

# 苦荞转录因子 *FtMYB41* 的克隆及功能分析

康 珍<sup>1,2</sup>, 杨 迪<sup>2</sup>, 郝彦蓉<sup>2</sup>, 卢 翔<sup>2</sup>, 周美亮<sup>2</sup>, 方正武<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>长江大学农学院, 湖北荆州 434025; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** 本试验以品苦一号为材料, 克隆得到 *FtMYB41* 基因。基因结构分析表明: *FtMYB41* 由 1 个 5' UTR 和 2 个内含子构成, CDS 全长 705bp, 编码 234 个氨基酸序列, 属于 MYB (Myeloblas-toma) 超级家族蛋白。系统进化树分析表明: *FtMYB41* 氨基酸编码蛋白与番茄 NP\_001234262.1 和烟草 NP\_001312384.1 同源关系较近。转录激活活性分析表明: *FtMYB41* 具有转录激活活性并且转录激活区域在羧基端 (C 端)。qRT-PCR 结果分析显示: *FtMYB41* 基因在根中表达量最高, 并且受到干旱和盐胁迫的诱导表达, 干旱胁迫 9 h 表达量显著提高。过表达拟南芥和苦荞毛状根抗逆性鉴定表明: *FtMYB41* 基因的过表达通过提高发芽率, 增加过氧化氢酶 (CAT, catalase) 和超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase) 酶活, 降低丙二醛 (MDA, malondialdehyde) 含量来提高抗旱性。

**关键词:** 苦荞; MYB 转录因子; 过表达; 抗旱

## Molecular Cloning and Functional Analysis of Transcription Factor *FtMYB41* in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum Tataricum*)

KANG Zhen<sup>1,2</sup>, YANG Di<sup>2</sup>, HAO Yan-rong<sup>2</sup>, LU Xiang<sup>2</sup>, ZHOU Mei-liang<sup>2</sup>, FANG Zheng-wu<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>College of Agriculture, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434025;  
<sup>2</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** In this study, we cloned the transcription factor gene *FtMYB41* in tartary buckwheat cultivar Pinku-1. Sequence analysis showed that the MYB super gene family member *FtMYB41* contained one 5' UTR and two introns, with the complete coding sequence of 705bp which encodes for 234 amino acids. Phylogenetic tree analysis showed that *FtMYB41* protein had close homology with tomato NP\_001234262.1 and tobacco NP\_001312384.1. Transcriptional activation analysis revealed the transcriptional activation activity at *FtMYB41* C-terminal. Moreover, the *FtMYB41* gene had the higher expression in roots and was induced by drought and salt stresses. The expression level of *FtMYB41* gene was significantly increased under drought stress for 9 h. Over-expressing *FtMYB41* gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and tartary buckwheat hair root resulted in improved drought resistance by increasing germination rate, increasing CAT and SOD activity, and decreasing MDA content.

**Key words:** tartary buckwheat; MYB transcription factor; overexpression; drought tolerance

植物在自然环境中, 通常会面临着生物和非生物胁迫, 干旱作为一种非生物胁迫, 严重制约着作物的生长和生产, 进而对农业生产产生不利影响。在我国, 北方地区多为干旱或半干旱地区。因此, 在这些地区, 干旱仍然是制约农业生产的主要因素<sup>[1]</sup>, 并且随

着人们生活水平的提高与全社会健康观念的加强, 荞麦及其加工产品已逐渐成为当今重要的保健食品。所以, 培育抗旱农作物, 增加杂粮作物的产量至关重要。

为了适应干旱的环境, 植物在生理生化水平上进化出了各种各样的抗逆机制。其中一种机制是抗

收稿日期: 2021-12-09 修回日期: 2021-12-17 网络出版日期: 2022-01-06

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211209002>

第一作者研究方向为荞麦品质抗逆研究, E-mail: kang100712@163.com

通信作者: 方正武, 研究方向为作物种质资源创新与利用, E-mail: fangzhengwu88@163.com

周美亮, 研究方向为荞麦种质资源与品质抗逆机制解析, E-mail: zhumeiliang@cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD1000700, 2019YFD1000703)

**Foundation project:** The National Key Research and Development Program of China (2019YFD1000700, 2019YFD1000703)

旱基因的调节<sup>[2]</sup>。抗旱基因主要分为功能性基因和调节性基因两类。转录因子(TFs, Transcription factors)属于调控基因,调节与抗旱性相关的多种功能基因的表达水平。多项研究表明,转录因子参与调节抗旱途径是提高植物抗旱性的有效途径<sup>[3]</sup>。目前,与植物抗旱性相关的TF家族主要有bZIP、AP2/ERF、MYB、WRKY、NAC等<sup>[4-6]</sup>。在这些转录因子中,MYB转录因子是植物中最常见、最大的转录因子家族之一,在植物转录调控网络中发挥着重要的作用。MYB蛋白最先在玉米中发现,可以分为3个亚家族:R1-MYB、R2R3-MYB和R1R2R3-MYB,在其N端的MYB DNA结合域分别有1个、2个和3个不完整的串联重复序列<sup>[7]</sup>。MYB因子参与植物的许多发育过程,如调节细胞周期和细胞发育,控制初级和次生代谢,以及调控对非生物和生物胁迫的反应<sup>[8-9]</sup>。大量研究表明MYB转录因子参与植物的非生物胁迫反应。水稻MYB转运蛋白*OsMYB48-1*通过增加ABA合成,从而提高水稻的抗旱性<sup>[10]</sup>;过表达小麦R2R3型MYB转运蛋白*TaODORANT1*通过激活与逆境和活性氧(ROS)相关的基因来提高烟草的抗旱性<sup>[11]</sup>,在干旱胁迫下,过表达小麦*TaMYBsm3*基因植株的枯萎症状较轻,萌发率较高,脯氨酸含量较高,丙二醛含量较低<sup>[12]</sup>;拟南芥MYB15通过提高ABA生物合成和信号转导相关基因的表达水平,以及提高胁迫保护蛋白的基因表达水平来提高拟南芥的抗旱性和耐盐性<sup>[13]</sup>,*AtMYB20*通过ABA依赖的方式负调控植物对干旱胁迫的适应性反应<sup>[14]</sup>;苹果MYB转录因子*MdoMYB121*基因的过表达显著提高了转基因番茄和苹果植株对高盐、干旱和低温胁迫的耐受性<sup>[15]</sup>;在观赏植物芍药中,R2R3-MYB转录因子*PlmMYB108*基因通过提高抗氧化酶活性,增加类黄酮含量以及提高光合作用的效率而产生抗旱性<sup>[1]</sup>;同样在落叶乔木中,杨树*PtrMYB94*基因通过调节脱落酸信号,以及上调与ABA和干旱反应相关基因的表达量以提高植物的抗旱性<sup>[16]</sup>。

荞麦属蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum* Mill.),一年生或多年生双子叶植物,有甜荞(*Fagopyrum esculentum* Moench)和苦荞(*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn)两个种,其生物学特征与栽培适宜区域均有所不同,甜荞主要分布于我国东北、华北地区;苦荞则主要分布在我国西南地区。荞麦作为一种药食同源的重要杂粮作物,营养丰富,不仅富含蛋白质、脂肪、维生素等营养成分,还含有许多禾本科粮食作物所不具有的生物黄酮类活性成

分<sup>[17-18]</sup>。但苦荞生长环境恶劣,经常遭受干旱,低温和盐胁迫等多种非生物胁迫,造成产量减少,因此通过分子手段来改良荞麦的抗逆性能显得尤为重要。之前的研究表明,在野生型拟南芥中过表达R2R3-MYB转录因子*FitMYB9*使植株在萌发期和苗期对ABA的敏感性增加,进一步研究发现*FitMYB9*通过激活ABA非依赖途径和ABA依赖途径中的一些胁迫相关基因,增加脯氨酸的含量以及P5CS1基因的激活,提高了转基因拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性<sup>[19]</sup>。Gao等<sup>[20]</sup>发现苦荞转录因子*FitMYB10*通过降低植物对ABA的敏感性和减少脯氨酸的含量,影响胁迫响应基因的表达,从而负调控植物耐盐性和抗旱性。本研究从苦荞品苦一号中克隆得到*FitMYB41*基因,通过生物信息学分析,自激活检验,基因表达模式分析发现该基因在苦荞根组织中表达量最高并且受到干旱胁迫和盐胁迫的诱导表达。进一步将*FitMYB41*过表达达到拟南芥和苦荞毛状根里面进行抗旱性鉴定,为后续进一步研究苦荞MYB转录因子在非生物胁迫中的作用奠定了分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及试剂

试验材料品苦1号、大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )、农杆菌(A4和GV3101)、过表达载体(pCAMBIA1307,简称1307)、酵母双杂载体(PGADT7和PGBKT7)均由中国农业科学院作物科学研究所荞麦基因资源创新研究组提供。选取饱满均匀的荞麦种子,用镊子剥离泡软的荞麦种皮,加入1%次氯酸钠溶液消毒5 min,灭菌水冲洗3~5次;再用75%酒精消毒3 min,灭菌水冲洗3~5次。待种子表面无水分后用镊子摆放于MS培养基中,在人工气候室(培养条件为温度22~25℃,光暗周期为16 h光照、8 h黑暗,湿度条件为75%~80%)培养21 d待用。

### 1.2 苦荞总RNA提取与cDNA合成

选取21 d苦荞幼苗的根茎叶50~100 mg,加液氮速冻研磨,使用RNA Easy Fast Plant Tissue Kit试剂盒(天根生化科技北京有限公司,中国)提取总RNA。测定所提RNA的OD<sub>260/280</sub>值,并用1%琼脂糖凝胶电泳对RNA进行检测,将检测合格的RNA使用HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)试剂盒(南京诺唯赞生物技术有限公司,中国)进行反转录。得到cDNA保存于-20℃冰箱。

1.3 苦荞*FitMYB41*基因的克隆和生物信息学分析  
以反转录的cDNA为模板,利用Primer 5设

计的引物(表 1)进行 *FtMYB41* 基因的 PCR 扩增, PCR 反应总体系为 50 $\mu$ L, 扩增程序为 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s; 32 cycles。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 片段大小正确后参照 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit(南京诺

唯赞生物技术有限公司, 中国)说明书纯化回收, 回收产物连接至 pTOPO-Blunt Simple Vector, 并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑选阳性单克隆, 经菌液 PCR 鉴定后送北京博迈德生物技术有限公司进行测序, 得到 *FtMYB41*-T 载体的质粒。

表 1 引物序列汇总

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	用途 Function
<i>FtMYB41</i> -TF	ATGGGAAGAGCTCCATGCTGT	基因克隆
<i>FtMYB41</i> -TR	TCAAAATCTGGTAAATCTTCTGACC	
<i>FtMYB41</i> -1307F	CTAGAAGTAGTGATCCATGGGAAGAGCTCCATG (BamH I)	
<i>FtMYB41</i> -1307R	GCGGAGTACCCGGGTACCTCAAAATCTGGTAAATC (Kpn I)	
BD- <i>FtMYB41</i> -F	tcagaggaggacctgcatatgATGGGAAGAGCTCCATGCTGT (Nde I)	转录激活
BD- <i>FtMYB41</i> -R	ctagttatcgccgctgagTCAAAATCTGGTAAATCTTCTGACC (Pst I)	
BD- <i>FtMYB41</i> N-F	tcagaggaggacctgcatatgATGGGAAGAGCTCCATGCTGT (Nde I)	
BD- <i>FtMYB41</i> N-R	ctagttatcgccgctgagCAAGTGAGTATGCCACACGTTCTT (Pst I)	
BD- <i>FtMYB41</i> C-F	tcagaggaggacctgcatatgAAGAAGAGGCTAAGCACCAGCC (Nde I)	
BD- <i>FtMYB41</i> C-R	ctagttatcgccgctgagTCAAAATCTGGTAAATCTTCTGACC (Pst I)	
TLF	CTCAAGCAATCAAGCATTCTAC	转基因拟南芥阳性鉴定
<i>FtMYB41</i> -qpcrF	TGGCGTGCTCTTCTAAACT	qRT-PCR
<i>FtMYB41</i> -qpcrR	CCTGGTAATCTTGGCGGTAT	
FtH3-QF	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	qRT-PCR 内参基因
FtH3-QR	CCAACAAGGTATGCTCAGC	

大写为 BD 载体 PGBKT7 的序列, 小写为 *FtMYB41* 基因序列; 酶切位点用下划线标示

Upper case is the sequence of BD vector PGBKT7, and lower case is the sequence of *FtMYB41*, the restriction sites are underlined

对测序正确的序列进行生物信息学分析, 利用 GSDS (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线工具, 预测和分析苦荞 *FtMYB41* 基因结构; 利用在线网站 NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对苦荞 *FtMYB41* 基因编码的氨基酸序的保守结构域分析; 利用 SOPMA 数据库 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 对 *FtMYB41* 的蛋白二级结构进行分析; 用在线软件 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对 *FtMYB41* 基因上游的启动子进行分析; 通过在线网站 NCBI 中 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 查找与苦荞 *FtMYB41* 同源性较高的序列, 并利用 MEGA 7.0 软件构建进化树。

#### 1.4 *FtMYB41* 基因在苦荞材料中的多样性分析

通过分析课题组前期重测序工作所建立的数据库, 选择 30 份 2019 年凉山收取的材料对苦荞 *FtMYB41* 基因(苦荞数据登录号: FtPinG0000919400.01)进行简单单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism)分析。

#### 1.5 苦荞 *FtMYB41* 基因的表达分析

**1.5.1 不同胁迫处理下苦荞 *FtMYB41* 基因的表达分析** 选取生长 14 d 长势良好、大小一致的苦荞无

菌苗放入液体 MS 培养基中, 室温震荡(120 r/min)适应 1 d, 然后分别用 150 mmol/L D-Mannitol、150 mmol/L NaCl 的 MS 液体处理 0、3、6、9 h 后取样, 提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 对 *FtMYB41* 基因在 D-Mannitol 和 NaCl 处理后的表达量进行分析。

**1.5.2 不同组织中苦荞 *FtMYB41* 基因的表达分析** 将生长 14 d 大小的苦荞无菌苗用 150 mmol/L D-Mannitol 和 150 mmol/L NaCl 处理 0、3、6、9 h 后取样, 分别提取根、茎、叶的总 RNA 并反转录成 cDNA, 对不同组织中 *FtMYB41* 基因的表达量以及干旱和盐诱导条件下不同组织中 *FtMYB41* 基因的表达量进行分析。

#### 1.6 苦荞 *FtMYB41* 基因的自激活活性分析

根据 *FtMYB41* 基因的保守结构域, 为了检测 *FtMYB41* 基因的自激活区域将 *FtMYB41* 基因分成三部分: 全长(705 bp, *FtMYB41*)、氨基端即 N 端(1~336 bp, *FtMYB41N*)和羧基端即 C 端(337~705 bp, *FtMYB41C*)。根据测序正确的 *FtMYB41* 基因序列和 BD(DNA-binding domain)载体 PGBKT7 的图谱设计引物 BD-*FtMYB41*-F/R、BD-*FtMYB41N*-F/R、BD-*FtMYB41C*-F/R(表 1)。以 *FtMYB41*-T 质粒为模板进行 PCR 扩增, 并用同源重组连接的方法将其回收产物与经过限制性核酸内切酶 NdeI 和 PstI

双酶切并胶回收的载体 PGBKT7 进行连接,转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,涂板挑菌,经菌液 PCR 鉴定以及测序比对后得到 BD-*FtMYB41*、BD-*FtMYB41N*、BD-*FtMYB41C* 重组载体;分别将 100  $\mu$ g 重组质粒加入到 100 mL Y2H Gold 酵母感受态细胞中,转化后产物涂布至 SD/-Leu/-Trp 二缺筛选培养基上,28  $^{\circ}$ C 培养 2~3 d,菌丝体长出后挑取单克隆进行 PCR 鉴定,将阳性菌液稀释  $10^{-1}$  和  $10^{-2}$  两个浓度梯度,各取菌液 5  $\mu$ L 点到 SD/-Leu/-Trp/-His 缺陷筛选培养基上,28  $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养。转化 PGBKT7 空载体的酵母菌株作为阴性对照。

## 1.7 植物表达载体的构建及拟南芥和苦荞毛状根的遗传转化

### 1.7.1 pCAMBIA1307-*FtMYB41* 过表达载体的构建

以测序比对正确的 *FtMYB41*-T 质粒为模板,依据 pCAMBIA1307 图谱和酶切位点 BamHI 和 KpnI 设计引物 *FtMYB41*-1307F/R(表 1) 进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖核酸凝胶检测条带正确并胶回收,与经过双酶切并回收的载体 pCAMBIA1307 进行同源重组,将 *FtMYB41* 基因全长序列正向插入到空载体 1307 中,连接转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞后进行菌液鉴定,测序比对后得到 *FtMYB41*-1307 过表达载体质粒。

### 1.7.2 农杆菌介导的拟南芥转化和阳性苗鉴定

将 *FtMYB41*-1307 过表达载体的质粒转化到根癌农杆菌 GV3101 感受态中,菌液鉴定正确后摇到 OD=0.6~0.8,通过蘸花法侵染野生型拟南芥,收取 T0 代过表达拟南芥种子后经潮霉素抗性筛选得到 T1 代 *FtMYB41*-1307 过表达拟南芥。以 T1 代过表达拟南芥叶片的 DNA 为模板,载体 1307 的通用引物 TLF 为正向引物,*FtMYB41*-1307R 为反向引物进行 PCR 鉴定,目的条带正确后获得阳性 *FtMYB41*-1307 过表达拟南芥。单株收种并加代到 T3 代进行后续的试验。

### 1.7.3 过表达毛状根的转化和鉴定

将 *FtMYB41*-1307 过表达载体质粒转化到农杆菌 A4 感受态中,参照谈天赋等<sup>[21]</sup>的方法侵染品苦一号,诱导得到毛状根,然后用引物 TLF 和 *FtMYB41*-1307R 对单根系进行 PCR 检测,选取阳性根系挪到含有 333mg/L 头孢霉素的 MS 固体培养基上,30 d 后挑选生长较好的主根系转移到含头孢霉素的 MS 液体培养基中,在黑暗条件下,120 r/min 摇床上培养 30 d 用于后续试验需要。

## 1.8 *FtMYB41*-1307 过表达拟南芥和毛状根的抗逆性鉴定

### 1.8.1 过表达拟南芥的发芽试验

将拟南芥过表达

(OE, overexpression) 株系 OE1、OE2、OE3 和 1307 空载体的 T3 代种子用 75% 乙醇和无水乙醇各洗 10 min 消毒并吹干后接种在实验组含有 150 mmol/L D-Mannitol 的 MS 固体培养基和对照组 MS 固体培养基上,每个株系接种 36 颗种子,处理和对照各设置 3 个重复,放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱春化 3 d,然后放到培养间在正常条件下培养。每隔 24 h 统计已发芽种子数至第 120 h(5 d),并计算发芽率(发芽种子数/供试种子数  $\times$  100%)。

### 1.8.2 过表达拟南芥的抗旱性鉴定

将拟南芥过表达株系 OE1、OE2、OE3 和 1307 空载体的 T3 代种子消毒后放到 MS 固体培养基上培养,7 d 后转移到装有 1:1 的蛭石和营养土的培养钵中在正常条件下(16 h 光照/8 h 黑暗,22  $^{\circ}$ C)连续浇水 21 d 后停止浇水,21 d 后观察生长状况。

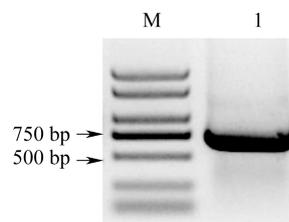
### 1.8.3 过表达毛状根的生理指标测定

将培养在 MS 液体培养基中的过表达毛状根 OE3、OE6、OE8 和空载体 A4 培养 30 d 后,用含有 150 mmol/L D-Mannitol 的 MS 液体培养基处理 9 h,对照组用 MS 液体培养基处理,每个处理和对照设置 3 组重复,取样后测定过氧化氢酶(CAT, catalase)活性、丙二醛(MDA, malondialdehyde)含量和超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦荞 *FtMYB41* 的克隆与生物信息学分析

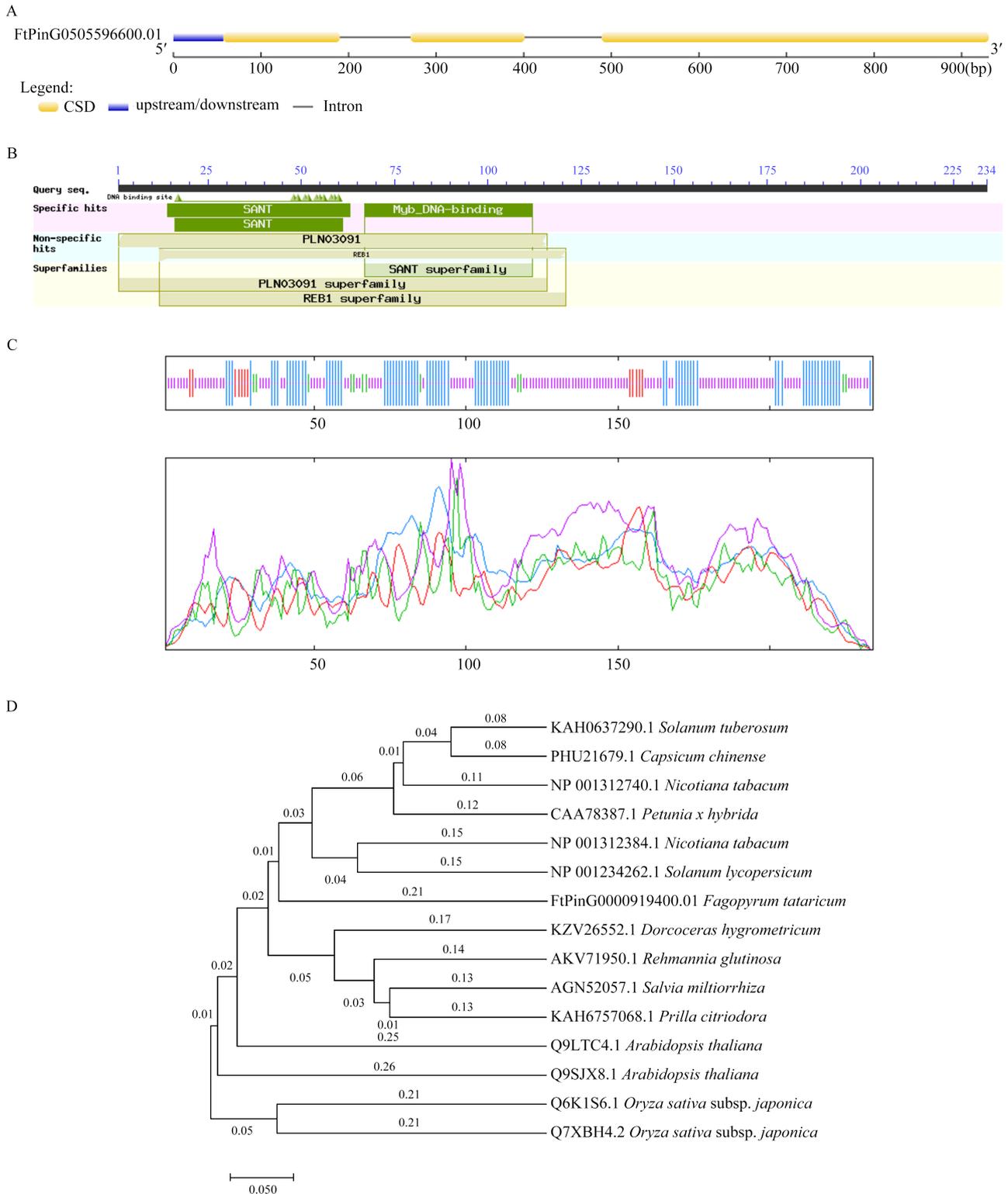
从品苦一号中提取总 RNA,以反转录的 cDNA 为模板,*FtMYB41*-TF/R 为引物克隆目的片段基因,扩增得到约 705 bp 大小的片段(图 1)。基因结构分析(图 2A)表明 *FtMYB41* 包含一个 5' UTR 和 2 个内含子;通过 NCBI CD search 功能对蛋白进行分析(图 2B),发现 *FtMYB41* 基因编码蛋白包含一个从 67~112 位的 MYB-DNA-binding 保守结构域,属



M: DL2000 marker, 下同; 1: *FtMYB41* 基因的 PCR 扩增目的条带  
M: DL2000 Marker, the same as below, 1: the PCR amplification target band of *FtMYB41* gene

图 1 苦荞 *FtMYB41* 基因 CDS 序列扩增

Fig.1 CDS sequence amplification of *FtMYB41* gene in tartary buckwheat



A: 苦荞 *FtMYB41* 基因结构; B: 苦荞 *FtMYB41* 蛋白的保守结构域; C: 苦荞 *FtMYB41* 蛋白二级结构, 蓝色代表  $\alpha$  螺旋; 红色代表延伸链; 绿色代表  $\beta$  转角结构; 紫色代表无规则卷曲, 数字代表氨基酸的大小; D: 苦荞 *FtMYB41* 蛋白及其他植物中的 MYB 同源蛋白的系统进化树

A: The genetic structure of *FtMYB41*, B: Conserved domain prediction of *FtMYB41* protein, C: Secondary structure of *FtMYB41* protein, alpha helix (blue), extended strand (red), beta turn (green), random coil (purple), the number represents the size of the amino acid,

D: Phylogenetic tree of *FtMYB41* protein and MYB homolog proteins from other plants

图 2 *FtMYB41* 基因的生物信息学分析

Fig.2 Bioinformatics analysis of *FtMYB41* gene

于 MYB 转录因子家族; SOPMA 数据库分析(图 2C) 显示 *FtMYB41* 蛋白二级结构包含 55.56% 不规则卷曲、34.19%  $\alpha$ -螺旋、5.13% 的延长链以及 5.13%  $\beta$ -转角; 启动子分析(表 2) 发现 *FtMYB41* 包含大量的 TATA-box 启动子元件和 CAAT-box 顺式作用元件, 此外还包括有茉莉酸甲酯和脱落酸激素响应调控元件以及一些其他胁迫响应元件例

如光响应顺式作用元件 G-box、厌氧诱导顺式调节元件 ARE 和缺氧特异性诱导增强子元件 GC-motif; 将 *FtMYB41* 与其他 14 个从 NCBI 中查找出来的已经报道的 MYB 转录因子家族的氨基酸序列进行比对, 并通过 MEGA 7.0 构建系统进化树发现 *FtMYB41* 与番茄 NP\_001234262.1 和烟草 NP\_001312384.1 同源性较高(图 2D)。

表 2 *FtMYB41* 基因启动子中的顺式作用元件

Table 2 Cis-elements in *FtMYB41* gene promoter sequence

元件名称 Cis-acting elements	序列 Sequence	功能 Function
G-box	CACGTG	光响应顺式作用元件
TATA-box	TATATAA ATATAT TATA TACAAAA TATACA ATTATA	启动子核心元件
CAAT-box	CAAAT CAAT	启动子和增强子区域中的顺式作用元件
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应顺式调控元件
CGTCA-motif	CGTCA	
ABRE	CACGTG ACGTG	脱落酸响应顺式作用元件
ARE	AAACCA	厌氧诱导顺式调节元件
Box 4	ATTAAT	参与光响应的保守 DNA 模块
GC-motif	CCCCCG	缺氧特异性诱导增强子元件

## 2.2 *FtMYB41* 基因的多样性分析

选择苦荞 5 号染色体编码区的 3 个 SNP 位点 36523871、36524618、36524702 进行简单分析, 结果见表 3, 3 个位点的碱基多样性表现为 36523871 (C/T)、36524618 (C/T)、36524702 (G/A), 说明 *FtMYB41* 基

因存在生物多样性。

## 2.3 苦荞 *FtMYB41* 基因的转录激活活性分析

酵母自激活实验分析显示(图 3) 所有构建到 BD 载体上的转化子都能在 SD/-Leu-Trp 二缺筛选培养基上正常生长, 说明所有的重组质粒成功转化

表 3 *FtMYB41* 基因的多样性分析

Table 3 Diversity analysis of *FtMYB41* gene

材料编号 Material number	36523871 位置 Location of 36523871	36524618 位置 Location of 36524618	36524702 位置 Location of 36524702	材料编号 Material number	36523871 位置 Location of 36523871	36524618 位置 Location of 36524618	36524702 位置 Location of 36524702
LN1	C	C	G	QH57	C	C	G
NMG2	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G	HB58	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G
NMG3	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G	HB61	C	C	A
NX6	C	C	G	HB63	C	C	G
QH8	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G	HB64	C	C	A
QH9	C	C	G	HB65	C	C	G
XZ10	C	C	G	YN100	T	A/T/C/G	A/T/C/G
XZ11	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G	YN101	T	A/T/C/G	A/T/C/G
XZ12	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G	YN102	C	C	G
XZ14	C	C	A	GS160	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G
XZ17	C	C	G	GS161	A/T/C/G	C	G
XZ19	C	C	A	GS162	C	C	G
XZ20	A/T/C/G	A/T/C/G	A/T/C/G	GS163	T	A/T/C/G	A/T/C/G
XZ21	C	C	A	GS165	C	C	G
GS190	C	C	A	GS167	C	C	A/G

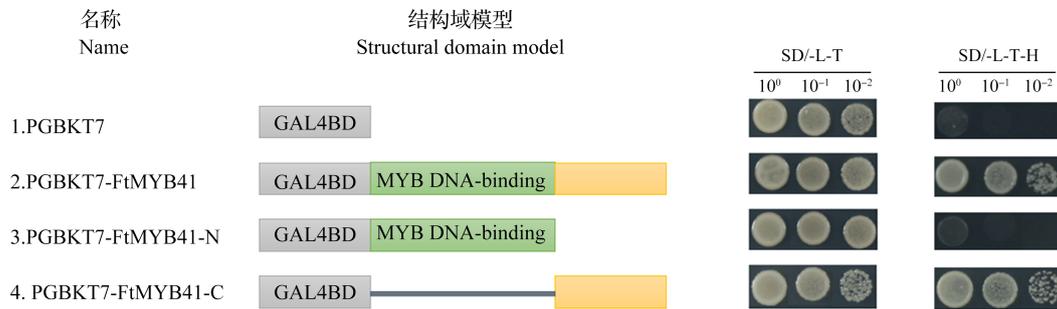


图 3 苦荞 *FtMYB41* 转录因子转录激活结构域的鉴定

Fig. 3 Identification of the transcriptional activation domain in *FtMYB41*

到酵母感受态细胞中;而只有 *FtMYB41*、*FtMYB41C* 构建到 BD 载体上的转化子能够在 SD/-Leu/Trp/-His 三缺陷筛选培养基上正常生长,说明苦荞 *FtMYB41* 基因具有转录激活活性并且转录激活区域在 C 端。

## 2.4 苦荞 *FtMYB41* 基因的表达模式分析

### 2.4.1 不同胁迫处理下苦荞 *FtMYB41* 基因的表达分析

用 150 mmol/L D-Mannitol 和 150 mmol/L NaCl 的 MS 液体分别处理 14 d 龄的品苦一号幼苗,在处理 0、3、6、9 h 后取样提取总 RNA 并反转录成 cDNA,对 *FtMYB41* 基因在 D-Mannitol 和 NaCl 处理后的表达量进行分析发现 *FtMYB41* 基因分别受到干旱和盐胁迫诱导表达,但是对 NaCl 诱导处理后基因的表达量并没有显著的提高,处理 9 h 后的表达量比处理前提高了 2.2 倍,而 D-Mannitol 处理 9 h 后 *FtMYB41* 基因有大幅度的提高,比处理前提高了 35.2 倍(图 4A)。

### 2.4.2 不同组织中苦荞 *FtMYB41* 基因的表达分析

取生长 14 d 的品苦一号幼苗的根、茎、叶鲜样分别提取 RNA,对 *FtMYB41* 基因在根、茎、叶中的表达分析发现该基因在不同组织中均有表达,在根中表达量最高,在叶中表达量最少(图 5B);用 150 mmol/L D-Mannitol 和 150 mmol/L NaCl 诱导处理后,*FtMYB41* 基因在根、茎、叶中的表达均有所提高,其中,在根中显著提高,D-Mannitol 和 NaCl 诱导处理 9 h 后 *FtMYB41* 基因分别提高了 14.6 倍和 12.7 倍(图 4C、D)。

## 2.5 过表达拟南芥和苦荞毛状根的遗传转化及鉴定

### 2.5.1 过表达拟南芥的转化及阳性苗鉴定

将 *FtMYB41-1307* 过表达载体成功转化野生型拟南芥,收取 T0 代种子并在潮霉素的抗性 MS 固体培养基上筛选得到 T1 代 *FtMYB41-1307* 过表达拟南芥,PCR 鉴定目的条带正确后获得阳性 *FtMYB41-1307*

过表达拟南芥 OE1、OE2、OE3(图 5A),单株收种并加代到 T3 代。

### 2.5.2 过表达苦荞毛状根的转化及阳性根系鉴定

参照谈天斌等<sup>[21]</sup>的方法得到 *FtMYB41-1307* 过表达毛状根后对单根系进行 PCR 检测鉴定,共鉴定出 8 个阳性根系 *FtMYB41-OE1*~*8*(图 5B),都是阳性根系。将条带大小正确的阳性根系接种到含有 333 mg/L 头孢霉素的 MS 固体培养基上,30 d 后接种到含头孢霉素的 MS 液体培养基中黑暗培养。

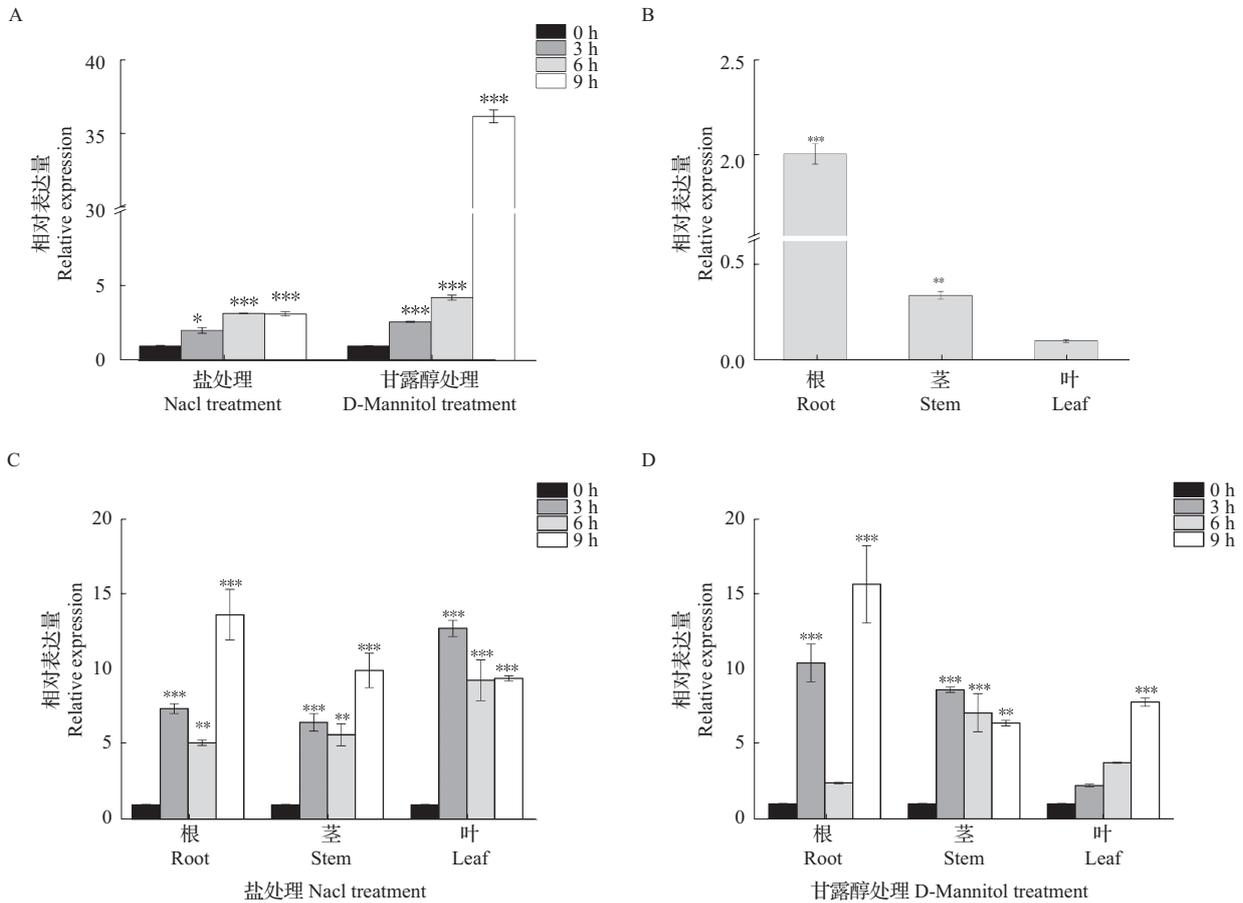
## 2.6 *FtMYB41-1307* 过表达拟南芥和毛状根的抗逆性鉴定

### 2.6.1 过表达拟南芥的抗旱性表型鉴定

选取转基因拟南芥阳性株系 OE1、OE2 和 OE3 的 T3 代种子进行种子萌发试验,转 1307 空载体拟南芥和过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥在正常条件下的萌发情况没有明显差异,但在甘露醇处理条件下转 1307 空载体拟南芥比过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥萌发率要低(图 6A、B)。将在 MS 固体培养基上培养 7 d 的野生型拟南芥和过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥转移到营养土里干旱处理 21 d,在正常条件下野生型和过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥生长无明显差异,但是在干旱条件下野生型拟南芥萎蔫程度比过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥萎蔫程度更加严重(图 6C)。这些结果表明 *FtMYB41* 基因具有抗旱功能。

### 2.6.2 过表达毛状根抗旱性相关生理指标测定

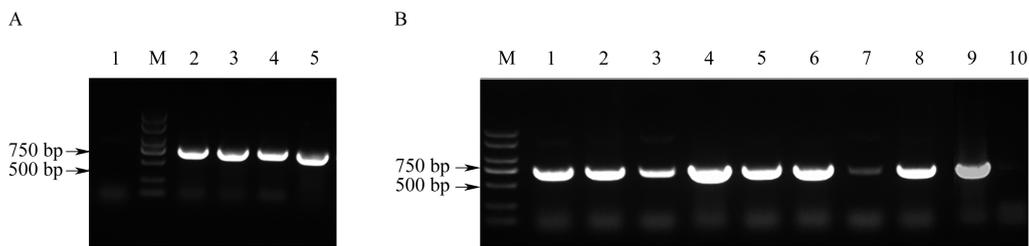
将长势一致的过表达毛状根 *FtMYB41-OE3*、*OE6*、*OE8* 和空载体 A4 用含有 150 mmol/L D-Mannitol 的 MS 液体培养基处理 9 h 后取样,测定 CAT 酶活、SOD 酶活和 MDA 含量。A4 毛状根和过表达 *FtMYB41-OE3*、*OE6*、*OE8* 毛状根的 CAT 和 SOD 酶活在未处理时没有显著差异,在甘露醇处理 9 h 后,转基因毛状根的酶活比 A4 毛状根显著升高,3 个转基因根系 OE3、OE6、OE8 的 CAT 酶活分别升高 3.2、4.5、3.7 倍;SOD 酶活分别升高 1.2、1.4、0.6 倍。



A: *FtMYB41* 基因在 150 mmol/L NaCl 和 D-Mannitol 诱导处理下的表达分析; B: *FtMYB41* 基因在品苦幼苗不同组织中的表达分析; C: *FtMYB41* 基因在 150 mmol/L NaCl 诱导处理下不同组织中的表达分析; D: *FtMYB41* 基因在 150 mmol/L D-Mannitol 诱导处理下不同组织中的表达分析; 数据表示为平均值  $\pm$  SD (n=3)

A: Expression analysis of *FtMYB41* gene under 150 mmol/L NaCl and D-Mannitol treatment, B: Expression analysis of *FtMYB41* gene in different tissues of Tartary buckwheat seedlings, C: Expression analysis of *FtMYB41* gene in different tissues under 150 mmol/L NaCl treatment, D: Expression analysis of *FtMYB41* gene in different tissues under 150 mmol/L D-Mannitol treatment, The error bars indicate  $\pm$  SD (n=3)

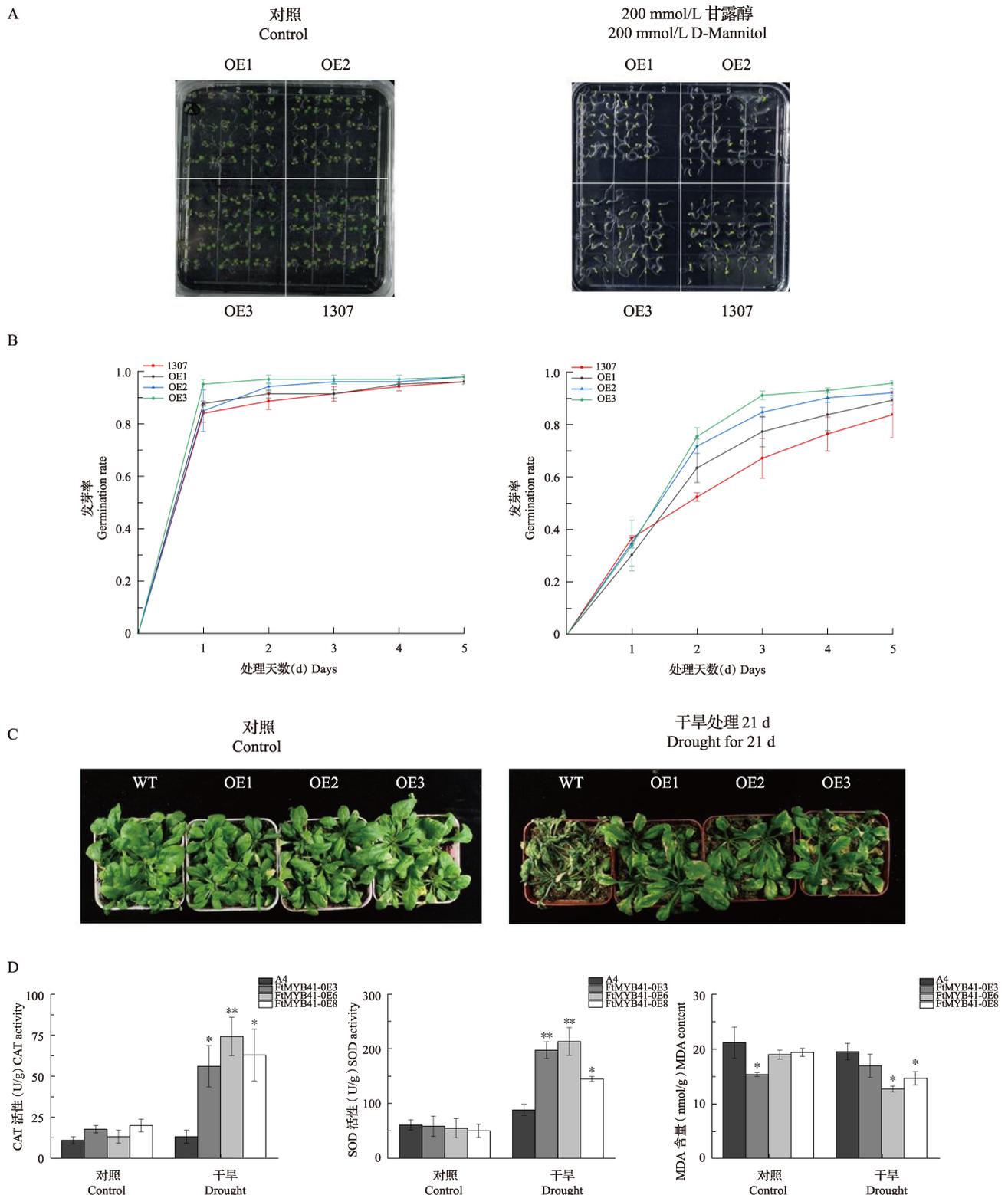
图 4 *FtMYB41* 基因在品苦一号中的表达分析  
Fig. 4 Expression analysis of *FtMYB41* in Tartary buckwheat



A: 1: 阴性对照: 灭菌水; 2~4: 过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥的 PCR 扩增目的条带, 分别对应 *FtMYB41*-1307 过表达拟南芥 OE1, OE2, OE3; 5: 阳性对照: *FtMYB41-T* 质粒; B: 1~8: 过表达 *FtMYB41* 基因毛状根的 PCR 扩增目的条带, 分别对应 8 个过表达毛状根阳性根系 *FtMYB41*-OE1~8; 9: 阳性对照: *FtMYB41-T* 质粒; 10: 阴性对照: 灭菌水

M: DL2000 Marker, A: 1: Negative control: ddH<sub>2</sub>O, 2-4: Target bands for PCR amplification of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with overexpression of *FtMYB41* gene, Target bands corresponding to *FtMYB41*-1307 overexpressed OE1, OE2 and OE3 in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., respectively, 5: Positive control: The plasmid of *FtMYB41-T*, B: 1-8: Target bands for PCR amplification of hairy roots with overexpressing of *FtMYB41* gene, The target bands were corresponding to 8 overexpressed hairy root positive roots *FtMYB41*-OE1-8, 9: Positive control: The plasmid of *FtMYB41-T*, 10: Negative control: ddH<sub>2</sub>O

图 5 过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥和毛状根分子鉴定  
Fig.5 Molecular identification of *FtMYB41* gene overexpressed in *Arabidopsis* and Hairy root



A: 干旱胁迫下各株系的发芽率; B: 干旱胁迫下各株系的发芽统计图; C: 在正常条件和干旱胁迫下过表达拟南芥和对照的生长状况; D: 在正常条件和干旱胁迫下转基因毛状根和对照的 CAT 活性、SOD 活性和 MDA 含量; \* 与 \*\* 分别表示在 0.05 与 0.01 水平下有显著性差异

A: Germination rate of each line under drought stress, B: Germination statistics of each strain under drought stress, C: Growth performance of *FtMYB41* over-expressed *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and control growth treated with normal conditions and drought stress, D: CAT activity, SOD activity and MDA content of transgenic hairy roots and controls under normal conditions and drought stress, \* and \*\* were significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively

图 6 *FtMYB41* 基因过表达拟南芥和毛状根的抗逆性鉴定

Fig.6 Identification of stress resistance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and Hairy Roots with overexpression of *FtMYB41* gene

过表达毛状根 OE6 和 OE8 的 MDA 含量在未处理时与 A4 毛状根没有明显差异,处理后比 A4 毛状根显著降低,但过表达根系 OE3 的 MDA 含量在处理前比 A4 毛状根显著减少,处理后的 MDA 含量虽然比 A4 毛状根少,但是没有显著差异(图 6D)。这些结果表明过表达 *FtMYB41* 基因毛状根通过减少 MDA 含量,增加 CAT 酶活性和 SOD 酶活性,从而实现抗旱。

### 3 讨论

干旱是限制作物生长和产量的主要环境压力。世界上很大一部分农业生产区受到持续干旱的影响,农作物造成了严重损害。据计算,在过去几十年里,干旱导致全球谷物大约减产 13.7%<sup>[22]</sup>。转录因子在作物抵御干旱胁迫时发挥了重要作用,促进了植物应对逆境的能力。已有文献报道 MYB 转录因子在非生物胁迫包括干旱、高盐、冷害和热胁迫中的调控机制<sup>[23]</sup>。本研究是从苦荞品苦一号克隆得到一个 MYB 转录因子 *FtMYB41*,氨基酸序列比对发现 *FtMYB41* 与番茄 NP\_001234262.1、烟草 NP\_001312384.1 同源性较高(图 5),烟草 NP\_001312384.1 (*NtMYB2*) 在转录水平受到真菌感染处理的诱导,同时激活了含有 13bp 基序的启动子和苯丙氨酸解氨酶基因(PV-PAL2)启动子在烟草原生质体中的表达,转 *NtMYB2* 基因烟草植株中过表达 *NtMYB2* 基因诱导反转录转座子 Tto1 和 PAL 基因的表达,这些结果表明 *NtMYB2* 参与了反转录转座子和防御相关基因的逆境反应<sup>[24]</sup>。因此推测 *FtMYB41* 基因可能参与植物的抗逆反应。

干旱诱导处理剂常用的有硝酸钾(KNO<sub>3</sub>)、磷酸三钾(K<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>)、聚乙二醇(PEG)、甘露醇(D-Mannitol)等,盐胁迫处理剂常用的是氯化钠(NaCl)。本研究选择 150 mmol/L D-Mannitol 和 150 mmol/L NaCl 处理 2 周龄的苦荞幼苗,发现 *FtMYB41* 基因在苦荞中的表达量受到 D-Mannitol 和 NaCl 的诱导上调,并且在 D-Mannitol 处理 9 h 表达量最高,是对照的 36.2 倍,进一步分析发现 *FtMYB41* 基因在根中表达量最高。Bian 等<sup>[25]</sup>发现大豆 MYB 转录因子 *GmMYB81* 的转录合成不仅在大豆组织中和胚发育过程中存在差异积累,而且在干旱和盐胁迫下表达量升高,分别为对照的 2.16 倍和 3.50 倍,说明 *GmMYB81* 对干旱和盐胁迫有积极的响应,因此推测 *FtMYB41* 基因对干旱和盐胁迫也有积极的响应。此外,高种子发芽率是植物抗盐和抗干旱胁迫的标

志,因为在不利的环境条件下种子萌发会被抑制,*GmMYB81* 的过表达显著提高了盐和干旱胁迫下种子的发芽率和绿苗率。本研究中,过表达 *FtMYB41* 的转基因拟南芥和对照组拟南芥在正常生长条件下并没有显著差异,在甘露醇处理条件下过表达 *FtMYB41* 基因拟南芥萌发率比对照组拟南芥平均提高了 8.6%,表明 *FtMYB41* 正向调控干旱条件下的种子萌发过程。长时间对转基因拟南芥与野生型拟南芥进行干旱胁迫处理发现野生型植株枯萎严重,而转基因拟南芥依然长势良好只是叶边缘有一点枯黄现象,说明 *FtMYB41* 基因具有抗旱功能。

活性氧(ROS, reactive oxygen species)是指氧自由基及其衍生物,包括过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),超氧离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>),单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)和羟基自由基(-OH)<sup>[26]</sup>。虽然 ROS 的产生是植物细胞代谢的正常现象,但环境胁迫导致 ROS 大量产生会对植物产生伤害,因此植物产生 ROS 和抗氧化防御需要保持平衡状态。此外,ROS 的过量积累可导致膜脂过氧化,MDA 是膜脂过氧化的产物,具有很强的细胞毒性,其含量反映了膜脂过氧化和胁迫对植物细胞的损伤程度<sup>[27]</sup>。棉花 R2R3 型 MYB 转录因子 *GbMYB5* 过表达促进转基因烟草脯氨酸和抗氧化酶 SOD 和 CAT 的积累,同时降低 MDA 的含量,高表达抗氧化基因 *GST*、多胺生物合成基因 *ADC1* 和 *SAMDC* 和干旱响应基因 *NCED3*、*BG3* 和 *RD26*,从而正向调控植物对干旱胁迫的适应性<sup>[28]</sup>。为了进一步研究 *FtMYB41* 基因对生理生化的影响,用甘露醇处理过表达 *FtMYB41* 基因毛状根 9 h 后检测 CAT 酶活、SOD 酶活和 MDA 含量,结果显示过表达毛状根在干旱胁迫后 CAT 酶活性、SOD 酶活性明显提高,同时 MDA 含量降低。因此 *FtMYB41* 基因在干旱胁迫中可能是通过增强植物的抗氧化防御,清除过量的活性氧,减少 MDA 含量从而提高植物的抗旱能力。综上所述,本研究从品苦一号中克隆得到 *FtMYB41* 基因,转录激活分析显示该基因具有 C 端自激活活性。*FtMYB41* 基因在苦荞幼苗根组织中表达量较高,且受到甘露醇和盐的诱导表达,在甘露醇处理 9 h 表达量显著增加,继续探究该基因在甘露醇处理时对植物的影响,结果显示,过表达 *FtMYB41* 基因提高了拟南芥种子的发芽率,降低了过表达毛状根 MDA 的含量,提高了抗氧化酶 CAT 和 SOD 的活性,从而提高了植物对干旱胁迫的耐受性。本研究对 *FtMYB41* 基因的结构分析和功能研究对苦荞中 MYB 转录因子家族的探究奠定了一定的基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Wu Y Q, Li T T, Cheng Z Y, Zhao D Q, Tao J. R2R3-MYB transcription factor PIMYB108 confers drought tolerance in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 12
- [ 2 ] Zhao D, Zhang X, Fang Z, Wu Y, Tao J. Physiological and transcriptomic analysis of tree peony (*Paeonia* section *Moutan* DC.) in response to drought stress. *Forests*, 2019, 10: 135
- [ 3 ] Ahmed R F I M, Shakir H A, Khan M, Chen L. Engineering drought tolerance in plants by modification of transcription and signalling factors. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, 34 ( 1 ): 781-789
- [ 4 ] Leng P, Zhao J. Transcription factors as molecular switches to regulate drought adaptation in maize. *Theoretische und Angewandte Genetik*, 2020, 133 ( 5 ): 1455-1465
- [ 5 ] Joshi R, Wani S, Singh B, Bohra A, Dar Z, Lone A, Pareek A, Singla-Pareek S L. Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 2016 ( 7 ): 1029
- [ 6 ] Baldoni E, Genga A. Plant MYB transcription factors: Their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16: 15811-15851
- [ 7 ] Du H, Zhang L, Liu L, Tang X F, Yang W J, Wu Y M, Huang Y B, Tang Y X. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry ( Moscow )*, 2009, 74 ( 1 ): 1-11
- [ 8 ] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 ( 10 ): 573-581
- [ 9 ] Antje F, Katja M, Braun E L, Erich G. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, 2011, 66 ( 1 ): 94-116
- [ 10 ] Xiong H, Li J, Liu P, Duan J, Zhao Y, Guo X, Li Y, Zhang H, Ali J, Li Z. Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. *PLoS ONE*, 2014, 9 ( 3 ): e92913
- [ 11 ] Wei Q, Luo Q, Wang R, Zhang F, He Y, Zhang Y, Qiu D, Li K, Chang J, Yang G, He G. A wheat R2R3-type MYB transcription factor TaODORANT1 positively regulates drought and salt stress responses in transgenic tobacco plants. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1374
- [ 12 ] Li Y, Zhang S, Zhang N, Zhang W, Li M, Liu B, Shi Z. MYB-CC transcription factor, TaMYBsm3, cloned from wheat is involved in drought tolerance. *BMC Plant Biology*, 2019, 19 ( 1 ): 143
- [ 13 ] Ding Z, Li S, An X, Liu X, Qin H, Wang D. Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics Genomics*, 2009, 36 ( 1 ): 17-29
- [ 14 ] Gao S, Zhang Y L, Yang L, Song J B, Yang Z M. AtMYB20 is negatively involved in plant adaptive response to drought stress. *Plant and Soil*, 2013, 376: 433-443
- [ 15 ] 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
- [ 16 ] Fang Q, Wang X, Wang H, Tang X, Liu C, Yin H, Ye S, Jiang Y, Duan Y, Luo K. The poplar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB94 coordinates with abscisic acid signaling to improve drought tolerance in plants. *Tree Physiology*, 2020, 40 ( 1 ): 46-59
- [ 17 ] 冯佰利, 姚爱华, 高金峰, 高小丽, 柴岩. 中国荞麦优势区域布局与发展研究. *中国农学通报*. 2005 ( 3 ): 375-377
- Feng B L, Yao A H, Gao J F, Gao X L, Chai Y. Study on the distribution and development of dominant regions of buckwheat in China. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005 ( 3 ): 375-377
- [ 18 ] 陈庆富. 荞麦属植物科学. 第一版. 北京: 科学出版社, 2012: 1-352
- Chen Q F. *Science of buckwheat*. First edition. Beijing: Science Press, 2012: 1-352
- [ 19 ] Gao F, Zhou J, Deng R Y, Zhao H X, Li C L, Chen H, Suzuki T, Park S U, Wu Q. Overexpression of a tartary buckwheat R2R3-MYB transcription factor gene, FtMYB9, enhances tolerance to drought and salt stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*. 2017, 214: 81-90
- [ 20 ] Gao F, Yao H, Zhao H, Zhou J, Luo X, Huang Y, Li C, Chen H, Wu Q. *Tartary buckwheat* FtMYB10 encodes an R2R3-MYB transcription factor that acts as a novel negative regulator of salt and drought response in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology Biochemistry*, 2016, 109: 387-96
- [ 21 ] 谈天斌, 卢晓玲, 张凯旋, 丁梦琦, 廖志勇, 周美亮. *TrMYB308* 基因的克隆及在苦荞毛状根中的功能分析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20 ( 6 ): 1542-1553
- Tan T B, Lu X L, Zhang K X, Ding M Q, Liao Z Y, Zhou M L. Cloning of *TrMYB308* gene and analysis of its function in *Fagopyrum tataricum* hairy root. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 ( 6 ): 1542-1553
- [ 22 ] Lesk C, Rowhani P, Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 2016, 529: 84-87
- [ 23 ] Wang X, Niu Y, Zheng Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 ( 11 ): 6125
- [ 24 ] Sugimoto K. MYB-Related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *The Plant Cell*, 2000, 12: 2511-2527
- [ 25 ] Bian S, Jin D, Sun G, Shan B, Zhou H, Wang J, Zhai L, Li X. Characterization of the soybean R2R3-MYB transcription factor GmMYB81 and its functional roles under abiotic stresses. *Gene*, 2020, 753: 144803
- [ 26 ] Hasanuzzaman M, Raihan M R H, Masud A A C, Rahman K, Nowroz F, Rahman M, Nahar K, Fujita M. Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under Salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 ( 17 ): 9326
- [ 27 ] Song Y, Yang W, Fan H, Zhang X, Sui N. TaMYB86B encodes a R2R3-type MYB transcription factor and enhances salt tolerance in wheat. *Plant Science*. 2020, 300: 110624
- [ 28 ] Chen T, Li W, Hu X, Guo J, Liu A, Zhang B. A cotton MYB transcription factor, GbMYB5, is positively involved in plant adaptive response to drought stress. *Plant Cell Physiology*, 2015, 56 ( 5 ): 917-929