

核桃 *JrEFM1* 转录因子响应逆境 及激素的表达模式^①

马凯恒^{1,2}, 李子仪¹, 李大培¹,
杨玉婷¹, 陈淑雯¹, 杨桂燕^{1,2}

1. 西北农林科技大学 林学院/陕西省经济植物资源开发利用重点实验室, 陕西 杨凌 712100;
2. 西北农林科技大学 林学院/山阳核桃板栗试验示范站, 陕西 杨凌 712100

摘要: MYB 转录因子在调控植物生长发育和逆境响应方面发挥着重要的作用. 通过克隆获得了核桃的 1 条 R1-MYB 类转录因子 *EFM* 基因(命名为 *JrEFM1*), 利用生物信息学和实时荧光定量 RT-PCR(RT-qPCR)技术, 分析在不同非生物及植物激素处理下 *JrEFM1* 的表达规律, 探究了 *JrEFM1* 的基本生物学功能. 结果显示, *JrEFM1* 的编码区长为 1 320 bp, 编码蛋白含 439 个氨基酸, 分子量为 48.322 KDa, 理论等电点为 9.26. 与葡萄、番薯等具有较近的进化关系. 其启动子包含干旱胁迫(MBS)、热激响应(HSE)、水杨酸(SA)、玉米素(O2-site)和赤霉素响应(GARE-motif)等相关元件. 对 *JrEFM1* 在干旱, 冷害, 热激, ABA, JA, SA 处理下的表达情况进行分析, 发现 *JrEFM1* 可被这些处理不同程度地诱导, 同时根和叶表现出不同的转录水平. 表明 *JrEFM1* 可响应逆境胁迫, 并与激素信号通路相关; *JrEFM1* 可作为核桃逆境响应机制研究及抗逆育种的优良候选基因.

关键词: 核桃; MYB 转录因子; *JrEFM1* 基因; 基因表达; 逆境

中图分类号: Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2019)06-0046-08

MYB 类转录因子与植物生长发育、生理代谢、逆境响应等过程有关, 是植物中最大的转录因子家族之一, 包含众多成员^[1-3]. MYB 类转录因子具有高度保守的 MYB 结构域, 因 MYB 结构域的数量差异, 被分为 R1-MYB, R2R3-MYB, R1R2R3-MYB 和 4R 等不同的亚类^[3]. 在这些类别中, 一般植物含有 R2R3-MYB 数量较多, 且研究较为深入. 如在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 有 64 个 R1-MYB 类基因, 126 个 R2R3-MYB 类基因, 5 个 R1R2R3-MYB 类基因, 1 个 4R-MYB 类基因^[4-5]. 水稻(*Oryza. sativa*)中有 70 个 R1-MYB 类基因, 109 个 R2R3-MYB 类基因, 5 个 R1R2R3-MYB 类基因, 1 个 4R-MYB 类基因^[4]. 不同类别的 MYB 在功能上具有一定差异, 因此, 对植物 MYB 进行相关研究应首先分析其属类关系. R1-MYB 也参与调控植株的逆境响应过程, 如过表达羊草(*Leymus chinensis*)R1-MYB 可改善转基因拟南芥的耐盐性^[6]; 麻风树(*Jatropha curca*)R1-MYB(*JcR1MYB1*)能在根中高水平表达, 且受聚乙二醇, NaCl, 低温以及脱落酸(ABA), 茉莉酮酸, 乙烯等处理诱导而上调表达, 过表达 *JcR1MYB1* 的转基因烟草具有较好的耐盐能力^[7]; 西红柿(*Solanum lycopersicum*)R1-MYB 在盐胁迫下与气孔开闭相关^[8], 但目前

① 收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 中国博士后科学基金特别资助项目(2017T100782); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JQ3066); 西北农林科技大学大学生创新创业训练计划项目(201803072).

作者简介: 马凯恒(1983-), 女, 实验师, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种的研究.

对 R1-MYB 的研究相对较少。

核桃(*Juglans regia*)属多年生落叶乔木,是中国重要的“木本粮油”战略树种,也是我国扶贫攻坚项目的重要树种。核桃产业在推动区域经济发展上具有重要作用,而核桃产业的健康快速发展与核桃的产量和质量息息相关。但近年来由于全球环境的变化,环境因子特别是西北地区夏秋核桃成熟期严重的高温干旱等气候现象,严重影响着核桃产业的发展。因此,选育抗逆优良核桃品种、掌握核桃抗逆适应机制,对深入了解核桃的适应性具有重要指导作用。而这关键的技术之一就是筛选鉴定核桃抗逆相关基因并对其进行功能机制分析。鉴于此,本研究我们克隆获得 1 条核桃的 R1-MYB(*JrEFM1*),对其基本生物学信息、启动子及逆境处理下的表达进行分析,探讨该基因的逆境响应潜力,为后续深入开展核桃逆境适应分子机制研究提供候选基因。

1 材料与方 法

1.1 材料及处理

本研究以 2 年生‘香玲’核桃嫁接苗为试验材料。分别对核桃进行 5 °C(低温),45 °C(高温),干旱(20% PEG₆₀₀₀),0.1 mmol/L ABA,2 mg/L 水杨酸(SA)以及 100 mg/L 茉莉酸(JA)胁迫处理 0,3,6,12,24 h,0 h 为对照。分别收集各处理时间点的根和叶,液氮速冻后保存于-80°C 冰箱备用。干旱,SA,ABA 及 JA 胁迫均使用浇灌根部的方法进行处理,且在胁迫时间内植株托盘有足够溶液保证处于胁迫状态。每个处理重复 3 次,每次重复处理包含 6 棵植株。

1.2 *JrEFM1* 的克隆与分析

以“MYB transcription factor”为关键词在‘香玲’核桃转录组中查找相关基因,经 BLAST 比对分析,获得若干 MYB 基因,选择其中 1 条 R1-MYB(命名为 *JrEFM1*)进行分析。用 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定 *JrEFM1* 的开放读码框(ORF),根据 ORF 两端序列设计引物 *JrEFM1*-F 和 *JrEFM1*-R(表 1),进行 PCR 扩增。扩增产物经纯化后与 pMD-18-T 连接并转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,挑取阳性克隆进行菌液 PCR 及测序确认。利用 Expasy ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对确认的 *JrEFM1* 序列特征进行分析。利用 BLASTP(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行序列同源性搜索;利用 Clustal 3.0 软件对不同物种的 R1-MYB 进行进化分析。使用 plantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)及 PLACE(<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>)分析该基因启动子中含有的顺式作用元件。

1.3 *JrEFM1* 的表达分析

采用 CTAB 法提取各样品总 RNA,经 DNA 消化酶处理后采用 PrimeScript™ RT reagent Kit(CWBIO,康为世纪,中国)反转录为 cDNA,稀释 10 倍作为实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)的模板,18S *rRNA* 基因为内参基因^[9-10],引物见表 1。qRT-PCR 使用 SYBR Green Real time PCR Master mix(CWBIO)进行。qRT-PCR 定量引物为 *JrEFM1*-DL-F 和 *JrEFM1*-DL-R(表 1)。定量反应使用 Applied Biosystems 生产的 StepOne™ Real-Time PCR System 进行。反应程序为 94 °C 预变性 30 s;94 °C 变性 12 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,45 个循环;81 °C 读板 1 s,每个样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对定量结果进行相对分析^[11],相对表达水平为相对于内参基因及对照的表达值。

表 1 本研究所用引物

引物名称	正向引物	反向引物
18S <i>rRNA</i>	5'-GGTCAATCTTCTCGTTCCTT-3'	5'-TCGCATTTTCGCTACGTTCTT-3'
<i>JrEFM1</i> -F/R	5'-ATGTGCTTTTCGACAAAATACC-3'	5'-TAAAACACAGGGAAAGTAGTG-3'
<i>JrEFM1</i> -DL-F/R	5'-ATGCAGCATCACGGTGGT-3'	5'-TCTGCTCCGAAGTCTCAG-3'

2 结果与分析

2.1 *JrEFM1* 全长 cDNA 序列分析

以核桃 cDNA 为模板,通过核桃转录组查找及 PCR 验证获得 1 条 *R1-MYB* 基因,即 *JrEFM1*。经分析发现 *JrEFM1* 基因 ORF 长 1 320 bp(图 1),相对分子质量为 48.322 kDa,编码的蛋白包含 439 个氨基酸(图 2),理论等电点为 9.26。BLAST 分析发现该基因具有 1 个 Myb_DNA-binding(Accession pfam00249)保守结构域,含有 myb_SHAQKYF,PLN03162 结构,表明 *JrEFM1* 为 R1-MYB^[12]。经 BLASTP 同源搜索及 TAIR 网查找获得不同植物的 MYB 蛋白,与 *JrEFM1* 蛋白进行进化分析,发现 *JrEFM1* 蛋白与葡萄(*Vitis amurensis*)VaGARP 进化关系较近(图 3),推测 *JrEFM1* 蛋白与这些同源蛋白具有相似功能。

```

1   ATGTGCTTTC GACAAAATAC CTTTCGTGTG TGGGGTGATT ATATTATATC TTCTCGACCG
61  AAGCGTTTTG CATCAGAAAC CCATAATTTT ACAAACGGAC TGAGCTATTT TCCCTCTCTT
121 TCTCTATTTT TGAATGAGAA AATGCAGCAT CACGGTGGTT TGAGCGTTCA GAAAATATGT
181 AAAGCTTTAG AGGACGAGCT CCGCAAGATC CAGGTGTTC GGCAGAACT ACCTCTCTGT
241 TTGGAGCTTG TTACCAAGC TATTGAGGCG TGTCGGCAAC AATTA TCGGG GACGACAACG
301 GAAAACAAC TCGCATGGCCA GTC TGAGAGT TCGGAGCAGA CGACTTCAA TGATGTCCA
361 CCAGTGTTTC AGGAGTTCTT TCCGATAAAG CGGTCTGCTT CATCCGATGA TGATAATGAA
421 GAGCACCATT CGCACGAGGC CAATACGGAG ACGGTGATCC GCAATGATAG TAAGAAAGAA
481 TCTGATTGGC TTAGATCCGT TCAGTTGTGG AATAACCCAA CCTCAGATCC ACGACCCAAA
541 GAGGATGTAC CGAGAAAGGC AACGGATTG AAGAGAAACG GTGGCGGGCG TGGTGGTGGT
601 GCTTTCAGC CTTTCCAAAG AGAGAAAAGT GTTGGAAGA GCAGTGCATC AGAGGGCAA
661 ACGCCTTCTT CTGTGGCACG GGAGGCCGCG CCAGCTGTGG GGTGGCTAC GACGAGTTCG
721 TCGGCGGTAA CAGCCACCGG AGGAGTGAT GGAAATGACA GAAGAGAAC GAGAGAAGGG
781 CAGTCTGAGA GAAAGCAGAG GCGGAATTGG TCCCCTGAGT TGCAC AAGCG GTTCTTGAAT
841 GCGCTTCAAC AACTTGGTGG TTCACATGCA GCACACCTA AGCAAATCAG GGAGCTAATG
901 AAGGTTGACG GGCTTACTAA TGACGAAGTC AAAAGCCATT TACAGAAA TA TAGGTTGCAC
961 ACAAGAAGAC CAAGTCCATC AATCCACAAT AATGGCAATC CACAACCAAC ACAAGTGTGA
1021 GTTGTGGAG GCATATGGAT GCCAGCACCT GATTATGCAG CAGCAATGGC GGCATCAGGG
1081 GAAGCATCCG GTGTGTGCTG AGCCAATGGA ATCTATGCTC CAGTGGCTG ACCACCACCA
1141 CCACCTGCAG TGCAACAGGA ATCATCATCT CAAAAAGTTC AAAGATTACA GCACAAAGAA
1201 TGCCGTCCCT CAAAATCACA ATCTGAAGAA AGGTTTAGCC ATAGTGGGAA GAGAGCTCGT
1261 TCTGATTC CCGGTACATC ATCCTCCACT CACACTACCA CTACTTTCC TGTGTTTTAG

```

图 1 *JrEFM1* 序列

```

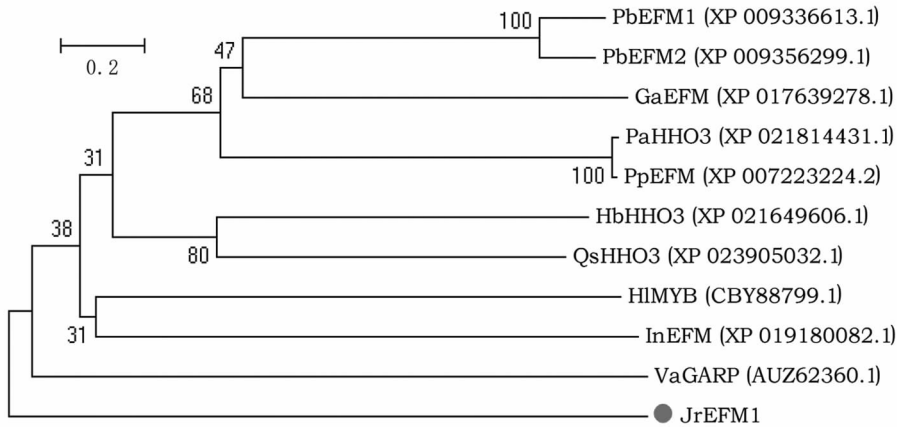
1   MCFRQNTFRG WGDYI ISSRP KRFASE THNF TNGLSYFPS L SFLFNEKMQH HGGLSVQKYV
61  KALEDELKRI OVFRRLEPLC LELVTOAIEA CROOLSGTT ENNSHGOSES SEQTTSNDVP
121 PVFEEFFPIK RSASSDDDNE EHHSHANTE TVIRNDSKKK SDWLRVQLW NNPTSDPRPK
181 EDVPRKATDL KRNGGGGGGG AFQPFQREKS VGKSASEGK TPSSVAREAA PAVGVATTS
241 SAVTATGGSD GNDRREQREG QSERKQRRNW SPELHKRFLN ALQQLGGSHA ATPKQIRELM
301 KVDGLTNDEV KSHLQKYRLH TRRPSPIHN NGNPQPQVV VVGGIWMPPAP DYAAAMAASG
361 EASGVAAANG IYAPVAAPP PPAVQQESS QKVQRLQHKC CRPSKQSEE RFSHSGRRAR
421 SDSPATSSST HTTTTFPVF

```

图 2 *JrEFM1* 蛋白序列

2.2 *JrEFM1* 启动子分析

从 NCBI 数据库中获得 *JrEFM1* 起始密码子上游 1 578 bp 的 DNA 序列进行启动子生物信息学分析,PlantCare 及 PLACE 预测显示,*JrEFM1* 启动子中除了 TATA-box,CAAT-box 等常见元件外,还包含与逆境响应及激素调控相关的顺式作用元件,如干旱胁迫(MBS),热激响应(HSE),ABA,SA,玉米素(O2-site),赤霉素响应(GARE-motif)等(表 2),推测其具有调控 *JrEFM1* 参与逆境刺激的能力。



进化树中蛋白名称后括号内为蛋白 GeneBank 登录号, 标尺表示蛋白之间的差异性, 分支上数值表示同一分支上蛋白的相关性。PbEFM1, PbEFM2, 梨 (*Pyrus × bretschneider*); HbHHO3, 橡胶 (*Hevea brasiliensis*); HIMYB, 蛇麻仔 (*Humulus lupulus*); VaGARP, 东北山葡萄 (*Vitis amurensis*); PaHHO3, 李树 (*Prunus avium*); PpEFM, 桃树 (*Prunus persica*); GaEFM, 棉 (*Gossypium arboreum*); InEFM, 番薯 (*Ipomoea nil*); QsHHO3, 栎树 (*Quercus suber*)。

图 3 *JrEFM1* 蛋白的进化分析

表 2 PlantCARE 及 PLACE 预测 *JrEFM1* 启动子的主要顺式作用元件

顺式作用元件	起始位点(方向)	序列	特性
Skn-1_motif	22(+)/351(-)	GTCAT	胚乳表达
circadian	430(-)/1 000(-)	CAANNNNATC	生物钟控制
TC-rich repeats	1 050(-)/1 267(-)	ATTTTCTTCA/ GTTTCTTAC	防卫及胁迫响应
TCA-element	647(-)/1 089(+)	CCATCTTTTT	SA 响应
O2-site	445(-) 542(-) 515(-)	GATGACATGA GATGATGTGG GATGATATGG	玉米素代谢调控
MBS	614(+)	TAACTG	干旱诱导型 MYB 结合位点
HSE	436(+)/762(+)/761(+)	CNNGAANNTTCNNG/ AAAAAATTC	热胁迫响应
GARE-motif	1 447(-)	AAACAGA	赤霉素响应
EIRE	1 019(+)	TTCGACC	诱导子响应元件
Box III	723(-)	CATTTACT	蛋白结合位点
3UTR Py-rich stretch	109(-)	TTCTTCTCT	表达水平相关
EBOXBNNAPA	51(+)/51(-)/476(+)/ 476(-)/524(+)/524(-)/ 609(+)/609(-)	CANNTG	ABA 响应
AE-box	849(+)	AGAAACTT	
Box 1	1 421(+)	TTTCAAA	光响应
Box 4	61(+)/390(+)	ATTAAT	
Sp1	901(-)	CC(G/A)CCC	

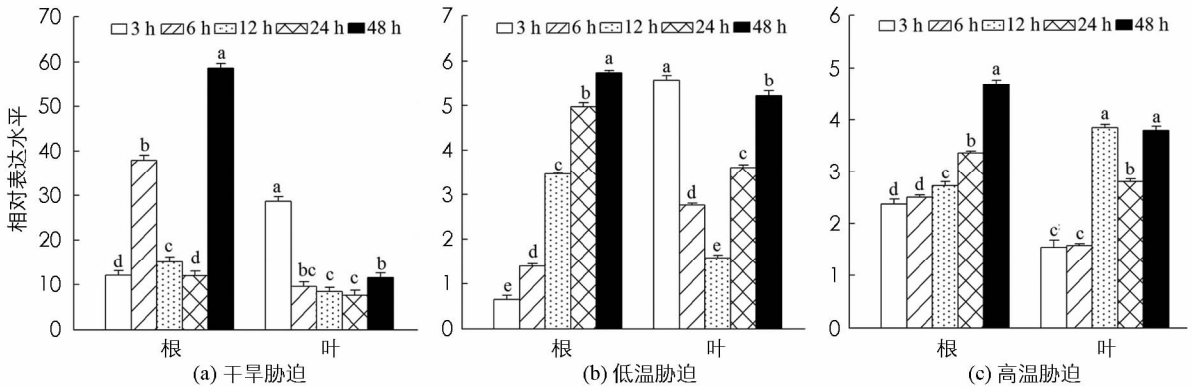
2.3 *JrEFM1* 响应非生物胁迫的表达模式

对基因进行逆境胁迫下的表达分析, 有利于快速了解其响应逆境的潜在功能。对核桃进行不同逆境处理后, 通过 qRT-PCR 技术分析 *JrEFM1* 在干旱、低温及热胁迫下的表达水平, 有利于预测 *JrEFM1* 响应干旱、低温及高温胁迫的功能。结果显示, *JrEFM1* 能被干旱、低温及高温胁迫不同程度地诱导; 不同胁迫时间下, 在叶和根中的表达水平存在明显差异; 在同一时间点, *JrEFM1* 在根和叶中的转录水平具有差异, 表明 *JrEFM1* 在干旱、低温及高温胁迫响应中具有时间表达及组织表达特异性(图 4)。从具体表达水平上看, 干旱胁迫能诱导 *JrEFM1* 在根和叶中高水平表达, 其在根中胁迫 48 h 的表达最大, 为对照的

58.62 倍; 在叶中, *JrEFM1* 的表达水平较根中低, 最大值出现在 3 h, 为对照的 28.64 倍(图 4a). 低温胁迫下, *JrEFM1* 在根的表达随胁迫时间延长变大, 到 48 h 时达最大, 为对照的 5.74 倍; 在叶中, *JrEFM1* 的表达在 3~12 h 逐渐下降, 在 12~48 h 逐渐升高, 最低值为对照的 1.58 倍(图 4b). 高温胁迫下, 根中 *JrEFM1* 的表达随时间延长逐渐增大, 为对照的 2.37~4.68 倍; 在叶中, 其转录水平为对照的 1.53~3.79 倍(图 4c).

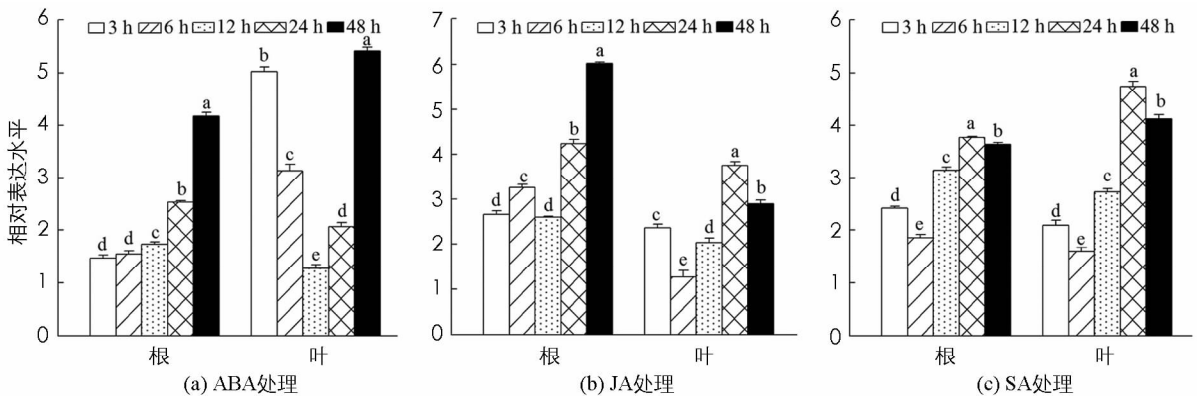
2.4 *JrEFM1* 响应外源激素刺激的表达模式

通常情况下, 在逆境响应中, 很多基因表达与相关激素信号通路相关. 因此, 对核桃材料进行不同的激素处理后分析 *JrEFM1* 的表达情况, 有利于了解 *JrEFM1* 响应激素调控的功能. 结果显示, 在 ABA, SA 和 JA 处理下, *JrEFM1* 在根和叶中都被明显诱导, 且也体现了时空表达特性和组织表达特性(图 5). ABA 处理下, *JrEFM1* 在根和叶中的表达趋势与低温胁迫下的表达相似, 即在根中随着时间延长逐渐增大, 为对照的 1.46~4.18 倍; 在叶中则先降低后增加, 12 h 表达水平最低, 为对照的 1.27 倍; 最大值出现在 48 h, 为对照的 5.41 倍(图 5a). JA 处理下, 根和叶中的表达趋势差异较大; 根中的最大表达为对照的 6.02 倍; 在叶中的转录水平, 为对照的 1.27~3.75 倍(图 5b). SA 处理下, *JrEFM1* 在根和叶中的表达趋势随时间变化相似, 在 6 h 和 24 h 分别达到最低和最高水平; 最大值分别为对照的 3.77, 4.75 倍(图 5c).



误差来自于 qRT-PCR 的 3 次重复; 图中小写字母不同表示在同一组织中各个时间点之间的差异具有统计学意义 ($p < 0.05$).

图 4 *JrEFM1* 在非生物胁迫下的表达水平



误差来自于 qRT-PCR 的 3 次重复; 图中小写字母不同表示在同一组织中各个时间点之间的差异具有统计学意义 ($p < 0.05$).

图 5 *JrEFM1* 在激素处理下的表达水平

3 讨 论

转录调控是植物逆境响应相关基因表达的最主要调控方式, 转录因子在其中起着重要作用. 植株的抗逆性是数量性状, 涉及大量相关基因的协调作用, 其分子调控机制十分复杂; 而在基因的表达调控过程中, 转录因子起到关键作用^[13]. 核桃是我国主要经济树种之一, 在推动区域经济发展上具有重要作用. 核桃同

其他植物一样,在受到外界干旱、盐碱、重金属、异常温度、病虫害等不良刺激时,相关转录因子会对胁迫产生应答反应^[13],以降低或消除给植株带来的危害.在诸多转录因子家族中,MYB类转录因子是植物中最大的转录因子家族之一.且大量研究表明,MYB在植株逆境调控中具有重要作用.如小麦(*Triticum aestivum*)R2M3-MYB亚家族基因 *TaMyb1D*在烟草(*Nicotiana tabacum*)植物中的过表达增强了烟草对干旱和氧化胁迫的耐受性,表明 *TaMyb1D*作为苯丙素代谢的负调控因子,是植物对干旱和氧化胁迫耐受性的正调控因子^[1].苹果(*Malus × domestica*)*MdMYB88*和 *MdMYB124*作为冷激结构蛋白3(COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3, *MdCSP3*)和生物钟相关基因1(CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1, *MdCCA1*)的直接调节因子,且能促进冷胁迫响应的 H₂O₂ 解毒^[14].番茄 *ARS1*基因能被盐胁迫诱导,其表达可有效改善植株的耐盐性^[8].因此,挖掘核桃 MYB 转录因子进行逆境响应分析,具有重要的研究前景和意义.在前期研究中,我们克隆获得了一些核桃逆境响应相关调控因子,其中包括 MYB.本研究我们对其中的 R1-MYB类基因 *JrEFM1* 进行分析,发现该蛋白在进化上与葡萄、番薯等的 MYB 相近,推测其可能与这些蛋白具有相似功能.

启动子是研究基因功能的重要组成部分,通常包含多种不同的顺式作用元件,与基因功能调节有关.如核桃 *JrVHAG1* 基因上游启动子中包含了 MYB, LTR, ARE 等与逆境响应相关的元件,经酵母单杂交试验调取获得上游能识别其中 MYB 元件的 *JrMYB2* 转录因子,参与 *JrVHAG1* 的 Cd 胁迫响应调控^[15].柞柳 *TheIF1A* 启动子包含 WRKY, MYB, DOF 等与逆境响应相关的元件,经分析发现,上游调控因子 *Dof* 等基因通过识别这些元件来调控 *TheIF1A* 响应盐和干旱等胁迫^[16].玉米 *ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 基因启动子序列中含有 ABA, SA, 低温等相关顺式作用元件,与盐、干旱、低温胁迫下 *ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 的表达相关^[17-18].本研究我们鉴定获得的 *JrEFM1* 上游 1 578 bp 启动子中也含有 SA, O₂-site, MBS, HSE 等顺式作用元件,预测该启动子也能调控 *JrEFM1* 参与植物生长发育及逆境响应过程.考虑到西北地区核桃生产受到高温和干旱等不良气候因子的严重制约,研究 *JrEFM1* 响应温度变化和干旱胁迫的潜在功能,有助于为核桃抗旱抵寒热相关生产管理及育种提供有效的基因资源和指导作用.因此,对核桃进行干旱、低温、高温等胁迫处理,分析根和叶中 *JrEFM1* 的表达水平,发现 *JrEFM1* 能被干旱、低温、高温不同程度地诱导,且体现出组织特异性(图 4).这与其他逆境响应相关基因在不同组织中的表达特性具有相似性.如柞柳 *HSP* 家族基因在不同时间的盐、旱等胁迫处理下,表现出了明显的根、茎、叶组织表达差异性^[19].核桃 WRKY 转录因子 *JrWRKY2* 和 *JrWRKY7* 在盐害、干旱、冷害、ABA 等处理下也表现出胁迫时间及根、叶差异表达^[10].核桃 *JrHSP20-1* 在不同温度胁迫下的表达也具有组织差异性^[17].可见,逆境响应相关基因的时空表达及组织表达特性普遍存在.表明 *JrEFM1* 在不同胁迫下的诱导表达与逆境响应调控具有重要关系.

MYB类转录因子在调控植株逆境响应中主要涉及激素信号通路.如拟南芥 *AtMyb7* 在种子发芽中起着关键作用.在 ABA 和高盐胁迫条件下, *AtMyb7* 植株显示出比野生型植株更低的发芽率^[18].与 WT 相比,过表达 *OsMYBR1* 的转基因植物表现出对干旱胁迫的更大耐受性和降低对 ABA 的敏感性,表明 *OsMYBR1* 参与介导植物对 ABA 和干旱的反应^[20].在荞麦中, *FtMYB13*, *FtMYB14*, *FtMYB15* 和 *FtMYB16* 为 JA 诱导型 MYB, 它们直接抑制荞麦中的芦丁生物合成. *FtMYB13* 能与 JA 信号传导的关键阻遏物 *Ft-JAZ1* 特异性地相互作用^[21].小麦 MYB 基因 *TaPIMP1* 受 ABA 和 SA 调控; *TaPIMP1* 表达不足的转基因小麦在 ABA 和 SA 处理后表现出胁迫应答基因的诱导受损,表明 *TaPIMP1* 作为一种正向分子连接体,通过调节小麦 ABA 和 SA 信号途径中与胁迫相关的基因调控抗旱性^[22].因此,本研究也分析了在不同激素(ABA, SA, JA)处理下 *JrEFM1* 的表达,发现该基因可被 ABA, SA, JA 显著诱导,并体现出组织特异性(图 5).由此可见, *JrEFM1* 调控植物逆境响应也极可能与 ABA, JA 及 SA 等信号通路相关.在后续研究中,我们将通过过量表达等方法全面分析 *JrEFM1* 的逆境响应功能机制.

参考文献:

- [1] WEI Q, ZHANG F, SUN F, et al. A Wheat MYB Transcriptional Repressor TaMyb1D Regulates Phenylpropanoid Metabolism and Enhances Tolerance to Drought and Oxidative Stresses in Transgenic Tobacco Plants [J]. *Plant Science*, 2017, 265: 112-123.
- [2] LIU X L, YU W W, ZHANG X H, et al. Identification and Expression Analysis under Abiotic Stress of the R2R3-MYB Genes in *Ginkgo biloba* L [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, 23(3): 503-516.
- [3] DU H, WANG Y B, XIE Y, et al. Genome-wide Identification and Evolutionary and Expression Analyses of MYB-related Genes in Land Plants [J]. *DNA Research*, 2013, 20(5): 437-448.
- [4] CHEN Y H, YANG X Y, HE KUN, et al. The MYB Transcription Factor Superfamily of Arabidopsis: Expression Analysis and Phylogenetic Comparison with the Rice MYB Family [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60(1): 107-124.
- [5] STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B. The R2R3-MYB Gene Family in Arabidopsis Thaliana [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5): 447-456.
- [6] CHENG L Q, LI X X, HUANG X, et al. Overexpression of Sheep Grass R1-MYB Transcription Factor *LcMYB1* Confers Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 70: 252-260.
- [7] LI H L, GUO D, PENG S Q. Molecular Characterization of the *Jatropha curcas* *JcR1MYB1* Gene Encoding a Putative R1-MYB Transcription Factor [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2014, 37(3): 549-555.
- [8] CAMPOS JF, CARA B, PEREZ-MARTIN F, et al. The Tomato Mutant *Ars1* (altered response to salt stress 1) Identifies an R1-type MYB Transcription Factor Involved in Stomatal Closure under Salt Acclimation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(6): 1345-56.
- [9] XU F, DENG G, CHENG S Y, et al. Molecular Cloning, Characterization and Expression of the Phenylalanine Ammonia-lyase Gene from *Juglans regia* [J]. *Molecules*, 2012, 17(7): 7810-7823.
- [10] YANG G, ZHANG W, LIU Z, et al. Both *JrWRKY2* and *JrWRKY7* of *Juglans regia* Mediate Responses to Abiotic Stresses and Abscisic Acid through Formation of Homodimers and Interaction [J]. *Plant Biology*, 2017, 19(2): 268-278.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] DAI X Y, XU Y Y, MA Q B, et al. Overexpression of an R1R2R3 MYB Gene, *OsMYB3R-2*, Increases Tolerance to Freezing, Drought, and Salt Stress in Transgenic Arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1739-1751.
- [13] LIU L, WHITE M J, MACRAE T H. Transcription Factors and Their Genes in Higher Plants Functional Domains, Evolution and Regulation [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 262(2): 247-257.
- [14] XIE Y, CHEN P, YAN Y, et al. An Atypical R2R3 MYB Transcription Factor Increases Cold Hardiness by CBF-dependent and CBF-independent Pathways in Apple [J]. *The New phytologist*, 2018, 218(1): 201-218.
- [15] XU Z G, GE Y, ZHANG W, et al. The Walnut *JrVHAG1* Gene is Involved in Cadmium Stress Response through ABA-signal Pathway and MYB Transcription Regulation [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 19.
- [16] YANG G Y, YU L L, WANG Y C, et al. The Translation Initiation Factor 1A (*TheIF1A*) from *Tamarix Hispidia* is Regulated by a Dof Transcription Factor and Increased Abiotic Stress Tolerance [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017(8): 513.
- [17] 孙宇栋, 杨桂燕, 贾彩霞, 等. 核桃 *JrHSP20-1* 基因鉴定及温度胁迫响应功能分析 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 41(6): 90-95.
- [18] KIM J H, HYUN W Y, NGUYEN H N, et al. AtMyb7, a Subgroup 4 R2R3 Myb, Negatively Regulates ABA-induced Inhibition of Seed Germination by Blocking the Expression of the bZIP Transcription Factor ABI5 [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2015, 38(3): 559-571.
- [19] YANG G Y, WANG Y C, ZHANG K M, et al. Expression Analysis of Nine Small Heat Shock Protein Genes from *Tamarix Hispidia* in Response to Different Abiotic Stresses and Abscisic Acid Treatment [J]. *Molecular Biology Re-*

ports, 2014, 41(3): 1279-1289.

- [20] YIN X, CUI Y, WANG M, et al. Overexpression of a Novel MYB-related Transcription Factor, *OsMYBR1*, Confers Improved Drought Tolerance and Decreased ABA Sensitivity in Rice [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 490(4): 1355-1361.
- [21] ZHANG K, LOGACHEVA M D, MENG Y, et al. Jasmonate-responsive MYB Factors Spatially Repress Rutin Biosynthesis in *Fagopyrum tataricum* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(8): 1955-1966.
- [22] ZHANG Z Y, LIU X, WANG X D, et al. An R2R3 MYB Transcription Factor in Wheat, TaPIMP1, Mediates Host Resistance to *Bipolaris Sorokiniana* and Drought Stresses through Regulation of Defense- and Stress-related Genes [J]. *The New Phytologist*, 2012, 196(4): 1155-1170.

On Expression Patters of Walnut R1-MYB Transcription Factor *JrEFM1* Responses to Different Stresses and Plant Hormones

MA Kai-heng^{1,2}, LI Zi-yi¹, LI Da-pei¹,
YANG Yu-ting¹, CHEN Shu-wen¹, YANG Gui-yan^{1,2}

1. Key Laboratory of Economic Plant Resources Development and Utilization in Shaanxi Province, College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Walnut and Chestnut Experiment Station of Shanyang, College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China

Abstract: MYB family transcription factors play important roles in regulation of plant growth, development and stress response. In this study, a R1-MYB transcription factor *EFM* gene (named *JrEFM1*) has been cloned, whose basic biological function has been predicted by analysis of the tissue expression profiles under abiotic stresses (drought, cold, heat) and plant hormone treatments (ABA, JA, SA) by means of the bioinformatics and real-time fluorescence quantitative RT-PCR (RT-qPCR) methods. The results show that the coding sequence (CDS) of the *JrEFM1* is 1320 bp, the coding polypeptide contains 439 amino acids, the molecular weight is 48.322 KDa, and the theoretical isoelectric point is 9.26. *JrEFM1* shared close evolution with the MYB transcription factors from *Vitis amurensis* and *Ipomoea nil*. The upstream promoter segment of *JrEFM1* is isolated and predicted to contain abundant *cis*-elements, such as drought stress (MBS), heat shock response (HSE), salicylic acid (SA), zeatin (O2-site) and gibberellin response (GARE-motif). The expression profiles of *JrEFM1* under drought, cold, heat, ABA, JA and SA treatments have been analyzed by qRT-PCR and show that *JrEFM1* could be induced by these treatments with root and leaf tissue specificity. These results indicate that *JrEFM1* could respond to stress and related to hormone signaling pathway; *JrEFM1* could be used as a good candidate gene for walnut stress response mechanism and resistance breeding.

Key words: *Juglans regia*; MYB transcription factor; *JrEFM1* gene; gene expression; stress