

桂花 *OfMYB1R47* 转录因子在芳香挥发物形成过程中的功能分析

岳远征^{1,2}, 胡宏敏^{1,2}, 刘家伟^{1,2}, 申慧敏^{1,2}, 施婷婷^{1,2}, 杨秀莲^{1,2}, 王良桂^{1,2}

(1. 南京林业大学 风景园林学院, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学 江苏省风景园林重点实验室, 江苏 南京 210037)

摘要: 【目的】花香是桂花 *Osmanthus fragrans* 最重要的观赏性状之一, 对桂花 MYB-related 基因家族成员 *OfMYB1R47* 在芳香挥发物形成过程中的功能进行鉴定, 可为桂花花香合成的转录调控机制研究提供新的基因节点。

【方法】以桂花‘日香桂’ *O. fragrans* ‘Rixianggui’ 和本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* 为材料, 以前期的花香转录组数据筛选出的 MYB-related 家族基因 *OfMYB1R47* 为目标基因。通过基因序列和系统进化树、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、亚细胞定位、酵母自激活、瞬时超量表达本氏烟草以及气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 测定挥发性代谢物质量分数, 对 *OfMYB1R47* 基因的特性和功能进行分析。【结果】*OfMYB1R47* 基因开放阅读框长度为 1 485 bp, 共编码 494 个氨基酸。系统进化树表明: 与 *OfMYB1R47* 同源性最高的基因在木犀科 Oleaceae 的木樨榄 *Olea europaea* subsp. *europaea* 中; RT-qPCR 分析发现: *OfMYB1R47* 基因的表达量随着桂花花香的释放呈现先上升后下降的趋势, 且在桂花花朵初花期表达量最高; 亚细胞定位和酵母自激活实验表明: *OfMYB1R47* 主要定位在细胞核, 且具有自激活活性; 与转化空载体的植株相比, 在瞬时超量表达该基因的本氏烟草叶片中, 辛醛、 β -紫罗兰酮等芳香挥发性物质质量分数均发生了明显改变。【结论】*OfMYB1R47* 具有典型的转录因子特征, 其表达模式与桂花花香的释放具有一定的关联性, 参与调控了桂花 β -紫罗兰酮等芳香物质的合成, 可作为桂花花香分子育种的基因资源。图 7 表 2 参 39

关键词: 桂花; MYB-related 转录因子; 气相色谱-质谱联用 (GC-MS); 花香

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)03-0465-10

Functional analysis of *OfMYB1R47* transcription factor in *Osmanthus fragrans* during the formation of aromatic volatiles

YUE Yuanzheng^{1,2}, HU Hongmin^{1,2}, LIU Jiawei^{1,2}, SHEN Huimin^{1,2},
SHI Tingting^{1,2}, YANG Xiulian^{1,2}, WANG Liangui^{1,2}

(1. College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] Fragrance is one of the most important ornamental traits of *Osmanthus fragrans*. The purpose of this study is to identify the function of *OfMYB1R47*, a member of the MYB-related gene family of *O. fragrans* in the formation of aromatic volatiles, so as to provide a new gene node for the study of transcriptional regulation mechanism of aroma synthesis in *O. fragrans*. [Method] The MYB-related family gene *OfMYB1R47* screened from the previous floral transcriptome data was used as the target gene, and *O. fragrans* ‘Rixianggui’ and *Nicotiana benthamiana* were used as materials. The characteristics and functions of *OfMYB1R47* gene were analyzed by gene sequence and phylogenetic tree, RT-qPCR, subcellular localization,

收稿日期: 2022-07-08; 修回日期: 2023-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32071828, 31870695); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 岳远征 (ORCID: 0000-0003-2599-6900), 副教授, 博士, 博士生导师, 从事园林植物育种与应用研究。

E-mail: yueyuanzheng@njfu.edu.cn. 通信作者: 王良桂 (ORCID: 0000-0002-5437-7140), 教授, 博士, 博士生导师, 从事园林植物育种与应用研究。E-mail: wlg@njfu.com.cn

yeast self-activation, as well as the transient overexpression and GC-MS volatile metabolites test in *N. benthamiana*. [Result] The length of the open reading frame of *OfMYB1R47* gene was 1 485 bp, encoding 494 amino acids. Phylogenetic tree analysis showed that *OfMYB1R47* had the highest homology gene in *Olea europaea* subsp. *europaea*. RT-qPCR analysis showed that the expression pattern of *OfMYB1R47* gene increased first, and then decreased with the release of *O. fragrans* aroma, and the highest expression level was found at the early flowering stage of *O. fragrans*. Subcellular localization and yeast self-activation tests showed that *OfMYB1R47* was mainly distributed in the nucleus and had self-activation activity. Compared with plants transformed into empty vectors, the contents of octanal, β -ionone and other aroma volatiles in the leaves of *N. benthamiana* with transient over-expression of this gene were significantly changed. [Conclusion] *OfMYB1R47* has typical transcription factor characteristics, and its expression pattern is related to the release of *O. fragrans*, which is involved in the regulation of the synthesis of floral substances such as β -ionone, and can be used as a gene resource for molecular breeding of *O. fragrans*. [Ch, 7 fig. 2 tab. 39 ref.]

Key words: *Osmanthus fragrans*; MYB-related transcription factor; Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS); aroma

桂花 *Osmanthus fragrans* 是木犀科 Oleaceae 木犀属 *Osmanthus* 常绿木本植物, 具有花朵形小繁多、花香迷人的特点, 是一种应用广泛的优良园林树种^[1-2], 并在食品和香水等商品中具有较高的应用价值^[3]。有研究表明: 桂花花香挥发物依据化学结构可划分为 6 个类别, 即萜烯类、酯类、烷烃类、酮类、醇类和醛类^[4-6]。也有研究通过气相色谱-嗅觉测量法 (GC-Olfactometry) 分析, 共鉴定出 11 种对桂花香气形成具有贡献的萜类活性物质^[7]; 同时, 在‘日香桂’ *O. fragrans* ‘Rixianggui’ 中也发现芳樟醇的含量与花香强度的变化高度相关^[8]; 此外, β -紫罗兰酮、芳樟醇及其衍生物等关键花香物质在不同桂花品种中相对含量的改变还是导致桂花品种间花香感官品质差异的重要原因^[9]。

花香物质合成的转录调控是一个复杂的过程, 其中转录因子对植物次生代谢物合成途径中结构基因的转录调控被认为是植物挥发性芳香物质生物合成的重要环节^[10-11]。在桂花中, 转录因子 *OfWRKY3* 和 *OfERF61* 可以直接调控催化产生挥发性芳香物质紫罗兰酮的类胡萝卜素裂解双加氧酶 4 基因 (*OfCCD4*) 的表达, 并认为它们可能参与了调节酮类花香物质紫罗兰酮的合成^[12-13]。此外, 有研究通过气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) 分析桂花花香挥发物, 并结合桂花全基因组 WRKY 和 MYB 转录因子的鉴定, 获得了一批与桂花萜烯类花香物质合成相关的候选基因^[3, 14]。

根据 MYB 结构域的数量, MYB 转录因子分为 4 个亚家族: 1R-MYB、R2R3-MYB、3R(R1R2R3)-MYB 和 4R-MYB 蛋白^[15]。其中, R2R3-MYB 已被证实与多种生物过程有关, 其在调控挥发性香气物质的合成与释放以及增强非生物胁迫能力等方面均具有重要的作用^[15-18]。1R-MYB 蛋白统称为 MYB-related 蛋白, 是最大的 MYB 基因亚家族, 在某些物种中 MYB-related 成员的数量甚至是 R2R3-MYB 的 2 倍^[18-19]。目前, 在 R2R3-MYB 亚家族中已鉴定出多个与花香挥发物合成有关的成员, 如在花香模式植物矮牵牛 *Petunia hybrida* 中已鉴定出 4 个通过调控苯基/苯丙烷代谢途径中结构基因的表达, 来参与花香物质合成的 R2R3 型 MYB 转录因子^[20-21]; 此外, 在玫瑰 *Rosa rugosa*^[22]、留兰香 *Mentha spicata*^[23-24]、姜花 *Hedychium coronarium*^[25]、百合 *Lilium brownii* var. *viridulum*^[26] 等观赏植物中, R2R3-MYB 转录因子也会参与调控植物花香物质的合成, 但关于 MYB-related 亚家族成员在调节植物花香合成的研究仍鲜有报道。

基于前期桂花全基因组和转录组的测序工作^[27], 本研究筛选出了 1 个与花香释放规律较为一致的 MYB-related 转录因子, 并根据其在染色体上的位置命名为 *OfMYB1R47*。本研究拟先通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术, 分析 *OfMYB1R47* 基因在‘日香桂’不同发育时期中的表达特性; 并结合亚细胞定位和酵母自激活实验进行基因特性分析; 然后将该基因在本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* 中瞬时表达; 最后通过 GC-MS 分析检测瞬时转化植株与瞬时转化空载植株中主要挥发性有机物质质量分数的变化, 进而探讨该基因在桂花花香合成过程中的功能, 旨在揭示桂花花香合成的转录调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

2021 年 10 月, 采集南京林业大学校园内‘日香桂’5 个不同发育阶段的花朵, 分别为铃梗期 (S1, 聚伞花序开始分散延伸), 香眼期 (S2, 花被纹理明显, 花顶端出现孔隙), 初花期 (S3, 大部分花处于半闭合状态, 花梗挺立), 盛花期 (S4, 花大部分或近全部呈开放状态) 和末花期 (S5, 花全部开放, 花瓣有所褶皱)^[28]。所有样品采集后立即放入液氮中速冻处理, 并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。每个花期具有 3 个生物学重复。此外, 还采集了瞬时转化 *OfMYB1R47* 基因和空载体的本氏烟草叶片, 用于后续目的基因半定量表达分析。本氏烟草种子由南京林业大学风景园林学院保存。

1.2 桂花 *OfMYB1R47* 转录因子的克隆及进化分析

使用 RNAprep Pure Plant 试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 从桂花 5 个花期提取桂花的总 RNA。随后从总 RNA 中去除 gDNA 后, 用 SuperMix 反转录试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 合成 cDNA, 条件如下: $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, 冰浴 2 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, 最后 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s^[29]。将 cDNA 用去离子水稀释 10 倍, 用于后续的基因克隆。使用 Primer Premier 5.0 软件设计克隆 *OfMYB1R47* 转录因子编码区的引物 (表 1), 基因克隆的反应体系为: cDNA 1 μL 、上下游引物各 1 μL 、PrimeSTAR mix 10 μL , ddH_2O 补至 20 μL 。PCR 扩增程序为: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s; $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min^[30]。通过凝胶电泳检测后, 使用北京全式金生物技术公司的 DNA 切胶回收试剂盒对扩增产物进行收集, 再将目标片段连接至用 *SmaI* 和 *KpnI* 酶切过的 Super1300 载体上, 并通过热激法转化大肠埃希菌 *Escherichia coli*, 随后挑选阳性菌落送至测序公司测序, 最后通过冻融法将测序正确的质粒转化根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*。此外, 使用美国生物技术信息中心 (NCBI) 在线网址 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 得到了与 *OfMYB1R47* 序列同源性较高的物种中的基因序列, 并用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-joining) 分析 1 000 次来构建系统进化树。

表 1 本研究所使用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物作用	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
1300-MYB1R47	基因克隆	aagcttctgcaggggccgggATGGAATCCAAAGTT TATAGGAATCC	gcccttgctccaccatggtaccGACAAGGCAACTCTCA TGTTGTGA
<i>pGBK77-MYB1R47</i>	酵母自激活	atggccatggagccgaattcATGGAATCCAAAGTTT ATAGGAATCC	gcaggtcgacggatccccgggGACAAGGCAACTCTC ATGTTGTGA
<i>OfACTIN</i>		CCCAAGGCAAACAGAGAAAAAAT	ACCCCATCACCAGAATCAAGAA
<i>OfMYB1R47</i>		ATCGCCTGGAGTGAATGCTAC	CACCAAGTAATGCGTTCACAGC
<i>NbCCD4.1</i>	荧光定量分析	TACCACAAACAAACAGTAGAGC	TCAATGAAAAGCGTTCACGAAA
<i>NbCCD4.2</i>		ACAAGAAAAGCCAACCCCATC	TGGAAATGATGGCCCTACTGT
<i>NbCCD4.3</i>		ACGGTTTCCACGGGCTTTT	GATGACACCCATGCCCTCTT
<i>NbCCD1</i>		TGGAGAGGCGAGAATAGAGGG	ACGGGGAGGTTGGTAAGAGG
<i>NbL25</i>	半定量分析	GCTAAGGTTGCCAAGGCTGTC	TAAGGTATTGACTTCTTTGTCTGA

1.3 桂花 *OfMYB1R47* 转录因子的 RT-qPCR 分析以及瞬时转化植株的半定量表达分析

按照上述方法提取了桂花 5 个花期的总 RNA, 并将其反转录为 cDNA, 用于基因表达分析。使用 Primer Premier 5.0 设计 *OfMYB1R47* 转录因子的 RT-qPCR 引物。并且选择桂花 *OfACTIN* 作为内参基因^[31]。每个 RT-qPCR 的表达量均来源于 3 个生物学重复和 3 个技术重复。原始数据使用 SPSS 26.0 中的 Turkey 检验进行差异显著性分析, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行表达量分析。同时, 提取瞬时转化 *OfMYB1R47* 基因和空载体植株叶片中的总 RNA, 并反转录成 cDNA 进行目的基因 *OfMYB1R47* 的半定量表达分析^[14]。烟草 *NbL25* 基因被选为内参基因。此外, 还选取了与桂花 *OfCCD4* 和 *OfCCD1* 同源的基因 *NbCCD4* 和 *NbCCD1* 来探究 *OfMYB1R47* 在烟草挥发性香气物质合成过程中潜在的调控关系。

1.4 桂花 *OfMYB1R47* 转录因子的亚细胞定位及酵母自激活

使用不含终止密码子,但包含了 *OfMYB1R47* 转录因子蛋白质编码区 (CDS) 的 Super 1300 载体以及 *SmaI* 和 *KpnI* 限制位点构建了 $35S::OfMYB1R47::GFP$ 。然后将含有 $35S::OfMYB1R47::GFP$ 的根癌农杆菌 (GV3101) 和阴性对照载体 (EV) 注射到生长了 35 d 的本氏烟草叶片中进行亚细胞定位分析。注射所用的烟草植株生长在温度为 $(26\pm 2)^\circ\text{C}$ 、光强为 $144\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照为 15 h 光/9 h 暗的生长室中。注射完载体的烟草浇透水后放置在生长室中生长 2 d 后,滴入稀释 100 倍后的 4,6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染液,再放置在 LSM710 激光共聚焦显微镜下观测绿色荧光信号。

此外,利用 *EcoRI* 和 *SmaI* 限制性酶切位点,将缺失终止密码子的 *OfMYB1R47* 基因的 CDS 区域连接到 pGBKT7 载体上。然后使用酵母菌株 AH109 (上海唯地) 获得 pGBKT7-OfMMB1R47 和 pGBKT7 载体。最后经 PCR 阳性检测后,挑取阳性克隆的单菌落在选择性培养基 SD/-Trp、SD/-Trp-Ade 和 SD/-Trp-Ade+X- α -gal 中黑暗培养 3 d,在恒温培养箱 (30°C) 中观察目的基因是否具有自激活活性。

1.5 桂花 *OfMYB1R47* 转录因子在本氏烟草叶片中的瞬时表达及芳香成分分析

联合顶空固相微萃取 (SPME) 和 GC-MS 方法检测瞬时转化植株与瞬时转化空载体植株中主要挥发性有机物质量分数的变化。目的基因瞬时转化方法同 1.4。测定叶片中芳香性挥发物的方法如下:每 30 mL SPME 瓶底部加入 1.5 g 新鲜叶片样品,中间加入 1 μL 稀释 1 万倍的癸酸乙酯^[29]。在 65°C 条件下将盖瓶中间暴露 30 min 后,将萃取头放到加热的注射器端口 3 min,并在 250°C 下进行解吸附作用。随后,通过 Trace DSQ GC-MS 装置鉴定解吸后叶片中的芳香挥发物^[32],并用正构烷烃混标 DLM-1342-5 计算挥发性成分的保留指数 (I_R),在美国国家标准技术研究所 (NIST) 数据库中 (<https://webbook.nist.gov/chemistry/cas-ser/>),与含有 DB-5MS (30.00 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) 的值进行比较,从而确认花香成分^[32-33]。此外,采用以下公式计算芳香挥发物质量分数:各组分质量分数=(各组分峰面积 \times 内标质量/内标峰面积/样品质量)。在 SIMCA 14.1 软件中,采用主成分分析法 (PCA) 对数据组内的重复性和组间的差异性进行分析,借助正交偏最小二乘判别分析法 (OPLS-DA) 和变量重要性投影值 (VIP) 对转基因组和对照组间关键的有机挥发物进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 桂花 *OfMYB1R47* 转录因子的克隆及编码蛋白分析

以桂花‘日香桂’盛花期花朵的 cDNA 为模板,使用特异性引物扩增获得了长度为 1 485 bp,可编码 494 个氨基酸的 *OfMYB1R47* 基因序列。进一步分析发现:*OfMYB1R47* 基因具有 MYB-related 基因家族的保守结构域 (图 1)。将从 NCBI 在线网址中获得的 13 个物种中与桂花同源性较高的目的基因进行系统发育树的构建,结果表明:*OfMYB1R47* 与木犀科木樨榄 *Olea europaea* subsp. *europaea* 中的基因 (CAA3020406.1) 具有最高的同源性 (图 2)。

2.2 RT-qPCR 分析

为了得到可靠的基因表达结果,选择内参基因 *ACTIN* 进行了 *OfMYB1R47* 基因在桂花花朵发育 5 个典型花期的表达分析 (图 3)。发现 *OfMYB1R47* 基因在 5 个花期中的表达展现出与桂花花朵转录组数据较为相似的表达趋势,即 *OfMYB1R47* 的表达在开花期间呈现先上升后下降的模式,在 S3 时期达到最高值,S3~S5 时期逐渐下降。

2.3 亚细胞定位及酵母自激活

经过亚细胞定位分析,发现在细胞核和细胞质中均检测到了 $35S::OfMYB1R47::GFP$ 融合蛋白的绿色荧光蛋白 (GFP) 荧光信号,经 DAPI 染色后发现细胞核绿色荧光与 DAPI 染色结果重合,证实了 *OfMYB1R47* 转录因子主要定位于细胞核 (图 4)。除此之外,将该基因的编码区克隆到酵母表达载体 pGBKT7 中,然后将阴性对照 pGBKT7 和含有 *OfMYB1R47* 转录因子的 pGBKT7 载体在连续稀释的 SD/-Trp、SD/-Trp-Ade 和 SD/-Trp-Ade+x- α -gal 培养基上培养并进行对比。结果表明:*pGBKT7-OfMYB1R47* 在 SD/-Trp 和 SD/-Trp-Ade 的平板上能够正常生长,并在含有 x- α -gal 的 SD/-Trp-Ade 培养基上变成蓝色,这表明 *OfMYB1R47* 转录因子具有自激活功能 (图 5)。

2.4 瞬时表达植物挥发性香气成分的验证与测定

OfMYB1R47 基因的半定量表达分析表明:在瞬时转化 *OfMYB1R47* 的植株中,都可以检测到

```

ATGGAATCCAAAGTTTATAGGAATCCATCAATAGTAGGGATGATATGTGCAGTCCAGGGTGTCCAGAGACTGGGAAAGAAAGCAGTCT
1  M E S K V Y R N P S I S R D D M C S P G C P E T W E R K Q S
GCATTAGTATGATCACCATAAGTACAAAATTTCCCTCTGCCACATGGCTTGTGGTTCTTCCCTTTAATTCAGAGGGGTAAAGATA
31  A L V R S P N S T K F P S C H M A C G S F P F N S E G V K I
GTTACTAGAGATAATGATGAAAACCTCCCGTAGGGCCTCAACCTAGAAAATGCAAAACAGGCAATTAGGCCTGTGTACATAGTGGATAT
61  V T R D N D E N S R R R T Q P R N A N K A I R P V S H S G Y
TGGAGAAATAGGAAGTCGTAGCATCTAAGCATTGTAGAGCGACTTCAAATCTGAAAGAGGAAGTTATAGTGCCAAATAAAAAAGATGC
91  W R I R K S L A S K H C R A T S N L K E E G Y S A N K K R C
AGTITTCGAAACAAAAGAACAGATATAACGCCAAATCTCAGAGGGATTATCCTTTCAAGAAAAGAAAGCTTTTTTACAGTAGCCCA
121 S F P N K K N R Y K R Q I S Q R D Y P F K K R K L F Y S S P
GCTCCTAATTCAGCAGTACTCATTAAAGCGATGAAATTTGTAGCTTTCCTGAGAATGACTGAAAGAGGAGTGCCTGCTCTGTGCTCT
151 A P N S D V L I N S D G I C S F P E N D S K G G A L L S G P
GCATCGCCTGGAGTGAATGCTACTCCCACTCTGCAGCAGGTGAATGTTCCGCTTCCAGTCTGGGAATCCCCTGTGAAGCTTAAGATC
181 A S P G V N A T P T S A A G E C S P F Q S G N S H V K L K I
AAGTCTTTCAGGGTTCCTGAGCTTTTATTGAGATTCAGAAAACGGCAACTGTGGGTCTCTAAGAGTACTGTATGAAAGCTGGAAC
211 K S F R V P E L F I E I S E T A T V G S L K S T V M K A V N
GCATTACTTGGTATGAGTACATGTTGGCATGCTTCCAGGGTAAAAGATTAAAGATGATAACAAAATTTATGCGAGCGGAAATC
241 A L L G D G L H V G M L L Q G K K I K D D N K T L L Q T G I
TGCATGATAACAAACAGATGCTCTGGGTTTATGCTTGTGCCAATCTACTCAAATTTCCCAACACCGTCCAGCATCTTCCGA
271 S H D N K P D A L G F M L V P N S T Q T F P T P C P D P F R
CCTCCTCGTATTCTCCACACCCTAGCAAGGAGCCCTTATTGCCAATGGGGTCAAGATGCCATTGAGCAGAAAAGTTTGGATGT
301 L P R D S P Q P L A R S P L I A N G V Q D A I E Q K S L D V
CTTACGGATCCTGCAGGAGTAACCTCAGGAATTTCCCTGAAAGTGAATAAGTTCAGCTCGTCTACTCCTGATATGTAGAGAAAAC
331 L T D P A G G N F R N F P E S D N G S A R S T P D M L E K T
CCTACAGTTTCACGAGCACTGGTGTGCTCCTAAAATGAGAGGCACTGGCTATTGTTCCCATGCACATATCTAAGCAATCTGAAGTGG
361 P T V S R A L V A A P K M R E A L A I V P M H I S K Q S E S
GCGAAGCGTCGAATCGCTCGCCCTTTTACTGTATCTGAGTGAATCATTTGGTTCAGGCTTTGAGAAGCTTGAACAGGAAGTGGCGT
391 A K R R M R R P F T V S E V E S L V Q A V E K L G T G R W R
GATGTTAAGCTGAGAGCTTTGATAATGCGAAACATAGAACTATGTGGATTTGAAGCAAGTGGAGACACTGGTGCACACTGCAAGA
421 D V K L R A F D N A K H R T Y V D L K D K W K T L V H T A R
ATATCCCCTCAACAAAGGAGAGCGAGCCGCTACCTCAGGAGCTTTAGACAGGGTGTAACTGCCATGCTTACTGGTGTGAGCAGCAA
451 I S P Q Q R R G E P V P O E L L D R V L T A H A Y W S E Q Q
ACCAAGTACCGGCTCAAATCACAACATGAGAGTTGCCTTGTCTGA
481 T K Y R L K S Q H E S C L V *
    
```

下划线标注序列为 1R-MYB 结构域；ATG 为起始密码子；TGA 为终止密码子。

图 1 桂花 *OfMYB1R47* 转录因子编码的氨基酸序列

Figure 1 Amino acid sequence of *OfMYB1R47*

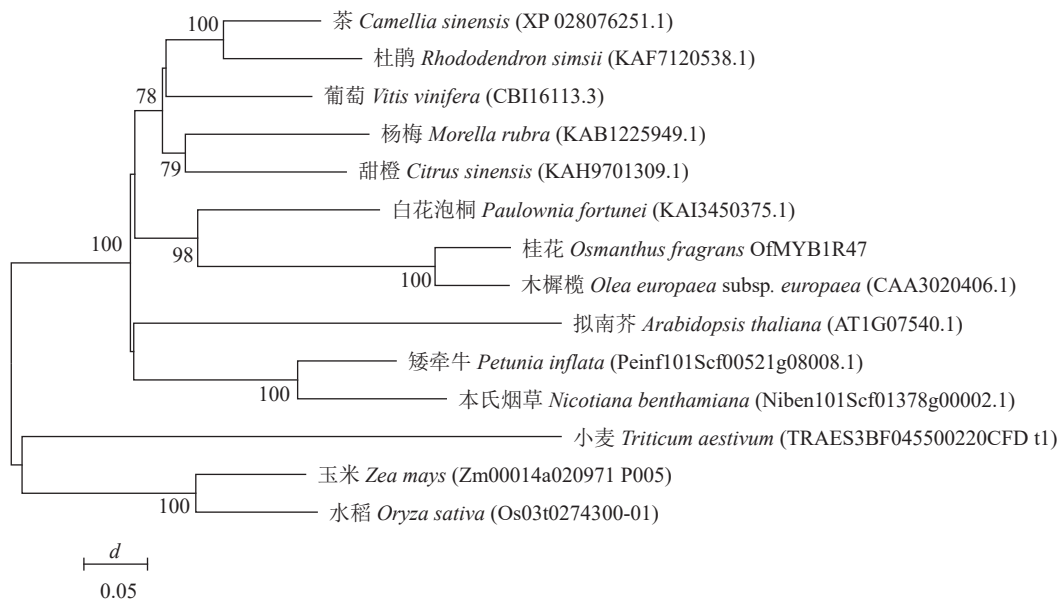


图 2 *OfMYB1R47* 蛋白的系统发育树分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of *OfMYB1R47*

OfMYB1R47 的表达，而在转化空载体植物中均未检测到 *OfMYB1R47* 的表达 (图 6A)，这说明本氏烟草的瞬时转化体系较为成功，可以用于后续基因功能的分析。从瞬时表达 *OfMYB1R47* 本氏烟草叶片中共鉴定出 17 种芳香性挥发物，包括 6 种酯类、6 种醛类、2 种酮类等 (表 2)。通过对瞬时表达 *OfMYB1R47* 基因和空载体植株挥发物的主成分 PCA 分析，发现瞬时转 *OfMYB1R47* 基因的植株可以与瞬时转化空载体的植株很好地区分开来，表现出较显著的代谢差异 (图 6B)。同时，最小偏二乘法 (OPLS-DA) 分析的结果也表明瞬时表达 *OfMYB1R47* 和空载体的组分可以完全分离 (图 6C)。综上所述，瞬时超量表达 *OfMYB1R47* 可导致本氏烟草叶片芳香性挥发物质量分数的构成发生改变。

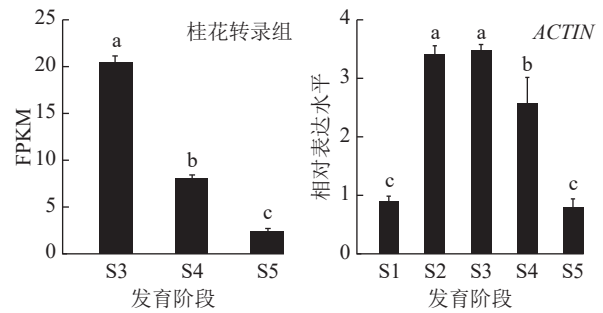
基于 OPLS-DA 分析，通过筛选 VIP > 1 和 P < 0.05 的差异物质，发现与瞬时表达空载体相比，

OfMYB1R47 瞬时表达植株中辛醛和 β -紫罗兰酮的相对含量都发生了显著改变(表2和图6D)。从GC-MS的峰面积来看, *OfMYB1R47* 瞬时表达植株中, 辛醛的面积明显比对照瞬时表达植株小, 表现为辛醛的相对含量显著下降; 而 β -紫罗兰酮的面积明显比对照瞬时表达植株大, 表现为 β -紫罗兰酮的相对含量明显上升(图6E)。此外, RT-qPCR 结果显示: 与瞬时表达空载体植株相比, 在瞬时表达 *OfMYB1R47-2* 植株中 *NbCCD4.1*、*NbCCD4.2*、*NbCCD4.3* 以及 *NbCCD1* 等与 β -紫罗兰酮合成相关的酶基因的表达量都显著上升(图7)。

3 讨论与结论

MYB-related 和 R2R3-MYB 转录因子为植物中

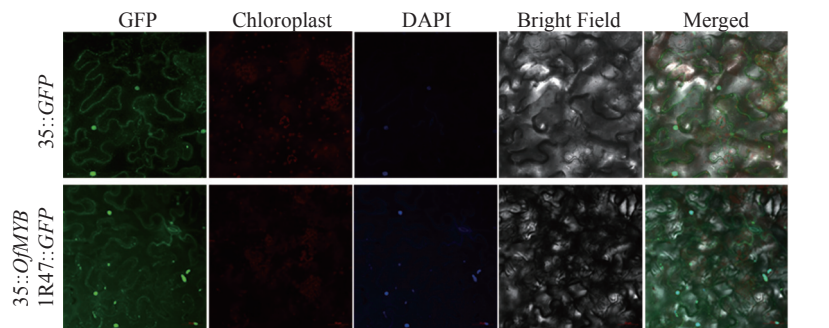
MYB 基因家族的 2 个主要成员, 它们在调节植物生长发育过程和响应非生物胁迫等方面均具有重要的作用。目前, 已有较多的与植物挥发性有机化合物合成相关的 R2R3-MYB 转录因子成员被鉴定出来^[24, 34-35], 然而, MYB-related 成员在花香挥发物合成过程中的功能目前仍鲜有报道。植物 MYB-related 转录因子通常具有一段高度保守的由 51 或 52 个氨基酸残基构成的结构域, 该结构域可以用于识别不同类型的顺式作用元件并发挥调控作用, 这也是 MYB-related 基因成员的重要特征^[16, 36-37]。在 *OfMYB1R47* 转录因子的 N 端也发现了这段保守结构域, 表明该基因为典型的 MYB-related 转录因子成员。通过系统进化树分析, 在 13 个代表性物种中均发现了 *OfMYB1R47* 的直系同源基因, 然而这些同源基因的功能仍然未知。



FPKM 表示每千个碱基转录每百万映射读取的片段。数据为平均值 \pm 标准差 ($n=3$)。不同小写字母表示同一指标不同花期差异显著 ($P<0.05$)。S1~S5 分别代表铃梗期、香眼期、初花期、盛花期和未花期。

图3 *OfMYB1R47* 基因在桂花花朵 5 个发育时期的表达模式分析

Figure 3 Expression pattern of *OfMYB1R47* in the five flower development stages of *O. fragrans*



GFP. 绿色荧光蛋白; Chloroplast. 叶绿体; DAPI. 核定位信号; Bright Field. 明场; Merged. 融合场。

图4 *OfMYB1R47* 蛋白在本氏烟草叶片中的亚细胞定位结果

Figure 4 Subcellular localization analysis of *OfMYB1R47* in the *N. benthamiana* leaves

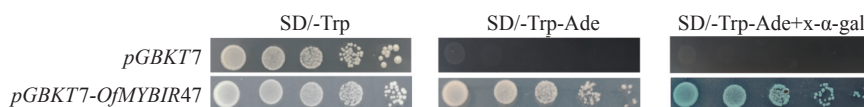
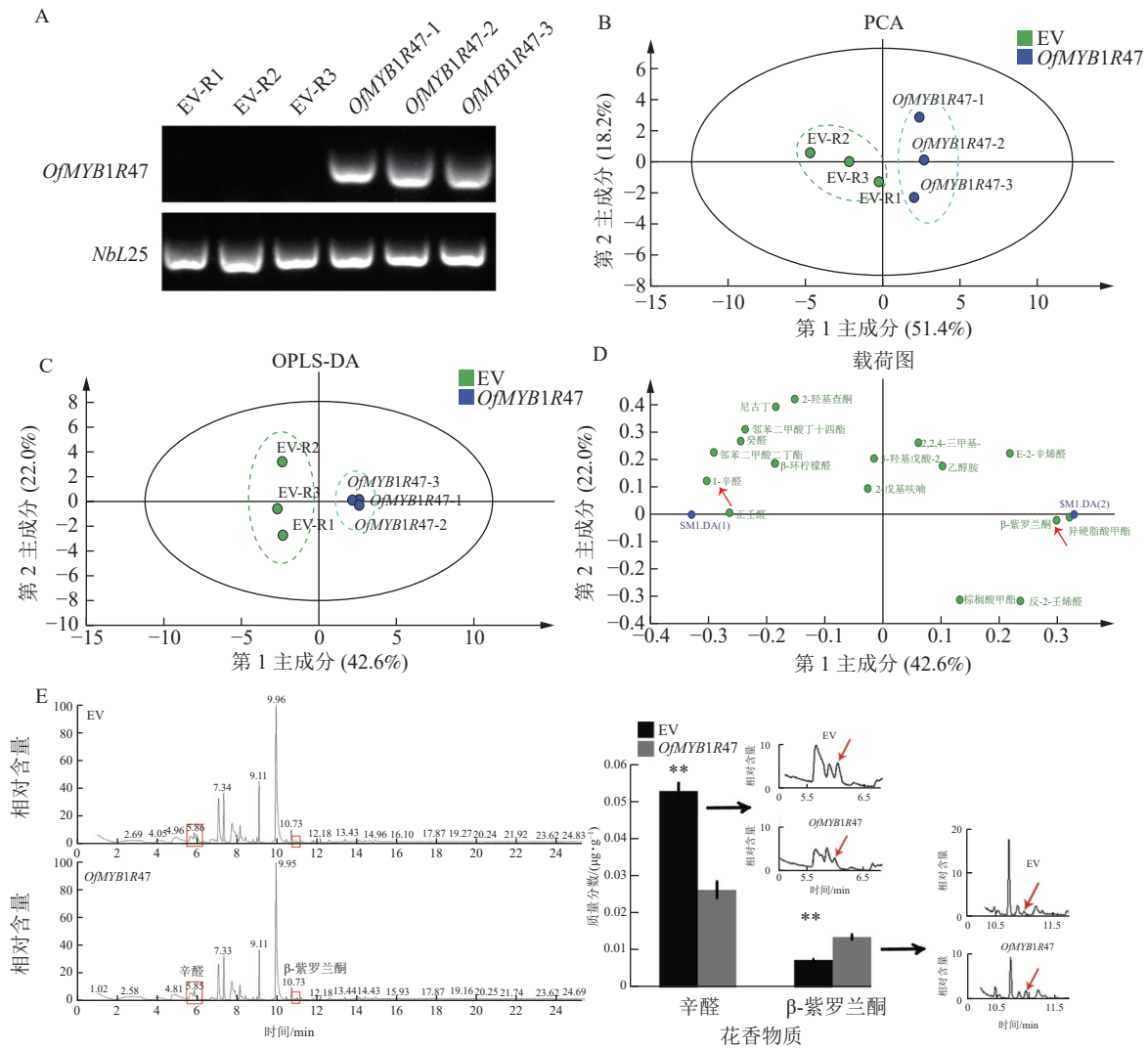


图5 *OfMYB1R47* 蛋白转录自激活分析

Figure 5 Transcriptional activation analysis of *OfMYB1R47*

花香调控基因的表达水平往往随着花朵的发育而表现出显著的变化, 且往往与不同花期花香释放的强度变化具有较高的相关性^[25]。为了获得较为可靠的基因表达分析结果, 本研究使用桂花 *ACTIN* 这个内参基因进行 RT-qPCR 分析, 结果发现: *OfMYB1R47* 转录因子在以内参基因为参考的分析结果中表现为先上升后下降的表达趋势, 这与桂花花香物质释放的规律一致^[38]。在姜花、矮牵牛、留兰香、蜡梅 *Chimonanthus praecox* 等观赏植物中研究表明: MYB 转录因子家族中的成员可与花香合成酶基因的启动子结合, 通过调控相应靶基因的表达水平来调节植物挥发性有机化合物的合成^[20, 24-25, 39]。在桂花中, 也



A. 用半定量表达分析探讨 *OjMYB1R47* 的基因转录调控。使用 *NbL25* 基因作为内参基因。EV-R1、EV-R2、EV-R3 分别代表了空载体瞬时表达植株的 3 个生物学重复。B. *OjMYB1R47* 瞬时表达植株芳香性挥发物 PCA 分析图。C. *OjMYB1R47* 瞬时表达植株芳香性挥发物 OPLS-DA 分析图。D. *OjMYB1R47* 瞬时表达植株和空载体瞬时表达植株中芳香性挥发物的加载散点图分析。红色箭头标记了瞬时表达植物中的花香成分。E. 用 *OjMYB1R47* 和对照载体注射后辛醛和 β -紫罗兰酮的芳香性挥发物分析。** $P < 0.01$ 。

图 6 *OjMYB1R47* 基因的功能分析

Figure 6 Functional analysis of *OjMYB1R47*

表 2 瞬时表达植株中芳香性挥发物的出峰时间和质量分数

Table 2 Peak time and content of aromatic volatiles in transient expression plants

Cas号	出峰时间/min	名称	物质质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RIL	VIP	P
			EV	<i>OjMYB1R47</i>			
141-43-5	2.50	乙醇胺 ethanolamine	0.017 0 \pm 0.008 5	0.026 8 \pm 0.020 5	-	0.529 9	0.491
644-78-0	4.02	2-羟基查酮 2-hydroxychalcone	0.081 5 \pm 0.059 5	0.044 2 \pm 0.003 4	-	0.961 8	0.391
3777-69-3	5.86	2-戊基呋喃 furan, 2-pentyl-	0.043 9 \pm 0.012 6	0.043 6 \pm 0.004 9	1 001	0.194 6	0.975
124-13-0*	5.99	辛醛 octanal	0.052 9 \pm 0.007 1	0.026 2 \pm 0.006 5	1 009	1.302 2	0.009
2548-87-0	6.67	E-2-辛烯醛 2-octenal, (E)-	0.011 2 \pm 0.003 2	0.015 8 \pm 0.003 4	1 066	1.004 8	0.173
124-19-6	7.07	正壬醛 nonanal	0.354 0 \pm 0.052 0	0.254 6 \pm 0.047 3	1 110	1.118 8	0.071
18829-56-6	7.73	反-2-壬烯醛 2-nonenal, (E)-	0.154 0 \pm 0.107 8	0.299 9 \pm 0.066 8	1 162	1.141 6	0.117
112-31-2	8.14	癸醛 decanal	0.144 7 \pm 0.038 5	0.088 5 \pm 0.019 5	1 209	1.131 7	0.087
432-25-7	8.42	β -环柠檬醛 1-cyclohexene-1-carboxaldehyde, 2,6,6-trimethyl-	0.021 2 \pm 0.002 2	0.017 6 \pm 0.004 3	1 219	0.850 0	0.277
54-11-5	9.82	尼古丁 pyridine, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-, (S)-	0.043 7 \pm 0.040 1	0.010 3 \pm 0.006 3	1 360	1.028 4	0.286
79-77-6*	10.99	β -紫罗兰酮 β -ionone	0.007 4 \pm 0.000 3	0.013 6 \pm 0.002 0	1 492	1.272 6	0.006

表 2 (续)

Table 2 Continued

Cas号	出峰时间/min	名称	物质质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RIL	VIP	P
			EV	OfMYB1R47			
166273-38-7	11.20	5-羟基戊酸-2,4-二叔丁基苯基酯 pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	0.024 2±0.006 7	0.023 4±0.013 2		0.354 2	0.934
6846-50-0	11.83	2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二异丁酸酯 2,2,4-trimethyl-1, 3-pentenediol diisobutyrate	0.018 2±0.005 8	0.020 1±0.009 4		0.515 5	0.780
84-69-5	14.11	邻苯二甲酸二异丁酯 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester	0.022 3±0.004 7	0.016 1±0.001 0		1.135 7	0.294
112-39-0	14.43	棕榈酸甲酯 hexadecanoic acid, methyl ester	0.011 3±0.005 3	0.014 4±0.002 9	1 929	0.777 2	0.424
84-74-2	14.94	邻苯二甲酸二丁酯 dibutyl phthalate	0.025 3±0.003 6	0.017 0±0.001 6		1.291 2	0.023
5129-61-3	15.94	异硬脂酸甲酯 heptadecanoic acid, 16-methyl-, methyl ester	0.000 0±0.000 0	0.005 3±0.001 1	2 103	1.365 1	0.015

说明: EV 表示阴性对照载体; VIP 表示变量重要性投影值; RIL 表示与 NIST 谱库或网站中文文献的保留指数对比鉴定值; *表示相对含量发生显著改变。

发现核定位转录因子 *OfERF61* 可通过调节 *OfCCD4* 的表达来影响桂花重要花香物质 β -紫罗兰酮的合成^[13]。在本研究中, 通过亚细胞定位预测发现: *OfMYB1R47* 转录因子蛋白主要位于细胞核内, 为典型的核定位转录因子。同时, 酵母自激活实验发现: *OfMYB1R47* 转录因子还具有较强的自激活活性。可见, *OfMYB1R47* 转录因子在桂花花香合成过程中可能具有重要的调控作用。

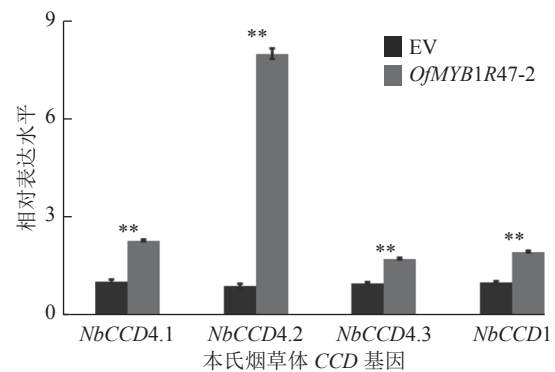
目前, 在本氏烟草中进行基因功能瞬时验证的体系已经在本源物种转基因较为困难的植物中广泛应用^[13, 25-26]。本研究将 *OfMYB1R47* 转录因子在本氏烟草中进行了瞬时超量表达, 发现瞬时转化空载体的植株可与瞬时转化 *OfMYB1R47* 载体的植株较好地划分为 2 个类群, 这说明在本氏烟草中, 异源表达

OfMYB1R47 基因后会引起来本氏烟草芳香性挥发物构成的改变。OPLS-DA 的 VIP 值分析表明: 辛醛和 β -紫罗兰酮是导致瞬时转化 *OfMYB1R47* 载体植株与瞬时转化空载体植株的芳香性挥发物聚类发生明显区分的重要香味物质, 且辛醛和 β -紫罗兰酮的含量与转化空载体的植株相比都发生了显著变化, 这表明 *OfMYB1R47* 转录因子在芳香性挥发物的合成过程中具有重要的调节作用。进一步研究表明: 瞬时表达 *OfMYB1R47* 植株中 *NbCCD4.1*、*NbCCD4.2*、*NbCCD4.3* 以及 *NbCCD1* 基因的表达明显上升, 表明在本氏烟草中瞬时过表达 *OfMYB1R47* 激活了 *NbCCD4.1*、*NbCCD4.2*、*NbCCD4.3* 和 *NbCCD1* 等与 β -紫罗兰酮合成相关的酶基因的表达, 从而导致 *OfMYB1R47* 瞬时表达植物中 β -紫罗兰酮相对含量的变化。

本研究鉴定了一个具有转录激活活性, 在桂花花朵中的表达模式与花香释放规律一致, 且参与调控芳香挥发物合成的核定位转录因子 *OfMYB1R47*, 有助于加深对 MYB-related 转录因子亚家族功能的了解, 可为今后桂花的花香分子育种提供可靠的基因资源。

4 参考文献

- [1] HUANG Bin, CHEN Huangqin, SHAO Nongquan. The ethanol extract of *Osmanthus fragrans* attenuates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated inflammatory effect through the nuclear factor erythroid 2-related factor-mediated antioxidant signalling pathway [J]. *Archives of Oral Biology*, 2015, 60(7): 1030 - 1038.
- [2] 王英, 张超, 付建新, 等. 桂花花芽分化和花开放研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2016, 33(2): 340 - 347. WANG Ying, ZHANG Chao, FU Jianxin, et al. Progresses on flower bud differentiation and flower opening in *Osmanthus fragrans* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2016, 33(2): 340 - 347.



EV 表示阴性对照载体; *NbCCD4*、*NbCCD1* 表示本氏烟草类胡萝卜素裂解双加氧酶 4 基因和 1 基因。*** $P < 0.01$ 。

图 7 本氏烟草 *CCD4* 和 *CCD1* 基因在瞬时表达植株中的表达量

Figure 7 Expression of *CCD4* and *CCD1* gene in transiently transformed plants

- [3] LI Haiyan, YUE Yuanzheng, DING Wenjie, *et al.* Genome-wide identification, classification, and expression profiling reveals R2R3-MYB transcription factors related to monoterpenoid biosynthesis in *Osmanthus fragrans* [J/OL]. *Genes*, 2020, **11**(4): 353 [2022-07-01]. doi: 10.3390/genes11040353.
- [4] FU Jianxin, HOU Dan, WANG Yiguang, *et al.* Identification of floral aromatic volatile compounds in 29 cultivars from four groups of *Osmanthus fragrans* by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2019, **60**(4): 611 – 623.
- [5] XIN Haiping, WU Benhong, ZHANG Haohao, *et al.* Characterization of volatile compounds in flowers from four groups of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2013, **93**(5): 923 – 931.
- [6] 孙宝军, 李黎, 韩远记, 等. 上海桂林公园桂花芳香成分的HS-SPME-GC-MS分析[J]. *福建林学院学报*, 2012, **32**(1): 39 – 42.
- SUN Baojun, LI Li, HAN Yuanji, *et al.* HS-SPME-GC-MS analysis of different *Osmanthus fragrans* cultivars from Guilin Garden in Shanghai [J]. *Journal of Fujian College of Forestry*, 2012, **32**(1): 39 – 42.
- [7] ZOU Jingjing, CAI Xuan, ZENG Xiangling, *et al.* Characterization of aroma-active compounds from sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) by SDE and SPME coupled with GC-MS and GC-olfactometry [J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2019, **22**(2): 277 – 282.
- [8] YANG Xiulian, YUE Yuanzheng, LI Haiyan, *et al.* The chromosome-level quality genome provides insights into the evolution of the biosynthesis genes for aroma compounds of *Osmanthus fragrans* [J/OL]. *Horticulture Research*, 2018, **5**: 72 [2022-07-01]. doi 10.1038/s41438-018-0108-0.
- [9] CAI Xuan, MAI Rongzhang, ZOU Jingjing, *et al.* Analysis of aroma-active compounds in three sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars by GC-olfactometry and GC-MS [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2014, **15**(7): 638 – 648.
- [10] AHARONI A, GALILI G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, **22**(2): 239 – 244.
- [11] 岳跃冲, 范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展[J]. *园艺学报*, 2011, **38**(2): 379 – 388.
- YUE Yuechong, FAN Yanping. The terpene synthases and regulation of terpene metabolism in plants [J]. *Acta Horticulture Sinica*, 2011, **38**(2): 379 – 388.
- [12] HAN Yuanji, WU Miao, CAO Liya, *et al.* Characterization of *OfWRKY3*, a transcription factor that positively regulates the carotenoid cleavage dioxygenase gene *OfCCD4* in *Osmanthus fragrans* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, **91**(4/5): 485 – 496.
- [13] HAN Yuanji, WANG Hongyun, WANG Xiaodan, *et al.* Mechanism of floral scent production in *Osmanthus fragrans* and the production and regulation of its key floral constituents, beta-ionone and linalool [J/OL]. *Horticulture Research*, 2019, **6**: 106 [2022-07-01]. doi: 10.1038/s41438-019-0189-4.
- [14] DING Wenjie, OUYANG Qixia, LI Yuli, *et al.* Genome-wide investigation of WRKY transcription factors in sweet osmanthus and their potential regulation of aroma synthesis [J]. *Tree Physiology*, 2020, **40**(4): 557 – 572.
- [15] ROSINSKI J A, ATCHLEY W R. Molecular evolution of the MYB family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1998, **46**(1): 74 – 83.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, *et al.* MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends in Plant Science*, 2010, **15**(10): 573 – 581.
- [19] WANG Lining, HUANG Qinghua, ZHANG Liulian, *et al.* Genome-wide characterization and comparative analysis of MYB transcription factors in *Ganoderma* species [J]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2020, **10**(8): 2653 – 2660.
- [20] COLQUHOUN T A, KIM J Y, WEDDE A E, *et al.* *PhMYB4* fine-tunes the floral volatile signature of *Petunia*×*hybrida* through *PhC4H* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(3): 1133 – 1143.
- [21] SPITZER-RIMON B, FARHI M, ALBO B, *et al.* The R2R3-MYB-like regulatory factor EOBI, acting downstream of EOBI, regulates scent production by activating *ODO1* and structural scent-related genes in petunia [J]. *The Plant Cell*, 2012, **24**(12): 5089 – 5105.
- [22] ZVI M M B, SHKLARMAN E, MASCI T, *et al.* *PAP1* transcription factor enhances production of phenylpropanoid and

- terpenoid scent compounds in rose flowers [J]. *New Phytologist*, 2012, **195**(2): 335 – 345.
- [23] WANG Qian, REDDY V A, PANICKER D, *et al.* Metabolic engineering of terpene biosynthesis in plants using a trichome-specific transcription factor *MsYABBY5* from spearmint (*Mentha spicata*) [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, **14**(7): 1619 – 1632.
- [24] REDDY V A, WANG Q, DHAR N, *et al.* Spearmint R2R3-MYB transcription factor *MsMYB* negatively regulates monoterpene production and suppresses the expression of geranyl diphosphate synthase large subunit (*MsGPPS. LSU*) [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, **15**(9): 1105 – 1119.
- [25] ABBAS F, KE Yanguo, ZHOU Yiwei, *et al.* Genome-wide analysis reveals the potential role of MYB transcription factors in floral scent formation in *Hedychium coronarium* [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **12**: 623742[2022-07-01]. doi: 10.3389/fpls.2021.623742.
- [26] YONG Yubing, ZHANG Yue, LYU Yingmin. A MYB-related transcription factor from *Lilium lancifolium* L. (LIMYB3) is involved in anthocyanin biosynthesis pathway and enhances multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(13): 3195[2022-07-01]. doi: 10.3390/ijms20133195.
- [27] YANG Xiulian, LI Haiyan, YUE Yuanzheng, *et al.* Transcriptomic analysis of the candidate genes related to aroma formation in *Osmanthus fragrans* [J/OL]. *Molecules*, 2018, **23**(7): 1604[2022-07-01]. doi: 10.3390/molecules23071604.
- [28] 杨康民, 朱文江, 蒋永明, 等. 桂花开花物候期的划分及其采收期的调查研究[J]. 园艺学报, 1986, **13**(4): 57 – 61.
YANG Kangmin, ZHU Wenjiang, JIANG Yongming, *et al.* Study on the division of flowering phenological period and its harvesting period of *Osmanthus fragrans* [J]. *Acta Horticulture Sinica*, 1986, **13**(4): 57 – 61.
- [29] YUE Yuanzheng, DU Juhua, LI Ya, *et al.* Insight into the petunia Dof transcription factor family reveals a new regulator of male-sterility [J/OL]. *Industrial Crops & Products*, 2021, **161**[2022-07-01]. doi:10.1016/j.indcrop.2020.113196.
- [30] 欧阳绮霞, 丁文杰, 吴秀怡, 等. 桂花RAP2-12基因的克隆与表达模式分析[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(8): 1267 – 1276.
OUYANG Qixia, DING Wenjie, WU Xiuyi, *et al.* Cloning and expression characteristic analysis of RAP2-12 in *Osmanthus fragrans* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(8): 1267 – 1276.
- [31] ZHANG Chao, FU Jianxin, WANG Yiguang, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in the quantitative real-time PCR analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) [J/OL]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0136355[2022-07-01]. doi: 10.1371/journal.pone.0136355.
- [32] JI Xiaoyue. Comparative investigation of volatile components and bioactive compounds in beers by multivariate analysis [J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2021, **36**(3): 374 – 383.
- [33] JI Xiaoyue. Comparative analysis of volatile organic compounds and bioactive compounds in typical coniferous and broad-leaved tree species [J]. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2020, **23**(5): 1105 – 1117.
- [34] JIAN Wei, CAO Haohao, YUAN Shu, *et al.* SIMYB75, an MYB-type transcription factor, promotes anthocyanin accumulation and enhances volatile aroma production in tomato fruits [J/OL]. *Horticulture Research*, 2019, **6**: 22[2022-07-01]. doi: 10.1038/s41438-018-0098-y.
- [35] ZHAO Pincang, HOU Shenglin, GUO Xiufang, *et al.* A MYB-related transcription factor from sheepgrass, LcMYB2, promotes seed germination and root growth under drought stress [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2019, **19**(1): 564[2022-07-01]. doi: 10.1186/s12870-019-2159-2.
- [36] RIECHMANN J L, RATCLIFFE O J. A genomic perspective on plant transcription factors [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, **3**(5): 423 – 434.
- [37] 刘彻, 姚盼盼, 宋皓, 等. 烟草1R MYB转录因子亚家族鉴定与分析[J]. 植物生理学报, 2022, **58**(5): 904 – 918.
LIU Che, YAO Panpan, SONG Hao, *et al.* Identification and analysis of 1R MYB transcription factor subfamily in tobacco [J]. *Plant Physiology Journal*, 2022, **58**(5): 904 – 918.
- [38] 曾祥玲, 章晓琴, 邹晶晶, 等. 基于cDNA-AFLP分析桂花开花进程中差异表达基因[J]. 广西植物, 2019, **39**(7): 940 – 950.
ZENG Xiangling, ZHANG Xiaoqin, ZOU Jingjing, *et al.* cDNA-AFLP analysis of differentially expressed genes during flowering in *Osmanthus fragrans* [J]. *Guihuia*, 2019, **39**(7): 940 – 950.
- [39] LIU Fei, XIAO Zhina, YANG Li, *et al.* PhERF6, interacting with EOB1, negatively regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers [J]. *New Phytologist*, 2017, **215**(4): 1490 – 1502.