

黄花梨**bZIP**的cDNA克隆与表达分析

宋燕春^{1,2*}, 李永裕^{1*}, 黄添毅¹, 陈铁娇¹, 吴少华^{1**}

(1. 福建农林大学园艺学院, 福州 350002; 2. 泸州市农业局, 四川 泸州 646000)

摘要: 为探讨黄花梨(*Pyrus pyrifolia* ‘Huanghua’) *PpbZIP* 基因的功能, 根据同源基因 *bZIP* 从黄花梨花芽中克隆到 *PpbZIP* 基因 (GenBank 登录号: KC951877)。 *PpbZIP* 基因的全长 cDNA 为 1843 bp, 其中开放阅读框长度 1227 bp, 编码 408 个氨基酸, 与同为蔷薇科的苹果 *bZIP* 蛋白序列的同源性高达 92%。 *PpbZIP* 基因的 QRT-PCR 分析表明, *PpbZIP* 基因在黄花梨花芽从休眠到休眠解除后的表达量呈先升高后降低的趋势。这表明 *PpbZIP* 参与了黄花梨花芽休眠过程的调控。

关键词: 黄花梨; *bZIP*; 克隆; 表达

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.02.010

Cloning and Expression Analysis of *bZIP* Gene from *Pyrus pyrifolia* ‘Huanghua’

SONG Yan-chun^{1,2*}, LI Yong-yu^{1*}, HUANG Tian-yi¹, CHEN Tie-jiao¹, WU Shao-hua^{1**}

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Luzhou Agriculture Bureau, Luzhou 646000, China)

Abstract: In order to understand the function of *PpbZIP* of *Pyrus pyrifolia* ‘Huanghua’, *PpbZIP* gene was cloned from flower buds of ‘Huanghua’ based on homologous gene of *bZIP*. The results showed that full length of cDNA of *PpbZIP* (GenBank accession No.: KC951877) was 1843 bp, containing an ORF of 1227 bp and encoding 408 amino acids. *PpbZIP* also shared 92% homology with *bZIP* of *Malus × domestica*. QRT-PCR analysis showed that the expression of *PpbZIP* gene increased at initiate dormancy stage and then decreased with dormancy releasing. It was suggested that *PpbZIP* could involve in the regulation of bud dormancy process of ‘Huanghua’.

Key Words: *Pyrus pyrifolia* ‘Huanghua’; *bZIP*; Clone; Expression

碱性亮氨酸拉链转录因子(Basic region/leucine zipper motif, *bZIP*)由 1 个 DNA 结合域和 1 个亮氨酸拉链二聚体结构域组成,是转录因子中较大的基因家族之一,也是真核生物转录因子中分布最广且最保守的一类^[1]。*bZIP* 类转录因子可分为 10 个亚族,其表达与功能在不同植物不同组织中存在较大差异^[2]。大量研究表明, *bZIP* 转录因子广泛存在于动植物的基因组中^[3-6],参与多种生物学过程,与器官组织分化、细胞生长、碳氮能量代谢、折叠蛋白

响应、种子储藏蛋白基因调节、糖代谢、生物和非生物胁迫等的响应有密切联系^[7],在生命活动中起着重要的作用。

黄花梨(*Pyrus pyrifolia* ‘Huanghua’)是蔷薇科(Rosaceae)梨属落叶果树,具有冬季休眠的生物学特性,其芽体必须经历充足的低温方可解除休眠。黄花梨的休眠与休眠解除关系到芽的新陈代谢、激素调节、营养物质的合成与运输、信号转导等一系列生理活动^[8]。有关 *bZIP* 转录因子的研究,已证实

收稿日期: 2013-05-07

接受日期: 2013-08-03

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20113515110011);福建省科技计划重点项目(2012N0005)资助

作者简介: 宋燕春(1986 ~),男,硕士,现从事园艺植物分子生物学研究。E-mail: 115957422@qq.com;李永裕(1981 ~),男,博士,现从事园艺植物生理生化研究。E-mail: lilin3182@163.com

* 共同第一作者

** 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 348279953@qq.com

bZIP 转录因子参与了这些生理活动^[7], 但 *bZIP* 转录因子与木本植物花芽休眠的相关性还鲜有报道。本文根据同源基因对黄花梨的 *bZIP* 转录因子进行克隆, 探讨黄花梨的 *bZIP* 转录因子的同源性和生物学信息, 同时采用 QRT-PCR 技术分析 *bZIP* 基因在黄花梨花芽休眠及解除过程中表达量的变化, 为黄花梨花芽休眠进程的分子生物学研究和木本植物的休眠研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

黄花梨(*Pyrus pyrifolia* 'Huanghua')花芽采自福建省三明市清流县龙津镇, 黄花梨树经 6 年以上人工栽培管理呈开心型, 高 3 m, 能正常开花结果。试验从 2011 年 11 月至 2012 年 3 月, 共采集 8 次样品。样品取回后将花芽剥出迅速放入液氮中, 速冻后保存在 -80℃。试验所需 PCR、QRT-PCR 相关试剂、DNA 片段纯化回收试剂盒等均为大连宝生物公司的产品, cDNA 第一链合成试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, 其它为国产分析纯试剂。

1.2 总RNA提取和cDNA第一链合成

试验采用改良 CTAB 法, 即 CTAB-Trizol 法小量提取黄花梨花芽总 RNA, 分别采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析、紫外分光光度计检测其完整性和质量。参照 Trans Script II First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 的使用说明书合成 cDNA 第一链, 接头引物为 AP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAG-TACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3', 产物于 -20℃ 保存备用。

1.3 花芽*bZIP*基因的克隆

以 NCBI 中已登录的 *bZIP* 基因为参考, 分析黄花梨花芽 *bZIP* 基因保守区序列, 应用 DNAMAN 软件设计 *bZIP* 基因保守区的同源简并引物, 分别为 *bZIP*-F: 5'-AAYMGRGARTCYGCWVGBMGA-TC-3' 和 *bZIP*-R: 5'-GHATTCTCYRASWSAAKWKCT-3'。获得保守区后, 对其进行扩增和测序, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物, 3'-RACE 的上游引物分别为 *bZIP*-3'-p1 (5'-AATAGGGAATCCGCTCGTCG-3') 和 *bZIP*-3'-p2 (5'-GCAAGCAGGCGGAATGCGATGAG-3'); *bZIP*-

3'-RACE 的下游引物为 AUAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'。5'-RACE 的上游引物为 AUAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'; 5'-RACE 的下游引物分别为 *bZIP*-5'-p1 (5'-AACTTCTGATCT-AAGAGTGCCATTT-3') 和 *bZIP*-5'-p2 (5'-AACCTAGATCGACGAGCGGATTCCCTA-3')。两轮槽式 PCR 扩增后回收 3' 端、5' 端扩增产物, 委托博尚生物公司测序, 并用 DNAMAN 软件拼接测序结果。

1.4 *bZIP*基因的生物信息学分析

运用 NCBI 在线数据库以及 DNAMAN 软件进行核苷酸和氨基酸同源性比对及进化树分析。运用 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>), Npsa-pbil (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopm.html), SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), TMHMM Server V. 2.0 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), WoLFPSORT (<http://wolfpsort.org/>), Prot (<http://psort.hgc.jp/form.html>), SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 等在线工具和软件对蛋白质基本理化性质、蛋白质结构、氨基酸磷酸化位点、跨膜螺旋区、亚细胞定位情况以及氨基酸信号肽等进行在线预测和分析。

1.5 *bZIP*基因的表达分析

根据 *PpbZIP* 序列设计 QRT-PCR 引物, 分别为 *bZIP*-qrt-5' (5'-CTAAAGAGAAAGAGAAGGAG-ACAAA-3') 和 *bZIP*-qrt-3' (5'-TGTGGAGGTATTG-GAGAATATGCC-3'), 以梨的 *ACTIN* 基因(GenBank 登录号为 JN684184.1)作为内参基因, 其引物分别为 p-actin-5' (5'-CCATCCAGGCTGTTCTCTC-3') 和 p-actin-3' (5'-GCAAGGTCCAGACGAAGG-3')。采用 TaKara(大连)的 PrimeScript RT reagent kit 试剂盒合成 cDNA 第一链, 根据 TaKara(大连)的 SYBR Prime Ex-Taq TM II 使用说明书, 在罗氏 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪上进行 QRT-PCR。

2 结果和分析

2.1 *PpbZIP*基因的克隆

以黄花梨 *bZIP* 的 cDNA 第一链为模板, 用所

设计的简并引物 *bZIP*-F 和 *bZIP*-R 扩增出长度为 155 bp 的特异性条带。经两轮槽式 PCR 扩增出 3'-RACE 序列长度为 583 bp, 5'-RACE 序列长度为 1258 bp。经拼接片段, 获得 cDNA 的全长序列长度为 1843 bp (图 1), 含有开放阅读框, 长度为 1227 bp, 5' UTR 为 278 bp, 3' UTR 为 335 bp。

核苷酸比对分析表明, 该基因与苹果 (*Malus × domestica*, HM122473.1)、大豆 (*Glycine max*, XM_003534246.1) 的 *bZIP* 基因核苷酸序列的相似度达到 93% 和 79%, 其所编码的氨基酸序列与苹果 (ADL36612.1)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*, AAK39130.1)、大豆 (ABP88244.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AAC36168.1) 的 *bZIP* 氨基酸序列的相似度分别为 92%、72%、70%、65%, 因此推断该基因为黄花梨的 *bZIP* 基因, 暂命名为 *PpbZIP* 基因, 送 GenBank 注册, 登录号: KC951877。

采用 BLAST P 分析 *PpbZIP* 的氨基酸序列, *PpbZIP* 具有两个保守结构域 (图 2), MFMR 与 Bzip1。其中 MFMR (multifunctional mosaic region) 为 G-box 家族的结合蛋白, 其 N 端富含脯氨酸残基, C 末端具有半极性和多功能嵌合域, 嵌合域能与 *bZIP*

进行特异结合形成特异蛋白^[9-10]。

2.2 *PpbZIP* 的氨基酸序列同源性分析

将黄花梨 *PpbZIP* 的氨基酸序列与其他物种的进行比对, 结果表明其与大豆 (XP_003534294.1)、苹果 (ADL36612.1)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*, XP_002304358.1)、碧桃 (*Prunus persica*, EMJ10401.1)、欧洲草莓 (*Fragaria vesca* subsp. *vesca*, XP_004300190.1) 和蓖麻 (*Ricinus communis*, XP_002518994.1) 的 *bZIP* 氨基酸序列同源性分别为 76%、92%、77%、91%、86% 和 78%。可见, 黄花梨和碧桃、苹果、草莓均为蔷薇科植物, 具有较高的同源性, 而与其他物种的同源性相对较低, 但 *bZIP* 结构域较保守 (图 3)。

为研究梨 *PpbZIP* 基因的进化关系, 选取苹果 (ADL36612.1)、菜豆 (AAK39130.1)、欧芹 (*Petroselinum crispum*, CAA71770.1)、拟南芥 (NP_850248.2)、大豆 (ABP88244.1)、小麦 (*Triticum aestivum*, ACI28287.1)、玉米 (*Zea mays*, ADX60116.1)、大麦 (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*, AAO06116.1)、水稻 (*Oryza sativa*, ABA96884.1)、长春花 (*Catharanthus roseus*, AAK-14790.1)、胡萝卜 (*Daucus carota*, BAG39452.1)、以及

```

1   TAGTACGGGAGGAAGACTGAATACGAAGAAGCTCCCTCCATCATCGGCCGCCGCGTCAGGCCACTTCTGTGTTTCTTTCGAATTTCTCCACCT
101 CCATTTCTTCTTCTTATTTCTTCAGCTCGCTCCTTTGCCGCCACCTCTCCCTCTCCCTCTGCCTCCACCTCAGGTGATGAGCATTGAAGGCTGCTGTTG
201 CCAACAGTGTCTTTGGGTGATTTTCTGTAGTAATGTAGGATGGTTGAAGAACCGAAGGCCGTGATTGGAGTATGCGTAGCAGTGAGATGGACA
1   M G S S E M D
301 AACCTCTAAAGAGAAAGAGAGACAAAGACACACCCGCTAGTACGAGGAGCAGTGTGCGACTACAGTGCTGTGCTGTATCTGAGTGGTC
8   K P S K E K E K E T K T T P A S T Q E Q S A T T S A G A V N P E W
401 GGGATTTACGGCATATTTCTCAATACCTCCACATGATTTATGGCTTCAAGTCGCAAGCTCACCCTATATGTGGGGGTTGAGCATATTATGCCACCC
41  S G F Q A Y S P I P P H G F M A S S P Q A H P Y M W G V Q H I M P P
501 TATAGTACCCCTCCGACCCATATGTGCAATGTATCCCATGGTGGCTTATATGCTCACCCTGTATGCTCTGATCTTATCTTTTATGCCGTTTG
75  Y S T P P H P Y V A M Y P H G G L Y A H P S M P P G S Y P F S P F
601 CTATGCTCTACCAATGGTATTGTAGAGGCTTCTGGTAACACCTGGGAGCATGGAACAGAGGTAAGCCATCTGAGGTCAAGGACAAATTACCAAT
108 A M P T P N G I V E A S G N T P G S M E A E G K P S E V K D K L P
701 AAAACGATCAAAAGGAAGCTTGGGAGTTGAATATGATTACAGGGAAGAATAACGAGCTTGGCAAAACATCAGGAGCCTGCTAATGGAGTTTATTC
141 I K R S K G S L G S L N M I T G K N N E L G K T S G A S A N G V Y S
801 AAAAGTGTGAGAGTGTAGTGTATGATGTAAGTAAGGAAGTATGCAAAATCTCAGAGTGATTCAAAATGAAGTCTGGGTGAGGCAAGATTCTTTGG
175 K S A E S A S D G T S E G S D A N S Q S D S Q L K S G V R Q D S L
901 AAGGTGATGTATCTAGAATGGCAGTTCTGCACATGGTTCTCAAAATGGAGCACCACACATACCATGTTGAATCAGACGATGGCCGTATGCCAAT
208 E G D V S Q N G S S A H G S Q N G A P N T H T M L N Q T M A V M P
1001 AACGGCTGCTGGTCTCTGGCGTTGTTCTGGTCTGCAACTAACTTAAATATTTGGGATGGATTATTTGGGAGCTCCACCTTCTGCCGCCATGCCTGCA
240 I T A A G A P G V V P G P A T N L N I G M D Y W G A P P S A A M P A
1101 ATGCGTGGGAAGGTGCAACCACTCCAGTATCAGCAGGAATAGTTACTGCTGGGTCTCGGGATAGTGTTCAGTCACAGCTTTGGTTACAAGATGAGAGAG
274 M R G K V A T T P V S A G I V T A G S R D S V Q S Q L W L Q D E R
1201 AGCTTAAAGACAGAAAAGAAAGCAGTCAATAGGGAATCGCTCGTGCATCTAGGTTGCAAGCAGGCGGAATGCGATGAGCTGGCCCTGCGTGCTGA
307 E L K R Q K R K Q S N R E S A R R S R L R K Q A E C D E L A L R A
1301 AGCCTTAAAGAGGAAAATGGCACTCTTAGATCAGAAAGTTAACCGGATCAGGAGCGAGTATGAGCTGCTTCTCTCAGAGATGCTCTCTAAAGGAGAGG
340 E A L K E E N G T L R S E V N R I R S E Y E L L L S E N A S L K E R
1401 CTTGGAGAAATCTGGTCATGAAGATACGCTCTGCCAGAGTGAACCACTTTGAGCAATGACACTAAACAGATTGCACAAACAGACCGCATGGCG
374 L G E I P G H E D V R S A R S E P H L S N D T K Q I A Q T E R H G
1501 GCCTTAGGATGAGTAGCTGAGCTTTGTGCTGCGTTCTTGACGAGCACAATCTAACCTATTAGCAACAGGGAGTTATTTTGATAGCGTGTAGTTTGA
407 G L *
1601 CCTTGTCCCAAGTTTAACTTTTATATTTTAGGAGATGTTTACGCGATGCAGATCATATTTATTTCTGCTTGGGCTACCTTTAAGAGTTGAAGGCCGA
1701 AGATGATATGTCTTGAGTATGAAATTAATGTTATACCTTGTTGTTCTTAAGGGTAGTCGCAITCACACTTAATTCATTGTATTGAATTATGGCCG
1801 ATGAATCCGTAACTGGGAGATTGATCAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *PpbZIP* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of *PpbZIP* and deduced amino acid sequence

猕猴(*Macaca mulatta*, NP_001253577.1)和大西洋鲑鱼(*Salmo sala*, ACI33334.1)等 13 种生物的 **bZIP** 氨基酸序列与 **PpbZIP** 氨基酸序列进行遗传聚类分析(图 4)。结果表明,以上 14 种生物的 **bZIP** 蛋白可按单子叶植物、双子叶植物和脊椎动物分别聚为 3 类,其中同为蔷薇科的苹果和黄花梨的遗传距离最

近,为 92%。

2.3 生物信息学分析

PpbZIP 蛋白结构分析 基于 ProtParam 软件的预测和分析, *PpbZIP* 基因编码 408 个氨基酸,蛋白质的相对分子量为 43.58 kDa,理论等



图 2 **PpbZIP** 蛋白的保守结构域

Fig. 2 Putative conserve domains for **PpbZIP** protein

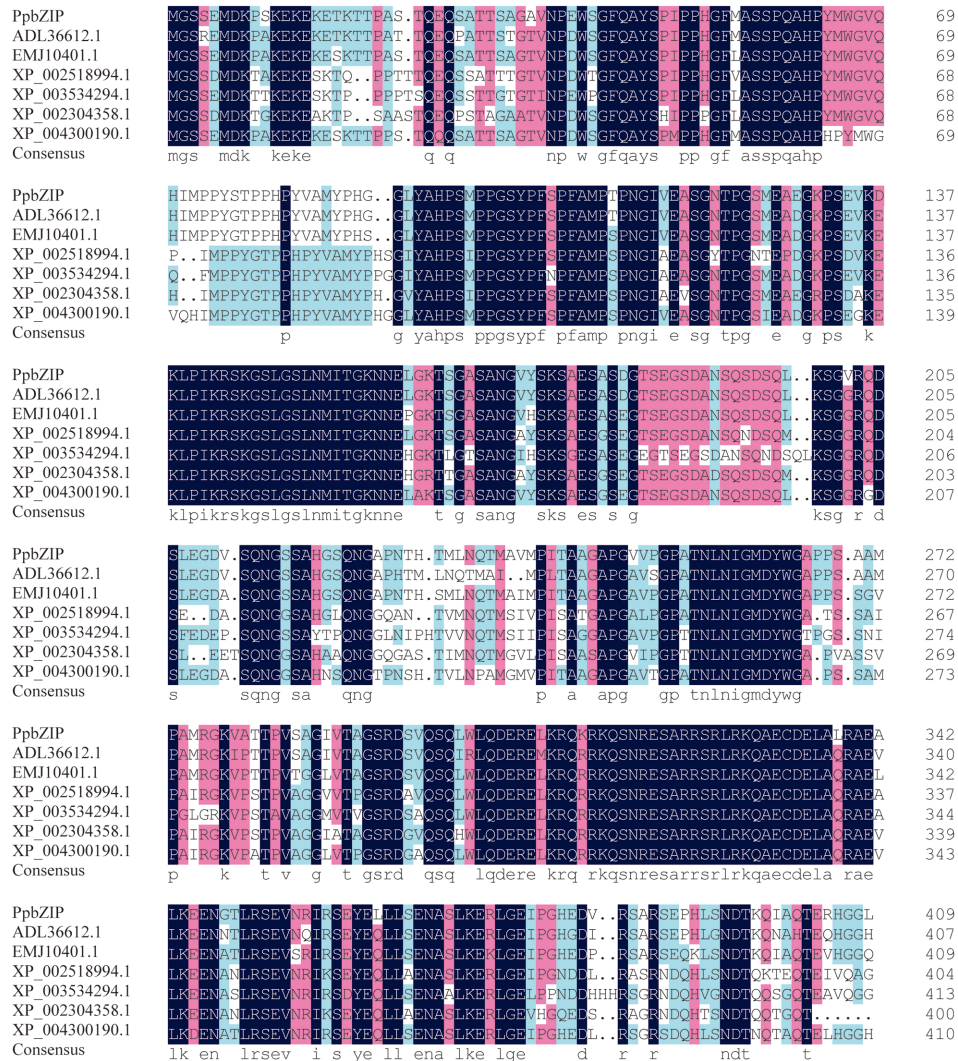


图 3 **PpbZIP** 氨基酸序列的多重对比。PpbZIP: 黄花梨; ADL36612.1: 苹果; EMJ10401.1: 碧桃; XP_002518994.1: 蓖麻; XP_003534294.1: 大豆; XP_002304358.1: 毛果杨; XP_004300190.1: 欧洲草莓。

Fig. 3 Multiple alignment of amino acid sequences of **PpbZIP** and **bZIP** of other species. **PpbZIP**: *Pyrus pyrifolia* 'Huanghua'; ADL36612.1: *Malus domestica*; EMJ10401.1: *Prunus persica*; XP_002518994.1: *Ricinus communis*; XP_003534294.1: *Glycine max*; XP_002304358.1: *Populus trichocarpa*; XP_004300190.1: *Fragaria vesca* subsp. *vesca*.

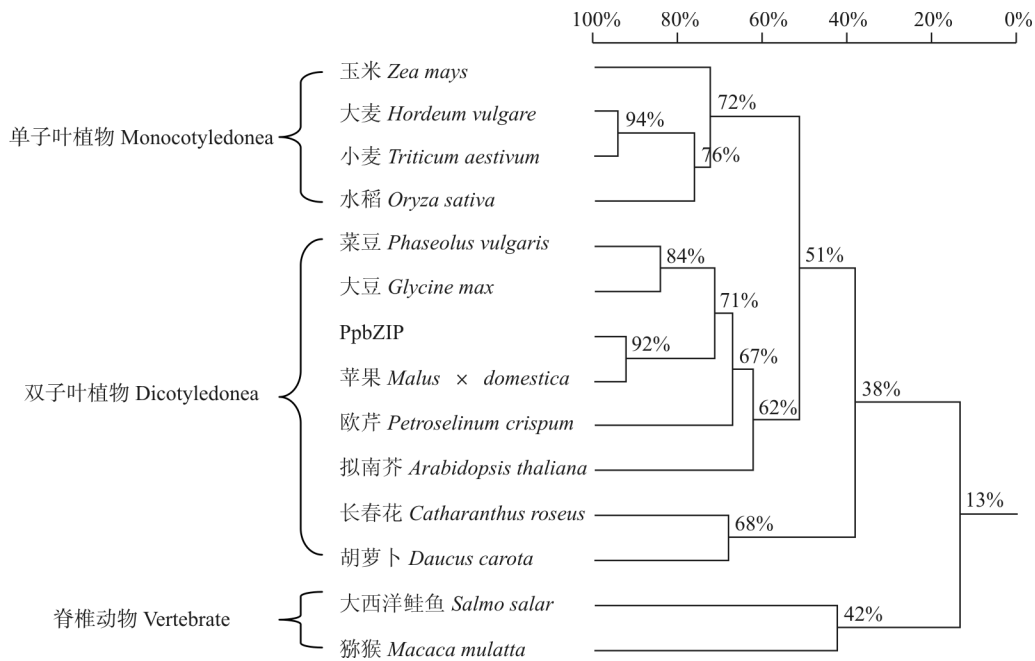


图4 PpbZIP 系统进化树

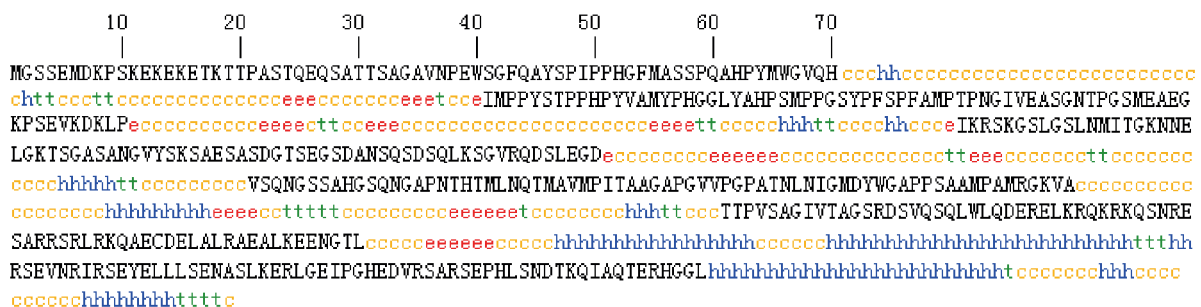
Fig. 4 Phylogenetic tree of PpbZIP

电点 6.62, 不稳定系数为 58.40, 带负电的氨基酸 (Asp + Glu) 有 44 个, 带正电的氨基酸 (Arg + Lys) 有 42 个, 分子式可写为 $C_{1860}H_{2959}N_{555}O_{621}S_{17}$ 。脂肪系数为 54.96, 总平均疏水性 (GRAVY) 值为 -0.775 , 用 ProtScale 对氨基酸亲水性进行预测, 结果表明 PpbZIP 多数为亲水性氨基酸, 因而其蛋白质结构稳定性差, 具有较强亲水性。

用 Npsa-pbil 在线工具预测该蛋白质的二级结构 (图 5), 可见有 46 个氨基酸残基形成延伸链, 33 个 β -螺旋以及 106 个氨基酸形成的 α -螺旋均嵌插在其余 224 个氨基酸形成的无规则卷曲中, 形成其二级结构。

PpbZIP 氨基酸磷酸化位点分析及信号肽预测
以 NetPhos 2.0 Server 在线软件预测 PpbZIP 氨基酸磷酸化位点。结果表明, 有 22 个丝氨酸 (serine, S) 残基参与磷酸化, 6 个苏氨酸残基 (threonine, T) 参与磷酸化修饰, 而酪氨酸 (tyrosine, Y) 在磷酸化过程中信号较弱, 仅有 3 个参与。SignalP 4.1 预测结果显示, PpbZIP 氨基酸不含信号肽, 为非分泌蛋白。

PpbZIP 蛋白跨膜结构分析 运用 TMpred 预测 PpbZIP 蛋白可能在第 231 和 235 位点分别含有一个由内向外和由外向内的跨膜螺旋结构, 然而用 TMHMM Server v.2.0 在线工具预测出该蛋白不是膜蛋白, 无跨膜螺旋区, 说明该蛋白跨膜结构不

图5 PpbZIP 蛋白的二级结构预测。大写字母: 氨基酸序列; 小写字母: 氨基酸链的结构; c: 无规则卷曲; h: α 螺旋; t: β 螺旋; e: 延伸链。Fig. 5 Predicted secondary structure of PpbZIP. Capital letters show amino acid sequence; Small letters show structure of amino acid chain; c: Random coil; h: α helices; t: β spiral; e: Extended chain.

明显。

PpbZIP 的亚细胞定位预测 使用 WoLFPSORT 和 Prot 在线软件预测 PpbZIP 蛋白在细胞核内的定位, WoLFPSORT 的得分为 14, 表明 PpbZIP 蛋白定位于细胞核中, 同时 Prot 软件预测该蛋白定位在细胞核内的概率为 0.88。

2.4 *PpbZIP*在花芽休眠过程中的表达

本实验花芽的采样时间为 2011 年 11 月至

2012 年 3 月, 11 月 4 日花芽开始进入休眠期, 1 月 3 日和 1 月 16 日花芽处于深度休眠期, 2 月 18 日花芽处于休眠解除和萌动期。采用 QRT-PCR 法检测梨花芽 *PpbZIP* 基因在休眠各时期的表达水平, 结果表明(图 6), 随着休眠的加深, *PpbZIP* 基因的表达逐渐增强, 在 1 月中旬达到最高值, 约为初始休眠期的 5.5 倍, 随后其表达先骤然降低后缓慢降低, 直至与初始休眠期的表达水平相当。

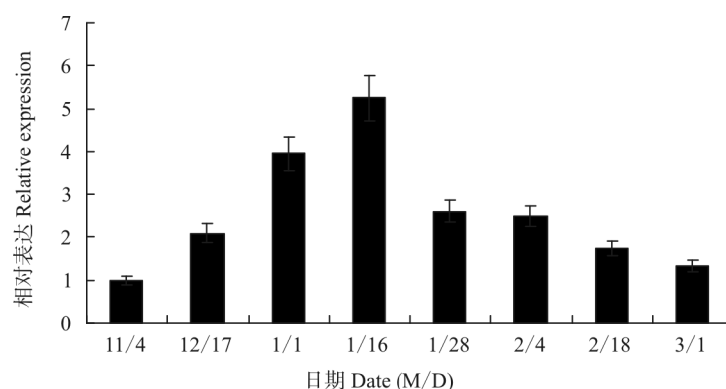


图 6 *PpbZIP* 基因在梨花芽休眠过程中的表达

Fig. 6 Relative expression level of *PpbZIP* gene during pear flower bud dormancy

3 讨论

花芽休眠在黄花梨的年生长周期中占有重要地位, 植物内原激素在休眠过程中起了重要调节作用^[11]。ABA 被普遍认为是主要的休眠促进物质和萌发抑制物质, 植物花芽在休眠前期 ABA 的含量不断升高, 休眠后期 ABA 含量不断降低, 植物芽休眠被打破^[12-13]。目前, 已有研究报道 *bZIP* 类转录因子的 G-box、C-box、A-box 等含 ACGT 顺式作用元件是识别 ABA 的核心序列, 部分受 ABA 诱导基因的启动子区也有这些类元件^[14-15]。*bZIP* 类转录因子 ACGT 顺式作用元件中以 G-box 元件最为普遍, 广泛存在于受 ABA、IAA、JA 和 SA 诱导的基因中。已在多种植物中报道了 *bZIP* 转录因子家族介导了 ABA 信号传导^[16], 如酵母^[17]、水稻^[18]等, 而且它们还参与了植物生理活动调控。Finkelstein 等^[19]报道拟南芥中 *bZIP* 家族的 *ABI5* 基因参与了 ABA 介导的信号传导并调控休眠; Hobo 等^[20]的研究表明 *bZIP* 类转录因子 *TRAB1* 作为反式作用因子参与了 ABA 的转录调控, 进而调控植物成熟和休眠。Nakashima 等^[21]还报道 *bZIP* 除直

接参与 ABA 的信号调控外, 还通过其凝胶激酶的磷酸化活性调节 SRK2E、SRK2D 和 SRK2I 蛋白激酶的表达, 这 3 种蛋白激酶又进一步参与 ABA 信号对植物种子的发育和休眠相关基因表达的调控。本研究结果表明, *PpbZIP* 基因的表达量在黄花梨花芽休眠前期随着休眠的加深而升高, 在休眠解除过程降低并恢复到正常水平。因此, 我们认为 *PpbZIP* 转录因子很可能通过介导 ABA 信号传导和调控受 ABA 诱导基因的表达, 从而进一步参与黄花梨花芽休眠的调控。

本文克隆的 *PpbZIP* 基因的 cDNA 全长为 1843 bp, 编码 408 个氨基酸, 具有 MFMR 与 bZIP1 两个保守结构域。生物信息学分析表明 *PpbZIP* 蛋白不含信号肽, 无明显的跨膜结构, 不是分泌蛋白。亚细胞定位预测结果显示该蛋白主要在细胞核内表达, 符合转录因子的特性。经 NCBI 比对表明 *PpbZIP* 基因与同为蔷薇科的苹果 *bZIP* 的遗传距离最近, 这与梨和苹果基因组之间具有高共线性、二者染色体同源源于蔷薇科祖先的 7 个染色体的结论相符合^[22]。梨属种质资源丰富, 全世界有 30 多种, 分东方梨和西方梨, 种群之间差异较大^[23], 本文采

用同源克隆的方法克隆出黄花梨的 *PpbZIP* 基因, 梨其他种群和品种的 *bZIP* 基因与黄花梨 *PpbZIP* 基因是否具有相似的特性值得进一步的深入研究, *bZIP* 基因在梨属植物中的差异研究将进一步丰富 *bZIP* 基因的研究资料。

参考文献

- [1] Glover J M, Harrison S C. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA [J]. *Nature*, 1995, 373(6511): 257–261.
- [2] Yang Y, Gao S Q, Tang Y M, et al. Advance of bZIP transcription factors in plants [J]. *J Triticeae Crops*, 2009, 29(4): 730–737.
杨颖, 高世庆, 唐益苗, 等. 植物bZIP转录因子的研究进展 [J]. *麦类作物学报*, 2009, 29(4): 730–737.
- [3] Oyama T, Shimura Y, Okada K. The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl [J]. *Gene Dev*, 1997, 11(22): 2983–2995.
- [4] Oeda K, Salinas J, Chua N H. A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes [J]. *EMBO J*, 1991, 10(7): 1793–1802.
- [5] Lin S F, Robinson D R, Oh J, et al. Identification of the bZIP and Rta homologues in the genome of rhesus monkey rhadinovirus [J]. *Virology*, 2002, 298(2): 181–188.
- [6] Albani D, Hammond-Kosack M C, Smith C, et al. The wheat transcriptional activator SPA: A seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(2): 171–184.
- [7] Wang J Z, Zhou J X, Zhang B L, et al. Genome-wide expansion and expression divergence of the basic leucine zipper transcription factors in higher plants with an emphasis on *Sorghum* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53(3): 212–231.
- [8] Zhang J Y, Qu S C, Guo Z R, et al. Biology function of bZIP transcription factors in plants [J]. *Acta Bot Boreal-Occid Sin*, 2011, 31(5): 1066–1075.
张计育, 渠慎春, 郭忠仁, 等. 植物bZIP转录因子的生物学功能 [J]. *西北植物学报*, 2011, 31(5): 1066–1075.
- [9] Sibérl Y, Doireau P, Gantet P. Plant bZIP G-box binding factors [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(22): 5655–5666.
- [10] Meier I, Gruissem W. Novel conserved sequence motifs in plant G-box binding proteins and implications for interactive domains [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22(3): 470–478.
- [11] Ni K C. Studies on chilling requirement and dormancy release related differentially expressed genes in *Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duanbing [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2009: 1–75.
倪开诚. 短柄樱桃需冷量及休眠解除相关差异表达基因研究 [D]. 金华: 浙江师范大学, 2009: 1–75.
- [12] Duan C G, Li X L, Gao D S, et al. Studies on regulations of endogenous ABA and GA₃ in sweet cherry flower buds on dormancy [J]. *Acta Hort Sin*, 2004, 31(2): 149–154.
段成国, 李宪利, 高东升, 等. 内源ABA和GA₃对欧洲甜樱桃花芽自然休眠的调控 [J]. *园艺学报*, 2004, 31(2): 149–154.
- [13] Tu B K, Ding X F. Changes in endogenous hormones and carbohydrates from dormancy to sprouting of *Toona sinensis* buds [J]. *Sci Sil Sin*, 2003, 39(4): 159–161.
涂炳坤, 丁小飞. 香椿芽休眠萌发期间内源激素和碳水化合物的变化 [J]. *林业科学*, 2003, 39(4): 159–161.
- [14] Lu Z X, Chang T J, Liu X, et al. Advances in the studies of plant basic leucine zipper (bZIP) proteins (A): Structure, classification, distribution and analyses of homology [J]. *Hereditas*, 2001, 23(6): 564–570.
路子显, 常团结, 刘翔, 等. 植物碱性亮氨酸拉链(bZIP)蛋白的研究进展(一)——结构、分类、分布和同源性分析 [J]. *遗传*, 2001, 23(6): 564–570.
- [15] Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements [J]. *FASEB J*, 1994, 8(2): 192–200.
- [16] Lopez-Molina L, Chua N H. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(5): 541–547.
- [17] Guan Y, Ren H, Xie H, et al. Identification and characterization of bZIP-type transcription factors involved in carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis [J]. *Plant J*, 2009, 60(2): 207–217.
- [18] Zou M J, Guan Y C, Ren H B, et al. A bZIP transcription factor, *OsABI5*, is involved in rice fertility and stress tolerance [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66(6): 675–683.
- [19] Finkelstein R R, Lynch T J. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(4): 599–609.
- [20] Hobo T, Kowiyama Y, Hattori T. A bZIP factor, *TRABI*, interacts with *VPI* and mediates abscisic acid-induced transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 15348–15353.
- [21] 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 Cell Physiol*, 2009, 50(7): 1345–1363.
- [22] Wu J, Wang Z W, Shi Z B, et al. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *Genome Res*, 2013, 23(2): 396–408.
- [23] Teng Y W, Chai M L, Li X G. A historic retrospect and the progress in the taxonomy of the genus *Pyrus* [J]. *J Fruit Sci*, 2004, 21(3): 252–257.
滕元文, 柴明良, 李秀根. 梨属植物分类的历史回顾及新进展 [J]. *果树学报*, 2004, 21(3): 252–257.