2022, 35(5): 1-13
http://www.lykxyj.com

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.005.001

滇牡丹 MYB 家族成员鉴定及 *PdMYB2* 的功能验证

邹红竹，韩璐璐，周　琳，吕纪杭，贾莹华，王　雁*

(中国林业科学研究院林业研究所，国家林业和草原局林木培育重点实验室，北京　10009)

摘要:［**目的**］研究 MYB 转录因子家族在滇牡丹黄色花花色变黄过程中的重要作用，为牡丹花色改良和分子育种提供候选基因。［**方法**］本研究基于滇牡丹花瓣的转录组数据，对滇牡丹 MYB 家族进行了成员鉴定及分类。依据系统进化树、同源序列比对、基因差异表达筛选到候选基因 *PdMYB2*，利用亚细胞定位、实时荧光定量 PCR、转基因烟草及液相色谱等方法对 *PdMYB2* 进行功能验证。［**结果**］在滇牡丹转录组中共鉴定到 64 个 MYB 基因家族成员，分别为 R2R3-MYB 成员 25 个，R1R2R3-MYB 1 个，4R-MYB 2 个，MYB-related 36 个。筛选到 1 个 R2R3-MYB 转录因子 *PdMYB2*，定位在细胞核和细胞质中，在烟草中过表达 *PdMYB2* 会引起烟草花青素积累量的增加，在花瓣中与花青素相关的结构基因 *NtCHS* 和 *NtCHI* 的表达量均上调。［**结论**］MYB 转录因子家族中的 *PdMYB2* 在类黄酮合成途径中具有正调控作用，可以促进花青素的积累，提高类黄酮途径上结构基因的表达量。

关键词: 滇牡丹；花色；MYB 转录因子家族；*PdMYB2*；功能验证

中图分类号: S685.11　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1001-1498(2022)05-0001-13

花色是牡丹（*Paeonia suffruticosa* Andr.）最重要的观赏性状，中国传统品种的牡丹花色多为白色、紫红色、粉色等颜色，黄色系的牡丹品种稀少。滇牡丹（*Paeonia delavayi* Franch.）是芍药科（Paeoniaceae）芍药属（*Paeonia*）牡丹组（Section Moutan DC.）肉质花盘亚组（Delavayanae）的落叶亚灌木。滇牡丹中的黄色花类群是十分重要的育种资源，法国和美国的育种专家用中国滇牡丹中的黄花类群开展远缘杂交，育出了当前流行的“金阁”、“金晃”、“海黄”等黄色花品种[1]。滇牡丹花色纯黄，但花朵较小，单瓣，花头下垂，在中原地区引种极难成功；中原牡丹与滇牡丹属于不同亚组，杂交有一定难度，目前杂交育出的黄色品种较少，且花头下垂[2]。迄今为止，传统的杂交育种手段未能高效地培育出人们理想中的色彩明亮纯正的黄色牡丹品种。了解滇牡丹黄色产生的分子机制对定向育种十分重要。

周琳等对滇牡丹黄色花的色素组成进行分析，认为主要为查尔酮苷/黄酮苷和黄酮醇苷的混合物，包括查尔酮苷类中的异杞柳苷及山奈酚苷、槲皮素苷、异鼠李素苷、金圣草黄素苷和芹菜素苷等[3]。类黄酮的生物合成始于 1 分子的 4-香豆酰-辅酶 A（coumaroyl-CoA）和 3 分子的丙二酰-辅酶 A（malonyl-CoA）被查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 催化形成四羟基查尔酮（2′,4′,6′,4-tetrahyroxychalcone，THC），为类黄酮合成提供了基本碳骨架。THC 作为重要的中间产物在不同酶的催化下进入不同的代谢途径，生成不同的物质。THC 在查尔酮 2′葡糖基转移酶（chalcone 2′-glucosyltransferases，THC2′GT）

收稿日期：2022-03-08　　修回日期：2022-05-15
基金项目：国家重点研发计划项目（2018YFD1000405）；国家自然科学基金项目（31972456）
* 通讯作者: 王雁，研究员，博士生导师，主要研究方向：花卉分子育种。E-mail：chwy8915@sina.com。

的作用下生成在液泡中稳定存在的异杞柳苷（isosalipurposide，ISP，黄色），这也是黄色花牡丹中的重要显色物质。THC 在查尔酮异构酶（chalcone isomerase，CHI）的作用下生成柚皮素（naringenin，黄色），是花青素、黄酮及黄酮醇生物合成的前体物质。柚皮素由黄烷酮 3-羟基化酶（flavanone 3-hydroxylase，F3H）催化生成各类花青素苷的必要前体物质二氢山萘酚（dihydrokaempferol，DHK），再由黄酮醇合成酶（flavonol synthase，FLS）催化合成山奈酚（kaempferol，浅黄色）和槲皮素（quercetin，浅黄色）[4-9]。

通过对拟南芥（*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.）、金鱼草（*Antirrhinum majus* L.）、玉米（*Zea mays* L.）、矮牵牛（*Petunia hybrida* (J. D. Hooker) Vilmorin）等模式植物类黄酮生物合成途径的深入研究发现，类黄酮合成途径的分子调控网络主要由结构基因（structural genes）和调节基因（regulatory genes）共同调控完成[10-12]。其中，MYB 转录因子家族是植物中最大的转录因子家族[13]。MYB 转录因子在 N 端都有一段保守的 MYB 结构域，是 DNA 的结合区（DNA-binding domain）。MYB 转录因子的 C 端有一个转录激活区（transcription activation domain），通过折叠成双亲性的螺旋结构从而激活转录[14-15]。根据 MYB 转录因子 N 端 R 结构（R1、R2、R3）的个数，可以将 MYB 转录因子大致分为 R1/R2-MYB、R2R3-MYB、R1R2R3-MYB 三个亚类，其中 R2R3-MYB 是植物中数目最多的一类，它们主要参与细胞分化、激素应答、次生代谢、环境胁迫以及抵御病虫害，而且能够调控植物花青素的生物合成[16]。

调控类黄酮合成途径的 MYB 基因已从多种植物中分离出来，并对它们的功能进行了广泛研究。Kobayashi 等从四倍体巨峰葡萄（*Vitis labruscana* Kyoho）中分离出 *MybA* 基因，通过调控 *UFGT* 基因参与葡萄花青素苷合成的调控[17]。Espley 等从苹果（*Malus* × *domestica* Borkh）中分离出 *MdMYB10* 基因，它在同源和异源系统中都能诱导花青素的积累，而且与 *MdbHLH3* 和 *MdbHLH33* 这 2 个 bHLH 蛋白共表达[18]。Chiou 等发现，文心兰（*Oncidium* spp.）*OgMYB1* 可以激活黄色唇瓣中的 *OgCHI* 和 *OgDFR* 的转录而诱导花青素的形成[19]。Feng 等在亚洲梨品种（*Pyrus pyrifolia* cv. ‘Aoguan’）中分离到 1 个 R2R3-MYB 转录因子基因 *PyMYB10*，证实在其成熟果实中，果皮中 *PyMYB10* 的转录量与花青素合成途径中的 *PyCHS*、*PyCHI*、*PyF3H* 等基因以及花青素的合成量呈正相关[20]。Yamagishi 等从亚洲百合 (*Lilium* ‘Montreux’) 中分离出 2 个 R2R3-MYB 转录因子 *LhMYB6* 和 *LhMYB12*，对其花青素合成具有正调节作用，并决定了花青素在特定器官和组织中积累[21]。Tian 等研究发现，红叶海棠（*Malus* ‘Flame’）中的 *McMYB10* 通过对海棠中 *McF3'H* 的正调控在海棠红叶着色中起着重要作用[22]。Tuan 等研究证明，桃（*Prunus persica* L.）中的 *PpMYB10.1* 是红皮桃花青素积累的主要调节因子，并具有活化作用[23]。Shi 等从茄子（*Solanum melongena* L.）中分离出 1 个 R2R3-MYB，命名为 *SmMYB75*，过表达 *SmMYB75* 后发现，导致花青素积累量增加，愈伤组织颜色由青变紫[24]。MYB 转录因子也并非都是激活子，也有一部分 MYB 转录因子起负调控作用。Colanero 等从番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 中获得了 1 个 R3-MYB 蛋白的突变基因，当其过度表达时，这种蛋白通过负面干扰由内源性 MBW 复合物介导的花青素生物合成途径的激活，抑制了番茄幼苗和植株中的花青素生成[25]。Gates 等从悬铃果属（*Iochroma* spp.）中发现 1 个新的 R3-MYB 转录因子等位基因与花色变异密切相关，命名为 *MYBL1*，是一种 MYB 的转录抑制因子，该基因的高表达与花青素代谢途径上 F3′5′H、DFR、ANS 基因下调有关[26]。Deng 等在香蕉（*Musa* spp.）中发现 1 个 R2R3-MYB 转录因子 *MaMYB4*，可以跟 CHS、ANS、DFR、bHLH 的启动子结合，从而抑制它们的表达，使花青素的积累量变少[27]。

MYB 转录因子在滇牡丹类黄酮生物合成途径中的作用未曾被报道过，本研究基于滇牡丹花瓣的转录组数据，对滇牡丹 MYB 家族进行了成员鉴定及分类。在分类得到的 MYB 转录因子中，依据系统进化树、同源序列比对、基因差异表达筛选到 1 个 R2R3 MYB 转录因子 *PdMYB2* 可能在类黄酮生物合成途径中发挥了重要作用。本研究利用亚细胞定位、实时荧光定量 PCR、瞬时过表达、转基因烟草及液相色谱串联质谱等方法对其进行了功能验证，为进一步深入分析 *PdMYB2* 的功能和调控机制奠定了基础，并为牡丹花色分子育种提供了候

选基因。

1　材料与方法

1.1　实验材料

本研究以滇牡丹纯黄色花为实验材料，所用材料均采集于云南省迪庆藏族自治州香格里拉县（29°58′7″ N，99°34′60″ E，海拔 3 400 m），根据牡丹生长发育年周期的划分，结合滇牡丹花蕾发育和花朵着色实际情况，采集花朵开放的 4 个进程：S1，硬蕾期（未着色紧实花朵）；S2，透色期（轻微着色，花蕾蓬松）；S3，初开期（花朵初开，花朵完全变黄）；S4，盛开期（花朵盛开，花药完全外露）（图 1）。采集时间为 2019 年 5 月，采集同一株滇牡丹上的 4 个时期的花朵，采集 3 株不同植株作为生物学重复，采集后将每朵花按花器官用锡箔纸包好，液氮速冻，保存于−80 ℃冰箱中。

图 1　滇牡丹花朵开放的 4 个阶段

Fig. 1　Four periods of blooming of *Paeonia delavayi* flowers

1.2　试验方法

1.2.1　滇牡丹 MYB 转录因子家族成员的鉴定和分析　根据滇牡丹花瓣转录组数据库（NCBI ID：PRJNA772706）的基因注释信息，分离出所有 MYB Isoforms，使用 NCBI 开放阅读框工具 ORFfinder 获取所有基因的 CDS 区，运用 EMBL-EBI 在线工具 Pfam（http://pfam.xfam.org/search/sequence）对全部 MYB Isoforms 的蛋白结构域进行检索，去除结构域完整度低于 30% 的序列，将剩余 MYB 转录因子根据相邻不完全重复区域数目对 MYB 转录因子进行分类，分为 R1R2R3-MYB、R2R3-MYB、R1-MYB、4R-MYB 及 MYB-related，并使用 MUSCLE（http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/）在线网站对它们进行多序列比对。从拟南芥数据库在线网站 TAIR（https://www.arabidopsis.org/index.jsp）下载拟南芥 R2R3-MYB 转录因子家族数据，运用 Mega7.0 软件，将滇牡丹 R2R3-MYB 与拟南芥 R2R3-MYB 进行系统发育分析。通过跟拟南芥 MYB 家族的聚类，预测滇牡丹中与类黄酮生物合成途径有关的 MYB 转录因子，并结合转录组差异表达热图，聚焦到可能参与类黄酮生物合成的 *PdMYB2* 转录因子上，对其进行进一步的分析和验证。

1.2.2　滇牡丹 *PdMYB2* 转录因子的克隆及序列分析　通过对前期构建的滇牡丹花瓣全长转录组数据库序列注释信息进行检索，获得滇牡丹 *PdMYB2*（Isoform0011606）序列，使用 NCBI 开放阅读框工具ORFfinder（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）获取该基因的 CDS 区。使用 Primer3web（https://primer3.ut.ee/）在线引物设计软件进行引物设计。克隆引物见表 1。用艾德莱植物 RNA 快速提取试剂盒（货号：RN38）根据说明书提取 RNA，用 TaKaRa 高保真酶（货号：R010A）克隆基因。利用生物信息学分析软件和工具对 *PdMYB2* 基因编码蛋白的理化性质和结构功能进行预测，为对 *PdMYB2* 基因的进一步研究和应用提供参考。利用 ExPasy 中的 Prot-Param 工具对 *PdMYB2* 基因编码蛋白的基本理化性质进行了分析。利用在线工具 Swiss-model 预测 *PdMYB2* 蛋白的三维结构。利用在线工具 NetPhos（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）预测 *PdMYB2* 的磷酸化位点。

1.2.3　实时荧光定量 PCR 分析　对滇牡丹 *PdMYB2* 基因在滇牡丹花瓣开放的 S1~S4 时期进行实时荧光定量 PCR 分析。在将 *PdMYB2* 转烟草后，对该转录因子基因在烟草的花、叶、茎中表达量进行实

表 1 引物

Table 1 Primers

引物名称 Primer Name	正向引物（5'-3'） Forword primer	反向引物（5'-3'） Reverse primer	用途 Description
PdMYB2	TTCCCGGGACAGAGTTCAGA	TGCGCTCCAGTCCATTTGCA	qRT-PCR
NtCHS	TTGGGCTGCAGAGACAAGCT	TTGGGCTGCAGAGACAAGCT	qRT-PCR
NtCHI	CCTGTTGGGGCATTGACGAT	AGTCCTGACACTCTTTCGGCGA	qRT-PCR
PsPP2A	CGTGTTTGGATGTTCTCAAGGC	GGCGAGTGAGTTTTCAGTTGGA	qRT-PCR
NtCP	CACCACAAAGGGCAATCTCA	CCGCCAGTCTTTCGTCTCC	qRT-PCR
PdMYB2	ATGGACAAAAAACCATGCAGCTCC	TTAATCACCATTAAGTAAATGC	PCR
PdMYB2	tctctctcaagcttggatccATGGACAAAAAACCATGCAG	cgggtcatgagctcctgcagATCACCATTAAGTAAATGCA	Subcellular localization
PdMYB2	gaacacgggggactcttgacATGGACAAAAAACCATGCAGCTCC	aaaagttcttctcctttactagTTAATCACCATTAAGTAAATGC	overexpression

时荧光定量 PCR 分析。对转基因烟草 *NtCHS*、*NtCHI* 的表达量进行实时荧光定量 PCR 分析。实时荧光定量 PCR 的产物见表 1。使用 TaKaRa TB Green® *Premix* Ex Taq™（货号：RR420A）按照说明书实验，使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算表达量。滇牡丹内参基因为 *PsPP2A*，烟草内参基因为 *NtCP*。

1.2.4 亚细胞定位分析 将 *PdMYB2* 基因去除终止密码子后的编码区构建到 PHB-GFP 载体上，引物见表 1。使用热击法将构建好的载体质粒转化到农杆菌 GV3101 菌株中。挑取鉴定为阳性的菌落，放入 5 mL 卡那霉素浓度为 50 μg·mL^{-1}、利福平浓度为 20 μg·mL^{-1} 的 LB 液体培养基中，震荡培养 12 h 左右后，取其中 1 mL 新鲜菌液，加入 100 mL 卡那霉素浓度为 50 μg·mL^{-1}、利福平浓度为 20 μg·mL^{-1} 的 LB 液体培养基中，继续震荡培养 6～8 h，震荡培养 6 h 后开始 0.5 h 检测菌液 OD_{600} 值，菌液 OD_{600} 值为 0.6～0.7 时停止摇菌。将菌液分装至无酶无菌的 50 mL 离心管中，5 000 rpm、10 min 离心收菌。在超净工作台内倒掉上清液，尽量将上清液去除干净。用亚细胞定位侵染液重悬菌体，使侵染液的 OD_{600} 值为 0.75。在黑暗中静置悬菌液 3 h，按 1:1 比例混合含有载体质粒的侵染液和空 mCherry 侵染液，使用 1 mL 无菌注射器注射 4～6 叶期的烟草叶片，注射完成后暗培养 12 h 后，转移至光下，进行 12 h 光照 12 h 黑暗交替培养 2.5 d。2.5 d 后将注射过的烟草叶片剪下，剪成 0.5 mm × 0.5 mm 大小，用 0.1 μg·mL^{-1} DAPI 染色 1～5 min 后，用激光共聚焦扫描显微镜（卡尔蔡司光学（中国）有限公司，型号：Zeiss LSM510 Meta）观察烟草细胞的 GFP 和 DAPI 荧光表达情况。

1.2.5 叶盘法转烟草 将 *PdMYB2* 基因的 CDS 区构建到 pCAMBIA1302 载体上，引物见表 1，使用热激法将构建好的 PdMYB2-pCAMBIA1302 载体质粒转化到 EHA105 农杆菌菌株感受态中。经过菌落 PCR 的鉴定，挑取鉴定为阳性的菌落，如 1.2.4 中方法培养菌液，当菌液 OD_{600} 值为 0.2～0.5 时停止摇菌，将菌液分装至无酶无菌的 50 mL 离心管中，5 000 rpm、10 min 离心收菌。在超净工作台内倒掉上清液，尽量将上清液去除干净。使用 1/2MS 液体培养基重悬菌块，使重悬液 OD_{600} 值在 0.5～0.8 之间侵染烟草。

取生长健壮的烟草组培苗叶片，修剪掉叶脉和边缘后，剪成 0.5 mm × 0.5 mm 大小，将剪好的叶片一部分浸入侵染液，一部分浸入 1/2MS 液体培养中作为空白对照，不断晃动，使叶片与菌液充分接触。3～5 min 后取出烟草叶片，在灭菌滤纸上吸干多余的菌液，烟草正面朝上，平铺于共培养分化培养基（MS + 0.5 mg·L^{-1} 6-BA + 0.05 mg·L^{-1} NAA + 100 μmol·L^{-1} AS + 琼脂，调节 pH = 5.8）中，封口膜封口，暗培养 72 h。暗培养后，将叶片用无菌水清洗 3 次，再用含 200 mg·L^{-1} 特美汀的无菌水清洗 3 次，转接于分化筛选培养基（MS + 0.5 mg·L^{-1} 6-BA + 0.05 mg·L^{-1} NAA + 20 mg·L^{-1} 潮霉素 B + 200 mg·L^{-1} 特美汀 + 琼脂，调节 pH = 5.8）上，封口膜封口，置于光照培养箱中 16 h 光照 8 h 黑暗培养。每 2 周更换 1 次培养基，待烟草小苗长至 2 cm 左右，即可切下小苗，转接于生根培养基（MS + 0.1 mg·L^{-1} NAA + 20 μg·L^{-1} 潮霉素 B + 200 mg·L^{-1} 特美汀 + 琼脂，调节 pH = 5.8）

上培养，继代 2 次后，能正常生根的即为阳性苗。小苗根生长至 2 cm 左右时，将小苗从组培瓶内移出，培养箱内缓苗 2 d 后即可将苗移至温室培养。

1.2.6　液相色谱分析花瓣中的色素变化　转基因烟草开花后，观测烟草花色表型的变化，并采集烟草花瓣部分，液氮速冻，存于−80 ℃ 冰箱中，使用液质联用分析系统（LC-MS/MS）的方法对花青素代谢物进行绝对定量检测。实验方法参照文献 [28-31]。

将采集的烟草花瓣真空冷冻干燥，用研磨仪 30 Hz 研磨 90 s，至样品变为粉末状，称取 50 mg 的花瓣粉末，溶解于 50 μL 的提取液中（提取液为含 0.1% 盐酸的 50% 甲醇水溶液）。溶解后，涡旋震荡 5 min，超声清洗仪波处理 5 min，高速离心机 12 000 rpm 低温 4 ℃ 离心 3 min，吸取上清液后，重复操作 1 次。将 2 次获得的上清液合为一管，用 0.22 μm 孔径的微孔滤膜进行过滤，保存于进样瓶中，用于 LC-MS/MS 分析。

液相条件主要包括：（1）色谱柱：ACQUITY BEH C18 1.7 μm，2.1 mm × 100 mm；（2）流动相：A 相为超纯水（加入 0.1% 的甲酸），B 相为甲醇（加入 0.1% 的甲酸）；（3）洗脱梯度：0.00 min B 相比例为 5%，6.00 min 增至 50%，12.00 min 增至 95%，保持 2 min，14 min 降至 5%，并平衡 2 min;（4）流速 0.35 mL·min^{-1}；柱温 40 ℃；进样量 2 μL。

质谱条件主要包括：电喷雾离子源（ESI）温度 550 ℃，正离子模式下质谱电压 5 500 V，气帘气（CUR）35 psi。在 Q-Trap 6500 + 中，每个离子对是根据优化的去簇电压（DP） 和碰撞能（CE）进行扫描检测。

将检测到的样本的积分峰面积代入标准曲线线性方程进行计算，最终得到实际样本中该物质的含量数据。计算公式为：样本中代谢物的含量 (μg·g^{-1})= $C\times V\times(1\,000\,000\times m)^{-1}$(式中，$C$：样本中积分峰面积代入标准曲线得到的浓度值 (ng·mL^{-1})；V：提取时所用溶液的体积 (μL)；m：称取的样本质量 (g)）。

该实验交由武汉迈特维尔生物科技有限公司（https://www.metware.cn/）完成。

2　结果与分析

2.1　滇牡丹 MYB 基因家族成员的预测

本研究通过转录组注释，共获得 93 个 MYB 转录因子，删除重复序列后，在 Pfam 在线蛋白结构域分析网站上进行结构域检索，去除结构域完整度低于 30% 的序列后，最终共获得 64 个 MYB 基因家族成员。对这些家族成员进行不完全重复结构域数目统计，分为 4 个亚类，其中，R2R3-MYB 成员有 25 个，R1R2R3-MYB 有 1 个，4R-MYB 有 2 个，MYB-related 有 36 个。为研究它们之间的系统进化关系，使用 MEGA7.0 构建 NJ 树（Neighbor-Joining）。图 2 表明：在滇牡丹纯黄色花中，4 种类型的 MYB 蛋白在进化树中划分较清楚，同一类型的 MYB 转录因子基本聚在相同的分支，这说明 MYB 转录因子家族在系统进化上具有保守性。

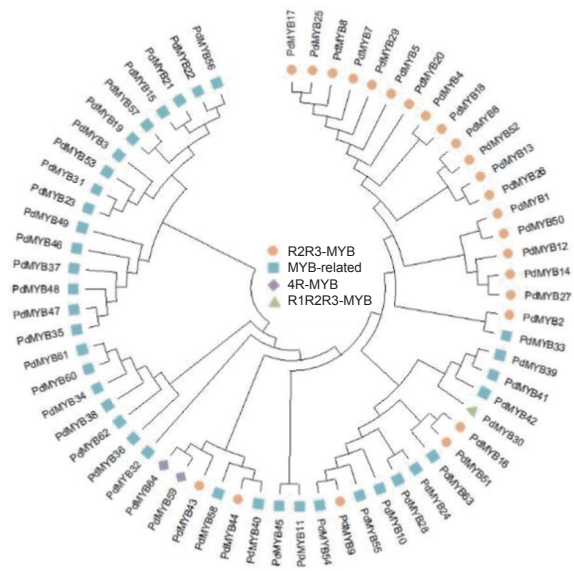


图 2　滇牡丹 MYB 基因家族进化树分析

Fig. 2　Neighbor-Joining tree of MYBs in *P. delavayi*

2.2　滇牡丹 R2R3-MYB 基因家族的系统发育分析及功能预测

R2R3-MYB 转录因子是 MYB 家族在植物中数目最多的一类，不仅调控植物的次生代谢、细胞分化、激素应答等过程，而且能调控花青素的生物合成。对滇牡丹中所有 R2R3-MYB 转录因子进行碱基数量、氨基酸数量、R2 及 R3 结构域在氨基酸序列中的位置、分子量、亲水性及等电点的统计（表 2），以进行后续研究。

为进一步研究滇牡丹 R2R3-MYB 转录因子的功能，从拟南芥 TAIR 网站下载拟南芥 R2R3-MYB 蛋白，将筛选出的 25 个滇牡丹 R2R3-MYB 与拟南芥 R2R3-MYB 转录因子构建系统发育树。拟南

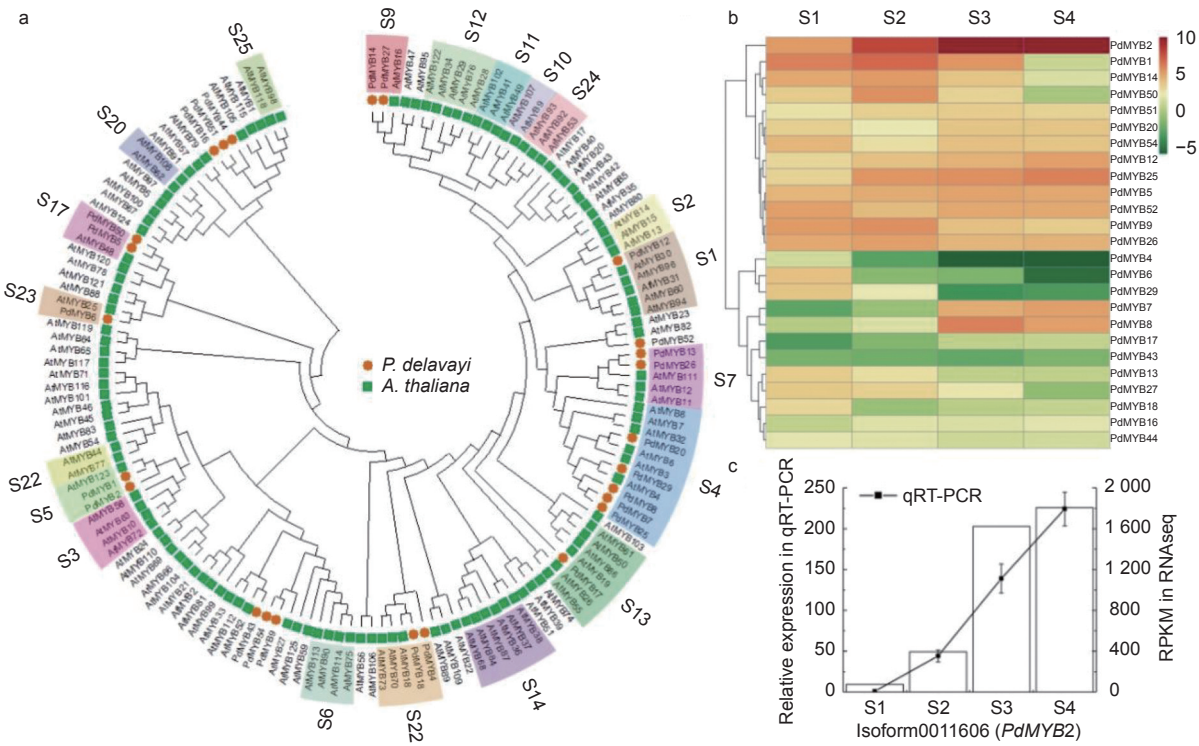
表 2 R2R3 MYB 理化性质统计

Table 2 Statistics of physical and chemical properties of R2R3 MYB

基因 gene name	基因编号 gene id	碱基数 Base number	氨基酸数 amino acids number	R2结构域的位置 R2 domain position	R3结构域的位置 3domain position	分子量 Protein Molecular Weight/Kda	亲水性 Protein gravy	等电点 pH
PdMYB1	Isoform0008837	667	221	16—63	69—113	25.76	−0.569	10.33
PdMYB2	Isoform0011606	600	199	16—63	69—112	22.89	−0.867	7.15
PdMYB4	Isoform0002005	657	218	13—60	68—111	24.64	−0.663	8.34
PdMYB5	Isoform0002587	825	274	9—56	62—106	30.95	−0.692	8.56
PdMYB6	Isoform0011673	600	199	17—64	70—115	22.78	−0.824	7.86
PdMYB7	Isoform0013531	768	254	14—61	67—111	28.13	−0.562	8.35
PdMYB8	Isoform0017135	768	255	14—61	67—111	28.27	−0.577	8.49
PdMYB9	Isoform0018896	987	328	12—57	66—107	35.76	−0.637	9.28
PdMYB12	Isoform0021375	1 002	333	14—61	67—112	37.39	−0.792	6.06
PdMYB13	Isoform0021493	1 140	379	14—61	67—112	42.62	−0.706	4.59
PdMYB14	Isoform0021847	1 230	409	14—61	67—112	44.42	−0.651	5.61
PdMYB16	Isoform0025007	1 203	400	60—105	112—156	43.29	−0.647	5.11
PdMYB17	Isoform0025203	765	254	14—61	67—110	28.13	−0.596	8.49
PdMYB18	Isoform0025403	693	230	12—59	65—110	26.07	−0.762	8.69
PdMYB20	Isoform0026151	930	309	14—61	67—111	34.36	−0.586	9.20
PdMYB25	Isoform0032639	768	255	14—61	67—111	28.24	−0.576	8.49
PdMYB26	Isoform0032990	1 140	379	14—61	67—112	42.70	−0.722	4.64
PdMYB27	Isoform0033499	1 230	409	14—61	67—112	44.41	−0.648	5.80
PdMYB29	Isoform0035601	693	230	14—61	67—111	26.17	−0.779	8.21
PdMYB43	Isoform0066537	981	326	211—254	263—307	37.44	−0.742	10.16
PdMYB44	Isoform0066976	2 691	896	543—587	595—636	102.00	−0.759	9.54
PdMYB50	Isoform0085902	561	186	9—56	62—107	21.37	−0.685	10.53
PdMYB51	Isoform0091920	1 204	426	60—105	112—156	46.05	−0.657	4.96
PdMYB52	Isoform0091937	855	284	14—61	67—111	32.26	−0.829	5.70
PdMYB54	Isoform0092276	984	327	12—57	66—107	35.66	−0.634	9.28

芥 MYB 转录因子家族大部分成员的功能都研究得比较清楚，系统发育树上同一分支的基因在功能上具有同源性和相似性，通过跟拟南芥 *MYB* 家族的聚类，可以预测滇牡丹中 MYB 转录因子的功能。在拟南芥中，S4、S5、S6、S7 分支参与类黄酮的生物合成。图 3a 表明：*PdMYB20*、*PdMYB29*、*PdMYB8*、*PdMYB7*、*PdMYB25* 与拟南芥第 4 亚家族的基因聚在一起，可能在类黄酮生物合成途径中行使转录抑制功能。*PdMYB1*、*PdMYB2* 与拟南芥第 5 亚家族的 *AtMYB123* 聚在一支，研究表明 *AtMYB123* 参与原花青素的生物合成，推测 *PdMYB1*、*PdMYB2*也可能在原花青素合成过程中行使一定的功能。拟南芥的第 6 亚家族主要参与花青素的生物合成，滇牡丹中没有 MYB 转录因子聚类到这个亚家族，这可能是由于滇牡丹花瓣纯黄，几乎不含有花青素的原因。*PdMYB13*、*PdMYB26* 聚类到拟南芥第 7 亚家族，这一家族的功能是参与黄酮醇的生物合成。

根据转录组 RPKM 数据构建 R2R3-*MYB* 转录因子表达量热图，图 3b 表明：25 个转录因子大体分为 2 个表达趋势，一部分随着花发育上调，一部分随着花发育下调。从图中可以看出，聚类在原花青素合成分支的 *PdMYB2* 转录因子的表达量远高于其它转录因子的表达量，对其进行实时荧光定



注：a：滇牡丹和拟南芥 MYB 基因家族进化树分析。b：R2R3-MYB 在滇牡丹花瓣发育 4 个时期表达量热图。c：*PdMYB2* 实时荧光定量 PCR 分析

Notes: a: Neighbor-Joining tree of MYBs in *P. delavayi* and *A.thaliana*. b: Heat map of R2R3-*MYB* expression in four stages of petal development of *P. delavayi*. c: *PdMYB2* qRT-PCR analysis

图 3　滇牡丹 R2R3-MYB 功能预测和表达分析

Fig. 3　Functional prediction and expression analysis of peony R2R3-MYB in *P. delavayi*

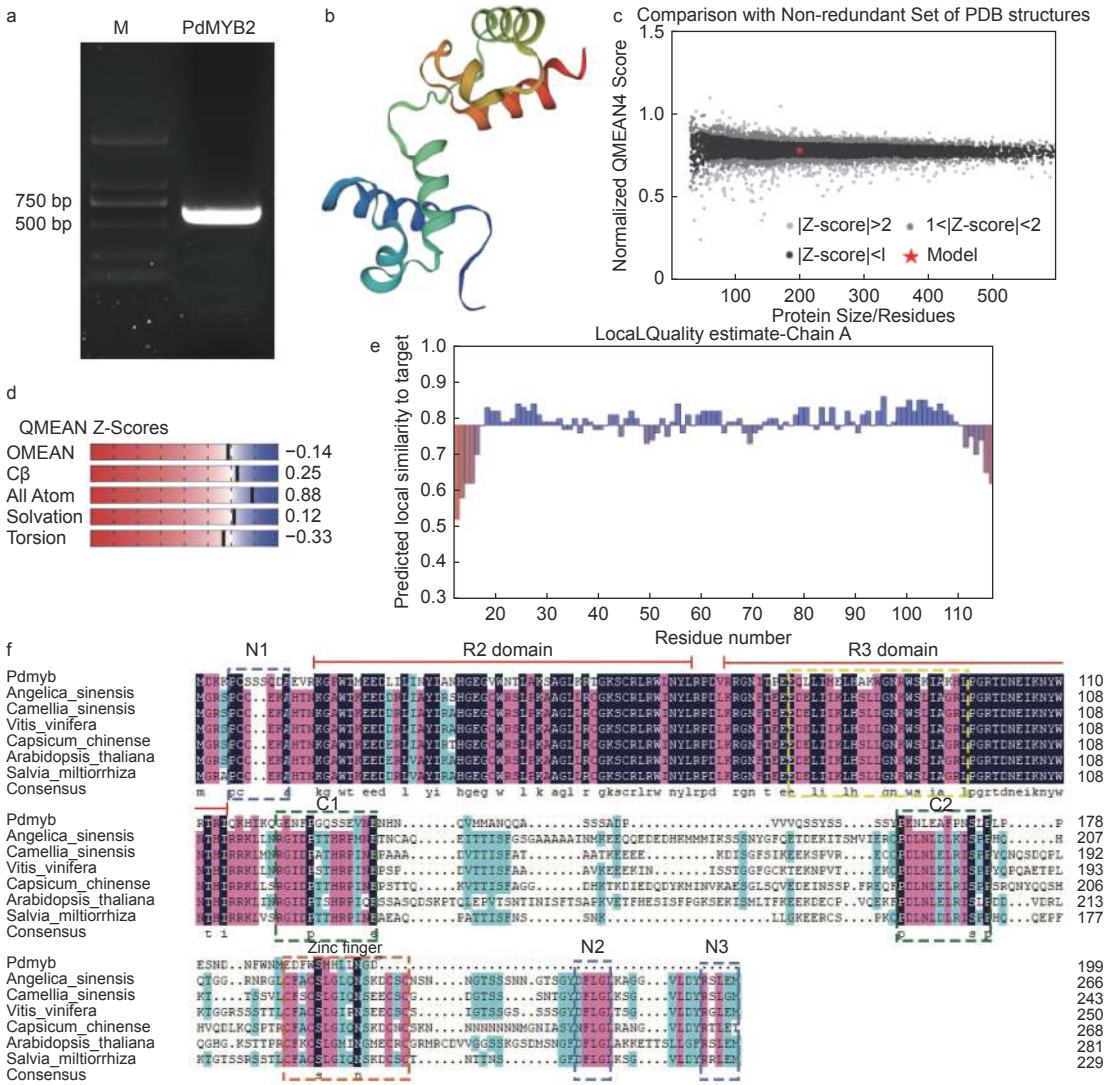
量 PCR 的验证（图 3c），RNA-seq 和 qRT-PCR 数据具有非常密切的相关性，且表达趋势具有高度的一致性。

2.3　*PdMYB2* 基因克隆及序列分析

使用全长引物克隆 *PdMYB2* 的全长 CDS 序列，获得 *PdMYB2* 序列 600 bp（图 4a），经测序，*PdTHC2'GT* 具有从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAA 的完整 ORF，编码 199 个氨基酸，将 *PdMYB2* 登录到 NCBI，登录号为：OM478634。选择当归（*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels，AYA44248.1）、茶（*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.，ARB51599.1）、葡萄（*Vitis vinifera* L.，NP_001268129.1）、黄灯笼辣椒（*Capsicum chinense* Jacq.，PHT97629.1）、拟南芥（*A. thaliana*，AAM67537.1）和丹参（*Salvia miltiorrhiza* Bunge，ADG46002.1）的参与烟草花青素苷合成的转录激活因子 R2R3-MYB 蛋白与 *PdMYB2* 进行多重比对 (图 4f)，在 *PdMYB2* 的 N-末端发现了 2 个保守的 DNA 结合结构域，N-末端的 R2 和 R3 DNA 结合结构域是与在其他物种中鉴定的 R2R3-MYB 转录调节因子同源的主要区域。但与其他 R2R3-MYB 蛋白相比，*PdMYB2* 中与 bHLH 结合并反应的特征序列显示出较低的同源性。还观察到 C1 和 C2 基序和 C 末端的锌指结构以及保守区的 N1、N2 和 N3 基序的同源性非常低。这些结果表明，不同植物中 R2R3-MYB 蛋白 C 末端的多样性。因此，在 *PdMYB2* 氨基酸序列中，DNA 结合结构域比转录激活结构域更保守，这从分子角度解释了 R2R3-MYB 在各种植物中功能的相似性和独特性。使用 BLAST 和 HHBlits 对 SWISS-MODEL 模板库进行了模板搜索，发现 *PdMYB2* 与 R2R3-MYB 转录因子识别靶 DNA（target DNA recognition by R2R3-type MYB transcription factor）蛋白模型同源性最高（57.66%）。因此，在模型的基础上，构建了 *PdMYB2* 蛋白的 3D 模型（图 4b～e）。预测 *PdMYB2* 的氨基酸序列包含 31 个潜在的磷酸化位点，包括 20 个丝氨酸、6 个苏氨酸和 5 个酪氨酸。

2.4　*PdMYB2* 基因的亚细胞定位

利用荧光报告基因（GFP）对 *PdMYB2* 基因



注：a：*PdMYB2* 基因 PCR 扩增产物，其中，M 为 DNA-maker DL2000。b：*PdMYB2* 的可视化三维模型。c：与蛋白质数据库（PDB, Protein Data Bank）结构的非冗余集合进行比较。d：Z-Score 作为一个统计值，可以用来表示模板蛋白与待测蛋白之间的匹配程度。QMEAN：模型质量评估的综合评分功能。All Atom：根据短程统计势计算出的残基的归一化全原子势能。Cβ：根据短期统计势计算出的残基的归一化 Cβ 势能。Solvation: 根据短程统计势计算出的残留物的归一化溶剂化势能。Torsion：暴露在相对溶剂可及性中的残留物的扭转能，计算方法是将残留物的最大可及表面积 (ASA，accessible surface area) 除以观测值。e：蛋白质的局部质量评估。f：*PdMYB2* 与其他 MYB 蛋白氨基酸序列的同源性比较。水平线分别代表 2 个 MYB 结构域 R2 和 R3。黄色框是与 bHLH 蛋白相互作用的特征序列。C1 和 C2 分别为转录抑制盒中的保守基序。橙色框是锌指结构。蓝色框分别是 N1、N2 和 N3 的特征序列

Notes: a: Polymerase chain reaction (PCR) amplification products of *PdMYB2*. b: Visualizable 3D model of *PdMYB2*. c: Comparison with Non-redundant Set of PDB (Protein Data Bank) structures. d: As a statistical value, Z-score can be used to represent the matching degree between template proteins and proteins to be tested. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. All Atom: Normalized all-atom potential energy of the residue calculated from the short-range statistical potentials. Cβ: Normalized cβ potential energy of the residue calculated from the short-range statistical potentials. Solvation: Normalized solvation potential energy of the residue calculated from the short-range statistical potentials. Torsion: Torsion energy of the residue exposed relative solvent accessibility, calculated by dividing the maximally accessible surface area (ASA) of a residue by the observed value. e: Local quality estimation of the protein. f: Homology comparison of amino acid sequence between *PdMYB2* and other MYB protein. The horizontal lines represent two MYB domains R2 and R3 respectively. Yellow box is the characteristic sequence of interaction with bHLH protein .The conserved motifs of C1 and C2 transcriptional inhibition in the box were respectively identified. Orange box with zinc finger structure. Blue boxes are N1, N2 and N3 feature sequences, respectively

图 4 *PdMYB2* 基因克隆、同源性比对、蛋白质模拟结果及质量评价

Fig. 4 *PdMYB2* gene cloning, homology comparison of amino acid sequence, protein modelling results and quality estimation.

进行亚细胞定位。构建了 35S:: PdMYB2-GFP 重组载体，以 35S::GFP 和 mCherry 共同作为阴性对照，将其在农杆菌的介导下转化进本氏烟草叶片细胞中，使用激光共聚焦显微镜观察 GFP 的荧光。图 5 显示：35S::GFP 的荧光在细胞核和细胞质中存在，*PdMYB2* 基因的荧光在细胞核中有明显的荧光表达，在细胞质中有微弱的荧光表达。因此，推断 *PdMYB2* 基因在细胞核和细胞质中均有定位。

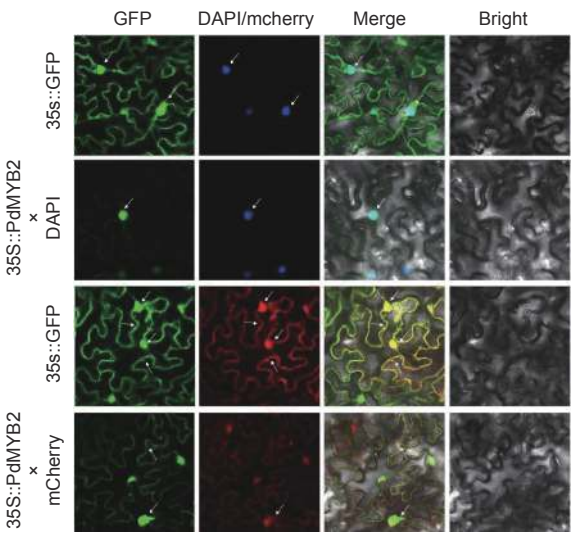


图 5　*PdMYB2* 在烟草中的亚细胞定位

Fig. 5　Subcellular localization of *PdMYB2* in *Nicotiana benthamiana*

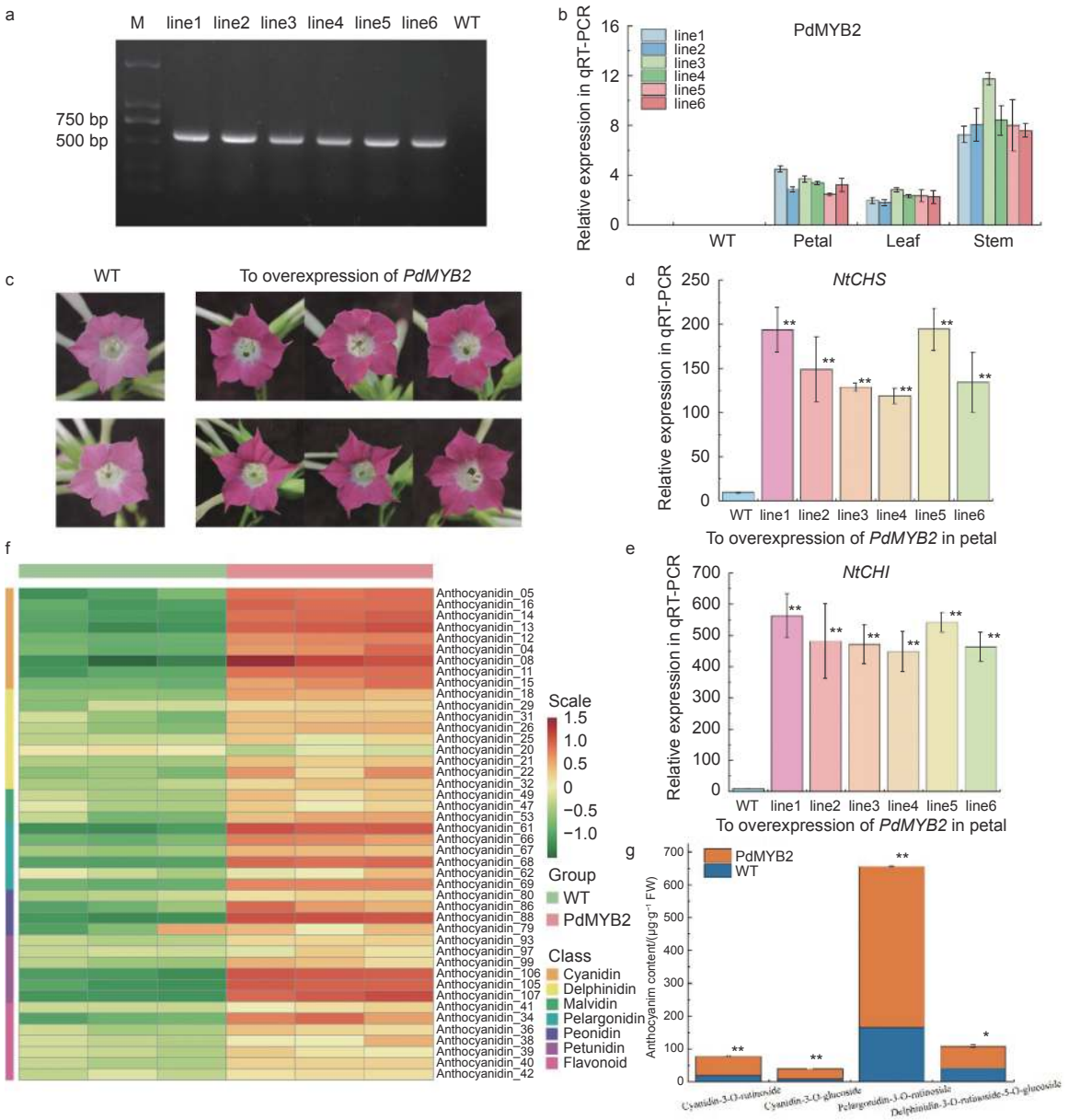
2.5　*PdMYB2* 基因在烟草中的过表达

2.5.1　*PdMYB2* 在烟草中的过表达　为进一步验证 *PdMYB2* 在类黄酮途径上的调控功能，将 35S::PdMYB2-pCAMBIA1302 载体通过叶盘法介导入烟草中。以 Hygromycin B 为抗性筛选标签，筛选出 6 个过表达 *PdMYB2* 的独立转基因烟草品系（line1～line6），出瓶后移至温室中，在相同光照、水分、温度条件下培养。提取每个烟草品系（line1～line6）及野生型烟草（WT，Wild Type）的 DNA，并以提取的 DNA 为模板，使用全长引物对 *PdMYB2* 基因进行克隆。琼脂糖凝胶电泳的结果显示：转化 *PdMYB2* 基因在各转基因株系中均可以检测到条带，而野生型烟草中未检测到该条带（图 6a）。对 6 个烟草株系进行 qRT-PCR 的验证，结果表明：*PdMYB2* 基因在不同组织中均有表达，表达量为茎>花>叶（图 6b）。

对烟草开花后表型进行观测，过表达 *PdMYB2* 的烟草植株开花后，6 个烟草株系的花色均比野生型的烟草花色为红色且显著变深（图 6c）。对过表达 *PdMYB2* 基因的烟草花瓣中烟草自身的 *NtCHS*、*NtCHI* 基因的变化量进行实时荧光定量 PCR 分析，结果表明：过表达 *PdMYB2* 基因后，烟草花瓣中 *NtCHS* 和 *NtCHI* 基因表达量明显上调（图 6d、e），且 *NtCHI* 的表达量上调水平高于 *NtCHS* 基因表达量，这说明在烟草中过表达 *PdMYB2* 基因确实影响了烟草类黄酮合成途径上基因的表达量。对过表达 *PdMYB2* 基因的烟草和野生型烟草进行花青素苷的定性定量分析，进一步验证表型的变化、类黄酮合成途径结构基因表达量的变化与类黄酮合成途径色素含量变化的一致性。对花青素苷含量进行绝对定量后，结果显示：与野生型相比，过表达 *PdMYB2*基因株系中大多数花青素苷成分都有不同程度的上调，其中，矢车菊素苷、天竺葵素苷、芍药花素苷和矮牵牛素苷显示出显著的上调差异（图 6f）。对单个色素成分及含量进行分析，矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷（Cyanidin-3-*O*-rutinoside）、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷（Cyanidin-3-*O*-glucoside）、天竺葵素-3-*O*-芸香糖苷（Pelargonidin-3-*O*-rutinoside）和飞燕草素-3-*O*-芸香糖苷-5-*O*-葡萄糖（Delphinidin-3-O-rutinoside-5-O-glucoside）的含量极显著增加，导致了花色的显著差异（图 6g）。

3　讨论

本研究的主要目的是了解滇牡丹类黄酮生物合成过程中的转录控制。本研究首次对滇牡丹中 MYB 转录因子家族成员进行鉴定，共鉴定到 64 个 MYB 基因家族成员，分别为 R2R3-MYB 成员 25 个，R1R2R3-MYB 1 个，4R-MYB 2 个，MYB-related 36 个，其中，R2R3-MYB 是植物中数目最多的一类，且能够调控植物类黄酮的生物合成[16]。拟南芥的 MYB 转录因子家族在植物中 MYB 转录因子家族功能研究较深入，笔者将滇牡丹的 R2R3-MYB 与拟南芥 R2R3-MYB 一起构建邻接树，由于 MYB 转录因子结构域的保守性，笔者认为处于相邻位置的滇牡丹 R2R3-MYB 转录因子与拟南芥 R2R3-MYB 转录因子具有更相似的结构，从而具有相似的功能。在拟南芥中，S4、S5、S6、S7 亚家族是跟色素合成相关的亚家族[32]。在第 4 亚家族中，*AtMYB3*、*AtMYB4*、*AtMYB32*[33-34]、*AtMYB8*[35]、*AtMYB6*、*AtMYB7*[36]



注：a：阳性转基因烟草株系 PCR 检测条带。b：*PdMYB2* 基因在 6 个转基因品系中的时空表达模式 c：烟草花在野生型和转基因株系间的表型特征。d：过表达 *PdMYB2* 基因后，烟草花中 *NtCHS* 基因的表达量变化。e：过表达 *PdMYB2* 基因后，烟草花中 *NtCHI* 基因的表达量变化。f：花色苷成分的热图分析。对含量进行了对数转换，并用 TBtools 软件包生成了热图。g：过表达 *PdMYB2* 后，花青素中主要色素成分含量的变化。b、d、e、g 中的数据是来自 3 个生物学重复的平均值。*表示差异显著（$P < 0.05$），**表示差异极显著（$P < 0.01$）

Notes: a: Electropherogram of positive PCR detection in transgenic tobacco lines. b: Temporal and spatial expression patterns of *PdMYB2* in the six transgenic tobacco lines. c: Phenotypic characterization of tobacco flowers between the wild type group and transgenic lines. d: After overexpression of *PdMYB2*, the expression quantity of *NtCHS* in tobacco flowers changed. e: After overexpression of *PdMYB2*, the expression quantity of *NtCHI* in tobacco flowers changed. f: Heatmap analysis of each anthocyanin component. The contents were log-transformed and used to generate a heatmap with the TBtools software package. g: After overexpression of *PdMYB2*, changes in the contents of main pigment components in anthocyanins. Data of b, d, e, g are the means (±SD) from three biological replicates.* indicate significant differences at the 0.05 level, ** indicate extremely significant differences at the 0.01 level

图 6 过表达 *PdMYB2* 基因烟草株系的功能分析

Fig. 6 Functional analysis of tobacco lines overexpressing *PdMYB2*

被证实可以作为转录激活因子和抑制因子。在第 5 亚家族中，*AtMYB123*（*TT2*）可以调控原花青素的积累[37]，苦荞麦中分离的 *TT2* 基因也有相同功能[38]。在第 6 亚家族中，过表达 *AtMYB75*、

AtMYB90[33] 可以导致花青素苷的积累。在第 7 亚家族中，*AtMYB11*、*AtMYB12*[33] 被证实可以调控黄酮醇的产生，甚至 *AtMYB12* 可以直接调控番茄组织中黄酮醇的产生[39]。由此，聚类在 S4 亚家族的 *PdMYB20*、*PdMYB29*、*PdMYB8*、*PdMYB7*、*PdMYB25*，聚类在 S5 亚家族的 *PdMYB1* 以及聚类在 S7 亚家族的 *PdMYB13*、*PdMYB26* 是后续研究的主要目标。

根据与拟南芥 R2R3-MYB 转录因子聚类结果及转录组表达量，笔者将 *PdMYB2* 基因从滇牡丹花瓣中分离出来。亚细胞定位显示，*PdMYB2* 定位在细胞核和细胞质中。通常 MYB 转录因子大多在核中定位，*PdMYB2* 在细胞质中的定位说明 *PdMYB2* 不完全进核，推测不但有转录因子功能，可能还有其他功能，比如与 bHLH 或 WD40 转录因子的互作，或者受诱导进核[40-42]。磷酸化是 MYB 蛋白重要的翻译后修饰。翻译后修饰建立了一种连接信号通路和反应的机制，根据信号，在适当的时间内调节蛋白质的表达和活性[43]。如磷酸化的 *RGPR-p117* 基因可以增强细胞中的调节钙蛋白 mRNA 表达，且 *RGPR-p117* 的表达模式为通过激素刺激后的蛋白激酶 C 信号传导介导后，在 NRK52E 细胞中从细胞质转运到细胞核[44]。本研究中，预测 *PdMYB2* 有 31 个磷酸化位点，包括 20 个丝氨酸、6 个苏氨酸和 5 个酪氨酸，并且 *PdMYB2* 被证明定位在细胞核和细胞质中，这与 *RGPR-p117* 相似。因此，推测 *PdMYB2* 可以通过磷酸化位点的磷酸化和去磷酸化的共价修饰决定其生理活性，这表明 *PdMYB2* 可能参与了细胞器功能的调节。

为进一步探明 *PdMYB2* 在类黄酮合成过程中的作用，利用叶盘法将 *PdMYB2* 基因转化进烟草中进行稳定表达。在稳定过表达 *PdMYB2* 的转基因烟草花瓣中，*NtCHI*、*NtCHS* 基因的表达量明显上调，且过表达 *PdMYB2* 后，*NtCHI* 表达上调的幅度大于 *NtCHS*，这可能是由于基因的级联效应造成的。

调控类黄酮合成途径的 MYB 基因已从多种植物中分离出来，不同的 MYB 转录因子可以引起不同种类的色素积累，其调控的酶基因也不相同。Kobayashi 等从四倍体巨峰葡萄中分离出的 *MybA* 基因通过表达 *UFGT* 基因参与葡萄花青素苷合成的调控[17]。Espley 等从苹果中分离出的 *MdMYB10* 基因在同源和异源系统中都能诱导花青素的积累，而且与 *MdbHLH3* 和 *MdbHLH33* 这 2 个 bHLH 蛋白共表达[18]。Chiou 等研究发现，文心兰 *OgMYB1*可以激活黄色唇瓣中的 *OgCHI* 和 *OgDFR* 的转录而诱导红色素的形成[19]。Tian 等研究发现，海棠中的 *McMYB10* 通过对海棠中 *McF3'H* 的正调控在红叶着色中起着重要作用[22]。由于 *PdMYB2* 在滇牡丹花瓣发育过程中呈现了高表达量，而纯黄滇牡丹花瓣中没有肉眼可见的红色素产生，笔者推测 *PdMYB2* 并不直接调控 CHI 基因的表达，而是通过调控 CHS 来调控下游基因的表达。Gu 等在牡丹中发现 1 个 R2R3-MYB 基因 *PsMYB12*，研究表明，*PsMYB12*与 bHLH 和 WD40 蛋白在直接激活 *PsCHS* 表达来调控花瓣斑点的形成[45]。在滇牡丹中 *PdMYB2*是否与 bHLH、WD40 互相作用以及是否直接与 CHS 作用，是后续研究的重点。

4　结论

本研究对滇牡丹中 MYB 转录因子家族的成员进行鉴定和分析。鉴定到 1 个 R2R3-MYB 转录因子 *PdMYB2*，通过对 *PdMYB2* 基因进行序列分析和功能验证，结果显示 *PdMYB2* 基因定位在细胞质和细胞核中，在类黄酮生物合成过程中对类黄酮的积累量具有正调控作用，在烟草中过表达 *PdMYB2* 可以促进花青苷的积累。对转基因烟草株系的 *NtCHS*、*NtCHI* 进行实时荧光定量 PCR 的分析，*PdMYB2* 可以提高 *NtCHS*、*NtCHI* 在花瓣中的表达量。

参考文献：

[1] 王莲英, 袁　涛. 中国牡丹品种图志: 续志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2015: 63-64.

[2] 李嘉珏, 张西方, 赵孝庆. 中国牡丹[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2011.

[3] 周　琳, 王　雁, 律春燕, 等. 云南野生黄牡丹花色素成分的鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39（8）：52-54.

[4] Bogs J, Downey M O, Harvey J S, *et al*. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves[J]. Plant Physiology, 2005, 139(2): 652-663.

[5] Leonard E, Chemler J, Lim K H, *et al*. Expression of a soluble flavone synthase allows the biosynthesis of phytoestrogen derivatives in Escherichia coli[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2006, 70(1): 85-91.

[6] Rademacher W. GROWTH RETARDANTS: Effects on gibber-

ellin biosynthesis and other metabolic pathways[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000, 51(51): 501-531.

[7] Schijlen E G, Vos C H, Tunen A J, *et al*. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants[J]. Phytochemistry, 2004, 65(19): 2631-2648.

[8] Sharma S B, Dixon R A. Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 2005, 44(1): 62-75.

[9] Zifkin M, Jin A, Ozga J, *et al*. Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism[J]. Plant Physiology, 2012, 158(1): 200-224.

[10] Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(2): 190-197.

[11] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. Plant Science, 2011, 181(3): 219-229.

[12] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5): 236-242.

[13] 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 confering abiotic stress tolerance in plants[J]. PloS ONE, 2013, 8: e69955.

[14] Lipsick J S. One billion years of *Myb*[J]. Oncogene, 1996, 13(2): 223-235.

[15] Ogata K, Morikawa S, Nakamura H, *et al*. Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DMA-binding domain from c-Myb[J]. Nature Structural Biology, 1995, 2: 309-320.

[16] Tang N, Chen X B. Research of MYB transcription factors in plant and abiotic stress response[J]. Journal of Biology, 2014, 31(3): 74-78.

[17] Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K C. M*yb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis[J]. Planta, 2002, 215(6): 924-933.

[18] Espley R V, Hellens R P, Putterill J, *et al*. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, *MdMYB10*[J]. Plant Journal, 2007, 49(3): 414-427.

[19] Chiou C Y, Yeh K W. Differential expression of MYB gene (*OgMYB1*) determines color patterning in floral tissue of oncidium gower ramsey[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 66(4): 379-388.

[20] Feng S Q, Wang Y L, Song Y, *et al*. Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a R2R3-*MYB* transcription factor *PyMYB10*[J]. Planta, 2010, 232(1): 245-255.

[21] Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, *et al*. Two R2R3-MYB genes, homologs of petunia *AN2*, Regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(3): 463-474.

[22] Tian J, Peng Z, Zhang J, *et al*. *McMYB10* regulates coloration via activating *McF3'H* and later structural genes in ever-red leaf crabapple[J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13(7): 948-961.

[23] Tuan P A, Bai S, Yaegaki H, *et al*. The crucial role of *PpMYB10.1* in anthocyanin accumulation in peach and relationships between its allelic type and skin color phenotype[J]. Bmc Plant Biology, 2015, 15(1): 1-14.

[24] Shi S, Liu Y, He Y, *et al*. R2R3-MYB transcription factor *SmMYB75* promotes anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 282: 110020.

[25] Colanero S, Perata P, Gonzali S. The atroviolacea gene encodes an R3-MYB protein repressing anthocyanin synthesis in tomato plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 830.

[26] Gates D J, Olson B J S C, Clemente T E, *et al*. A novel R3 MYB transcriptional repressor associated with the loss of floral pigmentation in *Iochroma*[J]. New Phytologist, 2017, 217(3): 1346-1356.

[27] Deng G M, Zhang S, Yang Q S, *et al*. *MaMYB4*, an R2R3-MYB repressor transcription factor, negatively regulates the biosynthesis of anthocyanin in banana[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 11: 600704.

[28] Paola-Naranjo R D D, José S, Ana M G, *et al*. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1054(1-2): 205-210.

[29] Alexander A D, Ghislaine H, Céline R, *et al*. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC-MS and LC-NMR[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 732: 145-152.

[30] De F M, Czank C, Saha S, *et al*. Methods for isolating, identifying, and quantifying anthocyanin metabolites in clinical samples[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(20): 10052-10058.

[31] Qinlong Z, Suize Y, Dongchang Z, *et al*. Development of "purple endosperm rice" by engineering anthocyanin biosynthesis in the endosperm with a high-efficiency transgene stacking system[J]. Molecular Plant, 2017, 10(7): 918-929.

[32] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-*MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4(5): 447-456.

[33] Kranz H D, Denekamp M, Greco R, *et al*. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 1998, 16(2): 263-276.

[34] Jin H L, Cominelli E, Bailey P, *et al*. Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*[J]. EMBO Journal, 2000, 19(22): 6150-6161.

[35] Romero I, Fuertes A, Benito M J, *et al*. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 1998, 1(4): 277.

[36] Li SF, Parish R W. Isolation of two novel *myb*-like genes from *Arabidopsis* and studies on the DNA-binding properties of their products[J]. Plant J, 1995, 8 (6) : 963-972.

[37] Nesi N, Jond C, Debeaujon I, *et al*. The *Arabidopsis TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed[J]. The Plant cell, 2001, 13(9): 2099-2114.

[38] Zhou M L, Yu T, Zhang K X, *et al*. Identification of *TT2* gene from floral transcriptome in *Fagopyrum tataricum*[J]. Food research international, 2013, 54(1): 1331-1333.

[39] Jie L, Butelli E, Hill L, *et al*. *AtMYB12* regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol[J]. Plant Journal, 2010, 56(2): 316-326.

[40] Matus J T, Poupin M J, Cañón P, *et al*. Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.)[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 72(6): 607-620.

[41] Sompornpailin K, Makita Y, Yamazaki M, *et al*. A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50(3): 485-495.

[42] De V N, Quattrocchio F, Mol J, *et al*. The *AN11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals[J]. Genes Dev, 1997, 11(11): 1422-1434.

[43] Krishna R G, Wold F. Post-translational modification of proteins[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1993, 67: 265-298.

[44] Yamaguchi M. Novel protein rgpr-p117: its role as the regucalcin gene transcription factor[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2009, 327(1-2): 53-63.

[45] Gu Z Y, Zhu J, Hao Q, *et al*. A novel R2R3-MYB transcription factor contributes to petal blotch formation by regulating organ-specific expression of *PsCHS* in tree peony *(Paeonia suffruticosa*)[J]. Plant and Cell Physiology, 2019, 60(3): 599-611.

Identification of MYB Family Members and Functional Verification of *PdMYB2* in *Paeonia delavayi*

ZOU Hong-zhu, *HAN Lu-lu*, *ZHOU Lin*, *LV Ji-hang*, *JIA Ying-hua*, *WANG Yan*

(State Forestry Administration, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing　10091, China)

Abstract: [**Objective**] The role of MYB transcription factor family in pigment formation of yellow *Paeonia delavayi* flowers was analyzed to provide candidate genes for color improvement and molecular breeding of tree peony. [**Method**] In this study, members of MYB gene family of *P. delavayi* were identified and classified based on the transcriptome data of petals. One member of R2R3-MYBs, *PdMYB2*, was selected as a candidate gene according to phylogenetic tree, homologous sequence alignment and gene differential expression analysis. The function of *PdMYB2* was analyzed by subcellular localization, qRT-PCR, transient overexpression, transgenic tobacco and LC-MS/MS. [**Result**] A total of 64 MYB genes were identified, including 25 R2R3-MYBs, one R1R2R3-MYBs, two 4R-MYBs and 36 members of MYB-related. The PdMYB2 was found to express in the nucleus and cytoplasm. Overexpression of *PdMYB2* in tobacco increased anthocyanin accumulation and up-regulated the expression of anthocyanin-related structural genes *NtCHS* and *NtCHI* in petals and leaves. [**Conclusion**] *PdMYB2* plays a positive regulatory role in the flavonoid biosynthesis pathway, which can promote the accumulation of anthocyanins and increase the expression of structural genes in the flavonoid pathway.

Keywords: *Paeonia delavayi*; flower color; MYB transcription factor family; *PdMYB2*; Functional verification

（责任编辑：张　研）