

利用酵母双杂交系统筛选花生 AhMYB44 互作蛋白

刘永惠^{1,2}, 沈一¹, 沈悦¹, 陈志德¹

(¹江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014; ²农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉 430000)

摘要: 前期根据花生干旱转录组测序结果克隆了一个胁迫诱导表达基因 *AhMYB44* 的全长序列。为进一步研究基因的功能, 本研究利用酵母双杂交系统进行其互作蛋白的筛选。结果显示: 根据基因序列构建的诱饵载体 pGBKT7-AhMYB44 本身无毒性, 且无自激活活性; 经与花生干旱及高盐胁迫相关的 cDNA 文库杂交、筛选、鉴定出 16 个插入序列, 它们对应的同源蛋白功能涉及植物转录调控、生长发育、信号转导、生物及非生物胁迫响应等多个方面; 其中 46 号候选互作蛋白与非生物胁迫密切相关, 结构域分析属于钙依赖性磷脂结合蛋白(膜联蛋白, ANNs), 植物膜联蛋白已被证实参与多种胁迫响应过程。因此推测 *AhMYB44* 可能通过胞内钙信号调控花生胁迫响应过程。这也为今后深入开展 *AhMYB44* 的功能及作用机制研究提供了参考依据。

关键词: 花生; 酵母双杂交; MYB; 互作蛋白

Yeast Two-Hybrid Screening of the Proteins Interacting with AhMYB44 from Peanut

LIU Yong-hui^{1,2}, SHEN Yi¹, SHEN Yue¹, CHEN Zhi-de¹

(¹Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; ²Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430000)

Abstract: We previously cloned the full-length coding sequence of the gene *AhMYB44*, which showed a stress-induced expression from peanut drought transcriptome sequencing datasets. In order to investigate the function of *AhMYB44*, a yeast two-hybrid system was deployed for identifying its interacting proteins. The results showed that the bait vector pGBKT7-AhMYB44 was not toxic and showed no self-activation activity. Sixteen coding sequences were identified by screening of cDNA libraries which were constructed from a drought and high-salt stress of peanut. We further conducted an *in-silico* analysis of their homologous proteins, such as plant transcriptional regulation, growth and development, signal transduction, biotic and abiotic stress responses. Out of that, the candidate gene (No.46) was annotated with the abiotic stress, and encoded for a calcium-dependent phospholipid binding protein (ANNEXIN). Therefore, we speculated that *AhMYB44* maybe participate into regulation of peanut stress response process through intracellular calcium signal. This result might provide a reference for further research on the function and mechanism of *AhMYB44*.

Key words: peanut; yeast two-hybrid; MYB; interact proteins

花生是我国重要的经济和油料作物, 面积仅次于油菜, 单产水平较高, 总产居油料作物之首^[1]。目前

我国干旱、半干旱耕地约占总耕地面积的 53%^[2], 盐碱耕地约占总耕地面积的 20%^[3]。花生抗旱耐瘠,

收稿日期: 2019-10-29 修回日期: 2019-11-13 网络出版日期: 2019-12-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191029002>

第一作者研究方向为花生资源研究和遗传改良, E-mail: yonghui126@126.com

通信作者: 陈志德, 研究方向为花生遗传育种, E-mail: chen701865@aliyun.com

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设项目 (CARS-13); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (cx(18)2015); 农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室开放课题项目 (KF2019011)

Foundation project: Special Fund for Modern Agroindustry Technology Research System of China (CARS-13), Independent Innovation Fund of Agricultural Science and Technology of Jiangsu Province (cx(18)2015), Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R. China (KF2019011)

是发展旱作农业的理想作物,同时在利用盐碱地方面也具有特殊的地位^[4]。虽然花生耐旱性较强,但在其生长发育过程中同样存在关键的需水阶段,在这些阶段,水分的缺失会严重影响花生的产量和品质^[5-6]。因此开展花生耐逆境胁迫的分子机理研究,对改良和提高花生品种的抗逆性具有重要的指导意义。

MYB类转录因子作为植物中最大的转录因子家族之一,具有种类多和功能多样化的特点^[7]。其中R2R3-MYB蛋白是植物所特有的,也是研究最为普遍的^[8]。该家族的很多成员参与了众多的生物过程,如对植物的生长发育、器官形态建成、次生代谢和胁迫应答等都具有重要的调控作用^[9]。在对非生物胁迫响应方面,已报道的拟南芥*AtMYB44*基因,其表达量受冷害、盐害、干旱等胁迫诱导;在拟南芥中过表达后,转基因植株对ABA诱导的气孔闭合反应更敏感;同时ABA信号负调控因子蛋白磷酸酶2C基因的表达量降低;转基因植株耐盐能力增强^[10]。

目前关于花生中的R2R3-MYB基因的功能研究报道不多。本实验室前期开展了花生耐旱转录组测序^[11],根据测序结果克隆到一个受干旱胁迫诱导表达的花生R2R3-MYB基因的全长序列,经NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对分析,为*AtMYB44*的同源基因(序列号:LOC112720536),故命名为*AhMYB44*,并进一步开展该基因的表达及功能分析。本研究主要利用酵母双杂交系统进行*AhMYB44*互作蛋白筛选鉴定,其中所利用的cDNA文库为已经构建好的干旱及高盐胁迫诱导的花生cDNA文库^[12],该文库具有较高的质量,可用于花生互作蛋白的筛选。

1 材料与方法

1.1 试验材料

花生干旱及高盐胁迫下的酵母双杂交cDNA文库和携带目的基因*AhMYB44*的PMD19T-*AhMYB44*质粒由本实验室保存;大肠杆菌DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、酵母质粒提取试剂盒等购自OMEGA公司;SoSoo重组克隆试剂盒购自TsingKe公司;酵母双杂交试剂盒 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System(含酵母菌株、载体、培养基等),及限制性内切酶等购自Clontech公司。

1.2 诱饵载体的构建

诱饵载体的构建主要利用SoSoo重组克隆试剂盒(同源重组方法)。根据*AhMYB44*序列和

pGBKT7载体序列设计带酶切位点的特异性引物,其中上游引物带EcoRI酶切位点(5'-ATGGCCATG GAGGCCGAATTCATGGCCATGTCTAGAA-3'),下游引物带SalI酶切位点(5'-TGCGGCCGCTGC AGGTCGACTCACGAGTTGACTTTG-3');并以PMD19T-*AhMYB44*质粒为模板进行PCR扩增,胶回收目的片段;同时对pGBKT7载体进行EcoRI和SalI的双酶切,并胶回收线性化后的载体;参照试剂盒的操作方法,将目的片段和载体进行连接、转化、挑选单克隆并测序,测序正确的克隆进行质粒提取,即为诱饵载体pGBKT7-*AhMYB44*。

1.3 诱饵载体的自激活及毒性检测

利用pGBKT7-53+pGADT7-T作为阳性对照,pGBKT7空载体作为阴性对照,将对照与诱饵载体pGBKT7-*AhMYB44*分别转化酵母Y2HGold感受态细胞,酵母感受态的制备及转化方法参考Yeastmaker Yeast Transformation System 2操作手册。将转化液分别涂布在SD/-Trp、SD/-Trp-Leu缺失培养基上,30℃倒置培养2~4d后观察生长情况。以此确定诱饵载体是否对酵母菌株有毒性,及是否对报告基因存在自激活现象。

1.4 酵母cDNA文库筛选

参照Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System操作手册,采用Mating杂交法,在2L三角瓶中加入5mL含诱饵载体的Y2HGold菌液和1mLY187cDNA文库菌液,其中文库菌液用45mL的2 \times YPDA(含50 μ g/mL Kanamycin)溶液洗文库2次,30℃,30~50r/min,缓慢振荡培养20~24h,培养20h后,取少量酵母杂交菌在显微镜下(40 \times)可观察到部分菌株呈三叶草形,即为杂交成功。收集杂交液,重悬后涂布于添加了X- α -Gal的SD/-Trp-Leu-His-Ade(QDO/X- α -Gal)四缺培养基平板上(约可涂布50块平板),30℃倒置培养3~5d后观察生长情况。

1.5 互作蛋白的分离鉴定

挑取上述QDO四缺培养基中长出的单克隆,利用酵母质粒提取试剂盒提取诱饵与互作蛋白表达质粒,利用pGADT7通用载体引物对酵母质粒进行PCR鉴定,符合要求的进一步转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,并涂布于LB固体培养基上(含50 μ g/mL Ampicillin),37℃过夜培养,挑选单克隆,提取质粒,即为分离出的插入cDNA片段。

1.6 互作蛋白的测序及比对分析

将插入片段进行测序,根据测序结果去除重复

或结构异常的克隆;将筛选后的插入片段在 NCBI 数据库中进行 Blastn 比对分析,找到与插入片段同源性最高的花生基因序列;利用该基因序列在拟南芥数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中进行 Blastx 比对分析,找到其在拟南芥中同源性最高的蛋白;汇总拟南芥相应蛋白的 GO (gene ontology) 生物过程分析结果,并以此作为参考依据,对插入片段测序结果进行功能分析。

1.7 互作蛋白的回复验证

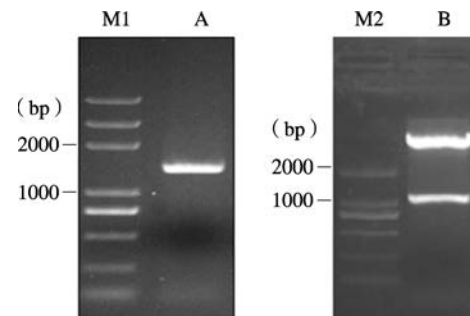
回复验证的阳性对照为 pGBKT7-53+pGADT7-T, 阴性对照为 pGBKT7-lam+pGADT7 及 pGBKT7-AhMYB44+pGADT7。利用含有 pGBKT7 空载体或 pGBKT7-AhMYB44 诱饵质粒的 Y2HGOLD 酵母转化子作为受体菌制备酵母感受态,将测序后的插入片段质粒分别转化其中,转化液涂布在 SD/-Trp-Leu、QDO/X- α -Gal 缺失培养基上,30 °C 倒置培养 3~5 d 后观察生长情况,以此对阳性克隆作进一步筛选和验证。

2 结果与分析

2.1 含 AhMYB44 基因的诱饵载体获得

前期我们根据花生转录组测序结果,从花生品种丰花 1 号中克隆到 AhMYB44 基因,片段大小为 1319 bp (图 1A),开放阅读框 (ORF) 为 951 bp;编码蛋白含有 316 个氨基酸,其蛋白相对分子量及等电点分别为 34.37 kD 和 9.57。在此基础上,利用 SoSoo 重组克隆试剂盒,通过同源重组的方法将 AhMYB44 序列连接到 pGBKT7 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α

感受态,阳性克隆测序结果显示目的基因与载体融合,且重组载体读码框正确,无移码突变,同时酶切验证结果 (图 1B) 也证实已成功构建诱饵质粒载体。



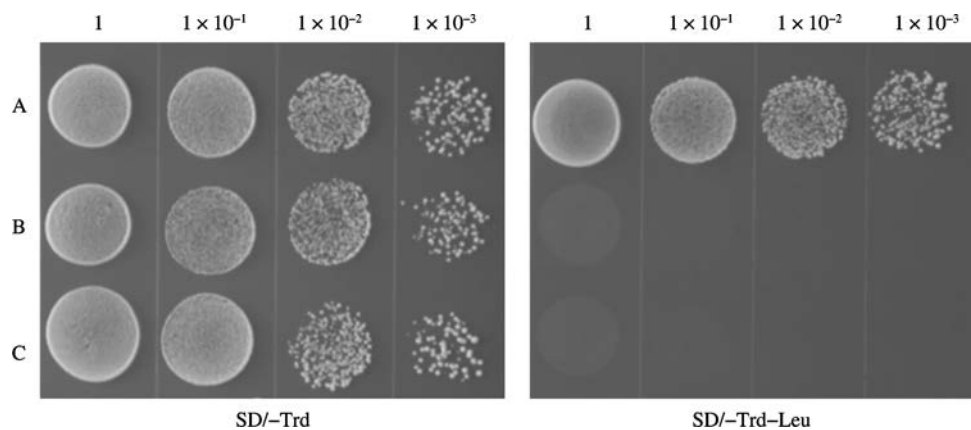
M1: DL5000 marker; M2: DL2000 marker; A: *AhMYB44* 基因的 PCR 扩增; B: 诱饵载体 pGBKT7-AhMYB44 的双酶切 (*EcoRI* and *SalI*) 验证

M1: DL5000 marker, M2: DL2000 marker, A: PCR amplification of *AhMYB44*, B: Verification of bait vector pGBKT7-AhMYB44 by double enzyme digestion (*EcoRI* and *SalI*)

图 1 含 *AhMYB44* 基因的酵母诱饵载体构建
Fig.1 Construction of yeast bait vector containing *AhMYB44*

2.2 诱饵载体毒性及自激活分析

将诱饵质粒和阳性、阴性对照分别转入酵母 Y2HGOLD 感受态中,转化液涂布在 SD/-Trp 及 SD/-Trp-Leu 培养基上。结果显示,在 SD/-Trp 培养基上,三者都能够正常长出白色单菌落,且菌落直径大于 2 mm,生长速度也无明显差异;但在 SD/-Trp-Leu 双缺失培养基上,仅阳性对照可以长出白色菌落,而阴性对照及转化诱饵质粒的都未长出。为了更直观地反映结果,如图 2 所示,我们收集三者 SD/-Trp 培养基



A: 阳性对照 (pGBKT7-53+pGADT7-T) 的生长情况; B: 阴性对照 (pGBKT7) 的生长情况; C: 诱饵载体 pGBKT7-AhMYB44 的生长情况; 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} 为酵母菌液的原液及不同稀释倍数,下同

A: Growth condition of positive control (pGBKT7-53+pGADT7-T), B: Growth condition of negative control (pGBKT7), C: Growth condition of bait vector pGBKT7-AhMYB44. 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} were the original solution and different dilution multiples of yeast solution, the same as below

图 2 诱饵载体毒性及自激活分析

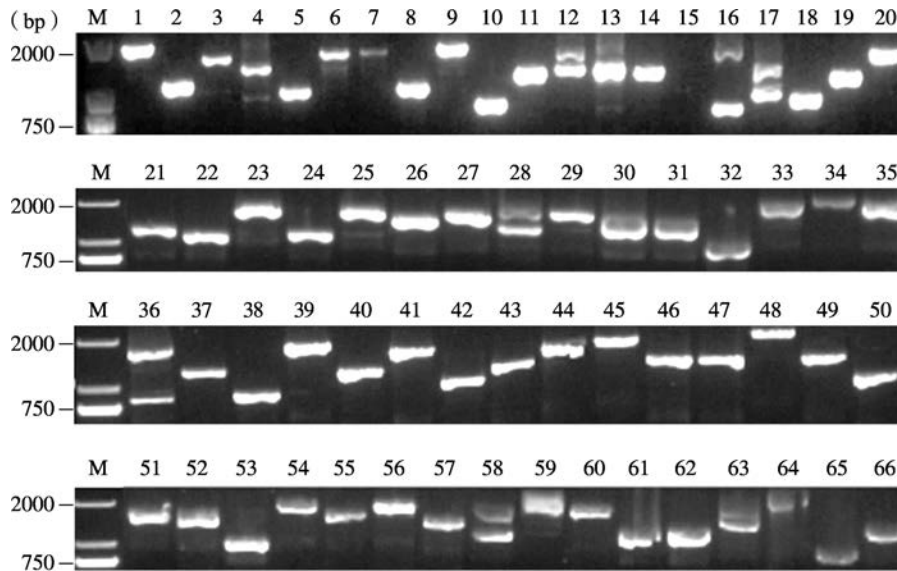
Fig.2 Analysis of toxicity and self-activation of bait vector

上的克隆,将原液及分别稀释 10 倍、100 倍、1000 倍的菌液,接种到同一块 SD/-Trp 或 SD/-Trp-Leu 培养基平板上进行菌落生长情况比较。由此可见诱饵载体无毒性且无自激活能力。

2.3 互作蛋白的筛选与分离

将诱饵质粒与 cDNA 文库混合进行杂交转化后,涂布于 QDO/X- α -Gal 培养基上,共获得 66 个酵母单克隆。PCR 鉴定结果(图 3)显示除了 15

号克隆质粒未扩增出片段,其余所有质粒的扩增片段都在 500 bp 以上(空载体片段约为 450 bp);有 9 个克隆质粒(4、12、13、16、17、28、36、58、63)扩增出双片段,表明这些质粒中可能至少包含 2 个 cDNA 文库插入片段。本实验仅挑选扩增片段单一的酵母质粒,导入大肠杆菌 DH5 α 进行扩大培养,分离插入片段,并分别进行测序分析。



M: DL2000 marker; 1~66: 各酵母质粒扩增片段

M: DL2000 marker, 1-66: Amplification fragments of yeast plasmids

图 3 筛选到的互作酵母质粒 PCR 鉴定结果

Fig.3 Colony-PCR identification of AhMYB44-interacting yeast plasmids

2.4 互作蛋白的测序及比对分析

根据测序分析结果,去除重复序列,最终获得了 16 个 cDNA 插入片段,分别进行生物信息学分析。如表 1 所示,表中列出了每个插入序列对应的 NCBI 花生数据库中相应的基因 ID,以及拟南芥数据库中相应同源性最高的蛋白及其 GO 生物过程分析结果。从结果来看,这些基因功能涉及植物的转录调控、生长发育、信号转导、生物及非生物胁迫响应等多个方面,其中 46 号测序序列对应的基因 ID(LOC112736751),其拟南芥同源蛋白(AT5G12380)与非生物胁迫响应密切相关(对冷、热、盐害及干旱胁迫等都有响应),且该蛋白位于细胞核中,分子功能分析显示有钙离子结合域或钙依赖性磷脂结合域,即为植物膜联蛋白。

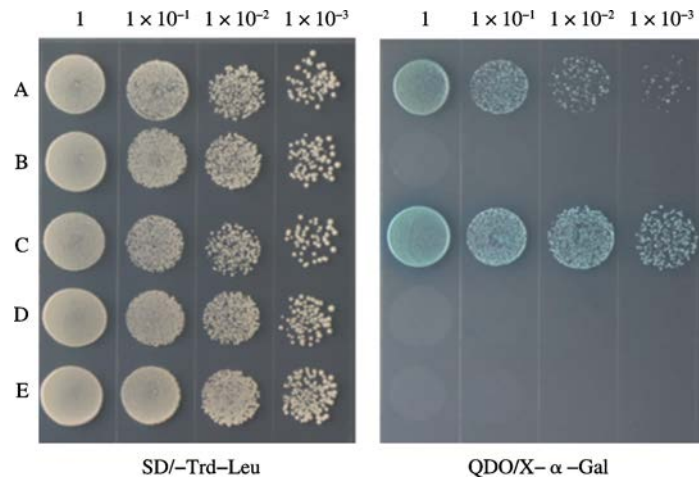
2.5 互作蛋白的回复验证

将上面筛选出的 16 个 cDNA 插入序列分别转化含有 pGBKT7 或 pGBKT7-AhMYB44 转化子的酵母感受态中,进行点对点回复验证。结果显示所有转化液在 SD/-Trp-Leu 培养基上均能正常生长,而在 QDO/X- α -Gal 培养基上的生长情况存在差异。其中有 5 个序列(1、6、20、30、64),无论是转化空载体还是诱饵载体,都能在 QDO/X- α -Gal 培养基上正常生长且呈蓝色,推断其本身可能具有自激活活性,因而无法确认是否与我们的诱饵蛋白之间存在真实的互作。此外作为重点分析的 46 号候选序列,回复验证结果见图 4,在 QDO/X- α -Gal 培养基上仅转化阳性对照和 pGBKT7 空载体+46 号序列的可以正常生长且呈蓝色,阴性对照及转化空载体的都未见菌斑。

表 1 酵母双杂交阳性菌斑插入 cDNA 序列分析结果

Table 1 Annotation of cDNA cloning sequences

编号 No.	NCBI 登录号 Gene ID	拟南芥同源基因 <i>Arabidopsis</i> homolog locus	参与的生物过程分析 GO biological process
1	LOC112710322	AT3G47610	1. 正转录调控 positive regulation of transcription; 2. DNA 模板 DNA-templated
2	LOC112744834	AT5G13110	1. 葡萄糖代谢过程 glucose metabolic process; 2. 戊糖磷酸盐分流 pentose-phosphate shunt; 3. 氧化特性 oxidative branch
3	LOC112805764	AT2G39050	1. 细菌防御反应 defense response to bacterium; 2. 气孔关闭 stomatal closure
6	LOC112771213	AT1G52870	未知功能 uncharacterized protein
9	LOC112767200	AT1G29340	1. 真菌防御反应 defense response to fungus; 2. 不相容互作 incompatible interaction; 3. 植物型超敏反应 plant-type hypersensitive response; 4. 蛋白泛素化 protein ubiquitination
20	LOC112747460	AT2G36490	1. DNA 去甲基化 DNA demethylation; 2. DNA 修复 DNA repair; 3. 碱基切除修复 base-excision repair; 4. 染色质沉默 chromatin silencing; 5. 真菌防御反应 defense response to fungus; 6. 染色质沉默的负调控 negative regulation of chromatin silencing
23	LOC112755041	AT5G38850	1. 信号转导 signal transduction
26	LOC112801888	AT5G63680	1. 胰岛素刺激的细胞反应 cellular response to insulin stimulus; 2. 糖酵解过程 glycolytic process; 3. 响应镉离子 response to cadmium ion
29	LOC112790156	AT5G18570	1. 叶绿体组织 chloroplast organization; 2. 胚胎发育 embryo development; 3. 胚胎发育止于种子休眠 embryo development ending in seed dormancy; 4. rRNA 加工 rRNA processing; 5. 响应光刺激 response to light stimulus; 6. 类囊体膜组织 thylakoid membrane organization
30	LOC112771726	AT3G12930	1. 负调控核糖体的生物合成 negative regulation of ribosome biogenesis; 2. 翻译负调控 negative regulation of translation
44	LOC112728837	AT1G32100	1. 木质素生物合成 lignan biosynthetic process; 2. 氧化还原过程 oxidation-reduction process
45	LOC112748004	AT1G32500	1. 胚胎发育止于种子休眠 embryo development ending in seed dormancy; 2. 铁硫集群组件 iron-sulfur cluster assembly; 3. 类囊体膜组织 thylakoid membrane organization
46	LOC112736751	AT5G12380	1. 响应冷害 response to cold; 2. 响应热害 response to heat; 3. 响应盐害 response to salt stress; 4. 响应干旱 response to water deprivation
53	LOC112766709	AT1G75900	1. 脂质分解代谢过程 lipid catabolic process
62	LOC112734165	AT1G14870	1. 氧化应激反应 response to oxidative stress
64	LOC112790423	AT5G55390	1. 真菌防御反应 defense response to fungus; 2. 正调控花发育 positive regulation of flower development; 3. 信号转导 signal transduction; 4. 植物无性繁殖阶段 vegetative to reproductive phase transition of meristem



A: pGBKT7-AhMYB44+46 号序列; B: pGBKT7 空载体 +46 号序列; C: 阳性对照 pGBKT7-53+pGADT7-T;
D: 阴性对照 pGBKT7-lam+pGADT7; E: 阴性对照 pGBKT7-MYB1+pGADT7
A: pGBKT7-AhMYB44 and No.46, B: pGBKT7 and No.46, C: positive control (pGBKT7-53+pGADT7-T),
D: negative control (pGBKT7-lam+pGADT7), E: negative control (pGBKT7-MYB1+pGADT7)

图 4 AhMYB44 与 46 号候选互作蛋白验证

Fig.4 Verification of AhMYB44 interacting with No.46

3 讨论

蛋白质在生物体机制中是必不可少的,生命活动的每时每刻都存在着蛋白质间的相互作用^[13]。目前有关蛋白质互作的方法有很多,包括酵母双杂交、免疫共沉淀 (Co-IP)、双分子荧光互补 (BiFC)、pull-down 等^[14]。其中酵母双杂交系统具有简单易行、筛选效率高等优点,成为筛选互作蛋白最常用的方法^[15],但其最大的缺点是假阳性比较高,需要通过回复验证及结合其他方法来进一步排除。正如本研究利用酵母双杂交系统筛选出 66 个单克隆,经测序分析获得了 16 个 cDNA 插入片段,但回复验证显示有 5 个序列即使是转化空载体酵母感受态,也能激活报告基因的表达及半乳糖苷酶活性。此外,酵母双杂交系统仅反映了诱饵蛋白与筛选出的序列片段之间的互作,而非完整的互作蛋白,因此可能还需要通过双分子荧光互补等实验进一步明确两者在细胞体内的定位和相互作用情况。

在筛选到的所有候选互作蛋白中,46 号候选互作蛋白是与非生物胁迫最密切相关的,根据其结构域特点推断为膜联蛋白 (ANNs)。膜联蛋白是一类钙依赖性磷脂结合蛋白,广泛存在于除酵母外的真核生物细胞中^[16]。植物中的 ANN 蛋白含量非常高,约占植物总蛋白量的 0.1%,在植物生长发育及响应逆境胁迫过程中起重要作用,目前已在水稻^[17]、大豆^[18]、棉花^[19]、番茄^[20]等作物中被证实。46 号候选互作蛋白对应的拟南芥同源蛋白为

AT5G12380 (又称 AtANN8),在拟南芥中过表达 *AtANN8* 基因可以提高植株的耐盐、耐旱性^[21];并且其同源蛋白 *AtANN1* 和 *AtANN4* 被认为在光的影响下可以相互作用共同调节拟南芥的耐盐、耐旱性^[22]。花生中也有膜联蛋白基因的相关报道,但主要是关于基因的挖掘和表达分析^[23-24],具体的功能及作用机制还不清楚。

目前关于 MYB 与 ANNs 之间关联的报道不多,廖婵璐^[25]利用拟南芥钙信号异常突变体系统筛选出 *myb30* 突变体,通过对该突变体的研究发现拟南芥 *AtMYB30* 通过影响 ANNs 介导的特异胞内钙信号的产生,调控了植物的氧化胁迫响应和热胁迫响应过程,表明 MYB 与 ANNs 之间确实存在相互作用。因此在本研究的基础上,进一步开展花生 *AhMYB44* 与候选互作蛋白 (LOC112736751, ANN8) 的关联研究,对深入了解花生 *AhMYB44* 的基因功能及其参与的胁迫响应机制有重要意义。

参考文献

- [1] 张铭. 不同花生品种对干旱胁迫与复水的响应及其机理. 泰安: 山东农业大学, 2017
Zhang M. Study on response of different peanut cultivars to drought stress and rewatering and its mechanisms. Taian: Shandong Agricultural University, 2017
- [2] 张智猛, 万书波, 戴良香, 宋文武, 陈静, 石运庆. 不同花生品种对干旱胁迫的响应. 中国生态农业学报, 2011, 19(3): 631-638
Zhang Z M, Wan S B, Dai L X, Song W W, Chen J, Shi Y Q. Response of different peanut varieties to drought stress. Chinese

- Journal of Eco-Agriculture, 2011, 19(3): 631-638
- [3] 王纶, 王星玉, 温琪汾, 武变娥, 曹利萍. 中国黍稷种质资源耐盐性鉴定. 植物遗传资源学报, 2007, 8(4): 426-429
Wang L, Wang X Y, Wen Q F, Wu B E, Cao L P. Identification of salt tolerance in chinese proso millet germplasm. Journal of Plant Genetic Resources, 2007, 8(4): 426-429
- [4] 刘永惠, 沈一, 陈志德, 王州飞, 颜伟. 不同花生品种(系)萌发期耐盐性的鉴定与评价. 中国油料作物学报, 2012, 34(2): 168-173
Liu Y H, Shen Y, Chen Z D, Wang Z F, Yan W. Identification of salt tolerance in peanut varieties /lines at the germination stage. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(2): 168-173
- [5] Jongrunklang N, Toomsan B, Vorasoot N, Jogloy S, Boote K J, Hoogenboom G, Patanotai A. Drought tolerance mechanisms for yield responses to pre-flowering drought stress of peanut genotypes with different drought tolerant levels. Field Crops Research, 2013, 144: 34-42
- [6] 孙东雷, 卞能飞, 陈志德, 邢兴华, 徐泽俊, 齐玉军, 王晓军, 王幸. 花生萌发期耐盐性综合评价及耐盐种质筛选. 植物遗传资源学报, 2017, 18(6): 1079-1087
Sun D L, Bian N F, Chen Z D, Xing X H, Xu Z J, Qi Y J, Wang X J, Wang X. Comprehensive evaluation of salt tolerance and screening for salt tolerant accessions of peanut (*Arachis hypogaea* L.) at germination stage. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(6): 1079-1087
- [7] Prouse M B, Campbell M M. The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819: 67-77
- [8] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science, 2010, 15(10): 573-581
- [9] Butt H I, Yang Z, Gong Q, Chen E Y, Wang X Q, Zhao G, Ge X Y, Zhang X Y, Li F G. *GaMYB85*, an R2R3 MYB gene, in transgenic *Arabidopsis* plays an important role in drought tolerance. BMC Plant Biology, 2017, 17: 142
- [10] Jung C, Seo J S, Han S W, Koo Y J, Kim C H, Song S I, Nahm B H, Choi Y D, Cheong J J. Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2008, 146: 623-635
- [11] Shen Y, E Z G, Zhang X J, Liu Y H, Chen Z D. Screening and transcriptome analysis of water deficiency tolerant germplasm in peanut (*Arachis hypogaea*). Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(5): 1-9
- [12] 刘永惠, 沈一, 陈志德. 花生干旱及高盐胁迫下的酵母双杂交文库构建. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 40-43
Liu Y H, Shen Y, Chen Z D. Construction and identification of a yeast two-hybrid cDNA library of peanut under drought and high salinity stress. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2016, 32(1): 40-43
- [13] 黄大辉, 张增艳, 辛志勇. 利用酵母双杂交系统研究植物与病毒蛋白相互作用的进展. 植物遗传资源学报, 2006, 7(4): 477-483
Huang D H, Zhang Z Y, Xin Z Y. Advances of the interaction between proteins of plant and virus using yeast two hybrid method. Journal of Plant Genetic Resources, 2006, 7(4): 477-483
- [14] 盛慧, 陈姗姗, 艾聪聪, 冯锐, 张修国. 利用酵母双杂交技术筛选卵菌效应因子互作蛋白概述. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2019, 50(3): 357-360
Sheng H, Chen S S, Ai C C, Feng R, Zhang X G. A review of interaction proteins of oomycete effectors screened by yeast two hybrid system. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition, 2019, 50(3): 357-360
- [15] Braun P, Aubourg S, Leene J V, Jaeger G D, Lurin C. Plant protein interactomes. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 161-187
- [16] Gerke V, Moss S E. Annexins: from structure to function. Physiological Reviews, 2002, 82: 331-371
- [17] Li X F, Zhang Q, Yang X, Han J B, Zhu Z G. *OsANN3*, a calcium-dependent lipid binding annexin is a positive regulator of ABA-dependent stress tolerance in rice. Plant Science, 2019, 284: 212-220
- [18] 王希, 李勇, 朱延明, 柏锡, 才华, 纪巍. 野生大豆胁迫应答膜联蛋白基因的克隆及胁迫耐性分析. 作物学报, 2010, 36(10): 1666-1673
Wang X, Li Y, Zhu Y M, Bai X, Cai H, Ji W. Cloning and tolerance analysis of *GsANN* gene related to response on stress in *Glycine soja*. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(10): 1666-1673
- [19] Liu W, Zhang B, He W, Wang Z, Li G, Liu J. Characterization of *in vivo* phosphorylation modification of differentially accumulated proteins in cotton fiber-initiation process. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2016, 48: 756-761
- [20] Ijaz R, Ejaz J, Gao S H, Liu T F, Intiaz M, Ye Z B, Wang T T. Overexpression of annexin gene *AnnSp2*, enhances drought and salt tolerance through modulation of ABA synthesis and scavenging ROS in tomato. Scientific Reports, 2017, 7: 12087
- [21] Yadav D, Ahmed I, Shukla P, Boyidi P, Kirti B P. Overexpression of *Arabidopsis AnnAt8* alleviates abiotic stress in transgenic *Arabidopsis* and tobacco. Plants, 2016, 5: 18
- [22] Huh S M, Noh E K, Kim H G, Jeon B W, Bae K, Hu H C, Kwak J M, Park O K. *Arabidopsis* annexins *AnnAt1* and *AnnAt4* interact with each other and regulate drought and salt stress responses. Plant and Cell Physiology, 2010, 51: 1499-1514
- [23] 丁红, 戴良香, 秦斐斐, 慈敦伟, 宋文武, 张智猛. 花生膜联蛋白基因 *AhAnn1* 的克隆与表达分析. 华北农学报, 2017, 32(3): 21-26
Ding H, Dai L X, Qin F F, Ci D W, Song W W, Zhang Z M. Cloning and expression of *AhAnn1* gene in peanut. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2017, 32(3): 21-26
- [24] 王慧敏, 李新国, 万书波, 张智猛, 丁红, 李国卫, 高文伟, 彭振英. 花生膜联蛋白基因家族成员的结构和表达分析. 作物学报, 2019, 45(3): 390-400
Wang H M, Li X G, Wan S B, Zhang Z M, Ding H, Li G W, Gao W W, Peng Z Y. Structure and expression analysis of the members of peanut annexin gene family. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(3): 390-400
- [25] 廖婵璐. 拟南芥转录因子 MYB30 通过胞内钙信号调控胁迫响应的机制研究. 北京: 中国农业大学, 2017
Liao C C. Study of transcription factor MYB30 in regulating stress responses through cytosolic calcium signaling in *Arabidopsis*. Beijing: China Agricultural University, 2017