甘薯 IbGAPCp1 在干旱和盐胁迫下的 表达及上游调控因子筛选

曹艳东1,白楠楠1,罗 状2,郑亚婷2,赵彩良2,唐锐敏1,武小平3,

贾峥嵘4,吴宇浩5,陈 伟3,贺立恒2,贾小云1

(¹山西农业大学生命科学学院/山西省特用作物遗传和代谢工程研究中心,太谷030801;²山西农业大学农学院/山西省特用作物遗传和 代谢工程研究中心,太谷030801;³山西农业大学玉米研究所,忻州034000;⁴山西农业大学高粱研究所,晋中030600;

5山西农业大学棉花研究所,运城044000)

摘要:质体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPCp,plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)在植物生长发育、能量代谢和 逆境响应中起重要作用。本研究以栗子香为材料,成功克隆了*IbGAPCp1*基因的开放阅读框(ORF)序列。亚细胞定位研究表 明,*IbGAPCp1*编码的蛋白质定位于叶绿体中。定量PCR分析显示,*IbGAPCp1*在甘薯不同组织中均有表达,其中叶片中的表 达量最高;随着块根的发育,*IbGAPCp1*基因的表达逐渐升高,在105 d时达到最高水平。为进一步探索*IbGAPCp1*基因的调控 机制,克隆了长为1940 bp的*IbGAPCp1*基因启动子序列 Pro-*IbGAPCp1。*顺式作用元件预测结果表明,Pro-*IbGAPCp1*中含有 多个与光响应、激素响应及分生组织表达等相关的元件。干旱和盐胁迫处理下*IbGAPCp1*基因的表达动态结果显示, *IbGAPCp1*基因对干旱和盐胁迫均有一定的响应。进一步通过构建诱饵载体并利用酵母单杂交技术筛选出了35个与 *IbGAPCp1*启动子区相互作用的上游调控因子,其中包括乙烯不敏感蛋白2、CCCH型锌指蛋白47及MYB44等。这些因子与 植物的生长发育、次生代谢、能量产生及多种逆境响应相关。本研究为深入探讨*IbGAPCp1*在甘薯非生物胁迫中的功能及作 用机制提供了理论基础。

关键词:甘薯;质体甘油醛-3-磷酸脱氢酶;酵母单杂交;非生物胁迫

Expression Profiles of Sweetpotato *IbGAPCp1* under Drought and Salt Stress Conditions and Identification of Its Upstream Regulatory Factors

CAO Yandong¹, BAI Nannan¹, LUO Zhuang², ZHENG Yating², ZHAO Cailiang², TANG Ruimin¹, WU Xiaoping³, JIA Zhengrong⁴, WU Yuhao⁵, CHEN Wei³, HE Liheng², JIA Xiaoyun¹

(¹College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University/Shanxi Engineering Research Center for Genetics and Metabolism of Special Crops, Taigu 030801; ²College of Agriculture, Shanxi Agricultural University/Shanxi Engineering Research Center for Genetics and Metabolism of Special Crops, Taigu 030801; ³Maize Research Institute, Shanxi Agricultural University, Xinzhou 034000;

energy and metabolism of special Crops, Taigu 050001, Mulze Research Institute, Shanxi Agriculturul Oniversity, Anzhou 0540

⁴Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030600;⁵Institute of Cotton Research,

Shanxi Agricultural University, Yuncheng 044000)

收稿日期: 2024-11-13 网络出版日期: 2025-02-12

URL: https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241113002

第一作者研究方向为植物重要功能基因的挖掘与应用,E-mail: kkgxb592260@163.com

通信作者:贾小云,研究方向为薯类作物遗传育种,E-mail: jiaxiaoyun@sxau.edu.cn

基金项目:山西省研究生科研创新项目(2023KY321);中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2024B007);山西农业大学科技创新提升工程(CXGC2023051,CXGC2023074);山西省回国留学人员科研资助项目(2021-074);山西省基础研究计划(202403021212098);山西农业大学杂粮研究院项目(Z120220502,ZLZD2404)

Foundation projects: The Graduate Research and Innovation Projects of Shanxi Province (2023KY321); The Central Guidance for Local Science and Technology Development Fund Project (YDZJSX2024B007); Science and Technology Innovation Enhancement Programs of Shanxi Agricultural University (CXGC2023051, CXGC2023074); Research Funding Project for Returned Overseas Students in Shanxi Province (2021-074); Shanxi Province Basic Research Program (202403021212098); Projects of the Millet Research Institute of Shanxi Agricultural University (Z120220502, ZLZD2404)

Abstract: Plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPCp) plays an important role in plant growth and development, energy metabolism, and stress response. In this study, we cloned the open reading frame (ORF) sequence of the *lbGAPCp1* gene from sweetpotato variety 'Lizixiang'. Subcellular localization studies showed that the lbGAPCp1 protein is targeted to the chloroplasts. Quantitative real-time PCR analysis showed that *lbGAPCp1* is ubiquitously expressed across sweetpotato tissues, with the highest transcripts detected in leaves. The expression of *lbGAPCp1* gene increased gradually with the development of sweetpotato tuberous root and reaching its peak at 105 days. In order to further explore the regulatory mechanism of *lbGAPCp1* gene, we cloned a 1940 bp sequence of the *lbGAPCp1* gene promoter, designated as Pro-*lbGAPCp1*. The prediction of cis-acting elements showed that Pro-*lbGAPCp1* contains several elements related to photoresponse, hormone response and meristem expression. Expression profiling under drought and salt stress showed that *lbGAPCp1* is responsive to both drought and salt stresses. Furthermore, yeast one-hybrid screening identified 35 upstream transcriptional regulators interacting with the promoter region of *lbGAPCp1*, including ethylene-insensitive protein 2, zinc finger CCCH domain-containing protein 47 and MYB44, factors that are known to modulate plant growth and development, secondary metabolism, energy production, and stress responses. This study provides a theoretical basis for future elucidating the functional role of *lbGAPCp1* in sweetpotato abiotic stress tolerance.

Key words: sweetpotato; plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; yeast one-hybrid; abiotic stress

甘薯[Ipomoea batatas (L.) Lam.]又名地瓜、山 芋等,为旋花科双子叶块根作物^[1],是世界上广泛种 植的薯类作物之一^[2],对维护国家粮食安全具有重 要作用。甘薯作为一种集粮食、蔬菜、工业原料和 生物能源于一体的多功能作物^[3-5],因富含蛋白质、 膳食纤维、碳水化合物等多种人体必需的营养成分 及β-胡萝卜素、花青素和酚酸等抗氧化物质而备受 青睐^[6-7]。我国盐碱和干旱土地面积广泛,边际土地 利用率低。甘薯具有高产和抗逆性强等特点,在逆 境条件下仍可维持相对稳定的生长和产量。因此, 甘薯重要抗逆基因的进一步挖掘及甘薯抗逆新品 种的培育,可有效地利用这些盐碱和干旱土地,缓 解耕地压力。

糖酵解是生物体内能量代谢的重要途径,其主要功能是通过分解葡萄糖产生ATP、NADH和丙酮酸,同时为合成代谢提供必要的前体物质。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)作为糖酵解途径中的关键酶,在真核和原核生物中均广泛存在,对DNA修复、转录调控、能量产生、糖和氨基酸平衡、根系生长及ABA信号转导等有重要的影响。高等植物体内,GAPDH根据磷酸化状态的不同,可以分为磷酸化和非磷酸化两大类型:非磷酸化的GAPDH(GAPN,non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)定位于胞质中,可以催化甘油醛-3-磷酸转化为3-磷酸甘油酸。除此之外,GAPN还参与基因表达调节、免疫应答反应和氧

化还原反应等多种生物功能[8]。磷酸化的 GAPDH根据其在细胞中的定位可分为细胞质 GAPDH (GAPC, cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、质体 GAPDH (GAPCp, plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)和叶绿 体中的 GADPH(GAPA/B, chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)^[9]。GAPDH在大豆中存 在16个家族成员,蛋白结构均包含两个高度保守 的结构域:负责结合NAD(P)⁺的N端Gp dh N结构 域(PF00044)和具有催化活性的C端Gp dh C结构 域(PF02800)^[10]。部分GAPDH还包括CP12结构域 (PF02672)以进一步增强其功能。其他作物中有关 GAPDH家族基因的研究基本上都是结合亚细胞定 位分为4个亚家族。例如,在中国春小麦中共鉴定 到22个TaGAPDH基因,这些基因可划分为4个不 同的亚家族,亚家族I对应于TaGAPA/B基因,亚家 族 II 对应于 TaGAPCp 基因, 亚家族 III 对应于 TaGAPC基因,亚家族IV对应于TaGAPN基因[11];杨 树中的13个 PtGAPDH家族成员分为 PtGAPA/B、 *PtGAPC、PtGAPCp和PtGAPN*四组^[12]。

定位于细胞质中的GAPC负责催化甘油醛-3-磷酸 形成1,3-二磷酸甘油酸这一可逆反应。研究表明, GAPC在植物对生物及非生物胁迫响应中扮演着关 键角色。例如,拟南芥AtGAPC在热胁迫下会进入 细胞核并与转录因子NF-YC10结合增强拟南芥的 耐热性^[13];木薯 MeGAPCs 基因沉默后抗病性增 加^[14];马铃薯 StGAPCI 过表达促进了硝酸盐转运蛋 白表达,改善了植株对氮的吸收与利用^[15];玉米中 厌氧胁迫诱导了 GAPC3 和 GAPC4 的表达^[16];水稻 OsGAPC3 过表达提高了植株的抗盐性^[17];甘蓝 BoGAPC基因的启动子区包含许多逆境和激素反应 相关的元件^[18]。

存在于叶绿体中的GAPA/B负责将1,3-二磷酸 甘油酸还原为甘油醛-3-磷酸。其中,GAPB起源于 GAPA基因复制,与GAPA相比,GAPB具有一个特定 的C末端延伸,但两者均参与陆地植物的卡尔文 循环途径^[19]。定位于质体中的GAPCp主要负责 催化甘油醛-3-磷酸生成1,3-二磷酸甘油酸。 GAPCp 在植物生长发育及能量产生中同样扮演 着重要角色。中国春小麦叶片中,干旱和盐胁迫 处理一定程度上诱导了 TaGAPCp1 基因的表 达^[20]。异养细胞质体中,GAPCp为合成代谢途径 提供3-磷酸甘油酸,促进种子中脂肪酸的生物合 成^[21]。GAPCp还通过丝氨酸生物合成的磷酸化途 径 (PPSB, phosphorylated pathway of serine biosynthesis)成为碳和氮代谢的重要连接器。在拟 南芥中,GAPCp缺乏会导致ABA不敏感、ABA信号 转导途径受损及雄性不育等,尤其在gapcp1gapcp2 双突变体中,拟南芥花粉表现出收缩和坍塌的表型 且在体外培养时无法发芽[22-23];此外,在根尖中, GAPCp的表达是初生根生长所必需的^[24]。

以上相关研究表明定位于细胞质中的GAPC和 定位于质体中的GAPCp对植物干旱和盐等非生物 胁迫具有一定的响应。然而,在甘薯中还尚未见到 关于GAPDH家族基因鉴定和功能方面的相关报 道。本研究以甘薯品种栗子香为材料,成功克隆了 *IbGAPCp1*基因的ORF序列,并分析了该基因在不 同发育时期、不同组织以及干旱和盐胁迫处理下的 表达模式。同时,克隆了*IbGAPCp1*基因的启动子 序列,通过顺式作用元件预测,发现该启动子中包 含多个与光响应、激素响应及分生组织表达等密切 相关的元件。为进一步探究*IbGAPCp1*基因的调控 机制,构建了酵母单杂交诱饵载体并从甘薯块根 cDNA酵母文库中筛选与*IbGAPCp1*基因的调控 用的调控因子。为进一步研究*IbGAPCp1*基因在甘 薯非生物胁迫中的作用机制提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用材料为淡黄心甘薯品种栗子香,2023年 种植于山西农业大学试验田。在扦插后的第60d、 75 d、90 d、105 d分别对植株的块根、茎段(距顶 部约 15 cm 的茎段)和顶部第 3 片展开叶进行取 样,每个样品包括 3 个生物学重复。叶片和茎段 用酒精棉擦拭,块根用水冲洗干净后切成小块, 立即用液氮速冻,于-80℃冰箱保存。诱饵载体 pAbAi由山东青岛欧易生物科技有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA与RNA的提取及cDNA的合成分别 采用CTAB法和快速通用植物RNA提取试剂盒3.0 (北京华越洋生物科技有限公司)提取基因组DNA 和RNA,通过核酸蛋白检测仪Nano Drop 2000C (Thermo Scientific)检测RNA的质量后,使用 MonScript[™] RTIII All-in-One Mix with dsDNase 反转 录试剂盒(武汉莫纳生物科技有限公司)合成cDNA。

1.2.2 IbGAPCp1 基因克隆及亚细胞定位载体的构 建 以栗子香的cDNA为模板,利用基因特异性引 物 IbGAPCp1-F-Xba I 和 IbGAPCp1-R-Sal I 扩增获 得 IbGAPCp1 的 ORF 序列, 扩增体系与程序参照 2× SuperTaq PCR StarMix(Dye)试剂盒(北京康润诚业 生物科技有限公司),使用AxyPrep DNA凝胶回收 试剂盒[康宁生命科学(吴江)有限公司]对扩增产 物进行纯化回收,将回收产物与pMD19-T载体连接 后转化至DH5α感受态细胞中,挑取阳性单克隆提 取质粒,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 测序验证。以测序验证成功的阳性质粒 pMD19-T-IbGAPCp1为模板进行扩增,将目的基因片段回收 产物和亚细胞定位载体pCAMBIA1301-35S-GFP分 别使用SalI和XbaI进行双酶切,将双酶切后回收 的基因片段和载体片段通过T4 DNA Ligase于16℃ 过夜连接后转化至DH5α感受态细胞。挑取阳性单 克隆提取质粒,同时用Sal I和Xba I进行双酶切验证 亚细胞定位载体 pCAMBIA1301-35S-IbGAPCp1-GFP是否构建成功。

1.2.3 IbGAPCp1蛋白的亚细胞定位将已经构 建好的亚细胞定位载体pCAMBIA1301-35S-*IbGAPCp1*-GFP和空载pCAMBIA1301-35S-GFP利 用液氮冻融法分别转化至农杆菌GV3101,挑单 克隆划线进行菌落PCR鉴定,PCR扩增体系与 程序参照2×SuperTaqPCR StarMix(Dye)试剂盒 (北京康润诚业生物科技有限公司),将PCR鉴定 为阳性的菌落接种于25 mL的LB液体培养基中,在 28℃,200 r/min下过夜培养至OD₆₀₀为0.6。于4℃, 12000 r/min离心10 min,弃上清,用含有100 µmol/L 乙酰丁香酮(AS, acetosyringone)、10 mmol/L 2-吗啉 乙磺酸(MES, 2-morpholinoethanesulphonic acid)和 10 mmol/L MgSO₄的等体积悬浮液重悬菌体,室温 孵育3h后注射生长期约为30d(14h光照/10h黑 暗,25℃)的本氏烟草叶片,暗培养12h,光照培养 24h后,置于Leica STELLARIS 5激光共聚焦显微 镜(德国徕卡)下观察IbGAPCp1蛋白的定位情况。

1.2.4 IbGAPCp1 基因在甘薯不同生长时期和组织 部位的表达分析 在甘薯生长周期中,60 d进入结 薯期:75d时地上部分和地下块根同时生长进入薯 蔓并长期;90d时地下块根迅速生长进入薯块膨大 期;到了105d,甘薯的生长接近成熟,块根的淀粉积 累达到高峰。为了研究薯块不同发育阶段及甘薯 不同组织部位 IbGAPCp1 基因的表达情况,使用 NCBI 的 Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih. gov/tools/primer-blast/)设计qRT-PCR引物(表1),分 别提取生长期为60 d、75 d、90 d和105 d的栗子香 块根及生长期为90d的根、茎、叶的RNA,反转录为 cDNA后,以IbActin(AY905538)为内参基因,通过 qRT-PCR分析 IbGAPCp1 在这些样本中的相对表达 量,qRT-PCR 扩增体系与程序参照 MonScript™ ChemoHS Specificity Plus qPCR Mix(None ROX)试 剂盒(武汉莫纳生物科技有限公司)。每个样品设 置3个生物学重复,采用2-44Ct法计算相对表达量。

1.2.5 *IbGAPCp1*基因启动子克隆及顺式作用元件 分析 甘薯*IbGAPCp1*启动子序列于甘薯参考基因 组数据库(https://sweetpotato.uga.edu/)中获得。以 栗子香的DNA为模板, Pro-*IbGAPCp1*-F和Pro-*IbGAPCp1*-R(表1)为引物进行PCR扩增, PCR扩增 体系与程序参照2×SuperTaq PCR StarMix(Dye)试 剂盒(北京康润诚业生物科技有限公司),产物纯化 回收后与克隆载体pMD19-T连接,连接产物转化至 DH5α感受态细胞,挑取阳性单克隆提质粒,测序比对 后利用Plant CARE(https://bioinformatics.psb.ugent. be/webtools/plantcare/html/)在线网站对*IbGAPCp1*启动 子的顺式作用元件进行分析。

1.2.6 干旱和盐胁迫下*IbGAPCp1*基因的表达模式 分析 选取大田中生长旺盛的栗子香甘薯植株,剪 取长约20 cm的插条,分别置于含有10% PEG-6000 的1/2 Hoagland 营养液及含有200 mmol/L NaC1的 1/2 Hoagland 营养液中进行胁迫培养,每个处理18个 插条,于0h、1h、3h、6h、12h、24h时分别从3个不同 插条的顶部第3片展开叶进行取样,液氮速冻于 -80℃保存。以*IbActin*为内参基因,通过qRT-PCR分 析基因的表达模式,qRT-PCR扩增体系与程序参照

Fable 1 Sequences of primers and their roles							
引物名称	引物序列(5'-3')	用途					
Primer name	Primer sequence (5'-3')	Application					
IbGAPCp1-Xba I-F	GC <u>TCTAGA</u> ATGGGGGTTCTCTTCTCCCT	ORF序列扩增					
IbGAPCp1-Sal I-R	GC <u>GTCGAC</u> GTTGGTGGCAGTAGCA						
IbGAPCp1-Sal I-F	GCGTCGACATGGGGGTTCTCTTCTCCCT	lbGAPCp1 亚细胞定位载体构建					
IbGAPCp1-Xba I-R	GC <u>TCTAGA</u> GTTGGTGGCAGTAGCA						
Pro-IbGAPCp1-F	GGCAATGGACCATTTATGGT	Pro-IbGAPCp1 启动子序列扩增					
Pro-IbGAPCp1-R	AAGCAGTATGACCTCCTCCG						
Pro-IbGAPCp1-1-Hind III-F	CC <u>AAGCTT</u> CCCATGCACGTGTTTTCATA	Pro-IbGAPCp1-1段启动子序列扩增					
Pro-IbGAPCp1-1-Xho I-R	CC <u>CTCGAG</u> CCGGTATGAAATAGTGAAAG						
qRT-IbActin -F	GACTACCATGTTCCCCGGTA	qRT-PCR分析					
qRT-IbActin -R	TTGTATGCCACGAGCATCTT						
qRT-IbGAPCp1-F	ACCACCAATTGCCTTGCTCC						
qRT-IbGAPCp1-R	TTTGTGTGGGCTGTGGTAGCG						
pAbAi-F	GCTCCTTCCTTCGTTCTTCCTTC	诱饵重组质粒酵母菌落PCR鉴定					
pAbAi-R	CGGCTACATGGCAGTTTGGAG						
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGGC	酵母阳性质粒鉴定					
3'AD-R	AGATGGTGCACGATGCACAG						

下划线代表酶切位点

表1 所用引物序列和用途

Underscores represent cleavage sites

MonAmp[™] ChemoHS Specificity Plus qPCR Mix (None ROX)试剂盒(武汉莫纳生物科技有限公司), 并采用2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量。

1.2.7 pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 诱饵载体的构建、 转化及自激活检测 为了更加精确的筛选出甘薯 *IbGAPCp1*基因上游的调控因子,选取包含脱落酸、 乙烯响应及光响应相关元件的*IbGAPCp1*基因启动 子序列(-1106~-1391 bp 区域,命名为 Pro-*IbGAPCp1*-1),根据 Pro-*IbGAPCp1*-1的序列设计克 隆引物(表1),以克隆得到的启动子为模板扩增目 的片段,产物经纯化回收后与pMD19-T载体连接转 化DH5α感受态,挑取阳性单克隆提取质粒。将阳 性质粒和 pAbAi 酵母诱饵载体分别用 *Hind* III和 *Xho* I 进行双酶切,过柱回收后过夜连接,将连接产 物转化至DH5α感受态细胞中,提取阳性质粒并进 行双酶切验证诱饵载体 pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 是 否构建成功。

利用限制性内切酶*Bst*B I将pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 重组质粒线性化,体系为:6 μ L pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 质粒,2 μ L 10×*Bst*B I buffer,1 μ L *Bst*B I,11 μ L ddH₂O;程序为:37℃,30 min。将线性化质粒转化 到Y1H酵母菌株中,涂布于SD/-Ura培养基,30℃倒 置培养3~5 d后,经PCR鉴定诱饵重组质粒是否成 功整合至Y1H酵母基因组中,PCR扩增体系与程序 参照2×SuperTaq PCR StarMix(Dye)试剂盒(北京康 润诚业生物科技有限公司)。

挑取鉴定后正确的阳性单克隆,接种于SD/-Ura 液体培养基中于30℃振荡培养,利用0.9% NaCl溶 液重悬菌体并调整至OD₆₀₀为0.002,涂布于含不同 浓度的金担子素A(AbA,Aureobasidin A:0 ng/mL、 100 ng/mL、150 ng/mL和200 ng/mL)的SD/-Ura的 固体培养基上,30℃培养3~5 d后观察酵母菌落的 生长状况,选择最佳的AbA浓度用于后期酵母单杂 交筛库实验。

1.2.8 酵母单杂交文库筛选及阳性克隆的鉴定参照 欧易生物的酵母文库单杂交筛选说明^[25]将次级文库质 粒转化到制备好的诱饵酵母感受态 pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1中,取菌液分别涂布于 SD/-Leu/AbA*的 固体培养基上,30℃下培养 3~5 d,观察菌落的生长 情况。

挑取SD/-Leu/AbA*培养基上生长的单克隆,在 相同的培养基上进行二次筛选,挑取单克隆分别接 种于3mL的SD/-Leu液体培养基中,30℃摇床培养 24~36h后进行破壁处理,PCR后通过琼脂糖凝胶电 泳检测,提取阳性酵母质粒,将其转化至DH5α感受态细胞,挑取阳性单克隆提取质粒,以T7-F和3'AD-R(表1)为引物进行PCR鉴定,PCR扩增体系与程序参照2×SuperTaqPCRStarMix(Dye)试剂盒(北京康润减业生物科技有限公司)。选择有条带的质粒测序,测序结果通过NCBI在线工具上的BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)进行序列比对分析和功能注释。

2 结果与分析

2.1 IbGAPCp1基因克隆及亚细胞定位载体的构建

以栗子香的 cDNA 为模板,利用特异性引物克 隆获得长度为1281 bp的*IbGAPCp1* 基因 ORF 序列, 与预期目的片段大小相符(图1A)。重组质粒 pCAMBIA1301-35S-*IbGAPCp1*-GFP的菌落 PCR 条 带单一且大小为1281 bp(图1B)。*Sal* I和 *Xba* I双 酶切重组质粒后产生一条与空载大小相近的条带 及一条1281 bp大小的条带(图1C),表明*IbGAPCp1* 亚细胞定位载体构建成功。

2.2 IbGAPCp1蛋白的定位

利用蛋白序列亚细胞定位在线工具WoLF PSORT(https://wolfpsort.hgc.jp/)预测*lbGAPCp1*编码的蛋白定位于叶绿体。为验证这一预测结果,将 pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP 重组质粒及 pCAMBIA1301-35S-GFP 空载体转化至农杆菌 GV3101后注射烟草叶片。在640 nm波长的激发光下 观察发现,注射35S::GFP质粒(pCAMBIA1301-35S-GFP空载体质粒)后整个细胞均呈现绿色荧光信号,而 注射35S::*lbGAPCp1*::GFP质粒(pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP重组质粒)的烟草叶片中,绿色 荧光信号仅在叶绿体中观察到,且与叶绿体自发的 红色荧光重合(图2)。这一结果表明*lbGAPCp1*编码 的蛋白质定位于叶绿体中,与预测结果一致。

2.3 *IbGAPCp1*在甘薯不同组织部位和生长时期的 表达特性

通过 qRT-PCR 分析了 *IbGAPCp1* 在生长期为 90 d的甘薯不同组织部位(根、茎、叶)及块根不同生 长时期(60 d、75 d、90 d、105 d)中的表达情况。结 果显示,*IbGAPCp1* 在甘薯的不同组织中均有表达, 且叶片中的表达量最高,约为根部的2.63 倍,茎部 表达量次之,约为根部的1.2倍(图3A)。此外,随着 甘薯块根的生长发育,*IbGAPCp1* 的表达量逐渐升 高,在105 d时达到峰值(图3B)。



A:*lbGAPCp1*基因的ORF扩增,1~3:*lbGAPCp1*基因扩增产物;B:pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP重组质粒菌落PCR鉴定,1:阴性对照无菌水,2~8:菌落PCR产物;C:pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP重组质粒双酶切验证,1:重组质粒pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP,2~ 4:双酶切后的重组质粒pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP,5:*lbGAPCp1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*-BFP,5:*lbGAPCP1*

A: ORF amplification of *lbGAPCp1* gene, 1-3: Amplified products of *lbGAPCp1* gene; B: pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP recombinant plasmid colony PCR identification, 1: Negative control sterile water, 2-8: Colony PCR products; C: Double enzyme digestion verification of the pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP recombinant plasmid, 1: Recombinant plasmid pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP, 2-4: Recombinant plasmid pCAMBIA1301-35S-*lbGAPCp1*-GFP after double enzyme digestion, 5: Amplified products of *lbGAPCp1* gene



图 1 IbGAPCp1基因克隆及亚细胞定位载体的构建 Fig. 1 Isolation of IbGAPCp1 gene and construction of subcellular localization vector

图 2 IbGAPCp1蛋白亚细胞定位分析 Fig. 2 Subcellular localization analysis of IbGAPCp1 protein

2.4 IbGAPCp1基因在干旱和盐胁迫下的表达模式

对甘薯植株进行干旱和盐胁迫处理,利用 qRT-PCR 检测 *IbGAPCp1* 基因在干旱和盐胁迫下 的表达情况。结果显示,含有 10% PEG-6000 和 200 mmol/L NaCl 的干旱和盐胁迫均会诱导 *IbGAPCp1* 基因的表达(图4)。干旱胁迫下,随着 胁迫时间的增加,*IbGAPCp1* 基因的表达量呈现 先上升后下降再上升的趋势,24 h时达到最高, 约为0 h的9.5倍;盐胁迫条件下,随着胁迫时间的 增加,*IbGAPCp1* 基因的表达量呈现先上升后下降 的趋势,于6 h时达到峰值,约为0 h的7.8倍。这 一结果表明*IbGAPCp1*基因对干旱和盐胁迫均有一定的响应。

2.5 IbGAPCp1基因启动子克隆及序列分析

以甘薯栗子香的DNA为模板,成功克隆得到了 大小为1940 bp的*IbGAPCp1*基因启动子序列。使 用在线网站Plant CARE对甘薯*IbGAPCp1*启动子顺 式作用元件进行分析。结果显示,*IbGAPCp1*启动 子序列中除含有基本顺式作用元件TATA-box、 CAAT-box和ATTATA-box外,还含有6类光响应相 关元件G-box、GT1-motif、AE-box、Box4、TCT-motif 和GATA-motif;4类激素响应相关元件,如乙烯响应 元件 ERE、茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif、脱 落酸响应元件 ABRE3a 和 ABRE;1类与分生组织表 达相关的 CAT-box 元件;1类应激响应元件 STRE; 其他元件包括参与创伤响应、厌氧诱导所必需的 调节元件、各类结合位点及 Myc 识别和结合元 件(表2)。



A:*IbGAPCp1*在生长期为90d的甘薯不同组织中的表达分析;B:*IbGAPCp1*在甘薯块根不同发育时期中的表达分析; 差异显著性以不同小写字母标记(P<0.05);下同

A: Expression analysis of *lbGAPCp1* in different tissues of sweetpotato at 90 days of growth; B: Expression analysis of *lbGAPCp1* in sweetpotato tuberous root at different developmental stages; Significance of differences marked with different lowercase letters (*P*<0.05); The same as below **图3** *lbGAPCp1*在甘薯不同组织部位及不同生长时期的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of IbGAPCp1 in different tissue sites and at different growth stages of sweetpotato





表2	Ib	GAI	PCp	1后	动	子	序列中	中的顺	页式 作	用元件分析	
	•									ANGING 1	

Table 2	Analysis of	cis-acting	elements	of IbGAP	Cp1	promoter	sequence
---------	-------------	------------	----------	----------	-----	----------	----------

元件	序列	数量	功能
Element	Sequence	Number	Function
G-box	CACGTG	2	参与光响应的顺式作用元件
G-box	CACGTC	1	参与光响应的顺式作用元件
G-box	TACGTG	1	参与光响应的顺式作用元件
GT1-motif	GGTTAAT	1	光响应元件
AE-box	AGAAACTT	1	光响应模块的一部分
Box 4	ATTAAT	2	参与光响应的保守DNA模块的一部分
TCT-motif	TCTTAC	1	光响应元件的一部分
GATA-motif	GATAGGA	1	光响应元件的一部分

表2(续)

元件	序列	数量	功能
Element	Sequence	Number	Function
ERE	ATTTCATA	1	乙烯响应元件
ERE	ATTTTAAA	1	乙烯响应元件
TGACG-motif	TGACG	2	参与茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件
ABRE3a	TACGTG	1	参与脱落酸响应的顺式作用元件
ABRE	CACGTG	1	参与脱落酸响应的顺式作用元件
ABRE	ACGTG	2	参与脱落酸响应的顺式作用元件
ABRE	TACGGTC	1	参与脱落酸响应的顺式作用元件
CAT-box	GCCACT	1	与分生组织表达有关的顺式作用元件
STRE	AGGGG	2	应激响应顺式作用元件
As-1	TGACG	2	TGA结合位点
WRE3	CCACCT	2	伤害响应
W-box	TTGACC	1	WRKY 结合位点
WUN-motif	AAATTACT	1	创伤诱导响应元件
ARE	AAACCA	3	厌氧诱导必需的顺式作用元件
МҮС	CATTTG	1	MYC转录因子结合位点
Мус	TCTCTTA	2	Myc 识别和结合元件

2.6 IbGAPCp1基因启动子诱饵载体的构建

以克隆得到的启动子序列为模板扩增 Pro-*IbGAPCp1-1*片段,并通过琼脂糖凝胶电泳检测得到 一条长为286 bp大小的条带,测序比对结果显示相 似度为 100%。进一步将克隆得到的 Pro-*IbGAPCp1-1*和诱饵载体 pAbAi分别进行双酶切回 收后过夜连接,并转化至DH5α感受态细胞,菌落 PCR条带单一旦大小为286 bp(图5A)。将得到的 阳性重组诱饵质粒经*Hind* III和*Xho*I双酶切验证 后,得到与预期相同大小的目的条带(图5B),表明 诱饵载体pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1构建成功。

4



A:pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1菌落PCR鉴定,1~9:Pro-*IbGAPCp1*-1-*Hind*III-F和Pro-*IbGAPCp1*-1-*Xho*I-R为引物的扩增产物, 10:阴性对照无菌水;B:pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1重组质粒双酶切验证,1:重组质粒pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1,2~3: 双酶切后的重组质粒pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1,4:Pro-*IbGAPCp1*-1的PCR扩增产物

A: pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 colony PCR identification, 1-9: The amplification products obtained using Pro-*IbGAPCp1*-1-*Hind* III-F and Pro-*IbGAPCp1*-1-*Xho* I-R as primers, 10: Negative control sterile water; B: Double enzyme digestion verification of the pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 recombinant plasmid, 1: Recombinant plasmid pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1, 2-3: Recombinant plasmid pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 after double enzyme digestion, 4: Pro-*IbGAPCp1*-1 PCR amplification product

图5 pAbAi-Pro-IbGAPCp1-1诱饵载体的构建

Fig. 5 Cloning of the pAbAi-Pro-IbGAPCp1-1 bait vector

2.7 pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 诱饵载体的自激活 检测

将 pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 诱饵重组质粒转化 至 Y1H 酵母菌株后,选择1个菌落 PCR 鉴定为阳性 的菌液(图 6A),分别涂布到含有不同浓度 AbA 的 SD/-Ura培养基上。结果显示,pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 在 SD/-Ura/AbA(150 ng/mL)的培养基上只生长出 一个菌落,而在 SD/-Ura/AbA(200 ng/mL)的培养基 上则完全不生长(图 6B),表明 200 ng/mL浓度的 AbA 能够抑制 pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1的自激活活 性,可作为后续酵母单杂交文库筛选试验的 AbA 浓度。



A:pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 酵母菌落 PCR 鉴定,1~6:pAbAi-F 和pAbAi-R 为引物的扩增产物,7:阴性对照无菌水; B:pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1诱饵载体自激活检测,使用图 A 中鉴定得到的菌株2进行试验 A: pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 yeast colony PCR identification, 1-6: pAbAi-F and pAbAi-R are amplified products of primers, 7: Negative control

sterile water; B: Self-activation detection of the pAbAi-Pro-*IbGAPCp1*-1 bait vector, strain 2 identified in figure A was used for the test **图6 pAbAi-Pro-***IbGAPCp1***-1** 阳性诱饵菌株的自激活检测

Fig. 6 Self-activation detection of pAbAi-Pro-IbGAPCp1-1 positive bait strains

2.8 酵母单杂交文库筛选

以Y1H[pAbAi-Pro-*lbGAPCp1*-1]为诱饵菌株, 在甘薯块根cDNA酵母次级文库质粒中筛选与之互 作的结合蛋白。通过在SD/-Leu/AbA(200 ng/mL) 的培养基上初筛和复筛后,共获得了50个阳性克 隆。以通用引物T7-F和3'AD-R进行PCR扩增后, 部分结果如图7所示,扩增产物大小均介于500~ 2000 bp之间,选取扩增条带明亮的阳性质粒送至生 工生物工程(上海)股份有限公司测序。



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

1-46: PCR fragments of yeast positive plasmid; -: Negative control sterile water 图7 阳性质粒 PCR 鉴定 Fig. 7 PCR identification of plasmids with inserts

2.9 阳性克隆序列分析和功能注释

将测序所得到的序列通过NCBI在线网站上的BLAST进行比对,去掉重复、未表征及未比对上的序列后,最终得到了35个可能与Pro-*IbGAPCp1*-1启动子区域结合的上游调控因子(表3)。功能注释与分析结果显示,这些上游调控因子包括:甘薯块根中主要的贮藏蛋白(如M16861.1及M16883.1)、参与蛋白质合成的核糖体蛋白(如XM_031251527.1、

表3 Pro-IbGAPCp1-1互作蛋白分析

XM_031269564.1 及 XM_031245851.1)、与植物次 生代谢和花青素合成相关的黄烷酮-3-羟化酶 (AB023790.1)、在转录调控和DNA修复中发挥功能 的组蛋白(XM_031271466.1)、参与各种非生物胁迫 且影响植物生长发育的蔗糖合酶2和MYB44等。这 些结果为进一步揭示*IbGAPCp1*基因的调控网络和 机制提供了线索。

Table 3	Analysis of proteins interacting with Pro-IbGAPCp1-1								
编号	蛋白名称	蛋白编号	功能注释						
Number	Protein name	Protein ID	Function annotations						
1	贮藏蛋白A	M16861.1	甘薯块根中的主要贮藏蛋白						
2	贮藏蛋白B	M16883.1	甘薯块根中的主要贮藏蛋白						
3	贮藏蛋白A前体	DQ195776.1	加工后形成成熟的功能性蛋白						
4	组蛋白H4	XM_031271466.1	在转录调控、DNA修复、DNA复制和染色体稳定性中发挥作用						
5	40S核糖体蛋白S13	XM_031251527.1	参与核糖体组装和蛋白质合成						
6	RNA结合蛋白 pno1	XM_031259394.1	参与核糖体生物合成						
7	RNA依赖性RNA聚合酶1	XM_031266735.1	对植物病毒起至关重要的防御作用						
8	真核生物翻译起始因子1A	XM_031270345.1	在真核生物翻译起始过程中起关键作用						
9	40S核糖体蛋白S12	XM_031269564.1	参与蛋白质合成						
10	60S核糖体蛋白L21-2	XM_031245851.1	参与蛋白质合成						
11	蛋白翻译因子SUI1同源物2	XM_031263649.1	参与蛋白质合成						
12	赖氨酸tRNA连接酶	XM_031270931.1	将赖氨酸(Lys)连接到相应的tRNA分子上,为蛋白质合成提供原料						
13	NADH脱氢酶[泛醌]1β亚复合物亚基9	XM_019331359.1	参与电子传递,维持能量代谢						
14	伴侣蛋白 dnaJ11	XM_031263975.1	参与蛋白质折叠和装配						
15	β-香树脂醇28-单加氧酶	XM_031266341.1	参与三萜类化合物的生物合成						
16	DNAJ蛋白同源物	XM_031252192.1	参与蛋白质稳态调控、植物对环境胁迫的响应						
17	磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚糖酸醛缩酶2	XM_031272576.1	参与糖代谢途径						
18	SRC1蛋白	XM_031272391.1	参与炎症反应和应激调控						
19	CTP合酶	XM_031239064.1	在核苷酸代谢、细胞增殖及免疫反应中发挥作用						
20	Remorin蛋白	XM_031255071.1	在植物生长发育、信号转导和胁迫应答方面起作用						
21	FCS-Like 锌指蛋白1	XM_031268069.1	在植物发育、衰老、应激缓解和糖信号传导方面发挥作用						
22	ADP-核糖基化因子2	XM_031244691.1	参与植物生长发育和激素信号传导						
23	类受体蛋白激酶FERONIA	XM_031270242.1	在植物生长发育、非生物和生物胁迫反应中发挥作用						
24	膜联蛋白RJ4	XM_031257564.1	可能是一种具有钙依赖性的磷脂结合蛋白						
25	3-异丙基苹果酸脱氢酶	XM_031241111.1	参与亮氨酸生物合成和花粉发育;促进植株开花和生长						
26	1型金属硫蛋白	AF116845.1	在金属离子稳态和信号传导方面发挥重要作用						
27	泛素结合酶 E2 28	XM_019314443.1	参与泛素化修饰和信号传导						
28	黄烷酮-3-羟化酶	AB023790.1	参与植物次生代谢、生长发育和逆境胁迫响应						
29	乙烯不敏感蛋白2	XM_031257049.1	乙烯信号转导途径中的核心正调节因子,参与信号转导、 转录调控 对环境刺激做出响应						

	衣3 (续)							
编号	蛋白名称	蛋白编号	功能注释					
Number	Protein name	Protein ID	Function annotations					
30	CCCH型锌指蛋白47	XM_031238411.1	参与植物的生长发育和逆境响应					
31	F-box蛋白pp2-a12	XM_031269773.1	参与植物对逆境胁迫的响应					
32	扩展蛋白B3	XM_031248668.1	参与植物生长发育和逆境胁迫响应					
33	蔗糖合酶2	XM_031257639.1	参与植物生长发育及淀粉合成					
34	细胞壁/液泡果糖甘酶1抑制剂	XM_031256581.1	参与调控ABA反应和耐盐性					
35	转录因子 MYB44	XM_031253583.1	参与植物代谢调节,如蔗糖和花青素的生物合成; 在植物对生物和非生物胁迫的响应中发挥关键作用					

表3(续)

3 讨论

自然界中,干旱和盐分引发的渗透胁迫能够破 坏植物细胞结构,干扰正常代谢途径,进而对农业 生产和粮食安全构成严重威胁^[26-27]。甘薯因营养丰 富且抗逆性强^[28]而被视为一种重要的农作物。为 有效增强甘薯在盐碱和干旱地区的适应能力和生 产潜力,培育抗逆性强的甘薯新品种成为当前研究 的重要方向。

GAPDH作为糖酵解途径中的关键酶,参与多种 细胞活动,包括蛋白磷酸化修饰、膜融合与转运、蛋 白质表达调控及DNA损伤修复等^[29]。GAPCp作为 GAPDH的一个亚家族,存在于质体中,参与植物的 碳氮代谢以及对逆境的响应。已有研究证实,PEG、 ABA、H₂O₂等不同化学物质对早期小麦幼苗叶片中 *TaGAPCp1*基因的表达有不同程度的诱导作用^[30]。 与本研究甘薯*IbGAPCp1*基因在盐分和干旱胁迫条 件下的研究结果相同。这一结果揭示了*IbGAPCp1* 基因在甘薯应对盐和干旱胁迫中具有一定的作用。

启动子序列分析发现*IbGAPCp1*基因的启动子 区域含有多种与光响应、激素响应及与分生组织表 达相关的顺式作用元件,暗示了该基因可能受到多 种信号分子的调控。转录因子等上游蛋白通过与 下游靶基因启动子区域的特定 DNA序列结合以调 控基因表达,进而影响植物的生长发育过程^[31]。本 研究通过酵母单杂交筛库共获得了 35个与 Pro-*IbGAPCp1*-1相互作用的调控因子,这些调控因子不 仅涉及蛋白质合成、能量储存等基础生理过程,还包 括多种与植物生长发育和逆境响应相关的酶^[32-33]。 其中,蔗糖合酶(SUS, sucrose synthase)是一种糖基 转移酶,在淀粉、纤维素的合成、糖代谢及种子和果 实发育中起着重要作用。*SUS2*(XM_031257639.1) 和*SUS3*是编码蔗糖合成酶的两个基因,拟南芥 sus2 和 sus3 突变体中淀粉含量降低^[34]。草莓 GAPCp1 过表达降低了蔗糖合酶、花青素合酶的转录水平进 而抑制了果实成熟^[35]。黄烷酮-3-羟化酶(F3H, flavanone 3-hydroxylase)在黄酮类化合物的生物合 成中具有关键作用,进而影响植物的抗逆性。拟南 芥中,南极苔藓PnF3H基因的过表达增强了植株对 盐和干旱的耐受性^[36]。CCCH型锌指蛋白是一类含 有特定锌指结构域的逆境响应蛋白,过表达 IbC3H18增强了甘薯的抗盐性和抗旱性[37]。过表达 GmZF351 增强了大豆植株的抗盐性^[38]。乙烯不敏 感蛋白2(EIN2, ethylene insensitive 2)是一种重要 的信号转导蛋白[39],在植物生长发育中起关键作 用,NtEIN2基因沉默的转基因烟草植株的花瓣衰老 延迟^[40]。转录因子 MYB44 属于 R2R3-MYB 亚家 族,在植物胁迫响应和代谢调节中发挥重要功能, 拟南芥中过表达小麦 TaMYB44-5A 降低了转基因植 株的抗旱性[41]; VvMYB44的过表达降低了葡萄的耐 寒性[42]。这些研究结果表明蔗糖合酶2、黄烷酮-3-羟化酶、CCCH型锌指蛋白、乙烯不敏感蛋白2及 MYB44转录因子等上游调控因子可能通过与 IbGAPCp1 启动子的特定区域结合进而调控植物的生 长发育及对逆境的响应。后续研究中,将构建这些调 控因子的过表达或者CRISPR基因编辑载体并进行甘 薯的遗传转化,以期获得抗逆性强的甘薯新材料。

综上所述,本研究不仅揭示了*IbGAPCp1*基因 在甘薯不同组织、不同发育阶段及盐和干旱胁迫下 的表达模式,还通过启动子序列分析和酵母单杂交 筛库初步解析了该基因的调控机制。这些发现为 培育具有更强抗逆性的甘薯新品种奠定了理论基 础和候选基因资源。然而,关于这些上游调控因子 如何具体影响*IbGAPCp1*基因的表达以及这些调控 机制在甘薯抗逆性中的具体作用,仍需进一步的研 究来阐明。期待未来的研究能够深入探索这些调 控机制,为甘薯的遗传改良和抗逆性育种提供新的 思路和方法。

参考文献

- [1] Behera S, Chauhan V B S, Pati K, Bansode V, Nedunchezhiyan M, Verma A K, Monalisa K, Naik P K, Naik S K. Biology and biotechnological aspect of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.): a commercially important tuber crop. Planta, 2022, 256(2): 40
- [2] Guo F, Meng X Q, Hong H T, Liu S Y, Yu J, Huang C, Dong T T, Geng H X, Li Z Y, Zhu M K. Systematic identification and expression analysis of *bHLH* gene family reveal their relevance to abiotic stress response and anthocyanin biosynthesis in sweetpotato. BMC Plant Biology, 2024, 24 (1):156
- [3] Sapakhova Z, Raissova N, Daurov D, Zhapar K, Daurova A, Zhigailov A, Zhambakin K, Shamekova M. Sweet potato as a key crop for food security under the conditions of global climate change: A review. Plants(Basel), 2023, 12(13): 2516
- [4] Lyu R Q, Ahmed S, Fan W J, Yang J, Wu X Y, Zhou W Z, Zhang P, Yuan L, Wang H X. Engineering properties of sweet potato starch for industrial applications by biotechnological techniques including genome editing. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(17): 9533
- [5] Rizzolo J A, Woiciechowski A L, Júnior A I M, Torres L A Z, Soccol C R. The potential of sweet potato biorefinery and development of alternative uses. SN Applied Sciences, 2021, 3 (3): 347
- [6] Gao X R, Zhang H, Li X, Bai Y W, Peng K, Wang Z, Dai Z R, Bian X F, Zhang Q, Jia L C, Li Y, Liu Q C, Zhai H, Gao S P, Zhao N, He S Z. The B-box transcription factor IbBBX29 regulates leaf development and flavonoid biosynthesis in sweet potato. Plant Physiology, 2023, 191(1): 496-514
- [7] Vamougne Kourouma. 甘薯的营养成分及β-胡萝卜素纳米乳 液研究.北京:中国农业科学院, 2019
 Kourouma V. Nutritional components of sweet potato and nanoemulsion of β-carotene. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019
- [8] 陈玉彬,刘奇源,罗燕,彭科琴,吕元兵,刘一灵,李振华. 烟草GAPDH全基因家族鉴定及其在烟苗发育早期的表达分析.山地农业生物学报,2024,43(5):8-17
 Chen Y B, Liu Q Y, Luo Y, Peng K Q, Lyu Y B, Liu Y L, Li Z H. Genome-wide identification of the GAPDH gene family and their expression analysis during the early development of tobacco seedlings. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2024, 43(5): 8-17
- [9] 卢倩, 弭晓菊, 崔继哲. 植物甘油醛-3-磷酸脱氢酶作用机制的研究进展. 生物技术通报, 2013 (8): 1-6 Lu Q, Mi X J, Cui J Z. Research advances on the mechanism of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in plant. Biotechnology Bulletin, 2013(8): 1-6
- [10] Zhao X C, Wang J, Xia N, Qu Y W, Zhan Y H, Teng W L, Li H Y, Li W B, Li Y G, Zhao X, Han Y P. Genome-wide identification and analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase family reveals the role of *GmGAPDH14* to

improve salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.). Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1193044

- [11] Zeng L F, Deng R, Guo Z P, Yang S S, Deng X P. Genomewide identification and characterization of Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*). BMC Genomics, 2016, 17:240
- [12] Wei H, Movahedi A, Yang J, Zhang Y Y, Liu G Y, Zhu S, Yu C M, Chen Y H, Zhong F, Zhang J. Characteristics and molecular identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in poplar. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 219:185-198
- [13] Kim S C, Guo L, Wang X M. Nuclear moonlighting of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates *Arabidopsis* response to heat stress. Nature Communications, 2020, 11(1):3439
- [14] Zeng H Q, Xie Y W, Liu G Y, Lin D Z, He C Z, Shi H T. Molecular identification of *GAPDHs* in cassava highlights the antagonism of *MeGAPCs* and *MeATG8s* in plant disease resistance against cassava bacterial blight. Plant Molecular Biology, 2018, 97(3): 201-214
- [15] Liu J R, Song J, Zhuang X Y, Lu Y F, Wang Q, Yang S M, Lu L M, Wang X Y, Li L Q. Overexpression of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 gene improves nitrogen absorption and utilization in potato. Horticulturae, 2023, 9(10):1105
- [16] Köhler U, Liaud M F, Mendel R R, Cerff R, Hehl R. The maize *GapC4* promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. Plant Molecular Biology, 1995, 29(6): 1293-1298
- [17] Zhang X H, Rao X L, Shi H T, Li R J, Lu Y T. Overexpression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene OsGAPC3 confers salt tolerance in rice. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 107: 1-11
- [18] Xie Q Q, Zhang H C, Hu D K, Liu Q Y, Zuo T H, Zhang Y Z, Liu Y M, Zhou S R, Zhu L Q. Analysis of SI-related *BoGAPDH* family genes and response of *BoGAPC* to SI signal in *Brassica oleracea* L. Genes (Basel), 2021, 12(11): 1719
- [19] Robbens S, Petersen J, Brinkmann H, Rouzé P, Van de Peer Y. Unique regulation of the Calvin cycle in the ultrasmall green alga Ostreococcus. Journal of Molecular Evolution, 2007, 64 (5): 601-604
- [20] 魏文杰.中国春小麦 TaGAPCp1和 TaGAPCp2 基因及其启动 子在非生物胁迫下的功能分析.杨凌:西北农林科技大学, 2017

Wei W J. Functional analysis of *TaGAPCp1/2* gene and their promoters under abiotic stress in Chinese spring wheat. Yangling:Northwest A&F university, 2017

[21] Flores-Tornero M, Anoman A D, Rosa-Téllez S, Toujani W, Weber A P M, Eisenhut M, Kurz S, Alseekh S, Fernie A R, Muñoz-Bertomeu J, Ros R. Overexpression of the triose phosphate translocator (TPT) complements the abnormal metabolism and development of plastidial glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mutants. Plant Journal, 2017, 89 (6): 1146-1158

- [22] Muñoz-Bertomeu J, Anoman A D, Toujani W, Cascales-Miñana B, Flores-Tornero M, Ros R. Interactions between abscisic acid and plastidial glycolysis in Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(1): 157-159
- [23] Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Irles-Segura A, Mateu I, Nunes-Nesi A, Fernie A R, Segura J, Ros R. The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in Arabidopsis. Plant Physiology, 2010, 152(4): 1830-1841
- [24] Anoman A D, Flores-Tornero M, Rosa-Telléz S, Muñoz-Bertomeu J, Segura J, Ros R. The specific role of plastidial glycolysis in photosynthetic and heterotrophic cells under scrutiny through the study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Plant Signaling & Behavior, 2016, 11 (3) : e1128614
- [25] 戴镕徽,高梦泽,王芳,蒋凌雁,罗丽娟. 柱花草 SgPAL3 基因启动子的克隆及上游转录因子的筛选. 草地学报,2024,32(1):66-74
 Dai R H, Gao M Z, Wang F, Jiang L Y, Luo L J. Cloning of SgPAL3 gene promoter and screening of upstream transcription factors in Stylosanthes. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(1):66-74
 [26] Zhang H, Wang Z, Li X, Gao X R, Dai Z R, Cui Y F, Zhi Y
- H. Liu Q C, Zhai H, Gao S P, Zhao N, He S Z. The *IbBBX24-IbTOE3-IbPRX17* module enhances abiotic stress tolerance by scavenging reactive oxygen species in sweet potato. New Phytologist, 2022, 233(3): 1133-1152
- [27] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, 2016, 167(2): 313-324
- [28] Huang C P, Liao J L, Huang W J, Qin N N. Salicylic acid protects sweet potato seedlings from drought stress by mediating abscisic acid-related gene expression and enhancing the antioxidant defense system. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 14819
- [29] Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Alaiz M, Segura J, Ros R. A critical role of plastidial glycolytic glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase in the control of plant metabolism and development. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(1): 67-69
- Li X X, Wei W J, Li F F, Zhang L, Deng X, Liu Y, Yang S
 S. The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for abiotic stress response in wheat. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 1104
- [31] 蔡艳梅,付雪梅,王华波,杨楠,陈龙清.蜡梅 CpBEAT3 启 动子克隆及其互作蛋白的初步验证.山东农业科学,2024, 56(5):27-35

Cai Y M, Fu X M, Wang H B, Yang N, Chen L Q. Cloning of *CpBEAT3* gene promoter from *Chimonanthus praecox* and preliminary verification of its interacting protein. Shandong agricultural sciences, 2024, 56(5): 27-35

- [32] Carlson M A, Haddad B G, Weis A J, Blackwood C S, Shelton C D, Wuerth M E, Walter J D, Spiegel P C Jr. Ribosomal protein L7/L12 is required for GTPase translation factors EF-G, RF3, and IF2 to bind in their GTP state to 70S ribosomes. FEBS Journal, 2017, 284(11): 1631-1643
- [33] Senthilkumar R, Yeh K W. Multiple biological functions of sporamin related to stress tolerance in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam). Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1309-1317
- [34] Angeles-Núñez J G, Tiessen A. Arabidopsis sucrose synthase 2 and 3 modulate metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds. Planta, 2010, 232(3): 701-718
- [35] Luo Y, Ge C, Yang M, Long Y, Li M Y, Zhang Y, Chen Q, Sun B, Wang Y, Wang X R, Tang H R. Cytosolic/Plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a negative regulator of strawberry fruit ripening. Genes (Basel), 2020, 11 (5): 580
- [36] Li C C, Liu S H, Yao X H, Wang J, Wang T L, Zhang Z H, Zhang P Y, Chen K S. *PnF3H*, a flavanone 3-hydroxylase from the Antarctic moss *Pohlia nutans*, confers tolerance to salt stress and ABA treatment in transgenic *Arabidopsis*. Plant Growth Regulation, 2017, 83: 489-500
- [37] Zhang H, Gao X R, Zhi Y H, Li X, Zhang Q, Niu J B, Wang J, Zhai H, Zhao N, Li J G, Liu Q C, He S Z. A non-tandem CCCH-type zinc-finger protein, IbC3H18, functions as a nuclear transcriptional activator and enhances abiotic stress tolerance in sweet potato. New Phytologist, 2019, 223 (4): 1918-1936
- [38] Wei W, Lu L, Bian X H, Li Q T, Han J Q, Tao J J, Yin C C, Lai Y C, Li W, Bi Y D, Man W Q, Chen S Y, Zhang J S, Zhang W K. Zinc-finger protein GmZF351 improves both salt and drought stress tolerance in soybean. Journal of Integrative Plant Biology, 2023, 65(7): 1636-1650
- [39] Ando A, Kirkbride R C, Qiao H, Chen Z J. Endosperm and maternal-specific expression of EIN2 in the endosperm affects endosperm cellularization and seed size in *Arabidopsis*. Genetics, 2023, 223(2): iyac161
- [40] Chakrabarti M, Bharti S. Role of EIN2-mediated ethylene signaling in regulating petal senescence, abscission, reproductive development, and hormonal crosstalk in tobacco. Plant Science, 2023, 332:111699
- [41] Peng D, Li L Q, Wei A S, Zhou L, Wang B X, Liu M L, Lei Y H, Xie Y Z, Li X J. TaMYB44-5A reduces drought tolerance by repressing transcription of *TaRD22-3A* in the abscisic acid signaling pathway. Planta, 2024, 260(2):52
- [42] Zhang H J, Hu Y F, Gu B, Cui X Y, Zhang J X. VvMYB44 transcription factor from Chinese wild *Vitis amurensis* negatively regulates cold tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *V. vinifera*. Plant Cell Reports. 2022, 41(8):1673-1691