

实时荧光定量分析小黑杨应拉木相关基因及转录因子的表达

魏志刚*, 张凯旋, 赵桂媛, 刘关君, 刘桂丰, 杨传平

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨150040

摘要: 利用实时定量RT-PCR技术, 比较了不同时期小黑杨应拉木中与木材形成相关的基因及其转录因子的表达模式。研究表明, 与纤维素合成相关的基因如纤维素合成酶基因(*CesA*)、蔗糖合成酶基因(*SUSY*)、ACC氧化酶基因(*ACO*)等基因胁迫后在弯曲茎的上侧中表达量高于其在弯曲茎的下侧中的表达; 尤其是*FLA*基因家族在弯曲茎的上侧中大量表达, 而在弯曲茎的下侧中几乎不表达。与之相反, 与木质素合成相关的基因如咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶(*CCoAOMT*)、苯丙氨酸裂解酶(*PAL*)、漆酶(laccase)、过氧化物酶(*POD*)等基因在弯曲茎的上侧中表达量低而在弯曲茎的下侧中表达量高, 转录因子*MYB*基因在弯曲茎的上侧中表达量高于其在弯曲茎的下侧中的。

关键词: 实时荧光定量; 小黑杨; 应拉木

Expression of Genes and Transcription Factors in Tension Wood of *Populus simonii* × *P. nigra* by Real-Time Fluorescent Quantitative PCR

WEI Zhi-Gang*, ZHANG Kai-Xuan, ZHAO Gui-Yuan, LIU Guan-Jun, LIU Gui-Feng, YANG Chuan-Ping

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: RT-PCR analyses were conducted to investigate the expression of genes involved in tension wood developmental stage of *Populus simonii* × *P. nigra* after gravity stress. The results showed these gene expression patterns are significantly different. The expression of genes which involved in cellulose biosynthesis such as *CesA*, *SUSY*, *ACO*, and *FLA* were found and over-represented in tension wood. However, some genes involved in lignin biosynthesis, for example, *CCoAOMT*, *PAL*, *Laccase* and *POD* overexpressed in opposite wood. The expression of transcription factor *MYB* in tension wood was more than that in opposite wood.

Key words: real-time fluorescent quantitative PCR; *Populus simonii* × *P. nigra*; tension wood

应力木(reaction wood)是茎或枝条在抵抗迫使它们倾斜或弯曲的重力作用下形成的非正常木材组织。针叶树中, 应力木形成于倾斜、弯曲树干或树枝的下方, 称之为应压(compression wood)。阔叶树中, 应力木产生于上方, 称之为应拉木或伸张木(tension wood) (成俊卿1983)。应拉木的次生壁最内层具特有的胶质层(也称G层), 富含胶质纤维, 纤维素含量较高, 比正常木材木质化程度低(牛敏等2010; 刘亚梅和刘胜全2010), 所以培育应拉木可以更有效地改良资源植物的造纸性能并且减少环境污染。

关于应力木形成的原因可从重力方向的角度来解释, 也可从树干重量产生的物理力的角度来考虑, 而后者能说明许多盘卷实验的结果, 另外还有主张由于植物激素分布不匀为应力木形成的原因(Du和Yamamoto 2007)。Hellgren等(2004)指出在

应力木形成过程中存在着重力刺激和激素信号转导的交互作用。目前, 从基因组学方面对木材形成机理的研究早已展开, Sterky等(1998)首次从杨树木材形成层组织中获得了5 692条非冗余EST序列; Déjardin等(2004)分析了杨树中与应拉木形成基因相关的10 000多条EST序列, 并对这些基因在弯曲茎上侧及下侧木质部中的表达进行了研究。但是对应力木形成机理的研究仍不完善, 需要进一步深入探讨。

小黑杨(*Populus simonii* × *P. nigra*)是小叶杨(*P. simonii*)与欧洲黑杨(*P. nigra*)的杂交种, 是林业生产上推广应用的优良品种之一, 具有适应性强、

收稿 2010-11-01 修定 2011-01-25

资助 黑龙江省重点攻关课题(GA06B301-4)和国家自然科学基金(30571513)。

* 通讯作者(E-mail: zhigangwei2008@163.com; Tel: 0451-82190607)。

抗寒、抗旱、耐瘠薄、耐盐碱等优良特性,其材质和纤维长宽比适合造纸。近几年对小黑杨的研究主要集中在抗病性(王志英等2010)、抗虫性(姜静等2004;孟繁君2007)和耐盐性(刘桂丰等2006;白爽2007;王雷等2009)等方面。本研究以小黑杨应拉木为材料,选取了弯曲处理1周、2周、3周、4周及8周的小黑杨应拉木上侧与下侧的未成熟木质部组织,选择了11条与小黑杨木材形成相关的基因及转录因子,利用实时荧光定量RT-PCR技术,研究了小黑杨应拉木木材形成过程中相关基因表达情况,为利用分子生物学手段培育优良材质的小黑杨树种提供研究依据。

材料与方 法

2008年6月15日在东北林业大学哈尔滨实验林场内选取二年生小黑杨(*Populu ssimonii*×*P. nigra*)为实验材料,进行弯曲处理,与水平倾斜成45度角。在弯曲处理后,分别取处理1周(6月22日)、

2周(6月29日)、3周(7月6日)、4周(7月13日)和8周(8月10日)的小黑杨弯曲茎部上侧(远离地面一侧记为TW)及下侧(近地面一侧记为OW)的未成熟木质部薄层组织,取材时间为早上7点,每次取2株弯曲小黑杨。与此同时,同时每周选取直立生长的小黑杨茎部做为对照,立即至于液氮中,-80℃保存备用。

用SDS法(赵桂媛等2010)提取对照(直立生长)和经不同时期弯曲处理的小黑杨茎未成熟木质部总RNA,用RNase-Free DNase (Promega)消化后,通过核酸测定仪(Eppendorf)和0.8%琼脂糖凝胶电泳对总RNA进行浓度和纯度测定。取各样品总RNA按照PrimeScript[®] RT reagent Kit (TaKaRa, Japan)分别进行反转录,产物稀释10倍用于后续实验。

根据小黑杨文库EST序列设计定量PCR引物,引物序列见表1。 α -actin基因(GH635102)作为内参基因,对试验结果进行标化处理。实时定量反应试剂盒为SYBR Premix Ex Taq[™] (TaKaRa, Japan)反

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers in RT-PCR

基因名称	GenBank注册号	引物序列
纤维素合成酶(<i>CesA 3-2</i>)	GH627687	上游: 5' GGCTTGCCATGAGTGTA 3' 下游: 5' ATCCTGAGAATCGTTGAG 3'
阿拉伯半乳糖蛋白 (<i>fasciclin-like arabinogalactan proteins, FLA</i>)	GH626908	上游: 5' GAGTCCTGTTGCTCCAGT 3' 下游: 5' GCTTTCAATCCAACCTAG 3'
蔗糖合成酶(<i>SUSY</i>)	GH627089	上游: 5' CTGACCAGGATTGAAGGC 3' 下游: 5' GACGTACTCCCAGACACC 3'
ACC氧化酶(<i>ACO</i>)	GH628001	上游: 5' CAAGACAATGGCTCAGA 3' 下游: 5' TCTCACCGCTATTCTTC 3'
咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶(<i>CCOAMT</i>)	GH626452	上游: 5' AGAGGTTGATTGAGCTTG 3' 下游: 5' ATCACCAACAGGAAGCAT 3'
阿魏酸-5-羟化酶(<i>F5H</i>)	GH628164	上游: 5' CGGGTCTGGTCGGAGGTC 3' 下游: 5' ACACGCTTGCTCGGAACG 3'
苯丙氨酸裂解酶(<i>PAL</i>)	GH627671	上游: 5' AACCCAAC TATTCCAAAC 3' 下游: 5' CTTCAAGCAITCCAGCAT 3'
4-香豆酸: 辅酶A连接酶(<i>4CL</i>)	GH628561	上游: 5' ATGGCGCAAACGGAGATG 3' 下游: 5' TGGCAGCGGTGGTAATGG 3'
漆酶(<i>laccase, Lac</i>)	GH626834	上游: 5' ATCGCAATTGTCTTTTC 3' 下游: 5' TGTCTCCGTTCTTCACTTC 3'
过氧化物酶(<i>peroxidase, POD</i>)	GH626185	上游: 5' ACAAGAAGACAAGGGGCA 3' 下游: 5' TCCACCACAGACTCCAAG 3'
转录因子(<i>MYB19</i>)	GH629191	上游: 5' AATGTTGCTGGCGTGCTG 3' 下游: 5' ATCTTGCTGCGATTTTGG 3'
α -肌动蛋白(α - <i>actin</i>)	GH635102	上游: 5' ATCGCAATTGTCTTTTC 3' 下游: 5' TGTCTCCGTTCTTCACTTC 3'

应体系25 μL , 包括SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μL 、上下游引物各0.5 μL 、cDNA模板2.0 μL 、无菌水9.5 μL 。反应在OPTION II荧光定量PCR仪上完成, 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 12 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸, 45 s; 78.5 $^{\circ}\text{C}$, 1 s, 读板; 45次循环。目的基因在不同胁迫处理下的相对表达量采用比较阈值法来测定, 通过计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值的来确定该基因在不同胁迫处理时间下的相对表达量(Livak和Schmittgen 2001)。

结果与讨论

1 RNA质量检测

采用改进的SDS法提取了小黑杨未成熟木质部总RNA, 经过紫外分光光度检测, A_{260}/A_{280} 在1.8~2.1。琼脂糖凝胶电泳检测结果(图1)显示, 总RNA 28S rRNA和18S rRNA的条带清晰, 无降解, 且28S rRNA亮度明显高于18S rRNA, 质量满足cDNA的合成的要求。

2 应拉木中部分木材相关基因表达的变化

如图2所示, 部分基因在应拉木中表达模式类似: 与纤维素合成、细胞壁结构相关的基因如纤维素合成酶基因(*CesA*)、阿拉伯半乳糖蛋白基因(*FLA*)、蔗糖合成酶基因(*SUSY*)和ACC氧化酶基因(*ACO*)都在TW中呈上调表达, 在OW中下调表达, 在TW中表达量远远高于其在OW中的表达(图2-A、B、C、D)。其中*CesA*基因家族是纤维素聚合作用的关键基因。蔗糖合成酶涉及最初的碳代

谢, *SUSY*基因的高表达直接为纤维素的生物合成提供底物UDP-葡萄糖来提高纤维素的合成效率。值得一提的是, *FLA*基因家族蛋白在TW中大量表达, 在不处理的小黑杨和OW中几乎不表达, 这与Lafarguette等(2004)研究证实的大量*PopFLAs*基因在应力木中上调表达, 尤其在凝胶层(G层)中表达量极高的结果相似, 可见*FLA*基因在TW中的特异表达与应拉木中特有的凝胶层(G层)的形成有关。同时*ACO*基因在TW中的过量表达也表明其在应拉木中起着促进弯曲茎部形成层生长与应拉木形成的作用。

应拉木与正常木相比, 木质素含量下降大约20%, 其形成过程中涉及木质化作用的基因以及与木质素单体合成特异途径分支的下游基因如咖啡酰辅酶A等基因的转录也显著降低(Paux等2005)。本研究结果(图2-E、H、G、I、J)表明与木质素合成相关的基因如咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶基因(*CCoAOMT*)、4-香豆酸: 辅酶A连接酶(*4CL*)、苯丙氨酸裂解酶基因(*PAL*)、漆酶(*LAC*)和过氧化物酶(*POD*)等基因在OW中的表达量均远高于其在TW中的, 且都是在处理第2周表达量最高; 而在TW中, 这些基因均呈现不同程度的下调表达。阿魏酸-5-羟化酶(*F5H*)基因在TW和OW中总体的表达水平并没有显著的变化, 仅在弯曲2周后在OW中的表达量急剧上升(图2-F)。

MYB转录因子是一类非常重要的植物转录因子, 调节细胞分化和细胞周期, 参与植物次级代谢过程以及对激素、环境胁迫的应答等。在木质素合成途径中, MYB转录因子通过结合基因启动子的AC元件来调节木质素的生物合成, 并能下调相关基因的表达来抑制苯基丙酸类合成途径, 最终导致整个植物体的木化组织中木质素含量减少(Karpinska等2004; Sonbol等2009)。本实验研究的小黑杨*MYB19*基因在应拉木TW中呈持续上调表达而在OW中一直是下调表达(图2-K)。在TW中, 合成木质素相关的基因*4CL*、*CCoAOMT*、*PAL*、*POD*的表达量相对于对照均有不同程度的下降, 而在OW中, 这些基因表达量均有增加, 由此可推测MYB转录因子在小黑杨应拉木TW的形成中的过量表达能够下调某些木质素合成相关基因的表达, 从而抑制了木质素的生物合成途径; 而在OW

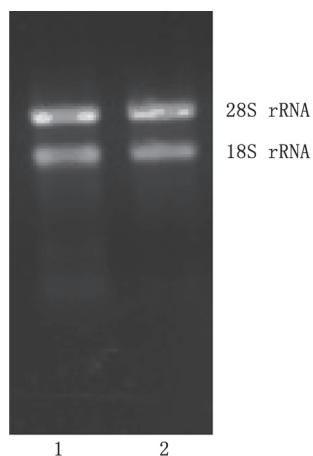


图1 小黑杨未成熟木质部总RNA的琼脂糖凝胶电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA from immature xylem of *Populus ssimonii* \times *P. nigra*

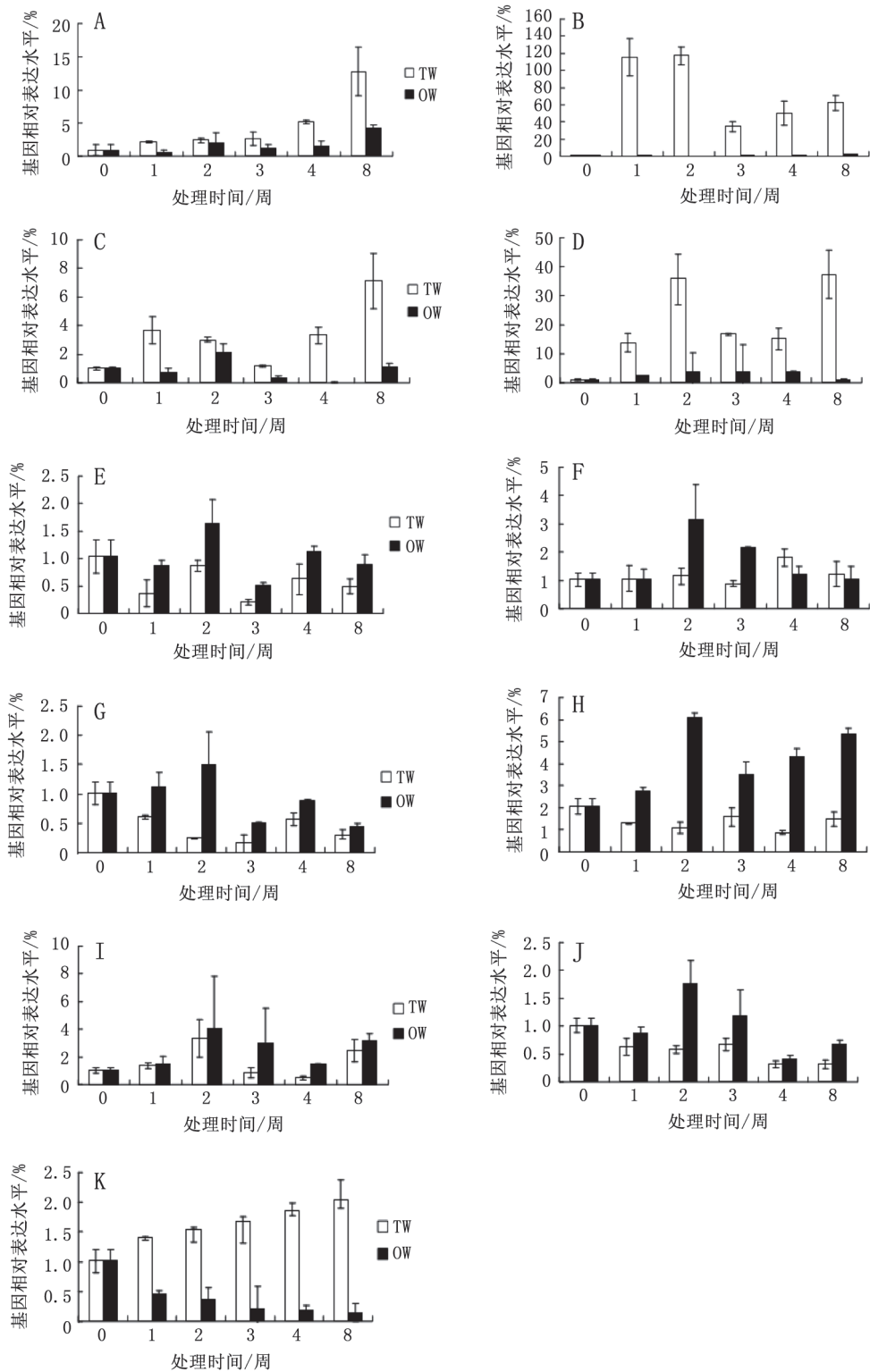


图2 应拉木中基因表达模式比较

Fig.2 Comparison of gene expression patterns in reaction wood

A: 纤维素合成酶基因(*CesA3-2*); B: 阿拉伯半乳糖蛋白基因; C: 蔗糖合成酶基因; D: ACC氧化酶基因; E: 咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶基因; F: 阿魏酸-5-羟化酶基因; G: 苯丙氨酸裂解酶基因; H: 4-香豆酸: 辅酶A连接酶基因; I: 漆酶基因; J: 过氧化物酶基因; K: MYB19转录因子。

中, MYB转录因子较低的表达量减弱了对木质素合成相关基因表达的影响, 使得这些基因的表达量相对于直立生长的对照组均有不同程度的提高。

参考文献

- 白爽(2007). 转*Lea*基因小黑杨花粉植株抗旱、耐盐性分析[硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学
- 成俊卿(1983). 木材学. 北京: 中国林业出版社, 785~788
- 姜静, 常玉广, 董京祥, 王志英, 刘桂丰(2004). 小黑杨转双价抗虫基因的研究. 植物生理学通讯, 40 (6): 669~672
- 刘桂丰, 杨传平, 蔡志军, 程贵兰, 詹立平(2006). 转*betA*基因小黑杨的耐盐性分析及优良转基因株系的选择. 林业科学, 42 (7): 33~36
- 刘亚梅, 刘胜全(2010). 欧美杨107杨苗人工倾斜树干应拉木形成特征及其解剖特性. 林业科学, 46 (5): 133~140
- 孟繁君, 熊忠平, 范海娟, 王志英, 刘桂丰, 胡春祥, 谢淑萍(2007). 转基因单倍体小黑杨对天幕毛虫的抗性分析. 东北林业大学学报, 35 (2): 38~39
- 牛敏, 高慧, 赵广杰(2010). 欧美杨107应拉木的纤维形态与化学组成. 北京林业大学学报, 32 (2): 142~144
- 王雷, 周博如, 吴丽丽, 吕澈妍, 曲跃军, 郑威, 姜廷波(2009). 小黑杨环锌指蛋白基因的克隆与表达分析. 植物生理学通讯, 45 (12): 1160~1166
- 王志英, 张福丽, 王占斌(2006). 小黑杨转几丁质酶基因及酶活性. 林业科学, 46 (2): 147~151
- 赵桂媛, 魏志刚, 刘关君, 张凯旋, 刘桂丰, 杨传平(2010). SMART策略构建小黑杨茎形成层全长cDNA文库. 北京林业大学学报, 32 (1): 52~56
- Déjardin A, Leplé JC, Lesage-Descauses MC, Costa G, Pilate G (2004). Expressed sequence tags from poplar wood tissues—A comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biol (Stuttg)*, 6 (1): 55~64
- Du S, Yamamoto F (2007). An overview of the biology of reaction wood formation. *J Integr Plant Biol*, 49 (2): 131~143
- Hellgren JM, Olofsson K, Sundberg B (2004). Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiol*, 135: 212~220
- Karpinska B, Karlsson M, Srivastava M, Stenberg A, Schrader J, Sterky F, Bhalerao R, Wingsle G (2004). MYB transcription factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen. *Plant Mol Biol*, 56 (2): 255~270
- Lafarguette F, Leplé JC, Déjardin A, Laurans F, Costa G, Pilate G (2004). Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol*, 164 (1): 107~121
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402~408
- Paux E, Carocha V, Marques C, Mendes de Sousa A, Borralho N, Sivadon P, Grima-Pettenati J (2005). Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytol*, 167 (1): 89~100
- Sonbol FM, Fornalé S, Capellades M, Encina A, Touriño S, Torres J, Rovira P, Ruel K, Puigdomènech P, Rigau J (2009). The maize ZmMYB42 represses the phenylpropanoid pathway and affects the cell wall structure, composition and degradability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 70 (3): 283~296
- Sterky F, Regan S, Karlsson J, Hertzberg M, Rohde A, Holmberg A, Amini B, Bhalerao R, Larsson M, Villarroel R et al (1998). Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5692 expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13330~13335