



大豆 *Glyma. 18G261700* 基因生物学分析及功能初探

苏林豪, 宋 勇, 郭尚敬

(聊城大学 农学院, 山东 聊城 252000)

摘 要: MYB 是参与花青素合成的重要调控基因, 数量众多且功能多样。为分析大豆中与花生黑色种皮调控基因 *AhTc1* (MYB 家族) 同源基因的功能, 本研究根据 *AhTc1* 基因序列信息, 同源克隆大豆 MYB 家族基因 *Glyma. 18G261700*, 对其进行生物信息学分析, 并检测不同种皮颜色大豆苗期不同部位花青素和基因表达量。结果显示: *Glyma. 18G261700* 全长 1 572 bp, 编码 189 个氨基酸, 属于 R2R3 型 MYB。*AhTc1* 编码的蛋白为疏水性蛋白, 而 *Glyma. 18G261700* 与之不同, 编码的蛋白为亲水性蛋白。三级结构中 *Glyma. 18G261700* 与 *AhTc1* 尾部有所区别, 在调控种皮颜色中可能具有不同功能。不同种皮颜色大豆幼苗根部花青素含量较低, 而 *Glyma. 18G261700* 基因的表达量较高, 表明在大豆幼苗期该基因的大量表达可能抑制根部花青素的合成, 但对种皮颜色的调控还需进一步探索。

关键词: 大豆; *Glyma. 18G261700*; 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达分析; 花青素含量

Cloning and Biological Function Analysis of Soybean *Glyma. 18G261700* Gene

SU Lin-hao, SONG Yong, GUO Shang-jing

(College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

Abstract: MYB is an important regulatory gene involved in the synthesis of anthocyanins, with numerous and diverse functions. In order to analyze the function of the homologous genes of *AhTc1* (MYB family) in soybean and the regulatory gene of black seed coat of peanut, this study cloned the MYB family gene *Glyma. 18G261700* based on the sequence information of *AhTc1* gene, carried out the analysis of biological information on *Glyma. 18G261700*, and detected anthocyanin and gene expression in different parts of soybean seedlings with different seed coat colors. The results showed that *Glyma. 18G261700* gene was 1 572 bp full length, encoded 189 amino acids, and was belonged to R2R3-MYB. The protein encoded by *AhTc1* was a hydrophobic protein, but the protein encoded by *Glyma. 18G261700* was a hydrophilic protein. In the tertiary structure, the tails of *Glyma. 18G261700* and *AhTc1* were different, and may have different functions in regulating the color of the seed coat. The root anthocyanin content in roots of soybean seedlings with different seed coat colors was lower, while the expression of the *Glyma. 18G261700* gene in their roots tended to be higher. The results showed that the high expression of this gene inhibited anthocyanin synthesis in soybean roots at seedling stage, but the regulation of seed coat color should be further explored.

Keywords: soybean; *Glyma. 18G261700*; gene cloning; bioinformatics analysis; gene expression analysis; anthocyanin content

大豆 (*Glycine max* L.) 种皮颜色、植株外观与商品关系密切, 花青素是导致大豆种皮颜色差异的物质之一, 在抵抗低温胁迫、抗氧化、抗病虫害等方面具有一定作用, 是大豆育种及后代鉴评的重要形态标记^[1]。花生、拟南芥、烟草和矮牵牛等植物花青素的合成代谢途径已被清楚解析^[2-3]。

花青素是通过花青素合成酶 (ANS) 和尿苷二磷酸类黄酮葡萄糖基转移酶的连续作用产生的; 另外一个途径是通过 ANS 介导的花青素还原酶 (ANR) 产生原花青素^[4-5]。花青素的转录激活由 MBW 复合物成员介导, 尤其是 bHLH 和 MYB 转录因子, 如 PAPA1、TTG1 和 TT8, 它们受温度和其他环境因素的调节^[6-7]。种皮、种脐和短柔毛 (毛状毛) 的色素沉着由 3 个独立位点 I、T 和 R 决定^[8]。I 位

点控制黄色种皮, T 位点编码类黄酮 39 羟化酶 (F39H) 基因, 其表达驱动花青素-原花青素途径分支的合成^[9]。R 位点编码 MYB 转录因子, 造成不同种皮颜色差异, RM55- γ^m 是突变等位基因 (γ^m) 的纯合子, 该等位基因控制黑色和棕色条纹种皮颜色; RM38- γ 控制棕色种皮颜色, 因为隐性 γ 等位基因可以翻译截短体 MYB 蛋白^[10]。Zabala 等^[9]已经证实了 *Glyma. 09g36983* 是在大豆 R 基因座上控制大豆种皮黑色的关键基因。且 R 位点 MYB 和 ANS 基因的差异表达支持其作为黑大豆种皮花青素合酶诱导剂的作用。由 R 编码的 MYB 基因在黑色种皮中仅以非常低的水平表达, 但它上调花青素合成酶基因 (ANS2、ANS3) 的表达以促进花青素合成。

大量研究表明 MYB 转录因子影响植物体各组

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 山东省农业科技园区产业提升工程项目 (2019YQ035); 聊城大学博士科研基金 (318051820)。

第一作者: 苏林豪 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事分子遗传育种研究。E-mail: 2013342143@qq.com。

通讯作者: 郭尚敬 (1970—), 男, 博士, 教授, 主要从事分子遗传育种研究。E-mail: guoshangjing@lcu.edu.cn;

宋勇 (1983—), 男, 博士, 讲师, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: songyong@lcu.edu.cn。

织颜色^[11]。拟南芥 *AtMYB75* (PAP1) 基因调控叶片产生花青素^[12-13],促进叶片颜色积累;番茄 *AtMYB75* 通过促进 *DFR* 的表达,诱导产生花青素促进番茄颜色形成^[14]。*MYB75* 被证明是与花青素合成有关的调控因子,在拟南芥和烟草中过量的 *MYB75* 表达导致 *PAL*、*CHS* 和 *DFR* 基因的上调^[15-17]。Javier 等^[18] 首次在玉米中发现了与花青素合成有关的 *MYB* 基因 *ZmMYB1*。在小麦中,相关 R2R3-MYB 和 bHLH 转录因子的互作可促进种皮中花青素的合成,使小麦籽粒颜色变为紫色^[19-20]。

目前,已在大豆中预测分析出 127 个 1R-MYB、244 个 2R-MYB 和 6 个 3R-MYB^[21]。大豆颜色类型多样,利用经典遗传学方法明确的 9 个遗传位点 I、R、T、O、W1、K1、G、D1 和 D2 分别位于 8、9、6、8、13、11、1、1 与 11 号染色体上^[1, 22-23]。其中 R2R3MYB 转录因子位于 R 位点,可调控花青素合成酶基因的表达^[24-25]。

Zhao 等^[26] 在紫色种皮花生中发现 *AhTcl* (*Ahy. J3K16K*) 的表达量上调,*AhTcl* 转基因烟草各部位呈现紫色,并且 *AhTcl* 基因编码蛋白是一种 R2R3-MYB 转录因子。本研究前期根据 *AhTcl* 基因从 NCBI 中同源检索到大豆基因 *Glyma. 18G261700*,为进一步研究该基因是否对大豆种皮颜色存在调控作用,对 *Glyma. 18G261700* 基因进行生物信息学分析,并探讨不同种皮颜色大豆的不同部位中花青素含量与该基因表达量的关系,旨在为探究大豆种皮颜色调控机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆为齐黄 34 (种皮颜色为黄色)、20LCA0075 (种皮颜色为黑色)、20LCA0341 (种皮颜色为红色) 和 20LCA0351 (种皮颜色为绿色),大肠杆菌 (*Escherich coli*) 感受态菌株 DH5 α ,均由聊城大学农作物种质资源创新研究院保存并提供。

Plant RNA Kit 购自北京 Bio-teke 公司,胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司,Prime STAR GXL DNA Polymerase、DNA 5 000 bp Marker、T4 DNAligase、DNA 2 000 bp Marker 和 Plant RNA Kit 购自北京 Bio-teke 公司,目标片段测序由青岛擎科有限公司完成。HiScript II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)、2 \times Phanta[®] Max Master Mix 和 qRT-PCR 预混液 ChamQ Universal SYBP qPCR Master Mix 购自 Vazhyme 公司。

1.2 主要仪器与设备

UV-8000 紫外分光光度计 (上海元析仪器有限公司);WGL-30B 电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司);CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪 (96 孔,美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 大豆叶片 DNA 提取 配制巯基乙醇 CTAB 混合液^[27],取制备的混合液于研钵中,研磨新鲜大豆叶片。取 1 mL 研磨溶液于离心管中,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min (每 2 min 混匀一次),加氯仿 300 μL ,混匀后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min,上清液转移到另一个离心管,加入 0.6 倍上清液体积的异丙醇,混匀并放置 2 min,再次离心 10 min,弃掉上清液。加入 0.6 倍上清液体积的 75% 乙醇,清洗后离心 5 min,倒出乙醇晾干,加 TE-Buffer 保存。

1.3.2 目的条带 PCR 扩增 以大豆 DNA 为模板,利用 DNAMAN 设计目的片段的特异性引物 MYB-F (5' -AACACGGGGGACTCTTGACCATGGAAGGACC-ATCAGGTGTG-3') 和 MYB-R (5' -AGCTGGTCACCAATTACACCTAGGGAAGTTTGAAGATCTTA-3')。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。使用 1% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,并对目的条带测序。

1.3.3 生物信息学分析 从大豆和花生基因组序列中分别获取 *Glyma. 18G261700* 与 *AhTcl* 起始密码子上游 2 000 bp 序列,作为启动子区域。将启动子序列提交至 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站,分析顺式作用元件。利用 MEGA 7.0 软件,采用遗传距离建树法的邻位连接法,将重复设定为 1 000,构建系统进化树。采用在线程序 ProParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质理化性质;在 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) 进行保守结构域及蛋白家族预测;利用在线工具 ProtScale (<http://web.expasy.org/ProScale/>) 进行蛋白质疏水性分析。利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsasopma.html) 预测蛋白质二级结构;利用在线工具 Swiss-Mode (<https://swissmodel.expasy.org/interactive/F4hC59/models/>) 构建蛋白质三级结构模型。利用 SignalP-4.1 预测蛋白信号肽;利用 TMpred 软件分析蛋白跨膜区域。

1.3.4 植物花青素含量测定 参照 Serrano 等^[28]的方法测定大豆花青素含量,分别将种皮与生长 7 d 的 4 个品种大豆根、茎和叶磨成粉末,加入酸性甲醇,4 ℃ 过夜提取。第 2 天 4 ℃ 离心 1 min,上清液置于新的离心管中,加入 1 mL 三氯甲烷,再加 400 μL 蒸馏水,离心 10 min,上清液用于花青素含量测定。利用分光光度计分别测定 530 nm 与 657 nm 处的吸光度。花青素含量 = (OD₅₃₀ - 0.25 OD₆₅₇)/M,其中,M 为样品质量(g)。设置 3 组生物学重复,每组重复测量 3 次。

1.3.5 基因相对表达量分析 利用在线软件 Primer-BLAST 设计 *Glyma. 18G261700* 基因荧光定量 PCR 引物 (F: 5'-GGGAAACAGATGCTCCCTG-3'; R: 5'-GATAGAGTTCGAGGAACAGGC-3'),以 F-box 为内参基因^[29],使用 Vazyme 公司的 ChamQ Universal SYBP qPCR Master Mix 荧光染料进行 qRT-PCR,检测候选基因的相对表达水平。qRT-PCR 程序:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 40 个循环。

1.4 数据分析

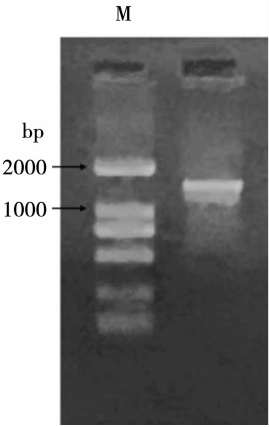
利用 CFX Manager 3.1 软件对数据进行分析,采用 Excel 2016 和 SPSS statistics 23 进行标准偏差计算与方差分析,利用 GraphPad Prism 5.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 *Glyma. 18G261700* 基因克隆

如图 1 所示,以基因特异性引物从供试大豆中

扩增到 1 条 1 500 bp 左右的亮带。测序与分析结果显示,该片段与 Willima 的 *Glyma. 18G261700* 基因序列的匹配度为 99%,序列全长为 1 582 bp,编码 189 个氨基酸。



注:M. 2 000 bp Marker.

图 1 目的片段琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of the target fragment

2.2 *Glyma. 18G261700* 基因生物信息学分析

2.2.1 同源性比较与系统进化树建立 从 NCBI 数据库选取花生和大豆中与 *AhTc1* 同源性较高的 MYB 蛋白序列 LOC112782321、LOC112716419、*Glyma. 09G235100*、*Glyma. 09G234900*、*Glyma. 18G-262000*、*Glyma. 09G235300* 和 *Glyma. 19G025000*。序列对比结果表明,这些序列在 N 端区域有非常高的保守性,均含有 R2R3 型 DNA 结合结构域(图 2)。系统进化树显示,*Glyma. 18G261700* 与 *AhTc1* 不在同一个分支,亲缘关系较远(图 3)。

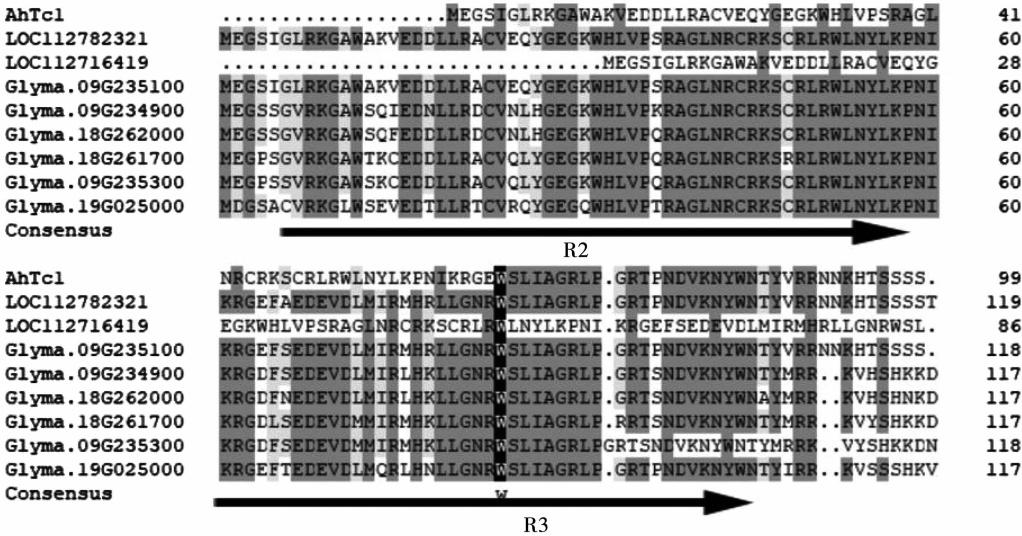


图 2 基因编码序列保守结构域比对

Fig. 2 The conserved domain sequence alignment of the encoded protein

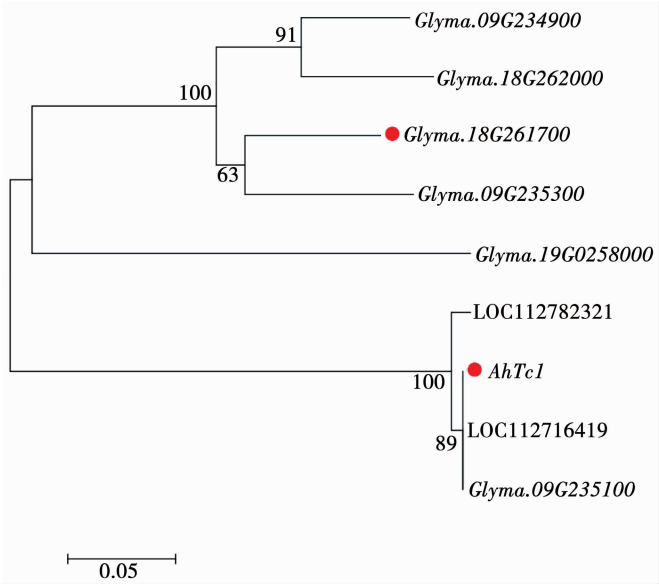


图3 大豆和花生中相似 MYB 系统进化分析

Fig. 3 The phylogenetic tree of related MYB in soybean and peanut

2.2.2 启动子序列顺式作用元件分析 对 *AhTc1* 与 *Glyma. 18G261700* 顺式作用元件进行分析的结果如表 1 所示,包含的顺式作用元件主要为两类:一类是与逆境响应相关的元件;另一类是与光信号相关的元件。两个基因顺式作用元件的数量一致,光响应元件数量明显多于其他顺式作用元件。推测 *AhTc1* 与 *Glyma. 18G261700* 可能受光信号调控,并在植物逆境响应过程中发挥重要作用。

表 1 *AhTc1* 与 *Glyma. 18G261700* 启动子顺式作用元件分析

Table 1 The *cis*-elements on the promoters of *AhTc1* and *Glyma. 18G261700*

名称 Name	序列 Sequence	作用 Function	数量 Number	
			<i>AhTc1</i>	<i>Glyma. 18G261700</i>
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸响应元件	1	1
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸响应元件	1	1
ABRE	ACGTG	脱落酸响应元件	1	1
Box 4	ATTAAT	光响应元件	1	1
G-box	TACGTG	光响应元件	1	1
GA-motif	ATAGATAA	光响应元件	1	1
GATA-motif	GATAGGA	光响应元件	1	1
TCT-motif	TCTTAC	光响应元件	1	1
CAAT-box	CAAT	启动子和增强子区域顺式作用元件	1	1
ARE	AAACCA	厌氧诱导元件	1	1

2.2.3 蛋白理化性质及结构分析 理化性质预测结果表明,*Glyma. 18G261700* 蛋白等电点大于 9,为碱性氨基酸序列^[30];亮氨酸(Leu)含量最高,占 10.2%;蛋白不稳定指数为 40.9,为不稳定蛋白(表 2)。

表 2 *AhTc1* 与 *Glyma. 18G261700* 蛋白的理化性质分析

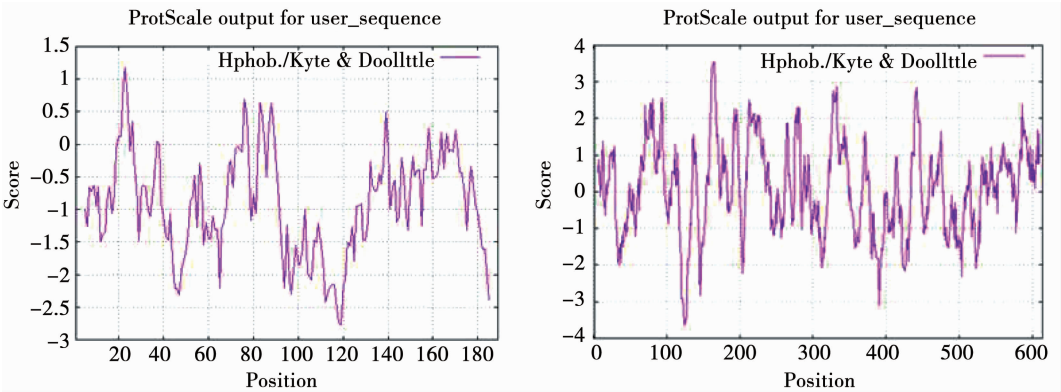
Table 2 The analysis of physical and chemical properties of *AhTc1* and *Glyma. 18G261700*

名称 Name	分子量 Molecular weight/Da	氨基酸及其含量 Amino acid and its content/%	不稳定指数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	疏水性平均值 GRAVY
AhTc1	73289.32	Ile(12.2)、Leu(12.9)、Lys(9.4)、Asn(8.0)	41.27	110.65	0.114
Glyma. 18G261700	26814.35	Leu(10.2)、Lys(8.1)、Gly(8.1)、Asn(7.7)	40.90	72.64	-0.735

Glyma. 18G261700 蛋白平均亲水性系数为 -0.735,为亲水性蛋白;AhTc1 蛋白平均亲水性系数为 0.114,为疏水性蛋白(图 4)。

Glyma. 18G261700 蛋白主要二级结构元件中无规则卷曲所占比例最高,为 49.2%;在 AhTc1 蛋白

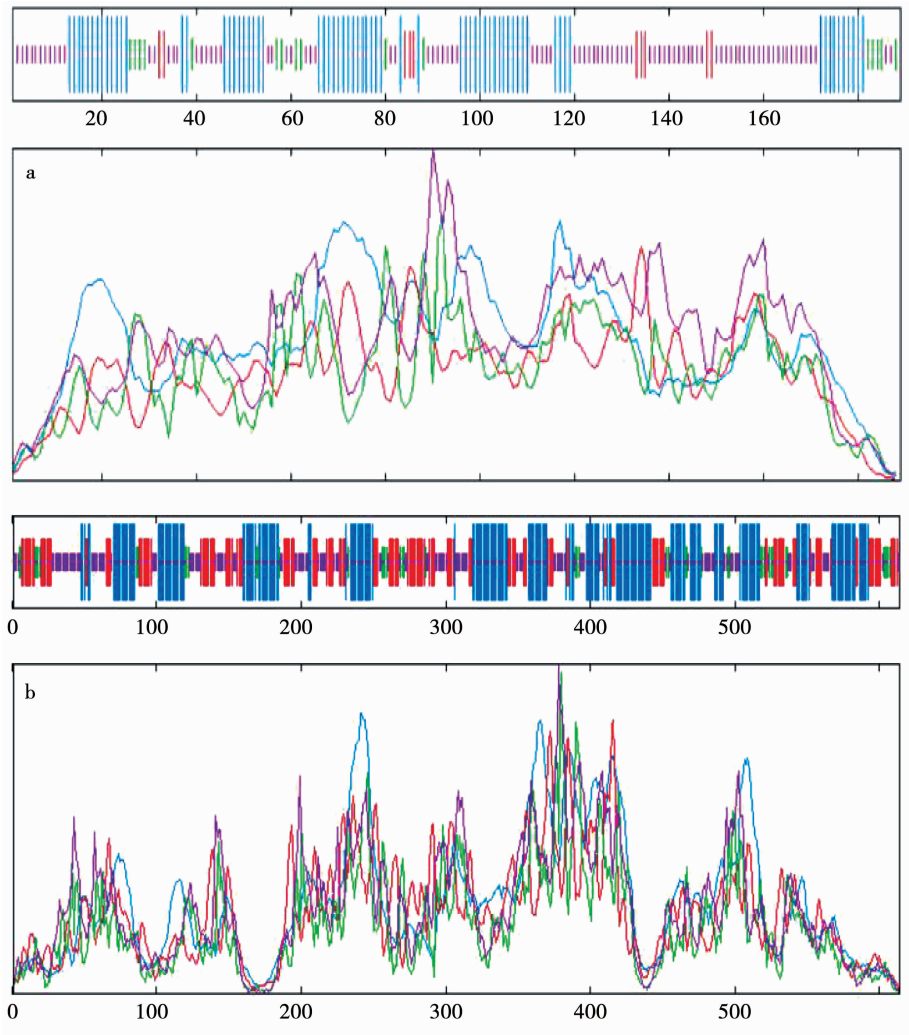
中, α -螺旋所占比例最高,为 38.6%(图 5)。 α -螺旋是蛋白质二级结构中十分稳定的形式,因此 AhTc1 蛋白稳定性高于 Glyma. 18G261700 蛋白。通过在线程序 Swiss-Mode(<http://swissmodel.expasy.org/>)对蛋白三维结构进行同源模拟的结果如图 6 所示。



注:a. Glyma. 18G261700;b. AhTc1。

图 4 蛋白疏水性预测分析

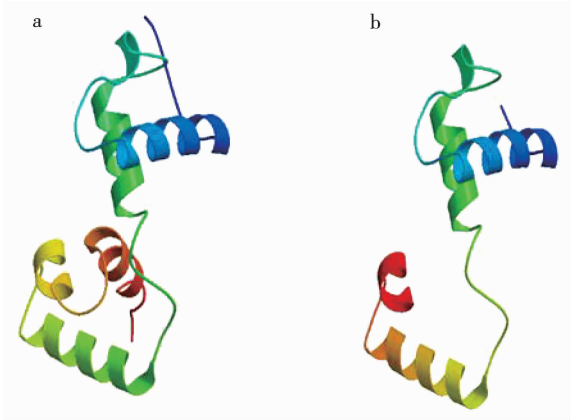
Fig.4 The forecast analysis of MYB protein hydrophobicity



注:a. Glyma. 18G261700;b. AhTc1。

图 5 蛋白二级结构预测

Fig.5 The prediction of protein secondary structure



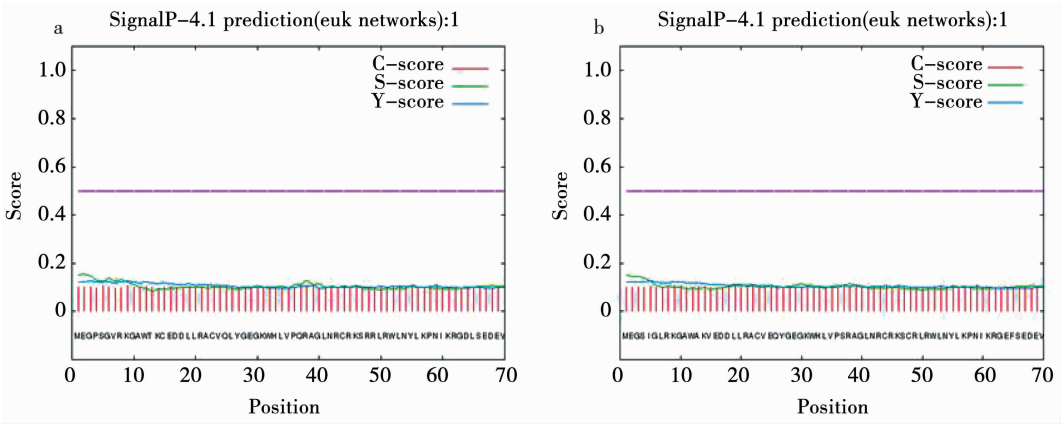
注:a. Glyma. 18G261700;b. AhTc1。

图6 蛋白三级结构预测

Fig. 6 The prediction of protein tertiary structure

2.2.4 编码蛋白序列信号肽及跨膜分析 SignalP-4.1 预测结果表明 AhTc1 与 Glyma. 18G261700 蛋白均不含信号肽(图7)。TMpred 软件在线分析蛋白

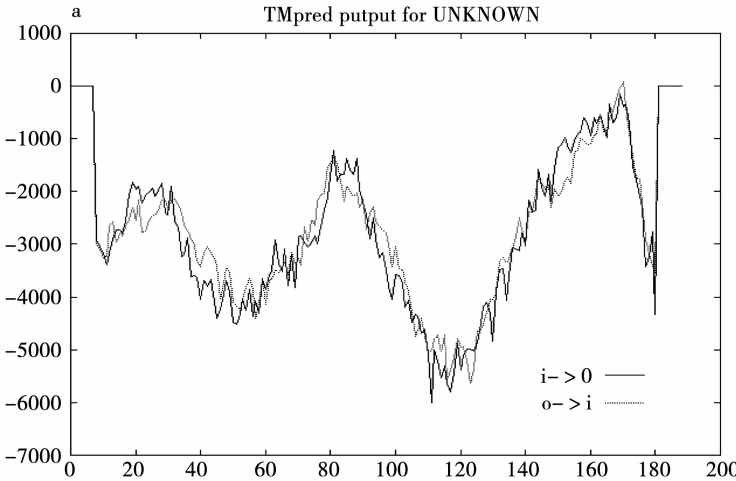
跨膜区域结果表明, Glyma. 18G261700 蛋白与 AhTc1 蛋白均无跨膜区域(图8)。

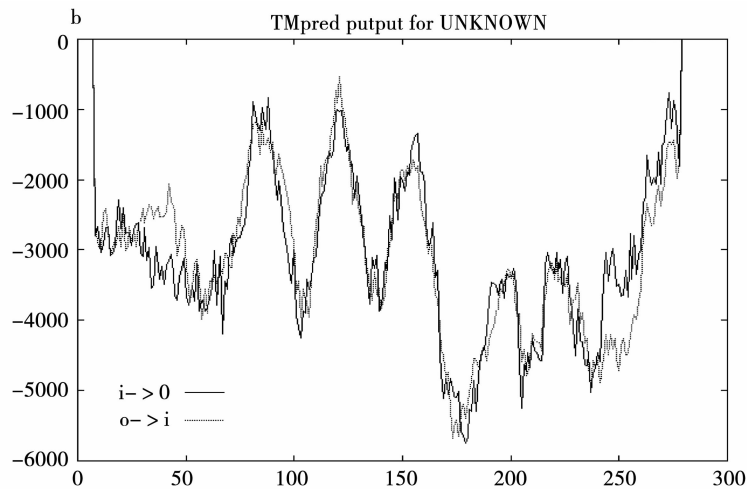


注:a. Glyma. 18G261700;b. AhTc1。

图7 蛋白信号肽预测

Fig. 7 The prediction of protein signal peptide





注: a. Glyma. 18G261700; b. AhTc1。

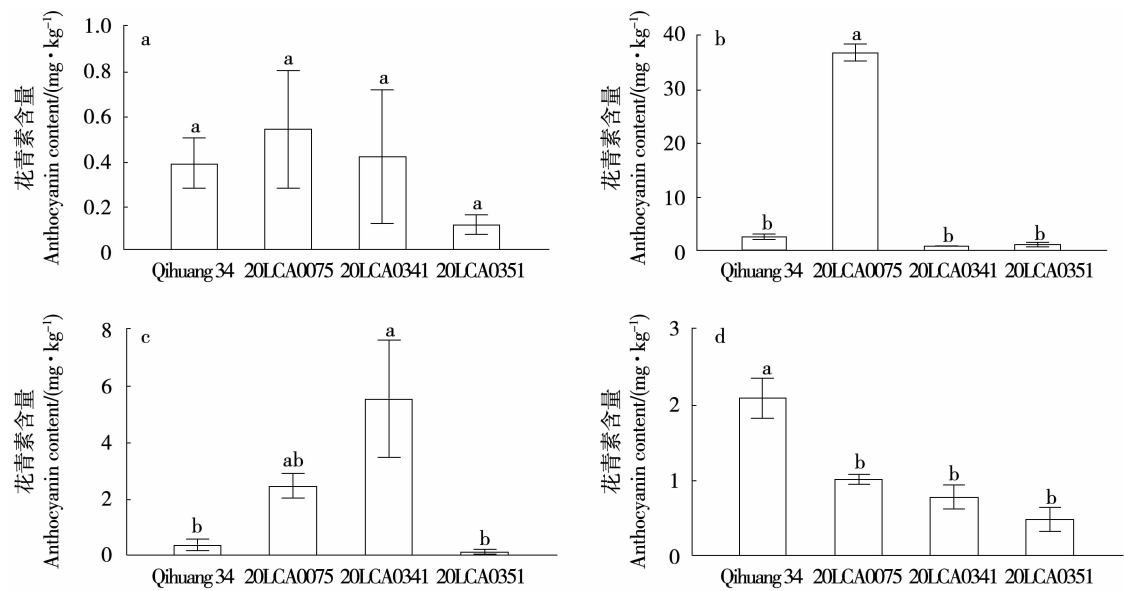
图 8 蛋白跨膜结构

Fig. 8 The transmembrane structure of the proteins

2.3 基因表达量与种皮颜色关系分析

2.3.1 各品种不同部位花青素含量分析 所有供试品种根部花青素含量均较低,且品种之间没有明显差异;20LCA0075 种皮花青素含量显著高于其他

品种;20LCA0341 茎部花青素含量显著高于齐黄 34 和 20LCA0351;齐黄 34 叶部花青素含量显著高于其他品种(图 9)。



注: a. 根部; b. 种皮; c. 茎部; d. 叶片。不同小写字母表示品种间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

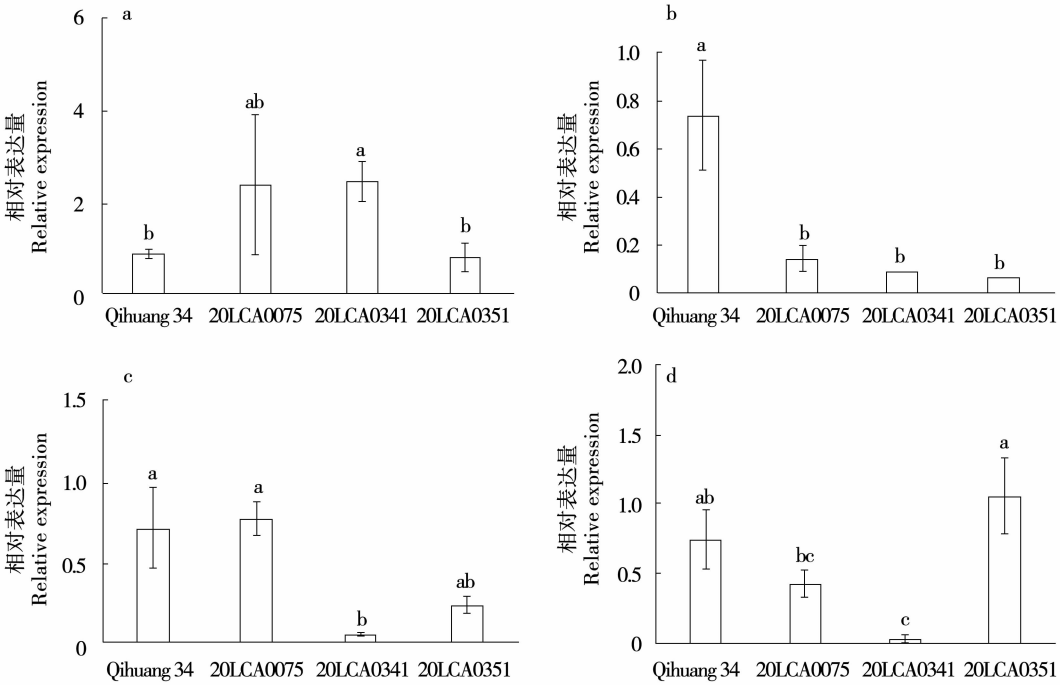
Note: a. Root; b. Seed coat; c. Stem; d. Leaf. Different lowercase indicate significant difference between varieties ($P < 0.05$). The same below.

图 9 各品种不同部位花青素含量

Fig. 9 The anthocyanin content in different parts of different varieties

2.3.2 各品种不同部位基因表达分析 各品种 *Glyma. 18G261700* 基因在根中相对表达量较高,其次是茎。*Glyma. 18G261700* 在 20LCA0075 根部相对表达量较高,茎部其次,种皮最少。在 20LCA0341

中,该基因在根中表达较高,其他组织中微量表达;在 20LCA0351 中,叶与根中相对表达量均较高,种皮最少。*Glyma. 18G261700* 在齐黄 34 种皮中表达量最高,茎部和叶部相对较低(图 10)。



注: a. 根部; b. 种皮; c. 茎部; d. 叶片。
Note: a. Root; b. Seed coat; c. Stem; d. Leaf.

图 10 不同品种和部位中 *Glyma. 18G261700* 相对表达量
Fig. 10 The relative expression of *Glyma. 18G261700* in different parts of different varieties

结合花青素含量测定结果,20LCA0341 茎中的花青素含量高于其他品种,而基因表达量最低;齐黄 34 的种皮颜色为黄色,花青素含量较其他品种低,而基因表达量最高。4 个品种中表现出根部花青素含量较低,而该基因表达量较高的趋势,因此推测在大豆幼苗期该基因的高表达量抑制了根部花青素合成。

3 讨论

本研究根据控制花生黑色种皮基因 *AhTc1* 的序列信息,同源克隆出大豆 MYB 家族基因 *Glyma. 18G261700*;并对其进行生物信息学分析,结果显示 *Glyma. 18G261700* 全长 1 572 bp,编码 189 个氨基酸;*Glyma. 18G261700* 基因含有 1 个 R2R3 结构域,属于 R2R3 型 MYB。在启动子顺式作用元件中,*Glyma. 18G261700* 和 *AhTc1* 的响应元件一致。在蛋白质理化性质中,*Glyma. 18G261700* 为亲水性蛋白,而 *AhTc1* 为疏水性蛋白。*Glyma. 18G261700* 蛋白主要二级结构元件中无规则卷曲所占比例最高,*AhTc1* 蛋白 α -螺旋所占比例较高。三级结构中,*Glyma. 18G261700* 与 *AhTc1* 尾部有所区别。系统进化树显示,*Glyma. 18G261700* 与 *AhTc1* 同源性不高,反而与 *Glyma. 09G235100* 同源性较高。Li 等^[31] 在紫色豇豆豆荚中发现 3 个 R2R3MYB 调节因子,ATPasp 2/MYB90 和单基因 *Glyma. 09G235100* 的高

倍数上调是豇豆紫荚表型的原因。推测 *Glyma. 18G261700* 与 *AhTc1* 在调控花青素方面可能发挥不同功能。

本研究通过对 4 个品种大豆幼苗不同部位(根、茎、叶)花青素含量比较,发现根部花青素含量最低,但存在根部该基因表达量较高的趋势,这可能与 R2R3-MYB 转录因子不仅能促进花青素合成,也能抑制花青素合成进而减少花青素积累有关。正调控和负调控作用的相互结合能够维持植物体内花青素的平衡^[32]。研究发现的第一个具有负调控作用的 R2R3-MYB 类转录因子是金鱼草中的 AmMYB308,AmMYB308 的过量表达可以抑制苯丙烷的代谢^[33],从而抑制了花青素合成调控。R2R3-MYB 类转录因子抑制花青素合成有两种作用方式,其中一种可以直接作用于结构基因的启动子,使结构基因表达量下调,花青素积累减少;另一种借助辅助因子 bHLH 抑制 MBW 复合物的表达,从而在花青素合成中起到负调控作用^[34]。目前已在拟南芥^[35]、大叶杨^[36]、苹果^[37]、水仙^[38] 和桑树花^[39] 等许多植物中证明 R2R3-MYB 类转录因子抑制花青素合成。

本研究对大豆种皮的花青素含量和 *Glyma. 18G261700* 相对表达量进行了分析,发现齐黄 34 (黄色种皮)种皮花青素含量较低,而 *Glyma. 18G261700* 相对表达量较高,和其他部位的调控机

制一致, *Glyma. 18G261700* 的高表达量抑制了花青素的合成。同时, 在 4 个品种中 20LCA0341 (黑色) 种皮花青素含量最高, 但 *Glyma. 18G261700* 相对表达量较低, 这与黑色大豆种皮颜色的形成主要与花青素和原花青素生物合成途径的酶密切相关^[23] 的研究结果一致, 推测该基因的表达量与花青素含量为负调控关系, 从而影响黄色、黑色大豆种皮颜色的形成。在从野生大豆到栽培大豆进化过程中 I 位点是重要的驯化位点, 出现大片段反转、重复插入等, 存在基因结构变异, 同时存在 RNA 干涉现象^[34-40], 导致种皮色从黑到黄的变化^[41]。T 位点有等位基因的序列变化^[42], 同时存在转座子插入调控, 导致同株不同色现象^[43]。R 位点调控机制更为复杂, 包括单碱基缺失、转座子插入、甲基化程度的改变^[44] 等。徐金瑞等^[45] 的研究表明深色大豆种子含有多多种花色苷, 种质资源间花色苷组分含量差异显著, 抗氧化能力也不尽相同; 大豆中花色苷含量受多基因调控, 表现出数量性状的遗传特征。位点间互作、基因间的调控以及类黄酮代谢通路, 共同构成种皮色调控网络^[46], 本研究对大豆 *Glyma. 18G261700* 基因进行了结构分析以及其部分生物学功能验证, 目前的数据尚不足分析大豆种皮颜色的调控机制, 后续将研究该基因在调控大豆种皮颜色中的功能。

4 结论

本研究克隆了大豆 MYB 家族基因 *Glyma. 18G261700*, 属于 R2R3 型 MYB。 *Glyma. 18G261700* 与 *AhTc1* 基因存在结构差异, *Glyma. 18G261700* 编码的蛋白为亲水性蛋白, *AhTc1* 编码的蛋白为疏水性蛋白。蛋白三级结构中 *Glyma. 18G261700* 与 *AhTc1* 尾部有所区别。不同种皮颜色大豆不同部位花青素含量与 *Glyma. 18G261700* 相对表达量分析, 表明在大豆幼苗期该基因的高表达量抑制根部花青素合成。推测 *Glyma. 18G261700* 在大豆幼苗期发挥一定种皮颜色调控作用。

参考文献

[1] YANG K, JEONG N, MOON J K, et al. Genetic analysis of genes controlling natural variation of seed coat and flower colors in soybean[J]. Journal of Heredity, 2010, 101(6): 757-768.

[2] BALDONI E, GENGA A, COMINELLI E. Plant MYB transcription factors: Their role in drought response mechanisms [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(7): 15811-15851.

[3] 李海芬, 邱金梅, 陈小平, 等. 花生花青素合成相关基因的表达与种皮颜色关系[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(5): 600-605. (LI H F, QIU J M, CHEN X P. Differential expression of genes associated with anthocyanin synthesis in peanut cultivars

with different testa color [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2017, 39(5): 600-605.)

[4] FUJIWARA Y, KONO M, ITO A, et al. Anthocyanins in perilla plants and dried leaves [J]. Phytochemistry, 2018, 147: 158-166.

[5] DONG T T, HAN R P, YU J W, et al. Anthocyanins accumulation and molecular analysis of correlated genes by metabolome and transcriptome in green and purple asparagus (*Asparagus oicinalis*, L.) [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 18-28.

[6] ZHENG T, TAN W R, YANG H, et al. Regulation of anthocyanin accumulation via MYB75/HAT1/TP1-mediated transcriptional repression[J]. PLoS Genetics, 2019, 15(3): e1007993.

[7] 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]. Plant Cell, 2001, 13(9): 2099-2114.

[8] TODD J J, VODKIN L O. Duplications that suppress and deletions that restore expression from a CHS multigene family[J]. Plant Cell, 1996, 8: 687-699.

[9] ZABALA G, VODKIN L. Cloning of the pleiotropic T locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 39 hydroxylase [J]. Genetics, 2003, 163: 295-309.

[10] GRACIA Z, Vodkin L O. Methylation affects transposition and splicing of a large CACTA transposon from a MYB transcription factor regulating anthocyanin synthase genes in soybean seed coats [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111959.

[11] WANG H Y, WANG H L, SHAO H B, et al. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 67.

[12] BOREVITZ J O, XIA Y, BLOUNT J, et al. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. Plant Cell, 2000, 12: 2383-2393.

[13] ZULUAGA D L, GONZALI S, LORETI E, et al. *Arabidopsis thaliana* MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants [J]. Functional Plant Biology, 2008, 35(7): 606-618.

[14] KIFERLE C, FANTINI E, BASSOLINO L, et al. Tomato R2R3-MYB proteins SIAN1 and SIAN2: Same protein activity, different roles[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136365.

[15] TOHGE T, NISHIYAMA Y, HIRAI M Y, et al. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor [J]. The Plant Journal, 2005, 42(2): 218-235.

[16] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Science, 2010, 15: 573-581.

[17] KATIYAR A, SMITA S, LENKA S K. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis* [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 544-563.

[18] JAVIER P A, DEBABROTA G, UDO W, et al. The regulatory *cl* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators[J]. The EMBO Journal, 1987, 6(12): 3553-3558.

[19] 蒋文慧. 小麦中调控胚芽鞘与籽粒花青素合成相关基因的筛选及其功能验证[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018: 1-52. (JIANG W H. Screening and functional identification of genes

related to coleoptile and grain anthocyanin synthesis in wheat [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2018: 1-52.)

[20] PENG X X, BAI N N, WANG H H. Isolation and expression profiles of cadmium stress-responsive rice WRKY15 transcription factor gene[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2018, 32(2): 103-110.

[21] LIU J Y, OSBOURN A, MA P D. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants[J]. Molecular Plant, 2015, 8: 689-708.

[22] SONG J, LIU Z, HONG H, et al. Identification and validation of loci governing seed coat color by combining association mapping and bulk segregation analysis in soybean[J]. PLoS One, 2016, 12, 11(7): e0159064.

[23] YAN F, DI S K, RYOJI T. CACTA-superfamily transposable element is inserted in MYB transcription factor gene of soybean line producing variegated seeds[J]. Genetics, 2015, 58(8): 365-374.

[24] 宋健. 大豆种皮色相关基因的图位克隆及功能解析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019: 82-85. (SONG J. Map based cloning and functional analysis of soybean seed coat color related genes[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019: 82-85.)

[25] 宋健, 郭勇, 于丽杰, 等. 大豆种皮色相关基因研究进展[J]. 遗传, 2012, 34(6): 687-694. (SONG J, GUO Y, YU L J, et al. Research progress of soybean seed coat color related genes[J]. Genetics, 2012, 34(6): 687-694.)

[26] ZHAO Y, MA J, LI M, et al. Whole-genome resequencing-based QTL-seq identified *AhTcl* gene encoding a R2R3-MYB transcription factor controlling peanut purple testa colour[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(1): 96-105.

[27] 王关林. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 86-90. (WANG G L. Principle and technology of plant genetic engineering[M]. Beijing: Science Press, 1998: 86-90.)

[28] SERRANO M, KANEHARA K, TORRES M, et al. Repression of sucrose/ultraviolet B light-induced flavonoid accumulation in microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2012, 158(1): 408-422.

[29] 张芷睿, 张耀华, 王秋实, 等. 大豆实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证[J]. 植物生理学报, 2020, 56(9): 1963-1973. (ZHANG Z R, ZHANG Y H, WANG Q S, et al. Screening and validation of internal reference genes in soybean real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Journal of Plant Physiology, 2020, 56(9): 1963-1973.)

[30] 蒋彦. 基础生物信息学及应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003. (JIANG Y. Basic bioinformatics and application[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2003.)

[31] LI Y, CHEN Q, XIE X, et al. Integrated metabolomics and transcriptomics analyses reveal the molecular mechanisms underlying the accumulation of anthocyanins and other flavonoids in cowpea pod (*Vigna unguiculata* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(34): 9260-9275.

[32] 刘恺媛, 王茂良, 辛海波, 等. 植物花青素合成与调控研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(14): 41-51. (LIU K Y, WANG M L, XIN H B, et al. Anthocyanin biosynthesis and regulate mechanisms in plants: A review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(14): 41-51.)

[33] TAMAGNONE L, MERIDA A, PARR A, et al. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco[J]. Plant Cell, 1998, 10: 135-154.

[34] 吴嘉诚, 王桂青, 曾黎辉. 中国水仙 R2R3-MYB 基因 *NtMYB5* 的克隆和功能研究[J]. 园艺学报, 2018, 45(7): 1327-1337. (WU J C, LIU G Q, ZENG L H. Cloning and functional analysis of R2R3-MYB gene *NtMYB5* in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. Horticultural Plant Journal, 2018, 45(7): 1327-1337.)

[35] ZHOU M L, ZHANG K X, SUN Z M, et al. LNK1 and LNK2 corepressors interact with the *MYB3* transcription factor in phenylpropanoid biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2017, 174(3): 1348-1358.

[36] YANG L, ZHAO X, RAN L Y, et al. *PtoMYB156* is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41209.

[37] XU Z S, FENG K, QUE F, et al. A MYB transcription factor *DcMYB6* is involved in regulating anthocyanin biosynthesis in purple carrot taproots[J]. Scientific Reports, 2017(7): 45324.

[38] 李军, 赵爱春, 余茂德. 桑树花青素合成相关 MYB 类转录因子的鉴定与功能分析[J]. 西北植物学报, 2016, 36(6): 1110-1116. (LI J, ZHAO A C, YU M D. Identification and function analysis of anthocyanin biosynthesis related MYB genes in mulberry[J]. Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica, 2016, 36(6): 1110-1116.)

[39] AKADA S, DUBE S K. Organization of chalcone synthase gene clusters and characterization of a new member of the family[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29: 189-199.

[40] CHO Y B, JONES S I, VODKIN L O. Nonallelic homologous recombination events responsible for copy number variation within an RNA silencing locus[J]. Plant Direct, 2019, 3: e00162.

[41] LIU Y C, DU H L, LI P C, et al. Pan-genome of wild and cultivated soybeans[J]. Cell, 2020, 182: 162-176.

[42] GUO Y, QIU L J. Allele-specific marker development and selection efficiencies for both flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes in soybean subgenus *soja* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126: 1445-1455.

[43] YAN F, DI S K, TAKAHASHI R. CACTA-superfamily transposable element is inserted in MYB transcription factor gene of soybean line producing variegated seeds[J]. Genetics, 2015, 58: 365-374.

[44] ZABALA G, VODKIN L O. Methylation affects transposition and splicing of a large CACTA transposon from a MYB transcription factor regulating anthocyanin synthase genes in soybean seed coats[J]. PLoS One, 2014, 9: e111959.

[45] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑大豆种质抗氧化能力及其与总酚和花色苷含量的关系[J]. 中国农业科学, 2006, 39: 1545-1552. (XU J R, ZHANG M W, LIU X H, et al. Correlation between antioxidation, and content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39: 1545-1552.)

[46] YOSHIDA K. Structural analysis and measurement of anthocyanins from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine legumes* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60: 589-593.