

# “苹果梨”*P<sub>y</sub>MYB114* 基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

鹿艳新, 王 雪, 曲柏宏

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘 要:**以延边“苹果梨”果实为试材,采用同源克隆的试验方法,研究了果实着色过程的转录基因 *P<sub>y</sub>MYB114*,并对其进行生物信息学分析。结果表明:*P<sub>y</sub>MYB114* 的 cDNA 全长为 744 bp,其包含 1 个完整的编码 201个氨基酸的 ORF,其编码蛋白的分子量约为 23.48 kDa,理论等电点(pI)为 9.57。同源性分析表明,*P<sub>y</sub>MYB114*基因与白梨的 *MYB114* 基因核酸序列的相似性高达 99%。系统进化树表明,*P<sub>y</sub>MYB114* 编码的氨基酸和白梨的 *MYB114* 编码的氨基酸在进化上亲缘关系最近。

**关键词:**“苹果梨”;*MYB114*;序列分析

**中图分类号:**S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0089-03

“苹果梨”(*Pyrus bretschneideri* Rehd. ‘Pingguoli’)是 1921 年从朝鲜引入,通过嫁接、培育、繁殖、引栽而成的地方品种。“苹果梨”不仅酸甜爽口、抗寒性强,而且还是世界上罕见的能着红色的大果梨品种,自然条件下果实可以着红晕。果实果皮着色的深浅由花青苷积累的含量和分布情况决定的,果皮的色泽程度与果皮中含有叶绿素、类胡萝卜素、花青素等的多少有关,多种色素作用在混合一起的作用结果决定了果皮的最终颜色<sup>[1-3]</sup>。红皮梨一直深受人们的喜爱,对“苹果梨”着色的结构基因已经有了一定的研究<sup>[4-6]</sup>;但尚少见涉及调控基因“苹果梨”着色分子机理的研究。

研究表明,植物中花青素的生物合成是由 MYB、bHLH 和 WD40 3 个转录因子进行调控的,转录基因转录出的产物主要作用于花青素生物合成途径结构基因的启动子,通过上调结构基因的表达,进而促进花青素的生物合成和累积<sup>[7]</sup>。有研究表明这 3 个转录因子的产物,两两相互作用并形成复合物共同协调结构基因。MYB 转录因子具有保守的 DNA 结合区域(Myb 结构域)。在高等植物中 MYB 类转录因子是最具多样化,功能最繁杂,占有的数量最多。它参与了植物次生代谢调节过程、应答外界环境与植物激素等刺激以及调节植物细胞的形态与模式建成、细胞分化、细胞周期等诸多过

程<sup>[8]</sup>。按照 MYB 含有的数量和结构不同,可分为 3 类 MYB 转录因子:含有 1 个结构域的 R3-MYB,含有 2 个结构域的 R2R3-MYB 和含有 3 个结构域的 R1R2R3-MYB,与花青素有关的 MYB 转录因子通常包含 R2 和 R3 2 个基序(R2R3-MYB)或包含 R3 1 个基序(R3-MYB)<sup>[9]</sup>。如今在许多植物中分离鉴定出与花青素合成调控过程有关的 R2R3-MYB 转录因子,而通过影响结构基因的表达间接调控花青素的合成<sup>[10]</sup>。已有研究表明 *MYB114* 属于 R2R3-MYB<sup>[9]</sup>,该试验以延边“苹果梨”果皮为试材,克隆花青苷合成途径中的调控基因 *MYB114*,以期为进一步探明“苹果梨”果皮着色分子机制,为红色梨新品种的培育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验样品于 2014 年 9 月 20 日在吉林省延边州龙井市华龙延边集团“苹果梨”示范基地取回。取样后迅速带回实验室,在果实的中间部位削取果皮,并用锡箔纸包好,做好标记,使用液氮进行速冻,再放入-80℃的超低温状态下保存备用。

菌株和载体:大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为园艺栽培学实验室保存。pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。

酶和生化试剂:Ex Taq 酶、反转录酶(M-MLV)、dNTPs、凝胶回收试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa),引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.2 试验方法

用改良的 CTAB 对“苹果梨”果皮的总 RNA 进行提取。

**第一作者简介:**鹿艳新(1988-),女,硕士研究生,研究方向为果树生理学。E-mail:395297341@qq.com.

**责任作者:**曲柏宏(1963-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事园艺植物栽培与生理等研究工作。E-mail:bhqu211@ybu.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31160389)。

**收稿日期:**2015-12-14

反转录 cDNA 第一链的合成。根据 GenBank 上已经登录的蔷薇科的 MYB114 基因序列的保守序列,利用 Oligo 6 软件设计了一对“苹果梨”MYB114 基因的特异引物:上游引物 A1;5'-GATGATCTTCTCAGGCAGAGCATTG-3';下游引物 A2;5'-CAACCAATCTTAGTCTGCAGCTCTTC-3'。RT-PCR 合成目的基因的 cDNA 全长。按照胶回收试剂盒 (TaKaRa) 的指示说明进行目的片段的回收。热激法将产物与 PMD18-T 载体 (TaKaRa) 进行连接。将连接产物向大肠杆菌的转化。菌液 PCR 筛选带有目的片段长度的克隆,送上海英骏生物公司测序。最后进行 MYB114 基因的多序列比对及系统发育分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 “苹果梨”果皮总 RNA 的提取与检测

用改良的 CTAB 法提取果皮总 RNA,电泳检测结果如图 1 所示。可以看出带型规则整齐,并且 28S 的条带亮度是 18S 的 2 倍,说明所提总 RNA 基本没有降解,结构较为完整,质量较好,DNA、多糖等物质的残留较少,满足逆转录及后续研究的要求。

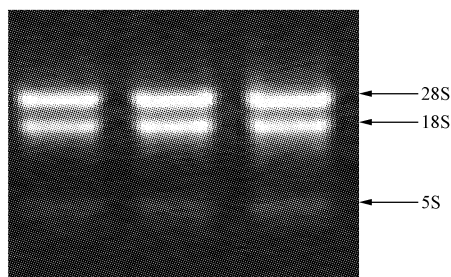


图 1 “苹果梨”果皮总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of 'Pingguoli'

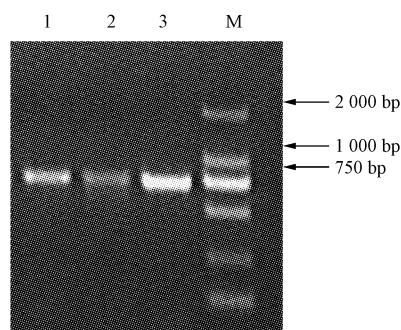
### 2.2 MYB114 产物的鉴定结果及测序

以反转录得到的 cDNA 为模板,加入引物 A1、A2,经过 PCR 仪器扩增后得到目的基因 cDNA 长度大致在 750 bp 左右(图 2),与预测的目的片段大小一致。

对其切胶回收后与 PMD18-T 载体连接,连接产物转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞进行养菌、涂板等过夜培养,筛选单菌落菌液 PCR 后送至上海英骏生物技术有限公司对目的基因进行测序。

### 2.3 PyMYB114 基因全长 cDNA 的序列分析

测序结果显示目的基因 cDNA 全长为 744 bp,命名为 PyMYB114。其中包含一个完整的编码 201 个氨基酸的 ORF,A+T 含量为 59.37%,C+G 为 40.63%。蛋白质质量为 23.48 kDa,等电点 PI 为 9.57。登陆 NCBI 进行 Blastn 多序列比对,发现目的序列与 GenBank 中已登录的蔷薇科植物的 MYB114 基因核苷酸序列高度同源。其中,与白梨(XM\_009336178)的 MYB114 基因相似性达到 99%;与亚麻芥(XM\_010475836)相似性为 80%,略低。



注:M:分子量标准(DL 2 000);1~3. RT-PCR 扩增产物。

Note:M:DL 2 000 Marker;1~3. Product of RT-PCR.

图 2 “苹果梨”MYB114 基因 RT-PCR 扩增

Fig. 2 RT-PCR amplification of MYB114 gene from 'Pingguoli'

表 1 “苹果梨”与其它代表性植物 MYB114 基因的相似度分析

Table 1 Nucleotide sequences identity of MYB114 between 'Pingguoli' and other representative plants

基因登录号 Accession No.	物种 Species	碱基相似度 Identity/%
XM_009336178	白梨 <i>Pyrus bretschneideri</i>	99
NM_001293828	苹果 <i>Malus domestica</i>	97
XM_011460503	草莓 <i>Fragaria vesca</i>	82
XM_010475836	亚麻芥 <i>Camelina sativa</i>	80

### 2.4 PyMYB114 氨基酸序列分析与系统进化树的构建

登陆 NCBI 对 PyMYB114 氨基酸序列运行 Blast 多序列比对,下载代表性植物序列并利用 MegAlign 程序对其进行相似性分析(图 3),可知 PyMYB114 与已登录的其它植物 MYB114 氨基酸序列相似度较高,进一步说明已成功克隆出 PyMYB114 基因序列。

利用 DNA Star 软件,对 PyMYB114 编码氨基酸序列及从 GenBank 中获得的其它植物 MYB114 基因序列编码的氨基酸进行系统进化分析。从图 4 可以看出,PyMYB114 基因编码的氨基酸序列与白梨 MYB114 基因编码的氨基酸序列单独聚成一类,说明“苹果梨”与白梨 MYB114 基因在进化上亲缘关系最近;PyMYB114 基因氨基酸序列与苹果 MYB114 基因的亲缘关系较近;与草莓、亚麻芥 MYB114 基因的亲缘关系较远。

## 3 讨论与结论

该试验以延边“苹果梨”果皮为试材,首次克隆出苹果梨花青苷合成途径中的调控基因 MYB114 的 cDNA 全长,命名为 PyMYB114,MYB114 基因 cDNA 全长 744 bp,其包含 1 个完整的编码 201 个氨基酸的 ORF,其编码蛋白的分子量约为 23.48 kDa,理论等电点 (pI) 为 9.57。经 Blastn 同源性比较,PyMYB114 基因与白梨 (XM\_009336178) 的 MYB114 基因核酸序列的相似性最高,达 99%;与苹果 (NM\_001293828) 的 MYB114 的核酸



注:a,草莓(XM\_011460503);b,苹果(NM\_001293828);c,“苹果梨”;d,白梨(XM\_009336178);e,亚麻芥(XM\_010475836)。

Note:a. *Fragaria vesca* (XM\_011460503); b. *Malus domestica* (NM\_001293828); c. ‘Pingguoli’; d. *Pyrus bretschneideri* (XM\_009336178); e. *Camelina sativa* (XM\_010475836).

图3 “苹果梨”和其它植物 MYB114 的氨基酸序列比对分析

Fig. 3 The amino acids sequences alignment of MYB114 between ‘Pingguoli’ and other plants

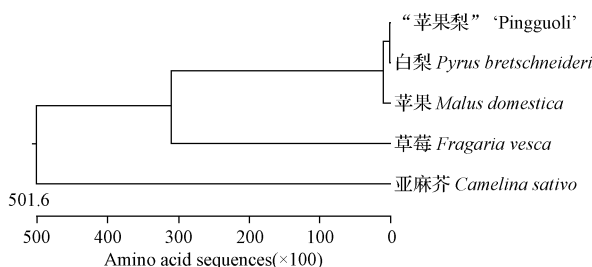


图4 “苹果梨”和其它植物 MYB114 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of MYB114 between ‘Pingguoli’ and other plants

序列相似性高达 97%;与草莓和亚麻芥的核酸相似性较低;但均在 80%左右。系统进化树表明,“苹果梨”和白梨的 MYB114 氨基酸在进化上亲缘关系最近。但 MYB114 在“苹果梨”果实着色过程中的调控作用仍需进一步研究分析,进而在分子生物学的角度上探讨果实着色的机理。

#### 参考文献

[1] 李秀菊,林涛,刘用生等.红色苹果色素形成生理研究[J].园艺学报,1997,32(3):2-6.

[2] RAE R N,LEE S K. Influence of chlorophyll, internal ethylene and PAL on anthocyanin synthesis in Fuji apple[J]. Korean Society Hort Sci, 1995, 36 (3): 361-370.

[3] LANCASTER J E, GRANT J E, GAROLGN E L. Skin color, in apple: influence of copigmentation and plastid pigments on shade and darkness of red color in five genotypes[J]. Amer Soc Hort Sci, 1994, 119: 63-69.

[4] 孙百灵,曲柏宏,李伟,等.‘苹果梨’果实着色相关酶基因片段克隆及表达分析[J].吉林农业大学学报,2012,34(4):423-427,442.

[5] 杨宏霞,刘冰雁,刘振坤,等.‘苹果梨’果实着色过程中 *P<sub>3</sub>CHI* 和 *P<sub>3</sub>F3H* 的克隆与表达分析[J].果树学报,2015(3):359-365,521.

[6] 杨宏霞,曲柏宏,刘振坤,等.延边苹果梨 *P<sub>3</sub>DFR* 基因的克隆及表达分析[J].北方园艺,2015(4):99-103.

[7] 崔道雷.云南红梨果皮转录因子 MYB、bHLH 和 WD40 互作及调控果皮着色机理研究[D].昆明:昆明理工大学,2013.

[8] 陈清,汤浩茹,董晓莉,等.植物 Myb 转录因子的研究进展[J].基因组学与应用生物学,2009(2):365-372.

[9] DELUC L, BARRIEU F, MARCHIVE C, et al. Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway[J]. Plant Physiol, 2006, 140: 499-511.

[10] XIE D Y, SHASHI S B, WRIGHT E, et al. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor[J]. Plant J, 2006, 45: 895-907.

## Clone and Sequence Analysis of *PyMYB114* Gene cDNA in *Pyrus bretschneideri* Rehd. ‘Pingguoli’

LU Yanxin, WANG Xue, QU Baihong

(College of Agronomy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

**Abstract:** Taking the *Pyrus bretschneideri* Rehd. ‘Pingguoli’ in Yanbian as test material, transcription gene *PyMYB114* during the pigmentation of ‘Pingguoli’ were researched by using homologous cloning and bioinformatics technology. The results showed that the cDNA of *PyMYB114* was 744 bp in length, encoded 201 amino acids with a calculated molecular weight (MV) of 23.48 kDa and isoelectric point (pI) of 9.57. Homology analysis revealed that the similarity between these cDNA fragments and the genes of other rosaceous plants was up to 99%. Phylogenetic tree indicated that amino acids encoded by *PyMYB114* and *Pyrus bretschneideri* were the most closed on the evolution.

**Keywords:** *Pyrus bretschneideri* Rehd. ‘Pingguoli’; MYB114; sequence analysis