

陆地棉基因 *GhMYB52* 的克隆及特征分析杜静静¹, 田岳¹, 冯昊¹, 郭梦兰², 杨琴莉¹, 丁林云¹, 李洁¹, 胡艳^{1,2*}, 张天真^{1,2}

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095;

2. 浙江大学农业与生物技术学院农学系, 杭州 310058)

摘要:【目的】克隆了 1 个在棉纤维发育次生壁加厚期优势表达的 R2R3 类 MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB) 转录因子基因 *GhMYB52* (Gh_A12G2460)。本研究旨在分析该 MYB 转录因子在陆地棉纤维次生壁发育过程中的作用。【方法】通过一步克隆法, 从陆地棉遗传标准系 TM-1 中克隆了 1 个在纤维次生壁加厚期优势表达的 R2R3 类 MYB 转录因子基因 *Gh_A12G2460*, 进化树分析结果表明 *Gh_A12G2460* 与拟南芥中 *AtMYB52* 基因的相似度最高, 因此将其命名为 *GhMYB52*。通过进化树构建、氨基酸序列多重比对、定量聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR)、烟草瞬时转化、酵母双杂交等对其基因结构、编码产物的结构、表达特征、亚细胞定位以及互作蛋白进行了分析。【结果】*GhMYB52* 基因的开放阅读框长 672 bp, 编码 223 个氨基酸残基, 预测蛋白的相对分子质量为 26.06 kDa, 等电点为 9.83。qRT-PCR 结果表明, *GhMYB52* 基因在开花后 15~25 d 的棉纤维中优势表达。亚细胞定位结果显示, *GhMYB52* 蛋白定位于细胞核, 符合转录因子的特征。酵母转化结果显示, *GhMYB52* 蛋白具有强烈的转录激活活性, 并且与 1 个 NAC 类转录因子 *GhFSN1* 有强烈互作。【结论】*GhMYB52* 是 1 个在棉花纤维次生壁加厚时期优势表达的 R2R3 类 MYB 转录因子, 它可能通过与 NAC 类转录因子互作, 形成蛋白复合物参与棉花纤维次生壁加厚过程。本研究为进一步从分子水平上验证 *GhMYB52* 基因在棉花纤维发育过程中的生物学功能奠定了基础。

关键词: 棉花; 纤维; *GhMYB52*; 克隆; 特征分析

Cloning and Characterization of the Transcription Factor Gene *GhMYB52* in *Gossypium hirsutum* L.Du Jingjing¹, Tian Yue¹, Feng Hao¹, Guo Menglan², Yang Qinli¹, Ding Linyun¹, Li Jie¹, Hu Yan^{1,2*}, Zhang Tianzhen^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Agronomy Department, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: [Objective] In this study, we cloned the R2R3 MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB) transcription factor gene *Gh_A12G2460*, which is highly expressed in the second cell wall (SCW) development stage during cotton fiber formation, and preliminarily investigated its functional role in fiber development at SCW stage. [Method] The *Gh_A12G2460* gene was isolated from *Gossypium hirsutum* acc. TM-1 by one-step cloning strategy. Sequence alignment showed it is similar to *AtMYB52* in *Arabidopsis*, so it was renamed as *GhMYB52*. The gene structure, protein structure, expression profile, subcellular location and protein-protein interaction were analyzed by phylogenetic analysis, multiple alignments of amino acid sequences, qRT-PCR, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient transformation system of tobacco, and yeast two hybridization assay. [Result] The results showed that *GhMYB52* contains a 672 bp open reading frame, encoding 223 amino acid residues, with a predicted nuclear localization signal region. qRT-PCR results indicated that *GhMYB52* is predominantly expressed in the fiber at 15—25 DPA (days post anthesis), suggesting it may be an SCW-associated gene. *GhMYB52* localized in the nucleus examined by tobacco transient expression, consistent with the characteristics of transcriptional factors. Yeast transformation test demonstrated it has transcriptional activation activity. Further protein-protein

收稿日期: 2019-07-05 第一作者简介: 杜静静 (1993—), 女, 硕士, 1045273743@qq.com。

* 通信作者: njauhuyan@njau.edu.cn

基金项目: 浙江大学基本科研业务费 (2018QNA6019); 国家科技重大专项——转基因生物新品种培育 (2016ZX08009)

interaction analysis revealed that GhMYB52 strongly interacts with GhFSN1, a NAC transcription factor. [Conclusion] These results demonstrated that GhMYB52 is a nuclear-localized transcription activator, which might participate in the SCW process of cotton fiber development by forming a corresponding regulatory network with NAC transcription factors. This study lays a foundation for further verification of the biological function of GhMYB52 in cotton fiber development at the molecular level.

Keywords: cotton; fiber; GhMYB52; cloning; characterization

自然界中植物通过基因的激活、沉默以及时空特异性的表达来调控细胞的分化、组织器官的形成以及植株的生长发育过程,这一系列的调控过程需要各种各样的酶和调节蛋白共同协作完成。转录因子(Transcription factor, TFs)就是这样一类调节蛋白。MYB 转录因子是目前在植物体内发现的数量最多、种类最丰富的 1 类转录因子,因其 N 端高度保守的 DNA 结合域——MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB) 结构域而得名,该结构域由 1 个或多个 51~52 个氨基酸串联而成的 R 结构域组成^[1-3]。R 结构域的主要作用是参与空间结构中疏水核心的形成,其数量是区分不同种类 MYB 基因的主要依据^[4]。根据 R 结构域的数量,MYB 基因家族分为 4 大类:(1) 含有 1 个 R 结构域的为 1R-MYB;(2) 含 2 个 R 结构域的为 R2R3-MYB;(3) 含有 3 个 R 结构域的为 3R-MYB;(4) 含有 4 个 R 结构域的 MYB 类转录因子,称为 4R-MYB 类转录因子^[5]。研究表明,MYB 转录因子在植物的次生壁(Secondary cell wall, SCW)发育过程中发挥重要的作用^[6]。高等植物尤其是拟南芥次生壁的加厚过程受到基于 NAC-MYB 转录因子形成的三级调控网络的调控:NAC 类转录因子作为转录开关调控位于下游的第二级 MYB 类转录因子,从而影响第三级的主要以 MYB 转录因子为主的转录因子,进而调控纤维素、半纤维素等的合成^[7]。

棉花成熟纤维细胞壁含有 90% 以上的纤维素^[8]。在棉花纤维细胞壁次生壁加厚期开花后 16~40 d (Days post anthesis, DPA), 纤维素大量合成和沉积^[9]。目前,有关纤维素合成和代谢的主要调控因子纤维素合酶的研究已有不少报道^[10], 其他糖代谢基因如蔗糖合酶、几丁质酶、 β -1, 3-内葡聚糖酶等也与纤维次生壁加厚密切相关^[11-15]。除此之外,一些转录因子也参与棉花纤维细胞次

生壁加厚过程。棉纤维细胞次生壁加厚期优势表达的 NAC 类转录因子 GhFSN1 在纤维 SCW 加厚期起正向调控作用。转基因试验证明,在棉花中过表达 GhFSN1 基因能够促进棉纤维 SCW 厚度的增加,但纤维长度变短。转录组数据表明 GhFSN1 能够通过激活其下游 SCW 相关基因来促进棉纤维 SCW 的生长发育,其中 MYB 在调控网络中发挥重要的作用。但是, GhFSN1 基因是通过调控哪些 MYB 基因参与棉纤维次生壁的发育过程尚不清楚^[16]。

次生壁加厚期纤维素的合成影响纤维的强度与马克隆值等,该时期是决定棉纤维品质的关键时期。因此,挖掘参与棉纤维次生壁加厚期的基因,研究次生壁发育的分子机制和调控网络具有重要的意义。本研究从陆地棉中筛选到 1 个在棉花纤维次生壁加厚期优势表达的 MYB 转录因子基因 GhMYB52,对其进行组织表达、转录激活鉴定、亚细胞定位和酵母互作分析,初步探究该基因的表达模式和分子功能,为今后深入研究该基因的分子生物学特性及遗传进化等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

用于棉花组织表达分析的陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 材料 TM-1 和海岛棉 (*G. barbadense* L.) 材料海 7124 均种植于南京农业大学当涂试验基地(安徽省马鞍山市当涂县),采用常规大田管理。

用于瞬时转化的烟草材料为本氏烟,种植于浙江大学人工气候室,温室条件:温度 22 °C;光照 16 h、黑暗 8 h;相对湿度 75%~80%。

以上所用植物材料均由南京农业大学作物遗传与种质创新国家实验室提供。

1.2 载体与试剂

使用的转基因载体 pBINGFP4、pGBKT7、

pGADT7 载体以及 Y2H 菌株保存于本实验室。大肠杆菌 DH5 α 感受态购于 Vazyme 公司、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 感受态购于南京沃华生物科技有限公司。限制性内切酶 *Bam*H I、*Sma* I、*Nde* I、*Eco*R I、*Kpn* I、*Nco* I 购于 NEB 公司。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygene 公司。One Step Cloning Kit 重组酶、Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 高保真

酶、HiScript Reverse Transcriptase 反转录试剂盒购买自 Vazyme 公司。YPDA、SD/-Trp、SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His 营养缺陷培养基、酵母双杂试剂盒 (Cat. No.630489) 购于 Takara 公司 (中国, 大连), X-Glu 试剂购于南京梅林雪海公司。乙酰丁香酮购于源叶生物。引物合成和测序由杭州擎科生物有限公司完成。RNA 快速提取试剂盒购于钟鼎生物 (中国, 南京)。本研究所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
GhMYB52F	TTACGAACGATAGGGTACCCCGGGATGTGTAGCCGAGGTCATTG
GhMYB52R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGATCCTAAGAAATTGAAGAAGGAAG
GhMYB52-qF	CAGCAGGGAAGAGCTGTAGG
GhMYB52-qR	AAAGCCTAGCGATAACAGCC
GhMYB52-YF	TCAGAGGAGGACCTGCATATGATGTGTAGCCGAGGT
GhMYB52-YR	TCGACGGATCCCCGGAATTCTCTATAAGAAATTGAA
GhFSN1-YF	GTACCAGATTACGCTCATATGATGCAAAGTTCATTT
GhFSN1-YR	ATGCCACCCGGGTGGAATTCTTATACACTAGCATT
Gh_D03G0370-F	CGGTGGTGTGAAGAAGCCTCAT
Gh_D03G0370-R	AATTCACGAACAAGCCTCTGGAA

注:下划线表示酶切位点。

Note: The underline represents the restriction site of restriction endonuclease.

1.3 RNA 的提取及 cDNA 的合成

按照 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒说明书,提取 TM-1 和海 7124 的花托、花瓣、雄蕊、雌蕊、花萼、-3 DPA、-1 DPA、1 DPA、3 DPA 的胚珠,以及 5 DPA、10 DPA、15 DPA、20 DPA、25 DPA、30 DPA 的棉花胚珠和纤维组织 RNA。使用反转录试剂盒将各组织 RNA 反转录,合成第一链 cDNA。

1.4 *GhMYB52* 基因的克隆

根据本课题组对 MYB 转录因子家族分析结果,从陆地棉 TM-1 基因组 (V1.1) 中获得了 34 个位于 A12 号染色体上的 R2R3 类 MYB 转录因子基因。结合陆地棉 TM-1 的 35 个不同组织表达谱数据^[10],从中选出了 1 个在棉花纤维发育次生壁加厚期优势表达的基因 Gh_A12G2460。因其与

拟南芥中 *AtMYB52* 基因的相似度最高,将其命名为 *GhMYB52*。进一步通过一步克隆法,设计带有 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切位点的重组引物 (Gh-MYB52F 和 GhMYB52R),以 TM-1 20 DPA 纤维组织的 cDNA 为模板扩增目的基因。聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 产物经过凝胶电泳回收试剂盒纯化后,与使用相同酶切位点进行双酶切后的 pBinGFP4 载体进行重组连接,并转化大肠杆菌。利用 pBinGFP4 载体通用引物 GFP4F 和 GFP4R 进行阳性鉴定,并送至杭州擎科生物有限公司进行测序。

1.5 生物信息学分析

使用 DNAMAN 软件对 *GhMYB52* 氨基酸序列进行保守性分析。采用邻近连接法 (Neighbor-joining, NJ) 使用 MEGA 构建系统进化树^[17]。

通过 ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 在线网站预测 GhMYB52 蛋白序列的理化性质和蛋白结构模型。

1.6 实时定量 PCR

实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-PCR) 反应体系和反应程序按照 AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒说明书进行。定量 PCR 仪型号为 Roche LightCycler 96 实时荧光定量 PCR, 操作方法参考分析仪说明书。定量引物为 GhMYB52-qF 和 GhMYB52-qR。棉花组成型表达的 *Histone 3* 基因 (Gh_D03G0370) 为内参基因。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析, 试验进行 3 次技术重复。荧光定量的数据利用 Excel 软件, 通过最小显著差数法 (Least significant difference, LSD) 进行差异显著性分析。

1.7 酵母转化

设计带有 *Nde* I 和 *Eco* R I 酶切位点的 PCR 引物: GhMYB52-YF 和 GhMYB52-YR, GhFSN1-YF 和 GhFSN1-YR, 分别扩增 *GhMYB52* 和 *GhFSN1* 基因的编码序列 (Coding sequence, CDS)。按照一步克隆法, 构建 GhMYB52-pGBKT7 和 GhFSN1-pGADT7 载体。按照 YeastmakerTM Yeast Transformation System 2 试剂盒说明书操作方法, 将 GhMYB52-pGBKT7 质粒转化 Y2H 菌株, 涂布于含有 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ AbA (Aureobasidin A, 金担子素) 抑制剂的 SD/-Trp 营养缺陷型培养基上, 以进行转录激活 / 抑制功能的验证。另外, 将 Gh-

MYB52-pGBKT7 和 GhFSN1-pGADT7 质粒共转化 Y2H 菌株, 并设置阳性对照 (pGBKT7-53 + pGADT7-T)、阴性对照 (pGBK-Lamin c + pGADT7-T), 涂布于含有 $450 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ AbA 抑制剂的三缺 SD/-Trp/-Leu /-His 营养缺陷型培养基上, 进行酵母互作分析。将培养基置于 30°C 恒温培养箱, 培养 2 d 左右, 观察菌斑的生长情况。

1.8 亚细胞定位鉴定

采用农杆菌转化法, 将构建好的过表达载体 35S::GhMYB52::GFP 转化农杆菌菌株 GV3101。按照烟草瞬时转化法, 选取培养 25 d 的烟草, 将准备好的农杆菌菌液, 注射进完整且厚的烟草叶片中。注射后对侵染的烟草叶片进行避光处理, 48 h 后在 Zeiss 荧光共聚焦显微镜下观察注射过的烟草叶片中的 GFP 信号^[18]。

2 结果与分析

2.1 GhMYB52 基因的克隆及序列特征分析

以陆地棉 TM-1 的 20 DPA 纤维 cDNA 为模板, 用一步克隆法获得 *GhMYB52* 基因的 CDS。*GhMYB52* 基因全长为 672 bp, 编码 223 个氨基酸残基。ExPASy 在线网站预测 *GhMYB52* 基因编码产物的相对分子质量约为 26.06 kDa, 等电点为 9.83, R2R3 结构域位于第 1~55 个氨基酸序列 (图 1)。通过 BlastP 比对, 在 TAIR 网站 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中筛选出 5 个与 *GhMYB52* 蛋白序列相似度大于 50% 的拟南芥

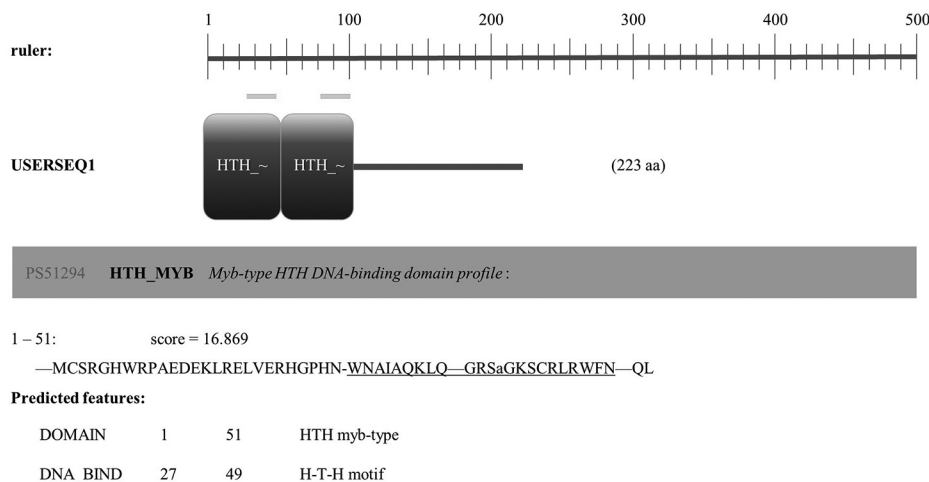


图 1 GhMYB52 蛋白结构域分析示意图

Fig. 1 Structure analysis of GhMYB52 protein

R2R3 类 MYB 转录因子。氨基酸序列分析结果(图 2)表明,*GhMYB52* 蛋白的 N 端含有 1 个高度保守的 R2R3 结构域。根据 R2R3 类 MYB 转录因子 C 端的保守性的差异,进一步将其分成 25 个亚族。我们提取了拟南芥中 R2R3 类不同亚族的 58 个转录因子,系统进化树的分析结果(图 3)表明,*GhMYB52* 属于 R2R3 类 MYB 转录因子家族第 21 亚族。

2.2 *GhMYB52* 基因的表达模式分析

陆地棉转录组数据显示,*GhMYB52* 基因在棉纤维次生壁加厚期优势表达,尤其是在 15

DPA、20 DPA、25 DPA 的纤维中表达量很高。利用 qRT-PCR 方法分析了 TM-1 中 *GhMYB52* 基因和海 7124 中同源基因 *GbMYB52* (GB_A12G3024)在花瓣、雌蕊、雄蕊、花托、-3~3 DPA 的胚珠、5~30 DPA 的胚珠以及纤维等不同组织中的表达情况。结果表明:在所检测的组织中,*GhMYB52* 与 *GbMYB52* 的表达情况基本一致,均在 15 DPA 的胚珠、15~25 DPA 的纤维中优势表达(图 4),与转录组数据的表达情况基本一致,推测 *GhMYB52* 基因可能在棉花纤维发育次生壁加厚期发挥功能。

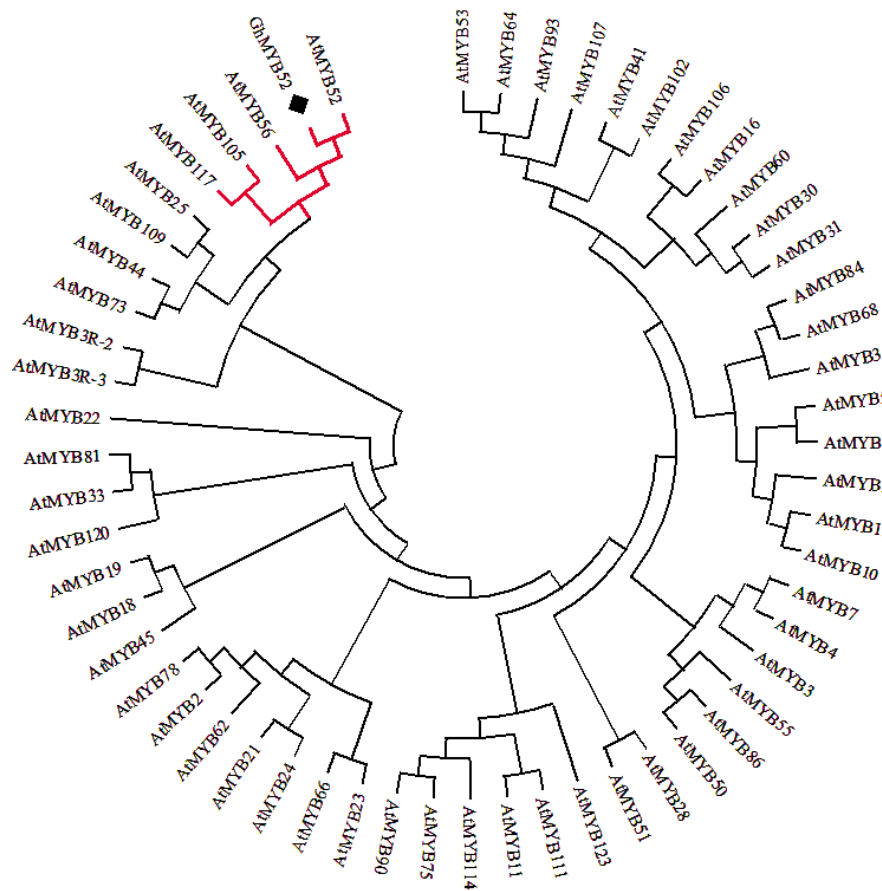
GhMYB52MCSRGRHWRPAED E KL	15
AtMYB52MMCSRGRHWRPAED E KL	16
AtMYB54MIMCSRGRHWRPAED E KL	17
AtMYB105	AQHLRSYYTSHREEDMNPNSDYSNCNKDITTVYRSCG.HSSKASVS.RGHWRPAED E KL	118
AtMYB117	GDVAVHEEE S NNN...NPNFSNSES G KKETTDSGQSWSSSSSKPSVLGRGHWRPAED V KL	109
AtMYB56	NPSISRNH P HNKSASVLESEDEHGNERGENEKS L MRGKSGINTKVCSRGRHWR P EDAKL	104
Consensusrghwrp ed kl	
GhMYB52	RELVE R HGPHNWN A IAQK L GRSAGKSCRLRWFNQLDPRINRSEFT E EEEEERLLSAHRIH	75
AtMYB52	RELVE R HGPHNWN A IAQK L SGR.SGKSCRLRWFNQLDPRINRNEFT E EEEEERLLASHRIH	75
AtMYB54	KDLVE R HGPHNWN A IAK L GR.SGKSCRLRWFNQLDPRINRNEFT E EEEEERLLASHRIH	76
AtMYB105	KELVAV I GEQNWNLIAEK L GR.SGKSCRLRWFNQLDPRINRRAFT E EEEEERLMOAHRLY	177
AtMYB117	KELVSI I GEQNWNLIAEK L GR.SGKSCRLRWFNQLDPRINRRAFT E EEEEERLMOAHRLY	168
AtMYB56	KELVA R HGPHNWN L ISNHL L GR.SGKSCRLRWFNQLDPRINRRAFT E EEEEERLLAHRAY	163
Consensus	lv gp rwn i l gr gkscrlrwnql dprin fteeee rl hr	
GhMYB52	GNRW V IARLFPGRTDNAVKNHWHVIMAR R QRSSLYAKTSH T P.....SKPLHHSQM	130
AtMYB52	GNRW V IARLFPGRTDNAVKNHWHVIMAR R GRERSK...LRPRG.....LGHDGTVAATG	127
AtMYB54	GNRW S IARLFPGRTDNAVKNHWHVIMAR T QTSKPRILLST S SSSLMASEQIMMSG	136
AtMYB105	GK N WAM I ARLFPGRTDNSVKNHWHVIMARKFRE Q SSSYR R KTMV.....LKPLIN...	229
AtMYB117	GK N WAM I ARLFPGRTDNSVKNHWHVIMARKRE H SSAYR R KLMSNN...PLKPHLTNNH	225
AtMYB56	GK N WAM I SRLFPGRTDNAVKNHWHVIMAR T RESQRQRQ Q PP L LS...RDAEMTVSSC	220
Consensus	gn w i r fpgrtdn vknhwhv mar r	
GhMYB52	GAG.....HGE L PLLLHKYKQGFPHNTCSPLN...ENHCVT T TQDKKEA	170
AtMYB52	MIGNY.....KDCDKERRLATTTAIN.FPYQF S HIN.HFOVLKEFLTGKIG	171
AtMYB54	GY N HN.....YSSDDRKKIFPADFIN.FPYKFS H IN.HLHFLKEFFPGKIA	180
AtMYB105	.PNP.....HIFNDFPTR.LAL T HLASSDHKQMLFVPCFPGYDHENES	272
AtMYB117	HPNPNPNYHSFISTNHYFAQPEFENLTHHIVNNAPITSDHNQVLVLF F HC F QGYEN.NEP	284
AtMYB56	RYNQG.....KFINEEDDDDDVS A VSTCTTEL S LTPPSSAYQPRFFNYDST	266
Consensus		
GhMYB52	IEFYDF.....LQVNTDSN K SEV T ENSRRD.....DEEVN...QOE	204
AtMYB52	FRNSTTPIQEGAI D QTKRPM E FYNFLQVNTDSKI.....HELIDNSRKDE	216
AtMYB54	LSHKAN.....CSK K PM E FYNFLQVNTDSNK.....SEIID...QDS	214
AtMYB105	PLMVDM.....FETQM V GDYIAWTQEATT.....FDFLN...CTG	305
AtMYB117	PMVSM.....FGNQMMVGDNVGAT S ALCNIPHIDPSNQEKPEPNAMH...WIG	332
AtMYB56	LASGKD.....GC V QRAEVNGIY G KKM H Q NHHT I S.....	298
Consensus		
GhMYB52	AMPLM H HHT . KAR...PSFFN F L.....	223
AtMYB52	EEDVDQNNRIPNENCVFFDFLSVGN S ASQGL	248
AtMYB54	GQSKRSDSD T HESHV P FFDFLSVGN S AS...	243
AtMYB105	KSEIF E RINEEKK...PFFDFL G IGTV.....	330
AtMYB117	MDAVDE V FEKAKQ P HFFDFL G IGTA.....	359
AtMYB56	.VSERK V EM M RS G YYYFDFL G YCA.....	323
Consensus	f fl	

下划线表示 R2R3 结构域;方框表示核定位信号。

The underlined shows the R2R3 domain; the box represents the nuclear localization signal.

图 2 *GhMYB52* 与拟南芥中 MYB 转录因子保守域氨基酸序列比对分析

Fig. 2 The sequence alignment of MYB domain of *GhMYB52* and related protein from *A. thaliana*



红色分支为 R2R3 类 MYB 转录因子家族第 21 亚族。

Red branch represents the 21st subfamily of the R2R3 MYB transcription factor.

图 3 棉花 GhMYB52 蛋白与拟南芥中 R2R3 类 MYB 蛋白的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the GhMYB52 protein and R2R3 MYB protein in *A. thaliana*

2.3 GhMYB52 蛋白亚细胞定位

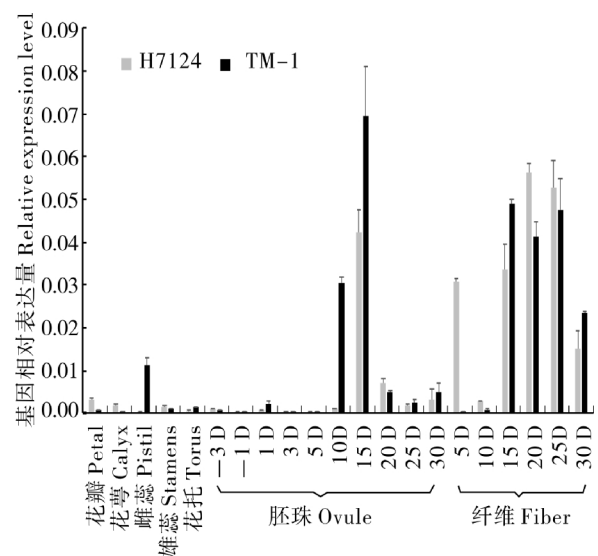
蛋白序列分析显示 GhMYB52 蛋白包含核定位信号。为了验证 GhMYB52 蛋白是否具有核定位特性, 在本氏烟叶片细胞中瞬时表达 GhMYB52, 结果(图 5)显示, 绿色荧光信号聚集在细胞核区域, 说明 GhMYB52 蛋白是 1 个核定位蛋白。

2.4 GhMYB52 转录激活活性分析

将转化得到的含 GhMYB52 基因的阳性单菌落涂在含有 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ AbA 抑制剂的 SD/-Trp 培养基上继续培养, 结果(图 6)表明, 菌落能够正常生长, 证明了 GhMYB52 具有转录激活活性, 是 1 个转录激活子。

2.5 GhMYB52 能与 NAC 类转录因子 GhFSN1 发生互作

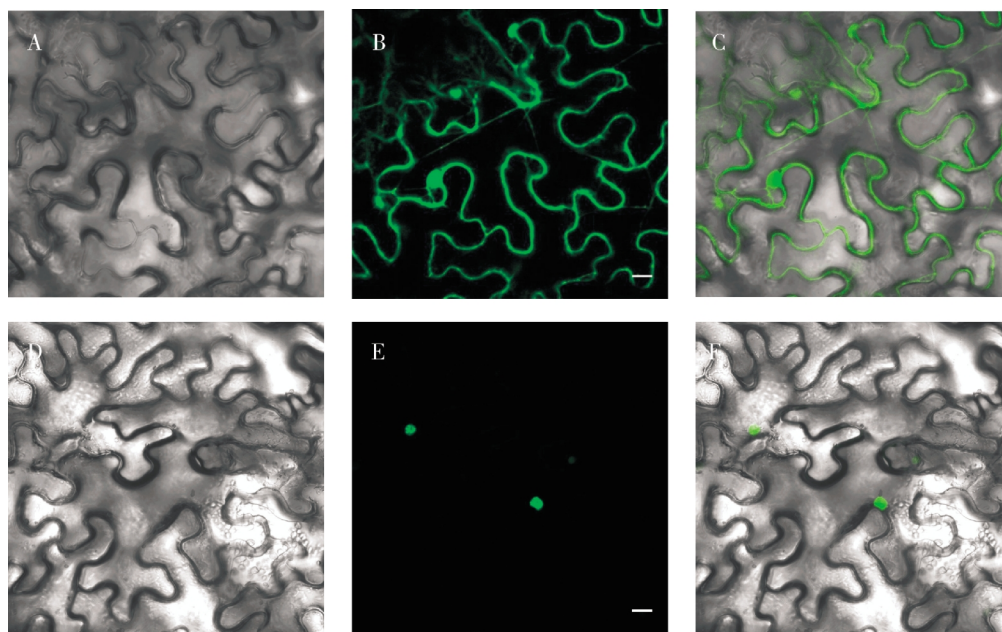
对过表达 GhFSN1 基因植株的转录组数据



D 代表开花后天数。D represents DPA.

图 4 GhMYB52 基因在棉花不同组织中的表达模式

Fig. 4 Expression profile of GhMYB52 gene in different tissues and different developmental stages

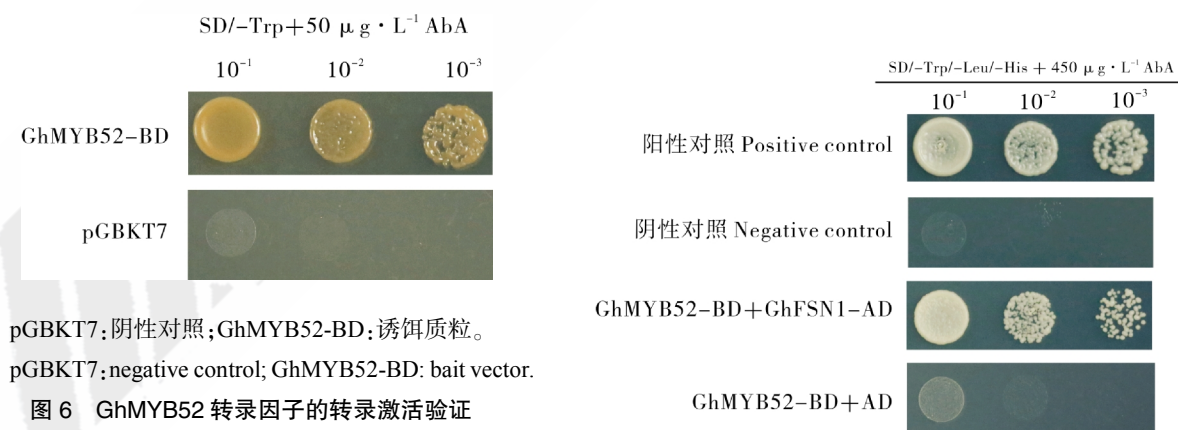


35S::GFP 蛋白(A~C)、35S::GhMYB52::GFP(D~F)在本氏烟(*N. benthamiana*)叶细胞中的亚细胞定位。A, D: 明场下的本氏烟表皮细胞; B, E: 488 nm 激发光下本氏烟表皮细胞; C, F: 明场和激发光下合并的本氏烟表皮细胞。标尺为 20 μm 。

Subcellular localization of 35S::GFP (A—C) and 35S::GhMYB52::GFP (D—F) in the leaf cells of *N. benthamiana*. A, D: Localization of GhMYB52-GFP in the epidermal cell of tobacco leaves under the bright field; B, E: Localization of GhMYB52-GFP in the epidermal cell of tobacco leaves under 488 nm excitation light; C, F: GFP in the tobacco cell of merged field. The scale bars was 20 μm .

图 5 *GhMYB52* 在本氏烟中的亚细胞定位

Fig. 5 Localization of GhMYB52 in leaf cells of *N. benthamiana*



pGBKT7: 阴性对照; GhMYB52-BD: 诱饵质粒。

pGBKT7: negative control; GhMYB52-BD: bait vector.

图 6 *GhMYB52* 转录因子的转录激活验证

Fig. 6 Assay of GhMYB52 transcriptional activation activity

分析,发现 *GhMYB52* 基因的表达呈现正相关的上调趋势^[16]。为了进一步研究 *GhMYB52* 参与棉花纤维次生壁加厚过程的机制,通过酵母双杂交试验的方法研究 *GhMYB52* 蛋白与 *GhFSN1* 蛋白之间的互作关系。酵母双杂交的结果(图 7)显示, *GhMYB52* 与 *GhFSN1* 之间能够发生较强的相互作用。

阳性对照: pGBKT7-p53 + pGAD-T-antigen; 阴性对照: pGBKT7 Lamin c + pGAD-T-antigen。

pGBKT7-p53 and pGBKT7 Lamin c were used as the positive and negative controls, respectively.

图 7 酵母双杂交验证 *GhMYB52* 与 NAC 类转录因子 *GhFSN1* 互作

Fig. 7 Interactions of GhMYB52 with the NAC transcription factor GhFSN by yeast-two hybridization assay

3 讨论

MYB 转录因子广泛存在于植物各类组织器官中。目前,关于 MYB 类转录因子的研究,主要集中在拟南芥、棉花、水稻等作物中^[19-24]。大量的 MYB 转录因子在植物的生长发育、细胞分化过程中发挥重要的作用^[25-29]。其中,MYB 转录因子在拟南芥的木质部导管细胞以及木质部、厚壁细胞的纤维细胞发育过程中的作用已经比较清楚:以 NAC 和 MYB 类转录因子为核心成员的一系列转录因子形成分级调控网络,调节下游的一系列 MYB 或者其他类转录因子参与次生壁中纤维素、半纤维素和木质素的合成过程^[30-34]。

拟南芥中 NAC 类转录因子基因 *SND1*,主要在拟南芥的维管束间纤维及木质部纤维细胞中特异性表达,过表达 *SND1* 能激活植物非厚壁组织细胞的次生壁合成,显性抑制 *SND1* 则能够引起维管束间纤维和木质部纤维次生壁的厚度显著下降。同时,*SND1* 能够调控下游的一些 MYB 类转录因子,如 *MYB52*、*MYB54*、*MYB85*、*MYB103* 等。在拟南芥中,抑制 *AtMYB52*、*AtMYB54* 基因的表达使得拟南芥束间纤维细胞壁的厚度明显下降^[35-36]。不同物种的同一亚族成员可能具有类似的功能。本研究从陆地棉 TM-1 中得到了 1 个 R2R3 类 MYB 转录因子 *GhMYB52*,氨基酸序列和进化树分析发现 *GhMYB52* 含有 1 个 R2R3 保守区和 1 个核定位区,与 *AtMYB52* 进化关系最近,同属第 21 亚族。在 TM-1、海 7124 中,*GhMYB52* 和其同源基因 *GbMYB52* 均在棉纤维次生壁加厚期优势表达,因此我们推测 *GhMYB52* 基因可能参与棉纤维次生壁加厚期的发育过程。

目前已经基本掌握了双子叶植物中次生壁的发育调控网络,但是棉纤维次生壁的发育过程是否存在同样的调控网络,目前尚不清楚。2017 年,李学宝团队发现棉花中的 NAC 类转录因子基因 *GhFSN1* 能够正向调控棉纤维次生壁厚度,过表达棉花植株的转录组数据表明,大量的 MYB 类转录因子受到调控,其中 *GhMYB52* 基因的表达受到 *GhFSN1* 的正向调控^[18]。我们通过酵母双杂交试验,在蛋白水平上验证了 *GhMYB52* 与 *GhFSN1* 之间能够发生较强的相互作用。

这一结果进一步表明 *GhMYB52* 基因在棉纤维次生壁发育过程中可能发挥重要的作用,为进一步研究棉花纤维次生壁加厚调控网络提供了依据。

4 结论

本研究在本实验室已有的研究基础上,通过一步克隆法,从陆地棉中克隆了 1 个 R2R3 类 MYB 转录因子基因。氨基酸序列保守性分析显示,该基因编码产物 N 端含有 1 个高度保守的 R2R3 结构域,且与拟南芥的 *AtMYB52* 基因具有较高的相似性,因此,将其命名为 *GhMYB52*。*GhMYB52* 基因的 cDNA 序列全长 672 bp,共编码 223 个氨基酸残基,蛋白的相对分子质量为 26.06 kDa,等电点为 9.83。瞬时转化烟草结果表明,*GhMYB52* 定位于细胞核,且具有转录激活活性。TM-1 中的表达分析结果显示,*GhMYB52* 基因在棉纤维次生壁加厚期优势表达。酵母双杂交的结果显示 *GhMYB52* 与正向调控棉纤维次生壁发育的 NAC 类转录因子 *GhFSN1* 发生较强的互作,表明 *GhMYB52* 可能参与棉纤维细胞次生壁的形成,但它在棉纤维次生壁发育过程中的作用机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘强,张贵友,陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用[J]. 科学通报,2000,45(14): 1465-1474.
Liu Qiang, Zhang Guiyou, Chen Shouyi. Structure and regulation of plant transcription factors[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(14): 1465-1474.
- [2] Dubos C, Stracke R, Grotewold E. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(10): 573-581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- [3] Roy S. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome [J]. Plant Signaling & Behavior, 2015, 11(1): 1559-2324. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1117723>
- [4] Wilkins O, Nahal H, Foong J, et al. Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors [J]. Plant Physiology, 2009, 149(2): 981-993. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132795>
- [5] Stracke R, Werber M, Weissshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001,

- 4(5): 447-456. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00199-0)
- [6] 薛英喜, 魏建华, 姜廷波, 等. 植物次生生长期 MYB 转录因子研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 374(13): 7650-7655. <https://doi.org/10.13989/j.cnki.0517-6611.2012.13.007.html>
- Xue Yingxi, Wei Jianhua, Jiang Tingbo, et al. Research progress on MYB transcription factors related to plant secondary growth [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2012, 374(13): 7650-7655.
- [7] Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, et al. NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 288. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00288>
- [8] Huwyler H R, Meier G F. Changes in the composition of cotton fibre cell walls during development[J]. Planta, 1979, 146(5): 635-642. <https://doi.org/10.2307/23374408>
- [9] 王娟. 棉花纤维伸长期与次生壁增厚期蛋白质组比较[J]. 作物学报, 2010, 36(11): 2004-2010. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2010.02004>
- Wang Juan. Comparison of proteome between cotton fiber elongation and secondary wall thickening period[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(11): 2004-2010.
- [10] Zhang T Z, Hu Y, Jiang W K. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 531-537. <https://doi.org/10.1038/nbt.3207>
- [11] Brown A, Affleck V, Kroon J, et al. Proof of function of a putative 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases from higher plants by mass spectrometry of product formation[J]. FEBS Letters, 2009, 583(2): 363-368. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.022>
- [12] Lee C H, O'Neill M A, Tsumuraya Y, et al. The irregular xylem 9 mutant is deficient in xylan xylosyl transferase activity [J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(11): 1624-1634. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm135>
- [13] Fang L, Tian R P, Chen J D, et al. Transcriptomic analysis of fiber strength in upland cotton chromosome introgression lines carrying different *Gossypium barbadense* chromosomal segments[J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(4): e94642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094642>
- [14] Ruan Y L, Xu S M, White R, et al. Genotypic and developmental evidence for the role of plasmodesmata regulation in cotton fiber elongation mediated by callose turnover[J]. Plant Physiology, 2004, 136(4): 4104-4113. <https://doi.org/10.2307/4356763>
- [15] Jiang Y J, Guo W Z, Zhu H Y, et al. Overexpression of *GhSusA1* increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality[J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(3): 301-312. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00662.x>
- [16] Zhang J, Huang G, Zou D, et al. The cotton (*Gossypium hirsutum*) NAC transcription factor (FSN1) as a positive regulator participates in controlling secondary cell wall biosynthesis and modification of fibers [J]. New Phytologist, 2018, 217(10): 625-640. <https://doi.org/10.1111/nph.14864>
- [17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- [18] 靳义荣, 宋毓峰, 白岩, 等. 林烟草钾离子通道基因 *NKT6* 的克隆与表达定位分析[J]. 作物学报, 2013, 39(9): 1602-1611. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2013.01602>
- Jin Yirong, Song Yufeng, Bai Yan, et al. Molecular cloning and expression analysis of potassium channel gene *NKT6* in *Nicotiana glauca* [J]. Acta Agronom Sinica, 2013, 39(9): 1602-1611.
- [19] Wang F Z, Chen M X, Yu L J, et al. OsARM1, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in regulation of the response to arsenic stress in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1868. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01868>
- [20] Butt H I, Yang Z, Gong Q, et al. *GaMYB85*, an R2R3 MYB gene, in transgenic *Arabidopsis* plays an important role in drought tolerance[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 142. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1078-3>
- [21] Zhu N, Cheng S, Liu X, et al. The R2R3-type MYB gene *OsMYB91* has a function in coordinating plant growth and salt stress tolerance in rice[J]. Plant Science, 2015, 236: 146-156. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.023>
- [22] Suo J, Liang X, Pu L, et al. Identification of *GhMYB109* encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1630(1): 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.08.009>
- [23] Nadeau J A. Stomatal development: New signals and fate determinants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(1): 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.10.006>
- [24] Velten J, Cakir C, Cazzonelli C I. A spontaneous dominant-negative mutation within a 35S::AtMYB90 transgene inhibits flower pigment production in tobacco[J/OL]. PLoS ONE, 2010, 5(3): e9917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009917>
- [25] Song S S, Qi T C, Huang H, et al. The Jasmonate-ZIM-Domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2011, 23(3): 1000-1013. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083089>
- [26] 杨晔, 潘腾飞, 潘东明. 中国水仙 *NtMYB1* 基因的克隆及表达分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(8): 1450-1457. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2013.08.009>
- Yang Ye, Pan Tengfei, Pan Dongming. Cloning and expression analysis of *NtMYB1* gene in Chinese *Narcissus* [J]. Journal of

- Tropical Crops, 2013, 34(8): 1450-1457.
- [27] Chen Y, Chen Z, Kang J, et al. *AtMYB14* regulates cold tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(1): 87-97. <https://doi.org/10.1007/s11105-012-0481-z>
- [28] Ko J H, Yang S H, Park A H, et al. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 2007, 50(6): 1035-1048. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03109.x>
- [29] Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, et al. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2007, 19(1): 270-280. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047043>
- [30] Mitsuda N, Ohme Takagi M. NAC transcription factors NST1 and NST3 regulate pod shattering in a partially redundant manner by promoting secondary wall formation after the establishment of tissue identity[J]. Plant Journal, 2008, 56(5): 768-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03633.x>
- [31] Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence[J]. The Plant Cell, 2005, 17(11): 2993-3006. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036004>
- [32] McCarthy R L, Zhong R Q, Ye Z H. MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50 (11): 1950-1964. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp139>
- [33] Zhong R Q, Lee C, Zhou J, et al. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2008, 20(10): 2763-2782. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061325>
- [34] Yamaguchi M, Goué N, Igarashi H, et al. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 906-914. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154013>
- [35] Yamaguchi M, Ohtani M, Mitsuda N, et al. VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(4): 1249-1263. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064048>
- [36] Zhong R Q, Demura T, Ye Z H. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2006, 18(11): 3158-3170. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047399> ●