

谷子 MYB 类转录因子 *SiMYB42* 提高转基因拟南芥低氮胁迫耐性

丁庆倩¹, 王小婷^{1,2}, 胡利琴¹, 齐欣¹, 葛林豪¹, 徐伟亚¹, 徐兆师¹,
周永斌^{1,2}, 贾冠清¹, 刁现民¹, 闵东红², 马有志¹, 陈明¹

1. 中国农业科学院作物科学研究所, 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081
2. 西北农林科技大学农学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 杨凌 712100

摘要: Myeloblastosis (MYB)类转录因子是高等植物中最大的转录因子家族之一, 在植物发育及防御反应过程中发挥重要作用, 还参与植物对于干旱等非生物胁迫的响应。谷子(*Setaria italica* L.)起源于中国, 具有抗旱、耐瘠薄的特性, 是研究单子叶作物非生物胁迫抗性的理想材料。本研究对耐低氮胁迫谷子品种郑 204 经低氮处理后进行转录组分析, 鉴定出一个在低氮胁迫条件下明显上调的 MYB 类转录因子 *SiMYB42*。系统发育树结果表明, *SiMYB42* 属于 R2R3-MYB 亚族, 具有 2 个 MYB 保守域; 表达模式分析显示, *SiMYB42* 在低氮、高盐、干旱和 ABA 胁迫条件下表达量显著上调; 亚细胞定位、quantitative real-time PCR 及转录激活活性分析结果表明, *SiMYB42* 蛋白定位于植物的细胞核和细胞膜中, 主要在谷子的叶部或根部表达, 具有转录激活活性; 基因功能分析结果表明, 在正常条件下, 转 *SiMYB42* 基因拟南芥与野生型 Columbia-0 拟南芥(WT)无明显差异, 但在低氮条件下, 转 *SiMYB42* 基因拟南芥的主根长、根系表面积及鲜重均显著高于 WT, 结果证明 *SiMYB42* 基因可以提高转基因植物对低氮胁迫的耐性; 下游基因表达分析结果显示, 在转 *SiMYB42* 基因拟南芥中, 参与植物氮素转运的硝酸盐转运基因 *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 的表达水平平均高于 WT, 启动子分析结果显示 *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 基因启动子序列中均具有 MYB 结合位点。以上结果证明, *SiMYB42* 可以通过调控下游硝酸盐转运体基因的表达提高植物在低氮条件下的耐性。本研究揭示了 *SiMYB42* 基因在低氮胁迫反应途径中的作用, 为进一步了解谷子低氮胁迫响应的调控网络奠定了基础。

关键词: 谷子(*Setaria italica* L.); MYB 类转录因子; 低氮胁迫; 基因表达分析; 基因功能分析

收稿日期: 2017-09-25; 修回日期: 2018-01-02

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(编号:2016ZX08002005)和中国农业科学院科技创新工程项目资助[Supported by the National Major Project for Developing New GM Crops (No.2016ZX08002005) and the Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences]

作者简介: 丁庆倩, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 905890270@qq.com

王小婷, 在读博士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 1534270156@qq.com

丁庆倩和王小婷并列第一作者。

通讯作者: 陈明, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 植物抗逆分子生物学。E-mail: chenming02@caas.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.17-315

网络出版时间: 2018/3/13 10:09:40

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180313.1009.006.html>

MYB-like transcription factor *SiMYB42* from foxtail millet (*Setaria italica* L.) enhances *Arabidopsis* tolerance to low-nitrogen stress

Qingqian Ding¹, Xiaoting Wang^{1,2}, Liqin Hu¹, Xin Qi¹, Linhao Ge¹, Weiya XU¹, Zhaoshi Xu¹, Yongbin Zhou^{1,2}, Guanqing Jia¹, Xianmin Diao¹, Donghong Min², Youzhi Ma¹, Ming Chen¹

1. National Key Facility For Crop Gene Resource and Genetic Improvement, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crop, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2. State Key Laboratory of Arid Region Crop Adversity Biology, College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: Myeloblastosis (MYB) transcription factors are one of the largest families of transcription factors in higher plants. They play an important role in plant development, defense response processes, and non-biological stresses, i.e., drought stress. Foxtail millet (*Setaria italica* L.), originated in China, is resistant to drought and low nutrition stresses and has been regarded as an ideal material for studying abiotic stress resistance in monocotyledon. In this study, we ran a transcription profile analysis of zheng 204 under low-nitrogen conditions and identified a MYB-like transcription factor *SiMYB42*, which was up-regulated under low-nitrogen stress. Phylogenetic tree analysis showed that *SiMYB42* belongs to R2R3-MYB subfamily and has two MYB conserved domains. Expression pattern analysis showed that *SiMYB42* was significantly up-regulated under various stress conditions, including low-nitrogen stress, high salt, drought and ABA conditions. The results of subcellular localization, quantitative real-time PCR and transcriptional activation analysis indicated that *SiMYB42* protein localizes to the nucleus and cell membrane of plant cells, mainly expressed in the leaf or root of foxtail millet, and has transcription activation activity. Functional analysis showed that there was no significant difference between transgenic *SiMYB42 Arabidopsis* and wild-type (WT) *Arabidopsis* under normal conditions; however, under low-nitrogen condition, the root length, surface area and seedling fresh weight in transgenic *SiMYB42 Arabidopsis*, were significantly higher than their counterparts in WT. These results suggest that *SiMYB42* transgenic plants exhibit higher tolerance to low-nitrogen stress. Expression levels of nitrate transporters genes *NRT2.1*, *NRT2.4* and *NRT2.5*, which are the transcriptional targets of *SiMYB42*, were higher in transgenic *SiMYB42 Arabidopsis* plants than those in WT; the promoter regions of *NRT2.1*, *NRT2.4* and *NRT2.5* all have MYB binding sites. These results indicate that *SiMYB42* might enhance foxtail millet tolerance to low-nitrogen condition through regulating the expression of nitrate transporter genes. This study reveals the possible functions of *SiMYB42* in a low-nitrogen stress response pathway, and provides a foundation for further understanding the entire regulation network of foxtail millet in response to low-nitrogen stress.

Keywords: foxtail millet (*Setaria italica* L.); MYB-like transcription factor; low-nitrogen stress; gene expression analysis; gene function analysis

氮素是作物从土壤中吸收最多的元素，是限制作物产量的关键因素。研究表明，硝酸盐不仅是植物生长发育的主要氮源^[1]，还是植物生长过程中的重要信号分子，可以调控植物一系列复杂的生理过程来影响植物对氮的利用效率，保证植物的正常生长发育^[2]。

转录因子是基因表达的重要调节因子，一般包

含 DNA 结合结构域以及转录激活/抑制结构域，通过调节下游靶基因的转录起始速率来综合调节许多生理和生物化学过程。Myeloblastosis(MYB)类转录因子是高等植物中最大的转录因子家族之一，在植物发育及防御反应过程中发挥重要作用，还参与植物对干旱等非生物胁迫的响应。此外，MYB 类转录因子还参与调节细胞的次级代谢^[3]、控制细胞形态

建成^[4];一些 MYB 类转录因子还参与植物氮素代谢过程。例如拟南芥 MYB 转录因子 *PAP2* 在低氮胁迫条件下高度诱导表达,该基因参与花青素代谢的过程,进而调控氮循环通路^[5]。单细胞红藻 MYB 转录因子基因 *CmMYB1* 可以调节植物的氮素利用^[6]。根据 MYB 保守域种类及数量的不同,MYB 类转录因子基因家族分为 3 个亚家族:MYB1R, R2R3-MYB 和 MYB3R,这 3 个亚家族分别含有 1 个、2 个和 3 个 MYB 保守域。其中 R2R3-MYB 是植物 MYB 类转录因子基因家族中最大的亚家族^[7]。因此,在过去 10 年中,R2R3-MYB 亚家族的成员已被广泛研究^[8]。据报道,R2R3-MYB 类基因不仅参与一些生理和化学过程,而且还参与胁迫响应^[9]、光响应等信号途径^[10]。例如:*ZmMYBC1* 主要在种子糊粉层和一些花组织中表达,调节分生组织的形成以及植物的花和种子的发育^[11]; *AtMYB2* 和 *AtMYC2* 互作能够转录激活干旱和 ABA 诱导基因 *RD22* 的表达^[12]; *AtMYB102* 能够调节干旱和盐胁迫响应过程,并且在损伤信号通路中发挥有重要作用^[13]。

谷子具有抗旱、耐贫瘠、适应性广的特点,是研究单子叶植物非生物胁迫响应过程的理想材料之一。目前,谷子功能基因组研究刚刚起步,参与谷子低氮胁迫响应的基因功能还有待深入研究。本研究从低氮胁迫耐性较强的谷子品种郑 204 克隆一个 MYB 转录因子基因 *SiMYB42* (Seita.2G286400.1)。*SiMYB42* 受低氮胁迫诱导表达。基因功能分析表明:转基因植株在低氮条件下表现为主根变长、根系表面积扩大、鲜重增加等特性,证明过表达 *SiMYB42* 基因可以提高转基因植物对低氮胁迫的耐性。同时发现 *SiMYB42* 基因可以调控下游硝酸盐转运基因的表达影响植物低氮胁迫耐性。本研究揭示了 *SiMYB42* 基因的功能及作用机制,为作物氮高效利用改良提供了优异基因资源,也为揭示谷子低氮胁迫耐性调控网络奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

谷子品种郑 204 由中国农业科学院作物科学研

究所刁现民研究员课题组提供,野生型 Columbia-0 拟南芥(WT)种子由本实验室保存。农杆菌 GV3101 菌株和大肠杆菌 TOP10 感受态分别购于全式金公司和江苏康为公司,带有 CaMV35S 启动子无 GUS 的 pBI121 载体、16318hGFP 载体、AH109 载体均由本实验室保存。

将清洗好的拟南芥种子均匀撒在 MS(4.43 g/L MS 粉末、10 g/L 蔗糖、1 mL/L 1000X 有机成分、5 mL/L 200X 肌醇和 2.4 g/L 植物凝胶)固体培养基上,4℃ 冰箱春化 3 d,然后在 16 h 光照/8 h 黑暗、相对湿度(RH)60%、温度 22℃ 的组培间中培养,生长 7 d 后移苗处理。对谷子的种子进行次氯酸钠处理打破休眠,然后均匀撒在湿润的滤纸上,30℃ 培养箱培养生长。待谷子幼苗生长为三叶一心且长势均一时,参考霍冬英等^[14]和闵东红等^[15]的方法,分别取谷子幼苗进行低氮(低氮水培营养液组分包括 0.2 mmol/L NH_4NO_3 、4.0 mmol/L MgCl_2 、1.0 mmol/L MgSO_4 、1.5 mmol/L KH_2PO_4 、1.5 mmol/L K_2HPO_4 、2.0 mmol/L K_2SO_4 、40 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Na}_2\text{Fe-EDTA}$ 、4.0 mmol/L H_3BO_3 、14 $\mu\text{mol/L}$ MnSO_4 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO_4 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ Na_2MoO_4 、0.6 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ NiCl_2 、20 nmol/L CoCl_2)、干旱(8% PEG6000)、NaCl(120 mmol/L)和 ABA(50 $\mu\text{mol/L}$)等水培处理。均在处理 0 h、1 h、6 和 24 h 后取整个植株于装有钢珠的 2.0 离心管中,将所有鲜样迅速于液氮速冻,-80℃ 存放待用。

1.2 谷子 *SiMYB42* 基因生物信息学分析

谷子数据来源于 Phytozome 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>),利用 SMART 数据库(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线工具分析谷子 *SiMYB42* 蛋白的保守结构域。用 Compute pI/Mw tool(<http://expasy.org/tools/>)计算蛋白质的分子量和等电点,根据 *SiMYB42* 氨基酸序列,利用 Plant TFDB(<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn>)搜索谷子中与之相关的 MYB 基因的氨基酸序列,并在 Phytozome 数据库中进行 BlastP 比对,搜索与其同源性较高的其他物种的基因序列,利用 ClustalW1.8.3^[16]进行多序列比对,并用软件 MEGA5.1^[17]以相邻法(Bootstrap 设为 1000)^[18]构建系统进化树。

1.3 RNA 提取和 Real-time PCR 分析

采用植物总 RNA 快速提取试剂盒(北京庄盟生物有限公司)提取 1.1 中各处理的样品以及谷子幼苗不同组织的总 RNA, 以 TransScript 一步法反转录试剂盒(TransGen, 北京)反转录成 cDNA。使用 Real MasterMix(SYBR Green)试剂盒, 荧光定量 PCR 仪 (ABI7500)进行 quantitative real-time PCR(qRT-PCR)扩增。以合成好的 cDNA 为模板, 用 *SiMYB42* 的定量特异性引物进行 PCR 扩增, 以 *SiActin* (*Si001873m.g*)为内参(表 1)。qRT-PCR 反应体系包含 2×SuperReal PreMix Plus 12.5 μL、正向引物和反向引物(10 μmol/L)各 0.75 μL, cDNA 模板(约 110 ng/μL) 2 μL、50×ROX Reference Dye 0.5 μL、ddH₂O 8.5 μL。采用 3 步法反应程序进行扩增: 95 15 min; 95 10 s, 60 20 s, 72 32 s, 40 个循环。根据各样品特有的 *Ct* 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因在不同处理条件下的相对表达量。

1.4 *SiMYB42* 基因克隆和表达载体构建

根据谷子低氮处理的转录组差异表达谱分析, 鉴定出一个受低氮诱导表达明显上调的 MYB 类转录因子 *SiMYB42*(Seita.2G286400.1)。根据谷子的 CDS 序列, 设计 *SiMYB42* 基因特异性引物 *SiMYB42-F* 和 *SiMYB42-R*, 以郑 204 的 cDNA 为模板扩增 *SiMYB42* 基因的完整编码框。利用 In-Fusion 重组

酶技术将对正确的目的片段分别连接到 16318h-GFP、CaMV35S 启动子的 pBI121 和 pGBKT7 载体上(表 1)。

1.5 *SiMYB42* 基因转录活性分析

一般情况下, 单独的 BD(pGBKT7)可以与 GAL4 上游活化序列(GLA UAS)结合, 但是不能引起转录, 然而将一段具有转录激活活性的转录因子基因构建到载体 BD 上, 若有转录激活活性, 则该基因表达产生的 BD 单独与 UAS 结合也可引起下游报告基因的转录, 这种现象为自激活现象, 因此, 本文利用这种自激活现象来验证该转录因子是否具有转录激活活性。将 1 μg *SiMYB42*-BD 质粒和与 1 μg 对应的 BD 空载体^[19]混合后转化到酵母 AH109^[20]菌株中。将转化产物涂布于 SD/-Trp 固体平板上, 倒置平板, 于 30 培养箱培养 3 d。挑取单克隆于 SD/-Trp 的液体培养基中, 静置培养 18 h。按照 $OD_{600}=10^0$ 、 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释酵母菌液, 将稀释后的酵母菌液分别点滴到 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal 的固体平板上, 倒置平板, 于 30 培养箱培养 3 d, 观察其在营养缺陷型培养基上的生长及显色情况, 判断是否具有转录激活活性。

1.6 *SiMYB42* 蛋白亚细胞定位

取两叶一心生长旺盛的谷子叶片, 参考 Yoo 等^[21]方法制备原生质体, 将融合表达的重组质粒 *SiMYB42*-

表 1 本研究所用的引物信息

Table 1 Primers information for this study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途	复性温度()
<i>SiMYB42</i>	F:ATGGGTTCTACAACGGCGA	基因克隆	59
<i>SiMYB42</i>	R:TCATCGCTTCCCTATAGCATTA		
<i>SiMYB42</i> -pBI121	F:CTCTAGAGGATCCCCGGGATTTGGGCTTCTCG	pBI121 载体构建	65
<i>SiMYB42</i> -pBI121	R:ACTAGTGATCCCCGGGTTACCTGCTGCAGC		
<i>SiMYB42</i> -GFP	F:ATCTCTAGAGGATCCATGGGGCGCGCAGC	GFP 载体构建	60
<i>SiMYB42</i> -GFP	R:GCTCACCATGGATCCGAACCTTTGCTCCG		
<i>SiMYB42</i> -BD	F:AGGAGGACCTGCATATGATGGGGCGGCAGCCGTGCT	BD 载体构建	68
<i>SiMYB42</i> -BD	R:GCCTCCATGGCCATATGGAACCTTTGCTCCGTTGAG		
<i>SiMYB42</i> -RT	F:TGGACGAGTTCAGCAGCAT	实时定量 PCR	60
<i>SiMYB42</i> -RT	R:CTCCGTTTGGAGCCGTTGA		
<i>SiActin</i>	F:GGCAAACAGGGAGAAGATGA	谷子内参基因扩增	60
<i>SiActin</i>	R:GAGGTTGTCCGGTAAGGTCACG		

GFP 和 16318hGFP 空载体质粒作为对照分别转化到原生质体中, 在 25 °C 培养箱中黑暗静置 18 h 以上。将静置后 *SiMYB42*-GFP 的原生质体分别进行 ABA (20 $\mu\text{mol/L}$)、LN(0.2 mmol/L)、NaCl(75 mmol/L)和 PEG(8%)处理, 各处理 3.5 h、3 h、2 h 和 1.5 h, 然后在激光共聚焦荧光显微镜(Zeiss LSM700)下观察 *SiMYB42*-GFP 蛋白亚细胞定位。

1.7 拟南芥转化及纯合转基因植株的获取

参考 Beehtold 等^[22]方法进行 *SiMYB42* 转基因的拟南芥遗传转化, 采用蘸花法侵染野生型拟南芥 (WT), 最终得到带有 CaMV35S 启动子无 GUS 的 pBI121 载体的拟南芥转基因植株。将烘干的 T₀ 代拟南芥种子撒播于含卡那霉素(50 mg/L)的 MS 培养基上进行筛苗, 最终筛选到 3 个转基因株系 OE1、OE2 和 OE3, 将 3 个转基因株系进行扩繁, 采用纯合的 T₃ 代种子进行功能验证。

1.8 *SiMYB42* 转基因拟南芥耐低氮分析

将野生型拟南芥及 *SiMYB42* 转基因株系 OE1、OE2 和 OE3 的种子用 70% 的酒精处理 3 min, ddH₂O 漂洗 5 次, 每次 1 min 左右, 用 1% 的 NaClO 溶液浸泡 15 min, ddH₂O 漂洗 3 次, 每次 1 min; 在 4 °C 春化 3 d 后, 再将种子分别点播至 MS(4.43 g/L MS 粉末、10 g/L 蔗糖、1 mL/L 1000X 有机成分、5 mL/L 200X 肌醇和 2.4 g/L 植物凝胶)固体培养基中。参考 Peters 等^[23]和 Wimalasekera 等^[24]的处理方法, 将生长 4 d 长势均一的 WT、OE1、OE2 和 OE3 的幼苗分别转移到含有 3 mmol/L 氮的培养基和 0.2 mmol/L 的低氮培养基上, 每个处理每个株系各放 3 株幼苗。垂直生长 7 d 后在 EPSON Flatbed Scanner EPSON Expression 10000XL 扫描仪上用 WINRHIZO pro-LA2400 软件对两种处理下的幼苗进行根系扫描, 直接显示根长和根系表面积, 采用方差分析软件统计分析数据, 用 GraphPad Prism 5 软件绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 *SiMYB42* 基因克隆及基因特性分析

本课题组前期工作通过对谷子低氮处理表达谱

进行分析, 发现一个 MYB 类转录因子基因 *SiMYB42* 响应低氮胁迫处理。从谷子品种内 701 中克隆 *SiMYB42* 基因, 通过测序发现该基因全长 5069 bp, 开放读码框(ORF)为 837 bp, 编码 278 个氨基酸, 分子量为 30.38 kDa, pI 为 5.42。为分析谷子及其他物种 MYB 基因家族的进化关系, 在 Phytozome 数据库中搜索与 *SiMYB42* 氨基酸序列相似性最高的 MYB 类转录因子。将氨基酸序列进行多重比对, 构建系统发育树(图 1A)。分析结果表明, 37 个 MYB 类蛋白分为 3 个亚族, 即 MYB1R、R2R3-MYB 和 MYB3R 亚族。*SiMYB42* 属于 R2R3-MYB 类蛋白, *SiMYB20* 和 *SiMYB42* 的同源性最高(57%), 同时和 *AtMYB42* 在一个分支上。蛋白结构分析显示(图 1B), 相同亚族的蛋白含有相同的 MYB 结构域, 其中 MYB1R 亚族蛋白只含有一个 MYB 结构域, R2R3-MYB 亚族蛋白含有 2 个 MYB 结构域, MYB3R 亚族蛋白含有 3 个 MYB 结构域。

2.2 *SiMYB42* 在不同胁迫条件下的表达模式分析

利用 qRT-PCR 分别扩增谷子幼苗在正常处理 (CK)和胁迫处理下 *SiMYB42* 的表达情况(图 2)。结果显示, 在 ABA 处理下, *SiMYB42* 的表达量逐渐上升, 在 24 h 时达到极显著差异, 表达量约是对照处理的 4 倍; 在低氮胁迫处理下, *SiMYB42* 在 6 h 表达达到最高值, 表达量比对照提高了约 3 倍; 在高盐(NaCl)处理下, *SiMYB42* 的表达量也呈上升趋势, 在 6 h 达到最高值, 但在 1 h 和 12 h 表达量达到极显著差异; 在干旱(PEG)处理下, *SiMYB42* 响应比较敏感, 在 24 h 时其表达量达到最高, 但在 1 h 达到极显著差异, 表达量约为对照的 7 倍。上述结果表明, *SiMYB42* 基因响应谷子 ABA、低氮、高盐、干旱等多种胁迫处理。

2.3 *SiMYB42* 蛋白亚细胞定位以及组织特异性表达特性

利用瞬时表达法将融合表达载体 p35S::SiMYB42-GFP 和 16318hGFP 空载体对照质粒分别转化到谷子叶片的原生质体中, 在共聚焦显微镜下观察 *SiMYB42*-GFP 融合蛋白亚细胞定位情况。结果显示,

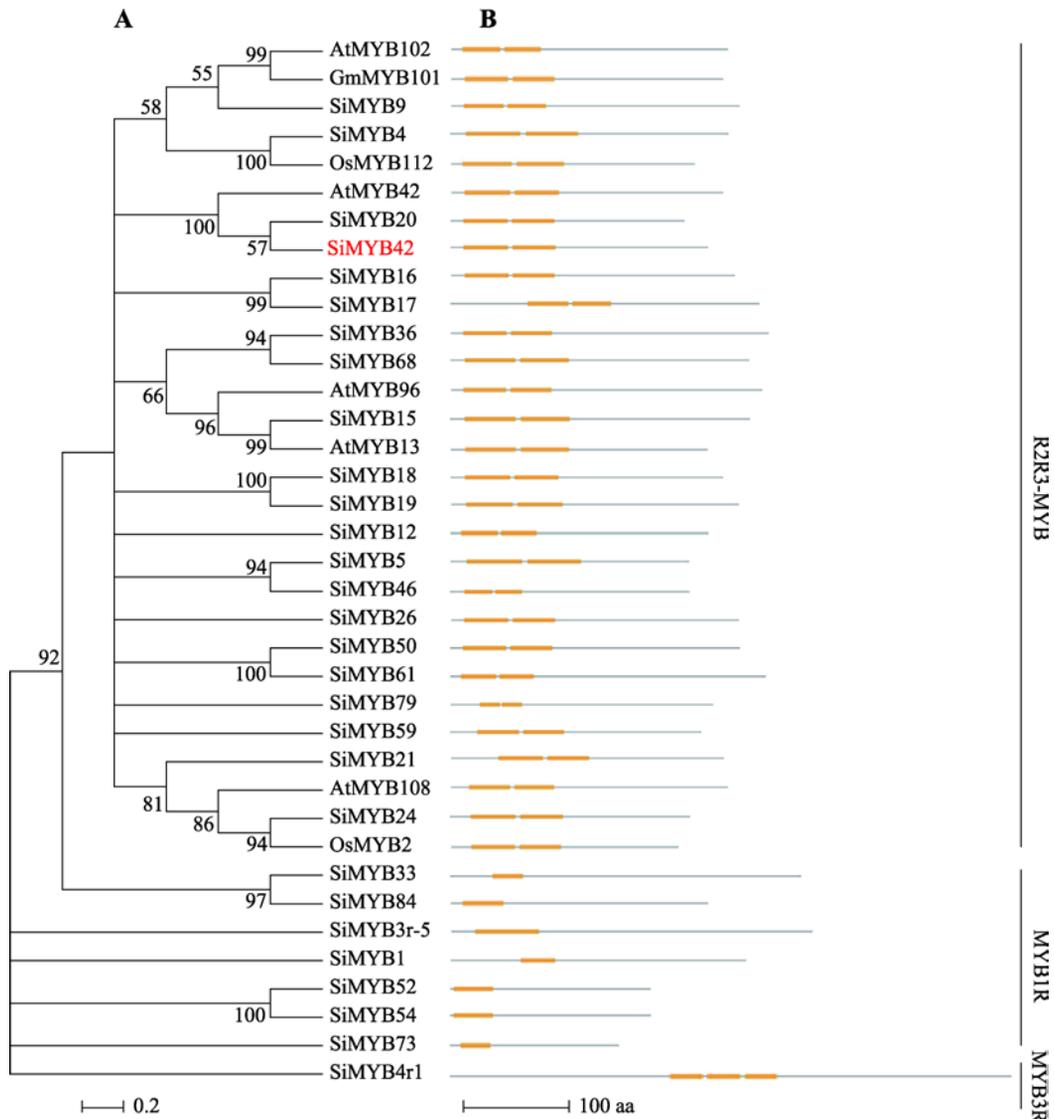


图 1 *MYB* 基因家族系统进化树和蛋白结构分析

Fig. 1 Phylogenetic tree and proteins structure analysis of *MYB* gene family

A: *MYB* 基因家族系统进化树分析(红色标注的为 *SiMYB42*) ; B: 蛋白结构分析(黄色方框代表 *MYB* 结构域)。

对照 GFP 蛋白在整个细胞中都可以表达, *SiMYB42*-GFP 融合蛋白定位在细胞膜和细胞核中。为探讨 *SiMYB42* 在生物逆境下调节功能是如何发挥的, 本文分别对瞬时表达后的原生质体进行了 ABA、低氮、高盐以及 PEG 的后处理, 观察 *SiMYB42* 亚细胞定位的变化。结果显示, *SiMYB42* 蛋白仍定位在细胞膜和细胞核中(图 3A)。qRT-PCR 结果表明, *SiMYB42* 主要在叶部表达量最高, 其次是在根中表达, 其他组织的表达量很低(图 3B), 表明 *SiMYB42* 主要在叶部或根部发挥作用。

2.4 *SiMYB42* 蛋白的转录活性分析

为研究 *SiMYB42* 是否具有转录激活活性, 将 *SiMYB42* 构建到表达载体 pGBKT7(BD)的 GAL4 DNA 结合域。利用 LiAc 方法将构建好的载体和 BD 空载体(做为对照)转化到制备好的酵母 AH109 感受态中, 在 SD/-Trp 单缺平板和 SD/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal 三缺平板上验证 *SiMYB42* 转录激活活性。结果显示: 所有转化子均能在 SD/-Trp 培养基上正常生长, *SiMYB42*-BD 重组质粒转化的酵母细胞在

SD/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal 平板上生长良好, 显淡蓝色, 表现出 α -半乳糖苷酶活性, 而对照组只能在 SD/-Trp 平板上生长, 并且没有显示 α -半乳糖苷酶活性 (图 4) 结果表明 *SiMYB42* 基因具有转录激活活性。

2.5 *SiMYB42* 转基因拟南芥苗期低氮胁迫耐性鉴定

将 *SiMYB42* 转基因拟南芥垂直培养 7 d 后, 在总氮浓度为 3 mmol/L 的正常培养基上(CK), 野生型拟南芥(WT)和 *SiMYB42* 转基因株系 OE1、OE2、OE3 的主根长和根表面积没有明显差异(图 5A)。在总氮浓度为 0.2 mmol/L 的低氮培养基的条件下, WT 和 *SiMYB42* 过表达植株的地上生长均受到一定的抑制, 但是转基因拟南芥的主根长明显高于 WT, 侧根也比 WT 多(图 5B)。分析 WT 和转基因拟南芥的主根长和根系表面积发现, 在对照处理的条件下, WT

和转基因拟南芥的主根长和根系表面积不存在明显差异, 而在低氮处理条件下, *SiMYB42* 转基因拟南芥的主根长和根系表面积均显著高于 WT(图 5: C, D)。经过称量转基因拟南芥和 WT 的鲜重发现, 在对照处理的条件下, *SiMYB42* 转基因拟南芥和 WT 的鲜重基本一致, 但在低氮处理条件下, *SiMYB42* 转基因植株的鲜重显著高于 WT(图 5E)。同时, 在苗期分析转基因拟南芥与 WT 对干旱和 ABA 的胁迫抗性发现, *SiMYB42* 转基因拟南芥和 WT 无明显的差异, 证明 *SiMYB42* 通过 ABA 和干旱胁迫非依赖途径调控植物对低氮胁迫的耐性。

2.6 *SiMYB42* 转基因植株的表达水平及下游氮胁迫相关基因的表达分析

SiMYB42 转基因植株的表达水平结果显示, OE2 的表达量最高, 约为 WT 的 4.5 倍(图 6A)。下游基

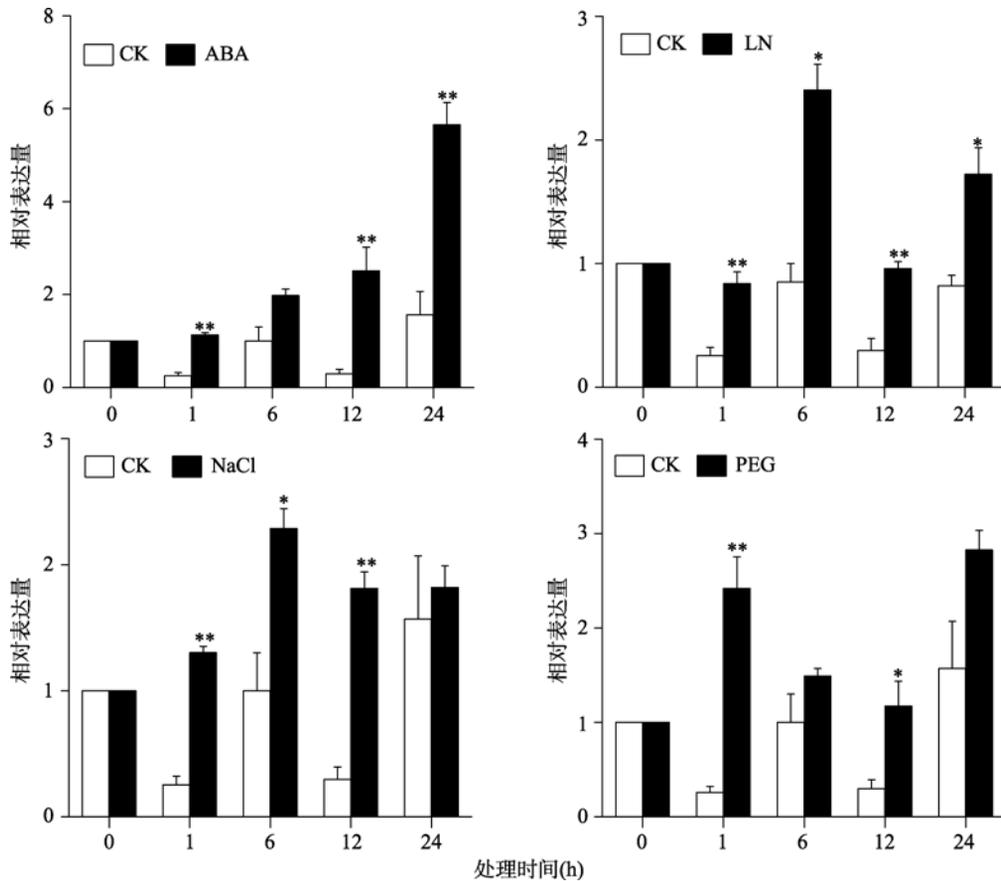


图 2 *SiMYB42* 在不同胁迫条件下的表达模式

Fig. 2 Expression patterns of the *SiMYB42* gene under various treatments

ABA: 脱落酸; LN: 低氮; NaCl: 高盐; PEG: 干旱; CK: 空白对照。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

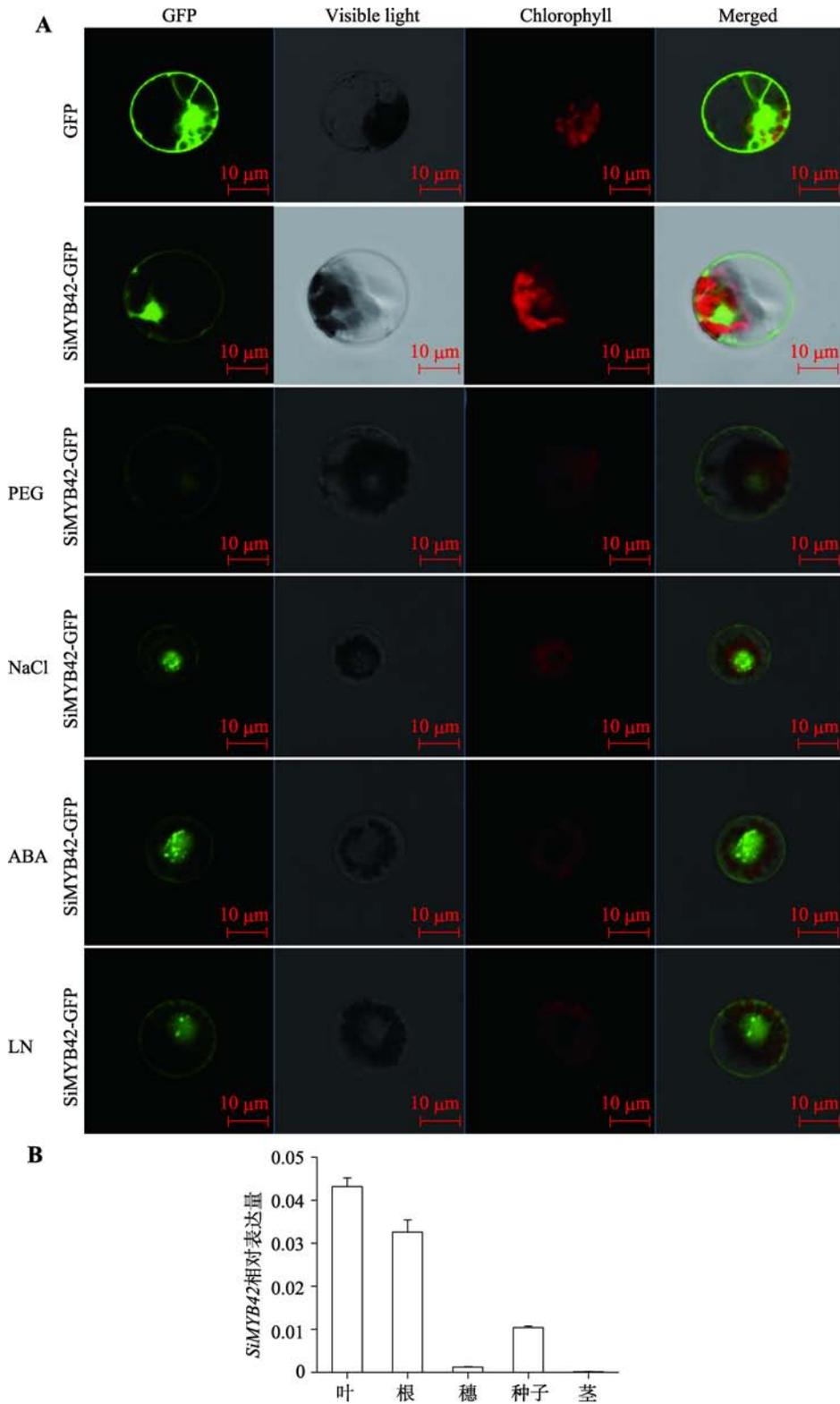


图 3 SiMYB42 蛋白亚细胞定位与组织特异性表达情况

Fig. 3 Subcellular localization and the tissue specific expression analysis of *SiMYB42*

A: SiMYB42 蛋白亚细胞定位; B: *SiMYB42* 在谷子不同组织中的表达情况。PEG: 干旱处理融合蛋白 SiMYB42-GFP; NaCl: 盐处理融合蛋白 SiMYB42-GFP; ABA: 脱落酸处理融合蛋白 SiMYB42-GFP; LN: 低氮处理融合蛋白 SiMYB42-GFP。

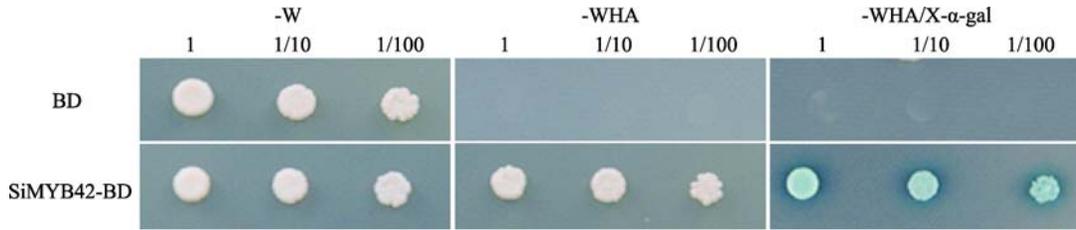


图 4 转录因子 *SiMYB42* 的转录激活活性

Fig. 4 Transcription activation activity of transcription factor *SiMYB42*

-W 代表缺陷型氨基酸 Trp ; -WHA 代表缺陷型氨基酸 Trp、His 和 Ade ; 1,1/10 和 1/100 代表稀释倍数

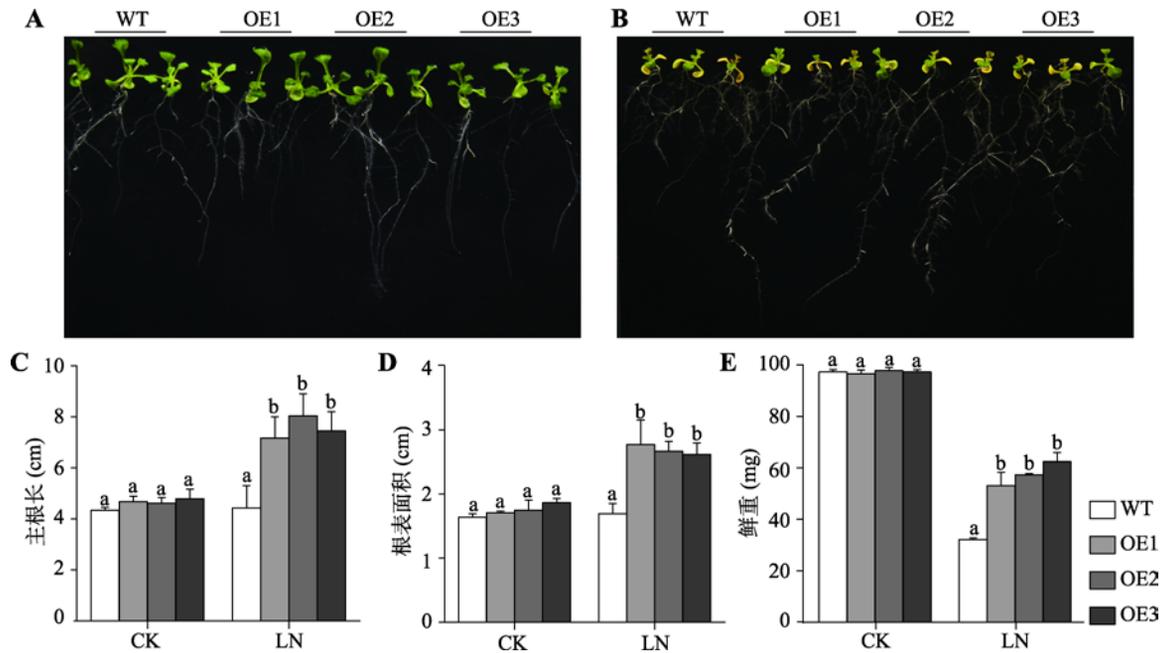


图 5 *SiMYB42* 转基因拟南芥在低氮胁迫下的抗性鉴定

Fig. 5 Resistance analysis of *SiMYB42* transgenic *Arabidopsis* under low-nitrogen stress treatment

A : 在对照 (3 mmol/L) 培养基上 *SiMYB42* 转基因植株与 WT 的生长情况 ; B : 在低氮 (0.2 mmol/L) 培养基上 *SiMYB42* 转基因植株与 WT 的生长情况 ; C : *SiMYB42* 转基因植株与 WT 的主根长统计结果 ; D : *SiMYB42* 转基因植株与 WT 的根表面积统计结果 ; E : *SiMYB42* 转基因植株与 WT 的鲜重统计结果。LN : 低氮处理。柱上小写字母 a 和 b 代表柱值在 0.05 水平上差异显著。OE1、OE2、OE3 分别代表着谷子基因 *SiMYB42* 转拟南芥的 3 个不同转基因株系。

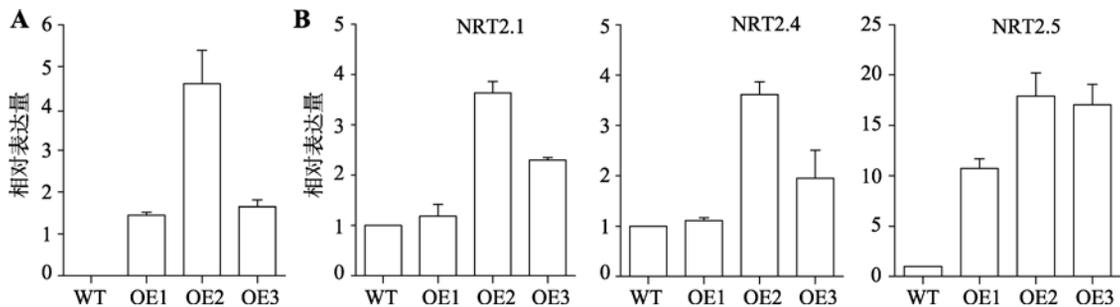


图 6 *SiMYB42* 转基因植株的表达水平及下游氮胁迫相关基因的表达分析

Fig. 6 Expression levels of *SiMYB42* and the nitrate transporters genes in *SiMYB42* transgenic plants

A : *SiMYB42* 在转基因株系中的表达 ; B : *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 在 *SiMYB42* 转基因拟南芥和 WT 中的相对表达量。OE1、OE2、OE3 分别代表着谷子基因 *SiMYB42* 转拟南芥的 3 个不同转基因株系。

因表达分析结果表明,在 *SiMYB42* 过表达植株中,部分硝酸盐转运体基因 *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 表达量都表现为不同程度的上调,其中 *NRT2.1* 与 *NRT2.4* 的表达量在 OE2 转基因株系中比 WT 上调了约 3.5 倍,在 OE3 转基因株系中 *NRT2.1* 与 *NRT2.4* 表达比 WT 上调 2 倍左右,但 OE1 转基因株系中 *NRT2.1* 和 *NRT2.4* 表达均不显著,应该是和自身的表达量低有关(图 6B)。但 *NRT2.5* 在 3 个转基因株系中的表达量均很高。根据 Lezhneva 等^[25]报道,*NRT2.5* 是一种高亲和力的 NO_3^- 转运蛋白,通过确保 *NRT2.1* 和 *NRT2.4* 共同有效摄取 NO_3^- ,在严重缺氮的植物中发挥重要作用,通过 NO_3^- 再活化过程参与 NO_3^- 的转运。此外,分析 *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 的启动子序列,发现它们均含有 MYB 结合元件,核心序列为 TAACGTG。因此转基因植株中 *NRT2.5* 的高表达水平这一结果与转基因拟南芥根长分析结果相符。

3 讨论

MYB 类转录因子在基因的表达调控中发挥着重要的作用。在拟南芥中,MYB 类转录因子参与高等植物氮缺乏胁迫的应答调控^[26]。此外,氮饥饿可以诱导高亲和力硝酸盐转运体和氮同化相关基因的表达^[27],而且也能够诱导激素生物合成和氮同化的过程^[28,29]。本研究克隆了一个属于 R2R3-MYB 亚家族的基因 *SiMYB42*,该基因在细胞核和细胞膜中均定位。组织特异性表达分析结果表明,该基因在谷子的叶和根中均表现为高表达。在低氮胁迫条件下,*SiMYB42* 基因在谷子中上调表达,并且 *SiMYB42* 转基因拟南芥植株的总根长、主根长和根表面积均显著高于 WT,侧根数显著增多(图 4)。因此,推测该基因参与了谷子低氮胁迫介导的侧根和主根的伸长生长过程,影响根吸收营养的表面积,从而促进植株对氮素的吸收利用。目前,报道的与氮代谢相关的 MYB 家族转录因子几乎都是 R2R3-MYB 亚族的基因^[30]。例如海棠花(*Malus spectabilis* (Ait.) Borkh) MYB 转录因子 *MsMYB10* 属于 R2R3-MYB,通过改变花青苷等类黄酮化合物的积累量来应答低氮胁迫,最大程度保护机体不受损害^[28];大豆(*Glycine max*

(Linn.) Merr.)R2R3-MYB 转录因子 *GmMYB101* 调节类黄酮生物合成来响应氮饥饿胁迫,表明 *GmMYB101* 在氮代谢调节中起重要作用^[31];火炬松(*Pinus taeda*)的两个 R2R3-MYB 类转录因子 *PtMYB1* 和 *PtMYB4* 能够在酵母、拟南芥和松树细胞中激活 *PsGS1b* 启动子的转录,*PsGS1b* 编码谷氨酰胺合成酶,促进氮循环的过程^[29]。本文克隆的 MYB 类转录因子也属于 R2R3-MYB 亚家族,在 MYB3 个亚家族中,主要是 R2R3-MYB 亚族成员参与调控氮代谢吸收相关的基因的表达调控。同时,从基因调控植物氮代谢作用机制看,*SiMYB42* 转录因子调控氮代谢过程的作用方式主要是通过硝酸盐转运体的调节。在 *SiMYB42* 转基因拟南芥植株中,硝酸盐转运蛋白基因 *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 的表达量相对于 WT 有着明显的提高,但是 *NRT2.5* 的在 3 个转基因拟南芥株系中的表达量均很显著,因此,推测在氮胁迫处理条件下 *NRT2.5* 起主要作用。同时,利用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测硝酸盐转运基因 *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 的启动子元件分析结果显示均具有一个 MYB 结合位点。由于植物对土壤中氮素胁迫的响应及运输主要发生在根部,因此,推测 *SiMYB42* 通过促进氮转运相关的硝酸盐转运蛋白基因的表达,提高植株对氮素的吸收,进而正向调控植物低氮胁迫抗性,这一作用机制与其他 MYB 类转录因子调控植物氮代谢的作用机制不同。虽然本研究初步阐明了谷子基因 *SiMYB42* 在低氮胁迫下调控途径,但是 *SiMYB42* 如何在低营养条件下调控根部发育的分子机制还需要进一步的研究。

SiMYB42 蛋白主要定位在细胞核与细胞膜上,可能是由于不同时期的 *SiMYB42* 蛋白的定位情况不同所造成的。我们推测定位于细胞膜上的 *SiMYB42* 蛋白在经过某些蛋白修饰后,会进入细胞核中行使功能,启动下游基因的表达。但是经过处理后的 *SiMYB42* 蛋白的定位未发生变化,因此 *SiMYB42* 蛋白的定位与胁迫处理的关系还需要进一步探讨。

研究表明,过表达 MYB 转录因子可提高转基因植株对多种非生物胁迫抗性。除了响应低氮胁迫,*SiMYB42* 虽然也受 ABA、高盐和干旱诱导表达,但是 *SiMYB42* 过表达植株并没有明显表现提高对 ABA、

高盐和干旱胁迫的抗性。这可能因为 *SiMYB42* 调控其他胁迫响应过程需要其他转录因子的参与。另外一个原因可能是低氮胁迫与其他胁迫的作用机制不同。低氮胁迫主要与植物的营养物质的吸收及代谢有关。干旱主要是脱水胁迫, 高盐包含离子毒害及脱水胁迫。本研究 *SiMYB42* 主要调节硝酸盐转运蛋白的表达, 这些下游基因的表达对脱水胁迫及离子毒害影响不大, 因此 *SiMYB42* 转基因植物未出现出抗旱及耐盐的特性。

参考文献(References):

- [1] Frink CR, Waggoner PE, Ausubel JH. Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1175–1180. [DOI]
- [2] Schachtman DP, Shin R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58(1): 47–69. [DOI]
- [3] Grotewold E, Drummond BJ, Bowen B, Peterson T. The MYB-homeologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, 1994, 76(3): 543–553. [DOI]
- [4] Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch J, Marks MD. A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell*, 1991, 67(3): 483–493. [DOI]
- [5] Razal RA, Ellis S, Singh S, Lewis NG, Towers GHN. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 31–35. [DOI]
- [6] Imamura S, Kanesaki Y, Ohnuma M, Inouye T, Sekine Y, Fujiwara T, Kuroiwa T, Tanaka K. R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(30): 12548–12553. [DOI]
- [7] Ma LG, Sun N, Liu XG, Jiao YL, Zhao HY, Deng XW. Organ-specific expression of *Arabidopsis* genome during development. *Plant Physiol*, 2005, 138(1): 80–91. [DOI]
- [8] Romero I, Fuertes A, Benito MJ, Malpica JM, Leyva A, Paz-Ares J. More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 14(3): 273–284. [DOI]
- [9] Daniel X, Lacomme C, Morel JB, Roby D. A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant J*, 1999, 20(1): 57–66. [DOI]
- [10] Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell*, 1995, 7(11): 1879–1891. [DOI]
- [11] KirikV, Kölle K, Wohlfarth T, Miséra S, Bäumlein H. Ectopic expression of a novel MYB gene modifies the architecture of the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant Mol Biol*, 1998, 13(6): 729–742. [DOI]
- [12] Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 63–78. [DOI]
- [13] Denekamp M, Smeekens SC. Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the *AtMYB102* transcription factor gene. *Plant Physiol*, 2003, 132(3): 1415–1423. [DOI]
- [14] Huo DY, Zheng WJ, Li PS, Xu ZS, Zhou YB, Chen M, Ma YZ, Min DH, Zhang XH. Identification, classification, and drought response of F-box gene family in *Foxtail millet*. *Acta Agron Sin*, 2014, 40(9): 1585–1594. 霍冬英, 郑炜君, 李盼松, 徐兆师, 周永斌, 陈明, 马有志, 闵东红, 张小红. 谷子 F-box 家族基因的鉴定、分类及干旱响应. *作物学报*, 2014, 40(9): 1585–1594. [DOI]
- [15] Min DH, Xue FY, Ma YN, Chen M, Xu ZS, Li LC, Diao XM, Jia GQ, Ma YZ. Characteristics of PP2C gene family in foxtail millet (*Setaria italica*). *Acta Agron Sin*, 2013, 39(9): 2135–2144. 闵东红, 薛飞洋, 马亚男, 陈明, 徐兆师, 李连城, 刁现民, 贾冠清, 马有志. 谷子 PP2C 基因家族的特性. *作物学报*, 2013, 39(9): 2135–2144. [DOI]
- [16] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(22): 4673–4680. [DOI]
- [17] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1244–1245. [DOI]
- [18] Felsenstein J. PHYLIP: phylogeny inference package Version 3.2. *Cladistics*, 1989, 5(2): 164–166. [DOI]
- [19] Chien CT, Bartel PL, Sternqanz R, Fields S. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(21): 9578–9582. [DOI]
- [20] Fields S, Sternqanz R. The two-hybrid system: an assay

- for protein-protein interactions. *Trends Genet*, 1994, 10(8): 286–292. [DOI]
- [21] Yoo SD, Cho YH, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2007, 2(7): 1565–1572. [DOI]
- [22] Bechtold N, Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. In: Martinez-Zapater JM, Salinas J, eds. *Arabidopsis Protocols*. Totowa: Humana Press, 1998, 82: 259–266. [DOI]
- [23] Peters C, Li MY, Narasimhan R, Roth M, Welti R, Wang XM. Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2010, 22(8): 2642–2659. [DOI]
- [24] Wimalasekera R, Pejchar P, Holk A, Martinec J, Scherer GF. Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 2010, 3(3): 610–625. [DOI]
- [25] Lezhneva L, Kiba T, Feria-Bourrellier AB, Lafouge F, Boutet-Mercey S, Zoufan P, Sakakibara H, Daniel-Vedele F, Krapp A. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J*, 2014, 80(2): 230–241. [DOI]
- [26] Little DY, Rao HY, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(38): 13693–13698. [DOI]
- [27] Crawford NM, Glass ADM. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(10): 389–395. [DOI]
- [28] Forde BG. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta-Biomemb*, 2000, 1465(1–2): 219–235. [DOI]
- [29] Meharg AA, Blatt MR. NO_3 -transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs-kinetic control by pH and membrane voltage. *J Memb Biol*, 1995, 145(1): 49–66. [DOI]
- [30] Gómez-Maldonado J, Avila C, De La Torre F, Cañas R, Cánovas FM, Campbell MM. Functional interactions between a glutamine synthetase promoter and MYB proteins. *Plant J*, 2004, 39(4): 513–526. [DOI]
- [31] Miyake K, Ito T, Senda M, Ishikawa R, Harada T, Niizeki M, Akada S. Isolation of a subfamily of genes for R2R3-MYB transcription factors showing up-regulated expression under nitrogen nutrient-limited conditions. *Plant Mol Biol*, 2003, 53(1–2): 237–245. [DOI]

(责任编辑: 储成才)