



研究论文

Research Article

砂梨 *MYB* 基因启动子克隆、生物信息学预测与等位变异分析

王月志¹, 戴美松¹, 张绍铃², 施泽彬^{1,2}

1 浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州, 310021

2 南京农业大学梨工程技术研究中心, 南京, 210095

✉ 通讯作者: shizebinszb@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 110 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0110

收稿日期: 2011 年 08 月 16 日

接受日期: 2011 年 09 月 28 日

发表日期: 2011 年 10 月 20 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

王月志等, 2011, 砂梨 *MYB* 基因启动子克隆、生物信息学预测与等位变异分析, 分子植物育种(online) Vol.9 No.110 pp.1799-1806 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0110)

引用格式(英文):

Wang et al., 2011, Cloning, Bioinformatics Prediction and Allelic Analysis of the Promoters of Sand Pear Putative *MYB* Gene, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.110 pp.1799-1806 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0110)

摘要 应用同源克隆方法从砂梨(*Pyrus pyrifolia*)中获得 4 个长度分别为 821 bp、874 bp、972 bp 和 914 bp 木质素合成调控因子 *MYB* 基因的启动子序列, GenBank 登录号分别为 JF900710、JF900709、JF900707 和 JF900708。生物信息学预测发现, 这些序列具有典型的启动子序列特征, 分别包含 71 个、77 个、86 个和 64 个调控元件。所预测的调控元件按功能主要分为组织特异性、生物胁迫应答、非生物胁迫应答、胁迫激素应答、生长激素应答和基础调控元件。部分类型调控元件在不同启动子间存在明显的数量差异。各启动子序列在褐、绿果皮砂梨间的等位变异分析发现, *PpMYBx2* 启动子区的一个 SNP(A/G) 位点与砂梨果皮褐、绿色性状间存在相关性。本研究为进一步开展 *MYB* 基因的表达分析、遗传定位, 以及探明砂梨木质素相关品质性状形成的分子机制奠定了基础。

关键词 砂梨; 木质素; *MYB* 启动子; 等位变异

Cloning, Bioinformatics Prediction and Allelic Analysis of the Promoters of Sand Pear Putative *MYB* Gene

Wang Yuezhi¹, Dai Meisong¹, Zhang Shaoling², Shi Zebin^{1,2}

1 Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Zhejiang, 310021, P.R., China

2 Engineering and Technology Research, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, P.R., China

✉ Corresponding author, shizebinszb@126.com; ✉ Authors

Abstract Four putative promoter sequences of lignin biosynthetic regulatory factor gene *MYB* were cloned from the sand pear (*Pyrus pyrifolia*) with homology method. The four clones have the length of 821 bp, 874 bp, 972 bp and 914 bp, respectively, and their GenBank accession number was JF900710, JF900709, JF900707 and JF900708, respectively. These sequences have the typical characteristics of gene promoters and contain 71, 77, 86 and 64 regulatory elements. The predicted regulatory elements can be typed by function into tissue-specific, biological stress responsive, abiotic stress responsive, stress hormone responsive, growth hormone responsive and basic regulatory type. The number of regulatory elements in some type changed significantly between the different promoters. The allelic analysis of the promoter sequences between green- and russet-skin fruit sand pear revealed that a SNP (A/G) site in *PpMYBx2* promoter region may have correlation with the fruit skin character. This study laid the foundation for further expression analysis and genetic mapping of *MYB* genes, and to reveal the molecular mechanisms for formation of sand pear quality traits associated with lignin.

Keywords Sand pear (*Pyrus pyrifolia*); Lignin; *MYB* promoter; Allelic variation

研究背景

木质素(Lignin)是由三种醇单体或单木质酚如香豆醇、松柏醇和芥子醇等合成的一种复杂的酚类聚合物, 是木质部细胞次生细胞壁的主要成分之一。在细胞壁木质化过程中, 木质素逐步渗入到细

胞壁, 填充于纤维素构架内, 加大了细胞壁的硬度, 增强了细胞的机械支持力和抗压强度, 促进机械组织的形成, 有利于巩固和支持植物体及促进水分、溶质输导等。同时, 由于木质素的不可溶性及多酚类物质的化学特性, 也增强了植物的抗病能力(陈永

忠等, 2003; Boerjan et al., 2003)。已有研究揭示, 木质素的生物合成大致可分为 3 个步骤: 首先是植物光合作用后的同化产物到苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等芳香族氨基酸的合成过程; 其后是从苯丙氨酸到羟基肉桂酸(HCA)及其辅酶 A 酯类; 最后是从羟基肉桂酰辅酶 A 酯类到合成木质素单体及其聚合物的过程(陈永忠等, 2003; Boerjan et al., 2003)。在木质素合成的过程中有很多的酶参与作用, 其中肉桂酰辅酶 A 还原酶(CCR)和肉桂醇脱氢酶(CAD)催化了第三阶段木质素单体的合成途径。

植物 MYB 转录因子家族成员众多, 它们在结构上的特点是具有保守的 DNA 结合结构域, 已有研究揭示它们主要在细胞周期和次生代谢中发挥调控作用(Stracke et al., 2001)。桉树(*Eucalyptus gunnii*)中的研究发现, MYB 转录因子 EgMYB2 与 EgCCR 和 EgCAD2 启动子的顺式调控区结合, 正向调控了 EgCCR 和 EgCAD2 在微管组织和木质化过程木质部中的特异表达(Lacombe et al., 2000; Lauvergeat et al., 2002; Goicoechea et al., 2005)。EgMYB2 及其松树同源基因 PtMYB4 过量表达的转基因烟草与野生型相比, 均表现出次生细胞壁明显增厚, 木质素含量显著增加; 与木质素合成相关酶类的表达丰度也明显提高(Patzlaff et al., 2003; Goicoechea et al., 2005)。拟南芥 EgMYB2 同源基因 AtMYB61 的表达变异引起了突变体 det3 的木质化异位(Newman et al., 2004), AtMYB46、AtMYB83 的过量表达激活了纤维素、木聚糖和木质素的生物合成路径, 并引起非厚壁组织细胞次生细胞壁的异常加厚(Zhong et al., 2007; McCarthy et al., 2009)。这些研究结果表明, EgMYB2 及其在不同物种中的同源基因均有调控木质素合成功能。定位于遗传图谱中的 EgMYB2 还与控制桉树木质部木质素含量性状位点表现出共分离, 这表明, 很可能是 EgMYB2 的等位变异引起了不同基因型桉树材料间木质部木质素含量的变化(Goicoechea et al., 2005)。

在梨果实发育过程中, 果皮角质层和表皮细胞破损后积累的木栓层形成果皮褐色锈斑(滕元文等, 2005, 中国南方果树, 34(3): 52-54, 56), 木质素是木栓层的重要成分(Pereira, 1988; Lopes et al., 2001), 因此木质素的积累可能与梨果皮锈斑的形成有关。此外, 木质素是细胞壁次生结构和石细胞的主要成分, 石细胞是由细胞壁次生加厚、木质素沉积而形成的, 木质素的合成、转运和沉积与石细胞的发育

关系密切(乔勇进等, 2005)。因此在砂梨中开展木质素合成调控的分子机理研究对分析砂梨相关品质形成的机理具有非常重要的意义。

苹果和梨同为蔷薇科梨亚科, 以前的研究揭示, 苹果和梨基因组间存在高度的微观共线性(Yamamoto et al., 2004; Velasco et al., 2010), 苹果中有关基因家族组成及序列信息可作为梨中同源基因分析的重要参考。基因启动子在基因表达调控中发挥着重要作用。本研究以苹果基因组序列信息为桥梁, 克隆了 4 个砂梨的 EgMYB2 同源基因启动子序列, 预测并分析了所获启动子的调控元件组成及类型, 以及各启动子在绿皮与褐果皮砂梨材料中的等位变异情况。

1 结果与分析

1.1 苹果 EgMYB2 同源基因的搜索

以 EgMYB2 为探针序列, 通过 BlastP 搜索苹果蛋白数据库, 共获得 4 条同源序列, 分别为 MDP0000736994、MDP0000296109、MDP000072-2954 和 MDP0000204495, 依次位于苹果的第 2、第 7、第 3 和第 2 染色体, 我们将其对应的基因分别命名为 MdMYBx1、MdMYBx2、MdMYBx3 和 MdMYBx4。

序列分析发现, 这 4 个基因与 EgMYB2 间分别存在 76.1%、75.3%、69.9%和 69.9%的蛋白质序列同源性; 系统发生分析显示, MdMYBx1、MdMYBx2 与 EgMYB2 聚为一组, 而 MdMYBx3 和 MdMYBx4 与拟南芥的 AtMYB46 聚为一组, 由此可以推测, 苹果基因组中的两组 EgMYB2 同源基因(图 1)在苹果与桉树及拟南芥发生分化前已经存在, 在苹果与桉树及拟南芥发生分化后, 这两组 EgMYB2 同源基因各发生了一次基因复制; 苹果的 4 个 EgMYB2 同源基因与 AtMYB61、PtMYB4 间均存在较大的序列分化。

1.2 砂梨 EgMYB2 同源基因启动子序列的克隆

我们分别选取苹果 MdMYBx1、MdMYBx2、MdMYBx3 和 MdMYBx4 起始密码子上游 1 000 bp 序列进行分析, 根据预测的启动子位置, 在启动子上游保守区段设计了 2 个正向引物(MYBx1/x2: 5'CCAGTAGTACTTGGGGTTGTAGA3'; MYBx3/x4: 5'GATTGTGAAAGCTCCAAATCAC3'), 它们各自与位于启动子下游保守性反向引物(5'CATCTTCCTCTGGTGACCACAA3')组合, 分别用于扩增砂梨品种初夏绿基因组中 MdMYBx1/

MdMYBx2, *MdMYBx3*/*MdMYBx4* 同源基因的启动子序列。

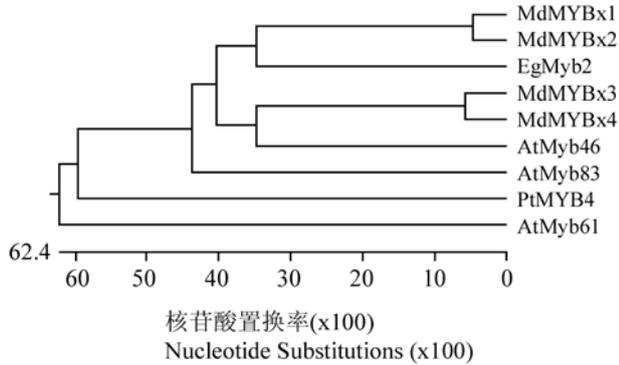


图1 苹果基因组中 *EgMyb2* 同源基因的系统发生分析
注: *MdMYBx1*、*MdMYBx2*、*MdMYBx3* 和 *MdMYBx4* 分别代表苹果基因组中 4 个不同的 *EgMyb2* 同源基因; 它们对应蔷薇科基因组数据库(GDR, Genome Database for Rosaceae)序列编号分别为 MDP0000736994, MDP0000296109, MDP0000722954 和 MDP0000204495

Figure 1 Phylogenesis of *EgMyb2* homologues in apple genome

Note: *MdMYBx1*、*MdMYBx2*、*MdMYBx3* and *MdMYBx4* represent the four different *EgMyb2* homologues in apple genome; Their accessions in the GDR (Genome Database for Rosaceae) are MDP0000736994, MDP0000296109, MDP0000722954 and MDP0000204495, respectively

扩增产物克隆测序后获得长度分别为 821 bp、874 bp、972 bp 和 914 bp 的 4 条序列。序列比较发现, 这 4 条砂梨序列分别与苹果 *MdMYBx1*、*MdMYBx2*、*MdMYBx3* 和 *MdMYBx4* 启动子序列间存在 94.6%、95.6%、97.6%和 96.1%的同源性, 这 4 条序列已提交 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 其序列号分别为 JF900710、JF900709、JF900707 和

表 1 砂梨木质素合成相关转录因子基因 *MYB* 启动子区特征序列位置预测

Table 1 Predicted position of the characteristic sequence in the promoter regions of sand pear putative transcription factor gene *MYB* related to lignin biosynthesis

预测项 Predicted item	启动子(对应基因) Promoter (Corresponding gene)			
	<i>PpMYBx1</i>	<i>PpMYBx2</i>	<i>PpMYBx3</i>	<i>PpMYBx4</i>
TATA box 位置 TATA box position	578 bp	664 bp	753 bp, 288 bp	709 bp
启动子位置 Promoter position	612 bp	677 bp	787 bp, 322 bp	741 bp
增强子位置 Enhancer position	484 bp	541 bp	527 bp	594 bp
克隆长度 Clone length	821 bp	874 bp	972 bp	914 bp

JF900708, 我们将这 4 条启动子序列对应的砂梨基因分别命名为 *PpMYBx1*、*PpMYBx2*、*PpMYBx3* 和 *PpMYBx4*。

对苹果和砂梨的启动子序列进行系统发生分析发现, 这 8 条序列共分化成 2 组, 每组又分化成 2 个亚组, 每个亚组均包含 1 个苹果序列和 1 个砂梨序列(图 2), 据此可以推测 *MYB1* 与 *MYB2*, *MYB3* 与 *MYB4* 间的复制在苹果与梨物种分化前已经发生。

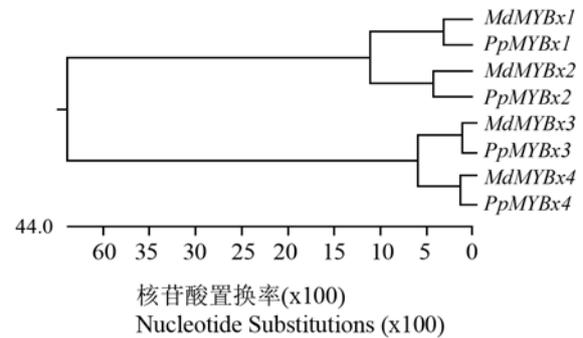


图 2 梨与苹果 *EgMyb2* 同源基因启动子序列的系统发生
注: 启动子: *MdMYBx1*、*PpMYBx1*、*MdMYBx2*、*PpMYBx2*、*MdMYBx3*、*PpMYBx3*、*MdMYBx4*、*PpMYBx4*

Figure 2 Phylogenesis of the promoters of pear and apple *EgMyb2* homologues

Note: Promoter: *MdMYBx1*、*PpMYBx1*、*MdMYBx2*、*PpMYBx2*、*MdMYBx3*、*PpMYBx3*、*MdMYBx4*、*PpMYBx4*

1.3 砂梨 *EgMYB2* 同源基因启动子预测

对所克隆的 4 条砂梨序列的启动子预测结果显示, 各序列中均存在启动子、增强子和 TATA-box 特征序列, 其中 *PpMYBx3* 的启动子序列中预测存在 2 个 TATA-box 和 2 个启动子特征序列(表 1)。

各启动子序列中存在着丰富的调控元件, 按照调控元件的功能将其分为 6 种类型(表 2), 这些调控元件反映了基因的表达特征。在各类调控元件中, 以组织特异性元件数目最多, 主要为涉及根部、胚轴和种子中表达的调控元件; 其次是胁迫激素和生长激素应答类元件, 胁迫激素应答元件主要为 ABA 应答元件, 少数为 SA 应答元件; 生长激素应答类元件包括了 GA 应答型和 IAA 应答型两类。“其它”

类型主要为基因表达的基础调控元件。尽管各启动子调控元件的组成类型相似, 但在某些类型调控元件的数目上存在明显差异。与其它基因的启动子序列相比, *PpMYBx1* 启动子序列中生物胁迫和生长激素应答类元件的数目明显偏多, *PpMYBx2* 和 *PpMYBx3* 启动子序列中胁迫激素应答类元件的数目也明显偏多。这一现象表明, 4 个砂梨 *EgMYB2* 同源基因可能存在表达上的分化。

表 2 砂梨木质素合成相关转录因子基因 MYB 启动子调控元件类型及数目

Table 2 Type and number of regulatory elements in the promoters of sand pear putative transcription factor gene MYB related to lignin biosynthesis

基因名称 Gene name	启动子调控元件类型及数目 Types and number of promoter regulatory elements						合计 Total
	组织特异性 Tissue specificity	生物胁迫 Biotic stress	非生物胁迫 Abiotic stress	胁迫激素 Stress hormone	生长激素 Growth hormone	其它 Others	
<i>PpMYBx1</i>	16	8	8	9	25	5	71
<i>PpMYBx2</i>	23	4	8	20	16	6	77
<i>PpMYBx3</i>	28	4	12	17	13	12	86
<i>PpMYBx4</i>	23	4	7	11	12	7	64

1.4 褐果皮与绿果皮砂梨中 *EgMYB2* 同源基因启动子的等位变异分析

为分析砂梨 *EgMYB2* 同源基因启动子序列中是否存在与果皮褐色相关的等位变异, 首先分别选取 3 个褐果皮和 3 个绿果皮材料, 以其基因组 DNA 为模板, 克隆各材料中 *EgMYB2* 同源基因的启动子序列, 测序后分别分析各个基因启动子序列在褐果皮与绿果皮材料间的等位变异。结果发现, *PpMYBx2* 启动子区在褐果皮与绿果皮砂梨材料间存在一个与皮色分化相一致的单核苷酸位点变异, 该位点在所有褐皮梨的克隆中均为鸟嘌呤 G, 而在所有绿皮梨的克隆中均为腺嘌呤 A(图 3)。

为进一步分析该 SNP 位点与砂梨果皮褐色/绿色的相关性, 我们在该位点处设计了一正向 SNP 引物 PP0180 (5'TAAGGATAAATTGTCCACACGCAA3'), 该引物与反向引物(5'CATCTTCCTCTGGTGACCA CAA3')组合, 可以区分该 SNP 位点处的等位变异。如图 3 所示, 该 SNP 引物组合可对 SNP 位点处含有腺嘌呤 A 的序列进行高效扩增(图 4, 4 泳道, 5 泳道, 6 泳道), 而对 SNP 位点处含有鸟嘌呤 G 序列的扩增效率很低(图 4, 1 泳道, 2 泳道, 3 泳道)。

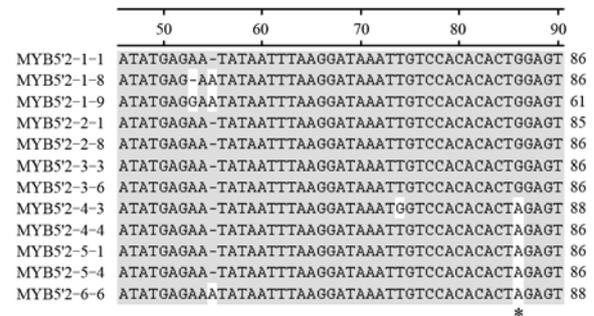


图 3 *PpMYBx2* 启动子区在褐果皮与绿果皮砂梨材料间存在的等位变异

注: MYB5'2-1-1, MYB5'2-1-8, MYB5'2-1-9, MYB5'2-2-1, MYB5'2-2-8, MYB5'2-3-3 和 MYB5'2-3-6 表示来自不同褐皮材料的克隆编号; MYB5'2-4-3, MYB5'2-4-4, MYB5'2-5-1, MYB5'2-5-4 和 MYB5'2-6-6 表示来自不同绿果皮材料的克隆编号; *: 等位变异处

Figure 3 Allelic variation exists in *PpMYBx2* promoter region between the green- and russet-skin-fruit sand pear genotypes
Note: MYB5'2-1-1, MYB5'2-1-8, MYB5'2-1-9, MYB5'2-2-1, MYB5'2-2-8, MYB5'2-3-3 and MYB5'2-3-6 indicate numbers of the clones from different russet-skin-fruit sand pear genotypes; MYB5'2-4-3, MYB5'2-4-4, MYB5'2-5-1, MYB5'2-5-4 and MYB5'2-6-6 indicate numbers of the clones from different green-skin-fruit sand pear genotypes; *: Allelic variation

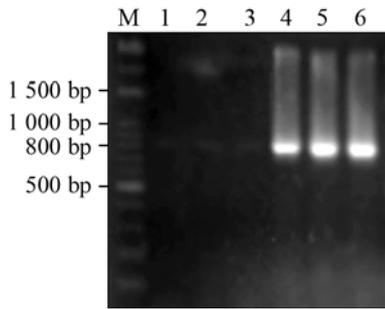


图4 SNP引物在*PpMYBx2*启动子区等位变异处扩增产物电泳注: M: 分子量标记; 1、2、3 分别表示来自不同褐皮砂梨材料的*PpMYBx2*启动子区克隆 MYB5'2-1-1、MYB5'2-2-1 和 MYB5'2-3-6; 4、5、6 分别表示来自不同绿皮砂梨材料的*PpMYBx2*启动子区克隆 MYB5'2-4-3、MYB5'2-5-1 和 MYB5'2-6-6

Figure 4 Gel electrophoresis of PCR products amplified by the SNP primers located at the allelic variation position in the *PpMYBx2* promoter region

Note: M: Molecular weight marker; 1, 2 and 3 represent *PpMYBx2* promoter clones MYB5'2-1-1, MYB5'2-2-1 and MYB5'2-3-6 from different russet-skin-fruit sand pear genotypes, respectively; 4, 5 and 6 represent *PpMYBx2* promoter clones MYB5'2-4-3, MYB5'2-5-1 and MYB5'2-6-6 from different green-skin-fruit sand pear genotypes, respectively

用所设计的引物分别扩增8个绿皮果和8个褐皮果材料的基因组DNA(图5), 结果显示: 绿皮果材料中有7个扩出明亮的目标条带; 褐皮果材料中尽管有5个材料的扩增带较弱, 但有3个材料也扩增出明亮的目标条带。

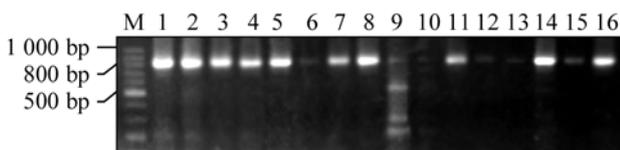


图5 *PpMYBx2*启动子区 SNP引物在不同绿皮与褐皮砂梨材料中扩增产物的电泳检测

注: M: 分子量标记; 1~8: 绿果皮梨材料 19-59、19-67、21-65、20-62、20-71、19-52、5-18 和‘初夏绿’的基因组DNA模板; 9-16: 褐果皮梨材料‘秋荣’、19-39、19-40、‘清香’、19-38、19-42、19-43、19-47的基因组DNA模板

Figure 5 Gel electrophoresis of PCR products amplified with the SNP primers located at the *PpMYBx2* promoter region in different green- and russet-skin-fruit sand pear genotypes

Note: M: Molecular weight marker; 1~8: Corresponding to the genomic DNA templates from the green-skin-fruit sand pear genotypes 19-59, 19-67, 21-65, 20-62, 20-71, 19-52, 5-18 and ‘Chu-xia-lv’, respectively; 9-16: Corresponding to the genomic DNA templates from the russet-skin-fruit sand pear genotypes ‘Akibae’ pear, 19-39, 19-40, ‘Qing-xiang’, 19-38, 19-42, 19-43 and 19-47, respectively

2 讨论

果皮色泽与果肉石细胞含量是影响砂梨外观和内在品质的重要因素, 但尚无关于砂梨果实皮色及石细胞形成分子机理的研究报道。鉴于 *EgMYB2* 及其同源基因在木质素生物合成中的重要调控作用, 因此选择砂梨的 *EgMYB2* 同源基因进行研究, 可能对从分子水平探明砂梨果皮褐色及石细胞形成机制具有重要意义。本研究通过对所克隆4个砂梨 *EgMYB2* 同源基因启动子序列调控元件的预测分类, 预测了砂梨各个 *EgMYB2* 同源基因的表达特征。以前的研究发现, 松树的 *PtMYB4* 基因主要在木质化细胞中表达, 桉树的 *EgMYB2* 也主要在木质部发生组织中表达, 拟南芥的 *AtMYB46* 主要在花序干的维管处表达(Patzlaff et al., 2003; Goicoechea et al., 2005; Zhong et al., 2007), 我们在砂梨 *EgMYB2* 同源基因启动子序列中预测到了较多调控根部、胚轴中表达的元件, 这表明, 砂梨 *EgMYB2* 同源基因可能与这些组织中的木质素合成调控相关。此外, 还预测到多个果实、种子中表达的调控元件, 因此砂梨 *EgMYB2* 同源基因还可能参与了果实、种子部位的木质素合成。启动子序列预测也揭示了砂梨的各个 *EgMYB2* 同源基因的调控元件存在分化(表2)。拟南芥中的研究表明, *AtMYB46* 主要在花序干中表达, 而 *AtMYB83* 则在茎干的维管细胞中特异表达(Zhong et al., 2007; McCarthy et al., 2009)。砂梨各个 *EgMYB2* 同源基因间也可能存在类似的表达分化。

褐皮与绿皮砂梨间的启动子序列等位变异分析发现, *PpMYBx2* 启动子区存在1个SNP位点, 该位点与砂梨果皮褐色/绿色性状间存在相关性, 但与不同材料的褐、绿色果皮变异并不完全符合。已有研究揭示, 植物MYB转录因子家族成员众多, 它们在结构上的特点是具有保守的单个或多个不完全重复的DNA结合域, 这些木质素合成相关的MYB转录因子属于两个重复(R2R3)类型。在拟南芥基因组中共有133个R2R3型MYB转录因子基因, 这些基因按序列发生关系被分为24个亚组(Stracke et al., 2001)。木质素合成相关的 *AtMYB46* 等被分在第13亚组(Kranz et al., 1998), 该组中除了 *AtMYB81* 和 *AtMYB83*, 还包含另外6个MYB基因(Allan et al., 2008), 这表明拟南芥中可能存在功能冗余的MYB基因。可以推测, 除了本研究已鉴定出4个砂梨 *EgMYB2* 同源基因, 砂梨基因组中还可能多个与拟南芥第13亚组MYB同源的转录因

子未被鉴定。对所克隆 4 个砂梨 *MYB* 基因启动子序列的预测分析发现, 尽管各启动子序列调控元件存在分化, 但组成相似(表 2), 因此可以推测: 这 4 个 *MYB* 基因可能在砂梨的生长发育过程中具有某些相似的生物学功能, *PpMYBx2* 并非是唯一调控砂梨木质素合成的基因。此外, 木质素生物合成涉及多个环节以及不同的催化酶类(陈永忠等, 2003; Boerjan et al., 2003), 因此不排除存在 *MYB* 以外调控因子变异引起的木质素相关性状遗传差异。

本研究克隆获得了 4 个砂梨 *EgMYB2* 同源基因的启动子序列, 是在园艺植物中克隆到的关于木质素合成代谢关键基因的调控序列。该项研究对于探明砂梨与木质素相关品质性状形成的分子机制和利用基因调控技术进行砂梨品质育种具有重要意义。另外, 利用生物信息学对砂梨 *MYB* 基因启动子调控元件进行了预测和分析, 并进行了启动子序列的等位变异分析, 为开展该基因的表达研究和遗传定位, 进一步确定其功能奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 材料

于 2010 年 4 月在浙江省农业科学院果园(杭州)取绿果皮砂梨材料 19-59、19-67、21-65、20-62、20-71、19-52、5-18、‘初夏绿’、5-18、31-3, 褐色果皮砂梨材料‘秋荣’、19-39、19-40、‘清香’、19-38、19-42、19-43、19-47、19-49、20-72 的幼叶, 液氮冷冻后 -70°C 保存备用。

3.2 基因组 DNA 提取

利用改良的 CTAB 法(刘小勇等, 1997)提取各砂梨材料的基因组 DNA, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的纯度和完整性, 用 U-0080D (Hitachi)紫外分光光度计检测 DNA 浓度, 将检测后的各 DNA 样品存于 -20°C 冰箱备用。

3.3 同源基因搜索与序列分析

利用桉树 *EgMYB2* 基因的蛋白序列(CAE09057)通过 BlastP 搜索苹果蛋白数据库(http://www.rosaceae.org/projects/apple_genome), 获取苹果对应同源基因的基因组序列, 再利用 softberry 数据库(<http://www.softberry.com>)对苹果各同源基因的启动子区进行在线预测, 砂梨基因启动子序列的预测方法相同。

3.4 目标序列的 PCR 扩增

根据启动子预测结果, 在各基因起始密码子上

游保守区设计可以扩增完整启动子的引物。引物序列由上海桑尼生物科技有限公司合成。反应体系为: PCR 反应体系 25 μL , 反应混和物中包括 30 ng 模板, 正、反向引物各 5 pmol, dNTP 各 5 nmoL, MgCl_2 37.3 nmoL, *rTaq* DNA 聚合酶 0.5 U (Takara, Japan), 10 \times 酶自带的 PCR 缓冲液 (2.5 μL)。PCR 反应程序为: 94°C 3 min; 94°C 30 s; 58°C 30 s; 72°C 1 min 30 s, 35 个循环; 72°C 7 min。应用 ThermoHyaid 梯度 PCR 仪进行扩增。用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳分离。EtBr 染色, 凝胶成像系统照相。

3.5 目的片段的回收、克隆、测序

用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)回收目的片段, 方法参照产品说明。将纯化的目的条带用 pGem-T-Easy 载体(购自 Invitrogen 公司)克隆, 方法参照厂商说明书。用各基因启动子特异引物通过 PCR 方法筛选阳性克隆。质粒提取及测序由上海桑尼生物科技有限公司完成。

3.6 序列同源性分析、启动子预测及调控元件的注释分类

序列排列和同源分析采用 ClustalW 方法(Thompson et al., 1994), 参数采用 MegAlign (Clewley and Arnold, 1997)软件的默认值。序列启动子及调控元件预测采用 softberry 网站的植物启动子及调控元件在线预测服务(<http://www.softberry.com/berry.html>)。根据预测结果, 对调控元件进行功能注释, 再按调控元件的类型将其分为组织特异类、生物胁迫应答类、非生物胁迫应答类、胁迫激素应答类、生长类激素应答类及其它共 6 种类型。

3.7 检测启动子区等位变异引物的开发及其在褐皮与绿皮砂梨中的扩增

按照材料与方法 3.4 与 3.5 分别克隆 3 个褐皮和 3 个绿皮砂梨材料中 *EgMYB2* 同源基因的启动子序列, 测序后再分析各启动子序列在绿皮材料和褐皮材料间的等位变异, 根据分析的结果设计可以检测等位变异的 PCR 引物, 并以不同等位变异序列的克隆为模板, 检测所设计引物对启动子等位变异的分辨效果。用检测有效的引物扩增更多的褐皮和绿皮砂梨材料, 以分析所获得的等位变异与砂梨褐皮/绿皮性状间的相关性。

作者贡献

王月志是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 王月志完成数据分析, 论文初稿的写作; 戴美松参与实验设计, 试验结果分析; 施泽彬是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究受现代农业(梨)产业技术体系建设专项资金(CARS-29-04)及浙江省农科院博士一次性科研启动经费资助。

参考文献

- Allan A.C., Hellens R.P., and Laing W.A. 2008, MYB transcription factors that colour our fruit, *Trends Plant Sci.*, 13(3): 99-102
- Boerjan W., Ralph J., and Baucher M., 2003, Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546
- Chen Y., Tan X., and David C., 2003, Lignin biosynthesis and genetic regulation, *Jiangxi Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis(Natural Sciences Edition))*, 25(4): 613-617 (陈永忠, 谭晓风, David C., 2003, 木质素生物合成及其基因调控研究综述(自然科学版), *江西农业大学学报*, 25(4): 613-617)
- Clewley J.P., and Arnold C., 1997, MEGALIGN, The multiple alignment module of LASERGENE, *Methods Mol. Biol.*, 70: 119-129
- Goicoechea M., Lacombe E., Legay S., Mihaljevic S., Rech P., Jauneau A., Lapiere C., Pollet B., Verhaegen D., Chaubet-Gigotand N., and Grima-Pettenati J., 2005, EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis, *Plant J.*, 43(4): 553-567
- Kranz H.D., Denekamp M., Greco R., Jin H., Leyva A., Meissner R.C., Petroni K., Urzainqui A., Bevan M., Martin C., Smeekens S., Tonelli C., Paz-Ares J., and Weisshaar B, 1998, Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, 16(2): 263-276
- Lacombe E., Van Doorselaere J., Boerjan W., Boudet A.M., and Grima-Pettenati J., 2000, Characterization of cis-elements required for vascular expression of the cinnamoyl-CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation, *Plant J.*, 23(5): 663-676
- Lauvergeat V., Rech P., Jauneau A., Guez C., Coutos-Thevenot P., and Grima-Pettenati J., 2002, The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species, *Plant Mol. Biol.*, 50(3): 497-509
- Liu X., Tian S., Qin G., and Shen R., 1997, An Improved Method for Extracting DNA from Plants and Microorganisms Using SDS-CTAB, *Beijing Linye Beijing Linye Daxue Xuebao (Journal of Beijing Forestry University)*, 19(3): 100-103 (刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 沈瑞祥, 1997, 提取植物和微生物DNA的SDS-CTAB改进法, *北京林业大学学报.*, 19(3): 100-103)
- Lopes M., Barros A., Neto C., Rutledge D., Delgadillo I., and Gil A., 2001, Variability of cork from Portuguese *Quercus suber* studied by solidstate C-13-NMR and FTIR spectroscopies, *Biopolymers*, 62(5): 268-277
- McCarthy R.L., Zhong R., and Ye Z.H., 2009, MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, 50(11): 1950-1964
- Newman L.J., Perazza D., Juda L., and Campbell M.M., 2004, Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the det3 mutant phenotype, *Plant J.*, 37(2): 239-250
- Patzlaff A., McInnis S., Courtenay A., Surman C., Newman L.J., Smith C., Bevan M.W., Mansfield S., Whetten R.W., Sederoff R.R., and Campbell M.M., 2003, Characterisation of a pine MYB that regulates lignification, *Plant J.*, 36(6): 743-754
- Pereira H., 1988, Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L., *Wood Sci Technol*, 22(3): 211-218
- Qiao Y., Zhang S., Tao S., Zhang Z., and Liu Z., 2005, Advances in research on developing mechanism of stone cells in pear fruit, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 22(4): 367-371 (乔勇进, 张绍玲, 陶书田, 张振铭, 刘招龙, 2005, 梨果实石细胞发育机理的研究进展, *果树科学*, 22(4): 367-371)
- Stracke R., Werber M., and Weisshaar B., 2001, The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Curr Opin Plant Biol.*, 4(5): 447-456
- Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S. K., Troggio M., Pruss D., Salvi S., Pindo M., Baldi P., Castelletti S., Cavaiuolo M., Coppola G., Costa F., Cova V., Dal Ri A., Goremykin V., Komjanc M., Longhi S., Magnago P., Malacarne G., Malnoy M., Micheletti D., Moretto M., Perazzolli M., Si-Ammour A., Vezzulli S., Zini E., Eldredge G., Fitzgerald L. M., Gutin N., Lanchbury J., Macalma T., Mitchell J. T., Reid J., Wardell B., Kodira C., Chen Z., Desany B., Niazi F., Palmer M., Koepke T., Jiwan D., Schaeffer S., Krishnan V., Wu C., Chu V. T.,

King S. T., Vick J., Tao Q., Mraz A., Stormo A., Stormo K., Bogden R., Ederle D., Stella A., Vecchietti A., Kater M. M., Masiero S., Lasserre P., Lespinasse Y., Allan A. C., Bus V., Chagné D., Crowhurst R. N., Gleave A. P., Lavezzo E., Fawcett J. A., Proost S., Rouzé P., Sterck L., Toppo S., Lazzari B., Hellens R. P., Durel C. E., Gutin A., Bumgarner R. E., Gardiner S. E., Skolnick M., Egholm M., Van de Peer Y., Salamini F., and Viola R., 2010, The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.), *Nat. Genet.*, 42: 833-839

Yamamoto T., Kimura T., Saito T., Kotobuki K., Matsuta N., Liebhard R., Gessler C., and Hayashi T., 2004, Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map, *Acta Horticulturae*, 663: 51-56

Zhong R., Richardson E.A., and Ye Z.H., 2007, The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 19(9): 2776-2792

 **5thPublisher**是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>