

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.03.008

马尾松 *PmMYB169* 基因的克隆及表达分析^①

刘沛宇^{1,2}, 刘小翠², 杨 鸥²,
彭 磊², 乔 光², 文晓鹏²

1. 贵州大学 农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025;
2. 贵州大学 林学院, 贵阳 550025

摘要: MYB 基因家族在植物生长发育和应答逆境胁迫中有重要作用. 通过 RT-PCR 和 RACE 技术从马尾松中克隆获得了 *PmMYB169* 全长 cDNA 序列, 分析了其在低磷胁迫下的表达特性. *PmMYB169* 全长为 1 407 bp, 开放阅读框为 927 bp, 编码 308 个氨基酸. 生物信息学分析表明, *PmMYB169* 蛋白序列中存在 MYB 家族结构区域, 属于 R2R3 类 MYB 转录因子; 同源性分析表明, *PmMYB169* 在 MYB 家族保守区域上同源性较高, 它与北美云杉亲缘关系最近. 荧光定量 PCR 对低磷胁迫下 *PmMYB169* 的表达分析结果表明, *PmMYB169* 的表达量随低磷胁迫时间延长呈上调趋势, 说明 *PmMYB169* 参与了低磷胁迫应答; 对不同组织的表达分析发现, *PmMYB169* 为组成型表达, 在马尾松根茎叶中均有表达, 以叶的表达量最高.

关键词: 马尾松; 低磷胁迫; MYB 转录因子; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785; S791.248

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)03-0048-07

马尾松(*Pinus massoniana*)是我国亚热带地区典型的针叶乡土树种, 也是我国松树中分布面积最广的主要树种之一, 其以生长快、产量高、适应力强、分布面积广、经济价值高、应用广泛等特性, 成为了我国南方地区主要的优质针叶用材树种之一^[1]. 作为马尾松生长的亚热带地区, 森林多为酸性红壤, 可溶性磷酸盐含量仅为 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 有些地区含量甚至更少, 严重地影响了马尾松的生长, 制约了其商品材的质量^[2]. 磷是植物生长发育必不可少的营养元素, 在核酸、磷脂和 ATP 的合成中起关键作用, 参与新陈代谢通路调节和关键酶的调控^[3]. 传统上通过施加磷肥使土壤得到改良能解决有效磷的缺乏, 但大量施用磷肥不仅会提高生产成本, 也会造成土壤磷素的异常累积, 从而面临水体富营养化等生态问题^[4]. 因此, 重视土壤磷素缺乏的多样化特点, 有针对性地选育出磷高效利用优良品种, 对提高磷素贫瘠人工林的生产力极为重要.

作为植物转录因子家族中数量最多的一类转录因子, MYB 转录因子广泛地参与了植物生长发育、细胞形态建成、次生物质代谢、信号转导及环境应答等多种生命活动^[5]. Hernández 等^[6]通过对大豆低磷胁迫后转录组分析发现, 大部分受到低磷诱导的转录因子都为 MYB 类转录因子. 在前期工作中, 通过耐低磷种质转录组分析, 发掘了应答低磷胁迫的 MYB 类转录因子^[7]. 在此基础上, 本研究克隆了马尾松 *PmMYB169* 基因的全长序列, 并进行了序列分析和蛋白质结构、功能预测; 在低磷胁迫下, 分析了该基因的时空性表达, 旨在为揭示马尾松耐低磷胁迫机制提供新信息.

1 材料与方法

1.1 植物材料与胁迫处理

选择四川眉山林场一代种子园耐低磷家系的种子, 经表面消毒后在 30 $^{\circ}\text{C}$ 无菌水中过夜浸泡催芽, 种

① 收稿日期: 2016-03-06

基金项目: 国家 863 子项目(2011AA10020301); 贵州省科技重大专项(20126011-1).

作者简介: 刘沛宇(1991-), 男, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 主要从事林木生物技术与遗传育种的研究.

通信作者: 文晓鹏, 教授.

植于石英砂介质的胸径 12 cm 的营养钵中. 待幼苗出芽 28 d 后进行磷胁迫与对照处理, 以全 Hoagland 营养液作为对照, 磷胁迫处理的营养液配方参考秦晓佳等的方法^[8], 胁迫时间为 12, 24, 36, 48 和 60 d, 按胁迫时间采集对应的马尾松幼苗, 置于 -80 °C 超低温冰箱中保存.

1.2 RNA 提取与 *PmMYB169* 全长克隆

所有试剂和容器均作无 RNase 处理, 容器用 0.1% DEPC 水浸泡过夜, 高温高压灭菌. 按照艾德莱生物公司 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒中的步骤进行总 RNA 提取.

根据前期课题组对低磷胁迫下马尾松转录组测序获得的 MYB 基因 EST 序列片段 MYB169, 共 558 bp, 在 Primer Premier 5 中设计特异性克隆全长的巢式引物(表 1), 按照 SMART RACE 5'/3' Kit 中步骤对 MYB169 基因进行 3' 和 5' 的巢式 PCR 扩增. 目的片段经回收, 连接到 pRACE 载体上, 再将载体转入感受态细胞中, 均匀涂于添加有 Amp 抗生素的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜; 次日随机挑取单克隆菌落, 并用 M13 载体引物进行菌落 PCR 验证, 确认目的条带后送英骏公司进行测序.

表 1 *PmMYB169* 基因克隆所用引物列表

引物名称	引物序列(5' to 3')	引物名称	引物序列(5' to 3')
<i>PmMYB169</i> GSP1	GGAGAGGAGAGGCATTTGACGAAC	<i>PmMYB169</i> NGSP2	TACCCTGTCGCTCTTGTCAGTGGA
<i>PmMYB169</i> GSP2	GA CT CAGATTTAGAGGTTACCGAGATGG	<i>PmMYB169</i> -F	AGAATGAATCCAAGGTGGCCCTACT
<i>PmMYB169</i> NGSP1	GACGGCAGGAGTTGAGCAAAGGTTTC	<i>PmMYB169</i> -R	ACGTCACATATGATGAGCATATGAA

1.3 序列分析

利用 NCBI 中在线软件 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>)对序列的载体与引物接头部分进行去除, 用生物学软件 DNASTAR 中 Seqman 对测序序列进行拼接, 并使用在线软件 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测和分析其开放阅读框. 根据获得的全长序列经 NCBI 在线检索分别获得 *PmMYB169* 基因与其它植物的核酸和氨基酸序列的同源性, 氨基酸序列比对采用 ClustalX2 软件, 进化树构建用 MEGA6; 利用在线软件 ExPASy(<http://www.expasy.org/>)中 ProtParam 和 ProtScale 对获得的蛋白序列理化特性进行分析; 用 Signal P4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对蛋白的信号肽进行预测; 用 SOPMA(<http://metadatabase.org/wiki/SOPMA>)在线软件对蛋白二级结构进行预测; 用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件对蛋白跨膜区域进行预测; 用 WoLFPSORT(<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)在线软件进行亚细胞定位预测; 用 SWISS-MODEL 数据库(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白三维结构.

1.4 *PmMYB169* 时空表达分析

根据 *PmMYB169* 基因序列, 利用 Primer Premier 5 软件设计相应的荧光定量和半定量引物, 以前期确定的适合的 *UBC* 和 *GADPH* 作为荧光定量内参基因(表 2), 以马尾松不同磷胁迫时期和不同组织的 cDNA 为模板, 根据 PowerUp™ SYBR Green Master Mix 提供的说明配制荧光定量 PCR 体系, 用 ABI 公司的 CFX Connect™ Real-Time System 进行荧光定量 PCR 扩增. 重复 3 次, 结果 Ct 值根据 Livak 和 Schmittgen(2001) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法分析数据获得相对表达量.

表 2 *PmMYB169* 基因 qPCR 所用引物列表

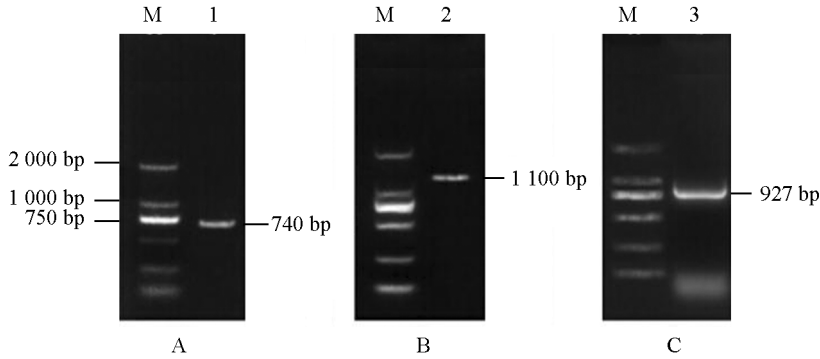
基 因	引物名称	引物序列(5' to 3')
<i>UBC</i>	UBC-F	GATTTATTTCAATTGGCAGGC
	UBC-R	AGGATCATCAGGATTTGGGT
<i>GADPH</i>	GADPH-F	AGGAGAGGACCAAGATAGGAAT
	GADPH-R	CCGCTGATGGAGAAAT
<i>PmMYB169</i>	<i>PmMYB169</i> -qRTF	TACCCTGTCGCTCTTGT
	<i>PmMYB169</i> -qRTR	CTGGCTGCATCGTCTTCTATT

2 结果与分析

2.1 *PmMYB169* 全长克隆

通过 RACE 方法对已有的 MYB169 基因 EST 序列进行扩增, 设计巢式扩增引物 *PmMYB169*GSP1、

PmMYB169GSP2、*PmMYB169NGSP1* 和 *PmMYB169NGSP2*, 经巢式 PCR 扩增获得 3'端序列约 740 bp (图 1A), 5'端序列约 1 100 bp(图 1B), 拼接共获得全长 1 407 bp; 利用 ORF Finder 对拼接的全长进行开放阅读框预测, 获得预测的开放阅读框大小为 927 bp, 非翻译区 5'-UTR 为 187 bp, 非翻译区 3'-UTR 为 293 bp, 编码 308 个氨基酸; 用 Primer Premier 5 在开放阅读框两端设计引物 *PmMYB169-F* 和 *PmMYB169-R*, 用以扩增基因 cDNA 全长, 通过测序验证表明所扩增得到的产物大小与预期片段大小相同 (图 1C), 说明克隆 *PmMYB169* 成功。



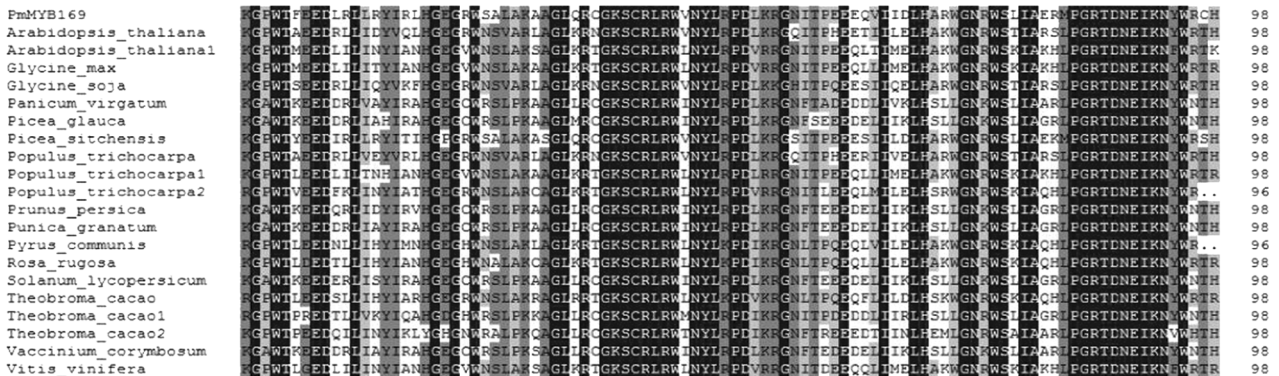
A. 3'-RACE 扩增, B. 5'-RACE 扩增, C. ORF PCR 扩增。

M. DL2000 Marker, 1-3. 依次为 3', 5'RACE 与完整 ORF 扩增产物。

图 1 *PmMYB169* 基因 RACE PCR 电泳图

2.2 *PmMYB169* 序列分析

利用 NCBI 中 Blast 对 *PmMYB169* 编码氨基酸进行同源性比对结果显示, *PmMYB169* 与北美云杉 (*Picea sitchensis* ABR16467.1) 在 MYB 保守结构域区域同源性最高, 可达到 87.88%, 与杨树 (*Populus trichocarpa* XP_002314515.1)、大豆 (*Glycine max* NP_001235865.1)、番茄 (*Solanum lycopersicum* NP_001233975.1)、石榴 (*Punica granatum* AJD79907.1) 等 15 种植物 MYB 转录因子结构域同源性都在 68%~73%(图 2), 说明马尾松 *PmMYB169* 在 MYB 结构域上保守性较高, 在进化过程中氨基酸的变化不大。在 *PmMYB169* 的保守结构域中, 存在典型的螺旋-转角-螺旋(HTH)结构, 该结构可与 DNA 区域相结合, 推测可能具有转录调控作用。



右侧数字为 MYB 保守结构域氨基酸个数。

图 2 *PmMYB169* 保守结构域氨基酸序列比对

利用 MEGA6 软件对氨基酸比对结果进行系统发育树构建, Boot-strap 值设定为 1 000. 结果显示, *PmMYB169* 与同为松科的北美云杉(*Picea sitchensis* ABR16467.1) 进化距离最近(图 3), 说明 *PmMYB169* 与北美云杉亲缘关系最近。木本植物杨树、可可树和梨树与 *PmMYB169* 亲缘关系较为接近, 3 个物种分布在进化树同一分支上; 与其亲缘关系较为接近的分支上也存在双子叶植物拟南芥、葡萄、大豆和玫瑰, 这可能由于 MYB 结构域在进化过程中保守程度高所致。

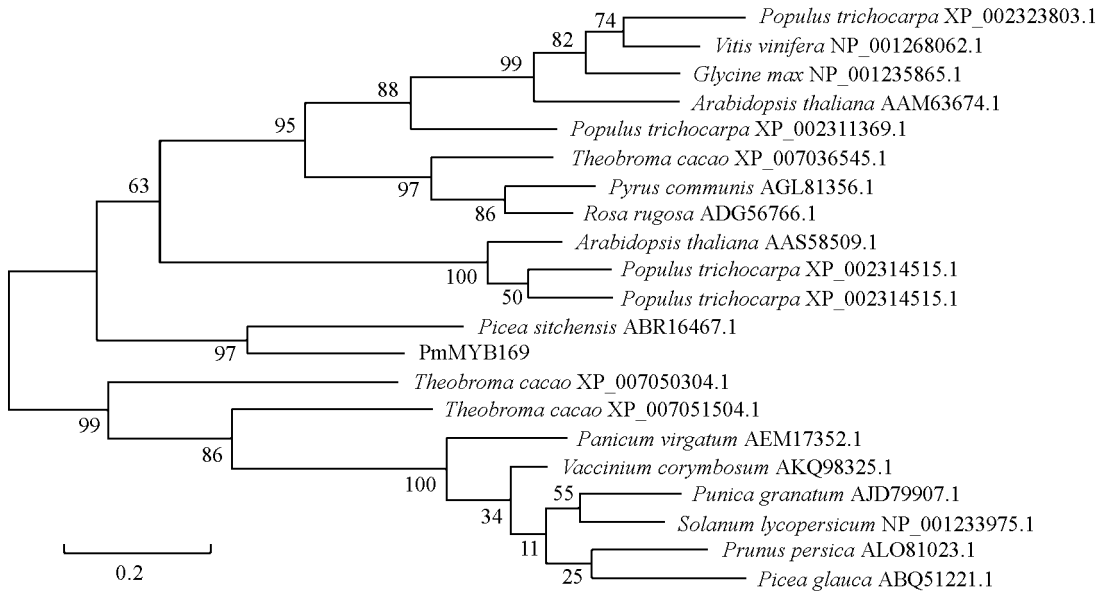


图 3 马尾松 *PmMYB169* 系统发育分析

2.3 *PmMYB169* 蛋白结构及理化特性分析

PmMYB169 全长共 1 407 bp, 编码 308 个氨基酸, 其中开放阅读框范围为 188 bp~1 114 bp. 利用在线软件 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 中 ProtParam 分析 *PmMYB169* 编码蛋白的理化性, *PmMYB169* 蛋白分子量为 34 703.2, 理论等电点(PI)为 6.32. 氨基酸含量较丰富的是 Leu(L)9.4%, Ser(S)8.8%, Ala(A)7.5%, Arg(R)6.8%, Pro(P)6.8%. 总蛋白质不稳定指数为 51.60, 属于不稳定蛋白质. 负电荷残基(Asp+Glu)总数为 38, 正电荷残基(Arg+Lys)总数为 35. 离体哺乳动物红细胞中半衰期为 30 h, 酵母体内为 20 h, 大肠杆菌体内为 10 h.

利用 ProtScale Sever 在线分析结果显示, *PmMYB169* 蛋白质得分最小负值为 -2.478, 最大正值为 1.211, 总平均疏水指数(GRAVY)为 -0.627, 所以 *PmMYB169* 为亲水蛋白. 利用 TMHMM 在线预测分析得到 *PmMYB169* 蛋白无跨膜部分存在. 利用 KinasePhos 在线预测对 *PmMYB169* 蛋白进行蛋白磷酸化位点预测结果显示, *PmMYB169* 蛋白中含有磷酸化位点, 包括 8 个丝氨酸(Ser)和 2 个苏氨酸(Thr)和 2 个酪氨酸(Tyr). 用 SignalP 4.1 Server 对 *PmMYB169* 预测结果显示, *PmMYB169* 基因所编码的蛋白不存在信号肽, 为非分泌蛋白. 利用 WoLFPSORT 在线软件对 *PmMYB169* 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果显示 nucl: 11, cyto: 1, pero: 1, 推测 *PmMYB169* 蛋白最可能存在于细胞核中.

利用 SOPMA 在线软件对 *PmMYB169* 蛋白进行蛋白二级结构预测, 结果显示 *PmMYB169* 蛋白由 30.84%的 α -螺旋、13.64%的延伸链、5.84% β 转角和 49.68%的无规则卷曲构成(图 4).

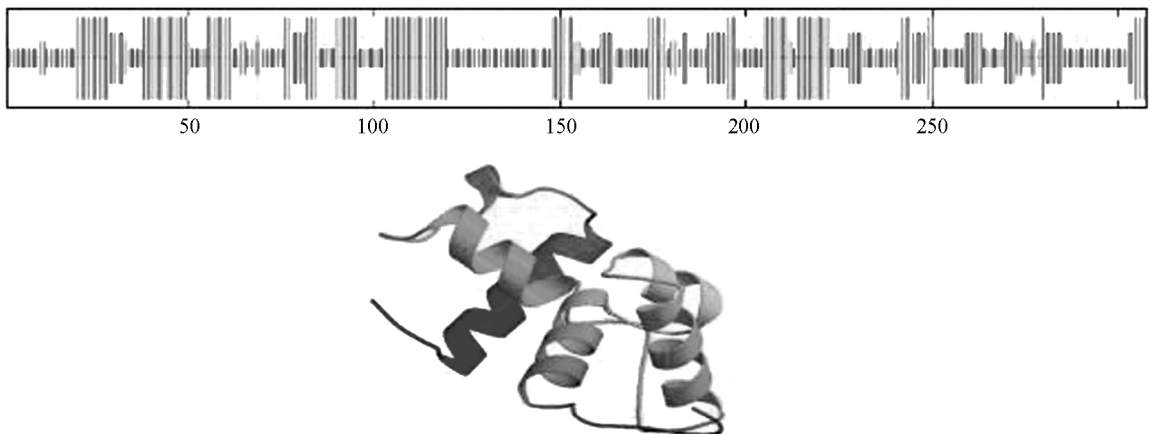


图 4 *PmMYB169* 蛋白二级结构与三维结构预测

利用 SWISS-MODEL 数据库预测 *PmMYB169* 蛋白三维结构. 结果表明, *PmMYB169* 的三维建模模

板编号为 3zqc. 3. A(MYB3 蛋白), 与模板有较高相似度的是在 16—114 位氨基酸, 相似度为 36.11%。这与在 NCBI Conserved domains 中预测的保守蛋白结构域范围一致, 预测分析显示 *PmMYB169* 蛋白结构在 16—63 位有一个 MYB 家族结构域; 在 69—114 位有另一个 MYB 家族结构域, 即 *PmMYB169* 基因为 MYB 家族中数量庞大的 R2R3 类 MYB 基因。

2.4 *PmMYB169* 的时空表达分析

以特定内参基因作为衡量标准, 通过实时定量 PCR 对马尾松不同组织器官及不同磷胁迫时间的表达进行分析, 能够在一定程度上反映 *PmMYB169* 基因在不同器官中表达差异和在磷转运调节过程中的作用。结果显示, *PmMYB169* 在根茎叶中均有表达, 且在 60 d 低磷胁迫处理后表达量达到最高值, 嫩叶中最高, 嫩根中次之, 嫩茎中最低。随着磷胁迫时间增加各组织中表达量均呈现上升—下降—上升的趋势, 在根和茎中, 36 d 的表达量最低, 60 d 的表达量最高; 而在叶中, 24 d 的表达量最低, 60 d 的表达量最高。与对照组相比, 茎中除 24 d 和 60 d 的表达量高于对照组, 其他时间段表达量都低于对照组; 根中只有 36 d 的表达量低于对照组; 叶中只有 24 d 的表达量低于对照组(图 5)。

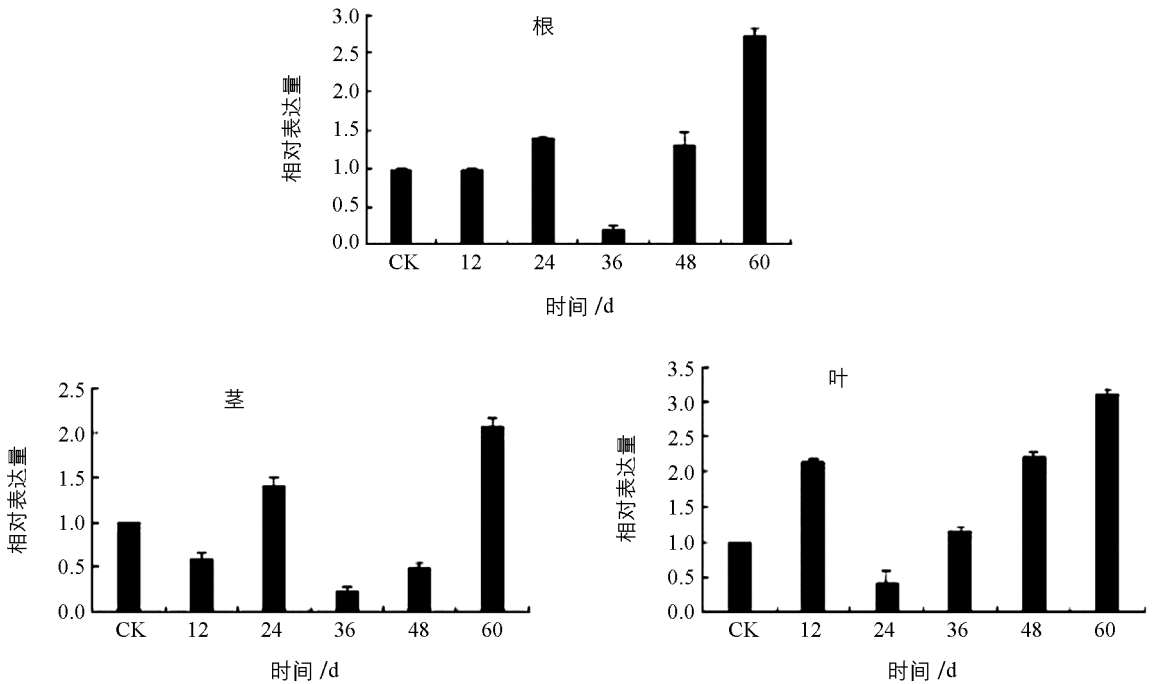


图 5 磷胁迫下不同器官 *PmMYB169* 的表达模式

3 讨论

在 MYB 结构域中色氨酸起着疏水作用, 对维持 HTH 构型有着特别重要的意义。有时色氨酸残基会被芳香族氨基酸或疏水氨基酸所取代, 尤其是 R3 结构域的第一个色氨酸常被亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸所取代^[9]。根据氨基酸残基的重复数目, 可以将 MYB 家族分为 4 个大类, 1R-MYB、R2R3-MYB、3R-MYB 和 4R-MYB, 其中以 R2R3 类 MYB 家族为多数^[10]。近年来在棉花^[11]、大豆^[12]、云杉^[13]、香梨^[14]等植物中克隆了不少 MYB 家族的基因, 不仅丰富了 MYB 家族成员, 并且逐渐完善了 MYB 家族基因对植物在生长发育、信号转导和逆境响应方面的作用与机制。研究发现陆地棉 *GhMYB11* 基因在棉花幼苗叶片响应黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)侵染、干旱、盐和氧化胁迫中表达显著上调^[15], 可能在生物与非生物胁迫中起到重要的作用。

MYB 转录因子作为转录因子家族中重要的成员, 通过与真核基因启动子区域中顺式作用元件特异性结合, 激活或抑制转录, 从而达到调节植物生长发育。在逆境胁迫中, MYB 转录因子同样也起到了关键作用, 近年来研究表明, 当植物受到外界环境胁迫时, 植物通过其信号转导途径能有效的调控体内相关功能基因表达, 进而引发一系列生理生化反应, 并形成高效有序的信号调控网络, 从而降低或消除给植物带来的危害^[16]。如拟南芥中 *MYB68* 基因, 高温胁迫下在根的中柱鞘细胞中特异表达, 其表达量的增高, 使得 *MYB68* 突变体生活力低于野生型, 从而参与高温应答^[17]。Ren 等^[18]在甘蓝型油菜中成功克隆出与拟南芥

AtPHR1 同源的基因 *BnPHR1*, 该基因在根中表达, 表达水平受外界磷水平调控, 其超表达能使高亲和磷转运因子 AtPT2 与 BnPT2 表达量大幅度提高. R2R3 类 MYB 转录因子, 作为 MYB 转录因子家族中最庞大的一类, 在调控次生代谢、细胞形态发生、激素刺激和环境胁迫应答、分生组织形成及细胞周期控制等方面都有广泛的作用^[19]. 如欧美杨中克隆的 *PeMYBF1* 在雄花序与雌花序中特异性表达, 可能参与欧美杨花的发育调控, 在发育不同时期花序中 *PeMYBF1* 基因表达水平受到严格调控^[20].

本文克隆得到的马尾松 MYB 转录因子 *PmMYB169*, 其推定蛋白具有典型的螺旋-转角-螺旋结构, 存在 2 个 MYB 家族结构域, 为 MYB 基因家族里数量最多的 R2R3 类 MYB 基因. 氨基酸序列同源性比较表明, *PmMYB169* 与松科云杉属亲缘关系最近, 与蔷薇科梨属 (AGL81356.1) 亲缘关系也较近, 保守序列中氨基酸序列相似度也较高. Wang 等在欧洲梨中克隆出的 *PcMYB10*, 作为 R2R3 类 MYB 转录因子, 参与表皮花青素积累^[21]. 通过对 *PcMYB10* 启动子的甲基化程度分析发现, 启动子高水平甲基化会降低 *PcMYB10* 在绿色表皮中的表达. 推测本文的 *PmMYB169* 除了在非生物胁迫中对磷吸收转运方面有一定作用外, 还可能在花青素积累方面也存在功能性表达.

PmMYB169 在根、茎和叶中的实时定量分析表明, *PmMYB169* 在此 3 个器官中均有表达, 且叶中表达量最高, 这个结果与 Zhou 等人在水稻中克隆的 *OsPHR1* 和 *OsPHR2* 表达部位和表达情况基本一致^[22], 推测可能由于 *PmMYB169* 特异性结合顺式作用元件, 调控磷转运相关基因, 参与植株从营养液中吸收磷、磷从根到茎的转运及磷在叶衰老时的再分配. 低磷胁迫不同时间段 *PmMYB169* 的实时定量分析表明, 随着胁迫时间的增加, *PmMYB169* 在不同组织中表达水平整体上升, 但在个别处理天数, 如 36 d, *PmMYB169* 在根和茎中表达量出现低谷, 而叶中表达量出现低谷则是在 24 d, 这个结果与王秀红等人在玉米中克隆的 *ZmPHR1* 在磷饥饿处理不同天数, 不同组织中基因的表达量有不同, 表现为先上调后下调再上调的趋势相近^[23], 推测前期 *PmMYB169* 可能对磷胁迫反应不太敏感, 只是微弱的上调, 在 60 d 后由于植株受到磷胁迫影响, *PmMYB169* 表达量提高, 使高亲和磷转运蛋白在根、茎和叶表达增大, 从而提高植株对的磷吸收, 也可能是 *PmMYB169* 与调控磷转运相关基因的上游顺式作用元件结合, 从而调控磷转运. 后期将通过遗传转化深入探讨 *PmMYB169* 的功能.

本研究通过对马尾松 *PmMYB169* 的克隆和其在低磷胁迫下的表达分析, 从低磷胁迫下马尾松 *PmMYB169* 基因的时空表达差异动态角度, 探讨了其在耐低磷方面的可能重要作用, 为后续深入了解马尾松抗逆机理及提高马尾松耐低磷生长提供了候选基因.

参考文献:

- [1] 丁贵杰, 吴协保, 王鹏程. 马尾松纸浆材林经营模型系统及优化栽培模式研究 [J]. 林业科学, 2002, 38(5): 7-13.
- [2] 周志春, 谢钰容, 金国庆, 等. 马尾松种源对磷肥的遗传反应及根际土壤营养差异 [J]. 林业科学, 2003, 39(6): 62-67.
- [3] THEODOROU M E, PLAXTON W C. Metabolic Adaptations of Plant Respiration to Nutritional Phosphate Deprivation [J]. Plant Physiol, 1993, 101(2): 339-344.
- [4] 曹靖, 张福锁. 低磷条件下不同基因型小麦幼苗对磷的吸收和利用效率及水分的影响 [J]. 植物生态学报, 2000, 24(6): 731-735.
- [5] HAILING J, CATHIE M. Multifunctionality and Diversity within the Plant MYB-Gene Family [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 41(5): 577-585.
- [6] HERNÁNDEZ G, RAMÍREZ M, VALDÉS-LÓPEZ O, et al. Phosphorus Stress in Common Bean: Root Transcript and Metabolic Responses [J]. Plant Physiol, 2007, 144(2): 752-767.
- [7] FAN Fu-hua, CUI Bo-wen, ZHANG Ting, et al. LTR-Retrotransposon Activation, IRAP Marker Development and Its Potential in Genetic Diversity Assessment of Masson Pine (*Pinus massoniana*) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 10(1): 213-222.
- [8] 秦晓佳, 丁贵杰. 低磷胁迫对不同种源马尾松幼苗的影响 [J]. 林业科技, 2012, 37(3): 1-5.
- [9] KAZUHIRO O, SOUICHI M, HARUKI N, et al. Solution Structure of a Specific DNA Complex of the Myb DNA-Binding Domain with Cooperative Recognition Helices [J]. Cell, 1994, 79(4): 639-648.
- [10] CHRISTIAN D, RALF S, ERICH G, et al. MYB Transcription Factors in Arabidopsis [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(10): 573-581.
- [11] 于月华, 倪志勇, 梁小莉, 等. 棉花转录因子基因 GhMYB 的克隆及特征分析 [J]. 棉花学报, 2015, 27(1): 31-38.
- [12] 魏麦玲, 裴丽丽, 刘佳明, 等. 大豆 MYB 转录因子基因 GmMYB174 的克隆及分子特性分析 [J]. 植物遗传资源学报,

2015, 16(1): 94–99.

- [13] FRANK B, JACQUELINE G P, JOHN M. Conifer R2R3-MYB Transcription Factors; Sequence Analyses and Gene Expression in Wood-Forming Tissues of White Spruce (*Picea glauca*) [J]. BMC Plant Biology, 2007, 7(1): 1–17.
- [14] WANG Bo-hui, SUN Xiao-xia, DONG Fang-yuan, et al. Cloning and Expression Analysis of an MYB Gene Associated with Calyx Persistence in Korla Fragrant Pear [J]. Plant Cell Rep, 2014, 33(8): 1333–1341.
- [15] 李菲, 柳展基, 王立国, 等. 棉花转录因子基因(GhMYB11)的克隆与表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 161–169.
- [16] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. MYB转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理 [J]. 遗传, 2008, 30(10): 1265–1271.
- [17] FENG C P, ANDREASSON E, MASLAK A, et al. Arabidopsis MYB68 in development and responses to environmental cues [J]. Plant Sci, 2004, 167(5): 1099–1107.
- [18] REN Feng, GUO Qian-qian, CHANG Li-li, et al. Brassica Napus PHR1 Gene Encoding a MYB-Like Protein Functions in Response to Phosphate Starvation [J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e44005.
- [19] 乔孟, 于延冲, 向凤宁. 拟南芥 R2R3-MYB类转录因子在环境胁迫中的作用 [J]. 生命科学, 2009, 21(1): 145–150.
- [20] 宿红艳, 王磊, 王仲礼, 等. 欧美杨 R2R3-MYB家族新基因 PeMYBF1的克隆及表达 [J]. 林业科学, 2011, 47(1): 42–49.
- [21] WANG Zhi-gang, DONG Meng, AIDE WANGg, et al. The Methylation of the PcMYB10 Promoter Is Associated with Green-Skinned Sport in Max Red Bartlett Pear [J]. Plant Physiology, 2013, 162(2): 885–896.
- [22] ZHOU J, JIAO F C, WU Z C, et al. OsPHR2 is Involved in Phosphate-Starvation Signaling and Excessive Phosphate Accumulation in Shoots of Plants [J]. Plant Physiol, 2008, 146(4): 1673–1686.
- [23] WANG X H, BAI J R, LIU H M, et al. Overexpression of a Maize Transcription Factor ZmPHR1 Improves Shoot Inorganic Phosphate Content and Growth of *Arabidopsis* under Low-Phosphate Conditions [J]. Plant Mol Biol Rep, 2012, 31(3): 665–677.

Cloning and Expression Analysis of *PmMYB169* Gene from *Pinus massoniana*

LIU Pei-yu^{1,2}, LIU Xiao-cui², YANG Kun²,
PENG Lei², QIAO Guang², WEN Xiao-peng²

1. College of Life Sciences/Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: MYB gene family plays an important role in plant growth and development and in responses to abiotic stresses. In a study reported in this paper, a full-length cDNA sequence of *PmMYB169* was cloned from masson pine (*Pinus massoniana*) using RT-PCR and RACE, and its expression under low phosphorus stress was analyzed. *PmMYB169* was 1 407 bp in total length, with an open reading frame (ORF) of 927 bp, encoding 308 amino acids. Bioinformatics analysis revealed that *PmMYB169* sequence belonged to R2R3-MYB, which contained MYB family structure with the conservative domains. Phylogenetic analysis showed that *PmMYB169* was most close to the MYB gene of *Picea sitchensis* and had fairly high homology in MYB family conservative domains. Fluorescence quantitative PCR analysis revealed that the expression of *PmMYB169* demonstrated a trend of up-regulation with the prolonging of phosphorus deficit, suggesting its involvement in the low phosphorus response pathway. Furthermore, *PmMYB169* gene was constitutively expressed because it could be detected in root, stem and leaf of the plant, among which leaf showed the highest expression.

Key words: *Pinus massoniana*; phosphorus deficiency; MYB transcription factor; gene cloning; expression analysis

