

文章编号:1001-1498(2016)01-0025-09

烟草和毛白杨次生维管发育相关 MYB 转录因子分析

郭伟, 赵树堂, 卢孟柱*

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: [目的]烟草具有典型的次生维管发育过程,为了阐明烟草可用于次生维管发育相关基因功能的研究, [方法]通过高通量测序技术获得了烟草维管组织发育的相关 MYB 转录因子, 比对毛白杨基因组数据库, 得到烟草和杨树的直系同源基因。利用烟草和毛白杨的基因表达谱, 分析了 MYB 基因表达量变化, 并进一步采用荧光定量 PCR 进行了不同组织的表达分析。 [结果]分析得到 48 对烟草和毛白杨的 MYB 直系同源基因, 可分为 23 个亚组。15 对 MYB 同源基因在烟草和毛白杨中的表达模式相似。 [结论]可以利用烟草所建立的快速基因鉴定系统分析 MYB 转录因子在维管发育过程中的调控作用。

关键词:烟草; 毛白杨; MYB; 次生生

中图分类号: S792.117; S572

文献标识码: A

Analysis of MYB Transcription Factor Involved in Development of Secondary Vascular System in Tobacco and *Populus tomentosa*

GUO Wei, ZHAO Shu-tang, LU Meng-zhu

(Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Tobacco plants have typical secondary vascular development process and can be used to study the function of genes related to secondary vascular development. 48 pairs of MYB orthologous genes obtained from tobacco and poplar were identified by searching in the entire poplar genome sequence with MYB transcription factor obtained from transcriptome of tobacco vascular tissues as probes, and were divided into 23 subgroups. The analysis of gene expression levels obtained using RNA-seq in tobacco and poplar suggested that 15 pairs of MYB orthologous genes shared similar expression patterns both in tobacco and poplar. The results of expression analysis using real time RT-PCR in different tissues of tobacco and poplar indicated that the MYB orthologous genes shared similar expression patterns both in tobacco and poplar. It is thus feasible to rapidly analyze the function of MYB transcription factors in vascular development process with tobacco.

Key words: tobacco; *Populus tomentosa*; MYB; secondary growth

木材是地球上重要的天然资源,是木本植物历年径向生长所产生的次生维管组织的总称^[1]。木材的形成是维管植物的一个重要的发育过程,涉及木

质部不同细胞类型的分化、木纤维的合成以及在细胞壁上的沉积,是一个复杂的基因调控过程^[1-2]。这些生物学过程的分子调控都是分子生物学研究的

收稿日期: 2013-05-14

基金项目: “十二·五”863 计划课题“林木优质、速生性状调控基因的分离及育种技术研究(2013AA102702)”。

作者简介: 郭伟(1983—),男,博士研究生. 主要研究方向: 林木遗传育种. E-mail: wwwguoweinet@163.com

* 通讯作者: 研究员,博士生导师. 从事分子生物学研究. E-mail: Lumz@caf.ac.cn

重要问题,也是木材形成调控的关键。研究木材形成的分子机制对于丰富次生维管发育的理论基础,了解木材形成的生物学过程,采用分子育种手段定向培育材性优良的树木新品种具有重要的应用价值。因为木本植物生长周期长,遗传分析困难,又缺少突变体,所以研究难度较大。许多关于维管组织发育的基因调控是由模式草本植物中获得的,导致林木木材形成的调控机制研究仍然属于初始阶段^[1]。因此,对于木本植物维管形成层的分子调控机制仍需要大量的研究工作^[3]。随着生物技术和基因组学的发展,毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)^[4,5]、海岸松(*Pinus spinaster* Ait.)^[6]、刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)^[7]、冈尼桉(*Eucalyptus gunnii* Hook. f.)^[8]和白云杉(*Piceaglauca* (Moench) Voss)^[9]等木本植物均采用基因组学技术进行了维管发育的相关研究。如从杨树维管再生系统中鉴定了大量的相关基因,迫切需要对它们进行功能鉴定^[4,10],其中,MYB 转录因子是一类重要的参与植物细胞次生壁形成的调控因子。

MYB 转录因子广泛分布于所有的真核生物中,并且组成了植物界中较大的转录因子家族。MYB 蛋白在 N 末端具有高度保守的 MYB DNA 结合结构域^[11]。MYB 结构域在动物、酵母、植物中高度保守,并且由 1~4 个不完全的重复组成(R0、R1、R2 和 R3),每个重复由大约 50~53 个氨基酸组成,编码 3 个 α 螺旋,第 2 和第 3 个螺旋形成一个螺旋-转角-螺旋(HTH)结构。HTH 结构通过插入到 DNA 双螺旋结构的大沟中与 DNA 结合^[12]。另外,MYB 转录因子包含 3 个被间隔开的色氨酸残基,它们在每一个重复的疏水性内核中形成一个簇,稳定 DNA 结合结构域的结构^[13]。MYB 蛋白的 C 末端是激活结构域,它的高特异性导致了 MYB 基因家族调控作用的不同^[12]。在植物细胞次生壁形成的分子调控网络中,MYB 转录因子基因起着重要的作用^[14-15]。虽然对少数 MYB 转录因子基因的功能进行了鉴定,但是大部分 MYB 基因家族成员功能未知,迫切需要一种快速的基因鉴定手段进行进一步的分析。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)虽然具有较小的体积、较快的生长速度和容易进行遗传转化等优点,但拟南芥却不具备典型的次生长特征,同时缺少某些木材形成的基因和相关的生物学过程^[16]。烟草(*Nicotianatabacum* L. cv. SR1)是一种具有典型的次生维管发育特征的 1 年生草本植

物^[17],具有遗传转化效率较高、生长速度较快、生命周期较短等优点^[18],并且烟草的病毒诱导基因沉默(VIGS)系统为研究者进行高通量的基因功能研究提供了平台^[19,20],为大规模筛选、鉴定相关基因提供了有效手段。本文分析了烟草和毛白杨维管组织相关 MYB 转录因子,得到了 48 对直系同源基因,通过基因表达谱测序(RNA-seq)和相对荧光定量 PCR 对烟草和毛白杨 MYB 同源基因的表达异同进行分析,旨在为进一步通过烟草 VIGS 系统进行杨树次生维管发育相关基因的功能研究,揭示木材形成过程中 MYB 转录因子的调控机制。

1 材料与方法

1.1 植物材料

烟草和毛白杨为中国林科院林业所生物技术室保存并繁殖。烟草实生苗和 1 年生毛白杨扦插苗于 3 月份在直径为 15 cm 的塑料花盆中种植,盆中含营养土和蛭石(1:1 混合),于温室中进行培养,每 5 d 浇自来水 1 次。

分别选取生根期(4 片展开叶)、抽薹期(6 片展开叶)、团棵期(8 片展开叶)、旺长期(14 片展开叶)和现蕾期(20 片展开叶)烟草的第 1~4、1~6、1~8、1~8、1~8 节间进行取材,作为烟草转录组高通量测序的实验材料。

对旺长期的烟草和扦插 4 个月的毛白杨的顶端分生组织、第 1 节间、第 2 节间、第 3 节间、第 4 节间、第 5 节间、第 6 节间、从顶端起第 5 片展开叶、根进行取材,分别标记为 TS、TIN1、TIN2、TIN3、TIN4、TIN5、TIN6、TL、TR 和 PS、PIN1、PIN2、PIN3、PIN4、PIN5、PIN6、PL、PR,作为基因表达谱高通量测序和相对荧光定量 PCR 的实验材料。

下午 4:00—5:00 取材。每个样本均取自 5 个植株的混合样本,液氮速冻后放置在 -80℃ 的超低温冰箱里储存。

1.2 实验方法

1.2.1 烟草转录组的高通量测序 选取烟草在生根期、抽薹期、团棵期、旺长期和现蕾期植株的节间,用 Qiagen 的 RNA 提取试剂盒(RNeasy Plant Mini kit)进行提取 RNA,用 Qiagen 的 RNase-free DNase I 进行去除 DNA,通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 样本的浓度和纯度。华大基因公司负责 cDNA 文库构建、Solexa 测序(IlluminaHiSeq™ 2000)和数据处理,使用 SOAPdenovo 拼接软件对 short reads 进

行数据组装。

1.2.2 烟草与毛白杨之间的 *MYB* 直系同源基因的鉴定 用基因注释与 *MYB* 保守基序进行本地 BLASTP 搜索相结合的方法,在烟草维管发育的转录组数据库中,对 *MYB* 基因进行搜索,然后通过 BLASTX 程序 ($E\text{-value} \leq 1e - 10$) 比对到烟草基因组数据库 (<http://solgenomics.net/>, 版本 v0.4.4) 得到全长蛋白序列,再通过 BLASTP 程序 ($E\text{-value} \leq 1e - 10$) 比对到毛白杨基因组数据库 (<http://www.phytozome.net/>, 版本 v3.0)。

1.2.3 *MYB* 蛋白序列比对及系统树构建 运用 Clustal X 1.83 软件对烟草和毛白杨的 *MYB* 基因的蛋白全长序列进行多重序列比对,用 MEGA 5.10 软件构建系统树,采用遗传距离建树法的相邻连接法 NJ 建树,并且进行 1 000 次重复比对校正,最终生成系统树。

1.2.4 基因表达谱 (RNA-seq) 高通量测序 选取烟草样本 (TIN1、TIN2、TIN3) 和毛白杨样本 (PIN1、PIN2、PIN3),分别提取 RNA、检测 RNA、构建 cDNA 文库、Solexa 测序 (方法同 1.2.1)。通过 ERANGE

软件 (<http://woldlab.caltech.edu/gitweb/>, 版本 4.0) 进行基因表达水平 (RPKM) 的归一化计算^[21]。

1.2.5 相对荧光定量 PCR 分析 *MYB* 基因表达量 提取烟草和毛白杨不同组织样本的 RNA,进行 DNA 的去除 (同上),抽取 800 ng RNA 作模板,使用 Invitrogen 的反转录试剂盒 (Superscript III First-Strand Synthesis System) 合成单链 cDNA,稀释 20 倍作为相对荧光定量 PCR 的模板。

使用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪进行相对荧光定量 PCR 反应,反应体系为:cDNA 2 μL , 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq II (TliRnaseH Plus) 10 μL , 50 \times ROX Reference Dye II 0.4 μL , 上下游引物 (表 1) 各 0.8 μL , 灭菌超纯水 6 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,40 个循环。每个实验设 4 次重复,选取 *NtEF-1 α* (Accession number: AF120093) and *PtUBQ* (Accession number: BU879229) 分别作为烟草和毛白杨的内参基因。利用 Sequence Detection Software 软件 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法)^[22] 和 SigmaPlot 12.0 软件进行数据分析。

表 1 荧光定量 PCR 的引物序列

基因名称	引物序列 (正向/反向)
<i>NtEF-1α</i>	TGAGATGCACCACGAAGCTC / CCAACATGTCTACCAGGAAGTG
<i>NtMYB15</i>	GGAATTGCAGCAAGGTTACCAG / TTGACGTTCCATGGTTTGTG
<i>NtMYB42</i>	CAAGATTACCGGAAGGACAGA / TGTAACAGGATCAATCCCCATC
<i>NtMYB50</i>	AGCTGGAATTCGGATGACAAGA / CCAACGCATGGATACTGAAACA
<i>NtMYB52-1</i>	ATTGGCATGTCTTAATGGCAAG / TCCGTCTTCGAAAACCATAGGA
<i>NtMYB52-2</i>	GCTGAAAATTGCAAGGCAGAT / TCCTCTTCTGTGAATGGGCTTC
<i>NtMYB61-1</i>	AAGCTTCTGAAGGCTCCAGTGA / TCGCTGAAGATGGTTTTGGTTT
<i>NtMYB103-5-1</i>	ATTTTGAACAAAGCCCCAAGT / TGTGTCTTGAACAACGAGCTG
<i>NtMYB109-1</i>	ATTGCAAAGTTGCTCCCTGGTA / ACCTTTCTAAGCCCAGCAAACC
<i>PtUBQ</i>	GTTGATTTTTGCTGGGAAGC / GATCTTGGCCTTCACGTTGT
<i>PtMYB15</i>	GCACTGAGCCACAACCTCAA / TAGTGATCCCCAGCTCTTG
<i>PtMYB42</i>	GCAGCTAGATTGCCTGGAAG / TTGTGCAAGGGTTTCATGTGT
<i>PtMYB50</i>	AAGTGGGGGTGAAAGAGGAG / TACGATCGGCAACCCTTTAG
<i>PtMYB52-1</i>	TTCACATGCAGGAAATCAA / CGCAAATTCGAAGAAGGTGA
<i>PtMYB52-2</i>	ACAGCTTGGTGTGTGTCAA / ATTTCTTTTGCCCAATGCAG
<i>PtMYB61-1</i>	GGTTCAGAACTGGGAAGCAA / AGAAAGCGTGTCTCTCGTAG
<i>PtMYB103-5-1</i>	TGACACGAGTACCTCGCTTG / ATGTTCAAGCTTGCCGAATC
<i>PtMYB109-1</i>	AGCCCCAGAAGTGAGAGAT / CTGGGATTTCCATGTGGTTC

2 结果与分析

2.1 烟草和毛白杨 *MYB* 基因家族同源基因的鉴定

从烟草维管组织转录组数据库中鉴定到了 48 个 *MYB* 转录因子家族成员基因,其中,44 个是 *R2R3-*

MYB 基因,3 个是 *3R-MYB* 基因,1 个是 *4R-MYB* 基因;然后将烟草的 *MYB* 基因的蛋白序列作为探针在杨树基因组数据库中进行 BLASTP 搜索,选择比对结果中分值最高并且 $E\text{-value} < e-10$ 的序列作为烟草 *MYB* 基因在毛白杨中的直系同源基因 (表 2)。

表2 烟草和毛白杨木材形成相关一对一的直系同源 MYB 基因

毛白杨基因名称	毛白杨基因编号	烟草基因名称	烟草基因编号	分类	基因描述
<i>PtMYB3R1</i>	Potri. 018G038000.1	<i>NtMYB3R1</i>	NbS00013812g0010.1	3R	<i>ATMYB3R-1, MYB3R-1</i>
<i>PtMYB3R4</i>	Potri. 006G241700.1	<i>NtMYB3R4</i>	NbS00038812g0010.1	3R	<i>AtMYB3R4, MYB3R-4</i>
<i>PtMYB3R5</i>	Potri. 006G085600.1	<i>NtMYB3R5</i>	NbS00007819g0018.1	3R	<i>ATMYB3R5, MYB3R-5</i>
<i>PtMYB4R1</i>	Potri. 015G041500.3	<i>NtMYB4R1</i>	NbS00044393g0007.1	4R	<i>AtMYB4R1, MYB4R1</i>
<i>PtMYBCDC5</i>	Potri. 019G018400.1	<i>NtMYBCDC5</i>	NbS00000867g0143.1	R2R3	<i>ATMYBCDC5, CDC5</i>
<i>PtMYB3</i>	Potri. 002G173900.1	<i>NtMYB3</i>	NbS00019249g0010.1	R2R3	<i>ATMYB3, MYB3</i>
<i>PtMYB4-1</i>	Potri. 004G174400.1	<i>NtMYB4-1</i>	NbS00059969g0007.1	R2R3	<i>ATMYB4, MYB4</i>
<i>PtMYB4-2</i>	Potri. 009G134000.2	<i>NtMYB4-2</i>	NbS00036063g0001.1	R2R3	<i>ATMYB4, MYB4</i>
<i>PtMYB7</i>	Potri. 014G100800.1	<i>NtMYB7</i>	NbS00020975g0001.1	R2R3	<i>ATY49, MYB7</i>
<i>PtMYB9</i>	Potri. 019G118800.1	<i>NtMYB9</i>	NbS00008719g0006.1	R2R3	<i>AtMYB9, MYB9</i>
<i>PtMYB14</i>	Potri. 002G038500.1	<i>NtMYB14</i>	NbS00027904g0003.1	R2R3	<i>ATMYB14, MYB14</i>
<i>PtMYB15</i>	Potri. 005G224100.1	<i>NtMYB15</i>	NbS00034285g0012.1	R2R3	<i>ATMYB15, MYB15</i>
<i>PtMYB17</i>	Potri. 002G157600.1	<i>NtMYB17</i>	NbS00022028g0005.1	R2R3	<i>AtMYB17, MYB17</i>
<i>PtMYB21</i>	Potri. 017G071500.1	<i>NtMYB21</i>	NbS00055891g0003.1	R2R3	<i>ATMYB3, MYB21</i>
<i>PtMYB36</i>	Potri. 004G215100.1	<i>NtMYB36</i>	NbS00045529g0003.1	R2R3	<i>AtMYB36, MYB36</i>
<i>PtMYB40</i>	Potri. 001G336700.1	<i>NtMYB40</i>	NbS00014139g0009.1	R2R3	<i>AtMYB40, MYB40</i>
<i>PtMYB42</i>	Potri. 001G118800.1	<i>NtMYB42</i>	NbS00051737g0004.1	R2R3	<i>AtMYB42, MYB42</i>
<i>PtMYB43</i>	Potri. 017G130300.1	<i>NtMYB43</i>	NbS00005264g0006.1	R2R3	<i>AtMYB43, MYB43</i>
<i>PtMYB48</i>	Potri. 009G027300.1	<i>NtMYB48</i>	NbS00050602g0005.1	R2R3	<i>ATMYB48, MYB48</i>
<i>PtMYB50</i>	Potri. 015G082700.1	<i>NtMYB50</i>	NbS00010663g0014.1	R2R3	<i>AtMYB50, MYB50</i>
<i>PtMYB52-1</i>	Potri. 005G186400.1	<i>NtMYB52-1</i>	NbS00012046g0005.1	R2R3	<i>ATMYB52, MYB52</i>
<i>PtMYB52-2</i>	Potri. 012G039400.1	<i>NtMYB52-2</i>	NbS00003846g0006.1	R2R3	<i>ATMYB52, MYB52</i>
<i>PtMYB52-3</i>	Potri. 015G033600.1	<i>NtMYB52-3</i>	NbS00057968g0006.1	R2R3	<i>ATMYB52, MYB52</i>
<i>PtMYB56</i>	Potri. 013G067000.1	<i>NtMYB56</i>	NbS00016266g0004.1	R2R3	<i>AtMYB56, MYB56</i>
<i>PtMYB61-1</i>	Potri. 005G001600.1	<i>NtMYB61-1</i>	NbS00038614g0005.1	R2R3	<i>ATMYB61, MYB61</i>
<i>PtMYB61-2</i>	Potri. 013G001000.1	<i>NtMYB61-2</i>	NbS00008992g0004.1	R2R3	<i>ATMYB61, MYB61</i>
<i>PtMYB62</i>	Potri. 008G122100.1	<i>NtMYB62</i>	NbS00002598g0015.1	R2R3	<i>AtMYB62, MYB62</i>
<i>PtMYB65</i>	Potri. 001G224500.3	<i>NtMYB65</i>	NbS00024794g0017.1	R2R3	<i>ATMYB65, MYB65</i>
<i>PtMYB67</i>	Potri. 001G075400.1	<i>NtMYB67</i>	NbS00004718g0002.1	R2R3	<i>ATMYB67, ATY53</i>
<i>PtMYB68</i>	Potri. 002G113700.2	<i>NtMYB68</i>	NbS00008336g0002.1	R2R3	<i>ATMYB68, MYB68</i>
<i>PtMYB73-1</i>	Potri. 002G122600.1	<i>NtMYB73-1</i>	NbS00056660g0001.1	R2R3	<i>ATMYB73, MYB73</i>
<i>PtMYB73-2</i>	Potri. 005G142600.1	<i>NtMYB73-2</i>	NbS00038953g0003.1	R2R3	<i>ATMYB73, MYB73</i>
<i>PtMYB73-3</i>	Potri. 014G035100.1	<i>NtMYB73-3</i>	NbS00037687g0002.1	R2R3	<i>ATMYB73, MYB73</i>
<i>PtMYB82</i>	Potri. 018G127700.1	<i>NtMYB82</i>	NbS00017553g0008.1	R2R3	<i>AtMYB82, MYB82</i>
<i>PtMYB83</i>	Potri. 001G267300.1	<i>NtMYB83</i>	NbS00023412g0010.1	R2R3	<i>AtMYB83, MYB83</i>
<i>PtMYB88</i>	Potri. 010G093000.1	<i>NtMYB88</i>	NbS00004262g0006.1	R2R3	<i>AtMYB88, MYB88</i>
<i>PtMYB91-1</i>	Potri. 006G085900.1	<i>NtMYB91-1</i>	NbS00022303g0002.1	R2R3	<i>ATMYB91, ATPHAN</i>
<i>PtMYB91-2</i>	Potri. 017G112300.1	<i>NtMYB91-2</i>	NbS00000683g0009.1	R2R3	<i>ATMYB91, ATPHAN</i>
<i>PtMYB94</i>	Potri. 017G082500.1	<i>NtMYB94</i>	NbS00017916g0019.1	R2R3	<i>ATMYB94, MYB94</i>
<i>PtMYB96</i>	Potri. 004G126700.1	<i>NtMYB96</i>	NbS00055631g0003.1	R2R3	<i>ATMYB96, MYB96</i>
<i>PtMYB102</i>	Potri. 004G033100.1	<i>NtMYB102</i>	NbS00015624g0009.1	R2R3	<i>ATMYB102, MYB102</i>
<i>PtMYB103</i>	Potri. 001G099800.1	<i>NtMYB103</i>	NbS00000532g0010.1	R2R3	<i>AtMYB103, MYB103</i>
<i>PtMYB106-1</i>	Potri. 010G165700.1	<i>NtMYB106-1</i>	NbS00000115g0004.1	R2R3	<i>AtMYB106, MYB106</i>
<i>PtMYB106-2</i>	Potri. 017G086300.2	<i>NtMYB106-2</i>	NbS00002367g0011.1	R2R3	<i>AtMYB106, MYB106</i>
<i>PtMYB108</i>	Potri. 008G101400.1	<i>NtMYB108</i>	NbS00027211g0002.1	R2R3	<i>AtMYB108, BOS1</i>
<i>PtMYB109-1</i>	Potri. 008G062700.1	<i>NtMYB109-1</i>	NbS00002711g0003.1	R2R3	<i>AtMYB109, MYB109</i>
<i>PtMYB109-2</i>	Potri. 010G195000.1	<i>NtMYB109-2</i>	NbS00029060g0017.1	R2R3	<i>AtMYB109, MYB109</i>
<i>PtMYB111</i>	Potri. 002G198100.1	<i>NtMYB111</i>	NbS00038665g0001.1	R2R3	<i>ATMYB111, MYB111</i>

注:毛白杨基因编号来自 phytozome 网站 <http://www.phytozome.net/>, 版本 v3.0; 烟草基因编号来自 sol genomics network 网站 <http://sol-genomics.net/>, 版本 v0.4.4。

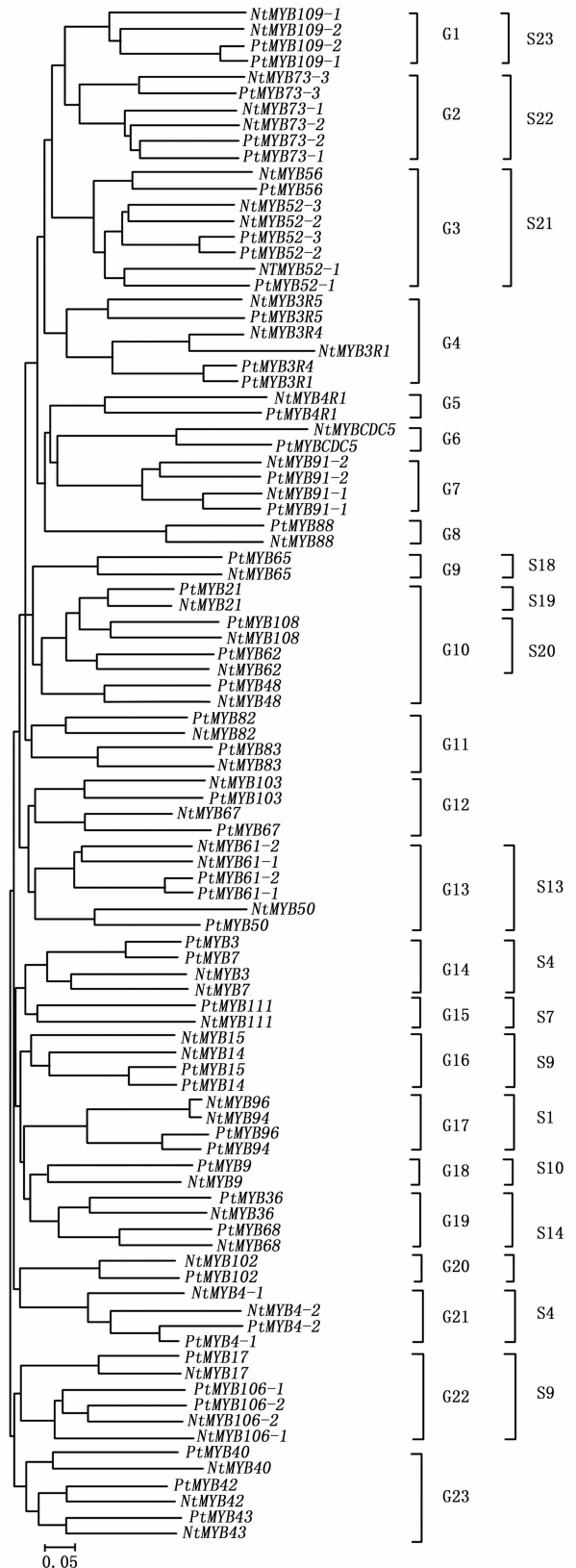
2.2 烟草和毛白杨的 MYB 同源基因的系统树分析

运用 Clustal X 1.83 软件对烟草和毛白杨的 MYB 基因的蛋白全长序列进行多重序列比对,用 MEGA 5.10 软件采用 Neighbor-Joining (NJ) 方法进行系统树构建(图 1)。96 个烟草和毛白杨的 MYB 基因划分为 23 个亚组(G1~23)。烟草和毛白杨的直系同源基因在系统树中属于同一个亚组。G4 包含 3 个烟草 3R-MYB 基因和 3 个毛白杨 3R-MYB 基因,G5 包含 1 个烟草 4R-MYB 基因和 1 个毛白杨 4R-MYB 基因,其余的亚组全部是 R2R3-MYB 基因。拟南芥的 R2R3-MYB 基因分为 25 个亚组(S1-S25)^[12,23],其中,S23、S22、S21、S18、S13、S4、S7、S9、S1、S10、S4 和 S9 亚组分别对应烟草和毛白杨的 G1、G2、G3、G9、G13、G14、G15、G16、G17、G18、G21 和 G22 亚组;而 G16 和 G22 对应的拟南芥同源基因在 S9 亚组,G14 和 G21 对应的拟南芥同源基因在 S4 亚组,说明烟草和毛白杨与拟南芥直系同源基因在序列上发生了分化,导致在系统发育树中分别属于不同的亚组。

2.3 烟草和毛白杨的 MYB 同源基因在维管发育过程中的表达分析

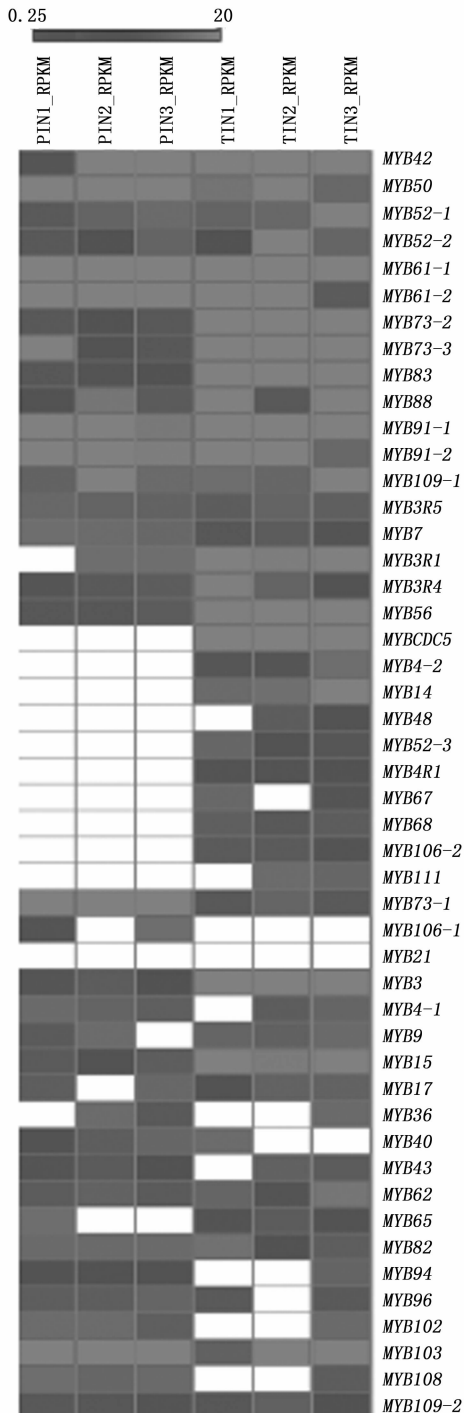
早期研究发现,旺长期的烟草和扦插 4 个月的毛白杨在第 1~3 节间完成了从初生生长到次生生长的转变,分别对烟草和毛白杨的第 1~3 节间的样本进行了高通量测序,得到从初生生长到次生生长过程中相关基因的表达谱(图 2)。在 48 对烟草和毛白杨的 MYB 同源基因中,15 对基因(MYB3R5、MYB7、MYB42、MYB50、MYB52-1、MYB52-2、MYB61-1、MYB61-2、MYB73-2、MYB73-3、MYB83、MYB88、MYB91-1、MYB91-2 和 MYB109-1)在烟草和毛白杨的 3 个节间的表达模式相似。

MYB3R1、MYB3R4、MYB56、MYBCDC5、MYB4-2、MYB14、MYB21、MYB48、MYB52-3、MYB4R1、MYB67、MYB68、MYB106-2、MYB111、MYB73-1、MYB106-1 这 16 对基因在烟草和毛白杨中的表达差异较大,其中,MYB4R1、MYBCDC5、MYB4-2、MYB14、MYB21、MYB48、MYB52-3、MYB67、MYB68、MYB106-2 和 MYB111 11 对 MYB 同源基因中的毛白杨基因在 3 个节间均没有发生表达,而相应的烟草的同源基因却发生了表达。MYB106-1 在毛白杨中表达而在烟草中没有表达,说明上述基因在烟草和毛白杨的进化过程中发生了组织特异表达的改变。MYB21 同源基因在烟草和毛白杨茎的前 3 个节间没有表达。



通过 Clustal X 1.83 软件对烟草和毛白杨 MYB 基因的全长蛋白序列进行比对,用 MEGA 5.10 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法采用 1 000 次重复比对进行系统树的构建,并进行了亚组(G)划分。图的最右侧是对应拟南芥 MYB 基因的亚组(S)。比例尺表示 0.05 个氨基酸的进化距离。

图 1 烟草和毛白杨的 MYB 基因的系统树分析



从左到右分别是 PIN1、PIN2、PIN3、TIN1、TIN2、TIN3 的 RPKM 值。热图的制作是通过 Matrix2png 网站 (英属哥伦比亚大学, <http://chibi.ubc.ca/matrix2png>)。RPKM 的值由不同的颜色表示:最小值 0.4,最大值 20。

图2 烟草和毛白杨 MYB 直系同源基因在前3个节间的表达分析

2.4 烟草和毛白杨 MYB 同源基因在不同组织中的表达分析

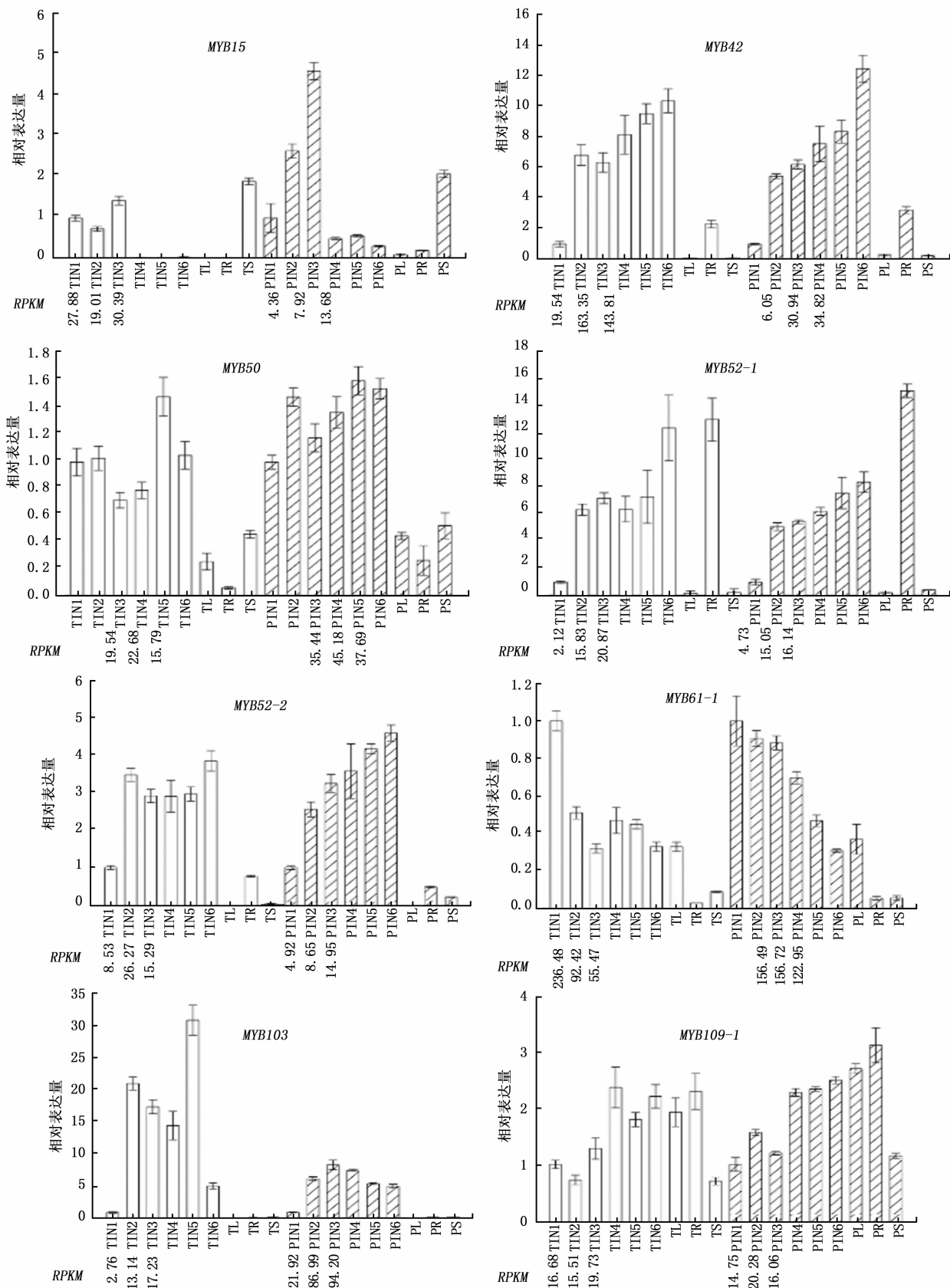
选择在烟草和毛白杨中都发生表达并且在毛白

杨中没有研究的 8 对 MYB 基因,在烟草和毛白杨的第 1~6 节间以及顶端分生组织、叶片、根中通过荧光定量 PCR 进行表达分析(图 3)。对比荧光定量 PCR 结果与基于测序的数字表达谱,发现烟草和毛白杨在不同组织中具有相同的变化趋势。这 8 对 MYB 同源基因在烟草和毛白杨的不同组织中的表达模式也基本一致(图 3)。

MYB42、MYB52-1、MYB52-2 的同源基因在烟草和毛白杨的顶端分生组织(SAM)和叶片中的表达量最低,在远离顶端的节间中的表达量比靠近顶端的节间高,说明基因表达水平随茎的木质化程度的提高而相应提高。MYB52-1 和 MYB109-1 在根中的表达量最高,MYB52-2 和 MYB42 在第 6 节间的表达量最高,说明 MYB52-1 和 MYB52-2 的相似性较高(图 1),但是表达模式却不同,说明这 2 个基因在进化过程中组织表达及作用发生了分化。MYB61-1 的表达模式与 MYB42、MYB52-1、MYB52-2 和 MYB109-1 相反,在远离顶端的节间比靠近顶端的节间表达量低,而叶片中的表达量比根高,说明 MYB61-1 的表达量变化与茎的木质化程度成反比,可能更多的参与了初生维管组织的形成。MYB103 在 SAM、叶片和根中的表达量很低,在茎不同节间中的表达量先升高后降低,在第 1 和第 6 节间的表达量最低,却在维管组织分化过程(第 2~5 节间)中的表达量较高,说明它们更多的参与到初生到次生生长的转换。MYB15 在 SAM 和前 3 个节间中的表达量较高,而在后 3 个节间、叶片和根中的表达量却很低,说明 MYB15 主要参与初生维管组织的形成和初生到次生生长的转换。MYB50 在第 1~6 节间的表达量较高,却在根中的表达量最低,说明 MYB50 特异参与了茎的初生生长、初生到次生生长的转换以及次生生长的整个维管组织发育过程。

3 结论与讨论

随着生命科学和生物技术的迅猛发展,一些木本植物的基因组测序已经完成,测序结果大多是存储在公用数据库的服务器中,研究人员经过生物信息学的初步分析,已经获得了大量有关木材形成过程的相关基因。随着高通量测序成本的降低、质量的提高,过去几年中在世界范围内产生了大量的测序结果。虽然公用服务器已经对普通研究人员开放,并且能够提供高效、新颖的分析方法,但是由于生物信息学相关知识并没有很好的普及,使大量测序



柱形图表示从荧光定量 RT-PCR 中得到的转录丰度(相对表达量);TIN1~6 为烟草的 1~6 节间;TL 为烟草的叶片;TR 为烟草的根;TS 为烟草的 SAM;PIN1~6 为毛白杨的 1~6 节间;PL 为毛白杨的叶片;PR 为毛白杨的根;PS 毛白杨的 SAM;RPKM 为基因在相应组织中的 RNA-seq 的表达值。

图 3 烟草和毛白杨的 MYB 直系同源基因在不同组织的表达分析

结果没有得到合理的使用;而在得到的分析结果中,注释信息(基因结构、推定的功能等)大多是通过与拟南芥基因组进行比对推测,而拟南芥本身不存在典型的次生长特征,缺少某些木材形成基因和相关的生物学过程^[16],显然这些基因的功能需要进一步鉴定。

本文将烟草维管组织转录组数据库中的 *MYB* 转录因子基因与毛白杨基因组数据库进行比对,得到 48 对 *MYB* 同源基因(表 2)。得到的这种一一对应关系,与拟南芥与毛白杨同源基因往往是一对二的关系不同,说明毛白杨和烟草更具有相同的进化背景,如可能是在染色体加倍后毛白杨和烟草才发生分化,二者更具有相同的生物学特征。通过对烟草和毛白杨的第 1~3 节间的样本进行基因表达谱高通量测序,得到每个同源基因在不同节间的表达量,找到了 15 对表达模式相似的同源基因。选取 8 对烟草和毛白杨中都发生表达并且在毛白杨中没有研究的 *MYB* 同源基因,在烟草和毛白杨的第 1~6 节间和根、叶和顶端分生组织中通过相对荧光定量 PCR 进行表达分析,结果不仅证明与表达谱结果一致,并且这 8 对 *MYB* 同源基因在烟草和毛白杨中具有相似的表达模式,说明通过研究烟草的 *MYB* 转录因子来揭示相应的毛白杨的维管发育相关基因的作用具有可行性。

MYB42、*MYB52-1* 和 *MYB52-2* 的同源基因在烟草和毛白杨中的表达量与茎的木质化程度成正比,在远离顶端的节间中的表达量比靠近顶端的节间高,与其直系同源基因 *AtMYB42* 和 *AtMYB52* 在拟南芥中的表达模式相似,其在茎的基部的表达量比中部和上部高^[15]。*MYB52-1* 在烟草和毛白杨的根中具有最高的表达量,而 *AtMYB52* 在拟南芥的根中表达量却很低,说明虽然 *MYB52-1*、*MYB52-2* 与 *AtMYB52* 的相似性很高,但是表达模式有区别,*MYB52-1* 可能在植物生长发育中参与了不同于 *MYB52-2* 的作用。*AtMYB42* 和 *AtMYB52* 在次生细胞壁的合成中即在纤维素、木聚糖和木质素合成中行使功能^[15],可以推测 *MYB42*、*MYB52-1* 和 *MYB52-2* 在烟草和毛白杨中可能会在不同器官的细胞壁合成中发挥作用,需要进一步加以阐明。*MYB61* 的同源基因在烟草和毛白杨中的表达量与茎的木质化程度成反比,即在远离顶端的节间中的表达量比靠近顶端的节间低。有研究表明,*AtMYB61* 的非正常表达是 *det3* 拟南芥突变体表现出

异位木质化的充分和必要条件^[24],所以,可以推测 *MYB61* 可能在维管组织发育过程中行使功能。*MYB103* 同源基因在烟草和毛白杨维管组织分化的过程(第 2~5 节间)中具有较高的表达量,而 *AtMYB103* 在拟南芥茎的基部的表达量比中部和上部高^[15],说明烟草和毛白杨中的 *MYB103* 同源基因与拟南芥 *AtMYB103* 都在植株的茎的快速伸长区的表达水平较高。*AtMYB103* 是 *SND1*、*NST1*、*VND6*、*VND7*、*NST1* 和 *NST2* 的下游靶基因,在次生细胞壁的合成中行使功能^[15],因此,可以推测烟草和毛白杨中的 *MYB103* 同源基因具有相似的功能。*MYB15* 同源基因在烟草和毛白杨的 *SAM* 和第 1~3 节间的表达量较高,而 *AtMYB15* 能够在 *ABA* 调节的响应环境信号途径和耐寒性中起作用^[25],说明 *MYB15* 可能具有多种功能,即能够在维管组织分化、信号转导和抗性中起作用,需要进一步阐明。目前没有关于 *MYB50* 和 *MYB109* 基因功能的报道,*MYB50* 同源基因在烟草和毛白杨的第 1~6 节间中具有较高的表达水平,而 *MYB109* 的同源基因在烟草和毛白杨叶片和根中的表达量都比较高,在茎中同样表现出与木质化程度成正比的模式,说明 *MYB50* 和 *MYB109* 能够在维管发育过程中起作用,有待进一步深入研究。总之,根据表达模式可以推测这 8 对 *MYB* 基因都能够在维管发育中起重要作用,有必要利用烟草的研究系统对其进行深入的功能鉴定。

病毒诱导的基因沉默 (*VIGS*) 是一种能够快速通过的 *RNAi* 来介导基因沉默的技术,不需要对植物进行遗传转化,能够对植物基因功能进行快速分析^[19-20]。烟草的 *VIGS* 系统是一个快速、可靠的基因功能分析系统,已在研究植物细胞壁形成相关基因的功能中得到成功应用^[20]。纤维素、木聚糖和木质素合成的相关基因,通过 *VIGS* 介导的烟草植株与在其它不同物种中不同基因沉默系统的表型相似^[20]。因此,上述获得的烟草和毛白杨 *MYB* 同源基因可以通过烟草的 *VIGS* 系统,研究它们在次生维管发育中的作用。

参考文献:

- [1] Plomion C, Leprovost G, Stoke A. Wood Formation in Trees[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(4): 1513 - 1523.
- [2] Groover A T. What genes make a tree a tree? [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(5): 210 - 214.
- [3] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. *Annual review of plant biology*, 2003, 54: 519 - 546.

- [4] Wang M, Qi X, Zhao S. Dynamic changes in transcripts during regeneration of the secondary vascular system in *Populus tomentosa* Carr. revealed by cDNA microarrays[J]. *BMC genomics*, 2009, 10:215.
- [5] Schrader J, Nilsson J, Mellerowicz E. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity[J]. *The Plant cell*, 2004, 16(9):2278–2292.
- [6] Nairn CJ, Lennon, D M, Wood-Jones A. Carbohydrate-related genes and cell wall biosynthesis in vascular tissues of loblolly pine (*Pinus taeda*) [J]. *Tree physiology*, 2008, 28(7):1099–1110.
- [7] Yang J, Kamdem D P, Keathley D E. Seasonal changes in gene expression at the sapwood-heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis[J]. *Tree physiology*, 2004, 24(4):461–474.
- [8] Paux E, Carocha V, Marques C. Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation[J]. *The New phytologist*, 2005, 167(1):89–100.
- [9] Pavy N, Boyle B, Nelson C. Identification of conserved core xylem gene sets: conifer cDNA microarray development, transcript profiling and computational analyses[J]. *The New phytologist*, 2008, 180(4):766–786.
- [10] Du J, Xie H L, Zhang D Q. Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach[J]. *Proteomics*, 2006, 6(3):881–895.
- [11] Lipsick J S. One billion years of Myb[J]. *Oncogene*, 1996, 13(2):223–235.
- [12] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(5):447–456.
- [13] Ogata K, Morikawa S, Nakamura H. Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb[J]. *Nature structural biology*, 1995, 2(4):309–320.
- [14] Ma Q H, Wang C, Zhu H H. TaMYB4 cloned from wheat regulates lignin biosynthesis through negatively controlling the transcripts of both cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase genes[J]. *Biochimie*, 2011, 93(7):1179–1186.
- [15] Zhong R, Lee C, Zhou J. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *The Plant cell*, 2008, 20(10):2763–2782.
- [16] Nieminen K M, Kauppinen L, Helariutta Y. A weed for wood? *Arabidopsis* as a genetic model for xylem development[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(2):653–659.
- [17] Cook C M, Daudi A, Millar D J. Transcriptional changes related to secondary wall formation in xylem of transgenic lines of tobacco altered for lignin or xylan content which show improved saccharification [J]. *Phytochemistry*, 2012, 74:79–89.
- [18] Al-Ahmad H, Galili S, Gressel J. Tandem constructs to mitigate transgene persistence: tobacco as a model[J]. *Molecular Ecology*, 2004, 13(3):697–710.
- [19] Huang C J, Zhang T, Li F F. Development and application of an efficient virus-induced gene silencing system in *Nicotiana tabacum* using geminivirus alphasatellite[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2011, 12(2):83–92.
- [20] Zhu X, Pattathil S, Mazumder K. Virus-induced gene silencing offers a functional genomics platform for studying plant cell wall formation [J]. *Molecular plant*, 2010, 3(5):818–833.
- [21] Mortazavi A, Williams B A, McCue K. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature methods*, 2008, 5(7):621–628.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402–408.
- [23] Dubos C, Stracke R, Grotewold E. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10):573–581.
- [24] Newman L J, Perazza D E, Juda L. Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the *det3* mutant phenotype [J]. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 2004, 37(2):239–250.
- [25] Reyes J L, Chua N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination [J]. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 2007, 49(4):592–606.

(责任编辑:詹春梅)