

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: 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。氮元素是保障作物稳产、高产的三大重要养分元素之一。氮信号途径相关基因研究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。本研究克隆了先前在高粱 BTX623 苗期缺氮、缺磷及缺钾表达谱中筛选出的 1 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 在二穗短柄草中验证了该基因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, 测定野生型和超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。本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: Sorghum is the fifth most important cereal crops in the world and shows strong tolerance to low-fertility soil and drought. Nitrogen is one of the three essential nutrients which ensures stable and high crop yield. The nitrogen signaling pathways 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 cloned 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* P. Beauv., 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* Heynh. 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 that *SbMYB-like* was involved in root elongation and

收稿日期: 2022-08-16 修回日期: 2022-09-01 网络出版日期: 2022-09-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220816002>

第一作者研究方向为作物分子育种, E-mail: swauzxx@126.com

基金项目: 辽宁省优秀青年自然科学基金(2021-YQ-04); 中国博士后面上基金(2021M693848); 国家谷子高粱产业体系(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)

flowering independent of the environmental nitrogen levels. Collectively, this study provided basic data for analysis molecular mechanism of sorghum response to nitrogen deficiency.

Key words: 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、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时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,抑制地上部分生长,促使根系伸长,增强根系吸收土壤中养分的能力^[5]。通常情况下,在水稻、拟南芥中以及其他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利用分子机理,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1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1个重复1R-MYB、2个重复2R(R2R3)-MYBs、3个重复3R(R1R2R3)-MYBs以及4个重复4R-MYBs^[10]。其中1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1个保守MYB的N端DNA结合域和1个独特的富含脯氨酸的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1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*PHR1*是1个MYB-related转录因子^[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^[14]。*AtMYBD*是1个花青素生物合成的正调控因子,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,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。本研究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着重要作用。本研究将为深入挖掘高粱氮素高效利用基因、培育养分高效利用作物提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料及生长条件

试验材料:高粱参考基因组测序品种BTX623,拟南芥Columbia(Col-0)野生型,以及二穗短柄草参考基因组测序品种Bd21。

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 min,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。高粱缺氮处理:对照组营养液详见表1,缺氮处理时将(NH₄)₂SO₄、KNO₃、Ca(NO₃)₂·4H₂O替换成相应浓度的K₂SO₄和CaCl₂;对照组正常种植14 d,每7 d换营养液一次,试验组正常种植7 d(营养液见表1),然后缺氮处理种植7 d。放置于室内温室中白天30℃,12 h光照,光强约800 μmol/m²/s;晚上22℃,12 h黑暗。

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 min,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 h,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。表型生长试验置于室内恒温 23 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗的温室中。拟南芥低氮、低磷实验:对照处理的培养基配方如表 1 所示;低氮处理时, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 加入量仅为对照组的 1/10, 补充相应浓度的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KCl 以及 CaCl_2 ;低磷处理时, KH_2PO_4 加入量仅为对照组的 1/10, 补充相应浓度的 KCl 。所有的培养液最后加入植物用凝胶 8 g/L, 灭菌待用。拟南芥沙培实验:沙子用反渗透水洗 6~8 遍, 至基本无混浊;然后将洗净的沙子进行灭菌, 沙子烘干后转入封底小钵, 进行拟南芥种植;对照及低氮处理营养液如拟南芥低氮实验配制, 但不加植物凝胶。每小钵苗从移栽到开花, 相应营养液灌溉总量在 300 mL 左右, 浇水使用反渗透纯净水。

表 1 高粱营养液配方

Table 1 Component of sorghum nutrition solution

元素 Element	母液浓度(mol/L) Concentration of stock solution	终浓度(mmol/L) Final use concentration	母液组合 Group of stock solution
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.547	0.5470	I
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.365	0.3650	
KH_2PO_4	0.182	0.1820	II
KNO_3	0.183	0.1830	III
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.366	0.3660	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.0005	IV
H_3BO_3	0.03	0.0030	
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001	0.0001	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.004	0.0004	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.002	0.0002	
$\text{NaFe-EDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.100	0.0400	V
MES	0.500	2.0000	VI

二穗短柄草种子消毒同上, 然后放置灭菌水中置于 4 °C 冰箱放置 36~48 h, 然后置于 25 °C 培养箱催芽, 种植于底部开孔的 96 孔 PCR 板中, 正常种植 7 d (营养液见表 1), 缺氮处理种植 7 d。缺氮处理时, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 替换成相应浓度的 K_2SO_4 和 CaCl_2 。对照组正常种植 7 d (营养液见表 1) 后, 更换营养液继续种植 7 d。缺氮处理、对照组均放置于 25 °C 恒温光照培养箱。文章所涉及的表型图片使用智能手机(小米 note3)进行拍摄, 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

高粱及二穗短柄草缺氮处理的样品到指定时间后进行取样, 高粱缺氮样品用于 *SbMYB-like* 基因克隆, 而二穗短柄草缺氮样品用来进行 *SbMYB-like*

同源基因表达特性分析。取完样品后, 快速浸入液氮, 于 -80 °C 超低温冰箱存放。待用时将样品取出, 放入液氮充分预冷的植物样品研磨仪 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 280 nm/260 nm, 260 nm/230 nm 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。取 2.5 μg 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 °C 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、组织表达实时荧光定量 PCR 分析以及拟南芥转基因筛选

引物利用 Oligo7.0 软件 (www.oligo.net) 设计, 由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 Taq™ 试剂 (宝日医生物技术(北京)有限公司), 罗氏 LightCycler480II 荧光定量 PCR 仪, 10 μL 体系, 3 个生物学重复以及 3 个技术重复进行试验。PCR 扩增程序如下: 95 °C 1 min; 94 °C 10 s, 58 °C 10 s, 72 °C 12 s, 设定 45 个循环, 相对表达水平采用 $2^{-\Delta(\Delta C_p)}$ 法计算。在计算高粱 *SbMYB-like* 基因在拟南芥超表达植株的表达量时, 因 *SbMYB-like* 属于外源基因, 对照 C_p 值自定义为 32 进行计算。拟南芥基因转化采用农杆菌浸花法, 获得 T_0 代种子; 播种于含有潮霉素的 MS 培养基中进行筛选, 获得阳性苗自

交获得 T_1 代种子;播种于含有潮霉素的 MS 培养基中进行筛选,然后计算分离比例,将符合 3:1 分离的

植株种植至少 20 株每株系,独立收种获得相应的 T_2 代种子;最终在 T_3 株系中鉴定到纯系。

表 2 本研究所用所有引物

Table 2 All primers used in the study

引物名称 Name of primers	正向序列(5'-3') Forward sequence(5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')	用途 Purpose
SbMYB	ATGTCTGGGTCCAGGAACCTCTT	TTAGTTCCAAGCTCCCTGTGTG	基因克隆引物
Bradi2g45770-qRT	TTTGCCTGAATGTAACCTCC	TCCGATCCTAAATGTTGTCGAA	定量 PCR 引物
Bradi2g45780-qRT	AAGCATACCGATATATTGTGA	AAGGCGGATTTAATTTAGCAA	定量 PCR 引物
BdUBC18 qRT-PCR	GTCACCCGCAATGACTGTAAGTTC	TTGTCTTGCGGACGTTGCTTTG	二穗短柄草中看家基因定量 PCR 引物
UBC.qPCR	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	TTGTGCCATTGAATTGAACCC	拟南芥中看家基因定量 PCR 引物
SbActin	ATGGCTGACGCCGAGGATATCCA	GAGCCACACGGAGCTCGTTGTAG	高粱中看家基因定量 PCR 引物
Sb03g030330KpnI/BamHI	AAGGTACCATGTCTGGGTCCAGGAACCTTC	AAGGATCCTTAGTTCCAAGCTCCCTGTGT	基因载体构建引物
Sb03g030330 94qRT	CGCCGCCATTATGAGATCCT	AGTTCCAAGCTCCCTGTGTG	定量 PCR 引物

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 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测。基因亚细胞定位使用 Euk-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2>)。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>) 同源基因采用 BLASTP 搜索。所有的入选基因编码的氨基酸序列用 ClustalX1.83 软件 (www.clustal.org) 进行序列联配,通过 MEGA7.0 软件 (<https://www.megasoftware.net>) 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 *SbMYB-like* 基因序列。该基因没有内含子,仅有 1 个外显子,编码含 87 个氨基酸的蛋白质。通过 NCBI 保守结构域搜索分析,显示出该基因编码了 1 个 SANT/Myb-like DNA-binding domain, 该结构域在第 16 位氨基酸到第 60 位氨基酸之间 (图 1)。另外利用亚细胞定位预测软件 Euk-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2>), 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^[19]也是一致的 (图 2)。

2.3 *SbMYB-like* 基因系统进化分析

将 *SbMYB-like* 编码蛋白序列在各物种包括

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,找出其蛋白序列相似度最高的基因共计 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,各序列在 SANT/Myb-like domain 上保守性总体比较高,在其他区域差别相对较大,特别是靠近 N 端区域 (图 3A)。结合序列联配比对和进化树信息,与 *SbMYB-like*

编码蛋白最为相近的是玉米 GRMZM2G049378 以及 GRMZM2G121753, 其次是与二穗短柄草中的 Bradi2g45770/Bradi2g45780 亲缘关系也较近, 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。

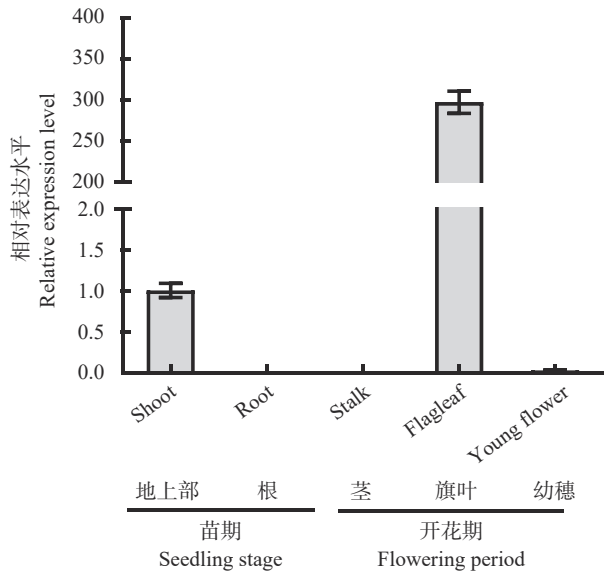


图2 *SbMYB-like* 基因组织表达 qRT-PCR 分析

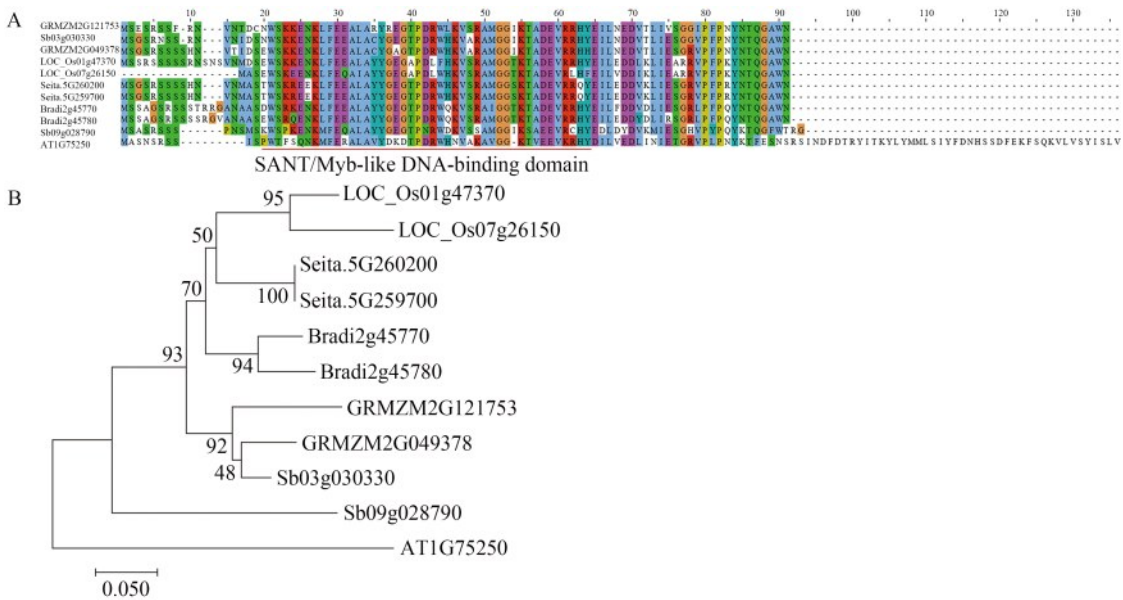
Fig.2 qRT-PCR analysis of *SbMYB-like* tissue expression

2.4 *SbMYB-like* 其他物种中同源基因受缺氮诱导特性分析

为了验证该基因功能保守性, 在二穗短柄草中进行 *SbMYB-like* 同源基因受缺氮诱导情况分析。野生型二穗短柄草缺氮处理 7 d, 缺氮下的植株已表现出叶片失绿、发黄, 特别是较老的叶片, 表明二穗短柄草已出现缺氮症状(图 4A)。取地上部分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)。说明 *SbMYB-like* 在二穗短柄草中可能具有同样功能。

2.5 *SbMYB-like* 拟南芥超表达植株中基因表达分析

SbMYB-like 拟南芥转基因植株 T₂ 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 T₃ 抗性基因筛选鉴定得到 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。结果表明相较于空载体转基因对照, 这 8 个株系的 *SbMYB-like* 基因表达水平范围为 200~6000 倍(图 5), 不同株系 *SbMYB-like* 基因表达水平的变异相对丰富。通过纯系鉴定, 获得了 8 个 *SbMYB-like* 不同表达量的单基因插入纯系。



A: *SbMYB-like* (Sb03g030330) 与其他 10 个同源基因编码蛋白序列联配, 分别是来自于高粱的 Sb09g028790, 玉米的 GRMZM2G049378 和 GRMZM2G121753, 二穗短柄草的 Bradi2g45770 和 Bradi2g45780, 谷子的 Seita.5G260200 和 Seita.5G259700, 水稻的 LOC_Os07g26150 和 LOC_Os01g47370, 拟南芥的 AT1G75250; 红线标注的是 SANT/Myb-like DNA-binding 结构域; B: *SbMYB-like* 与其他 10 个同源基因编码蛋白进化树构建

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 P. Beau.*, Seita.5G260200 and Seita.5G259700 from foxtail millet, LOC_Os07g26150 and LOC_Os01g47370 from rice, AT1G75250 from *Arabidopsis Heynh.*; red line indicates SANT/Myb-like DNA-binding domain; B: Phylogenetic tree construct of proteins encoded by *SbMYB-like* and other 10 homologs

图3 *SbMYB-like* 与同源基因编码蛋白序列联配及进化树分析

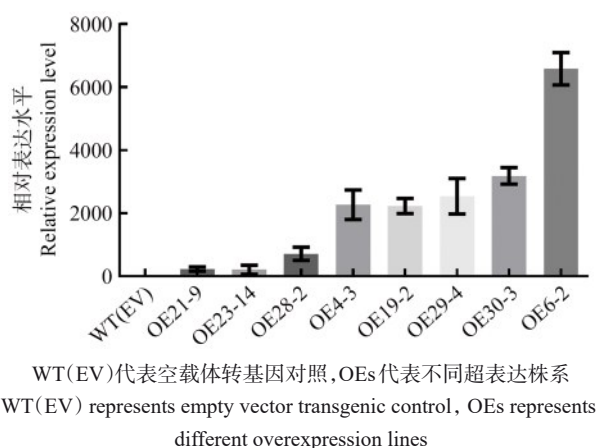
Fig.3 Protein sequence alignment of *SbMYB-like* and other homologs, and phylogenetic tree analysis



A: 二穗短柄草缺氮处理 7 d 地上部表型。CK: 对照; -N: 缺氮处理; 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 *Brachypodium* P. Beauv. under nitrogen deficiency conditions for seven days. CK: Control; -N: Nitrogen deficiency;
B: qRT-PCR analysis of two homologs under nitrogen deficiency conditions in *Brachypodium* P. Beauv.

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 in *Brachypodium* P. Beauv. under nitrogen deficiency conditions



WT(EV)代表空载体转基因对照, OEs代表不同超表达株系
WT(EV) represents empty vector transgenic control, OEs represents different overexpression lines

图 5 *SbMYB-like* 拟南芥超表达株系基因表达分析

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

2.6 *SbMYB-like* 拟南芥超表达植株根系低氮、低磷表型分析

因该基因受缺氮和缺磷诱导,特别是缺氮,不论是植株地上部分还是根系都受缺氮诱导。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(OE6-2、OE30-3、OE19-2、OE28-2以及OE23-14)进行低氮、低磷处理,观察根系低氮、低磷的反应。结果显示株系 OE6-2 和 OE30-3 主根不论是在正常条件下或是低氮诱导情况下,或是在低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~D)。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,对低氮、低磷诱导主

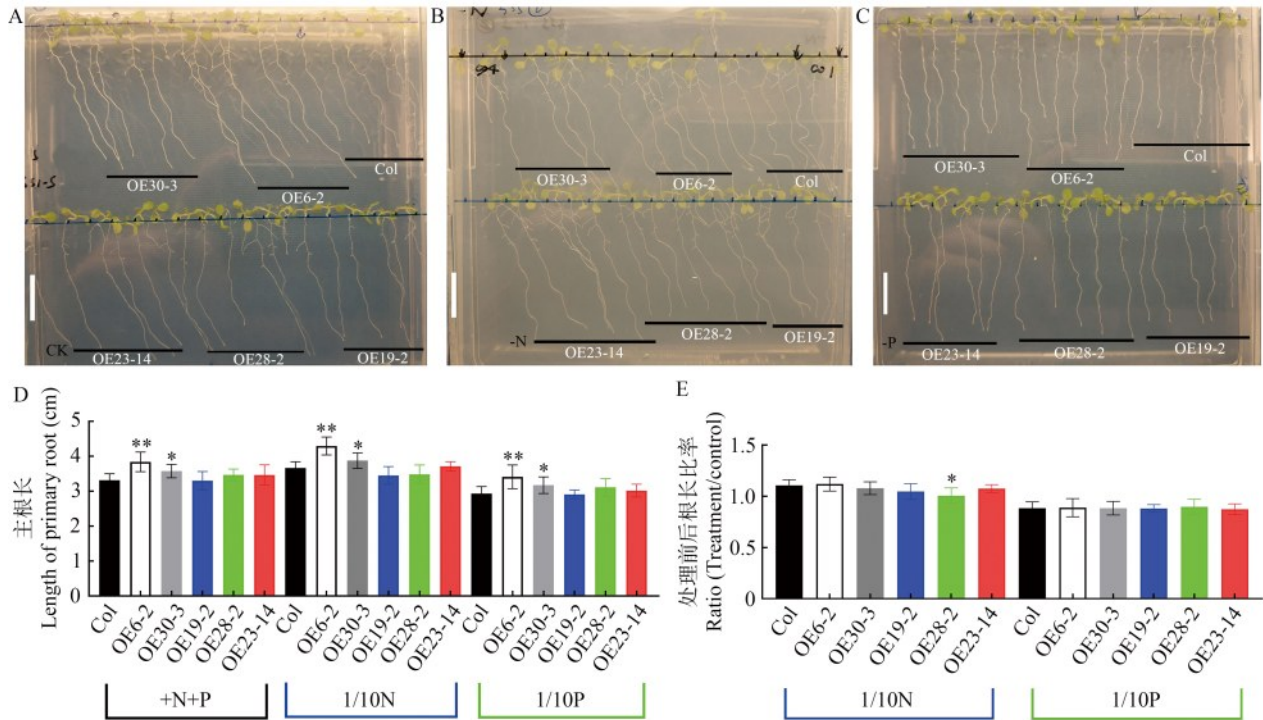
根伸长的比例也进行了统计,结果显示不论低氮还是低磷条件下,对根系伸长或是抑制的比例较野生型无显著变化(图 6E)。结果表明 *SbMYB-like* 在拟南芥中超表达,可以促进根系伸长,但不依赖于外源氮或磷源水平。

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,而氮过于丰富则延迟开花^[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* 表达有显著差异的拟南芥超表达株系,OE30-3 代表高丰度表达株系,OE28-2 代表低丰度表达株系进行试验。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 1/10 氮进行处理,每组每个株系 8 个重复共计 16 株苗。结果显示在正常条件下,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;而在低氮条件下,两个超表达株系仍较野生型提前开花,其中超表达株系 OE30-3 与野生型的莲座叶差异达到极显著(图 7)。结果表明 *SbMYB-like* 基因在拟南芥中超表达能够促进开花。

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。本研究克隆了高粱受缺氮特异诱导的 *SbMYB-like* 基因,并进行了其他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。



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)、低氮条件下(B)和低磷条件下(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; +N+P: 氮磷充足, 1/10N: 氮素浓度为充足水平下的1/10, 1/10P: 磷素浓度为充足水平下的1/10; 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。Bar=2 cm

A-C: Root phenotypes of Col and five *SbMYB-like Arabidopsis Heynh.* overexpressing lines under normal (A), low nitrogen (B) and low phosphate conditions (C); D: Primary root lengths of Col and five *SbMYB-like Arabidopsis Heynh.* overexpression lines under different treatment conditions; +N+P: The sources of N and P were sufficient, 1/10N: Concentration of sources of N is 1/10 of that of sufficient condition, 1/10P: Concentration of sources of P is 1/10 of that of sufficient condition; E: Ratio of primary roots induced or inhibited under nitrogen or phosphorus deficiency conditions of Col and five *SbMYB-like Arabidopsis Heynh.* overexpression lines. Bar=2 cm

图6 *SbMYB-like*拟南芥超表达株系根系低氮、低磷条件下表型分析

Fig.6 Performance analysis of the roots of *SbMYB-like Arabidopsis Heynh.* overexpression lines under low nitrogen and low phosphate conditions



A: 野生型及两个*SbMYB-like*拟南芥超表达株系在氮充足和低氮条件下开花时表型; +N: 氮充足条件, 1/10N: 氮素浓度为充足水平下的1/10;

B: 野生型及两个*SbMYB-like*拟南芥超表达株系在氮充足和低氮水平下开花时莲座叶数目统计; T检测, *在P<0.05水平上差异显著, **在P<0.01水平上差异显著

A: Growth performance of WT and two *SbMYB-like Arabidopsis Heynh.* overexpressing lines at flowering period under nitrogen sufficient and low nitrogen conditions; +N: nitrogen sufficient conditions, 1/10N: Concentration of sources of N is 1/10 of that of sufficient condition; B: Number of rosette leaves of WT and two *SbMYB-like Arabidopsis Heynh.* overexpressing lines at flowering stage under different treatments. Student's t-test, * significant difference at the P<0.05 level, ** significant difference at the P<0.01 level

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 Heynh.* overexpression lines under different nitrogen levels

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,本课题组筛选出一些NPK缺乏特异诱导基因。其中1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]。本研究克隆了该基因,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(图2),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),与高粱中其他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是*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*同源的基因*GRMZM2G049378*以及*GRMZM2G121753*在叶片中也受缺氮强烈诱导。不论是在玉米品种B73还是A188中,在缺氮20 d和30 d的叶片中都受缺氮诱导,而且30 d更强烈^[20]。玉米和二穗短柄草中的两个同源基因都受缺氮强烈诱导,表明*SbMYB-like*基因功能可能在单子叶植物中功能比较保守,与双子叶中的基因功能可能有很大不同。

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,其他株系较野生型无显著差异。而株系*OE6-2*和*OE30-3*中*SbMYB-like*基因表达水平是8个超表达株系中最高的两个(图5),分别为6000倍、3000倍,可能该基因对根系的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。尽管本研究发现*SbMYB-like*基因在促进拟南芥主根伸长上,并不依赖外界氮素水平(图6)。然而氮对植物侧根、根毛的生长发育也至关重要^[21],*SbMYB-like*有可能参与了氮依赖的侧根和根毛的伸长调控,因此下一步有必要研究*SbMYB-like*基因在侧根或是根毛中的调控作用。另外生长素是调控植物根系生长发育的核心激素^[22],

高粱*SbMYB-like*基因促进根系的伸长可能通过生长素信号途径。将来利用转录组分析、生长素测定、生长素标记基因等,鉴定与生长素信号途径相关基因,解析该基因参与根系调控的分子途径。通常情况下,氮素水平对植物开花有重要影响^[6-7]。如小麦MYB-related家族成员*TaMYB72*转化水稻,发现对水稻开花有促进作用^[15]。拟南芥中MYB-related基因FE,也发现参与了开花时间的调控^[16]。本研究表明*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,且这一促进作用并不是氮素水平依赖性的。考虑到MYB-related基因家族成员众多,*TaMYB72*和FE基因是否受缺氮诱导,*SbMYB-like*调控开花的分子机制是否与*TaMYB72*和FE一致或是不同,有待进一步深入研究。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子叶和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。MYB-related家族成员作用广泛,如参与次生代谢途径、节律等其他途径的调控^[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。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

本研究克隆了前期在高粱苗期缺氮、缺磷以及缺钾表达谱中鉴定到的1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(3): 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(3): 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, <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05608-w>
- [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(6): 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(3): 895-905
Kang Z, Yang D, Hao Y R, Lu X, Zhou M L, Fang Z W. Molecular cloning and functional analysis of transcription factor FtMYB41 in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(3): 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. AtMYB2, 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 in Arabidopsis. *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, Ausin 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.). (2013-02) [2022-10]. <https://docslib.org/doc/7227421/plant-guide-sorghum-sorghum-bicolor>
- [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] Schlüter U, Mascher M, Colmsee C, Scholz U, Bräutigam 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
- [21] Liu B H, Wu J Y, Yang S Q, Schiefelbein J, Gan Y B. Nitrate regulation of lateral root and root hair development in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(15): 4405-4414
- [22] Saini S, Sharma I, Kaur N, Pati P K. Auxin: A master regulator in plant root development. *Plant Cell and Reports*, 2013, 32(6): 754-757