 712 等系列番茄新品种选育及遗传改良基础研究 (东北农业大学、浙江大学, 李景富等); 4. 设施蔬菜栽培生产技术 (西北农林科技大学, 邹志荣等); 5. 白菜基因组测序和功能研究 (中国农科院蔬菜花卉所, 王晓武等); 6. 设施精品哈密瓜新品种选育与示范 (新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所, 张瑞等); 7. 菊花优异种质资源挖掘与新品种选育 (南京农业大学, 陈发棣等)。

会议号召广大园艺工作者以获奖者为榜样, 继续发扬团结奉献, 勇于探索, 勇于创新的科学精神, 坚定不移走中国特色自主创新道路, 为园艺事业做出更大贡献。

华耐园艺科技奖是经科技部批准, 中国园艺学会和北京华耐农业发展有限公司联合设立的社会力量科技奖励项目, 奖励在国内园艺科技领域做出突出贡献的科研成果, 由中国园艺学会具体承办。该奖每两年评选一次, 每次获奖成果不超过 16 个, 其中特等奖不超过 2 个, 奖金各 10 万元, 科技奖不超过 14 个, 奖金各 5 万元。

第四届授奖活动时间为 2016 年, 由成果完成单位自愿申请, 详情请登录中国园艺学会网站查询。

中国园艺学会

2014 年 10 月