

文章编号: 1674-7054(2020)02-0170-07

# 木薯 MeNOSIP 与 MeRbohD 蛋白的 互作验证及其对外源激素的响应

赵 锐<sup>1,2</sup>, 樊若晨<sup>1</sup>, 丁凯旋<sup>1</sup>, 唐枝娟<sup>1</sup>, 王红刚<sup>1</sup>,

黄思源<sup>1</sup>, 蒋凌雁<sup>1</sup>, 陈银华<sup>1</sup>, 耿梦婷<sup>1</sup>

(1. 海南大学 热带作物学院, 海口 570228; 2. 海南大学 生命科学与药学院, 海口 570228)

**摘要:** 为了解木薯 (*Manihot esculenta*) MeRbohD 在抗病途径中的功能, 笔者在获得 MeRbohD 候选互作蛋白 MeNOSIP (nitric oxide synthase-interacting protein, 一氧化氮合酶互作蛋白) 的基础上, 通过 RT-PCR 克隆获得 MeNOSIP 基因编码区序列, 并进行生物信息学分析。结果表明, MeNOSIP 的 CDs 序列全长 918 bp, 编码含 305 个氨基酸的多肽, 属于不稳定的亲水类蛋白质, 亚细胞定位预测 MeNOSIP 在细胞膜上表达。采用酵母杂交验证发现, MeRbohD 与 MeNOSIP 真实互作。MeRbohD 和 MeNOSIP 在 JA, SA, ABA 诱导下基因均上调表达; ABA 处理下, MeRbohD 和 MeNOSIP 基因表达变化趋势一致, 推测它们可能共同参与了由 ABA 介导的抗逆通路。

**关键词:** MeRbohD; 互作蛋白; MeNOSIP; 表达分析

中图分类号: S 188.1; S 533; Q 344.13

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.02.007

植物呼吸爆发氧化酶 (Respiratory burst oxidase homologue, Rboh) 即 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX) 是动物 NADPH 氧化酶核心亚基 gp91<sup>phox</sup> 的同源物<sup>[1]</sup>。ROS (Reactive Oxygen Species) 包括 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH 等, 主要由质膜上的 Rboh、过氧化物酶和胺氧化酶催化形成。植物在响应逆境胁迫时, Rboh 将电子传递给 O<sub>2</sub> 生成超氧阴离子, 在超氧化物歧化酶的作用下产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROS 迅速增加作为信号分子传递到下游基因。Rboh 作为产生 ROS 的关键活性酶, 在植物的生长发育起关键作用, 调节细胞中的许多重要代谢途径。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 AtRbohD 和 AtRbohF 是 AtRbohs 基因家族中表达最高的基因, 其他的 AtRboh 基因则保持在低表达水平<sup>[2]</sup>。高表达的 AtRbohD 在细胞程序性死亡、细胞壁木质化、对胁迫的信号传导中发挥着重要作用<sup>[3-5]</sup>。模式识别受体 (PRRs) 对病原相关分子模式 (PAMPs) 的感知导致 ROS 的爆发主要依赖于 AtRbohD。RbohF 可能在某些反应中与 RbohD 协同作用<sup>[6]</sup>。在拟南芥 atrbohD/ atrbohF 双重突变体的 ROS 含量降低, ABA 诱导的气孔关闭, ROS 积累及 Ca<sup>2+</sup> 通道的活跃程度均削弱<sup>[3, 7-8]</sup>。植物 NADPH 氧化酶的活性主要受 Ca<sup>2+</sup>、蛋白磷酸化、Rac 蛋白及激素调控。Ca<sup>2+</sup> 的拮抗剂 EGTA 能有效抑制马铃薯 (*Solanum tuberosum*) StRboh 蛋白诱导的 ROS<sup>[9]</sup>; Ca<sup>2+</sup> 通过与 AtRbohD 蛋白 N 端的 EF-手性基序结合, 改变其蛋白结构, 从而调控 AtRbohD 活性<sup>[10]</sup>。磷酸化状态的 AtCDPK5 能进一步磷酸化 AtRbohD 蛋白, 从而激活活性氧的爆发<sup>[11]</sup>。AtBik1 (botrytis-induced kinase1) 能够磷酸化 AtRbohD 蛋白的第 343 位和第 347 位丝氨酸, 激活其活性, 促进 ROS 的积累, 同时正反馈调节 Ca<sup>2+</sup> 信号, 促进 Ca<sup>2+</sup> 的细胞内流, 引起气孔关闭<sup>[6]</sup>。Rac 是一种具有 GTP 酶活性的蛋白, 调控 ROS 的形成, 进而影响细胞的各种生理过程和增强植物抗病能力。烟草中 NtRac5 基因通过负调控 Rboh 基因活性参与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的合成<sup>[12]</sup>。研究发现, 水稻 (*Oryza sativa*) OsRac1 与 OsRbohB 蛋白的 N 端相互

收稿日期: 2020-02-11

修回日期: 2020-02-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31560497); 海南省创新团队项目 (2018CXTD330)

第一作者: 赵锐 (1994-), 男, 海南大学生命科学与药学院 2017 级硕士研究生. E-mail: 1651350314@qq.com

通信作者: 耿梦婷 (1989-), 女, 博士, 讲师. 研究方向: 作物遗传育种. E-mail: 49887267@qq.com

作用,同时,细胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高也促进了 RbohB 的酶活性的提高<sup>[13]</sup>。水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和脱落酸(ABA)广泛参与调控植物的抗逆响应过程,它们可促进 *Rboh* 的表达及酶活性提高。拟南芥外源施加 MeJA 可以诱导 *AtRbohD* 和 *AtRbohF* 表达量升高<sup>[14]</sup>。外源施加 ABA 可以直接刺激 Rboh 氧化酶的活性,产生 ROS 类物质,参与植株抗逆的生理调节过程<sup>[7]</sup>。

木薯(*Manihot esculenta*)作是世界三大薯类之一,是重要的粮食作物和生物质能源作物<sup>[15]</sup>。木薯作为热区作物对低温,干旱等环境因素非常敏感,病害也是影响木薯产量的一个重要因素<sup>[16-18]</sup>。植物 NADPH 氧化酶家族中 *RbohD* 基因已被证实与病原微生物的互作中主要负责 ROS 的形成。目前,木薯中还没有关于 *MeRbohD* 相关的报道。推测 *MeRbohD* 可能作为信号传导中的重要基因参与木薯的抗逆响应途径。笔者在获取 *MeRbohD* 的互作蛋白基础上,利用酵母点对点杂交验证方法验证 *MeRbohD* 和 *MeNOSIP* (nitric oxide synthase-interacting protein) 的互作关系;从木薯 cDNA 中扩增得到 *MeNOSIP* 的 CDs 序列,利用生物信息学方法初步分析 *MeNOSIP* 基因和蛋白的理化性质;同时,利用实时荧光定量 PCR 分析 *MeNOSIP* 在 JA, SA, ABA 诱导下的表达情况,旨在为木薯的遗传改良提供参考资料。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 华南 8 号木薯品种(SC8),酵母菌株 AH109,大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,酵母双杂交载体质粒 pGADT7, pGBKT7, pGADT7-LargeT, pGBKT7-p53, pGBKT7-laminc, pGADT7-MeRbohD 均由海南大学生物资源可持续利用生物重点实验室提供。

1.2 *MeNOSIP* 基因的克隆 以木薯 SC8 的 cDNA 为模板,用 Thermo 的高保真酶和基于木薯基因组数据库设计的基因编码区引物(primerF: ATGCCTCAGAGACACTCG/primer R: TTAAATCTTCATTGCGGC)进行目的基因 CDs 序列的扩增,扩增程序为:95 °C 3 min;30 个循环,95 °C 10 s,58 °C 10 s,72 °C 20 s;72 °C 5 min。扩增产物取 2  $\mu\text{L}$  进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增获得的目的条带通过 TA 克隆到中间载体 pEASY-Blunt,转化大肠杆菌感受态,筛选阳性克隆送华大基因公司测序。

1.3 *MeNOSIP* 生物信息学分析 利用蛋白质网站 ExPAS(<http://web.expasy.org/protparam/>)鉴定 *MeNOSIP* 蛋白的理化性质。利用网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)对 *MeNOSIP* 蛋白进行亚细胞定位预测。利用 MapGene2chrom([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.1/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/))进行 *MeNOSIP* 的染色体定位分析。运用 MEGA7.0 对木薯(*Manihot esculenta*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、烟草(*Nicotiana tomentosiformis*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)、玉米(*Zea mays*)、大麦(*Hordeum vulgare*)等的 *NOSIP* 蛋白序列进行多序列比对,构建 NJ 进化树。

1.4 酵母双杂交验证 *MeNOSIP* 与 *MeRbohD* 的互作关系 为了验证筛选到的 *MeNOSIP* 与 *MeRbohD* 是否真实互作,笔者将 *MeNOSIP* 构建至诱饵载体 pGBKT7-BD,与 pGAD 共转入酵母 AH109 菌株,涂布在 SD/TL 平板。鉴定无误后,点在 SD/TL,SD/TLHA 和 SD/TLHA+20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  x- $\alpha$ -gal 的平板中,验证 *MeNOSIP* 是否有自激活活性。将 pGBKT7-MeNOSIP 与 pGADT7-MeRbohD 共同转化酵母菌株 AH109。28 °C 暗培养 3 d 后,挑取单菌落进行菌落 PCR,鉴定阳性克隆。将阳性克隆点至 SD/TL,SD/TLHA 和 SD/TLHA+20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  x- $\alpha$ -gal 的平板中,28 °C 培养 4 d 后观察菌落生长情况,验证互作关系。

1.5 *MeNOSIP* 表达模式分析 茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)等激素在植物应对各种胁迫下发挥重要的调节作用。为了探究 *MeRbohD* 和 *MeNOSIP* 是否会响应这 3 种激素的诱导,选取生长约 30 d 长势良好的木薯 SC8 幼苗,分别用 JA(100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), SA(2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ABA(100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 溶液喷雾处理。提取处理不同时间点下的木薯 RNA 进行反转录用于 *MeRbohD* 和 *MeNOSIP* 基因的表达模式分析。qRT-PCR 程序按 SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa)说明操作:95 °C 预变性 30 s;40 个循环包括 95 °C 变性 5 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s。*Ubq10* 基因作为参照基因,计算  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值。每个样品、每个时间点设 3 个生物学重复,重复 3 次实验。结果利用 GraphPad 软件绘图。

## 2 结果与分析

2.1 *MeNOSIP* 基因的克隆 以木薯 SC8 的 cDNA 为模板,利用 *MeNOSIP* 编码区引物扩增得到 1 条约 900 bp

的目的片段(图1),从图1可知,电泳条带单一,无拖尾,特异性强,与预期大小一致。TA克隆到中间载体pEASY-Blunt、转化大肠杆菌感受态后测序。测序结果表明,该序列全长918 bp,编码1条含有305个氨基酸的多肽,命名为MeNOSIP(Phytozome编号:Manes.S039100.1;GeneBank登录号:XM\_021746786.1)。

**2.2 MeNOSIP蛋白的理化性质分析** 对MeNOSIP蛋白进行理化性质分析,MeNOSIP蛋白分子式为 $C_{1475}H_{2374}N_{424}O_{453}S_{23}$ ,相对分子质量约为 $34.03 \times 10^3$ ,等电点约为8.95。此蛋白富含赖氨酸(11.8%),亮氨酸(9.2%),谷氨酸(7.5%),丝氨酸(7.2%)。蛋白不稳定指数为46.82,属于不稳定蛋白。对MeNOSIP做亲水性分析,从图2可知,该蛋白亲水系数为-0.628,属于亲水类蛋白。通过预测发现MeNOSIP定位于细胞膜。

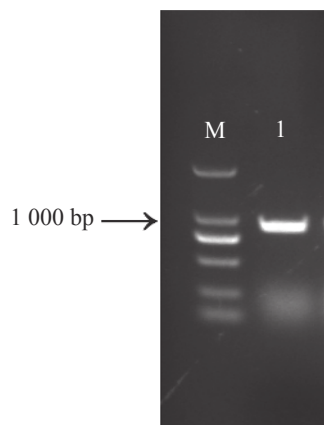


图1 MeNOSIP PCR 扩增

M: DL2000 DNA Maker; 1: MeNOSIP 的扩增产物。

Fig. 1 Amplification of the full length cDNA of MeNOSIP

M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product of MeNOSIP.

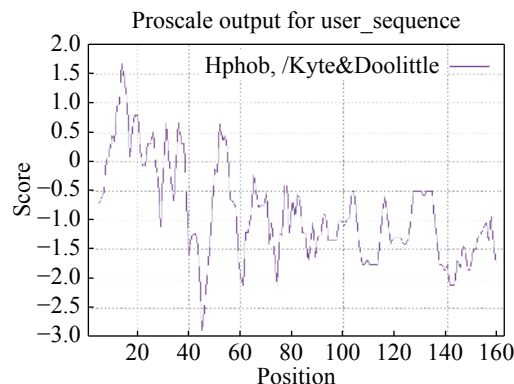


图2 木薯 MeNOSIP 蛋白亲水性分析  
负值表示亲水性,正值表示疏水性。

Fig. 2 Hydropilia analysis of MeNOSIP protein

Negative values: hydrophilic; positive values: hydrophobicit.

**2.3 MeNOSIP的染色体定位** 利用Phytozome网站下载木薯全基因组数据,在MapGene2chrom上分析MeNOSIP染色体定位。结果如图3所示:MeNOSIP基因定位在木薯第17号染色体上,基因位置从第14 842 551位碱基到14 844 636位碱基。

**2.4 MeNOSIP的进化分析** 应用MEGA 7.0对木薯(XM\_021746786.1),拟南芥(AT1G61620),水稻(LOC4332437),巴西橡胶树(LOC110661181),烟草(LOC107823767),番茄(LOC101247881),马铃薯(LOC102602935),玉米(LOC1103639300),大麦(AK370636.1)的NOSIP蛋白序列进行多序列比较和构建进化树。从图4可知:木薯NOSIP与巴西橡胶树的NOSIP亲缘关系最近,约为92.81%,与水稻,玉米的亲缘关系较远。

**2.5 MeRbohD与MeNOSIP蛋白的验证** 自激活检测中,实验组(BD-MeNOSIP+AD)和阳性对照(AD-largeT+BD-p53)、阴性对照(AD-largeT+BD-laminC)的酵母在SD/TL平板上均能正常生长,但仅有阳性对照在SD/TLHA平板上生长,在SD/TLHA+ x-α-gal平板上酵母菌落变蓝,实验组的生长状态与对照一致

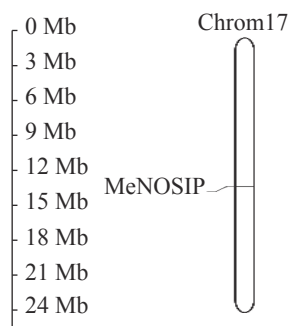


图3 木薯 MeNOSIP 染色体定位

Fig. 3 Chromosomal localization of the MeNOSIP gene in cassava

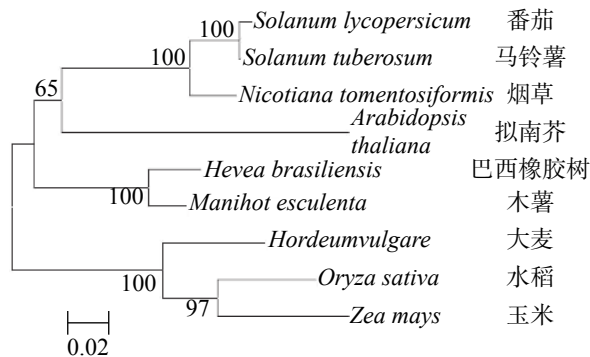


图4 不同物种的NOSIP聚类分析

Fig. 4 NOSIP cluster analysis

(图 5), 实验表明, MeNOSIP 不具有自激活活性。在酵母双杂交验证中, 实验组 (AD-MeRbohD+BD-MeNOSIP) 和对照在 SD/TL 平板上均能正常生长, 仅有实验组和阳性对照在 SD/TLHA 平板上生长, 且在 SD/TLHA+x- $\alpha$ -gal 平板上酵母菌落变蓝(图 6), 结果表明, MeNOSIP 蛋白与 MeRbohD 蛋白存在互作作用。

2.6 MeNOSIP 表达模式分析 分析木薯 *MeRbohD* 和 *MeNOSIP* 基因在植物激素 JA, SA, ABA 诱导下的表达模式, 结果分别如图 7A, B 所示。实验发现, *MeRbohD* 均能在早期响应 3 种激素的诱导, 分别在 JA,

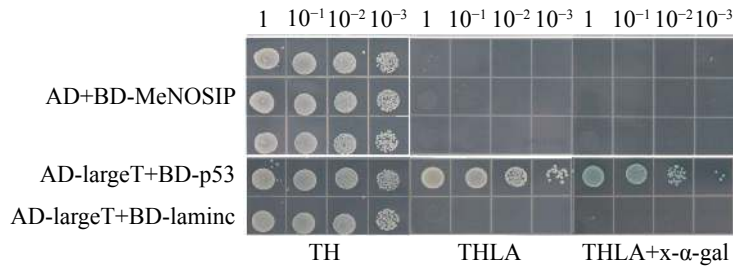


图 5 MeNOSIP 蛋白自激活检测

Fig. 5 Self-activation assay of *MeNOSIP*

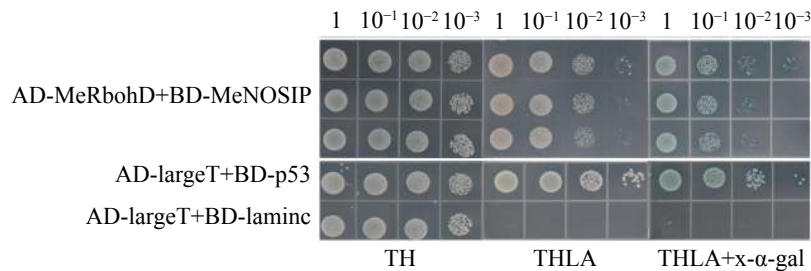


图 6 酵母双杂交验证 MeRbohD 和 MeNOSIP 的互作

Fig. 6 Identification of the interaction between *MeRbohD* and *MeNOSIP* by yeast two-hybrid assays

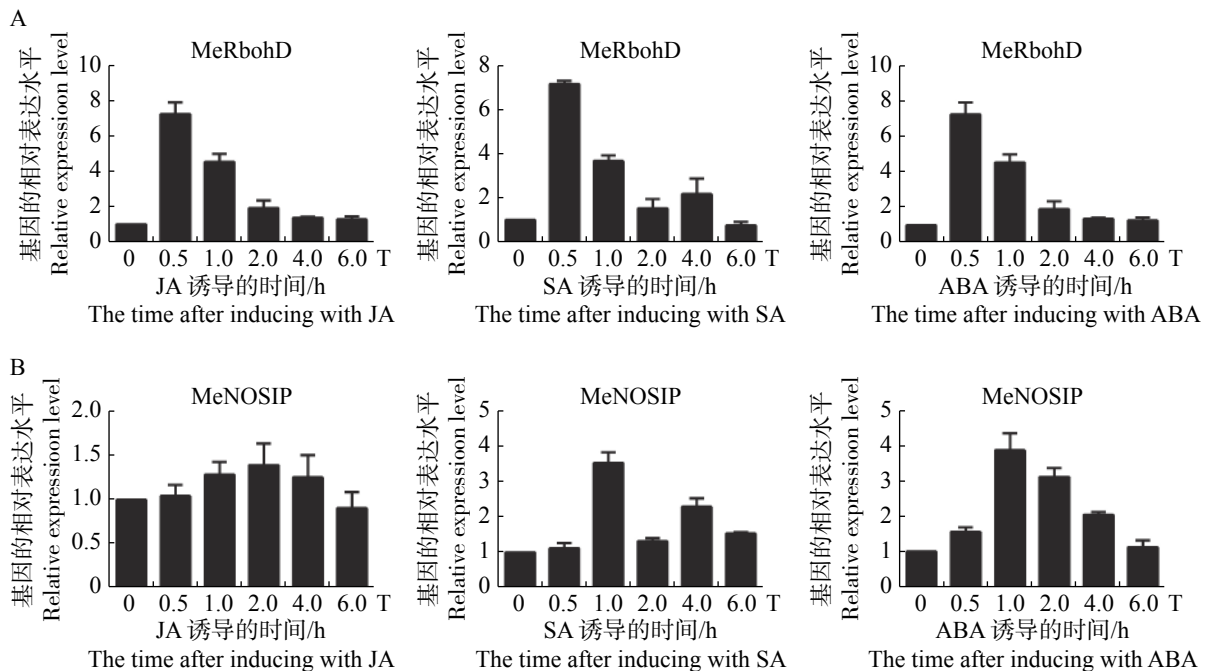


图 7 *MeRbohD*, *MeNOSIP* 受到激素 JA, SA 和 ABA 诱导后的表达分析

A: *MeRbohD*; B: *MeNOSIP*.

Fig. 7 Expression analysis of *MeRbohD* and *MeNOSIP* induced by JA, SA and ABA, respectively



SA 处理 30 min 后, ABA 处理 3 h 后基因表达上调 5 ~ 10 倍。JA 处理下 *MeNOSIP* 的表达量没有明显的变化, 推测 *MeNOSIP* 可能不参与 JA 引起的信号传导。SA 处理 1 h 后和 ABA 处理 3 h 后, *MeNOSIP* 的表达量上调约 4 倍。在 ABA 的诱导下, *MeRbohD* 与 *MeNOSIP* 基因的表达量变化水平基本一致, 因此, 推测 *MeRbohD* 和 *MeNOSIP* 可能共同参与了由 ABA 介导抗逆通路。

### 3 讨论

木薯作为热区重要的经济和粮食作物, 其产量受到生物胁迫(细菌性枯萎病、褐色条斑病、粉蚧等)和非生物胁迫(低温、干旱)的制约, 同时在木薯收获后, 块根易发生生理性腐烂, 不耐贮藏。ROS 是植物中重要的信号分子, 在调控生长发育、应对非生物胁迫和激发植物免疫反应中都起着重要的作用<sup>[19]</sup>。提高木薯块根清除 ROS 的能力, 有利于延缓生理性腐烂的发生。*RbohD* 作为 ROS 产生过程中的关键基因, 在植物响应逆境胁迫过程中发挥着重要作用。植物 *Rboh* 的酶活性受到其互作蛋白的调控, 如 *AtBik1*, *OsRac1*。在获得 *MeRbohD* 新的候选互作蛋白 *MeNOSIP* 的基础上, 本研究中笔者克隆了 *MeNOSIP* 的编码基因, 全长 918 bp, 编码 305 个氨基酸, *MeNOSIP* 蛋白分子式为  $C_{1475}H_{2374}N_{424}O_{453}S_{23}$ , 相对分子质量约为  $34.03 \times 10^3$ , 等电点约为 8.95。*MeNOSIP* 基因定位于木薯 17 号染色体, 蛋白与巴西橡胶树 *NOSIP* 有较高的同源性(92.81%)。亚细胞定位预测 *MeNOSIP* 蛋白存在于细胞膜上。

目前, 在植物中有还没有关于 *NOSIP* 的功能研究报道。*NOSIP* 作为一氧化氮合酶(NOS)的伴侣蛋白, 与 NOS 互作调节生物体内一氧化氮水平<sup>[20]</sup>。细胞内  $Ca^{2+}$  通过与钙调蛋白的相互作用来激活神经元的一氧化氮合酶(NOS)家族催化产生一氧化氮<sup>[21]</sup>。一氧化氮(NO)作为一种高效的信号分子, 与活性氧(ROS)反应生成更强大的氧化剂活性氮(RNS)调节细胞功能<sup>[22]</sup>, 信号传导途径和各种病理过程中发挥着重要作用<sup>[22]</sup>。ROS 和 RNS)作为细胞内的第 2 信使参与信号转导, 细胞生长, 分化。但过量的 ROS 和 RNS 的产生会导致严重的细胞损伤。*NOSIP* 则在这一过程中负责调节神经元细胞中的一氧化氮稳态<sup>[20]</sup>。

本实验成功克隆得到 *MeRbohD* 和 *MeNOSIP* 的编码基因, 采用酵母点对点杂交方法验证了 *MeNOSIP* 与 *MeRbohD* 互作关系。*MeNOSIP* 蛋白预测定位于细胞膜, 推测 *MeRbohD* 与 *MeNOSIP* 互作位置在细胞膜上。进一步研究发现, JA, SA, ABA 均能诱导 *MeNOSIP* 与 *MeRbohD* 的表达量提高, 特别是在 ABA 的诱导下, *MeRbohD* 与 *MeNOSIP* 的表达量变化趋势一致, 因此, 推测 *MeRbohD* 和 *MeNOSIP* 可能共同参与了由 ABA 介导抗逆通路。在神经元细胞中 *NOSIP* 与 NOS(一氧化氮合酶)互作调控胞内一氧化氮水平<sup>[20]</sup>。在哺乳动物的吞噬细胞中一氧化氮与活性氧(ROS)反应形成活性氮(RNS)作为第 2 信使进行信号传导<sup>[22]</sup>。因此, 推测在木薯防卫反应中, *RbohD* 与 *NOSIP*、NOS 三者之间相互作用调控胞内 RNS 的生成, 进行信号传导。本研究所用到的酵母 cDNA 文库是由木薯致病细菌致病细菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) 处理木薯 SC8 植株后构建得到的。推测木薯细胞膜表面的模式识别受体接受到病原微生物激发的信号后, 激活细胞内一系列信号传导和防卫反应, 例如  $Ca^{2+}$  增加, MAPK 的活化, 激活了细胞膜上 *MeRbohD* 的活性, 导致 ROS 的爆发, 与 *MeNOSIP* 互作调控胞内一氧化氮的生成、气孔关闭, 胼胝质沉淀等。本实验验证了 *MeNOSIP* 与 *MeRbohD* 的真实互作, 笔者推测在木薯细胞膜上 *MeNOSIP* 与 *MeRbohD* 互作, 并能调控 *MeRbohD* 的活性, 进而调节植物细胞中 ROS 的生成。

### 参考文献:

- [1] BABIOR B M, LAMBETH J D, NAUSEEF W. The neutrophil NADPH oxidase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 397(2): 342 - 344.
- [2] TORRES M A, DANGL J L, JONES J D G. Arabidopsis gp<sup>91phox</sup> homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(1): 517 - 522.
- [3] TORRES M A, DANGL J L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(4): 397 - 403.

- [4] MILLER G, SCHLAUCH K, TAM R, et al. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli [J]. *Science Signaling*, 2009, 2(84): 45.
- [5] DENNESS L, MCKENNA J F, SEGONZAC C, et al. Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species-and jasmonic acid-dependent process in Arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 1364 – 1374.
- [6] KADOTA Y, SHIRASU K, ZIPFEL C. Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(8): 1472 – 1480.
- [7] MA L, ZHANG H, SUN L, et al. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> homeostasis in Arabidopsis under salt stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(1): 305 – 317.
- [8] TORRES M A, JONES J D G, DANGL J L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 373 – 378.
- [9] KOBAYASHI M, OHURA I, KAWAKITA K, et al. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase [J]. *The plant cell*, 2007, 19(3): 1065 – 1080.
- [10] OGASAWARA Y, KAYA H, HIRAOKA G, et al. Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(14): 8885 – 8892.
- [11] DUBIELLA U, SEYBOLD H, DURIAN G, et al. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(21): 8744 – 8749.
- [12] HASSANAIN H H, SHARMA Y K, MOLDOVAN L, et al. Plant Rac proteins induce superoxide production in mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272: 783 – 788.
- [13] WONG H L, PINONTOAN R, HAYASHI K, et al. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(12): 4022 – 4034.
- [14] MARUTA T, INOUE T, TAMOI M, et al. Arabidopsis NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor [J]. *Plant Science*, 2011, 180(4): 655 – 660.
- [15] HU W, XIA Z Q, YAN Y, et al. Genome-wide gene phylogeny of CIPK family in cassava and expression analysis of partial drought-induced genes [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015(6): 914.
- [16] 卢赛清, 盘欢, 马崇熙, 等. 2008 年广西木薯低温冻害情况及应对措施[J]. *广西热带农业*, 2009(1): 21 – 22.
- [17] OKOGBNIN E, SETTER T L, FERGUSON M, et al. Phenotypic approaches to drought in cassava [J]. *Frontiers in Physiology*, 2013(4): 93.
- [18] 方佳, 濮文辉, 张慧坚. 国内外木薯产业发展近况[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(16): 353 – 361.
- [19] VRANOVA E, INZE D, VAN B F. Signal transduction during oxidative stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1227 – 1236.
- [20] DREYER J, HIRLINGER D, MULLER-ESTERL W, et al. Spinal upregulation of the nitric oxide synthase-interacting protein NOSIP in a rat model of inflammatory pain [J]. *Neuroscience Letters*, 2003, 350(1): 13 – 16.
- [21] GARTHWAITE J, CHARLES S L, CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain [J]. *Nature*, 1988, 336(6197): 385 – 388.
- [22] HALLIWELL B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? [J]. *Trends in biochemical sciences*, 2006, 31(9): 509 – 515.

## Verification of the Interaction Between Cassava MeNOSIP and MeRbohD Proteins and Their Response to Exogenous Hormones

ZHAO Rui<sup>1,2</sup>, FAN Ruochen<sup>1</sup>, DING Kaixuan<sup>1</sup>, TANG Zhijuan<sup>1</sup>, WANG Honggang<sup>1</sup>,  
HUANG Siyuan<sup>1</sup>, JIANG Lingyan<sup>1</sup>, CHEN Yinhua<sup>1</sup>, GENG Mengting<sup>1</sup>

(1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. College of Life Science and Pharmacy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** *MeNOSIP* (Nitric oxide synthase interaction protein) gene coding region sequence in cassava was obtained by RT-PCR cloning based on the MeRbohD candidate interaction protein MeNOSIP to study the

function of cassava *MeRbohD* in the disease resistance pathway. Bioinformatics analysis revealed that the CDs sequence of *MeNOSIP* was 918 bp, encoding a polypeptide containing 305 amino acids, and *MeNOSIP* belongs to an unstable hydrophilic protein. The subcellular localization predicted the expression of *MeNOSIP* on the cell membrane. Yeast hybridization was used to verify the true interaction between *MeRbohD* and *MeNOSIP*. *MeRbohD* and *MeNOSIP* genes were up-regulated under the induction of JA, SA, and ABA treatment, and *MeRbohD* and *MeNOSIP* gene expression under the ABA treatment tended to be consistent, which indicated that they might be involved in the ABA-mediated stress resistance pathway.

**Keywords:** *MeRbohD*; interaction protein; *MeNOSIP*; expression analysis

(责任编辑:潘学峰)

(上接第 169 页)

## Morphology of *Thuidium cymbifolium* and GC-MS Analysis of Its Volatile Compounds

QIN Xinting<sup>1,2,3</sup>, YANG Lin<sup>4</sup>, XU Qiongyu<sup>3</sup>, HU Xu<sup>5</sup>, WANG Xinguang<sup>1,3</sup>, ZHANG Lina<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Center for Terrestrial Biodiversity of the South China Sea, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 3. College of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 4. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 5. College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** *Thuidium cymbifolium*, a traditional medicine, was collected from Limu Mountain in Hainan to observe its morphology and analyze its volatile composition. Its morphology was compared with that of its 4 relatives and varieties to find out their morphological difference, and its volatile compounds was extracted by using accelerated solvent extraction (ASE) with petroleum ether as solvent and then analyzed by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analysis showed that the volatile compounds of *T. cymbifolium* were identified to contain 31 constituents, accounting for 91.1% of the total chemical composition. The main constituents were esters (25.48%), terpenes (22.64%), ketones (20.64%) and sterols (10.61%), including butyl butyrate (18.96%), 4-heptanone (10.90%), squalene (10.75%) and 4-heptanone,3-methyl (9.74%).

**Keywords:** *Thuidium cymbifolium*; morphological characteristics; volatile constituents; GC-MS

(责任编辑:潘学峰)