

# 木薯 *RLK1* 候选互作蛋白筛选及其与 *BSK* 互作的酵母验证

郑雨<sup>1,2#</sup>, 程潇<sup>1,2</sup>, 程科<sup>1,2</sup>, 赵惠萍<sup>1,2\*</sup>

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国; 2. 海南大学 三亚南繁研究院/海南省耐盐作物生物技术重点实验室, 海南 三亚 572025 中国)

**摘要:** 为了筛选出木薯 (*Manihot esculenta*) 中与 *MeRLK1* (receptor-like kinase 1) 共同调控木薯抗病的相关蛋白, 本研究通过酵母双杂交文库筛选, 获得 *MeRLK1* 蛋白的 24 个候选互作蛋白, 包括 Heat shock protein (Hsp)、ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) 和 Aquaporin transported protein (AQP) 等。进一步分析 *MeRLK1* 与 24 个候选互作基因的时空表达相关性, 结果发现, 在不同组织部位和在胁迫条件下 *Pentatricopeptide repeat 2 (PPR2)*、*BR-signaling kinase (BSK)* 等基因表达与 *MeRLK1* 存在较高的相关性 ( $R>0.7$ )。在筛选的基础上, 构建油菜素内酯 (Brassinosteroid, BR) 信号通路相关蛋白 *MeBSK* 全长序列载体, 通过酵母双杂交实验发现, *MeRLK1* 与 *MeBSK* 可能存在互作关系, 后续需要进一步通过 BiFC 验证体内互作。

**关键词:** 木薯; *MeRLK1*; 酵母双杂交; 互作蛋白

中图分类号: S533 文献标志码: A 文章编号: 1674–7054(2026)02–0223–10

郑雨, 程潇, 程科, 等. 木薯 *RLK1* 候选互作蛋白筛选及其与 *BSK* 互作的酵母验证[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(2): 223–232. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240187 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswwb.20240187



木薯 (*Manihot esculenta*) 是世界三大薯类作物之一, 至少有 4 000 多年的栽培史和食用史<sup>[1]</sup>。19 世纪 20 年代引进中国, 主要种植在广东、广西、海南和福建等省区<sup>[2]</sup>。木薯块根富含淀粉, 干淀粉含量可达 71.6%, 还含有蛋白质、脂肪、维生素及钙、钾等微量元素<sup>[3]</sup>。木薯还是重要的生物能源作物, 通过木薯的发酵和转化, 可以生产出生物燃料如乙醇等<sup>[4]</sup>。然而, 木薯在生长过程中会受到多种病害的侵袭, 如细菌性枯萎病 (cassava bacterial blight), 木薯花叶病 (cassava mosaic disease), 褐斑病 (brown speckle disease) 等, 这些病害不仅影响木薯的正常生长, 还能导致产量下降和品质受损<sup>[5]</sup>。研究木薯抗病信号网络, 对提高木薯抗病性起到关键作用。

植物在漫长的进化过程中演变出 2 大天然免疫系统, 包括基础免疫反应和效应子触发的免疫

反应, 基础免疫反应是由病原物相关分子模式所诱发的植物免疫反应, 这些分子模式是病原菌特有的、能够触发植物免疫反应的特征性信号<sup>[6]</sup>。病原菌释放出的分子模式会被模式识别受体识别, 从而引发一系列的信号转导, 包括诱导防御基因的表达、活性氧产生等<sup>[7]</sup>。这使得植物能够产生抗菌物质、增强细胞壁结构以及启动系统性免疫反应以抑制病原微生物的生长<sup>[8-9]</sup>。其中, 模式识别受体由位于质膜上的类受体蛋白激酶或类受体蛋白组成。类受体蛋白激酶 (receptor kinase, RLK) 在生物体内, 特别是在植物中, 起着极其重要的作用。它们是一类存在于细胞膜上的单次跨膜蛋白, 其具有一个存在于胞外用于接受外源信号的 LRR 结构域、一个作为信号传递工具的跨膜结构域及一个存在于细胞内通过磷酸化完成信号传递的激酶结构域, 它们通过感知和响应外界信号, 参



收稿日期: 2024–12–17

修回日期: 2025–03–11

基金项目: 海南省教育厅资助项目 (Hnky2024-10); 海南省研究生创新研究课题项目 (Qhyb2023-77)

\*第一作者: 郑雨 (2000—), 男, 海南大学热带农林学院 2023 级硕士研究生。E-mail: zzzzzzy0628@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

与调控植物生长发育、免疫防御等多个过程<sup>[10-11]</sup>。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有超过 600 个该类蛋白,其胞外受体结构域与信号分子结合后激活胞内激酶结构域,通过磷酸化作用将信号传递给下游,最终产生一系列生物效应<sup>[12-13]</sup>。类受体蛋白激酶可以根据胞外域的结构差异分为多个激酶家族,其中,富含亮氨酸的类受体蛋白激酶(Leucine-rich repeat receptor-like protein kinases, LRR-RLKs)是拟南芥中最大且研究最深入的 RLK 亚家族<sup>[14]</sup>。类受体蛋白激酶可以参与调控不同类型的免疫反应,与其他免疫组分(如共受体、防御蛋白等)相互作用形成复合物,这种互作不仅增强了免疫反应的强度和特异性,还使得植物能够更精准地应对不同类型的病原菌<sup>[15]</sup>。

周萌萌<sup>[16]</sup>通过分离鉴定得到 *RLK* 家族的 *MeRLK1*,发现其参与木薯抗病。在其他植物中 *RLK1* 可以通过与蛋白互作来参与信号传导、免疫反应等过程,如拟南芥中类受体蛋白激酶(Wall-associated receptor-like kinase 4, WAKL4)与 Cd 转运蛋白(Natural resistance-associated macrophage protein 1, NRAMP1)相互作用并使其磷酸化,导致 NRAMP1 的泛素化和液泡依赖性降解增强,从而降低 Cd 摄取<sup>[17]</sup>。但 *MeRLK1* 在木薯体内的互作网络尚不清楚。为了探寻能够与 *MeRLK1* 蛋白协同调控木薯抗病的相关蛋白,本研究利用酵母双杂交技术,筛选 *MeRLK1* 的候选互作蛋白并初步验证候选互作蛋白与 *MeRLK1* 的相互作用,旨在进一步揭示木薯中 *RLK1* 的功能和作用机制,为木薯产业奠定抗病基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** ‘华南 124 号’木薯种植于海南省耐盐作物生物技术重点实验室;反转录酶(Cat K1622)、限制性内切酶 *Bam*H I (Cat FD0055)、*Eco*R I (Cat FD0275)购自 Thermo Fisher 公司;DNA 聚合酶(Cat P112-03)购自 Vazyme 公司;质粒提取试剂盒(Cat DP103-03)、DNA 纯化试剂盒(Cat DP214-03)购自天根生化公司;缺陷型培养基(Cat PM2220 PM2110)购自北京酷来搏科技有限公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (Cat DL1001S)购自上海唯地生物公司;酵母双杂交载体质粒 pGBKT7、

pGADT7 由海南省耐盐作物生物技术重点实验室保存。

**1.2 *MeRLK1* 表达谱分析** 根据 Tropical Crops Omics Database 数据库 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/tcod/>)中 *MeRLK1* 的 CDS 序列信息<sup>[18]</sup>,分别查询分析了 *MeRLK1* 在木薯不同组织部位中及叶片接种地毯草黄单胞菌木薯萎蔫致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xam*)后 1、3、5 d 的表达量。

**1.3 *MeRLK1* 自激活检验** 将 pGBKT7-*MeRLK1* 和 pGADT7 质粒共同转化到 AH109 酵母中,涂布于二缺(SD-T-L)和四缺(SD-T-L-H-A)培养基,检测 *MeRLK1* 蛋白是否存在自激活。

**1.4 *MeRLK1* 蛋白候选互作蛋白的筛选** 将 pGBKT7-*MeRLK1* 的质粒与木薯 AD 文库质粒共转入 AH109 中,并将产物分别涂在二缺和四缺缺陷培养基上倒置于 28 °C 培养箱培养 4 d,挑取单菌落于二缺液体培养基中培养 2 d。提取酵母质粒,利用 AD 通用引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳后切取单一条带纯化回收,并送华大公司测序,测序结果与 Phytozome v13(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)中的木薯库进行序列比对,筛选出 *MeRLK1* 可能互作的蛋白并对其进行功能注释、亚细胞定位预测及聚类分析。通过 Tropical Crops Omics Database 数据库分析 24 个候选互作基因在不同组织部位及叶片接种 *Xam* 后的表达量,利用 Ttools 软件制作表达量热图及相关性分析图。

**1.5 *MeBSK* 基因克隆** 以培养 4 周的木薯为材料,采用 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)法提取总 RNA,逆转录制备 cDNA。以 cDNA 为模板,根据 Phytozome v13 数据库中 *MeBSK* (brassinolide-signaling kinase) CDS 序列设计特异性引物。利用 cDNA 扩增出 *MeBSK* 全长并进行胶回收,与中间载体 pEASY-T3 连接,转入 DH5 $\alpha$  后在氨苄固体培养基上培养 12 h,进行菌落 PCR 验证,挑选明亮单一的单克隆送测序,比对测序结果并保留序列正确的菌株。

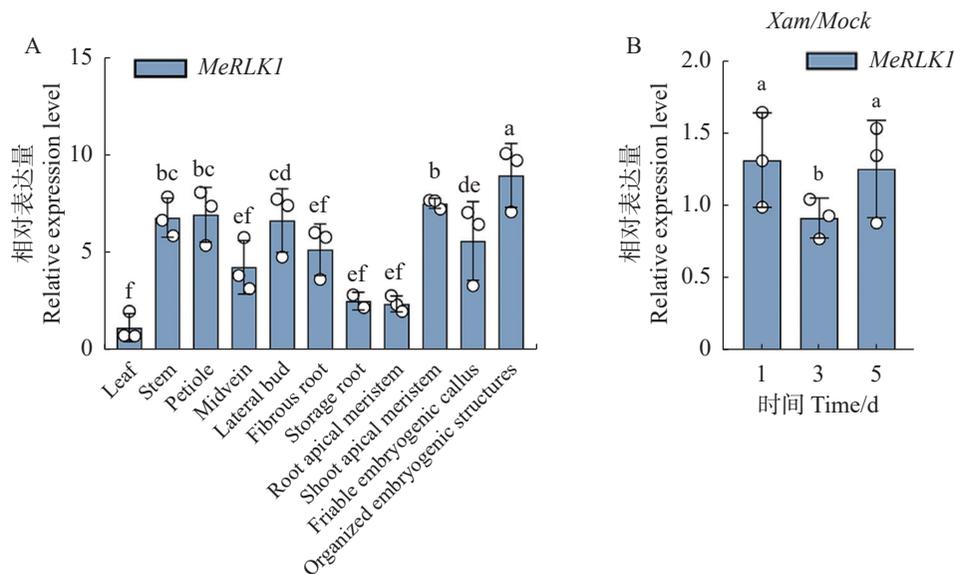
**1.6 pGBKT7-*MeBSK* 载体的构建** 以测序正确的质粒为模板扩增 *MeBSK* 片段,使用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对载体 pGADT7 进行双酶切使其线性化,纯化酶切产物后与 *MeBSK* 片段进行同源重组<sup>[19]</sup>,

经菌落 PCR 验证后选取条带大小正确的菌液提质粒并酶切验证。

**1.7 *MeRLK1* 与 *MeBSK* 酵母双杂交反转验证** 将 pGBKT7-*MeRLK1* 和 pGADT7-*MeBSK* 共转入 AH109 酵母感受态中, 筛选出阳性克隆提取质粒, 分别利用 *MeRLK1* 和 *MeBSK* 全长引物对酵母质粒进行 PCR 扩增。将验证正确的菌株及对照菌株按  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  进行梯度稀释, 分别点滴于二缺和四缺培养基上, 观察其生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MeRLK1* 表达谱分析 根据 Tropical Crops



A. 木薯中不同组织 *MeRLK1* 表达量; B. 木薯中 *Xam* 处理后 *MeRLK1* 表达量。

A. Expression levels of *MeRLK1* in different tissues of cassava; B. Transcript level of *MeRLK1* after *Xam* infection in cassava.

图 1 *MeRLK1* 表达谱分析

Fig. 1 Expression levels of *MeRLK1*

注: 不同小写字母表示差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )。

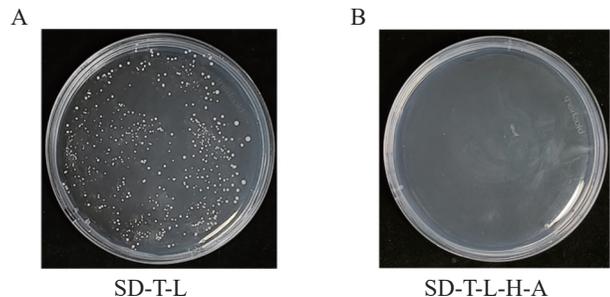
Note: Different lowercase letters indicate significant difference level ( $P < 0.05$ ).

**2.2 *MeRLK1* 自激活验证** 将 pGBKT7-*MeRLK1* 和 pGADT7 空载共转 AH109 进行自激活检测。实验结果发现, 共转后的酵母菌在二缺培养基上的生长情况表明质粒成功转入酵母细胞, 但在四缺培养基上无法正常生长(图 2-A、图 2-B), 表明 *MeRLK1* 蛋白不具有自激活活性, 可用于后续对木薯 cDNA 文库进行候选互作蛋白筛选。

### 2.3 酵母双杂交筛选 *MeRLK1* 候选互作蛋白

将 pGADT7 质粒文库与 pGBKT7-*MeRLK1* 质粒共转入 AH109 中, 通过 PCR 鉴定, 结果显示, PCR 产物电泳条带大多在 500 ~ 2 000 bp 之间(图 3), 说

Omics Database 数据库分析了 *MeRLK1* 在木薯中叶、叶中脉、叶柄、侧芽、茎、贮藏根、须根、胚源性愈伤组织、有序胚胎发生结构、顶端分生组织、根尖分生组织等 11 个不同组织部位的基因表达量。结果发现, *MeRLK1* 在木薯有序胚胎发生结构的表达量最高, 其次是顶端分生组织、叶柄、茎、侧芽, 有序胚胎发生结构、须根、叶中脉的表达量较低, 在贮藏根、根尖分生组织、叶的表达量最低(图 1-A)。同时还发现, 木薯叶片在接种 *Xam* 的 1、3、5 d 后 *MeRLK1* 的相对表达量变化显著, 表明 *MeRLK1* 可以响应 *Xam* 的侵染(图 1-B)。



SD-T-L

SD-T-L-H-A

A. 酵母在 SD-T-L 培养基生长图; B. 酵母在 SD-T-L-H-A 培养基生长图。

A. Growth diagram of yeast in SD-T-L medium; B. Growth diagram of yeast in SD-T-L-H-A medium.

图 2 *MeRLK1* 自激活验证

Fig. 2 Verification of *MeRLK1* auto-activation

明成功筛选到多个可能与 *MeRLK1* 互作的蛋白。送测后将测序结果与 Phytozome v13 数据库比对, 去除移码和重复, 初步获得 24 个与 *MeRLK1* 互作的候选互作蛋白, 根据 Phytozome v13 数据库中的

信息对其进行注释, 并通过亚细胞定位预测网站 (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 对候选互作蛋白亚细胞定位进行预测(表 1)。

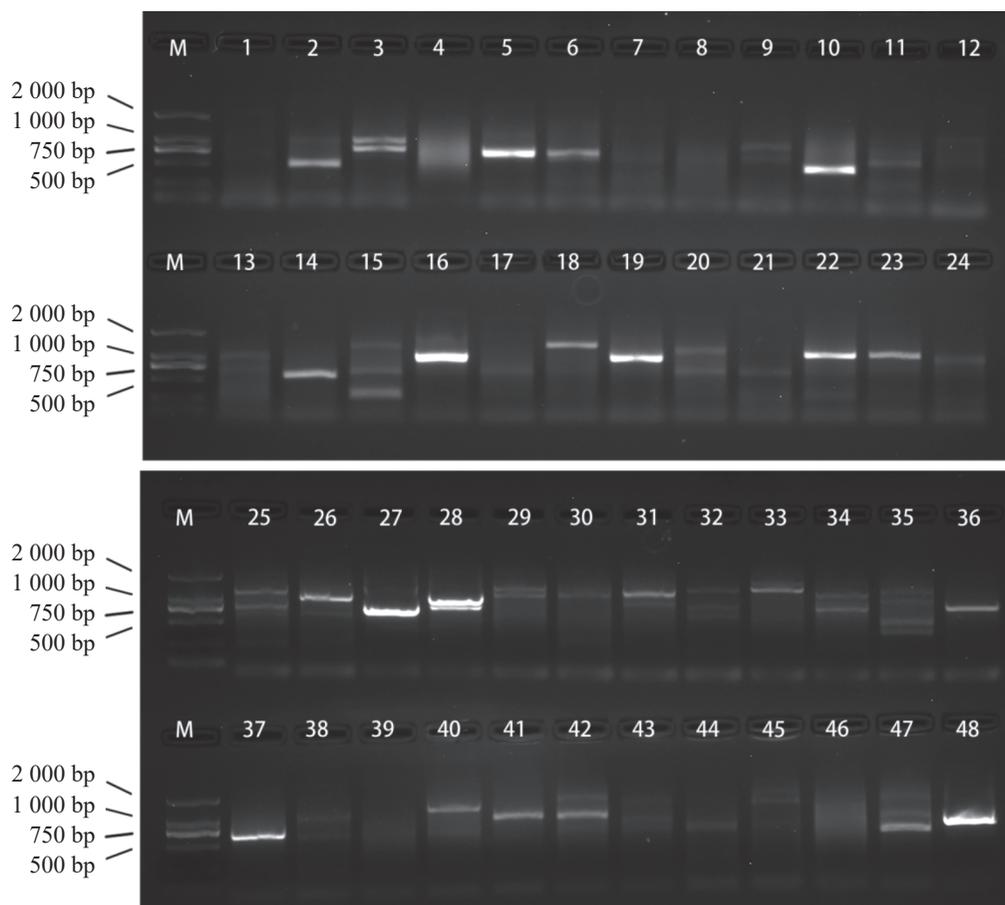


图 3 酵母双杂交筛选 *MeRLK1* 候选互作蛋白

Fig. 3 Y2H screening for *MeRLK1*-interacting proteins

注: 候选蛋白重组质粒菌液 PCR。M, DL2000 DNA Marker; 1~48, 阳性克隆。

Note: PCR of the bacterial liquid containing the recombinant plasmid of candidate proteins. M, DL2000 DNA Marker; 1-48, Positive colonies.

表 1 *MeRLK1* 候选互作蛋白注释

Tab. 1 Annotation of candidate interacting proteins of *MeRLK1*

序号 Number	基因号 Gene identifier	蛋白名 Protein	基因注释 Gene annotation	亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction
1	Manes.03G062300	AQP	Aquaporin transported	Cell membrane
2	Manes.03G046900	NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	Mitochondrial matrix
3	Manes.04G003400	CBR2 <sup>[20]</sup>	NADH-cytochrome b5 reductase	Chloroplast stroma
4	Manes.05G143400	TRX	Thioredoxin	Nucleus/Cytoplasm
5	Manes.05G145400	E-Syts <sup>[21]</sup>	Extended synaptotagmin-related	Cytoplasm/Endoplasmic reticulum
6	Manes.05G155266	CREB <sup>[21]</sup>	cAMP-response element binding protein related	Nucleus
7	Manes.06G134700	Hsp	Heat shock protein, mitochondrial-related	Mitochondrial/Chloroplast
8	Manes.06G151900	PTK	Protein tyrosine kinase	Chloroplast
9	Manes.07G088100	PPR2	Pentatricopeptide repeat 2	Cytoplasm

续表 1 Tab. 1 Continued

序号 Number	基因号 Gene identifier	蛋白名 Protein	基因注释 Gene annotation	亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction
10	Manes.09G153400	GME <sup>[22]</sup>	GDP-D-mannose 3', 5'-epimerase	Cytoplasm
11	Manes.07G104200	UBE2C <sup>[23]</sup>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	Nucleus
12	Manes.08G079293	MT	Metallothionein	Chloroplast
13	Manes.14G112768	TM9SF <sup>[24]</sup>	Transmembrane 9 superfamily member	Cell membrane
14	Manes.05G135400	BSK <sup>[25]</sup>	BR-signaling kinase	Chloroplast
15	Manes.12G158700	USP	Universal stress proteins	Chloroplast
16	Manes.09G171400	DAP	Dormancy/auxin associated protein	Nucleus
17	Manes.13G061700	FLA2	Fasciclin-like arabinogalactan protein 2	Cell membrane
18	Manes.12G098200	UBE2M <sup>[26]</sup>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M	Nucleus/Cytoplasm
19	Manes.14G132521	XPR1	Xenotropic and polytropic reterovirus receptor 1	Cytoplasm
20	Manes.15G149500	ARF1	ADP-ribosylation factor 1	Peroxisome
21	Manes.09G060608	ENO	Enolase	Cytoplasm
22	Manes.18G096100	NEDD8	Ubiquitin-like protein	Nucleus/Cytoplasm
23	Manes.16G049900	COX11	Cytochrome c oxidase assembly protein subunit 11	Mitochondrial/Chloroplast
24	Manes.16G078300	SHMT <sup>[26]</sup>	Glycine hydroxymethyltransferase	Chloroplast

注: 基因号从Phytozome v13数据库中获得。

Note: The gene ID was obtained from Phytozome v13 database.

依照蛋白功能对 *MeRLK1* 筛选获得的互作候选蛋白进行分类(图 4), 分类结果显示, 互作候选蛋白中有 50% 与细胞代谢相关, 12.5% 参与能量

代谢过程, 8.3% 与生长发育相关, 16.7% 与蛋白质合成与降解有关, 8.3% 与转录相关, 4.2% 参与激素信号传导即油菜素内酯信号激酶 *BSK*。

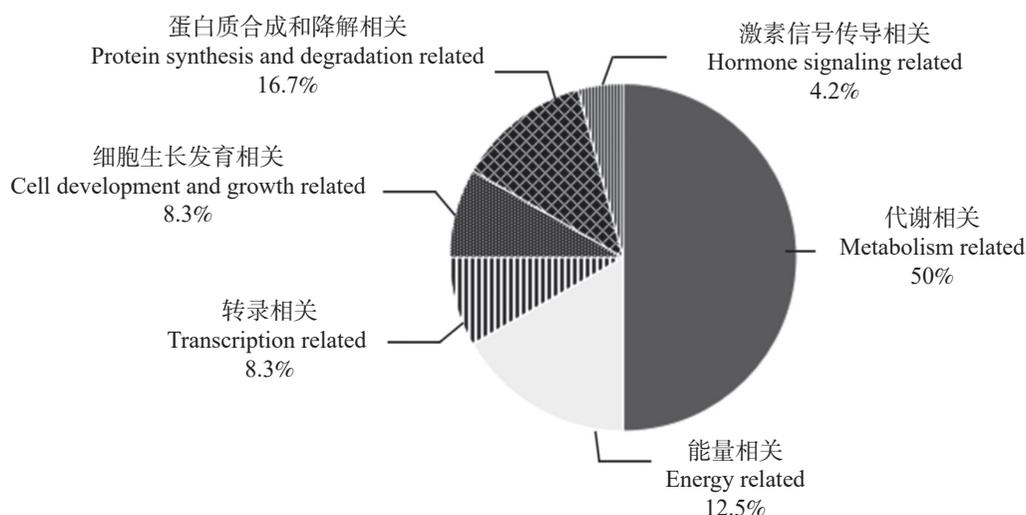


图 4 交互候选蛋白功能聚类分析图

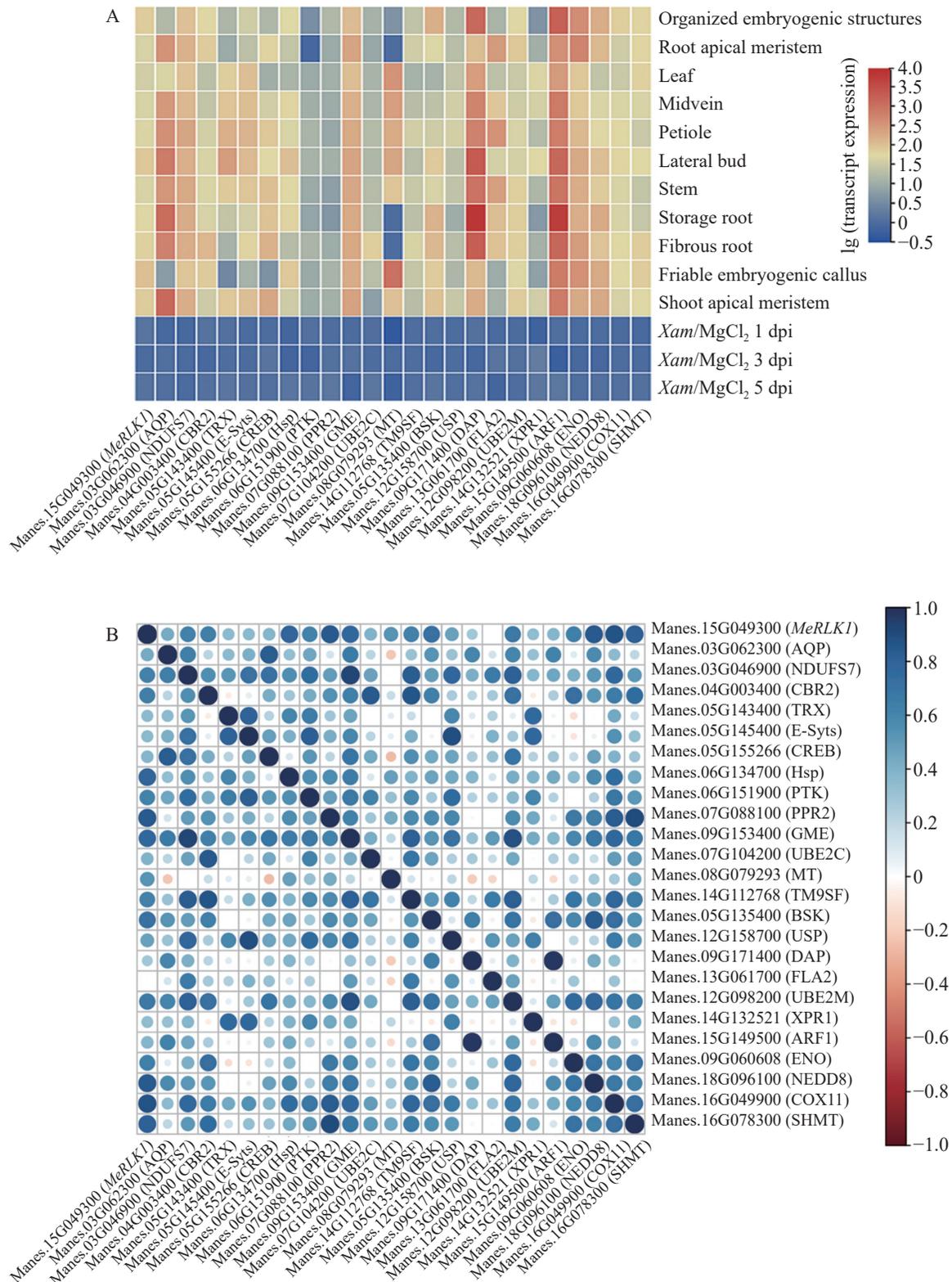
Fig. 4 Functional clustering analysis diagram of candidate interacting proteins

根据 Tropical Crops Omics Database 数据库分析了 24 个互作候选基因在木薯中 11 个不同组织部位的基因表达量及木薯叶片接种 *Xam* 后的表达量。应用 Tbtools 软件构建了 *MeRLK1* 与互作候

选基因相关性分析热图, 结果发现, 与细胞生长发育相关(1 个)、激素信号传导相关(1 个)、能量相关(4 个)以及代谢相关(11 个)的基因都能在叶中脉、叶柄、侧芽、茎、储藏根、顶端分生组织中高

度表达(图 5-A), 此外, 通过对 *MeRLK1* 与其他 24 个基因的表达量进行了相关性分析, 发现其与 *HSP*、

*GME*、*COX11*、*SHMT*、*PPR2*、*BSK*、*NEDD8* 等相关系数较高( $R>0.7$ )(图 5-B), 表明 *MeRLK1* 可能



A. 互作候选基因表达量热图; B. 互作候选基因表达相关性分析。

A. Heat map of candidate genes; B. Analysis of correlation of candidate gene.

图 5 *MeRLK1* 与互作候选基因表达相关性分析

Fig. 5 Analysis of correlation between *MeRLK* and candidate-interaction protein gene

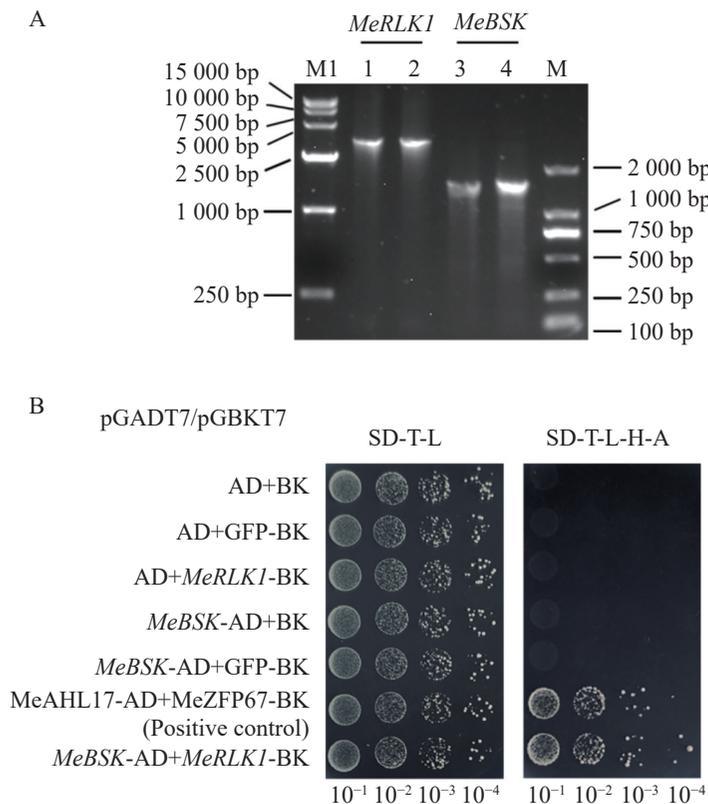
注: *R*, 相关系数。

Note: *R*, Correlation coefficient.

会与以上基因共同调控信号传导及能量代谢等途径,但各个途径之间是否存在交集还有待进一步研究。

**2.4 *MeBSK* 载体构建与互作验证** 植物激素通过不同的信号传导途径参与植物的生理反应,在植物生长发育过程中起到重要的调控作用,而 *BSK* 作为互作候选蛋白中一个与植物激素信号传导相关的蛋白,参与着 BR 信号通路的传导过程。因此,选取 *BSK* 候选蛋白进一步验证相互作用。本研究以‘华南 124’木薯品种的 cDNA 为模板,根据 Phytozome v13 中 *MeBSK* 的 CDS 序列,设计特异性引物扩增 *MeBSK* 的全长序列并构建 pGADT7-*MeBSK* 表达载体。利用 *MeRLK1* 和

*MeBSK* 全长引物对共转后的酵母质粒进行 PCR 验证,结果显示所提质粒可以分别扩增出 *MeRLK1* 和 *MeBSK* 全长片段大小相同的片段(图 6-A)。将这些菌株及对照菌株按  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  进行梯度稀释,分别点滴于二缺和四缺培养基上,观察生长情况发现,实验组和对照组的酵母菌株均可以在二缺平板上生长,而在四缺平板上只有实验组 pGBKT7-*MeRLK1*+pGADT7-*MeBSK* 的菌株可以正常生长(图 6-B)。通过酵母双杂交对 *MeRLK1* 和 *MeBSK* 的互作关系进行验证,但仅酵母点对点验证无法排除假阳性确定互作关系,后续将需要进一步在体内体外通过 BiFC、Pull down 等互作实验确认互作关系。



A. 酵母质粒 PCR 验证; B. 酵母双杂交点对点验证 *MeRLK* 和 *MeBSK* 互作。

A. PCR validation of yeast plasmid; B. Point-to-point verification the interaction between *MeRLK* and *MeBSK* using yeast two-hybrid.

图 6 酵母双杂交验证

Fig. 6 Yeast two hybrid validation

注: 1~4, 以 *MeRLK1*-BK+*MeBSK*-AD 酵母质粒为模板扩增产物。

Note: 1-4, Amplification product using the yeast plasmid *MeRLK1*-BK+*MeBSK*-AD as template.

### 3 讨论

类受体蛋白激酶是一类在植物中不可或缺的跨膜蛋白,它们通过感知外部信号(如激素、病原体等),调控植物的生长发育,包括细胞分裂、分化

和器官形成<sup>[27-28]</sup>。RLKs 还参与植物的免疫防御,识别病原体并激活抗病反应。此外,它们可以启动防御机制并提高植物抗逆性,在非生物胁迫(如干旱、盐害)的适应中起关键作用<sup>[29]</sup>。

本研究利用酵母双杂交技术系统筛选得到

24个 *MeRLK1* 的互作候选蛋白,分析相关系数发现, *MeRLK1* 与候选基因存在时空表达的同步性。激素信号在植物中起着核心调控作用,它们通过复杂的信号网络协调植物的生长和适应能力。因此,本研究根据激素信号通路筛选出了1个BR信号转导途径下游的关键受体激酶 *BSK*,分析后发现,该基因与 *MeRLK1* 存在较高的相关性,并通过酵母双杂点对点进一步验证了 *MeBSK* 与 *MeRLK1* 的互作关系。类受体蛋白激酶作为植物中最大的跨膜信号感知家族,通过其胞外结构域特异性识别配体(如多肽、激素或病原相关分子),并依赖胞内激酶结构域与下游蛋白质形成互作网络,以此实现对植物生长发育、免疫反应的调控。例如,类受体蛋白激酶 *FERONIA* 与 *RALF* 肽信号互作后可以调节钙离子通道使胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,激活  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的蛋白激酶,进而磷酸化多种代谢相关的酶,如参与糖酵解和三羧酸循环的酶来调控能量代谢<sup>[30]</sup>。此外,类受体蛋白激酶 *TMK1* 与质膜  $\text{H}^+$ -ATP 酶相互作用,介导其磷酸化,导致质外体酸化从而调控植物根的生长<sup>[31]</sup>。基于上述文献及本研究筛选得到的 *CREB*、*GME* 等蛋白,推测 *MeRLK1* 可能通过与多种 ATP 酶(如质膜  $\text{H}^+$ -ATP 酶、线粒体 ATP 酶等)相互作用,调控其磷酸化状态或活性,从而影响 ATP 的合成与水解过程。亦或者 *MeRLK1* 还可能通过调节信号分子(如钙离子、活性氧等)的传递,间接调控能量代谢相关通路,最终影响植物的生长发育和逆境响应。但 *MeRLK1* 是否且如何直接或间接调控植物的能量代谢过程还有待进一步研究,这一推想为进一步研究 *MeRLK1* 在植物能量代谢中的具体作用机制提供了新的思路。在拟南芥中, *LRR1* 与泛素连接酶 *PUB11* 互作介导蛋白降解从而负调控植物的干旱胁迫响应<sup>[32]</sup>。基于本研究的筛库结果发现, *UBE2M* 与 *UBE2C* 同样参与泛素化修饰,因此,初步推测 *MeRLK1* 可能通过与 *UBE2M* 和 *UBE2C* 互作参与其他蛋白的泛素化修饰,但需要进一步通过体内体外酵母双杂、BiFC 等验证互作,以及免疫沉淀结合质谱分析鉴定泛素化靶蛋白及修饰位点等实验深入研究泛素化修饰。但该筛选结果至少提供了下一步可供 *MeRLK1* 参与泛素化修饰的候选靶蛋白,为解析 *MeRLK1* 通过泛素化调控植物胁迫响应的分子通路奠定了基础。

本研究通过酵母筛选并初步验证了 *MeRLK1* 与 BR 信号关键组分 *MeBSK* 的互作,暗示着 *MeRLK1* 在 BR 信号通路中的潜在作用及二者介导免疫反应之间的潜在联系。在植物中, BR 信号通路是一个调节植物生长发育的重要信号转导途径,其起始于激素信号与受体 *BRI1* 的结合<sup>[33]</sup>。 *BRI1* 是一种位于细胞膜上的富含亮氨酸重复序列的类受体蛋白激酶。当 BR 与 *BRI1* 结合后,会引起 *BRI1* 自身磷酸化,随后激活其下游的激酶。 *BSK* 是受体样细胞质激酶-X II 亚家族的成员,其可作为接收来自 *BRI1* 信号的重要下游,并将信号进一步向下游传递<sup>[34]</sup>。除此之外,类受体蛋白 *BAK1* 通过与 *BRI1* 相互作用参与发育调节,并通过与 *FLS2* 相互作用参与对病原体的先天免疫<sup>[35]</sup>。 *MeRLK1* 与 *BRI1* 同属于类受体蛋白激酶家族,由 *MeRLK1* 与 *BSK* 的初步互作关系推测 *MeBSK* 可以接受来自 *MeRLK1* 传递的信号来调控 BR 信号网络,且 *MeRLK1* 可能与其他类受体蛋白如 *FIS2*、*BAK1* 等互作参与植物的免疫反应,但后续还需通过体内体外对 *MeRLK1* 与 *BSK* 的互作关系作进一步验证。这一推测为深入研究 *MeRLK1* 在植物生长发育和免疫调控中的多重功能提供了重要的理论依据,同时也为解析类受体蛋白激酶家族成员在植物信号网络中的功能多样性和协同作用机制开辟了新的研究方向。

作为 BR 信号系统关键激酶,本研究发现, *MeRLK1* 在酵母系统中与 *MeBSK* 互相作用,但 *MeRLK1* 与 *MeBSK* 互作是否会影响 *MeRLK1* 的抗病性尚不清楚,并且 *MeRLK1* 与 *MeBSK* 的互作是否影响 BR 信号通路的传导也有待进一步研究。本研究利用酵母双杂技术,鉴定到 24 个候选蛋白与 *MeRLK1* 可能存在相互作用,丰富了 RLK 家族的互作网络,为抗性基因的筛选提供新思路 and 想法,为木薯遗传改良奠定基础。

## 参考文献:

- [1] 曹升,陈江枫,黄富宇,等. 广西木薯产业现状分析及其发展建议[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(6): 1468-1476. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-1191.2021.06.005>
- [2] 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.
- [3] Chisenga S M, Workneh T S, Bultosa G, et al. Progress in research and applications of cassava flour and starch: a

- review [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(6): 2799–2813.
- [4] Egbune E O, Ezedom T, Orororo O C, et al. Solid-state fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): a review [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2023, 39(10): 259.
- [5] 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, 4(12): 2355–2368. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.001>
- [6] Cui Y, Lu X, Gou X. Receptor-like protein kinases in plant reproduction: Current understanding and future perspectives [J]. *Plant Communications*, 2022, 3(1): 100273.
- [7] Sellge G, Kufer T A. PRR-signaling pathways: Learning from microbial tactics [J]. *Seminars in Immunology*, 2015, 27(2): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.009>
- [8] Yuan M, Ngou B P M, Ding P, et al. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2021, 62: 102030.
- [9] Ngou B P M, Ding P, Jones J D G. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system [J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(5): 1447–1478.
- [10] Dievart A, Gottin C, Périn C, et al. Origin and diversity of plant receptor-like kinases [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2020, 71: 131–156.
- [11] Wei Z, Li J. Receptor-like protein kinases: key regulators controlling root hair development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(9): 841–850.
- [12] Shiu S H, Karlowski W M, Pan R, et al. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(5): 1220–1234.
- [13] Shiu S H, Bleecker A B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(19): 10763–10768.
- [14] Lehti-Shiu M D, Zou C, Hanada K, et al. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(1): 12–26. <https://doi.org/10.1104/pp.108.134353>
- [15] Qu J, Dry I, Liu L, et al. Transcriptional profiling reveals multiple defense responses in downy mildew-resistant transgenic grapevine expressing a TIR-NBS-LRR gene located at the *MrRUN1/MrRPV1* locus [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 161. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00597-w>
- [16] 周萌萌. MeAHL17 转录因子调节木薯对细菌性枯萎病抗性分子机理研究 [D]. 海口: 海南大学, 2023.
- [17] Yuan J J, Zhao Y N, Yu S H, et al. The *Arabidopsis* receptor-like kinase WAKL4 limits cadmium uptake via phosphorylation and degradation of NRAMP1 transporter [J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 9537.
- [18] Kang H, Huang T, Duan G, et al. TCOB: an integrated resource for tropical crops [J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(D1): D1651–D1660. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad870>
- [19] Eggleston A K, Kowalczykowski S C. An overview of homologous pairing and DNA strand exchange proteins [J]. *Biochimie*, 1991, 73(2/3): 163–176.
- [20] Chen J, Sun Y, Chen L, et al. NADH-Cytochrome B5 reductase 2 suppresses retinal vascular dysfunction through regulation of vascular endothelial growth factor A in diabetic retinopathy [J]. *Experimental Eye Research*, 2022, 222: 109186. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109186>
- [21] Zheng W, Guo J, Lu X, et al. cAMP-response element binding protein mediates podocyte injury in diabetic nephropathy by targeting lncRNA DLX6-AS1 [J]. *Metabolism*, 2022, 129: 155155. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155155>
- [22] Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, et al. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato [J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(3): 499–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03972.x>
- [23] Xie C, Powell C, Yao M, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C: a potential cancer biomarker [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 47: 113–117.
- [24] Yu Y, Song Y, Cheng L, et al. CircCEMIP promotes anoikis-resistance by enhancing protective autophagy in prostate cancer cells [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022, 41(1): 188.
- [25] Zhang B, Wang X, Zhao Z, et al. OsBR11 activates BR signaling by preventing binding between the TPR and kinase domains of OsBSK3 via phosphorylation [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(2): 1149–1161. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01668>
- [26] Lu X, Kong X, Wu H, et al. UBE2M-mediated neddylation of TRIM21 regulates obesity-induced inflammation and metabolic disorders [J]. *Cell Metabolism*, 2023, 35(8): 1390–1405. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.05.011>
- [27] Richard M M S, Gratias A, Alvarez Diaz J C, et al. A common bean truncated CRINKLY4 kinase controls gene-for-gene resistance to the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(10): 3569–3581. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab082>
- [28] Xun Q, Wu Y, Li H, et al. Two receptor-like protein kinases, MUSTACHES and MUSTACHES-LIKE, regulate lateral root development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *New Phytologist*, 2020, 227(4): 1157–1173. <https://doi.org/10.1111/nph.16599>

- [29] Wang J, Wang J, Li J, et al. The RLK protein TaCRK10 activates wheat high-temperature seedling-plant resistance to stripe rust through interacting with TaH2A. 1 [J]. *The Plant Journal*, 2021, 108(5): 1241–1255. <https://doi.org/10.1111/tpj.15513>
- [30] Haruta M, Sabat G, Stecker K, et al. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion [J]. *Science*, 2014, 343(6169): 408–411. <https://doi.org/10.1126/science.1244454>
- [31] Li L, Verstraeten I, Roosjen M, et al. Cell surface and intracellular auxin signalling for H<sup>+</sup> fluxes in root growth [J]. *Nature*, 2021, 599(7884): 273–277. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04037-6>
- [32] Chen X, Wang T, Rehman A U, et al. *Arabidopsis* U-box E3 ubiquitin ligase PUB11 negatively regulates drought tolerance by degrading the receptor-like protein kinases LRR1 and KIN7 [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(3): 494–509. <https://doi.org/10.1111/jipb.13058>
- [33] Su B, Zhang X, Li L, et al. Dynamic spatial reorganization of BSK1 complexes in the plasma membrane underpins signal-specific activation for growth and immunity [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(4): 588–603. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.01.019>
- [34] Zhang S, Hu X, Dong J, et al. Identification, evolution, and expression analysis of OsBSK gene family in *Oryza sativa* Japonica [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 565. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03905-1>
- [35] Zada A, Lv M, Li J. Molecular lesions in BRI1 and its orthologs in the plant Kingdom [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(15): 8111. <https://doi.org/10.3390/ijms25158111>

## Screening of the candidate interacting protein of *RLK1* and validation of its interacting relationship with *BSK* by yeast two-hybrid in cassava

Zheng Yu<sup>1,2#</sup>, Cheng Xiao<sup>1,2</sup>, Cheng Ke<sup>1,2</sup>, Zhao Huiping<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University/Hainan Key Laboratory of Biotechnology of Salt Tolerant Crops, Sanya, Hainan 572025, China)

**Abstract:** In order to screen proteins in cassava (*Manihot esculenta*) that jointly regulate cassava disease resistance with *MeRLK1*, 24 candidate interacting proteins of the *MeRLK1* protein including heat shock protein (Hsp), ADP-ribosylation factor 1 (ARF1), aquaporin transported protein (AQP), etc were selected through screening from the yeast two-hybrid library. Further analysis of the spatiotemporal expression correlation between *MeRLK1* and 24 candidate interacting genes revealed that genes including *Pentatricopeptide repeat 2 (PPR2)* and *BR-signaling kinase (BSK)* exhibited high correlations ( $R > 0.7$ ) with *MeRLK1* expression across diverse tissues and under stress conditions. Based on the screening, the full-length sequence vector of *MeBSK*, a protein related to the brassinosteroid (BR) signaling pathway was constructed. Through the yeast two-hybrid experiment, it was found that there might be an interaction between *MeRLK1* and *MeBSK*. Subsequently, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) will be needed to further verify internal interactions.

**Keywords:** *Manihot esculenta*; *MeRLK1*; yeast two-hybrid; interaction protein

(责任编辑:潘学峰)