

# 沙地云杉 MYB 转录因子家族鉴定及其对盐胁迫的响应

隋明明, 张富满, 田甜, 闫艳秋, 耿乐, 李慧\*, 白玉娥\*

内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010000

隋明明, 张富满, 田甜, 闫艳秋, 耿乐, 李慧, 白玉娥. 沙地云杉 MYB 转录因子家族鉴定及其对盐胁迫的响应[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 825-844.

SUI Mingming, ZHANG Fuman, TIAN Tian, YAN Yanqiu, GENG Le, LI Hui, BAI Yu'e. Identification of the MYB transcription factor family involved in response to salt stress in *Picea mongolica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 825-844.

**摘要:** 沙地云杉(*Picea mongolica*)具有耐寒、耐旱及耐盐的优良特性,是“三北”地区生态建设及城市绿化的重要树种。MYB 转录因子可以响应非生物胁迫及次生代谢产物合成过程,为鉴定沙地云杉 MYB 转录因子家族并探究其在盐胁迫过程中的响应,本研究以挪威云杉基因组及沙地云杉转录组数据为参考,共鉴定出 196 个 MYBs 家族成员。根据系统进化树,MYB 转录因子家族分为 7 个亚类,其中, R2R3-MYB 亚类基因数量最多,占 84.77%, R-R 和 R1R2R3 亚类数量最少,均占 0.51%。基序、结构域、基因结构及保守性分析表明,同一亚类 MYB 转录因子具有高度保守性且具有相似基序和基因结构。不同盐胁迫梯度实验表明,沙地云杉最高的耐受盐胁迫浓度为 1 000 mmol/L。在 1 000 mmol/L 盐胁迫浓度下设置不同处理时间(0、3、6、12、24 h)并测定转录组数据,共筛选出 34 个 MYBs 差异表达基因,表明其可能在调控盐胁迫过程中发挥着重要作用。对差异基因编码的蛋白进行理化性质分析发现,蛋白序列长度在 89–731 aa,分子量约为 10.19–79.73 kDa,等电点为 4.80–9.91,不稳定系数 41.20–70.99。亚细胞定位显示,大部分蛋白位于细胞核,3 个蛋白位于叶绿体中。选取其中 12 个 MYB 基因进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)验证,其表达模式与 RNA-seq 数据一致。本研究为后续探索沙地云杉中 MYB 家族成员在响应盐胁迫过程的功能及作用机制提供了数据支持。

**关键词:** 沙地云杉; MYB 转录因子家族; 转录组分析; 盐胁迫

资助项目: 国家自然科学基金(32360402); 内蒙古自治区自然科学基金(2022MS03037)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360402) and the Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation (2022MS03037).

\*Corresponding authors. E-mail: LI Hui, lihui1984@imau.edu.cn; BAI Yu'e, baiyue@imau.edu.cn

Received: 2024-08-30; Accepted: 2024-12-03; Published online: 2024-12-04

## Identification of the MYB transcription factor family involved in response to salt stress in *Picea mongolica*

SUI Mingming, ZHANG Fuman, TIAN Tian, YAN Yanqiu, GENG Le, LI Hui\*, BAI Yu'e\*

College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, Inner Mongolia, China

**Abstract:** *Picea mongolica*, known for its remarkable tolerance to cold, drought, and salinity, is a key species for ecological restoration and urban greening in the “Three Norths” region of China. MYB transcription factors are involved in plant responses to abiotic stress and synthesis of secondary metabolites. However, studies are limited regarding the MYB transcription factors in *P. mongolica* and their roles in salt stress tolerance. In this study, 196 MYBs were identified based on the genome of *Picea abies* and the transcriptome of *P. mongolica*. Phylogenetic analysis classified the MYB transcription factors into seven subclasses. The R2R3-MYB subclass contained the maximum number of genes (84.77%), while the R-R and R1R2R3 subclasses each represented the smallest proportion, at about 0.51%. The MYB transcription factors within the same subclass were highly conserved, exhibiting similar motifs and gene structures. Experiments with varying salt stress gradients revealed that *P. mongolica* could tolerate the salt concentration up to 1 000 mmol/L. From the transcriptome data of *P. mongolica* exposed to salt stress (1 000 mmol/L) for 0, 3, 6, 12, and 24 h, a total of 34 differentially expressed MYBs were identified, which suggested that these MYBs played a key role in regulating the response to salt stress. The proteins encoded by these differentially expressed genes varied in length from 89 aa to 731 aa, with molecular weights ranging from 10.19 kDa to 79.73 kDa, isoelectric points between 4.80 and 9.91, and instability coefficients from 41.20 to 70.99. Subcellular localization analysis indicated that most proteins were localized in the nucleus, while three were found in the chloroplasts. Twelve MYBs were selected for quantitative real-time PCR (qRT-PCR), which showed that their expression patterns were consistent with the RNA-seq data. This study provides valuable data for further investigation into the functions and mechanisms of MYB family members in response to salt stress in *P. mongolica*.

**Keywords:** *Picea mongolica*; MYB transcription factor family; transcriptome analysis; salt stress

沙地云杉(*Picea mongolica*)属松科云杉属常绿乔木,是内蒙古自治区特有的乡土树种<sup>[1]</sup>,也是我国“三北”防护林建设及城市绿化的重要树种。在全球范围内,沙地云杉仅分布于我国内蒙古浑善达克沙地的东南部,该地区环境条件极其恶劣,为适应环境,沙地云杉形成了耐寒、抗旱、耐盐碱等特性<sup>[2]</sup>。沙地云杉既具有

生态和经济价值,也具有较高的研究价值。沙地云杉林可以防风固沙、防止水土流失,使干旱荒漠化地区的自然环境得到保护和改善<sup>[3]</sup>,其木材可提取松脂油,也可用于造纸、生产家具和乐器等<sup>[4]</sup>。

转录因子(transcription factor, TFs)通过调控基因表达来参与植物许多重要的发育过程,

如细胞形态发生、信号转导和环境胁迫反应<sup>[5]</sup>。MYB 是植物中数量较多、功能多样的一类转录因子家族,在大多数植物中普遍存在,并且与植物的生长发育以及逆境胁迫有着紧密的联系。1987年, Paz-Ares 等<sup>[6]</sup>最先在玉米中发现了 MYB 基因。MYBs 蛋白 N 端具有高度保守的 1-4 个 MYB DNA-binding domain (R) 结构域,其是由 50-53 个非同源氨基酸(R)组成的不完全串联重复序列,能与真核基因启动子区域的顺式元件特异性结合来调控基因表达<sup>[7]</sup>。根据 R 的数量, MYB 转录因子大致可分为 4 个亚类: R1-MYB/MYB-related (含有 1 个 R1/R2 结构域)、R2R3-MYB (含有 R1R2 结构域)、R1R2R3-MYB (含有 R1R2R3/3R 结构域)和 4RMYB (含有 4 个 R 结构域)<sup>[8-10]</sup>。研究发现, MYB 转录因子在植物生长发育<sup>[11]</sup>、细胞代谢<sup>[12-13]</sup>、细胞转运和逆境胁迫响应<sup>[14]</sup>、信号转导、激素合成、初级<sup>[15]</sup>和次级代谢<sup>[16]</sup>以及抵抗病原体感染<sup>[17]</sup>等方面发挥着至关重要的作用。其中, R2R3-MYB 亚类在植物中研究最多<sup>[18]</sup>,而其他 MYB 亚类基因报道相对较少。Zhao 等<sup>[19]</sup>发现 R2R3-MYB 基因 *GhMYB73* 过表达,在 Na<sup>+</sup>及脱落酸(abscisic acid, ABA)的作用下诱导基因编码的蛋白(*AtPYL8*、*AtABI5*、*AtABF3*和 *AtRD29B*)相互作用,提高转基因拟南芥对盐胁迫的耐受性。苦荞麦中 *FtMYB30* 与 ABA 受体蛋白 *AtRCAR1/2/3* 间存在直接互作,下游 ABA 依赖途径相关基因 *RD29B* 和 *RD26* 转录水平提高,降低转基因植株对盐分和 ABA 的敏感性<sup>[20]</sup>。水稻中的 *OsMYB30* 通过结合 *OsPAL6* 和 *OsPAL8* 的启动子,提高苯丙氨酸解氨酶含量,积累木质素和水杨酸,从而增强水稻对褐飞虱的抗性<sup>[21]</sup>。*AtMYB66* 正向调控 *AtMYB23* 参与一个正反馈回路,促进拟南芥根部细胞分化过程<sup>[22]</sup>。Caprice-like MYB (CPC-like)类基因

参与细胞形态发生的调控<sup>[23-24]</sup>; R1R2R3-MYB 基因在根毛细胞分化和细胞周期的调控中具有保守功能<sup>[24-25]</sup>。

土壤盐分过高威胁着植被生存及作物生产,据统计,全球约 9 500 万 km<sup>2</sup> 的陆地出现土壤盐碱化现象<sup>[26-27]</sup>。其中,2 300 万 km<sup>2</sup> 灌溉土地中约有 20%-30%正在遭受一定程度的次生盐碱化,且这一比例正在持续增长<sup>[28]</sup>。研究植物在生长发育过程中基因与调节因子如何相互作用以应对盐碱环境的响应机制极其重要。MYB 转录因子在响应逆境胁迫扮演着极其重要的角色,目前在多种植物中已被鉴定,其数量因物种不同而差异较大。如拟南芥<sup>[29]</sup> (*Arabidopsis thaliana*)中鉴定出 198 个 MYB 转录因子,陆地棉<sup>[30]</sup>(upland cotton)中鉴定出 492 个,大豆<sup>[31]</sup>(soybean)中鉴定出 244 个,杨树<sup>[32]</sup>(*Populus*)中鉴定出 192 个,苹果<sup>[33]</sup>(*Malus domestica*)中鉴定出 222 个。本研究参考挪威云杉基因组及沙地云杉转录组数据,通过 HMMER search 初步鉴定 MYB 家族成员,基于基因结构、基序、结构域等分析确定家族成员并构建系统进化树。对沙地云杉幼苗进行不同盐胁迫浓度处理实验,选取临界浓度,设置盐胁迫不同处理时间并进行转录组测序,分析响应盐胁迫的差异 MYB 基因的表达特征,初步探究沙地云杉 MYB 基因在盐胁迫过程中的作用。本研究以期为沙地云杉耐盐相关研究提供候选基因,并为进一步挖掘沙地云杉基因家族在盐胁迫过程中的功能及抗盐碱分子育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

沙地云杉种子采自内蒙古自治区赤峰市白音敖包自然保护区沙地云杉天然林(117°06'E-117°16'E, 43°3'N-43°36'N)。将种子播种至含

有 0.2 kg 的基质土(蛭石 : 营养土=1 : 3)的花盆中[8.4 cm (直径)×7.2 cm (高)]于(24±1) °C、湿度 75%、光照强度 500 lx 下培养。

选取生长健康、长势一致的 6 个月龄沙地云杉幼苗进行盐胁迫处理。在盐胁迫前, 先将每盆幼苗的质量标定一致, 分别浇入 70 mL 不同浓度的氯化钠溶液(0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000、1 100、1 200、1 300、1 400、1 500 mmol/L)观察幼苗针叶变化。每个梯度 3 个重复, 每个重复 10 棵幼苗。选定临界盐胁迫浓度后, 收集不同处理时间(0、3、6、12、24 h)的幼苗针叶, 针对每组胁迫处理时间均设置 3 个重复实验样本, 进而开展转录组测序工作。为消除生物节律对胁迫的影响, 在 1 d 中的同一时间段集中取样。

## 1.2 MYB 家族成员鉴定

转录组分析参考挪威云杉基因组(<https://plantgenie.org/>), 在 PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库中下载 MYB DNA binding domain 隐马尔可夫模型(PFAM 数据库登录号: PF00249), 通过 HMMER 软件在沙地云杉转录组数据中进行搜索, 阈值设定为  $1e-03$ 。使用本地 Blastp 将初次鉴定到的 MYB 家族成员同源比对到拟南芥基因组上, 阈值设定为  $1e-05$ 。基于比对结果对沙地云杉中的 MYB 家族成员进行命名。对初次鉴定到的 MYB 家族成员, 利用 TBtools (v2.086)中 Batch SMART 模块进行进一步鉴定, 去除 domain 不完整的家族成员。

## 1.3 MYB 蛋白系统发育树的构建

对确定的 MYB 家族成员, 使用 MEGA 6.06 软件进行多重序列比对, 将比对结果利用邻接(neighbor-joining, NJ)法中的 Poisson model 进行系统进化树构建, 自展值(bootstrap)设置为 1 000。使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>)及 Adobe Illustrator 2020 对系统发育树进行可视化及美化。

## 1.4 MYB 的基序、保守结构域、基因结构分析

通过 MEME (<http://meme-suite.org/>)在线网站对 MYB 基因进行保守基序分析, 其中基序数目设置为 10, 其他参数设置为默认值, 利用 TBtools (v2.086)软件中 Basic BioSequence View 版块进行可视化。使用 MEGA 6.06 软件对序列进行对齐, 然后使用 genedoc 软件截取保守结构域, 利用 Jalview 软件及 Adobe Illustrator 2020 进行可视化及美化。根据基因注释文件(gff)使用 TBtools 中 Visualize Gene Structure 模块绘制 MYB 基因结构图。

## 1.5 盐胁迫处理下 MYB 基因表达水平分析

将不同盐胁迫时间(0、3、6、12、24 h)的沙地云杉针叶进行转录组测序, 通过 DESeq2 软件包进行差异分析, 阈值设定为  $|\log_2FC| \geq 0.585$  及  $P\text{-value} \leq 0.05$ , 筛选 0 h vs. 3 h、0 h vs. 6 h、0 h vs. 12 h、0 h vs. 24 h 各组的差异基因取交集, 得到的差异基因与鉴定的 MYB 家族成员取交集, 确定最终的差异表达的 MYB 基因。使用 TBtools 中 HeatMap 模块对沙地云杉不同盐胁迫时间的 MYB 差异基因表达情况聚类并绘制热图。

## 1.6 MYB 差异基因蛋白理化性质分析

使用在线网站 ProtParam (<http://web.Expasy.org/protparam>)对差异 MYB 基因的编码蛋白的理化性质进行分析。利用 ExPASy ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html))计算 MYB 蛋白氨基酸残基数、等电点(isoelectric point, PI)、分子量(molecular weight, MW)、不稳定指数。利用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)在线软件预测 MYB 蛋白的亚细胞定位。

## 1.7 差异表达 MYB 基因定量分析

采集不同盐胁迫时间(0、3、6、12、24 h)

的沙地云杉叶片,用液氮冷冻,使用 CWBIO (北京康为世纪生物科技有限公司)全能型植物 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。通过 1.0%琼脂凝胶电泳及 NanoDrop 2000 来测定其 RNA 完整性和浓度。使用北京康为世纪生物科技有限公司 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,将 cDNA 稀释 5 倍后作为模板使用。使用 DNAMAN 9 软件为 *PmMYB15a*、*PmMYB36b*、*PmMYB15c*、*PmMYB79a*、*PmMYB112*、*PmMYB123f*、*PmCPC5*、*PmRVE2b*、*PmMYB73a*、*PmMYB5d*、*PmMYB126*、*PmMYB55e* 这 12 个 MYB 基因设计 qRT-PCR 引物(表 1)。采用罗氏实时荧光定量(LightCycler 480) PCR 仪进行定量分析,每个处理进行 3 个生物学重复,以 *EF1a* 作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量,并使用 GraphPad Prism 10 软件进行差异显著性分析和 Origin 64 柱状图绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 确定临界盐胁迫浓度

本研究设置了不同梯度盐浓度(0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、

1 000、1 100、1 200、1 300、1 400、1 500 mmol/L)处理实验并对沙地云杉的幼苗进行观察(图 1),发现 0、100、200、300、400、500 mmol/L 盐胁迫时,针叶均无明显变化;600 mmol/L 和 700 mmol/L 处理第 7 天出现叶尖微黄;800 mmol/L 处理第 7 天开始呈现暗绿色,叶片呈现轻微缩水现象;900 mmol/L 处理第 7 天叶片基部发黄;1 000 mmol/L 处理第 7 天叶片出现明显的变黄缩水现象;1 100 mmol/L 处理第 5 天叶基部出现干枯现象,第 7 天叶片全部变黄;1 200 mmol/L 处理第 6 天就出现干枯变黄且叶片基部和茎都缩水变干;1 300、1 400、1 500 mmol/L 等浓度处理第 5 天叶子干枯变黄,第 7 天部分叶片掉落呈死亡状态。根据胁迫后针叶状态变化,选定 1 000 mmol/L 浓度进行不同时间(0、3、6、12、24 h)盐胁迫处理。

### 2.2 沙地云杉 MYB 蛋白的系统进化树分析

利用 HMMER search 初步筛选目的 MYB 基因家族成员,通过观察保守结构域,进一步删除只含有 1 个 SANT 保守结构域的基因。删除的 MA\_10207129g0010、MA\_459865g0010 (与

表 1 PmMYB 基因的引物

Table 1 Primers of PmMYB

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Product size (bp)
<i>PmEF1a</i>	GATTGAGCGATCCACCAACC	CTCAGACACAGGCACAGTTC	
<i>PmMYB5d</i>	CGAAGGCCAATGGAGAGC	CTCATTATCTGTTCTGCCGGG	172
<i>PmMYB15a</i>	ATGGGTCGAGCTCCTTGC	TCTAGAGTCCAGGGGCCCTT	21
<i>PmMYB15c</i>	ATGGGTCGAGCTCCTTGC	ATCCAGAGTCCAGGAGCCTT	22
<i>PmMYB36b</i>	CACCAAGGACAACGATAATCAG	TTCAGACGAGCTTTGAGTGTTC	103
<i>PmMYB55e</i>	ACCACAGATCGACGGAGGA	TGTCACCTGGCCGGCTACA	101
<i>PmMYB73a</i>	CCAGCTGAGTCCACAAGTCG	CTGAGAGTGGAGTTCAGTGGT	120
<i>PmMYB79a</i>	AGGCAACGCCAGCGTAATAT	CCGTCTCGGTGTCTCTAAAT	114
<i>PmMYB112</i>	TAGAAGATTCGGTGCGGTATTC	CTCATCCATTTGTATTGGCTG	108
<i>PmMYB123f</i>	ATGTGTAGATCTCTAGTTGTTGGA	TCCTCGTTAGCAGTCCAAGC	35
<i>PmMYB126</i>	CAGGAGGTCTTTTCTTTACCG	AATGAGATGAGAATAGGGGGTTTC	101
<i>PmRVE2b</i>	GAAGGTAGTGGAGCCGGTG	TTGCAAAAATTAACAGCTGATGC	119
<i>PmCPC5</i>	ATGGATCACGCAGACACAGA	CTCCGACGAGTTTGTGCA	122

*AtMYB36* 同源), MA\_89624g0010 (与 *AtMYB105* 同源)、MA\_10369351g0010 (与 *AtMYB106* 同源)、MA\_75839g0010 (与 *AtMYB109* 同源)、MA\_10426901g0020 (与 *AtMYB111* 同源)、MA\_10433368g0020、MA\_154146g0010、MA\_336002g0010、MA\_362115g0010、MA\_5780677g0010 (与 *AtMYB123* 同源)、MA\_946553g0010 (与 *AtMYB14* 同源)、MA\_10427849g0010、MA\_29879g0010 (与 *AtMYB15* 同源)、MA\_10428747g0010 (与 *AtMYB16* 同源)等 48 个基因不含 R2R3 特有的 2 个相邻 SANT 结构域特征, 最终确定 196 个 PmMYB 家族成员。经 ClustalW 比对后, 利用 MYB 的保守蛋白序列和编码蛋白序列构建系统发育树。使用 Blastp 比对到拟南芥基因组,

并进行命名分类。将鉴定的 196 个 PmMYB 家族成员分为 7 个亚类, 包括 167 个 R2R3、13 个 CPC-like、9 个 CCA1-like、3 个 I-box、2 个 Atypical MYB、1 个 R-R 和 1 个 R1R2R3 (图 2)。其中 R2R3 类 PmMYB 家族成员数量最多, 占总数 MYB 家族成员的 84.77%, CPC-like 占 6.60%, CCA1-like 占 4.57%, R-R、I-box 等类型所占比例最少。

### 2.3 沙地云杉 MYB 结构域、基因结构和基序分析

结构域分析表明不同亚类 MYB 家族成员包含的 SANT 结构域数量存在明显差异, 其中 R2R3 中含有 2 个相邻的 SANT 结构域(图 3A、3D), CCA1-like、CPC-like 和 I-box 仅含有 1 个 SANT 保守结构域(图 4A), R-R 含有 2 个

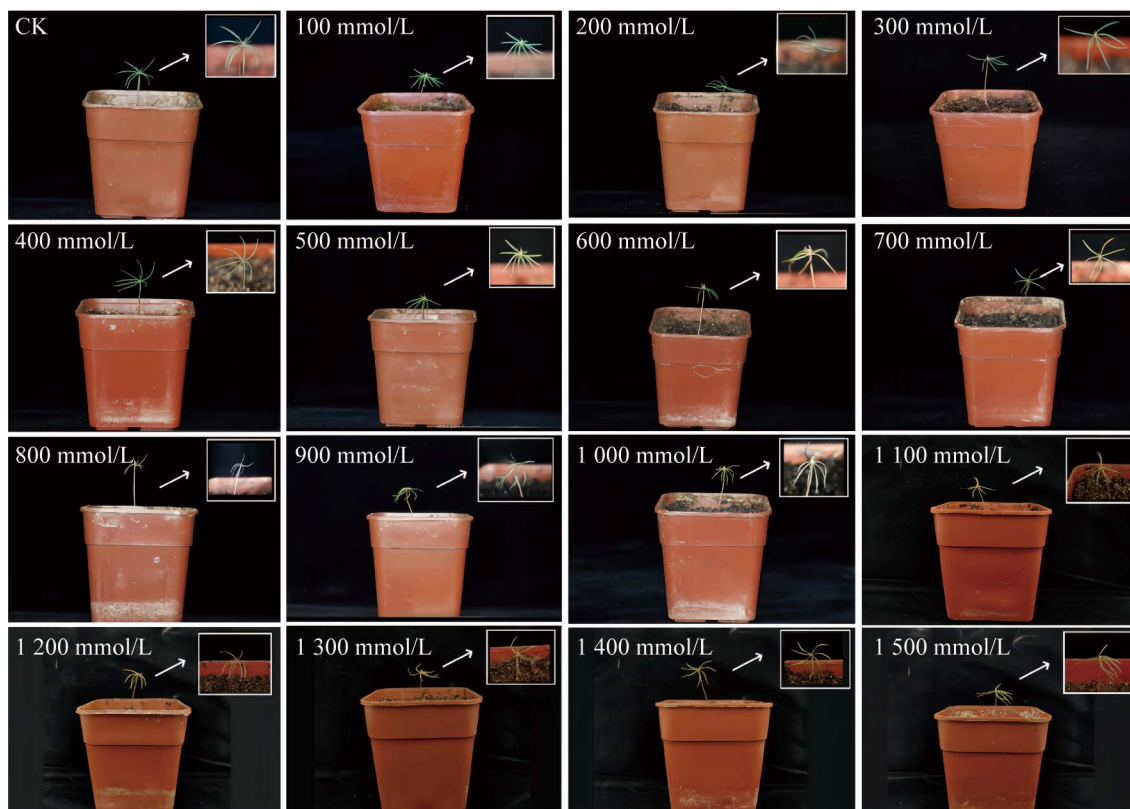


图 1 沙地云杉耐盐临界浓度筛选

Figure 1 Critical concentration screening of salt tolerance in *Picea mongolica*.

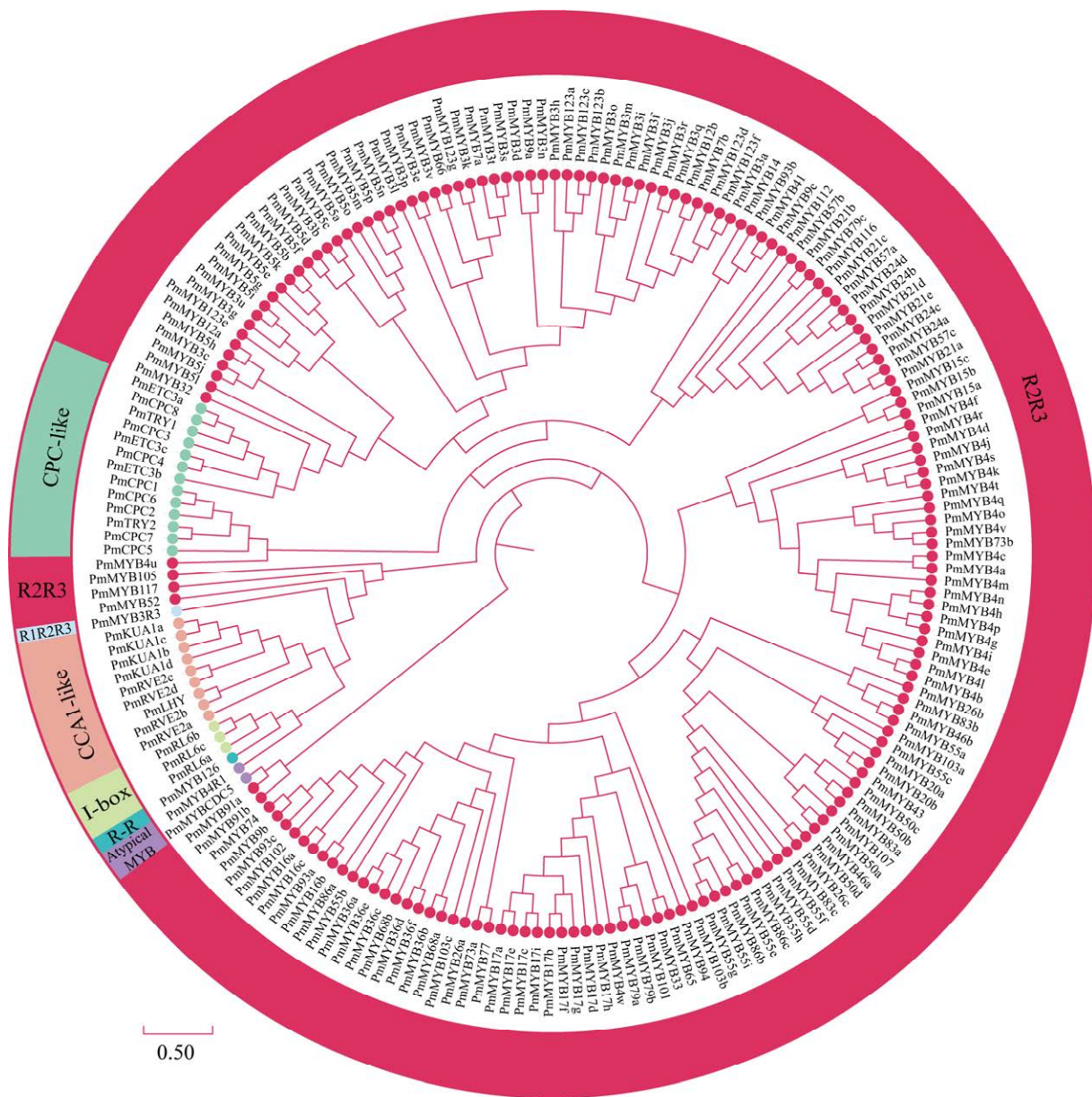
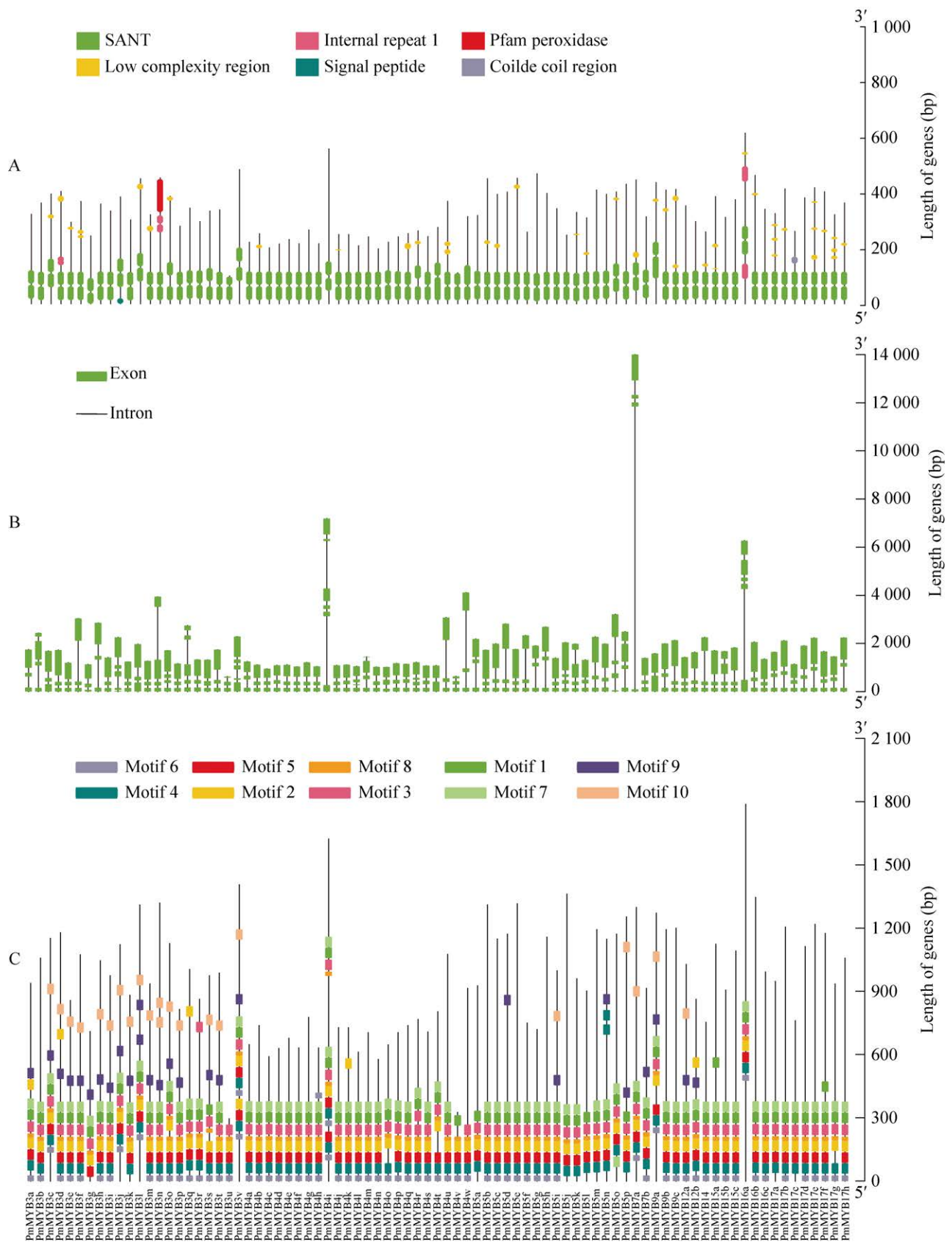


图 2 沙地云杉 MYB 蛋白的系统进化树 采用最大似然法, bootstrap=1 000。

Figure 2 Phylogenetic tree of PmMYB proteins. Maximum likelihood method used, bootstrap=1 000.

SANT 保守结构域,而 R1R2R3 含有 3 个 SANT 保守结构域。对于 Atypical MYB, SANT 结构域的数量并不固定,例如: *PmMYB4R1* 具有 5 个 SANT 保守结构域; *PmMYBCDC5* 具有 2 个相邻的 SANT 保守结构域及其他不同功能的结构域组成。对鉴定的 MYB 基因结构进行分析显示, R2R3 亚类含有 1–6 个外显子(图 3B、3E),

其中 76.64%(128 个)的 R2R3 亚类成员具有 3 个外显子。*PmMYB91a*、*PmMYB77*、*PmMYB73b*、*PmMYB73a* 只含有 1 个外显子,其中 *PmMYB91a* 外显子长度最长。其他 MYB 亚类中(图 4B),含有 1–12 个外显子,绝大部分的 CPC-like 亚类含有 3 个外显子,CCA1-like 亚类基因中 *PmRVE2a* 所含外显子数量最多。





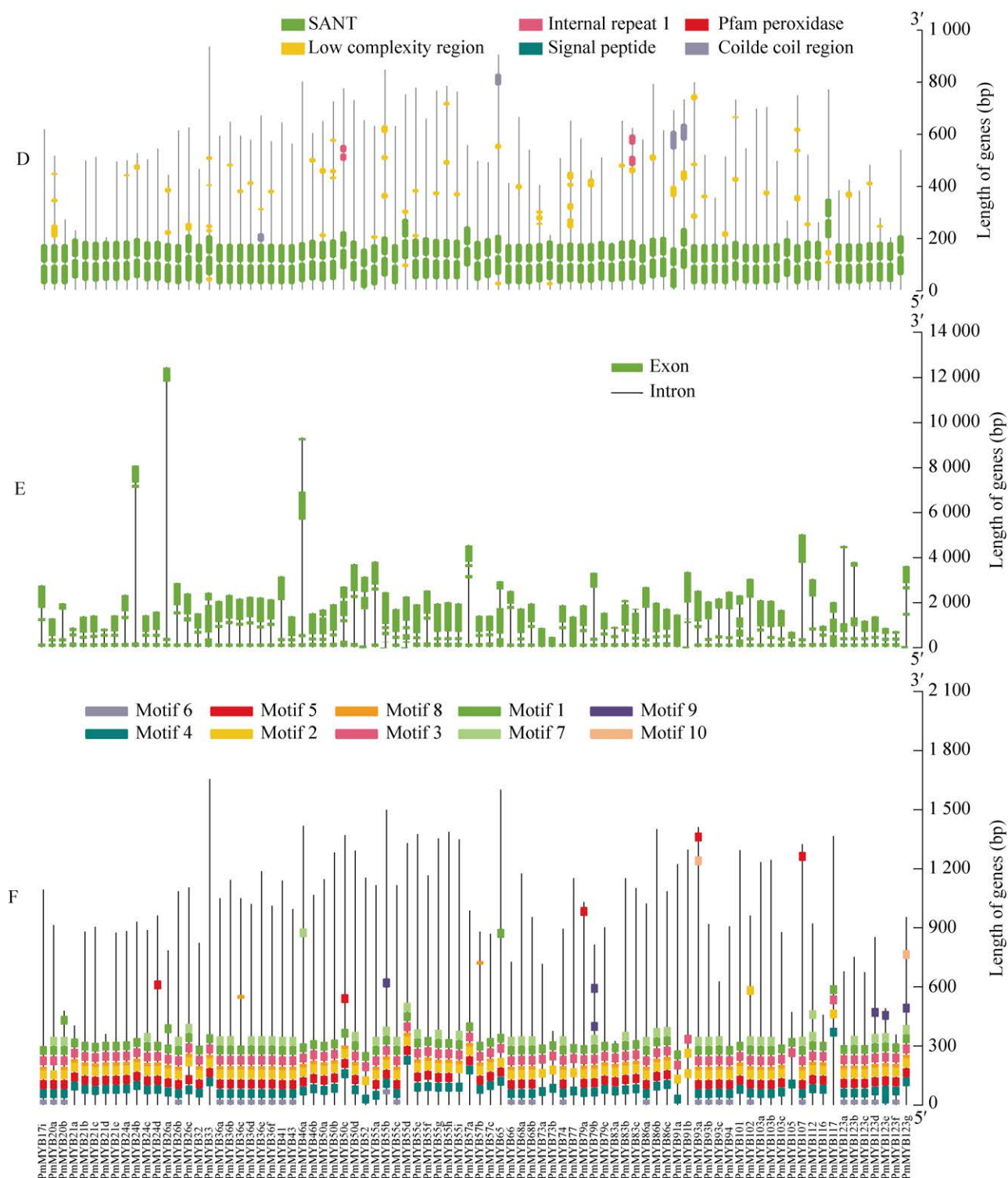


图3 R2R3亚类结构域、基因结构和基序分析 A、D: R2R3亚类结构域; B、E: R2R3亚类基因结构; C、F: R2R3亚类保守基序。

Figure 3 Analysis of R2R3 subfamily domains, gene structures and motifs. A, D: Subfamily domains of R2R3; B, E: Gene structures of R2R3; C, F: Motifs of R2R3.

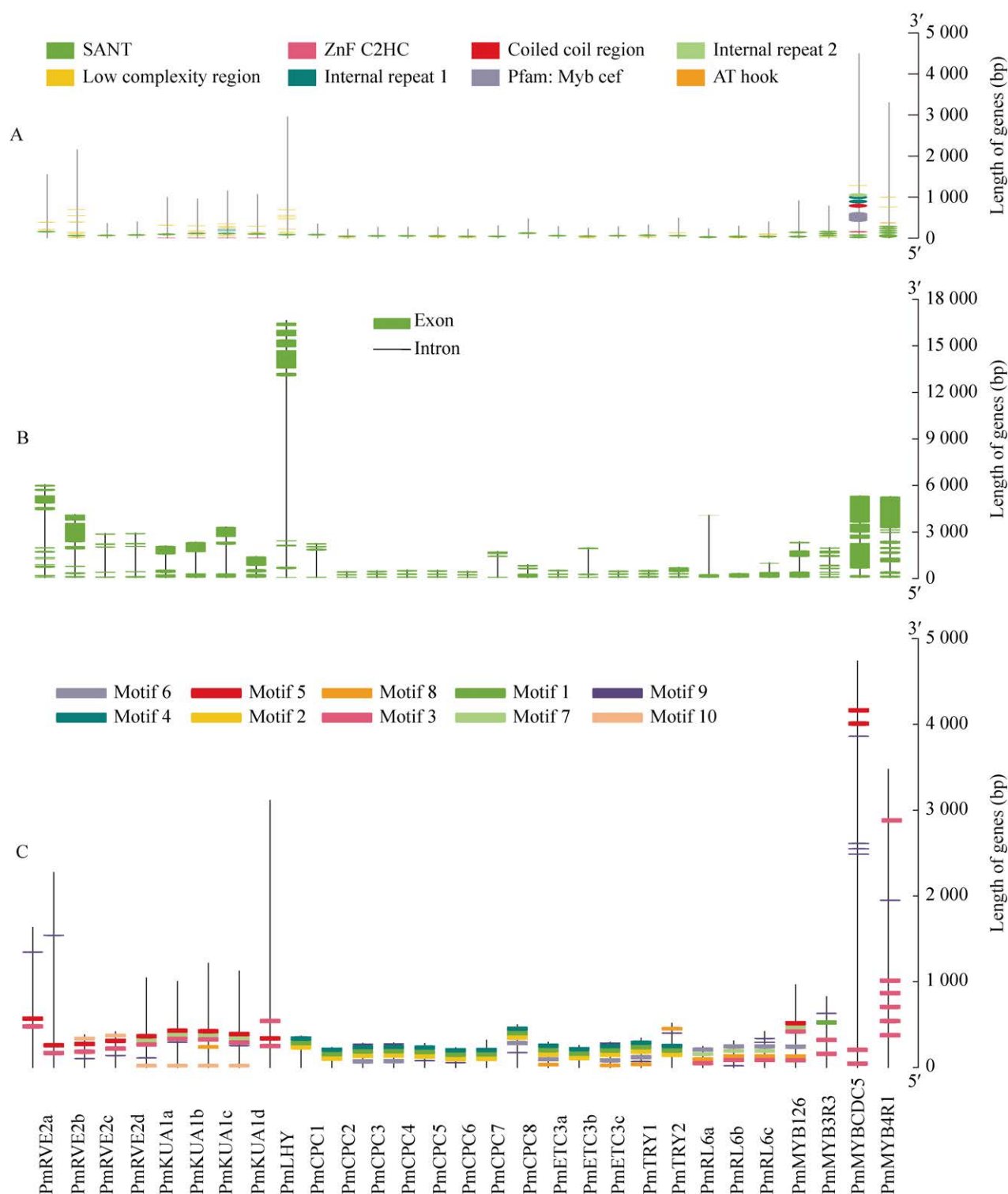


图 4 其他 MYB 亚类结构域、基因结构和基序分析 A: 其他 MYB 亚类结构域; B: 其他 MYB 亚类基因结构; C: 其他 MYB 亚类保守基序。

Figure 4 Analysis of other MYB subfamilies subfamily domains, gene structures and motifs. A: Subfamily domains of other MYB; B: Gene structures of other MYB; C: Motifs of other MYB.

基序分析显示, R2R3 亚类成员含有 1–8 个基序, 大部分成员共同拥有 1、2、3、4、5、8 基序, 表明 R2R3 亚类的基序具有一定的保守性(图 3C、3F)。对于其他亚类的 MYB 基序结构(图 4C): CPC-like 具有共同基序 1、2 和 4; CCA1-like 具有共同的基序 3 和 5; I-box 具有 3、6、7 和 8 基序; 而 R-R、R1R2R3 和 Atypical MYB 有 2 个及以上的基序 3。CCA1-like、I-box、R-R、R1R2R3 及 Atypical MYB 亚类共同具有基序 3, 表明这 5 个亚类可能具有相似的功能。

## 2.4 不同亚类 MYBs 转录因子的保守性分析

从系统发育树中选取 47 个 R2R3 进行保守性分析, 其保守结构域包含 2 个相邻区域, 命名为 R2 和 R3, R2 区域为第 1 个氨基酸(amino acid, aa)到 51 aa, R3 区域为 54 aa 到 106 aa (图 5)。在这 2 个区域中, R3 保守性水平高于 R2 (图 5A)。CCA1-like、CPC-like 和 I-box 类 MYB 家族成员只有 2 个区域长度约为 50 aa 的 SANT 结构域(图 5B–5D)。其中 CCA1-like 大致分为 2 类, 这 2 类间保守性较低, 而这 2 类内保守性较高。CPC-like 和 I-box 的保守性均较高, 表明这些转录因子在功能上相似(图 5B–5D)。由于 R-R 和 R1R2R3 亚类分别只鉴定到 1 个成员, 因此未进行保守性分析。

## 2.5 沙地云杉 MYB 基因的特异性表达分析

为进一步了解沙地云杉 MYB 基因在盐胁迫过程的表达模式, 本研究基于沙地云杉盐胁迫浓度为 1 000 mmol/L 下不同处理时间(0、3、6、12、24 h)的转录组数据, 观察 MYB 基因在盐胁迫中表达水平并进行分析。4 组间的差异基因取并集, 共有 7 458 个差异基因, 与鉴定的 196 个 MYB 基因取交集, 最终根据 Venn 图确定 34 个差异 MYB 基因(图 6A)。结果显示,

有 10 个 MYB 基因在盐胁迫浓度为 1 000 mmol/L 处理 24 h 后具有较高的表达水平(图 6B), 如 *PmMYB79a*、*PmCPC5*、*PmMYB123f*、*PmMYB24a*、*PmMYB112*、*PmRVE2b*、*PmMYB5e* 等, 而在对照组(0 h)表达水平较低, 表明这些基因在盐胁迫调控中可能具有重要功能。此外, 4 个基因 (*PmMYB3f*、*PmMYB5h*、*PmMYB3b* 和 *PmMYB93b*) 在盐胁迫处理 3 h 后表达最高。盐胁迫处理 6 h 后, *PmMYB3e* 基因表达最高。以上结果表明, 不同盐胁迫处理时间对 MYB 基因家族成员表达量的影响不同。

## 2.6 PmMYB 差异基因编码蛋白质的理化性质分析

沙地云杉差异 MYB 基因的编码序列(coding sequence, CDS)长度为 270–2 196 bp; 蛋白序列长度为 89–731 aa; 分子量约为 10.19–79.73 kDa; 等电点为 4.80 (*PmMYB15c*)–9.91 (*PmMYB123f*); 不稳定系数 41.20 (*PmMYB101*)–70.99 (*PmMYB21c*)。其中 *PmCPC5* 的 CDS、蛋白质序列长度、分子量均最小; 而 *PmRVE2b* 的 CDS、蛋白质序列长度、分子量均最大(表 2)。亚细胞定位结果显示, 31 个 MYB 蛋白都位于细胞核内, *PmKUA1b*、*PmKUA1c* 和 *PmKUA1d* 位于叶绿体中。表明这些 PmMYB 转录因子可能分别在叶绿体和细胞核中发挥调节作用。

## 2.7 盐胁迫下 PmMYB 基因的定量分析

选择 12 个 MYB 基因进行 qRT-PCR 检测, 结果表明在盐胁迫处理后, 10 个 PmMYB 基因在盐处理 24 h 后上调表达, 其中不同基因上调表达程度有所不同, 如: *PmMYB15c* 和 *PmMYB112* 在 24 h 上调至少 50 倍, *PmMYB15a* 在 24 h 上调至少 30 倍, *PmMYB79a* 和 *PmMYB123f* 上调 10 倍左右, *PmMYB73a*、*PmMYB36b*、*PmMYB5d*、*PmRVE2b* 和 *PmCPC5* 基因在盐胁迫处理 24 h 后上调表达不显著(图 7)。而其中 *PmMYB126* 和

*PmMYB55e* 在盐胁迫过程中下调表达。通过 qRT-PCR 与 RNA-seq 分组数据(0 h vs. 3 h, 0 h vs. 6 h, 0 h vs. 12 h, 0 h vs. 24 h)进行分析, 发现

qRT-PCR 与 RNA-seq 表达结果一致(图 8)。以上结果说明不同沙地云杉 MYB 基因家族成员在盐胁迫中可能发挥不同作用。

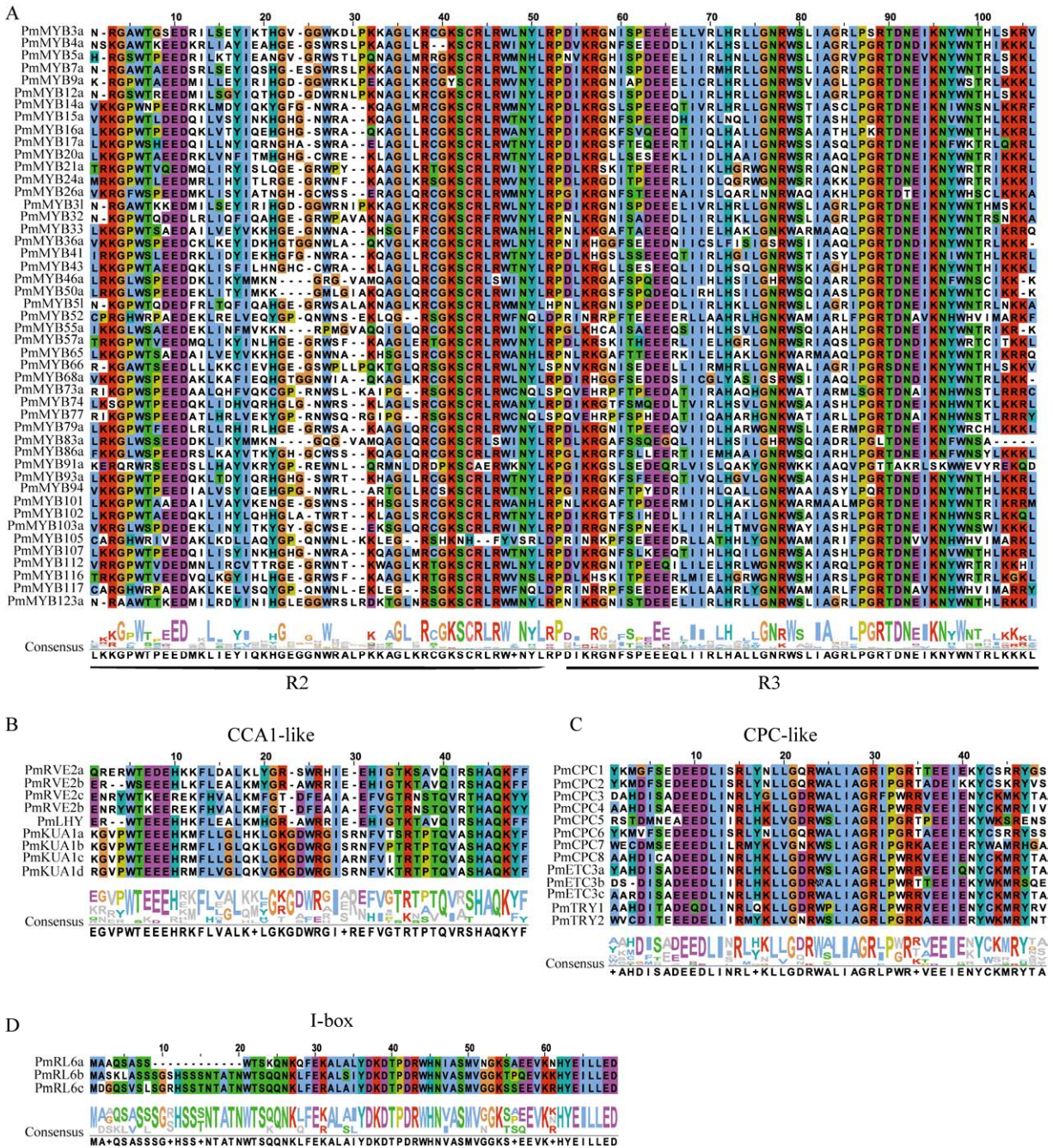


图 5 PmMYB 亚家族成员的保守性分析 A: R2R3 的保守性分析; B: CCA1 的保守性分析; C: CPC-like 的保守性分析; D: I-box 的保守性分析。

Figure 5 Conservative analysis of PmMYB subfamily members. A: Conservative analysis of R2R3; B: Conservative analysis of CCA1; C: Conservative analysis of CPC-like; D: Conservative analysis of I-box.

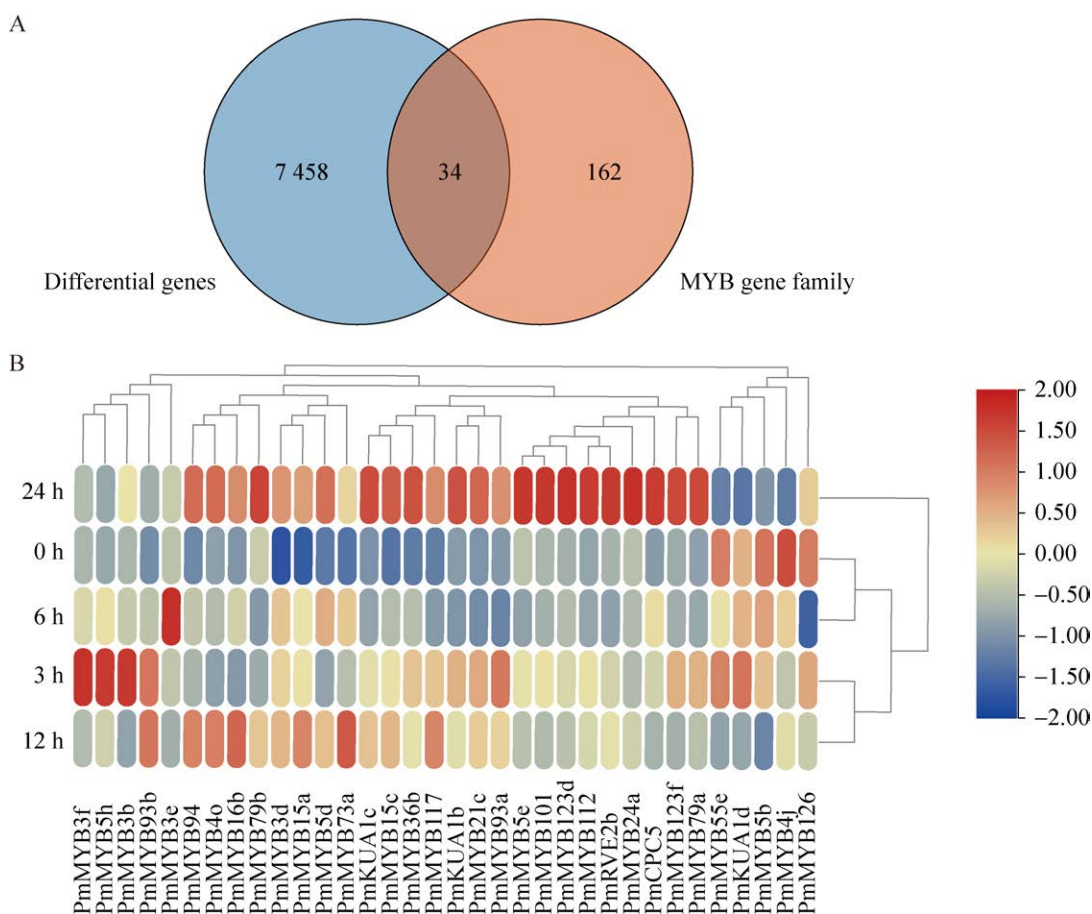


图6 PmMYB差异基因表达模式图 A:PmMYB差异基因Venn图;B:PmMYB基因在盐胁迫1 000 mmol/L浓度不同处理时间的表达模式热图。颜色越趋向红色表达量越高,颜色越趋向蓝色表达量越低。

Figure 6 Graph of PmMYB differential gene expression patterns. A: Venn plot of PmMYB differential genes; B: Heat map of the expression pattern of PmMYB gene in salt stress at 1 000 mmol/L concentration for different treatment times. The more the color tends to be red the higher the expression, the more the color tends to be blue the lower the expression.

### 3 讨论

目前,许多植物的MYB基因家族已经被报道<sup>[30-33]</sup>,但沙地云杉中相关研究较少。本研究结合HMMER检索法和Blastp方法,根据保守结构域的特征,将沙地云杉中鉴定出的196个基因分为7类:R2R3、CPC-like、CCA1-like、I-box、Atypical MYB、R-R和R1R2R3(图2)。拟南芥中鉴定出的198个AtMYB基因大致分为9类(R2R3、CCA1-like、CPC-like、TBP-like、

I-box、R-R、Atypical MYB、R1R2R3、Unclassified MYB-related)<sup>[34]</sup>。野牡丹中421个McMYB分为10类(R2R3、R-R、CPC-like、CCA1-like、TBP-like、R1R2R3、I-box、Atypical MYB、MYB-CC和MYB-like)<sup>[35]</sup>。相比拟南芥和野牡丹,本研究中除R2R3亚类外,MYB-related基因家族的其他亚类数量偏少,其原因可能是在沙地云杉进化过程中,缺少“gain-of-repeat”事件,导致R1R2R3-MYB和4R-MYB蛋白数量较少。另外由于转录组测序受检测部位、检测

时期等诸多因素的影响导致某些基因无法检出, 最终导致一些 MYB 基因家族成员的遗漏。参考基因组的注释和组装质量是影响基因家族鉴定结果的关键因素<sup>[36]</sup>, 组装质量较差的基因组往往会产生与生物体内实际序列不符的基因片段,

直接导致对序列的误判, 进而影响鉴定结果。在本研究中, 最初通过 HMMER search 和 Blastp 方法鉴定到的部分成员, 包括 MA\_10207129g0010、MA\_459865g0010、MA\_89624g0010、MA\_10369351g0010、MA\_75839g0010 等(图 9),

表 2 PmMYB 差异基因编码的蛋白理化性质分析

Table 2 Analysis of physicochemical properties of PmMYB gene differential proteins

Protein name	Length of CDS (bp)	Number of amino acids (aa)	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point (pI)	Instability index	Subcellular localization
PmMYB3b	1 050	352	40.13	6.40	61.32	nucl
PmMYB3d	1 179	392	43.83	5.14	54.05	nucl
PmMYB3e	858	285	32.13	8.64	54.58	nucl
PmMYB3f	1 074	358	40.06	6.06	49.14	nucl
PmMYB4j	729	242	27.25	6.61	50.67	nucl
PmMYB4o	647	215	24.61	8.95	53.05	nucl
PmMYB5b	1 311	436	48.63	5.32	54.99	nucl
PmMYB5d	1 173	390	44.09	5.59	53.65	nucl
PmMYB5e	1 317	438	48.31	5.35	60.91	nucl
PmMYB5h	1 158	385	44.10	5.66	52.64	nucl
PmMYB15a	1 125	374	41.76	4.87	54.10	nucl
PmMYB15c	1 092	363	40.76	4.80	57.89	nucl
PmMYB16b	1 347	448	49.60	6.73	46.56	nucl
PmMYB21c	987	328	37.75	5.24	70.99	nucl
PmMYB24a	963	320	36.09	5.89	43.02	nucl
PmMYB36b	1 248	415	45.31	5.33	51.08	nucl
PmMYB55e	1 503	500	55.41	5.36	41.71	nucl
PmMYB73a	780	259	27.78	8.76	57.35	nucl
PmMYB79a	1 125	374	41.86	6.27	52.94	nucl
PmMYB79b	888	295	32.62	7.61	60.41	nucl
PmMYB93a	1 542	512	56.76	5.93	45.92	nucl
PmMYB93b	1 002	333	37.49	5.21	58.78	nucl
PmMYB94	990	329	37.26	5.57	48.90	nucl
PmMYB101	1 413	470	51.26	5.02	41.20	nucl
PmMYB112	1 005	334	38.10	6.33	64.08	nucl
PmMYB117	1 491	496	55.29	6.72	49.00	nucl
PmMYB123d	930	309	34.89	5.72	61.11	nucl
PmMYB123f	387	129	15.05	9.91	68.33	nucl
PmRVE2b	2 196	731	79.73	5.88	57.19	nucl
PmKUA1b	969	322	34.61	8.89	55.52	chlo
PmKUA1c	1 173	390	41.45	7.64	52.33	chlo
PmKUA1d	1 086	361	39.43	7.21	60.85	chlo
PmCPC5	270	89	10.19	5.61	60.10	nucl
PmMYB126	930	309	34.23	8.68	62.47	nucl

nucl: Nuclei; chlo: Chloroplasts.

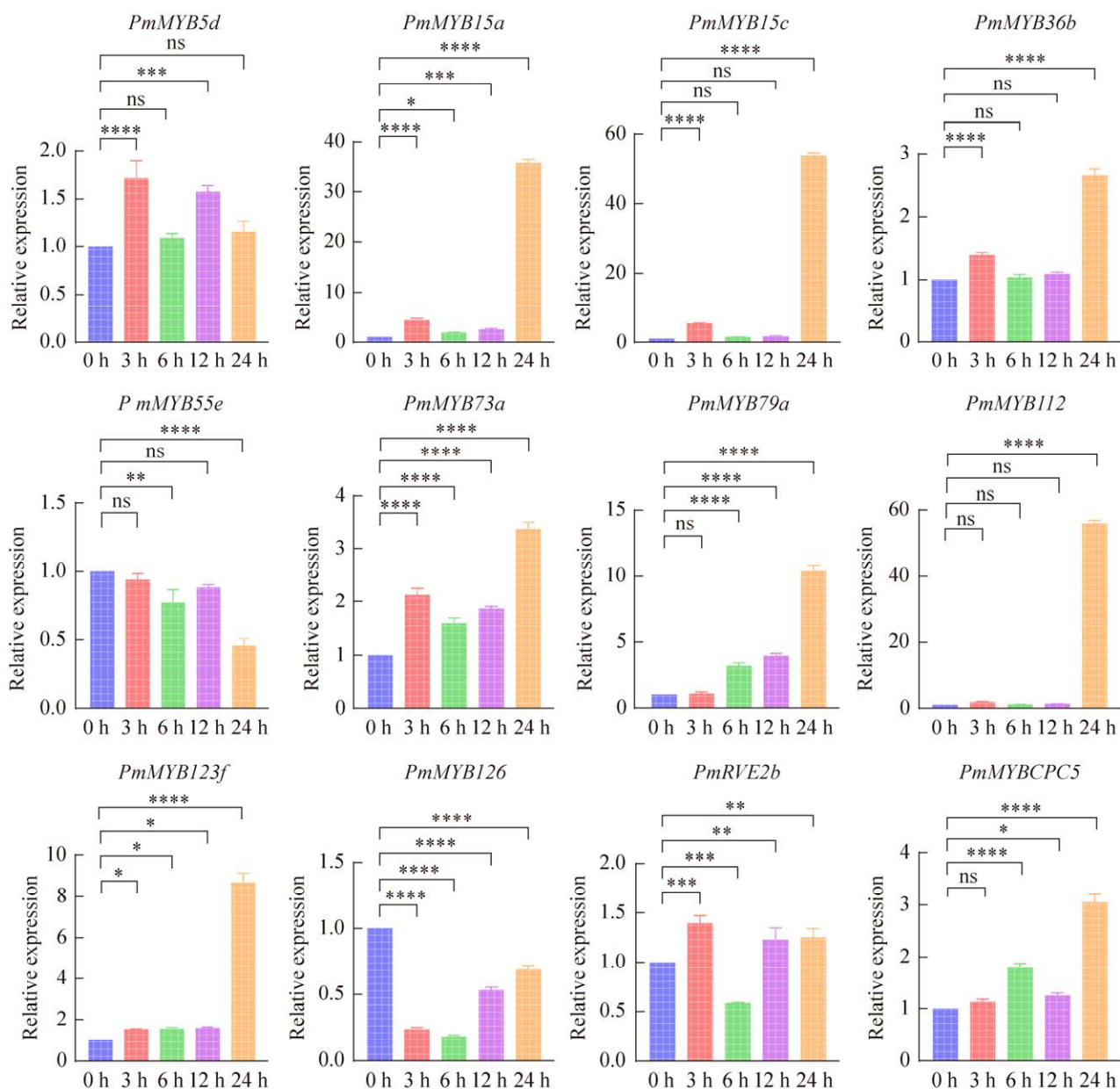


图7 12个PmMYB差异基因的qRT-PCR表达分析

Figure 7 qRT-PCR analysis of 12 PmMYB differential genes. ns:  $P > 0.1$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

通过进一步结构域分析发现, 这些基因均存在相应MYB亚类的关键特征结构域缺失的现象, 因此本研究中将此类基因删除。科学的验证方法是需要从沙地云杉cDNA中克隆以上基因确认其真实序列, 避免由于基因组的不完美组装而导致的错误鉴定。

本研究通过对沙地云杉MYB基因家族的综合分析揭示了不同亚类基因结构和蛋白质结构的共同特征(图3和图4)。基因结构的差异是导致蛋白质多样性和功能差异的关键因素, 也可反映基因进化的结果<sup>[37]</sup>。因此, 通过基序分析发现同一亚群的MYB具有相同类型且数量

大致相同的基序(图 3C、3F 和图 4C), 例如: R2R3-MYB 家族的大多数成员均包含 2-7 基序, CCA1-like 成员有共同 3 和 5 基序, CPC-like 具有共同的 1、2 和 4 保守基序, I-box 具有 3、6、7、8 基序, 具有相同基序的亚类表明它们可能具有相似的功能。基因结构分析可揭示 MYB 基因中内含子长度的变化, 不同的外显子-内含子构型有助于其功能多样性。然而内含

子和外显子位置的基因组信息也可为建立进化关系提供重要证据<sup>[38-39]</sup>。玉米 MYB 系统发育树中发现, 相同亚群或亚支系的基因通常含有相同的内含子模式, 内含子位置完全保守并且内含子数量通常为 1-2 个<sup>[40]</sup>。此结果与建兰<sup>[41]</sup>、蔗茅<sup>[42]</sup>、蒺藜苜蓿<sup>[43]</sup>和香蕉<sup>[44]</sup>中研究结果一致。与前人研究一致, 在本研究中 R2R3、CPC-like 和 I-box 亚类中大多数基因的内含子数

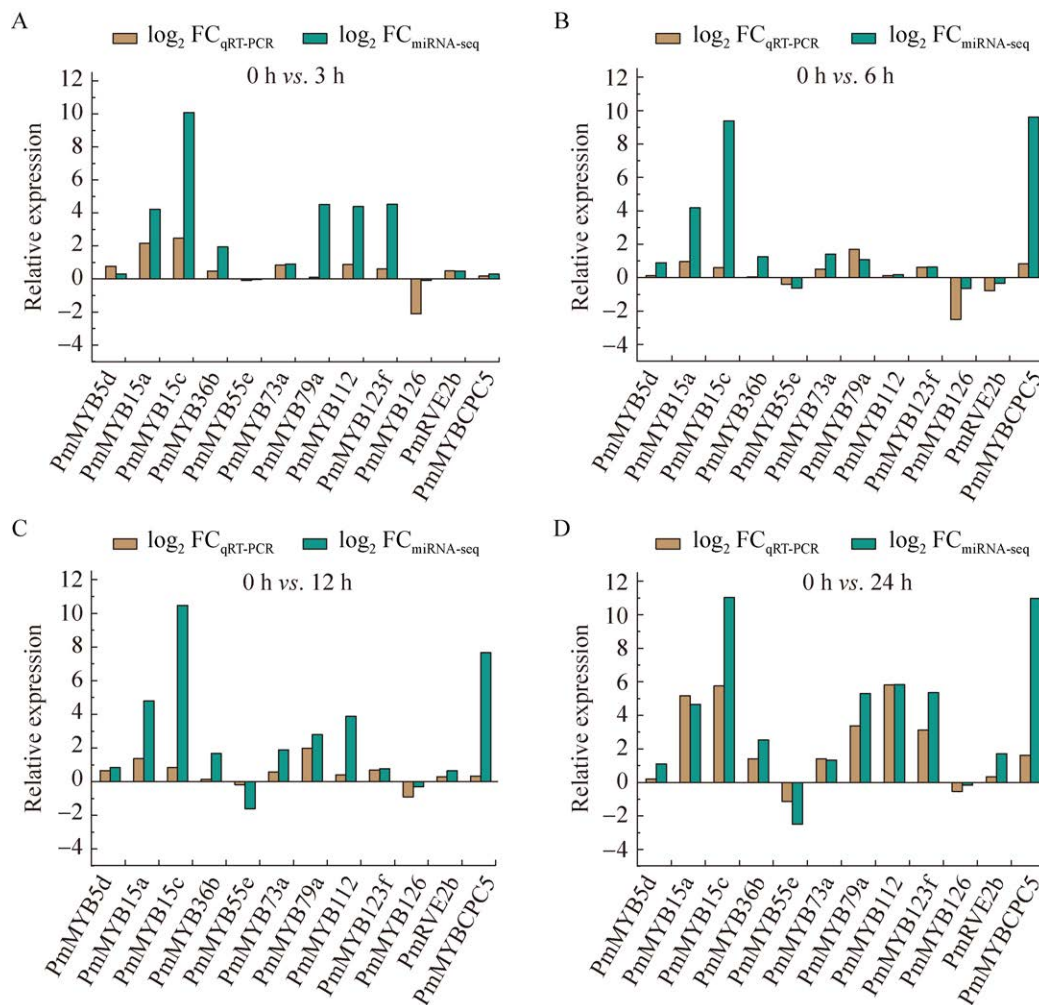


图 8 qRT-PCR 与 miRNA-seq 结果趋势比较分析 A: 0 h vs. 3 h qRT-PCR 与 miRNA-seq 趋势分析; B: 0 h vs. 6 h qRT-PCR 与 miRNA-seq 趋势分析; C: 0 h vs. 12 h qRT-PCR 与 miRNA-seq 趋势分析; D: 0 h vs. 24 h qRT-PCR 与 miRNA-seq 趋势分析。

Figure 8 Comparative analysis of trends in qRT-PCR and miRNA-seq results. A: 0 h vs. 3 h qRT-PCR with miRNA-seq trend analysis; B: 0 h vs. 6 h qRT-PCR with miRNA-seq trend analysis; C: 0 h vs. 12 h qRT-PCR with miRNA-seq trend analysis; D: 0 h vs. 24 h qRT-PCR with miRNA-seq trend analysis.



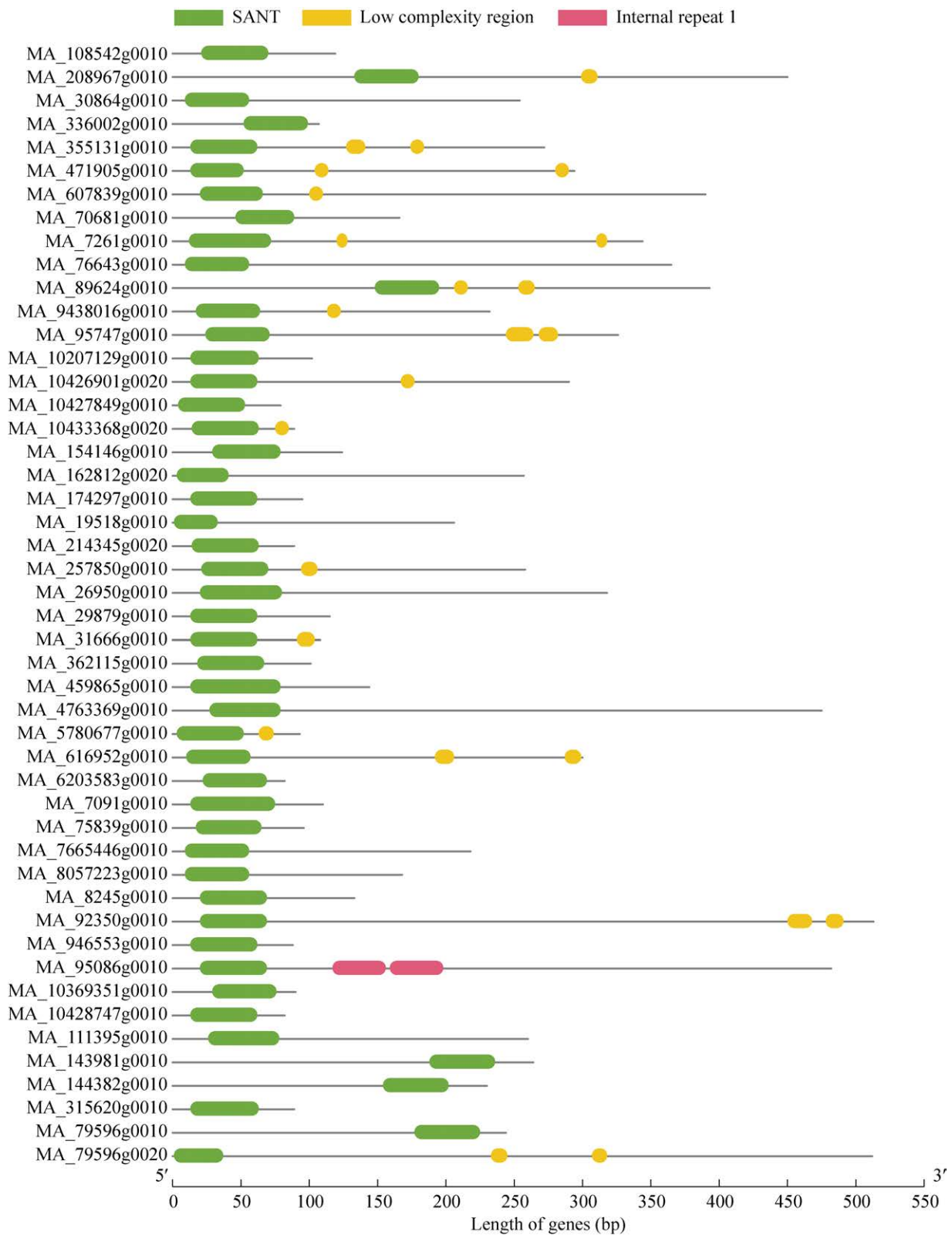


图 9 R2R3 不完整结构域分析

Figure 9 Analysis of the incomplete structural domain of R2R3.

量分别为 2、2、1 个, 各亚类中的基因内含子数量高度保守(图 3B、3E 和图 4B)。此外, 沙地云杉转录组中筛选出的差异表达基因的氨基酸类型、长度、分子量和等电点也存在显著差异, 这可能是由于不同亚类内的外显子插入或丢失、功能多样性和亚功能化等进化事件造成的<sup>[45-46]</sup>。

高等植物已经进化出多种机制来应对盐胁迫, 包括激活特定的转录因子和改变相关基因的表达<sup>[26-27]</sup>。MYB 基因已被证明参与多种生物和非生物胁迫机制。在盐胁迫下, 野生型苦豆子与 *SaR2R3-MYB15* 转基因植株相比, 其过表达可提高抗氧化酶活性和脯氨酸积累, 降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量<sup>[47]</sup>。在盐胁迫处理的棉花转录组数据中, *GhMYB73* 显著表达<sup>[48]</sup>, 当过表达 *GhMYB73* 基因时, 在 Na<sup>+</sup> 及 ABA 的作用下诱导基因编码的蛋白(AtPYL8、AtABI5、AtABF3 和 AtRD29B)相互作用, 进而提高转基因拟南芥对盐胁迫的耐受性<sup>[19]</sup>。*SIMYB55* 沉默表达的转基因番茄植株诱导 ABA 的积累, 通过 ABA 介导的信号转导途径调控干旱和盐胁迫反应等相关基因的表达, 提高植株对胁迫的耐受性<sup>[49]</sup>。与野生型山丹相比, 过表达 *LpMYB4* 的烟草植株在盐碱胁迫下生长较好, 叶片萎蔫和倒伏较低, 过表达 *LpMYB4* 烟草植株的叶绿素含量显著高于野生型且相对电导率显著低于野生型, 表明过表达 *LpMYB4* 转基因植株能减轻盐胁迫对植物细胞膜的损伤<sup>[50]</sup>。本研究与以上结果研究一致, 在盐胁迫处理的沙地云杉转录组中有 34 个 MYB 基因差异表达(图 6), 其中 *PmMYB15a*、*PmMYB15c*、*PmMYB55e*、*PmMYB4j*、*PmMYB4o* 和 *PmMYB73a* 响应盐胁迫, 推测在沙地云杉中 MYB15、MYB73、MYB4 和 MYB55 基因可能在盐胁迫响应中发挥重要作用。

## 4 结论

MYB 家族广泛分布于真核生物中, 在调控植物生长发育中起着关键作用。本研究基于盐胁迫下沙地云杉的转录组数据, 鉴定出 196 个 MYB 基因家族成员, 大致分为 R2R3-MYB、CPC-like、CCA1-like、I-box、Atypical MYB、R-R 和 R1R2R3 这 7 个亚类, 通过对亚类的基因结构、基序、保守性分析发现, 每个亚类 MYB 都表现出相对较高的保守性。如: 大部分 R2R3 成员共同含有 1、2、3、4、5、8 基序, 其保守结构域包含 2 个相邻区域, R2 区域为第 1 个氨基酸(aa)到 51 aa, R3 区域为 54 aa 到 106 aa, R3 保守性水平高于 R2。34 个 MYB 基因家族成员在盐胁迫转录组数据中差异表达, 表明这 34 个 MYB 家族成员可能参与盐胁迫过程。*PmMYB79a*、*PmCPC5*、*PmMYB123f*、*PmMYB112*、*PmRVE2b* 等 10 个基因参与调控盐胁迫过程并发挥着重要作用。本研究为筛选沙地云杉耐盐基因及功能研究提供了数据支持。

## REFERENCES

- [1] 王炜, 梁存柱, 李洪峰, 刘钟龄, 宝音陶格涛. 白音锡勒草原沙地云杉林的性质、可能成因及自然更新能力的初步研究[J]. 干旱区资源与环境, 2000, 14(2): 59-64.  
WANG W, LIANG CZ, LI HF, LIU ZL, Baoyintaogetao. Preliminary study on properties, probable causes and capacity for natural regeneration of *Picea meyeri* forest on sandy land in Baiyinxile[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2000, 14(2): 59-64 (in Chinese).
- [2] 姜联合. 沙地云杉之源: 白音敖包保护区[J]. 植物杂志, 2001, (4): 6-7.  
JIANG LH. The source of *Picea mongolica*: Baiyin Ovoo Reserve[J]. Botanical Journal, 2001, (4): 6-7 (in Chinese).
- [3] 哈布尔, 白玉娥, 候伟峰, 青山. 沙地特有树种沙地云杉研究进展与展望[J]. 北方园艺, 2021(14): 152-157.  
HA BE, BAI YE, HOU WF, QING S. Research progress and prospect of *Picea mongolica* of species endemic to sandy land[J]. Northern Horticulture, 2021(14): 152-157 (in Chinese).
- [4] 黄三祥, 李新彬, 林田苗, 全昌明, 罗菊春, 王立新. 沙地云杉育苗技术及苗木年生长规律研究[J]. 北京

- 林业大学学报, 2003, 25(6): 11-14.  
HUANG SX, LI XB, LIN TM, QUAN CM, LUO JC, WANG LX. Breeding techniques and annual growth rhythm of *Picea mongolica* seedlings[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2003, 25(6): 11-14 (in Chinese).
- [5] LATCHMAN DS. Transcription factors: an overview[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1997, 29(12): 1305-1312.
- [6] PAZ-ARES J, GHOSAL D, WIENAND U, PETERSON PA, SAEDLER H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators[J]. The EMBO Journal, 1987, 6(12): 3553-3558.
- [7] 赵恩鹏, 成玉富, 杨旭. 茄科植物转录因子 MYB 基因家族的研究进展[J]. 分子植物育种, 2021, 19(5): 1522-1530.  
ZHAO EP, CHENG YF, YANG X. Research progress of MYB transcription factors in *Solanaceae* plants[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(5): 1522-1530 (in Chinese).
- [8] ROSINSKI JA, ATCHLEY WR. Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin[J]. Journal of Molecular Evolution, 1998, 46(1): 74-83.
- [9] ITO M. Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants[J]. Journal of Plant Research, 2005, 118(1): 61-69.
- [10] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, WEISSHAAR B, MARTIN C, LEPINIEC L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(10): 573-581.
- [11] PEREZ-RODRIGUEZ M, JAFFE FW, BUTELLI E, GLOVER BJ, MARTIN C. Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers[J]. Development, 2005, 132(2): 359-370.
- [12] BEDON F, GRIMA-PETTENATI J, MACKAY J. Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*)[J]. BMC Plant Biology, 2007, 7: 17.
- [13] STRACKE R, ISHIHARA H, HUEP G, BARSCH A, MEHRTENS F, NIEHAUS K, WEISSHAAR B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling[J]. The Plant Journal, 2007, 50(4): 660-677.
- [14] DELUC L, BOGS J, WALKER AR, FERRIER T, DECENDIT A, MERILLON JM, ROBINSON SP, BARRIEU F. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries[J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 2041-2053.
- [15] LI CN, NG CKY, FAN LM. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling[J]. Environmental and Experimental Botany, 2015, 114: 80-91.
- [16] ULLAH C, UNSICKER SB, FELLEBERG C, CONSTABEL CP, SCHMIDT A, GERSHENZON J, HAMMERBACHER A. Flavan-3-ols are an effective chemical defense against rust infection[J]. Plant Physiology, 2017, 175(4): 1560-1578.
- [17] YU YH, GUO DL, LI GR, YANG YJ, ZHANG GH, LI SH, LIANG ZC. The grapevine R2R3-type MYB transcription factor VdMYB1 positively regulates defense responses by activating the stilbene synthase gene 2 (VdSTS2)[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 478.
- [18] MARTIN C, PAZ-ARES J. MYB transcription factors in plants[J]. Trends in Genetics, 1997, 13(2): 67-73.
- [19] ZHAO YY, YANG ZE, DING YP, LIU LS, HAN X, ZHAN JJ, WEI X, DIAO YY, QIN WQ, WANG P, LIU PP, SAJJAD M, ZHANG XL, GE XY. Over-expression of an R2R3 MYB gene, GhMYB73, increases tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Science, 2019, 286: 28-36.
- [20] WANG S, WU HL, CAO XX, FAN WJ, LI CL, ZHAO HX, WU Q. Tartary buckwheat FtMYB30 transcription factor improves the salt/drought tolerance of transgenic *Arabidopsis* in an ABA-dependent manner[J]. Physiologia Plantarum, 2022, 174(5): e13781.
- [21] HE J, LIU YQ, YUAN DY, DUAN MJ, LIU YL, SHEN ZJ, YANG CY, QIU ZY, LIU DM, WEN PZ, HUANG J, FAN DJ, XIAO SZ, XIN YY, CHEN XN, JIANG L, WANG HY, YUAN LP, WAN JM. An R2R3 MYB transcription factor confers brown planthopper resistance by regulating the phenylalanine ammonia-lyase pathway in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(1): 271-277.
- [22] KANG YH, KIRIK V, HULSKAMP M, NAM KH, HAGELY K, LEE MM, SCHIEFELBEIN J. The *MYB23* gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the *Arabidopsis* root epidermis[J]. The Plant Cell, 2009, 21(4): 1080-1094.
- [23] SCHELLMANN S, SCHNITTGER A, KIRIK V, WADA T, OKADA K, BEERMANN A, THUMFAHRT J, JÜRGENS G, HÜLSKAMP M. TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(19): 5036-5046.
- [24] KIRIK V, SIMON M, HUELSKAMP M, SCHIEFELBEIN J. The enhancer of try and *cpc1* gene acts redundantly with triptychon and caprice in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*[J]. Developmental Biology, 2004, 268(2): 506-513.
- [25] ITO M, ARAKI S, MATSUNAGA S, ITOH T, NISHIHAMA R, MACHIDA Y, DOONAN JH, WATANABE A. G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors[J]. The Plant Cell, 2001, 13(8): 1891-1905.
- [26] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.
- [27] YANG YQ, GUO Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses[J].

- The New Phytologist, 2018, 217(2): 523-539.
- [28] ISMAIL AM, HORIE T. Genomics, physiology, and molecular breeding approaches for improving salt tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2017, 68: 405-434.
- [29] RIECHMANN JL, HEARD J, MARTIN G, REUBER L, JIANG C, KEDDIE J, ADAM L, PINEDA O, RATCLIFFE OJ, SAMAHA RR, CREELMAN R, PILGRIM M, BROUN P, ZHANG JZ, GHANDEHARI D, SHERMAN BK, YU G. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. Science, 2000, 290(5499): 2105-2110.
- [30] SALIH H, GONG WF, HE SP, SUN GF, SUN JL, DU XM. Genome-wide characterization and expression analysis of MYB transcription factors in *Gossypium hirsutum*[J]. BMC Genetics, 2016, 17(1): 129.
- [31] DU H, YANG SS, LIANG Z, FENG BR, LIU L, HUANG YB, TANG YX. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 106.
- [32] WILKINS O, NAHAL H, FOONG J, PROVART NJ, CAMPBELL MM. Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors[J]. Plant Physiology, 2009, 149(2): 981-993.
- [33] CAO ZH, ZHANG SZ, WANG RK, ZHANG RF, HAO YJ. Genome wide analysis of the apple MYB transcription factor family allows the identification of *MdoMYB121* gene conferring abiotic stress tolerance in plants[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69955.
- [34] CHEN YH, YANG XY, HE K, LIU MH, LI JG, GAO ZF, LIN ZQ, ZHANG YF, WANG XX, QIU XM, SHEN YP, ZHANG L, DENG XH, LUO JC, DENG XW, CHEN ZL, GU HY, QU LJ. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60(1): 107-124.
- [35] LI H, WEN XX, WEI MK, HUANG X, DAI SP, RUAN L, YU YX. Genome-wide identification, characterization, and expression pattern of MYB gene family in *Melastoma candidum*[J]. Horticulturae, 2023, 9(6): 708.
- [36] JIANG CK, RAO GY. Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants[J]. Plant Physiology, 2020, 183(2): 637-655.
- [37] NIAN LL, LIU XL, YANG YB, ZHU XL, YI XF, HAIDER FU. Genome-wide identification, phylogenetic, and expression analysis under abiotic stress conditions of LIM gene family in *Medicago sativa* L.[J]. PLoS One, 2021, 16(6): e0252213.
- [38] ZHOU Y, TAO JJ, AHAMMED GJ, LI JW, YANG YX. Genome-wide identification and expression analysis of aquaporin gene family related to abiotic stress in watermelon[J]. Genome, 2019, 62(10): 643-656.
- [39] ZHOU YF, WANG XQ, SONG MJ, HE ZD, CUI GZ, PENG GD, DIETERICH C, ANTEBI A, JING NH, SHEN YD. A secreted microRNA disrupts autophagy in distinct tissues of *Caenorhabditis elegans* upon ageing[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4827.
- [40] DU H, FENG BR, YANG SS, HUANG YB, TANG YX. The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e37463.
- [41] KE YJ, ZHENG QD, YAO YH, OU Y, CHEN JY, WANG MJ, LAI HP, YAN L, LIU ZJ, AI Y. Genome-wide identification of the MYB gene family in *Cymbidiumensifolium* and its expression analysis in different flower colors[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(24): 13245.
- [42] RAO XB, QIAN ZF, XIE LY, WU HY, LUO Q, ZHANG QY, HE LL, LI FS. Genome-wide identification and expression pattern of MYB family transcription factors in *Erianthus fulvus*[J]. Genes, 2023, 14(12): 2128.
- [43] MIN XY, WU HL, ZHANG ZS, WEI XY, JIN XY, NDAYAMBAZA B, WANG YR, LIU WX. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Medicago truncatula*[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2019, 28(3): 320-335.
- [44] HU W, HOU XW, HUANG C, YAN Y, TIE WW, DING ZH, WEI YX, LIU JH, MIAO HX, LU ZW, LI MY, XU BY, JIN ZQ. Genome-wide identification and expression analyses of aquaporin gene family during development and abiotic stress in banana[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(8): 19728-19751.
- [45] MILLARD PS, KRAGELUND BB, BUROW M. R2R3 MYB transcription factors—functions outside the DNA-binding domain[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(10): 934-946.
- [46] ZHU T, LIU Y, MA LT, WANG XY, ZHANG DZ, HAN YC, DING Q, MA LJ. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the SPL gene family in wheat[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 420.
- [47] WANG Y, YANG XM, HU YN, LIU XQ, SHARENG TY, CAO GX, XING YK, YANG YW, LI YX, HUANG WL, WANG ZB, BAI GW, JI YY, WANG YZ. Transcriptome-based identification of the SaR2R3-MYB gene family in *Sophora alopecuroides* and function analysis of SaR2R3-MYB15 in salt stress tolerance[J]. Plants, 2024, 13(5): 586.
- [48] ZHANG TZ, HU Y, JIANG WK, FANG L, GUAN XY, CHEN JD, ZHANG JB, SASKI CA, SCHEFFLER BE, STELLY DM, HULSE-KEMP AM, WAN Q, LIU BL, LIU CX, WANG S, PAN MQ, WANG YK, WANG DW, YE WX, CHANG LJ, et al. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(5): 531-537.
- [49] CHEN YN, LI L, TANG BY, WU T, CHEN GP, XIE QL, HU ZL. Silencing of SIMYB55 affects plant flowering and enhances tolerance to drought and salt stress in tomato[J]. Plant Science, 2022, 316: 111166.
- [50] ZHANG FR, ZHANG XC, WAN WH, ZHU XY, SHI MX, ZHANG L, YANG FS, JIN SM. MYB4 in *Lilium pumilum* affects plant saline-alkaline tolerance[J]. Plant Signaling & Behavior, 2024, 19(1): 2370724.