

黑果枸杞 R1-MYB 转录因子基因的克隆及表达分析

王翠平¹, 陈建伟¹, 严莉^{1,2}, 乔改霞¹, 李健¹

1. 宁夏林业研究院 种苗生物工程国家重点实验室, 宁夏 银川 750004

2. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021

摘要: 目的 对可能参与花青素代谢调控的黑果枸杞 R1-MYB 转录因子基因进行克隆、生物信息学分析和不同品种、同一品种不同器官及盐胁迫条件下差异表达分析。方法 通过同源基因克隆和 RACE 方法得到黑果枸杞 R1-MYB 转录因子编码区全长, 通过转录组数据获得宁夏枸杞同源基因序列。通过 Prot、Param、Smart、PSORT 和 SOPMA 进行生物信息学分析, 通过 MEGA 5.0 构建 NJ 系统进化树。同时采用 Real-time PCR 的方法进行基因表达分析。结果 获得黑果枸杞 LrMYB1R1 (KY568981) 及宁夏枸杞 LbMYB1R1 (KY568982) 基因全长 cDNA, cDNA 编码区全长 1 496 bp, 编码区为 927 bp, 编码产物包含 308 个氨基酸, 编码蛋白相对分子质量分别为 33 400 和 33 490, 理论等电点分别为 7.80 和 7.78, 属于 R1-MYB 转录因子, 经预测其编码蛋白位于细胞核中; LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 与茄科植物番茄、马铃薯、烟草中的 MYB1R1-like 蛋白具有高度相似性。LrMYB1R1 的表达表现出器官和发育阶段中差异性, 具有品种特异性, LrMYB1R1 的表达受盐胁迫抑制。结论 丰富了对 R1 类 MYB 转录因子的研究, 为接下来的基因功能研究及利用基因工程手段提高黑果枸杞中花青素含量奠定基础。

关键词: 枸杞; R1-MYB 转录因子; 基因克隆; 生物信息学; real-time PCR; 表达分析

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)01-0203-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.028

Cloning and expression analysis of R1-MYB transcription factor in *Lycium ruthenicum*

WANG Cui-ping¹, CHEN Jian-wei¹, YAN Li^{1,2}, QIAO Gai-xia¹, LI Jian¹

1. Key State Laboratory of the Seedling Bioengineering, Ningxia Forestry Research Institute, Yinchuan 750004, China

2. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: Objective To clone the R1-MYB transcription factor participated in the anthocyanidin metabolism, and to analyze by bioinformatics analysis. Different expression of different varieties, different organs of the same species and salt stress conditions in *Lycium* were analyzed. To clone the full-length cDNA encoding R1-MYB, to perform bioinformatic analysis, and to study its expression in different cultivators and different developmental stage and in response to NaCl stress in *Lycium ruthenicum* and *L. barbarum*. **Methods** The full-length cDNA encoding R1-MYB was cloned using homology-based cloning and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique in *L. ruthenicum*, and the homologous gene was obtained by transcriptome in *L. barbarum*. The bioinformatics analysis was carried out by using Prot, Param, Smart, PSORT, and SOPMA methods. And the phylogenetic tree was constructed based on software MEGA5.0. Gene expression analysis was done by method of Real-time PCR. **Results** We the MYB transcription factor in *L. ruthenicum* was cloned and named as LrMYB1R1 (GenBank accession number KY568981), and LbMYB1R1 (GenBank accession number KY568982) in *L. barbarum*. Bioinformatics analysis showed that the length of LrMYB1R1 was 1 496 bp and the CDS was 927 bp. The coding products contained 308 amino acids, the molecular weight of the protein was 33 400 and 33 490, the theoretical isoelectric point was 7.80 and 7.78, belonging to the R1-MYB transcription factor, and the encoded protein is predicted to be located in the nucleus. The results of phylogenetic tree analysis showed that LrMYB1R1 and LbMYB1R1 were highly similar to MYB1R1-like protein in *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, and *Nicotiana tabacum*. Real-time PCR analysis showed that LrMYB1R1 had higher expression level in leaves and young fruits in *L. ruthenicum*, followed by stems, young leaves, flowers, purple fruits and black fruits, only slightly expressed in roots. In addition, the relative expression levels of LrMYB1R1 decreased in response

收稿日期: 2017-08-20

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (NZ16215)

作者简介: 王翠平 (1984—), 女, 博士, 研究方向为枸杞遗传育种。Tel: (0951)5667119 E-mail: wangcuiqingcas@163.com

to salt stress. **Conclusion** The study of R1 MYB transcription factor has been enriched, which has laid the foundation for the subsequent research on gene function and for the high-yielding anthocyanin by genetic engineering method in *L. ruthenicum*.

Key words: *Lycium ruthenicum* Murr.; R1-MYB transcription factor; gene cloning; bioinformatics; real-time PCR; expression analysis

MYB 是最大的植物转录因子基因家族之一, 具有高度保守的 DNA 结合结构域, 结合结构域通常包括 1~3 个不完全重复序列, 每个重复序列包含约 52 个保守氨基酸残基和间隔序列, 折叠成螺旋-转角-螺旋 (HTH) 结构, 根据重复序列的数量, MYB 转录因子可以分为 4 类: R2R3-MYB、R1-MYB、R3-MYB 和 R4-MYB^[1]。MYB 转录因子广泛参与植物次生代谢的调控, 以及对激素和环境因子的响应, 并且在调节植物细胞分化、器官发生、叶片形态发生以及抗病性中起重要作用^[2-6]。目前研究的大多数 MYB 转录因子属于 R2R3-MYB, 对 R1-MYB 的研究比较少。有证据表明^[7-10], R1-MYB 在植物生长、发育和胁迫反应中起作用。马铃薯 MybSt1 是植物中报道的第 1 个 R1-MYB 类转录因子。拟南芥 CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED CCA1 是 R1-MYB 转录因子, 与光信号转导相关^[7]。在马铃薯、羊草、玉米和麻风树中克隆得到 R1-MYB 转录因子, 并且表明其与胁迫耐受相关^[8-10]。

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 属于茄科枸杞属植物, 主要分布于中亚地区, 如中国、巴基斯坦、印度等, 在我国宁夏贺兰山、青海东部、新疆北部、内蒙古西部、陕西北部、甘肃和西藏等地皆有分布。黑果枸杞生长于干旱、盐碱胁迫严重的地方, 拥有着极强的抗逆能力, 富含多糖、色素、黄酮、多酚等活性成分^[11], 成为维、藏药中的常用药材^[12]。而黑果枸杞果实成熟后呈紫黑色, 花青素量丰富, 高于传统认为高花青素量的物种如蓝莓、黑加仑等, 被称为“花青素之王”^[13]。在本研究中, 为了克隆黑果枸杞中可能与花青素合成相关的转录因子, 本课题组通过同源基因克隆和 RACE 方法克隆得到了黑果枸杞 R1-MYB 转录因子基因, 命名为 LrR1MYB1, 并且在宁夏枸杞 (中科绿川 1 号) 中通过转录组数据分析, 得到了与 LrR1MYB1 同源的基因, 命名为 LbR1MYB1。同时, 本研究进行了生物信息学分析, 并且分析了 LrR1MYB1 在不同品种枸杞、黑果枸杞不同组织器官及盐胁迫条件下黑果枸杞中该基因的表达, 为进一步研究该基因的功能奠定基础, 也为对黑果枸杞花青素调控途径的研究提供依据。

1 材料

实验材料包括黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 中的宁黑 1 号和甘黑 2 号, 宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 中的宁杞 1 号、中科绿川 1 号、宁杞 3 号、宁杞 4 号、宁杞 5 号、宁杞 6 号、宁杞 7 号、宁杞 8 号、宁杞 9 号、精杞 3 号、0901 和 201401, 宁夏枸杞变种黄果枸杞 *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K. F. Ching 及枸杞 *Lycium chinense* Mill., 共 16 个枸杞品种, 取自宁夏林业研究院枸杞资源试验田 (中国银川), 常规栽培管理。于 2015 年 8 月采集材料, 分别采摘黑果枸杞成熟根、茎、叶、花和果实 (青果、紫果、黑果) 和其他 15 个枸杞品种幼叶, 材料采集后立即置于液氮中速冻, 存于 -80 °C 冰箱备用。

2 方法

2.1 样品采集及处理

选取黑果枸杞饱满种子, 于 70% 乙醇浸泡 30 s, 10% 次氯酸钠处理 10 min, 无菌水洗涤 7 次后, 播种于不含 NaCl 的 MS 组培瓶中, 培养箱生长条件为 25 °C, 12 h 光/12 h 暗光周期。生长 2 周后, 选取生长一致的黑果枸杞幼苗在含 250 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基中培养, NaCl 处理 0、6、12、24、48 h 后进行取样, 每种处理包括 3 个生物学重复, 每个重复包含 3 颗幼苗。取样后, 幼苗立即液氮速冻保存于 -80 °C。

2.2 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

RNA 提取采用 SDS-LiCl 沉淀法^[14], 用 DNase I (TaKaRa, 大连, 中国) 去除总 RNA 中可能存在的基因组 DNA 污染, 通过 M-MLV 逆转录酶 (TaKaRa, 大连, 中国) 进行逆转录, 获得 cDNA 第一链, 于 -20 °C 保存, 用于定量 PCR; 使用 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 试剂盒 (Clontech, Mountain View, CA, 美国) 合成 cDNA 第一条链, 用于 RACE。

2.3 LrMYB1R1 基因的克隆

根据对番茄 *Solanum lycopersicum* L.、甜椒 *Capsicum annuum* L.、矮牵牛 *Petunia hybrida* Vilm 等植物中 MYB 转录因子基因的多序列比对, 以保守区设计简并引物 (引物序列见表 1), 以 cDNA 为

表 1 基因克隆、荧光定量 PCR 扩增引物

Table 1 Primers used for gene cloning and real-time PCR experiments

引物名称	引物序列 (5'-3')	目的	扩增产物长度/bp
LrMYBIEST-F	GAGCACAAGCTATTCCTTTTGG	同源基因片段扩增	498
LrMYBIEST-R	CAATGTCAACGA(T/C)AA(C/T)GAAGATG		
GSP1	GATTACGCCAAGCTTGTGTGGGTGTGCGAGTCTTGACG	5'RACE 扩增	
NGSP1	GATTACGCCAAGCTTCCTAGAGATTCTCTCCAATCTCCTTTTC		
GSP2	GATTACGCCAAGCTTCGGTTCATCTTTATTCATCCGGTCG	3'RACE	
NGSP2	GATTACGCCAAGCTTGCCTGTTGTTCCACTGTCAAATTCATC		
LrMYB1R1F	CGGTGCCTGTTGTTCCACT	荧光定量 PCR	161
LrMYB1R1R	CTTGAAATCCTGAGTGCCTAGTAG		
ActinF	AACCACTGCTGAACGGGAAAT	荧光定量 PCR 内参基因	195
ActinR	CATGGATGGCTGGAAGAGGAC		

模板扩增, PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (TaKaRa, 中国) 进行扩增, 按说明书进行。反应产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 Wolact[®] DNA Products Clean-up Kit 试剂盒进行切胶回收, 回收产物用 pMDTM 18-T Vector Cloning Kit 连接至 pMD18T 载体, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 选择阳性单菌落 PCR 鉴定后送往北京六合华大基因科技有限公司测序, 测序后获得 LrMYB1R1 部分序列。

根据 LrMYB1R1 部分序列设计 GSP 和 NGSP 引物, 使用 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) 分别进行 5' 和 3' RACE, PCR 程序: 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 min, 72 °C 延伸 3 min 共循环 25 次, 反应产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目的条带, 与 Lineareized pRACE vector (由 Clontech SMARTer RACE 5'/3' Kit 提供) 载体连接, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 选择阳性单菌落 PCR 鉴定后送往北京六合华大基因科技有限公司测序, 测序后获得 LrMYB1R1 5' 和 3' 端序列, 使用 DNAMAN 拼接序列, 获得 LrMYB1R1 完整序列。LbMYB1R1 序列由宁夏枸杞 (中科绿川 1 号) 转录组数据序列比对获得。

2.4 生物信息学分析

使用 NCBI 中的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) Finder 工具预测目标基因的寻找编码框; 通过 ProtParam (<http://web.expasy.org/ProtParam/>) 和 Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线软件对该基因编码蛋白的基本理论性质和保守结构域

进行初步分析; ProtScale 分析蛋白质疏水性; PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) 分析蛋白的亚细胞定位预测; SOPMA 软件预测蛋白的二级结构; NCBI 平台进行 Blast 同源比对分析, Clustalx (Ver.1.83) 软件进行多序列对齐和排序, MEGA 5.0 构建 NJ 系统进化树, 比对序列包括 11 种植物 MYB 转录因子, 包括黑果枸杞 *L. ruthenicum* Murr. (LrMYB1R1)、宁夏枸杞 *L. barbarum* L. (LbMYB1R1)、烟草 *Nicotiana tabacum* L. (XP_016441775.1)、番茄 *S. lycopersicum* Mill. (XP_004236161.1)、马铃薯 *Solanum tuberosum* L. (XP_006344987.1)、甜椒 *Capsicum annuum* L. (XP_016578317.1)、牵牛 *Ipomoea nil* L. (XP_019154450.1)、芝麻 *Sesamum indicum* L. (XP_011071772.1)、长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (ABL63124.1)、蓖麻 *Ricinus communis* L. (EEF52080.1)、狭叶羽扇豆 *Lupinus angustifolius* L. (OIW18369.1)。

2.5 基因差异表达分析

采用 Real-time PCR 方法, 检测 LrMYB1R1 在不同品种枸杞, 黑果枸杞不同器官及黑果枸杞在 250 mmol/L NaCl 胁迫的表达变化。选用枸杞 LbActin (HQ415754) 作为内参, 引物序列见表 1。反应体系为: 模板 cDNA 2 μ L (10 ng/ μ L), 上下游引物分别为 1 μ L (2 μ mol/L), SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (QPK-201, TOYOBO, Osaka, 日本) 10 μ L, ddH₂O 6 μ L。PCR 反应程序: 95 °C、2 min, 95 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、30 s, 40 个循环, 每个样品做 3 个重复。所用仪器为 Bio-Rad IQ5 Real-time PCR 仪, 相对表达量的计算采用

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[15]。采用 SPSS 20.0 对表达量进行显著性分析, 每处理重复 3 次。

3 结果与分析

3.1 黑果枸杞 LrMYB1R1 基因的克隆与序列分析

如图 1 所示, 通过简并引物 LrMYB1R1EST-F 和 LrMYB1R1EST-R 获得长度为 498 bp 的 LrMYB1R1 基因片段; RACE 扩增获得 566 bp 的 5'端序列和 539 bp 的 3'端序列。通过将中间片段、3'端序列和 5'端序列拼接, 得到全长为 1 496 bp 的 LrMYB1R1 基因全长 cDNA 序列。使用编码区引物扩增获得 927 bp 的

编码区序列。该基因包含 99 bp 的 5'非编码区、470 bp 的 3'非编码区和 927 bp 的编码区, 可编码 308 个氨基酸, 被命名为 LrMYB1R1, 并将基因序列提交 GenBank 数据库, 登录号为 KY568981。LbMYB1R1 序列由宁夏枸杞(中科绿川 1 号)转录组数据序列比对获得, 序列全长 1 406 bp, 编码区长 927 bp, 编码 308 个氨基酸, 基因登陆号为 KY568982。这 2 个基因 cDNA 编码长度均为 927 bp, 与 LbMYB1R1 编码区相比, LrMYB1R1 存在 12 个碱基差异, 蛋白序列存在 5 个氨基酸差异(图 1)。

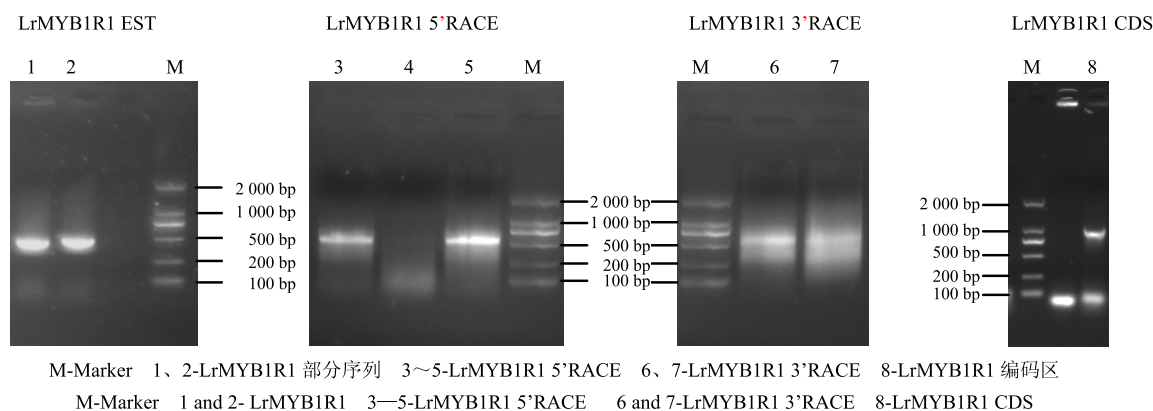


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

3.2 黑果枸杞 LrMYB1R1 基因及中科绿川 1 号 LbMYB1R1 的生物信息学分析

3.2.1 LrMYB1R1 与 LbMYB1R1 蛋白基本理化性质和保守结构域分析 通过 ORF Finder 在线工具找到 LrMYB1R1 与 LbMYB1R1 的 ORF, 其编码区长均为 927 bp, 编码 308 个氨基酸。使用 ProtParam 在线软件分析该蛋白序列的理化性质表明, LrMYB1R1 蛋白的分子式为 $C_{1439}H_{2291}N_{427}O_{473}S_8$, 相对分子质量为 33 400, 等电点为 7.80, 丝氨酸(Ser)、亮氨酸(Leu)、天冬酰胺(Asn)、甘氨酸(Gly)在氨基酸序列组成中出现频率较高, 分别占 16.9%、9.1%、7.5%和 7.5%, 而一些氨基酸如脱落酸(Pyl)、胱氨酸(Sec)在氨基酸序列中则没有出现。不稳定性系数(instability index, II)为 50.16, 为不稳定蛋白。总平均亲水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -0.493, 脂肪系数(aliphatic index, AI)为 73.67, 说明该蛋白质亲水区域多于疏水区域, 为亲水蛋白; LbMYB1R1 蛋白的分子式为 $C_{1447}H_{2300}N_{426}O_{473}S_8$, 相对分子质量为 33 490, 等电点为 7.78, Ser、Leu、Gly、Asn 在氨基酸序列组成

中出现频率较高, 分别占 16.2%、8.8%、7.5%和 7.1%, 而一些氨基酸如 Pyl、Sec 在氨基酸序列中则没有出现。II 为 56.23, 为不稳定蛋白。GRAVY 为 -0.489, AI 为 73.99, 为亲水蛋白。

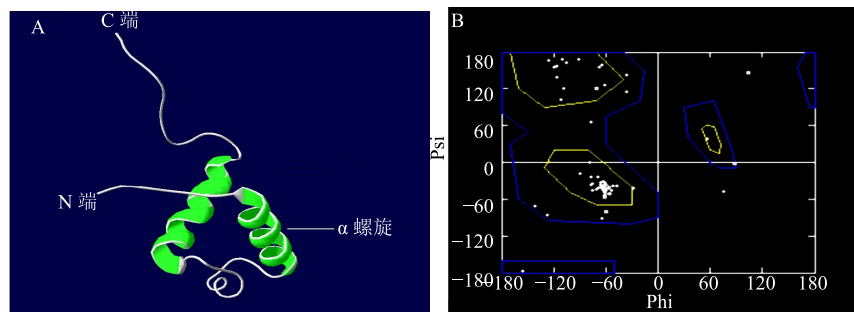
通过 Smart 分析表明 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 蛋白在氨基酸序列第 99~149 可能含有一个 SANT 结构域, 属于 R1-MYB 转录因子。

3.2.2 LrMYB1R1 蛋白磷酸化和糖基化位点 蛋白质的修饰方式包括蛋白质的磷酸化和糖基化, 它可以调节蛋白质的活力和功能。分别运用 NetPhos 2.0 Serve 和 DictyOGlyc 1.1 Server 在线软件预测 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 基因翻译后磷酸化、O-糖基化修饰情况。结果显示, LrMYB1R1 蛋白可能发生磷酸化修饰的位点有 48 个, 其中 Ser、苏氨酸(Thr)、酪氨酸(Tyr)可能发生磷酸化修饰的位点分别有 36、11、1 个; 有可能发生 O-糖基化修饰的位点有 2 个。LbMYB1R1 蛋白有可能发生磷酸化修饰的位点有 46 个, 其中 Ser、Thr、Tyr 可能发生磷酸化修饰的位点分别有 34、11、1 个; 有可能发生 O-糖基化修饰的位点有 3 个。

3.2.3 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 亚细胞定位和蛋白的二、三级结构预测 根据 PSORT 在线软件预测表明 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 蛋白主要定位于细胞核中。使用 SOPMA 软件预测 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 蛋白的二级结构, LrMYB1R1 蛋白 α 螺旋 (h) 占 11.36%、 β -折叠 (e) 占 25.32%、 β -转角 (t) 占 6.17%, 无规卷曲 (c) 占 57.14%; LbMYB1R1 蛋白 α 螺旋 (h) 占 11.36%、 β -折叠 (e) 占 26.30%、 β -转角 (t) 占 5.52%, 无规卷曲 (c)

占 56.82%。

经过同源建模构建了黑果枸杞 LrMYB1R1 编码蛋白质的三维空间结构 (图 2-A), 从图可看出由 1 个 SANT 结构域, 折叠成 HTH 构型, 可以与目标 DNA 双螺旋结构的大沟特异结合, 从而发挥其功能^[2]。Ramachandram 能量图 (图 2-B) 分析显示有 98.70% 的氨基酸残基处于能量稳定区域。LbMYB1R1 编码蛋白质三级结构与 LrMYB1R1 相似。



A-三维结构模型 B-Ramachandram 能量图, 其中 Psi 与 Phi 表示蛋白质的二面角

A-Three-dimensional structure predicted by Swiss-Model B-Ramachandram plot. Protein dihedral angle are represented in symbol Psi and Phi

图 2 黑果枸杞 LrMYB1R1 蛋白的三维空间结构

Fig. 2 Three-dimensional structure of LrMYB1R1 protein constructed by homology-based modeling

3.2.4 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 蛋白氨基酸序列的同源比对及进化树分析 在 NCBI 上筛选出与 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 基因氨基酸序列相似性较高的 9 个不同物种的 MYB 蛋白, 并将其与 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 基因预测的氨基酸序列进行多序列比对。结果显示, LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 蛋白氨基酸序列与其他 MYB 氨基酸序列在 N 端有较高的保守性, 但在 MYB 蛋白 C 末端启动子结构域保守性较低 (图 3), 这可能是 MYB 蛋白具有多种多样调节作用的原因^[3-4]。

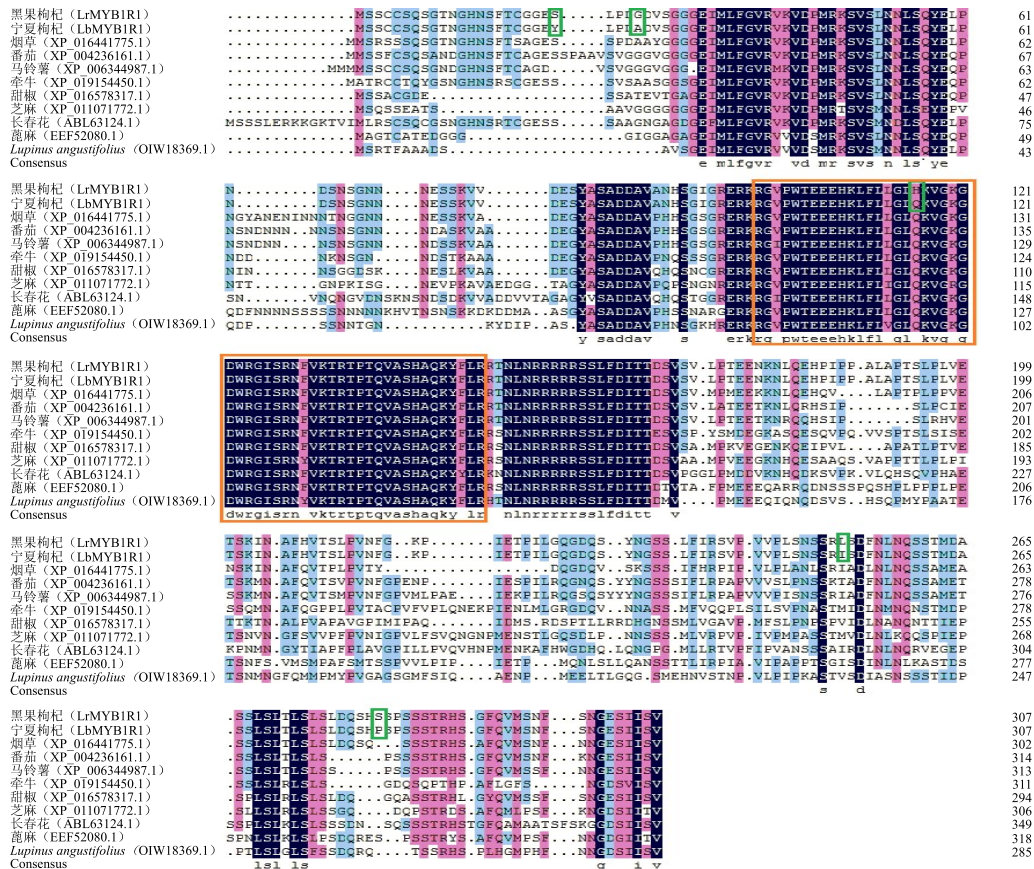
氨基酸同源比对分析表明 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 蛋白与茄科植物番茄、马铃薯、烟草 MYB1R1-like 蛋白氨基酸序列相似性较高, 分别达到 75%、73%、76%和 75%、73%、77%。使用 MEGA5.0 构建的 NJ 进化树 (图 4) 显示 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 蛋白同番茄、马铃薯、烟草进化关系较近, 表现出较高的同源性, 但与其他科植物同源性较低, 这表明 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 在植物间存在一定分化, 在同类型植物间表现出较高的保守型。

3.3 LrMYB1R1 基因组织特异性表达分析

利用 Real-time PCR 的方法分析了

LrMYB1R1 在不同品种枸杞, 黑果枸杞不同器官, 及胁迫条件下黑果枸杞幼苗中的差异表达情况。结果表明 LrMYB1R1 基因在黑果中具有器官和不同发育阶段的差异性。在老叶和青果中的相对表达量分别达到 49.27 和 42.05; 茎、幼叶、花、紫果和黑果中的表达量次之, 分别达到 30.99、27.49、15.24、19.40 和 10.71; 在根中表达量最低, 为 1.00 (图 5)。

分析 LrMYB1R1 基因在 16 个枸杞品种中的表达差异, 发现 LrMYB1R1 在韩国枸杞中表达最高, 宁杞 3 号次之, 在中科绿川 1 号、宁杞 1 号、宁杞 4 号、宁杞 5 号、宁杞 6 号、宁杞 7 号、宁杞 8 号、宁杞 9 号、宁黑 1 号、甘黑 2 号、精杞 3 号、黄果枸杞、0901 和 201401 中的表达量最低 (图 6)。检测 LrMYB1R1 基因在不同时间 NaCl (250 mmol/L) 胁迫条件下的表达差异 (图 7), 发现随着 NaCl 处理时间的延长, LrMYB1R1 基因表达量的变化趋势为先降低后升高, 其中在 2 h 时表达量显著下降, 在 24 h 时显著升高 ($P < 0.05$), 这表明 LrMYB1R1 可能参与黑果枸杞盐胁迫的响应。



黑色表示完全相同, 粉色和蓝色表示部分相同, 绿色方框表示黑果枸杞和宁夏枸杞氨基酸差异位点, 棕色方框区为 LrMYB1R1 蛋白的 1 个 SANT 结构域
Black area-the same sequence, pink and blue area-partial matching, green rectangle-different aa sites between *L. barbarum* and *L. ruthenicum*, orange rectangle-one SANT motif in MYB1R1 proteins

图 3 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 与其他 9 种植物同源蛋白的氨基酸序列比对结果

Fig. 3 Structure and sequence alignment analysis among LrMYB1R1, LbMYB1R1, and MYB1R1 homologs of nine plants

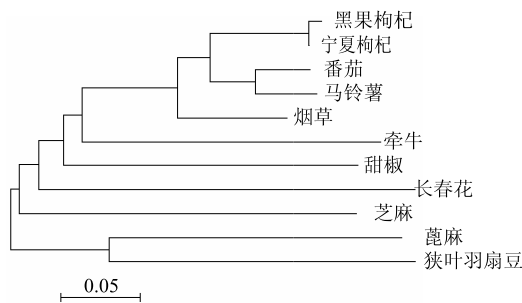
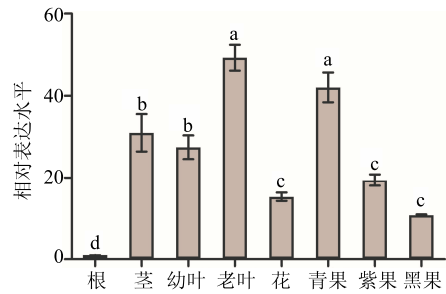


图 4 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 氨基酸序列与其他物种 R1-MYB 亚家族的聚类分析

Fig. 4 Clustering analysis of LrMYB1R1, LbMYB1R1 and other R1-MYB subfamily based on amino acid sequences

4 讨论

本研究从黑果枸杞中克隆获得了 LrMYB1R1 基因, 该基因序列全长 1 496 bp, 其 ORF 为 927 bp, 编码 308 个氨基酸的蛋白质。并通过中科绿川 1 号转录组数据获得其同源基因 LbMYB1R1 序列,

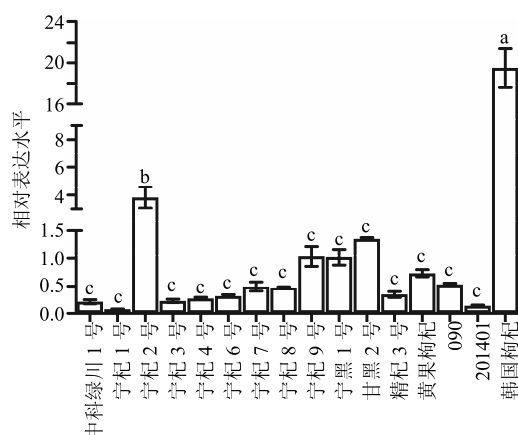


小写字母表示不同器官和果实基因表达差异显著性 ($P < 0.05$)

Letters indicate significant differences in different organs ($P < 0.05$)

图 5 LrMYB1R1 基因在黑果枸杞各器官和果实中的表达分析
Fig. 5 Real-time PCR analysis of LrMYB1R1 in different organs and fruits of *L. ruthenicum*

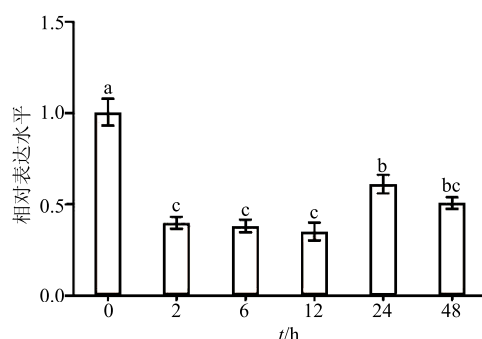
该基因序列全长 1 406 bp, 其 ORF 为 927 bp, 编码产物包含 308 个氨基酸。通过在线分析表明 LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 均定位于细胞核中, 本课题组也构建了 GFP 亚细胞定位载体, 对该结论



小写字母表示不同枸杞品种基因表达差异显著性 ($P < 0.05$)
Letters indicate significant differences in different wolfberry species ($P < 0.05$)

图 6 LrMYB1R1 基因在 16 个枸杞品种中的表达分析

Fig. 6 Real-time PCR analysis of LrMYB1R1 in 16 wolfberry species



小写字母表示不同胁迫时间基因表达差异显著性 ($P < 0.05$)
Letters indicate significant differences in different treatment times ($P < 0.05$)

图 7 LrMYB1R1 在不同时间 NaCl 胁迫下的表达分析

Fig. 7 Real-time PCR analysis of LrMYB1R1 in different treatment times of NaCl stress

进行进一步验证。通过 SMART 在线预测 LrMYB1R1 和 LbR1MYB1 均含有 1 个 SANT 结构域, 属于 R1-MYB 转录因子。枸杞属植物, 黑果枸杞和宁夏枸杞的 LrMYB1R1 和 LbR1MYB1 保守性较高, 仅有 5 个氨基酸位点的差异。通过同源性分析和进化树分析表明, LrMYB1R1 和 LbMYB1R1 基因的氨基酸序列与茄科植物番茄、马铃薯、烟草 MYB1R1-like 蛋白氨基酸序列相似性较高 (图 5)。

虽然 MYB 转录因子在植物中研究很多, 但是对 MYB 转录因子的研究主要集中于 R2R3-MYB, 对 R1-MYB 的研究还相对较少。MYB 转录因子的功能主要集中于细胞发生、二级代谢、疾病和激素

反应及细胞循环中的转录调控, 而 R1-MYB 的功能则为光节律反应^[7,16], 根毛形成^[9]等。也有研究表明, R1-MYBke 参与了胁迫响应^[8,10]。番茄 R1-MYB 转录因子 ASR1 参与盐胁迫下的气孔的关闭^[17]。JcR1MYB1 基因参与 PEG、盐、低温胁迫下表达量显著上调^[10]。Cai 等^[18]发现 TaMYB3R1 基因参与小麦对干旱、盐和冷胁迫的响应。Shin 等^[19]发现 StMYB1R-1 基因过表达可以增加马铃薯对干旱胁迫的耐受性。研究发现 R1MYB1 在不同品种的枸杞中的表达出现了差异性, 而在黑果枸杞不同组织和器官中也出现了差异表达。而 NaCl (250 mmol/L) 胁迫处理后, LrMYB1R1 基因表达量降低。LrMYB1R1 基因的表达存在明显的组织特异性、品种特异性, 且盐胁迫抑制了该基因的表达。本研究丰富了目前相对较少的 R1-MYB 类转录因子的研究, 为后期的基因功能研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Baldoni E, Genga A, Cominelli E. Plant MYB transcription factors: Their role in drought response mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7): 15811-15851.
- [2] Du H, Zhang L, Liu L, *et al.* Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family [J]. *Biochemistry*, 2009, 74(1): 1-11.
- [3] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, *et al.* MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573-581.
- [4] Yang X Y, Li J G, Pei M, *et al.* Over-expression of a flower-specific transcription factor gene AtMYB24 causes aberrant anther development [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(2): 219-228.
- [5] Waites R, Selvadurai H R N, Oliver I R, *et al.* The phantastica gene encodes a myb transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum* [J]. *Cell*, 1998, 93(5): 779-789.
- [6] Chen Y S, Chao Y C, Tseng T W, *et al.* Two MYB-related transcription factors play opposite roles in sugar signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 93(3): 299-311.
- [7] Wang Z Y, Tobin E M. Constitutive expression of the circadian clock associated 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression [J]. *Cell*, 1998, 93: 1207-1217.
- [8] Jia G, Li B, Zhang D, *et al.* Cloning and characterization of a novel R1-MYB transcription factor in maize [J]. *Prog Nat Sci*, 2009, 19(9): 1089-1096.
- [9] Klinge B, Lange T, Werr W. The ibp genes of maize are

- expressed in non-meristematic, elongating cells of the seedling and in abortive floral organs [J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 255(3): 248-257.
- [10] Li H L, Guo D, Peng S Q. Molecular characterization of the *Jatropha curcas* *JcR1MYB1* gene encoding a putative R1-MYB transcription factor [J]. *Genet Mol Biol*, 2014, 37(3): 549-555.
- [11] 冯美玲, 王书芳, 张兴贤. 枸杞子的化学成分分析 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 265-268.
- [12] 郑国琦, 胡正海. 宁夏枸杞的生物学和化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 796-800.
- [13] 孙楠, 杜连平, 孙跃宁, 等. 黑果枸杞、枸杞、黑加仑中原花青素含量对比研究 [J]. 食品与药品, 2013, 15(4): 275-277.
- [14] Hua X J, van de Cotte B, van Montagu M, *et al.* The 5' untranslated region of the *At-P5R* gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation [J]. *Plant J*, 2001, 26(2): 157-169.
- [15] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [16] Kuno N. The novel MYB protein early-phytochrome-responsive1 is a component of a slave circadian oscillator in arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(10): 2476-2488.
- [17] Campos J F, Cara B, Perez-Martin F, *et al.* The tomato mutant *ARS1* (altered response to salt stress 1) identifies an R1-type MYB transcription factor involved in stomatal closure under salt acclimation [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(6): 1345-1356.
- [18] Cai H, Tian S, Liu C, *et al.* Identification of a *MYB3R* gene involved in drought, salt and cold stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Gene*, 2011, 485(2): 146-152.
- [19] Shin D, Moon S J, Han S, *et al.* Expression of *StMYB1R-1*, a novel potato single MYB-like domain transcription factor, increases drought tolerance [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(1): 421-432.