

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230026

毛竹 *PheMYB2R-4* 的克隆与功能分析

秦子璐, 何威, 王雨芳, 吴敏

(安徽农业大学林学与园林学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: [目的] 研究 MYB 转录因子家族在毛竹干旱胁迫反应中的重要作用, 为毛竹的抗逆改良和分子育种提供基因资源。[方法] 从毛竹的基因组数据库中获得 *PheMYB2R-4* 的基因序列, 利用亚细胞定位和转录活性实验分析基因的分子特性、通过实时荧光定量 PCR 技术、转基因拟南芥表型分析和逆境相关生理生化指标的测定来确定 *PheMYB2R-4* 基因的功能。[结果] 毛竹中 *PheMYB2R-4* 编码 1 个 305 个氨基酸的蛋白 *PheMYB2R-4*, 其 N 端区域有一个保守的 R2R3 区域, 属于 R2R3-MYB 亚家族。*PheMYB2R-4* 基因的表达受到干旱和盐的显著诱导。*PheMYB2R-4* 是一个核定位蛋白, 具转录自激活活性。*PheMYB2R-4* 的过表达提高了干旱胁迫下拟南芥的叶片相对含水量, 降低了相对电导率并减少了丙二醛的积累, 说明过表达 *PheMYB2R-4* 通过提高拟南芥的保水能力和减少氧化损伤来增强转基因拟南芥的耐旱性; 同时干旱胁迫下, *AtRD22*、*AtRD29A*、*AtDREB2A* 和 *AtLEA* 基因的表达量均上调。[结论] MYB 转录因子家族中 *PheMYB2R-4* 在干旱胁迫应答反应中具有正调控作用, 可以提高植物的耐旱性, 增强干旱响应基因的表达量。

关键词: 毛竹; *PheMYB2R-4* 转录因子; 非生物胁迫; 干旱应答

中图分类号: S722

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2023)05-0100-11

毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz.) 是一种具有重要经济和生态意义的非木材林产品。在毛竹生长过程中, 非生物胁迫条件严重制约了其产量和品质^[1]。近年来, 毛竹基因组测序工作的完成, 为从分子水平探讨毛竹抗逆调控方式提供了研究依据。目前在毛竹中, 已分离和鉴定出很多参与毛竹非生物胁迫反应相关的功能基因。Wu 等研究发现, 毛竹中的 LBD 类转录因子 *PheLBD29* 的表达量被 PEG、NaCl、ABA 和 MeJA 显著诱导。干旱胁迫条件下, 过表达 *PheLBD29* 的转基因植株通过降低相对电解质、丙二醛和过氧化物的积累来提高可溶性糖的含量, 以及改变 *LEA*、*DREB2A*、*RD22*、*ERD15*、*Di19* 和 *RAB18* 等胁迫相关基因的表达量来提高转基因植物的耐旱性^[2]。同样毛竹中的 C2H2 类转录因子 *PheDi19-8* 的表达量也被 PEG、NaCl 和 ABA 显著诱导,

成苗期干旱胁迫条件下, 转基因株系的存活率 (60.34%) 显著高于野生型对照植株 (36.7%); 且在转基因植株中, 生物量含量及可溶性糖含量的积累, *LEA*、*RD29A*、*DREB2A* 和 *RD22* 基因的表达量得到了提高^[3]。与过表达 *PheLBD29* 基因的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 不同的是, 过表达 *PheDi19-8* 基因的植株对 ABA 并不敏感。Gao 等研究发现在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中过表达 *Phehdz1* 基因也可以显著提高植株对干旱胁迫的耐受性^[4]。利用农杆菌转化法在拟南芥中过表达毛竹 WKRY 类转录因子 *WKRY83* 和 *WKRY86*, 分别增强了转基因植物对盐和干旱胁迫的耐受性^[5-6]。Liu 等研究发现在拟南芥和水稻中过表达毛竹 TCP 类转录因子 *PheTCP10*, 促进了转基因植物叶片细胞中气孔的关闭, 减少了水分的流失, 提高了对干旱胁迫的耐受性^[7]; Xu 等进一

收稿日期: 2023-01-16 修回日期: 2023-05-25

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 32201640); 安徽省高校自然科学基金 (No. KJ2021A0164); 安徽省博士后基金 (No. 2021B549)

作者简介: 吴敏, 讲师, 硕士生导师, 主要研究方向: 林木分子育种。E-mail: annongwumin@sina.com

步地发现, *PheTCP10* 通过调控 *BTB/TAZ* 基因 (*BT2*) 的表达, 进而提高转基因植物对高盐环境的适应性^[8]。在水稻中超表达 *ASR* 类转录因子 *PheASR2*, 促进了水稻植株气孔关闭, 降低了叶片失水速率, 增加了抗旱性^[9]。此外, 毛竹中的 *PheC3H74*、*PheCPK1*、*PhePLATZ1*、*PeSNAC-1*、*PheTCP9* 等基因也被证实在植物的非生物胁迫反应中发挥着重要作用^[10-14]。

从前期的研究结果, 我们可以看出转录因子在调节毛竹非生物胁迫反应中发挥着重要作用^[5-14]。*MYB* 转录因子家族是植物中最大的转录因子家族^[15]。*MYB* 转录因子在 N 端都有一段保守的 *MYB* 结构域, 是 DNA 的结合区 (DNA-binding domain)。MYB 转录因子的 C 端有一个转录激活区 (transcription activation domain), 通过折叠成双亲性的螺旋结构从而激活转录^[16-17]。根据 *MYB* 转录因子 N 端 R 结构 (R1、R2、R3) 的个数, 可以将 *MYB* 转录因子大致分为 R1/R2-*MYB*、R2R3-*MYB*、R1R2R3-*MYB* 三个亚类, 其中 R2R3-*MYB* 是植物中数目最多的一类^[18], 目前已在很多物种中鉴定出与植物逆境相关的 R2R3-*MYB* 转录因子。R2R3-*MYB* 转录因子主要通过两个方面来正向或者负向地调控植物对外界逆境环境的适应性。一是通过与顺式作用元件特异结合实现对逆境的调控。如枸桔 (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) 的 *PtsrMYB* 蛋白能够与 *ADC* 基因的启动子区域的 *MYBCORE* 元件相结合, 调控 *ADC* 基因表达改变转基因植物体内多胺的含量, 从而调控转基因植株的抗旱性^[19]。杜梨 (*Pyrus betulifolia* Bunge) Raf.) 中 *PbrMYB21* 蛋白能够 *POD*、*SOD* 和 *P5CS* 基因的启动子结合, 激活此类非生物胁迫反应基因的表达, 从而调控转基因杜梨的抗旱性^[20]。Cui 等利用 EMSA 实验证明, *AtMYB20* 能够与 *PP2Cs* 基因的启动子序列中的 *TAACTG* 元件结合, 进而调节植物的耐盐性^[21]。

二是 R2R3-*MYB* 转录因子通过参与到多种信号通路途径调控植物的耐旱性。大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) *GmMYB84* 通过调节转基因大豆中的活性氧物质 (ROS) 来调控主根的长度, 进而提高转基因大豆的耐旱性^[22]。拟南芥中过表达 *AtMYB15* 增强了转基因植物对 ABA 的敏感性, 且与 ABA 合成、信号、响应相关基因的表达模式也

得到了增强, 表明 *AtMYB15* 可能通过 ABA 依赖的途径调控了植物对干旱胁迫的响应^[23]。毛竹作为重要的非木木材林, 在毛竹的基因组中, 已鉴定出 114 个 R2R3-*MYB* 转录因子^[13]。到目前为止, 毛竹 R2R3-*MYB* 相关转录因子在非生物胁迫中作用的研究不多, 只报道了 *MYB2* 参与了非生物胁迫, 对毛竹低温胁迫和盐胁迫的响应起着重要的作用^[24]。然而, 目前对毛竹中其它 R2R3-*MYB* 相关转录因子在非生物胁迫中的作用却知之甚少。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用毛竹种子来自于中国浙江省天目山国家级自然保护区, 种植于温室培养, 光周期 (光/暗) 16 h/8 h, 温度 25 °C, 湿度 60%。

拟南芥种子由本实验室保存, 种植于光周期 (光/暗) 为 16 h/8 h, 温度为 (光/暗) 22 °C, 湿度为 60% 的温室中培养。

1.2 实验方法

1.2.1 材料处理 对三个月大小的毛竹种苗, 分别浇灌 20% PEG-6000 和 200 mmol·L⁻¹ 氯化钠溶液, 同时选取生长一致的种苗分别放置在不同温度的 (42 °C 和 4 °C) 培养箱中, 模拟高温和低温处理。分别在 0、1、12、24、48 和 72 h 时, 在相同部位, 剪取长势相似的叶片 10 片, 每次 3 个生物学重复, -80 °C 保存。

对转基因拟南芥进行扩繁至 T3 代, 将消毒后的 T3 代拟南芥 OE-6、OE-8、OE-9 和野生型株系种子在点铺在 MS 平板上进行萌发, 且 MS 平板中添加不同浓度的甘露醇。同时, 将消毒后的 T3 代拟南芥 OE-6、OE-8 和野生型株系种子在点铺在 MS 平板上进行萌发, 萌发 10 d 后选取大小一致的转基因株系和野生型幼苗移入营养土中生长。待幼苗生长 3 周时, 停止供水, 进行缺水干旱处理, 分析转基因植株的抗旱表型。

1.2.2 序列的获得及进化树的构建 毛竹 *PheMYB2R-4* (PH01000388G0380) 的氨基酸序列从 (<http://www.bamboogdb.org/>) 网站上获取, 从 phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 网站上, 下载拟南芥、玉米 (*Zea mays* L.)、水稻和小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的氨基酸序列, 并在 DNAMAN 中进行氨基酸序列比对。

1.2.3 RNA 的提取及 qRT-PCR 分析 利用 RNAiso Plus 试剂盒 (Takara 货号: 9108) 根据说明书提取 RNA, 利用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒 (Takara 货号: RR036A) 根据说明书反转录 RNA。荧光定量实验所用引物由 Primer Express 3.0 进行设计 (表 1), NCBI 网站验证特

异性后由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成, 每对引物扩增产物长度为 80 ~ 200 bp。使用 TransStart® Green qPCR Super Mix (货号: AQ101-01) 按照说明书实验, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算表达量。TIP41 基因作为毛竹内参基因, Atactin2 基因作为拟南芥内参基因。荧光定量引物见表 1。

表 1 荧光定量引物
Table 1 Primer for qRT-PCR

基因 Gene	引物名称 Primer Name	引物序列 (5'-3')Primer sequence(5'-3')
TIP41	TIP41F	AAAATCATTGTAGGCCATTGTCTG
	TIP41R	ACTAAATTAAGCCAGCGGGAGTG
PheMYB2R-4	PheMYB2R-4F	TTGGAAGCAGGTGGTCGATC
	PheMYB2R-4R	AACCTGCAGCACTCGTAGTC
Atactin2	Atactin2F	AAGCTGGGGTTTTATGAATGG
	Atactin2R	TTGTCCACACACAAGTGCATCAT
AtRD29A	AtRD29AF	TGAAAGGAGGAGGAGGAATGGTTGG
	AtRD29AR	ACAAAACACACATAAACATCCAAAGT
AtRD22	AtRD22F	CAAACCCCTTTCGTGATAACTATGCA
	AtRD22R	TTTCCCGCGAACCAAGTC
AtDREB2A	AtDREB2AF	GCGATTTTCATCTGGATCACATT
	AtDREB2AR	GCAGGTTCTCGCATCCTT
AtLEA	AtLEAF	GGCGGATTTGAGGGACGAAA
	AtLEAR	GTTATGGTGGCCTGGAAGCT

1.2.4 转录活性分析 设计 PheMYB2R-4 的转录活性引物序列, F:5'-GgaattcATGGAAGGGCTCCATGT-3') 和 R:5'-CGggatccTTACATCATCGTTACCTTCCC-3', 通过 PCR 扩增获得两端分别带有 EcoR I 和 BamH I 酶切位点的 PheMYB2R-4 基因片段。以 pGBKT7 为基础载体, 构建含有目的片段的重组载体, 分析 PheMYB2R-4 的转录激活活性。同时设置阴性对照: pGBKT7 空载体; 阳性对照: pGBKT7-53 + pGADT7-T。使用热击法将构建好的载体质粒转化到农杆菌 GV3101 菌株中。参照唯地生物公司的说明书 (货号: YC1002S), 进行酵母的转化。分别取菌液 100 μ L 涂布于单缺 (SD/Trp-) 和三缺 (SD/Trp-/His-/Ade-/X- α -gal) 固体培养基进行培养 (30 $^{\circ}$ C), 观察分析并拍照记录。

1.2.5 亚细胞定位分析 设计 PheMYB2R-4 的亚细胞定位引物序列, F: 5'-GCtctagaATGGAAGGGCTCCATGT-3'

和 R: 5'-CGggatccCATCATCGTTACCTTCCC-3', 通过 PCR 扩增获得两端分别带有 Xba I 和 BamH I 酶切位点的 PheMYB2R-4 基因片段。以 pCAMBIA-1305 为基础载体, 构建含有目的片段的重组载体, 分析 PheMYB2R-4 的亚细胞定位。同时设 pCAMBIA-1305 空载为对照组。分别吸取 50 μ L pCAMBIA-1305 重组质粒、pCAMBIA-1305 空载的农杆菌液于摇菌管中同时加入 5 mL YEP、5 μ L 50 mg·mL⁻¹ Kan 和 5 μ L 25 mg·mL⁻¹ Rif 于恒温摇床中 28 $^{\circ}$ C、220 r·min⁻¹ 培养 36 ~ 48 h。然后吸取 2 mL 到无菌的 10 mL 无菌管中, 常温, 5 000 rpm, 离心 5 min; 弃上清, 用纯水将菌斑重悬, 再次离心; 加入 2 mL 纯水, 用分光光度计测 OD₆₀₀ 值, 计算, 将到菌液浓度调到 0.8 ~ 1.0; 将菌液注射到生长健康 3 周的本式烟草叶片中, 做好标记。黑暗培养 36 ~ 48 h 左右, 用激光共聚焦显微镜观察细胞中的 GFP 信号。

1.2.6 转基因拟南芥的获得 设计 PheMYB2R-

4 的过表达载体引物序列, F:5'-GGcgtaccATGGGAAGGGCTCCATGT-3'和 R:5'-GCTctagaTTACATCATCGTTACCTTCCC-3', 通过 PCR 扩增获得两端分别带有 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点的 *PheMYB2R-4* 基因片段。以 pCAMBIA-1301 为基础载体, 构建过表达载体。将构建好的重组菌液培养至 OD_{600} 值达到 0.8 ~ 1.0 左右, 同时配置转化 Buffer 溶液。处理液使用前还需加入表面活性剂 (Solarbio:627N021)。用转化 Buffer 溶液悬浮离心的菌体, 制备侵染溶液, 然后将整个花序浸泡在侵染液中 5 min, 3 ~ 4 周后果荚成熟即可收取转基因 T0 代种子。

1.2.7 筛选转基因植株 将 T0 代种子进行消毒清洗发芽后, 均匀涂布在含有潮霉素的 MS 培养基平板上。进一步对筛选的阳性植株进行 PCR 分子检

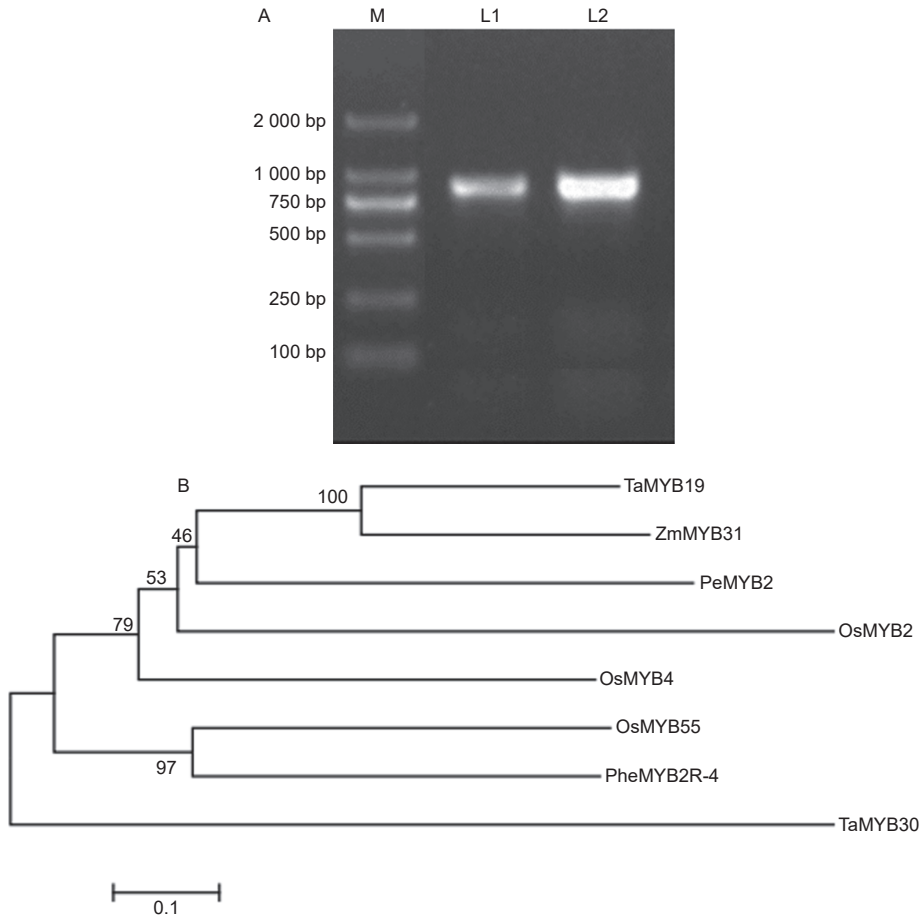
测, 提取阳性拟南芥植株基因组, 并作为 PCR 扩增模板, 用目的基因 *PheMYB2R-4* 序列引物扩增片段, 鉴定转基因拟南芥是否转化成功, 阴性对照为野生型拟南芥, 阳性对照为含有 *PheMYB2R-4* 的农杆菌质粒。

1.2.8 生理生化指标的测定 叶片相对含水量 (RWC) 和相对电导率 (REL) 的测定方法按照 Wu 等的文献中的报道^[3,5,9]。丙二醛 (MDA) 具体测定方法按照试剂盒 (Solarbio:BC0020) 说明书进行操作。

2 结果与分析

2.1 毛竹 *PheMYB2R-4* 转录因子的克隆及序列分析

以毛竹 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果获得一条约 918 bp 的特异性条带, 与预期目的基因



注: A: *PheMYB2R-4* 基因 PCR 扩增产物, 其中, M 为 DNA-maker DL2000; L1 和 L2 为 *PheMYB2R-4* 基因的 PCR 产物条带。B: *PheMYB2R-4* 与其他 MYB 蛋白的进化树分析。

Notes: A: Polymerase chain reaction (PCR) amplification products of *PheMYB2R-4*. B: Phylogenetic analysis of *PheMYB2R-4* and other MYB protein.

图 1 *PheMYB2R-4* 基因克隆及进化树分析

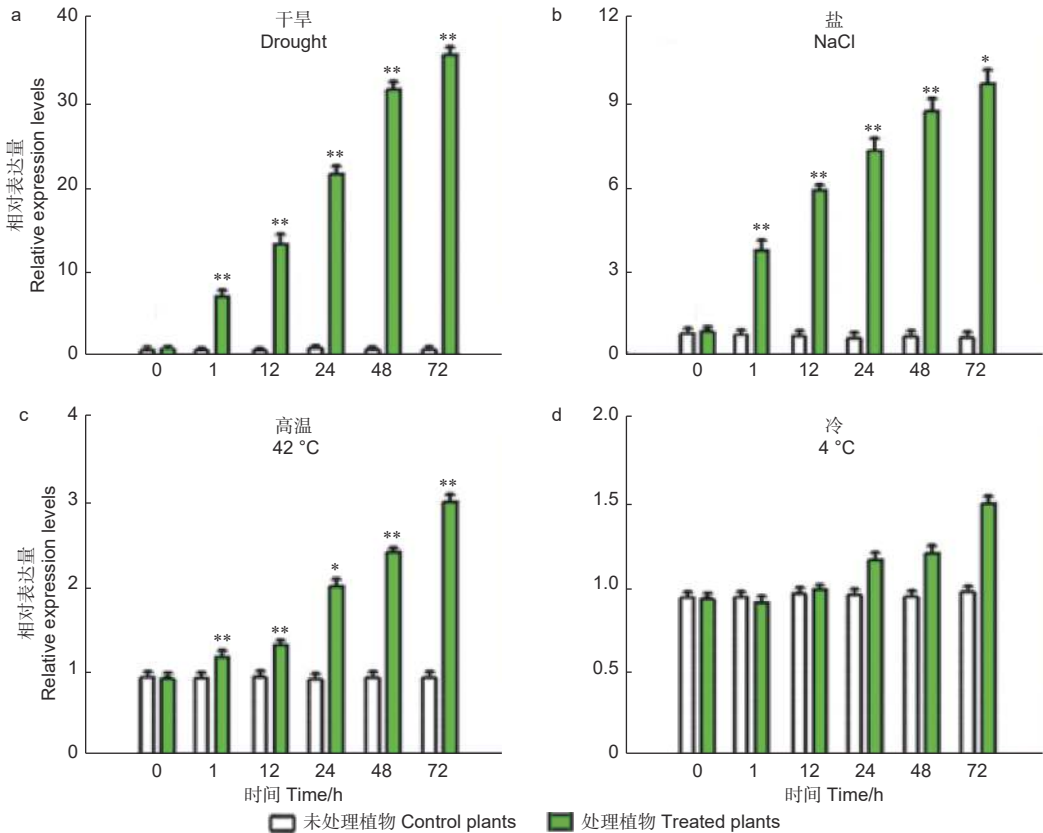
Fig. 1 *PheMYB2R-4* gene cloning and phylogenetic analysis

大小为基本一致 (图 1A)。测序结果表明, 目的片段大小 918 bp, 与毛竹基因组数据库 PH01000388 G0380 编码区一致, 该基因编码一个 305 aa 的蛋白, 分子量为 33.95 kD, 理论等电点 pI 为 8.4, 根据 Hou 等对毛竹中 R2R3-MYB 转录因子的鉴定和分析, 将该基因命名为 *PheMYB2R-4*^[13]。

2.2 *PheMYB2R-4* 的逆境处理表达分析

干旱和高盐处理后, 荧光定量结果显示 *PheMYB2R-4* 的转录水平在检测的时间点的都表

现出上调状态 (图 2)。值得注意的是, *PheMYB2R-4* 的表达在干旱处理 72 h 时是对照组 CK 的 36 倍 (图 2A)。在高盐处理 72 h 时是对照组 CK 的 11 倍 (图 2B)。然而在高温处理下, 处理 24 h 之后, *PheMYB2R-4* 的表达才开始上升, 72 h 时是对照组 CK 的 3 倍 (图 2C)。低温处理下, 与对照相比, *PheMYB2R-4* 的表达在 24 h 之后才有差异 (图 2D)。



注: A: *PheMYB2R-4* 在干旱 (20% PEG-6000) 胁迫下的基因表达。B: *PheMYB2R-4* 在盐 (200 mmol·L⁻¹ NaCl) 胁迫下的基因表达。C: *PheMYB2R-4* 在高温 (42 °C) 胁迫下的基因表达。D: *PheMYB2R-4* 在低温 (4 °C) 胁迫下的基因表达。A、B、C、D 中的数据是来自 3 个生物学重复的平均值。*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Notes: A: Relative expression of *PheMYB2R-4* in response to drought (20% PEG-6000) treatment. B: Relative expression of *PheMYB2R-4* in response to salt (200 mmol·L⁻¹ NaCl) treatment. C: Relative expression of *PheMYB2R-4* in response to high temperature (42 °C) treatment. D: Relative expression of *PheMYB2R-4* in response to low temperature (4 °C) treatment. Data of A, B, C and D are the means (\pm SD) from three biological replicates. * indicate significant differences at the 0.05 level, ** indicate extremely significant differences at the 0.01 level

图 2 *PheMYB2R-4* 在干旱、盐、高温及低温胁迫下的基因表达

Fig. 2 Relative expression of *PheMYB2R-4* in response to drought, salt, high temperature and low temperature treatments

2.3 *PheMYB2R-4* 的分子特征分析

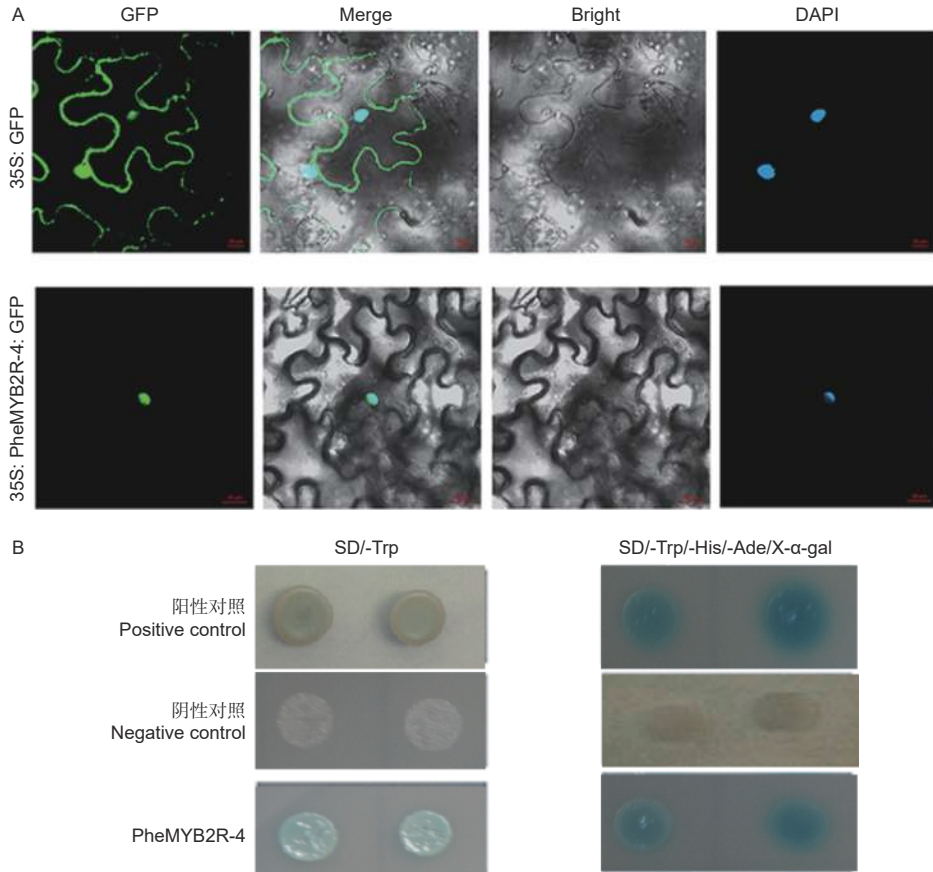
将构建成功的重组质粒 (p1305-35S-*PheMYB2R-4*-GFP) 分别导入农杆菌, 同时将空载体作为对照 (p1305-35S-GFP), 侵染烟草瞬时表

达, 观察定位。结果如 3A 所示: 空白对照的 GFP 信号充满整个细胞中, 而实验组 (p1305-35S-*PheMYB2R-4*-GFP) 只在核内检测到信号, 并且也与 DAPI 核定位信号相重合, 说明 *PheMYB2R-*

4 是核定位蛋白。

通过 PEG/LiAc 法将 *PheMYB2R-4* 基因与 pGBKT7 的重组质粒, 阴性对照组的空载 pGBKT7 和阳性对照组 pGBKT7-53 + pGADT7-T 转化至 Y2H Gold 酵母中, 在 SD/-Trp 单缺板, 缺陷培养基 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal 三缺平板上进行避光培养。结果如图 3B 所示: 实验

组和对照组的酵母在单缺板 SD/-Trp 都可以正常生长, 说明 *PheMYB2R-4* 基因对酵母无毒性, 可以在酵母系统中进行实验。然后再在含有 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SD/-Trp/-His/-Ade 固体培养基上进行避光培养 3 ~ 5 d, 发现实验组和阳性对照组酵母生长状况良好, 并且变蓝色, 说明 *PheMYB2R-4* 在酵母菌株中具有自激活活性 (图 3B)。



注: A: *PheMYB2R-4* 的亚细胞定位分析; B: *PheMYB2R-4* 的转录活性分析

Notes: A: Subcellular localization analysis of *PheMYB2R-4*; B: Transcription activity analysis of *PheMYB2R-4*.

图 3 *PheMYB2R-4* 的分子特征分析

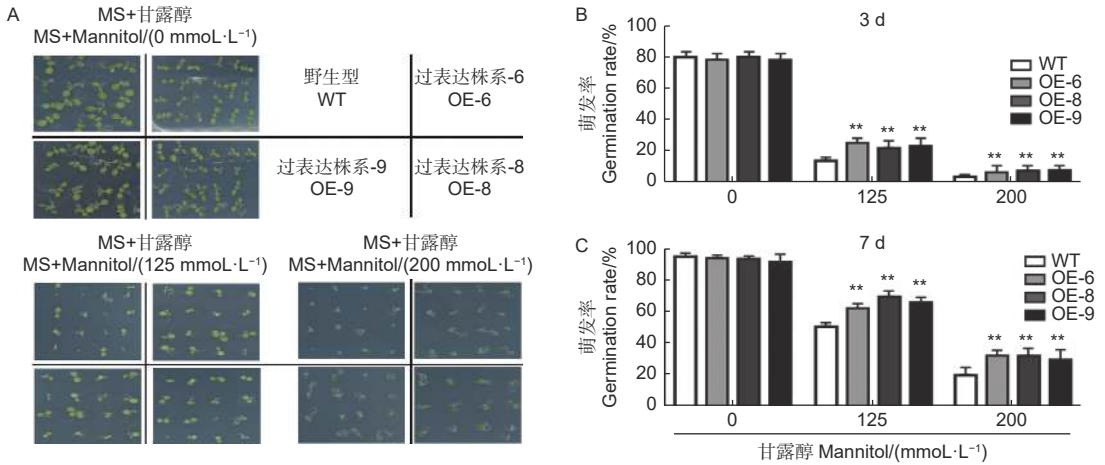
Fig. 3 Molecular characteristic analysis of *PheMYB2R-4*

2.4 过量表达 *PheMYB2R-4* 转基因拟南芥的表型分析

对获得的转基因拟南芥, 提取基因组, 进行 PCR 克隆验证, 并筛选出表达量较高的株系进行功能分析。对 T3 代转基因拟南芥和野生型植株种子在不同浓度的甘露醇 (0 、 125 、 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 溶液中进行萌发, 分别于 3 d 和 7 d 后统计萌发率。结果表明, 当平板中不含有甘露醇溶液时, 转基因植株和野生型拟南芥的萌发率无明显差异, 而在含有 $125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘露醇

平板中, 3 d 时, 转基因拟南芥的萌发率分别为 32% 和 8% 左右, 而野生型拟南芥的萌发率分别为 18% 和 4% 左右 (图 4B)。7 d 时, 转基因拟南芥的萌发率分别为 68% 和 40% 左右, 而野生型拟南芥的萌发率分别为 56% 和 22% 左右 (图 4C)。

选取生长时期和状态一致的株系移栽到营养土中生长 3 周左右, 对转基因和野生型拟南芥进行干旱缺水处理。结果如图 5A 所示, 在干旱处理前, 转基因植株和野生型拟南芥生长无明显差别, 在缺水处理 10 d 之后, 发现野生型拟南芥较转基因植

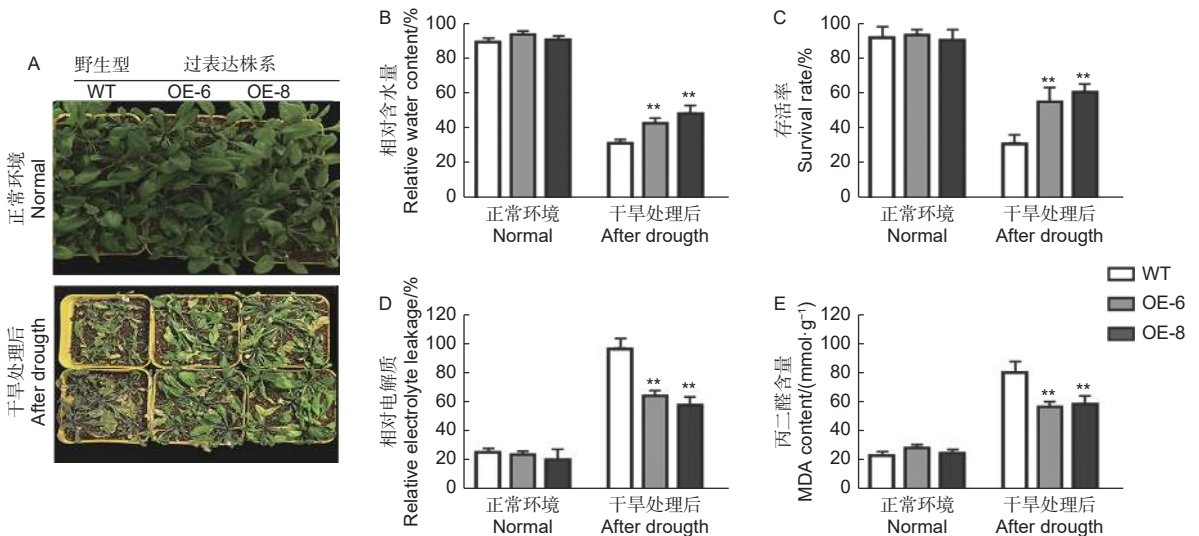


注: A: 在 0、125 和 200 mmol·L⁻¹ 甘露醇处理条件下野生型和转基因拟南芥的萌发表型; B 和 C: 不同浓度甘露醇处理条件下野生型和转基因拟南芥在不同时期的萌发率统计。B 和 C 中的数据是来自 3 个生物学重复的平均值。*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Notes: A: Germination phenotypes of wild type and transgenic *Arabidopsis* under 0, 125 and 200 mmol·L⁻¹ Mannitol treatment; B and C: Germination rate statistics of wild type and transgenic *Arabidopsis* at different stages under different Mannitol concentrations. Data of B and C are the means (\pm SD) from three biological replicates.* indicate significant differences at the 0.05 level, ** indicate extremely significant differences at the 0.01 level

图 4 野生型和转基因拟南芥在甘露醇下的萌发分析

Fig. 4 Germination Analysis of wild type and transgenic *Arabidopsis* under Mannitol treatment



注: A: 野生型和转基因拟南芥在干旱处理前后的表型分析; B-E: 野生型和转基因拟南芥在干旱处理前后的对相对含水量 (B)、存活率 (C)、相对电导率 (D) 及丙二醛含量 (E) 的测定。B、C、D、E 中的数据是来自 3 个生物学重复的平均值。*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Notes: A: Phenotypic analysis of wild type and transgenic *Arabidopsis* before and after drought treatment; B-F: Determination of relative water content (B), survival rate (C), relative electrolyte (D) and malondialdehyde content (E) of wild type and transgenic *Arabidopsis* before and after drought treatment. Data of B, C, D, E are the means (\pm SD) from three biological replicates.* indicate significant differences at the 0.05 level, ** indicate extremely significant differences at the 0.01 level

图 5 野生型和转基因拟南芥在干旱下的表型分析

Fig. 5 Phenotypic Analysis of wild type and transgenic *Arabidopsis* under drought treatment

株受到更加明显的干旱胁迫, 表现为叶片卷曲严重, 生长受阻, 叶片含水量 (RWC) 明显较低 (图 5A、B), 且野生型植株的绿叶存活率显著低于转基因株

系 (图 5C), 表明转基因植株耐旱性较强。

同时, 对于干旱处理前和处理后植株进行了抗逆相关生理生化指标的测定, 重点对相对电导率

(REL) 以及丙二醛 (MDA) 含量进行了分析, 如图 5D 和 5E 所示, 转基因和野生型植株两个所测定的生理生化指标在处理前没有显著差异。在干旱处理后, 转基因株系和野生型植株的相对电导率 (REL) 以及丙二醛 (MDA) 含量都得到增加, 野生型植株上升幅度显著高于转基因植株, 进一步说明了转基因植株的耐旱性优于野生型。

2.5 干旱相关基因的表达分析

通过对胁迫相关基因表达的检测发现, 正常处理下的 *RD22* (responsive to dehydration 22)、*RD29A* (desiccation-responsive protein 29A)、*DREB2A* (dehydration-responsive element binding protein 2) 和 *LEA* (dehydrin LEA) 在所有株系中的表达水平是相似的。相反, 在缺水处理 3 d 下, 转基因株系中的这些基因的表达水平被显著诱导, 表明了过表达 *PheMYB2R-4* 能够调节胁迫响应相关基因的表达, 进而提高植物的耐旱性 (图 6)。

3 讨论

MYB 转录因子家族, 其中 R2R3 亚类是目前

研究较为广泛的一类 MYB 转录因子家族。R2R3 亚类的 MYB 转录因子在植物的非生物胁迫反应中发挥着重要作用, 目前已在农作物、林木、蔬菜、花卉等物种中已鉴定出相关的功能基因^[3, 5, 8-9]。尽管 2018 年 Hou 等在毛竹的基因组数据中, 鉴定出 114 个 R2R3 亚类的 MYB 转录因子, 但是毛竹中关于 R2R3 亚类的 MYB 转录因子参与植物干旱胁迫反应的研究却鲜有报道。

本研究从毛竹中克隆 1 个 MYB 基因, 该基因全长为 918 bp (图 1), 编码 305 个氨基酸, 被命名为 *PheMYB2R-4*, 属于 MYB-R2R3 基因家族^[13]。进化树结果显示, *PheMYB2R-4* 与水稻中的 *OsMYB55* 亲缘关系较近 (图 1)。Casaretto 等研究发现, 将 *OsMYB55* 基因超表达达到玉米中, 与对照植株相比, 在干旱和高温条件下, 转基因植株的叶绿素含量明显较高, 说明过量表达 *OsMYB55* 基因提高了转基因植株对于干旱和高温的耐性^[25]。此外在本研究中, qRT-PCR 实验表明, *PheMYB2R-4* 的表达被 20% PEG6000 和 200 mmol·L⁻¹ NaCl 显著诱导 (图 2)。由此猜测 *PheMYB2R-4* 可能参

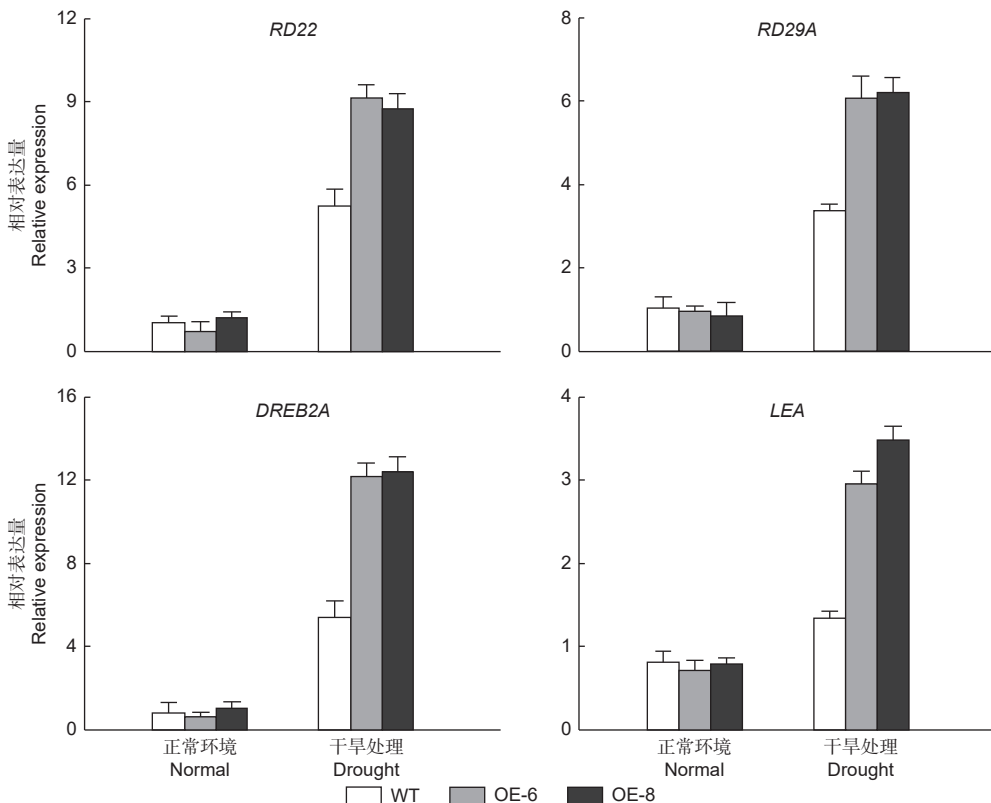


图 6 干旱相关基因在野生型和转基因拟南芥中干旱处理前后的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of drought-related genes in wild type and transgenic *Arabidopsis* before and after drought treatment.

与植物参与植物的非生物胁迫反应。为了验证这一猜测,本研究分别开展了三个方面的工作。

首先,将 *PheMYB2R-4* 基因异源表达达到拟南芥中进行功能研究。结果显示,过表达 *PheMYB2R-4* 转基因植物展现出了对干旱的耐受性(图3和图4)。另外, *PheMYB2R-4* 在拟南芥中过表达对拟南芥生长发育而未产生影响,此种情况在 *PheDi9-8*、*PheCDPK1*、*PheC3H74*、*PheWRKY86* 等的转基因拟南芥实验中亦有报道^[3,6,10-11]。

其次,干旱会损害植物的生理过程,进而会引起植株一系列的生理生化指标的改变^[21]。叶片失水率(RWC)是评价植物抗逆性的重要指标^[26]。研究结果表明,在干旱条件下,转基因 *PheMYB2R-4* 株系相比野生型植株具有更高的RWC(图5B)。此外,作为评估细胞膜损伤的重要指标相对电导率(REL)和反映膜脂过氧化程度的丙二醛(MDA)含量^[27-28]。在我们研究中,过表达 *PheMYB2R-4* 株系的REL和MDA含量明显低于野生型,这表明转基因株系受到更轻微的膜损伤(图5D和图5E)。这表明 *PheMYB2R-4* 通过减轻膜损伤和减少水分流失来提高植物的抗旱性。

最后,前期大量研究表明,过量表达抗逆相关的转录因子通常是通过改变下游相关胁迫基因的表达,来提高植物对外界环境的适应性^[29-31]。在本研究中, *RD22*、*RD29A*、*DREB2A* 和 *LEA*, 4个已被证明主要参与干旱胁迫的基因^[32-35], 干旱胁迫后在OE-6和OE-8中的表达量显著高于WT(图6)。由此推测,干旱胁迫下, *PheMYB2R-4* 极有可能是通过调控这些干旱胁迫信号通路中关键基因的表达,最终影响毛竹对干旱胁迫的耐受性,而 *PheMYB2R-4* 基因直接调控的靶基因,是后续研究的重点。

以上研究结果表明 *PheMYB2R-4* 在植物的干旱胁迫中发挥着重要的作用,研究结果将进一步创新和丰富MYB转录因子的研究理论,并为毛竹抗逆新种质的创建提供新的基因资源。

4 结论

本研究从毛竹的基因组中筛选出1个R2R3-MYB转录因子 *PheMYB2R-4*, 通过对 *PheMYB2R-4* 基因进行分子特性分析和功能验证,结果显示 *PheMYB2R-4* 基因定位在细胞核中,且在酵母中

具有转录活性。在逆境胁迫过程中对干旱胁迫具有正调控作用,在拟南芥中过表达 *PheMYB2R-4* 可以提高转基因拟南芥对干旱胁迫的耐受性。在干旱胁迫下, *PheMYB2R-4* 可以提高 *AtRD22*、*AtRD29A*、*AtDREB2A* 和 *AtLEA* 在转基因拟南芥中的表达量。

参考文献:

- [1] 杨振亚,周本智,周燕,等. PEG模拟干旱对毛竹种子萌发及生长生理特性的影响[J]. 林业科学研究, 2018, 31(6): 47-54.
- [2] WU M, HE W, WANG L N, et al. *PheLBD29*, an LBD transcription factor from Moso bamboo, causes leaf curvature and enhances tolerance to drought stress in transgenic *Arabidopsis*[J]. Journal of Plant Physiology, 2023, 280: 153865.
- [3] WU M, LIU H L, GAO Y M, et al. The moso bamboo drought-induced 19 protein *PheDi19-8* functions oppositely to its interacting partner, *PheCDPK22*, to modulate drought stress tolerance[J]. Plant Science, 2020, 299: 110605.
- [4] GAO Y M, LIU H L, ZHANG K M, et al. A moso bamboo transcription factor, *Phehdz1*, positively regulates the drought stress response of transgenic rice[J]. Plant cell reports, 2021, 40(1): 187-204.
- [5] WU M, LIU H L, HAN G M, et al. A moso bamboo *WRKY* gene *PeWRKY83* confers salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 11721.
- [6] WU M, ZHANG R, XU Z Y, et al. The moso bamboo *WRKY* transcription factor, *PheWRKY86*, regulates drought tolerance in transgenic plants[J]. Plant physiology and biochemistry, 2022, 170: 180-191.
- [7] LIU H L, GAO Y M, WU M, et al. *TCP10*, a *TCP* transcription factor in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), confers drought tolerance to transgenic plants[J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 172: 104002.
- [8] XU Y Z, LIU H L, GAO Y M, et al. The *TCP* transcription factor *PeTCP10* modulates salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(10): 1971-1987.
- [9] WU M, LIU R, GAO Y M, et al. *PheASR2*, a novel stress-responsive transcription factor from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), enhances drought tolerance in transgenic rice via increased sensitivity to abscisic acid[J]. Plant physiology and biochemistry, 2020, 154: 184-94.
- [10] CHEN F, LIU H L, WANG K, et al. Identification of CCCH zinc finger proteins family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), and *PeC3H74* confers drought tolerance to transgenic plants[J]. Front. Plant Sci., 2020, 11: 579255.
- [11] WU M, LIU H X, WANG L N, et al. Comparative genomic ana-

- lysis of the CPK gene family in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and the functions of *PheCPK1* in drought stress[J]. *Protoplasma*, 2023, 260(1): 171-187.
- [12] ZHANG K M, LAN Y G, WU M, *et al.* PhePLATZ1, a PLATZ transcription factor in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), improves drought resistance of transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 186: 121-134.
- [13] HOU D, ZHAO Y, HU Q T, *et al.* PeSNAC-1 a NAC transcription factor from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) confers tolerance to salinity and drought stress in transgenic rice[J]. *Tree Physiology*, 2020, 40(12): 1792-1806.
- [14] XU Y Z, WANG L N, LIU H X, *et al.* Identification of TCP family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and salt tolerance analysis of *PheTCP9* in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2022, 256(1): 5.
- [15] CAO, Z H, ZHANG S Z, WANG R K, *et al.* Genome wide analysis of the apple MYB transcription factor family allows the identification of *MdoMYB121* gene conferring abiotic stress tolerance in plants[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69955.
- [16] LIPSICK J S. One billion years of Myb[J]. *Oncogene*, 1996, 13(2): 223-235.
- [17] OGATA K, MORIKAWA S, NAKAMURA H, *et al.* Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DMA-binding domain from c-Myb[J]. *Nature Structural Biology*, 1995, 2(4): 309-320.
- [18] 唐 宁, 陈信波. 植物MYB转录因子与非生物胁迫响应研究[J]. *生物学杂志*, 2014, 31 (3): 74-78.
- [19] SUN P P, ZHU X F, HUANG X F, *et al.* Overexpression of a stress-responsive MYB transcription factor of *Poncirus trifoliata* confers enhanced dehydration tolerance and increases polyamine biosynthesis[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 78: 71-79.
- [20] LI K Q, XING C H, YAO Z Z, *et al.* PbrMYB21, a novel MYB Protein of *Pyrus betulaefolia*, functions in drought tolerance and modulates polyamine levels by regulating arginine decarboxylase gene[J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(9): 1186-1203.
- [21] CUI M H, YOO K S, HYOUNG S, *et al.* An *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factor, AtMYB20, negatively regulates type 2C serine/threonine protein phosphatases to enhance salt tolerance[J]. *FEBS Letters*, 2013, 587(12): 1773-1778.
- [22] WANG N, ZHANG W, QIN M, *et al.* Drought tolerance conferred in soybean (*Glycine max. L*) by GmMYB84, a novel R2R3-MYB transcription factor[J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(10): 1764-1776.
- [23] DING Z H, LI S M, AN X L, *et al.* Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genet Genomics*, 2009, 36(1): 17-29.
- [24] 肖冬长, 张智俊, 徐英武, 等. 毛竹 MYB 转录因子 PeMYB2 的克隆与功能分析[J]. *遗传*, 2013, 35 (10): 1217-1225.
- [25] EL-KEREAMY A, BI Y M, RANATHUNGE K, *et al.* The rice R2R3-MYB transcription factor OsMYB55 is involved in the tolerance to high temperature and modulates amino acid metabolism[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52030.
- [26] AHAMMED G J, LI X, WAN H, *et al.* *SIWRKY81* reduces drought tolerance by attenuating proline biosynthesis in tomato[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 270.
- [27] QUAN W, HU Y, MU Z, *et al.* Overexpression of *AtPYL5* under the control of guard cell specific promoter improves drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 129: 150-157.
- [28] CUI J, JIANG N, ZHOU X, *et al.* Tomato MYB49 enhances resistance to *Phytophthora infestans* and tolerance to water deficit and salt stress[J]. *Planta*, 2018, 248(6): 1487-1503.
- [29] KRISHNA R, KARKUTE S G, ANSARI W A, *et al.* Transgenic tomatoes for abiotic stress tolerance: status and way ahead[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(4): 143.
- [30] PENG Y, ZHANG J, CAO G, *et al.* Overexpression of a *PLDα1* gene from *Setaria italica* enhances the sensitivity of *Arabidopsis* to abscisic acid and improves its drought tolerance[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(7): 793-802.
- [31] XU G Y, ROCHA P S, WANG M L, *et al.* A novel rice calmodulin-like gene, *OsMSR2*, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2011, 234(1): 47-59.
- [32] THAMMEGOWDA V, HARSHAVARDHAN V S, SEILER C, *et al.* AtRD22 and AtUSPL1, members of the plant-specific BURP domain family involved in *Arabidopsis thaliana* drought tolerance[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e110065.
- [33] HUA Z M, YANG X, FROMM M E. Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active *Arabidopsis* MAPKK or MAPK proteins[J]. *Plant Cell and Environment*, 2006, 29(9): 1761-1770.
- [34] SAKUMA Y, MARUYAMA K, OSAKABE Y, *et al.* Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1292-1309.
- [35] CANDAT A, PASZKIEWICZ G, NEVEU M, *et al.* The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in *Arabidopsis* offers tailored protection against abiotic stress[J]. *Plant Cell*, 2014, 26(7): 3148-3166.

Cloning and Functional Analysis of *PheMYB2R-4* in *Phyllostachys edulis*

QIN Zi-lu, HE Wei, WANG Yu-fang, WU Min

(School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei, 230036)

Abstract: [Objective] The role of MYB transcription factor family in the drought stress response of *Phyllostachys edulis* was analyzed to provide candidate genes for stress resistance improvement and molecular breeding of moso bamboo. [Method] In this study, the gene sequence of *PheMYB2R-4* was obtained from the genome database of *Phyllostachys edulis*, and the molecular characteristics of *PheMYB2R-4* was analyzed by subcellular localization and transcriptional activity experiments. The function of *PheMYB2R-4* was confirmed by qRT-PCR, phenotype analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana* and determination of stress-related physiological and biochemical indicators. [Result] *PheMYB2R-4* encoded a protein with 305 amino acids, which had a conservative R2R3 domain in its N-terminal region and belonged to the R2R3-MYB subfamily. The expression of *PheMYB2R-4* gene was significantly induced by drought and salt. *PheMYB2R-4* was a nuclear localization protein and had transcriptional self-activation activity. The overexpression of *PheMYB2R-4* increased the relative water content of *Arabidopsis thaliana* leaves under drought stress and decreased the relative conductivity and the accumulation of malondialdehyde, indicating that the overexpression of *PheMYB2R-4* enhanced the drought tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* by improving its water retention capacity and reducing oxidative damage. At the same time, under drought stress, *AtRD22*, *AtRD29A*, *AtDREB2A* and *AtLEA* were all up-regulated. [Conclusion] *PheMYB2R-4* has a positive regulatory role in the response to drought stress, which can improve the drought tolerance of plants and enhance the expression of drought response genes.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; *PheMYB2R-4* transcription factor; abiotic stress; drought response

(责任编辑: 张 研)