

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.24215

CSTR: 32231.14.PSJ.2095-0837.24215

李琳, 付强, 杨涛, 莫小连, 陈晓龙, 赵杰宏, 邹颀. 铁皮石斛种子 cDNA 酵母文库的构建及 DELLA 互作蛋白筛选[J]. 植物科学学报, 2025, 43 (2): 221-229

Li L, Fu Q, Yang T, Mo XL, Chen XL, Zhao JH, Zou J. cDNA yeast library construction of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo seeds and screening and analysis of DELLA interacting proteins[J]. *Plant Science Journal*, 2025, 43 (2): 221-229

铁皮石斛种子 cDNA 酵母文库的构建及 DELLA 互作蛋白筛选

李琳, 付强, 杨涛, 莫小连, 陈晓龙, 赵杰宏, 邹颀*

(贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025)

摘要: 赤霉素 (GA) 广泛参与植物生命周期的各种生长过程, DELLA 蛋白作为 GA 信号通路中的抑制子, 对植物的生长发育起抑制作用。铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 种子中高表达的 DELLA 家族基因可能与其种子自然萌发困难有关。为筛选铁皮石斛 DoDELLA 蛋白的互作蛋白, 解析 DoDELLA 在种子萌发过程中的作用机制, 本研究利用 Gateway 重组技术构建了铁皮石斛种子 cDNA 文库, 采用同源重组的方法构建 DoDELLA4 重组诱饵载体, 从 cDNA 文库中筛选 DoDELLA4 的互作蛋白。结果显示, 铁皮石斛种子 cDNA 文库的库容量为 1.20×10^7 CFU, 平均插入片段大于 1 000 bp, 重组率 100%。在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基中添加 20 mmol/L 的 3-AT 可抑制重组诱饵载体 pGBKT7-DoDELLA4 的自激活。从文库中筛选获得了 70 个潜在的互作蛋白, 通过酵母双杂交实验, 验证了 DoELIP1、5807、DoTZF、DoUBQ、DoGRPA3 与 DoDELLA4 蛋白存在互作关系。研究结果为进一步探究 DoDELLA 基因调控铁皮石斛种子萌发的分子机制提供了基础。

关键词: 铁皮石斛; 酵母双杂交; DoDELLA 基因; 互作蛋白

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837 (2025) 02-0221-09

cDNA yeast library construction of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo seeds and screening and analysis of DELLA interacting proteins

Li Lin, Fu Qiang, Yang Tao, Mo Xiaolian, Chen Xiaolong, Zhao Jiehong, Zou Jie*

(School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: Gibberellins (GAs) regulate diverse growth processes throughout the plant life cycle. DELLA proteins function as key repressors in the GA signaling pathway, inhibiting plant growth and development. The high expression of DELLA family genes in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo seeds may be related to their poor natural germination. To identify interacting proteins of DoDELLA and elucidate its role in seed germination, a cDNA library was constructed from *D. officinale* seeds using Gateway recombination technology. A recombinant bait vector for DoDELLA4 was generated using homologous recombination and used to screen interacting proteins from the cDNA library. The constructed library exhibited a capacity of 1.20×10^7 CFU, with an average insert size exceeding 1 000 bp and a recombination efficiency of 100%. The recombinant bait vector pGBKT7-DoDELLA4 effectively suppressed self-activation in SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade medium supplemented with 20 mmol/L 3-AT. Screening identified 70 potential interacting proteins, and yeast two-hybrid assays confirmed interactions between DoDELLA4 and DoELIP1, 5807, DoTZF, DoUBQ, and DoGRPA3. These findings establish a foundation for further investigation into the molecular mechanisms by which DoDELLA

收稿日期: 2024-09-05, 接受日期: 2024-10-20。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160720)。

作者简介: 李琳 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源和生物技术 (E-mail: 2904891810@qq.com)。

* 通信作者 (Author for correspondence. E-mail: 157870300@qq.com)。

regulates seed germination in *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; Yeast two-hybrid; DoDELLA; Interacting proteins

DELLA 蛋白是植物特异性核蛋白 GRAS 家族中的一个亚家族, 因其 N 端具有高度保守的 DELLA 结构域而命名。不同物种中 DELLA 蛋白的数量及作用方式不同, 目前, 已经从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[1]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[2]、大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)^[3]、梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehder)^[4]、谷子 (*Setaria italica* (L.) Beauv)^[5] 等几十种植物中相继鉴定出 DELLA 蛋白。AtRGL2 是种子萌发的主要负调节因子^[6]。DELLA 和 ABI3、ABI5 在高温下能相互作用, 激活下游基因 *SOMNUS* 的表达, 进而抑制种子萌发^[7]。*PbDELLA* 影响梨子房的生长发育和种子形成^[4], *SiDELLA* 在谷子干种子中的高表达会抑制种子的萌发^[5]。DELLA 蛋白的 N 端是赤霉素 (Gibberellin, GA) 信号的感应器, 当该结构域发生突变时, 其对赤霉素信号的识别能力变弱, 导致 DELLA 蛋白的累积, 增强了 DELLA 蛋白对植物生长发育的抑制作用^[8]。

赤霉素作为一类作用广泛的植物激素, 调节植物生长的各个阶段, 包括打破种子休眠、促进茎和根的伸长生长、调控花的发育起始、提高抗逆性等^[9-14]。DELLA 蛋白是 GA 信号通路中的负调控因子, GA 通过降解 DELLA 蛋白, 进而缓解 DELLA 引起的生长抑制作用, 刺激植物生长^[15]。

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 又名黑节草, 是中国传统的名贵中药材, 也是一种重要的兰科观赏植物。铁皮石斛的种子细小, 呈粉尘状, 且数量庞大, 因缺乏足够的营养物质储备, 在自然环境中难以萌发, 通常要与某些真菌共生才能萌发^[16]。为了有效保护野生资源, 目前国内铁皮石斛的大规模育苗均采用组织培养的方法^[17]。本实验室前期从铁皮石斛中克隆出 6 个 *DELLA* 家族基因, 其中, *DoDELLA1*、*DoDELLA4* 所编码的蛋白质 N 端结构域发生突变, 且在种子中高表达, 可能与铁皮石斛种子的自然萌发困难有关。本研究通过构建铁皮石斛种子 cDNA 文库, 并以 *DoDELLA4* 为诱饵载体进行互作蛋白筛选, 以期为进一步揭示 *DoDELLA* 蛋白在铁皮石斛种子萌发过程的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及取样

铁皮石斛材料取自上海浦东孙桥农业园区铁皮石斛种植基地, 选取雁荡山青杆品系经过人工授粉后形成的成熟蒴果, 于 2023 年 11 月 18 日采集, 清洗后转移至超净台, 吸干水分, 用镊子夹紧果柄一端, 另一端剪开一小口, 轻敲镊子使种子抖入冻存管, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 铁皮石斛种子 RNA 的提取及酵母双杂交文库的构建

采用 CTAB 法提取总 RNA。在 1.5 mL 离心管中加入 600 μ L CTAB 裂解液。种子在液氮中研磨成粉末, 转移到 CTAB 裂解液中, 涡旋震荡混匀, 42 °C 水浴 90 min; 加入 700 μ L 预冷的氯仿-异戊醇混合液, 混匀, 4 °C, 13 000 r/m, 离心 15 min; 转移 600 μ L 上清液到新的 1.5 mL 离心管, 加入 600 μ L 4 mol/L LiCl 和 300 μ L 无水乙醇, 放至 -20 °C 冰箱 90 min; 然后离心 15 min, 弃上清; 在沉淀中加入 700 μ L 预冷的 2 mol/L LiCl, 离心 15 min, 弃上清; 75% 乙醇洗涤沉淀; 晾干, 加入适量 RNA-酶 free H₂O 溶解, 电泳检测后于 -80 °C 保存。参考 GenElute™ Direct mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, 美国) 说明书, 分离 mRNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用于文库构建。

酵母双杂交文库的构建参照 CloneMiner™ II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, 美国) 说明书, 将 mRNA 进行反转录, 合成双链 cDNA, 再连接 attB1 重组接头, 合成含有接头的双链 cDNA。通过色谱柱分级法将 cDNA 分级分离并回收, 进一步利用 BP Clonase® II enzyme mix 进行 BP 反应并连接 pDONR222 载体, 将反应产物转入大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中, 得到初级文库。随机挑取 24 个单克隆, 进行 PCR 扩增, 电泳检测重组率及插入片段长度。

利用 EZgene™ Plasmid Midiprep Kit II 抽提初级文库质粒, 将得到的质粒利用 LR Clonase II Mix 进行 LR 反应, 以及与 pGADT7-DEST 载体的

连接, 连接产物转入大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中, 得到次级文库。按照上述方法鉴定库容量、重组率及插入片段的长度。

1.3 诱饵载体 pGBKT7-*DoDELLA4* 的构建

根据 *DoDELLA4* 基因序列和 pGBKT7 载体序列, 设计带酶切位点的特异性引物, 上游引物 pGBKT7-*DoDELLA4*-F 为: 5'-TCAGAGGAGGACCTGCATATG-GACGAGAGTTCGTACGGTCAGG-3', 下游引物 pGBKT7-*DoDELLA4*-R 为: 5'-CCGCTGCAGGTCGACGGATCCCTACTCTCGCCG-GTCAGAACC-3'。利用高保真酶扩增 *DoDELLA4* 基因的全长序列, 胶回收 PCR 产物; 提取 pGBKT7 载体质粒, 在 37 °C 条件下使用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 对载体进行双酶切, 胶回收纯化线性化的载体, 利用无缝连接酶将上述 PCR 产物与线性化载体在 50 °C 条件下连接 5 min, 连接产物转入大肠杆菌感受态, 挑取单菌落进行测序, 提取测序正确的 pGBKT7-*DoDELLA4* 重组质粒, 保存菌株。

1.4 诱饵载体 pGBKT7-*DoDELLA4* 毒性及自激活检测

参照 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Takara, 日本) 制备和转化酵母感受态细胞。利用 LiAc 转化法, 将诱饵载体 pGBKT7-*DoDELLA4* 和空载载体 pGBKT7 分别转入 Y2HGold 酵母感受态, 进行毒性检测。转化后的酵母菌液涂布于 SD/-Trp 平板, 30 °C 倒置培养 2~3 d, 对比 Y2HGold (pGBKT7-*DoDELLA4*) 和 Y2HGold (pGBKT7) 在 SD/Trp 缺陷培养基上的生长情况, 判断诱饵载体对酵母是否有毒性。

分别以 pGBKT7-53+pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam+pGADT7-T 作为阳性对照和阴性对照, pGBKT7-*DoDELLA4*+pGADT7 作为自激活检测组, 将对照组和自激活检测组共转化到 Y2HGold 酵母感受态, 进行自激活检测。转化后的酵母菌液涂布于 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺陷培养基, 30 °C 倒置培养 3~5 d, 观察酵母生长情况, 判断诱饵载体是否存在自激活情况。

若诱饵载体存在自激活性, 可在缺陷培养基中添加适量的 *HIS3* 竞争性抑制剂 3-AT 进行抑制, 将含有 pGBKT7-*DoDELLA4*+pGADT7 质粒的 Y2HGold 酵母菌液分别涂布在含有 5、10、20、

30、40、60、80 mmol/L 3-AT 的 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺陷培养基上, 30 °C 倒置培养 3~5 d, 观察酵母生长情况。

1.5 酵母双杂交文库筛选

取 10 µg 铁皮石斛种子 cDNA 文库质粒与 5 µg 诱饵质粒 pGBKT7-*DoDELLA4*, LiAc 转化法转化至 Y2HGold 酵母感受态。在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/3-AT (20 mmol/L) 平板上, 30 °C 倒置培养 3~5 d, 单克隆长至 1~2 mm 大小, 初筛完成。为了去除假阳性, 进行二次筛选, 将初筛平板上的单克隆点到 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-Gal/3-AT (20 mmol/L) 平板上, 30 °C 培养 3~5 d, 挑取颜色变蓝的菌落进行 PCR 并测序。

1.6 互作蛋白的验证

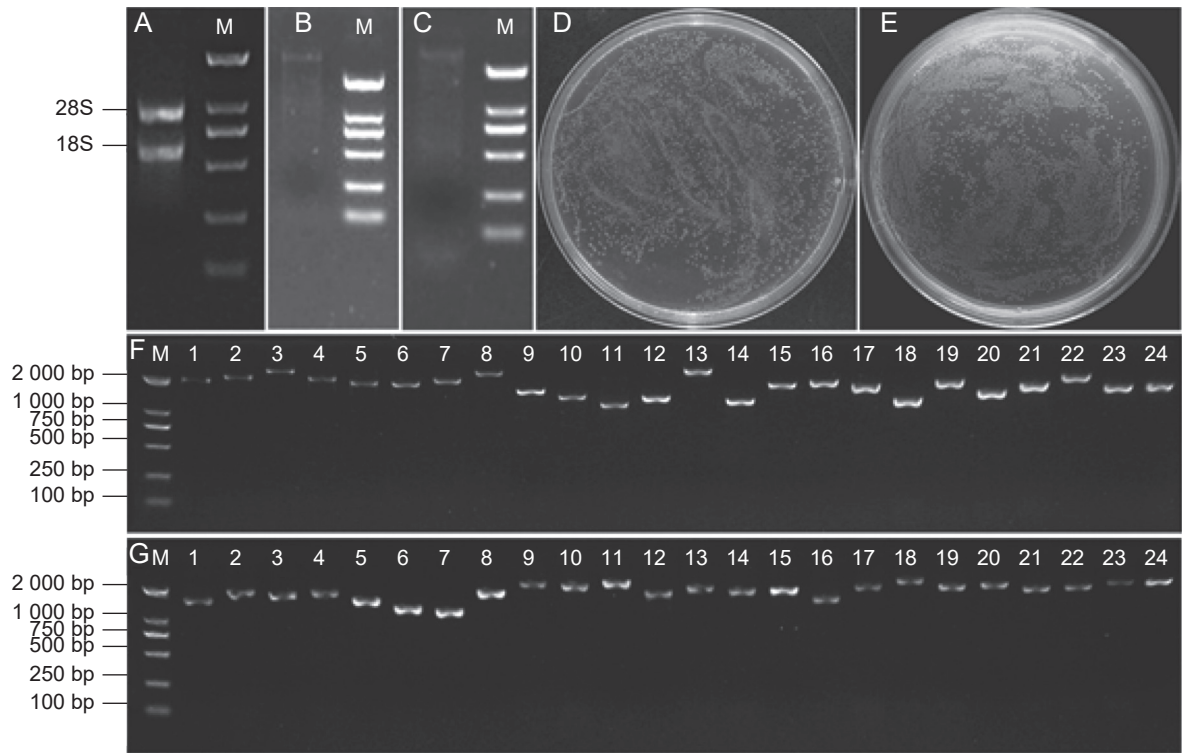
克隆候选互作蛋白基因的 CDS 序列, 重新构建 pGADT7 质粒, 将 pGADT7-候选互作蛋白质粒与诱饵质粒 pGBKT7-*DoDELLA4* 共转化于 Y2HGold 酵母感受态中, 涂布 SD/-Trp/-Leu 缺陷培养基, 30 °C 培养 3~5 d, 挑取单克隆重悬于 0.9% 的 NaCl 溶液中, 按梯度稀释, 转接到 SD/-Trp/-Leu/-SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/3-AT 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-Gal/3-AT 缺陷培养基。30 °C 倒置培养 3~5 d, 以 pGBKT7-53+pGADT7-T 为阳性对照, pGBKT7-Lam+pGADT7-T 为阴性对照, 观察酵母生长及显色情况。

2 结果与分析

2.1 酵母文库的构建及鉴定

采用 CTAB 法提取铁皮石斛种子的总 RNA, 电泳显示总 RNA 的 28S 和 18S 两条主带完整清晰, 没有弥散 (图 1: A)。分离纯化 mRNA (图 1: B), 反转录合成双链 cDNA, 电泳检测 cDNA 的质量较好 (图 1: C)。将 cDNA 与 attB1 重组接头连接, BP 重组反应连接 pDONR222 载体后, 转化涂板, 获得初级文库, 共 1 600 个单克隆, 得到的文库库容量为 1.28×10^7 CFU (图 1: D), 随机挑取 24 个克隆进行 PCR 扩增, 发现插入片段平均长度大于 1 000 bp (图 1: F), 重组率为 100%, 达到初级文库要求。

将初级文库质粒与 pGADT7-DEST 载体进行 LR 反应, 转化涂板, 获得次级文库, 共 1 500 个单克隆, 计算库容量为 1.20×10^7 CFU (图 1: E),



A~C: 总 RNA、mRNA、cDNA; D、E: 初级文库和次级文库; F、G: 初级文库和次级文库的插入片段 PCR 检测。M: DNA 分子量标准。
A-C: Total RNA, mRNA, and double-stranded cDNA; D-E: Primary and secondary library capacity identification; F,G: PCR detection of primary and secondary library inserts. M: DNA molecular weight marker.

图 1 酵母双杂交文库构建
Fig. 1 Yeast two-hybrid library construction

随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR 扩增，片段平均长度大于 1 000 bp (图 1: G)，重组率为 100%，以上结果表明所构建的 cDNA 文库满足酵母双杂交筛选条件。

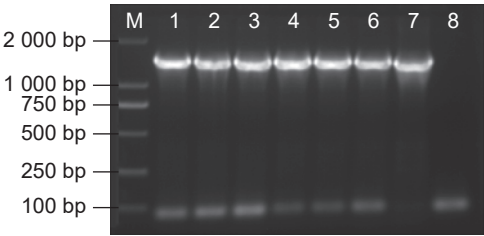
2.2 诱饵载体 pGBKT7-DoDELLA4 的构建

扩增 *DoDELLA4* 基因的 CDS 序列，与线性化的 pGBKT7 载体连接后，转化大肠杆菌感受态。37 °C 倒置培养，挑取 6 个单克隆进行鉴定，结果显示均为阳性克隆 (图 2)。测序结果显示，*DoDELLA4* 基因插入到 pGBKT7 载体的正确位置，且无移码突变，表明诱饵载体构建成功。

2.3 诱饵载体毒性及自激活分析

以空载质粒 pGBKT7 为对照，将诱饵载体转入 Y2HGold 酵母感受态，涂布于 SD/-Trp 平板上，结果显示，诱饵载体转入 Y2HGold 酵母后，菌落生长情况与对照一致 (图 3: A)，表明诱饵载体对酵母细胞无毒性。

为避免假阳率过高，进一步检测诱饵载体是否存在自激活现象。将不同质粒组合转入 Y2HGold



M: DNA 分子量标准; 1: 阳性对照; 2~7: 阳性克隆; 8: 阴性对照。
M: DNA molecular weight marker; 1: Positive control; 2-7: Positive clones; 8: Negative control.

图 2 pGBKT7-DoDELLA4 菌落 PCR 鉴定
Fig. 2 PCR identification of pGBKT7-DoDELLA4 colonies

酵母菌株，分别涂布于 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上，结果显示 (图 3: B)，阳性对照在两种平板上均能生长，阴性对照只在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长，说明对照组正常。自激活检测组 pGBKT7-DoDELLA4+pGADT7 在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长，说明共转化是成功的，同时也能在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上生长，说明诱饵载体具有自激活性。

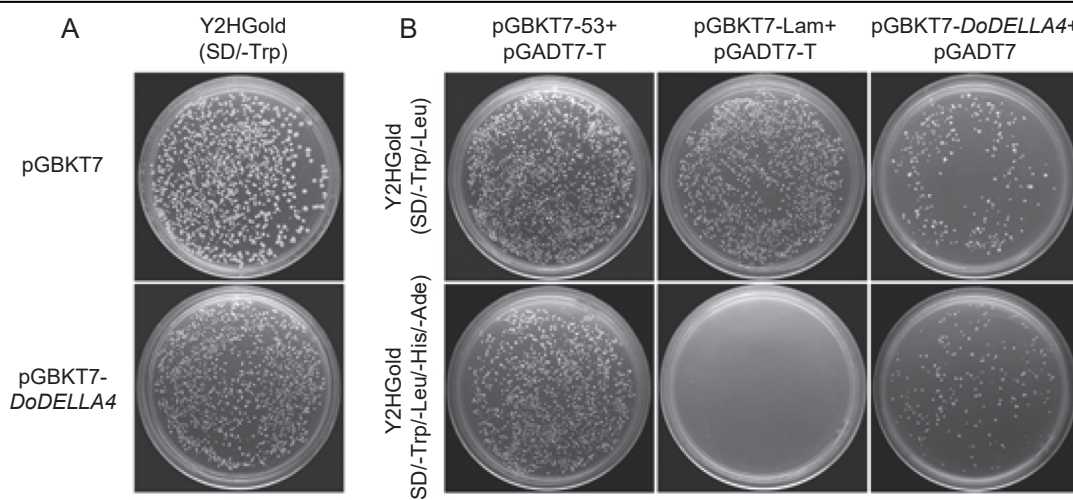


图 3 诱饵载体表达蛋白毒性 (A) 和自激活 (B) 检测

Fig. 3 Detection of toxicity (A) and self-activation (B) of expressed proteins in the decoy vector

为了抑制诱饵载体的自激活性, 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板中分别加入不同浓度的 3-AT。结果发现, 浓度为 20 mmol/L 的 3-AT 能够抑制诱饵载体的自激活现象 (图 4)。

2.4 酵母双杂交筛选候选互作蛋白

将诱饵质粒 pGBKT7-DoDELLA4 与铁皮石斛 cDNA 文库质粒共转化入 Y2HGold 酵母感受态, 涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/3-AT (20 mmol/L)

缺陷培养进行初筛, 共获得 70 个克隆 (图 5: A), 将这些克隆在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/3-AT (20 mmol/L) 平板上进行复筛, 发现 70 个克隆均能生长且变蓝 (图 5: B)。挑取这些单克隆进行菌落 PCR, 部分结果见图 5: C。将阳性克隆进行测序, 测序结果在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行比对后, 最终得到 70 个候选互作蛋白 (附表 1¹⁾)。

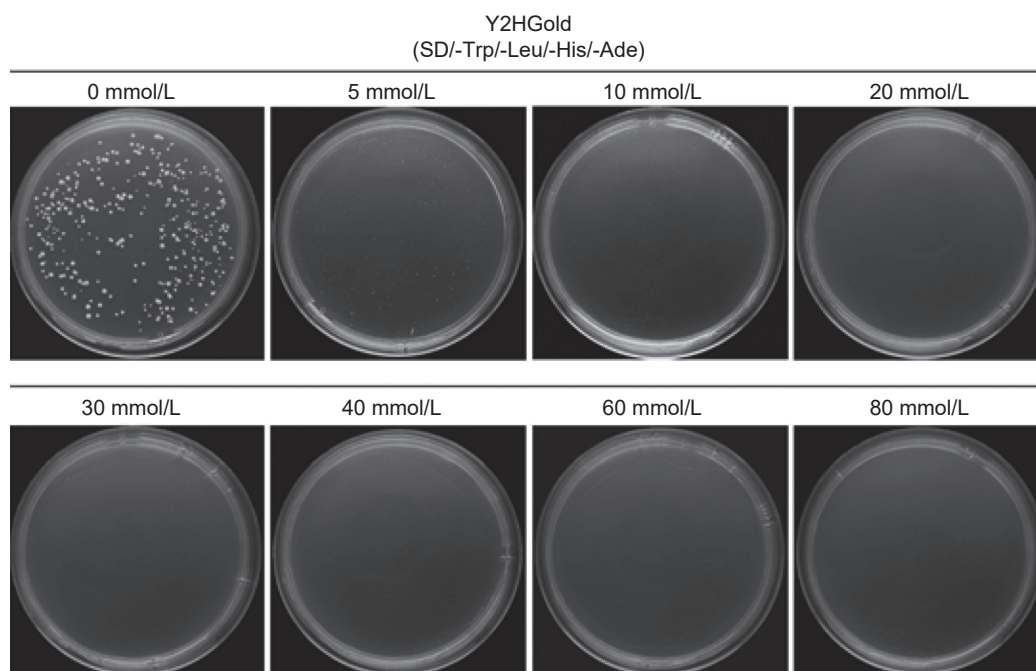
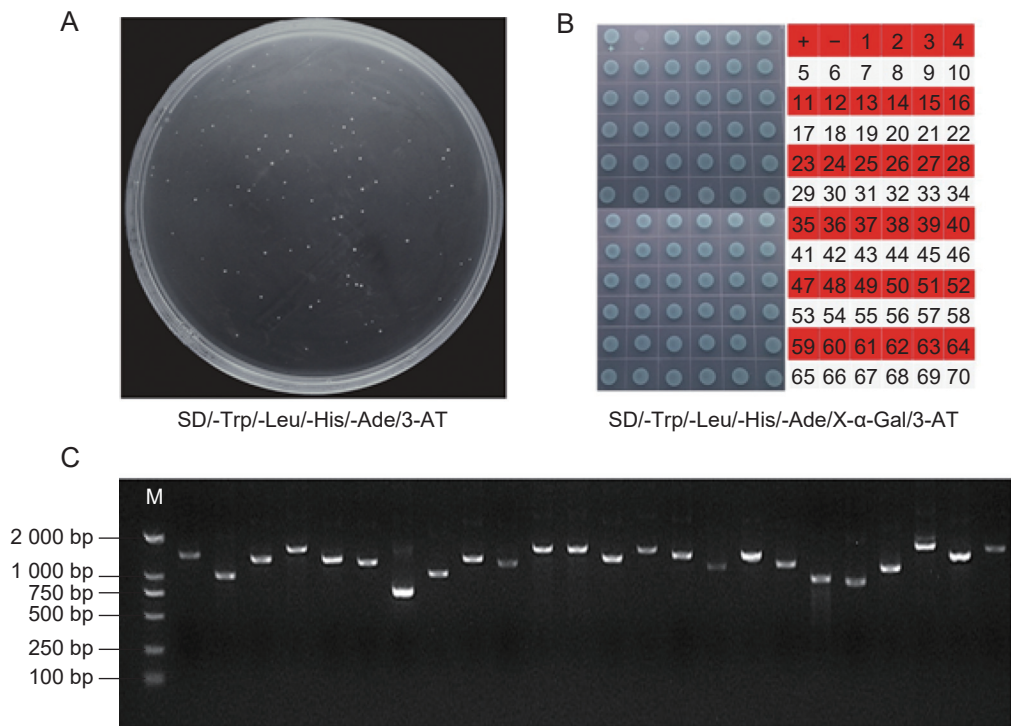


图 4 3-AT 最佳抑制浓度的筛选

Fig. 4 Screening of optimal inhibitory concentration of 3-AT

1) 如需查阅附表内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。



A: 初筛; B: 复筛; C: 互作蛋白的酵母菌落 PCR 鉴定。+: 阳性对照; -: 阴性对照; M: DNA 分子量标准。
A: Primary screening; B: Rescreening; C: Yeast colony PCR identification of interacting proteins. +: Positive control; -: Negative control; M: DNA molecular weight marker.

图 5 cDNA 文库筛选阳性克隆
Fig. 5 cDNA library screening for positive clones

2.5 点对点互作验证

从候选互作蛋白中选取出现频率较高的 7 个蛋白进行互作验证, 蛋白具体信息见表 1。从 NCBI 数据库中下载编码这些候选互作蛋白的 CDS 序列, 设计特异性引物, 扩增目的片段, 并与线性化的 pGADT7 载体进行连接, 最终得到 7 个重组猎物载体。

将诱饵载体 pGBKT7-DoDELLA4 和 7 个猎物载体分别共转化到 Y2HGOLD 酵母感受态, 挑取阳性克隆进行点对点互作验证。结果显示

(图 6), 实验组和对照组均能在 SD/-Trp/-Leu 平板上正常生长, 而在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/3-AT (20 mmol/L) 平板上, 则只有阳性对照和实验组 (pGADT7-DoELIP1、pGADT7-5807、pGADT7-DoTZF、pGADT7-DoUBQ、pGADT7-DoGRPA3) 能够正常生长, 且在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-Gal/3-AT 平板上颜色变蓝。这些结果说明, DoELIP1、5807、DoTZF、DoUBQ、DoGRPA3 等 5 个蛋白分别与 DoDELLA4 蛋白存在互作关系。

表 1 互作蛋白的功能注释
Table 1 Functional annotation of interacting proteins

编号 No.	GenBank 登录号 GenBank Accession Number	基因注释 Gene annotation	基因名 Gene
4	XM_020850203.2	脱水蛋白 DHN4	DoDHN4
6	XM_028692804.1	早期光诱导蛋白 1, 叶绿体	DoELIP1
13	XM_020828349.2	油体蛋白 S2-2	DoOLES2-2
14	XM_020837109.2	多聚泛素蛋白	DoUBQ
21	XM_028698338.1	含锌指 CCCH 结构域蛋白 2	DoTZF
27	XM_020849176.2	未表征蛋白	5807
39	XM_020825139.1	富含甘氨酸蛋白 A3	DoGRPA3

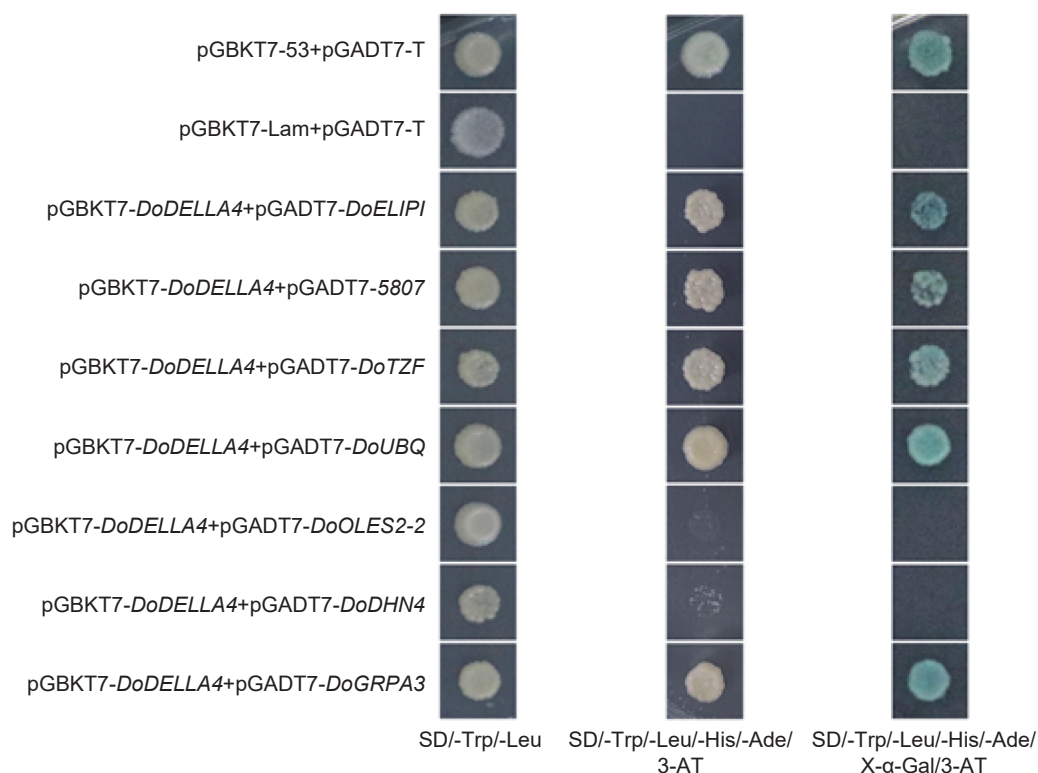


图 6 DoDELLA 互作蛋白的点对点互作验证

Fig. 6 Point-to-point interaction verification of DoDELLA interacting proteins

3 讨论

铁皮石斛是一种具有景天酸代谢途径 (Crassulacean acid metabolism, CAM) 的植物, 能够有效抵抗低温、高盐、干旱等非生物胁迫。刘博婷等^[18]利用 RNA-seq 技术研究了铁皮石斛 *DcAl* 基因家族在低温胁迫下的表达模式, 推测 *DcAl*s 通过调控基因表达, 增加细胞内可溶性多糖的含量, 从而提高铁皮石斛的低温耐受性。Zhang 等^[19]发现, 铁皮石斛可通过减缓生长、积累相容性溶质以及增加根中过量 Na^+ 的排出来适应盐胁迫。Huang 等^[20]则指出, 轻度缺水可激活铁皮石斛的激素信号转导途径, 而严重干旱胁迫则会启动类黄酮生物合成途径。本研究通过 Gateway 重组技术构建了铁皮石斛种子的 cDNA 文库, 并筛选出与 DoDELLA 蛋白潜在互作的蛋白, 为解析 DoDELLA 基因的功能及作用机制提供了基础。然而, 酵母双杂交筛选过程中可能存在假阳性问题, 需通过一对一验证以及双分子荧光互补 (BiFC)、免疫共沉淀 (Co-IP)、pull-down 等体内外蛋白互作实验进一步鉴定。

本研究共筛选到 70 个可能与 DoDELLA 相互作用的候选蛋白, 包括肽基脯氨酰顺反异构酶 FKBP12、类脱水蛋白 DHN4、类几丁质酶蛋白 1、GATA 转录因子 20、叶绿体 DCL 蛋白、以及早期光诱导蛋白 1 (ELIP1) 等。早期研究发现, 转录因子 DAG1 的缺失会导致叶绿体蛋白如 ELIP1 和 ELIP2 的失调, 进而影响拟南芥种子的萌发。在非生物胁迫下, 单突变体 *elip1* 种子的萌发率较低, 而 *elip2* 种子的萌发率较高; DAG1 的缺失则提高了 *elip1 elip2* 双突变体种子的萌发率^[21]。

另一个候选互作蛋白——多聚泛素蛋白, 则主要参与泛素/26S 蛋白酶体途径中的蛋白质水解, 进而影响植物生长发育的多项生理活动^[22]。脱落酸 (ABA) 和 GA 在植物生长发育的多个阶段发挥重要调控作用, 尤其是在调节种子萌发过程中不可或缺。DELLA 蛋白是 GA 信号通路的抑制子, 当植物接收到 GA 信号时, F-box 蛋白 (SLY1) 介导 DELLA 蛋白的泛素化降解, 从而解除其对生长的抑制作用^[23]。在种子萌发过程中, ABI5 作为 ABA 信号传导途径的下游组分, 其表达也受到泛素化的调节。RPN10 通过指导特定蛋白质进入

26S 蛋白酶体进行降解,影响拟南芥的诸多调节过程。当 RPN10 亚基发生突变时, *rpn10-1* 突变体表现出类似过表达 *ABI5* 的表型,如种子萌发率降低、生长速度减缓、雄蕊数量减少等,且对 ABA 超敏感。RPN10 的突变影响了 *ABI5* 基因的转录水平,导致 *ABI5* 蛋白的降解受阻^[24]。

本研究筛选到的候选蛋白包括 XM_028698338.1 编码的含锌指 CCCH 结构域蛋白 2。研究表明,拟南芥 *AtTZF4*、*AtTZF5* 和 *AtTZF6* 基因通过调控对 ABA 和 GA 响应至关重要的基因,从而影响种子的萌发^[25]。*CpC3H3* 基因可能通过与其他开花基因互作或影响开花信号途径中的关键因子来调控蜡梅 (*Chimonanthus praecox* (L.) Link) 开花^[26]。*SOM* 编码位于细胞核的 CCCH 型锌指蛋白,其通过调节 ABA 和 GA 代谢基因的表达影响种子萌发。*SOM* 还参与植物色素信号转导途径,调节 PIL5 下游的激素代谢基因^[27]。*SOMNUS/AGL67/EBS* 复合物通过表观修饰激活 *SOMNUS* 表达,抑制高温胁迫下的种子萌发^[28]。水稻中 *SOMNUS* 的同源基因 *OsZFL1* 在干种子中高表达,吸水后表达水平迅速下降,推测其与种子萌发及发育相关^[29]。本研究鉴定发现,DoTZF 蛋白与 DoDELLA 蛋白存在互作。CCCH 型锌指蛋白在植物生长发育调控中具有重要作用,而 DoTZF 是否参与调控铁皮石斛种子的萌发尚需进一步研究。

此外,本研究筛选到了 XM_020825139.1 编码的富含甘氨酸蛋白 A3 (GRP)。GRPs (Glycine-rich proteins) 是一类广泛存在于植物体内的蛋白质,富含高度重复的甘氨酸序列^[30]。在冷胁迫下, *AtGRP2* 促进拟南芥种子的萌发^[31];在盐或脱水胁迫下, *AtGR-RBP4* 则延缓拟南芥种子的萌发^[32]。*AtRZ-1a* 基因通过调控萌发相关基因的表达影响拟南芥种子的萌发,在盐或干旱胁迫下,过表达 *AtRZ-1a* 的拟南芥转基因植株种子萌发迟缓,而敲除 *AtRZ-1a* 基因的突变体则表现出更强的萌发和生长能力^[33]。研究者还从中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) 的转录组数据库中筛选到 3 个 GRP 编码基因 (*PpcGRP4*、*PpcGRP6*、*PpcGRP7*),其中,过表达 *PpcGRP6* 和 *PpcGRP7* 基因均能显著促进拟南芥种子的萌发^[34]。

除了上述已注释的蛋白外,本研究还筛选到 1 个与 DoDELLA 蛋白存在互作的未表征蛋白

(XM_020849176.2),该蛋白在铁皮石斛生长发育中的具体功能尚不清楚。因此,深入探究 DoDELLA 与互作蛋白之间的分子互作机制,对于理解 DoDELLA 基因的功能及其在铁皮石斛生长调控中的作用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Wen CK, Chang C. *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses[J]. *Plant Cell*, 2002, 14 (1): 87-100.
- [2] Zhang YH, Bian XF, Zhang SB, Ling J, Wang YJ, et al. Identification of a novel gain-of-function mutant allele, *slr1-d5*, of rice DELLA protein[J]. *J Integr Agr*, 2016, 15 (7): 1441-1448.
- [3] Yuan YX, Wang LX, Zhao QY, Liu CW, Fu X, et al. Genome-wide identification, expression analysis and functional study of DELLA genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2024, 29 (5): 198.
- [4] 岳溶溶. 梨单性结实相关 DELLA 基因的功能分析 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019: 32-38.
- [5] 李露露. 谷子 DELLA 基因的鉴定、克隆与功能分析 [D]. 太原: 山西农业大学, 2022: 29-46.
- [6] Hussain A, Peng JR. DELLA proteins and GA signalling in *Arabidopsis*[J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, 22 (2): 134-140.
- [7] Lim S, Park J, Lee N, Jeong J, Toh S, et al. ABA-insensitive3, ABA-insensitive5, and DELLAs interact to activate the expression of *SOMNUS* and other high-temperature-inducible genes in imbibed seeds in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2013, 25 (12): 4863-4878.
- [8] 赵春丽, 王晓, 陈家兰, 陈何, 王乐, 等. 植物 DELLA 蛋白家族研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26 (5): 1299-1308.
- [9] Cheng H, Qin LJ, Lee S, Fu XD, Richards DE, et al. Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function[J]. *Development*, 2004, 131 (5): 1055-1064.
- [10] 于磊. 水曲柳 DELLA 家族基因应答低温胁迫及参与被动休眠调控研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021: 51-70.
- [11] Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, Nilsson O. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation[J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (9): 2172-2181.
- [12] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 225-251.

- [13] Davière JM, Achard P. Gibberellin signaling in plants[J]. *Development*, 2013, 140 (6): 1147–1151.
- [14] Ito T, Okada K, Fukazawa J, Takahashi Y. DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling[J]. *Plant Signal Behav*, 2018, 13 (3): e1445933.
- [15] Tyler L, Thomas SG, Hu JH, Dill A, Alonso JM, *et al.* DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135 (2): 1008–1019.
- [16] 马庆, 付强, 杨银, 陈兰娅, 陈海, 等. 铁皮石斛分子生物学研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2023, 42 (4): 45–50.
- Ma Q, Fu Q, Yang Y, Chen LY, Chen H, *et al.* A review of molecular biology of *Dendrobium officinale*[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2023, 42 (4): 45–50.
- [17] 王美娟, 赵千里, 柏冰洋, 向松竹, 洪承昊. 铁皮石斛的组织培养及种植技术研究进展 [J]. 中南农业科技, 2023, 44 (1): 217–221.
- [18] 刘博婷, 唐演儿, 李琳, 林一帆, 李学诗, 等. 铁皮石斛酸性蔗糖转化酶基因家族鉴定及低温下表达分析 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50 (24): 33–42.
- [19] Zhang MZ, Liu N, da Silva JAT, Liu XC, Deng RF, *et al.* Physiological and transcriptomic analysis uncovers salinity stress mechanisms in a facultative crassulacean acid metabolism plant *Dendrobium officinale*[J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 1028245.
- [20] Huang H, Jiao YX, Tong Y, Wang YH. Comparative analysis of drought-responsive biochemical and transcriptomic mechanisms in two *Dendrobium officinale* genotypes[J]. *Ind Crop Prod*, 2023, 199: 116766.
- [21] Rizza A, Boccaccini A, Lopez-Vidriero I, Costantino P, Vitorioso P. Inactivation of the *ELIP1* and *ELIP2* genes affects *Arabidopsis* seed germination[J]. *New Phytol*, 2011, 190 (4): 896–905.
- [22] 强承魁, 凤舞剑, 王胜永, 赵虎, 苏新林, 周保亚. 拟南芥泛素家族的全基因组分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29 (5): 969–975.
- Qiang CK, Feng WJ, Wang SY, Zhao H, Su XL, Zhou BY. Genome-wide analysis of ubiquitin family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29 (5): 969–975.
- [23] McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, *et al.* The *Arabidopsis* *SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase[J]. *Plant Cell*, 2003, 15 (5): 1120–1130.
- [24] Smalle J, Kurepa J, Yang PZ, Emborg TJ, Babiychuk E, *et al.* The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling[J]. *Plant Cell*, 2003, 15 (4): 965–980.
- [25] Bogamuwa S, Jang JC. The *Arabidopsis* tandem CCCH zinc finger proteins AtTZF4, 5 and 6 are involved in light-, abscisic acid- and gibberellic acid-mediated regulation of seed germination[J]. *Plant, Cell Environ*, 2013, 36 (8): 1507–1519.
- [26] 肖诗琪. 蜡梅 CCCH 型锌指蛋白基因 *CpC3H3* 在成花诱导中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2022: 35–45.
- [27] Kim DH, Yamaguchi S, Lim S, Oh E, Park J, *et al.* SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5[J]. *Plant Cell*, 2008, 20 (5): 1260–1277.
- [28] Li P, Zhang QL, He DN, Zhou Y, Ni HH, *et al.* AGAMOUS-LIKE67 cooperates with the histone mark reader EBS to modulate seed germination under high temperature[J]. *Plant Physiol*, 2020, 184 (1): 529–545.
- [29] 闫丽华. 水稻 *SOMNUS* 同源基因在光敏色素介导的光反应中的作用初探 [D]. 烟台: 烟台大学, 2018: 17–22.
- [30] 张水军, 曾千春, 卢秀萍, 李文正. 植物富含甘氨酸蛋白的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26 (14): 54–58.
- Zhang SJ, Zeng QC, Lu XP, Li WZ. Progress on plant glycine-rich protein[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26 (14): 54–58.
- [31] Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, *et al.* Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions[J]. *Plant J*, 2007, 50 (3): 439–451.
- [32] Kwak KJ, Kim YO, Kang H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *GR-RBP4* under high salinity, dehydration, or cold stress[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56 (421): 3007–3016.
- [33] Kim YO, Pan S, Jung CH, Kang H. A zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein, atRZ-1a, has a negative impact on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under salt or drought stress conditions[J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48 (8): 1170–1181.
- [34] 徐瑞. 中国樱桃富含甘氨酸 RNA 结合蛋白基因克隆与功能初鉴 [D]. 金华: 浙江师范大学, 2018: 36–47.

(责任编辑: 李惠英)