

参薯 *DaKNOX16* 基因的特征分析及 互作蛋白的筛选验证

林慧婷^{1#}, 张宇霆¹, 赵奥特¹, 黄小龙³, 吴文婧³, 黄东益², 夏 薇^{1,2*}

(1. 海南大学 热带农林学院(农业农村学院、乡村振兴学院), 海南海口 570228 中国; 2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572022 中国; 3. 海南大学 生命健康学院, 海南海口 570228 中国)

摘 要: KNOX(KNOTTED1-like HOMEODOMAIN)转录因子参与植物器官的形态建成, 调控植物的生长发育。本研究通过参薯不同组织的表达谱、同源比对等方法鉴定参薯块茎特异表达 *DaKNOX16* 基因, 并通过生信分析和酵母双杂交实验, 研究该基因的功能。通过 HMM search 和 BLAST 分析, 共鉴定到 12 个参薯 *KNOX* 基因, 与水稻、拟南芥、马铃薯 *KNOX* 基因构建系统发育树, 发现 *DaKNOX16* 与拟南芥 *AtSTM* 亲缘关系较近。参薯转录谱数据表明 12 个 *KNOX* 基因中, *DaKNOX16* 具有块茎高表达的特征。*DaKNOX16* 包含保守的 KNOX1、KNOX2、Homeobox KN 和 ELK 结构域, 是由 α -螺旋和无规则卷曲组成的一个酸性蛋白。通过酵母双杂交筛选库和酵母点对点互作验证, 发现 *DaKNOX16* 可以与转录因子 D4ZF-HD 互作。本研究推测该基因可能通过与转录因子 D4ZF-HD 互作发挥功能。

关键词: 参薯; *DaKNOX16*; 特征分析; 酵母双杂交

中图分类号: S539; S503.53 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2026)04-0557-09

林慧婷, 张宇霆, 赵奥特, 等. 参薯 *DaKNOX16* 基因的特征分析及互作蛋白的筛选验证[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(4): 557–565. DOI: [10.15886/j.cnki.rdswwb.20250006](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rdswwb.20250006) CSTR: 32425.14.
j.cnki.rdswwb.20250006



参薯(*Dioscorea alata* L.)是热带及亚热带地区重要的粮食作物, 主要特征为叶片厚纸质, 心形或三角形, 薯块为棒状、棍状或块状, 外表皮褐色, 肉质以淡紫色偏多。参薯分布在中国的浙江、湖北、湖南、云南、广西和台湾等地, 多作蔬菜食用。参薯块茎是一种变态茎, 是参薯主要的产品器官, 具有耐储存的特性。块茎是由匍匐茎的顶端膨大产生的, 在诱导条件下, 其纵向生长停止, 在近根尖区域开始径向扩张, 细胞分裂和横向生长, 从而膨大形成块茎。块茎内含有丰富的碳水化合物、蛋白质、薯蓣皂苷等营养成分, 对人体健康具有诸多益处, 具有益脾、改善心血管功能、抗肿瘤等功效。其中, 薯蓣皂苷是一种具有抗氧化特性的天然甾类皂苷, 在制药工业中发挥着关键作用^[1-2]。

KNOX 是一种同源异型盒的蛋白, 可以调控植物根及侧根器官分化、茎的伸长、叶片形态和生殖器官的发育, 并参与激素代谢活动和信号传导途径。KNOX 蛋白一般包含 4 个特征结构域, 即 KNOX1、KNOX2、ELK 和 HD 结构域。KNOX 基因家族根据结构特征、表达模式和系统发育分析分为 3 个亚家族: Class I、Class II 和 Class M^[3]。KNOX I 类基因主要在茎尖分生组织表达, 对茎尖分生组织(shoot apical meristem, SAM)的形成和维持至关重要^[4]。*STM* 基因的功能缺失或者突变会导致无法形成顶端分生组织^[5]。过表达 *PaSTM* 可以促进蝴蝶兰类原球茎和拟南芥新芽的再生, 对器官的形成起着重要作用^[6]。*KNOX* 基因可能参与调控细胞分化, 从而促进芽的形成^[7]。马铃薯 *POTH1* 过表达使得株系叶片变小、茎节间缩

© CC BY 4.0 收稿日期: 2025-01-04

修回日期: 2025-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160470)

*第一作者: 林慧婷(1999—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 1624862140@qq.com

*通信作者: 夏薇(1983—), 女, 教授。研究方向: 薯类作物分子生物学、椰子遗传育种。

E-mail: saizjxiawei@hainanu.edu.cn

短导致植株矮化和促进块茎的形成^[8]。在马铃薯匍匐茎近根尖区, *StBEL5/POTH1* 异源二聚体通过结合 *GA20ox1* 的启动子区直接抑制 *GA20ox1* 的转录, 导致匍匐茎中 GA 水平下降^[9]。KNOX II 类基因在植物中的表达更广泛, 主要在植株高度、叶片形态、器官发育等方面发挥着重要作用。在苜蓿中, KNOX (*MtKNAT3/4/5*) TFs 通过下调 *MtEFD/MtRR4* 的表达, 参与调控豆科植物的根瘤器官边界和形状^[10]。在水稻中, KNOX II 类基因 *HOS59* 过表达导致籽粒变小、叶片直立、株高降低^[11]。*OsKNAT7* 与 *OsGRF4*、*NAC31* 相互作用, 通过控制细胞的扩增和细胞壁增厚, 调节籽粒大小^[12]。而 Class M 亚家族仅含有 KNOX1 和 KNOX2 两个结构域。在拟南芥中, *KNATM* 为 Class M 亚家族的一个独特成员, 在器官原基近端和成熟器官的边界表达, 过表达 *AtKNATM* 植株的叶柄更长、叶片呈锯齿形, 以及出现延迟开花的现象^[13]。

基于前人研究发现 KNOX 基因在茎尖分生组织维持中发挥重要作用^[4-6], 且也有研究表明, 马铃薯 KNOX I 类基因 *POTH1* 过表达可促进块茎的形成^[8,9,14-15]。但目前 KNOX 基因在参薯中的具体调控机制仍有待阐明。而参薯块茎是由其腋芽经过生长与分化过程而形成的。所以本研究团队推测 KNOX 基因可能参与参薯腋芽增殖分化, 调控参薯块茎形成, 由此对该基因家族的成员开展研究。本研究团队通过 HMM search 和 BLAST 分析, 对参薯 KNOX 基因家族展开研究, 共鉴定到 12 个参薯 KNOX 基因; 进一步分析发现该家族成员 *DaKNOX16* 基因在参薯块茎特异表达。为此, 还分析了参薯 *DaKNOX16* 基因的理化性质、蛋白结构、启动子顺式元件, 并利用酵母双杂交筛选出 *DaKNOX16* 的互作蛋白。这些研究结果为深入解析 KNOX 基因家族在参薯结薯中的功能和作用机制提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料 pGBKT7 质粒、pGADT7 质粒和参薯 cDNA 文库质粒以及参薯 Da70 组培苗由本实验室收集保存。AH109 感受态、DH5 α 大肠杆菌感受态购自上海唯地生物科技有限公司。反转录试剂盒、产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒等购自南京诺唯赞生物公司。引物由北京擎科生物科

技有限公司合成。

1.2 DaKNOX16 特征分析 从 NCBI 下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、参薯的 KNOX 蛋白序列进行对比, 构建系统进化树。根据 NCBI 公布的参薯叶片、茎、块茎、零余子、花组织的转录谱数据, 利用 TBtools 软件进行可视化, 分析 *DaKNOX* 在不同组织中的表达特征。

1.3 DaKNOX16 生物信息学分析 利用 ExPASy 预测参薯 *DaKNOX16* 蛋白编码氨基酸的理化性质。通过 SOPMA 预测参薯 *DaKNOX16* 蛋白预测蛋白质二级结构。通过 SWISS-MODEL 预测蛋白质三级结构。使用 PlantCARE 数据库对参薯 *DaKNOX16* 基因启动子 motif 进行预测和分析, 利用 TBtools 软件进行可视化。利用 TMHMM v2.0 预测参薯 *DaKNOX16* 蛋白的跨膜结构。利用 SignalP v6.0 预测参薯 *DaKNOX16* 蛋白的信号肽。利用 CD-Search 预测参薯 *DaKNOX16* 蛋白的保守结构域, 利用 MEME 软件分析 KNOX 蛋白的保守基序。通过 AlphFold v3 在线网站预测二者的三维结构, 使用 Pymol 检查预测的蛋白结构, 选取预测结构排名最佳的构象作为 *DaKNOX16*、D4ZF-HD 的对接结构文件, 用于对接。对接结构采用 Pymol 软件进行对接结果的 3D 可视化。

1.4 载体的构建 利用 Trizol 法提取参薯 Da70 总 RNA, 使用反转录试剂盒反转录为 cDNA。以参薯 Da70 cDNA 为模板, 使用引物(表 1)扩增目的片段。根据相应酶切位点对质粒载体进行酶切, 通过同源重组构建载体。

1.5 酵母双杂交筛选 DaKNOX16 互作蛋白及验证 自激活检测: 将 pGBKT7-*DaKNOX16* 诱饵载体转化到酵母 AH109 感受态中, 点板于 SD/-Trp、10 个不同浓度 3-AT 的 SD/-Trp-His 缺陷平板上。

酵母双杂交筛选 *DaKNOX16* 互作蛋白: 将 pGBKT7-*DaKNOX16* 诱饵载体和参薯文库质粒共同转化到酵母 AH109 感受态中, 涂布于 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-His-Leu 缺陷平板上, 30℃ 培养 2~3 d 后, 挑取单克隆进行菌落 PCR, 经 1% 凝胶电泳检测选取条带在 750~1500 bp 的 PCR 产物送测。

互作验证方法: 将 pGADT7-D4ZF-HD 与 pGBKT7-*DaKNOX16* 共同转化到酵母 AH109 感受态中, 涂布于 SD/-Trp-Leu 缺陷平板上, 培养

表 1 实验所用的引物

Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer Name	序列(5'—3') Sequence (5'—3')
pGBKT7-DaKNOX16- <i>Eco</i> R I-F	CATATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGAAGCAAGGAATGGG
pGBKT7-DaKNOX16- <i>Bam</i> H I-R	GCCGCTGCAGGTCGACGGATCCAAGAAGTGTCTGGACCGCA
pGADT7-D4ZF-HD- <i>Eco</i> R I-F	ATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGTCTGAAGGAAGTAGGGTAATG
pGADT7-D4ZF-HD- <i>Bam</i> H I-R	CTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCGCGACCCCTTTGCGTCC
pGADT7-F	TAATACGACTCACTATAGGGC
pGADT7-R	AGATGGTGCACGATGCACAG
pGBKT7-F	TAATACGACTCACTATAGGGC
pGBKT7-R	GTGTGGTCAATAAGAGCGA

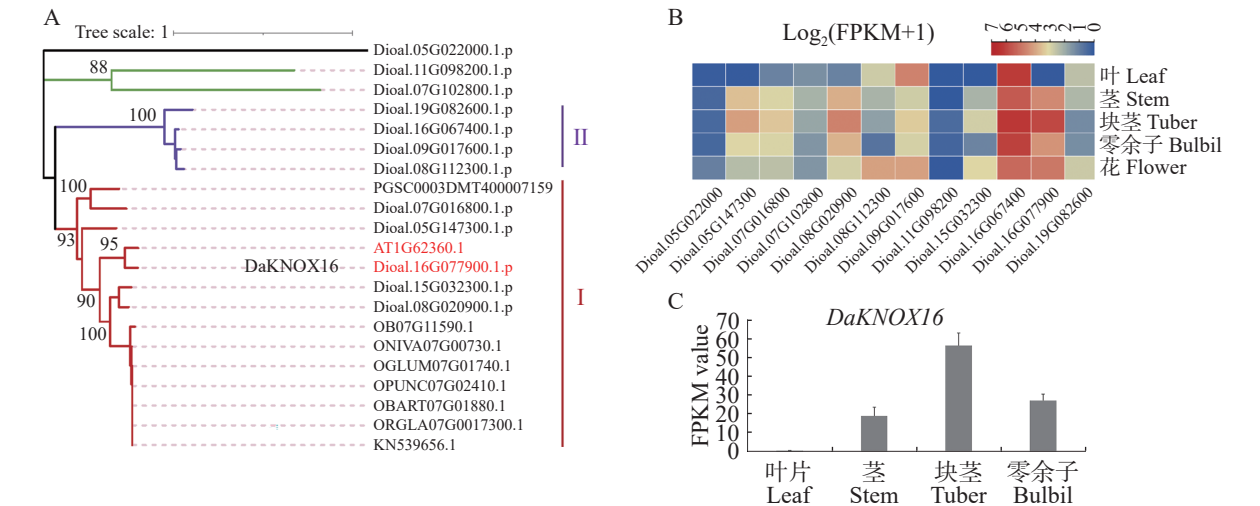
2~3 d 后挑取单克隆于 SD/-Trp-Leu 液体培养基中, OD₆₀₀ 调至 0.2, 用无菌水稀释 10 倍、100 倍、1000 倍, 分别点板于 SD/-Trp-Leu、SD/-Trp-Leu-His-Ade 缺陷平板上, 培养 2~3 d。

2 结果与分析

2.1 参薯块茎特异表达 KNOX 基因挖掘与特征分析

通过 HMM search 和 BLAST 分析, 参薯基因组中一共有 12 个 KNOX 基因(图 1)。与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)的 KNOX 蛋白进行多序列对比, 发现参薯 *DaKNOX16* 与拟南芥 AtSTM 亲缘关系较近, 与马铃薯、水稻的 KNOX 基因均聚类于第 I 亚群中, *Dioal.19G082600*、*Dioal.16G067400*、*Dioal.09G017600*、*Dioal.08G112300*

聚类于第 II 亚群中, 而 *Dioal.05G022000*、*Dioal.11G098200*、*Dioal.07G102800* 只含有 KNOX2 保守结构域, 未聚类到两个亚群中(图 1-A)。根据 NCBI 公布的参薯叶片、茎、块茎、零余子、花组织的转录谱数据, 将参薯的 KNOX 基因的 FPKM 值绘制热图(图 1-B), 分析发现 *Dioal.05G022000*、*Dioal.05G147300*、*Dioal.11G098200*、*Dioal.15G032300*、*Dioal.16G077900* 在叶片中不表达, *Dioal.05G022000*、*Dioal.05G147300*、*Dioal.07G016800*、*Dioal.07G102800*、*Dioal.08G020900*、*Dioal.08G112300*、*Dioal.09G017600*、*Dioal.11G098200*、*Dioal.15G032300*、*Dioal.19G082600* 在各组织表达水平较低, *Dioal.16G067400* 在各组织表达水平较高, 而 *Dioal.16G077900*(*DaKNOX16*)在块茎和叶片表达水平存在差异, 因此推测其可能与块茎形成有



A. 参薯与部分物种 KNOX 基因的系统进化树分析; B. 参薯 KNOX 基因在叶片、茎、块茎、零余子、花组织的表达热图; C. *DaKNOX16* 在不同组织的相对表达量。

A. Phylogenetic tree analysis of KNOX gene between *Dioscorea alata* and some other species; B. Expression heat map of the KNOX gene in the leaves, stems, tubers, seedlings and flower tissues of *D. alata*; C. The relative expression level of *DaKNOX16* in different tissues.

图 1 块茎特异表达 *DaKNOX16* 特征分析

Fig. 1 Analysis of the characteristics of *DaKNOX16* specific to tubers

关。进一步分析 *DaKNOX16* 的表达特征,发现该基因在茎、块茎中表达,而在叶片中不表达,同时发现其在块茎中的表达量显著高于其他组织(图 1-C)。

提取 *DaKNOX16* 基因上游 2 kb 的启动子序列,进行启动子的顺式作用元件预测,结果发现,

DaKNOX16 基因启动子序列存在保守的顺式作用元件 TATA-box、CAAT-box, 激素响应元件: 脱落酸响应 ABRE、水杨酸响应 TCA-element、赤霉素响应元件 P-box, 此外还包含与分生组织表达相关的顺式调控元件 CAT-box 等(图 2)。

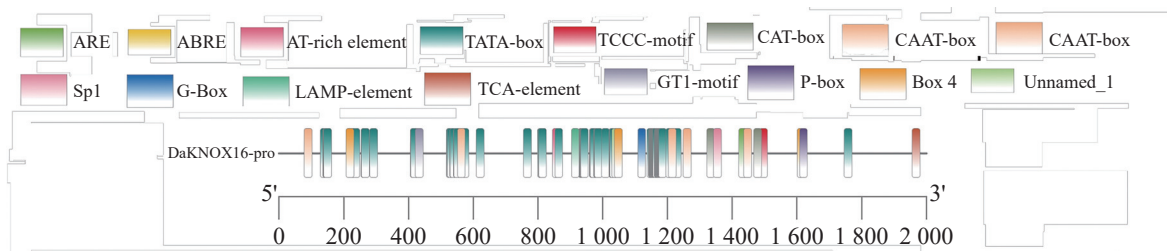


图 2 *DaKNOX16* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 2 Analysis of *cis*-acting elements of *DaKNOX16* gene promoter

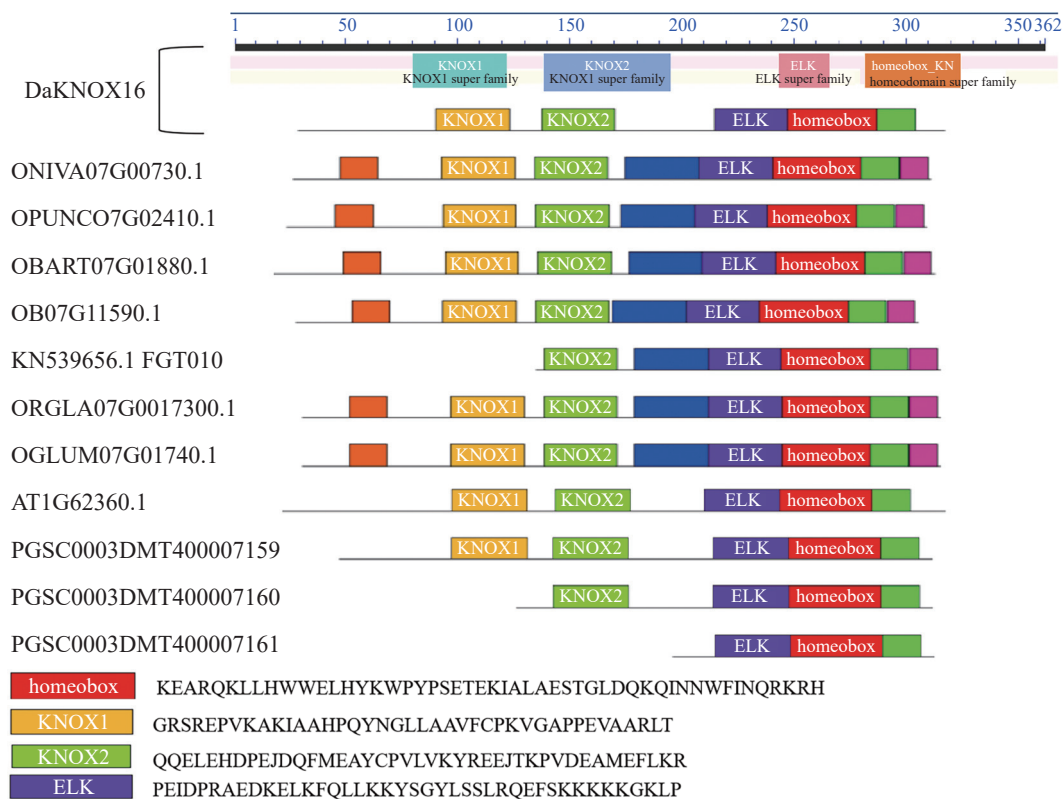


图 3 *DaKNOX16* 蛋白序列结构特征分析

Fig. 3 Analysis of the sequence structure characteristics of *DaKNOX16* protein

2.2 参薯 *DaKNOX16* 蛋白结构分析

2.2.1 *DaKNOX16* 蛋白序列结构特征分析 利用 MEME 软件分析参薯、水稻、马铃薯和拟南芥 KNOX 蛋白的保守基序,发现大部分成员拥有共同的 KNOX1、KNOX2、Homeobox KN 和 ELK 基序,除了 1 个水稻 *KNOX* 基因成员、1 个马铃薯基因成员缺失 *KNOX1*、*KNOX2*, 1 个马铃薯基因成员缺失 *KNOX1*,分析发现 *DaKNOX16* 含有 KNOX1、

KNOX2、Homeobox KN 和 ELK 四个保守结构域,属于 KNOX 基因家族成员(图 3)。

2.2.2 *DaKNOX16* 蛋白结构生物信息学分析

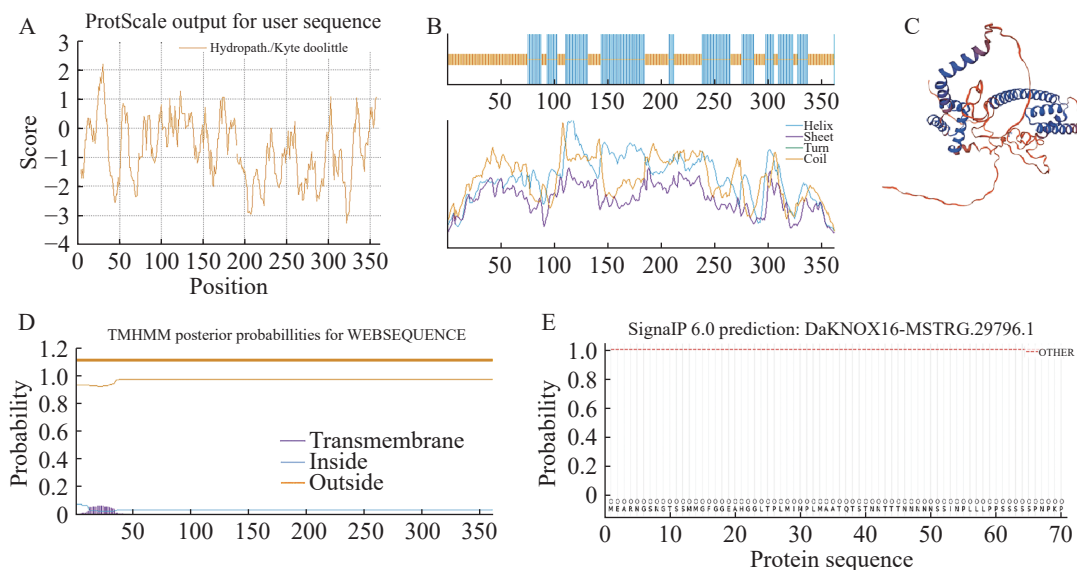
通过生物信息学分析,发现 *DaKNOX16* 蛋白为亲水性酸性蛋白,其等电点为 6.42,氨基酸数为 362 个 aa,分子质量为 40 187.23 Da,平均亲疏水性系数为 -0.729(图 4-A),不稳定系数为 44.99,归类为不稳定蛋白,该蛋白含量排名前三的为 Leu(L)、

Pro(P)、Ser(S), 占比分别为 10.2%、9.7%、9.9%。*DaKNOX16* 蛋白二级结构中, α -螺旋占比 44.75%、无规则卷曲占比 55.25%(图 4-B), 三级结构预测结果与二级结构一致(图 4-C)。*DaKNOX16* 不存在跨膜结构(图 4-D), 并且没有信号肽(图 4-E)。

2.3 酵母双杂交筛选 *DaKNOX16* 互作蛋白 将 pGBKT7-*DaKNOX16* 诱饵载体与阴性对照 pGBKT7 载体分别转入 AH109 感受态中, 通过酵母自激活检测, 结果发现 pGBKT7-*DaKNOX16* 在 3-AT 浓度为 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SD/-Trp-His 缺陷培养基上无法生长, 这表明该基因没有转录自激活活性(图 5-A), 因此可以在 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT 的基础上进行酵母双杂交筛选。通过酵母双杂交方法进行

筛选 *DaKNOX16* 的互作蛋白, 共筛选出 89 个阳性克隆, 测序结果得到 16 个候选互作蛋白(图 5-B, 表 2)。基因比对注释, 发现候选互作蛋白中, 有 1 个参与信号转导通路, 5 个参与调控生长发育, 此外还有 6 个核糖体蛋白、1 个转运蛋白、3 个蛋白质降解(表 2)。筛选到的候选基因中有 1 个转录因子 D4ZF-HD(*Dioal.04G020800.1*)。

2.4 *DaKNOX16* 与 D4ZF-HD 互作验证 为了验证 *DaKNOX16* 与转录因子 D4ZF-HD 互作关系。1) 对 *DaKNOX16*、D4ZF-HD 之间的相互作用模式进行预测, 二者在结合的相互作用界面附近的氨基酸残基之间具有氢键相互作用, 且发现两个蛋白通过 LYS(赖氨酸)和 ASN(天冬氨酸)在

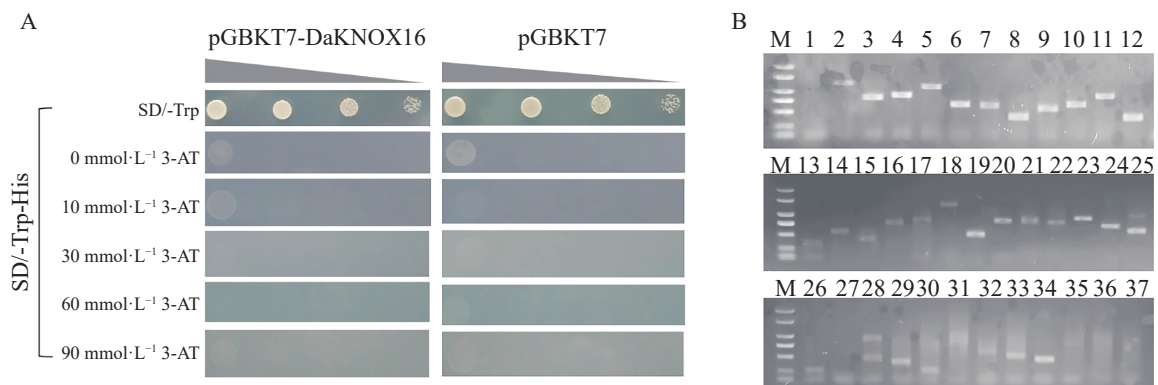


A. 亲疏水性分析; B. 二级结构预测分析; C. 三级结构预测分析; D. 跨膜结构预测分析; E. 信号肽结构预测分析。

A. Hydrophilic analysis; B. Secondary structure prediction analysis; C. Tertiary structure prediction analysis; D. Transmembrane structure prediction analysis; E. Signal peptide structure prediction analysis.

图 4 *DaKNOX16* 蛋白序列结构特征分析

Fig. 4 Analysis of the structural features of the *DaKNOX16* protein sequence



A. 诱饵载体自激活检测; B. M, DL2000 DNA Marker (1~37, 部分单克隆的 1% 凝胶电泳图)。

A. Self-activation detection of bait carrier; B. M, DL2000 DNA Marker (1~37, Partial monoclonal 1% gel electrophoresis patterns).

图 5 酵母双杂交筛选 *DaKNOX16* 互作蛋白

Fig. 5 Yeast two-hybrid interaction verification

表 2 DaKNOX16 的候选互作蛋白的功能类型

Tab. 2 Functional types of candidates interacting proteins of DaKNOX16

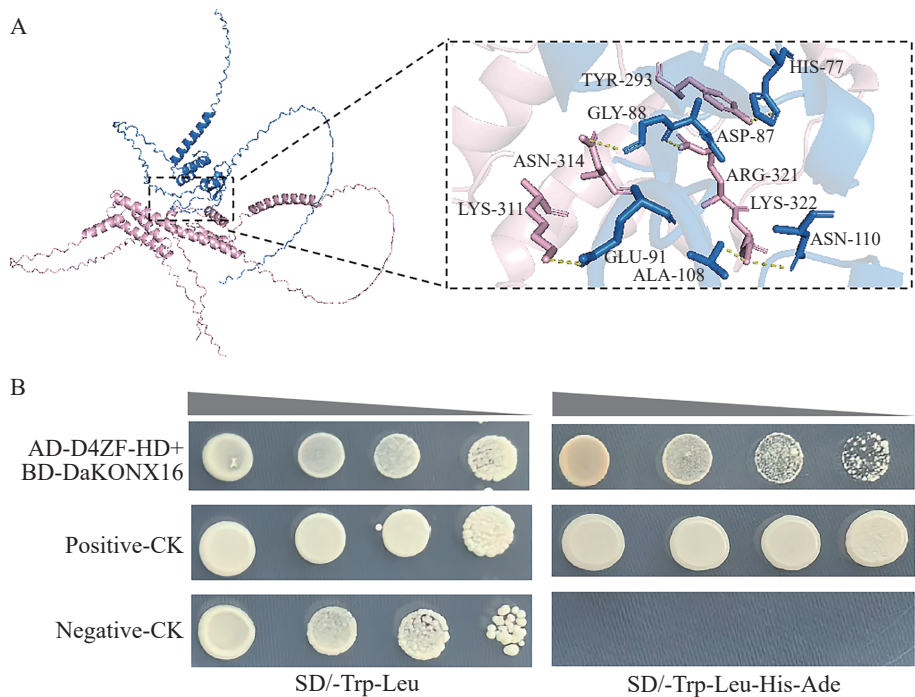
生物学过程 Biological process	基因名称 Gene	总基因数 Total gene
信号传导 Signal transduction	FAR1-related sequence 11	1
生长点发育调控 Regulation of growth point development	ZF-HD、Late embryogenesis abundant protein, group2、Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein、Transcription regulatory protein SNF2, putative、CLIP-associated protein	5
核糖体蛋白 Ribosomal protein	Ribosomal protein L21、Ribosomal protein L5、Ribosomal protein S19 family protein、Ribosomal protein S13A、Ribosomal protein S1、Ribosomal protein S12B	6
蛋白降解 Protein degradation	Ubiquitin-specific protease 8	1
转运蛋白 Transporter protein	ABC transporter family protein、Nodulin MtN21/EamA-like transporter family protein、RING/U-box superfamily protein	3

相互作用的界面间发生多结合位点(图 6-A)。2) 将 pGADT7-D4ZF-HD 与 pGBKT7-DaKNOX16 诱饵载体共同转化到 AH109 感受态中。3) 阳性对照 (Positive-CK) 为 pGADT7-T 和 pGBKT7-p53, 阴性对照 (Negative-CK) 为 pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam, 通过酵母双杂交点对点验证发现 pGBKT7-DaKNOX16+pGADT7-D4ZF-HD 在 3-AT 浓度为 0 mmol·L⁻¹ 的 SD/-Trp-His-Leu-Ade 缺陷培养基上生长。这个结果表明, DaKNOX16 与 D4ZF-HD 存

在互作关系(图 6-B)。

3 讨论

KNOX 转录因子参与调节植物激素和植物器官的形态建成。马铃薯 KNOX I 类基因 *POTH1* 的 mRNA 被证明具有韧皮部移动性, 该基因过表达促进块茎形成^[8,14]。*KNOX* 与 *StBEL5* 基因相互作用通过靶向控制参与激素合成的基因来调节块茎的形成^[9,15]。目前已有多个物种的 KNOX 基因



A. DaKNOX16 与 D4ZF-HD 的结合模式图; B. pGBKT7-DaKNOX16 与 pGADT7-D4ZF-HD 酵母双杂交互作验证。
A. Diagram of the binding mode between DaKNOX16 and D4ZF-HD; B. Yeast two-hybrid interaction verification of pGBKT7-DaKNOX16 and pGADT7-D4ZF-HD.

图 6 DaKNOX16 与 D4ZF-HD 互作验证

Fig. 6 Verification of interaction between DaKNOX16 and D4ZF-HD

注: DaKNOX16 显示为粉色的 cartoon、sticks 模式; D4ZF-HD 显示为蓝色的 cartoon、sticks 模式, 氢键显示为黄色虚线。

Note: DaKNOX16 is shown as a pink cartoon, sticks model; D4ZF-HD is shown as a blue cartoon, sticks model, and hydrogen bonds are indicated by yellow dotted lines.

家族被鉴定和分析^[3,16], 而 *KNOX* 基因在参薯中的功能研究十分欠缺。本研究鉴定到一个块茎特异表达的 *DaKNOX16* 基因, 该基因具有典型的 *KNOX* 基因保守结构域, 且是一个酸性蛋白, 不稳定系数为 44.99, 归类为不稳定蛋白, 与前人在甘薯中的研究结果一致^[3]。通过转录谱数据分析 *KNOX* 基因在不同组织的表达特征, 结果显示 *DaKNOX16* 在茎、块茎中表达, 且在块茎表达水平显著高于其他组织的表达水平, 故推测 *DaKNOX16* 基因可能参与调控参薯块茎的形态建成。多序列比对分析表明, *DaKNOX16* 基因与拟南芥 *AtSTM* 亲缘关系较近。在拟南芥中, *AtSTM* 是茎分生组织关键调控因子, 强 *STM* 突变体完全缺乏 SAM 及无法形成茎器官^[17-19]。*DaKNOX16* 基因启动子含有与分生组织表达相关的顺式调控元件 CAT-box, 以及激素响应元件(脱落酸响应 ABRE、水杨酸响应 TCA-element、赤霉素响应元件 P-box 等)。这些结果表明 *DaKNOX16* 基因可能在激素响应、非生物胁迫和分生组织分化能力的维持等方面起着重要的作用。

本研究利用酵母双杂交筛选到 16 个与 *DaKNOX16* 互作候选蛋白, 通过功能注释和文献参考, 最终确定候选互作蛋白 D4ZF-HD。D4ZF-HD 属于 ZF-HD(Zinc finger-homeodomain)基因家族成员。作为一种植物特异性转录因子, 锌指同源结构域(ZF-HD)不仅是磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)编码基因的潜在调节因子, 还参与激素信号传导、根毛伸长、叶片细胞大小调控及衰老等生理过程^[20-21]。HB21 是 ZF-HD 基因家族转录因子, 参与腋芽休眠的建立, 是 AP2 的直接靶点; HB 基因促进 ABA 的生物合成和积累, 从而调控拟南芥花序停滞^[22]。ZF-HD 转录因子在 miR157 介导下调拟南芥的分枝和花序结构形成^[23]。研究表明, 木薯受到病原菌的感染时, *ZF-HD* 基因的表达上调, 揭示了其可能提高作物的抗病性^[24]。在水稻中, *OsZHD1* 基因过表达可诱导水稻叶片轴向卷曲和下垂^[25]。通过筛选 *DaKNOX16* 的互作蛋白, 本研究团队同样筛选出上述蛋白, 且通过酵母点对点实验表明, *DaKNOX16* 与 D4ZF-HD 存在互作关系, 说明 D4ZF-HD 在参薯中可能也参与参薯调控激素信号传导、应对逆境胁迫响应等生物过程, 从而直接或者间接调控参薯块茎形成和生长

过程。

综上所述, 本研究从参薯中克隆了 *KNOX* 家族基因成员 *DaKNOX16*, 分析了该基因的理化性质和表达模式, 利用酵母双杂交技术筛选出 1 个与 *DaKNOX16* 互作蛋白 D4ZF-HD, 对深入解析 *KNOX* 基因家族在参薯块茎形成过程中的调控功能具有重要理论指导价值。

参考文献:

- [1] Bredeson J V, Lyons J B, Oniyinde I O, et al. Chromosome evolution and the genetic basis of agronomically important traits in greater yam[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2001. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29114-w>
- [2] Li J, Liang Q, Li C F, et al. Comparative transcriptome analysis identifies putative genes involved in dioscin biosynthesis in *Dioscorea zingiberensis*[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 454. <https://doi.org/10.3390/molecules23020454>
- [3] Jia L C, Yang Z T, Shang L L, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *KNOX* family and its diverse roles in response to growth and abiotic tolerance in sweet potato and its two diploid relatives[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 572. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10470-4>
- [4] Hay A, Tsiantis M. *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity[J]. *Development*, 2010, 137(19): 3153-3165. <https://doi.org/10.1242/dev.030049>
- [5] Cao X W, Du Q W, Guo Y H, et al. Condensation of *STM* is critical for shoot meristem maintenance and salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(9): 1445-1459. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.09.005>
- [6] Fang S C, Chen J C, Chang P Y, et al. Co-option of the *SHOOT MERISTEMLESS* network regulates protocorm-like body development in *Phalaenopsis aphrodite*[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(1): 127-145. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac100>
- [7] Yang Q Q, Cong T C, Yao Y C, et al. *KNOX* genes were involved in regulating axillary bud formation of *Chrysanthemum × morifolium*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(8): 7081. <https://doi.org/10.3390/ijms24087081>
- [8] Rosin F M, Hart J K, Horner H T, et al. Overexpression of a *Knotted-like homeobox* gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(1): 106-117. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015560>
- [9] Chen H, Banerjee A K, Hannapel D J. The tandem complex of *BEL* and *KNOX* partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1*[J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(2): 276-284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2004.02048.x>

- [10] Di Giacomo E, Laffont C, Sciarra F, et al. KNAT3/4/5-like class 2 KNOX transcription factors are involved in *Medicago truncatula* symbiotic nodule organ development[J]. *New Phytologist*, 2017, 213(2): 822–837. <https://doi.org/10.1111/nph.14146>
- [11] Sheng M H, Ma X L, Wang J Y, et al. KNOX II transcription factor HOS59 functions in regulating rice grain size[J]. *The Plant Journal*, 2022, 110(3): 863–880. <https://doi.org/10.1111/tpj.15709>
- [12] Wang S G, Yang H L, Mei J S, et al. Rice homeobox protein KNAT7 integrates the pathways regulating cell expansion and wall stiffness[J]. *Plant Physiology*, 2019, 181(2): 669–682. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00639>
- [13] Magnani E, Hake S. *KNOX* lost the *OX*: the *Arabidopsis* *KNATM* gene defines a novel class of KNOX transcriptional regulators missing the homeodomain[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(4): 875–887. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058495>
- [14] Mahajan A, Bhogale S, Kang I H, et al. The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79(6): 595–608. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9931-0>
- [15] Lin T, Sharma P, Gonzalez D H, et al. The impact of the long-distance transport of a *BEL1*-like messenger RNA on development[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(2): 760–772. <https://doi.org/10.1104/pp.112.209429>
- [16] 叶明辉, 赵朋, 牛洋, 等. 马铃薯同源异形框基因家族的鉴定和表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(2): 224–239. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-7968.2021.02.003>
- [17] Long J A, Moan E I, Medford J I, et al. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 1996, 379(6560): 66–69. <https://doi.org/10.1038/379066a0>
- [18] LONG J, BARTON M K. Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*[J]. *Developmental Biology*, 2000, 218(2): 341–353. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9572>
- [19] Nidhi S, Preciado J, Tie L. Knox homologs shoot meristemless (STM) and KNAT6 are epistatic to CLAVATA3 (CLV3) during shoot meristem development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(9): 6291–6302. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06622-4>
- [20] Zhao H, Wang Y T, Zhao S, et al. HOMEBOX PROTEIN 24 mediates the conversion of indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid to promote root hair elongation[J]. *New Phytologist*, 2021, 232(5): 2057–2070. <https://doi.org/10.1111/nph.17719>
- [21] Ferela A, Debernardi J M, Rosatti S, et al. Interplay among ZF-HD and GRF transcription factors during *Arabidopsis* leaf development[J]. *Plant Physiology*, 2023, 191(3): 1789–1802. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad009>
- [22] Sánchez-gerschon V, Martínez-fernández I, González-bermúdez M R, et al. Transcription factors HB21/40/53 trigger inflorescence arrest through abscisic acid accumulation at the end of flowering[J]. *Plant Physiology*, 2024, 195(4): 2743–2756. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac234>
- [23] Lee Y K, Kumari S, Olson A, et al. Role of a ZF-HD transcription factor in miR157-mediated feed-forward regulatory module that determines plant architecture in *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8665. <https://doi.org/10.3390/ijms23158665>
- [24] Li J Y, Li M C, Shen T T, et al. Molecular characterization of cassava zinc finger-homeodomain (ZF-HD) transcription factors reveals their role in disease resistance[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 279(Pt1): 134846. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134846>
- [25] Xu Y, Wang Y, Long Q, et al. Overexpression of *Os-ZHD1*, a zinc finger homeodomain class homeobox transcription factor, induces abaxially curled and drooping leaf in rice[J]. *Planta*, 2014, 239(4): 803–816. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2009-7>

Characterization of *DaKNOX16* gene and screening and verification of its interacting proteins in *Dioscorea alata*

Lin Huiting^{1#}, Zhang Yuting¹, Zhao Aote¹, Huang Xiaolong³,
Wu Wenqiang³, Huang Dongyi², Xia Wei^{1,2*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry (College of Agriculture and Rural Areas, College of Rural Revitalization), Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572022, China; 3. School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: KNOX (KNOTTED1-like HOMEODOMAIN) transcription factors are involved in the morphogenesis of plant organs and regulate plant growth and development. The specific expression of *DaKNOX16* gene in the tubers of *Dioscorea alata* was identified by the expression profiles of different tissues of *Dioscorea* and homologous alignment, and the function of the gene was analyzed by bioinformatics analysis and yeast two-hybrid experiments. A total of 12 *Dioscorea KNOX* genes were identified by HMMsearch and BLAST analysis. The phylogenetic tree was constructed with *KNOX* genes of rice, Arabidopsis and potato, and it was found that *DaKNOX16* was closely related to Arabidopsis AtSTM. Transcriptome data showed that *DaKNOX16* had the characteristics of high expression in tubers among the 12 *KNOX* genes. *DaKNOX16* contains conserved KNOX1, KNOX2, Homeobox KN and ELK domains and is an acidic protein composed of α -helix and random coil. Through yeast two-hybrid screening and yeast point-to-point interaction verification, it was found that *DaKNOX16* could interact with the transcription factor D4ZF-HD. It is hence speculated that this gene may exert its function through interaction with the transcription factor D4ZF-HD, which provides an important theoretical basis for further understanding of the regulation of tuber development by *KNOX* genes.

Keywords: *Dioscorea alata*; *DaKNOX16*; characteristic analysis; yeast two-hybrid

(责任编辑: 叶 静)