

DOI: 10.11686/cyxb2025045

http://cyxb.magtech.com.cn

陈斌, 刘晏廷, 陈胜艳, 等. 神农香菊 *CiMYB4* 基因分析及其抗旱功能鉴定. 草业学报, 2026, 35(1): 179—191.

CHEN Bin, LIU Yan-ting, CHEN Sheng-yan, et al. Bioinformatics analysis of *CiMYB4* in *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* and functional characterization of its role in drought resistance. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(1): 179—191.

神农香菊 *CiMYB4* 基因分析及其抗旱功能鉴定

陈斌, 刘晏廷, 陈胜艳, 薛晴, 李梦雨, 王霁佳, 孙颖, 何淼*

(东北林业大学园林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 干旱是影响菊花地理分布和生长发育的一个重要环境因子, MYB作为植物重要的转录因子家族广泛参与非生物胁迫的调控过程。本研究通过对课题组前期从神农香菊中克隆获得的 *CiMYB4* 基因以及启动子序列进行生物信息学分析, 并测定干旱胁迫处理后过表达 *CiMYB4* 烟草和野菊株系的生理指标, 初步解析 *CiMYB4* 在干旱胁迫中的功能。研究表明: *CiMYB4* 开放阅读框全长 846 bp, 编码 281 个氨基酸, 属于 R2R3-MYB 亚族, 定位在细胞核中。 *CiMYB4* 启动子序列中存在 7 个与干旱胁迫相关的顺式作用元件, 其中 4 个为脱落酸 (ABA) 响应元件, 3 个为 STRE 干旱胁迫响应元件。在干旱处理 7 和 14 d 时, 过表达 *CiMYB4* 烟草和野菊株系的丙二醛 (MDA) 含量均显著低于野生型 ($P < 0.05$), 而脯氨酸 (Pro) 含量以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性均显著高于野生型 ($P < 0.05$)。综合上述结果可知, *CiMYB4* 在干旱胁迫中具有正向调控功能, 是培育抗旱性强的菊花新品种潜在的基因资源。

关键词: 神农香菊; *CiMYB4*; 启动子; 抗旱

Bioinformatics analysis of *CiMYB4* in *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* and functional characterization of its role in drought resistance

CHEN Bin, LIU Yan-ting, CHEN Sheng-yan, XUE Qing, LI Meng-yu, WANG Ji-jia, SUN Ying, HE Miao*

College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Drought is an important environmental factor affecting the geographical distribution and growth of chrysanthemums (*Chrysanthemum* × *morifolium*). The MYB transcription factors, as a significant family of plant transcription factors, are widely involved in the regulation of responses to abiotic stresses. In this research, the *CiMYB4* gene and its promoter sequence were cloned from *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* and bioinformatics analyses were conducted. Additionally, the physiological indices of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) and *C. indicum* lines overexpressing *CiMYB4* were measured during a drought stress treatment to provide preliminary insights into its function in the drought response. The results showed that the length of the *CiMYB4* open reading frame was 846 bp, encoding a protein consisting of 281 amino acids. The protein was identified as a member of the R2R3-MYB subfamily and was predicted to localize to the nucleus. The promoter region of *CiMYB4* contained seven *cis*-elements associated with drought stress, including four abscisic acid response elements and three STRE drought response elements. At 7 and 14 days of a drought treatment, the malondialdehyde content was significantly lower in *CiMYB4*-overexpressing tobacco and *CiMYB4*-overexpressing chrysanthemum plants than in

收稿日期: 2025-02-18; 改回日期: 2025-04-07

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (2572022AW15) 资助。

作者简介: 陈斌 (1994—), 男, 江苏徐州人, 在读博士。E-mail: cb20200103_dr@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: hm2017148@126.com

their respective wild-type controls ($P < 0.05$), whereas the proline content and the activities of superoxide dismutase and catalase were significantly higher than those of the wild type controls ($P < 0.05$). Together, these results demonstrate that *CiMYB4* plays a positive regulatory role in drought stress responses and it is a potential genetic resource for developing new chrysanthemum cultivars with enhanced drought tolerance.

Key words: *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*; *CiMYB4*; promoter; drought resistance

水资源的充分供给是植物正常生长的保障,缺水会导致植物遭受干旱胁迫,影响植物正常的生长发育以及生理代谢,甚至会造成植物死亡的严重后果^[1]。植物为了应对干旱胁迫的不利影响,已在形态、生理生化以及分子机制等方面进化出多种应对策略。在形态建成策略上,植物通过增加深层根系数量、缩小叶面积和关闭气孔等方式达到增加水分吸收,减少蒸腾水分损失,提高水分利用效率的目的^[2-5];在生化水平上,植物可以通过提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)等保护性酶活性减少干旱引发的氧化损伤^[6],还可以通过提高渗透调节物质和次生代谢物含量维持细胞内外渗透压的平衡^[7-8];在分子机制方面,植物可以通过激活MYB、WRKY、NAC和bZIP等转录因子调控靶基因的表达,提高植物的抗旱能力^[9-13]。

MYB转录因子是植物中成员数量最多的基因家族之一^[14],其典型特征为N端有1~4个不完全重复且高度保守的MYB结构域。根据不完全重复的MYB结构域(R1, R2和R3)数量,将该家族成员分为4个亚族:1R-MYB、R2R3-MYB、R1R2R3-MYB和4R-MYB。研究发现大多数MYB转录因子家族成员仅包含两个不完全重复的MYB结构域序列,属于R2R3-MYB亚族,它们可以特异性结合靶基因启动子上的顺式作用元件来激活或抑制其转录^[15-16]。研究表明R2R3-MYB亚族基因在调控植物响应非生物胁迫中发挥重要作用。在野菊(*Chrysanthemum indicum*)中过表达神农香菊(*C. indicum* var. *aromaticum*)的*CiMYB4*基因,能显著提高镉胁迫下转基因株系的抗氧化酶活性以及镉富集转运能力^[17]。白梨(*Pyrus bretschneideri*)的*PbMYB1L*基因可通过上调*AtCBF1*, *AtCBF2*, *AtCBF3*和*AtCBF4*基因的表达增强转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)株系的低温耐受性^[18]。更多的研究发现许多R2R3-MYB亚族转录因子参与植物干旱胁迫响应。在棉花(*Gossypium hirsutum*)中沉默*GhMYB3*可以提高抗氧化酶活性,减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累,除此之外还能够通过关闭气孔减少水分蒸发,提高棉花的抗旱性^[19]。*ZmMYB56*通过特异性结合*ZmTOM7*启动子上的顺式作用元件激活其转录,诱导玉米(*Zea mays*)叶片气孔关闭,减少水分蒸发^[20]。在杨树(*Populus tomentosa*)中过表达*PtoMYB142*可以靶向激活*CER4*和*KCS6*的转录,增加叶片蜡质合成,增强杨树耐旱性^[21]。*ZmMYB153*通过参与脱落酸(abscisic acid, ABA)信号途径,调节玉米气孔活动,从而影响植物的干旱耐受性^[22]。以上研究结果表明R2R3-MYB亚族基因能通过协调不同的路径调控植物响应干旱胁迫,然而有关菊花(*Chrysanthemum morifolium*)R2R3-MYB转录因子家族响应干旱胁迫的研究相对较少。

菊花常作为鲜切花和景观绿化花卉使用,具有重要的经济和观赏价值,在花卉市场中占据不可替代的地位。干旱作为一种常见的胁迫因子,严重威胁菊花的生长和产量,制约菊花的地理分布和应用范围,大大降低了菊花的经济效益和观赏价值,是菊花生命周期中最大的非生物胁迫之一。鉴于此,提高菊花的抗旱能力是园林花卉产业发展中一个亟待解决的难题。因此本研究对课题组前期从神农香菊中克隆获得的*CiMYB4*基因以及启动子序列进行生物信息学分析,以过表达*CiMYB4*烟草(*Nicotiana tabacum*)和野菊株系为试验材料^[23-25],通过观察干旱胁迫后的表型以及测定相关生理指标,以期明确*CiMYB4*的抗旱功能,为培育抗旱性强的菊花新品种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于2019年9月在东北林业大学园林学院人工栽培室进行。人工栽培室环境条件为:温度24~26℃,

相对湿度 60%~70%, 12 h 光照, 白天光照强度为 $480 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。将实验室前期已获得的 3 个过表达 *CiMYB4*(OX-1、OX-2、OX-3)和转空载(KZ)烟草株系的 T_2 代以及野生型(CK)烟草株系的种子置于 1.5 mL 离心管中浸泡 24 h, 播种基质采用 70% 腐殖土+30% 蛭石混合, 经 120 °C 高温灭菌后装入直径为 10 cm, 高为 12 cm 的花盆中, 采用浸盆法充分浸润盆中的栽培基质, 然后将浸泡后的烟草种子均匀地撒播在播种基质表层, 覆膜保湿保温。待烟草幼苗长出 2 片真叶后, 将其分别移栽至直径为 14 cm, 高为 16 cm 的花盆中, 种植基质为经灭菌的 60% 腐殖土+20% 珍珠岩+20% 蛭石的混合基质。待烟草长至 6~7 片真叶时, 分别选取状态良好且长势一致的不同株系的烟草开始进行自然干旱处理, 每个株系处理 30 盆。于 0、7、14 和 21 d 进行表型观察和生理指标的测定, 每个株系不同处理时间随机选取 3 盆测定, 并重复 3 次。选择课题组已获得的 2 个过表达 *CiMYB4*(COX-1、COX-2)、转空载(CKZ)以及野生型(WT)生长状态良好的野菊株系, 剪取带顶芽长约 4~5 cm 的茎段作为插条, 扦插于充分湿润的黄沙中, 然后覆膜保湿。待插条生根后种植于直径为 14 cm, 高为 16 cm 的花盆中, 种植基质同烟草。常规养护 15 d 后进行自然干旱处理, 每个株系处理 30 盆。于 0、7 和 14 d 进行表型观察和生理指标的测定, 每个株系不同处理时间随机选取 3 盆测定, 并重复 3 次。

1.2 *CiMYB4*蛋白的生物信息学分析

利用 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对 *CiMYB4* 蛋白质进行理化特性分析, 利用 SOPMA 2.0 分析预测 *CiMYB4* 蛋白质的二级结构。

1.3 亚细胞定位

利用基因枪法将构建好的 35S::*CiMYB4*-GFP 以及 35S::*GFP* 载体轰击转化洋葱(*Allium cepa*)表皮细胞^[26], 将转化后的洋葱表皮细胞置于 25 °C 环境中暗培养 16~24 h 后利用激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM800, 德国)观察荧光信号位置。

1.4 *CiMYB4*启动子序列顺式作用元件分析

使用 PlantCare 在线数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析预测课题组前期克隆得到的 *CiMYB4* 启动子序列中所包含的顺式作用元件。

1.5 *CiMYB4*启动子- β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GUS)活性检测

根据 PlantCare 预测的结果, 将启动子进行 5' 端缺失分段克隆, 并参照 ClonExpress® II One Step Cloning Kit(南京诺唯赞生物科技有限公司)说明书设计添加包含 *Hind* III 酶切位点的上游同源臂引物 P-F、P1-F、P2-F、P3-F、P4-F 和添加包含 *Bam* H I 酶切位点的下游同源臂引物 P-R, 引物序列见表 1。利用 *Hind* III 和 *Bam* H I 限制性内切酶线性化 pBI121-GUS 载体, 将以上 5 段带有同源臂的启动子序列参照 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 说明书进行同源重组, 重组质粒结构如图 1 所示。参照说明书所述步骤将阳性对照组 35S::*GUS* 和 P::*GUS*、P1::*GUS*、P2::*GUS*、P3::*GUS* 以及 P4::*GUS* 重组质粒转化到农杆菌感受态细胞 EHA105(上海唯地生物技术有限公司)中, 以 4 周龄的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)顶部第 2~4 片完全展开的叶片为试验材料, 利用注射器将 35S::*GUS*、P::*GUS*、P1::*GUS*、P2::*GUS*、P3::*GUS* 以及 P4::*GUS* 农杆菌侵染液和阴性对照

表 1 启动子克隆引物序列

Table 1 Promoter clone primers' sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>CiMYB4</i> -2001-F (P-F)	GATTACGCCA <u>AAGCTTTT</u> GTGGAATCAAACATGCAAAAC
<i>CiMYB4</i> -1764 (P1-F)	GATTACGCCA <u>AAGCTT</u> CTATAAAAATATGCATAACGAAAAAT
<i>CiMYB4</i> -1299 (P2-F)	GATTACGCCA <u>AAGCTT</u> AGAAATTATTATGTAACCTAG
<i>CiMYB4</i> -954 (P3-F)	GATTACGCCA <u>AAGCTTTT</u> CATTTCTCTTTATTGTCAATTC
<i>CiMYB4</i> -417 (P4-F)	GATTACGCCA <u>AAGCTTTT</u> CATAAGCAAATAGATTCCCT
<i>CiMYB4</i> -2001-R (P-R)	ACCACCGGGGAT <u>CCC</u> CATATTTAGACTTTCTTCTTTG

下划线标注序列为酶切位点序列。The sequence on the underlined is the sequence of restriction endonuclease.

缓冲液注射至本氏烟草叶片中,擦除叶片上多余的菌液,黑暗环境中静置 12 h 后,于昼夜为 16 h/8 h 光环境中培养 24 h,参照 GUS 染色试剂盒法(北京酷来搏科技有限公司)对本氏烟草叶片进行染色。染色结束后用 70% 乙醇溶液将染色后的叶片进行脱色,直至阴性对照叶片变为白色。

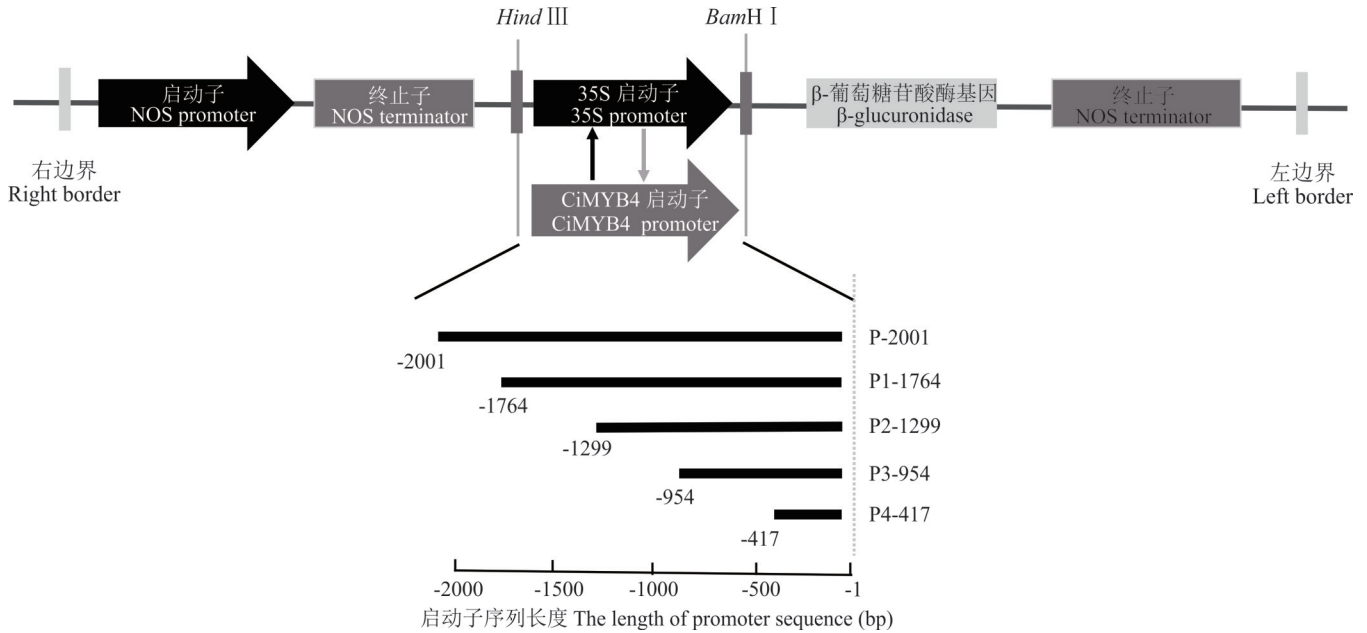


图 1 *CiMYB4* 基因启动子 5' 端缺失片段

Fig. 1 *CiMYB4* gene promoter 5' deletion fragments

1.6 生理指标的测定

选取烟草植株茎顶部第 3~4 片成熟完整的叶片,野菊植株顶部第 3~5 片成熟完整的叶片,用锡箔纸包裹后迅速置于液氮中带回实验室,用于各项生理指标的测定。采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量;采用酸性茚三酮法测定脯氨酸(proline, Pro)含量;采用氮蓝四唑(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)光化学还原法测定 SOD 活性;采用紫外分光光度法测定 CAT 活性^[27]。

1.7 数据整理与分析

用 Excel 2016 对数据进行整理和作图,利用 SPSS 22.0 对数据进行方差分析,用 Duncan 法进行多重比较 ($P < 0.05$)。

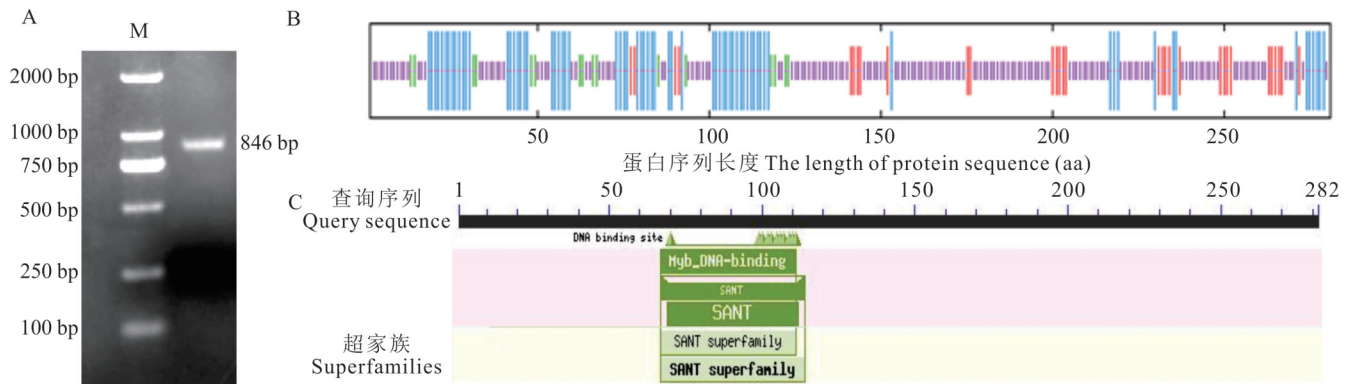
2 结果与分析

2.1 *CiMYB4* 生物信息学分析

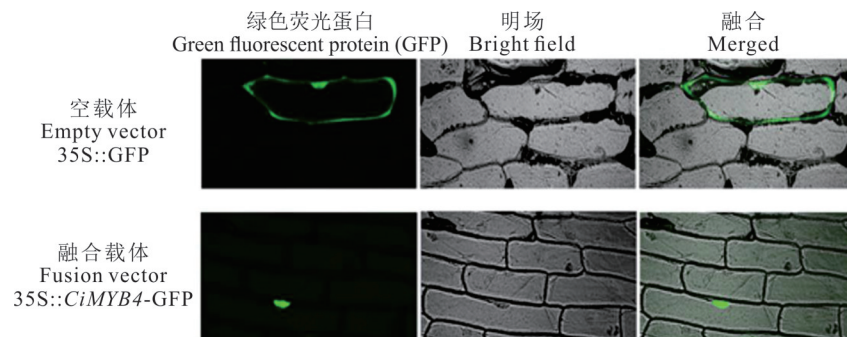
本研究以神农香菊叶片 cDNA 为模板克隆获得了 *CiMYB4* 基因,登录号为 MH142214,其长度为 846 bp(图 2A),编码 281 个氨基酸。*CiMYB4* 蛋白的二级结构以无规则卷曲为主(图 2B),占比 58.36%, α 螺旋占比 24.91%, β 转角占比 5.69%,延伸链占比 11.03%。*CiMYB4* 氨基酸序列在 67~114 aa 处和 69~112 aa 处有两个植物 MYB 转录因子家族的特异性 SANT(MYB-DNA-binding)结构域,属于 R2R3-MYB 亚族(图 2C)。

2.2 *CiMYB4* 亚细胞定位

将构建好的 35S::*CiMYB4*-GFP 以及 35S::*GFP* 载体利用基因枪法转化洋葱表皮细胞后,在激光共聚焦显微镜下观察。结果显示(图 3),在转化 35S::*GFP* 空载体的洋葱表皮细胞的细胞膜与细胞核中均能观察到绿色荧光,而在转化 35S::*CiMYB4*-GFP 融合载体的洋葱表皮细胞中仅有细胞核发出绿色荧光,证明 *CiMYB4* 定位在细胞核中。

图 2 *CiMYB4* 的生物信息学分析Fig. 2 Bioinformatics analysis of *CiMYB4*

A: *CiMYB4* 的克隆 Cloning of *CiMYB4*; B: *CiMYB4* 蛋白的二级结构预测 Prediction of *CiMYB4* protein secondary structure. 紫色 Purple: 无规则卷曲 Random coil, 蓝色 Blue: α 螺旋 α -helix, 绿色 Green: β 转角 β -turn, 红色 Red: 延伸链 Extended strand; C: *CiMYB4* 蛋白的保守结构域 Conserved domain of *CiMYB4*.

图 3 *CiMYB4* 的亚细胞定位Fig. 3 Subcellular localization of *CiMYB4*

2.3 *CiMYB4* 启动子顺式作用元件分析

启动子在启动和调控基因转录表达的过程中发挥重要作用,而启动子上的顺式作用元件又与该基因的调控表达网络以及功能密切相关,因此对于基因启动子的研究能为后续研究基因功能奠定基础。为进一步探究 *CiMYB4* 的潜在功能,利用在线软件 PlantCare 对课题组前期已克隆获得的 2001 bp 的 *CiMYB4* 基因启动子序列进行分析。结果表明(表 2 和图 4) *CiMYB4* 基因启动子具有 2 类结构元件,包括 50 个 TATA-box 核心启动子元件以及 35 个 CAAT-box 启动子和增强子区域调控元件,具备启动子的典型特征;3 类激素响应元件,包括 3 个 ABRE、1 个 AAGAA-motif 脱落酸响应元件和 1 个 TGA-element 生长素响应元件;3 类胁迫相关的响应元件,包括 1 个 LTR 低温响应元件,3 个 STRE 干旱胁迫响应元件,2 个 TC-rich repeats 防卫和胁迫响应元件;7 类光响应元件,包括 2 个 G-box 元件、1 个 GATA-motif 元件、3 个 GT1-motif 元件、1 个 I-box 元件、2 个 Box 4 元件、1 个 chs-CMA1a 元件以及 1 个 MRE 元件;1 类参与分生组织表达的 CAT-box 元件;此外,该启动子还具有 7 个 MYB 结合位点、3 个 MYC 结合位点以及 2 类未知功能元件(A-box 和 AT~TATA-box)。通过对该启动子的分析,发现该启动子区域具有 7 个干旱胁迫响应相关的顺式作用元件(4 个 ABA 响应元件和 3 个 STRE 元件),因此推测 *CiMYB4* 可能参与神农香菊的干旱胁迫响应。

2.4 *CiMYB4* 启动子活性分析

对瞬时转化后的烟草叶片 GUS 染色后利用脱色液脱色,该启动子 5' 端不同长度缺失片段活性分析结果表明,5 段 5' 端缺失片段均具有 GUS 活性(图 5),表明这 5 段启动子片段均能启动基因的表达,但 GUS 活性差异明显,其中 P 及 P3 段 GUS 活动较强,P1、P2、P4 段 GUS 活性较弱,表明 -954 至 -417 bp 启动子区域是启动基因转录的关键区域,这可能与该区域内存在多种顺式作用元件,且各元件之间相互串联发挥的协同作用有关。

表2 *CiMYB4*启动子顺式作用元件Table 2 *Cis-acting elements of CiMYB4 promoter*

类别 Category	名称 Name	核心序列 Core sequence	功能 Function	数量 Amount
结构元件 Structure elements	TATA-box	TATA	核心启动子元件 Core promoter element	50
	CAAT-box	CAA(A)T	启动子和增强子区域调控元件 Regulatory element in promoter and enhancer regions	35
激素响应元件 Phytohormone responsive elements	ABRE	ACGTG	脱落酸响应元件 Abscisic acid responsive element	3
	AAGAA-motif	GTAAAGAAA	脱落酸响应元件 Abscisic acid responsive element	1
	TGA-element	AACGAC	生长素响应元件 Auxin acid responsive element	1
胁迫响应元件 Abiotic stress responsive elements	LTR	AAAGCC	低温响应元件 Low temperature responsive element	1
	STRE	AGGGG	干旱胁迫响应元件 Drought stress responsive element	3
	TC-rich repeats	ATTTTCTT	防卫和胁迫响应元件 Defense and stress responsive element	2
光响应元件 Light responsive elements	G-box	(T)CACGTG(T)	光响应元件 Light responsive element	2
	GATA-motif	AAGGATAAGG	光响应元件 Light responsive element	1
	GT1-motif	GGTTAA	光响应元件 Light responsive element	3
	I-box	CCTTATCCT	光响应元件 Light responsive element	1
	Box 4	ATTAAT	光响应元件 Light responsive element	2
	chs-CMA1a	TTACTTAA	光响应元件 Light responsive element	1
MRE	AACCTAA	光响应元件 Light responsive element	1	
生长发育调控元件 Development-related elements	CAT-box	GCCACT	分生组织表达元件 Meristem expression element	1
功能未知元件 Function unknown elements	MYB CORE	TAACCA,CAACAG	MYB结合位点 MYB binding site	7
	MYC CORE	CATTTG,CAATTG	MYC结合位点 MYC binding site	3
	A-box	CCGTCC	未知功能元件 Function unknown element	2
	AT~TATA-box	TATATA	未知功能元件 Function unknown element	1

2.5 *CiMYB4*转基因烟草抗旱性分析

不同时间干旱胁迫后,不同烟草株系的表型出现了明显不同(图6)。干旱胁迫7 d时所有烟草株系均出现了不同程度的萎蔫,但3个过表达株系(OX-1、OX-2、OX-3)的萎蔫程度轻于2个对照株系(CK和KZ)。干旱胁迫14 d时,CK和KZ株系几乎所有叶片枯黄萎蔫,而OX-1和OX-3株系大部分叶片仍保持正常状态,OX-2株系顶端部分保持正常状态。干旱胁迫21 d时,CK和KZ株系几乎全部枯死,而3个过表达株系(OX-1、OX-2、OX-3)顶端叶片仍有部分保持绿色、挺立状态,这表明*CiMYB4*作为正向调控因子调控转基因烟草的抗旱性。

不同时间干旱胁迫对不同烟草株系的生理指标产生了显著影响($P < 0.05$,图7)。MDA是膜脂氧化的最终产物,是衡量植物受损伤程度的重要指标。随着干旱时间的延长,不同烟草株系的MDA含量均显著升高($P < 0.05$),其中CK和KZ株系在干旱21 d时死亡,无法测得相应指标。干旱14 d的CK和KZ株系MDA含量分别为干旱0 d时的4.91和5.43倍,而OX-1、OX-2和OX-3烟草株系的MDA含量在干旱21 d时达到最高,分别为干旱0 d时的4.00、3.81和3.66倍。不同烟草株系间的Pro含量随着干旱时间的增加均呈先升高后降低的变化趋势,2个对照组株系(CK和KZ)和3个转基因烟草株系(OX-1、OX-2、OX-3)的Pro含量均在干旱7 d时达到最高,且显著高于干旱0 d时的含量($P < 0.05$),分别为干旱0 d时的3.05、3.11、3.66、3.61和3.82倍。不同烟草株系的SOD和CAT活性随着干旱时间的增加发生了显著的变化($P < 0.05$)。5个烟草株系的SOD和CAT活性均在干旱7 d时达到最高,随后显著降低($P < 0.05$),表明这两种酶在应对干旱胁迫时存在明显的阈值。OX-1、OX-2和OX-3烟草株系的SOD和CAT活性在干旱7和14 d时均显著高于CK和KZ株系($P < 0.05$);且在干旱14 d时差

```

+ TGTGGAATCA AACATGCAAA ACCCCTAATT AAT TACAAGA GTAATAAAAC CCTAATTGCC AAAAAACAA
- ACACCTTAGT TTTGACGTTT TGGGATTAA TTAATGTCTT CATTATTTTG GGATTAACGG TGTITTTGTT

+ AAACCTAAT TTAACCATAA GCATAGATCG ATCCCAATAC ATGCATAACC AAAATCAAGA TTCGATTTTT
- TTTGGGATTA AATGTGTATT CGTATCTAGC TAGGGTTATG TACGTATTGG TTTTAGTTCT AAGCTAAAAA

+ ATAAGAATAT TAATAATCAC TGAGAACCCT TACTAGGTTA TATA TGTTTA AAGTAGCTCT GATACCACCT
- TATTCTTATA ATTATTAGTG ACTCTTGGGA ATGATCCAAT ATATACAAAT TTCATCGAGA CTATGGTGAA

+ TAGGGTCTG GTGGTCATCC ACACGGCTAT AAAATATGCA TAACGAAAA TAAACACATA AAGCCGTCTA
- ATCCCAAGAC CACCAGTAGT TGTGCCGATA TTTTATACGT ATTGCTTTTT ATTTGTGTAT TTCGGCAAGT

+ GACCAAAATC CTAATATGTA GATAATAAA CATCAATATA ACATATATC AACACGTATA AAGGGCGTTT
- CTGGTTTTAG GATTATAAT CTATTAATTT TAGTTATAT TGTATATAGA TTGTGCATAT TTCCCGCAAA

+ AGAAAATTA CTGTTAATC CTGTGTATG TAAGCTTATT TAACCTTTTC AGCTGCACGG AACGCCTTCT
- TCTTTAAAT GAACAATTAG TAAATAATAC ATTGCAATAA ATTGGAAAAG TCGACGTGCC TTGCGGAAGA

+ TGATTTTCTT GATGCTACAT GATTACCTTT AGGGTTTTTT TTTGGGATTA TCACCTTTTG GACAGTGTCA
- ACTAAAAGAA CTACGATGTA CTAATGGAAA TCCCAAAAA AAACCTAAT AGTGAAAAAC CTGTCAAGT

+ GTTATTCACC GGTACTCCAC AGGTAGGACT AGAGCTACAA ACCTATGCAA GTTAGCGAA CACGATATGG
- CAATAGTGG CCATGAGGTG TCCATCTGTA TCTCGATGTT TGGATACGTT CAATCCGCTT GTGCATATCC

+ GGGTAAAAAC CCTTATCGAC TATACAAGTC GACTAGGGTG TCGACTTAAA GTCGATCGAC CAAAGGGATA
- CCCATTTTGG GGAATAGCTA ATATGTCAG CTGATCCAC AGCTGAATTT CAGCTAGCTG GTTCCCTAT

+ AAACCTTTG GTTCGATGTA TCGCACAAAG AGAAGAGACC GGGGAGCCGG GGGGGAGATT TTTAGGTTAT
- TTTGGGAAAC CAAGCATACT AGCGTGTTC TTTTGGGG CCCTCCGCC CCCCTCTAA AATCCAAATA

+ GAGAAATTA TATGTAATA CTAGAAAGCC TTTGGTATT ATAAAATACC AAGGAAGGTT CTAGTAGGAT
- CTCTTAATA ATACATTTTG GATCTTTCGG AAACCATAAA TATTTTATGG TTCTTCCAA GATCATCCTA

+ TTGAAAAGTT ATCATGTTAA ACCTAGAAAG CCTTTGCTAT TTAATAAATA CCAAGGAAGG TTCTAGTAGG
- AAGTTTTCAA TAGTACAATT TGGATCTTTC GGAAACGATA AATATTTTAT GGTTCCTTCC AAGATCATCC

+ ATTTGAAAG CCTAATCCTT GTTCAACAAG TAATCAAGCT TGACATATCA AATTGATCCG TCCCTCTTA
- TAAACCTTTC GATTAGGAA CAAGTTGTTT ATTAGTTCGA ACTGTATAGT TAACTAGGC AGGGAGAAAT

+ GGGTCTGTCG ATGTATGACA CAACCTATG ATTTGTGTT TTTGTCGTT ACTAGCTAGC CTCTAGTATT
- CCCAGACAGC TACATAGTGT GTTGGGATC TAAAACACAA AAACAGCAAA TGATCGATCG GAGATCATAA

+ TATCATGAAT AAATATTATA CTTTGGTTAA TTACCCTTTA GCTCTTAAAT ATAAATAACA CTATATTTCA
- ATAGTACTTA TTTATAATAT GAAACCAAT AATGGCAAAAT CGAGAATTTA TATTTATGTT GATATAAAGT

+ TTTCCCTTTT ATTGTCATTT CATTTCGTAA CTCGTTTCTT GTTTTCACCT GCTTGTCTG TTTAGTGTGC
- AAAAGAGAAA TAAAGATGAA GTAAAGCATT GAGCAAAGAA CAAAAGTGAA CGAACAGAC AAATCACACG

+ ACCGATGTA CCTTTCGGCA TTTCTGTGAA GGTAAAGTGG AAAGCCGTTA TGTTGTTTC ATATAATCCT
- TGGCTACAT GAAAGCCGT AAAGACACTT CCATTCACAC TTTCCGCAAT ACAACAAAGC TATATTAGGA

+ TTCCTATTGC GTCTCACTAC TGCTCCTTAC TATTGTTTTT TTTCACTGCT AATTTGCTTA AAAACCTCTA
- AAGGATAACG CAGAGTAGTG ACAGAGGAATG ATAAACAAG AAAAGTGAACGA TTAAGCGAT TTTTGGGAGT

+ AATTTTCTGA TAGTATAATT TGAACATAAT TGGTATCAT TTTGATTTGA TTTTCAAAAG CAAAACTTTT
- TTAAAGACT ATCATATTA ACCTGATTA ACCAATAGTA AAACAAACT ACAAGGTTTC GTTTGAAAAA

+ GTTATAATAT TTTGTAAGC TGAACAGAA CGCCACCCAT TAAACATTAG TACATAAAGC ATCGCAAGAC
- CAATATTATA AACACATTGC ACTTTGCTT GCGGTGGGTA ATTTGTAAT AATGATTGCT TACGTTCTG

+ ATCACAATAA TTTGATTA AGTTCTACCA ACACCCGTTT CAATCAAAAT GACCCGTTAC CGTCCCTGTT
- TAGTGTATT AAAGCTAATA TCAAGATGTT TGTGGGCAAG GTTATTTTA TGGGCAATG CGAGCAGTAA

+ GTACTATTTT TCGGAAAGTG TCGAAGGATA CGTATTTAAT TATTGACACT AAACAATATT GTAGGGCTTC
- ATGATATAC AGGACTTAC AGCTTCTAT GCATAAATG ATAACTGTGA TTTGTTATAA CATCCCGAAG

+ TATTTTAAAT ATCAAGTCTT GGATTGAATC ATATACCAAT TGGTTCATAA GCAAAATAGA TTCCTGATA
- ATAAAAATTA TAGTTCAGAA CCTAAGCTTAG TATATGTTTA AAGAGTATT CGTTTTATCT AAGGGACTAT

+ TCTTATCCTA ACCATCATTG GTGATTACT TAGAATAAAA CACTTTTACT TAAATAAAA TACTTAAAAA
- AGAATAGGAT TGGTAGTAAT CACCTAATGA ATCTTTATT GTGAAAATGA ATTTTATTAT ATGAATTTT

+ GTTATACAAG TATCCACAAA TAAGTCTAAC AATCACTAAA TATCTAGTTG AGTATTTAT TTTAATAATA
- CAATATGTTT ATAGGTGTTT ATTCAGATTG TTAGTGATT ATAGATCAAC TCGTAAACTA AAATATTAT

+ CGGATATGTC GTAATATCAT CATAAACAG AGCCACCAG CCACTCCCTC AAACCTGTCT CACCAACTCG
- GCCTATACAC CATTATAGTA GTATTTGCTC TCGGGTGGTC GGTGAGGGAG TTTGGACAGA GTGGTTGAGC

+ CATCTAGAAG CATTACTTCT CTCTCTCTCT CATCTATAAC ATATCTCTCT CAACCCACTA TAAAATAGTC
- GTAGATCTTC GTAATGAAA GAGAGAGAGA GTAGATATTG TATAGAGAGA GTTGGGTGAT ATTTTATCAG

+ AAAAGCTTAT AAAATCAAT CCAATCAAG TACTCAAAAA GCCGGCTAT CATATCTCTC TCTCTGAAA
- TTTTCGATA TTTTAGTTAG GGTAAAGTTC ATGAGTTTT CGGCCGATA GTATAGAGAG AGAGAACTTT

+ AAACCAAAA ATTTGGGAGT TCAAGAAGA AAGCTAAA
- TTTGAGTTT TAACCTTCA AGTTTCTCT TTCAGATTT
    
```

- A-box功能未知元件 Function unknown element
- AAGAA-motif脱落酸响应元件 Abscisic acid responsive element
- ABRE脱落酸响应元件 Abscisic acid responsive element
- ABRE3a脱落酸响应元件 Abscisic acid responsive element
- ABRE4脱落酸响应元件 Abscisic acid responsive element
- AT-TATA-box功能未知元件 Function unknown element
- Box 4光响应元件 Light responsive element
- CAAT-box启动子和增强子区域调控元件 Regulatory element in promoter and enhancer regions
- CAT-box分生组织表达元件 Meristem expression element
- A-box功能未知元件 Function unknown element
- G-box光响应元件 Light responsive element
- GATA-motif光响应元件 Light responsive element
- GT1-motif光响应元件 Light responsive element
- I-box光响应元件 Light responsive element
- LTR低温响应元件 Low temperature responsive element
- MRE光响应元件 Light responsive element
- MYB CORE MYB结合位点 MYB binding site
- MYC CORE MYC结合位点 MYC binding site
- MYB CORE MYB结合位点 MYB binding site
- MYB CORE MYB结合位点 MYB binding site
- STRE干旱胁迫响应元件 Drought stress responsive element
- TATA-box核心启动子元件 Core promoter element
- TATA-box核心启动子元件 Core promoter element
- TC-rich repeats防卫和胁迫响应元件 Defense and stress responsive element
- TGA-element生长素响应元件 Auxin responsive element
- chs-CMA1a光响应元件 Light responsive element

图 4 *CiMYB4* 启动子序列及部分顺式作用元件

Fig. 4 *CiMYB4* promoter sequence and some *cis*-acting elements

异最大,其中 OX-1、OX-2 和 OX-3 烟草株系 SOD 活性的平均值分别较 CK 和 KZ 株系显著提高 82.83% 和 71.44% ($P < 0.05$), OX-1、OX-2 和 OX-3 烟草株系 CAT 活性的平均值较 CK 和 KZ 株系分别显著提高 98.25% 和 99.68% ($P < 0.05$)。

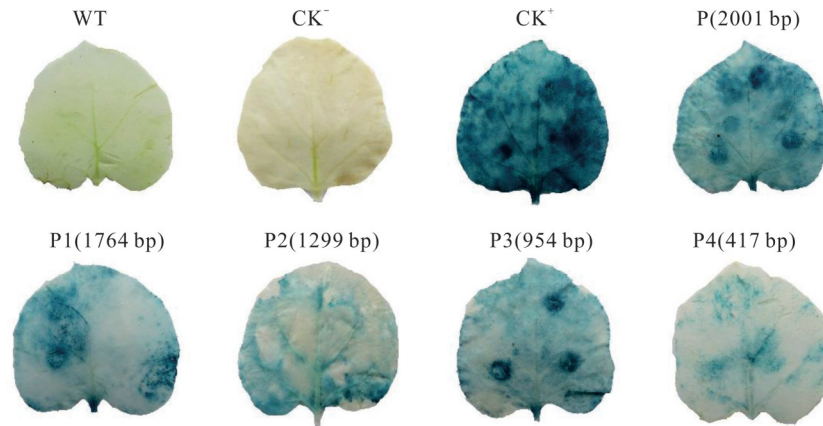


图5 *CiMYB4*启动子 β -葡萄糖苷酶活性分析

Fig. 5 Analysis of β -glucuronidase (GUS) activity of *CiMYB4* promoter

WT: 野生型 Wild type; CK^- : 阴性对照(仅注射缓冲液) Negative control (only buffer solution); CK^+ : 阳性对照(pBI121-GUS空载) Positive control (pBI121-GUS); P, P1, P2, P3, P4: 启动子5'端不同长度缺失片段 Different length deletion fragments of promoter 5' end.

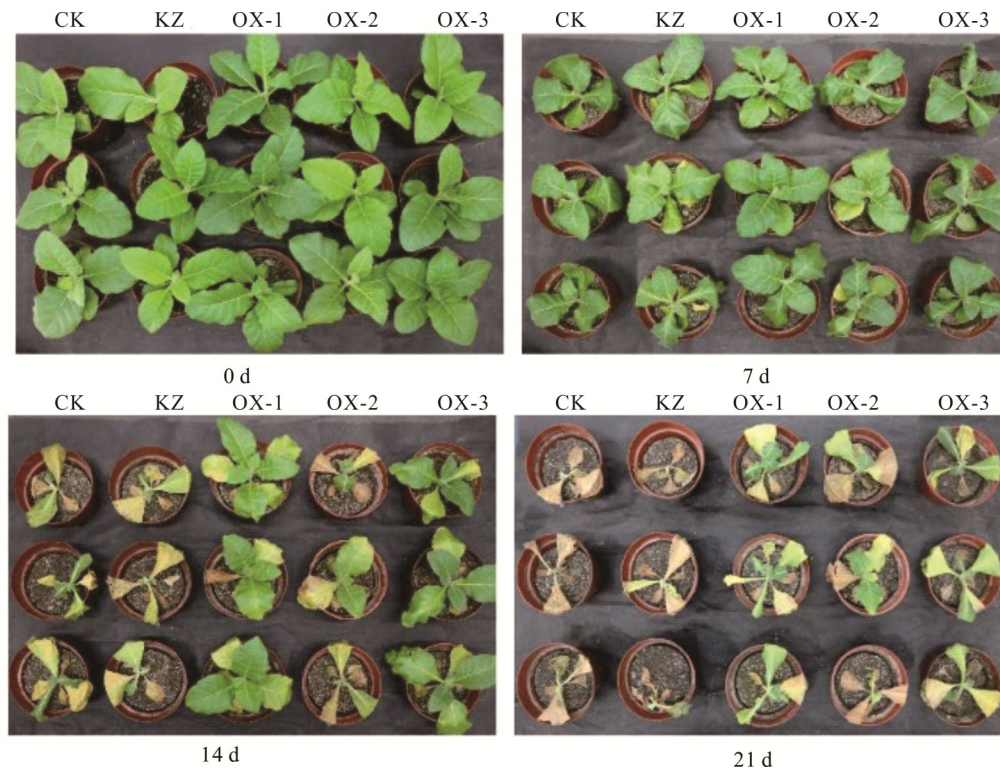


图6 干旱胁迫对转基因烟草表型的影响

Fig. 6 Effects of drought stress on phenotypes of *CiMYB4* transgenic tobacco

2.6 *CiMYB4*转基因野菊抗旱性分析

随着干旱时间的增加,不同的野菊株系产生了明显的变化(图8)。干旱胁迫7 d时,WT和CKZ株系叶片出现明显的萎蔫,而2个过表达*CiMYB4*野菊株系(COX-1和COX-2)依然保持正常的生长状态。干旱胁迫14 d时,WT和CKZ株系萎蔫倒伏,而COX-1和COX-2株系出现部分萎蔫现象,但茎秆依然呈直立状态。

不同时间干旱胁迫对不同野菊株系产生了显著影响($P < 0.05$,图9)。干旱0 d时4个株系野菊的MDA含量无显著差异($P > 0.05$),而在干旱7和14 d时,COX-1和COX-2株系的MDA含量显著低于WT和CKZ株系,其中在干旱14 d时差异最大,COX-1株系的MDA含量分别为WT和CKZ株系的57.97%和60.17%,COX-2株系的MDA含量分别为WT和CKZ株系的52.18%和54.16%。随着干旱时间的增加,不同株系野菊的Pro含量与

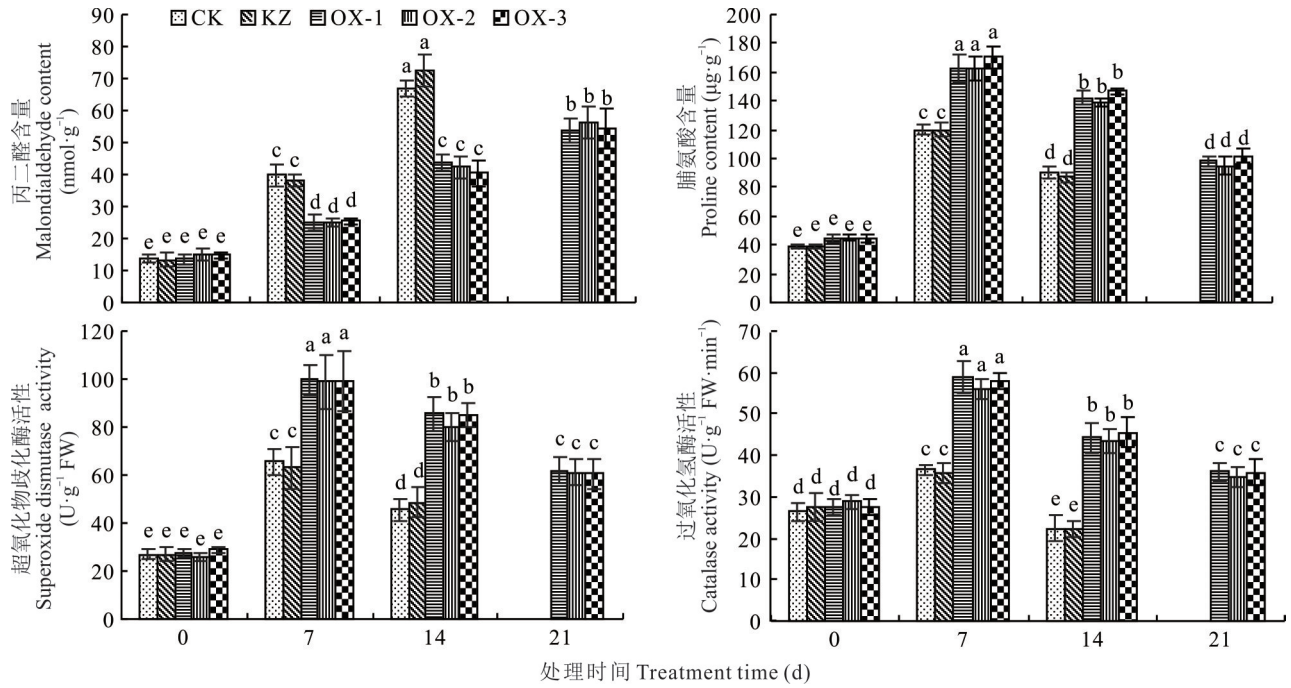


图 7 干旱胁迫对转基因烟草生理指标的影响

Fig. 7 Effects of drought stress on physiological index of *CiMYB4* transgenic tobacco

不同小写字母表示不同株系不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。The different lowercase letters mean the significant differences among treatments of the different lines ($P < 0.05$). The same below.

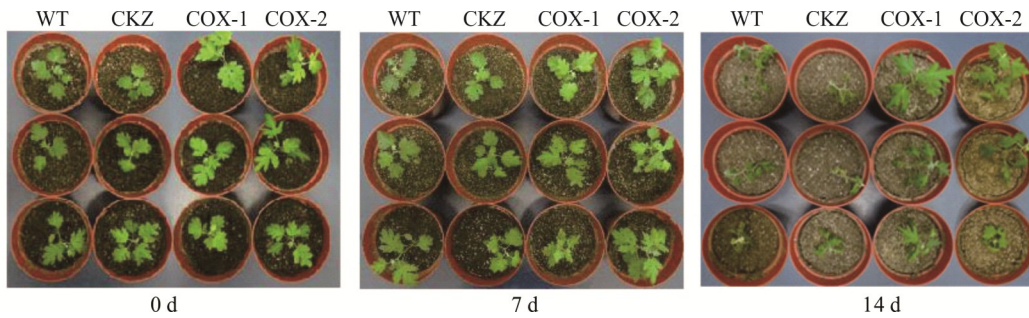


图 8 干旱胁迫对转基因野菊表型的影响

Fig. 8 Effects of drought stress on phenotypes of *CiMYB4* transgenic *C. indicum*

干旱 0 d 相比显著增加 ($P < 0.05$), 且干旱 7 和 14 d 时, COX-1 和 COX-2 株系的 Pro 含量均显著高于 WT 和 CKZ 株系 ($P < 0.05$)。随着干旱时间的增加, 不同株系野菊的 SOD 和 CAT 活性均呈先升高后降低的趋势。在干旱 7 和 14 d 时, COX-1 和 COX-2 株系的 SOD 和 CAT 活性均显著高于 WT 和 CKZ 株系 ($P < 0.05$)。在干旱 7 d 时, COX-1 和 COX-2 株系的 SOD 和 CAT 活性均达到最高, 其中 COX-1 的 SOD 和 CAT 活性分别为 0 d 时的 3.44 和 4.94 倍, COX-2 的 SOD 和 CAT 活性为 0 d 时的 3.34 和 4.57 倍。在干旱 14 d 时 WT 和 CKZ 的 SOD 和 CAT 活性显著低于 0 d ($P < 0.05$), 这可能是由于干旱 14 d 对 WT 和 CKZ 株系造成了不可逆的损伤。

3 讨论

MYB 是植物中最大的转录因子家族之一, 不仅参与植物的初级和次级代谢, 还参与多种生物和非生物胁迫的响应^[28]。MYB 转录因子家族分为 4 个亚族, 其中大多数 MYB 转录因子都属于 R2R3-MYB 亚族^[29-30], 该亚族在植物抗逆中发挥重要作用。在矮牵牛 (*Petunia hybrida*)、铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)、银杏 (*Ginkgo biloba*)、拟南芥、水稻 (*Oryza sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、烟草和大豆 (*Glycine max*) 中分别鉴定出 106、99、

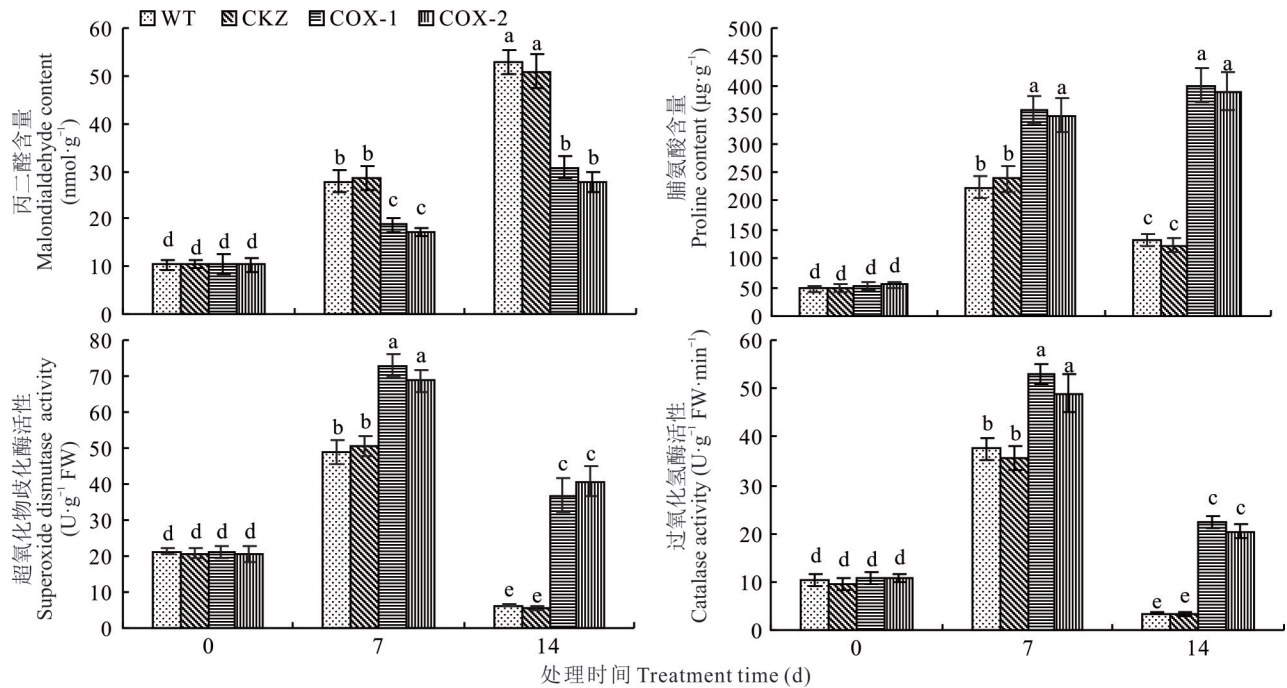


图9 干旱胁迫对转基因野菊生理指标的影响

Fig. 9 Effects of drought stress on physiological index of *CiMYB4* transgenic *C. indicum*

69、137、95、393、174 和 288 个 R2R3-MYB 亚族基因^[28,31-37],其中许多基因已被证明能够响应干旱、高温、盐碱、重金属等非生物胁迫。本研究通过对 *CiMYB4* 基因的生物信息学分析发现, *CiMYB4* 有两个植物 MYB 转录因子家族的特异性 SNAT 结构域,属于 R2R3-MYB 亚族。亚细胞定位在转录因子的功能发挥以及基因表达调控机制的研究中具有重要意义。目前绝大多数转录因子都定位在细胞核中,但也有少部分转录因子定位在质膜和细胞核中,这可能与蛋白修饰和磷酸化有关^[38-39]。*CiMYB4* 只定位在细胞核中,表明其只在细胞核中发挥作用。

转录因子通过结合靶基因启动子的顺式作用元件调控下游功能基因的转录表达,所以在鉴定基因功能时,分析其启动子区域包含的顺式作用元件类型及数量显得尤为重要。启动子通常是指位于基因 5' UTR 上游,能够与 RNA 聚合酶特异性结合并启动转录的非编码核苷酸序列,一般包括核心启动子区、上游元件和应答元件 3 个部分^[40],其中应答元件是转录因子识别并结合的序列,与基因功能的发挥密切相关,常见的应答元件有茉莉酸甲酯响应元件 (CGTCA-motif)、脱落酸响应元件 (ABRE)、生长素响应元件 (TGA-element)、水杨酸响应元件 (TCA-element)、光响应元件 (G-box)、低温响应元件 (LTR) 以及 MYB (CAACCA)、WRKY (W-box)、MYC (CATGTG) 等转录因子特异性结合顺式作用元件。本研究发现 *CiMYB4* 的启动子序列中具有 3 类激素响应元件、3 类胁迫相关的响应元件、7 类光响应元件、7 个 MYB 结合位点以及 3 个 MYC 结合位点,其中有 7 个顺式作用元件与干旱调控相关,这表明 *CiMYB4* 能够参与植物多种生理功能的调控,尤其是在干旱胁迫中发挥重要作用。

干旱是限制植物生长发育的非生物因素,一直都是植物胁迫研究的热点。在干旱胁迫下,植物可以通过调控细胞运动、基因表达和抗氧化系统活性等方式增强对干旱胁迫的耐受性。其中抗氧化酶系统是降低植物 ROS 损伤的重要屏障,SOD、POD、CAT 等抗氧化酶的活性在胁迫条件下会被快速激活,以清除细胞内积累的 H₂O₂ 和 O₂⁻^[41],从而达到保护植物细胞的目的。不同类型的酶发挥不同的功能。SOD 首先将 O₂⁻ 转化为 H₂O₂ 和 O₂,然后分解产生的 H₂O₂ 和内源 H₂O₂ 刺激 POD 和 CAT 活性。本研究发现过表达 *CiMYB4* 的野菊和烟草株系在干旱处理 7 和 14 d 时的 SOD 和 CAT 活性均显著高于转空载和野生型株系 ($P < 0.05$),这表明 *CiMYB4* 基因可能会激活抗氧化酶相关基因的表达以增强 SOD 和 CAT 的活性,清除植株体内由于干旱胁迫过量累积的 ROS,这与 Zhu 等^[19]的研究结果一致。当胁迫导致的 ROS 积累量超过抗氧化酶的清除能力时,细胞膜就会发生过氧化反应,导致细胞液外渗,造成植物生理代谢紊乱。MDA 是膜脂氧化的最终产物,也是膜系统受损的重要标志之一^[42]。

过表达 *CiMYB4* 的野菊和烟草株系 MDA 含量虽然也随干旱胁迫时间的延长显著升高 ($P < 0.05$), 但均低于转空载和野生型株系。这一方面说明抗氧化酶清除 ROS 有明显的阈值, 另一方面也表明 *CiMYB4* 基因是响应干旱胁迫的正调控因子。除抗氧化酶系统外, Pro 作为一种渗透调节物质也被证明是有效的自由基清除剂, 在稳定原生质胶体、细胞代谢过程、维持渗透调节平衡等方面起重要作用^[43-44]。过表达 *CiMYB4* 的野菊和烟草株系在干旱胁迫下可显著增加 Pro 含量 ($P < 0.05$), 这表明 *CiMYB4* 可协同调控渗透调节系统与抗氧化酶系统增强植株的抗旱能力。

4 结论

神农香菊 *CiMYB4* 基因编码 281 个氨基酸, 属于 R2R3-MYB 亚族, 定位于细胞核中。启动子区域包含 7 个响应干旱的顺式作用元件。在烟草和野菊中过表达 *CiMYB4* 基因能通过提高抗氧化酶活性以及 Pro 含量增强转基因株系的抗旱性。本研究明确了 *CiMYB4* 基因是一个抗干旱胁迫的正向调控因子, 为菊花抗旱新品种的选育提供了基因资源, 具体的抗旱调控机制需后续进一步研究。

参考文献 References:

- [1] Gao S Z, Chen X H, Lin M H, *et al.* A birch ELONGATED HYPOCOTYL 5 gene enhances UV-B and drought tolerance. *Forestry Research*, 2024, 4(1): e022.
- [2] Yu Z H, Chen X S, Chen Z W, *et al.* *BcSRC2* interacts with *BcAPX4* to increase ascorbic acid content for responding ABA signaling and drought stress in pak-choi. *Horticulture Research*, 2024, 11(8): uhae165.
- [3] Lynch J P. Rightsizing root phenotypes for drought resistance. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(13): 3279–3292.
- [4] Li L L, Zhu H L, Ju Y Q, *et al.* Comparison of microstructure and physiological response of the leaves of six *Rosa rugosa* genotypes under drought stress. *Ornamental Plant Research*, 2024, 4(1): e016.
- [5] Li J Y, Ren J J, Lei X Y, *et al.* CsREV-CsTCP4-CsVND7 module shapes xylem patterns differentially between stem and leaf to enhance tea plant tolerance to drought. *Cell Reports*, 2024, 43(4): 113987.
- [6] He L Y, Tan M M, Che H T, *et al.* Cloning and analysis of drought tolerance function of the *LpDREB9* in *Lilium pumilum*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(1): 161–173.
贺龙义, 谭萌萌, 车海涛, 等. 细叶百合 *LpDREB9* 基因克隆及耐旱性分析. *草业学报*, 2025, 34(1): 161–173.
- [7] Lim C, Kang K, Shim Y, *et al.* Inactivating transcription factor *OsWRKY5* enhances drought tolerance through abscisic acid signaling pathways. *Plant Physiology*, 2022, 188(4): 1900–1916.
- [8] Zhao P P, Zhao M, Gao X Y, *et al.* *GhWRKY1bD* improves drought tolerance by co-regulation of ABA, ROS, and proline homeostasis in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Industrial Crops and Products*, 2024, 220(1): 119179.
- [9] Ge M M, Tang Y, Guan Y J, *et al.* *TaWRKY31*, a novel WRKY transcription factor in wheat, participates in regulation of plant drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 27.
- [10] Liu J T, Wang Y Q, Ye X R, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the WRKY gene family in response to low-temperature and drought stresses in *Cucurbita pepo* L. *Scientia Horticulture*, 2024, 330(1): 113048.
- [11] Luo Y R, Xu X Y, Yang L F, *et al.* A R2R3-MYB transcription factor, *FeR2R3-MYB*, positively regulates anthocyanin biosynthesis and drought tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 217(1): 109254.
- [12] Fan K, Wu Y C, Mao Z J, *et al.* A novel NAC transcription factor *ZmNAC55* negatively regulates drought stress in *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 214(1): 108938.
- [13] Yang X Z, Li X, Wang X, *et al.* Genome-wide identification and characterization of bZIP gene family explore the responses of *PsebZIP44* and *PsebZIP46* in *Pseudoroegneria libanotica* under drought stress. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 1–15.
- [14] Riechmann J L, Heard J, Martin G, *et al.* *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, 290(5499): 2105–2110.
- [15] Ren Z Z, Zhang P Y, Su H H, *et al.* Regulatory mechanisms used by *ZmMYB39* to enhance drought tolerance in maize (*Zea mays*) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 211(1): 108696.
- [16] Yang B C, Song Z H, Li C N, *et al.* RSM1, an *Arabidopsis* MYB protein, interacts with HY5/HYH to modulate seed germination and seedling development in response to abscisic acid and salinity. *PLoS Genetics*, 2018, 14(12): e1007839.

- [17] Li Q, Kang F, Xue Q, *et al.* Functional analysis of the R2R3-MYB transcription factor *CiMYB4* of *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* in response to cadmium stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(5): 128–142.
李强, 康璠, 薛晴, 等. 神农香菊 R2R3-MYB 转录因子 *CiMYB4* 在镉胁迫中的功能分析. *草业学报*, 2024, 33(5): 128–142.
- [18] Zhou X, Lei D Y, Yao W T, *et al.* A novel R2R3-MYB transcription factor *PbMYB1L* of *Pyrus bretschneideri* regulates cold tolerance and anthocyanin accumulation. *Plant Cell Reports*, 2024, 43(2): 34.
- [19] Zhu N, Duan B L, Zheng H L, *et al.* An R2R3-MYB gene *GhMYB3* functions in drought stress by negatively regulating stomata movement and ROS accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 197(1): 107648.
- [20] Li B Z, Liu R N, Liu J, *et al.* *ZmMYB56* regulates stomatal closure and drought tolerance in maize seedlings through the transcriptional regulation of *ZmTOM7*. *New Crops*, 2024, 1(1): 100012.
- [21] Song Q, Kong L F, Yang X R, *et al.* *PtoMYB142*, a poplar R2R3-MYB transcription factor, contributes to drought tolerance by regulating wax biosynthesis. *Tree Physiology*, 2022, 42(10): 2133–2147.
- [22] Zhang J P, Wang G R, Bie H, *et al.* Transcription factor *ZmMYB153* enhances drought tolerance in maize seedlings by regulating stomatal movement through ABA signaling. *Acta Agronomica Sinica*, (2025-04-10)[2025-04-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.s.20250110.1231.002.html>.
张建鹏, 王国瑞, 别海, 等. 转录因子 *ZmMYB153* 通过 ABA 信号调节气孔运动增强玉米苗期抗旱性. *作物学报*, (2025-04-10)[2025-04-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.s.20250110.1231.002.html>.
- [23] Wang J J. Cloning of *CiMYB4* *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* and genetic transformation of *Chrysanthemum indicum*. Harbin: Northeast Forestry University, 2019.
王霁佳. 神农香菊 *CiMYB4* 基因的克隆及对野菊的遗传转化. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- [24] Xue Q. Functional analysis of *CiMYB4* gene in response to cadmium stress and cloning, expression analyse of its promoter in *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*. Harbin: Northeast Forestry University, 2022.
薛晴. 神农香菊 *CiMYB4* 响应镉胁迫的功能研究及其启动子克隆与表达分析. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022.
- [25] Li M Y. Verification of drought tolerance function of *CiMYB4* gene of *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* and construction of RNAi vector. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.
李梦雨. 神农香菊 *CiMYB4* 基因抗旱性功能验证及 RNAi 载体构建. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.
- [26] Zhou L, Shi K, Cui X R, *et al.* Overexpression of *MsNAC51* from alfalfa confers drought tolerance in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, 2023, 205(1): 105143.
- [27] Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment. Beijing: Higher Education Press, 2000.
李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 中国高等教育出版社, 2000.
- [28] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, *et al.* MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(10): 573–581.
- [29] Ren M H, Zhang Y P, Xu T, *et al.* Identification and expression analyses of R2R3-MYB subfamily in alfalfa under drought stress. *Acta Agronomia Sinica*, 2023, 31(4): 972–983.
任明辉, 张雨蓬, 许涛, 等. 紫花苜蓿 R2R3-MYB 亚家族鉴定与干旱胁迫下的表达分析. *草地学报*, 2023, 31(4): 972–983.
- [30] Jiang Y J, Yu Y P, Sun X Y, *et al.* Identification of R2R3-MYB gene family and analysis of its expression pattern in centipedegrass under drought stress. *Acta Agronomia Sinica*, 2023, 31(9): 2628–2641.
蒋宇佳, 于元平, 孙向一, 等. 假俭草 R2R3-MYB 基因家族的鉴定及其在干旱胁迫下的表达模式分析. *草地学报*, 2023, 31(9): 2628–2641.
- [31] Chen G Q, He W Z, Guo X X, *et al.* Genome-wide identification, classification and expression analysis of the MYB transcription factor family in *Petunia*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4838.
- [32] Zhang T T, Cui Z, Li Y X, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of MYB transcription factor superfamily in *Dendrobium catenatum*. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12(1): 714696.
- [33] Wei Q H, Chen R, Wei X, *et al.* Genome-wide identification of R2R3-MYB family in wheat and functional characteristics of the abiotic stress responsive gene *TaMYB344*. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 792.
- [34] Yang J H, Zhang B H, Gu G, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the R2R3-MYB gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 432.
- [35] Feller A, Machemer K, Braun E L, *et al.* Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors.

- The Plant Journal, 2011, 66(1): 94–116.
- [36] Du H, Yang S S, Liang Z, *et al.* Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 106.
- [37] Chen Y H, Yang X Y, He K, *et al.* The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60(1): 107–124.
- [38] Ding Q Q, Wang X T, Hu L Q, *et al.* MYB-like transcription factor *SiMYB42* from foxtail millet (*Setaria italica* L.) enhances *Arabidopsis* tolerance to low-nitrogen stress. *Hereditas*, 2018, 40(4): 327–338.
丁庆倩, 王小婷, 胡利琴, 等. 谷子 MYB 类转录因子 *SiMYB42* 提高转基因拟南芥低氮胁迫耐性. *遗传*, 2018, 40(4): 327–338.
- [39] Yang S, Cai W W, Shen L, *et al.* A CaCDPK29-CaWRKY27b module promotes *CaWRKY40* mediated thermotolerance and immunity to *Ralstonia solanacearum* in pepper. *New Phytologist*, 2022, 233(4): 1843–1863.
- [40] Liu W, Stewart J. Plant synthetic promoters and transcription factors. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 37(1): 36–44.
- [41] Chen B, Xue Q, Li Z W, *et al.* Effects of light intensities on physiological characteristics and ultrastructure of four Commelinaceae plants. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(2): 281–292.
陈斌, 薛晴, 李子葳, 等. 光强对 4 种鸭跖草科植物叶片生理特性和超微结构的影响. *草地学报*, 2021, 29(2): 281–292.
- [42] Yang C W, An M Z, Ren W, *et al.* Contrasting cold tolerance and underlying physiological mechanisms in two rye varieties during seed germination and seedling stages. *Chinese Journal of Grassland*, 2024, 46(6): 1–9.
杨朝伟, 安明珠, 任伟, 等. 两个黑麦品种种子萌发期和幼苗期耐寒性差异及其生理机制. *中国草地学报*, 2024, 46(6): 1–9.
- [43] Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, *et al.* Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture*, 2009, 29(1): 185–212.
- [44] Bai A X, Lu X Y. Effects of calcium and calcium effectors on antioxidant system and osmotic adjustment substances content of sour jujube (*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*) seedlings under NaCl stress. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(9): 1910–1920.
白爱兴, 鲁晓燕. 钙和钙效应剂对 NaCl 胁迫下酸枣幼苗抗氧化系统及渗透调节物质含量的影响. *植物生理学报*, 2020, 56(9): 1910–1920.