



菠萝酵母双杂交文库构建及AcETR2a互作蛋白的筛选

王燕莹, 温雨兴, 李运合*

闽台特色园林植物福建省高校重点实验室, 闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建漳州363099

*通信作者(liyunhe16@163.com)

摘要: 乙烯广泛应用于菠萝催花来调节产期, 但其诱导开花的分子机理尚不清楚, 前期研究发现菠萝乙烯受体基因 *Ananas comosus ethylene response 2 (AcETR2a)* 在菠萝开花过程中起着重要作用。为了进一步筛选AcETR2a的互作蛋白, 本研究构建了菠萝花芽分化的cDNA文库, 以AcETR2a为诱饵蛋白, 利用酵母双杂交系统对其互作蛋白进行筛选和分析, 并对部分候选蛋白进行点对点验证。结果筛选到了60个阳性克隆, 经测序鉴定出46个与AcETR2a互作的候选蛋白; GO和KEGG富集结果表明, 候选蛋白主要参与细胞进程、代谢过程、生物调控等生物过程, 并涉及核苷酸代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、信号转导及运输等通路。酵母双杂交点对点验证结果表明, AcETR2a与转录因子AcABI4、木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶AcXTH9之间存在强互作。研究结果为揭示AcETR2a的蛋白互作关系网提供了参考依据。

关键词: 菠萝; AcETR2a; 酵母双杂交; 蛋白互作

Construction of a yeast two-hybrid library and screening of interacting proteins with AcETR2a in pineapple

WANG Yanying, WEN Yuxing, LI Yunhe*

Key Laboratory of Landscape Plants with Fujian and Taiwan Characteristics of Fujian Province University, School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363099, China

*Corresponding author (liyunhe16@163.com)

Abstract: Ethephon is widely applied in pineapple cultivation to artificially induce flowering and regulate production period, however, the molecular mechanisms remain poorly understood. Previous studies have shown that the pineapple ethylene receptor gene, *Ananas comosus ethylene response 2 (AcETR2a)*, plays an important role in pineapple flowering. In the present study, a cDNA library of pineapple flower bud differentiation was constructed, and the yeast two-hybrid system was used to screen and analyze the interacting proteins of AcETR2a. Some candidate proteins were verified using the yeast two-hybrid point-to-point method. In total, 60 positive clones were screened, and 46 candidate proteins interacting with AcETR2a were identified by sequencing. GO and KEGG analyses revealed that the candidate proteins were mainly involved in cellular processes, metabolic processes, bioregulation, and other biological processes, as well as in pathways such as nucleotide metabolism, amino acid metabolism carbohydrate metabolism, signal transduction and transport. The yeast two-hybrid point-to-point validation results showed strong interactions between AcETR2a and ABSCISIC ACID INSENSITIVE4 (AcABI4), as well as AcETR2a and xylo-

收稿 2025-03-12 修定 2025-05-06

资助 福建省自然科学基金(2022J01906)、国家重点研发计划(2018YFD1000500)和闽南师范大学校长基金(KJ2020004)。

glucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9 (AcXTH9). This study provides a reference for elucidating the protein interaction network of AcETR2a.

Key words: pineapple; AcETR2a; yeast two-hybrid; protein interaction

我国是菠萝(*Ananas comosus*)生产大国之一,总产量居世界第四(FAO 2023)。自然开花是菠萝生产中的一个严重的问题,通常受到当年12月到次年1月低温天气的影响,我国菠萝经常在次年的2~3月份发生自然开花,果实集中在5月—6月上市。由于自然开花时间不一致,导致果实成熟期不统一,使收获期长达数周之久(朱祝英等2012),采收时间的延长也导致了田间管理成本的提高,严重制约菠萝产业的发展(Bartholomew和Sanewski 2018)。乙烯是一种重要的植物激素,参与植物多个生长发育过程,能显著促进荔枝(*Litchi chinensis*)、龙眼(*Dimocarpus longan*)、芒果(*Mangifera indica*) (Maloba等2017; 范茜茜等2015; 陈厚彬等2014)和菠萝(Liu等2021; Bartholomew和Sanewski 2018; 张治礼等2012)等南方常绿果树的花芽分化。在这其中,利用乙烯及其衍生物对菠萝进行人工催花已经广泛应用于菠萝生产(Bartholomew和Sanewski 2018),但不同品种、不同季节的菠萝对乙烯诱导的敏感性存在差异(邓彪等2022; 刘胜辉等2019; 张治礼等2012),实际生产中经常出现由于催花不当导致开花率降低甚至不开花,而造成少果甚至无果,目前解决这一关键问题的理论依据尚不充分。因此,了解乙烯诱导菠萝成花机理既能丰富乙烯调控植物开花的理论依据,又能在生产上为人工调控菠萝花期、实现周年供果提供指导,具有重要的理论和实践意义。

前人通过对拟南芥乙烯反应突变体的遗传分析获得一个线性信号途径(Zhao等2021),由位于内质网膜的乙烯受体感知外界乙烯的变化,在没有乙烯的情况下,乙烯受体抑制乙烯反应,而当乙烯结合到乙烯受体上时,则消除这种抑制作用从而引发乙烯反应。目前,拟南芥中已克隆到5个乙烯受体基因,分别是ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1)、ETR2、ETHYLENE RESPONSE SENSOR1 (ERS1)、ERS2 和 ETHYLENE INSENSITIVE4 (EIN4) (Kendrick和Chang 2008); 此外,也从其他多种植物,如水

稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)和烟草(*Nicotiana tabacum*),克隆到相应的乙烯受体基因(Yang等2015)。乙烯受体可以分为两个亚家族,亚家族1包括ETR1和ERS1,亚家族2包括ETR2、ERS2和EIN4 (Gallie 2015); 在单子叶植物中,亚家族1只有类似ERS1的乙烯受体,而亚家族2包含类似EIN4/ETR2的乙烯受体(Gallie 2015),菠萝中则只有ERS1s和ETR2s两种乙烯受体(Li等2016)。乙烯受体在植物生殖器官中高度表达,可能参与调控开花时间,如超表达OsETR2的水稻植株对乙烯的敏感性降低进而推迟花芽分化,通过RNAi抑制OsETR2表达,则增强了水稻对乙烯的敏感性并加速花芽分化,这表明乙烯和乙烯受体分别起着促进和抑制水稻开花的作用(Wuriyanghan等2009)。相反,西葫芦(*Cucurbita pepo*)两个突变体etr1a和etr2b都表现出雌花形成时间推迟、数目减少和开花延迟的表型,说明CpETR1A和CpETR2B起着促进西葫芦成花的作用(García等2020)。

前期研究表明(Li等2016),菠萝的四个乙烯受体基因分别属于ERS1家族(AcERS1a和AcERS1b)和ETR2家族(AcETR2a和AcETR2b),其中AcERS1b、AcETR2a和AcETR2b可能在菠萝成花中起到重要的作用,但其具体的作用机制尚不清晰。乙烯与多种植物激素之间存在复杂的调控网络(Iqbal等2017),乙烯受体与其他蛋白互作调控植物多个生长发育过程(Zhao等2021)。然而,在乙烯调控菠萝成花过程中,乙烯受体和哪些蛋白存在互作尚不清楚,为此,本研究构建菠萝花芽分化的膜蛋白酵母双杂交文库,选取其中一个受外源乙烯影响较大的乙烯受体即AcETR2a (Li等2016)构建诱饵载体,利用酵母双杂交系统对其互作蛋白进行筛选和分析,并对筛选到的互作蛋白进行GO和KEGG分析;再选取前期转录组测序(Liu等2021)确定为差异表达基因且在其他植物上表现出与开花相关的两个蛋白,进行酵母双杂点对点验证,并对筛选到的部分蛋白

进行讨论, 有助于深入了解AcETR2a的蛋白互作关系网, 为人工诱导菠萝开花提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

SDO (SD/-Leu)、DDO (SD/-Leu/-Trp)、TDO (SD/-Leu/-Trp/-His)、QDO (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade)、X-α-gal、YPDA和LB培养基均购于北京酷莱博生物科技有限公司; 酵母菌株感受态NMY51、pBT3、pNubG-Fe65、pTSU2-APP、pOst1-Nubal、pPR3等载体均购于武汉金开瑞生物工程有限公司; All-direct重组酶购于上海宝吉生物技术有限公司; 感受态细胞DH10B、DH5α, OK Clon DNA Ligation Kit购于艾科瑞生物公司; NcoI、SacII、BamHI、EcoRI、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于TaKaRa (大连)。

1.2 植物材料处理与酵母膜杂交文库构建

选取大小一致的13个月株龄的‘巴厘’菠萝 (*Ananas comosus* L. ‘Comte de Paris’), 参照李运合等(2016)的方法用400 mg·L⁻¹乙烯利进行催花处理。收集处理后不同时期(8 h、1 d、4 d、7 d和14 d)菠萝茎尖, 采用CTAB法提取RNA, 用于构建菠萝花芽分化酵母膜杂交文库。

将不同时期菠萝茎尖RNA均匀混合后, 通过Oligotex mRNA Kits (Qiagen)分离纯化mRNA。参考 Supscript double stand cDNA Kit (Invitrogen 北京)文库创建试剂盒说明书, 合成双链cDNA; 在加5'接头(3个读码框, 每个读码框连接一份, 共3份)和

均一化处理后, 使用1%浓度的低熔点琼脂糖胶, 电泳cDNA产物, 切胶回收1 000 bp以上的片段, DEPC水溶解回收产物。然后使用同源重组的方式, 将上步7 μL的cDNA与3 μL酶切处理线性化的pPR3载体混合, 之后加入5 μL的All-direct重组酶以及5 μL的水, 混匀, 置于50℃反应1 h完成连接反应; 之后转化大肠杆菌DH10B感受态细胞, 加入LB培养基培养; 培养结束后, 将培养物加入甘油至终浓度20%存于-80℃, 此菌液即为获得的酵母双杂交文库菌液。取转化后细菌原液10 μL稀释1 000倍后, 从中取出10 μL涂布于含有100 mg·L⁻¹氨苄青霉素的LB平板, 第二天计数。每毫升文库液库容(CFU·mL⁻¹)=平板上的克隆数/10 μL×1 000×10³; 文库总库容(CFU)=CFU·mL⁻¹×文库菌液总体(mL)。

从生成的克隆子中随机选择24个单克隆进行PCR分析, 电泳检测以确定插入片段的长度和重组率。

1.3 菠萝AcETR2a诱饵载体的构建

根据前期得到的AcETR2a序列(GenBank登录号KM062064), 通过NCBI Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), 设计带有接头的全长序列引物AcETR2a-F和AcETR2a-R (表1), 以1.2中的菠萝cDNA为模板进行PCR扩增。获得包含酶切位点的AcETR2a ORF全长片段后割胶回收, 之后通过OK Clon DNA Ligation Kit将其与NcoI、SacII双酶切的pBT3载体相连, 构建诱饵载体pBT3-AcETR2a。将2 μL连接产物转化到大肠杆菌感受态细

表1 本研究中所使用的引物序列
Table 1 Primers used in this study

用途	引物名称	引物序列(5'→3')
AcETR2a全长扩增	AcETR2a-F	TAATTAAGGCCGCTCGGCCCATGGATGCGAAATCCAATCCCCTGTGAAC
	AcETR2a-R	TAAGATCTGACGTCAGCGCTCCGCGGCTATGTGTTTTGAAGAACCCTGATG
AcABI4全长扩增	AcABI4-F	ACGATGTTCCAGATTACGCTGGATCCATGGAAAGTCCGGGTACAGGGGTGTGCAGAGG
	AcABI4-R	GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTAGAGATCAAAGAGGAACGGATCCGCATCA
AcXTH9全长扩增	AcXTH9-F	ACGATGTTCCAGATTACGCTGGATCCATGGCGCTCTCGAGAGGT
	AcXTH9-R	GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTCAGGGTGTGGCGGTGGT

-F代表上游引物, -R代表下游引物, 下划线部分为接头序列。

胞*DH5 α* 中,在含有50 mg·L⁻¹硫酸卡那霉素的LB固体培养基上过夜培养;之后挑取单克隆摇菌提取质粒后进行双酶切验证,挑选条带正确的菌液送至广州艾基生物技术有限公司测序。测序正确后,提取pBT3-AcETR2a质粒,用于下一步实验。

1.4 诱饵载体的毒性和自激活检测

为检测pBT3-AcETR2a诱饵载体的毒性及自激活活性,采用LiAc法(Gietz和Schiestl 2007)将pBT3-AcETR2a诱饵质粒和猎物空载pPR3共同转染到NMY51酵母感受态细胞中,将转化后的这些酵母涂布在DDO、TDO、TDO/3-AT (5、10、15、20 mmol·L⁻¹)培养基上进行培养,观察菌落生长情况,确定pBT3-AcETR2a诱饵蛋白的自激活活性及毒性。另一方面,也将共转化的pOst1-NubI+pBT3-AcETR2a的NMY51的酵母感受态细胞涂布在DDO、TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹)和QDO平板上置于30℃培养箱环境下培养3~4 d,以此来评估pBT3-AcETR2a在NMY51酵母中的功能表达。

1.5 酵母双杂交筛选AcETR2a互作蛋白

首先从SD/-Leu平板中挑取生长良好含pBT3-AcETR2a的单克隆,接种到50 mL的SD/-Leu液体培养基中,在30℃摇床中培养使其OD₆₀₀达到0.2后将其转移到YPDA液体培养基中进行震荡培养,直至OD₆₀₀值在0.6~0.8后离心,去除上清,用无菌水重悬菌体,再次离心后弃上清,使用LiAc方法重悬菌体,混匀后置于冰上。将菠萝cDNA文库质粒转化至含有诱饵载体的NMY51感受态,均匀涂抹于含5 mmol·L⁻¹ 3-AT的TDO/X- α -gal平板上,在30℃条件下培养3~4 d,之后从TDO/X- α -gal/3-AT平板上挑选变蓝的单个菌落,转移到新的QDO/X- α -gal/3-AT (5 mmol·L⁻¹)平板上继续在30℃培养3 d,以pNubG-Fe65+pTSU2-APP共转化菌液和pPR3+pTSU2-APP共转化菌液分别作阳性和阴性对照进行二次筛选。对这两种培养基上变蓝的单菌落进行统计,即为候选的阳性克隆。

1.6 候选蛋白生物信息学分析

将筛选到的候选互作蛋白进行测序,在NCBI数据库中进行BLAST比对分析,获得同源序列,预测基因功能。在UniProt网站(<https://www.uniprot.org>)上对候选蛋白的功能进行注释,对这些蛋白质

进行Gene Ontology (GO)和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)的通路分析。

1.7 酵母双杂交点对点验证

本研究筛选到的两个互作蛋白AcABI4 (GenBank 登录号XP_020081967.1)和AcXTH9 (GenBank 登录号OAY70160.1)为前期转录组测序(Liu等2021)得到的菠萝成花差异表达基因编码产物,且二者在其他植物上表现出与开花相关的特性,因此选择这两个蛋白进行酵母双杂交点对点实验,验证酵母双杂交筛库结果。首先根据*AcABI4*、*AcXTH9*序列设计带有酶切接头的引物(表1),参照1.3节中诱饵载体的构建方法进行PCR扩增和载体构建,将包含酶切位点的*AcABI4*和*AcXTH9* ORF全长片段与*Bam*HI、*Eco*RI双酶切后的pPR3载体相连,经过测序后,选取序列正确的菌液提取质粒即为猎物载体pPR3-AcABI4和pPR3-AcXTH9重组质粒。

将猎物载体pPR3-AcABI4和pPR3-AcXTH9与诱饵载体pBT3-AcETR2a共转化酵母细胞, pNubG-Fe65+pTSU2-APP共转染NMY51酵母作为阳性对照, pPR3+pTSU2-APP共转染NMY51酵母则作为阴性对照。再依次从自激活、共转化实验组、共转化阳性、阴性对照组涂布的DDO平板上挑取单菌落,分别接种于5 mL DDO液体培养基,30℃ 250 r·min⁻¹培养16 h,接着取300 μ L菌液于50 mL DDO液体培养基中,30℃ 250 r·min⁻¹培养8~12 h至OD₆₀₀值为0.4~0.8,实验组和对照组分别各取4个0.2 mL PCR管,分别加入90 μ L 0.9% NaCl,依次编号为A~D,从上述摇好的菌液中取10 μ L菌液加入管A中混匀,从混匀的A中取10 μ L菌液加入管B中混匀,从混匀的B中取10 μ L菌液加入管C中混匀,从混匀的C中取10 μ L菌液加入管D中混匀,从上述A、B、C、D管中各取10 μ L菌液点种到平板DDO、TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹)、QDO上,30℃培养箱培养3 d,观察菌斑生长情况。

2 实验结果

2.1 菠萝cDNA文库的构建及质量检测

乙烯利催花处理后14 d可见菠萝茎尖发生明显膨大(图1),前期组织学切片结果表明此时已经形成苞片和小花原基(李运合等2016; Liu等2021),

因此选取0~14 d之间不同时期茎尖, 采用CTAB方法提取RNA构建菠萝花芽分化酵母双杂交文库。电泳检测结果显示, 用于建库的样品RNA条带清晰、无降解, 符合建库要求(图2-A)。将不同时期RNA等量混匀后再使用Oligotex mRNA Kits分离纯化样本的mRNA, 电泳结果显示mRNA条带清晰, 呈弥散状分布, 条带分布均匀, 质量合格, 且mRNA量也满足建库需要(图2-B)。

对cDNA进行分离和采集, 并成功收集范围在1 000~5 000 bp的双链cDNA。通过重组反应, 将双链cDNA与pPR3结合, 并进一步转化为大肠杆菌DH10B, 从而得到文库菌液。

取转化后细菌原液10 μL 稀释1 000倍后, 从中取出10 μL 涂布LB平板(含氨苄抗性), 第2天计数。结果如下: 在10 μL 原始电转化菌液稀释1 000倍后, 取10 μL 涂板, 共长了约230个克隆子(图2-C), 则库容量为: $230/10 \times 100 \times 1\ 000 = 2.3 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 共计5 mL的转化后原始菌液, 则总库容量为: $2.3 \times 5 \times 10^6 \text{ CFU} = 1.15 \times 10^7 \text{ CFU}$ 。

挑取平板上的单克隆, 进行PCR扩增, 电泳检测PCR产物大小。由图2-D可见, 插入片段平均长度在1 200 bp左右, 文库阳性率为100%。

2.2 菠萝AcETR2a诱饵载体的构建

在具有卡那抗性的LB固体培养基上挑取单克隆摇菌过夜, 提取质粒, 利用限制性内切酶NcoI和SacII对其进行双酶切后电泳, 出现7 600 bp左右的载体条带和2 300 bp左右的目的条带(图3), 说明pBT3-AcETR2a载体构建成功。随后经测序验证

插入序列没有发生突变, 可以用于下一步实验。

2.3 诱饵载体的毒性与自激活活性

如图4-A所示, 共转化的pBT3-AcETR2a+pPR3酵母菌涂布平板DDO生长良好, 说明重组诱饵质粒成功转入NMY51酵母细胞且对其无毒性; 涂布平板TDO有菌落生长说明诱饵蛋白能激活酵母细胞报告基因HIS3的表达, 有自激活作用。由于pBT3-AcETR2a存在自激活, 能够在TDO培养基上生长, 需要筛选抑制诱饵载体激活的背景生长。进一步对含不同浓度3-AT的培养基, 即TDO/3-AT ($5 \sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)培养基上酵母菌的生长情况进行分析, 结果发现所有平板都无菌落生长, 说明 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT即可抑制自激活, 可以此浓度进行后续实验。

进一步将获得的重组诱饵质粒进行功能分析, 即将pOst1-NubI和诱饵质粒pBT3-AcETR2a共转化NMY51感受态, 涂布平板DDO能生长, 说明共转化成功, 涂布TDO/3-AT ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和QDO有菌落生长, 说明诱饵构建的读码框正确, 泛素化系统是存在功能的(图4-B)。

2.4 酵母双杂交筛选AcETR2a候选互作蛋白

以pBT3-AcETR2a+pPR3为诱饵载体进行一轮筛选后, 成功培养出多个在TDO/X- α -gal/3-AT ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)培养基中生长良好的蓝色菌落(图5-A)。选取70个形态一致的单克隆进行加压培养, 在QDO/X- α -gal/3-AT ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)培养基上进行第二轮筛选, 结果显示, 这70个蓝色菌斑均正常生长(图5-B)。从中初步选出60个阳性克隆, 利用通用引物

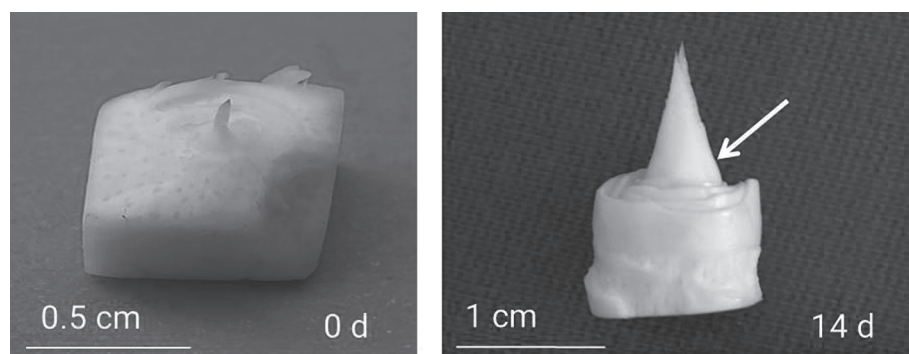


图1 乙烯利诱导菠萝花芽分化

Fig. 1 Flower bud differentiation in pineapple after ethephon treatment

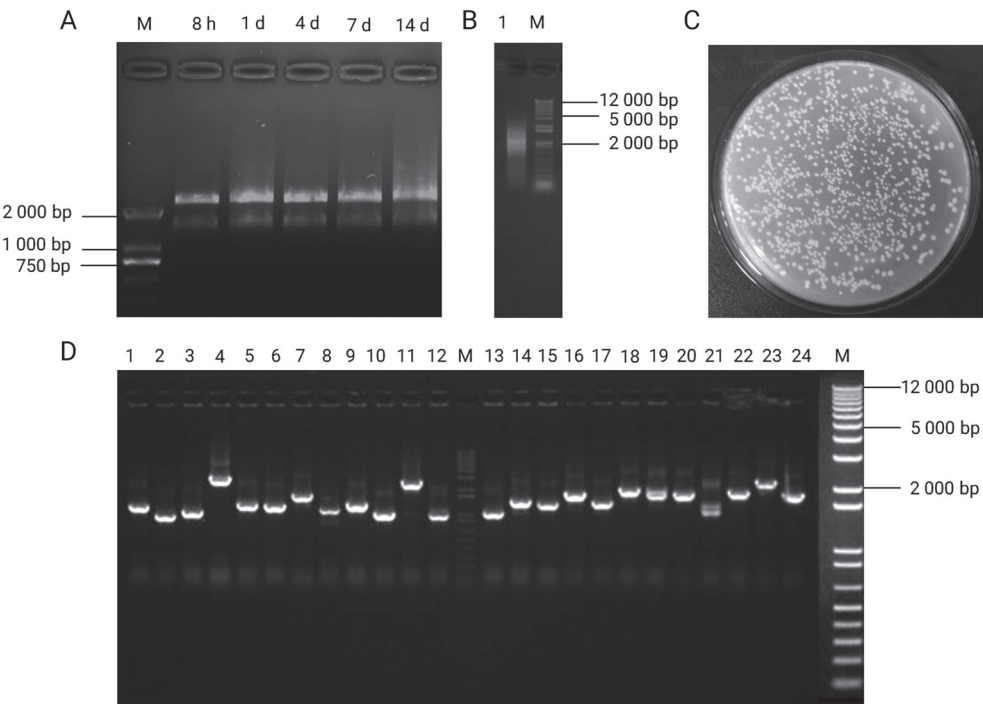


图2 菠萝cDNA文库的构建

Fig. 2 Construction of pineapple cDNA library

A: 菠萝RNA提取; B: 分离纯化mRNA; C: 文库稀释1 000倍后的滴度检测; D: PCR检测文库插入的cDNA片段。

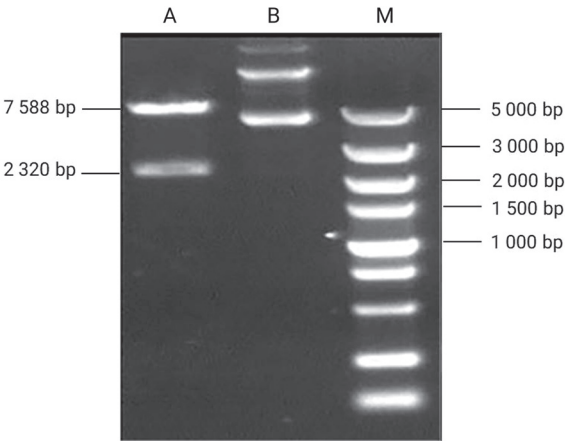


图3 pBT3-AcETR2a质粒酶切电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of pBT3-AcETR2a plasmid digested by restriction enzymes

A: *Nco*I和*Sac*II双酶切后的pBT3-AcETR2a质粒; B: 未酶切的pBT3-AcETR2a质粒。

进行PCR检测,结果显示均为单一插入,片段长度介于500~2 000 bp之间(图5-C)。对阳性克隆进行测序分析和重复序列整合后,所得的序列在NCBI数据库中比对,从中筛选出46个可能参与相互作用的蛋白,主要包括乙烯响应转录因子AcA-BI4、F-box/kelch蛋白AcFKF1、木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶蛋白AcXTH9等(表2)。

2.5 候选蛋白的生物信息学分析

进一步对46个候选互作蛋白进行GO和KEGG路径分析。GO分析发现,这些蛋白可分为22个功能群,分属三个GO术语,即生物过程、细胞组分和分子功能。其中生物过程中最具代表性的两个功能群是细胞进程(32个蛋白)和代谢过程(20个蛋白);分子功能中最具代表性的两个功能群则分别是结合(30个蛋白)和催化活性(20个蛋白);而细胞组分只有细胞结构实体(38个蛋白)和蛋白质复合

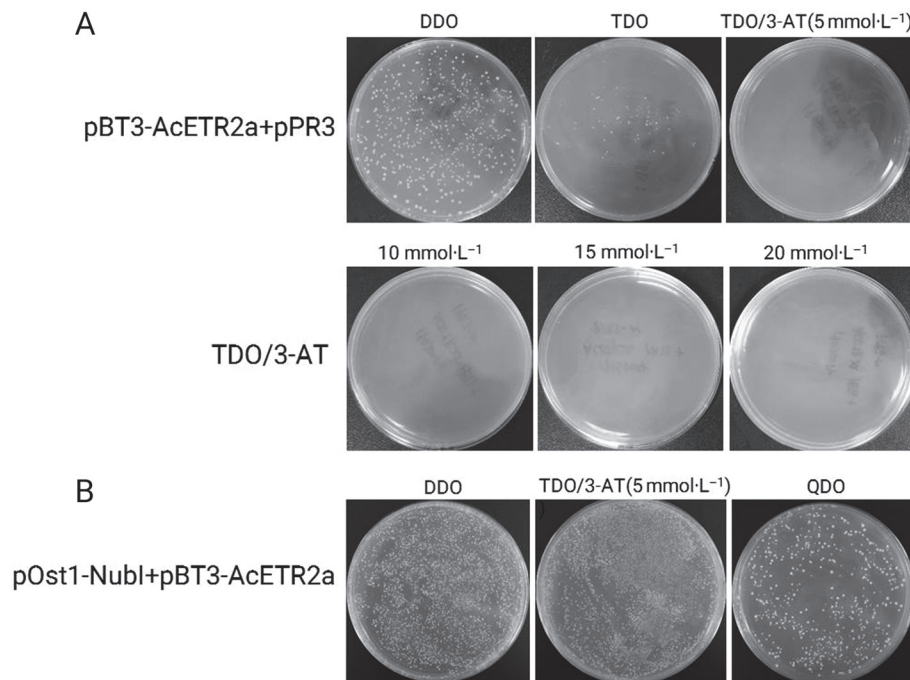


图4 诱饵载体pBT3-AcETR2a检测
Fig. 4 Testing the bait vector pBT3-AcETR2a

A: pBT3-AcETR2a的毒性与自激活活性检测; B: pBT3-AcETR2a的系统功能验证。

物(15个蛋白)两个功能群(图6-A)。另一方面, KEGG分析表明这些蛋白质被富集到13个代谢通路中, 主要包括翻译(6个蛋白)、全局和总览图(6个蛋白)、环境适应性(4个蛋白)、氨基酸代谢(3个蛋白)、转运和分解代谢(3个蛋白)等通路(图6-B), 表明这些过程是菠萝成花过程中的活跃通路。

2.6 酵母双杂交点对点验证

阳性对照 pNubG-Fe65+pTSU2-APP 在 DDO、TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹)、QDO 培养基上生长良好, 阴性对照 pPR3+pTSU2-APP 在 DDO 培养基上正常生长, 在 TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹)、QDO 无菌落生长(图7-A)。

将测序结果正确的猎物质粒 pPR3-AcXTH9、pPR3-AcABI4 与诱饵质粒 pBT3-AcETR2a 共同转化到酵母细胞中, 并在 DDO、TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹) 和 QDO 平板上培养, 结果表明, 涂布 DDO 平板能够生长, 说明 pBT3-AcETR2a+pPR3-AcXTH9 已成功转入宿主菌中且对宿主菌无毒性; 涂布 TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹) 和 QDO 平板能长, 说明 pBT3-AcETR2a

与 pPR3-AcXTH9 之间有强相互作用, 同时激活报告基因 *HIS3* 和 *ADE2*; 同样, pBT3-AcETR2a+pPR3-AcABI4 能够在三种培养基中生长, 也说明 pBT3-AcETR2a 与 pPR3-AcABI4 之间有强相互作用, 同时激活报告基因 *HIS3* 和 *ADE2* (图7-B)。

再依次从自激活、共转化实验组、共转化阳性、阴性对照组涂布的 DDO 平板上挑单菌落, 培养至合适浓度后, 稀释不同浓度点种到 DDO、TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹)、QDO 平板上, 30℃ 培养箱培养 3 d。结果表明, pBT3-AcETR2a+pPR3 (自激活组) 在 TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹) 和 QDO 平板上自激活受到抑制, pPR3+pTSU2-APP (阴性对照组) 同样受到抑制, 无菌落形成。而实验组 pBT3-AcETR2a+pPR3-AcXTH9 和 pBT3-AcETR2a+pPR3-AcABI4 稀释不同浓度的菌液在 TDO/3-AT (5 mmol·L⁻¹) 和 QDO 平板上仍然正常生长, 因此也证实 pBT3-AcETR2a 与 pPR3-AcXTH9 和 pPR3-AcABI4 存在强相互作用 (图7-C)。

表2 酵母双杂交文库筛选获得与AcETR2a互作的蛋白
Table 2 AcETR2a interacting proteins obtained through yeast two-hybrid library screening

克隆编号	基因注释	GenBank登录号	E值	相似度
1	NHP2蛋白1 (NHP2-like protein 1)	OAY70016.1	4e-81	100%
2	转录因子E2FA (transcription factor E2FA)	OAY76505.1	2e-98	100%
3	假定膜蛋白(putative membrane protein)	OAY78492.1	2e-55	100%
4	乙烯响应转录因子(ABI4 ethylene-responsive transcription factor ABI4-like)	XP_020081967.1	2e-14	100%
5	GATA转录因子2 GATA (transcription factor 2-like)	XP_020094116	2e-96	91%
6	减数分裂特异性蛋白PAIR3 (meiosis-specific protein PAIR3)	XP_020104233	2e-130	97%
7	真核翻译起始因子3F (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F)	XP_020113705.1	9e-36	90%
8	未知蛋白(uncharacterized protein LOC109709564)	XP_020087450.1	3e-23	97%
9	F-box/kelch-repeat蛋白(F-box/kelch-repeat protein)	XP_020109349.1	1e-46	83%
10	前体mRNA剪接因子(syf2 Pre-mRNA-splicing factor syf2)	OAY75563.1	3e-22	100%
11	半胱氨酸蛋白酶1 (cysteine proteinase 1)	OAY84317.1	2e-47	99%
12	T-复合物蛋白1亚基α (T-complex protein 1 subunit alpha)	OAY66185.1	1e-76	99%
13	SUMO结合酶SCE1 (SUMO-conjugating enzyme SCE1)	XP_020094536.1	3e-107	99%
14	60S核糖体蛋白L35a-1 (60S Ribosomal protein L35a-1)	XP_020091253.1	2e-77	100%
15	叶绿素酶-2 (chlorophyllase-2)	XP_020092711.1	2e-56	99%
16	木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶蛋白9 (Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9)	OAY70160.1	0.0	90%
17	抑制蛋白(profilin)	NP_001413125.1	2e-36	80%
18	延伸因子1 (elongation factor 1-gamma 2-like)	XP_020092744.1	1e-102	99%
19	线虫抗性蛋白HSPRO2 (nematode resistance protein-like HSPRO2)	OAY66198.1	6e-117	100%
20	La相关蛋白6B (La-related protein 6B)	XP_020106944.1	7e-43	100%
21	组蛋白H3.3 (Histone H3.3)	XP_020083113.1	8e-94	100%
22	RAN GTP酶激活蛋白2 (RAN GTPase-activating protein 2-like)	XP_020103286.1	5e-43	98%
23	SPIRAL1-3蛋白(protein SPIRAL1-like 3)	XP_020103898.1	7e-31	100%
24	WAT1相关蛋白(WAT1-related protein)	OAY76094.1	7e-21	95%
25	核苷二磷酸还原酶大亚基(ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit-like)	XP_020081756.1	1e-53	100%
26	Argonaute 4B-蛋白(protein argonaute 4B-like)	XP_020113863.1	2e-55	96%
27	真核翻译起始因子3B亚基(eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B)	OAY71089.1	4e-77	100%
28	琥珀酸半醛脱氢酶, 线粒体异构体X2 (succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform X2)	XP_020103434.1	7e-09	87%
29	乙烯响应转录因子1 (ethylene-responsive transcription factor 1-like)	XP_020112276.1	2e-11	86%
30	LHY-like isoform X5蛋白(protein LHY-like isoform X5)	XP_020114598.1	4e-16	97%
31	未知蛋白(uncharacterized protein LOC109710249)	XP_020088347.1	2e-36	100%
32	假定蛋白(hypothetical protein ACMD2_15879)	OAY72335.1	3e-115	99%
33	未知蛋白(uncharacterized protein At2g23090-like)	XP_020092124.1	2e-42	96%
34	非特异性脂质转移蛋白(non-specific lipid-transfer protein)	OAY84307.1	4e-41	97%
35	热休克蛋白81-1 (heat shock protein 81-1)	XP_020083187.1	3e-04	96%
36	铁氧还蛋白-NADPH还原酶(ferredoxin--NADP reductase, embryo isozyme, chloroplastic)	OAY79157.1	2e-140	100%

表2 (续)				
克隆编号	基因注释	GenBank登录号	E值	相似度
37	细胞色素c氧化酶5C亚基(cytochrome c oxidase subunit 5C)	XP_020087525.1	9e-37	100%
38	热休克因子结合蛋白(heat shock factor binding protein)	XP_020089814.1	5e-25	100%
39	假定蛋白(hypothetical protein ACMD2_00878)	OAY65815.1	3e-18	100%
40	GTP结合核蛋白(Ran-3 GTP-binding nuclear protein Ran-3-like)	XP_020098991.1	1e-84	98%
41	微管蛋白α链(tubulin alpha chain)	OAY79315.1	3e-37	84%
42	线粒体外膜蛋白(mitochondrial outer membrane protein porin 1)	OAY77772.1	2e-95	100%
43	蛋白翻译因子SUI1同源物(protein translation factor SUI1 homolog)	XP_020100555.1	2e-74	100%
44	亮氨酸拉链19 (leucine zipper 19-like)	XP_020097048	2e-80	91%
45	小RNA降解核酸酶3-异构体(X4 Small RNA degrading nuclease 3-like isoform X4)	XP_020080025.1	2e-09	71%
46	微管蛋白β-1链(tubulin beta-1 chain-like)	XP_020101923.1	4e-62	80%

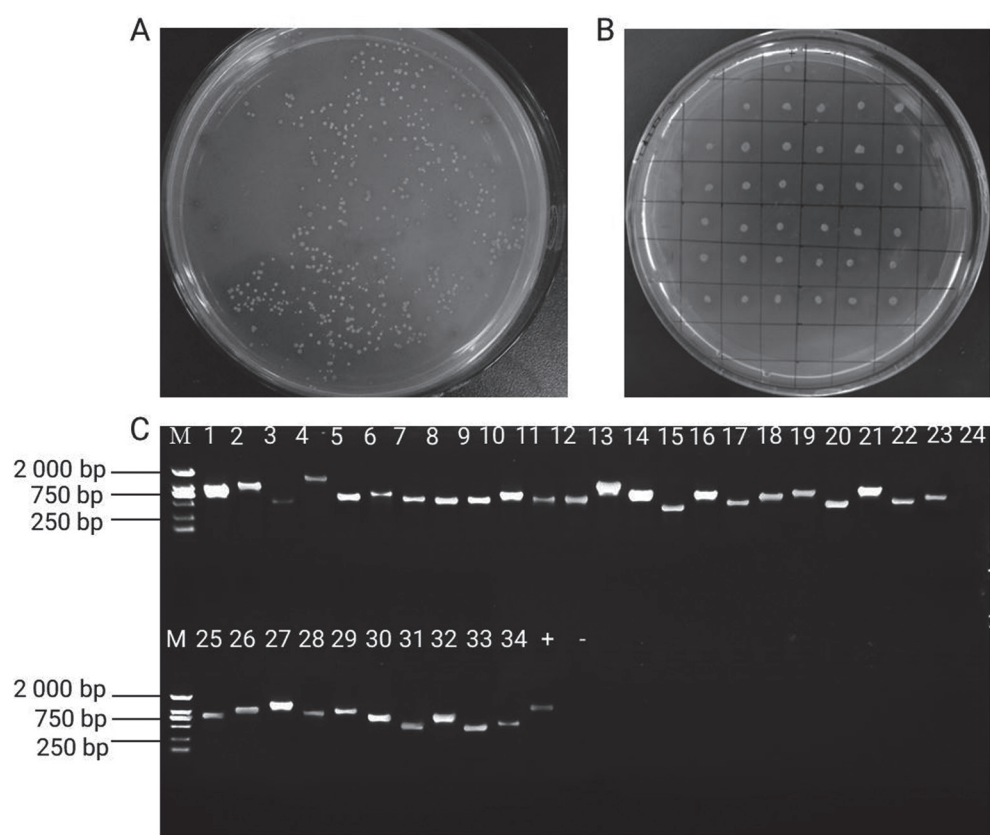


图5 酵母双杂交筛选AcETR2a互作蛋白

Fig. 5 Yeast two-hybrid screening of AcETR2a interacting proteins

A: 转化的酵母细胞涂布TDO/X-α-gal/3-AT (5 mmol·L⁻¹)平板; B: 转化的酵母细胞涂布QDO/X-α-gal/3-AT (5 mmol·L⁻¹)平板; C: 部分阳性克隆菌落PCR产物琼脂糖凝胶电泳图, 泳道1~34为菌落PCR产物, 泳道+为阳性对照, 泳道-为阴性对照。

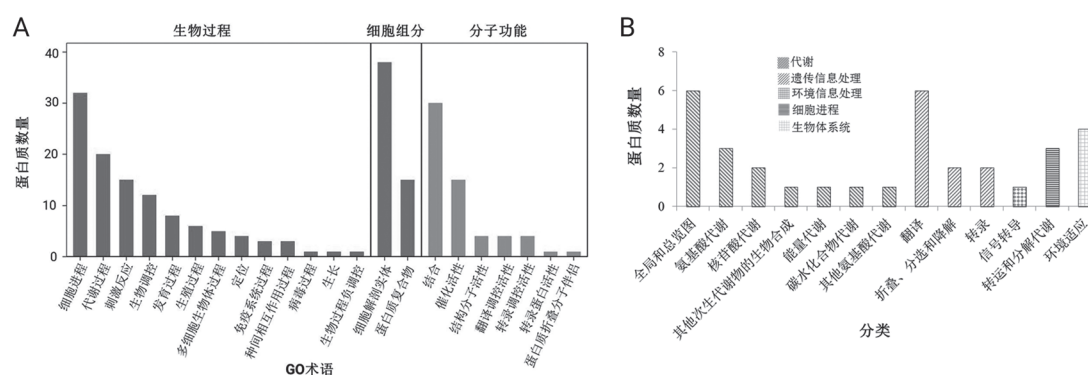


图6 候选互作蛋白的GO和KEGG功能分析图

Fig. 6 Functional analysis of GO and KEGG of the candidate interacting proteins

A: 候选互作蛋白的GO功能分析图; B: 候选互作蛋白的KEGG功能分析图。

3 讨论

生产上通常应用乙烯利处理诱导菠萝成花, 因此其成花过程离不开乙烯信号通路的调控。乙烯信号通路中的关键蛋白之一乙烯受体与多个蛋白存在互作现象, 如, 在无乙烯时, 乙烯受体直接与CTR1蛋白结合激活其酶活性, 进而抑制乙烯信号传导; 有乙烯存在时, 乙烯受体与乙烯结合, 不再与CTR1结合, 最终通过一系列反应, 激活下游的乙烯调控基因(Zhao等2021)。此外, 研究还发现拟南芥RTE1 (REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY 1)与ETR1互作正向调节ETR1信号, ECIP1 (EIN2 C-TERMINUS INTERACTING PROTEIN 1)与ETR2、EIN4、EIN2之间互作, 影响乙烯与盐胁迫反应(Yang等2015)。除了在拟南芥中鉴定出多个乙烯受体互作蛋白, 最近研究者发现, 在没有乙烯时, 水稻一个膜蛋白OsMHZ3与乙烯受体OsERS2和OsETR2相互作用, 维持OsCTR2的活性, 从而抑制乙烯信号转导; 乙烯处理则破坏MHZ3-受体-OsCTR2复合物内的结合, 减少OsCTR2的磷酸化并启动下游信号(Li等2024)。这些结果表明乙烯受体通过与不同蛋白互作, 进而影响乙烯信号转导。

酵母双杂交(Y2H)系统建立以来(Fields和Song 1989), 已被广泛应用到各种植物上的蛋白互作筛选和验证研究, 如马铃薯(*Solanum tuberosum*) StIPT互作蛋白、桑树(*Morus alba*) MaTGA1互作蛋白的

筛选与鉴定(石源睿等2024; 戴凡炜等2023)。本研究利用酵母双杂筛选到了多个与菠萝乙烯受体AcETR2a存在互作的蛋白(表2), 对其进行GO和KEGG分析, 并通过酵母双杂点对点确认AcETR2a与AcABI4、AcXTH9之间存在强互作(图6)。AcABI4为拟南芥转录因子ABI4的同源蛋白, 其最早是通过正向遗传学筛选到的ABA不敏感突变体*abi4-1*而获此命名(Finkelstein 1994), 属于APETALA2/ethylene responsive factor (AP2/ERF)类转录因子, 其激活或抑制一系列下游基因的表达, 从而调控植物的多种生长发育进程(Chandrasekaran等2020), 包括从营养生长到生殖生长的转变(Shu等2018)。如拟南芥*abi4*缺失突变体呈现出早花特征, 过量表达ABI4则促进转录因子FLC的转录, 从而推迟开花(Shu等2016)。AcXTH9为木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶(XTH)家族成员, 该家族是植物细胞壁重构过程中的关键酶(Rose等2002), 部分家族成员参与植物花器官的发育, 如芸薹(*Brassica campestris*)雌蕊花芽形成以及拟南芥雄蕊花丝发育等(Kurasawa等2009; Shin等2006)。

此外, 还筛选到一个F-box蛋白AcFKF1 (表2)。FKF1是一个蓝光受体, 其与GA信号通路中的负调节因子DELLA蛋白互作, 促进其降解, 进而诱导开花相关基因如FT、SOC1、LFY等表达从而促进拟南芥开花(Yan等2020); 玉米FKF1蛋白ZmFKF1a、ZmFKF1b通过与ZmCONZ1、ZmGII1互作, 调节玉

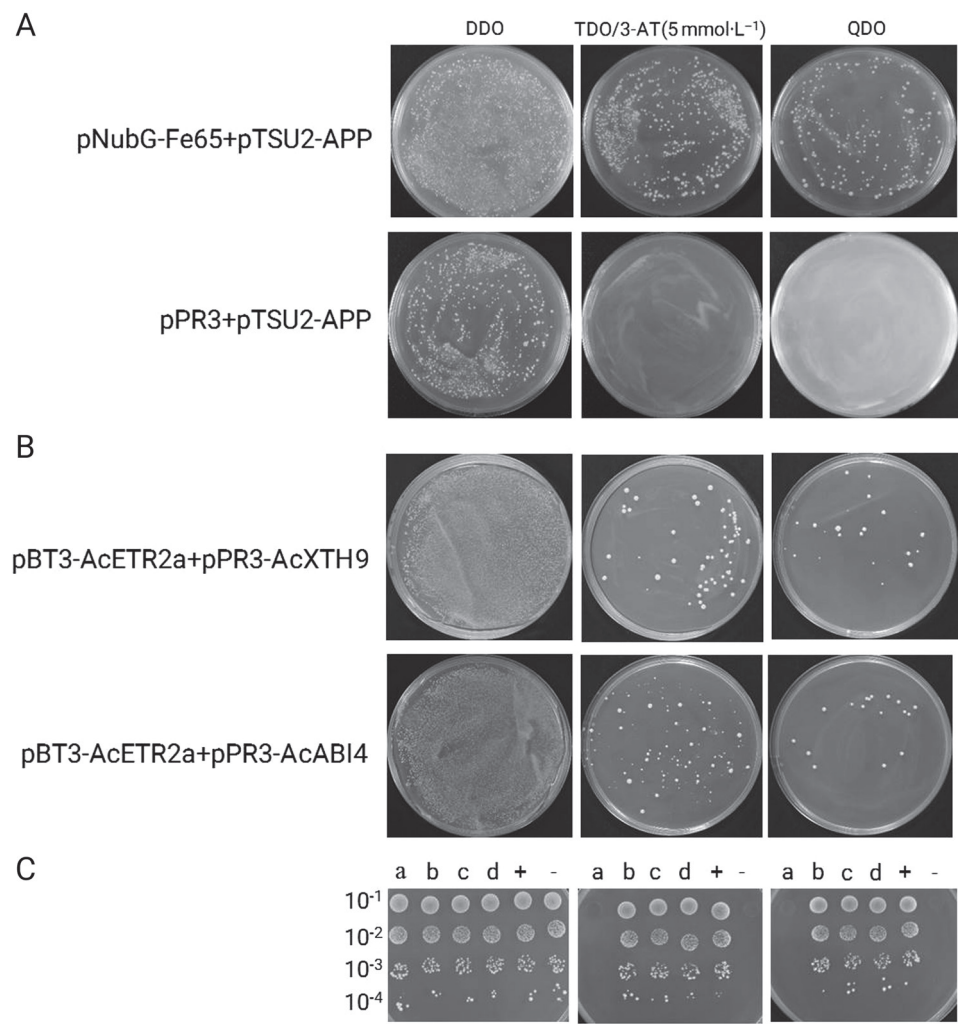


图7 酵母双杂交点对点验证
Fig. 7 Yeast two-hybrid point-to-point validation

A: 阳性对照和阴性对照; B: 质粒共转化NMY51; C: 共转化点板验证; a: pBT3-AcETR2a和pPR3自激活, b: pBT3-AcETR2a和pOst1-NubI 功能验证; c: pBT3-AcETR2a和pPR3-AcXTH9 实验组; d: pBT3-AcETR2a和pPR3-AcABI4 实验组; +: pNubG-Fe65和pTSU2-APP阳性对照组; -: pPR3和pTSU2-APP阴性对照组。

米花期变化(Chen等2024), 这说明可能有多种蛋白与FKF1发生互作。那么菠萝中除了乙烯受体蛋白AcETR2a外, 是否还有其他蛋白与AcFKF1互作, 它们是协同还是通过独立通道来调节菠萝开花呢? 还需深入研究。

本研究通过建立菠萝花芽分化cDNA文库和酵母双杂筛库找到AcETR2a的多个互作蛋白, 丰富了AcETR2a的作用机理网络。但是AcETR2a和这些蛋白互作后, 如何激活或抑制下游开花基因

的表达需要在后续的工作中深入研究。

参考文献(References)

Bartholomew DP, Sanewski GM (2018). Inflorescence and fruit development and yield. In: Sanewski GM, Bartholomew DP, Paull RE (eds). The Pineapple: Botany, Production and Uses. 2nd ed. London: CABI Publishing, 233–268

Chandrasekaran U, Luo XF, Zhou WG, et al (2020). Multifaceted signaling networks mediated by abscisic acid insensitive 4. Plant Commun, 1: 10040

- Chen HB, Su ZX, Zhang R, et al (2014). Progresses in research of litchi floral differentiation. *Sci Agr Sin*, 47: 1774–1783 (in Chinese with English abstract) [陈厚彬, 苏钻贤, 张荣等(2014). 荔枝花芽分化研究进展. *中国农业科学*, 47: 1774–1783]
- Chen SH, Gao S, Wang DY, et al (2024). *FKF1b* controls reproductive transition associated with adaptation to geographical distribution in maize. *J Integr Plant Biol*, 66: 943–955
- Dai FW, Wang ZJ, Luo GQ, et al (2023). Construction of yeast two-hybrid cDNA library induced by *Ralstonia solanacearum* and interaction protein screening and identification for MaTGA1 in mulberry roots. *Plant Physiol J*, 59: 2126–2134 (in Chinese with English abstract) [戴凡炜, 王振江, 罗国庆等(2023). 青枯菌诱导的桑树根部酵母双杂交文库构建和MaTGA1互作蛋白的筛选及鉴定. *植物生理学报*, 59: 2126–2134]
- Deng B, Cai ZY, Wang XM, et al (2022). Effects of ethylene-based induction on bud differentiation morphology and endogenous hormone content in three pineapple cultivars and endogenous hormone content. *South China Fruits*, 51: 63–70 (in Chinese) [邓彪, 蔡昭艳, 王小媚等(2022). 乙烯利诱导对3个菠萝栽培品种花芽分化形态与内源激素含量的影响. *中国南方果树*, 51: 63–70]
- Fan QQ, Wang ZH, Xiong B, et al (2015). Effects of several regulation measures on change of endogenous hormones in terminal bud at flowering stage and the flower-formation and fruit-setting of longan. *Guihaia*, 35: 685–691 (in Chinese with English abstract) [范茜茜, 汪志辉, 熊博等(2015). 几种调控措施对龙眼顶芽激素及成花坐果的影响. *广西植物*, 35: 685–691]
- FAO (2023). Faostat database. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Accessed 29 April 2025
- Fields S, Song O (1989). A novel genetic system to detect protein: protein interactions. *Nature*, 340: 245–246
- Finkelstein RR (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *ABI3* mutations. *Plant J*, 5: 765–771
- García A, Aguado E, Martínez C, et al (2020). The ethylene receptors *CpETR1A* and *CpETR2B* cooperate in the control of sex determination in *Cucurbita pepo*. *J Exp Bot*, 71: 154–167
- Gallie DR (2015). Appearance and elaboration of the ethylene receptor family during land plant evolution. *Plant Mol Biol*, 87: 521–539
- Gietz RD, Schiestl RH (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2: 31–34
- Iqbal N, Khan NA, Ferrante A, et al (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Front Plant Sci*, 8: 475
- Kendrick MD, Chang C (2008). Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 479–485
- Kurasawa K, Matsui A, Yokoyama R, et al (2009). The *AtXTH28* gene, a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, is involved in automatic self-pollination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 50: 413–422
- Li XK, Huang YH, Zhao R, et al (2024). Membrane protein MHZ3 regulates the on-off switch of ethylene signaling in rice. *Nat Commun*, 15: 5987
- Li YH, Sun GM, Zhang HN, et al (2016). Isolation and expression analysis of the genes encoding polar auxin transporter *AcPINs* and *AcAUXs* in pineapple. *Acta Horti Sin*, 43: 1916–1928 (in Chinese with English abstract) [李运合, 孙光明, 张红娜等(2016). 菠萝生长素极性运输载体基因*AcPINs*和*AcAUXs*的分离与表达分析. *园艺学报*, 43: 1916–1928]
- Li YH, Wu QS, Huang X, et al (2016). Molecular cloning and characterization of four genes encoding ethylene receptors associated with pineapple (*Ananas comosus* L.) flowering. *Front Plant Sci*, 7: 710
- Liu M, Wu QS, Liu SH, et al (2021). Combining single-molecule sequencing and Illumina RNA sequencing to elucidate flowering induction of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] treated with exogenous ethylene. *J Plant Growth Regul*, 94: 303–321
- Liu SH, Li YH, Yang YM, et al (2019). Research on summer flowering technology of ‘Tainong 17’ pineapple. *South China Fruits*, 48: 73–75 (in Chinese) [刘胜辉, 李运合, 杨玉梅等(2019). “台农17”菠萝夏季催花技术研究. *中国南方果树*, 48: 73–75]
- Maloba S, Ambuko J, Hutchinson M, et al (2017). Off-season flower induction in mango fruits using ethephon and potassium nitrate. *J Agr Sci*, 9: 158–167
- Rose JK, Braam J, Fry SC, et al (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol*, 43: 1421–1435
- Shi YR, Wu ML, Shan QW, et al (2024). Construction of yeast two-hybrid cDNA library and interacting protein screening and identification for StIPT in potato. *Plant Physiol J*, 60: 1747–1758 (in Chinese with English abstract) [石源睿, 吴美玲, 单虔文等(2024). 马铃薯酵母双杂交cDNA文库构建及StIPT互作蛋白筛选鉴定. *植物生理学报*, 60: 1747–1758]
- Shin YK, Yum H, Kim ES, et al (2006). BcXTH1, a *Brassica campestris* homologue of *Arabidopsis* XTH9, is associated with cell expansion. *Planta*, 224: 32–41
- Shu K, Chen Q, Wu YR, et al (2016). ABSCISIC ACID-IN-

- SENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting *Arabidopsis* *FLOWERING LOCUS C* transcription. *J Exp Bot*, 67: 195–205
- Shu K, Luo XF, Meng YJ, et al (2018). Toward a molecular understanding of abscisic acid actions in floral transition. *Plant Cell Physiol*, 59: 215–221
- Wuriyanghan H, Zhang BO, Cao WH, et al (2009). The ethylene receptor *ETR2* delays floral transition and affects starch accumulation in rice. *Plant Cell*, 21: 1473–1494
- Yan JD, Li XM, Zeng BJ, et al (2020). FKF1 F-box protein promotes flowering in part by negatively regulating DEL-*LA* protein stability under long-day photoperiod in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 62: 1717–1740
- Yang C, Lu X, Ma B, et al (2015). Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: conserved and diverged aspects. *Mol Plant*, 8: 495–505
- Zhang ZL, Fan HY, Hua M, et al (2012). Induction of pineapple flowering and underlying physiological and molecular bases. *Chin J Trop Crops*, 33: 950–955 (in Chinese with English abstract) [张治礼, 范鸿雁, 华敏等(2012). 菠萝开花诱导及其生理与分子基础. *热带作物学报*, 33: 950–955]
- Zhao H, Yin CC, Ma B, et al (2021). Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: new regulators and mechanisms. *J Integr Plant Biol*, 63: 102–125
- Zhu ZY, Yang YM, Sun GM, et al (2012). Natural flowering of pineapple and its suppression techniques. *China Trop Agr*, (5): 75–77 (in Chinese) [朱祝英, 杨玉梅, 孙光明等(2012). 菠萝自然开花及其抑制技术. *中国热带农业*, (5): 75–77]