

大豆疫霉中 Myb 类转录因子的预测与分析

王子迎 (合肥师范学院生命科学系, 安徽合肥 230061)

摘要 [目的] 为阐明大豆疫霉中 Myb 类转录因子的作用机理提供科学依据。[方法] 以从大豆疫霉基因组数据库中筛选的大豆疫霉 Myb 类转录因子为研究对象, 分析其在大豆疫霉中的分布特点和 4 个重要值较大的 Myb 因子在大豆疫霉与寄主互作过程中的转录模式, 并对 Myb 因子进行聚类。[结果] 大豆疫霉基因组中含 50 个 Myb, 其在基因组中的分布不均; 50 个 Myb 因子可聚为 6 类 (A、B、C、D、E、F), 其中聚类组 E 中 Myb 因子最多, 占总数的 40%, 聚类组 B 中 Myb 因子最少, 只有 4 个; Myb 因子在疫霉菌丝数据库中出现频率最高 (0.44%), 在侵染数据库中出现频率最低 (0.26%); 4 个 Myb 因子在疫霉侵染寄主过程中均有转录。[结论] 该研究为明确大豆疫霉 Myb 的生理功能及其在疫霉致病过程中的作用提供了参考。

关键词 Myb; 大豆疫霉; 转录因子

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)09-03969-03

Prediction and Analysis on Myb Transcription Factors in *Phytophthora sojae*

WANG Zi-ying (Department of Life Science, Hefei Teachers College, Hefei, Anhui 230061)

Abstract [Objective] The study was to provide the scientific basis for illustrating the action mechanism of Myb transcription factors in *Phytophthora sojae*. [Method] With Myb transcription factors in *P. sojae* screened from the phytophthora genome database as the research objects, their distribution characteristics in *P. sojae* and the transcription model of 4 Myb factors with bigger important value during the interaction process of *P. sojae* with host were analyzed, and the Myb factors were clustered. [Result] The genome of *P. sojae* contained 50 Myb factors which distribution were not uniform. 50 Myb factors could be clustered into 6 groups (A, B, C, D, E, F). And the Myb factors in group E were the most, accounting for 40% of the total, while that in group B was the least (only 4). Myb factors had the highest frequency (0.44%) in *Phytophthora capsici* database, while had the lowest frequency (0.26%) in infection database. 4 Myb factor were all transcribed in process of the infection of *Phytophthora* on host. [Conclusion] The research provided the reference for understanding the physiological function of Myb and its function in pathogenic process of *P. sojae*.

Key words Myb; *Phytophthora sojae*; Transcription factor

在真核生物的生命活动中, 转录因子起着重要的调控作用, 了解转录因子基因的表达与调控是阐明病原菌致病性的关键^[1]。Myb 转录因子家族成员以含有 Myb 结构域为共同特征, 每个 Myb 结构域通常由 51~52 个氨基酸组成, 含有 3 个规则间隔的色氨酸残基 (W)^[2]。按所含 Myb 结构域的数目, Myb 转录因子可分成 R1、R2R3、R1R2R3 3 个家族^[2], Myb 转录因子主要参与生物的生长、发育和抗胁迫等方面的调节^[3]。

目前, 分离和鉴定转录因子的方法主要有试验方法(遗传筛选法、直接克隆法)和生物信息学法。其中, 遗传筛选法鉴定转录因子具有一定的偶然性, 并且耗时, 效率低。直接克隆法因转录因子表达丰度低, 且表达具有组织特异性, 分离和鉴定转录因子存在障碍。而生物信息学法鉴定转录因子和靶基因, 是基于转录因子的保守的 DNA 特征结构建立起来的, 这种方法弥补了传统试验法的缺陷, 大大提高了转录因子的发现几率, 成为当前最有效的鉴定转录因子的方法之一^[4]。

大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 属于茸鞭生物界卵菌门疫霉属, 其侵染大豆引起的疫霉根腐病是大豆生产中的一种毁灭性病害^[5]。在大豆疫霉基因组中预测有 90 个 Myb 转录因子^[6], 但 Myb 因子在大豆疫霉中的分布特征和具体功能尚缺乏研究。鉴于此, 笔者从大豆疫霉基因组数据库中筛选大豆疫霉 Myb 类转录因子基因, 并分析其在大豆疫霉中的分布特点, 在此基础上, 选择 4 个重要值较大的 Myb 转录因子分析其在大豆疫霉与寄主互作过程中的转录模式, 以期阐明大豆疫霉中 Myb 因子的作用机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 Myb 因子的筛选 大豆疫霉 Myb 转录因子从大豆疫霉菌基因组数据库 Joint Genome Institute *Phytophthora sojae* database v.1.1 (<http://genome.jgi-psf.org/Physo1-1/Physo1-1.home.html>) 中利用 HMMProfam, ProScan 等工具筛选 (JGI Version 1.1, 截至 2008 年 3 月 10 日)。非大豆疫霉的 Myb 转录因子从 Sanger 中心的 Pfam 同源蛋白家族数据库 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Release 9.0, 2007 年 3 月中) 下载得到。

1.2 分析方法 序列比对软件 BLAST2.2.14 从 NCBI 的 GenBank 中下载 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。核酸序列编码蛋白质应用 NCBI 中的 BLASTX web 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行在线分析。Myb 因子的二级折叠结构用 MFOLD 3.1 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) 进行在线预测。应用 MEGA 3.0 软件生成 Myb 因子的进化树。

1.3 Myb 因子的转录分析 取 10% V8 培养液中培养 4 d 的大豆疫霉菌株 PS26 菌丝体, 接种于生长 14 d 的大豆品种合丰 35 的叶片上。分别提取接种菌丝体 (接种后 0、6、12、24、36、48 h) 的 RNA, 并用 DNase (Qagen) 消解以排除基因组 DNA 的干扰。用 10 μg 总 RNA 进行反转录合成第一链 cDNA, 并以 2 μl 稀释液为模板在 25 μl 体系中进行 PCR 扩增, 以校正模板浓度; 对不同循环次数的 PCR 产物进行比较, 优化扩增条件。

引物序列: PsMyb1 (Protein ID:121308) 的上游引物为 5-TCTCCCCCAGCAGCAG-3, 下游引物为 5-CGGGGAGTTCATCATGCC-3; PsMyb2 (Protein ID:142552) 的上游引物为 5-ATGATGCCCAGCCAGCAC-3, 下游引物为 5-GTCGACTTGGTCTGTCAGG-3; PsMyb3 (Protein ID:134946) 的上游引物为 5-A-GACTCCCAGGAAGAAAGTG-3, 下游引物为 5-TTACGAGCAGAGCTTGCTG-3; PsMyb4 (Protein ID:131353) 的上游引物为 5-

基金项目 国家自然科学基金项目(30800040); 安徽省高校优秀青年人才基金项目(2007jqL105)。

作者简介 王子迎(1976-), 男, 安徽灵璧人, 博士, 副教授, 从事真菌遗传与分子生物学研究。

收稿日期 2008-12-22

ATGACCATCACACCGCGCG-3, 下游引物为5-GTCCGCGCTCG-GACCGTGA-3; 以大豆疫霉的 actinA 为 PCR 反应的内标, 上游引物为5-GTACTGCAACATCGTGTCTGTCG-3, 下游引物为5-TTAGAAGCACTTGCGGTGCACG-3。

PCR 反应于 MJ-PTC 200 Thermocycler (MJ Research, Warrington, MA) 中进行。PCR 产物用含 1.2% 溴化乙锭的琼脂糖 (上海申能博彩公司) 凝胶进行电泳, 用 Gel Doc 2000 (Bio-RAD, Segrate Italy) 拍摄电泳结果, 用图像分析软件 Quantity One 4.4.0 (Bio-RAD, Segrate Italy) 对电泳产物进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 大豆疫霉中 Myb 因子的数量和分布 在大豆疫霉菌基因组中, 利用 ProScan 工具预测到 90 个 Myb binding domain, 将其在同源蛋白家族数据库 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 中进行筛选, 结果在 10^{-5} 显著水平上筛选到 50 个 Myb 类转录因子, 占大豆疫霉菌基因总数的 0.41%。

大豆疫霉菌基因组约为 95 Mbp, 已测定序列的为 86 Mbp, 分布在 1 810 个 scaffold 上。其中 54 个大型 scaffold 包括了 1/2 以上的基因组序列。将 Myb 基因在大豆疫霉菌基因组中进行定位, 发现 Myb 基因在基因组中的分布并不均匀, 在第 15、23、12 和 26 4 个 Scaffold 上比较集中, 分别有 10、7、4 和 3 个 Myb。在 Scaffold 15 和 Scaffold 23 上, Myb 基因的出现频率为 4.5%, 为其在全基因组中出现频率 (0.41%) 的 10 多倍。

2.2 大豆疫霉 Myb 因子的聚类分析 根据氨基酸序列, 对 50 个大豆疫霉 Myb 因子进行聚类分析。结果显示, 在 20% 的相似性水平上 50 个 Myb 因子被划分为 6 个聚类组 (图 1)。聚类组 E 共含有 20 个 Myb 因子, 占总数的 40%, 聚类组 D 含

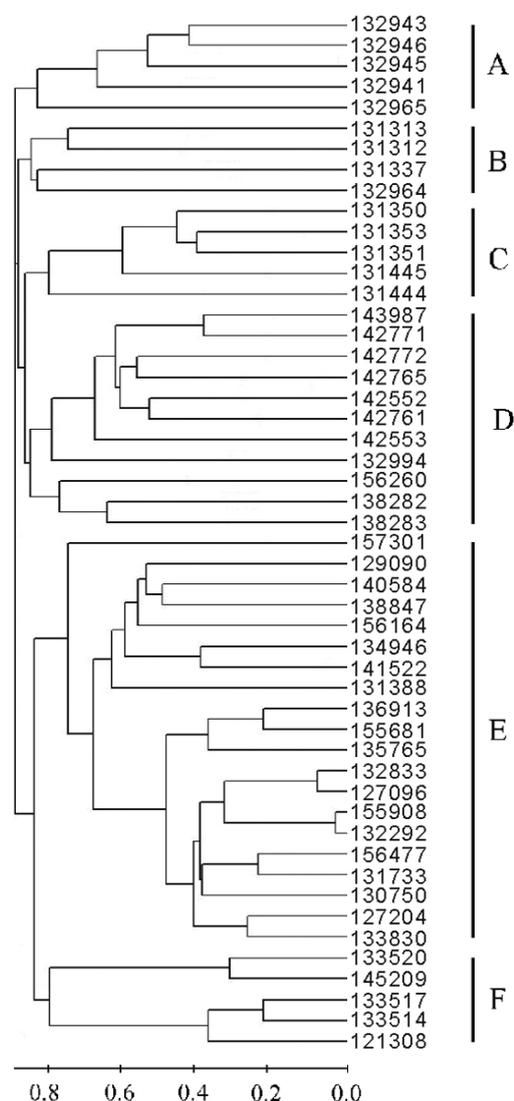


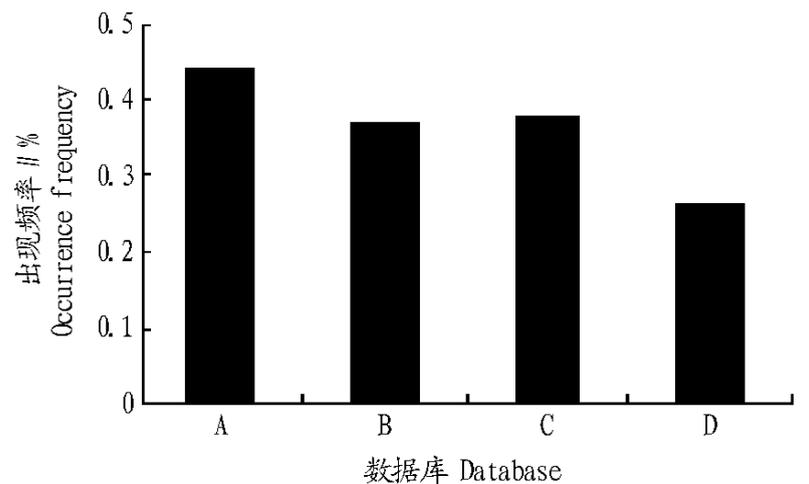
图 1 根据 Myb 因子的氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.1 The constructed phylogenetic tree according to amino acid sequences alignment of Myb

有 11 个 Myb 因子 (22%), 聚类组 A、C 和 F 均含有 5 个 Myb

因子, 聚类组 B 所含 Myb 因子最少, 为 4 个。进一步分析发现, Scaffold 15 中的 Myb 主要存在于聚类组 B (131312、131313 和 131337) 和聚类组 C (131350、131351、131353、131444 和 131445) 中, 而 Scaffold 23 中的 Myb 主要存在于聚类组 A (132941、132943、132945、132946 和 132965) 中。

2.3 Myb 因子在不同数据库中的丰度 由于 Pfgd (Phytophthorafunctional genomics database, <http://www.pfgd.org>) 中已经对 EST 片段进行了预测^[4], 利用 Pfgd 的检索系统查询 Myb 转录因子, 并记录其在每个数据库中的数量, 然后除以每个数据库中 EST 的总数, 即可得到该类转录因子在某一特定发育或侵染阶段的表达丰度。该研究搜索了大豆疫霉菌丝、游动孢子、休止孢萌发和侵染 4 个阶段的数据库。结果表明 (图 2), Myb 因子在大豆疫霉不同数据库中的丰度存在差别。其中 Myb 因子在菌丝数据库中出现频率最高, 为 0.44%, 在侵染数据库中出现频率最低, 为 0.26%。



注: A 为菌丝数据库; B 为游动孢子数据库; C 为休止孢萌发数据库; D 为侵染数据库。

Note: A. Mycelium database; B. Zoospore database; C. Cyst germination database; D. Infection database.

图 2 大豆疫霉 Myb 因子在不同数据库中的丰度

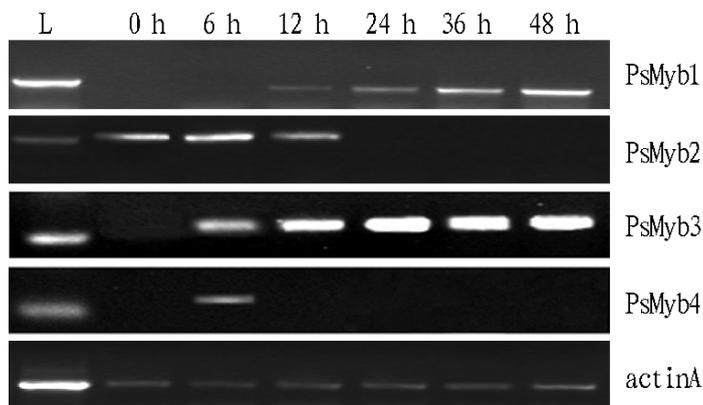
Fig.2 The frequency of Mybs in different databases of *Phytophthora sojae*.

2.4 大豆疫霉侵染寄主过程中 Myb 因子的转录 为研究 Myb 基因在大豆疫霉与寄主互作不同阶段的转录情况, 采用半定量 RT-PCR 方法对 4 个 Myb 基因在 6 个时间点的转录模式进行了分析。结果显示 (图 3), 4 个 Myb 基因在大豆疫霉侵染寄主过程中均有转录, 其中 Ps Myb1 和 Ps Myb3 的转录随互作时间的延长明显上调, 表达量逐渐增加; Ps Myb2 在无互作和互作前期均表达, 但互作后期不表达; Ps Myb4 在互作早期表达, 随互作时间的延长停止表达。

3 结论与讨论

Myb 转录因子在植物中的含量约为 1.3%, 在卵菌中的含量约为 0.5%, 而在真菌中的含量低于 0.2%^[2]。Myb 转录因子在大豆疫霉中占基因总数的 0.41%。与橡树疫霉的 Myb 数量几乎一致, 但由于大豆疫霉的基因数量 (约 19 027 个) 比橡树疫霉 (约 15 743 个) 多, 所以其转录因子出现的频率比橡树疫霉略低, 但两者在各自基因组中出现的频率差别较小^[7], 但与真菌差别较大, 这可能与其亲缘关系有关^[8]。

Myb 蛋白虽然在序列上具有一定的保守性, 在结构上具有一定的相似性, 但不同物种、不同个体, 甚至同一个体不同组织器官之间, Myb 蛋白的功能存在较大差异。Myb 基因可



注:L 为分子量标准(250 bp);0 h 表示未接种疫霉的培养产物的表达;6~48 h 表示在大豆叶片上接种大豆疫霉6、12、24、36 和48 h 后 Myb 基因的表达;actinA 作对照;基因对应的蛋白质编号为:PsMyb1, 121308;PsMyb2, 142552;PsMyb3, 134946;PsMyb4, 131353。

Note:L, Molecular weight standard;0 h, Expression of culture products with vaccination;6-48 h, Expression of Myb gene after inoculating soybean vaccine on soybean leaves 6,12,24,36 and 48 h respectively;actinA is taken as control. The protein code of genes are as follows: PsMyb1, 121308; PsMyb2, 142552; PsMyb3, 134946; PsMyb4, 131353.

图3 Myb 基因的 RT-PCR 分析

Fig.3 RT-PCR analysis of the expression of Myb genes

以调节生物的次生代谢^[9]、细胞分裂与形成^[10]、致病性^[11]、孢子形成与萌发^[12]等生理功能。大豆疫霉游动孢子、休止孢萌发、侵染和菌丝数据库中均有 Myb 因子,说明 Myb 可能与以上几个阶段的发育有关。

有研究表明,转录因子 NFS 和 NFC 控制马铃薯晚疫病菌孢子囊中的原生质割裂^[13]。大豆疫霉 C2H2 类锌指蛋白转录因子(DV738013)的干扰突变体完全丧失致病性,说明转录因子在调控疫霉菌发育与致病性中起着重要作用^[14]。大豆疫霉 Myb 基因家族具有至少 50 个 Myb 基因,但对其功能的研究较少^[15]。该研究对大豆疫霉的 4 个 Myb 基因在大豆疫霉与大豆互作过程中的表达模式进行了分析,发现其在

不同互作时段的表达量不同,但其代谢途径有待于进一步研究。随着大豆疫霉遗传转化体系的逐步完善及 TILLING 等基因干涉技术的发展,大豆疫霉 Myb 因子的生理功能及其在大豆疫霉致病过程中的作用机理将得到进一步研究。

参考文献

- [1] TYLER B M. Genetics and genomics of the oomycete-host interface[J]. *Trends Genet*, 2001, 17: 611 - 614.
- [2] THOMPSON MA, RAMSAY R G. MYB: an old oncogene with new roles[J]. *Biessays*, 1995, 17: 341 - 350.
- [3] STRACKE R. The R2R MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 447 - 456.
- [4] CAJENDRAN K, GONZALES M D, FARMER A, et al. Phytophthora functional genomics database (PFGD): functional genomics of phytophthora plant interactions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 465 - 470.
- [5] WRAITER J A, ANDERSON T R, ARSYAD D M, et al. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998[J]. *Can J Plant Pathol*, 2001, 23: 115 - 117.
- [6] COVERS F, GJZEN M. Phytophthora genomics: the plant destroyers' genome decoded[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 1295 - 1301.
- [7] TYLER B M, TRIPATHY S, ZHANG X, et al. Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis[J]. *Science*, 2006, 313: 1261 - 1266.
- [8] JUDELSON H S. The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge[J]. *Fungal Genet Biol*, 1997, 22: 65 - 76.
- [9] HARDHAMA R. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity[J]. *Australian Plant Pathol*, 2001, 30: 91 - 98.
- [10] VAN WP, DEJ AJ, JUDELSON H S, et al. The ipi1 gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection[J]. *Fungal Genet Biol*, 1998, 23: 126 - 138.
- [11] TYLER B M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their host[J]. *Ann Rev Phytopathol*, 2002, 40: 137 - 167.
- [12] JUDELSON H S, BLANCO F A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 47 - 58.
- [13] TAN S, KIM K S, JUDELSON H S. A cluster of NF transcriptional regulators with divergent patterns of spore-specific expression in *Phytophthora infestans*[J]. *Fungal Genet Biol*, 2005, 42: 42 - 50.
- [14] CHEN X R, SHEN G, WANG Y L, et al. Identification of *Phytophthora sojae* genes upregulated during the early stage of soybean infection[J]. *FEMS Micro Letters*, 2007, 269: 280 - 288.
- [15] WANG Z Y, WANG Y C, CHEN X R, et al. Differential screening reveals genes differentially expressed in low and high virulence near-isogenic *Phytophthora sojae* lines[J]. *Fungal Genet Biol*, 2006, 43: 826 - 839.

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995: 155.
- [2] 张卫明, 钱学射, 顾龚平. 沙苑子的保健功效与药膳[J]. *中国野生植物资源*, 2004, 23(5): 7 - 8.
- [3] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型的标准化问题[J]. *武汉植物学研究*, 1985, 3(4): 297 - 302.
- [4] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A A. Nonrandomness for centromeric position of chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52: 201 - 220.
- [5] STEBBINS G L. Chromosome evolution in higher plants[M]. London: Academic Press, 1971: 87 - 123.
- [6] 王冰, 白云, 陈连庚. 扁茎黄芪染色体的核型分析[J]. *中药材*, 2002, 25(8): 541 - 543.

(上接第3944页)

其报道的核型公式为: $2n = 2x = 16 = 10m + 6sm$, 仅由中部着丝粒染色体(m)和近中部着丝粒染色体(sm)组成, 属“2A”类型。该研究结果核型公式为: $2n = 2x = 16 = 10m(2SAT) + 4sm + 2st$, 除中部着丝粒染色体(m)和近中部着丝粒染色体(sm), 还有近端部着丝粒染色体(st), 属“2B”类型。

植物染色体的数目与形态是其最稳定的细胞学特征之一, 对沙苑子染色体数目和形态的精确研究在其良种培育、驯化及生药鉴定等方面具有重要价值。