

研究报告

Research Report

菘蓝转录因子 IiMYB 的基因克隆及表达特征

马雪祺¹ 李姝诺¹ 张国宁¹ 李元玉¹ 陈万生^{1,2} 肖莹^{1*} 孙连娜^{1*}

1 上海中医药大学, 中药炮制教研室, 中药研究所中药资源与生物技术中心, 上海, 201203; 2 第二军医大学附属长征医院医疗保障中心, 上海, 200003

* 通信作者, xiaoyingtc@shutcm.edu.cn; sssnmr@163.com

摘要 MYB 转录因子在植物生长发育、次生代谢产物生物合成以及抗逆应激等多个方面发挥重要作用。为了研究菘蓝中特异 MYB 转录因子的表达特征, 本研究采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆菘蓝中目标 MYB 转录因子编码基因 IiMYB 的全长 cDNA 并获得其基因组 DNA 序列, 通过 qRT-PCR 检测 IiMYB 在四倍体菘蓝和二倍体菘蓝各器官以及不同胁迫条件下的表达情况。IiMYB 的 cDNA 序列全长 926 bp (GenBank 登录号: DQ468346), 含 600 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 199 个氨基酸, 其对应的基因组 DNA 序列含有 3 个外显子和 2 个内含子。生物信息学分析表明 IiMYB 与拟南芥的 AtMYBL2 同源性最高, 遗传距离最近, 并仅含有一个 myb 域(R3)。IiMYB 在两种倍性菘蓝的根茎叶中均有表达, 其中叶中最高, 且在四倍体中的表达水平高于二倍体。胁迫因素高盐(NaCl), 茉莉酸甲酯(MeJA), 赤霉素(GA3), 脱落酸(ABA)和水杨酸(SA)处理均能上调 IiMYB 的表达水平, 而低温(4 °C)处理对 IiMYB 的表达水平无显著影响。本研究首次从菘蓝植物中克隆得到 MYB 转录因子并进行了表达分析, 为进一步阐明与 MYB 转录因子相关的四倍体菘蓝优良性状形成的分子机制提供一定基础, 也为通过分子育种培育优质菘蓝品系提供了条件。

关键词 菘蓝; MYB 转录因子; 分子克隆; 生物信息学; 表达分析

Gene Cloning and Expression Characteristics of Transcription Factor IiMYB from *Isatis indigotica*

Ma Xueqi¹ Li Shunuo¹ Zhang Guoning¹ Li Yuanyu¹ Chen Wansheng^{1,2} Xiao Ying^{1*} Sun Lianna^{1*}

1 Teaching and Research Department of Chinese Medicine Processing, Research and Development Center of Chinese Medicine Resources and Biotechnology, Institute of traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203; 2 Medical Guarantee Center, Changzheng Hospital, Naval Medical University, Shanghai, 200003

* Corresponding author, xiaoyingtc@shutcm.edu.cn; sssnmr@163.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0025

Abstract MYB transcription factors play an important role in plant growth and development, biosynthesis of secondary metabolites, as well as resistance to stresses. To explore the expression characteristics of a specific MYB transcription factor from *Isatis indigotica*, the full-length cDNA of the target MYB transcription factor encoding gene IiMYB is cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE), and its genomic DNA sequence is further obtained. qRT-PCR is used to detect the expression levels of IiMYB in different organs of tetraploid and diploid *I. indigotica* and under various stress conditions. The full-length cDNA of IiMYB gene is 926 bp (GenBank accession number: DQ468 346) long with an open reading frame (ORF) of 600 bp encoding a

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2021 年 5 月 19 日; 接受日期: 2021 年 5 月 20 日; 发表日期: 2021 年 5 月 27 日

引用格式: 马雪祺, 李姝诺, 张国宁, 李元玉, 陈万生, 肖莹, 孙连娜, 2021, 菘蓝转录因子 IiMYB 的基因克隆及表达特征, 分子植物育种(网络版), 19(25): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0025) (Ma X.Q., Li S.N., Zhang G.N., Li Y.Y., Chen W.S., Xiao Y., and Sun L.N., 2021, Gene cloning and expression characteristics of transcription factor IiMYB from *Isatis indigotica*, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 19(25): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0025))

polypeptide of 199 amino acid residues. The corresponding genomic DNA sequence contains 3 exons and 2 introns. Bioinformatics analysis shows that IiMYB has the highest homology and closest genetic distance with AtMYBL2 from *Arabidopsis*, and also contains only one myb domain (R3). IiMYB is expressed in the roots, stems and leaves of both diploid and tetraploid *I. indigotica*, with the highest expression level in leaves, and its expression in tetraploid one is higher than that in diploid. Stress treatments including salt (NaCl), methyl jasmonate (MeJA), gibberellin (GA3), abscisic acid (ABA), and salicylic acid (SA) can all increase IiMYB expression level, while low temperature (4 °C) treatment has no significant effect on IiMYB expression. In this study, a MYB transcription factor is cloned from *I. indigotica* for the first time and its expression characteristics are analyzed, which provides a possibility to further elucidate the MYB relevant molecular mechanism of polyploidy vigor of *I. indigotica*, and also prompts to cultivate high-quality *I. indigotica* through molecular breeding.

Keywords *Isatis indigotica* Fortune; MYB transcription factor; Molecular cloning; Bioinformatics; Expression analysis

菘蓝(*Isatis indigotica* Fortune)为十字花科菘蓝属(*Cruciferae*)草本植物。其根入药为板蓝根,其叶入药为大青叶,有清热解毒、凉血消斑、利咽止痛的功效,广泛应用于临床(胡永胜等, 2015)。本课题组前期经过多倍体育种培育了四倍体菘蓝优良品系,与原二倍体亲本相比,四倍体菘蓝的根、叶增产显著,且表现出稳定的高水平抗病毒活性(乔传卓等, 1989)。为了探究两种倍性菘蓝品质差异的分子机制,课题组前期通过拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因芯片对二倍体和四倍体菘蓝的全基因组基因表达水平进行比较(Lu et al., 2006a),并对筛选获得的一系列差异基因进行表达特征及功能研究,包括信号转导基因 I-iCPK1 (Pan et al., 2008)和 I-iCPK2 (Lu et al., 2006b)、气孔密度调节基因 I-iSDD1 (Xiao et al., 2010)、抗病毒活性成分木脂素生物合成相关基因 I-iPAL (Lu et al., 2006c; Ma et al., 2016) 及转录因子 I-iWRKY34 (Xiao et al., 2020)等,以期获得影响四倍体菘蓝优良性状形成的关键遗传靶点。例如:基因芯片的结果显示转录因子 I-iWRKY34 在四倍体菘蓝中的表达显著高于二倍体亲本,以此为依据,分离获得了 I-iWRKY34 编码基因并进行靶向调控,发现 I-iWRKY34 的高表达确实能促进菘蓝根系发育、激活木脂素类成分的生物合成,并能提升抗寒抗旱能力(Xiao et al., 2020)。

转录因子(transcription factor, TF)作为转录调控最重要的成员,参与植物生长发育、信号转导、代谢调控及抗逆响应等各个关键环节,发挥中枢核心调控作用(肖莹等, 2019)。通过比较两种倍性菘蓝差异的转录因子,发现与 WRKY 类似,四倍体菘蓝中 MYB 转录因子的表达显著高于二倍体亲本(Lu et al., 2006a),提示四倍体菘蓝中 MYB 转录因子的高表达很可能也是影响其优势性状特征形成的重要遗传因

素。MYB 转录因子家族是一类含有 myb 结构域的转录因子,作为最大的转录因子家族之一,对调控植物生长发育、次生代谢产物生物合成及胁迫响应等发挥重要作用。例如:青蒿 *Artemisia annua* 中 MYB 转录因子 AaTAR2 对青蒿腺毛发育、青蒿素和类黄酮的生物合成具有积极的调控作用(Zhou et al., 2020);在拟南芥中异源表达二色补血草 (*Limonium bicolor*) 的 MYB 转录因子 LbTRY 能显著促进根毛生长(Leng et al., 2021);转录因子 MdMYB73 通过水杨酸途径提高苹果(*Malus sieversii*)对真菌(*Botryosphaeria dothidea*)的抗性(Gu et al., 2020)。综上,本研究聚焦前期实验提示的四倍体菘蓝中高表达的目标 MYB 转录因子(Lu et al., 2006a),对其进行基因克隆和表达特征研究,以期通过分子育种培育高产高抗、抗病毒活性成分高积累的高品质菘蓝品系提供基础。

1 结果与分析

1.1 IiMYB 基因克隆

通过 RACE-PCR 技术克隆获得 IiMYB 全长 cDNA 序列为 926 bp (GenBank 登录号: DQ468346) (图 1A), 包含一个 600 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 199 个氨基酸。IiMYB 的 cDNA 含有长度为 117 bp 的 5'UTR, 209 bp 的 3'UTR (图 2), 四倍体菘蓝中 I-iMYB 基因的 cDNA 序列与二倍体中完全一致。扩增 IiMYB 基因全长 cDNA 对应的基因组序列的 PCR 得到了一条清晰的条带(图 1B)。测序结果表明 IiMYB 基因组 DNA 序列为 979 bp, 含有 2 个内含子, 它们的剪接遵守 GT/AG 法则(图 2)。

1.2 IiMYB 的生物信息学特征

IiMYB 的等电点(pI)为 9.71, 分子量大小约为

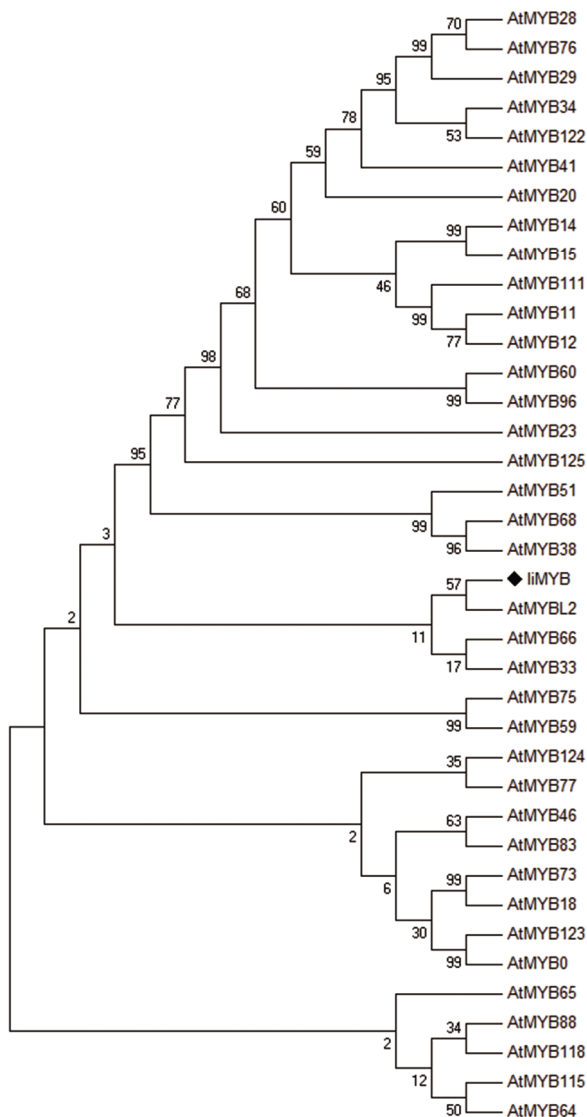


图4 liMYB与拟南芥AtMYBs蛋白的系统进化树
Figure 4 Phylogenetic tree of liMYB and AtMYBs from *Arabidopsis*

BA, 100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 8 h 后的样品中, liMYB 的表达与对照相比均提高了大约 2 倍 ($p < 0.01$), 但冷处理对 liMYB 的表达几乎没有影响(图 6)。

2 讨论

MYB 是植物中最大的转录因子家族之一, 参与植物生长发育、生理代谢、细胞的形态和模式建成等生理过程(牛义岭等, 2016; Li et al., 2019), 且在次生代谢调控(Cao et al., 2020)及干旱、盐渍、冷害等胁迫反应中均发挥重要作用(Tiwari et al., 2020)。前期利用拟南芥基因芯片筛选发现四倍体菘蓝中特异 MYB 基因的表达水平显著高于二倍体亲本(Lu et al., 2006a), 提示四倍体菘蓝的优良性状(高产高抗, 抗病

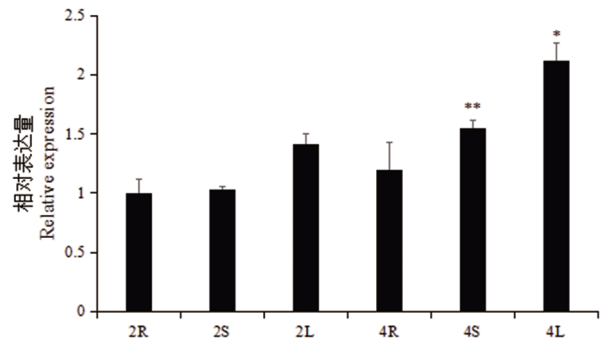


图5 liMYB在二倍体和四倍体菘蓝中的相对表达量(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

注: 2: 二倍体菘蓝; 4: 四倍体菘蓝; R: 根; S: 茎; L: 叶

Figure 5 Relative expression level of liMYB in diploid and tetraploid *I. indigotica* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Note: 2: Diploid *I. indigotica*; 4: Tetraploid *I. indigotica*; R: Root; S: Stem; L: Leaf

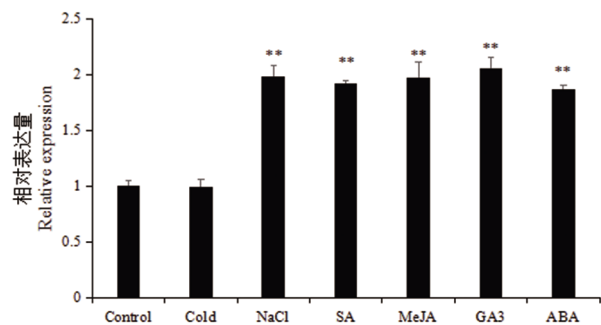


图6 liMYB在不同处理8小时后的相对表达量(** $p < 0.01$)

Figure 6 Relative expression level of liMYB after various treatments for 8 hours (** $p < 0.01$)

毒性成分高积累)可能与 MYB 基因的高表达密切相关。由于拟南芥基因芯片获得的四倍体菘蓝比二倍体高表达的 MYB 探针 At1g71030 对应的基因为 AtMYBL2 (Kirik and B?umlein, 1996), 本研究利用 AtMYBL2 序列进行特异引物设计, 以保证扩增获得的 liMYB 是菘蓝 MYB 基因大家族中与 AtMYBL2 同源的基因成员。基因表达水平检测发现 liMYB 在四倍体菘蓝根、茎和叶中的表达显著高于二倍体亲本, 进一步明确了 liMYB 在两种倍性菘蓝中的表达差异, 为研究与之相关的四倍体菘蓝优良性状形成的分子机制提供了科学依据。

本研究获得的 liMYB 是菘蓝中首个报道的 MYB 基因, 与拟南芥中 AtMYBL2 的同源性较高, 且具有相似的结构特征。该结果一方面进一步证明了同源克隆获取目标基因的准确性, 另一方面提示 liMYB 可能具有与 AtMYBL2 相似的功能。文献报道拟南芥中 AtMYBL2 作为转录抑制因子(Ye et al.,

2012), 负调控拟南芥花青素的生物合成(Xie et al., 2016), 而花青素是保护植物组织免受许多环境胁迫的类黄酮化合物(Kim et al., 2017), 说明 AtMYBL2 参与了拟南芥对外界环境的响应。IiMYB 转录因子在菘蓝中是否发挥类似功能值得进一步研究。

环境改变和植物激素能诱导胁迫相关基因的表达从而使植物产生抗逆活性(黎家和李传友, 2019)。本研究发现 NaCl, SA, MeJA, GA3 和 ABA 处理均能上调 IiMYB 的表达水平, 提示 IiMYB 可能参与以上胁迫响应, 这与其它植物中 MYB 参与抗逆反应的功能相似。例如, MeJA 处理可以显著提高茶树(*Camellia sinensis*) 中 CsMYB8 和 CsMYB20 的表达水平(Wang et al., 2018); 低温、干旱、高盐和激素处理能提高菠萝(*Ananas comosus*) 中 AcoMYB4 的表达水平, 且通过 ABA 信号转导途径调控渗透胁迫(Chen et al., 2020); 多种胁迫因素(包括 NaCl, GA3, MeJA, ABA, IAA 和低温)能诱导 TaMYB86B 表达提升, 且过表达 TaMYB86B 会增加小麦(*Triticum aestivum*) 中胁迫相关基因的表达量(Song et al., 2020)。综上, 四倍体菘蓝抗逆活性的增强是否与 IiMYB 表达的提升相关值得深入研究。本研究推测在四倍体菘蓝中转录因子 IiMYB 的高表达可能会影响到一批受之调控的基因的表达, 从而对四倍体菘蓝的抗逆活性等多种性状产生影响。接下来本研究将通过遗传转化、蛋白互作实验等筛选 IiMYB 调控的下游基因并深入研究其在调控四倍体菘蓝优良性状形成中的作用。

3 材料与方法

3.1 实验材料的处理

二倍体和四倍体菘蓝种子采集自海军军医大学药学院植物园。培养基质为泥炭土和珍珠岩按 1:1 的体积比混合而成。培养温度 25/18 °C (白天/夜晚), 光照强度 120 μmol/m²/s, 光周期 16/8 h (白天/夜晚)。生长两个月后, 分别采集两种倍性菘蓝的根、茎和叶, 用于提取 DNA 和 RNA, 每种实验材料采集三个生物学重复。

3.2 菘蓝核酸的提取以及 RACE cDNA 文库的构建

分别按照 CTAB 法和 TRIzol 法提取四倍体菘蓝的 DNA 和 RNA, 并检测浓度和纯度。按 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 操作程序以总 RNA 为模板构建 RACE cDNA 文库。5'-ready 和 3'-ready RACE cDNA 文库于 -20 °C 保存。

3.3 菘蓝 IiMYB 基因全长 cDNA 及对应的基因组序列的获得

根据 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 实验手册进行 RACE-PCR 实验, 扩增获得 IiMYB 基因全长 cDNA 及其对应的基因组序列(表 1)。PCR 扩增反应体系为 50 μL, 并通过琼脂糖凝胶电泳对目的片段进行回收纯化, 纯化后的 PCR 产物连接 pMD-18T 载体, 转入大肠杆菌菌株 DH5α, 菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

3.4 IiMYB 的生物信息学研究

基于 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 的预测和分析获得 IiMYB 的蛋白质基本性质。通过 Vector NTI Advance 11.5.1 软件预测基因 ORF 并完成核苷酸的翻译。

使用 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 网站以 IiMYB 的核苷酸序列进行 BLAST 筛选相似序列(表 2), 并使用 <http://tcoffee.crg.cat/> 网站、Jalview 和 Vector NTI Advance 11.5.1 对这些基因编码的蛋白序列进行多重序列比对和分析。

通过文献调研筛选到同为十字花科植物拟南芥中 38 条功能明确的 MYB 基因, 并在 NCBI 找到其氨基酸序列。使用 MEGA 7.0 软件以 neighbor-joining (NJ) 法, 在重复 1 000 次计算下构建这 38 条 AtMYBs 与 IiMYB 蛋白的系统进化树。

3.5 IiMYB 的器官及胁迫表达特征

胁迫处理方法: 将四倍体菘蓝幼苗置于 4 °C 冰箱 8 h 进行冷处理; 分别使用 250 mmol/L NaCl、1 mmol/L SA、500 μmol/L MeJA、100 μmol/L GA3 和 100 μmol/L ABA 五种溶液喷洒于四倍体菘蓝幼苗的叶表面, 收集处理 8 h 后的叶片样品。分别将未作冷处理或喷洒蒸馏水的四倍体菘蓝叶片作为对照样品。每种实验材料采集三个生物学重复。

采用 TRIzol 法提取生长两个月的两种倍性菘蓝的根、茎和叶, 以及不同胁迫处理后的四倍体菘蓝叶片的 RNA。用 NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 试剂盒将不同器官及不同胁迫处理后的菘蓝总 RNA 反转录成 cDNA, 作为 qRT-PCR 反应的模板。qRT-PCR 按照 TaKaRa TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒的操作程序进行, IiMYB 基因特异引物为 MYB-qRT-F、MYB-qRT-R, 内参基因引物为 actin-F、actin-R (表 1)。基因相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 方法计算, 每个样品独立重复三次, 通过 Student's t-test 分析处理样品与对照中基

表 1 菘蓝 *LiMYB* 基因克隆和表达分析所用引物序列Table 1 Primer sequences used in gene cloning and expression analyses of *LiMYB*

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer Name	Sequence (5'-3')
MYB3'GSP1	GATGGTCATTGATAGCGGGAAGATTGC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
MYB3'GSP2	TAGCGGGAAGATTGCCAGGACGAACC
NUP	AAGCAGTGGT AACAAACGCAGAGT
MYB5'GSP1	TTCTTGAAGGCAGCGAACTGGCAAAG
MYB5'GSP2	TGTTGAGGTCAGGCAAACGGCTATGTC
MYBF-S	GCAAACAACCTCACAATCAATCAACT
MYBF-AS	GAGTTTTCCGCAATCTCACAATACACCA
MYB-qRT-F	CTGGACGAACCGACAACGAAGT
MYB-qRT-R	AAGGCAGCGAACTGGCAAAGAA
actin-F	ATCCTCCGTCTTGACCTTGCT
actin-R	TTTCCCCTTGCTGTTGTG

表 2 多序列比对中用到的 MYB 蛋白的信息

Table 2 Information about MYB protein used in multiple sequence alignment

序列名称	GenBank 登录号	植物来源
Primer Name	GenBank Accession	Plant Organism
AtMYBL2	NP_177259.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BnMYBL2-1	AFM91072.1	<i>Brassica napus</i>
BnMYBL2-2	AFM91074.1	<i>Brassica napus</i>
BnMYBL2-3	AFM91076.1	<i>Brassica napus</i>
BnMYBL2-4	AFM91078.1	<i>Brassica napus</i>
BrMYBL2-1	AFM91080.1	<i>Brassica rapa</i>
BrMYBL2-2	AFM91082.1	<i>Brassica rapa</i>
BoMYBL2-1	AFM91084.1	<i>Brassica oleracea</i>
BoMYBL2-2	AFM91086.1	<i>Brassica oleracea</i>

因相对表达量的差异显著性 (差异极显著: ** $p < 0.01$; 差异显著: * $p < 0.05$)。

作者贡献

马雪祺完成了本文的基因克隆、表达分析实验和论文初稿的撰写;李姝诺完成了生物信息学分析;张国宁协助数据分析及论文修改;李元玉完成了相关图表的制作;陈万生是本实验的指导者;肖莹提出实验想法,设计实验及指导研究、完成文章的修改和定稿;孙连娜指导并推进整个项目的进展工作。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金资助项目(81874335

和 31872665)、上海市青年科技启明星计划(18QB1402700) 和上海中医药大学项目(A1-GY20-306-02-08)共同资助。

参考文献

- Cao Y.P., Li K., Li Y.L., Zhao X.P. and Wang L.H., 2020, MYB Transcription Factors as Regulators of Secondary Metabolism in Plants, *Biology*, 9(3): 61
- Chen H.H., Lai L.Y., Li L.X., Liu L.P., Jakada B.H., Huang Y.M., He Q., Chai M.N., Niu X.P. and Qin Y., 2020, AcoMYB4, an Ananas comosus L. MYB Transcription Factor, Functions in Osmotic Stress through Negative Regulation of A-BA Signaling, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16): 5727.
- Gu K.D., Zhang Q.Y., Yu J.Q., Wang J.H., Zhang F.J., Wang C.K., Zhao Y.W., Sun C.H., You C.X., Hu D.G. and Hao Y.J., 2020, R2R3-MYB Transcription Factor MdMYB73 Confers Increased Resistance to the Fungal Pathogen *Botryosphaeria dothidea* in Apples via the Salicylic Acid Pathway, *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(1): 447-458.
- Hu Y.S., Zhang L. and Chen W.S., 2015, Molecular cloning and expression analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase gene from *Isatis indigotica*, *Zhongcaoyao (Chinese Traditional and Herbal Drugs)*, 46(001): 101-106. (胡永胜, 张磊, 陈万生, 2015, 菘蓝中肉桂酸-4-羟基化酶基因克隆与表达分析, *中草药*, 46(001):101-106.)
- Kim S., Hwang G., Lee S., Zhu J.Y., Paik I., Thom T.N., Kim J. and Oh E., 2017, High Ambient Temperature Represses Anthocyanin Biosynthesis through Degradation of HY5, *Frontiers in Plant Science*, 8: 1787.
- Kirik V. and Boumleil H., 1996, A novel leaf-specific myb-relat-

- ed protein with a single binding repeat, *Gene*, 183 (1-2): 109-113.
- Leng B.Y., Wang X., Yuan F., Zhang H.N., Lu C.X., Chen M. and Wang B.S., 2021, Heterologous expression of the *Limonium bicolor* MYB transcription factor LbTRY in *Arabidopsis thaliana* increases salt sensitivity by modifying root hair development and osmotic homeostasis, *Plant Science*, 302: 110704.
- Li J. and Li C.Y., 2019, Seventy-year major research progress in plant hormones by Chinese scholars, *Zhongguo Kexue (Scientia Sinica (Vitae))*, 49(10): 1227-1281. (黎家, 李传友, 2019, 新中国成立 70 年来植物激素研究进展, *中国科学: 生命科学*, 49(10): 1227-1281.)
- Li J.L., Han G.L., Sun C.F. and Sui N., 2019, Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding, *Plant Signaling and Behavior*, 14(8): e1613131.
- Lu B.B., Pan X.Z., Zhang L., Huang B.B., Sun L.N., Li B., Yi B., Zheng S.Q., Yu X.J., Ding R.X. and Chen W.S., 2006a, A genome-wide comparison of genes responsive to autopolyploidy in *Isatis indigotica* using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix genechips, *Plant Molecular Biology Reporter*, 24(2): 197-204.
- Lu B.B., Ding R.X., Zhang L., Yu X.J., Huang B.B. and Chen W.S., 2006b, Molecular cloning and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase gene IiCPK2 Responsive to polyploidy from tetraploid *Isatis indigotica*. *Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 39(5): 607-617.
- Lu B.B., Du Z., Ding R.X., Zhang L., Yu X.J., Liu C.H. and Chen W.S., 2006c, Cloning and Characterization of a Differentially Expressed Phenylalanine Ammonialyase Gene (IiPAL) After Genome Duplication from Tetraploid *Isatis indigotica* Fort, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(12): 1439-1449.
- Lu Y., Gao C.X. and Han B., 2006, Sequence Analysis of Polyadenylation Signal Sites of Rice mRNA, *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, (7): 819-826. (陆颖, 高晨曦, 韩斌, 2006, 水稻 mRNA 多聚腺苷化信号位点的序列分析, *科学通报*, (7): 819-826.)
- Ma R.F., Liu Q.Z., Xiao Y., Zhang L. and Li Q., 2016, The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Isatis indigotica* Fort.: molecular cloning, characterization, and expression analysis, *Chinese journal of natural medicines*, 14 (11): 801-812.
- Niu Y.L., Jiang X.M. and Xu X.Y., 2016, Research advances on transcription factor MYB gene family in plant, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 14(8): 2050-2059. (牛义岭, 姜秀明, 向阳, 2016, 植物转录因子 MYB 基因家族的研究进展, *分子植物育种*, 14(8): 2050-2059.)
- Pan X.Z., Xiao Y., Wang Z.N., Zhang L. and Tang K.X., 2008, Tetraploids *Isatis indigotica* are more responsive and adaptable to stresses than the diploid progenitor based on changes in expression patterns of a cold inducible IiCPK1, *Biologia*, 63(4): 535-541.
- Qiao C.Z., Wu M.S., Dai F.B., Cui X. and Li L., 1989, Studies on polyploid breeding of *Isatis indigotica* Fort, *Journal of Integrative Plant Biology*, 31(9): 678-683+743. (乔传卓, 吴美枢, 戴富宝, 崔熙, 李玲, 菘蓝多倍体育种的研究, *Journal of Integrative Plant Biology*, 1989(09): 678-683+743.)
- Song Y.S., Yang W.J., Fan H., Zhang X.S. and Na S., 2020, TaMYB86B encodes a R2R3-type MYB transcription factor and enhances salt tolerance in wheat, *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 300: 110624.
- Tiwari P., Indoliya Y., Chauhan A.S., Pande V. and Chakrabarty D., 2020, Over-expression of rice R1-type MYB transcription factor confers different abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206(111361): 1-12.
- Wang W.L., Cui X., Wang Y.X., Liu Z.W. and Zhuang J., 2018, Members of R2R3-type MYB transcription factors from subgroups 20 and 22 are involved in abiotic stress response in tea plants, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(5): 1141-1153.
- Xiao Y., Yu X.J., Chen J.F., Di P., Chen W.S. and Zhang L., 2010, IiSDD1, a gene responsive to autopolyploidy and environmental factors in *Isatis indigotica*. *Molecular Biology Reports*, 37(2): 987.
- Xiao Y., Feng J.X. and Chen W.S., 2019, Transcription factor regulation on the quality formation of traditional Chinese medicine, *Shijie Kexue Jishu - Zhongyiyao Xiandaihua (Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology)*, 21(5): 854-858. (肖莹, 冯婧娴, 陈万生, 2019, 转录因子调控对中药材质量形成的作用, *世界科学技术 - 中医药现代化*, 21(05): 854-858.)
- Xiao Y., Feng J.X., Li Q., Zhou Y.Y., Bu Q.T., Zhou J.H., Tan H.X., Yang Y.B., Zhang L. and Chen W.S., 2020, Ii-WRKY34 positively regulates yield, lignan biosynthesis and stress tolerance in *Isatis indigotica*, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(12): 2417-2432.
- Xie Y., Tan H.J., Ma Z.X. and Huang J.R., 2016, DELLA Proteins Promote Anthocyanin Biosynthesis via Sequestering MYBL2 and JAZ Suppressors of the MYB/bHLH/WD40 Complex in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Plant*, 9(5): 711-721.
- Ye H.X., Li L., Guo H.Q. and Yin Y.H., 2012, MYBL2 is a substrate of GSK3-like kinase BIN2 and acts as a corepressor of BES1 in brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U-*

nited States of America, 109(49): 20142-20147.

Zhou Z., Tan H.X., Li Q., L Q., Wang Y., Bu Q.T., Li Y.X., Wu Y., Chen W.S. and Zhang L., 2020, TRICHOME AND

ARTEMISININ REGULATOR 2 positively regulates trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, *New Phytologist*, 228(3): 932-945.