

孙 宇, 刘志鑫, 叶 子, 等. 杧果 RAV 基因家族的全基因组分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(4): 957-967.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.04.019

杧果 RAV 基因家族的全基因组分析

孙 宇^{1,2}, 刘志鑫², 叶 子^{1,2}, 罗睿雄³, 刘晓妹^{1,2}, 蒲金基^{1,2}, 张 贺^{1,2}

(1. 海南大学植物保护学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海南 海口 571101; 3. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南 海口 571101)

摘要: 为了揭示 RAV 家族基因在杧果中的序列特征及其表达特性, 采用生物信息学方法对杧果 RAV 家族基因进行序列分析, 并通过 qRT-PCR 技术研究杧果胶孢炭疽菌和细菌性黑斑病菌侵染过程中该家族基因的相对表达量。结果表明, 从杧果基因组中鉴定出 6 个 RAV 基因家族成员, 其编码的蛋白质均具有 AP2 和 B3 超家族保守域结构, 命名为 *MiRAV1~MiRAV6*。*MiRAV1* 和 *MiRAV5* 为不稳定亲水碱性蛋白质, *MiRAV2* 和 *MiRAV3* 为不稳定亲水酸性蛋白质, *MiRAV4* 为稳定亲水酸性蛋白质, *MiRAV6* 为稳定亲水碱性蛋白质。杧果 RAV 基因编码的蛋白质主要定位于细胞核中, 无规则卷曲和 α -螺旋是 6 个 *MiRAVs* 蛋白二级结构的主要元件。系统进化树结合基序分析结果表明, 在杧果与拟南芥、烟草、苹果、菠萝和毛果杨中, RAV 家族基因具有多样性, 在进化上结构具有保守性。qRT-PCR 结果显示, 胶孢炭疽菌侵染过程中, 杧果 RAV 基因的相对表达量均显著下调; 细菌性黑斑病菌侵染过程中, *MiRAV1~MiRAV6* 的相对表达量在 3 h 时均显著下调, *MiRAV1*、*MiRAV2*、*MiRAV3* 和 *MiRAV6* 的相对表达量在 6 h 时均显著上调, *MiRAV1*、*MiRAV5* 和 *MiRAV6* 的相对表达量分别在 12 h、24 h、48 h、72 h 时均显著上调。以上发现将为研究杧果 RAV 基因家族成员的功能和作用机制奠定基础。

关键词: 杧果; RAV 基因家族; 全基因组鉴定; 表达分析

中图分类号: S667.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)04-0957-11

Genome-wide analysis of the RAV gene family in mango

SUN Yu^{1,2}, LIU Zhi-xin², YE Zi^{1,2}, LUO Rui-xiong³, LIU Xiao-mei^{1,2}, PU Jin-ji^{1,2}, ZHANG He^{1,2}

(1. College of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101, China; 3. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: In order to reveal the sequence and expression characteristics of RAV gene in *Mangifera indica*, the sequence of the RAV gene family was analyzed using bioinformatics methods, and the relative expression level of RAV gene family was studied by qRT-PCR during the infection of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. The results showed that six RAV gene family members were identified from the mango genome, and the encoded proteins had the conserved domains of the AP2 and B3 superfamily, named *MiRAV1-MiRAV6*. *MiRAV1* and *MiRAV5* were unstable hydrophilic basic proteins, *MiRAV2* and *MiRAV3* were unstable hydrophilic acidic proteins, *MiRAV4* was a

收稿日期: 2020-11-25

基金项目: 国家重点研发专项(2019YFD1000504); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630042017019)

作者简介: 孙 宇(1995-), 男, 海南三亚人, 硕士研究生, 研究方向为植物保护。(E-mail) sunyuqq@ qq.com

通讯作者: 张 贺, (E-mail) atzhezhe@ 163.com; 蒲金基, (E-mail) cata-spj@ 163.com

stable hydrophilic acidic protein, and *MiRAV6* was a stable hydrophilic basic protein. The proteins encoded by RAV gene of mango were mainly located in the nucleus, and random coil and α -helix were the main elements of secondary structure of six *MiRAVs* proteins. Phylogenetic tree construction combined with motif analysis showed that, among mango and *Arabidopsis thaliana*, tobacco, ap-

ple, pineapple and *Populus tomentosa*, the RAV family genes were diverse and their structure was conservative in evolution. The results of qRT-PCR indicated that the relative expression of RAV gene in mango was significantly down regulated during the infection of *Colletotrichum gloeosporioides*. During the infection of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the relative expression levels of *MiRAV1-MiRAV6* were significantly down regulated at 3 h, and the relative expression levels of *MiRAV1*, *MiRAV2*, *MiRAV3* and *MiRAV6* were significantly up-regulated at 6 h, and the relative expression levels of *MiRAV1*, *MiRAV5* and *MiRAV6* were significantly up-regulated at 12 h, 24 h, 48 h and 72 h, respectively. These results will lay a foundation for further study on the function and mechanism of RAV gene family members in mango.

Key words: mango; RAV gene family; genomic identification; expression analysis

转录因子,又称反式作用因子,其具有特殊的结构可调控基因表达,是植物中重要的调控因子。植物转录因子在胁迫反应中,对调控基因表达发挥重要作用^[1-3],当植物受到逆境胁迫时,转录因子与相应的顺式作用元件结合,可以调控下游相关基因的表达^[4]。RAV(Related to AB13/VP1)转录因子广泛存在于植物中,该家族同时具有 2 个保守结构域^[5-8]:位于 N 端,可与 GCC-box 区域特异性结合的 AP2 结构域;位于 C 端,可与 CACCTG 序列特异性结合的 B3 结构域^[9]。VP1/ABI3 以及 ARFs 转录因子家族都具有该结构域,主要调控植物对生长素和脱落酸的反应^[10]。RAV 属于 AP2/ERF 家族的一个亚家族,该家族还包含 ERF、AP2、DREB 亚家族^[11]。

迄今为止,RAV 基因家族成员已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[12-13]、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[14]、棉花(*Gossypium*)^[15]、东方山羊豆(*Galega orientalis*)^[16]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[17]、茶树(*Camellia sinensis*)^[18]等植物中被陆续克隆和鉴定。例如:在拟南芥中发现 7 个 RAV 基因家族成员 *AtRAV1~AtRAV7*,*AtRAV1* 和 *AtRAV2* 在拟南芥中参与应对外界胁迫和叶片衰老^[12-13];黄瓜中 *CsRAV* 在各个组织中均有表达^[14];棉花中 *GhRAV* 表达受黄萎病菌的诱导^[15];东方山羊豆中 *GoRAV* 表达不仅受低温和聚乙二醇的诱导,还受茉莉酸甲酯、水杨酸和脱落酸的诱导^[16];烟草中 *GmRAV* 过量表达会导致叶片失绿,同时抑制植株的生长^[17];茶树中 *CsRAV* 表达受 NaCl、乙烯和低温的诱导^[18]。RAV 基因广泛的分布表明它们在植物的生长发育和抗逆反应调控过程中起着非常重要的作用。

芒果(*Mangifera indica*),被称为热带水果之王,是热带地区重要的果树,也是农民脱贫致富的“金芒果”和“致富树”。随着 2020 年芒果全基因组测序的完成^[19],芒果基因功能的研究进程明显加快,然而目前国内外对芒果 RAV 基因家族的研究还未见报道。

为此,本研究对芒果 RAV 基因家族成员的序列特征及其表达特性进行分析,为芒果基因功能的分析以及芒果的遗传育种等方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 芒果生物胁迫处理

芒果嫁接苗由农业农村部儋州芒果种质资源圃提供,品种为贵妃芒。将株高约 60 cm,均匀一致,树龄 1 年的芒果嫁接苗移栽到花盆内,以室温 25℃,相对湿度 70%~90%,光周期 12 h(光)/12 h(暗)的条件下进行生物胁迫处理。设置胶孢炭疽菌和细菌性黑斑病菌 2 个处理,每个处理 3 株苗,处理 0 h 作为对照。以分生孢子含量为 1 ml 2×10^6 个的胶孢炭疽菌分生孢子悬浮液、含量为 2×10^7 CFU 的细菌性黑斑病菌悬浮液分别对芒果嫁接苗叶片均匀喷雾,取样时间分别为 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h,将芒果叶片剪碎,液氮速冻,−80℃ 保存待用。

1.2 芒果全基因组数据的来源

芒果全基因组数据来源于 NCBI (PRJNA487154),拟南芥、烟草、苹果(*Malus domestica*)、菠萝(*Ananas comosus*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*) 5 个物种的基因组和 RAV 基因信息分别来源于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 PlantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/>) 数据库。

1.3 芒果 RAV 基因家族成员的鉴定

从拟南芥数据库获取 *AtRAV1~AtRAV7* 氨基酸序列,并将其作为查询对象在芒果基因组数据库中执行 Blastp 比较($E \leq 10^{-10}$)。使用 Pfam 工具(<http://pfam.xfam.org/>)检测得到的芒果蛋白质氨基酸序列结构域,进一步去除没有典型 AP2 和 B3 结构域的蛋白质氨基酸序列,最终得到所有芒果 RAV 基因家族成员^[20]。其他 5 个物种中的 RAV 基因家族成员采用类似的方法进行筛选。

1.4 杧果 RAV 基因家族的生物信息学分析

通过在线工具 ProtParam 预测 RAV 相对分子量、等电点、外显子数、脂溶指数、氨基酸数等理化性质^[21];利用 PSORT 在线软件进行亚细胞定位预测;通过 SOPMA 在线软件预测蛋白质的二级结构;利用 NCBI Conserved Domain Search 预测 RAV 的保守结构域,再通过 SWISS-MODEL 在线工具对蛋白质保守域的三级结构进行预测;利用 MEME 在线软件对杧果 RAV 家族的蛋白质保守基序进行分析^[22],再通过 DNAMAN 6.0 软件进行高同源蛋白的氨基酸序列比对。

1.5 系统进化树分析

利用 ClustalW 程序对杧果和拟南芥、烟草、苹果、菠萝、毛果杨的 RAV 家族成员的氨基酸序列进行多序列比对。获得 RAV 蛋白氨基酸序列后使用 MEGA 7.0 软件,通过邻近法构建进化树,其中校验参数 Bootstrap 值设置为1 000次重复^[23]。

1.6 RNA 提取及 cDNA 合成

杧果叶片总 RNA 提取参照 RNeasy Pure 多糖

多酚植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司产品)说明书中的方法。利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录成第 1 链 cDNA^[24]。

1.7 杧果 RAV 基因家族表达分析

利用 QuantStudio 6 Flex 的实时荧光定量 PCR 检测系统检测胶孢炭疽菌和细菌性黑斑病菌侵染下杧果 RAV 家族基因的表达量,引物见表 1。反应体系为 18.0 μ l,设置 2 个复孔。反应程序参照 UltraSYBR Mixture 试剂盒说明书(北京康为世纪生物科技有限公司产品)进行设置。以杧果 *MiActin* 作为内参基因,0 h 的表达量为对照,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据统计,确定 *MiRAV1*~*MiRAV6* 的相对表达量^[25],并通过 HemI 1.0.3.7 软件绘制热图,其中设置胶孢炭疽菌相对表达量热图参数(条形图的数量)为 11,小数点位数值为 2,最小值为-20,阶跃值为 2;设置细菌性黑斑病菌相对表达量热图参数(条形图的数量)为 11,小数点位数值为 2,最小值为-2,阶跃值为 2。整个表达矩阵每个值进行对数转化,底数为 2。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	前引物 (5'→3')	后引物 (5'→3')	片段大小 (bp)	熔解曲线温度(℃)
<i>MiRAV1</i>	ATCGAGGCTGACTCAAGGAA	GCCGTTTGTTTGAAGTTGGT	209	81.69
<i>MiRAV2</i>	AGAAGCATCAACGGGTATGG	TTGCTCTCTTCGAGCTCCTC	235	74.15
<i>MiRAV3</i>	AGAAGCATCAACGGGTATGG	TTGCTCTCTTCGAGCTCCTC	235	71.79
<i>MiRAV4</i>	TGCCCTAAATGGAGGAGTTG	TGTGCCCTCACAAACGATAAA	190	73.75
<i>MiRAV5</i>	GCATCACTGCTCAAGAACCA	CTGAAATAGCTCACGGCACA	197	77.79
<i>MiRAV6</i>	CGAGGCAGACTCAAGAAAGC	GCCGTTTGTTTGAAGTTGGT	207	80.52
<i>MiActin</i>	GTTTCCCACTATGCTGGGTAGG	AGATCTTTTCCATATCATCCAGTT	167	83.73

2 结果与分析

2.1 全基因组水平鉴定杧果 RAV 基因家族成员

在杧果基因组数据库中进行 Blastp 检索,发现杧果 RAV 基因家族有 6 个成员,分别命名为 *MiRAV1*~*MiRAV6*。通过生物学在线分析工具 ProtParam 对杧果 RAV 基因家族 6 个成员 *MiRAV1*~*MiRAV6* 编码的蛋白质氨基酸序列的理化性质进行了分析,结果(表 2)表明,6 个 *MiRAVs* 蛋白相对分子质量为 32 523 340~44 122 280,蛋白质等电点为 5.83~9.34,外显子数均为 2,脂溶指数为 58.93~

74.31,氨基酸数为 281~392 个,不稳定指数为 34.14~46.61,亲水性平均数为-0.506~-0.863。因此,预测这 6 个 *MiRAVs* 蛋白中 *MiRAV1* 和 *MiRAV5* 为不稳定亲水碱性蛋白质,*MiRAV2*~*MiRAV3* 为不稳定亲水酸性蛋白质,*MiRAV4* 为稳定亲水酸性蛋白质,*MiRAV6* 为稳定亲水碱性蛋白质。

对杧果 RAV 家族成员进行亚细胞定位预测,结果(表 3)显示,它们主要定位于细胞核中,其次定位于叶绿体和细胞质中,推断该家族成员主要存在于进行光合作用的器官中。其中,只有 *MiRAV1* 和 *MiRAV4* 没有定位于叶绿体,*MiRAV4* 和 *MiRAV6* 没

有定位于细胞质、线粒体、过氧化氢酶体、质膜定位的 *MiRAVs* 成员最少。

表 2 杧果 RAV 家族蛋白质基本信息

Table 2 Basic information of RAV family proteins in mango

蛋白质	氨基酸序列	相对分子质量	等电点	脂溶指数	氨基酸数	不稳定指数	亲水性平均系数
MiRAV1	GWHPABLA011374	44122 280	9.34	74.31	392	42.32	-0.560
MiRAV2	GWHPABLA020547	32523 340	5.83	58.93	281	40.09	-0.828
MiRAV3	GWHPABLA020764	32574 470	5.89	59.96	281	41.05	-0.816
MiRAV4	GWHPABLA022421	38588 950	6.73	59.61	332	34.14	-0.863
MiRAV5	GWHPABLA025995	39717 050	7.08	69.97	344	46.61	-0.506
MiRAV6	GWHPABLA033587	40575 860	9.03	67.78	361	36.18	-0.591

表 3 杧果 RAV 家族蛋白质亚细胞定位预测

Table 3 Subcellular location prediction of RAV family proteins in mango

蛋白质	细胞核	叶绿体	细胞外	细胞质	细胞骨架	线粒体	过氧化物酶体	质膜	液泡
MiRAV1	11	-	-	2	1	-	-	-	-
MiRAV2	8	1	1	1	-	-	2	-	1
MiRAV3	10	1	1	1	-	1	-	-	-
MiRAV4	13	-	-	-	-	-	-	1	-
MiRAV5	10	1	-	3	-	-	-	-	-
MiRAV6	11	1	-	-	1	-	-	-	1

“-”表示没有定位到。

通过 SOPMA 在线软件对 MiRAV1~MiRAV6 蛋白进行二级结构预测。如图 1 所示,6 个 *MiRAVs* 蛋白无规则卷曲结构占比为 44.58%~54.85%, α -螺旋结构占比为 21.88%~31.67%,延伸链结构占比为 16.86%~19.13%, β -转角结构占比为 4.85%~7.56%。因此,预测无规则卷曲和 α -螺旋是 6 个 *MiRAVs* 蛋白二级结构的主要元件,其次是延伸链和 β -转角。

通过 NCBI Conserved Domain Search 对杧果 RAV 家族蛋白质氨基酸序列进行保守结构域分析,发现 MiRAV1~MiRAV6 蛋白均含有 AP2 和 B3 超家族保守域(图 2)。6 个 *MiRAVs* 蛋白 AP2 超家族保守域位置介于 18~124;B3 超家族保守域位置介于 137~291。基于同源建模原理,通过 SWISS-MODEL 软件对杧果 RAV 蛋白的 2 个保守结构域(AP2、B3)三级结构进行预测,发现在 AP2 保守结构域中,含有 1 个 α -螺旋和 3 个反向平行的 β -转角;B3 保守结构域中,含有 1 个 α -螺旋、2 个反向平行的 β -折叠和延伸链。

2.2 杧果 RAV 蛋白系统进化树分析

为了更好地了解杧果 RAV 基因家族的系统发育关

系,将杧果(6 个)、拟南芥(7 个)、烟草(5 个)、苹果(11 个)、菠萝(2 个)、毛果杨(5 个)RAV 基因编码的蛋白质氨基酸序列通过 Blast 工具进行蛋白质氨基酸序列分析,利用 ClustalW 程序和 MEGA 7.0 软件构建 6 个杧果 RAV 蛋白与其他物种(共 5 种)植物 RAV 蛋白系统进化树(图 3),将 36 个 RAV 成员分成 3 个分支(Class I、Class II 和 Class III),结果显示,6 个物种的 RAV 蛋白家族成员相互嵌合在一起,表明植物 RAV 在进化过程中相对保守。每个分支中均存在 2 个杧果 RAV 成员,其中,Class I 包含杧果 2 个、拟南芥 2 个、毛果杨 3 个、苹果 5 个和烟草 1 个;Class II 包含杧果 2 个、苹果 4 个、菠萝 2 个和拟南芥 5 个;Class III 包含杧果 2 个、毛果杨 2 个、烟草 4 个和苹果 2 个。在 36 个 RAV 成员中,MiRAV1、MiRAV6 分别与 MDP0000128924、MDP0000939633 亲缘关系最近,MiRAV2、MiRAV3 分别与 AtRAV1、AtRAV7 亲缘关系最近,MiRAV4 与 MDP0000207722、MDP0000485280 亲缘关系最近,MiRAV5 与 Potri.018G109200.1、Potri.018G109200.2 亲缘关系最近。因此,推测 RAV 家族蛋白质不仅具有多样性,对于亲缘关系较近的蛋白质,它们还具有相似或相近的生物学功能。

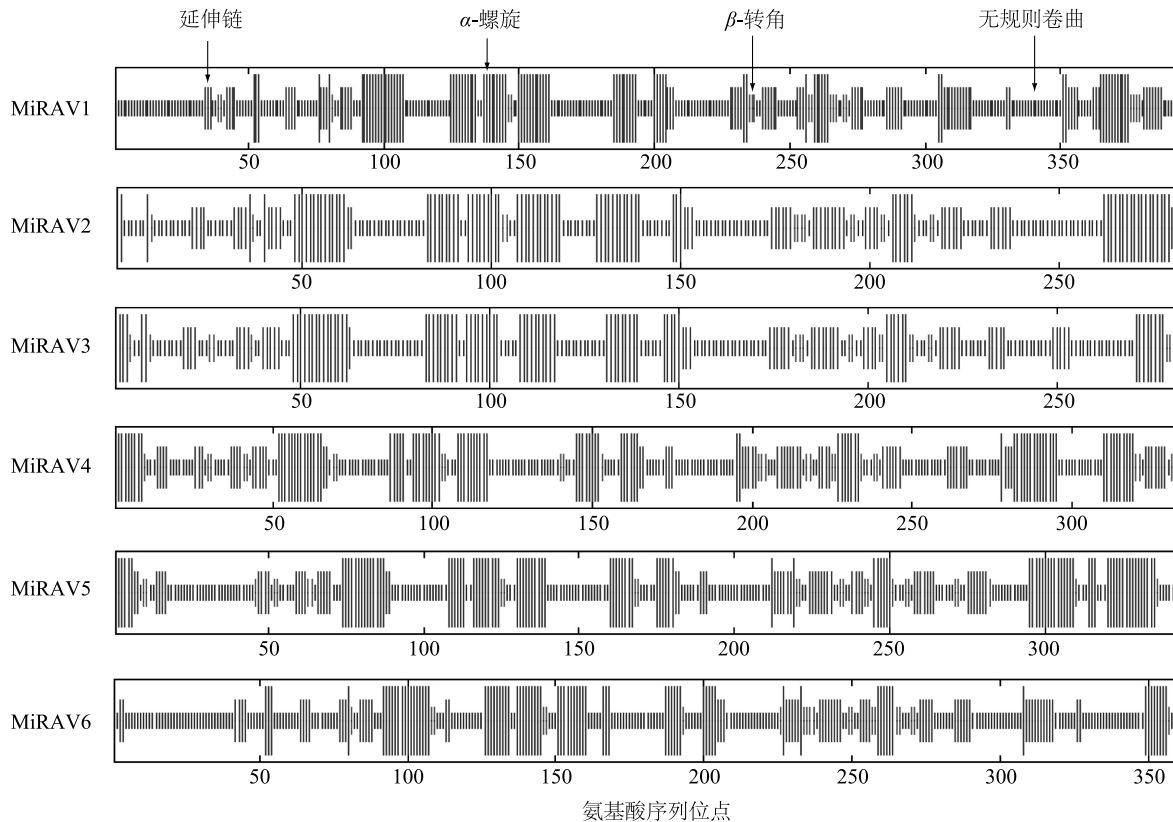


图1 杧果 RAV 家族的二级结构预测

Fig.1 Secondary structure prediction of RAV family in mango

2.3 杧果 RAV 家族蛋白质 motif 和保守结构域分析

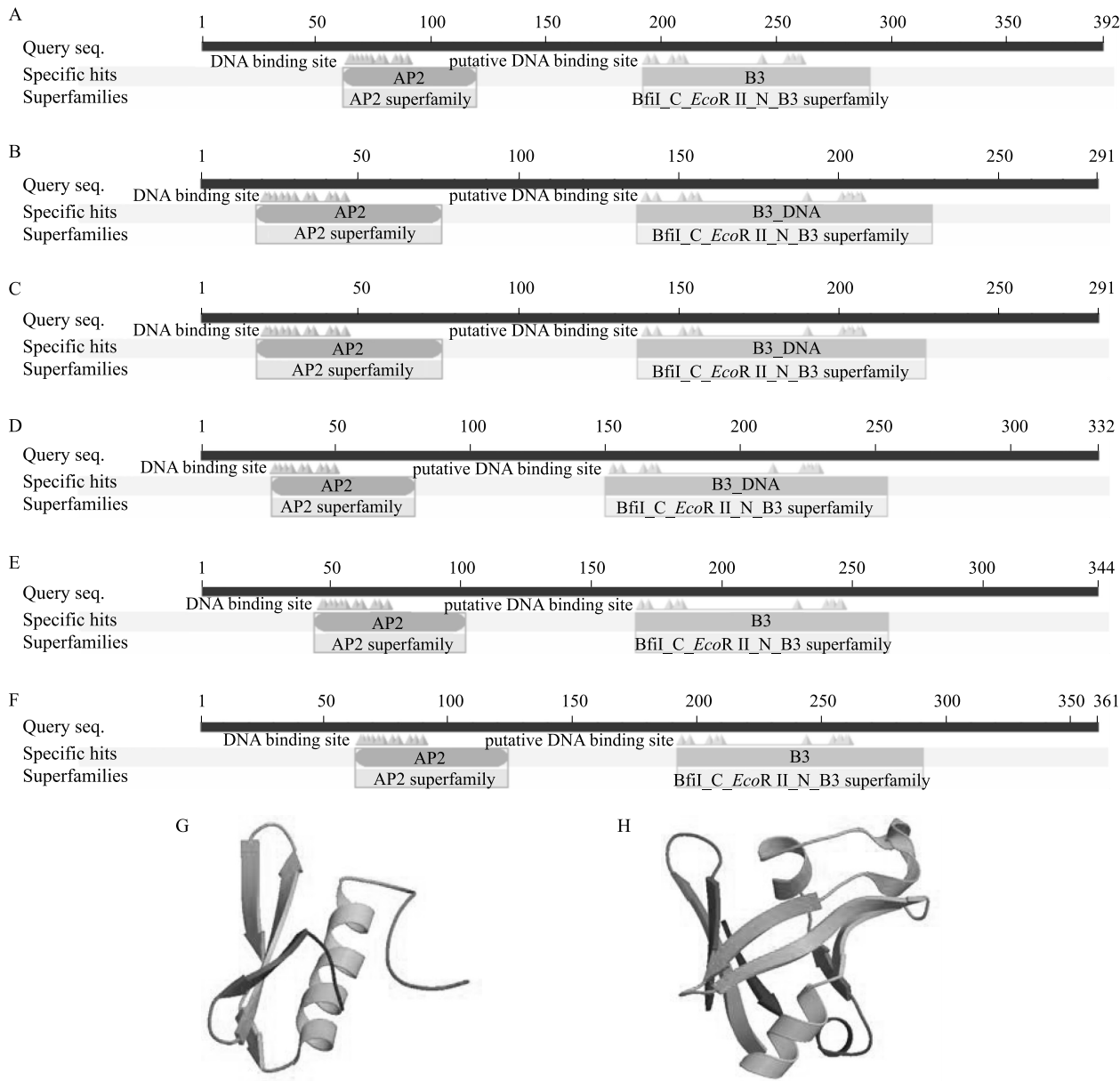
基于在线软件 MEME 对杧果、拟南芥、烟草、苹果、菠萝、毛果杨 RAV 转录因子家族的蛋白质保守基序进行分析(图4),在 RAV 转录因子家族中鉴定出 5 个保守基序,主要的保守基序有 4 个(motif1~motif4),N 端均存在保守的 motif1,C 端均存在保守的 motif2。其中,MiRAV4~MiRAV5、AtRAV3~AtRAV4、MDP0000526584、MDP0000534780、MDP0000165802、MDP0000207722、MDP0000485280、Potri. 018G109200. 1、Potri. 018G109200. 2、Potri. 003G212800. 1、XP_016492322.1 不含有 motif5。通过基序分析发现,RAV 基因家族在进化上结构具有保守性。

通过 DNAMAN 6.0 软件对杧果 6 个 RAV 蛋白和拟南芥 7 个、烟草 5 个、苹果 11 个、菠萝 2 个、毛果杨 5 个 RAV 蛋白进行多序列比对。结果(图5)发现,MiRAV1~MiRAV6 与 5 个物种的 RAV 转录因子家族存在 2 个相似的保守域 A 和保守域 B,保守域 A 与 motif1 基本重叠,保守域 B 与 motif2、motif3 基本重叠。因此,可以推测 motif1、motif2 和 motif3

是构成 AP2、B3 结构域的主要结构。

2.4 杧果 RAV 基因家族的胁迫响应

以杧果 *MiActin* 作为内参基因,0 h 处理作为对照,利用 qRT-PCR 检测并分析了 2 种病原菌侵染过程中杧果 RAV 家族基因的表达程度。qRT-PCR 结果显示,MiRAV1~MiRAV6 和内参基因 *MiActin* 的熔解曲线为单峰,熔解温度分别为 81.69 °C、74.15 °C、71.79 °C、73.75 °C、77.79 °C、80.52 °C、83.73 °C,将 qRT-PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳,结果(图6)显示,目标条带单一,清晰,与预计大小一致,说明所设计的引物具有特异性;杧果胶孢炭疽菌侵染过程中(图7A),MiRAV1~MiRAV6 的相对表达量均显著下调,其中 MiRAV1~MiRAV6 相对表达量在 6 h 时达到最低值,MiRAV1~MiRAV5 的相对表达量在 72 h 时达到最高值,MiRAV6 的相对表达量在 48 h 时达到最高值;杧果细菌性黑斑病菌侵染过程中(图7B),MiRAV1~MiRAV6 的相对表达量在 3 h 时均显著下调,MiRAV1、MiRAV2、MiRAV3 和 MiRAV6 的相对表达量在 6 h 时显著上调,MiRAV1、MiRAV5 和 MiRAV6 的相对表达量分别在 12 h、24 h、48



A; MiRAV1; B; MiRAV2; C; MiRAV3; D; MiRAV4; E; MiRAV5; F; MiRAV6; G; MiRAV 蛋白 AP2 三级结构预测模型; H; MiRAV 蛋白 B3 三级结构预测模型。

图 2 杧果 RAV 蛋白保守结构域分析及三级结构预测

Fig.2 Conserved domain analysis and tertiary structure prediction of RAV protein in mango

h、72 h 时均显著上调。结果表明,在不同病原菌侵染过程中, *MiRAV1* ~ *MiRAV6* 的相对表达量与对照差异显著。

3 讨论

基因组测序技术的提高和分子生物学研究的深入,为植物基因家族的鉴定、功能基因的挖掘提供了基础,大量植物全基因组已经被成功测序。RAV 家

族是一类植物特异的转录因子,广泛存在于植物细胞内。在拟南芥^[12-13]、黄瓜^[14]、棉花^[15]、东方山羊豆^[16]、烟草^[17]、茶树^[18] 等中关于 RAV 已开展相应研究,主要体现在参与应对外界胁迫和叶片衰老等方面功能,但关于其杧果 RAV 转录因子家族的研究至今仍未见报道。

本研究在杧果全基因组水平鉴定到 6 个 RAV 基因,理化性质分析结果表明, *MiRAV1* 和 *MiRAV5*

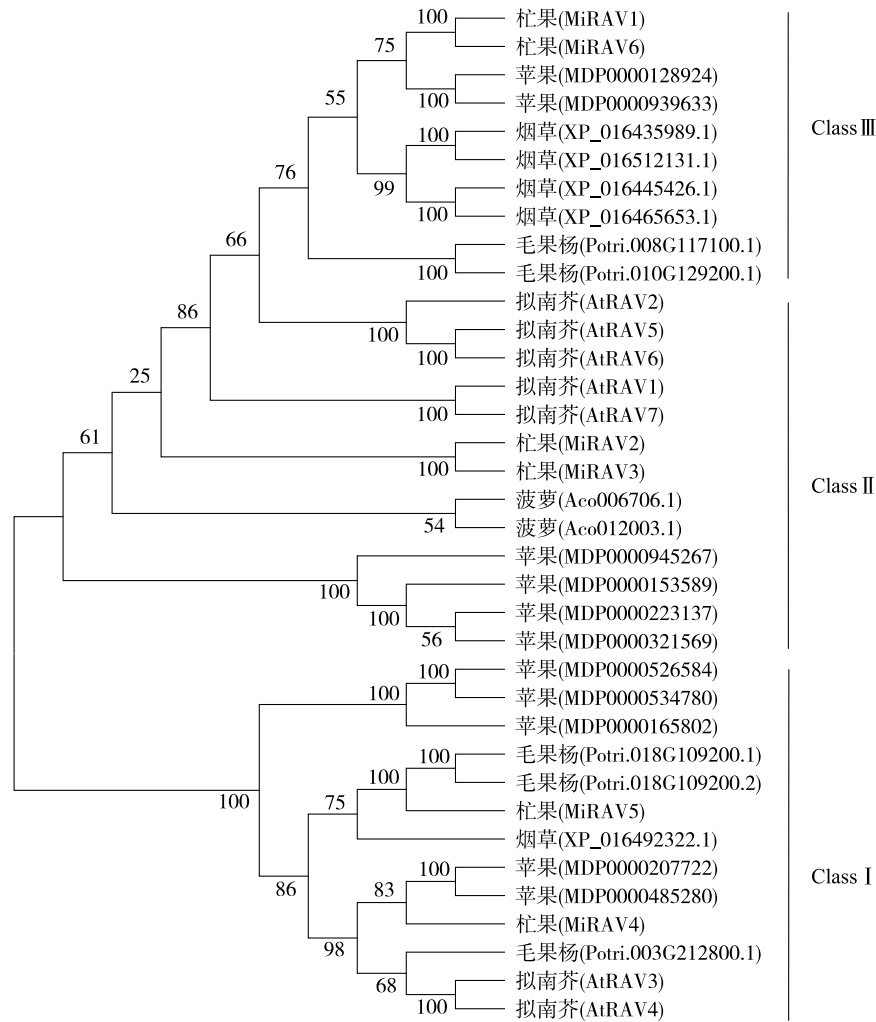
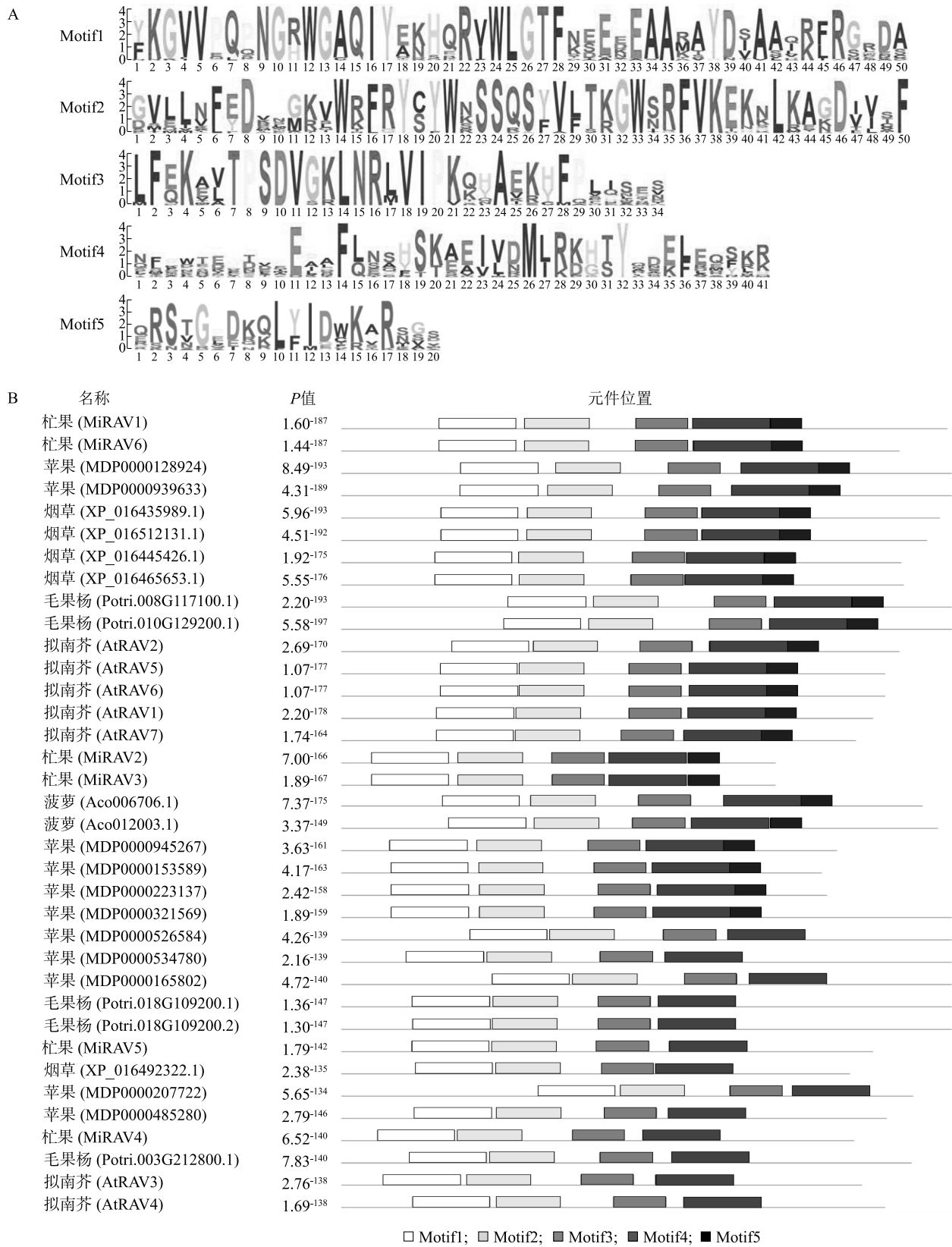


图3 36个RAV蛋白系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed from 36 RAV proteins

为不稳定亲水碱性蛋白质, MiRAV2 和 MiRAV3 为不稳定亲水酸性蛋白质, MiRAV4 为稳定亲水酸性蛋白质, MiRAV6 为稳定亲水碱性蛋白质。杧果 RAV 蛋白主要存在于细胞核中, 无规则卷曲和 α -螺旋是 6 个 MiRAVs 蛋白二级结构的主要元件, 均具有 AP2 和 B3 超家族保守域结构, AP2 保守域三级结构含有 1 个 α -螺旋和 3 个反向平行的 β -转角, B3 保守域三级结构含有 1 个 α -螺旋、2 个反向平行的 β -折叠和延伸链, 据此推断它们在调控生物性状上存在协同作用。杧果与拟南芥、烟草、苹果、菠萝、毛果杨 RAV 蛋白家族构建系统进化树结合基序分析结果显示, 6 个物种的 RAV 蛋白家族成员相互嵌合在一起, 表明植物 RAV 基因在进化过程中相对保守; 在模式植物拟南芥中参与应对外界胁迫和叶片

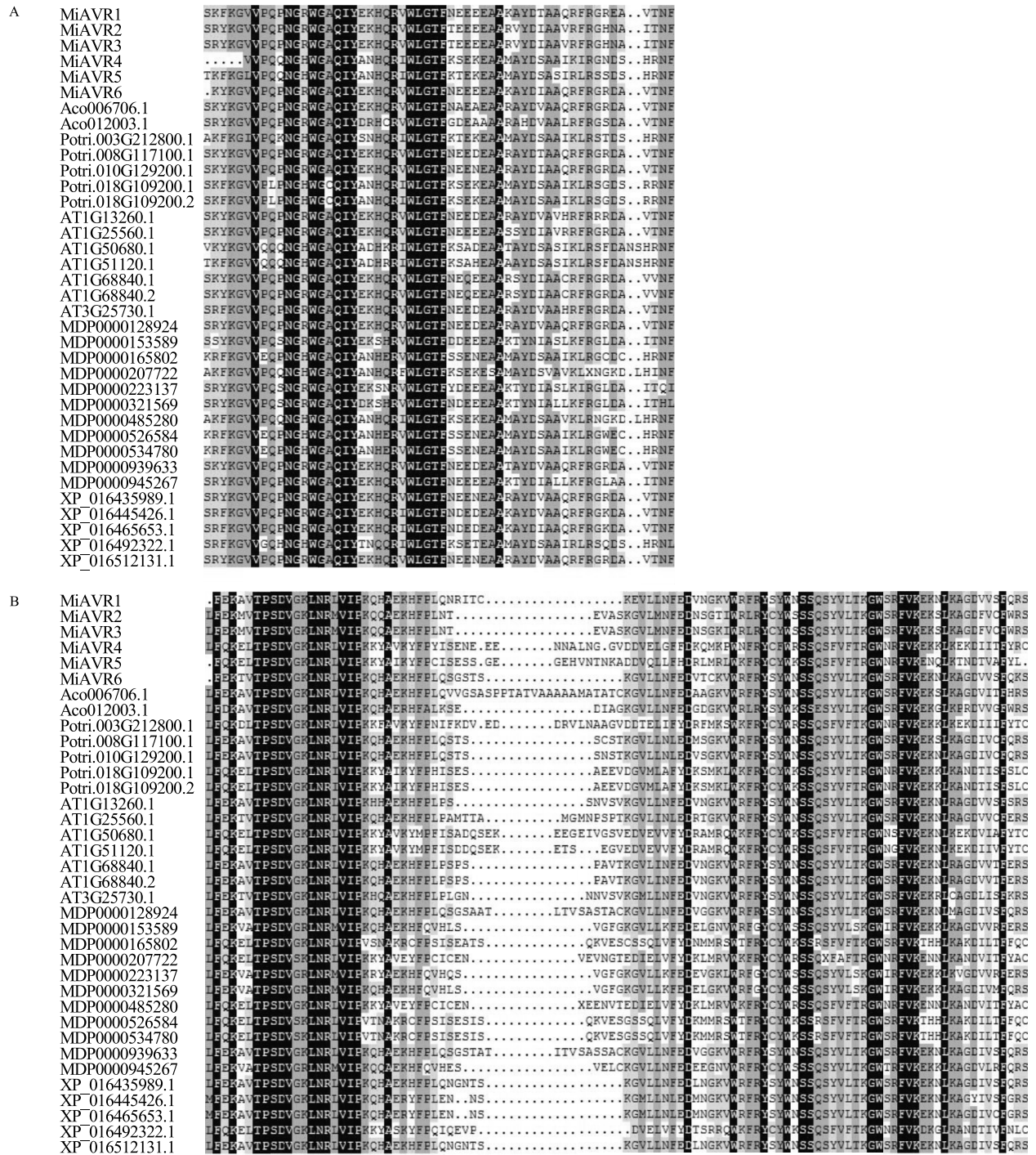
衰老的基因 *AtRAV1* 和 *AtRAV2* 被聚类到 Class II 中, 因此, 推断该 Class II 分支下的杧果 *MiRAV2* 和 *MiRAV3* 基因可能与应对外界胁迫和叶片衰老有关^[12-13]; 对于亲缘关系较近的蛋白质, 推断它们还具有相似或相近的生物学功能; 杧果 RAV 蛋白主要的保守基序有 4 个 (motif1 ~ motif 4), *N* 端均存在保守的 motif1, *C* 端均存在保守的 motif2, motif1 ~ motif 3 与卢合均等^[15] 研究棉花时所鉴定到的 motif1 ~ motif3 基本一致, motif1 与韩林贺等^[26] 研究普通烟草时所鉴定到的 motif1 基本一致; 杧果与其他 5 个物种 RAV 蛋白进行多序列比对结果显示, 存在 2 个明显的保守域 A 和保守域 B, 保守域 A 与 motif1 基本重叠, 保守域 B 与 motif2、motif3 基本重叠, 因此, 可以推测 motif1 是构成 AP2 的主要结构, motif2 和



A:RAV 家族 motif 分析;B:MEME 预测的 5 个保守位点 LOGO 图。

图 4 36 个 RAV 蛋白保守基序分析

Fig.4 Conserved motif analysis of 36 RAV proteins



A: 杧果、菠萝、毛果杨、拟南芥、苹果和烟草 RAV 蛋白中 AP2 结构域的多序列比对; B: 杧果、菠萝、毛果杨、拟南芥、苹果和烟草 RAV 蛋白中 B3 结构域的多序列比对。

图 5 杧果与其他 5 个物种 RAV 蛋白保守域序列分析

Fig.5 Sequence analysis of RAV protein conserved domain in mango and five other species

motif3 是构成 B3 的主要结构。

中国杧果病害危害严重, 常见的病害有炭疽病、细菌性黑斑病、白粉病、蒂腐病、疮痂病等^[27-28], 其中, 杧果胶孢炭疽病与细菌性黑斑病为害杧果最为

严重^[29-30]。为了解杧果 RAV 基因在胶孢炭疽菌与细菌性黑斑病菌侵染下相对表达量的变化, 对杧果叶片进行胶孢炭疽菌与细菌性黑斑病菌生物胁迫处理, 并通过 qRT-PCR 技术研究胶孢炭疽菌与细菌性

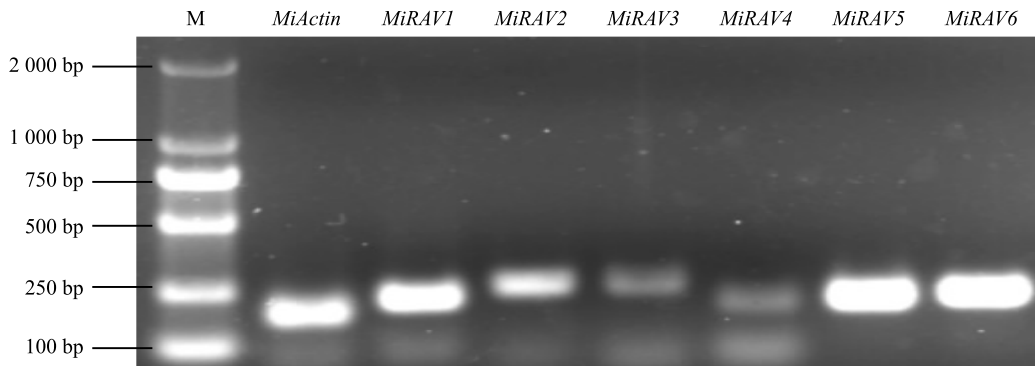


图 6 qRT-PCR 产物电泳图

Fig.6 Electrophoresis of qRT-PCR products

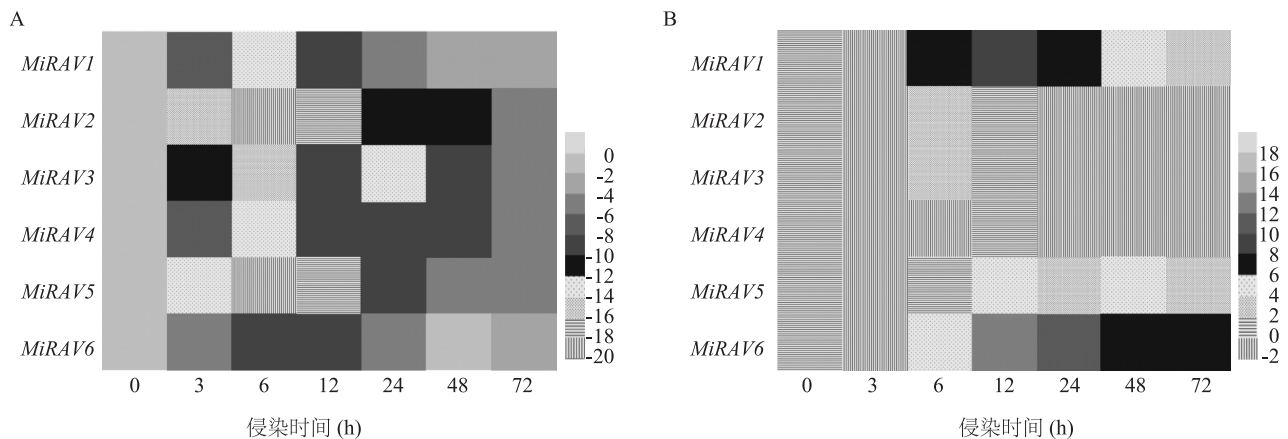
A: 芒果胶孢炭疽菌侵染过程中, *MiRAV1*~*MiRAV6* 的相对表达量; B: 芒果细菌性黑斑病菌侵染过程中, *MiRAV1*~*MiRAV6* 的相对表达量。

图 7 芒果 RAV 基因家族在不同病原菌胁迫下的表达

Fig.7 Expression analysis of RAV gene family in mango under different pathogen stress treatments

黑斑病菌侵染过程中芒果 RAV 家族基因的相对表达量。结果显示,在不同病原菌侵染过程中,*MiRAV1*~*MiRAV6* 的相对表达量与对照差异显著,表明 *MiRAV1*~*MiRAV6* 对生物胁迫有响应。RAV 基因家族的表达分析研究,更多集中在 MeJA^[16]、NaCl^[18]、ABA 和低温^[26]等非生物胁迫上,也有前人在研究中提到 RAV 基因对棉花黄萎病菌^[15]、番茄青枯病菌^[31]等生物胁迫的响应,本研究通过对芒果接种胶孢炭疽菌与细菌性黑斑病菌后的分析,发现了此家族的部分成员在胶孢炭疽菌与细菌性黑斑病菌侵染植株之后出现上调表达的现象,表明 RAV 基因可能在芒果提高抗炭疽病和细菌性黑斑病的能力方面起着积极作用,如 *MiRAV1*、*MiRAV5*、*MiRAV6* 在细菌性黑斑病菌侵染后的 12~72 h 显著上调表达,可以作为后续研究芒果抗细菌性黑斑病机制的候选基因,

这也在分子水平上拓宽了芒果响应生物胁迫的机制。

参考文献:

- [1] OHAMA N, SATO H, SHINOZAKI K, et al. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(1): 53-65.
- [2] KIM Y S, AN C, PARK S, et al. CAMTA-mediated regulation of salicylic acid immunity pathway genes in arabidopsis exposed to low temperature and pathogen infection[J]. The Plant Cell, 2017, 29(10): 2465-2477.
- [3] PRASAD K V S K, ABDRL-HAMEED A A E, XING D, et al. Global gene expression analysis using RNA-seq uncovered a new role for SR1/CAMTA3 transcription factor in salt stress[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 443-448.
- [4] SCHWECHHEIMER C, BEVAN M. The regulation of transcription factor activity in plants[J]. Trend in Plant Science, 1998, 3(10): 278-283.

- [5] GIRAUDAT J, HAUGE B M, VALON C, et al. Isolation of the Arabidopsis *ABI3* gene by positional cloning[J]. The Plant Cell, 1992, 4(10): 1251-1261.
- [6] SUZUKI M, KAO C Y, MCCARTY D R. The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity[J]. The Plant Cell Online, 1997, 9(5): 799-807.
- [7] RIECHMANN J L, LAIN S, GARCIA J A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology[J]. Journal of General Virology, 1992, 73(1): 1-16.
- [8] KAGAYA Y, OHMIYA K, HATTORI T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartiterecognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(2): 470.
- [9] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. Science, 2000, 290(10): 2105.
- [10] FINKELSTEIN R R, WANG M L, LYNCH T J, et al. The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein[J]. Plant Cell, 1998, 10(6): 1043.
- [11] 孙 尧, 孙 鑫, 王 雷. 毛果杨 *RAV/PLC* 基因生物信息学分析[J]. 广东农业科学, 2019, 46(12): 36-41, 153.
- [12] HU Y X, WANG Y X, LIU X F, et al. Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development[J]. Cell Research, 2004, 14(1): 8-15.
- [13] SOHN K H, LEE S C, JUNG H W, et al. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 61(6): 897-915.
- [14] 蒋伦伟, 胡丽芳, 袁永成, 等. 黄瓜 *RAV* 基因家族的全基因组分析[J]. 中国蔬菜, 2012, 1(16): 15-21.
- [15] 卢合均, 周忠丽, 陈浩东, 等. 棉花 *RAV* 基因家族的全基因组分析[J]. 棉花学报, 2014, 26(6): 471-482.
- [16] CHEN X, WANG Z, WANG X, et al. Isolation and characterization of GoRAV, a novel gene encoding a RAV-type protein in *Galegae orientalis*[J]. Genes Genet Syst, 2009, 84(2): 101.
- [17] SRINIVASAN C, LIU Z R, HEIDMANN I, et al. Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. Planta, 2007, 225: 341-351.
- [18] 陈林波, 李叶云, 王 琴, 等. 茶树冷诱导基因 *RAV* 的克隆与表达特性分析[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 354.
- [19] PENG W, YING F L, JIAN F H, et al. The genome evolution and domestication of tropical fruit mango[J]. Genome Biology, 2020, 21(1). Doi:10.1186/s13059-020-01959-8.
- [20] FINN R D, COGGILL P, EBERHARDT R Y, et al. The pfam protein families database: towards a more sustainable future[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44: 279-285.
- [21] GASTEIGER E, GATTIKER A, HOOGLAND C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [22] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: 202-208.
- [23] KUMAR S, STECHER G, TAMUR K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [24] 夏 杨, 苏初连, 晁 骏, 等. 菠萝 *VOZ* 转录因子序列特征及其对非生物胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2018, 38(7): 1228-1234.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. Methods-A Companion to Methods in Enzymology, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] 韩林贺, 徐同庆, 任昂彦, 等. 普通烟草 *RAV* 家族基因结构与功能分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(4): 1658-1665.
- [27] 蒲金基, 张 贺, 周文忠. 芒果病害综合防治技术[J]. 中国热带农业, 2015(3): 38-42.
- [28] 杨郑州, 黄柳芳, 谢晓娜, 等. 叶疫病菌侵染芒果后叶片细胞壁降解酶活性测定[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(10): 138-141.
- [29] 喻群芳, 漆艳香, 张辉强, 等. 4 种生防菌对芒果细菌性黑斑病的田间防效[J]. 中国热带农业, 2019(3): 23-25.
- [30] 于海英, 兰建强, 王晓燕, 等. 芒果胶孢炭疽菌致病性的初步研究[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2012: 210-213.
- [31] LI C W, SU R C, CHENG C P, et al. Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway[J]. Plant Physiology, 2011, 156(1): 213-227.

(责任编辑: 陈海霞)