

扁桃MYB46转录因子基因的克隆及其表达模式分析

朱秋萍¹, 郭春苗², 王娟³, 李宁², 杨波^{2*}, 廖康^{1*}

¹新疆农业大学特色果树研究中心, 乌鲁木齐830052

²新疆农业科学院园艺作物研究所, 乌鲁木齐830091

³新疆农业科学院经济作物研究所, 乌鲁木齐830091

摘要: 为初步探讨扁桃内果皮薄厚差异形成的机理及MYB46转录因子基因在扁桃内果皮木质素生物合成途径中的作用, 本研究以薄壳‘纸皮’和厚壳‘长石头’2个扁桃品种为供试材料, 测定内果皮厚度和木质素含量并分析两者的关系。利用RT-PCR结合RACE技术克隆MYB46转录因子基因, 并利用实时荧光定量PCR技术分析其表达模式。序列分析结果表明, *AcMYB46-z*和*AcMYB46-c*基因全长均为1 380 bp, ORF均为1 017 bp, 均编码338个氨基酸, 蛋白的相对分子质量分别为37.36和38.77 kDa。推测*AcMYB46-z*和*AcMYB46-c*氨基酸序列N端均含有2个高度保守结构域SANT, 表明其均属于R2R3类转录因子。系统进化树分析结果*AcMYB46-z*和*AcMYB46-c*分别与桃、梅聚为一类。通过qRT-PCR技术对MYB46转录因子基因的时空表达模式进行研究, 发现在2个扁桃品种各个发育时期均有表达。相关性分析结果表明, 2个扁桃品种的内果皮厚度与木质素含量均呈极显著正相关。推测MYB46转录因子基因参与调控扁桃内果皮木质素的代谢。

关键词: 扁桃; MYB46转录因子基因; 木质素; 表达模式

扁桃(*Amygdalus communis*)又名‘巴旦姆’, 是世界著名干果, 具有很高的营养价值和经济价值(乔进春等2002)。扁桃果实是由外果皮、中果皮、内果皮、种仁几部分组成, 其中内果皮和种仁最具经济价值, 如内果皮薄, 出仁率高, 价值高, 反之则出仁率低, 经济价值低(张建国等2002)。内果皮木质化加厚是由于石细胞层的增多, 石细胞的形成是由于木质素积累, 而木质素是一种芳香性高聚物, 主要沉积在维管植物次生增厚的细胞壁中, 与植物生长发育过程中的次生代谢产物及内果皮形成紧密相关(曹爱娟等2009)。

木质素的生物合成主要由两类基因调控, 一类是调节基因, 一类是结构基因, 由调节基因编码的转录因子可以调控结构基因的表达。研究发现MYB转录因子参与植物苯丙烷代谢途径的调控, 该过程与木质素的代谢调控高度相关, 拟南芥中AtMYB26可能通过*NST1*和*NST2*基因调控次生细胞壁的合成, AtMYB46的过量表达可激活纤维素、半纤维素和木质素的生物合成并导致次生壁异位沉积(郭光艳等2015)。Kim等(2013)研究发现MYB46可直接对木质素合成途径和纤维素生物合成进行调控; 此外, 研究发现水稻、玉米和拟南芥中的MYB46能够激活下游的次生壁形成相关转录因子基因的表达(Zhong等2010)。MYB46和MYB83可以冗余调控次生细胞壁形成(Zhao和Dixon 2011;

Zhong和Ye 2012)。目前, 有关木质素生物合成相关的MYB类转录因子的研究多集中在拟南芥(Bhargava等2010; Öhman等2013)和部分林木、作物(Goicoechea等2005; Patzlaff等2003)以及部分水果上(Fornalé等2010; Sonbol等2009), 对扁桃果实内果皮中MYB46转录因子基因的研究, 特别是对木质素合成调控开展的相关研究还未见报道。

本研究以薄壳扁桃‘纸皮’和厚壳扁桃‘长石头’为试材, 利用RT-PCR结合RACE技术克隆得到2种扁桃的MYB46基因全长, 并对其进行生物信息学分析; 利用qRT-PCR技术对2个扁桃品种果实内果皮在不同发育时期的MYB46基因的表达模式进行分析, 并结合扁桃内果皮木质化过程中厚度、木质素含量的变化趋势, 初步探明木质素合成相关基因MYB46对扁桃内果皮木质化过程的调控, 为选育扁桃新品种奠定分子理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与处理

试验于2016年4月在喀什地区莎车县扁桃资

收稿 2018-01-08 修定 2018-03-19

资助 国家自然科学基金(31460497)和上海合作组织科技伙伴计划(2017E01025)。

* 共同通讯作者: 廖康(liaokang01@163.com)、杨波(yang-boyys@163.com)。

源圃进行,选择同一果园内树势健壮、管理水平一致的扁桃(*Amygdalus communis* L.)薄壳品种‘纸皮’和厚壳品种‘长石头’各5株,分别于花后25、40、55、70、85、100、115 d 7次采集2个品种正常发育的果实各50个。当天带回实验室,果实清洗干净后,去除果肉和种仁,一部分将内果皮用刀切开,用于厚度的测量,剩余部分按时期分别进行混样,放置液氮速冻后冻存-80°C冰箱备用。

1.2 扁桃内果皮厚度的测量

利用游标卡尺对扁桃花后25、40、55、70、85、100、115 d的果实内果皮厚度进行测量,各样品测定均10个重复,计算平均值。采用Excel 2010和SPSS 20.0软件进行方差分析。

1.3 扁桃内果皮木质素含量的测定

采用巯基乙酸法(张水明等2015)对‘纸皮’和‘长石头’2个扁桃品种花后25、40、55、70、85、100、115 d的果实内果皮木质素含量进行测定,各样品测定均3个重复,计算平均值。采用Excel 2010和SPSS 20.0软件进行方差分析。

1.4 扁桃MYB46基因cDNA全长克隆及生物信息学分析

1.4.1 MYB46基因全长克隆

根据GenBank公布的几种植物的MYB46基因序列进行比对得到的DNA结构域保守区设计特异扩增引物(MYB46-F、MYB46-R)。扁桃幼果期内果皮0.5 g,提取总RNA(多糖多酚植物总RNA提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司),反转录合成cDNA第一链(PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒,北京全式金生物技术有限公司)。以cDNA为模板,使用特异引物进行PCR扩增。反应条件为94°C预变性5 min; 94°C变性30 s, 50°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 反应35个循环; 72°C延伸10 min。琼脂糖凝胶进行电泳检测和回收纯化目的片段(普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,北京天根生化科技有限公司),回收产物连接到pEASY-T5 Zero载体(pEASY[®]-T5 Zero Cloning Kit,北京全式金生物技术有限公司),转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆,菌液PCR检测后将3个单克隆菌液送往上海生工生物技术公司进行测序。

根据测序结果得到的保守片段和RACE试剂盒(TaKaRa公司)设计5'-RACE和3'-RACE的特异性

引物(5'-AP-F、5'-AP-R、3'-AP-F和3'-AP-R)分别进行5'-RACE和3'-RACE配对扩增,目的基因回收、纯化、连接、转化及测序同片段克隆。获得的MYB46中间序列和cDNA末端序列进行拼接,得到cDNA全长序列。

1.4.2 MYB46基因生物信息学分析

利用Blast功能对扁桃MYB46基因序列进行比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 使用ProtParam预测编码蛋白的理化性质(<http://web.expasy.org/protparam/>); 使用DNAMAN软件进行氨基酸多重序列比对分析; 使用SMART软件对其保守域进行预测; 利用MEGA7.0绘制系统进化树。

1.5 MYB46基因时空表达分析

运用qRT-PCR检测MYB46基因内果皮木质化过程中的表达情况。根据扁桃MYB46基因全长序列设计qRT-PCR引物(AcMYB46-F和AcMYB46-R),分别以花后25、40、55、70、85、100、115 d的扁桃内果皮cDNA为模板,以扁桃Actin为内参,用实时定量PCR方法进行基因表达分析(北京全式金生物技术有限公司),在罗氏LightCycler96荧光定量PCR仪上进行扩增。采用20 μ L反应体系,反应条件为94°C预变性30 s; 94°C变性5 s, 60°C退火15 s, 72°C延伸10 s, 反应45个循环。每个样品进行3个生物学重复,2个技术重复。反应完成后,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行相对表达量计算(张驰宇等2005),并采用Excel 2010和SPSS 20.0软件对获得的表达量进行方差分析。

2 实验结果

2.1 2个扁桃品种在不同发育时期内果皮厚度和木质素含量的变化

在整个内果皮发育过程中,‘纸皮’和‘长石头’内果皮厚度和木质素含量均持续上升,且‘长石头’内果皮厚度和木质素含量的日增长量分别为0.0114 mm和7.16 mg·g⁻¹,高于‘纸皮’(分别为0.0034 mm和4.00 mg·g⁻¹)。从木质素含量的变化规律发现,厚壳‘长石头’扁桃内果皮木质素含量快速积累持续时间为40~85 d、日增长量为9.41 mg·g⁻¹,‘纸皮’内果皮木质素含量快速积累持续时间为55~85 d、日增长量为5.56 mg·g⁻¹。SPSS分析发现,‘纸皮’和‘长石头’2个扁桃品种内果皮厚度与内果皮木质素含量在1%水平呈显著正相关,相关系数分别为0.935和0.831(图1)。

表1 试验需用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物类型	引物名称	引物序列(5'→3')
目的片段特异性引物	MYB46-F	AGCGGCAAAGAACAACAA
目的片段特异性引物	MYB46-R	CTCTCTCCCTACCTTTATGAGC
荧光定量PCR引物	AcMYB46-F	ATCCTCGGAGCCTAAAGAT
荧光定量PCR引物	AcMYB46-R	GCATTGTAGTATCCACCTGC
内参引物	AcActin-F	CCTTCAATGTGCCTGTATGTATGT
内参引物	AcActin-R	CCAGCAAGGTCCAGACGAAGAAT
5'-RACE扩增引物	5'-AP-F	CCATTGATTGTGTGGTGC
5'-RACE扩增引物	5'-AP-R	GCTGAGAAAGGGTTTGTGG
3'-RACE扩增引物	3'-AP-F	TTGGGAAGGCAACGATTC
3'-RACE扩增引物	3'-AP-R	TGGATACTACAATGCCACCC

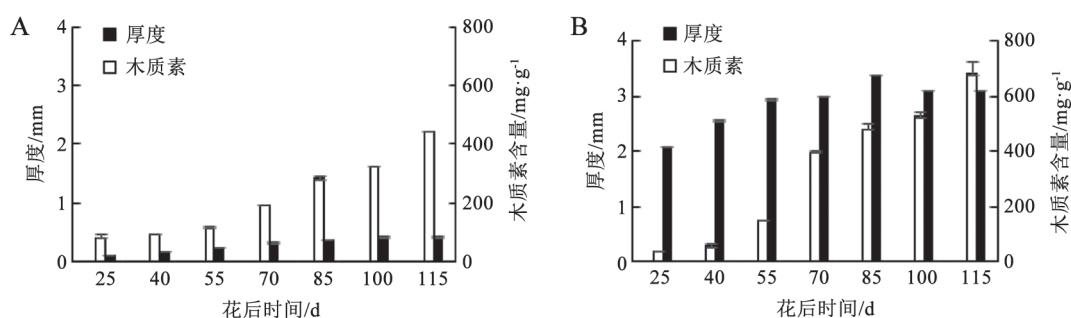


图1 2个扁桃品种在不同发育时期内果皮厚度和木质素含量的变化

Fig.1 Changes of thickness and lignin content of endocarp in different development stages of two almond varieties

A: '纸皮'品种; B: '长石头'品种。

2.2 2个扁桃品种MYB46同源片段和RACE扩增

对'纸皮'和'长石头' RT-PCR扩增MYB基因同源片段, 挑选阳性克隆测序, 分别得到391和385 bp的核酸片段(图2, 条带1和2), 序列比对结果该片段与桃、李、梅一致性95%以上, 初步判断该片段为扁桃MYB46基因序列片段。3'端扩增分别得到808

和846 bp的带有多聚A尾巴的片段(图2, 条带3和4), Blast比对, 结果表明该片段与桃、李、梅一致性90%以上, 且该片段与原同源序列重叠, 确认其为扁桃的3'端序列。5'端扩增分别得到735和757 bp的片段(图2, 条带5和6), 序列比对分析确定其为扁桃的5'端序列。

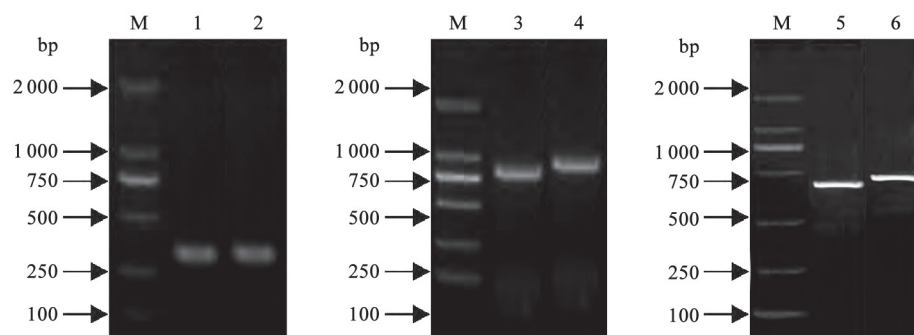


图2 2个扁桃品种MYB46基因同源片段、3'-RACE和5'-RACE扩增结果

Fig.2 PCR products of RT-PCR, 3'-RACE and 5'-RACE of MYB46 from two almond varieties

M: DL2000; 1、3、5: *AcMYB46-z*; 1: 391 bp, 3: 808 bp, 5: 735 bp; 2、4、6: *AcMYB46-c*; 2: 385 bp, 4: 846 bp, 6: 757 bp。

2.3 2个扁桃品种MYB46片段拼接及cDNA全长的生物信息学分析

分别将2个品种获得的MYB46中间序列和cDNA末端序列进行拼接,得到2个cDNA全长序列,分别命名为AcMYB46-z和AcMYB46-c。序列分析表明,AcMYB46-z基因全长1 380 bp, ORF为1 017 bp, 编码338个氨基酸, 该蛋白的相对分子质量为37.36 kDa, 理论pI为5.13, 推测的分子式为C₁₆₁₇H₂₄₉₀N₄₆₂O₅₂₂S₁₉。AcMYB46-c全长1 380 bp, ORF为1 017 bp, 编码338个氨基酸, 该蛋白的相对分子质量为38.77 kDa, 理论pI为8.94, 推测的分子式为C₁₇₀₅H₂₆₀₄N₅₀₆O₅₀₆S₁₅。

NCBI网站上的Blast比对发现,AcMYB46-z和AcMYB46-c基因编码的氨基酸序列与桃、李、梅MYB46基因编码氨基酸序列一致性均达到90%以

上;使用DNAMAN软件将AcMYB46-z和AcMYB46-c推导氨基酸序列与其他植物中调控木质素代谢的氨基酸序列进行比对发现AcMYB46-z和AcMYB46-c蛋白的N端均与梨、苹果、桃、拟南芥MYB46蛋白相似度高(图3)。使用SMART软件对其保守域进行分析,结果表明,AcMYB46-z和AcMYB46-c蛋白的N端均有2个高度保守功能区SANT(图4),分别位于27~77位和80~128位氨基酸,25~75位和78~126位氨基酸,该保守结构域属于MYB家族基因所特有的R2R3型,因此这2个基因均属于R2R3型MYB转录因子基因。通过利用MEGA7.0软件对不同植物MYB蛋白做系统发育分析(图5),结果显示AcMYB46-z与桃PpMYB46编码的蛋白在一个分支上且亲缘关系最近,AcMYB46-c与梅PmMYB46在同一个分支上且亲缘关系最近。

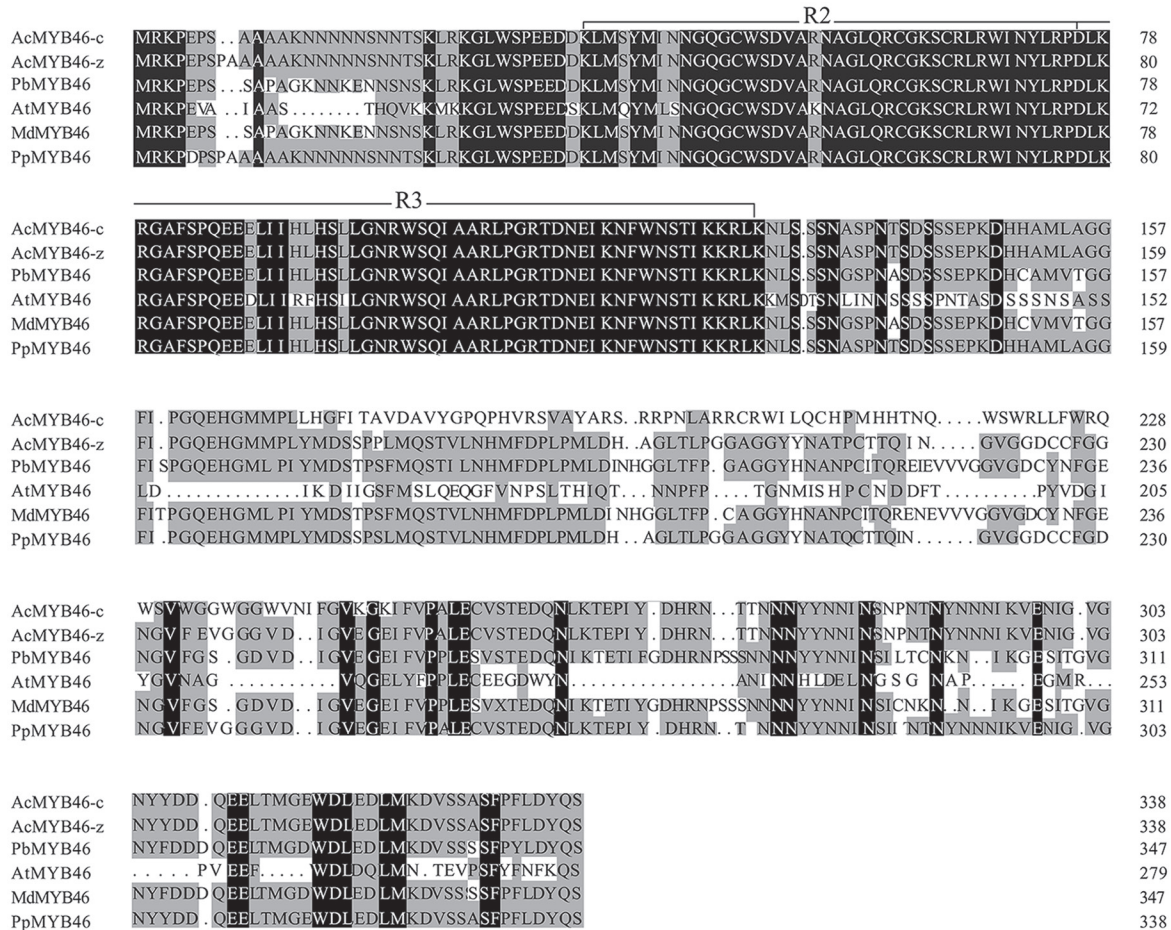


图3 扁桃与其他植物MYB氨基酸序列比对

Fig. 3 Alignment of amino acid sequence of MYB from almond and other plant species

图中各氨基酸序列来源及GenBank序列号如下,梨(*Pyrus bretschneideri*): PbMYB46 (XP009343724.1); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtMYB46 (AF062884.1); 苹果(*Malus domestica*): MdMYB46 (XP008363629.1); 桃(*Prunus persica*): PpMYB46 (XP020416948.1)。

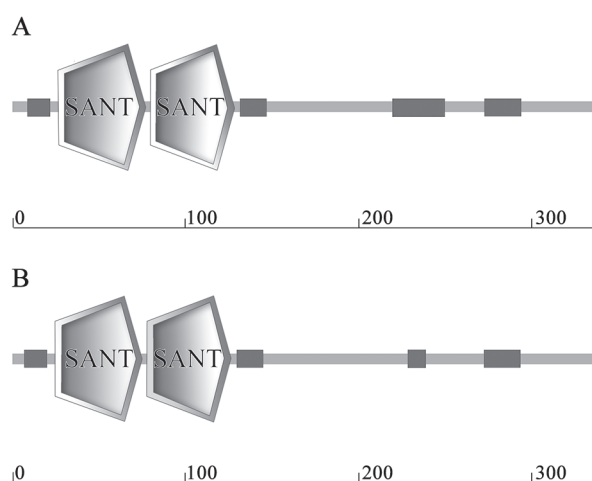


图4 2个扁桃品种MYB46蛋白结构域的预测
Fig.4 Prediction of protein domains of MYB46 genes from two almonds varieties
A: AcMYB46-z; B: AcMYB46-c。

2.4 2个扁桃品种MYB46基因在不同发育时期相对表达量的变化

在内果皮发育全过程中AcMYB46-z和AcMYB46-c基因表达水平趋势一致,均呈现先上升后下降的趋势,但2个基因的相对表达量高峰出现的时间不一致,分别在花后55和85 d,且相对表达量达到较高水平持续的时间也不同,AcMYB46-c表达时间较长。AcMYB46-z的相对表达量达到高峰之后,相对表达量均低于AcMYB46-c(图6)。

3 讨论

扁桃是四大干果之一,其果仁具有丰富的营养价值,富含脂肪、碳水化合物、食物纤维、果胶等,扁桃仁的功效与作用也得到了传统中医和现代医学的认可(姜仲茂等2016)。内果皮薄厚是扁桃重要的经济性状之一,厚壳产量低且不易脱壳,而薄壳产量高易露仁,探讨扁桃内果皮适宜厚度的形成机理具有重要的意义。本研究通过测定扁桃内果皮厚度及其主要成分木质素的含量,得知扁桃内果皮薄厚存在较大差异,其木质素含量在内果皮发育的整个时期呈上升趋势,二者存在较高的正相关性,该研究结果与曹丹琴等(2015)在石榴上的研究结果一致。因此木质素是构成扁桃内果皮厚度的一个重要组分,这为深入了解扁桃内果皮薄厚差异形成机理提供基础。

MYB转录因子在植物次生壁发育过程中发挥着非常重要的作用(Zhao和Dixon 2011; Xu等2014),且在拟南芥中已鉴定出多个与木质素合成相关的MYB转录因子。前人对拟南芥的研究已证明,MYB46是植物细胞壁的第二作用元件,可对木质素的生物合成、半纤维素和纤维素的形成起到调控作用(Zhong等2008; Kim等2013)。此外,木质素积累量是影响植物次生细胞壁增厚的重要影响因子(薛英喜等2012),进一步证实了MYB46基因可能是扁桃内果皮木质化加厚过程中的一个关键性基因,对扁桃木质素合成起着非常重要的作用。

本研究分别从薄壳扁桃‘纸皮’和厚壳扁桃‘长石头’克隆得到了AcMYB46-z和AcMYB46-c基因全长序列,生物信息学分析发现AcMYB46-z和AcMYB46-c氨基酸序列与桃、李、梅相似度均达到90%以上,且AcMYB46-z和AcMYB46-c蛋白N端均有2个高度保守结构域SANT,分别位于27~77位和80~128位氨基酸,25~75位和78~126位氨基酸,表明其均属于R2R3类转录因子。AcMYB46-z、AcMYB46-c分别与桃、梅聚为一类。表明了在不同物种中,MYB46蛋白结构与序列均存在差异,甚至同一物种MYB46也存在多个分支,这与邵文婷等(2013)结果相符。MYB高度保守的DNA结合结构域为分离和鉴定MYB家族转录因子提供坚实的理论基础。

通过荧光定量PCR技术对不同品种相关基因时空表达特征进行了研究,结果表明AcMYB46-z和AcMYB46-c基因相对表达量均呈先升高后下降的趋势,但相对表达量高峰期出现在不同的时间点(55 d和85 d),且在AcMYB46-z相对表达量达到峰值之后其均低于AcMYB46-c基因的相对表达量,达到峰值之前则相反,这可能与厚壳‘长石头’扁桃果实内果皮发育期(90 d)略长于薄壳‘纸皮’扁桃(75 d),且厚壳‘长石头’扁桃内果皮木质素含量快速积累持续时间(40~85 d)长于薄壳‘纸皮’扁桃(55~85 d)有关(朱秋萍等2017)。推测MYB46转录因子基因参与调控扁桃内果皮木质素的代谢,较厚壳需要更高MYB46基因表达且持续时间较长。

木质素生物合成途径非常复杂,MYB蛋白作为植物中重要的一类转录因子,其调控内果皮木质素合成途径及其具体的作用机理还有待于进一步

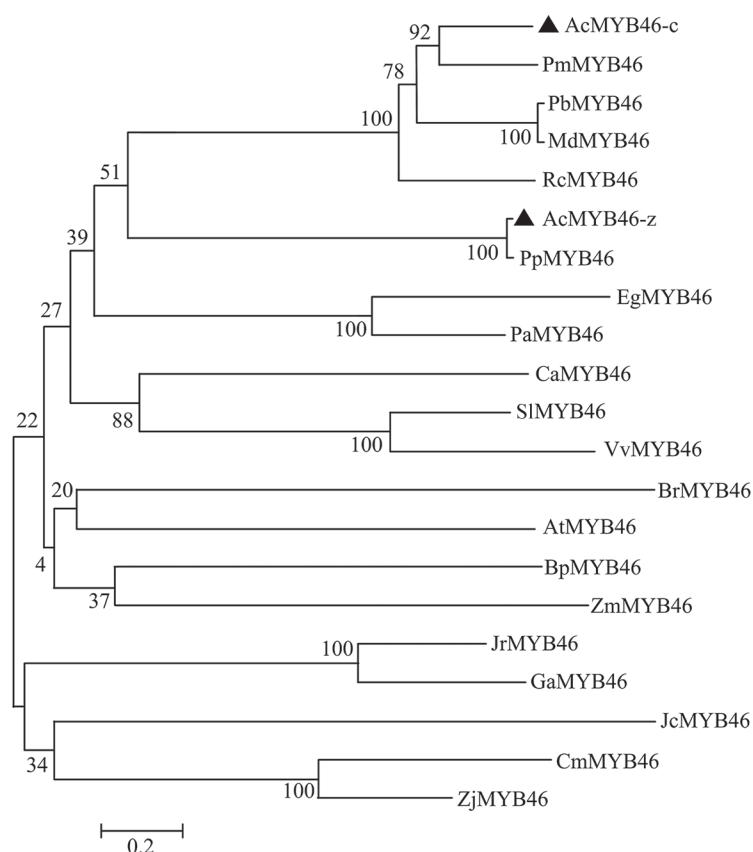


图5 扁桃与其他植物MYB46氨基酸序列的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of the amino acid sequence of MYB46 from almond and other plant species

图中各氨基酸序列来源及GenBank序列号如下, 桃(*Prunus persica*): PpMYB46 (XP020416948.1); 梅(*Prunus mume*): PmMYB46 (XP008227297.1); 梨(*Pyrus bretschneideri*): PbMYB46 (XP009343724.1); 苹果(*Malus domestica*): MdMYB46 (XP008363629.1); 蓖麻(*Ricinus communis*): RcMYB46 (XP020416948.1); 巨桉(*Eucalyptus grandis*): EgMYB46 (XP010037524.1); 白菜(*Brassica rapa*): BrMYB46 (XP009112912.1); 核桃(*Juglans regia*): JrMYB46 (XM_018975334.1); 麻风树(*Jatropha curcas*): JcMYB46 (XP012089996.2); 木本棉(*Gossypium arboreum*): GaMYB46 (XM017789005.1); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtMYB46 (AF062884.1); 李(*Prunus avium*): PaMYB46 (XP021812111.1); 枣(*Ziziphus jujuba*): ZjMYB46 (XM_016020396.1); 玉米(*Zea mays*): ZmMYB46 (XP_015875881.1); 葡萄(*Vitis vinifera*): VvMYB46 (XP_002275467.2); 甜瓜(*Cucumis melo*): CmMYB46 (XP_008461287.1); 白桦(*Betula platyphylla*): BpMYB46 (AKN79282.1); 甜椒(*Capsicum annuum*): CaMYB46 (XP_016548901.1); 番茄(*Solanum lycopersicum*): SlMYB46 (XP_004251366.1)。

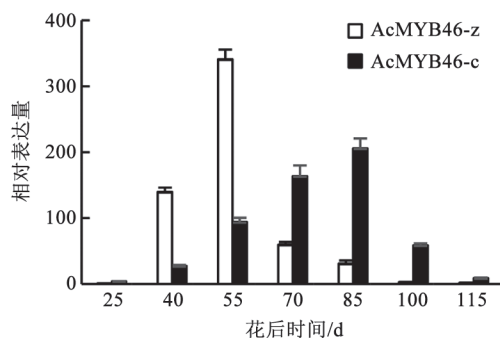


图6 2个扁桃品种MYB46基因不同发育阶段相对表达量的变化

Fig.6 Changes of MYB46 gene expression in different developmental stages of two almond varieties

步研究。本研究实验结果为今后探明扁桃内果皮薄厚差异形成机理提供一定的理论依据。

参考文献(References)

- Bhargava A, Mansfield SD, Hall HC, et al (2010). MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the Arabidopsis inflorescence stem. *Plant Physiol*, 154 (3): 1428–1438
- Cao AJ, Wang YN, Ge SL, et al (2009). Changes of the enzyme activity during the deposition process of lignin in peach endocarp. *J Beijing Agric Coll*, 24 (1): 5–8, 19 (in Chinese with English abstract) [曹爱娟, 王有年, 葛水莲等(2009). 桃内果皮木质素沉积过程中酶活性的变化. *北京农学院学报*, 24 (1): 5–8, 19]

- Cao DQ, Yang J, Guan XW, et al (2015). Cloning and expression of a lignin biosynthesis-related transcription factor gene *PgMYB* in pomegranate seed coat. *Acta Bot Bor-Ocid Sin*, 35 (1): 23–29 (in Chinese with English abstract) [曹丹琴, 杨健, 关晓弯等(2015). 石榴种皮木质素合成相关转录因子基因*PgMYB*的克隆与表达. 西北植物学报, 35 (1): 23–29]
- Fornalé S, Shi XH, Chai CL, et al (2010). *ZmMYB31* directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J Cell Mol Biol*, 64 (4): 633–644
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, et al (2005). EgMYB2, a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J*, 43 (4): 553–567
- Guo GY, Bai F, Liu W, et al (2015). Research progress in the regulation of lignin biosynthesis by transcription factors. *Sci Agric Sin*, 48 (7): 1277–1287 (in Chinese with English abstract) [郭光艳, 柏峰, 刘伟等(2015). 转录因子对木质素生物合成调控的研究进展. 中国农业科学, 48 (7): 1277–1287]
- Jiang ZM, Uwin TN, Wang S, et al (2016). Evaluation of amino acid composition and nutritional value of wild almond kernel from different habitats. *Food Sci*, 37 (4): 77–82 (in Chinese with English abstract) [姜仲茂, 乌云塔娜, 王森等(2016). 不同产地野生长柄扁桃仁氨基酸组成及营养价值评价. 食品科学, 37 (4): 77–82]
- Kim WC, Ko JH, Kim JY, et al (2013). *MYB46* directly regulates the gene expression of secondary wall-associated cellulose synthases in Arabidopsis. *Plant J*, 73 (1): 26–36
- Öhman D, Demedts B, Kumar M, et al (2013). MYB103 is required of *FERULATE-5-HYDROXYLASE* expression and syringyl lignin biosynthesis in Arabidopsis stems. *Plant J*, 73 (1): 63–76
- Qiao JC, Zhu ML, Yang MS, et al (2002). Flowering and fruiting characteristics of almond. *J Fruit Sci*, 19 (3): 167–170 (in Chinese with English abstract) [乔进春, 朱梅玲, 杨敏生等(2002). 扁桃的开花结实特性. 果树学报, 19 (3): 167–170]
- Patzlaff A, Mcinnis S, Courtenay A, et al (2003). Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J*, 36 (6): 743–754
- Shao WT, Liu Y, Han HQ, et al (2013). Cloning and expression analysis of anthocyanin biosynthesis related gene *SmMYB* in eggplant. *Acta Hort Sin*, 40 (3): 467–478 (in Chinese with English abstract) [邵文婷, 刘杨, 韩洪强等(2013). 茄子花青素合成相关基因*SmMYB*的克隆与表达分析. 园艺学报, 40 (3): 467–478]
- Sonbol FM, Fornalé S, Capellades M, et al (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): 283–293
- Xu Q, Yin XR, Zeng JK, et al (2014). Activator- and repressor-type MYB transcription factors are involved in chilling injury induced flesh lignification in loquat via their interactions with the phenylpropanoid pathway. *J Exp Bot*, 65 (15): 4349–4359
- Xue YX, Wei JH, Jiang TB, et al (2012). Advances in MYB transcription factors related to plant secondary development. *J Anhui Agric Sci*, 40 (13): 7650–7655 (in Chinese with English abstract) [薛英喜, 魏建华, 姜廷波等(2012). 植物次生长相关MYB转录因子研究进展. 安徽农业科学, 40 (13): 7650–7655]
- Zhang CY, Xu SG, Huang XX (2005). A new and convenient quantitative method for real-time RT-PCR relative to fluorescence. *Prog Biochem Biophys*, 32 (9): 883–888 (in Chinese with English abstract) [张驰宇, 徐顺高, 黄新祥(2005). 一种新颖简便的荧光实时RT-PCR相对定量方法的建立. 生物化学与生物物理进展, 32 (9): 883–888]
- Zhang JG, Lu XX, Wang S, et al (2002). Cultivation utilization and development of almond. *Nonwood Forest Res*, 20 (1): 36–38 (in Chinese with English abstract) [张建国, 卢小秀, 王森等(2002). 扁桃的栽培利用及其开发. 经济林研究, 20 (1): 36–38]
- Zhang SM, Gong LY, Cao DQ, et al (2015). Cloning and expression of total lignin content in pomegranate seed coat and cloning of *PgCOMT* gene. *J Trop Subtrop Bot*, 23 (1): 65–73 (in Chinese with English abstract) [张水明, 龚凌燕, 曹丹琴等(2015). 石榴种皮总木质素含量及*PgCOMT*基因的克隆与表达. 热带亚热带植物学报, 23 (1): 65–73]
- Zhao Q, Dixon RA (2011). Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends Plant Sci*, 16 (4): 227–233
- Zhong RQ, Lee CH, Ye ZH (2010). Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors. *Plant Physiol*, 152 (2): 1044–1055
- Zhong RQ, Lee CH, Zhou JL, et al (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20 (10): 2763–2782
- Zhong RQ, Ye ZH (2012). MYB46 and MYB83 bind to the SMRE sites and directly activate a suite of transcription factors and secondary wall biosynthetic genes. *Plant Cell Physiol*, 53 (2): 368–380
- Zhu QP, Guo CM, Xu J, et al (2017). Tissue anatomical observation of almond endocarp development. *Nonwood Forest Res*, 35 (4): 124–129 (in Chinese with English abstract) [朱秋萍, 郭春苗, 许娟等(2017). 扁桃内果皮发育的组织解剖学观察. 经济林研究, 35 (4): 124–129]

Cloning and expression patterns analysis of *MYB46* transcription factor gene in almond

ZHU Qiu-Ping¹, GUO Chun-Miao², WANG Juan³, LI Ning², YANG Bo^{2,*}, LIAO Kang^{1,*}

¹Research Centre for Xinjiang Special Fruit Tree, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

²Institute of Horticulture Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China

³Institute of Economic Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China

Abstract: To elucidate the mechanism of difference in the formation of almond endocarp thickness and the function of *MYB46* transcription factor gene in lignin biosynthesis pathway, we determined thickness and lignin content in the endocarp of two almond varieties, ‘Zhipi’ and ‘Changshitou’, and analyzed the relationship between them. *MYB46* gene was cloned by RT-PCR combined with the RACE technology, and its expression pattern was analyzed. The results of sequence analysis showed that both *AcMYB46-z* and *AcMYB46-c* gene had total length of 1 380 bp, including 1 017 bp ORF, which encoded 338 amino acids. The relative molecular weight of the proteins were 37.36 and 38.77 kDa. Both *AcMYB46-z* and *AcMYB46-c* belonged to R2R3 transcription factor, with two highly conserved SANT domains at their N terminal. The results of phylogenetic tree analysis showed that *AcMYB46-z* and *AcMYB46-c* were clustered with peach and plum, respectively. The spatio-temporal expression pattern of *MYB46* transcription factor gene was studied by qRT-PCR technology. It was found that two almond cultivars were expressed at different developmental stages. The correlation analysis showed that endocarp thickness of two almond varieties was significantly correlated with the lignin content. It was speculated that *MYB46* transcriptional factor gene participated in the regulation of the metabolism of lignin in the endocarp of almond.

Key words: almond; *MYB46* transcription factor gene; lignin; expression pattern

Received 2018-01-08 Accepted 2018-03-19

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31460497) and Shanghai Cooperation Organization Science and Technology Partnership Program (2017E01025).

*Co-corresponding authors: Liao K (liaokang01@163.com), Yang B (yangboyys@163.com).