



柑橘溃疡病抗性相关转录因子 CitMYB20 的功能

姚利晓, 范海芳, 张庆雯, 何永睿, 许兰珍, 雷天刚, 彭爱红, 李强, 邹修平, 陈善春

(西南大学/中国农业科学院柑桔研究所国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712)

摘要:【目的】了解柑橘不同品种 *CitMYB20* 对柑橘溃疡病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*) 和外源植物激素的应答情况, 评价转基因植株对柑橘溃疡病的抗性, 验证 *CitMYB20* 的生物学功能。【方法】根据柑橘基因组序列设计引物, PCR 法同源克隆柑橘溃疡病抗性品种金弹金柑 (*Fortunella japonica*) 和敏感品种枣阳小叶枳 (*Poncirus trifoliata*) 的 *CitMYB20* 基因序列和启动子序列, 利用在线软件 PlantCARE 对启动子序列进行顺式作用元件预测。以针刺法对金弹金柑和枣阳小叶枳离体叶片接种柑橘溃疡病菌, 用外源激素水杨酸、茉莉酸甲酯和乙烯利处理金弹金柑和枣阳小叶枳的叶片, 在处理的不同时期收集材料, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *CitMYB20* 的表达水平。分别构建 *CitMYB20* 的过表达载体和抑制表达载体, 根癌农杆菌法转化枳上胚轴, 随机摘取转基因株系成熟叶片进行柑橘溃疡病离体抗性评价。【结果】金弹金柑和枣阳小叶枳中 *CitMYB20* (GenBank 登录号分别为 MN689609 和 MN689608) 序列高度保守, 相似度达到 99%; 两者的启动子序列 (GenBank 登录号分别为 MN689611 和 MN689610) 虽然都具有脱落酸和茉莉酸甲酯的响应元件, 但金弹金柑中还具有水杨酸响应的顺式作用元件, 而枣阳小叶枳中缺少该元件。在体外接种柑橘溃疡病菌 5 d 时, 金弹金柑成熟叶片中 *CitMYB20* 表达量显著上升, 达到对照的 2.5 倍; 而枣阳小叶枳叶片 *CitMYB20* 在整个接菌周期内表达量未发生显著变化。外源激素处理时, *CitMYB20* 对水杨酸和茉莉酸甲酯的响应相似, 即在金弹金柑中呈现出先升高后降低的趋势, 而在枣阳小叶枳中表达量降低, 随后又恢复正常。乙烯利处理时, *CitMYB20* 在金弹金柑中表达量略有下降, 在枣阳小叶枳中表达量先升后降。遗传转化共获得 7 株过表达植株和 5 株抑制表达植株, 转基因植株与对照植株相比在形态发育上未见明显差异。*CitMYB20* 过表达植株能够在一定程度上减弱柑橘溃疡病的症状, 而抑制 *CitMYB20* 表达植株对柑橘溃疡病菌的敏感性增强。【结论】*CitMYB20* 在柑橘溃疡病抗性品种中受柑橘溃疡病菌的诱导表达; *CitMYB20* 是防御柑橘溃疡病菌入侵的一种正向调控转录因子, 其抗柑橘溃疡病功能可能需要水杨酸和茉莉酸信号途径的作用; *CitMYB20* 可作为柑橘抗溃疡病分子育种的候选基因。

关键词: 柑橘黄单胞杆菌柑橘亚种; 柑橘溃疡病; R2R3-MYB 转录因子; 过表达; RNA 干扰; 抗病性

Function of Citrus Bacterial Canker Resistance-Related Transcription Factor CitMYB20

YAO LiXiao, FAN HaiFang, ZHANG QingWen, HE YongRui, XU LanZhen, LEI TianGang,
PENG AiHong, LI Qiang, ZOU XiuPing, CHEN ShanChun

(National Center for Citrus Variety Improvement, Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712)

收稿日期: 2019-10-13; 接受日期: 2019-11-26

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-26)、重庆市基础与前沿研究 (一般) 项目 (cstc2018jcyjAX0247)、中央高校基本业务费专项资金 (XDJK2019B018)

联系方式: 姚利晓, E-mail: yaolixiao@cric.cn. 范海芳, E-mail: 609925006@qq.com. 姚利晓和范海芳为同等贡献作者。通信作者陈善春, E-mail: chenshanchun@cric.cn

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to reveal the response of *CitMYB20* to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) and exogenous phytohormones in different citrus varieties, evaluate the resistance of transgenic plants to citrus bacterial canker (CBC), and to verify the biological function of *CitMYB20*. 【Method】The primer pairs were designed according to the *Citrus* genome, the open reading frame sequences and promoter sequences of *CitMYB20* were cloned from CBC resistant variety *Fortunella japonica* and CBC sensitive variety *Poncirus trifoliata* by PCR. The cis-acting elements of promoter sequences were predicted using online software PlantCARE. The detached mature leaves from *F. japonica* and *P. trifoliata* were inoculated with *Xcc* by acupuncture method, and collected at 0, 1, 3, and 5 d after inoculation. The citrus leaves were collected after being treated with exogenous salicylic acid, methyl jasmonate, and ethephon respectively for 0, 12, 24, 36, and 48 h. The expression of *CitMYB20* was detected by qRT-PCR using the above treated leaves. The over-expressed vector and RNA interference vector of *CitMYB20* were constructed through inserting the target sequences into the pLGNe plasmid. The transgenic plants were obtained through *Agrobacterium tumefaciens*, and the mature leaves of transgenic lines were randomly selected to conduct resistance evaluation against CBC. 【Result】The open reading frames of *CitMYB20* in *F. japonica* (GenBank number MN689609) and *P. trifoliata* (GenBank number MN689608) were highly conservative, with a similarity of 99%. There were abscisic acid-responsive and methyl jasmonate-responsive cis-acting elements in the promoter sequence of *CitMYB20* from two varieties of citrus. However, there was a salicylic acid-responsive element in the promoter sequence from *F. japonica* (GenBank number MN689611), but not in the sequence from *P. trifoliata* (GenBank number MN689610). At the 5th day of *Xcc* *in vitro* inoculation, the expression of *CitMYB20* in mature leaves of *F. japonica* was increased significantly, reaching 2.5 times of the healthy control, while the expression of *CitMYB20* in *P. trifoliata* did not show significantly change during the whole infection period. During exogenous hormone treatment, the response of *CitMYB20* to salicylic acid and methyl jasmonate was similar, that is, it showed the trend of first increasing and then decreasing in *F. japonica*, while the expression of *CitMYB20* in *P. trifoliata* was decreased firstly and then returned to normal. When the leaves were treated with exogenous ethephon, the expression of *CitMYB20* in *F. japonica* was decreased slightly, while in *P. trifoliata*, it showed the trend of first increasing and then decreasing. A total of 7 over-expressed plants and 5 RNA-interfered ones were obtained through genetic transformation. There was no significant difference in morphological development between transgenic plants and control plants. The results of disease resistance evaluation showed that the *CitMYB20* over-expressed plants could reduce the symptom of CBC, while the RNA-interfered plants were more sensitive to *Xcc*. 【Conclusion】The expression of *CitMYB20* was induced by *Xcc* in CBC resistant variety. *CitMYB20* is a positive regulatory transcription factor against *Xcc*, its function against CBC may require salicylic acid and jasmonic acid signaling pathway. *CitMYB20* can be used as a candidate gene for genetically modified breeding against CBC.

Key words: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*); citrus bacterial canker (CBC); R2R3-MYB transcription factor; overexpression; RNA interference (RNAi); disease resistance

0 引言

【研究意义】柑橘溃疡病 (citrus bacterial canker, CBC) 是一种由柑橘黄单胞杆菌柑橘亚种 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*) 引起的严重威胁我国柑橘产业的检疫性细菌病害^[1]。该病可引起柑橘落叶、落果和枯枝, 降低果实的商品价值, 给柑橘产业带来巨大的经济损失。筛选抗柑橘抗溃疡病关键基因、利用基因工程培育抗病品种是一种从根本上解决柑橘病害的有效途径^[2]。【前人研究进展】柑橘转基因抗溃疡病育种有两种策略, 一种策略是通过敲除宿主植物的柑橘溃疡病菌敏感基因以防止病原的侵染^[3]; 另外一种方法是在柑橘中过表达外源抗性基因, 使用的外源基因主要有昆虫抗菌肽基因^[4]、植物抗性基因^[5-7]和转录因子^[8-10]等。转录因子通过激活或抑制其他转录因子和下游基因的表达影响植物对病原的敏感性和抗性。

R2R3-MYB 转录因子家族含有 2 个保守的 MYB 结构域, 是植物界最大的转录因子家族之一。植物基因组中含有多个 R2R3-MYB 成员, 如地钱中 21 个、拟南芥中 126 个、杨树中 192 个、苹果中 222 个^[11-14]。MYB 基因在植物抵御有害昆虫、真菌、细菌和病毒侵染的过程中具有重要作用。小麦 MYB 基因 *TaMYB19*、*TaMYB29* 和 *TaMYB44* 在蚜虫取食时表达量显著上升, 通过调控韧皮部防卫反应抵抗蚜虫的危害^[15]; 而另一种小麦 MYB 基因 *TaPIMP2* 通过调控植物抗性基因 *PR1a*、*PR2*、*PR5* 和 *PR10* 的表达, 对麦根腐平脐蠕孢 (*Bipolaris sorokiniana*) 具有抗性^[16]; 杨树 MYB115 激活原花青素合成基因, 增加次生代谢物含量, 从而增强植物对杨树溃疡病菌 (*Dothiorella grefaria*) 的抗性^[17]; 甜樱桃 *PacMYBA* 在拟南芥中异源表达, 可增强转基因株系对丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pst*) DC3000 的

抗性^[18]; *SIMYB28* 被干扰株系中番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) 含量降低, 表明 *SIMYB28* 负调控 TYLCV 的侵染过程^[19]。【本研究切入点】柑橘中存在 100 多个 R2R3-MYB 转录因子基因^[20-21], 对其功能研究结果显示, 柑橘 MYB 转录因子调控花青素、木质素、类黄酮和黄酮醇等次生代谢产物的合成^[22-25], 在拟南芥中异源表达可增强转基因植株的抗旱性^[26]。但尚未见柑橘 MYB 基因参与生物学胁迫的相关报道。笔者所在实验室前期转录组测序结果表明, 柑橘 R2R3-MYB 基因 *CitMYB20* (Ciclev10005629m) 在感染柑橘溃疡病菌的甜橙中上调表达。【拟解决的关键问题】克隆不同柑橘品种 *CitMYB20* 基因序列和启动子序列, 分析 *CitMYB20* 在柑橘溃疡病菌和不同外源植物激素诱导下的表达水平, 并构建过表达载体和干扰载体, 对转基因株系进行抗病性评价, 以期获得新的抗溃疡病相关候选基因。

1 材料与方法

试验于 2017 年 3 月至 2019 年 3 月在国家柑桔品种改良中心完成。

1.1 材料与试剂

供试枣阳小叶枳 (*Poncirus trifoliata*)、金弹金柑 (*Fortunella japonica*) 和晚锦橙 (*Citrus sinensis*) 均取自国家果树种质重庆柑橘圃。柑橘溃疡病菌由中国农业科学院柑桔研究所胡军华博士提供。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感受态细胞 EHA105、植物表达载体 pLGNe、抑制表达中间载体 pUCRNAi 由笔者实验室制备和保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 DH5 α 、T 克隆载体 pGEM-T Easy、DNase I (RNase-free) 和反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。植物总 RNA 提取试剂盒和植物 DNA 快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司。NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒购自 NovoProtein 公司。

1.2 *CitMYB20* 基因序列克隆

按照植物 RNA 快速提取试剂盒说明书提取晚锦橙、枣阳小叶枳和金弹金柑成熟叶片的总 RNA, 进行反转录获得 cDNA 模板。使用 *CitMYB20*-F 和 *CitMYB20*-R 引物对(表 1), 在高保真酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 作用下, 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min 获得 PCR 产物。经加 poly (A) 尾, 胶纯化回收等操作后, 将 PCR 产物与 T 载体连接, 热击法转化感受态

DH5 α 。挑选菌液 PCR 检测阳性的克隆送至擎科生物技术有限公司测序。

1.3 *CitMYB20* 启动子序列克隆

利用植物 DNA 快速提取试剂盒从枣阳小叶枳和金弹金柑成熟叶片中提取 DNA。PCR 扩增体系同 1.2, 所用引物对为 *CitMYB20*-F (P) 和 *CitMYB20*-R (P) (表 1), 退火温度为 53 $^{\circ}$ C, 延伸时间为 1.5 min。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件对启动子序列进行分析。

1.4 柑橘溃疡病菌和外源激素对 *CitMYB20* 的诱导表达

选取枣阳小叶枳和金弹金柑的成熟叶片, 在 75% 的酒精中消毒 3—5 s, 再用无菌水清洗 3 次, 无菌脱脂棉将叶片擦干, 无菌针在叶片表面刺孔形成伤口, 在伤口处接种柑橘溃疡病菌, 对照组用水处理, 28 $^{\circ}$ C 培养 0、1、3、5 d, 切取接种孔附近的叶片提取 RNA。

用打孔器在消毒叶片上打孔, 取叶圆片分别浸泡在 10 μ mol \cdot L⁻¹ 水杨酸溶液、100 μ mol \cdot L⁻¹ 茉莉酸甲酯溶液、10 μ mol \cdot L⁻¹ 乙烯利溶液中, 无菌水处理做对照。28 $^{\circ}$ C 下处理 0、12、24、36、48 h 收集叶圆片。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

qRT-PCR 利用 NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒, 所用引物为 *CitMYB20*-F (q) 和 *CitMYB20*-R (q), 反应体系为 12 μ L, 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_{t\text{CitMYB20}} - C_{t\text{actin}}$) 方法计算相对表达量。

1.6 过表达载体构建

对连接有 *CitMYB20* 的 T 载体和植物双元表达载体 pLGNe 进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 胶回收酶切产物, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 将连接产物 pLGNe-*CitMYB20* 转化感受态 DH5 α 。随机挑选克隆经 PCR、双酶切验证正确后, 提取过表达载体 pLGNe-*CitMYB20*, 利用电转化法转化感受态农杆菌 EHA105 备用。

1.7 干扰载体构建

利用引物对 *CitMYB20*-F (g) 和 *CitMYB20*-R (g) (表 1) 扩增 *CitMYB20* 基因干扰片段。利用限制性内切酶 *Asc* I 和 *Swa* I 对 PCR 产物和中间载体 pUCRNAi 进行双酶切, 连接后将干扰片段正向插入中间载体生成 pUCRNAi1-*CitMYB20*。将干扰片段的 PCR 产物和 pUCRNAi1-*CitMYB20* 同时用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切, 连接后将干扰片段反向插入, 构建载体 pUCRANi-*CitMYB20*。将 pUCRANi-*CitMYB20* 和 pLGNe 用

Kpn I 和 *Sal* I 双酶切, 将干扰片段插入 pLGNe 成功构建干扰载体 pLGNe-pUCRANi-CitMYB20, 并转入根癌农杆菌 EHA105 备用。

1.8 根癌农杆菌法转化和转基因植株检测

在无菌条件下去掉枣阳小叶枳种子表皮, 放置于 MS 固体培养基上 28℃暗培养。待外植体生长到一定高度后, 将上胚轴切成 1 cm 左右的茎段。将含有过表达载体 pLGNe-CitMYB20 的根癌农杆菌菌液和含有干扰载体 pLGNe-pUCRANi-CitMYB20 的根癌农杆菌菌液及空载体菌液分别侵染上胚轴茎段。用无菌滤纸将茎段擦干, 摆放在 MS 固体共培养基上, 置于 26℃培养箱中暗培养 3 d, 转到 MS 固体筛选培养基中, 28℃暗培养 7 d 左右, 随后转移至光照培养箱中 28℃培养。待新芽长出后, 切取少量组织进行 GUS 染色。将 GUS 染色阳性芽嫁接到网室的资阳香橙砧

木上。提取转基因植株叶片 DNA 进行 PCR 检测, 验证 *CitMYB20* 是否整合到柑橘基因组中。提取转基因植株叶片 RNA 进行 qRT-PCR, 检测 *CitMYB20* 的表达量。

1.9 柑橘溃疡病抗性评价

按照贾瑞瑞等^[27]的描述, 采用体外接种法对转基因植株进行柑橘溃疡病抗性评价。从每株转基因植株上选取 9 张叶片, 在 75%的酒精中消毒 3—5 s, 再用无菌水清洗 3 次, 无菌脱脂棉擦干叶片, 用无菌针在叶片表面刺 14—20 个小孔, 移液器吸取 1 μL 柑橘溃疡病菌悬浮液 (1×10⁵ cfu/mL) 滴加在小孔处。对照组为非转基因植株, 28℃条件下培养 10 d, 拍照, 用 ImageJ Launcher 软件统计病斑面积。Excel 处理数据, SPSS 20 进行差异显著性分析, *P*<0.05 表示差异显著。

表 1 所用引物序列

Table 1 The primer sequences

引物名称 Primer name	用途 Amplification	引物序列 Primer sequence (5'-3')	备注 Remark
CitMYB20-F	克隆基因开放阅读框 To clone ORF sequence	ATAGGATCCATGGGGAGGGCTCCCTG	<i>Bam</i> H I 酶切位点 <i>Bam</i> H I restriction site
CitMYB20-R		CCGGAATTCCCTAAAATGGTAATGTTAATGAGTCTGC	<i>Eco</i> R I 酶切位点 <i>Eco</i> R I restriction site
CitMYB20-F (g)	克隆基因抑制表达片段 To clone RNAi fragment sequence	GCTCTAGAGGCGCGCCAAGCAAAACCAGAAGGCC	<i>Xba</i> I 和 <i>Asc</i> I 酶切位点 <i>Xba</i> I and <i>Asc</i> I restriction site
CitMYB20-R (g)		CGCGGATCCATTATAATACCGATCGCAAATTCATTAAG	<i>Bam</i> H I 和 <i>Sma</i> I 酶切位点 <i>Bam</i> H I and <i>Sma</i> I restriction site
CitMYB20-F (P)	克隆启动子 To clone promoter sequence	CCAGAACCTTTACTTTAATTCTATTTT	
CitMYB20-R (P)		CTTGTTAATTTCTTTCAAAGTAGTGGAG	
CitMYB20-F (q)	检测 <i>CitMYB20</i> 的表达量 To detect <i>CitMYB20</i> expression	CTCCTCGGTCACTACTGGAGA	
CitMYB20-R (q)		CATTAAGGCCGCTCCGAAA	
actin-f	检测 <i>actin</i> 的表达量 To detect <i>actin</i> expression	CATCCCTCAGCACCTTCC	
actin-r		CCAACCTTAGCACTTCTCC	
35S-F	鉴定过表达植株 To identify over-expressed plant	GGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAAC	
CitMYB20-R (OE)		TGACCACCTATTCCCAACATGT	
CitMYB20-F (RNAi)	鉴定 RNAi 抑制表达植株 To identify RNAi plant	ATTTGCGATCGGTATTTAAATGTGTAA	
CitMYB20-R (RNAi)		GCTAGCCAGGATCCAAATACCTGCAAA	

2 结果

2.1 不同品种 *CitMYB20* 基因序列和启动子序列的克隆与分析

分别从晚锦橙、枣阳小叶枳和金弹金柑中扩增 *CitMYB20* 的开放阅读框序列, 在 GenBank 数据登录

号为 MN689607、MN689608 和 MN689609。序列分析结果表明, 来源于上述 3 个柑橘品种的 *CitMYB20* 的核苷酸序列相似度为 98.60%, 氨基酸序列相似度为 97.64%, 表明该基因在不同柑橘品种间序列差异甚微。

分别从枣阳小叶枳和金弹金柑中克隆 *CitMYB20*

起始密码子上游 1 500 bp 的启动子序列（GenBank 数据登录号为 MN689610 和 MN689611），其核苷酸序列的相似性为 95.16%。软件预测结果显示，该基因在抗性品种金弹金柑和易感品种枣阳小叶枳中都含有参与植物激素应答相关的顺式作用元件 ABRE（响应脱落酸）、CGTCA-motif（响应茉莉酸甲酯）、TGACG-motif（响应茉莉酸甲酯）。但是金弹金柑中含有 TCA-element（响应水杨酸）而枣阳小叶枳中缺少这一元件（表 2）。

2.2 柑橘溃疡病菌对 CitMYB20 的诱导表达

取易感品种枣阳小叶枳和抗性品种金弹金柑的成熟离体叶片接种柑橘溃疡病菌菌液。qRT-PCR 结果表明易感品种枣阳小叶枳在接种柑橘溃疡病菌 0、1、3 和 5 d 时, CitMYB20 的表达量与对照相比无明显变化；

而抗性品种金弹金柑 CitMYB20 的相对表达量则上调幅度明显，尤其是在接种柑橘溃疡病菌 5 d 时表达量为对照的 2.5 倍（图 1）。

2.3 激素对 CitMYB20 的诱导表达

CitMYB20 对不同外源激素的应答反应不尽相同。其中，水杨酸和茉莉酸甲酯对 CitMYB20 诱导表达结果相似，在两种激素处理后，金弹金柑中 CitMYB20 的相对表达量均呈现出先升高后降低的趋势，处理 24 h 相对表达量最高；而枣阳小叶枳中该基因的相对表达量均为先降低后升高，处理 24 h 相对表达量最低。乙烯利处理后，CitMYB20 的表达量在枣阳小叶枳中 12 h 达到最高值，之后表达量降低；而在金弹金柑中其表达量呈现缓慢下降的趋势（图 2）。

表 2 CitMYB20 启动子顺式作用元件

Table 2 Cis-acting elements in promoter of CitMYB20 predicted through PlantCARE

元件名称 Motif name	序列 Sequence	位置 Position		方向 Strand		功能 Function
		枣阳小叶枳 <i>P. trifoliata</i>	金弹金柑 <i>F. japonica</i>	枣阳小叶枳 <i>P. trifoliata</i>	金弹金柑 <i>F. japonica</i>	
ABRE	ACGTG	-1198	-1190	+	+	脱落酸响应 Absciscic acid responsiveness
CGTCA-motif	CGTCA	-321	-321	-	-	茉莉酸甲酯响应 Methyl jasmonate responsiveness
		-316		+		
TGACG-motif	TGACG	-321	-321	+	+	
		-316		-		
TCA-element	CCATCTTTT		-1452		-	水杨酸响应 Salicylic acid responsiveness
			-1390		+	

“+”：正向 Forward direction；“-”：反向 Reverse direction

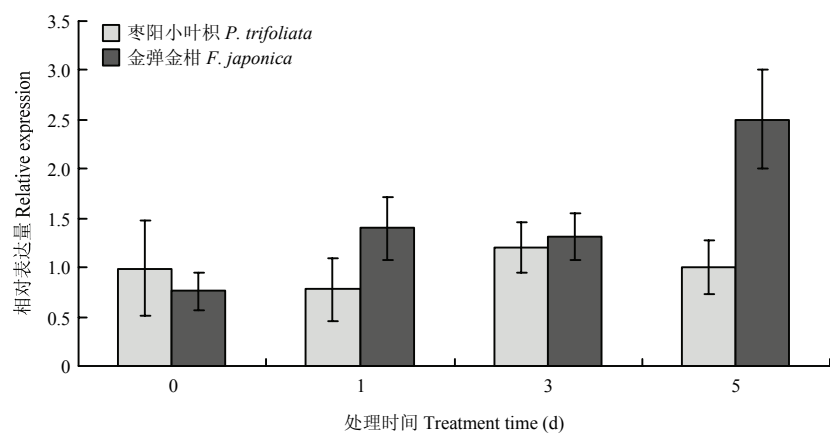
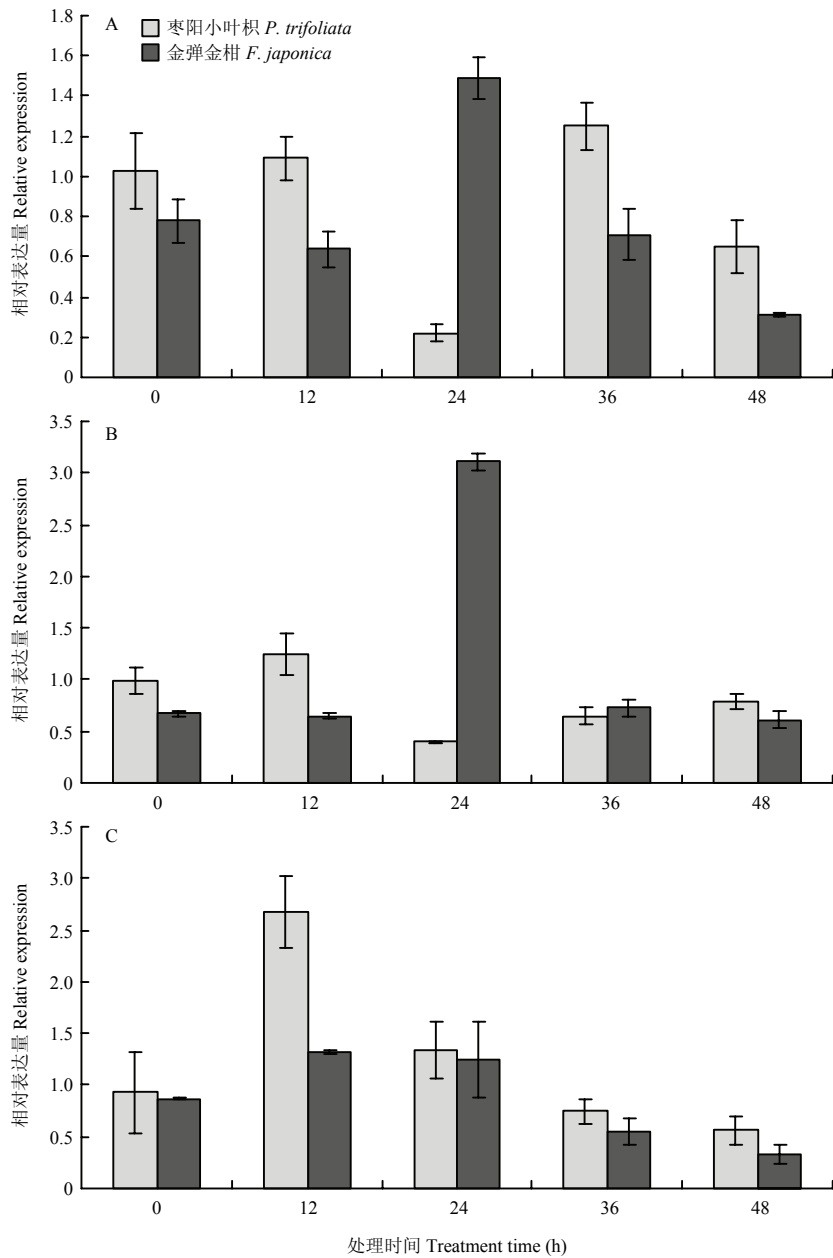


图 1 柑橘溃疡病菌对 CitMYB20 的诱导表达

Fig. 1 The expression of CitMYB20 induced by Xcc



A: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸 Salicylic acid; B: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate; C: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯利 Ethephon

图 2 不同激素对 *CitMYB20* 的诱导表达分析

Fig. 2 Expression analysis of *CitMYB20* induced by different hormones

2.4 *CitMYB20* 过表达和干扰植株抗性分析

经菌液 PCR 检测、质粒 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切鉴定和测序结果分析, 确认 *CitMYB20* 的开放阅读框成功插入 pLGNe 载体, 获得长度为 13.47 kb 的 pLGNe-*CitMYB20* 植物过表达载体。另外选取 *CitMYB20* 的特异性片段, 将抑制表达片段分别正、反向连接到 pUCRNAi 上得到中间载体 pUCRNAi-*CitMYB20*, 随

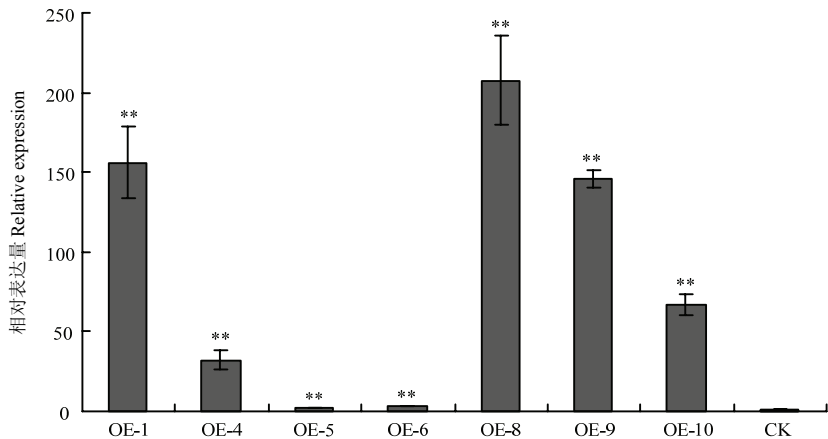
后连接到 pLGNe 载体上, 经 *Kpn* I/*Sal* I 双酶切验证和测序分析, 获得长度为 14.80 kb 的 pLGNe-pUCRNAi-*CitMYB20* 干扰载体。

利用根癌农杆菌法转化枣阳小叶枳上胚轴, 将 GUS 染色呈蓝色的阳性芽嫁接到无菌的晚锦橙实生苗上。待嫁接芽抽出新芽后, 将试管苗嫁接到网室中两年生的资阳香橙砧木上。提取嫁接苗叶片 DNA,

PCR 法再次检测转基因阳性植株，共获得 7 株 *CitMYB20* 过表达株系，分别命名为 OE-1、OE-4、OE-5、OE-6、OE-8、OE-9、OE-10；5 株 *CitMYB20* 干扰株系，分别命名为 R-3、R-8、R-9、R-10 和 R-11。qRT-PCR 结果显示，在过表达植株中，*CitMYB20* 显著上调表达，最高表达倍数达 207 倍（图 3）；在干扰植株中，*CitMYB20* 的表达显著下调，最低仅为对照表达量的 12%（图 4）。

与非转基因植株的表型相比，枣阳小叶枳 *CitMYB20* 过表达植株和干扰植株的株高和叶片大小

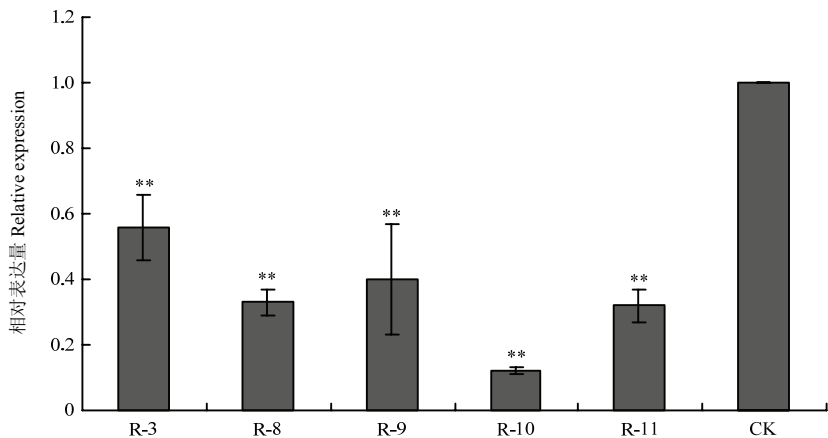
未观测到明显的变化。选取生长状态一致的过表达植株叶片，采用针刺法接种柑橘溃疡病菌，10 d 后对其拍照统计病斑面积。结果显示，过表达植株叶片的病斑面积均小于非转基因植株叶片的病斑面积，其中 OE-1、OE-6、OE-10 这 3 株转基因材料的病斑面积与非转基因植株相比存在显著差异，病斑面积减少 25% 左右（图 5）。RNAi 抑制 *CitMYB20* 表达植株叶片的病斑面积均大于非转基因植株叶片的病斑面积，其中 R-9 转基因植株的病斑面积与非转基因植株相比存在显著差异，病斑面积增加约 40%（图 6）。



CK：非转基因植株 Non-transgenic plant；OE：过表达植株 Over-expressed plant；**： $P<0.01$ 。下同 The same as below

图 3 过表达植株的 *CitMYB20* 相对表达量检测

Fig. 3 Detection of *CitMYB20* relative expression level in over-expressed plants



R：RNAi 植株 RNAi plant。下同 The same as below

图 4 RNAi 植株的 *CitMYB20* 相对表达量检测

Fig. 4 Detection of *CitMYB20* relative expression level in RNAi plants

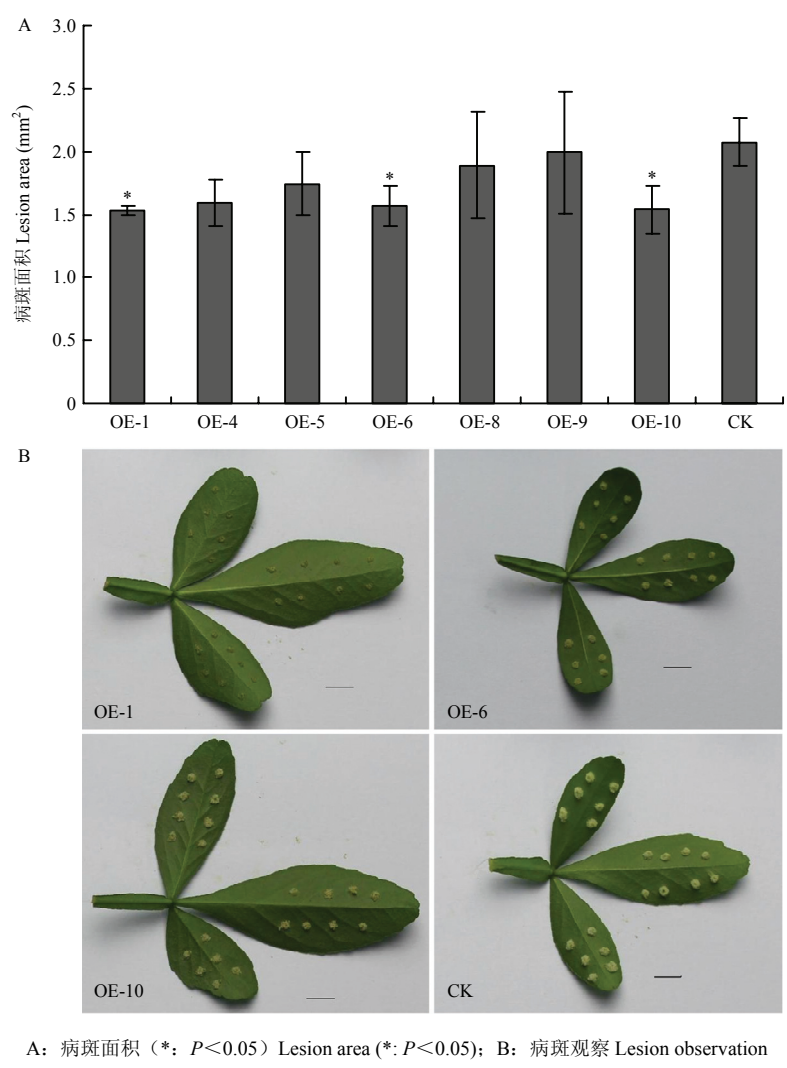


图 5 过表达 *CitMYB20* 植株的柑橘溃疡病抗性评价

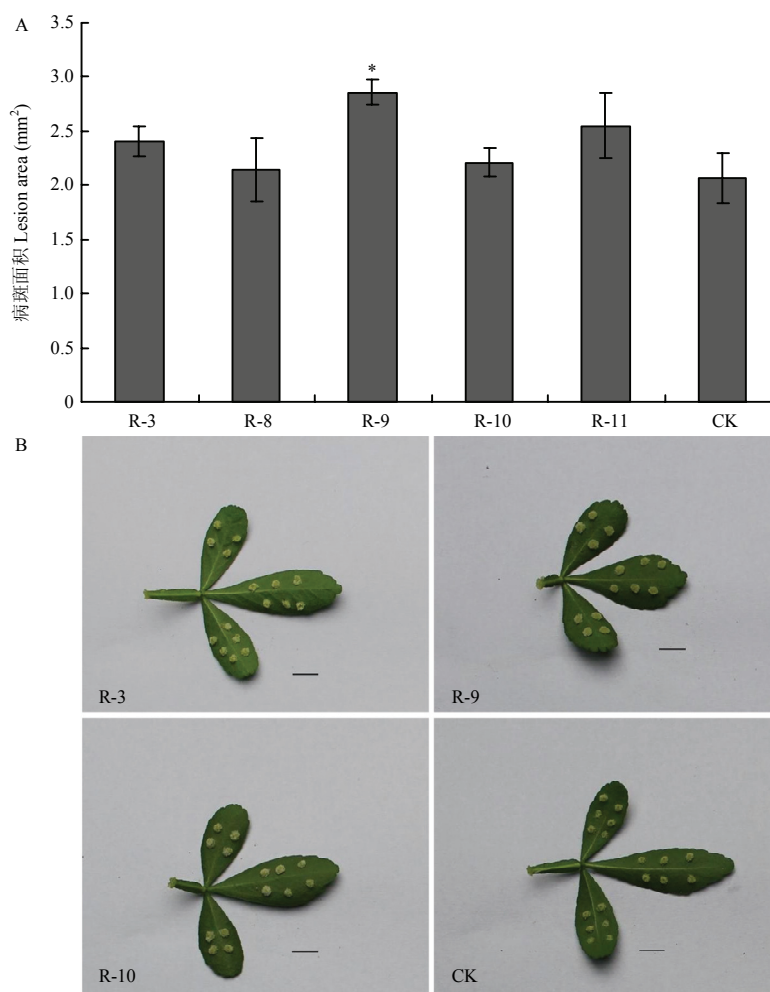
Fig. 5 Evaluation of citrus bacterial canker resistance in over-expressed *CitMYB20* plants

3 讨论

CitMYB20 (Ciclev10005629m) 是 XIE 等^[20]从柑橘基因组数据库中鉴定出的众多 R2R3-MYB 类转录因子基因之一。范海芳等^[28]曾从晚锦橙、酸柚、纽荷尔脐橙和四季橘中克隆 *CitMYB20* 基因序列，其序列相似度在核酸水平达到 99%。本试验克隆了枣阳小叶枳和金弹金柑 *CitMYB20* 基因序列，与晚锦橙 *CitMYB20* 相比，在核苷酸水平上相似度也达 99%，表明 *CitMYB20* 在柑橘不同品种间高度保守。受柑橘溃疡病菌侵染后，*CitMYB20* 在抗性品种四季橘中上调表达 3 倍，在易感品种纽荷尔脐橙中无差异表达^[28]。本研究以柑橘溃疡病抗性品种金弹金柑和易感品种枣

阳小叶枳作为材料，分析柑橘溃疡病菌侵染不同时间基因表达量的变化，也发现 *CitMYB20* 在感染柑橘溃疡病菌的抗性品种中显著上调表达，同样在感染柑橘溃疡病菌的易感品种中未发现显著差异表达。

本研究中，*CitMYB20* 过表达植株在接种柑橘溃疡病菌 10 d 后的病斑面积与对照植株相比明显减小（图 5），抑制表达植株在接种柑橘溃疡病菌后病斑面积与对照植株相比明显增加（图 6），表明 *CitMYB20* 能够抵抗柑橘溃疡病菌侵染，在抗溃疡病途径中起到正调控作用。然而，转基因植株对柑橘溃疡病的抗性与 *CitMYB20* 的表达量之间没有观测到明显的相关性。在已报道的转基因植物研究中也有类似现象，即基因的过表达或抑制表达程度与转基因植株的抗性和敏感性之间不存在



A: 病斑面积 (*: $P < 0.05$) Lesion area (*: $P < 0.05$); B: 病斑观察 Lesion observation

图 6 *CitMYB20* 抑制表达植株的柑橘溃疡病抗性评价

Fig. 6 Evaluation of citrus bacterial canker resistance in plants inhibiting *CitMYB20* expression

直接关系, 或具有相同或相似表达水平的转基因植株对病原的抗性程度不等^[8,29-30]。这可能与外源基因在植物基因组上插入位点相关, 影响基因组上其他基因的表达从而影响其抗性; 也可能与外源基因在翻译和翻译后水平的调控相关, 虽然外源基因表达水平甚高, 但在转基因植物中其蛋白的表达并不一定很高, 因而外源基因的过表达量达到抗性水平时, 更高的基因表达量也不会进一步增加转基因植物的抗性。

R2R3-MYB 转录因子通过调控植物体内多种途径抵抗细菌病原的危害。研究显示 *AtMYB30* 是过敏性细胞死亡的正向调控因子, 在拟南芥和烟草中过表达 *AtMYB30*, 转基因植株对不同的病原细菌表现过敏反应 (hypersensitive response, HR) 或类似过敏反应, 并能增强对丁香假单胞杆菌番茄致病变种的抗

性; 在反义表达 *AtMYB30* 的拟南芥株系中, 能强烈抑制对病原细菌的抗性和 HR 细胞死亡反应, HR 和防卫反应相关基因的表达也发生改变^[31]。偃麦草 R2R3-MYB 基因 *TiMYB2R-1* 的异源表达可增强转基因小麦对全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis*) 的抗性^[32]。小麦 R2R3-MYB 基因 *TaPIMP1* 在烟草中的异源表达则表现出对青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 的抗性^[33]。*CitMYB20* 与拟南芥同源基因的进化树分析显示, 该基因与拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子 *AtMYB15* 的同源性最高^[28], 前人研究表明 *AtMYB15* 能够参与木质素的生物合成和植物的基础免疫调节, 增强对丁香假单胞杆菌番茄致病变种 DC3000 的抗性^[34], 由此推测 *CitMYB20* 可能通过植物次生代谢物的合成在柑橘溃疡病菌侵染过程中发挥抵抗作用。

水杨酸^[35]、茉莉酸^[36]等植物激素能够参与植物抗病途径的信号传导,在植物抵御病菌侵染的过程中发挥重要作用。目前关于 R2R3-MYB 转录因子通过激素信号通路参与病菌响应的研究也有报道,如 *AtMYB44* 能够通过水杨酸信号通路抵抗丁香假单胞杆菌番茄致病变种的侵染^[37]。拟南芥茉莉酸合成突变体 *coi1* 受灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 侵染后,拟南芥 R2R3-MYB 基因 *BOS1* 的诱导表达被延迟且表达增幅减少,提示病菌对 *BOS1* 的诱导表达与茉莉酸信号通路之间存在相关性^[38]。本研究使用外源激素水杨酸、茉莉酸甲酯和乙烯利分别对 *CitMYB20* 进行诱导表达,结果显示该基因在金弹金柑和枣阳小叶枳中对水杨酸和茉莉酸甲酯呈现出相反的诱导表达方式(图 2),推测该基因的抗病途径可能受到水杨酸和茉莉酸甲酯的诱导。另外,笔者在分析启动子顺式作用元件时发现,与金弹金柑相比,枣阳小叶枳 *CitMYB20* 的启动子序列中缺少水杨酸响应的功能元件 TCA-element(表 2)。有研究显示启动子序列的缺失会严重影响基因表达的变化^[39]。笔者的研究结果也显示,在受外源水杨酸诱导时,枣阳小叶枳中 *CitMYB20* 在一定时期表达量不增反降(图 2)。枣阳小叶枳对柑橘溃疡病抗性的丧失是否因为 TCA-element 元件的缺失从而失去水杨酸诱导抗性基因表达的能力,有待于进一步研究。

4 结 论

CitMYB20 编码序列在不同柑橘品种间非常保守,但启动子序列在柑橘溃疡病抗性品种金弹金柑和敏感品种枣阳小叶枳之间存在差异。*CitMYB20* 在金弹金柑中受柑橘溃疡病菌和外源激素水杨酸、茉莉酸甲酯的诱导表达。过表达 *CitMYB20* 柑橘株系对柑橘溃疡病的抗性得到明显提高,抑制 *CitMYB20* 表达的植株则降低了对柑橘溃疡病的抗性,推测该基因在柑橘抗溃疡病途径中具有重要作用。

References

- [1] FERENC C M, GOCHEZ A M, BEHLAU F, WANG N, GRAHAM J H, JONES J B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(6): 1302-1318.
- [2] 姚利晓, 何永睿, 邹修平, 雷天刚, 许兰珍, 彭爱红, 陈善春. 柑橘基因工程育种研究策略及其进展. *果树学报*, 2013, 30(6): 1056-1064.

- Journal of Fruit Science*, 2013, 30(6): 1056-1064. (in Chinese)
- [3] PENG A, CHEN S, LEI T, XU L, HE Y, WU L, YAO L, ZOU X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15: 1509-1519.
- [4] KOBAYASHI A K, VIEIRA L G E, BESPALHOK FILHO J C, LEITE JR. R P, PEREIRA L F P, MOLINARI H B C, MARQUES V V. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic sweet orange expressing the sarcotoxin IA gene. *European Journal of Plant Pathology*, 2017, 149(4): 865-873.
- [5] OMAR A A, MURATA M M, EL-SHAMY H A, GRAHAM J H, GROSSER J W. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing Xa21 from rice. *Transgenic Research*, 2018, 27(2): 179-191.
- [6] 胡安华, 祁静静, 张庆雯, 陈善春, 邹修平, 许兰珍, 彭爱红, 雷天刚, 姚利晓, 龙琴, 何永睿, 李强. 柑橘溃疡病相关基因 *CsPGIP* 的克隆与表达. *中国农业科学*, 2019, 52(4): 639-650.
- HU A H, QI J J, ZHANG Q W, CHEN S C, ZOU X P, XU L Z, PENG A H, LEI T G, YAO L X, LONG Q, HE Y R, LI Q. Cloning and expression analysis of the citrus bacterial canker-related gene *CsPGIP* in citrus. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(4): 639-650. (in Chinese)
- [7] 邹修平, 龙俊宏, 彭爱红, 陈敏, 龙琴, 陈善春. 超量表达 *CsGH3.6* 通过抑制生长素信号转导增强柑橘溃疡病抗性. *中国农业科学*, 2019, 52(21): 3806-3818.
- ZOU X P, LONG J H, PENG A H, CHEN M, LONG Q, CHEN S C. Overexpression of *CsGH3.6* enhanced resistance to citrus canker disease by inhibiting auxin signaling transduction. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(21): 3806-3818. (in Chinese)
- [8] HE Y, JIA R, QI J, CHEN S, LEI T, XU L, PENG A, YAO L, LONG Q, LI Z, LI Q. Functional analysis of citrus AP2 transcription factors identified CsAP2-09 involved in citrus canker disease response and tolerance. *Gene*, 2019, 707: 178-188.
- [9] LI Q, JIA R R, DOU W, QI J, QIN X, FU Y, HE Y, CHEN S. CsBZIP40, a BZIP transcription factor in sweet orange, plays a positive regulatory role in citrus bacterial canker response and tolerance. *PLoS ONE*, 2019, 14(10): e0223498.
- [10] 窦万福, 祁静静, 胡安华, 陈善春, 彭爱红, 许兰珍, 雷天刚, 姚利晓, 何永睿, 李强. GST pull-down 联合 LC-MS/MS 筛选柑橘抗溃疡病转录因子 CsBZIP40 的互作蛋白. *中国农业科学*, 2019, 52(13): 2243-2255.
- DOU W F, QI J J, HU A H, CHEN S C, PENG A H, XU L Z, LEI T G, YAO L X, HE Y R, LI Q. Screening of interacting proteins of

- anti-canker transcription factor CsBZIP40 in citrus by GST pull-down combined with LC-MS/MS. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(13): 2243-2255. (in Chinese)
- [11] CAO Z H, ZHANG S Z, WANG R K, ZHANG R F, HAO Y J. Genome wide analysis of the apple MYB transcription factor family allows the identification of *MdoMYB121* gene conferring abiotic stress tolerance in plants. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69955.
- [12] WILKINS O, NAHAL H, FOONG J, PROVART N J, CAMPBELL M M. Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 981-993.
- [13] STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5): 447-456.
- [14] ALBERT N W, THRIMAWITHANA A H, MCGHIE T K, CLAYTON W A, DEROLE S C, SCHWINN K E, BOWMAN J L, JORDAN B R, DAVIES K M. Genetic analysis of the liverwort *Marchantia polymorpha* reveals that R2R3MYB activation of flavonoid production in response to abiotic stress is an ancient character in land plants. *New Phytologist*, 2018, 218(2): 554-566.
- [15] ZHAI Y, LI P, MEI Y, CHEN M, CHEN X, XU H, ZHOU X, DONG H, ZHANG C, JIANG W. Three *MYB* genes co-regulate the phloem-based defence against English grain aphid in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(15): 4153-4169.
- [16] WEI X, SHAN T, HONG Y, XU H, LIU X, ZHANG Z. TaPIMP2, a pathogen-induced MYB protein in wheat, contributes to host resistance to common root rot caused by *Bipolaris sorokiniana*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1754.
- [17] WANG L, RAN L, HOU Y, TIAN Q, LI C, LIU R, FAN D, LUO K. The transcription factor MYB115 contributes to the regulation of proanthocyanidin biosynthesis and enhances fungal resistance in poplar. *New Phytologist*, 2017, 215(1): 351-367.
- [18] SHEN X, GUO X, GUO X, ZHAO D, ZHAO W, CHEN J, LI T. PacMYBA, a sweet cherry R2R3-MYB transcription factor, is a positive regulator of salt stress tolerance and pathogen resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 112: 302-311.
- [19] LI T, ZHANG X Y, HUANG Y, XU Z S, WANG F, XIONG A S. An R2R3-MYB transcription factor, S1MYB28, involved in the regulation of TYLCV infection in tomato. *Scientia Horticulturae*, 2018, 237: 192-200.
- [20] XIE R, LI Y, HE S, ZHENG Y, YI S, LV Q, DENG L. Genome-wide analysis of citrus *R2R3MYB* genes and their spatiotemporal expression under stresses and hormone treatments. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e113971.
- [21] LIU C, WANG X, XU Y, DENG X, XU Q. Genome-wide analysis of the R2R3-MYB transcription factor gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(10): 6769-6785.
- [22] JIA N, LIU J, SUN Y, TAN P, CAO H, XIE Y, WEN B, GU T, LIU J, LI M, HUANG Y, LU J, JIN N, SUN L, XIN F, FAN B. *Citrus sinensis* MYB transcription factors *CsMYB330* and *CsMYB308* regulate fruit juice sac lignification through fine-tuning expression of the *Cs4CL1* gene. *Plant Science*, 2018, 277: 334-343.
- [23] HUANG D, WANG X, TANG Z, YUAN Y, XU Y, HE J, JIANG X, PENG S A, LI L, BUTELLI E, DENG X, XU Q. Subfunctionalization of the *Ruby2-Ruby1* gene cluster during the domestication of citrus. *Nature Plants*, 2018, 4(11): 930-941.
- [24] JIA N, LIU J, TAN P, SUN Y, LV Y, LIU J, SUN J, HUANG Y, LU J, JIN N, LI M, IMAM K M S U, XIN F, FAN B. *Citrus sinensis* MYB transcription factor CsMYB85 induce fruit juice sac lignification through interaction with other CsMYB transcription factors. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: Article 213.
- [25] HUANG D, YUAN Y, TANG Z, HUANG Y, KANG C, DENG X, XU Q. Retrotransposon promoter of *Ruby1* controls both light- and cold-induced accumulation of anthocyanins in blood orange. *Plant, Cell and Environment*, 2019, 42(11): 3092-3104.
- [26] ROMERO-ROMERO J L, INOSTROZA-BLANCHETEAU C, ORELLANA D, AQUEA F, REYES-DIAZ M, GIL P M, PABLO MATTE J, ARCE-JOHNSON P. Stomata regulation by tissue-specific expression of the *Citrus sinensis* MYB61 transcription factor improves water-use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 54-60.
- [27] 贾瑞瑞, 周鹏飞, 白晓晶, 陈善春, 许兰珍, 彭爱红, 雷天刚, 姚利晓, 陈敏, 何永睿, 李强. 柑橘响应溃疡病菌转录因子 CsBZIP40 的克隆及功能分析. *中国农业科学*, 2017, 50(13): 2488-2497.
- JIA R R, ZHOU P F, BAI X J, CHEN S C, XU L Z, PENG A H, LEI T G, YAO L X, CHEN M, HE Y R, LI Q. Gene cloning and expression analysis of canker-related transcription factor CsBZIP40 in citrus. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(13): 2488-2497. (in Chinese)
- [28] 范海芳, 彭蕴, 张庆雯, 何永睿, 邹修平, 李强, 彭爱红, 许兰珍, 雷天刚, 陈善春, 姚利晓. 柑橘 R2R3-MYB 类转录因子 CitMYB20 的克隆与表达分析. *分子植物育种*, 2019, 17(10): 3199-3207.
- FAN H F, PENG Y, ZHANG Q W, HE Y R, ZOU X P, LI Q, PENG A H, XU L Z, LEI T G, CHEN S C, YAO L X. Cloning and expression of citrus R2R3-MYB transcription factor *CitMYB20*. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(10): 3199-3207. (in Chinese)
- [29] ZOU X, JIANG X, XU L, LEI T, PENG A, HE Y, YAO L, CHEN S. Transgenic citrus expressing synthesized *cecropin* B genes in the

- phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. *Plant Molecular Biology*, 2017, 93(4/5): 341-353.
- [30] HAO G X, STOVER E, GUPTA G. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and Huanglongbing (HLB). *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: Article 1078.
- [31] VAILLEAU F, DANIEL X, TRONCHET M, MONTILLET J L, TRIANTAPHYLID S C, ROBY D. A R2R3-MYB gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(15): 10179-10184.
- [32] LIU X, YANG L, ZHOU X, ZHOU M, LU Y, MA L, MA H, ZHANG Z. Transgenic wheat expressing *Thinopyrum intermedium* MYB transcription factor *TiMYB2R-1* shows enhanced resistance to the take-all disease. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(8): 2243-2253.
- [33] LIU H, ZHOU X, DONG N, LIU X, ZHANG H, ZHANG Z. Expression of a wheat MYB gene in transgenic tobacco enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*, and to drought and salt stresses. *Functional and Integrative Genomics*, 2011, 11(3): 431-443.
- [34] CHEZEM W R, MEMON A, LI F S, WENG J K, CLAY N K. SG2-type R2R3-MYB transcription factor MYB15 controls defense-induced lignification and basal immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2017, 29(8): 1907-1926.
- [35] VLOT A C, DEMPSEY D M A, KLESSIG D F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47: 177-206.
- [36] BROWSE J. Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 183-205.
- [37] ZOU B, JIA Z, TIAN S, WANG X, GOU Z, LÜ B, DONG H. AtMYB44 positively modulates disease resistance to *Pseudomonas syringae* through the salicylic acid signalling pathway in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology*, 2013, 40(3): 304-313.
- [38] MENGISTE T, CHEN X, SALMERON J, DIETRICH R. The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2003, 15(11): 2551-2565.
- [39] YU Q B, HUANG M, JIA H G, YU Y, PLOTTO A, BALDWIN E A, BAI J H, WANG N, GMITTER JR. F G. Deficiency of valencene in mandarin hybrids is associated with a deletion in the promoter region of the valencene synthase gene. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 101.

(责任编辑 岳梅)