

杨树*PdMYB161*基因的功能分析

庄亚妹^{1,2}, 唐贤丰², 柴国华², 周功克², 王凯荣^{1,*}

¹青岛农业大学资源与环境学院, 青岛市农村环境工程研究中心, 山东青岛266109; ²中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东青岛266101

摘要: 杨树R2R3-MYB基因家族包括194个成员, 参与众多生长发育过程。我们前期的研究表明杨树*PdMYB90/167*是一对同源基因, 在拟南芥中能够调控茎秆次生细胞壁的形成、花器官发育和开花时间。本文从功能上鉴定了*PdMYB90/167*的另一个同源基因*PdMYB161*, 生化和遗传证据表明该基因在杨树茎秆木质部大量表达, 编码蛋白定位于细胞核, 在拟南芥中过表达导致转基因植株早衰并倒伏, 茎秆细胞壁变薄, 纤维素、半纤维素和木质素含量降低, 对应基因的表达量也发生显著变化。这些结果意味着*PdMYB161*基因可能参与杨树茎秆次生木质部的形成和植株衰老。结合以前的研究结果, 我们认为*PdMYB161*和*PdMYB90/167*基因在进化过程中可能产生功能异化, 这些结果也为植物同源基因功能进化提供了新证据。

关键词: *PdMYB161*; 细胞壁; 衰老; 功能分化; 杨树; 拟南芥

Functional Analysis of Poplar *PdMYB161* Gene in *Arabidopsis*

ZHUANG Ya-Mei^{1,2}, TANG Xian-Feng², CHAI Guo-Hua², ZHOU Gong-Ke², WANG Kai-Rong^{1,*}

¹Qingdao Engineering Research Center for Rural Environment, College of Resource and Environment, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ²Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China

Abstract: Poplar R2R3-MYB gene family contains 194 members, which play diverse roles in developmental and adaptive processes. Our previous results demonstrated that a pair of paralogs *PdMYB90* and *PdMYB167* function in the regulation of secondary wall formation and flowering time in *Arabidopsis*. In this paper, a MYB transcription factor designated *PdMYB161*, highly homologous to *PdMYB90/167*, was isolated from poplar and further functionally studied in *Arabidopsis*. We showed that *PdMYB161* is highly expressed in xylem and the encoded protein is targeted to nucleus. Ectopic expression of *PdMYB161* in *Arabidopsis* produced abnormal phenotypes, including presenility and thinner stem cell wall thickness than that of the wild type. Immunohistochemical and qRT-PCR analyses showed that the amounts of cellulose, xylan and lignin contents were decreased in *PdMYB161* overexpression *Arabidopsis* plants. These results suggest that *PdMYB161* may be involved in secondary wall formation and senescence. Combined with previous results, we speculate that *PdMYB161* and *PdMYB90/167* might have functional divergence during the evolutionary process.

Key words: *PdMYB161*; cell wall; senescence; functional divergence; poplar; *Arabidopsis*

木材是地球上重要的可再生资源, 是造纸、板材、生物能源等工业的主要原材料, 具有十分重要的应用价值。木材的形成是维管形成层细胞经过分裂、分化, 向内产生木质部, 向外产生韧皮部连年沉积和累加的结果。一般来说, 木材包括40%~50%纤维素、10%~30%半纤维素和20%~30%木质素。随着现代生物技术的迅猛发展, 林木研究已从传统育种转向分子育种, 而杨树作为木本植物的模式生物, 有其独特的分子应用优势。例如, 杨树具有生长速度快、适应性强、成材早且木材蓄积量大的特点, 而且杨树遗传背景丰富, 易于快速无性化扩繁、遗传转化, 已完成全

基因组测序(Du和Groover 2010; Jansson和Douglas 2007)。因此鉴定杨树木材(主要是次生木质部)形成的调控基因, 解析其分子调控机制, 是利用基因工程手段定向改良木材材性的基础。

杨树次生木质部的形成涉及到一个复杂的分子调控系统。在这个系统中, 一些转录因子(如ARF、Homeobox、NAC、MYB和CCCH)发挥至

收稿 2015-09-01 修定 2015-10-23

资助 国家自然科学基金(31300165)和中科院青岛生物能源与过程研究所所长创新基金(C.GH)。

* 通讯作者(E-mail: krwang1@163.com)。

关重要的作用, 构成一个至少三层的级联调控网络(Tang等2015; Chai等2014a, b; Du和Groover 2010; Demura和Fukuda 2007)。MYB是一类植物特异的转录因子, 其N端含有一段51~52个氨基酸组成的MYB结构域, 根据MYB结构域的个数, 可简单分成R1-MYB、R2R3-MYB、R1R2R3-MYB 3个亚类(陈娜等2015)。植物中绝大多数MYB属于R2R3-MYB类亚家族, 由多个成员组成。例如, 拟南芥有126个成员, 水稻有140个, 杨树有194个(Chai等2014b; Stracke等2001)。这些MYB转录因子不仅广泛参与植物次生代谢、激素、逆境的调控(陈晓丽等2015; Singh等2002), 而且在细胞分化、器官形成、叶片形态建成方面具有重要的调节作用(Vannini等2004)。最近越来越多的研究表明, MYB转录因子在维管植物次生木质部的形成中发挥着重要调控作用(Demura和Ye 2010; Zhong等2008)。在模式植物拟南芥中, 一组亲缘关系较近的MYB转录因子(包括MYB46/83、MYB4/7、MYB103和MYB52/54)在次生细胞壁形成过程中起协同作用, 并功能冗余(Demura和Ye 2010)。在杨树中, 拟南芥MYB46/83的同源基因*PtrMYB2/3/20/21*被认为是调控次生木质部形成的关键枢纽, 过量表达导致转基因植株矮小、叶片卷曲、叶片薄壁细胞异位增厚, 而显性抑制导致植株茎秆次生细胞壁变薄(Zhong等2013, 2011; McCarthy等2010)。由于杨树在进化中涉及到大量的基因复制, 致使一个拟南芥基因往往对应2~3个杨树的同源基因, 而且这些同源基因会出现功能相同、类似及异化的现象(Tuskan等2006), 因而分别鉴定每个同源基因尤为必要。

我们前期的研究表明, 杨树R2R3-MYB基因家族的194个成员形成80个基因对, 来源于多种基因复制, 产生5种基因命运(Chai等2014b)。其中, *PdMYB90*和*PdMYB167*是拟南芥MYB52的同源基因, 在拟南芥中过量表达均能导致转基因植株倒伏, 茎秆细胞壁变薄, 花器官异常, 育性下降, 开花时间提前。本文从功能上鉴定了杨树*PdMYB90/167*的另一个同源基因*PdMYB161*, 发现该基因在茎秆细胞壁形成和衰老过程中发挥作用, 为深入揭示*PdMYB161*基因调控杨树次生木质部形成的分子机制奠定了基础。

材料与amp;方法

1 植物材料

‘南林895’杨(*Populus deltoides*×*P. euramericana* cv. ‘Nanlin895’)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Col-0为本实验室保存, 种植于温室中, 温度为24℃, 湿度55%, 光周期为16 h光照/8 h黑暗。

2 拟南芥侵染及转基因阳性苗筛选

以‘南林895’杨为材料, 根据*PdMYB161*基因设计特异引物*PdMYB161cDNA*F/R(表1), 扩增其编码区。挑取阳性克隆测序正确后, 通过Gateway技术连入pEARLY100载体(Invitrogen, BASTA抗性)构建成过表达载体, 经农杆菌介导转入拟南芥野生型。收获T₀代种子播种于土中, 50 mg·L⁻¹ BASTA筛选阳性苗, 利用半定量RT-PCR检测存活苗中*PdMYB161*的表达量。T₂代种子再经BASTA筛选, 并统计性状分离比例, 选取单插入株系进行性状观察。

3 半定量PCR (RT-PCR)及实时荧光定量PCR (qRT-PCR)

参照我们以前的报道(Chai等2014b), 利用CTAB法提取杨树和拟南芥样品总RNA, 用RT-PCR鉴定*PdMYB161*过表达阳性苗, 利用qRT-PCR检测*PdMYB161*组织表达模式和细胞壁相关基因在过表达植株中的表达情况。样品总RNA经DNase I (Fermentas)消化后, 用Revert First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)反转录合成cDNA第一链。RT-PCR鉴定*PdMYB161*过表达阳性苗时, *PdMYB161cDNA*F/R(表1)用作引物, PCR扩增*PdMYB161*编码区, 30个循环; *ACTIN2* (AT3G18780)为内对照, 25个循环。qRT-PCR检测*PdMYB161*表达模式时, 利用特异引物*PdMYB161qPCR*F/R(表1)在杨树6个组织(根、叶、芽、皮层、木质部和韧皮部)中扩增*PdMYB161*片段; *PdUBQ10* (BU879229)用作内对照。qRT-PCR检测14个细胞壁相关基因(表1)在转基因植株的表达情况时, *ACTIN2*用作内对照。PCR反应在Light Cycler 480实时荧光定量PCR系统(Roche)上进行。基线与循环阈值(C_T值)使用Light Cycler 480软件自动生成。利用Livak和Schmittgen (2001)报道的2^{-ΔΔC_T}方法, 计算相对表达量和标准误。

表1 半定量PCR及实时荧光定量PCR引物

Table 1 Primers used in semi-quantitative PCR and real time qRT-PCR

基因登录号	引物名称	引物序列(5'→3')
POPTR_0007s01430	PdMYB161cDNAF	ATGTCTAGCAGAGGCCATTG
	PdMYB161cDNAR	CTACAATCCACTAACTTGG
POPTR_0007s01430	PdMYB161qPCRf	CTCCAAGTAAAGACCGAGTCTAG
	PdMYB161qPCRr	ACCAGCCCTGCTCTTAGGC
AT3G18780	ACT2F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
	ACT2R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
BU879229	PdUBQ10F	GTTGATTTTGTGTTGGGAAGC
	PdUBQ10R	GATCTTGGCCCTTCACGTTGT
AT5G44030	CESA4qPCRf	GGATCAGCTCCGATCAATTT
	CESA4qPCRr	ACCACAAAAGGACAATGACGA
AT5G17420	CESA7qPCRf	CAGGCGTACTCACAATGCT
	CESA7qPCRr	TGTCAATGCCATCAAACCTT
AT4G18780	CESA8qPCRf	ACGGAGAGTTCTTTGTGGCT
	CESA8qPCRr	GGTCTGTGTTGGAACAATGG
AT5G54690	IRX8qPCRf	GTGGTCACAGGAAAGGATT
	IRX8qPCRr	AGCAAGAGAGGAGCAAGGAG
AT5G54160	COMT1qPCRf	TTCCATTGCTGCTCTTTGTC
	COMT1qPCRr	CATGGTGATTGTGGAATGGT
AT4G36220	C3H1qPCRf	GTTGGACTTGACCGGATCTT
	C3H1qPCRr	ATTAGAGGCGTTGGAGGATG
AT2G40890	F5HqPCRf	CTTCAACGTAGCGGATTTCA
	F5HqPCRr	AGATCATTACGGGCCTTAC
AT1G51680	4CL1qPCRf	TCAACCCGGTGAGATTTGTA
	4CL1qPCRr	TCGTCATCGATCAATCCAAT
AT2G37040	PAL1qPCRf	AAGATTGGAGCTTTCGAGGA
	PAL1qPCRr	TCTGTTCCAAGCTCTTCCCT
AT1G15950	CCR1qPCRf	GTGCAAAGCAGATCTTCAGG
	CCR1qPCRr	GCCGCAGCATAATTACAAA
AT5G16600	MYB43qPCRf	TTGACCTCAAGTGGCTTTCATCCGA
	MYB43qPCRr	AGCTGCTCAAATCATTGATGTCCA
AT4G35350	XCP1qPCRf	TTGACCCATGAAGAGTTCAAAGGAAGA
	XCP1qPCRr	GAAAGCGAACTCAGATTCCTGTTG
AT1G20850	XCP1qPCRf	TTGCGAGATGCAAAAGGAT
	XCP1qPCRr	GCCAATGCCTTCAAGAGACT
AT5G64530	XND1qPCRf	ACCCTGATGTCATCCCCGACCTT
	XND1qPCRr	TGGCTCGTCCATTCCCATTGATCCC

4 杨树PdMYB161的亚细胞定位

将杨树*PdMYB161*基因编码区连入pK7FWG2 (Invitrogen)载体中GFP的下游, 形成35S:GFP-PdMYB161融合蛋白, 按照我们以前的方法(Chai等2014b)转化烟草(*Nicotiana tabacum*)叶表皮细胞, 暗培养3 d后, 利用Olympus FluoView FV1000 confocal显微镜(激发光488 nm)观察GFP信号。

5 拟南芥茎横切面的树脂切片分析

以播种后8周的拟南芥基部茎为材料, 利用光

学显微镜观察野生型及突变体茎次生细胞壁的发育情况。主要步骤如下: (1)材料固定, 用锋利刀片将拟南芥茎基部切成0.5 cm长的小段, 置于5%戊二醛固定液中, 真空抽气直至材料沉于管底; (2)脱水, 去除戊二醛固定液, 用PBS缓冲液(pH 7.2)清洗, 1%锇酸固定1 h, PBS缓冲液冲洗后, 依次利用30%、50%、70%、80%、90%、100%丙酮对其梯度脱水; (3)浸透及包埋, 用丙酮(A)和包埋剂(B)按照A/B=7/3、A/B=3/7、B的比例浸透, 每步至少

6 h, 最后在65 °C纯包埋剂中聚合24 h; (4)切片, 利用Leica EM UC6切片机将其切成10 μm的超薄切片; (5)观察, 利用Olympus DX51光学显微镜观察细胞壁厚度, 拍照。利用DP2-BSW (Olympus)软件分别统计木质纤维、束间纤维、导管的细胞壁厚度。每种器官至少统计100个细胞。利用SAS软件(SAS Institute Inc., USA)对细胞壁的厚度进行显著性分析。

6 拟南芥茎横切面的免疫组化分析

参照Tang等(2015)的方法, 利用Calcofluor White (Sigma)、多糖单克隆抗体LM10和HCl-间苯三酚分别检测次生细胞壁的3个组分(纤维素、半纤维素和木质素)在野生型和过表达植株茎中的分布情况。对于纤维素和半纤维素, 首先利用3% MP/PBS封闭切片, 然后加入多克隆抗体LM10, 室温孵育, anti-rat抗体反应后, 加入含有FITC偶联的二抗孵育, 切片清洗后利用Calcofluor White染色, 最终利用荧光显微镜Olympus DX51观察显色后切片中纤维素和半纤维素的分布。对于木质素, 在切

片上加入数滴HCl-间苯三酚, 显色3 min后立刻照相。所有图像均使用Adobe Photoshop 7.0处理。

7 细胞壁成分分析

将播种后6周的拟南芥茎秆用于细胞壁成分分析。按照Chai等(2014b)的方法, 利用Waters HPLC系统检测细胞壁酒精不溶残渣(AIRs)的单糖组分, 利用Glucose Assay Kit (Cayman Chemical)检测H₂SO₄ (67%, V/V)处理后AIRs中纤维素的含量, 利用乙酰溴法结合分光光度计(VARIAN Cary 50)检测AIRs中木质素的含量。

实验结果

1 *PdMYB161*的表达模式及亚细胞定位

选取杨树6个组织(根、叶、芽、皮层、木质部和韧皮部), 检测*PdMYB161*基因的组织表达模式。结果显示, 相对于其他检测组织, *PdMYB161*基因在木质部中大量表达(图1-A), 意味着该基因可能参与木质部的形成。我们进一步利用烟草瞬时表达系统观察*PdMYB161*的亚细胞定位, 结果表

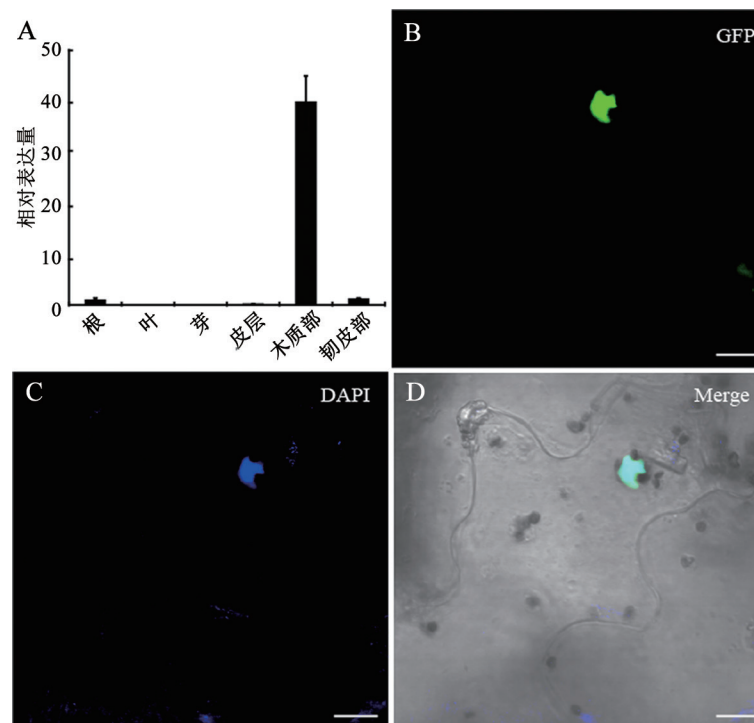


图1 杨树*PdMYB161*基因的表达模式及亚细胞定位

Fig.1 Expression pattern and subcellular localization of *PdMYB161*

A: qRT-PCR检测*PdMYB161*基因在不同组织中的表达情况。B~D: Confocal观察GFP-*PdMYB161*在烟草叶表皮细胞中的定位。DAPI: 一种特异识别核的染料。标尺=10 μm。

明*PdMYB161*定位于细胞核(图1-B~D), 是典型的转录因子。

2 *PdMYB161*过表达拟南芥出现倒伏表型

利用花序浸染法将*PdMYB161*过表达载体转入拟南芥野生型中。收获T₀代种子直接播种于土中, BASTA筛选后获得14棵存活苗。继续利用BASTA筛选T₂代幼苗, 观察存活率, 统计分离比。结果显示2、4、11、12号株系的分离比分别为58:19、96:30、21:9、48:12, 基本符合3:1, 说明是单拷贝插入。RT-PCR检测结果表明, 这些转基因植株中存在*PdMYB161*转录本(图2-A)。进一步观察这些转基因株系的表型, 如图2-B所示, 过表达植株相对野生型表现出倒伏、果荚早衰的现象。这些结果意味着*PdMYB161*基因可能在茎秆细胞壁形成和衰老过程中发挥作用。

3 *PdMYB161*过表达拟南芥茎秆细胞壁明显变薄

为了阐明*PdMYB161*基因是否影响茎秆次生

细胞壁的厚度, 我们利用树脂切片观察了8周野生型和*PdMYB161*过表达植株基部茎的横切面。与野生型相比, 过表达*PdMYB161*导致转基因植株茎秆纤维和导管细胞壁均明显变薄(图2-C~F)。统计分析表明转基因植株茎秆束间纤维、导管和木质纤维的细胞壁厚度比野生型分别低37%、16%和26%(图2-G)。

4 *PdMYB161*过表达拟南芥中纤维素、半纤维素和木质素的积累受到明显抑制

过表达*PdMYB161*导致转基因植株茎秆次生细胞壁变薄意味着次生细胞壁的3种主要组分(纤维素、半纤维素和木质素)可能也受到了影响。为了检验这些组分含量是否发生变化, 我们对拟南芥茎秆的横切面进行了免疫组化分析(图3), 并进一步对其进行了化学定量分析(表2)。结果表明: 与野生型相比, *PdMYB161*过表达植株中纤维素、半纤维素和木质素的积累明显受到抑制。

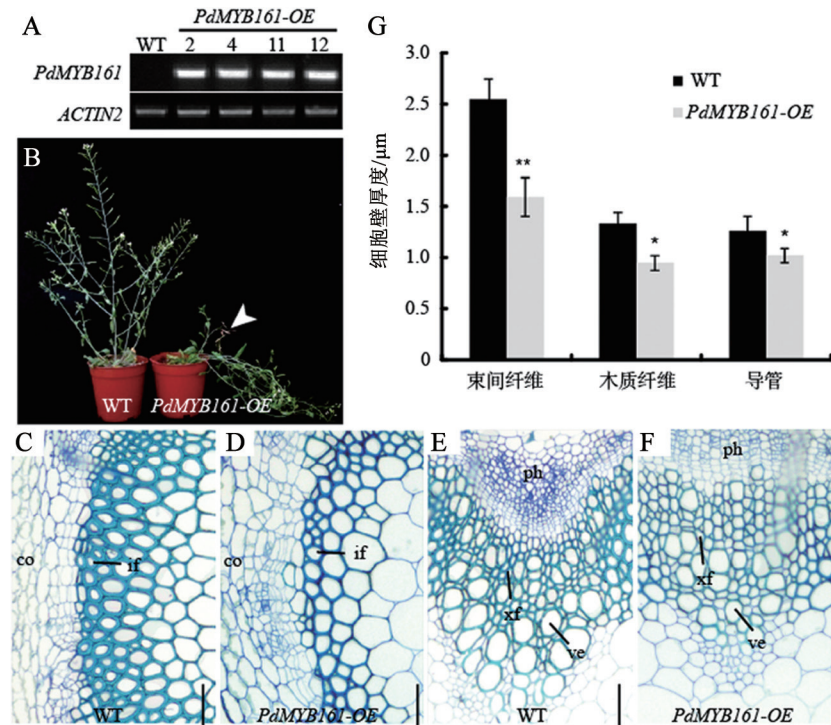


图2 在拟南芥中过量表达*PdMYB161*基因抑制次生细胞壁的形成

Fig.2 Overexpression of *PdMYB161* in *Arabidopsis* suppresses secondary wall formation

PdMYB161-OE: *PdMYB161*过表达植株; WT: 野生型植株。A: RT-PCR分析4个代表性转基因植株中*PdMYB161*转录水平。*ACTIN2*用作内对照。B: 播种后6周的野生型和*PdMYB161*过表达植株(2#)表型。箭头指示早开裂果荚。C~F: 播种后8周的野生型和*PdMYB161*过表达植株基部茎的横切面。C和D: 维管束间纤维; E和F: 维管束。co: 皮层; if: 束间纤维; ph: 韧皮部; xf: 木质纤维; ve: 导管。标尺=50 μm。G: 统计分析8周野生型和*PdMYB161*过表达植株基部茎束间纤维、木质纤维和导管细胞壁的厚度。各取100个细胞用于统计。*和**: 显著($P<0.05$)和极显著差异($P<0.01$)。

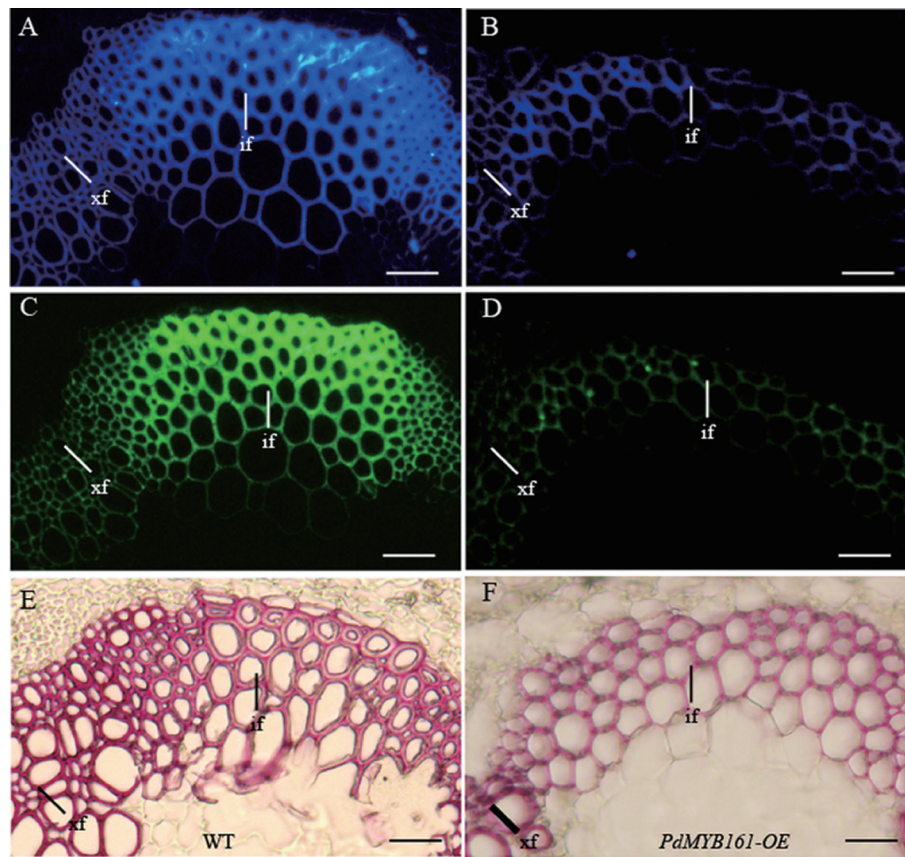


图3 野生型和*PdMYB161*过表达拟南芥基部茎横切面免疫组化分析

Fig.3 Deposition of cellulose, xylan and lignin in the stem secondary walls of wild-type and *PdMYB161* overexpression *Arabidopsis* plants

A和B: Calcofluor White检测纤维素的分布; C和D: 多糖单克隆抗体LM10检测半纤维素的分布; E和F: HCl-间苯三酚检测木质素的分布。*PdMYB161-OE*: *PdMYB161*过表达植株; WT: 野生型植株。标尺=100 μm 。

表2 野生型和*PdMYB161*过表达拟南芥植株
茎秆细胞壁成分分析

Table 2 Cell wall composition analysis of the stems of wild-type and *PdMYB161* overexpression *Arabidopsis* plants

细胞壁成分	含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	野生型	<i>PdMYB161</i> 过表达植株
甘露糖	13.31 \pm 1.52	10.18 \pm 0.63
鼠李糖	6.43 \pm 0.47	7.09 \pm 0.52
葡萄糖	14.53 \pm 0.74	10.95 \pm 0.42
半乳糖	12.17 \pm 1.08	13.63 \pm 1.60
木聚糖	75.42 \pm 5.14	51.86 \pm 5.05*
阿拉伯糖	8.30 \pm 0.11	8.58 \pm 1.03
果糖	0.92 \pm 0.14	0.74 \pm 0.35
纤维素	214.37 \pm 14.30	190.15 \pm 18.60*
木质素	291.61 \pm 22.10	223.30 \pm 26.13**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

5 *PdMYB161*过表达拟南芥中次生细胞壁相关基因表达量发生变化

用qRT-PCR检测次生细胞壁相关基因在过表达植株中的表达情况, 结果表明, 与野生型相比, 过表达*PdMYB161*基因抑制纤维素合成酶基因(*CESA4*、*CESA7*、*CESA8*) (Taylor等2000)、木聚糖合成基因(*IRX8*) (Peña等2007)、木质素合成基因(*COMT1*、*C3H1*、*F5H*、*4CL1*、*PAL1*、*CCR1*) (Raes等2003)的表达, 而激活转录因子*MYB43*的表达(图4)。 *PdMYB161*过表达植株表现出早衰的表型提示我们*PdMYB161*基因可能参与了细胞程序性死亡。为此, 本研究检测了3个细胞程序性死亡相关基因(*XCP1*、*XCP2*、*XND1*) (Avcı等2008; Funk等2002)的表达情况。结果显示: 过表达*PdMYB161*能促进这3个基因的表达(图4)。这说明

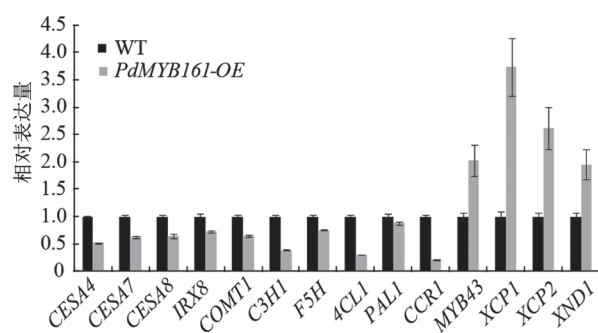


图4 qRT-PCR分析*PdMYB161*过表达植株中次生细胞壁相关基因的表达

Fig.4 qRT-PCR detecting the expression of several genes associated with secondary wall biosynthesis in *PdMYB161* overexpression plants

CESA4、*CESA7*和*CESA8*: 次生细胞壁纤维素合成基因; *IRX8*: 木糖合成基因; *COMT1*、*C3H1*、*F5H*、*4CL1*、*PAL1*和*CCR1*: 木质素合成基因; *MYB43*: 次生细胞壁调控基因; *XCP1*、*XCP2*和*XND1*: 程序性死亡相关基因。 *PdMYB161-OE*: *PdMYB161*过表达植株; WT: 野生型植株。 *ACTIN2*用作内对照。

*PdMYB161*基因可能通过调控*XCP1*、*XCP2*和*XND1*的表达而调控植株衰老。

讨 论

拟南芥R2R3-MYB基因家族包含126个成员, 参与众多生长发育过程。例如, *CAPRICE*和*WEREWOLF*调控拟南芥细胞形态形成(Tominaga等2007); *MYB58/63*在细胞壁形成过程中特异调控木质素合成(Zhou等2009); *MYB44*通过调控气孔开放参与拟南芥抗旱(Jung等2008); *MYB30*通过调控开花关键基因*FT*控制拟南芥开花(Liu等2014)。我们前期的研究表明杨树R2R3-MYB基因家族包含194个成员, 其中两个成员*PdMYB90/167*参与木材形成和花器官发育(Chai等2014b)。本文进一步功能鉴定*PdMYB90/167*同源基因*PdMYB161*, 发现在拟南芥中过量表达该基因导致转基因植株倒伏, 茎秆细胞壁变薄。免疫组化和化学定量分析表明, 过表达植株相对于野生型茎秆纤维素、半纤维素和木质素的含量均降低。这些表型与*PdMYB90/167*过表达拟南芥植株类似(Chai等2014b)。杨树*PdMYB90/167/161*是拟南芥*MYB52*的同源基因, 在拟南芥过表达均导致转基因植株倒伏, 细胞壁变薄。这似乎与拟南芥*MYB52*在细胞壁形成中的作用不一致, 因为过表达*MYB52*没有明显表型, 而显

性抑制导致转基因植株细胞壁变薄(Zhong等2008)。这不可能是过表达*PdMYB161*基因导致其共抑制的结果, 因为该基因在转录水平上表达量升高。一个可能的解释是, *PdMYB90/167/161*与其他蛋白形成复合体, 非正常过量表达这三个蛋白中的任何一个均能打破蛋白复合体的平衡, 导致成熟蛋白复合体含量降低, 出现异常表型(Chai等2014b; Birchler等2005)。当然, 我们不能排除这三个杨树基因可能与拟南芥*MYB52*功能不同, 在杨树次生木质部形成中起负调控作用。这需要进一步利用实验对其进行验证。但不管怎么样, 我们的结果说明*PdMYB161*确实参与了杨树次生木质部的形成。同时, 我们发现过表达*PdMYB161*也导致转基因植株早衰, 诱导程序性死亡相关基因*XCP1*、*XCP2*和*XND1*表达, 意味着*PdMYB161*基因可能与衰老有关, 这明显不同于*PdMYB90/167*过表达植株的早花和花器官异常。众所周知, 植物(例如杨树)在进化过程中形成大量同源基因, 而这些同源基因往往会出现功能相同、类似及异化的现象(Tuskan等2006)。综合这些试验结果, 我们推测杨树*PdMYB161*和*PdMYB90/167*基因可能在进化过程中产生了功能异化, 既保留了一些基本功能, 也产生了一些新的特异功能。我们的结果也为植物同源基因功能进化提供了新证据。

参考文献

- 陈娜, 迟晓元, 潘丽娟, 陈明娜, 禹山林(2015). MYB转录因子在植物盐胁迫调控中的研究进展. 植物生理学报, 50 (9): 1395~1399
- 陈晓丽, 李红兵, 孙振玫, 李孟洁, 李雨霖, 郭尚洙, 邓西平(2015). 过表达*IbMYB1*基因甘薯增强了对土壤干旱胁迫的抗性. 植物生理学报, 51 (9): 1440~1446
- Avci U, Petzold HE, Ismail IO, Beers EP, Haigler CH (2008). Cysteine proteases XCP1 and XCP2 aid micro-autolysis within the intact central vacuole during xylogenesis in *Arabidopsis* roots. Plant J, 56 (2): 303~315
- Birchler JA, Riddle NC, Auger DL, Veitia RA (2005). Dosage balance in gene regulation: biological implications. Trends Genet, 21 (4): 219~226
- Chai GH, Qi G, Cao YP, Wang ZG, Yu Li, Tang XF, Yu YC, Wang D, Kong YZ, Zhou GK (2014a). Poplar PdC3H17 and PdC3H18 are direct targets of PdMYB3 and PdMYB21, and positively regulate secondary wall formation in *Arabidopsis* and poplar. New Phytol, 203 (2): 520~534
- Chai GH, Wang ZG, Tang XF, Yu L, Qi G, Wang D, Yan XF, Kong YZ, Zhou GK (2014b). R2R3-MYB gene pairs in *Populus*: evolution and contribution to secondary wall formation and flower-

- ing time. *J Exp Bot*, 65 (15): 4255–4269
- Demura T, Fukuda H (2007). Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci*, 12 (2): 64–70
- Demura T, Ye ZH (2010). Regulation of plant biomass production. *Curr Opin Plant Biol*, 13 (3): 299–304
- Du J, Groover A (2010). Transcriptional regulation of secondary growth and wood formation. *J Integr Plant Biol*, 52 (1): 17–27
- Funk V, Kositsup B, Zhao CS, Beers EP (2002). The *Arabidopsis* xylen peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiol*, 128 (1): 84–94
- Jansson S, Douglas CJ (2007). *Populus*: a model system for plant biology. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 435–458
- Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong JJ (2008). Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 146 (2): 623–635
- Liu L, Zhang J, Adrian J, Gissot L, Coupland G, Yu D, Turck F (2014). Elevated levels of *MYB30* in the phloem accelerate flowering in *Arabidopsis* through the regulation of *FLOWERING LOCUS T*. *PLoS ONE*, 9 (2): e89799
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- McCarthy RL, Zhong R, Fowler S, Lyskowski D, Piyasena H, Carleton K, Spicer C, Ye ZH (2010). The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 51 (6): 1084–1090
- Peña MJ, Zhong R, Zhou GK, Richardson EA, O'Neill MA, Darvill AG, York WS, Ye ZH (2007). *Arabidopsis* irregular xylem8 and irregular xylem9: implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell*, 19 (2): 549–563
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W (2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 133 (3): 1051–1071
- Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 5 (5): 430–436
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (5): 447–456
- Tang XF, Zhuang YM, Qi G, Wang D, Liu HH, Wang KR, Chai GH, Zhou GK (2015). Poplar PdMYB221 is involved in the direct and indirect regulation of secondary wall biosynthesis during wood formation. *Sci Rep*, 16 (5): 12240
- Taylor NG, Laurie S, Turner SR (2000). Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12: 2529–2539
- Tominaga R, Iwata M, Okada K, Wada T (2007). Functional analysis of the epidermal-specific MYB genes *CAPRICE* and *WEREWOLF* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (7): 2264–2277
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A et al (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313 (5793): 1596–1604
- Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I (2004). Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J*, 37 (1): 115–127
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy R, Ye ZH (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20 (10): 2763–2782
- Zhong R, McCarthy RL, Haghghat M, Ye ZH (2013). The poplar MYB master switches bind to the SMRE site and activate the secondary wall biosynthetic program during wood formation. *PLoS ONE*, 8 (7): e69219
- Zhong R, McCarthy RL, Lee C, Ye ZH (2011). Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Plant Physiol*, 157 (3): 1452–1468
- Zhou J, Lee C, Zhong R, Ye ZH (2009). MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21 (1): 248–266