

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00373

## 糜子抗旱节水相关基因 *PmMYB* 的克隆及表达分析

胡银岗<sup>1,2,3</sup>, 林凡云<sup>1</sup>, 王士强<sup>1</sup>, 何蓓如<sup>1</sup>

1. 西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100;
2. 国家小麦改良中心杨凌分中心, 杨凌 712100;
3. 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

**摘要:** 根据在糜子抗旱节水分子基础研究中获得的一个糜子 *MYB* 基因的 EST 序列, 以其序列及水稻 *MYB18* 基因的序列为基础设计引物, 扩增得到 1 739 bp 的全长基因组序列。序列分析表明, 其包含 121 bp(347~467 bp) 和 93 bp(599~691 bp) 的两个内含子, 3 个外显子; 全长 cDNA 序列为 1 525 bp, 其中 3' 非翻译区为 212 bp, 5' 非翻译区为 41 bp, 编码区为 1 272 bp, 共编码 424 个氨基酸, C-端存在一个丝氨酸(Ser, S)丰富区。该基因具有两个典型的 MYB 类转录因子基因的 DNA 结合区(DNA-binding domain), 分别为 13~63、66~114 位氨基酸, 属于典型的 R2R3-MYB 转录因子。对其与水稻、玉米、火炬松、拟南芥、辣椒、陆地棉、大麦及茄子等 9 种植物的 *MYB* 基因的 R2、R3 重复区的氨基酸序列多重比较, 表明 R2R3 重复序列在植物中具有较高的保守性; 基于氨基酸序列的编码区系统进化树分析表明, 不同植物的 *MYB* 基因遗传分化很大, 序列相似性为 32%~84%, 其中糜子 *MYB* 基因与水稻的 *MYB18* 相似程度最高(84%), 与大麦和玉米的相似性分别为 46% 和 41%。通过半定量 RT-PCR 对其表达模式分析表明, 该基因在水分胁迫和干旱后复水条件下上调表达, 与糜子抗旱节水紧密相关。该基因的克隆为进一步探讨利用该基因改良其他植物的抗旱节水性奠定了良好的基础。

**关键词:** 糜子; MYB 转录因子; 基因克隆; 表达模式; 进化分析

## Cloning and expression analysis of drought-tolerant and water-saving related gene *PmMYB* in broomcorn millet

HU Yin-Gang<sup>1,2,3</sup>, LIN Fan-Yun<sup>1</sup>, WANG Shi-Qiang<sup>1</sup>, HE Bei-Ru<sup>1</sup>

1. Agronomy College of Northwest A & F University, Yangling 712100, Chian;
2. Yangling Center of National Wheat Improve Center, Yangling 712100, China;
3. Shannxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China

**Abstract:** Exploring novel genes and gene combinations are of primary importance in plant drought-tolerance and water-saving research. Based on the EST sequence of *MYB* gene obtained in the research on molecular basis of drought-tolerance and water-saving in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.), a 1 739 bp genomic sequence of *MYB* gene, designated *PmMYB*, was amplified using primers based on this EST sequence and that of rice *MYB18*. Sequence analysis indicated that *PmMYB* consisted of 2 introns, 121 bp (347~467 bp) and 93 bp (599~691 bp) in length respectively, and 3 exons. The full-length cDNA sequence of *PmMYB* is 1 525 bp, which includes 212 bp 3' untranslated region, 41 bp 5' untranslated region, and 1 272 bp coding region which encodes 424 amino acids with a serine-rich region. *PmMYB* is a typical R2, R3-MYB transcription factor with its 2 typical DNA-binding domains (amino acid sites of 13~63 and 66~114).

收稿日期: 2007-07-19; 修回日期: 2007-12-22

基金项目: 西北农林科技大学科研基金面上项目(编号: 2006ZR013); 科技部 973 计划前期项目(编号: 2006CB708208)[Supported by the Scientific Research Program of NWAUFU (No.2006ZR013) and the Prophase Program of 973 Plan of Ministry of Sci-tech, China (No.2006CB708208)]

作者简介: 胡银岗(1967-), 男, 陕西韩城人, 博士, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 作物分子遗传育种。E-mail: huyingang@nwsuaf.edu.cn

The multiple alignment of R2, R3 amino acid repeat regions of *MYB* genes among broomcorn millet, rice, corn, loblolly pine, Arabidopsis, capsicum, upland cotton, barley and aubergine indicates that R2, R3 repeat regions are very conserved. The phylogenetic analysis based on amino acid sequence shows that *MYB* genes are highly divergent with similarity ranging from 32% to 84%. *PmMYB* has the highest similarity (84%) with *MYB18* gene of rice, whereas 46% and 41% with barley and corn, respectively. Semi-quantitative RT-PCR confirmed that *PmMYB* was upregulated by water stress and re-watering in broomcorn millet. Cloning this gene may provide a good foundation to improve the drought-tolerance and water-saving in broomcorn millet as well as in other plants

**Keywords:** broomcorn millet; MYB transcription factor; gene cloning; express profile; phylogenetic analysis

干旱是农业生产中面临的一个重要限制因子,揭示抗旱植物抗旱节水的分子基础,挖掘可用于作物抗旱节水遗传改良的新基因一直是植物抗旱节水研究的一个焦点<sup>[1]</sup>。糜子(*Panicum miliaceum* L.)是我国古老的一种禾本科作物,具有较高的气孔蒸腾阻力和高叶片水势,形成每克干物质约需消耗 255.12 克水,低于谷子(257.0)、高粱(276.39)、玉米(337.62)等耐旱节水作物,约为小麦(513)、大麦(534)等作物的一半<sup>[2]</sup>。揭示糜子抗旱节水涉及的主要代谢途径,挖掘其中的关键候选基因,可为禾本科作物抗旱节水的遗传改良提供新的基因资源。

我们利用抑制减杂杂交技术(SSH)分别构建了糜子抗旱材料在干旱胁迫后复水过程与干旱胁迫条件下的SSH-cDNA文库,通过序列分析对其抗旱节水涉及的代谢途径进行了分析,从中筛选了部分基因作为抗旱节水遗传改良的候选基因进行深入研究<sup>[3,4]</sup>。糜子MYB转录因子基因即是其中的一个关键候选基因。

MYB家族转录因子是植物中比较重要的一类转录因子,在生物体内主要起转录激活作用。许多研究表明在植物对水分、高盐等胁迫的响应作用中,MYB类转录因子,特别是含有R2、R3 两个MYB结构域的MYB转录因子基因参与了依赖于ABA的基因表达,启动一些受ABA诱导基因的表达,在应答外界环境胁迫中起重要作用<sup>[5,6]</sup>。本研究以差减文库中获得的MYB基因的EST序列为基础,以该EST序列和与其同源性较高的水稻MYB基因的序列的保守区设计引物,采用PCR技术从糜子基因组DNA中克隆了糜子MYB转录因子基因的片段,并对其结构特点等进行了初步分析,对其与水稻、玉米等植物中的MYB转录因子基因的R2、R3 重复区的氨基酸序列的保守性进行了多重比较和植物MYB基因

的进化分析,并利用半定量 RT-PCR 对糜子 MYB 转录因子基因在不同水分胁迫和胁迫后复水条件下的表达模式进行了分析。这些研究为进一步探讨糜子 MYB 转录因子基因作为新的抗旱节水基因资源的可行性奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料及处理

以印度 790051 为试材,种子经 70%乙醇消毒后,于培养皿中水培,发芽后,选取生根及发芽较好的种子,移栽入花盆中,介质为土+蛭石(1:1)。幼苗生长期间保持土壤相对含水量在 75±5%,幼苗长至 4 叶期时开始自然干旱处理,对照正常浇水(土壤相对含水量保持在 75%左右)。分别在土壤相对含水量为 75%、36%、24%时进行取样,当土壤相对含水量达到 24%时部分叶片已经开始卷曲,出现萎蔫现象,取样后立即进行复水处理,复水时采取上浇、下渗方式,分别于复水后 2 h、6 h、12 h 取样。取样后样品于液氮中速冻,−70℃保存备用。

土壤相对含水量的测定采用称重法,计算公式为:土壤相对含水量(%)=(土壤实际含水量/土壤最大毛细管持水量)×100%。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 及基因组 DNA 的提取

总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂盒(天根生化,北京)进行,提取后采用 DNase (TaKaRa, 大连)去除痕量 DNA,方法依照说明书进行。

糜子基因组DNA提取采用CTAB法<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.2 基因组扩增体系及条件

以获得的糜子 MYB 基因 EST 序列(RS366, GenBank 收录号 DW177353)及水稻 MYB18 的 mRNA 序列(GenBank 收录号 AJ495786)为参照,设

计了两对引物, 分别为 eRS366-1(正向 5'-AGTTGCTGCCGTCTCCCA-3', 反向 5'-CTGGTGACCTATTGAGCCCTGT-3'), eRS366-2(正向 5'-TTTCCACTGTGATGGCA-3', 反向 5'-ATCTGGTGTCTGTTC-3'), 采用这两对引物分别对糜子基因组 DNA 进行扩增。

20  $\mu$ L 反应体系包括 DNA(30 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu$ L, dNTPs(2 mmol/L)2  $\mu$ L, 正向和反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, *Taq* DNA polymerase(5 U/ $\mu$ L)0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 接着进行 95 $^{\circ}$ C 40 s, 52 $^{\circ}$ C (eRS366-1 引物对)或 55 $^{\circ}$ C (eRS366-2 引物对)40 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 反应后于 4 $^{\circ}$ C 保温。扩增产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.3 扩增片段的回收与克隆

将目标片段在紫外灯下从琼脂糖凝胶中切出, 采用 Agarose Gel DNA Purification Kit(TaKaRa, 大连)回收目标片段, 与 pGEM-T Easy 载体(Promega, USA)连接, 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 利用蓝白筛选与 SP6 和 T7 引物 PCR 相结合筛选阳性克隆, 阳性克隆进一步培养后利用 H.Q.&Q.质粒微量抽提试剂盒(安徽, 优晶)提取质粒 DNA, 送上海英骏公司采用 SP6 和 T7 引物进行双向测序。

### 1.2.4 序列分析

将测序得到的序列去除载体、引物及接头序列后, 采用 Bioedit 软件进行序列拼接, 蛋白质氨基酸序列保守结构域分析采用 NCBI 的 rpsblast 和 ExPASy 网站(<http://cn.expasy.org>)的 prosite 进行, 蛋白质的等电点及分子量计算采用 ExPASy 网站的 ProtParam(<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>)进行, 亚细胞定位分析采用 WoLF PSORT 软件(<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>)进行在线分析。采用 DNAMAN5.2.2 进行序列的多重比较及系统进化树分析。

### 1.2.5 cDNA 合成与半定量 RT-PCR 分析

cDNA 第一链合成采用 AMV 反转录酶(TaKaRa, 大连)进行, 20  $\mu$ L 反应体系包括: 总 RNA 1  $\mu$ g, 5 $\times$ Buffer 4  $\mu$ L, dNTP(10 mmol/L)2  $\mu$ L, RNase inhibitor(20 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, Oligo(dT)<sub>18</sub>(50  $\mu$ mol/L)1.5  $\mu$ L, AMV transcriptase(20 U/ $\mu$ L)2  $\mu$ L, DEPC-H<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L; 42 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 反应后置于冰上, 加入适量 DEPC-H<sub>2</sub>O 进行稀释后用于 RT-PCR 分析。

根据所获得 EST 的序列设计半定量 RT-PCR 引物, 正向引物为 5'-CTGGTGACCTATTGAGCCC-3', 反向引物为 5'-CGGCAGAAAGGCATTGAC-3'。同时, 根据 Vanden [8] 等报道的珍珠粟的 actin 基因的序列设计一对糜子 actin 引物(正向: 5'-ACCGAAGCC-CCTCTTAACCC-3', 反向: 5'-GTATGGCTGACAC-CATCACC-3'), 作为调整模板量的内参。引物由上海生物工程公司合成。

20  $\mu$ L 的半定量 RT-PCR 的反应体系为, 经内参调整的适宜体积的 cDNA 模板, 10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu$ L, dNTP(2 mmol/L)2  $\mu$ L, 正向引物(10 mmol/L)0.5  $\mu$ L, 反向引物(10 mmol/L)0.5  $\mu$ L, *Taq* DNA polymerase(5 U/ $\mu$ L), 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 接着 95 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 反应后于 4 $^{\circ}$ C 保温。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳扩增产物检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 糜子 MYB 转录因子基因的克隆及结构分析

以依据糜子复水与干旱胁迫 SSH-cDNA 文库中与 MYB 基因同源性较高的 EST 序列(RS366, GenBank 收录号 DW177353), 及水稻 MYB 类转录因子(MYB18, GenBank 收录号 AJ495786)的序列设计的两对引物, 对糜子的基因组 DNA 进行扩增, 分别扩增出了 1 267 bp 和 541 bp 的片段(图 1), 对这两个片段分别与 pGEM-T easy 载体连接, 进行克隆, 测序。采用 Bioedit 软件进行序列拼接, 获得糜子 MYB 基因的基因组序列为 1 739 bp。

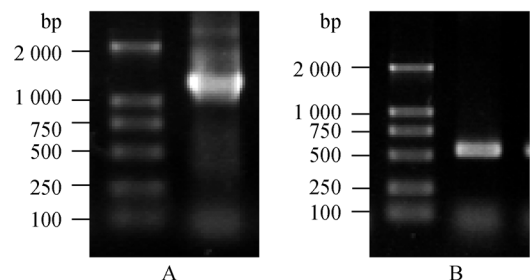


图 1 糜子 MYB 转录因子基因的基因组扩增

A: 引物 eRS366-1 的扩增结果; B: 引物 eRS366-2 的扩增结果。

Fig. 1 Amplification of MYB transcription factor gene using genomic DNA of broomcorn millet

A: Primer pair of eRS366; B: Primer pair of eRS366-2.

获得的糜子 *MYB* 基因的基因组序列的 722~1302 核苷酸与 EST RS366 的相似性为 95%。水稻 *MYB18* 基因 cDNA 序列的编码区为 271~1557, 所获序列与水稻 *MYB18* 基因的序列进行比较, 发现该基因已含有水稻 *MYB18* 基因的编码区序列, 对比二者发现克隆到的糜子 *MYB* 基因的基因组序列包含

有两个内含子, 分别为 121 bp(347~467 bp)、93 bp(599~619 bp), 3 个外显子。去除其内含子序列后获得 1 525 bp 的该糜子 *MYB* 基因的全长 cDNA, 包括 3' 非翻译区为 212 bp, 5'非翻译区为 41 bp, 编码区为 1 284 bp, 共编码 424 个氨基酸(图 2), 命名为 *PmMYB*, 这是在糜子中首次报道克隆的 *MYB* 基因。

```

1  ATGGGGAGGCACTCCTGCTGTTACAAGCAGAAGCTGAGGAAGGGGCTCTGGTCTCCTGAGGAAGATGAGAAGCTCATGAACCACATAACC
   M G R H S C C Y K Q K L R K G L W S P E E D E K L M N H I T
91  AAACATGGGCATGGCTGCTGGAGCACTGTCCCAAAGCTTGCAGGGCTTCAGAGATGTGAAAAGAGCCGAGGCTGAGATGGATAAAATTAC
   K H G H G C W S T V P K L A G L Q R C G K S R R L R W I N Y
181 CTGAGGCCTGACCTCAAAAGAGGTGCATTCTCTCAGGAAGAGGAAGACCTTATCATTGAACTCCATGCTGTTTTGGGCAACAGGTGGTCT
   L R P D L K R G A F S Q E E E D L I I E L H A V L G N R W S
271  CAGATTGCAACACGGTTGCTGGAAGAACTGATAACGAGATCAAGAACTCTCTGGAAGCTCAAGCATCAAGAAGAAGCTCCGGCAGAAAGGC
   Q I A T R L P G R T D N E I K N L W N S S I K K K L R Q K G
361  ATTGACCCCAACACCTACAAGCCCTTGGCCGAGGTTTTTCGCAAAGCAGCTCCCAATCAGTACTGAAAGAAGCTCCGAGTCCAGTGAT
   I D P N T Y K P L A E V F R K A A P T I S T E R T S E S S D
451  GTTGACCCCTTCAAGTGGTGGCGCACTTGGCAACTTGGCCATATTCTCAGTGAGACAGCACAATCACCAGAGCTGCTGCCAGTGTCTCGGT
   V D P S S G G A L G N L S H I L S E T A Q S P E L L P V L G
541  AAGCATCGCAAAAGAACTACTAGTTTGGCGCATCTAAGGGTGCCACCGAAGGAGCTATTCTTGATCAGCTTGTCTTAGTCATGATAAC
   K H R K E T T S L A H L R V P P K E L F L D Q L V S S H D N
631  CTGCCCCGGCTGCCGCTCAACTGGCCCAATCCCAAAATTTCCCTTTCCAGCAGTTGATGTGCTACAGCAACGAACTTGGCAGCAAGCATGGT
   L P G C R S T G P I P N F P F Q Q L M C Y S N E L G S K H G
721  GGCAGCACGAATTACCTCTGGTTTAACCAAGATGAGTCAAGCTGCAGCACCGTTTCCACTGTGATGGCACCAGTTTCGCCGTCAACTCTC
   G S T N Y L W F N Q N E S S C S T V S T V M A P V S P S T L
811  TCAACATCAACAGGGCTCAATAGGTCAACAGAGATCCCACTCTGGAGGTACTGGCATTGAGTACCCAATTCTATTGGGATACGACT
   S T S T G L N R S P E N P H S G G T G I Q S T Q F Y W D T T
901  AATCCTAGCAGCAGCAGCTAAAGGAAGCAGTGAAGCAACAGCTTGGGATTGAGCTGCAAAGCACAAGCTCAATTCTGGAGAATAGT
   N P S S S S S K G S S G S N S L G F E L Q S T S S I L E N S
991  ATCTTCCCATGGACAGATTATCACCAGATAAAATAGCCACCTAGAGGAAGAACTCAAGTGGCCTGACTTGCTCCATGGAACCTTTACA
   I F P W T D L S P D K N S H L E E E L K W P D L L H G T F T
1081 GATACACCAGCAACCATGCAGAACTTTAGCCAATCACTGTATGAAGATGTGGTCAAAGCCGAGAGCCAATTCAACATGGAGGGCCTCTGT
   D T P A T M Q N L S Q S L Y E D V V K A E S Q F N M E G L C
1171 GCCGCTTGGTCTCAAAATCTGCAGCCACAGCAACATCTGCAGGTAGTATCCGATTTGTATGACAAGGATTTGCAGAGAAATGTCCTTGTCT
   A A W S Q N L Q P Q Q H L Q V V S D L Y D K D L Q R M S L S
1261 TTTGAGAATATCTAG
   F E N I *

```

图 2 *PmMYB* 基因核酸序列及推导的氨基酸序列

注: 阴影部分为 R2、R3 重复; □: 推测的转录激活区。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PmMYB*

Note: The gray sequences are R2, R3 repeats; □: Possible transcription activated region.

利用 NCBI 的 rpsblast 对该基因编码区氨基酸序列对保守结构域分析显示(图 3), 该基因具有两个典

型的 *MYB* 家族基因的 DNA 结合区(DNA-binding domain), 分别为 9~61、62~116 位氨基酸, 及该家族

基因的 RNA 剪切信号。利用 ScanProsite 分析显示该基因含有两个 MYB 类 HTH-DNA-binding 结构域, 分别为 37~60、89~112 位氨基酸, 该基因属于典型的 R2、R3 类 MYB 转录因子。其 R3 结构域的第一个色氨酸残基(Trp, W)被苯丙氨酸(Phe, F)取代。

大多数 MYB 转录因子的转录激活功能域一般位于其蛋白的中间或 C-端, 常以富含酸性氨基酸、脯氨酸、谷氨酰胺或丝氨酸/苏氨酸为特征 [9]。分析糜子 *MYB* 基因, 发现在其 C-端存在一个丝氨酸(Ser, S)丰富区, 推测该 *MYB* 基因可能具有转录活性。

经软件预测, 该蛋白 PI 为 6.71, MW 为 47 273.90。该基因被定位在细胞核里, 这与参与基因转录的功能相一致。

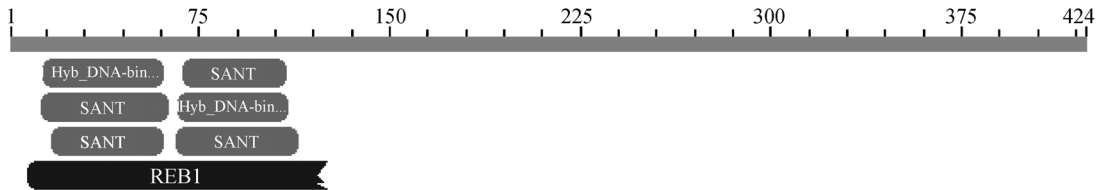


图3 *PmMYB* 基因保守结构域  
Fig. 3 Conserved domains of *PmMYB*

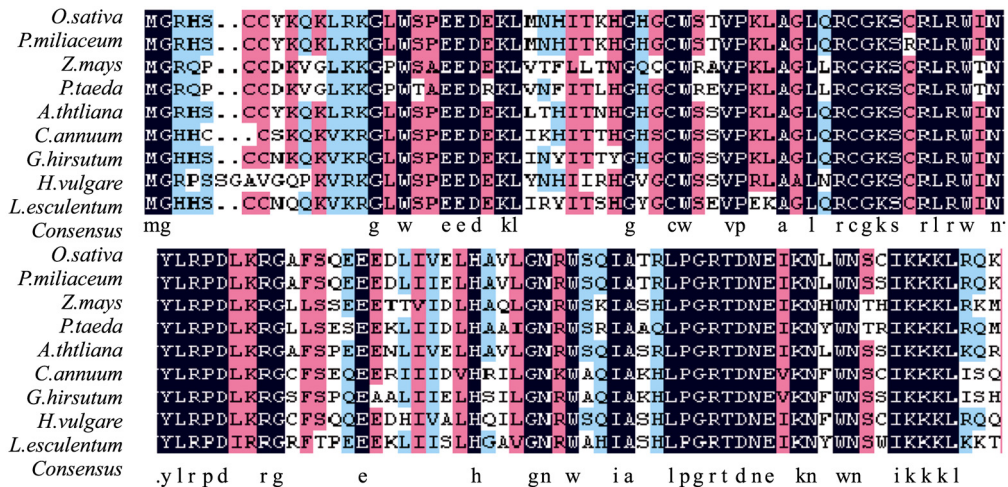


图4 几种植物 *MYB* 基因 R2、R3 重复序列多重比较  
Fig. 4 Multiple alignment of R2, R3 repeats of *MYB* genes from some plants

### 2.3 不同植物 *MYB* 基因的系统进化树

基于氨基酸序列的系统进化树分析表明(图 5), 不同植物的 *MYB* 基因遗传分化很大, 糜子的 *MYB* 基因与水稻的相似程度最高(84%), 与小麦和玉米 *MYB* 基因相似性较低, 分别为 46%和 41%。

### 2.4 *PmMYB* 基因的表达模式分析

为了明确 *PmMYB* 基因在水分胁迫下的表达模

### 2.2 不同 *MYB* 类基因 R2、R3 重复区的多重比较

对来源于水稻(*Oryza sativa*, AJ495786)、糜子(*Panicum miliaceum*)、玉米(*Zea mays*, AF474118)、火炬松(*Pinus taeda*, DQ399057)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AC003970)、辣椒(*Capsicum annuum*, AF 477956)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*, AY518320)、大麦(*Hordeum vulgare*, X70878)及茄子(*Lycopersicon esculentum*, X95297)等 9 种植物的 *MYB* 基因的 R2、R3 重复区的氨基酸序列进行多重比较(图 4)。结果表明, 不同植物之间 *MYB* 转录因子的 R2、R3 重复序列具有较高的一致性(67%~98%), 其中糜子 *MYB* 基因与水稻的一致性为 98%。

式, 利用半定量 RT-PCR 技术对该基因的表达进行了分析, 结果显示 *PmMYB* 基因的表达受水分胁迫及复水的诱导(图 6,A)。利用 GeneSnap 软件对 *PmMYB* 基因在不同处理条件下的相对表达量进行的分析(图 6,B)。糜子 *MYB* 基因在糜子正常生长(土壤相对含水量为 75%时)下有一定的表达, 在干旱处理条件下(土壤相对含水量为 36%时)表达量很高。当植株受到重度胁迫时(土壤相对含水量 24%)

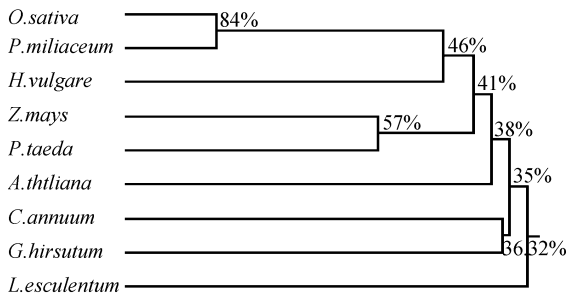


图 5 基于氨基酸序列的 *MYB* 基因系统进化树  
Fig. 5 Homology phylogenetic tree based on amino acid sequence of *MYB* genes from some plants

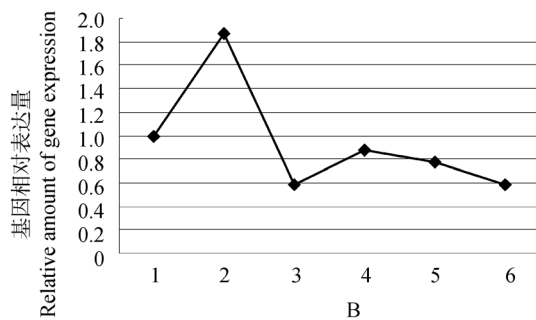
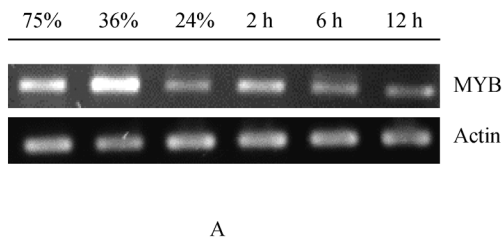


图 6 糜子 *MYB* 基因在不同水分胁迫和复水条件下的半定量 RT-PCR 分析

A: 土壤相对含水量 75%, 36%, 24% 和复水后时间 2 h, 6 h, 12 h 表示样品的不同处理; B: 横坐标的 1~6 样品分别土壤相对含水量 75%, 36%, 24% 和复水后 2 h, 6 h, 12 h 处理下的样品。

Fig. 6 RT-PCR patterns of *PmMYB* under different water stress and re-watering conditions

A: Soil water status at 75%, 36%, and 24% of relative moisture content, and times at 2 h, 6 h, and 12 h after rehydration indicated the treatments samples collected; B: 1 to 6 in abscissa represent samples collected under treatments of soil water relative moisture contents of 75%, 36% and 24%, and times at 2 h, 6 h, and 12 h after rehydration, respectively.

### 3 讨论

转录因子也称反式作用因子,是指能够与基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白,通过它们之间以及与其他相关蛋白之间的相互作用激活或抑制某些基因的转录 [10,11]。植物各种诱导型基因的表达主要受特定转录因子在转录水平上的调控 [12]。MYB 家族转录因子是植物中比较重要的一类转录因子,在生物体内主要起转录激活作用 [13,14]。MYB 家族转录因子的共同特征是含有 1~3 个不完全重复的 MYB 结构域(R1, R2, R3),该结构域是一段约 51~52 个氨基酸的肽段,包含一系列高度保守的氨基酸残基和间隔序列,正是这些保守的氨基酸残基使 MYB 结构域折叠成螺旋-螺旋-转角-螺旋(helix-helix-turn-helix)结构 [13]。在每个 MYB 结构域中一般含有 3 个保守的色氨酸(W)残基,在植物 R2R3-MYB 蛋白中 R3MYB 结构域的第一个色氨酸常被疏水氨基酸(I, L, F)取代。根据所含 MYB 结构域的数目,植物中 MYB 类转录因子分为 3 个亚

类,分别为包含有 1、2、3 个 MYB 结构域的蛋白。其中 R2、R3 亚类成员含有两个 MYB 结构,主要参与次生代谢的调节,或控制细胞的分化,及应答外界环境刺激等 [13,14]。目前的研究认为 MYB 转录因子参与番茄的过敏性反应 [4]、拟南芥对冷及盐胁迫的反应 [6] 等。如蔡新忠 [4] 等对 MYB 基因 *LeMYB1* 在 Cf-9 决定的 HR 和抗病性中的作用进行了研究,认为该基因可能在 Cf-9 决定的 HR 和抗病性产生中起调节作用。Zhu 等 [6] 对拟南芥一个 MYB 转录因子基因 *HOS10-1* 突变体的研究表明,该突变体对低温、外源脱落酸及盐胁迫都很敏感,尤其是适应不了寒冷。在植物对水分胁迫的响应作用中,MYB 类转录因子参与了依赖于 ABA 的基因表达,在干旱胁迫条件下可以启动一些受 ABA 诱导的基因的表达,进而启动植物的抗旱、耐旱机制 [15]。如拟南芥的 *ATMYB2* 基因在对脱水、盐胁迫及 ABA 的应答中起到转录调控作用 [15]。Oono 等 [16] 对利用基因芯片对拟南芥 7 000 个已知基因的

分析中, *MYB* 基因的表达受复水的诱导。我们的 RT-PCR 结果(图 6)也表明, 糜子的 *MYB* 基因可能参与了复水的过程。

本研究以我们构建的糜子干旱后复水与干旱的抑制减法杂交 cDNA 文库中的 EST 序列及其同源性较高的水稻 *MYB18* 基因的 cDNA 序列为基础, 通过 PCR 扩增克隆了糜子 *MYB* 转录因子基因。该基因的半定量 RT-PCR 分析表明该基因与糜子的抗旱节水相关, 目前正在构建表达载体, 对其功能进行深入分析。该基因的克隆为进一步探讨利用该基因改良糜子和其他作物的抗旱节水性奠定了良好的基础。

### 参考文献(References):

- [1] GUO Shu-Qiao, HUANG Ji, JIANG Yan, ZHANG Hong-Sheng. Cloning and characterization of RZF71 encoding a C2H2-type zinc finger protein from rice. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29 (5): 607–613.  
郭书巧, 黄骥, 江燕, 张红生. 水稻 C2H2 型锌指蛋白基因 RZF71 的克隆与表达分析. *遗传*, 2007, 29(5): 607–613.
- [2] GAO Jun-Shan, WEI Yang-Hao. Drought-resistance adaptation and importance of broomcorn millet in drought areas. *Journal of Millet Crops*, 1990, 4: 30–33.  
高俊山, 魏仰浩. 我国糜子的抗旱适应性及其在干旱地区农业生产中的地位. *粟类作物*, 1990, 4: 30–33.
- [3] LIN Fan-Yun, HU Yin-Gang, SONG Guo-Qi, ZHANG Hong, LIU Tian-Ming, HE Bei-Ru. Isolation and analysis of genes induced by rehydration after serious drought in Broomcorn Millet (*Panicum miliaceum* L.) by using SSH. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14 (4): 537–541.  
林凡云, 胡银岗, 宋国琦, 张宏, 刘天明, 何蓓如. 干旱复水条件下诱导的糜子特异表达基因的分离与分析, *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 537–541.
- [4] LIN Fan-Yun, HU Yin-Gang, SONG Guo-Qi, HE Bei-Ru. Gene expression profile analysis of broomcorn millet during rehydration after serious drought by means of SSH. *Journal of Northwest A & F University (Nat Sci ed)*, 2007, 35 (3): 81–86.
- 林凡云, 胡银岗, 宋国琦, 何蓓如. 糜子干旱后复水过程中基因表达谱的初步分析. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2007, 35(3): 81–86.
- [5] CAI Xin-Zhong, XU You-Ping, LOU Jian. Cloning of tomato *myb* gene fragments and expression upon development of hypersensitive response. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30 (5): 589–591.  
蔡新忠, 徐幼平, 楼健. 番茄 *myb* 基因片段的克隆及在过敏反应时的表达. *园艺学报*, 2003, 30(5): 589–591.
- [6] Zhu JH, Verslues PE, Zheng XW. HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(28): 9966–9971. [\[DOI\]](#)
- [7] Murray HG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321–4325. [\[DOI\]](#)
- [8] Vanden BN, Bridget GC, Ingo H. High-throughput screening of suppression subtractive hybridization cDNA libraries using DNA microarray analysis. *Bio Techniques*, 2004, 37(5): 818–824.
- [9] Jin H, Martin C. Multi-functionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(5): 577–585. [\[DOI\]](#)
- [10] Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(12): 1305–1312. [\[DOI\]](#)
- [11] LI Jie. Plant transcription factor and gene regulation. *Bulletin of Biology*, 2004, 39 (3): 9–11.  
李洁. 植物转录因子与基因调控. *生物学通报*, 2004, 39(3): 9–11.
- [12] Glazebrook J. Genes controlling expression of defence responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4 (4): 301–308. [\[DOI\]](#)
- [13] Thomas J, Gonda. The c-Myb oncoprotein. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, 30 (5): 547–551. [\[DOI\]](#)
- [14] Ito M. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol*, 2000, 43 (5-6): 677–690. [\[DOI\]](#)
- [15] Abe H, Urao T, Ito T. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2003, 15 (1): 63–78. [\[DOI\]](#)
- [16] Oono Y, Seki M, Nanjo T. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J*, 2003, 34 (6): 868–887. [\[DOI\]](#)