



网络出版日期:2019-07-09

doi:10.7606/j.issn.1004-1389.2019.08.008

网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20190708.0933.032.html>

过表达 *GhMYB4* 基因对棉花茎秆木质素合成的影响

夏成林,于月华,左林,陈全家,倪志勇

(新疆农业大学农学院,乌鲁木齐 830052)

摘要 旨在探究过表达陆地棉(*Gossypium hirsutum*) *GhMYB4* 基因对棉花茎秆木质素合成的影响。利用 Wiesner 组织化学染色的方法对棉花茎秆进行染色,并用 Klason 法对棉花茎秆的局部位置进行木质素总量测定。对距离下胚轴 0~1 cm、2~7 cm、10~12 cm 处不同茎秆部位的次生壁木质素进行化学组织染色,定量分析染色组织结构发现,大部分的转基因株系相比对照受体株系在初生木质部和初生韧皮部的染色范围、细胞层数和染色程度上均有一定的显著性增加。通过对 29 个过表达转基因株系和对照受体株系在棉花茎秆距离下胚轴 2~7 cm 处木质素总量的定量分析发现,有 23 个过表达转基因株系相比于对照受体株系的木质素总量有显著性的增加和 1 个株系出现显著性降低的现象。这些结果表明 *GhMYB4* 基因参与调控棉花茎秆的木质素生物合成。

关键词 陆地棉;木质素;过表达;切片

中图分类号 S562

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)08-1267-07

MYB 转录因子是植物中功能最多样化的家族之一,已被证实在多种植物中参与调控不同的代谢途径^[1]。MYB 转录因子具有 1~4 个由 50~53 个氨基酸残基构成的不完全重复的高度保守的 DNA 结构域,即 MYB 结构域^[2],根据其结构域位置和数目的不同,可将其分为 4 类(R1/2-MYB 或 R3-MYB、R2R3-MYB、3R-MYB 和 4R-MYB)^[3]。自从在玉米中克隆首个 MYB 转录因子基因 *C1*^[4]后,在多种生物中也相继发现含有 R2R3-MYB 的同源基因,研究发现 MYB 转录因子参与调节多种次生代谢途径,如苯丙烷类代谢途径、细胞壁组分合成和硫代葡萄糖苷的生物合成等,进而对植物次生壁的形成发挥调控作用^[5]。

木质素(Lignin)是一种苯环结构的天然高分子物质,是构成植物细胞壁骨架的重要组成部分^[6]。在植物维管组织的机械强度、抵抗病菌侵害和运输水分等方面发挥着重要作用^[7]。近年来的研究表明,MYB 转录因子与多种顺式作用元件结合,调控下游基因的表达。MYB 转录因子与木质素代谢相关基因启动子序列中的一些顺式

作用元件结合,如 AC-I、AC-II、AC-III 等顺式作用元件,进而对木质素的合成产生促进或抑制作用^[8]。木质素含量降低会造成作物株系易倒伏,易被病菌侵染等不良状况的发生^[9]。为了克服这一现象,一些经济作物的改良需要适当增加木质素在茎秆中的合成积累,适当提高单位面积下细胞的数目,降低细胞排列分布的间隙,使改良的木质部导管壁韧性加强,从而可以在极大程度上降低病菌的感染入侵,对减少水分流失也有一定抑制作用^[10]。

陆地棉(*Gossypium hirsutum*)是世界上重要的经济作物之一。棉花的抗倒伏性状依赖于茎秆组织中木质素的机械支撑作用。因此,研究调控棉花茎秆木质素代谢的 MYB 转录因子的功能具有重要的意义。本研究旨在分析过表达 *GhMYB4* 基因对陆地棉茎秆中木质素合成的影响。为深入研究 *GhMYB4* 基因在陆地棉中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 对照受体棉花株系为‘cjq-

收稿日期:2019-02-07 修回日期:2019-04-15

基金项目:国家自然科学基金(U1703115);南京农业大学—新疆农业大学联合基金(KYYJ201801)。

第一作者:夏成林,男,硕士研究生,从事棉纤维发育相关基因功能研究。E-mail:233092920@qq.com

通信作者:倪志勇,男,博士,副教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:nizhiyong@126.com

5',转基因过表达 *GhMYB4* 棉花株系为 T4 代植株,编号为‘lrp1’~‘lrp29’。试验材料栽种于新疆农业大学棉花光照培养室培育。

1.1.2 试剂 甲醇、巯基乙酸、浓盐酸、氢氧化钠、木质素标准品、间苯三酚、超纯水和双蒸水。

1.2 方法

1.2.1 棉花茎秆木质素化学组织染色 对 35~55 d 棉花茎秆材料进行化学组织染色。分别取对照受体和转基因型株系距离下胚轴 0~1 cm、2~7 cm、10~12 cm 部位徒手制作临时切片。参考 Wiesner 法^[11]在切片表面滴加 $w=15\%$ 间苯三酚和 $\varphi=10\%$ 盐酸溶液,漂洗后于光学显微镜下观察并拍照。

表 1 棉花木质素标准曲线质量浓度的测定

Table 1 Determination of cotton lignin standard curve

编号 Number	0	1	2	3	4	5	6
质量浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) Mass concentration	0	10	20	30	40	50	60
1 mg/mL 母液/mL Mother liquid	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5

1.2.4 棉花木质素质量分数测定 通过标准曲线的回归方程计算出棉花茎秆中木质素的质量浓度,再利用下面公式计算其质量分数。

$$\text{木质素质量分数} = C(\mu\text{g}/\text{mL}) \times 2(\text{mL}) \times 0.001 / 0.03(\text{g})$$

2 结果与分析

2.1 棉花茎秆木质素的化学组织染色

用 Wiesner 法对棉花茎秆进行染色,根据染色程度的深浅和范围可以初步反映出木质素的积累情况,以及所在的组织位置和分布情况。以下试验株系均是以转基因‘lrp17’株系为例与对照受体‘cqj-5’株系进行的结果比对分析。

2.1.1 初生木质部木质素染色范围距离分析 在电子显微镜 10×物镜下观察木质素组织染色区域发现(图 1),在距离下胚轴 0~1 cm、2~7 cm、10~12 cm 处进行对比,依据细胞排列的方向进行直线测量,发现大部分的‘lrp17’转基因株系相比对照受体‘cqj-5’株系在初生木质部区域的染色范围距离更长。在初生木质部染色范围距离的定量分析发现(图 2),在距离下胚轴 0~1 cm 和 2~7 cm 中,转基因株系和对照受体株系在染色的范围距离上具有显著性的增加。

2.1.2 初生木质部木质素染色细胞层数分析 在电子显微镜 40×物镜下观察初生木质部染色

1.2.2 棉花茎秆木质素总量测定 样品取自 45 d 棉花茎秆距离下胚轴 2~7 cm 处的对照受体株系和转基因株系茎秆,做 3 次生物学重复试验。参考 Klason 法^[12],获得木质素—巯基乙酸(LTGA)沉淀物。用 2 mL 的 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液溶解棕色沉淀。在紫外分光光度计下的 280 nm 处测定木质素溶液的吸光度。

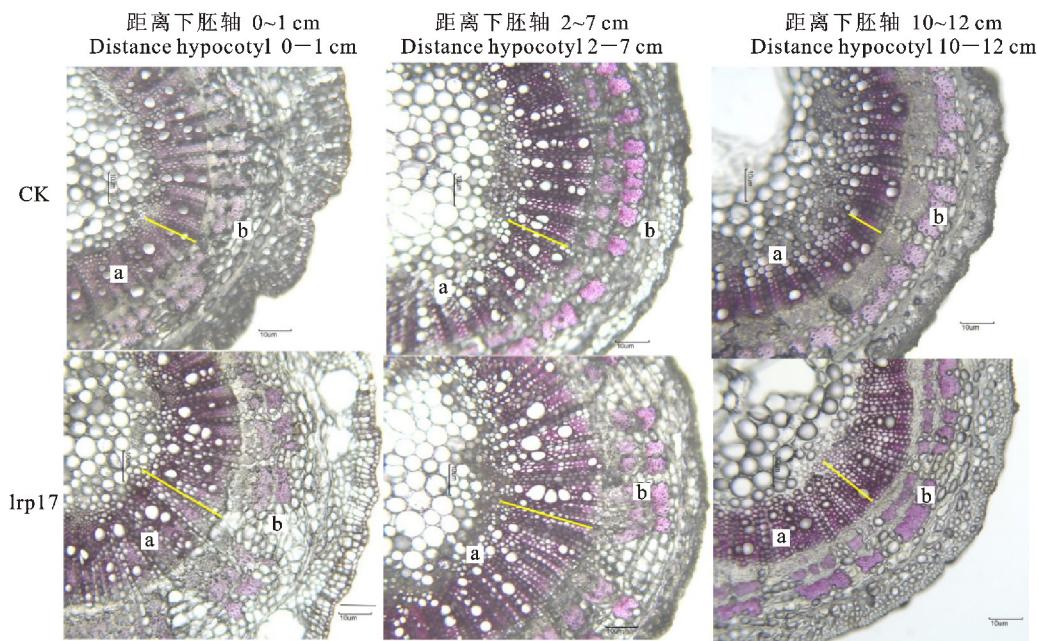
1.2.3 棉花木质素标准品标准曲线测定 称取 100 mg 木质素标准品于 100 mL 的 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液溶中,终质量浓度为 1 mg/mL。在 25 mL 容量瓶中将木质素的终质量浓度再稀释成不同的 6 份,用紫外分光光度计在 280 nm 处测定溶液的吸光值。

区域发现(图 3),大部分转基因‘lrp17’株系初生木质部的细胞排列层数相比对照受体株系‘cqj-5’有一定增多。通过对细胞层数的定量分析发现(图 4),在距离下胚轴 2~7 cm 处,转基因‘lrp17’株系相比对照受体‘cqj-5’株系具有显著性的增加。

2.1.3 初生韧皮部木质素染色深浅程度分析 在电子显微镜 40×物镜下观察初生韧皮部染色区域发现(图 5),在距离下胚轴 0~1 cm、2~7 cm、10~12 cm 处进行对比,‘lrp17’转基因株系相比对照受体‘cqj-5’株系的染色程度大部分都有显著性的加深。

2.2 棉花茎秆木质素总量测定分析

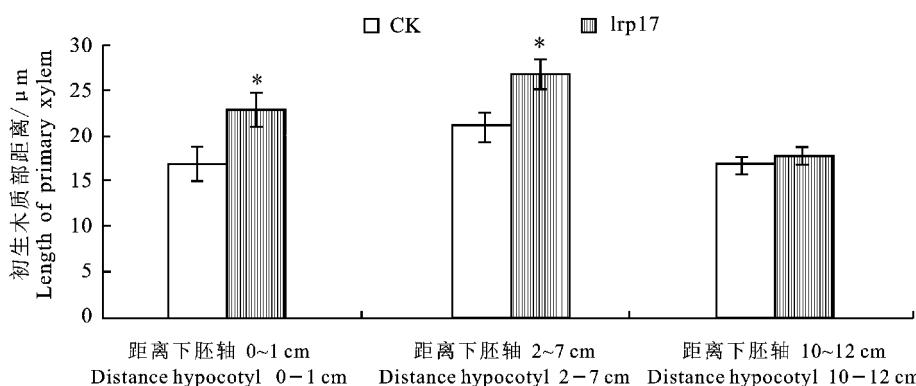
通过木质素标准品参与得到标准曲线测定的结果,用 Excel 计算得回归方程: $y = 312.941x - 9.565(R^2 = 0.999175)$, y 为待测液质量浓度, x 为待测液吸光度值)。将对照受体株系‘cqj-5’和‘lrp1’~‘lrp29’系列的每一个棉花株系的茎秆进行木质素总量测定,数值带入回归方程中。结果表明(图 6),转基因株系中的‘lrp13’‘lrp15’‘lrp16’‘lrp18’和‘lrp29’株系相比对照受体‘cqj-5’株系的木质素质量分数没有出现显著性的增减差异,‘lrp19’株系的木质素质量分数出现显著性的减少现象,其他 23 个株系均与对照受体株系‘cqj-5’的木质素质量分数有显著性增加,其中‘lrp17’株系木质素的表达量最高。



a. 初生木质部 Primary xylem; b. 初生韧皮部 Primary phloem; 刻度尺为 $10 \mu\text{m}$ The scale is $10 \mu\text{m}$; 下图 3 和图 5 同此 Fig. 3 and Fig. 5 are the same

图 1 电子显微镜 $10\times$ 物镜下的 35~55 d 转基因‘lrp17’株系与受体株系‘cqj-5’(CK) 棉花材料茎秆的横切木质素组织化学染色分析

Fig. 1 Cross-cut lignin histochemical staining analysis of cotton stalks of 35~55 d transgenic ‘lrp17’ strain and recipient strain ‘cqj-5’(CK) under electron microscope $10\times$ objective



数值是 3 次生物学重复的“平均值±标准差”,星号表示明显不同于对照受体 cqj-5 ($P < 0.05$),下同 Values are “mean ± standard deviation of three biological replicates, and asterisks indicate significantly different from control receptor cqj-5 ($P < 0.05$). The same below

图 2 在电子显微镜 $40\times$ 物镜下的 35~55 d 转基因‘lrp17’株系与受体株系‘cqj-5’(CK) 棉花材料茎秆的横切木质素组织化学染色距离分析

Fig. 2 The cross-cut lignin histochemical staining distance analysis of the 35~55 d transgenic ‘lrp17’ strain and the recipient strain ‘cqj-5’(CK) cotton material stem under the electron microscope $40\times$ objective lens

3 讨论与结论

之前的研究表明,在大多数植物生长发育进

程中 MYB 转录因子对次生壁的表达调控存在促进或抑制作用^[13~14]。本研究通过对棉花茎秆木质素染色分析发现,过表达GhMYB4 株系相比对

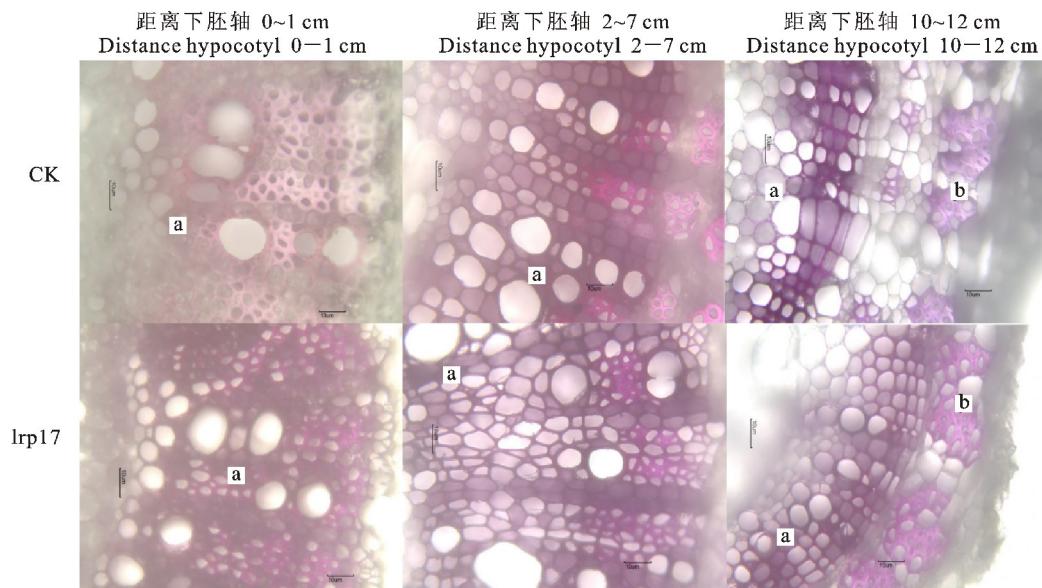


图3 电子显微镜40×物镜下的35~55 d转基因‘lrp17’株系与受体株系‘cqj-5’(CK)棉花材料茎秆的横切木质素组织化学染色分析

Fig. 3 Cross-cut lignin histochemical staining analysis of cotton stalks of 35—55 d transgenic ‘lrp17’ strain and recipient strain ‘cqj-5’(CK) under electron microscope 40× objective

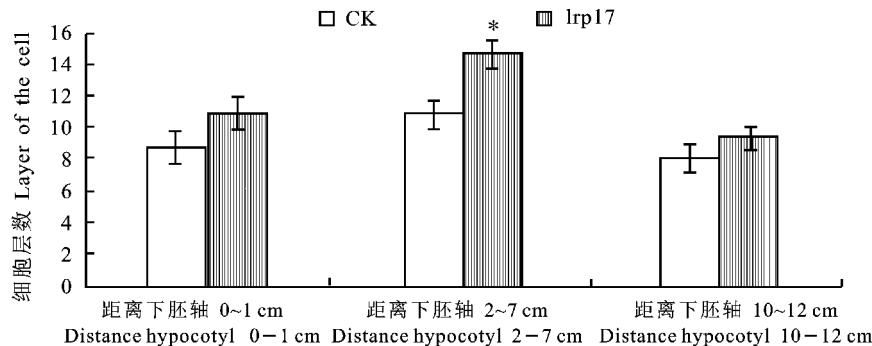


图4 在35~55 d转基因‘lrp17’株系与受体株系‘cqj-5’(CK)棉花材料茎秆的横切木质素组织化学染色分析下的细胞层数测量

Fig. 4 The number of cell layers under the cross-cut lignin histochemical staining analysis of the 35—55 d transgenic ‘lrp17’ strain and the recipient strain ‘cqj-5’(CK) cotton material stem

照受体株系初生木质部的染色范围扩大、细胞层数增多,且初生韧皮部染色加深。大部分过表达*GhMYB4*基因株系相比对照受体株系茎秆木质素质量分数增加,因此推测*GhMYB4*转录因子可能正调控棉花茎秆的木质素代谢。

在许多植物中陆续发现多种MYB转录因子对次生壁中的木质素合成起到一定促进或抑制作用。如在拟南芥过表达菊花*CmMYB1*基因能够在一定程度上抑制次生壁中木质素的合成积累^[15]。拟南芥*AtMYB58*和*AtMYB63*^[16],小麦*TaMYB4*^[17],以及玉米*ZmMYB31*和*Zm-MYB46*^[18-19]等基因都在次生壁发育过程中调控

木质素的合成。火炬松*PtMYB4*^[20]与*Ptmyb1*^[21]和桉树*EgMYB2*^[22]转录因子通过与启动子区域中的AC顺式作用元件结合,从而对木质素的生物合成起到正调控作用;水稻*OsMYB46*基因可以促进表皮细胞木质素和木聚糖纤维素的合成^[23];拟南芥*AtMYB46*基因受NST3的调控,通过同时对*AtMYB85*和*KNAT7*基因的多级转录调控,进而对次生壁的木质素含量产生抑制或促进作用^[24]。本研究发现*GhMYB4*基因在陆地棉茎秆中参与次生壁木质素的合成,本研究为进一步探究*GhMYB4*基因的生物学功能奠定理论基础。

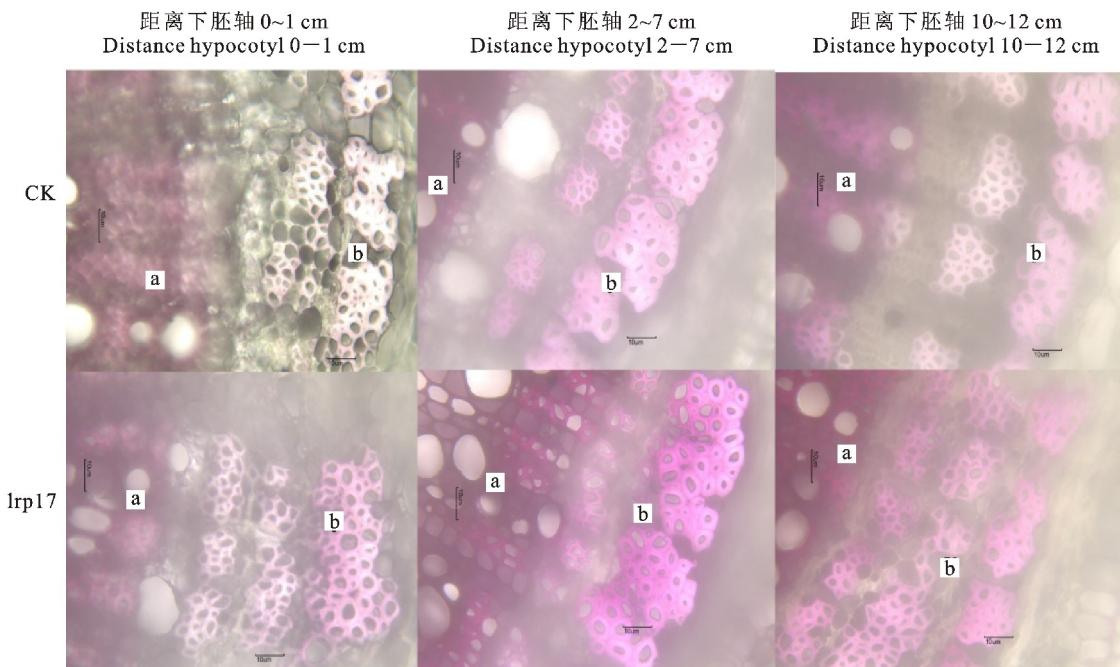
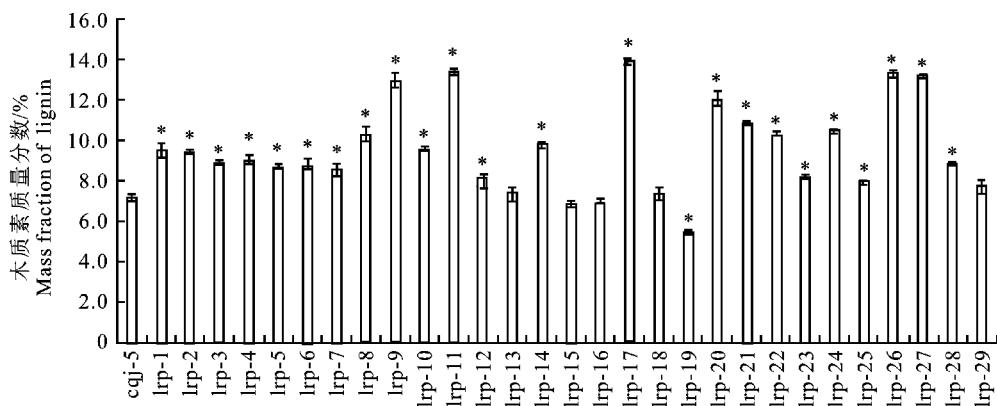


图5 电子显微镜40×物镜下的35~55 d转基因‘lrp17’株系与受体株系‘cqj-5’(CK)棉花材料茎秆的横切木质素组织化学染色分析

Fig. 5 Cross-cut lignin histochemical staining analysis of the 35–55 d transgenic ‘lrp17’ strain and the recipient strain ‘cqj-5’ (CK) cotton material stem under electron microscope 40× objective



星号表示明显不同于对照受体‘cqj-5’($P < 0.01$) The asterisk indicates significantly different from the control receptor ‘cqj-5’ ($P < 0.01$)

图6 受体‘cqj-5’(CK)和转基因‘lrp1’~‘lrp29’棉花株系茎秆中木质素质量分数

Fig. 6 Mass fraction of lignin in the stems of the receptor ‘cqj-5’ (CK) and the transgenic ‘lrp1’–‘lrp29’ cotton

参考文献 Reference:

- [1] DU H, ZHANG L, LIU L, et al. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, 74(1):1-11.
- [2] JIN H, MARTIN C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 41(5):577-585.
- [3] OGATA K, MORIKAWA S, NAKAMURA H, et al. Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-
- [4] PAZ-ARES J, GHOSAL D, WIENAND U, et al. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators [J]. *Embo Journal*, 1987, 6(12):3553-3558.
- [5] LIU Y, SHI Z, MAXIMOVA S N, et al. Tc-MYBPA is an *Arabidopsis* TT2-like transcription factor and functions in the regulation of proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao* [J]. *BioMed Central Plant Biology*, 2015, 15(1):

binding domain from c-Myb [J]. *Nature Structural Biology*, 1995, 2(4):309.

- 160.
- [6] WHETTEN R, SEDEROFF R. Lignin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7):1001.
- [7] ZHONG R, TAYLOR J J, YE Z H. Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(12):2159-2170.
- [8] KIM W C, KO J H, HAN K H. Identification of a cis-acting regulatory motif recognized by MYB46, a master transcriptional regulator of secondary wall biosynthesis [J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 12):3917.
- [9] ZHANG L, YAN L, WANG Z, et al. Characterization of lignin derived from water-only and dilute acid flowthrough pretreatment of poplar wood at elevated temperatures [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1):203.
- [10] HUANG G Q, GONG S Y, XU W L, et al. A fasciclin-like arabinogalactan protein, GhFLA1, is involved in fiber initiation and elongation of cotton [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3):1278-1290.
- [11] XU L, ZHU L, TU L, et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(15):5607-5621.
- [12] GUILLAUMIE S, MZID R, MÉCHIN V, et al. The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72(1-2):215.
- [13] JIN H, COMINELLI E, BAILEY P, et al. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis* [J]. *Embo Journal*, 2014, 19(22):6150-6161.
- [14] LEGAY S, SIVADON P, BLERVACQ A S, et al. EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar [J]. *New Phytologist*, 2010, 188(3):774-786.
- [15] ZHU L, SHAN H, CHEN S, et al. The heterologous expression of the chrysanthemum R2R3-MYB transcription factor *CmMYB1* alters lignin composition and represses flavonoid synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plos One*, 2013, 8(6):e65680.
- [16] ZHOU J, LEE C, ZHONG R, et al. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1):248-266.
- [17] MA Q H, WANG C, ZHU H H. TaMYB4 cloned from wheat regulates lignin biosynthesis through negatively controlling the transcripts of both cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase genes [J]. *Biochimie*, 2011, 93(7):1179-1186.
- [18] FORNALÉ S, SHI X, CHAI C, et al. ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux [J]. *Plant Journal*, 2010, 64(4):633-644.
- [19] ZHONG R, LEE C, MCCARTHY R L, et al. Transcriptional activation of secondary wall biosynthesis by rice and maize NAC and MYB transcription factors [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2011, 52(10):1856.
- [20] PATZLAFF A, NEWMAN L J, DUBOS C, et al. Characterisation of *PtMYB1*, an R2R3-MYB from pine xylem [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 53(4):597-608.
- [21] NEWMAN E L, CAMPBELL J M, MCINNIS S, et al. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2010, 36(6):743-754.
- [22] GOICOECHEAM, LACOMBE E, LEGAY S, et al. EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis [J]. *The Plant Journal*, 2005, 43(4):553-567.
- [23] ZHAO K, BARTLEY L E. Comparative genomic analysis of the R2R3 MYB secondary cell wall regulators of *Arabidopsis*, poplar, rice, maize, and switchgrass [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1):135-135.
- [24] ZHONG R, RICHARDSON E A, YE Z H. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(9):2776-2792

Effects of Overexpression of *GhMYB4* Gene on Lignin Synthesis in Cotton Stem

XIA Chenglin, YU Yuehua, ZUO Lin, CHEN Quanjia and NI Zhiyong

(College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract This paper aims to investigate the function of *GhMYB4* gene in *Gossypium hirsutum* and analyze its regulation of lignin synthesis during overexpression and development. Cotton stalks were stained by Wiesner histochemical staining method, and the total lignin content of cotton stalks was determined by Klason method according to the degree of dyeing. By chemically staining the secondary wall lignin at different stems at 0—1 cm, 2—7 cm, and 10—12 cm from the hypocotyl, and comparing the quantitative analysis of the stained tissue structure, most of the results were found. The transgenic lines showed a significant increase in the staining range, cell layer number and staining degree of the primary xylem and the primary phloem compared with the control recipient strain. Quantitative analysis of the total amount of lignin at the 2—7 cm hypocotyl of cotton stalks by 29 overexpressing transgenic lines and control recipient strains revealed that there were 24 overexpressing transgenic lines related to control receptors. The total amount of lignin in the strain increased significantly. The *GhMYB4* gene was involved in the regulation of lignin biosynthesis in stems.

Key words *Gossypium hirsutum*; Lignin; Over expression; Slicing

Received 2019-02-07

Returned 2019-04-15

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. U1703115); Joint Fund of Nanjing Agricultural University and Xinjiang Agricultural University (No. KYYJ201801).

First author XIA Chenglin, male, master student. Research area: gene function of cotton fiber development. E-mail: 233092920@qq.com

Corresponding author NI Zhiyong, male, Ph. D, associate professor. Research area: plant molecular biology. E-mail: nizhiyong@126.com

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)