

蒲公英 *TmRAVI* 基因克隆及其响应脱落酸信号表达分析

吴志清^{1,2}, 亓希武², 房海灵², 于 旻², 李 莉², 柏 杨², 刘 群^{2,①}, 梁呈元^{1,2,①}

[1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023;

2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 江苏 南京 210014]

摘要: 根据脱落酸处理的蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.)的转录组数据,在蒲公英中克隆获得1个编码RAV转录因子的基因序列,命名为*TmRAVI*。*TmRAVI*的开放阅读框(ORF)长度为1 026 bp,编码342个氨基酸。*TmRAVI*的理论相对分子质量为38 229,理论等电点为pI 9.20。*TmRAVI*为不稳定蛋白,具有亲水性,没有跨膜结构域和信号肽,含有44个磷酸化位点。氨基酸序列比对结果显示:*TmRAVI*与莴苣(*Lactuca sativa* Linn.)*LsRAVI*氨基酸序列的同源性最高(一致性为85.88%),具有高度保守的AP2和B3结构域。系统发育分析结果表明*TmRAVI*与其他5种植物的RAV转录因子聚在一起。*TmRAVI*在蒲公英叶中的相对表达量显著($P<0.05$)高于根和花。*TmRAVI*受 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸和 $250\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的显著诱导。*TmRAVI*能够显著上调脱落酸敏感型转录因子基因*TmAREB1*的表达。*TmRAVI*是核定位转录因子,与脱落酸信号核心蛋白家族成员*TmSnRK2.6*互作。综上所述,蒲公英*TmRAVI*响应脱落酸等多种信号,其编码蛋白与*TmSnRK2.6*互作,并调控*TmAREB1*的表达。

关键词: 蒲公英; *TmRAVI*; 基因克隆; 表达; 脱落酸信号响应

中图分类号: Q785; Q943.2; S567.23⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)01-0047-12

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.01.05

Gene cloning of *TmRAVI* in *Taraxacum mongolicum* and analysis on its expression in response to abscisic acid signaling WU Zhiqing^{1,2}, QI Xiwu², FANG Hailing², YU Xu², LI Li², BAI Yang², LIU Qun^{2,①}, LIANG Chengyuan^{1,2,①} [1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2024, 33(1): 47-58

Abstract: Based on the transcriptome data of *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. treated with abscisic acid (ABA), a gene sequence encoding RAV transcription factor was cloned from *T. mongolicum*, and named as *TmRAVI*. The open reading frame (ORF) of *TmRAVI* is 1 026 bp in length, encoding 342 amino acids. The theoretical relative molecular mass of *TmRAVI* is 38 229, and the theoretical isoelectric point is pI 9.20. *TmRAVI* is an unstable protein with hydrophilicity, has no transmembrane domain and signal peptide, and contains 44 phosphorylation sites. The amino acid sequence alignment result shows that *TmRAVI* has the highest homology with the amino acid sequence of *LsRAVI* in *Lactuca sativa* Linn. (the identity is 85.88%), and has highly conserved AP2 and B3 domains. The phylogenetic analysis result indicates that *TmRAVI* and RAV transcription factors in other five plants are clustered together. The expression level of *TmRAVI* in leaf of *T. mongolicum* is significantly ($P<0.05$) higher than those in root and flower. *TmRAVI* is significantly induced by $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA and $250\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl. *TmRAVI* can significantly up-regulate the expression of abscisic acid-sensitive transcription factor gene

收稿日期: 2023-08-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(32200299); 江苏省自然科学基金项目(BK20220753); 江苏省植物资源研究与利用重点实验室开放基金项目(JSPKLB202201; JSPKLB202310)

作者简介: 吴志清(1996—),女,山西临汾人,硕士研究生,主要从事药用植物资源方面的研究。

①通信作者 E-mail: liuqun1025265208@sina.com; liangcy618@aliyun.com

引用格式: 吴志清, 亓希武, 房海灵, 等. 蒲公英 *TmRAVI* 基因克隆及其响应脱落酸信号表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(1): 47-58.

TmAREB1. *TmRAV1* is a nucleus-localized transcription factor, and can interact with the abscisic acid signaling core protein family member *TmSnRK2.6*. In conclusion, *TmRAV1* in *T. mongolicum* responds to multiple signals including abscisic acid, its encoding protein interacts with *TmSnRK2.6*, and regulates the expression of *TmAREB1*.

Key words: *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.; *TmRAV1*; gene cloning; expression; response to abscisic acid signaling

蒲公英 (*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.) 为一种药食同源的多年生植物,全草入药,具有清热解毒、消肿散结等功效^[1]。蒲公英主要有效成分为酚酸类、黄酮类和香豆素类等^[2-3],具有抗菌、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等药理作用^[4-5]。目前,已开发出多种蒲公英产品,包括蒲公英根茶、蒲公英花茶、蒲公英挂面和蒲公英酵素等,市场需求量大^[6]。蒲公英种质资源良莠不齐,其产量和质量难以稳定控制,因此,如何获得高品质的蒲公英新种质资源成为制约该产业发展的一个重要因子,利用生物技术改良蒲公英种质资源成为研究的热点之一^[7]。

AP2/ERF (apetala2/ethylene responsive factor) 转录因子家族成员能够响应多种生物和非生物胁迫,激活激素应答信号,从而参与调控植物的生长发育过程^[8]。根据保守结构域的类型,AP2/ERF 转录因子家族可分为4个亚家族:AP2 (apetala2)、RAV (related to abscisic acid insensitive 3/viviparous 1)、ERF (ethylene responsive factor) 和 DREB (dehydration-responsive element binding protein)^[9-11]。RAV 转录因子含有 N 端的 AP2 结构域和 C 端的 B3 结构域^[12],参与多种逆境胁迫。例如:在棉花 (*Gossypium hirsutum* Linn.) 中过表达拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] *AtRAV1* 和 *AtRAV2* 能提高棉花的抗旱性,延迟开花时间并增加纤维长度^[13];在拟南芥中过表达大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] *GmRAV-03* 能够提高拟南芥的抗旱和耐盐能力,表现出对脱落酸 (ABA) 响应不敏感^[14];在黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.) 中,*CsRAV1* 响应脱落酸信号,从而提高黄瓜对盐胁迫的耐受性^[15]。进一步研究发现,RAV 转录因子还能参与植物对病原体的响应。例如:番茄 (*Solanum lycopersicum* Linn.) *SlRAV2* 受外源基因 *AtCBF1* 的调控,进而调控致病相关基因的表达,从而增强番茄对青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 感染的耐受性^[16];木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) *MeRAV1* 和 *MeRAV2* 通过调控褪黑素合成基因

MeTDC2、*MeT5H* 和 *MeASMT1* 的表达来提高木薯对细菌性枯萎病的抵抗能力,且 *MeRAV1*、*MeRAV2*、*MeRAV3*、*MeRAV4*、*MeRAV5*、*MeRAV6* 和 *MeRAV7* 能共同调节活性氧含量和下游抗病基因 *MebZIP5*、*MeNR2*、*MeIAA5* 和 *MeIAA17* 的表达,进而提高木薯的抗病能力^[17-18]。水稻 *RAV* 在受到条纹病毒和黑条矮缩病毒侵染时其表达量显著变化^[19]。

前期研究结果显示,脱落酸可以显著促进蒲公英次生代谢产物的积累,提高蒲公英的品质^[20]。因此,本研究通过对脱落酸处理的蒲公英转录组数据进行分析,筛选出1个差异表达的 *RAV1* 基因,对该基因编码蛋白进行了氨基酸序列比对、系统进化关系、二级结构、三级结构以及亚细胞定位等分析,并分析该基因在蒲公英中的表达模式,验证其转录调控特性及蛋白互作的功能,以期研究 *RAV* 转录因子参与蒲公英逆境胁迫的生物学功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试野生蒲公英植株和种子均采自南京中山植物园 (东经 118°49'48"、北纬 32°03'00",海拔 106 m)。于3月至4月采集蒲公英全株,用蒸馏水清洗干净后分别取根、叶和花,液氮速冻后于-80℃保存,用于后续 RNA 提取。

于3月至4月采集蒲公英种子,于同年4月种植于有机质土壤 (南京寿德生物科技有限公司) 与蛭石 (体积比 1:3) 的混合基质中,种植 15 d 后,将蒲公英幼苗移栽至塑料盆 (长 10 cm、宽 10 cm、高 10 cm) 中,每盆 1 株,然后置于人工培养箱 (温度 26℃、光照时间 16 h·d⁻¹) 中培养 60 d 左右开始实验。共设置 100 μmol·L⁻¹ 脱落酸 (ABA)、100 μmol·L⁻¹ 茉莉酸甲酯 (MeJA)、100 μmol·L⁻¹ 赤霉素 (GA)、100 μmol·L⁻¹ 水杨酸 (SA) 和 250 mmol·L⁻¹ NaCl 5 个处理。选择长势基本一致的幼苗,每个处理用 200 mL

处理液将幼苗喷洒至叶湿润并灌根。分别于处理 0、2、4、8 和 24 h 采集叶,用液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱,用于后续 RNA 提取。每个处理各处理时间取 3 株,作为 3 个生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取、cDNA 合成及基因克隆 取蒲公英新鲜叶片用液氮研磨,根据 RNA 提取试剂盒 Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit (LS1040)〔普洛麦格(北京)生物技术有限公司〕的使用说明书提取蒲公英叶片的 RNA,使用 UniClone One Step Seamless Cloning Kit (SC612) (北京金沙生物技术有限公司)试剂反转录获得蒲公英 cDNA。根据蒲公英 *RAVI* 的全长编码序列 (CDS) 设计特异性引物

TmRAVI-F 和 *TmRAVI*-R (表 1),以 cDNA 为模板利用高保真 DNA 聚合酶 Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase (P505) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行扩增。扩增体系总体积 25.0 μL,包括 Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL,2×Phanta Max Buffer 12.5 μL,dNTP Mix 1.0 μL、上游和下游引物各 0.5 μL,cDNA 1.0 μL 及 ddH₂O 9.0 μL。使用 TC-E-48D 基因扩增仪(杭州博日科技股份有限公司)进行 PCR 扩增。扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环;72 °C 终延伸 7 min。扩增产物使用质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(B518131)〔生工生

表 1 用于蒲公英 *TmRAVI* 基因克隆和功能研究的引物相关信息

Table 1 Primer-related information for gene cloning and functional study of *TmRAVI* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.

引物 Primer	序列(5'→3') ¹⁾ Sequence (5'→3') ¹⁾	用途 Application
<i>TmRAVI</i> -F	ATGGATACAAGTTGCACAG	基因克隆 Gene cloning
<i>TmRAVI</i> -R	TTACAAAGCATTGATAAGTC	
pHellsgate- <i>TmRAVI</i> -F	TTTGGAGAGGACACGCTCGAGATGGATACAAGTTGCACAG	亚细胞定位 Subcellular localization
pHellsgate- <i>TmRAVI</i> -R	GCTCACCATGAATTCCTCGAGCAAAGCATTGATAAGTC	
qRT- <i>TmRAVI</i> -F	ACAACCACCGAAACCATCTC	实时荧光定量 PCR Real-time fluorescence quantitative PCR
qRT- <i>TmRAVI</i> -R	AACGTGCCAAGCCATACTCT	
<i>β-Actin</i> -F	AGCAGCTTCCATTCCGATCA	
<i>β-Actin</i> -R	GGTACATGTTCCACCACCAC	
pGreen0800- <i>TmAREB1</i> -F	CAGCCCGGGGATCCGTTACGGATGCTATGAGCTAC	双荧光素酶分析 Dual-luciferase analysis
pGreen0800- <i>TmAREB1</i> -R	AGAAGTACTGGATCCAGTAGAAATTCCTCAACTTTG	
BD- <i>TmSnRK2.6</i> -F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGATCGATCGGCGCTTA	酵母双杂交 Yeast two-hybrid
BD- <i>TmSnRK2.6</i> -R	CGACGGATCCCCGGGAATTCCTTATAACGCGTATACAATC	
AD- <i>TmRAVI</i> -F	GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGATACAAGTTGCACAG	
AD- <i>TmRAVI</i> -R	ATGCCCACCCGGGTGGAATTCCTTACAAAGCATTGATAAGTC	
pXY104- <i>TmRAVI</i> -cYFP-F	CGGTACCCGGGATCCATGGATACAAGTTGCACAG	双分子荧光互补 Bimolecular fluorescence complementary
pXY104- <i>TmRAVI</i> -cYFP-R	CGACTCTAGAGGATCCCAAAGCATTGATAAGTC	
pXY106- <i>TmSnRK2.6</i> -nYFP-F	ATCCTCTAGAGTCGACATGGATCGATCTGCGCTT	
pXY106- <i>TmSnRK2.6</i> -nYFP-R	TGCCTGCAGGTCGACCATTGCATAAACTATCTCC	
M13-F	CAGGGTTTTCCAGTCACG	载体通用引物 Universal primer of vector
M13-R	GAGCGGATAACAATTTCCACAC	
35S-F	GACGCACAATCCCACTATCC	
35S-R	TGAACTTGTGGCCGTTTACGTC	
pGreen0800F	CGACGGTATCGATAAGCTTGATATC	
GLP2R	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC	
T7F	GTAATACGACTCACTATAGGGCGA	
3'AD	AGATGGTGCACGATGCACAG	
3'BD	TTTTCGTTTTAAAACCTAAGAGTC	
cYFP-F	TTGGAGAGAACACGGGGACGAG	
cYFP-R	GCGGACTGGTAGCTCAGCTAG	
nYFP-F	CAACAGCCACAACGTCTATATCA	
nYFP-R	TTTCCAATGCCATAATACTC	

¹⁾ 下划线示酶切位点 The underlines indicate restriction sites.

物工程(上海)股份有限公司]获得产物,将胶回收产物连接到TA克隆载体(C601-01)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)上,转化至大肠杆菌感受态DH5 α (TSC-C01)(南京擎科生物科技有限公司),利用50 mg·mL⁻¹卡那霉素进行筛选,获得阳性克隆,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 生物信息学分析 从NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得TmRAV1的同源序列,并进行保守结构域分析;在PlantTFDB网站(<http://plantfdb.gao-lab.org/>)下载拟南芥转录因子氨基酸序列;利用ProtParam在线工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质理化特性;利用Plant-mPLoc软件(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)预测亚细胞定位;利用SignalP-6.0软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0/>)分析信号肽;利用TMHMM2.0在线软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析跨膜结构域;利用NetPhos-3.1网站(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)预测磷酸化位点;分别利用在线软件SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)和SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)分析二级结构和三级结构;利用GeneDoc软件进行同源序列比对分析;利用MEGA 7.0软件,采用邻接法绘制系统发育树,自展支持率(bootstrap value)为1 000。

1.2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 根据TmRAV1的CDS序列设计荧光定量PCR引物qRT-TmRAV1-F和qRT-TmRAV1-R(表1),分别提取蒲公英不同组织和不同处理叶的总RNA,反转录获得cDNA。使用qRT-PCR酶GS AntiQ qPCR SYBR Green Master Mix(SQ412)(北京金沙生物科技有限公司)进行qRT-PCR分析。扩增体系总体积10.0 μ L,包括SYBR 5.0 μ L、cDNA 1.2 μ L、上游和下游引物0.4 μ L及RNAase-free ddH₂O 3.0 μ L。使用CFX-Opus 96荧光定量PCR仪(美国BIO-RAD公司)进行扩增。扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性10 s、58 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸15 s,40个循环;在72 $^{\circ}$ C采集信号。以 β -Actin为内参基因,利用2^{- $\Delta\Delta$ C_T}计算相对表达量^[21]。每个处理3个技术重复。

1.2.4 亚细胞定位分析 使用限制性内切酶Xho I对pHellsgata8-GFP(35S:GFP)空质粒进行酶切,回

收大片段。使用特异性引物pHellsgate-TmRAV1-F和pHellsgate-TmRAV1-R克隆获得TmRAV1编码序列,连接至pHellsgata8-GFP载体并转化至大肠杆菌感受态DH5 α ,使用载体上游引物35S-F和目的基因下游引物pHellsgata8-TmRAV1-R进行PCR验证,将验证成功的单菌落送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序成功的重组质粒pHellsgata8-TmRAV1-GFP通过农杆菌转化法转至根癌农杆菌感受态GV3101,挑取直径1~2 mm的农杆菌菌落进行PCR验证(载体下游引物35S-R和目的基因上游引物pHellsgata8-TmRAV1-F),验证成功的农杆菌在LB培养基中过夜培养至OD₆₀₀值约0.8,于4 $^{\circ}$ C、5 000 r·min⁻¹离心3 min,去除上清液;使用重悬液[含10 mmol·L⁻¹ 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸(MES)、10 mmol·L⁻¹ MgCl₂和0.2 mmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮]进行重悬,使菌液OD₆₀₀值约1.0,注射到本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* Domin)叶片背面进行瞬时表达,暗培养2~3 d后,使用LSM900激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)观察结果。以注射含有pHellsgata8-GFP空质粒的农杆菌的叶片为对照,实验重复3次。

1.2.5 双荧光素酶(Dual-LUC)分析 根据蒲公英基因组(<https://ngdc.cncb.ac.cn/search/>)查找得到TmAREB1基因的启动子片段,利用primer5.0设计引物pGreen0800-TmAREB1-F和pGreen0800-TmAREB1-R,并按照“1.2.4”中载体构建的方法将proAREB1构建到pGreen0800(BamH I酶切位点)载体上,得到pGreen0800-proTmAREB1重组质粒(用于驱动萤火虫荧光素酶报告基因),转至根癌农杆菌感受态GV3101;然后与含有pHellsgata8-TmRAV1-GFP重组质粒(用于驱动海肾荧光素酶报告基因)的农杆菌按照体积比1:1共同注射于本氏烟草叶片背面。实验步骤参照“1.2.4”,暗培养2~3 d后,根据双荧光素酶试剂盒TransDetect[®] Double-Luciferase Reporter Assay Kit(AT321)(北京全式金生物技术股份有限公司)说明书对叶片进行处理,使用Tanon 5200 Multi全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能生命科学有限公司)观察。将含有pHellsgata8-GFP空质粒与pGreen0800-proTmAREB1重组质粒的农杆菌按照体积比1:1共同注射于本氏烟草叶片背面作为对照^[21]。

1.2.6 酵母双杂交(Y2H)实验 在蒲公英基因组

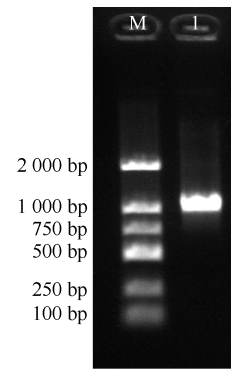
中,通过同源比对筛选获得脱落酸信号核心蛋白家族成员 *AtSnRK2.6* 的同源基因 *TmSnRK2.6*。设计同源重组引物 BD-*TmSnRK2.6*-F 和 BD-*TmSnRK2.6*-R 将 *TmSnRK2.6* 连接到 pGBKT7(*EcoR* I 酶切位点)载体上,同时设计引物 AD-*TmRAV1*-F 和 AD-*TmRAV1*-R 将 *TmRAV1* 构建到 pGADT7(*EcoR* I 酶切位点)载体上,方法参照“1.2.4”。将构建好的 pGADT7-*TmRAV1* 和 pGBKT7-*TmSnRK2.6* 重组质粒共同转化至酵母菌感受态 Y2H 中,在 SD/-Trp/-Leu 培养基上生长 3~5 d 后转移至含 X- α -gal 的 SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu 培养基上观察是否变蓝。pGADT7 及 pGBKT7 空质粒共转化 Y2H 作为阴性对照。

1.2.7 双分子荧光互补(BiFC)分析 分别将 *TmRAV1* 和 *SnRK2.6* 构建到 pXY104-cYFP(*Bam*H I 酶切位点)和 pXY106-nYFP(*Sal* I 酶切位点)载体上,获得 pXY104-*TmRAV1*-cYFP 和 pXY106-*SnRK2.6*-nYFP 重组质粒,按照“1.2.4”中的方法转化至根癌农杆菌感受态 GV3101,将含有 pXY104-*TmRAV1*-cYFP 和 pXY106-*SnRK2.6*-nYFP 重组质粒的农杆菌按照体积比 1:1 混合后共同注射于本氏烟草叶片背面,暗培养 2~3 d,使用 LSM900 激光共聚焦显微镜观察。cYFP 和 nYFP 空质粒共同转化作为阴性对照。

2 结果和分析

2.1 *TmRAV1* 基因克隆及蛋白质生物信息学分析

2.1.1 基因克隆及测序分析 以蒲公英叶片 cDNA 作为模板,使用特异性引物 PCR 扩增得到 1 条长度约 1 000 bp 的条带(图 1),将胶回收片段连接转化后进行测序,测序结果与预期结果一致,*TmRAV1* 开放阅读框(ORF)长度为 1 026 bp,GC 含量为 47.95%,编码 342 个氨基酸(图 2)。



M: DL2000 DNA marker; 1: *TmRAV1*.

图 1 蒲公英 *TmRAV1* PCR 扩增产物的电泳结果
Fig. 1 Electrophoresis result of PCR amplification product of *TmRAV1* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.

```

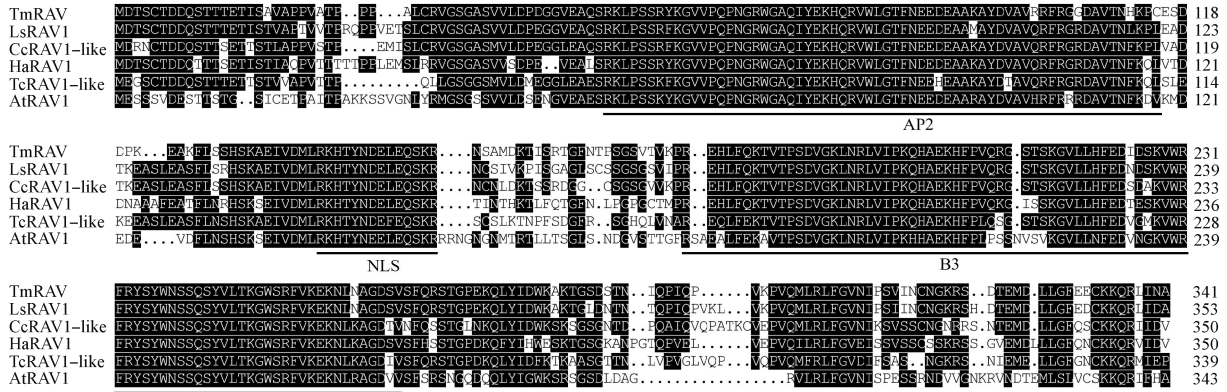
1 ATGGATACAAGTTGCACAGATGATCAAAAGCACAAACCACCGAAACCATCTCCGCGTTGCACCACCGTTCGCCACCCCTCCGCCGGCGCTGTGCCGGGTTCGGGAGCGGAGCTAGCGTGGTT
  M D T S C T D D Q S T T T E T I S A V A P P V A T P P P A L C R V G S G A S V V
121 CTTGACCCGGACGGAGCGTTGAAGCACAGTCGAGGAAGCTACCAATCAATATAAAGGCGTCGTTCCACAGCCGATGGCCGTTGGGGAGCTCAGATTTACGAGAAAACACCAGAGA
  L D P D G G V E A Q S R K L P S S R Y K G V V P Q P N G R W G A Q I Y E K H Q R
241 GTATGGCTTGGCAGCTTTAACGAGGAAGATGAAGCTGCCAAGGCGTACGACGTCGCGGTACGACGCTTTCGCCGGGAGACGCCGTCACAAACCACAAGCCTTGGCAATCCGATGACCCA
  V W L G T F N E E D E A A K A Y D V A V R R F R G G D A V T N H K P C E S D D P
361 AAAGAAGCAAAGTTCTTAAGCTCTCACTCAAAGCCGAGATCGTTGATATGCTGAGAAAAACACACGTCACAATGATGAAGTGGAGCAAAGTAAAAGAACTCCGCCATGGATAAAACCAATT
  K E A K F L S S H S K A E I V D M L R K H T Y N D E L E Q S K R N S A M D K T I
481 TCACGAAGTGGGTTAATACTCCTTCCGGTCTGTACCCTTAAGCCACGAGAACCTCTTCCAGAAGACTGTTACCCCAAGTGACGTCGGAAAACCTGAACCCGGCTCGTGATACCAAAA
  S R T G F N T P S G S V T V K P R E H L F Q K T V T P S D V G K L N R L V I P K
601 CAACACGCAGAAAACACTTTCGGGTTACAGAGGAGGAGCACTTCAAAGGAGTCTTTTACATTTCAAGATATTGATTCAAAAGTATGGAGATTTCGTTATTCTTACTGGAACAGCAGC
  Q H A E K H F P V Q R G S T S K G V L L H F E D I D S K V W R F R Y S Y W N S S
721 CAGAGCTACGTGTTAACCAAAGGTTGGAGCCGGTTTGTGAAAGAGAAAAACTTAAACGCCGGTATAGTGTAGCTTTCAGAGATCAACTGGGCCGGAAAAGCAGCTTTCATAGATTTGG
  Q S Y V L T K G W S R F V K E K N L N A G D S V S F Q R S T G P E K Q L Y I D W
841 AAAGCTAAAACCGGTCGATAGTACGAACATACAGCCCATCAACCGGTCAAACCGGTTACAGATTTACGGTTATTTGGGGTTAACATTCAGAGTGTATTAACTGCAATGGCAAGAGG
  K A K T G S D S T N I Q P I Q P V K P V Q M L R L F G V N I P S V I N C N G K R
961 AGTGATACAGAAATGGATTATTAGGGTTTGAAGGAGTGAAGAAACAAAGACTTATCAATGCCTTTG
  S D T E M D L L G F E E C K K Q R L I N A L
    
```

图 2 蒲公英 *TmRAV1* 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *TmRAV1* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. and its encoding amino acid sequence

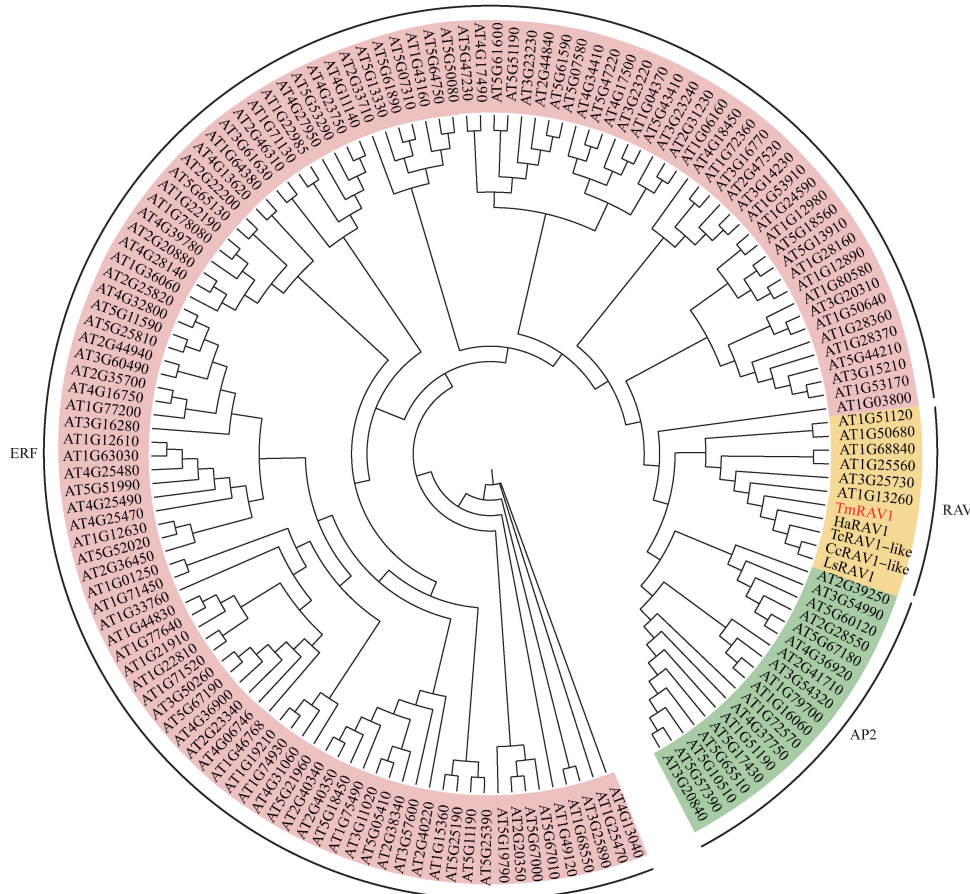
2.1.2 同源序列比对及系统发育树构建 蒲公英 *TmRAV1* 与其他植物 RAV 的氨基酸序列比对结果(图 3)显示:蒲公英 *TmRAV1* 与其他植物的 RAV 具有高度保守的 AP2 和 B3 结构域以及核定位信号,且与莴苣(*Lactuca sativa* Linn.) *LsRAV1* (NCBI 登录号 XP_023746260.1)的同源性最高,一致性达 85.88%。

将 *TmRAV1* 与莴苣等 4 个物种的 RAV 以及拟南芥 AP2、ERF 和 RAV 亚家族进行系统发育树的构建,结果(图 4)显示:蒲公英 *TmRAV1* 与莴苣 *LsRAV1*、朝鲜蓟 [*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (Linn.) Benth.] *CcRAV1*、向日葵 (*Helianthus annuus* Linn.) *HaRAV1* 和除虫菊 [*Tanacetum cinerariifolium*



Tm: 蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.; Ls: 莴苣 *Lactuca sativa* Linn. (XP_023746260.1); Cc: 朝鲜蓟 *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (Linn.) Benth. (XP_024988000.1); Ha: 向日葵 *Helianthus annuus* Linn. (XP_022020644.1); Tc: 除虫菊 *Tanacetum cinerariifolium* (Treviranus) Schultz Bipontinus (GEW18075.1); At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. (ATIG13260). 括号中编号为 NCBI 登录号 Nos. in the brackets are accession numbers in NCBI. AP2, B3: DNA 保守结构域 DNA conserved domain; NLS: 核定位信号 Nuclear localization signal.

图3 蒲公英 TmRAV1 与其他植物 RAV 的氨基酸序列比对
Fig. 3 Amino acid sequence alignment between TmRAV1 in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. and RAVs in other plants



Tm: 蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.; Ls: 莴苣 *Lactuca sativa* Linn. (XP_023746260.1); Cc: 朝鲜蓟 *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (Linn.) Benth. (XP_024988000.1); Ha: 向日葵 *Helianthus annuus* Linn. (XP_022020644.1); Tc: 除虫菊 *Tanacetum cinerariifolium* (Treviranus) Schultz Bipontinus (GEW18075.1). 括号编号为 NCBI 登录号 Nos. in the brackets are accession numbers in NCBI. 以“AT”开头的编号均为拟南芥中蛋白质的 NCBI 登录号 Nos. starting with “AT” are all NCBI accession numbers of proteins in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

图4 蒲公英 TmRAV1 与莴苣等4种植物的 RAV 以及拟南芥 AP2、ERF 和 RAV 亚家族的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of TmRAV1 in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. with RAVs in four plants including *Lactuca sativa* Linn. and AP2, ERF, and RAV subfamilies in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

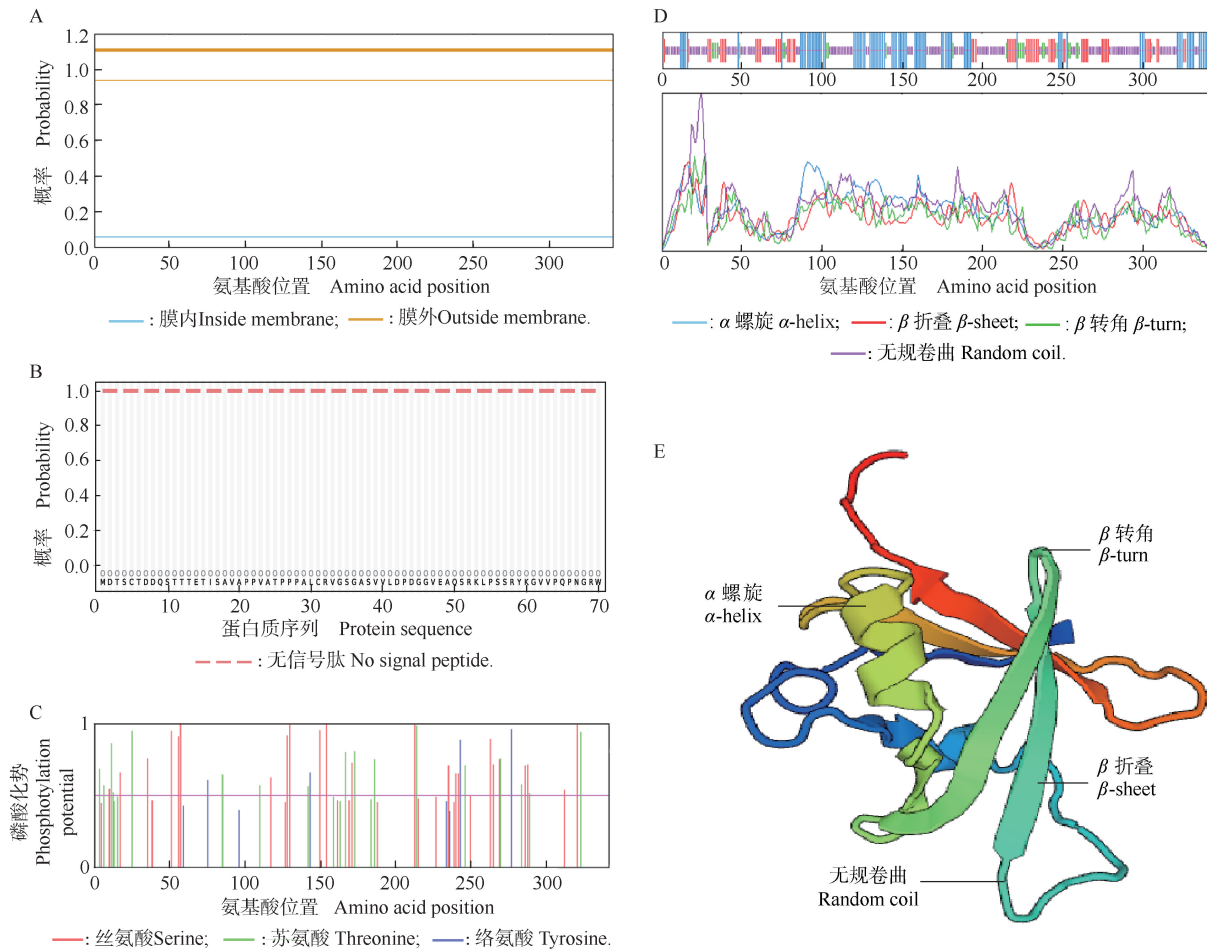
(Treviranus) Schultz Bipontinus] TcRAV1 先聚在一起, 再与拟南芥 RAV 亚家族聚为一支。

2.1.3 蛋白质理化性质及结构分析 蒲公英 *TmRAV1* 的分子式为 $C_{1678}H_{2654}N_{486}O_{517}S_{10}$, 理论相对分子质量为 38 229, 理论等电点为 pI 9.20。 *TmRAV1* 中带正电荷和负电荷的氨基酸残基分别为 49 和 40 个。 *TmRAV1* 的不稳定指数为 46.45, 为不稳定蛋白; 脂肪指数为 66.93; 总平均亲水指数 (GRAVY) 为 -0.692, 是亲水性蛋白。 Plant-mPLoc 预测结果显示 *TmRAV1* 是核定位转录因子。 *TmRAV1* 上没有跨膜结构域, 也没有信号肽 (图 5-A, B)。 *TmRAV1* 上有 44 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 23 个, 苏氨酸 17 个, 酪氨酸 4 个 (图 5-C)。 二级结构预测结果显示: *TmRAV1* 中含有 27.49% α 螺旋、7.31% β 折叠、

18.71% β 转角和 46.49% 无规卷曲 (图 5-D)。 以氨基酸相似性为 77.27% 的拟南芥 AtRAV1 (1wid.1.A) 为模板分子构建 *TmRAV1* 的三级结构, 预测结果 (图 5-E) 显示: *TmRAV1* 的三级结构也由 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规卷曲构成, 与其二级结构预测结果一致。

2.2 *TmRAV1* 表达分析

蒲公英 *TmRAV1* 在不同组织和不同处理叶中的表达模式见图 6。 结果显示: 蒲公英不同组织中 *TmRAV1* 的相对表达量由高到低依次为叶、花、根, 且不同组织间差异达到显著 ($P < 0.05$) 水平。 在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱落酸处理下, *TmRAV1* 的相对表达量随着处理时间的延长整体呈先升高后降低的变化趋势, 在处理 2~8 h 较高。 在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯处



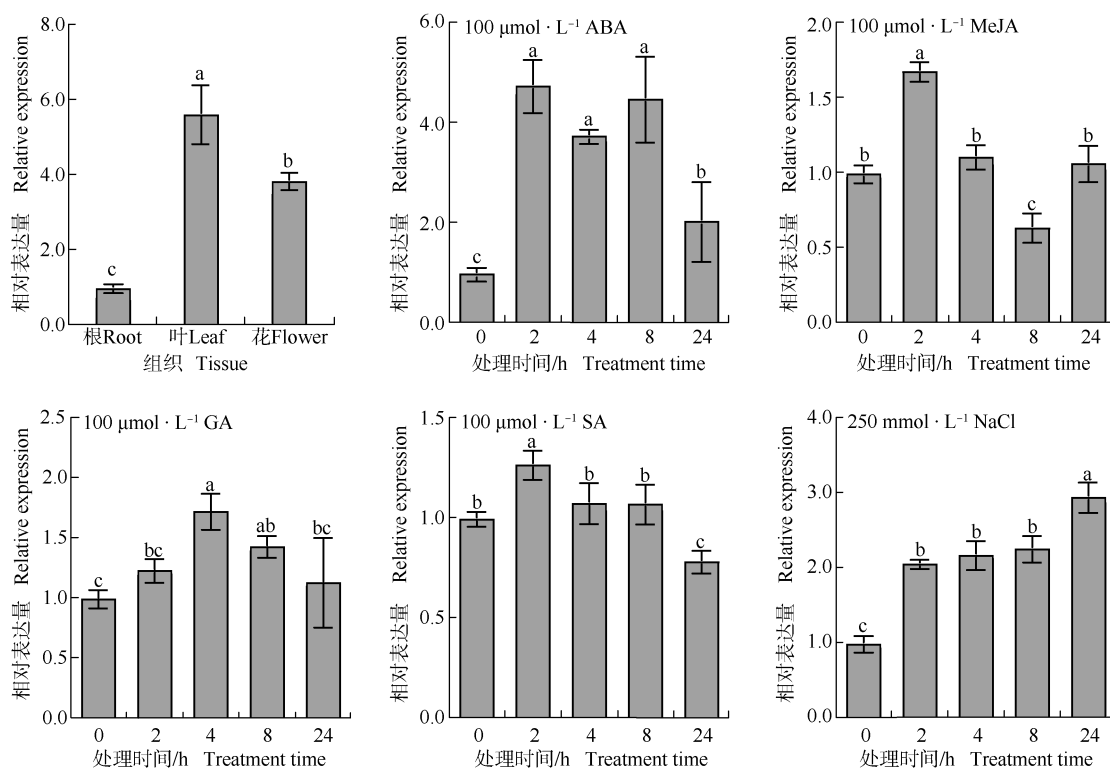
A: 跨膜结构域预测 Prediction of transmembrane domain; B: 信号肽预测 Prediction of signal peptide; C: 磷酸化位点预测 Prediction of phosphorylation site; D: 二级结构预测 Prediction of secondary structure; E: 三级结构预测 Prediction of tertiary structure.

图 5 蒲公英 *TmRAV1* 的生物信息学分析

Fig. 5 Bioinformatics analysis on *TmRAV1* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.

理下, *TmRAVI* 的相对表达量随着处理时间的延长呈“升高—降低—升高”的变化趋势, 在处理 2 和 8 h 分别显著高于和低于其他处理时间。在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素处理下, *TmRAVI* 的相对表达量随着处理时间的延长呈先升高后降低的变化趋势, 在处理 4 h 达到

最高。在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸处理下, *TmRAVI* 的相对表达量随着处理时间的延长呈先升高后降低的变化趋势, 在处理 2 h 达到最高。在 $250 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下, *TmRAVI* 的相对表达量在处理 24 h 内呈逐渐升高的趋势。



ABA: 脱落酸 Abscisic acid; MeJA: 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate; GA: 赤霉素 Gibberellin; SA: 水杨酸 Salicylic acid. 同一图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same graph indicate the significant ($P < 0.05$) differences.

图6 蒲公英 *TmRAVI* 的表达模式
Fig. 6 Expression patterns of *TmRAVI* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.

2.3 *TmRAVI* 亚细胞定位分析

蒲公英 *TmRAVI* 的亚细胞定位结果(图7)显示: 对照组 35S:GFP 细胞膜和细胞核上有绿色荧光, 而 *TmRAVI* 仅在细胞核中有荧光, 说明 *TmRAVI* 定位于细胞核中。

2.4 *TmAREB1* 启动子分析及 *TmRAVI* 双荧光素酶分析

蒲公英 *TmAREB1* 启动子含有多个顺式作用原件, 其中包括 2 个 TGTTC-motif、2 个 CAACA-motif、1 个 W-box、1 个 ABRE、1 个 G-box 和 1 个 TGACG-motif(图8)。

双荧光素酶分析结果(图9)显示: 实验组(含有 35S:*TmRAVI*-GFP 与 pGreen0800-*proTmAREB1* 的农

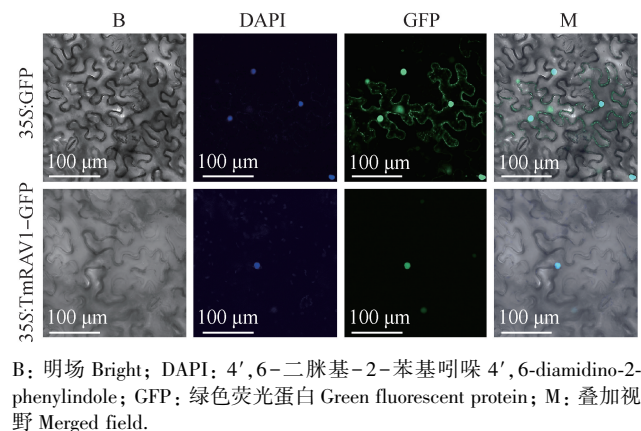


图7 蒲公英 *TmRAVI* 的亚细胞定位
Fig. 7 Subcellular localization of *TmRAVI* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.

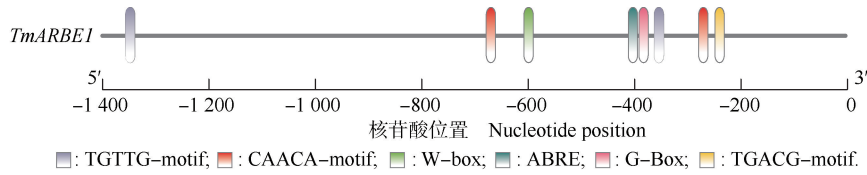
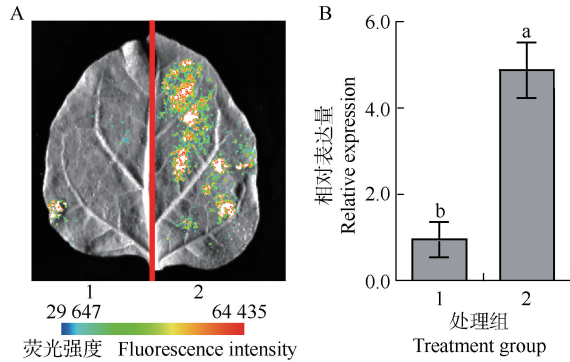


图 8 蒲公英 *TmAREB1* 启动子分析结果
Fig. 8 Promoter analysis result of *TmAREB1* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.



1: 对照组 The control group; 2: 实验组 Experimental group. 图 B 中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the graph B indicate the significant ($P < 0.05$) differences.

A: 本氏烟草叶片背面荧光活性图 Fluorescence activity map on the back of *Nicotiana benthamiana* Domin leaf; B: 实验组与对照组荧光活性相对表达量 Relative expression of fluorescence activity between the experimental group and the control group.

图 9 蒲公英 *TmRAV1* 与 *proTmAREB1* 的双荧光素酶分析结果
Fig. 9 Dual-luciferase analysis result of *TmRAV1* and *proTmAREB1* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.

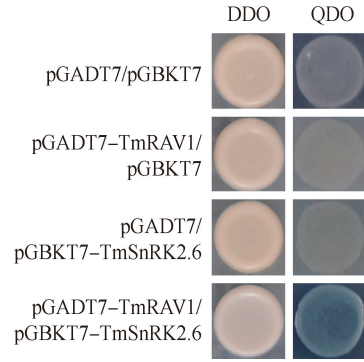
杆菌共同注射本氏烟草)的荧光素酶活性是对照组(含有 35S:GFP 空质粒与 pGreen0800-*proTmAREB1* 的农杆菌共同注射本氏烟草)的 4.82 倍,二者间存在显著 ($P < 0.05$) 差异,说明 *TmRAV1* 能够显著上调 *TmAREB1* 的表达。

2.5 *TmRAV1* 酵母双杂交分析

将蒲公英的脱落酸信号核心蛋白家族成员 *TmSnRK2.6* 与 *TmRAV1* 进行酵母双杂交分析,结果(图 10)显示:*TmRAV1* 与 *TmSnRK2.6* 能够在酵母体内互作。

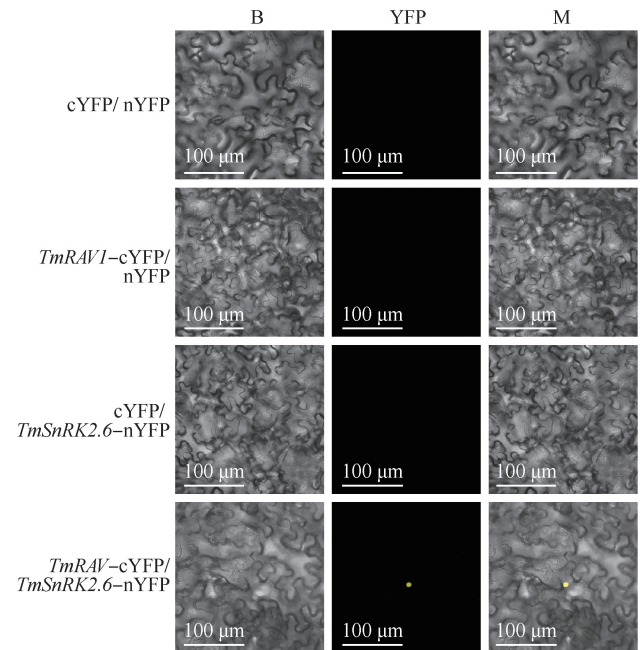
2.6 *TmRAV1* 双分子荧光互补分析

双分子荧光互补分析结果(图 11)显示:将含有 *TmRAV1*-cYFP 和 *TmSnRK2.6*-nYFP 的农杆菌共同注射本氏烟草叶片时能够看到黄色荧光蛋白(YFP)荧光信号,但是 cYFP 和 nYFP 共同转化(阴性对照)中没有荧光信号,说明 *TmRAV1* 能够与 *TmSnRK2.6* 在本氏烟草体内形成异源二聚体。



DDO: SD/-Trp/-Leu 培养基 SD/-Trp/-Leu medium; QDO: SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu 培养基(含 X-α-gal) SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu medium (containing X-α-gal).

图 10 蒲公英 *TmRAV1* 与 *TmSnRK2.6* 酵母双杂交分析结果
Fig. 10 Yeast two-hybrid analysis result of *TmRAV1* and *TmSnRK2.6* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.



B: 明场 Bright; YFP: 黄色荧光蛋白 Yellow fluorescent protein; M: 叠加视野 Merged field.

图 11 蒲公英 *TmRAV1* 与 *TmSnRK2.6* 双分子荧光互补分析结果
Fig. 11 Bimolecular fluorescence complementation analysis result of *TmRAV1* and *TmSnRK2.6* in *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.

3 讨论和结论

AP2/ERF 超家族成员 RAV 转录因子是植物中特有的一类转录因子,主要参与植物的生长发育及其非生物胁迫响应过程,已经在多种植物中有相关报道,如水稻 (*Oryza sativa* Linn.)、小黑杨 (*Populus × xiaohei* T. S. Hwang et Liang)、御谷 [*Pennisetum glaucum* (Linn.) R. Brown]、枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]、甘蔗 (*Saccharum officinarum* Linn.) 等^[11,22-25]。本研究从蒲公英中克隆得到 1 个 RAV 转录因子基因 *TmRAV1*, *TmRAV1* 与莴苣 *LsRAV1* 氨基酸序列的一致性达到 85.88%,属于 RAV 亚家族。*TmRAV1* 有 44 个磷酸化位点,因此可能被 SnRK2 等蛋白激酶磷酸化^[26]。亚细胞定位结果显示 *TmRAV1* 定位于细胞核,这与转录因子在细胞核中发挥的作用一致,且与先前的预测结果相同。*TmRAV1* 具有 N 端 AP2 结构域和 C 端 B3 结构域,与已有研究报道^[27]一致,因此 *TmRAV1* 可能与 AGCCGCC (GCC-box)、CAACA-motif 和 CACCTG 序列结合^[17,28]。

RAV 参与调节激素、干旱和盐胁迫反应^[29-30]。qRT-PCR 结果表明蒲公英叶中的 *TmRAV1* 受多种激素和 NaCl 胁迫诱导。*TmRAV1* 受 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱落酸的显著调控,其相对表达量在处理 24 h 内整体先升高后降低,在处理 2~8 h 较高,说明 *TmRAV1* 可能参与脱落酸信号通路。在 250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下,*TmRAV1* 的相对表达量在处理 24 h 内持续升高,说明 *TmRAV1* 能够持续响应 NaCl 胁迫,后续实验需要降低 NaCl 溶液的浓度或者延长处理时间至 3~5 d^[15,31]。在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯处理下,*TmRAV1* 的相对表达量在处理 0~8 h 先升高后降低并在处理 2 h 达到峰值,而在处理 24 h 又再次升高,可能涉及茉莉酸信号负调控作用机制^[32-33]。在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素处理下,*TmRAV1* 的相对表达量在处理 24 h 内也先升高后降低,显示 *TmRAV1* 可能参与赤霉素信号通路。在水稻中水杨酸处理上调了 *OsRAV1*、*OsRAV3*、*OsRAV4*、*OsRAV7*、*OsRAV8*、*OsRAV11*、*OsRAV12* 和 *OsRAV13* 的表达,下调了 *OsRAV9*、*OsRAV14* 和 *OsRAV15* 的表达^[19]。本研究中 *TmRAV1* 在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸处理下表达模式与 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素处理相似。根据上述研究结果,*TmRAV1* 受脱落酸调控最为显著,因而可能参与脱落

酸信号转导。脱落酸信号是植物抵御环境胁迫的重要组成部分^[34],因此,后续研究应聚焦于脱落酸对 *TmRAV1* 的调控机制。

脱落酸应答元件结合蛋白 (AREB) 是脱落酸敏感型转录因子。在拟南芥中, *AtAREB1* 能够介导 ABRE 依赖性脱落酸信号转导,从而增强拟南芥的抗旱性^[35]。丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 中的 *SmAREB1* 能够响应脱落酸信号,调控酚酸合成^[36]。在番茄中过表达 *SlAREB1* 能够提高植株在盐碱胁迫下的抗氧化能力^[37]。因此,AREB 转录因子参与植物抵抗逆境胁迫,并调控植物次生代谢。在拟南芥中, *AtRAV1* 抑制 *AtABI5* 的表达,进而促进种子萌发和幼苗发育^[38]。在棉花中过表达 *AtRAV1/2* 和 *AtABI5* 能够增强棉花的抗旱能力,并最终提高产量^[39]。*TmAREB1* 与已报道的莴苣 *LsABI5* 同源性较高,可能存在 *TmRAV1*-*TmAREB1* 调控模式^[20]。本研究初步证明 *TmRAV1* 促进 *TmAREB1* 表达,且 *proTmAREB1* 启动子上含有 CAACA-motif (RAV1 转录因子结合元件),后续将通过酵母单杂交和电泳迁移率实验验证 *TmRAV1* 是否直接靶向结合 CAACA-motif。

SnRK2 蛋白激酶是脱落酸信号通路中的关键蛋白质家族之一^[40]。在拟南芥中, *AtSnRK2* 能够调控其种子的发育和休眠^[41],其中, *AtSnRK2.2*、*AtSnRK2.3* 和 *AtSnRK2.6* 还能够通过响应脱落酸信号调控气孔关闭,适应干旱环境^[42]。苹果 (*Malus pumila* Mill.) 中的 *MdSnRK2.4* 和 *MdSnRK2.9* 参与渗透胁迫响应,被激活并进而磷酸化 *MdHb1* 和 *MdACO1*,促进乙烯合成,从而调控果实成熟^[43]。拟南芥中的 *AtSnRK2* 能够磷酸化 *AtABI5*^[41]、*AtAREB3*^[44] 和 *AtRAV1*^[29] 等转录因子,参与脱落酸信号通路下游的信号转导。本研究通过酵母双杂交和双分子荧光互补实验初步验证了 *TmRAV1* 与脱落酸信号途径核心蛋白家族成员 *TmSnRK2.6* 互作,后续将通过 Pull-down 和 CoIP 实验验证 *TmRAV1* 和 *TmSnRK2.6* 是否直接互作。

基于上述研究,后期将通过获得 *TmRAV1* 转基因蒲公英进一步验证 *TmRAV1* 在脱落酸信号途径中的具体作用机制,为蒲公英优质资源创新提供基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版 (一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 367.
- [2] LI W, LEE C, KIM H Y, et al. Chemical constituents of the aerial part of *Taraxacum mongolicum* and their chemotaxonomic

- significance [J]. *Natural Product Research*, 2017, 31(19): 2303–2307.
- [3] DUAN L, ZHANG C, ZHAO Y, et al. Comparison of bioactive phenolic compounds and antioxidant activities of different parts of *Taraxacum mongolicum*[J]. *Molecules*, 2020, 25(15): 3260.
- [4] KANG L, MIAO M S, SONG Y G, et al. Total flavonoids of *Taraxacum mongolicum* inhibit non-small cell lung cancer by regulating immune function [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 281: 114514.
- [5] 张松保, 孔令婕, 谷 巍, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的蒲公英化学成分分析及其抗癌机制的网络药理学研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(2): 305–314.
- [6] LIU Q, XU Y, WU Z, et al. Understanding the biosynthesis and regulatory mechanisms of bioactive compounds in *Taraxacum* species (dandelions), a model system for natural rubber, food, and medicinal plant biology [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2023, 41(6): 406–425.
- [7] 付晨青, 何立威, 王秀萍, 等. 药食同源蒲公英的开发应用研究现状与展望[J]. *陕西农业科学*, 2021, 67(5): 86–88.
- [8] 悦曼芳, 张 春, 吴忠义. 植物转录因子 AP2/ERF 家族蛋白结构和功能的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(12): 11–26.
- [9] FU M, KANG H K, SON S-H, et al. A subset of Arabidopsis RAV transcription factors modulates drought and salt stress responses independent of ABA [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(11): 1892–1904.
- [10] SONG X, WANG J, MA X, et al. Origination, expansion, evolutionary trajectory, and expression bias of AP2/ERF superfamily in *Brassica napus* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1186.
- [11] OSNATO M, MATIAS-HERNANDEZ L, AGUILAR-JARAMILLO A E, et al. Genes of the RAV family control heading date and carpel development in rice[J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(4): 1663–1680.
- [12] YAMASAKI K, KIGAWA T, INOUE M, et al. Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1 [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(12): 3448–3459.
- [13] MITTAL A, JIANG Y, RITCHIE G L, et al. AtRAV1 and AtRAV2 overexpression in cotton increases fiber length differentially under drought stress and delays flowering [J]. *Plant Science*, 2015, 241: 78–95.
- [14] ZHAO S P, XU Z S, ZHENG W J, et al. Genome-wide analysis of the RAV family in soybean and functional identification of *GmRAV-03* involvement in salt and drought stresses and exogenous ABA treatment [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 905.
- [15] LI J, SONG C, LI H, et al. Comprehensive analysis of cucumber RAV family genes and functional characterization of *CsRAV1* in salt and ABA tolerance in cucumber [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1115874.
- [16] LI C W, SU R C, CHENG C P, et al. Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(1): 213–227.
- [17] WEI Y, CHANG Y, ZENG H, et al. RAV transcription factors are essential for disease resistance against cassava bacterial blight via activation of melatonin biosynthesis genes [J]. *Journal of Pineal Research*, 2018, 64(1): e12454.
- [18] WANG P, YAN Y, LU Y, et al. The co-modulation of RAV transcription factors in ROS burst and extensive transcriptional reprogramming underlies disease resistance in cassava [J]. *Plant Cell Reports*, 2022, 41(5): 1261–1272.
- [19] CHEN C, LI Y, ZHANG H, et al. Genome-wide analysis of the RAV transcription factor genes in rice reveals their response patterns to hormones and virus infection [J]. *Viruses*, 2021, 13(5): 752.
- [20] LIU Q, WU Z, HAN B, et al. Comprehensive metabolomic and transcriptomic analysis reveals that TmbZIP1-Tm4CL1 transcriptional module mediates ABA-promoted chicoric acid biosynthesis in *Taraxacum mongolicum* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 322: 112429.
- [21] LIU Q, YAO L, XU Y, et al. *In vitro* evaluation of hydroxycinnamoyl CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase expression and regulation in *Taraxacum antungense* in relation to 5-caffeoylquinic acid production [J]. *Phytochemistry*, 2019, 162: 148–156.
- [22] PENG Z, WANG M, ZHANG L, et al. *EjRAV1/2* delay flowering through transcriptional repression of *EjFTs* and *EjSOC1s* in loquat [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 816086.
- [23] 靳春慧, 文小卉, 刘羽婷, 等. 小黑杨 *RAV1* 与 *RAV2* 基因的克隆与表达分析 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2023, 51(9): 58–69.
- [24] 周梦蝶, 王泽玉, 王辰雨, 等. 御谷 *RAV1* 基因及启动子的克隆与生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(15): 4880–4890.
- [25] TAVARES E Q P, DE SOUZA A P, ROMIM G H, et al. The control of endopolygalacturonase expression by the sugarcane RAV transcription factor during aerenchyma formation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(2): 497–506.
- [26] 庞彩红, 李双云, 夏 阳, 等. 植物非 ABA 依赖型 SnRK2 研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2018, 54(1): 19–24.
- [27] FENG K, HOU X L, XING G M, et al. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(6): 750–776.
- [28] WESSLER S R. Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 54–56.
- [29] XIE Z, NOLAN T M, JIANG H, et al. AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 228.
- [30] MATÍAS-HERNÁNDEZ L, AGUILAR-JARAMILLO A E, MARÍN-GONZÁLEZ E, et al. RAV genes: regulation of floral

- induction and beyond [J]. *Annals of Botany*, 2014, 114(7): 1459–1470.
- [31] 杨金荣, 崔婉宁, 张瑜, 等. 基于转录组数据的半夏 *AP2/ERF* 基因家族鉴定及逆境响应分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(5): 176–184.
- [32] YUE P, JIANG Z, SUN Q, et al. Jasmonate activates a CsMPK6-CsMYC2 module that regulates the expression of β -citraurin biosynthetic genes and fruit coloration in orange (*Citrus sinensis*) [J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(4): 1167–1185.
- [33] LIU Y, DU M, DENG L, et al. MYC2 regulates the termination of jasmonate signaling via an autoregulatory negative feedback loop [J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(1): 106–127.
- [34] ALI A, PARDO J M, YUN D J. Desensitization of ABA-signaling: the swing from activation to degradation [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 379.
- [35] FUJITA Y, FUJITA M, SATOH R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(12): 3470–3488.
- [36] JIA Y, BAI Z, PEI T, et al. The protein kinase *SmSnRK2.6* positively regulates phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* by interacting with *SmAREB1* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1384.
- [37] XU Z, WANG F, MA Y, et al. Transcription factor SlAREB1 is involved in the antioxidant regulation under saline-alkaline stress in tomato [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1673.
- [38] FENG C Z, CHEN Y, WANG C, et al. *Arabidopsis* RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of *ABI3*, *ABI4*, and *ABI5* during seed germination and early seedling development [J]. *The Plant Journal*, 2014, 80(4): 654–668.
- [39] MITTAL A, GAMPALA S S L, RITCHIE G L, et al. Related to ABA-Insensitive3 (*ABI3*)/*Viviparous1* and *AtABI5* transcription factor co-expression in cotton enhances drought stress adaptation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(5): 578–589.
- [40] LIN Z, LI Y, WANG Y, et al. Initiation and amplification of SnRK2 activation in abscisic acid signaling [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2456.
- [41] NAKASHIMA K, FUJITA Y, KANAMORI N, et al. Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, *SRK2D/SnRK2.2*, *SRK2E/SnRK2.6/OST1* and *SRK2I/SnRK2.3*, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50(7): 1345–1363.
- [42] YANG X, GAVYA S L, ZHOU Z, et al. Abscisic acid regulates stomatal production by imprinting a SnRK2 kinase-mediated phosphocode on the master regulator *SPEECHLESS* [J]. *Science Advances*, 2022, 8(40): eadd2063.
- [43] JIA M, LI X, WANG W, et al. SnRK2 subfamily I protein kinases regulate ethylene biosynthesis by phosphorylating HB transcription factors to induce *ACO1* expression in apple [J]. *New Phytologist*, 2022, 234(4): 1262–1277.
- [44] WANG P, XUE L, BATELLI G, et al. Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(27): 11205–11210.

(责任编辑: 张明霞)

(上接第46页 Continued from page 46)

- [49] KAYA C, UGURLAR F, ASHRAF M, et al. Methyl jasmonate and sodium nitroprusside jointly alleviate cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants by modifying nitrogen metabolism, cadmium detoxification, and AsA-GSH cycle [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 654780.
- [50] CUI H, YANG F, LI Y. Exogenous methyl jasmonate enhances lipid production in *Isochrysis galbana* under nitrogen deprivation and high light [J]. *Algal Research*, 2021, 58: 102406.
- [51] REPKINA N, IGNATENKO A, HOLOPSTSEVA E, et al. Exogenous methyl jasmonate improves cold tolerance with parallel induction of two cold-regulated (*COR*) genes expression in *Triticum aestivum* L. [J]. *Plants*, 2021, 10(7): 1421.
- [52] ZHANG M, ZHAO R, HUANG K, et al. OsWRKY76 positively regulates drought stress via OsBHLH148-mediated jasmonate signaling in rice [J]. *Front in Plant Science*, 2023, 14: 1168723.
- [53] 杨阔. 苹果 C2H2 型锌指蛋白 MdZAT10 调控叶片衰老和干旱胁迫的机理研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021: 47–81.
- [54] YANG K, AN J P, LI C Y, et al. The apple C2H2-type zinc finger transcription factor MdZAT10 positively regulates JA-induced leaf senescence by interacting with MdBT2 [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 159.

(责任编辑: 张明霞)