

神农香菊 *R2R3-MYB* 基因家族鉴定及其响应 UV-B 胁迫的表达模式分析

何叶¹, 梅洋¹, 汪苗苗¹, 杨静月¹, 张景景^{1,2*}, 刘义飞^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430061

摘要: **目的** 旨在鉴定神农架民间药用植物神农香菊 *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* 的 *R2R3-MYB* 基因家族成员 (命名为 *CiaMYB*), 解析其基因进化特征及响应 UV-B 胁迫的表达特征模式, 探讨其调控黄酮类化合物合成的分子机制。**方法** 基于神农香菊全基因组序列, 通过生物信息学分析全面鉴定 *CiaMYB* 家族成员, 系统分析其蛋白理化性质、染色体定位、基因结构、共线性关系及顺式作用元件组成; 结合转录组测序与相关性分析, 筛选参与黄酮类化合物生物合成的 *CiaMYB* 基因; 利用实时荧光定量 PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 验证关键基因表达模式, 并解析蛋白功能定位。**结果** 共鉴定出 140 个 *CiaMYB* 基因, 其编码蛋白为 206~868 个氨基酸组成的亲水性蛋白, 不均匀分布于 9 条染色体中。启动子区富集光响应、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 信号通路相关顺式作用元件。UV-B 辐照显著诱导 *CiaMYB* 基因差异表达和叶片总黄酮积累, 其中 *CiaMYB040* 和 *CiaMYB066* 与拟南芥黄酮醇合成关键的 *S7* 亚家族高度同源, 且表达量与总黄酮含量呈极强正相关, 提示其在黄酮合成途径中发挥关键转录调控作用。亚细胞定位证实 *CiaMYB040* 和 *CiaMYB066* 蛋白定位于细胞核。**结论** 首次系统揭示神农香菊 *R2R3-MYB* 家族成员的进化特征, 初步筛选了响应 UV-B 胁迫参与调控黄酮类物质合成的 *CiaMYB* 基因, 为解析植物高海拔抗逆适应的分子机制, 菊科植物黄酮代谢调控及抗逆遗传改良提供了重要的候选基因资源。

关键词: 神农香菊; *R2R3-MYB*; 转录调控; UV-B; 黄酮代谢

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1460-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.04.022

Identification of *R2R3-MYB* gene family in *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* and analysis of their expression patterns in response to UV-B stress

HE Ye¹, MEI Yang¹, WANG Miaomiao¹, YANG Jingyue¹, ZHANG Jingjing^{1,2}, LIU Yifei^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061, China

Abstract: Objective To identify members of the *R2R3-MYB* gene family (named *CiaMYB*) in *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*, a folk medicinal plant from Shennongjia, analyze their genetic evolutionary characteristics and expression patterns in response to UV-B stress, and explore the molecular mechanisms by which they regulate flavonoid synthesis. **Methods** Based on the whole-genome sequence of *C. indicum* var. *aromaticum*, bioinformatics analyses were performed to comprehensively identify *CiaMYB* members, and systematic analyses were conducted on their protein physicochemical properties, chromosomal localization, gene structure, collinearity relationships, and composition of *cis*-acting elements. Combined with transcriptome sequencing and correlation analysis, *CiaMYB* genes involved in flavonoid biosynthesis were screened. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the expression patterns of key genes, and the functional localization of the proteins was analyzed. **Results** A total of 140 *CiaMYB* genes were identified, encoding hydrophilic proteins consisting of 206—868 amino acids, which are unevenly distributed on nine chromosomes. The promoter regions are enriched with *cis*-acting elements related to light response, abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MeJA) signaling pathways. UV-B irradiation significantly induces differential expression of *CiaMYB* genes and accumulation of total flavonoids in leaves. Among them, *CiaMYB040* and *CiaMYB066* are highly homologous to the *S7*

收稿日期: 2025-10-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32270231); 湖北中医药大学重大项目 (2023ZDXM006)

作者简介: 何叶 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源品质评价及开发利用。E-mail: 2477067231@qq.com

*通信作者: 张景景, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药资源评价与应用。E-mail: zhangjingjing851@126.com

刘义飞, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药品质多组学研究。E-mail: liuyifei@hbucom.edu.cn

subfamily, which is critical for flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana*, and their expression levels show a strong positive correlation with total flavonoid content, suggesting that they play a key transcriptional regulatory role in the flavonoid synthesis pathway. Subcellular localization confirmed that CiaMYB040 and CiaMYB066 proteins are localized in the nucleus. **Conclusion** This study is the first to systematically reveal the evolutionary characteristics of R2R3-MYB family members in *C. indicum* var. *aromaticum*, and preliminarily screen CiaMYB genes that respond to UV-B stress and are involved in regulating flavonoid synthesis. It provides important candidate gene resources for elucidating the molecular mechanism of plant high-altitude stress adaptation, as well as for flavonoid metabolism regulation and stress-resistant genetic improvement in Asteraceae plants.

Key words: *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* L.; R2R3-MYB; transcriptional regulation; UV-B; flavonoid metabolism

神农香菊 *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* L.为中药资源物种野菊 *C. indicum* L.的地方性变种,独特分布于湖北神农架地区海拔2000 m以上的向阳开阔山地^[1],因全株具有浓郁的香气而得名。作为民间草药,神农香菊富含萜类和黄酮类等天然成分^[2],其干燥花蕾常用作健康茶饮或其他药用材料,相比野菊花具有更好的清热解毒、消炎抗菌等功效^[3-4]。由于其独特的香气,前期研究多集中于对神农香菊挥发油成分及相关药理药效作用机制的研究,为其作为芳香性添加剂、医药或化妆品原料应用等提供科学佐证^[5]。相反,神农香菊的黄酮类成分及其产生的机制研究较少。作为野菊独特的变种资源,神农香菊也是现代药用和观赏菊花育种的优良芳香型亲本材料,具有广阔的应用价值和前景。

植物适应高海拔极端环境通常会面临强 UV-B 辐射、低温、干旱等不同的环境压力。UV-B 辐射作为高海拔生态系统的核心胁迫因子,不仅直接威胁植物基因组的稳定性,造成 DNA 损伤^[6],还会降低光合作用能力,影响植物的形态和生长发育^[7]。为了适应环境,植物通常会进化对应的保护或者修复机制,包括诱导特殊次生代谢产物形成,塑造物种独特的化学防御和生态适应体系^[8]。已有研究表明,植物响应 UV-B 辐射的次生代谢产物主要为酚类化合物、黄酮类物质以及羟基肉桂酸酯等,在其表皮细胞的液泡中形成富集,促进 UV-B 的吸收和对植物内部组织的保护^[9]。UV-B 辐射压力在植物体内的反馈通过激活 UVR8-COP1-HY5 等核心信号通路,调控黄酮类化合物及萜类骨架的生物合成,形成“光胁迫-代谢重构”的适应性响应网络^[10-11]。

转录因子(transcription factors, TFs)在植物逆境应答中发挥核心调控作用,其中 MYB 家族因参与次生代谢、细胞周期及信号转导而备受关注^[12]。R2R3-MYB 亚家族作为植物中最大的 MYB 类型,其成员通过保守的 DNA 结合域(DNA bindign

domain, DBD)识别靶基因启动子区的特定基序,调控类黄酮^[13]、木脂素^[14]及萜类^[15]等代谢通路。前期研究表明,UV-B 胁迫可改变 R2R3-MYB 基因的表达,例如在高山作物苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.^[16]中,UV-B 处理会抑制 FtMYB4R1 的表达,解除其对下游基因的抑制,从而促进黄酮类化合物的积累。UV-B 辐照茶树 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze 叶片后,通过激活 CsMYB75 直接或间接调控萜类合成酶基因(*CsTPS*)促进萜类化合物合成^[17]。在神农香菊中,部分研究报道了 R2R3-MYB 类转录因子对镉和干旱胁迫耐受性及木质素形成的影响^[18],但该类转录因子在介导神农香菊高海拔 UV-B 胁迫适应性中的功能机制尚未报道。由于缺乏完整基因组数据,神农香菊中该类转录因子家族成员的基因结构、理化性质及其染色体定位信息尚未得到系统解析。

本研究基于课题组前期获得的神农香菊基因组,在全基因组层面系统鉴定神农香菊 R2R3-MYB 基因家族成员,解析其理化特征、染色体分布方式及进化关系;与此同时,通过 UV-B 梯度胁迫实验,结合转录组和黄酮成分含量分析,揭示 MYB 基因表达与黄酮成分含量动态变化的关系,并利用亚细胞定位进一步验证候选基因的功能定位。研究结果为神农香菊及其他菊科药用植物的黄酮类成分生物合成调控与抗逆应答分子机制研究提供重要理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

实验材料采自湖北神农架林区神农香菊原始生境中经自然成熟的种子。将种子置于光照培养箱中,于 25 °C、45%相对湿度及 650 μW/cm² 自然光条件下萌发,并持续培养 60 d,选取长势一致的植株进行 UV-B 处理。设置 5 个处理组:自然光对照组(UV 0)、UV-B 辐照组包括 12 h (UV 12)、24 h (UV 24)、48 h (UV 48) 和 72 h (UV 72)。辐照强

度 $400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，每组 6 个生物学重复，实验独立重复 3 次。辐照结束后，采集神农香菊顶部的叶片 3~4 片，液氮冷冻后存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2 试剂

植物 RNA 提取试剂盒 (Bioteke Corporation, 批号 B026007023)、RNA 反转录试剂盒 (Transgen, 批号 AH311)、总黄酮含量测定试剂盒 (biosharp, 批号 BL867A)、qRT-PCR 试剂盒 (ABclonal, 批号 RK21219)、琼脂糖凝胶回收试剂盒 (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, Omega 公司)。

2 方法

2.1 *CiaMYB* 基因家族鉴定与序列分析

基于课题组前期获得的神农香菊二倍体基因组数据 (NGDC: PRJCA029409)，采用 HMMER 3.0^[19] 软件，以 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 的 MYB 结构域 (PF00249) 隐马尔可夫模型 (HMM) 为查询响应对象，筛选含完整 R2R3-MYB 结构域的蛋白序列 (E 值 $\leq 1 \times 10^{-5}$)，结果列为候选基因集 1。从 TAIR 数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 R2R3-MYB 蛋白序列 (126 条)，通过 BLAST 比对 (E 值 $\leq 1 \times 10^{-5}$ ，相似度 $\geq 50\%$)^[20]，筛选神农香菊同源基因，结果列为候选基因集 2。取 2 个结果的交集，进一步基于序列长度 (≥ 200 个氨基酸) 和 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>) 在线工具验证结构域完整性，最终确定 *CiaMYB* 基因家族成员。利用 ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 计算蛋白相对分子量、等电点、不稳定指数及亲水性平均值等，通过 Plant-PLoc 在线工具 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>) 预测亚细胞定位。

2.2 保守基序和基因结构分析

基于 R2R3-MYB 蛋白序列比对结果，利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 预测蛋白保守基序 (最大 Motif 数=10)。利用 TBtools (v2.315)^[21] 对 R2R3-MYB 外显子和内含子信息进行提取、定位和可视化。

2.3 染色体定位与共线性分析

从神农香菊基因组注释文件中提取 *CiaMYB* 基因染色体定位信息，使用 TBtools 工具绘制基因分布图。通过 MCScanX^[22] 分析串联重复与片段重复事件，构建神农香菊与菊科近缘物种野菊、菊花脑 *C. nankingense* R2R3-MYB 基因的共线性关系。

2.4 启动子区域顺式调控元件分析

利用 TBtools 提取 *CiaMYB* 基因启动子区上游 2 000 bp 序列。将这些基因提交到 Plant CARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)，鉴定光响应、激素响应及胁迫相关元件。

2.5 家族成员系统分类

对神农香菊和拟南芥的 R2R3-MYB 蛋白序列进行系统发育分析。使用 MUSCLE (v5.1.0)^[23] 对 R2R3-MYB 蛋白进行多序列比对，采用 IQ-TREE (v2.2.3)^[24] 基于最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建系统发育树，重复抽样 1 000 次。通过 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 进行结果可视化。

2.6 总黄酮含量测定

称取约 0.1 g 神农香菊新鲜叶片，研磨均质后加入 1.5 mL 的 60% 乙醇， $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡提取 2 h， $10\,000 \sim 12\,000 \times g$ ， $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min，取上清，置冰上待测。采用总黄酮含量测定试剂盒， $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定叶片黄酮总含量，于 510 nm 波长下测定反应吸光度值，通过标准曲线计算总黄酮含量。

2.7 与黄酮合成关联 *MYB* 基因分析

结合拟南芥 R2R3-MYB 亚家族功能分类信息^[25] 和系统发育树聚类，初步筛选与黄酮合成相关的 *CiaMYB* 基因。基于神农香菊不同 UV-B 辐照时间 (0、12、24、48、72 h) 转录组测序数据 (NGDC: CRA032029)，根据 Tags Per Million 算法 (TPM) 对 RNA-seq 表达进行归一化处理，利用迈维云平台 (<https://cloud.metware.cn>) 绘制 *CiaMYB* 基因在不同 UV-B 辐照时间下的表达模式热图。随后对 *CiaMYB* 基因的表达量与总黄酮含量进行皮尔逊相关 (Pearson correlation) 系数分析，最终，将与总黄酮含量显著相关且与系统发育鉴定到的重合的 *CiaMYB* 基因作为实验验证的候选基因。

2.8 qRT-PCR 分析

从转录组数据中鉴定的候选 *CiaMYB* 基因的 CDS 序列，通过 Snapgene (v4.3.11) 软件设计特异性引物 (表 1)。选择 *EF1a* 基因作为内参基因^[26]。使用植物 RNA 提取试剂盒 (Bioteke Corporation, 批号 B026007023) 提取神农香菊 UV-B 辐照组叶片总 RNA，用 RNA 反转录试剂盒 (Transgen 公司, 批号 AH311) 反转录成 cDNA，使用实时荧光定量 PCR 仪 (Roche Diagnostics GmbH 公司, 德国) 进行 qRT-PCR 检测，反应体系及程序参考 qRT-PCR 试剂盒 (ABclonal 公司, 批号 RK21219)，每个样品

表 1 *CiaMYB* 基因 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences of *CiaMYB* gene

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>CiaMYB040</i>	CGTATGATGATTGGAATTGG	ATCTGTTGTAGTGCTCTC
<i>CiaMYB066</i>	GGCGAACTGATAATGAGATA	TTATGTCAACCGAGGCTA
<i>EF1α</i>	TTTTGGTATCTGGTCCTGGAG	CCATTCAAGCGACAGACTCA

重复 3 次。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法^[27] 计算相对表达量, 通过 GraphPad prism 9.0 进行独立样本 *t* 检验及单因素方差分析 (多组间比较), 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为显著差异。

2.9 亚细胞定位实验

根据植物 RNA 提取试剂盒 (Bioteke 公司, 批号 B026007023) 提取神农香菊的总 RNA。采用 RNA 反转录试剂盒 (Transgen 公司, 批号 AH311) 将 RNA 样品逆转录为 cDNA, 并保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。根据瞬时表达载体 pSurper1300-GFP 的 HindIII、Acc65I 酶切位点, 使用 Snapgene 软件设计含有 pSurper1300-GFP 载体同源序列的引物 (表 2), 以 cDNA 为模板对 *CiaMYB* 基因进行 PCR 扩增。使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit,

Omega 公司) 纯化回收目的片段后, 与 pSurper1300-GFP 连接并转化至 DH5 α 感受态细胞。筛选阳性克隆进行测序通过化学转化法将构建好的载体质粒转入根癌农杆菌 (GV3101) 中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。利用接种环将根癌农杆菌刮下固体培养皿, 接入 50 mL 相应抗性的 LB 液体培养基, 200 r/min 过夜摇菌, 收集菌体 (5 000 r/min 离心 10 min)。去除上清, 将细菌重悬于 10 mmol/L MgCl $_2$ (含 100 $\mu\text{mol/L}$ AS) 悬浮液中, 并将 A_{600} 调整至 0.6 左右。选取生长状况良好的本氏烟草植株, 用 1 mL 注射器注射于叶片下表皮, 去除针尖, 做好标记。将注射后的烟草植株在弱光下培养 2 d。取标记好的农杆菌注射烟草叶片, 制成玻片, 在激光共聚焦扫描显微镜 (Leica 公司, 德国) 下观察, 并拍照。

表 2 *CiaMYB* 基因亚细胞定位引物序列
Table 2 Subcellular localization primer sequences of *CiaMYB* gene

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>CiaMYB040</i>	CAAATCGACTCTAGAAAGCTT	CTCGCCCTTGCTCATGGTACCTT
	ATGGAAAGGGGTTGAGAAAA	AAGAAAGAAGCCATGCATCTGA
<i>CiaMYB066</i>	CAAATCGACTCTAGAAAGCTT	CTCGCCCTTGCTCATGGTACCCTA
	ATGGGAAGAGCACCTTGCTG	GTAGCGATGTAGCTCAAGATTATCA

3 结果与分析

3.1 神农香菊 *R2R3-MYB* 基因家族成员的鉴定

本研究基于拟南芥 126 个 *R2R3-MYB* 蛋白序列和保守结构域 PF00249, 对神农香菊进行全基因组扫描, 共鉴定出 140 个完整的 *R2R3-MYB* 基因, 命名为 *CiaMYB001*~*CiaMYB140* (图 1-A)。基因理化性质分析显示, *CiaMYB* 蛋白家族成员间存在显著差异, 蛋白长度范围为 206~868 aa, 相对分子质量为 24 070~966 500, 理论等电点为 4.75~9.81, 79 个蛋白呈酸性, 61 个呈碱性。所有成员 GRAVY 值均 < 0 , 表明均为亲水性蛋白, *CiaMYB108* 亲水性最强 (-1.036)。不稳定指数分析显示, 仅 5 个蛋白 (*CiaMYB028*、*CiaMYB031*、*CiaMYB085*、

CiaMYB113 和 *CiaMYB120*) 具备结构稳定性 ($II < 40$)。亚细胞定位预测表明, 所有 *CiaMYB* 蛋白均定位于细胞核。

染色体定位分析显示, 140 个 *CiaMYB* 基因非均匀分布于神农香菊的 9 条染色体上 (图 1-A)。1 号染色体 *CiaMYB* 基因数目最多 (21 个, 占 15.00%), 8 号染色体最少 (6 个, 占 4.29%)。Chr1、Chr2、Chr6 和 Chr7 染色体均存在串联基因簇分布现象, 暗示 MYB 家族成员的扩张。多序列比对揭示 *CiaMYB* 基因结构域高度保守 (图 1-B): R2 结构域含 3 个色氨酸 (W) 残基, 呈 [W]-x(19)-[W]x(19)-[W] 基序; R3 结构域含 2 个 W 残基, N 端呈 [W]-x(18)-[W] 基序。

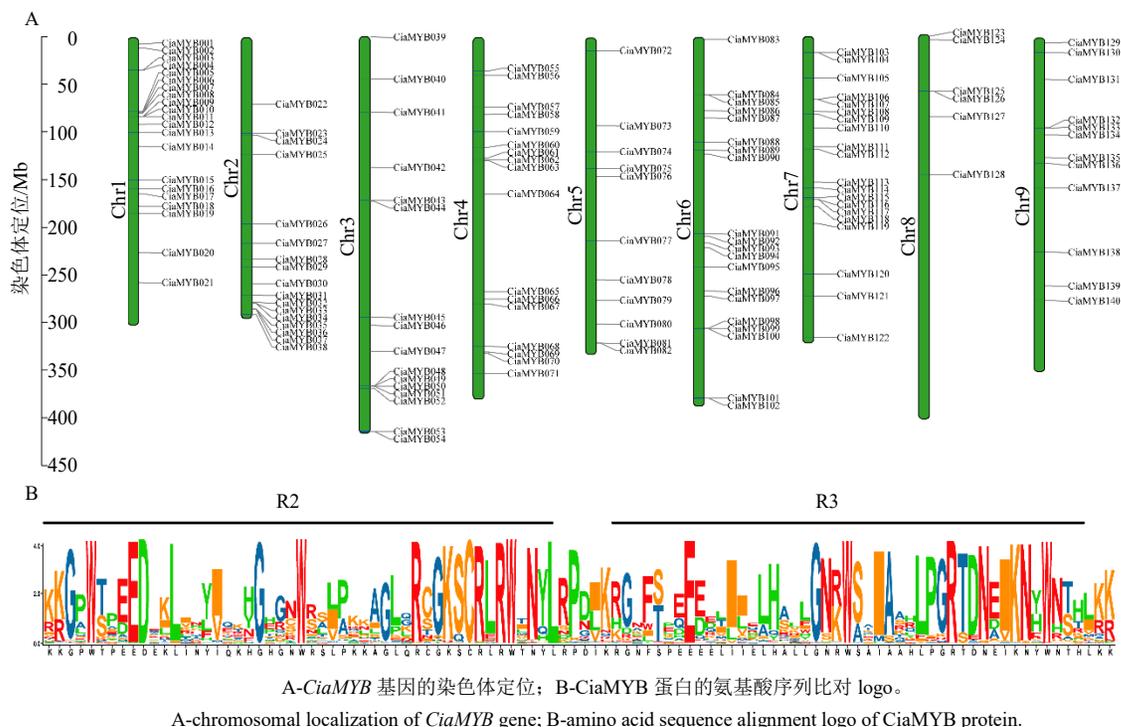


图1 神农香菊 *CiaMYB* 基因的染色体定位分析

Fig. 1 Chromosomal localization analysis of *CiaMYB* gene from *C. indicum* var. *aromaticum*

3.2 *CiaMYB* 基因的分类、保守基序和结构分析

在 140 个 *CiaMYB* 蛋白中，共识别出 10 个保守基序 (Motif 1~10)，其长度为 11~38。除 *CiaMYB028* 和 *CiaMYB085*，其余转录因子均含有 3 个或 3 个以上的保守基序。Motif 1~4 在 135~139 个 *CiaMYB* 蛋白家族成员中普遍存在，构成 MYB 结构域核心组件 (图 2-A)。虽然同一亚家族的 *CiaMYB* 蛋白的基序组成较为相似，部分成员在保守基序上也存在不一致，这些可能部分源自进化过程中的结构变异。相比而言，不同亚家族成员的基序组成多不同，反映了 *R2R3-MYB* 基因结构的多样化。

CiaMYB 基因结构分析进一步表明其内含子和外显子数目存在差异。在 140 个亚家族成员中，多数基因包含 1~3 个外显子 (108, 83.57%)，其余则包含 4 个或以上外显子 (图 2-B)。同时，除了 *CiaMYB018*、*CiaMYB029*、*CiaMYB032*、*CiaMYB033*、*CiaMYB034*、*CiaMYB087*、*CiaMYB109*、*CiaMYB119*、*CiaMYB120* 等 10 个基因外，其余 *CiaMYB* 基因的编码序列均被内含子中断。

3.3 *CiaMYB* 基因的基因复制与共线性分析

基因复制是影响基因家族形成、成员扩张及功能分化的主要因素。对神农香菊 *CiaMYB* 基因家族

成员之间的基因复制事件分析共鉴定出 50 个 (35.71%) 重复基因 (图 3)。这些重复基因为 25 个高度同源的基因对 (图 4)，均被鉴定为全基因组复制 (whole genome duplication, WGD) 基因。因此，WGD 事件可能是驱动 *CiaMYB* 基因家族成员扩张的最重要因素。

基于神农香菊与野菊、菊花脑的共线性分析表明，共有 108 个神农香菊 *CiaMYB* 基因与野菊中的 *MYB* 基因存在共线性关系，而菊花脑中有 101 个 (图 4)。物种共线性基因的数量差异与三者之间的物种进化关系差异 (变种间与物种间) 具有较好的一致性。此外，89 个 *CiaMYB* 基因为 3 个物种共享，可能在其生长发育和进化过程中发挥了核心基础调控功能。

3.4 *CiaMYB* 基因的顺式作用元件分析

对 *CiaMYB* 基因启动子区的顺式作用元件预测分析表明，大多数 *CiaMYB* 基因的启动子存在激素相关元件，如茉莉酸甲酯 (MeJA, 506)、脱落酸 (ABA, 429)、赤霉素 (GA, 115) 和水杨酸 (SA, 67) 等。此外还包括干旱诱导 (108)、低温 (120)、防御和胁迫响应 (72) 和伤害 (3) 等胁迫响应元件，以及与植物生长发育过程调控相关的元件如生长素响应 (106) 等 (表 3)。

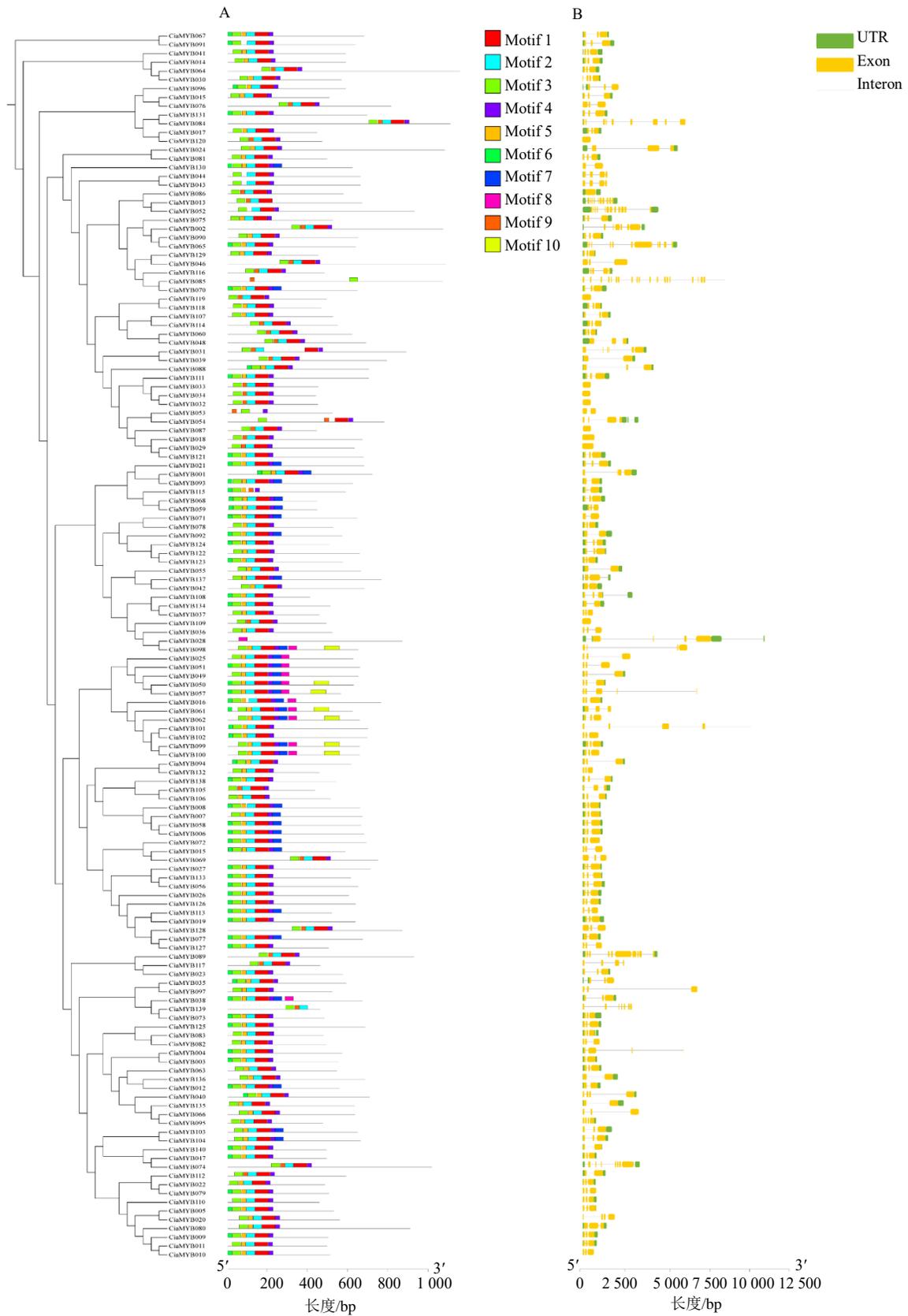
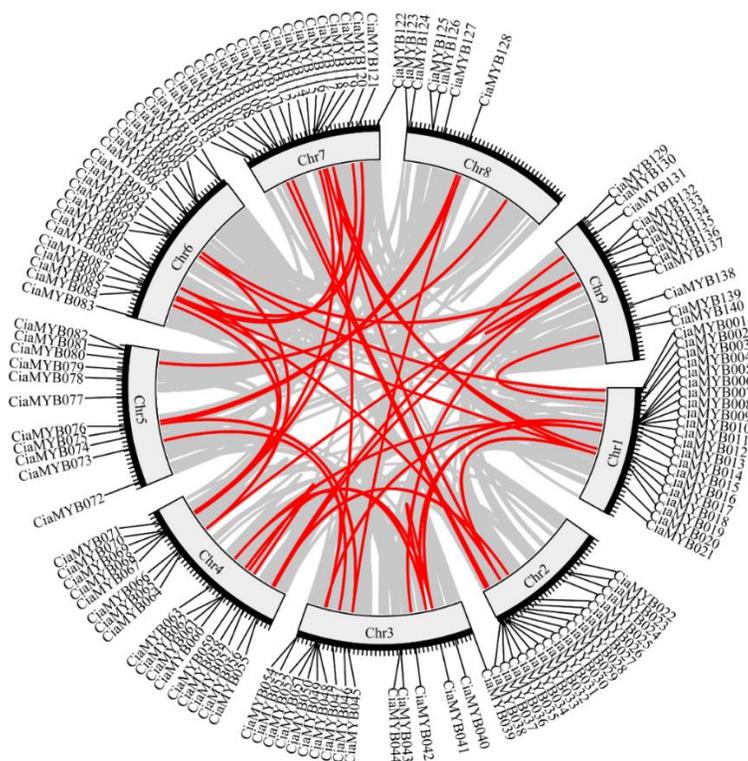


图 2 神农香菊 *CiaMYB* 基因的基序组成和基因结构

Fig. 2 Motif composition and gene structure of *CiaMYB* genes in *C. indicum* var. *aromaticum*



红色线表示 CiaMYB 复制片段。

Red lines indicate CiaMYB duplication segments.

图3 神农香菊 R2R3-MYB 基因家族的共线性分析

Fig. 3 Collinearity analysis of R2R3-MYB gene family in *C. indicum* var. *aromaticum*

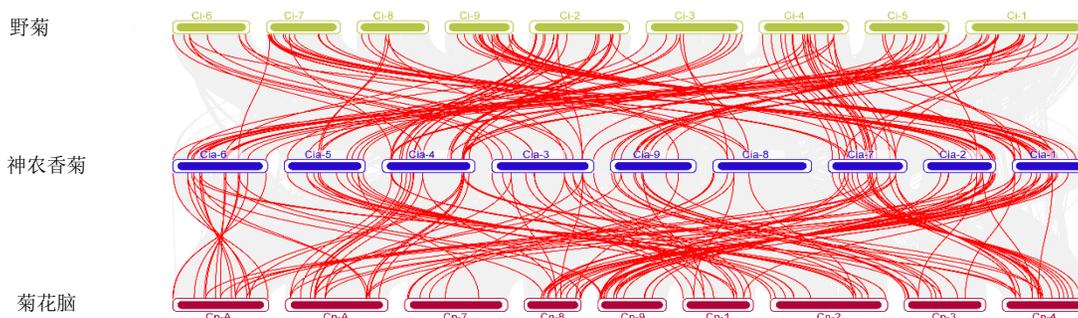


图4 神农香菊、野菊和菊花脑中 R2R3-MYBs 的共线性关系

Fig. 4 Collinearity relationships of R2R3-MYBs among *C. indicum* var. *aromaticum*, *C. indicum* and *C. nankingense*

140 个 *CiaMYB* 基因启动子中均含有光响应元件 (951)。其中, 大部分 *CiaMYB* 基因启动子中含有 G-Box 元件 (125), 其次是 GT1-motif 元件 (51) (图 5)。上述结果表明, *CiaMYB* 基因在神农香菊生长发育和胁迫响应过程中可能受到启动子区域多种顺式作用元件的调控。

3.5 UV-B 辐射对神农香菊形态及总黄酮含量的影响

为更好地理解高海拔环境中增加的 UV-B 辐射对神农香菊生长与适应的影响, 本研究对神农香菊幼苗实施梯度时间 (0、12、24、48、72 h) 的 UV-

B 辐照胁迫处理。形态观察显示, UV-B 辐射 12 h 后神农香菊的叶片无明显萎蔫或干枯现象, 但 24 h 及以后的时间段其叶片呈现渐进式卷曲和枯萎变黄现象 (图 6-A)。通过紫外分光光度计法测定叶片中总黄酮的含量, 发现 UV-B 胁迫能显著诱导黄酮类物质积累 ($P < 0.05$), 在 UV-B 胁迫 12 h 和 24 h 后, 与对照相比, 总黄酮含量分别上升 2.66、3.73 倍 (图 6-B)。而在 24 h 后逐渐达到总黄酮积累的平台期, 24、48、72 h 总黄酮含量未显示出显著差异。该动态变化与植物应对 UV-B 辐射的典型防御策略一致, 即通过次生代谢产物合成增强光保护能力。

表3 神农香菊 *R2R3-MYB* 基因家族顺式作用元件分类

Table 3 Classification of *cis*-acting elements of *R2R3-MYB* gene family in *C. indicum* var. *aromaticum*

分类	元件名称	数量
生长发育响应	auxin-responsive element	106
	cell cycle regulation-responsive element	19
	element for maximal elicitor-mediated activation (2copies)	14
	element involved in differentiation of the palisade cells	8
	endosperm expression-responsive element	39
	meristem expression-responsive element	67
	seed-specific regulation-responsive element	27
非生物胁迫响应	defense and stress-responsive element	72
	low-temperature-responsive element	120
	MYB binding site involved in drought-inducibility	108
	wound-responsive element	3
激素响应	salicylic acid-responsive element	67
	abscisic acid-responsive element	429
	MeJA-responsive element	506
	gibberellin-responsive element	275
光响应	light responsive element	951

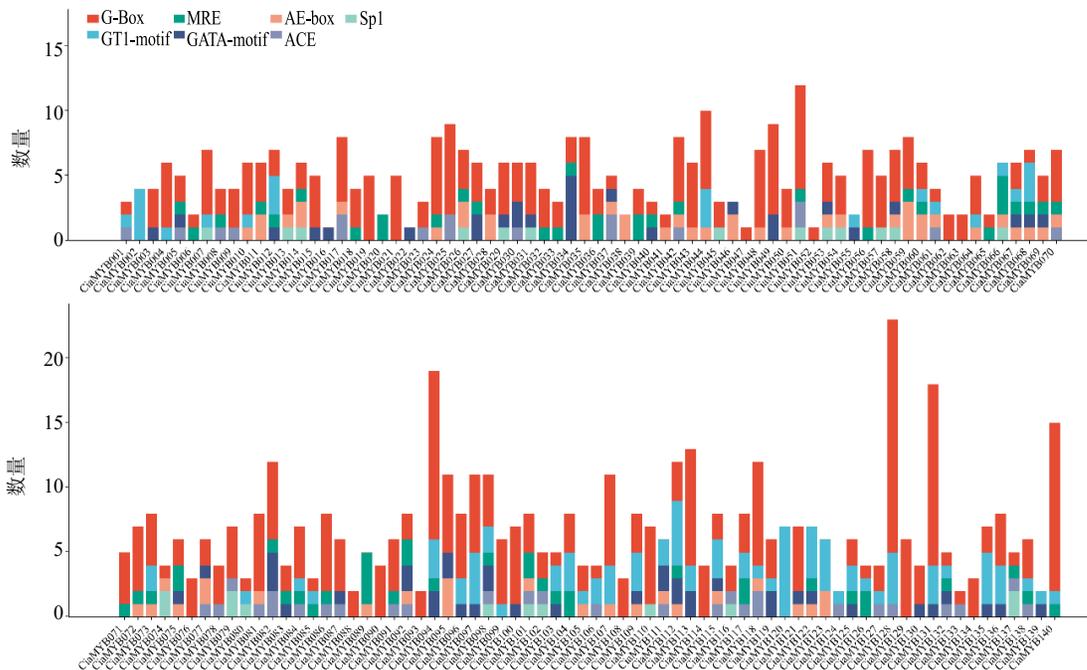


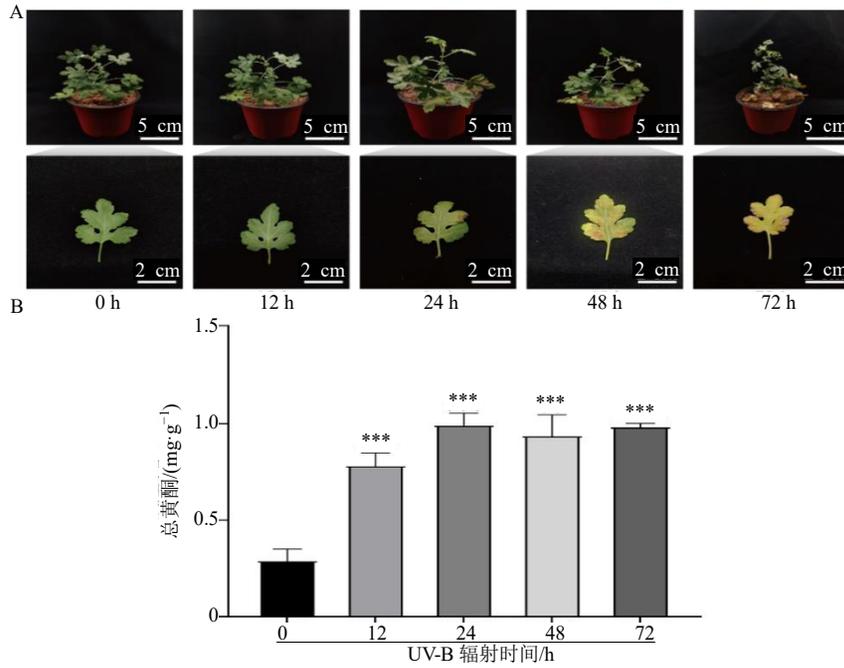
图5 神农香菊 *R2R3-MYB* 基因家族启动子区域光响应元件数量堆叠图

Fig. 5 Stacked bar chart of number of light-responsive elements in promoter region of *R2R3-MYB* gene family in *C. indicum* var. *aromaticum*

3.6 候选基因筛选与 qRT-PCR 验证

为进一步探究 *CiaMYB* 中参与黄酮类化合物生物合成的成员，利用最大似然法 (ML) 构建了 140 个神农香菊 *CiaMYB* 基因和 126 个拟南芥 *AtMYB* 基因的系统发育树 (图 7)。参考拟南芥 *AtMYB* 基因的分类体系 (S1~S25) [25]，将神农香菊 *CiaMYB* 基因分为 27 个亚家族，命名为 C1~C27。现有研究

表明，拟南芥 S7 亚家族成员 (*AtMYB11/12/111*) [28] 与 S19 亚家族成员 (*AtMYB21/24/57*) [29] 均参与植物黄酮醇生物合成的正向调控。基于 *AtMYB* 与 *CiaMYB* 进化树的亚家族聚类分析，鉴定出 5 个 *CiaMYB* 成员 (*CiaMYB063/095/066/135/040*) 与黄酮醇特异性调控基因 *AtMYB11/12/111* 具有高度同源性，推测其可能具备类似的功能。

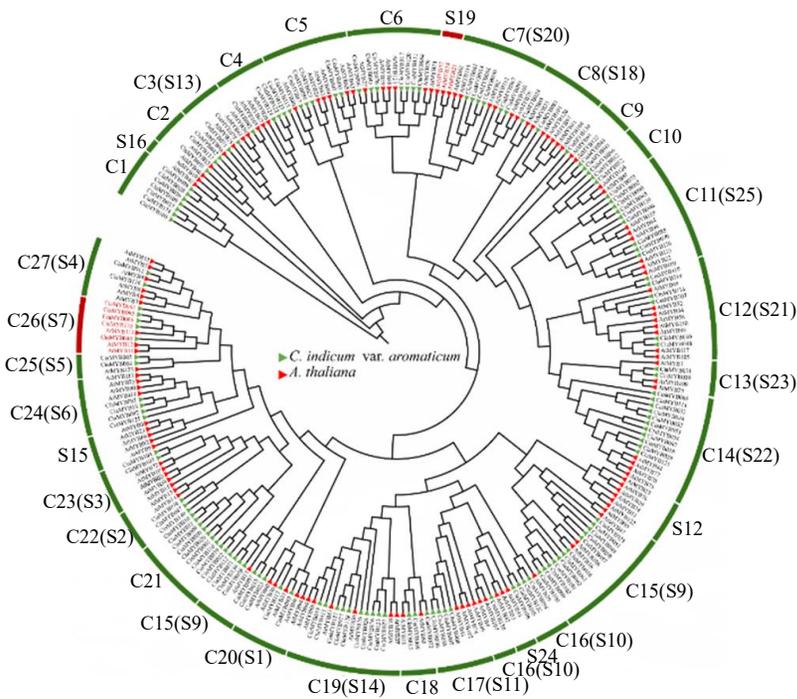


A-在 UV-B 辐射 ($400 \mu\text{w}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和对照 (0h) 条件下, 不同时间处理 (12、24、48、72 h) 盆栽神农香菊幼苗的表型变化; B-不同处理下叶片总黄酮含量; 与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

A-Phenotypic changes of potted *C. indicum* var. *aromaticum* seedlings under UV-B radiation ($400 \mu\text{w}\cdot\text{cm}^{-2}$) and control (0 h) conditions at different treatment times (12, 24, 48, 72 h); B-total flavonoid content in leaves under different treatments; *** $P < 0.001$ vs control group.

图 6 UV-B 辐射对神农香菊表型及总黄酮含量的影响

Fig. 6 Effects of UV-B radiation on phenotype and total flavonoid content in *C. indicum* var. *aromaticum*



红色标记 S7 和 S19 亚家族。

Subfamilies S7 and S19 were marked in red.

图 7 神农香菊和拟南芥 R2R3-MYB 蛋白的系统进化关系

Fig. 7 Phylogenetic relationships of R2R3-MYB proteins between *C. indicum* var. *aromaticum* and *Arabidopsis thaliana*

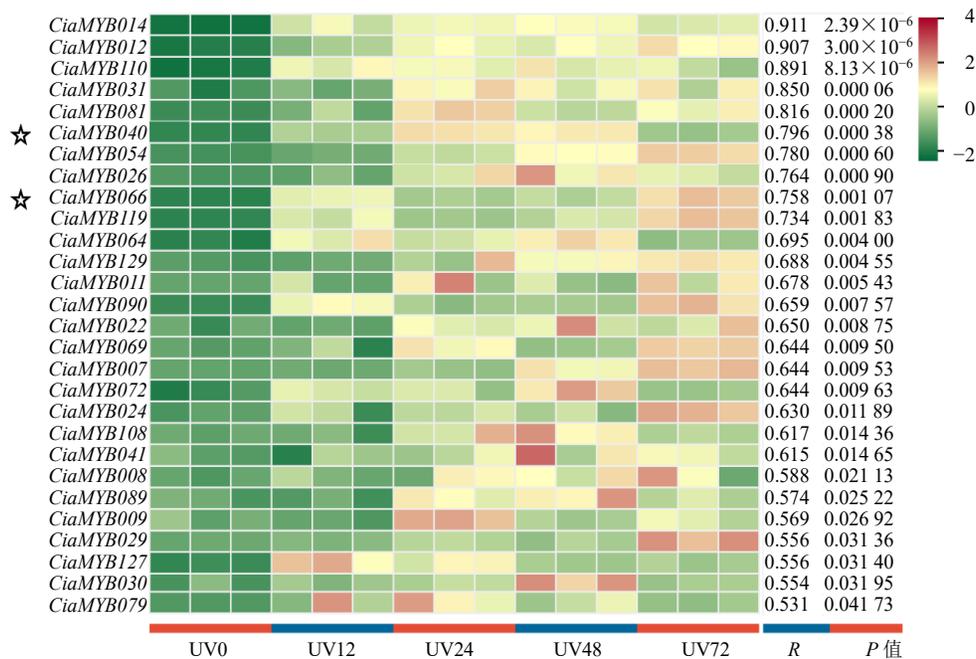
为明确 *CiaMYB* 基因表达与总黄酮含量变化的关系，以揭示 UV-B 胁迫下可能参与黄酮代谢调控的关键基因，本研究对不同 UV-B 辐照时间的总黄酮含量与 *CiaMYB* 基因表达谱进行皮尔逊相关分析。结果显示，28 个 *CiaMYB* 基因的表达量与总黄酮含量呈显著正相关 ($P < 0.05$) (图 8)。综合上述分析，最终选取与拟南芥 S7 亚家族同源性较高的 *CiaMYB040* 和 *CiaMYB066* 作为候选基因。

qRT-PCR 验证显示，2 个候选基因 (*CiaMYB040/066*) 的相对表达量在 UV-B 辐照下

呈现显著上调的趋势，且与转录组结果完全一致 (图 9)。

3.7 亚细胞定位分析

为解析候选 *CiaMYB* 蛋白在细胞内的具体存在位置，对 *CiaMYB040/066* 进行亚细胞定位研究。通过烟草叶片瞬时表达系统，发现 pSurper1300-*CiaMYB040/066-GFP* 融合蛋白的荧光信号定位于细胞核 (图 10)，与生物信息学预测结果一致。该结果支持其作为转录因子直接调控下游靶基因的假说，为后续功能验证提供重要依据。



图中展示具有显著相关性的 28 个 *CiaMYB* 基因 ($P < 0.05$)；星号标记的基因为候选基因。

Only 28 *CiaMYB* genes with statistically significant correlation were shown ($P < 0.05$); The stars indicated candidate genes.

图 8 神农香菊 *CiaMYB* 基因在不同 UV-B 辐照时间下的表达水平热图及与总黄酮含量之间的相关性

Fig. 8 Heatmap of expression levels of *CiaMYB* genes in *C. indicum* var. *aromaticum* under different UV-B irradiation durations and their relationships to total flavonoid content

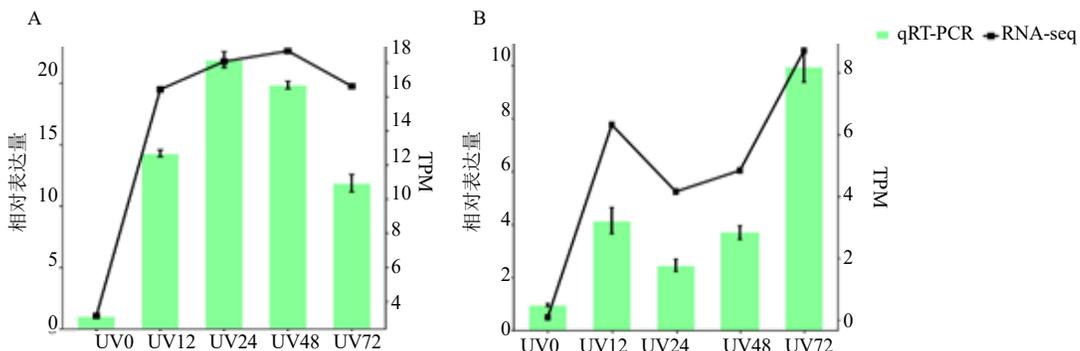
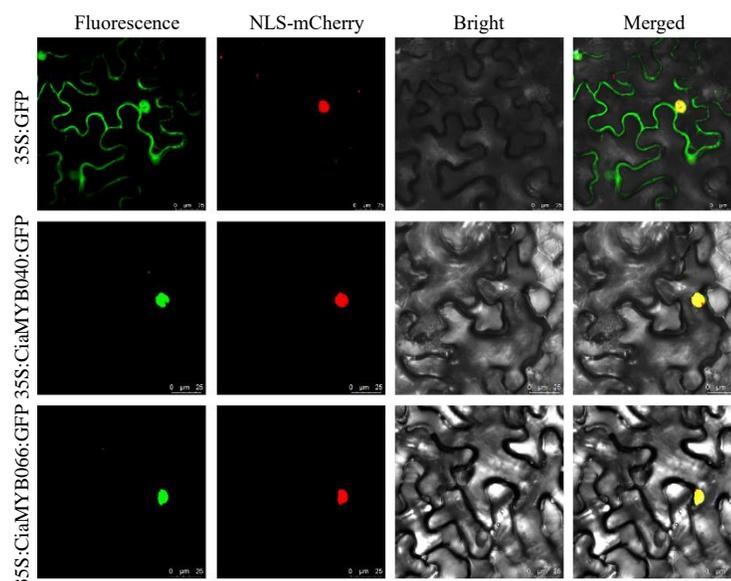


图 9 qRT-PCR 检测 *CiaMYB040* (A) 和 *CiaMYB066* (B) 的相对表达量

Fig. 9 qRT-PCR was used to detect relative expression levels of *CiaMYB040* (A) and *CiaMYB066* (B)

图 10 *CiaMYB040* 和 *CiaMYB066* 蛋白的亚细胞定位Fig. 10 Subcellular localization of *CiaMYB040* and *CiaMYB066* proteins

4 讨论

神农香菊为特异性生长在神农架高海拔生境的民间草药，相关黄酮类、萜类等次生代谢成分的特殊累积反映了植物对特殊环境的适应。在植物的初级和次级代谢、生长发育及响应不同环境的生物和非生物胁迫等过程中，R2R3-MYB 类转录因子起到了重要作用^[30]。作为 MYB 家族最大的分支，迄今为止在双子叶和单子叶植物中已报道超过 100 个 R2R3-MYB 亚家族成员。本研究从神农香菊基因组中鉴定出 140 个 R2R3-MYB 基因，分属 27 个亚支，具有不同的基因结构、染色体分布和理化性质。基因复制事件分析表明，全基因组复制是神农香菊 R2R3-MYB 家族成员扩张的主要驱动力，暗示神农香菊基因组可能经历古多倍化或局部基因组复制事件。在其近缘种类群如野菊^[31]、菊花脑^[32]、甘菊 *C. lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino^[33] 的基因组研究中，这些菊属植物共同经历了至少 2 次整基因组复制事件，同时还包括一些近期的染色体局部片段复制事件的产生。在 R2R3-MYB 基因扩张模式上，神农香菊的与甜菊 *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. 的相似^[34]，但区别于以串联重复为主的辣椒 *Capsicum annuum* L.^[35]，反映了物种家族基因扩张和进化的特异性，可能相关于植物对多样化生境的适应性差异。

启动子顺式作用元件分析揭示 *CiaMYB* 基因的光响应调控网络特征：在 *CiaMYB* 基因启动子区域

均检测到光响应元件（G-Box/GT1-motif 等），其中 89.29% 含有 G-Box（CACGTG）元件，其功能依赖于光信号通路核心转录因子 HY5（ELONGATED HYPOCOTYL 5）。HY5 直接调控 MYB 基因（如 *AtMYB12*）的表达，进而激活类黄酮合成酶基因（如 *FLS*、*CHS*），增强植物对 UV-B 的防御能力^[36]。此外，GT1-motif 元件也广泛存在于 *CiaMYB* 基因启动子区域，通常与 GT 家族转录因子结合，参与光和胁迫响应。例如，苦荞中 *FtMYB6* 的启动子中含有多个 GT1-motif，通过激活 *F3'H* 和 *FLS* 基因，显著增加芦丁等黄酮醇的积累^[37]。

UV-B 辐照显著诱导神农香菊叶片总黄酮积累，且呈现“快速上升-平台维持”的动态特征，12 h 和 24 h 时含量分别为对照的 2.66 倍和 3.73 倍，24 h 后进入稳定期，这与高海拔植物银杏 *Ginkgo biloba* L.^[38]、杜鹃 *Rhododendron simsii* Planch.^[39] 和桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T. S. Ying 等^[40] 通过次生代谢产物增强 UV-B 防御的典型策略一致，表明黄酮类物质是神农香菊适应高海拔强 UV-B 环境的重要化学防御物质。系统发育分析发现 *CiaMYB040* 和 *CiaMYB066* 与拟南芥 S7 亚家族（*AtMYB11/12/111*）高度同源，而该亚家族是黄酮醇合成的关键调控因子，提示二者可能具备类似的黄酮代谢调控功能。进一步的相关性分析显示，这 2 个基因的表达量与总黄酮含量呈极强正相关（ $R > 0.7$ ， $P < 0.05$ ），且 qRT-PCR 验证证实其在 UV-B 处理后

显著上调,表达趋势与总黄酮积累动态高度吻合,亚细胞定位结果也证实其定位于细胞核,符合转录因子的功能特征^[41],因此成为调控UV-B诱导黄酮合成的核心候选基因。这一结果与其他植物中的研究规律一致:例如山核桃 *Carya cathayensis* Sarg.中,与S7亚家族同源的 *CcMYB12* 的表达量在UV-B和NaCl胁迫下表达量显著上调,过表达 *CcMYB12* 的拟南芥中,黄酮合成基因 (*CHS*、*F3H*) 表达量增加2~3倍,总黄酮含量提升50%,其启动子区域富含的G-Box和ABRE光响应元件是UV-B诱导表达的关键^[42];本研究中, *CiaMYB040* 和 *CiaMYB066* 启动子区同样富集G-Box、GT1-motif等光响应元件,推测其可能通过类似机制,在UV-B信号激活下结合黄酮合成关键基因(如 *CHS*、*FLS*)的启动子,直接调控其表达,从而驱动黄酮积累。

本研究在神农香菊全基因组中鉴定出140个 *CiaMYB* 基因,分属27个亚家族,其编码的蛋白均为亲水性蛋白,且不均匀分布于9条染色体上。共线性分析表明,全基因组复制是该基因家族扩张的主要驱动因素。此外,启动子分析表明 *CiaMYB* 启动子区域含丰富光响应、ABA、MeJA及胁迫响应元件。UV-B辐射可显著诱导 *CiaMYB* 基因差异表达及叶片总黄酮积累,其中 *CiaMYB040* 和 *CiaMYB066* 与拟南芥黄酮醇合成关键的S7亚家族高度同源,其表达量与总黄酮含量呈极强正相关,亚细胞定位实验证实二者定位于细胞核。本研究为解析植物高海拔抗逆适应分子机制及菊科植物抗逆遗传改良提供了重要候选基因资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 袁仁森,王旭,张景景,等. 神农香菊自然居群遗传变异评价研究及核心种质筛选 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(4): 1325-1334.
- [2] 雷霄飞,杨学领. 神农香菊化学成分及药理作用研究进展 [J]. 现代农业科技, 2014(19): 312-313.
- [3] Wang X, Zhang J J, Liu Z G, et al. Comparative transcriptome analysis of three chrysanthemums provides insights into flavonoid and terpenoid biosynthesis [J]. *J Plant Biol*, 2021, 64(5): 389-401.
- [4] Chen K L, Liu Y M, Zhang Y, et al. A special aromatic *Chrysanthemum* breed with high content of thujone [J]. *Phcog Mag*, 2020, 16(71): 625.
- [5] Feng Y, Li B, Hu J, et al. Sustainable use of *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* as value-added green materials in microemulsion hydrogels [J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2023, 11(9): 3820-3831.
- [6] Shi C, Liu H T. How plants protect themselves from ultraviolet-B radiation stress [J]. *Plant Physiol*, 2021, 187(3): 1096-1103.
- [7] Sztatelman O, Grzyb J, Gabryś H, et al. The effect of UV-B on *Arabidopsis* leaves depends on light conditions after treatment [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 281.
- [8] Xiong Y, Yuan S, Xiong Y L, et al. Analysis of allohexaploid wheatgrass genome reveals its Y haplome origin in Triticeae and high-altitude adaptation [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 3104.
- [9] Ferreyra M L F, Serra P, Casati P. Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure [J]. *Physiol Plant*, 2021, 173(3): 736-749.
- [10] Takshak S, Agrawal S B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2019, 193: 51-88.
- [11] Liang T, Shi C, Peng Y, et al. Brassinosteroid-activated BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 inhibits flavonoid biosynthesis and coordinates growth and UV-B stress responses in plants [J]. *Plant Cell*, 2020, 32(10): 3224-3239.
- [12] 胡雅丹,伍国强,刘晨,等. MYB转录因子在调控植物响应逆境胁迫中的作用 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(6): 5-22.
- [13] Li Y P, Qin W, Fu X Q, et al. Transcriptomic analysis reveals the parallel transcriptional regulation of UV-B-induced artemisinin and flavonoid accumulation in *Artemisia annua* L [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 163: 189-200.
- [14] He J, Liu Y Q, Yuan D Y, et al. An R2R3 MYB transcription factor confers brown planthopper resistance by regulating the phenylalanine ammonia-lyase pathway in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(1): 271-277.
- [15] Hao X L, Pu Z Q, Cao G, et al. Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by SmMYB98 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Adv Res*, 2020, 23: 1-12.
- [16] Liu M Y, Sun W J, Ma Z T, et al. Integrated network analyses identify MYB4R1 neofunctionalization in the UV-B adaptation of Tartary buckwheat [J]. *Plant Commun*, 2022, 3(6): 100414.
- [17] Shamala L F, Zhou H C, Han Z X, et al. UV-B induces distinct transcriptional re-programing in UVR8-signal transduction, flavonoid, and terpenoids pathways in *Camellia sinensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 234.
- [18] 李强,康璠,薛晴,等. 神农香菊R2R3-MYB转录因子

- CiMYB4 在镉胁迫中的功能分析 [J]. 草业学报, 2024, 33(5): 128-142.
- [19] Potter S C, Luciani A, Eddy S R, et al. HMMER web server: 2018 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W200-W204.
- [20] Luo D F, Mei D S, Wei W L, et al. Identification and phylogenetic analysis of the R2R3-MYB subfamily in *Brassica napus* [J]. *Plants*, 2023, 12(4): 886.
- [21] Chen C J, Wu Y, Li J W, et al. TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Mol Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [22] Wang Y P, Tang H B, Debarry J D, et al. MCScanX: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): e49.
- [23] Edgar R C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(5): 1792-1797.
- [24] Minh B Q, Schmidt H A, Chernomor O, et al. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era [J]. *Mol Biol Evol*, 2020, 37(5): 1530-1534.
- [25] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573-581.
- [26] Gu C S, Chen S M, Liu Z L, et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Chrysanthemum* subjected to biotic and abiotic stress [J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 49(2): 192-197.
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] Chang Y K, Shi M M, Wang X, et al. A CRY1-HY5-MYB signaling cascade fine-tunes guard cell reactive oxygen species levels and triggers stomatal opening [J]. *Plant Cell*, 2025, 37(4): koaf064.
- [29] Zhang X Y, He Y Q, Li L Y, et al. Involvement of the R2R3-MYB transcription factor MYB21 and its homologs in regulating flavonol accumulation in *Arabidopsis* stamen [J]. *J Exp Bot*, 2021, 72(12): 4319-4332.
- [30] Wu Y, Wen J, Xia Y P, et al. Evolution and functional diversification of R2R3-MYB transcription factors in plants [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac058.
- [31] Deng Y N, Yang P, Zhang Q L, et al. Genomic insights into the evolution of flavonoid biosynthesis and *O*-methyltransferase and glucosyltransferase in *Chrysanthemum indicum* [J]. *Cell Rep*, 2024, 43(2): 113725.
- [32] Song A P, Su J S, Wang H B, et al. Analyses of a chromosome-scale genome assembly reveal the origin and evolution of cultivated *Chrysanthemum* [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2021.
- [33] Wen X H, Li J Z, Wang L L, et al. The *Chrysanthemum lavandulifolium* genome and the molecular mechanism underlying diverse *Capitulum* types [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhab022.
- [34] Xu X Y, Yang Y H, Zhang T, et al. Systematic analysis of the R2R3-MYB transcription factor gene family in *Stevia rebaudiana* [J]. *Ind Crops Prod*, 2024, 210: 118123.
- [35] Arce-Rodríguez M L, Martínez O, Ochoa-Alejo N. Genome-wide identification and analysis of the MYB transcription factor gene family in chili pepper (*Capsicum* spp.) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2229.
- [36] Bhatia C, Pandey A, Gaddam S R, et al. Low temperature-enhanced flavonol synthesis requires light-associated regulatory components in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(10): 2099-2112.
- [37] Yao P F, Huang Y J, Dong Q X, et al. FtMYB6, a light-induced SG7 R2R3-MYB transcription factor, promotes flavonol biosynthesis in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(47): 13685-13696.
- [38] Liu S A, Gu X Y, Jiang Y B, et al. UV-B promotes flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* by inducing the GbHY5-GbMYB1-GbFLS module [J]. *Hortic Res*, 2023, 10(8): uhad118.
- [39] Yu W, Zhou X R, Meng J H, et al. WRKY transcription factors modulate the flavonoid pathway of *Rhododendron chrysanthum* pall. under UV-B stress [J]. *Plants*, 2025, 14(1): 133.
- [40] Zhao Q Z, Dong M Y, Li M F, et al. Light-induced flavonoid biosynthesis in *Sinopodophyllum hexandrum* with high-altitude adaptation [J]. *Plants*, 2023, 12(3): 575.
- [41] Liu C Y, Long J M, Zhu K J, et al. Characterization of a *Citrus* R2R3-MYB transcription factor that regulates the flavonol and hydroxycinnamic acid biosynthesis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25352.
- [42] Wang Y G, Ye H Y, Wang K T, et al. CcMYB12 positively regulates flavonoid accumulation during fruit development in *Carya cathayensis* and has a role in abiotic stress responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15618.