果 树 学 报 2023,40(7):1294-1311
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20220561

欧洲葡萄*VvJAZ9*基因互作蛋白的筛选与验证

刘德帅,冯 美,樊姗姗,孙雨桐,迟敬楠,姚文孔*

(宁夏大学农学院·宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室,银川 750021)

摘 要:【目的】探究葡萄*JAZ*家族基因特点及在低温胁迫下的表达情况,以期筛选出与低温胁迫相关的家族成员,并进一步筛选其互作蛋白,为后续葡萄抗寒机制研究提供理论依据。**【方法】**以拟南芥和葡萄基因组数据为基础,获得葡萄*JAZ*家族成员基因并进行同源克隆、染色体定位、理化性质以及蛋白家族聚类等分析,利用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)技术分析*VvJAZ*家族成员基因在低温胁迫下的表达情况,应用酵母双杂交技术进行互作蛋白筛选和验证,并通过双分子荧光互补试验验证候选互作蛋白与VvJAZ9蛋白的互作关系。**【结果】**葡萄中有11个*JAZ*家族基因,随机分布于7条染色体上,都具有JAZ家族蛋白中特有且高度保守的TIFY和Jas结构域,均属于碱性不稳定亲水蛋白;聚类分析表明,葡萄JAZ家族蛋白可分为3个亚族,其中VvJAZ9与拟南芥AtJAZ1和AtJAZ2的亲缘关系最近,VvJAZ1与VvJAZ11、VvJAZ5与VvJAZ6同源关系最近。qRT-PCR结果表明,*VvJAZ9*是葡萄*JAZ*家族成员基因中受低温诱导表达最为明显的1个基因。通过酵母双杂交试验筛选获得26个可能与VvJAZ9存在互作关系的候选蛋白;通过qRT-PCR分析候选蛋白的相关基因在低温胁迫下的表达模式,结果表明*HAP5A*基因受低温诱导表达趋势与筛选出的*VvJAZ9*基因类似,推测HAP5A可能是JAZ9候选互作蛋白中响应低温最为显著的1个蛋白;通过同源克隆获得了*VvHAP5A*基因序列,全长636 bp,编码211个氨基酸,进一步分析发现该基因是NF-YC类型的转录因子,通过酵母双杂交和双分子荧光互补试验也证实了JAZ9与HAP5A蛋白全长有互作关系。**【结论】**鉴定并克隆到了葡萄的11个*VvJAZs*基因,*VvJAZ9*和*VvHAP5A*基因均响应葡萄低温诱导表达,并且二者还具有蛋白互作关系,可为进一步研究葡萄*JAZ*基因参与低温胁迫的机制提供参考。

关键词:欧洲葡萄;*JAZ*基因家族;蛋白互作;低温胁迫;表达分析

中图分类号:S663.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2023)07-1294-18

Screening and verification of *JAZ9* gene interacting proteins in *Vitis vinifera*

LIU Deshuai, FENG Mei, FAN Shanshan, SUN Yutong, CHI Jingnan, YAO Wenkong*

(College of Agriculture, Ningxia University/Ningxia Key Laboratory of Modern Molecular Breeding of Dominant and Characteristic Crops, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

Abstract:【Objective】The aims of this experiment were to investigate the characteristics of grapevine *JAZs* gene family and its expression pattern in response to low temperature stress, to screen out the JAZs family members which related to low temperature stress, to screen the candidate substrates of the low temperature-induced JAZ proteins by the yeast two-hybrid assay, and to provide a theoretical basis for the study on cold resistance mechanism in grapevines.【Methods】Based on the genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* and grapevine, the grapevine *JAZs* gene family members were obtained and analyzed by homologous cloning, and their chromosomal localization, physicochemical properties and protein family clustering were also investigated. We used the qRT-PCR experiment to analyze the expression of the *JAZs* gene family members under low temperature treatment conditions, and the yeast two-hybrid was used to screen the candidate substrates of low temperature-induced JAZ protein, and the yeast two-hybrid assay and bimolecular fluorescence complementation assay were used to verify the in-

收稿日期:2022-10-13 **接受日期:**2023-02-14

基金项目:国家自然科学地区科学基金项目(31960586);宁夏回族自治区重点研发项目(2018BEB04004);宁夏自然科学基金(2019AAC03005)

作者简介:刘德帅,男,在读硕士研究生,主要从事果树学研究。Tel:18709511745,E-mail:lds201220@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:15121817013,E-mail:yaowenkong@163.com

teractions between the candidate protein and the target JAZ protein.【Results】Eleven *JAZs* gene family members were cloned by homologous sequences in grapevine. These genes were randomly distributed on seven chromosomes, all of which have TIFY and Jas structural domains that are unique and strongly conserved in JAZs family proteins, and all of them belong to basic hydrophilic proteins. Cluster analysis showed that grapevine JAZs family proteins can be divided into three subfamilies. In subgroup Ⅰ, VvJAZ4 and VvJAZ9 are closest to AtJAZ1 and AtJAZ2 in *Arabidopsis*. In subgroup Ⅱ, VvJAZ1 and VvJAZ11 are closest to AtJAZ9 in *Arabidopsis*. In subgroup Ⅲ, VvJAZ3, VvJAZ5, VvJAZ6, VvJAZ7 and VvJAZ8 are most closely related to AtJAZ7 and AtJAZ8 in *Arabidopsis*. The following qRT-PCR results showed that among the *JAZs* gene family members, the transcripts of *VvJAZ9* were significantly induced by low temperature, with the lowest level at 0 h and the highest level at 24 h. The expression of *VvJAZ2* and *VvJAZ10* genes showed an increasing trend at first, followed by a decreasing expression, and then gradually increasing again. The expression of *VvJAZ3*, *VvJAZ5/6* and *VvJAZ8* was at a low level before 12 h and peaked at 24 h. The expression of *VvJAZ1* showed a decreasing trend firstly, and then showed an increasing expression pattern, while the expression of *VvJAZ11* showed a decreasing expression trend in response to low temperature treatment, with the lowest expression level at 24 h. According to the qRT-PCR assay, we found that *VvJAZ9* was one of the most significantly low temperature-induced gene among the grapevine *JAZs* gene family members. By the yeast two-hybrid assay, we obtained 26 candidate proteins to be the candidate substrates of the VvJAZ9 protein, including bZIP, HAP5A, CONSTANS-LIKE 2, STOP1, CSN5B, GAI1, NINJA and so on. Based on the conserved structural domains of 26 VvJAZ9 candidate reciprocal proteins, the homologous sequences of some proteins were obtained, and the mRNA sequences corresponding to the related genes were obtained by the blast analysis in the NCBI database. The qRT-PCR primers for these candidate protein-related genes were designed by Primer 6.0 software. The results indicated that the *bZIP* gene showed a rising trend at first, and then showed a decreasing expression trend after treatment with low temperature, and the maximum level was presented at 3 h. The transcripts of *CONSTANS-LIKE 2*, *STOP1* and *GAI2* showed a down regulation toward at first, and then presented the increasing expression trend, and the lowest expression point was observed at 6 h after cold treatment. The expression of *CSN5B* showed a double-peaked trend, and the maximum expressions were at 6 h and 24 h, respectively. The expression of *NINJA* showed a gradually decreasing trend. The transcripts of *HAP5B* and *GAI1* increased at first and then decreased, and both of them reached to the maximum expression at 3 h. However, the expression level of *HAP5A* showed a gradually increasing expression trend, which was similar to the low temperature-induced expression trend of *VvJAZ9* we screened. By the qRT-PCR analysis of the candidate genes, we considered that the expression of *HAP5A* gene was similar to the *VvJAZ9* gene in terms of low temperature. Therefore, the *HAP5A* might be one of the most significant expression of the JAZ9 candidate interacting protein among the JAZ9 candidate substrates in response to low temperature. Furthermore, *VvHAP5A* was cloned by homologous sequences, and its ORF includes 636 nucleotides, encoding 211 amino acids. Further analysis revealed that the *VvHAP5A* gene is a NF-YC type transcription factor gene, and the interacting relationship between JAZ9 and the full length of HAP5A protein was also confirmed by the yeast two-hybrid and bimolecular BiFC experiments.【Conclusion】The 11 *VvJAZs* genes from grapes were identified and cloned, and both *VvJAZ9* and *VvHAP5A* responded to low temperature in grapevines, and they also had protein interaction relationship. These results can provide reference for further study on the mechanism of grape *JAZ* genes involved in low temperature stress.

Key words: *Vitis vinifera* L.; *JAZ* gene family; Protein interaction; Low temperature stress; Expression analysis

葡萄（*Vitis* spp.）为葡萄科（Vitaceae）葡萄属（*Vitis* L.）的多年生落叶藤本植物，是世界上广泛栽培的经济果树之一[1]。近年来，我国葡萄优质高效标准化栽培模式及管理技术发展迅猛，栽培面积、产量均居世界前列，葡萄产业已经成为我国果树产业的重要组成部分[2-3]。目前，我国栽培的葡萄多数为欧洲葡萄（*V. vinifera* L.）品种，具有品质优良但抗寒性差的特点，在越冬和“倒春寒”侵袭过程中，常出现葡萄枝蔓冻伤、花芽冻干、果实冻落，甚至树体死亡等现象，严重影响了葡萄产量、经济效益和产业发展[2,4]。为防止冻害，我国北方葡萄产区多采用葡萄树体埋土的方式，这既增加成本，又对树体产生伤害，影响产量，还不利于环境保护[5-6]。因此，挖掘葡萄中与抗寒相关的基因并研究其功能和作用机制，对解决葡萄冻害问题具有重要的理论意义和实际应用价值。

植物激素在植物生长发育和抵抗逆境胁迫中都有不可或缺的作用。茉莉酸（jasmonic acid，JA）及其衍生物茉莉酸甲酯（methyl jasmonate，MeJA）是主要的茉莉酸类化合物（JAs）[7]。JAs作为一种广泛存在于植物中的内源生长调节物质和信号分子，在调控植物生长发育、次生代谢以及生物和非生物胁迫的防御反应中发挥着重要作用[8-10]。研究发现，在低温胁迫条件下植物内源JAs含量会增加，而施用外源JAs则会通过提高抗氧化酶活性、增强抗氧化剂和防御化合物的合成、促进热激蛋白的激活和诱导冷响应基因的表达形式来增强植物的抗寒性，包括番茄（*Solanum lycopersicum*）[11]、葡萄（*V. vinifera*）[12]、香蕉（*Musa paradisiaca*）[13]等。在正常条件下，JA信号通路中的抑制因子JAZ蛋白（jasmonate ZIM-domain）通过阻遏ICE1蛋白（inducer of CBF expression）、MYC2（myelocytomatosis proteins）的激活，来抑制下游冷响应基因的表达；植物受到冷胁迫时内源JAs含量增加，JA活性因子JA-Ile（jasmonic acid-isoleucine）大量积累，促使JAZ蛋白与SCF^{COI1}（Skp1-Cul1-F-box protein coronatine insensitive 1）的结合使得JAZ蛋白泛素化后被26S蛋白酶降解，解除对ICE1、MYC2的阻遏，激活下游冷响应基因*CBF*（C-repeat binding factor）、*DREB*（dehydration responsive element binding factor）和*ICE41*的表达[14-15]。

JAZ蛋白是植物中特有的锌指蛋白，定位于细胞核中，属于TIFY蛋白家族，由ZIM（zinc-finger protein expressed in inflorescence meristem）、Jas（jasmonates）和NT（N terminal domain）3个结构域组成[16-17]。ZIM和Jas是JAZ蛋白主要含有的2个特定保守区，位于N端的ZIM（又称TIFY）结构域，由包含1个TIFY基序（TIF[F/Y]XG）在内的28个氨基酸组成，该结构域介导JAZ蛋白同源或异源二聚体的形成以及与NINJA（novel interactor of JAZ）等抑制子的互作[18]；位于C端的Jas（又称CCT_2）结构域，可以与MYC、ICE蛋白的ACT和TAD区域有着广泛互作，也是JA-Ile（jasmonic acid-isoleucine）与COI1（coronatine insensitive 1）相互作用的关键[15,19]；NT是JAZ蛋白N端的1个弱保守区，该结构域可以与DELLA蛋白互作抑制JA信号[20]。此外，葡萄中有11个JAZs蛋白，但目前行使的功能还不明了[21]。将毛葡萄（*V. quinquangularis*）*VqJAZ4*、*VqJAZ7*基因在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中异源表达可以减轻白粉病发病症状，增强对白粉病的抗性，但也提高了对灰霉病菌的易感性[22-23]。本研究克隆欧洲葡萄霞多丽中*JAZ*家族基因，获得其开放阅读框（open reading frame，ORF）序列，并进行了序列分析，同时对*JAZ*家族成员基因进行实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）分析，获得葡萄在低温胁迫反应中差异表达的*JAZs*基因，然后将差异表达的*JAZs*基因利用酵母双杂交技术筛选互作蛋白并进行验证，为葡萄抗寒控机制的研究和抗寒葡萄品种的选育提供理论基础与参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

试验于2022年3月—9月在宁夏大学农学院宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室进行。试验材料为2年生欧洲葡萄霞多丽（*V. vinifera* L.‘Chardonnay’）盆栽扦插苗，于植物培养间（25 ℃，16 h光照，8 h黑暗）进行培养。选取生长状况良好，长势一致、无病虫害的盆栽葡萄苗为试验植株，试验植株为同一批扦插育苗且萌芽后25 d的葡萄苗，将选取的试验植株平均分为2组，一组放置于低温培养箱内（立德泰勃，上海）分别进行4 ℃低温处理，另一组正常培养为对照（CK），光照条件一致，每个处理设置3次生物学重复。分别在0、3、6、12、24 h收集2组供试葡萄苗从顶端往下数的第3和第4枚展开的叶片为试验样品，立即放入液氮中冷冻，然后置于−80 ℃冰箱保存，用于后续试验（图1）。

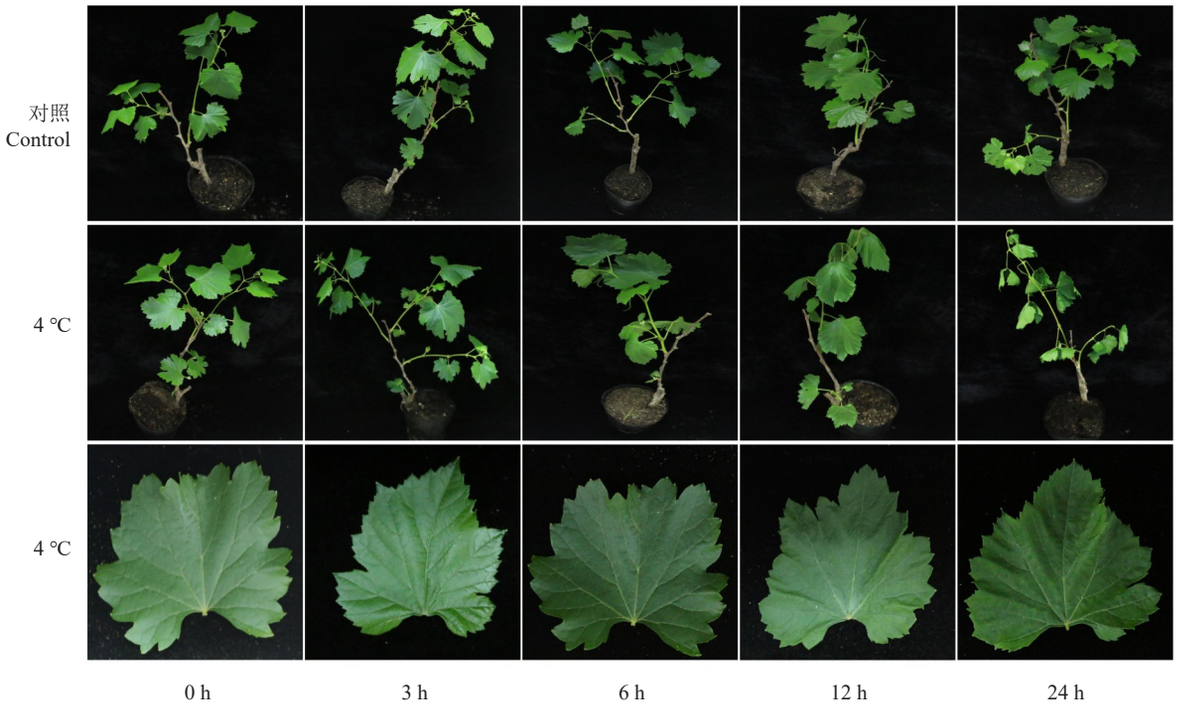


图1　葡萄4 ℃低温处理与样品采集

Fig. 1　Grape 4 ℃ low temperature treatment and sample collection

1.2　葡萄*JAZ*家族基因的鉴定

从TAIR数据库（https://www.arabidopsis.org/）中获取拟南芥JAZ家族蛋白序列信息作为搜寻葡萄同源基因的探针序列。利用Pfam数据库（http://pfam.xfam.org/）下载TIFY（PF06200）和CCT_2（PF09425）结构域的隐马尔可夫模型文件，使用HMMER 3.0软件筛选出葡萄全基因组蛋白序列中含有这2个结构域的候选蛋白。利用NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）、Pfam数据库和SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）进一步验证候选VvJAZ蛋白的保守结构域，以确定葡萄*JAZ*家族成员基因。在NCBI网站和葡萄基因组网站（http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/）中获取*JAZ*家族成员基因的编码序列（coding sequence，CDS）、基因组序列、外显子数量以及在染色体上的位置信息。采用在线软件ExPASy ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/）分析*VvJAZs*基因编码的蛋白的理化性质，采用MEGA 7.0软件中的邻接法（neighbor-joining，NJ）构建蛋白系统进化树（bootstrap设为1000）。

1.3　葡萄*JAZ*家族基因CDS的克隆

使用Plant RNA kit试剂盒（Omega，美国）分别提取4 ℃低温处理后0、3、6、12和24 h叶片总RNA，然后按照PrimeScript™ Ⅱ Strand cDNA Synthesis Kit剂盒试（TaKaRa，日本）说明书合成第一链cDNA。以混合cDNA为模板，使用基因特异性引物对葡萄*JAZ*家族成员基因的CDS序列进行克隆。运用在线网站Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator（http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html）设计同源克隆所用的全部引物（表1）。参考俞沁含等[24]的反应体系与程序进行PCR反应。PCR产物经过凝胶检测、胶回收后获得相应的目的片段，经连接反应与pMD19-T载体相连接，将重组产物转化大肠杆菌（*Escherichia coli*）Top10感受态细胞，经阳性克隆筛选后，送单克隆至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序确认，获得含有目的基因的重组载体。

1.4　诱饵表达载体的构建及自激活检测

利用Primer Premier 6.0软件设计*VvJAZ9*基因的全长特异引物（表1），以欧洲葡萄霞多丽叶片的cDNA为模板进行PCR反应，胶回收目的片段。同时利用*Eco*RⅠ和*Bam*HⅠ双酶切诱饵载体pGBKT7后，将回收的PCR产物与酶切后的线性载体进行同源重组，随后转化至*E. coli* DH5*α*感受态细胞，经阳性克隆筛选后，送单克隆至公司测序，测序准确后获得重组质粒pGBKT7-*VvJAZ9*。以pGBKT7-p53+

pGADT7-T为阳性对照，pGBKT7-Lam+pGADT7-T为阴性对照，pGBKT7为空载对照，pGBKT7-*VvJAZ9*+pGADT7为自激活检测组，采用PEG/LiAc法将其共转化至酵母Y2H Gold感受态细胞中，涂布于SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal（DDO/X）培养基上，再将自激活检测组另涂布于SD/-Leu/-Trp/-His/X-α-Gal（TDO/X）和SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA（QDO/X/A）培养基上，在恒温培养箱中30 ℃倒置培养3~4 d，观察菌落的生长和颜色变化，确定诱饵蛋白是否具有自激活活性[25]。

1.5 酵母双杂交cDNA文库的构建与VvJAZ9互作蛋白的筛选

运用CloneMiner™ Ⅱ cDNA Library Construction Kit试剂盒（Invitrogen，美国）构建酵母双杂交cDNA文库，参考韩雪等[25]的方法进行，具体操作步骤如下，选取4 ℃低温处理0、3、6、12和24 h的霞多丽葡萄植株叶片，分别提取总RNA，各取5 μg等质量均匀混合，根据Oligotex mRNA Midi Kit试剂盒（Qiagen，德国）说明书对mRNA进行分离纯化，参考CloneMiner™ Ⅱ cDNA Library Construction Kit试剂盒说明书将分离纯化后的mRNA反转录合成双链cDNA。将cDNA与三框attB1重组接头连接（3种接头分别各连接1份）后，混匀加入TEN Buffer清洗过的分级柱，对cDNA分级分离及收集。将收集的cDNA与pDONR222载体进行BP重组反应，反应产物通过电转化至*E. coli* DH10B感受态细胞，加入4 mL SOC培养基，37 ℃，225 r·min^{-1}培养1 h后，获得初级文库菌液，并进行库容量、重组率和插入片段长度的鉴定。从检验合格的初级文库（Uncut型）中抽提质粒，将得到的质粒质量浓度调整到300 mg·L^{-1}后与pGADT7-DEST进行LR重组反应，产物经电转化至*E. coli* DH10B，37 ℃，225 r·min^{-1}培养1 h后得到次级文库菌液，并进行文库质量鉴定，将次级文库菌液涂布在氨苄平板培养基上，37 ℃过夜培养后，用液体培养基洗脱后抽提质粒，用于后续酵母双杂交共转化。

将10 μg pGADT7文库质粒与5 μg pGBKT7-*VvJAZ9*诱饵质粒共转化Y2H Gold感受态细胞。先涂布在SD/-Leu/-Trp/-His/X-α-Gal（TDO/X）固体培养基上，30 ℃倒置培养3~5 d，待单克隆长至1~2 mm时，初筛完成。再挑取TDO/X平板上的蓝色阳性克隆转移到SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA（QDO/X/A）固体培养基上进行复筛，然后置于恒温培养箱中30 ℃倒置培养3~4 d后，挑取阳性克隆并从中提取酵母质粒。然后将＞500 bp的PCR产物送至公司进行测序，在NCBI Blastx（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast）进行比对分析候选互作蛋白。挑选含正确ORF的候选互作蛋白，根据其序列设计引物（表1），克隆至pGADT7载体上，并与pGBKT7-*VvJAZ9*共转化Y2H Gold感受态细胞中进行回转验证[26]。

1.6 双分子荧光互补试验验证候选蛋白互作关系

设计*VvJAZ9*和*VvHAP5A*基因的ORF中不含终止密码子的同源重组引物（表1），通过双分子荧光互补试验（bimolecular fluorescent complimentary，BiFC），将其构建至BiFC验证载体pB221-cYFP、pB221-nYFP，形成pB221-*JAZ9*-cYFP和pB221-*HAP5A*-nYFP。然后将构建好的pB221-*JAZ9*-cYFP和pB221-*HAP5A*-nYFP及对照载体分别大提质粒之后将所获得的质粒通过乙醇沉淀法浓缩至1500~2000 mg·L^{-1}。采用酶解法分离拟南芥叶肉组织原生质体，通过PEG（polyethylene glycol）介导法分别将质粒两两组合共转至拟南芥原生质体，22 ℃弱光孵育18 h进行瞬时表达，使用激光共聚焦显微镜（Leica TCS SP8 X，德国）观察并拍照。

1.7 实时荧光定量PCR

利用qRT-PCR检测低温胁迫下葡萄*JAZ*家族成员基因和与VvJAZ9互作候选蛋白的相关基因的表达情况。qRT-PCR所用引物均使用Primer Premier 6.0软件设计（表1）。使用Plant RNA kit试剂盒（Omega，美国）分别提取对照（CK）和4 ℃低温处理0、3、6、12、24 h的叶片样品总RNA，各取1 μg通过PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒（TaKaRa，日本）将RNA反转录为cDNA，稀释10倍后用于后续的qRT-PCR分析。qRT-PCR反应用SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time)试剂盒（TaKaRa，日本）进行；反应体系为：上下游引物各0.8 μL，模板1 μL，SYBR试剂10 μL，用ddH_2O补齐至20 μL；反应程序为：95 ℃预变性10 min，95 ℃变性15 s，60 ℃退火1 min，72 ℃延伸30 s，循环40次；每次循环第2步进行荧光采集，使用qTOWER 2.0仪器（Analytik Jena，德国）进行qRT-PCR检测，每个样品设置3次生物学重复，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算基因的相对表达量。

表1　引物列表

Table 1　List of primers

引物名称 Primer name	引物序列（5’-3’）Primer sequence (5’-3’)	用途 Purpose
VvJAZ9-F	ATGTCGAGCTCCTCGGATATTGC	基因克隆 Gene cloning
VvJAZ9-R	CTACTTTGGAGATTTGGCAGCCAAG	
pGBKT7-*VvJAZ9*-F	TATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGTCGAGCTCCTCGGATATTGC	酵母双杂 Yeast two-hybrid
pGBKT7-*VvJAZ9*-R	GCCGCTGCAGGTCGACGGATCCCTACTTTGGAGATTTGGCAGCCAAG	
pGADT7-*VvHAP5A*-F	GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGAACAACCAGCAGGCCCAAT	
pGADT7-*VvHAP5A*-R	CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTTATACATACCCTTGGCCATCAAGATTCC	
pBI221-NE-*VvHAP5A*-F	GGCCCAGGCCTACTAGTGGATCCATGGAGAACAACCAGCAGGCCCAAT	BiFC验证 BiFC verification
pBI221-NE-*VvHAP5A*-R	TACCCGGGAGCGGTACCCTCGAGTTATACATACCCTTGGCCATCAAGATTCC	
pBI221-CE-*VvJAZ9*-F	GAGAACACGGGGGACTCTAGAATGTCGAGCTCCTCGGATATTGC	
pBI221-CE-*VvJAZ9*-R	GTACATGGTACCCCGCTCGAGCTTTGGAGATTTGGCAGCCAAG	
VvJAZ1-F	TGGCAGCAGGTGATGGTGTC	表达分析 Expression analysis
VvJAZ1-R	AGACTGAGCAACAGGATGTGAAGA	
VvJAZ2-F	CACTGGCACGAAGGAAGTCATTG	
VvJAZ2-R	GCGTATTGGATGTGAGGTGGATATG	
VvJAZ3-F	AGACGCTATCTCGCCATCTCTG	
VvJAZ3-R	CTTCCATCCTATTCTTCCGCTTCTG	
VvJAZ4-F	GCTCCTCTTGGCTCTGAACTG	
VvJAZ4-R	TGGAGAAGGTCTGGATGGATTGT	
VvJAZ5/6-F	TGATGGAGACGGGAAGAGGAAG	
VvJAZ5/6-R	TGAGGCAGTCGGGGTTCTTGT	
VvJAZ7-F	CTCCACTGCTCACACTTCTTCAAT	
VvJAZ7-R	TGCCGTTGCTGTTGCTCTTG	
VvJAZ8-F	GCCTTCTTCCCTCCACTGCTTA	
VvJAZ8-R	TGCTGCTGCTGCTGCTCTT	
VvJAZ9-F	CGGCTCAACCAGTTGCTTGT	
VvJAZ9-R	GTGCTCTTGCTGTGATCCTATCTT	
VvJAZ10-F	CACCGTCAACAACACTACAATCCTA	
VvJAZ10-R	GAGTAGCCAAGCCACTTATTCCAT	
VvJAZ11-F	CTGCTTCATCTAATGTTGGCTCTCA	
VvJAZ11-R	GGAGGCTCTGGTTGGTTGGTAG	
bZIP-F	ACAGCAGCAGCAGCAACCA	
bZIP-R	GTCACAGCATCAGTGCCAGAAC	
HAP5A-F	GGTCCTACCAACGCCAAGAGAT	
HAP5A-R	GCACATCCTCATCCGCCTTCA	
CONSTANS-LIKE 2-F	CGCTGACATCCACTCCGCTAAT	
CONSTANS-LIKE 2-R	CTGCCTCGTCTTCGTCTTCCTC	
STOP1-F	GAGGAGCCACTTGAAGCACTGT	
STOP1-R	CTGCTACTGCTGCTGCTGACA	
CSN5b-F	GCCTTCGCTTTGCCCGTTGA	
CSN5b-R	GTCCTGCCTGCTTGTTGGTCTG	
NINJA-F	CAACCTCAAGGCTGGCTTCACA	
NINJA-R	GAACCTCCTTTGCGACCTCAGA	
HAP5B-F	AACTGCTCCAATGGTGGCTTCTG	
HAP5B-R	GCTGCTGTTGATGCTGCTGTTG	
GAI2-F	CGTCGTCGTCGTCTTCGTCAT	
GAI2-R	CCTGCGAGTCCACCACTACAAC	
GAI1-F	TCCACACCTGCCTCCAACTGA	
GAI1-R	ACACAGCACATGCCACAAGGA	
VvActin-F	CTATCCTTCGTCTTGACCTTGCTG	
VvActin-R	AGTGGTGAACATGTAACCCCTCTC	

1.8 数据统计与分析

使用Excel 2019整理试验数据，利用IBM SPSS 25.0对试验数据进行统计分析，并采用Student's *t*-test进行显著性分析（$p<0.05$），然后使用Origin Pro 2021作图。试验数据以（平均值±标准差）表示。

2 结果与分析

2.1 葡萄*JAZ*家族成员基因的鉴定与分析

运用生物信息学手段从葡萄基因组中鉴定出11个*JAZ*家族成员基因，根据参考序列在染色体上的分布将所获得的*JAZ*家族基因分别命名为*VvJAZ1*~*VvJAZ11*。由表2可知，这11个*VvJAZs*基因不均匀地分布在7条染色体上，其中1号染色体含有2个*VvJAZs*基因，10号染色体含有4个*VvJAZs*基因，有5个*VvJAZs*基因分别位于4、9、11、12、17号染色体上。这些*VvJAZs*基因CDS长度为297（*VvJAZ3*）~1167（*VvJAZ1*）bp，外显子有2~8个，编码氨基酸序列长度为98（*VvJAZ3*）~388（*VvJAZ1*）aa，分子质量最大为40.31 ku，最小为11.26 ku，等电点在9.19~10.46之间，不稳定系数在46.91~85.17之间。11个VvJAZ蛋白的GRAVY（grand average of hydropathicity）值为均负值，表明葡萄JAZ家族蛋白为碱性不稳定亲水蛋白。

表2 葡萄*JAZ*家族成员的基因信息

Table 2 Basic information of *JAZ* gene family in grape

基因名称 Gene name	基因登录号 GenBank No.	染色体 Chromosome	外显子 Exon	编码区 CDS/bp	氨基酸数 Amino acid number/aa	等电点 pI	分子质量 Molecular mass/ku	不稳定系数 Instability index	亲水性 Hydropathicity
VvJAZ1	XM_002284819.2	Chr1	7	1167	388	9.19	40.31	46.91	−0.226
VvJAZ2	XM_002262714.3	Chr1	6	639	212	9.24	23.75	56.84	−0.467
VvJAZ3	XM_003634778.3	Chr4	2	297	98	9.69	11.26	78.61	−0.777
VvJAZ4	XM_002272327.4	Chr9	5	861	286	9.21	30.66	55.41	−0.707
VvJAZ5	XM_002277733.4	Chr10	3	384	127	9.77	14.73	79.09	−0.913
VvJAZ6	XM_002277769.4	Chr10	3	384	127	9.77	14.72	78.12	−0.926
VvJAZ7	XM_002277916.4	Chr10	2	432	143	10.46	16.10	84.93	−0.785
VvJAZ8	XM_002271161.4	Chr10	3	366	121	9.55	13.74	85.17	−0.560
VvJAZ9	XM_002277121.3	Chr11	5	807	268	9.82	28.57	47.51	−0.404
VvJAZ10	XM_002263220.4	Chr12	6	702	233	9.51	26.31	68.54	−0.735
VvJAZ11	XM_002282652.4	Chr17	8	1137	378	9.24	39.36	47.82	−0.210

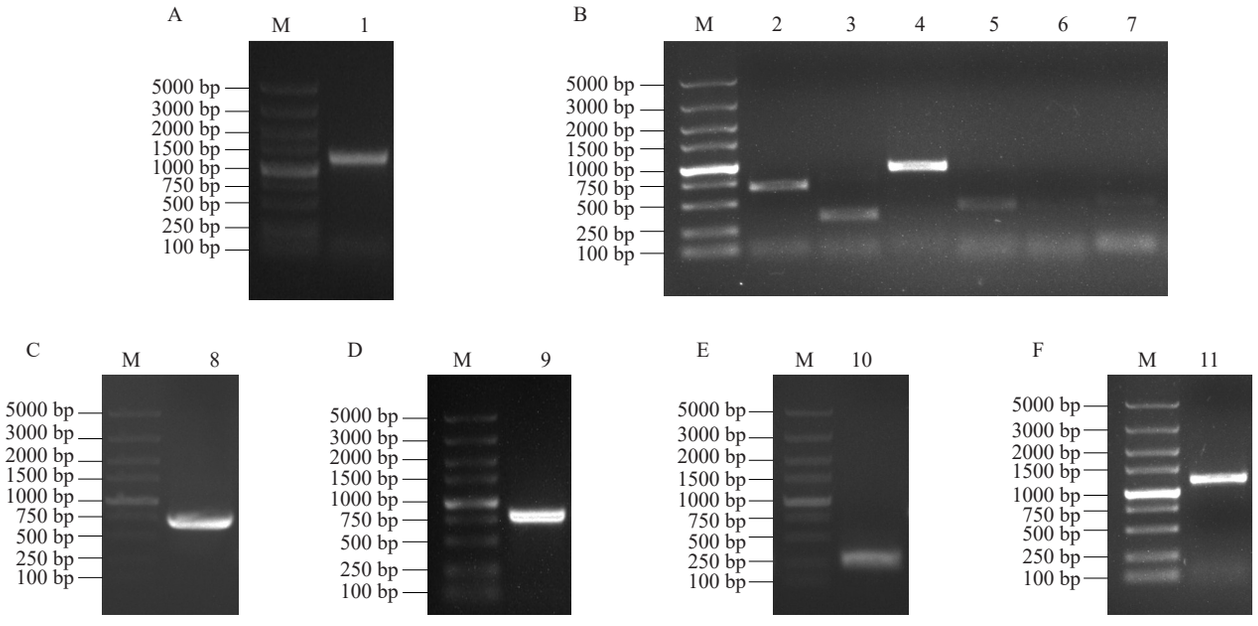
2.2 葡萄*JAZ*家族基因克隆与聚类分析

以4 ℃低温处理后不同时间节点的葡萄叶片的混合cDNA为模板通过同源克隆的方式从欧洲葡萄霞多丽中克隆到11个*JAZ*家族成员基因。结果表明，克隆到葡萄中的*JAZs*基因与所预测的葡萄基因组中ORF长度和所编码的氨基酸序列长度基本一致（图2）。

对获得的葡萄JAZ家族蛋白序列进行多重比对分析，发现11个VvJAZ蛋白序列中都含有TIFY和Jas这2个高度保守的结构域，符合JAZ家族类型特点（图3-A）。葡萄JAZ家族成员的氨基酸序列聚类分析显示，VvJAZ1与VvJAZ11、VvJAZ4与VvJAZ9、VvJAZ5与VvJAZ6的氨基酸相似度最高（图3-B）。从葡萄JAZs蛋白与拟南芥中的JAZ蛋白的聚类结果可以看出（图3-C），葡萄JAZ家族蛋白可分为3个亚族；在亚组Ⅰ中的VvJAZ4、VvJAZ9与拟南芥中AtJAZ1和AtJAZ2的亲缘关系最近；在亚组Ⅱ中的VvJAZ1、VvJAZ11与拟南芥中AtJAZ9的进化距离最近；在亚组Ⅲ中的VvJAZ3、VvJAZ5、VvJAZ6、VvJAZ7、VvJAZ8与拟南芥中AtJAZ7和AtJAZ8的亲缘关系最近；其中，VvJAZ1与VvJAZ11、VvJAZ5与VvJAZ61同源关系最近，推测其在蛋白功能上具有一定的相似性。

2.3 葡萄*JAZ*家族基因在低温胁迫下的表达分析

对所获得的葡萄*JAZ*家族基因的核苷酸序列聚类分析后发现，*VvJAZ5*和*VvJAZ6*的核苷酸相似度达到96.88%，因而在设计qRT-PCR引物时选择*VvJAZ5*与*VvJAZ6*的同源片段区域，命名为*VvJAZ5/6*。qRT-PCR分析结果表明（图4），在欧洲葡萄*JAZs*基因家族中的*VvJAZ9*基因受低温诱导表达最为明



A. *VvJAZ1* 基因克隆；B. *VvJAZ2*、*VvJAZ3*、*VvJAZ4*、*VvJAZ5*、*VvJAZ6*、*VvJAZ7* 基因克隆；C. *VvJAZ8* 基因克隆；D. *VvJAZ9* 基因克隆；E. *VvJAZ10* 基因克隆；F. *VvJAZ11* 基因克隆。M. DL5000 bp DNA Marker；1~11. 目的基因。

A. Cloning of *VvJAZ1* gene; B. Cloning of *VvJAZ2*, *VvJAZ3*, *VvJAZ4*, *VvJAZ5*, *VvJAZ6* and *VvJAZ7* genes; C. Cloning of *VvJAZ8* gene; D. Cloning of *VvJAZ9* gene; E. Cloning of *VvJAZ10* gene; F. Cloning of *VvJAZ11* gene. M. DL5000 bp DNA Marker; 1-11. Target gene.

图 2　葡萄 *JAZ* 家族基因克隆

Fig. 2　Cloning of *JAZ* family genes in grape

显，在 0 h 相对表达量最低，在 24 h 达到最高；*VvJAZ2* 和 *VvJAZ10* 基因均呈现先上升再下降、后期又逐渐上升的表达趋势；*VvJAZ3*、*VvJAZ5/6* 及 *VvJAZ8* 基因在 12 h 以前相对表达量均处于较低水平，但在 24 h 达到顶峰；*VvJAZ1* 基因在受到低温处理后相对表达量呈现出先降低后又逐渐上升的表达模式，而 *VvJAZ11* 基因在受到低温处理后相对表达量呈现逐渐下降的表达趋势，在 24 h 相对表达量最低。这 11 个 *VvJAZs* 基因中仅有 *VvJAZ9* 基因的相对表达量随着低温时间延长而呈现显著上升趋势，是受低温诱导表达显著的基因，推测该基因可能响应低温调控，参与葡萄抵御冷胁迫的应答过程。

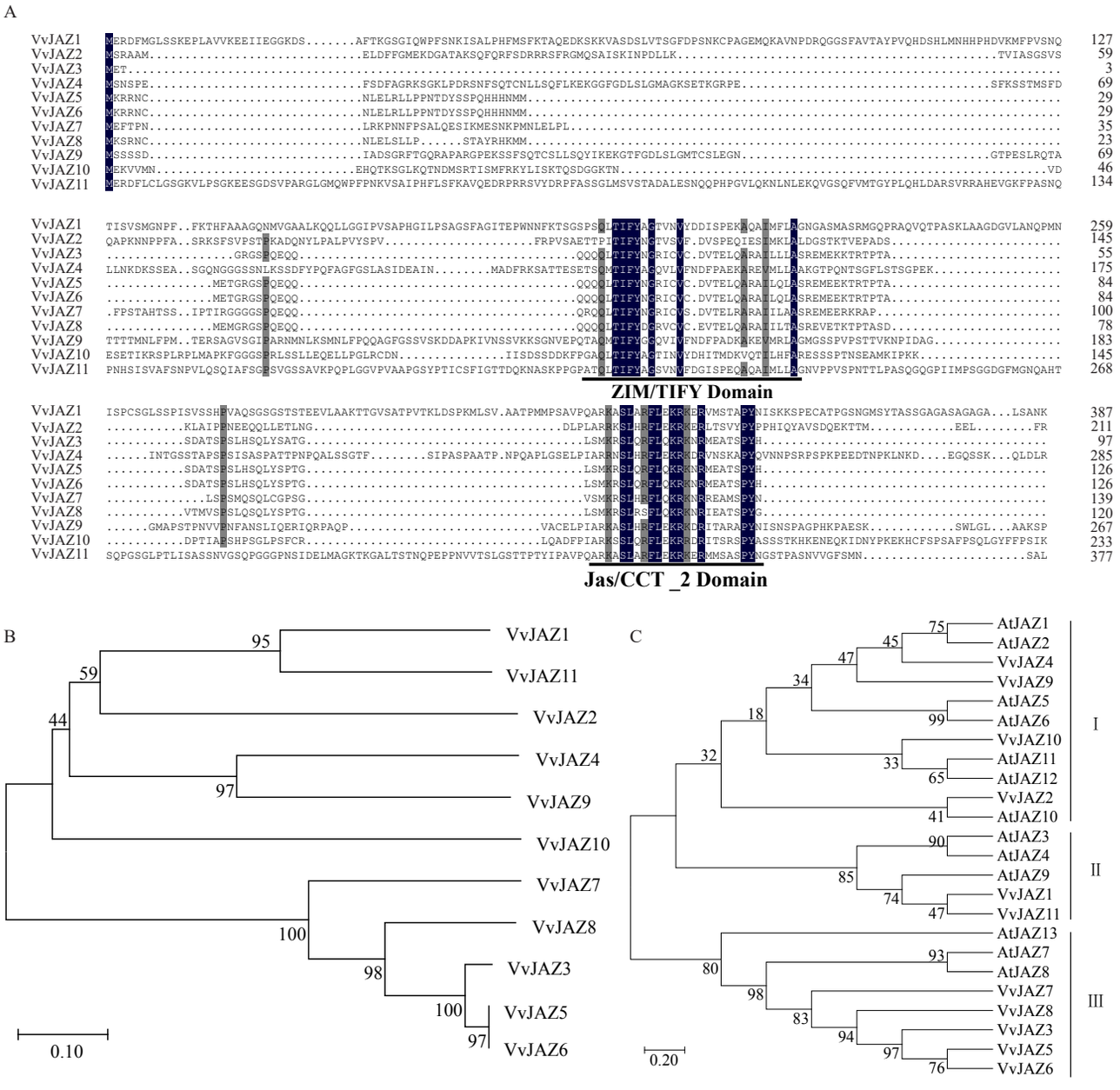
2.4　诱饵载体自激活检测

在筛库之前，需将构建好的 pGBKT7-*VvJAZ9* 诱饵载体进行自激活检测。在 SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal（DDO/X）培养基上阳性对照（pGBKT7- p53 + pGADT7-T）有蓝色酵母菌落生长，而阴性对照（pGBKT7-Lam+pGADT7-T）有菌落生长但未显现蓝色，说明阳性和阴性对照试验成功（图 5）。pGBKT7 空载体和 pGBKT7-*VvJAZ9*+pGADT7 在 SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal 上生长，在 SD/-Leu/-Trp/-His/X-α-Gal（TDO/X）和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA（QDO/X/A）上不生长，说明 pGBKT7-*VvJAZ9* 质粒成功转入酵母菌株中，且无自激活活性，可以用于后续筛选试验（图 6）。

2.5　酵母双杂交筛选 VvJAZ9 互作蛋白

2.5.1　*文库初筛与复筛*　将 pGBKT7-*VvJAZ9* 诱饵质粒和构建的酵母双杂交文库质粒共转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞，转化产物涂布在 SD/-Leu/-Trp/-His/X-α-Gal（TDO/X）平板上培养 3~5 d，初筛共获得 72 个蓝色的酵母克隆（图 7-A~B）。在转化过程中检测转化情况，确定转化效率＞2^{10} cfu·μg^{-1}，总转化子数＞2^{10} cfu。再挑取 TDO/X 筛选平板上的蓝色阳性克隆转移到 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA（QDO/X/A）筛选平板上，共筛选到 50 个蓝色克隆（图 7-C），最终对 50 个克隆全部测序。

2.5.2　*候选互作蛋白的鉴定*　将筛选到的 50 个阳性克隆在四缺培养基上扩大培养后，提取酵母质粒，运用 pGADT7 载体上通用引物对质粒进行 PCR 检测，将所获得的条带中＞500 bp 的 PCR 产物送公司进行测序，测序结果通过 NCBI 数据库中进行 Blastx 比对分析，去除移码的假阳性克隆后，初步获得 26



A. 葡萄 JAZ 家族蛋白的多序列比对，图中点表示序列比对空位，黑线区域表示 TIFY 和 Jas 保守结构域；B. 葡萄 JAZ 家族氨基酸聚类分析；C. 葡萄 JAZs 蛋白与拟南芥 JAZ 家族成员的系统进化分析。

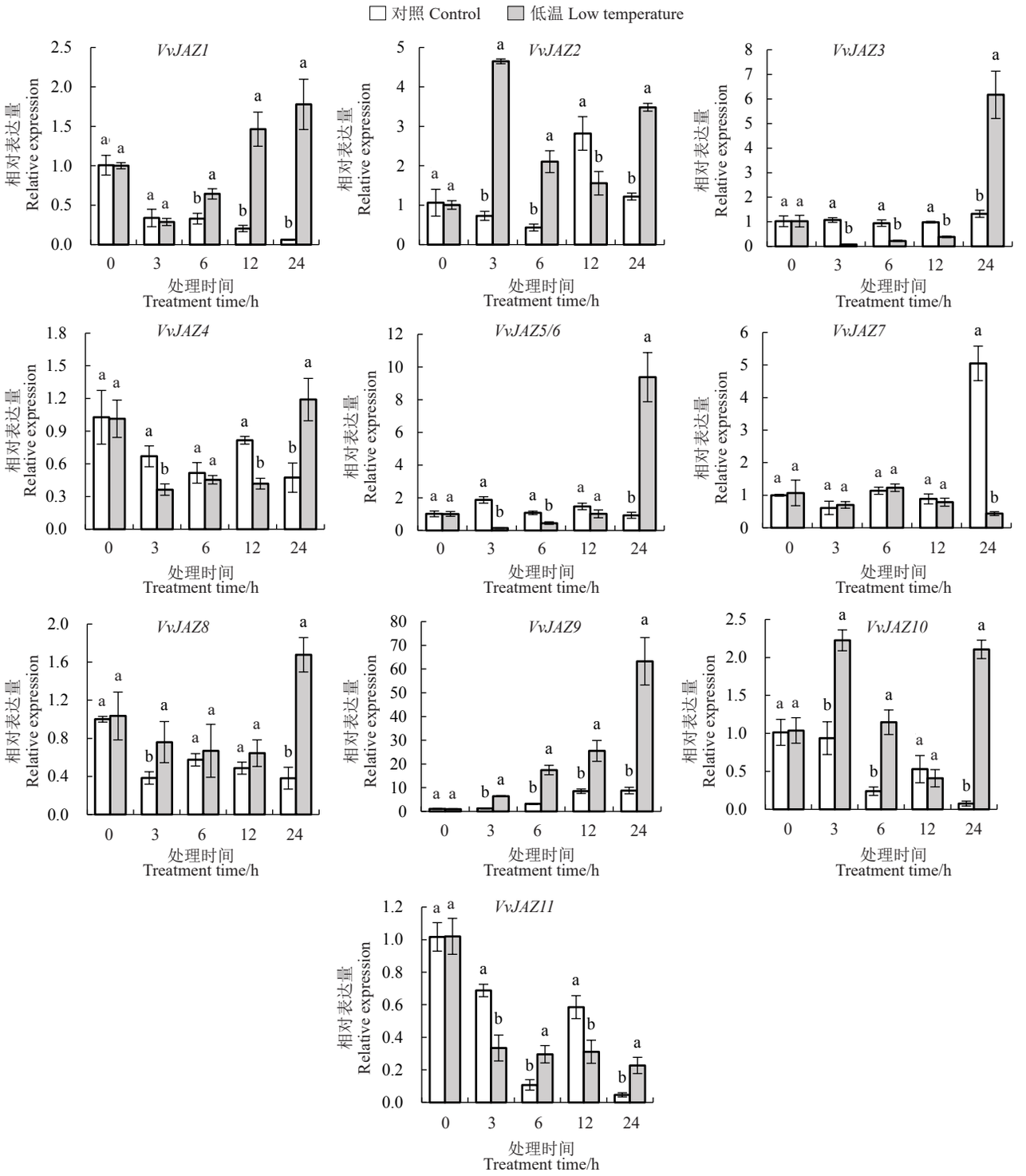
A. Multiple sequence alignment of grape JAZs protein; The dots represent sequence alignment vacancies, and the black line region represent conserved domains of TIFY and Jas; B. Amino acid cluster analysis of JAZe family in grape; C. Phylogenetic analysis of grape JAZs protein and Arabidopsis JAZ family members.

图 3 葡萄 JAZs 蛋白序列比对和聚类分析

Fig. 3 Sequence alignment and cluster analysis of grape JAZs protein

个可能与VvJAZ9互作的候选蛋白，包括核转录因子Y亚基C-9亚型X3、精氨酸脱羧酶、JAZ1蛋白、冠状激素不敏感蛋白、锌指蛋白CONSTANS-like 2、KH结构域蛋白和忍者家族蛋白等（表3）。

2.5.3 VvJAZ9候选互作蛋白的相关基因在低温胁迫下的表达分析 qRT-PCR分析结果如图8所示，在4 ℃低温处理的欧洲葡萄中*bZIP*（XP_002266061.1）基因表现出先上升后下降的表达趋势，且在3 h相对表达量达到最高；*CONSTANS-LIKE 2*（RVX06365.1）、*STOP1*（XP_002267529.1）和*GAI2*（CAN59753.1）呈现出先下降后逐渐上升的表达趋势，均在6 h相对表达量最低；*CSN5B*（XP_002283561.1）则呈现出双峰



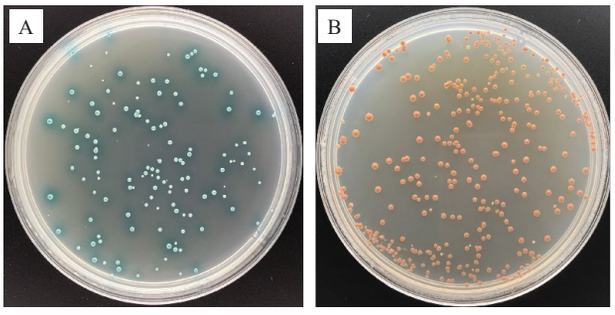
不同小写字母表示在 $p<0.05$ 水平差异显著。下同。

Different lowercase letters indicate significant difference at $p<0.05$ level. The same below.

图 4　*VvJAZ* 家族基因在低温条件下 qRT-PCR 分析

Fig. 4　qRT-PCR analysis of *VvJAZ* family genes under low temperature

的表达趋势，分别在6 h和24 h相对表达量达到最大；*NINJA*（XP_002283979）呈现出逐渐下降的表达趋势；*HAP5B*（XM_002262845.4）和 *GAI1*（XM_002284612.4）表现出先上升后下降的表达趋势，都在3 h相对表达量达到最大；而*HAP5A*（CAN73357.1）则呈现出逐渐上升的表达趋势，这与已筛选出的*VvJAZ9*受低温诱导表达趋势类似。以上结果表明，HAP5A可能是响应低温较为显著的VvJAZ9候选互作

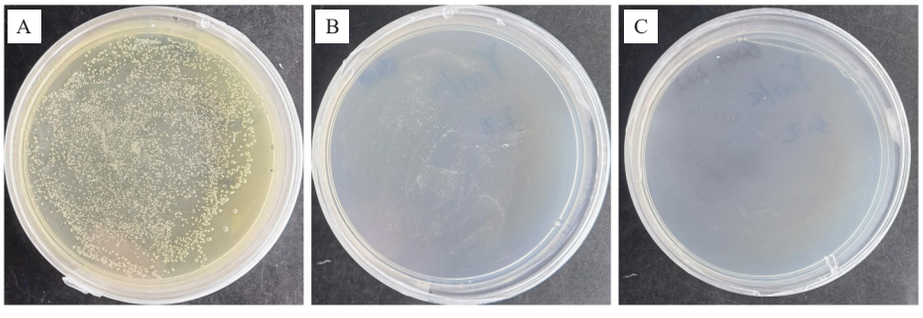


A. 阳性对照（pGBKT7-p53+pGADT7-T）；B. 阴性对照（pGBKT7-Lam+pGADT7-T）；A 和 B 的培养基为 DDO/X。

A. Positive control (pGBKT7-p53+pGADT7-T); B. Negative control (pGBKT7-Lam+pGADT7-T); The medium of A and B is DDO/X.

图 5 酵母双杂交诱饵载体检测阳性对照与阴性对照

Fig. 5 Positive and negative control of yeast two-hybrid bait vector detection

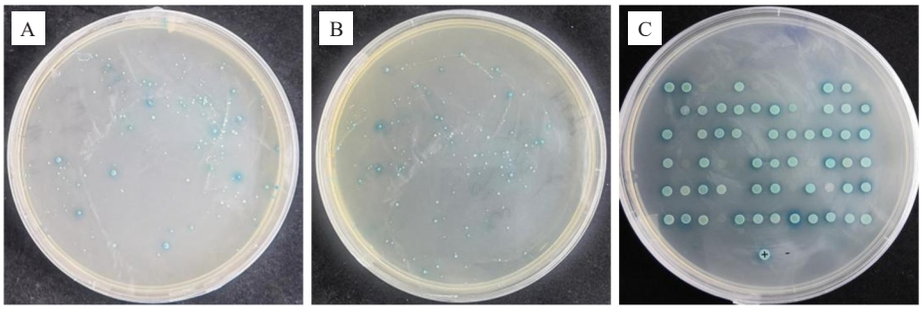


A. DDO/X 培养基；B. TDO/X 培养基；C. QDO/X/A 培养基；图示为 JAZ9 诱饵蛋白自激活检测，A、B 和 C 代表诱饵载体在不同培养基上生长情况。

A. DDO/X medium; B. TDO/X medium; C. QDO/X/A medium; The picture shows is the self-activation detection of JAZ9 bait protein, A, B and C represent the growth of bait vector on different media.

图 6 诱饵蛋白自激活检测

Fig. 6 Self-activation detection of the bait protein



A 和 B 是初筛培养基 TDO/X，C 是复筛培养基 QDO/X/A，“+”和“-”为酵母双杂交阳性对照和阴性对照。

A and B are the primary screening medium TDO/X, C is the secondary screening medium QDO/X/A, “+” and “-” are positive and negative control of yeast two-hybrid.

图 7 初筛与复筛筛选平板上的阳性克隆

Fig. 7 Positive clones on the screening plate of primary and secondary screening

蛋白。

2.5.4 VvJAZ9 与 VvHAP5A 回转验证 为进一步验证VvJAZ9与VvHAP5A蛋白互作关系，从霞多丽葡萄cDNA中同源克隆到*VvHAP5A*的ORF序列，其ORF序列共636 bp，编码211个氨基酸，*VvHAP5A*基因是1个NF-YC类型的转录因子基因。采用同源重组的方法获得pGADT7-*HAP5A*载体，然后将pGADT7-*HAP5A*和pGBKT7-*JAZ9*共转化酵母感受

表 3　VvJAZ9 蛋白酵母双杂交筛选获得的候选互作蛋白

Table 3　Candidate interacting proteins obtained by yeast two-hybrid screening of VvJAZ9

编号 Number	登录号 Accession No.	注释 Annotation
1	XP_003633639.1	核转录因子 Y 亚基 C-9 亚型 X3 Nuclear transcription factor Y subunit C-9 isoform X3 [*V. vinifera*]
2	CAA65585.1	部分精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase, partial [*V. vinifera*]
3	XP_002267588.1	含有 SH3 结构域的蛋白 2 亚型 X1 SH3 domain-containing protein 2 isoform X1 [*V. vinifera*]
4	AEP60132.1	JAZ1 [*V. rupestris*]
5	XP_002270683.1	SNF1 相关蛋白激酶调节亚基 beta-1 SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-1 [*V. vinifera*]
6	RVW44524.1	叶绿素 a-b 结合蛋白 CP29.2，叶绿体 Chlorophyll a-b binding protein CP29.2, chloroplastic [*V. vinifera*]
7	BAF95867.1	假定质体脂相关蛋白，部分 Putative plastid lipid-associated protein, partial [*Vitis* hybrid cultivar]
8	RVW72224.1	无特征蛋白 CK203_059503 Uncharacterized protein CK203_059503 [*V. vinifera*]
9	RVW95477.1	保守低聚高尔基复合体亚基 4 Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4 [*V. vinifera*]
10	XP_002274576.1	mec-8 和 unc-52 蛋白同源物 2 的抑制因子 Suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2 [*V. vinifera*]
11	XP_002274568.2	蛋白质 TIFY 4B 亚型 X2 Protein TIFY 4B isoform X2 [*V. vinifera*]
12	XP_002283629.2	可能是 3-羟基异丁酸脱氢酶样 1，线粒体 Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1, mitochondrial [*V. vinifera*]
13	XP_010662714.1	U-box 结构域蛋白 32 亚型 X2 U-box domain-containing protein 32 isoform X2 [*V. vinifera*]
14	CAN73357.1	假设蛋白 VITISV_012625 Hypothetical protein VITISV_012625 [*V. vinifera*]
15	XP_002283561.1	COP9 信号体复合体 5b 亚基 COP9 signalosome complex subunit 5b [*V. vinifera*]
16	XP_002276145.2	冠状激素不敏感蛋白 1 Coronatine-insensitive protein 1 [*V. vinifera*]
17	CAN73357.1	假设蛋白 VITISV_012625 Hypothetical protein VITISV_012625 [*V. vinifera*]
18	CAN59753.1	假设蛋白 VITISV_036639 Hypothetical protein VITISV_036639 [*V. vinifera*]
19	RVX06365.1	锌指蛋白 CONSTANS-like 2 Zinc finger protein CONSTANS-like 2 [*V. vinifera*]
20	XP_002267529.1	蛋白质对质子根毒性 1 敏感 Protein sensitive to proton rhizotoxicity 1 [*V. vinifera*]
21	RVW40458.1	假设异天冬氨酸肽酶 / L -天冬酰胺酶 2 Putative isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 2 [*V. vinifera*]
22	CAN80969.1	假设蛋白 VITISV_032938 Hypothetical protein VITISV_032938 [*V. vinifera*]
23	XP_003633728.1	KH 结构域蛋白 At4g18375 KH domain-containing protein At4g18375 [*V. vinifera*]
24	XP_002283979	忍者家族蛋白 mc410 亚型 X Ninja-family protein mc410 isoform X1 [*V. vinifera*]
25	XP_010664564	可能与 BOI 相关的 E3 泛素蛋白连接酶 2 Probable BOI-related E3 ubiquitin-protein ligase 2 [*V. vinifera*]
26	XP_002266061.1	无特征蛋白 At4g06598 bZIP Uncharacterized protein At4g06598 bZIP [*V. vinifera*]

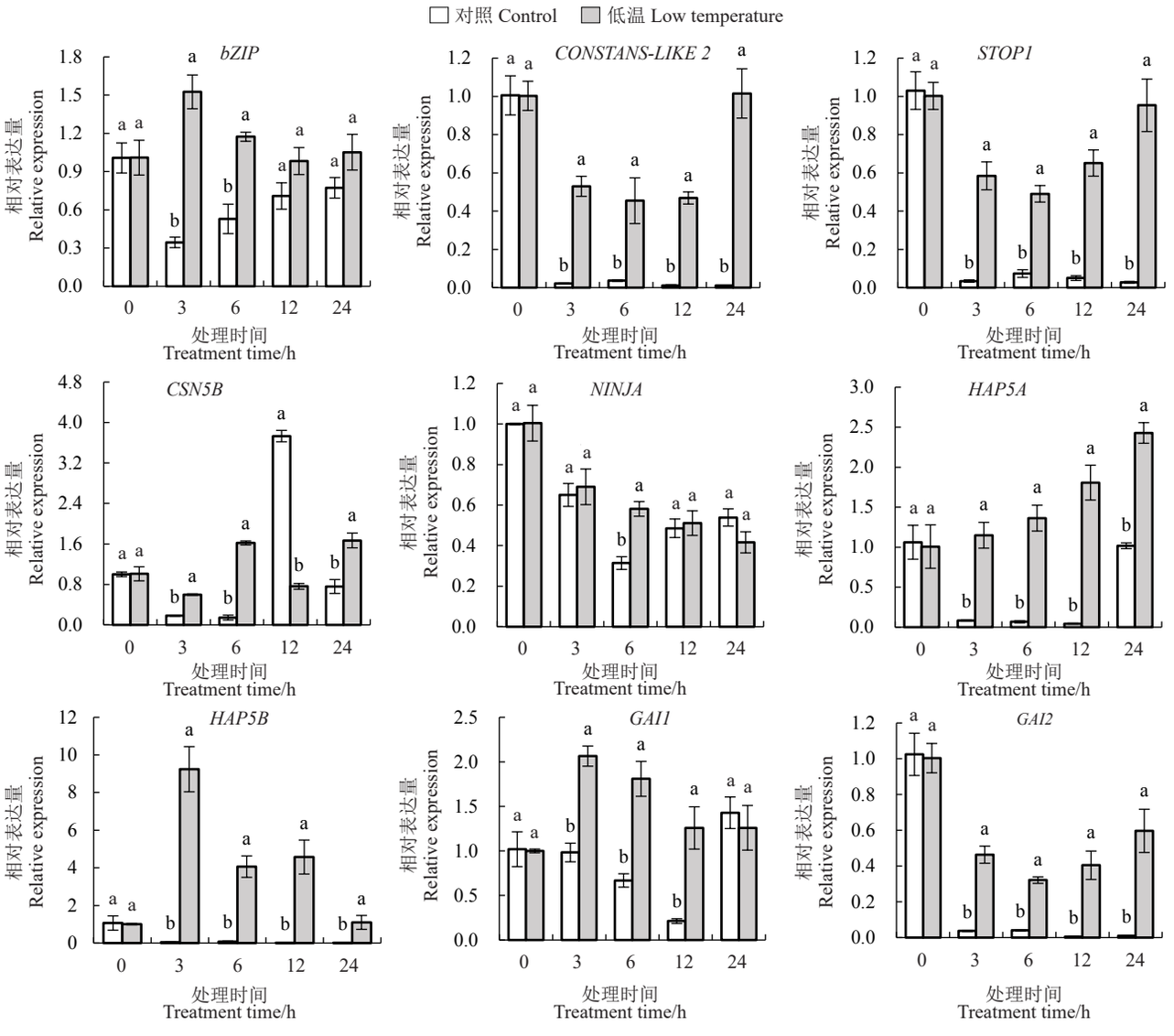


图 8 VvJAZ9 候选互作蛋白相关基因的 qRT-PCR 分析

Fig. 8 qRT-PCR analysis of VvJAZ9 candidate interacting protein-related genes

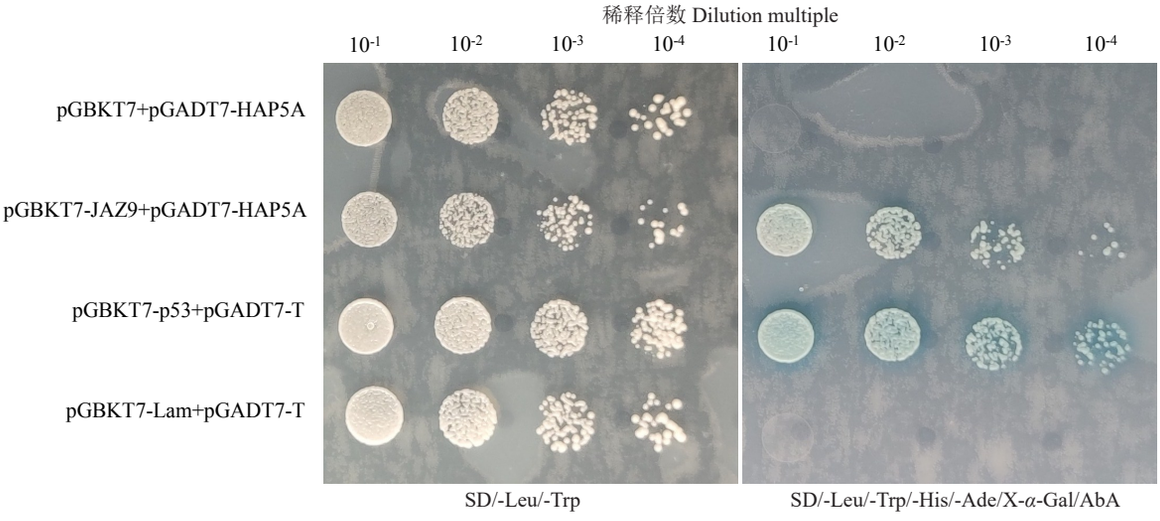
态细胞中进行回转验证。共转化的酵母在SD/-Leu/-Trp培养基上均可正常生长，但在SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA（QDO/X/A）培养基上只有pGBKT7-*JAZ9*+pGADT7-*HAP5A*和阳性对照（pGBKT7-p53+pGADT7-T）显现蓝色酵母菌落，并随着稀释倍数的增大，蓝色菌落在减少，说明VvJAZ9与VvHAP5A蛋白具有相互作用（图9）。

2.6 VvJAZ9与VvHAP5A蛋白互作验证

利用BiFC试验进一步验证VvJAZ9与VvHAP5A在植物体内的互作关系，结果如图10所示，共转化的$cYFP^{JAZ9}$+$nYFP^{HAP5A}$在拟南芥原生质体中可以观察到黄色荧光信号，而$cYFP^{JAZ9}$+nYFP和cYFP+$nYFP^{HAP5A}$均未观察到黄色荧光信号，表明VvJAZ9和VvHAP5A蛋白在植物体内存在互作关系。

3 讨 论

JA是一种广泛存在于高等植物体内脂肪酸衍生的植物激素，不仅在植物生长发育过程中具有重要的调节作用，而且在植物应对生物和非生物胁迫中也扮演着重要的角色[27]。SCF^{COI1}泛素蛋白复合体、转录抑制因子JAZ蛋白和转录激活因子MYC蛋白是JA信号途径的3个核心组件，其中JAZ蛋白作为E3泛素连接酶SCF^{COI1}的靶蛋白和MYC的转录抑制子，是JA信号转导途径的关键组分，在JA调控植物胁迫应答的过程中发挥着重要作用[16]。*JAZ*家族

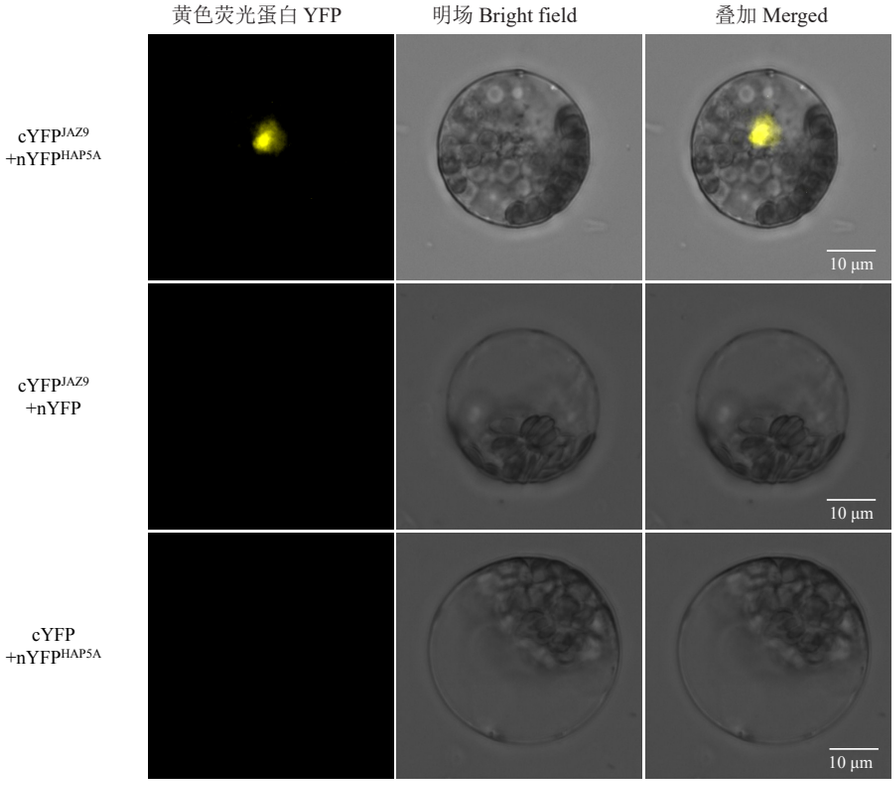


pGBKT7-p53+pGADT7-T 为阳性对照，pGBKT7-Lam+pGADT7-T 为阴性对照。

pGBKT7-p53+pGADT7-T as positive control, pGBKT7-Lam+pGADT7-T as negative control.

图 9　VvJAZ9 与 VvHAP5A 候选互作蛋白的回转验证

Fig. 9　Rotary verification of VvJAZ9 and VvHAP5A candidate interacting proteins



图中白色横线表示 10 μm 标尺。

The white horizontal line in the figure indicates 10 μm scale.

图 10　VvJAZ9 与 VvHAP5A 蛋白的 BiFC 验证

Fig. 10　BiFC verification of VvJAZ9 and VvHAP5A proteins

成员基因众多，且生物学功能丰富。目前已报道在拟南芥[28]、烟草（*Nicotiana tabacum*）[29]、小麦（*Triticum aestivum*）[30]、玉米（*Zea mays*）[31]、番茄（*S. lycopersicum*）[32]、黄瓜（*Cucumis sativus*）[33]、西瓜（*Citrullus lanatus*）[34]等中分别鉴定出 12、15、14、38、13、11、8 个 *JAZ* 成员。

笔者在本研究中利用生物信息学方法，从葡萄全基因组序列中鉴定到 11 个葡萄 *JAZ* 家族成员基

因，分别命名为*VvJAZ1~VvJAZ11*，这与前人在葡萄上的筛选鉴定结果一致[21]。这11个成员不均匀地分布在7条染色体上，但在10号染色体上分布较为密集，这与粗山羊草（*Aegilops tauschii*）*JAZ*家族基因在染色体上的分布研究类似[35]。对这11个JAZ家族成员的蛋白序列进行比对分析后发现，葡萄中VvJAZ蛋白都具有2个高度保守的TIFY和Jas结构域，属于典型的JAZ家族蛋白，与甘薯（*Ipomoea batatas*）中JAZ蛋白结构研究一致[36]。通过对葡萄JAZ家族成员的理化性质分析发现，11个VvJAZ蛋白的平均亲水性均为负值且等电点均大于7.0，都属于碱性不稳定亲水蛋白，与核桃（*Juglans regia*）中JAZ蛋白性质研究一致[37]。根据芥菜（*Brassica juncea*）[38]与拟南芥JAZ家族的系统进化树分析结果，将这些JAZ明显分为5个亚组（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ），而在本研究中葡萄与拟南芥JAZ家族成员的系统进化树被分为3个亚组；在亚组Ⅰ中的VvJAZ9与拟南芥中AtJAZ1和AtJAZ2的亲缘关系最近；在亚组Ⅱ中的VvJAZ1、VvJAZ11和亚组Ⅲ中的VvJAZ5与VvJAZ6同源关系最近，并推测其在蛋白功能上有一定的相似性。

*JAZs*基因是茉莉酸信号通路中的关键节点基因，也是植物响应逆境胁迫的关键调控因子[27]。有研究表明，*JAZs*基因参与一些植物的低温胁迫，*JAZ1*和*JAZ4*基因过度表达会使植物对冷胁迫敏感，也会抑制拟南芥中的ICE-CBF信号通路和冷冻反应[14]。*JAZ1*基因沉默的拟南芥愈伤组织中钙调素含量显著增加，同时也增强了对冷应激的耐受性[39]。在低温胁迫下，耐低温的棉花（*Gossypium hirsutum*）品种中*GhJAZ1*基因的上调表达更为显著，推测该基因参与棉花低温胁迫防御反应[40]。笔者在本研究中通过对葡萄*JAZ*家族成员基因在低温条件下的qRT-PCR分析发现，这11个*VvJAZs*基因都存在不同程度的受低温诱导表达，但只有*VvJAZ9*基因的相对表达量随低温胁迫时间的延长而呈现上升趋势，是受低温诱导表达最为显著的基因。

蛋白之间的相互作用对阐明胞内信号转导有重要意义。JAZ可以与ICE[14]、MYC[41]、bHLH[42]类蛋白互作，在JA信号通路中发挥作用，参与植物生长发育以及逆境响应。水稻（*Oryza sativa*）中OsJAZ9蛋白与OsMYB30相互作用负调控*BMY*基因以调节淀粉分解和麦芽糖积累，从而增强植物的抗寒性[43]。作为抑制子的MdJAZ1/4可与MdMYC2结合，促进抗寒相关基因的表达，提高苹果（*Malus pumila*）愈伤组织对低温的抵抗能力[44]。MdJAZ1和MdJAZ2通过与MdABI4蛋白相互作用负调节*MdABI4*基因以促进*MdICE2*基因对其下游靶基因*MdCBF1*的转录调节，从而提高苹果的耐寒性[45]。甜樱桃（*Prunus avium*）PavJAZ1/2/3与PavMYC2相互作用共同响应温度胁迫并协同调控开花[46]。本研究通过酵母双杂交试验筛选获得26个可能与VvJAZ9存在互作关系的候选蛋白，进一步运用qRT-PCR技术分析候选互作蛋白的相关基因在低温胁迫下的表达情况后发现，这些相关基因中有1个*HAP5A*基因的相对表达量随低温时间的延长而呈现出显著上升的趋势，这与从葡萄*JAZ*家族成员基因中筛选出的*VvJAZ9*受低温诱导表达模式相似，推测HAP5A可能是候选互作蛋白中响应低温较为明显的且与JAZ9有互作关系的蛋白。

NF-Y（nuclear factor-Y）又称为HAP（heme activator protein），是广泛存在于真核生物中的转录因子，以NF-YA（HAP2/CBF-B）、NF-YB（HAP3/ CBF-A）和NF-YC（HAP5/CBF-C）3种亚基构成异源三聚体的形式调控下游基因的表达[47]。研究发现，HAPs家族参与胚胎合成、种子萌发、开花调控、果实成熟以及响应逆境胁迫等生长发育过程[48]。*HAP5*基因通过与*GSH2*（glutathione synthetase）的启动子结合，诱导*GSH2*基因表达，提高细胞中谷胱甘肽含量，减轻活性氧对细胞膜的损伤，从而有效提高假丝酵母（*Candida glycerinogenes*）对2-苯乙醇的耐受性[49]。将青杆（*Picea wilsonii*）*PwHAP5*基因在拟南芥中过表达可显著提高幼苗对盐分的耐受性[50]；*AtHAP5A*基因通过与*AtXTH2*启动子上的CCAAT顺式作用元件结合来正向调节拟南芥对冷胁迫的响应，过表达*AtHAP5A*基因也可增强拟南芥植株对冷冻的耐受性[51-52]。此外，PwHAP5可以与PwFKBP12发生互作，参与花粉管发育和花粉管定向控制[53]；OsHAP5和OsHAP2相互作用，共同参与水稻光周期开花的调控[54]。本研究通过qRT-PCR分析获得1个响应低温较为显著的JAZ9候选互作蛋白HAP5A，进一步通过酵母双杂交和双分子荧光互补实验也表明VvJAZ9与VvHAP5A蛋白存在互作关系。

4 结　论

从葡萄基因组共鉴定到11个*VvJAZs*基因，编码氨基酸序列长度为98~388 aa，分子质量在11.26~40.31 ku，均为碱性亲水蛋白，分布于3个亚组中，其中VvJAZ9与拟南芥AtJAZ1和AtJAZ2蛋白的亲缘关系最近。qRT-PCR表明，*VvJAZ9*和*VvHAP5A*基因均响应低温诱导表达，推测该基因可能在葡萄抵御冷胁迫的应答过程中起重要作用。酵母双杂交和双分子荧光互补试验结果都表明，VvJAZ9与VvHAP5A蛋白具有互作关系。本研究为进一步开展葡萄*JAZ*基因参与低温胁迫的研究奠定理论基础，为探讨葡萄抗逆分子机制研究提供参考。

参考文献 References：

[1] 陆昱颖，万然，樊秀彩，张颖，孙磊，刘崇怀，姜建福 . 中国和UPOV、日本葡萄品种DUS测试指南比较分析[J]. 果树学报，2023，40(2)：363-375.
LU Yuying，WAN Ran，FAN Xiucai，ZHANG Ying，SUN Lei，LIU Chonghuai，JIANG Jianfu. Comparative analysis of test guidelines for distinctness，uniformity and stability of grapevine (*Vitis* L.) formulated by China，UPOV and Japan[J]. Journal of Fruit Science，2023，40(2)：363-375.

[2] 张利鹏，刘怀锋，辛海平 . 葡萄抗寒机制研究进展[J]. 果树学报，2023，40(2)：350-362.
ZHANG Lipeng，LIU Huaifeng，XIN Haiping. Research progress in cold tolerance mechanism of grape [J]. Journal of Fruit Science，2023，40(2)：350-362.

[3] 刘砚璞，肖雪，赵建明，朱自果 . 中国野生燕山葡萄*VyCIPK9*基因的克隆与功能分析[J]. 果树学报，2022，39(10)：1748-1758.
LIU Yanpu，XIAO Xue，ZHAO Jianming，ZHU Ziguo. Cloning and functional analysis of *VyCIPK9* gene in Chinese wild grape (*Vitis yeshanensis* 'Yanshan') [J]. Journal of Fruit Science，2022，39(10)：1748-1758.

[4] 刘畅，杨兴旺，王小龙，王志强，刘凤之，王海波 . 植物防冻剂对葡萄抗寒能力的影响研究进展[J]. 中国果树，2022(3)：6-9.
LIU Chang，YANG Xingwang，WANG Xiaolong，WANG Zhiqiang，LIU Fengzhi，WANG Haibo. Research progress on the effect of plant antifreeze on grape under low-temperature stress[J]. China Fruits，2022(3)：6-9.

[5] FENNELL A. Freezing tolerance and injury in grapevines[J]. Journal of Crop Improvement，2004，10(1/2)：201-235.

[6] 段晓凤，张晓煜，张磊，刘建文，南学军，李楠，李红英 . 酿酒葡萄越冬防冻技术研究发展概况[J]. 农业工程，2022，12(6)：133-138.
DUAN Xiaofeng，ZHANG Xiaoyu，ZHANG Lei，LIU Jianwen，NAN Xuejun，LI Nan，LI Hongying. General situation of research and development on antifreeze technology for wine grape overwintering[J]. Agricultural Engineering，2022，12(6)：133-138.

[7] ALI M S，BAEK K H. Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences，2020，21(2)：621.

[8] 李芳菲，马文瑶，程大伟，黄海娜，顾红，陈锦永，杨英军 . 植物生长调节物质对葡萄着色影响的研究进展[J]. 果树学报，2019，36(7)：928-938.
LI Fangfei，MA Wenyao，CHENG Dawei，HUANG Haina，GU Hong，CHEN Jinyong，YANG Yingjun. Advances in grape coloration regulated by plant growth regulators[J]. Journal of Fruit Science，2019，36(7)：928-938.

[9] WASTERNACK C，HAUSE B. Jasmonates：biosynthesis，perception，signal transduction and action in plant stress response，growth and development：An update to the 2007 review in annals of botany[J]. Annals of Botany，2013，111(6)：1021-1058.

[10] GHORBEL M，BRINI F，SHARMA A，LANDI M. Role of jasmonic acid in plants：The molecular point of view[J]. Plant Cell Reports，2021，40(8)：1471-1494.

[11] DING F，WANG C，XU N，WANG M L，ZHANG S X. Jasmonic acid-regulated putrescine biosynthesis attenuates cold-induced oxidative stress in tomato plants[J]. Scientia Horticulturae，2021，288：110373.

[12] 解振宇，杨江山 . 茉莉酸甲酯对高寒地区设施延后栽培葡萄生理的影响[J]. 中国农学通报，2016，32(16)：66-71.
XIE Zhenyu，YANG Jiangshan. Effect of methyl jasmonate on physiology of delayed culture grape in alpine greenhouse[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2016，32(16)：66-71.

[13] 冯斗，褚维言，黄政树，邓付园，谭湘 . 茉莉酸甲酯对低温胁迫下香蕉幼苗的生理效应[J]. 果树学报，2009，26(3)：390-393.
FENG Dou，XUAN Weiyan，HUANG Zhengshu，DENG Fuyuan，TAN Xiang. Effects of MeJA on cold tolerance of banana seedlings[J]. Journal of Fruit Science，2009，26(3)：390-393.

[14] 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]. The Plant Cell，2013，25(8)：2907-2924.

[15] 樊晓培，邢津溥，魏铁锁，李欣洋，苍晶，徐庆华，张达 . 外源MeJA对低温胁迫下冬小麦冷响应基因表达的影响[J]. 麦类作物学报，2020，40(3)：292-299.
FAN Xiaopei，XING Jinpu，WEI Tiesuo，LI Xinyang，CANG Jing，XU Qinghua，ZHANG Da. Effect of exogenous MeJA on the expression of cold response genes in winter wheat under low temperature stress[J]. Journal of Triticeae Crops，2020，40(3)：292-299.

[16] THINES B，KATSIR L，MELOTTO M，NIU Y J，MANDAOKAR 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 signalling[J]. Nature，2007，448(7154)：661-665.

[17] THIREAULT C，SHYU C，YOSHIDA Y，ST AUBIN B，CAM-

POS M L，HOWE G A. Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal，2015，82(4)：669-679.

[18] BROWSE J，WALLIS J G. *Arabidopsis* flowers unlocked the mechanism of jasmonate signaling[J]. Plants，2019，8(8)：285.

[19] SHEARD L B，TAN X，MAO H B，WITHERS J，BEN-NISSAN G，HINDS T R，KOBAYASHI Y，HSU F F，SHARON M，BROWSE J，HE S Y，RIZO J，HOWE G A，ZHENG N. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI_1-JAZ co-receptor[J]. Nature，2010，468(7322)：400-405.

[20] MELOTTO M，MECEY C，NIU Y J，CHUNG H S，KATSIR L，YAO J，ZENG W Q，THINES B，STASWICK P，BROWSE J，HOWE G A，HE S Y. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI_1 F-box protein[J]. The Plant Journal，2008，55(6)：979-988.

[21] ZHANG Y C，GAO M，SINGER S D，FEI Z J，WANG H，WANG X P. Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape[J]. PLoS One，2012，7(9)：e44465.

[22] HANIF M，RAHMAN M U，GAO M，YANG J H，AHMAD B，YAN X X，WANG X P. Heterologous expression of the grapevine *JAZ7* gene in *Arabidopsis* confers enhanced resistance to powdery mildew but not to *Botrytis cinerea*[J]. International Journal of Molecular Sciences，2018，19(12)：3889.

[23] ZHANG G F，YAN X X，ZHANG S L，ZHU Y X，ZHANG X M，QIAO H B，VAN NOCKER S，LI Z，WANG X P. The jasmonate-ZIM domain gene *VqJAZ4* from the Chinese wild grape *Vitis quinquangularis* improves resistance to powdery mildew in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology and Biochemistry，2019，143：329-339.

[24] 俞沁含，焦淑珍，吴楠，张宁波，徐伟荣 . 葡萄 E3 泛素酶 HOS1 基因克隆、表达及抗血清制备[J]. 园艺学报，2021，48(6)：1173-1182.
YU Qinhan，JIAO Shuzhen，WU Nan，ZHANG Ningbo，XU Weirong. Molecular cloning，expression and polyclonal antibody preparation of E3 ubiquitin ligase gene *HOS1* from *Vitis vinifera*[J]. Acta Horticulturae Sinica，2021，48(6)：1173-1182.

[25] 韩雪，王树芳，林金星 . 拟南芥酵母双杂交文库构建及 ADPG1 互作蛋白筛选[J]. 中国细胞生物学学报，2022，44(6)：1048-1055.
HAN Xue，WANG Shufang，LIN Jinxing. Construction of yeast two-hybrid library of *Arabidopsis thaliana* and screening of ADPG1 interacting proteins[J]. Chinese Journal of Cell Biology，2022，44(6)：1048-1055.

[26] 郑巧玲，申威，姚文孔，徐伟荣 . 山葡萄低温诱导酵母双杂三框 cDNA 文库构建和 VaCIPK18 互作蛋白筛选鉴定[J]. 园艺学报，2020，47(12)：2301-2316.
ZHENG Qiaoling，SHEN Wei，YAO Wenkong，XU Weirong. Construction of yeast two-hybrid three-frame cDNA library of *Vitis amurensis* and screening of VaCIPK18 interaction protein[J]. Acta Horticulturae Sinica，2020，47(12)：2301-2316.

[27] WASTERNACK C，STRNAD M. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites: Pathways，transcription factors and applied aspects: A brief review[J]. New Biotechnology，2019，48：1-11.

[28] CHICO J M，CHINI A，FONSECA S，SOLANO R. JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology，2008，11(5)：486-494.

[29] ZHANG H Y，LI W J，NIU D X，WANG Z J，YAN X X，YANG X L，YANG Y F，CUI H. Tobacco transcription repressors NtJAZ：potential involvement in abiotic stress response and glandular trichome induction[J]. Plant Physiology and Biochemistry，2019，141：388-397.

[30] XIE S F，CUI L C，LEI X L，YANG G，LI J，NIE X J，JI W Q. The TIFY gene family in wheat and its progenitors：genome-wide identification，evolution and expression analysis[J]. Current Genomics，2019，20(5)：371-388.

[31] SUN P D，SHI Y N，VALERIO A G O，BORREGO E J，LUO Q Y，QIN J，LIU K，YAN Y X. An updated census of the maize TIFY family[J]. PLoS One，2021，16(2)：e0247271.

[32] CHINI A，BEN-ROMDHANE W，HASSAIRI A，ABOUL-SOUD M A M. Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses[J]. PLoS One，2017，12(6)：e0177381.

[33] PAN J W，TU J Y，SHARIF R，QI X H，XU X W，CHEN X H. Study of JASMONATE ZIM-Domain gene family to waterlogging stress in *Cucumis sativus* L.[J]. Vegetable Research，2021，1(1)：1-12.

[34] YANG Y X，AHAMMED G J，WAN C P，LIU H J，CHEN R R，ZHOU Y. Comprehensive analysis of TIFY transcription factors and their expression profiles under jasmonic acid and abiotic stresses in watermelon[J]. International Journal of Genomics，2019，2019：6813086.

[35] 王玉昆，苑少华，苑国良，段文静，王鹏，廖祥政，陈兆波，王娜，王拯，张立平，赵昌平 . 粗山羊草 *JAZ* 基因家族的全基因组鉴定与分析[J]. 麦类作物学报，2016，36(1)：9-17.
WANG Yukun，YUAN Shaohua，YUAN Guoliang，DUAN Wenjing，WANG Peng，LIAO Xiangzheng，CHEN Zhaobo，WANG Na，WANG Zheng，ZHANG Liping，ZHAO Changping. Genome-wide identification and analysis of *JAZ* gene family in *Aegilops tauschii*[J]. Journal of Triticeae Crops，2016，36(1)：9-17.

[36] 黄小芳，毕楚韵，陈其俊，刘江洪，胡韵卓，黄碧芳，许明，陈选阳，林世强 . 甘薯基因组 *JAZ* 基因家族的鉴定与分析[J]. 基因组学与应用生物学，2021，40(s4)：3685-3693.
HUANG Xiaofang，BI Chuyun，CHEN Qijun，LIU Jianghong，HU Yunzhuo，HUANG Bifang，XU Ming，CHEN Xuanyang，LIN Shiqiang. Identification and analysis of *JAZ* gene family in *Ipomoea batatas* genome[J]. Genomics and Applied Biology，2021，40

(S4)：3685-3693.

[37] 刘凯，李津津，王红霞，李林晴，赵书岗，张俊佩，马庆国，张志华 . 核桃 JrJAZ 基因家族鉴定与转录表达分析[J]. 河北农业大学学报，2021，44(1)：41-50.
LIU Kai，LI Jinjin，WANG Hongxia，LI Linqing，ZHAO Shugang，ZHANG Junpei，MA Qingguo，ZHANG Zhihua. Identification and transcriptional expression analysis of walnut JrJAZ gene family[J]. Journal of Hebei Agricultural University，2021，44(1)：41-50.

[38] CAI Z M，CHEN Y Q，LIAO J J，WANG D D. Genome-wide identification and expression analysis of jasmonate ZIM domain gene family in tuber mustard (*Brassica juncea* var. *tumida*)[J]. PLoS One，2020，15(6)：e0234738.

[39] MAKHAZEN D S，VEREMEICHIK G N，SHKRYL Y N，TCHERNODED G K，GRIGORCHUK V P，BULGAKOV V P. Inhibition of the *JAZ1* gene causes activation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis* callus cultures[J]. Journal of Biotechnology，2021，342：102-113.

[40] 蔡肖，甄军波，江振兴，刘琳琳，刘迪，张建宏，田海燕，张香云，迟吉娜 . 陆地棉低温响应基因 GhJAZ1 的克隆及表达分析[J]. 华北农学报，2018，33(1)：7-13.
CAI Xiao，ZHEN Junbo，JIANG Zhenxing，LIU Linlin，LIU Di，ZHANG Jianhong，TIAN Haiyan，ZHANG Xiangyun，CHI Jina. Cloning and expression analysis of cold response gene GhJAZ1 from *Gossypium hirsutum* L.[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica，2018，33(1)：7-13.

[41] GOOSSENS J，SWINNEN G，VANDEN BOSSCHE R，PAUWELS L，GOOSSENS A. Change of a conserved amino acid in the MYC_2 and MYC3 transcription factors leads to release of JAZ repression and increased activity[J]. New Phytologist，2015，206(4)：1229-1237.

[42] FONSECA S，FERNÁNDEZ-CALVO P，FERNÁNDEZ G M，DÍEZ-DÍAZ M，GIMENEZ-IBANEZ S，LÓPEZ-VIDRIERO I，GODOY M，FERNÁNDEZ-BARBERO G，VAN LEENE J，DE JAEGER G，FRANCO- ZORRILLA J M，SOLANO R. bHLH003，bHLH013 and bHLH017 are new targets of JAZ repressors negatively regulating JA responses[J]. PLoS One，2014，9(1)：e86182.

[43] LV Y，YANG M，HU D，YANG Z Y，MA S Q，LI X H，XIONG L Z. The OsMYB30 transcription factor suppresses cold tolerance by interacting with a JAZ protein and suppressing *β*-amylase expression[J]. Plant Physiology，2017，173(2)：1475-1491.

[44] 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- MYC_2 pathway[J]. Plant Cell，Tissue and Organ Culture (PCTOC)，2019，136(1)：75-84.

[45] AN J P，XU R R，LIU X，SU L，YANG K，WANG X F，WANG G L，YOU C X. Abscisic acid insensitive 4 interacts with ICE1 and JAZ proteins to regulate ABA signaling-mediated cold tolerance in apple[J]. Journal of Experimental Botany，2022，73(3)：980-997.

[46] 王继源，王丽，纠松涛，孙菀霞，徐岩，刘勋菊，张才喜 . 甜樱桃 $PavMYC_2$ 基因克隆与表达分析[J]. 果树学报，2022，39(5)：701-711.
WANG Jiyuan，WANG Li，JIU Songtao，SUN Wanxia，XU Yan，LIU Xunju，ZHANG Caixi. Cloning and expression analysis of $PavMYC_2$ gene in *Prunus avium* L.[J]. Journal of Fruit Science，2022，39(5)：701-711.

[47] 李世贵，马瑞，王芳芳，刘维刚，杨江伟，唐勋，张宁，司怀军 . 植物 NF-Y 转录因子研究进展[J]. 植物生理学报，2021，57(2)：248-256.
LI Shigui，MA Rui，WANG Fangfang，LIU Weigang，YANG Jiangwei，TANG Xun，ZHANG Ning，SI Huaijun. Research progresses on plant NF-Y transcription factors [J]. Plant Physiology Journal，2021，57(2)：248-256.

[48] ZANETTI M E，RÍPODAS C，NIEBEL A. Plant NF-Y transcription factors：Key players in plant-microbe interactions，root development and adaptation to stress[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms，2017，1860(5)：645-654.

[49] WANG Y Q，ZHANG Z Y，LU X Y，ZONG H，ZHUGE B. Transcription factor Hap5 induces gsh2 expression to enhance 2-phenylethanol tolerance and production in an industrial yeast *Candida glycerinogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2020，104(9)：4093-4107.

[50] LI L L，YU Y L，WEI J，HUANG G X，ZHANG D，LIU Y，ZHANG L Y. Homologous HAP5 subunit from *Picea wilsonii* improved tolerance to salt and decreased sensitivity to ABA in transformed *Arabidopsis*[J]. Planta，2013，238(2)：345-356.

[51] SHI H T，CHAN Z L. AtHAP5A modulates freezing stress resistance in *Arabidopsis* independent of the CBF pathway[J]. Plant Signaling & Behavior，2014，9(7)：e29109.

[52] SHI H T，YE T T，ZHONG B，LIU X，JIN R，CHAN Z L. AtHAP5A modulates freezing stress resistance in *Arabidopsis* through binding to CCAAT motif of AtXTH21[J]. New Phytologist，2014，203(2)：554-567.

[53] YU Y L，LI Y Z，HUANG G X，MENG Z D，ZHANG D，WEI J，YAN K，ZHENG C C，ZHANG L Y. PwHAP5，a CCAAT-binding transcription factor，interacts with PwFKBP12 and plays a role in pollen tube growth orientation in *Picea wilsonii*[J]. Journal of Experimental Botany，2011，62(14)：4805-4817.

[54] XING Q K，ZHENG Z M，ZHOU X G，CHEN X J，GUO Z J. *Ds9* was isolated encoding as OsHAP3H and its C-terminus was required for interaction with HAP2 and HAP5[J]. Journal of Plant Biology，2015，58(1)：26-37.