

## 基于全长转录组测序的掌叶大黄 R1-MYB 基因家族鉴定分析

赵霞<sup>1,2#</sup>, 李元敏<sup>1,3#</sup>, 李依民<sup>1,2\*</sup>, 肖光辉<sup>4</sup>, 张明英<sup>1</sup>, 程文萍<sup>1</sup>, 高静<sup>1,2</sup>,  
彭亮<sup>1</sup>, 张岗<sup>1,2\*</sup>

(1. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046; 2. 陕西中医药大学陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046; 3. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 西安 712046; 4. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710119)

**摘要:** 作为 MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 转录因子家族的一大类, R1-MYB (MYB-related) 家族在植物生长发育、环境胁迫及激素信号转导等方面发挥重要的调节作用。本研究基于全长转录组测序分析, 系统筛选掌叶大黄 R1-MYB 家族基因, 分析其编码蛋白的理化、结构域及分子进化等特性, 利用 RNA-seq 进行基因组织表达分析, 并检测 *RpMYB24* 响应激素、非生物胁迫的表达模式。结果表明, 共鉴定到掌叶大黄 49 个 R1-MYB 家族基因, 主要编码热稳定的亲水蛋白, 大部分定位于细胞核。各蛋白无规卷曲和  $\alpha$  螺旋所占比例较大, 存在 MYB 家族标志性的 W 型保守氨基酸。掌叶大黄 R1-MYB 家族成员分布于 CCA1 (circadian clock associated 1)-like、I-box (GATAAG)-like、CPC (CAPRICE)-like、TRF (telomere repeat binding factor)-like 和 TBP (TATA binding protein)-like 5 个亚组, 且 CCA1-like 数量居多。RNA-seq 揭示 49 个 R1-MYBs 基因在掌叶大黄根、根茎及叶中差异表达, 根及根茎中分别有 15、23 个基因表达量高于叶中。发现 *RpMYB24* 基因受脱落酸 (abscisic acid, ABA)、水杨酸 (salicylic acid, SA) 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 的诱导, 且能显著应答损伤、低温或高温胁迫, 但对于干旱胁迫响应不显著。本研究系统鉴定了掌叶大黄 R1-MYB 家族基因及其分子特征, 为下一步开展基因功能验证提供基础, 进而为大黄药材品质形成的转录调控机制研究提供科学依据。

**关键词:** 掌叶大黄; R1-MYB; 转录因子; 基因表达; 胁迫

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1354-10

## Identification and analysis of R1-MYB gene family in *Rheum palmatum* L. based on full-length transcriptome sequencing

ZHAO Xia<sup>1,2#</sup>, LI Yuan-min<sup>1,3#</sup>, LI Yi-min<sup>1,2\*</sup>, XIAO Guang-hui<sup>4</sup>, ZHANG Ming-ying<sup>1</sup>,  
CHENG Wen-ping<sup>1</sup>, GAO Jing<sup>1,2</sup>, PENG Liang<sup>1</sup>, ZHANG Gang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 2. Key Laboratory for Research and Development of "Qin Medicine" of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 4. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

**Abstract:** As one kind of v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog (MYB) transcription factors,

收稿日期: 2022-08-23; 修回日期: 2022-09-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104334, 81973430); 咸阳市中青年科技创新领军人才项目 (L2022CXNLRC009); 陕西省重点产业创新链资助项目 (2021ZDLSF04-01); 陕西中医药大学“秦药”品质评价与资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01).

\*共同第一作者.

\*通讯作者 E-mail: jay\_gumling2003@aliyun.com; 2051058@sntcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1009

R1-MYB (MYB-related) family plays an important role in plant growth and development, as well as environmental stress and hormone signal transduction. In this study, R1-MYB family genes in *Rheum palmatum* L. were systematically screened based on full-length transcriptome sequencing analysis. Firstly, the physicochemical, protein domain and molecular evolution characteristics of the coding proteins were analyzed. Furthermore, the tissue expression levels of R1-MYB genes were analyzed by RNA-seq. We also investigated the expression pattern of *RpMYB24* in response to various hormones and abiotic stresses. The results showed that a total of 49 R1-MYB genes were identified, which mainly encoded thermally stable hydrophilic proteins. Most of the deduced proteins were predicted to locate in nucleus. Each protein had a large proportion of random curl and  $\alpha$  helix, and also had the W-type conserved amino acids which were the signature of MYB. R1-MYB family members were distributed in five subgroups, including circadian clock associated 1 (CCA1)-like, I-box (GATAAG)-like, CAPRICE (CPC)-like, telomere repeat binding factor (TRF)-like and TATA binding protein (TBP)-like, and the number of CCA1-like was the majority. RNA-seq revealed that 49 R1-MYB genes were differentially expressed in roots, rhizomes and leaves of *R. palmatum*, and the expression levels of 15 and 23 genes in roots and rhizomes were higher than those in leaves, respectively. *RpMYB24* transcript was induced by abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and methyl jasmonate (MeJA) treatment, and could also significantly respond to injury, low temperature and high temperature stresses except drought stress. This study systematically identified the R1-MYB family genes and their molecular characteristics, better for further gene functional validation, and then provide a scientific basis for the transcriptional regulation mechanism research into rhubarb quality formation.

**Key words:** *Rheum palmatum* L.; R1-MYB; transcription factor; gene expression; stress

掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 系《中华人民共和国药典》2020 年版正品大黄三基源植物之一, 其药材具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄等功效<sup>[1]</sup>。掌叶大黄主要分布于甘肃、青海、陕西等海拔地区, 野生资源有限, 临床需求量大, 目前主要为栽培品<sup>[2]</sup>。大黄的主要活性成分为蒽醌类成分, 其生物合成途径主要由莽草酸、甲羟戊酸、磷酸甲基赤藓醇及聚酮途径复合而成<sup>[3]</sup>。苯丙烷代谢途径起始于上游糖酵解, 与莽草酸途径共同产生苯丙氨酸, 故大黄蒽醌类成分与苯丙氨酸同享莽草酸途径<sup>[4]</sup>。研究发现, 通过抑制苯丙氨酸解氨酶活性阻断苯丙酸途径, 使代谢流偏向合成蒽醌途径, 可提高蒽醌类物质的积累量<sup>[5]</sup>。MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 转录因子被证实广泛参与调控植物细胞苯丙烷类代谢<sup>[6]</sup>。因此, 挖掘掌叶大黄 MYB 并阐明作用机制对解析蒽醌类成分生物合成的调控研究具有重要意义。

药用植物在生长发育过程中常经受各种胁迫 (也称逆境)<sup>[7]</sup>。基于“顺境出产量, 逆境促品质”, 中药材“拟境栽培”生态种植便是模拟药用植物野生环境, 以实现药用植物品质的“天地人药合一”<sup>[8]</sup>。植物在面对不良环境时其细胞迅速从“舒适”状态转变进入“胁迫响应”状态, 这依赖于植物对环境胁迫的感知、激素信号的激发、转录因子的活化等一系列复杂的生理生化反应<sup>[9]</sup>。MYB 是应答外界环境指导细胞转录调控的重要参与者, 也是植物中成员众多且功能多样的一大

类转录因子。MYB 蛋白 N 端含有约 50 个高度保守的氨基酸残基和间隔序列组成的 R 结构域, 保守氨基酸残基以螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix, HTH) 形式参与结合 DNA。根据 R 结构域的重复数量, MYB 家族分为 R2R3-MYB、3R-MYB、4R-MYB 和 R1-MYB/MYB-related 四类, 分别含有 2、3、4 个和单一 R 结构域<sup>[10,11]</sup>。R2R3-MYB 在植物中最常见, 普遍参与植物细胞分化、激素应答、次生代谢及环境胁迫生理适应等多种生物学过程<sup>[12]</sup>。但关于 R1-MYB 的相关报道较少, 限制了对植物 MYB 功能的深入研究。

植物中的第一个 R1-MYB 基因分离自马铃薯 *MybSt1*<sup>[13]</sup>。随着基因组测序技术的发展, 逐渐在拟南芥<sup>[4]</sup>、三七<sup>[15]</sup>、山楂<sup>[16]</sup>等多种植物中鉴定了 R1-MYB 类转录因子。该家族蛋白主要由 CCA1 (circadian clock associated 1) -like、I-box (GATAAG) -like、CPC (CAPRICE) -like、TRF (telomere repeat binding factor) -like 和 TBP (TATA binding protein) -like 5 个亚组构成; 其中 CCA1-like 和 TBP-like 亚组所含成员最多, 具有典型的保守基序, CCA1-like 亚组在 MYB 重复序列的第 3 个螺旋中含有高度保守的 SHAQK (Y/F) F 基序, TBP-like 亚组含有高度保守的 LKDKW (R/K) (N/T) 基序<sup>[17]</sup>。大量研究揭示, R1-MYB 参与植物生长发育、环境胁迫及激素信号转导等生理过程。如拟南芥韧皮部特异 FE 蛋白通过调控韧皮部细胞中与开花相关蛋白的合成和运输来调节开花过程<sup>[18]</sup>。干旱胁迫条件下, 过表达 *OsMYB48* 的转基因水稻在萌发和萌发后阶段

对脱落酸 (abscisic acid, ABA) 高度敏感, 促进体内更多内源 ABA 的积累<sup>[19]</sup>。羊草 *LcMYB2* 在转基因拟南芥中直接结合渗透胁迫标记基因 *AtDREB2A*、*AtLEA14* 和 *AtP5CSI* 的启动子并激活其表达, 以抵御干旱胁迫<sup>[20]</sup>。

本研究以掌叶大黄为对象, 利用全长转录组测序技术结合 RNA-seq 挖掘 R1-MYB 转录因子家族基因并分析其差异表达特征, 同时进行 *RpMYB24* 基因响应激素、非生物胁迫的表达模式检测, 为后续深入研究其在大黄生长发育及萜醌类成分代谢调控中的作用机制提供支撑。

## 材料与amp;方法

**主要试剂和仪器** 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、水杨酸 (salicylic acid, SA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA) (上海源叶生物科技有限公司); Trizol 试剂盒 (Life technologies 公司); SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (美国 Clontech 公司); RN38-EASYspin Plus 植物 RNA 提取试剂盒 (北京艾德莱公司); PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒、TB Green® Premix ExTaq™ II (TliRNaseH Plus) (TaKaRa 公司)。NanoDrop™ 2000 分光光度计 (美国 Thermo-fisher 公司); PacBio Seque III 测序仪 (美国 PacBio 公司); StepOnePlus™ Real-Time PCR (qPCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); K5800 自动检测微量分光光度计 (凯奥公司)。

**材料** 2021年8月在甘肃省陇南市甘肃中医药大学和政药用植物园分别采集掌叶大黄 *R. palmatum* L. 一年生植株和成熟种子, 经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定。

选择大小一致、饱满的种子点播于装有 200 g 泥炭土 (klasmann) 的黑色塑料花盆中 (直径 9 cm、高 12.5 cm), 每盆点播 4 颗种子, 23 ± 2 °C, 光周期 16/8 h, 光照强度 9 000 Lx 条件下培养。初次浇水至盆底有水排出即可, 每隔 3 天补充水 50 mL。生长至 1 月龄时选取长势均匀、生命旺盛的掌叶大黄幼苗 3 株, 将根、叶等量混合, 液氮中速冻后置于干冰中送广州基迪奥生物科技有限公司进行全长转录组测序分析。取一年生植株 3 株, 根、根茎、叶 3 个部位各等量混合后进行 RNA-Seq 分析。

同时, 选取生命旺盛、长势均匀的一月龄幼苗, 激素处理组分别喷施 200 μmol·L<sup>-1</sup> MeJA、SA、ABA, 喷施溶剂模拟对照组; 非生物胁迫处理组分别进行干旱 (10% PEG 6000)、盐 (100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)、高温 (40 °C)、低温 (4 °C)、机械损伤 (针刺叶片), 喷施无茵

水模拟对照组; 两组材料均以 0 h 为空白对照, 所有样品重复 3 次, 分别于处理后 1、3、6、12 和 24 h 取样处理, 液氮速冻后置 -80 °C 冰箱保存备用。

**全长转录组测序及 R1-MYB 鉴定** 利用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, NanoDrop™ 2000 分光光度计检测其完整性, 检测合格后的总 RNA 使用 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit 及 PCR 扩增合成全长 cDNA 并进行 SMRT bell 文库构建。采用 PacBio Seque III 进行上机测序, 利用 SMRT Link V8.0.0 分析原始数据。先提取高质量的环形一致性序列 (circular consensus sequencing, CCS), 聚类 FLNC reads, 得到完整的 isoform。通过 BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 将 isoform 比对到蛋白数据库 Nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot>) 和 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) 进行功能注释。

使用转录因子数据库 plant TFdb (<http://plantfdb.gao-lab.org/index.php>) 在蛋白序列中找到有已知转录因子的 motif, 进行转录因子家族归类。挑选 R1-MYB 转录因子家族基因, 再次进行 BlastX 比对, 结合 ORF Finder 分析筛选出具有完整开放阅读框 (ORF) 的全长基因。用 ExPASy (<https://prosite.expasy.org/prosite.html>) 分析基因编码蛋白质的结构域, 同时用 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进行验证。

**蛋白序列分析** 利用在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA ([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)) 对掌叶大黄 R1-MYB 转录因子的一级、二级结构进行理化性质分析。SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 和 TMHMM 预测信号肽和跨膜区域。WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 预测亚细胞定位。MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/streme>) 分析保守氨基酸基序, 并用 TBtools 将其可视化。用 Weblogo<sup>[21]</sup> 分析蛋白序列位点。借助 MEGA 7 邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 进行掌叶大黄 R1-MYB 系统进化树构建分析, 自举值为 1 000 次。

**基因组织表达分析** 基于 RNA-Seq 转录组测序数据, 筛选出 R1-MYB 转录因子在掌叶大黄根、根茎和叶中的表达数据, 以 FPKM 值表示丰度, 经 log<sub>2</sub> 标准化后运用 TBtools 绘制 R1-MYB 基因在不同组织中的相对表达量热图, 分析其在掌叶大黄不同组织部位的表达模式。

***RpMYB24* 的表达模式分析** 参照 RN38-EASYspin Plus 植物 RNA 提取试剂盒提取掌叶大黄各样品总

RNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性, 用 K5800 自动检测超微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。

基于 RNA-Seq 转录组测序数据选择 CCA1-like 亚组中于根中高表达的 *RpMYB24* 基因进行表达模式分析, 利用 qPCR 检测其在一年生掌叶大黄根、根茎、叶中的表达水平及其响应激素或非生物胁迫的相对表达量, 以  $\beta$ -actin 为内参基因<sup>[22]</sup>。*RpMYB24* 基因 qPCR 引物: *RpMYB24*-qPCR-F 5'-CCTGGACATCTGAGGAGCATAG-3', *RpMYB24*-qPCR-R 5'-CATTGTCTTCGGGCACTG-3', 扩增产物长 239 bp。使用 TB Green® Premix ExTaq™ II (TliRNaseH Plus) 进行 qPCR。20  $\mu$ L 反应体系: 2 $\times$  TB Green® Premix ExTaq™ II (TliRNaseH Plus) 10  $\mu$ L、forward/reverse primer 各 0.8  $\mu$ L、cDNA 模板 2  $\mu$ L、50 $\times$  ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。反应程序: 预变性 95 °C 30 s, 变性 95 °C 5 s, 退火 60 °C 30 s, 延伸 60 °C 34 s, 40 个循环, 反应结束后于 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s 条件下绘制熔解曲线。包括不加模板的对照在内, 所有 qPCR 反应技术重复和实验重复各 3 次, 应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[23]</sup> 计算相对表达量。

***RpMYB24* 编码蛋白的分子进化分析** 通过 NCBI 和 PlantTFDB 数据库检索 *RpMYB24* 同源序列, 使用 MEGA 7 邻接法进行分子进化分析。

**统计学分析** 应用 SPSS 24 软件对 *RpMYB24* 基因响应外源激素及非生物胁迫的表达量进行 *t* 检验分析,  $P < 0.05$  代表有显著性差异。

## 结果与分析

### 1 R1-MYB 转录因子序列分析

掌叶大黄全长转录组包含 55 个 TF 家族, R1-MYB 家族有 92 个 isoforms, 包含完整 ORF 的 isoform 有 58 个。整理 ORF 差异位点并合并重复, 最终获得 49 个全长 R1-MYB 转录因子, 编号 *RpMYB1*~*RpMYB49* (表 1)。蛋白氨基酸序列最长的是 *RpMYB1/2/5*, 有 720 个残基, 最短的是 *RpMYB49*, 编码 260 个残基。

对 49 个 R1-MYB 蛋白序列的一级结构特征分析发现, 蛋白的分子质量在 28.134 (*RpMYB49*)~78.633 (*RpMYB1*) kD; 理论等电点介于 5.17~9.53, 包括 32 个碱性蛋白, 17 个酸性蛋白, 表明在不同的微环境中 R1-MYB 转录因子发挥着不同生物学功能。所有 R1-MYB 蛋白的平均亲水性数值是负值, 说明其均为亲水性蛋白; *RpMYB31/39* 的稳定系数  $< 40$ , 推测其为

稳定蛋白, 其余 47 个为不稳定蛋白; 脂肪系数为 55.76~80.26, 说明 R1-MYB 转录因子基因编码蛋白的热稳定性较好。二级结构分析发现, 掌叶大黄 R1-MYB 家族蛋白均具有  $\alpha$  螺旋、延伸链、 $\beta$  转角和无规卷曲, 主要由  $\alpha$  螺旋和无规卷曲构成 (所占比平均值分别为 30.33%、57.78%), 延伸链和  $\beta$ -折叠所占比值较小 (所占比平均值分别为 8.83%、3.06%), 散布于整个蛋白中。SignalP-5.0 和 TMHMM 在线分析一致表明掌叶大黄 R1-MYB 蛋白均无信号肽和跨膜结构域。亚细胞定位结果显示, 掌叶大黄 R1-MYB 蛋白仅 *RpMYB48* 定位于细胞质, 其余成员均定位于细胞核。

### 2 进化树分析

利用 MEGA7.0 构建掌叶大黄与拟南芥 R1-MYB 转录因子家族系统进化树。图 1 结果表明, 49 个 R1-MYB 蛋白分为 CCA1-like、TBP-like、CPC-like、TRF-like 和 I-box-like 5 个亚组, 其中 CCA1-like 是最大的 1 个亚组, 含有 *RpMYB* 家族成员 24 个, 占总数的 48.98%, 又分成多个小的亚支; 其次是 TBP-like、TRF-like、CPC-like 亚组, 分别含有 9、9、4 个 *RpMYB* 基因家族成员, 依次占总数的 18.37%、18.37%、8.16%; 与拟南芥 I-box-like 相近的转录因子在掌叶大黄中较少, 只有 3 个, 仅占 6.12%。其中, *RpMYB28* 与拟南芥 AT3G09600.2/*RVE8* 亲缘关系较近, 可能具有相似的生物学功能。

### 3 保守基序分析

利用在线软件 MEME 对掌叶大黄 49 个 R1-MYB 蛋白序列进行保守基序分析 (图 2)。结果表明, 不同 R1-MYB 转录因子基因包含的保守元件数量及种类存在差异, *RpMYB10/12/14* 基因包含的保守元件数量最少 (1 个), *RpMYB1/2/5/11/15* 基因包含的保守元件数量最多 (13 个), 说明 *RpMYBs* 成员具有功能冗余现象, 也具有功能差异性。Motif2 存在于所有 MYB 序列中, 且大多分布于近 N 端, 可能是掌叶大黄 R1-MYB 转录因子的特征基序。Motif15 是 CCA1-like 亚组的特征基序, 且是最短的基序, 含有 8 个氨基酸残基, 最长含有 50 个氨基酸残基。此外, Motif3、Motif7 和 Motif17 也存在于 CCA1-like 亚组, 其中, Motif7 位于该亚组的近 N 端。CPC-like 亚组的 *RpMYB3/4* 和 TBP-like 亚组成员均拥有 Motif18, 但所处位置有差异。

MYB 蛋白结合位点序列分析结果表明 (图 3), R1-MYB 转录因子的每个重复结构域约为 51 aa, 且存在 MYB 标志性的 W 型保守氨基酸, R1-MYB 的第 3 个色氨酸被甲硫氨酸 (k) 或半胱氨酸 (D) 取代, 第一个色氨酸残基高度保守, 说明其对于形成疏水核和维持三维结构非常重要。

**Table 1** Basic information of R1-MYB transcription factors in *R. palmatum*. pI: Isoelectric point; GRAVY: Grand average of hydropathicity

Gene symbol	Sequencing ID	Protein length (aa)	Molecular weight (Da)	pI	GRAVY	Instability index	Fatty coefficient	Alpha helix	Extended strand	Beta turn	Random coil
<i>RpMYB1</i>	Isoform0001686	720	78 633.76	6.07	-0.781	52.08	60.39	24.03%	5.42%	2.22%	68.33%
<i>RpMYB2</i>	Isoform0002152	720	78 556.62	6.12	-0.79	52.35	60.39	25.97%	6.25%	2.64%	65.14%
<i>RpMYB3</i>	Isoform0002173	658	74 424.35	8.34	-0.974	55.08	62.07	56.84%	5.47%	4.26%	33.43%
<i>RpMYB4</i>	Isoform0002641	659	74 547.59	8.34	-0.955	54.14	63.31	57.21%	5.46%	4.25%	33.08%
<i>RpMYB5</i>	Isoform0002840	720	78 575.66	6.12	-0.782	52.08	60.39	24.44%	7.22%	2.22%	66.11%
<i>RpMYB6</i>	Isoform0004774	635	69 756.57	5.17	-0.664	48.11	71.67	24.57%	11.34%	3.15%	60.94%
<i>RpMYB7</i>	Isoform0005245	614	68 171.04	8.92	-0.643	58.12	72.07	21.99%	12.38%	3.75%	61.89%
<i>RpMYB8</i>	Isoform0005378	690	75 187.64	8.34	-0.592	50.34	75.42	17.68%	12.61%	3.48%	66.23%
<i>RpMYB9</i>	Isoform0006986	640	72 243.68	6.29	-0.957	55.89	63.05	54.37%	5.62%	3.91%	36.09%
<i>RpMYB10</i>	Isoform0010223	670	75 137.03	8.69	-1.165	72.4	62.15	39.85%	8.21%	4.63%	47.31%
<i>RpMYB11</i>	Isoform0010351	514	55 678.65	6.07	-0.625	46.78	62.72	21.98%	6.23%	2.14%	69.65%
<i>RpMYB12</i>	Isoform0010794	608	68 280.64	9.51	-0.926	60.17	67.38	36.68%	4.11%	2.30%	56.91%
<i>RpMYB13</i>	Isoform0012565	470	53 946.03	6.23	-0.785	49.73	80.26	52.98%	2.34%	1.49%	43.19%
<i>RpMYB14</i>	Isoform0014170	432	46 499.83	5.58	-0.506	51.11	66.67	34.95%	5.09%	0.93%	59.03%
<i>RpMYB15</i>	Isoform0014609	514	55 610.57	6.13	-0.613	45.69	62.92	22.76%	6.23%	2.53%	68.48%
<i>RpMYB16</i>	Isoform0015432	405	44 703.66	8.45	-0.577	54.01	76.25	18.27%	11.60%	1.98%	68.15%
<i>RpMYB17</i>	Isoform0015860	374	41 792.19	9.44	-0.693	59.47	65.45	20.32%	12.83%	2.41%	64.44%
<i>RpMYB18</i>	Isoform0019461	402	44 436.33	8.45	-0.586	54.34	75.85	22.14%	10.20%	1.49%	66.17%
<i>RpMYB19</i>	Isoform0021823	402	44 463.36	8.45	-0.593	54.34	75.85	18.66%	11.69%	2.24%	67.41%
<i>RpMYB20</i>	Isoform0022646	293	31 216.49	6.41	-0.687	47.52	59.32	20.14%	12.29%	4.10%	63.48%
<i>RpMYB21</i>	Isoform0023114	399	44 513.38	9.53	-0.972	51.18	67.09	60.90%	1.75%	3.26%	34.09%
<i>RpMYB22</i>	Isoform0023982	370	40 697.27	5.9	-0.823	60.57	68.57	30.00%	5.68%	1.62%	62.70%
<i>RpMYB23</i>	Isoform0024607	427	46 837.45	9.44	-0.928	44.17	55.76	34.19%	4.22%	2.11%	59.48%
<i>RpMYB24</i>	Isoform0024646	375	40 075.85	6.7	-0.592	61.63	56.99	13.07%	9.87%	2.13%	74.93%
<i>RpMYB25</i>	Isoform0025237	370	40 628.16	5.77	-0.813	59.9	68.57	28.92%	6.76%	2.43%	61.89%
<i>RpMYB26</i>	Isoform0025261	353	38 441.88	7.14	-0.71	65.39	61.73	31.16%	7.37%	1.70%	59.77%
<i>RpMYB27</i>	Isoform0025338	307	33 080.65	6.01	-0.386	52.66	72.77	44.95%	7.49%	3.91%	43.65%
<i>RpMYB28</i>	Isoform0027902	306	33 609.99	8.3	-0.593	42.34	64.41	28.10%	6.86%	4.25%	60.78%
<i>RpMYB29</i>	Isoform0027961	333	34 781.7	8.71	-0.413	59.52	64.23	7.21%	17.12%	3.00%	72.67%
<i>RpMYB30</i>	Isoform0029831	348	39 259.05	7.36	-0.818	41.14	74.28	32.18%	9.48%	2.87%	55.46%
<i>RpMYB31</i>	Isoform0031429	309	34 015.51	8.9	-0.638	34.23	76.31	47.25%	8.41%	3.56%	40.78%
<i>RpMYB32</i>	Isoform0032110	303	32 954.93	8.78	-0.656	47.02	61.88	24.09%	7.92%	3.63%	64.36%
<i>RpMYB33</i>	Isoform0033061	290	31 756.23	6.16	-0.932	53.13	65.97	36.21%	5.52%	4.83%	53.45%
<i>RpMYB34</i>	Isoform0033819	274	30 662.11	8.79	-0.498	45.09	66.2	39.85%	8.21%	4.63%	47.31%
<i>RpMYB35</i>	Isoform0034193	355	38 644.09	7.14	-0.704	65.31	61.66	30.42%	5.07%	1.13%	63.38%
<i>RpMYB36</i>	Isoform0036039	305	33 516.15	9.09	-0.505	43.44	72.52	43.28%	8.85%	3.61%	44.26%
<i>RpMYB37</i>	Isoform0036743	310	345 36.43	8.61	-0.464	48.9	71.42	22.58%	8.06%	3.87%	65.48%
<i>RpMYB38</i>	Isoform0037363	301	33 028.59	9.09	-0.502	45.84	73.49	46.18%	7.64%	3.65%	42.52%
<i>RpMYB39</i>	Isoform0037744	289	31 634.73	9.42	-0.741	38.65	66.99	47.06%	7.61%	2.08%	43.25%
<i>RpMYB40</i>	Isoform0038308	293	31 243.52	6.41	-0.696	46.86	59.32	19.45%	12.29%	3.75%	64.51%
<i>RpMYB41</i>	Isoform0039688	303	32 998.98	8.78	-0.656	47.02	62.18	24.09%	7.92%	3.63%	64.36%
<i>RpMYB42</i>	Isoform0039877	283	31 021.6	8.5	-0.576	53.12	67.84	20.49%	12.01%	1.77%	65.72%
<i>RpMYB43</i>	Isoform0039969	282	30 351.76	9.04	-0.411	63.8	74.65	19.86%	14.54%	4.26%	61.35%
<i>RpMYB44</i>	Isoform0041222	266	28 533.8	7.94	-0.486	56.9	68.98	15.41%	15.41%	2.63%	66.54%
<i>RpMYB45</i>	Isoform0042536	331	34 629.55	8.71	-0.4	58.08	65.5	10.88%	12.99%	2.42%	73.72%
<i>RpMYB46</i>	Isoform0043169	275	30 598.69	7.55	-0.699	51.93	74.62	46.18%	5.45%	3.64%	44.73%
<i>RpMYB47</i>	Isoform0043290	260	28 148.4	9.39	-0.492	74.89	70.12	16.92%	21.54%	3.85%	57.69%
<i>RpMYB48</i>	Isoform0044981	269	28 623.89	6.4	-0.384	43.88	68.25	32.71%	8.18%	5.20%	53.90%
<i>RpMYB49</i>	Isoform0048867	260	28 134.38	9.39	-0.492	74.89	70.12	16.54%	16.15%	4.23%	63.08%

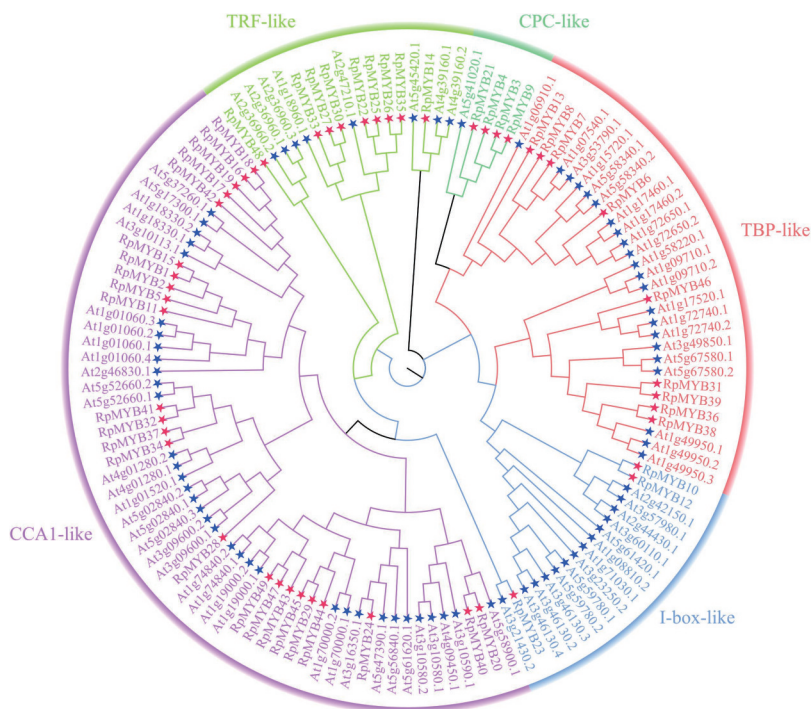
#### 4 不同组织表达量热图

将49个*RpMYBs*基因在掌叶大黄3个部位的差异表达数据进行层级聚类。图4结果表明,绝大部分基因的表达不恒定,在不同组织具有相对较高的表达量,叶、根和根茎表达量较高的基因数分别有23、15和25个。其中*RpMYB6/17/22/25/29/41/45/46*在根和根茎

中表达量均较高,呈现类似的表达模式。CCA1-like、TRF-like、CPC-like及I-box-like基因在掌叶大黄根、茎、叶中均表达;而TBP-like基因在根茎中高表达。

#### 5 *RpMYB24*的表达模式

以叶为参考样本,qPCR分析检测*RpMYB24*在掌叶大黄一年生植株根、根茎、叶中表达水平,结果显示,



**Figure 1** Evolutionary tree of *R. palmatum* and *Arabidopsis* R1-MYB members. CCA1: Circadian clock associated 1; I-box: GATAAG; CPC: CAPRICE; TRF: Telomere repeat binding factor; TBP: TATA binding protein



**Figure 2** Evolution tree (A), conserved motifs (B) and conserved motif signatures (C) of R1-MYB in *R. palmatum*

*RpMYB24* 在根、根茎中的表达量分别为叶中的 7.81、4.36 倍, 根及根茎中表达量显著高于叶中。

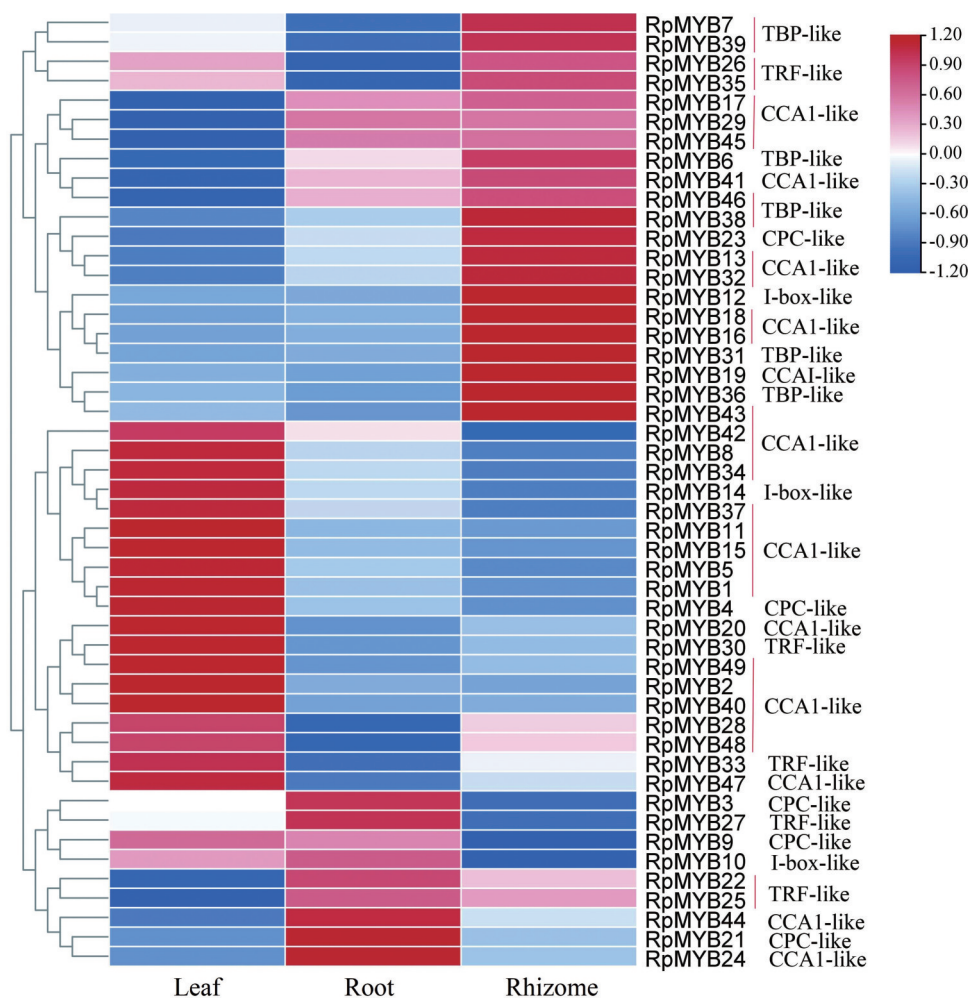
*RpMYB24* 响应外源激素处理不同时间点的表达见图 5A。以 0 h (control check, CK) 为空白对照, Mock 在处理 3 h 内迅速下调后缓慢恢复; 与之相反的是,

MeJA 和 ABA 处理分别持续上调至峰值为 CK 的 1.74 (3 h)、2.63 (1 h) 倍后逐渐下调; SA 处理在 24 h 内缓慢促进表达, 在 6 h 上调明显。

图 5B 为 *RpMYB24* 应答非生物胁迫处理不同时间点的表达分析, 以 0 h (CK) 为对照, 发现对比 Mock, 干



**Figure 3** DNA binding domain of R1-MYB proteins in *R. palmatum*. The horizontal coordinate indicates the conserved amino acid position (aa) and the height of the amino acid character indicates the size of the percentage at the site



**Figure 4** Expression heat map of R1-MYB genes in different tissues of *R. palmatum*

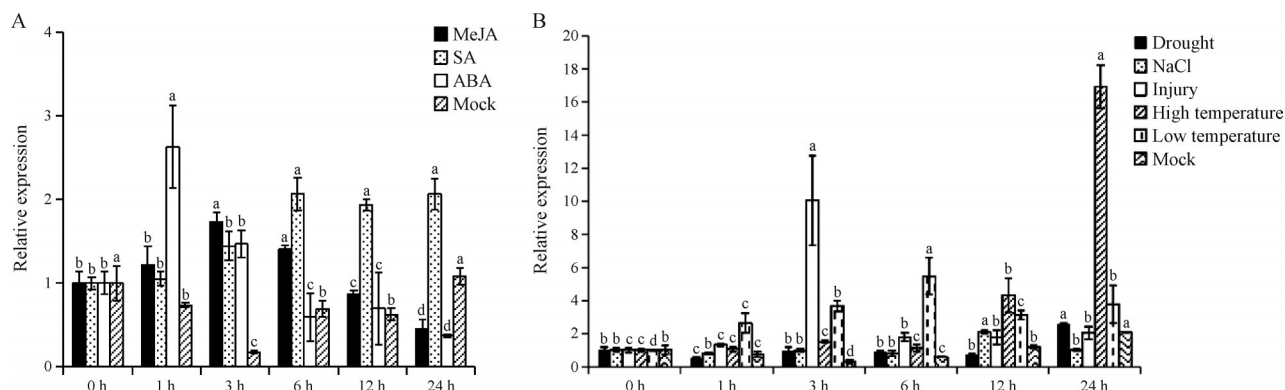
早组中的表达变化不显著; 受损伤、低温、高温胁迫表达变化显著, 分别在 3、6、24 h 达峰值, 为 CK 的 10.01、5.46、16.88 倍; 盐胁迫 12 h 显著上调, 后下调。

### 6 RpMYB24 蛋白的分子进化分析

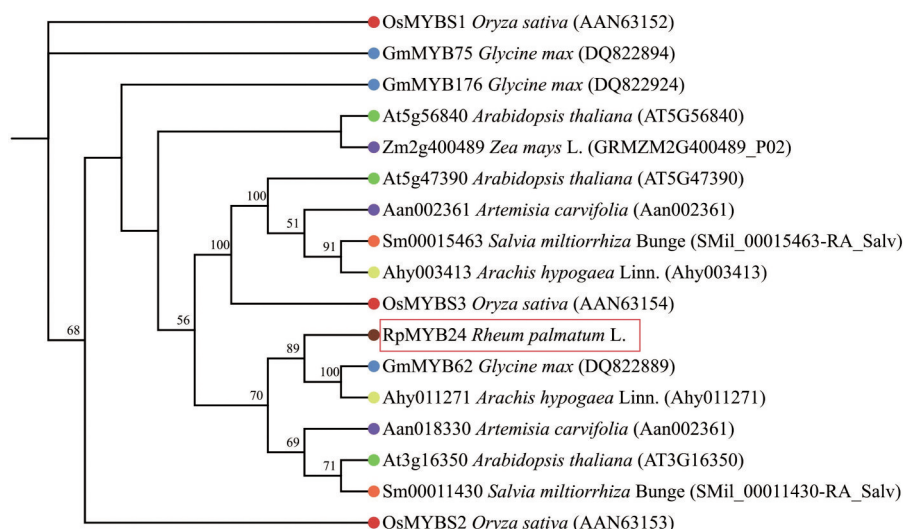
从 NCBI 和 PlantTFDB 数据库下载拟南芥、丹参、水稻、玉米、大豆、青蒿、花生等 7 种植物 R1-MYB 蛋白家族成员, 采用 MEGA 7 邻接法分析 *RpMYB24* 基因编码蛋白的分子进化关系。图 6 结果显示, *RpMYB24* 与大豆 *GmMYB62*、花生 *Ahy011271* 关系最近。

### 讨论

R1-MYB 基因家族在大多数物种中已有鉴定, 不仅在维持染色体结构的完整性方面发挥作用, 还参与生长发育、激素应答、环境胁迫等众多生命活动过程<sup>[9]</sup>。被子植物中存在大量 R1-MYB 基因, 藻类等低等植物中相对较少<sup>[11]</sup>。本研究基于全长转录组测序技术挖掘到 92 个 R1-MYB isoforms, 通过 ORF Finder 结合 BlastX 分析筛选出具有完整 ORF 的全长基因, 人工手动去除重复的 isoforms, 最终确定 49 个 R1-MYB 基因。相较于水稻<sup>[24]</sup>、红花<sup>[25]</sup>、川白芷<sup>[26]</sup>基因组的 70、



**Figure 5** Expression pattern of *RpMYB24* in response to hormones (A) and stress treatments (B). MeJA: Methyl jasmonate; SA: Salicylic acid; ABA: Abscisic acid; Mock groups in A and B are the corresponding hormone and stress treatment mock groups, respectively. Different lowercase letters (a, b, c, d) above the columns represent statistically significant ( $P < 0.05$ ) differences among different hormones and different stresses



**Figure 6** Phylogenetic tree of *RpMYB24* with R1-MYBs from other plants

128、122 个基因, 掌叶大黄的 R1-MYB 基因数量较少, 这是由于物种在进化过程中, 基因不断复制与分化, 外加环境适应, 进而导致不同物种间基因数量的差异。随着后续大黄基因组测序研究的推进, 可能会补充本研究鉴定的 R1-MYB, 结合基因共线性、染色体定位等分析, 系统阐明掌叶大黄 R1-MYB 基因分子特征。

系统进化分析显示, 掌叶大黄 R1-MYB 家族成员在 5 个亚组中均有不均匀分布, 且 CCA1-like 亚组中数量最多。研究表明, CCA1-like 蛋白参与植物的昼夜节律调节<sup>[27]</sup>, 如 *CCA1/LHY* 参与拟南芥早期的光形态建成、光周期节律的维持、调控和光周期开花<sup>[28]</sup>。*RpMYB1/2/5/11/15* 与拟南芥 *AT1G01060.1/LHY* 高度同源, 且包含的保守元件数量最多, 说明 *RpMYB1/2/5/11/15* 可能在大黄光周期节律的诱导和保持机制中起重要作用。该亚家族成员的二级结构也有明显的特点,

主要有  $\alpha$ -螺旋、无规卷曲。相对于 TBP-like 亚家族庞大的数量, 目前只有少数基因进行了功能验证。其中, *Smh1*<sup>[29]</sup> 可参与编码末端结合转录因子, 调控端粒酶活性; *PcMYB1*<sup>[30]</sup> 在体内与光调节启动子单元 (LRU1) 相互作用, 调控植物生长发育。本研究揭示了 24 个 CCA1-like 基因, 9 个 TBP-like 基因, 亚家族成员之间蛋白二级结构预测结果十分相似, 但序列间同源性相对较低, 说明这些亚组成员可能在掌叶大黄生长发育方面发挥广泛的生物功能。

掌叶大黄 R1-MYB 家族成员蛋白二级结构具有 HTH 结构, 符合 MYB 蛋白的结构特点<sup>[31]</sup>, 从结构上证实预测结果属于 MYB 转录因子蛋白。川白芷 R1-MYB 家族基因中存在多个保守结构域, 其中 Motif6 和 Motif9 保守性较高, Motif2 出现频率最高<sup>[27]</sup>。马铃薯 R1-MYB 中含有 Motif1~Motif20, Motif1 和

Motif2 出现频次最高<sup>[32]</sup>。掌叶大黄 R1-MYB 转录因子蛋白序列含有 Motif1~Motif20, Motif2 出现频次最高。三者有一定区别, Motif2 均出现频率高且稳定, 同一亚组基因含有相似基序, 但所含 Motif 数量与分布不同的特点, 表明 R1-MYB 类转录因子的空间位置保守性相对较低。保守序列中 3 个均匀分布的氨基酸 (W) 残基存在被替换的情况, 但第 1 个 W 高度保守, 且存在其他保守的氨基酸残基, 推测可能对维持其 HTH 结构具有重要意义。

R1-MYB 基因家族成员通常具有组织表达特异性, 这与其所调控的生命活动有关。本研究组织表达热图揭示 CCA1-like、TRF-like 及 I-box-like 基因在掌叶大黄根、根茎、叶中均表达; 有趣的是, I-box-like 类基因在叶片组织中有较高的表达量, 说明该类基因虽然缺少 C 端转录激活区, 但具有广泛的表达谱<sup>[11]</sup>, 推测其参与调控掌叶大黄的发育和相关生理代谢过程, 如番茄 I-box-like 基因 *Lefsm1*, 可特异调控早期果实发育<sup>[33]</sup>。选择一个在根中高表达的 R1-MYB 基因, *RpMYB24* 组织表达量热图与 qPCR 结果一致, 其表达量次序为根 > 根茎 > 叶, 说明其主要在掌叶大黄地下部分发挥作用。

内源激素在调节植物体生理生化反应中起重要信号转导的作用, 而植物 MYB 基因表达也与激素密切相关<sup>[9]</sup>。如 ABA 和干旱处理下大豆 *GmMYB174* 基因的表达量下调, 盐胁迫下表达量上调<sup>[34]</sup>。黑果枸杞 *LrMYB1R1* 在不同时间 NaCl (250 mmol·L<sup>-1</sup>) 胁迫条件下差异表达, 可能参与黑果枸杞盐胁迫的响应<sup>[35]</sup>。本研究发现 *RpMYB24* 基因受 ABA、SA 和 MeJA 处理显著诱导, 损伤、低温、高温胁迫均显著提高 *RpMYB24* 表达水平, 说明 *RpMYB24* 可能在掌叶大黄应对干旱、盐胁迫、微生物胁迫等生理过程起作用, 但其具体作用机制有待深入研究。*RpMYB24* 系统进化分析表明 *RpMYB24* 与 *GmMYB62* 亲缘关系最近, 研究发现, *GmMYB62* 与 *GmMYB176* 相互作用可调节大豆 *CHS8* 基因的表达和异黄酮的生物合成<sup>[36]</sup>, 推测 *RpMYB24* 可能作用于苯丙烷类生物代谢途径。同时 *RpMYB24* 与 *OsMYB3* 也聚在一大支, 而 *OsMYB3* 参与低温应激反应, 结合本研究中发现该基因受低温调控的结果, 推测其功能可能与低温应答有关<sup>[37]</sup>。

目前对 MYB 转录因子的研究主要集中于 R2R3-MYB, 对 R1-MYB 的研究还相对较少, 本研究主要鉴定了 49 个掌叶大黄 R1-MYB 转录因子家族成员, 通过生物信息学对其蛋白理化特性与结构特征进行初步分析, 实时荧光定量表达分析的方法对 *RpMYB24* 进行鉴定与表达分析, 为探究掌叶大黄生长发育、代谢过程及

非生物胁迫的调控机制提供参考依据, 同时丰富了 R1-MYB 类转录因子的研究, 为后期的基因功能研究奠定了基础。

**作者贡献:** 赵霞和李元敏是本研究的执行人; 程文萍参与数据整理及论文初稿的写作; 肖光辉、张明英、高静和彭亮参与实验设计和实验结果分析; 张岗和李依民是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 23.
- [2] Chen YY, Tang YP, Chen JQ, et al. Research progress and utilization strategy on resource chemistry of Rhei Radix et Rhizoma [J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中草药), 2018, 49: 5170-5178.
- [3] Li H, Zhang N, Li YM, et al. High-throughput transcriptomic sequencing of *Rheum palmatum* L. seedlings and elucidation of genes in anthraquinone biosynthesis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1908-1917.
- [4] Fabiola MV, Mao XY, Clint C. Linking phenylpropanoid metabolism, lignin deposition, and plant growth inhibition [J]. Curr Opin Biotechnol, 2019, 56: 202-208.
- [5] Perassolo M, Quevedo C, Busto V, et al. Enhance of anthraquinone production by effect of praline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia linctorum* suspension cultures [J]. Enzyme Microb Technol, 2007, 41: 181-185.
- [6] Liu JY, Osbourn A, Ma PD. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. Mol Plant, 2015, 8: 689-708.
- [7] Huang LQ, Guo LP. Accumulation of secondary metabolites under environmental stress and the formation of Daoist medicinal herbs [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 277-280.
- [8] Guo LP, Zhou LY, Kang CZ, et al. Strategies for medicinal plants adapting environmental stress and "simulative habitat cultivation" of Dao-di herbs [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 1969-1974.
- [9] Qiu WY, Wang SY, Li XF, et al. Functions of plant MYB transcription factors in response to abiotic stress and plant hormones [J]. Acta Agric Zhejiangensis (浙江农业学报), 2020, 32: 1317-1328.
- [10] Rosinski JA, Atchley WR. Molecular evolution of the MYB family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin [J]. Mol Evol, 1998, 46: 74-83.
- [11] Lin WK, Bolitho K, Grafton K, et al. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 50.
- [12] Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, et al. MYB transcription

- factor genes as regulators for plant responses: an overview [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2013, 19: 307-321.
- [13] Baranowskij N, Frohberg C, Prat S, et al. A novel DNA binding protein with homology to MYB oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator [J]. *EMBO J*, 1994, 13: 5383-5392.
- [14] Chen YH, Yang XY, He K, et al. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 107-124.
- [15] Shi Y, Man JH, Jiang WY, et al. Cloning and subcellular location of the *PnMYB1R1* gene from *Panax notoginseng* and expression analysis with different stresses [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1506-1515.
- [16] Li XY, Yang ZY, Ji W, et al. Excavation and comparative analysis of MYB families based on different colours of *hawthorn* flowers [J]. *Acta Agric Nucl Sin (核农学报)*, 2021, 35: 49-59.
- [17] Du H, Wang YB, Xie Y, et al. Genome-wide identification and evolutionary and expression analyses of MYB-related genes in land plants [J]. *DNA Res*, 2013, 20: 437-448.
- [18] Mitsutomo A, Hidetaka K, Ayako WT, et al. FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of FLOWERING LOCUS T and FLOWERING LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1 [J]. *Plant J*, 2015, 83: 1059-1068.
- [19] Xiong HY, Li JJ, Liu PL, et al. Overexpression of *OsMYB48-1*, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e92913.
- [20] Zhao PC, Hou SL, Guo XF, et al. A MYB-related transcription factor from sheep grass, *LcMYB2*, promotes seed germination and root growth under drought stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 564.
- [21] Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, et al. WebLogo: a sequence logo generator [J]. *Genome Res*, 2004, 14: 1188-1190.
- [22] Sun ML, Wang YS, Yang DQ, et al. Selection of internal reference genes in real-time fluorescence quantitative PCR analysis of tea tree [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2010, 45: 579-587.
- [23] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-C^T}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [24] Zhu QH, Ramm K, Shivakkumar R, et al. The *ANTHER INDHISCENCE1* gene encoding a single MYB domain protein is involved in anther development in rice [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1514-1525.
- [25] Hong YQ, Ahmad N, Zhang JY, et al. Genome-wide analysis and transcriptional reprogrammings of MYB superfamily revealed positive insights into abiotic stress responses and anthocyanin accumulation in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Mol Genet Genomics*, 2022, 297: 125-145.
- [26] Yao F, Jiang MY, Yang YS, et al. Bioinformatics and expression analysis on MYB related family in *Angelica dahurica* var. *formosana* [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2022, 47: 1831-1846.
- [27] Nguyen NH, Lee H. MYB-related transcription factors function as regulators of the circadian clock and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2016, 11: e1139278.
- [28] Shi Y, Guo S, Dong SF, et al. Research advances in circadian rhythm regulation genes *CCA1/LHY* in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant Breeding (分子植物育种)*, 2020, 18: 7080-7087.
- [29] Marian CO, Bordoil SJ, Goltz M, et al. The maize Single myb histone 1 gene, *Smh1*, belongs to a novel gene family and encodes a protein that binds telomere DNA repeats *in vitro* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1336-1350.
- [30] Feldbrugge M, Sprenger M, Hahlbrock K, et al. *PcMYB1*, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts *in vivo* with a light-regulatory promoter unit [J]. *Plant J*, 1997, 11: 1079-1093.
- [31] Liu XT, Fan BB, Zhang XT, et al. Sequence analysis of MYB transcription factor genes in *Solanum tuberosum* [J]. *Mol Plant Breeding (分子植物育种)*, 2019, 17: 6596-6603.
- [32] Liu YH, Zeng YT, Li YM, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the MYB-related transcription factor superfamily in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 2450-2464.
- [33] Rivka B, Irina S, Tail E, et al. The tomato early fruit specific gene *Lefsm1* defines a novel class of plant-specific SANT/MYB domain proteins [J]. *Planta*, 2005, 221: 197-211.
- [34] Wang F, Chen HW, Li QT, et al. *GmWRKY27* interacts with *GmMYB174* to reduce expression of *GmNAC29* for stress tolerance in soybean plants [J]. *Plant J*, 2015, 83: 224-236.
- [35] Wang CP, Chen JW, Yan L, et al. Cloning and expression analysis of R1-MYB transcription factor in *Lycium ruthenicum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2018, 49: 203-210.
- [36] Li XY, Dhaubhadel S. 14-3-3 proteins act as scaffolds for *GmMYB62* and *GmMYB176* and regulate their intracellular localization in *soybean* [J]. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 965-968.
- [37] Su CF, Wang YC, Hsieh TH, et al. A novel *MYBS3*-dependent pathway confers cold tolerance in rice [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153: 145-158.