

木薯 MeHsfB3b 转录因子与 MeFKBP20 蛋白互作关系验证

王超群¹, 李琳琳¹, 陈银华¹, 张肖飞³, 姚 远^{2*}, 耿梦婷^{1*}

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南热带农业资源研究院, 海南海口 571101; 3. 国际热带农业中心, 哥伦比亚卡利 AA6713

摘 要: 热激转录因子 MeHsfB3b 是调控木薯抗细菌性枯萎病的重要节点, 前期通过酵母双杂交技术获得 MeHsfB3b 的候选互作蛋白 MeFKBP20, 该蛋白属于 FKBP 型肽脯氨酰顺反异构酶基因家族。本研究克隆获得 *MeFKBP20* 基因全长为 561 bp, 编码 186 个氨基酸, 蛋白质分子质量为 19.99 kDa, 具有 FKPB_C 结构域。表达模式分析发现: *MeFKBP20* 基因在木薯成熟叶片及根部高表达, 在幼叶和叶柄的表达量较低; 并能够迅速响应病原菌 *XpmCHN11* 诱导, 持续保持较高的表达丰度, 推测其参与了木薯响应病原菌侵染的过程。利用酵母双杂交点对点、双分子荧光互补实验证明 MeHsfB3b 蛋白通过在 201~241 aa 区域与 MeFKBP20 蛋白作用。本研究结果有助于进一步解析 *MeHsfB3b* 基因调控木薯对细菌性枯萎病的抗病机理。

关键词: 热激转录因子; FKBP 型肽脯氨酰顺反异构酶; 酵母双杂交; 双分子荧光互补

中图分类号: S533 文献标识码: A

Verification of the Interaction Between Cassava MeHsfB3b Transcription Factor and MeFKBP20 Protein

WANG Chaoqun¹, LI Linlin¹, CHEN Yinhua¹, ZHANG Xiaofei³, YAO Yuan^{2*}, GENG Mengting^{1*}

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Institute for Tropical Agricultural, Haikou, Hainan 571101, China; 3. International Center for Tropical Agriculture, Cali AA6713, Colombia

Abstract: The heat shock transcription factor MeHsfB3b is important in regulating the resistance to cassava bacterial blight. In the previous study, the candidate interaction protein MeFKBP20 of MeHsfB3b was obtained by the yeast two-hybrid technology, which belongs to the FKBP-type peptide prolyl cis-trans isomerase gene family. In this study, the full-length *MeFKBP20* gene was cloned to be 561 bp, encoding 186 amino acids, with a molecular weight of 19.99 kDa and a FKPB_C domain. The expression pattern analysis showed that *MeFKBP20* was highly expressed in mature leaves and roots of cassava, and the expression level of young leaves and petioles was low. It could quickly respond to the induction of pathogen *XpmCHN11* and maintain a high expression abundance, suggesting that it is involved in response to pathogen infection. The interaction between MeHsfB3b protein and MeFKBP20 protein through 201–241 aa region was proved by the yeast two-hybrid point-to-point and bimolecular fluorescence complementation experiments. The results of this study are helpful to further analyze the mechanism of *MeHsfB3b* gene regulating cassava resistance to cassava bacterial blight.

Keywords: heat shock transcription factor; FKBP-type peptide prolyl cis-trans isomerase; yeast two-hybrid; bimolecular fluorescence complementation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.03.002

收稿日期 2023-02-09; 修回日期 2023-03-14

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC492); 海南省研究生创新科研课题 (No. Qhys2021-178)。

作者简介 王超群 (1997—), 男, 硕士, 研究方向: 作物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 耿梦婷 (GENG Mengting), E-mail: mengtingeng8908@163.com; 姚 远 (YAO Yuan), E-mail: yaoyuan@itbb.org.cn。

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 具有高光合效率、高淀粉产量、耐旱、耐贫瘠等特性,广泛种植于非洲、南美洲和亚洲热带地区,为 105 个国家的近 10 亿人提供主食^[1-2],同时也是生产淀粉、生物乙醇及其他生物基产品的重要工业原料^[3]。木薯细菌性枯萎病 (cassava bacterial blight, CBB) 是由菜豆黄单胞菌木薯枯萎致病变种 (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, *Xpm*) 引起的检疫性病害^[4-5]。病原菌主要由叶面气孔或伤口侵入经维管束扩散至全株,初期症状表现叶组织出现水浸状半透明角斑不规则分布,而后扩大形成深褐色斑块并伴随乳白色或黄橙色分泌物,后期叶片卷曲呈现焦枯症状或全株调亡^[6-7]。CBB 对木薯生产存在巨大破坏性,甚至是毁灭性的,被认为是限制木薯产业健康发展的病害之一,是仅次于木薯花叶病毒病的第二大病害^[6, 8]。

植物在与病原菌互作过程中存在广泛的信号交流,通过感知病原菌作出应激反应,增强自身抗病性^[9-11]。热激转录因子 (heat stress transcription factors, HSFs) 作为逆境信号传导的主要调控因子,不但参与高温、干旱、渗透及缺氧等非生物胁迫,还参与了植物对病原菌侵染的响应过程^[12-15]。HSFs 在进化上高度保守,根据结构域分为 A、B、C 三个亚类,木薯基因组中,存在 32 个 HSFs 成员,其中 A 类 18 个, B 类 12 个, C 类 2 个。HSFs 参与木薯对 *Xpm* 病原菌侵染过程。木薯 *MeHsf3* 基因表达量下调,导致木薯对细菌性枯萎病表现易感。进一步研究发现 *MeHsf3* 转录因子通过对下游靶基因 *MeEDS1* 和 *MePR4* 的转录调控激活木薯对 CBB 的免疫反应^[13]。*MeHsfB3b* (*MeHsf20*) 转录因子正向调控木薯褪黑素合成关键基因 *MeASMT2* 表达,通过积累更多的褪黑素提高木薯抗病性^[16]。

本实验室前期利用酵母双杂交技术筛选获得 *MeHsfB3b* 的候选互作蛋白 *MeFKBP20*。*MeFKBP20* 蛋白属于 FK506 结合蛋白 (FK506 binding protein, FKBP) 家族^[17]。FKBP 家族成员参与蛋白质折叠、运输、激素信号传导、植物生长和应激反应等生物学过程^[18-20]。例如,小麦 FKBP73、FKBP77 蛋白以及拟南芥 FKBP62、FKBP65 蛋白受伤害、NaCl 胁迫和丙二醛处理诱导,进而诱导非生物胁迫响应基因的表达做出应激反应^[21-22]。在植物中 FKBP 型 PPIase 可以作为分子伴侣与其他蛋白相互作用,调控广泛的发育

过程、胁迫反应和植物防御^[23]。FKBP15-2 作为辣椒疫霉 RXLR 效应因子 PcAvr3a12 的直接靶标,正向调节植物对疫霉菌免疫反应^[24]。本研究拟克隆木薯 *MeFKBP20* 基因,分析该基因的表达模式,利用酵母双杂和双分子荧光互补验证 *MeFKBP20* 与 *MeHsfB3b* 的互作关系及互作区域。研究结果有利于进一步解析木薯 *MeHsfB3b* 转录因子调控褪黑素积累抵御 *Xpm* 侵染的分子机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 华南 8 号木薯苗 (SC8)、本生烟草 (*Nicotiana. benthamiana*) 为实验室保存株。

1.1.2 菌株 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、农杆菌 GV3101 (pSoup-p19)、酵母 AH109 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。病原菌 *Xpm*CHN11 为本实验室保存。

1.1.3 质粒载体 中间载体 pEASY-Blunt 购自北京全式金生物技术有限公司 (TransGen Biotech); 酵母双杂交载体 pGBKT7、pGADT7 为实验室保存; 双分子荧光互补实验载体 pNC-BiFC-Enc、pNC-BiFC-Ecc 为中国热带农业科学院热带生物技术研究所周鹏老师实验室提供。

1.1.4 酶及药品试剂 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。质粒小提、琼脂糖凝胶回收、PCR 产物柱回收试剂盒等均购自北京艾德莱生物科技股份有限公司。Seamless Assembly Cloning Kit 试剂盒购自中美泰和生物技术 (北京) 有限公司。TB Green[®] Premix Ex Taq[™] 购自 TaKaRa 公司。RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型 DP441) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerases 购自 NEB 公司。引物合成及测序由深圳华大基因科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 互作蛋白 *MeFKBP20* 基因克隆及序列分析 根据 Phytozome v13 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) 公布 *MeFKBP20* 基因 (登录号: Manes.07G117900) 序列, 使用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Primer-BLAST 工具设计该基因的特异性扩增引物及 qPCR 定量检测引物 (表 1)。以 SC8 木薯叶片 cDNA 作为模板, 使用 Q5 DNA Polymerase (50 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C

表 1 引物信息
Tab. 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
MeFKBP20-F	ATGGGTGATGCAGTTGA	基因克隆
MeFKBP20-R	CTATTTGGATTTTCCCT	
Q-MeFKBP20-F	GGCTCTGTAATTCAATCTTGGG	检测基因表达量
Q-MeFKBP20-R	ACCCAGCACTTCCATAGG	
BD-MeFKBP20-F	CAGAGGAGGACCTGCATATGATGGGTGATGCAGTTGA	构建 pGBKT7-MeFKBP20 载体
BD-MeFKBP20-R	CTGCAGGTCGACGGATCCCTATTTGGATTTTCCCT	
BiFC-MeFKBP20-F	AGTGGTCTCTGTCCAGTCTATGGGTGATGCAGTTGA	构建 pNC-BiFC-Ecc-MeFKBP20 载体
BiFC-MeFKBP20-R	GGTCTCAGCAGACCACAAGTTTGGATTTTCCCTTTC	
Tubulin-F	ATGCGGTTCTTGATGTTGTTC	内参基因
Tubulin-R	TCGGTGAAGGGAATACAGAGA	
M13-F	GTAAACGACGGCCAGT	检测 pEASY-Blunt 重组子
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	
T7	TAATACGACTCACTATAGG	检测 pGBKT7 重组子
3'BD	TAAGAGTCACTTTAAATTTGTATAC	
ProF	GCATTCTACTTCTATTGCAGC	检测 pNC-BiFC-Ecc 重组子
CR	GTCGCCGATGGGGGTGTTCT	

延伸 50 s) 进行 CDS 区序列扩增。PCR 产物纯化后回收目的片段, 构建至中间载体 pEASY-Blunt, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆送深圳华大基因科技有限公司 Sanger 测序, 选取序列正确的阳性单克隆摇菌提取重组质粒。

使用 DNAMAN v6 软件进行木薯、拟南芥、麻风树、山谷栎、橡胶树、蓖麻、水稻、番木瓜、甜橙、大豆、银白杨的 FKBP20 蛋白氨基酸序列比对。

1.2.2 *MeFKBP20* 基因表达模式分析 以 SC8 木薯新叶、成熟叶、顶芽、叶柄、块根木质部、块根韧皮部、须根及病原菌 *XpmCHN11* 侵染 0、3、6 h 和 1、3、6 d 叶片的 cDNA 为模板, 木薯 *Tubulin* 基因作内参, 使用 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 分析 *MeFKBP20* 基因的表达模式。每个样品设置 3 个重复, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因相对表达量。

1.2.3 酵母双杂交验证蛋白 MeHsfB3b 与 MeFKBP20 的互作关系 将 *MeFKBP20* 基因构建至 pGBKT7 载体, 与空载体 pGADT7 通过酵母转化液共转至 AH109 酵母细胞, 涂布在 SD/-Trp/-Leu(SD/TL)平板筛选阳性克隆。液体 SD/TL 培养基扩大培养阳性单克隆, 梯度稀释, 点 SD/-Trp/-Leu (SD/TL)、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (SD/TLHA)、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+X- α -Gal 平板进行毒性及自激活检测。

将无毒性、无自激活活性重组质粒 pGBKT7-

MeFKBP20 与 pGADT7-*MeHsfB3b*、pGADT7-*MeHsfB3b* (1~127 AA)、pGADT7-*MeHsfB3b* (1~201 AA)、pGADT7-*MeHsfB3b* (127~241 AA) 分别共转化 AH109 酵母细胞, 通过营养缺陷型培养基筛选, 验证互作关系及互作区域。

1.2.4 双分子荧光互补验证蛋白 MeHsfB3b 与 MeFKBP20 的互作关系 使用 Nimble Cloning 试剂盒将 MeHsfB3b 蛋白融合在 nEYFP 的 N 端获得 pNC-BiFC-Enc-*MeHsfB3b* 载体, 将 MeFKBP20 蛋白融合在 cEYFP 的 N 端获得 pNC-BiFC-Ecc-*MeFKBP20* 载体, 转化农杆菌 GV3101 (pSoup-p19) 菌株。按照验证组 (pNC-BiFC-Enc-*MeHsfB3b*+pNC-BiFC-Ecc-*MeFKBP20*) 和对照组 (pNC-BiFC-Enc+pNC-BiFC-Ecc、pNC-BiFC-Enc-*MeHsfB3b*+pNC-BiFC-Ecc、pNC-BiFC-Enc+pNC-BiFC-Ecc-*MeFKBP20*) 的菌液体积 1 : 1 混合注射本生烟草叶片, 常规培养 48~72 h, 使用激光共聚焦显微镜观察 YFP 荧光, 拍照记录。

2 结果与分析

2.1 *MeFKBP20* 基因克隆及序列分析

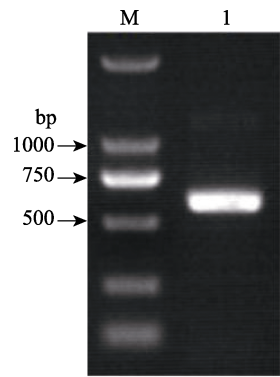
根据木薯基因组数据库信息设计 *MeFKBP20* 基因的特异性引物, 通过 RT-PCR 扩增 SC8 木薯品种的 *MeFKBP20* 基因编码区, 结果获得约 600 bp 的扩增产物 (图 1)。Sanger 测序显示获得 1 个 561 bp 基因片段, 编码 186 个氨基酸残基。蛋白序列比对分析发现, 木薯 MeFKBP20 蛋白与

麻风树、橡胶树的 FKBP20 同源性最高，分别为 92.00%、91.43%，与山谷栎、蓖麻、番木瓜、甜橙、银白杨的 FKBP20 同源性均大于 84.00%，而与拟南芥、大豆、水稻的 FKBP20 相似性较低，分别为 82.29%、81.14%、80.11%。上述蛋白均具有完整的 FKBP_C (FKBP-typepeptidyl-prolylcis-transisomerase, PPIase) 结构域 (图 2)。

2.2 MeFKBP20 基因表达模式分析

为了分析候选互作蛋白的潜在功能，通过实时荧光定量 PCR 研究其在不同组织部位及响应病原菌 *XpmCHN11* 侵染的表达模式。结果发现，木薯 *MeFKBP20* 基因在木薯成熟叶、块根木质部、块根韧皮部和须根的表达量均较高，而新叶、顶芽、叶柄的表达量则相对较低；木薯叶片在接种病原菌 *XpmCHN11* 后，*MeFKBP20* 基因表达在 6 h

后显著升高，至接种的第 6 天基因表达量较对照组增高近 3.5 倍 (图 3)。以上结果表明，*MeFKBP20* 基因的表达受到病原菌 *XpmCHN11* 的诱导。



M: DL2000 DNA marker.

图 1 MeFKBP20 基因克隆

Fig. 1 Cloning of MeFKBP20 gene

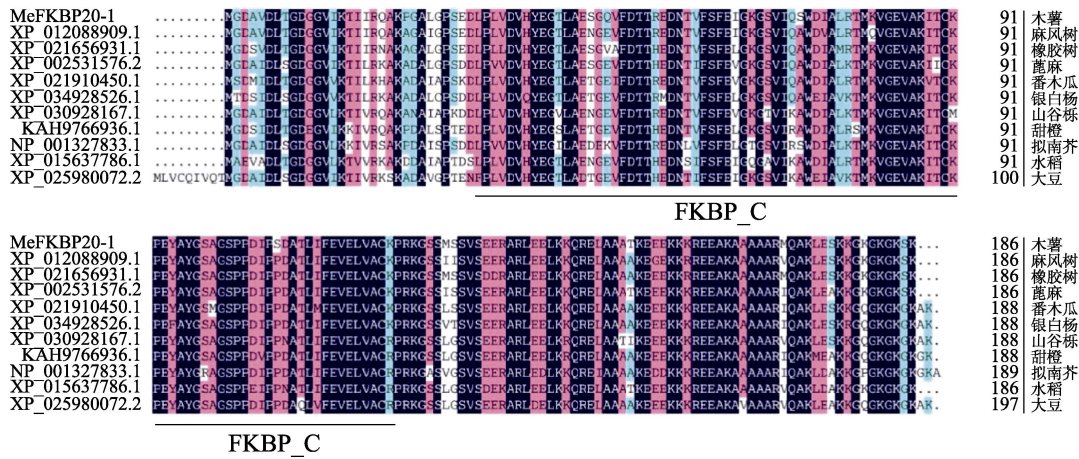
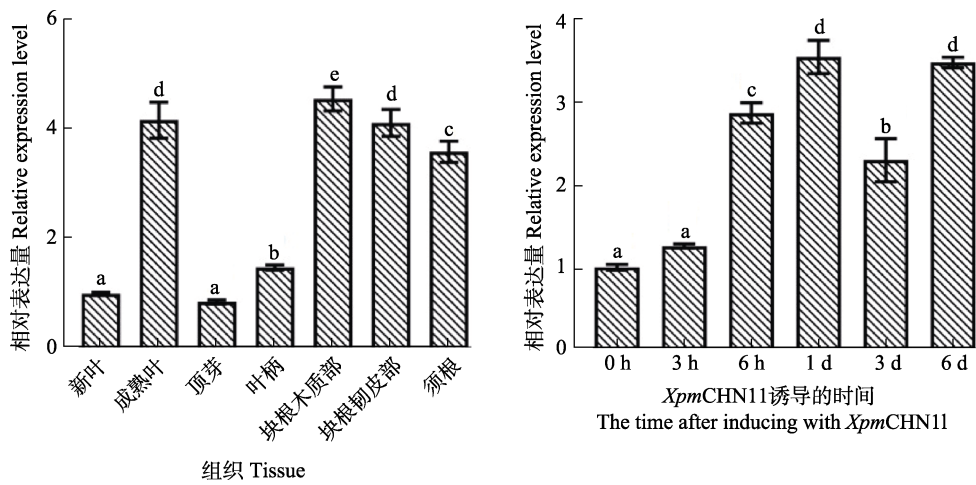


图 2 不同物种 FKBP20 蛋白的多序列比对分析

Fig. 2 Multiple sequence alignment analysis of MeFKBP20 protein in different species



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 3 MeFKBP20 基因表达模式分析

Fig. 3 Analysis of MeFKBP20 gene expression pattern

2.3 酵母双杂交点对点验证蛋白 MeHsfB3b 与 MeFKBP20 的互作关系及互作位点

使用酵母转化液将诱饵载体 pGBKT7-*MeFKBP20* 与空载 pGADT7 共转至酵母 AH109 菌株, 进行毒性及自激活活性检测, 结果如图 4 所示。共转有诱饵载体 pGBKT7-*MeFKBP20*+pGADT7 的酵母细胞, 只能在 SD/-Trp/-Leu 培养基生长, 与阴性对照 (pGADT7-T+pGBKT7-*Lam*) 一致; 而阳性对照 (pGADT7-T+pGBKT7-*p53*) 在所有缺陷型培养基均能正常生长, 并且能够激活 *MEL1* 报告基因合成 α -半乳糖苷酶水解底物 X- α -Gal 使菌斑呈现蓝色。以上结果表明,

MeFKBP20 蛋白对酵母细胞无毒性且无自激活活性, 可用于酵母双杂交点对点验证。

木薯 MeHsfB3b 蛋白与 MeFKBP20 蛋白酵母双杂交验证结果如图 5 所示, 共转 pGADT7-*MeHsfB3b* 和 pGBKT7-*MeFKBP20* 质粒的 AH109 酵母菌生长同阳性对照相似, 能够在所有缺陷型培养基上正常生长, 同时可以激活报告基因 *MEL1* 表达水解底物 X- α -Gal 使菌斑呈现蓝色; 而阴性对照则无法在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+X- α -Gal 培养基上生长。以上结果表明 MeHsfB3b 蛋白与 MeFKBP20 蛋白存在互作关系。

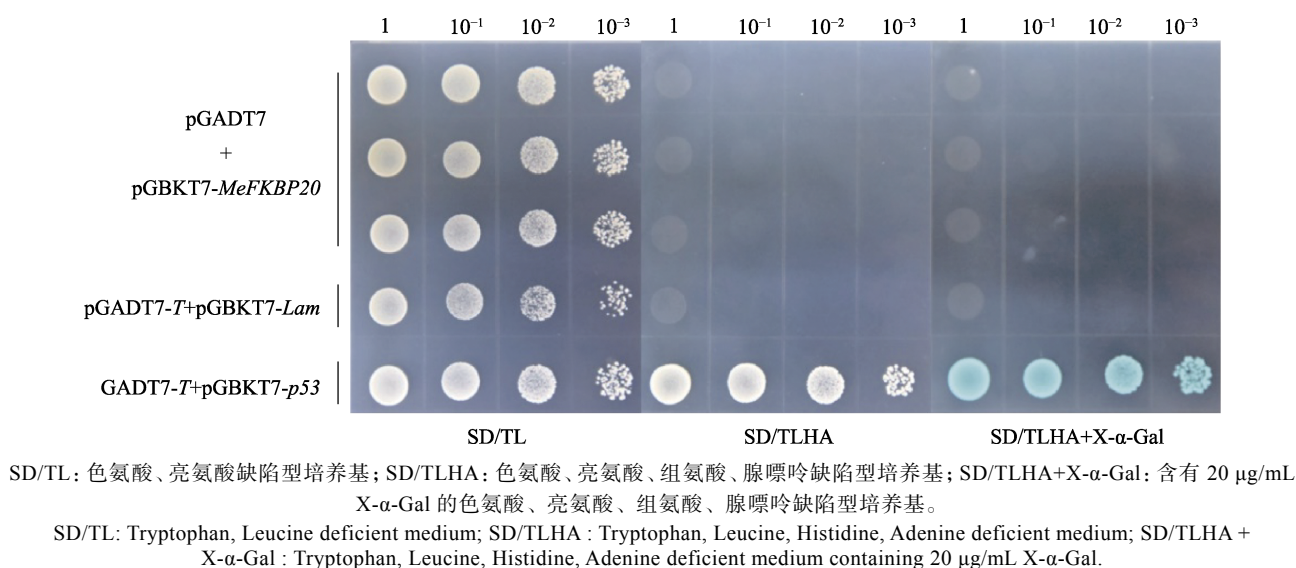


图 4 诱饵载体 pGBKT7-*MeFKBP20* 毒性及自激活活性检测

Fig. 4 Detection of toxicity and self-activation activity of bait vectors pGBKT7-*MeFKBP20*

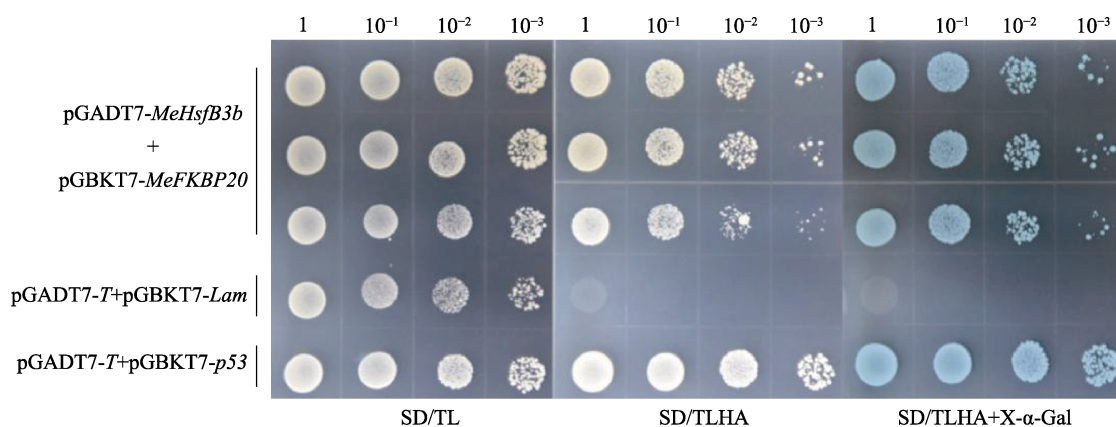


图 5 *MeHsfB3b* 蛋白与 *MeFKBP20* 互作关系验证

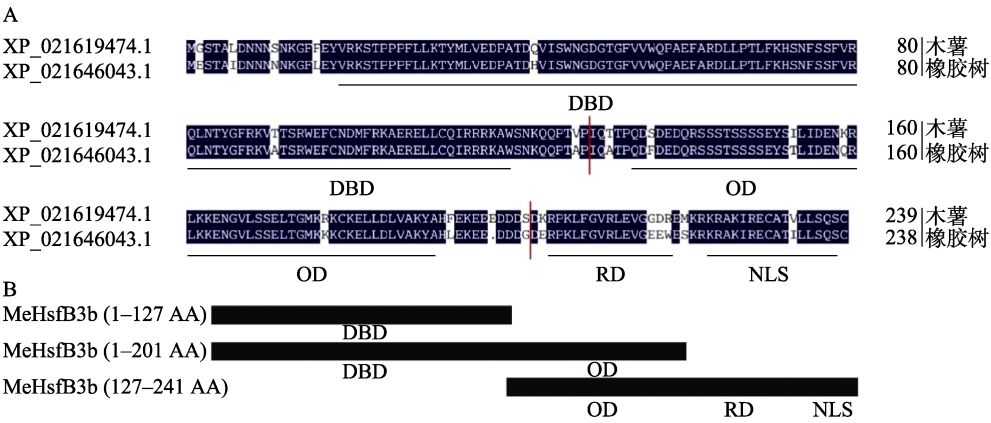
Fig. 5 Verification of the interaction between MeHsfB3b protein and MeFKBP20

为了进一步研究 MeHsfB3b 蛋白与 MeFKBP20 蛋白的互作区域, 根据 MeHsfB3b 蛋白序列保守区域逐级截短为 3 段(图 6), 分别构建至 pGADT7

载体。将含有 *MeHsfB3b* 基因截短片段的重组质粒与 pGBKT7-*MeFKBP20* 组合, 共转化 AH109 酵母细胞, 进行互作验证。结果如图 7 所示, 所

有的菌落均可以在 SD/-Trp/-Leu 培养基正常生长，而在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上阴性对照与 pGADT7-*MeHsfB3b* (1~127 aa) +pGBKT7-*MeFKBP20*、pGADT7-*MeHsfB3b* (1~201 aa) + pGBKT7-*MeFKBP20* 菌落均无法生长，仅含有

pGADT7-*MeHsfB3b* (127~241 aa) +pGBKT7-*MeFKBP20* 菌落能够正常生长并且在含有 X- α -Gal 的平板变蓝色，与阳性对照一致。说明 MeHsfB3b 蛋白通过 201~241 aa 区域与 MeFKBP20 蛋白相互作用。



A: MeHsfB3b 蛋白氨基酸序列分析; B: MeHsfB3b 蛋白截短示意图。
A: Amino acid sequence analysis of MeHsfB3b protein; B: The truncated diagram of MeHsfB3b protein.

图 6 MeHsfB3b 蛋白氨基酸序列分析及截短示意图

Fig. 6 Amino acid sequence analysis and truncation diagram of MeHsfB3b protein

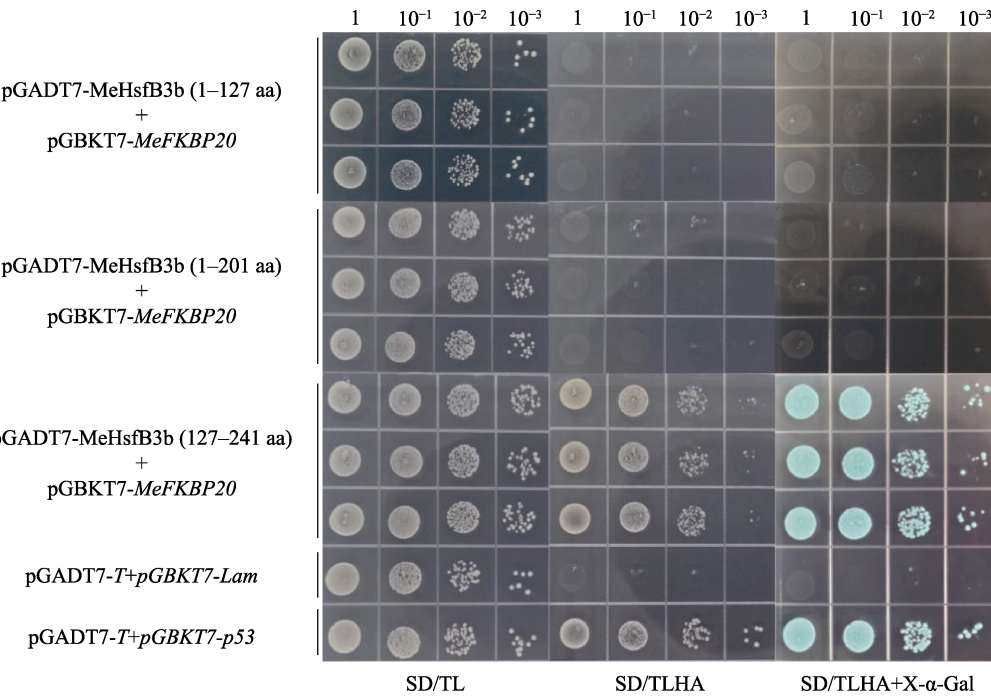


图 7 MeHsfB3b 蛋白不同区域与 MeFKBP20 蛋白互作关系验证

Fig. 7 Verification of the interaction between different regions of MeHsfB3b protein and MeFKBP20 protein

2.4 双分子荧光互补验证蛋白 MeHsfB3b 与 MeFKBP20 的互作关系

将 MeHsfB3b 蛋白融合在 nEYFP 的 N 端、MeFKBP20 蛋白融合在 cEYFP 的 N 端构建 BiFC 验证载体，通过农杆菌介导的烟草叶片瞬时转化

验证其互作关系。如图 8 所示，所有对照组均无黄色荧光，验证组 pNC-BiFC-Enc-*MeHsfB3b*+pNC-BiFC-Ecc-*MeFKBP20* 在细胞膜发出黄色荧光。表明，MeHsfB3b 蛋白与 MeFKBP20 蛋白在细胞膜发生相互作用。

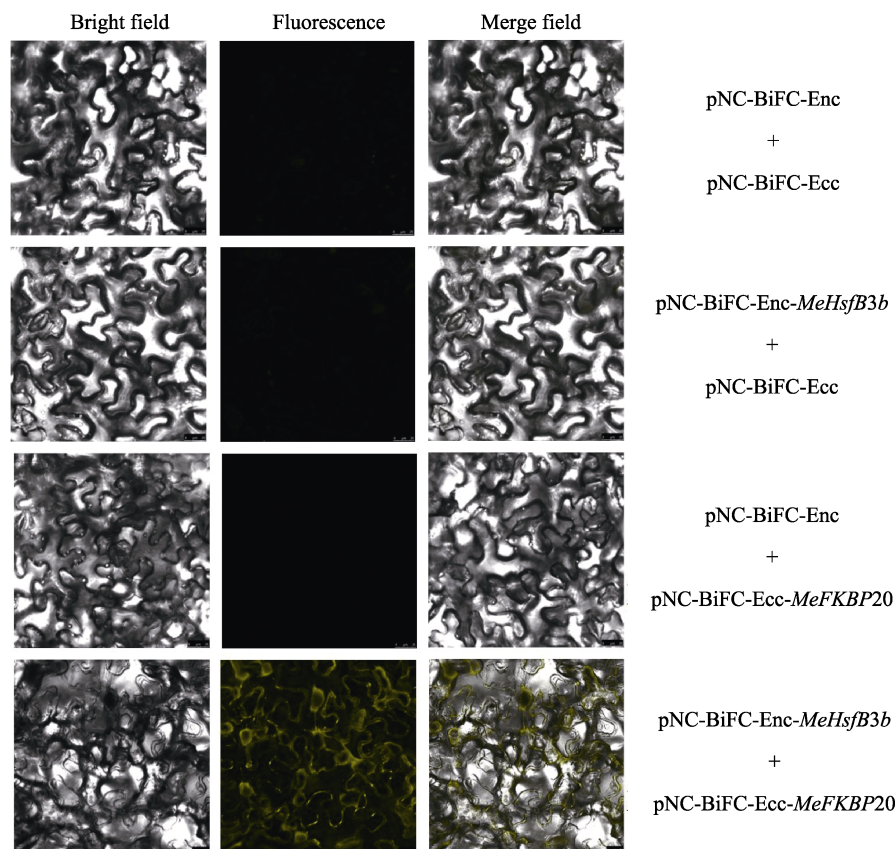


图 8 BiFC 验证 MeHsfB3b 蛋白与 MeFKBP20 蛋白互作关系

Fig. 8 BiFC verified the interaction of MeHsfB3b with MeFKBP20

3 讨论

热激转录因子作为植物体内重要的调控因子,广泛参与包括极端温度胁迫、干旱胁迫、盐碱胁迫的非生物胁迫响应以及病原菌、害虫造成的生物胁迫防御过程^[10-11]。热激转录因子家族 HsfA 亚族在其 C 端具有 AHA 基序的转录激活结构域,可独立调控下游基因的表达。拟南芥 *AtHsfA6a* 基因通过 ABA 依赖性信号通路调节大量与胁迫相关的靶基因增强种子萌发期和幼苗期对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性^[25]。ZHOU 等^[26]研究发现番茄受到 RKNs (根结线虫属的植物寄生线虫) 攻击时, HsfA1a 作为关键性调控因子接受应激信号转录表达,激活 *Wfi1* (whitefly induced 1) 依赖性 ROS 信号诱导受损细胞周围发生超敏反应 (HR),进而防御 RKNs 对植株的侵害。HsfB 和 HsfC 缺少该基序无转录激活活性无法调控下游基因^[27]。有研究表明, HsfB 亚族可通过与其他蛋白的相互作用协同调控下游基因表达做出应激反应。番茄在热应激状态下,分子伴侣 HSP90 协同 HsfB1 既可作为热应激诱导基因 (HS-gene) 的中间阻遏物进行负调控,又可以作为其他转录因

子的共激活因子被招募到管家基因 (HK-gene) 启动子区的 Hsf 结合位点正调控基因表达^[28]。木薯 *MeHsfB3b* 基因分属于 B 族,不具备转录激活结构域^[29],可能通过与其他蛋白相互作用协同调控下游靶基因表达响应病原菌 *XpmCHN11* 侵染。前期通过酵母双杂交文库筛选,获得候选互作蛋白 MeFKBP20。本研究通过酵母双杂交点对点、双分子荧光互补实验证明 MeHsfB3b 蛋白通过 201~241 aa 区域与 MeFKBP20 蛋白作用。

FKBPs 属于 FK506 结合蛋白家族,参与广泛的生物过程,包括转录调节、蛋白质折叠、信号转导和免疫抑制^[30]。CYBELLE 等^[31]发现 PASTICCINO1 (一种 FKBP 蛋白) 蛋白通过 C 端结构域控制着蛋白的亚细胞分布以及与其他蛋白的相互作用,同时能够招募转录因子 NAC 家族的成员,并将该转录因子靶向到细胞核中。有研究表明,过量表达辣椒 *FKBP15-2* 可以增强植物对疫霉菌的免疫反应^[24]。拟南芥敲除 *AtFKBP65* 基因导致对丁香假单胞菌的敏感性增强,而过量表达会诱导 *WRKY33* 和 *bGS2* 基因转录在细胞壁积累更多的胼胝质阻止丁香假单胞菌快速侵入植物

组织^[32]。本研究通过对 *MeFKBP20* 基因的表达模式分析发现该基因在华南 8 号木薯多组织部位高表达,并且该基因的表达受到木薯细菌性枯萎病病原菌 *XpmCHN11* 的诱导,表明该基因可能参与木薯对 CBB 的响应过程。因此推测 *XpmCHN11* 病原菌侵染木薯诱导 MeFKBP20 和 MeHsfB3b 蛋白表达并相互作用,协同调控褪黑素合成基因表达,增强抗病性。在后续研究中,本课题组将通过转基因及基因编辑进行稳定的遗传转化,进一步验证 MeFKBP20-MeHsfB3b 分子模块调控木薯抗病功能,深入挖掘抗病功能基因资源,为培育抗细菌性枯萎病的木薯新种质提供理论依据和新的策略。

参考文献

- [1] HU W, JI C M, LIANG Z, YE J Q, OU W J, DING Z H, ZHOU G, TIE W W, YAN Y, YANG J H, MA L M, YANG X Y, WEI Y X, JIN Z Q, XIE J H, PENG M, WANG W Q, GUO A P, XU B Y, GUO J C, CHEN S B, WANG M C, ZHOU Y, LI X L, LI R X, XIAO X H, WAN Z Q, AN F F, ZHANG J, LENG Q Y, LI Y, SHI H T, MING R, LI K M. Resequencing of 388 cassava accessions identifies valuable loci and selection for variation in heterozygosity[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 316.
- [2] ZHANG P, WANG W Q, ZHANG G L, KAMINEK M, DOBREV P, XU J, GRUISSEM W. Senescence-inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(7): 653-669.
- [3] LI S B, CUI Y Y, ZHOU Y, LUO Z T, LIU J D, ZHAO M M. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(8): 2282-2290.
- [4] RITA DE CÁSSIA CERQUEIRA M, CARLOS AUGUSTO DOREA B, KATIA NOGUEIRA P, HARLLEN SANDRO ALVES DA S, CLAUDIA FORTES F, SAULO ALVES SANTOS DE O. Improvement of the specific detection of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* based on the *pthB* gene[J]. *Acta Scientiarum Agronomy*, 2019, 41: e42708.
- [5] 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]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(1): 116-121. (in Chinese)
- [6] ANDRÉ ANTOINE F, VALERIEN AMÉGNIKIN Z, KERSTIN W. Cassava bacterial blight: a devastating disease of cassava[M]. Rijeka: IntechOpen. 2017.
- [7] ZÁRATE-CHAVES C A, GÓMEZ DE LA CRUZ D, VERDIER V, LÓPEZ C E, BERNAL A, SZUREK B. Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(12): 1520-1537.
- [8] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, CITOVSKEY V, SRIARIYANUM M, RONALD P, DOW M, VERDIER V, BEER S V, MACHADO M A, TOTH I, SALMOND G, FOSTER G D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(6): 614-629.
- [9] 邵坤仲, 吕昕培, 李佳吕, 陈佳, 赵玲玉, 任伟, 张金林. 高等植物热激转录因子生物学特性及其在非生物胁迫适应中的作用[J]. *应用生态学报*, 2022, 33(8): 2286-2296.
SHAO K Z, LYU X P, LI J L, CHEN J, ZHAO L Y, REN W, ZHANG J L. Biological characteristics of heat shock transcription factors in higher plants and their roles in abiotic stress adaptation[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2022, 33(8): 2286-2296. (in Chinese)
- [10] 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.
- [11] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324.
- [12] 张楠, 王映红, 王志敏, 岳振宇, 牛义. 植物热激转录因子家族的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1155-1167.
ZHANG N, WANG Y H, WANG Z M, YUE Z Y, NIU Y. Research progress of plant heat shock transcription factor family[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(4): 1155-1167. (in Chinese)
- [13] 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.
- [14] SINGH A, MITTAL D, LAVANIA D, AGARWAL M, MISHRA R C, GROVER A. OsHsfA2c and OsHsfB4b are involved in the transcriptional regulation of cytoplasmic *OsClpB* (*Hsp100*) gene in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2012, 17(2): 243-254.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] NEYE H. Peptidyl-prolyl isomerases[M]. New York: Elsevier, 2007: 1.
- [18] CHANG H H, LEE C H, CHANG C J, JAN F J. FKBP-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase interacts with the movement protein of tomato leaf curl new Delhi virus and impacts viral replication in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(4): 561-575.
- [19] BISSOLI G, NIÑOLES R, FRESQUET S, PALOMBIERI S, BUESO E, RUBIO L, GARCÍA-SÁNCHEZ M J, FERNÁNDEZ J A, MULET J M, SERRANO R. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase ROF2 modulates intracellular pH homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2012, 70(4): 704-716.
- [20] YU Y L, LI Y J, JIA F J, ZHAO M, LI W C, SUN Q, LI N N, LI W L, MENG Z D. *ZmFKBP20-1* improves the drought and salt tolerance of transformed *Arabidopsis*[J]. *Journal of Plant Biology*, 2017, 60(6): 558-570.
- [21] VUCICH V A, GASSER C S. Novel structure of a high molecular weight FK506 binding protein from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular & General Genetics*, 1996, 252(5): 510-517.
- [22] WEBER H, CHÉTELAT A, REYMOND P, FARMER E E. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde[J]. *The Plant journal*, 2004, 37(6): 877-888.
- [23] GOLLAN P J, BHAVE M, ARO E M. The FKBP families of higher plants: exploring the structures and functions of protein interaction specialists[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(20): 3539-3547.
- [24] FAN G J, YANG Y, LI T T, LU W Q, DU Y, QIANG X Y, WEN Q J, SHAN W X. A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits a plant PPIase to suppress endoplasmic reticulum-mediated immunity[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(8): 1067-1083.
- [25] HWANG S M, WON K D, SEOK W M, SEOP J H, SIM S Y, SALINA S A, JA C G, DONG B J. Functional characterization of *Arabidopsis* HsfA6a as a heat-shock transcription factor under high salinity and dehydration conditions[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2014, 37(5): 1202-1222.
- [26] ZHOU J, XU X C, CAO J J, YIN L L, XIA X J, SHI K, ZHOU Y H, YU J Q. Heat shock factor HsfA1a is essential for *R* gene-mediated nematode resistance and triggers H₂O₂ production[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(3): 2456-2471.
- [27] 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-Genes Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819(2): 104-119.
- [28] HAHN A, BUBLAK D, SCHLEIFF E, SCHARF K D. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(2): 741-755.
- [29] YU X Y, YAO Y, HONG Y H, HOU P Y, LI C X, XIA Z Q, GENG M T, CHEN Y H. Differential expression of the Hsf family in cassava under biotic and abiotic stresses[J]. *Genome*, 2019, 62(8): 563-569.
- [30] ZHANG N, FENG S Q, TIAN Y, ZHUANG L, CHA G, DUAN S Y, LI H M, NONG X Q, ZHANG Z H, TU X B, WANG G J. Identification, characterization and spatiotemporal expression analysis of the *fkbp* family genes in *Locusta migratoria*[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 4048.
- [31] CYBELLE S, FRANÇOIS R, LIONEL G, EMILIE V, OLIVIER G, HALIMA M, THIMOTÉ M, YANNICK B, DANNY G, DENIS F J. The C terminus of the immunophilin PASTICCINO1 is required for plant development and for interaction with a NAC-like transcription factor[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(35): 25475-25484.
- [32] POGORELKO G V, MOKRYAKOVA M, FURSOVA O V, ABDEEVA I, PIRUZIAN E S, BRUSKIN S A. Characterization of three *Arabidopsis thaliana* immunophilin genes involved in the plant defense response against *Pseudomonas syringae*[J]. *Gene*, 2014, 538(1): 12-22.