

木薯 *MeYippee1* 基因的克隆、表达及互作蛋白研究

任治欣^{1,2,3}, 陆小花^{1,2,3}, 郑婉茹¹, 梁宝娟^{1,2,3}, 张慧敏^{1,2,3}, 葛玉建^{1,2,3}, 陈 新^{2,3}, 姚 远^{2,3*}, 耿梦婷^{1*}, 郭建春^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院, 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. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572000

摘 要: 解析木薯淀粉合成相关酶的表达调控机制, 有助于高产、高淀粉木薯分子育种。前期研究发现, 生长素快速响应基因 *MeSAUR1* 正调控淀粉合成关键酶 AGPase 的小亚基编码基因 *MeAGPS1a* 的表达; 酵母双杂交筛选发现 1 个 Yippee 蛋白成员 *MeYippee1* 是 *MeSAUR1* 的候选互作蛋白。本研究克隆 SC8 木薯品种 *MeYippee1* 基因的编码区, 全长 321 bp, 无内含子, 编码 106 个氨基酸, 编码的蛋白预测具有 4 个磷酸化位点。*MeYippee1* 基因在不同组织器官中的表达分析发现, *MeYippee1* 在腋芽中的表达量最高, 其次为须根、块根和成熟叶, 在茎和叶柄中的表达量较低, 在顶芽和嫩叶中的表达量最低。*MeYippee1* 在块根发育各时期的表达分析发现, *MeYippee1* 主要在块根形成期表达。酵母双杂交点对点验证发现 *MeYippee1* 和 *MeSAUR1* 蛋白存在互作关系。本研究结果为 *MeSAUR1* 和 *MeYippee1* 互作正调控 *MeAGPS1a* 表达的分子机理解析提供新的线索。

关键词: *MeYippee1*; 表达模式; 酵母双杂交

中图分类号: S533 文献标志码: A

Cloning, Expression, and Interaction Protein Study of *MeYippee1* Gene in Cassava

REN Zhixin^{1,2,3}, LU Xiaohua^{1,2,3}, ZHENG Wanru¹, LIANG Baojuan^{1,2,3}, ZHANG Huimin^{1,2,3}, GE Yujian^{1,2,3}, CHEN Xin^{2,3}, YAO Yuan^{2,3*}, GENG Mengting^{1*}, GUO Jianchun^{2,3*}

1. Tropical Agriculture and Forestry College, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: Understanding the expression regulation mechanisms of enzymes related to starch synthesis in cassava can significantly advance the molecular breeding for high yield and high starch content. Prior research has uncovered that the auxin-responsive gene, *MeSAUR1*, upregulates the expression of *MeAGPS1a*, a gene encoding the small subunit of the key starch-synthesizing enzyme, AGPase. Yeast two-hybrid screening identified a Yippee protein family member, *MeYippee1*, as a candidate interacting protein with *MeSAUR1*. In this study, the coding region of the *MeYippee1* gene from cassava variety SC8 was cloned. The gene was 321 bp in the coding region, lacking introns, encoding a protein of 106 amino acids, with four predicted phosphorylation sites. Expression analysis in different tissues and organs revealed that *MeYippee1* was most highly expressed in axillary buds, followed by fibrous roots, storage roots, and mature leaves, while expression levels were lower in stems and petioles, and the lowest in apical buds and young leaves. Expression analysis during the different developmental stages of the storage root showed that *MeYippee1* expression was primarily during the formation phase of the storage roots. Further point-to-point yeast two-hybrid verification indicated an inter-

收稿日期 2024-03-12; 修回日期 2024-06-04

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31960058); 国家木薯产业技术体系项目 (No. CARS11-HNGJC)。

作者简介 任治欣 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 作物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 姚 远 (YAO Yuan), E-mail: yaoyuan@itbb.org.cn; 耿梦婷 (GENG Mengting), E-mail: mengtinggeng8908@163.com; 郭建春 (GUO Jianchun), E-mail: jianchunguo@163.com。

active relationship between MeYippee1 and MeSAUR1 proteins. The results would provide new insights into the molecular mechanism underlying the positive regulation of *MeAGPS1a* expression by MeSAUR1.

Keywords: *MeYippee1*; expression pattern; yeast two hybrid

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.007

木薯是世界上最重要的主食作物之一, 尤其在全球范围内的贫困地区, 木薯淀粉是人们获取热量的主要来源^[1]。解析木薯淀粉合成和产量形成的分子机理对木薯高产、高淀粉育种具有重要意义。淀粉主要由葡萄糖分子通过糖基转移酶的作用聚合而成, 主要在叶绿体和淀粉体内合成, 涉及 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase)、淀粉合成酶 (SS)、淀粉分支酶 (SBE)、去支链酶 (DBE) 等^[2]。植物激素在调节淀粉合成中扮演着重要角色, 尽管它们并不直接参与淀粉的生物合成途径。植物激素, 如生长素 (auxin)、赤霉素 (gibberellins)、细胞分裂素 (cytokinins) 和脱落酸 (abscisic acid) 等通过影响植物的生长发育和淀粉合成途径来间接调控淀粉的合成。脱落酸 (ABA) 和吲哚-3-乙酸 (IAA) 与玉米胚乳发育早期和中期淀粉合成相关基因的表达显著相关^[3]。ABA 诱导了荷花转录因子基因 *NnABI4* 表达上调, 而 *NnABI4* 可结合淀粉合成酶基因 *NnSS1* 的启动子促进其表达, 从而增强荷花根茎中的淀粉积累^[4]。IAA、GA₃ (赤霉素) 和 ZR (玉米素) 作为生长促进剂, 能够刺激木薯营养器官的生长, 进而增加光合产物的生成; 而 ABA 作为生长抑制剂, 可以减缓营养器官的发育, 限制块根的纵向生长, 同时促进块根的横向扩张和体积增大^[5]。植物激素调控木薯块根形成和淀粉积累的机理有待进一步解析。

SAUR (small auxin up RNA) 是一类与生长素信号传导相关的基因家族。在植物中, SAUR 基因家族编码的蛋白质通常参与调节生长素的响应, 在调节植物生长、发育和适应环境变化中起着重要作用。实验室前期研究证明, 木薯 *MeSAUR1* 结合 AGPase 的小亚基编码基因 *MeAGPS1a* 的启动子正调控该基因的表达, 表明 *MeSAUR1* 间接参与了木薯淀粉的合成。酵母双杂交试验筛选出 1 个 Yippee 蛋白成员 MeYippee1 是 *MeSAUR1* 的候选互作蛋白。Yippee 蛋白是一种高度保守的锌指结合蛋白, 其同源基因广泛存在于真菌、植物、动物等多种真核生物中。锌指蛋白在生物体中扮演着多种重要角色, 尤其是在基因表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程

中, 能够与 DNA、RNA、蛋白质或其他小分子特异性结合, 从而参与转录和翻译水平上的基因表达调控。Yippee 蛋白在植物中的生物学功能解析较少。过表达水稻 *OsYIPL1* 基因可以提升水稻的萌发率^[6]。另外, Yippee 蛋白基因家族还能调控植物细胞的增殖分化, 有研究表明其家族成员与 MAPK 信号通路相互作用, 从而影响细胞的生长; Yippee 蛋白可能还与免疫反应有关, 有研究证明它可以调节植物抵抗病原体的侵染^[7]。上述研究进展为解析 Yippee 基因在植物生理过程中的作用提供了宝贵的信息。

木薯 *MeYippee1* 基因的具体功能尚不清楚。本研究克隆 *MeYippee1* 的编码区, 开展序列分析及基因在不同组织中的表达模式研究, 通过酵母双杂交技术验证 *MeYippee1* 与 *MeSAUR1* 之间的相互作用, 研究结果为进一步研究 *MeYippee1* 在木薯淀粉积累过程中的功能提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

华南 8 号 (SC8) 木薯采自国家木薯种质资源圃; RNA 提取试剂盒购自北京聚合美生物科技有限公司; 反转录酶购自莫纳生物科技有限公司; qRT-PCR 酶购自诺瓦生物公司; 克隆基因聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 缺陷培养基 (SD) 购自北京酷来博科技有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 、酵母菌 AH109 购自上海唯地生物技术有限公司; 酵母双杂交载体质粒 pGBKT7-p53、pGADT7-T、pGBKT7-lam、pGBKT7、pGADT7 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *MeYippee1* 基因的克隆 参照 RNA 提取试剂盒 Plant Total RNA Isolation Kit Plus 的说明书提取 RNA。并用 MonScriptTM RTIII All-in-One Mix with dsDNase 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。根据 NCBI 数据库提供的 *MeYippee1* 的 CDS 序列信息, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *MeYippee1* 的上、下游引物, 并命名为 *MeYippee1*-BD-F/R (表 1), 在北京擎科生物科技股份有限公司

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
MeYippee1-BD-F/R	F: TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGCGGAATTGGTGGGT R: TGC GGCCGCTGCAGGTCGACCTAATCAGCAACAGTATGGAGACC	克隆
MeYippee1-real-F/R	F: CATTCTGTTCTCCCACG R: TTCCCTTCCTTGACTTCTG	荧光定量
Tublin-F/R	F: ATGCGGTTCTTGATGTTGTTC R: TCGGTGAAGGGAATACAGAGA	

司合成。以 cDNA 为模板，*MeYippee1*-BD-F/R 为引物扩增 *MeYippee1*。反应体系（50 μL）：2×PCR Solution Prime STAR HS (Premix) 25 μL，*MeYippee1*-BD-F 1 μL；*MeYippee1*-BD-R 1 μL，ddH₂O 22 μL，cDNA 模板 1 μL。扩增程序：94 ℃ 5 min；98 ℃ 10 s，56 ℃ 15 s，72 ℃ 30 s，35 个循环；72 ℃ 10 min。16 ℃ 保存产物。

1.2.2 *MeYippee1* 的生物信息学分析 通过 GSDS (<https://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件预测木薯 *MeYippee1* 基因的结构；通过 ProParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测木薯 *MeYippee1* 的理化性质；通过 TMHMM (TMHMM 2.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services) 在线软件预测 *MeYippee1* 蛋白质的跨膜区域；通过 SignalP-6.0 (SignalP 6.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services) 在线软件预测 *MeYippee1* 蛋白质的信号肽区域；通过 NetPhos (NetNGlyc 1.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services) 在线软件预测该蛋白的磷酸化位点；通过 Wolf PSORT[WOLF PSORT: Protein Subcellular Localization Prediction (hgsc.jp)] 在线网站对 *MeYippee1* 蛋白质的亚细胞定位进行预测；使用 MEGA7.1 软件的 Neighbor-Joining 法构建 *MeYippee1* 系统进化树。

1.2.3 *MeYippee1* 的表达模式分析 设计 *MeYippee1* 基因的 qPCR 引物并命名为 *MeYippee1*-real-F/R (表 1)，以木薯 *Tublin* 基因作为内参基因，设计其 qPCR 引物并命名为 *Tublin*-F/R (表 1)，进行荧光定量分析。反应体系（10 μL）：MonAmpTM ChemoHS qPCR Mix 5 μL，*MeYippee1*-real-F 0.2 μL，*MeYippee1*-real-R 0.2 μL；的 ddH₂O 2.6 μL，模板 2 μL。反应程序：95 ℃ 10 min；95 ℃ 10 s，58 ℃ 10 s，72 ℃ 30 s，41 个循环。

1.2.4 *MeYippee1* 蛋白的毒性和自激活检测 将

pGBKT7 和 pGBKT7-*MeYippee1* 质粒分别转化至 AH109 酵母，并在色氨酸缺陷型培养基上培养，观察酵母的生长情况，检测 *MeYippee1* 蛋白是否对酵母生长有影响。将 pGADT7 和 pGBKT7-*MeYippee1* 共同转化到 AH109 酵母，在色氨酸、亮氨酸缺陷型培养基（SD/T），色氨酸、亮氨酸、组氨酸、腺嘌呤缺陷型培养基（SD/TLHA）和含有 X-α-Gal 的色氨酸、亮氨酸、组氨酸、腺嘌呤缺陷型培养基（SD/TLHA+X-α-Gal）上分别培养，观察酵母的生长情况，检测 *MeYippee1* 蛋白是否自激活。

1.2.5 *MeYippee1* 与 MeSAUR1 酵母双杂交点对点验证 将 pGBKT7-*MeYippee1* 和 pGADT7-*MeSAUR1* 共转化至 AH109 酵母，筛选出阳性克隆。将阳性菌株及对照菌株点种在不同培养基上，检查生长情况和颜色变化。

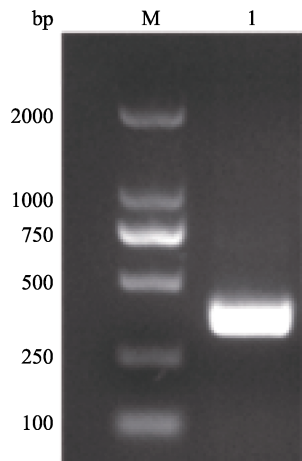
1.3 数据处理

采用 SPSS 26 软件进行数据统计分析，采用邓肯法进行单因素多样本差异显著性方差分析。

2 结果与分析

2.1 *MeYippee1* 基因的克隆与生物信息学分析

2.1.1 *MeYippee1* 基因的克隆 本研究以 SC8 木薯品种的 cDNA 为模板，设计特异性引物进行 RT-PCR，获得目的条带（图 1）。基因测序发现，*MeYippee1* 基因的 CDS 区长度为 321 bp，编码 106 个氨基酸。与 phytozome (<http://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 数据库中 AM560 木薯品种的 *MeYippee1* 基因序列对比发现，有 1 个碱基有差别，SC8 木薯的 *MeYippee1* 基因第 256 个碱基为“C”，而 AM560 木薯的 *MeYippee1* 基因在该位置的碱基为“T”（图 2）。核苷酸的差异导致了氨基酸序列的改变，SC8 木薯 *MeYippee1* 蛋白的第 86 个氨基酸为“P”，而 AM560 木薯 *MeYippee1* 蛋白在该位置的氨基酸则为“S”（图 3）。



M: DL2000 DNA marker.
图 1 *MeYippee1* 基因克隆
Fig. 1 Cloning of the *MeYippee1* gene

2.1.2 *MeYippee1* 基因的生物信息学分析 通过 ProParam 在线预测木薯 *MeYippee1* 蛋白分子式为 $C_{548}H_{851}N_{155}O_{154}S_6$, 分子质量 (Mw) 约为 12.27 kDa, 理论等电点 (pI) 为 8.69, 不稳定系数为 14.55, 为稳定蛋白, 总平均亲水系数为-0.377, 表明该蛋白属于亲水蛋白。该蛋白含有 20 种氨基酸残基, 其中 Ala (A) 含量与 Lys (K) 最高, 均占

8.50%, Pro (P) 的含量最低, 占 0.90% (表 2)。

MeYippee1 蛋白质的跨膜区域预测结果表明 *MeYippee1* 蛋白没有跨膜区域。通过 SignalP-6.0 软件预测 *MeYippee1* 蛋白质的信号肽区域发现, *MeYippee1* 蛋白质无 Sec/SPI 信号肽, 不属于分泌蛋白和跨膜蛋白, 符合 TMHMM 软件的预测结果。通过 NetPhos 软件预测该蛋白的磷酸化位点发现 *MeYippee1* 蛋白可能含有 4 个磷酸化位点。*MeYippee1* 蛋白质的亚细胞定位预测结果显示, 该蛋白最有可能定位于细胞质中, 其次是在线粒体中。

2.1.3 *MeYippee1* 系统进化树分析 将 *MeYippee1* 序列选取与相似程度比较高的 19 种其他物种的 Yippee 序列 [紫树 (*Nyssa sinensis*, KAA8533573.1)、巴西橡胶 (*Hevea brasiliensis*, XP_021661656.1)、云南金钱槭 (*Dipteronia dyeriana*, KAK2658520.1)、文冠果 (*Xanthocerasorbifolium*, KAH7543806.1)、茶树 (*Camellia sinensis*, XP_028081361.1)、狭叶羽扇豆 (*Lupinus angustifolius*, XP_019415243.1)、木豆 (*Cajanus cajan*, XP_020226898.1)、白羽扇豆 (*Lupinus albus*,

	1	11	21	31	41	51	61	71	81
AM560	ATGGCGGAATTGGTGGGTCCTCGGTTGTACAGCTGTTATAATTGTCGAAACCATGTTCTCTTCATGATGATATAAATTTCTAAGGCTTTT								
SC8	ATGGCGGAATTGGTGGGTCCTCGGTTGTACAGCTGTTATAATTGTCGAAACCATGTTCTCTTCATGATGATATAAATTTCTAAGGCTTTT								
Consensus	atggcggaattgggtgggtcctcggtgtgtacagctgttataattgtcgaaacccatgtttctcttcctcatgatgatataaatttctaagcgtttt								
	91	101	111	121	131	141	151	161	171
AM560	CAGGGAAGAAATGCCGAGCATTCTGTTCTCCACGCAATGAATATTATTGTAGGTGCTAAAGAAGATAGGCATCTGATAACTGGTCTC								
SC8	CAGGGAAGAAATGCCGAGCATTCTGTTCTCCACGCAATGAATATTATTGTAGGTGCTAAAGAAGATAGGCATCTGATAACTGGTCTC								
Consensus	cagggaagaatggcgagcatttctgttctccacgcaatgaatattattgtaggtgctaaagaagataggcatctgataactgggtctc								
	181	191	201	211	221	231	241	251	261
AM560	CATACTGTTGCTGATATCTATTGTGCTGATTGCCGTGAGGTGTTGGGTTGGAAGTACGAGCGAGCTTATGAAGCATCTCAGAAGTACAAG								
SC8	CATACTGTTGCTGATATCTATTGTGCTGATTGCCGTGAGGTGTTGGGTTGGAAGTACGAGCGAGCTTATGAAGCATCTCAGAAGTACAAG								
Consensus	catactgttgctgatatctattgtgctgattgccgtgaggtgttgggttgggaagtacgagcgagccttatgaagca ctcagaagtacaag								
	271	281	291	301	311	321	331	341	351
AM560	GAAGGGAATTCATACTTGAGAAGTCGAAAATTGTTAAGGAAAACCTGGTAA								
SC8	GAAGGGAATTCATACTTGAGAAGTCGAAAATTGTTAAGGAAAACCTGGTAA								
Consensus	gaagggaattcatacttgagaagtcgaaaattgttaaggaaaactggtaa								

图 2 SC8 与 AM560 木薯的 *MeYippee1* CDS 序列比对
Fig. 2 Sequence alignment of *MeYippee1* CDS in SC8 and AM560

	1	11	21	31	41	51	61	71	81
AM560	MAELVGPRLYSCYNCRNHVSLHDDIISKAFQGRNGRAFLFSHAMNIIVGAKEDRHLITGLHTVADIYCADCREVLGWKYERAYEASQKYK								
SC8	MAELVGPRLYSCYNCRNHVSLHDDIISKAFQGRNGRAFLFSHAMNIIVGAKEDRHLITGLHTVADIYCADCREVLGWKYERAYEAPQKYK								
Consensus	maelvgprrlyscyncrnhvslhddiiskafqgrngrafllfshamniivgakedrhlitglhtvadiyadcrcvlgwkyerayea qkyk								
	91	101	111	121	131	141	151	161	171
AM560	EGKFILEKSKIVKENW								
SC8	EGKFILEKSKIVKENW								
Consensus	egkfilekskivkenw								

图 3 SC8 与 AM560 的 *MeYippee1* 氨基酸序列比对
Fig. 3 Comparison of amino acid sequences of *MeYippee1* between SC8 and AM560

表 2 *MeYippee1* 氨基酸组成
Tab. 2 *MeYippee1* amino acid composition

氨基酸 Amino acid	数量 Quantities	比例 Ratio/%	氨基酸 Amino acid	数量 Quantities	比例 Ratio/%
Ala (A)	9	8.50	Leu (L)	8	7.50
Arg (R)	7	6.60	Lys (K)	9	8.50
Asn (N)	5	4.70	Met (M)	2	1.90
Asp (D)	5	4.70	Phe (F)	4	3.80
Cys (C)	4	3.80	Pro (P)	1	0.90
Gln (Q)	2	1.90	Ser (S)	6	5.70
Glu (E)	8	7.50	Thr (T)	2	1.90
Gly (G)	7	6.60	Trp (W)	2	1.90
His (H)	5	4.70	Tyr (Y)	6	5.70
Ile (I)	8	7.50	Val (V)	6	5.70

KAF1893681.1)、决明(*Senna tora*, KAF7830747.1)、薯蓣(*Diospyros lotus*, XP_052183539.1)、酸枣(*Ziziphus jujuba* var. *Spinosa*, XP_015886610.1)、莲藕(*Nelumbo nucifera*, XP_010267494.1)、东方银耳(*Trema orientale*, PON81226.1)、栓皮栎(*Quercus suber*, XP_023912069.1)、麻疯树(*Jatropha curcas*, XP_012084536.1)、白花羊蹄甲(*Bauhinia variegata*, KAI4338001.1)、牧豆树(*Prosopis cineraria*, XP_054799767.1)、大叶栎(*Quercus lobata*, XP_030934691.1)、土瓶草(*Cephalotus follicularis*, GAV82826.1)]构建*MeYippee1*系统进化树,结果显示,与*MeYippee1*亲缘关系最近的是巴西橡胶树(图4)。

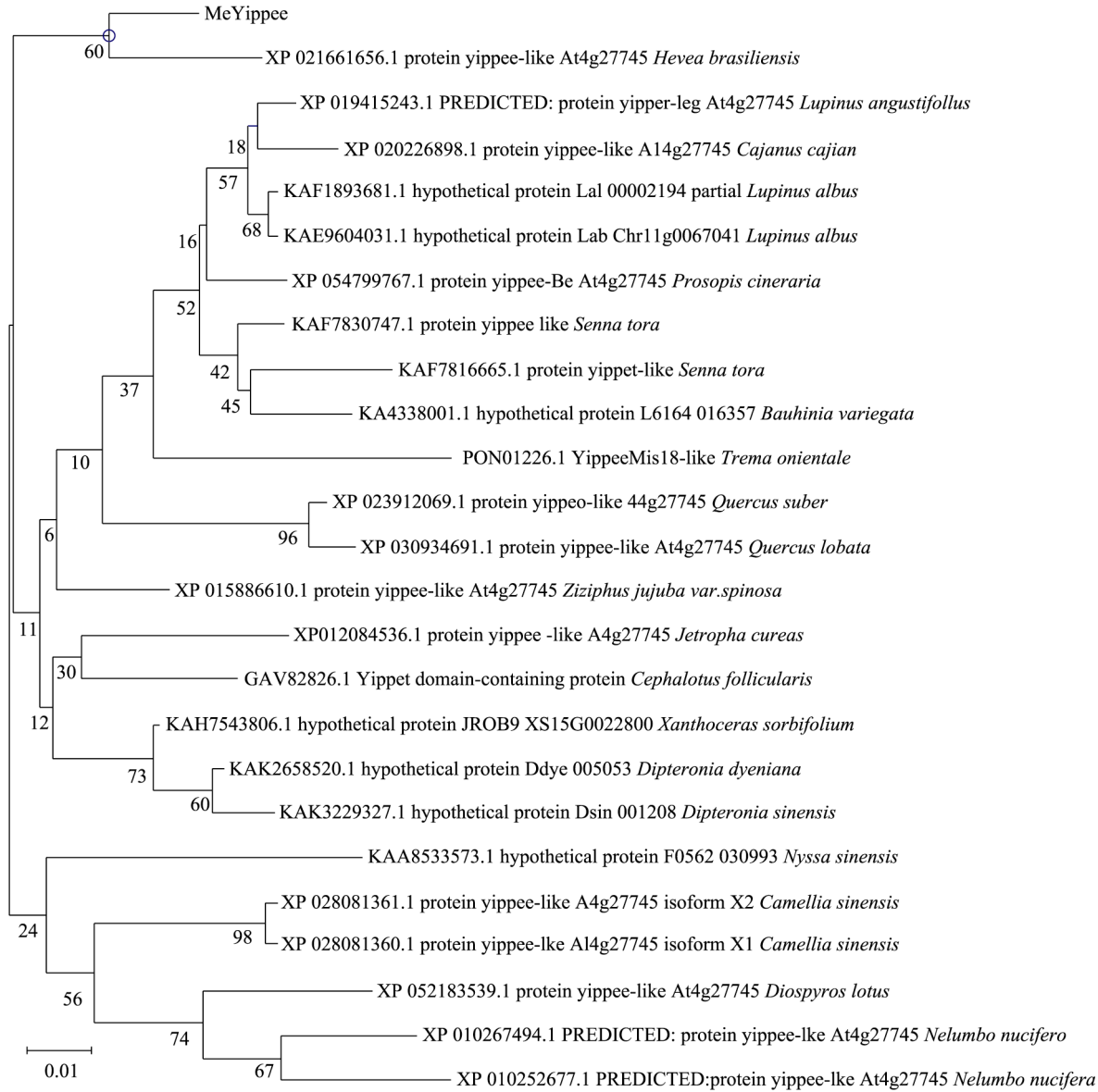
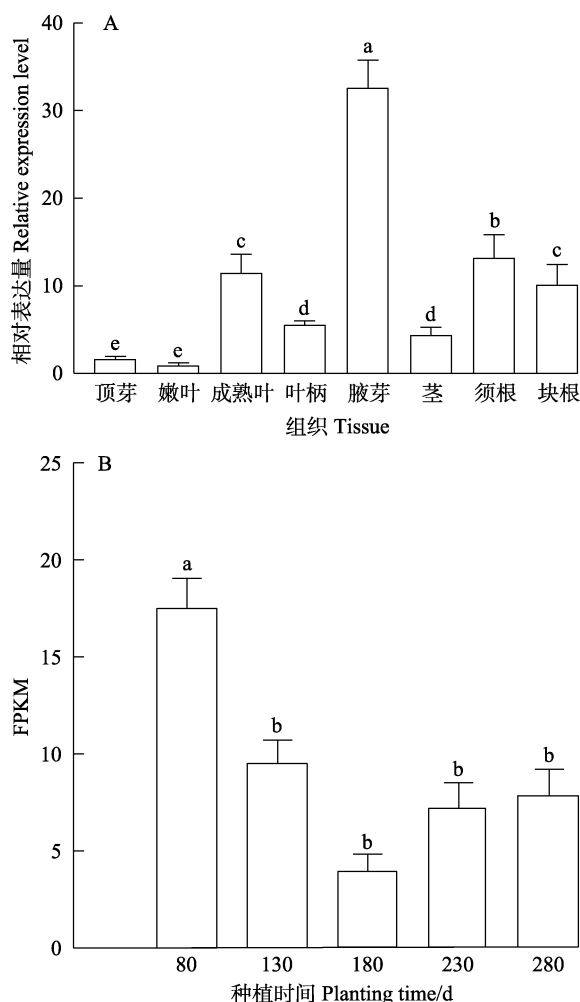


图 4 木薯以及其他物种的 Yippee 系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of Yippee in cassava and other species

2.2 *MeYippee1* 的表达模式分析

采用 qRT-PCR 技术分析 *MeYippee1* 在 SC8 木薯的嫩叶、成熟叶、叶柄、块根、须根、腋芽、顶芽、茎等 8 个不同组织部位的表达模式。结果发现, *MeYippee1* 在腋芽的表达量最高, 其次为须根、块根和成熟叶, 在茎和叶柄的表达量较低, 在顶芽和嫩叶表达量最低(图 5A)。利用本实验室前期获得 SC8 木薯形成期块根(种植后 80 d)、膨大期块根(种植后 130 d 和 180 d)和成熟期块根(种植后 230 d 和 280 d)的转录组数据分析木薯 SC8 块根不同发育时期的转录组的表达情况, 发现 *MeYippee1* 主要在块根形成期表达, 且与其他时期的表达差异显著(图 5B)。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 5 *MeYippee1* 的表达模式分析

Fig. 5 Expression pattern analysis of *MeYippee1*

2.3 *MeYippee1* 蛋白的毒性和自激活检测

2.3.1 *MeYippee1* 蛋白毒性检测 在酵母双杂交

实验前, 需确保外源蛋白不抑制酵母生长。将 BD-*MeYippee1* 与 BD 载体分别转化至 AH109 酵母, 通过比较生长情况来评估目标酵母生长是否受抑制。结果显示, 2 种酵母菌斑生长相似(图 6), 表明 *MeYippee1* 蛋白无细胞毒性, 适合进行后续

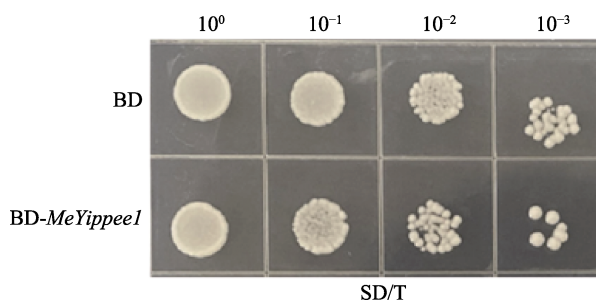


图 6 *MeYippee1* 蛋白的毒性检测

Fig. 6 Toxicity detection of *MeYippee1* protein

2.3.2 自激活检验 将 BD-*MeYippee1* 与 AD 载体共同转入 AH109 酵母菌株进行自激活检验。共转化 BD-*MeYippee1* 和 AD 载体的酵母菌、阳性对照 (AD-Large T+BD-p53) 和阴性对照 (AD-Large T+BD-laminc) 的酵母菌在 SD/TL 的培养基上均能生长。只有阳性对照在 SD/TLHA 和 SD/TLHA+X- α -Gal 培养基上生长, 且其菌斑在 SD/TLHA+X- α -Gal 培养基上呈现蓝色(图 7), 表明 *MeYippee1* 蛋白不具备自激活特性。

2.4 *MeYippee1* 与 *MeSAUR1* 酵母双杂交点对点验证

本研究采用酵母双杂交技术来探究 *MeSAUR1* 与 *MeYippee1* 之间的相互作用。将含有 AD-*MeSAUR1* 和 BD-*MeYippee1* 的质粒共转入酵母菌中, 并在不同的选择性培养基上进行培养。在 SD/TL、SD/TLHA 以及 SD/TLHA+X- α -Gal 培养基上, 转基因酵母菌均能正常生长, 而在 SD/TLHA+X- α -Gal 培养基上, 酵母菌落呈现蓝色(蓝色是 β -半乳糖苷酶活性的指示), 表明在 SD/TLHA 培养基中, *MeSAUR1* 与 *MeYippee1* 之间发生了相互作用(图 8)。

3 讨论

木薯淀粉的合成涉及多种酶, 包括 ADPG 焦磷酸化酶、颗粒结合淀粉合酶、淀粉合酶、淀粉分支酶 (SBE)、脱支酶^[8-12]等, 这些酶在淀粉生物合成过程中起着关键作用。研究人员已通过转基因、基因编辑等方式验证了 *MeGBSSI*、*MeSBE2.1*、

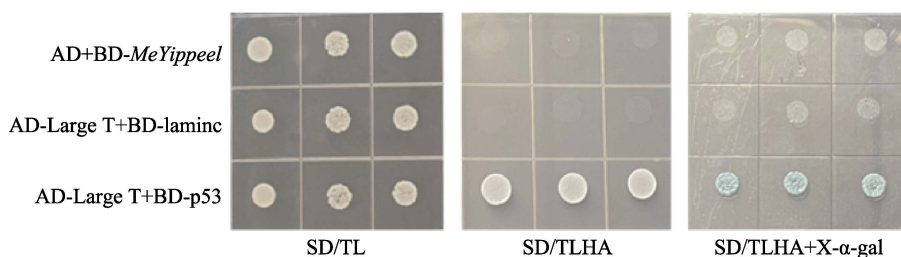
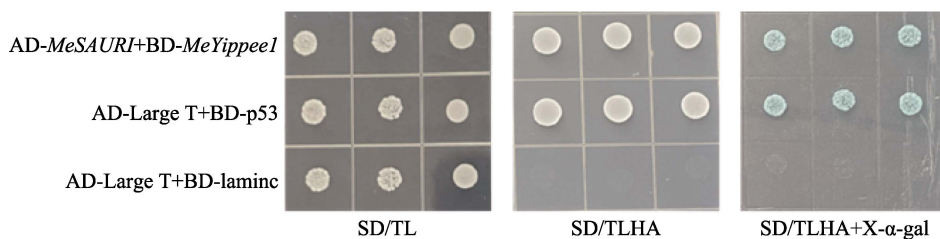
图 7 *MeYippee1* 蛋白的自激活检测Fig. 7 Self activation detection of *MeYippee1* protein

图 8 酵母双杂交验证

Fig. 8 Yeast two hybrid validation

MeSBE2.2 等基因参与淀粉合成^[13]。IHEMER 等^[14]通过在木薯中表达改良的细菌 *glgC* 基因,成功地增加了 AGPase 活性,导致转基因木薯的淀粉产量显著增加。还有报道指出通过 RNA 干扰技术降低木薯中 2 个淀粉分支酶基因 (*BE1* 和 *BE2*) 的表达,成功培育出了含有高比例直链淀粉的木薯品种^[15]。然而,木薯淀粉合成相关基因的表达调控研究较少,调控网络有待解析,Yippee 基因家族成员已被证实参与调控细胞分裂和器官发育^[16],但是尚未有该基因家族参与淀粉合成相关基因表达调控的报道。本实验室前期研究发现 ADPG 焦磷酸化酶小亚基基因 *MeAGPS1a* 受 *MeSAUR1* 正调控,本研究通过酵母双杂交实验进一步证明 *MeSAUR1* 与 *MeYippee1* 存在互作关系。

生长素参与植物库器官的发育及淀粉的合成调控。生长素在水稻淀粉合成中起正调控作用,水稻籽粒发育过程中生长素和淀粉浓度同时增加。施用 IAA 可增加籽粒的淀粉含量,降低水稻生长素响应因子基因 *OsARF18* 表达,导致生长素信号传导改变,影响水稻生长、发育及淀粉合成^[17]。豌豆的生长素生物合成基因 *PsTAR2* 突变体的 IAA 含量显著降低,这一结果导致 AGPase 大亚基的编码基因 *PsAGPL1* 表达量显著降低,使得 AGPase 活性降低 3 倍,突变体的豌豆种子变小,淀粉含量显著减少^[18]。木薯块根发育的研究发现,生长素信号的增强与淀粉储存代谢的激活密切相关。在木薯块根形成期,须根发育膨大形成

块根^[19],块根内源生长素 IAA 含量显著提高^[5]。在木薯块根形成的过程中,生长素相关基因 (*ARF*、*SAUR*、*AUX1* 等) 的表达水平提高,促进块根的次生生长和淀粉合成。本研究发现 *MeYippee1* 基因主要在木薯块根形成期表达,因此推测 *MeYippee1* 和生长素信号传导相关蛋白 *MeSAUR1* 互作,协同响应生长素对木薯块根发育和淀粉积累的调控。后续研究中,将进一步分析 *MeSAUR1* 和 *MeYippee1* 互作对 *MeAGPS1a* 表达的影响,通过转基因验证 *MeYippee1* 在木薯块根形成和淀粉积累过程中的功能。

参考文献

- [1] MCMAHON J, SAYRE R, ZIDENGA T. Cyanogenesis in cassava and its molecular manipulation for crop improvement[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(7): 1853-1867.
- [2] PFISTER B, ZEEMAN S C. Formation of starch in plant cells[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(14): 2781-2807.
- [3] CHEN J, HUANG B, LI Y, DU H, GU Y, LIU H, ZHANG J, HUANG Y. Synergistic influence of sucrose and abscisic acid on the genes involved in starch synthesis in maize endosperm[J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(13): 1684-1691.
- [4] WU P, LIU A, ZHANG Y, FENG K, ZHAO S, LI L. NnABI4-mediated ABA regulation of starch biosynthesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13506.

- [5] 罗兴录, 樊吴静, 王军. 木薯不同生育时期内源激素含量变化研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(21): 82-86.
LUO X L, FAN W J, WANG J. Studies on the changes of endogenous hormones in cassava during growing development[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(21): 82-86. (in Chinese)
- [6] 周炼, 陈洛, 吴伟, 杨梯丰, 张少红, 赵均良. 一个锌指结合蛋白编码基因调控水稻种子萌发[J]. 广东农业科学, 2022, 49(9): 1-9.
ZHOU L, CHEN L, WU W, YANG T F, ZHANG S H, ZHAO J L. Seed germination in rice regulated by a zinc-finger binding protein encoding gene[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2022, 49(9): 1-9. (in Chinese)
- [7] HAN J H, SHIN J H, LEE Y H, KIM K S. Distinct roles of the YPEL gene family in development and pathogenicity in the ascomycete fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 14461.
- [8] BALLICORA M A, IGLESIAS A A, PREISS J. ADP- Glucose Pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis[J]. Photosynthesis Research, 2004, 79(1): 1-24.
- [9] ZHANG S, LI C, GILBERT R G, MALDE A K. Understanding the binding of starch fragments to granule-bound starch synthase[J]. Biomacromolecules, 2021, 22(11): 4730-4737.
- [10] LETERRIER M, HOLAPPA L D, BROGLIE K E, BECKLES D M. Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8: 98.
- [11] YU J, WANG K, BECKLES D M. Starch branching enzymes as putative determinants of postharvest quality in horticultural crops[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 479.
- [12] XIA W, ZHANG K, SU L, WU J. Microbial starch debranching enzymes: developments and applications[J]. Biotechnology Advances, 2021, 50: 107786.
- [13] PEI J, WANG H, XIA Z, LIU C, CHEN X, MA P, LU C, WANG W. Phylogeny and expression pattern of starch branching enzyme family genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) under diverse environments[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2015, 406(1/2): 273-284.
- [14] IHEMERE U, ARIAS-GARZON D, LAWRENCE S, SAYRE R. Genetic modification of cassava for enhanced starch production[J]. Plant Biotechnology Journal, 2006, 4(4): 453-465.
- [15] ZHOU W, ZHAO S, HE S, MA Q, LU X, HAO X, WANG H, YANG J, ZHANG P. Production of very-high-amylose cassava by post-transcriptional silencing of branching enzyme genes[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62(6): 832-846.
- [16] 彭忠禄, 万永奇, 罗桐秀, 邓云, 莫小阳, 李永青, 袁葵洲, 吴秀山. *Yippee* 转基因果蝇品系的建立及基因功能的初步研究[J]. 生命科学研究, 2009, 13(3): 209-214.
PENG Z L, WAN Y Q, LUO T X, DENG Y, MO X Y, LI Y Q, YUAN W Z, WU X S. Construction of *Yippee* gene transgenic flies and its functional research[J]. Life Science Research, 2009, 13(3): 209-214. (in Chinese)
- [17] HUANG J, LI Z, ZHAO D. Deregulation of the OsmiR160 target gene *OsARF18* causes growth and developmental defects with an alteration of auxin signaling in rice[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29938.
- [18] MCADAM E L, MEITZEL T, QUITTENDEN L J, DAVIDSON S E, DALMAIS M, BENDAHMANE A I, THOMPSON R, SMITH J J, NICHOLS D S, URQUHART S, GÉLINAS-MARION A, AUBERT G, ROSS J J. Evidence that auxin is required for normal seed size and starch synthesis in pea[J]. New Phytologist, 2017, 216(1): 193-204.
- [19] DING Z, FU L, TIE W, YAN Y, WU C, DAI J, ZHANG J, HU W. Highly dynamic, coordinated, and stage-specific profiles are revealed by a multi-omics integrative analysis during tuberous root development in cassava[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(22): 7003-7017.