

李晓筱,徐俊雄,刘 婵,等. 虎杖 MYB 转录因子 *PcMYB2* 基因的克隆与原核表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):50–55.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.23.012

虎杖 MYB 转录因子 *PcMYB2* 基因的克隆与原核表达

李晓筱,徐俊雄,刘 婵,王岩岩,伍 翔,覃建兵,柳忠玉

(长江大学生命科学学院,湖北荆州 434025)

摘要:为了探究 MYB(髓细胞组织增生病毒癌基因同源物)转录因子在虎杖苯丙烷代谢途径中的作用,以虎杖叶片为材料,通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得 1 个 MYB 转录因子,命名为 *PcMYB2*,GenBank 登录号为 MG020557。序列分析表明,*PcMYB2* 基因的 cDNA 序列全长为 938 bp,开放阅读框(ORF)为 738 bp,编码 245 个氨基酸,推测蛋白质分子质量为 27.917 ku。*PcMYB2* 编码的氨基酸序列具有 R2R3–MYB 类转录因子的共同特征,其 N 端具有 R2、R3 这 2 个 MYB 结构域,并且 R3 结构域中包含 1 个能与 bHLH 转录因子相互作用的[D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R 基序。进化树分析表明,*PcMYB2* 蛋白与苜蓿中参与原花青素调控的 MtPAR 聚为 1 组。将该基因的 ORF 片段连接到原核表达载体 pET20b 中,构建融合表达载体 pET20b–*PcMYB2*,转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta (DE3)中进行表达。SDS–PAGE(十二烷基硫酸钠–聚丙烯酰胺凝胶电泳)检测显示表达蛋白与预期大小一致,表明成功克隆 *PcMYB2* 基因的 cDNA 全长序列,构建的原核表达载体 pET20b–*PcMYB2* 可用于该基因的功能研究。

关键词:虎杖;MYB 转录因子;*PcMYB2*;原核表达;苯丙烷代谢;原花青素

中图分类号:S567.23⁺9.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2018)23–0050–05

MYB(v–myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, 即髓细胞组织增生病毒癌基因同源物)转录因子是最大的植物转录因子家族成员之一。目前已经发现的 MYB 转录因子不仅参与植物次生代谢调控、激素和环境因子的应答^[1–2],还对细胞分化、器官的形成、植物抗病具有重要的调节作用^[3]。苯丙烷类物质在植物中普遍存在,包括黄酮醇、木质素、花青素、原花青素、单宁等,MYB 转录因子对苯丙烷类代谢起重要的调控作用^[4]。

虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)是蓼科多年生草本植物,其根或根茎入药,传统中医临床用于治疗肝胆疾病、肺热咳嗽、疮痈肿毒以及烫伤烧伤、急性细菌性痢疾与各类炎症。虎杖根茎富含的白藜芦醇、类黄酮等药效成分都由苯丙烷类代谢途径得到^[5]。目前,对虎杖苯丙烷类代谢的研究多集中在结构基因上,例如白藜芦醇合成酶基因 *PcRS*^[6]、查尔酮合成酶基因 *PcCHS*^[7]等。而 MYB 转录因子对虎杖苯丙烷类代谢的调控作用鲜有报道。

笔者所在课题组前期已经从虎杖叶片中克隆到 1 个类黄酮代谢相关的 MYB 转录抑制因子 *PcMYB1*^[8]。在此基础上,本研究又从虎杖叶片中克隆了 1 个新的 MYB 转录因子 *PcMYB2*,对其进行生物信息学分析,构建 *PcMYB2* 基因的原核表达载体并诱导表达,为丰富 MYB 转录因子的功能奠定基础。

收稿日期:2018–03–25

基金项目:国家自然科学基金(编号:81803670);国家级大学生创新项目(编号:201810489013);长江大学校级大学生创新训练计划(编号:2017073)。

作者简介:李晓筱(1998—),女,湖北仙桃人,主要从事药用植物次生代谢研究。E–mail:xufzy2016@126.com。

通信作者:柳忠玉,博士,讲师,主要从事中药生物技术研究。E–mail:zyliu2004@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2017 年 1 月至 2018 年 2 月在长江大学进行。虎杖植株种植于长江大学苗圃。总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第 1 链合成试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、pMD18–T 载体购自 TaKaRa 公司。SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(RACE 为 cDNA 末端快速扩增技术)购自 Clontech 公司。

1.2 方法

1.2.1 虎杖叶片总 RNA 的提取和反转录 用 Trizol 法提取虎杖叶片总 RNA,用 cDNA 第 1 链合成试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA 备用,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 MYB 基因保守区域片段的获得 通过分析已公布的苯丙烷类代谢相关的 R2R3–MYB 转录因子的核酸序列和氨基酸序列,在保守区域设计简并引物 MYB12 和 MYB12(表 1)。以虎杖叶片 cDNA 为模板进行 RT–PCR(逆转录 PCR),PCR 反应条件如下:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物纯化后连接至 pMD18–T 载体,转化大肠杆菌 DH5α,挑取若干单菌落进行 PCR 检测,并送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 cDNA 的 3'端和 5'端扩增 3'RACE 和 5'RACE 第 1 链的合成按照试剂盒使用说明书进行。根据 MYB 基因的保守区域测序结果设计 3'RACE 和 5'RACE 引物(表 1),PCR 扩增并回收扩增产物,连接至 pMD18–T 载体,转化大肠杆菌 DH5α,PCR 检测筛选阳性克隆并测序。

1.2.4 *PcMYB2* 全长 cDNA 拼接及生物信息学分析 将获得的 MYB 保守区域片段和两端序列进行拼接,获得 *PcMYB2* 基

表 1 基因特异引物序列

引物类型	引物名称	引物序列 (5'→3')
保守区域片段引物	MYB2	GGAAAGTCCTGCAGGCTGAGNTGGAYNAAYT
	MYBr2	CAGATGAGTATGCCAAACGTTCTTDATYTCRIT
3'RACE 和 5'RACE 引物	3'GSP3	AATAGATGGTCTGCAATCGCGGCAAGA
	3'GSP4	CAAGATTGCCAGGACGAACAGAT
	5'GSP3	AACACTAGAAATTTCCGAGCCATCC
	5'GSP4	GCAAGGAAATCATCTCAATTTAAAT
	YORF2	CATG CC ATGGGGAGAAGAAAGCCA
基因 ORF 引物	YORFr2	CCGCTCGAG GAAATTTCCGAGCCA

因的 cDNA 全长序列。将 *PcMYB2* 序列在 NCBI(美国国立生物技术信息中心)数据库中用 BLAST 工具进行同源分析;利用开放阅读框(open reading frame,ORF)finder 软件分析开放阅读框;利用 Protparam 软件分析编码蛋白的氨基酸序列组成、分子质量、等电点等理化性质;采用 SWISS - MODELSOPMA 进行蛋白二级结构分析。利用 DNAMAN 软件进行多重序列比对;利用软件 Clustalx 2.1 和 MEGA 5 构建系统进化树。用作同源性和进化树分析的序列均来自于 GenBank,具体情况列于表 2。

表 2 多重序列比较和进化分析所用 MYB 蛋白

蛋白名称	蛋白编号	物种
AtMYB5	AT3G13540	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
VvMYB5a	AY555190	葡萄(<i>Vitis</i> spp.)
VvMYBPA1	AM259485	葡萄(<i>Vitis</i> spp.)
DkMYB4	AB503701	柿子(<i>Diospyros kaki</i>)
AtMYB123	At5g35550	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
DkMYB2	AB503699	柿子(<i>Diospyros kaki</i>)
MtPAR	HQ337434	苜蓿(<i>Medicago truncatula</i>)
PcMYB2	MG020557	虎杖(<i>Polygonum cuspidatum</i>)
AtMYB75	At1g56650	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
AtMYB113	At1g66370	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
PhAN2	AF146702	矮牵牛(<i>Petunia hybrida</i>)
VvMYBA1	AB097923	葡萄(<i>Vitis</i> spp.)

1.2.5 *PcMYB2* 基因原核表达载体的构建 根据原核表达载体和 *PcMYB2* 基因 cDNA 序列信息,设计 1 对特异性引物 YORF2 和 YORFr2 扩增该基因 ORF。PCR 扩增条件如下:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后,将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收。用 *Nco* I 和 *Xho* I 分别酶切 PCR 回收产物和原核表达载体,用 *T*₄ DNA 连接酶连接回收纯化的目的片段和切开的载体,并转化大肠杆菌 DH5 α ,经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切以及测序鉴定后获得的阳性克隆即为重组原核表达载体,将其命名为 pET20b - *PcMYB2*。

1.2.6 重组菌 pET20b - *PcMYB2*/Rosetta (DE3) 诱导表达 利用软件 *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 对 *PcMYB2* 序列进行稀有密码子分析。选择能提供稀有密码子的 *E. coli* Rosetta(DE3)菌株作为宿主菌。将测序正确的重组质粒 pET20b - *PcMYB2* 转化至表达菌株 *E. coli* Rosetta (DE3),得到重组菌 pET20b - *PcMYB2*/Rosetta (DE3)。挑取单菌落接种于含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的 LB 培养基内,37 ℃ 振荡过夜培养。次日以 1% 量接种于含有相应抗生素的 LB 培养基

内,37 ℃ 培养至 *D*_{600 nm} 约为 0.5 时,吸出 1 mL 菌液作对照,其余加入异丙基硫代半乳糖苷(简称 IPTG,终浓度为 0.5 mmol/L),诱导 3 h 后,收集 1 mL 菌液,将收集的菌液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,向沉淀中加入 200 μ L PBS(磷酸缓冲盐溶液),充分混匀后加入 50 μ L 5 \times SDS(十二烷基硫酸钠)上样缓冲液,100 ℃ 煮沸 10 min,4 ℃ 冷却。取 15 μ L 样品上样,用 12% SDS - PAGE(十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳)检测。电泳结束后,用考马斯亮蓝染色,最后成像分析。

2 结果与分析

2.1 虎杖 *PcMYB2* 基因的 cDNA 全长的获得及序列分析 提取虎杖叶片总 RNA 用于 RT - PCR,利用简并引物 MYB2 和 MYBr2,以 cDNA 为模板扩增 MYB 基因保守区域,挑选阳性克隆测序得到 1 个长 189 bp 的保守区域片段(图 1 - A)。设计特异引物 3'GSP3 和 3'GSP4,参照试剂盒说明书进行 3'RACE,扩增得到 1 个长 568 bp 的带有多聚 A 尾巴的片段(图 1 - B)。设计特异引物 5'GSP3 和 5'GSP4,参照试剂盒说明书进行 5'RACE,扩增得到 1 个长 849 bp 的片段(图 1 - C)。将获得的两端序列与保守区域片段序列进行拼接得到 1 个长 938 bp 的 cDNA 序列,命名该基因为 *PcMYB2* (GenBank 登录号为 MG020557)。

序列分析表明,*PcMYB2* 基因的 5'端有长度为 102 bp 的非编码区,3'端有长度为 98 bp 的非编码区,ORF 由 738 个核苷酸组成,编码 1 个含有 245 个氨基酸的蛋白质,起始密码子为 ATG(图 2 划线部分),终止密码子为 TAG(图 2)。利用 ExPASy 的软件 Protparam 预测 *PcMYB2* 编码蛋白的理化性质,推测该蛋白分子式为 C_{1 228} H₁₈₉₀ N₃₅₄ O₃₇₆ S₉,总原子数为 3 857 个,分子质量为 27.917 ku,理论等电点(pI)为 5.8。带正电荷的氨基酸残基(Arg + Lys)总数为 30 个,带负电荷的氨基酸残基(Asp + Glu)总数为 35 个。采用 SWISS - MODELSOPMA 进行 *PcMYB2* 的编码蛋白二级结构分析,*PcMYB2* 的编码蛋白二级结构中 α - 螺旋占 35.51%, β - 转角占 12.65%,延伸链占 12.24%,无规则卷曲占 39.59%。

2.2 虎杖 *PcMYB2* 蛋白的同源性分析及进化树构建 利用 Blast 进行同源性分析,结果表明,虎杖 *PcMYB2* 蛋白与苜蓿 MtPAR (HQ337434)、拟南芥 AtMYB5 (AT3G13540)、葡萄 VvMYB5a (AY555190)、柿子 DkMYB4 (AB503701)、葡萄 VvMYBPA1 (AM259485)、拟南芥 AtMYB123 (At5g35550)、柿子 DkMYB2 (AB503699)的氨基酸

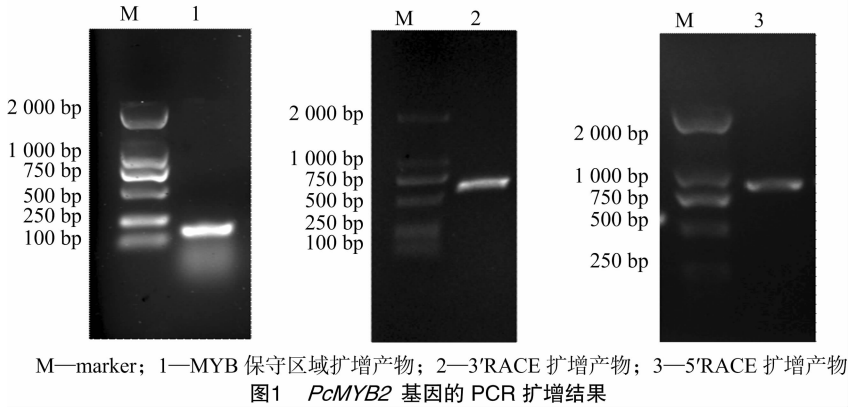


图1 *PcMYB2* 基因的 PCR 扩增结果

```
1 ATGGGGAGAAGAAAGCCATGTTATGTGAGTAATGAAGGGGTTAAGAGAGGAGCATGGACT
1 M G R R R K P C Y V S N E G V K R G A W T
61 CCTGAGGAGGACACCATTCCTCTCAATTTATTTCTCATGGTGAAGGCAAAATGGAAT
21 P E E D T I L S Q F I L S H G E G K W N
121 TCCCTTCCCAGGCGAGCAGGTCTTAAGAGATGCGGCAAGAGTTGTAGGCTTCGATGGCTG
41 S L P R R A G L K R C G K S C R L R W L
181 AATTATCTAAGGCCAGACATCAAGAGAGGGAATATAACCCCTGATGAAGAAGACCTCATT
61 N Y L R P D I K R G N I T P D E E D L I
241 GTTAGACTCCACAGCTTTTGGGCAACCGATGGTCGTTGATAGCAGGAAGACTACAGGA
81 V R L H K L L G N R W S L I A G R L P G
301 CGAACAGACAATGAAATCAAGAATTACTGGAACACTAGCCTGTGGAAGAAGCTAGAGGCA
101 R T D N E I K N Y W N T S L S K K L E A
361 GGGGCCTCAAAGACGGTTACTAGTCAAGATCCGATGATCAAAACAACCTTCATTAAGTGC
121 G A S K T V T S Q D P M I K T T S L K C
421 ATCCAAAAAATCACCTACAGGTGGCTGAAAATGAGATGCAGTTGTTTCATGGGTGAAAGC
141 I Q K N H L Q V A E N E M Q L F M G E S
481 TCCTCACATTACATGACTTAACCTACTGATCATGATGATGTTAATGACACTTTGAACATG
161 S P H Y N D L T T D H D D V N D T L N M
541 AGGTTTGAGTTCAATTATGAGTTGGGTACGGCAGAGGAAGGGTGAGAAATGAGGGGTCA
181 R F E F N Y E L G T A E E G W R N E G S
601 TTCTTCAATGGGGGTACAGGGGAAGATTATGGTGCACCGCCTGATCAGATACAGCACAAAG
201 F F N G G T G E D Y G A P P D Q I Q H K
661 GGCAATGAAATTGCAGATGACTTCAACTTCTTGACAAATTGCTGGATCATGAAGGCGGA
221 G N E I A D D F N F L A Q L L D H E G G
721 TGGCTCGGAAATTTCTAG
241 W L G N F *
```

图2 *PcMYB2* 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

序列一致性较高,相似性分别为 72%、72%、72%、68%、68%、66%、62%。

为研究 *PcMYB2* 蛋白与其他 MYB 蛋白的进化关系,选取其他物种参与原花青素和花青素代谢的 MYB 转录因子序列构建进化树,进化树可明显分为 2 个分支(图 3)。参与花青素调控的拟南芥 *AtMYB75*、拟南芥 *AtMYB113*、矮牵牛 *PhAN2*、葡萄 *VvMYBA1* 等序列聚为 1 支。而 *PcMYB2* 与参与原花青素调控的 MYB 转录因子聚在另外 1 个分支上,该分支上有拟南芥 *AtMYB5*、葡萄 *VvMYB5a*、柿子 *DkMYB4*、葡萄 *VvMYBPA1*、拟南芥 *AtMYB123*、柿子 *DkMYB2*、苜蓿 *MtPAR*。因此推测虎杖 *PcMYB2* 的功能可能与原花青素合成有关。

促进原花青素合成的 MYB 转录因子的 C 端差异很大,根据 C 端功能基序的不同,目前已知的促进原花青素合成的 MYB 可分为 4 个组^[9]。第 1 组 MYB 转录因子的 C 端具有 DDxF[S/P]SFL[N/D]SLIN[E/D]保守序列。第 2 组 MYB 转录因子的 C 端包括 V[H/Y][L/N]PKPxR,[S/T]L[E/D]KLY[E/D]EY[L/F]QLL 和 LD[S/Y]FAXSLL[I/V]保守序列。第 3 组 MYB 转录因子的 C 端具有 V[L/V]R[T/P][K/R]A[L/L/V][R/K]C 保守序列。第 4 组 MYB 转录因子

MtPAR 的 C 端不具有特定的保守序列。进化树分析表明,本研究中的虎杖 *PcMYB2* 与 *MtPAR* 的进化距离最近,同属于第 4 组(图 3)。

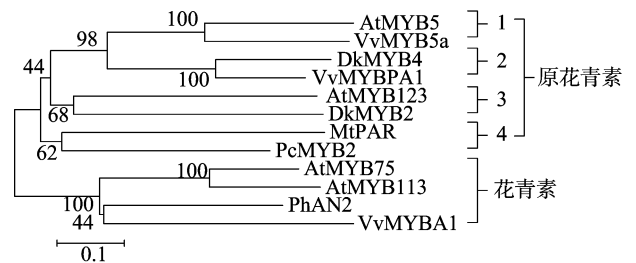
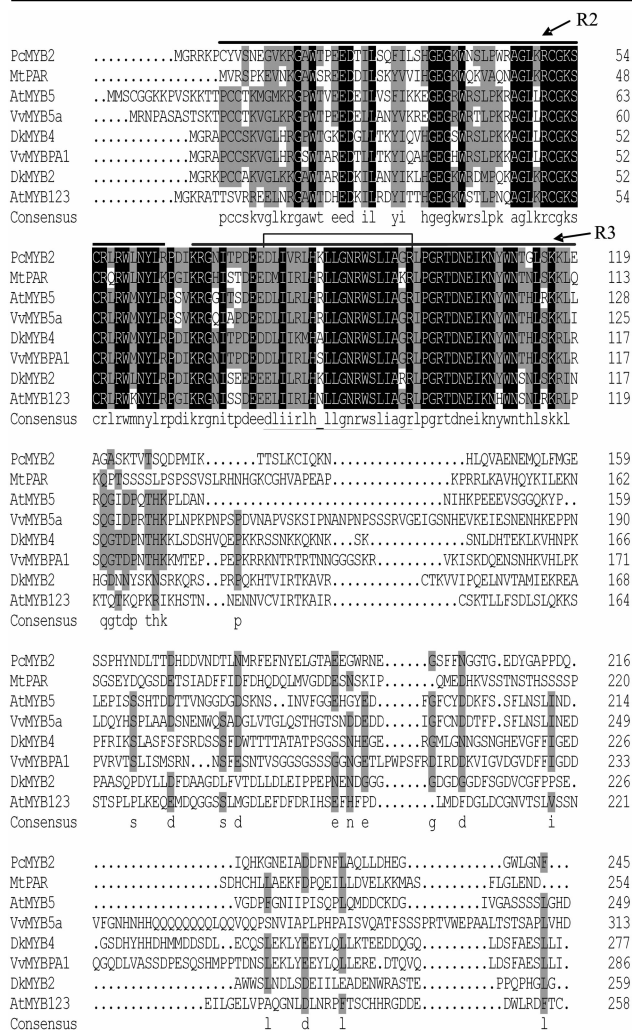


图3 *PcMYB2* 与其他物种 MYB 氨基酸序列的系统进化树分析

利用 DNAMAN 软件进行多重序列比对发现,虎杖 *PcMYB2* 蛋白与其他 MYB 转录因子的保守区域主要集中在 N 端,虎杖 *PcMYB2* 蛋白在 N 端具有 2 个典型的 MYB DNA 结合域,即 R2、R3 结构域,为典型的 R2R3 - MYB 转录因子(图 4)。*PcMYB2* 蛋白符合 R2R3 - MYB 类转录因子的特征,并且在 *PcMYB2* 蛋白 N 端的 R3 结构域中包含 1 个能与 bHLH 转录因子相互作用的 [D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R 基



横线部分为 R2、R3 结构域。方框表示与 bHLH 转录因子作用的 [D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₄Lx₃R 基序
图4 不同植物 MYB 氨基酸序列比对

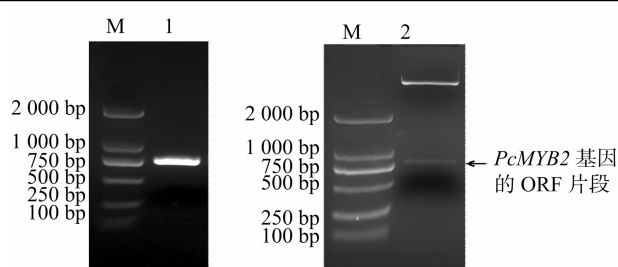
序。但是 PcMYB2 蛋白的 C 端不具有特定的保守序列。

2.3 原核表达载体 pET20b - *PcMYB2* 的构建

将 *PcMYB2* 基因的 ORF 区域 (738 bp) 构建到载体 pET20b 中, 获得原核表达载体 pET20b - *PcMYB2*。对原核表达载体 pET20b - *PcMYB2* 进行菌液 PCR 鉴定, 获得 1 条 738 bp 左右的特异性片段 (图 5 - A)。将原核表达载体 pET20b - *PcMYB2* 用 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切, 切出大小约为 738 bp 的片段, 该片段为 *PcMYB2* 基因的 ORF 片段, 如图 5 - B 的箭头所示。同时测序结果表明, 连入表达载体 pET20b 中的 *PcMYB2* 基因 ORF 片段与目的序列一致, 未出现碱基突变和移码现象。利用软件 *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 对 *PcMYB2* 基因 ORF 片段序列进行稀有密码子分析, 结果表明, *PcMYB2* 基因 ORF 片段序列的稀有密码子占 26%, 因此选择能提供稀有密码子的 *E. coli* Rosetta (DE3) 菌株作为宿主菌。将 pET20b - *PcMYB2* 质粒转化大肠杆菌感受态 *E. coli* Rosetta (DE3) 后, 得到重组菌 pET20b - *PcMYB2*/Rosetta (DE3)。

2.4 重组菌 pET20b - *PcMYB2*/Rosetta (DE3) 的诱导表达

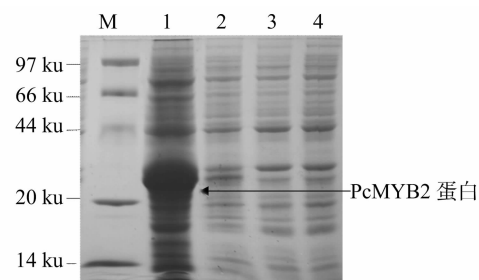
PcMYB2 基因的 ORF 由 245 个氨基酸组成, 理论蛋白质分子质量为 27.917 ku, 融合 His - Tag (组氨酸标签) 后理论分



M—marker; 1—PCR 扩增质粒 pET20b-*PcMYB2* 获得的目标片段; 2—质粒 pET20b-*PcMYB2* 双酶切结果

图5 重组质粒 pET20b-*PcMYB2* 的验证

子质量为 28.74 ku。由 12% SDS - PAGE 结果 (图 6) 可知, 与未诱导的重组菌 pET20b - *PcMYB2*/Rosetta (DE3) 相比, IPTG 诱导的重组菌 pET20b - *PcMYB2*/Rosetta (DE3) 出现特异条带, 特异条带的大小与理论值相符, 而空载体 pET20b/Rosetta (DE3) 菌种诱导前后均无特异条带表达。结果表明, 重组菌 pET20b - *PcMYB2*/Rosetta (DE3) 已成功表达目的蛋白 PcMYB2, 如图 6 箭头所示。



M—marker; 1—诱导 pET20b-*PcMYB2*/Rosetta (DE3); 2—未诱导 pET20b-*PcMYB2*/Rosetta (DE3); 3—诱导 pET20b/Rosetta (DE3); 4—未诱导 pET20b/Rosetta (DE3)

图6 pET20b-*PcMYB2*/Rosetta (DE3) 的 SDS-PAGE 分析

3 结论与讨论

已有的研究表明, 苜蓿 *MtPAR*、拟南芥 *AtMYB5*、葡萄 *VvMYBPA1*、拟南芥 *AtMYB123* 等均属于调控原花青素合成的转录激活因子^[10], 本研究的虎杖 *PcMYB2* 与这些 MYB 聚为 1 支, 推测 *PcMYB2* 可能是参与虎杖原花青素合成的转录激活因子。

虽然花青素和原花青素都受 MYB 调控, 但原花青素的调控比花青素要复杂。调控花青素合成的 *VvMYBA1*^[11]、*PhAN2*^[12]、*AtMYB75*^[13]、*AtMYB113*^[14] 等序列 C 端都具有保守 KPRPR^[S/T]F 序列。而调控原花青素合成的 MYB 的 C 端差异很大, 根据 C 端保守基序的不同 MYB 可分为 4 个组, 保守基序不同导致功能也发生了分化^[9]。例如, 拟南芥 *AtMYB5*、*AtMYB123* 由于 C 端保守基序不同而分属于 2 个不同的组。 *AtMYB123* 特异调控拟南芥种皮中原花青素的生物合成^[15], 而 *AtMYB5* 不仅调控原花青素合成, 还参与调控种皮发育和毛状体的形成^[16]。来自于葡萄的 *VvMYBPA1*^[17]、*VvMYBPA2*^[18]、*VvMYB5a*^[19] 和 *VvMYB5b*^[20] 分属于 3 个不同的组, 其中 *VvMYBPA1*、*VvMYBPA2* 在浆果成熟时特异调控原花青素合成, 但是 *VvMYB5a* 和 *VvMYB5b* 对原花青素和花青素合成均起调控作用。苜蓿中也有类似报道, 苜蓿 *MtPAR*^[21]、*MtMYB5* 和 *MtMYB14*^[22] 分属于 3 个组, 其中 *MtPAR* 特异调控苜蓿种皮中原花青素合成, 而 *MtMYB5* 和

MtMYB14 对苜蓿原花青素和黏液质都有调控作用。此外,桃 PpMYB7 调控原花青素合成,但该序列与前人报道的 4 组 MYB 转录因子皆不相同^[23]。综上所述,不同组 MYB 转录因子之间在序列、表达、功能上已产生分化,表明植物原花青素合成调控的复杂性。本研究的虎杖 PcMYB2 与苜蓿 MtPAR 的进化距离最近,同属于第 4 组,在 C 端都不具有保守基序,在 N 端的 R3 结构域中都包含 1 个能与 bHLH 转录因子相互作用的 [D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R 基序。MYB 转录因子往往通过 [D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R 基序与 bHLH 蛋白互作,才能充分发挥调控原花青素合成的作用^[15,24]。虽然 PcMYB2 与 MtPAR 具有类似的序列特点,但 PcMYB2 表达特性、调控模式及功能等,还需要通过进一步转化模式植物加以研究。

本研究中的 PcMYB2 基因 (GenBank 登录号为 MG020557) 与前期获得的 PcMYB1 基因^[8] 相比较,核酸序列相似性仅为 61%,氨基酸序列一致性低于 50%;PcMYB1 蛋白属于 Sg4 亚家族,是一个类黄酮代谢的转录抑制因子,而本研究的 PcMYB2 蛋白可能是参与原花青素合成的转录激活因子,推测 PcMYB1 和 PcMYB2 蛋白在苯丙烷代谢中具有不同的功能。稀有密码子的存在往往影响真核基因在原核系统中的表达^[25],为解决此问题,本研究选择能提供稀有密码子的 Rosetta(DE3) 菌株作为宿主菌,并成功表达 PcMYB2 蛋白。后续将纯化该蛋白用于体外凝胶迁移 (EMSA) 试验,从而鉴定 PcMYB2 蛋白与元件的作用情况,有利于进一步研究 PcMYB2 蛋白的生物学功能。

本研究从虎杖叶片中成功克隆了 1 个 R2R3 - MYB 类转录因子 PcMYB2 基因,PcMYB2 基因含有长为 738 bp 的开放读码框,编码 245 个氨基酸残基。PcMYB2 蛋白与苜蓿参与原花青素调控的 MtPAR 聚为一组。PcMYB2 蛋白的 N 端 R3 结构域中包含 1 个能与 bHLH 转录因子相互作用的 [D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R 基序。本研究构建了 PcMYB2 基因的原核表达载体 pET20b - PcMYB2,并在大肠杆菌表达菌株 Rosetta(DE3) 中成功表达。

参考文献:

- [1] Baldoni E, Genga A, Cominelli E. Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(7): 15811 - 15851.
- [2] Ambawat S, Sharma P, Yadav N R, et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses; an overview[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants; an International Journal of Functional Plant Biology, 2013, 19(3): 307 - 321.
- [3] Chezem W R, Clay N K. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs[J]. Phytochemistry, 2016, 131(11): 26 - 43.
- [4] Dixon R A, Liu C, Jun J H. Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(2): 329 - 335.
- [5] Yi T, Zhang H, Cai Z. Analysis of rhizoma *Polygoni cuspidati* by HPLC and HPLC - ESI/MS[J]. Phytochemical Analysis, 2007, 18(5): 387 - 392.
- [6] Liu Z Y, Zhuang C X, Sheng S J, et al. Overexpression of a resveratrol synthase gene (*PcRS*) from *Polygonum cuspidatum* in transgenic

- Arabidopsis* causes the accumulation of trans - piceid with antifungal activity[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(11): 2027 - 2036.
- [7] Shen Y L, Li X, Chai T Y, et al. Outer - sphere residues influence the catalytic activity of a chalcone synthase from *Polygonum cuspidatum* [J]. FEBS Open Bio, 2016, 6(6): 610 - 618.
 - [8] 柳忠玉, 雷 健, 李晓筱, 等. 虎杖转录因子 PcMYB1 基因的克隆及原核表达[J]. 河南农业科学, 2018, 47(1): 96 - 102.
 - [9] Hancock K R, Collette V, Fraser K, et al. Expression of the R2R3 - MYB transcription factor TaMYB14 from *Trifolium arvense* activates proanthocyanidin biosynthesis in the legumes *Trifolium repens* and *Medicago sativa* [J]. Plant Physiology, 2012, 159(3): 1204 - 1220.
 - [10] Liu J Y, Osbourn A, Ma P D. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. Molecular Plant, 2015, 8(5): 689 - 708.
 - [11] Kobayashi S, Goto - Yamamoto N, Hirochika H. Retrotransposon - induced mutations in grape skin color [J]. Science, 2004, 304(5673): 982.
 - [12] Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, et al. Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color [J]. Plant Cell, 1999, 11(8): 1433 - 1444.
 - [13] Zvi M M, 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.
 - [14] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, et al. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings [J]. Plant Journal, 2008, 53(5): 814 - 827.
 - [15] Sharma S B, Dixon R A. Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2005, 44(1): 62 - 75.
 - [16] Li S F, Milliken O N, Pham H, et al. The arabidopsis MYB5 transcription factor regulates mucilage synthesis, seed coat development, and trichome morphogenesis [J]. Plant Cell, 2009, 21(1): 72 - 89.
 - [17] Bogs J, Jaffé F W, Takos A M, et al. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development [J]. Plant Physiology, 2007, 143(3): 1347 - 1361.
 - [18] Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, et al. Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway [J]. Plant Physiology, 2009, 149(2): 1028 - 1041.
 - [19] Deluc L, Barrieu F, Marchive C, et al. Characterization of a grapevine R2R3 - MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway [J]. Plant Physiology, 2006, 140(2): 499 - 511.
 - [20] Deluc L, Bogs J, Walker A R, et al. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries [J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 2041 - 2053.
 - [21] Verdier J, Zhao J, Torres - Jerez I, et al. MtPAR MYB transcription factor acts as an on Switch for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(5): 1766 - 1771.
 - [22] Liu C, Jun J H, Dixon R A. MYB5 and MYB14 play pivotal roles in

王立,殷剑美,张培通,等. 兴化龙香芋脱毒快繁组培技术体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):55-59.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.013

兴化龙香芋脱毒快繁组培技术体系的建立与优化

王立,殷剑美,张培通,韩晓勇,郭文琦,李春宏

(江苏省农业科学院经济作物研究所,江苏南京 210014)

摘要:以兴化龙香芋茎尖为材料,通过设计 $L_9(3^3)$ 正交试验,以 MS + 30.0 g/L 蔗糖 + 6.0 g/L 琼脂为基本培养基,分别加入不同质量浓度的 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、噻苯隆(TDZ)、萘乙酸(NAA)和活性炭,进行兴化龙香芋脱毒快繁组培技术体系的研究。结果表明,兴化龙香芋愈伤组织的最佳诱导培养基为 MS + 0.5 mg/L TDZ + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA + 30.0 g/L 蔗糖,不定芽的最佳诱导培养基为 MS + 0.5 mg/L TDZ + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA + 30.0 g/L 蔗糖,不定芽增殖的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L TDZ + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L 6-BA + 30.0 g/L 蔗糖,组培苗生根的最佳培养基为 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 0.1 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L 活性炭 + 30 g/L 蔗糖。

关键词:兴化龙香芋;茎尖;组织培养;正交试验

中图分类号: S632.304⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0055-05

兴化龙香芋是江苏省泰州市兴化地区特有的芋头品种,其母芋近圆形,肉质白、粉而香,子芋少,呈椭圆形,肉质粉且糯^[1]。兴化龙香芋采用垛田种植,生长方式独特,种植历史悠久,耐贮运,品质优良,含有丰富的蛋白质、淀粉以及钙、铁等矿物质,是人们喜食的蔬菜品种之一。随着纪录片《舌尖上的中国》的热播,兴化的垛田龙香芋成功申请了国家地理标志保护,其品牌价值迅速提升,市场需求量巨大。但是,由于生产上常采用块茎繁殖龙香芋,长期的自繁留种易引起兴化龙香芋的种性退化,导致芋病毒病的普遍发生,从而严重影响兴化龙香芋的产量和品质^[2]。目前,采用组织培养技术对芋组织进行脱毒快繁的研究已有报道,通过组织培养脱毒技术不但可以降低芋植株的发病率,还能明显提高芋头的产量和品质^[3-5]。

正交试验不仅可以大大减少工作量,还可以通过分析极差和方差结果,发现组培过程中的关键因素,获得最佳培养条件和培养基最优组合,因此在植物组织培养中具有重要的应

用价值^[6]。本研究通过对兴化龙香芋茎尖组培技术进行研究,旨在建立并优化兴化龙香芋茎尖脱毒快速繁殖组织培养技术体系,探索兴化龙香芋农家优良品种脱毒复壮的有效方法,为优良龙香芋种源的生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择大小一致、外表无创伤的兴化龙香芋球茎,用 0.5% K_2MnO_4 浸泡 5 min 后,用沙土覆盖至整个芋块的 2/3 处,放置于光照培养箱中,在温度为 25℃、相对湿度为 70% 的条件下催芽 10 d 左右。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选取及消毒灭菌 待球茎顶芽生长到 3~4 cm 长时,剥除外层 2~3 层鳞片,切下顶芽,切成带球茎 1 cm³ 左右的芽,用流动的水冲洗 10 min。在无菌条件下进行以下操作:用 70% 乙醇表面消毒 2 次,每次 30 s,然后放在 5% 次氯酸钠溶液中消毒 10 min,最后用无菌水清洗 3~4 次,获得无菌外植体;使用体视显微镜和解剖针将顶芽外层的鳞芽剥除,获得长 1.0 mm 左右的茎尖生长点。

1.2.2 愈伤组织的诱导 在无菌条件下,对上述所得的无菌外植体进行不定芽的诱导。培养条件:白天温度为 (25 ± 1)℃,夜间温度为 (20 ± 1)℃,湿度为 65%~70%,光照度为 3 000 lx,光照时间为 12 h/d。诱导培养基以 MS + 30 g/L 蔗糖 + 6.0 g/L 琼脂为基本培养基(pH 值为 5.8),按照表 1 的配方分别添加 0.1、0.5、1.0 mg/L TDZ(噻苯隆),0.1、0.5、1.0 mg/L

收稿日期:2017-06-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31501776);江苏省自然科学基金(编号:BK20140752);江苏省农业科学院基本科研业务专项[编号:ZX(15)4014]。

作者简介:王立(1985—),男,河南郑州人,博士,副研究员,主要从事芋资源鉴定与种质创新方面的研究。E-mail:wljaas@163.com。

通信作者:殷剑美,博士,研究员,主要从事特色经济作物的研究工作。E-mail:yinjm2006@jaas.ac.cn。

seed coat polymer biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. Plant Physiology, 2014, 165(4):1424-1439.

[23] Zhou H, Lin W K, Liao L, et al. Peach MYB7 activates transcription of the proanthocyanidin pathway gene encoding leucoanthocyanidin reductase, but not anthocyanidin reductase [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6(10):908.

[24] Pireyre M, Burow M. Regulation of MYB and bHLH transcription factors: a glance at the protein level [J]. Molecular Plant, 2015, 8(3):378-388.

[25] 杜海,刘蕾,唐晓凤,等. 大豆 MYB 转录因子 GmMYBZ2 的鉴定、突变分析及原核表达 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(2):301-306.