## 蓝莓转录因子VcMYB21在果实着色及幼苗UV处理中的响应

刘中帅,袁义杭,张通,张凌云\*

北京林业大学,省部共建森林培育与保护教育部重点实验室,北京100083

摘要:本研究通过RACE-PCR从蓝莓中克隆得到一个R2R3-MYB转录因子,命名为VcMYB21,该基因全长1 373 bp,编码区 722 bp,编码233个氨基酸。生物信息学分析发现其理论分子量为58.37 kDa,pl值为5.12,中部有1个2Fe-2S结合域和1个 EGF-like结构域,属于膜外蛋白,结构不稳定。酵母双杂交实验表明VcMYB21蛋白无自激活活性,能自身形成同源二聚 体。组织特异性表达实验显示VcMYB21主要在蓝莓的果皮和叶片中表达。在蓝莓果实发育过程中,VcMYB21基因的表达 量整体呈下降趋势,在果实发育早期表达量最高,之后迅速下降,全红果时期略微上升;花青素的含量随果实发育持续上升, 在紫果期达到最大。UV-B与UV-C处理均显著诱导VcMYB21在蓝莓幼苗叶片组织中的表达,其中对UV-B处理更为敏感。 UV-B处理5 min以及UV-C处理10 min均能显著诱导该基因的表达,随处理时间的延长,基因表达量下降;花青素的含量在 基因表达量下降后迅速上升,之后花青素分解,积累量下降。这些研究结果表明VcMYB21在UV处理后叶片花青素积累过 程及蓝莓果实着色过程中可能发挥着负调控作用。

关键词:蓝莓; VcMYB21; 基因表达; 逆境响应

通过转录因子调控目的基因表达是植物调控 生长发育及生理代谢的一种重要方式(陈清等2009), 大部分逆境诱导基因都受到特殊的转录因子调控 (Hu等2008)。MYB是最大的植物转录因子家族成 员之一(Miyakeet等2003),包括R2R3-MYB、bHLH 结构以及WDR蛋白,这些蛋白通过形成MBW复合 体结构激活转录, MBW复合体通过一些特定的作 用元件直接作用于DNA的启动子区,进而调控目 的基因的表达。已经报道的靶基因序列包括MYB 响应原件、R2R3-MYB的AC作用元件以及E-BOX 或bHLH绑定区(Feller等2011; Lai等2013; Xu和 Grain 2014)。植物细胞正是通过R2R3MYB、bHLH 以及WDR之间复杂的相互作用来行使特定的功能 (Broun 2005; Koes和Verweij 2005; Ramsay和Glover 2005)。据报道, MYB转录因子参与了细胞分化、 细胞周期的调节(Payne等2000; Suo等2003)、激素 和环境因子的应答(Lea等2007)、植物次生代谢以 及叶片等器官形态建成(杜海等2008)等多种生物 学过程。

许多研究表明, MYB转录因子参与了植物花 青素的积累过程, 对果皮、果肉、叶片和花器官等 各种颜色的形成具有重要作用(王华等2015; Zifkin等 2012; 邢文和金晓玲2015)。随着果实的发育, 苹果 中的*MdMYB10*基因过表达能使得果肉变红(Espley 等2007), 杨梅中的MrMYB1随果实成熟着色表达 量持续显著上升(Niu等2010)。花青素的生物合成 不但受植物体内部遗传信息的调控, 外界环境如 紫外光处理、盐胁迫等也能诱导花青素的表达(齐 艳等2014;杨乐等2015;Yoshida等2015),大量研究 结果显示,MYB转录因子还在响应UV胁迫中发挥 重要的调控作用。拟南芥的*AtMYB4*基因突变后能 增加拟南芥抵抗UV胁迫的能力(Jin等2000),而苦养 通过上调*FtMYB11*的表达抵御UV伤害(Gao等 2016),苹果果皮中的*MdMYBA*基因在UV-B处理时 能显著上调,促进果实中花青素的生物合成进而 降低UV对果实的伤害(Ban等2007),但目前其具体 的调控机制有待进一步探究。

高丛蓝莓是杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(Vaccinium)植物,果实中含有丰富的花青素,具有防止脑神经老化、强心、抗癌软化血管、增强人机体 免疫等功能(van der Heijden等2016)。目前调控花 青素合成的MYB转录因子在葡萄、草莓等果实中 研究较多,但在蓝莓中研究报道较少;此外,以往研 究多集中在促进花青素合成的基因上,负调控花青 素合成的研究相对较少。本研究在实验室前期蓝 莓转录组测序的数据基础(Li等2016)上,在蓝莓中 克隆并鉴定了一个R2R3-MYB转录因子VcMYB21。 通过荧光定量PCR实验测定VcMYB21基因在果实 着色过程的差异表达,分析其随果实着色过程的

- 资助 国家自然科学基金项目(31270663)和国家转基因生物新品 种培育科技重大专项(2013ZX08009003-002-004)。
  - \* 通讯作者(E-mail: lyzhang73@sohu.com)。

收稿 2016-08-22 修定 2016-12-14

表达量的变化与蓝莓果实中花青素含量的变化趋势,并进一步通过对蓝莓幼苗UV处理时*VcMYB21* 基因在叶片中表达量与花青素含量的变化来分析 基因的功能,以期为研究蓝莓花青素生物合成与 积累机制提供分子基础。

## 材料与方法

#### 1 实验材料

试验用的高丛蓝莓(Vaccinium corymbosum L.) 果实及一年生'日出(Sunrise)'和'喜来(Sierra)'蓝莓 苗取材于秦皇岛天硕农业科技开发有限公司。蓝 莓根、茎、叶、花、果实组织分别取材于5年生 的'日出(Sunrise)'和'喜来(Sierra)'2个蓝莓品种,选 取生长健康、长势一致的植株,分别从东、西、 南、北方向随机取样,经液氮处理后-80°C超低温 冰箱保存。

#### 2 胁迫处理

用于处理的幼苗为'日出(Sunrise)'和'喜来(Sierra)'组培移栽一年生苗,每3株一组做紫外光处理, 共进行3次生物学重复。处理时,植株顶端距离光 源约20 cm,分别在UV-B (40 W, 305 nm,北京电光 源研究所)和UV-C (40 W, 254 nm,北京电光源研究 所)照射处理0、5、10、15、20、25和30 min。处 理后立即将叶片剪下用锡箔纸包好,经液氮处理 后-80°C超低温冰箱保存备用。

#### 3 生物信息学分析

通过Blast在NCBI在线数据库中搜索其他物种的VcMYB21基因的同源序列,用DNAMAN软件进行 氨基酸多序列比对分析,并用ClustalX和MEGA 5.0软 件构建系统发育树。用Compute pl/Mw工具预测 蛋白等电点和分子质量(http://web.Expasy.org/ compute pi/), ProParam预测该蛋白分子式及不稳 定指数(http://web.expasy.org/protparam/); SignalP做 信号肽预测(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/); ProtScale分析蛋白疏水性 (http://web.expasy.org/ protscale/); FoldIndex做无序化特征预测(http://bip. weizmann.ac. il/fldbin/find-ex); 蛋白二级结构和三 级结构则分别用SOPMA (http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php)和SWISS (http://swissmodel.expasy.org)进 行预测; 用ScanProsite对蛋白进行功能位点预测 (http://prosite.expasy.org/scanprosite/)。

## 4 RNA提取及第一链cDNA合成

分别收集幼苗、花及果实等不同组织材料,通 过Plant RNA Kit试剂盒(OMEGA,北京)提取各样品 的总RNA,并利用PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit反转 录试剂盒(TIANGEN,北京)合成第1链cDNA\作为 模板,分别用于基因克隆和荧光定量PCR的模板。

#### 5 荧光定量PCR分析

用DNAMAN和Oligo软件设计VcMYB21基因 的特异性表达引物,以蓝莓UBC28基因为内参基 因,通过 ABI Step One Plus荧光实时定量PCR仪检 测VcMYB21在蓝莓根、茎、叶、花、果实和果皮 等不同组织以及在UV-C与UV-B光照处理蓝莓叶 片后VcMYB21的表达模式。其中,根、茎、叶、 花和果皮是不同发育时期样品均匀混合后磨样用 于测定。每个处理的样品设3个生物学重复。荧 光染料使用 SYBR Green (TIANGEN,北京),反应 程序为: 95°C预变性15 min; 95°C变性30 s, 60°C退 火30 s (40 个循环); 引物序列见表1。

## 6 VcMYB21-pGADT7和VcMYB21-pGBKT7酵母 双杂载体的构建

从蓝莓中克隆得到*VcMYB21*编码区序列, 连 接到PEASYT1载体(TIANGEN, 北京)上, 转化大肠 杆菌感受态细胞DH5α, 挑选阳性菌落测序验证后,

表1 cDNA克隆及荧光定量PCR、半定量PCR和载体转化所用的引物

Table 1 Primers used in cDNA cloning, qRT-PCR, semi-quantitative PCR and victor transformation

引物名称	前引物(5'→3')	后引物(5'→3')							
5' RACE	CAGTCTTAAGCTCGGGCCCCA	GTTGAGTTCGCCATAGCCCAC							
3' RACE	CTTGCTGGCATTGCAAAGTAT	CTGCCAGGAAACAGCTATGAC							
ORF	ATGAGGAAGCCATGTTGTGAG	TCATGTAAAGAGAGGAAGGGTG							
RT-PCR	GATTACATTCGCAGGCACGG	CCAGGAGTGCATGAAGCTTG							
VcMYB21-pGADT7	CGGAATTCATGAGGAAGCCATGTTGTGAG	CGGGATCCTCATGTAAAGAGAGGAAGGGTG							
VcMYB21-pGBKT7	CGGAATTCATGAGGAAGCCATGTTGTGAG	CGGGATCCTCATGTAAAGAGAGGAAGGGTG							

经液氮速冻保存于-80°C冰箱。设计构建VcMYB21pGADT7和VcMYB21-pGBKT7表达载体的引物序 列,其中上游引物用EcoRI,下游引物用BamHI,由 上海Invitrogen生物公司合成,具体序列见表1。从 构建好的PEASYT1载体上用带相应酶切位点的引 物进行PCR得到目的基因,将扩增产物及载体通过 EcoRI/BamHI (Thermo Scientific,美国) 37°C、2 h双 酶切作用后,利用 T4 DNA 连接酶(Thermo Scientific, 美国) 16°C过夜连接,获得重组表达载体VcMYB21pGADT7和VcMYB21-pGBKT7,利用Clontech公司 的酵母双杂系统进行酵母实验。

#### 7 花青素的测定

采用pH试差法测定花青素含量,具体方法参照杨兆艳(2007)一文。

#### 实验结果

#### 1 VcMYB21基因的表达特征

根据转录组测序获得的VcMYB21基因cDNA 片段,以蓝莓的cDNA为模板,设计特异引物进行5' 端和3'端的RACE-PCR,PCR扩增产物胶回收后连 接Peasy-T1载体,筛选阳性克隆测序,将测序结果序 列与己有的cDNA序列进行拼接得到的VcMYB21的 全长cDNA序列(图1)。VcMYB21基因全长为1 373 bp, 起始子ATG出现在103 bp, 终止子TAG出现在 826 bp, 在1 348 bp处出现PolyA尾巴。在231~239 bp和626~634 bp处有2Fe-2S结合域, 在293~304 bp 处有EGF-like结构域, 在314~327 bp处有硫解酶的 活性位点(图1)。设计引物ORF-F、ORF-R克隆*Vc-MYB21*的编码区, 并将其构建到Peasy-T1载体上测 序验证, 获得基因的ORF片段, 引物序列见表1。

#### 2 VcMYB21序列特征预测与分析

#### 2.1 VcMYB21结构和理化性质预测

VcMYB21基因的理化分析实验显示,该基因编码233个氨基酸,理论分子质量为58.37 kDa,pl值为5.12,蛋白分子式为C<sub>2124</sub>H<sub>3548</sub>N<sub>702</sub>O<sub>871</sub>S<sub>172</sub>,无负电残基(Asp+Glu)和正电氨基酸残基(Arg+Lys)。肽链中Ala含量最多,占总量的30.2%;其次是Cys,占总量的24.5%。不稳定指数为47.62,高于40的阈值,预测VcMYB21蛋白不太稳定,VcMYB21不含信号肽,因此不属分泌蛋白。磷酸化位点预测发现VcMYB21的17、141、148、150、173和197位氨基酸为丝氨酸(Ser)磷酸化位点,11和180位为苏氨酸(Thr)磷酸化位点。VcMYB21蛋白在N端36~59以及88~111位氨基酸是HTH结合区域;蛋白疏水性指数为-9.80,表明该蛋白为亲水蛋白(图2-A)。VcMYB21蛋白进行固有无序化分析的结果显示,

1	CACCTO	TCT	стс	TCTO	CTC	TCT	CTG	TAT	CTG	TAT	CTA	TCT	ATC	TAT	CTA	TCT	GTG	TGT	стс	TGT	GAA	GGG	GAT	TTG	GAG	GTT	TAT.	ATA	CTC
91	TGTGTG	AG T.	AGA	ATG	AGG.	AAG	CCA	TGT	TGT	GAG	AAG	CAA	GAC	ACG	AAT	AAA	GGA	GCA	TGG	TCC	AAA	CAA	GAG	GAT	CAG.	AAG	CTC.	ATA	GAT
31			L	M	R	K	Ρ	С	С	Е	K	Q	D	Т	N	K	G	A	Ψ	S	Κ	Q	Ε	D	Q	K	L	I	D
181	TACATTCGCAGGCACGGTGAAGGCTGTTGGCGTACCATCCCGCAGGCTGCAGGACTACTTCGTTGTGGTAAAAGTTGTAGGCTAAGA															AGA	IGG												
61	ΥI	R	R	Η	G	Ε	G	С	Ψ	R	Т	Ι	Ρ	Q	A	A	G	L	L	R	С	G	K	S	С	R	L	R	Ψ
271	ATTAAT	TAC	CTG	AGA	CCA	GAQ	CTC	AAA	AGG	GGC	AAC	TTT	GC¢	GAA	GAC	GAA	GAA	GAT	CTC	ATC	ATC	AAG	CTT	CAC	GCA	CTC	CTG	GG T.	AAC
91	I N	Y	L	R	Ρ	D	L	K	R	G	N	F	A.	E	D	Ε	E	D	L	Ι	Ι	K	L	Н	A	L	L	G	N
361	CGGTGG	TCA	TTG.	ATA	GCA	GGA	AGA	TTG	CCA	GGG	CGA	ACC	GAC	AAC	GAA	GTC	AAG	AAT	TAC	TGG	AAC	TCC	CAT	TTG.	AGA	AGA.	AAG	CTT	ATG
121	R₩	S	L	I	A	G	R	L	Ρ	G	R	Т	D	N	Ε	۷	K	N	Y	Ψ	N	S	H	L	R	R	K	L	M
451	AACATG	GG T.	ATCO	GACO	CCA	AAT.	AAT	CAC	CGG	TTA	AAT	CAG	AAT	CIC	ccc	CCT	CGC	TCT	CAA	AAT	CCA	CGT	CCC.	TCT	CCC.	ACTO	GCA	ACA	GCT
151	N M	G	I	D	P	N	N	Н	R	L	N	Q	N	L	P	Р	R	S	Q	N	P	R	Р	S	P	T	A	T	A
541	TCTTCT	GCT	TCT	AAA	CAC	GAC	GTA	TCT	CAG	CCA	TTG	AAG	ACC	AAG	CTA	GCG	GAG	AAT	GAT	CAG	GIC	TCC	GAT	GCT	GCA	AGT	TGT	CTA	FAC
181	SS	A	S	K	H	D	V	S	Q	P	L	K	T	K	L	A	E	N	D	Q	V Tam	S	D	A	A	S	C	L	D
631	GACGAC	TCC.	ACA	CCG:	IGC	TTG	CCT	GAT	TTA	AAT	CTT	GAT	CTI	AAA	ATT	ACC	CIG	AAT	CAT	TCT	TCT	TCA	ATT	ICC.	ATD	GAT	ATT	GTT	JAA .
211	D D	2	1	Р 	ل • ۳۳	L	Р 7	U Taa	L	N TTA	L	U 100	L	A C T T	1	1	L	N	H	3	3	Стт	L	3	1	U V		V H A CO	E
721	GAGGAG	AAG.	AAA(	JAA	41 I) T	- AD		IUC C	ACA	TIA	ICA	AGG	GCI	611	GRA	100	AAC	un,	IGU	uu.	ACC	UII T			11 L	ACA T	168	IAC	111
241	E E	A CCA	A	E 	L TCA	D TCA	۱۳۸۷	3	1	L		N ATA	A TTT	V CCC	E	3	N	L		r cc.	I TCC	ь 	P	L 	r ATA	1 L	*	1 4-2 T	T T T
811	ACAATC	CAA	****	888. T	16A 7 4 T	CAA	AIA TAC	GAG.	***	ARG.	***	AIA TAT	111 TTC		ARG	666	AGU	CCA	***	CAT	CC A	AAU	588. 	***	818 788	***	881. 477	AC I	111
901	CCAATG	TCA	TTT'	TCAT	TCA	ACT	CCA	AGA TCA	AAA TTT	AGA CCC	TC A	1AI	115	GCA TTA	AGG	GGA ACT	GCI TAT	CGA	TCA	TCC		ACG.	CAT	- 1 T	CAC	C TC	ALL AAC	16A	TCC
0.91	ACCCCA	TTA	TTC	TUR.	ATT	CTT	CAA	CAC	4C 4	000 000	CTC	TCC	111 TT 0	110	AGC CAT	TCA	TAT	TCA	TTA	TTC	886 880	CCC	TTA	CAR	CAG	TCT	TC TO	CAR	ATC
171	TTCTTC	CON	110. TTT(	1 1 1 <i>1</i> 2 T T (	200	TCA	TTT	TCC	TTC	AGA	TCC	CAT	000	070	CAI	CT 6	101	1CA	ATC	6 T 6	TAT	GGC GTC	CTC	3 A A C	TTM	CTC	1010 00T	TGT	TTC
261	CACACT	100		7 6 T'	TCC	CCT	TGT	100	TTA	ACA 6 T 6	ACT	CAA	A TC	TTC	ATC	ATT	TTC	ATT	CGT	TAT	101 177	CAT	d TT	76 T	CGT	CT4	TTA	TCC	CTC
351	CATATT	444	CTT	TGT	TGA		CAG	TTA	464	444	TAT	TTG	GCI	ACC	CC A	GCT	CGA	440	CAT	CGA	acd	100	666	444	444		i î	100	510
551	·····		***	***			~						~~		~~~	~~ *			~****	~~~	····· (								

#### 图1 VcMYB21 cDNA全长及其编码氨基酸序列

Fig.1 Nucletide sequences of VcMYB21 cDNA and its deduced sequences of amino acid



图2 VcMYB21蛋白结构及理化性质分析 Fig.2 Protein structure and chemical properties analysis of VcMYB21

VcMYB21蛋白无序化特征明显(图2-B)。VcMYB21 氨基酸序列二级结构(图2-C)中α螺旋中有73个氨 基酸,占总量的31.33%;无规则卷曲有137个氨基 酸,占58.80%;延伸链23个,分别占9.87%,与三级 结构结果相似(图2-D)。

#### 2.2 VcMYB21多重序列比对与系统进化树

将VcMYB21 cDNA序列编码的氨基酸序列在 NCBI的在线数据库中进行Blast分析,发现与VcMY-B21一致性较高的同源蛋白有笃斯越橘(Vaccinium uliginosum, VuMYBC2)、白梨(Pyrus × bretschneideri, PbMYB308, LOC103948474)、苹果(Malus × domestica, MdMYB308, LOC103416449; Malus hybrid cultivar, MhMYB2)、克莱门柚(Citrus clementina, CcMYB)、 猴面花(Erythranthe guttatus, EgMYB32, LOC1059-71972)、雷蒙德氏棉(Gossypium raimondii, GrMYB305, LOC105782572)等。通过Clustal-X将蓝莓VcMY-B21氨基酸序列与这7个物种同源蛋白多序列比对, 发现VcMYB21在进化上相对保守,与笃斯越橘的 MYBC2基因吻合度高(图3-A),但品种间基因有个别 突变。系统发育树显示蓝莓与白梨和克莱门柚的遗 传距离也比较接近,用ProParam预测发现该蛋白与 笃斯越橘中蛋白非常接近,为R2R3型MYB(图3-B)。

## 2.3 VcMYB21跨膜结构预测和蛋白自激活性检测

VcMYB21基因编码蛋白含有233个氨基酸残基,无典型的跨膜结构域,属膜外蛋白。

为了探究VcMYB21蛋白是否具有自激活活性, 分别将构建好的pGBKT7-VcMYB21与空pGADT7、 pGADT7-VcMYB21与空pGBKT7、pGADT7-VcMYB21与pGBKT7-VcMYB21以及阳性对照 pGBKT7-53+pGADT7-T和阴性对照pGBKT7-Lam+



pGADT7-T共转AH121酵母感受态中,涂布于SD/ -Trp/-His缺陷型培养基上,发现均能生长证明载体 成功转入酵母(图5-A)。将在SD/-Trp/-His缺陷型培 养基上生长好的酵母转接到SD/-Trp/-Ade/-His/-Leu 四缺培养基上时,阳性对照能正常生长,阴性对照 不能生长,VcMYB21-pGBKT7+pGADT7也不能正 常生长,因此显示VcMYB21蛋白没有自激活活性(图 5-B)。将在SD/-Trp/-His缺陷型培养基上生长好的酵 母转接到含有15 mmol·L<sup>-1</sup> 3-AT和100 µL X-a-Gal的 SD/-Trp/-His/-Leu (图5-C)、SD/-Trp/ -His/-Leu/-Ade (图5-D)缺陷型培养基上时,阳性对照以及VcMYB21pGADT7+VcMYB21-pGBKT7酵母菌株能生长并 植物生理学报





A: SD/-Trp/-His二缺培养基; B: SD/-Trp/-Ade/-His/-Leu四缺培养基; C: SD/-Trp/-His/-Leu三缺培养基; D: SD/-Trp/-Ade/-His/-Leu四 缺培养基, C和D的三缺和四缺培养基中加X-α-gal。21B+AD为VcMYB21-pGBKT7+pGADT7, 21A+BD为VcMYB21-pGADT7+pGBKT7, 21A+21B为VcMYB21-pGADT7+VcMYB21-pGBKT7, CK+为pGADT7-T+pGBKT7-53, CK-为pGADT7-T+pGBKT7-λ, 二缺板上的单菌落 在无菌水中稀释10 (10×)倍和100 (100×)倍后滴在三缺和四缺培养基上

呈蓝色,其他均不能正常生长,说明VcMYB21蛋白 能自身形成同源二聚体。

#### 3 VcMYB21组织特异性表达

通过荧光定量PCR分析VcMYB21基因的组织 特异性表达,发现VcMYB21在不同品种蓝莓幼苗 各组织中的表达一致。VcMYB21在根、茎、叶、花、果实和果皮中都有表达,其中在果皮中表达量最高,其次是叶片,在根部表达量最少,VcM-YB21基因在果皮中的表达量是根部表达量的9倍 (图6)。





4 在果实着色过程中*VcMYB21*基因表达量以及花 青素含量的变化

分别选取'日出'和'喜来'蓝莓小绿果(花后10 d)、绿果(花后20 d)、白果(花后40 d)、半红果(花后 50 d)、全红果(花后60 d)和紫果(花后75 d) 6个典型 时期的果实,通过荧光定量PCR分析VcMYB21在此6 个时期的表达量。结果(图7)显示,VcMYB21在'日出' 和'喜来'品种间随果实发育的变化趋势较一致,从果 实发育的整个过程来看,基因的表达量都呈现下降 的趋势。在小绿果期VcMYB21基因的表达量最高, 之后表达量迅速下降,在全红期达略微上升但并不 显著,紫果期又下降到绿果期的水平。其中小绿果 期基因表达量约为绿果期的5倍(图7)。花青素含量 在'日出'和'喜来'中随果实着色呈上升趋势,其中,从 小绿果到白果时期花青素积累迅速,在白果到全红 果时期花青素合成积累速率变缓。花青素积累量都 在小绿果时期最少[1.69 mg·g<sup>-1</sup> (FW)],在紫果期达到 最大值[6.93 mg·g<sup>-1</sup> (FW)],约为小绿果期的4倍(图7)。

## 5 VcMYB21基因对胁迫处理的响应

UV-B与UV-C处理均显著诱导VcMYB21基因 在蓝莓幼苗叶片中的表达(图8)。其中VcMYB21基 因对UV-B处理更敏感,在处理5 min时VcMYB21基



图7 '日出'和'喜来'蓝莓中VcMYB21基因在果实不同发育时期的表达

Fig.7 Expression analysis of VcMYB21 gene in 'Sunrise' and 'Sierra' blueberry at different developmental stages of fruit



图8 UV-B和UV-C处理后VCMIB21基因在监理初围叶片中的农达重变化 Fig.8 Changes in VcMYB21 gene expression of 'Sunrise' and 'Sierra' seedlings leaves under UV-B and UV-C

因表达量达到最大;之后迅速下降到低于未处理时的表达水平;在处理25 min时略微上升,但不高于未处理时的基因表达量,*VcMYB21*基因在UV-B处理5 min时的表达量约是处理10 min时的6倍(图8-A和B)。在UV-C处理5~10 min时,*VcMYB21*基因的表达量达到最大,之后下降;*VcMYB21*基因在UV-C处理5 min时的表达量约是处理30 min时的3倍(图8-C和D)。UV-B与UV-C处理下,花青素含量在'日出'和'喜来'中含量变化相似。UV-B处理5 min和UV-C处理10 min后,花青素迅速增长;UV-B处理15 min和UV-C处理25 min后,花青素含量逐渐下降到低于未处理时的花青素含量(图8)。

## 讨 论

本研究在蓝莓中克隆并鉴定了一个MYB转录 因子,该基因与收录在NCBI数据库中的高丛蓝莓 转录因子MYB21的核苷酸序列相似度为99%,基因 序列号为KT225483.1,所以将本研究中克隆得到 的MYB转录因子命名为VcMYB21。生物信息学分 析显示VcMYB21基因含有两个典型的2Fe-2S和一 个EGF-like结构功能域。2Fe-2S结构复合体能结 合泛醇或质体醌上的阴离子,氧化硫酸化后将离 子释放到铁血离子用于形成细胞色素(Harnisch等 1985; Madueño等1992)。EGF-like结构域是一种表 皮生长因子,与Ca离子结合、逆境响应以及细胞 成熟凋亡等相关(Downing等1996; Bork等1996; Phan等2006), 暗示了VcMYB21基因可能与细胞着 色和逆境响应等生理过程相关。研究证实了这一 推论, NCBI在线数据库中Blast检索结果显示笃斯 越桔的VuMYBC2基因与本研究中的VcMYB21基因 核苷酸序列相似度为98%, 它们含有相同的2Fe-2S 结构域。Primetta等(2015)研究发现VuMYBC2基因 在笃斯越桔白化果中的表达量显著低于在正常成 熟的紫色果实中的表达量。另外, Harkenrider等 (2016)发现OsWAK25基因含有一个EGF-like结构 域,在水稻中过表达该基因能显著提高水稻抗细 菌和真菌病原体侵染的能力。

此外,本研究发现*VcMYB21*是一种膜外活跃的蛋白,酵母双杂交实验显示*VcMYB21*自身无自激活活性,但能形成自身同源二聚体。大量研究发现MYB基因通过形成异源二聚体发挥功能,相

对少量的研究表明MYB转录因子通过自身形成同 源二聚体发挥作用(Wang等2016)。Teruaki等 (1993)同样发现存在一含有锌指结构的MYB蛋白 能形成同源二聚体。张志毅等(2012)研究发现同 源二聚体转录因子识别螺旋相对运动存在平面摆 动现象,很多转录因子被小分子或其他蛋白调控 正是通过影响二聚体的形成和稳定来实现的。 Farquharson (2016)研究表明, *DYTI*转录因子同源 二聚体的形成受其他异源二聚体调控。因此我们 推测*VcMYB21*可能在其他因子作用下改变自身构 象来行使不同的功能。

本研究中蓝莓组织特异性表达实验显示Vc-MYB21基因在根、茎、叶、花、果实中都有表达, 但是在果皮中表达量最高,此结果与Escarpa和González (1998)在苹果中的研究结果一致。Berardini 等(2005)研究表明果皮是花青素积累的关键部位, 暗示了该基因可能参与蓝莓花青素的生物合成过 程。VcMYB21基因在小绿果时期的表达量最高、随 着蓝莓果实的发育,到白果期基因的表达量迅速 下降,同时伴随着花青素的大量积累;从白果期到 紫果期基因的表达量略微上升的同时,花青素的 积累速率随之放缓。这一研究结果与Cavallini等 (2015)在葡萄中的的研究结果一致,葡萄中的Vv-MYBC2基因随葡萄成熟表达量也呈现下降的趋势, 过表达葡萄中的VvMYBC2基因会显著下调花青素 的生物合成,而葡萄的VvMYBC2基因与本文研究的 VcMYB21基因高度同源。这些结果表明VcMYB21 基因的表达可能抑制了花青素的积累。

当蓝莓幼苗在UV-B和UV-C处理一段时间内, 叶片中VcMYB21基因的表达量会迅速上调,说明 该基因对UV具有一定的响应,该结果与Gao等 (2016)在苦荞中的研究结果一致,苦荞FtMYB11基 因在UV处理一段时间也显著上调;与Jin等(2000) 在拟南芥中的研究结果相反,拟南芥的AtMYB4基 因在UV处理短时间内就表现为显著下调的趋势。 但是,随UV处理时间的延长,VcMYB21基因的表达 量迅速下降,同时伴随着花青素的大量积累,这一 结果不仅与本实验中随果实花青素积累基因表达 量的变化趋势一致,也与杨俊枫等(2016)在蓝莓果 实UV处理10 min时花青素含量是对照的3.36倍。

以往研究表明,当植物受到外界环境胁迫,如光 照、低温、盐胁迫、氧化胁迫、蔗糖及大量营养 元素缺失等,都能诱导花青素的生物合成(洪雪等 2014)。UV光胁迫下一定时间内在苹果和梨中花 青素也出现类似的含量变化(Feng等2013; Escarpa 和González 1998),但在草莓中的研究结果相反 (Miao等2016; Aharoni等2001)。此外,本研究结果 显示,虽然VcMYB21在蓝莓果皮中表达量最高,但 是除果皮以外,该基因在叶片中的表达量显著高 于在根、茎等其他组织中的表达量,说明该基因 也可能对植物叶片响应逆境中花青素的生物合成 起到一定的调节作用。

值得注意的是, 蓝莓VuMYBPA1基因的表达量 在蓝莓白化突变体的果实中下调, VuCHS、VuDFR 和VuANS等花青素合成途径酶基因的表达量也明 显下调(Primetta等2015)。推测VcMYB21基因可能 通过调节花青素合成途径中的各种酶基因的表达 来调控花青素的生物合成, 模式植物拟南芥中的 MYB11、MYB12等基因也证实了这一现象(Sivankalyani等2016)。Jiang等(2016)研究表明茄子果 皮中花青素的合成受到SmMYB基因调控的同时, 还受到SmCRY1、SmCRY2、SmCOP1、SmHY5 等 基因的共同调控, 推测花青素的生物合成也受到 其他调节因子的共同作用, 但VcMYB21基因具体 的调控机制有待进一步探究。

#### 参考文献

- Aharoni A, devos CH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JN, O'Connell AP (2001). The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flaconol accumulation in transgenic tobacco. Plant J, 28 (3): 319–332
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T (2007). 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, 48 (7): 958–970
- Berardini N, Fezer R, Conrad J, Beifuss U, Carle R, Schieber A (2005). Screening ofmango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. J Agric Food Chem, 53: 1563–1570
- Bork P, Downing AK, Kieffer B, Campbell ID (1996). Structure and distribution of modules in extracellular proteins. Q Rev Biophys, 29 (2): 119–167
- Broun P (2005). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. Curr Opin Plant Biol, 8: 272–279

- Cavallini E, Matus JT, Finezzo L, Zenoni S, Loyola R, Guzzo F, Schlechter R, Ageorges A, Arce-Johnson P, Tornielli GB (2015).
  The phenylpropanoid pathway is controlled at different branches by a set of R2R3-MYB C2 repressors in grapevine. Plant Physiol, 167 (4): 1448–1470
- Chen Q (2009). Progress in plant Myb transcription factors. Geno Appl Biol, (02): 365–372 (in Chinese with English abstract) [陈 清(2009). 植物Myb转录因子的研究进展. 基因组学与应用生物学, (02): 365–372]
- Downing AK, Knott V, Werner JM, Cardy CM, Campbell ID, Handford PA (1996). Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. Cell, 85 (4): 597–605
- Du H, Yang WJ, Liu L, Tang XF, Wu YM, Huang YB, Tang YX (2008). Cloning and functional identification of the two MYB transcription factors GmMYBJ6 and GmMYBJ7 in soybean. Acta Agron Sin, 34 (7): 1179–1187 (in Chinese with English abstract) [杜海, 杨文杰,刘蕾, 唐晓风, 吴燕民, 黄玉碧, 唐益雄(2008). 大豆 MYB转录因子基因GmMYBJ6和GmMYBJ7的克隆及表达分 析.作物学报, 34 (7): 1179–1187]
- Escarpa A, González MC (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. J Chromatogr A , 823 (1-2): 331–337
- Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC (2007). Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. Plant J, 49 (3): 414–427
- Farquharson KL (2016). A domain in the bHLH transcription factor DYT1 is critical for anther development. Plant Cell, 28 (5): 997–998
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. Plant J, 66 (1): 94–116
- Feng F, Li M, Maa F, Cheng L (2013). Phenyl propanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure. Plant Physiol Biochem, 69: 54–61
- Gao F, Zhao HX, Yao HP, Li CL, Chen H, Wang AH, Park SU, Wu Q (2016). Identification, isolation and expression analysis of eight stress-related *R2R3-MYB* genes in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). Plant Cell Rep, 35 (6): 1385–1396
- Harkenrider M, David RS, Vleesschauwer D, Li T, Zhang XT, Chern MS, Canlas P, Zuo SM, Pamela CR (2016). Overexpression of rice wall-associated kinase 25 (OsWAK25) alters resistance to bacterial and fungal pathogens. PLoS One, 11 (1): e0147310
- Harnisch U, Weiss H, Sebald W (1985). The primary structure of the iron-sulfur subunit of ubiquinol-cytochrome c reductase from Neurospora, determined by cDNA and gene sequencing. Eur J Biochem, 149 (1): 95–99
- Hong X, Zhang SB, Xu J, Cui Y (2014). Progress in the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis* important transcription factor. Acta Hortic Abst, 04 (3): 1–3 (in Chinese with English abstract) [洪雪, 张少斌, 徐江, 崔月(2014). 拟南芥花青素合成

途径重要转录因子的研究进展.中国园艺文摘,04(3):1-3]

- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L (2008). Characterization of transcription factorgene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. Plant Mol Biol, 67: 169–181
- Jiang MM, Ren L, Lian HL, Liu Y, Chen HY (2016). Novel insight into the mechanism underlying light-controlled anthocyanin accumulation in eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Sci, 249: 46–58
- Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrtens F, Jnes J, Tibelli C, Weisshaar B, Martin C (2000). Transcription repression by At-MYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. EMBO J, 19 (22): 6150–6161
- Koes R, Verweij W (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. Trends Plant Sci, 10 (5): 236–242
- Lai Y, Li H, Yamagishi M (2013). A review of target gene specificity of flavonoid R2R3-MYB transcription factors and a discussion of factors contributing to the target gene selectivity. Front Biol, 8: 577–598
- Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C (2007). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. Planta, 225 (5): 1245–1253
- Li L, Zhang HH, Liu ZS, Cui XY, Zhang T, Li YF, Zhang LY (2016). Comparative transcriptome sequencing and *de novo* analysis of *Vaccinium* corymbosum during fruit and color development. BMC Plant Biol, 16 (1): doi:10.1186/s12870-016-0866-5
- Madueño F, Napier JA, Cejudo FJ, Gray JC (1992). Import and processing of the precursor of the Rieske FeS protein of tobacco chloroplasts. Plant Mol Biol, 20 (2): 289–299
- Miao LX, Zhang YC, Yang XF, Xiao JP, Zhang HQ, Zhang ZF, Wang YZ, Jiang GH (2016). Colored light-quality selective plastic films affect anthocyanin content, enzyme activities, and the expression of flavonoid genes in strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruit. Food Chem, 207: 93–100
- Miyake K, Ito T, Senda M, Ishikawa R, Harada T, Niizeki M, Akada S (2003). Isolation of a subfamily of genes forR2R3-MYB transcription factors showing up-regulated ex-pression under nitrogen nutrient-limited conditions. Plant Mol Biol, 53 (1-2): 237–245
- Niu SS, Xu CJ, Zhang WS, Zhang B, Li X, Wang KL, Ferguson IB, Allan AC, Chen KS (2010). Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit by a R2R3 MYB transcription factor. Planta, 231 (4): 887–899
- Payne CT, Zhang F, Lloyd AM (2000). GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. Genetics, 156 (3): 1349–1362
- Phan UT, Waldron TT, Springer TA (2006). Remodeling of the lectin-EGF-like domain interface in *P*- and *L*-selectin increases adhesiveness and shear resistance under hydrodynamic force. Nat Immunol, 7 (8): 883–889
- Primetta AK, Karppinen KK. Riihinen R, Jaakola L (2015). Metabolic and molecular analyses of white mutant *Vaccinium* berries show down-regulation of MYBPA1-type R2R3 MYB regulatory factor. Planta, 242 (3): 631–643
- Qi Y, Xing YX, Zheng H, Sun QQ, Li DB, Wang JF, Shi M, Zhao B,

Guo YD (2014). UV-A and UV-B increase the anthocyanin content of cabbage seedlings and regulation of gene expression analysis. J Chin Agric Univ, (02): 86–94 (in Chinese with English abstract) [齐艳, 邢燕霞, 郑禾, 孙倩倩, 李殿波, 王晋芳, 石锦, 赵冰, 郭仰东(2014). UV-A和UV-B提高甘蓝幼苗花青素含量 以及调控基因表达分析. 中国农业大学学报, (02): 86–94]

- Ramsay NA, Glover BJ (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. Trends Plant Sci, 10 (2): 63–70
- Sivankalyani V, Feygenberg O, Diskin S, Wright B, Noam A (2016). Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. Postharvest Biol Tec, 111: 132–139
- Suo J, Liang X, Pu L, Zhang Y, Xue Y (2003). Identification of GhMYB121 encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Biochim Biophys Acta, 1630 (1): 25–34
- Teruaki NS, Naoki S, Akinori SS (1993). Negative autoregulation of c-Myb activity by homodimer formation through the leucine zipper. J Biol Chem, 269 (29): 21914–21923
- Van der Heijden RA, Morrison MC, Sheedfar F, Mulder P, Schreurs M, Hommelberg PPH, Hofker MH, Schalkwijk C, Kleemann R (2016). Effects of anthocyanin and flavanol compounds on lipid metabolism and adipose tissue associated systemic inflammation in diet-induced obesity. Mediat Inflamm, (8): 1–10
- Wang H, Li MF, Yang Y, Jin WM (2015). Advances on the molecular mechanisms of snthocyanin synthesis in fruits. Plant Physiol J, 51 (01): 29–43 (in Chinese with English abstract) [王华, 李茂福, 金万梅(2015). 花青素生物合成分子机制研究进展. 植物生理 学报, 51 (01): 29–43]
- Wang HY, Wang HL, Shao HB, Tang XL (2016). Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. Front Plant Sci, 7: doi: 10.3389/fpls.2016.00067
- Xing W, Jin XL (2015). Advances of MYB transcription factor regulation of plant flavonoid biosynthesis. Mol Plant Breed, (03): 689– 696 (in Chinese with English abstract) [邢文, 金晓玲(2015).调 控植物类黄酮生物合成的MYB转录因子研究进展. 分子植物 育种, (03): 689–696]
- Xu WJ, Grain D (2014). Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed. New Phytol, 202 (1): 132–144
- Yang L, Yang JF, Hou ZX, Gong ZZ, Wang C, Shi WJ (2015). UV-B on different developmental stages from the main body of blueberry fruit quality and related enzyme activity. Acta Bot Boreali-Occid Sin, (12): 2477–2482 (in Chinese with English abstract) [杨乐,杨俊枫,侯智霞,宫中志,王冲,史文君(2015). UV-B对 不同发育时期离体蓝莓主要果实品质及相关酶活性的影响. 西北植物学报, (12): 2477–2482]
- Yang JF, Shi WJ, Yang L, Gong ZZ, Li BB, Hou ZX (2016). Effects of UV irradiation on accumulation of anthocyanins and the activity, expression of key enzyme in veraison 'Northland' blueberry. Acta Hortic Sin, 43 (4): 663–673 (in Chinese with English ab-

stract) [杨俊枫, 史文君, 杨乐, 宫中志, 李彬彬, 侯智霞(2016). 紫外光对北陆越橘转色果花青苷积累关键酶活性及其基因表达的影响. 园艺学报, 43 (4): 663–673]

- Yang ZY (2007). Anthocyanin content in mulberry red pigment by pH-differential spectrophotometry. Food Sci Technol, (4): 201–203 (in Chinese with English abstract) [杨兆艳(2007). pH 示差法测定桑椹红色素中花青素含量的研究. 食品科技, (4): 201–203]
- Yoshida K, Ma D, Constabel CP (2015). The MYB182 protein down-regulates proanthocyanidin and anthocyanin biosynthesis in poplar by repressing both structural and regulatory flavonoid genes. Plant Physiol, 167 (3): 693–710 (2007). 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, 48 (7): 958–970

- Zhang ZY, Liu M, Wang YL, Li BP, Yue JJ, Liang L, Sun JZ(2012). In homodimer recognition helix transcription factor found in relative motion swing plane phenomenon. Lett Biotech, (01): 65–70 (in Chinese with English abstract) [张志毅, 刘明, 王月兰, 李 北平, 岳俊杰, 梁龙, 孙建中(2012). 在同源二聚体转录因子识 别螺旋相对运动中发现平面摆动现象. 生物技术通讯, (01): 65–70]
- Zifkin M, Jin A, Jocelyn A, Ozga L, Irina Z, Johann P, Schernthaner P, Gesell A, Suzanne RA, James AK, et al (2012). Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism. Plant Physiol, 158 (1): 200–224

# Expression characteristics of the transcription factor *VcMYB21* in blueberry fruit coloration and response to UV in seedling

LIU Zhong-Shuai, YUAN Yi-Hang, ZHANG Tong, ZHANG Ling-Yun\*

Key Laboratory of Forest Silviculture and Conservation of the Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: VcMYB21 is a transcription factor of R2R3-MYB. In this study, VcMYB21 was cloned by RACE-PCR method in blueberry. Bioinformatics analysis showed that the full length of VcMYB21 cDNA was 1 373 bp, including the ORF 722 bp, encoding 233 amino acids. The theoretical molecular weight of VcMYB21 was 58.37 kDa, and the value of isoelectric point (pI) was 5.12. The ScanProsite online software showed that the protein contains a 2Fe-2S and a EGF-like binding sites, and it belongs to the outer membrane with unstable structure. Yeast two-hybrid experiment showed that VcMYB21 did not have autoactivation and had the ability to form homo-dimers itself. Tissue-specific expression showed that VcMYB21 was mostly expressed in peel and leaves. The expression of VcMYB21 was highest at the early development stage of fruit, and then decreased sharply with a slightly elevation in the period of whole red fruit. The anthocyanin content of fruit increased as the coloration of fruit, and reach the highest at the period of purple fruit of blueberry. Furthermore, the expression of VcMYB21 was significantly induced under UV-B and UV-C treatment in the leaves of blueberry seedlings. The data showed that VcMYB21 was more sensitive to UV-B treatment. The expression of VcMYB21 was significantly induced after 5 min of UV-B treatment and 10 min of UV-C treatment. The anthocyanin content rose sharply after VcMYB21 expression declined. Both of the expression of VcMYB21 and the anthocyanin content decreased after 10 min of UV-B treatment and 15 min of UV-C treatment. These results indicated that Vc-MYB21 played a negative role in fruit coloration and played roles during abiotic stress of UV. Key words: blueberry (Vaccinium corymbosum); VcMYB21; gene expression; stress response

Received 2016-08-22 Accepted 2016-12-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31270663) and the National Cultivate New Varieties of GMO Technology Major Projects (Grant No. 2013ZX08009003-002-004).

<sup>\*</sup>Corresponding author (E-mail: lyzhang73@sohu.com).