

桃ABA信号关键基因*PpABI5*酵母单杂交文库构建及其上游转录因子的筛选

郇蕾, 王旭旭, 陈修森, 文滨滨, 谭秋平, 陈修德, 高东升, 李玲*, 付喜玲*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 脱落酸(ABA)在植物的生长发育中起着重要的作用, *ABI5*是响应ABA信号的关键基因, 研究调控*ABI5*基因表达的转录因子对进一步阐述ABA信号转导及调控具有重要意义。本研究中, 将3-AF1、Box I和Sp1三次重复串联后连接到pAbAi诱饵质粒上, 转化酵母细胞构建诱饵载体, 构建桃(*Prunus persica*)酵母单杂交cDNA文库, 再共转化诱饵菌株, 经同源重组筛选*PpABI5*启动子的上游转录调节因子。构建的cDNA文库库容为 1×10^7 CFU, 插入片段长度平均在1 500 bp左右。酵母单杂交筛选结果经测序和Blast同源性分析, 获得PpDAM3和PpDAM5两个转录因子。酵母单杂交进一步证实PpDAM3和PpDAM5能与*PpABI5*启动子结合。这些研究结果表明, PpDAM3和PpDAM5可能参与调控*PpABI5*的转录, 并为深入研究ABA信号转导通路奠定基础。

关键词: *ABI5*; 桃; 启动子; 酵母单杂交; 转录因子

植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)在植物的整个生命周期中起着关键作用, 例如ABA参与种子的发育, 胚乳中贮藏物质的合成, 种子休眠及抑制胚胎萌发等方面(于敏等2016; Finkelstein等2002; Kanno等2010)。在果树芽休眠的调控中, ABA被普遍认为是主要的萌发抑制物质和休眠促进物质(王连荣等2008)。ABA-insensitive 5 (*ABI5*)为碱性亮氨酸拉链(bZIP)类型的转录因子, 对ABA信号转导过程起重要的作用, 在种子休眠和萌发过程中参与ABA信号通路(赵菲佚等2015; Lopez-Molina和Chua 2000; 孙明岳等2016)。拟南芥*abi5*突变体能够降低ABA抑制萌发的敏感性及对一些能被ABA诱导的基因进行负调控。*ABI5*转录激活与*ABI5*的稳定性影响*ABI5*的累积程度(Brocard等2002)。ABA响应途径中元件的鉴定与作用机理是研究ABA信号转导的基础。因此, 研究调控*ABI5*基因表达的转录因子十分重要。目前, 已有研究表明, 拟南芥光信号途径中的FAR-RED-IMPAIRED RESPONSE 1 (*FAR1*)和FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3 (*FHY3*)转录因子能够与*ABI5*启动子中的FHY3/*FAR1*-binding site (*FBS*)元件结合(Tang等2013), *LONG HYPOCOTYL 5* (*HY5*)也能作为转录激活因子上调*ABI5*的表达(Chen等2008)。此外, Xu等(2014)发现, B-box 21 (*BBX21*)不仅能够通过与*HY5*结合妨碍*HY5*与*ABI5*的互作, 其自身也作为*ABI5*的上游转录因子负调控*ABI5*的表达, 且*ABI5*能够直接与其启动子中3个典型的G-box结合来激活自身表达。酵母单杂交文库是一种常用于分析

和鉴定DNA与蛋白质结合的方法。近年来, 通过构建酵母单杂交cDNA文库并用诱饵载体筛选出与之互作的蛋白的报道不断增多。例如, 通过酵母单杂交技术利用GA20-氧化酶(*gibberellin 20-oxidase1*, *GA20ox1*)基因启动子筛选拟南芥转录因子库, 获得转录因子RAP2.4f, 并通过双荧光素酶检测到RAP2.4f对*AtGA20ox1*的启动子活性具有抑制作用(钟曦等2016); 获得木薯细胞壁转化酶基因*MeCW-INV6*可能的上游转录因子锌指蛋白、组氨酸蛋白H1.2、AT-hook核定位蛋白和线粒体受体TOM5(郭育强等2016); 利用启动子序列筛选到葡萄糖信号途径中*AtPGR*基因的上游转录因子*AtSTKL1*和*AtSTKL2*(Chung等2016)。本研究在分析*ABI5*启动子获得顺势作用元件的基础上, 构建了桃酵母单杂交cDNA文库, 获得了与*ABI5*启动子顺式作用元件结合的上游转录因子, 以期研究*ABI5*的调控机理奠定基础。

材料与方法

1 材料

‘中油4号’油桃[*Prunus persica* (L.) Batsch cv. ‘Zhongyousihao’]种植于山东农业大学科技创新园区园艺实验站, 选取自然休眠期桃花芽为实验材料。

收稿 2017-03-06 修定 2017-06-16

资助 国家自然科学基金(31672137)和山东省自然科学基金(ZR2014CM015)。

* 共同通讯作者(E-mail: lilingsdau@163.com; xilingfu@sdau.edu.cn)。

Plasmid Maxi Kit购自德国Qiagen公司, TRIzol Reagent购自美国Invitrogen公司, 1 kb DNA Ladder和超纯琼脂糖购自上海海科生物技术有限公司, Taq DNA聚合酶和 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs购自宝生物工程公司。

2 *ABI5*基因启动子的序列分析

提取桃树基因组DNA, 在拟南芥数据库上查找*AtABI5*的启动子序列。据此设计引物*PpABI5-F* (5'-GAATTCTCAATTGTACTGGAGGCATCTG-3')和*PpABI5-R* (5'-GAGCTCGTTTTTCGTGTGGTCTGCACTT-3'), 克隆得到*PpABI5*基因的启动子并测序。利用启动子在线分析软PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析该启动子的顺式作用元件。

3 诱饵载体的构建

利用PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析*ABI5*启动子的顺式作用元件。最终选取富集光响应作用元件的启动子区域(5'-TGCACGGCCTGGAACCTT-GAAATTTGGATAAGAGATATATAATTAGGCTA-AGAAAAGTGAGAGGGGGGCATAGGACCCCC-GGCCTTGTCTCCCTCCCCCTTGTCTT-3')进行3次重复串联作为诱饵序列, 单序列中含光响应元件3-AF1 binding site、Box I和Sp1。用限制性内切酶*Bst*BI酶切pAbAi载体, 使其线性化并带有粘性末端, 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化该片段。

4 酵母诱饵报告子的金担子素(Aureobasidin A, AbA)抗性筛选

从bait中挑选正常生长的酵母菌落, 用适量0.9% NaCl重新悬浮菌液, 调至 OD_{600} 约0.002 (即大约每100 μL 包含2 000个细胞), 将酵母诱饵报告子菌液100 μL 分别涂布到含0、100、300和500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA的SD/-Ura培养基上, 于30°C倒置培养2~3 d, 观察酵母菌落的生长情况, 确定文库筛选时AbA的使用浓度。

5 诱饵载体转化酵母Y1HGold

将线性化的质粒转入Y1HGold菌株, 用SD/-Ura培养基进行筛选。培养3 d后, 挑取3个单菌落, 用Matchmaker Insert Check PCR Mix 1 (Clontech)做菌落PCR, 确定阳性菌落。若利用这对引物可以扩增出一段包含bait序列的约1.4 kb+X的片段, 表明诱饵质粒成功整合到Y1HGold中。

6 用于构建文库的cDNA合成

采用Trizol法提取1.0 g油桃花芽总RNA。使用Oligotex mRNA Kit (Qiagen)分离纯化样本的mRNA。采用酶促法合成cDNA双链, 具体操作如下: 在0.2 mL RNase free PCR管中加入7 μL mRNA、1 μL 3'反转录引物(F: 5'-TAATACGACTCACTA-TAGGGCGAGCGCCGCCATG-3'; R: 5'-GTGAAC-TTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT-3')、1 μL dNTPs ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 65°C孵育5 min, 立即置于冰上降至45°C, 孵育2 min, 加入混匀的4 μL 5×反转录缓冲液、2 μL DTT ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、5 μL 反转录酶(ABI), 避免产生气泡, 于50°C孵育60 min; 在上述反应液中加入91 μL DEPC水、30 μL 5×Second Strand Buffer、3 μL $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (each) dNTPs、1 μL 大肠杆菌DNA连接酶($10 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、4 μL 大肠杆菌DNA聚合酶I、1 μL 大肠杆菌RNA酶H ($2 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 于16°C孵育2 h, 加入2 μL T4 DNA聚合酶, 16°C孵育5 min, 加入10 μL $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0)、160 μL 酚:氯仿:异戊醇(体积比25:24:1)混合液, 充分混匀30 s, 室温下23 669×g离心5 min, 将上清液取到新的离心管中, 乙醇沉淀, 溶于105 μL DEPC水中。加5'接头, 反应体系中含34 μL cDNA、5 μL 10×T4连接酶缓冲液、10 μL 5' Adapter ($1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、1 μL $40 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ T4 DNA连接酶(NEB), 混匀后16°C孵育16~24 h。使用低熔点琼脂糖电泳cDNA, 切胶回收1 kb以上的条带, 乙醇沉淀后溶于14 μL 水中。

7 酵母单杂交文库构建

(1) cDNA与载体连接。构建重组反应体系含14 μL cDNA、2 μL pGADT7-Rec2 ($300 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、4 μL 5×In-Fusion HD Enzyme Premix (Clontech), 混匀后置于50°C孵育30 min, 于重组反应体系中加入2 μL 的Proteinase K, 37°C孵育15 min, 75°C中10 min, 补水到100 μL 。依次加入1 μL 20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 糖原、50 μL $7.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4OAc 、375 μL 100%乙醇, 混合均匀并置于-80°C不少于1 h。于4°C下23 669×g离心30 min。去上清, 加入150 μL 的70%乙醇, 4°C下23 669×g离心3 min, 重复此步骤一次, 去尽上清, 避免触动cDNA沉淀, 室温将cDNA晾干于5~10 min。用10 μL 的DEPC水重新悬浮cDNA沉淀, 用枪吸打30~40次。瞬时离心2 s收集cDNA, 立即置冰上。

(2)电转化大肠杆菌感受态细胞。将1 mm电转杯(Bio-Rad)置于-80°C预冷30 min, 在冰上将2 μL重组产物和50 μL感受态细胞加入电转杯, 置冰上45 min, 于电转化仪(Bio-Rad)上电击, 电击后迅速向电转杯中加入LB培养基1 mL, 然后取至新的15 mL离心管中, 置于37°C下225~250 r·min⁻¹培养至少1 h, 将培养物稀释10、100、1 000、10 000倍, 分别取10 μL稀释液涂平板用于计算库容, 剩余培养物于4°C保存过夜, 或者加入甘油至终浓度20%存于-80°C。

(3)库容量鉴定。取转化后细菌原液10 μL稀释100倍后, 从中取出10 μL涂布LB平板(含卡纳抗性), 第二天计数。库容量(CFU·mL⁻¹)=平板上的克隆数/10 (μL)×稀释倍数(100倍)×重悬液体积(1×10³ μL), 文库总库容量(CFU)=库容量(CFU·mL⁻¹)×文库菌液总体积(mL), 库容量至少应大于10⁶。

8 酵母单杂交筛选

采用LiAc法转化酵母感受态细胞, 菌落PCR检测阳性克隆。以T7引物(5'-TAATACGACTCAC-TATAGGGC-3')进行测序。

实验结果

1 *ABI5*基因启动子的序列分析

启动子分析表明, *PpABI5*启动子序列中含有多个植物的组成型核心启动子顺式作用元件, 如CAAT-box和TATA-box; 还含有多种植物激素的响应元件, ABRE、AuxRR-core、GARE-motif、CGTCA-motif、P-box、TGACG-motif; 光响应元件AAAC-motif、G-box、Sp1、Box I、GT1-motif; 响应环境胁迫的元件LTR、MBS、TC-rich repeats; 参与分生组织发育的CAT-box及胚乳表达必需的GARE-motif等(表1)。

表1 *PpABI5*启动子的顺式作用元件分析

Table 1 The *cis*-acting element analysis of *PpABI5* promoter

功能位点	单序列(5'→3')	生物学功能	出现次数
AAAC-motif	CAACAAAAACCT	光响应元件	1
ABRE	CACGTG	ABA响应元件	3
AT-rich element	ATAGAAATCAA	AT富集DNA结合蛋白结合位点	2
AuxRR-core	GGTCCAT	生长素响应中的顺式作用元件	1
CAAT-box	CCAAT/CAAT	启动子和增强子共同作用的顺式作用元件	80
CAT-box	GCCACT	分生组织表达相关顺式作用元件	1
G-box	CACGTG (ACACGTGT/CACATGG/CACGTG)	光响应顺式作用元件	8
GARE-motif	AAACAGA	赤霉素响应元件	4
Skn-1-motif	GTCAT	胚乳表达必需的调控元件	5
Sp1	CC(G/A)CCC	光响应元件	1
TATA-box	taTATAAAAtc/ATTATA/TATATAA	-30位置附近核心启动子转录起始位点	60
Box I	TTTCAAA	光响应元件	2
LTR	CCGAAA	低温响应元件	1
MBS	TAACGTG	干旱诱导响应元件	3
MRE	AACCTAA	光响应中MYB结合位点	1
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件	1
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	防御和胁迫下响应元件	1
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸响应元件	1
Box-W1	TTGACC	真菌诱导响应元件	2
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸响应元件	1

2 诱饵载体的构建

将3次串联重复序列连接到诱饵载体pAbAi上, 将*Bst*BI线性化的pAbAi-bait转化Y1HGGold酵母菌, 并涂平板培养3 d后, 挑取生长健康的单菌落进

行PCR鉴定。电泳结果显示, 扩增获得一段1.4 kb片段(图1), 表明诱饵质粒成功转入酵母。

3 AbA抗性筛选结果

AbA抗性测定结果显示, 转化菌株在含有100

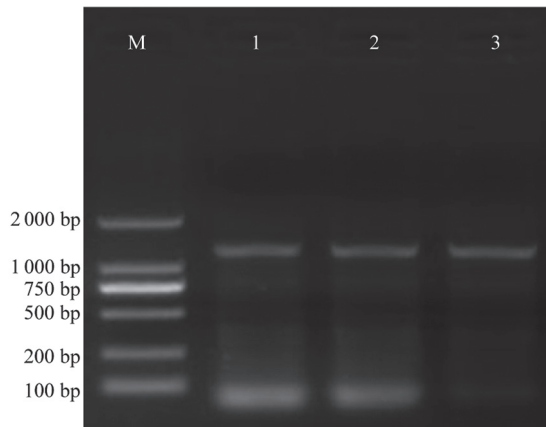


图1 Y1HGold酵母菌落的PCR鉴定

Fig.1 PCR detection of Y1HGold yeast colony

M: DL 2000 DNA marker; 1~3: PCR扩增产物。

$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA的SD/-Ura平板上生长良好,而在含有 $300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA的SD/-Ura平板上停止生长(图2),说明 $300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA即可用于酵母单杂交筛选。

4 酵母单杂交cDNA文库的构建与质量鉴定

由Trizol法提取的桃花芽总RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,总RNA的28S rRNA和18S rRNA条带清晰(图3-A),且28S亮度约为18S的2倍,说明总RNA质量较好,没有发生降解和污染,可用于构建cDNA文库。

将cDNA与线性化的pGADT7载体共转化酵母Y1HGold感受态细胞,10 μL 转化的酵母细胞稀释100倍后在LB培养基上长出200个克隆,库容量=

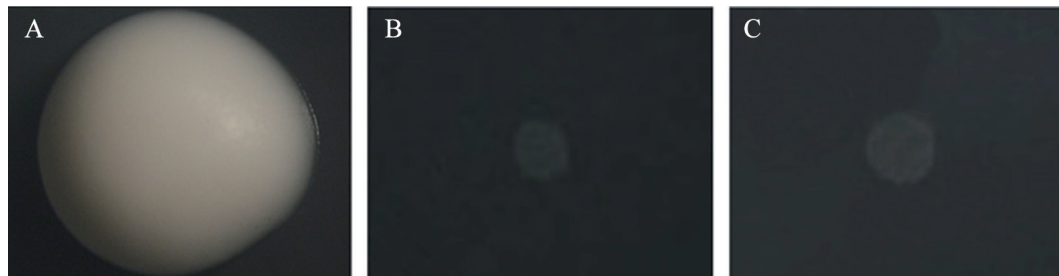


图2 Y1HGold (pAbAi-bait)的AbA抗性筛选

Fig.2 Resistance screening of Y1HGold (pAbAi-bait) with AbA

A: 含 $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA的SD/-Ura; B: 含 $300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA的SD/-Ura; C: 含 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA的SD/-Ura。

$200/10\times 100\times 1\ 000=2\times 10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。共计5 mL的转化后原始菌液,总库容量= $2\times 10^6\times 5=1\times 10^7\text{ CFU}$,大于 10^6 ,共转化后,挑取平板上的单克隆,经PCR扩增,电泳检测PCR产物大小,结果表明,插入片段主要分布于1 000~3 000 bp之间,呈明亮的弥散状条带(图3-B),说明酵母单杂交文库构建成功。

5 *PpABI5*启动子片段与桃cDNA文库的酵母单杂交筛选

酵母转化产物在含 $300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ AbA的SD/-Leu/-Ura培养基上培养3~5 d,挑取单克隆进行PCR扩增,获得PCR扩增产物大于500 bp的阳性克隆35个(图4)。对35个克隆PCR产物进行测序,将测序结果在NCBI中进行Blast比对分析,结果显示,阳性菌落编码的蛋白有2个为休眠相关的PpDAM3和PpDAM5转录因子,可能通过ABA途径调控休眠,其余大多为功能未知的蛋白。

6 *PpABI5*启动子片段与PpDAM3和PpDAM5的互作验证

对转录因子PpDAM3和PpDAM5与诱饵载体进行一对一酵母单杂交互作验证,结果显示,所有共转诱饵质粒和AD载体的Y1HGold菌株在二缺培养基上都长出了克隆,说明共转化成功;挑取SD/-Leu/-Ura培养基上的克隆至含有不同浓度AbA的SD/-Leu/-Ura培养基上,DAM3-AD/pAbAi-bait、DAM5-AD/pAbAi-bait和阳性对照克隆均可正常生长,而对照组克隆则不能生长,表明PpDAM3和PpDAM5蛋白与诱饵序列存在潜在的结合关系(图5)。

讨 论

ABA在植物的整个生活周期中起着关键作用。研究ABA响应途径中元件的作用机理是解析

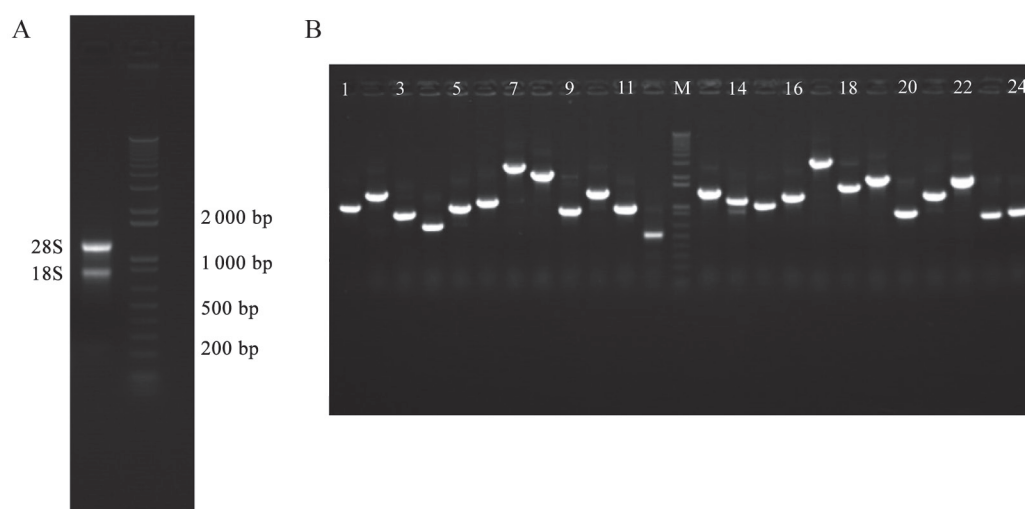


图3 总RNA样品(A)和构建的cDNA文库(B)的电泳检测
 Fig.3 Electrophoresis of total RNA sample (A) and constructed cDNA library (B)
 M: DL 12000 DNA marker; 1~24: PCR扩增产物。

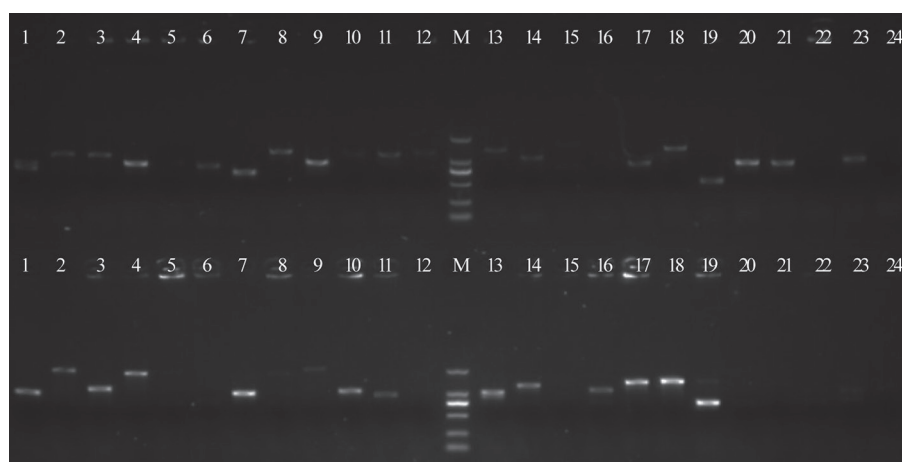


图4 cDNA文库插入片段的PCR扩增
 Fig.4 PCR amplification of cDNA library inserts
 M: DL 2000 DNA marker, 条带从上至下分别为2000、1000、750、500、200、100 bp; 1~24: PCR扩增产物。

ABA信号转导的基础。本研究中, 采用FullCoV技术构建桃树cDNA文库, 选取*PpABI5*启动子上的光信号作用元件进行串联重复后构建诱饵载体, 从桃树cDNA文库中筛选与*PpABI5*结合的上游转录因子, 结果表明, 从酵母转化产物中筛选获得转录因子PpDAM3、PpDAM5及其他功能未知的蛋白。

*Dormancy-associated MADS-box (DAM)*基因属于*MADS-box*基因家族的成员, 最早由Bielenberg等(2008)通过分子标记对EVG位点进行定位和基因表达情况对比分析获得, 并分离和命名了与休

眠相关的*DAM1*、*DAM2*、*DAM3*、*DAM4*、*DAM5*和*DAM6*基因。研究表明*MADS-box*基因主要作用是调控植物花器官的发育(李元元和王鲁等2010; 曾英等2001)。Li等(2009)对桃树生长周期内*PpDAM*基因表达变化的研究发现, *PpDAM3*在生长季节表达水平一直较高, 冬季开始表达量下降, 发芽时期表达量降至最低, 然后上升至较高水平, 推测*PpDAM3*的表达受低温调控, 随着低温积累量的增加而表达下调。Yamane等(2011)发现, *PpDAM5*与桃的内休眠有关, 在内休眠期间表达量上调, 休眠

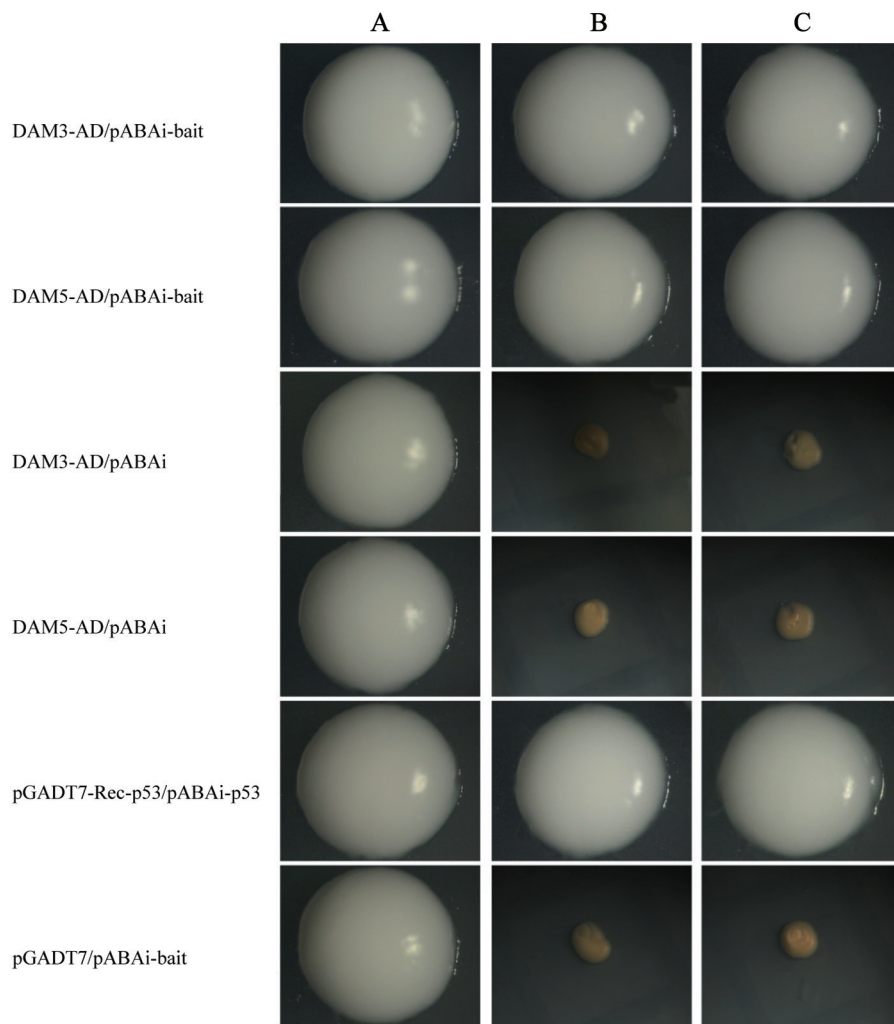


图5 酵母单杂交对诱饵载体与转录因子PpDAM3和PpDAM5结合的验证

Fig.5 Yeast one-hybrid verification of bait vector and transcription factors DAM3 and DAM5 interaction

A: SD/-Leu/-Ura培养基; B: 含300 ng·mL⁻¹ AbA的SD/-Leu/-Ura培养基; C: 含500 ng·mL⁻¹ AbA的SD/-Leu/-Ura培养基。

解除期间表达下调。而Jiménez等(2010)研究不同品种桃芽休眠过程发现, *PpDAM3*和*PpDAM5*均在冬季低温条件下表达下调, 且*PpDAM5*的表达水平与发芽率成反比。Leida等(2012)通过抑制性差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)方法鉴定也表明*PpDAM5*为与桃芽休眠解除相关的特异基因, *PpDAM5*负调控桃树的发芽, 且与需冷量有着很好的相关性(孙艳飞等2013)。我们通过进一步的酵母单杂交共转验证表明PpDAM3和PpDAM5蛋白确与*PpABI5*诱饵序列结合, 因此推测DAM类转录因子很可能调控*PpABI5*的转录, 下一步我们将深入研究桃树中PpDAM转录因子对*PpABI5*转录的调控作用, 并对筛选获得的其他功

能未知的蛋白进行进一步的功能鉴定, 以期完善*PpABI5*基因的功能解析, 为深入研究ABA信号转导通路奠定基础。

参考文献

- Bielenberg DG, Wang Y, Li ZG, Zhebentyayeva T, Fan SH, Reighard GL, Scorza R, Abbott AG (2008). Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics Genomes*, 4: 495–507
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2002). Regulation and role of the *Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol*, 129 (4): 1533–1543
- Chen H, Zhang JY, Neff MM, Hong SW, Zhang HY, Deng XW, Xiong LM (2008). Integration of light and abscisic acid signaling

- during seed germination and early seedling development. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 4495–4500
- Chung MS, Lee S, Min JH, Huang P, Ju HW, Kim CS (2016). Regulation of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane glucose-responsive regulator (*AtPGR*) expression by *A. thaliana* storekeeper-like transcription factor, *AtSTKL*, modulates glucose response in *Arabidopsis*. Plant Physiol Biochem, 104: 155–164
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. Plant Cell, 14 (Suppl): S15–S45
- Guo YQ, Liu J, Fu SP, Duan RJ, Li RM, Yao Y, Hu XW, Guo JC (2016). Constructing yeast one-hybrid library and screening the potential regulator of *MeCWINV6* in cassava. Mol Plant Breeding, 14 (10): 2777–2784 (in Chinese with English abstract) [郭育强, 刘姣, 符少萍, 段瑞军, 李瑞梅, 姚远, 胡新文, 郭建春(2016). *MeCWINV6*酵母单杂交文库构建及其调控基因筛选. 分子植物育种, 14 (10): 2777–2784]
- Jiménez, Reighard GL, Bielenberg DG (2010). Gene expression of *DAM5* and *DAM6* is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. Plant Mol Biol, 73: 157–167
- Kanno Y, Jikumaru Y, Hanada A, Nambara E, Abrams SR, Kamiya Y, Seo M (2010). Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: examination of the site of abscisic acid biosynthesis, abscisic acid transport and hormone interactions. Plant Cell Physiol, 51: 1988–2001
- Leida C, Josef R, Garcia-Brunton J, Rios G, Badenes ML (2012). Gene expression analysis of chilling requirements for flower bud break in peach. Plant Breeding, 131: 329–334
- Li YY, Wang L (2010). The molecular mechanism of MADS-box genes regulates floral formation and flowering in plant. Genomics Appl Biol, 29: 1122–1132 (in Chinese with English abstract) [李元元, 王鲁(2010). MADS-box基因控制植物成花的分子机理. 基因组学与应用生物学, 29: 1122–1132]
- Li Z, Reighard GL, Abbott AG, Bielenberg DG (2009). Dormancy-associated MADS genes from the *EVG* locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. J Exp Bot, 60: 3521–3530
- Lopez-Molina L, Chua NH (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 41 (5): 541–547
- McCarty DR (1995). Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. Plant Physiol Plant Mol Biol, 46: 71–93
- Sun MY, Zhou J, Tan QP, Fu XL, Chen XD, Li L, Gao DS (2016). Analysis of basic leucine zipper genes and their expression during bud dormancy in apple (*Malus × domestica*). Sci Agric Sin, 49 (7): 1325–345 (in Chinese with English abstract) [孙明岳, 周君, 谭秋平, 付喜玲, 陈修德, 李玲, 高东升(2016). 苹果bZIP转录因子家族生物信息学分析及其在休眠芽中的表达. 中国农业科学, 49 (7): 1325–1345]
- Tang WJ, Ji Q, Huang Y, Jiang Z, Bao M, Wang HY, Lin RC (2013). FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 and FAR-RED IMPAIRED RESPONSE1 transcription factors integrate light and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 163: 857–866
- Wang LR, Li ZX, Chang MH (2008). Research advance of dormancy physiology of deciduous fruit tree. J Anhui Agric Sci, 37 (7): 2657–2659 (in Chinese with English abstract) [王连荣, 李振侠, 常美花(2008). 落叶果树休眠生理研究进展. 安徽农业科学, 37 (7): 2657–2659]
- Xu DQ, Li JG, Gangappa SN, Chamari H, Lin F, Mats X, Jiang Y, Deng XW, Holm M (2014). Convergence of light and ABA signaling on the *ABI5* promoter. PLoS Genetics, 10 (2): e1004197
- Yamane H, Ooka T, Jotatsu H (2011). Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. J Exp Bot, 62 (10): 3481–3488
- Yu M, Xu H, Zhang H, Zhu Y (2016). Regulation of plant hormones on seed dormancy and germination. Plant Physiol J, 52 (5): 599–606 (in Chinese with English abstract) [于敏, 徐恒, 张华, 朱英(2016). 植物激素在种子休眠与萌发中的调控机制. 植物生理学报, 52 (5): 599–606]
- Zeng Y, Hu JY, Li ZJ (2001). MADS-Box genes in the evolution of flower development. Plant Physiol Commun, 37 (4): 281–287 (in Chinese) [曾英, 胡金勇, 李志坚(2001). 植物MADS盒基因与花器官的进化发育. 植物生理学通讯, 37 (4): 281–287]
- Zhao FY, Jiao CJ, Chen Q, Wang TS, Tian CF, Gao YM (2015). PKS5 kinase is involved in ABA response through phosphorylating *ABI5* in *Arabidopsis*. Plant Physiol J, 51 (10): 1719–1728 (in Chinese with English abstract) [赵菲, 焦成瑾, 陈荃, 王太木, 田春芳, 高雅梅(2015). 拟南芥PKS5激酶磷酸化*ABI5*参与植物ABA响应. 植物生理学报, 51 (10): 1719–1728]
- Zhong X, Duan QH, Li XM, Tang DY, Zhao XY, Liu XM (2016). Screening of transcription factors binding to the promoter of *AtGA20ox1*. Acta Laser Biol Sin, 25: 263–269 (in Chinese with English abstract) [钟曦, 段秋红, 李新梅, 唐冬英, 赵小英, 刘选明(2016). 与*AtGA20ox1*启动子结合的转录因子筛选分析. 激光生物学报, 25: 263–269]

Constructing yeast one-hybrid library and screening the potential regulator of *PpABI5* in peach (*Prunus persica*)

HUAN Lei, WANG Xu-Xu, CHEN Xiu-Miao, WEN Bin-Bin, TAN Qiu-Ping, CHEN Xiu-De, GAO Dong-Sheng, LI Ling*, FU Xi-Ling*

College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: Abscisic acid (ABA) plays an important role in plant growth and development. *ABI5* is a key ABA-responsive gene, so it is important to find the transcription factors that regulate the expression of *ABI5* to reveal the mechanism underlying ABA signaling. In this study, three copies of 3-AF1 binding site, Box I and Sp1 were linked into pAbAi vector to construct bait vector, meanwhile the one-hybrid cDNA library of peach (*Prunus persica*) was built. Then we used the cDNA and pGADT7-Rec vector to co-transform into the bait yeast strain to screen upstream transcription factors of the promoter region of *PpABI5* gene via homologous recombination. The estimated cDNA library storage capacity is almost 1×10^7 CFU and inserted PCR fragments sizes are about 1 500 bp. Several proteins interacting with bait vector are screened out by sequencing analysis and by Blast homology analysis, including PpDAM3, PpDAM5 and proteins of unknown function. Yeast one-hybrid further confirmed that PpDAM3 and PpDAM5 could bind to the promoter of *PpABI5*. These results indicate that PpDAM3 and PpDAM5 might regulate the transcription of *PpABI5* and provide a basis for further study of signaling pathway of ABA.

Key words: *ABI5*; peach; promoter; yeast one-hybrid; transcription factor

Received 2017-03-06 Accepted 2017-06-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31672137), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2014CM015).

*Corresponding authors (E-mail: lilingsdau@163.com; xilingfu@sdau.edu.cn).