

甜樱桃 *PavMYC2* 基因克隆与表达分析

王继源, 王丽^a, 纠松涛, 孙莞霞, 徐岩, 刘勋菊, 张才喜*

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要:【目的】克隆甜樱桃 *PavMYC2* 基因并研究其表达模式, 为深入研究其在花芽响应温度逆境中的功能奠定基础。【方法】从甜樱桃基因组数据库中获得 *PavMYC2* 基因的序列, 对该基因进行生物信息学分析和亚细胞定位; 通过 qRT-PCR 技术探究 *PavMYC2* 基因在甜樱桃不同组织及花芽各个时期的表达模式; 运用双分子荧光互补实验(BiFC)检测其与 PavJAZ 蛋白的互作关系; 结合前人转录组结果分析 *PavJAZ* 的季节表达模式。【结果】*PavMYC2* 编码 689 个氨基酸, 具有 bHLH-Zip 保守结构域, 属于 bHLH 家族。亚细胞定位结果表明, 该基因在细胞核中发挥功能。进化树结果表明, 甜樱桃 *PavMYC2* 与中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus*) 和樱花 (*Prunus yedoensis*) 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果分析发现, *PavMYC2* 的表达具有组织特异性, 在花芽中表达量最高, 依次是叶、茎、花、根中表达量的 4.8、4.9、8.8、37.4 倍。在花芽中, *PavMYC2* 的表达量在夏秋季高, 然后逐渐降低, 在冬季维持一定的表达水平, 春季时最低。顺式作用元件分析发现, 该基因启动子上含有大量光响应元件、多种激素响应元件和低温胁迫等相关元件。互作蛋白结果显示, *PavMYC2* 可以与 *PavJAZ1/2/3* 蛋白发生互作, 进一步对 *JAZs* 基因的表达模式进行分析, 发现 *PavJAZ1/2/3/5* 与 *PavMYC2* 的表达量变化相似。【结论】克隆得到 1 个 *PavMYC2* 基因, 夏秋季高温时期在花芽中高表达, 随后逐渐降低, 在冬季维持一定的表达水平, 春季开花时最低。其与 *PavJAZ1/2/3* 互作, 协同响应温度胁迫。该研究为进一步探究甜樱桃花芽中 MYC2 在响应温度胁迫和调控开花进程中的作用奠定了基础。

关键词:甜樱桃; 花芽; 温度胁迫; MYC2

中图分类号:S662.5

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2022)05-0701-11

Cloning and expression analysis of *PavMYC2* gene in *Prunus avium* L.

WANG Jiyuan, WANG Li^a, JIU Songtao, SUN Wanxia, XU Yan, LIU Xunju, ZHANG Caixi*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract:【Objective】Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is an important economic fruit crop in temperate regions of the world. Temperature stress is closely involved in flower bud differentiation. JA-activated transcription factor MYC2, which is the most extensively studied components in the JA signaling pathway, plays a regulatory role in temperature stress. However, the MYC2 gene has been less studied in sweet cherry. In the present research, *PavMYC2* gene was cloned successfully, and the functional localization of MYC2 gene was identified. Moreover, its expression pattern during organogenesis, dormancy and flowering stages was analyzed.【Methods】The sweet cherries Royal Lee and Hongdeng were selected for the current experiment, which were grafted on Chinese cherry rootstock (*P. pseudocerasus* Lindl. ‘Daqingye’). Royal Lee is a low chilling requirement cultivar from the breeding program of low-chill sweet cherries in California, USA, and Hongdeng is a high chilling requirement cultivar from China. Both cultivars were grown in the experimental farm at Shanghai Jiao Tong University in Shanghai (121.48°E, 31.25°N). Floral buds of sweet cherries were collected on 15 July, 15 August, 15 September, 15 October, 15 November and 15 December in 2019; and 15 January, 5 February, 5 March, 10 March and 15 March in 2020. All materials were collected for three biological replicates. These buds were fro-

收稿日期:2021-10-11 接受日期:2022-02-16

基金项目:现代农业产业技术体系专项资金(CARS-30-5-02); 国家自然科学基金青年科学基金(32102347)

作者简介:王继源,男,博士,研究方向为果树生长发育机制。Tel:18930315351, E-mail:016150910029@sjtu.edu.cn。a 为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. Tel:021-34205961, E-mail:acaizh@sjtu.edu.cn

zen in liquid nitrogen and stored at -80 °C before RNA extraction. According to the manufacturer's instructions, total RNA was extracted using an RNAprep purePlant Kit (TianGen, China). To isolate the full-length cDNA of these genes, 1 µg of total RNA was converted into cDNA using PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRaBiotechnology, Dalian, China) and was subsequently diluted five times with sterile water. Primers were designed using Primer 5 software. The PCR-products were cloned into the pEASY®- Blunt Cloning Vector (TransGen Biotech, Beijing, China), and then sequenced. Phylogenetic and molecular evolutionary analysis were conducted using MEGA version 6. To generate a phylogenetic tree, the complete sequences of the other species were obtained from the GenBank DNA database. The Neighbor-Joining method in MEGA was used to construct different trees. The reliability of the obtained trees was tested using bootstrapping with 1000 replicates. RT-qPCR was performed on a Bio-Rad System (Bio-Rad, CA, USA). The procedure was conducted as follows: 95 °C for 30 s, amplification for 40 cycles (95 °C for 5 s, and 60 °C for 30 s). *PavMYC2* cDNAs were cloned into PHB vectors containing a cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, a translation enhancer and a GFP fluorescent protein tag in the subcellular localization assessment. We cloned the CDS of *PavMYC2* and *PavJAZ1-6* into the vector pXY104 and pXY106 for BiFC assay, respectively. Constructed vectors were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 and subsequently cultured to an OD₆₀₀ of approximately 0.8-1.0. The mixed suspension liquid with pairs were co-transformed into five-week-old leaves of *Nicotiana benthamiana* after 2 to 5 h. Yellow fluorescent protein (YFP) signals were detected after 48-72 h by a laser scanning confocal microscope (ZeissLSM510/ConfoCor2). **【Results】***PavMYC2* contained an open reading frame (ORF) of 689 bp that encoded a predicted protein of 237 amino acids. It contained a conserved domain bHLH-Zip, belonging to bHLH family. To examine the subcellular localization of *PavMYC2* in sweet cherry, the coding sequence of *PavMYC2* was fused to the PHB-GFP vector. The PHB-GFP vector with the CaMV 35S promoter driving GFP alone was used as a negative control. A transient expression assay was performed in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *PavMYC2*-GFP fusion construct revealed GFP fluorescence in nucleus, compared with empty PHB-GFP vector. To better understand genetic relationship between *PavMYC2* and other reported *MYC2-like* genes, we performed the phylogenetic tree analysis, which indicated that *PavMYC2* was closely to *Pps-MYC2* and *PyMYC2* from *P. pseudocerasus* and *P. yedoensis*, suggesting a conserved function with these evolutionarily closer *MYC2* homologs. To investigate the possible roles of *PavMYC2* in the development of sweet cherry, we performed the relative expression levels from various tissues of sweet cherry by using qRT-PCR analysis. *PavMYC2* expression in sweet cherries was observed in vegetative and floral tissues, but much higher level in flower buds with 4.8-, 4.9-, 8.8-, 37.4-fold than that in young leaves, stems, roots and flowers. As a result, the highest transcriptional level of *PavMYC2* occurred in floral buds, indicating that *PavMYC2* might play an important role in the development of floral buds. The seasonal expression level of *PavMYC2* was higher during the stage of summer and autumn growth in floral buds, then gradually decreased, maintained a certain level of expression in winter, and reached the lowest level in spring. The cis-acting element analysis showed that the *PavMYC2* gene promoter contained a large number of light-responsive elements, hormone-responsive elements and temperature stress-related elements. We performed BiFC assays to detect protein-protein interactions. The BiFC assays indicated that *PavMYC2* interacted with *PavJAZ1/2/3* in leaves of *Nicotiana benthamiana*, which had similar expression patterns with *PavMYC2*, suggesting that *PavMYC2* and *PavJAZs* may co-regulate the temperature stress and flowering. **【Conclusion】**A *PavMYC2* gene was cloned and highly expressed in summer and autumn stages, and thereafter declined gradually, maintained a certain level of

expression in winter, and reached the lowest in spring. This study lays the foundation for further investigation on the role of MYC2 in sweet cherry buds in response to temperature stress and regulation of flowering process.

Key words: Sweet cherry; Floral buds; Temperature stress; MYC2

甜樱桃(*Prunus avium* L.)为蔷薇科李属植物,在温带落叶果树中属于成熟较早的树种。甜樱桃营养丰富,含有多种营养元素和生物活性成分,例如,葡萄糖、维生素C和花色苷等^[1-2],具有较高的营养和经济价值。

近年来,全球甜樱桃的种植面积和产量迅速增加,并呈现持续增长态势,甜樱桃产业发展潜力巨大。但其生长周期跨度大且比较复杂,花芽生长易受夏季高温和冬季低温影响,形成畸形果或不能结实,导致产量下降,品质参差不齐,经济价值急剧下滑。因此,探究甜樱桃花芽在不同温度胁迫下的生长发育情况有助于其产量和品质的提升。

高温胁迫对植物的光合作用、呼吸作用、细胞组织稳定性、渗透系统等造成一定程度的伤害,影响植物的正常生长^[3],且夏季高温影响甜樱桃花芽分化,容易导致畸形果的形成^[4-5],对产量和品质提升产生不利影响,经济效益下降。有学者研究,在面对高温胁迫时,野生型拟南芥体内出现茉莉酸积累;且外源应用茉莉酸有助于维持高温下植物的细胞活力^[6]。花芽分化后,为了抵御冬季低温危害,花芽进入休眠状态,需要经过一定时间的低温积累才能解除休眠,促进花芽的进一步生殖生长。有研究表明,茉莉酸处理可以显著提高冷藏水稻幼苗的存活率^[7],并且在拟南芥冷驯化诱导过程中提高冷冻耐受性方面具有积极作用^[8]。

茉莉酸能够响应高温、低温等多种非生物胁迫^[9],MYC2转录因子在茉莉酸信号转导途径中起着核心调控作用,增强植物对逆境的抵抗能力,有利于植物正常生长发育。目前,MYC2转录因子在甜樱桃中的研究几乎处于空白状态。因此,研究MYC2基因如何调控甜樱桃花芽响应温度胁迫的机制有着重要意义。

基于此,依据樱桃基因组数据库信息,笔者成功克隆了茉莉酸信号途径的响应因子*PavMYC2*基因,并利用实时荧光定量测定了其在不同发育阶段的表达模式,探索*PavMYC2*与*PavJAZs*蛋白互作关系,为深入探究甜樱桃花芽发育阶段MYC2基因在温度

胁迫中发挥的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

试验材料为栽植于上海交通大学甜樱桃栽培基地(121.48°E, 31.25°N),2009—2010年定植的10年生甜樱桃树种,所选品种分别为低需冷量的罗亚理(Royal Lee)和高需冷量的红灯(Hongdeng),砧木为大青叶(*P. pseudocerasus* ‘Daqingye’)。株行距为4 m×6 m,采用主干疏层形整枝,在避雨条件下栽培,其余均按常规管理。基地实时温度用HOBO UX100-003(HOBO, USA)记录。

于2019年7月15日、8月15日、9月15日、10月15日、11月15日、12月15日和2020年1月15日、2月5日、3月5日、3月10日、3月15日采集樱桃花芽样品并用液氮速冻,然后保存于-80 °C冰箱备用。

1.2 甜樱桃*MYC2*基因克隆

采用天根公司植物总RNA提取试剂盒,按照说明书进行甜樱桃花芽中总RNA的提取。1 μg 罗亚理和红灯 RNA 使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)进行反转录成cDNA。使用 Prime 5 软件,依据甜樱桃参考基因组(<http://cherry.kazusa.or.jp/>)进行引物设计,克隆*PavMYC2*,使用 PrimeSTAR Max Premix (TaKaRa)按照说明书进行PCR反应。25 μL体系,12.5 μL PrimeSTAR Max Premix,上下游引物各0.5 μL,模板1 μL,加水补齐25 μL,所用程序为:98 °C 变性 5 min;98 °C 5 s,55 °C 5 s,72 °C 30 s,35个循环;72 °C 延伸 5 min。通过1%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,并用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(B518131,生工生物)按照标准操作步骤进行纯化,PCR纯化产物连接pEASY-Blunt Cloning Vector(TransGen),并送擎科公司测序。

1.3 序列分析、系统进化树构建及蛋白互作预测

应用DNAMAN进行多序列的对比分析,分析其序列的一致度和相似性;采用MEGA 6中的邻接法,进行系统进化分析,从NCBI里GenBank DNA

database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 获得的同源蛋白构建系统进化树,步长值为 1000。在 STRING 网站 (https://string-db.org/cgi/input?sessionId=xo2a1k8QkhcK&input_page_active_form=single_identifier) 进行蛋白互作预测。

1.4 PavMYC2 亚细胞定位实验

将 PavMYC2 的 cDNAs 与具有 35S 强启动子和 GFP 荧光蛋白的 PHB 载体相连接。同源重组法构建 PavMYC2-PHB 载体,然后转入 GV3101 感受态,每 10 μL 感受态加 1 μL 连接好的阳性重组质粒,轻轻拍打管底混匀,依次于冰上静置 5 min、液氮 5 min、37 °C 水浴 5 min、冰浴 5 min。在超净工作台上加入 500 μL 无抗生素的 LB 液体培养基,在 28 °C 下振荡培养 2~3 h。涂布在含有卡那霉素(50 mg· L^{-1})、利福平(20 mg· L^{-1})抗性的 LB 平板上,2~3 d 后挑斑,验证阳性克隆后,摇菌至 OD_{600} 值在 1.0 左右,使用 10 mmol· L^{-1} MES-KOH (pH=5.2)、10 mmol· L^{-1} MgCl₂、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ acetosyringone 配置的悬浮液进行悬浮,室温静置 2~5 h 后,注射进入生长约 35 d 的烟草叶片,3~7 d 后在激光共聚焦(Zeiss LSM510/ConfoCor2)下扫描,并以 GFP-PHB 空载作为对照。

1.5 PavMYC2 荧光定量分析

以甜樱桃 PavActin 为内参。根据荧光定量 PCR 引物设计原则,使用 Primer 5 设计引物。Bio-Rad System(Bio-Rad, CA, USA) 用于荧光定量实验,程序为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。3 次生物学重复。荧光值变化曲线和熔解曲线用于分析结果的准确性。数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析,利用 Excel 等软件进行统计学分析。

1.6 PavMYC2 与 PavJAZs 双分子荧光互补实验(BiFC)

使用 pXY104 和 pXY106 载体,同源重组法构建 BiFC 实验的 PavMYC2-pXY104、PavJAZ1-pXY106、PavJAZ2-pXY106、PavJAZ3-pXY106、PavJAZ4-pXY106、PavJAZ5-pXY106 和 PavJAZ6-pXY106 载体。将载体分别转入 GV3101 感受态,挑斑验证阳性克隆后,摇菌至 OD_{600} 值为 0.8~1.0。每一对互作载体菌液混合,室温放置 2~5 h 后,注射入生长 35 d 左右的烟草叶片中,黑暗中培养 1 d,正常光照培养 2 d,然后在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。以 pXY104 和 pXY106 空载体为对照。

2 结果与分析

2.1 PavMYC2 基因鉴定与进化分析

对甜樱桃中的 MYC2 基因依据 GenBank 登录号 XP_021803466 进行基因克隆与序列鉴定。Pav-MYC2 开放阅读框长 2070 bp, 编码 689 个氨基酸。PavMYC2 与桃和拟南芥的 MYC2 基因编码的氨基酸序列进行比对发现,它们都具有 bHLH-Zip 保守结构域,表明 PavMYC2 为 bHLH 家族转录因子(图 1-A)。

为了确定 PavMYC2 的系统进化关系,从 NCBI 数据库中检索其他物种中与 PavMYC2 蛋白同源性较高的氨基酸序列,利用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树(图 1-B)。结果表明,甜樱桃与中国樱桃(*Prunus pseudocerasus*)、樱花(*Prunus yedoensis*)的 MYC2 的遗传距离最近,而与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)之间的遗传距离较远。

2.2 PavMYC2 亚细胞定位和基因表达模式分析

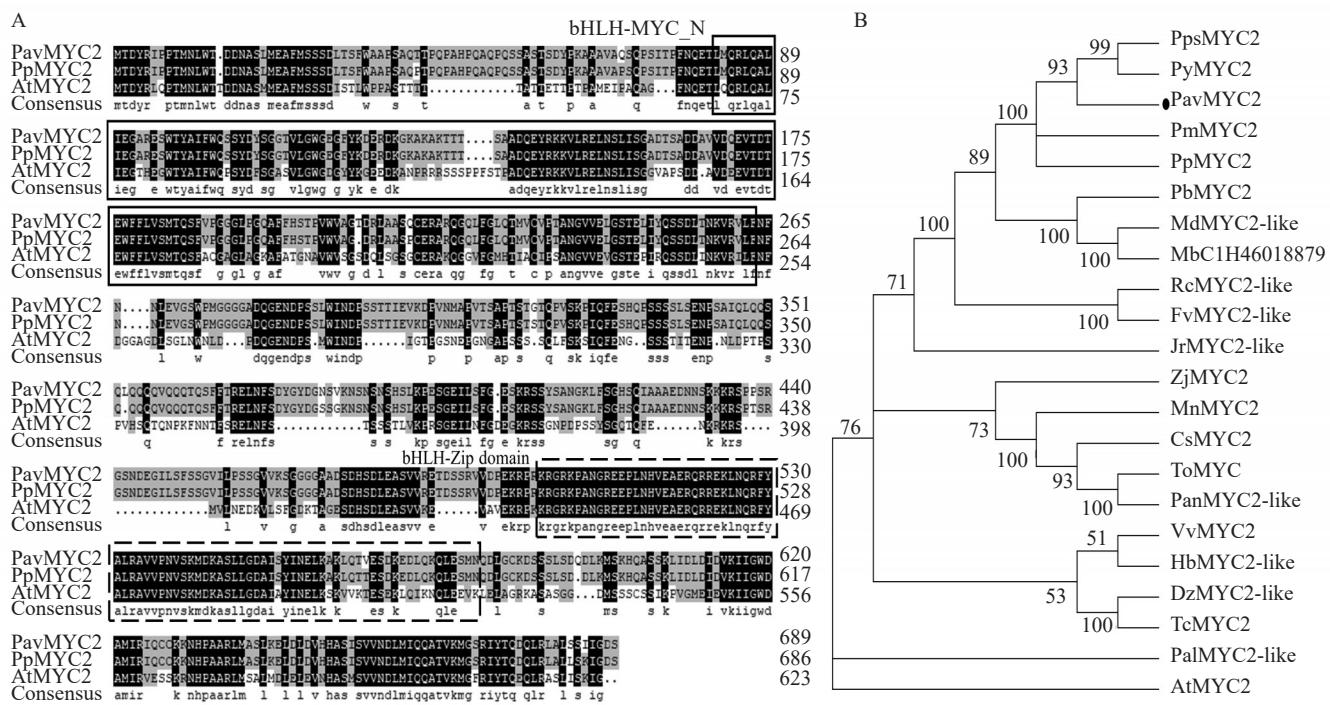
为了探究甜樱桃 PavMYC2 蛋白的亚细胞定位,用 PavMYC2 的 cDNA 序列构建具有强启动子 CaMV 35S 和荧光蛋白标签的 PHB-GFP 载体,空载作为对照(图 2-A)。在烟草叶片中瞬时表达 Pav-MYC2 的荧光蛋白,和对照相比,PavMYC2 只在细胞核中表达(图 2-B)。

进一步测定了 PavMYC2 在甜樱桃各个组织中的表达量,以探究其在花芽生长发育过程中的功能。PavMYC2 在叶子、根、茎、花芽和花中已检测到其表达,在根中的表达量最低,在花芽中表达量最高且花芽中的表达量依次比叶子、茎、花和根中的高 4.8、4.9、8.8 和 37.4 倍(图 2-C)。

另外,为了进一步确定 PavMYC2 在樱桃花芽发育各个生长时期发挥的作用,对其季节性表达趋势进行分析。从夏季至次年春季依次取样,包含了花芽发育的重要阶段。PavMYC2 在夏秋季表达量最高,然后开始下降,春季表达量最低(图 2-D)。

2.3 PavMYC2 启动子顺式作用元件分析

PavMYC2 启动子顺式作用元件主要可以分为三种类型:光响应元件、激素响应元件和胁迫相关元件(表 1)。光响应元件中,以 G-Box 光响应元件的数量最多达 7 个,另外还包括 Box4、GATA-motif、I-box、TCT-motif 等光响应元件;激素响应元件中,脱落酸响应元件 ABRE 的数量高达 10 个,因此,Pav-



A. 甜樱桃的 MYC2 和桃、拟南芥的 MYC2 的序列比对, bHLH-MYC_N 和 bHLH-Zip 结构域分别用实线和虚线框在图中表明; B. 进化树基于甜樱桃和其他物种 MYC2 及其同源蛋白的氨基酸序列构建, 甜樱桃的 MYC2 蛋白在图中已用黑点表明, 这些蛋白在 Genebank 中的登录号为: AtMYC2. 拟南芥 (NP_174541.1); PpsMYC2. 中国樱桃 (ALN42127.1); PyMYC2. 樱花 (PQQ11938.1); PmMYC2. 梅 (XP_008238247.1); PpMYC2. 桃 (XP_020419289.1); PbMYC2. 梨 (XP_018500941.1); MdMYC2-like. 苹果 (XP_008341963.2); MbC1H46. 山荆子 (TQD95523.1); ReMYC2-like. 月季 (XP_024169176.1); FvMYC2-like. 草莓 (XP_004300239.1); JrMYC2-like. 核桃 (XP_018811463.1); Zj-MYC2. 枣 (XP_015896923.1); MnMYC2. 川桑 (XP_010104300.1); CsMYC2. 大麻 (XP_030501877.1); ToMYC. 异色山黄麻 (PON87401.1); PanMYC2-like. 麻叶山黄麻 (PON45335.1); VvMYC2. 葡萄 (XP_002280253.2); HbMYC2-like. 橡胶树 (XP_021664832.1); DzMYC2-like. 榴莲 (XP_022737560.1); TcMYC2. 可可 (XP_017973469.1); PalMYC2-like. 白牧豆树 (XP_028802884.1)。

A. Alignment of the sequence of MYC2 from sweet cherry, peach, and *Arabidopsis*. bHLH-MYC_N and bHLH-Zip domains are indicated by solid and dotted boxes; B. Phylogenetic tree based on the amino acid alignment of PavMYC2 protein in sweet cherry marked with dots and other plant species. Accession numbers are as follows: AtMYC2. *Arabidopsis* (NP_174541.1); PpsMYC2. *Prunus pseudocerasus* (ALN42127.1); PyMYC2. *Prunus yedoensis* (PQQ11938.1); PmMYC2. *Prunus mume* (XP_008238247.1); PpMYC2. *Prunus persica* (XP_020419289.1); PbMYC2. *Pyrus x bretschneideri* (XP_018500941.1); MdMYC2-like. *Malus domestica* (XP_008341963.2); MbC1H46. *Malus baccata* (TQD95523.1); ReMYC2-like. *Rosa chinensis* (XP_024169176.1); FvMYC2-like. *Fragaria vesca* subsp. *vesca* (XP_004300239.1); JrMYC2-like. *Juglans regia* (XP_018811463.1); Zj-MYC2. *Ziziphus jujuba* (XP_015896923.1); MnMYC2. *Morus notabilis* (XP_010104300.1); CsMYC2. *Cannabis sativa* (XP_030501877.1); ToMYC. *Trema orientalis* (PON87401.1); PanMYC2-like. *Parasponia andersonii* (PON45335.1); VvMYC2. *Vitis vinifera* (XP_002280253.2); HbMYC2-like. *Hevea brasiliensis* (XP_021664832.1); DzMYC2-like. *Durio zibethinus* (XP_022737560.1); TcMYC2. *Theobroma cacao* (XP_017973469.1); PalMYC2-like. *Prosopis alba* (XP_028802884.1).

图 1 PavMYC2 序列和进化分析

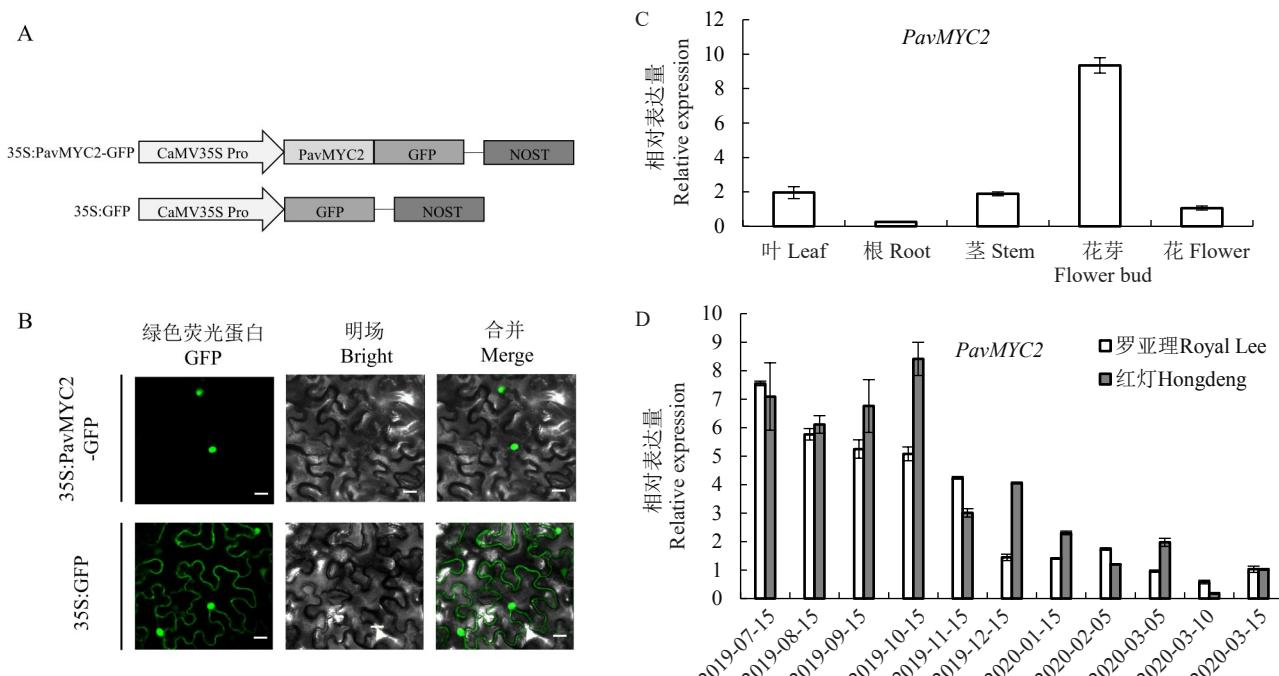
Fig. 1 Sequence and phylogenetic analysis of PavMYC2

MYC2可能在ABA信号转导途径中起着一定的调控作用。其他还包括茉莉酸甲酯响应元件CGTCA-motif和TGACG-motif, 生长素响应元件TGA-box; 胁迫相关元件中主要有低温诱导元件LTR和厌氧诱导元件ARE, 表明PavMYC2在植物生长发育过程和响应外界环境变化中发挥一定作用。

2.4 PavMYC2互作蛋白预测分析

互作蛋白的预测结果显示, 得分在0.7以上与

MYC2互作的蛋白有13个(表2、图3)。其中大多是JAZ蛋白,JAZ类蛋白在JA信号转导途径中起着抑制子的作用^[10-11]。此外, 互作蛋白还包括NINJA家族蛋白、COI家族蛋白和PPR家族蛋白。利用MEME软件, 对PavJAZ基因家族蛋白的保守基序进行分析, 结果显示PavJAZ1-PavJAZ6共有2个保守基序, LOGO显示的即为保守基序Tify和jas的序列结构(图4), Tify基序的长度为21个氨基酸, jas基



A. 35S:PavMYC2-GFP 和 35S:GFP 载体构建示意图;B. 在烟草叶片上表达 35S:PavMYC2-GFP 和 35S:GFP 载体蛋白,激光共聚焦采集荧光信号,观察亚细胞定位,比例尺为 20 μm;C. *PavMYC2* 在甜樱桃不同部位的表达量分析,包括叶片、根、茎干、花芽和花;D. 2019 年 7 月 15 日到 2020 年 3 月 15 日罗亚理和红灯两个品种花芽中 *PavMYC2* 季节性基因表达分析。

A. Schematic representation of the 35S:PavMYC2-GFP fusion construct and the 35S:GFP construct; B. Leaves of *Nicotiana benthamiana* plants expressing 35S:PavMYC2-GFP and 35S:GFP. Scale bar = 20 μm; C. Spatial expression of *PavMYC2* was detected in different sweet cherry tissues, including leaves, roots, stems, flower buds, and flowers; D. Seasonal expression of *PavMYC2* was detected in flower buds of the two cultivars Royal Lee and Hongdeng from 15 July 2019 to 15 March 2020.

图 2 *PavMYC2* 基因表达模式和亚细胞定位分析

Fig. 2 Expression patterns analysis and subcellular localization of *PavMYC2*

表 1 *PavMYC2* 基因启动子顺式作用元件

Table 1 *PavMYC2* gene promoter cis-acting elements

元件类型 Component type	相关元件 Related component	数量 Number	功能注释 Functional comment
光响应元件 Photoresponsive element	Box 4	2	光响应元件 Photoresponsive element
	G-Box	7	光响应元件 Photoresponsive element
	GATA-motif	1	光响应元件 Photoresponsive element
	GT1-motif	1	光响应元件 Photoresponsive element
	I-box	2	光响应元件 Photoresponsive element
	TCT-motif	1	光响应元件 Photoresponsive element
激素响应元件 Hormone response element	ABRE	10	脱落酸响应元件 Abscisic acid response element
	CGTCA-motif	4	茉莉酸甲酯响应元件 Methyl jasmonate response element
	TGACG-motif	4	茉莉酸甲酯响应元件 Methyl jasmonate response element
	TGA-box	1	生长素响应元件 Auxin response element
胁迫相关元件 Stress related component	LTR	1	低温诱导元件 Low temperature inducing element
	ARE	2	厌氧诱导元件 Anaerobic inducing element

序的长度为 27 个氨基酸,其保守度相对较高。尽管基序所处的位置各有不同,但 PavJAZs 全都具有相同的保守基序,且 Tify 基序都位于 5' 端,jas 基序都位于 3' 端。

2.5 PavJAZs 基因季节性表达趋势分析

通过 INRA (<https://bwenden.shinyapps.io/Dor->

Patterns/) 对 PavJAZs 在各个时期的相对表达量进行分析(图 5),结果显示,PavJAZ1、2、3、5 的总体表达量呈现先上升后下降的趋势,并且在 8 月份时表达量达到高峰。PavJAZ1、PavJAZ2、PavJAZ5 在高峰期之后表达量迅速下降,与 PavMYC2 的表达量变化趋势相似。然而,PavJAZ4 和 PavJAZ6 的表达量不

表 2 PavMYC2 互作蛋白预测

基因号 Gene ID	蛋白号(桃) Protein ID (<i>Prunus persica</i>)	蛋白名称 Protein name	得分 Score	蛋白号(甜樱桃) Protein ID (<i>Prunus avium</i>)
18777327	XP_020419289	MYC2	1.000	XP_021802110
18790611	XP_007223954	TIFY 9	0.972	XP_021818119
18769244	XP_007202425	TIFY 10A (JAZ1)	0.971	XP_021804920
18776110	XP_007209282	TIFY 6B (JAZ6)	0.883	XP_021802863
18769568	XP_007204726	TIFY 3B-like (JAZ3)	0.871	XP_021804597
18771850	XP_007203684	mc410	0.868	XP_021807187
18791864	XP_007223248	TIFY 6B-like	0.858	XP_021821107
18770917	XP_007202173	MMK1	0.830	XP_021814026
18785599	XP_007219048	MYC2-like1	0.812	XP_021814970
18785811	XP_007220435	coronatine-insensitive protein 1 (COI1)	0.809	XP_021832998
18777047	XP_020419108	MYC2-like2	0.800	XP_021816617
18793674	XP_020411327	Pentatricopeptide repeat (PPR-like1)	0.752	XP_021831619
18793536	XP_020411326	pentatricopeptide repeat (PPR-like2)	0.752	XP_021831618
18778454	XP_007212237	TIFY 5A (JAZ5)	0.724	XP_021834265

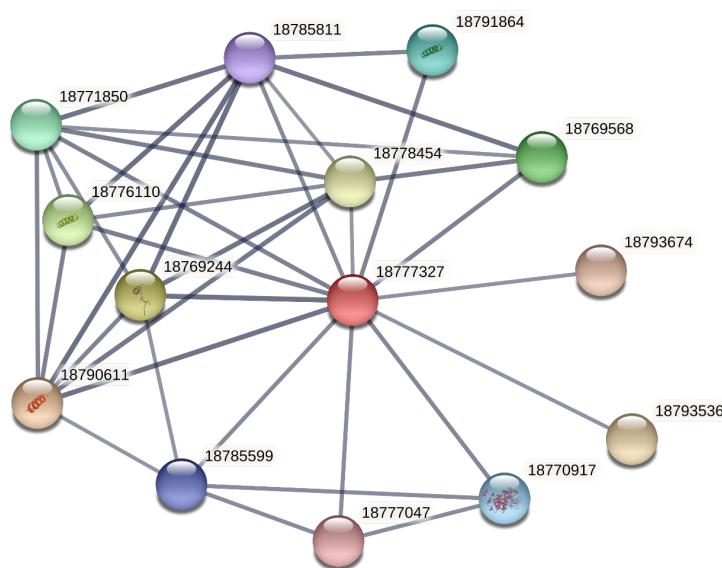


图3 与 PavMYC2 互作的蛋白预测
Fig. 3 Predicted proteins interacting with PavMYC2

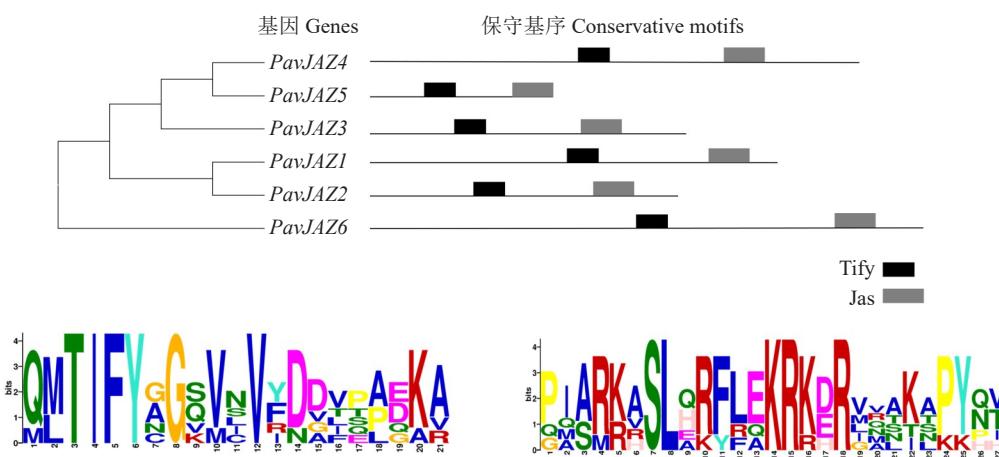
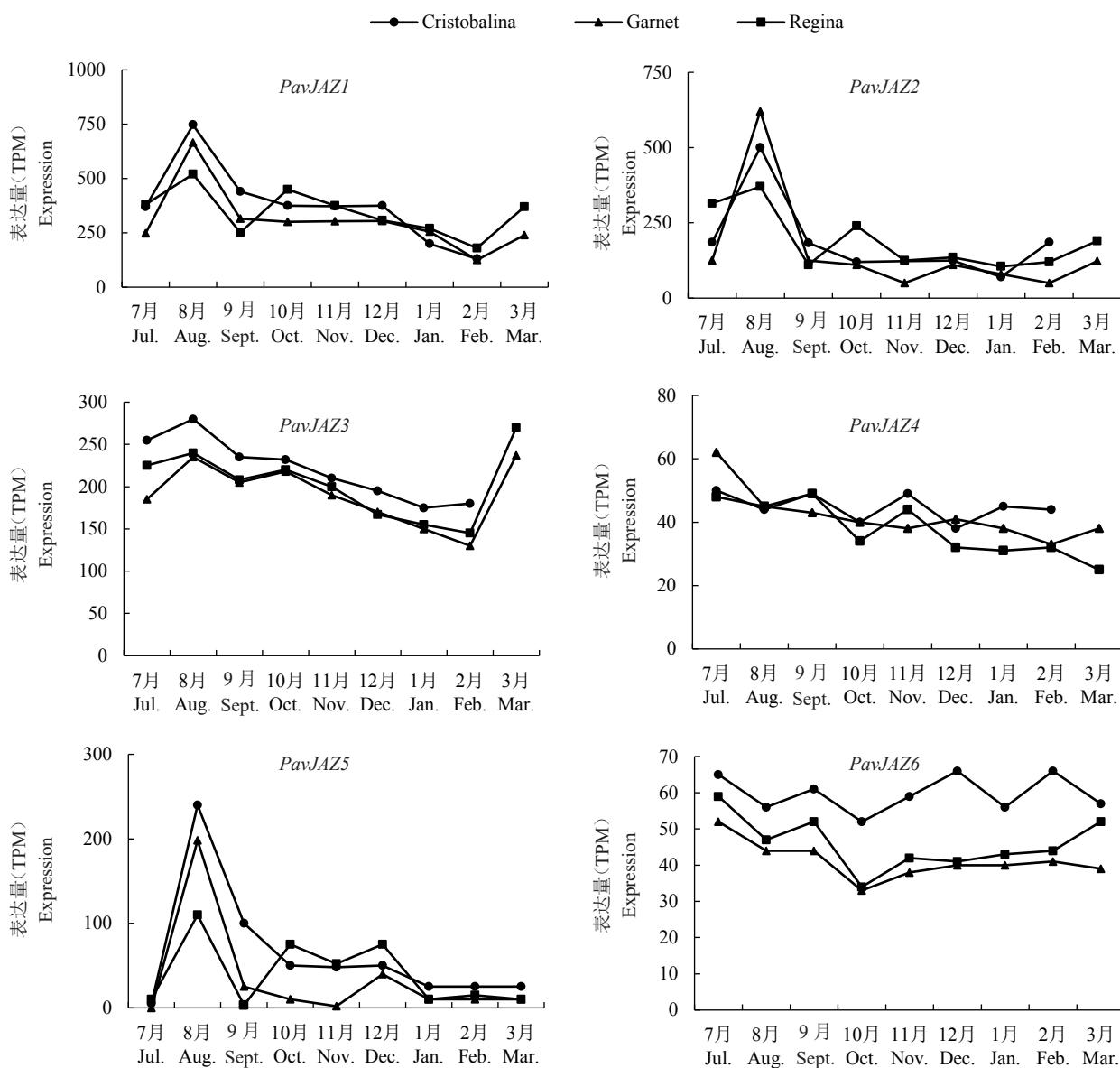


图 4 PavJAZ1-6 蛋白保守基序分析
Fig. 4 Amino acid motifs analysis of PavJAZ1-6 proteins

图5 甜樱桃花芽中 *PavJAZ1-6* 基因的季节性表达趋势Fig. 5 Seasonal expression levels of *PavJAZ1-6* in sweet cherry flower buds

规则变化,推测二者与 *PavMYC2* 无直接的相关性。

2.6 双分子荧光互补验证 *PavMYC2* 与 *PavJAZs* 之间的互作

对 *PavMYC2* 与 *PavJAZ1-PavJAZ6* 分别进行双分子荧光互补实验,将构建好的 *PavMYC2-pXY104* 与 *PavJAZs-pXY106* 的菌液充分混匀,注入烟草叶片中,3 d 后在激光共聚焦下观察荧光信号(图6)。结果显示, *PavMYC2-pXY104+PavJAZ1-pXY106*、*PavMYC2-pXY104+PavJAZ2-pXY106* 和 *PavMYC2-pXY104+PavJAZ3-pXY106* 组合可以观察到黄色的荧光信号,而且黄色荧光主要集中在细胞核上,而 *PavMYC2-pXY104+pXY106*、*pXY104+PavJAZ1-*

pXY106、*pXY104+PavJAZ2-pXY106* 和 *pXY104+PavJAZ3-pXY106* 的组合中并未出现荧光信号,表明 *PavMYC2* 与 *PavJAZ1*、*PavJAZ2* 和 *PavJAZ3* 之间存在蛋白互作,与 *PavJAZ4*、*PavJAZ5* 和 *PavJAZ6* 之间不存在蛋白互作。

3 讨 论

花是植物重要的繁殖器官,在温带果树中,花发育的好坏决定了果实的数量和质量。夏季高温影响花芽分化,冬季低温会影响甜樱桃花芽的休眠进程,早春低温冻害会破坏甜樱桃的花蕾^[12],所以如何响应温度胁迫对甜樱桃的生殖生长至关重要。

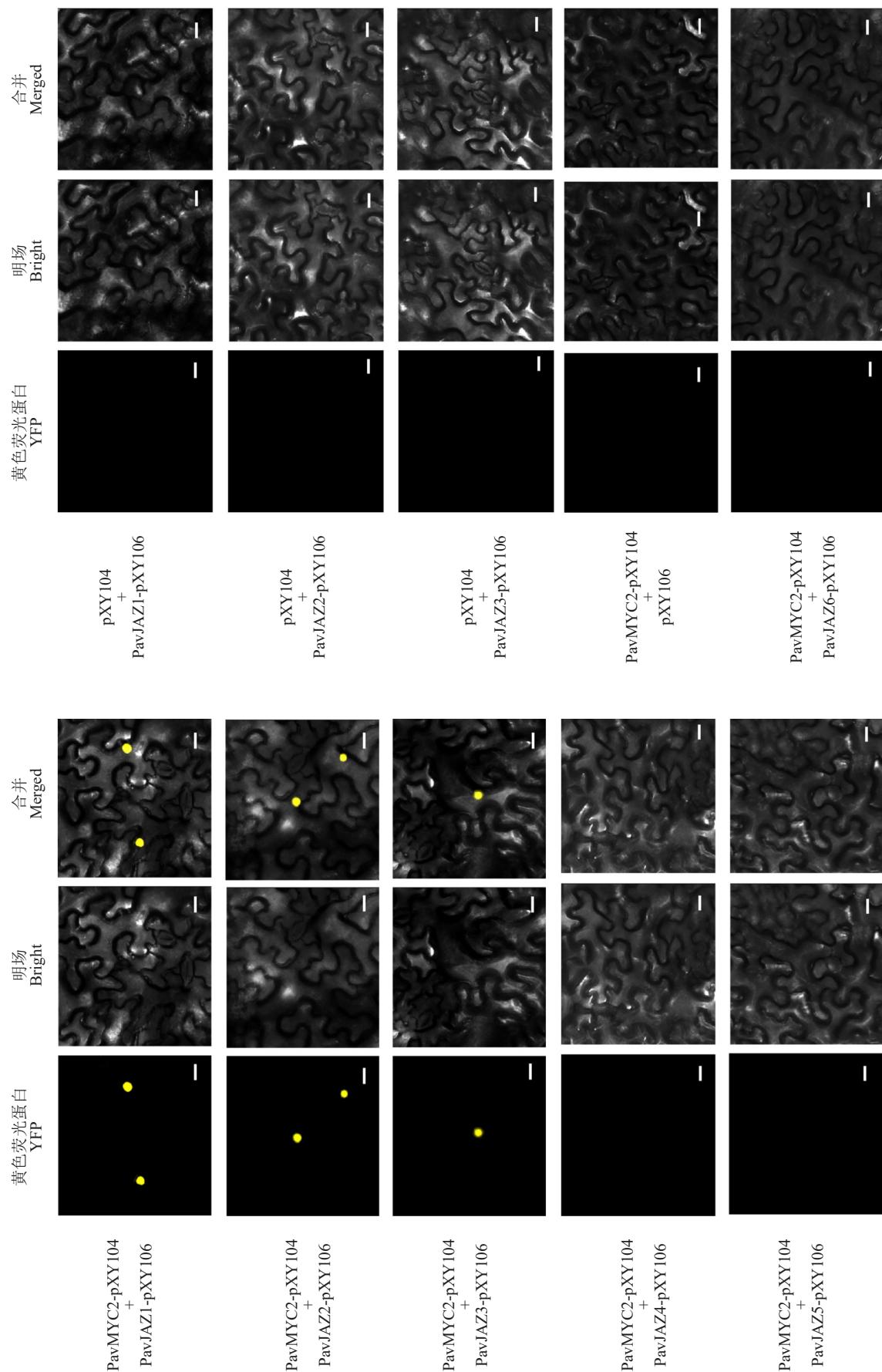


图 6 *PavMYC2* 与 *PavJAZ1-6* 蛋白互作分析
Fig. 6 Protein interactions between *PavMYC2* and *PavJAZ1-6*

MYC2转录因子是bHLH转录因子家族的重要成员之一,在茉莉酸信号转导途径中起着核心调控作用,并且也参与了植物不同组织和器官应对逆境的过程^[13-14]。本研究通过甜樱桃参考基因组设计引物,成功克隆了*PavMYC2*基因,其具有bHLH-Zip保守结构域,属于bHLH家族。根据bHLH特点和作用方式可以分为不同的亚族,有学者对拟南芥、水稻、藻类等bHLH转录因子的各个方面进行综合分析,将其分为32个亚族^[15]。甜樱桃MYC2基因的表达模式分析发现,其在花芽中的表达含量最高,说明*PavMYC2*基因主要在花芽中起作用,并且*PavMYC2*基因的表达趋势随季节变化,在夏秋季表达量最高,然后逐渐下降,在冬季维持一定的表达水平,春季开花时表达量最低,表明*PavMYC2*基因可能参与甜樱桃花芽响应高低温胁迫且和开花早晚有关。

茉莉酸可以提高植物可溶性蛋白含量,减轻高温造成的氧化伤害,维持植物正常生长^[16-17]。MYC2转录因子激活茉莉酸途径下游基因表达,调控植物对温度胁迫的应答反应^[18]。烟草中,高温诱导*Nt-MYC2a*表达,促进茉莉酸的生物合成^[19]。在研究植物耐冷性时,有学者发现,在热带果树香蕉中*Ma-MYC2s*可能与*MaICE1*之间存在相互作用,并且对CBF低温应答途径相关基因的表达产生一定影响,在一定程度上提高了香蕉果实的耐寒性^[20]。在外源MeJA处理后,冬小麦*TaMYC2*表达水平明显升高,而且脯氨酸和可溶性糖含量增加,耐寒性增强^[21]。

植物开花主要受到光照和温度两个方面影响^[22-23],光周期和光质对植物发育至关重要。光周期可以帮助植物预测每个季节到来的时刻^[24],光质信号可以与温度信号相互作用调节植物开花^[25]。研究表明MYC2可以与FT(*FLOWERING LOCUS T*)基因的染色质区域特异性结合,并且通过MYC突变体的筛选证明MYC2/3/4与FT相互作用调节开花^[26]。*PavMYC2*具有光启动子元件以及低温响应元件,可能通过外界的光和温度等环境条件影响*PavMYC2*基因表达,进而影响甜樱桃开花进程。

Zhai等^[27]研究表明JA受体COI1和JAZ蛋白参与调控开花。JAZ蛋白是茉莉酸信号转导途径中的抑制子,JAZ1蛋白抑制茉莉酸酯响应基因的转录^[28]。感知激素信号后,JAZ阻遏物可以通过释放MYC2的蛋白酶体降解并且激活JA的反应。在茉莉酸信号通路中,MdJAZ1/4可以结合MdMYC2共

同影响苹果愈伤组织对低温的抵抗能力^[29]。MYC2与大部分JAZ蛋白相互作用^[30],本研究发现甜樱桃MYC2与JAZ1、JAZ2、JAZ3之间存在互作,而与JAZ4、JAZ5、JAZ6之间不存在相互作用,因此表明*PavMYC2*和JAZs在甜樱桃花芽中共同响应温度胁迫并协同调控开花。

*MYC2*基因在调控植物抵御高低温胁迫和开花过程中起着至关重要的作用,随着研究进一步深入,*PavMYC2*基因调控机制将逐渐明确,有助于阐明甜樱桃在不同温度胁迫下的生长发育机制,进一步提高其产量和品质。

4 结 论

笔者在研究中成功克隆*PavMYC2*基因,并且分别从生物信息和分子层面分析其结构,验证其功能。该基因在夏秋季花芽中高表达,随后逐渐下降,在冬季维持一定的表达水平,春季开花时最低。同时,*PavMYC2*与*PavJAZ1/2/3*互作,协同响应高低温胁迫。该研究为进一步探究甜樱桃花芽中MYC2在响应温度胁迫和调控开花进程中的作用奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] GAO L, MAZZA G. Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(2):343-346.
- [2] QUERO-GARCÍA J, IEZZONI A, PULAWSKA J, LANG G. 樱桃:科学与生产[M]. 张才喜. 译. 上海:上海交通大学出版社, 2021: 576-588.
- [3] QUERO-GARCÍA J, IEZZONI A, PULAWSKA J, LANG G. Cherries: Botany, production and uses[M]. ZHANG Caixi. Trans. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University Press, 2021: 576-588.
- [4] XIE Yuling. 高温胁迫对植物生理影响的研究进展[J]. 吉林农业, 2019(8):107-108.
- [5] WANG J Y, LIU J X, JIU S T, LI Y T, MATTHEW W, SHE W J, WANG L, MA C, XU W P, WANG S P, ZHANG C X. The MADS-box genes PaMADS3/4/5 co-regulate multi-pistil formation induced by high temperature in *Prunus avium* L. [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 256: 108593.
- [6] LIU J X, WANG J Y, SHE W J, WANG L, LUO M, CHEN Y J, LI Y T, WANG S P, ZHANG C X. MADS-Box genes are involved in cultivar- and temperature- dependent formation of multi-pistil and polycarpy in *Prunus avium* L.[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2019, 38(3): 1017-1027.
- [7] CLARKE S M, CRISTESCU S M, MIERSCH O, HARREN F J, WASTERNACK C, MUR L A. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*[J].

- New Phytologist, 2009, 182(1):175-187.
- [7] LEE T M, LUR H S, CHU C. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: II. Modulation of free polyamine levels[J]. Plant Science, 1997, 126(1):1-10.
- [8] HU Y R, JIANG L Q, WANG F, YU D Q. Jasmonate regulates the inducer of CBF expression- C- repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2013, 25(8):2907-2924.
- [9] WASTERNACK C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development[J]. Annals of Botany, 2007, 100(4):681-697.
- [10] CHINI A, FONSECA S, FERNÁNDEZ G, ADIE B, CHICO J M, LORENZO O, GARCÍA-CASADO G, LÓPEZ-VIDRIERO I, LOZANO F M, PONCE M R, MICOL J L, SOLANO R. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling[J]. Nature, 2007, 448(7154):666-671.
- [11] SHEARD L B, TAN X, MAO H B, WITHERS J, BEN-NISSAN G, HINDS T R, KOBAYASHI Y, HSU F, SHARON M, BROWSE J, HE S Y, RIZO J, HOWE G A, ZHENG N. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor[J]. Nature, 2010, 468(7322):400-405.
- [12] LIU J X, WANG J Y, SHE W J, WANG L, LUO M, CHEN Y J, LI Y T, WANG S P, ZHANG C X. MADS-box genes are involved in cultivar- and temperature- dependent formation of multi-pistil and polycarpy in *Prunus avium* L. [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2019, 38(3):1017-1027.
- [13] 李罡,李文龙,许雪梅,李成浩. MYC2 转录因子参与植物发育调控的研究进展[J]. 植物生理学报,2019,55(2):125-132.
LI Gang, LI Wenlong, XU Xuemei, LI Chenghao. Research progress of MYC2 transcription factors participating in plant development and regulation[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55 (2): 125-132.
- [14] 沈乾,陆续,张凌,高丽娣,唐克轩. 植物中 MYC2 转录因子功能研究进展[J]. 上海交通大学学报,2012,30(6):51-56.
SHEN Qian, LU Xu, ZHANG Ling, GAO Erdi, TANG Kexuan. Advances in the studies of MYC2 transcription factor in plants[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University, 2012, 30(6): 51-56.
- [15] CARRETERO P L, GALSTYAN A, ROIG V I, MARTÍNEZ-GARCÍA J F, BILBAO-CASTRO J R, ROBERTSON D L. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3):1398-1412.
- [16] 陈培琴,郁松林,詹妍妮,康喜亮. 茉莉酸对葡萄幼苗耐热性的影响[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2006,24(1):87-91.
CHEN Peiqin, YU Songlin, ZHAN Yanni, KANG Xiliang. Effect of jasmonic acid on thermotolerance of grape seedlings[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2006, 24(1):87-91.
- [17] 曹冬梅,王云山,康黎芳,张超,刘琛彬. 高温对红掌幼苗叶片茉莉酸浓度及抗氧化系统的影响[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(5):102-104.
CAO Dongmei, WANG Yunshan, KANG Lifang, ZHANG Chao, LIU Chenbin. Effect of high temperature on jasmonic acid (JA) concentration and antioxidation of *Anthurium andraeanum* seedling leaf[J]. Chinese Journal of Ecological Agriculture, 2007, 15(5):102-104.
- [18] 丁永强. 茉莉酸和光照调控烟草叶片黄化的作用机制分析[D]. 重庆:西南大学,2017.
DING Yongqiang. Regulation of leaf chlorosis by jasmonate and light signals in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.
- [19] YANG L M, LI J Y, JI J H, LI P, YU L L, ABD-ALLAH E F, LUO Y M, HU L W, HU X Y. High temperature induces expression of tobacco transcription factor NtMYC2a to regulate nicotine and JA biosynthesis[J]. Frontiers in Physiology, 2016, 7:465.
- [20] ZHAO M L, WANG J N, SHAN W, FAN J G, KUANG J F, WU K Q, LI X P, CHEN W X, HE F Y, CHEN J Y, LU W J. Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MaICE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit[J]. Plant Cell & Environment, 2013, 36(1):30-51.
- [21] 赵虎. MeJA 对冬小麦抗寒生理及寒胁迫下 *TaCOII/TaMYC2* 基因表达量的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2018.
ZHAO Hu. Effect of MeJA on cold-resistance and cold stress of *TaCoII/TaMYC2* gene in winter wheat[D]. Haerbin : Northeast Agricultural University, 2018.
- [22] LEE J H, LEE J S, AHN J H. Ambient temperature signaling in plants: An emerging field in the regulation of flowering time[J]. Journal of Plant Biology, 2008, 51:321-326.
- [23] SANCHEZ S E, CAGNOLA J I, CREPY M, YANOVSKY M J, CASAL J J. Balancing forces in the photoperiodic control of flowering[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2011, 10(4):451-460.
- [24] ÍÑIGO S, ALVAREZ M J, STRASSER B, CALIFANO A, CERDÁN P D. PFT1, the MED25 subunit of the plant mediator complex, promotes flowering through CONSTANS dependent and independent mechanisms in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2012, 69(4):601-612.
- [25] FOREMAN J, JOHANSSON H, HORNITSCHEK P, JOSSE E M, FANKHAUSER C, HALLIDAY K J. Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures[J]. The Plant Journal, 2011, 65(3):441-452.
- [26] WANG H P, LI Y, PAN J J, LOU D J, HU Y R, YU D Q. The bHLH transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 are required for Jasmonate-Mediated inhibition of flowering in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2017, 10(11):1461-1464.
- [27] ZHAI Q Z, ZHANG X, WU F M, FENG H L, DENG L, XU L, ZHANG M, WANG Q M, LI C Y. Transcriptional mechanism of jasmonate receptor COI1-Mediated delay of flowering time in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2015, 27(10):2814-2828.
- [28] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, NIU Y J, MANDAKAR A, LIU G H, NOMURA K, HE S Y, HOWE G A, BROWSE J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signaling[J]. Nature, 2007, 448(7154):661-665.
- [29] WANG Y C, XU H F, LIU W J, WANG N, QU C Z, JIANG S H, FANG H C, ZHANG Z Y, CHEN X S. Methyl jasmonate enhances apple cold tolerance through the JAZ-MYC2 pathway[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2019, 136: 75-84.
- [30] FERNÁNDEZ-CALVO P, CHINI A, FERNÁNDEZ-BARBERO G, CHICO J M, GIMÉNEZ-IBÁÑEZ S, GEERINCK J, EECKHOUT D, SCHWEIZER F, GODOY M, FRANCO-ZORRILLA J M, PAUWELS L, WITTERS E, PUGA M I, PAZARES J, GOOSSENS A, REYMOND P, JAEGER G D, SOLANO R. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses[J]. The Plant Cell, 2011, 23(2):701-715.