

利用酵母双杂交筛选菠萝 AcSWEET11 的互作蛋白

林文秋, 刘胜辉, 张秀梅, 张红娜, 李运合, 吴青松*

中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/农业农村部热带果树生物学重点实验室/海南省热带园艺产品采后生理与保鲜重点实验室, 广东湛江 524091

摘要: SWEET (sugars will eventually be exported transporter) 基因在植物开花过程中具有重要的作用, 但 AcSWEET11 在菠萝成花中的作用机制尚不清楚。通过鉴定成花过程中与 AcSWEET11 的互作蛋白, 为菠萝成花机制的解析奠定基础。本研究利用共转化的方法在菠萝成花过程的 cDNA 膜文库中筛选 AcSWEET11 的互作蛋白, 分析候选蛋白的表达量。结果表明, pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 对 NMY51 酵母细胞无毒性, 但有自激活活性。进一步研究结果显示, 在 TDO/3'AT 培养基和 QDO 培养基上自激活受到抑制。利用该系统筛选到了 81 个阳性克隆, 经测序鉴定出 48 个与 AcSWEET11 互作的候选蛋白, 包括 E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like、Trehalose-phosphate synthase 7、Cytochrome P450、Transcription factor LUX 等。GO 和 KEGG 分析结果显示, 48 个蛋白主要分布在细胞进程、代谢过程、刺激反应和催化活性等生物过程, 参与脂类代谢、氨基酸代谢和碳水化合物代谢、信号转导和运输与分解代谢等新陈代谢途径。Trehalose-phosphate synthase 7 (XP_020105459.1)、Protein TIFY3-like (XP_020082835.1)、40S ribosomal protein S27 (XP_020092770.1)、Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like (XP_020112516.1) 等 4 个基因与 AcSWEET11 表达趋势一致, 在菠萝成花过程中下调表达; Dihydrolipoyl dehydrogenase 2 (XP_020113798.1)、Putative lipid-transfer protein DIR1 (XP_020086640.1)、clathrin assembly protein At4g32285 (XP_020108161.1) 等 3 个基因在菠萝成花过程中上调表达。这些结果表明, AcSWEET11 可能通过与 Trehalose-phosphate synthase 7 等蛋白发生互作, 参与菠萝成花过程。本研究进一步丰富了 AcSWEET11 的蛋白互作网络, 为 AcSWEET11 在菠萝成花中的调控机制的解析奠定基础。

关键词: 菠萝; AcSWEET11; 酵母双杂交; 互作蛋白

中图分类号: S668.3 文献标志码: A

Screening of AcSWEET11 Interacting Proteins Using Yeast Two-hybrid System in Pineapple (*Ananas comosus* L.)

LIN Wenqiu, LIU Shenghui, ZHANG Xiumei, ZHANG Hongna, LI Yunhe, WU Qingsong*

South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Key Laboratory of Hainan Province for Postharvest Physiology and Technology of Tropical Horticultural Products, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

Abstract: SWEET (sugars will eventually be exported transporter) plays an important role in plant flowering. However, the mechanism of flower was unclear in pineapple. In this study, the interacting proteins of AcSWEET11 were identified, in order to lay a foundation for analysis of the flowering mechanism of pineapple. In this study, the interacting proteins of AcSWEET11 were screened from the pineapple flowering cDNA membrane library by co-transformed, and then the expression levels of the candidate proteins during flowering were analyzed. pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N was non-toxicity for NMY51 yeast cells but had autonomous activation. Further study showed that autonomous activation was restrained after adding 3'AT in TDO and QDO. A total of 81 positive clones were screened by yeast two-hybrid, and 48 proteins were identified by sequencing which were probably interactive with AcSWEET11. The proteins were contained

收稿日期 2024-01-10; 修回日期 2024-01-14

基金项目 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 321QN302); 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 32001989)。

作者简介 林文秋 (1989—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 菠萝遗传育种与生物技术。*通信作者 (Corresponding author): 吴青松 (WU Qingsong), E-mail: hnwuqs@163.com。

E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like, Trehalose-phosphate synthase 7, Cytochrome P450 90A1-like and Transcription factor LUX. GO and KEGG revealed that 48 proteins may participate in lipid metabolism, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, signal transduction and transport and catabolism. And the expression of *Trehalose-phosphate synthase 7* (XP_020105459.1), *Protein TIFY 3-like* (XP_020082835.1), *40S ribosomal protein S27* (XP_020092770.1) and *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like* (XP_020112516.1) were down regulated during flowering induction that consistent with *AcSWEET1* while the expression of *Dihydrolipoyl dehydrogenase 2* (XP_020113798.1), *Putative lipid-transfer protein DIR1* (XP_020086640.1), *Clathrin assembly protein At4g32285* (XP_020108161.1) were up regulated. *AcSWEET11* might interact with the proteins such as Trehalose-phosphate synthase 7 to participate in pineapple flowering. The protein interaction network of *AcSWEET11* was plentiful to provide a foundation for analysis the regulatory mechanism of *AcSWEET11* in pineapple flowering.

Keywords: pineapple; *AcSWEET11*; yeast two-hybrid system; interacting proteins

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.003

菠萝 [*Ananas comosus* (L.) Merr] 是世界重要的热带果树之一, 也是我国重要的热带经济作物。菠萝是聚花果植物, 花芽分化一旦开始, 花序和果实的发育就会持续下去, 直到果实成熟^[1], 成花与否决定了菠萝产量与品质的形成。目前, 生产中菠萝的开花途径有 2 个, 一是经过冬季低温后自然成花^[2], 二是栽培 12~16 个月后经人工诱导成花。自然开花会导致果实成熟期不一致, 收获期延长, 甚至出现部分植株 3~4 a 才能自然开花现象, 限制了菠萝产业的发展^[3]。为了解决这一问题, 生产上主要利用乙烯利、电石等乙烯衍生物对菠萝进行人工诱导成花 (催花) 达到产期调节的效果^[4], 但催花效果受到品种、环境条件和菠萝的生长发育时期的影响。如果催花不当, 会造成减产、果实品质下降, 甚至是绝收的情况, 严重影响了经济效益, 阻碍了产业的升级^[5]。因此, 解析菠萝的成花机制, 对促进菠萝产期的调节具有重要意义。

SWEET 广泛存在于植物体, 在植物的许多生理过程中发挥着重要的作用。自 2010 年 CHEN 等^[6]从拟南芥中第一次鉴定出糖转运蛋白基因 *SWEET* 以来, 通过对已经发表的基因组序列进行全基因组检索分析, 在多种植物中鉴定到了大量的 *SWEETs*^[7-9]。*SWEET* 属于 MtN3/saliva 家族, 膜内区域高度保守, 具有双向转运糖的功能, 包含 7 个跨膜 α -螺旋结构, 形成三螺旋束, 促进糖的跨膜运输^[10]。不同植物的 *SWEET* 系统进化分析结果表明, 在植物中 *SWEET* 基因家族可以分为 4 个亚类, 且每个亚类的主要转运底物不同: I 亚类主要转运脱氧葡萄糖, 拟南芥的 *AtSWEET1* 是第一个以糖转运为特点的糖转运蛋白, 具有葡萄糖的转运活性, 参与花粉对单糖的

吸收^[11]; II 亚类主要转运单糖, 葡萄 *VvSWEET4* 主要负责葡萄糖的转运, 水稻 *OsSWEET5* 参与半乳糖转运^[11-12]; III 亚类主要转运蔗糖, 拟南芥 *AtSWEET11* 和 *AtSWEET12* 负责将细胞内的蔗糖流出到细胞壁间隙进而装载到韧皮部用于蔗糖的长距离运输^[13]; 而 IV 亚类主要介导了果糖的单向运输, *AtSWEET17* 定位到液泡膜上, 外部供应果糖时, 其在根延伸区高度表达, 促进根从外部吸收果糖, 介导液泡对果糖的摄取并储存^[14-15]。*SWEETs* 调控植物花器官的发育, 在植物开花过程中发挥着重要的调控作用。在水稻中 *OsSWEET11* 在圆锥花序和花药中高表达, 遗传转化研究结果表明 *OsSWEET11* 调控小孢子在花粉母细胞阶段和未成熟花粉的发育。*OsSWEET11* 通过降低花粉发育过程中淀粉的含量导致育性下降^[7]。*OsSWEET14* 基因敲除后, 突变植株的种子变小, 生长延缓, 植株的生殖发育延迟^[16]。一些研究结果表明 *SWEETs* 不仅能够影响植物的育性, 在植物的花器官形成过程中也起着重要的作用。通过分析牡丹花花器官形成过程中葡萄糖含量变化和 *PsSWEET* 表达量变化发现, *PsSWEET8* 极可能通过调控牡丹花瓣葡萄糖的转运从而调控开花过程^[17]。最新的研究表明, 在长日照条件下超表达 *AtSWEET10* 后拟南芥提前开花, 进一步的研究结果表明 *AtSWEET10* 位于 FT 信号途径的下游^[18], 这是首次有直接证据证明 *SWEET* 参与了植物成花转变的过程。但是 *AtSWEET10* 是如何调控开花的机制尚不清楚。因此, 推测 *AtSWEET10* 可能在 FT 的诱导下进行转录然后运输糖或者 FT 蛋白来促进开花^[18]。

已有研究表明, 菠萝 (无刺卡因) 成花过程中可溶性糖和蔗糖含量显著提高^[19], 且本课题组

前期研究结果证实, AcSWEET11 能够促进果实糖积累^[20], 并能促进拟南芥提早开花(待发表), 但其在成花中的作用机制尚不清楚。本研究利用酵母双杂交技术, 筛选菠萝花芽分化过程的 cDNA 文库中与 AcSWEET11 互作的候选蛋白, 为进一步研究 AcSWEET11 参与成花调控的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母粉(yeast extract)和胰蛋白胨(tryptone)购自 OXOID 公司; 缺陷培养基(minimal synthetic defined medium, SD)DDO(SD/-Leu/-Trp)、TDO(SD/-Leu/-Trp/-His)、TDO/X(SD/-Leu/-Trp/-His/X-a-gal)、QDO(SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade)和 YPDA 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; X-a-gal 购自 YEASEN 公司; 酵母菌株感受态 NMY51 和 pBT3、pNubG-Fe65、pTSU2-APP、pPR3 等载体购自武汉金凯瑞生物工程有限公司; 菠萝花芽的 cDNA 文库由本研究中心保存。

1.2 方法

1.2.1 诱饵载体的毒性和自激活检测 毒性和自激活检测方法参照王会勤^[21]的方法。以 pNubG-Fe65 和 pTSU2-APP 共转化 NMY51 酵母菌为阳性对照, pPR3-N 和 pTSU2-APP 共转化酵母菌为阴性对照。将 pBT3-STE-AcSWEET11 和猎物空载 pPR3-N 通过 LiAc 的方法共转化至酵母 NMY51 中, 在 DDO、TDO、TDO/AT 和 QDO 培养基上 30 ℃ 培养 3~4 d, 观察菌落的生长情况, 检测 pBT3-STE-AcSWEET11 诱饵蛋白的毒性和自激活活性。通过对 pBT3-STE-AcSWEET11 和 Post-Nubal 共转化 NMY51 酵母菌, 在 DDO、TDO/3'AT 和 QDO 培养基上培养, 观察菌落的生长情况, 检测 pBT3-STE-AcSWEET11 在酵母 NMY51 中的表达功能。

1.2.2 互作蛋白的筛选 从 SD/-Leu 平板挑取生长状态良好、含有 pBT3-STE-AcSWEET11 的单克隆接种至 50 mL 的 SD/-Leu 液体培养基, 30 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2 后, 转接至 YPDA 液体培养基中, 震荡培养, 使 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 (12~16 h); 室温离心, 收集菌体, 用无菌水重悬, 离心后弃上清; 加入 LiAc 重悬菌体, 混匀, 置冰上, 制备含有诱饵载体的 NMY51 感受态。将菠萝 cDNA 文库质粒转化含有诱饵载体的 NMY51 感受态后,

均匀涂布于 TDO/X/3'AT 5 mmol/L 平板上, 30 ℃ 培养 3~4 d。挑选 TDO/X/3'AT 板上变蓝的单菌落, 转接于新的 QDO/X 平板上, 30 ℃ 培养 3 d, 统计 2 种培养基上变蓝的单菌落, 即为候选阳性克隆。

1.2.3 候选互作蛋白的测序鉴定 提取阳性克隆质粒, 利用通用引物(Up: CTTTCCTTATACATTA-GGACC, Dn: GGGACCTAGACTTCAGGTTG)进行 PCR 扩增。选取条带单一, 大于 500 bp 的有效克隆片段, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。测序结果在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库上进行 BLAST 比对分析。

1.2.4 生物信息学分析 利用在线网站 UniProt (<https://www.uniprot.org>) 注释候选蛋白的功能。将获得的候选蛋白进行 Gene Ontology (GO) 和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路分析。

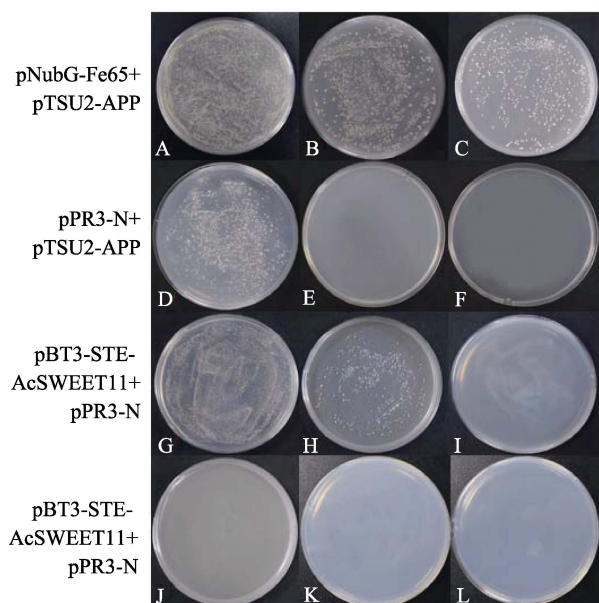
1.2.5 候选蛋白基因的表达分析 对乙烯利诱导菠萝成花过程(0、8、16、32 d)进行转录组测序, 获得花芽分化过程中基因表达量的数据, 利用 Heml 软件计算各时期基因表达量的 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 值, 并绘制候选蛋白基因在乙烯利诱导菠萝成花过程中的表达热图。

2 结果与分析

2.1 诱饵载体的毒性和自激活检测

以 pNubG-Fe65 和 pTSU2-APP 共转化 NMY51 酵母菌为阳性对照, pPR3-N 和 pTSU2-APP 共转化酵母菌为阴性对照。将 pBT3-STE-AcSWEET11 诱饵重组质粒和猎物空载 pPR3-N 共转化 NMY51 酵母感受态。结果表明, pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 在 DDO 培养基上的酵母菌生长状态良好, 说明 pBT3-STE-AcSWEET11 和 pPR3-N 已成功转入 NMY51 酵母菌中, 且对 NMY51 酵母细胞无毒性。pNubG-Fe65+pTSU2-APP 在 DDO、TDO/3'AT、QDO 培养基上生长良好, pPR3-N+pTSU2-APP 在 DDO 培养基上正常生长, 在 TDO/3'AT、QDO 无菌落生长, 诱饵重组质粒 pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 的酵母菌在 TDO 培养基能够生长, 表明 pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 有自激活现象, 激活 HIS3 的表达(图 1A~图 1H)。为了抑制酵母菌中 HIS3 的表达, 在 TDO 培养基中添加不同浓度的 3'AT。

结果显示,在添加 3'AT 后酵母菌没有生长, HIS3 的表达受到抑制(图 1I~图 1K)。进一步分析其在 QDO 培养基上的生长情况,结果显示,转化 pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 的酵母菌不能生长(图 1L)。以上结果表明, pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 在 TDO/3'AT 培养基和 QDO 培养基上自激活受到抑制,后续可在 TDO/3'AT 和 QDO 培养基上进行互作蛋白的筛选。



A~C: pNubG-Fe65+pTSU2-APP 分别在 DDO、TDO/3'AT、QDO 平板的生长情况; D~F: pPR3-N+pTSU2-APP 分别在 DDO、TDO/3'AT、QDO 平板的生长情况; G~L: pBT3-STE-AcSWEET11 分别在 DDO、TDO、5 mmol/L TDO/3'AT、10 mmol/L TDO/3'AT、15 mmol/L TDO/3'AT 和 QDO 平板的生长情况。

A~C: The situations of pNubG-Fe65+pTSU2-APP yeast cells grows in DDO、TDO/3'AT、QDO culture, respectively; D~F: The situations of pPR3-N+pTSU2-APP yeast cells grows in DDO、TDO/3'AT、QDO culture, respectively; G~L: The situations of pBT3-STE-AcSWEET11 yeast cells grows in DDO、TDO、5 mmol/L TDO/3'AT、10 mmol/L TDO/3'AT、15 mmol/L TDO/3'AT and QDO culture, respectively.

图 1 诱饵毒性及自激活检测

Fig. 1 Toxicity and autonomous activation of bait vector

将 Post-Nubal 和 pBT3-STE-AcSWEET11 共转化 NMY51 酵母菌,分别在 DDO、TDO/3'AT 和 QDO 培养基上培养。结果表明,在 DDO 培养基上有菌落生长,说明共转化成功;在 TDO/3'AT 和 QDO 培养基上菌落生长良好,表明 pBT3-STE-AcSWEET11 在 NMY51 系统能正确表达,可进行下一步文库筛选(图 2)。

2.2 候选互作蛋白的筛选及鉴定

利用菠萝花芽分化的 cDNA 膜文库筛选与

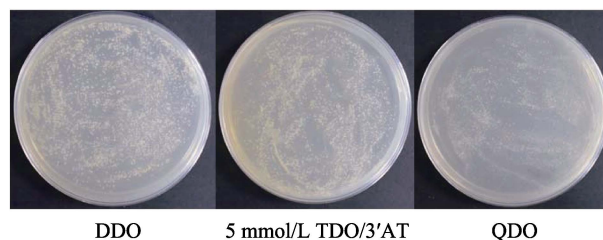
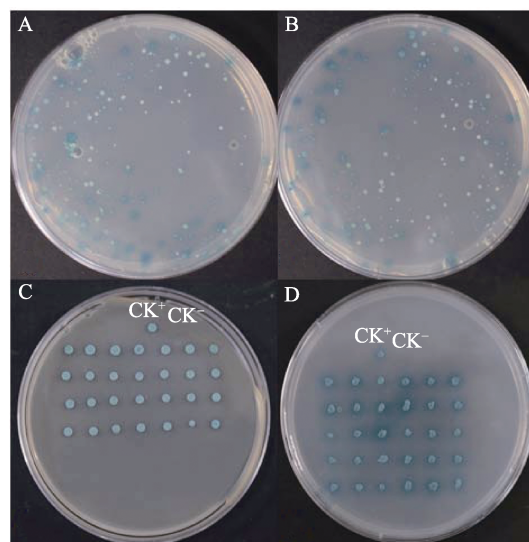


图 2 诱饵载体 pBT3-STE-AcSWEET11 的系统功能验证
Fig. 2 Verification of system function for bait vector pBT3-STE-AcSWEET11

AcSWEET11 互作的蛋白。以 pTSU2-APP 和 pNubG-Fe65 共转化菌液为阳性对照 (CK⁺), pTSU2-APP 和 pPR3-N 共转化菌液为阴性对照 (CK⁻), 经过 2 次筛选, 共获得 81 个在 TDO/X/3'AT 培养基中生长良好的蓝色菌落(图 3A、图 3B)。进一步加压培养, 将 58 个大小均一的单克隆点种在含有 QDO/X 培养基上进行再次筛选。结果显示, 58 个蓝色菌斑均能正常生长(图 3C、图 3D), 初步筛选出 58 个阳性克隆。将这 58 个阳性克隆进行菌落 PCR 反应 (pPR3-N 为阳性对照, CK⁺; H₂O 为阴性对照, CK⁻), 电泳检测结果表明, 插入片段条带单一, 大小约为 500~2000 bp (图 4)。分



A: 第一次转化的酵母细胞在 TDO/X/3'AT 培养基上生长的情况; B: 第二次转化的酵母细胞在 TDO/X/3'AT 培养基上生长的情况; C: 第一次转化的酵母细胞在 QDO/X 培养基上生长的情况; D: 第二次转化的酵母细胞点种 QDO/X 培养基上生长的情况。

A: The situations of the first transformed yeast cells grows in TDO/X/3'AT culture; B: The situations of the second transformed yeast cells grows in TDO/X/3'AT culture; C: The situations of the first transformed yeast cells grows in QDO/X culture; D: The situation of the second transformed yeast cells grows in QDO/X culture.

图 3 互作蛋白的筛选

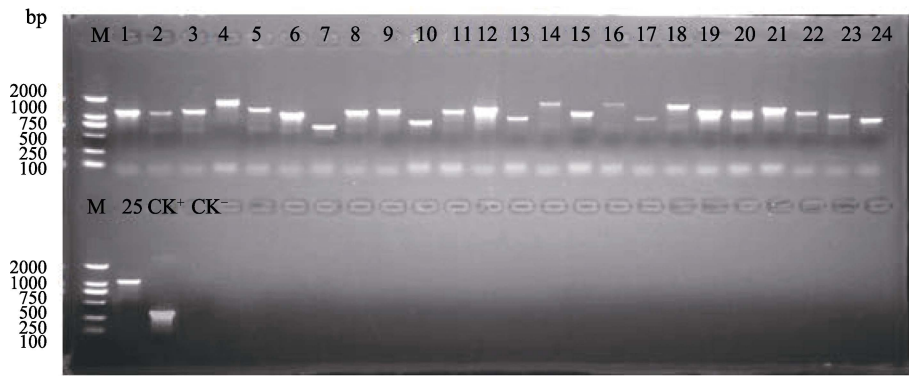
Fig. 3 Screened of interacting proteins

别提取阳性克隆质粒并进行测序分析，合并重复序列，测序结果在 NCBI 进行比对，筛选到 48 个可能与 AcSWEET11 相互作用的蛋白（表 1）。主要包括 E3 泛素连接酶 RING1-like、海藻糖磷酸合成酶、细胞色素 P450、LUX 转录因子等。

2.3 候选蛋白的生物信息学分析

对获得的 48 个候选互作蛋白进行 GO 和 KEGG 分类分析。GO 分析结果表明，48 个蛋白主要富集在细胞进程（cellular process）、代谢过程（metabolic process）、刺激反应（response to stimulus）、细胞解剖实体（cellular anatomical

entity）、结合（binding）和催化活性（catalytic activity）等生物过程（图 5）。KEGG 分析结果显示，48 个蛋白主要的 KEGG 途径包括脂类代谢（lipid metabolism）、氨基酸代谢（amino acid metabolism）、其他次生代谢物的生物合成（biosynthesis of other secondary metabolites）和碳水化合物代谢（carbohydrate metabolism）等新陈代谢途径，翻译（translation）和折叠、分类和降解（folding, sorting and degradation）等遗传信息途径，以及信号转导（signal transduction）与运输和分解代谢（transport and catabolism）等通路（图 6）。



M: DL 2000 DNA marker; 1~25: 菌落 PCR 产物。
M: DL 2000 DNA marker; 1-25: The PCR products of colonies.

图 4 部分阳性克隆菌落 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.4 Result of PCR products from partially positive clonal colonies by agarose gel electrophoresis

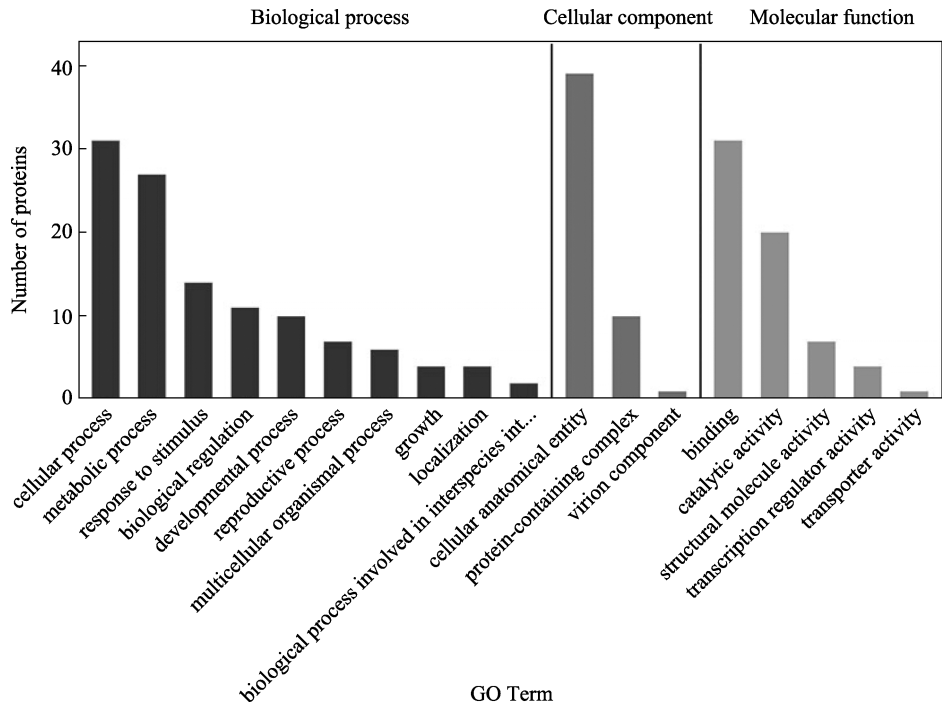


图 5 候选互作蛋白的 GO 功能分析

Fig. 5 GO functional analysis of candidate interacting proteins

表 1 酵母双杂交系统筛选出的与 AcSWEET11 互作的蛋白
Tab. 1 Screening of proteins interacting with AcSWEET11 by yeast two-hybrid system

编号 No.	基因注释 Gene annotation	GenBank 登录号 GenBank accession number
1	Tubby-like F-box protein	XP_020088583.1
2	F-box protein PP2-B11	OAY76934.1
3	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	XP_020096081.1
4	Cytochrome P450 90A1-like	XP_020101190.1
5	Cytochrome P450 98A1	XP_020114040.1
6	PLAT domain-containing protein 3-like	XP_020091149.1
7	Dihydrolipoyl dehydrogenase 2	XP_020113798.1
8	Tubulin alpha chain	XP_020095799.1
9	Hypothetical protein ACMD2_18406	OAY83140.1
10	Protein SRG1	OAY83593.1
11	Putative lipid-transfer protein DIR1	XP_020086640.1
12	T-complex protein 1 subunit zeta	XP_020100745.1
13	Pentatricopeptide repeat-containing protein At3g62890	XP_020086106.1
14	Probable clathrin assembly protein At4g32285	XP_020108161.1
15	Adenosylhomocysteinase	XP_020106819.1
16	Lysine-specific demethylase JMJ25	XP_020112685.1
17	Basic transcription factor 3-like	XP_020094731.1
18	Protein TIFY 3-like	XP_020082835.1
19	Vacuolar proton pump subunit B2	XP_020088591.1
20	40S ribosomal protein S27	XP_020092770.1
21	60S ribosomal protein L18a-2	XP_020079935.1
22	Ribosomal protein L2	YP_009116384.1
23	N-alpha-acetyltransferase 16, NatA auxiliary subunit	XP_020105507.1
24	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like	XP_020112516.1
25	Lipoxygenase 6	XP_020110641.1
26	DNA polymerase lambda glyoxysomal fatty acid	XP_020083041.1
27	beta-oxidation multifunctional protein MFP-a-like isoform X2	XP_020103271.1
28	Serine/threonine-protein kinase EDR1-like isoform X2	XP_020098526.1
29	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	OAY80757.1
30	Polyubiquitin-like	XP_020091802.1
31	E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like	XP_020112621.1
32	Serine/threonine-protein kinase STY46-like	XP_020115320.1
33	Photosynthetic NDH subunit of lumenal location 4	XP_020089715.1
34	Hypothetical protein ACMD2_07758	OAY73788.1
35	60S acidic ribosomal protein P0	XP_020109789.1
36	Inhibitor of bruton tyrosine kinase	OAY68292.1
37	Acyl-CoA-binding protein	XP_020113385.1
38	Transcription factor LUX	XP_020097739.1
39	Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase 7	XP_020105459.1
40	Proteasome subunit beta type-5-like	XP_020096619.1
41	Trithorax group protein osa-like	XP_020113943.1
42	Uncharacterized protein LOC109720880	XP_020103811.1
43	Uncharacterized protein LOC109712697	XP_020092020.1
44	Uncharacterized protein LOC109707352 isoform X4	XP_020084163.1
45	Uncharacterized protein LOC109711902 isoform X3	XP_020090847.1
46	Uncharacterized protein LOC109711741 isoform X2	XP_020090525.1
47	Uncharacterized protein LOC109707959	XP_020085097.1
48	Uncharacterized protein LOC109718933 isoform X1	XP_020101014.1

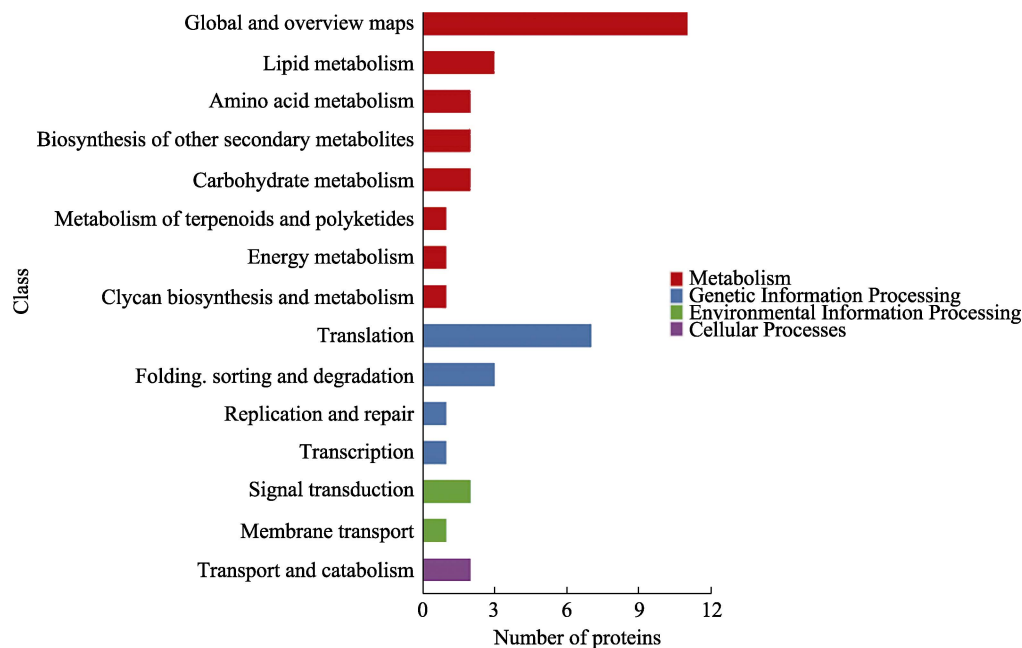


图 6 候选互作蛋白的 KEGG 代谢通路分析

Fig. 6 KEGG metabolic pathway analyses of candidate interacting proteins

2.4 候选蛋白的基因表达分析

为了确定候选互作蛋白基因的表达情况，对前期获得的菠萝花芽分化过程中的转录组数据进行分析，结果表明，共有 30 个候选蛋白基因检测到表达量，18 个候选蛋白基因在乙烯利诱导菠萝成花中未检测到。进一步分析结果表明，*Trehalose-phosphate synthase 7* (XP_020105459.1)、*Protein TIFY 3-like*(XP_020082835.1)、*40S ribosomal protein S27* (XP_020092770.1)、*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like* (XP_020112516.1) 等 4 个基因与 *AcSWEET11*(XP_020107765.1)表达一致，在菠萝成花过程中下调表达；*Dihydrolipoyl dehydrogenase 2* (XP_020113798.1)、*Putative lipid-transfer protein DIR1* (XP_020086640.1)、*Clathrin assembly protein At4g32285* (XP_020108161.1) 等 3 个基因在菠萝成花过程中上调表达（图 7）。表明 *Trehalose-phosphate synthase 7* 等 7 个候选互作蛋白在菠萝成花过程中具有重要作用。

3 讨论

酵母双杂交是一种筛选互作蛋白的常用方法，广泛应用于未知互作蛋白的筛选和已知蛋白间相互作用的验证。但该系统存在假阳性率和假阴性率高等局限性^[22]。自激活和毒性是导致假阳性率和假阴性率高的主要因素。当诱饵蛋白和猎物蛋白单独或结合后，出现毒性，抑制酵母细胞

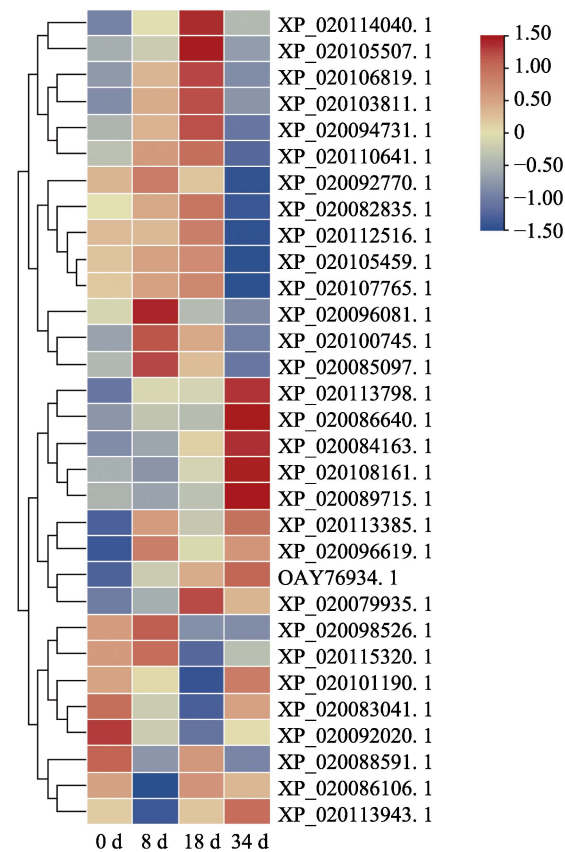


图 7 候选蛋白在菠萝花芽分化过程中的表达热图

Fig. 7 Expression heatmap of candidate interacting proteins during pineapple flowering

的正常生长，从而出现假阴性；而当诱饵蛋白存在自激活活性，猎物蛋白与诱饵蛋白结合后可激

活报告基因的表达,从而出现假阳性^[23]。为了抑制诱饵蛋白的自激活活性,不同缺陷培养基以及在缺陷培养基中添加不同浓度 3'AT 被广泛应用于酵母双杂交的过程中。谢瑞莹等^[23]通过在 TDO 培养基中添加 10 mmol/L 的 3'AT,抑制了 pGBKT7-NtMYB4a+pGADT7 的自激活活性;在葡萄中,将 pGBKT7-VvJAZ9+pGADT7 在 QDO/X/A 的培养基上培养,其自激活活性受到抑制^[24]。本研究结果显示, pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 存在自激活现象,通过在 TDO 培养基中添加不同浓度的 3'AT 后或在 QDO 培养基上培养,酵母菌不能生长,表明 3'AT 和 QDO 培养基能够抑制 pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 的自激活活性。

菠萝花芽分化是一个复杂的生物学过程,受到自身因素和外界环境条件的影响,涉及糖、氨基酸、植物激素等生理生化变化^[19, 25-26]。本课题组的前期研究结果表明, AcSWEET11 可促进可溶性糖的积累^[20],但其在成花中的作用机制尚不清楚。本研究利用酵母双杂交技术,筛选了 48 个与 AcSWEET11 互作的蛋白,这些蛋白主要富集在氨基酸、碳水化合物以及信号转导和运输、分解等代谢通路上,推测 AcSWEET11 可能通过氨基酸、碳水化合物和信号转导等途径参与菠萝的成花过程。

拟南芥 *AtSWEET10* 能够促进拟南芥提早开花,且处于 FT 的下游^[18]。在本研究中,没有筛选到 FT 等成花相关的基因,推测 AcSWEET11 可能不是通过直接与 FT 等成花相关基因相互作用参与菠萝的成花过程。*Trehalose-phosphate synthase* (TPS) 基因在拟南芥成花启动中具有重要作用,其主要通过调控 SPL 等基因的表达参与拟南芥的成花过程,是糖作为信号物质参与成花的关键途径^[27]。本研究结果表明, AcSWEET11 和 AcTPS7 能够产生互作,且其在菠萝成花过程中的表达模式一致,推测 AcSWEET11 可能通过 TPS 信号途径参与菠萝成花。乙烯是诱导菠萝成花的关键激素,外源乙烯通过促进内源乙烯的合成诱导菠萝成花^[4]。已有报道表明 E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin-protein ligase RING1) 能直接与 ACS 合成酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) 相互作用来调节乙烯的合成^[28]。本研究结果显示, AcSWEET11 和 E3 泛素连接酶存在互作,推测 AcSWEET11 可能通过与 E3 泛素连接酶互作来调控乙烯的合成参与菠萝的成花过程。此外,本研

究还筛选到了 1 个 LUX 转录因子。在水稻中, OsLUX 通过调控 OsELF3-1 和 OsELF4s 蛋白抑制 *Hd1/Ghd7* 的表达参与成花^[29]。而在菠萝中, AcSWEET11 是否与水稻相似,能够通过与 LUX 相互作用,调控 ELF 等蛋白的表达来参与菠萝的成花过程,需要进一步研究。

4 结论

本研究通过对 pBT3-STE-AcSWEET11+pPR3-N 的毒性和自激活活性的检测,建立 AcSWEET11 的酵母双杂交系统。利用该系统筛选了 48 个与 AcSWEET11 互作的候选蛋白。对 48 个蛋白进行 GO 和 KEGG 分析,其主要分布在细胞进程、代谢过程、刺激反应和催化活性等生物过程,参与氨基酸代谢、碳水化合物代谢和信号转导和运输等新陈代谢途径,推测 AcSWEET11 可能通过氨基酸代谢、碳水化合物代谢或者信号转导等途径参与菠萝的成花过程。

参考文献

- [1] LI Y H, WU Q S, HUANG X, LIU S H, ZHANG H N, ZHANG Z, SUN G M. Molecular cloning and characterization of four genes encoding ethylene receptors associated with pineapple (*Ananas comosus* L.) flowering[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 710.
- [2] BARTHOLOMEW D P, PAULL R E, ROHRBACH K G. The pineapple: botany, production and uses[M]. Wallingford: CABI Publishing, 2003.
- [3] 朱祝英, 杨玉梅, 孙光明, 刘胜辉. 菠萝自然开花及其抑制技术[J]. *中国热带农业*, 2012, 48(5): 85-87.
ZHU Z Y, YANG Y M, SUN G M, LIU S H. Natural flowering of pineapple and its inhibition techniques[J]. *China Tropical Agriculture*, 2012, 48(5): 85-87. (in Chinese)
- [4] 刘胜辉, 臧小平, 张秀梅, 孙光明. 乙烯利诱导菠萝 [*Ananas comosus* (L.) Merril] 花芽分化过程与内源激素的关系[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(9): 1487-1492.
LIU S H, ZANG X P, ZHANG X M, SUN G M. Changes of endogenous hormone levels during the inflorescence differentiation in pineapple (*Smooth Cayenne* cv.)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(9): 1487-1492. (in Chinese)
- [5] 张治礼, 范鸿雁, 华敏, 何凡. 菠萝开花诱导及其生理与分子基础[J]. *热带作物学报*, 2012, 33(5): 950-955.
ZHANG Z L, FAN H Y, HUA M, HE F. Induction of pineapple flowering and underlying physiological and molecular bases[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(5): 950-955. (in Chinese)

- [6] CHEN L Q, HOU B H, LALONDE S, TAKANAGA H, HARTUNG M L, QU X Q, GUO W, KIM J, UNDERWOOD W, CHAUDHURI B, CHERMAK D, ANTONY G, WHITE F F, SOMERVILLE S C, MUDGETT M B, FROMMER W B. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens[J]. *Nature*, 2010, 468 (7323): 527-532.
- [7] HU B, WU H, HUANG W F, SONG J B, LIN Y J. SWEET gene family in *Medicago truncatula*: genome-wide identification, expression and substrate specificity analysis[J]. *Plants*, 2019, 8: 338.
- [8] LIN Q H, ZHONG Q Z, ZHANG Z H. Identification and functional analysis of SWEET gene family in *Averrhoa carambola* L. fruits during ripening[J]. *PeerJ*, 2021, 9(3): e11404.
- [9] 黄成, 李旭楠, 李诗燕, 王锦达. 植物 SWEET 基因家族的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(17): 17-26.
- HUANG C, LI X N, LI S Y, WANG J D. Research progress of plant SWEET gene family[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(17): 17-26. (in Chinese)
- [10] EOM J S, CHEN L Q, SOSSO D, JULIUS B T, LIN I, QU X Q, BRAUN D M, FROMMER W B. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 25: 53-62.
- [11] CHONG J, PIRON M C, MEYER S, MERDINOGLU D, BERTSCH C, MESTRE P. The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(22): 6589-6601.
- [12] ZHOU A, MA H P, FENG S, GONG S F, WANG J G. A novel sugar transporter from *dianthus spiculifolius*, DsSWEET12, affects sugar metabolism and confers osmotic and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 497.
- [13] CHEN L Q, QU X Q, HOU B H, SOSSO D, OSORIO S, FERNIE A R, FROMMER W B. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport[J]. *Science*, 2012, 335(6065): 207-211.
- [14] CHARDON F, BEDU M, CALENGE F, KLEMENS P A W, SPINNER L, CLEMENT G, CHIETERA G, LERAN S, FERRAND M, LACOMBE B, LOUDET O, DINANT S, BELLINI C, NEUHAUS H E, DANIEL-VEDELE F, KRAPP A. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2013, 23(8): 697-702.
- [15] GUO W J, NAGY R, CHEN H Y, PFRUNDER S, YU Y C. SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(2): 777-789.
- [16] YUAN M, ZHAO J, HUANG R, LI X H, XIAO J H, WANG S P. Rice MtN3/saliva/SWEET gene family: evolution, expression profiling, and sugar transport [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(6): 559-570.
- [17] 王锐, 徐娟娟, 刘鑫, 逮久幸, 栗燕. 牡丹开花相关 SWEET 家族基因生物信息学与表达模式分析[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(12): 2145-2153.
- WANG R, XU J J, LIU X, DAI J X, LI Y. Bioinformatics and expression pattern analysis of SWEET family genes during peony flowering development[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(12): 2145-2153. (in Chinese)
- [18] ANDRES F, KINOSHITA A, KALLURI N, FERNANDEZ V, COUPLAND G. The sugar transporter SWEET10 acts downstream of FLOWERING LOCUS T during floral transition of *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 1-14.
- [19] ÁVILA M, BLANCO M A, NIEVES N, GONZALEZ J, MARRERO P, GONZALEZ A, QUIONES J, MARTINEZ T. Effect of ethef on flowering induction in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Smooth Cayenne cv. *Serrana*. I changes in levels of polyamines, proteins and carbohydrates[J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 666(666): 175-182.
- [20] LIN W Q, PU Y, LIU S H, WU Q S, YAO Y L, YANG Y M, SUN W S, ZHANG X M. Genome-wide identification and expression patterns of AcSWEET family in pineapple and AcSWEET11 mediated sugar accumulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22): 13875.
- [21] 王会勤. 基于酵母双杂交与转录组联合分析筛选牡丹 ARRO-1 的互作基因[D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
- WANG H Q. Screening of the interaction genes of ARRO-1 based on yeast two-hybrid and transcriptome analysis in tree peony during adventitious rooting[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [22] 仇婷婷, 李瑞梅, 周杨骄, 林雪君, 姚远, 刘姣, 符少萍, 胡新文, 郭建春. 利用酵母双杂交筛选果胶甲酯酶抑制因子 MePMEI1 的互作蛋白[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(4): 1626-1633.
- QIU T T, LI R M, ZHOU Y J, LIN X J, YAO Y, LIU J, FU S P, HU X W, GUO J C. Screening of pectin methylesterase inhibitor MePMEI1-interacting proteins in cassava (*Manihot esculenta*) using yeast two-hybrid system[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(4): 1626-1633. (in Chinese)
- [23] 谢瑞莹, 曾露桂, 姜超英, 聂琼. 烟草 *NtMYB4a* 基因酵母双杂交诱饵载体的构建及互作蛋白的筛选[J]. *核农学报*, 2022, 36(7): 13181328.
- XIE R Y, ZENG L G, JIANG C Y, NIE Q. Construction of

- yeast two-hybrid bait vector and identification of proteins interacting with *NtMYB4a* in tobacco[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(7): 1318-1328. (in Chinese)
- [24] 刘德帅, 冯美, 樊姗姗, 孙雨桐, 迟敬楠, 姚文孔. 欧洲葡萄 *VvJAZ9* 基因互作蛋白的筛选与验证[J]. 果树学报, 2023, 40(7): 1294-1311.
- LIU D S, FENG M, FAN S S, SUN Y T, CHI J N, YAO W K. Screening and verification of *JAZ9* gene interacting proteins in *Vitis vinifera*[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(7): 1294-1311. (in Chinese)
- [25] LIU S H, ZANG X P, SUN G M. Changes in endogenous hormone concentrations during inflorescence induction and development in pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) by ethephon [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(53): 10892-10899.
- [26] LIU M, WU Q S, LIU S H, ZHANG H N, LIN W Q, ZHANG X M, LI Y H. Combining single-molecule sequencing and illumina RNA sequencing to elucidate flowering induction of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] treated with exogenous ethylene[J]. Plant Growth Regulation, 2021, 94(2021): 303-321.
- [27] WAHL V, PONNU J, SCHLERETH A, ARRIVAUULT S, LANGENECKER T, FRANKE A, FEIL R, LUNN F E, STITT M, SCHMID M. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*[J]. Science, 2013, 339: 704-707.
- [28] LYZENGA W J, BOOTH J K, STONE S L. The *Arabidopsis* RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase7[J]. The Plant Journal, 2012, 71(1): 23-24.
- [29] XU P, ZHANG Y, WEN X, YANG Q Q, LIU L, HAO S L, LI F X, WU Z Z, SHAH L, SOHAIL A, LIU Q N, SUN L P, HONG Y B, CHEN D B, SHEN X H, ZHAN X D, CHENG S H, CAO L Y, WU W X. The clock component *OsLUX* regulates rice heading through recruiting *OsELF3-1* and *OsELF4s* to repress *Hd1* and *Ghd7*[J]. Journal of Advanced Research, 2022, 48: 17-31.