

刘艳艳,丁颖,刘兴华,等. 辣椒生长素抑制蛋白基因 *CaARPI* 的克隆及其对青枯菌侵染的响应[J]. 江苏农业科学,2023,51(21):13-19.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.21.003

# 辣椒生长素抑制蛋白基因 *CaARPI* 的克隆 及其对青枯菌侵染的响应

刘艳艳,丁颖,刘兴华,郑佳秋

(江苏沿海地区农业科学研究所,江苏盐城 224000)

**摘要:**生长素响应基因编码生长素抑制蛋白(ARP),是非常重要的下调基因,能够抑制生长素(IAA)信号的转导,在植物的生长、发育、抗病、抗逆以及种子休眠等过程中发挥重要作用。为解析辣椒 *ARPI* 基因的序列特征和功能,以辣椒品种 CM334 为试材,克隆获得辣椒 *ARPI* 基因 cDNA 全长序列,命名为 *CaARPI*,GenBank 登录号为 AAR83888.1。序列分析结果表明,辣椒 *CaARPI* 基因的 cDNA 全长 228 bp,没有非翻译区,包含 1 个 228 bp 的开放阅读框架,编码 75 个氨基酸。*CaARPI* 基因含有 2 个外显子和 1 个内含子,全长 385 bp。*CaARPI* 蛋白的分子量为 8.298 ku,理论等电点为 9.99,没有跨膜结构,不存在信号肽,为亲水性不稳定蛋白,二元结构元件多为无规则卷曲。*CaARPI* 蛋白与同属茄科植物的马铃薯、番茄、黄果茄、烟草生长素抑制蛋白的同源性较高,序列一致性分别为 95.00%、96.67%、93.24%、91.89%。实时荧光定量 PCR 分析结果表明,*CaARPI* 基因在青枯菌侵染 1~7 d 期间均呈现极显著下调的趋势,推测该基因可能在辣椒应答青枯病侵染中发挥重要作用。

**关键词:**辣椒;*CaARPI* 基因;基因克隆;序列分析;表达分析

**中图分类号:**S641.301;S436.418.1<sup>+</sup>9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)21-0013-06

植物可以通过多种抗病途径抵御环境中众多病原菌的侵染,但抗病性的建立会以减慢植物生长为代价,如植物受到病菌侵染时,则减弱生长信号通路,激活防卫反应上游的基因或转录因子来抵御病原物侵染;在无病菌侵害时,使抗病信号通路处于非激活状态来关闭抗病途径,植物生长不受抑制<sup>[1-2]</sup>。生长素作为调节植物生长的信号分子,通过与受体组织器官结合来激活生长素响应因子,以实现促进或抑制生长素相关基因的转录,从而参与植物生长发育的过程和对疾病等的防御过程<sup>[3-4]</sup>。生长素应答基因主要包括受生长素信号激活表达的生长素激活基因和受生长素信号抑制的生长素抑制基因<sup>[5-8]</sup>,其中生长素抑制基因主要包括生长素抑制蛋白(auxin repressed protein, ARP)基因和休眠相关蛋白(dormancy related protein, DRM)基因<sup>[5]</sup>,二者密切相关,一起形成 *ARP/DRM* 基因

家族。

人们对生长素的研究主要集中在受生长素信号诱导上调表达的基因上<sup>[9-11]</sup>,如 *ARF*、*SAUR* 等,然而关于受生长素诱导下调表达的基因却研究较少<sup>[12-14]</sup>,如生长素抑制蛋白基因,该基因是在抑制生长素信号转导过程中起重要作用的下调基因,能够参与下游基因的表达调控。生长素抑制蛋白除了可以调节植物生长和调控植物激素生长素变化<sup>[13,15-16]</sup>,也在植物应答病原菌中发挥重要的作用。研究发现,在拟南芥中 *miR393* 基因被诱导后,生长素受体蛋白 TIR1 被下调,生长素信号的传递受到抑制,生长素合成发生改变,低量的生长素提高了生长素抑制基因的表达<sup>[17]</sup>。苏盼盼在感病和抗病水稻品种中接种稻瘟病病菌,发现抗病品种中 *OsARPI* 和其他 3 个生长素抑制蛋白同源基因对稻瘟病病菌的响应较感病品种中的更为敏感,与感病品种相比,抗病品种中 *OsARPI* 被诱导表达的速度更快,效率更高<sup>[18]</sup>。但是,在已有的研究中极少见到辣椒 *ARPI* 对青枯菌产生生理响应及抗性机制的报道。

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是一种栽培范围广、经济效益高且深受人们喜爱的茄科蔬菜,在农业生产中具有重要的地位<sup>[19]</sup>。而在大田生产过程

收稿日期:2023-08-18

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(21)3031];江苏省农业重大新品种创制专项(编号:PZCZ201715)。

作者简介:刘艳艳(1990—),女,山东日照人,硕士,助理研究员,主要从事作物抗逆育种研究。E-mail:1052233980@qq.com。

通信作者:郑佳秋,硕士,副研究员,主要从事辣椒抗逆育种研究。  
E-mail:nky8236@163.com。

中,夏季高温高湿的气候和种类繁多的土传病害病原菌共存的环境成为了辣椒长期演化过程中的选择压力。在这种选择压力下,辣椒很可能会进化出一套精细复杂的抗青枯病和耐高温高湿胁迫的机制<sup>[20]</sup>。然而,目前对辣椒抗青枯病的机制研究的报道依然较少,因此挖掘抗青枯病相关基因和研究抗青枯病机制对培育抗青枯病辣椒品种具有重要意义。笔者所在团队前期利用 RNA-seqs 技术分析了辣椒在青枯菌侵染过程中的转录组数据,发现生长抑制蛋白 CaARP1 的转录水平出现了持续下调的趋势。因此,本研究通过克隆获得辣椒 *APR1* 基因 cDNA 全长序列,并对该基因进行相关生物信息学分析,并使用实时荧光定量 PCR 技术确认了 *CaARP1* 在青枯菌侵染下下调表达的特征,为进一步解析 *CaARP1* 在辣椒青枯侵染过程中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

本研究以辣椒品种 CM334 为试验材料,由福建农林大学遗传改良中心提供。试验时间为 2021 年 6 月至 2023 年 5 月,试验地点为福建农林大学遗传改良中心。青枯菌处理:本试验使用灌根法<sup>[21]</sup>接种辣椒植株,准备青枯菌菌体,悬浮于经高压灭菌的双蒸水中, $D_{595\text{ nm}}$ 调至 0.8(浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL),并倒入育苗瓶进行接种处理,接种辣椒苗置于 28℃ 人工气候箱培养,分别在接种后 1、3、5、7 d 收集辣椒茎基部往上 2 cm 茎段用于 RNA 提取。

1.2 辣椒总 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提

取辣椒幼苗叶片总 RNA。使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT-PCR Kit 进行反转录合成 cDNA,作为基因克隆的模板。

1.3 辣椒 *CaARP1* 基因的克隆

以辣椒全基因组数据库 (<http://peppersequence.genomics.cn>) 为参考,对辣椒转录组测序数据进行分析,根据 UniGene 注释结果 *CaARP1* 基因全长序列,并设计基因特异性引物进行 PCR 扩增,ARP-F:5'-gctaagagagaagATGCTGTTGATTGATAAACTTTGGG-3';ARP-sma I-R:5'-gcccttgctcaccatcccgggTGATGCTTAGATCTGGTGTTCCTCC-3',以辣椒叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物用柱式胶回收试剂盒回收,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,得到辣椒 *CaARP1* 基因的 cDNA 序列。

1.4 *CaARP1* 基因的生物信息学分析

利用 ORF finder 软件在线分析 *CaARP1* 的开放阅读框架,并预测其编码蛋白的氨基酸序列。利用 ExPASy ProtParam 分析辣椒 *CaARP1* 蛋白的理化性质;利用 NCBI 上的 CDD 分析辣椒 *CaARP1* 蛋白的保守结构域;利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 分别预测辣椒 *CaARP1* 蛋白的二级结构和三级结构;利用 ProtScale 预测辣椒 *CaARP1* 蛋白的亲疏水性;利用 TMHMM 2.0 和 SignalP 5.0 分别预测辣椒 *CaARP1* 蛋白的跨膜结构域和信号肽;利用 PSORT 预测辣椒 *CaARP1* 蛋白的亚细胞定位。利用 ClustalX 2.0 软件比对辣椒 *CaARP1* 及 NCBI 上下载的其他物种同源 ARP 的氨基酸序列,并用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树(bootstrap = 1 000)。各生物学信息分析软件网址详见表 1。

表 1 生物信息学分析软件

软件	网址
ProtParam	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>
SOPMA	<a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4</a>
SWISS-MODEL	<a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>
ProtScale	<a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a>
TMHMM 2.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0</a>
SignalP 5.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0</a>
PSORT	<a href="https://psort1.hgc.jp/form.html">https://psort1.hgc.jp/form.html</a>

1.5 *CaARP1* 基因的实时荧光定量 PCR 表达分析

利用实时荧光定量 PCR 检测青枯菌灌根处理后 0、1、3、5、7 d 辣椒 *CaARP1* 基因的表达量。根据 *CaARP1* 基因的序列设计定量 PCR 引物, *CaARP1* -

Fq: CAAACTCCGAAAGAGCCTCTCT 和 *CaARP1* - Rq: TCATGATGCTTAGATCTGGTGT; 内参基因 *CaActin* 的引物为 *CaActin* - F: TTGGATTCTGGTGATGGTGTG 和 *CaActin* - R: AACATGGTTGAGCCACCA

CTG。PCR 反应体系及反应条件参考文献[21]。每个样品重复 3 次,使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法分析结果[22]。数据采用 SPSS 19.0 软件分析,结果保存成“平均值  $\pm$  标准差”的形式,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

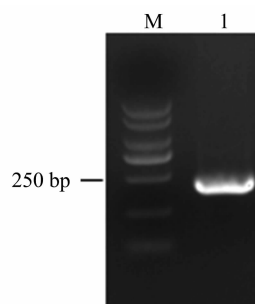
### 2.1 辣椒 *CaARP1* 基因全长 cDNA 序列的获得

辣椒 *CaARP1* 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示,在 230 bp 左右有单一条带,测序后获得辣椒 *ARP1* 基因全长 cDNA 序列,命名为 *CaARP1*, GenBank 登录号为 AAR83888.1。该基因 cDNA 片段全长 228 bp,没有非翻译区,包含 1 个 228 bp 的开放阅读框架,编码 75 个氨基酸(图 2)。

### 2.2 辣椒 *CaARP1* 基因的生物信息学分析

**2.2.1 基因结构** 将辣椒 *CaARP1* 基因的 cDNA 序列与 DNA 序列进行比对(图 3)后发现,在基因组水平上, *CaARP1* 基因含有 2 个外显子、1 个内含子,全长 385 bp。

**2.2.2 理化性质** 在 NCBI 上进行保守结构域分析,发现将 *CaARP1* 蛋白含有 1 个 Auxin\_repressed 结构域,位于第 20 ~ 72 个氨基酸位置,是一种生长素抑制蛋白。*CaARP1* 蛋白的理化性质:预测其分子式为  $C_{366}H_{563}N_{109}O_{111}S_1$ ,原子总数为 1 150,相对分子质量为 8.298 ku,含有 75 个氨基酸。*CaARP1* 蛋



M—DNA marker 2 000 bp; 1—RCR 扩增产物

图1 辣椒 *CaARP1* 基因 PCR 扩增产物

```

1 ATGTCGGCGACTCCGCCGACGCCAGGTACGCCGGTGACGCCGACA
  M S A T P P T P G T P V T P T
46 AACACGTCGCCGACGGTACGTAAGGAGAACGTATGAGGAGGTGTG
  N T S P T V R K E N V W R S V
91 TTTCAACCAGGAAGCAATCTAGCTACCAGGAGGATTGGTGC TGAG
  F H P G S N L A T R R I G A E
136 GTGTTTGATAAGCC TTCTACCC TAATGCTCCCACTGTTTATGAC
  V F D K P S H P N A P T V Y D
181 TGGCTGTACAGTGGGAACACCAGATCTAAGCATCATGAGAAGAGC
  W L Y S G N T R S K H H E K S
226 TGA
  *
  
```

ATG—起始密码子; TGA—终止密码子; \*—翻译终止

图2 辣椒 *CaARP1* 基因 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列

白的理论等电点为 9.99,含有带负电荷残基(Asp + Glu)5 个,带正电荷残基(Arg + Lys)9 个,脂肪系数为 44.13,蛋白质三维结构不稳定指数为 44.95,是一种碱性不稳定蛋白。

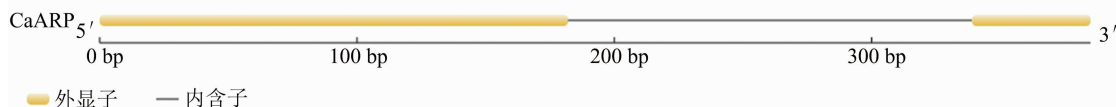


图3 辣椒 *CaARP1* 基因的结构

**2.2.3 二级结构和三级结构** 辣椒 *CaARP1* 蛋白的二级结构预测结果显示该蛋白由 3 种二级结构元件组成,包括占比 6.67% 的  $\alpha$ -螺旋、22.67% 的延伸链和 70.67% 的无规则卷曲(图 4 - A)。利用 SWISS - MODEL 软件构建辣椒 *CaARP1* 蛋白可能的三级结构模型,结果见图 4 - B,空间结构以无规则

卷曲为主,含有部分  $\alpha$ -螺旋和延伸链,同二级结构预测结果基本上一致。

**2.2.4 疏水性** 根据 ProtScale 软件预测 *CaARP1* 蛋白亲疏水性,结果显示该蛋白在第 34 个氨基酸处出现最大值,为 0.344,疏水性最强;在第 70 个氨基酸处出现最小值,为 -3.022,亲水性最强(图 5)。

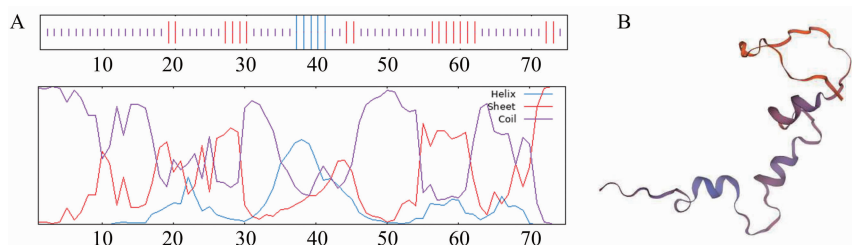


图4 辣椒 *CaARP1* 蛋白的二级结构(A)和三级结构(B)

该蛋白亲水性平均值为 -0.924,推测其为一种亲水性蛋白。

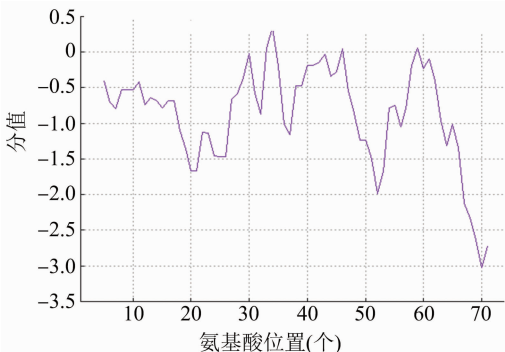


图5 CaARP1 蛋白的亲疏水性分析

2.2.5 信号肽和跨膜结构域 通过 SiganalP 5.0 软件分析辣椒 CaARP1 蛋白信号肽序列,结果表明,该蛋白未发现信号肽及其剪切位点,说明该蛋白属于非分泌蛋白。通过在线生物软件 TMHMM 2.0 预测辣椒 CaARP1 蛋白的跨膜结构域,结果表明该蛋白没有明显的跨膜结构,是一种非跨膜蛋白质。

2.2.6 亚细胞定位 利用 PSORT 对辣椒 CaARP1 蛋白亚细胞定位进行预测,结果表明 CaARP1 蛋白最可能被定位于细胞核(60.9%),其次是线粒体(26.1%),再次是分泌系统囊泡(4.3%)、过氧化物酶体(4.3%)、细胞质(4.3%)等。

2.2.7 同源性与系统进化关系 NCBI 在线通过 Blastp 将 *CaARP1* 基因推导的氨基酸序列与 GenBank 中已经登录的黄果茄 AAS75891.1 (*Solanum virginianum*)、烟草 AAS76635.1 (*Nicotiana tabacum*)、欧白英 XP\_055805508.1 (*S. dulcamara*)、马铃薯 XP\_006347006.1 (*S. tuberosum*)、彭氏番茄 XP\_015068255.1 (*S. pennellii*)、喜马拉雅凤仙花 XP\_047328583.1 (*Impatiens glandulifera*)、胡桃 XP\_018858854.1 (*Juglans regia*)、欧洲油菜 XP\_013734249.1 (*Brassica napus*)、萝卜 KAJ4891583.1 (*Raphanus sativus*)、牡丹 ABW74471.1 (*Paeonia suffruticosa*)、阿月浑子 XP\_031278964.1 (*Pistacia vera*)、番茄 NP\_001307367.1 (*S. lycopersicum*)、牛奶子 AAC62104.2 (*Elaeagnus umbellata*)、牵牛 XP\_019175658.1 (*Ipomoea nil*) 等植物的 ARP 氨基酸序列进行同源性比对,发现辣椒 CaARP1 氨基酸序列与这些物种的 ARP 氨基酸序列的一致性分别为 93.24%、91.89%、90.54%、95.00%、81.82%、80.00%、71.83%、69.01%、71.43%、65.00%、83.02%、96.67%、71.83%、88.00%,相似性较高,均达到 60% 以上,N 端和 C 端的氨基酸序列高度保守(图 6)。

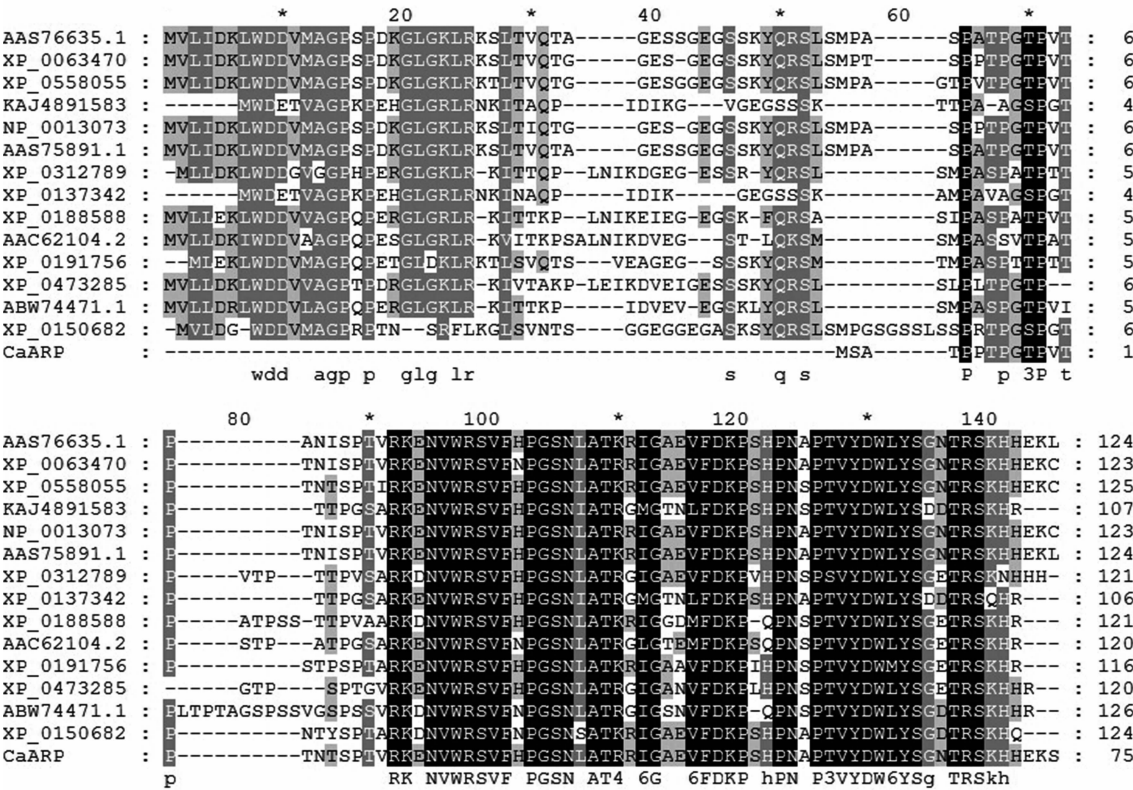


图6 辣椒 CaARP1 蛋白与其他植物 ARP 蛋白的氨基酸序列比对

由图 7 可知,同属茄科植物的马铃薯、番茄、黄果茄、烟草的 ARP 蛋白处于同一分支,具有较高的同源性,其中马铃薯和番茄的 ARP 蛋白与辣椒

CaARP1 的同源性最高,亲缘关系最近。辣椒 CaARP1 与十字花科欧洲油菜和萝卜 ARP 蛋白的亲缘关系较远。

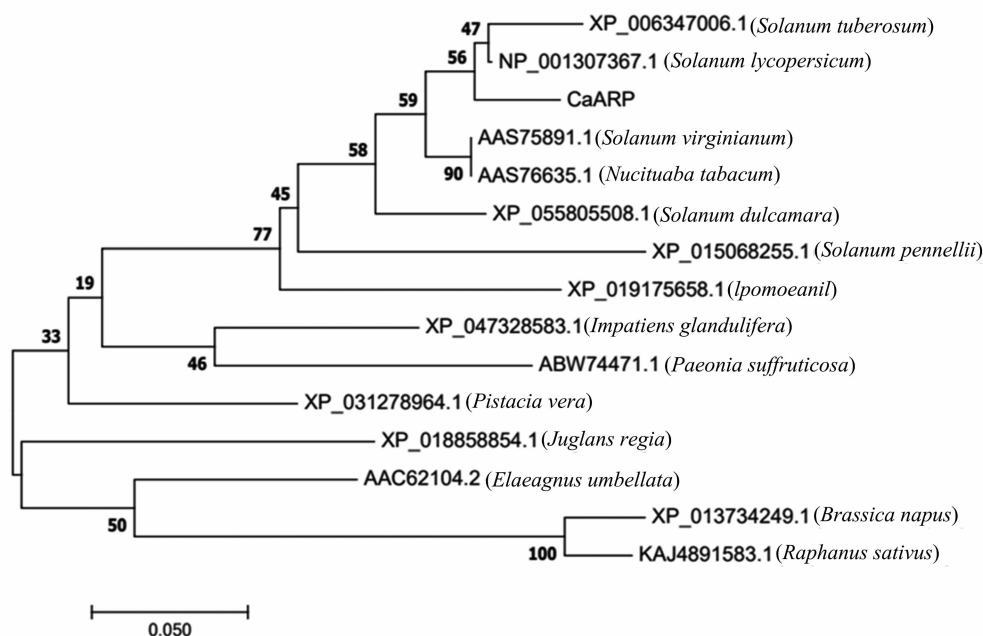
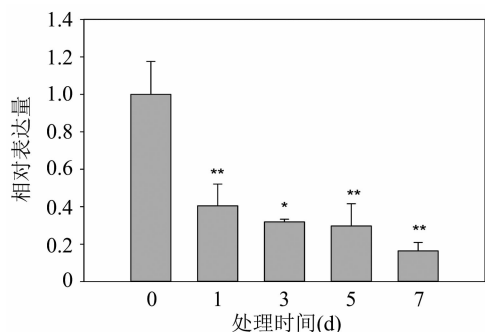


图7 不同物种 ARP 蛋白的系统进化树

### 2.3 CaARP1 基因在青枯菌处理下的表达分析

参与植物防御反应的基因在病原菌感染过程中往往表现出诱导表达或抑制表达的趋势。为了推测 CaARP1 基因在辣椒应答青枯菌侵染中的可能功能,本研究分析了其在青枯菌侵染过程中的转录水平变化情况。本研究使用灌根的方法在辣椒根部接种青枯菌,在接种后 1、3、5、7 d 收集茎基部(青枯菌大量繁殖的主要组织)提取总 RNA。通过荧光定量 PCR 检测了 CaARP1 的表达水平,由图 8 可知,接种 1 d 后 CaARP1 转录水平出现了极显著下调的趋势,该趋势持续到了接种后 7 d。以上结果暗示着 CaARP1 在辣椒应答青枯菌侵染过程中发挥着重要的作用。



\*, \*\* 分别表示在 0.05、0.01 水平上与对照差异显著

图8 青枯菌处理下 CaARP1 基因的表达情况

### 3 讨论与结论

对于生长素信号的识别、合成及代谢相关蛋白基因表达调控,需要很多基因的参与。在烟草中通过对生长素抑制基因 NtARP1 沉默和过表达发现, NtARP1 基因是调节烟草生长和抗病的重要因子<sup>[23]</sup>。Park 等的研究表明,黑刺槐生长素抑制蛋白 RpARP 编码基因表达与植株生长呈负相关,当生长素含量高时,其表达量就降低,植株表现为生长<sup>[24]</sup>。Zhao 等的研究表明,烟草生长素抑制蛋白 NtARP1 可激活细菌蛋白激发子诱导的过敏反应<sup>[23]</sup>。

辣椒是茄科植物的典型代表。笔者所在实验室前期工作中,利用 RNA-seqs 技术分析了辣椒在青枯菌侵染过程中的转录组数据,发现生长抑制蛋白 CaARP1 的转录水平出现了持续下调的趋势,本研究使用荧光定量 PCR 技术确认了 CaARP1 在青枯菌侵染下下调表达的特征。大量研究表明,植物在遭受到病原菌侵染的过程中,可暂时性地通过关闭生长发育相关基因的表达而抑制植物的生长发育,而通过驱动免疫相关基因的表达激活植物防御反应,对病原菌的入侵作出积极响应,该策略可以帮助植物在有效的资源情况下,合理调控基因的表达,保证植物生长和防御之间的平衡<sup>[25-28]</sup>。CaARP1



编码蛋白在青枯菌侵染下出现了持续下调的趋势,笔者推测在青枯菌侵染辣椒过程中,病原菌通过直接或者间接的方式抑制生长抑制蛋白 CaARP1 的转录水平,解除 CaARP1 对辣椒生长的抑制作用,促进了辣椒的生长并通过某些机制关闭寄主的防御反应,实现其侵染的目的,具体的分子机制有待于进一步解析。

本研究以辣椒品种 CM334 为研究材料,成功克隆了辣椒 *CaARP1* 基因 cDNA 全长序列,长度为 228 bp,包含一个 228 bp 的开放阅读框架,编码 75 个氨基酸。CaARP1 蛋白为碱性亲水性非分泌蛋白,与番茄同源性最高、亲缘关系最近。CaARP1 蛋白分子量为 8.298 ku,理论等电点为 9.99,带正电荷和负电荷的氨基酸数分别为 9、5 个。该蛋白最可能位于细胞核,无规则卷曲在预测的二级结构中占比最大。*CaARP1* 基因在青枯菌处理后的表达量呈现了持续下调的趋势,暗示该基因很可能在辣椒应答青枯病过程中发挥重要作用。后期的研究可以通过转基因和病毒诱导基因沉默研究 CaARP1 蛋白在辣椒应答青枯菌中的功能。

#### 参考文献:

- [1] 李成. 生长素抑制蛋白 ARP1 对烟草生长和抗病性的交叉调控作用[D]. 南京:南京农业大学,2015:1-5.
- [2] 刘艳艳,丁颖,郑佳秋,等. 植物 PRRs 和 NLRs 介导的免疫信号通路研究进展[J]. 江苏农业科学,2023,51(8):43-50.
- [3] Spoel S H, Dong X N. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells[J]. Nature Reviews Immunology, 2012,12(2):89-100.
- [4] Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature,2005,435(7041):446-451.
- [5] Lee J, Han C T, Hur Y. Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, *BrARP1* and *BrDRM1* [J]. Molecular Biology Reports,2013,40(1):197-209.
- [6] Gray W M, Kepinski S, Rouse D A, et al. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins[J]. Nature,2001,414(6861):271-276.
- [7] Kumar R, Agarwal P, Tyagi A K, et al. Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles of auxin-responsive *GH3* genes during development and response to different stimuli in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Molecular Genetics and Genomics,2012,287(3):221-235.
- [8] Zhu Q, Li B Y, Mu S Y, et al. TTG2-regulated development is related to expression of putative auxin response factor genes in tobacco[J]. BMC Genomics,2013,14(1):806.
- [9] Hayashi K I. The interaction and integration of auxin signaling components[J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(6):965-975.
- [10] Calderón Villalobos L I A, Lee S, de Oliveira C, et al. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin[J]. Nature Chemical Biology,2012,8(5):477-485.
- [11] Wang R H, Estelle M. Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway[J]. Current Opinion in Plant Biology,2014,21:51-58.
- [12] Wu L M, Yu M, Holowachuk J, et al. Evaluation of a *Brassica napus* auxin-repressed gene induced by flea beetle damage and *Sclerotinia sclerotiorum* infection [J]. American Journal of Plant Sciences,2017,8(8):1921-1952.
- [13] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. *ARF1*, a transcription factor that binds to auxin response elements[J]. Science,1997,276(5320):1865-1868.
- [14] Abel S, Theologis A. Early genes and auxin action [J]. Plant Physiology,1996,111(1):9-17.
- [15] Guilfoyle T J, Hagen G. Auxin response factors [J]. Current Opinion in Plant Biology,2007,10(5):453-460.
- [16] Roosjen M, Paque S, Weijers D. Auxin response factors: output control in auxin biology[J]. Journal of Experimental Botany,2018,69(2):179-188.
- [17] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling[J]. Science, 2006,312(5772):436-439.
- [18] 苏盼盼. 水稻生长素抑制基因 *OsARP1* 与 *Pid3* 介导的稻瘟病抗性关系的初步研究[D]. 南昌:南昌大学,2018:4-7.
- [19] 刘艳艳. *CaSGT1* 和 *GaSRC2-1* 互作及其在 *PcINF1/CaSRC2-1* 激活辣椒免疫反应中的作用分析[D]. 福州:福建农林大学,2016.
- [20] 申磊. *CaCDPK15*、*CaCBL1* 与 *CaCML13* 在辣椒应答青枯菌感染或高温高湿胁迫中的作用分析[D]. 福州:福建农林大学,2020:3-27.
- [21] Shen L, Liu Z Q, Yang S, et al. Pepper CabZIP63 acts as a positive regulator during *Ralstonia solanacearum* or high temperature-high humidity challenge in a positive feedback loop with CaWRKY40 [J]. Journal of Experimental Botany,2016,67(8):2439-2451.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [J]. Methods,2001,25(4):402-408.
- [23] Zhao Y Y, Li C, Ge J, et al. Recessive mutation identifies auxin-repressed protein ARP1, which regulates growth and disease resistance in tobacco [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014,27(7):638-654.
- [24] Park S, Han K H. An auxin-repressed gene (*RpARP*) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation [J]. Tree Physiology, 2003,23(12):815-823.
- [25] Zhou J M, Zhang Y L. Plant immunity: danger perception and signaling[J]. Cell,2020,181(5):978-989.

邓文楷, 彭 艳, 杨 成, 等. 建兰 MYB 基因家族鉴定及在盐胁迫下的表达分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(21): 19–28.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.21.004

# 建兰 MYB 基因家族鉴定及在盐胁迫下的表达分析

邓文楷<sup>1</sup>, 彭 艳<sup>1</sup>, 杨 成<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>2</sup>, 潘贵英<sup>3</sup>

(1. 贵州民族大学生态环境工程学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州民族大学研究生工作部, 贵州贵阳 550025;  
3. 贵州民族大学工程实训中心, 贵州贵阳 550025)

**摘要:**植物 MYB 家族是最大的转录因子家族, 在植物胁迫反应中起着重要作用。基于全基因组分析, 对建兰 (*Cymbidium ensifolium*) MYB 家族成员进行鉴定和生物信息学分析, 并分析相关基因在不同盐胁迫类型下的表达情况。结果表明, 从建兰基因组中共鉴定出 136 个 CeMYB 转录因子, 包括 27 个 1R-MYB、102 个 R2R3-MYB、5 个 3R-MYB 和 2 个 4R-MYB。通过与拟南芥 MYB 进行系统发育得到 20 个基因簇, 表明这些 CeMYB 可能具有多种生物学功能。亚细胞定位、染色体定位及保守域显示, 136 个 CeMYB 分布在 18 条染色体上, 大多数 CeMYB 位于细胞核中, 且具有典型的氨基酸序列重复; 基序预测分析表明, 多个保守元件主要位于 CeMYB 的 N 端, 表明它们的功能相对保守。转录组表达分析表明, S13 亚家族的 *CeMYB61* 和 *CeMYB89* 可能是调控盐胁迫的关键基因, qRT-PCR 验证进一步表明, *CeMYB61*、*CeMYB89* 在不同组织中表现为根系 > 假鳞茎 > 叶片 > 花序, 其表达水平、模式与植株 Na<sup>+</sup> 浓度分布一致, 证实 *CeMYB61*、*CeMYB89* 是建兰耐受盐胁迫的指示基因。研究为进一步探索 MYB 基因的潜在机制及盐胁迫下候选基因的挖掘提供了理论基础。

**关键词:**建兰; MYB 转录因子; 盐胁迫; 基因组; qRT-PCR

**中图分类号:**S682.310.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)21-0019-10

建兰 (*Cymbidium ensifolium*) 是中国栽培历史悠久的传统兰花种类之一, 因其香气馥郁、花姿优美等优点具有较高的观赏价值, 深受消费者喜爱<sup>[1]</sup>。水分、温度等环境皆会影响建兰的生长发育及体态建成<sup>[2]</sup>, 且近期研究表明, 由于野外氮沉降或室内施肥方式导致的盐胁迫已成为影响兰花生长与栽培的重要非生物因素<sup>[3]</sup>。在绿色植物中, 盐对植物体的影响可贯穿植物生长史的各个发育时期, 研究表明盐胁迫可对叶绿体光化学反应产生不利影响<sup>[4]</sup>, 导致气孔关闭、胞间 CO<sub>2</sub> 浓度增加, 此外可导

致离子稳态失衡、激素代谢紊乱及 DNA 突变等<sup>[5]</sup>。在非生物胁迫反应中发掘候选基因和剖析信号机制, 是应对植物非生物胁迫的关键策略。

MYB 家族是数量最多的转录因子家族之一, 广泛分布于高等植物的基因组中; MYB 家族的共同特征是具有高度保守的 DNA 结合结构域, 在其 N 末端由 1~4 个不完整的重复序列构成<sup>[6]</sup>。这些重复序列包含 3 个保守的色氨酸残基并编码 3 个  $\alpha$ -螺旋和 1 个与 DNA 结合的螺旋-转角折叠结构<sup>[7]</sup>。而 C 末端区域是一个高度不一致的激活域, 从而广泛调控 MYB 的功能表达<sup>[8]</sup>。根据 MYB 不完全串联重复序列(R)的数量和位置, 可将 MYB 家族成员分为 4 个亚家族, 即 1R-MYB 蛋白(含有 1 个 R 结构域)、R2R3-MYB 蛋白(含有 2 个 R 结构域)、R3-MYB 蛋白(包含 3 个 R 结构域)和 4R-MYB 蛋白(包含 4 个 R1 和/或 R2 结构域)<sup>[9]</sup>。一般来说, 具有 2 个重复序列的 MYB 成员是高等植物中的

收稿日期: 2023-05-13

基金项目: 贵州省特色林业产业项目(编号: 特林研 2020-04); 贵州省大学生创新创业项目(编号: S202010672021)。

作者简介: 邓文楷(1996—), 男, 四川自贡人, 硕士研究生, 主要从事园艺环境工程研究。E-mail: dl18222235394@163.com。

通信作者: 彭 艳, 博士, 副教授, 主要从事生物环境地球化学研究。E-mail: yan.jane.peng@gmail.com。

[26] Wang Z X, Yang L Y, Jander G, et al. AIG2A and AIG2B limit the activation of salicylic acid-regulated defenses by tryptophan-derived secondary metabolism in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2022, 34(11): 4641–4660.

[27] Bjornson M, Pimprikar P, Nürnberger T, et al. The transcriptional

landscape of *Arabidopsis thaliana* pattern-triggered immunity [J]. Nature Plants, 2021, 7(5): 579–586.

[28] Macho A P, Schwessinger B, Ntoukakis V, et al. A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation [J]. Science, 2014, 343(6178): 1509–1512.