

石榴木质素合成相关基因 *PgMYB308* 的克隆和表达分析

黄蓉, 熊枫, 陈磊, 张水明, 董丽丽*

(安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

摘要: 该研究以‘红玉石籽’ (*Punica granatum* cv. Hongyushizi) 石榴为试验材料, 采用 RACE 和 RT-PCR 方法, 获得与木质素的合成相关基因 *PgMYB308*。 *PgMYB308* 基因 cDNA 全长 792 bp, 编码 263 个氨基酸。分子量为 29.56 kD, 理论等电点为 9.07。序列比对和功能域分析发现, *PgMYB308* 包含 R2 和 R3 保守域, 以及 C1、C2、C4 和锌指基序。系统进化树分析显示, *PgMYB308* 与其他物种起源相同, 而与桉树 *EgMYB308* 亲缘关系最近。荧光定量 PCR 分析表明, *PgMYB308* 在茎、叶和种子等组织中均有表达, 其中茎中表达量最高, 叶片中表达量最低; *PgMYB308* 在‘突尼斯软籽’中表达最高, 而在‘红玉石籽’和‘白玉石籽’中表达量较低; *PgMYB308* 在‘红玉石籽’籽粒的不同时期均有表达, 但在花后 20 d 相对表达量最高, 以后随发育进程呈现逐渐下降的趋势。

关键词: 石榴; *MYB308*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of Lignin Biosynthesis-Related Gene *PgMYB308* in Pomegranate

HUANG Rong, XIONG Feng, CHEN Lei, ZHANG Shuiming, DONG Lili*

(College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In this study, *PgMYB308*, the related gene to the synthesis of lignin, was cloned using RACE and RT-PCR methods, with ‘*Punica granatum* cv. Hongyushizi’ as the experimental materials. The cDNA full-length sequence of *PgMYB308* was 792 bp, which reduced 263 amino acids. Sequence alignment and functional domain analysis revealed that *PgMYB308* contained R2, R3, C1, C2, C4 and Zing finger motifs. Phylogenetic tree analysis indicated that *PgMYB308* shared the same origin with other species, and had the closest relationship with *Eucalyptus grandis* *EgMYB308*. The fluorescent quantitative PCR analysis showed that *PgMYB308* expression was detected in stems, leaves and seeds. The expression in stems were the highest, while the lowest in leaves; *PgMYB308* expression was higher in ‘Tunisiruanzi’, while lower in ‘Hongyushizi’ and ‘Baiyushizi’; *PgMYB308* expression was detected in ‘Hongyushizi’ seeds of different periods. The relative expression of *PgMYB308* gradually declined from 20 d to –120 d, and the relative expression was the highest at 20 d.

Key words: pomegranate; *MYB308*; gene cloning; expression analysis

收稿日期: 2017-08-08; 修改稿收到日期: 2017-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(30900971)

作者简介: 黄蓉 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 主要研究果树资源与生物技术育种。E-mail: 13732583377@163.com

* 通信作者: 董丽丽, 博士, 讲师, 主要从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: dongli0608@163.com

石榴 (*Punica granatum* L.)在世界各地广泛栽培,是中国的特色经济林树种之一^[1]。石榴按照籽粒软硬度分为软籽、较软籽、较硬籽和硬籽^[2]。其中,软籽石榴可食率高,较为珍贵,是石榴育种的重要方向。木质素含量与石榴籽粒的硬度密切相关,因此,调节木质素的合成是降低石榴籽粒硬度的重要途径。

MYB 家族基因以含有 MYB 结构域为共同特征,是植物中最大的转录因子家族之一。MYB 家族中的多个成员参与木质素的合成。火炬松 *Pt-MYB4* 的过表达能够引起木质素含量的增加^[3]。*EgMYB1* 能够直接结合于木质素合成基因 *CCR*、*CAD* 启动子区域的顺式调控区,最终调控木质素的合成及次生壁的形成^[4]。*EgMYB1* 在桉树的根和茎中的次生木质部表达,是次生细胞壁形成的抑制因子,通过结合于木质素合成基因的 MBSIIIG 位点,抑制这些基因的表达,从而调控木质素的合成^[5]。银合欢 *LiMYB1* 的过量表达能够引起苯丙烷途径基因表达水平的降低,从而引起木质素含量的降低^[6]。毛白杨 *PtoMYB216* 是木质素合成基因的转录激活子,特异表达于次生壁形成期,*PtoMYB216* 的过量表达能够导致木质素的异位沉积^[7]。菊花 *CmMYB1* 基因在茎中的表达量最高,被认为是木质素合成基因的负调节因子^[8]。将金鱼草 *MYB308* 基因在烟草中过表达引起了木质素合成途径基因 *C₄H*, *4CL*, *CAD* 表达量的变化,并最终引起木质素含量的降低^[9]。以上研究说明 MYB 家族成员能够通过影响木质素合成途径有效调控木质素的合成,因此,MYB 家族基因在利用基因工程手段调控木质素的合成中具有较大的应用潜力。

本研究从石榴中克隆了 *MYB308* 同源基因

PgMYB308, 并采用实时荧光定量 PCR 对该基因在不同石榴品种、不同组织、不同籽粒发育阶段的表达水平进行了检测。从而为进一步研究 *Pg-MYB308* 的功能奠定基础,也为软籽石榴的新品种培育提供基因储备。

1 材料和方法

1.1 实验材料

于安徽农业大学农业园石榴种质资源圃中采集‘红玉石籽’品种的茎、叶片、种子,浸于液氮中带回实验室,随后储存于-80 ℃冰箱中备用;采集‘红玉石籽’、‘白玉石籽’、和‘突尼斯软籽’成熟度一致的果实,剥离假种皮、种仁,取种皮部分浸于液氮中带回实验室,储存于-80 ℃冰箱中备用;分别采集开花后 20、40、60、80、100 和 120 d 的‘红玉石籽’的果实,带回实验室,同上所述,取种皮储存于-80 ℃冰箱中备用。

1.2 方 法

1.2.1 基因全长序列的克隆 RNA 提取及反转录参考董丽丽等^[10]的方法根据 NCBI 已经公布的多个物种的保守序列设计引物(表 1) *MYB308*-PF/*MYB308*-PR 进行中间片段的扩增。在获取的中间片段上继续设计引物 *MYB308*-5′ R1/*MYB308*-5′ R2 和 *MYB308*-3′ GSP1/*MYB308*-3′ GSP2,按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 步骤,通过巢式 PCR 分别进行 *MYB308* 基因 5′端和 3′序列的扩增。将三部分序列进行拼接,并设计引物 *MYB308*-F/*MYB308*-R 进行扩增,最终获得 *PgMYB308* 基因的全长序列。使用 KOD plus 高保真酶扩增 *PgMYB308*,经加 A 反应后连接到 pGEM-Teasy 载体,由上海生

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	序列(5'→3')Sequence	用途 Usage
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	通用引物 Universal primers
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
MYB308-3'GSP1	AGGCATCGACCC TTCCACCC	<i>PgMYB308</i> 3'端扩增
MYB308-3'GSP2	TAGAGTACAGCATCAAGAG	Amplification for 3'-RACE of <i>PgMYB308</i>
MYB308-5'GSP1	GTAGCTCGTTGATTGGCCGGTG	<i>PgMYB308</i> 5'端扩增
MYB308-5'GSP2	CATTATCGGCCTTCTTCTCTTGA	Amplification for 5'-RACE of <i>PgMYB308</i>
MYB308-F	ATGGGAAGGTCTCCTTGCTGTG	<i>PgMYB308</i> 全长扩增
MYB308-R	CTAGCAATCATACAAAAATAGA	Amplification for full length of <i>PgMYB308</i>
MYB308-RT-F	CCCTCCCCATCAAACCCAATACC	<i>PgMYB308</i> 荧光定量 PCR
MYB308-RT-R	CGCCGCTGCCTCTGCCCCCGCTA	qRT-PCR
<i>PgACT</i> -PF	AGTCCTCTTCCAGCCATCTC	<i>PgACTIN</i> 扩增
<i>PgACT</i> -PR	CACTGAGCACAATGTTTCCA	Amplification for <i>PgACTIN</i>

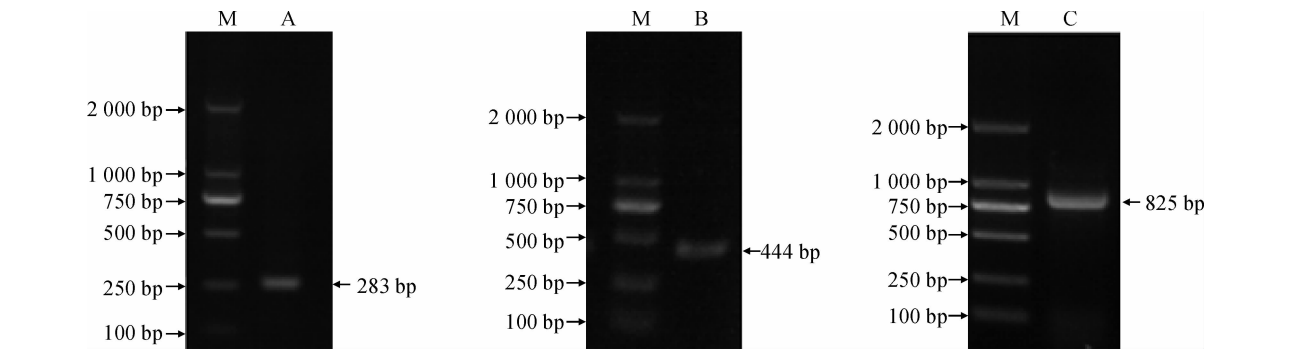
工公司进行测序。

1.2.2 基因表达、序列及系统进化等分析 根据 *PgMYB308* 的全长序列,使用 Primer premier 5.0 设计引物 MYB308-RT-F/MYB308-RT-R。采用 Trizol 方法提取茎、叶片和种子的 RNA,分别取 4 μg 经 DNase I 处理后的 RNA,利用 MMLV 反转录酶进行反转录,获得 cDNA 模板。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 的操作步骤,并参照董丽丽等的反应体系、反应程序及计算方法进行荧光定量 PCR^[11]。基因表达分析、序列分析和系统进化树的构建及数据分析均参考张水明等的方法^[11]。

2 结果和分析

2.1 石榴 *PgMYB308* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

根据已经公布的冈尼梭、枇杷、烟草等物种的 MYB308 的序列,设计引物 MYB308-PF/MYB308-PR 进行扩增,挑选阳性克隆测序得到一个长 283 bp 核酸片段(图 1, A)。使用基因特异引物 MYB308-5'F1/MYB308-5'R1 进行 MYB308 基因 5'端序列的扩增,得到一个长 444 bp 的片段(图 1, B)。使用 MYB308-3'GSP1 和 UPM-Long 引物进行

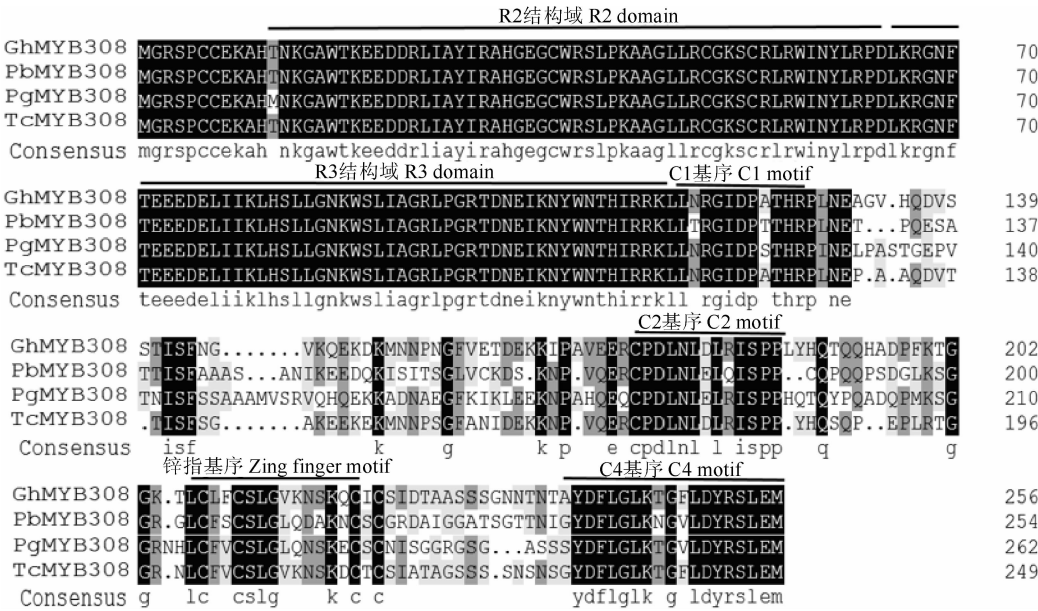


M. DL 2000;A. 中间片段扩增结果;B. 5'-RACE 扩增结果;C. 3'-RACE 扩增结果

图 1 *PgMYB308* 基因扩增结果

M. DL 2000;A. Amplification results of intermediate fragment;B. Amplification results of 5'-RACE;
C. Amplification results of 3'-RACE

Fig. 1 The amplification results of *PgMYB308*



GhMYB308. 陆地棉 (XP_016672334.1);PbMYB308. 白梨 (XP_009376958.1);TcMYB308. 可可 (XP_007041863)

图 2 *PgMYB308* 及其他物种 MYB308 序列比对

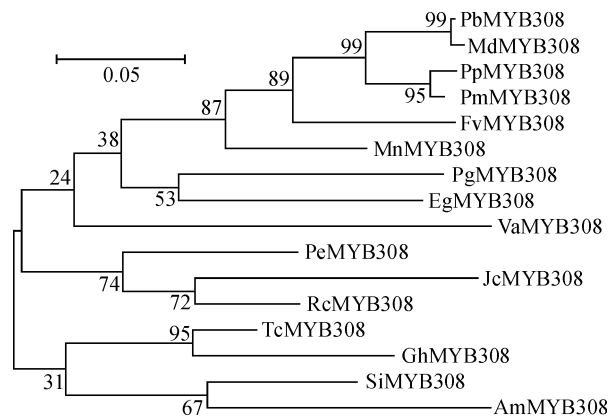
GhMYB308. *Gossypium hirsutum* (XP_016672334.1);PbMYB308. *Pyrus bretschneideri* (XP_009376958.1);
TcMYB308. *Theobroma cacao* (XP_007041863)

Fig. 2 Alignment of *PgMYB308* with other MYB308s

MYB308 基因 3'端序列的扩增,得到一个 825 bp 带有多聚 A 尾巴的片段(图 1, C)。将获得的石榴 MYB308 基因片段、3'端和 5'端序列拼接,获得 987 bp *PgMYB308* 基因序列。该基因开放阅读框为 792 bp,编码 263 个氨基酸。利用 ExPaSy ProtPara 在线工具预测分子量为 29.56 kD,理论等电点为 9.07。

2.2 石榴 *PgMYB308* 的同源分析

将 *PgMYB308* 基因编码的氨基酸序列与 NCBI



PbMYB308. 白梨(XP_007200603.1);MdMYB308. 苹果(NP_001315806.1); PpMYB308. 巴旦木(XP_007200603.1); PmMYB308. 梅(XP_008236005.1); FvMYB308. 野草莓(XP_004289866.1); MnMYB308. 桑树(XP_010090332.1); *PgMYB308*. 石榴(AJD79907.1);EgMYB308. 桉树(XP_010028718.1); VaMYB308. 赤豆(XP_017420603.1);PeMYB308. 胡杨(XP_011046699.1);JcMYB308. 麻风树(XP_012081759.1); RcMYB308. 蓖麻(XP_002530824.1); TcMYB308. 可可(XP_007041863);GhMYB308. 陆地棉(XP_016672334.1); SiMYB308. 芝麻(XP_011092988.1);AmMYB308. 金鱼草(P81393.1);分支点数字表示基于 500 次重复该节点的自展支持率;标尺代表遗传距离

图 3 不同物种 MYB308 的系统进化分析

PbMYB308. *Prunus persica* (XP_007200603.1); MdMYB308. *Malus domestica* (NP_001315806.1); PpMYB308. *Prunus persica*(XP_007200603.1); PmMYB308. *Prunus mume* (XP_008236005.1); FvMYB308. *Fragaria vesca* (XP_004289866.1); MnMYB308. *Morus notabilis* (XP_010090332.1); *PgMYB308*. *Punica granatum* (AJD79907.1);EgMYB308. *Eucalyptus grandis* (XP_010028718.1); VaMYB308. *Vigna angularis*(XP_017420603.1); PeMYB308. *Populus euphratica* (XP_011046699.1); JcMYB308. *Jatropha curcas* (XP_012081759.1); RcMYB308. *Ricinus communis*(XP_002530824.1); TcMYB308. *Theobroma cacao*(XP_007041863); GhMYB308. *Gossypium hirsutum* (XP_016672334.1); SiMYB308. *Sesamum indicum* (XP_011092988.1); AmMYB308. *Antirrhinum majus* (P81393.1). The nodes in the figure show the bootstrap values based on 500 replications. The scale represents the genetic distance

Fig. 3 Phylogenetic analysis among different MYB308s

公布的其他物种的氨基酸序列进行比对,发现 *PgMYB308* 与可可的相似性最高,达 75.09%,与白梨和棉花的相似性分别为 74.44%和 71.8%。*PgMYB308* 氨基酸序列上存在 MYB 家族的保守域: R2 结构域(12~64)、R3 结构域(65~115)、C1、C2、锌指和 C4 基序(图 2)。

2.3 *PgMYB308* 同源蛋白系统发育分析

为了确定 *PgMYB308* 与其他物种 MYB308 的亲缘关系,利用 MEGA 5.05 软件,将 *PgMYB308* 与已克隆的野茶树、白梨、巴旦木、桉树、胡杨等 15 个物种中的 MYB308 进行多重序列比对和系统进化分析(图 3)。结果显示, *PgMYB308* 与其他物种的 MYB308 起源相同,确实是 MYB308 家族的同源基因。但在后来进化的不同时期,与其他物种分离开来。*PgMYB308* 和桉树 *EgMYB308* 的亲缘关系最近,聚为一枝,而与金鱼草 *AmMYB308* 亲缘关系较远。

2.4 不同组织中 *PgMYB308* 基因的表达分析

以品种‘红玉石籽’为材料,对石榴不同组织中 *PgMYB308* 基因表达水平进行检测。结果表明: *PgMYB308* 基因在茎、叶片和种子中均有表达。以种子表达量作为对照,茎中的表达量最高,是叶片中的 6.5 倍,而叶片中的表达量最低(图 4)。

2.5 不同石榴品种中 *PgMYB308* 基因表达

为探讨不同石榴品种中 *PgMYB308* 基因的表达水平,对种皮中 *PgMYB308* 的相对表达量进行检测。结果表明: *PgMYB308* 基因在不同籽粒硬度品种的种皮中表达具有显著差异,以‘白玉石籽’为对照,‘突尼斯软籽’中表达量最高,为‘红玉石籽’的 2.2 倍。而 *PgMYB308* 在‘红玉石籽’与‘红玉石籽’中的表达量无显著性差异(图 5)。

2.6 不同发育时期 *PgMYB308* 基因的表达

为揭示 *PgMYB308* 基因在籽粒不同发育时期的

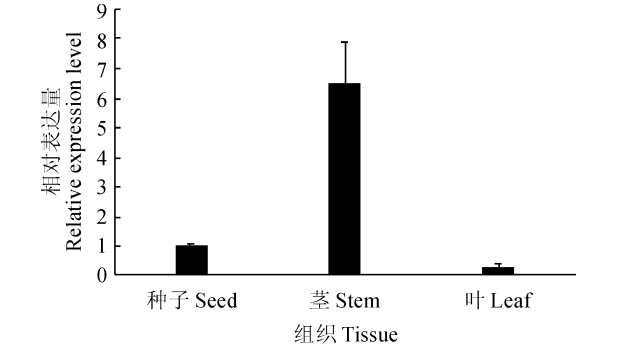
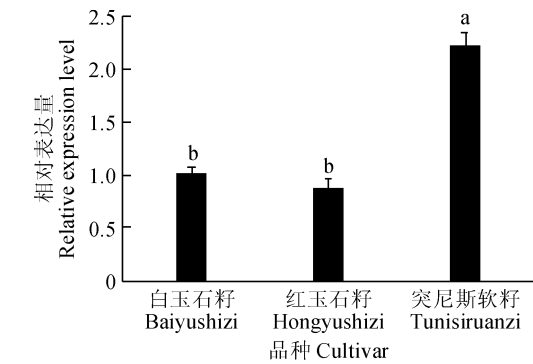


图 4 石榴不同组织 *PgMYB308* 基因的相对表达量
Fig. 4 The relative expression of *PgMYB308* in different tissues of pomegranate



图中不同小写字母表示差异显著, 下同同

图 5 石榴不同品种种皮中 *PgMYB308* 基因的相对表达
Different normal letter mean significant difference.
The same as below

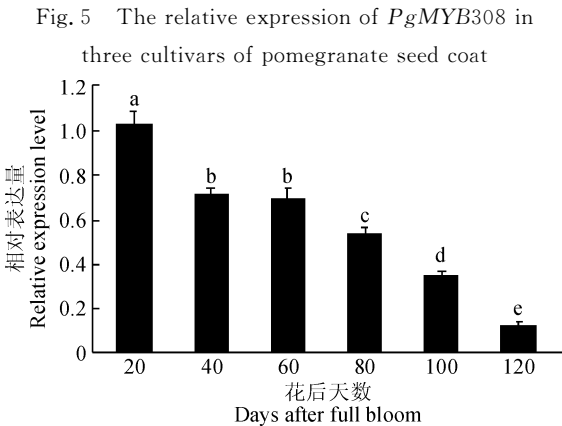


图 6 石榴开花后不同时期籽粒中 *PgMYB308* 基因的相对表达量
Fig. 6 The relative expression of *PgMYB308* in different periods of pomegranate seeds
表达特性。分别对开花后 20、40、60、80、100 和 120 d 的‘红玉石籽’籽粒进行取样检测。结果表明：*PgMYB308* 在籽粒的不同时期均有表达，整体呈现逐渐下降的趋势，在 20 d 时相对表达量最高（图 6）。

3 讨 论

MYB 转录因子能够调控木质素的合成，而这种调控通常是通过转录激活或转录抑制木质素合成途径基因的表达来实现。如：拟南芥 *MYB58* 能够直接激活 *PAL*、*4CL1*、*HCT*、*C3H1*、*CCoAOMT1*、

CCR1、*CAD6* 等基因的表达^[12]。为在石榴中揭示 *MYB* 转录因子对木质素合成的调控，本研究从石榴中克隆了 *MYB308* 的同源基因，该基因推定的氨基酸序列含有 *MYB* 家族共有的保守域：R2 结构域、R3 结构域、C1、C2、锌指和 C4 基序^[13]。进化树分析表明石榴 *MYB308* 与其他物种中 *MYB308s* 的起源相同，且与桉树 *EgMYB308* 亲缘关系较近，说明该基因的确是 *MYB308* 的同源基因，因此命名为 *PgMYB308*。

为分析石榴不同组织中 *PgMYB308* 基因的表达特性，对‘红玉石籽’茎、叶、种子各组织中 *PgMYB308* 基因表达水平进行检测。发现 *PgMYB308* 基因在茎中表达量最高，在叶片中表达量最低。由于 *MYB* 参与调控木质素合成的成员主要在纤维及导管中高表达^[14]，因此 *PgMYB308* 基因的表达特性与前人的研究较为一致。

根据前期对不同石榴品种硬度及木质素含量的检测，选取‘红玉石籽’、‘白玉籽籽’和‘突尼斯软籽’等 3 个品种，对其籽粒中 *PgMYB308* 基因的相对表达量进行检测。结果表明木质素含量较低的‘突尼斯软籽’中 *PgMYB308* 基因的表达水平较高，而木质素含量较高的‘红玉石籽’和‘白玉籽籽’*PgMYB308* 基因的表达水平较低，说明 *PgMYB308* 可能是石榴木质素合成的负调控因子。

对不同时期籽粒中的 *PgMYB308* 基因的表达量进行检测，发现 *PgMYB308* 基因的表达量呈现出逐渐降低的趋势。而鉴于对石榴木质素合成基因 *PgCCR* 及 *Pg4CL* 的研究认为，木质素合成在籽粒的发育中可能存在先上升后下降的趋势。由此说明，在石榴籽粒的木质素合成中，可能多个因素参与调控。

综上所述，对石榴 *PgMYB308* 基因的时空表达研究发现，*PgMYB308* 基因可能是木质素合成的负调控因子，并且在石榴籽粒的木质素合成中具有重要作用。因此，*PgMYB308* 基因的功能值得深入解析，从而为利用分析生物学手段培育软籽石榴新品种奠定理论基础。

参考文献：

[1] 苑兆和. 石榴分子生物学研究进展[J]. 落叶果树, 2016, 48(5): 1-8.

[2] YUAN Z H. Advances in molecular biology of pomegranate [J]. *Deciduous Fruits*, 2016, 48(5): 1-8.

[2] ABDOLKARIM Z, ZABIHOLLAH Z, REZA F, *et al.* A me-

chanical method of determining seed-hardness in pomegranate [J]. *Journal of Crop Improvement*, 2013, **27**(4): 444-459.

[3] PATZLAFF A, MCLNNIS S, COURTENAY A, *et al.* Characterisation of a pine MYB that regulates lignification[J]. *The Plant Journal*, 2003, **36**(6): 743-754.

[4] GOICOEHEA M, LACOMBE E, LEGAY S, *et al.* EgMYB2, a new transcriptional activator from Eucalyptus xy-lem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosyn-thesis[J]. *The Plant Journal*, 2005, **43**(4): 553-567.

[5] LEGAY S, SIVADON P, BLERVACQ A S, *et al.* EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis and pop-ular[J]. *New Phytologist*, 2010, **188**(3): 774-786.

[6] OMER S, KUMAR S, KHAN B M. Over-expression of a subgroup 4 R2R3 type MYB transcription factor gene from Leucaena leucocephala reduces lignin content in transgenic to-bacco[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, **32**(1): 161-171.

[7] TIAN Q, WANG X, LI C, *et al.* Functional characterization of the poplar R2R3-MYB transcription factor PtoMYB216 in-volved in the regulation of lignin biosynthesis during wood for-mation[J]. *PloS one*, 2013, **8**(10): e76369.

[8] ZHU L, SHAN H, CHEN S, *et al.* The heterologous expres-sion of the chrysanthemum R2R3-MYB transcription factor CmMYB1 alters lignin composition and represses flavonoid synthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(6): e65680.

[9] TAMAGNONE L, MERIDA A, PARR A, *et al.* The Am-MYB308 and AmMYB330 transcription factors from Antirrh-i-num regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in trans-genic tobacco[J]. *The Plant Cell*, 1998, **10**(2): 135-154.

[10] 董丽丽, 户 倩, 李川微, 等. 石榴 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因的克隆和表达分析[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(11): 2 146-2 151.

DONG L L, HU Q, LI C W, *et al.* Cloning and expression a-nalysis of pomegranate 4-coumarate-CoA Ligase *Pg4CL*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia sinica*, 2016, **36**(11): 2 146-2 151.

[11] 董丽丽, 龚凌燕, 陈 磊, 等. 石榴肉桂酰辅酶 A 还原酶基-因的克隆与表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2016, **39**(5): 747-753.

DONG L L, GONG L Y, CHEN L, *et al.* Cloning and ex-pression analysis of *PgCCR* from pomegranate[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, **39**(5): 747-753.

[12] ZHOU J, LEE C, ZHONG R, *et al.* MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(1): 248-266.

[13] SHEN H, HE X, POOVAIAH C R, *et al.* Functional char-acterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of ligno-cellulosic feedstocks[J], *New Phytologist*, 2009, **193**(1): 121-136.

[14] LEGAY S, LACOMBE E, GOICOEHEA M, *et al.* Molec-ular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway[J]. *Plant Sci-ence*, 2007, **173**(5): 542-549.

(编辑:宋亚珍)