

# 菊花 *CmMYB15-like* 基因抗旱性功能鉴定

史志坤, 张怡雪, 宋子燕, 张开明, 李永华, 李菲

(河南农业大学风景园林与艺术学院/郑州市特色景观植物资源开发与利用重点实验室, 郑州 450002)

**摘要:** 菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) 具有重要的观赏与经济价值, 干旱会降低其产量和品质, 产生巨大经济损失。挖掘菊花中的抗旱基因, 培育抗旱品种是解决上述问题的关键之一。MYB 转录因子参与植物生长发育和响应非生物胁迫。本研究于拟南芥中异源表达菊花 *CmMYB15-like* 基因, 通过观察干旱胁迫后的表型变化, 测定相对含水量 (Relative Water Content, RWC)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、可溶性糖 (Soluble Sugars, SS)、超氧化物歧化酶 (Super Oxide Dismutase, SOD) 活性、木质素含量等指标, 探究该基因的抗旱性功能。结果显示, 较野生型相比, 过表达 *CmMYB15-like* 提高了干旱胁迫后植株的 RWC、SS 含量以及 SOD 酶活性, 降低了 MDA 含量, 增加了主根长度和侧根数目。此外, *AtPAL2*、*AtPAL4*、*At4CL1* 等木质素合成相关基因上调, 木质素含量高于野生型。这些结果表明, *CmMYB15-like* 参与拟南芥干旱胁迫反应, 为菊花抗旱基因资源筛选和品种培育提供一定理论依据。

**关键词:** 菊花; MYB 转录因子; *CmMYB15-like*; 拟南芥; 抗旱

## Drought Resistance Function Identification of *Chrysanthemum CmMYB15-like* Gene

SHI Zhikun, ZHANG Yixue, SONG Ziyang, ZHANG Kaiming, LI Yonghua, LI Fei

(College of Landscape Architecture and Art, Henan Agricultural University/Zhengzhou Key Laboratory for Development and Utilization of Characteristic Landscape Plant Resources, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** *Chrysanthemum morifolium* has important ornamental and economic value. Drought reduces its yield and quality, resulting in great economic losses. Digging up drought-resistant genes in chrysanthemum and breeding drought-tolerant varieties is one of the keys to solving the above problems. MYB transcription factors are involved in plant growth and development and response to abiotic stress. This study involved the heterologous expression of the *CmMYB15-like* gene from chrysanthemum in *Arabidopsis*, followed by the observation of phenotypic changes under drought stress. The investigation of drought resistance function of this gene included measurement of relative water content (RWC), malondialdehyde (MDA) levels, soluble

收稿日期: 2024-05-20

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为植物逆境胁迫, E-mail:1056187354@qq.com

通信作者: 李菲, 研究方向为园林植物逆境生理与分子生物学, E-mail:lifei92@henau.edu.cn

基金项目: 中国博士后科学基金 (2022M721037); 国家自然科学基金青年项目 (32302597); 河南省自然科学基金青年项目 (232300420187)

Foundation projects: China Postdoctoral Science Foundation (2022M721037); National Natural Science Foundation of China Youth Project (32302597); Youth Project of Natural Science Foundation of Henan Province (232300420187)

sugars (SS), superoxide dismutase (SOD) activity, and lignin content. The results showed that overexpression of *CmMYB15-like* increased RWC and SS contents and SOD activity, decreased MDA content, and increased taproot length and lateral root number after drought stress, compared with the wild type. In addition, the lignin synthesis-related genes such as *AtPAL2*, *AtPAL4* and *At4CL1* were up-regulated, and the lignin content was higher than that in the wild type. These results indicate that *CmMYB15-like* is involved in the drought stress response of *Arabidopsis Thaliana*, which provides a theoretical basis for the selection of drought-resistant gene resources and breeding of chrysanthemum cultivars.

**Key words:** Chrysanthemum; MYB Transcription Factor; *CmMYB15-like*; *Arabidopsis*; Drought Resisting

菊花是中国十大传统名花和世界四大切花之一，生长发育经常受到环境胁迫，其中干旱胁迫是制约菊花品质及产值的重要因素之一。在严重干旱胁迫下，菊花会出现萎蔫、失绿等变化，持续时间过长还会导致植株死亡。通过挖掘菊花中的抗旱性基因，选育抗旱性品种是解决上述问题的关键。MYB 转录因子由其 N 端保守的 MYB 结构域命名，以结构域中不完全重复序列的多少以及位置分为 1R-MYB (MYB-related)、2R-MYB (R2R3-MYB)、3R-MYB (R1R2R3-MYB) 和 4R-MYB 四个亚类，植物中以 2R-MYB 亚家族最为常见<sup>[1,2]</sup>。随着基因组、转录组测序的深入，越来越多的 MYB 转录因子被挖掘，且大量的研究表明 MYB 转录因子参与调控植物的生长发育、逆境响应及激素信号调节等方面<sup>[3]</sup>。如棕榈槭 *ApMYB77* 过表达拟南芥，通过上调 ABA 胁迫相关基因 *AtNAC072*、*AtDREB2A*、*AtERD1*、*AtMYB2*、*AtRD20*、*AtRD29A* 的表达，可提高拟南芥的抗旱性<sup>[4]</sup>。山荆子 *MbMYB108* 在拟南芥中表达，提高了对活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的清除能力、增加了脯氨酸和叶绿素含量，使拟南芥的抗旱性增强<sup>[5]</sup>。苜蓿 *MsMYBH* 直接与 *MsMCP1*、*MsMCP2*、*MsPRX1A* 和 *MsCARCAB* 启动子结合，提高其表达，增强其保水能力、光合作用效率以及清除过量的 ROS 以应对干旱<sup>[6]</sup>。这些研究结果表明 MYB 家族转录因子可通过多种方式调节植物抗旱性。

MYB15 作为 MYB 家族蛋白成员之一，目前有关研究大多集中在抗病、抗蚜以及耐寒性等方面，如拟南芥 SG2-R2R3-MYB 型转录因子 MYB15 通过提高体内木质素含量介导木质化和基础免疫<sup>[7]</sup>。番茄 SIMYB15 和 HY5 协同作用，激活 *CBF1*、*CBF2* 和 *CBF3* 的表达，正调控其耐寒性<sup>[8]</sup>。菊花 *CmMYB15* 结合 AC 元件，通过提高木质素含量来提高菊花的抗蚜性<sup>[9]</sup>。我们前期研究发现一个新的菊花 MYB 转录因子 *CmMYB15-like*，同源于 *AtMYB15*，通过结合 *Cm4CL2* 启动子上的 AC-I (GGTAGGT)、AC-II (ACCAACC) 元件激活其表达，调控木质素积累，增加细胞壁厚度进而提高菊花抗蚜性<sup>[10]</sup>。但关于 *CmMYB15-like* 调控植物抗旱性的作用机制未见报道。本研究发现菊花 *CmMYB15-like* 基因响应干旱胁迫诱导表达，因此异源转化拟南芥研究其抗旱性功能。将 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥后进行干旱胁迫，结合存活率，相对含水量、可溶性糖含量、超氧化物歧化酶活性，丙二醛、木质素含量等，明晰 *CmMYB15-like* 提高拟南芥抗旱性的作用机制，为菊花抗旱资源的筛选以及品种培育提供理论支持。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 试验材料

植物试验材料为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) ‘神马’。

## 1.2 表达分析

选用生长情况良好且大小一致的生长有 6-8 片真叶的盆栽菊花苗，生长环境为白天 16 h/23℃，夜间 8 h/22℃，光照 15000 Lx，对其进行 7 d 的正常浇水培养。用 200 g/L PEG-6000 处理菊花苗，模拟干旱 (DR) 胁迫处理，该方法采用灌根法进行<sup>[11]</sup>。在胁迫后 0、1、3、6、9 h 取第三片完全展开叶，液氮速冻后进行研磨，提取 RNA，将 RNA 反转录为 cDNA，以其为模板进行 RT-qPCR 反应，用于 *CmMYB15-like* 干旱胁迫响应分析，对未进行干旱处理的对照组 (CK) 进行均一化处理。引物序列 qRT-*CmMYB15-like*-F: TCTACCTCTAACCAACCATC; qRT-*CmMYB15-like*-R: CCTTTATTATCACCGTTTCC，试验进行 3 次生物学重复。

## 1.3 植物表达载体构建

转拟南芥过表达载体详细构建过程见 Li 等<sup>[10]</sup>。

## 1.4 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥创制

用花序浸染法转化野生型拟南芥，在含有潮霉素的培养基筛选转基因抗性植物，采用鉴定引物 SP-F: GAACCAATAGTTTCGCAATG; pMDC43-R: ACGATCGGGAAATTCTGA 通过 PCR 法鉴定转基因阳性苗。经过自交和抗性筛选得到 T3 代纯合转基因拟南芥，同时对获得转基因拟南芥进行 RT-PCR 半定量检测，引物序列 qRT-*CmMYB15-like*-F:TCTACCTCTAACCAACCATC; qRT-*CmMYB15-like*-R:CCTTTATTATCACCGTTTCC，以 *Actin* 内参基因为对照，稳定遗传转化实验在南京农业大学菊花遗传育种与分子生物学实验室完成。

## 1.5 自然干旱抗性表型鉴定

将在 MS 固体培养基上生长有 4 片真叶的转基因和野生型拟南芥幼苗移栽到黑色小方盆 (7 cm x 7 cm) (营养土:蛭石=2:1) 中，在人工气候培养箱 (白天 16 h/23℃，夜间 8 h/22℃，光照 15000 Lx) 中培养 28 d，期间正常浇水。选取生长状况良好的转基因和野生型拟南芥盆栽苗进行 14 d 自然干旱处理，后复水 3 d，观察植株表型，并拍照记录。分别采集干旱胁迫处理前和处理 14 d 后的野生型及 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥地上部的叶片，用于测定相关生理指标。采集各株系距基部 1 cm 茎组织，用于测定木质素合成相关基因的表达量，以及各株系地上部茎组织，用于测定木质素总含量，每次试验共 30 棵苗，试验进行 3 次生物学重复。

## 1.6 生理生化指标测定

相对含水量的测定参考 Xiao 等<sup>[12]</sup>描述的方法；超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定采用氮蓝四唑 (NBT)

法<sup>[13]</sup>测定；丙二醛（MDA）含量测定采用硫代巴比妥酸比色法<sup>[13]</sup>；可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法<sup>[14]</sup>测定。

### 1.7 幼苗子叶与根的形态学观察

采用 200 mmol/L 甘露醇<sup>[15]</sup>模拟干旱胁迫处理，将消毒后的转基因和野生型拟南芥种子分别播种到 MS 和 200 mmol/L 甘露醇培养基上，避光放置于 4°C 冰箱春化 2 d，后转入（白天 16 h/23°C，夜间 8 h/22°C，光照 15000 Lx）无菌光照培养箱中培养 7 d，观察各株系生长状况。

将消毒后的转基因和野生型拟南芥种子播种到 MS 固体培养基上，避光放置于 4°C 冰箱春化 2 d，后转入（白天 16 h/23°C，夜间 8 h/22°C，光照 15000 Lx）无菌光照培养箱中培养 4 d，选取根长一致的幼苗移到垂直放置的 200 mmol/L 甘露醇培养基上处理 7 d，统计不同株系的主根长度（Image J 测定）及一级侧根数目。

### 1.8 木质素合成相关基因的表达检测

拟南芥以 Actin 作为内参基因，采用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）检测木质素合成相关基因 *AtPAL1*、*AtPAL2*、*AtPAL4*、*AtCAH*、*At4CL1*、*AtHCT*、*AtC3H1*、*AtCCoAOMT*、*AtCCR1*、*AtF5H*、*AtCOMT*、*AtCAD5*<sup>[16,17]</sup> 的表达水平，以野生型相同部位茎组织作为对照，试验进行 3 次生物学重复。

### 1.9 木质素含量检测

木质素总含量测定采用木质素含量检测试剂盒（BC4200-50T/48S，Solarbio）；木质素染色：使用震动切片机（Leica，美国）对各株系茎组织进行切片，切片厚度 100 μm，于盐酸-间苯三酚溶液（间苯三酚 0.1 g，加乙醇 1 mL，再加盐酸 9 mL，混合均匀，现配现用）中浸泡 5 min 后，置于载玻片上并于体式显微镜（Leica，美国）下观察拍照。每个株系观察 10 棵。

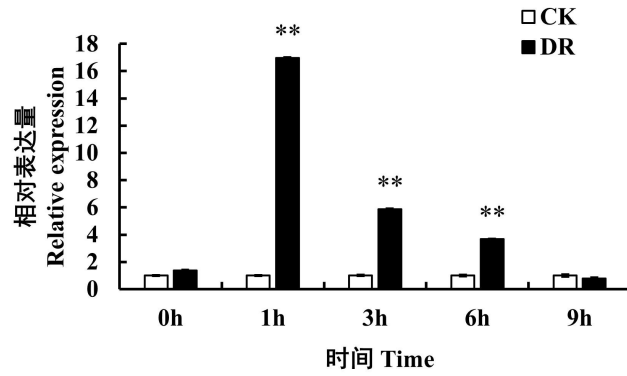
### 1.10 数据处理

使用 SPSS 22.0、Microsoft Excel 2021 和 Origin 2019 进行数据处理和制图及显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达分析

为探究 *CmMYB15-like* 基因是否与干旱胁迫相关，分析了 *CmMYB15-like* 响应干旱的表达特性。结果显示，干旱胁迫处理诱导 *CmMYB15-like* 上调表达，在 1 h 达到最高，为对照组的 16.9 倍（图 1），推测 *CmMYB15-like* 可能与菊花干旱胁迫应答有关。



CK 表示正常浇水；DR 表示干旱处理；\*\*表示在  $P<0.01$  显著差异

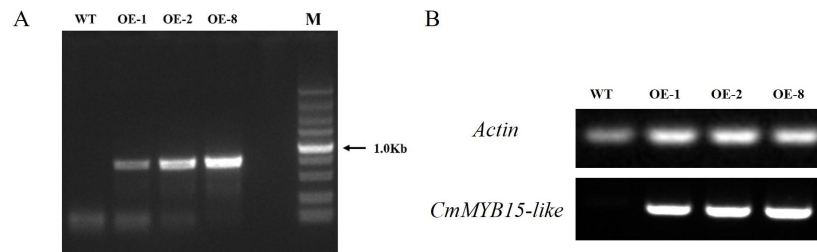
CK means normal watering; DR Stands for drought treatment;\*\* indicate significant difference at  $P<0.01$  level

图 1 *CmMYB15-like* 在干旱胁迫下的表达模式分析

Fig. 1 Analysis of expression patterns of *CmMYB15-like* under drought stress

## 2.2 *CmMYB15-like* 过表达转基因拟南芥

利用花序浸染法转化野生型拟南芥，在含有潮霉素的培养基上进行两代筛选，在 T2 代种子中选择全抗植株，进行阳性植株鉴定，如图所示（图 2A），继续培养得到 T3 代 OE-1、OE-2、OE-8 三个纯合株系，进行 RT-PCR 半定量鉴定，结果如图所示（图 2B）。



A: T2 代 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥鉴定；B: *CmMYB15-like* 转基因拟南芥半定量鉴定；M: DL5000 DNA marker, WT: 野生型植株；OE-1、

OE-2、OE-8: 3 个 *CmMYB15-like* 转基因株系

A: Identification of T2 generation *CmMYB15-like* transgenic Arabidopsis ; B: Semi-quantitative identification of *CmMYB15-like* transgenic Arabidopsis ;

M: DL5000 DNA marker, WT: wild type plant; OE-1、OE-2、OE-8: Three *CmMYB15-like* transgenic strains

图 2 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥的鉴定

Fig. 2 Identification of *CmMYB15-like* transgenic Arabidopsis

## 2.3 *CmMYB15-like* 异源转化拟南芥抗旱表型鉴定

为了直观的对转基因拟南芥和野生型进行抗旱性评估，于盆栽条件下自然失水 14 d 后进行表型观察。失水胁迫处理前，野生型和过表达株系生长状况良好，胁迫处理后，野生型叶片失水严重、叶片萎蔫发黄，受胁迫损伤程度更深（图 3），其存活率、相对含水量相较于过表达株系显著降低（图 4），表明转基因植

株可以通过减少水分散失的方式来提高植株的抗旱性。

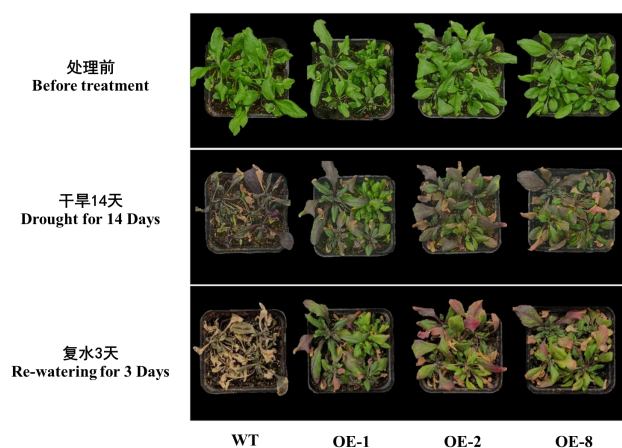
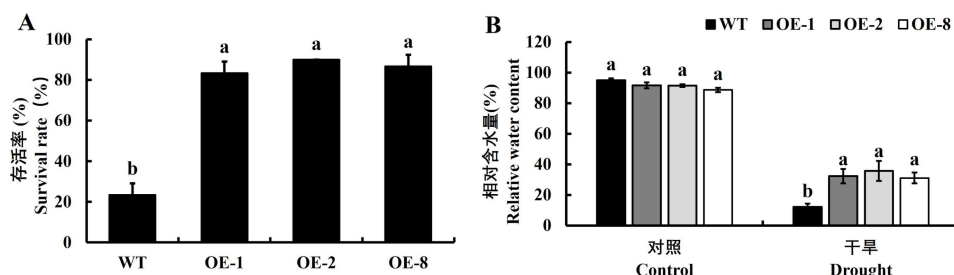


图 3 野生型与 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥抗旱性表型鉴定

Fig 3. Phenotypic identification of drought resistance of *Arabidopsis thaliana* overexpressed by wild type and *CmMYB15-like*



A: 自然失水 14 d 各株系存活率统计; B: 不同处理下各株系相对含水量测定; 不同小写字母表示显著性差异,  $P < 0.05$ , 误差线代表生物学重复之间的标准误,  $n=3$ 。下同

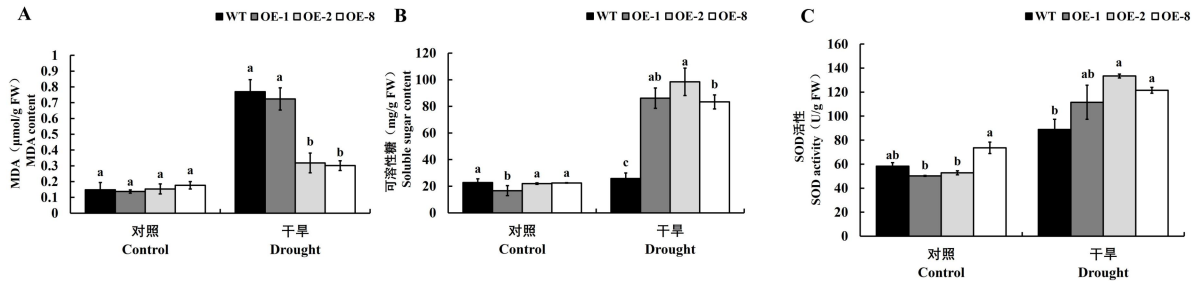
A: Survival rate statistics of each strain after 14 days of natural water loss; B: Determination of relative water content of each strain under different treatments; Different lowercase letters indicate significant differences,  $P < 0.05$ , and error line represents biological duplication,  $n=3$ . The same as below.

图 4 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥在干旱胁迫下的存活率及相对含水量

Fig. 4 Survival rate and relative water content of *CmMYB15-like* transgenic *Arabidopsis thaliana* under drought stress

## 2.4 过表达 *CmMYB15-like* 对生理指标的影响

为进一步分析过表达 *CmMYB15-like* 提高拟南芥抗旱性的原因, 分析了各株系在胁迫处理前后的 MDA、SS 含量及 SOD 活性变化。结果显示, 干旱胁迫前 MDA 含量、SOD 活性与野生型相比无显著性差异, OE-1 株系 SS 含量较野生型显著性降低。在干旱胁迫后, *CmMYB15-like* 转基因株系 OE-1、OE-2、OE-8 的 MDA 含量分别为 0.72、0.31、0.3  $\mu\text{mol/g}$ , 较野生型分别减少了 7%、61%、59% (图 5A); 可溶性糖含量分别为 86.16、98.4、83.36  $\text{mg/g}$ , 较野生型分别增加了 233%、281%、222% (图 5B); SOD 活性分别为 111.55、130.45、119.92  $\text{U/g}$ , 较野生型分别增加了 30%、53%、40% (图 5C)。表明过表达 *CmMYB15-like* 通过降低植株体内 MDA 含量, 增加 SS 含量、SOD 活性来减少胁迫条件下的 ROS 积累, 缓解氧化损伤, 同时调节渗透平衡, 减少水分的流失。



A: MDA 含量; B: SS 含量; C: SOD 活性

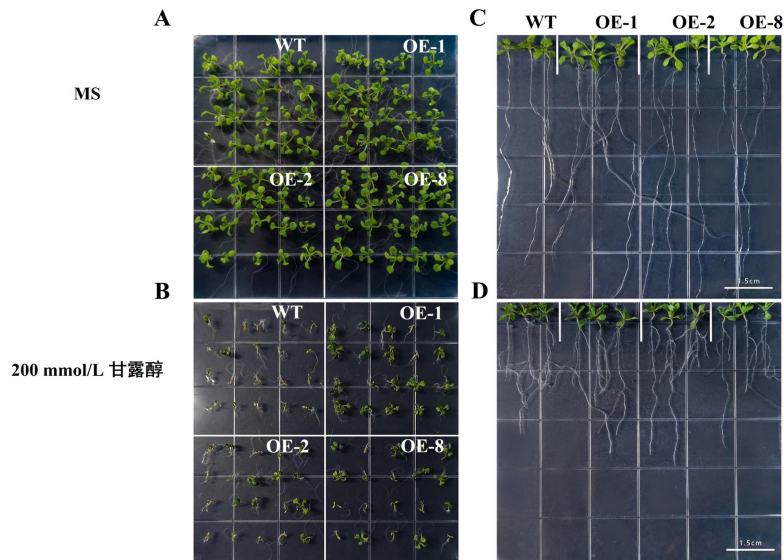
A: MDA content; B: soluble sugar content; C: SOD activity

图 5 干旱处理前后野生型和 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥植株生理指标测定

Fig. 5 Physiological indices of *Arabidopsis thaliana* plants with wild type and *CmMYB15-like* overexpression before and after drought treatment

## 2.5 过表达 *CmMYB15-like* 对主根长和一级侧根数量的影响

为了观测过表达 *CmMYB15-like* 对拟南芥地下部分形态的影响，进一步分析 *CmMYB15-like* 如何提高植株的抗旱性，对植株的根系生长情况进行观察。在 MS 培养基中，*CmMYB15-like* 转基因株系较野生型相比，其生长状况（图 6A、C）、主根长度无显著性差异（图 7A），但一级侧根数显著增加（图 7B），分别为野生型的 4.6、3.6、3.6 倍。在 200 mmol/L 甘露醇培养基中，*CmMYB15-like* 转基因株系生长状况明显强于野生型（图 6B、D）。数据统计发现，在 200 mmol/L 甘露醇处理下，*CmMYB15-like* 转基因株系 OE-1、OE-2 的主根长度分别为野生型的 2.1、2.2 倍，但 OE-8 株系主根长度与野生型相比无显著性差异（图 7A），OE-1、OE-2、OE-8 的一级侧根数目分别为野生型的 2.1、2.3、2.0 倍（图 7B）。表明过表达 *CmMYB15-like* 在一定程度上通过促进主根长度与增加一级侧根数量来增强植株地下部的吸水能力，提高植株的抗旱性。

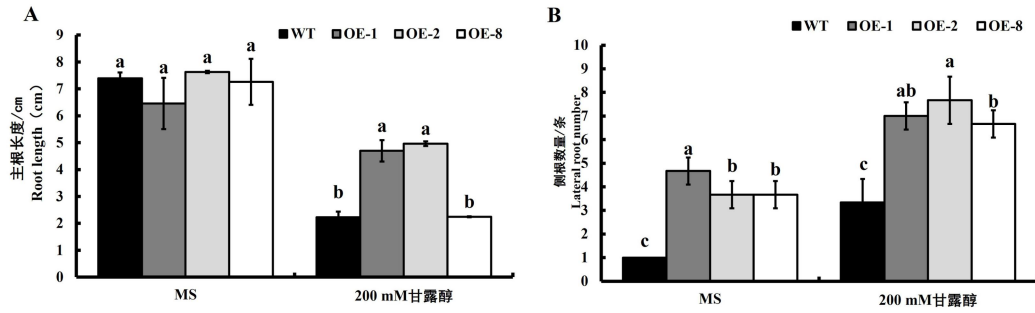


A: MS 培养基生长 7 d 表型; B: 200 mmol/L 甘露醇培养基生长 7 d 表型; C: MS 培养基生长 7 d 根长及侧根; D: 200 mmol/L 甘露醇生长 7 d 根长及侧根

A: MS medium growth for 7 days phenotype; B: 200 mmol/L mannitol medium growth phenotype for 7 days; C: Root length and lateral root were grown on MS medium for 7 days; D: 200 mmol/L mannitol growth for 7 days root length and lateral roots

图 6 甘露醇处理对野生型与 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥生长状况及根系形态的影响

Fig. 6 Effects of mannitol treatment on root morphology, taproot length and lateral root number of wild type and *CmMYB15-like* overexpressed *Arabidopsis thaliana*



A: 不同处理各株系主根长度统计; B: 不同处理各株系侧根数目统计

A: Statistics of taproot length of different strains under different treatments; B: Statistics on the number of lateral roots of each strain under different treatments

图 7 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥在甘露醇板上的主根长度及侧根数目

Fig. 7 Taproot length and lateral root number of *CmMYB15-like* transgenic *Arabidopsis thaliana* on mannitol plate

## 2.6 木质素生物合成路径基因表达量检测

在前期的研究中发现, 过表达 *CmMYB15-like* 基因可以提高菊花体内的木质素含量<sup>[10]</sup>, 并且有研究报道, 木质素含量增加可提高植株抗旱性<sup>[18]</sup>. 本研究采用 RT-qPCR 对木质素生物合成路径基因的表达进行了检测, 定量结果显示, *CmMYB15-like* 转基因株系 OE-1、OE-2、OE-8 体内的木质素生物合成路径基因的表达量都出现不同程度的上调, 其中 *AtPAL2*、*AtPAL4*、*At4CL1*、*AtHCT*、*AtCCR1*、*AtF5H*、*AtCOMT* 的基因表达量较野生型显著性升高 (图 8), 表明过表达 *CmMYB15-like* 提高了木质素生物合成路径基因的表达。

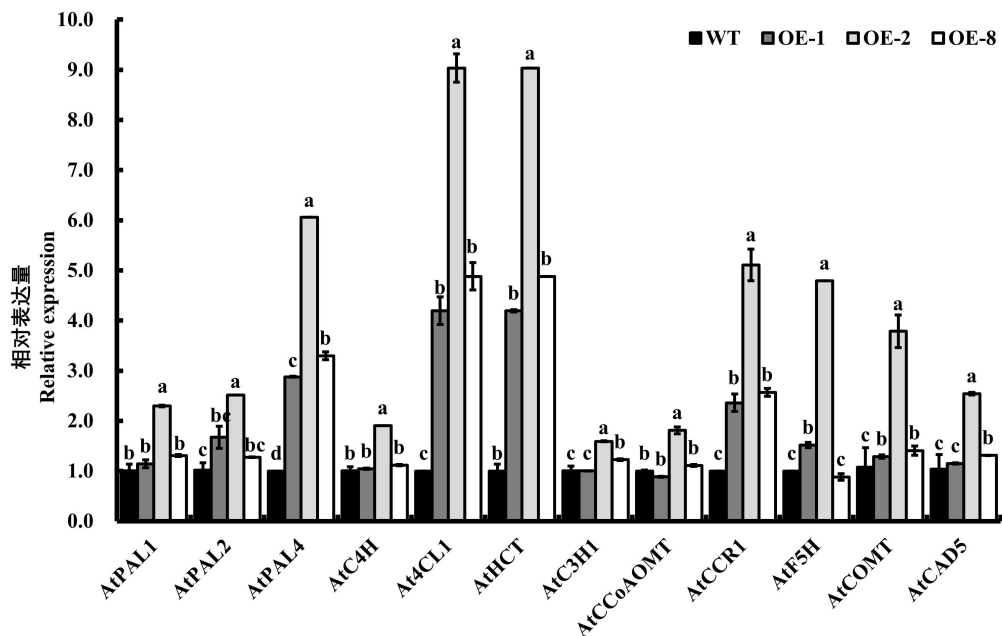


图 8 木质素生物合成路径基因表达量

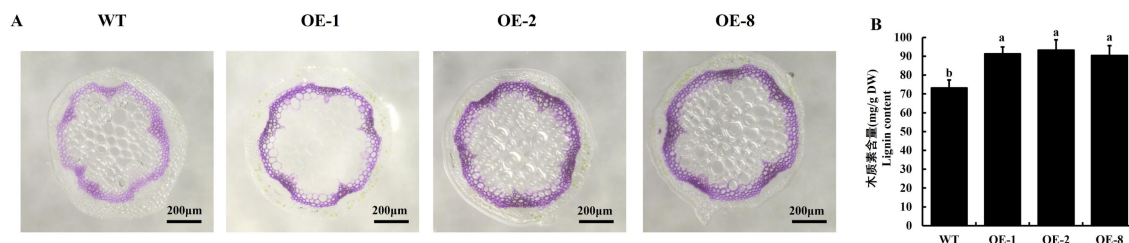
Fig. 8 Gene expression of lignin biosynthesis pathway

## 2.7 过表达 *CmMYB15-like* 提高木质素含量

采集野生型及 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥植株基部茎组织部位进行盐酸-间苯三酚染色观察分析, 其



结果显示, *CmMYB15-like* 转基因过表达株系 OE-1、OE-2、OE-8 中木质部着色程度较野生型明显加深 (图 9A)。木质素含量测定结果表明, *CmMYB15-like* 转基因株系 OE-1、OE-2、OE-8 中木质素含量分别为 91.30、93.23、90.36 mg/g, 较野生型分别增加了 25%、27%、24% (图 9B), 表明过表达 *CmMYB15-like* 提高了植株体内木质素含量。



A: 不同植株中茎组织的木质素沉积,标尺代表 200 μm; B: 不同植株中茎组织的木质素含量

A: The lignin deposition in stem tissue of different plants, the ruler represents 200 μm; B: The lignin content in stem tissues of different plants

图 9 野生型与 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥木质素含量

Fig. 9 Arabidopsis lignin content overexpressed by wild type and *CmMYB15-like*

### 3 讨论

目前研究表明, 干旱胁迫是影响植物正常生长的主要因素之一, 植物面对胁迫采取的防御措施大多数与自身内部的基因调控有关, 其中 MYB 转录因子是植物在干旱防御体系中非常重要的一类蛋白质。如小麦 *TaODORANT1* 过表达降低了 ROS 的积累, 并且上调胁迫相关基因的表达, 提高了烟草的抗旱性<sup>[19]</sup>; 棉花 *GhMYB36* 过表达促进了植物体内抗氧化酶活性, 并且直接结合 *PR1* 基因, 上调 *LTP4*、*PR2*、*ABR*、*PR1* 干旱胁迫相关基因的表达, 来增强棉花和拟南芥抗旱性<sup>[20]</sup>; 白桦 *PbrMYB21* 过表达降低 ROS 的含量, 并且直接结合精氨酸脱羧酶 (ADC) 基因, 提高游离多胺含量, 提高其抗旱性<sup>[21]</sup>。本研究以稳定遗传转化获得的 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥为基础, 研究发现异源表达 *CmMYB15-like* 可以提高拟南芥的抗旱性。

#### 3.1 *CmMYB15-like* 通过提高活性氧清除能力增强植株抗旱性

丙二醛 (MDA) 是植物细胞膜脂过氧化的重要指标之一, 可作为干旱指标来评估质膜损伤程度和植物对干旱胁迫的耐受能力。有研究发现苦荞 *FtMYB13*、*FtMYB41* 转化拟南芥, 过表达植株 MDA 含量降低, 过氧化物酶活性增加, 转基因植物的抗旱性显著增加<sup>[22,23]</sup>。本研究发现干旱胁迫下, 转基因株系 OE-2、OE-8 的 MDA 含量较野生型显著减少 (图 5A)。SOD、POD、CAT 是植物抗氧化体系中重要的抗氧化酶, 也是衡量植物抗旱性强弱的重要生理指标。如, 棉花中沉默 *GhMYB3* 显著降低了干旱胁迫下植物体内 ROS 的积累, 且 SOD、POD、CAT 活性显著增加, 提高了棉花的抗旱性<sup>[24]</sup>, 野生大麦 *HvbZIP21*、玉米 *ZmHsf28* 过表达提高 SOD、POD、CAT 活性, 以应对干旱<sup>[25,26]</sup>。SOD 活性测定结果表明, 过表达 *CmMYB15-like* 显著提高了植株干旱胁迫下的 SOD 活性 (图 5C)。表明过表达 *CmMYB15-like* 可以提高拟南芥的活性氧清除能力及细胞膜的抗氧化能力。

### 3.2 *CmMYB15-like* 通过提高植株渗透调节能力增强植株抗旱性

可溶性糖作为一种调节渗透压的重要溶质，在植物受到干旱胁迫时，其含量会增加，来降低体内的渗透势，进而抵抗胁迫伤害<sup>[27,28]</sup>。花生 *AhMYB44* 过表达提高了体内可溶性糖、脯氨酸含量，增强了植物耐旱性<sup>[29]</sup>。可溶性糖含量测定结果表明，干旱胁迫下过表达 *CmMYB15-like* 显著提高了植株体内可溶性糖含量（图 5B），表明过表达 *CmMYB15-like* 提高了植株细胞膜的稳定性，有利于增强植株抗旱性。

### 3.3 *CmMYB15-like* 通过促进植株根系的生长增强植株的抗旱性

有研究表明植物在干旱条件下会通过改变根系的形态来抵御干旱胁迫带来的伤害<sup>[30]</sup>。本实验利用甘露醇模拟干旱胁迫，与野生型相比，*CmMYB15-like* 过表达株系的主根长度与侧根数目显著性增加。和对照组相比，干旱胁迫在一定程度上促进了拟南芥根系的生长，但干旱不是促进拟南芥侧根生长的主要原因，拟南芥侧根数目的显著性增加主要是过表达 *CmMYB15-like* 基因，从而提高了拟南芥的抗旱性。*CmMYB15-like* 过表达拟南芥抗旱性表型鉴定试验也证明，与 WT 相比，*CmMYB15-like* 过表达株系抗旱性更强。说明过表达 *CmMYB15-like* 降低了拟南芥对甘露醇的敏感性，且对后期根系的发育有显著促进作用，特别是侧根的生长，进而增强了转基因拟南芥的抗旱性。

### 3.4 *CmMYB15-like* 通过提高木质素含量增强植株的抗旱性

木质素广泛存在于植物的细胞壁中，能够增强植物的机械强度，维持细胞内的水分运输及渗透平衡，并参与植物胁迫反应。据报道，水稻次生细胞壁中木质素含量降低可减少叶片中水分含量，导致抗旱性减弱<sup>[31]</sup>。番茄根部木质素积累，增加了根部的木质化，促进了根系细胞壁硬化，从而提高其抗旱性<sup>[32]</sup>。在胡萝卜中，*DcDREB1A* 过表达在一定程度上通过上调木质素生物合成相关基因的表达水平以及增加茎中木质素含量来提高抗旱性<sup>[16]</sup>。*MeRAV5* 通过调节过氧化氢和木质素积累促进木薯的干旱胁迫抗性<sup>[33]</sup>。*CtCYP71A1* 过表达上调拟南芥、红花体内脯氨酸含量及 *PAL*、*C4HI*、*HCT* 等木质素生物合成相关基因的表达，降低 ROS 的积累，来促进两者的抗旱性和木质素积累<sup>[34]</sup>。以上研究表明，木质素含量提高正调节植物的耐旱性。前期研究发现在‘神马’菊花中，*CmMYB15-like* 结合 *Cm4CL2* 启动子区域 AC 顺式元件，上调 *Cm4CL2* 表达，有助于木质素沉积和细胞壁增厚<sup>[10]</sup>。本研究发现，在 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥株系中，木质素生物合成途径多个基因表达量上调，木质素含量显著提高。先前有报道，在乌苏里杨中，*PuC3H35*-*PuEARLI1*-*PuCCRS*-木质素模块提高了根系中木质素含量，促使维管组织的细胞壁更加坚韧，提高了细胞的输水能力<sup>[35]</sup>。在葡萄中 *VbZIP30* 直接结合靶基因 *VvPRX NI*，过表达提高了茎次生木质部中木质素含量，从而提高其抗旱性<sup>[36]</sup>。该研究发现过表达 *CmMYB15-like* 可以提高植株体内木质素含量，但是目前还不清楚木质素含量增加是否提高了导管的输水能力，或者降低导管栓塞的程度，亦或者增加根部的木质素含量，提高地下部的输水能力，从而提高植物的抗旱性，这也是下一步深入开展木质素是如何提高植株抗旱性的研究方向之一。

## 4 结论

通过前期的研究，初步推测 *CmMYB15-like* 可以提高植物的抗旱性。于拟南芥中异源表达菊花 *CmMYB15-like* 基因，发现过表达株系在干旱胁迫下的存活率、相对含水量显著高于 WT，其 SOD 活性以及 SS、MDA 含量对比发现过表达植株在干旱胁迫下 ROS 清除能力更强且细胞膜稳定性更高，甘露醇培养基生长状况和根系对比发现过表达株系在干旱胁迫下绿叶更多，主根更长且侧根数目显著增多，相比野生型，*CmMYB15-like* 过表达株系木质素生物合成相关基因发生不同程度上调以及木质素含量升高。基于试验结果，提出菊花 *CmMYB15-like* 过表达提高了拟南芥体内的抗氧化物活性、可溶性糖含量、木质素合成相关基因表达以及木质素积累，并促进根系发育来提高植株维持水分的能力，4 种调控机制共同促进了 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥对干旱胁迫的耐受性。但 *CmMYB15-like* 在菊花抗旱中是否起作用，还需进一步在菊花中验证其功能。

### 参考文献：

- [1] Li J L, Han G L, Sun C F, Sui N. Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding. *Plant Signaling & Behavior*,2019,14(8):1613-131
- [2] Jiang C K, Rao G Y. Insights into the Diversification and Evolution of R2R3-MYB Transcription Factors in Plants. *Plant Physiol*,2020,183(2):637-655
- [3] Wang X, Niu Y, Zheng Y. Multiple Functions of MYB Transcription Factors in Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*,2021,22(11):6125
- [4] Zhu L, Li S S, Ma Q Y, Yan K Y, Wen J, Li Q Z, Ren J, Chen Z. An *Acer palmatum* R2R3-MYB Gene, ApMYB77, Confers Freezing and Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation*(prepublish),2023,42:1017-1030
- [5] Yao C Y, Li W H, Liang X Q, Ren C K, Liu W D, Yang G H, Zhao M F, Yang T Y, Li X G, Han D G. Molecular Cloning and Characterization of MbMYB108, a *Malus baccata* MYB Transcription Factor Gene, with Functions in Tolerance to Cold and Drought Stress in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*,2022,23(9):4846
- [6] Shi K, Liu J, Liang H, Dong H B, Zhang J L, Wei Y H, Zhou L, Wang S P, Zhu J H, Cao M S, Jones CS, Ma D M, Wang Z. An alfalfa MYB-like transcriptional factor MsMYBH positively regulates alfalfa seedling drought resistance and undergoes MsWAV3-mediated degradation. *Journal of Integrative Plant Biology*,2024,66(4):683-699
- [7] Luo Y Y, Bai R, Li J, Yang W D, Li R X, Wang Q Y, Zhao G F, Duan D. The transcription factor MYB15 is essential for basal immunity (PTI) in Chinese wild grape. *Planta*,2019,249(6):1889-1902
- [8] Zhang L Y, Jiang X C, Liu Q Y, Ahammed GJ, Lin R, Wang L Y, Shao S J, Yu J Q, Zhou Y H. The HY5 and MYB15 transcription factors positively regulate cold tolerance in tomato via the CBF pathway. *Plant Cell And Environment*,2020,43(11):2712-2726
- [9] An C, Sheng L P, Du X P, Wang Y J, Zhang Y, Song A P, Jiang J F, Guan Z Y, Fang W M, Chen F D, Chen S M. Overexpression of *CmMYB15* provides

chrysanthemum resistance to aphids by regulating the biosynthesis of lignin. *Horticulture Research*,2019,11(6):84

- [10] Li F, Zhang Y, Tian C, Wang X H, Zhou L J, Jiang J F, Wang L K, Chen F D, Chen S M. Molecular module of CmMYB15-like-Cm4CL2 regulating lignin biosynthesis of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) in response to aphid (*Macrosiphoniella sanborni*) feeding. *New Phytologist*,2023,237(5):1776-1793
- [11]孔洁珂,杨妮,罗微,胡志航,王雅慧,庄静.茶树 NAC 转录因子基因 CsNAC79 和 CsNAC9 鉴定及其对非生物胁迫的响应.西北植物学报, 2024, 44 (04): 572-581
- Kong J Y, Yang N, Luo W, Hu Z H, Wang Y H, Zhuang J. Identification of NAC transcription factor genes CsNAC79 and CsNAC9 in tea plants and their response to abiotic stress. *Acta Botanica Sinica*, 2024,44(04):572-581
- [12] Xiao N, Ma H Z, Wang W X, Sun Z K, Li P P, Xia T. Overexpression of ZmSUS1 increased drought resistance of maize (*Zea mays* L.) by regulating sucrose metabolism and soluble sugar content. *Planta*,2024,259(2):43
- [13] 刘保国,张艳文,姚珂心,史志坤,李菲,李永华,张开明.四季秋海棠 BsMYB62 的抗旱性功能研究.西北农林科技大学学报:自然科学版,2024, 52(04):1-10
- Liu B G,Zhang Y W,Yao K X,Shi Z K,Li F,Li Y H,Zhang K M. Drought tolerance functions of BsMYB62 in *Begonia semperflora*. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*,2024,52(04):1-10
- [14] Wang X, Wu Z, Zhou Q, Wang X, Song S, Dong S K. Physiological Response of Soybean Plants to Water Deficit. *Frontiers in Plant Science*,2022,31(12):809692
- [15] Chen Q, Peng L, Wang A H, Yu L Z, Liu Y, Zhang X R, Wang R L, Li X Y, Yang Y, Li X F, Wang J M. An R2R3-MYB FmMYB11 from Tartary buckwheat has contrasting effects on abiotic tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*,2023,280:153842
- [16] Li T, Huang Y, Khadr A, Wang Y H, Xu Z S, Xiong A S. DcDREB1A, a DREB-binding transcription factor from *Daucus carota*, enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* and modulates lignin levels by regulating lignin-biosynthesis-related genes. *Environmental and Experimental Botany*,2020,169:103896
- [17] Sun Y, Jiang C, Jiang R, Wang F, Zhang Z, Zeng J. A Novel NAC Transcription Factor From *Eucalyptus*, EgNAC141, Positively Regulates Lignin Biosynthesis and Increases Lignin Deposition. *Frontiers in Plant Science*,2021,8(12):642090 *Journal*,2022,20(4):736-747
- [18] Bang S W, Choi S, Jin X J, Jung S E, Choi J W, Seo J S, Kim J K. Transcriptional activation of rice CINNAMOYL-CoA REDUCTASE 10 by OsNAC5, contributes to drought tolerance by modulating lignin accumulation in roots. *Plant Biotechnology Journal*,2022,20(4):736-747
- [19] Wei Q H, Luo Q C, Wang R B, Zhang F, He Y, Zhang Y, Qiu D, Li K X, Chang J L, Yang G X, He G Y. A Wheat R2R3-type MYB Transcription Factor TaODORANT1 Positively Regulates Drought and Salt Stress Responses in Transgenic Tobacco Plants. *Front in Plant Science*, 2017,(8):1374
- [20] Liu T L, Chen T Z, Kan J L, Yao Y, Guo D S, Yang Y W, Ling X T, Wang J Y, Zhang B L. The GhMYB36 transcription factor confers resistance to biotic and abiotic stress by enhancing PR1 gene expression in plants. *Plant Biotechnol Journal*,2022,20(4):722-735
- [21] Li K Q, Xing C H, Yao Z H, Huang X S. PbrMYB21, a novel MYB protein of *Pyrus betulaefolia*, functions in drought tolerance and modulates polyamine

levels by regulating arginine decarboxylase gene. *Plant Biotechnol Journal*,2017,15(9):1186-1203

- [22] Huang Y J, Zhao H X, Gao F, Yao P F, Deng R Y, Li C L, Chen H, Wu Q. A R2R3-MYB transcription factor gene, FtMYB13, from Tartary buckwheat improves salt/drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology And Biochemistry*,2018,132:238-248
- [23] 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): 895-95.
- Kang Z, Yang D, Hao Y R, Lu X, Zhou M L, Fang Z W. Cloning and functional analysis of Tartary buckwheat transcription factor FtMYB41. *Journal of Plant Genetic Resources*,2022,23(03):895-905
- [24] Zhu N, Duan B L, Zheng H L, Mu R R, Zhao Y Y, Ke L P, Sun Y Q. An R2R3 MYB gene GhMYB3 functions in drought stress by negatively regulating stomata movement and ROS accumulation. *Plant Physiology And Biochemistry*, 2023,197:107648
- [25] Pan R, Buitrago S, Feng Z B, Abou-Elwafa S F, Xu L, Li C D, Zhang W X. HvZIP21, a Novel Transcription Factor From Wild Barley Confers Drought Tolerance by Modulating ROS Scavenging. *Frontiers in Plant Science*,2022,22(13):878459
- [26] Liu L J, Zhang Y H, Tang C, Shen Q Q, Fu J Y, Wang Q. Maize Transcription Factor ZmHsf28 Positively Regulates Plant Drought Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*,2023,24(9):8079
- [27] Cui X Y, Tang M H, Li L, Chang J G, Yang X Q, Chang H L, Zhou J Y, Liu M, Wang Y, Zhou Y, Sun F J, Chen Z Y. Expression Patterns and Molecular Mechanisms Regulating Drought Tolerance of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Conferred by Transcription Factor Gene GmNAC19. *International Journal of Molecular Sciences*,2024,25(4):2396
- [28] Cao L R, Ma C C, Ye F Y, Pang Y Y, Wang G R, Fahim A M, Lu X M. Genome-wide identification of NF-Y gene family in maize (*Zea mays* L.) and the positive role of ZmNF-YC12 in drought resistance and recovery ability. *Frontiers in Plant Science*,2023,14:1159955
- [29] Liu Y H, Shen Y, Liang M, Zhang X Y, Xu J W, Shen Y, Chen Z D. Identification of Peanut AhMYB44 Transcription Factors and Their Multiple Roles in Drought Stress Responses. *Plants (Basel)*,2022,11(24):3522
- [30] Qin T Y, Kazim A, Wang Y H, Richard D, Yao P F, Bi Z Z, Liu Y H, Sun C, Bai J P. Root-Related Genes in Crops and Their Application under Drought Stress Resistance-A Review. *International Journal of Molecular Sciences*,2022,23(19):11477
- [31] Li W Q, Zhang M J, Gan P F, Qiao L, Yang S Q, Miao H, Wang G F, Zhang M M, Liu W T, Li H F, Shi C H, Chen K M. CLD1/SRL1 modulates leaf rolling by affecting cell wall formation, epidermis integrity and water homeostasis in rice. *Plant Journal*,2017,92(5):904-923
- [32] Xie J Q, Cao B L, Xu K. Uncovering the dominant role of root lignin accumulation in silicon-induced resistance to drought in tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*,2024,259(1):129075
- [33] Yan Y, Wang P, Lu Y, Bai Y J, Wei Y X, Liu G Y, Shi H T. McRAV5 promotes drought stress resistance in cassava by modulating hydrogen peroxide and lignin accumulation. *Plant Journal*,2021,107(3):847-860
- [34] Zhang Q Y, Ahmad N, Li Z L, He J Z, Wang N, Naeem M, Jin L B, Yao N, Liu X M. CtCYP71A1 promotes drought stress tolerance and lignin accumulation in safflower and Arabidopsis. *Environmental and Experimental Botany*,2023,213: 105430
- [35] Li D D, Yang J L, Pak S, Zeng M Z, Sun J L, Yu S, He Y T, Li C H. PuC3H35 confers drought tolerance by enhancing lignin and proanthocyanidin

biosynthesis in the roots of *Populus ussuriensis*. *New Phytologist*,2022,233(1):390-408

- [36] Tu M X, Wang X H, Yin W C, Wang Y, Li Y J, Zhang G F, Li Z, Song J Y, Wang X P. Grapevine VlbZIP30 improves drought resistance by directly activating VvNAC17 and promoting lignin biosynthesis through the regulation of three peroxidase genes. *Horticulture Research*,2020,7:150