

木薯 MeCML42 互作蛋白筛选

张慧敏^{1,2,3}, 葛玉建^{1,2,3}, 侯静怡^{1,2}, 梁宝娟^{1,2,3}, 任治欣^{1,2,3}, 郭建春^{2,3}, 姚 远^{2,3},
王亚杰^{2,3*}, 耿梦婷^{1*}

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/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/海南热带农业资源研究院/海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 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: 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 具有抗旱、耐贫瘠、适应性强等优良的种植特点, 是全世界 10 亿多人口的主要粮食作物。CMLs (calmodulin-like proteins) 是一种植物类钙调蛋白, 是存在于细胞内的钙感受器, 与其他钙调素结合蛋白相互作用调控细胞生理过程, 参与植物逆境胁迫响应。木薯 *MeCML42* 基因受干旱胁迫诱导, 为了研究该基因参与的干旱胁迫响应通路, 本研究利用酵母双杂交筛选 *MeCML42* 的互作蛋白。首先利用同源重组技术构建 pGBKT7-*MeCML42* 诱饵载体, 通过自激活检测证明 *MeCML42* 蛋白无自激活活性。毒性检测实验证明, *MeCML42* 蛋白对酵母菌没有毒性, 不影响酵母正常生长。通过酵母双杂交进行 cDNA 文库筛选, 获得 7 个候选互作蛋白。通过酵母双杂交回转变实验验证了 *MeCML42* 与硫氧还蛋白 *MeCDSP32* 存在互作关系。甘露醇模拟干旱胁迫发现, *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 均受干旱诱导表达, 且在胁迫 48 h 的表达量最高, 此结果说明 *MeCML42* 蛋白与 *MeCDSP32* 蛋白协同参与了木薯对干旱胁迫的响应。本研究结果为 *MeCML42* 参与木薯响应干旱胁迫通路提供新的依据。

关键词: 木薯; *MeCML42*; 酵母双杂交; *MeCDSP32*

中图分类号: S533 文献标志码: A

Screening of MeCML42 Interacting Proteins in Cassava

ZHANG Huimin^{1,2,3}, GE Yujian^{1,2,3}, HOU Jingyi^{1,2}, LIANG Baojuan^{1,2,3}, REN Zhixin^{1,2,3}, GUO Jianchun^{2,3},
YAO Yuan^{2,3}, WANG Yajie^{2,3*}, GENG Mengting^{1*}

1. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) has excellent planting characteristics such as drought resistance, barren tolerance and strong adaptability, and is the main food crop for more than 1 billion people in the world. CMLs (calmodulin-like proteins) are plant calmodulin-like receptors in cells. They interact with other calmodulin-binding proteins to regulate cellular physiological processes and participate in plant stress response. *MeCML42* gene in cassava is induced by drought stress. In order to study the drought stress response pathway involved in this gene, yeast two-hybridization was used to screen the interacting proteins of *MeCML42*. Firstly, the decoy vector pGBKT7-*MeCML42* was constructed by homologous recombination technique, and the self-activation experiment showed that *MeCML42* protein had no self-activation activity. The toxicity test showed that *MeCML42* protein was not toxic to yeast and did not affect the normal growth of yeast. The cDNA library was screened by yeast two-hybridization and 7 candidate interacting proteins were obtained. The interaction between *MeCML42* and thioredoxin *MeCDSP32* was veri-

收稿日期 2024-03-07; 修回日期 2024-03-29

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC709, No. 324QN318); 国家木薯产业技术体系项目 (No. CARS11-HNCYH)。

作者简介 张慧敏 (1998—), 女, 硕士, 研究方向: 作物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 王亚杰 (WANG Yajie), E-mail: wangyajie@itbb.org.cn; 耿梦婷 (GENG Mengting), E-mail: mengtinggeng8908@163.com。

fied by yeast double heterogyclic experiment. Mannitol simulation of drought stress showed that the expressions of *MeCML42* and *MeCDSP32* were both induced by drought, and the expression levels were the highest at 48 h under stress. These results indicated that *MeCML42* and *MeCDSP32* were synergistically involved in cassava's response to drought stress. The results of this study provide a new basis for *MeCML42* to participate in cassava response to drought stress.

Keywords: cassava; *MeCML42*; yeast two-hybrid; *MeCDSP32*

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.002

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 为大戟科木本植物, 是重要的根茎类热带作物^[1]。木薯块根具有丰富的淀粉, 被认为是生物能源、变性淀粉以及动物饲料的理想原料作物^[2-3]。木薯具有一定的干旱耐受性, 但苗期的生长严重受干旱制约, 种植后 3~4 个月是灌溉木薯的关键时期^[4]。在这个时期的水分胁迫会导致植物死亡或者储藏根产量减少高达 60%^[5]。在干旱条件下, 木薯通过快速闭合气孔和叶片脱落以限制水分的进一步丢失, 这是保护植物免受脱水的一种机制^[6]。尽管木薯对干旱具有一定的耐受性, 但这种耐受性是以牺牲块根产量为代价的。一些参与木薯的干旱胁迫响应的基因已经被挖掘。TURYAGYENDA 等^[7]通过全基因组关联研究 (GWAS) 挖掘了 23 个与干旱耐受性相关的显著单核苷酸多态性 (SNPs), 这些 SNPs 分布在木薯的不同染色体上, 与干旱条件下的干物质含量、根产量和淀粉产量等性状相关。*MeALDH* 和 *MeMSD* 通过清除 ROS 来保护细胞免受氧化应激的损害, 而 *MeZFP* 和 *MeRD28* 则可能参与调节渗透物质, 帮助木薯在干旱条件下维持细胞的水分和稳定性, 这些基因均在抗旱木薯品种中上调表达。

钙离子作为重要的次信使, 在植物的生长发育和逆境响应中发挥着重要作用^[8]。CMLs (calmodulin-like proteins) 是一种植物类钙调蛋白, 起源于真核生物, 参与植物的生长发育并且发挥重要作用^[9]。植物类钙调蛋白是存在于细胞内的钙感受器, 与其他钙调素结合蛋白相互作用调控细胞生理过程^[10]。拟南芥的类钙调蛋白 CML37 正调控 ABA 介导干旱胁迫^[11]。水稻 OsERF48 转录因子通过调控 *OsCML16* 基因表达, 增强根部生长和干旱耐受性^[12]。过表达甜瓜的 *CmCML13* 基因, 提高拟南芥的抗旱性^[13]。研究表明 ABA、MeJA、IAA 正调控 *MeCML42* 启动子活性, 而 SA 对 *MeCML42* 启动子活性则为负调控^[14]。本研究通过酵母双杂交筛选 *MeCML42* 的候选互

作蛋白, 点对点验证实验证明 *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 存在互作关系, 并利用 qPCR 分析 *MeCML42* 和 *MeCDSP32* 在干旱胁迫下的表达特征。本研究结果有助于进一步解析 *MeCML42* 在木薯响应干旱胁迫过程的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为华南 8 号木薯 (SC8), 在 24 °C 培养室中生长。主要试剂: 质粒提取试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 和纯化试剂盒 (Cycle Pure Kit) 购自 OMEGA 公司; 酵母双杂交载体 pGBKT7、pGADT7、pGBKT7-*lam*、pGBKT7-*p53*、pGADT7-*T* 均由本实验室提供; AH109 酵母感受态和大肠杆菌感受态 DH5 α 均购自上海唯地生物技术有限公司; X- α -gal 酵母显色底物购自北京索莱宝科技有限公司; 限制性核酸内切酶 (*EcoR* I、*Bam*H I) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; PrimeSTAR HS (Premix) DNA Polymerase 酶购自 TaKaRa 公司、酵母缺陷平板购自 Clontech 公司; 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; RNA 提取试剂盒 (M5 HiPer Plant RNeasy Complex Mini Kit “繁可简”) 购自北京聚合美生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 (MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsDNase) 和 qPCR 试剂盒 (ChemoHS qPCR Mix) 购自莫纳 (武汉) 生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 诱饵载体 pGBKT7-*MeCML42* 的构建 按照聚合美“繁可简”RNA 提取试剂盒说明书提取 SC8 木薯全株 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 RNA 质量, 逆转录成 cDNA。采用 PrimeSTAR 高保真酶, 以携带重组接头的引物扩增 *MeCML42* 的编码区 (引物序列见表 1)。扩增获得并回收与预期片段大小一致的目的基因, 然后通过聚合美试剂盒说明书将 *MeCML42* 回收片

段与线性化载体 pGBKT7 (*EcoR* I 和 *Bam*H I) 连接。将同源重组产物转入 DH5 α 大肠杆菌感受态中，筛选获得单菌落。利用 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 进行菌液 PCR 反应，通过凝胶电泳鉴定筛选阳性菌落，并进行 Sanger 测序，获得测序正确的阳性克隆。

表 1 引物序列信息
Tab. 1 Primers sequence information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
pGBKT7- MeCML42	F: TGGCCATGGAGGCCGAATTCatgaccaagatagg- agaatttgaac R: TCGGCGCCGCTGCAGGTCGACctgcatcataacc- taaattcttc
pGADT7- MeCDSP32	F:CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCTACAG- TCACCAATTT R: AGCTCGAGCTCGATGGATCCATAGGTTACA- CGAACTCCTT
pGADT7- MeRBCSP	F: CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCTACCT- CTATGCTTTC R: AGCTCGAGCTCGATGGATCCATAATCGGTG- CCGGGAGGCT
pGADT7- MeUPF0415	F: CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCTGAA- AACGAACTTCA R: AGCTCGAGCTCGATGGATCCATCACCAGTT- AATGCCCTGG
pGADT7- MeIF-3-4	F: CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCTGGG- TTCACCAGCAC R: AGCTCGAGCTCGATGGATCCCACACCAGC- TGACACTTCAT
pGADT7- MeNADP	F: CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGCGGTG- GCAGGGCTAAC R: AGCTCGAGCTCGATGGATCCCATTCTCCT- GGAAGCATTG
MeCML42- qPCR	F: AACTTGTGTTTCGCCACCTG R: CAACCATCTCCATCGGAGTC
MeCDSP32- qPCR	F: CCTTTCTCGCAACGAGACT R: TTGCTATTAGCGCTGTGGCT

1.2.2 MeCML42 蛋白的毒性检测 and 自激活 (1) 毒性检测。将 pGBKT7 空载载体和 pGBKT7-MeCML42 诱饵载体分别转入 AH109 酵母感受态进行毒性检测。将转化后酵母菌液涂布在 SD/-Trp 培养基上，倒置在 28 $^{\circ}$ C 的酵母培养箱中生长约 3 d，得到酵母单菌落。挑取单菌落，使用 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 酶体系进行菌斑 PCR 验证，验证引物为 5-BD-F、3-BD-R。选取阳性酵母菌株进行扩大培养，将 pGBKT7 空载酵母菌液和 pGBKT7-MeCML42 酵母菌液分别接种至 SD/-Trp 液体培养基中，摇菌至 OD₆₀₀ 为 0.6。将菌液稀释为 1 : 1、1 : 10、1 : 100、1 : 1000、1 : 10000 等不同浓度，涂布于一缺 (SD/-Trp) 培养基上，在

28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2~3 d，观察菌落的生长状况。

(2) 自激活检测。将 pGBKT7-MeCML42 诱饵载体与 pGADT7 空载载体共转至 AH109 酵母感受态，涂布于二缺 (SD/-Trp-Leu) 培养基上，稀释从平板上挑取的阳性菌落，接种于二缺平板 (SD/-Trp-Leu)、四缺平板 (SD/-Trp-Leu-His-Ade) 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 平板上。分别以 pGBKT7-p53+pGADT7-T 和 pGBKT7-lam+pGADT7-T 共转化酵母为阳性对照和阴性对照。在 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2~3 d，观察菌落的生长状况。

1.2.3 MeCML42 的酵母双杂交文库筛选 制备携带 pGBKT7-MeCML42 诱饵质粒的 AH109 酵母感受态细胞。取本实验室的 SC8 木薯品种 cDNA 文库质粒 30 μ g，加入至 1.2 mL 酵母感受态细胞中进行转化。将转化后的酵母菌液涂布于三缺平板 (SD/-Trp-Leu-His) 上，在 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2~3 d，观察酵母生长状态。将三缺 (SD/-Trp-Leu-His) 平板上生长的菌落 (大于 2 mm) 挑到 20 μ L 0.9% NaCl 溶液中，混合均匀后点板至 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 平板上，平板倒置在 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 3 d 左右，观察酵母的生长状态。挑取蓝色单菌落进行菌落 PCR，将获得的片段进行测序分析，获得候选互作蛋白。

1.2.4 MeCML42 的酵母双杂交回转变验证 根据候选互作蛋白测序信息，在木薯基因组数据库搜索 CDS 区，设计携带重组接头的引物 (表 1)，克隆候选互作蛋白基因。通过同源重组试剂盒说明书将候选互作蛋白回收片段与线性化载体 pGADT7 连接，转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态中，转化方法详见说明书。挑取单菌落，利用 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 进行菌液 PCR 反应，通过凝胶电泳鉴定获得阳性克隆，Sanger 测序获得序列正确的载体并提取质粒。将含有候选互作蛋白基因的 pGADT7 载体与 pGBKT7-MeCML42 质粒共转化 AH109 感受态细胞获得转基因酵母。将阳性酵母菌液点样于 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 培养基平板上，将平板倒置在 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养，观察酵母其生长状态，验证候选互作蛋白是否与 MeCML42 存在互作关系。

1.2.5 MeCML42 与互作基因 MeCDSP32 在干旱胁迫下的表达分析 选取同一生长时期同一表型的 SC8 木薯植株，使用 300 mmol/L 甘露醇溶液浇灌至木薯根部，处理 0、12、24、48 h 后取样。

参照聚合美 RNA 提取试剂盒说明书提取植株全株总 RNA,使用莫纳逆转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。根据 *MeCML42* 和 *MeCDSP32* 基因 CDS 序列,使用 NCBI 网站设计 qPCR 引物(表 1),分析 SC8 木薯的 *MeCML42* 和 *MeCDSP32* 基因在干旱胁迫下的表达量变化。

2 结果与分析

2.1 pGBKT7-MeCML42 诱饵载体构建

提取质量良好的 SC8 木薯总 RNA,并逆转录为 cDNA,使用携带重组接头的特异性引物扩增 *MeCML42* 基因的编码区。PCR 产物经电泳检测显示得到约 400 bp 的片段(图 1),条带单一且明亮,符合片段预期大小(420 bp)。将回收的 *MeCML42* 基因片段与线性化 pGBKT7 载体连接涂板,挑取 8 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定,将得到阳性菌落测序,获得序列正确的 pGBKT7-

MeCML42 诱饵载体。

2.2 pGBKT7-MeCML42 诱饵载体的毒性和自激活检测

将 pGBKT7 空载质粒与 pGBKT7-*MeCML42* 诱饵质粒分别转化 AH109 酵母,梯度稀释后接种于 SD/-Trp 平板,观察菌斑生长状态。结果显示,pGBKT7 空载与 pGBKT7-*MeCML42* 诱饵载体转基因酵母生长状态大致相同(图 2),说明 pGBKT7-*MeCML42* 诱饵载体对酵母细胞无毒性。

将 pGBKT7-*MeCML42* 诱饵质粒与 pGADT7 共转至 AH109 酵母,菌株可在 SD/-Trp-Leu 培养基上正常生长(图 3)。进一步观察发现实验组(pGBKT7-*MeCML42*+pGADT7)和阴性对照(pGBKT7-*lam*+pGADT7-*T*)在四缺培养基中均无生长,只有阳性对照(pGBKT7-*p53* + pGADT7-*T*)生长出酵母菌斑。结果表明,*MeCML42* 蛋白无法独自激活下游报告基因,即无自激活能力,可以进行酵母双杂交实验。

2.3 酵母双杂交筛选 MeCML42 的候选互作蛋白

使用 SC8 木薯的 cDNA 文库筛选 *MeCML42* 候选互作蛋白,最终在 SD/-Trp-Leu-His-Ade+X- α -gal 平板上共生长出 21 个蓝色菌落(图 4)。说明这 21 个蓝色菌落携带的蛋白与 *MeCML42* 可能存在互作关系。经菌落 PCR 获得扩增产物后,进行 Sanger 测序分析,最终获得了 7 个候选互作蛋白基因(表 2)。

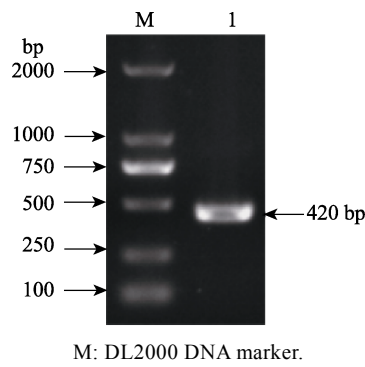


图 1 *MeCML42* 基因 PCR 扩增产物
Fig. 1 PCR amplification of *MeCML42* gene

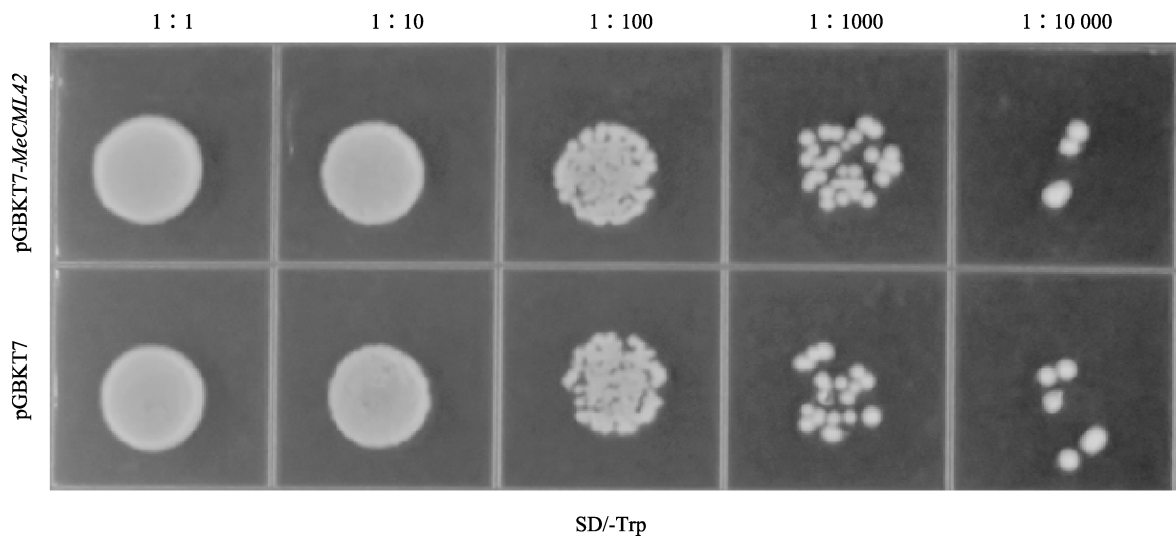


图 2 pGBKT7-*MeCML42* 诱饵蛋白毒性检测
Fig. 2 Toxicity detection of pGBKT7-*MeCML42* decoy protein

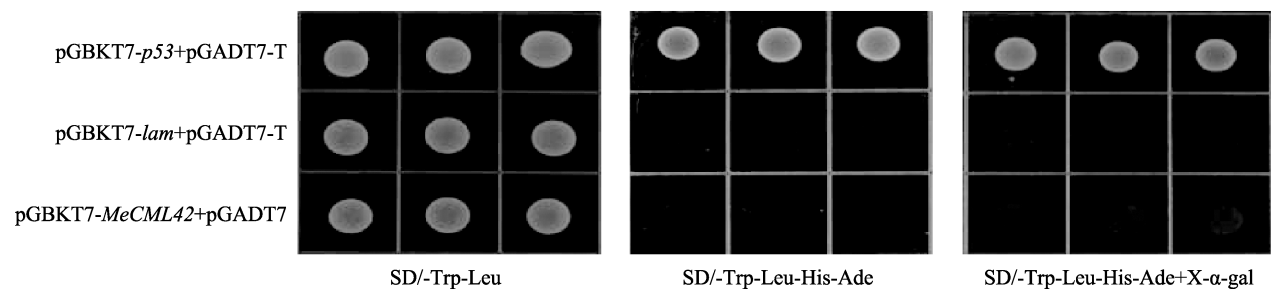


图 3 pGBKT7-*MeCML42* 诱饵蛋白自激活检测
Fig. 3 pGBKT7-*MeCML42* decoy protein self-activation detection

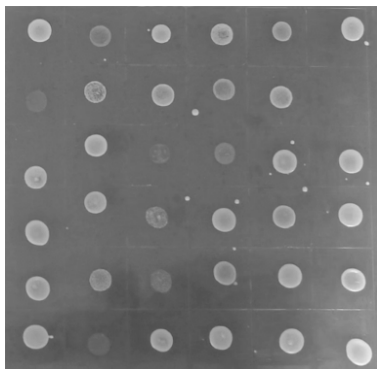


图 4 候选酵母阳性菌斑
Fig. 4 Candidate yeast positive plaque

2.4 *MeCML42* 候选互作蛋白的酵母双杂交回
转验证

克隆候选互作蛋白 *MeCDSP32*、*MeRBCSP*、*MeUPF0415*、*MeIF-3-4* 和 *MeNADP* 的编码区，分别连接至 *pGADT7* 载体，构建回转验证载体：*pGADT7-MeCDSP32* (*AD-CDSP32*)、*pGADT7-MeRBCSP* (*AD-RBCSP*)、*pGADT7-MeUPF0415* (*AD-UPF0415*)、*pGADT7-MeIF-3-4* (*AD-IF-3-4*)、*pGADT7-MeNADP* (*AD-NDAP*)。将 *pGBKT7-MeCML42*(*BD-MeCML42*) 诱饵蛋白分别与 *AD-MeCDSP32*、*AD-MeRBCSP*、*AD-MeUPF0415*、*AD-MeIF-3-4*、*AD-MeNADP* 共转至 *AH109* 感受

态细胞中，涂布于二缺 (*SD/-Trp-Leu*) 培养基平板上，菌斑经 PCR 鉴定后，将共转化成功的酵母菌液接种于含有 *SD/-Trp-Leu*、*SD/-Trp-Leu-His-Ade* 和 *SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal* 等缺陷培养基平板上。结果发现，转 *AD-MeCDSP32* 载体的酵母在 *SD/-Trp-Leu*、*SD/-Trp-Leu-His-Ade*、*SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal* 平板上均长出菌斑，且在 *SD/-Trp-Leu-His-Ade+X-α-gal* 培养基平板上的菌斑变蓝 (图 5)，说明 *MeCDSP32* 与 *MeCML42* 蛋白存在互作关系。

2.5 *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 在干旱胁迫下表达分析

为了探究 *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 在干旱胁迫下的表达水平，使用 300 mmol/L 甘露醇溶液处理 *SC8* 植株，使用 qPCR 技术分析 *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 在干旱胁迫不同时间后的表达量变化。结果表明 (图 6)，*MeCML42* 在干旱胁迫 48 h 时的表达量显著高于 0 h，提高了 17.3 倍。*MeCDSP32* 随着干旱胁迫处理时间越久，表达量越高，干旱胁迫 48 h 的表达量比 0 h 提高了 12.75 倍。*MeCML42* 与 *MeCDSP32* 在干旱胁迫 48 h 的表达量均显著上调，说明 *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 参与了对干旱胁迫的响应。

表 2 候选互作蛋白信息
Tab. 2 Information of candidate interacting proteins

编号 No.	GenBank 登录号 GenBank login number	基因注释 Gene annotation	蛋白名称 Protein name
1	XP_043812633	phospholipase D delta	MePPD
2	XP_021614118	thioredoxin-like protein, chloroplastic	MeCDSP32
3	XP_043809748	ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic-like	MeRBCSP
4	XP_021604623	UPF0415 protein C7orf25 homolog	MeUPF0415
5	XP_021592489	translation initiation factor IF3-4, chloroplastic	MeIF3-4
6	XP_021624572	malate dehydrogenase [NADP], chloroplastic	MeNADP
7	XP_021602529	probable membrane-associated 30 kDa protein, chloroplastic	MePma

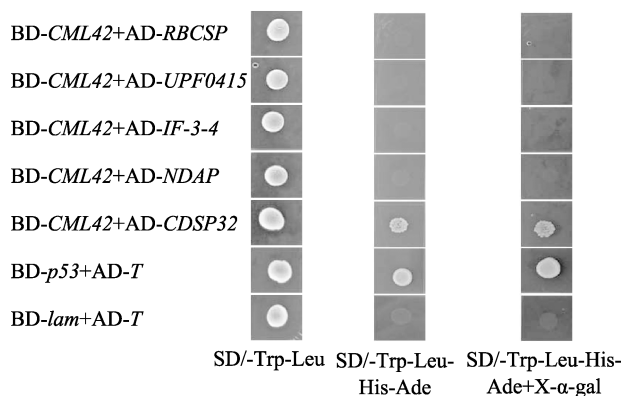
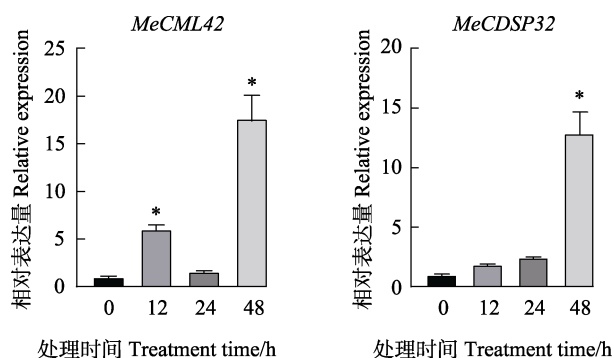


图 5 酵母双杂交点对点验证

Fig. 5 Yeast two-hybrid point-to-point verification



处理时间 Treatment time/h

处理时间 Treatment time/h

表示差异显著 ($P < 0.05$)。 indicate significant difference ($P < 0.05$).图 6 *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 在干旱胁迫下表达分析Fig. 6 Expression analysis of *MeCML42* and *MeCDSP32* under drought stress

3 讨论

类钙调蛋白 CMLs (calmodulin-like proteins) 是一类类似于钙调素 (calmodulin, CaM) 的蛋白, 二者之间具有高度同源性^[15]。CMLs (calmodulin-like proteins) 是存在于细胞内的 Ca^{2+} 感受器, 胞内 Ca^{2+} 水平通量在介导应激反应通路中发挥关键作用^[16]。钙调素或类钙调蛋白是含有不同数量的“EF-hand”基序的酸性小蛋白。这些蛋白质通过其 EF-hand 结构域与 Ca^{2+} 的高亲和力结合来感知和解码细胞钙离子信号, 从而诱导蛋白质的构象变化并暴露其疏水表面^[17]。CMLs 与激酶、磷酸酶、转录因子以及其他信号蛋白发生相互作用, 参与植物的生长发育、应答环境刺激等多种生理过程。当植物经历干旱胁迫时, 细胞内的钙离子水平会发生变化, 触发信号传导过程, 激活钙感受器, 如钙调蛋白和类钙调蛋白 (CMLs)^[18]。木薯 *MeCML42* 的表达受到干旱胁迫诱导, 但是 *MeCML42* 蛋白在木薯中参与的干旱胁迫信号通

路尚未明确。

本研究通过酵母双杂交筛选获得了 *MeCML42* 的互作蛋白硫氧还蛋白 *MeCDSP32*, 该蛋白属于叶绿体干旱胁迫诱导蛋白编码基因 (chloroplast drought-induced stress protein of 32 kD)。CDSP32 由 2 个硫氧还蛋白模块组成, 这 2 个模块在质体防御氧化损伤方面起着关键作用^[19]。植物类硫氧还蛋白通过改变蛋白质的氧化还原状态, 在植物生长发育、非生物胁迫响应过程中具有重要作用。过表达棉花的 *CDSP32* 基因可提高拟南芥的耐旱、耐盐及抗氧化胁迫的能力。过表达烟草 *CDSP32* 基因可增强 SOD、POD 和 CAT 等抗氧化酶的功能, 提高 AsA-GSH 循环和 Trx-Prx 途径去除 H_2O_2 的能力, 提高烟草对镉胁迫的抗性^[20]。在干旱条件下, 马铃薯 *CDSP32* 的 mRNA 和蛋白质含量显著上升, 这有助于保护叶绿体免受干旱引起的氧化损伤^[21]。本研究分析了 *MeCML42* 和 *MeCDSP32* 在干旱胁迫下的表达量变化, 发现在 48 h 时二者的表达量显著上调, 相比 0 h, 分别上调了 17.3 倍和 12.75 倍。因此推测, *MeCML42* 与 *MeCDSP32* 互作, 共同参与了木薯对干旱胁迫的响应。后续将通过 BiFC 双分子荧光互补实验进一步验证它们的相互作用, 通过转基因分析 *MeCML42* 和 *MeCDSP32* 的功能, 明确在木薯响应干旱胁迫的功能。

参考文献

- [1] WANG W Q, FENG B X, XIAO J F, XIA Z Q, ZHOU X C, LI P H. Cassava genome from a wild ancestor to cultivated varieties[J]. Nature Communications, 2014, 5(1): 5110.
- [2] BALAT M, BALAT H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel[J]. Applied Energy, 2009, 86(11): 2273-2282.
- [3] SCHMITZ P M, KAVALLARI A. Crop plants versus energy plants-on the international food crisis[J]. Bioorganic Medicinal Chemistry, 2008, 17(12): 4020-4021.
- [4] TURYAGYENDA F L, KIZITO E B, BAGUMA Y, OSIRU D. Evaluation of Ugandan cassava germplasm for drought tolerance[J]. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 2013, 5(3): 212-226.
- [5] HILLOCKS R J, THRESH J M, BELLOTTI A C. Cassava: biology, production and utilization[M]. Wallingford: CABI Publishing, 2002.
- [6] PATRÍCIA P S S D, SOUSA M B, JORGE E O D, VIANNA M C, SILVA D O C R, LEAL V S,

- CONSTANTINO B J. Genome-wide association study of drought tolerance in cassava[J]. *Euphytica*, 2021, 217: 60.
- [7] TURYAGYENDA L B F, KIZITO E B, FERGUSON M, BAGUMA Y, AGABA M, HARVEY J J W, OSIRU D S O. Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava[J]. *AoB PLANTS*, 2013, 5: plt007.
- [8] 曹绍玉, 王艳芳, 苏婉玉, 张琳, 张应华, 许俊强. 类钙调蛋白在植物生长发育及逆境胁迫中的功能研究进展[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(10): 1517-1526.
- CAO S Y, WANG Y F, SU W Y, ZHANG L, ZHANG Y H, XU J Q. Research progress of calmodulin-like functions in plant growth and development and stress[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(10): 1517-1526. (in Chinese)
- [9] 曾后清, 张夏俊, 张亚仙, 汪尚, 皮二旭, 王慧中, 杜立群. 植物类钙调素生理功能的研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(6): 705-715.
- ZENG H Q, ZHANG X J, ZHANG Y X, WANG S, PI E X, WANG H Z, DU L Q. Research progress of physiological functions of plant calmodulins[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2016, 46(6): 705-715. (in Chinese)
- [10] 苏智宏, 黎圣金, 田长恩, 周玉萍. 植物类钙调素 CML37 的转录激活活性分析[J]. *科技视界*, 2020(26): 155-156.
- SU Z H, LI S J, TIAN C E, ZHOU Y P. Analysis of transcriptional activation activity of plant calmodulin-like CML37[J]. *Science and Technology Vision*, 2020(26): 155-156. (in Chinese)
- [11] SCHOLZ S S, REICHELT M, VADASSERY J, MITHÖFER A. Calmodulin-like protein CML37 is a positive regulator of ABA during drought stress in *Arabidopsis*[J]. *Plant Signaling Behavior*, 2015, 10(6): e1011951.
- [12] HARIN J, JOONG P C, PARK S H, REVECHE R M C F, SHIC K Y, SUH J W, KIM J K. Overexpression of *OsERF48* causes regulation of *OsCML16*, a calmodulin-like protein gene that enhances root growth and drought tolerance[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(10): 1295-1308.
- [13] YANG S, XIONG X, ARIF S, GAO L, ZHAO L, SHAH I H, ZHANG Y A. Calmodulin-like CmCML13 from *Cucumis melo* improved transgenic *Arabidopsis* salt tolerance through reduced shoot's Na^+ , and also improved drought resistance[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 155: 271-283.
- [14] 侯静怡, 甄兴厚, 王亚杰, 张慧敏, 李瑞梅, 刘姣, 郭建春, 耿梦婷, 姚远. 木薯 MeCML42 基因启动子克隆及激素响应分析[J/OL]. *分子植物育种*, 1-14[2024-03-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230526.0955.002.html>.
- HOU J Y, ZHEN X H, WANG Y J, ZHANG H M, LI R M, LIU J, GUO J C, GENG M T, YAO Y. Cloning and hormone response analysis of MeCML42 gene promoter in cassava[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 1-14[2024-03-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230526.0955.002.html>. (in Chinese)
- [15] LI F F, HUANG C J, LI Z H, ZHOU X P. Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1003921.
- [16] 吴春婷, 范甜, 吕天晓, 周玉萍, 田长恩. 钙调素结合蛋白参与调控植物逆境胁迫的研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2022, 30(6): 823-834.
- WU C T, FAN T, LYU T X, ZHOU Y P, TIAN C E. Research progress of calmodulin-binding protein involved in regulation of plant stress[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2022, 30(6): 823-834. (in Chinese)
- [17] ZENG H Q, ZHU Q Q, YUAN P G, YAN Y, YI K K, DU L Q. Calmodulin and calmodulin-like protein-mediated plant responses to biotic stresses[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2023, 46(12): 3680-3703.
- [18] LIMA L L, BALBI B P, MESQUITA R O, SILVA J C F D, COUTINHO F S, CARMO F M S, VITAL C E, MEHTA A, LOUREIRO M E, ELIZABETH P B F. Proteomic and metabolomic analysis of a drought tolerant soybean cultivar from Brazilian Savanna[J]. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 2019. DOI:10.20900/cbpg20190022.
- [19] MOHAMMED E, ADEEL A, HANTAO W, LIANG M, YU S X, WEI H L. Overexpression of CDSP32 (GhTRX134) cotton gene enhances drought, salt, and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plants*, 2020, 9(10): 1388.
- [20] ZHANG H, YAO T, WANG Y, WANG J C, SONG J Q, CUI C C, JI G X, CAO J N, SALMAN M, HONG A, ZHANG H H. Trx CDSP32-overexpressing tobacco plants improves cadmium tolerance by modulating antioxidant mechanism[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 194: 524-532.
- [21] BROIN M, CUINÉ S, PELTIER G, REY P. Involvement of CDSP32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants[J]. *FEBS Letters*, 2000, 467(2/3): 245-248.