

珙桐MYB转录因子*DiMYB1*基因的克隆及表达分析

戴鹏辉*, 任锐*, 曹福祥, 刘志明, 李萌**

中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙410004

摘要: 根据珙桐转录组测序结果, 筛选到一个与原花青素合成相关的基因, 通过克隆该基因片段并进行序列分析确定该基因编码一个珙桐MYB转录因子, 将其命名为*DiMYB1* (GenBank登录号KR996175)。该基因开放阅读框全长为924 bp, 编码产物包含307个氨基酸。对其编码产物的基本理化性质、亲水性和疏水性、保守结构域、亚细胞定位等方面进行了生物信息学分析和预测。对*DiMYB1*基因编码产物的氨基酸序列进行聚类分析表明, 其与拟南芥MYB123转录因子的同源性最高。应用qRT-PCR分析该基因的表达模式发现, *DiMYB1*基因在珙桐紫色幼叶中的表达量最高, 其次是雄蕊, 在芽、茎、成熟叶片、苞片、果肉和种子中只有微量表达。另外, *DiMYB1*基因的表达量在珙桐败育种子中显著高于正常种子, 且在中期败育种子中表达量达到最高。构建原核表达载体pET-28a (+)-*DiMYB1*, 并在大肠杆菌BL21 (DE3)中获得高效表达。本研究通过对*DiMYB1*基因进行克隆与表达分析, 为探索该基因在珙桐逆境胁迫、花青素合成和种子发育过程中的调控功能奠定基础。

关键词: MYB转录因子; 原花青素合成; 逆境胁迫; 珙桐

珙桐(*Davidia involucrata*)是珙桐科珙桐属落叶乔木, 第三纪古热带孑遗物种(中国植被编委会1980)。其起源古老, 曾被植物学家称为“植物活化石”和“林海中的珍珠”(唐晓军2002)。珙桐是中国特有物种, 属国家I级重点保护濒危物种。珙桐具有极高的观赏价值和学术研究价值。我国从20世纪70年代开始进行珙桐研究, 现有的珙桐研究报道主要集中在珙桐群落、引种栽培、组培技术、次生代谢、分子标记等方面, 分子生物学方面的相关报道还比较少。

本研究小组前期构建了珙桐果实及种子的转录组数据库, 并对珙桐正常种子和败育种子中差异表达的基因进行了分析。研究发现, 很多逆境胁迫响应基因, 包括编码*DREB*、*MYB*和*WRKY*等转录因子的基因在败育种子中显著上调表达(Li等2016)。本研究选择了在败育种子中表达量上调最为显著的与原花青素(anthocyanin)合成相关的MYB转录因子作为研究对象。

花青素是一类水溶性色素, 是决定被子植物花、果实和种皮等颜色的重要色素之一, 属于类黄酮类次生代谢物。花青素合成的前体物是苯丙氨酸, 它在苯丙氨酸裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)的作用下生成肉桂酸, 经过一系列的酶促反应, 最终在类黄酮糖基转移酶(UDP glucose-flavonoid-3-O-glycosyltransferase, UFGT)的作用下将不稳定的花青素转化成花色苷(Springob等2003; Hichri等2011; Petroni和Tonelli 2011)。花色苷对

植物适应环境有很大意义, 它可以提高植物光保护、抗冻、抗旱、抗氧化和抗菌的能力(孙明霞等2003)。

MYB转录因子是参与花青素生物合成的关键转录因子之一, 有着广泛的生物学功能, 如参与植物激素应答、次生细胞壁木质素合成、控制植物细胞的形态和模式的建成、参与植物苯丙烷类次生代谢途径的调节、促进植物本身对寒冷、紫外线胁迫和病原微生物攻击的适应等(Allan等2008; Hichri等2011; 陈俊和王宗阳2002)。当植物处于低温、干旱、磷酸盐缺乏等胁迫环境下时, MYB会激活花青素合成途径中的关键酶的编码基因, 如*PAL*、*C4H*等的表达, 在植物叶片中迅速累积花青素, 调节渗透压, 从而提高植物抵御逆境的能力(胡可等2010; Nagarajan等2016)。此外, 橡胶树*HbMYB1*可抑制诱导橡胶树细胞凋亡的各种生物和非生物胁迫机制, 葡萄的*MYB14*与*MYB15*基因则能够减轻真菌对葡萄的侵害(Holl等2013; Peng等2011)。

珙桐经历第四纪冰川期孑遗至今, 其果实与种子具有极强的抗低温、干旱等逆境的能力, *DiMYB1*在败育种子中的高表达量可能是植物受逆境诱导的响应。我们观察到, 珙桐幼苗叶片常出现深紫色, 而在成熟叶中很少见到紫色叶片, 可能是由于

收稿 2016-05-23 修定 2016-07-18

资助 湖南省百人计划(112-0991)、中南林业科技大学博士科研基金(0490016)和中南林业科技大学青年基金(QJ201512)。

* 并列第一作者。

** 通讯作者(E-mail: limeng0422@foxmail.com)。

不良的生长环境诱导了*DiMYB1*基因大量表达,进而调控原花青素的合成和累积,使幼苗具有更强的抗逆能力。本研究克隆珙桐*DiMYB1*基因的cDNA全长序列,并分析该基因在各组织器官和种子不同发育时期的表达变化情况,以期为进一步探索*DiMYB1*基因在珙桐逆境胁迫中的调节机制和发育过程中的生物学功能奠定基础。

材料与方法

1 材料

珙桐(*Davidia involucrata* Baill.)芽、紫色幼叶、绿色成熟叶片、茎、苞片、果肉、种子、雄蕊皆采集自湖南省张家界市桑植县八大公山国家级自然保护区,其中种子的采集时间为7~9月,其余组织样品采集时间为4~5月。将新鲜样品采集后迅速置于液氮中速冻后-70°C保存。

2 方法

2.1 总RNA的提取及反转录cDNA的合成

分别将样品在液氮中迅速研磨,采用E.Z.N.A.TM Plant RNA试剂盒快速提取总RNA,采用TaKaRa cDNA合成试剂盒进行反转录合成cDNA,产物于-20°C条件下保存备用。

2.2 目标基因克隆

根据目标基因的ORF序列使用Primer 5.0设计特异引物DiMYB1-F/DiMYB1-R(引物序列见表1),分别在引物两端加入*Bam*HI和*Hind*III酶切位点。以cDNA为模板进行全长扩增,反应产物于琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的条带,与pMD18-T载体连接。将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态中,选择阳性单菌落PCR鉴定后送往铂尚生物技术有限公司测序,测序无误后将载体命名为pMD18-T-DiMYB1。

表1 本研究使用的引物序列

Table 1 Primer sequences in the present study

引物名称	序列(5'→3')	扩增长度/bp	扩增效率/%	熔点温度/°C
DiMYB1-F	CGCGGATCCATGCGGAAGGAAACCATGCTGTGC	924	-	-
DiMYB1-R	ATTTAAGTCCCCTACTTACCTAACTAATTCGAACCC			
Q-DiMYB1-F	CACAACAATTAGATAATCAAT	101	98.05	80.82
Q-DiMYB1-R	GATGAACCTCCTACTACTA			
DiActin7-F	GGTCGTACAACCTGGTAT	76	94.02	79.93
DiActin7-R	TAGATACTTCCGATACGAG			
DiCAC-F	GGTGGATGCCTTCCGAATAA	83	102.76	78.74
DiCAC-R	CTAACCTCCAACGAGCAAGA			

2.3 生物信息学分析

使用NCBI中的ORF Finder (Open Reading Frame Finder)工具,预测目标基因的ORF。通过ExPASy-ProtParam tool、SMART、NetPhos、SignalP 4.1等在线软件对该基因编码蛋白的氨基酸组成、相对分子质量、理论pI值、亲水性/疏水性等理化性质进行初步分析。聚类分析采用NCBI数据库中的BLAST软件将目标基因编码的氨基酸序列在GenBank中进行同源性搜索,获得与其同源性较高的物种的氨基酸序列。使用MEGA 6.06软件中的邻位归并法(N-J法)进行聚类分析。

2.4 qRT-PCR分析

qRT-PCR反应体系使用2×SYBR Green qPCR Master Mix (High ROX) (Biotool),引物序列见表

1。选择在不同珙桐组织中表达量较稳定的*CAC*基因(未发表数据)为组织表达分析的内参基因,选择在种子中表达量较稳定的珙桐*Actin7*基因(未发表数据)为种子表达分析的内参基因,进行数据均一化。每个组织和种子样品均设置3个生物学重复,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据分析(Livak和Schmittgen 2001)。

2.5 原核表达

用*Bam*HI和*Hind*III对pMD18-T-DiMYB1进行双酶切,与同样用*Bam*HI和*Hind*III双酶切后回收的pET-28a (+)载体连接,将连接产物导入至大肠杆菌BL21 (DE3)感受态中,鉴定出阳性单菌落并测序。确定序列及载体组装无误后,将重组的载体命名为pET28a (+)-DiMYB1。将含pET28a (+)-

DiMYB1质粒的菌株接种于20 mL含50 mg·mL⁻¹卡那霉素的新鲜LB培养基, 37°C、165 r·min⁻¹摇床震荡培养过夜。次日进行亚培养, 培养至OD₆₀₀约为0.6时吸取1 mL菌液, 记为0 h的非诱导样品, 然后在剩余菌液中加入终浓度为0.5 mmol·L⁻¹的IPTG, 继续诱导培养, 并于1、2、3、4 h分别吸取1 mL菌液制样。最后使用10%的SDS-PAGE电泳对目的蛋白的诱导表达情况进行分析。

实验结果

1 珙桐种子中MYB基因的表达模式

本研究在珙桐转录组数据库中筛选到18个在正常和败育种子中差异表达的MYB基因(图1), 除了c39392.graph_c0和c32239.graph_c0在败育种子下调表达外, 其余16个基因均上调表达, 最明显的是c19374.graph_c0、c39858.graph_c0和c15946.graph_c0, 其中c39858.graph_c0在败育种子中的RPKM (reads per kilobases per million reads)值显著高于c19374.graph_c0和c15946.graph_c0, 因此将其作为本研究的目的基因。通过c39858.graph_c0在转录组中的功能注释及其序列在NCBI中的比对结果, 预测该基因编码一个调控原花青素生物合成的MYB转录因子(anthocyanin regulatory C1 protein)。

2 珙桐总RNA提取及*DiMYB1*基因克隆

对珙桐不同样品的总RNA进行了提取。所提取的RNA D_{260 nm}/D_{280 nm}比值均在1.9~2.0之间, 纯度较高。RNA电泳检测结果(图2-A)所示, 样品RNA

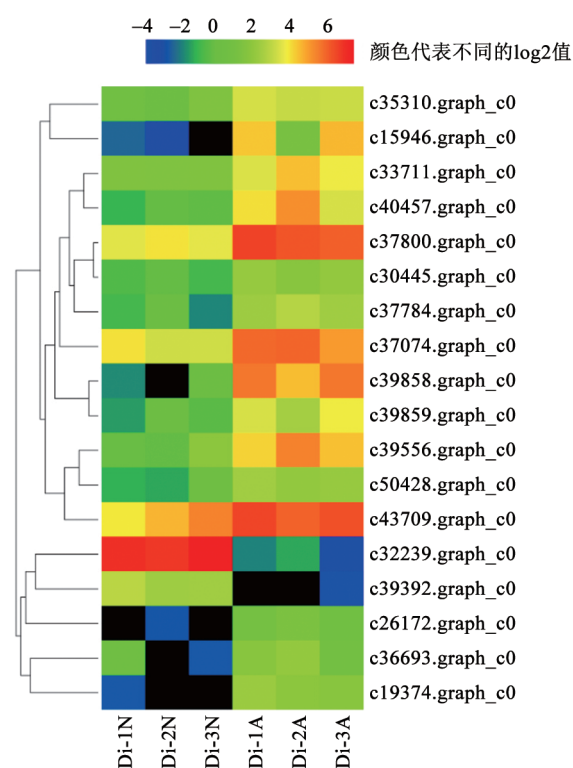


图1 MYB基因在正常种子和败育种子中的表达模式
Fig.1 Expression pattern of MYB gene in normal and abortive seeds

Di-1N、Di-2N和Di-3N为正常种子的3个样品; Di-1A、Di-2A和Di-3A为败育种子的3个样品; 不同颜色方块所对应的log₂值越大, 表明MYB在该样品中的表达量越高; 黑色方块代表未检测到表达。

的28S rRNA信号强于18S rRNA, 5S rRNA条带较弱, 证明提取的RNA完整性好, 无降解。

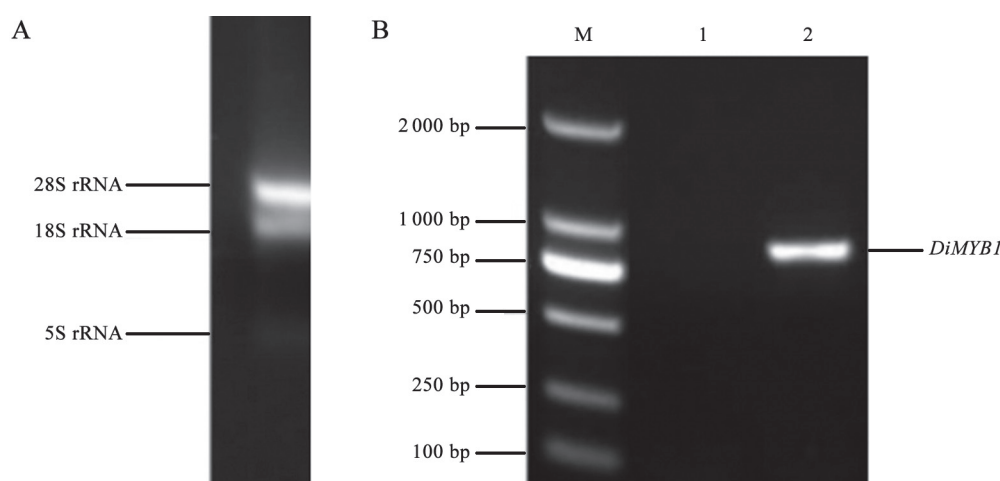


图2 总RNA提取和*DiMYB1*基因克隆

Fig.2 Total RNA extraction and PCR product of *DiMYB1*

A: 样品总RNA; B: *DiMYB1*基因片段克隆。M: DNA分子量标准; 1: 阴性对照; 2: 目的基因片段。

通过PCR从珙桐败育种子的cDNA中扩增到了一条长度为924 bp的DNA片段(图2-B)。经测序及BLAST比对,确定其编码一个MYB1转录因子,命名为*DiMYB1*。将该基因在GenBank中注册(登录号KR996175)。

3 生物信息学分析

3.1 DiMYB1蛋白质氨基酸序列分析

使用在线软件预测了该基因编码蛋白的理化性质,该蛋白质的化学式为 $C_{1524}H_{2446}N_{444}O_{473}S_{12}$,相对分子量大小约35 kDa,编码307个氨基酸残基,等电点为7.02,脂肪系数为84.50,半衰期为30 h,不稳定系数为43.78,属不稳定蛋白。该蛋白含量最多的氨基酸是Leu,其次是Asn和Ser。带正电荷的氨

基酸残基(Arg+Lys)总数为41个,带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)总数为41个。

3.2 DiMYB1蛋白保守结构域分析及聚类分析

将DiMYB1蛋白的氨基酸序列与GenBank中已经注册的不同物种的氨基酸序列利用ClustalX 2.1软件进行同源性比对,所得结果用BioEdit软件进行分析(图3),结果表明珙桐DiMYB1转录因子的氨基酸序列含SANT结构域、Rap1_C区、Pox_H7区、Myb-like DNA结合区,与其他物种保守序列不同的是,DiMYB1蛋白跨膜螺旋区及高度保守结构域中第14位的赖氨酸和第107位的酪氨酸分别被精氨酸和组氨酸取代,第80位的精氨酸被赖氨酸取代。

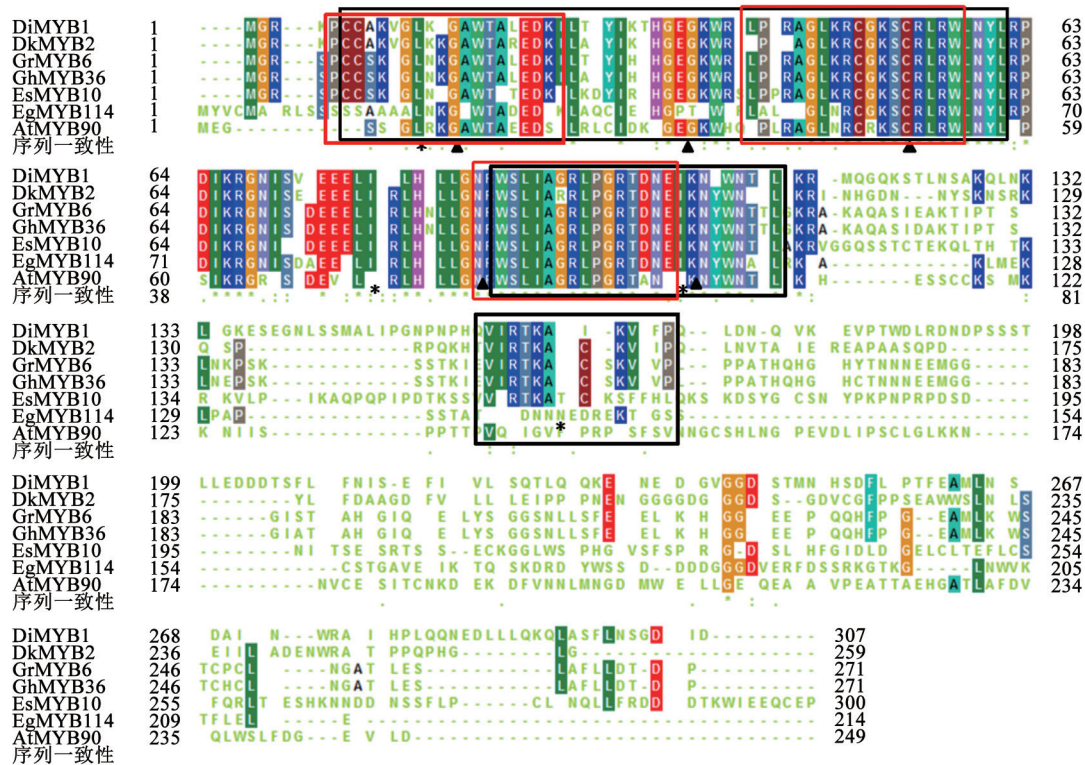


图3 珙桐DiMYB1蛋白同源序列比对

Fig.3 Homologous alignments of DiMYB1 protein

红色方框表示Myb-like DNA保守结合域;▲表示保守的色氨酸残基;*表示不同于其他保守序列的氨基酸;黑色方框表示亲脂性区域(位于160~175位氨基酸之间)、SANT结构域(位于17~60、71~111位氨基酸之间)、Rap1_C区(位于13~49位氨基酸之间)、Pox_H7区(位于187~227位氨基酸之间)。DiMYB1: 珙桐(*Davidia involucrata*, KR996175); DkMYB2: 柿树(*Diospyros kaki*, AB503699); GrMYB6: 雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*, XM_012632600); GhMYB36: 陆地棉(*Gossypium hirsutum*, AF336284); EsMYB10: 淫羊藿(*Epimedium sagittatum*, JN426957); EgMYB114: *Erythranthe guttatus* (XM_012971863); AtMYB90: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_176813)。

使用Protscal在线软件预测了珙桐DiMYB1蛋白的亲水性和疏水性,该蛋白的平均亲水系数

为-0.675,通过亲水性分布图反应了该蛋白质的折叠情况。多肽链第170位氨基酸最高分值为1.433,

疏水性最强, 在第102位、280位氨基酸最低分值为-2.444, 亲水性最强, 且亲水性氨基酸分布较均匀。根据氨基酸分值越高疏水性越强, 分值越低亲水性越强的规律, 所以推测DiMYB1蛋白为亲水性蛋白。经SignalP 4.1 Server预测其有一条信号肽。

*DiMYB1*基因属于R2R3MYB基因家族, 将其单独与拟南芥R2R3MYB基因家族中相似度相对较高

的S4、S5、S6、S7、S12、S15六个亚族进行了氨基酸序列比对(图4), 其与拟南芥第五亚族的*AtMYB123*相似度很高, 有研究表明, *AtMYB123*是一个在拟南芥种子发育时期与原花青素累积相关的关键转录因子(樊锦涛等2014; Dubos等2010)。因此, 预测*DiMYB1*基因和*AtMYB123*基因的功能相近, 即与种子中原花青素的累积有关。

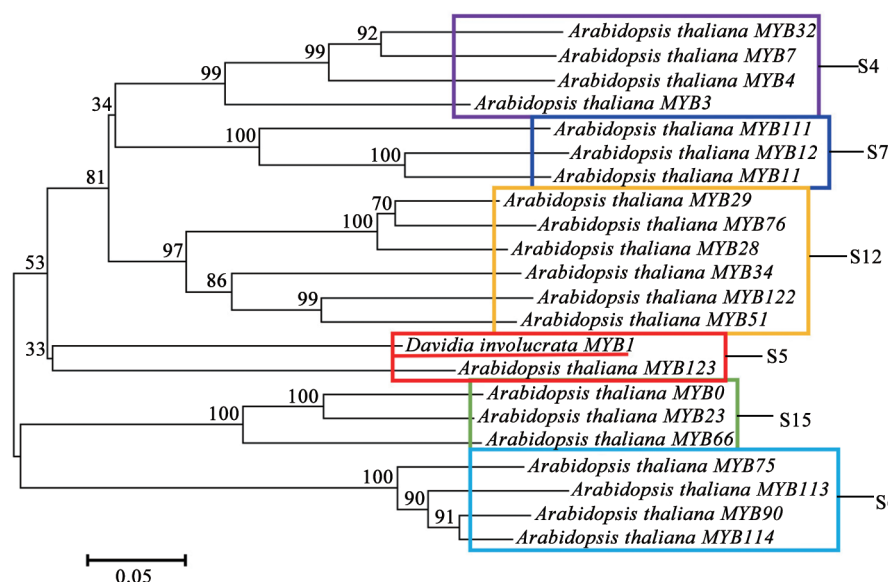


图4 珙桐DiMYB1氨基酸序列与拟南芥6个R2R3MYB亚家族的聚类分析

Fig.4 Clustering analysis of DiMYB1 and *Arabidopsis thaliana* six R2R3MYB subfamily based on amino acid sequence

3.3 珙桐DiMYB1蛋白二级结构、三级结构及亚细胞定位的预测

利用在线SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)软件对珙桐DiMYB1蛋白的二级结构进行了预测, 其二级结构由 α -螺旋(40.72%)、 β -折叠(14.01%)、 β -转角(9.45%)、无规则卷曲(35.83%)组成, 其中 α -螺旋和无规则卷曲为主要构件, 其次为 β -折叠和 β -转角。利用在线ExPASy (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>)中的SWISS-MODEL同源建模预测DiMYB1的三级结构模型(图5)。

利用Psort (<http://www.genscript.com/psort.html>)对DiMYB1蛋白进行亚细胞定位, 预测结果显示该蛋白位于细胞核的可能性是91.3%, 位于线粒体中的可能性是8.7%。通过Netphos 2.0 server预测了DiMYB1蛋白的磷酸化位点, 结果表明DiMYB1

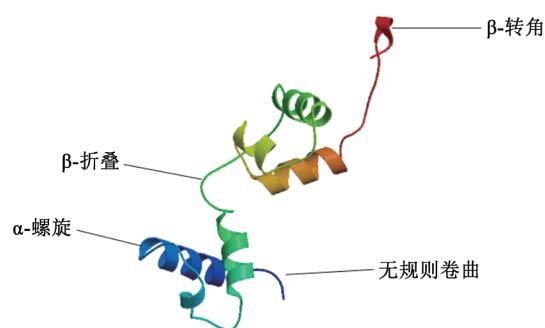


图5 DiMYB1三级结构预测模型

Fig.5 Predicted three-dimensional configuration of DiMYB1

蛋白含有11个丝氨酸位点、3个苏氨酸位点和1个酪氨酸位点。

4 珙桐DiMYB1基因的表达分析

珙桐各组织的qRT-PCR结果表明, *DiMYB1*基因在紫色幼叶中表达量最高, 雄蕊中次之, 在芽、

茎、成熟叶片、苞片、果肉、种子中表达量极低。其中,雄蕊中*DiMYB1*基因的表达量约为苞片、果肉、种子的6倍,约为芽、茎、成熟叶片的15倍,均差异显著($P < 0.05$);紫色幼叶中*DiMYB1*基因的表达量约为成熟叶片中的26倍,差异显著($P < 0.05$) (图6)。

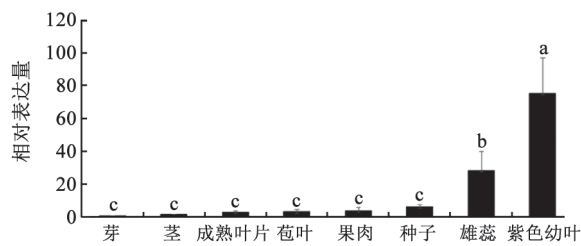


图6 *DiMYB1*基因在不同组织中的表达水平

Fig.6 Expression levels of *DiMYB1* gene in different tissues
各柱形上小写字母不同表示在0.05水平上差异显著;图7同。

对珙桐正常和败育种子中*DiMYB1*基因的表达量进行qPCR检测,结果表明,*DiMYB1*基因在正常和败育种子中均有表达(图7)。在正常种子中,*DiMYB1*基因在近成熟期表达量最高,分别约为正常种子膨大期和营养高速合成期的6.5倍和5倍。败育种子中,*DiMYB1*基因的表达量在初期较低,中期表达量迅速上升且达到表达高峰,约为初期的13倍;后期表达量相对中期有所下调,但相对初期仍较高。比较*DiMYB1*基因在同一采集时期的正常种子和败育种子中的表达量发现,该基因在初期败育种子中的表达量是同期正常种子(膨大期)的

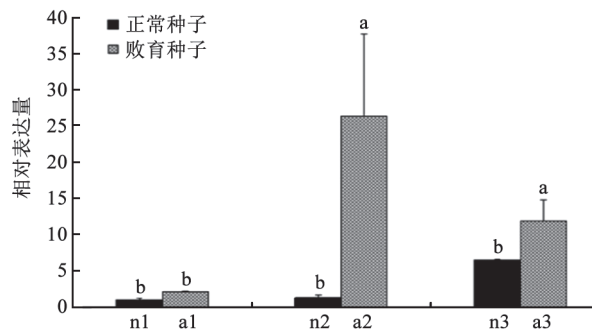


图7 *DiMYB1*基因在珙桐种子不同发育时期的表达量

Fig.7 Expression levels of *DiMYB1* gene in different developmental stages of *Davidia* seeds

n1: 正常种子膨大期; n2: 正常种子营养高速合成期; n3: 正常种子近成熟期; a1: 初期败育种子; a2: 中期败育种子; a3: 后期败育种子。

2.2倍;中期败育种子中的表达量是同期正常种子(营养高速合成期)的19.6倍,表达量差异值达到最高;后期败育种子中的表达量是同期正常种子(近成熟期)的1.8倍。综上所述,*DiMYB1*基因在败育种子中的表达量均高于正常种子,且在营养高速合成期的败育种子中表达量最高,明显高于其他时期。

5 pET28a (+)-*DiMYB1*表达载体构建与原核表达

将*DiMYB1*基因转入pET28a (+)载体中成功构建原核表达载体pET28a (+)-*DiMYB1*。将重组载体pET28a (+)-*DiMYB1*转入BL21 (DE3)中,提取重组质粒。用*Bam*HI和*Hind*III双酶切鉴定,经1.5% TAE琼脂糖凝胶电泳分析,显示在1 000 bp附近出现酶切条带,说明该重组质粒已成功转入BL21 (DE3)中,可用于后续原核表达实验。原核表达结果(图8)显示,在蛋白质相对分子质量小于44.3 kDa的位置检测到诱导表达蛋白条带,与目标蛋白的分子量预测值相符,表明重组质粒pET28a (+)-*DiMYB1*在BL21 (DE3)中成功表达。诱导产物量随诱导时间的延长逐渐增加,在3 h左右目标蛋白的表达量达到最大值。

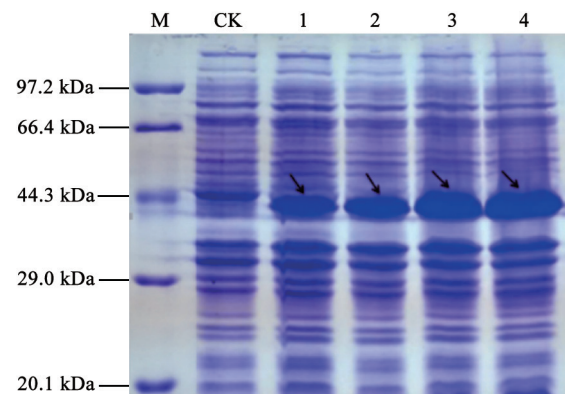


图8 *DiMYB1*蛋白原核表达分析

Fig.8 Prokaryotic expression of *DiMYB1* protein

M: 蛋白质分子量标准; CK: pET28a (+)-*DiMYB1*未诱导菌对照; 1~4分别为pET28a (+)-*DiMYB1*经0.5 mmol·L⁻¹ IPTG诱导1、2、3、4 h的诱导蛋白;黑色箭头指示目的蛋白pET28a (+)-*DiMYB1*。

讨 论

本研究从珙桐中克隆到一个编码MYB转录因子的基因*DiMYB1*,对该基因的核苷酸序列及其编码产物进行了生物信息学分析和预测,结果表明*DiMYB1*蛋白为亲水性蛋白,其氨基酸序列具有多

个功能域,如Rap1_C区、Pox_H7区、Myb-like DNA-Binding区。聚类分析表明,其与拟南芥R2R3MYB中第五亚家族AtMYB123转录因子的同源性最高,它们分别是果实、种子中与原花青素累积相关的关键转录因子,预测*DiMYB1*基因是一个调控珙桐果实及种子中原花青素合成的关键转录因子(Dubos等2010;方芳2015)。构建原核表达载体pET28a(+)-*DiMYB1*,并将*DiMYB1*蛋白在*E. coli* BL21(DE3)中高效表达,为今后深入研究*DiMYB1*蛋白在植物调控网络中的功能奠定基础。

研究发现,MYB类转录因子的过量表达会影响植物的正常生长发育,如*AtMYB26*基因的过量表达会诱导合成次生壁的相关基因表达,从而导致次生壁异位沉积。在拟南芥中过量表达*ZmMYB31*和*PeMYB2*会使拟南芥出现植株矮化和晚花的现象(肖冬长等2013;Fornale等2010)。*AtMYB56*基因特异性地调控种子颗粒大小(Zhang等2013)。在整个转录调控中,如果MYB转录因子表达异常或基因沉默都会影响花药的正常发育,形成空泡状和畸形花粉,最终导致部分雄性不育甚至完全雄性不育,如*AtMYB103*基因的沉默会使花粉壁不能正常形成而最终导致种子败育(邓志刚等2013;Zhang等2007)。本研究中*DiMYB1*基因在各个时期的败育种子中的表达量均比正常种子表达量高,尤其在中后期的败育种子中*DiMYB1*基因的表达量远超过在正常种子的表达量,推测*DiMYB1*基因在珙桐种子败育过程中发挥了重要的调控作用。

有研究表明,在植物组织器官中,类黄酮化合物的累积是植物抵抗逆境的一个重要特性,类黄酮在植物中具有保护植物免受紫外伤害,增强植物耐寒性、抗旱性和抗虫性等功能,而MYB转录因子与类黄酮代谢调控密切相关。本实验中,*DiMYB1*基因在紫色幼叶中的表达量比成熟叶片高,可能是由于*DiMYB1*基因的大量表达促使类黄酮化合物累积,从而能使幼叶呈紫色而免受紫外伤害。同时,*DiMYB1*基因在败育种子中表达量较正常种子高,败育种子处于逆境中,推测可能是逆境诱导败育种子中*DiMYB1*基因上调表达,使类黄酮大量合成,从而提高了种子对逆境的抵抗能力。对于珙桐*DiMYB1*基因在原花青素合成和植物抗逆胁迫中确切的分子调控机制,有待进一步深入研究。

参考文献

- Allan AC, Hellens RP, Laing WA (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci*, 13 (3): 99–102
- China's Vegetation Editorial Board (1980). *Vegetation of China*. Beijing: Science Press, 298–299 (in Chinese) [中国植被编委会(1980). 中国植被. 北京: 科学出版社, 298–299]
- Chen J, Wang ZY (2002). Progress in the study of plant MYB transcription factors. *J Plant Physiol Mol Biol*, 28 (2): 81–88 (in Chinese with English abstract) [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]
- Deng ZG, Jin L, Li J, Wang WB, Yang L, Wang XJ (2013). Pathways of MYB transcription factors regulating anther development and pollen formation. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 33 (4): 850–856 (in Chinese with English abstract) [邓志刚, 金樑, 李晶, 王文斌, 杨龙, 王晓娟(2013). MYB类转录因子对花药和花粉发育的调控途径. 西北植物学报, 33 (4): 850–856]
- 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
- Fan JT, Jiang CQ, Xing JH, Dong JF (2014). Structure and function of the 22nd subfamily in *Arabidopsis* R2R3-MYB family. *Hereditas*, (10): 985–994 (in Chinese with English abstract) [樊锦涛, 蒋琛茜, 邢继红, 董金皋(2014). 拟南芥R2R3-MYB家族第22亚族的结构与功能. 遗传, (10): 985–994]
- Fornale S, Shi X, Chai C, Encina A, Irars S, Capellades M, Fuguet E, Torres J, Rovira P, Puigdomènech P, et al (2010). ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J*, 64 (4): 633–644
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot*, 62: 2465–2483
- Holl J, Vannozzi A, Czemplin S, D'Onofrio C, Walker AR, Rausch T, Lucchin M, Boss PK, Dry IB, Bogs J (2013). The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell*, 25: 147–154
- Hu K, Han KT, Dai SL (2010). Regulation of plant anthocyanin synthesis and pigmentation by environmental factors. *Chin Bull Bot*, 45 (3): 307–317 (in Chinese) [胡可, 韩科厅, 戴思兰(2010). 环境因子调控植物花青素合成及呈色的机理. 植物学报, 45 (3): 307–317]
- Li M, Dong XJ, Peng JQ, Xu W, Ren R, Liu J, Liu ZM (2016). *De novo* transcriptome sequencing and gene expression analysis reveal potential mechanisms of seed abortion in dove tree (*Davidia involucrata* Baill.). *BMC Plant Biol*, 16 (1): 1
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Nagarajan VK, Sathesh V, Poling MD, Raghothama KG, Jain A (2016). *Arabidopsis* MYB-related HHO₂ exerts a regulatory influence on a subset of root traits and genes governing phosphate homeostasis. *Plant Cell Physiol*, 57 (6): 1142–1152
- Petroni K, Tonelli C (2011). Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Sci*, 181: 219–229

- Peng SQ, Wu KX, Huang GX, Chen SC (2011). HbMYB1, a MYB transcription factor from *Hevea brasiliensis*, suppresses stress induced cell death in transgenic tobacco. *Plant Physiol Biochem*, 49: 1429–1435
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep*, 20: 288–303
- Sun MX, Wang BZ, Fan H, Zhao KF (2003). Anthocyanins of leaves and their environmental significance in plant stress responses. *Plant Physiol Commun*, (6): 688–694 (in Chinese) [孙明霞, 王宝增, 范海, 赵可夫(2003). 叶片中的花色素苷及其对植物适应环境的意义. *植物生理学通讯*, (6): 688–694]
- Tang XJ (2002). Features and value of *Davidia involucrata* Bail. *Southwest Hortic*, (3): 54–55 (in Chinese) [唐晓军(2002). 珙桐的特性与价值. *西南园艺*, (3): 54–55]
- Wan F (2015). Involvement of *DkMYB* and *DkbHLH* transcription factors in persimmon fruit postharvest destringency (Master's thesis). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [方芳(2015). *DkMYB*和*DkbHLH*介入柿果实采后脱涩转录调控机制研究(硕士论文). 杭州: 浙江大学]
- Xiao DC, Zhang ZJ, Xu YW, Yang L, Zhang FX, Wang CL (2013). Cloning and functional of *Phyllostachys edulis* MYB transcription factor *PeMYB2*. *Hereditas*, (10): 1217–1225 (in Chinese with English abstract) [肖冬长, 张智俊, 徐英武, 杨丽, 张风雪, 王超莉(2013). 毛竹MYB转录因子*PeMYB2*的克隆与功能分析. *遗传*, (10): 1217–1225]
- Zhang YJ, Liang WQ, Shi JX, Xu J, Zhang DB (2013). *MYB56* encoding a R2R3 MYB transcription factor regulates seed size in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol*, 55 (11): 1166–1178
- Zhang ZB, Zhu J, Gao JF, Wang C, Li H, Li H, Zhang HQ, Zhang S, Wang DM, Wang QX, et al (2007). Transcription factor *AtMYB103* is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and anther formation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 52 (3): 528–538

Cloning and expression analysis of a gene encoding MYB1 transcription factor in *Davidia involucrata*

DAI Peng-Hui*, REN Rui*, CAO Fu-Xiang, LIU Zhi-Ming, LI Meng**

College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: According to the *Davidia involucrata* transcriptome sequencing data, a gene involved in proanthocyanin biosynthesis was selected. The target gene was identified to encode a MYB1 transcription factor in *D. involucrata* by cloning and sequence analysis and named as *DiMYB1* (GenBank accession No. KR996175). The fragment of *DiMYB1* includes a ORF (open reading frame) of 924 bp, which encodes a protein product of 307 amino acids. Bioinformatic analysis and prediction have been conducted to identify the physicochemical property, hydrophilia and hydrophobicity, conserved domain and subcellular localization of DiMYB1 protein. Phylogenetic analysis based on the amino acid sequence of DiMYB1 indicated it has the highest homology with *Arabidopsis thaliana* MYB123 transcription factor. Expression patterns of *DiMYB1* was detected by qRT-PCR and the result showed that *DiMYB1* had the highest transcript abundance in purple young leaves, followed by purple stamens, while had the less transcript abundance in buds, stems, mature leaves, bracts, fruits, and seeds. In addition, transcript abundance of *DiMYB1* in abortive seeds was significantly higher than in normal seeds, and reached the peak in the middle developmental stages in abortive seeds. Subsequently, prokaryotic expression vector of pET-28a (+)-*DiMYB1* has been constructed successfully and was induced to express effectively in *E. coli* BL21 (DE3). This work lays a foundation for further exploring the function of MYB1 transcription factors in response to stress, proanthocyanin biosynthesis and development regulation in *D. involucrata*.

Key words: MYB1 transcription factor; proanthocyanin synthesis; stress conditions; dove tree (*Davidia involucrata*)

Received 2016-05-23 Accepted 2016-07-18

This work was supported by the One-Hundred-Talents Scheme of Hunan Province (Grant No. 112-0991), the Doctoral Scientific Research Foundation of Central South University of Forestry and Technology (Grant No. 0490016), and Youth Foundation of Central South University of Forestry and Technology (Grant No. QJ201512).

*Co-first authors.

**Corresponding author (E-mail: limeng0422@foxmail.com).