

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240147



主持人: 缪卫国, 吴少英

木薯 RXam2 的原核蛋白表达及抗病功能分析

唐璐芝[#], 吴竞远, 陈元来, 朱彬彬, 赵惠萍^{*}

(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: 为挖掘木薯(*Manihot esculenta*)抗病基因, 本研究克隆了一个特异性免疫受体相关基因 *Resistance to Xam* (*MeRXam2*), 对其蛋白结构进行分析, 发现该基因的编码序列(Coding sequence, CDS)区域为 3 561 bp, 蛋白大小约为 132.847 kDa, 通过实时荧光定量(Real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)分析发现, 在病原菌侵染下 *MeRXam2* 表达量随着时间的增加而增加, 在 24 h 表达量达到最大, 这表明 *MeRXam2* 参与到木薯抗病反应中。此外, 通过同源重组构建 *MeRXam2*-pET32a 蛋白表达载体, 进行蛋白的诱导及测定, 并且通过对木薯叶片组织进行外源喷施 *MeRXam2* 蛋白后, 研究结果发现, 其细菌数明显低于对照株系, 该蛋白能减缓细菌的侵染, 该研究为木薯分子育种提供了理论依据和候选蛋白。

关键词: 木薯; 基因克隆; 原核表达; 免疫应答

中图分类号: Q78; S565.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)04-0561-09

唐璐芝, 吴竞远, 陈元来, 等. 木薯 RXam2 的原核蛋白表达及抗病功能分析 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(4): 561-569. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240147

木薯(*Manihot esculenta*)是多年生灌木植物, 广泛种植于热带和部分亚热带地区^[1]。木薯具有耐旱、耐贫瘠、易栽培、块根富含淀粉等优良特性^[2], 一株木薯能够形成多达 14 个地下贮藏根, 为约 8 亿人提供营养^[3]。除了食用, 木薯还用于制药、纺织、造纸和生物燃料等行业, 具有巨大的经济价值^[4]。但是木薯的病害会对其产量造成严重的损失, 其中木薯细菌性枯萎病最为严重, 它是由地毯草黄单孢杆菌木薯萎蔫致病变种 *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*(*Xam*)所引起的, 会导致叶片枯萎和块根淀粉含量下降, 严重时导致全株死亡^[5]。因此寻求有效防控木薯细菌性枯萎病的方法是现在亟待解决的问题, 分离鉴定木薯抗病基因是其中重要的一环^[6]。

在病原菌长期侵害植物的过程中, 植物形成了先天免疫系统^[7], 主要有病原相关分子模式激发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)和效应蛋白激发的免疫反应(Effector-triggered

immunity, ETI), 且 PTI 和 ETI 二者协同互作^[8], 其中 ETI 是植物免疫系统中的一个重要部分, 主要依赖于植物一类胞内免疫受体(Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat, NLR)识别病原微生物, 调节植物免疫反应^[9], 该蛋白具有核苷酸结合域并富含亮氨酸重复序列(Nucleotide binding site-leucine-rich repeat, NBS-LRR)且高度保守^[10], NLR 蛋白主要包括 3 部分^[11]: (1)可变的 N 端, 能够激发下游传递免疫信号^[12]; (2)Nucleotide-binding adaptor shared by Apaf1, certain R genes and CED4(NB-ARC)结构域, 可以与不同的核苷酸结合使 NLR 蛋白处于不同的状态^[13]; (3)C 端的富亮氨酸重复类受体蛋白激酶(Leucine-rich-repeat, LRR)结构域, 可以负调控 NLR 蛋白的活性^[14]。

NLR 是植物中非常重要的一类抗病基因家族(R 基因), NLR 广泛参与植物的生物胁迫^[15]。有研究表明, 在野生稻(*Oryza officinalis*)中含有 NB-ARC 结构域的基因是具有抗病功能的^[16]。马铃薯

收稿日期: 2024-09-13

修回日期: 2024-11-30

基金项目: 海南省研究生创新科研课题(Qhys2023-232, Qhys2023-248, Qhyb2023-97)

[#]第一作者: 唐璐芝(1998—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: tangluzhi2024@163.com

^{*}通信作者: 赵惠萍(1994—), 女, 讲师。研究方向: 作物遗传育种。E-mail: 996427@hainanu.edu.cn

(*Solanum tuberosum*)中的 Ry_{STO} 可编码 NLR 蛋白,转基因 Ry_{STO} 马铃薯植株可增强马铃薯对马铃薯疫病的抗性^[17]。过表达 *TaRGA5* 基因,可增强小麦(*Triticum aestivum*)对白粉病的抗性^[18],并且 NLR 正调控番茄对晚疫病(*Phytophthora infestans*)的抗性^[19]。而在玉米(*Zea mays*)中突变含 NLR 结构的基因,导致水杨酸(Salicylic acid, SA)合成信号受到阻碍,进而负调控玉米抗病性^[20]。在不同的物种中 NLR 结构都与调控病害息息相关^[21],在木薯中过表达具有 NLR 结构的 *MeRPPL1*(单个等位基因)基因,对南非木薯花叶病毒具有直接抗性^[22]。*MeLRRs* 是通过调控水杨酸含量和活性氧的积累以及致病相关基因 1(*Pathogenesis-related protein 1, PR1*)的表达量,从而正调控木薯细菌性枯萎病的抗病性^[23]。抗病小体(Zygote arrest-1, ZAR1)是通过识别病原微生物分泌效应因子,触发植物细胞死亡,从而阻止病原菌的扩散以达到抗病功能^[24]。木薯中具 NBS-LRR 结构的基因众多,现已鉴定出 228 个 *NBS-LRR* 型基因和 99 个部分 *NBS* 基因^[25],而大部分具 NBS-LRR 结构的基因的功能还有待进一步

研究。

基于前人研究^[26]和木薯 *NLR* 基因组序列,本研究鉴定了 1 个木薯体内编码 NLR 蛋白的基因 *MeRXam2*,克隆了全长序列。对该基因进行了生物信息学分析以及探讨了其在木薯被病原菌感染后的表达水平,并通过外源喷施蛋白探索 *MeRXam2* 蛋白对病原菌的影响,旨在为木薯分子育种提供候选蛋白。

1 材料与方法

1.1 植物材料 供试材料为‘华南 124’木薯品种,将木薯的茎秆截成 10~15 cm 长短(保留 2~3 芽点),种植在装有混有营养土和蛭石的花盆中,茎秆于 28~30 ℃、12 h 黑暗和 12 h 光照交替的条件下生长。

1.2 引物信息 通过数据库 phytozome(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>)查找 *MeRXam2* 的 CDS 序列,用 Primer 5.0 软件设计引物,引物合成和测序委托华大基因公司完成,具体引物信息如表 1 所示。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer	碱基序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Use
<i>QMeRXam2</i> -F	TATAATTCAAGCCATTC	qRT-PCR
<i>QMeRXam2</i> -R	ATCCAACAAGTCATCTG	qRT-PCR
Elongation factor 1- α -F	TAACCACCCTGGTCAGATTGGAA	内参基因
Elongation factor 1- α -R	AACTTGGGCTCCTTCTCAAGCTCT	内参基因
<i>MeRXam2</i> -F	ATGGCAGAGATAGCCATATCC	<i>MeRXam2</i> 扩增
<i>MeRXam2</i> -R	CTATTTCTGGAAGTCAGGTGA	<i>MeRXam2</i> 扩增
<i>MeRXam2</i> -pET32a-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGGCAGAGATAGCCATATCCC	载体构建
<i>MeRXam2</i> -pET32a-flag-R	TTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAG TCTTTCTGGAAGTCAGGTGACCCA	载体构建

1.3 木薯 RNA 提取及反转录 取木薯叶片 0.2~0.5 g,用液氮研磨充分,采用 CTAB 提取法提取木薯 RNA。用反转录试剂盒(11151ES0, YEASEN)将 RNA 反转录为 cDNA,每个 RNA 样品取 4 μ L,依次加入反转录酶混合体系 5 μ L、水 11 μ L,混合均匀后,37 ℃ 反应 5 min,85 ℃ 终止反应,RNA 与 cDNA 存放在-80 ℃ 冰箱保存备用。

1.4 *MeRXam2* 基因克隆 以 cDNA 作为模板,用 *FastPfu* DNA Polymeraset 扩增 *MeRXam2* 片段,

琼脂糖凝胶电泳检测基因片段大小,将目的片段用胶回收试剂盒回收,将回收的片段与 pEASY-Blunt3 连接,并转化到 DH5 α 感受态细胞中(ZC101-2, ZOMANBIO),然后挑选单菌落进行菌落 PCR 验证,PCR 程序设置程序如下:预变性 95 ℃,3 min、变性 95 ℃,30"、退火 55 ℃,3 min、延伸 72 ℃,根据片段长度设置 1 000 bp $\cdot$ min⁻¹、变性至延伸设置循环 $n \geq 32$ 次,最终延伸 72 ℃,5 min。若为阳性克隆,挑选单一明亮的单克隆菌株送华

大公司测序, 测序返回结果与网站上的序列进行比对, 将 *MeRXam2* 序列一致的菌液保存。

1.5 生物信息学分析和进化树构建 蛋白质的理化性质通过在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)进行分析; 通过在线软件(<https://www.uniprot.org/>)绘制蛋白质的二级结构; 蛋白质的三级结构通过在线工具 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行预测; 磷酸化位点通过(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)进行预测, 蛋白的跨膜结构相关信息通过(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测, 构建进化树所需序列在 NCBI 网址(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上下载, 利用 MEGA.11 软件进行进化树的构建。

1.6 *MeRXam2* 表达谱分析 用 *Xam* 侵染木薯叶片组织, 然后分别取 0、1、3、6、12 和 24 h 的样品提取 RNA, 反转录为 cDNA, 用实时荧光定量 PCR 检测 *MeRXam2* 的表达量, 使用 0.1 mL 96 孔 qPCR 板白色(KG2554, KIRGEN), 在实时荧光定量系统(CFX Connect™ Real-Time, Bio-Rad Laboratories)中进行。

1.7 *MeRXam2* 表达载体的构建 提取构建成功的 *MeRXam2*-Blunt3 载体质粒, 以质粒为模板, 扩增 *MeRXam2* 的片段, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切载体 pET32a, 用同源重组连接的方法将 *MeRXam2* 片段连接到已经线性化的 pET32a 载体上, 转化后, 经过菌落 PCR 验证, 挑选具有单一明亮条带的菌落, 并用 LB 液体培养基培养, 提取质粒, 双酶切验证, 符合预期大小, 并送华大公司测序, 若序列一致, 即视为构建载体成功。

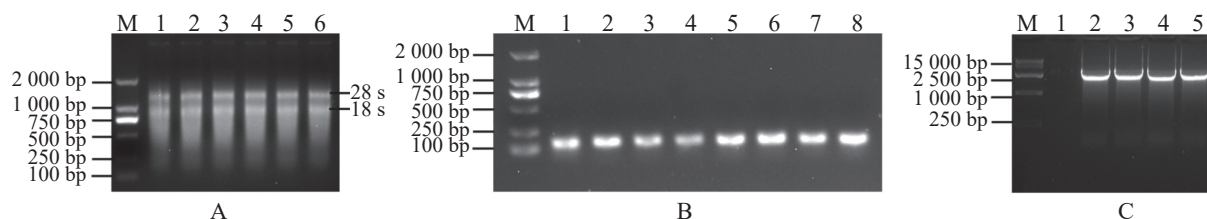
1.8 *MeRXam2*-pET32a 蛋白诱导及检测 将构

建成功的质粒 *MeRXam2*-pET32a 转入到 BL21(DE3) 感受态细胞(ZC121-2, ZOMANBIO), 经 PCR 验证, 挑选具有单一明亮的菌落进行后续的实验。将过夜的菌液加入新鲜含氨苄青霉素钠抗性的 LB 液体培养基中, 使菌液的 OD₆₀₀ 值为 0.1~0.2, 放入摇床中培养(37 °C, 150 r·min⁻¹), 当 OD₆₀₀ 值达到 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol·L⁻¹, 继续放入摇床中(37 °C, 150 r·min⁻¹)进行培养并诱导蛋白。与此同时, 取 0、1、3、6 h 的蛋白样品, 离心(12 000 r·min⁻¹, 10 min), 弃上清, 菌体用 100 μL PBS(pH7.4)重悬, 超声波破碎, 离心(4 °C, 12 000 r·min⁻¹, 5 min), 弃上清液, 沉淀用 PBS 悬起, 然后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测, 并测定蛋白浓度。

1.9 *MeRXam2* 的功能探究 细菌数的测定: 木薯在接种 *Xam* 后喷施蛋白, 于 0、3、6 d 后用打孔器取相同大小的叶片, 用 75%(v/v)的乙醇浸泡 5 min, 灭菌水清洗 3 次, 吸水纸吸干叶片表面水分, 用研磨器将叶片组织磨碎, 加入灭菌水混匀, 在超净工作台里进行梯度稀释, 并点在不含抗性的固体的培养基中, 倒置放入 28 °C 恒温培养箱进行培养, 第 2 天进行细菌数的统计。

2 结果与分析

2.1 *MeRXam2* 基因克隆 为克隆 *MeRXam2* 基因, 首先提取木薯叶片总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 发现有 28、18 s 条带(图 1-A), 即为 RNA 提取成功。然后将 RNA 反转录成 cDNA, 用木薯内参基因进行 PCR 检测 cDNA 的质量, 发现



A. 木薯叶片总 RNA 的提取, M.DL2 000 DNA Marker, 泳道 1~6 为木薯叶片总 RNA 检测; B.cDNA 琼脂糖凝胶电泳检测, M.DL2 000 DNA Marker, 泳道 1~8 为内参基因的 PCR 扩增检测; C.扩增 *MeRXam2* 基因片段, M.DL15 000 DNA Marker, 泳道 2~5 为 PCR 扩增产物。

A. Total RNA was extracted from cassava leaves. M. DL2 000 DNA Marker; lanes 1-6 were the total RNA of cassava leaves. B.cDNA agarose gel electrophoresis test; M. DL2 000 DNA Marker; lanes 1-8 were PCR amplification of reference gene. C. The *MeRXam2* amplified gene fragments; lanes 2-5 were the PCR amplified products.

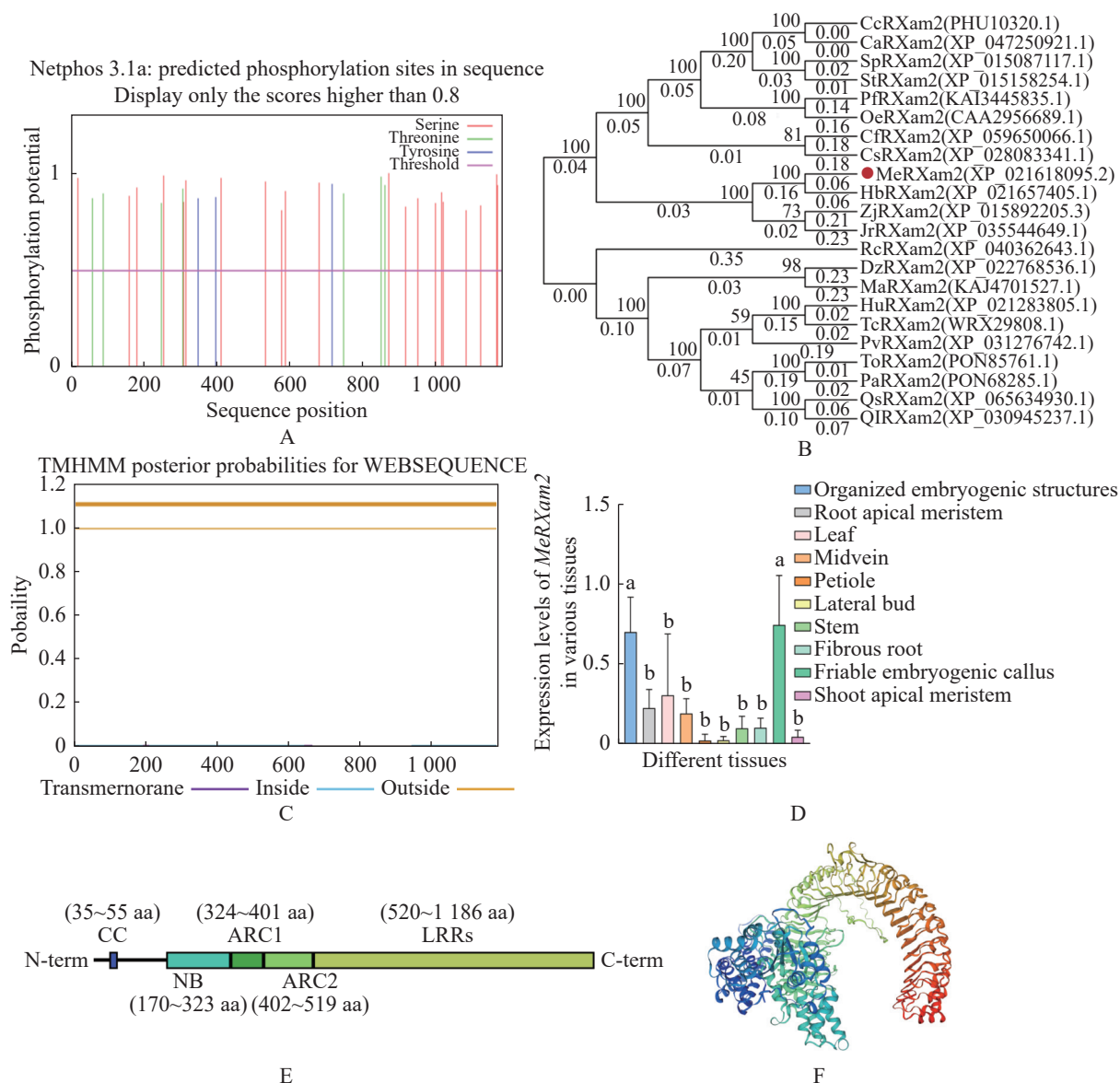
图 1 *MeRXam2* 基因的获取
Fig. 1 Acquisition of the *MeRXam2* gene

可扩增单一条带,说明 cDNA 反转录成功(图 1-B)。最后以 cDNA 为模板,扩增 *MeRXam2* 目的片段,得到与预测大小一样的片段(图 1-C)。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 *MeRXam2* 蛋白结构分析及进化树构建

通过对 *MeRXam2* 蛋白磷酸化位点进行预测,发现有多磷酸化位点(图 2-A),通过构建进化树发现与 *MeRXam2* 同源性最高的是橡胶树(*Hevea brasiliensis*)HbRXam2(图 2-B),橡胶树和木薯同属于大戟科植物,两条蛋白序列同源性达到



A.磷酸化位点分析; B.不同物种间 *MeRXam2* 同源蛋白的系统进化树其物种分别是中华辣椒、墨西哥辣椒、潘那利番茄、马铃薯、白花泡桐、木樨榄、佛罗里达山茱萸、茶、橡胶树、枣、核桃、月季、楝、哥伦比亚锦葵、可可、榴莲、开心果、异色山黄麻、榆科山黄麻、欧洲栓皮栎、加州白栎; C.跨膜结构域预测图; D.*MeRXam2* 在不同组织胚胎发生结构、根尖分生组织、叶片、中脉、叶柄、侧芽、茎、须根、易碎胚性愈伤组织和茎尖分生组织的表达情况; E.蛋白二级结构; F.蛋白三级结构预测。

A. Phosphorylation site analysis; B. Phylogenetic tree of *MeRXam2* homologous proteins among different plant species including *Capsicum chinense*, *Capsicum annuum*, *Solanum pennellii*, *Solanum tuberosum*, *Paulownia fortunei*, *Olea europaea* L., *Cornus florida*, *Camellia sinensis*, *Hevea brasiliensis*, *Ziziphus jujuba*, *Juglans regia*, *Rosa chinensis*, *Melia azedarach*, *Herrania umbratica*, *Theobroma cacao*, *Durio zibethinus*, *Trema orientale*, *Trema orientale*, *Parasponia andersoni*, *Quercus suber*, *Quercus lobata*; C. Prediction of transmembrane domains; D. *MeRXam2* expression of embryogenic structures, root apical meristem, leaf, midvein, petiole, lateral bud, stem, fibrous root, friable embryogenic callus and shoot apical meristem in different tissues; E. Protein domain structure; F. Protein tertiary structure prediction.

图 2 *MeRXam2* 蛋白理化分析及进化树构建

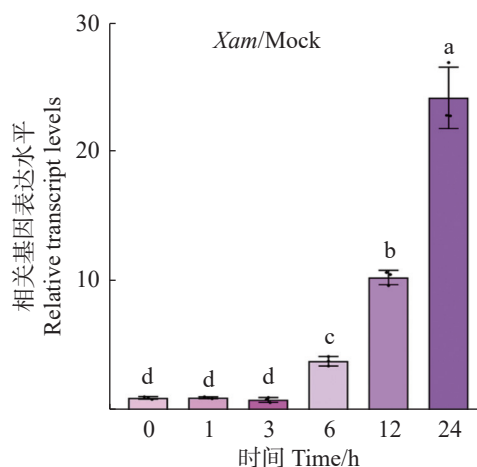
Fig. 2 Physio-chemical analysis and evolutionary tree construction of *MeRXam2* protein

84.26%。此外,对蛋白进行了跨膜结构域预测,该蛋白不存在跨膜结构域(图 2-C)。

基于 TCOD expression 在线数据库 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/tcod/expressions>) 中 *MeRXam2* 在不同组织的表达情况,并绘制成柱状图,发现 *MeRXam2* 在胚胎发生结构和易碎胚性愈伤组织的表达量相对较高(图 2-D)。此外,本研究通过对蛋白结构的预测,发现 *MeRXam2* 结构主要包括 3 个区域:靠近 N 端的 CC 结构域(35 ~ 55 aa)、中间区域的 NB-ARC(170 ~ 519 aa),NB-ARC 其中又包含 3 个小区域,分别是 NB 结构域(170 ~ 323 aa),ARC1 结构域(324 ~ 401 aa),ARC2 结构域(402 ~ 519 aa)、还有靠近 C 端的 LRRs 结构域(520 ~ 1186 aa),LRRs 是典型的 NLR 结构,根据在线软件 (<https://www.uniprot.org/>) 提供的信息绘制了该蛋白的结构(图 2-E)。另外,还通过网站绘制了 *MeRXam2* 的三级结构(图 2-F)。蛋白质的理化性质通过在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行分析,结果表明,*MeRXam2* 为木薯特异性免疫系统的受体 NLR 蛋白,CDS 序列有 3516 bp,氨基酸序列有 1186 aa,该蛋白分子式为 $C_{5947}H_{9596}N_{1598}O_{1713}S_{61}$,预期蛋白大小约为 132.847 kDa,理论等电点 8.12。

2.3 *MeRXam2* 基因的表达分析 为了解 *MeRXam2* 是否参与到木薯的抗病过程中,采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *MeRXam2* 基因在木薯被 *Xam* 处理 0、1、3、6、12 和 24 h 后的表达水平。研究结果发现,随着时间的变化,*MeRXam2* 表达量逐渐增

加,且在 24 h 时的表达量达到最高(图 3),这表明 *MeRXam2* 可能参与到木薯抗病反应过程中。



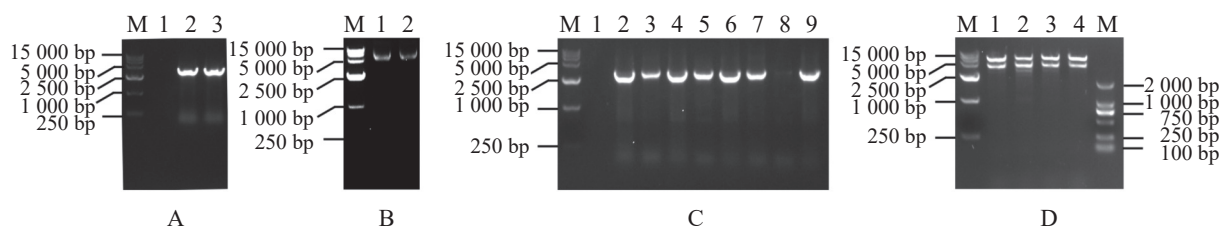
设置对照组接种 $MgCl_2$ 溶液,实验组接种 *Xam* 菌株,分别取 0、3、6、12 和 24 h 的被 *Xam* 侵染后的木薯叶片,0 h 的表达量设为 1,实验组 *MeRXam2* 表达量/对照组 *MeRXam2* 表达量,表示 *MeRXam2* 相对表达量,不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

The control group was inoculated with $MgCl_2$ solution, and the experiment group inoculated with *Xam* strain. Cassava leaves were collected at 0 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h after inoculation of *Xam*. The expression at 0 h was set to 1, and the experiment group *MeRXam2* expression/control group *MeRXam2* expression represent the relative expression of *MeRXam2*. Different letters indicate significant difference at the level of ($P < 0.05$).

图 3 *MeRXam2* 基因表达水平

Fig. 3 *MeRXam2* gene expression profile level

2.4 *MeRXam2* 载体构建 为构建 *MeRXam2*-pET32a 原核蛋白表达载体,首先用 PCR 体系扩增了 *MeRXam2* 片段(图 4-A),通过同源重组连接的方法,将目的基因与已用限制性内切酶 *Bam*H I



A. *MeRXam2* 扩增片段, M. DL15 000 DNA Marker, 泳道 2~3 以 *MeRXam2*-pEASY-Blunt3 为模板扩增的产物; B. 酶切载体 pET32a 的电泳图, M. DL15 000 DNA Marker, 泳道 1~2 是酶切载体 pET32a; C. *MeRXam2*-pET32a 载体转化后菌落 PCR 验证, M. DL15 000 DNA Marker, 泳道 1~9 菌落 PCR 验证; D. 酶切验证, M. DL15 000 DNA Marker, M. DL2 000 DNA Marker, 泳道 1~4 *MeRXam2*-pET32a 载体双酶切验证产物。

A. Amplified fragments of *MeRXam2*. M. DL15 000 DNA Marker; M. DL15 000 DNA Marker; lanes 2~3: products amplified with *MeRXam2*-pEASY-Blunt3 as template. B. Electrophoregram of digested vector pET32a. M: DL15 000 DNA Marker; lanes 1~2 were the digestion vector pET32a. C: PCR verification of colonies transformed with *MeRXam2*-pET32a vector. M. DL15 000 DNA Marker; lanes 1~9: PCR validation of the colonies. D. Verification of enzyme digestion. M. DL15 000 DNA Marker; M. DL2 000 DNA Marker; lanes 1~4: the enzyme-digested products of *MeRXam2*-pET32a vector.

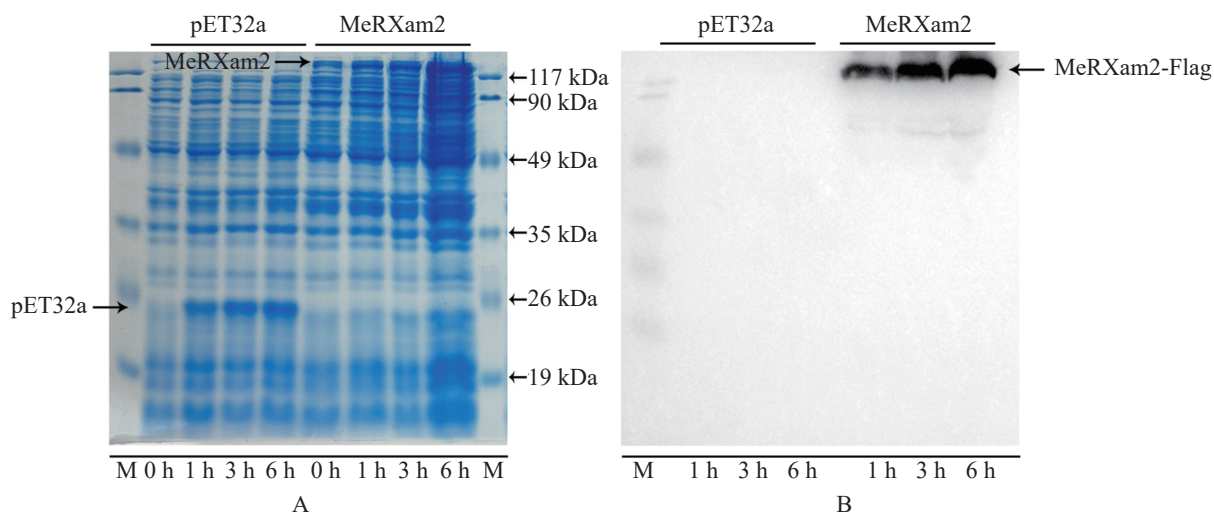
图 4 *MeRXam2* 载体构建

Fig. 4 Construction of *MeRXam2* gene vector

和 *EcoR* I 双酶切好的载体 pET32a 连接(图 4-B), 转化到 DH5 α 感受态细胞中, 通过菌落 PCR 验证, 挑选阳性单克隆(图 4-C), 用含氨苄青霉素钠抗性的液体 LB 培养, 提取质粒, 双酶切验证, 切下来的目的片段大小符合(图 4-D), 并送测序验证, 测序结果返回与序列一致, 即为载体构建完成。

2.5 MeRXam2 蛋白诱导 为探究蛋白的功能,

本研究进行了 MeRXam2-pET32a 的蛋白诱导, 结果发现能在 37 °C 下诱导出蛋白, 并且随着时间的增加, 蛋白的浓度也增加(图 5-A—图 5-B)。为进行后续的实验, 对 6 h 的蛋白用酶标仪测定蛋白浓度, MeRXam2 蛋白在 595 nm 吸光度平均值为 0.735, 标准曲线 $Y=0.5493X+0.4016$ ($R^2=0.9938$), 最终得出蛋白质量浓度为 $0.608\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



A. SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色, 从左至右, M. 预染蛋白质分子量标准(19~117 kDa), pET32a 0~6 h 诱导的对照蛋白, MeRXam2 0~6 h 诱导的目标蛋白; B. 蛋白质免疫印迹, 从左至右, M. 预染蛋白质分子量标准(19~117 kDa), MeRXam2 0~6 h 诱导的目标蛋白。

A. SDS-PAGE Coomassie blue staining. From left to right, M. Prestained protein molecular weight standard(19~117 kDa); the control protein induced by pET32a for 0~6 h, and the target protein induced by MeRXam2 for 0~6 h. B. Western blot. From left to right, M: Prestained protein molecular weight standard(19~117 kDa); target proteins induced by MeRXam2 for 0~6 h.

图 5 MeRXam2 蛋白

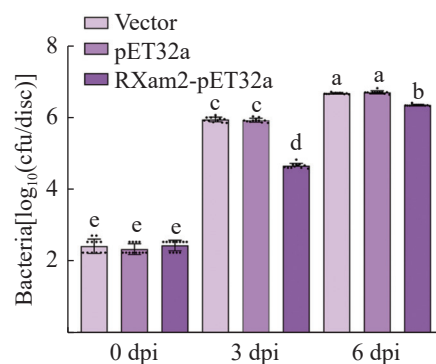
Fig. 5 MeRXam2 protein

2.6 MeRXam2 抗病功能分析 为探究 MeRXam2

蛋白对 *Xam* 繁殖的影响, 本研究对本薯叶片接种了 *Xam* 病原菌, 并对接种了 *Xam* 的本薯植株分别外源喷施水、pET32a 蛋白和 MeRXam2 蛋白, 检测病菌的繁殖情况, 结果发现, 对照组的细菌数显著高于实验组(图 6), 推测 MeRXam2 蛋白可能参与了木薯的抗病过程, 并且外源喷施 MeRXam2 蛋白可有效减缓病原菌的繁殖。

3 讨论

植物中编码 NLR 结构域的基因是植物中重要的抗病基因, 能够识别病原菌微生物, 调节免疫反应^[27]。基于木薯细菌性枯萎病害的危害性, 鉴定和分离木薯抗病基因具有重要意义^[28]。因此挖掘出有利用价值的 NLR 基因, 对提高木薯产量和保证粮食安全具有重要意义^[29]。



外源喷施水(Vector)、pET32a 蛋白、MeRXam2 蛋白 *Xam* 侵染的过程中细菌数变化趋势, 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

The change of number of bacteria during the infection of exogenous spray water(Vector), pET32a protein and MeRXam2 protein *Xam*, and different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 6 MeRXam2 蛋白对病原菌的影响

Fig. 6 The influence of MeRXam2 protein on pathogenic bacteria

目前研究表明,不同物种中皆发现了具有 NLR 结构的蛋白,该结构蛋白常具有 NBS 和 LRR 结构域,如苜蓿(*Medicago ruthenica*)基因组中共鉴定出 338 个 NLR 基因^[30],薯蓣(*Dioscorea polystachya*)基因组中鉴定出 167 个 NBS-LRR 基因^[31],猕猴桃(*Actinidia chinensis*)基因组中鉴定了 100 个 NBS-LRR 基因^[32],研究对 12 个蔷薇科基因组进行有关 NBS-LRR 基因搜索,筛选出 2 188 个 NBS-LRR 基因^[33]。本研究分析了木薯 MeRXam2 的蛋白结构,发现 MeRXam2 的 C 端含有一种典型的 NLR 结构-LRR 结构域(520 ~ 1 186 aa),这表明 MeRXam2 是 NLR 基因。

不同物种的 NLR 蛋白都与抗病性有关联,例如,水稻(*Oryza sativa*)^[34]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[35]、小麦^[36]等物种。在具有 NBS-2 的转化体的水稻中,其植株对叶瘟病能产生抗性,通过基因转化和标记辅助选择渗入易感籼稻品种中,赋予了籼稻株对叶片稻瘟病的抗性^[34]。在拟南芥中 ZAR1 抗病小体,作为钙渗透性阳离子通道来触发免疫和细胞死亡^[35]。在小麦中发现 TaRACK1B 能调节小麦花叶病毒感染的免疫反应,病毒可能会破坏植物 NLR 蛋白复合物,抑制 NLR 蛋白介导的广谱抗病毒免疫反应,从而导致小麦易受病毒感染^[36]。与此一致的是,本研究发现 MeRXam2 可以参与到木薯抗病应答反应中。在有关蛋白与植物的抗病研究中,外源喷施超敏蛋白对葡萄霜霉病有抑制效果^[37]。进一步对 MeRXam2 蛋白抗病功能分析中,Xam 的繁殖受到外源喷施的 MeRXam2 蛋白的影响,MeRXam2 蛋白可有效缓解细菌的侵染。NLR 蛋白在体内同样也发挥了重要作用,在 NLR 蛋白在植物防御反应中,有通过充当守卫或诱饵,有作为下游信号转导成分,有调节蛋白结构等各种机制,进而影响植物的免疫反应^[38]。后续可进一步研究 MeRXam2 在木薯体内的具体抗病分子机制。

综上所述,NLR 是植物中重要的抗病基因家族,NLR 蛋白对提高植物免疫力具有巨大潜在研究价值,本研究为木薯分子育种提供了理论依据和候选蛋白。

参考文献:

- [1] 劳承英,黄渝岚,李艳英,等.木薯/大豆间作行距对作物产量和效益的影响[J].南方农业学报,2023,54(7): 2005 - 2014.
- [2] 张圆雷,张宏图,徐子寅,等.干旱模式下木薯气孔密度及生理指标的比较分析[J].热带生物学报,2025,16(2): 163 - 171.
- [3] AMELEWORK A B, BAIRU M W. Advances in genetic analysis and breeding of cassava (*Manihot esculenta* crantz): a review[J]. Plants, 2022, 11(12): 1617.
- [4] 付海天,郑华,文峰,等.中国木薯研究及产业发展趋势[J].农业研究与应用,2022,35(4): 9 - 22.
- [5] MEDINA C A, REYES P A, TRUJILLO C A, et al. The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(3): 593 - 606.
- [6] 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.
- [7] ZHOU J M, ZHANG Y L. Plant immunity: danger perception and signaling[J]. Cell, 2020, 181(5): 978 - 989.
- [8] YUAN M H, NGOU B P M, DING P T, et al. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2021, 62: 102030.
- [9] HUANG S J, JIA A L, MA S C, et al. NLR signaling in plants: from resistosomes to second messengers[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2023, 48(9): 776 - 787.
- [10] JUBIC L M, SAILE S, FURZER O J, et al. Help wanted: helper NLRs and plant immune responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2019, 50: 82 - 94.
- [11] MARCHAL C, MICHALOPOULOU V A, ZOU Z, et al. Show me your ID: NLR immune receptors with integrated domains in plants[J]. Essays in Biochemistry, 2022, 66(5): 527 - 539.
- [12] CHIA K S, CARELLA P. Taking the lead: NLR immune receptor N-terminal domains execute plant immune responses[J]. New Phytologist, 2023, 240(2): 496 - 501.
- [13] PAN Y H, CHEN L, GUO H F, et al. Systematic analysis of NB-ARC gene family in rice and functional characterization of GNP12[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 887217.
- [14] WANG J Z, CHEN T Y, HAN M, et al. Plant NLR immune receptor Tm-2² activation requires NB-ARC domain-mediated self-association of CC domain[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(4): e1008475.
- [15] LIU X X, WAN L. Molecular insights into the biochemical functions and signalling mechanisms of plant NLRs[J]. Molecular Plant Pathology, 2022, 23(6): 772 - 780.
- [16] SINHA P, KUMAR T D, SK H, et al. Fine mapping and sequence analysis reveal a promising candidate gene encoding a novel NB-ARC domain derived from wild rice (*Oryza officinalis*) that confers bacterial blight resistance[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1173063.
- [17] GRECH-BARAN M, WITEK K, SZAJKO K, et al. Ex-

- treme resistance to *Potato virus Y* in potato carrying the *Ry_{sto}* gene is mediated by a TIR-NLR immune receptor [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(3): 655 – 667.
- [18] LIU X Y, YANG C X, WU S Q, et al. Genetic basis identification of a *NLR* gene, *TaRGA5-like*, that confers partial powdery mildew resistance in wheat SJ106[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(12): 6603.
- [19] BASHIR S, REHMAN N, FAKHAR ZAMAN F, et al. Genome-wide characterization of the *NLR* gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) and their relatedness to disease resistance[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 931580.
- [20] ZHU Y X, GE C X, MA S J, et al. Maize ZmFNSI homologs interact with an NLR protein to modulate hypersensitive response[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2529.
- [21] VARDEN F A, SAITOH H, YOSHINO K, et al. Cross-reactivity of a rice NLR immune receptor to distinct effectors from the rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae* provides partial disease resistance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(35): 13006 – 13016.
- [22] RAMULIFHO E, REY C. A coiled-coil nucleotide-binding domain leucine-rich repeat receptor gene *MeRPPL1* plays a role in the replication of a geminivirus in cassava[J]. *Viruses*, 2024, 16(6): 941.
- [23] ZHANG H, YE Z, LIU Z X, et al. The cassava NBS-LRR genes confer resistance to cassava bacterial blight[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 790140.
- [24] CHEN L J, XIAO J H, SONG Y X, et al. The zygotic division regulator ZAR1 plays a negative role in defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 736560.
- [25] LOZANO R, HAMBLIN M T, PROCHNIK S, et al. Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the Cassava genome[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 360.
- [26] DÍAZ-TATIS P A, OCHOA J C, RICO E M, et al. RXam2, a NLR from cassava (*Manihot esculenta*) contributes partially to the quantitative resistance to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2022, 109(3): 313 – 324.
- [27] ADACHI H, KAMOUN S. NLR receptor networks in plants[J]. *Essays in Biochemistry*, 2022, 66(5): 541 – 549.
- [28] GANGURDE S S, XAVIER A, NAIK Y D, et al. Two decades of association mapping: insights on disease resistance in major crops[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1064059.
- [29] URBACH J M, AUSUBEL F M. The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(5): 1063 – 1068.
- [30] TONG C Y, ZHANG Y T, SHI F L. Genome-wide identification and analysis of the *NLR* gene family in *Medicago ruthenica*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 13: 1088763.
- [31] ZHANG Y M, CHEN M, SUN L, et al. Genome-wide identification and evolutionary analysis of *NBS-LRR* genes from *Dioscorea rotundata*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 484.
- [32] WANG T, JIA Z H, ZHANG J Y, et al. Identification and analysis of NBS-LRR genes in *Actinidia chinensis* genome[J]. *Plants*, 2020, 9(10): 1350.
- [33] GUO L P, YOU C, ZHANG H H, et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR genes in Rosaceae species reveals distinct evolutionary patterns[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 1052191.
- [34] ZHENG X W, ZHAI W X, LI X B, et al. NBS-LRR resistance gene homologues in rice[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2001, 44(3): 253 – 262.
- [35] BI G Z, SU M, LI N, et al. The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling[J]. *Cell*, 2021, 184(13): 3528 – 3541.
- [36] HU H C, ZHANG T Y, WANG J N, et al. The dynamic TaRACK1B-TaSGT1-TaHSP90 complex modulates NLR-protein-mediated antiviral immunity in wheat[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(10): 114765.
- [37] 赵烁. 喷施超敏蛋白对葡萄生长结实及诱导抗性的作用研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020. doi: [10.27277/d.cnki.gsdnu.2020.000827](https://doi.org/10.27277/d.cnki.gsdnu.2020.000827).
- [38] BARRAGAN A C, WEIGEL D. Plant NLR diversity: the known unknowns of pan-NLRomes[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(4): 814 – 831.

Analysis of prokaryotic protein expression and disease resistance function of cassava RXam2

TANG Luzhi[#], WU Jingyuan, CHEN Yuanlai, ZHU Binbin, ZHAO huiping^{*}

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

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) has important economic value. Exploring the key genes of cassava is of great significance for improving cassava quality. To mine disease-resistant genes of cassava, a specific immune receptor-related gene resistant to *Xam* (*MeRXam2*) was cloned, and its protein structure was analyzed. The analysis was found that the coding sequence (CDS) region of this gene is 3561 bp, with the protein size of about 132.847 kD. Real-time fluorescent quantitative (Real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) analysis showed that the expression level of *MeRXam2* increased with time under pathogen infection and reached the maximum at 24 h, indicating that *MeRXam2* was involved in the resistance response to cassava disease. In addition, a *MeRXam2*-pET32a protein expression vector was constructed by homologous recombination, and the protein was induced and determined. After exogenous spraying of MeRXam2 protein on cassava leaf tissues, the number of bacteria was found significantly lower than that of the control strain, indicating that this protein could slow down bacterial infection. This founding might provide a theoretical basis and candidate protein for cassava molecular breeding.

Keywords: cassava; gene cloning; prokaryotic expression; immune response

(责任编辑: 潘学峰)