

中/国/资/源/生/物/研/究/系/列

白桦抗旱耐盐和次生壁形成的分子机理

国会艳 杨传平 王玉成/著



科学出版社

白桦抗旱耐盐和次生壁 形成的分子机理

国会艳 杨传平 王玉成 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书首先进行 *BplMYB46* 转录因子的核定位; 分析该基因是否被胁迫诱导以及在不同部位的表达。克隆启动子, 进行顺式元件分析, 检测其活性; 构建过表达和抑制表达载体, 转基因后进行胁迫处理, 根据表型、组化、生理指标、解剖学以及 *SOD* 等基因的表达确定 *BplMYB46* 基因是否具有抗逆性和在调控次生壁形成中的功能; 分析其是否有转录激活活性以及与同源的白桦 *MYB* 的互作; 构建随机元件库, 酵母单杂交筛选与其互作的元件; 利用表达谱技术分析 *BplMYB46* 调控的下游代谢途径及靶基因。最后, 确定白桦 *BplMYB46* 基因在响应非生物胁迫和次生细胞壁形成中的功能及调控机制, 为白桦的遗传改良奠定基础。

本书可供林学专业的高年级本科生、研究生学习参考, 也可以作为林业院校和师范院校林木遗传育种、分子生物技术等相关专业研究生的科研参考书。

图书在版编目 (CIP) 数据

白桦抗旱耐盐和次生壁形成的分子机理 / 国会艳, 杨传平, 王玉成著.
—北京: 科学出版社, 2015.9
ISBN 978-7-03-045509-3

I. ①白… II. ①国… ②杨… ③王… III. ①白桦-基因转录-研究
IV. ①S792.153

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 202609 号

责任编辑: 张会格 白 雪 / 责任校对: 郑金红

责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 北京铭轩堂广告设计有限公司

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 9 月第 一 版 开本: 720 × 1000 B5

2015 年 9 月第一次印刷 印张: 9 3/4

字数: 200 000

定价: 68.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

低温、干旱和高盐等逆境胁迫会给植物生长带来严重的危害，致使产量降低、品质下降。植物在逆境胁迫下会产生一系列的应答反应，以减轻或消除逆境胁迫对植物造成的伤害，这种应答反应是一个多基因、多信号途径以及多基因产物的复杂过程。其中包括在转录水平调控对应基因的表达，转录水平的调控由启动子与转录因子相互作用完成。在逆境胁迫条件下，转录因子与胁迫应答基因启动子上的顺式作用元件结合，特异性地启动应答基因的转录，从而做出相应的调节反应。

植物维管组织是植物的“骨架”，包括木质部和韧皮部。木质部主要运输水分和矿物质，并提供机械支持作用；韧皮部运输光合产物和一些植物生长发育相关的营养物质。维管组织发育是一个受多基因调控、内外环境共同影响的生理过程，包括维管组织的排列方式、叶脉脉络的建成、原形成层细胞的分裂分化、初生木质部与次生木质部的分化等。植物的次生生长过程使细胞壁加厚，植物根、茎加粗，次生生长主要为植物次生细胞壁的形成，涉及细胞壁组分的变化，主要包括纤维素的定向排列和木质素的沉积，在纤维素和木质素的合成过程中需要很多酶和转录因子的参与。

MYB 转录因子是植物中最大的转录因子家族成员之一，主要参与植物细胞分化、激素和环境因子的应答，并对植物次生代谢及叶片等器官的形态建成具有重要的调控作用。有研究报道，MYB 转录因子能够通过 ABA 信号途径调节气孔的关闭、抵御干旱和病菌的胁迫；调控纤维素与半纤维素的合成；调节植物苯丙烷类次生代谢途径，该过程涉及木质素的合成；参与植物次生生长，并与其他转录因子构成次生壁合成的转录调控网络。因此，对于 MYB 转录因子的研究非常重要。

本书主要研究了白桦 BplMYB46 转录因子的表达模式、功能及行使功能的信号转导机制。第 1 章简要介绍了植物基因启动子和转录因子的研究概况和国内外发展趋势；第 2 章主要进行了 BplMYB46 转录因子的亚细胞定位和在不同生长期、不同组织以及同一组织不同部位的时空表达模式研究；第 3 章主要进行了 BplMYB46 基因在盐旱胁迫下以及在植物次生细胞壁形成中的功能研究；第 4 章首先确定 BplMYB46 转录因子的转录激活结构域，然后与白桦的同源 MYB 转录因子进行互作分析；第 5 章主要通过酵母单杂交和染色质免疫共沉淀技术研究了 BplMYB46 转录因子与下游基因的互作；第 6 章通过数字基因表达谱技术分析了 BplMYB46 转录因子在与下游基因互作中一些基因共同参与白桦抗旱耐盐及次生

细胞壁合成过程；第 7 章简要讨论了 BplMYB46 转录因子的功能和作用机制，对未来的研究工作进行了展望。

国会艳博士撰写第 2 章至第 6 章，杨传平教授撰写内容简介、前言和第 1 章，王玉成教授撰写第 7 章，刘桂丰主审。本书的研究和出版得到了东北林业大学国家高技术研究发展计划（863 计划）“白桦、桉树等分子育种与品种创制”（项目编号：2011AA100202）课题以及牡丹江师范学院“烟草抗 PVY 基因功能验证及 K326、中烟 100 抗性改良”（项目编号：110201301010）的国家烟草专卖局课题资助，特致诚挚谢意。

由于作者水平有限，难免有不足之处，恳请同行、专家以及学者批评指正。

著 者

2015 年 3 月 28 日

目 录

前言

1 绪论	1
1.1 植物基因启动子的研究进展	1
1.1.1 启动子的结构和功能	1
1.1.2 启动子的分类	1
1.2 植物转录因子的研究	2
1.2.1 转录因子的结构和分类	2
1.2.2 转录因子的活性	4
1.2.3 转录因子的功能	4
1.2.4 MYB 转录因子的研究进展	6
1.3 本研究的目的和意义	8
2 白桦 <i>BplMYB46</i> 基因的表达研究	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 植物材料	10
2.1.2 载体与菌株	10
2.1.3 主要试剂	10
2.1.4 药品及培养基制备	11
2.2 实验方法	12
2.2.1 <i>BplMYB46</i> 转录因子的亚细胞定位	12
2.2.2 白桦 <i>BplMYB46</i> 基因分析	16
2.2.3 白桦 <i>BplMYB46</i> 基因的表达	16
2.2.4 <i>BplMYB46</i> 启动子序列分析	18
2.2.5 <i>BplMYB46</i> 启动子的时空表达分析	18
2.3 结果与分析	22
2.3.1 <i>BplMYB46</i> 转录因子的亚细胞定位	22
2.3.2 白桦 <i>BplMYB46</i> 基因分析	24
2.3.3 白桦 <i>BplMYB46</i> 基因的表达	24
2.3.4 pCAMBIA1301- <i>BplMYB46</i> 启动子序列元件分析	27
2.3.5 <i>BplMYB46</i> 启动子的时空表达	28
2.4 讨论	30

2.5 本章小结.....	31
3 白桦 <i>BplMYB46</i> 基因的功能研究	33
3.1 实验材料.....	33
3.1.1 植物材料.....	33
3.1.2 载体与菌株.....	33
3.1.3 试剂.....	33
3.1.4 溶液及培养基制备.....	34
3.2 实验方法.....	35
3.2.1 <i>BplMYB46</i> 基因植物过表达载体的构建和工程菌的制备.....	35
3.2.2 <i>BplMYB46</i> 基因对白桦的遗传转化.....	40
3.2.3 <i>BplMYB46</i> 转基因白桦在非生物胁迫下的抗逆分析.....	42
3.2.4 <i>BplMYB46</i> 基因在白桦次生壁合成中的功能分析.....	46
3.3 结果与分析.....	48
3.3.1 <i>BplMYB46</i> 基因植物表达载体的构建和工程菌的制备.....	48
3.3.2 转基因白桦的筛选与检测.....	52
3.3.3 <i>BplMYB46</i> 转基因白桦苗非生物胁迫下的抗逆分析.....	54
3.3.4 <i>BplMYB46</i> 基因在白桦次生壁合成中的功能分析.....	65
3.4 讨论.....	69
3.5 本章小结.....	71
4 <i>BplMYB46</i> 转录激活结构域和同源蛋白的互作研究	73
4.1 实验材料.....	73
4.1.1 菌株与载体.....	73
4.1.2 常用试剂.....	73
4.1.3 药品及培养基制备.....	73
4.2 实验方法.....	75
4.2.1 <i>BplMYB46</i> 转录因子转录激活结构域的研究.....	75
4.2.2 <i>BplMYB46</i> 转录因子与同源基因互作的研究.....	78
4.3 结果与分析.....	81
4.3.1 <i>BplMYB46</i> 转录因子转录激活结构域分析.....	81
4.3.2 <i>BplMYB46</i> 转录因子与同源蛋白的互作.....	83
4.4 讨论.....	86
4.5 本章小结.....	87
5 <i>BplMYB46</i> 识别顺式作用元件的研究	89
5.1 实验材料.....	89
5.1.1 菌株与载体.....	89
5.1.2 主要试剂.....	89

5.1.3 药品及培养基制备.....	90
5.2 实验方法.....	91
5.2.1 BplMYB46 识别顺式作用元件的研究	91
5.2.2 BplMYB46 与顺式作用元件的互作验证	100
5.2.3 染色质免疫共沉淀 (ChIP) 技术分析 BplMYB46 与下游基因的互作....	106
5.3 结果与分析.....	109
5.3.1 BplMYB46 识别顺式作用元件的分析	109
5.3.2 BplMYB46 与顺式作用元件互作分析	114
5.3.3 ChIP 实验结果分析.....	117
5.4 讨论.....	118
5.5 本章小结.....	120
6 <i>BplMYB46</i> 调控下游基因的表达分析.....	121
6.1 实验材料.....	121
6.1.1 植物材料.....	121
6.1.2 常用试剂	121
6.1.3 溶液配制	121
6.2 实验方法.....	121
6.2.1 RNA 的提取与反转录.....	121
6.2.2 数字基因表达谱文库的构建和测序	122
6.2.3 数据的处理.....	122
6.2.4 测序评估	122
6.2.5 基因表达量统计	123
6.2.6 差异表达基因筛选	123
6.2.7 RT-PCR 方法验证表达谱测序结果.....	123
6.3 结果与分析.....	125
6.3.1 表达谱测序结果评估	125
6.3.2 差异表达基因分析.....	129
6.3.3 RT-PCR 验证表达谱结果.....	131
6.4 讨论.....	132
6.5 本章小结.....	133
7 讨论与展望.....	134
7.1 讨论.....	134
7.2 展望.....	136
参考文献.....	137

1 绪 论

1.1 植物基因启动子的研究进展

1.1.1 启动子的结构和功能

对多种基因启动子区的研究发现,大多数功能基因的启动子具有相同的结构模式,植物基因在一般情况下以 A (腺嘌呤) 为转录起始点,两侧多为嘧啶^[1,2],在-25~-30bp 处为 TATA 框,-70~-78bp 处为 CAAT 盒,-80~-110bp 区为 GC 盒。TATA 框上游的保守序列被称为上游启动子元件 (UPE),这些序列和结构共同作用以确保转录精确而有效地起始。真核生物基因启动子的核心结构 (corepromoter) 在转录起始点-40~+50,能结合并调控转录起始前复合物的装配、确定转录起始位点并调控转录的方向、对胞内的激活子及抑制子做出应答的功能^[3],由 RNA 聚合酶指导转录的基因启动子主要包含一个 TATA 框和 (或) 起始子 (Inr)。

1.1.2 启动子的分类

按照基因的表达方式,启动子被分为组成型启动子 (基因在植物中的表达不被某种物质诱导并无时空限制)、诱导型启动子 (基因的表达可被某种物质诱导,无诱导物存在时基因表达水平很低甚至无表达) 和组织特异性启动子 (基因只在植物的某个组织或器官中表达)。

1.1.2.1 组成型启动子

CaMV35S 启动子最初是从烟草花叶病毒基因的启动子分离得到的,可以启动多种植物异源基因的表达,属于组成型启动子。分几个区段的启动子的研究显示,不同区段能够对基因表达产生组织特异性。A 区 (-90~+8bp) 多在根或将发育为根的胚组织中表达,B 区 (-343~-90bp) 多在地上部分表达。完整的 CaMV35S 启动子是植物基因工程应用最多的组成型启动子,在拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]^[4]、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)^[5] 及毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr.)^[6] 等植物的转基因工作中都有广泛应用。

actin 启动子是植物体内一个高表达的组成型启动子,actin 基因编码的蛋白质

属于细胞骨架的基本物质,因此这个启动子在所有组织中可能都有一定的活性^[7]。*Act1* 启动子是 *actin* 家族中应用最多的启动子之一,其起始转录的必要元件位于起始密码子上游的 113kb 区域内。水稻 *Act1* 基因的 5'端有很多重复的短小元件:在 559~570bp 和 608~619bp 处分别有一个、-316~-345bp 处前后有两个 16bp 的序列 AAG/CCCC(T)AAAGTG/CCTA,其下游相隔 20bp 处重复接连 8 组保守的序列 CCCAA 和 12bp 的重复序列 GGTTTTTAAGTT。位于重复元件下游的很多序列被证实能够调控基因表达,-146~-186bp 是一个 poly A,40 个中有 35 个碱基 A。 -35~-41bp 是 TATA 框,它的 3'端有一个 79bp 的外显子,GC 丰富并包括很多重复序列 ATCC 三聚碱基。*Act1* 基因 5'端的内含子长 313bp,对基因的表达有相当重要的作用,是它的第一个内含子^[8]。单子叶植物常用的组成型启动子还有玉米泛素基因 (ubiquitin) 的启动子等。

1.1.2.2 诱导型启动子

植物受不同信号刺激,据此启动子主要分为物理、化学和生物因素诱导表达的启动子。

1.1.2.3 组织特异性启动子

受启动子调节的基因转录一般只发生在某些特定组织或器官中,呈现发育调节的特性。

1.2 植物转录因子的研究

1.2.1 转录因子的结构和分类

转录因子 (transcription factor, TF), 亦称反式作用因子, 是一类能与真核生物基因启动子的顺式作用元件发生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白, 通过它们之间及与其他相关蛋白质之间的相互作用, 激活或抑制转录。根据蛋白质的结构, 转录因子主要具有 4 个功能域, 为 DNA 结合域 (DNA-binding domain)、转录调控域 (transcription regulation domain, 包括激活域和抑制域)、寡聚化位点 (oligomerization site) 和核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)。转录因子通过这些功能域, 在特定的时间进入细胞核与启动子顺式作用元件或其他转录因子的功能域相互作用来调控基因的转录表达^[9]。

在真核生物中, mRNA 的转录起始是一个非常复杂的过程, 在基因表达中起调控作用的顺式作用元件由启动子和 DNA 调控序列组成。基因的转录起始涉及很多转录因子, 这些转录因子可以分为两类, 包括普遍性转录因子 (general transcription

factor) 和特异性转录因子 (specific transcription factor)。目前, 在真核生物中分离到的普遍性转录因子有 TF II A、B、D、E、F、(G/J)、H 和 I, 主要作用是在启动子的 TATA 框与 RNA 聚合酶 II 组装成转录起始复合物, 从而激活所有基因的转录。特异性转录因子也是一种 DNA 结合蛋白, 它和 DNA 上其他调控元件结合, 只激活特定的基因转录^[10]。特异性转录因子根据 DNA 结合域的不同分为不同种类, 如 MYB 类、bZIP 类、ERF 类、WRKY 类等, 详细信息见表 1-1。其中, 一些结构域还可根据其特征区中保守的氨基酸残基的数目和位置划分为几个亚类, 如根据半胱氨酸 (C) 和组氨酸 (H) 残基的数量和位置, 将含锌指结构域的转录因子分为 C_2H_2 、 C_2HC 、 C_2C_2 、 $C_2HCC_2C_2$ 、 $C_2C_2C_2C_2$ 等亚类^[11]。

表 1-1 植物转录因子 DNA 结合域的特点

Table 1-1 The characteristics of DNA-binding domain in plant transcription factors

转录因子类型	DNA 结合域结构特征	典型的转录因子
MYB	含有 1~3 个由 51~53 个氨基酸残基组成的呈螺旋-转角-螺旋构象的不完全重复序列, 每个重复都含 3 个保守的色氨酸残基	C1、P、PL (玉米) Atmyb1 (拟南芥)
AP2/EREBP	约由 60 个氨基酸残基组成, 含有 3 个平行的 β 折叠和 1 个双亲性 α 螺旋	DREB1、DREB2 (拟南芥) EREBP1-3 (烟草)
MADS	约由 56 个氨基酸残基组成, 含有 1 个长 α 螺旋和两个 β 链	AG、AP1、CAL、AP3 (拟南芥) 和 TM3 (番茄)
bHLH、MYC	含有两个相连的基本亚区, 其中碱性氨基酸区与 DNA 结合有关, 螺旋-环-螺旋区参与二聚体形成	Lc、B-Peru、R-S (玉米) RAP-1 (拟南芥)
HD	约由 60 个氨基酸残基组成的折叠成球形的结构域, 含有 3 个或 4 个 α 螺旋	Kn1 (玉米) OSH1 (水稻) KNAT1 (拟南芥)
C_2H_2 (Zn)	由 30 个氨基酸残基组成, 含两个保守的半胱氨酸和 (或) 两个组氨酸残基, 它们在四级结构上与锌离子结合	WZF1 (小麦) EPF (矮牵牛) PEI1 (拟南芥)
bZIP	由 60~80 个氨基酸残基组成, 包括 1 个有 25 个氨基酸残基的富含碱性氨基酸的区域和 1 个亮氨酸拉链区	O2 (玉米) PosF21 (拟南芥) HBP-1 (小麦)
AT-hook motif	含有 1 个 R (G/P) RGRP 共有核心序列, 通过 RGR 区与富含 A/T 的 DNA 区域小沟结合	SB16 (大豆) PF1 (水稻)
trihelix	富含碱性、酸性以及脯氨酸/谷氨酸, 呈螺旋-环-螺旋-环-螺旋构象	GT-2 (水稻, 拟南芥)
HMG 框	由 3 个 α 螺旋组成的 L 形区, 两臂张开约成 80°	HMGa (玉米) ATHMG (拟南芥)
B3	VP1 和 ABI3AC-端含 120 个氨基酸残基的保守序列	VP1 (玉米) PvAlf (菜豆)
ARF	由 350 个氨基酸残基组成的类似 B3 的序列	ARF1 (拟南芥)

1.2.2 转录因子的活性

转录因子的活性受很多因素的影响,包括转录后修饰、在细胞中的位置及与其他蛋白质的互相作用等。转录后修饰对调控转录因子的活性有着十分重要的作用。转录后修饰主要表现在对蛋白质的磷酸化修饰上,它不仅可以调节转录因子进入细胞核的过程,还可以改变转录因子的活性及其与 DNA 的结合能力。例如,调节玉米种子醇溶蛋白基因表达的转录因子 O2,具有 8 个能够结合氨基酸的位点,能被酪蛋白激酶 II (CK II) 磷酸化,其中转录激活区内就有 6 个。O2 有多种磷酸化、非磷酸化或低磷酸化形式能与 DNA 结合,而高磷酸化形式缺乏与 DNA 结合的能力,这进一步验证了 O2 磷酸化比例与昼夜变化紧密相关,进而来调控基因的转录活性,以确保蛋白质定时、定量的合成^[12]。

转录因子是在细胞核内发挥其功能的,所以,对其进入细胞核过程的调节至关重要。转录因子进入细胞核是主动运输的过程,首先通过核定位信号区与受体蛋白之间相互作用,然后与位于核孔处的亲核蛋白结合,借助亲核蛋白通过核孔复合体进入细胞核内。没有核定位信号区的转录因子靠与具有核定位信号区的转录因子发生作用进入细胞核^[13]。

转录因子的活性还与其他蛋白质间的相互作用有关。转录因子之间通过寡聚化区发生作用,对它们与 DNA 的结合方式、能力和在细胞中的位置进行调节。

1.2.3 转录因子的功能

1.2.3.1 转录因子与植物抗逆

植物逆境胁迫包括生物胁迫和非生物胁迫。生物胁迫主要为病虫害、杂草等,非生物胁迫主要为干旱、高盐碱、水涝、高温及冻害等。在胁迫刺激下,一些转录因子过量表达,将信号传递和放大,调控相应的下游功能基因的表达,从而提高植物的抗逆性^[14]。

与植物逆境相关的转录因子主要有 AP2/EREBP 类、bZIP 类、WRKY 类、bHLH 类、MYB 类和 NAC 类基因家族。其中, CBF (C-repeat binding factor) 转录因子为碳亚基结合因子,属于 AP2/EREBP 中很重要的一类,主要和低温胁迫密切相关。Oakenfull 等学者首先克隆并获得了生长在北极的欧洲越橘的 CBF 基因,构建过表达载体后将其转入拟南芥中,结果发现欧洲越橘的 CBF 过表达能够提高拟南芥的抗寒能力^[15]。Lee 和 Thomashow 在拟南芥中发现 3 个与光周期相关的 CBF 基因,在长日照条件下,光敏色素 B (phytochrome B) 和光敏色素交互因子 (phytochrome-interacting factor) 使 CBF 基因表达量下降,而在短日照条件下, CBF

基因被抑制表达的情况被解除,表达量急剧升高,最后得出结论:这3个 *CBF* 基因短日照情况下在拟南芥中的表达量高于长日照情况下,从而提高在短日照情况下拟南芥的抗低温能力^[16]。*ERF* 转录因子也属于 AP2/EREBP 中的一类,Xiong 等^[17]在油菜中找到一个 *ERF* 基因,发现在低温、干旱、高盐 and ABA 的胁迫下油菜中 *ERF* 基因的表达量和未处理的相比有所上调,于是将此基因进行定点突变,突变后增强了 *ERF* 基因与一个低温胁迫元件结合的能力,将 *ERF* 基因和突变的 *ERF* 基因分别转入拟南芥中,结果发现 *ERF* 基因过表达的转基因拟南芥的抗寒能力高于野生型拟南芥,而突变的 *ERF* 基因过表达的转基因拟南芥的抗寒能力优于 *ERF* 基因过表达的转基因拟南芥。

bZIP 转录因子也是一类重要的转录因子,参与植物体内的基因表达及调控。Lee 等在甜椒中获得一个 bZIP 转录因子,它能够被一些非生物刺激和逆境诱导,把它构建到过表达载体中后转入拟南芥,结果发现转基因拟南芥在整个生长阶段抗干旱和高盐能力有很大提高^[18]。Lu 等在水稻中发现一个 *OsbZIP72* 转录因子,它能够被 ABA 信号途径诱导,并且通过酵母杂交实验发现此转录因子能够与 ABRE 元件结合,转 *OsbZIP72* 基因水稻显示了对 ABA 的超敏性,实验结果表明 *OsbZIP72* 能通过 ABA 信号途径诱导提高水稻的抗干旱能力^[19]。

WRKY 蛋白是一类植物所特有的转录因子超家族,在植物抗逆过程起着关键的作用。Wang 等学者在葡萄中发现一些 WRKY 转录因子,实时荧光定量 PCR 结果发现有 36 个 WRKY 转录因子的表达水平在低温诱导下发生了变化,鉴定出 15 个转录因子确实与低温胁迫相关,其中有 3 个基因与 ABA 信号转导途径紧密关联^[20]。Tripathi 等做了 WRKY 转录因子在干旱响应下的综述性研究,因为在干旱胁迫情况下一般都伴随着高温胁迫和密集强度的光照,所以研究 WRKY 转录因子在干旱胁迫下的表达模式非常重要^[21]。Jiang 和 Deyholos 在拟南芥中发现两个与高盐胁迫相关的 WRKY25 和 WRKY33 转录因子,将它们转入拟南芥后提高了拟南芥的耐盐能力,并分别鉴定了 WRKY25 和 WRKY33 转录因子下游的 31 个和 208 个启动子,在这些启动子序列中包含大量的 W-box 元件^[22]。

bHLH 类转录因子及同源物是植物基因组的一个大家族,参与植物中多种生理生化反应过程,但 bHLH 类转录因子在植物中的功能被解析得还不是十分透彻^[23]。近些年,bHLH 类转录因子被研究得比较多,Jiang 等在拟南芥中得到一个 *bHLH92* 基因,观察到在高盐、干旱和低温胁迫下,*bHLH92* 基因有丰富的转录水平,并且利用微阵列技术获得了在高盐胁迫下 *bHLH92* 基因作用的 19 个下游靶基因^[24]。

MYB 类转录因子是数量最大、功能最多的转录因子家族之一,在植物胁迫应答中起着重要的调节作用。拟南芥的 *AtMYB68* 能够抵抗高温胁迫^[25],*AtMYB2* 的耐寒能力显著增强^[26],水稻 *Osmby4* 基因的过表达大大提高了转基因水稻对干旱、高盐、紫外辐射等的耐受能力^[27]。NAC 转录因子参与多种植物生物和非生物胁迫反应、激

素信号转导途径等过程,对于植物的生长发育起到关键的调节作用^[28]。Zhu 等在西红柿中获得一个 *SINAC4* 基因,实验结果证明, *SINAC4* 基因能够抵抗高盐和干旱胁迫的逆境生长环境^[29]。Liu 等学者在水稻和棉花中发现一个逆境胁迫相关的 *SNAC1*,实验证明它能够通过增强根的发育和减少蒸腾速度来抵抗高盐和干旱胁迫^[30]。

从以上研究可以看出,转录因子在植物抗逆方面的作用是很重要的,但很多时候,单独的一个转录因子并不能完全起到抗逆作用,需要多个转录因子共同作用才能完成。Xu 等在葡萄中获得 2 个 *bHLH* 基因,将它们转入拟南芥后通过正向调节 *CBF* 基因的表达,增强了拟南芥抗低温耐力^[31]。Hemsley 等在拟南芥中发现 3 个 *MED* (调节复合体亚基) 基因能激活下游 *CBF* 基因的表达,从而使植物的抗低温能力提高^[32]。Shan 等在香蕉中发现一个 *MaNAC1* 基因,它通过与下游的 ICE1-CBF 低温诱导信号途径的交互作用,从而提高香蕉的抗低温能力^[33]。

1.2.3.2 转录因子与植物次生代谢

次生代谢是植物对环境的适应性结果,当植物受到病菌或生物以及非生物胁迫后,产生并累积很多次生代谢物,从而提高自身的抵抗能力。转录因子在植物次生代谢调节方面也起着非常重要的调控作用。陆续有学者在这方面进行了相关的研究。Fits 和 Memelink 在长春花中发现 AP2/EREBP 类中一个基因 *ORCA3* 参与吲哚萜类生物碱合成^[34], Heinekamp 等在烟草中获得一个 *bZIP* 基因,它能够调控苯丙烷代谢途径^[35], Johnson 等在拟南芥中找到一个 *WRKY* 转录因子,它能够调控拟南芥的单宁酸、毛状体以及黏液的合成^[36], Xie 等在苹果中发现一个 *bHLH* 转录因子,它在低温响应中能够促进花青素的积累^[37],在 2014 年有学者在荔枝中发现一个决定花青素合成的关键性转录因子 *LcMYB1*^[38]。植物的次生代谢有一个复杂的调控网络,很多时候需要多个基因共同参与才能完成, Hartmann 等发现在拟南芥中 *MYB*、*bZIP* 和 *bHLH* 这 3 个转录因子在光响应条件下通过相互作用来调控苯丙烷的合成^[39]。

1.2.4 MYB 转录因子的研究进展

1.2.4.1 MYB 转录因子的结构

在 *MYB* 转录因子的 N 端,有一个 DNA 结合域(DNA-binding domain, DBD),含有 51~53 个氨基酸,在这个结合区通常含有 1~3 个串联的、不完全重复的 *MYB* 结构域(R1、R2 和 R3),每个结构域折叠成螺旋-转角-螺旋(HTH)与 DNA 大沟结合^[40]。每个结构域一般含有 3 个保守的色氨酸残基(每隔约 18 个氨基酸间隔 1 个色氨酸残基)起着疏水核心的作用,对维持螺旋-转角-螺旋构型有重要的作用。在 *MYB* 转录因子的 C 端一般含有一个富含酸性氨基酸的转录激活区(transcription activation domain, TAD),折叠成双亲性螺旋起作用,具有一定的可塑性。在 C 端

还有一个不完全界定的负调节区 (negative regulatory domain, NRD)^[41]。根据保守区 DNA 结构域对转录因子进行分类, 植物中的 MYB 类转录因子可分为 3 个亚类: R1-MYB、R2R3-MYB 和 R1R2R3-MYB。R1-MYB 蛋白亚类, 如拟南芥的 CCA1、LHY 和 CPC1 蛋白^[42]以及玉米的 IBP1 蛋白^[43], R1 型 MYB 转录因子可能是一类重要的端粒结合蛋白, 能调控基因转录并保持染色体结构的完整; R1R2R3-MYB 亚类, 如拟南芥的 MYB3R4 和 MYB3R1^[44, 45]等蛋白质, 主要调节细胞的分化, 调控细胞周期; R2R3-MYB 蛋白是最常见的 MYB 转录因子类型, 这类转录因子在拟南芥^[46]、番茄^[47]以及黄瓜^[48]等植物中广泛存在, 对植物的细胞分化、器官形成和形态建成等具有一定的调控作用^[49, 50], 调控植物次生代谢, 参与植物对激素及环境因子的应答^[51, 52]。

1.2.4.2 MYB 转录因子与植物细胞形态建成及次生生长

MYB 转录因子在植物的形态建成方面的功能被研究得比较清楚。Wang 等在拟南芥中发现 GLABRA2 和 R3-MYB 能够正向调节毛状体和根毛的发育^[53]。Gan 等学者在拟南芥中发现一个新的 R3-MYB, 它通过下调拟南芥正向调节毛状体发育基因的表达式来减少拟南芥毛状体的数量^[54]。Slabaugh 等学者在拟南芥中发现一个内质网膜锚定转录因子 MaMYB, 它属于 R2R3-MYB, 能够与乙烯联合作用增加拟南芥根毛的长度^[55]。近年来又有学者发现与毛状体发育相关的 R2R3-MYB 转录因子^[56]。Machado 等在棉花中获得一个 R2R3-MYB-GhMYB25, 将它进行抑制表达后, 棉花的纤维长度变短、毛状体数量减少, 而将 GhMYB25 过表达之后, 棉花的纤维长度增加、毛状体数量也增多^[57]。接下来, 又有学者在棉花中发现与纤维长度发育相关的 R2R3-MYB 转录因子 GhMYB109, 并进行相关的研究工作, 结果证明此转录因子能够促进棉花纤维的发育, 从而增加棉花纤维的长度^[58]。有一些学者发现 MYB 转录因子与花的发育如花形、花色等密切相关^[59, 60]。

次生生长主要是维管形成层的分化活动, 使植物细胞壁加厚、茎与根加粗的过程, 主要为次生细胞壁的发育。次生细胞壁包括木质素、纤维素和半纤维素等成分。研究发现, 很多转录因子如 AP2/EREBP、MYB、NAC、MADS、WRKY 等都能调控植物的次生生长, 其中 NAC 和 MYB 转录因子起着关键性作用。Zhong 等发现拟南芥的 AtMYB46 是次生壁相关的 NAC 结构蛋白 1 (secondary wall-associated NAC domain protein 1, SND1) 直接调控的转录因子, 能够促进植物次生细胞壁的合成^[61], McCarthy 等又发现另一个 SND1 开关直接作用的转录因子 AtMYB83, 主要在次生壁的纤维和导管中有特异性的表达, 从而促进次生壁的加厚^[62]。同年, Zhou 等发现 MYB58 和 MYB63 是拟南芥次生壁形成中木质素合成的转录激活子^[63]。Zhong 等在 2012 年研究了 AtMYB46 和 AtMYB83 能够结合的下游元件, 并且发现 MYB43、MYB52、MYB54、MYB58 和 MYB63 等是 AtMYB46 直接作用的

下游转录因子，它们在次生壁的发育过程中处于同一个调控网络中^[64]。从以上研究中不难发现，MYB 转录因子在植物次生壁的发育中起着非常重要的作用。

1.2.4.3 MYB 转录因子与植物激素

转录因子与植物激素有很大的相关性，它们的相互作用可引起一系列生理生化反应，从而在植物生长、抵御外界刺激中起到重要的调节作用。Lu 等^[65]在谷子中发现 3 个 MYB 转录因子，它们通过与淀粉酶启动子中的元件结合，从而在赤霉素（GA）的信号途径中起到一定的调节作用。乙烯是另一个调节植物生长的重要激素信号分子，Shin 等^[66]在拟南芥中发现一个 MYB77，它能够与乙烯响应因子（auxin response factor, ARF）相互作用而导致拟南芥侧根的数量减少。Li 和 Zachgo^[67]在拟南芥中发现 TCP3 转录因子能与 R2R3-MYB 蛋白交互，促进类黄酮的生物合成，但负向调节乙烯响应信号而引起乙烯相关发育的缺陷。Kwon 等^[68]在拟南芥中发现，在黑暗培养条件下，MYBH 转录因子能够导致光敏色素交互因子（phytochrome-interacting factor, PIF）积累的增加，随后引起了乙烯生物合成的增加从而使拟南芥的胚轴伸长。

1.2.4.4 MYB 转录因子与植物抗逆

MYB 转录因子在植物抗逆方面的研究也相当广泛。Vanninia 等^[69]研究了水稻的 *OsMYB4* 基因，它是一个冷胁迫诱导的基因，*OsMYB4* 基因过表达引起了 254 个基因的上调表达，这些上调表达基因大多数不仅使植物的抗寒能力提高，而且使植物的耐干旱以及耐高盐等抗逆胁迫能力提高。Pasquali 等^[70]随后将 *OsMYB4* 基因转入苹果内，结果显示提高了转基因苹果的抗干旱和低温能力。Liao 等^[71]在大豆中发现 43 个 MYB 基因在 ABA、高盐、干旱以及低温诱导下表达量发生了变化，然后深入研究了其中 3 个基因：*GmMYB76*、*GmMYB92* 和 *GmMYB177*，通过对它们进行转录激活活性和酵母单杂交等实验的研究，结果显示 *GmMYB* 基因可能通过调控抗逆响应基因而在大豆的抗逆胁迫中起重要的作用。Xiong 等^[72]在水稻中发现一个 *OsMYB48-1* 基因，实验发现此基因的表达能够被 PEG、ABA 以及 H_2O_2 等强烈诱导，将 *OsMYB48-1* 基因的过表达载体转入水稻之后，进行了一系列实验，结果显示 *OsMYB48-1* 基因能够通过调节逆境诱导的 ABA 合成途径增强植物的抗干旱和高盐胁迫的能力。Sun 等^[73]在三叶橘中分离得到一个 *PtsrMYB48* 基因，将其转入烟草后进行实验，结果表明，*PtsrMYB48* 基因的过表达增强了植物的抗旱能力。

1.3 本研究的目的和意义

白桦（*Betula platyphylla* Suk.）为桦木科桦属植物，为落叶乔木，生长速度快，

是东北地区次生林的先锋树种,耐寒能力强,喜酸性土壤,在胶合板、单板的家具制造以及纸浆材等方面有广泛的应用^[74]。由于其重要的生态、观赏和实用经济价值,历来被列为国家科技计划研究的重要树种之一。对其遗传改良的范围也在不断扩大,其主要目标是培育速生、优质和高抗的林木新品种。近年来,利用基因工程技术对林木进行遗传改良,已经显现出优势和发展潜力^[75]。因此发掘具有调控植物抗逆能力及材性的优质基因,研究其功能及调控机制,为林木分子生物学研究提供理论基础,并为利用分子生物学手段进行林木新品种培育提供材料,具有重要的理论与应用价值。

以往关于植物抗逆或材性方面的研究,主要在模式植物如拟南芥^[76-78],经济作物如水稻^[19]、棉花^[30]和烟草^[52],果蔬如辣椒^[18]、葡萄^[20]、香蕉^[33]中进行,对木本植物研究相对薄弱,主要集中在对杨树^[79]和桉柳^[80]的抗逆研究方面。近年来已有学者开始进行白桦木质部发育方面的研究,Liu 等^[81]在白桦体内克隆获得 4 个纤维素合酶基因,分别以不同时期、不同组织的白桦 cDNA 为模板,进行定量 PCR 来研究纤维素合酶基因对白桦木质部发育的影响;Wang 等^[82]对白桦的应拉木和应力木进行了转录组分析来研究木质素和纤维素的合成及表达情况,并发现一些与次生壁合成相关的差异基因。宋福南^[83]克隆了白桦中的咖啡酰辅酶 A-*O*-甲基转移酶 (caffeoyl-CoA-*O*-methyltransferase, CCoAOMT) 基因,构建抑制表达载体后分别转入烟草和白桦来研究它对木质素合成的影响,结果发现转基因烟草中的总木质素含量降低,但在转基因白桦中没有发现木质素的变化,只是初步推测 CCoAOMT 基因参与木质素 S 型单体的合成;吕梦燕^[84]利用反义 RNA 技术构建咖啡酸 5-羟化基阿魏酸-*O*-甲基转移酶 (cinnamate-*O*-methyltransferase, COMT) 基因的抑制表达载体后转入白桦体内,定量 PCR 结果显示转基因白桦的 COMT 基因表达量比野生型低很多,但关于它对木质素合成的研究还未开展。由此可见,对白桦抗逆及木质部发育方面的研究相对较少,白桦具有重要的经济价值,因此利用分子生物学手段对白桦的抗逆能力及材质材性的研究具有重要的实际意义。