

• 药材与资源 •

虎杖 MYB 转录因子 PcMYB1 的表达特性和功能研究

徐俊雄, 覃建兵, 王岩岩, 伍翔, 林艳丽, 吴端阳, 张鸿杰, 柳忠玉*

长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025

摘要: 目的 对虎杖中 1 个新的 R2R3-MYB 转录因子基因 PcMYB1 进行转录活性鉴定和表达特性分析, 并在转基因拟南芥中进行功能研究。方法 利用酵母单杂交实验分析 PcMYB1 的转录活性; 荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术检测虎杖中 PcMYB1 的表达模式; 利用 Wiesner 染色和溴乙酰法检测 PcMYB1 转基因拟南芥中的木质素含量; RT-PCR 技术分析 PcMYB1 转基因拟南芥木质素合成相关基因的表达。结果 酵母单杂实验结果表明, PcMYB1 具有转录抑制活性; RT-PCR 结果显示 PcMYB1 在虎杖根、茎、叶中均有表达, 在叶中表达量最高, 并且紫外照射处理可诱导叶片中 PcMYB1 的表达; 与野生型拟南芥相比, 转基因拟南芥的株高降低了 24.07%, 木质部的细胞染色程度浅, 转基因拟南芥木质素含量降低了 14.81%, 参与木质素合成的 AtC4H、AtC3H、AtF5H、AtCOMT、AtCAD 基因表达下调。结论 PcMYB1 具有转录抑制活性, 对植物木质素合成具有负调控作用。

关键词: 虎杖; PcMYB1; 转录活性; 表达分析; 木质素合成

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0726-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.024

Expression and function analysis of transcription factor PcMYB1 from *Polygonum cuspidatum*

XU Jun-xiong, QIN Jian-bing, WANG Yan-yan, WU Xiang, LIN Yan-li, WU Duan-yang, ZHANG Hong-jie, LIU Zhong-yu

College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

Abstract: **Objective** To identify the transcriptional activity and expression profile of PcMYB1, encoding a new R2R3-MYB transcription factor from *Polygonum cuspidatum*, and evaluate the biological functions of PcMYB1 in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Methods** The yeast one-hybrid system assay was conducted to test the transcriptional activity of PcMYB1. The tissue-specific expression profiles of PcMYB1 and the gene expression of *P. cuspidatum* leaves in response to UV-C irradiation were analyzed by RT-PCR analysis. To assess the biological functions of PcMYB1, the gene was expressed in *A. thaliana* under the control of CaMV 35S promoter. To obtain information about the lignin composition, cross-sections of the basal part of the inflorescence stem of wild-type and transgenic *A. thaliana* plants were treated with Wiesner staining, and the lignin content was measured by acetyl bromide method. RT-PCR analysis was used to determine expression levels of the genes encoding the enzymes of lignin biosynthesis. **Results** After expression of reporter and effector constructed in yeast, β -galactosidase assays showed that the transcriptional activation activity of VP16 domain was reduced markedly when fused to PcMYB1 protein, indicating that PcMYB1 has transcriptional repression activities. Expression pattern analysis showed that PcMYB1 was widely expressed in all tissues examined, but predominantly in leaves. PcMYB1 showed a peak of transcription at 6 h post UV-C treatment. The transgenic lines with reduction in height was 24.07% shorter than the wild-type plants. Wiesner staining of lignin in stem cross-sections revealed the typical intense red stain of secondary cell walls in wild-type plants, but less intense staining was detected in transgenic plants, and lignin accumulation was significantly decreased (about 14.81%) in transgenic plants stems. The expression of genes involved in the lignin biosynthetic pathway, including AtC4H, AtC3H, AtF5H, AtCOMT, and AtCAD, were down-regulated in transgenic lines compared to wild-type plants. **Conclusion** Taken together, this study provided the evidence for the biological functions of PcMYB1 as a negative regulator of lignin pathway.

Key words: *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.; PcMYB1; transcriptional activity; expression analysis; lignin biosynthesis

收稿日期: 2019-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803670); 长江大学校级大学生创新训练计划项目 (2019279)

作者简介: 徐俊雄 (1995—), 男, 硕士在读, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: 201771446@yangtzeu.edu.cn

*通信作者 柳忠玉 (1978—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物次生代谢与调控。E-mail: zyliu2004@126.com

虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 是蓼科多年生药用草本植物, 药用成分包含蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类和多糖类等化合物^[1-2], 药用价值丰富。

研究发现, 药用植物中多种药用成分的合成均受到 ERF、bZIP、WRKY、MYB 等转录因子的调节^[3]。MYB 转录因子是最大的植物转录因子家族成员之一, 广泛存在于植物中, MYB 转录因子家族约有 200 多个转录基因成员, 根据保守序列结构和功能的不同可以划分为 28 个亚家族^[4]。该类基因具有重要的生物学功能, 主要参与植物体内的代谢过程和控制细胞的形态发生, 调节植物的生长, 参与多种植物逆境防御反应和植物次生代谢调控。MYB 在药用植物药效成分的合成中起重要调控作用, 如丹参 SmMYB39 调控迷迭香酸的合成^[5]; 水母雪莲中黄酮合成受 MYB 和 bHLH 二元复合体调控^[6]; 灯盏花 ebMYB6 对羟基肉桂酸代谢有一定的抑制作用^[7]; 红花 CtFRMYB1 和 CtFRMYB2 参与红花类黄酮调控^[8]。尽管多种药用植物中的 MYB 转录因子基因已被克隆, 但虎杖中鲜有 MYB 转录因子的功能研究报道。

课题组前期从虎杖中分离得到 1 个新的转录因子 PcMYB1 (GenBank 登录号为 KY495789)^[9], 生物信息学分析该 PcMYB1 转录因子序列的 C 端存在一个抑制结构域基序 pdLNL[D/E]LXI[G/S], 已有的研究表明具有该基序的转录因子一般具有转录抑制活性^[10]。因此推测 PcMYB1 是一个负转录调控因子, 但 PcMYB1 的表达特性与调控模式还需要进一步转化模式植物来加以验证。故该研究拟通过酵母单杂实验分析 PcMYB1 的转录活性, 运用 RT-PCR 技术分析 PcMYB1 的表达模式, 对转基因拟南芥进行表型观察并测定次生代谢产物的含量, 探索虎杖 R2R3-MYB 转录因子 PcMYB1 基因的功能, 为进一步研究 PcMYB1 参与植物次生代谢产物合成的分子机制奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品种植于长江大学苗圃, 由长江大学生命科学学院柳忠玉讲师鉴定为虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 植株。大肠杆菌菌株 DH5 α , 酵母菌株 AH109, 质粒 1K-5 (含 PcMYB1 编码序列), 质粒 pGBKT7A (含单纯疱疹病毒蛋白 VP16 激活结构域) 等由该实验室保存。卡那霉素

(kanamycin, Kan)、潮霉素 (hygromycin, hyg)、小量质粒提取试剂盒、RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒和胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司; 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶购自 TaRaKa 公司; 所用引物和测序服务由上海生物工程有限公司完成。

1.2 仪器

HP1500GS-D 型植物培养箱 (武汉瑞华以期设备有限公司); HVE-50 灭菌锅 (HIRAYAMA 公司); DYY-8C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); Universal HoodIII 凝胶成像系统 (BIORAD 公司); SW-CJ-2FD 双人单面洁净工作台 (苏洁净化有限公司); Olympus 正置显微镜 (上海普赫光电科技有限公司)。

2 方法

2.1 样品的处理

虎杖植株种植于长江大学苗圃, 取生长状态良好的虎杖根、茎、叶等组织, 参考方法^[11]对虎杖叶片进行紫外胁迫处理, 收集的植物材料用液氮冻存。本课题组前期已经构建了 PcMYB1 基因的过量表达载体, 利用花絮浸染法转化拟南芥并且获得转基因拟南芥 T₁ 代种子^[12]。以获得的 T₁ 代种子为材料, 连续多代种植, 拟南芥培养于光照培养箱 (16 h 光照/8 h 黑暗, 22 °C), 以筛选得到的 T₃ 代纯合株系进行后续检测实验。

2.2 植物 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 Tiangen RNA 试剂盒提取植物 RNA, 经 DNase I 消化处理后电泳检测总 RNA 的浓度和质量。采用反转录试剂盒合成第一条单链 cDNA, -80 °C 备用。

2.3 酵母单杂表达载体的构建

以 1K-5 质粒 (含 PcMYB1 编码序列) 为模板, 设计引物扩增 PcMYB1 基因开放阅读框 (ORF) 片段, 正向引物序列为 5'-CGCGGATCCGTATGGGTAGGTCTCCAT-3', 反向引物序列为 5'-AAAACTGCAGCTTCATCTCCAAAGT-3'。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。对连有酶切位点的 PcMYB1 基因 ORF 片段和 pGBKT7A 酵母杂交载体用 BamH I 和 Pst I 进行双酶切, 回收基因片段与载体片段进行连接转化, 经 PCR 阳性筛选与酶切鉴定后送至测序, 获得酵母单杂杂交载体 pGBKT7A-PcMYB1。载体 pGBKT7A 与 pGBKT7A-PcMYB1 结构见图 1。

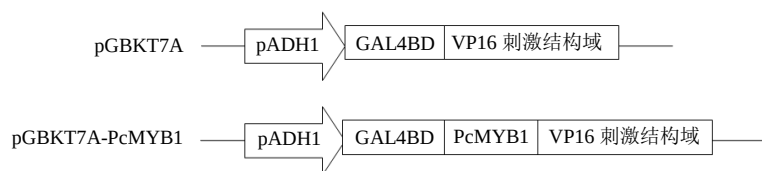


图 1 pGBKT7A 与 pGBKT7A-PcMYB1 载体结构示意图

Fig. 1 Structure of pGBKT7A and pGBKT7A-PcMYB1 vectors

2.4 PcMYB1 基因的转录活性分析

以 pGBKT7A 质粒为阳性对照, 运用 LiAc 转化法^[13]将 pGBKT7A-PcMYB1 重组载体转入酵母菌株 AH109, 在 SD/-Trp 单缺和 SD/-Trp/-His 的双缺平板上进行筛选, 筛选获得的阳性克隆转移至含有 X- α -gal 的 SD/-Trp 培养基上进行显色实验, 30 °C 倒置避光培养, 7 d 后观察酵母生长状况, 拍照记录。

2.5 PcMYB1 转录因子基因的表达特性分析

采用 RT-PCR 技术, 检测 PcMYB1 在虎杖不同组织和紫外胁迫下虎杖叶片的表达。根据虎杖 PcActin 基因设计内参引物 (正向引物序列为 5'-TACAATGAGCTTCGGGTTC-3', 反向引物序列为 5'-GCTCTTTGCAGTTTCCAGCT-3'), 根据 PcMYB1 序列设计特异引物 (正向引物序列为 5'-AAAAGTGCAGATGGGTAGTCTCCATGT-3', 反向引物序列为 5'-CCCAAGCTTTCACCTTCA-TCTCCAAAGT-3')。所有实验 PCR 反应程序均为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

2.6 PcMYB1 转基因拟南芥木质素含量测定

取生长 40 d 的野生型拟南芥和转基因拟南芥, 拟南芥靠近底座叶 1 cm 左右的主茎横切成薄片, Wiesner 法染色^[14], 染色完成后放于正置显微镜下观察木质部染色后的变化。

利用溴乙酰法测定拟南芥木质素含量^[15]。取生长 40 d 的拟南芥茎秆, 烘干磨粉, 取 0.1 g 干粉分别用无水乙醇、95%乙醇和纯净水洗涤, 去除可溶性物质后烘干。加入 5 mL 溴乙酰和 15 mL 冰乙酸混匀, 70 °C 恒温水浴 1 h 后依次加入 9 mL 2 mol/L NaOH 和 30 mL 冰乙酸。离心取上清, 加冰乙酸稀释, 测 280 nm 下的样品吸光度, 每个样品重复 3 次。

2.7 PcMYB1 转基因拟南芥木质素合成相关基因的表达分析

分别提取生长 40 d 的转基因拟南芥和野生型拟南芥的叶片总 RNA, 以逆转录的 cDNA 为模板, 拟南芥 Actin 基因为内参, 采用 RT-PCR 技术分析转基因拟南芥和野生型拟南芥的木质素合成相关基因的表达差异。木质素合成相关基因和 RT-PCR 引物见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence by RT-PCR

基因名称	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
C4H	GCAAGCTGAATTGTCCACCT	CACATCCTTGAAGCTGAGCA
PAL	CATCTGTTGGAAGGTGCTGA	CACCTCACAGACAATCATTTG
HCT	CATTCACTCTTTCCCGCTTC	GTTCCCATCCTCCTTGGATT
C3H	CACGCTTGAGCTCTTCACAC	GTTAGCAACGCATCAACGAA
4CL	AAAAGTGCCTCCGTTTCTCC	TCGATAAATCCGACGTCTCC
F5H	CTTTAGGAGCCGTGAGACCA	AGAGTGGGCCTTAACGGAGT
COMT	CGTCGCAGACAACCTTGTATG	TGATCTCCCATCATGTCATCG
CCoAOMT	CATCATCGACCAATGGAGAA	TCGATCAAACGCTTGTGGTA
CCR	TCTTTCACACGGCTTCTCCT	AAAGACTGGCGTTGATCGTC
CAD	CGAGTCTCTCAAACGCAGTG	GTTAGGTGGAGTCGGTCACA
Actin	ACTACCGCAGAACGGGAAAT	CATCTGTTGGAAGGTGCTGA

3 结果与分析

3.1 酵母表达载体的鉴定

将酵母单杂交载体质粒 pGBKT7A-PcMYB1 进行 PCR 鉴定和 *Bam*H I/*Pst* I 双酶切鉴定, 均能得到大小约 800 bp 的片段 (图 2)。经测序, 连入质粒 pGBKT7A 中的 PcMYB1 基因未出现碱基突变和移码现象, 即成功构建了酵母单杂交表达载体 pGBKT7A-PcMYB1。

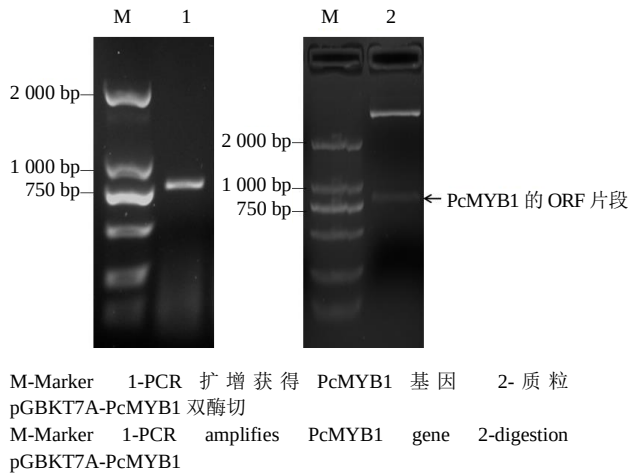
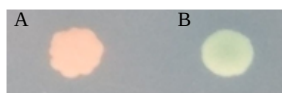


图 2 重组质粒 pGBKT7A-PcMYB1 的验证

Fig. 2 Identification of pGBKT7A-PcMYB1

3.2 PcMYB1 转录因子的转录活性分析

将 pGBKT7A 阳性对照和 pGBKT7A-PcMYB1 载体分别转化 AH109 酵母菌株, 在 SD/-Trp 单缺和 SD/-Trp/-His 双缺平板上进行筛选, 随后将筛选得到的阳性克隆转至显色培养基 (SD/-Trp+X- α -gal) 上倒置避光培养, 呈蓝色的酵母菌落表明转入片段能够启动报告基因的表达, 具有转录激活活性。结果表明, pGBKT7A 转化子和 pGBKT7A-PcMYB1 转化子均能在 SD/-Trp 单缺和 SD/-Trp/-His 双缺平板上正常生长, 说明构建的基因表达框均能正常发挥功能。阳性对照 pGBKT7A 转化子在双缺平板上显现出明显的蓝色, 而 pGBKT7A-PcMYB1 转化子未显蓝色 (图 3), 说明 PcMYB1 抑制了单纯疱疹病毒蛋白 VP16 激活结构域的转录激活活性, 即 PcMYB1 编码的蛋白具有转录抑制功能。



A-pGBKT7A-PcMYB1 转化子 B-阳性对照 pGBKT7A 转化子

A-pGBKT7A-PcMYB1 B-positive control pGBKT7A

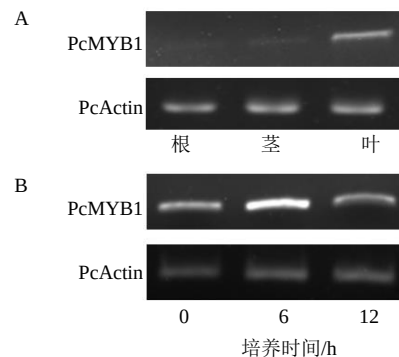
图 3 PcMYB1 的转录活性验证分析

Fig. 3 Transcriptional activity of PcMYB1

3.3 PcMYB1 基因的表达模式分析

采用 RT-PCR 技术对 PcMYB1 在虎杖根、茎、叶的表达进行分析, 结果表明, PcMYB1 在根、茎、叶中均有表达, 在根茎中的表达很弱, 在叶片中的表达最高 (图 4-A)。

对虎杖叶片进行紫外胁迫处理, 采用 RT-PCR 技术分析 PcMYB1 在紫外胁迫处理后叶片中的表达。结果表明, 处理后的叶片随着培养时间的增长, PcMYB1 表达量呈现先上升后回调的特征, 紫外处理后 6 h 的虎杖叶片中 PcMYB1 基因的表达达到峰值 (图 4-B)。说明 PcMYB1 响应了紫外胁迫。



A-PcMYB1 在根、茎、叶中的表达分析 B-紫外胁迫下叶片 PcMYB1 的表达分析

A-PcMYB1 expression in roots, stems and leaves B-PcMYB1 expression in leaves under UV stress

图 4 PcMYB1 的表达模式分析

Fig. 4 PcMYB1 gene expression pattern

3.4 PcMYB1 转基因拟南芥的表型观察

课题组前期已经构建了 PcMYB1 基因的过量表达载体, 并且获得转基因拟南芥 T₁ 代种子^[12]。以已经获得的 T₁ 代种子为材料, 连续多代种植并筛选得到 T₃ 代纯合株系 35::PcMYB1。与野生型拟南芥相比, 转基因拟南芥 (35::PcMYB1) 出现植株矮化现象, 株高降低了 24.07%。

3.5 PcMYB1 转基因拟南芥株系的木质素含量检测

对生长 40 d 的拟南芥茎段组织进行 Wiesner 染色, 染色完成后的茎段切片置于正置显微镜下观察其变红程度, 颜色越红说明木质素含量越高。与野生型拟南芥相比, 转基因拟南芥 (35::PcMYB1) 的木质部细胞染色区域减少, 木质部染色程度浅 (图 5)。说明 PcMYB1 转基因拟南芥的木质素含量比野生型拟南芥低。

采用溴乙酰法测定拟南芥茎段的木质素含量, 野生型拟南芥成熟期株高约为 22.03 cm, 木质素质

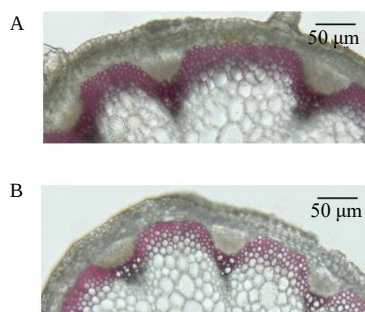


图 5 野生型拟南芥 (A) 与转基因株系 (B) 切片染色图
Fig. 5 Section staining observation of wild-type plants (A) and transgenic plants (B) of *A. thaliana*

量分数为 204.74 mg/g；转基因拟南芥 (35::PcMYB1) 品系的株高约为 16.75 cm，木质素质量分数为 174.42 mg/g。转基因与野生型拟南芥相比，转基因拟南芥 (35::PcMYB1) 木质素含量降低了 14.81%，统计学分析达到显著水平 ($P < 0.05$)，测定结果与 Wiesner 木质素染色结果一致。

3.6 PcMYB1 转基因拟南芥木质素合成相关基因的表达

以 Actin 基因为内参基因，采用 RT-PCR 检测拟南芥中木质素合成途径中相关基因的表达。与野生型拟南芥相比，转基因拟南芥 (35::PcMYB1) 中 C4H、C3H、F5H、COMT、CAD 等基因的表达量均有不同程度的降低，PAL、HCT、4CL、CCoAOMT、CCR 等基因的表达量未见有显著变化 (图 6)。结果说明，PcMYB1 基因的过量表达导致木质素合成相关基因的表达下调。

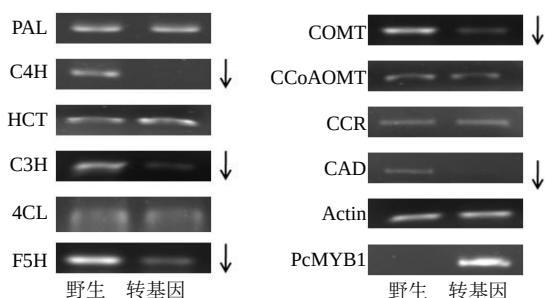


图 6 PcMYB1 转基因拟南芥与野生型木质素合成相关基因的表达差异分析
Fig. 6 Differential expression analysis of genes related to lignin synthesis

4 讨论

研究发现木薯 MebZIP9 基因具有转录激活活性，能够响应某些生物胁迫和非生物胁迫的应答，活性调控区域位于基因序列的 N 端^[16]。小麦中的 MYB 类转录因子 TaODORANT1 的转录活性调控

区域位于基因的 C 端，TaODORANT1 能够提高转基因烟草的耐旱与耐盐性^[17]。本研究的 PcMYB1 具有转录抑制活性，能够响应紫外胁迫，是一个负转录调控基因，但具有转录活性的调控序列位于 PcMYB1 基因的 N 端或 C 端还有待研究，后续将进一步通过酵母单杂实验进行验证。

R2R3-MYB 型转录因子广泛存在于植物中，主要参与植物体内代谢过程和控制细胞的形态发生，调节植物的生长，参与胁迫应答^[18-19]。本研究叶片中 PcMYB1 的表达量最高，选用虎杖叶片分析紫外胁迫处理后 PcMYB1 的表达特征，结果显示 PcMYB1 响应紫外胁迫，这与 Xi 等^[11]的研究结果一致。

MYB 转录因子基因同时参与调控植物的多种次生代谢途径，对植物的细胞分化、形态发生和建成有重要的调控作用。研究表明，葡萄 VvMYBPA1^[20]、拟南芥 AtMYB7^[21]等转录因子基因均调控原花青素的合成，杨树 PtoMYB156^[22]参与黄酮类物质的合成，荷花 NnMYB4^[21]和玉米 ZmMYB31^[23]等转录因子基因参与调控木质素的合成。本研究中，转基因拟南芥 (35::PcMYB1) 的植株发生矮化现象，木质素含量降低，这与荷花 NnMYB4 和玉米 ZmMYB31 等基因的拟南芥转基因研究结果一致。木质素是维持细胞壁结构完整性和维管植物茎干强度的基础，不同植物的木质素组成和含量有一定差异，植物中木质素的组成主要包括 G-木质素、S-木质素和 H-木质素等单体^[24]。本研究结果显示 PcMYB1 参与调控木质素的合成，但具体参与调控何种木质素单体的合成还有待研究。

多种植物的 MYB 转录因子已被发现参与木质素的合成代谢途径，通过调控木质素合成关键酶基因的表达在木质素代谢过程中发挥着重要作用^[22,25-28]。如杨树 PtoMYB156 转基因胡杨中的 F5H2、CCoMOT1、C3H1、HCT1、LAC40、C4H2 等基因的表达下调，抑制了木质素的合成^[22]，荷花 NnMYB4 转基因拟南芥木质素合成关键基因 C3H、4CL1、F5H、COMT、C4H、CCR 表达量降低^[25]，松树 PtMYB4 转基因烟草的木质素含量上升，与木质素合成相关的 PAL 基因表达量降低，CCR、COMT、C3H、CCoAOMT 表达量提高^[26]，柳枝稷 PvMYB4 转基因烟草品系的 PAL、C4H、C3'H、4CL、COMT、CCR 和 CAD 等基因表达下调，木质素合成减少^[27-28]，而本研究中 PcMYB1 转基因拟南芥木

质素合成相关基因 C4H、C3H、F5H、COMT、CAD 的表达降低,与上述实验结果类似。R2R3 型 MYB 转录因子可通过与木质素合成相关基因启动子区的 AC 元件结合对木质素生物合成途径进行调控,AC 元件分为 AC-I (ACCTACC)、AC-II (ACCAACC) 和 AC-III (ACCTAAC),一般位于木质素合成途径中的 PAL、C4H、4CL、C3H、CCoAOMT、CCR 和 CAD 等基因的启动子区^[24]。因此,本研究后续可分析 PcMYB1 与下游基因启动子区的 AC 元件的互作,进一步研究 PcMYB1 调控木质素合成的分子机制。

本研究证明转录因子 PcMYB1 具有转录抑制活性,PcMYB1 在虎杖根、茎、叶中均有表达。与野生型拟南芥相比,转基因拟南芥(35::PcMYB1)株系出现植株矮化现象,木质部细胞层数变少且木质素含量降低,PcMYB1 基因的过量表达导致木质素合成相关基因 C4H、C3H、F5H、COMT、CAD 表达下调,即 PcMYB1 转录因子是一个负调控转录因子,对木质素的合成起抑制作用。

参考文献

- [1] Benová B, Adam M, Onderková K, et al. Analysis of selected stilbenes in *Polygonum cuspidatum* by HPLC coupled with coul array detection [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(13): 2404-2409.
- [2] 薛 岚. 中药虎杖的药理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(11): 651-653.
- [3] Cho S, Namkoong K, Shin M, et al. Cardiovascular protective effects and clinical applications of resveratrol [J]. *J Med Food*, 2017, 20(4): 323-334.
- [4] Liu J, Osbourn A, Ma P, et al. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(5): 689-708.
- [5] Li C, Lu S. Genome-wide characterization and comparative analysis of R2R3-MYB transcription factors shows the complexity of MYB-associated regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(4): 277-289.
- [6] 王亚杰, 李厚华, 付婉艺, 等. 水母雪莲红色细胞系类黄酮含量和相关基因表达 [J]. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1225-1234.
- [7] 庄宇翔, 何凤明, 张云峰, 等. 灯盏花 MYB 基因克隆及其荧光表达载体的构建 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4306-4315.
- [8] 陈 江, 唐小慧, 任超翔, 等. 调控红花类黄酮合成 MYB 转录因子基因克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4523-4529.
- [9] 柳忠玉, 雷 健, 李晓筱, 等. 虎杖转录因子 PcMYB1 基因的克隆及原核表达 [J]. 河南农业科学, 2018, 47(1): 96-102.
- [10] Kazan K. Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif containing repressors [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(3): 109-112.
- [11] Xi H, Ma L, Liu G, et al. Transcriptomic analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves after exposure to ultraviolet irradiation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): 1371-1394.
- [12] 李晓筱, 刘 婵, 徐俊雄, 等. 虎杖基因 PcMYB1 真核表达载体构建及遗传转化 [J]. 长江大学学报: 自科版, 2018, 15(22): 39-42.
- [13] 房志家, 陈 婷, 郝贺龙, 等. 酿酒酵母转化方法的新探索 [J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(4): 5-8.
- [14] Pomar F, Merino F, Barceló A R. O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction [J]. *Protoplasma*, 2002, 220(1): 17-28.
- [15] Yan L, Liu S, Zhao S, et al. Identification of differentially expressed genes in sorghum (*Sorghum bicolor*) brown midrib mutants [J]. *Physiol Plant*, 2012, 146(4): 375-387.
- [16] 李小林, 韦运谢, 胡 伟, 等. MebZIP9 转录因子的表达定位及转录激活活性分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4540-4546.
- [17] Wei Q, Luo Q, Wang R, et al. A wheat R2R3-type MYB transcription factor *TaODORANT1* positively regulates drought and salt stress responses in transgenic tobacco plants [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8(8): 1374-1389.
- [18] Tamagnone L, Merida A, Parr A, et al. The *AmMYB308* and *AmMYB330* transcription factors from *antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 135-154.
- [19] Zhao J, Zhang W, Zhao Y, et al. *SAD2*, an importin β -like protein, is required for UV-B response in *Arabidopsis* by mediating MYB4 nuclear trafficking [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3805-3818.
- [20] Bogs J, Jaffé F W, Takos A M, et al. The grapevine transcription factor *VvMYBPA1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(3): 1347-1361.
- [21] Fornalé S, Lopez E, Salazar-Henao J E, et al. *AtMYB7*, a new player in the regulation of UV-Screens in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(3): 507-516.
- [22] Yang L, Zhao X, Ran L, et al. *PtoMYB156* is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism and

- secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(10): 1209-1238.
- [23] Fornalé S, Shi X, Chai C, *et al.* *ZmMYB31* directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux [J]. *Plant J*, 2010, 64(4): 633-644.
- [24] 郭光艳, 柏 峰, 刘 伟, 等. 转录因子对木质素生物合成调控的研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(7): 1277-1287.
- [25] 李针针, 刘兆磊, 陈发棣, 等. 荷花 R2R3-MYB 转录因子 *NnMYB4* 对拟南芥木质素合成的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2016, 39(6): 932-938.
- [26] Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, *et al.* Characterisation of a pine MYB that regulates lignifications [J]. *Plant J*, 2003, 36(6): 743-754.
- [27] Shen H, He X, Poovaiah C R, *et al.* Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor *PvMYB4* for improvement of lignocellulosic feedstocks [J]. *New Phytol*, 2012, 193(1): 121-136.
- [28] Shen H, Poovaiah C R, Ziebell A, *et al.* Enhanced characteristics of genetically modified switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for high biofuel production [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 71-85.