

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220503

杨树 MYC 基因家族成员表达模式研究

胡梦璇¹, 宋学勤¹, 刘颖丽¹, 赵树堂^{1*}

(林木遗传育种全国重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 探究 *bHLH* 亚家族成员 *MYC* 基因在杨树生长发育及对环境响应中的表达模式, 为解析茉莉酸信号通路关键基因 *MYC* 调控杨树生长发育及抗逆响应提供参考。[方法] 利用生物信息学方法鉴定杨树基因组中的 *MYC* 基因家族成员并对各成员的基因结构、保守基序进行了系统分析; 在此基础上, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *MYC* 成员在不同组织、不同植物激素响应及逆境胁迫下的表达模式。[结果] 毛果杨基因组中含有 10 个 *MYC* 成员, 这些成员在进化上相对保守, 均具有典型的 *bHLH* 结构域, 根据进化关系将其分为 3 个分支。组织表达分析发现, 大部分 *MYC* 家族成员在根中均具有较高表达量, 分枝 II 两对基因在茎中呈相反表达模式。不同激素处理及非生物胁迫条件下 *MYC* 基因存在显著表达差异, 但基因对之间多存在类似的表达模式。[结论] 杨树 *MYC* 基因家族成员可能参与不同的生物学过程, 研究结果为深入解析杨树 *MYC* 基因的功能奠定了基础。

关键词: 毛果杨; *MYC* 基因; 表达分析

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2023)03-0032-09

植物激素茉莉酸 (JA) 是脂肪酸衍生的羧脂素, 在植物生长发育和逆境胁迫响应等过程中发挥重要作用^[1]。JA 通过其信号转导途径调控与多种激素互作或调控下游响应基因参与多种生物学过程。JA 信号途径是一个由多基因参与的复杂调控过程^[2]。Coronatine insensitive 1 (COI1) 是 JA 信号的受体, 与 JA 结合后促进转录抑制因子 jasmonate ZIM-domain (JAZ) 家族蛋白泛素化并被 26S 蛋白酶体降解, 从而解除 JAZ 对转录因子髓细胞组织增生蛋白 (Myelocytomatosis proteins, MYCs) MYC2 的抑制作用, 最终激活下游响应基因的表达^[3]。植物中 MYC 是 JA 信号途径中关键转录因子, 通过形成 COI1/JAZs/MYC 复合物发挥调控作用, 参与多种激素信号转导过程^[4]。

MYC 转录因子含有保守的 *bHLH* 结构域, 属于 *bHLH* 类转录因子家族。*bHLH* 结构域由碱性域与 HLH 域组成, N 端碱性域具有 DNA 结合功能,

C 端 HLH 域参与 *bHLH* 蛋白二聚化形成同源或异源二聚复合体^[5]。*bHLH* 类转录因子是转录因子中的超级家族, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中共有 158 个家族成员, 分为 26 个亚家族, 其中, MYC 转录因子分布于亚家族 III^[6], 包含 8 个成员。已有研究证明, MYC 转录因子在植物生长发育、次生代谢物的合成、逆境响应、植物激素信号转导及不同激素信号通路之间的相互作用中发挥关键作用^[4,7-8]。MYC2 是 MYC 类转录因子中研究最透彻的一个, 在 JA 信号通路中发挥关键调控作用。在拟南芥根系发育过程中, MYC2 可以直接结合到维持根尖细胞活性的关键转录因子 *PLT1* 和 *PLT2* 的启动子上抑制其表达, 进而抑制拟南芥主根分生区细胞分裂^[9]。在蓝光诱导下, 拟南芥 MYC2/MYC4 可以结合 *NST1* 启动子激活其表达, 进而调控次生壁合成, 促进花序轴纤维细胞次生壁加厚^[10]。改变红光与远红光比例, 光

收稿日期: 2022-10-26 修回日期: 2022-12-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32271902)

* 通讯作者: 赵树堂, 博士, 副研究员, 研究方向: 林木分子生物学。E-mail: shutang@caf.ac.cn

敏色素互作因子 PIF4 能够与 MYC2/MYC4 直接相互作用影响 MYC 蛋白核定位, 抑制 MYC2/MYC4 对 *NST1* 的激活进而影响细胞次生壁加厚^[11]。在花发育过程中, *myc2/3/4* 三突变体及 *myc2/3*、*myc2/4* 双突变体表现出早开花表型^[12], 同时伴有花萼发育延迟、花药不能正常开裂或开裂延迟以及花粉粒存活率低等表型^[13]。此外, MYC2 参与多种植物激素间的调控, 包括生长素、细胞分裂素、乙烯等。MYC2 可以与乙烯不敏感转录因子 EIN3 相互作用, 抑制 *EIN3* 的转录活性, 从而抑制 *HLS1* 的表达, 最终影响拟南芥黄化苗顶端弯钩的形成^[14]。在果实成熟方面, MYC2 转录因子能通过结合苹果乙烯合成途径中的 *ACC* 合成酶基因和 *ACC* 氧化酶基因启动子调控乙烯合成进而影响果实成熟^[15]。最近研究表明, MYC2 可以通过抑制细胞分裂素氧化酶/脱氢酶 (*CKX*) 基因来提高细胞分裂素含量, 从而抑制不定根的起始^[16]。综上所述, MYC 类转录因子对植物生长发育及生物和非生物胁迫响应具有重要调控作用。

尽管 MYC 基因家族已在拟南芥、水稻 (*Oryza sativa* L.) 等模式植物中研究得比较深入, 但在林木中其功能研究还鲜有报道。杨树 (*Populus* L.) 是重要的人工林树种, 而且具有基因组小、适应性强、遗传转化体系成熟等特性, 已成为林木分子育种研究的模式树种。因此, 本文系统分析了杨树 MYC 家族成员基因结构、蛋白保守结构域、组织表达特性及不同激素和胁迫响应模式, 研究结果为进一步解析杨树 MYC 基因的生物学功能奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 杨树 MYC 家族成员鉴定与分析

在拟南芥基因组网站 TAIR (TAIR - Home Page (arabidopsis.org)) 数据库中获取 MYC 基因家族 8 个成员的氨基酸序列, 并以此为靶序列, 在 Phytozome 网站 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 中通过 BLASTP 方法比对检索毛果杨基因组数据库 V4.1, 获得 MYC 直系同源氨基酸序列。利用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 在线工具分析杨树 MYC 蛋白基本理化性质。使用 WoLEPSORT (WoLF PSORT: Protein Subcellular Localization Prediction Tool (genscript.com)) 在线工具分析杨树 MYC 蛋白的亚细胞定位情况。

1.2 MYC 基因家族系统进化树构建

参考 MEGA7.0^[17], 利用 MEGA11 中 ClustalW 程序, 将毛果杨、拟南芥 MYC 蛋白序列进行多重序列比对; 采用 Neighbor-Joining (NJ) 法, 模型为 p-distance, 成对删除, 校验参数为 1000, 构建系统发育进化树。iTOL (<https://itol.embl.de/>) 在线网站进一步完善进化树。

1.3 基因结构和保守结构域分析

杨树 MYC 基因结构用 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 软件分析。杨树 MYC 蛋白结构域使用 MEME (MEME - Submission form (meme-suite.org)) 在线分析, 最大 motif 检索数为 10, 其余为默认参数。

1.4 杨树 MYC 基因组织特异性表达分析

实验所用材料 84K 杨 (*Populus alba* × *P. glandulosa*) 由林木遗传育种全国重点实验室保存。RNA 提取使用 (RNA Easy Fast Plant Tissue Kit) 试剂盒。分别提取温室培养 2 个月 84K 杨的根、茎、叶以及茎的不同部位的总 RNA, 反转录合成 cDNA 第一条链, 并以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 分析 (qRT-PCR)。反应体系为 TB Green® Premix EX Taq™ II 5 μL, 正向引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL, 反向引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL, cDNA 1 μL, 超纯水 3 μL; qRT-PCR 程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s; 60 °C 30 s; 50 °C 30 s, 45 个循环。引物序列见表 1。

1.5 杨树 MYC 基因响应激素和非生物胁迫表达分析

激素处理: 选择生长 4 周的 84K 组培苗, 分别进行生长素 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA)、细胞分裂素 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA) 和茉莉酸 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA) 处理。处理时间为: 生长素 (0.5、1、2、3、6 h)、细胞分裂素 (0.5、1、2、3 h)、茉莉酸 (1、3、6、9、12 h)。每个处理包含 3 次生物学重复, 每次重复包含 3 株独立植株, 取样位置为顶端向下第 4 片叶, 以未处理的 84K 杨作为对照。

非生物胁迫处理: 84K 杨温室培养 4 周后, 分别进行 4 °C、20% PEG6000 及 $200 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理, 处理 3、6、12、24 h 后取顶端第 4 片叶, 每处理重复 3 次, 每重复 3 株植株混合取样, 以未处理 84K 杨作为对照。

使用 RNA Easy Fast Plant Tissue Kit 试剂盒提取处理后杨树叶片 RNA, 并通过反转录试剂盒

表1 实时荧光定量PCR引物序列
Table 1 The primers used for quantitative real-time PCR

引物 Primer	序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物 Primer	序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>PtrMYC2a-F</i>	TATGCCAATGTGTCTGTGATGAATG	<i>PtrMYC2a-R</i>	TCTTGCGTGTAAAACCGACTCC
<i>PtrMYC2b-F</i>	AATGCTGGGATTCCGCAACTAC	<i>PtrMYC2b-R</i>	TGATGATTGTTATTGTTCGCACTCT
<i>PtrbHLH14a-F</i>	GTGGTCCCGAATGTGTCAAAGATG	<i>PtrbHLH14a-R</i>	ATGTTTCGCATTACCAGAGATTTTTG
<i>PtrbHLH14b-F</i>	TACTCAAGCAAGTTAGCAACAAGC	<i>PtrbHLH14b-R</i>	ATCAACCAATCTCTCCAGGTCCAT
<i>PtrbHLH14c-F</i>	GCTCGTGAAACAGAAGAAGCAAAT	<i>PtrbHLH14c-R</i>	TAGAGGAAAGTCCGAGTCTGAATGC
<i>PtrbHLH14d-F</i>	TGACACTATGGACAATCAAAGCACC	<i>PtrbHLH14d-R</i>	ATTCACATTATCGGATTGGACCCTA
<i>PtrbHLH3a-F</i>	CAACAAGCACGAATCAAGTTTATGG	<i>PtrbHLH3a-R</i>	GGACAAGTCATCATTTGGCTGC
<i>PtrbHLH3b-F</i>	GGAGTCTCACCCCGTTTCTACC	<i>PtrbHLH3b-R</i>	CAGTCTTGAGCAGTGATTTGATGTT
<i>PtrbHLH17a-F</i>	CAAGGGACACCAGGTGAGTTTAT	<i>PtrbHLH17a-R</i>	CCTGCTTTTGACCTTGGTAGTGATT
<i>PtrbHLH17b-F</i>	AGGCTTCATTGTTGGGAGATGCTAT	<i>PtrbHLH17b-R</i>	AATGCTCCCGACTTTTCCCTT
<i>PtrActin-F</i>	AAACTGTAATGGTCCTCCCTCCG	<i>PtrActin-R</i>	GCATCATCACAACTCACTCTCCGA

合成单链 cDNA。使用 Primer Premier 5 软件, 在杨树 MYC 基因序列的非保守区设计 qRT-PCR 引物 (表 1), 引物序列的 T_m 值为 60~62 °C, 并由生工生物公司合成。qRT-PCR 使用 TB Green® Premix EX Taq™ II (TaKaRa Dalian, China) 试剂盒, 并根据 Roche480 实时荧光定量 PCR 仪说明书进行操作。反应体系为: TB Green® Premix EX Taq™ II 5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, 超纯水 3 μ L。qRT-PCR 所用内参基因为杨树 Actin 基因 (基因序列号: Potri.001G309500)。每个模板设置 4 个重复, 所有实验均进行 3 次生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行定量数据分析。

2 结果与分析

2.1 毛果杨 MYC 家族成员鉴定及分析

利用 Phytozome 网站 BLAST 工具查找拟南芥 MYCs 在毛果杨基因组中同源基因, 共筛选获得 10 个杨树 MYC 基因成员 (表 2), 编码的蛋白质序列长度为 466~660 aa, 蛋白质分子量介于 52.34~72.09 kDa, 等电点为 5.38~7.72。亚细胞定位预测结果显示: 10 个 MYC 蛋白亚细胞定位不同, 其中, 6 个定位在细胞核, 2 个定位在细胞核和细胞质, 2 个定位在细胞核与叶绿体。基于鉴定出的毛果杨 *PtrMYCs* 以及拟南芥 MYC 基因家族编码的氨基酸序列, 使用 NJ 法构建系统发育进化树, 结果 (图 1) 显示: 与拟南芥 MYC 基因

表2 杨树 MYC 基因家族成员基本信息
Table 2 Basic information of MYC family members in Populus

基因名称 Gene	基因ID Gene number	基因在染色体位置 Location	蛋白质长度 Protein length/aa	等电点 PI	分子量 MW/kDa	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>PtrMYC2a</i>	Potri.001G142200	Chr01 (+) 11649287-11651987	648	5.38	71.11	细胞核
<i>PtrMYC2b</i>	Potri.003G092200	Chr03 (-) 11839709-11842763	660	5.49	72.09	细胞核
<i>PtrBHLH14a</i>	Potri.001G083500	Chr01 (-) 6613720-6615721	472	7.17	52.73	细胞核/细胞质
<i>PtrBHLH14b</i>	Potri.003G147300	Chr03 (+) 16158005-16160025	466	7.72	52.34	细胞质/细胞核
<i>PtrBHLH14c</i>	Potri.002G176900	Chr02 (+) 13775139-13776876	492	5.40	54.70	细胞核
<i>PtrBHLH14d</i>	Potri.014G103700	Chr14 (+) 6950999-6952650	494	5.91	54.87	细胞核/叶绿体
<i>PtrBHLH3a</i>	Potri.002G042000	Chr02 (-) 2756159-2758458	504	6.59	54.92	细胞核/叶绿体
<i>PtrBHLH3b</i>	Potri.005G221100	Chr05 (+) 22329285-22332096	505	6.13	55.44	细胞核
<i>PtrBHLH17a</i>	Potri.002G172101	Chr02 (-) 13241064-13244032	619	6.14	68.25	细胞核
<i>PtrBHLH17b</i>	Potri.014G099700	Chr14 (-) 6539405-6542974	620	6.16	68.02	细胞核

家族类似, 毛果杨 MYC 基因家族分为 3 个分枝, 但不同分枝成员数量与拟南芥存在较大差异。分枝 I 包含拟南芥 MYC2/3/4/5 共 4 个基因, 但杨树中只有 2 个同源基因, 分别命名为 *PtrMYC2a* 和 *PtrMYC2b*; 分枝 II 包含拟南芥 *AtbHLH14* 及杨树 4 个同源基因, 分别命名为 *PtrbHLH14a*~*14d*; 分枝 III 包括拟南芥 *AtbHLH3* 和 *AtbHLH17*, 每个基因在杨树中均有 2 个同源基因, 命名为 *PtrbHLH3a*、*PtrbHLH3b* 和 *PtrbHLH17a*、*PtrbHLH17b*。

2.2 *PtrMYC* 家族基因结构以及蛋白保守域分析

为了了解 *PtrMYC* 基因的结构特征, 对其基因结构及保守基序进行分析, 发现杨树所有 MYC 基因均不含内含子 (图 2A)。使用 MEME 软件对杨树 MYC 蛋白进行保守结构域分析, 结果表明: 所有 MYC 蛋白的结构域在进化上是高度保守的, Motif1、2、3、4、5、6、7、8 存在于所有家族成员中, 其中, Motif1、3、7 和 2、4、5、6、8 为该家族基因保守的特征结构域即 bHLH 和 bHLH-

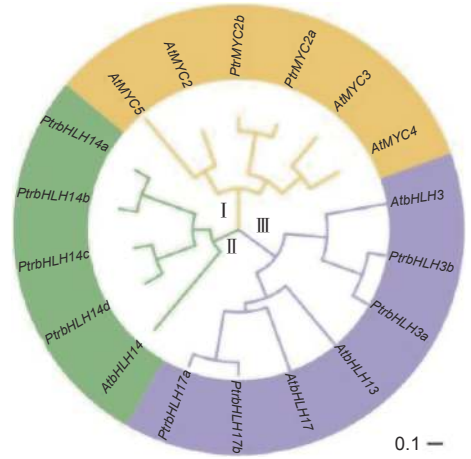


图 1 杨树和拟南芥 MYC 基因家族系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of MYC family members between *Populus* and *Arabidopsis*

MYC_N。另外, 有的家族分枝具有或缺失某些蛋白基序, 如 Motif9 仅存在于分枝 II 的家族成员中, Motif10 仅存在于分枝 I 和 III 的成员中, 大多数同源配对成员有高度相似的结构域组成, 提示可能在基因功能上存在冗余 (图 2B)。

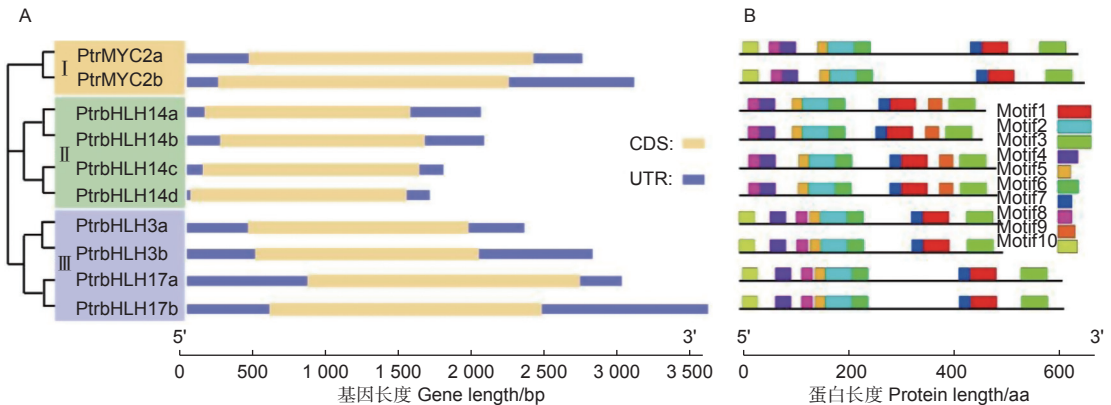


图 2 杨树 MYC 家族成员基因结构 (A) 和蛋白保守结构域 (B) 分布

Fig. 2 Gene structure (A) and distribution of conserved motifs (B) of *PtrMYC* family members in *Populus*

2.3 基因组织表达特异性分析

基因组织特异性表达模式研究对预测基因功能具有重要的作用。为了探讨 *PtrMYC* 基因家族在杨树生长发育中的功能, 本研究利用 qRT-PCR 方法分析了 MYC 基因各成员在不同器官和组织的表达特异性, 结果 (图 3) 显示: 不同 MYC 家族成员具有不同的组织表达特异性, 但基因对之间多存在类似的表达模式。除 *PtrbHLH3a* 外, 其余 9 个 *PtrMYC* 基因在根中均有较高表达量, 说明大部分 MYC 家族成员可能在根系发育过程中发挥作用; 在从顶端到基部的不同茎段中, *PtrbHLH14a* 和

PtrbHLH14b 这一组基因对表达量呈现先上升后下降的趋势, 说明它们可能在茎由初生生长向次生生长发育过程中具有重要调节作用; *PtrbHLH14c* 和 *PtrbHLH14d* 这组基因对表达量则呈现下降的趋势, 说明可能在顶端分生组织发育中具有重要的作用。杨树 MYC 家族成员在不同器官和组织存在显著表达差异, 说明不同成员可能在杨树生长发育不同生物学过程中发挥调控作用。

2.4 MYC 家族基因响应生长素、细胞分裂素及茉莉酸的表达模式分析

为进一步了解杨树 MYC 家族基因对不同植物

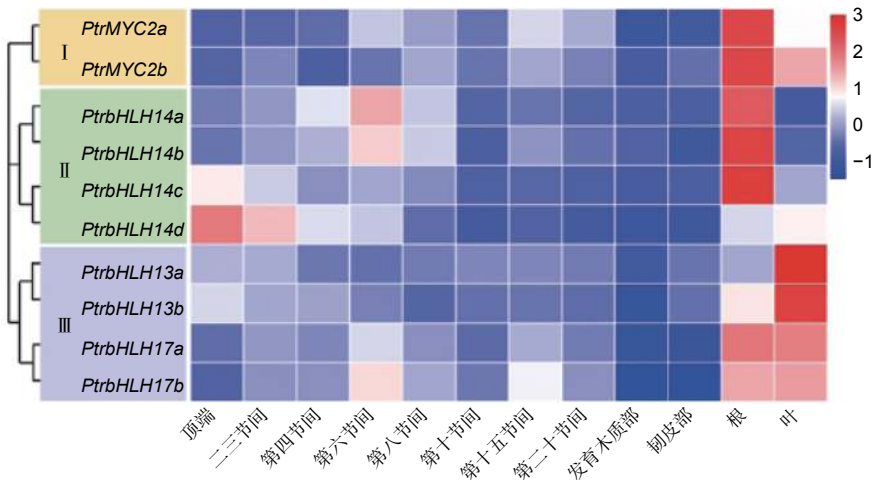


图 3 杨树 MYC 基因组织表达分析

Fig. 3 Expression analyses of MYCs in *Populus*

激素的响应情况, 本研究利用 qRT-PCR 方法检测了其生长素 (NAA)、细胞分裂素 (6-BA)、茉莉酸 (MeJA) 响应的表达模式 (图 4)。在 NAA、6-BA、MeJA 处理后, 杨树 MYC 基因家族各成员表达模式各不相同。*PtrbHLH14a*、*PtrbHLH14b* 基因表达量受生长素诱导 0.5 h 后开始下调, 表明生长素可以快速抑制特异 MYC 基因的表达。细胞分裂素处理 0.5 h 后, *PtrbHLH14a*、*PtrbHLH14b*、*PtrbHLH14d* 基因表达量显著上调, 说明它们可以快速响应细胞分裂素处理。大部分杨树 MYC 基因都能响应茉莉酸信号, 茉莉酸处理后, *PtrMYC2a*、*PtrMYC2b*、*PtrbHLH14c*、*PtrbHLH14d*、*PtrbHLH17a*、*PtrbHLH17b* 基因表达量显著上调。值得注意的是, *PtrbHLH14a* 和 *PtrbHLH14b* 基因对能够响应生长素和细胞分裂素处理, 但表达模式呈相反趋势, 说明它们可能同时参与生长素与细胞分裂素信号通路。综上所述, MYC 家族成员可能广泛参与不同激素调控植物生长发育的多个过程。

2.5 MYC 基因响应低温、干旱和 NaCl 胁迫的表达模式分析

为揭示杨树 MYC 基因对非生物胁迫的响应机制, 本研究利用 qRT-PCR 方法检测了该家族基因在 4 °C、PEG6000 和 NaCl 胁迫下的表达模式 (图 5)。在 200 mmol·L⁻¹ NaCl、20% PEG6000 及 4 °C 低温处理后, 杨树 MYC 基因家族各成员表达都受到不同程度的诱导, 且大部分基因表达量在处理 12 h 达到高峰。低温处理可以诱导 6 个杨树 MYC 基因上调表达, 其中 *PtrbHLH17a*、*PtrbHLH17b* 两个基因受低温诱导上调表达最多,

且在 12 h 达到峰值; *PtrbHLH14a*、*PtrbHLH14b* 下调表达, 说明不同 MYC 基因响应低温表达方式不同。在 NaCl 处理之后, *PtrMYC2b*、*PtrbHLH14b*、*PtrbHLH3a*、*PtrbHLH3b*、*PtrbHLH14a*、*PtrbHLH14d* 基因的表达量先上调再下调, 而 *PtrMYC2a*、*PtrbHLH14c*、*PtrbHLH17b* 基因则呈现相反表达模式。干旱处理后, *PtrbHLH14a*、*PtrbHLH14b*、*PtrbHLH14d*、*PtrbHLH3a* 基因表达量显著上调, 其中, *PtrbHLH3a* 表达量在处理 12 h 时达到高峰, 其它 3 个基因在 9 h 时达到高峰, 说明不同 MYC 基因响应干旱时间不同。另外, 同一分支基因响应相同非生物胁迫时具有相似表达模式, 说明基因功能存在冗余。综上所述, MYC 家族成员在不同非生物胁迫中表达情况存在差异, 推测在植物响应逆境胁迫中发挥不同作用。

3 讨论

林木在长期进化过程中形成了自己独特的生物学特征和环境适应性, 而基因组学和基因功能研究发现, 不同物种同源基因可能在功能上存在较大差异, 因此, 在模式树种杨树中开展基因功能研究对揭示林木特有的生物学过程具有重要意义^[18]。MYC 基因家族是 *bHLH* 基因家族一个亚家族, 对植物的生长发育及环境适应性具有重要作用。目前, 在拟南芥中对 MYC2 基因进行了较为深入的研究, 发现该基因不仅能参与调控根、叶、种子等器官的发育活动, 并且还以调控开关的角色存在于多种激素通路互作过程中^[5]。然而, 模式树木毛果杨中, MYC 家族基因基本特征及其逆境胁迫响应

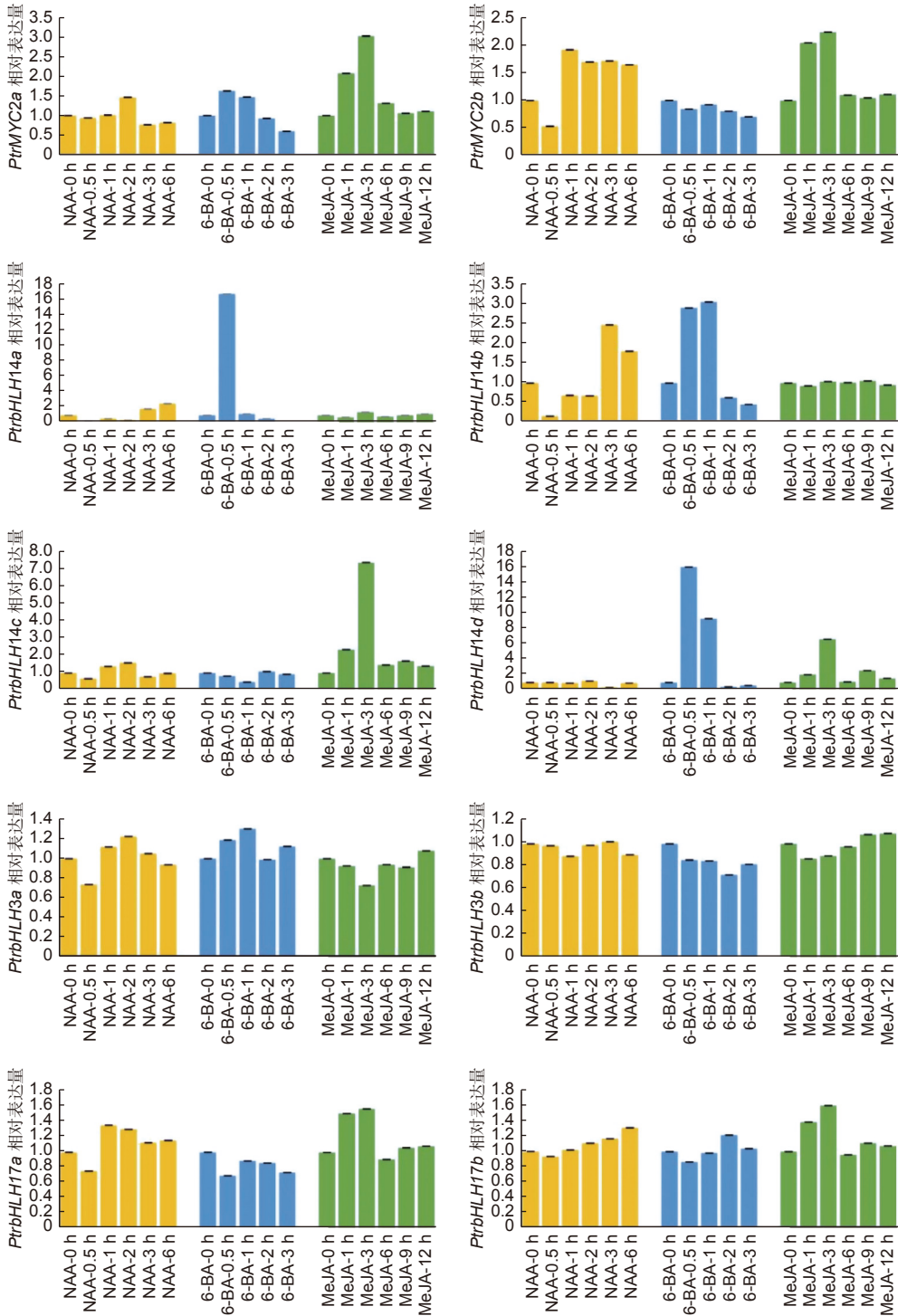


图 4 生长素、细胞分裂素、茉莉酸处理后杨树 MYC 基因的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of *PtrMYCs* under NAA, 6-BA, MeJA treatment

特性尚无报导。本研究根据拟南芥 MYC 基因家族氨基酸序列, 在毛果杨基因组中通过序列比对获得了杨树 MYC 基因家族成员, 并对其基因结构、组织表达特异性及对激素和逆境响应表达模式等进行了系统分析。在毛果杨基因组中共鉴定出 10 个 MYC 成员, 系统进化树分析发现该基因家族分为 3 个分

枝, 其中, 分枝 I 包含 2 个成员, 分枝 II 有 4 个成员, 分枝 III 有 4 个成员, 这与拟南芥中各分枝成员数量相差较大, 说明 MYC 基因家族不同分枝在进化过程中可能存在基因扩张或丢失现象。蛋白结构域分析发现, *PtrMYC* 蛋白含有多个基序, 10 个 Motif 中有 8 个 Motif 存在于所有 MYC 成员

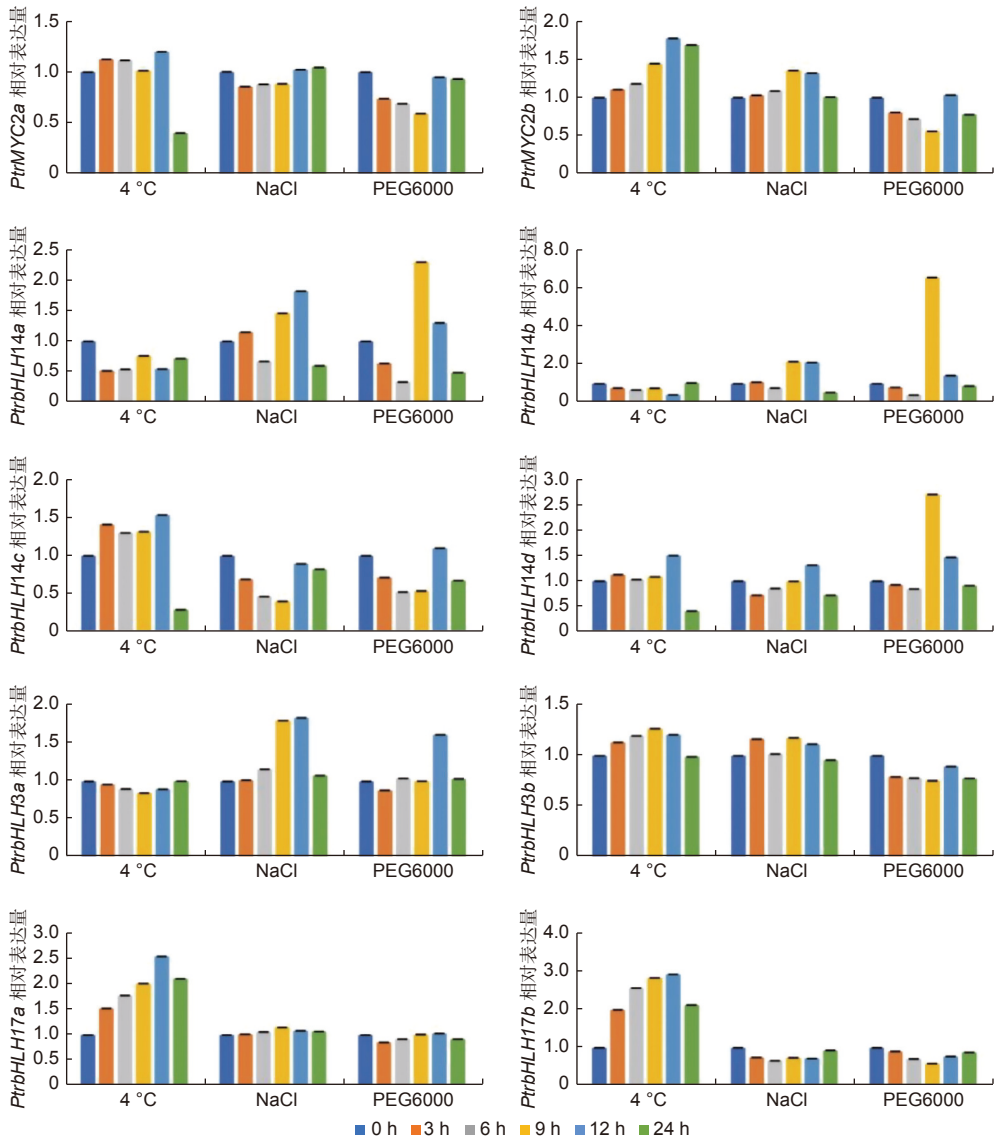


图 5 胁迫条件下 MYC 基因的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *PtrMYCs* under 4 °C, NaCl and PEG6000 treatment

中 (图 2B), 表明 *PtrMYC* 成员之间在蛋白结构上高度保守。

基因组织表达特异性对进一步探究其功能具有重要作用。本研究中, 杨树 *PtrMYC* 在不同器官和组织存在明显表达差异, 表明它们可能在不同生长发育过程中发挥作用。拟南芥中研究发现, *MYC2* 抑制主根分生区细胞分裂^[9], 同时促进侧根形成^[19]。另外, *MYC2* 可以通过调控细胞分裂素含量抑制不定根起始^[16], 说明 *MYC2* 转录因子对根系发育的调控是多方面的。组织表达分析表明, *PtrMYC* 家族 9 个成员在根部表达水平较高, 暗示它们可能参与杨树根系不同发育过程。在叶片发育过程中, *MYC2* 能通过抑制生长素合成进而抑制叶脉发

育^[20]。Qi 等^[13] 研究表明, *MYC2/MYC3/MYC4* 在激活叶片衰老相关基因 *SAG29* 诱导叶片衰老中存在功能冗余, 而 *bHLH03*、*bHLH13*、*bHLH14* 和 *bHLH17* 与 *SAG29* 的启动子结合抑制其表达, 拮抗 *MYC2/MYC3/MYC4* 诱导的叶片衰老^[21]。另外, *MYC2-Dof2.1* 形成前馈机制促进叶片衰老^[22]。本研究中发现, *PtrbHLH3a*、*PtrbHLH3b*、*PtrbHLH17a*、*PtrbHLH17b* 等在叶片中高丰度表达, 可能参与杨树叶片发育和衰老过程的调控。

植物激素之间的相互作用组成一个非常复杂的信号调控网络, 在植物生长发育和逆境响应过程中起着非常重要的调控作用^[23]。*MYC* 基因在不同激素之间互作过程中具有重要作用。在根和叶片

发育过程中, MYC 家族基因能够抑制细胞分裂素代谢和生长素合成影响不定根起始和叶脉发育^[16,20]。拟南芥中, MYC2 可以与其靶基因 *ERD1* 的启动子结合, 激活其表达, 进而激活 JA 诱导的脱水应激反应^[24]。此外, 茉莉酸和生长素协同作用调控拟南芥热形态建成^[25]。在苹果愈伤组织中过表达 *MdMYC2* 增加了 *MdClbHLLH1*、*MdCBF1*、*MdCBF2* 和 *MdCBF3* 的表达水平, 导致苹果抗冻耐受性显著提高^[26]。在番茄中 MYC2 激活乙烯响应因子 *SIERF.B8* 的转录, 进而增强 JA 信号, 增加了番茄耐寒性^[27]。本研究发现, 不同 *PtrMYC* 成员响应激素和非生物胁迫方式不同, 一些 MYC 基因既受激素诱导, 又响应某种非生物胁迫, 如 *PtrMYC14a*、*PtbHLLH14b* 表达可以被生长素抑制, 也可以被细胞分裂素诱导, 同时还可以响应盐和干旱胁迫; 而 *PtrMYC2b* 表达能够被茉莉酸诱导, 同时还可以响应低温和盐胁迫, 提示 MYC 基因家族可能参与不同植物激素相互作用, 进而广泛参与到植物生长发育和非生物胁迫响应中, 且不同成员可能参与不同生物学过程, 但其具体调控机制尚需进一步研究。

4 结论

本文系统分析了杨树 MYC 基因家族的基因和蛋白结构、组织表达特异性以及响应激素和逆境的表达模式。杨树基因组中共有 10 个 MYC 成员, 均含有 bHLH 转录因子典型结构域; 组织表达分析发现, 杨树 MYC 基因家族成员表达模式各异, 可能参与了不同的生物学过程的调控。在不同的植物激素处理下, 杨树 MYC 家族成员表达模式多样, 表明不同的 MYC 基因可能参与到不同的植物激素信号通路。在不同的非生物胁迫下, 杨树 MYC 基因家族各成员的表达情况也不同, 表明杨树 MYC 基因在不同的非生物胁迫下发挥不同的功能。本研究为揭示 MYC 基因在杨树生长发育和胁迫响应过程中的基因功能奠定了基础。

参考文献:

[1] BROWSE J. Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60(1): 183-205.

[2] ACOSTA I F, FARMER E E. Jasmonates[J]. *The Arabidopsis Book*, 2010, 8: e0129.

[3] CHINI A, BOTER M, SOLANO R. Plant oxylipins:

COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module[J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(17): 4682-4692.

- [4] SONG C, CAO Y P, DAI J, *et al.* The Multifaceted Roles of MYC2 in plants: toward transcriptional reprogramming and stress tolerance by jasmonate signaling[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 868874.
- [5] 李 罡, 李文龙, 许雪梅, 等. MYC2 转录因子参与植物发育调控的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(2): 125-132.
- [6] PIRES N, DOLAN L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants[J]. *Molecular Biology Evolution*, 2010, 27(4): 862-874.
- [7] LORENZO O, CHICO J M, SANCHEZ-SERRANO J J, *et al.* JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(7): 1938-1950.
- [8] DOMBRECHT B, XUE G P, SPRAGUE S J, *et al.* MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(7): 2225-2245.
- [9] CHEN Q, SUN J, ZHAI Q, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(9): 3335-3352.
- [10] ZHANG Q, XIE Z, ZHANG R, *et al.* Blue light regulates secondary cell wall thickening via MYC2/MYC4 activation of the NST1-directed transcriptional network in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(10): 2512-2528.
- [11] LUO F, ZHANG Q, XIN H, *et al.* A Phytochrome B-PIF4-MYC2/MYC4 module inhibits secondary cell wall thickening in response to shaded light[J]. *Plant Communications*, 2022, 3(6): 100416.
- [12] WANG H P, LI Y, PAN J J, *et al.* The bHLH transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 are required for jasmonate-mediated inhibition of flowering in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(11): 1461-1464.
- [13] QI T, HUANG H, SONG S, *et al.* Regulation of jasmonate-mediated stamen development and seed production by a bHLH-MYB complex in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(6): 1620-1633.
- [14] SONG S, HUANG H, GAO H, *et al.* Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(1): 263-279.
- [15] LI T, XU Y, ZHANG L, *et al.* The jasmonate activated transcription factor MdMYC2 regulates ETHYLENE RESPONSE FACTOR and ethylene biosynthetic genes to promote ethylene biosynthesis during apple fruit ripening[J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(6): 1316-1334.
- [16] DOB A, LAKEHAL A, NOVAK O, *et al.* Jasmonate inhibits adventitious root initiation through repression of CKX1 and activation of RAP2.6L transcription factor in *Arabidopsis*[J]. *Journal*

- of Experimental Botany, 2021, 72(20): 7107-7118.
- [17] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [18] JANSSON S, DOUGLAS C J. Populus: A Model System for Plant Biology[J]. Annual Review of Plant Biology, 2007, 58: 435-458.
- [19] SUN J, XU Y, YE S, *et al.* *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation[J]. The Plant Cell, 2009, 21(5): 1495-1511.
- [20] HUANG C F, YU C P, WU Y H, *et al.* Elevated auxin biosynthesis and transport underlie high vein density in *C₄* leaves[J]. Proceedings National Academy of Sciences of USA, 2017, 114(33): E6884-E6891.
- [21] QI T, WANG J, HUANG H, *et al.* Regulation of jasmonate-induced leaf senescence by antagonism between bHLH subgroup IIIe and III d factors in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2015, 27(6): 1634-1649.
- [22] ZHUO M N, SAKURABA Y, YANAGISAWA S. A jasmonate-activated MYC2-Dof2.1-MYC2 transcriptional loop promotes leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2020, 32(1): 242-262.
- [23] KAZAN K, MANNERS J M. The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(12): 4087-4100.
- [24] LI Y, YANG X, LI X. Role of jasmonate signaling pathway in resistance to dehydration stress in *Arabidopsis*[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2019, 41(6): 1-12.
- [25] AGRAWAL R, SHARMA M, DWIVEDI N, *et al.* MEDIATOR SUBUNIT17 integrates jasmonate and auxin signaling pathways to regulate thermomorphogenesis[J]. Plant Physiology, 2022, 189(4): 2259-2280.
- [26] WANG Y, XU H, LIU W, *et al.* Methyl jasmonate enhances apple' cold tolerance through the JAZ-MYC2 pathway[J]. The Plant Cell, 2019, 136(1): 75-84.
- [27] DING F, WANG C, XU N, *et al.* The ethylene response factor SIERF. B8 triggers jasmonate biosynthesis to promote cold tolerance in tomato[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 203: 105073.

Analysis of Expression Patterns of MYC Family Members in *Populus*

HU Meng-xuan¹, SONG Xue-qin¹, LIU Ying-li¹, ZHAO Shu-tang¹

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To explore the expression patterns of MYC genes, a subfamily of bHLH gene family, in the growth and development of poplar, and the response to different hormones and environmental factors, provides references for revealing the roles of MYCs in regulation of plant growth and environmental adaptability. [Method] Bioinformatic analysis was used to determine the family members of MYC and their gene structure and conserved motifs. Quantitative real-time PCR was carried out to analyze the expression patterns of MYC family members in different tissues and under different kinds of phytohormones and stress treatments. [Result] Ten MYC members was found in the genome of *Populus* and the *PtrMYC* genes were conserved during evolution, and all of them contained bHLH domains, which were divided into three classes in phylogenetic tree. Analysis of the expression patterns showed that most members were mainly expressed in the roots, and two gene pairs in clade II had opposite expression pattern during stem development. The MYC genes exhibited distinct expression pattern under different hormone treatments and abiotic stress, but most gene pairs shared similar expression patterns. [Conclusion] Different MYC members may be involved in different biological processes. The results of this study provide a reference for further decipher the function of MYCs in poplar.

Keywords: *Populus*; MYC gene; expression analysis