植物遗传资源学报
Journal of Plant Genetic Resources DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20220816002

高粱缺氮特异诱导基因 *SbMYB-like* 克隆及功能分析

朱振兴，李　丹，陆晓春

（辽宁省作物分子改良重点实验室，辽宁省农业科学院高粱研究所，沈阳 110161）

摘要：氮元素是保障作物稳产、高产的三大重要养分元素之一。高粱是全球重要的五大粮食作物之一，具有耐瘠薄、耐旱等特性。尽管在拟南芥和水稻中氮信号途径相关基因的研究相对深入，但在高粱中基本不清楚，挖掘缺氮诱导基因，有助于解析高粱氮素吸收、利用相关分子通路。本研究从高粱 BTX623 苗期缺氮、缺磷及缺钾表达谱中筛选出一个地上部分特异受缺氮诱导的 MYB_related 转录因子家族成员 *SbMYB-like* 基因 *Sb03g030330*，该基因编码蛋白预测定位于细胞核。高粱中组织表达 qRT-PCR 分析表明 *SbMYB-like* 基因在根、茎、花中表达较低，主要在叶片中表达。进化树分析表明该基因与玉米、二穗短柄草中同源基因亲缘关系相对较近。通过 qRT-PCR 在高粱和二穗短柄草中验证了该基因及其在二穗短柄草中同源基因地上部分受缺氮诱导的特性。在高粱 BTX623 品种中分离并克隆了 *SbMYB-like* 基因，构建超表达载体，转化拟南芥获得了超表达株系。通过缺氮和缺磷处理，测定野生型和过表达纯系植株主根长度和开花时间，结果表明该基因在促进根系伸长和开花方面有重要的作用，但此促进作用并不依赖于外源氮素水平。该基因的研究，为高粱缺氮响应分子途径解析，提供了基础数据。

关键词：MYB_related; 转录因子；缺氮；开花；根伸长；高粱

Cloning and Functional Analysis of Nitrogen Deficiency Induced Gene *SbMYB-like* in Sorghum

ZHU Zhen-xing, LI Dan, LU Xiao-chun

(Liaoning province key laboratory of crop molecular improvement, Sorghum institute of Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161)

Abstract: Nitrogen is one of the three essential nutrients which ensures stable and high crop yield. Sorghum is the fifth most important cereal crops in the world and shows strong tolerance to low-fertility soil and drought. Although the nitrogen signaling pathways in Arabidopsis and rice are well investigated, its mechanism in sorghum remains largely unknown. Deciphering the nitrogen deficiency inducible genes will help to analyze the molecular pathways involved in sorghum nitrogen absorption and utilization. A member of MYB_related transcription factor family, *SbMYB-like* (*Sb03g030330*) was identified based on the global gene expression profiles of sorghum seedlings under nitrogen, phosphorus, and potassium deficiency conditions. *SbMYB-like* was found being inducible by nitrogen deficiency in shoots, and its deduced protein SbMYB-like was predicted to be localized in the nucleus. qRT-PCR analysis showed that the transcripts of *SbMYB-like* were lower in roots, stems and flowers, whereas abundant in leaves. Phylogenetic tree analysis indicated that SbMYB-like was closely grouped with its homologs in maize and Brachypodium, and both homologs were inducible under nitrogen deficiency condition by qRT-PCR. The *SbMYB-like* coding sequence from sorghum BTX623 variety was isolated and transformed into Arabidopsis driven by a constitutive promoter. The growth parameters of *SbMYB-like* over-expressing plants under nitrogen and phosphorus deficiency conditions were measured. The results showed *SbMYB-like* was involved in root elongation and flowering independent of the environmental nitrogen levels. Collectively, this study provided basic

收稿日期：2022-08-16　　**修回日期：**2022-09-01　　**网络出版日期：**
URL：
第一作者研究方向为作物分子育种，E-mail : swauzzx@126.com
通信作者：朱振兴，研究方向为作物分子育种，E-mail : swauzzx@126.com
基金项目：辽宁省优秀青年自然基金（2021-YQ-04）；中国博士后面上基金（2021M693848）；国家谷子高粱产业体系岗位专家（CARS-06-14.5-A3）。
Foundation projects：Excellent Youth Natural Science Foundation of Liaoning province of China (2021-YQ-04)， China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2021M693848)，National Millet and Sorghum Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-06-14.5-A3).

data for analysis molecular mechanism of sorghum response to nitrogen deficiency.

Keywords: MYB_related; transcription factor; nitrogen deficiency; flowering; root elongation; sorghum

氮是构成生物体的必需元素之一，植物通过根系吸收和同化无机氮源，将无机氮转化成氨基酸，继而合成各种蛋白质，参与植物的生长和发育。。氮肥是大多数非豆科作物主要的投入之一，约占世界肥料消耗量的 60%[1]。中国粮食产量尽管已经连续数年增产，然而在氮肥消耗上已经约占世界氮肥消费量的 30%[2]。不合理的氮肥使用，特别是过量施用，既不经济也不环保。一般作物当季氮肥利用率约 40%[3]，大部分未被作物利用的肥料进入自然环境中，造成很多环境问题。诸如水体富营养化、进入大气加剧温室效应、臭氧层破坏、加剧雾霾等。

通常土壤中的氮素分布不均匀，植物在应对这种易变的养分环境，已经进化出一系列的氮缺乏响应措施[4]。如水稻在缺氮的条件下，抑制地上部分的生长，促使根系伸长，增强根系吸收土壤中养分能力[5]。通常情况下，在水稻、拟南芥中以及其它一些植物中缺氮可以促进植物开花，而过量的氮肥会造成植物的贪青晚熟[6-7]。培育氮养分高效利用作物是减少氮肥使用的重要途径，挖掘氮素缺乏响应相关基因，对解析氮素养分高效分子机理，培育节氮作物有重要作用。

MYB 转录因子是植物中非常庞大的一个转录因子家族，作用广泛，参与抗旱、次生代谢等调控过程[8-9]。这个家族成员都包含 MYB 结构域，通常这些结构域会有 1～4 个不等的重复，根据 MYB 重复数量不同分为一个重复 1R-MYB、二个重复 2R(R2R3)-MYBs、三个重复 3R(R1R2R3)-MYBs 以及四个重复 4R-MYBs[10]。其中一个重复 1R-MYB 也称为 MYB_related 转录因子，如 *AtmybL2* 基因最初是从拟南芥 cDNA 文库中分离出来的，这个 *MYB-like* 基因主要在叶片中表达，编码的氨基酸包含一个保守 MYB 的 N 端 DNA 结合域和一个独特的富含脯氨酸 C 端[11]。*MYB-related* 转录因子在植物中分布广泛，拟南芥中有 97 个成员、水稻中有 106 个，而高粱中有 129 个[12]。*MYB-related* 转录因子成员参与了开花、果实发育、低氮磷响应、节律调控、以及一些次生代谢物苯丙烷类衍生物的代谢调控[13-14]。在开花调控上，小麦中 *MYB-related* 家族成员 *TaMYB72*，在水稻中超表达促进了水稻开花 [15]；*FE* 是一个韧皮部特异表达的 *MYB_related* 基因，也发现参与开花时间的调控[16]。植物低磷响应分子调控网络的核心基因是一个 *MYB-related* 转录因子，*PHR1* 基因[17]。受低氮诱导的 *MYB-related* 转录因子 *AtNsr1*，其 T-DNA 插入突变体中硝态氮转运体 *AtNRT2.5* 的表达也被改变了[14]。*AtMYBD* 是一个花青素生物合成的正调控因子，同时发现其调控依赖于生物钟节律[13]。

高粱是全球五大谷物类作物之一，具有耐瘠薄、耐旱等特性，一般种植在一些半干旱、瘠薄的边际土地上[18]。高粱基因组较小，是 C4 植物研究的模式植物，因此挖掘高粱低氮诱导基因，有助于解析高粱缺氮诱导的分子机制。本文鉴定和克隆了高粱低氮特异诱导转录因子 *SbMYB-like* 基因，通过在拟南芥超表达转化，初步分析了该基因的功能，表明该基因在促进根系生长和开花方面发挥重要作用。该研究为深入挖掘高粱氮素高效基因、培育养分高效作物提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料及生长条件

高粱参考基因组测序品种 BTX623 种子，拟南芥 Columbia（Col-0）野生型种子，以及二穗短柄草参考

基因组测序品种 Bd21 种子。

高粱种植步骤如下，挑选大小一致、饱满、无霉点、色泽好的高粱种子于 5%次氯酸钠溶液中，摇床上震荡消毒 10 分钟，然后用自来水冲洗数遍后，转入培养皿内并加入少量水（刚好没过），放置于 37℃培养箱内，过夜，待种子露白后，播于漂浮在营养液中的纱网板上，营养液改良自木村氏培养液配方（表 1），用 NaOH 调 pH 至 5.8。

表 1　高粱营养液配方

Table 1　Component of sorghum nutrition solution

元素 Element	母液浓度（M） Concentration of stock solution	终浓度（mM） Final use concentration	母液分组 Group of stock solution
$MgSO_4.7H_2O$	0.547	0.5470	I
$(NH4)_2SO_4$	0.365	0.3650	
KH_2PO_4	0.182	0.1820	II
KNO_3	0.183	0.1830	III
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0.366	0.3660	
$MnCl_2.4H_2O$	0.005	0.0005	IV
H_3BO_3	0.03	0.0030	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.001	0.0001	
$ZnSO_4.7H_2O$	0.004	0.0004	
$CuSO_4.5H_2O$	0.002	0.0002	
NaFe-EDTA.$3H_2O$	0.100	0.0400	V
MES	0.500	2.0000	VI

拟南芥 Col 野生型种子置于 2.0 mL 灭菌的离心管中，5%次氯酸钠溶液中消毒 10 分钟，然后用灭菌的蒸馏水清洗 5～6 遍，吸干水分后放置在超净台上晾干，然后播种于 1/2MS 培养基中。先 4℃冰箱放置 48 小时，然后放置于 25℃恒温光照培养箱（日本松下/三洋 MLR-352H-PC 植物培养箱）培养。表型生长实验置于室内恒温 23℃，16 小时光照/8 小时黑暗的温室中。

二穗短柄草种子消毒同上，然后放置灭菌水中置于先 4℃冰箱放置 48～36 小时，然后放置 25℃培养箱催芽，然后种植于底部开孔的 96 孔 PCR 板中，正常种植一周（营养液见表 1），缺氮处理种植一周（放置于 25℃恒温光照培养箱）。缺氮处理时，$(NH4)_2SO_4$、 KNO_3、$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 替换成相应浓度的 K_2SO_4 和 $CaCl_2$。文章所涉及的表型图片使用智能手机（小米 note3）进行，拟南芥根长采用 Image J 软件（https://imagej.nih.gov/ij/）测量。

1.2　RNA 提取、第一链 cDNA 合成及 PCR 扩增

取完样品后，快速浸入液氮后，于-80℃超低温冰箱存放。待用时将样品取出，放入植物样品研磨仪液氮充分预冷的 25 mL 钢罐中研磨（Tissuelyser-64，上海净信实业发展有限公司），然后用 Trizol 试剂（上海英俊生物有限公司）提取总 RNA。微分光光度计 Nanodrop2000c（赛默飞世尔科技（中国）有限公司）测定浓度和质量，要求 280nm/260nm, 260nm/230nm 在 1.8～2.0 之间，同时进行 1.2%琼脂糖电泳检测 RNA 条带，要求条带清晰、无拖尾，28S 条带亮度大概是 18S 条带 2 倍最优。采用基因组 DNA 去除试剂盒 TURBO DNA-free™ 试剂盒（赛默飞世尔科技（中国）有限公司）按照说明进行总 RNA 的基因组污染去除。然后取 2.5μg 总 RNA，利用 SweScript RT I First Strand cDNA Synthesis Kit (With gDNA Remover) （武汉赛维尔生物科技有限公司）先进行基因组污染处理，然后按照说明进行逆转录得到 cDNA，置于-80℃待用。由于

该基因预测无内含子，所以总 RNA 进行了严格的基因组污染去除。

1.3 基因克隆、载体构建以及表达实时荧光定量 PCR 分析

引物利用 Oligo7.0 软件设计，然后由公司（南京金斯瑞生物科技有限公司）合成 ePAGE 级别引物（本研究所用引物详见表 2）。高保真 Taq 酶（PrimeSTAR® HS DNA Polymerase，宝日医生物技术（北京）有限公司）进行 PCR 扩增得到目标条带后，凝胶回收（北京天根生物科技有限公司），然后利用 pEASY®-Blunt Zero Cloning Kit（北京全式金生物技术股份有限公司）进行 T 载体连接，挑取单克隆，菌液 PCR 确定阳性后，挑选 3～6 个单克隆测序（江苏金唯智生物科技有限公司），获取该基因转录本。利用 KpnI/BamHI 快切酶（赛默飞世尔科技（中国）有限公司）双酶切构建到 35S1300gai 载体上（以 pCambia1300 为基础改的载体）。基因表达实时定量分析，采用 SYBR 方法进行。使用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂（宝日医生物技术（北京）有限公司），在荧光定量 PCR 仪上（罗氏 LightCycler480II），10μl 体系，三个生物学重复以及三个技术重复进行实验；PCR 扩增程序如下，95℃ ，1min；94℃，10 s；58℃ ，10 s； 72℃， 12 s，一般设定 45 个循环，相对表达水平采用 2Δ(-ΔCp)法计算。在计算高粱在拟南芥中超表达植株的表达量中时，因 *SbMYB-like* 属于外源基因，对照 Cp 值统一取 32 进行计算。

表 2 本研究所用所有引物

Table 2 All Primers used in the study

引物名 Name of primers	序列(5’-3’) Sequence(5’-3’)	用途 Use
SbMYB.F	ATGTCTGGGTCCAGGAACTCTT	基因克隆引物
SbMYB.R	TTAGTTCCAAGCTCCCTGTGTG	
Bradi2g45770-qRT.F	TTTGCACTGAATGTAACCTCC	定量 PCR 引物
Bradi2g45770-qRT.R	TCCGATCCTAAATTGTTGTCGAA	
Bradi2g45780-qRT.F	AAGCATACCGATATATTGTGA	定量 PCR 引物
Bradi2g45780-qRT.R	AAGGCGGATTTAATTTAGCAA	
BdUBC18 qRT-PCR.F	GTCACCCGCAATGACTGTAAGTTC	二穗短柄草中看家基因定量 PCR 引物
BdUBC18 qRT-PCR.R	TTGTCTTGCGGACGTTGCTTTG	
UBC.qPCR.F	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	拟南芥中看家基因定量 PCR 引物
UBC.qPCR.R	TTGTGCCATTGAATTGAACCC	
SbActin.F	ATGGCTGACGCCGAGGATATCCA	高粱中看家基因定量 PCR 引物
SbActin.R	GAGCCACACGGAGCTCGTTGTAG	
Sb03g030330KpnI.F	AAGGTACCATGTCTGGGTCCAGGAACTCTTC	基因载体构建引物
Sb03g030330BamHI.R	AAGGATCCTTAGTTCCAAGCTCCCTGTGTGT	
Sb03g030330 94qRT.F	CGCCGCCATTATGAGATCCT	定量 PCR 引物
Sb03g030330 94qRT.R	AGTTCCAAGCTCCCTGTGTG	

1.4 保守结构域预测、亚细胞定位预测、序列联配和进化树分析

保守结构域采用在线程序 CDD 预测（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）。基因亚细胞定位使用 Euk-mPLoc 2.0（http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2）。该基因不同物种中同源基因搜索网址如下，拟南芥（https://www.arabidopsis.org/）、水稻(https://rice.plantbiology.msu.edu/）、玉米（https://www.maizegdb.org/）、高粱、谷子以及二穗短柄草中（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/pz/portal.html）相应的网站进行蛋白同源基因 BLASTP 搜索。所有的入选基因编码氨基酸序列用 ClustalX1.83 软件进行序

列联配，通过 MEGA7.0 软件采用邻结法（NJ）进行进化树构建，设置 bootstrap 为 1000 次。

2　结果与分析

2.1　基因克隆及序列生物信息学分析

以 BTX623 品种在苗期缺氮条件下，地上部分总 RNA 合成的第一链 cDNA 为模板，按照网上预测的转录本参考序列（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/pz/portal.html）设计引物进行 PCR 扩增（表 2），获得目标条带后，测序确认了 *SbMYB-like* 基因序列。该基因编码了 87 个氨基酸的蛋白质，与基因组相比，表明该基因没有内含子仅有一个外显子。通过 NCBI 保守结构域搜索分析，显示出该基因编码了一个 SANT/Myb-like DNA-binding domain 蛋白，该结构域在第 16 位氨基酸到第 60 位氨基酸之间。另外利用亚细胞定位预测软件 Euk-mPLoc 2.0，预测该基因编码蛋白定位于细胞核。

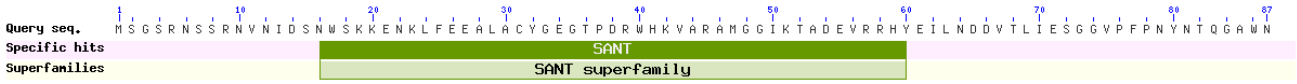
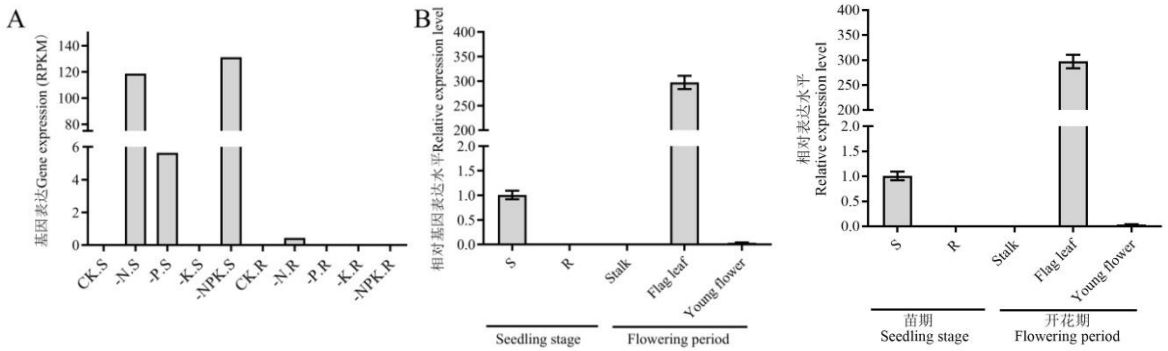


图 1　*SbMYB-like* 基因编码蛋白保守结构域分析

Fig. 1　Conserved domain analysis of *SbMYB-like*

2.2　*SbMYB-like* 基因表达特性分析

高粱组织表达实时荧光定量 PCR 分析表明，该 *SbMYB-like* 转录因子主要在叶片中表达，而在根中、茎秆几乎无表达，仅在穗中略有表达，与表达谱中主要在地上部分表达也是一致的[19]（图 2）。



SbMYB-like 基因组织表达 qRT-PCR 分析。S，地上部分；根部；Stalk，高粱茎秆；Flag leaf，旗叶；Young flower，幼穗。

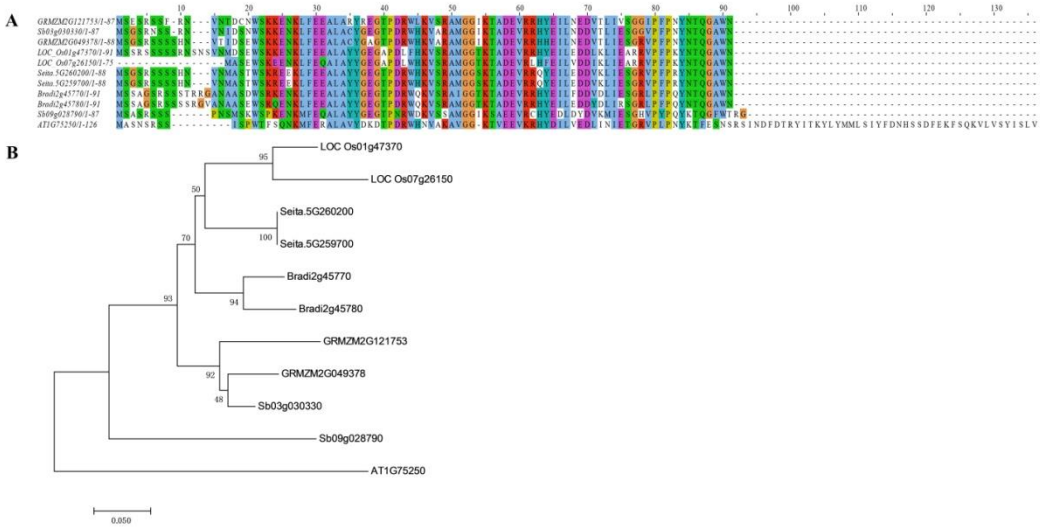
qRT-PCR analysis of SbMYB-like tissue expression. S, Shoots; R, roots.

图 2　*SbMYB-like* 基因表达特性分析。

Fig. 2　Expression pattern of *SbMYB-like*.

2.3　*SbMYB-like* 基因系统进化分析

将 SbMYB-like 编码氨基酸序列在各物种包括高粱、水稻、拟南芥、玉米、二穗短柄草等参考基因组数据库中进行 BLASTP 检索，找出其最相近的蛋白共计 11 个，进行序列联配和进化树的构建。蛋白序列联配的结果显示出在 SANT/Myb-like domain 上保守性总体比较高，在其他区域差别相对大，特别是 N 端（图 3A）。结合序列联配比对和进化树信息，与 *SbMYB-like* 最为相近的是玉米 *GRMZM2G049378* 以及 *GRMZM2G121753* 两个基因，其次是二穗短柄草中的两个基因 *Bradi2g45770*/*Bradi2g45780* 也亲缘关系较近，与谷子、水稻、拟南芥的中基因距离相对较远，特别是拟南芥中的基因。



A：SbMYB-like（Sb03g030330）与其它 10 个同源基因蛋白序列联配，分别是来自于高粱的 Sb09g028790，玉米中 GRMZM2G049378 和 GRMZM2G121753，二穗短柄草中 Bradi2g45770 和 Bradi2g45780，谷子中 Seita.5G260200 和 Seita.5G259700，水稻中 LOC_Os07g26150 和 LOC_Os01g47370，拟南芥中 AT1G75250；B：SbMYB-like 与其它 10 个同源基因进化树构建。

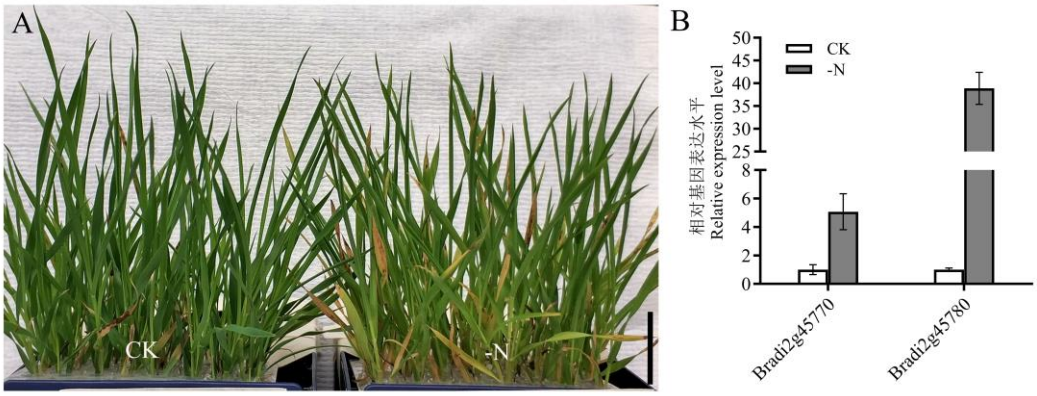
A: Protein sequence of SbMYB-like (Sb03g030330) aligns with other 10 homologs, namely Sb09g028790 from sorghum, GRMZM2G049378 and GRMZM2G121753 from maize, Bradi2g45770 and Bradi2g45780 from Brachypodium, and Seita.5G260200 and Seita.5G259700, LOC_Os07g26150 and LOC_Os01g47370 in rice, AT1G75250 in Arabidopsis; B: Phylogenetic tree construct of SbMYB-like and 10 other homologs.

图 3　*SbMYB-like* 与同源基因蛋白序列联配及进化树分析。

Fig. 3　Protein sequence alignment of SbMYB-like and other homologs, and phylogenetic tree analysis.

2.4　*SbMYB-like* 其它物种中同源基因受缺氮诱导特性分析

玉米中存在两个同源基因 *GRMZM2G049378* 以及 *GRMZM2G121753* 与 *SbMYB-like 基因*最相似，其次是在二穗短柄草中的两个基因 *Bradi2g45770*/*Bradi2g45780*。为了验证该基因功能保守性，在二穗短柄草中进行该基因受缺氮诱导情况分析。野生型二穗短柄草缺氮处理一周，缺氮下的植株已表现出叶片失绿、发黄，特别是较老的叶片（图 4A）。然后取样进行基因表达实时荧光定量分析，结果表明二穗短柄草中这两个同源基因也受缺氮强烈诱导，特别是 *Bradi2g45780*（图 4B）。



A：二穗短柄草缺氮处理 7 天地上部表型，bar=2cm；B：二穗短柄草中两个同源基因受缺氮诱导情况 qRT-PCR 分析。

A: Shoots phenotype of Brachypodiumunder nitrogen deficiency conditions for seven days, bar=2cm; B, qRT-PCR analysis of two homologs under nitrogen deficiency conditions in Brachypodium.

图 4　*SbMYB-like* 在二穗短柄草中同源基因受缺氮诱导情况分析。

Fig. 4　Expression of *SbMYB-like* homologs inBrachypodium under nitrogen deficiency conditions.

2.5 *SbMYB-like* 拟南芥过表达植株中基因表达分析

SbMYB-like 拟南芥转基因植株 T_2 代利用抗性筛选鉴定，保留符合单基因遗传规律的株系，最终在 T_3 抗性基因筛选鉴定得到的 8 个纯系，对这 8 个株系进行了 *SbMYB-like* 基因表达实时荧光定量分析。结果表明这 8 个株系，*SbMYB-like* 基因表达水平从最高 6000 倍到最低 200 倍（图 5），不同株系 *SbMYB-like* 基因表达水平变异相对丰富。

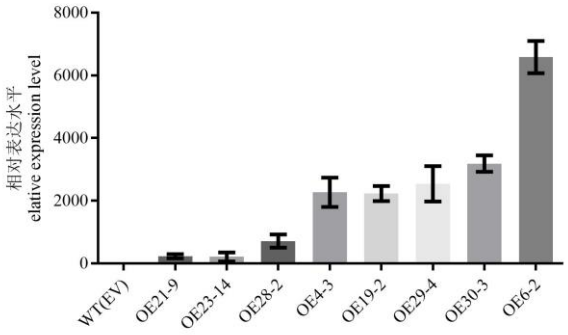
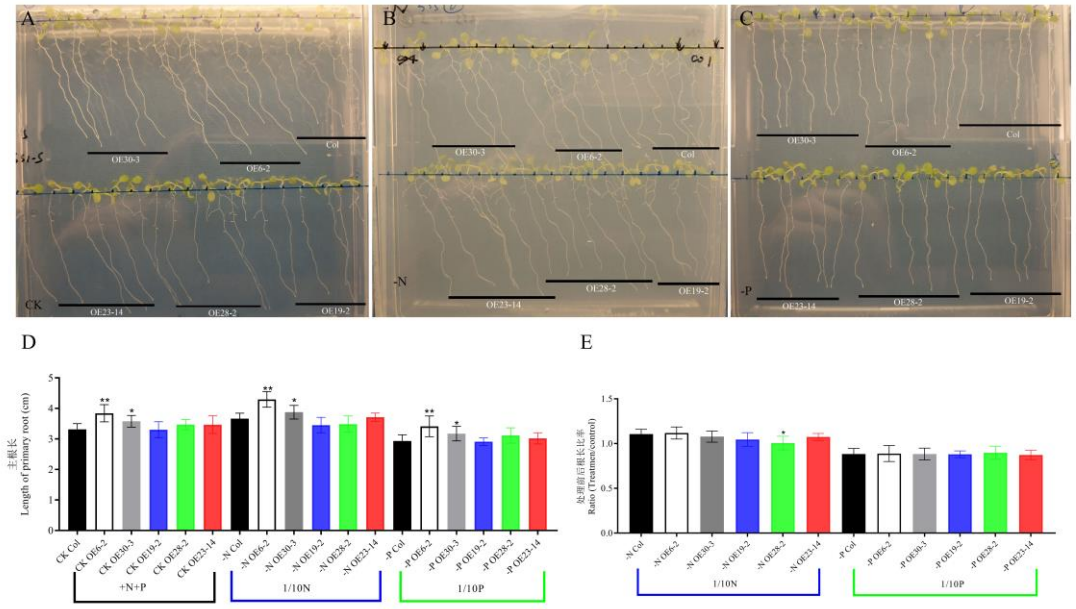


图 5 *SbMYB-like* 拟南芥过表达株系基因表达分析。

Fig. 5 Expression of *SbMYB-like* of overexpression plants in Arabidopsis.

2.6 *SbMYB-like* 拟南芥超表达植株根系缺氮、缺磷表型分析

因该基因受缺氮和缺磷诱导，特别是缺氮不论是地上部分还是根系中都受缺氮诱导。根系是植物吸收养分的重要器官，氮素对根系构型有重要的调控作用。为探索该基因是否参与氮素对根系调控，挑选了 5 个代表不同表达量的单基因超表达株系进行缺氮、缺磷处理，观察根系缺氮、缺磷的反应。结果显示出有两个株系 *OE6-2* 和 *OE30-3* 主根不论是在正常条件下或是缺氮诱导情况下，或是在缺磷主根生长抑制条件下，都显示出主根长度显著长于野生型植株，而其他株系主根较野生型根系长度并无显著差异（图 6A-6D）。为了确认主根的伸长或抑制是否依赖于外界氮素和磷素的供应，我们对缺氮、缺磷诱导主根伸长的比例也进行了统计，结果显示出不论缺氮还是缺磷条件下，对根系伸长或是抑制的比例较野生型无显著变化（图 6E）。



A-C：Col 野生型及 5 个 *SbMYB-like* 拟南芥超表达株系在正常条件下（A）、缺氮条件下（B）和缺磷条件下（C）根系表型；D: Col 野生型及 5 个 *SbMYB-like* *拟南芥*超表达株系在不同处理条件下主根长度统计；E：Col 野生型及 5 个 *SbMYB-like* 拟南芥超表达株系主根在缺氮或缺磷条件下诱导或抑制的比例统计。

A-C: Root phenotypes of Col and five *SbMYB-like* Arabidopsis overexpressing lines under normal (A), nitrogen-deficient (B) and phosphorus-deficient (C); D: Primary root lengths of Col and five *SbMYB-like* Arabidopsis overexpression lines under different treatment conditions; E: Ratio of primary roots induced or inhibited under nitrogen or phosphorus deficiency conditions of Col and five *SbMYB-like* Arabidopsis overexpression lines.

图 6　*SbMYB-like* 拟南芥超表达株系根系缺氮、缺磷条件下表型分析。

Fig. 6　Performance analysis of the roots of *SbMYB-like* Arabidopsis overexpression lines under nitrogen and phosphorus deficiency conditions.

2.7　*SbMYB-like* 拟南芥超表达植株对开花的影响

氮素对植物开花有重要影响，通常情况下，在拟南芥及水稻中缺氮促进开花、而氮过于丰富延迟开花[6-7]。为了验证 *SbMYB-like* 基因是否对开花有影响，选取了两个 *SbMYB-like* 基因表达有显著差异的拟南芥超表达株系，一个代表高丰度表达株系 *OE30-2*，另一个代表低丰度表达株系 *OE28-2* 进行实验。利用沙培，采用底部无小孔的小钵进行营养液供应栽培。一组进行正常氮养分供应，一组采用十分之一氮进行处理，每组每个株系八个重复共计 16 株苗。结果显示出在正常条件下，两个超表达株系均提前开花，抽薹时期的莲座叶数目显著少于野生型植株；而在缺氮条件下，开花还是较野生型提前开花，其中超表达株系 *OE30-2* 与野生型的莲座叶差异达到极显著（图 7）。



A: 野生型及两个 *SbMYB-like* 拟南芥超表达株系在氮充足和 1/10 氮水平下开花时表型; B: 野生型及两个 *SbMYB-like* 拟南芥超表达株系在氮充足和 1/10 氮水平下开花时莲座叶数目统计。

A: Growth performance of WT and two *SbMYB-like* Arabidopsis overexpressing lines at flowering period under nitrogen sufficiency and 1/10 nitrogen level; B: Number of rosette leaves of WT and two *SbMYB-like* Arabidopsis overexpressing lines at flowering stage under different treatments.

图 7　*SbMYB-like* 拟南芥超表达株系在不同氮水平下开花时间分析。

Fig. 7　Analysis of flowering time of *SbMYB-like* Arabidopsis overexpression lines under different nitrogen levels.

3　讨论

氮肥是保障农作物高产稳产的重要因素之一，挖掘氮缺乏诱导基因有助于解析氮高效的分子机理。本文鉴定和克隆了高粱受缺氮特异诱导的 *SbMYB-like* 基因，并进行了其它物种中同源基因缺氮诱导特性分析，在拟南芥中进行超表达转化，对转基因纯系进行了根系表型和开花时间的观察。

从前期高粱苗期氮缺乏（-N）、磷缺乏(-P)以及钾缺乏(-K)表达谱研究中，我们筛选出一些 NPK 缺乏特异诱导基因。其中一个 *SbMYB-like* 转录因子，该基因不论是在地上部分还是根系中都受缺氮特异诱导，特别是地上部分强烈受缺氮诱导，缺磷地上部分略有诱导，而缺钾几乎不受影响[19]。实时荧光定量分析 *SbMYB-like* 基因组织表达，表明该基因主要在叶片中表达，而且受缺氮特异诱导。同属一个转录因子家族的拟南芥 *AtmybL2* 基因，也是主要在叶片中表达[11]，表明该基因可能主要在叶片中起作用。*SbMYB-like* 基因在玉米和二穗短柄草中的同源基因都有两个，而高粱 *SbMYB-like* 与玉米中的两个基因最相近（图 3），与高粱中其它 MYB 基因相似性并不高，有可能该基因功能在高粱中与玉米、二穗短柄草中有所分化，而且是 1:2 的进化关系。与拟南芥中编码蛋白相似度最高的基因 *AT1G75250*，从蛋白序列联配和进化树来看，*AT1G75250* 编码蛋白在 C 端比 SbMYB-like 多出一段，很可能该基因在拟南芥中并无同源基因。玉米中已发表的数据表明，与高粱 *SbMYB-like* 同源基因 *GRMZM2G049378* 以及 *GRMZM2G121753* 这两个基因在叶片也受缺氮强烈诱导。不论是在玉米品种 B73 中，还是 A188，在缺氮 20 天和 30 天叶片中都受缺氮诱导，而且 30 天还更强烈[20]。从玉米和二穗短柄草中的两个同源基因受缺氮的诱导情况来看，也都受缺氮强烈诱导，表明 *SbMYB-like* 基因功能可能在单子叶植物功能比较保守，与双子叶中基因功能可能有很大不同，而且拟南芥中极可能不存在该基因的同源基因。

高粱 *SbMYB-like* 基因在拟南芥中进行超表达转化，转基因纯系根系表型分析表明该基因能够促进根系伸长，但是该基因对根系的促进作用，并不依赖外界氮素或是磷素水平（图 6）。而且只有两个株系 *OE6-2* 和 *OE30-3* 对根系有促进作用，其它株系较野生型无显著差异。而这两个株系 *OE6-2* 和 *OE30-3* 表达量是最

高的两个株系，一个 6000 倍，一个 3000 倍，可能该基因对根系促进伸长作用，需要基因表达量达到一定阈值才能发挥作用。通常情况下，氮素水平对植物开花有重要影响[6-7]。如 MYB-related 家族成员 *TaMYB72*，对水稻开花有促进作用[15]。我们的研究表明 *SbMYB-like* 基因在拟南芥中也能促进开花，与基因的表达量也呈现一致对应关系，且这促进作用并不是氮素水平依赖性的。尽管 *SbMYB-like* 基因受缺氮强烈诱导，在拟南芥中超表达株系的表型不论是促进根系伸长或是促进开花，结果都表明这些作用与外界供应氮素水平无关。高粱 SbMYB-like 与拟南芥中基因编码蛋白序列相似度低，拟南芥中很可能没有该基因的同源基因，而在玉米和二穗短柄草中有高度相似的基因（图 3），可能该基因功能在单双子叶植物中存在不同。因此高粱 *SbMYB-like* 在拟南芥中异源表达，对根伸长以及开花的促进不依赖于外界氮素水平也是可能的。下一步需要在高粱、玉米等作物中进行该基因功能验证，才有可能解析该基因参与高粱缺氮诱导的响应分子机制。另一方面，MYB-related 家族成员作用广泛，如参与次生代谢途径、节律等其它途径的调控[8, 9, 11, 13]，该基因对根系和开花的促进可能属于间接作用，将来通过 RNA-seq、Chip-seq 等技术手段进一步挖掘该基因调控网络有助于阐明该基因功能。此外因 *SbMYB-like* 基因主要在叶片中表达，下一步研究重点要集中在地上部分的观察上，包括叶片发育、植株产量等生长参数的研究上。该基因能促进根系伸长，未来可能有助于培育根系发达的作物，改良根系构型，提高养分吸收效率，培育养分高效作物。

4 结论

在高粱苗期缺氮、缺磷以及缺钾表达谱中鉴定到一个受缺氮特异诱导的转录因子 *SbMYB-like* 基因，该基因在玉米和二穗短柄草中的同源基因也同样受缺氮强烈诱导，在拟南芥中超表达 *SbMYB-like* 基因，显著促进了拟南芥主根伸长以及植株开花，该促进作用并不依赖外界氮素水平，表明该基因是植株根系伸长及开花的重要调控基因，但有关该基因参与高粱缺氮响应分子机制有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Wang Y Y, Cheng Y H, Chen K E, Tsay Y F. Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69(1): 85-122.

[2] Wang S T, Zhang X M, Wang C, Zhang X Y, Reis S, Xu J M, Gu B J. A high-resolution map of reactive nitrogen inputs to China. Scientific Data, 2020, 7(1): 379.

[3] 吴远帆, 钟建中, 高雅洁, 廖育林, 聂军, 鲁艳红. 湖南省3种粮油作物当季化肥利用率现状研究. 湖南农业科学, 2022, (03): 33-37.
Wu Y F, Zhong J Z, Gao Y J, Liao Y L, Nie J, Lu Y H. Fertilizer use efficiency of three grain and oil-bearing crops in hunan province. Hunan Agricultural Sciences, 2022, (03): 33-37.

[4] Xu G H, Fan X R, Miller A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63(1): 153-182.

[5] Garnett T, Conn V, Kaiser B N. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. Plant, Cell & Environment, 2009, 32(9): 1272-1283.

[6] Zhang S N, Liu Y, Du M K, Shou G Z, Wang Z Y, Xu G H. Nitrogen as a regulator for flowering time in plant. Plant and Soil, 2022.

[7] Vidal E A, Moyano T C, Canales J, Gutierrez R A. Nitrogen control of developmental phase transitions in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(19): 5611-5618.

[8] 谈天斌, 卢晓玲, 张凯旋, 丁梦琦, 廖志勇, 周美亮. TrMYB308基因的克隆及在苦荞毛状根中的功能分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20(06): 1542-1553.
Tan T B，Lu X L，Zhang K X，Ding M Q，Liao Z Y，Zhou M L. Cloning of *TrMYB308* gene and analysis of its function in *Fagopyrum tataricum* hairy root. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(6):1542-1553

[9] 康珍, 杨迪, 郝彦蓉, 卢翔, 周美亮, 方正武. 苦荞转录因子FtMYB41的克隆及功能分析. 植物遗传资源学报, 2022, 23(03): 895-905.
Kang Z, Yang D, Hao Y R, Lu X, Zhou M L. Molecular cloning and functional analysis of transcription factor *FTMYB41* in tartary buckwheat（*Fagopyrum Tataricum*）, Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(03): 895-905[10] Ambawat S, Sharma P, Yadav N R, Yadav R C. MYB transcription factor genes

as regulators for plant responses: an overview. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2013, 19(3): 307-321.

[11] Matsui K, Umemura Y, Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. The Plant Journal, 2008, 55(6): 954-967.

[12] Jin J P, Tian F, Yang D C, Meng Y Q, Kong L, Luo J C, Gao G. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D1040-D1045.

[13] Nguyen N H, Lee H. MYB-related transcription factors function as regulators of the circadian clock and anthocyanin biosynthesis inArabidopsis. Plant Signaling & Behavior, 2016, 11(3): e1139278.

[14] Todd C D, Zeng P, Huete A M R, Hoyos M E, Polacco J C. Transcripts of MYB-like genes respond to phosphorous and nitrogen deprivation in Arabidopsis. Planta, 2004, 219(6): 1003-1009.

[15] Zhang L C, Liu G X, Jia J Z, Zhao G Y, Xia C, Zhang L N, Li F, Zhang Q, Dong C H, Gao S C, Han L Z, Guo X P, Zhang X, Wu J X, Liu X, Kong X Y. The wheat MYB-related transcription factor TaMYB72 promotes flowering in rice. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(8): 701-704.

[16] Abe M, Kaya H, Watanabe-Taneda A, Shibuta M, Yamaguchi A, Sakamoto T, Kurata T, Aus ń I, Araki T, Alonso-Blanco C. FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of flowering locus T and flowering locus T interacting protein 1. The Plant Journal, 2015, 83(6): 1059-1068.

[17] Nilsson L, Muller R, Nielsen T H. Increased expression of the MYB-related transcription factor, PHR1, leads to enhanced phosphate uptake in Arabidopsis thaliana. Plant Cell and Environment, 2007, 30(12): 1499-1512.

[18] Dial H. Plant guide for sorghum (Sorghum bicolor L.). USDA-Natural Resources Conservation, 2012.

[19] Zhu Z X, Li D, Wang P, Li J H, Lu X C. Transcriptome and ionome analysis of nitrogen, phosphorus and potassium interactions in sorghum seedlings. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 2020, 32(4): 271-285.

[20] Schl üter U, Mascher M, Colmsee C, Scholz U, Br äutigam A, Fahnenstich H, Sonnewald U. Maize Source Leaf Adaptation to Nitrogen Deficiency Affects Not Only Nitrogen and Carbon Metabolism But Also Control of Phosphate Homeostasis. Plant Physiology, 2012, 160(3): 1384-1406.