

# 小麦 *TaMYB35* 基因的克隆与表达分析

王伟伟, 马锦绣, 曹志琛, 郝小聪, 朱文根, 左静红,

郭春曼, 赵昌平, 汪德州, 唐益苗

(北京市农林科学院北京杂交小麦工程技术研究中心/杂交小麦分子遗传北京市重点实验室, 北京, 100097)

**摘要:** MYB 类转录因子是高等植物中最大的转录因子家族之一, 参与植物多种生命活动的调控。近年来的研究表明, MYB 类转录因子在花发育过程的各个阶段以及花器官的不同部分发挥调控作用, 拟南芥、水稻、大豆、葡萄等植物均有报道。为研究 MYB 转录因子在小麦 (*Triticum aestivum* L.) 穗部发育中的作用, 对小麦最新基因组数据进行分析, 以拟南芥花药发育调控基因 *AtMYB35* 通过同源克隆法获得小麦直系同源 MYB 基因, 根据其染色体位置分别命名为 *TaMYB35A*、*TaMYB35B*、*TaMYB35D*, 并对其进行了分析。序列分析表明: *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 分别含有 924bp、927bp 和 927bp 的完整开放阅读框, 分别编码 307 个、308 个和 308 个氨基酸; *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 蛋白序列 N 端均含有两个 MYB 结构域, 为 MYB 基因家族中的 R2R3-MYB 类转录因子。系统进化分析表明: *TaMYB35A* 与二粒小麦 (*Triticum dicoccum*) 处于同一分支, 其亲缘关系更近; *TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 处于同一分支, 亲缘关系更近。荧光定量表达分析表明: *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 主要在雄蕊中表达, 小穗 (除去雄蕊) 中少量表达, 其他组织基本不表达。不育和可育环境下, *TaMYB35A* 表达有显著差异。本研究明确了 *TaMYB35* 在小麦花药发育过程中的表达特性, 为研究二系杂交小麦分子育种提供新基因资源。

**关键词:** 小麦; *TaMYB35*; 细胞程序性死亡; 雄性不育

## Cloning and expression analysis of *TaMYB35* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.)

WANG Wei-Wei, MA Jin-Xiu, CAO Zhi-Chen, HAO Xiao-Cong, ZHU Wen-Gen,

ZUO Jing-Hong, GUO Chun-Man, WANG De-Zhou; TANG Yi-Miao

(Hybrid Technology Engineering Research Center of Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100097)

**Abstract:** MYB transcription factors are one of the largest transcription factor families in higher plants, and they are involved in the regulation of a variety of plant life activities. Recent studies have shown that MYB transcription factors play a regulatory role in various stages of flower development and different parts of flower organs. There have been reports on Arabidopsis, rice, soybeans, grapes and other plants. In order to study the role of MYB transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.) ear development, the latest wheat genome data was analyzed, and the wheat orthologous MYB gene was obtained by homologous cloning using the

收稿日期: 2020-09-15 修回日期: 2020-12- 网络出版日期: 2020-12-15

URL: [http://www.cajonline.cn](#)

第一作者研究方向为小麦分子育种, E-mail: wangweiwei2398@163.com; 马锦绣为共同第一作者

通信作者: 赵昌平, 研究方向为小麦杂种优势利用, E-mail: cp\_zhao@vip.sohu.com

汪德州, 研究方向为小麦分子育种, E-mail: wangdezhou84@126.com

唐益苗, 研究方向为小麦分子育种, E-mail: tangyimiao@126.com

基金项目: 北京市农林科学院青年科研基金 (QNJ201805); 北京市农林科学院能力建设专项 (KJCX20200423); 基因组学育种协同创新 (KJCX201907-2)

Foundation Projects: Youth Research Fund of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (QNJ201805); Special Capacity Building Project of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20200423); Collaborative Innovation in Genomics Breeding (KJCX201907-2)

Arabidopsis thaliana anther development regulating gene AtMYB35. They were named *TaMYB35A*, *TaMYB35B*, and *TaMYB35D* according to their chromosomal positions, and they were analyzed. Sequence analysis showed that *TaMYB35A*, *TaMYB35B* and *TaMYB35D* contained complete open reading frames of 924bp, 927bp and 927bp, respectively, encoding 307, 308 and 308 amino acids, respectively; *TaMYB35A*, *TaMYB35B* and *TaMYB35D* protein sequences all contained two MYB domains at the N-terminus, Is the R2R3-MYB transcription factor in the MYB gene family. Phylogenetic analysis shows that *TaMYB35A* and *Triticum dicoccum* are in the same branch, and their relationship is closer; *TaMYB35B* and *TaMYB35D* are in the same branch, and their relationship is closer. Fluorescence quantitative expression analysis showed that *TaMYB35A*, *TaMYB35B* and *TaMYB35D* were mainly expressed in stamens, a small amount of expression in spikelets (excluding stamens), and almost no expression in other tissues. There is a significant difference in the expression of *TaMYB35A* in sterile and fertile environments. This study clarified the expression characteristics of *TaMYB35* in the development of wheat anthers, and provided new genetic resources for the study of molecular breeding of two-line hybrid wheat.

**Key words:** Wheat; *TaMYB35*; Programmed cell death; Male sterility

MYB (myeloblastosis) 类转录因子是高等植物中最大的转录因子 (transcription,TF) 家族之一, 参与调控多种生命活动, 如细胞形成、信号转导、生物和非生物胁迫响应等。*ZmMYB1* 是第一个在高等植物中发现的 MYB 类基因, 该基因参与了野生型玉米糊粉中色素的合成<sup>[1]</sup>。随着拟南芥基因组序列的发表, 植物 MYB 类转录因子有了系统性的研究<sup>[2]</sup>。植物 MYB 蛋白的特征是 N 端含有高度保守的 MYB 结构域, 这个结构域通常由 1-4 个不完全重复氨基酸序列(R)组成。根据含有 R 结构的种类和数量的不同, MYB 蛋白可分为 4 大类: 4R-MYB、R1R2R3-MYB、R2R3-MYB 和 MYB-related<sup>[3]</sup>。R 结构包含大约 52 个氨基酸, 每个氨基酸形成 3 个  $\alpha$  螺旋。每个重复序列的第二和第三个螺旋与 3 个规则间隔的色氨酸 (W) 残基构建一个螺旋-转角-螺旋(HTH)结构, 在 HTH 三维结构中形成疏水核心<sup>[4]</sup>。每个重复序列的第三个螺旋是“识别螺旋”, 它与插在主沟槽中的 DNA 直接结合<sup>[5]</sup>。R2R3-MYB 是 MYB 基因家族中最大的一类, N 端含有 2 个保守的 MYB 结构域<sup>[6]</sup>, C 端具有高度的可变性, 是转录激活功能域, 参与调控植物细胞发育、调节代谢等<sup>[7, 8]</sup>。

随着分子生物技术的发展, 越来越多的植物花器官发育关键基因被发掘, 调控机制的研究也日渐深入, 证实了 MYB 类转录因子参与调控花器官的形态建成<sup>[9]</sup>。MYB 转录因子通过调控绒毡层的形态及其细胞程序性死亡 (PCD)、花药开裂和光合产物的运输等影响开花时间、花型花色及花药的发育<sup>[10-12]</sup>。拟南芥中的 *AtMYB21*、*AtMYB24*、*AtMYB57* 通过与茉莉酸甲酯等激素相互作用或调节苯丙烷代谢途径控制木质素的合成进而调控花药开裂<sup>[13, 14]</sup>。DYT1、AMS、MS1 以及 R2R3-MYB 转录因子 MYB35 是拟南芥中一系列调控花粉壁和绒毡层发育的转录因子, 敲除这些基因产生的突变体特异性表现出绒毡层或花粉壁发育畸变<sup>[15, 16]</sup>。猕猴桃中的一个由 WD 重复蛋白、bHLH 和 R2R3-MYB 转录因子组成的复合物参与调控花青素的合成, 进而影

响花瓣形态和颜色<sup>[9]</sup>。水稻中的GAMYB转录因子通过控制GA信号转导影响开花诱导、花粉形成、花粉管伸长等过程<sup>[17,18]</sup>。小麦中的*TaMYB80*是一个花药发育相关转录因子，小麦绒毡层程序性死亡（PCD）发生在四分体后期/小孢子初期，*TaMYB80*在四分体/小孢子阶段的花药中表达量达到最高，之后小麦绒毡层程序性死亡（PCD）的启动也随之开始<sup>[19,20]</sup>。MYB类转录因子通过调控花药花粉发育影响植物育性<sup>[21]</sup>，利用该类转录因子创制雄性不育系可应用到杂种优势中，因此，研究该类转录因子具有重要的应用价值。

本研究根据拟南芥花药调控相关基因 *AtMYB35* 找到亲缘关系相近的小麦 MYB 序列信息，通过同源克隆获得小麦直系同源基因 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D*。分析表明，*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 蛋白结构中 N 端含有 2 个保守的 R 结构组成的 DNA 结合结构域，均为 R2R3-MYB 类转录因子。表达分析表明，*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 主要在减数分裂时期雄蕊中表达，小穗（除去雄蕊）中低表达，*TaMYB35A* 在籽粒中少量表达，其他组织基本不表达。*TaMYB35A* 在可育和不育环境下有显著的表达差异，为研究其对小麦雄性不育机理提供理论基础。

## 1、材料与方法

### 1.1 试验材料及其处理

本研究采用的小麦品种是：小麦恢复系品种太原 806；小麦不育系品种 BS366；普通六倍体小麦品种 JING411。试验所用种子均由北京市农林科学院杂交小麦工程技术研究中心提供。

北京海淀区种植的小麦不育系品种 BS366，普通六倍体小麦品种 JING411，小麦恢复系品种太原 806，在减数分裂期取植株各个部位包括根、茎、叶、雄蕊、小花（除雄蕊），在灌浆期完成前取籽粒，液氮冷冻，置于-80℃保存备用。

取北京海淀（可育环境）和河南邓州（不育环境）田间种植的小麦不育系品种 BS366 和普通六倍体小麦品种 JING411 减数分裂前期、二分体时期、四分体时期和小孢子期的雄蕊，液氮冷冻，置于-80℃保存备用。

### 1.2 提取 RNA 及合成 cDNA

利用 Trizol 法提取小麦不同组织器官的总 RNA。提取完成后测定 RNA 的 OD<sub>260/280</sub> 值，同时通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性，检测合格后置于-80℃冰箱保存备用。反转录反应使用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)试剂盒，PCR 仪上进行变性、退火反应。合成后的 cDNA 置于-20℃冰箱保存备用。

### 1.3 小麦 MYB 蛋白 TaMYB35 编码基因克隆

根据拟南芥上已发表的调控花药发育相关基因 *AtMYB35*，用 Gramene (<http://gramene.org/>)网站的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 进行生物序列同源性检索，选取相似度 35.71%的小麦基因序列及其同

源序列。根据染色体位置将其暂时命名为 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D*。根据下载的序列 *TraesCS4A02G113000.1* 及其同源序列 *TraesCS4B02G191200.1* 和 *TraesCS4D02G192400.1* 设计引物 *TaMYB35A-F*、*TaMYB35A-R*、*TaMYB35B-F*、*TaMYB35B-R*、*TaMYB35D-F* 和 *TaMYB35D-R* (表 1)。使用太原 806 的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。扩增体系 50 uL, 包括 2×Phanta Max Master Mix (Vazyme, 南京) 25 uL、上下游引物 (10 umol·L<sup>-1</sup>) 各 2 uL、模板 DNA (100 ng·L<sup>-1</sup>) 2 uL、ddH<sub>2</sub>O 19 uL。扩增程序: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 15 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的片段经胶回收纯化并克隆到 pEASY®-Blunt Cloning Kit (TransGen, 北京) 载体上, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 TOP10, 将菌液均匀的涂抹到含有卡那霉素 (浓度 100 ng/L) 的 LB 固体培养基上, 37°C 倒置培养 13-16 h 之后进行挑斑摇菌, 经菌落 PCR 鉴定后, 每个样品选取 3 个独立克隆进行测序 (北京六合华大基因公司)。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer name and sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Purpose
<i>TaMYB35A-F</i>	AAGGGGAGGGGAGGAGGGT	全长引物
<i>TaMYB35A-R</i>	TCAAACGAAAATGTGATGCCCTAAA	
<i>TaMYB35B-F</i>	TTGTAGAAGGGGAGGGGAAGGAG	
<i>TaMYB35B-R</i>	TCAAACGAAAATGTGATGCCCTAAA	
<i>TaMYB35D-F</i>	TTGTAGAAGGGGAGGGGAAGGA	
<i>TaMYB35D-R</i>	GTCCCAATGTAAGATATGTAACCT	
<i>TaMYB35A-qPCR-F</i>	CGCAGTCCTGAACCACCAC	荧光定量目的基因 引物
<i>TaMYB35A-qPCR-R</i>	CACCATCGGCTGCAATACTA	
<i>TaMYB35B-qPCR-F</i>	GCTGGTTCTCGAGCTATACATA	
<i>TaMYB35B-qPCR-R</i>	CAGGTAGTTGGGTACCTCAG	
<i>TaMYB35D-qPCR-F</i>	GGGACGGCATTTAAGCATATTT	
<i>TaMYB35D-qPCR-R</i>	ACGCTTAATAGCTCATCATCGA	
Actin-F	TACTCCCTCACAACAACCG	荧光定量内参引物
Actin-R	AGAACCTCCACTGAGAACAA	
<i>TaMYB35A-BD-F</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTC	转录激活引物
<i>TaMYB35A-BD-R</i>	TCAAACGAAAATGTGATGCCCTAAA	
<i>TaMYB35B-BD-F</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTC	
<i>TaMYB35B-BD-R</i>	TTGTAGAAGGGGAGGGGAAGGAG	
<i>TaMYB35D-BD-F</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTC	
<i>TaMYB35D-BD-R</i>	TTGTAGAAGGGGAGGGGAAGGAG	
<i>TaMYB35A-BD-F</i>	CCGCTGCAGGTCGACGGATCC	
<i>TaMYB35A-BD-R</i>	TCAAACGAAAATGTGATGCCCTAAA	
<i>TaMYB35B-BD-F</i>	CCGCTGCAGGTCGACGGATCC	
<i>TaMYB35B-BD-R</i>	TCAAACGAAAATGTGATGCCCTAAA	
<i>TaMYB35D-BD-F</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTC	
<i>TaMYB35D-BD-R</i>	TTGTAGAAGGGGAGGGGAAGGAG	
<i>TaMYB35D-BD-F</i>	CCGCTGCAGGTCGACGGATCC	
<i>TaMYB35D-BD-R</i>	CCGCTGCAGGTCGACGGATCC	

#### 1.4 *TaMYB35* 基因的生物信息学分析

将 *TaMYB35A* 的蛋白序列作为目标序列, 在 Ensembl (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 网站进行同源搜索, 获得野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*)、短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、水稻 (*Oryza sativa*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、玉米 (*Zea mays*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、大豆 (*Glycine max*) 和葡萄 (*Vitis vinifera*) 的同源蛋白序列, 并对以上蛋白序列在 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 中进行保守结构域分析, 使用 DNAMAN8 软件输出序列比对结果。使用 MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) 进行多序列比对分析 (参数使用网站默认参数), 并将比对结果导入 MEGA7.0 软件中, 使用邻接法和泊松校正模型创建系统进化树, bootstrap 值设置为 1000 次重复, 构建包含单子叶和双子叶植物的 9 个物种的 MYB 蛋白的系统进化树。利用 New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/>) 预测 *TaMYB35A*、*TaMYB35B*、*TaMYB35D* 基因上游 2 kb 左右至转录起始位点的启动子顺势作用元件。

#### 1.5 *TaMYB35* 基因的表达分析

利用 Wheat Expression Browser (<http://wheat-expression.com/>) 网站对小麦 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因的表达进行预测分析。根据 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因 cDNA 序列, 设计定量 PCR 引物 (表 1), 由北京六合华大基因科技有限公司合成。以小麦 Actin 为内参对照, 之前合成的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 分析。反应体系 20  $\mu$ L, 包括 10  $\mu$ L SYBR®Green Realtime PCR Master Mix、1  $\mu$ L primer#1 (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)、1  $\mu$ L primer #2 (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)、1  $\mu$ L Template DNA 和 7  $\mu$ L PCR grade water。反应程序为 95°C 2 min; 95°C 15 s, 54°C 30 s, 40 个循环, 溶解曲线分析为 54°C-95°C。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法进行数据计算, 基因的相对表达量使用 (平均值 $\pm$ 标准差) 表示。

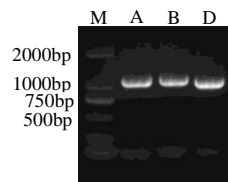
#### 1.6 *TaMYB35* 基因的转录激活特性分析

利用酵母系统分析 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 的转录激活特性。将小麦 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因构建到 pGBKT7 载体上 (表 1)。制备 AH109 酵母感受态细胞, 将构建好的质粒载体转化酵母感受态细胞, 转化成功后涂布在 SD/-Trp 缺陷固体培养基上, 30°C 倒置培养 2-3 d。挑取单克隆酵母菌落接种于 SD/-Trp 液体缺陷培养基中, 30°C 振荡培养 2-3 d, 提取酵母质粒 PCR 验证阳性结果。将上一步所得菌液稀释到 OD<sub>600</sub>=0.1, 分别点接到含有 X- $\alpha$ -gal 的 SD/-Trp、SD/-Trp/-His 缺陷固体培养基上, 30°C 倒置培养 2-3 d, 阳性对照为 pGBKT7-GAL4-SV40-T53。诱饵蛋白如果无转录激活则转化子不能在 SD/-Trp/-His 培养基上生长, 诱饵蛋白有转录激活则转化子可以在 SD/-Trp/-His 培养基上生长。以上载体和试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。

## 2 结果与分析

### 2.1 *TaMYB35* 基因的克隆及其编码蛋白的结构分析

以太原 806 的 cDNA 为模板, 利用引物 *TaMYB35A-F*/*TaMYB35A-R*、*TaMYB35B-F*/*TaMYB35B-R* 和 *TaMYB35D-F*/*TaMYB35D-R* (表 1) 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 得到三条大小为 1000bp 左右的单一条带 (图 1), 将目的片段纯化、克隆并测序。通过比较基因组区域 (<http://gramene.org/>) 和全长 cDNA 序列确定 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 的基因结构, 含有的编码序列长度分别为 921 bp、924 bp 和 924 bp, 预测其编码的蛋白长度分别为 307、308 和 308 个氨基酸。并通过 ClustalW 程序进行多序列比对和蛋白保守结构域预测 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) 发现其 N 端都具有两个不完全重复的 R 保守域, R 结构大约由 52 个氨基酸残基组成。推测 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因属于 R2R3 型 MYB 转录因子。



M: DL2000; A: *TaMYB35A* 扩增产物; B: *TaMYB35B* 扩增产物; D: *TaMYB35D* 扩增产物;

M: DL2000; A: *TaMYB35A* amplification product; B: *TaMYB35B* amplification product; D: *TaMYB35D* amplification product;

图 1 *TaMYB35* 扩增产物凝胶电泳

Fig.1 Amplicons of *TaMYB35* separated by electrophoresis

### 2.2 *TaMYB35* 基因的同源蛋白序列比对及进化分析

为了分析 *TaMYB35* 基因的系统进化关系, 将蛋白序列进行 Blastp 全长序列比对 (图 2), 分析表明, *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 蛋白序列的 N 端具有 2 个保守的 R 结构, 属于 R2R3 型 MYB 转录因子, 保守域中含有 4 个保守的色氨酸 (Trp, W) 残基, 第 3 个色氨酸被芳香族氨基酸酪氨酸 (Tyr, Y) 替代, 第 4 个色氨酸被苯丙氨酸 (Phe, F) 取代, 色氨酸是非极性疏水氨基酸, 等电点 5.89, 酪氨酸是极性亲水氨基酸, 等电点 5.66, 这些保守位点突变可能影响了 MYB 蛋白的功能。*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 的 C 端存在显著差异, 可能导致蛋白质互作的变化, 进而影响到细胞发育与形态建成、调节代谢、植物应激反应等方面。三维结构分析表明 (图 3), 每个 R 结构形成 3 个  $\alpha$  螺旋。每个重复序列的第二和第三个螺旋与 3 个规则间隔的色氨酸残基构建一个螺旋-转角-螺旋 (HTH) 结构, 在 HTH 三维结构中形成疏水核心。

*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 蛋白与来源于野生二粒小麦 (TRIDC4AG015600)、大麦 (HORVU4Hr1G055680)、短柄草 (BRADI\_1g65238v3)、水稻 (Os03g0296000)、玉米 (Zm00001d028777)、拟南芥 (MYB35/AT3G28470)、大豆 (KRH18536) 和葡萄 (VIT\_14s0066g02180) 的蛋白序列相似性分别为

100%、93.05%、62.67%、68.95%、60.50%、35.71%、31.20%、39.22%。所有蛋白 N 端均包含 MYB 结构域，位置基本相同，且高度保守。利用邻接法构建进化树（图 4），结果表明，单子叶和双子叶植物分属在不同分支上。TaMYB35A 与二粒小麦亲缘关系最相近，TaMYB35B 和 TaMYB35D 亲缘关系相近。

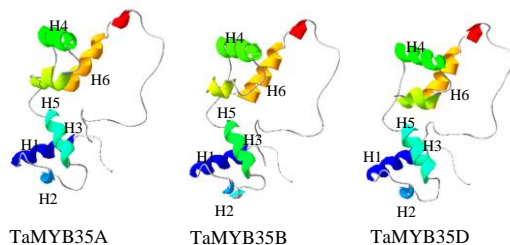


黑色直线代表 R2R3-MYB 结构域，红色框圈出分别被酪氨酸和苯丙氨酸替代的色氨酸位置

The black straight line represents the R2R3-MYB domain, the red box circles the positions of tryptophan replaced by tyrosine and phenylalanine

图 2 TaMYB35A、TaMYB35B、TaMYB35D 蛋白与其他 8 种植物 MYB 蛋白序列的比对

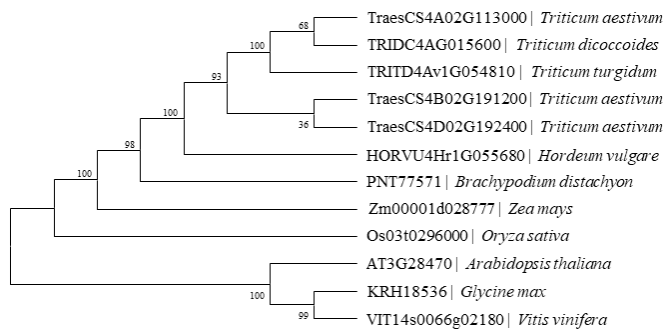
Fig. 2 Comparison of TaMYB35A、TaMYB35B、TaMYB35D protein and the eight MYB protein sequences in other plants



H1、H2、H3、H4、H5、H6 分别表示 R2R3-MYB 蛋白结构域中的 6 个螺旋结构  
H1, H2, H3, H4, H5 and H6 represent the six helices in the R2R3-MYB domain

图 3 TaMYB35A、TaMYB35B 和 TaMYB35D 三维结构模型

Fig.3 The three-dimensional structure fitting model diagram of TaMYB35A、TaMYB35B and TaMYB35D



邻接法构建的进化树，表示 TaMYB35A、TaMYB35B、TaMYB35D 与其他 9 种植物 MYB 蛋白系统进化关系。

The phylogenetic tree was constructed by the adjacency method, representing the evolution analysis of TaMYB35A、TaMYB35B、TaMYB35D and the nine MYB proteins in other plants.

图 4 TaMYB35A、TaMYB35B 和 TaMYB35D 系统进化关系

Fig.4 Phylogenetic analysis of TaMYB35A、TaMYB35B and TaMYB35D proteins

### 2.3 TaMYB35 基因启动子顺式作用预测分析

启动子具有转录起始的特异性，位于结构基因 5' 端上游，能够使 RNA 聚合酶与模板 DNA 准确结合，是调控基因准确表达和有效转录所必须的结构。为研究 TaMYB35A、TaMYB35B 和 TaMYB35D 基因的功能，对其上游约 2kb 左右至转录起始位点启动子顺式作用元件进行预测并统计（表 2），结果显示：三个基因均包含的启动子顺式作用元件有 GATA-box（叶绿素 a/b 结合蛋白顺式作用元件），DOFCOREZM（蛋白质结合所需的核位点元件），CAAT-box（启动子和增强子区共有顺式作用元件）和 ARR1AT（响应调节顺式作用元件），4 种光效应顺式作用元件 GT1-motif、ATCT-motif、G-box 和 GA-motif，2 种与茉莉酸甲酯(MeJA) 反应有关的顺式作用调节因子 CGTCA-motif 和 TGACG-motif 等。TaMYB35A 中有 16 个 Pollen1 Lelat52（花粉启动子功能结构的调控元件），远远高于 TaMYB35B 和 TaMYB35D 中的数量，只有 TaMYB35A 中含有的-



300ELEMENT 元件（胚乳特异性表达反应元件），推测 *TaMYB35A* 可能参与籽粒发育过程。

表 2 *TaMYB35* 基因 5'上游区预测的启动子调控元件

Table 2 Putative promoter sequences in 5' upstream regions of *TaMYB35*

名称 Name	功能 function	A	B	D
Pollen1 Lelat52	regulatory element in functional architecture of a pollen promoter	16	4	2
GATA-box	cis-acting element in chlorophyll a/b binding protein	10	11	10
DOFCOREZM	Core site required for binding of Dof proteins	17	12	13
GT1-motif	light responsive element	17	11	6
ARE	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	2	1	2
ATCT-motif	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1	4	1
CAAT-box	common cis-acting element in promoter and enhancer regions	12	11	14
CGTCA-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	3	2	2
G-box	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	1	5	8
GA-motif	part of a light responsive element	1	0	0
GC-motif	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility	2	3	3
MBS	MYB binding site involved in drought-inducibility	3	2	3
TATA-box	core promoter element around -30 of transcription start	3	1	0
TGACG-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	3	2	2
A-box	cis-acting regulatory element	0	1	1
ABRE	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	0	3	4
CCAAT-box	MYBHv1 binding site	4	8	13
ARR1AT	cis-acting element in response regulator	12	15	12
-300ELEMENT	endosperm-specific expression responsive element	4	0	0
WRKY	cis-acting element in a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway	4	6	9
SORLIP1	cis-acting element in promoter motifs involved in the network of phytochrome	3	7	6

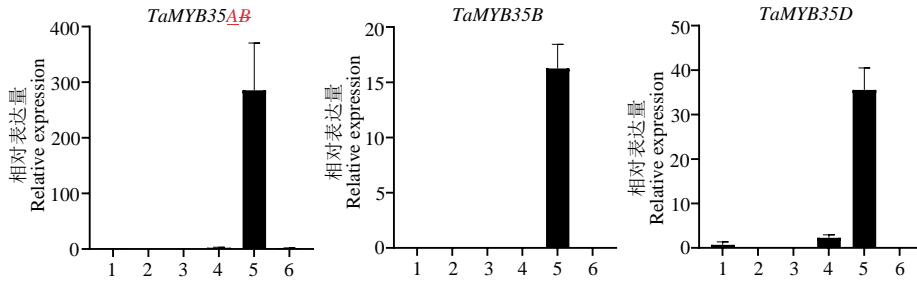
#### 2.4 *TaMYB35* 基因的组织特异性表达分析

利用 Wheat Expression Browser (<http://wheat-expression.com/>) 网站查找小麦转录组数据，对小麦 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因不同组织的表达分析表明：*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因主要在穗中表达，其他组织表达量极低（表 3）。使用 1.2 中保存的太原 806 cDNA 材料进行 RT-qPCR，结果表明：*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因在雄蕊中高度表达，但三个基因相对表达量有差异，*TaMYB35A* 和 *TaMYB35D* 在小穗（除去雄蕊）中有少量表达，*TaMYB35A* 在籽粒中少量表达，其他组织中表达量极低。此结果与小麦转录组数据库结果基本吻合（图 5）。

表 3 *TaMYB35* 组织表达预测分析

Table 3 Prediction of *TaMYB35* gene expression in different tissues

基因名称 Name	根 roots	叶/茎 leaves/shoots	穗 spike	籽粒 grain
<i>TaMYB35A</i>	0.016896	0.021455	7.916904	0.047102
<i>TaMYB35B</i>	0	0.009136	10.46649	0.008011
<i>TaMYB35D</i>	0.00449	0.002541	8.889307	0.0119



1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4: 小穗 (除去雄蕊); 5: 减数分裂时期的雄蕊; 6: 籽粒  
 1: Root; 2: Stem; 3: Leaf; 4: Spikelet (removal of stamen); 5: Stame at meiosis; 6: Seed

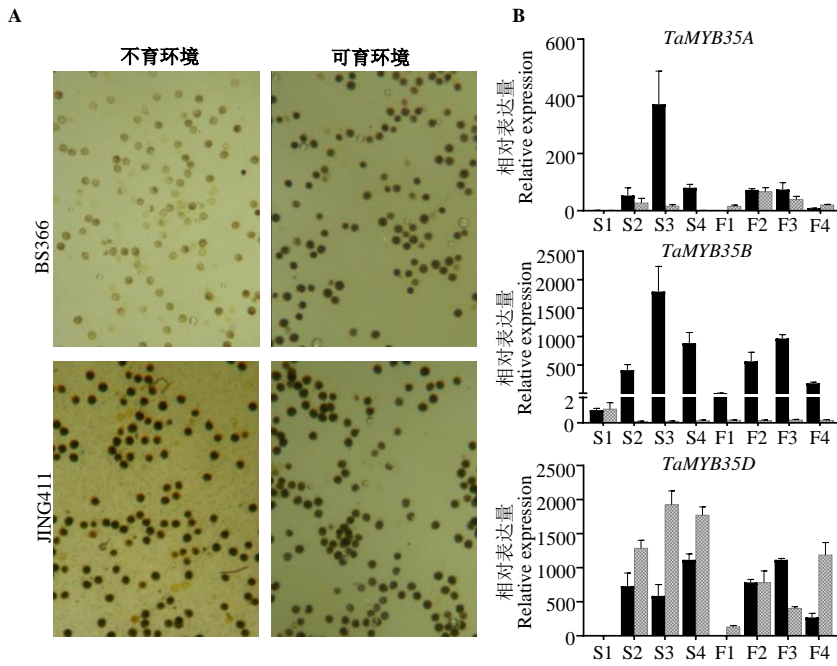
图5 小麦 *TaMYB35* 基因在不同器官中的相对表达量

Fig.5 Relative expression of *TaMYB35* gene in different organs in wheat

## 2.5 *TaMYB35* 基因在小麦温敏雄性不育系 BS366 中的表达分析

为进一步研究 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因在温敏雄性不育小麦中的表达模式，以小麦雄性不育系 BS366（高温可育，低温不育）和普通小麦 JING411（对照）为实验材料，可育和不育环境下分别取开花期的花粉，用 3:1 乙醇: 乙酸(vol/vol)混合液固定，用 2%碘-碘化钾对花粉进行染色，花粉碘染结果表明（图 6A），可育环境下，不育系 BS366 和普通小麦 JING411 大部分小孢子内淀粉达到充足状态，不育环境下，普通小麦 JING411 小孢子内淀粉正常累积，不育系 BS366 小孢子内淀粉积累异常。用碘-碘化钾染色法能够清晰观察到小麦小孢子内淀粉积累的情况，通过开花期花粉粒内淀粉的积累情况可以辅助判断花粉的育性。

利用荧光定量 PCR 技术，分析 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因在不育环境和可育环境下的表达特性。结果表明（图 6B），不育环境下，*TaMYB35A* 在温敏型不育系 BS366 四分体时期表达最高，随后降低，对照 JING411 无显著变化，可育环境下，*TaMYB35A* 在 BS366 和 JING411 表达趋势相近；在可育和不育环境下，*TaMYB35B* 在温敏型不育系 BS366 中表达趋势相似，均在四分体时期表达量达到最高值，其后降低，*TaMYB35B* 在对照 JING411 中基本不表达；在可育和不育环境下，*TaMYB35D* 在 BS366 和 JING411 表达趋势略有不同，但都有较高的相对表达量。



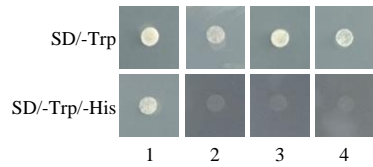
A: 不育和可育环境下花粉碘染结果; B:S1-S4 分别表示 BS366 和京 411 在不育环境下的减数分裂前期、二分体期、四分体期和小孢子期; F1-F4 分别表示 BS366 和京 411 在可育环境下的减数分裂前期、二分体期、四分体期和小孢子期  
A: Stain with I<sub>2</sub>-KI in sterile and fertile environment; B: S1-S4 indicate pre-meiosis stage, pre-meiosis, bipartite, tetrad and microspores in infertile environment; F1-F4 indicate pre-meiosis stage, pre-meiosis, bipartite, tetrad and microspores in fertile environment.

图 6 小麦 *TaMYB35* 基因不育和可育环境下在抽穗期四个阶段的相对表达量

Fig.6 Relative expression of *TaMYB35* in wheat at four stages of heading stage in fertile and infertile environment

## 2.6 *TaMYB35* 基因转录激活验证

为验证 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 是否具有转录激活功能, 本研究通过构建酵母表达载体对转录激活进行检验。结果表明, 在 SD/-Trp 培养基上, 阳性对照 pGBKT7-GAL4-SV40-T53, pGBKT7-TaMYB35A、pGBKT7-TaMYB35B 和 pGBKT7-TaMYB35D 正常生长。在 SD/-Trp/-His 培养基上, 阳性对照 pGBKT7-GAL4-SV40-T53 正常生长, pGBKT7-TaMYB35A、pGBKT7-TaMYB35B 和 pGBKT7-TaMYB35D 不生长, 说明 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 不具有转录激活活性(图 7)。转录激活是许多转录因子的特征, 具有转录激活结构域的转录因子可以直接激活靶基因的表达。



1: pGBKT7-GAL4-SV40-T53; 2: pGBKT7- TaMYB35A; 3: pGBKT7- TaMYB35B; 4: pGBKT7- TaMYB35D;

图 7 *TaMYB35* 转录激活验证

Fig. 7 transcriptional activation analysis of *TaMYB35*

### 3 讨论

本研究在小麦中发现的 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因编码的蛋白是 R2R3-MYB 类蛋白，是 MYB 家族第一大类，该类转录因子基因主要通过 MYB 结构域与启动子中的顺式作用元件(cis-acting element)结合，通过转录激活/抑制调控其靶基因的表达，对植物生长发育至关重要。在花发育转录调控通路上，MYB 是一类关键转录因子，通过多个途径来调控开花时间、花色、绒毡层的发育及小孢子的成熟等。*OsMYB80* 沉默导致水稻(*Oryza sativa*)中绒毡层发育异常，表现出绒毡层细胞提前解体现象，最终导致花粉败育<sup>[22]</sup>。

启动子顺式作用元件分析表明，三个基因均包含 4 种光周期响应元件 GT1-motif、ATCT-motif、G-box 和 GA-motif，光周期响应元件是光诱导型启动子必备的元件，通过特殊组合方式共同调控基因的表达<sup>[23]</sup>。三个基因均包含 2 种与茉莉酸甲酯反应有关的顺式作用调节因子 CGTCA-motif 和 TGACG-motif，茉莉酸甲酯对花药开裂具有诱导作用，MYB 类转录因子能通过与其与茉莉酸甲酯等激素相互作用调控花药开裂。研究发现，经过喷施茉莉酸甲酯，不育系花药开裂率增加，结实率显著增加，但这一措施对常规品种无显著影响<sup>[24]</sup>。*TaMYB35A* 中有 16 个 Pollen1 Lclat52 (花粉启动子功能结构的调控元件)，*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 中仅发现 2-4 个，暗示 *TaMYB35A* 可能与花药发育有密切关系。*TaMYB35A* 中含有-300ELEMENT 元件 (胚乳特异性表达反应元件)，而组织表达结果发现籽粒中 *TaMYB35A* 有少量表达，推测 *TaMYB35A* 还可能参与籽粒发育过程。顺式元件数量和种类的差异可能是造成该功能差异的原因，但不排除其他调控机制的存在，这些调控机制也能导致表达模式产生差异。

*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因在雄蕊中高度表达，推测 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 基因可能都参与小麦雄蕊发育调控过程。高等植物中，花药绒毡层细胞程序性死亡为花粉的发育提供营养，提前或延迟都会导致花粉败育。拟南芥中的绒毡层或花粉壁发育受转录因子 DYT1、AMS、MS1 和 R2R3-MYB 型 MYB 转录因子 *AtMYB35* 共同作用<sup>[25]</sup>，小麦绒毡程序性细胞死亡(PCD)发生在花药发育的四分体后期和小孢子早期之间<sup>[20]</sup>，推测 *TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 可能参与绒毡层或花粉壁发育调控过程。不育环境下，*TaMYB35A* 在不育系 BS366 中四分体时期的表达量远远高于 JING411，其他时期

表达趋势与对照 JING411 趋于一致，由此推测 *TaMYB35A* 基因可能是一个参与调控温敏不育的相关基因。*TaMYB35B* 在不育系 BS366 中表达趋势相似，均在四分体时期表达量达到最高值，但在对照 JING411 始终表达量极低，*TaMYB35B* 基因在不同品种雄蕊中的表达有差异，可能在进化过程中参与调控育性变化。*TaMYB35D* 在 BS366 和 JING411 表达趋势不同，但都有较高的相对表达量。*TaMYB35D* 是小麦花粉发育调控关键基因，但可能与 BS366 在不育环境下的雄蕊败育调控无关。*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 蛋白 N 端都含有高度保守蛋白序列，C 端不同的转录激活/抑制结构域可能解释了他们在可育和不育环境下的表达差异。转录因子分结合结构域和激活结构域，*TaMYB35A*、*TaMYB35B* 和 *TaMYB35D* 转录激活试验发现其本身不具有转录激活活性，可能需要通过与互作蛋白结合，进而激活转录活性行使其功能。雄性不育为作物杂种优势育种提供了极大的便利，以上发现为应用基因工程技术创建雄性不育系提供了备选基因。

设置了格式: 字体: 倾斜

设置了格式: 字体: 倾斜

设置了格式: 字体: 倾斜

#### 参考文献

- [1] PAZ-ARES J, GHOSAL D, WIENAND U, et al. The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators [J]. *Embo Journal*, 1987, 6(12): 3553-8.
- [2] STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5): 447-56.
- [3] AN Y, XIAOYAN D, WEN-HAO Z. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2541-56.
- [4] OGATA K, KANEI-ISHII C, SASAKI M, et al. The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1996, 3(2): 178-87.
- [5] JIA L, CLEGG M T, JIANG T. Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(2): 575-85.
- [6] XIAOLONG L, CHENG X, JIANG M L, et al. Genome-Wide Identification, Evolution and Functional Divergence of MYB Transcription Factors in Chinese White Pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Plant & Cell Physiology*, 4): 824.
- [7] KRANZ H D, DENEKAMP M, GRECO R, et al. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2010, 16(2): 263-76.
- [8] JIN H, MARTIN C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 41(5): 577-85.
- [9] FRASER L G, SEAL A G, MONTEFIORI M, et al. An R2R3 MYB transcription factor determines red petal colour in an *Actinidia* (kiwifruit) hybrid population [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 28.
- [10] HIGGINSON T, SONG F L, PARISH R W. AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2010, 35(2): 177-92.
- [11] 樊新萍, 牛西午. 拟南芥花药和花粉发育的基因调控 [J]. *山西农业科学*, 2013, 41(005): 506-10.  
FAN XP, NIU XW. Gene Regulation of *Arabidopsis thaliana* Anther and Pollen Development Process [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2013, 41(005): 506-10.
- [12] dsRNA silencing of an R2R3-MYB transcription factor affects flower cell shape in a *Dendrobium* hybrid [J]. *Bmc Plant Biology*, 2015, 15(1): 194.
- [13] SONG S, QI T, HUANG H, et al. The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(3): 1000-13.
- [14] CHENG H, SONG S, XIAO L, et al. Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(3): e1000440.
- [15] FERGUSON A C, PEARCE S, BAND L R, et al. Biphasic regulation of the transcription factor ABORTED MICROSPORES (AMS) is essential for tapetum

- and pollen development in Arabidopsis [J]. *New Phytologist*, 2017.
- [16] CHEN H, ZHU J, LI H, et al. Defective of Tapetum Development and Function1 (TDF1) is essential for tapetal development and plays a vital role in tapetum gene regulation network in Arabidopsis; proceedings of the International Conference on Arabidopsis Research, F, 2007 [C].
- [17] AYA K, UEGUCHI-TANAKA M, KONDO M, et al. Gibberellin Modulates Anther Development in Rice via the Transcriptional Regulation of GAMYB [J]. *THE PLANT CELL ONLINE*, 2009, 21(5): 1453-72.
- [18] CHOON-TAK, KWON, SUK-HWAN, et al. The Rice Floral Repressor Early flowering1 Affects Spikelet Fertility By Modulating Gibberellin Signaling [J]. *Rice* (New York, NY), 2015.
- [19] PHAN H A, LI S F, PARISH R W. MYB80, a regulator of tapetal and pollen development, is functionally conserved in crops [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(1-2): 171-83.
- [20] BROWNE R G, SYLVANA I, LI S F, et al. Anther Morphological Development and Stage Determination in *Triticum aestivum* [J]. *Frontiers in Plant ence*, 2018, 9(228-).
- [21] 王鹏科, 黄寿松. 小麦核型雄性不育杂种优势利用研究的现状与展望 [J]. *国外农学:麦类作物*, 1993, 000(002): 46-8.  
WANG KP, HUANG ST. Current Status and Prospect of Utilization of Heterosis in Wheat Karyotype Male Sterility [J]. *Agronomy abroad: wheat crops*, 1993, 000(002): 46-8.
- [22] PAN X, YAN W, CHANG Z, et al. OsMYB80 Regulates Anther Development and Pollen Fertility by Targeting Multiple Biological Pathways [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2020, (5): 5.
- [23] MANDE X, YAN L, ZHIQIANG Z, et al. Isolation and Characterization of a Green-Tissue Promoter from Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 2009.
- [24] 马骅. 茉莉酸甲酯(MeJA)诱导光温敏雄性不育小麦花药开裂的研究 [D]; 内蒙古农业大学, 2011.  
MA Y. Study on the Anther Dehiscence Induced by MeJA in Photoperiod-Temperature Sensitive Genic Male Sterile Wheat Lines [D]; Inner Mongolia Agricultural University, 2011.
- [25] ZHU J, LOU Y, XU X, et al. A Genetic Pathway for Tapetum Development and Function in Arabidopsis [J]. *植物学报(英文版)*, 2011, 11): 892-900.