

石榴种皮木质素含量及 *PgSND1* 基因的表达与初步功能分析

夏小丛, 杨选文, 曹尚银*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:【目的】探讨石榴籽粒硬度的形成机制和 *PgSND1* 在石榴种皮木质素合成过程中的功能。【方法】测定了不同品种、不同发育时期石榴籽粒硬度和种皮木质素含量, 并且分析了 *PgSND1* 在石榴不同组织、不同品种、不同发育时期的表达模式, 以及 *PgSND1* 作为一个转录因子来发挥的转录调控功能。【结果】不同发育时期的‘突尼斯’和‘三白’石榴籽粒硬度与木质素含量呈正相关, 相关系数为 0.964 1。从‘突尼斯’软籽石榴中分离了 *PgSND1*, 开放阅读框为 1 245 bp, 编码 415 个氨基酸, 与 AtNST3(SND1) 亲缘关系较近, 蛋白同源性达到 48.324%。PgSND1 蛋白的 N 端含有一个保守的 NAC 结构域, 转录自激活结构域位于 C 端。PgSND1 转录因子可以通过形成同源蛋白二聚体来发挥其转录调控功能。【结论】推测 *PgSND1* 可能转录抑制调控石榴种皮木质素的合成。

关键词: 石榴; 籽粒硬度; 木质素; *PgSND1*; 表达分析

中图分类号: S665.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)Suppl.-074-06

Total lignin content in pomegranate seed coat and expression analysis and preliminary functional analysis of *PgSND1* gene

XIA Xiacong, YANG Xuanwen, CAO Shangyin*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】 In order to study the mechanism of the formation of seed hardness and the function of *PgSND1* on lignin synthesis in pomegranate seed coat. 【Methods】 We measured the seed hardness and lignin content of pomegranate in different cultivars and different development stages, and analyzed the expression pattern of *PgSND1* in different tissues, cultivars and development stage of pomegranate, and how *PgSND1* functions as a transcription factor. 【Results】 There was a positive correlation between the hardness and the lignin content of ‘Tunisia’ soft seed and ‘Sanbai’ at different developmental stages, and the correlation coefficient was 0.964 1. *PgSND1* was isolated from the ‘Tunisia’ pomegranate genome. We used the ClustalW software and MEGA5.0 software to systematically analyze the relationship between the *PgSND1* and the Arabidopsis thaliana NAC family members. The results showed that *PgSND1* was in the same subgroup as AtNST1-3, and was in the same branch as AtNST3 (SND1), indicating that their close relationship. The open reading frame of *PgSND1* was 1 245 bp, and encode a protein with 415 amino acids. Phylogenetic analysis showed that *PgSND1* shares 48.324% similarity with AtNST3. *PgSND1* has a conserved NAC-like domain that contains five subdomains at the N-terminus, and contains a conserved LP and WQ motif at the C-terminus, which are similar to NST1-3 in *Arabidopsis thaliana*. We create the fusion construct of *pGBKT7-PgSND1*, *pGBKT7-PgSND1N* and *pGBKT7-PgSND1C*. The fusion vector were transformed into yeast strains AH109 and Y187 (containing the ADE2 and LacZ reporter genes), respectively. The full length of *PgSND1* and the C-terminus of *PgSND1* showed transcriptional self-activa-

收稿日期: 2017-08-15

接受日期: 2017-09-05

基金项目: 国家科技基础性工作专项重点项目“我国优势产区落叶果树农家品种资源调查与收集”(2012FY110100); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2017-ZFRI)。

作者简介: 夏小丛, 女, 研究方向为果树遗传育种。E-mail: 1127141855@qq.com

*通信作者 Author for correspondences. Tel: 0371-65330963, E-mail: 13937192127@163.com

tion activity, and the N-terminus of *PgSND1* lacks the activity of transcriptional self-activation. *PgSND1* can interact with itself in the yeast cell, therefore, *PgSND1* functions by forming homodimers. The expression level of *PgSND1* was higher in leaves, roots and stems of 'Tunisia', but it was little expressed at 30 days after Booting, and the expression level of *PgSND1* increased at 60 days and 120 days after booting. While, *PgSND1* was little expressed in 'Sanbai'.【Conclusion】We speculated that *PgSND1* may inhibit the synthesis of lignin in pomegranate seed coat.

Key words: Pomegranate; Breed hardness; Lignin; *PgSND1*; Expression analysis

石榴(*Punica granatum* L.),属于石榴科石榴属落叶果树,灌木或小乔木,原产于伊朗、阿富汗等中亚地区,后来广泛栽培于热带、亚热带地区^[1]。石榴果实中含有丰富的天然活性物质,具有较高的保健价值^[2]。籽粒硬度是影响石榴品质的一个重要因素,石榴籽粒软硬直接影响它的口感和市面上受欢迎的程度。陆丽娟等发现石榴籽粒的硬度性状可能由多个基因来控制,同时也可能存在着主效基因,此外光照、树体营养等环境因素对石榴籽粒硬度也具有一定的影响^[3]。杭志奇等^[4]指出石榴种皮中木质素含量很高,这直接影响着籽粒硬度。张水明等^[5]研究发现,石榴的籽粒硬度和种皮总木质素含量之间存在显著的正相关关系。

木质素是广泛存在于植物体内的一种芳香性高聚物,主要沉积在维管植物次生增厚的细胞壁中^[6]。近年来的研究表明,MYB和NAC等转录因子在木质素生物合成中起重要的调控作用。1997年,Aida等^[7]发现在矮牵牛*NAM*基因、拟南芥*ATAF1/2*和*CUC2*基因编码蛋白N端都包含一段保守的150个氨基酸序列,把这个氨基酸序列命名为NAC结构域。Kubo等采用微阵列分析方法在拟南芥中发现7个维管发育相关并含有NAC结构域的转录因子VND1-7,它们的功能与根维管组织木质部分化相关。Mitsuda等^[8]采用嵌合显性抑制策略揭示出两个NAC转录因子NST1和NST2,它们对花药内皮层细胞次生壁加厚是非常重要的。SND1/NST3位于整个次生壁合成网络的上游,是控制纤维次生壁合成代谢的一种主要转录调控开关。过表达*SND1*可激活次生壁生物合成基因的表达,导致次生壁的增厚^[9]。目前,已经在杨树、水稻和玉米中发现了SND1的同源蛋白,发现它们与拟南芥SND1功能相似。

笔者通过测定不同时期、不同石榴品种的籽粒硬度与种皮总木质素含量,分析2者的相关性。对*PgSND1*进行了生物信息学分析,分析其作为一个

NAC转录因子来发挥功能。RT-PCR技术分析了*PgSND1*在不同时期、不同石榴品种中的表达水平,这些为深入了解石榴软籽性状的产生机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料均取自中国农业科学院郑州果树研究所石榴资源圃。分别选取‘突尼斯’和‘三白’花后30、60、120 d的籽粒,部分4℃保存,用于总木质素含量测定;部分-80℃保存,用于基因表达分析。

1.2 试验仪器

荧光定量PCR仪、紫外可见分光光度计、TA-XT质构仪、30℃培养箱、37℃培养箱。

1.3 实验方法

1.3.1 种子硬度测量 使用TA-XT质构仪测定种子硬度。每个石榴品种选取30粒,3次测量取平均值。

1.3.2 种子木质素含量测量 采用紫外分光光度计法^[10]对石榴种皮的总木质素含量进行测定,各样品测定均3次重复取平均值。

1.3.3 *PgSND1*基因表达分析 以不同品种石榴和不同发育时期的石榴种皮cDNA为模板,以石榴*Actin*为内参,对基因的表达量进行荧光定量检测^[11]。

1.3.4 *PgSND1*的生物信息学分析 通过MEGA5.0软件进行进化树分析,分析*PgSND1*与拟南芥NAC家族成员蛋白的亲缘进化关系。利用ClustalW软件比较*PgSND1*与拟南芥NAC家族部分蛋白的同源性,分析它们蛋白序列中一些保守的结构域。

1.3.5 *PgSND1*酵母表达载体的构建 在*PgSND1*全长序列、N端序列和C端序列的5'端、3'端分别引入*EcoRI*、*BamHI*酶切位点,高保真PFU酶扩增得到带有*EcoRI*和*BamHI*酶切位点的*PgSND1*全长片段以及*PgSND1(N)*和*PgSND1(C)*片段。凝胶电泳检测条带的大小后,切胶回收,分别用*EcoRI*和

*Bam*HI 双酶切目的片段和 *pGADT7/pGBKT7* 载体,之后进行连接、转化,提质粒。

1.3.6 PgSND1 转录自激活检测 AH109 菌株含有报告基因 ADE2, Y187 菌株含报告基因 LacZ, 将 *BD-PgSND1* 载体分别转入酵母菌株 AH109 和 Y187 检测报告基因是否被激活表达即可检测该蛋白是否有自激活现象。含有空 BD 载体的菌株作为阴性对照。将在 SD/-trp 平板上生长的 AH109 阳性克隆划线于 SD/-trp-Ade-His 平板, 若能够生长则说明该蛋白具有自激活效应。同时将在 SD/-trp 平板上生长的 Y187 阳性克隆滴菌于滤纸上进行 X-gal 显色反应, 若显蓝, 则说明该蛋白具有自激活效应。

1.3.7 酵母双杂交 挑取 AH109 阳性转化子和 Y187 阳性转化子到含有 1 mL YPDA 液体的 EP 管中, 30 °C 摇床, 50 r·min⁻¹ 培养 24 h。然后 12 000 r·min⁻¹, 15 s, 离心后弃上清, 用 500 μL 的 0.9% NaCl 悬浮菌体沉淀。取 100 μL 菌液涂于 SD/-Trp/-Leu 平板, 长出合子。如果这个酵母合子能在 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 平板上生长, 说明这 2 个蛋白能相互发生作用。

2 结果与分析

2.1 不同发育时期不同品种石榴籽粒硬度和种皮总木质素含量

对开花后 30、60、120 d 的‘突尼斯’软籽石榴和‘三白’硬籽石榴的籽粒硬度和木质素含量进行测量, 从表 1 中发现随着开花后时间的延长和果实的发育,

籽粒硬度逐渐增强, 木质素含量也都明显增强。同时, ‘三白’籽粒硬度要明显大于突尼斯。籽粒硬度大的, 其木质素含量也相应增高, 两者呈正相关关系。

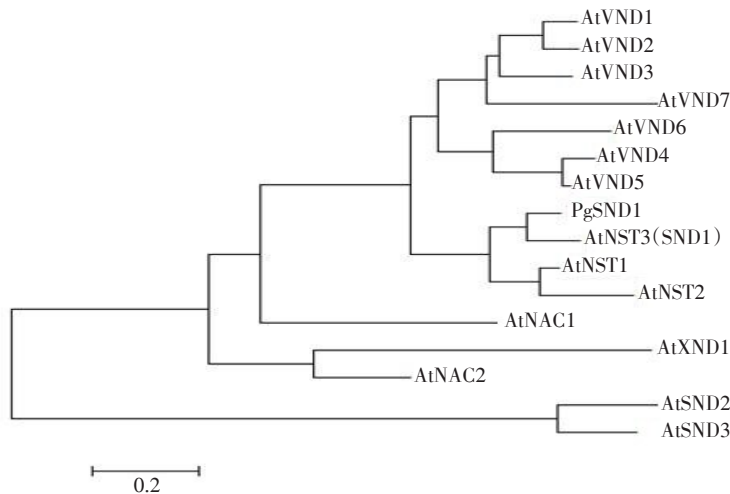
表 1 不同发育时期、不同品种石榴籽粒硬度和木质素含量
Table 1 Seed hardness and lignin content of pomegranate at different development stages and different cultivars

品种 Varieties	发育时期 Time after broom/d	籽粒硬度 Seed hardness/ kg	木质素含量 Lignin content/%
突尼斯 Tunisia	30	0.566±0.166	1.488±0.032
突尼斯 Tunisia	60	1.969±0.466	10.350±0.722
突尼斯 Tunisia	120	2.030±0.706	10.606±0.758
三白 Sanbai	30	0.603±0.223	1.468±0.052
三白 Sanbai	60	4.159±0.671**	13.717±0.687*
三白 Sanbai	120	7.357±1.148**	14.983±0.430*

2.2 PgSND1 的生物信息学分析

2.2.1 PgSND1 蛋白的系统进化分析 为了研究石榴中 PgSND1 蛋白与其他物种中 SND1 蛋白的进化关系, 笔者利用 Clustalw 软件和 MEGA5.0 软件对 PgSND1 与拟南芥 NAC 家族中的成员进行了系统进化分析, 图 1 结果显示 PgSND1 与 AtNST1、2、3 处于同一个亚组, 并且与 AtNST3(SND1) 处于同一个分枝, 说明其亲缘关系较近。

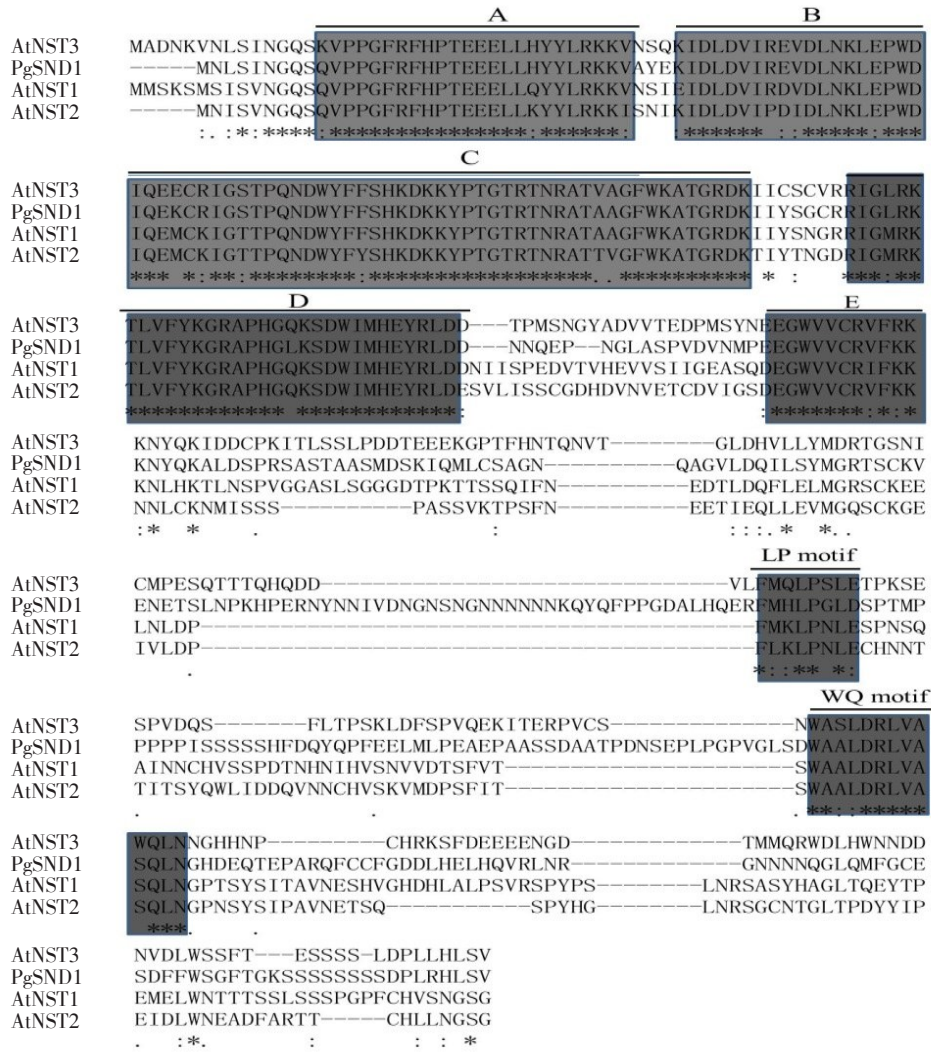
2.2.2 石榴 PgSND1 同源性分析 *PgSND1* (Gglean016635) ORF 全长 1 245 bp, 编码 415 个氨基酸。为了进一步分析 PgSND1 与拟南芥 NAC 家族的亲缘关系, 运用 CLUSTALW 软件进行了同源序列比对。图 2 结果发现: PgSND1 与 AtNST1、2、3 同源性



GeneID: PgSND1 (Gglean016635), AtNST1 (At2g46770), AtNST2 (At3g61910), AtNST3 (At1g32770), AtVND1 (At2g18060), AtVND2 (At4g36160), AtVND3 (At5g66300), AtVND4 (At1g2260), AtVND5 (At1g62700), AtVND6 (At5g62380), AtVND7 (At1g71930), NT XND1 (At5g64530), Nt NAC1 (At1g56010), Nt NAC2 (At5g39610), AtSND2 (AT4G28500), AtSND3 (AT1G28470)

图 1 石榴 PgSND1 蛋白与拟南芥 NAC 家族成员蛋白的系统进化分析

Fig.1 Phylogenetic relationship between PgSND1 and family members of NAC in Arabidopsis



* 表示相同的氨基酸,灰色部分代表保守结构域。

* indicate the same amino acid sites. The conserved domain are indicated in gray.

图2 PgSND1蛋白与拟南芥NST蛋白的序列比对

Fig.2 Amino acid sequence alignment of PgSND1 and Arabidopsis thaliana NST proteins

达到49.863%、46.4072%、48.324%。通过对结构域进行分析,PgSND1 N端序列比较保守,具有一个保守的类似NAC结构域,包含5个亚结构域。并且在蛋白的C端,含有一个保守的LP和WQ基序,这些都与拟南芥中NST1-3相似。这些结果说明PgSND1具备NAC转录因子的特征。

2.3 不同发育时期不同品种石榴中PgSND1基因表达分析

提取‘突尼斯’和‘三白’叶、茎、根、花后30、60、120 d籽粒RNA,逆转录成cDNA。荧光定量结果表明:PgSND1在突尼斯叶、茎中有表达,但是在根中表达量最高(图3)。花后30 d基本不表达,在花后

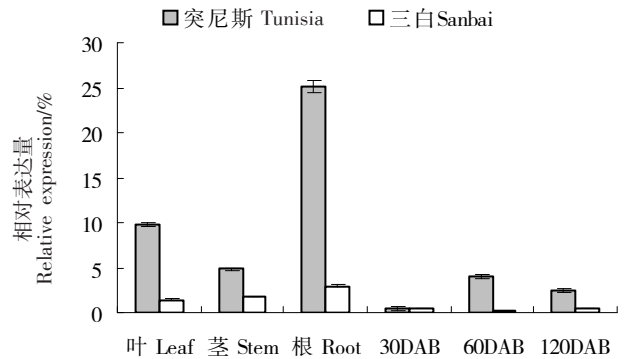


图3 不同发育过程不同品种石榴中PgSND1的表达
Fig.3 Relative expression of PgSND1 at different development stage and cultivars

60 d 和 120 d 表达量稍微有上升。*PgSND1* 在‘三白’根、茎、叶中都有表达,在花后 30、60、120 d 籽粒中基本不表达。

2.4 *PgSND1* 的转录自激活活性分析

为了分析 *PgSND1* 是否具有转录自激活活性(图 4),笔者构建了 *PgSND1* 的融合酵母表达载体,将 *pGBKT7-PgSND1* 载体转化酵母菌株 AH109 和 Y187,发现 AH109 转化子在 SD-Trp/-Ade 和 SD-Trp/-His 平板上都能生长,并且 Y187 转化子经 X-gal 显色显蓝色,说明 *PgSND1* 蛋白具有转录自激活活性。对 *PgSND1* 蛋白进行了 N 端和 C 端的截短,N 端包含前 517 bp,C 端包含 728 bp。发现 *PgSND1N* 端蛋白不具有转录自激活活性,*PgSND1C* 端蛋白具有转录自激活活性,这些结果说明 *PgSND1* 蛋白的转录自激活区域位于蛋白的 C 端。

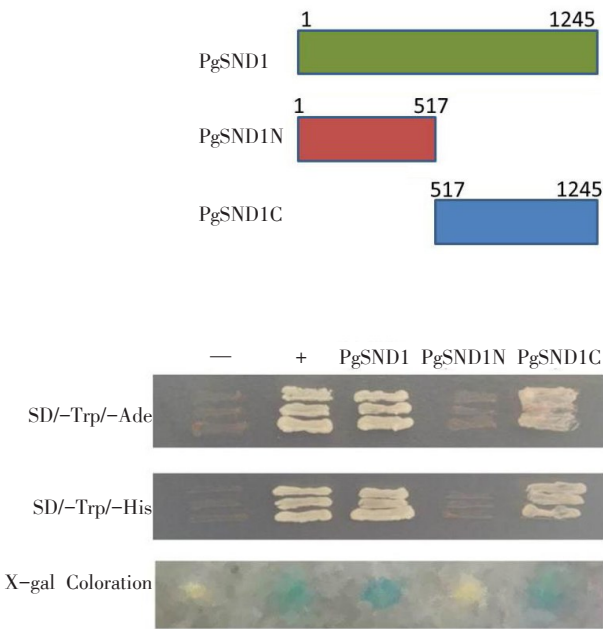


图 4 *PgSND1* 蛋白的转录自激活活性检测

Fig. 4 Transactivation activity assay of *PgSND1* protein

2.5 *PgSND1* 可以通过形成同源二聚体来发挥功能

转录因子一般通过形成同源或异源二倍体来结合 DNA,从而发挥其功能。笔者构建了 *PgSND1* 的融合酵母表达载体,将 *PgADT7-PgSND1* 转化酵母菌株 AH109, *PgBKT7-PgSND1N* 转化酵母菌株 Y187,经过酵母双杂交结果表明:*PgSND1* 可以同自身蛋白相互发生作用,通过形成同源蛋白二聚体来发挥功能(图 5)。

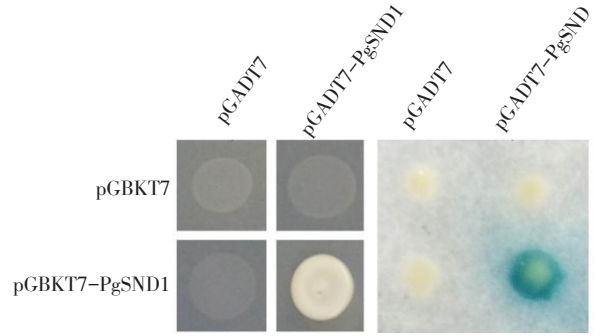


图 5 酵母双杂交验证 *PgSND1* 与自身的交互

Fig. 5 Y2H assays to detect the interactions of *PgSND1* and itself

3 讨论

石榴是一种古老的药用果树,其籽粒中含有丰富的维生素尤其是 B 和 C、微量矿物元素,能够补充人体所缺失的微量元素和营养成分。石榴籽粒软硬程度是重要的果实品质,软籽石榴价值高,需求量大。笔者通过测定‘三白’和‘突尼斯’2 个品种中的籽粒硬度和木质素含量,发现两者呈正相关关系。同时,我们还发现随着果实的发育,其籽粒硬度逐渐增加,并且木质素含量也随之增加。

木质素是维管植物细胞壁的重要组成部分之一,MYB 和 NAC 等转录因子在木质素生物合成中起重要的调控作用。NAC 转录因子的 N 端具有高度保守的 150 个氨基酸构成的 NAC 结构域,可结合 DNA 和其他蛋白^[12]。NAC 转录因子的转录激活区域位于 C 端,不同成员间差别较大^[13]。本研究从石榴基因组中分离了 *PgSND1* 基因,通过与拟南芥 NAC 家族成员进行系统进化分析,发现 *PgSND1* 与 *AtNST3* (*SND1*) 亲缘关系较近。同时,笔者把 *PgSND1* 与拟南芥 *NST1-3* 进行蛋白序列比对,发现其同源性很高,达到 48%。*PgSND1* 蛋白的 N 端也具有保守的 NAC 结构域,在 C 端也具有保守的 LP 和 WQ 基序,并且其转录激活结构域位于 C 端,*PgSND1* 蛋白通过形成同源二聚体来发挥转录调控功能。这些结果说明 *PgSND1* 具备 NAC 转录因子的特征,可能发挥相类似的功能。

本研究通过测定石榴籽粒硬度和木质素含量,明确了两者存在正相关关系。通过实时荧光定量技术分析了 *PgSND1* 在不同品种、不同发育阶段的石榴中的表达水平,结果表明木质素含量与 *PgSND1* 的表达水平可能存在相关关系。*PgSND1* 与拟南芥

中SND1蛋白同源性较高,并且它具备NAC结构域,能形成同源二聚体,说明PgSND1作为NAC转录因子来发挥转录调控功能。PgSND1是否也会是调控石榴籽粒硬度的主开关,还要进一步研究。

参考文献 References:

- [1] HOLLAND D, HATIB K, BAR-YA·AKOV I. Pomegranate: botany, horticulture, breeding [J]. Horticultural Reviews, 2009, 35(2): 127-191.
- [2] 何锦,李勇.石榴的化学组成和功能的研究[J].粮油食品, 2012, 20(2): 42-45.
HE Jin, LI Yong. Research progress on chemical composition and healthy function of pomegranate [J]. Science and Technology of cereals, Oils and Foods, 2012, 20(2): 42-45.
- [3] 陆丽娟,巩雪梅,朱立武.不同品种石榴籽粒硬度的研究[J].安徽农业大学学报, 2006, 33(3): 356-359.
LU Lijuan, GONG Xuemei, ZHU Liwu. Study on seed hardness of pomegranate cultivars in China[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2006, 33(3): 356-359.
- [4] 杭志奇,韩清波,许景松.石榴籽成分分析[J].安徽农业科学, 2010, 38(33): 18740-18741.
HANG Zhiqi, HAN Qingsong, XU Jingsong. Components analysis of *Punica granatum* L. seed[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(33): 18740-18741.
- [5] 张水明,龚凌燕,曹丹琴,张永娟,杨健.石榴种皮总木质素含量及PgCOMT基因的克隆与表达[J].热带亚热带植物学报, 2015, 23(1): 65-73.
ZHANG Shuiming, GONG Lingyan, CAO Danqin, ZHANG Yongjuan, YANG Jian. Cloning and expression of PgCOMT and lignin content of PgCOMT in pomegranate seed coat[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2015, 23(1): 65-73.
- [6] VANHOLME R, DEMEDTS B, MORREEL K, RALPH J, BOERJAN W. Lignin biosynthesis and structure [J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 895-905.
- [7] AIDA M, ISHIDA T, FKAKI H, FUJISAWA H, TASAKA M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*, analysis of the cup-shaped cotyledon mutant[J]. The Plant Cell, 1997, 9: 841-857.
- [8] MITSUDA N, SEKI M, SHINOZAKI K, OHME-TAKAGI M. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence[J]. The Plant Cell, 2005, 17(11): 2993-3006.
- [9] ZHONG R, RICHARDSON E A, YE Z H. Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*[J]. Planta, 2007, 225(6): 1603-1611.
- [10] 陈清,汤浩茹,董晓莉,侯艳霞,罗娅,蒋艳,黄琼瑶.植物Myb转录因子的研究进展[J].基因组学与应用生物学, 2009, 28(2): 365-372.
CHEN Qing, TANG Hanru, DONG Xiaoli, HOU Yanxia, LUO Ya, JIANG Yan, HUANG Qiongyao. Advances in Research on Myb Transcription Factors in Plants [J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(2): 365-372.
- [11] 曹丹琴,杨健,关晓弯,张永娟,龚凌燕,张水明.石榴种皮木质素合成相关转录因子基因PgMYB的克隆与表达[J].西北植物学报, 2015, 35(1): 23-29.
CAO Danqin, YANG Jian, GUAN Xiaowan, ZHANG Yongjuan, GONG Lingyan, ZHANG Shuiming. Cloning and expression of the transcription factor PgMYB related to lignin synthesis in pomegranate seed coat[J]. Journal of Northwest Botanical Sciences: 2015, 35(1): 23-29
- [12] ERNST H A, OLSEN A N, LARSEN S, Lo LEGGIO L. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors[J]. The EMBO Reports, 2004, 5(3): 297-303.
- [13] OOKA H, SATOH K, DOI K, NAGATA T, OTOMO Y, MURAKAMI K, MATSUBARA K, OSATO N, KAWAI J, CARNINCI P, HAYASHIZAKI Y, SUZUKI K, KOJIMA K, TAKAHARA Y, YAMAMOTO K, KIKUCHI S. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Research, 2003, 10(6): 239-247.