

## 丝瓜 MYB 基因家族的鉴定与表达模式分析

吴 珊<sup>1</sup>, 余小丽<sup>2</sup>, 宋 航<sup>2</sup>, 孙 淼<sup>1</sup>, 曾厚圆<sup>2</sup>, 杨丽欣<sup>2</sup>, 刘 雷<sup>2</sup>, 练华山<sup>1\*</sup>, 刘 鹏<sup>2\*</sup>

1. 成都农业科技职业学院风景园林学院, 四川 成都 611130

2. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳 621000

3. 成都农业科技职业学院园艺研究所, 四川 成都 611130

**摘 要:** **目的** 研究药食同源植物丝瓜 *Luffa cylindrica* MYB (*LcMYB*) 基因转录因子家族成员的结构和功能, 鉴定参与抗褐化作用的主要成员及其作用机制。 **方法** 基于 Pfam 数据库及 NCBI 保守结构域分析, 对丝瓜全基因组水平 MYB 转录因子进行鉴定。通过 Expasy、MEME 等在线工具分析 *LcMYB* 转录因子家族蛋白理化性质、顺式作用元件及保守结构域。然后利用 MEGA 软件构建系统发育树, 分析丝瓜与拟南芥、苹果、番茄、茄子及马铃薯等植物 MYB 蛋白的系统发育关系。结合 2 个褐化敏感程度不同的丝瓜转录组, 筛选了丝瓜褐化相关的关键 MYB 转录因子及其靶基因。 **结果** 全基因组水平共鉴定到 449 个具有相似基因结构及保守基序的 MYB 基因, 可聚类为 4 个亚家族(R1\_MYB、R2R3\_MYB、R3\_MYB 和 R4\_MYB), 并在正反链均存在可能的顺式调控元件。靶基因及基因表达分析结果显示多个 MYB 及其靶基因尤其是多铜氧化酶相关基因可能在鲜切丝瓜的不同褐化阶段起重要的作用, 是丝瓜褐化的关键调节因子。 **结论** 系统鉴定了 *LcMYB* 家族基因, 并鉴定了可能参与丝瓜褐化的 MYB 基因及其靶基因, 有助于进一步了解和丰富 *LcMYB* 基因家族的生理功能, 并为进一步解析果实褐化调控机制, 提高果实品质提供了候选基因。

**关键词:** 丝瓜; MYB 基因家族; 转录因子; 褐化; 多铜氧化酶

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)12-4159-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.023

## Identification and expression pattern analysis of MYB gene family in *Luffa cylindrica*

WU Shan<sup>1</sup>, YU Xiaoli<sup>2</sup>, SONG Hang<sup>2</sup>, SUN Miao<sup>1</sup>, ZENG Houyuan<sup>2</sup>, YANG Lixin<sup>2</sup>, LIU Lei<sup>2</sup>, LIAN Huashan<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>2</sup>

1. School of Landscape Architecture, Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China

2. College of Life Science and Biotechnology, Mianyang Teachers' College, Mianyang 621000, China

3. Horticulture Research Institute, Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China

**Abstract: Objective** To study the structure and function of the *Luffa cylindrica* MYB (*LcMYB*) gene transcription factor (TF) family and identify the main member involved in anti-browning and its mechanism. **Methods** Based on Pfam database and NCBI conserved domain analysis, the MYB transcription factors at the whole-genome level of *L. cylindrica* were identified. The physicochemical properties, cis-acting elements and conserved domains of *LcMYB* transcription factor family proteins were analyzed by using online tools such as Expasy and MEME. Then, constructing a phylogenetic tree using MEGA software to analyze the phylogenetic relationships of MYB proteins among *L. cylindrica* and other plants such as *Arabidopsis thaliana*, apple, tomato, eggplant, and potato. Finally, the key MYB transcription factors and their target genes related to browning in *L. cylindrica* were screened by combining two *L. cylindrica* transcriptomes with different degrees of browning sensitivity. **Results** At the whole-genome level, a total of 449 MYB genes with similar gene structures and conserved motifs were identified, clustering into four subfamilies (R1\_MYB, R2R3\_MYB, R3\_MYB, and R4\_MYB), with potential cis-regulatory elements presenting on both the sense and antisense strands. The results of

收稿日期: 2024-01-02

基金项目: 四川省应用基础研究计划项目 (2021YJ0307); 成都农业科技职业学院科研课题 (202ZR103); 四川省科技计划重点研发项目 (2021YFN0113); 四川省科技厅科技计划项目 (2021YFN0113)

作者简介: 吴 珊 (1980—), 女, 四川蒲江人, 生物工程博士, 高级农艺师, 长期从事植物遗传育种、生物与医药专业相关研究。

Tel: 15928505345 E-mail: 86015956@qq.com

\*通信作者: 刘 鹏 (1988—), 男, 山西长治人, 博士, 讲师, 主要从事植物抗逆基因遗传资源挖掘与利用。

Tel: 18030608041 E-mail: liupeng2023@mtc.edu.cn

练华山 (1979—), 男, 四川大竹人, 硕士, 教授, 高级农艺师, 长期从事蔬菜育种及高效益栽培技术相关研究。

Tel: 18980850046 E-mail: 49939450@qq.com

target gene analysis and gene expression analysis indicated that multiple *MYB* genes and their target genes, particularly those associated with multicopper oxidase, may play crucial roles in different stages of browning in fresh-cut *L. cylindrica*, serving as key regulatory factors for *L. cylindrica* browning. **Conclusion** This study systematically identified the *LcMYB* family gene and pinpointed *MYB* genes potentially involved in *L. cylindrica* browning along with their target genes, which will help to further understand and enrich the physiological functions of the *LcMYB* gene family, offering candidate genes for further elucidating the regulation mechanism of fruit browning and enhancing fruit quality.

**Key words:** *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem.; *MYB* gene family; transcription factor; browning; multicopper oxidase

丝瓜 *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. 是一种分布广泛的药食同源植物, 其根茎、藤、叶、花、果实及种子均可入药, 在消炎、抗氧化、降血糖、调血脂、改善脏器功能及免疫调节等方面均有一定功效<sup>[1]</sup>。丝瓜果实在日常生活中还是被大众普遍接受的一种蔬菜, 其味甘, 性寒, 入肝、胃经, 可治痰喘咳嗽、肠风痔漏、痈肿等症, 在机体平衡调节, 心脑血管疾病预防等方面有一定作用<sup>[2]</sup>。然而, 在鲜切丝瓜的运输和储存中, 褐化是一个丝瓜产业尚未解决的问题, 褐化使得丝瓜的品质下降, 并造成了粮食的极大浪费<sup>[3]</sup>。因此研究丝瓜褐化对提升丝瓜药食品质具有重要意义。

转录因子又称反式作用因子, 普遍存在于真核生物中, 与 RNA 聚合酶形成转录起始复合体, 共同参与转录起始的过程。转录因子在植物的基因表达过程中发挥重要作用, 能够参与调节植物生长<sup>[4]</sup>、发育<sup>[5]</sup>、果实颜色发育<sup>[6]</sup>、逆境反应<sup>[7]</sup>和细胞分裂<sup>[8]</sup>等多种生理机制, 因此, 揭示转录因子在生物体内具体的生理功能以及调控机制成为了研究的热点。植物中的转录因子主要包括 *MYB* (*Myeloblastosis*)、*bHLH* (*basic Helix-Loop-Helix*)、*AP2/ERF*、*WRKY*、*NAC* 等, 其中 *MYB* 是植物转录因子中最大的一个家族。*MYB* 转录因子广泛存在于植物中, 其最早在玉米 *Zea mays* L. 中被鉴定出来<sup>[9]</sup>, 随后在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L.<sup>[10]</sup> 以及其他物种中被大量的发现<sup>[11]</sup>。*MYB* 蛋白在调控植物发育、代谢、生物及非生物胁迫中发挥着关键作用<sup>[12]</sup>。Wang 等<sup>[13]</sup>发现, 杨树 *PdMYB118* 与 *bHLH* 转录因子 *PdTT8* 通过互作可以调控由受伤引起的花青素生物合成。Liu 等<sup>[14]</sup>发现过表达 *GhMYB36* 可以提高拟南芥和棉花的抗旱性以及轮纹枯萎病抗性。

*MYB* 转录因子所共有的特征是在 N 端有保守的 *MYB* 结构域, 该结构域由 50~53 个氨基酸残基构成<sup>[5-6]</sup>, 通常由 1~4 条重复片段 (R) 组成<sup>[15]</sup>, 每个片段可以编码 3 个  $\alpha$ -螺旋, 这种结构有利于

*MYB* 转录因子与靶 DNA 更好的结合<sup>[15]</sup>。根据每个转录因子 *MYB* 结构域包含 R 数量的不同, 可以将其划分为 4 类, 分别是 R1-*MYB*、R2R3-*MYB*、R3-*MYB*、R4-*MYB* 家族<sup>[16]</sup>。前人报道中, 荔枝 *Litchi chinensis* L. 中的 *MYB* 转录因子可在原花青素的生物合成中发挥调节作用, 而原花青素是荔枝果实采收后引起果皮快速褐变的关键物质<sup>[17]</sup>。马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 在采收后, 由于酶促褐变反应, 很容易腐烂, 这一现象造成了粮食的大量损失。对切割后的马铃薯块茎进行转录组分析发现其中对损伤反应最大的转录因子是 *MYB*。其主要通过上调酶促褐变相关基因的表达引起马铃薯的褐化<sup>[18]</sup>。

然而目前关于 *LcMYB* 转录因子的鉴定以及基因功能的研究尚未有进行, 因此本实验希望通过对 *LcMYB* 转录因子基因家族的鉴定以及功能研究, 揭示丝瓜褐化与 *LcMYB* 转录因子间的关系, 为解析丝瓜褐化的调控机制提供实验基础, 为培育高品质、抗褐化的丝瓜品种提供有益的基因资源。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

样品由成都农业科技职业学院练华山教授鉴定为丝瓜 *Luffa cylindrica* L.。所有丝瓜样本均种植在成都农业科技职业学院农业园艺学院的试验田。采用了鲜切后褐化程度不同 (切开后 24 h 可见明显褐化差异) 的 2 个丝瓜品种 (LQY: 易褐变; JD: 抗褐变)。丝瓜果实在花后 15、20、45 d 3 个坐果阶段进行采收, 并分别标记为 S1、S2 和 S3 (2021 年 4 月—2021 年 5 月)。采收后将果实立即放入液氮中速冻备用。

### 1.2 仪器

HH-6 型恒温水浴锅, 购于青岛路博建业环保科技有限公司; 凝胶成像系统 (Bio-Rad ChemiDoc XRS+, 美国伯乐有限公司); 5415R 型离心机 (Eppendorf Centrifuge, 德国艾本德有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 MYB 基因的鉴定及序列分析

从 Pfam 数据库 (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 下载 MYB 基因家族的 HMM 模型 (Myb\_DNA-binding. hmm) 进行下载, 利用 hmmsearch 程序基于马尔可夫模型从丝瓜的基因组中鉴定 MYB 蛋白。随即利用 NCBI CD search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 网页工具从初步鉴定得到的蛋白中筛选出包含 MYB 保守结构域的 MYB 蛋白, 并进行重命名, 随后利用 Expasy 在线工具计算蛋白理化性质。

### 2.2 MYB 基因的系统发育分析及分类

丝瓜 MYB 基因 (*LcMYB*) 家族成员系统发育分析、R2R3\_MYB 亚家族及不同物种间 MYB 基因家族成员系统发育分析均采用 MEGA-X 进行。多序列比对使用 MEGA 程序中 MUSCLE 算法和默认参数进行。系统发育树利用 IQ-TREE 2 程序使用最大似然法进行构建。R 语言中 ggtree 程序包用于系统发育树的美化。168 个拟南芥, 238 个苹果, 148 个番茄, 105 个茄子以及 126 个马铃薯的 MYB 蛋白序列下载于 PlantTFdb 数据库 (<http://planttfdb.gao-lab.org/>)。

### 2.3 保守基序、结构域、顺式调控元件和基因结构分析

为了了解 *LcMYB* 基因的结构, 使用在线网站 MEME (<https://meme-suite.org/meme/to-ols/meme>) 鉴定保守基序。使用在线网站 PlantPAN 3.0 ([http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/p-romoter\\_multiple.php](http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/p-romoter_multiple.php)) 预测 *LcMYB* 基因上游 2 000 bp 内的所有顺式调控元件。使用 TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) 可视化 *LcMYB* 基因的内含子/外显子结构。使用 R 4.2.0 版本中的 gggene 程序包可视化上游区域基因结构。

### 2.4 褐化相关 MYB 基因及其靶基因筛选

丝瓜的转录组数据来自本实验室前期研究, 原始数据可以从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行下载, 获取号为: PRJNA935857。简单来说, 收集易褐化品种 (LQY, browning 组, 简称 B 组) 和抗褐化品种 (JD, excellent 组, 简称 E 组) 丝瓜的 3 个坐果阶段 (S1、S2 和 S3) 的果实, 速冻于液氮中。利用 TRIzol 法提取总 RNA, 然后使用琼脂糖凝胶电泳检验所提取 RNA 的质量, 样本质量合格后使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平

台进行 PE150 双端测序。对下机数据指控后, 与参考基因组进行比对, 并统计比对上的 reads。用 FPKM 归一化方法计算基因相对表达水平。使用 R 版本 4.2.0 中的 pheatmap 程序包可视化基因表达情况。然后根据条件  $|\log_2FC| > 2$  筛选在同一发育时期不同丝瓜中差异表达的 MYB 基因, 并对差异 MYB 基因进行韦恩分析, 明确各阶段差异基因间的数量关系。然后, 基于生物信息学方法鉴定 *LcMYB* 的潜在靶基因, 并按照靶基因 motif 数量  $\geq 3$  并且在 3 个阶段中 B 组和 E 组中的  $|\log_2FC| > 10$  的标准筛选靶基因, 并计算 MYB 转录因子和靶基因之间表达相关性, 筛选  $\text{corr} > 0.85$ ,  $P < 0.05$  的基因作为相应 MYB 基因最终的靶基因。最后将与褐化相关的差异表达的 *LcMYB* 基因及其对应靶基因在不同丝瓜品种的 3 个坐果阶段的表达量进行热图展示。

### 2.5 LcMYB 上游潜在 TF 的生物信息学分析

使用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 预测 *LcMYB* 与其他转录因子之间的调控关系。Cytoscape 用于绘制靶基因和上游转录因子的分子调控网络。从丝瓜的转录组数据中获取不同处理下上游转录因子的表达数据, 利用 R 4.2.0 版中的 pheatmap 包绘制热图。

## 3 结果与分析

### 3.1 LcMYB 基因家族的鉴定和理化性质分析

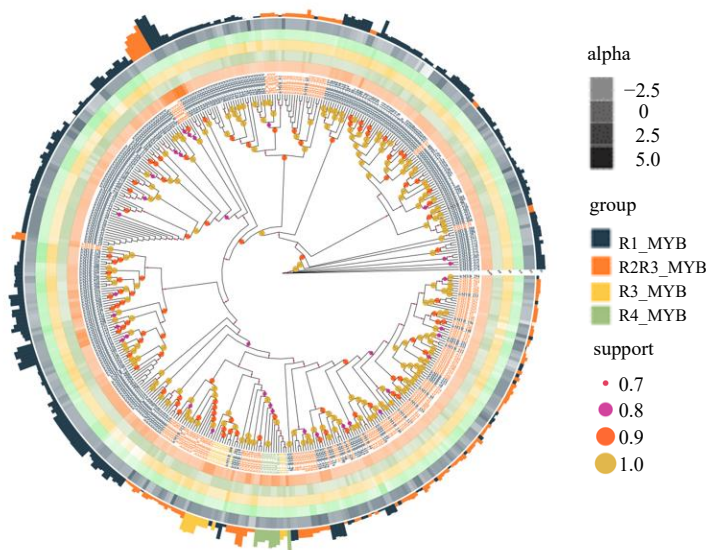
通过马尔可夫模型鉴定得到 516 个 MYB 蛋白, 利用 NCBI CD search 验证马尔可夫鉴定结果, 得到 449 个含有 MYB 保守结构域的蛋白, 并将 MYB 蛋白重命名为 *LcMYB1*~*LcMYB449*。通过 Expasy 在线工具对 449 个 *LcMYB* 蛋白的物理化学性质进行分析, 发现 MYB 蛋白质长度在 101 (*LcMYB200*)~1 936 (*LcMYB253*) aa, 其相对分子质量和等电点分别在 11.28 (*LcMYB200*)~211.61 (*LcMYB253*) 和 4.22 (*LcMYB224*)~11.05 (*LcMYB357*)。它们的亲水指数在 -1.63 (*LcMYB134*)~ -0.11 (*LcMYB118*), 脂肪指数在 7.76 (*LcMYB134*)~15.92 (*LcMYB165*), 均小于 16。有 13 个 MYB 转录因子不稳定系数小于 40, 为稳定蛋白, 其余 436 个为不稳定蛋白 (不稳定系数  $> 40$ ), 说明 MYB 转录因子蛋白大部分是不稳定的蛋白质。此外, 根据 MYB DNA binding 的数量 (1~4 个), *LcMYB* 基因家族可被分为 4 个亚家族, 分别为 R1\_MYB、R2R3\_MYB、R3\_MYB 和 R4\_MYB 等 4 个亚家族。统计不同亚家族成员, 发现其数量分别为 296、135、

10 和 8 个。

### 3.2 *LcMYB* 基因家族系统发育分析与表征

为了分析 *LcMYB* 成员间的亲缘关系,基于 *LcMYB* 蛋白构建了无根系统发育树(图 1)。结果显示,大部分不同亚家族 *MYB* 基因可以很好地聚在一起。R1\_MYB 亚家族成员最多,约占整个无根树的 65.92%,并且在 R1\_MYB 成员主要分布的分支内,混入了 35 个 R2R3\_MYB 家族成员,说明其除 *MYB* 保守结构外可

能还存在其他相似的结构。另外, R2R3\_MYB 亚家族作为植物中最重要的 *MYB* 亚家族,其占据了无根树的 30%区域,其中 32 个 R1\_MYB 亚家族成员与其聚集在一个大的分支上,推测这些 R1\_MYB 家族成员可能在基因结构上进化出了与 R2R3\_MYB 家族成员类似的结构。最后,集中到 3R\_MYB 和 4R\_MYB 分枝上的蛋白数量最少且数目相近,均分布在无根树的正下方,分别有 10 和 8 个蛋白。



4 个亚群分别用不同的颜色表示,并将支持率按照不同颜色和不同大小圈表示为 4 个等级;进化树外的 6 层从内到外分别表示蛋白质相对分子质量 (PMW)、蛋白质等电点 (PIP)、蛋白质亲水性 (PH)、蛋白质脂肪指数 (PAI)。

The four subgroups are represented by different colors, and the support rate is represented as four levels according to different colors and circles of different sizes. The six layers outside the evolutionary tree represent from the inside out protein molecular weight (PMW), protein isoelectric point (PIP), protein hydrophilicity (PH), protein aliphatic index (PAI).

图 1 *LcMYB* 转录因子的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *LcMYB* transcription factors

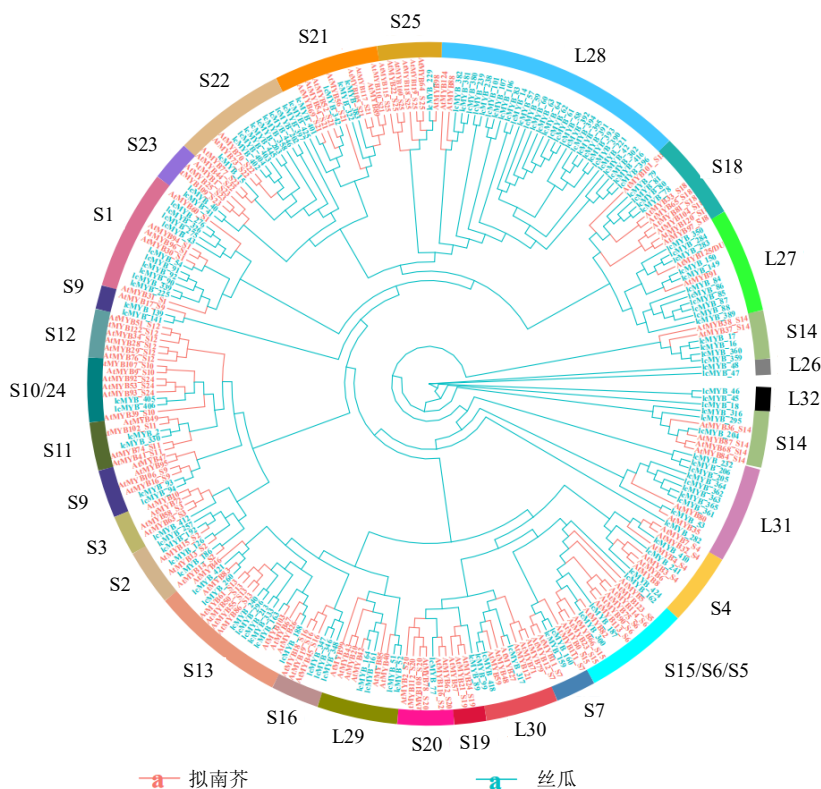
R2R3\_MYB 亚家族是植物 *MYB* 基因家族中最重要的亚家族,其成员众多,功能丰富<sup>[19]</sup>。为了进一步划分丝瓜 R2R3\_MYB 的亚类,进一步构建了丝瓜及拟南芥 R2R3\_MYB 亚家族的系统发育树。结果显示,以拟南芥 R2R3\_MYB 为参考,丝瓜 R2R3\_MYB 可被分为 32 个亚群,通过观察,发现丝瓜 R2R3\_MYB 亚家族中有 84 个蛋白被聚类到拟南芥 R2R3\_MYB 蛋白所在的 25 个亚类上 (S1~S25),且在进化枝中分离良好,另外还有 51 个丝瓜 R2R3\_MYB 未聚集到拟南芥分枝,它们聚集成 7 个新的亚类,命名为 L26~L32 (图 2)。

为了揭示 *LcMYB* 家族的分布情况与其他物种间的关系,利用 MEGA 程序对 449 个 *LcMYB* 转录因子蛋白及另外 5 个物种的 *MYB* 转录因子氨基酸序列进行系统进化树构建及分析(图 3)。结果显示

R1\_MYB 家族成员在丝瓜中分布最多,推测 *MYB* 基因家族可能在丝瓜中经历了扩张。所有物种均含有 1R\_MYB、R2R3\_MYB、3R\_MYB 和 4R\_MYB 亚家族成员,整体来看在这些物种中 R2R3\_MYB 亚家族的转录因子数目最多,特别的是在丝瓜中 1R\_MYB 亚家族基因的数目最多。通过上述的结果可以推测这些在同一个分组中的基因可能出现在丝瓜、拟南芥、茄子等物种分化之前,并且这些基因在植物的生长发育中可能具有相似的作用。

### 3.3 *LcMYB* 基因结构和保守基序分析

为了进一步了解 *LcMYB* 基因的结构特征,利用 MEME 对 *LcMYB* 进行保守元件分析,得到相关性最高的 10 个保守元件(图 4),其中 motif1、motif2 和 motif3 为编码 *MYB* DNA binding 的结构域。

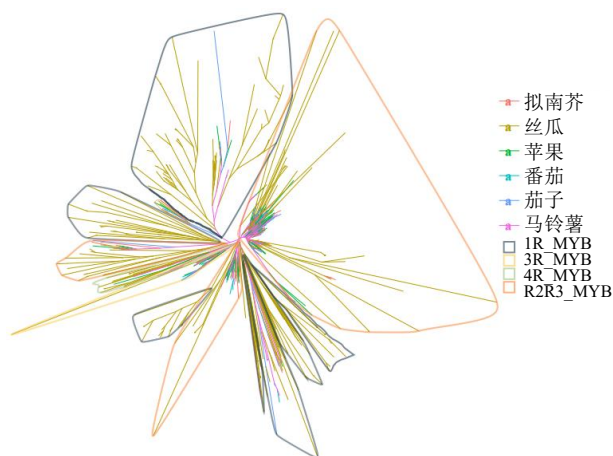


S1~S25 为能明确分类的 R2R3\_MYB 蛋白; L26~L32 为未明确分类的 R2R3\_MYB 蛋白, 定义为丝瓜的新分类亚群。

S1—S25 is R2R3\_MYB protein that can be clearly classified; L26—L32 is R2R3\_MYB protein that can not clearly classified, defined as a new taxonomic subgroup of *L. cylindrica*.

图 2 丝瓜和拟南芥 R2R3\_MYB 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree on R2R3\_MYB of *L. cylindrica* and *Arabidopsis thaliana*



按照不同颜色的边框将 MYB 分成 4 个亚家族, 且通过不同颜色进化枝表示不同物种; 该系统发育树中 MYB 亚家族按照丝瓜的亚家族聚类情况为依据, 按照该进化枝上丝瓜大部分 MYB 所属的亚家族来划分。

MYB is divided into 4 subfamilies according to different colored borders, and different species are represented by different colored evolutionary branches, the MYB subfamilies in the phylogenetic tree are divided according to the subfamily clustering of the *L. cylindrica* and the subfamilies to which most MYB belonged on this evolutionary branch.

图 3 丝瓜和其他 5 个物种 MYB 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of MYB in *L. cylindrica* and five other species

图 4 *LcMYB* 转录因子家族的保守结构序列Fig. 4 Conservative structural sequences of *LcMYB* transcription factor family

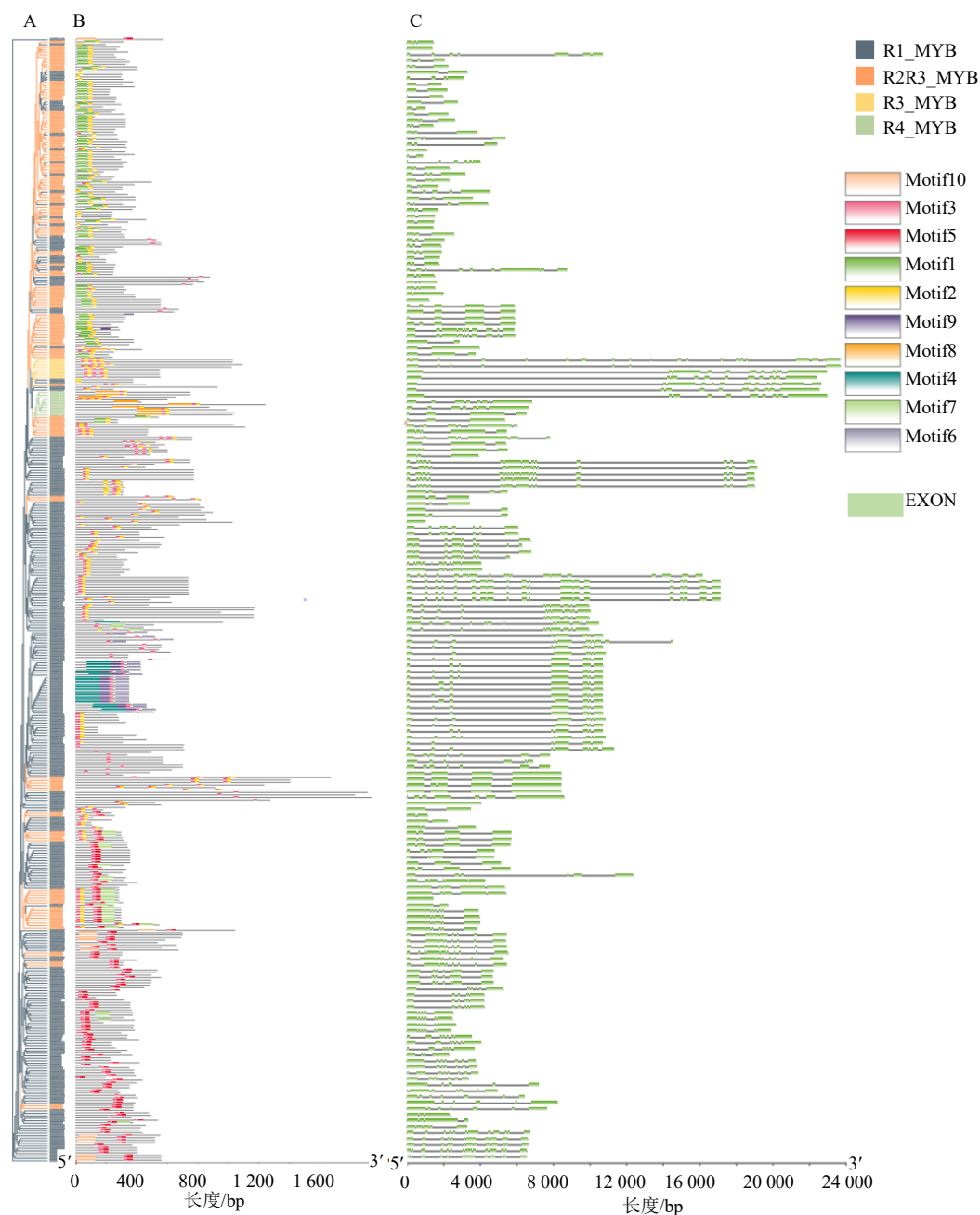
对 MYB 家族成员基因进一步分析显示, MYB 的 4 个亚家族 R1\_MYB、R2R3\_MYB、R3\_MYB 和 R4\_MYB 成员的结构信息如图 5-A、B 显示, MYB 家族中大多数蛋白中均有 motif2 存在。同一个亚家族中的序列具有相似的结构, motif3 几乎存在于所有的 R1\_MYB 亚家族中, 在 R1\_MYB 亚家族中出现最多的基序组合为 motif3+motif5, 另一大类组合为 motif2+motif3, 排在第3位的基序组合由 motif3+motif4+motif6+motif9 组成。R2R3\_MYB 亚家族是 *LcMYB* 家族中的第2大亚家族, 大多数的 R2R3\_MYB 亚家族由 motif1+motif2 组成, 有少量的蛋白由 motif2+motif3+motif5+motif7 组成。丝瓜中 R3\_MYB 和 R4\_MYB 亚家族的数量不多, 其中 R3\_MYB 亚家族主要由多个 motif2+motif3 组成, R4\_MYB 亚家族主要由 motif2+motif3+motif8 组成 (图 5-B)。

为了进一步研究 449 条转录因子的特性, 本研究对 449 条 *LcMYB* 基因的外显子-内含子模式进行了分析。结果发现, 几乎所有的同一类型转录因子在系统发育树上邻近的编码基因都具有相近的基因

结构, 在这 449 个基因中, 外显子数目为 1~20, 其中, R1\_MYB 亚家族转录因子的外显子数量相差较大, 集中在 2~20, R2R3\_MYB 亚家族转录因子的外显子数量主要集中在 1~5, 仅有少量基因外显子数量超过 7 个, R3\_MYB 亚家族转录因子外显子数量较多且集中, 主要集中在 10~20, R4\_MYB 亚家族转录因子外显子数量较少, 主要分布在 5~8 (图 5-C)。

### 3.4 *LcMYB* 基因参与丝瓜的褐化调控分析

为了进一步了解 *LcMYB* 转录因子的功能, 对 *LcMYB* 基因进行筛选, 通过韦恩分析共筛选出了 113 个差异表的 MYB 基因 (图 6-A)。通过生物信息学分析鉴定了 *LcMYB* 的潜在靶基因, 通过 MYB 转录因子和靶基因的关系进行画图, 结果如图 6-B 所示, 在 3 个阶段都有表达的转录因子数目远远大于仅在 1 个阶段中表达的转录因子数目, 尤其在第 2 坐果阶段差异表达的 MYB 转录因子数目最少。在 3 个阶段都有表达的转录因子中, *LcMYB\_205*、*LcMYB\_202*、*LcMYB\_379*、*LcMYB\_161* 等基因通过上调表达的方式参与多个靶基因的调控, *LcMYB\_*



A-蛋白系统发育分析; B-保守基序分析; C-基因结构分析。

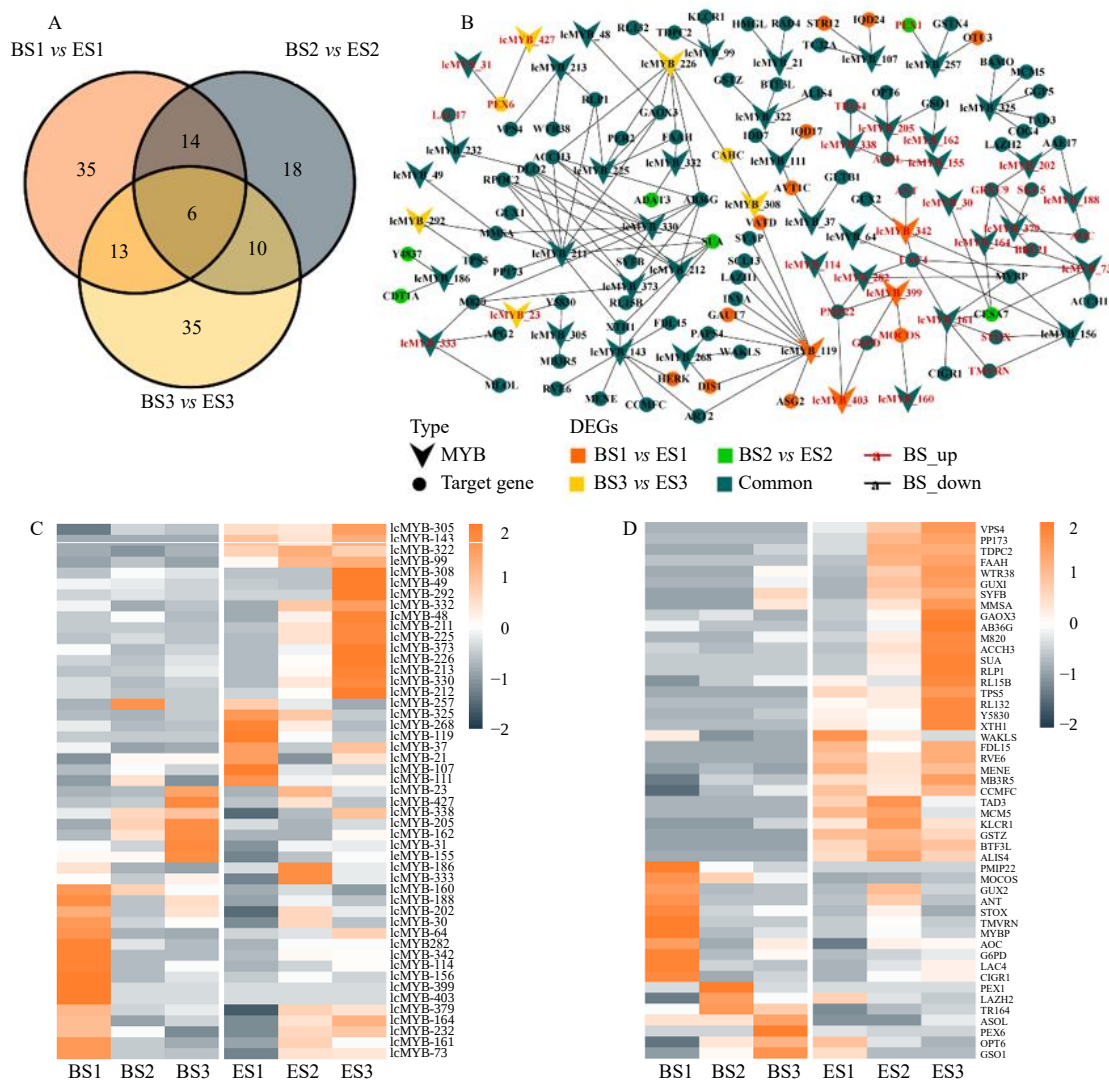
A-protein phylogenetic analysis; B-conservation motif analysis; C-gene structure analysis.

图 5 *LcMYB* 转录因子亚家族的研究Fig. 5 Study on subfamilies of *LcMYB* transcription factors

143、*LcMYB\_211*、*LcMYB\_225*、*LcMYB\_212*、*LcMYB\_330*、*LcMYB\_257*、*LcMYB\_107*、*LcMYB\_325*、*LcMYB\_156* 等基因通过下调表达的方式参与多个靶基因的调控。仅在第 1 阶段表达的转录因子中，*LcMYB\_399*、*LcMYB\_342* 和 *LcMYB\_403* 通过上调表达的方式参与多个靶基因的调控，*LcMYB\_119* 通过下调表达的方式参与多个靶基因的调控，仅在第一阶段表达的转录因子中，*LcMYB\_23* 通过上调表

达的方式参与多个靶基因的调控，*LcMYB\_226* 通过下调表达的方式参与多个靶基因的调控。

将 *MYB* 基因在不同丝瓜品种的 3 个坐果阶段的表达量绘制成热图 (图 6-C)，在第 1 个坐果阶段中，*LcMYB\_160*、*LcMYB\_188*、*LcMYB\_202* 等 16 个基因在 B 组中高表达，*LcMYB\_325*、*LcMYB\_268*、*LcMYB\_119* 等 7 个基因在 E 组中高表达；在第 2 个坐果阶段中，*LcMYB\_257* 在 B 组中高表达，4 个基



A-差异基因韦恩图；B-靶基因-LcMYBs 的分子调控网络分析，箭头代表 MYB 基因，圆形代表靶基因，橙色代表第 1 阶段差异表达基因，绿色代表第 2 阶段差异表达基因，黄色代表第 3 阶段差异表达基因，深绿色代表 3 个阶段共有的差异表达基因，不同文字颜色表示差异表达基因的上下调情况，红色表示上调的差异基因，黑色表示下调的差异基因；C-LcMYBs 基因表达模式热图；D-部分靶基因的表达模式热图。

A-Venn diagram of differential genes. B-molecular regulatory network analysis of target genes and LcMYBs. Among them, the arrow represents the MYB gene, and the circle represents the target gene, orange represents stage I differentially expressed genes, green represents stage II differentially expressed genes, yellow represents stage III differentially expressed genes, and dark green represents differentially expressed genes common to the three stages. In addition, different text colors indicate the upregulation and downregulation of differentially expressed genes, with red indicating upregulation of differentially expressed genes and black indicating downregulation of differentially expressed genes. C, D-the expression pattern heat maps of LcMYBs genes and some target genes.

图 6 *LcMYB* 的潜在靶基因的生物信息学分析

Fig. 6 Bioinformatics analysis of potential target genes of *LcMYB*

因 (*LcMYB\_186*、*LcMYB\_333*、*LcMYB\_322*、*LcMYB\_99*) 在 E 组中高表达；在第 3 个坐果阶段中，*LcMYB\_23*、*LcMYB\_427* 和 *LcMYB\_338* 等 7 个基因在 B 组中高表达，*LcMYB\_305*、*LcMYB\_143* 和 *LcMYB\_322* 等 16 个基因在 E 组中高表达。推测转录因子可能在不同坐果阶段调控不同的基因影响丝瓜对褐化的响应。*LcMYB\_332*、*LcMYB\_48* 和 *LcMYB\_211* 等 9 个基因在 E 组中，随着坐果阶段的

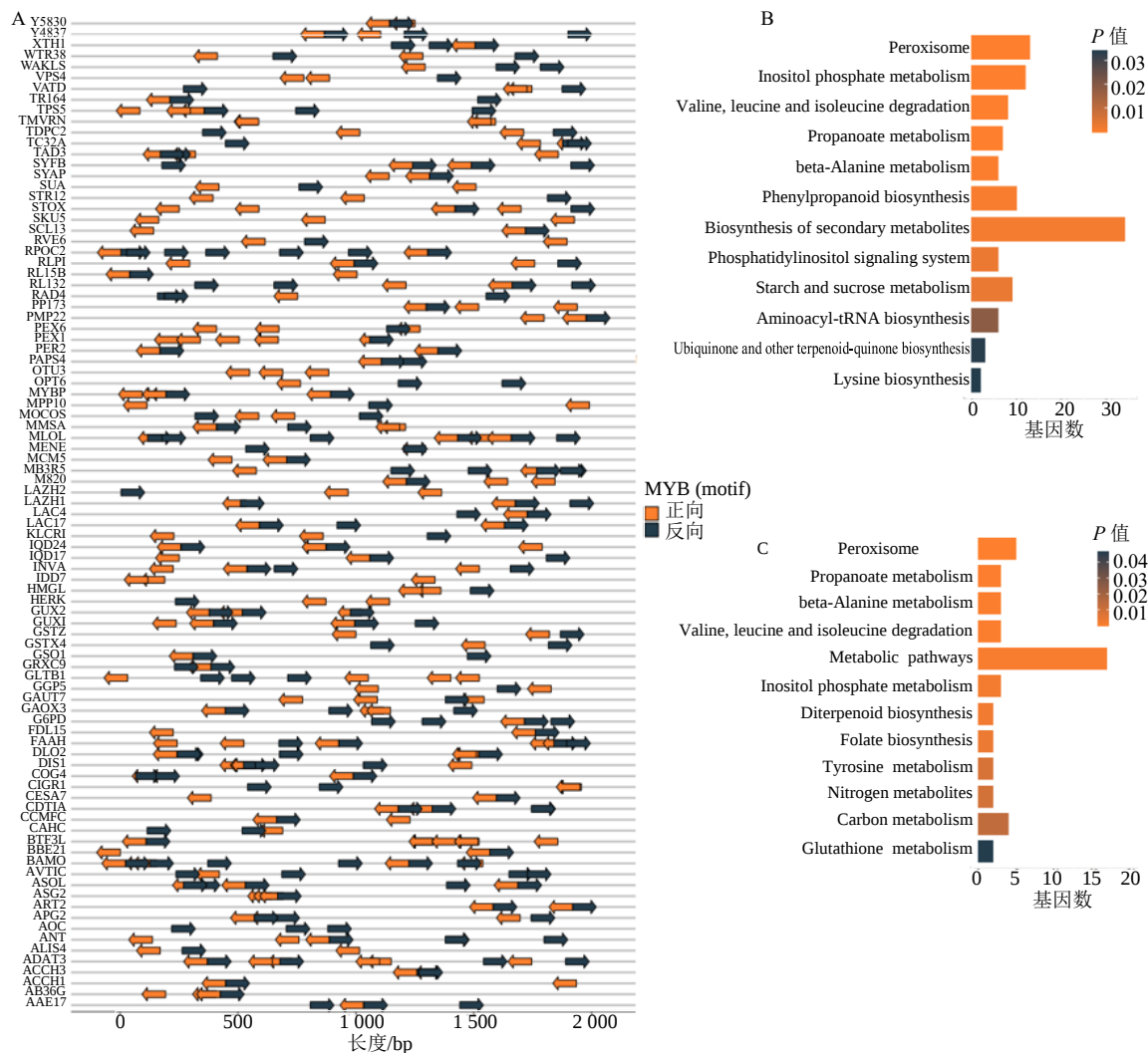
推移逐渐高表达，推测可能是转录因子调控上述基因上调表达引起丝瓜抗褐化性状出现。

将 MYB 转录因子的部分靶基因在不同丝瓜品种的 3 个坐果阶段的表达量绘制成热图 (图 6-D)，通过观察，发现在 2 个物种中高表达的靶基因重复性较低，在褐化丝瓜品种中，分别有 *Peripheral myelin protein 22* (*PMP22*)、*molybdenum cofactor sulfurase* (*MOCOS*) 和 *GlcA substitution of Xylan 2*

(*GUX2*) 等 11 个基因、*PEX1*、*LAZH2* 和 *TRI64* 共 3 个基因以及 *ASOL*、*PEX6*、*Oligopeptide transporters* 6 (*OPT6*)、*GSO1* (*GASSHO1*) 共 4 个基因在第 1、第 2 和第 3 个坐果阶段高表达, 这些基因在对应的抗褐化品种中均未高表达, 凸显出了靶基因在两个品种的表达差异, *RL15B*、*Trehalose phosphate synthase 5* (*TPS5*) 和 *RL132* 等 17 个基因在抗褐化丝瓜品种 3 个坐果阶段中均呈高表达, *VPS4*、*PP173* 和 *TDPC2* 等 14 个基因在抗褐化丝瓜品种 3 个坐果阶段中的表达量呈上升趋势 (图 6-D)。

MYB 结合元件分析结果显示, 在丝瓜褐化相关基因的启动子中观察到所有启动子都含有反应元

件, 并且几乎所有的基因的正反链上都具有反应元件。为了了解这些 MYB 转录因子靶基因的功能, 分别对丝瓜中所有靶基因以及褐化相关的靶基因进行富集分析。KEGG 结果显示, MYB 转录因子的靶基因功能主要集中在次生代谢产物的生物合成、肌醇磷酸代谢、过氧化物酶体、苯丙烷生物合成和淀粉和蔗糖代谢等相关通路 (图 7-B); 与褐化相关靶基因的功能主要集中在谷胱甘肽代谢、二萜类生物合成和过氧化物酶体等相关通路上 (图 7-C)。其中过氧化物酶体和谷胱甘肽代谢相关通路参与氧化反应引起的丝瓜酶促褐化, 丙氨酸代谢、酪氨酸代谢以及氮代谢等通路参与非酶促反应引起的丝瓜褐变。



A-LcMYB 靶基因中顺式调控元件的分布; B-所有靶基因的 KEGG 富集分析; C-褐化相关靶基因的 KEGG 富集分析。

A-distribution of cis regulatory elements in the *LcMYB* target gene. B-KEGG enrichment analysis of all target genes. C-KEGG enrichment analysis of browning related target genes.

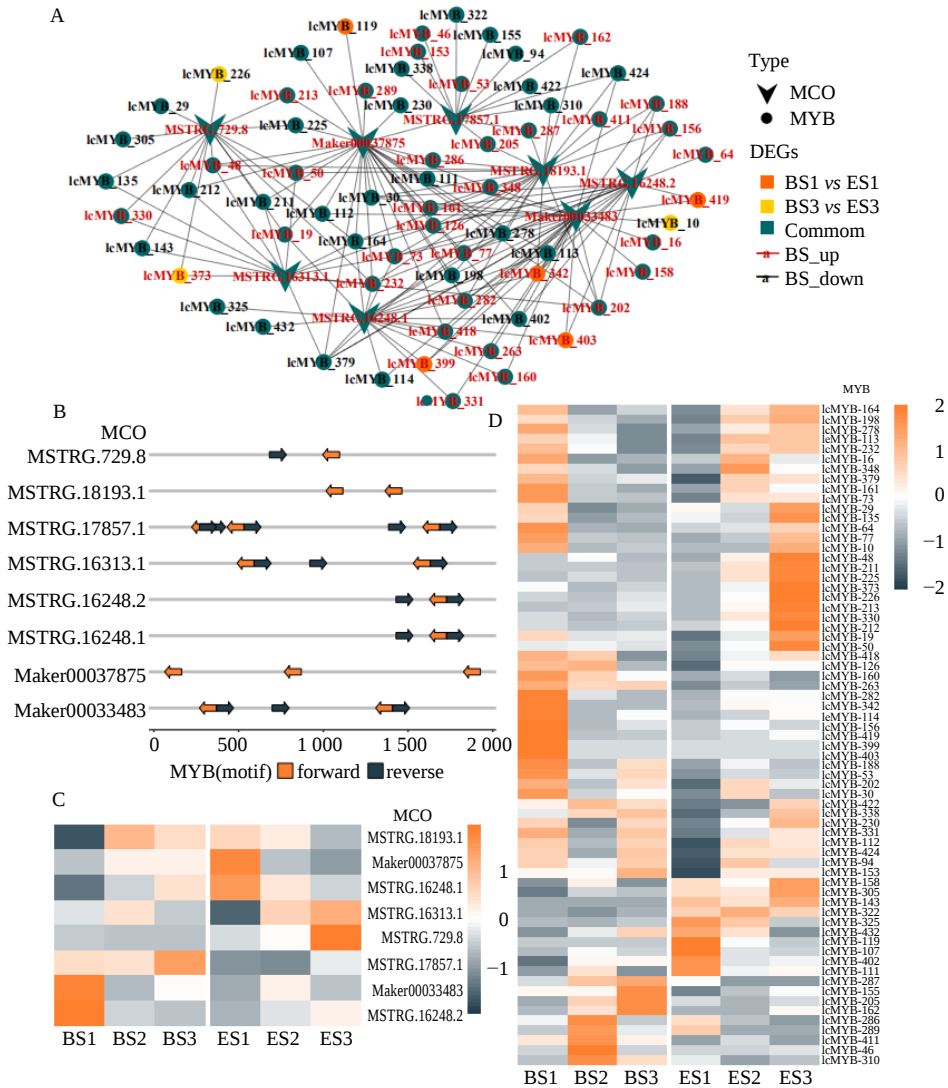
图 7 丝瓜褐化相关基因的分析

Fig. 7 Analysis of browning related genes in *L. cyclindrica*

### 3.5 *LcMYB* 基因通过可能通过调节多铜氧化酶相关靶基因调控丝瓜褐化

前人研究发现多铜氧化酶 (MCOs) 家族广泛存在于植物中并参与褐化调节, 因此将多铜氧化酶与 *LcMYB* 转录因子结合分析, 结果显示, 丝瓜多铜氧化酶相关靶基因与 *LcMYB* 基因的相互作用关系非

常紧密, 其中 8 个丝瓜 *MCO* 基因均上调, 并且同时受到多个 *MYB* 转录因子的调控 (图 8-A)。在丝瓜多铜氧化酶相关靶基因中存在大量的顺式作用元件, 其中 *Maker00037875* 和 *MSTRG.18193.1* 仅在正链上具有反应元件, 其余基因在正反链上均具有反应元件 (图 8-B)。为了分析与 *MYB* 相关的 *MCO*



A-丝瓜 MCO 和 MYB 分子调控网络分析, 不同的形状表示 *LcMYB* 和 MCO; 不同的图标颜色表示不同分组的 DEGs, 橙色表示 BS1 vs ES1 特有的 DEGs, 黄色表示 BS3 vs ES3 特有的 DEGs, 蓝色表示以上各比较组间共有的 DEGs; 不同文字颜色表示 DEGs 的上下调情况, 红色表示在 BS 中上调的 DEGs, 黑色表示在 BS 中下调的 DEGs; B-MCO 家族的 MYB 顺式调控元件分布; C-MCO 基因在 2 个品种丝瓜中不同发育阶段的表达模式; D-LcMYB 基因在 2 个品种丝瓜中不同发育阶段的表达模式。

A-analysis of molecular regulatory networks of MCO and MYB in *L. cylindrica*. The different shapes represent *LcMYB* and *lcMCO*; different icon colors represent different groups of DEGs, orange represents unique DEGs of BS1vsES1, yellow represents unique DEGs of BS3vsES3, and blue represents common DEGs among the comparison groups mentioned above; different text colors indicate the upward and downward adjustment of DEGs, red represents the upward adjustment of DEGs in BS, and black represents the downward adjustment of DEGs in BS. B-the distribution of MYB cis regulatory elements in the MCO family. C-the expression patterns of MCO genes in two luffa varieties at different developmental stages. D-the expression patterns of *LcMYB* genes in two luffa varieties at various developmental stages.

图 8 *LcMYB* 基因与铜氧化酶相关靶基因的关系

Fig. 8 Relationship between *LcMYB* genes and target genes related to copper oxidase

基因和 *LcMYB* 基因在丝瓜中的表达模式,从转录组数据中获取 8 个 *MCO* 基因和 *LcMYB* 基因在 2 个丝瓜品种不同坐果期的 FPKM 值,分别生成基因的表达谱。结果显示,在第 1 坐果阶段中,Maker00033483 和 MSTRG.16248.2 在 B 组中高表达, Maker00037875 和 MSTRG.16248.1 在 E 组中高表达,第 3 坐果阶段中, MSTRG.17857.1 在 B 组中高表达, MSTRG.729.8 在 E 组中高表达(图 8-C)。

在 *LcMYB* 基因的表达谱中,可以发现 2 个品种相同阶段高表达的基因几乎没有重叠(图 8-D),这表明在 2 个品种中主要发挥作用的是不同的 MYB 基因。在 B 组中,第 1 坐果阶段高表达的基因数量高于第 2、3 坐果阶段, *LcMYB\_282*、*LcMYB\_342* 和 *LcMYB\_114* 等 11 个基因在第 1 坐果阶段高表达, *LcMYB\_286*、*LcMYB\_289* 和 *LcMYB\_411* 等 5 个基因在第 2 坐果阶段高表达, *LcMYB\_287*、*LcMYB\_155*、*LcMYB\_205*、*LcMYB\_162* 共 4 个基因在第 3 坐果阶段高表达。在 E 组中,第 3 坐果阶段高表达的基因数量高于第 1、2 坐果阶段,其中 *LcMYB\_325*、*LcMYB\_432* 和 *LcMYB\_119* 等 6 个基因在第一坐果阶段高表达, *LcMYB\_16*、*LcMYB\_348*、*LcMYB\_322* 共 3 个基因在第 2 坐果阶段高表达, *LcMYB\_29*、*LcMYB\_135* 和 *LcMYB\_48* 等 15 个基因在第 3 坐果阶段高表达。

#### 4 讨论

MYB 转录因子主要参与植物的生长发育、初级和次级代谢、氧化应激等方面的调控<sup>[20]</sup>。Sun 等<sup>[21]</sup>利用 HMM 数据搜索及同源比对等方式在马铃薯中鉴定到 158 个 MYB 转录因子。研究发现多个 MYB 可能参与了马铃薯类黄酮的合成或激素或胁迫的响应。本研究基于丝瓜基因组的组装和注释,共鉴定到 449 个 *LcMYB* 转录因子,其数目在植物 MYB 数目的范围内<sup>[22]</sup>。在拟南芥、苹果、番茄、茄子、马铃薯等物种中, R2R3\_MYB 亚家族的数目最多<sup>[23]</sup>,而在 *LcMYB* 所属的 4 个亚家族中, R1\_MYB 亚家族的数目最多,有 296 个基因,而 R2R3\_MYB 亚家族有 135 个基因。猜测这有可能是 R1\_MYB 亚家族在丝瓜内经历了扩张和物种适应之后的结果。

同源基因大多都具有相似的功能<sup>[24-25]</sup>,在 *LcMYB* 家族系统发育树上,同一分支相邻的基因基本都具有相同的结构, *LcMYB\_192*、*LcMYB\_257* 和 *LcMYB\_412* 等 8 个基因具有相同的结构并聚集在同一支, *LcMYB\_102*、*LcMYB\_103* 和 *LcMYB\_104* 等 8 个基因包含相同的基序且序列最长,也聚集在

同一分支,这些基因在基因座上以基因簇的形式存在,表明这些蛋白质可能具有相似的功能。

在已有的研究中,发现 R1\_MYB 家族基因主要参与植物的形态发育、次生代谢及果实的发育等生理过程<sup>[26]</sup>, R2R3\_MYB 则广泛参与植物初生及次生代谢、激素信号传导、生物及非生物逆境响应等生命过程<sup>[12]</sup>, R3\_MYB 在细胞周期控制方面起到重要的调控作用<sup>[27]</sup>, R4\_MYB 目前在植物中功能研究较少。基因在生物体内发挥的功能与其基因数量分布情况有关<sup>[28]</sup>,丝瓜中 R1\_MYB 亚家族基因数目最多,因此,猜测 *lc1R\_MYB* 亚家族在 *LcMYB* 中发挥主要作用。

在现有的研究中,将果实褐化分为酶促褐化和非酶促褐化,果实褐化以酶促褐化为主<sup>[29]</sup>,而褐化的主要原因是多酚类物质氧化成醌类物质,使得果实变为褐色<sup>[30]</sup>。在苹果褐化的研究中,发现苹果 MYB 转录因子可以激活 *ACS* 和 *ACO* 基因的表达来调控 ET 的生物合成,最终通过提高多酚氧化酶活力的方式引起苹果果实褐变的现象<sup>[31]</sup>,在另外的研究中,MYB 转录因子在调控苹果褐变中发挥着与 PPO 相当的作用,并且在物理损伤后,响应氧化应激反应,这会促进苹果的褐化<sup>[29]</sup>。在丝瓜中,MYB 家族可能也存在类似的调控机制, *LcMYB225/226* 调控转录抑制因子 *PER2* 的表达, *LcMYB73/164/202/379* 调控氧化还原酶编码基因 *GRXC9* 的表达,因此推测 *LcMYB* 转录因子通过下调靶基因 *PER2* 的表达,降低对乙烯的抑制作用,通过上调靶基因 *GRXC9* 的表达促进氧化还原反应,最终促进丝瓜的褐化。

多铜氧化酶在桃褐化<sup>[32]</sup>、荔枝褐化<sup>[30]</sup>过程中起着重要作用,在本实验室尚未发表的研究中也发现,丝瓜多铜氧化酶与丝瓜的褐化有着密切的联系。因此,将 *LcMYB* 基因与铜氧化酶相关靶基因进行结合分析。在褐化品种的 3 个发育阶段分别有 *LcMYB\_282*、*LcMYB\_342*、*LcMYB\_114* 等 11 个基因和 *LcMYB\_286*、*LcMYB\_289*、*LcMYB\_411* 等 5 个基因以及 *LcMYB\_287*、*LcMYB\_155*、*LcMYB\_205* 等 4 个基因高表达。以上的基因均参与多铜氧化酶相关靶基因调控,并引起 *SKU5*、*LAC4*、*LAC17*、*ASOL*、*LAC1* 等 5 个 *MCO* 编码基因在褐化丝瓜品种中上调。因此推测,褐化丝瓜品种中 MYB 转录因子通过上调多铜氧化酶相关靶基因的表达从而强化了丝瓜的褐化。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 李佳欣, 冯玉. 丝瓜不同部位药理作用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 355-361.
- [2] 柳明悦, 郭洪波. 丝瓜的食药价值及其开发前景 [J]. 新农业, 2023(22): 12-13.
- [3] Feng Y N, Feng C, Wang Y H, *et al.* Effect of  $\text{CaCl}_2$  treatment on enzymatic browning of fresh-cut *Luffa* (*Luffa cylindrica*) [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(6): 473.
- [4] Muthamilarasan M, Khandelwal R, Yadav C B, *et al.* Identification and molecular characterization of MYB transcription factor superfamily in C4 model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109920.
- [5] Zhang C H, Ma R J, Xu J L, *et al.* Genome-wide identification and classification of MYB superfamily genes in peach [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0199192.
- [6] Ji Q, Wang D W, Zhou J, *et al.* Genome-wide characterization and expression analyses of the MYB superfamily genes during developmental stages in Chinese jujube [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6353.
- [7] Fan H H, Cui M L, Li N H, *et al.* Genome-wide identification and expression analyses of *R2R3-MYB* transcription factor genes from two Orchid species [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9781.
- [8] Muhammad N, Luo Z, Yang M, *et al.* The joint role of the late anthocyanin biosynthetic UFGT-encoding genes in the flowers and fruits coloration of horticultural plants [J]. *Sci Hortic*, 2022, 301: 111110.
- [9] Rabinowicz P D, Braun E L, Wolfe A D, *et al.* Maize *R2R3 Myb* genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants [J]. *Genetics*, 1999, 153(1): 427-444.
- [10] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(5): 447-456.
- [11] Du H, Zhang L, Liu L, *et al.* Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family [J]. *Biochemistry*, 2009, 74(1): 1-11.
- [12] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, *et al.* MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573-581.
- [13] Wang H H, Wang X Q, Yu C Y, *et al.* MYB transcription factor PdMYB118 directly interacts with bHLH transcription factor PdTT8 to regulate wound-induced anthocyanin biosynthesis in poplar [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 173.
- [14] Liu T L, Chen T Z, Kan J L, *et al.* The GhMYB36 transcription factor confers resistance to biotic and abiotic stress by enhancing *PR1* gene expression in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20(4): 722-735.
- [15] Prouse M B, Campbell M M. The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(1): 67-77.
- [16] Jiang C Z, Gu J Y, Chopra S, *et al.* Ordered origin of the typical two-and three-repeat *Myb* genes [J]. *Gene*, 2004, 326: 13-22.
- [17] Zhong R H, Wei J B, Liu B, *et al.* Metabolite and transcriptome profiles of proanthocyanidin biosynthesis in the development of *Litchi* fruit [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 532.
- [18] Wang L, Wang W X, Shan J W, *et al.* A genome-wide view of the transcriptome dynamics of fresh-cut potato tubers [J]. *Genes*, 2023, 14(1): 181.
- [19] 康凯程, 牛西强, 黄先忠, 等. 辣椒 R2R3-MYB 转录因子家族的全基因组鉴定与比较进化分析 [J]. 植物学报, 2021, 56(3): 315-329.
- [20] 位欣欣, 兰海燕. 植物 MYB 转录因子调控次生代谢及逆境响应的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(8): 12-23.
- [21] Sun W J, Ma Z T, Chen H, *et al.* MYB gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.): Genome-wide identification of hormone-responsive reveals their potential functions in growth and development [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4847.
- [22] Carré I A, Kim J Y. MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(374): 1551-1557.
- [23] Matus J T, Aquea F, Arce-Johnson P. Analysis of the grape MYB *R2R3* subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 83.
- [24] Cobo N, Wanjugi H, Lagudah E, *et al.* A high-resolution map of wheat *QYr.ucw-1BL*, an adult plant stripe rust resistance locus in the same chromosomal region as *Yr29* [J]. *Plant Genome*, 2019, 12(1): 78-89.
- [25] Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development [J]. *Bioessays*, 2010, 32(6): 473-480.
- [26] Ambawat S, Sharma P, Yadav N R, *et al.* MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2013, 19(3): 307-321.
- [27] Pesch M, Hülskamp M. One, two, three...models for trichome patterning in *Arabidopsis*? [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12(5): 587-592.
- [28] 郭凯, 侯留迪, 张莹莹, 等. 植物 MYB 基因家族研究进展 [J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2020, 17(6): 93-98.
- [29] Wang X Y, Zhang X M, Jia P, *et al.* Transcriptomics and metabolomics provide insight into the anti-browning mechanism of selenium in freshly cut apples [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1176936.
- [30] 张海新, 宁久丽, 及华. 果实褐变研究现状及发展方向 [J]. 保鲜与加工, 2010, 10(1): 7-10.
- [31] 李婷, 王文军, 陈鸥, 等. AP2/ERF 转录因子调控果蔬采后病害的作用研究进展 [J]. 食品科学, 2022, 43(15): 312-319.
- [32] 王康, 杨民杰, 吴思宜, 等. 桃漆酶基因家族鉴定及其与冷害褐变的关系 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 264-274.

[责任编辑 时圣明]