

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.02.007

引用格式:陆洋,蔡丽蓉,彭迪,等.海雀稗酵母单杂文库构建及*Pvrboh5*上游调控因子筛选[J].草地学报,2026,34(2):447—455
LU Yang, CAI Li-rong, PENG Di, et al. Construction of Yeast One-hybrid Library and Screening of Factors Regulating *Pvrboh5* Expression in *Paspalum vaginatum*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(2):447—455

海雀稗酵母单杂文库构建及*Pvrboh5*上游调控因子筛选

陆 洋,蔡丽蓉,彭 迪,陈亚方,黎俊显,刘大林,潘 玲*
(扬州大学动物科学与技术学院,江苏 扬州 225009)

摘要:为了探究*Pvrboh5*表达的分子调控机制,本研究运用gateway技术构建了海雀稗(*Paspalum vaginatum* Swartz)酵母单杂文库并筛选海雀稗*Pvrboh5*的上游调控因子。本试验以盐处理‘海岛2000’海雀稗为材料,经PCR扩增得到*Pvrboh5*的启动子序列,再将其连接至酵母单杂诱饵载体pBait-AbAi上并命名为p*Pvrboh5*-AbAi,接着转化到Y1H Gold酵母菌株上构建重组诱饵菌株。同时利用gateway技术构建酵母单杂文库。在分离纯化mRNA的基础上,合成了3种读码框的双链cDNA,通过BP反应构建其相应的初级文库,再通过LR反应构建高质量的次级文库。最后从海雀稗酵母cDNA文库中筛选与*Pvrboh5*互作的转录因子。结果显示,p*Pvrboh5*-AbAi/Y1H Gold诱饵菌株在AbA浓度为100 ng·mL⁻¹时转录自激活得到有效抑制;在筛库实验中,共获得18个与*Pvrboh5*启动子结合的蛋白。以上结果为后续深入探究*Pvrboh5*基因调控机制提供理论基础。

关键词:海雀稗;酵母单杂;Gateway技术;*Pvrboh5*启动子;转录因子

中图分类号:S688.4

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)02-0447-09

Construction of Yeast One-hybrid Library and Screening of Factors Regulating *Pvrboh5* Expression in *Paspalum vaginatum*

LU Yang, CAI Li-rong, PENG Di, CHEN Ya-fang, LI Jun-xian, LIU Da-lin, PAN Ling*
(Yangzhou University, College of Animal Science and Technology, Yangzhou, Jiangsu Province 225009, China)

Abstract: To explore the molecular regulatory mechanisms of *Pvrboh5* expression, this study constructed a yeast one-hybrid library from *P. vaginatum* (*Paspalum vaginatum* Swartz) using Gateway technology and screened the upstream regulatory factors of *Pvrboh5*. Salt-treated stolons of *P. vaginatum* ‘Sea Isle 2000’ were used as experimental material. The promoter sequence of *Pvrboh5* was amplified by PCR and subsequently ligated into the yeast one-hybrid bait vector pBait-AbAi, the construct was named as p*Pvrboh5*-AbAi. This construct was then transformed into the Y1H Gold yeast strain to generate the recombinant bait strain. Concurrently, the yeast one-hybrid library was constructed using Gateway technology. Following mRNA isolation and purification, three reading-frame double-stranded cDNAs were synthesized. Primary libraries were constructed via BP reaction, followed by the generation of high-quality secondary libraries through LR reaction. Finally, transcription factors interacting with *Pvrboh5* were identified by screening the *P. vaginatum* yeast cDNA library. The results showed that transcriptional autoactivation of the p*Pvrboh5*-AbAi/Y1H Gold bait strain was effectively suppressed at an AbA concentration of 100 ng·mL⁻¹. In the screening experiment, a total of 18 proteins that bind to the *Pvrboh5* promoter were identified. These findings provide a theoretical foundation for further elucidating the regulatory mechanisms of the *Pvrboh5* gene.

Key words: *Paspalum vaginatum*; Yeast one-hybrid; Gateway technology; *Pvrboh5* promoter; Transcription factor

收稿日期:2025-04-09;修回日期:2025-07-13

基金项目:国家自然科学基金(32401488);扬州大学海内外优秀人才科研启动经费(137013098/5019)资助

作者简介:陆洋(2001-),男,汉族,江苏无锡人,硕士研究生,主要从事海雀稗机理研究,E-mail:lyydx2019@163.com;*通信作者 Author for correspondence, E-mail:panling1199@126.com

海雀稗 (*Paspalum vaginatum* Swartz), 又称夏威夷草 (Seashore paspalum), 是禾本科 (Gramineae), 雀稗属 (*Paspalum*) 的一种多年生暖季型草坪草, 主要分布在热带和亚热带地区, 是世界公认的暖季型优质草坪草。除了作为草坪植物, 海雀稗亦是盐碱地绿化的首选地被植物, 可用于海滨滩涂改良和水土保持等, 在环境治理及生态修复方面发挥着重要的作用^[1]。与此同时, 海雀稗是玉米、高粱等重要粮食作物的野生近缘物种^[2-3]。研究海雀稗对盐胁迫环境的抵御机制, 可以为改善其他谷物作物抗逆性提供新的研究思路, 进而促进农业的发展。

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 广泛存在于植物和哺乳动物细胞中, ROS 可作为第二信使激活下游防御基因的表达^[4]。呼吸爆发氧化酶同源物 (Respiratory burst oxidase homolog, rboh), 是植物中一类关键的 NADPH 氧化酶。植物体内的 ROS 主要由 rboh 蛋白催化产生。由于 ROS 在细胞中保持在较低水平以防止氧化损伤, 因此 rboh 蛋白控制的局部 ROS 爆发使其成为有效的信号分子来调节植物的生长发育和应激反应^[5]。rboh 基因启动子区域含有多种顺式作用元件, 但不同 rboh 成员启动子所携带的顺式作用元件在类型和数量上存在显著差异。植物通过特定的转录因子识别并结合这些顺式作用元件, 在转录水平上精确调控不同 rboh 的表达, 进而决定了它们在植物体内功能的多样性。如在拟南芥中, 低氧胁迫诱导内源性乙烯的生物合成。乙烯信号上调乙烯响应因子 *AtERF73/HRE1* 的表达。*AtERF73/HRE1* 直接结合 *AtRbohB/D/G/I* 基因启动子区域中的乙烯响应元件 (EREs), 对这些 rboh 基因的表达实施差异性调控。这种精确的调控机制维持了 ROS 在胁迫条件下的动态平衡, 最终提高植物对低氧胁迫的耐受性^[6]; 在盐胁迫环境下, 烟草 bHLH (Basic helix-loop-helix) 转录因子 *NtbHLH123* 的表达被激活。*NtbHLH123* 与烟草 *NtRbohE* 基因的启动子区域相互作用, 正向调控其转录表达, 进而促进 ROS 的产生, 增强植物的耐盐性。海雀稗 *Pvrboh5* 是拟南芥 *AtrbohD* 的同源基因^[7]。在拟南芥中, *AtrbohD* 产生的 ROS 可以作为信号分子调节盐胁迫环境下的 Na^+/K^+ 稳态, 从而提高拟南芥的耐盐性^[8]。然而, 关于海雀稗 *Pvrboh5* 抵抗逆境胁迫的分子调控机制知之甚少。海雀稗通过介导何种转录因子与

Pvrboh5 基因启动子上对应的顺式作用元件相互作用来调控 *Pvrboh5* 基因的表达有待深入研究。

酵母单杂系统 (Yeast one-hybrid, Y1H) 衍生自酵母双杂系统, 与酵母双杂系统不同的是, 酵母单杂系统研究蛋白质与 DNA 之间的相互作用, 尤其是转录因子 (Transcription factor, TF) 与靶 DNA 启动子区域的结合^[9-11]。Gateway 技术是依据噬菌体侵染宿主大肠杆菌从而将自身基因整合到宿主基因组上的过程发展而来的一个技术^[12]。与其他酵母单杂文库构建技术相比, Gateway 技术有着高通量、高效克隆的优点。在国内, 已经有报告表明在辣椒上成功利用 Gateway 技术高效构建酵母双杂分析用 cDNA 文库^[13]。基于 Gateway 重组克隆技术的高通量特性, 可高效构建高质量酵母单杂交 cDNA 文库。该文库为系统筛选 *Pvrboh5* 基因的潜在转录调控因子提供了可靠平台, 并可直接验证候选转录因子与 *Pvrboh5* 启动子区顺式作用元件的特异性互作关系。本研究以海雀稗品种‘海岛 2000’为实验材料, 利用 Gateway 技术构建酵母单杂文库并构建 *Pvrboh5* 诱饵载体, 同时以 *Pvrboh5* 酵母诱饵菌株对该酵母单杂交文库进行筛选, 以期后续探究 *Pvrboh5* 调控因子及验证转录因子与 *Pvrboh5* 启动子区域互作奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 以海雀稗品种‘海岛 2000’为试验材料, 剪取匍匐茎放置于扬州大学动物科学与技术学院恒温培养箱中进行水培, 培养箱温度设为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}/25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (昼/夜), 光照强度为 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期为 16 h/8 h (昼/夜), 相对湿度为 65%~75%。材料培养约 15 d, 期间按需更换 1/2 霍格兰营养液。将培养完成的海雀稗幼苗置于浓度为 $400\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中处理 1 h^[14], 后剪取匍匐茎用于后续试验。

1.1.2 试验试剂 Dynabeads™ mRNA 纯化试剂盒 (cat. 61006)、dNTP 混合物 (cat. 18427013)、SuperScript™ III 逆转录酶 (cat. 18080-093)、第二链缓冲液 (cat. 10812-0114)、大肠杆菌 DNA 连接酶 (cat. 18052019)、DNA 聚合酶 I (cat. 18010017)、T4 DNA 聚合酶 (cat. 18005017)、T4 DNA 连接酶 (cat. 15224041)、核糖核酸酶 H (cat. 18021014)、

cDNA 分级分离色谱柱 (cat. 18092-015)、Gateway™ BP Clonase™ II 酶混合物 (cat. 11789-020)、Gateway™ LR Clonase™ II 酶混合物 (cat. 11791-020)、Electro MAX™ DH10B T1 噬菌体耐受感受态细胞 (cat. 12033-015) 均购自赛默飞科技公司; YNB (Coolaber, cat. PM2070-500G), PEG3350 (Coolaber, cat. CP8211-500G), 乙酸锂二水本 (Sangon-Biotech, cat. A500565-0250), 鲑鱼精 DNA (Solarbio, cat. H1060), PEG/LiAC (Coolaber, cat. YT0006-50mL), YPDPlusLiquid (Coolaber, cat. YT0004-25mL)。试验所用引物均由 Invitrogen 公司合成并纯化。

1.2 试验方法

1.2.1 海雀稗 *Pvrboh5* 启动子区域顺式作用元件分析 通过 phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 数据库获得海雀稗 *rbob5* 启动子区域序列。

将启动子区域序列截短为 800 bp 后采用在线网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对海雀稗 *Pvrboh5* 启动子区域进行顺式作用元件分析。

1.2.2 海雀稗 *Pvrboh5* 启动子克隆及诱饵载体的构建 以海雀稗‘海岛 2000’的 DNA 为模板, 以 *Pvrboh5*-F 和 *Pvrboh5*-R (表 1) 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶在 5 v·cm⁻¹ 电压下电泳 20 min, 电泳片段在紫外灯下切取出来, 根据厂家的试剂盒 (Axygen, cat. AP-GX-50) 说明书放在一个体系中进行溶胶回收, 用总体积 40 μL 的水溶解回收 DNA。通过同源重组的方法, 将目的片段连接至酵母单杂诱饵载体 pBait-AbAi, 并将重组诱饵载体命名为 p*Pvrboh5*-AbAi。利用限制性内切酶 EcoRV 对重组质粒进行酶切, 酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 验证重组质粒实际片段大小是否与理论值一致。

表 1 本试验中所用到的引物
Table 1 Primers used in this study

用途 Application	引物名称 Primer name	序列 Sequences(5'-3')
启动子扩增	Pvrboh5-F	TTGAATTCGAGCTCGGTACCTtaaatatagataatgaaatagacgatctgttgactcatc
	Pvrboh5-R	TACAGAGCACATGCCTCGAGggcagagtccaacctccgctc
cDNA 第一链的合成	Biotin-attB2-Oligo (dT) Primer Sequence	GGCGGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGT
cDNA 三框接头序列	ATTB1-A-F	TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGG
	ATTB1-A-R	CCAACTTTTTTTGTACAAAGTTGTCCCC
	ATTB1-B-F	TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGA
	ATTB1-B-R	TCCAACCTTTTTTTGTACAAAGTTGTCCCC
	ATTB1-C-F	TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGAA
	ATTB1-C-R	TTCCAACCTTTTTTTGTACAAAGTTGTCCCC
文库克隆检测	pDONR222-F	TCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTT
	pDONR222-R	AGAGCTGCCAGGAACAGCTATGACCATGTAATACGACTC
诱饵重组菌株检测	Pvrboh5 鉴定-F	CTATGGACTGCTTTGCATTTGG

1.2.3 *Pvrboh5* 诱饵载体线性化及酵母 Y1H Gold 的转化 将 p*Pvrboh5*-AbAi 诱饵载体与阳性对照 p53-AbAi 质粒进行酶切线性化处理, 使用限制性核酸内切酶 BstBI 进行酶切反应, 酶切完成后使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳回收线性 DNA 片段根据酵母转化混合液 PEG/LiAC (Coolaber, cat. YT0006-50 mL) 使用说明书上的操作流程将其转化至酵母感受态细胞。每个转化用 300 μL 无菌水悬浮菌体, 轻轻吹打混匀, 涂布于相应的缺陷型筛选平板上于 30℃ 培养 3~5 d。挑取培养基上形态规则的白色单菌落并配制 PCR 检测的反应体系, 诱饵重组菌株用引物见表 1, PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳并分析来进行重组酵母菌株的阳性鉴定。

1.2.4 重组诱饵酵母菌株的自激活检测 挑取培养基上的单菌落用 3 mL 的 SD/-Ura 培养基在 30℃ 摇床培养 14 h 后常温离心 5 min 收集菌体。菌体用无菌水重悬, 调整 OD600 至 0.2 后取 1 μL 菌液加无菌水稀释 100 倍。把所有稀释后的酵母菌液分别涂布到不同浓度梯度 AbA (0, 50, 100, 150, 200, 500, 800, 1000 ng·mL⁻¹) 的 SD/-Ura 平板, 30℃ 培养箱培养 2~3 d。实验组在某个 AbA 浓度下的平板未长出菌落, 记为其最低 AbA 抑制浓度。阳性对照 p53-AbAi 的最低 AbA 抑制浓度为 200 ng·mL⁻¹。

1.2.5 海雀稗酵母单杂文库的构建及鉴定 取海雀稗完整植株的根茎叶, 根据 CTBA 法提取其 Total RNA, 用琼脂糖凝胶检测片段大小, 取质量合

格的 Total RNA 进行分离纯化操作。参照 Clone-Miner™ cDNA 文库构建操作指南进行反转录反应、聚合反应以及连接反应,合成含相应 attB1 接头的 3 种读码框双链 cDNA(表 1),利用 TEN buffer 进行分级分离。将上述 cDNA 进行 BP 重组反应,反应 16~20 h 后将重组产物加到 50 μL 电转化 Electro MAX DH10B 细胞中,转化阶段完成后,将细胞转移到 SOC 培养基中,在 37℃ 下培养 1 h。培养结束后,取菌液 10 μL 用于库容量鉴定。稀释初级文库质粒至 300 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,取初级文库质粒进行 LR 重组反应 16~20 h。将 LR 重组产物电转化至 DH10B 感受态细胞,后加入 SOC 培养基并将其置于 37℃, 225~250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温摇床培养 1 h。培养结束后取菌液 10 μL 用于库容量鉴定。根据入门载体 pDONR222 上特有的序列设计引物(表 1),用枪头随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR 鉴定。PCR 产物取 5 μL ,与 loading buffer 混合后进行电泳检测,判断文库插入片段长度和阳性率。

1.2.6 海雀稗酵母单杂交文库筛选 从 SD-Ura 平板挑取单克隆菌种接到 10 mL 液体 SD-Ura 培养基中,30℃,225 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 8 h。将 10 mL 菌液转移至 40 mL 液体 SD-Ura 培养基中,30℃,225 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 12 h。室温 700 $\times\text{g}$,5 min 收集菌体,用 YPDA 液体重悬,转移至 100 mL YPDA 液体培养基中,使其初始 OD₆₀₀=0.15,30℃,225 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 4~5 h 后至 OD₆₀₀=0.6,用 50 mL 离心管室温 700 $\times\text{g}$,5 min 收集菌体。分别用 30 mL 无菌水、1 mL 的 1.1 $\times$ TE/LiAc 重悬菌体,离心后取上清合并,用 400 μL 的 1.1 $\times$ TE/LiAc 重悬。向离心管中依次加入 PEG/LiAc,感受态细胞,ssDNA (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),文库质粒 DNA 于 30℃ 水浴 45 min。加入 160 μL 的 DMSO 混匀,42℃ 热激 20 min。室温 700 $\times\text{g}$,离心 5 min 收集菌体,弃上清,加入 3 mL 的 YPDA 液体培养基,30℃,150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 复苏 1.5 h。在质粒导入酵母诱饵菌株后,取转化后的重悬菌液 300 μL ,涂布到 SD-Ura-Leu+100 ngAbA 平板,30℃ 培养 3~5 d。

1.2.7 阳性克隆的检测 从上述 SD-Ura-Leu+100 ngAbA 平板上挑取所有大颗饱满的克隆,用生理盐水重悬后,点板于 SD-Ura-Leu+100 ngAbA 平板,30℃ 培养 3~5 d。进行菌落 PCR 扩增,并电泳检测,将扩增的目的条带回收后进行测序,并将测序结果与对应物种的 cds 数据库进行比对,获得猎物蛋白相关信息。

2 结果与分析

2.1 *Pvrboh5* 诱饵载体构建及顺式作用元件分析

由于载体构建采用同源重组和 golden gate 无缝克隆方法,构建完成后目标片段两端不含有酶切位点,因此无法通过双酶切得到目标基因片段和载体骨架片段。故本试验选择 1~3 个阳性条带对应的菌液,取 100 μL 送样测序。测序结果包含 *Pvrboh5* 启动子序列(图 1),说明诱饵载体构建成功。

利用 PlantCARE 数据库对 *Pvrboh5* 启动子进行顺式元件的分析。结果显示,除了 TATA-box 和 CAAT-box 以外,还含有光响应元件、激素响应原件、植物生长发育相关元件及非生物胁迫响应原件(表 2)。其中光响应元件包括 G-box、GT1-motif 和 GA-motif;激素响应元件包括响应脱落酸的 ABRE、响应茉莉酸的 CGTCA-motif、TGACG-motif 以及响应生长素的 AuxRR-core;非生物胁迫响应原件包括厌氧诱导响应元件 ARE 和干旱诱导响应元件 MBS。其他元件包括种子特异性调控元件 GCN4-motif,氧化应激响应元件 as-1 及 3 个未知功能元件。

2.2 *pPvrboh5*-AbAi 诱饵菌株的鉴定和自激活检测

本试验预测 p53-AbAi/Y1H Gold 阳性对照用通用引物 YSH-F/YSH-R 能扩增出 1771 bp 的条带,阴性对照无条带,p*Pvrboh5*-AbAi/Y1HGold 酵母重组菌株用引物 *Pvrboh5* 鉴定-F(表 1)及通用引物 YSH-R 扩增片段大小为 2041 bp。实验结果表明 p53-AbAi/Y1H Gold 阳性对照电泳检测结果位于 1500~2000 bp 之间且 p*Pvrboh5*-AbAi/Y1HGold 酵母重组菌株电泳检测条带位于 2000 bp 左右(图 2),符合预期。取 1 个阳性条带对应的菌液,摇菌进行自激活检测。p53-AbAi 为阳性对照,正常情况下 AbA 浓度为 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 即可完全抑制菌株生长。图 3 中未加 AbA 时菌株生长正常,加入 AbA 后菌落生长受到抑制,说明体系正常运作。p*Pvrboh5*-AbAi 为实验组,在 AbA 抑制浓度为 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时完全无菌落长出,因此对于该实验组,100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 是最低 AbA 抑制浓度(图 3),可以直接进行酵母筛库。

载体序列:

1-aagcttgaat tcgagctcgg taccttaaat atagataatg aaatagacga tctgtttgac -60
61-tcatctgaga acacaacac cgaggagatg gtaaaagcta gtccggttcg gtcggcagtt -120
121-tgctctatgc ggcacacatg tccacacatg ataagagaga agagcgtcgc gagccggcca -180
181-gaagccaatg gaggctccta gcttagggag tggtagtggt ttatgaaaca aatgtttact -240
241-cactattcaa atgagccctt aaccaccccc aacatgaagt acgggcgcat cggcaaggcc -300
301-atttctttta atttctcga tggtagcgat gcatatgccg attgagggcg acatctgcga -360
361-cagtgtgtgc tgaattgcct ttgctctctg gtcagagata gtagggtggc ctgaccttta -420
421-acagaatgcc tatccaccg ttigtatgtg aactttact tgccataact acatgtgtta -480
481-tttatagca taaacaccca tggtaacgtc aaacatgttt ttatcaggtc tctacaatg -540
541-actccaaatg caaagcagtc catagtcttt gtgaactcgg tccatgaaaa aggtaccatc -600
601-atgcatattg gctgttcata aagaataaaa cattattatc ttctactagc atctctcttc -660
661-aatgtttctt ttttttata tgaataaata tactgtgggt actatgctcc actgaagtgt -720
721-acacattgtg acacaatagc atatagctaa aaacacattt cacatatgga ctgattactc -780
781-taatacatg tttgttgcca cgaagcggag ggttgaaact tgccctcgag catagtgttc -840
841-tgtatgata taaaactctt gttttctctt ttctctaaaa tattctttcc ttatcatata -900
901-ggtcctttgt agcataaatt actatacttc tatagacagc caaacacaaa tccacacact -960
961-aaataataaa tggcaaaccc tttttgctta gttttcttat cacagagacc tacaacatgc -1020
1021-catgtagcgc attaganaac aagttttagt cccatcaaaa cgttgttgaa ggtgcaaaaa -1080
1081-tacaaacccc ctttaagcga ctgggtgcac tacatctttc tgggatccat catgtgtgtt -1140
1141-gtgttcatta ctaatccgc accttggatc ttcaagactc tttttttatg ttctgtgttc -1200
1201-actttattca tcatctcagc tactgtcacg tttttcttca atgccttgcc catctcaaca -1260
1261-tgggtggcgc tgaatttcac ttcatgttac ttccagatg accgcagggc ttctattact -1320
1321-gtcaaatgta taccagcggt ggaacaacat ttatagcgcg acaatttaag tgatattctt -1380
1381-gcaacatcga cgaattctct ttggacatt ttacatgggt taccgttgag actatttcat -1440
1441-tatggggccc catttgtctg tgcgtccatc ttatctgat ttggtccacc aactgttttg -1500
1501-caaggttatg cttttgtcatt tggttatagt aacctgtttg gtgttatcat gcaaaatgac -1560
1561-tttccagccc ctcccccatg gtataaanaa ctctatagat tgcaatcagc caactatgat -1620
1621-atgcatggt cgcctggatg ttatgcataa tactgtgat taatatgat -1680
1681-actacatggt tttcaaatct ctccgtcatt ttccgtgctt ttcccttcat gcattccggg -1740
1741-tgtgctacta tggaaagccc gttttctgtt tattgttttc caaaattgaa gccttgtttt -1800
1801-attgcttatg ttgtcgtgtt atggtgggtc actatgtatc tgacacacca ttattttgta -1860
1861-gaacttatgg caggtttctg gctgtcatat gttattttcc agtacacaaa gtacacacat -1920
1921-ttacaatgtg tagataatgc tcttttttgc agatgggtcat acacttcaat tgagaataac -1980
1981-gataatcaca agagtgtacc attggtcgca gattcaaaag atatcgaaag tggccctttg -2040
2041-tccaacttgg aacttgactt tgatcttaat atgactgatg aaccagtgat aagcccttcg -2100
2101-ttatttgatg gatctacttc gtgttctcgt tcgtcccgca cgtctataac gtcaatagat -2160
2161-gtaaaagagg cttaaaggaa tccattatgt actattttaa aaacacaaac ttgtggatgt -2220
2221-tcgttttatt cttttctttt taacttttta tcatgggagc ctacttccgc tttttccgca -2280
2281-tttggttaca tgacatcaac catatcagca aaagtgtatc ggggtattat ttgtccgtca -2340
2341-tttctctgtt ctgcgtatta ttccaacgcg ttgtttgctc gctttctgac aaactggccc -2400
2401-tcgactctag cgaattaatt cgtaatcatg tcatagctgt ttctctgtg aaattgttat -2460
2461-ccgctcacaa ttccacacaa catagcagcc ggaagcataa agtgaagac ctgggggtgc -2520
2521-taagtgtgta gctaactcac attaatgtcg ttgcgctcac tggccgcttt ccagtcggga -2580
2581-aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggcacacgcg cggggagagg cggtttcgct -2640
2641-attggggcgt cttccgcttc ctgcgtcact gactgcgtcg gctcgtgctg tcggcgtcgg -2700
2701-cgagcggtat cagctcacct aaaggcggta atacggttat cacagaatc aggggataac -2760
2761-gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgc -2820
2821-ttgcgtgcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgaagctca -2880
2881-agtcagaggt ggcgaacccc gacagagcta taagaatacc aggcgttttc cccgtggaac -2940
2941-tcccctgtgc gctctcctgt tccgaccccg ccgcttaccg gatacctgtc cgcttttctc -3000
3001-ccttcgggaa gctgtgcgct ttctcatagc tcacgtctga ggtatctcag tccggtgtag -3060
3061-gtcgttctgc ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagccgca ccgctgcgcc -3120
3121-ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagc acgactttac gccactggca -3180
3181-gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcgggtgctac agagtctctg -3240
3241-aagtggtggc ctaactacgc ctacacatga agaacagtat ttgggtatct gcctctgctg -3300
3301-aagccagtta ccttcggaaa aagagtttgt agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct -3360
3361-ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa -3420
3421-gaagatcctt tgatcttttc tacggggctc gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa -3480
3481-gggatttttg tcatgagat atcaaaaagg atcttcacct agatctcttt aaatataaaa -3540
3541-tgaagtttta aatcaatca agtatatat gagtaacctt ggtctgacag ttaccaatgc -3600
3601-ttaactcagtg aggcacctat ctacgcgcat tgcctatttc gttcatccat agttgcctga -3660
3661-ctccccgctg ttagataaac taccgataac gagggtttac catctggccc cagtgctgca -3720
3721-atgataccgc gagaccacgc ctacccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc -3780
3781-ggaagggcgc agcgagaaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat -3840
3841-tgttgcggcg aagctagatg aagtagttcg ccagtttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc -3900
3901-attgctacag gcactgtggt gtcacgctcg tcgttttgta tggcttcatc cagctccggc -3960
3961-tcccaacgat caagcgagat cccatgatcc cccatgtttt gcaaaaaagg ggttagctcc -4020
4021-ttgcgtcttc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgtttatcat catggttatg -4080
4081-gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccactcgtaa gatcgttttc tgtgactgtt -4140
4141-gagatctcaa ccaagtctat ctgagaatag tgaatcggcg gaccgagttg ctcttgcccg -4200
4201-taaccaatgc gggataatgc cgcgccacat agcagaacct taaaagtgtc catcatgga -4260
4261-aaacgtttct cggggcgaaa actctcaagg ctcttaccgc ttttgagatc cagttcgtg -4320
4321-atgagcggat gtcaccccaa ctgattcttca gttactttta gtttccacag cgtttctggg -4380
4381-tgagcaaaaa cagggaagca aatgccgca aaaaagggaa taaggcgac acggaatgt -4440
4441-tgaactacta tactcttctt ttttcaatat tattgaagca ttatcaggg ttattgtctc -4500
4501-atgagcggat acatatgtga atgattttga aaaaattgag aatatgggtg tccgcgca -4560
4561-tttccccgaa aagtgccacc tgggttaata ctgataatg taaattgaag ctctaatgtg -4620
4621-tgagtttagt atacatgat ttacttataa tacatttttt tagttttgct ggccgcatct -4680
4681-tctcaaatat gcttccacgc ctgcttttct gtaacgttca cctctacct tgatccctc -4740
4741-tcccttttga aatagtcctc ttccaacaa aataagctga gatcctgtag agaccacatc -4800
4801-atccacgggt ctatactgtt gaccacatgc gttccctgt tcatctaaac ccacacggg -4860
4861-tgtcatacac aaccaatgct aaccttcatc tcttccaccc atgtctcttt gagcaataa -4920
4921-gccgataaca aaacttttgt cgtcttctgc aatgtcaaca gtacccttag tatattctcc -4980
4981-atgagtagtg gaggccctgc atgacaattc tgctaacatc aaaaggcctc taggttctct -5040
5041-tgttacttct tctgcgcctt gcttcaaac gctaacaata cctggggcca ccacaccgtg -5100
5101-tgcatctgta atgtctgccc attctgctat tctgtataca cccgcagagt actgcaattt -5160
5161-gactgtatta ccaatgtcag caaattttct gttctogaag agtaaaaaat tgtattggc -5220
5221-ggataatgcc tttagcggtc taactgtgcc ctccatggaa aaatcagcta agatattcac -5280
5281-atgtgttttt agtaaaaaa tttggggacc taatgcttca actaactcca gtaattctct -5340
5341-ggtgtgtgca acatccaatg aagcacacaa gttgtgttgc tttctgtgca tgatattaaa -5400
5401-tagcttgcca gcaacaggac taggatgagt agcagcagct tccttatatg tagctttgca -5460
5461-catgatttat cttcgttttc gcagggtttt gttctgtgco agtttggtta agaatactg -5520
5521-gcaattttat gtttttcaaa cactacatat gcgtatatat accaatctaa gtctgtgctc -5580
5581-cttctctgtt tcttctctct gttcggagat taccgaatca aaaaaatttc aaggaaaccg -5640
5641-aaatcaaaaa aaagaataaa aaaaaaatga tgaattgaa

图 1 诱饵载体序列

Fig. 1 Decoy vector sequence

注:划线部分为 *Purboh5* 启动子序列

Note: The underlined portion indicates the *Purboh5* promoter sequence

表 2 海雀稗 *Purboh5* 启动子所含有的顺式元件

Table 2 cis-acting elements in *Purboh5* promoter

名称 Name	序列 Sequence	功能 Functions
TATA-box	TATA(AA)	—30 转录起始结合
CAAT-box	CCAAT/CAAAT	启动子和增强子共同作用的顺式作用元件
ABRE	TACGGTC/ACGTG	脱落酸响应
ARE	AAACCA	厌氧诱导响应元件
AuxRR-core	GGTCCAT	生长素响应
as-1	TGACG	氧化应激响应元件
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应元件
G-box	TACGTG	光响应元件
GT1-motif	GGTTAA	光响应元件
GA-motif	ATAGATAA	光响应元件
GCN4_motif	TGAGTCA	种子特异性调控
MBS	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
DRE-core	GCCGAC	功能未知
MYC	CATTGT/CATGTG	功能未知
W box	TTGACC	功能未知

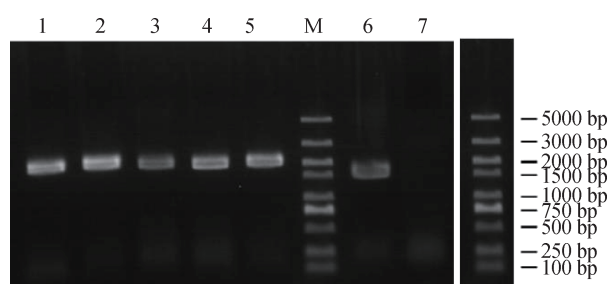


图2 重组酵母菌株阳性鉴定

Fig. 2 Positive identification of recombinant yeast strain

注:图2中编号1~5为p*Pvrboh5*-AbAi,编号6为p53-AbAi,编号7为Y1H Gold。M为5000 bp marker

Note: in Figure 2, numbers 1-5 are p*Pvrboh5*-AbAi, number 6 is p53-AbAi, and number 7 is Y1H Gold. M is 5000 bp marker

2.3 海雀稗 Total RNA 的提取与 mRNA 的分离纯化

利用分光光度计对提取出的海雀稗 Total RNA 进行定量分析,其提取出的浓度为 $743 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,总量为 $271 \mu\text{g}$;OD260/OD280为2.19。经琼脂糖凝胶电泳检测,28 S 条带亮度约为18 S 条带的两倍,以上结果说明所提 Total RNA 完整性及纯度较好(图4a)。经 Dynabeads™ mRNA 纯化试剂盒分离纯化后的 mRNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果呈弥散状条带且高亮部分位于500 bp以上(图4b),mRNA 纯化质量较好。

2.4 酵母单杂文库的构建

通过 BP 重组反应构建酵母单杂初级文库。为了鉴定初级文库的库容,将 $10 \mu\text{L}$ 菌液按照 1:1000 稀释,取 $50 \mu\text{L}$ 涂布含卡那霉素的 LB 平板,经 37°C 过夜培养后,平板上的克隆数目为417个,经公式计算其浓度为 $8.3 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图5a)。由于菌液为 2 mL ,因此其总克隆数为 $1.7 \times 10^7 \text{ cfu}$ 。从平板上随机挑取24个克隆进行菌落 PCR,结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示所有泳道均有带,

初级文库重组率为100%,文库平均插入片段大于1000 bp(图5c)。以上结果表明本研究构建的初级文库质量合格,可以用于次级文库构建。通过 LR 重组反应构建酵母单杂次级文库,以相同的方法鉴定次级文库的库容。经检测,平板上的克隆数目为391个,经公式计算其库容量为 $7.8 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,总克隆数为 $1.6 \times 10^7 \text{ cfu}$ (图5b)。从平板上随机挑取24个克隆进行菌落 PCR 及后续琼脂糖凝胶电泳检测,可以看出平均插入片段大于1000 bp 且重组率为100%(图5d)。以上结果说明酵母单杂文库构建成功,可以满足后续筛库实验需求。

2.5 酵母单杂文库筛选 *Pvrboh5* 上游调控因子

为了得到与 *Pvrboh5* 启动子相互作用的上游调控因子,用 p*Pvrboh5*-AbAi/Y1HGold 酵母重组菌株作为诱饵细胞制备感受态,转入海雀稗酵母核文库质粒。通过对阳性克隆中猎物蛋白基因序列的检测、比对、结果分析,除去重复后共有18种不同蛋白的编码基因。通过功能注释得到这18个基因的信息(表3),其中包括2个可能的转录因子 *Pavag07G229800* 和 *Pavag03G393300*,4个能量代谢相关的蛋白(*Pavag02G004700*, *Pavag01G451200*, *Pavag04G256500*, *Pavag02G316800*),3个蛋白质合成及代谢相关的蛋白(*Pavag10G271900*, *Pavag01G468200*, *Pavag02G297900*),2个转录相关蛋白(*Pavag01G187400*, *Pavag07G146100*),2个细胞色素相关蛋白(*Pavag07G218100*, *Pavag06G107400*),1个多糖合成相关蛋白 *Pavag08G116800*,1个细胞膜相关蛋白 *Pavag03G126500*,1个超氧化物歧化酶 *Pavag01G354500* 以及2个功能未知的蛋白(*PavagK060400*, *Pavag10G182400*)。

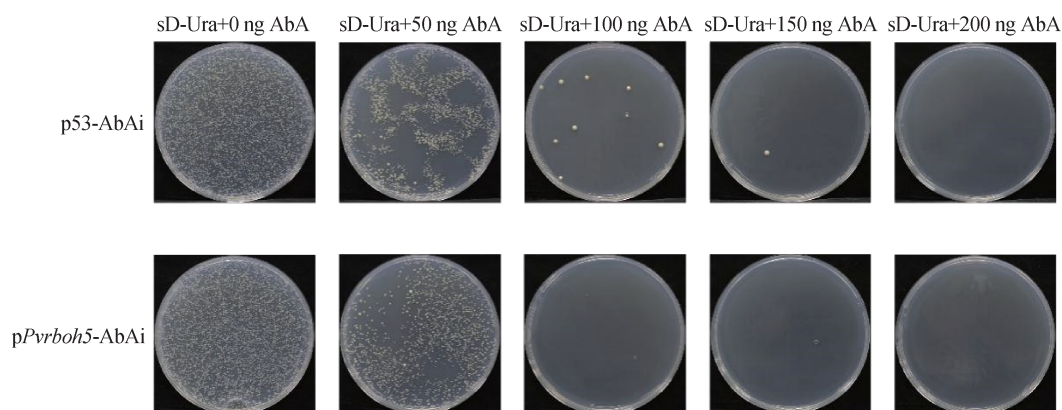


图3 AbA 抑制浓度测定

Fig. 3 Determination of AbA inhibitory concentrations

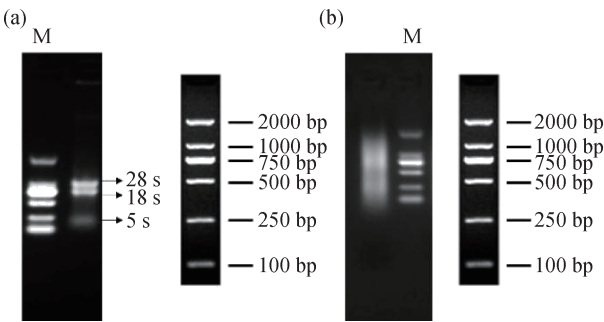


图 4 Total RNA 的提取与 mRNA 的分离纯化

Fig. 4 Total RNA extraction and mRNA isolation and purification

注:图 4a 为总 RNA 提取的琼脂糖凝胶电泳结果,图 4b 为 mRNA 分离纯化的琼脂糖凝胶电泳结果,M 为 2000 bp marker
Note: Figure 4a shows the agarose gel electrophoresis results of total RNA extraction, and Figure 4b shows the agarose gel electrophoresis results of mRNA isolation and purification. M is 2000 bp marker

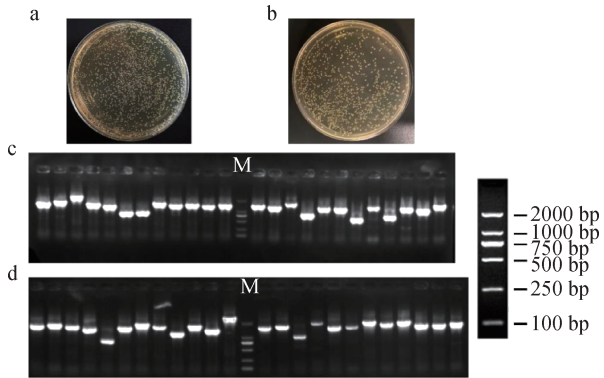


图 5 文库质量鉴定

Fig. 5 Library quality identification

注:图 5a 为初级文库库容鉴定,图 5b 为次级文库库容鉴定,图 5c 为初级文库菌落 PCR,图 5d 为次级文库菌落 PCR,M 为 2000 bp marker
Note: Figure 5a shows the library capacity assessment of the primary library, and Figure 5b shows the library capacity assessment of the secondary library; Figure 5c shows the colony PCR of the primary library and Figure 5d shows the colony PCR of the secondary library. M is 2000 bp marker

3 讨论

在植物体内,ROS 作为信号分子在调控生长发育、逆境胁迫中发挥着重要的作用。ROS 的产生,主要来源于定位在质膜上的 rbohs 蛋白。植物 *rbohs* 是一个庞大的基因家族。目前,在拟南芥、水稻及烟草上分别鉴定出 10^[15],9^[16],20^[17] 个 *rboh* 基因,在本物种海雀稗上,先前的研究也已发现 8 个 *rboh* 家族成员。不同的 *rbohs* 在其启动子区域有着不同类型和数量的顺式作用元件,因此发挥着不同的功能。通过对

表 3 筛库得到的与 *Pvrboh5* 启动子作用的蛋白

Table 3 Proteins interacted with *Pvrboh5* promoter by Y1H screening

基因 ID Gene ID	功能注释 Functional annotation
<i>Pavag07G229800</i>	包含 NAC 结构域的蛋白
<i>Pavag02G004700</i>	甘氨酸氨基转移酶,参与 C4 光合碳同化循环
<i>Pavag01G451200</i>	NADH 脱氢酶 1 α 亚复合物亚基 13
<i>Pavag01G187400</i>	RNA 聚合酶 II 转录亚基 16
<i>Pavag10G271900</i>	肽基-脯氨酰基顺反异构酶
<i>Pavag08G116800</i>	4- α -半乳糖醛酸转移酶
<i>PavagK060400</i>	功能未知的蛋白
<i>Pavag07G218100</i>	类黄酮 3'-羟化酶,细胞色素 P450 78A6 相关
<i>Pavag07G146100</i>	核糖核酸酶 T2, RNA 结合相关
<i>Pavag04G256500</i>	线粒体 ADP/ATP 载体蛋白
<i>Pavag03G393300</i>	包含 BTB/POZ 结构域的蛋白质
<i>Pavag03G126500</i>	疏水蛋白 RCI2A, 蛋白脂膜电位调节剂
<i>Pavag01G354500</i>	超氧化物歧化酶, Cu-Zn 家族, SOD1
<i>Pavag10G182400</i>	功能未知的蛋白
<i>Pavag02G316800</i>	光系统 I, Psal
<i>Pavag02G297900</i>	真核翻译起始因子, SUI1
<i>Pavag01G468200</i>	丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白磷酸酶
<i>Pavag06G107400</i>	细胞色素 C 氧化酶生物发生蛋白, CMC2

海雀稗 *Pvrboh5* 启动子区域顺式作用元件分析发现,除了光响应元件和生长素响应元件外,其还有着厌氧诱导响应元件、干旱胁迫响应元件这些非生物胁迫响应元件。已有报道显示,在拟南芥中, *AtABI4* 与 *AtrbohD* 启动子区域的 CCAC 顺式作用元件,通过介导 ROS 积累和清除,在盐胁迫条件下调节种子发芽; *AtERF6* 可以与 *AtrbohD* 启动子区域相结合,从而响应并调节氧化应激^[18]; 在烟草中, *NtHLLH123* 可以与 *NtRbohE* 基因启动子上的盐反应基序区域(E-box)结合,从而调节 ROS 稳态并增强耐盐性^[7]。与此同时,海雀稗 *Pvrboh5* 对盐胁迫响应表现出了正向调控关系,也许正是通过启动子上的这些顺式作用元件对盐胁迫进行了响应。

本研究通过酵母单杂筛库共获得了 18 个与 *Pvrboh5* 启动子结合的蛋白基因。其中,可能的转录因子分别是包含 BTB/POZ 结构域的 *Pavag03G393300* 以及包含 NAC 结构域的 *Pavag07G229800*。BTB/POZ 家族蛋白的 N 端都含有 BTB/POZ 结构域,其 C 端包含的结构域有所不同,大多含有锌指结构。根据 C 端的结构,BTB/POZ 家族蛋白可以分成不同的亚类^[19]。在植物中,BTB/POZ 家族蛋白多与植物的抗病性相关^[20]。如在拟南芥中,通过过表达及沉默含有 BTB/POZ 结构域的转录因子 *AtNPR1*,发现其与拟南芥对寄生霜霉菌和丁香假单胞菌的抗性有着显著的相关性^[21-22];在玉米中,

ZmBT2a 可以与 E3 泛素化蛋白 *ZmCUL3a*, *ZmCUL3b* 结合从而影响到下游抗病转录因子 *ZmLOXs*, *ZmPRs*, 以此提高玉米的抗病性^[23]。NAC 转录因子(NAC TFs)是植物特有的转录因子家族^[24],其在 N 端有着保守的 NAC 结构域,可以识别并结合 CATGTG 及以 CACG 为核心 DNA 位点^[25]。其中,在 *Pvrboh5* 启动子区域顺式作用元件分析中发现有着 2 个含有 CATGTG 序列(MYC)的顺式作用元件,推测 *Pavag07G229800* 可能与该序列结合从而调控 *Pvrboh5* 的表达。NAC 转录因子的功能涵盖植物生命周期的多个维度,其既可以调控植物的生长发育,又可以推动植物对逆境胁迫的响应^[26]。例如,在水稻中,*OsNAC25* 通过调控阴离子通道 *OsSLAH3* 的表达,来调节水稻根部钾离子吸收速率以响应低钾胁迫^[27];在拟南芥中,拟南芥 *NAC056* 通过直接调控 CBF 通路中的关键基因(如 *CBF1*)来增强拟南芥的对冻胁迫的抗性^[28]。

近年来,随着对 NAC 转录因子的深入研究,其对于叶片衰老的调控作用越来越受到人们的重视。叶片衰老是植物生长发育阶段中一个高度调控的过程。通过将营养物质从恶化的叶片转移到新生长的营养和生殖器官中,最大限度地提高植物的适应性,它的发生受到转录因子的严格控制^[29]。拟南芥 *ANAC092* (*ORE1*)是叶片衰老主调节因子。在叶片衰老过程中,拟南芥 *ORE1* 已被明确报道通过与衰老增强基因 *BFN1* 启动子的体内结合来控制叶片衰老。*ORE1* 还被证明在拟南芥体内与另外两个衰老相关基因(即 *SAG29/SWEET15* 和 *SINA1*)的启动子结合,表明了 *ORE1* 在衰老过程中的核心作用^[30]。此外,拟南芥 *ANAC029*^[31], *ANAC016*^[32], *ORS1*^[33] 等多个 NAC 结构域转录因子都被证实与叶片衰老相关。以上结果都说明 NAC 结构域转录因子在叶片衰老过程中起着关键作用。现有的文献表明 H_2O_2 信号参与调控海雀稗的盐诱导叶片衰老^[14]。与此同时, *ANAC092* 在盐胁迫后,启动子活性增加,盐胁迫可激活 *ANAC092* 启动子,促进其转录^[34]。综上所述,推测 *Pavag07G229800* 是包含 NAC 结构域的转录因子且受到盐胁迫的激活从而调控 *Pvrboh5* 的表达,以此来应对叶片衰老,此结果还需要通过试验进一步进行探究。

4 结论

本研究以海雀稗‘海岛 2000’品种构建高质量

的酵母单杂文库及海雀稗 *pPvrboh5*-AbAi 诱饵载体,获得无自激活的重组酵母菌株并确定了其最低 AbAi 抑制浓度。最后进行了酵母单杂筛库,获得了 18 个与 *Pvrboh5* 启动子结合的蛋白,可能的转录因子分别是包含 BTB/POZ 结构域的 *Pavag03G393300* 以及包含 NAC 结构域的 *Pavag07G229800*。可继续通过试验进一步验证挖掘出的转录因子对海雀稗 *Pvrboh5* 应对盐胁迫的调控作用。

参考文献

- [1] 宋鑫. 海滨雀稗抗逆性研究进展[J]. 现代农业科技, 2024(11):126-132
SONG X. Research progress on stress resistance of seashore Paspalum [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2024(11):126-132
- [2] QI P, EUDY D, SCHNABLE J C, et al. High density genetic maps of seashore Paspalum Using genotyping-by-sequencing and their relationship to the sorghum bicolor genome[J]. Scientific Reports, 2019(9):12183
- [3] SUN G C, WASE N, SHU S Q, et al. Genome of Paspalum vaginatum and the role of trehalose mediated autophagy in increasing maize biomass [J]. Nature Communications, 2022(13):7731
- [4] SACHDEV S, ANSARI S A, ANSARI M I, et al. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms[J]. Antioxidants, 2021, 10(2):277
- [5] 蒋序春, 龚记熠, 耿兴敏, 等. 植物 *Rboh*s 基因功能及其调控机制的研究进展[J]. 生物学杂志, 2025, 42(3):100-107
JIANG X C, GONG J Y, GENG X M, et al. Study on the function and regulation mechanism of *Rboh*s gene in plants [J]. Journal of Biology, 2025, 42(3):100-107
- [6] YANG C Y, HUANG Y C, OU S L. ERF73/HRE1 is involved in H_2O_2 production via hypoxia-inducible *Rboh* gene expression in hypoxia signaling [J]. Protoplasma, 2017, 254(4):1705-1714
- [7] LIU D, LI Y Y, ZHOU Z C, et al. Tobacco transcription factor bHLH123 improves salt tolerance by activating NADPH oxidase NtRbohE expression[J]. Plant Physiology, 2021, 186(3):1706-1720
- [8] TORRES M A, DANGL J L, JONES J D G. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response[J]. PNAS, 2002, 99(1):517-522
- [9] 李艳茹, 周丽莹, 董笛, 等. 日本结缕草 (*Zoysia japonica*) 酵母杂交 cDNA 文库的构建及分析[J]. 草地学报, 2023, 31(11):3271-3277
LI Y R, ZHOU L Y, DONG D, et al. Construction and analysis of a yeast hybrid cDNA library of *Zoysia japonica* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(11):3271-3277
- [10] 冯志娟, 刘娜, 张古文, 等. 菜用豌豆酵母单杂 cDNA 文库及

- 糖转运蛋白 PsSWEET15 诱饵载体构建[J]. 分子植物育种, 2023, 21(19): 6390-6397
- FENG Z J, LIU N, ZHANG G W, et al. Construction of vegetable pea yeast one-hybrid cDNA library and sugar transporter PsSWEET15 bait vector[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(19): 6390-6397
- [11] 黄小龙, 孙贵连, 马丹丹, 等. 水稻幼苗酵母单杂文库构建及 LAZY1 上游调控因子筛选[J]. 生物技术通报, 2023, 39(9): 126-135
- HUANG X L, SUN G L, MA D D, et al. Construction of yeast one-hybrid library and screening of factors regulating LAZY1 expression in rice[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(9): 126-135
- [12] OHARA O, TEMPLE G. Directional cDNA library construction assisted by the in vitro recombination reaction[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(4): e22
- [13] 邱爱连, 刘林林, 蔡汉阳, 等. Gateway 技术构建酵母双杂分析用辣椒 cDNA 文库[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(4): 791-796
- QIU A L, LIU L L, CAI H Y, et al. Construction of a cDNA library of pepper for yeast two-hybrid analysis using gateway technology [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2010, 32(4): 791-796
- [14] PAN L, XU T C, WANG J, et al. Root-sourced H_2O_2 is essential for maintaining jasmonic acid and Na^+/K^+ homeostasis to delay leaf senescence during salt stress in *Paspalum vaginatum* [J]. Horticultural Plant Journal, 2025, 11(3): 1364-1376
- [15] SAGI M, FLUHR R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 336-340
- [16] WANG G F, LI W Q, LI W Y, et al. Characterization of rice NADPH oxidase genes and their expression under various environmental conditions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(5): 9440-9458
- [17] YU S Z, KAKAR K U, YANG Z X, et al. Systematic study of the stress-responsive Rboh gene family in *Nicotiana tabacum*: genome-wide identification, evolution and role in disease resistance[J]. Genomics, 2020, 112(2): 1404-1418
- [18] LUO X F, DAI Y J, ZHENG C, et al. The ABI4-RbohD/VTC2 regulatory module promotes reactive oxygen species (ROS) accumulation to decrease seed germination under salinity stress[J]. New Phytologist, 2021, 229(2): 950-962
- [19] BONCHUK A, BALAGUROV K, GEORGIEV P. BTB domains: A structural view of evolution, multimerization, and protein-protein interactions[J]. BioEssays, 2023, 45(2): 2200179
- [20] 张淑珍, 闫晓飞, 张传忠, 等. 植物 BTB/POZ 蛋白及其抗病性研究进展[J]. 大豆科学, 2019, 38(2): 311-316
- ZHANG S Z, YAN X F, ZHANG C Z, et al. Progress in the studies of plant BTB/POZ protein and the disease resistance[J]. Soybean Science, 2019, 38(2): 311-316
- [21] CHERN M, FITZGERALD H A, CANLAS P E, et al. Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(6): 511-520
- [22] SILVA K J P, BRUNINGS A, PERES N A, et al. The Arabidopsis NPR1 gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry[J]. Transgenic Research, 2015, 24(4): 693-704
- [23] ZHOU F, WANG Y G, LIU P F, et al. Function of ZmBT2 gene in resistance to pathogen infection in maize [J]. Phytopathology Research, 2024, 6(1): 43
- [24] OOKA H, SATOH K, DOI K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. DNA Research, 2003, 10(6): 239-247
- [25] TRAN L P, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, et al. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive Cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter [J]. The Plant Cell, 2004, 16(9): 2481-2498
- [26] 于婧瑶, 巩琛锐. 植物 NAC 转录因子的生物学功能研究进展 [J]. 河南科学, 2024, 42(11): 1589-1601
- YU J Y, GONG C R. Advances in biological functions of plant NAC transcription factors [J]. Henan Science, 2024, 42(11): 1589-1601
- [27] WANG C, SONG S W, FU J, et al. The transcription factor OsNAC25 regulates potassium homeostasis in rice [J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(3): 930-945
- [28] XU P P, MA W, FENG H F, et al. The NAC056 transcription factor confers freezing tolerance by positively regulating expression of CBFs and NIA1 in Arabidopsis [J]. Plant Communications, 2024, 5(7): 100923
- [29] PODZIMSKA-SROKA D, O'SHEA C, GREGERSEN P L, et al. NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops [J]. Plants, 2015, 4(3): 412-448
- [30] MATA LLANA-RAMIREZ L P, RAUF M, FARAGE-BARHOM S, et al. NAC transcription factor ORE1 and senescence-induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) constitute a regulatory cascade in Arabidopsis [J]. Molecular Plant, 2013, 6(5): 1438-1452
- [31] ZHANG Y Y, ZANG Y H, CHEN J W, et al. A truncated ETHYLENE INSENSITIVE3-like protein, GhLYI, regulates senescence in cotton [J]. Plant Physiology, 2023, 193(2): 1177-1196
- [32] JUNG K, GIL N, OK L. Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2016, 33: 48-56
- [33] BALAZADEH S, KWASNIEWSKI M, CALDANA C, et al. ORS1, an H_2O_2 -responsive NAC transcription factor, controls senescence in Arabidopsis thaliana [J]. Molecular Plant, 2011, 4(2): 346-360
- [34] BALAZADEH S, SIDDIQUI H, ALLU A D, et al. A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence [J]. The Plant Journal, 2010, 62(2): 250-264