

· 热带作物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230035



主持人: 徐 冉

## 木薯 *MePPD3* 基因的克隆及功能分析

贾素行, 朱寿松, 符仁稳, 李春霞, 陈银华

(海南大学热带作物学院, 海口 570228)

**摘要:** 为了探究 PsbP 蛋白是否在木薯 (*Manihot esculenta*) 抗病中发挥功能, 以木薯‘华南 8 号’总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增 *MePPD3* 基因 (Phytozome 数据库编号: Manes.05G127800)。序列分析结果显示, *MePPD3* 基因全长 807 bp, 编码 268 个氨基酸, 在氨基酸序列第 106 ~ 266 位存在 PsbP 结构域, 推测其为 psbP 蛋白。蛋白多序列比对、进化树和保守结构域分析表明, 木薯 *MePPD3* 蛋白与巴西橡胶 (*Hevea brasiliensis*) 中 PsbP 家族蛋白的同源性最高, 同源率高达 99%。亚细胞定位显示, *MePPD3* 蛋白定位在叶绿体。qRT-PCR 结果显示, *MePPD3* 基因在木薯不同组织中的表达量具有较大差异, 在叶片特别是成熟叶片中表达量最高; 此外, 该基因表达量受到菜豆黄单胞菌木薯萎蔫致病变种 (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, *Xpm*) 诱导后显著上升。利用 VIGS 技术沉默 *MePPD3* 基因, qRT-PCR 结果表明, *MePPD3* 基因沉默成功, 其表达量显著下降; *Xpm* 侵染植株后, 沉默植株 pCsCMV-*MePPD3* 叶片的病斑面积显著小于野生型植株, 故推测 *MePPD3* 可能负调控木薯对细菌性枯萎病的抗病性。

**关键词:** 木薯; *MePPD3*; 生物信息学分析; *Xpm* CHN11

**中图分类号:** S533 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 7054(2024)01 - 0010 - 09

贾素行, 朱寿松, 符仁稳, 等. 木薯 *MePPD3* 基因的克隆及功能分析 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(1): 10-18.

doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230035

木薯 (*Manihot esculenta*) 是热带地区主要的粮食作物和经济作物, 有着“地下粮仓”、“淀粉之王”的称号<sup>[1-2]</sup>, 木薯在我国主要用于各种工业原料的生产<sup>[3-5]</sup>, 其市场前景十分巨大。菜豆黄单胞菌木薯萎蔫致病变种 (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, *Xpm*) 早已列入我国有害生物名录, 它是木薯细菌性枯萎病的病原菌, 其能够使木薯叶片褪绿萎蔫甚至全株死亡, 可导致木薯减产 20% ~ 90%<sup>[6-7]</sup>。1991 年于类囊体腔中首次发现 PsbP 蛋白, 后经过不断研究发现 PsbP 蛋白广泛存在于藻类、蓝细菌和高等植物中<sup>[8-9]</sup>。目前, 已发现的 PsbP 蛋白分为 3 大类, 分别是 PsbP 蛋白、类 PsbP 蛋白 PPL (PsbP-like protein) 和 PsbP 结构域蛋白 PPD (PsbP-domain protein)<sup>[10-12]</sup>。PsbP 蛋白是叶绿体光系统

II (photosystem II complex, PS II) 的重要组成部分, 它在维持钙离子、氯离子浓度方面发挥重要作用; 此外, 敲除 *PsbP* 基因后, PS II 的功能将受到一定的影响<sup>[13-15]</sup>。科学家在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发现, PPL1 能参与 PS II 复合体的组装, 其和植物适合光照强度变化有关<sup>[16-17]</sup>; 拟南芥的 PPL2 缺失突变体中, 叶绿体 NADH 脱氢酶的积累量和活性降低<sup>[17]</sup>。Roose 等<sup>[8]</sup> 于 2007 年从拟南芥基因组中鉴定出 7 个 PPD 蛋白, 它们分别是 PPD1、PPD2、PPD3、PPD4、PPD5、PPD6、PPD7。已有研究发现, PPD1 是 PSI 复合体的组装因子, 在拟南芥中, PPD1 缺失突变体导致 PSI 复合体无法正常组装, 从而影响植物的光合作用<sup>[18-19]</sup>; 在拟南芥中, PPD5 蛋白和 OST1 相互作用并被其磷

收稿日期: 2023 - 03 - 09

修回日期: 2023 - 04 - 23

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (31860485)

第一作者: 贾素行 (1997-), 男, 海南大学热带作物学院 2020 级硕士研究生。E-mail: 1982888092@qq.com

通信作者: 李春霞 (1980-), 女, 博士, 教授。研究方向: 植物与病原互作机制。E-mail: chun\_xia\_li@126.com;

陈银华 (1976-), 男, 博士, 教授。研究方向: 热带作物与微生物互作。E-mail: yhchen@hainanu.edu.cn

酸化,使细胞中  $H_2O_2$  积累增加并使气孔关闭增强<sup>[20]</sup>。但目前尚未有过任何关于 PPD3 蛋白功能的研究报道。

本研究以‘华南 8 号’木薯为材料,通过 qRT-PCR 扩增得到 *MePPD3*(*Manihot esculenta* psbP domain-containing protein 3)基因,并对该基因进行生物信息学分析;同时,对该基因在木薯不同部位和病原菌 *Xpm* CHN11 侵染后不同时间的表达模式进行分析;最后利用 TRV 介导的基因沉默技术沉默 *MePPD3* 基因后测定抗病表型,旨在为进一步研究 *MePPD3* 基因的分子机理和木薯抗细菌枯萎病的抗病机理提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞和农杆菌

GV3101 感受态细胞购自上海唯地生物;菜豆黄单胞菌木薯萎蔫致病变种 *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* CHN11 由笔者所在实验室提供。

1.2 植物材料 供试的木薯品种为‘华南 8 号’(‘SC8’),由笔者所在实验室提供。

1.3 试剂 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(RNA prep Pure Plant Kit)和 RNA 反转录试剂盒(FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix)购自天根生化科技有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自艾德莱。

1.4 所用引物 从 phytozome 数据库中下载木薯 *MePPD3* 基因的 CDS 序列,使用 Primer Primer 5.0 分别设计该基因的全长扩增引物、定量分析引物和亚细胞定位引物。本研究所用引物如表 1 所示。

表 1 本研究所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')	引物用途
<i>EF1<math>\alpha</math>-F</i>	TGCCATGTTCCGTGGAAAGATG	内参基因引物
<i>EF1<math>\alpha</math>-R</i>	CCCCTAGGTGGAATGTCACAGACAC	内参基因引物
<i>MePPD3-F</i>	CATATGATGGCGTCTGTTTCTTTGCTGTC	扩增目的基因
<i>MePPD3-R</i>	GAATTCTCATGAAATGAACCTGAAGGATG	扩增目的基因
qpcr- <i>MePPD3-F</i>	AGACTGATGAGCTTCGCGTT	定量分析
qpcr- <i>MePPD3-R</i>	TGACTTGAACCCGCCGTTAG	定量分析
1300- <i>MePPD3-F</i>	TTGATACATATGCCCGTCGACATGGCGTCTGTTTCTTTGC	亚细胞定位
1300- <i>MePPD3-R</i>	GCCCTTGCTCACCATGGATCCTGAAATGAACCTGAAGGATG	亚细胞定位

1.5 *MePPD3* 基因 cDNA 全长序列克隆 取少许木薯叶片于液氮中速冻,用液氮预冷后的研钵进行研磨。使用试剂盒提取木薯 RNA 并将其反转录为 cDNA。以木薯 cDNA 为 PCR 模板,以 *MePPD3-F* 和 *MePPD3-R* 为引物,扩增木薯 *MePPD3* 基因序列。待琼脂糖凝胶电泳检测结果无误后,转入植物亚细胞载体 pCAMBIA1300-35S-GFP 中,挑选阳性单克隆送至楠山生物进行测序。

1.6 *MePPD3* 基因的生物信息学分析 借助 SignalP 5.0 Server 对 *MePPD3* 蛋白的信号肽进行预测;通过 TMHMM Serverv 2.0 分析 *MePPD3* 蛋白的跨膜结构;利用 NetPhos 3.1 Server 在线工具

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测 *MePPD3* 蛋白的磷酸化位点和糖基化位点;分别使用在线网站 PSIPRED.(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)和 PHYRE2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>)预测 *MePPD3* 蛋白的二级结构和三级结构。

通过 NCBI 序列比对,找到 *MePPD3* 蛋白在不同植物中的同源蛋白。通过 DNAMAN 8.0 软件对这 9 个同源蛋白进行多序列比对;使用 MEGA 11.0 软件对这些同源蛋白构建 NJ 进化树;使用 MEME 在线网站对 *MePPD3* 及其同源蛋白进行保守 Motif 分析。

1.7 *MePPD3* 基因的亚细胞定位 将构建好的

植物亚细胞定位载体 pCAMBIA1300-35S-GFP-*MePPD3* 与空载 pCAMBIA1300-35S-GFP 分别转入 GV3101 菌株。挑取阳性克隆于 28 °C 200 r·min<sup>-1</sup> 培养过夜, 取适量菌液转移至新的 LB(含 Kan 和 Rif)液体培养基中扩大培养。调节  $OD_{600} \approx 1.0$ , 黑暗静置 2.5 h, 注射于生长 30 d 左右的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 叶片背面, 做好标记, 培养 40 h 后于共聚焦显微镜下观察其荧光。

**1.8 qRT-PCR 检测 *MePPD3* 基因在木薯不同部位中的表达水平** 使用 Primer Primer 5.0 设计定量引物 qPCR-*MePPD3*-F/R。分别取长势相同的木薯的顶芽、幼嫩叶片、成熟叶片、叶柄、须根、块根等部位, 每个部位至少 3 个生物学重复, 液氮速冻后, 使用 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒提取木薯总 RNA, 然后再按照 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒的流程反转录 cDNA。

**1.9 qRT-PCR 检测 *Xpm* CHN11 侵染后不同时间 *MePPD3* 基因表达水平变化** 用  $OD_{600} \approx 0.05$  的菜豆黄单胞菌木薯萎蔫致病变种 *Xpm* CHN11 侵染多株长势相同的木薯, 分别于侵染后 0 h、6 h、1 d、3 d、5 d 随机剪取叶片, 液氮速冻后将其研磨提取 RNA, 并反转录为 cDNA。

**1.10 VIGS 沉默 *MePPD3* 基因后检测木薯抗病性有无变化** 构建沉默载体 pCsCMV-*MePPD3*。将其与正对照 pCsCMV-B 和负对照 pCsCMV-A 分别转化入 GV3101 菌株, 在 LB 液体培养基(含 Kan 和 Rif)中培养阳性克隆至  $OD_{600} = 1.0$ 。然后注射于木薯‘SC8’叶片背面, 24 °C 培养 30 d。

在 LPGA 固体培养基(含 Chl)上活化 *Xpm* CHN11 菌株, 活化 2 次后, 用无菌水清洗菌体并稀释至  $OD_{600} = 0.05$ , 用该菌液注射木薯叶片。侵染 6 d 后, 观察叶片表面病斑的扩散情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MePPD3* 基因的克隆及其理化性质分析

以木薯 RNA 为模板, *MePPD3*-F/R 为上下游引物, 通过 RT-PCR 技术, 得到目的基因 *MePPD3* (*Manihot esculenta* psbP domain-containing protein 3)(图 1-a)。基因序列分析发现, *MePPD3* 基因全长 807 bp, 编码 268 个氨基酸。ExPasy 在线网站分析结果显示, *MePPD3* 相对分子质量为 67 522.75, 理论等电点为 5.11, 分子式为 C<sub>2467</sub>H<sub>4129</sub>N<sub>807</sub>O<sub>1033</sub>

S<sub>184</sub>, 不稳定系数为 49.9, 脂肪系数为 27.14, 亲水系数为 0.775。使用 NCBI 的 CDD 数据库分析其保守结构域, 结果发现, 其氨基酸序列第 106 ~ 266 位存在 PsbP 结构域(图 1-b), 推测其为 PPD3 蛋白。

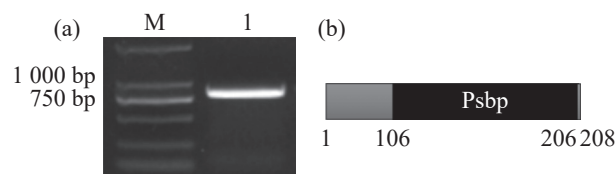


图 1 *MePPD3* 基因全长扩增及蛋白结构分析

a: *MePPD3* 全长扩增; M: DL2000 DNA Marker; 1: *MePPD3*; b: 蛋白结构分析。

**2.2 *MePPD3* 蛋白的生物信息学分析** 使用 NetPhos 在线网站, 预测 *MePPD3* 蛋白有 32 个磷酸化位点, 其中, 有 19 个丝氨酸、6 个苏氨酸和 7 个酪氨酸(图 2-a); 有 5 个糖基化位点(图 2-b); 使用 TMHMM 在线网站预测发现, 其存在跨膜结构域(图 2-c); 使用 SignalIP 在线网站发现, 其无信号肽(图 2-d); 使用 PSIPRED 在线网站预测 *MePPD3* 蛋白二级结构, 发现其有 6 处螺旋结构, 其中, 螺旋占 21.3%, 折叠占 26.5%, 无规卷曲占 52.2%(图 2-e); 通过 PHYRE2 在线网站预测其三级结构, 发现其有 6 个螺旋结构, 这符合二级结构预测结果和 PsbP 蛋白的结构特征(图 2-f)。

**2.3 *MePPD3* 蛋白同源序列、进化树和保守结构域分析** 为研究 PPD3 蛋白在不同植物中是否具有较高的同源性, 首先在 NCBI 通过 BLAST 比对, 在橡胶 (*Hevea brasiliensis*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*)、茶树 (*Camellia sinensis*)、胡杨 (*Populus euphratica*)、芒果 (*Mangifera indica*)、麻风树 (*Jatropha curcas*)、开心果 (*Pistacia vera*) 等 8 种植物中找到了与木薯 *MePPD3* 蛋白同源的氨基酸序列(表 2)。使用 DANMAN 8.0 对这些序列进行比对(图 3), 结果发现, *MePPD3* 蛋白在不同的植物中具有较高的同源性, 其中与橡胶中 PPD3 蛋白的同源性最高。PsbP 保守结构域在不同植物中的差别不大(图中红线框), 且 N 端氨基酸序列含有叶绿体/线粒体定位信号(图中蓝线), 表明 *MePPD3* 蛋白可能定位于叶绿体或线粒体。

为了进一步验证这些蛋白的亲缘关系, 使用

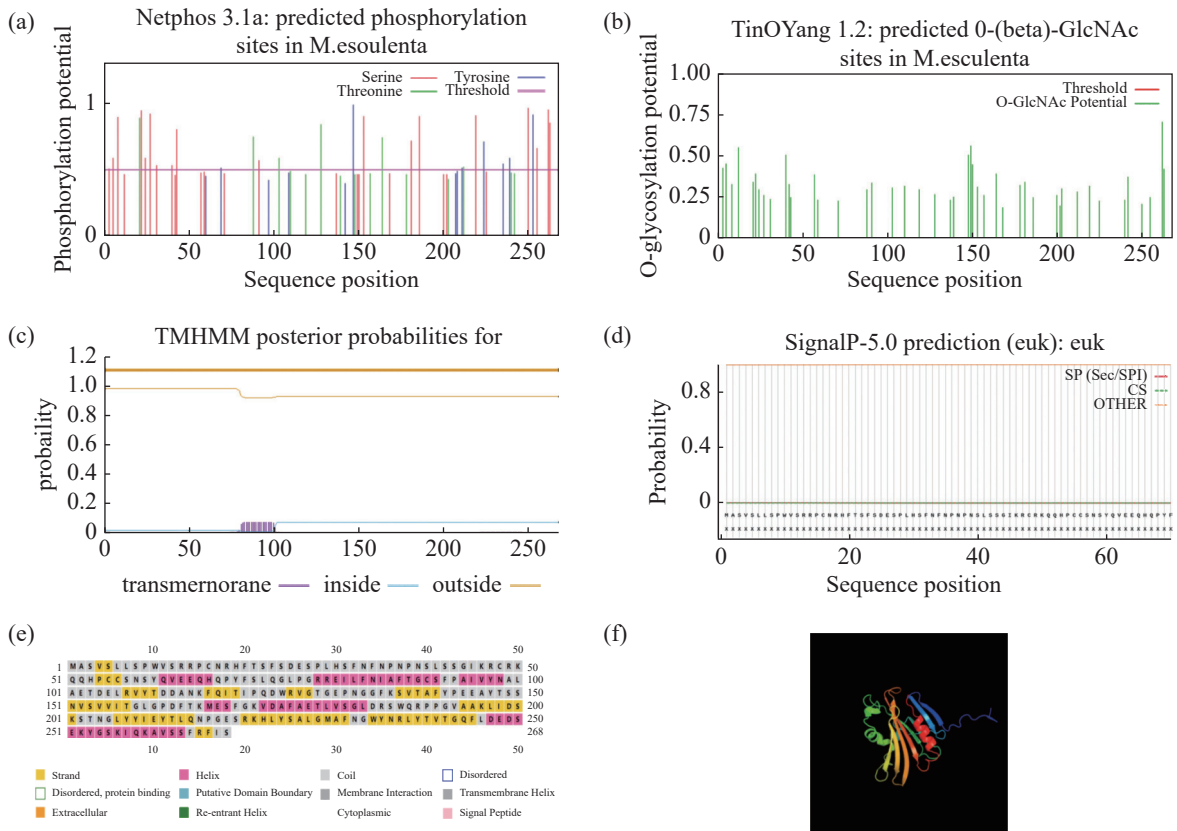


图 2 *MePPD3* 蛋白的生物信息学分析

a: 磷酸化位点预测; b: 糖基化位点预测; c: 跨膜结构域预测; d: 信号肽预测; e: 二级结构预测; f: 三级结构预测。

表 2 *MePPD3* 在不同植物中的同源蛋白

物种名称	学名	基因号
木薯	<i>Manihot esculenta</i>	Manes.05G127800.1
橡胶	<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021686524.1
蓖麻	<i>Ricinus communis</i>	XP_015573931.1
胡杨	<i>Populus euphratica</i>	XP_011041160.1
雷公藤	<i>Tripterygium wilfordii</i>	XP_038714823.1
茶树	<i>Camellia sinensis</i>	XP_028073751.1
芒果	<i>Mangifera indica</i>	XP_044475605.1
麻风树	<i>Jatropha curcas</i>	XP_012073570.1
开心果	<i>Pistacia vera</i>	XP_031270258.1

MEGA11.0 对这 9 个同源蛋白构建 NJ 进化树 (图 4)。结果发现,木薯中的 *MePPD3* 蛋白与其他几种植物中的 *MePPD3* 蛋白具有较高的亲缘关系,值得一提的是它与橡胶中 PPD3 蛋白的亲缘关系最接近,可达 99%,蓖麻中的 PPD3 蛋白次之。

应用 MEME 在线网站对 *MePPD3* 蛋白及其

同源蛋白进行保守 Motif 分析 (图 5),发现这 9 个同源蛋白至少含有 6 个保守 Motif,其中, Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4 和 Motif 6 具有高度保守性。此外, *MePPD3* 蛋白和橡胶、蓖麻中 PPD3 蛋白具有 Motif 的种类和数量一致,均具有这 8 个 Motif。这与同源蛋白多序列比对和进化树分析的结果一致,初步说明, PPD3 蛋白在不同植物体内具有较高的保守性, *MePPD3* 蛋白的功能极有可能与其他 PPD3 蛋白的功能一致。

2.4 *MePPD3* 蛋白的亚细胞定位 为探究木薯 *MePPD3* 蛋白在植物细胞内的亚细胞定位,构建了植物亚细胞定位载体 pCAMBIA1300-35S-GFP-*MePPD3* (图 6-a)。使用已提前转进 GV3101 菌株的亚细胞定位载体 pCAMBIA1300-35S-GFP-*MePPD3* 和空载 pCAMBIA1300-35S-GFP 注射生长约 30 d 的烟草叶片。40 h 后,剪取叶片观察荧光信号 (图 6-b),结果发现,与对照 (GFP 空载) 相比,试验组在叶绿体中能观测到绿色荧光,且能与叶绿体的红色自发荧光基本重合,表现出黄色的光。说明 *MePPD3* 蛋白定位在叶绿体中,符合

叶绿体/线粒体定位信号

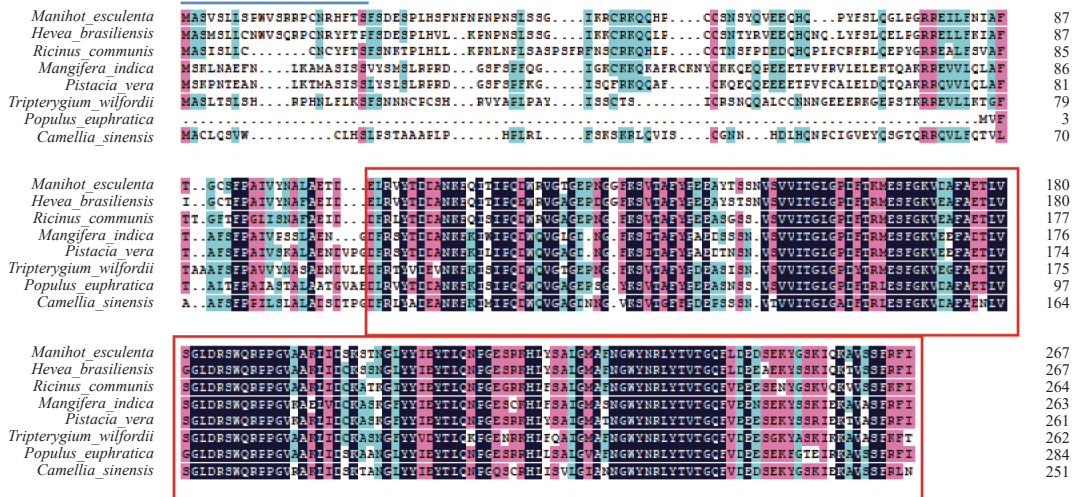


图 3 MePPD3 在不同植物中的同源序列对比

红线框代表 PsbP 结构域; 蓝线代表叶绿体/线粒体定位信号。

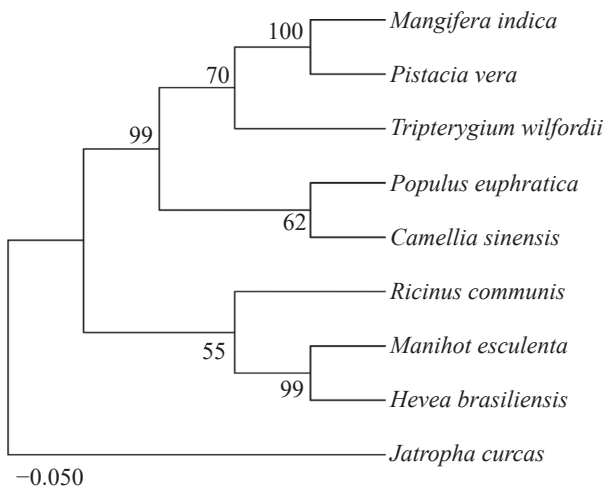


图 4 不同物种间 MePPD3 同源蛋白的系统进化树分析

Psbp 蛋白(叶绿体光系统 II 亚基蛋白)的特点。

2.5 木薯不同部位 MePPD3 基因的表达模式分析

为研究木薯 MePPD3 基因在木薯不同部位中的表达情况, 分别选择同一株‘SC8’木薯的成熟叶片、幼嫩叶片、叶柄、顶芽、块根、须根等部位, 对其进行 real-time PCR 检测 MePPD3 基因的表达量是否发生变化。观察发现(图 7), MePPD3 基因在木薯不同组织中均有表达, 其在木薯叶片中的表达量最高, 在幼嫩叶片中的表达量为顶芽的 5 倍, 在成熟叶片中的表达量为顶芽的 18 倍; 在木薯的叶柄、须根、块根的表达量和顶芽接近。这说明 MePPD3 基因主要在木薯的叶片中表达, 这与其具有的 Psbp 结构域的功能相符。

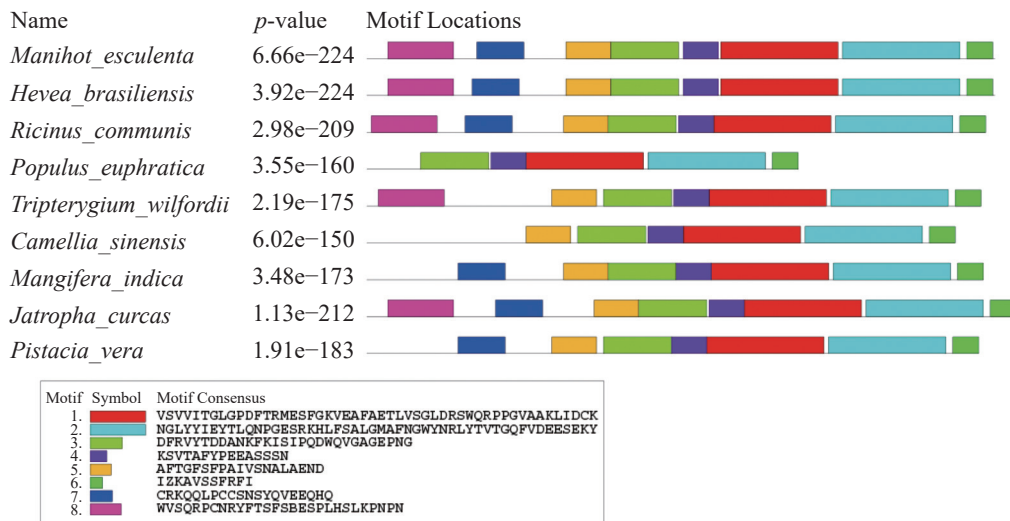


图 5 MePPD3 结构域分析

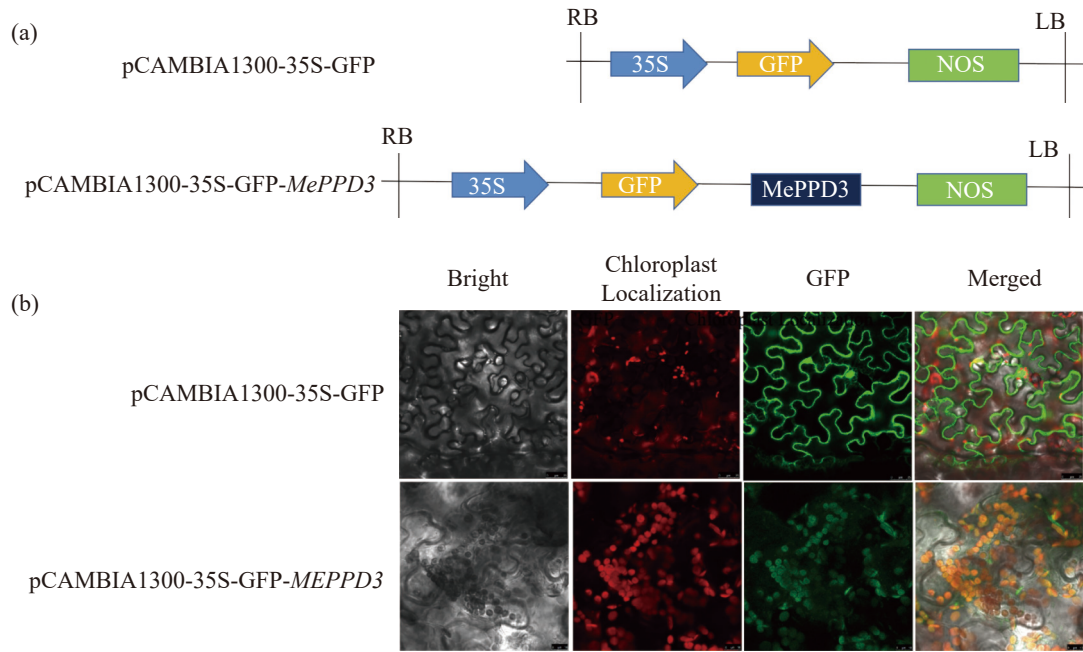


图 6 *MePPD3* 蛋白的亚细胞定位

a: 亚细胞定位载体构建; b: *MePPD3* 烟草中亚细胞定位分析, 图中线段长度为 20 μm。

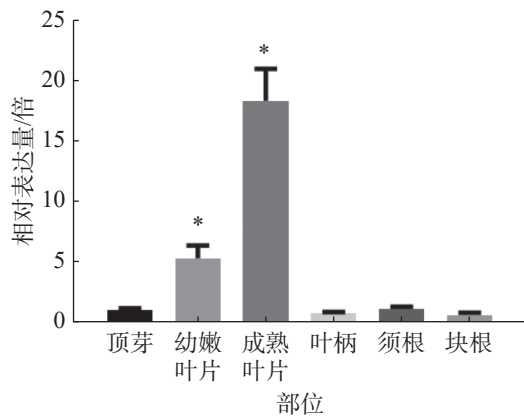


图 7 *MePPD3* 基因在木薯不同部位的表达模式图

\*表示  $P < 0.05$ , 下同。

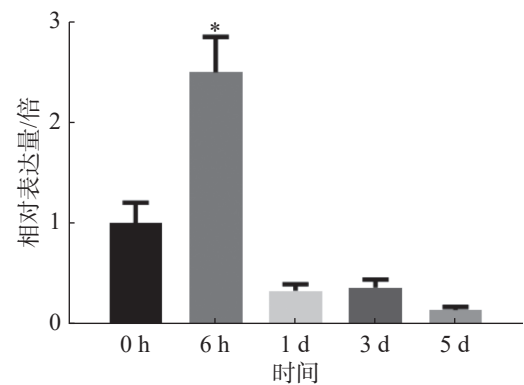


图 8 病原菌侵染后不同时间 *MePPD3* 基因的表达量

**2.6 病原菌侵染不同时间后 *MePPD3* 基因的表达模式分析** 为探究病原菌 *Xpm* CHN11 侵染后 *MePPD3* 基因在木薯叶片中的表达量是否发生变化, 分别取接种 0、6 h、1、3、5 d 的木薯叶片, 通过实时荧光定量 PCR 检测 *MePPD3* 基因的表达量变化(图 8)。从中可以明显地看出, 在 *Xpm* CHN11 侵染木薯后的不同时间, *MePPD3* 基因的表达量呈先上升再下降趋势。在 6 h 时, 其表达量上升了 2.5 倍; 在 1、3 和 5 d 时, 其表达量逐渐下降为本底表达量。这说明, *MePPD3* 基因可能在木薯抗病过程中发挥着作用。

**2.7 *MePPD3* 基因沉默后木薯 SC8 抗病性** 为明确 *MePPD3* 基因在木薯抗病过程中的作用,

采用 VIGS 技术沉默 *MePPD3* 基因, 沉默 40 d 后, 接种正对照植株的叶片出现了白化表型(图 9-a)。qRT-PCR 结果显示, 经过 VIGS 沉默之后, *MePPD3* 基因的相对表达量显著降低, 其表达量下降了 2 倍(图 9-b), 说明该基因受到了有效沉默。

分别在沉默植株和野生型植株上接种 *Xpm* CHN11, 结果发现, 接种后 6 d, 沉默植株和野生型植株叶片均已产生水渍状病斑, 且沉默植株的水渍状病斑明显小于野生型植株(图 9-c), 统计后发现沉默植株的病斑面积约为对照植株的一半(图 9-d), 该结果显示 *MePPD3* 负调控了木薯的抗病性。

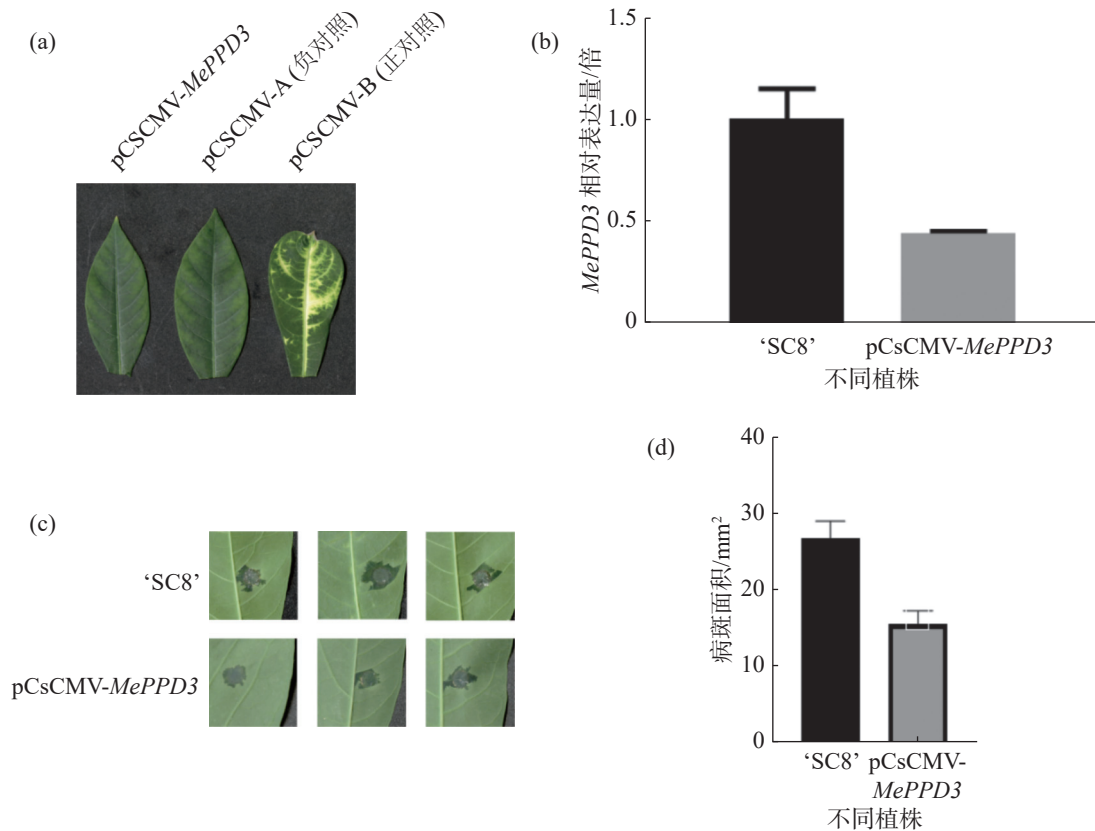


图9 VIGS 沉默植株表型及抗病性检测

a: 沉默成功表型; b: *MePPD3* 基因沉默效率; c: 接菌表型; d: 统计病斑面积; 'SC8' 为野生型、pCsCMV-*MePPD3* 为沉默植株。

### 3 讨论

叶绿体是植物体所特有的细胞器, 它能为植物体的各项生命活动提供能量。PsbP 蛋白是叶绿体光系统 II 的重要组成部分, 它能参与 PS II 的组装<sup>[13-15]</sup>。此外, 葡萄球菌葡萄球菌 RXLR 效应因子 RXLR31154 通过影响 Psbp 来降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累, 从而促进葡萄致病<sup>[21]</sup>。PPD 蛋白是 PsbP 蛋白家族的一员, 目前已发现的 PPD 蛋白有 7 种。蛋白在 PSI 组装过程中发挥重要作用<sup>[18-19]</sup>; PPD5 蛋白和 ROS 爆发、气孔关闭有关<sup>[19]</sup>。以上研究充分说明了 Psbp 蛋白在植物光合作用和免疫反应中发挥着一定的作用。但目前关于 PPD3 蛋白的研究却不是很多。

为了增进对 PPD3 蛋白的了解, 本研究首次从木薯数据库中得到 *MePPD3* 基因。*MePPD3* 基因 CDS 序列全长 807 bp, 编码 268 个氨基酸序列。对 *MePPD3* 基因进行了一系列的生物信息学分析, 结果发现: 该蛋白第 50~100 位存在跨膜结构, 第 106 到 266 位为 PsbP 保守结构域。其三级

结构由 6 个螺旋组成, 符合 PsbP 蛋白家族的结构特征。选取 8 种植物中的同源蛋白序列进行多序列比对、进化树和保守结构域分析, 结果发现, PPD3 蛋白在不同植物中具有较高的保守性, 木薯 *MePPD3* 蛋白和橡胶中 PPD3 蛋白具有相同的保守结构域, 且两者的相似性可达 99%。因此, 推测 PPD3 蛋白在不同植物中起到的作用一致或相近。此外, 通过烟草瞬时表达, 证实 *MePPD3* 定位于叶绿体, 这与 PPD3 蛋白的叶绿体/线粒体定位信号相符, 说明 *MePPD3* 可能在叶绿体中发挥功能。另外, 本研究通过 qRT-PCR 检测, 发现 *MePPD3* 基因在木薯成熟叶片中表达量最高; 黄单胞菌 *Xpm* CHN11 侵染木薯叶片后, *MePPD3* 表达量呈现上调趋势, 初步推断, *MePPD3* 可能参与了木薯的抗病途径; VIGS 沉默 *MePPD3* 基因后接种结果显示, *MePPD3* 负调控木薯的抗病途径。结合前人研究推测, *MePPD3* 可能通过影响气孔开闭和 ROS 爆发来参与木薯抗病, 是否正确仍需要后续研究来证实。

## 参考文献:

- [1] 黄洁, 李开绵, 叶剑秋, 等. 我国的木薯优势区域概述[J]. 广西农业科学, 2008(1): 104 – 108.
- [2] 李开绵, 林雄, 黄洁. 国内外木薯科研发展概况[J]. 热带农业科学, 2001(1): 56 – 60.
- [3] FERRARO V, PICCIRILLO C, TOMLINS K, et al. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and yam (*Dioscorea* spp.) crops and their derived foodstuffs: safety, security and nutritional value[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(16): 2714 – 2727.
- [4] PINTO-ZEVALLOS D M, PAREJA M, AMBROGI B G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view[J]. *Phytochemistry*, 2016(130): 10 – 21.
- [5] ZHANG M, XIE L, YIN Z, et al. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities[J]. *Bioresource Technology*, 2016(215): 50 – 62.
- [6] LÓPEZ C E, BERNAL A J. Cassava bacterial blight: Using genomics for the elucidation and management of an old problem[J]. *Tropical Plant Biology*, 2012, 5(1): 117 – 126.
- [7] ZÁRATE-CHAVES C A, GÓMEZ DE LA CRUZ D, VERDIER V, et al. Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(12): 1520 – 1537.
- [8] BRICKER T M, ROOSE J L, ZHANG P, et al. The PsbP family of proteins[J]. *Photosynthesis Research*, 2013, 116(2): 235 – 250.
- [9] IFUKU K. The PsbP and PsbQ family proteins in the photosynthetic machinery of chloroplasts[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 81: 108 – 114.
- [10] BRICKER T M, FRANKEL L K. Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: A critical analysis[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 2011, 104(1/2): 165 – 178.
- [11] IFUKU K, ISHIHARA S, SHIMAMOTO R, et al. Structure, function, and evolution of the PsbP protein family in higher plants[J]. *Photosynthesis Research*, 2008, 98(1/2/3): 427 – 437.
- [12] IFUKU K, NAKATSU T, KATO H, et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies on the extrinsic 23 kDa protein in the oxygen-evolving complex of photosystem II [J]. *Acta Crystallographica Section D*, 2003, 59(Pt8): 1462 – 1463.
- [13] IDO K, IFUKU K, YAMAMOTO Y, et al. Knockdown of the PsbP protein does not prevent assembly of the dimeric PS II core complex but impairs accumulation of photosystem II supercomplexes in tobacco[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2009, 1787(7): 873 – 881.
- [14] IFUKU K, YAMAMOTO Y, ONO T A, et al. PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(3): 1175 – 1184.
- [15] YI X, HARGETT S R, LIU H, et al. The PsbP protein is required for photosystem II complex assembly/stability and photoautotrophy in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(34): 24833 – 24841.
- [16] CHE Y, KUSAMA S, MATSUI S, et al. *Arabidopsis* PsbP-like protein 1 facilitates the assembly of the photosystem II super complexes and optimizes plant fitness under fluctuating light[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2020, 61(6): 1168 – 1180.
- [17] ISHIHARA S, TAKABAYASHI A, IDO K, et al. Distinct functions for the two PsbP-like proteins PPL1 and PPL2 in the chloroplast thylakoid lumen of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(3): 668 – 679.
- [18] LIU J, YANG H, LU Q, et al. PsbP-domain protein1, a nuclear-encoded thylakoid luminal protein, is essential for photosystem I assembly in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(12): 4992 – 5006.
- [19] ROOSE J L, FRANKEL L K, BRICKER T M. The PsbP domain protein 1 functions in the assembly of luminal domains in photosystem[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(34): 23776 – 23785.
- [20] ROOSE J L, FRANKEL L K, BRICKER T M. Developmental defects in mutants of the PsbP domain protein 5 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Public Library of Science*, 2011, 6(12): e28624.
- [21] LIU R, CHEN T, YIN X, et al. A *Plasmopara viticola* RXLR effector targets a chloroplast protein PsbP to inhibit ROS production in grapevine[J]. *The Plant Journal*, 2021, 106(6): 1557 – 1570.



## Cloning and physicochemical characterization of *MePPD3* gene from cassava (*Manihot esculenta*)

JIA Suhang, ZHU Shousong, FU Renwen, LI Chunxia, CHEN Yinhua  
(College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** The subcellular localization and expression analysis of PsbP protein *MePPD3* (*Manihot esculenta* PsbP domain-containing protein 3, Phytozome database number: Manes.05G127800) were performed to explore whether *MePPD3* is involved in disease resistance of cassava. *MePPD3* gene was amplified by RT-PCR. Sequence analysis showed that *MePPD3* gene was 807bp in length, encoding 268 amino acids, with PsbP domain located at position 106-266 aa. Bioinformatics analysis of *MePPD3* protein was conducted by NetPhos 3.1 Server, SignalP 5.0 Server, TMHMM Serverv, PSIPRED and PHYRE2 online, respectively. The results indicated that *MePPD3* protein contained 32 phosphorylation sites, 5 glycosylation sites, and 1 transmembrane domain. The secondary structure of the protein was composed of 21.3% Helix (Helix), 26.5% fold (strand) and 52.2% random curl (loop). The multiple sequence alignment, phylogenetic tree analysis and conserved domain analysis indicated that *PPD3* protein had a high genetic relationship among different plants. Subcellular localization showed that *MePPD3* protein was localized in chloroplast. QRT-PCR results revealed that the expression level of *MePPD3* gene in different cassava tissues was significantly different, and was the highest in mature leaves. In addition, the expression of this gene was induced by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), indicating *MePPD3* is involved in the resistance of cassava to *Xpm*. After *MePPD3* gene was silenced by VIGS technique, the leaf lesion area of silent plants was significantly smaller than that of the control plants, which implies that *MePPD3* negatively regulates cassava resistance to bacterial fusarium wilt caused by *Xpm*.

**Keywords:** cassava; *MePPD3*; bioinformatics analysis; *Xpm* CHN11

(责任编辑:潘学峰)