

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, 造成巨大经济损失。挖掘菊花中的抗旱基因, 培育抗旱品种是解决上述问题的重要手段。MYB转录因子参与植物生长发育和响应非生物胁迫。本研究在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、丙二醛含量、可溶性糖含量、超氧化物歧化酶活性、木质素含量等指标, 探究该基因的抗旱性功能。结果显示, 过表达 *CmMYB15-like* 拟南芥的存活率、相对含水量、超氧化物歧化酶活性、可溶性糖含量较野生型显著升高, 丙二醛含量较野生型显著下降; 幼苗主根长度及侧根数目较野生型显著升高。此外, *AtPAL2*、*AtPAL4*、*At4CL1* 等木质素合成相关基因表达显著上调, 木质素含量显著提高。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. It is an important means to solve the above problems to dig out drought resistant genes in chrysanthemum and cultivate drought resistant varieties. 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) content, soluble sugars (SS) content, superoxide dismutase (SOD) activity, and lignin content. The survival rate, relative water content, superoxide dismutase activity and soluble sugar content of overexpressed *CmMYB15-like Arabidopsis thaliana* were significantly increased compared with the wild type, while the malondialdehyde content was significantly decreased compared with the wild type. The length of taproot and number of lateral roots were significantly higher than those of wild type. In addition, *AtPAL2*, *AtPAL4*, *At4CL1* and other lignin synthesis-related genes were significantly up-regulated, and the lignin content was significantly increased. 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

收稿日期: 2024-05-20 网络出版日期: 2024-09-25

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240520002>

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)

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^[1-2]。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^[3]。如棕榈碱*ApMYB77*过表达拟南芥,通过上调脱落酸胁迫相关基因*AtNAC072*、*AtDREB2A*、*AtERD1*、*AtMYB2*、*AtRD20*、*AtRD29A*的表达,可提高拟南芥的抗旱性^[4]。山荆子*MbMYB108*在拟南芥中表达,提高了对活性氧(ROS, reactive oxygen species)的清除能力、增加了脯氨酸(Pro, proline)和叶绿素(Chl, chlorophyll)含量,使拟南芥的抗旱性增强^[5]。苜蓿*MsMYBH*直接与*MsMCP1*、*MsMCP2*、*MsPRX1A*和*MsCARCAB*启动子结合,提高其表达,可增强植株保水能力、光合作用效率及活性氧清除能力以应对干旱^[6]。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,目前相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^[7]。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^[8]。菊花*CmMYB15*结合AC元件,通过提高木质素(Lig, lignin)含量来增强菊花的抗蚜性^[9]。本实验室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^[10]。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

醛含量、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’,均来自南京农业大学菊花遗传育种与分子生物学实验室。

1.2 表达分析

选用30盆在黑色小方盆(7 cm×7 cm)扦插生根、生长情况良好且大小一致、生长有6~8片真叶的盆栽菊花苗,生长环境为白天16 h/23 °C,夜间8 h/22 °C,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15盆菊花苗,模拟干旱胁迫处理,该方法采用灌根法进行^[11],对其余15盆未进行干旱处理的对照组进行均一化处理。在胁迫后0、1、3、6、9 h取第3片完全展开叶,每一个时间点取3株,对照组取样方法同处理组,液氮速冻后进行研磨,用植物RNA提取试剂盒(华越洋,北京)提取RNA,用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录酶(Takara,北京)将RNA反转录为cDNA,以其为模板进行qRT-PCR反应,用于*CmMYB15-like*干旱胁迫响应分析。反应体系为20 μL:模版cDNA 2 μL,上下游引物(表1)各1 μL (10 μmol/L), 2×SYBR Green Pro Taq HS Premix 10 μL, RNase free water 6 μL。反应程序为:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s, 60 °C退火并延伸30 s, 40个循环。试验进行3次生物学重复。

1.3 植物表达载体构建

根据前期获得的*CmMYB15-like*基因序列,利用Primer 5.0软件设计带有同源臂的CDS区克隆引物*CmMYB15-like-ORF-F*与*CmMYB15-like-ORF-R*(表1),反应体系为25 μL:模版cDNA 2 μL,上下游引物各1 μL, 2×*ApexHF* FS PCR Master Mix 12.5 μL, RNase free water 8.5 μL。反应程序为:94 °C预变性30 s;98 °C变性10 s, 67 °C退火5 s, 72 °C延伸5 s, 35个循环;72 °C终止延伸5 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,OMEGA胶回收试剂盒回收目的片段,与*EcoR*I单酶切后的pMDC43线性化载体连接并转化,阳性克隆送公司测序,对测序正确的菌液用Fast Plasmid Miniprep Kit(庄盟)提取质粒,并转化农杆菌EHA105感受态保存备用。

表 1 引物名称及序列

Table 1 The name and sequence of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Using
Actin-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	内参引物
Actin-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	
CmMYB15-like-ORF-F	TTTCATTGCCATACGGAATTCATGGGGAGAGCACCTTGTGT	基因克隆引物
CmMYB15-like-ORF-R	ATGAATGCTCATCCGGAATTCAAACTCAGGTAACCTCGGGTAGTTCC	
qRT-CmMYB15-like-F	TCTACCTCTAACCAACCATC	qRT-PCR引物
qRT-CmMYB15-like-R	CCTTTATTATCACCGTTTCC	
SP-F	GAACCAATAGTTTCGCAATG	转基因拟南芥 PCR 鉴定引物
pMDC43-R	ACGATCGGGGAAATTCGA	

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,使用含有潮霉素的培养基筛选转基因抗性植物,采用鉴定引物(表1)通过PCR鉴定T2代转基因阳性苗。反应体系为25 μL :DNA 2 μL ,上下游引物各1 μL ,rTaq酶12.5 μL ,RNase free water 8.5 μL 。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终止延伸5 min。转基因阳性苗经过自交和潮霉素抗性筛选得到T3代纯合转基因拟南芥OE-1、OE-2、OE-8三个株系,同时对获得的转基因拟南芥进行qRT-PCR半定量检测,引物序列见表1,以Actin内参基因(表1)为对照,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及相关生理指标测定

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 \times 7 cm)(营养土:蛭石=2:1)中,各株系移栽12盆,每盆5株,在人工气候培养箱(白天16 h/23 $^{\circ}\text{C}$,夜间8 h/22 $^{\circ}\text{C}$,光照15000 Lx)中培养28 d,期间正常浇水。选取生长状况良好的OE-1、OE-2、OE-8转基因和野生型拟南芥各6盆盆栽苗进行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,用于测定相对含水量、超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量、可溶性糖含量相关生理指标。相对含水量的测定参考Xiao等^[12]方法;超氧化物歧化酶活性测定采用氮蓝四唑法^[13];丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸比色法^[13];可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色

法^[14];试验进行3次生物学重复。

分别采集正常生长约28 d的3个转基因株系和野生型拟南芥距基部1 cm的茎组织,每个株系采集9株,分别用于木质素合成相关基因的表达检测、木质素染色和木质素含量测定。拟南芥以Actin作为内参基因,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测木质素合成相关基因*AtPAL1*、*AtPAL2*、*AtPAL4*、*AtC4H*、*At4CL1*、*AtHCT*、*AtC3H1*、*AtCCoAOMT*、*AtCCR1*、*AtF5H*、*AtCOMT*、*AtCAD5*^[15-16]的表达水平,试验进行3次生物学重复。体系、程序方法同1.2。

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器(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。

1.6 幼苗子叶与根的形态学观察

采用200 mmol/L甘露醇^[17]模拟干旱胁迫处理,将消毒后的OE-1、OE-2、OE-8转基因和野生型拟南芥种子同时分别播种到MS和200 mmol/L甘露醇培养基上,每个株系各20粒,避光放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱春化2 d后,转入无菌光照培养箱(白天16 h/23 $^{\circ}\text{C}$,夜间8 h/22 $^{\circ}\text{C}$,光照15000 Lx)中培养7 d,观察转基因和野生型各株系生长状况。试验进行3次生物学重复。

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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱春化2 d,后转入无菌光照培养箱(白天16 h/23 $^{\circ}\text{C}$,夜间8 h/22 $^{\circ}\text{C}$,光照15000 Lx)中培养4 d,各株系选取9株根长

一致的幼苗分别移栽到垂直放置的MS和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软件测定)及一级侧根数目。

1.7 数据分析

使用 SPSS 22.0、Microsoft Excel 2021 和 Origin 2019 进行数据处理、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,与 0 h 相比,干旱胁迫处理后 1、3、6 h 的 *CmMYB15-like* 表达量显著上调,在 1 h 达到最高,为 1 h 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。

2.2 *CmMYB15-like* 过表达转基因拟南芥鉴定

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,于 T2 代种子中选择全抗植株,进行阳性植株鉴定,结果显示,OE-1、OE-2、OE-8 株系在 817 bp 位置有条带,野生型没有(图 2A),说明野生型没有 *CmMYB15-like* 这个基因序

列,OE-1、OE-2、OE-8 三个株系是过表达株系。继续培养得到 T3 代 OE-1、OE-2、OE-8 三个株系,对野生型和 T3 代 3 个转基因株系进行 qRT-PCR 半定量鉴定,结果显示,拟南芥 *Actin* 内参基因在野生型及转基因株系中都有条带(108 bp),*CmMYB15-like* 基因只在转基因株系中有条带,而野生型中没有,表明成功获得 T3 代纯合转基因株系(图 2B)。

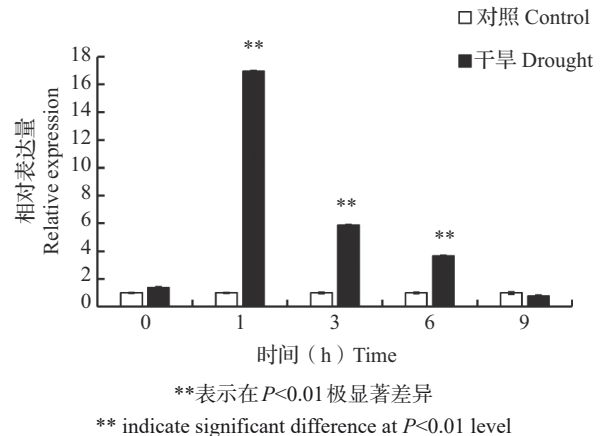
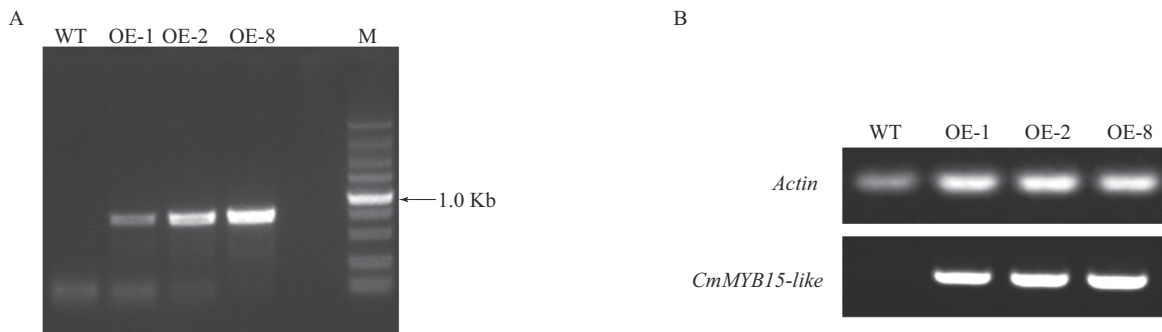


图 1 *CmMYB15-like* 在正常浇水及干旱胁迫下的表达模式分析

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



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*; 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

为了直观地对转基因和野生型拟南芥进行抗旱性评估,于盆栽条件下自然失水 14 d 及复水 3 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 14 d 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。

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丙二醛、可溶性糖含量及超氧化物歧化酶活性变化。结果显示,在干旱胁迫前,转基因和野生型株系中丙二醛含量无显著性差异;OE-1 株系的可溶性

糖含量较野生型显著下降,OE-2和OE-8株系较野生型无显著性差异;转基因株系的超氧化物歧化酶活性较野生型无显著性差异。在干旱胁迫后,*CmMYB15-like*转基因株系OE-1、OE-2、OE-8的丙二醛含量分别为0.72 $\mu\text{mol/g}$ 、0.31 $\mu\text{mol/g}$ 、0.30 $\mu\text{mol/g}$,OE-2、OE-8较野生型显著下降,分别减少了61%、59%(图5A);OE-1、OE-2、OE-8的可溶性糖含量分别为86.16mg/g、98.40mg/g、83.36 mg/g,较野生型显

著上升,分别增加了233%、281%、222%(图5B);OE-1、OE-2、OE-8的超氧化物歧化酶活性分别为111.55 U/g、130.45 U/g、119.92 U/g,OE-1、OE-2、OE-8较野生型显著上升,分别增加了30%、53%、40%(图5C)。表明过表达*CmMYB15-like*通过降低植株体内丙二醛含量,增加可溶性糖含量、超氧化物歧化酶活性来减少胁迫条件下的活性氧积累,缓解氧化损伤,同时调节渗透平衡,减少水分的流失。

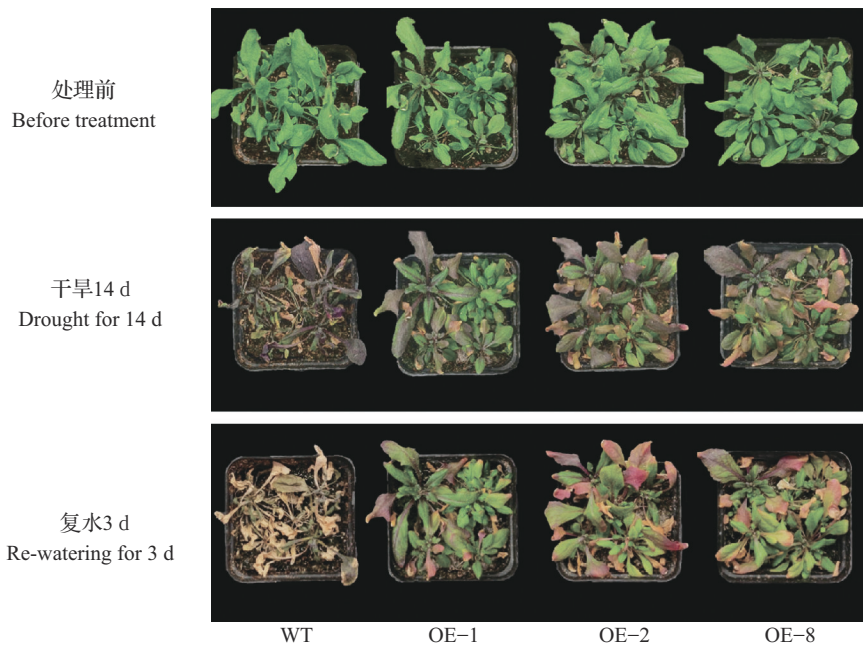
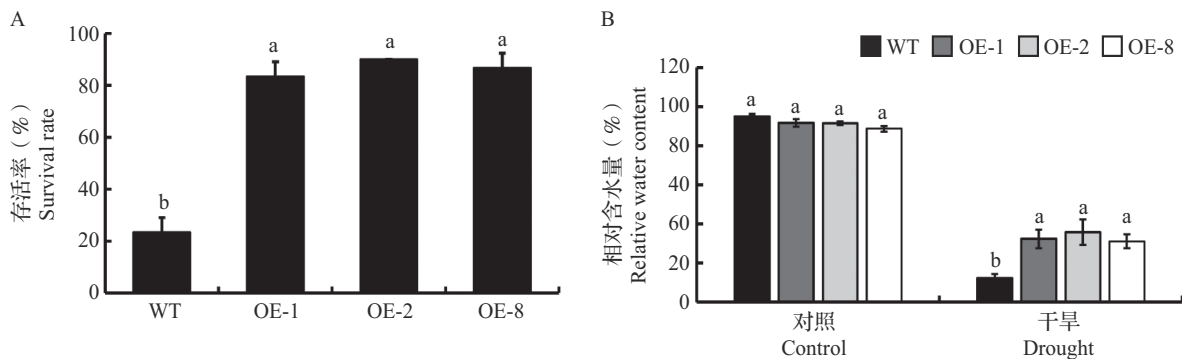


图3 野生型与*CmMYB15-like*过表达拟南芥抗旱性表型鉴定

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



A: 胁迫处理14 d各株系存活率; B: 不同处理下各株系相对含水量; 不同小写字母表示显著性差异, 误差线代表生物学重复之间的标准误, n=3; 下同

A: Survival rate of each strain after 14 d of stress treatment; B: Relative water content of each strain under different treatments; Different lowercase letters indicate significant differences, 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

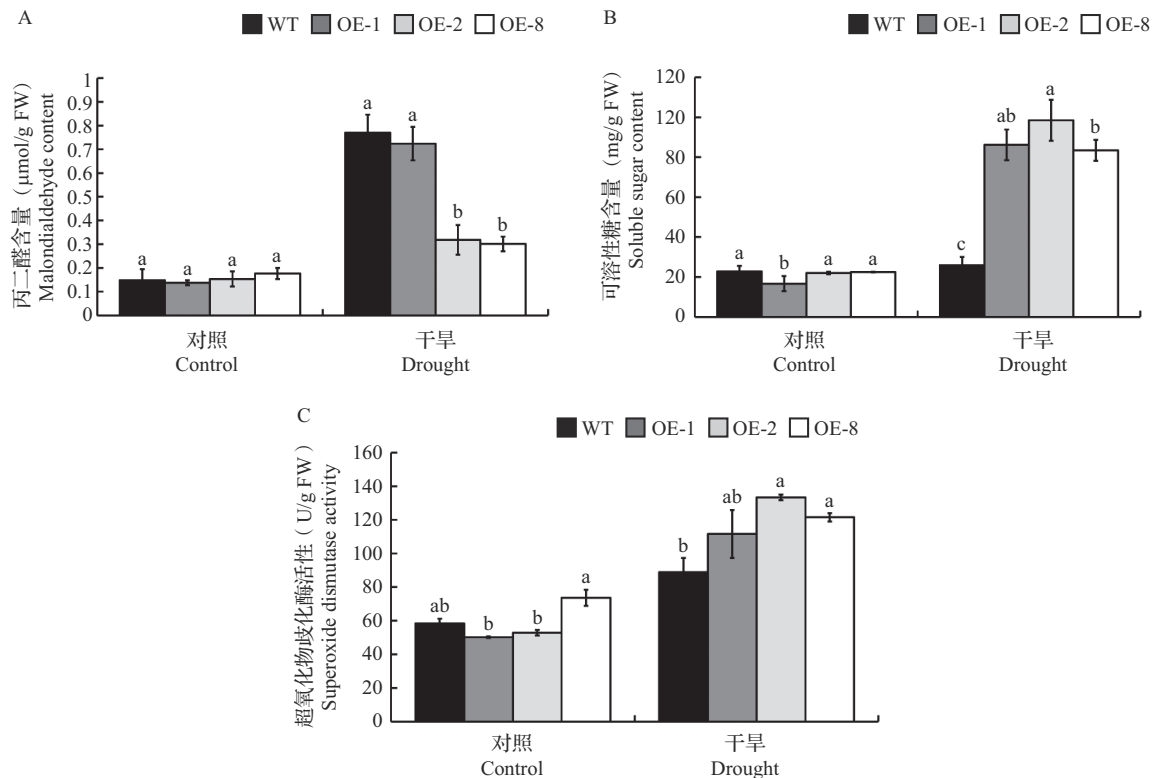


图5 干旱处理前后野生型和 *CmMYB15-like* 过表达拟南芥植株生理指标测定

Fig. 5 Physiological indices of *Arabidopsis thaliana* plants of 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* 转基因株系与野生型相比,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),OE-1、OE-2和OE-8分别为野生型的4.6倍、3.6倍和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)。在200 mmol/L甘露醇处理下,*CmMYB15-like* 转基因株系OE-1和OE-2的主根长度分别为野生型的2.1倍和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和OE-8的一级侧根数目分别为野生型的2.1倍、2.3倍和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。

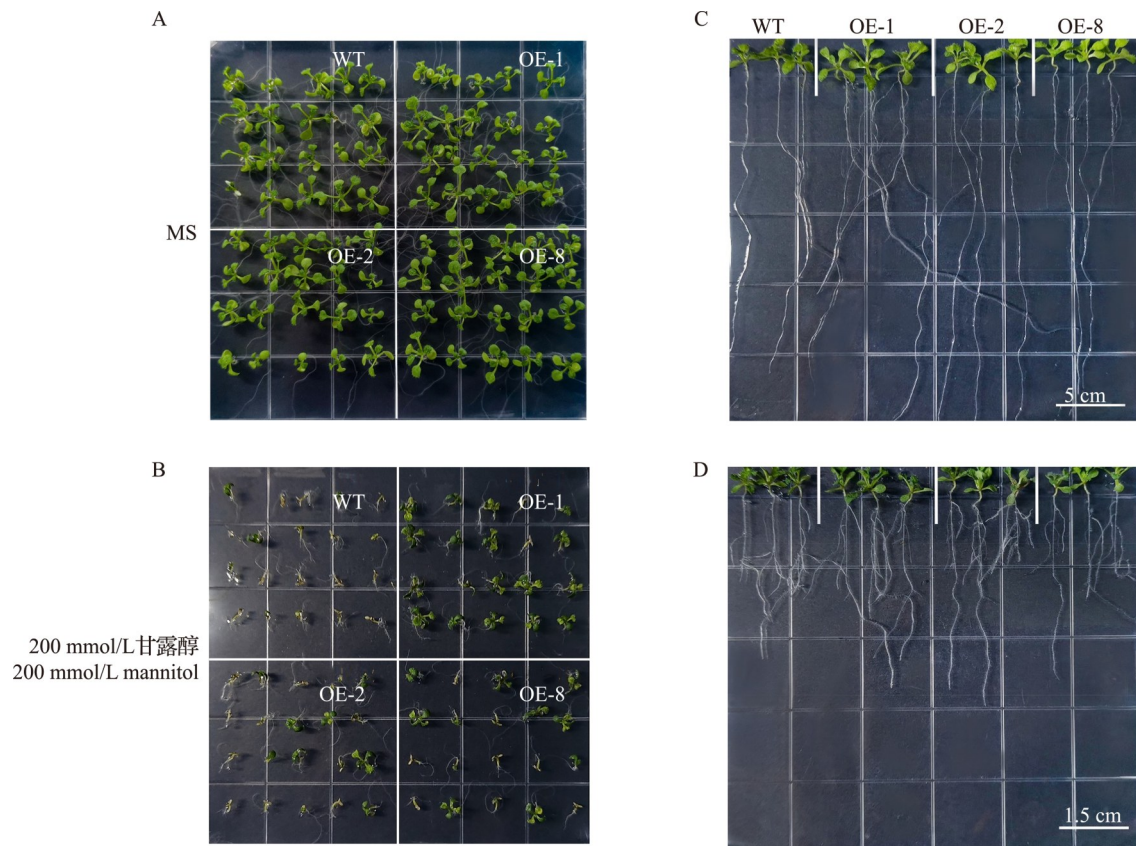
2.6 木质素生物合成路径基因相对表达量检测

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^[10],并且有研究报告,木质素含量增加可提高植株抗旱性^[18]。本研究采用qRT-PCR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* 的基因表达量均较野生型显著升高(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量。

2.7 过表达 *CmMYB15-like* 提高木质素含量

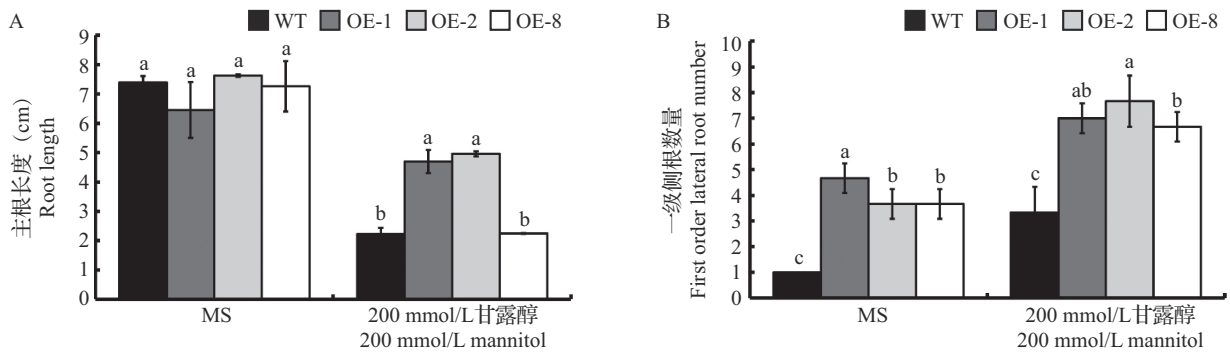
采集野生型及 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥植株基部茎组织部位进行盐酸-间苯三酚染色观察分析,其结果显示,*CmMYB15-like* 转基因过表达株系OE-1、OE-2、OE-8中木质部着色程度较野生型明显加深(图9A)。木质素含量测定结果表明,*CmMYB15-like* 转基因株系OE-1、OE-2、OE-8中木质素含量分别为91.30 mg/g、93.23 mg/g、90.36 mg/g,较野生型显著增加,分别增加了25%、27%、24%(图9B),表明过表达 *CmMYB15-like* 提高了植株体内木质素含量。



A, B: MS 和 200 mmol/L 甘露醇培养基中生长 7 d 的表型; C, D: MS 和 200 mmol/L 甘露醇培养基中生长 7 d 的根长及侧根
A, B: Phenotype grown in MS and 200 mmol/L mannitol medium for 7 d; C, D: The root length and lateral root grown in MS and 200 mmol/L mannitol medium for 7 d

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; B: 不同处理各株系侧根数目

A: Root length of different strains under different treatments; B: The number of first order lateral roots of each strain under different treatments

图 7 *CmMYB15-like* 转基因拟南芥在甘露醇处理后的主根长度及侧根数目

Fig. 7 The main root length and lateral root number of *CmMYB15-like* transgenic *Arabidopsis thaliana* after mannitol treatment

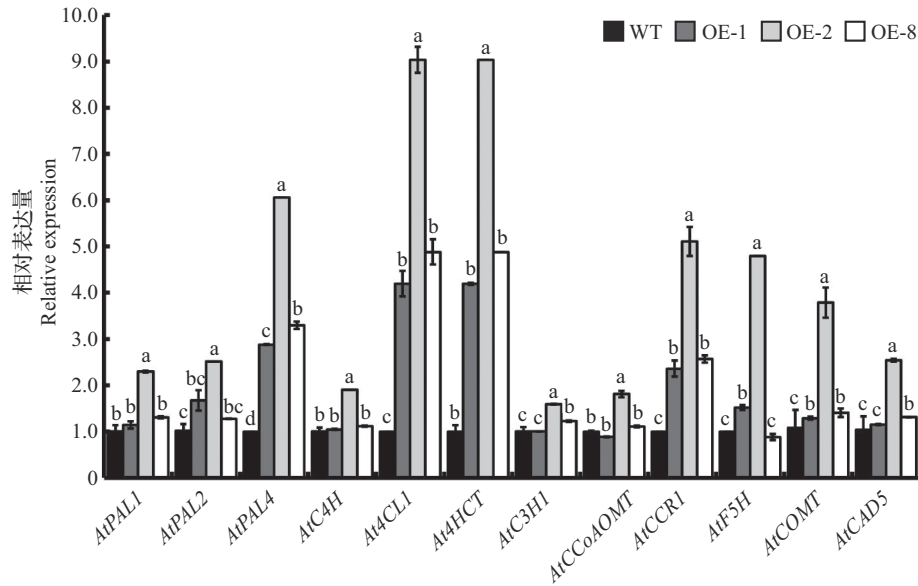
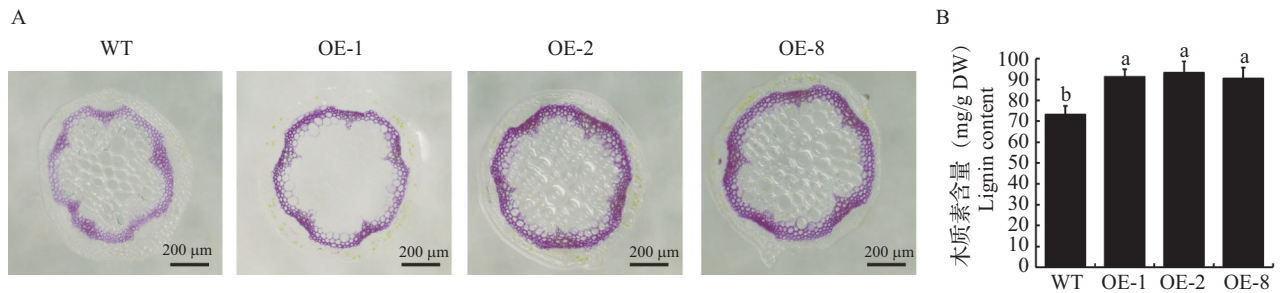


图8 木质素生物合成途径基因相对表达量

Fig. 8 Gene relative expression of lignin biosynthesis pathway



A:不同植株中茎组织的木质素沉积;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; 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 Lignin content in wild type and *CmMYB15-like* overexpressing *Arabidopsis*

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。如小麦 *TaODORANT1* 过表达降低了活性氧的积累,并且上调胁迫相关基因的表达,提高了烟草的抗旱性^[19];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^[20];白桦 *PbrMYB21* 过表达降低活性氧的含量,并且直接结合精氨酸脱羧酶(ADC, arginine decarboxylase)基因,提高游离多胺含量,提高其抗旱性^[21]。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,过表达植株丙二醛含量降低,过氧化物酶活性增加,转基因植物的抗旱性显著增加^[22-23]。本研究发现干旱胁迫下,转基因株系 OE-2、OE-8 的丙二醛含量较野生型显著减少。超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶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活性氧的积累,且超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性显著增加,提高了棉花的抗旱性^[24];野生大麦 *HvbZIP21*^[25]、

玉米 *ZmHsf28*^[26] 的过表达提高了超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性以应对干旱。超氧化物歧化酶活性测定结果表明,过表达 *CmMYB15-like* 显著提高了植株干旱胁迫下的超氧化物歧化酶活性,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^[27-28]。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^[29]。本研究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,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^[30]。本研究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一级侧根数目显著增加。在 MS 培养基和甘露醇培养基中,转基因株系的侧根数目显著高于野生型,且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,拟南芥一级侧根数目的显著增加主要是过表达 *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,与野生型相比, *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^[31]。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^[32]。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^[16]。*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^[33]。*CtCYP71A1* 过表达通过上调拟南芥、红花体内脯氨酸含量及 *PAL*、*C4H1*、*HCT* 等木质素生物合成相关基因的表达,降低活性氧的积累,来促进两者的抗旱性和木质素积累^[34]。以上研究表明,木质素含量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^[10]。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。在乌苏里杨中, *PuC3H35-PuEARL11-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^[35]。在葡萄中 *VibZIP30* 直接结合靶基因 *VvPRXN1*,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^[36]。本研究发现过表达 *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野生型;超氧化物歧化酶活性以及可溶性糖、丙二醛含量对比发现,过表达植株在干旱胁迫下活性氧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,主根更长且一级侧根数目显著增多;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酶活性、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,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):1613131
- [2] Jiang C K, Rao G Y. Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants. *Plant Physiology*, 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*, 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 C S, 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 G J, 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. *Newphytologist*, 2023, 237 (5):1776-1793
- [11] 孔洁琦, 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(4):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 Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(4):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(4):95-104
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 semperfloren*. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2024, 52(4):95-104
- [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] Li T, Huang Y, Khadr A, Wang Y H, Xu Z S, Xiong A S. DeDREB1A, 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
- [16] 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
- [17] 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 FtMYB11 from *Tartary buckwheat* has contrasting effects on abiotic tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 2023, 280:153842
- [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 Biotechnology 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(3):895-905
- 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(3):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. HvbZIP21, 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. MeRAV5 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