

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01217

毛竹 MYB 转录因子 *PeMYB2* 的克隆与功能分析

肖冬长, 张智俊, 徐英武, 杨丽, 张凤雪, 王超莉

浙江农林大学, 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 临安 311300

摘要: MYB 类转录因子在调控逆境应答基因的表达起着重要的作用, 是最大的植物转录因子之一。文章通过同源基因克隆方法和 RACE(Rapid-amplification of cDNA ends)技术, 以毛竹幼苗为材料, 获得一个 MYB 类转录因子, 命名 *PeMYB2*。氨基酸序列分析表明, *PeMYB2* 具有典型的 R2R3-MYB 特征, N 端含有两个串联重复保守结构域, C 端含有一个膜蛋白 DUF3651; 进化树分析表明, *PeMYB2* 与水稻 *OsMYB18* 序列相似性最高, 达到 85.98%; 酵母单杂实验表明, *PeMYB2* 具有转录激活功能。将 *PeMYB2* 转化拟南芥对其功能进行分析, 获得 7 株转基因纯合体植株。比较转基因和野生型拟南芥表型发现, *PeMYB2* 的过量表达使转基因拟南芥出现矮化、晚花的现象; 非生物胁迫处理(盐胁迫、干旱胁迫、低温胁迫)结果表明, 转基因拟南芥中 *PeMYB2* 的过量表达, 导致转基因植株对盐胁迫和低温胁迫有更高的耐性, 但是对低温胁迫的耐受性没有明显的变化; 进一步通过盐胁迫信号通路相关 Marker 基因(*NXH1*、*SOS1*、*RD29A*、*COR15A*)的定量 PCR 实验验证, 发现 *PeMYB2* 对下游这些抗逆基因的表达具有调控作用。上述实验结果表明, 毛竹 *PeMYB2* 可参与非生物胁迫调控, 对毛竹盐胁迫和低温胁迫的响应起着重要的作用。

关键词: 毛竹; *PeMYB2*; 非生物胁迫; 转基因

Cloning and functional analysis of *Phyllostachys edulis* MYB transcription factor *PeMYB2*

XIAO Dong-Chang, ZHANG Zhi-Jun, XU Ying-Wu, YANG Li, ZHANG Feng-Xue,
WANG Chao-Li

State Key Laboratory Cultivation Base of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: MYB-type transcription factor is one of the largest families in plants, which plays important roles in accepting stress signals from environment and regulating the expression of stress-tolerant genes. In this paper, using homologous cloning and RACE technology, a MYB-type transcription factor, designated *PeMYB2*, was cloned from *Phyllostachys edulis*. The results of bioinformatics showed that *PeMYB2* is a typical R2R3-MYB. It contained two tandem repeats in its N-terminus, and a membrane protein DUF3651 in its C-terminus. In addition, phylogenetic analysis indicated that *PeMYB2* shared the highest homology with 85.98% to *OsMYB18* protein from *Oryza sativa* spp. *Japonica*. In addition, a yeast one-hybrid assay showed that *PeMYB2* could activate the expression of downstream genes. After *PeMYB2* was

收稿日期: 2013-04-23; 修回日期: 2013-06-04

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2011CB111500), 浙江农林大学基础基金项目(编号: 2010FR072)和浙江省自然科学基金项目(编号: Y307469) 资助

作者简介: 肖冬长, 硕士研究生, 专业方向: 生物技术与种质创新。E-mail: xdc1115@163.com

通讯作者: 张智俊, 副教授, 研究方向: 生物技术与种质创新。E-mail: 397942805@qq.com

transformed into *Arabidopsis thaliana*, seven *PeMYB2* transgenic *Arabidopsis* lines were obtained. Phenotypic analysis of the transgenic and wild-type *Arabidopsis* showed that over-expression of *PeMYB2* caused delayed flower or dwarfism in transgenic *Arabidopsis*. Under the abiotic stress conditions, such as salt and cold stresses, the over-expression of *PeMYB2* in *Arabidopsis* had higher survival rate than the wild-type *Arabidopsis*. Expression analysis of saline stress response marker genes in the transgenic and wild-type plants under the salt stress condition showed that *PeMYB2* regulated the expression of *NXH1*, *SOS1*, *RD29A*, and *COR15A*. As the result, *PeMYB2* might play an important role in various responses to abiotic stresses in *P. edulis*.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; *PeMYB2*; abiotic stress; transgene

干旱、盐碱、极端温度等非生物胁迫是引起全球粮食作物减产的首要原因^[1]。随着干旱和盐渍化土地面积的迅速扩张,预计到 2050 年将有 50% 的可耕地面积严重盐渍化^[2],因此,抗逆相关基因的研究成为农作物育种中重要的研究方向。由于转录因子在植物防卫反应和逆境胁迫应答过程中扮演着非常重要的角色,因此,利用转录因子改良和提高植物的综合抗逆性具有良好的应用前景^[3]。

目前,与植物逆境抗性相关的转录因子主要有 5 大类: bZIP (Basic zinc finger protein) 类、WRKY 类、AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein) 类、NAC (NAM、ATAF1/2、CUC1/2) 类和 MYB (V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 类^[4]。其中 MYB 类是最大的植物转录因子基因家族之一,参与调控植物对生物和非生物胁迫的双重响应。自 Paz-Ares 等^[5, 6]首次报道玉米转录因子 *C1* 基因克隆以来,已有数百种调控干旱、盐渍、激素、低温及生长发育等相关基因表达的转录因子基因被分离克隆,据推测拟南芥中至少有 1 553 个转录因子基因,约占其基因总数的 5.9%^[7]。目前,已在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、玉米 (*Zea mays* L.)、水稻 (*O. sativa*)、金鱼草 (*Antirrhinum majus*)、葡萄 (*V. vinifera*)、杨树 (*Populus*)、火炬松 (*Pinus taeda*) 和桉树 (*Eucalyptus gunnii*) 等多种植物中对 MYB 基因进行了系统研究^[8],分析显示拟南芥中至少含有 196 个 MYB 基因,毛果杨中至少含有 197 个 MYB 基因,葡萄中至少含有 124 个 MYB 基因^[9],而玉米中至少含有 157 个 MYB 基因^[10]。这些 MYB 基因广泛参与植物的各种发育和代谢的调节,其中许多参与胁迫应答调节,如拟南芥中 *MYB68* 基因在根的柱鞘细胞中特异性表达,在高温胁迫下,根中 *MYB68* 表达明显增

加,转基因拟南芥在高温下的存活率明显比野生型高^[11];另外有研究表明, *AtMYB102* 和 *AtMYB41* 亦可通过影响机械损伤和渗透胁迫后的脱水反应产生对昆虫等生物胁迫的抗性^[12, 13]。

竹子是世界上最重要的经济森林资源之一,大约有 25 亿人在经济上受益于竹类相关产品^[14]。中国是竹类资源最丰富的国家,素有“竹子王国”之称,约有竹类 37 属 499 种^[15],其中毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 是所有竹类中人工种植面积最大、经济价值最高的竹种,具有重要的生态和经济价值^[16]。毛竹可在微酸性或中性土壤中生长,根系发达,对干旱、低温等逆境有一定的耐受性。因此,从竹类植物发掘抗逆相关优质基因资源,对禾本科农作物遗传改良有一定的应用价值。本研究通过同源基因克隆和 RACE 技术,首次从毛竹中克隆获得一个新的 MYB 转录因子基因 *PeMYB2* (GenBank 登陆号: HM747940.1),通过转化拟南芥,分析该基因在拟南芥中应对盐碱胁迫、干旱胁迫、低温胁迫反应过程中的作用,拟为农作物抗逆育种研究提供候选优质基因资源并为竹类植物抗逆研究奠定一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

取水培法培养一个月左右的毛竹实生苗嫩叶,液氮速冻-80℃ 保存备用;拟南芥选用哥伦比亚野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 作为后续转基因功能验证的初始材料;毛竹和拟南芥种子由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 毛竹幼苗 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取叶片在液氮中迅速研磨成粉末, 采用 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus(TaKaRa, Japan)提取总 RNA, 用 DNase I 酶消除 RNA 中的 DNA 污染。以 1 μ g 左右的毛竹总 RNA 为模板, 利用 RNA PCR Kit (TaKaRa, Japan)逆转录合成 cDNA 的第一条链。

1.2.2 毛竹 *PeMYB2* 全长 cDNA 的克隆

根据水稻 *OsMYB18*(CAD44612.1)同源基因全长 cDNA 序列, 分别在保守性较高的 CDS 区域设计特异性引物 PM-1 和 PM-2(序列见表 1), 以毛竹 cDNA 为模板, 采用 RACE 试剂盒 5'-Full RACE kit D315 和 3'-Full RACE kit D314(Takara, Japan)分别进行 5'和 3'RACE 扩增。将大小符合要求的电泳条带回收, 克隆至 pMD18-T 载体; 热激法转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 检测筛选阳性单克隆, 由上海生工生物工程技术服务有限公司进行正反向测序。测序结果经拼接后最终确定 *PeMYB2* cDNA 全长序列。

1.2.3 *PeMYB2* 序列分析

用 Invitrogen vector 10.0 对毛竹 *PeMYB2* 的 ORF 进行查找和翻译, 利用在线 ProtParam 程序对 *PeMYB2* 进行理化分析, 并使用在线 Blastp 和 ClustalW 对 *PeMYB2* 进行序列相似性比对, 结合 MEGA4.1 构建系统进化树。

PeMYB2 转录激活活性验证

PCR 扩增 *PeMYB2* CDS 全长(1 ~ 1 281 bp)、*TINY*^[17] CDS 全长(1 ~ 708 bp), 引物见表 1。琼脂糖凝胶电泳、鉴定回收后, 用 T4 连接酶分别将上述目的序列与 pGBKT7 载体连接。测序验证目的序列与 pGBKT7 BD (Binding domain)融合表达的读码框, 转化酵母感受态细胞 AH109, 设置 pGBKT7 为阴性对照, pGBKT7-TINY2 为阳性对照。按照不同比例 1:1、1:10、1:100 稀释后分别均匀涂布于 SD/-Trp 单缺陷平板和 SD/-Trp/-His 双缺陷平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d。SD/-Trp 单缺陷平板生长的酵母单菌落提质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 各挑取 2 个单菌落提取质粒并酶切鉴定, 检测出的阳性菌落用接种环转移到 100 μ L 的无菌水中, 漩涡打散, 各取 5 μ L, 滴在涂有 SD/-Trp/ α -gal 固体平板上, 每个样点 3 个重复平行样, 28 $^{\circ}$ C

培养 2~3 d 后观察菌落颜色变化。

1.2.4 *PeMYB2* 蛋白 DNA 结构域的原核表达

利用 MYB-F1 和 MYB-R1 引物, PCR 扩增 *PeMYB2* R2R3 结构域, 将目的基因连接到 pET28a 载体上, 分别转化到宿主大肠杆菌 DE3、Rosetta 和 Plys 内进行原核表达。阳性菌经菌液 PCR、酶切及测序确定读码框正确性。挑取阳性单菌落, 接种于含有 Kan(100 mol/mL)的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。第二天稀释(1:100)过夜菌液, 37 $^{\circ}$ C 培养到 OD₆₀₀=0.5 后, 冷却到室温, 加入 IPTG(24 mmol/L)诱导, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 6 h 和 20 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后, 离心收集菌体、超声破碎和 SDS-PAGE 胶检测目的蛋白。

1.2.5 *PeMYB2* 转化拟南芥

根据 *PeMYB2* 的 ORF 区设计引物 1301-PM-F 和 1301-PM-R, PCR 扩增 *PeMYB2* ORF 全长, 琼脂糖凝胶电泳检测、回收, 用 T4 连接酶将目的序列与 pCambia1301 载体连接, 组成重组质粒 pCambia1301-*PeMYB2*。用电击法将重组质粒 pCambia1301-*PeMYB2* 转化农杆菌 GV3101, PCR 验证阳性菌落, 并提取质粒, 测序正确后用农杆菌蘸花法转化拟南芥。转化后的拟南芥在 22 $^{\circ}$ C、16 h/8 h(光/暗)的条件下培养。

1.2.6 *PeMYB2* 过表达植株的获取与表型观察

应用潮霉素筛选和 PCR 检测转 *PeMYB2* 的拟南芥, 获得阳性 T₃ 植株, 通过半定量 PCR 从阳性植株中筛选获得 *PeMYB2* 的过表达株系。比较 *PeMYB2* 过表达株系与野生型拟南芥在生殖生长阶段和营养生长阶段的表型差异。

1.2.7 *PeMYB2* 过表达拟南芥抗非生物胁迫反应

将长有 4 片真叶的 *PeMYB2* 过表达拟南芥和野生型拟南芥分别进行 3 种胁迫处理。干旱处理: 停止对拟南芥 3 周不浇水后, 恢复正常浇水 1 周, 统计野生型拟南芥和 *PeMYB2* 过表达拟南芥的存活率; 冷处理: 将拟南芥放入 0 $^{\circ}$ C 的冷柜中处理 24 h 后, 重新转入驯化室正常培养 2 周, 统计野生型拟南芥和 *PeMYB2* 过表达拟南芥的存活率; 高盐处理: 野生型拟南芥和 *PeMYB2* 过表达拟南芥每隔 3 d 浇 200 mmol/L 的 NaCl 溶液, 处理 2 周, 恢复正常浇水 1 周, 统计野生型拟南芥和 *PeMYB2* 过表达拟南芥的存活率。

1.2.8 转 *PeMYB2* 拟南芥盐胁迫信号通路相关 Marker 基因表达特性分析

提取 1.2.7 中盐胁迫处理后 *PeMYB2* 过表达拟南芥和野生型拟南芥叶片的总 RNA, 反转录成 cDNA 作为模板, 用 SYBR 作为荧光染料, Marker 基因的引物参照表 1, 通过 Real-time PCR 对 Marker 基因的表达模式进行分析。

2 结果与分析

2.1 毛竹 *PeMYB2* 全长 cDNA 的克隆与序列分析

经克隆后测序, 获得全长为 1 766 bp 的 *PeMYB2* 基因(GenBank 登录号: HM747940.1), 开放阅读框为 1 281 bp, 编码 427 个氨基酸。经 Blastp 比对分析,

PeMYB2 属于典型的 R2R3-MYB 亚家族, N 端含有两个保守的 MYB 结构域 R2 和 R3, C 端含有一个膜蛋白 DUF3651。R2 和 R3 分别由 52 个和 51 个氨基酸组成, R2 结构域含有 3 个色氨酸(W), R3 含有 2 个色氨酸, 第一个色氨酸被苯丙氨酸(F)所取代, 保守色氨酸之间由 18~19 氨基酸间隔(图 1)。*PeMYB2* 氨基酸序列经 Clustal X 比对后, 用 MEGA 4.1 系统构建系统发育树(图 2), 结果显示, 毛竹 *PeMYB2* 与禾本科单子叶模式植物水稻 *OsMYB18* 的序列相似性最高, 达到 85.98%, 而与双子叶模式植物拟南芥的序列相似性最低, 只有 40.23%。

2.2 *PeMYB2* 结构域蛋白的原核表达

用 ProtParam 程序对 *PeMYB2* 进行理化分析,

表 1 本研究使用的引物

引物名称	引物序列(5'→3')
PM-1	ATCAGCACTGAAAGGACCTC
PM-2	AAGACAAGGACATCCTTTGC
<i>PeMYB2</i>	F: GGAATTCCATATGATGGGGAGGCATTCTGCTGCTACA R: CGGGATCCGATATTCTCAAAAGACA
MYB	F: GGAATTCCATATGATGGGGAGGCATTCTGCTGCTACA R: CGGGATCCTCCTTGCTGTCGTAGCT
1301-PM	F: GGGGTACCATGGGGAGGCATTCTGCTGCTGCTACA R: GCTCTAGAGATATTCTCAAAAGACA
TINY	F: GGAATTCCATATGATGGCAGAGGAATACTACAGCCT R: CGGGATCCGAGATCCCATGACAAGC
NXH1	F: CCACTCGAACCCTGCATTACT R: CTCAAGCCTTACTAAGATCAGGAGG
SOS1	F: CGGCAGCATGGTTAATGTGTAC R: TTGGCTGAAACGAGACCTTGA
RD29A	F: ATGATGACGAGCTAGAACCTGAA R: GTAATCGGAAGACACGACAGG
COR15A	F: GCGTATGTGGAGGAGAA R: AGGTAAGACCCTACTTTGTG
At-actin	F: TGCCCATCGGGTAATTCATAGTTC R: CCTCATGCCATCCTCCGTCTT
MYB-SYRB	F: ATGAGACCACCTGTTCTCCAGGACAGCATG R: CACTGTCCCAAACTTGACAGGGCTTCAG

```

1  MGRHSCCYKQKLRLKGL[SPEEDEKL MNHITKHGHGC[STVPKLAGLQRCGKSCRLR
57  [INYLRLPDLKRGASQEEEDLIHLEHVLNENR[SHIATRLPGR TDNEIKNL[NSCIKKK
116  LRQQGIDPNTHKPLTEVDRSKAAPTISTERTSESSDVPSSGGALGNLSHLLSETAQSP
176  LLPVLGKHRTETPSLARLKVPPKELFLDQLASGHENLPSGRSSGSIPNFPFQHLFCYSNE
236  FSSRDSGGTNSLWFNQNESSGSAVSTVMPPVSPSTLSTPTGLNLSPDNPHSGGTGVHN
294  AQFYWDTANPSSSSSTGSNGSNGLGFEQSTSSLENSIFPWTDLPDKDSQVHLEEL
409  KWPDLLHGTFTPETSAAMQNLGQSLYEDVVKAESQFNMEGLCAAWCQNLQPQHQIV
427  VTDMYDKDLQRMSLSFENI

```

图 1 *PeMYB2* 氨基酸序列分析

阴影为保守氨基酸; R2、R3 为 MYB DNA 结合域; DUF365 为 C 端未知膜蛋白。

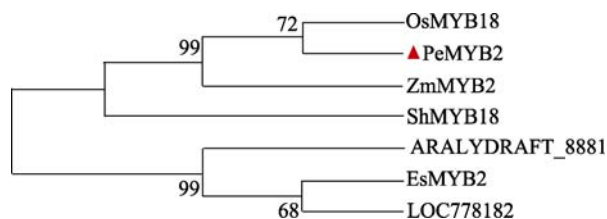


图 2 *PeMYB2* 与其他物种的蛋白序列进化树

OsMYB18 : 水稻(CAD44612.1); ZmMYB2 : 玉米(ACG25437.1); ShMYB18 : 甘蔗(ACT98139.1); LOC778182 : 大豆(XP_003521641.1); EsMYB2 : 三枝九叶草(AFH03054.1); ARALYDRAFT_888197 : 拟南芥(XP_002889757.1)。

发现全长 *PeMYB2* 蛋白不可溶, 而 *PeMYB2* 的 DNA 结构域蛋白(N 端 1~120 个氨基酸)是可溶蛋白, 蛋白表达载体 pET28a-N-*PeMYB2* 在 DE3、Rosetta 和 Plys 3 种不同的宿主细胞内表达。在 20℃ 诱导表达

时, Rosetta 和 Plys 内表达的 *PeMYB2* 蛋白同样不可溶, 而在 DE3 细胞中表达的 *PeMYB2* 蛋白, 在上清和沉淀中都有表达(图 3A); 在 37℃ 诱导表达时, *PeMYB2* 蛋白在 3 种宿主细胞内表达的蛋白都不可溶(图 3B), 这为后续体外 DNA 结合实验及晶体结构的解析奠定了前期实验基础。

2.3 *PeMYB2* 转录激活功能分析

将转化有重组质粒 pGBKT7-TINY2、pGBKT7-*PeMYB2* 和空载 pGBKT7 的酵母 AH109 细胞涂于 SD/-Trp/ α -gal 固体平板上生长 2~3 d 后, 转有 pGBKT7-TINY2、pGBKT7-*PeMYB2* 的酵母菌落显现蓝色, 而阴性对照 pGBKT7 酵母菌落不显色(图 4), 说明 *PeMYB2* 具有转录激活活性。

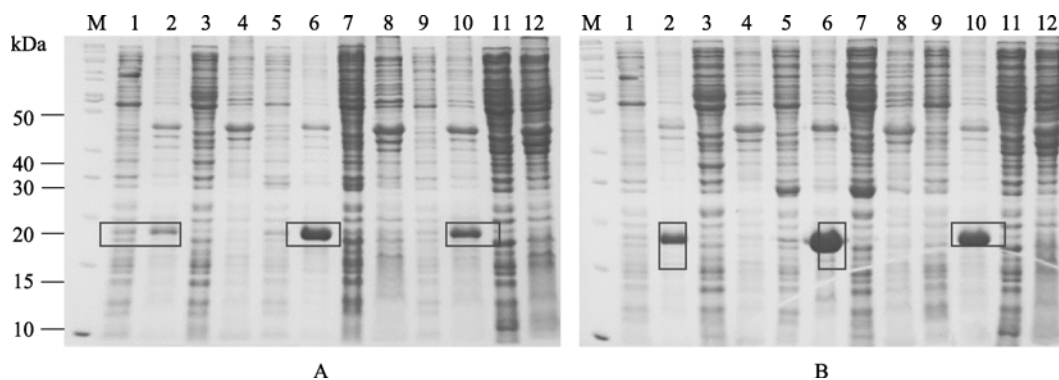


图 3 *PeMYB2* 蛋白原核表达

A : 20℃ 诱导表达; B : 37℃ 诱导表达。1~4 宿主细胞为 DE3; 5~8 为 Rosetta 细胞; 9~12 为 Plys 细胞。1、2、5、6、9 和 10 为 IPTG 诱导, 3、4、7、8、11、12 未加 IPTG 诱导; 奇数为上清, 偶数为沉淀, 方框里为目的蛋白。

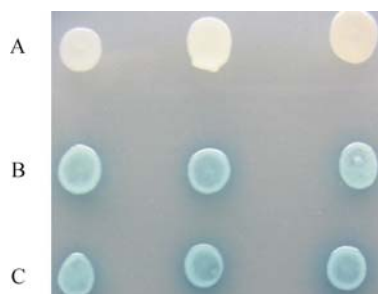


图 4 *PeMYB2* 转录激活活性的验证

A 阴性对照 pGBKT7; B 阳性对照 pGBKT7-TINY2; C pGBKT7-*PeMYB2*。

2.4 *PeMYB2* 过表达拟南芥的筛选和表型分析

pCAMBIA1301 带有抗潮霉素标记基因, 因此转化有重组质粒 pCAMBIA1301-*PeMYB2* 的拟南芥

可以在带潮霉素的 MS 固体培养基上生长(图 5), 用潮霉素初步筛选阳性植株, 并通过 GUS 染色和提取基因组后 PCR 验证, 进一步排除假阳性植株, 直到获得 T₃ 代阳性植株。进一步用 RT-PCR 从阳性植株中筛选出 *PeMYB2* 过表达株系, 获得超表达株系 L1(图 6)。对拟南芥的表型观察发现, 过表达株系 L1 比野生型拟南芥出现矮化、晚花的现象(图 7)。

2.5 *PeMYB2* 过表达拟南芥对非生物胁迫分析

野生型拟南芥(WT)和 *PeMYB2* 过表达拟南芥(L1)分别在高盐(200 mmol/L NaCl)、低温(0℃)和干旱下生长(图 8), WT 和 L1 的存活率统计结果显示, 在盐胁迫下生长, 野生型拟南芥的存活率只有 5%, 大部分都死亡, L1 植株的存活率达到 57.5%; 在低



图 5 潮霉素筛选 *PeMYB2* 的 T3 代阳性植株

温胁迫下生长, 野生型拟南芥的存活率为 60%, L1 植株的存活率高达 80%; 干旱胁迫下生长, 野生型拟南芥的存活率为 70%, L1 植株的存活率高达 65%, 差异性不大。



图 6 RT-PCR 检测阳性植物中 *PeMYB2* 的表达量

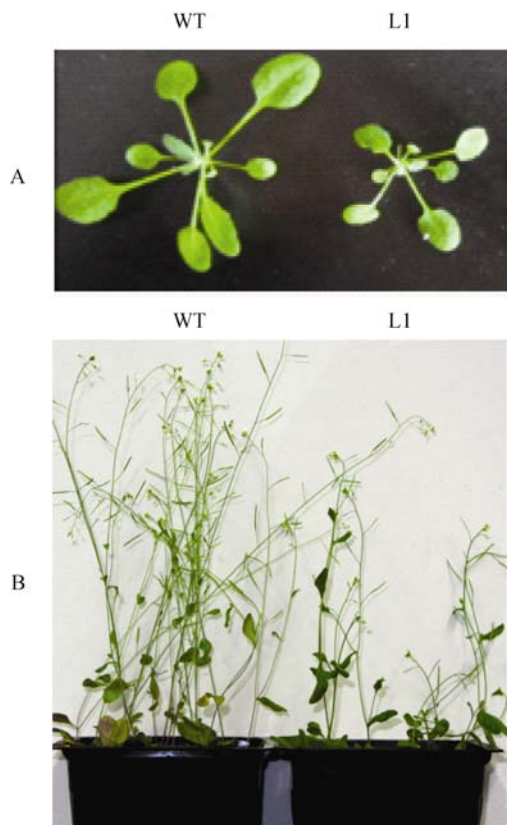


图 7 野生型和转基因拟南芥的表型差异
A: 第二周; B: 第六周。

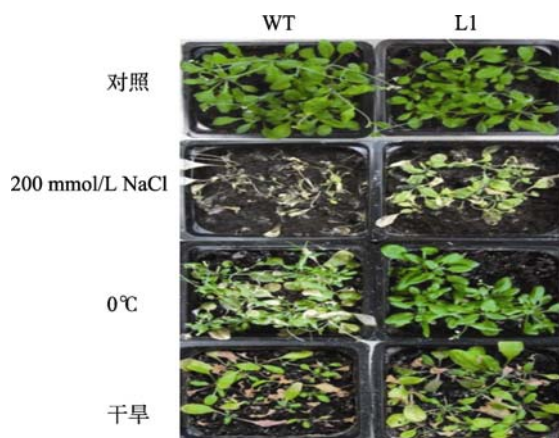


图 8 *PeMYB2* 过表达拟南芥苗期的抗胁迫能力分析

2.5 盐胁迫信号通路相关 Marker 基因的表达特性分析

PeMYB2 基因在拟南芥内过量表达, 从表型上看该基因增强了拟南芥对高盐和冷胁迫的抗性, 特别是对高盐 NaCl 的抗性, 但是否能对下游相关抗逆基因表达进行调控, 是其作为转录因子的另外一个直接证据。通过进一步检测已知下游 *NXH1*、*SOS1*、*RD29A*、*COR15A* 等胁迫相关的 Marker 基因的表达情况, 发现转基因 L1 拟南芥中 *NXH1*、*RD29A*、*COR15A* 在处理前后的表达, 相对于野生型 WT 的表达量均有明显的提高(2~12 倍), 而 *SOS1* 的表达量相差不大(图 8)。说明 *PeMYB2* 可对下游抗性基因进行调控, 并进一步证明 *PeMYB2* 具有胁迫应答调节的功能。

3 讨论

植物在生长和发育过程中会遇到各种非生物胁迫(干旱、低温、盐碱以及病原侵染等), 此时, 植物

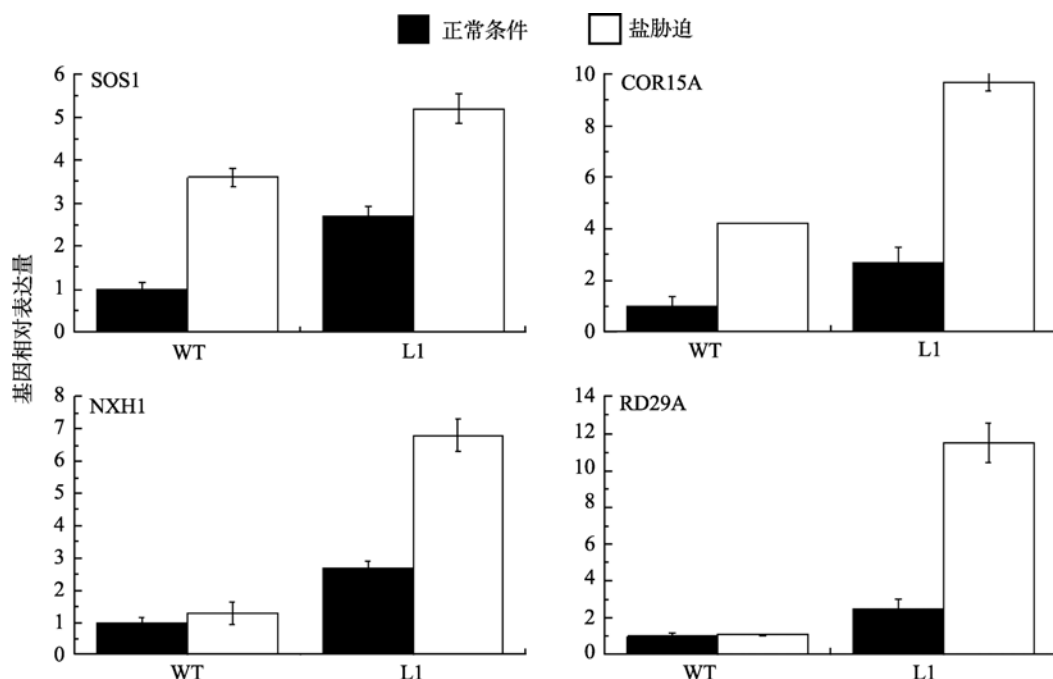


图 9 盐胁迫下 L1 和 WT Marker 基因的表达

细胞会在染色体DNA水平、转录水平及转录后水平上精确调控基因的表达以适应不同环境的变化^[18]。转录因子通常采用与顺式作用元件发生特异性结合的模式,在转录水平上调控下游基因表达。MYB类转录因子是植物中最大的转录因子家族之一^[19],参与植物次生代谢调控^[20~22]、激素和环境因子的应答^[11, 23~25],并对细胞分化、细胞周期、器官的形成以及植物叶片的形态建成具有重要的调节作用^[26~29]。目前,已经有很多MYB转录因子从不同的植物中被克隆和标识出来,但毛竹中的MYB还未有相关报道。通过对毛竹部分基因组序列^[30]比对等生物信息学分析推测,毛竹基因组可能存在多个MYB转录因子,但这些MYB均未被详细注释。因此,本文从毛竹中克隆获得的*PeMYB2*转录因子,并对*PeMYB2*功能进行初步验证分析,将有助于更多竹类植物转录因子的发现和鉴定。

PeMYB2 经序列比对和进化分析发现,该转录因子属于R2R3-MYB家族,含 2 个重复MYB结构域,每个结构域形成 3 个 α -螺旋,其中第 2 和第 3 个螺旋结构形成 1 个HTH(螺旋-转角-螺旋)。MYB每个结构域含有 3 个保守的色氨酸(18~19 个氨基酸间隔),构成了HTH的疏水中心^[31]。每个重复的第 3 个螺旋被称为“识别螺旋”,在识别特异的DNA时,由 2 个识

别螺旋共同作用完成与DNA直接结合^[32]。序列分析显示毛竹*PeMYB2* 的R3 结构域中,第一个色氨酸被苯丙氨酸所取代,类似的情况在禾本科小麦*TaMYB30*^[33]和*TaMYB30-B*^[34]中也存在,目前该突变对功能产生何种影响还有待进一步DNA Binding实验验证。

转录激活是转录因子的一个重要功能性特征。通过酵母单杂实验对毛竹*PeMYB2* 转录激活活性进行验证,结果显示*PeMYB2* 能够有效激活酵母下游报告基因的表达,说明*PeMYB2* 具有的转录激活功能。为了进一步对*PeMYB2* 的功能进行鉴定,通过农杆菌蘸花法转化拟南芥,获得的*PeMYB2* 过表达拟南芥,可大大增强拟南芥对盐胁迫和低温胁迫的抗性,进一步证明*PeMYB2* 可参与植物抵抗盐胁迫和低温胁迫途径的调控,有望成为作物抗逆育种的一个候选基因。另外,*PeMYB2* 在拟南芥中过表达也会对拟南芥生长发育产生影响,导致转基因拟南芥出现矮化、晚花的现象,此种情况在*AtDREB1*^[35]、*OsDREB1A*^[36]、*GmDREB2*^[37]、*TaMYB30-B*^[34]等的转基因拟南芥实验中亦有报道。尽管转录因子过表达导致转基因植物矮化或晚花的具体机制尚不明确,但该现象可能对于竹类植物开花机制的研究有一定参考意义。

转录因子调控下游基因的表达对于植物的抗逆性至关重要。*NHX1*、*SOS1*、*RD29A*和*COR15A*^[38~40]都是植物参与胁迫反应的抗性基因,它们的表达水平是植物适应逆境的一个标志。本文实时荧光定量PCR结果显示,*PeMYB2*在拟南芥中过量表达时,增强了下游盐胁迫信号通路中Marker基因*NHX1*、*RD29A*和*COR15A*盐胁迫诱导表达水平,而这3个Marker基因盐胁迫下表达量的提高很可能是导致转基因拟南芥对盐胁迫耐性增强的主要原因,推测*PeMYB2*极有可能是通过调控这些盐胁迫信号通路中关键基因的表达,最终影响毛竹对盐胁迫等的耐受性。

参考文献(References):

- [1] Boyer JS. Plant productivity and environment. *Science*, 1982, 218(4571): 443–448. DOI
- [2] Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Di Fonzo N, Faccioli P, Grossi M, Mastrangelo AM, Pecchioni N, Stanca AM. Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(5): 649–665. DOI
- [3] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 吴燕民, 黄玉碧, 唐益雄. MYB转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理. *遗传*, 2008, 30(10): 1265–1271. DOI
- [4] Schwechheimer C, Bevan M. The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(10): 378–383. DOI
- [5] Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J*, 1987, 6(12): 3553–3558. DOI
- [6] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(5): 410–417. DOI
- [7] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 1995, 7(2): 173–182. DOI
- [8] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573–581. DOI
- [9] Wilkins O, Nahal H, Foong J, Provart NJ, Campbell MM. Expansion and diversification of the Populus R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiol*, 2009, 149(2): 981–993. DOI
- [10] Du H, Feng BR, Yang SS, Huang YB, Tang YX. The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize. *PloS ONE*, 2012, 7(6): e37463. DOI
- [11] Feng CP, Andreasson E, Maslak A, Mock HP, Mattsson O, Mundy J. *Arabidopsis MYB68* in development and responses to environmental cues. *Plant Sci*, 2004, 167(5): 1099–1107. DOI
- [12] Lippold F, Sanchez DH, Musialak M, Schlereth A, Scheible WR, Hinch DK, Udvardi MK. AtMyb41 regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009, 149(4): 1761–1772. DOI
- [13] Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmaroli G, Tonelli C. Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant J*, 2008, 53(1): 53–64. DOI
- [14] Lobovikov M, Ball L, Guardia M, Russo L. World bamboo resources: a thematic study prepared in the framework of the Global Forest Resources Assessment 2005. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007. DOI
- [15] Zhou MB, Yang P, Gao PJ, Tang DQ. Identification of differentially expressed sequence tags in rapidly elongating *Phyllostachys pubescens* internodes by suppressive subtractive hybridization. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(1): 224–231. DOI
- [16] Liu L, Cao XL, Bai R, Yao N, Li LB, He CF. Isolation and characterization of the cold-induced *Phyllostachys edulis* AP2/ERF family transcription factor, *peDREB1*. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(3): 679–689. DOI
- [17] Wei G, Pan Y, Lei J, Zhu YX. Molecular cloning, phylogenetic analysis, expressional profiling and in vitro studies of TINY2 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38(4): 440–446. DOI
- [18] Zhang YY, Yang CW, Li Y, Zheng NY, Chen H, Zhao QZ, Gao T, Guo HS, Xie Q. SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(6): 1912–1929. DOI
- [19] Romero I, Fuertes A, Benito M, Malpica J, Leyva A, Paz-Ares J. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 14(3): 273–284. DOI
- [20] Boddu J, Svabek C, Ibraheem F, Jones AD, Chopra S. Characterization of a deletion allele of a sorghum Myb gene yellow seed1 showing loss of 3-deoxyflavonoids.

- Plant Sci*, 2005, 169(3): 542–552. [DOI](#)
- [21] Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N, Grima-Pettenati J. *EgMYB2*, a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J*, 2005, 43(4): 553–567. [DOI](#)
- [22] Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC. ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1612–1624. [DOI](#)
- [23] Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 2007, 225(5): 1245–1253. [DOI](#)
- [24] Churin Y, Adam E, Kozma-Bognar L, Nagy F, Börner T. Characterization of two Myb-like transcription factors binding to CAB promoters in wheat and barley. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(2): 447–462. [DOI](#)
- [25] Higginson T, Li SF, Parish RW. *AtMYB103* regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2003, 35(2): 177–192. [DOI](#)
- [26] Martin C, Paz-Ares J. MYB transcription factors in plants. *Trends Genet*, 1997, 13(2): 67–73. [DOI](#)
- [27] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J*, 2004, 37(1): 115–127. [DOI](#)
- [28] Shin B, Choi G, Yi H, Yang S, Cho I, Kim J, Lee S, Paek NC, Kim JH, Song PS. *AtMYB21*, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J*, 2002, 30(1): 23–32. [DOI](#)
- [29] Raffaele S, Rivas S, Roby D. An essential role for salicylic acid in *AtMYB30*-mediated control of the hypersensitive cell death program in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2006, 580(14): 3498–3504. [DOI](#)
- [30] Peng ZH, Lu Y, Li L, Zhao Q, Feng Q, Gao ZM, Lu HY, Hu T, Yao N, Liu KY, Li Y, Fan DL, Guo YL, Li WJ, Lu YQ, Weng QJ, Zhou CC, Zhang L, Huang T, Zhao Y, Zhu CR, Liu XG, Yang XW, Wang T, Miao K, Zhuang CY, Cao XL, Tang WL, Liu GS, Liu YL, Chen J, Liu ZJ, Yuan LC, Liu ZH, Huang XH, Lu TT, Fei BH, Ning ZM, Han B, Jiang ZH. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456–461. [DOI](#)
- [31] Ogata K, Kanei-Ishii C, Sasaki M, Hatanaka H, Nagadoi A, Enari M, Nakamura H, Nishimura Y, Ishii S, Sarai A. The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat Struct Mol Biol*, 1996, 3(2): 178–187. [DOI](#)
- [32] Jia L, Clegg MT, Jiang T. Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 575–585. [DOI](#)
- [33] Zhang LC, Zhao GY, Jia JZ, Liu X, Kong XY. Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. *J Exp Bot*, 2012, 63(1): 203–214. [DOI](#)
- [34] Zhang LC, Zhao GY, Xia C, Jia JZ, Liu X, Kong XY. A wheat R2R3-MYB gene, *TaMYB30-B*, improves drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J Exp Biol*, 2012, 63(16): 5873–5885. [DOI](#)
- [35] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10(8): 1391–1406. [DOI](#)
- [36] Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 2003, 33(4): 751–763. [DOI](#)
- [37] Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Bioch Biophys Res Commun*, 2007, 353(2): 299–305. [DOI](#)
- [38] 朱丹, 柏锡, 朱延明, 才华, 李勇, 纪巍, 陈超, 安琳, 朱毅. 野生大豆盐碱胁迫相关 *GsTIFY11b* 的克隆与功能分析. *遗传*, 2012, 34(2): 230–239. [DOI](#)
- [39] 周晓馥, 王兴智. 植物耐盐相关基因: *SOS* 基因家族研究进展. *遗传*, 2002, 24(2): 190–192. [DOI](#)
- [40] Wang H, Datla R, Georges F, Loewen M, Cutler AJ. Promoters from *kin1* and *cor6.6*, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. *Plant Mol Biol*, 1995, 28(4): 605–617. [DOI](#)