

百合*LaMYB26*基因克隆与表达分析

王雪倩^{1,2}, 袁国振^{1,2}, 吴泽^{1,2}, 何岭^{1,2}, 滕年军^{1,2*}

¹南京农业大学园艺学院/农业农村部景观设计重点实验室, 南京210095

²八卦洲现代园艺产业科技创新中心, 南京210043

摘要: 本研究从亚洲百合(*Lilium Asiatic hybrids*)花粉败育品种‘小小的吻’中克隆获得一个MYB转录因子基因*LaMYB26*。序列分析显示, *LaMYB26*基因的开放阅读框(ORF)长762 bp, 编码253个氨基酸。结构域分析显示, *LaMYB26*含有2个典型的SANT结构域, 属于MYB转录因子家族中的R2R3-MYB型。多序列比对发现, *LaMYB26*与其他物种的MYB类蛋白的氨基酸序列有57.78%的相似性。理化性质、亲/疏水性和无序化分析显示, *LaMYB26*转录因子是亲水性蛋白且偏碱性, 存在无序化区域。信号肽和跨膜结构域分析表明, 其不存在信号肽和跨膜结构域。空间结构分析显示, *LaMYB26*有2个典型的 α -螺旋串联。实时荧光定量PCR (qRT-PCR)显示, *LaMYB26*基因在败育时期表达量明显上调, 且在花药中特异表达。结果显示, *LaMYB26*基因在百合花粉败育过程中可能发挥着重要作用, 对*LaMYB26*的生物学信息学分析拟为深入研究其功能及作用机制提供参考。

关键词: 百合; 花粉败育; MYB转录因子; 基因克隆; 表达分析

百合(*Lilium spp.*)是百合科(Liliaceae)多年生球根植物, 是世界五大鲜切花之一, 因其丰富的色彩和独特的香味而具有高观赏价值; 某些品种的鳞茎还可作为蔬菜食用, 广受人们的喜爱(张盟等2016; 李一寒等2018)。但百合花药体积巨大, 花粉囊内含有大量花粉粒, 在盛花期花粉散出, 不仅会污染花朵表面, 降低其观赏价值, 缩短观赏周期, 而且对部分人群而言, 飘散在空中的花粉会造成其身体的过敏反应, 如流鼻涕、打喷嚏等不适行为(王蓝青等2018)。传统的解决办法是人工摘除花药, 但这将耗费大量的时间和人工成本(赵香娜等2018)。百合中某些品种, 如亚洲百合(*Lilium Asiatic hybrids*)品种‘小小的吻’(‘Little Kiss’), 其小孢子在发育过程中会发生花粉败育现象, 即花粉囊最初产生正常功能的小孢子, 但在小孢子发育过程中逐渐失去育性甚至降解。而花粉败育也是雄性不育的表现形式之一, 在杂交育种培育无花粉百合中具有优势(Kazama等2016)。在这一过程中有许多因素参与调控, 而转录因子(transcription factors, TFs)作为一类重要的调节蛋白在小孢子发育过程中发挥重要作用(王科2018)。

MYB转录因子作为植物众多转录因子家族成员之一, 和其他转录因子一起协同调控植物的生长发育, 参与包括细胞分裂与分化、次生代谢、生物和非生物胁迫, 以及细胞周期的调节等多个生物进程(Dubos等2010)。MYB转录因子家族都具

有非常保守的DNA结合结构域(陈清等2009), 并根据MYB结构域个数的不同被分为4类, 分别是1R-MYB蛋白、R2R3-MYB蛋白、R1R2R3-MYB蛋白和4R-MYB蛋白(左然等2012), 其中1R-MYB和R2R3-MYB是其中最主要的类型(Kranz等1998), 主要控制植物次生代谢以及植物细胞的特性。早在1987年, Paz-Ares等人(1987)从玉米(*Zea mays*)中克隆出第一个参与类黄酮合成的MYB转录因子C1 (Colorless1)后, 其他MYB转录因子也被相继克隆出来。目前, 在模式作物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, *AtMYB26*转录因子基因已被克隆, 其功能主要涉及花药内皮层次生增厚和开裂, 同时也与花粉的育性密切相关(Steiner-Lange等2003), 但在除豌豆(*Pisum sativum*) (Uimari和Strommer 1997)以外的其他物种中尚未得到验证。

本研究从亚洲百合花粉败育品种‘小小的吻’中克隆得到*LaMYB26*基因, 对该转录因子进行了多重序列比对、理化性质、信号肽与跨膜结构、无序化、系统进化树、二三级结构预测和亚细胞定位等生物信息分析。为验证*LaMYB26*基因在百合花粉败育过程中表达量的变化, 通过实时荧光定

收稿 2019-01-09 修订 2019-03-03

资助 江苏省“六大人才高峰”项目(NY-077)、江苏省现代农业(花卉)产业技术体系项目(JATS[2018]006)和中央高校基本科研业务费专项资金(YTZ201602)。

* 通讯作者(njteng@njau.edu.cn)。

量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法, 在败育品种和正常发育品种中, 对小孢子败育前后时期以及不同组织器官中*LaMYB26*基因的表达量进行了检测。本实验为进一步深入研究*LaMYB26*转录因子在花粉败育中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料与取样

供试亚洲百合(*Lilium L.*, Asiatic hybrids) ‘小小的吻’ (‘Little Kiss’)和‘西伯利亚’ (‘Siberia’)种植在南京农业大学百合种质资源圃的温室中。分别对生长2个月的败育前后两时期的花药以及不同组织器官进行取样并提取RNA, 并将提取的RNA反转录成cDNA, 用于qRT-PCR的模板, 并以‘小小的吻’的cDNA作为克隆基因的模板, 各工具酶类由TaKaRa公司(大连)提供。

1.2 基因克隆

按照TRIzol法提取百合‘小小的吻’和‘西伯利亚’的总RNA, 利用ND-1000微量紫外检测仪(Nano-Drop, Wilmington, DE, USA)测定RNA浓度, 按照反转录试剂盒PrimeScript RT reagent Kit (大连TaKaRa公司)完成cDNA合成。基于本实验室百合的转录组数据, 设计一对扩增引物(MYB26 F: 5'-ATGGGCCATCACTCATGCTG-3'; MYB26 R: 3'-GGGCACCCAATGCTGCTGCA-5')。PCR扩增体系为50 μ L, 包括: 25 μ L PrimeSTAR高保真酶、21 μ L 双蒸水(ddH₂O)、1 μ L cDNA, 以及上下游引物各1.5 μ L。反应条件为: 98°C预变性5 min; 98°C变性10 s, 55°C退火15 s, 72°C延伸50 s, 共38个循环; 72°C延伸3 min。PCR产物用15 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳分离, 切取目的胶块, 参照DNA回收试剂盒说明书将其回收纯化, 连接至pMD18-T载体(大连TaKaRa公司), 转化至大肠杆菌[*Escherichia coli* (Mig) Cast. & Chalm.] DH5 α (TaKaRa, 大连), 挑取阳性克隆菌液送至通用生物系统(滁州)公司测序。

1.3 序列分析

核苷酸和蛋白序列的BLAST比较搜索和保守域预测在NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)相关程序中完成。结构域分析利用SMART网站

(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。序列多重比对、氨基酸亲疏水性用DNAMAN 6.0软件完成。利用SignalP在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析*LaMYB26*是否具有分泌蛋白所需的疏水性N端信号肽。*LaMYB26*蛋白的跨膜结构应用在线工具TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)进行预测及分析。使用MEGA 7.0完成进化树测试和编辑并生成报告图形。蛋白空间结构模型通过SWISS-MODEL建立, 并在Swiss PDB Viewer软件上编辑生成分析图形。利用FoldIndex程序完成蛋白无序化特性的分析。用ExpASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件进行蛋白组成成分及理化性质分析, 并利用Plant-mPloc (<https://omictools.com/plant-mploc-tool>)在线网站进行其亚细胞定位预测。

1.4 百合*LaMYB26*基因表达特性分析

qRT-PCR按照SYBR *Premix Ex Taq*试剂盒操作说明进行。根据本文克隆的‘小小的吻’中扩增得到的*LaMYB26*基因序列设计表达检测引物MYB26F (5'-ATAACAGGGCGGCATTGATG-3')和MYB26R (3'-GCCAACACAGCCCCTTCTC-5')。用百合的 β -Actin基因作为内参基因, 与目标基因一起扩增, 每个处理设置3个生物学重复。在iQ 5 Real-time PCR System中完成qRT-PCR的数据分析。扩增程序为: 95°C 3 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 39个循环, 然后利用iQ 5 Software进行熔解曲线分析。相对定量参考丁爱琴等(2009)的方法使用内参基因的 $\Delta\Delta C_t$ 法, 表达差异等于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

2 实验结果

2.1 基因克隆

以‘小小的吻’花药的cDNA为模板, MYB26 F和MYB26 R为引物, 通过PCR扩增得到目的片段(图1)。序列测定与分析表明, *LaMYB26*基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)为762 bp, 编码253个氨基酸。和转录组数据库中的CL5278.Contig1_All序列进行BLAST比对, 发现两序列完全一致。将该序列上传NCBI的GenBank, 登记号为MK336407。

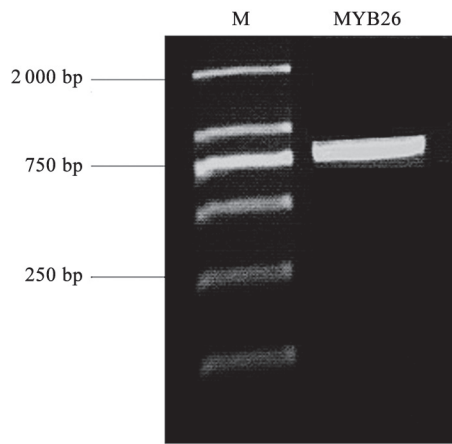


图1 百合LaMYB26基因的克隆

Fig.1 Cloning of LaMYB26 gene in lily

M: DL2000 marker; MYB26:开放阅读框扩增产物。

2.2 LaMYB26转录因子氨基酸序列比对及理化性质分析

百合LaMYB26保守域(图2-A)与结构域(图2-B)预测结果显示, LaMYB26转录因子在13~62以及66~114位氨基酸之间, 分别含有一个高度保守的SANT功能结构域。根据百合LaMYB26氨基酸序列在NCBI中BLAST同源检索与比对, 获得和不同植物中相似度较高的MYB氨基酸序列。将百合LaMYB26转录因子与芦笋(*Asparagus officinalis*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、榴莲(*Durio zibethinus*)、罂粟(*Papaver somniferum*)、灯笼椒(*Capsicum annuum*)、苜蓿(*Medicago truncatula*)、藜麦(*Chenopodium quinoa*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、树棉(*G. arboretum*)等多个

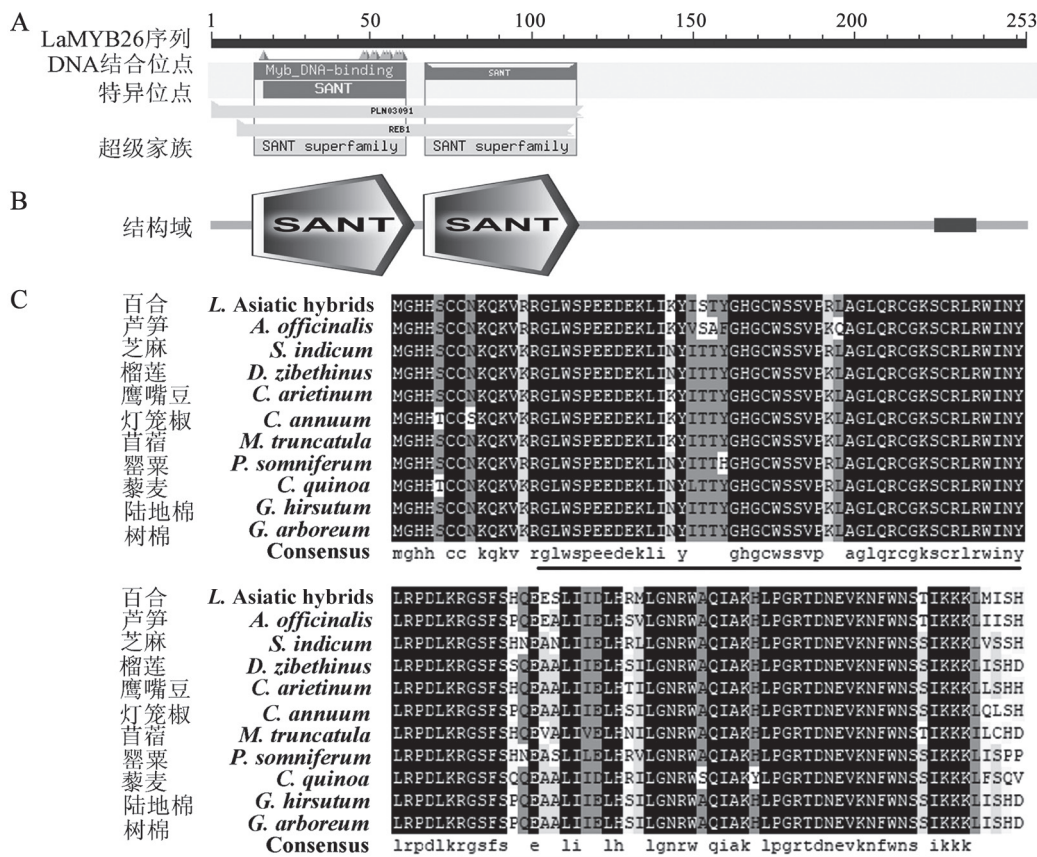


图2 百合LaMYB26转录因子的超级家族(A)和结构域预测(B)以及与其他物种氨基酸序列的多重比对(C)

Fig.2 Prediction of superfamily (A) and conserved domains (B) of LaMYB26 in lily and multiple alignment of relative amino acid sequences (C)

A: LaMYB26的序列长度、所含的DNA结合位点与特异结合位点, 以及其所属的超级家族; B: LaMYB26的SANT结构域; C: 与其他物种氨基酸序列的多重比对, 黑线部分为SANT结构域。

物种的MYB转录因子的氨基酸序列进行多重比对(图2-C), 结果显示一致性为57.78%。而且上述物种都含有2个SANT结构域。利用ExPASy网站对MYB26进行氨基酸组成成分及理化性质分析, LaMYB26分子式为 $C_{1285}H_{1963}N_{361}O_{367}S_{19}$, 原子总数为3 995, 分子质量为28 950.06 Da, 等电点为7.23, 碱性氨基酸比重略高于酸性氨基酸。脂肪族氨基酸占比27.6%左右, 芳香族氨基酸占比9.2%, 脂肪系数为70.95, 亲水指数为-0.514, 表明LaMYB26为亲水性蛋白。

将百合LaMYB26氨基酸序列在BLAST进行同源检索与比对, 获得不同植物中相似度较高的MYB氨基酸序列。利用ExPASy网站对MYB进行氨基酸组成成分及理化性质分析(表1), 结果表明, 这些植物中MYB蛋白长度范围在210~370 aa之间, 分子质量范围在28.950~41.333 kDa之间, 等电点范围在5.99~8.94之间, 其中7个MYB等电点小于7, 显酸性; 4个MYB等电点大于7, 显碱性。不稳定系数均大于40, 为不稳定蛋白。脂肪系数均小于100, 亲水系数小于0, 均为亲水性蛋白。

2.3 LaMYB26转录因子的进化分析

百合LaMYB26转录因子的进化分析参考Tohge等(2005)的MYB家族分类方法。在Plant Transcription Factor Database (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn>)网站上下载拟南芥注释明确的MYB家族成员序列, 然后与百合中LaMYB26转录因子进行同源进

化比对, 构建同源进化树, 结果(图3)表明, LaMYB26在进化关系上与AtMYB26和AtMYB103的同源性最高。此外, 从NCBI中下载其余10种植物的MYB26转录因子的氨基酸序列, 利用邻接法(neighbor-joining)与百合LaMYB26蛋白序列比对建立系统进化树, 结果显示其与芦笋的MYB26聚集在一个分支上(图4), 表明这两者的同源性最高。

2.4 百合LaMYB26转录因子亲/疏水性分析

利用DNAMAN 6.0软件对百合LaMYB26转录因子进行疏水性/亲水性分析, 结果如图5中箭头所示, 百合LaMYB26转录因子亲水性最强的位点是第22位的天冬氨酸(Asp) (图5-A), 疏水性最强的位点是第220位的异亮氨酸(Ile), 其峰值为2.18(图5-B), 但疏水性向下峰值高于向上峰值, 因此LaMYB26转录因子属于亲水性蛋白。

2.5 百合LaMYB26转录因子氨基酸序列的无序化分析与亚细胞定位预测

利用FoldIndex程序对百合LaMYB26氨基酸序列进行了折叠的无序化分析, 如图6所示, 百合LaMYB26转录因子序列中存在无序化区域。利用Plant-mPLoc软件分析亚细胞定位, 结果显示百合LaMYB26转录因子定位在细胞核上。

2.6 信号肽及跨膜结构的预测与分析

利用SignalP在线软件对LaMYB26蛋白进行分析, 结果如图7-A所示, 最大C得分为0.110, 最大

表1 不同植物中MYB转录因子氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 Comparison of amino acid sequences and physicochemical properties of MYB transcription factors among different plants

来源植物	GenBank登记号	蛋白长度/aa	分子质量/kDa	等电点	不稳定指数	脂肪系数	平均亲水系数
百合	MK336407	253	28.950	7.23	76.32	70.95	-0.514
芦笋	XP_020259417.1	325	36.349	6.79	53.89	72.40	-0.620
芝麻	XP_011081563.1	210	23.821	8.94	54.91	81.29	-0.617
榴莲	XP_022777222.1	362	40.261	6.23	61.51	77.87	-0.407
鹰嘴豆	XP_004510395.1	333	38.176	6.23	53.02	82.58	-0.562
灯笼椒	XP_016567469.1	276	31.346	7.68	48.32	76.30	-0.529
苜蓿	XP_024628590.1	348	39.839	5.99	61.84	80.40	-0.572
罂粟	XP_026452795.1	326	36.779	6.69	54.74	70.55	-0.608
藜麦	XP_021716060.1	370	41.333	6.48	62.23	68.00	-0.585
陆地棉	XP_016701145.1	352	38.869	6.11	58.50	77.05	-0.427
树棉	XP_017629546.1	352	38.822	6.11	56.82	77.05	-0.420

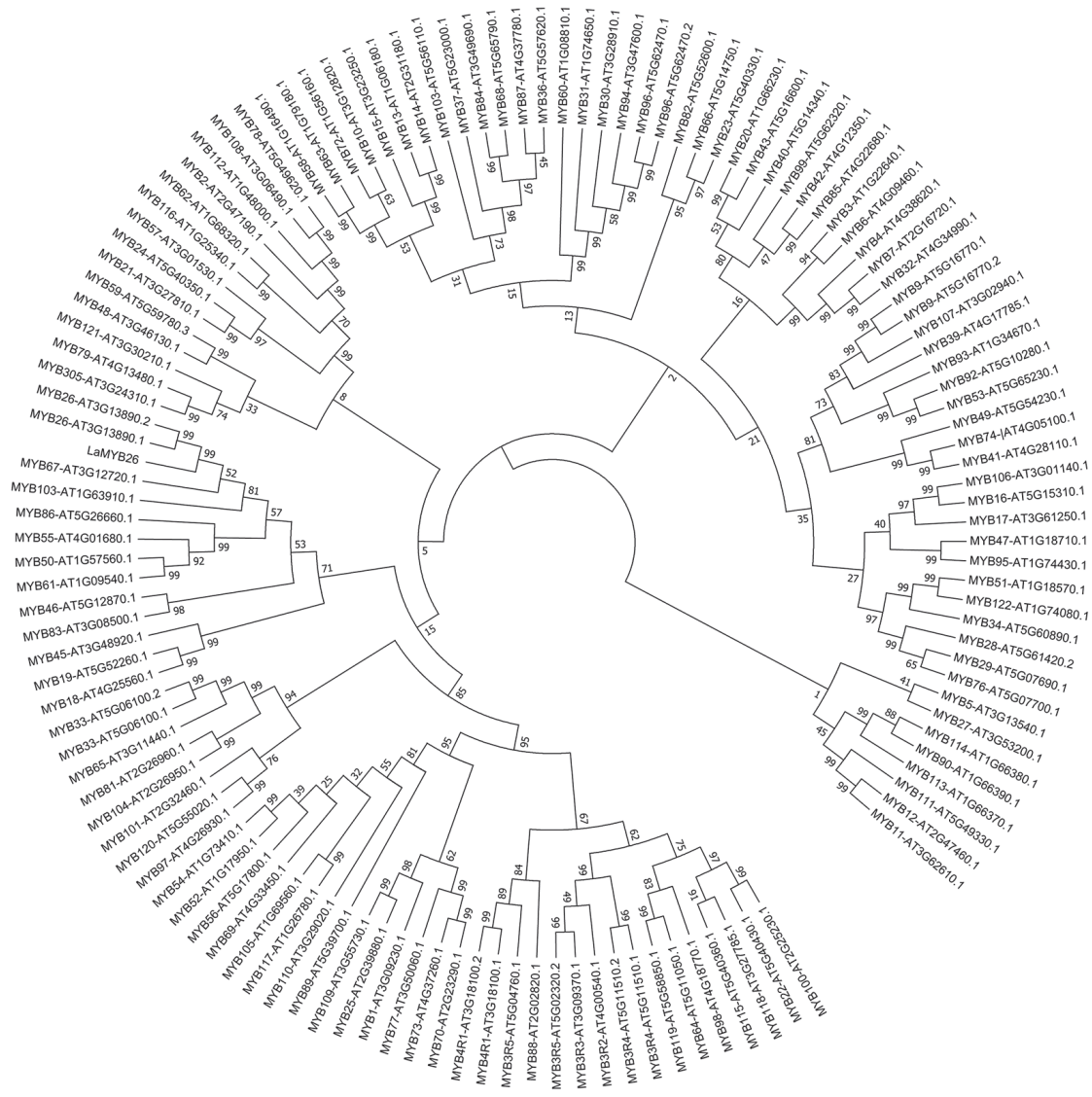


图3 百合LaMYB26与拟南芥AtMYB的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of LaMYB26 in lily and AtMYBs in *A. thaliana*

图中转录因子编号代表Plant Transcription Factor Database中明确注释的MYB家族成员,其后数字为其在该网站中的TF ID.

Y 得分为0.109,最大 S 得分为0.127,无峰值出现,因此LaMYB26蛋白不存在信号肽,因此也说明该蛋白不属于分泌蛋白。

应用TMPred在线软件对LaMYB26蛋白的跨膜结构进行分析,结果显示,LaMYB26蛋白有一个跨膜结构域,跨膜螺旋位于第217~235位氨基酸之间,共包含19个氨基酸,方向为膜外侧到膜内侧($o \rightarrow i$),但其分数为437(分数 >500 为显著跨膜结

构),为不显著跨膜结构,因此,LaMYB26蛋白实际不存在跨膜结构(图7-B)。

2.7 百合LaMYB26转录因子的二级和三级结构预测与分析

百合LaMYB26转录因子的二级结构分析结果(图8-A)表明,LaMYB26由24.9%的 α -螺旋(α -helix)、7.5%的 β -折叠(β -turn)、7.1%的延伸主链(extended strand)和60.5%的随机卷曲(random coil)组成。百

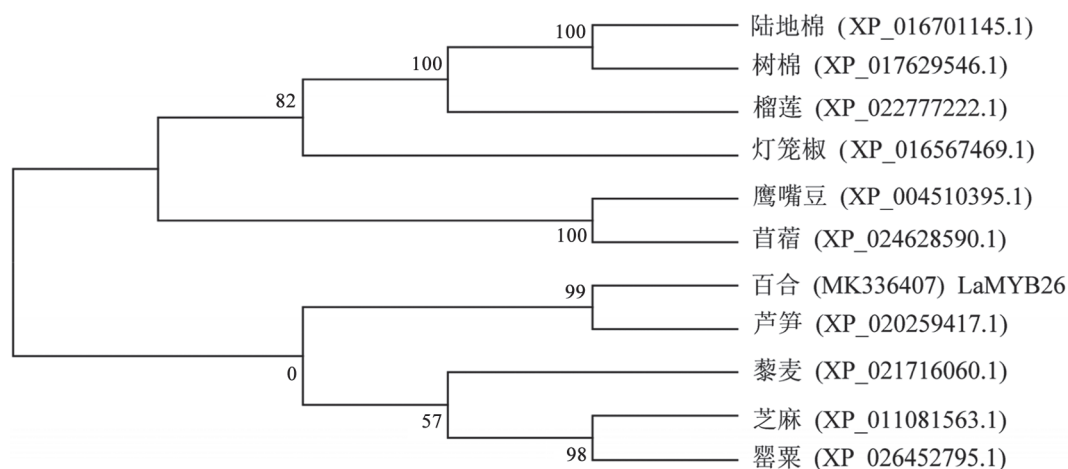


图4 百合LaMYB26与其他多物种MYB的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of LaMYB26 in lily and MYBs in other species

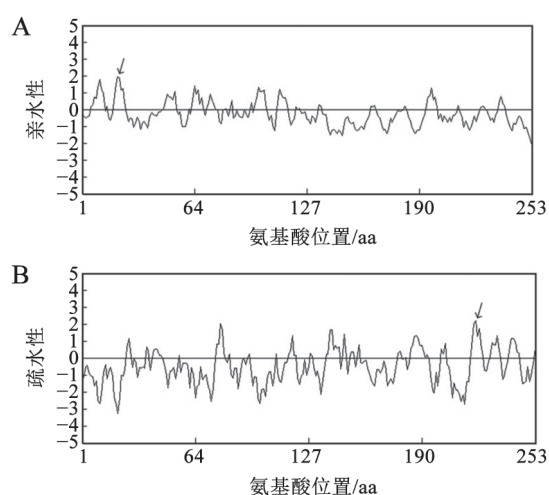


图5 百合LaMYB26转录因子氨基酸序列的亲水性(A)和疏水性(B)分析

Fig.5 Analyses on hydrophilicity (A) and hydrophobicity (B) of amino acid sequence of LaMYB26 transcription factor in lily

合LaMYB26转录因子三级结构预测结果如图8-B所示, MYB26链从N端合成延伸到C端, 由2个典型的 α -螺旋串联重复组成, 因此 α -螺旋和 β -折叠等三级结构推测与二级结构推测是吻合的。

2.8 百合LaMYB26基因的表达分析

通过qRT-PCR检测LaMYB26基因在‘小小的吻’和‘西伯利亚’中小孢子发育正常(四分体)和败育关键时期(单核花粉粒)以及‘小小的吻’不同组织

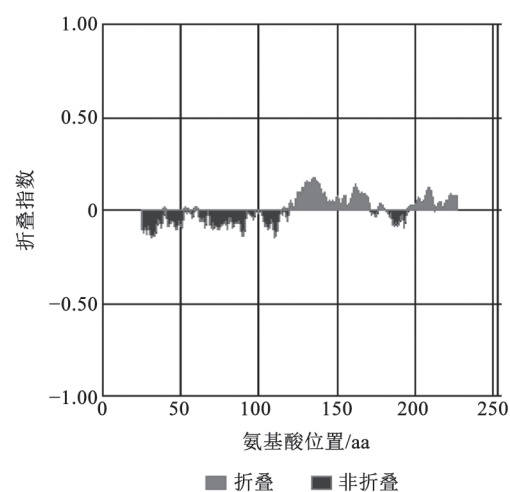


图6 百合LaMYB26折叠状态的分析

Fig.6 Analysis of the folding state of LaMYB26 in lily

器官中的表达情况, 从图9-A可以看出, 在两个品种的不同发育时期, LaMYB26基因均有表达, 且其相对表达量在不同发育阶段中存在差异。在‘小小的吻’中, MYB26在败育关键阶段表达量显著上升, 为四分体时期的1.88倍。在小孢子正常发育品种‘西伯利亚’中MYB26表达量在单核花粉粒时期表达量降低, 但表达量变化不大。从图9-B中可看出在‘小小的吻’中, LaMYB26基因在根、茎、花瓣和花药中均有表达, 在叶中无表达量, 其中在花药中表达量最高, 表明其在花药中特异表达。

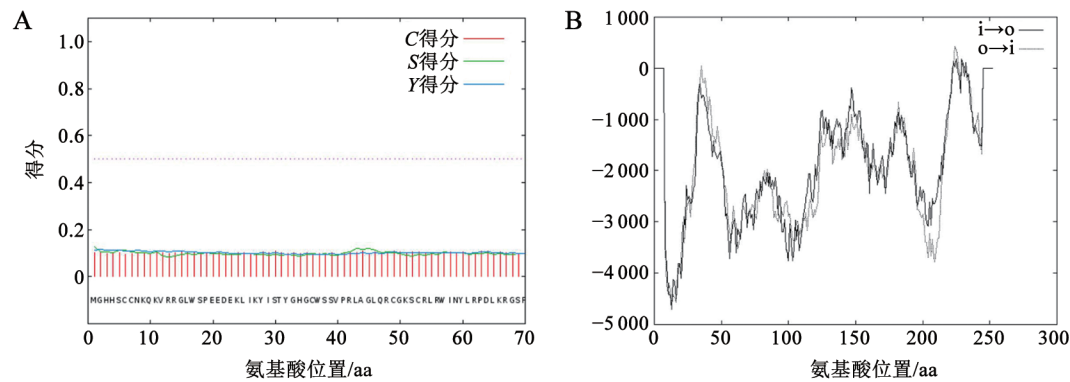


图7 LaMYB26蛋白信号肽(A)与跨膜结构域(B)预测和分析

Fig.7 Prediction and analysis of signal peptide (A) and transmembrane domain (B) in LaMYB26 protein

C得分: 原始剪切位点的分数(raw cleavage site score); S得分: 信号肽的分数(signal peptide score); Y得分: 综合剪切位点的分数(combined cleavage site score)。i→o: 膜内侧到膜外侧(inside→outside); o→i: 膜外侧到膜内侧(outside→inside)。

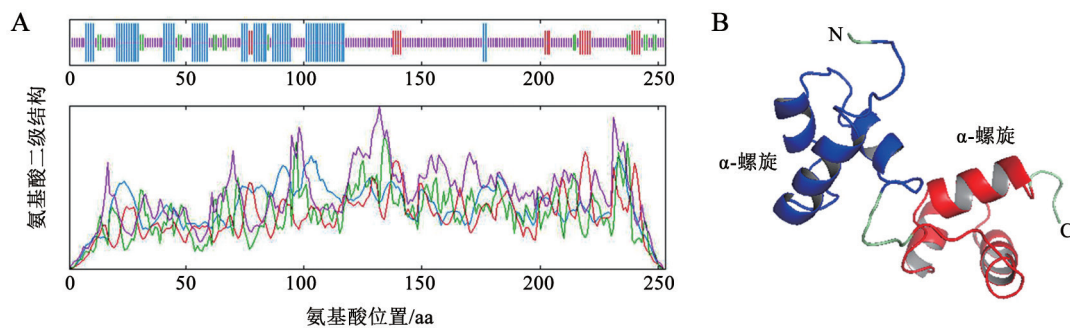


图8 百合LaMYB26转录因子的二级结构(A)与三级结构(B)预测

Fig.8 The predicted secondary structure (A) and tertiary structure (B) of LaMYB26 in lily

A: 蓝色表示 α -螺旋, 红色表示 β -折叠, 绿色表示 β -转角, 粉色表示随机卷曲。

3 讨论

自20世纪80年代开始, 我国相继开始了百合种质资源调查、新品种选育、种球规模化生产等方面的研究。经过30多年的探索, 百合已经成为国内市场上主要的商用鲜切花之一, 占比大, 份额高, 市场广阔(赵祥云和王文和2017)。但在百合花朵开放过程中, 花药会逐渐形成裂口, 花粉囊内花粉大量散出沾落到花瓣的表面且不易去除, 会缩短花朵观赏周期(张继等2005)。而且飘散在空中的花粉会引起打喷嚏、流眼泪等过敏症状, 从而降低百合的观赏寿命(庄严等2010)。目前, 赵兴华等(2009)已经利用杂交等方式培育出花药退化性百合品种‘无粉白’, 该品种极大解决了百合花粉污染的问题。

花药壁的开裂与否和花粉的发育密切相关, 首先表皮薄弱处的细胞溶解产生裂口, 之后花药壁回缩使裂口加宽以释放花粉(Jenkins等2010)。Nelson等(2012)构建了花药开裂时期的成熟花药壁结构, 包括外表皮细胞层, 以及包含次生增厚的内壁层, 该模型表明, 内壁次生增厚在花药开裂过程中发挥重要作用。在野生型拟南芥中, 药室内壁细胞膨胀使裂口开裂, 随后药室内壁干燥脱水使细胞壁特异收缩, 最后形成裂口, 花药散出(Dawson等1999), 这与Nelson的模型是相符的。然而, Yang等(2017)的研究发现, 拟南芥的花药不开裂突变体中, 小孢子无法与外界进行物质与能量的交换, 最终花粉败育。而花药开裂以及小孢子发育这一过程是由多个基因联合调控, 某些转录因子在这一过程中发挥着重要作用, 高等植物中的转录因子能

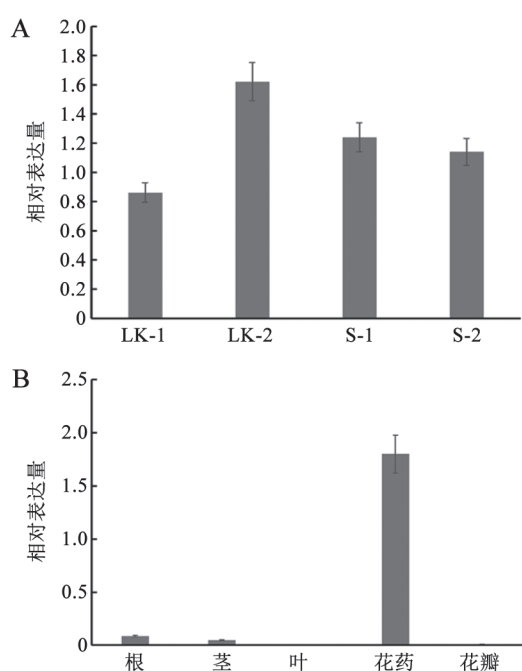


图9 不同发育时期(A)以及不同组织中(B)百合*LaMYB26*相对表达量

Fig.9 Relative expression levels of *LaMYB26* in differently developmental stages (A) and different tissues (B) in lily

与控制细胞分裂、小孢子发育和花药发育相关基因上游的顺式作用元件相结合,从而调控植物生长生殖发育(杨致荣等2004; 刘强等2000)。随着拟南芥基因组的完成,编码植物花药开裂调控相关的转录因子的整个基因组可以被识别和鉴定(Riechmann等2000)。但目前研究大多集中在双子叶植物中,像水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、百合等单子叶植物尚未涉及,因此研究百合中和花药开裂以及小孢子育性相关的转录因子具有重要意义。

植物中的MYB转录因子家族庞大,近年来的研究已表明,MYB转录因子家族参与多个生物学过程,包括参与次级代谢过程、调节细胞形态、参与植物对生物和非生物胁迫的应答、在植物对激素反应中起作用以及在细胞循环和增殖中起作用等。在现有的植物四类MYB转录因子中,R2R3-MYB类是数目最多的一类。目前,在拟南芥中已经发现了126个R2R3-MYB成员,以N-端含有由两个MYB结构域构成的DNA结合功能域为特征,每个结构域是由大约52个氨基酸重复序列组成,每

个重复序列均可组成HTH (helix-turn-helix)结构。而且R2R3-MYB蛋白中的大多数都具有转录激活功能域(Stracke等2001)。樊锦涛等(2014)根据其C-端氨基酸序列将R2R3-MYB蛋白进一步细分到了22个亚组。研究表明,R2R3-MYB类蛋白功能集中在调控次生代谢、细胞分裂与增殖以及细胞周期控制上(Albert等2014)。

本文克隆得到的百合*LaMYB26*基因编码的转录因子具有SANT结构域的典型特征,这与Boyer等(2004)和Zhang等(2011)的研究结果相吻合。对*LaMYB26*转录因子氨基酸组成成分、理化性质、亲水性和疏水性的分析结果显示,*LaMYB26*属于疏水性蛋白,二级结构主要表现为随机卷曲和 α -螺旋结构。三级结构分析显示,其由典型的 α -螺旋串联组成,这和Takos等(2006)对MYB基因结构研究一致。*LaMYB26*转录因子属于MYB家族里的R2R3-MYB亚家族,系统进化分析显示其与拟南芥*AtMYB26*和*AtMYB103*亲缘关系最近,和其他物种的进化分析表明其与芦笋MYB26亲缘关系最近,并且序列比对发现*LaMYB26*与多种亲缘关系相近的植物的MYB类转录因子的相似性很高。

在Zhang等(2010)对水稻MYB103转录因子的研究中发现,其调控植物花药内壁绒毡层的发育,其异常发育会导致细胞衰亡过程加速,最终小孢子败育。冯丹丹(2008)的研究中发现,拟南芥中一个控制小孢子发育的MYB32转录因子能够调节花药内壁腊质的合成、小孢子花粉外壁蛋白的合成以及花粉活力。MYB103和MYB32都属于R2R3-MYB家族,且与*LaMYB26*亲缘关系较近。目前对模式植物拟南芥的MYB26研究表明,其调节花粉内壁的次生增厚,最终导致花药开裂。在*MS35*突变体中,MYB26翻译起始上游1 288 bp的缺失和重排,而MYB26表达严重下调会导致花药不开裂,从而影响小孢子的育性。根据我们的表达模式分析和前人的研究,推测*LaMYB26*基因很有可能参与了花药壁的开裂并且可能对小孢子的正常生长发育发挥着重要作用。此外,qRT-PCR也显示*LaMYB26*基因强烈响应花粉败育的发生,推测*LaMYB26*基因与植物小孢子育性相关。

综上,*LaMYB26*基因在百合花粉败育过程中

可能发挥着重要作用, 在无花粉百合分子育种中将具有潜在的应用价值。对*LaMYB26*转录因子基因的生物学信息学分析将为深入研究*LaMYB26*功能及作用机制提供参考。

参考文献(References)

- Albert NW, Griffiths AG, Cousins GR, et al (2014). Anthocyanin leaf markings are regulated by a family of *R2R3-MYB* genes in the genus *Trifolium*. *New Phytol*, 205 (2): 882–893
- Boyer LA, Latek RR, Peterson CL (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (2): 158–163
- Chen Q, Tang HR, Dong XL, et al (2009). Progress in the study of plant Myb transcription factors. *Genom Appl Biol*, 28 (2): 365–372 (in Chinese with English abstract) [陈清, 汤浩茹, 董晓莉等(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]
- Dawson J, Sözen E, Vizir I, et al (1999). Characterization and genetic mapping of a mutation (*ms35*) which prevents anther dehiscence in *Arabidopsis thaliana* by affecting secondary wall thickening in the endothecium. *New Phytol*, 144 (2): 213–222
- Ding AQ, Li SC, Liu QC, et al (2018). Cloning and expression analysis of *RhATAF1* gene in *Rosa hybrida*. *Plant Physiol J*, 54 (11): 1711–1718 (in Chinese with English abstract) [丁爱琴, 李绍翠, 刘庆超等(2018). 月季*RhATAF1*基因的克隆及表达特性分析. *植物生理学报*, 54 (11): 1711–1718]
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 15 (10): 570–581
- Fan JT, Jiang WX, Xing JH, et al (2014). Structure and function of the 22nd subfamily in *Arabidopsis* R2R3-MYB family. *Hereditas Beijing*, 36 (10): 985–994 (in Chinese with English abstract) [樊锦涛, 蒋琛茜, 邢继红等(2014). 拟南芥R2R3-MYB家族第22亚族的结构与功能. *遗传*, 36 (10): 985–994]
- Feng DD (2008). Fine mapping of *Arabidopsis thaliana* gene controlling microspores development and Cloning of male sterility gene promoters from *Arabidopsis* (dissertation). Shanghai: Shanghai Normal University (in Chinese with English abstract) [冯丹丹(2008). 一个控制拟南芥小孢子发育基因的定位和雄性不育基因启动子的克隆(学位论文). 上海: 上海师范大学]
- Jenkins ES, Paul W, Craze M, et al (2010). Dehiscence-related expression of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a polygalacturonase in transgenic plants of *Brassica napus*. *Plant Cell Environ*, 22 (2): 159–167
- Kazama T, Itabashi E, Fujii S, et al (2016). Mitochondrial ORF79 levels determine pollen abortion in cytoplasmic male sterile rice. *Plant J*, 85 (6): 707–716
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, et al (1998). Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (2): 263–276
- Li YH, He SQ, Meng Y, et al (2018). Isolation and identification of the fungal pathogens causing root and bulb rot disease on edible lily (*Lilium brownie* var. *viridulum*) of Changping district in Beijing. *J Beijing Univ Agr*, 33 (2): 32–37 (in Chinese with English abstract) [李一寒, 何思琦, 孟嫣等(2018). 北京昌平区食用百合根及鳞茎腐烂的病原菌分离与鉴定. *北京农学院学报*, 33 (2): 32–37]
- Liu Q, Zhang GY, Chen SY (2000). The structure and regulation of plant transcription factors. *Chin Sci Bull*, 45 (14): 1465–1474 [刘强, 张贵友, 陈受宜(2000). 植物转录因子的结构与调控作用. *科学通报*, 45 (14): 1465–1474]
- Nelson MR, Band LR, Dyson RJ, et al (2012). A biomechanical model of anther opening reveals the roles of dehydration and secondary thickening. *New Phytol*, 196 (4): 1030–1037
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, et al (1987). The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J*, 6 (12): 3553–3558
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, et al (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290 (5499): 2105–2110
- Steiner-Lange S, Unte US, Eckstein L, et al (2003). Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant J*, 34 (4): 519–528
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (5): 447–456
- Takos AM, Jaffé FW, Jacob SR, et al (2006). Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiol*, 142 (3): 1216–1232
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, et al (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J*, 42 (2): 218–235
- Uimari A, Strommer J (1997). MYB26: a MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *Plant J*, 12 (6): 1273–1284
- Wang K (2018). *Arabidopsis* transcription factor MS188 regulates the expression of sporopollenin synthesis gene (dissertation). Shanghai: Shanghai Normal University (in Chinese with English abstract) [王科(2018). 拟南芥转录因子MS188调控孢粉素合成基因表达的研究(学位论文)

- 文). 上海: 上海师范大学]
- Wang LQ, Wu MJ, Wang XQ, et al (2018). Determination of pollen quantity and features of pollen dispersal for 95 lily resources. *J Nanjing Agr Univ*, 41 (6): 1018–1028 (in Chinese with English abstract) [王蓝青, 吴美娇, 王雪倩等(2018). 95份百合种质资源花粉量的测定与散粉特性分析. *南京农业大学学报*, 41 (6): 1018–1028]
- Yang C, Song J, Ferguson AC, et al (2017). Transcription factor MYB26 is key to spatial specificity in anther secondary thickening formation. *Plant Physiol*, 75: 333–350
- Yang ZR, Wang XC, Li XM, et al (2004). Advance on the study of transcription factors in higher plants. *Hereditas Beijing*, 26 (3): 403–408 (in Chinese with English abstract) [杨致荣, 王兴春, 李西明等(2004). 高等植物转录因子的研究进展. *遗传*, 26 (3): 403–408]
- Zhang F, Liu X, Zuo K, et al (2011). Molecular cloning and expression analysis of a novel SANT/MYB gene from *Gossypium barbadense*. *Mol Biol Rep*, 38 (4): 2329–2336
- Zhang J, Wu J, Zeng JY (2005). Study on stability of anther pigment of *Lilium siberia*. *Food Sci*, 26 (1): 88–90 (in Chinese with English abstract) [张继, 吴建, 曾家豫(2005). 西伯利亚百合花药色素稳定性的研究. *食品科学*, 26 (1): 88–90]
- Zhang M, Miao YJ, Li YF, et al (2016). Determination of the critical period of floral induction for hybrid plants between *Lilium × formolongi* and oriental hybrid lily. *Acta Horti Sin*, 43 (4): 735–742 (in Chinese with English abstract) [张盟, 苗英靖, 李玉帆等(2016). 新铁炮百合与东方百合杂种成花诱导关键时期的确定. *园艺学报*, 43 (4): 735–742]
- Zhang S, Fang ZJ, Zhu J, et al (2010). *OsMYB103* is required for rice anther development by regulating tapetum development and exine formation. *Chin Sci Bull*, 55 (29): 3288–3297
- Zhao XN, Li JC, Zhang P (2018). Several problems in the process of artificial emasculation of cotton. *Mod Rural Sci Technol*, (9): 100 (in Chinese) [赵香娜, 李记臣, 张鹏(2018). 棉花人工去雄杂交过程中的几个问题. *现代农村科技*, (9): 100]
- Zhao XY, Wang WH (2017). Market expansion, strengths combination, cooperation and win-win situation: the status quo, existing problems and development prospects of China's lily industry. *China Flowers Hortic*, (13): 10–13 (in Chinese) [赵祥云, 王文和(2017). 拓展市场 强强联手 合作共赢——我国百合产业现状、存在问题和发展前景. *中国花卉园艺*, (13): 10–13]
- Zhao XH, Yin DS, Zhang DX, et al (2009). Breeding of an innovative resource of anther degraded male sterile lily “No Powder White”. *Liaoning Agr Sci*, (1): 61 (in Chinese) [赵兴华, 印东生, 张道旭等(2009). 花药退化型雄性不育百合创新资源“无粉白”的选育. *辽宁农业科学*, (1): 61]
- Zhuang Y, Sun XM, Wang XY, et al (2010). The influence of ambient air pollutants on outpatient visits for allergic disease and pollinosis. *Chin J Prev Med*, 44 (12): 1121–1127 (in Chinese with English abstract) [庄严, 孙新民, 王学艳等(2010). 大气污染对变应性疾病及花粉症就诊人次的影响. *中华预防医学杂志*, 44 (12): 1121–1127]
- Zuo R, Xu ML, Chai GH, et al (2012). Function and regulation mechanism of plant MYB transcription factors. *Chin Bull Life Sci*, 24 (10): 1133–1140 (in Chinese with English abstract) [左然, 徐美玲, 柴国华等(2012). 植物MYB转录因子功能及调控机制研究进展. *生命科学*, 24 (10): 1133–1140]

Cloning and expression analysis of *LaMYB26* gene in lily

WANG Xue-Qian^{1,2}, YUAN Guo-Zhen^{1,2}, WU Ze^{1,2}, HE Ling^{1,2}, TENG Nian-Jun^{1,2,*}

¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University / Key Laboratory of Landscape Design, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China

²Baguazhou Science and Technology Innovation Center of Modern Horticultural Industry, Nanjing 210043, China

Abstract: LaMYB26, a MYB transcription factor, was cloned from lily (*Lilium* Asiatic hybrids) cultivar ‘Little Kiss’ with pollen abortion in this study. Sequence analysis revealed that the open reading frame of *LaMYB26* gene is 762 bp and encodes 253 amino acids. LaMYB26 transcription factor contains two typical SANT domains and belongs to the R2R3-MYB type in the MYB family transcription factor. Multi-sequence comparison finds that the amino acid sequence of LaMYB26 is 57.78% in similarity to those of MYB proteins in other species. The physicochemical properties, hydrophilicity/hydrophobicity and disorder analyses of LaMYB26 transcription factor demonstrates that it is a hydrophilic and alkaline protein with a disordered region. Analyses of signal peptide, transmembrane domain, and spatial structure indicate that LaMYB26 has no signal peptide and transmembrane domain, but has two typical α -helix series. Quantitative real-time PCR showed that the expression level of *LaMYB26* gene was up-regulated during pollen abortion stage and was specifically expressed in lily anther. Taken together, the results suggest that *LaMYB26* gene may play an important role in lily pollen abortion, and the current bioinformatic analyses of LaMYB26 would lay a foundation for further studies of its function and mechanism.

Key words: *Lilium*; pollen abortion; MYB transcription factor; gene cloning; expression analysis

Received 2019-01-09 Accepted 2019-03-03

This work was supported by the High Level Talent Project of the Top Six Talents in Jiangsu (NY-077), the Modern Agricultural Industry Technology System in Jiangsu (JATS[2018]006), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (YTZ201602).

*Corresponding author (njteng@njau.edu.cn).