

掌叶大黄转录因子 *RpMYB4* 基因克隆及分子表达特性

李元敏¹, 张娜^{1,2}, 李慧¹, 张明英¹, 彭亮¹, 颜永刚¹, 李依民^{1*}, 张岗^{1*}

(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. 陕西省天芪生物科技有限责任公司, 陕西 榆林 718400)

摘要: MYB 转录因子在植物生长发育、次生代谢及逆境胁迫等过程中发挥重要的转录调控作用。本实验在掌叶大黄转录组数据库中筛选一个包含完整开放阅读框 (ORF) 的 MYB 家族成员序列, 首次克隆获得 *RpMYB4* 基因 ORF, 编码一条 245 个氨基酸的多肽, 分子质量为 26.99 kDa, N 端含有 R2R3-MYB 亚家族典型的 2 个 DNA 保守结合域 (HTH-MYB), 无信号肽或跨膜域, 与其他植物物种 MYB 转录因子多序列比对均高达 61% 以上, 系统进化分析显示与 FtMYB8 关系最近, 共同聚在 S4 亚家族。亚细胞定位结果显示 *RpMYB4*-GFP 定位在烟草细胞核内。实时荧光定量分析表明 *RpMYB4* 的组织表达有差异, 叶中表达量最高, 依次为叶柄、根茎、根及种子; 受 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理, *RpMYB4* 表达在 24 h 内持续下调, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸 (SA) 处理在 12 和 24 h 显著上调, 该基因对 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸 (ABA) 处理未见明显变化; *RpMYB4* 基因受干旱、高温及损伤胁迫诱导, 分别在 24、24、3 h 处达峰值, 低温胁迫抑制其表达, 6 h 呈谷值, 其对盐胁迫响应不显著。首次获得掌叶大黄 *RpMYB4* 基因, 在叶片和叶柄中表达量高, 受激素 SA 与干旱、高温及损伤胁迫等诱导表达, 为后续研究其在大黄次生代谢及逆境胁迫中的分子作用奠定基础。

关键词: 掌叶大黄; 转录因子; MYB; 基因表达; 胁迫

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)04-1170-08

Cloning and expression characteristics of a transcription factor gene *RpMYB4* in *Rheum palmatum* L.

LI Yuan-min¹, ZHANG Na^{1,2}, LI Hui¹, ZHANG Ming-ying¹, PENG Liang¹,
YAN Yong-gang¹, LI Yi-min^{1*}, ZHANG Gang^{1*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine of Pharmacy/Shaanxi Qinling Chinese Herbal Medicine Application Development Engineering Technology Research Center, Xi'an 712046, China; 2. Shaanxi Tianqi Biotechnology Limited Liability Company, Yulin 718400, China)

Abstract: MYB transcription factors play many important regulatory roles in plant growth and development, secondary metabolism, and stress adaptation processes. In this work, an MYB gene containing a complete open reading frame (ORF) was selected from the transcriptome database of *R. palmatum* L. *RpMYB4* ORF and cloned, encoding a polypeptide of 245 amino acids with a molecular weight of 26.99 kDa. *RpMYB4* lacks a signal peptide or transmembrane domain but contains two conserved DNA binding domains (HTH-MYB) of the R2R3-MYB subfamily at the N-terminus. Multiple-sequence alignment demonstrated that *RpMYB4* shared as high as 61% identity with many MYB proteins from other species. Phylogenetic analysis showed that *RpMYB4* had the closest relationship with FtMYB8 and was clustered in the S4 subfamily. Subcellular localization by confocal microscopy

收稿日期: 2020-10-26; 修回日期: 2020-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973430); 陕西中医药大学校级课题 (2020PG29); 陕西中医药大学思邈青年学者项目; 陕西中医药大学新进博士科研启动经费 (104080001); 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).

*通讯作者 E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com; 2051058@sntcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1654

showed that an *RpMYB4*-GFP-fusion protein localized to the nucleus in tobacco. Real-time fluorescence quantitative PCR analyses revealed that *RpMYB4* was differentially expressed in various tissues, with the highest expression in leaves, followed by petioles, rhizome, and roots, and with the lowest level in mature seeds. After treatment of *R. palmatum* L. seedlings with $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA, the expression of *RpMYB4* in leaves was down-regulated within 24 h, and significantly up-regulated after $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA treatment at 12 h and 24 h. However, gene expression did not change with $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA treatment. The transcripts of *RpMYB4* under drought, high temperature, and mechanical injury stresses reached a peak at 24 h, 24 h, and at 3 h, respectively, while *RpMYB4* expression was inhibited by low temperature stress, reaching its lowest value at 6 h. The gene showed no significant response to salt stress. Overall, *RpMYB4* was cloned from *R. palmatum* L. for the first time, showed high expression in leaves, and was responsive to SA and various abiotic stress treatments including drought, high temperature, and mechanical injury. The results will be useful for further analysis of secondary metabolism and stress adaptations in *R. palmatum* L.

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

植物在长期的进化过程中形成了一系列复杂的细胞信号转导及调控网络以适应不断变化的环境, 转录因子在其中起重要的调控作用^[1]。植物中转录因子有58个家族, MYB转录因子家族是成员众多且功能多样的一大类, 其DNA结合结构域通常包含1~4个不完全重复域, 该结构域由两部分构成, 前者由51~52个高度保守的氨基酸残基组成, 后者包含18~19个氨基酸, 它们共同构成螺旋-转角-螺旋结构 (helix-turn-helix, HTH)^[2]; 根据HTH结构域的数目, MYB一般分为1R-MYB、R2R3-MYB、R1R2R3-MYB和4R-MYB四大类^[3]。植物R2R3-MYB家族成员序列高度保守, 报道较为普遍, 拟南芥已鉴定有126个R2R3-MYB^[4], 丹参有110个^[5], 铁皮石斛有136个^[6], 广泛参与植物形态建成、次生代谢调控及对生物和非生物胁迫逆境适应。拟南芥 *AtMYB32* 和 *AtMYB4* 可通过调控苯丙烷代谢途径来影响花粉发育, 从而影响花粉壁的组成^[7]。甘草 *GIMYB4* 和 *GIMYB88* 受茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导以正向调节类黄酮的合成^[8]。人参 *PgMYB1* 受脱落酸 (ABA)、水杨酸 (SA)、盐和冷胁迫诱导表达, MeJA 处理则抑制其表达^[9]。

大黄作为我国常用大宗药材, 药理药效作用明确, 临床应用广泛。掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 系大黄三基原之一, 以干燥根及根茎入药, 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^[10]。现代药理研究表明, 大黄有调节胃肠功能、心脑血管保护、抗肿瘤及免疫调节等活性^[11]。大黄耐寒, 喜光照, 常生长于向阳山地林边草地、山地灌丛、草甸之间, 分布海拔在2 500~4 400 m, 野生资源相对较少^[11]。目前, 大黄主要栽培于甘肃、青海、陕西等高海拔适生区, 这种特殊的生态环境对其次生代谢物合成与积累乃至药材品质形成至关重要。为解析大黄蒽醌类有效成分的合成途径及调控机制, 课题组前期对一年生掌叶大黄

根、根茎和叶片进行比较转录组测序 (SRR10855670), 挖掘大量与大黄生长发育、次生代谢及逆境胁迫等生物学过程密切相关的基因。本研究从中鉴定到一个R2R3-MYB家族成员基因Cluster-7329.53230 (1 395 bp), 包含完整ORF (738 bp), 与植物R2R3-MYB家族成员序列相似性较高 (>61%); 比较转录组测序分析其转录本在大黄根、根茎、叶片中差异积累, 鉴于R2R3-MYB家族在植物次生代谢调控的重要功能, 初步推测该基因可能参与掌叶大黄蒽醌类物质次生代谢。本研究进行该基因RT-PCR克隆、生物信息学分析, 同时进行该基因的组织、激素 (MeJA、SA、ABA) 及非生物 (干旱、盐、高温、低温、损伤) 胁迫处理表达分析, 为下一步研究其分子功能提供依据。

材料与方法

材料 2019年10月在甘肃省陇南市宕昌县阿坞乡麻界村 (东经104°10'4.98", 北纬34°16'50.9", 海拔2 377 m) 分别采集掌叶大黄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为掌叶大黄 *R. palmatum* L.。在实验室取大黄根、根茎、叶、叶柄4个部位及种子样品置液氮速冻后放入-80 °C冰箱保存备用。

参考Hei等^[12]建立的方法培养大黄无菌实生苗。选取生命旺盛、长势均匀的一个月龄幼苗, 分别喷施 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MeJA、SA、ABA激素作为处理组, 以不含激素的溶剂模拟喷施作为对照; 同时, 对无菌苗进行干旱 (10% PEG 6000)、盐 ($100 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)、高温 (40 °C)、低温 (4 °C)、机械损伤 (针刺叶片) 等非生物胁迫处理, 以无菌水处理为对照组, 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取处理和对照组样品, 液氮速冻后置-80 °C冰箱保存备用。

本氏烟 *Nicotiana benthamiana* Domin 由本实验室保存。

总 RNA 提取及 cDNA 合成 使用植物 RNA 提取试剂盒 RN38 (艾德莱, 北京) 提取掌叶大黄各样品的总 RNA, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 用 K5800 自动检测超微量分光光度计 (凯奥, 中国) 检测 RNA 浓度和纯度; 使用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒 (TaKaRa, 中国) 合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。所有操作均按试剂盒说明书进行。

基因克隆 掌叶大黄 MYB 基因 Cluster-7329.53230 ORF 738 bp, 利用 Primer Premier 5.0 设计跨 ORF 引物: RpMYB4-ORF-F 5'-ATGAGAAAGCCGTGCTGCG-3', RpMYB4-ORF-R 5'-TCATGTAAAGAGGACAAGAGTACTAGGG-3'。PCR 体系为 25 μL: 2×*Es Taq* Master-Mix 12.5 μL、Forward Primer 1 μL、Reverse Primer 1 μL、Template DNA 1 μL、ddH₂O 9.5 μL; PCR 扩增条件: 预变性 95 °C 5 min、变性 95 °C 30 s, 退火 60 °C 30 s, 40 个循环, 延伸 72 °C 2 min、彻底延伸 72 °C 5 min, 4 °C 保温。将获得的 PCR 特异性片段经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 胶回收试剂盒 (TianGen, 中国) 纯化回收, 连入 pUC19 载体 (TaKaRa, 中国), 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 随机选取 3 个带有目的产物的阳性克隆质粒, 送由上海生工完成测序。

生物信息学分析 使用在线工具分析基因核酸及蛋白序列分析, 在 NCBI BLASTx (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) 分析 cDNA; ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 一系列工具分析基因编码蛋白质的结构域和基元, InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/iprscan5-R20191011-031954-0959-15799854-p2m/>) 与 PROSITE (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/PSScan.cgi>) 分析蛋白的保守结构域与基元 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) 和 Compute pI/MW (https://web.expasy.org/compute_pi/) 分析蛋白质理化性质和二级结构, SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) 和 TMHMM 预测信号肽和跨膜区域, Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 和 WolfPSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位; 借助 MegAlign6.0 进行多序列比对, 利用 MEGA 6.0 构建系统进化树。

亚细胞定位 为验证 RpMYB4 的亚细胞定位, 在 RpMYB4 ORF 扩增引物两端分别加入 NcoI 和 SpeI 酶切位点: RpMYB4_{orf}-GFP-F: 5'-CCATGGATGAGAAA GCCGTGCTGCGA-3', RpMYB4_{orf}-GFP-R: 5'-ACTAG

TTGTAAAGAGGACAAGAGTAC-3', 克隆后连接至 pCAMBIA1302 构建重组载体, CaCl₂ 法转入农杆菌感受态细胞 EHA105 (唯地, 上海), 倒置培养 2 天, 挑取阳性克隆接种到含有抗生素的 5 mL LB 培养基中, 28 °C, 200 r·min⁻¹ 培养至菌液浑浊后, 用 5 mL 农杆菌缓冲液洗涤 3 次, 稀释至菌体浓度 (*A*₆₀₀) 为 200 时, 避光静置 2 h。选择长有 8 叶左右的本氏烟的第 2~4 叶, 快速撕取内表皮, 平铺于 MS 固体培养基, 25 °C 下暗培养 36 h。农杆菌注射法将质粒 pCAMBIA1302-GFP、pCAMBIA1302-RpMYB4-GFP 转化到内表皮, 25 °C 共培养 36 h 后, 用 10 μg·mL⁻¹ 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 20 min, 再用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 制片, 用 Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜 (Olympus, 日本) 观察。

基因表达模式 利用实时荧光定量 PCR 分析 RpMYB4 在一年生掌叶大黄不同组织部位、激素和非生物胁迫处理下的表达特征。以 β-actin 为内参基因^[13], qPCR 引物序列为: RpMYB4-qPCR-F 5'-ATCACATCC AACCTCGTCAC-3', RpMYB4-qPCR-R 5'-TGTCCG ATGCCGTAGTAAGC-3', 扩增产物长度 188 bp。使用 TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 中国) 进行 qPCR。20 μL 反应体系: 2×TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) 10 μL、Forward/Reverse Primer 各 0.8 μL、cDNA 模板 2 μL、50×ROX Reference Dye 0.4 μL、ddH₂O 7 μL。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, 融解曲线 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。同时绘制融解曲线, 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, 利用 StepOnePlus® Real-Time (Applied Biosystems, 美国) 进行 qPCR 检测, 使用 2^{-ΔΔCt} 法^[14] 计算相对表达量。

结果与分析

1 基因克隆分析

以掌叶大黄无菌苗的 cDNA 为模板, 利用 RpMYB4-ORF-F/R 进行 RT-PCR。扩增产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得清晰明亮的单条带 (图 1)。目标条带经克隆测序获得 738 bp 的序列, 与原 Cluster-7329.53230 ORF 一致, BLASTx 比对发现其与苦荞麦 *FtMYB4* (GenBank 登录号 KR072701) 相似性高达 74.69%, 命名为 RpMYB4 (MW269546)。

2 蛋白理化特性、结构域分析

Compute pI/MW 预测 RpMYB4 基因编码蛋白的分子式为 C₁₁₇₀H₁₈₈₃N₃₅₅O₃₅₇S₁₁, 分子质量为 26.99 kDa, 等电点为 8.71, RpMYB4 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 34,

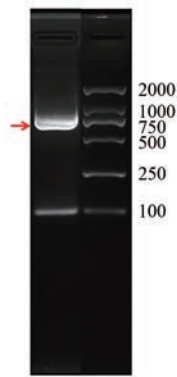


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the amplified *RpMYB4* ORF fragment

负电荷残基 (Asp+Glu) 30。该蛋白不稳定系数为 43.4, 脂肪系数为 77.18, 亲水性系数为 -0.641。SOPMA 分析表明, *RpMYB4* 二级结构主要由 α 螺旋 (alpha helix, 25.71%)、随机卷曲 (random coil, 55.10%)、延伸链 (extended strand, 13.88%) 和少量的 β 转角 (beta turn, 5.31%) 组成。

利用 InterProScan 与 PROSITE 分析预测一致, *RpMYB4* 包含两个典型的 MYB 结构域, 分别含有 52 个和 54 个氨基酸 (图 2), PROSITE SCAN 分析表明该蛋白中包含 1 个 *N*-糖基化位点 (146~149)、1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (52~54)、4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (18~21、100~103、150~153、174~177)、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (99~107)、8 个 *N*-豆蔻酰化位点 (11~16、35~40、45~50、86~91、120~125、162~

167、167~172、228~233)、1 个酰胺化位点 (206~209) 和 1 个 ATP/GTP 结合位点基序 A (P 环) (45~52)。使用 SignalP 4.1 和 TMHMM 在线分析一致表明该蛋白无信号肽或跨膜域, 同时 Plant-mPLOC 和 WolfPSORT 一致预测 *RpMYB4* 定位在细胞核。

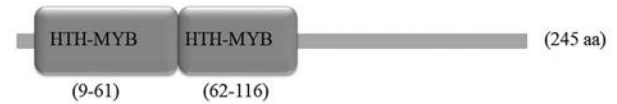


Figure 2 PROSITE analysis of the deduced *RpMYB4* protein

3 蛋白多序列比对和进化分析

借助 DNASTar6.0 软件中的 MegAlign 对目的蛋白和其他 MYB 家族植物蛋白进行多序列比对。图 3 分析显示, *RpMYB4* 蛋白序列中包含两个 MYB 基序, 属于典型的植物 R2R3 亚家族 MYB 转录因子, 与苦荞 *Fagopyrum tataricum* (AKV16373)、大豆 *Glycine soja* (KHN20933)、豇豆 *Vigna unguiculata* (XP_027939617)、桉树 *Eucalyptus grandis* (XP_010044170)、木薯 *Manihot esculenta* (XP_021601304)、杨梅 *Morella rubra* (KAB1211278)、李 *Prunus persica* (XP_007215900)、核桃 *Juglans regia* (XP_018816947)、石榴 *Punica granatum* (XP_031394004) 等蛋白的相似性较高, 分别为 74.69%、67.5%、66.83%、66.67%、66.5%、64.34%、64.16%、63.52%、61.02%。

从 NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 和 phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)

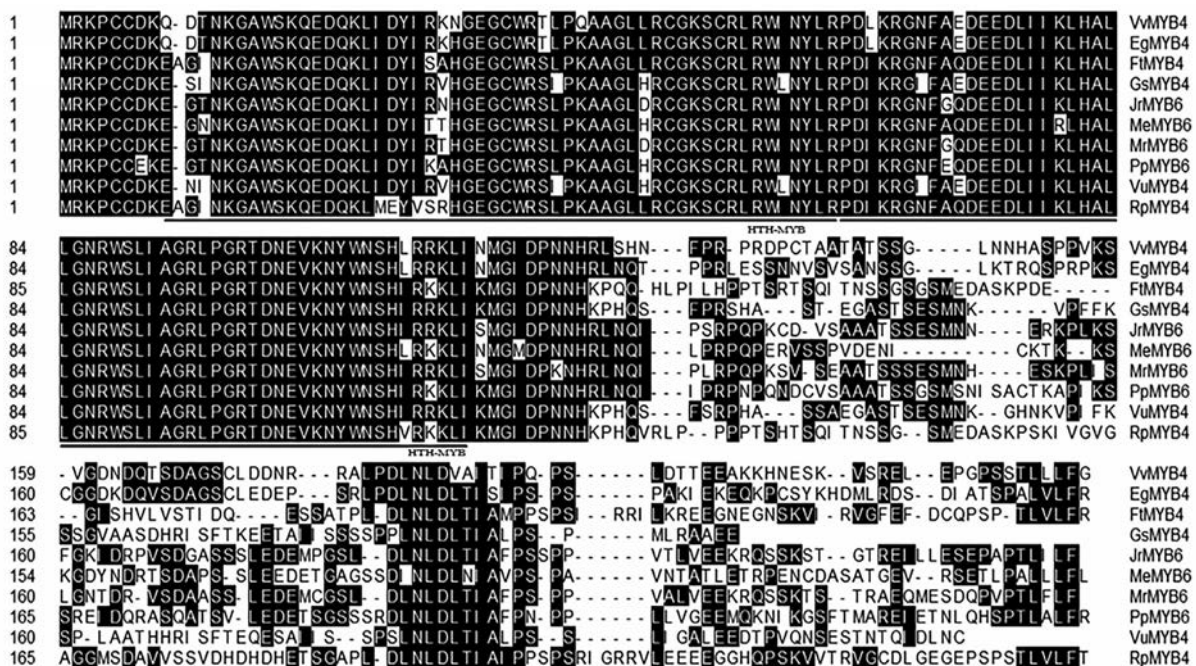


Figure 3 Multiple sequence alignments of *RpMYB4* with MYB proteins from other plants

pz/portal.html) 数据库中下载拟南芥、苦荞麦、丹参、人参和桃等植物 R2R3-MYB 蛋白家族成员, 采用 MEGA 6.0 软件邻接法 (Neighbour-Joining) 分析 RpMYB4 基因编码蛋白的分子进化关系。图 4 结果显示所选取的 24 个基因被划分在 R2R3-MYB 的 S4 和 S6 亚家族, RpMYB4 与苦荞麦 FtMYB8 关系最近, 被聚在 S4 亚家族。

4 亚细胞定位分析

用激光共聚焦显微镜观察 PCR 检测阳性的本氏烟叶片表皮细胞。图 5 结果表明, 细胞核和细胞质均出现空载对照的绿色荧光; RpMYB4-GFP 融合蛋白的绿色荧光在细胞核可以被观察到, 且绿色荧光信号十分明亮。

5 RpMYB4 的组织表达特异性

分别提取掌叶大黄根、根茎、叶、叶柄、种子各样品总 RNA, 利用 qPCR 检测不同组织部位中的基因表达。从图 6 可以看出, RpMYB4 基因在大黄 5 种组织中的相对表达量差异显著, 基因转录本在叶、叶柄中丰度最高, 分别为根中的 16.84、15.58 倍, 根茎中相对表达量为根中的 4.03 倍, 而在种子中的表达量最低, 仅为根中的 0.05 倍。

6 RpMYB4 应答外源激素的表达模式

对掌叶大黄无菌苗喷施外源激素 MeJA、SA、ABA, 以 0 h (CK) 为对照, qPCR 分别检测处理后 1、3、6、12、24 h 后 RpMYB4 的相对表达量 (图 7), Mock 在处理 1 h 内迅速下调至 CK 的 0.3 倍后缓慢恢复, MeJA 应答 RpMYB4 表达持续下调至 24 h 为 CK 的 0.43 倍, SA 显著上调 RpMYB4, 在 12 h 持续上升为 CK 的 2.26 倍, 24 h 为 CK 的 2.54 倍; ABA 应答基因表达未见明显变化。

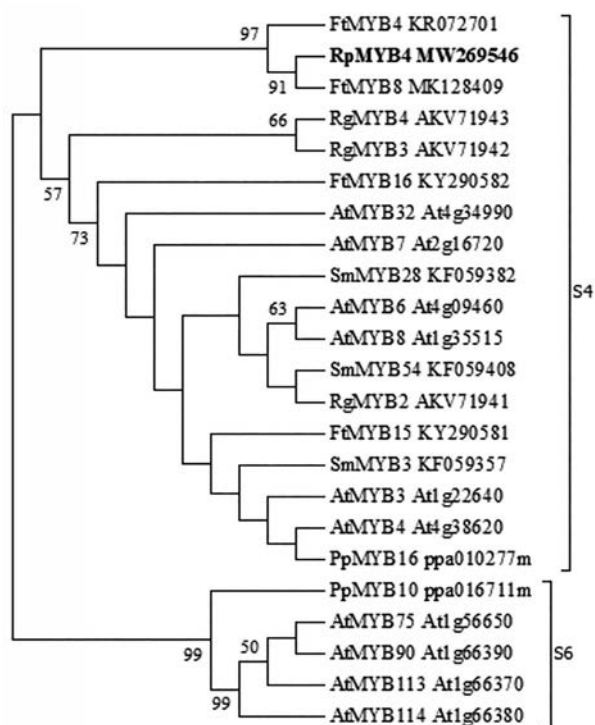


Figure 4 Phylogenetic relationship of RpMYB4 with MYBs from other plants

7 RpMYB4 响应非生物胁迫的表达模式

掌叶大黄无菌苗经干旱、盐、高温、低温、机械损伤 5 种非生物胁迫处理, 以 0 h (CK) 为对照, 分析了在处理 1、3、6、12、24 h 的 RpMYB4 相对表达量 (图 8)。结果显示 RpMYB4 基因在 Mock 组中的表达变化不显著; 其转录本在 10% PEG, 高温胁迫处理 24 h 均显著上调, 分别为 CK 的 2.17、2.6 倍; 该基因响应低温胁迫, 其表达量先下调后恢复, 在 6 h 处达谷值为 CK 的 0.35 倍; 损

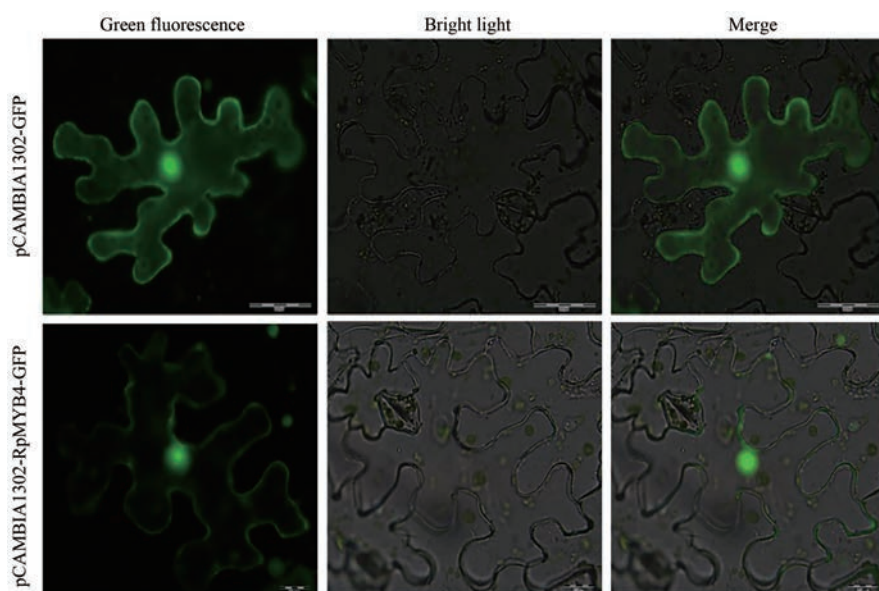


Figure 5 Subcellular localization of RpMYB4 in leaf epidermal cells of *N. benthamiana*

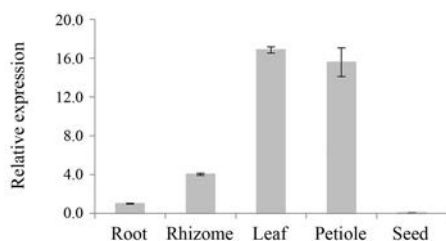


Figure 6 Expression analyses of *RpMYB4* in different tissues

伤胁迫下表达量先上调后恢复, 在 3 h 处达峰值为 CK 的 3.91 倍; 盐胁迫下基因表达水平未见显著影响。

讨论

MYB 作为最大的转录因子家族之一, 在植物特定

形态发生、细胞生长发育及次生代谢调控等方面都有明确的研究进展^[1]。目前在模式植物和农作物中的研究最为广泛, 为药用植物等其他重要类群 MYB 转录因子的鉴定及功能研究提供线索^[3]。本研究首次从掌叶大黄中分离到 *RpMYB4*, 其与 GenBank 中多个植物 MYB 基因一致性较高, 编码蛋白分子质量为 26.99 kDa, 并且包含 2 个 MYB-DBD 结构域, 符合 R2R3-MYB 的结构特征。通过本氏烟叶表皮亚细胞定位与在线预测结果一致显示 *RpMYB4* 为核定位蛋白, 符合转录因子在细胞核内与特定基因的启动子区域结合实现调控表达的特点^[1]。因此 *RpMYB4* 为掌叶大黄 R2R3-MYB 家族新鉴定的成员。

生物体功能基因家族成员通常具有相似的结构域

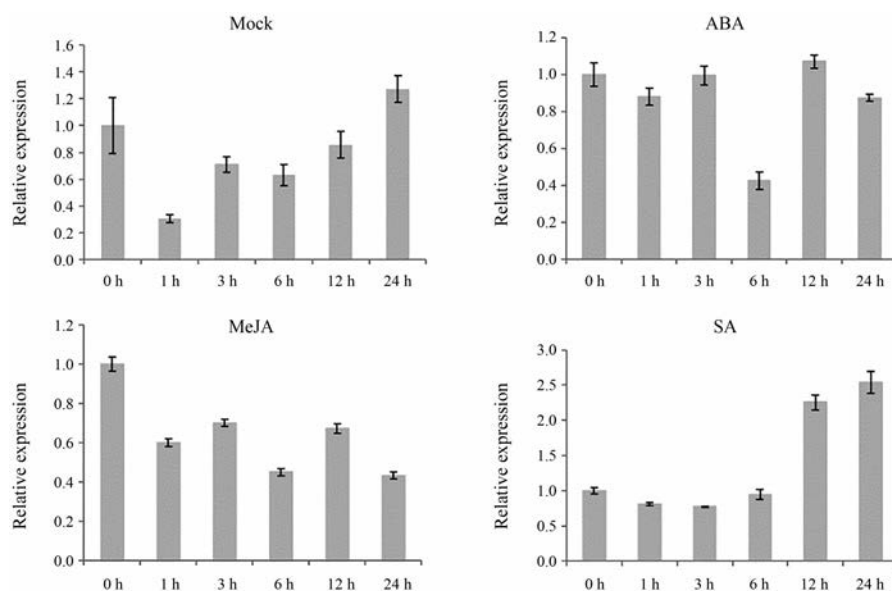


Figure 7 Expression analyses of *RpMYB4* in response to treatment with exogenous hormones

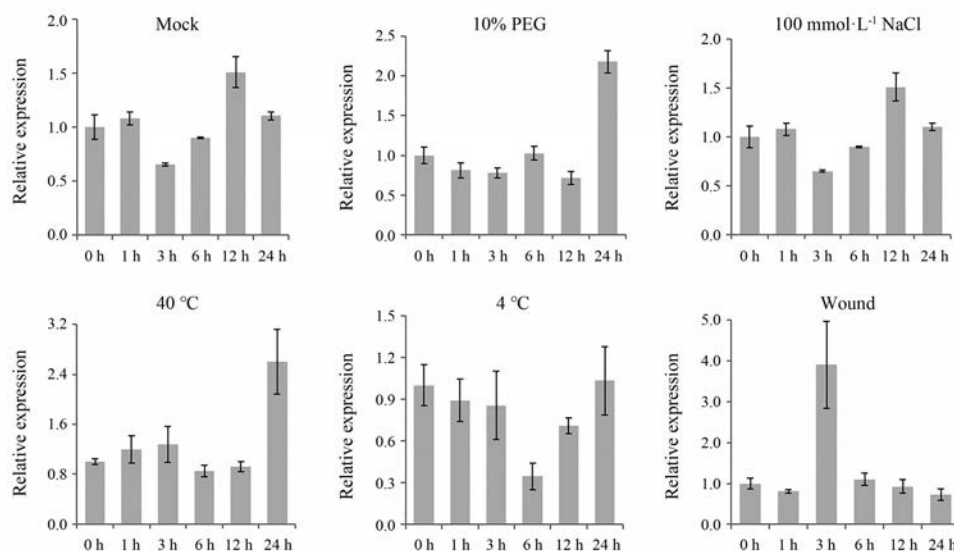


Figure 8 Expression analyses of *RpMYB4* in response to various abiotic stresses

和进化关系。巴戟天 MoMYB45 和 MoMYB65 系统进化共同聚在 S4 亚家族, 该亚家族蛋白 C 端含有保守的 EAR 基序, 被认为二者在苯丙烷代谢途径中功能有相似性—作为抑制剂抑制一些关键酶基因的表达^[15]。本研究分子进化分析显示 RpMYB4 聚在植物 R2R3-MYB S4 亚家族, 与苦荞麦 FtMYB8 关系最近。前期研究结果表明 S4 亚家族 MYB 转录因子在次生代谢调控水平上多抑制植物细胞苯丙烷类生物合成通路^[16]。抑制拟南芥 *AtMYB32* 表达可增加 COMT 基因转录水平, 降低与原花色苷生物合成相关的 DFR 和 ANS 基因水平^[7]。*AtMYB4* 通过调节肉桂酸 4-羟化酶基因的表达负调控对羟基肉桂酸代谢, 并且受损伤和紫外光胁迫下调^[17]。苦荞 *FtMYB8* 可以抑制花青素与原花青素积累以及阻碍苦荞幼叶边缘腺毛发育^[18]。因此, 推测 *RpMYB4* 可能直接或间接地参与苯丙烷类次生代谢合成与调控。

MYB 基因家族的成员通常具有组织表达特性, 这与其所调控的生命活动有关。研究发现银杏 *GbMYB26* 和 *GbMYB31* 转录本在叶和雌蕊中丰度很高, 可能参与叶和雌蕊中类黄酮物质的合成与调节^[19]。红花 *CtMYB-TF7* 在根、茎及叶中表达量低, 但花中表达量较高, 且系统进化与已报道的两个黄酮类成分调控转录因子关系较近, 预测 *CtMYB-TF7* 可能参与红花黄酮类成分的调控^[20]。本研究 qPCR 结果揭示 *RpMYB4* 的表达模式依此为叶片 > 叶柄 > 根茎 > 根 > 种子, 说明其可能主要在叶片和叶柄中发挥作用。

植物适应环境胁迫的转录调控研究通常结合转录因子对不同激素或生物或非生物胁迫的响应研究。紫草 *LeMYB1* 响应 MeJA 快速上调表达, 且蒽醌类化合物紫草素也显著诱导积累, 而 2,4-D 同时抑制 *LeMYB1* 的表达及紫草素的合成^[21]。水稻 *OsMYB84* 受 ABA、高盐处理显著诱导表达, 可能通过依赖 ABA 信号通路参与盐胁迫应答^[22]。本研究结果表明大黄 *RpMYB4* 对各激素和非生物胁迫处理的响应存在一定差异。*RpMYB4* 基因受 SA 处理 24 h 显著上调, 与 *GbMYB26* 响应 SA 的表达模式类似^[19], 推测 *RpMYB4* 可能通过水杨酸信号通路起作用。MeJA 处理抑制 *RpMYB4* 基因表达, 而低温胁迫下 6 h 显著下调其表达水平, MeJA 又是植物 CBF/DREB1 冷胁迫响应途径的早期关键信号^[23], 暗示 *RpMYB4* 可能与 MeJA 负调控冻害胁迫的耐受过程有关。*RpMYB4* 基因表达变化不受 ABA 处理的影响, 而受高温和干旱处理 24 h 诱导, 这与厚叶旋蒴苣苔 *BcMYB1* 干旱诱导具有一定相似性^[24], 说明 *RpMYB4* 可能通过一种不依赖 ABA 的信号通路参与大黄对干旱的生理适应。机械损伤被认为是诱导植物通过苯丙烷途径防御

的重要手段之一^[25], *RpMYB4* 表达受针刺损伤在 3 h 显著上调, 在时间点上基因表达远早于其他胁迫条件, 说明该基因可能作用于苯丙烷类或其他保护性次生代谢物的合成以保护机体免受损伤。*RpMYB4* 响应激素和胁迫的差异表达, 对于后续研究该基因在大黄活性成分合成调控及抗逆生理过程中的作用有重要意义, 尚需进一步深入研究。

作者贡献: 第一作者李元敏负责实验、数据分析及论文撰写; 通讯作者张岗、李依民负责实验设计、数据分析和论文修改; 张娜、李慧参与实验及数据分析; 张明英、彭亮、颜永刚参与样品采集和数据分析。

利益冲突: 本文所有的作者之间不存在利益冲突。

References

- [1] Hai D, Li Z, Liu L, et al. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family [J]. *Biochem (Mosc)*, 2009, 74: 1-11.
- [2] Rosinski JA, Atchley WR. Molecular evolution of the MYB family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin [J]. *J Mol Evol*, 1998, 46: 74-83.
- [3] Katiyar A, Smita S, Lenka S, et al. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis* [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 544.
- [4] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 573-581.
- [5] Li CL, Lu SF. 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: 1-12.
- [6] Li SY, Li TT, Li L, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *Dendrobium officinale* R2R3-MYB transcription factor [J]. *Mol Plant Breeding (分子植物育种)*. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200923.0903.002.html>.
- [7] Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, et al. *AtMYB32* is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2004, 40: 979-995.
- [8] Li Y, Chen X, Wang J, et al. Two responses to MeJA induction of R2R3-MYB transcription factors regulate flavonoid accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *PLoS One*, 2020, 15: e0236565.
- [9] Afrin S, Zhu J, Cao H, et al. Molecular cloning and expression profile of an abiotic stress and hormone responsive MYB transcription factor gene from *Panax ginseng* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47: 267-77.
- [10] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part I. 2020 ed. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 24.
- [11] Yang Y, Shui PX, Chen Y, et al. Efficacy of rhubarb in clinical

- application and its pharmacological effects [J]. *Genom Appl Biol*, 2017, 36: 1226-1231.
- [12] Hei XB, Li YY, Li H, et al. Investigation on seeds characteristics and establishment of aseptic cultural system for *Rheum palmatum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2019, 50: 4430-4437.
- [13] Sun ML, Wang YS, Yang DQ, et al. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis* [J]. *Chin Bull Bot (植物学报)*, 2010, 45: 579-587.
- [14] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e45.
- [15] Xie DJ, Ye YJ, Yang DM, et al. Identification and analysis of the R2R3-MYB transcription factor based on a transcriptome database in *Morinda officinalis* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 160-167.
- [16] Zhou M, Zhang K, Sun Z, et al. LNK1 and LNK2 corepressors interact with the MYB3 transcription factor in phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2017, 174: 1348-1358.
- [17] Jin H, Cominelli E, Bailey P, et al. Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis* [J]. *EMBO J*, 2000, 19: 6150-6161.
- [18] Huang Y, Wu Q, Wang S, et al. *FtMYB8* from Tartary buckwheat inhibits both anthocyanin/proanthocyanidin accumulation and marginal trichome initiation [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 263.
- [19] Liu X, Yu W, Zhang X, et al. Identification and expression analysis under abiotic stress of the R2R3-MYB genes in *Ginkgo biloba* L. [J]. *Physiol Mol Biol Plant*, 2017, 23: 503-516.
- [20] Chen J, Tang XH, Ren CX, et al. Cloning and expression analysis of MYB transcription factor genes in safflower [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 144-149.
- [21] Zhao H, Baloch SK, Kong LR, et al. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of *LeMYB1* from *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Biol Plant*, 2014, 58: 436-444.
- [22] Lu B, Zhang WZ, Li CY, et al. The MYB transcription factor *OsMYB84* confers salt stress response through the ABA pathway [J]. *J Fudan Univ (Nat Sci)*, (复旦大学学报 自然科学版), 2015, 54: 591-600.
- [23] 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 Zhejiang (浙江农业学报)*, 2020, 32: 1317-1328.
- [24] Chen BJ, Wang Y, Hu YL, et al. Cloning and characterization of a drought-inducible MYB gene from *Boea crassifolia* [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 493-500.
- [25] Bohlmann J, Crock J, Jetter R, et al. Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible(*E*)- α -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 6756-6761.