

· 热带作物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240146



主持人: 张洪亮, 徐 冉

MeDAWDLE 基因的克隆和蛋白功能验证

谭梦婷[#], 徐浩然, 曾鸿秋^{*}

(海南大学 热带农林学院/海南省耐盐作物生物技术重点实验室, 海南 海口 570228 中国)

摘 要: 为探究 MeDAWDLE 蛋白功能, 以木薯‘华南 124 号’为材料, 通过 PCR 扩增对 MeDAWDLE 进行分离和鉴定。分析进化树发现, MeDAWDLE 蛋白与苹果中的 DAWDLE 蛋白具有 76.3% 的同源性。蛋白序列的理化性质分析显示, MeDAWDLE 蛋白大小为 52 kDa, 理论等电点为 5.04, 表达分析发现 MeDAWDLE 在木薯不同组织器官中均有表达, 并在胁迫条件下表达上调。通过构建表达载体完成蛋白诱导, 并在进一步的蛋白功能分析中发现, MeDAWDLE 能显著提升木薯的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平及抗病能力, 表明 MeDAWDLE 可能在木薯的胁迫响应中发挥着重要作用。

关键词: 木薯; DAWDLE 蛋白; 载体构建; 原核表达

中图分类号: S533; Q344.13

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)03-0370-09

谭梦婷, 徐浩然, 曾鸿秋. MeDAWDLE 基因的克隆和蛋白功能验证 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(3): 370-378.

doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240146

木薯(*Manihot esculenta*)含有丰富的淀粉、矿物质和少量的蛋白质^[1], 是世界第六大粮食作物^[2]。木薯耐贫瘠, 但经常遭受各种病害的侵袭^[3], 如细菌性枯萎病、花叶病、褐斑病等。其中, 木薯细菌性枯萎病由地毯草黄单胞菌属木薯萎蔫致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xam*)引起, 是木薯最严重的世界性病害之一, 对木薯产量能造成 50%~75% 的损失^[4]。因此, 挖掘木薯候选抗病基因, 培育优良木薯抗病品种, 是当前需要解决的问题。

为了抵抗病原菌的侵染, 植物通过一系列的抗病基因和抗病信号分子产生复杂的免疫防卫反应^[5]。例如, 植物通过模式触发免疫(pattern-triggered immunity, PTI)^[6]及效应触发免疫(effector-triggered immunity, ETI)^[7]来识别和对抗发病机制, PTI 会触发快速而短暂的活性氧(reactive oxygen species, ROS)爆发, 而 PTI 和 ETI 的共同激活则会导致二次持续的 ROS 产生^[8]。ROS 不仅可以对病原物直接造成损伤, 还可以作为信号分

子传递信号诱导植物细胞的程序性死亡从而限制病原物^[9]。

DAWDLE(DDL)是一类含有保守叉头相关结构域(forkhead-associated domain, FHA)的蛋白, 该类蛋白在植物发育和免疫中发挥了重要作用。Feng 等^[10]利用筛选拟南芥免疫缺陷型突变体的手段以及生化实验方法, 鉴定到拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 DAWDLE 蛋白能够通过多聚 ADP-核糖化(poly ADP-ribosylation, PARylation)修饰来启动对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC3000)的免疫反应, 且在 DDL 突变体中, 防御基因表达和胼胝质沉积减少, 表明 DDL 在晚期免疫反应中起作用^[11]。在拟南芥中 DAWDLE 能够结合 DCL1(Dicer-like 1)和 DCL3(Dicer-like 3)后调节 DCL 酶的活性, 从而调节内源 small RNA 生成^[12]。有研究发现在过表达 miR394(microRNAs)后拟南芥会对灰孢杆菌(*Botrytis cinerea*)感染表现出易感性, 而在侵染灰孢杆菌前 miR394 过表达株中 DDL 的表达水平呈

收稿日期: 2024-09-15

修回日期: 2024-10-11

基金项目: 海南省研究生创新科研课题(Qhys2023-233, Qhys2022-69)

[#]第一作者: 谭梦婷(1998—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。Email: 15927947285@163.com

^{*}通信作者: 曾鸿秋(1991—), 男, 副教授。研究方向: 作物抗病分子生物学。Email: zhq@hainanu.edu.cn

上升状态,但在拟南芥受到灰孢杆菌侵染后 *DDL* 的表达水平则受到抑制^[13]。*DAWDLE* 除了参与植物免疫防御外还影响其生长发育,前人研究发现在拟南芥中 *DAWDLE* 在根和茎的分生组织中表达,*DDL* 突变体导致植株发育迟缓、结实率降低、生长周期延长等多效性生长缺陷^[14]。此外,2022 年 Xiong 等^[15]发现 *DAWDLE* 可以与 bud site selection protein 13 (*BUD13*)、growth development and splicing 1 (*GDS1*)组成 retention and splicing (*RES*)复合体,通过影响前体 RNA 剪接调控拟南芥根与胚发育。现有研究表明 *DAWDLE* 在模式植物中积极参与植物的生长发育和免疫调节过程,然而其在木薯中抗病功能仍不清晰。

为探究 *MeDAWDLE* 蛋白是否参与木薯抗胁迫反应,本研究通过分离鉴定 *MeDAWDLE*,并对其进行了生物信息学分析,通过公共转录组数据分析得到了 *MeDAWDLE* 在不同组织中的表达及对木薯细菌性枯萎病致病菌的响应情况,并完成 *MeDAWDLE*-pET28a 载体构建和蛋白诱导及部分功能验证,为木薯抗病基因挖掘以及精准分子育种提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 本研究的试验材料为木薯品种‘华南 124 号’(South China 124, SC124),种植于本实验室的种质基地。使用的试剂材料有:2×Taq Master MIX(Dye Plus)(Cat P112-03,诺唯赞生物科技)、2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Cat Q711-02,诺唯赞生物科技)、西班牙琼脂粉(Cat 162135, Biowest)、通用型 DNA 纯化回收试剂盒(Cat DP214-03,天根生化科技)、RNA 提取酚试剂(Cat W0250, Solarbio)、反转录试剂盒(Cat K1622, 赛默飞)、β-巯基还原剂(Cat M8210, Solarbio)、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)(Cat I8070-5g, Solarbio)、脱脂奶粉(Cat P0216-300g, 碧云天)、His-tag 抗体(Cat AH367, 碧云天)、生物素标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(Cat A0216, 碧云天)、DH5α(Cat DL1001S, 唯地生物)和 BL21 (DE3)感受态细胞(Cat ZC121-2, 唯地生物)等。

1.2 木薯总 RNA 的提取以及反转录 将适量的叶片放入到研钵中,利用液氮将其研磨成粉末后,

用 CTAB 提取液提取 RNA,并使用反转录试剂盒将其反转录成 cDNA,放入-80 ℃ 冰箱保存^[16]。

1.3 基因克隆 根据在线数据库中木薯的数据,查找到 *MeDAWDLE*(Phytozome 数据库编号:Manes.03G127500)的编码序列(coding sequence, CDS),使用 Primer5 软件,设计全长引物 *MeDAWDLE*-F (5'-ATGGCCCCCTTCCTTGCTCG-3')和 *MeDAWDLE*-R (5'-TCAGCCTGCTGAATTC TCGTG-3')。以 cDNA 为模板,进行 *MeDAWDLE* 片段的扩取(表 1),扩增程序为:95 ℃ 3 min; 34 个循环,95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s; 72 ℃ 10 min。将目的片段进行胶回收并与 pEASY-T3 连接,随后通过菌落 PCR 进行验证,选择单一明亮的单克隆,进行测序比对,将测序结果与目的基因序列相同的菌株保存到-40 ℃ 冰箱。

表 1 PCR 体系

Tab. 1 The volume of PCR reaction

试剂 Reagent	体系/μL System/μL
2×Taq Master MIX(Dye Plus)	25.00
dd H ₂ O	20.00
<i>MeDAWDLE</i> -F	1.25
<i>MeDAWDLE</i> -R	1.25
cDNA	2.50

1.4 构建进化树及理化性质分析 从 Phytozome 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中获得的 *MeDAWDLE* 蛋白序列和陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、拟南芥、水稻(*Oryza sativa*)和苹果(*Malus pumila*)中高同源性的蛋白序列比对,通过 MEGA 11.0 绘图软件绘制成完整的系统进化树。在 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)网站进行蛋白大小和等电点预测;利用 NetPhos 3.1 在线预测 *MeDAWDLE* 蛋白的磷酸化位点;在 TMHMM 2.0 分析 *MeDAWDLE* 蛋白的跨膜结构;在 Signal 5.0 对 *MeDAWDLE* 蛋白的信号肽进行预测;使用 Phytozome 中的数据分析其结构域^[17]。

1.5 *MeDAWDLE* 的表达模式分析 通过分析 TCOD gene search(<https://ngdc.cncb.ac.cn/tcod/genes/>)中公共转录组数据得到了 *MeDAWDLE* 在木薯不同部位的表达量;通过在线网站(

solgenomics.net/)选取 *MeDAWDLE* 特异序列,并根据此序列设计定量引物 *qMeDAWDLE-F* (5'-TTCCTTGCTCGCTGAG-3')和 *qMeDAWDLE-R* (5'-ATGGGAGATTGTGAATGACT-3'),用 *Xam* 侵染多株长势相同的木薯,对照株注射 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂,并于受侵染后 0、1、3、6、12、24 h 进行叶片取样后,提取 RNA 并使用反转录试剂盒(Cat K1622,赛默飞)反转录成 cDNA,用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, RT-qPCR)(表 2)分析木薯受侵染后 *MeDAWDLE* 的表达水平变化,每个样品进行 3 次重复。

表 2 荧光实时定量 PCR 反应体系

Tab. 2 The volume of quantitative real-time PCR reaction

试剂 Reagent	体系/ μL System/ μL
2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master MIX	7.5
dd H ₂ O	6.4
<i>qMeDAWDLE-F</i>	0.3
<i>qMeDAWDLE-R</i>	0.3
cDNA	0.5

1.6 原核表达载体的构建及诱导蛋白 挑选构建成功的 *MeDAWDLE*-pEASY-T3 菌株质粒作为模板,用 PCR 扩增(引物: *MeDAWDLE*-pET28a-F (5'-TTGGGGATGGGTCGCGGATCCATGGCCCCCTTCCTTGCTCG-3')和 *MeDAWDLE*-pET28a-R (5'-ACGGAGCTCGAATTCGGATCCGCCTGCTGAATTCTCGTGCA-3'))目的片段(表 1),扩增程序为: 95 °C 3 min; 34 个循环, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s; 72 °C 10 min。采用同源连接将 *MeDAWDLE* 片段连接到 pET28a 载体上,并进行大肠杆菌转化,通过菌落 PCR 验证,以及后续提质粒,酶切验证^[18]。将成功构建的重组质粒转入 DE3 菌株中, 37 °C 摇床进行培养,待 OD₆₀₀ 值达到 0.6,按照体积 1 : 1 000 的比例加入 1 mol·L⁻¹ IPTG,并于 0、3、6 h 时取样菌体各 2 mL,低温保存,超声破碎后 4 °C 离心,取上清进行检测。

1.7 *MeDAWDLE* 重组蛋白的验证 将 37 °C 条件下诱导的菌体超声破碎,离心吸取上清 100 μL ,向其加入 10 μL 上样缓冲液后涡旋混匀,沸水浴 5 min 后,将每个样品等量上样至蛋白胶孔中,然后开始电泳。电泳结束后,将其中一块蛋白胶

进行考马斯亮蓝染色,另一块胶放置于 PVDF (polyvinylidene fluoride)膜上进行转膜,用 1×TBS (tris buffered saline)溶液清洗膜,先倒入牛奶进行孵育后,加入 10 mL 的一抗(His 抗体)孵育 2 h 后,更换二抗进行孵育 1 h,最后用 A、B 显影液进行显影拍照^[19]。

1.8 ROS 检测 取长势一致的木薯,分别用 30、300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的 pET28a 和 *MeDAWDLE*-pET28a 蛋白,并添加体积分数 0.5% 的表面活性剂(Silwet L-77)外源喷施处理木薯叶片 3 d,随后使用圆形打孔器取叶圆,并将背面划伤后朝下放置在水面上过夜;次日将叶圆分别放置在黑色 96 孔酶标板中,配置反应液 [1% 的 Flg22+2% 的鲁米诺+2% 的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)]。将反应液加入放有叶片的酶标板后迅速放入酶标仪中自动检测数据,检测 45 次,持续时间 30 min^[20]。

1.9 *Xam* 侵染 外源蛋白喷施木薯叶片 3 d 后,于第 4 天对木薯叶片背面进行接种实验。事先将实验室保存的 *Xam* 菌体在无抗 LB 平板上划线活化,挑取单菌落加入到无抗 LB 培养基中培养,至 OD₆₀₀ 值为 0.6 时离心,4 000 r·min⁻¹, 10 min。并用 1 mol·L⁻¹ MgCl₂ 重悬,测 OD₆₀₀ 值为 1.0 时,用 1 mL 注射器将菌液侵染至木薯叶片背面。

1.10 菌落数统计 在完成 *Xam* 侵染后,对木薯叶片侵染部位进行 0 d 取样,每个样品取 4 个接种位置(面积约 1 cm²),样品使用体积分数 75% 的乙醇消杀 5 min,随后用灭菌水清洗两次后,将叶片充分研磨,用灭菌水进行 10 倍浓度的梯度稀释,将样品滴定到无抗 LB 平板上,每个样品至少重复 3 次。封板后于 28 °C 摇床中倒置培养 24 h。并统计菌落数以确保病原菌接种程序一致,后续于接种后 4 d 取样,方法同上。

2 结果与分析

2.1 *MeDAWDLE* 的克隆 提取木薯叶片 RNA 并反转录,通过 PCR 扩增获得目的片段(图 1-A)。然后将回收的片段连接到 pEASY-T3 载体后,转入 DH5 α 菌株中,涂板后挑选单菌落进行 PCR 验证,得到了 7 个阳性克隆(图 1-B),摇菌提取质粒后送测序。

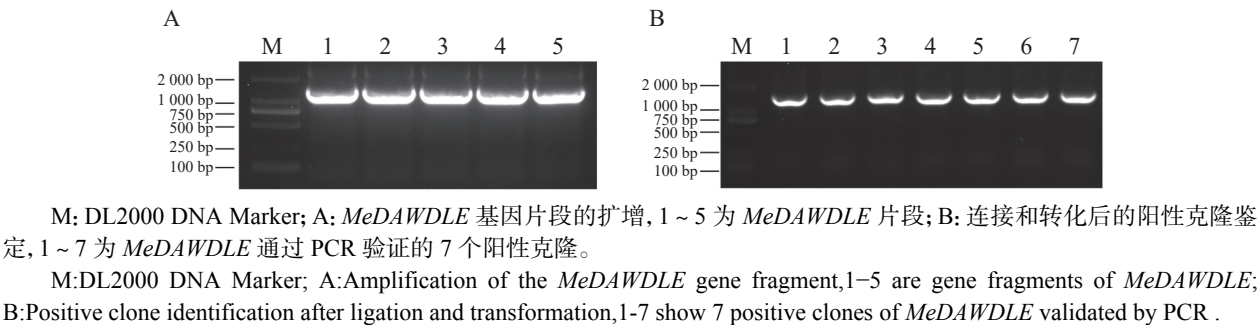


图 1 *MeDAWDLE* 克隆

Fig. 1 *MeDAWDLE* clone

2.2 生物信息学分析

2.2.1 DAWDLE 进化树分析 将所得测序结果输入 NCBI 中比对发现该基因为木薯中的 *DAWDLE*, CDS 序列为 1359 bp, 将目标蛋白序列进行同源 blast

比对, 并通过 MEGA 11.0 构建了木薯、陆地棉、拟南芥、水稻和苹果中的 *DAWDLE* 进化树, 结果显示木薯中的 *DAWDLE* 与苹果中的 *DAWDLE* 蛋白同源性较高, 同源率为 76.3% (图 2-A)。

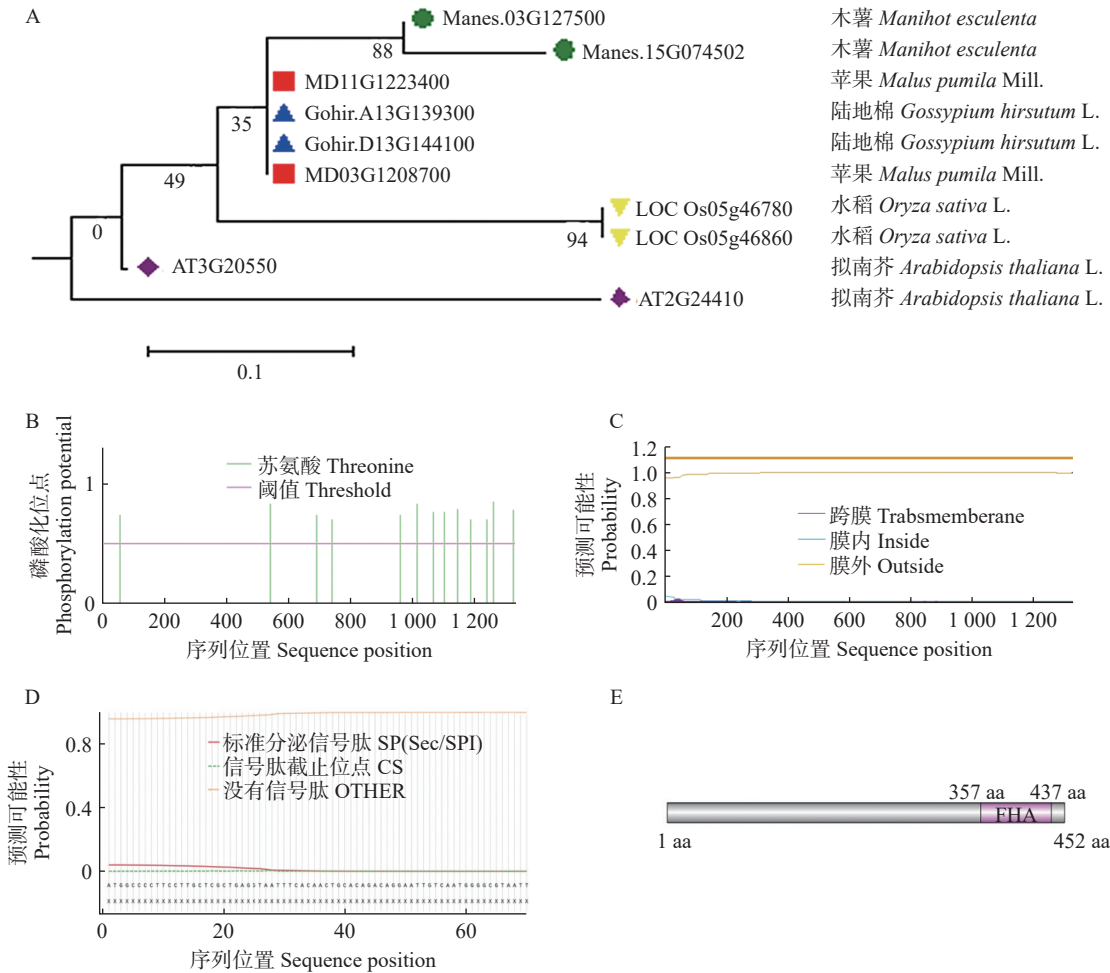
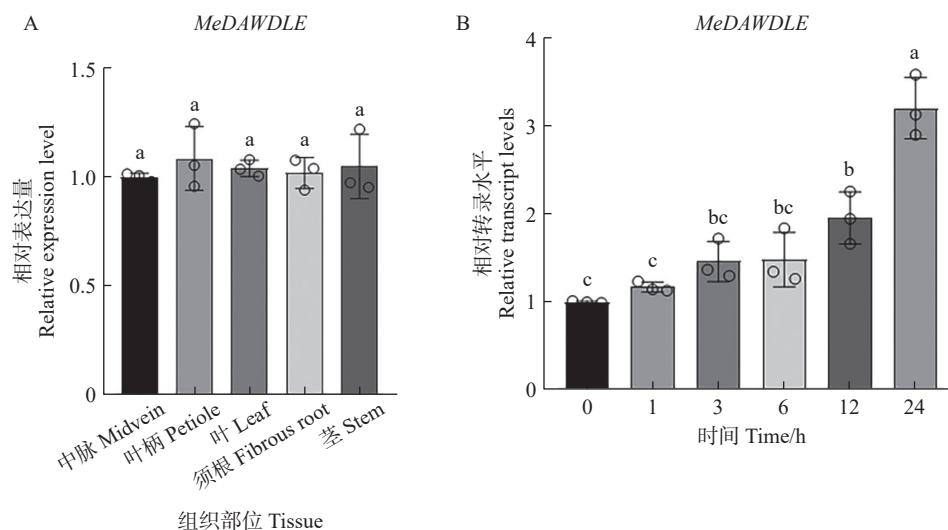


图 2 *MeDAWDLE* 生物信息学分析
Fig. 2 Bioinformatics analysis of *MeDAWDLE*

2.2.2 MeDAWDLE 蛋白结构分析 通过 ProParam 在线预测了 MeDAWDLE 的蛋白分子式为 $C_{4009}H_{6661}N_{1359}O_{1647}S_{259}$, 蛋白分子质量为 52 kDa, 理论等电点 (isoelectric point, PI) 为 5.04, 不稳定系数为 39.86, 为稳定蛋白, 亲水总平均数为 0.831, 表明该蛋白属于疏水蛋白。用 NetPhos 网站在线预测, 发现 MeDAWDLE 的蛋白可能存在磷酸化位点 (图 2-B); 使用 TMHMM 网站发现, 其不存在跨膜结构域 (图 2-C); 通过 SignalP 在线网站预测其无信号肽 (图 2-D); 使用 Phytozome 对其结构进行分析, 发现其氨基酸序列在 357 ~ 437 aa 存在 FHA 结构域 (图 2-E), FHA 是叉头相

关结构域, 其在细胞内发挥着重要的调控作用^[21]。

2.3 MeDAWDLE 的表达模式分析 通过分析 TCOG gene search 中公共转录组数据得到其在木薯不同部位的表达量以及 *Xam* 侵染木薯后基因的表达数据, 发现 MeDAWDLE 在木薯不同组织中均有分布 (图 3-A); 为了探究 MeDAWDLE 在木薯叶片被 *Xam* 侵染后表达量是否发生变化, 分别选取接种后 0、1、3、6、12、24 h 的木薯叶片, 通过 RT-qPCR 检测 MeDAWDLE 的表达量变化。结果表明 MeDAWDLE 的表达量呈上升趋势, 即 MeDAWDLE 可能在木薯抗病过程中发挥一定的作用 (图 3-B)。



A: MeDAWDLE 在木薯不同部位的表达量; B: MeDAWDLE 在 *Xam* 侵染下的表达量。

A: Expression levels of MeDAWDLE in different parts of cassava; B: Expression level of MeDAWDLE under *Xam* infection.

图 3 MeDAWDLE 的表达模式分析

Fig. 3 Expression levels of MeDAWDLE in different parts of cassava

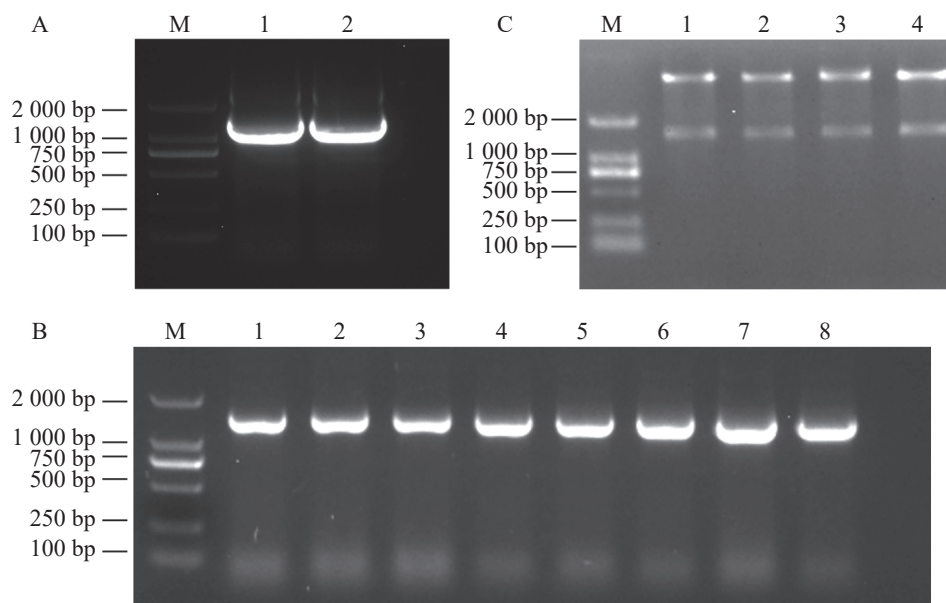
不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, SPSS 26 邓肯单因素多样本差异显著性方差分析)。

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, SPSS 26 Duncan one-way multiple sample analysis of variance).

2.4 原核表达载体构建 挑选构建成功的 MeDAWDLE-pEASY-T3 菌株质粒作为模板, 通过 PCR 扩增获得目的片段 (图 4-A)。使用同源连接将 MeDAWDLE 片段连接到 pET28a 载体上, 涂板后挑选单菌落进行 PCR 验证 (图 4-B), 挑选阳性克隆摇菌提质粒。用 *Bam*H I 酶切验证, 在酶切预测大小 (1359 bp) 出现目的条带, 其中 4 个克隆均能切出目的条带 (图 4-C), 得到 4 个原核表达载体的单克隆。

2.5 MeDAWDLE 重组蛋白诱导验证 将 MeDAWDLE-pET28a 重组质粒转入到 DE3 细胞感

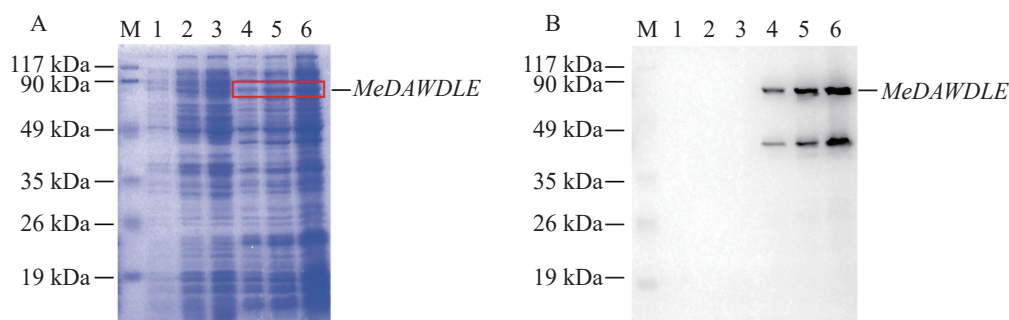
受态后进行蛋白诱导。先将菌液 37 °C 培养直至 OD₆₀₀ 值达到 0.6, 然后按照体积 1 : 1 000 的比例加入 1 mol·L⁻¹ IPTG, 37 °C 诱导, 并将诱导 0、3、6 h 所得的蛋白取样检测, 其中一部分用于考马斯亮蓝染色 (图 5-A), 另一部分用于 Western blot 验证 (图 5-B)。结果显示, 随着时间的推移 MeDAWDLE 的蛋白诱导量越来越高, 在 6 h 的蛋白浓度为 2.2 mg·mL⁻¹, 根据考马斯亮蓝染色 (图 5-A) 和 Western blot (图 5-B) 结果可以确定蛋白诱导成功, 且依据蛋白大小预测结果, 再加上载体上融合的氨基酸序列, 可确定上面条带是目的条带。



M: DL2000 DNA Marker; A: *MeDAWDLE* 扩增, 1~2 是以 T 载作为模板扩增的 *MeDAWDLE*; B: 同源重组后菌落 PCR, 1~8 表示 PCR 检验; C: 同源重组后验证, 1~4 表示酶切 4 个 *MeDAWDLE*-pET28a 载体。

M:DL2000 DNA Marker; A:*MeDAWDLE* amplification, 1-2:*MeDAWDLE* amplified using T-carrier as a template; B:Colony PCR after homologous recombination,1-8: PCR testing; C:Verification after homologous recombination,1-4: Enzyme digestion of 4 *MeDAWDLE*-pET28a vectors.

图 4 *MeDAWDLE*-pET28a 载体构建
Fig. 4 Construction of *MeDAWDLE*-pET28a vector



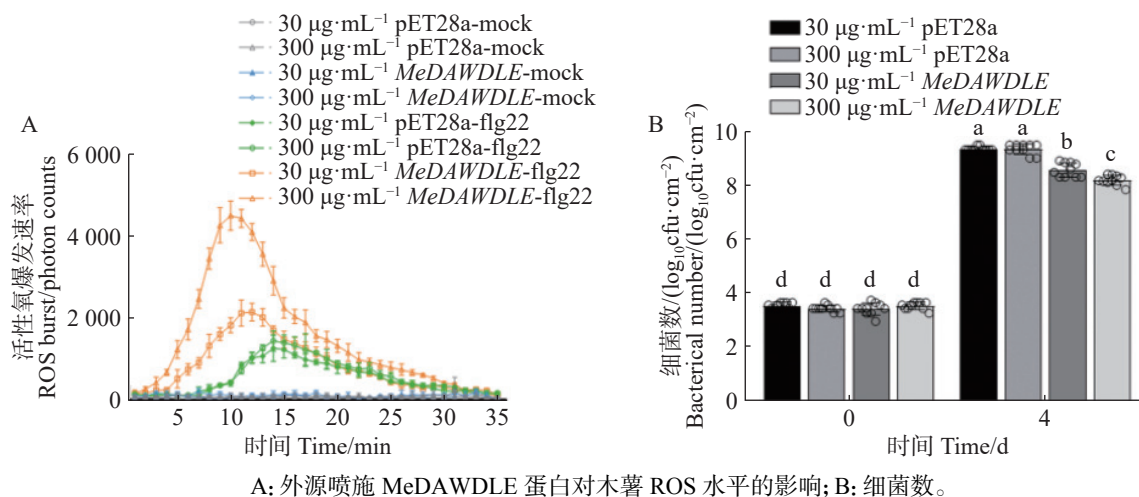
M: 预染蛋白质分子质量标准 (19~117 kDa); A: 考马斯亮蓝染色检验, 从左到右依次为对照蛋白的 0、3、6 h 的上清液, *MeDAWDLE*-pET28a 蛋白 0、3、6 h 的上清液; B: Western blot 检验, 从左到右依次为对照蛋白的 0、3、6 h 的上清, *MeDAWDLE*-pET28a 蛋白 0、3、6 h 的上清液。

M:Pre-stained protein markers (19-117 kDa); A:Coomassie brilliant blue staining test, From left to right, the supernatants of control protein at 0, 3, 6 h, and the supernatants and precipitation of *MeDAWDLE*-pET28a protein at 0, 3, 6 h; B:Western blot test, From left to right, the supernatants of control protein at 0, 3, 6 h, and the supernatants and precipitation of *MeDAWDLE*-pET28a protein at 0, 3, 6 h.

图 5 *MeDAWDLE* 蛋白诱导表达
Fig. 5 Induced expression of the *MeDAWDLE* protein

2.6 *MeDAWDLE* 蛋白功能验证 为了明确 *MeDAWDLE* 蛋白的功能, 本研究使用两个浓度梯度: 30 和 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 *MeDAWDLE*-pET28a, 加上 pET28a 蛋白, 喷施木薯叶片 3 d 后进行 ROS 检测。试验结果显示, 与对照相比, 喷施 *MeDAWDLE*-pET28a 蛋白后, 木薯植株由 flg22 诱导的 ROS 爆发更为剧烈, 且喷施 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

蛋白处理组的 ROS 爆发水平显著高于喷施 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的处理组 (图 6-A); 此外, 在完成外源蛋白喷施处理后, 在木薯叶片上侵染 *Xam*, 在对侵染后 0 d 和 4 d 的叶片细菌数进行定量分析发现, 与对照相比喷施 *MeDAWDLE*-pET28a 蛋白后的木薯细菌数更少, 且 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白浓度比 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理后抗病效果更好 (图 6-B), 结果说



A: 外源喷施 MeDAWDLE 蛋白对木薯 ROS 水平的影响; B: 细菌数。
A: The effect of exogenous MeDAWDLE protein sprayed on ROS levels; B: Bacterial count.

图 6 MeDAWDLE 蛋白功能验证

Fig. 6 Functional validation of MeDAWDLE protein

明 MeDAWDLE 可能正调控了木薯对细菌性枯萎病的抗性。

3 讨论

DAWDLE 是一类含有保守 FHA 结构域的蛋白, 在植物中 FHA 结构域作为一种磷酸肽识别结构域, 其结构蛋白通过独特的结构域和相互作用模式在细胞内发挥着重要的调控作用, 确保细胞的正常生理功能和对外界环境的适应能力^[22]。在拟南芥中 FHA 结构域蛋白激酶相关蛋白磷酸酶 (kinase-associated protein phosphatase, KAPP) 通过 FHA 结构域与多种受体样激酶 (receptor-like kinases, RLKs) 相互作用, 如: BRI1 (brassinosteroid insensitive 1)、BAK1 (BRI1-associated kinase 1) 和 FLS2 (Flagellin sens 2), 使 RLKs 去磷酸化, 导致 RLKs 激酶的活性降低和信号减弱, 从而调控植物生长和响应病原体等多种信号通路^[23]; 在拟南芥中 DDL 蛋白通过 FHA 结构域结合 DCL1 和 DCL3 后调节两者酶活性来影响拟南芥体内的 small RNA 生成^[12], 在木薯中, 通过结构与分析发现 MeDAWDLE 氨基酸序列在 357 ~ 437 aa 的位置上含有 FHA 结构域, 且与苹果中的 DAWDLE 蛋白同源性为 76.3%, 由此推测, FHA 可能介导 DDL 与其他蛋白的互作。此外还有研究报道发现 DAWDLE 蛋白可以与 AtBUD13、GDS1 组成一个 RES 复合体, 调控拟南芥根与胚的发育^[15]; 并且其蛋白的多聚 ADP-核糖化修饰能够调控拟南芥对 *Pst* DC3000 的免疫反应^[11]。但在木薯中 DDL

是否通过 FHA 结构域与其他蛋白互作以及是否存在类似的生物学功能还有待进一步研究。

本研究通过分离鉴定了 MeDAWDLE 并明确了其在 *Xam* 侵染下的表达差异。通过木薯在胁迫下一些基因的差异性表达, 进而可知这些基因的表达差异对于理解其适应环境和抵抗胁迫的分子机制是很重要的。如木薯中有多个 CC 类谷氧还蛋白 (glutaredoxins, GRXs) 在叶片中的表达受干旱胁迫的诱导, 其中 MeGRXC3 通过调控过氧化氢酶的活性促使木薯应对干旱胁迫^[24]; 并且在木薯中验证了 SR (arginine/serine-rich) 蛋白在植物应对盐胁迫反应中的关键作用, 且其中 MeRS40 的转录水平在盐胁迫下被明显诱导^[25]; 除此之外, 在木薯受到 *Xam* 侵染后, *MebHLH149* 在侵染早期表达水平显著上调, 通过参与关键信号级联增强了植物对病原体的反应能力^[26]。即 MeDAWDLE 在木薯受 *Xam* 侵染后会被显著诱导表达, 表明其可能参与到木薯的免疫调控反应过程。

本研究诱导表达 MeDAWDLE-pET28a 蛋白, 并对其蛋白功能进行初步验证, 发现 MeDAWDLE 可能正调控了木薯对细菌性枯萎病的抗性。ROS 是植物激活免疫反应的关键信号^[27], 在小麦研究中发现来源于黄花叶病毒 (wheat yellow mosaicvirus, WYMV) 的 VsiRNA (virus-derived small interference RNA) 通过调控 ROS 信号激活植物免疫反应^[28]; 在拟南芥中研究发现 PRR (pattern recognition receptor) 激活的蛋白激酶 BIK1 (botrytis-induced kinase 1) 和 MPK4 (mitogen-activated protein kinase

4)对脂质激酶 DGK5(diacylglycerol kinase 5)的差异磷酸化反向调节磷脂酸(phosphatidic acid, PA)爆发,从而调节 ROS 的产生影响植物免疫^[29]。本研究发现喷施 MeDAWDLE 蛋白能诱导 ROS 的爆发,进而表明 MeDAWDLE 可能参与调控木薯的抗逆性。小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)效应蛋白 Hasp98 能够与小麦抗病正调控因子 TaMAPK4(mitogen-activated protein kinase 4)互作,并抑制 TaMAPK4 激酶活性,调控寄主免疫促进条锈菌侵染^[30]。本研究发现对于喷施 MeDAWDLE 蛋白后再侵染 *Xam* 的木薯,其细菌数明显低于对照组,这说明外源喷施 MeDAWDLE 蛋白增强了木薯的抗病性。

综上所述,本研究通过部分生物信息学分析、构建表达载体完成蛋白诱导以及后续的蛋白功能验证,揭示了 MeDAWDLE 对木薯活性氧水平的积极调控并初步确定其参与木薯免疫应答过程中,能够为木薯的抗逆性基因研究提供新的参考。

参考文献:

- [1] LIN Z J D, TAYLOR N J, BART R. Engineering disease-resistant cassava[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2019, 11(11): a034595.
- [2] ZÁRATE-CHAVES C A, DE LA CRUZ D G, VERDIER V, et al. Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(12): 1520 – 1537.
- [3] 时涛,李超萍,王国芬,等. 中国木薯病害研究进展与展望[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(12): 2355 – 2368.
- [4] YOODEE S, KOBAYASHI Y, SONGNUAN W, et al. Phytohormone priming elevates the accumulation of defense-related gene transcripts and enhances bacterial blight disease resistance in cassava[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 122: 65 – 77.
- [5] 崔亚宁,钱虹萍,赵艳霞,等. 模式识别受体的胞内转运及其在植物免疫中的作用[J]. *植物学报*, 2020, 55(3): 329 – 339.
- [6] CHANG M, CHEN H, LIU F Q, et al. PTI and ETI: convergent pathways with diverse elicitors[J]. *Trends in Plant Science*, 2022, 27(2): 113 – 115.
- [7] HERMANS D, VAN BEERS L, BROUX B. Nectin family ligands trigger immune effector functions in health and autoimmunity[J]. *Biology*, 2023, 12(3): 452.
- [8] WANG D, YUAN M H, ZHUANG Y M, et al. DGK5-mediated phosphatidic acid homeostasis interplays with reactive oxygen species in plant immune signaling[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(7): 1263 – 1265.
- [9] YU X Q, NIU H Q, LIU C, et al. PTI-ETI synergistic signal mechanisms in plant immunity[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(8): 2113 – 2128.
- [10] FENG B M, MA S S, CHEN S X, et al. PARylation of the forkhead-associated domain protein DAWDLE regulates plant immunity[J]. *EMBO Reports*, 2016, 17(12): 1799 – 1813.
- [11] BIGEARD J, COLCOMBET J, HIRT H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI)[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(4): 521 – 539.
- [12] ZHANG S X, DOU Y C, LI S J, et al. DAWDLE interacts with DICER-LIKE proteins to mediate small RNA biogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2018, 177(3): 1142 – 1151.
- [13] TIAN X, SONG L P, WANG Y, et al. miR394 Acts as a negative regulator of *Arabidopsis* resistance to *B. cinerea* infection by targeting *LCR*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 903.
- [14] MORRIS E R, CHEVALIER D, WALKER J C. *DAWDLE*, a forkhead-associated domain gene, regulates multiple aspects of plant development[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(3): 932 – 941.
- [15] XIONG F, REN J J, WANG Y Y, et al. An *Arabidopsis* retention and splicing complex regulates root and embryo development through pre-mRNA splicing[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(1): 621 – 639.
- [16] PARK S J, CHOI S W, KIM G M, et al. Light-stabilized FHA2 suppresses miRNA biogenesis through interactions with DCL1 and HYL1[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(4): 647 – 663.
- [17] BROOKS III L, HEIMSATH E G, JR, LORING G L, et al. FHA-RING ubiquitin ligases in cell division cycle control[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(21): 3458 – 3466.
- [18] WANG Q L. The role of forkhead-associated (FHA)-domain proteins in plant biology[J]. *Plant Molecular Biology*, 2023, 111(6): 455 – 472.
- [19] 昌燕李,韦运谢. 木薯 *MeCAMTA* 基因的克隆与原核表达[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(3): 744 – 750.
- [20] HERB M, SCHRAMM M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 313.
- [21] MACHIDA S, YUAN Y A. Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* dawdle forkhead-associated domain reveals a conserved phospho-threonine recognition cleft for dicer-like 1 binding[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(4): 1290 – 1300.
- [22] NARAYANAN L A, MUKHERJEE D, ZHANG S X, et al. Mutational analyses of a fork head associated domain protein, DAWDLE, in *Arabidopsis thaliana*[J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2014, 5(18): 2811 – 2822.
- [23] DING Z F, WANG H C, LIANG X Y, et al. Phosphop-

- rotein and phosphopeptide interactions with the FHA domain from *Arabidopsis* kinase-associated protein phosphatase[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(10): 2684 – 2696.
- [24] GUO X, YU X L, XU Z Y, et al. CC-type glutaredoxin, MeGRXC3, associates with catalases and negatively regulates drought tolerance in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(12): 2389 – 2405.
- [25] MA X W, MA Q X, MA M Q, et al. Cassava *MeRS40* is required for the regulation of plant salt tolerance[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, 22(5): 1396 – 1411.
- [26] CUI M, AN F F, CHEN S B, et al. Expression pattern and functional analysis of *MebHLH149* gene in response to cassava bacterial blight[J]. *Plants*, 2024, 13(17): 2422.
- [27] SIES H, BELOUSOV V V, CHANDEL N S, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(7): 499 – 515.
- [28] LIU P, ZHANG X X, ZHANG F, et al. A virus-derived siRNA activates plant immunity by interfering with ROS scavenging[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(7): 1088 – 1103.
- [29] KONG L, MA X Y, ZHANG C, et al. Dual phosphorylation of DGK5-mediated PA burst regulates ROS in plant immunity[J]. *Cell*, 2024, 187(3): 609 – 623.e21.
- [30] WEI J, WANG X, HU Z, et al. The *Puccinia striiformis* effector Hsp98 facilitates pathogenicity by blocking the kinase activity of wheat TaMAPK4[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 65(1): 249 – 264.

Cloning and protein functional validation of *MeDAWDLE* gene

TAN Mengting[#], XU Haoran, ZENG Hongqiu^{*}

(Key Laboratory of Biotechnology of Salt Tolerant Crops of Hainan Province; School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: In order to investigate the protein function of MeDAWDLE, Cassava SC 124 was used as a variety of cassava to isolate and identify its *MeDAWDLE* through PCR amplification. The evolutionary tree revealed that MeDAWDLE shares high homology with the DAWDLE protein in apples at a homology rate of 76.3%. Analysis of the physicochemical properties of MeDAWDLE sequence revealed that the molecular weight of MeDAWDLE is 52 kDa and that the theoretical isoelectric point of MeDAWDLE is 5.04. Expression analysis showed that *MeDAWDLE* is distributed in different tissues and organs of cassava, and the transcript of *MeDAWDLE* is upregulated under stress conditions. To explore the protein function of MeDAWDLE, the expression vector was constructed and the protein was induced. Further protein function analysis revealed that MeDAWDLE can significantly increase the reactive oxygen species (ROS) levels and the disease resistance of cassava. All these results indicated that MeDAWDLE might play an important role in cassava stress response.

Keywords: cassava (*Manihot esculenta*); DAWDLE protein; vector construction; prokaryotic expression

(特邀编辑:王 旭; 责任编辑:钟云芳)