

TrMYB308 基因的克隆及在苦荞毛状根中的功能分析

谈天斌^{1,2}, 卢晓玲^{1,2}, 张凯旋², 丁梦琦², 廖志勇¹, 周美亮²

(¹温州大学生命与环境科学学院, 温州 325035; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: MYB 类转录因子广泛参与调控植物的生长发育过程, 对植物次生代谢也具有重要调控作用。前期研究以 V 型紫斑白三叶为材料, 通过 RNA-Seq 技术, 筛选出与类黄酮合成相关的转录因子 TrMYB308。在此基础上从 V 型紫斑白三叶中克隆出 TrMYB308 基因, 该基因的 ORF 全长为 921 bp, 编码 306 个氨基酸。亚细胞定位结果表明, TrMYB308 定位于细胞核。多序列比对和系统发育分析表明, TrMYB308 属于典型的 R2R3-MYB 转录因子, 且该蛋白与红三叶 TaMYB308 和苜蓿 MtMYB308 等蛋白亲缘关系较近。表达特性分析结果表明, TrMYB308 基因在紫斑白三叶各个组织中均有表达, 且其表达量受 JA 的诱导。在苦荞毛状根中异源表达 TrMYB308, 结果发现转基因根系中的类黄酮代谢途径部分关键酶基因 (如 *FtF3H* 和 *FtFLS*) 的表达量明显增加; 转基因根系总黄酮的含量明显高于对照组。基于以上结果, 推测 TrMYB308 可能参与类黄酮次生代谢生物合成调控。本研究为荞麦类黄酮合成分子机制探索及荞麦品质改良提供了理论依据。

关键词: V 型紫斑白三叶; MYB 转录因子; 类黄酮合成; 次生代谢

Cloning and Functional Analysis of Transcription Factor Gene TrMYB308 in Tartary Buckwheat Hairy Roots

TAN Tian-bin^{1,2}, LU Xiao-ling^{1,2}, ZHANG Kai-xuan², DING Meng-qi², LIAO Zhi-yong¹, ZHOU Mei-liang²

(¹College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035; ²Institute of

Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: MYB transcription factors are widely involved in the regulation of plant growth and development, and they also play important roles in secondary metabolism. In our previous study, the transcription factor TrMYB308 related to flavonoid synthesis was identified by RNA-Seq in V-type purple white clover. Based on these results, the open reading frame (ORF) of TrMYB308 gene was cloned with a length of 921 bp, encoding for 306 amino acid residues. Subcellular localization analysis indicated that TrMYB308 was localized to the nucleus. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that TrMYB308 protein belongs to a typical R2R3-MYB transcription factor subfamily and shows sequence close similarity to TaMYB308 from *Trifolium pratense* L. and MtMYB308 from *Medicago sativa* L.. Expression analyses revealed that the transcripts of TrMYB308 were detected in all tissues and inducible under JA treatment. Heterologous expression of TrMYB308 in tartary buckwheat hairy root resulted in significant transcriptional elevation of flavonoid metabolic pathway key enzyme genes (*FtF3H*, *FtFLS*). Consistently, the content of total flavonoids in transgenic roots was significantly increased if compared to that of the non-transgenic roots. Hence, we speculated that TrMYB308 is involved in the regulation of secondary metabolic biosynthesis of flavonoids. These results provided a theoretical foundation for the genetic improvement of flavonoid content in buckwheat.

Key words: V-type purple white clover; MYB transcription factors; flavonoid synthesis; secondary metabolism

收稿日期: 2019-04-12 修回日期: 2019-05-22 网络出版日期: 2019-06-10

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190412003>

第一作者研究方向为荞麦品质代谢调控研究, E-mail: ttb120130@163.com

通信作者: 廖志勇, 研究方向为药用动植物活性化合物的分离、改造与活性研究, E-mail: zyliao@wzu.edu.cn

周美亮, 研究方向为荞麦种质资源与品质代谢调控研究, E-mail: zhumeiliang@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划中欧政府间合作项目 (2017YFE0117600); 国家自然科学基金面上项目 (31572457)

Foundation project: National Key R&D Program of China (2017YFE0117600), National Natural Science Foundation of China (31572457)

类黄酮物质是一类非常重要的植物苯丙烷次级代谢产物,主要包括黄酮醇、花青素和原花色素,其广泛分布于植物界,并在许多植物组织,如根、叶、花和果实中均有大量分布^[1-2]。该类化合物具有多种生物学功能,如调节植物的生长发育、环境因子胁迫和次生代谢等^[3-4]。相关药理和临床试验证实类黄酮物质还具有重要的药理功能对维持人体健康具有重要的作用,例如抗癌、抗衰老、软化血管、改善视力等^[5-7]。因此,类黄酮类化合物一直备受关注,被认为是一类极富医疗、保健和食用价值的天然产物,具有广阔的开发、应用前景。

类黄酮物质的生物合成途径十分复杂,需经过一系列的酶促催化才能最终合成。该催化过程可分为 3 个阶段。第 1 阶段是由苯丙氨酸经多个酶催化合成 4- 香豆酰 CoA; 第 2 阶段是由 4- 香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 酶催化合成二氢黄酮醇; 第 3 阶段是由二氢黄酮醇经多酶催化合成花青素和原花青素的过程。该催化过程涉及苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查尔酮合成酶(CHS)、黄酮醇-3'-羟化酶(F3'H)、黄酮醇合酶(FLS)和二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)等多种酶^[8]。随着对类黄酮合成分子机制理解的深入,代谢工程成为植物类黄酮品质改良的重要手段。由于类黄酮生物合成受多基因的协同调控,且转录因子又能同时调控多基因的协同表达。因此,筛选并鉴定影响类黄酮积累的调控因子已成为研究者们努力攻克的难点和方向。

MYB 类转录因子,因其 N 端含有高度保守 DNA 结合域(DNA-binding domain)而得名,其广泛存在于真核生物界,是植物中最大的转录因子家族之一。MYB 蛋白初级结构由 4 部分构成,包括 DNA 结合结构域(DBD, DNA binding domain)、转录激活功能域(DAD, DNA activation domain)、寡聚化位点以及核定位信号区。依据 DNA 结合结构域中重复序列的数目将 MYB 分成 4 类: 1R-MYB、2R-MYB、3R-MYB 和 4R-MYB 类转录因子。其中 R2R3-MYB 是最大的一类转录因子,其对植物的生长发育、器官形态建成、次生代谢和胁迫应答等具有重要调控作用^[9-10]。此外,茉莉酸(JA, jasmonate acid)是一种广泛存在的内源性植物激素,由脂类自由基氧化形成,JA 及其衍生物茉莉酸甲酯(MeJA)和异亮氨酸(JA-Ile)统称为茉莉酸类物质(JAs, jasmonate acids)。其中,茉莉酸甲酯(MeJA, methyl jasmonate)是 JAs 的一种活性分子形式。JAs 具有多种功能,一方面可以调控特定的初级代谢途径为

次级代谢提供必要的底物^[11-12]; 另一方面可以调控次生代谢过程,合成次生代谢产物以应对生物和非生物胁迫,如机械损伤、昆虫防御和抵抗病原菌等^[13-14]。目前许多研究表明, JAs 介导的 MYB 转录因子参与调控类黄酮次生代谢生物合成相关的关键酶基因表达,从而影响类黄酮物质的合成与积累,例如苹果(*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) 中的 MdMYB9/10/11^[15-16]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中的 MYB75 和 MYB90^[17-18]、白三叶(*Trifolium repens* L.) 中的 TrMYB133/134^[19]等。

荞麦是蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum* Mill.) 的药食饲兼用作物,在全世界范围内均有种植。荞麦营养丰富,富含黄酮类物质,尤其是芦丁等生物活性成分,因其具有抗氧化、抗肿瘤等功效,从而被广泛应用于食品、医疗和保健等行业。因此,对荞麦类黄酮次生代谢生物合成调控机理的探索具有十分重要的理论意义。本课题组前期选育的 V 型紫斑白三叶,其叶片中部具有倒“V”型紫斑的鲜明特征(图 1)。前期研究发现,紫斑提取物富含花青素等类黄酮物质。为了探究紫斑形成的分子机制,分别以普通白三叶和紫斑白三叶叶片为材料,利用转录组测序技术挖掘紫斑差异表达基因。根据差异 RNA-Seq 结果^[20],筛选获得一个 MYB 类转录因子 TrMYB308,结合生物信息学分析,采用 qRT-PCR 技术分析了 *TrMYB308* 基因在紫斑白三叶不同组织和激素胁迫下(JA)的表达模式。通过亚细胞定位和转录激活试验进一步研究该转录因子的功能,并将其在苦荞毛状根中过表达,以验证其生物学功能,为荞麦类黄酮合成分子机制探索及荞麦品质改良提供了实验证据和理论参考。



图 1 普通白三叶与 V 型紫斑白三叶的表型差异

Fig.1 Phenotype between white clover and V-purple white clover

1 材料与方法

1.1 研究材料

白三叶(海法)、V 型紫斑白三叶和苦荞(川荞 1 号)种子;大肠杆菌菌株 DH5 α 、酵母 *pJ94A*、

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) A4; 植物原生质体表达载体 pAN580、酵母转录激活载体 pAS2-1、入门载体 pPOTO-Blunt、过表达载体 pCAMBIA-1302, 上述材料均由本实验室保存提供。限制性内切酶、T4 连接酶、胶回收试剂盒以及 cDNA 合成试剂盒, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司。PCR 扩增的酶和试剂、实时荧光定量 PCR 的试剂、质粒提取, 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。DNA 标准分子量购自北京博迈德生物技术有限公司。Trizol 和 RNA 提取试剂盒购自北京天根科技公司。原生质体转化所用纤维素酶和离析酶均购自美国 Sigma 公司。PCR 引物合成及 DNA 测序由北京博迈德生物技术有限公司完成。白三叶和 V 型紫斑白三叶材料种植于中国农业科学院试验田及组培室。培养条件: 温度为 18 °C, 光周期为 16 h, 光照 /8 h 黑暗, 相对湿度 40%~60%。

1.2 研究方法

1.2.1 *TrMYB308* 基因克隆 V 型紫斑白三叶总 RNA 提取: 选取 4 周龄幼苗叶片, 利用 Trizol 法^[21]抽提 V 型紫斑白三叶总 RNA。用 RNase free DNase (天根生化科技公司) 消除残存的 DNA, 然后用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司) 进行反转录获得 V 型紫斑白三叶的 cDNA。反转录反应体系为: DNase 消化的 RNA (500 ng/ μ L) 11 μ L, Oligo (dT) 18 primer 1 μ L, 5 $\times$ Reaction Buffer 4 μ L, Revert Aid M-MuLV RT (200 U/ μ L) 1 μ L, RiboLock RNase Inhibitor 1 μ L, 再用 RNase-free 水补至 20 μ L。反应体系混匀后, 65 °C 退火 5 min, 冰浴 2 min, 42 °C 孵育 1 h, 70 °C 反应 5 min 终止反应, 反转录产物稀释 5~10 倍, -20 °C 保存备用。

***TrMYB308* 基因克隆:** 通过普通白三叶与紫斑白三叶叶片的 RNA 转录组测序技术, 分析并筛选获得该基因 CDS 序列。结合生物信息学分析, 由 NCBI blast 序列比对可知, 目的基因编码的蛋白与红三叶的 MYB-related 308 蛋白同源性最高为 91%; 蒺藜苜蓿中的 MYB-related 308 蛋白同源性为 84%。根据 *TrMYB308* 基因的 ORF (Open Reading Frame) 设计特异 PCR 扩增引物, F: 5'-ATGGGAAGATCACCTTG-3' 和 R: 5'-TCATTTCATTCTAAGCC-3'。接着, 以 V 型紫斑白三叶 cDNA 为模板, *TrMYB308*-F 和 *TrMYB308*-R 为

引物进行 PCR 扩增, 获得目的基因的 CDS 序列。PCR 反应体系为: cDNA 模板 2 μ L (250 ng/ μ L), 2 $\times$ phanta Mix Master Mix 25 μ L, 上下游引物各加 2 μ L (10 pmol/ μ L), 加 ddH₂O 补至 50 μ L。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 34 个循环, 72 °C 延伸 8 min。

1.2.2 目的基因序列分析 用 NCBI blast 分析目的基因序列, 使用 CLUSTALW 对 *TrMYB308* 的同源蛋白序列进行比对, 并用 MEGA7 软件绘制邻近树 (neighbor-joining tree), 树的每个节点的 bootstrap 值为 1000。

1.2.3 实时定量荧光 PCR 分析 组织表达样品: 取 V 型紫斑白三叶的根、茎、叶、花和叶柄等组织, 经液氮速冻并储存于 -80 °C 冰箱。然后提取样品总 RNA, 反转录成 cDNA, -20 °C 保存备用。

MeJA 诱导表达样品: 白三叶和紫斑白三叶材料在组培室光照培养 3 周, 注意避免染菌和其他的胁迫。待其长出真叶后用 50 μ mol/L MeJA, 分别震荡 (120 r/min) 室温处理 0、1、4、8 和 12 h 后取样。处理其他条件和培养均保持一致, 对照组添加同体积的二甲基亚砷 (DMSO)。取样之后用滤纸快速吸干并置于液氮中速冻, 保存于 -80 °C 冰箱备用。

转基因毛状根样品: 将农杆菌 A4 介导的转基因毛状根, 待其长至 28 d 时取样 (此时毛状根的生长状态最好)。用滤纸快速吸干并用液氮速冻, 保存于 -80 °C 冰箱备用。

实时荧光定量 PCR: 分别以白三叶组成型表达的 *TrActin* 基因和荞麦组成型表达的 *FtH3* 基因为内参; 设计基因特异引物, 以制备好的 cDNA 为模板, qPCR 反应体系: ChamQTM SYBR[®] qPCR Master Mix 10.0 μ L, PCR Forward Primer (10 mol/L) 0.4 μ L, PCR Reverse Primer (10 mol/L) 0.4 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L, 补水至 20 μ L。qRT-PCR 程序: 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。每个样品重复测定 3 次, 在 BAI 7500 Real-time PCR 仪上进行 qRT-PCR 检测。本试验中用 RQ (相对表达量) = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的算法, 计算目标基因的相对表达量; 设置诱导表达 0 h 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 1, 计算出 1、4、8 和 12 h 的表达倍数。实时荧光定量 PCR 的引物详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' -3')	引物用途 Purpose of primer
TrMYB308-QF	5' -ATGCCGTTCAATTTTAGTG -3'	荧光定量 PCR 引物序列 qRT-PCR primer sequences
TrMYB308-QR	5' -TTACGAATCGATCCTGCT -3'	
TrActin-QF	5' -CGTATGAGCAAGGAGATCACTG 3'	
TrActin-QR	5' -CATCTGCTGGAAGGTGCT -3'	
FtPAL-QF	5' -CGGAGCTTCTGGTGTGGAGAACAG-3'	关键酶基因荧光 定量 PCR 引物序列 qRT-PCR of key enzymes primer sequences
FtPAL-QR	5' -CTAGCAGATAGGCAGAGGAGCAC-3'	
FtFLS-QF	5' -GCAACGGAAGTACAAGGCAGTG-3'	
FtFLS-QR	5' -ACTGGGGTAGTTTGTGAGCTTG-3'	
FtFH3-QF	5' -TCACCCTCTTGCTTCAAGACCAAG-3'	
FtFH3-QR	5' -CCTCACTGCCAGCGGGTAAAC-3'	
FtFLS1-QF	5' -CTTGGCCTCCAGTGTTGGAAAG-3'	
FtFLS1-QR	5' -GCAGCTCAGGAAGAGGTCCAAC-3'	
FtH3-QF	5' -CAAGGAAGGTATCCACCG-3'	
FtH3-QR	5' -TTAGAATCCACCACGAAGACG-3'	

1.2.4 亚细胞定位 根据 *TrMYB308* 的 ORF 设计特异性引物, PAN580-F: 5'-TCCGGAGCTAGCTCTAGAATGGGAAGATCACCTTGTGT-3' 和 pAN580-R: 5'-CTTGCTCACCATGGATCCTTTCATTCTAAGCCTTTGTA -3'。以 *TrMYB308*-T 载体为模板, pAN580-F/R 为引物进行 PCR 扩增, 获得含酶切位 *TrMYB308* 基因的 PCR 产物。对骨架载体进行酶切后纯化回收。将目的基因采用同源重组的方法构建至 pAN580 表达载体上, 获得融合蛋白重组质粒 pAN580-MYB308-GFP。重组质粒 pAN580-MYB308-GFP 测序正确后, 通过 PEG 介导法分别将重组质粒与对照 (pAN580-GFP) 质粒转入拟南芥原生质体中, 25 ℃ 培养 20 h, 采用激光共聚焦显微镜 (ZEISS LSM700, Germany) 观察 GFP 信号, 确定其亚细胞定位。

1.2.5 转录激活活性分析 根据 *TrMYB308* 的 ORF 设计酵母转录激活的特异性引物, pAS2-1-F: 5' -GGAGGCCCCGGGGATCCATGGGAAGATCACTTGT-3' 和 pAS2-1-R: 5' -TTCATAGATCTCTCGAGTCATTTTCAATTCTAAGCCTTT-3'。采用同源重组的方法, 将目的基因序列构建到 pAS2-1 载体上。制备 *pJ94A* 酵母感受态细胞, 并将构建好的质粒载体转化酵母感受态细胞, 转化成功后涂布在 SD/-Trp 缺陷固体培养基上, 28 ℃ 倒置培养 2~3 d。挑取单克隆, 经 PCR 阳性鉴定, 将酵母菌落接种于 SD/-Trp 液体缺陷培养基中, 28 ℃ 振荡过夜培养。将所得菌液稀释至 OD₆₀₀=0.1, 分别点样在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His 缺陷固体培养基上, 28 ℃

倒置培养 2~3 d。阳性对照为 pAS2-1-Active, 阴性对照为空载 pAS2-1。

1.2.6 农杆菌介导的苦荞毛状根转化系统的构建及遗传转化 过表达载体的构建: 根据 *TrMYB308* 的 ORF 序列设计含 *NcoI* 和 *BamHI* 酶切位点的上下游引物, PCR 扩增 *TrMYB308* 的全长序列。上游引物, OE-MYB7-F: 5' -CCATGGGAAGATCACCTTGT-3' 和下游引物, OE-MYB7-R: 5' -GGATCCTCATTTCATTTCTAAGCC-3'。随后经酶切、回收和连接转化后, 将 *TrMYB308* 全长序列正向插入 pCAMBIA-1302 载体的 CaMV35S 启动子后, 构建过表达载体 pBA1302-*TrMYB308*。

农杆菌介导的苦荞毛状根转化: 挑选成熟饱满的苦荞种子 (川荞 1 号) 用 10% 次氯酸钠溶液消毒 7~10 min, 用 75% 酒精灭菌 5~8 min, 再用无菌水清洗 3~5 次; 4 ℃ 春化 3~4 d 后选取萌发状态一致的种子种植在无激素 MS 培养基上, 将其置于组培室 25 ℃ (光周期为 16 h/8 h) 培养, 待其萌发生长 2 周龄后用于农杆菌侵染。用热激法将过表达载体质粒 pCAMBIA1302-*TrMYB308* 以及空载体质粒分别转化发根农杆菌 A4。接着挑取阳性单克隆至 YEB 液体培养基中 (含有 Kan 50 mg/L) 28 ℃ 振荡培养 48 h, 2500 r/min 离心 8 min 后集菌, 并用液体 MS 溶液重悬菌体至终浓度 OD₆₀₀=0.6~0.8。在超净台剪下培养 2 周龄的苦荞幼苗的下胚轴或叶片, 并用尖镊子扎破创造尽可能多的伤口。然后将外植体浸入提前制备好的侵染液中边摇晃边侵染 8~15 min。

将处理后的苦荞下胚轴放在无激素的 MS 培养基上,放置在组培室中黑暗条件下 25 ℃共培养 3~7 d。挑选长势良好的毛状根,剪取根系约 3 min 转至含 200 mg/L Cef(头孢)的 MS 液体培养基中,置于转速为 120 r/min 的摇床上 28 ℃暗培养。培养 28 d 后取样并进行后续试验,设置 3 组重复。

1.2.7 转基因毛状根的总黄酮含量分析 采用三氯化铝法^[22-23]测定转基因苦荞毛状根的总黄酮含量。用已确定的超声提取率,超声 30 min。总黄酮标准曲线的绘制:称取芦丁标准品 3.6 mg,于容量瓶中加入 80% 甲醇 20 mL 定容即得芦丁标准溶液。分别吸取芦丁标准溶液 4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125、0.063、0.031 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加入 0.1 mol/L 的三氯化铝溶液 2 mL、1 mol/L 的乙酸钾溶液 3 mL,用 80% 甲醇溶液定容,摇匀后室温下放置 30 min,同时以 80% 甲醇溶液作为空白对照。在波长为 420 nm 处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 *TrMYB308* 的克隆和序列分析

以 V 型紫斑白三叶的 cDNA 为模板,使用 Oligo7 设计的特异扩增引物 *TrMYB308-F* 和 *TrMYB308-R* 进行 PCR 扩增,得到包含部分 5'-UTR 和部分 3'-UTR 在内的 *TrMYB308* 的 ORF (ORF, open reading frame) 序列,与 RNA-Seq 筛选所获得的片段大小基本一致。

生物信息学分析发现,该基因的 ORF 长度为 921 bp,编码蛋白分子量为 3.39 kD 的 306 个氨基酸,且所编码蛋白的等电点 (pI) 为 8.49。在 NCBI 数据库中用 Blast 比对发现,该蛋白与红三叶 (*Trifolium pratense* L.) MYB-related protein 308-like protein 同源性最高 (91.0%),将其命名为 *TrMYB308*。用 Uniprot 软件分析可知, *TrMYB308* 包含 2 个保守的 DNA 结合结构域,是典型的 R2R3MYB 转录因子, C 端的氨基酸变化较大 (图 2A)。将 *TrMYB308* 与其他物种中同源的 R2R3 转录因子蛋白序列进行比对,例如红三叶、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.)、拟南芥和水稻 (*Oryza sativa* L.) 等。结果表明,这些 MYB 蛋白的 N 端氨基酸序列高度保守,在 9~61 bp 和 62~116 bp 区域分别是 R2R3-MYB 的 R2 和 R3 结合结构域 (图 2A)。采用 MEGA7 软件对这些蛋白通过邻接法构建进化树,并进行分子发育分析发现, *TrMYB308* 与红三叶、蒺藜苜蓿和鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* L.) 等双子叶植物亲缘关系较

近,但相关基因功能报道却很少;而该蛋白与水稻和玉米 (*Zea mays* L.) 等单子叶植物亲缘关系较远 (图 2B)。

2.2 *TrMYB308* 的亚细胞定位及转录激活验证

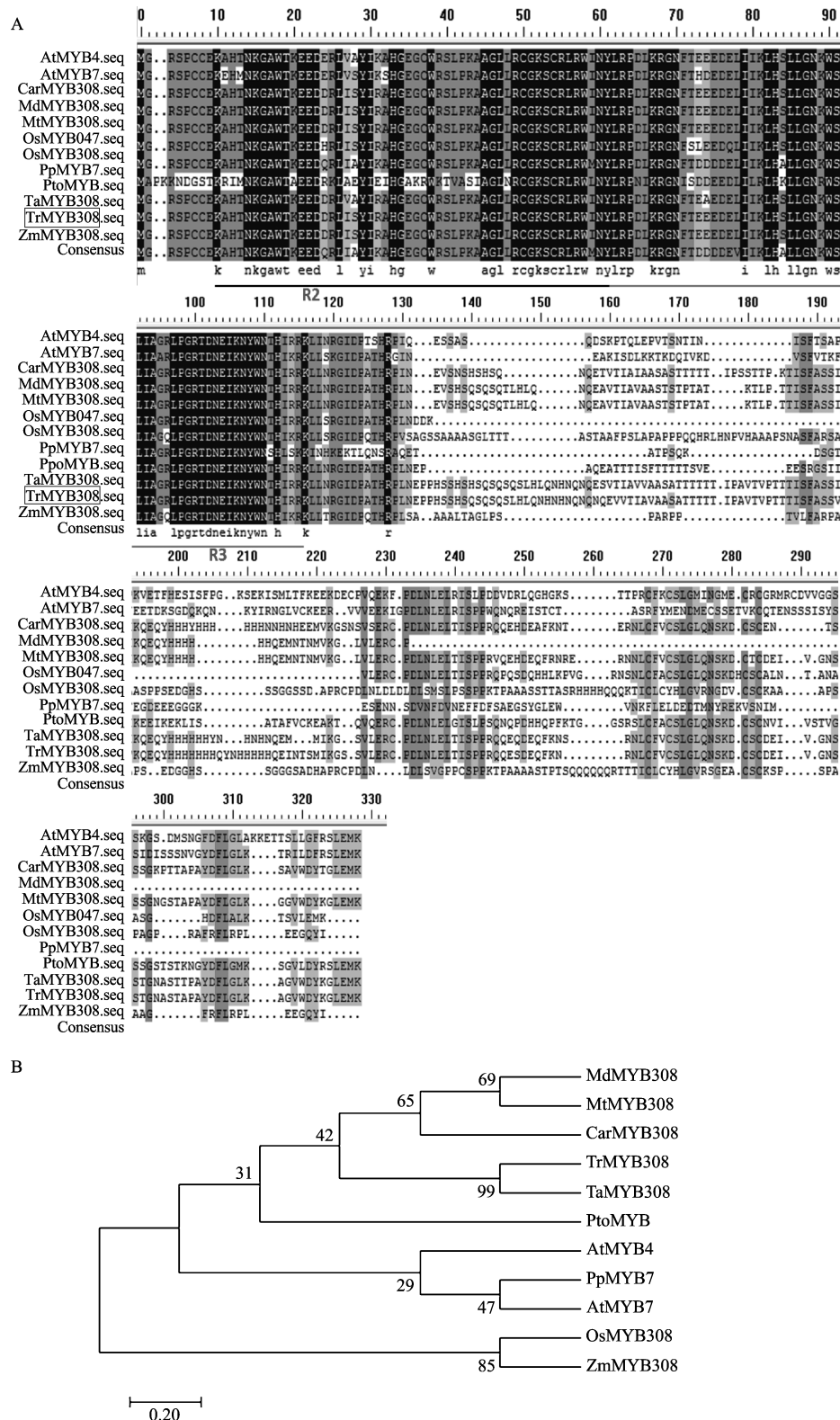
转录因子功能的发挥与其在细胞中的定位密切相关,为探究 *TrMYB308* 的具体定位情况,构建 pAN580-*TrMYB308*-GFP 重组质粒,通过 PEG 介导法转入拟南芥原生质体。25 ℃培养 16~20 h 后,用激光共聚焦显微镜观察细胞中发出 GFP 绿色荧光的位置。结果发现,转 35S-GFP 的荧光信号分布于整个细胞内,而 35S-*TrMYB308*-GFP 融合蛋白的信号都集中在细胞核内 (图 3A)。结果表明, *TrMYB308* 属于典型的转录因子并在细胞核中发挥转录调控功能。

为了验证 *TrMYB308* 是否具有转录激活功能,构建具有 GAL4 DNA 结合结构域的 pAS2-1-*TrMYB308* 酵母表达重组质粒,分别将 pAS2-1-*TrMYB308*、pAS2-1 (阴性对照)、pAS2-1-*Active* (阳性对照) 转入酵母 *pJ94A* 中。结果显示,三者酵母单缺培养基 SD (-Trp) 中均能正常生长。转入 pAS2-1-*Active* 可在二缺培养基 SD (-Trp, His) 上正常生长,阴性对照和 pAS2-1-*TrMYB308* 均无法在二缺培养基上生长 (图 3B),说明 *TrMYB308* 蛋白无转录自激活活性,该转录因子可能还需要与其他转录调控蛋白互作才能发挥其转录调控功能。

2.3 *TrMYB308* 基因的表达特性

2.3.1 *TrMYB308* 基因的组织表达特性 qRT-PCR 分析结果发现, *TrMYB308* 在成熟 V 型紫斑白三叶的各个组织中均有表达,其中在叶片的表达量最高,是根中表达量的 7 倍 (图 4A);在叶柄和花中的表达量也较高,在根和茎中的表达量则相对较低。上述结果表明, *TrMYB308* 基因具有组织特异性,在叶片中的表达量最高,在根中最低。因此,推测其可能对紫斑形成起重要调控作用。

2.3.2 *TrMYB308* 基因受 MeJA 诱导的表达分析 用茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理 3 周龄的普通白三叶和紫斑白三叶幼苗,并在不同的处理时间点提取处理材料的总 RNA,用 Real-time PCR 检测 *TrMYB308* 的转录水平。结果如图 4 所示,目的基因的表达量随着 MeJA 处理时间的增加而逐渐增高,在 8 h 达到峰值,此后又逐渐降低。在处理 1 h 时,2 种材料中的 *TrMYB308* 的表达量均开始上调,普通白三叶组在处理 4 h、8 h 和 12 h 时其表达量无显著变化。而紫斑白三叶组, *TrMYB308* 基因的表达随着

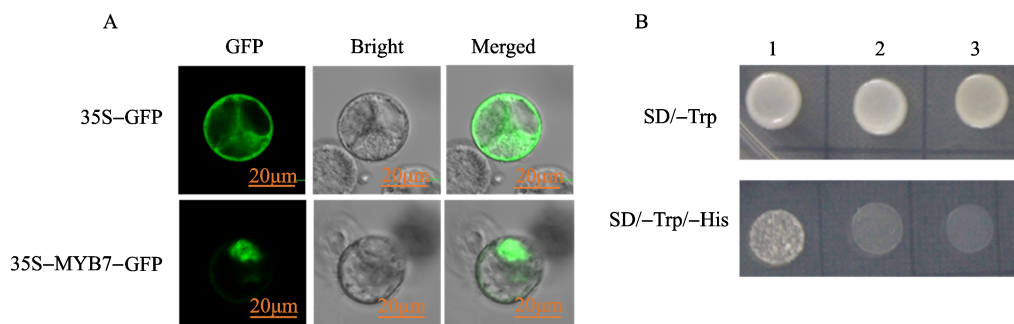


A: *TrMYB308* 与其他 R2R3-MYB 类同源蛋白序列多重比对; B: *TrMYB308* 和其他植物 R2R3-MYB 蛋白的系统进化树

A: Multi-alignment of *TrMYB308* with other R2R3-MYB type proteins, B: Phylogenetic tree of *TrMYB308* and R2R3-MYBs from other plants, *AtMYB4*: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.NP_195574.1, *AtMYB7*: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.NP_179263.1, *CarMYB308*: *Cicer arietinum* L.XP_004505789.1, *MtMYB308*: *Medicago truncatula* Gaertn.XP_003607200.1, *MdMYB308*: *Malus domestica* (Suckow) Borkh. NP_001315806.1, *OsMYB308*: *Oryza sativa* L.XP_015627699.1, *ZmMYB308*: *Zea mays* L.XP_008657016.1, *PpMYB7*: *Prunus persica* (L.) Batsch KT159231.1, *PtoMYB7*: *Populus tomentosa* C.K.Schneid., *TaMYB7*: *Trifolium pratense* L., *TrMYB308*: *Trifolium repens* L.

图 2 *TrMYB308* 的同源蛋白序列比对及系统发育分析

Fig.2 Multiple alignment of *TrMYB308* homologous proteins and phylogenetic analysis

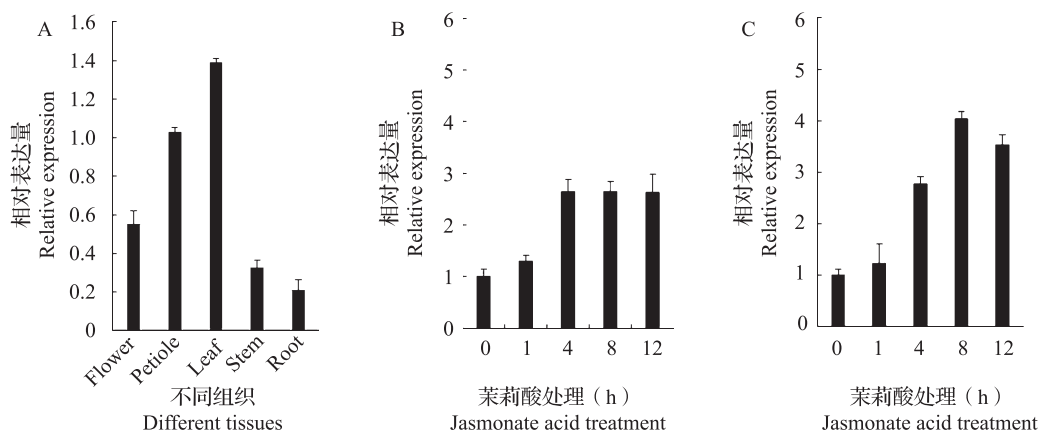


A: TrMYB308 的亚细胞定位,空载 35S-GFP 和 35S-*TrMYB308*-GFP 在拟南芥原生质体中表达; B: 酵母转录转录激活试验

A: expression of 35S-GFP and 35S-*TrMYB308*-GFP in *Arabidopsis* protoplasts, B: 1.pAS2-1-Active, 2.pAS2-1-*TrMYB308*, 3.pAS2-1 empty

图 3 TrMYB308 的亚细胞定位和酵母转录转录激活试验

Fig.3 Subcellular localization of TrMYB308 in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and transcription activation assay of TrMYB308



A: V 型紫斑白三叶不同组织中 *TrMYB308* 的相对表达量; B: 普通白三叶中 *TrMYB308* 受 MeJA 诱导的表达谱;

C: V 型紫斑白三叶中 *TrMYB308* 受 MeJA 诱导的表达谱

A: relative expression levels of *TrMYB308* in different tissues of v-type purple white clover, B: expression pattern of *TrMYB308* induced by MeJA in common white clover, C: expression pattern of *TrMYB308* induced by MeJA in V-type purple white clover

图 4 *TrMYB308* 基因的表达特性

Fig.4 Expression specificity of *TrMYB308* gene

MeJA 处理时间的增加,呈现显著的先增加后下降的趋势。此外,V 型紫斑组比普通组受 MeJA 诱导的程度更大(图 4B、图 4C)。上述结果表明,目的基因参与了植物对 JA 信号的应答反应,且 V 型紫斑白三叶相比普通白三叶对 JA 激素胁迫更敏感。

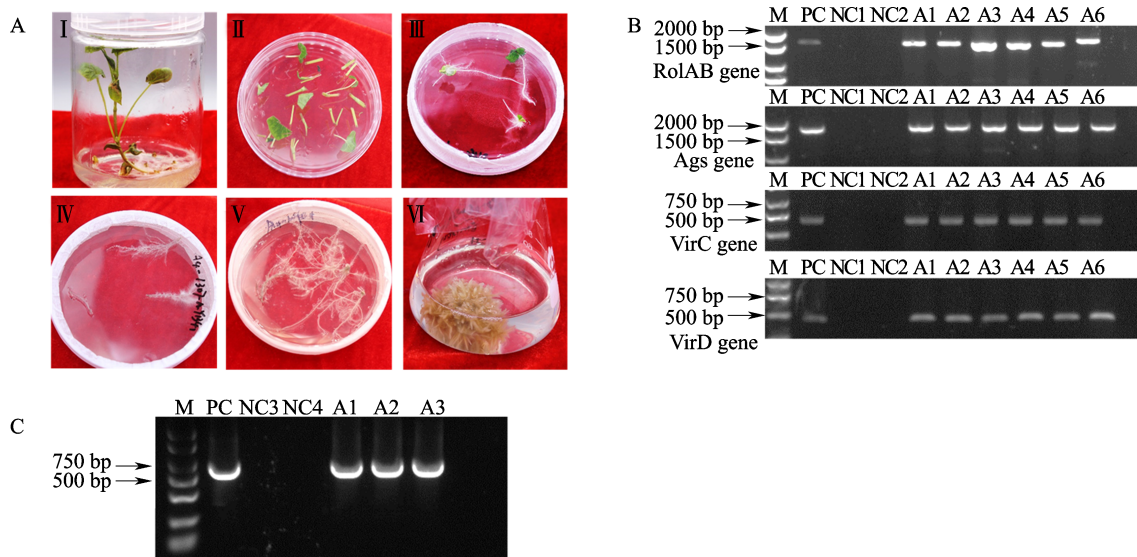
2.4 毛状根的诱导及转基因根系的鉴定

为了探究 TrMYB308 是否调控黄酮生物合成,选择黄酮含量丰富的苦荞毛状根作为体内验证系统,于是构建 pCambia1302-*TrMYB308* 过表达载体,并用 A4 农杆菌介导的方法将过表达和对照质粒均转入苦荞毛状根中(图 5A)。为了筛选阳性转基因根系,对 A4 毛状根和转基因根系进行 PCR 分子鉴定。首先,提取各根系的 DNA 与阳性对照质粒进行 PCR 分析发现, A4 农杆菌 Ri 质粒的转移区和毒性区相关的基因(例如 *RolAB*、*Ags*、*VirC* 和 *VirD* 等)的片段大小与阳性对照一致(图 5B),

表明所诱导的毛状根为阳性;其次,转 pCAI1302-*TrMYB308* 根系 A1、A2 和 A3 的扩增片段与阳性对照组(*TrMYB308* 质粒)大小完全一样(图 5C)。上述结果表明,我们成功地诱导并筛选获得了转基因苦荞毛状根阳性根系 A1、A2 和 A3(图 5C)。

2.5 在苦荞毛状根中过表达 *TrMYB308* 对总黄酮积累的影响

2.5.1 转基因毛状根系的生长指数和总黄酮含量检测分析 如图 6 所示,分别在 3、7、14、21、28 和 35 d 检测毛状根的鲜重,统计其生长指数。结果发现, A4、A4-1302 和 A4-1302-*TrMYB308* 均在前 7 d 生长速度较为缓慢;7~28 d 生长最快;28~35 d 其生长速度又开始下降。其次, A4、A4-1302 和 A4-1302-*TrMYB308* 根系中, A4 根系生长状态最好, A4-1302 根系生长状态次之;最后, A4-1302-*TrMYB308* 根系生长最为缓慢(图 6A)。



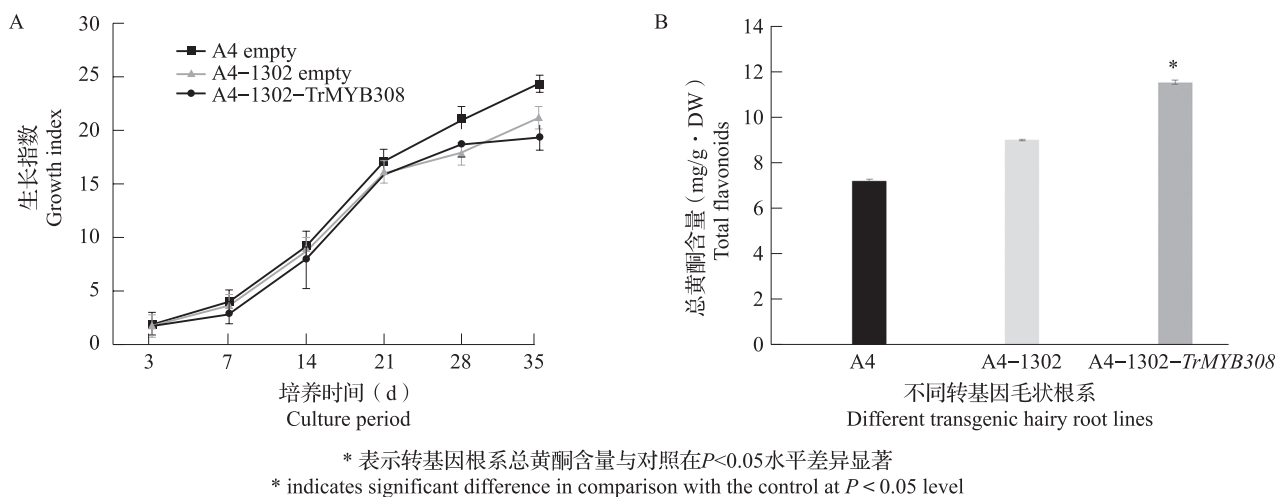
A: 苦荞毛状根的诱导过程; B: A4 毛状根的分子鉴定, M: DL2000 DNA Marker, PC: pRiA4 (阳性对照), NC1: H₂O, NC2: 天然的苦荞根系 (阴性对照), A1~A6: 转基因根系 DNA; C: 转基因毛状根的分子鉴定,

PC: pCAI1302-*TrMYB308*, NC3: 转 A4 根系 DNA, NC4: 转 pCAI1302-A4 根系 DNA

A: Induction process of hairy roots of Tartary buckwheat, B: Molecular identification of hairy roots of A4, M: DL2000 DNA Marker, PC: pRiA4 (positive control), NC1: H₂O, NC2: Natural roots of Tartary buckwheat (negative control), A1-A6: different transgenic lines, C: Molecular identification of transgenic hairy root lines, PC: pCAI1302-*TrMYB308*, NC3: transgenic line of A4 rhizogenes, NC4: transgenic line of pCAI1302-A4

图 5 苦荞毛状根的诱导过程和转基因根系的鉴定

Fig.5 Induction process of hairy roots of tartary buckwheat and identification of transgenic root lines



* 表示转基因根系总黄酮含量与对照在 $P < 0.05$ 水平差异显著
* indicates significant difference in comparison with the control at $P < 0.05$ level

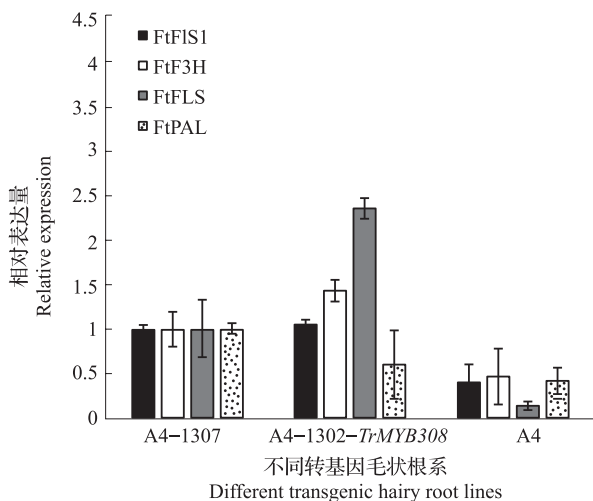
图 6 不同转基因毛状根系的生长指数测定和总黄酮含量测定

Fig.6 Determination of total flavonoid contents and growth index of different transgenic hairy root lines

对 *TrMYB308* 基因毛状根和对照根系 (A4、A4-1302) 进行总黄酮含量的测定。每个株系测定 3 个植株, 每株重复测 3 次, 方差分析结果表明处理间差异显著 ($P < 0.05$)。结果分析表明 A4-1302-*TrMYB308* 株系与对照组总黄酮含量差异显著 (图 6B); 说明转基因植株的总黄酮含量均有提高, 进一步证明目的基因可能参与调控苦荞毛状根中类黄酮的生物合成。

2.5.2 转基因毛状根类黄酮合成途径关键酶基因的表达量分析 提取转基因毛状根阳性根系的总 RNA, 反转录合成第 1 链 cDNA, 分别对类黄酮代谢途径关键酶基因 (*FtPAL*、*FtF3H*、*FtFLS*、*FtFLS1*) 的表达量进行 qRT-PCR 检测分析。结果如图 7 所示, *TrMYB308* 基因的导入显著提高了转基因苦荞毛状根中类黄酮生物合成途径 *FtF3H* (对照组的 1.4 倍) 和 *FtFLS* (对照组的 2.4 倍) 酶基因的表

达量。相反, *FtPAL* 的表达量有轻微的下调, 但转 A4-1302-TrMYB308 根系与转 A4 根系相比发现, *FtPAL* 的表达量存在轻微的上调; *FtFLS* 的表达量没有明显的变化(图 7)。说明目的基因的导入提高了毛状根中类黄酮代谢途径酶基因的表达量, 从而促进类黄酮化合物的生物合成。



FtH3 作为内参基因, 每组数据代表 3 次重复试验的平均值 $\pm$ SD
FtH3 was used as an internal control. Error bars represent the standard deviation of triplicate runs for qRT-PCR

图 7 不同转基因毛状根系中类黄酮代谢途径酶基因的表达量

Fig.7 Expression of flavonoid biosynthetic enzyme genes in different transgenic hairy root lines

3 讨论

类黄酮又称黄酮类物质, 广泛存在植物界中, 并分布于植物多个组织器官中如根、茎、叶和果实等^[1-2]。该物质具有多种生物学功能, 不仅对于维持植物的正常的生命活动具有重要作用, 例如生长发育、环境胁迫和次生代谢等^[3-4]; 而且对维持人体健康具有非常重要的作用, 例如抗氧化、抗衰老和预防心血管疾病等^[5-7]。豆科和蓼科植物富含黄酮类物质, 且其生物合成途径由多基因多转录因子协同参与调控。研究发现, 紫斑的主要成分是花青素等类黄酮物质, 因此阐明 V 型紫斑白三叶的紫斑部位花青素合成调控的分子机理十分重要。目前研究发现, 主要有 3 类转录因子参与花青素等类黄酮物质生物合成关键酶基因的转录调控, 分别是 MYB、bHLH 和 WD40 蛋白, 这 3 类转录因子蛋白相互作用形成 MBW 复合体 (MYB-bHLH-WD40) 直接调控靶基因的表达^[24]。其中, MYB 类转录因子是参与花青素生物合成调控的关键因子, 现已从

许多植物中分离、鉴定了参与花青素等类黄酮物质生物合成的 R2R3-MYB 转录因子, 例如红三叶的 TaMYB14^[25]; 拟南芥的 PAP1 和 PAP2 等^[26]; 百脉根 (*Lotus corniculatus* L.) 的 LjTT2a^[27] 和蒺藜苜蓿的 MtPAR^[28] 等。Albert 等^[24] 在白三叶中筛选克隆了 3 个转录因子 TrRED LEAF、TrRLD (RED LEAF DIFFUSE) 和 TrRED V, 通过瞬时转录激活试验证明 TrRED LEAF 能激活 *TrDFR* 和 *TrAN1* 靶基因的表达, 进而促进植株叶片紫斑部位的花青素合成。本研究通过差异 RNA-Seq 筛选获得一个重要 TrMYB308 蛋白, 生物信息学分析发现其 N 端 9~116 bp 区域内含有典型的 R2、R3 DNA 结合重复序列 (图 2A), 并结合亚细胞定位试验中 GFP 信号的分布情况 (图 3A), 发现该蛋白是定位于细胞核的典型 R2R3-MYB 转录因子。由于 TrRED LEAF TrMYB308 和同属于 R2R3 转录因子, 因此推测它们行使类似的功能。此外, 本研究还发现, 过表达的苦荞毛状根中 *FtF3H* 和 *FtFLS* 的表达量明显的上调, 该结果暗示, *TrMYB308* 可能激活 *FtF3H* 和 *FtFLS* 的表达 (图 7)。再结合 Albert 等的研究结果, 我们推测, TrMYB308 蛋白也可能激活 *TrDFR* 和 *TrAN1* 基因的表达。

茉莉酸类物质 (JAs, jasmonate acids) 是一种广泛存在的内源性植物激素, 并作为一类重要的内源性信号分子^[29], 对植物的生长发育、生物防御和次生代谢等具有主要的调控作用。其中, JAs 介导的次生代谢产物生物合成的转录调控由 SCF^{COI1} 复合物、JAZ 蛋白质、MYC2 和其他一些转录因子 (如 MYBs、WRKYs 和 ERFs) 共同调控, 这些转录因子家族可调控多个生物合成途径相关基因的表达^[29-30]。而且有研究发现, JAs 是植物次生代谢产物合成途径最有效的诱导子^[31], 本研究发现紫斑白三叶比普通型对 JA 信号更敏感 (图 4B、C), 即指前者的类黄酮合成基因的表达水平较高, 对应的类黄酮含量就高。类黄酮含量高则能增强自身对环境胁迫的适应性; 同时, 还表明其具有抗炎、抗氧化以及抗肿瘤等功效^[5-7]。目前许多研究发现, JA 介导的 MYB 转录因子广泛参与调控黄酮类物质的生物合成, 例如火炬松 (*Pinus taeda* L.) 的 PtMYB14^[32], 苹果的 MdMYB9/10/11^[15-16], 拟南芥的 PAP2/MYB90 和 AtAP1/MYB75^[17-18] 等。其中, 拟南芥中的 AtAP1/MYB75 转录因子对类黄酮生物合成起正调控作用。Mitsunami 等^[33] 在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中异源表达 MYB75 基因并用 JA 处理发现, 处理组的

NtF3H、*NtAn1a* 和 *NtAn1b* 基因的表达显著高于对照组,且转基因株系中的类黄酮含量也显著增加。Boter 等^[17]研究发现, *TrJAZ3* 蛋白是 JA 信号通路中的关键抑制子,对类黄酮生物合成相关的转录因子 *AtMYB75* 和 *AtFIL* 具有抑制作用。同时,揭示了 *TrJAZ3* 蛋白在 JA 信号通路中的重要调控作用。第一,确保只有 JA 信号存在时才能激活 *AtMYB75* 以及 *AtMYB75* 参与形成的 MBW 复合体的活性,从而激活下游靶基因的表达,进而促进转基因拟南芥株系中类黄酮物质的积累;第二,当体内 JA 水平下降时, *TrJAZ3* 蛋白能快速抑制 *TrMYB75* 转录因子的活性,从而抑制下游靶基因的表达,进而抑制转基因拟南芥中类黄酮物质的积累。此外, An 等^[15]研究发现,在苹果中也存在类似的调控模式。外源 JA 诱导 *MdJAZs* 蛋白降解并解除其对 *MdMYB9* 和 *MDMYB11* 转录因子的抑制作用,从而激活下游靶基因 *MdANS* 和 *MdANR* 等的表达,进而促进愈伤组织中原花青素和果肉中花青素的积累。本研究发现, MeJA 处理 8 h 可使普通白三叶处理组中的 *TrMYB308* 的表达量比对照组上调 2.8 倍(图 4B);紫斑处理组中的目的基因的表达量上升 4.2 倍(图 4C)。与 Boter 等^[17]的研究结果类似,本研究鉴定 *TrMYB308* 蛋白对类黄酮生物合成也起正调控作用。此外, Gonzalez 等^[18]发现 JA 还能介导 MYB 与其他蛋白(bHLHs 和 WD40s)形成的 MBW(MYB-bHLH-WD40)复合体参与调控类黄酮的生物合成。因此我们推测, *TrMYB308* 可能存在某些互作蛋白(如 *TrJAZs*、*TrbHLHs* 和 *TrWD40s*),并以复合体的形式共同调控苦荞毛状的类黄酮物质的生物合成。

荞麦属于蓼科荞麦属,是一种重要的杂粮兼药用植物,栽培种主要有苦荞、甜荞和金荞麦,其具有生长周期短、适应性强及营养全面等特点。苦荞又名鞑靼荞麦,因其种子和制品味苦而得名,中国主要种植于西南地区。苦荞的营养丰富全面,富含黄酮类物质,尤其芦丁含量较高,作为降“三高”粮食而深受消费者喜爱。许多研究已证明,转录因子广泛参与植物生长发育、次生代谢、环境与激素胁迫应答、器官发育等方面^[9, 34-35]。研究发现荞麦中的 R2R3-MYB 转录因子有多种生物学功能,包括抗逆胁迫和次生代谢等方面^[36]。目前荞麦中的转录因子研究仍集中在 R2R3-MYB 转录因子上,例如 *FtMYB9*、*FtMYB10* 与 ABA(脱落酸)密切相关,广泛参与 ABA 介导的各种胁迫反应,例如

干旱、低温和盐胁迫等。但两者的生物学功能却截然相反,前者是激活子可以增强植物对外界的胁迫抵抗作用,而后者是抑制子则会减弱其对外界的胁迫抵抗作用^[37-38]。Zhang 等^[39]利用转录组测序和重测序技术,分离并克隆了一组受 JA 诱导的参与调控芦丁(黄酮醇途径)的 R2R3-MYB 转录因子 *FtMYB11/13/14/15*,其 C 端含有 SID 结构域。在细胞质中合成 *FtMYB11* 蛋白通过与细胞核膜蛋白 *FtSAD2*(Sensitive to ABA and Drought 2)互作,进而促使 MYB 抑制子从细胞质转运到细胞核并与 *FtJAZ*(Jasmonate-Zim-domain protein)蛋白互作,然后结合到靶基因的顺式作用元件上,协同抑制靶基因的表达从而抑制芦丁的合成与积累^[40]。本研究发现, *TrMYB308* 的表达量也显著地受 JA 的诱导,当 MeJA 处理 8 h 时 V 型紫斑白三叶中 *TrMYB308* 基因的表达量比未处理组高 4 倍(图 4C)。综上所述,我们推测 *TrMYB308* 也可能与 *TrJAZ* 蛋白和 *FtSAD2* 蛋白发生互作,从而协同调控靶基因的表达。

R2R3 型转录因子 *FtMYB1* 与 *AtTT2* 属于同源蛋白,经酵母转录激活试验证明其属于转录激活子。在烟草中异源表达 *FtMYB1* 可使 *DFR*(二氢黄酮醇-4-还原酶)的表达量比对照增加 5.6 倍,进而促进原花青素的积累^[41]。*FeMYB1* 是荞麦中一个重要的转录激活子,已证明 *FeMYB1* 与 *AtFLS* 基因的启动子结合并激活关键酶基因 *DFR* 和 *LDOX* 的表达^[42],从而使荞麦类黄酮的含量增加。本研究将 *TrMYB308* 在苦荞毛状根中异源表达,分析发现转基因根基中关键酶 *FtF3H* 和 *FtFLS* 的表达量比对照组分别增加了约 1.4 和 2.4 倍(图 7)。在类黄酮合成代谢途径中, *FtF3H* 和 *FtFLS* 基因处于 *DFR* 基因的上游。因此推测, *TrMYB308* 蛋白也可能激活 *DFR* 基因的表达,并影响花青素的合成。但酵母转录激活试验证明 *TrMYB308* 并无转录自激活活性(图 3B),因此推测,该转录因子还存在其他的互作蛋白,相互作用后共同调控下游靶基因的表达。此外,本研究发现过表达 *TrMYB308* 基因不仅能显著上调 *FtFLS* 的表达量(图 7),还能显著增加转基因根系中的总黄酮含量(图 6B)。因此我们推测, *TrMYB308* 转录因子通过结合 *FtF3H* 和 *FtFLS* 基因的启动子,从而激活 *FtF3H* 和 *FtFLS* 基因的表达,进而促进转基因根系中类黄酮物质的积累。

综上所述, *TrMYB308* 基因在叶、叶柄和花等组织中优势表达,且其表达量显著受 MeJA 诱导。

TrMYB308 基因的过表达, 不仅使转基因苦荞毛状根中类黄酮合成途径部分酶基因的表达量显著提高, 也使转基因根系中的总黄酮含量得到了显著提高。上述结果证明了该基因正调控类黄酮的生物合成。本研究为我们后续深入挖掘 *TrMYB308* 基因调控的下游靶基因的分子作用机制奠定了理论依据。此外, 由于本研究的相关工作主要是在苦荞毛状根中完成, 因此还需要在荞麦株系中对 *TrMYB308* 转录因子的功能加以验证和深入解析。

参考文献

- [1] Buer C S, Imin N, Djordjevic M A. Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52 (1): 98-111
- [2] Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie A R. The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 48 (2): 123-152
- [3] Falcone Ferreyra M L, Rius S P, Casati P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 222
- [4] Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, 2009, 14 (3): 125-132
- [5] Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Michael A J, Tohge T, Yamazaki M, Saito K. Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 2014, 77 (3): 367-379
- [6] Ross J A, Kasum C M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 2002, 22 (1): 19-34
- [7] 姚娜, 荆礼, 郑汉, 陈敏, 申业. 茉莉酸信号通路中的转录因子对药用植物次生代谢调控的研究进展. *中国中药杂志*, 2018, 43 (5): 897-903
Yao N, Jin L, Zheng H, Chen M, Shen Y. Research progress of jasmonate-responsive transcription factors in regulating plant secondary metabolism. *China journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43 (5): 897-908
- [8] Jaakola L, Määtä K, Pirttilä A M, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 2002, 130 (2): 729-739
- [9] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 (10): 573-581
- [10] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4 (5): 447-456
- [11] Pauwels L, Inzé D, Goossens A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science*, 2009, 14 (2): 87-91
- [12] Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, Prathapani N K, Shklarman E, Ovadis M, Vainstein A. EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia. *The Plant Cell*, 2010, 22 (6): 1961-1976
- [13] Ghasemi Pirbalouti A, Sajjadi S E, Parang K. A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 2014, 347 (4): 229-239
- [14] Pérez A C, Goossens A. Jasmonate signalling: a copycat of auxin signalling? *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36 (12): 2071-2084
- [15] An X H, Tian Y, Chen K Q, Liu X J, Liu D D, Xie X B, Cheng C G, Cong P H, Hao Y J. MdMYB9 and MdMYB11 are involved in the regulation of the JA-induced biosynthesis of anthocyanin and proanthocyanidin in apples. *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56 (4): 650-662
- [16] Lu Y F, Chen Q, Bu Y F, Luo R, Hao S X, Zhang J, Tian J, Yao Y C. Flavonoid accumulation plays an important role in the rust resistance of malus plant leaves. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1286
- [17] Boter M, Golz J F, Giménez-Ibañez S, Fernandez-Barbero G, Franco-Zorrilla J M, Solano R. Filamentous flower is a direct target of JAZ3 and modulates responses to jasmonate. *Plant Cell*, 2015, 27 (11): 3160-3174
- [18] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 2008, 53 (5): 814-827
- [19] Albert N W. Subspecialization of R2R3-MYB repressors for anthocyanin and proanthocyanidin regulation in forage legumes. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1165
- [20] 李金博. V 型紫斑白三叶新品种的选育及其研究. 兰州: 兰州大学, 2016
Li J B. A new variety breeding and study of white clover with purple V-marking. Lanzhou: Lanzhou University, 2016
- [21] Chomczynski P, Nicoletta Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162 (1): 156-159
- [22] 李为喜, 朱志华, 李国营, 刘方, 李燕, 刘三才. AIC13 分光光度法测定荞麦种质资源中黄酮的研究. *植物遗传资源学报*, 2008, 9 (4): 502-505
Li W X, Zhu Z H, Li G Y, Liu F, Li Y, Liu S C. Study on flavone in buckwheat determined by spectrophotometric method. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2008, 9 (4): 502-505
- [23] 刘三才, 李为喜, 刘方, 李燕, 朱志华. 苦荞麦种质资源总黄酮和蛋白质含量的测定与评价. *植物遗传资源学报*, 2007, 8 (3): 317-320
Liu S C, Li W X, Liu F, Li Y, Zhu Z H. Identification and evaluation of total flavones and protein content in tartary buckwheat germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8 (3): 317-320
- [24] Albert N W, Griffiths A G, Cousins G R, Verry I M, Williams W M. Anthocyanin leaf markings are regulated by a family of R2R3-MYB genes in the genus *Trifolium*. *New Phytologist*, 2014, 13100 (2): 882-893
- [25] Kerry R H, Vern C, Karl F, Margaret G, Hong X, Kim R, Chris J, Susanne R. Expression of the R2R3-MYB transcription factor

- TaMYB14 from *Trifolium arvense* activates proanthocyanidin biosynthesis in the legumes *Trifolium repens* and *Medicago sativa*. *Plant Physiology*, 2012, 159(3): 1204-1220
- [26] Qi T, Song S, Ren Q, Wu D, Huang H, Chen Y, Fan M, Peng W, Ren C, Xie D. The Jasmonate-ZIM-Domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 2011, 23(5): 1795-1814
- [27] Yoshida K, Iwasaka R, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Sakuta M. Functional differentiation of lotus japonicus TT2s, R2R3-MYB transcription factors comprising a multigene family. *Plant & Cell Physiology*, 2008, 49(2): 157-169
- [28] Verdier J, Zhao J, Torres-Jerez I, Ge S, Liu C, He X, Mysore K S, Dixon R A, Udvardi M K. MtPAR MYB transcription factor acts as an on switch for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1766-1771
- [29] Yao N, Jing L, Zheng H, Chen M, Shen Y. Research progress of jasmonate-responsive transcription factors in regulating plant secondary metabolism. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43(5): 897-903
- [30] Wasternack C, Strnad M. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites-Pathways, transcription factors and applied aspects -A brief review. *New Biotechnology*, 2019, 25(48): 1-11
- [31] 李欣, 李影, 曲子越, 孙璐, 王思瑶, 詹亚光, 尹静. bHLH 转录因子在茉莉酸信号诱导植物次生产物合成中的作用及分子机制. *植物生理学报*, 2017, 53(1): 1-8
- Li X, Li Y, Qu Z Y, Sun L, Wang S Y, Zhan Y G, Yin J. The molecular mechanism and the function of bHLH regulating jasmonic acid-mediated secondary metabolites synthesis. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(1): 1-8
- [32] Frank B, Claude B, Sébastien C, Caroline L, Brian B, Shawn D M, Axel S, Jonathan G, Jacqueline G P, Armand S, John M. Subgroup 4 R2R3-MYBs in conifer trees: gene family expansion and contribution to the isoprenoid-and flavonoid-oriented responses. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(14): 3847-3864
- [33] Mitsunami T, Nishihara M, Galis I, Alamgir K M, Hojo Y, Fujita K, Sasaki N, Nemoto K, Sawasaki T, Arimura G. Overexpression of the PAP1 transcription factor reveals a complex regulation of flavonoid and phenylpropanoid metabolism in *Nicotiana tabacum* plants attacked by *spodoptera litura*. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108849
- [34] Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson P A, 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. *EMBO Journal*, 1987, 6(12): 3553-3558
- [35] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5): 447-456
- [36] Lai Y S, Li H X, Yamagishi M. A review of target gene specificity of flavonoid R2R3-MYB transcription factors and a discussion of factors contributing to the target gene selectivity. *Frontiers in Biology*, 2013, 8(6): 577-598
- [37] Gao F, Yao H, Zhao H, Zhou J, Luo X, Huang Y, Li C, Chen H, Wu Q. Tartary buckwheat FtMYB10 encodes an R2R3-MYB transcription factor that acts as a novel negative regulator of salt and drought response in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 109(3): 387-396
- [38] Gao F, Zhou J, Deng R Y, Zhao H X, Li C L, Chen H, Suzuki T, Park S U, Wu Q. Overexpression of a tartary buckwheat R2R3-MYB transcription factor gene, FtMYB9, enhances tolerance to drought and salt stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 214: 81-90
- [39] Zhang K, Logacheva M D, Meng Y, Hu J, Wan D, Li L, Janovská D, Wang Z, Georgiev M I, Yu Z, Yang F, Yan M, Zhou M. Jasmonate-responsive MYB factors spatially repress rutin biosynthesis in *fagopyrum tataricum*. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(8): 1955-1966
- [40] Zhou M, Sun Z, Ding M, Logacheva M D, Kreft I, Wang D, Yan M, Shao J, Tang Y, Wu Y, Zhu X. FtSAD2 and FtJAZ1 regulate activity of the FtMYB11 transcription repressor of the phenylpropanoid pathway in *Fagopyrum tataricum*. *New Phytologist*, 2017, 216(3): 814-828
- [41] Bai Y C, Li C L, Zhang J W, Li S J, Luo X P, Yao H P, Chen H, Zhao H X, Park S U, Wu Q. Characterization of two tartary buckwheat R2R3-MYB transcription factors and their regulation of proanthocyanidin biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 2014, 152(3): 431-440
- [42] Matsui K, Oshima Y, Mitsuda N, Sakamoto S, Nishiba Y, Walker A R, Ohme-Takagi M, Robinson S P, Yasui Y, Mori M, Takami H. Buckwheat R2R3 MYB transcription factor FeMYB1 regulates flavonol biosynthesis. *Plant Science*, 2018, 127(4): 466-475