

## 木薯 *MeHsfB3a* 基因的克隆及其抗细菌性枯萎病功能鉴定

李琳琳<sup>1</sup>, 王超群<sup>1</sup>, 李春霞<sup>1</sup>, 骆凯<sup>1</sup>, 王红刚<sup>1</sup>, 陈银华<sup>1</sup>, 张肖飞<sup>2</sup>, 耿梦婷<sup>1\*</sup>

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 国际热带农业中心, 哥伦比亚卡利 AA 6713

**摘要:** 木薯是热带地区重要的粮食作物, 菜豆黄单胞菌属木薯细菌性枯萎病致病种 (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, *Xpm*) 侵染引起的细菌性枯萎病是木薯的重要病害。挖掘、鉴定木薯抗 *Xpm* 病原菌侵染的基因, 并解析其抗病机制有利于开发木薯抗病种质。植物热激转录因子 (heat shock transcription factors, Hsfs) 在植物抵御生物胁迫和非生物胁迫的过程中发挥重要作用。本研究利用 RT-PCR 技术从 ‘华南 8 号’ (‘SC8’) 木薯品种克隆热激蛋白转录因子基因 *MeHsfB3a* 的全长。生物信息学分析发现 *MeHsfB3a* 含有 2 个外显子和 1 个内含子, 全长 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 蛋白理论相对分子质量 27.9 kDa, 理论等电点 pI 为 7.59, 理论不稳定系数为 56.86, 属于不稳定蛋白质, 亲水性平均指数 -0.880, 表明该蛋白水溶性较好, 脂溶指数为 65.98。亚细胞定位预测该蛋白可定位于细胞核。利用 qRT-PCR 技术分析发现 *MeHsfB3a* 在嫩叶、成熟叶、顶芽、叶柄、块根、须根均有表达, 在成熟叶中的表达量最高, 在其他器官中的表达量较少。采用 *Xpm*HN11 病原菌侵染木薯 ‘SC8’ 叶片 0、3、6 h 和 1、3、6 d 后分析 *MeHsfB3a* 表达, 发现 1 d 以后该基因的表达显著提高。说明 *MeHsfB3a* 参与 ‘SC8’ 木薯对 *Xpm*HN11 病原菌的响应过程。采用 VIGS 技术沉默木薯 ‘SC8’ 的 *MeHsfB3a* 基因, 该基因沉默效率降低了 68.26%~82.44%。接种 *Xpm*HN11 病原菌至沉默植株叶片, 于接菌 0、3、6 d 进行发病情况分析, 发现沉默植株的病斑面积显著高于对照。本研究鉴定了热激蛋白转录因子基因 *MeHsfB3a* 参与木薯抗 *Xpm*HN11 病原菌侵染的过程, 有助于进一步解析木薯对细菌性枯萎病的抗病机理。

**关键词:** 热激转录因子; 基因表达; VIGS; *MeHsfB3a* 基因

中图分类号: S533; S435.33 文献标识码: A

## Cloning of Cassava *MeHsfB3a* Gene and Identification of Its Resistance to Cassava Bacterial Blight

LI Linlin<sup>1</sup>, WANG Chaoqun<sup>1</sup>, LI Chunxia<sup>1</sup>, LUO Kai<sup>1</sup>, WANG Honggang<sup>1</sup>, CHEN Yinhua<sup>1</sup>, ZHANG Xiaofei<sup>2</sup>, GENG Mengting<sup>1\*</sup>

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. International Center for Tropical Agriculture, Cali AA 6713, Colombia

**Abstract:** Cassava is an important food crop in tropical regions. Cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) is an important disease of cassava. Excavating and identifying the genes of cassava resistance to *Xpm* and analyzing its disease resistance mechanism are beneficial to the development of cassava disease-resistant germplasm. Plant heat shock transcription factors (Hsfs) play an important role in the process of plants resisting biotic and abiotic stresses. In this study, the full-length heat shock protein transcription factor gene *MeHsfB3a* was cloned from cassava cultivar ‘Huanan 8’ (‘SC8’) by RT-PCR technology. Bioinformatics analysis found that *MeHsfB3a* contained two exons and one intron, with a full length of 729 bp, encoding 242 amino acids with 27.9 kDa and pI=7.59. The theoretical instability coefficient was 56.86, which is an unstable protein, and the average hydrophilicity index was -0.880, indicating that the protein has good water solubility, and the fat solubility index was 65.98. The protein was

收稿日期 2022-04-23; 修回日期 2022-05-08

基金项目 海南大学世界一流学科建设经费专项 (No. RZZX201907); 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC492); 国家木薯产业技术体系 (No. CARS-11-HNCYH)。

作者简介 李琳琳 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物分子育种。\*通信作者 (Corresponding author): 耿梦婷 (GENG Mengting), E-mail: mengtinggeng8908@163.com。

predicted to localize in the nucleus. qRT-PCR analysis found that *MeHsfB3a* was expressed in young leaves, mature leaves, terminal buds, petioles, tuberous roots and fibrous roots, with the highest expression in mature leaves and less in other organs. The expression of *MeHsfB3a* was analyzed after 0 h, 3 h, 6 h, 1 d, 3 d and 6 d after infection of cassava ‘SC8’ leaves by pathogen *XpmHN11*, and it was found that the expression of this gene was significantly increased after 1 d. This indicated that *MeHsfB3a* was involved in the response of ‘SC8’ cassava to *XpmHN11*. The *MeHsfB3a* gene of cassava ‘SC8’ was silenced by the VIGS technology, and the gene silencing efficiency reached 68.26%–82.44%. The leaves of silent plants were inoculated with *XpmHN11*, and the disease incidence was analyzed on 0 d, 3 d, and 6 d of inoculation, and it was found that the area of disease spots of the silent plants was significantly higher than that of the control. This study identified the heat shock protein transcription factor gene *MeHsfB3a* involved in the process of cassava resistance to *XpmHN11*, which would help to further analyze the disease resistance mechanism of cassava to cassava bacterial blight.

**Keywords:** heat shock transcription factor; gene expression; VIGS; *MeHsfB3a* gene

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.01.002

植物在生长发育过程中面临生物胁迫和非生物胁迫,为了应对胁迫以维持正常生长,植物进化出了许多抵御逆境的机制<sup>[1]</sup>。其中热激转录因子(heat stress transcription factors, Hsfs)是该防御体系中响应逆境信号的重要元件<sup>[2]</sup>。研究表明 Hsfs 参与了高温、干旱、盐胁迫和氧化损伤等逆境的调控,在植物抵御非生物胁迫过程中有重要作用<sup>[3-4]</sup>。在拟南芥中过量表达大白菜 *BrHsf16* 基因,可明显提高转基因拟南芥植株在热胁迫下的存活率<sup>[5]</sup>。沉默辣椒 *CaHsfald* 基因,导致植株耐热性降低<sup>[6]</sup>。过量表达热激转录因子 *GmHsfA1* 的大豆植株在受到干旱逆境胁迫下,脯氨酸、可溶性糖含量明显增高,植株的抗干旱性增强<sup>[7]</sup>。拟南芥 *AtHsfA7b* 可调控下游抗逆相关靶基因表达响应盐胁迫,通过降低细胞失水率、调节渗透势来提高植株耐盐性<sup>[8]</sup>。用  $H_2O_2$  处理水稻种子,发现水稻中多个 *OsHsfs* 表达量增加,在抵抗氧化胁迫等方面发挥重要作用<sup>[9]</sup>。同时, Hsfs 在作物响应病害胁迫过程中也起着重要作用。水稻白叶枯病是由黄单胞杆菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)引起的病害,分别对水稻抗病品种‘SH5’和感病品种‘8411’接种黄单胞杆菌,6 h 后 *OsHsfA2a*、*OsHsfA2b*、*OsHsfB2a*、*OsHsfB2b*、*OsHsfB2c*、*OsHsfC1b* 和 *OsHsfC2c* 表达量显著上调,*OsHsfA2c* 和 *OsHsfB4c* 表达量显著下调,这说明 Hsfs 在抵御病害侵染时发挥了作用<sup>[10]</sup>。过表达 *AtHsfA1b* 的拟南芥转基因植株在接种病原菌 Pto DC3000 进行抗性实验证明,过表达植株的细菌数目显著低于野生型,*AtHsfA1b* 正调控拟南芥对 Pto DC3000 的抗病性<sup>[11]</sup>。

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是大戟科木薯属多年生灌木,是世界三大薯类作物之一<sup>[12]</sup>。木薯块根肉质,富含淀粉,以之为基础的食品和生物能源等产业是热区农业经济的重要组成部分<sup>[13]</sup>。木薯细菌性枯萎病(cassava bacterial blight, CBB)是由菜豆黄单胞菌属木薯细菌性枯萎病致病种(*Xanthomonas phoseoli* pv. *manihotis*, *Xpm*)引起的病害,是影响我国木薯生产的重要病害之一。前人研究报道 *Xpm* 病原菌侵染木薯后, *MeWRKY79* 和 *MeHsf20* 基因被诱导表达, *MeWRKY79* 和 *MeHsf20* 转录因子可分别结合褪黑素合成基因 *MeASMT2* 启动子上的 *W-box* 和 *HSE* 元件来激活 *MeASMT2* 表达,调控褪黑素的合成积累,增强木薯对 *Xpm* 病原菌的抗性<sup>[14]</sup>。木薯 *MeHsf3* 可提高水杨酸信号途径基因 *MeEDS1* 和 *MePR4* 的转录水平,参与木薯抵御 *Xpm* 病原菌的侵染<sup>[15]</sup>。

本研究基于前期转录组数据发现,我国木薯主栽品种‘SC8’在受到 *XpmHN11* 病原菌侵染时,热激蛋白转录因子 *MeHsfB3a* 的表达量显著上调。为了进一步验证 *MeHsfB3a* 在抵御木薯细菌性枯萎病中发挥的作用,本研究从‘SC8’木薯 cDNA 中克隆了 *MeHsfB3a* 全长序列,进行了生物信息学分析,利用 qRT-PCR 技术分析了该基因在木薯不同器官中的表达模式,并验证了 *MeHsfB3a* 的表达受 *XpmHN11* 病原菌诱导;采用病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术沉默 *MeHsfB3a*,验证了 *MeHsfB3a* 参与木薯对木薯细菌性枯萎病抗性抗病功能,为木薯抗病育种提供新的抗性基因。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

植物材料: 本研究采用的木薯品种为‘华南 8 号’(‘SC8’), 采自于海南大学木薯种质资源圃。烟草本生烟由本实验室提供。

质粒和菌株: VIGS 沉默载体 pCsCMV-NC 质粒由中国热带农业科学院热带生物技术研究所周鹏老师课题组赠与。大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌菌株 GV3101、木薯细菌性枯萎病菌 (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* HN11,

*Xpm*HN11) 由本实验室分离获得。

试剂: LA Taq<sup>®</sup>高保真酶购于 TaKaRa 公司, 限制性内切酶购于 NEB 公司, TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司, RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 TaKaRa 公司, Nimble cloning 试剂盒购自海南壹田生物科技公司, 质粒小量快速提取试剂盒、PCR 产物纯化回收试剂盒等均购自北京艾德莱生物科技公司。

引物: 本实验的引物均由生工生物科技(上海)有限责任公司合成, 引物序列如见表 1。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物用途 Primer usage
MeHsfB3a-F	GTCGAATTCATGGAGTCTGCAGCTACAG	基因克隆
MeHsfB3a-R	CATGGATCCTTATTGTCATGATTGAGCTA	基因克隆
qRT-MeHsfB3a-F	GACATGTTTCGAAAGGGTGAAA	qRT-PCR
qRT-MeHsfB3a-R	TAGTGAGCTCCGAACTCAATAC	qRT-PCR
EF1a-F	TAGTCCACTTGGGTCCTTCTT	qRT-PCR
EF1a-R	TGAAGCTGTTGATGTTTACG	qRT-PCR
VIGS-MeHsfB3a-F	GCCTGGTGCCGCGCGCAGCACTAACAAGCAACAACCTAC	VIGS 沉默
VIGS-MeHsfB3a-R	TGCTCGAGTGC GGCCGCAAGTTCTCCCAACTTCTAATC	VIGS 沉默

### 1.2 方法

1.2.1 *MeHsfB3a* 基因的克隆 采用 TRIzol 法提取‘SC8’木薯总 RNA, 用微量分光光度计检测提取的总 RNA 浓度和纯度, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 质量。采用 RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录为 cDNA, 用于基因扩增。根据木薯基因组数据库 phytozome 中获得的 *MeHsfB3a* (Manes.09G02-0300.1) 序列信息, 采用 Premier 5.0 软件设计扩增引物 MeHsfB3a-F、MeHsfB3a-R。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 克隆木薯 *MeHsfB3a* 基因编码区序列。反应体系为: TaKaRa LA Taq 0.2  $\mu$ L, 10 $\times$ LA PCR Buffer 2  $\mu$ L, dNTP Mixture 4  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 PCR 产物纯化回收试剂盒回收目的片段, 连接 pEASY-Blunt 载体上, 转化进大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态, 挑取阳性单克隆进行菌落 PCR 检测, 送生工生物科技(上海)有限责任公司进行测序后用质粒小量快速提取试剂盒提取 pEASY-Blunt-*MeHsfB3a* 质粒。

1.2.2 *MeHsfB3a* 生物信息学分析 将测序得到的片段序列与预测的 *MeHsfB3a* 基因编码区序列进行比对, 确定扩增的序列的正确性。*MeHsfB3a* 蛋白的理化性质如氨基酸数、分子式、分子量、等电点、不稳定系数、脂肪指数和平均亲水系数由在线网站 ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行预测。运用 GSDS (Gene Structure Display Server) 在线网站分析 *MeHsfB3a* 外显子-内含子的结构。采用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 在线软件对 *MeHsfB3a* 蛋白进行亚细胞定位预测。

1.2.3 *MeHsfB3a* 基因的表达分析 设计 *MeHsfB3a* 进行 qRT-PCR 实验的引物: qRT-MeHsfB3a-F、qRT-MeHsfB3a-R, 以木薯新叶、成熟叶、顶芽、叶柄、块根、韧皮部、须根为模板进行该基因表达的组织特异性分析, 分别以接种了 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 *Xpm*HN11 病原菌不同时间点 (0、3、6 h 和 1、3、6 d) 的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 分析 *MeHsfB3a* 是否响应病原菌侵染。qRT-PCR 反应体系为: TB Green Premix Ex Taq II (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性

30 s; 40 个循环包括 95℃ 变性 5 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 最后 72℃ 延伸 5 min。每个样品设置 3 个重复, 以 *EF1α* 为参照基因。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算基因表达值。

**1.2.4 *MeHsfB3a* 的 VIGS 载体构建与侵染 ‘SC8’ 木薯** 采用在线软件 SGN VIGS Tool (<https://vigs.solgenomics.net/>) 设计诱导 *MeHsfB3a* 的沉默靶基因片段。以 1.2.1 获得的 pEASY-Blunt-*MeHsfB3a* 质粒为模板, 特异性引物 VIGS-*MeHsfB3a*-F、VIGS-*MeHsfB3a*-R 扩增靶标片段, 采用 Nimble cloning 试剂盒构建 pCsCMV-*MeHsfB3a* 重组质粒。将重组质粒转入农杆菌 GV3101, 挑取阳性单克隆于含卡那霉素和利福平 (浓度均为 50 mg/L) 的 LB 液体培养基中过夜培养, 菌液浑浊后 4000 r/min, 5 min 收集菌体, 用 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 清洗菌体 2 次, 加重悬液: 1 mol/L MES (吗啉乙磺酸) + 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> + 200 mmol/L AS (乙酰丁香酮) 重悬菌体并调整 OD<sub>600</sub>=0.75, 每个处理组设置生物学重复 3 株, 每株选择 4 片发育健康的叶片, 用 1 mL 注射器将悬浮菌液注射进木薯每片裂叶背部主叶脉两侧, 每片叶注射 8 个孔, 每个孔注射约 10 μL。以含有 CsCMV 病毒全序列和指示基因 *ChII* 沉默靶点的重组质粒 pCsCMV-B<sup>+</sup> 为正对照。ChII 是组成镁螯合酶的亚基之一, 是催化叶绿素生物合成的第一步, 沉默 *ChII* 可导致植株出现白化退绿表型。仅含有 CsCMV 病毒全序列的质粒 pCsCMV-A<sup>-</sup> 为负对照。侵染后 45 d, 正对照叶片出现白化退绿表型, 分别提取负对照组和实验组木薯新叶总 RNA 并反转录为 cDNA 检测目的基因表达量。

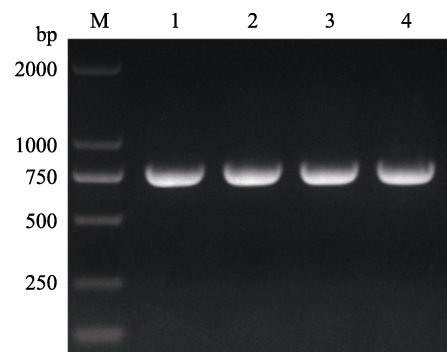
**1.2.5 *XpmHN11* 病原菌侵染 VIGS 沉默植株的抗病功能鉴定** 从 -80℃ 冰箱中取出保存的 *XpmHN11*, 划线培养于 LPGA 固体培养基上, 28℃ 倒置培养 2 d; 蘸取长出的单克隆菌落于 500 μL 的 LPGA 液体培养基中, 28℃, 200 r/min 摇床培养 20 h 左右; 吸取浑浊的菌液 200 μL, 并用涂布棒均匀涂到 LPGA 固体培养基上, 28℃ 培养 24 h 左右, 10 μmol/L MgCl<sub>2</sub> 洗下菌体, 放置在 50 mL 离心管中; 4000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 10 μmol/L MgCl<sub>2</sub> 洗菌 2 次, 再用 10 μmol/L MgCl<sub>2</sub> 重悬, 调 OD<sub>600</sub>=0.1。使用 1 mL 注射器将 *XpmHN11* 菌液注射到 *MeHsfB3a* 沉默植株新叶的叶脉两侧, 选择 4 片叶片, 每片裂叶注射 4 个孔, 每个孔注射约 10 μL, 注射后做上标记。木薯叶

片侵染 *XpmHN11* 后, 分别取 0、3、6 d 的叶片样品, 观察水渍状病斑的扩散情况并拍照记录, 使用 ImageJ 软件计算病斑面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MeHsfB3a* 基因的克隆

以 ‘SC8’ 木薯 cDNA 为模板, PCR 克隆 *MeHsfB3a* 基因全长, 获得了大小约为 750 bp 的目的片段 (图 1)。将该片段纯化、回收并连接中间载体 pEASY-Blunt, 转化大肠杆菌获得阳性克隆进行测序分析。结果表明扩增得到的 *MeHsfB3a* 片段大小为 729 bp, 编码 242 个氨基酸。



M: DL2000 DNA maker; 1~4: *MeHsfB3a* 的扩增产物。

M: DL2000 DNA maker; 1-4: PCR product of *MeHsfB3a*.

图 1 *MeHsfB3a* 基因克隆

Fig. 1 Cloning of *MeHsfB3a*

### 2.2 *MeHsfB3a* 的生物信息学分析

利用在线网站 ExPASy 分析木薯 *MeHsfB3a* 蛋白的生理生化性质。结果显示 *MeHsfB3a* 蛋白理论分子式: C<sub>1224</sub>H<sub>1934</sub>N<sub>350</sub>O<sub>383</sub>S<sub>9</sub>, 理论相对分子质量 (Mw) 为 27.9 kDa, 理论等电点 pI 为 7.59。该蛋白富含: 谷氨酸 Glu (10.0%)、亮氨酸 Leu (9.1%)、赖氨酸 Lys (8.7%)、丝氨酸 Ser (8.3%)、精氨酸 (7.5%)、苏氨酸 (6.6%)、天冬酰胺 Asn (5.8%)。亲水指数从 -2.744 到 2.222 (负值表示亲水性, 正值表示疏水性), 亲水性平均指数 -0.880, 表明该蛋白水溶性较好 (图 2)。理论不稳定系数为 56.86, 属于不稳定蛋白质。脂溶指数为 65.98。利用 GSDS 在线网站分析 *MeHsfB3a* 基因的结构特点, 结果显示, 该基因含有 2 个外显子和 1 个内含子。利用在线网站 Plant-mPLOC SEfvEf 预测 *MeHsfB3a* 蛋白可能定位于细胞核。

### 2.3 *MeHsfB3a* 基因的表达模式分析

采用 qRT-PCR 技术对 *MeHsfB3a* 基因在木薯新叶、成熟叶、顶芽、叶柄、块根、韧皮部、须

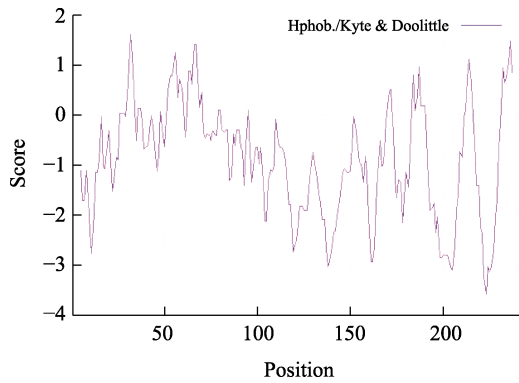


图 2 木薯 *MeHsfB3a* 蛋白亲水性分析

Fig. 2 Hydrophilicity analysis of cassava *MeHsfB3a*

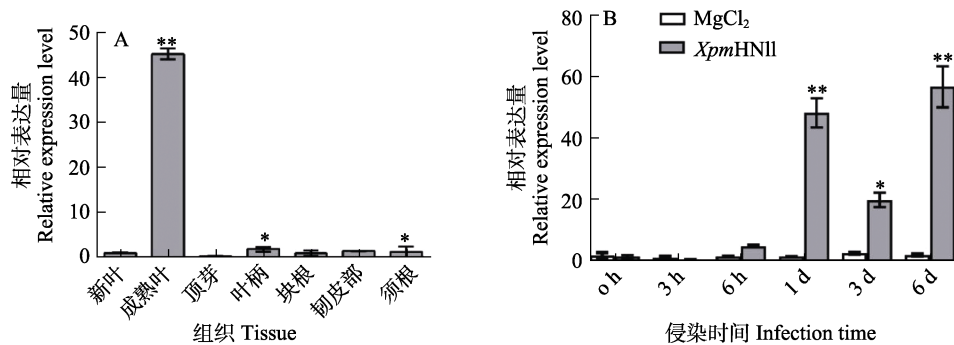
根的表达式进行分析。结果发现 *MeHsfB3a* 基因在成熟叶的表达式最高，约为新叶的 45 倍，其次为须根、叶柄，在其他部位中的表达式极低(图 3A)。木薯 ‘SC8’ 叶片接种了 *XpmHN11* 病菌 0、3、6 h 和 1、3、6 d 后，以接种了 10 mmol/L  $MgCl_2$  的木薯叶片为对照，提取叶片 RNA 并反转录为 cDNA 进行 *MeHsfB3a* 基因表达式分析，结果发现接种 1 d 后该基因的表达式急剧升高，其中在 6 d 时，

表达式提高了 60 倍。这说明 *MeHsfB3a* 基因的表达式受 *XpmHN11* 病菌的诱导(图 3B)。

### 2.4 VIGS 沉默验证 *MeHsfB3a* 参与木薯对细菌性枯萎病抗病过程

2.4.1 VIGS 沉默效果分析 接种 VIGS 实验的正对照 pCsCMV- $B^+$  载体，在侵染 45 d 后，木薯新叶出现了白化退绿现象，而负对照 pCsCMV- $A^-$  与 pCsCMV-*MeHsfB3a* 重组质粒的叶片无变化，这表明 pCsCMV-NC 系统已经对木薯内源的 *ChII* 基因产生了沉默(图 4)。提取实验组 pCsCMV-*MeHsfB3a* 和负对照 pCsCMV- $A^-$  的木薯新叶的总 RNA 并反转录为 cDNA，通过 qRT-PCR 检测目的基因沉默效率。每组数据来自 3 个生物学重复(3 株)，结果如图(图 5)，与负对照植株相比，沉默植株新叶中的 *MeHsfB3a* 表达式下降了 68.26%~82.44%，说明 *MeHsfB3a* 基因在新叶受到了有效沉默，可以对新叶进行后续抗性实验。

2.4.2 VIGS 沉默植株抗病性检测 为了验证 *MeHsfB3a* 在木薯抗细菌性枯萎病过程中的功能，



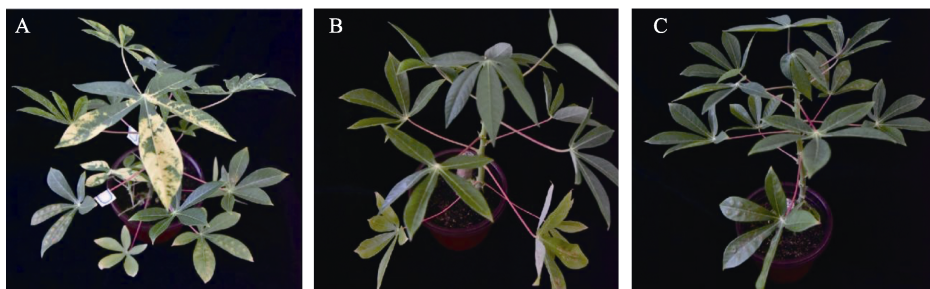
A: *MeHsfB3a* 基因在不同组织器官中的表达式模式; B: 木薯细菌性枯萎病菌 *XpmHN11* 侵染下 *MeHsfB3a* 基因的表达式模式;

\*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

A: Expression pattern of *MeHsfB3a* in different tissues; B: Expression analysis of *MeHsfB3a* under the treatment of cassava bacterial blight pathogen *XpmHN11*; \* indicates significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\* indicates extremely significant difference ( $P < 0.01$ ).

图 3 *MeHsfB3a* 基因表达式模式

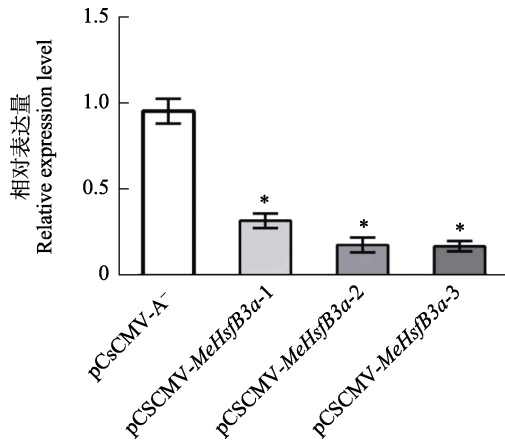
Fig. 3 Expression pattern of *MeHsfB3a*



A: pCsCMV- $B^+$ ; B: pCsCMV- $A^-$ ; C: pCsCMV-*MeHsfB3a*.

图 4 VIGS 试验后木薯叶片表型变化

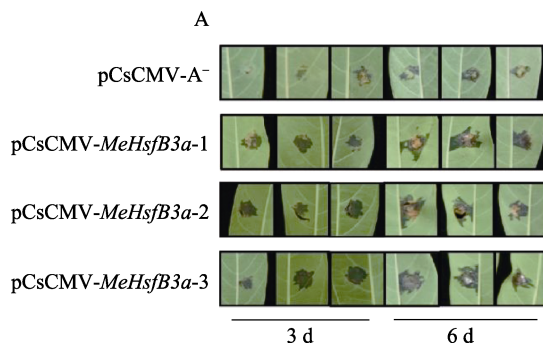
Fig. 4 Phenotypic changes of cassava leaves after VIGS test



pCSCMV-A<sup>-</sup>取自负对照组 3 株木薯新叶；pCSCMV-MeHsfB3a-1、2、3 分别取自实验组 3 株木薯新叶；\*表示差异显著 ( $P<0.05$ )。pCSCMV-A<sup>-</sup> was taken from the new leaves of three cassava plants in the negative control group; pCSCMV-MeHsfB3a-1, 2, 3 were taken from the new leaves of three cassava plants in the experimental group; \* indicates significant difference ( $P<0.05$ ).

图 5 VIGS 沉默 MeHsfB3a 的效果检测

Fig. 5 Detection of target gene expression after VIGS



\*表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

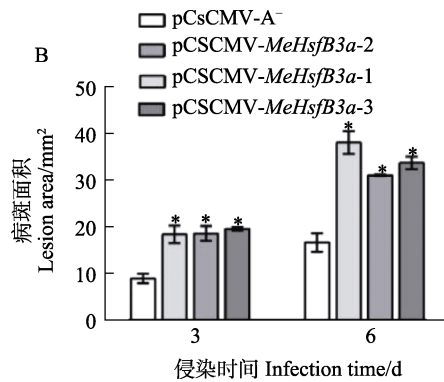
\* indicates significant difference ( $P<0.05$ ).

图 6 XpmHN11 侵染后不同时间点植株的抗性分析

Fig. 6 Phenotypes of XpmHN11 infected leaves at different time points

本研究将病原菌 *XpmHN11* 接种至 *MeHsfB3a* 沉默植株 (pCsCMV-MeHsfB3a) 和负对照植株 (pCsCMV-A<sup>-</sup>) 新叶叶片。在接种 3 d 时, *MeHsfB3a* 沉默植株和负对照植株叶片均出现水渍状病斑, 但是 *MeHsfB3a* 沉默植株的病斑扩散面积较大。接种 6 d 时, *MeHsfB3a* 沉默植株的病斑进一步扩大, 而负对照植株病斑缓慢扩大 (图 6A)。

为了使病斑面积具体量化, 采用 ImageJ 软件计算接种病原菌 3 d 和 6 d 后的病斑面积, 并制作柱状图进行显著性分析。在接种 3 d 时, *MeHsfB3a* 沉默植株的病斑面积是负对照植株的 2.22~2.38 倍; 在接种 6 d 时, *MeHsfB3a* 沉默植株的病斑面积是负对照植株的 1.86~2.28 倍 (图 6B)。此结果表明, 沉默了 *MeHsfB3a* 基因后, 木薯对 *XpmHN11* 病原菌的敏感性增加。



### 3 讨论

植物 Hsfs 不仅通过特异地结合热激蛋白 (heat shock protein, Hsp) 基因启动子上的热击响应元件 (heat shock element, HSE), 调控 *Hsp* 基因的表达, 增强植物的耐热性, 还可以调控许多抗逆基因的表达, 提高植物抵御生物及非生物胁迫的能力<sup>[16]</sup>。Hsfs 由多个基因家族编码, 其蛋白质结构高度保守, 根据不同的保守结构域可分为 HsfA、HsfB、HsfC 三类<sup>[17]</sup>。HsfA 亚家族在热、干旱、盐和氧化损伤反应中的功能已经有很多研究报道, 然而对 HsfB、HsfC 家族的了解还较少。最近的研究表明, HsfB 和 HsfC 家族在植物对生物和非生物胁迫的反应中也具有重要的作用。过

量表达 *OsHsfB2b* 的转基因粳稻脯氨酸含量下降, 导电率上升, 植株抗旱性下降<sup>[18]</sup>。5℃低温处理水稻, 水稻 HsfA 族和 C 族成员表达量上调, B 族成员表达量下降<sup>[19]</sup>。低温条件下甘蓝 *BraHsfC039* 的表达量上升, 小麦过量表达 *TaHsfC3* 后, 在低温处理时可承受更长时间<sup>[20]</sup>。

本研究通过 RT-PCR 从感病品种 ‘SC8’ 基因组中扩增获得 HsfB 家族基因: *MeHsfB3a*, 该基因全长为 729 bp, 编码 289 个氨基酸, 含有 2 个外显子和 1 个内含子。亚细胞定位分析发现, *MeHsfB3a* 预测定位于细胞核, 符合转录因子的定位特征。通常 HsfB 族编码的蛋白缺少转录激活结构域, 可能对靶基因的转录起抑制作用。拟南芥

AtHsfB1 和 AtHsfB2b 定位于细胞核直接抑制 *AtHsfA2*、*AtHsfA7a*、*AtHsfB1* 和 *AtHsfB2b* 的表达<sup>[21]</sup>。*Hsfs* 在植物的不同器官中表达模式具有差异, 如玉米 *ZmHsf06* 在根中表达量较高<sup>[22]</sup>, 而 *ZmHsf12* 在新叶中表达量高<sup>[23]</sup>。表达分析显示 *MeHsfB3a* 在成熟中表达量最高, 在其他器官中的表达量较低。有研究发现木薯 MCOL1522 品种在细菌性枯萎病菌株 *XamORST4* 侵染时 *MeHsfB3a* 基因表达量上调<sup>[24]</sup>。因此, 推测 *MeHsfB3a* 可能在木薯抵御细菌性枯萎病过程中发挥作用, 但该研究并未克隆 *MeHsfB3a* 基因序列并验证该基因的功能。本研究将在海南分离得到的菌株 *XpmHN11* 接种于 ‘SC8’ 木薯叶片发现 *MeHsfB3a* 的表达被病原菌侵染激活, 最高达到 60 倍, 表明该基因参与 ‘SC8’ 木薯对细菌性枯萎病病原菌的响应过程。前人的研究发现, 木薯的其他 Hsf 家族基因成员也同样受细菌性枯萎病病原菌侵染的诱导。*MeHsf3* 在 *Xpm* 病原菌侵染木薯 SC124 叶片 6 h 后, 转录水平上调了 8 倍<sup>[15]</sup>。

病毒诱导的基因沉默技术 (VIGS) 是一种方便有效的反向遗传学技术, 可以通过构建重组病毒载体来沉默植物体内的目的基因。目前已经开发了多种植物病毒载体, 可以对植物各个组织的基因进行沉默<sup>[25]</sup>。其中由烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 介导的 VIGS 体系对宿主影响较小, 因此应用最为广泛。WEI 等<sup>[14]</sup>在 2017 年利用 TRV 介导的沉默体系对木薯 *MeHsf20* 和 *MeWRKY79* 进行了沉默, 结果发现沉默了 *MeWRKY79* 和 *MeHsf20* 的植株中褪黑素合成相关基因 *MeASMT2* 的转录下调, 导致褪黑素减少, 植株抗病性降低。LI 等<sup>[26]</sup>在 2017 年同样以 TRV 介导的沉默体系诱导沉默木薯 bZIP 转录因子中的 *MebZIP3* 和 *MebZIP5*, 沉默效率分别达到了 50% 和 40%, 接种木薯细菌性枯萎病病原菌后, 沉默植株表现出疾病敏感表型、防御相关基因转录水平降低、胼胝质沉积减少, 说明了 *MebZIP3* 和 *MebZIP5* 正调控木薯细菌性枯萎病。最近 TUO 等<sup>[27]</sup>成功利用木薯普通花叶病毒 (CsCMV) 开发了适用于木薯的新型 VIGS 系统 pCsCMV-NC。本研究利用 pCsCMV-NC 介导的 VIGS 技术沉默木薯 *MeHsfB3a* 基因, 实时荧光定量结果显示实验组 *MeHsfB3a* 基因表达量均降低了 68.26%~82.44%, 这说明 *MeHsfB3a* 基因已经受到了显著沉默。用 *XpmHN11* 病原菌接种 *MeHsfB3a*

基因沉默木薯植株, 发现木薯对细菌性枯萎病的抗病能力显著降低。基于以上结果, 本研究证明了热激蛋白转录因子基因 *MeHsfB3a* 受 *XpmHN11* 病原菌诱导表达, 参与木薯抗细菌性枯萎病的过程。在未来的研究工作中, 本实验室将利用转基因技术, 过量表达 *MeHsfB3a* 进一步验证该基因的抗病功能, 并解析 *MeHsfB3a* 转录因子调控的下游抗病通路。

## 参考文献

- [1] OHAMA N, SATO H, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response[J]. Trends in Plant science, 2017, 22(1): 53-65.
- [2] SCHARF K D, BERBERICH T, EBERSBERGER I, NOVER L. The plant heat stress transcription factor (*Hsf*) family: structure, function and evolution[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2012, 1819(2): 104-119.
- [3] CHARNG Y Y, LIU H C, LIU N Y, CHI W T, WANG C N, CHANG S H, WANG T T. A heat-inducible transcription factor, *HsfA2*, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2007, 143(1): 251-262.
- [4] SEWELAM N, OSHIMA Y, MITSUDA N, OHME-TAKAGI M. A step towards understanding plant responses to multiple environmental stresses: a genome-wide study[J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(9): 2024-2035.
- [5] 张慧敏, 赵乾宇, 李红颖, 卢玲, 张一卉, 邱念伟, 王凤德, 高建伟. 过量表达大白菜 *BrHSF16* 基因提高转基因拟南芥耐热性[J]. 植物生理学报, 2021, 57(10): 1915-1925.  
ZHANG H M, ZHAO Q Y, LI H Y, LU L, ZHANG Y H, QIU N W, WANG F D, GAO J W. Overexpression of Chinese cabbage *BrHSF16* gene enhances heat tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Journal of Plant Physiology, 2021, 57(10): 1915-1925. (in Chinese)
- [6] GAI W X, MA X, LI Y, XIAO J J, KHAN A, LI Q H, GONG Z H. *CaHsfA1d* improves plant thermotolerance via regulating the expression of stress-and antioxidant-related genes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(21): 8374.
- [7] 吴广锡, 魏崃, 唐晓飞, 王伟威, 王鹏飞, 王兴宇, 刘丽君. 大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 对高温和干旱信号的表达反应[J]. 分子植物育种, 2013, 11(1): 62-71.  
WU G X, WEI L, TANG X F, WANG W W, WANG P F, WANG X Y, LIU L J. The expression response in transgenic *GmHsFA1* soybean to the signals of heat and drought stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(1): 62-71. (in Chinese)
- [8] ZANG D D, WANG J X, ZHANG X, WANG Y C. *Arabi-*

- dopsis* heat shock transcription factor *HSFA7b* positively mediates salt stress tolerance by binding to an E-box-like motif to regulate gene expression[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(19): 5355-5374.
- [9] MITTAL D, CHAKRABARTI S, SARKAR A, SINGH A, GROVER A. Heat shock factor gene family in rice: genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(9): 785-795.
- [10] 匡洁, 胡海涛, 张维林, 王长春, 杨玲. 比较 12 个 *OsHsf*s 在抗感水稻品种响应白叶枯病菌中的表达[J]. *热带作物学报*, 2013, 34(1): 125-129.  
KUANG J, HU H T, ZHANG W L, WANG C C, YANG L. Comparative expression analysis of twelve *OsHsf*s in resistant and susceptible rice to bacterial blight[J]. *Journal of Tropical Crops*, 2013, 34(1): 125-129. (in Chinese)
- [11] BECHTOLD U, ALBIHLAL W S, LAWSON T, FRYER M J, SPARROW A C, RICHARD R, PERSAD R, BOWDEN L, HICKMAN R, MARTIN C, BEYNON J L, BUCHANAN-WOLLASTON V, BAKER N R, MORISON I L, SCHOFFL F, OTT S. *Arabidopsis* heat shock transcription factor *hsc70* overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(11): 3467-3481.
- [12] 李超萍, 时涛, 刘先宝, 蔡吉苗, 裴月令, 黄贵修. 国内木薯病害普查及细菌性萎蔫病安全性评估[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(1): 116-121.  
LI C P, SHI T, LIU X B, CAI J M, PEI Y L, HUANG G X. General survey on cassava diseases and safety assessment of cassava bacterial blight[J]. *Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(1): 116-121. (in Chinese)
- [13] GUO M, LIU J H, MA X, LUO D X, GONG Z H, LU M H. The plant heat stress transcription factors (*HSFs*): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 114.
- [14] WEI Y X, LIU G Y, BAI Y J, XIA F Y, HE C Z, SHI H T. Two transcriptional activators of N-acetylserotonin O-methyltransferase 2 and melatonin biosynthesis in cassava[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(17): 4997-5006.
- [15] WEI Y X, LIU G Y, CHANG Y L, HE C Z, SHI H T. Heat shock transcription factor 3 regulates plant immune response through modulation of salicylic acid accumulation and signalling in cassava[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(10): 2209-2220.
- [16] NOVER L, BHARTI K, DORING P, MISHRA S K, GANGULI A, SCHARF K D. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2001, 6(3): 177.
- [17] XIANG J H, RAN J, ZOU J, ZHOU X Y, LIU A L, ZHANG X W, PENG Y, TANG N, LUO G Y, CHEN X B. Heat shock factor *OsHsfB2b* negatively regulates drought and salt tolerance in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(11): 1795-1806.
- [18] LIU A L, ZOU J, ZHANG X W, ZHOU X Y, WANG W F, XIONG X Y, CHEN L Y, CHEN X B. Expression profiles of class a rice heat shock transcription factor genes under abiotic stresses[J]. *Journal of Plant Biology*, 2010, 53(2): 142-149.
- [19] MA J, XU Z S, WANG F, TAN G F, LI M Y, XIONG A S. Genome-wide analysis of HSF family transcription factors and their responses to abiotic stresses in two Chinese cabbage varieties[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(2): 513-523.
- [20] ZHANG S X, XU Z S, LI P S, YANG L, WEI Y Q, CHEN M, LI L C, ZHANG G S, MA Y Z. Overexpression of *TaHSF3* in transgenic *Arabidopsis* enhances tolerance to extreme temperatures[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(3): 688-697.
- [21] IKEDA M, MITSUDA N, OHME-TAKAGI M. *Arabidopsis HsfB1* and *HsfB2b* act as repressors of the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(3): 1243-1254.
- [22] LI H C, ZHANG H N, LI G L, LIU Z H, ZHANG Y M, ZHANG H M, GUO X L. Expression of maize heat shock transcription factor gene *ZmHsf06* enhances the thermotolerance and drought-stress tolerance of transgenic *Arabidopsis*[J]. *Functional Plant Biology*, 2015, 42(11): 1080-1091.
- [23] LI H C, ZHANG H N, LI G L, LIU Z H, ZHANG Y M, ZHANG H M, GUO X L. Characteristics and regulating role in thermotolerance of the heat shock transcription factor *ZmHsf12* from *Zea mays* L.[J]. *Journal of Plant Biology*, 2019, 62(5): 329-341.
- [24] MUÑOZ-BODNAR A, PEREZ-QUINTER A L, GOMEZ-CANO F, GIL J, MICHELMORE R, BERNAL A, SZUREK B, AND LOPEZ C. RNAseq analysis of cassava reveals similar plant responses upon infection with pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(11): 1901-1912.
- [25] PFLIEGER S, RICHARD M M S, BLANCHET S, MEZIADI C, GEFFROY V. VIGS technology: an attractive tool for functional genomics studies in legumes[J]. *Functional Plant Biology*, 2013, 40(12): 1234.
- [26] LI X L, FAN S, HU W, LIU G, WEI Y X, HE C Z, SHI H T. Two cassava basic leucine zipper (bZIP) transcription factors (*MebZIP3* and *MebZIP5*) confer disease resistance against cassava bacterial blight[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2110.
- [27] TUO D, ZHOU P, YAN P, CUI H, LIU Y, WANG H, SHEN W. A cassava common mosaic virus vector for virus-induced gene silencing in cassava[J]. *Plant Methods*, 2021, 17(1): 1-12.