

张进兵, 沈春修, 王舸泓, 等. 东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS11.2* 位点候选基因 *LOC_Os11g35390-DX* 的克隆、生物信息学分析及遗传转化[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(6): 1612-1616.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.06.035

东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS11.2* 位点候选基因 *LOC_Os11g35390-DX* 的克隆、生物信息学分析及遗传转化

张进兵, 沈春修, 王舸泓, 廖建平, 却志群

(宜春学院生命科学与资源环境学院/江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000)

关键词: 东乡野生稻; 耐冷; 数量性状座位(Quantitative trait locus, QTL); 转录组分析; 半定量 RT-PCR
中图分类号: S511.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)06-1612-05

Cloning, bioinformatic analysis and genetic transformation of candidate gene *LOC_Os11g35390-DX* at QTL *qCTS11.2* in Dongxiang wild rice

ZHANG Jin-bing, SHEN Chun-xiu, WANG Ge-hong, LIAO Jian-ping, QUE Zhi-qun

(College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University/Key Laboratory of Regulation of Crop Growth and Development in Jiangxi Province, Yichun 336000, China)

Key words: Dongxiang wild rice; cold tolerance; quantitative trait locus (QTL); transcriptome analysis; semi-quantitative RT-PCR

低温寒害是影响水稻生产的主要不利因素之一,特别是苗期对低温胁迫尤为敏感,早春时期的水稻秧苗暴露于低温胁迫下,幼苗发育变缓、变黄、枯萎,最终导致水稻产量下降^[1]。受低温逆境胁迫的影响,东南亚和南亚共约有 7.00×10^6 hm²土地无法种植水稻^[2]。在中国,除了纬度较高的东北水稻耕作区易受低温影响外,长江中下游地区早春时期的“倒春寒”常导致水稻烂根、烂秧,对水稻产量产生了严重影响。据统计,每年中国稻作区均有低温冷害发生,平均4~5年发生1次严重冷害,造成水稻灾年年均减产 $5.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{10}$ kg^[3]。挖掘水稻自身的耐冷相关基因,培育强耐冷性水

稻品种是解决当前生产上这一突出问题的重要途径。

据国家水稻数据中心(<http://www.ricedata.cn/>)统计,截至2020年2月1日,水稻中已被克隆的耐冷相关基因共计81个,其中占比最大的一类是转录因子基因,约占50%,当遭遇冷胁迫时,植物转录因子的表达被启动,然后激活下游一系列抗寒功能性基因的表达,从而提高了植物的抗寒性^[4-5]。由此可见,耐冷相关转录因子基因在未来水稻抗寒育种中有着广阔的应用前景。MYB(V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)转录因子基因家族是目前植物中已知基因数最为庞大的转录因子基因家族之一。MYB转录因子由其N端保守的DNA结合结构域而得名,根据结构域中不完全重复的R结构的数量,可将MYB转录因子分为4个亚类:单一R结构的MYB、R2R3型MYB、3R-MYB及4R-MYB。此外,有较多研究发现MYB转录因子广泛参与了植株耐低温胁迫的基因转录调控网络^[6-8]。自东乡野生稻被发现以来,一直以耐冷性强而著称,然而目前在东乡野生稻中还未见关于MYB转录因子在低温逆境胁迫中发挥作用的

收稿日期:2020-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660379);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ180844, GJJ180845);江西省作物生长发育调控重点实验室开放课题项目(KFJJ201802)

作者简介: 张进兵(1998-),男,江西南昌人,本科,主要从事水稻抗逆性研究。(E-mail): zhangjinbing98@163.com

通讯作者: 却志群, (E-mail) zhiqunqun@163.com

报道。

笔者所在课题组前期通过对耐冷东乡野生稻、茶陵野生稻、东乡野生稻与冷敏感水稻 93-11 杂交所得 F_2 代越冬群体 (OOP, 由 20 个典型的可越冬存活的 F_2 代个体组成) 及冷敏感水稻 93-11 苗期冷处理 (4 °C 3 d) 前后的转录组数据进行比较分析, 获得了 462 个与水稻苗期耐冷性相关的差异表达基因 (Different expressed genes, DEG)^[9], 结合 Mao 等公布的 13 个东乡野生稻苗期耐冷数量性状 QTL 信息^[10], 发现有 1 个差异表达基因 *LOC_Os11g35390* 刚好落于 QTL 的 *qCTS11.2* 位点区域。本研究将东乡野生稻中该差异表达的基因暂命名为 *LOC_Os11g35390-DX*, 并将该基因视为耐冷 QTL 的 *qCTS11.2* 基因的候选基因, 拟通过半定量 RT-PCR 技术验证该基因在东乡野生稻冷胁迫前后表达量的变化, 克隆以该基因为中心的上下游各延伸约 1.2 kb 的基因片段, 并预测分析该基因的上游潜在功能顺式元件, 最后借助农杆菌介导的方法转化冷敏感水稻受体品种明恢 86。本研究结果可为后续东乡野生稻耐冷基因在耐低温胁迫功能中的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料为东乡野生稻, 受体材料为冷敏感水稻品种明恢 86, 2 种水稻材料均由笔者所在实验室保存。大肠杆菌菌株 DH5 α 、农杆菌菌株 EHA105 均购自北京全式金生物技术有限公司。植物表达载体 pCAMBIA1300 由笔者所在实验室保存。

RNA 抽提试剂盒, 购自成都福际生物技术有限公司; 高保真 DNA 聚合酶、Fast Pfu DNA 聚合酶、RT-PCR 试剂盒, 均购自 TransGen 公司; 质粒抽提试剂盒, 购自 OMEGA 公司; 限制性内切酶 *BamH* I、*Kpn* I, 购自 Thermo 公司; *rTaq* DNA 聚合酶, 购自 TaKaRa 公司。其余试剂均为国产或进口分析纯级别。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 根据 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 中公布的水稻 *LOC_Os11g35390* 基因及其上游序列信息, 使用 Primer 5.0 软件设计基因扩增引物 35390-DX-F、35390-DX-R, 参照外显子序列设计半定量 RT-PCR 引物 SQU-35390-F、SQU-35390-R, *Tubulin*-F、*Tubulin*-R 为内参基因 *Tubulin* 的扩增引物, *Hpt*-F、*Hpt*-R 为潮霉素抗性标记基因的扩增引物。

1.2.2 荧光定量表达分析 参照 TIANGEN 公司的 Super Real PerMix Plus (SYBR Green) 试剂盒操作方法说明, 以 SQU-35390-F、SQU-35390-R 为引物, 在 StepOne PlusTM 荧光定量 PCR 仪中进行实时荧光定量 PCR 扩增, 用 $\Delta\Delta Ct$ 分析方法评估基因的表达水平。将东乡野生稻幼苗在常温条件 (28 °C 左右) 下培养至 4 周左右后置于 4 °C 冷藏柜中进行冷

处理, 以处理前的东乡野生稻叶片样本作为对照组, 将东乡野生稻于 4 °C 冷处理 1 d、2 d、3 d 后的叶片样本作为试验组, 以微管蛋白 (*Tublin*) 编码基因作为内参基因, 设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

1.2.3 遗传转化 用农杆菌介导的转化方法将构建好的植物表达载体 pCAMBIA1300-35390-DX 导入转基因受体水稻品种明恢 86 中, 在转基因过程中, 培养基的配制参照魏林艳^[11]的方法。

1.2.4 耐冷性的鉴定 待来源于 T_0 代转基因株系的 T_1 代水稻种子发芽后, 将其置于盛有 50 mg/L 潮霉素溶液的培养皿 (直径为 90 mm) 中, 进行约 10 d 的筛选培养, 选择生长不受抑制的 T_1 代转基因植株与同时进行发芽处理的受体明恢 86 植株 (在盛有灭菌水的培养皿中培养) 移栽到同 1 个盛有泥土的塑料培养容器中 (19 cm \times 13 cm \times 12 cm)。采用自然光照射, 平均昼夜温度为 28 °C 至 22 °C, 每天对幼苗浇水直至 3~4 叶期, 而后将幼苗移栽至 4 °C 的环境中, 进行 2~3 d 的冷处理。复活 10 d 后分别统计野生型植株、转基因植株的复活率 (复活率=处理后复活幼苗数/幼苗总数 \times 100%), 试验设 3 次重复。

1.2.5 生物信息学分析 用生物信息学软件 PlantCARE 分析启动子序列, 预测其中存在的顺式元件; 用在线分析软件 SMART 对基因编码蛋白质的结构域进行预测分析; 用 DNAMAN 进行氨基酸序列的多重比对和系统进化树的构建。

2 结果与分析

2.1 QTL *qCTS11.2* 位点候选基因 *LOC_Os11g35390-DX* 的确定

根据 Mao 等^[10] 公开的东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS11.2* 位点最邻近侧翼标记的序列信息, 在公共数据网站 gramene (<http://ensembl.gramene.org/Tools/Blast>) 上对两端侧翼标记序列进行 BLAST, 以确认其在水稻染色体上的确切位置。随后在 Rice Genome Annotation Project 网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice>) 上输入这 2 个侧翼标记序列的物理位置信息, 并查阅该区段中的所有基因, 与笔者所在课题组前期通过 RNA-seq 测序统计发现的 462 个东乡野生稻和 OOP 共有的与耐冷相关的差异表达基因进行比对, 最终发现在 462 个低温诱导的差异表达基因中有 2 个基因 (*LOC_Os11g31190-DX*、*LOC_Os11g35390-DX*) 位于 *qCTS11.2* 位点所处的染色体区段中, 本研究选取的候选基因 *LOC_Os11g35390-DX* 正是其中之一。

2.2 低温胁迫下东乡野生稻 *LOC_Os11g35390-DX* 基因的表达

在前期的研究中, 笔者用 RNA-seq 技术对耐冷东乡野生稻苗期冷处理前后的转录组进行分析发现, 东乡野生稻 *LOC_Os11g35390-DX* 基因的表达量在冷处理后显著下调, 仅为冷处理前表达量的 13.4%。这一结果显示, 在东乡野生稻

中,低温胁迫会诱导 *LOC_Os11g35390-DX* 基因表达量的下调。为了验证这一结论,用实时荧光定量 PCR 对东乡野生稻中的 *LOC_Os11g35390-DX* 基因在冷胁迫处理条件下的相对表达量进行分析。结果显示,在连续冷胁迫处理 3 d 的过程中,东乡野生稻中 *LOC_Os11g35390-DX* 基因的表达量表现出逐渐下调的趋势;冷处理 3 d 后,该基因的表达量下降至冷处理前表达量的 7.8%。

2.3 东乡野生稻 *LOC_Os11g35390-DX* 基因的克隆

对包含 *LOC_Os11g35390-DX* 基因及其上游、下游序列在内的共计 4.5 kb 的 DNA 片段进行 PCR 扩增。PCR 扩增结果显示,扩增出的特异性条带与目的片段大小相符,约为 4.5 kb。随后用 *Bam*H I、*Kpn*I 限制性内切酶双酶切 PCR 扩增产物,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带,与同样用 *Bam*H I、*Kpn*I 限制性内切酶双酶切后的表达载体 pCAMBIA1300 进行连接。通过 *Bam*H I、*Kpn*I 双酶切鉴定重组克隆 pCAMBIA1300-35390-DX,结果显示,本研究获得了 1 个阳性克隆,电泳所得大小约为 9.0 kb 的条带是 pCAMBIA1300 载体片段,大小约为 4.5 kb 的条带是目的基因片段。

2.4 *LOC_Os11g35390-DX* 蛋白结构域的分析及多重比对

通过对阳性克隆测序结果与公共数据库中水稻品种日本晴测序结果对应位点的全长 cDNA 序列进行比对,推测该基因全长 cDNA 大小为 993 bp,编码 330 个氨基酸,使用生物信息学工具 SMART 对 *LOC_Os11g35390-DX* 蛋白氨基酸序列的保守结构域进行分析。结果显示,东乡野生稻 *LOC_Os11g35390-DX* 蛋白的 N 端有 2 个保守结构域 SANT (SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIIB DNA-binding domains),分别位于氨基酸序列第 14~64 号位点及第 67~155 号位点之间的区段,这一结构域是 MYB 转录因子典型的 R2R3 型保守结构域,表明东乡野生稻的 *LOC_Os11g35390-DX* 基因属于 R2R3 型 MYB 转录因子基因。从国家水稻数据中心网站 (www.ricedata.com) 上获取其他已克隆的水稻 R2R3 型 MYB 转录因子的氨基酸序列,使用 DNAMAN 将东乡野生稻 *LOC_*

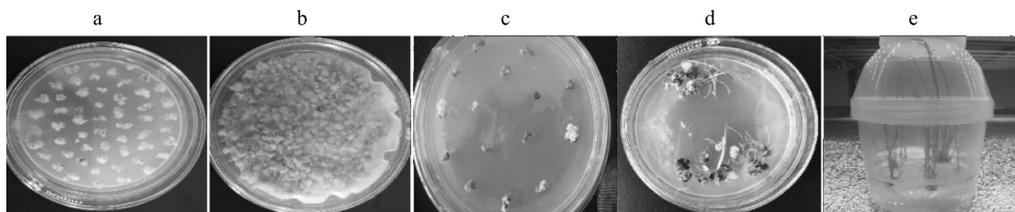
Os11g35390-DX 基因编码的蛋白质氨基酸序列与其进行多重比较,结果显示,东乡野生稻 *LOC_Os11g35390-DX* 基因编码的蛋白质氨基酸序列与 *OsJAMyb*^[12]、*OsMYB2P-1*^[13]、*OsMYB91*^[14]、*OsMYB2*^[15] 及 *OsMYB103*^[16] 等 R2R3 型 MYB 转录因子基因编码的蛋白质氨基酸序列存在 30.98% 的一致性。

2.5 水稻 MYB 转录因子基因分子进化树的构建

为了对东乡野生稻 *LOC_Os11g35390-DX* 基因的功能进行初步预测,用 DNAMAN 软件将该基因与 19 个已克隆的水稻 MYB 转录因子基因进行系统发育分析并构建进化树。结果表明,*LOC_Os11g35390-DX* 基因与 *Osmyb4* 基因^[17]、*OsMYB30* 基因^[18] 同源性最高,亲缘关系最近;与水稻 *MYB1* 基因^[19]、*OsMYB6* 基因^[20] 的同源性最低,亲缘关系最远。

2.6 重组质粒 pCAMBIA1300-35390-DX 的遗传转化及 T₁ 代转基因植株耐冷表型的鉴定

将转入植物表达载体 pCAMBIA1300-35390-DX 的农杆菌菌株接种在含有 50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平的 LB 固体平板上,培养 2~3 d 后侵染预备好的冷敏感水稻明恢 86 的愈伤组织,愈伤组织经与农杆菌克隆共培养,潮霉素筛选培养,分化培养基上的光照分化培养及幼苗生根壮苗后,最终获得 24 株转入重组载体 pCAMBIA1300-35390-DX 的转基因植株(图 1)。用潮霉素抗性标记基因部分序列的特异性引物 *Hpt-F*、*Hpt-R* 对经潮霉素抗性筛选获得的 T₀ 代转基因水稻幼苗进行 PCR 扩增检测。结果显示,24 个被检测植株中都检测到了目标条带,阳性率为 100%,说明本研究已经获得转 *LOC_Os11g35390-DX* 基因的阳性株系。部分潮霉素抗性标记基因特异性引物的 PCR 检测结果显示,阳性样本在 900 bp 左右有目标条带,而野生型阴性对照无条带。本研究同时对来源于 T₀ 代转基因株系的 T₁ 代转基因植株与野生型水稻植株进行了耐冷表型的比较鉴定,然而未发现 T₁ 代转基因植株的耐冷性与野生型植株之间的耐冷性有明显差异。



a:愈伤组织培养;b:愈伤组织与转入 pCAMBIA1300-35390-DX 载体的农杆菌共培养;c:抗性愈伤组织的潮霉素筛选;d:愈伤组织的分化培养;e:转基因植株的生根壮苗培养。

图 1 遗传转化实物

Fig.1 Physical map of genetic transformation

2.7 *LOC_Os11g35390-DX* 基因上游启动子主要顺式作用元件的分析预测

本研究用启动子分析工具 PlantCARE 预测了 *LOC_*

Os11g3539-DX 基因起始密码子上游约 1.2 kb 启动子序列中的主要顺式作用功能元件。结果表明,该顺式作用元件包含一些启动子的基本元件,包括 3 个转录起始核心顺式作用元

件 TATA-box 位点、3 个启动子结构以及增强子结构中常见的顺式作用元件 CAAT-box 位点。除了这些启动子的基本元件外,上游启动子序列还包含与非生物逆境胁迫有关的 4 个 MYC 转录因子结合顺式作用元件和 1 个 MYB 转录因子结合顺式作用元件,另外还携带一些与激素调控相关的作用元件,包括与茉莉酸信号通路相关的顺式作用元件 GGTCA-motif、TGACG-motif,与脱落酸响应信号通路相关的顺式作用元件 ABRE 以及与生长素响应相关的顺式作用元件 TGA-element。

3 讨论

植物在生长发育过程中常受到各种逆境胁迫的影响,经过漫长的进化过程,植物受到逆境胁迫后,通过自身基因转录、转录水平的调控,形成了完整的抗逆境胁迫体系^[21]。由此可见,与植物抗逆境胁迫相关的基因常为胁迫诱导表达基因,通过自身转录或翻译的变化,参与到植物抗逆境胁迫响应的机制中。通过 QTL 定位方法获得的 QTL 在染色体上的长度范围动辄达 kb 级,其中包含的基因数量巨大,无法实现基因的单独克隆鉴定、表型分析等工作,而缩小 QTL 定位范围又面临找寻分子标记难度逐步加大、工作量繁杂等问题。本研究结合 Mao 等^[10]公开的东乡野生稻苗期耐冷 QTL 染色体位置信息,将低温处理(4 °C 处理 3 d)后在东乡野生稻和 OOP 中都出现下调表达且同时落在 QTL *qCTS11.2* 位点所在区段的差异表达基因 *LOC_Os11g35390-DX* 作为东乡野生稻 *qCTS11.2* 位点中的 1 个候选基因,由于水稻耐冷相关基因往往是冷诱导表达基因,这种将水稻耐冷基因 QTL 定位与冷胁迫处理前后转录组分析获得的差异表达基因结合的基因克隆研究思路在很大程度上为耐冷 QTL 所在染色体区段候选基因的筛选提供了便利,有助于加快水稻耐冷基因的挖掘进程。

SMART 在线分析软件预测结果表明,东乡野生稻 *LOC_Os11g35390-DX* 基因属于典型的 R2R3 型 MYB 转录因子基因,MYB 转录因子是植物中一类重要的转录因子,因其结构中存在高度保守的 DNA 结合区域(myb 结构域)而得名。MYB 转录因子家族具有广谱作用,广泛参与植物组织的形态建成、次生代谢、激素调控及信号转导过程^[22]。此外,在植物遭受非生物逆境胁迫时,MYB 转录因子也通过调控下游基因的表达而参与生物应答。Liao 等^[23]将大豆 *Gm-MYB177* 基因转入拟南芥,提高了拟南芥的耐旱性;Zhai 等^[24]报道,MYBC1 转录因子可独立于 CBF 通路负调控拟南芥的耐寒性。*LOC_Os11g35390-DX* 基因编码的氨基酸序列与其他已克隆的水稻 R2R3 型 MYB 转录因子氨基酸序列的比对结果表明,它们之间的氨基酸序列同源性较低,表明水稻 R2R3 型 MYB 转录因子之间差异较大,推测存在多个进化分支。通过构建分子进化树发现,*LOC_Os11g35390-DX* 基因与水稻 R2R3 型 MYB 基因 *Osmyb4*、*OsMYB30* 的亲缘关系最

近。有研究发现,过表达水稻 *Osmyb4* 基因显著增强了拟南芥植株的抗寒性,同时,转基因植株中部分参与低温胁迫响应的基因表达量也发生了变化,表明水稻 *Osmyb4* 基因在植物响应低温胁迫的信号传导通路中起着开关作用^[17],而过表达 *OsMYB30* 基因的转基因水稻植株却呈现低温胁迫敏感的表型^[18]。以上结果表明,与 *LOC_Os11g35390-DX* 基因亲缘关系较近的 R2R3 型 MYB 转录因子基因 *Osmyb4*、*OsMYB30* 在水稻应答低温胁迫的正负调控中发挥了重要的调节作用。结合 *LOC_Os11g35390-DX* 基因受低温诱导后表达量降低这一特性,推测 *LOC_Os11g35390-DX* 基因可能参与东乡野生稻低温胁迫应答的负调控过程。

通过在线分析软件 PlantCARE 分析东乡野生稻转录因子基因 *LOC_Os11g35390-DX* 的上游启动子序列,结果显示,在 *LOC_Os11g35390-DX* 基因的启动子序列中,除了包含一些常见功能顺式作用元件外,还存在 MYB、MYC 等两类被广泛报道参与植物非生物胁迫响应的基因表达调控网络的转录因子结合位点。由此推测,在东乡野生稻中,*LOC_Os11g35390-DX* 基因作为 1 种 MYB 转录因子基因调节下游基因表达的同时,自身的表达也可能被上游 MYB 或 MYC 转录因子调控,推测其在东乡野生稻低温胁迫响应的基因表达调控网络中起到中间信号传递的作用。另外,预测分析结果表明,在 *LOC_Os11g35390-DX* 基因启动子上还分布着与脱落酸、茉莉酸及生长素等在植物响应逆境胁迫时发挥重要作用的植物激素信号通路相关联的顺式作用元件,表明该基因可能也参与了植物激素响应逆境胁迫的信号转导途径的基因表达调控。

参考文献:

- [1] ANDAYA V C, MACKILL D J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(392): 2579-2585.
- [2] STHAPIT B R, WTCOMBEL J R. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening [J]. *Crop Science*, 1998, 38(3): 660-665.
- [3] 蔡志欢,张桂莲. 水稻低温冷害研究进展[J]. *作物研究*, 2018, 32(3): 249-255.
- [4] SU C F, WANG Y C, HSIEH T H, et al. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 145-158.
- [5] WANG Q Y, GUAN Y C, WU Y R, et al. Over-expression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(6): 589-602.
- [6] AGARWAL M, HAO Y J, KAPOOR A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(49): 37636-37645.

- [7] SU L T, LI J W, LIU D Q, et al. A novel MYB transcription factor, *GmMYB11*, from soybean confers drought and cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 2014, 538(1): 46-55.
- [8] SHINGOTE P R, KAWAR P G, PAGARIYA M C, et al. Ectopic expression of *SsMYB18*, a novel MYB transcription factor from *Saccharum spontaneum* augments salt and cold tolerance in tobacco [J]. *Sugar Tech*, 2017, 19(3): 270-282.
- [9] SHEN C X, LI D, HE R H, et al. Comparative transcriptome analysis of RNA-seq data for cold-tolerant and cold-sensitive rice genotypes under cold stress [J]. *Journal of Plant Biology*, 2014, 57(6): 337-348.
- [10] MAO D H, YU L, CHEN D Z, et al. Multiple cold resistance loci confer the high cold tolerance adaptation of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) to its high-latitude habitat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128(7): 1359-1371.
- [11] 魏林艳. 籼稻明恢 86 多基因遗传转化及再生体系的优化[D]. 福州:福建农林大学, 2018.
- [12] CAO W L, CHU R Z, ZHANG Y, et al. *OsJAMyb*, a R2R3-type MYB transcription factor, enhanced blast resistance in transgenic rice [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2015, 92: 154-160.
- [13] DAI X Y, WANG Y Y, YANG A, et al. *OsMYB2P-1*, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(1): 169-183.
- [14] ZHU N, CHENG S F, LIU X Y, et al. The R2R3-type MYB gene *OsMYB91* has a function in coordinating plant growth and salt stress tolerance in rice [J]. *Plant Science*, 2015, 236: 146-156.
- [15] YANG A, DAI X Y, ZHANG W H. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2541-2556.
- [16] ZHANG S, FANG Z J, ZHU J, et al. *OsMYB103* is required for rice anther development by regulating tapetum development and exine formation [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2010, 55(29): 3288-3297.
- [17] CANDIDA V, FRANCE L, MARCELLA B, et al. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants [J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(1): 115-127.
- [18] LV Y, YANG M, HU D, et al. The *OsMYB30* transcription factor suppresses cold tolerance by interacting with a JAZ protein and suppressing β -amylase expression [J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(2): 1475-1491.
- [19] WANG T, TOHGE T, IVAKOV A, et al. Salt-related *MYB1* coordinates abscisic acid biosynthesis and signaling during salt stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 1027-1041.
- [20] TANG Y H, BAO X X, ZHI Y L, et al. Overexpression of a MYB family gene, *OsMYB6*, increases drought and salinity stress tolerance in transgenic rice [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 168.
- [21] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 199-206.
- [22] 吕波, 张文政, 李春雨, 等. MYB 家族转录因子 *OsMYB84* 通过 ABA 信号通路参与盐胁迫响应 [J]. *复旦学报 (自然科学版)*, 2015, 54(5): 591-600.
- [23] LIAO Y, ZOU H F, WANG H W, et al. Soybean *GmMYB76*, *GmMYB92*, and *GmMYB177* genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Cell Research*, 2008, 18(10): 1047-1060.
- [24] ZHAI H, BAI X, ZHU Y M, et al. A single-repeat R3-MYB transcription factor *MYBC1* negatively regulates freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 394(4): 1018-1023.

(责任编辑:徐 艳)