

# 苹果 *MdMYB2* 基因的克隆及功能鉴定

曲丰佳, 安建平, 姚继芳, 李浩浩, 李媛媛, 由春香, 王小非\*, 郝玉金\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 以‘嘎拉’苹果为材料, 采用同源克隆和 PCR 技术分离了苹果基因 *MdMYB2* (基因序列号: MDP0000823458)。*MdMYB2* 的开放阅读框 (ORF) 长度为 873 bp, 编码含有 290 个氨基酸的蛋白, 预测其蛋白质分子量为 32.92 kD, 等电点为 4.91。系统进化树分析显示, 苹果 MYB2 与梨 MYBL2 亲缘关系最近, 同源性最高。组织表达分析表明, *MdMYB2* 在苹果的各个组织均有表达, 在茎和果实中表达相对较高。*MdMYB2* 的表达明显受盐胁迫的诱导。构建了 *MdMYB2* 的表达载体, 并通过农杆菌介导的遗传转化得到了转基因苹果愈伤和转基因拟南芥植株。抗性试验表明, 过量表达 *MdMYB2* 明显提高了转基因苹果愈伤对盐胁迫的抗性。此外, 异位表达 *MdMYB2* 也能提高拟南芥对盐胁迫的抗性, 以上试验结果表明 *MdMYB2* 在植物盐胁迫响应中发挥重要作用。

**关键词:** 苹果; *MdMYB2*; 基因克隆; 盐胁迫

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 12-2245-10

## Gene Cloning and Functional Identification of an Apple *MdMYB2* Gene

QU Fengjia, AN Jianping, YAO Jifang, LI Haohao, LI Yuanyuan, YOU Chunxiang, WANG Xiaofei\*, and HAO Yujin\*

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** *MdMYB2* gene was cloned from *Malus × domestica* ‘Gala’ with homologous cloning using RT-PCR method. Its open reading frame (ORF) contained 873 bp nucleotides, which encodes a predicted protein containing 290 amino acid residues. The predicted protein has a molecular mass of 32.92 kD and a pI value of 4.91. Phylogenetic analysis demonstrated that *MdMYB2* showed the highest evolutionary relationship with *PbMYBL2* from pear. Expression analysis showed that the *MdMYB2* gene was constitutively expressed in different tissues, with rather higher expression levels in fruit and stem than in others. Meanwhile, its expression was noticeably induced by salt stress treatment. Finally, transgenic apple calli and *Arabidopsis* were obtained with *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Tolerance assays indicated that overexpression of *MdMYB2* remarkably enhanced the tolerance of transgenic apple calli to high salinity, further supporting that *MdMYB2* positively regulates salt tolerance in apple. In addition, ectopic expression of *MdMYB2* also enhanced salt stress tolerance in *Arabidopsis*, indicating that *MdMYB2* plays an important role in plant salt stress tolerance.

收稿日期: 2017-09-26; 修回日期: 2017-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601742, 31772275, 31471854); 山东省产业体系岗位专家项目 (SDAIT-06-03)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: haoyujin@sdau.edu.cn; xfwang2004@163.com)

**Keywords:** apple; *MdMYB2*; gene clone; salt stress

MYB (v-MYB avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 转录因子家族是植物最大的转录因子家族之一 (Nguyen & Lee, 2016), 广泛参与细胞分化、细胞周期调节 (Payne et al., 2000; Suo et al., 2003), 激素和环境因子应答 (Chen et al., 2003; Lea et al., 2007), 植物次生代谢, 叶片等器官形态建成 (Lee & Schiefelbein, 2002; Legay et al., 2007; Yang et al., 2007) 以及植物花色素积累等过程 (Ban et al., 2007; Espley et al., 2007)。

R2R3-MYB 蛋白是植物中数量最多的一类 MYB 蛋白, 其中大多具有转录激活功能域, 能受多种环境因子的诱导, 广泛参与植物生物与非生物胁迫响应。目前 R2R3-MYB 蛋白已经在多种模式植物中进行了广泛的研究, 如在拟南芥中, *AtMYB6*、*AtMYB41*、*AtMYB44* 均受高盐、冷、干旱的诱导 (Zhu et al., 2005; Cominelli et al., 2008; Jung et al., 2008), *AtMYB32*、*AtMYB102* 受机械损伤的诱导 (Denekamp & Smeekens, 2003; Preston et al., 2004), *AtMYB30*、*AtMYB73*、*AtMYB108* 受病原菌的诱导 (Mengiste et al., 2003; Jia et al., 2011); 在小麦中, *TaMYB32*、*TaMYB33*、*TaMYB56-B* 和 *TaMYB73* 受盐胁迫诱导表达, 在小麦中过量表达这些基因能提高小麦的耐盐性 (Zhang et al., 2011, 2012; He et al., 2012; Qin et al., 2012); 在烟草中, 过量表达 *NtMYB1* 促进花青素积累, 提高抵抗冷和氧化胁迫的能力 (Meng et al., 2014); 在水稻中, *OsMYB2* 受盐、冷和干旱胁迫的诱导 (Yang et al., 2012)。

转录因子 *AtMYB2* 属于 R2R3-MYB 类转录因子。*AtMYB2* 通过调控 *miR399f* 表达调控磷饥饿反应 (Baek et al., 2013)。干旱胁迫条件下, 拟南芥中 *AtMYC2* 和 *AtMYB2* 是脱落酸信号中的转录活化因子, *AtMYB2* 过量表达对脱落酸更敏感 (Abe et al., 2003)。同时, *AtMYB2* 在植物盐胁迫抗性过程中也发挥重要作用 (Yoo et al., 2005)。

在拟南芥中, *AtMYB2* 响应多种非生物胁迫已得到初步研究, 而在苹果等木本植物中, 对其同源基因功能的鉴定尚少 (曹忠慧 等, 2013; 张全艳 等, 2016)。本试验中以‘嘎拉’苹果为试材, 采用同源克隆的方法获得 *MdMYB2* (基因序列号: MDP0000823458)。通过氨基酸序列比对发现 *MdMYB2* 和 *AtMYB2* 具有 52.04% 的同源性, 推测 *MdMYB2* 是 *AtMYB2* 的一个类似蛋白。通过农杆菌介导的遗传转化获得转 *MdMYB2* 的苹果愈伤和拟南芥, 并对其进行了盐胁迫抗性的功能鉴定, 以期揭示 *MdMYB2* 在苹果盐胁迫中的作用, 为培育抗盐性强的苹果品种奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料材料

2016 年 8 月, 采集山东农业大学南校区果树试验站的 5 年生‘嘎拉’苹果的生长根、幼茎、新生叶、初花期的花和花后 20 d 的幼果作样本, 用液氮速冻, 存放于 -80 °C 冰箱备用。

分别用 0、100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 处理组培生根的‘嘎拉’苹果幼苗, 分时间段 (0、3、6、12、24 h) 取整株苹果组培苗迅速用液氮冷冻, 存放于 -80 °C 冰箱备用。

### 1.2 引物设计

在苹果基因组数据库中检索序列, 设计出一系列引物 (表 1)。

表 1 本研究中所用的引物  
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Prime name	引物序列 Prime sequence	
MdMYB2	F: GTCGACATGGATATTAATAATGTTTCATG	R: GAATTCTTAGTCATCACTAAGCTGT
MdMYB2(RT)	F: GAATTCTTGGTTGATCCTAATTTTCGTG	R: GTCGACACACATGGTGTACCACCCGA
MdMYB2-Anti	F: TGCAGGTCTGAAACGAAGTCTG	R: GCGGGAATGAAGTTGAAGAA

### 1.3 *MdMYB2* 的克隆与同源性分析

各组织的 RNA 提取采用的是 RNA plant plus Reagent 试剂盒 (天根)。以提取的苹果总 RNA 为模板, 用 Clontech SMART<sup>TM</sup> Library 反转录试剂盒合成 cDNA。根据苹果基因组数据库中检索到的序列, 设计引物, 以 ‘嘎拉’ 苹果的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。50  $\mu\text{L}$  反应体系为: 37.5  $\mu\text{L}$  去离子水, 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Trans Taq HiFi buffer 2 (全式金, 北京), 4  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  cDNA (200 ng) 和 0.5  $\mu\text{L}$  Taq 酶 (全式金, 北京)。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 36 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  后延伸 10 min; PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 同时回收目的条带, 连接到 pMD18-T 克隆载体进行测序。

从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载对应的其他物种的核酸和蛋白序列。利用 DNAMAN 软件进行 MYB2 的氨基酸序列比对, 通过 MEGA 5.0 软件进行 Neighbor-Joining 系统进化树分析。

### 1.4 *MdMYB2* 的表达分析

采用 *MdActin* (GenBank accession number CN938024) 为内参基因。荧光定量 PCR 使用的仪器为 BIO-RAD IQ5, 所有 PCR 反应均设 3 次重复。

PCR 反应体系为: SYBR Green I Master 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 加去离子水至 20  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 40 个循环; 每次循环至第 2 步进行荧光采集, 然后退火到 65  $^{\circ}\text{C}$ 。最后采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup>  法进行定量数据的分析。

### 1.5 转基因苹果愈伤组织的获得

选用 ‘王林’ 苹果愈伤组织进行遗传转化。愈伤组织固体培养基为 MS + 30 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 1.0 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 6-BA + 1.0 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 2,4-D + 7.5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 琼脂, pH 6.0 ~ 6.1。每 15 d 继代 1 次。

参照 Hu 等 (2012) 的方法进行苹果愈伤组织的遗传转化。用继代 12 d 左右长势良好的愈伤组织进行农杆菌侵染, 浸泡 20 min 后除去菌液, 将愈伤组织转移至固体继代培养基上暗培养 2 d。然后将愈伤组织平铺到含 360 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 头孢霉素和 30 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 卡那霉素的愈伤筛选培养基上, 继续将长出的愈伤组织继代筛选 3 ~ 4 次, 获得稳定生长的抗性愈伤组织。

提取愈伤组织的 DNA, 用于 PCR 鉴定。

### 1.6 转基因拟南芥的获得

参照 Hu 等 (2015) 的方法进行拟南芥的遗传转化, 得到拟南芥种子。用 70% 乙醇处理 2 min, 4% 次氯酸钠处理 8 ~ 10 min, 去离子水冲洗 4 ~ 5 次。然后播到含有 30 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 卡那霉素的 MS 培养

基上, 用 PCR 筛选出的抗性植株, 得到杂合的转基因植株, 经过连续 3 代的筛选, 获得 T3 代纯合的转基因植株。

### 1.7 苹果愈伤组织和拟南芥的 NaCl 处理及其相关指标测定

分别用前述愈伤组织固体培养基和分别加入 50 和 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 培养基处理 ‘王林’ 苹果野生型 (WT)、过量表达 (MdMYB2-OE) 和反义表达 (MdMYB2-Anti) 愈伤组织, 处理 20 d 后分别称量鲜样质量。

将拟南芥野生型及 T3 代纯合的转基因株系种子进行消毒处理, 4 ℃ 春化处理 3 d, 播种到 MS 培养基上, 3 d 后将幼苗分别转移到 MS、MS + 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 培养基上, 放置于光照培养箱中培养 (光照 16 h/黑暗 8 h, 22 ℃)。10 d 后测量幼苗主根长度和叶绿素含量。

将拟南芥野生型以及 T3 代纯合的转基因株系种子播种到 MS 培养基上, 15 d 后分别移栽到营养钵中, 浇水并覆膜。7 d 后揭膜, 分别用水和 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 处理, 每 3 d 浇 1 次, 20 d 后测丙二醛含量。

上述每个处理均设 3 次生物学重复。

称取拟南芥, 将其剪碎并用 95%乙醇处理 12 h。以 95%乙醇为空白对照, 测 649 nm 和 665 nm 波长下的吸光度。计算叶绿体色素含量。

拟南芥的丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸法 (赵世杰 等, 1994)。

### 1.8 数据分析

每个试验均重复 3 次, 所有结果都是基于 3 个平行试验的平均值。使用 R (3.0.2) 软件, 使用 DPS 数据处理系统, 采用 Tukey 多重比较法进行统计学分析 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MdMYB2* 的克隆及进化树分析

以 ‘嘎拉’ 苹果组培苗的 cDNA 为模板, 通过 PCR 克隆到一条大约 900 bp 的条带 (图 1), 与预期的大小一致。

对克隆得到的片段进行测序分析, 结果表明, 该片段的开放阅读框 (ORF) 长度为 873 bp, 编码含有 290 个氨基酸的蛋白, 预测其蛋白质分子量为 32.92 kD, 等电点为 4.91。

利用 MEGA5.0 软件将苹果 *MdMYB2* 蛋白序列与梨、枣、拟南芥、甜橙等 20 个不同物种的 MYB2 蛋白序列进行多序列对比分析, 构建进化树, 苹果 MYB2 与梨 MYB2 亲缘关系最近, 同源性最高 (图 2)。

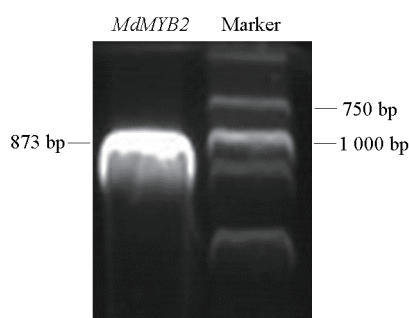


图 1 *MdMYB2* 的 PCR 扩增产物电泳  
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products for cloning of *MdMYB2*

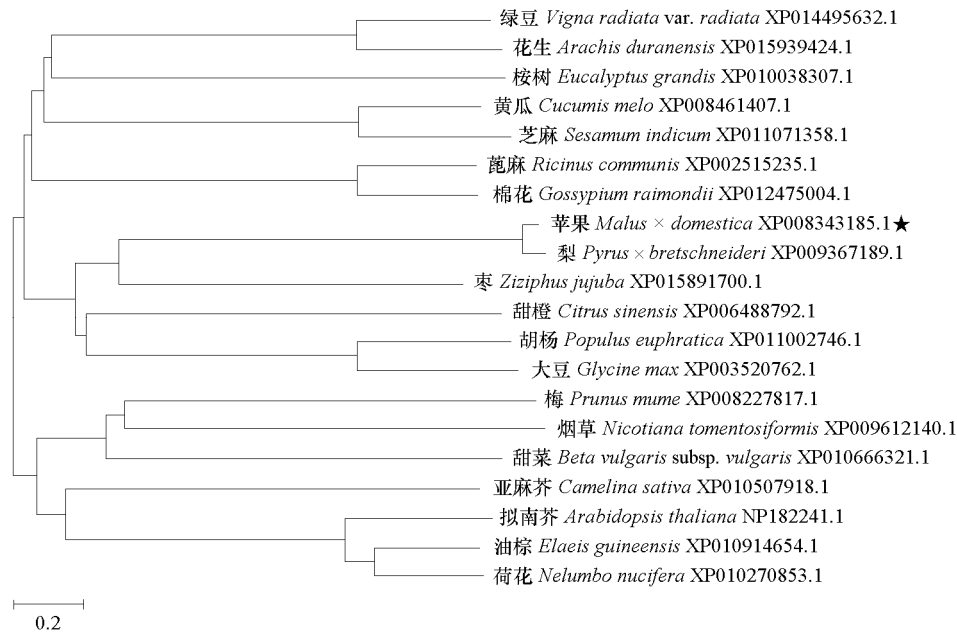


图 2 苹果 *MdMYB2* 及其同源基因的进化分析  
Fig. 2 Evolution analysis of *MdMYB2* in apple and its homologous

2.2 苹果 MYB2 与拟南芥 MYB2 序列比对与保守域分析

通过氨基酸序列比对发现 *MdMYB2* 和 *AtMYB2* 的相似度是 52.04%，具有保守的 R2R3-MYB 结构域，猜测 *MdMYB2* 是 *AtMYB2* 的一个类似蛋白（图 3）。

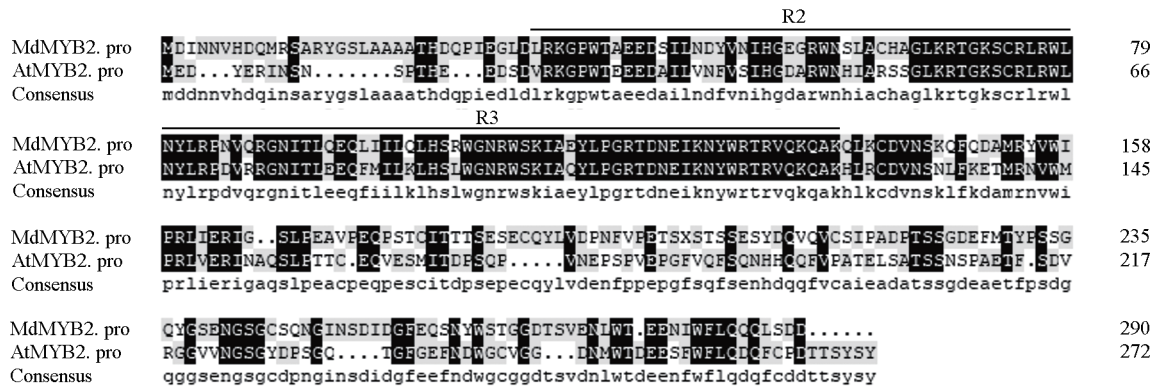


图 3 苹果 MYB2 及拟南芥 MYB2 的氨基酸序列比对  
Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *MdMYB2* and *AtMYB2*

2.3 *MdMYB2* 的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *MdMYB2* 在‘嘎拉’苹果不同组织中的表达，*MdMYB2* 在根、茎、花、叶和幼果（花后 20 d）中均有表达，其中在茎和幼果中表达量较高（图 4）。

生根后的‘嘎拉’苹果幼苗用 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 处理后，*MdMYB2* 的表达明显受到诱导。在

处理 3 h 时达到最高水平, 处理 6 h 时明显下降, 12 h 时达到最低, 之后上升 (图 5)。

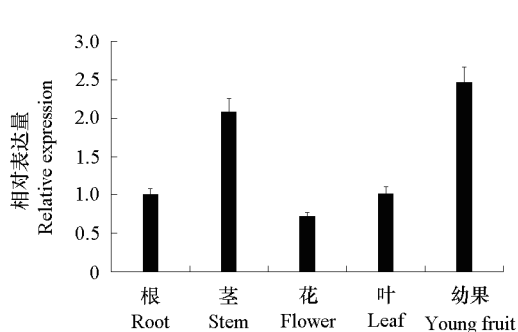


图 4 *MdMYB2* 在苹果不同组织中的表达分析

Fig. 4 Analysis of the expression of *MdMYB2* in different tissues of apple

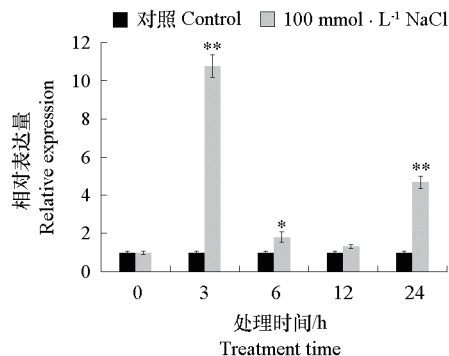


图 5 *MdMYB2* 在盐胁迫下‘嘎拉’苹果幼苗中的表达分析

Fig. 5 Analysis of *MdMYB2* expression in the ‘Gala’ seedlings in response to salt stress

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.4 *MdMYB2* 表达载体的构建及转基因苹果愈伤组织和拟南芥的鉴定

利用引物中引入的 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点, 将 *MdMYB2* 从 pMD18-T 载体中酶切回收, 并对 pRI101 进行同样酶切, 将两者在 16 °C 连接, 转化大肠杆菌, 鉴定阳性克隆。将成功构建的 *MdMYB2*-pRI101 植物过量表达载体转化农杆菌 LBA4404。通过侵染‘王林’苹果愈伤进行基因的遗传转化, 获得过表达 (*MdMYB2*-OE)、反义表达 (*MdMYB2*-Anti) 转基因愈伤组织。通过侵染花序的方法获得过表达 (*MdMYB2*-OE) 转基因拟南芥。定量 RT-PCR 分析检测转基因愈伤组织和转基因拟南芥 *MdMYB2* 的表达量 (图 6)。与野生型‘王林’愈伤组织相比, 过表达 *MdMYB2* 明显提高, 而反义表达 *MdMYB2* 明显抑制 *MdMYB2* 的表达。同时, 与野生型相比, 在拟南芥中异位表达 *MdMYB2* 也明显提高了 *MdMYB2* 的表达量。

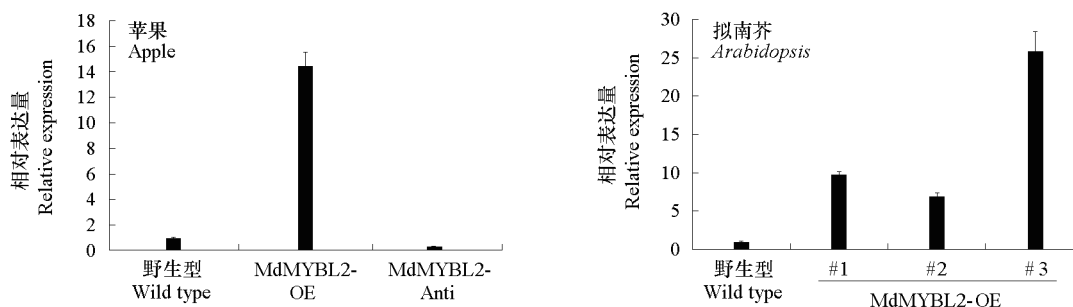


图 6 RT-PCR 分析 *MdMYB2* 在转基因‘王林’苹果愈伤和拟南芥中的表达水平

Fig. 6 RT-PCR analysis of the expression level of *MdMYB2* in ‘Orin’ calli and *Arabidopsis*

## 2.5 过量表达 *MdMYB2* 提高苹果愈伤组织盐抗性

在愈伤固体培养基上将野生型和苹果‘王林’转基因愈伤组织预培养 14 d, 然后称取相同量的愈伤组织, 在加入不同 NaCl 浓度培养基上进行培养, 结果发现, 在含有 50 和 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl

培养基上培养受到一定程度的抑制, 但过量表达 (*MdMYB2*-OE) 的愈伤组织鲜样质量 (0.83 g 和 0.52 g) 高于野生型 (0.64 g 和 0.38 g) 和反义表达 (*MdMYB2*-Anti) 愈伤组织 (0.53 g 和 0.22 g) (图 7)。说明 *MdMYB2* 过量表达能提高苹果愈伤组织对盐胁迫的抗性。

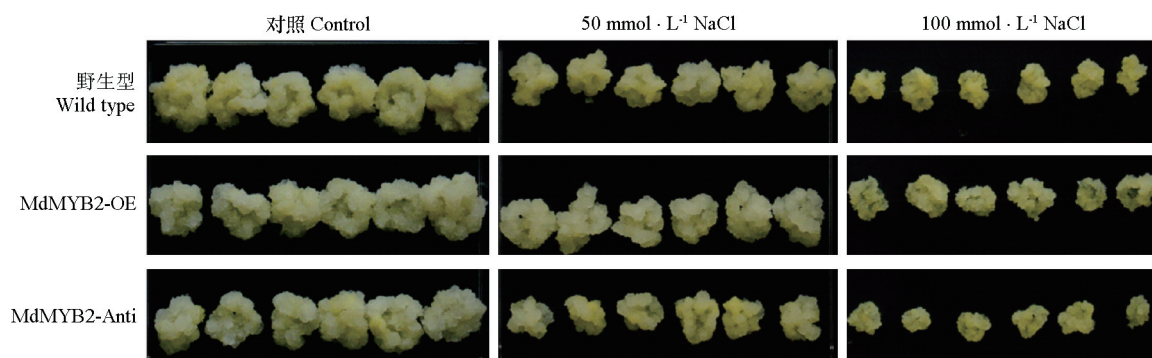


图 7 *MdMYB2* 基因在苹果愈伤中超表达对愈伤盐胁迫抗性的影响  
Fig. 7 Effects of *MdMYB2* gene over-expression on salt stress in calli

## 2.6 异位表达 *MdMYB2* 提高拟南芥幼苗盐抗性

MS 培养基 (对照) 上, 生长 13 d 龄的野生型与转基因拟南芥幼苗长势相似, 主根长度和叶绿素含量相差不大; 在 MS + 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 培养基上, 13 d 龄野生型和转基因拟南芥均主根变短、叶绿素含量减少, 但野生型的主根长度和叶绿素含量明显低于异位表达 *MdMYB2* 拟南芥 (图 8), 表明在拟南芥中异位表达 *MdMYB2* 提高了拟南芥的盐抗性。

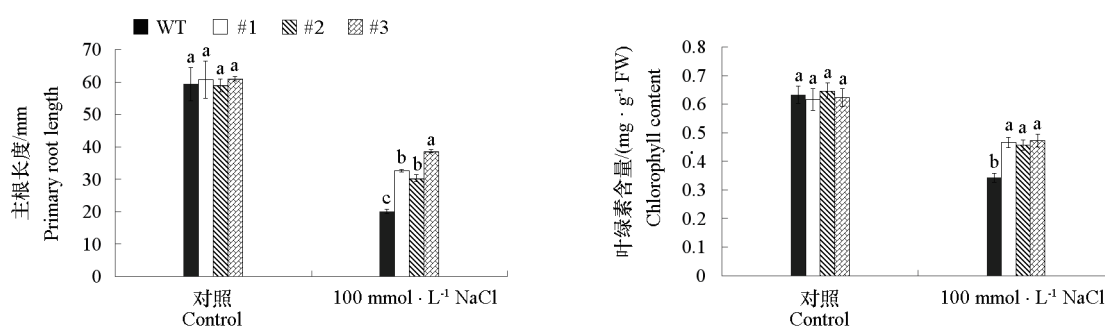


图 8 盐胁迫条件下拟南芥野生型 (WT) 和异位表达 *MdMYB2* 株系 (#1、#2、#3)  
13 d 龄幼苗的根长和叶绿素含量

Fig. 8 Root length and chlorophyll content of 13-day-old wild type (WT) *Arabidopsis* and ectopic expression *MdMYB2* lines (#1, #2, #3) under NaCl stress

## 2.7 异位表达 *MdMYB2* 提高拟南芥成苗对盐胁迫的抗性

观察盐胁迫对 *MdMYB2* 转基因拟南芥 42 d 成苗的影响, 正常浇水处理的拟南芥生长旺盛。盐处理的野生型植株大部分叶片褪绿萎蔫, 而转基因拟南芥植株叶片比较绿, 萎蔫较少 (图 9)。



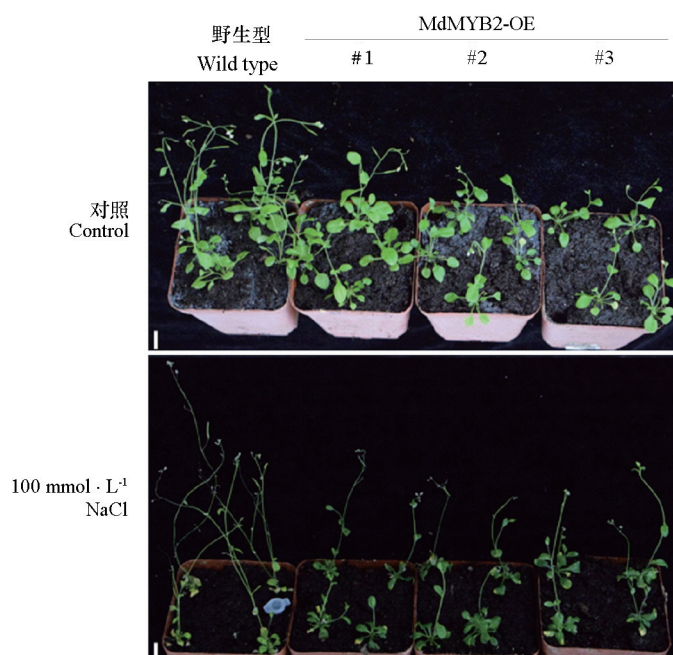


图9 盐胁迫条件下拟南芥野生型和异位表达 *MdMYB2* 株系 (#1、#2、#3) 42 d 龄成苗的生长状态

Fig. 9 Growth status of 42-day-old *Arabidopsis* wild type and ectopic expression *MdMYB2* lines (#1, #2, #3) under salt stress

盐处理条件下野生型拟南芥丙二醛含量明显高于 *MdMYB2* 异位表达株系 (图 10)。说明异位表达 *MdMYB2* 能提高拟南芥对盐胁迫的抗性。此外, 异位表达 *MdMYB2* 拟南芥植株的株高略低于野生型, 可能是由于 *MdMYB2* 过量表达抑制开花, 造成植株生长迟缓。

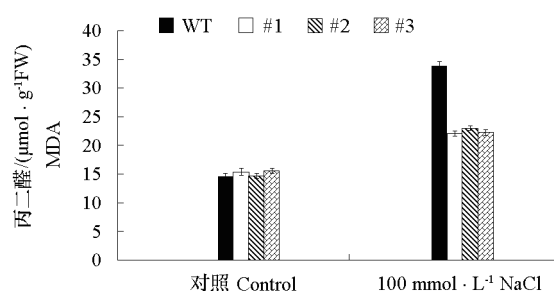


图10 盐胁迫条件下拟南芥野生型 (WT) 和异位表达 *MdMYB2* 拟南芥株系 (#1、#2、#3) 42 d 龄成苗的丙二醛含量

Fig. 10 MDA content of 42-day-old *Arabidopsis* wild type (WT) and ectopic expression *MdMYB2* line (#1, #2, #3) under salt stress

### 3 讨论

MYB 转录因子是植物最大的转录因子家族之一, 在此前的研究中已经被证实可参与到多种生物和非生物胁迫过程当中, 从而使植物适应不同的环境变化。本研究中以‘嘎拉’苹果为材料, 采用同源克隆和 PCR 技术分离了 *MdMYB2* 基因。系统进化树分析显示: 苹果 MYB2 与梨 MYB2 的亲



缘关系最近, 同源性最高。基因组表达分析显示: *MdMYB2* 在苹果的各个组织中均有表达, 但在茎和果实中的表达量相对较高。这表明 *MdMYB2* 可能在苹果的营养生长和果实发育过程中发挥着重要的作用。非生物胁迫表达响应分析显示: 盐胁迫处理时, *MdMYB2* 的表达量在处理 3 h 时有明显上升, 随后明显下降。说明 *MdMYB2* 的表达受盐胁迫的诱导。

为进一步研究 *MdMYB2* 在植物耐盐胁迫中的作用, 构建了 *MdMYB2* 的过量表达载体, 并通过农杆菌介导的遗传转化得到了 *MdMYB2* 转基因苹果愈伤组织和异位表达转基因拟南芥。抗性分析表明: *MdMYB2* 过量表达明显提高了转基因苹果愈伤组织对盐胁迫的抗性, 异位表达 *MdMYB2* 也能提高拟南芥对盐胁迫的抗性。暗示 *MdMYB2* 在响应植物抗盐胁迫中发挥着重要作用。

氨基酸序列比对发现, 拟南芥 MYB2 与苹果 MYB2 蛋白同源序列相似度达 52.04%, 并且 *AtMYB2* 与 *MdMYB2* 在提高植株的耐盐胁迫过程中均发挥重要作用。暗示 *MdMYB2* 与 *AtMYB2* 功能类似, 可能也在激素响应和磷饥饿响应中发挥重要作用。

## References

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15 (1): 63 – 78.
- Baek D, Kim M C, Chun H J, Kang S, Park H C, Shin G, Kim D H. 2013. Regulation of miR399f transcription by AtMYB2 affects phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161 (1): 362 – 373.
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T. 2007. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell Physiol*, 48 (7): 958 – 970.
- Cao Zhong-hui, Wang Rong-kai, Hao Yu-jin. 2013. Ectopic expression of *MdMYB121* gene enhances tolerance to abiotic stresses in tobacco. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (6): 1033 – 1042. (in Chinese)
- 曹忠慧, 王荣凯, 郝玉金. 2013. 苹果 *MdMYB121* 基因异位表达提高烟草的抗逆性. *园艺学报*, 40 (6): 1033 – 1042.
- Chen S C, Peng S Q, Huang G X, Wu K X, Fu X H, Chen Z Q. 2003. Association of decreased expression of a MYB transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol*, 51 (1): 51 – 58.
- Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmarol I G, Tonell C. 2008. Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, 53 (1): 53 – 64.
- Denekamp M, Smeekens S C. 2003. Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. *Plant Physiol*, 132: 1415 – 1423.
- Espley R V, Hellens R P, Putterill J, Stevenson D E, Kuttay-Amma S, Allan A C. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J*, 49 (3): 414 – 427.
- He Y, Li W, Lv J, Jia Y, Wang M, Xia G. 2012. Ectopic expression of a wheat MYB transcription factor gene, *TaMYB73*, improves salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 63: 1511 – 1522.
- Hu D G, Li M, Luo H, Dong Q L. 2012. Molecular cloning and functional characterization of *MdSOS2* reveals its involvement in salt tolerance in apple callus and *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 31: 713 – 722.
- Hu D G, Sun M H, Sun C H, Liu X, Zhang Q Y, Zhao J, Hao Y J. 2015. Conserved vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit B1 improves salt stress tolerance in apple calli and tomato plants. *Sci Hortic-Amsterdam*, 197: 107 – 116.
- Jia J, Xing J H, Dong J G, Han J M, Liu J S. 2011. Functional analysis of *MYB73* of *Arabidopsis thaliana* against *Bipolaris oryzae*. *Agricultural Sciences in China*, 10 (5): 721 – 727.
- Jung C, Seo J S, Han S W, Koo Y J, Kim C H, Song S I, Cheong J J. 2008. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146 (2): 623 – 635.
- Lea U S, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C. 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225 (5): 1245 – 1253.

- Lee M M, Schiefelbein J. 2002. Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell*, 14 (3): 611 – 618.
- Legay S, Lacombe E, Goicoechea M, Brière C, Séguin A, Mackay J, Grima-Pettenati J. 2007. Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Science*, 173 (5): 542 – 549.
- Meng X, Yin B, Feng H L, Zhang S, Liang X Q, Meng Q W. 2014. Overexpression of *R2R3-MYB* gene leads to accumulation of anthocyanin and enhanced resistance to chilling and oxidative stress. *Biologia Plantarum*, 58: 121 – 130.
- Mengiste T, Chen X, Salmeron J, Dietrich R. 2003. The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15 (11): 2551 – 2565.
- Nguyen N H, Lee H. 2016. MYB-related transcription factors function as regulators of the circadian clock and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Signal & Behav*, 11 (3): e1139278.
- Payne C T, Zhang F, Lloyd A M. 2000. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics*, 156 (3): 1349 – 1362.
- Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, Li S F, Parish R W. 2004. *AtMYB32* is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 40 (6): 979 – 995.
- Qin Y, Wang M, Tian Y, He W, Han L, Xia G. 2012. Over-expression of *TaMYB33* encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep*, 39: 7183 – 7192.
- Suo J, Liang X, Pu L, Zhang Y, Xue Y. 2003. Identification of GhMYB109 encoding a R2R3MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Biochim Biophys Acta*, 1630 (1): 25 – 34.
- Yang A, Dai X, Zhang W H. 2012. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 63 (7): 2541 – 2556.
- Yang X Y, Li J G, Pei M, Gu H, Chen Z L, Qu L J. 2007. Over-expression of a flower-specific transcription factor gene *AtMYB24* causes aberrant anther development. *Plant Cell Rep*, 26 (2): 219 – 228.
- Yoo J H, Park C Y, Kim J C, Do Heo W, Cheong M S, Park H C, Lee J H. 2005. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (5): 3697 – 3706.
- Zhang L, Zhao G, Jia J, Liu X, Kong X. 2011. Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. *J Exp Bot*, 63: 203 – 214.
- Zhang L, Zhao G, Xia C, Jia J, Liu X, Kong X. 2012. Overexpression of a wheat MYB transcription factor gene, *TaMYB56-B*, enhances tolerances to freezing and salt stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Gene*, 505: 100 – 107.
- Zhang Quan-yan, Liu Xiao, Yu Jian-qiang, Hu Da-gang, Hao Yu-jin. 2016. Molecular cloning and functional characterization of *MdMYB73* reveals its involvement in salt tolerance in apple callus and *Arabidopsis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (11): 2073 – 2080. (in Chinese)  
张全艳, 刘 晓, 于建强, 胡大刚, 郝玉金. 2016. *MdMYB73* 的分子克隆及其在苹果愈伤组织和拟南芥幼苗中的盐抗性功能鉴定. *园艺学报*, 43 (11): 2073 – 2080.
- Zhao Shi-jie, Xu Chang-cheng, Zou Qi, Meng Qing-wei. 1994. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. *Plant Physiol Commun*, 30 (3): 207 – 210. (in Chinese)  
赵世杰, 许长成, 邹 琦, 孟庆伟. 1994. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. *植物生理学通讯*, 30 (3): 207 – 210.
- Zhu J K, Verslues P E, Zheng X, Lee B H, Zhan X, Manabe Y, Hasegawa P M. 2005. HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (28): 9966 – 9971.