Open Access

MeAPX2 在木薯抗普通花叶病毒病中的功能分析

付子昱#, 韦运谢*

（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: 抗坏血酸过氧化物酶（ascorbate peroxidase, APX）在植物抵御逆境胁迫中有显著作用。为了探究APX 在木薯抗普通花叶病毒病（cassava common mosaic virus, CsCMV）中的功能, 通过分析 CsCMV 侵染过程中, APX 酶活和 *MeAPXs* 的表达量发现, APX 酶活下降, 且 *MeAPX2* 的表达量显著下降, 因此确定 *MeAPX2* 为候选基因进行进一步研究。通过构建 *MeAPX2* 抑制植株和指标测定发现, *MeAPX2* 正调控木薯对 CsCMV 的抗性。进一步蛋白互作分析发现, MeAPX2 靶向结合 CsCMV 的外壳蛋白（coat protein, CP）, 且体内体外实验证实 CP 可抑制 MeAPX2 的活性。本研究结果显示, CsCMV 侵染木薯过程会抑制 APX 酶活, MeAPX2 通过直接靶向结合 CP 蛋白正调控木薯对 CsCMV 的抗性。

关键词: 木薯; *MeAPX2*; 木薯普通花叶病毒; 外壳蛋白; 功能分析

中图分类号: Q78; S533　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1674 − 7054(2026)06 − 1009 − 09

付子昱, 韦运谢. *MeAPX2* 在木薯抗普通花叶病毒病中的功能分析[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(6): 1009−1017.　DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.20250032　CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswxb.20250032

木薯（*Manihot esculenta* Crantz）是大戟科木薯属多年生灌木。作为世界六大粮食作物之一[1], 广泛种植于热带地区[2−3]。木薯有许多不同于其他粮食作物的优势[4], 如无需种子萌发, 可通过茎秆扦插进行无性生殖[5], 且木薯抗干旱、耐贫瘠、无需精耕细作[6], 具有长期发展潜力与研究价值。然而, 木薯在生长过程中常受多种病害危害, 严重影响其产业的发展, 如木薯花叶病毒病（cassava mosaic disease, CMD）。CMD 对木薯来说是一种毁灭性病害, 感染后会导致田间减产 30% ~ 40%, 且同一植株会被多种病毒反复感染, 对我国乃至全球的木薯生产构成了极大的威胁[7], 其中木薯普通花叶病毒（cassava common mosaic virus, CsCMV）是 CMD 致病病毒之一[8]。该病毒编码 5 个蛋白, 分别为编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase, RdRp）、3 个运动蛋白（triple gene block, TGB）和结构外壳蛋白（coat protein, CP）[9]。利用生物科学技术分离鉴定抗病基因, 解析其抗病机制, 创制抗病种质是目前防治 CMD 最有效的方法[10]。

当植物遭受病害危害或面临复杂环境时, 各种胁迫严重影响植物正常生长发育, 使细胞代谢异常, 导致植物体内产生大量活性氧（reactive oxygen species, ROS）物质, 例如超氧阴离子、羟基自由基和过氧化氢等[11], 从而破坏生物膜的结构和功能[12−13]。为了有效清除细胞内多余的 ROS, 植物进化出复杂的抗氧化系统, 降低和消除氧化胁迫, 保证植物正常生长发育。植物抗氧化系统大致可分为两类: 第一类是抗氧化剂, 如抗坏血酸（ascorbic acid, AsA）和谷胱甘肽（glutathione, GSH）等; 第二类是抗氧化酶, 如超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）等[14]。其中, 抗坏血酸过氧化物酶（ascorbate peroxidase, APX）参与抗坏血酸–谷胱甘肽（ascorbate-glutathione, ASC-GSH）循环清除植物体内积累的过氧化氢物质[15]。目前, 已有多种植物如盐地碱蓬（*Suaeda salsa*）[16]、白桦（*Betula platyphylla*）[17]、黑麦草（*Lolium perenne*）[18]、番茄（*Solanum lycopersicum*）等的 *APX* 基因

CC BY 4.0
收稿日期: 2025−02−15　　**修回日期:** 2025−03−16

基金项目: 海南省研究生创新科研课题（Qhys2023-238）
#第一作者: 付子昱（1999—）, 男, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 983443459@qq.com

***通信作者:** 韦运谢（1989—）, 女, 研究员。研究方向: 作物抗病分子生物学。E-mail: 994016@hainanu.edu.cn

被克隆[19]，并证实 *APX* 在抗氧化胁迫中的重要作用。目前有研究表明木薯遭遇胁迫发生响应时，木薯中 APX 活性也会发生变化[20]。当 ROS 的清除速度提升时，木薯对低温的耐受性也会增强[21]。而关于 *APX* 在木薯中免疫调控作用仍未见有关报道，木薯如何响应病毒侵染及抵御病毒的免疫系统网络尚未清楚。

本研究克隆 *MeAPX2* 并构建其抑制和过表达植株，对其进行木薯花叶病毒侵染，并对相关基因转录水平及酶活等生理指标进行测定，以期探究 *MeAPX2* 在木薯抗普通花叶病毒中的功能；同时解析 *MeAPX2* 在木薯抗普通花叶病中的作用机制，证实 *MeAPX2* 靶向结合 CsCMV 中的 CP，且 *MeAPX2* 的酶活可被 CP 抑制，以期筛选出抗病新品种、确保木薯产业的稳定发展起到一定作用。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所使用的过表达载体为 pEGAD，抑制载体为 pTRV1 和 pTRV2，蛋白表达载体为 pET32a，酵母相关载体为 pGBKT7、pGADT7。大肠杆菌 DH5α 感受态（DL1001，上海唯地），农杆菌 GV3101 感受态细胞（AC1001，上海唯地），BL21（DE3）感受态细胞（CD601，TRANS）。实验材料所用木薯品种均为‘华南 124’，栽培体积比例为 $V_{营养土}$：$V_{蛭石}$=2：1，置于海南三亚崖州独村实验室露天培养。

1.2 木薯种植及处理 选取 15～20 cm，有 3～4 个芽眼且大小基本一致的木薯茎秆放入花盆中，种植 3～4 周（平均温度 28～32 ℃）。将生长状况一致的木薯苗叶片接种病毒，每个处理设置 3 个生物学重复，最后将木薯叶片进行取样，用液氮速冻，置于−80 ℃ 超低温冰箱保存。

1.3 APX 酶活测定 根据南京建成生物工程研究所抗坏血酸过氧化物酶（APX）测试盒（A123-1-1，南京建成）对蛋白进行酶活性测定。按照说明书配置体系，最后加 100 μL 待测样品。将上述反应体系混匀后立即在 37 ℃ 条件下水浴 2 min，以沸水失活的蛋白为空白对照，最终在 290 nm 处测定数据，并计算酶活。进行 3 次生物学重复，并记录相关数值。酶活性定义：每 mg 重组蛋白每 min 在每 mL 体系中催化 1 μmol·L^{-1} 底物为 1 个活力单位（U）。测定木薯叶片的 APX 酶活，将处理后的 0.1 g 叶片置于研钵中，加入缓冲液 0.9 mL，冰水浴匀浆，离心后取上清，视作蛋白重复上述操作。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 合成 根据 CTAB 粗提取法提取木薯叶片 RNA[22]，再参照试剂盒（11151ES10，YEASEN）反转录成 cDNA。

1.5 *MeAPX2* 全长片段扩增 根据 Phytozome 数据库中木薯 *MeAPX2* 基因的序列信息，设计全长扩增引物 *MeAPX2*-F（ATGCCGAAGAACTACCCAAAA）和 *MeAPX2*-R（TTACGCCTCAGCAAATCCGA）。以木薯 cDNA 为模板，扩增 *MeAPX2* 的编码区（Coding sequences，CDS），凝胶电泳检测扩增产物。将 PCR 产物利用胶回收试剂盒回收，连接到所需载体上构建 *MeAPX2* 相关载体，进行后续实验。

1.6 *MeAPXs* 基因的相对转录水平表达分析 根据序列目的基因设计荧光定量 PCR 引物（q*MeAPXs*-F/R），RT-qPCR 反应为 15 μL，包括：TB Green Premix Ex Taq Ⅱ Fast qPCR（2×）为 7.5 μL，正反引物各 0.3 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH_2O 4.9 μL。扩增程序：95 ℃ 预变性 3 min，95 ℃ 变性 15 s，55 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 20 s，循环 48 次。以木薯 *MeEF1a* 为内参基因，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *MeAPXs* 基因相对转录水平表达量。

1.7 构建 *MeAPX2* 过表达和抑制植株过表达和抑制植株 将构建好的 pEGAD-*MeAPX2* 和 pTRV2-*MeAPX2* 质粒转入根癌农杆菌 GV3101 菌株中并注射木薯叶片。提取对照组与实验组叶片 RNA 并反转录成 cDNA 作为模板，以木薯 *MeEF1a* 为内参基因，采用 RT-qPCR 的方法分析 *MeAPX2* 在植株中的相对表达情况[23]，确定过表达和抑制植株是否构建成功。

1.8 酵母点对点分析 将酵母表达质粒 pGBKT7-A、pGADT7-B 转化到酵母 AH109 菌株的感受态中，并分别涂在 SD/-Leu-Trp（630417，Clontech）和 SD/-Leu-Trp-His-Ade（630428，Clontech）的平板上，于 28 ℃ 条件下培养。分别挑取 SD/-Leu-Trp-His-Ade 平板上的酵母单菌落至 SD/-Leu-Trp 培养液中培养，当菌液 OD_{600} 达到 1 时，提取酵母质粒并进行 PCR 验证。将验证正确的单菌落在超净工作台中梯度稀释并点板至 SD/-Leu-Trp 和 SD/-Leu-Trp-His-Ade 板培养基上，28 ℃ 条件培养 4 d 后，进行拍照记录[24]。

1.9 原核表达载体的构建及诱导蛋白 将目的片

段通过同源连接连接到 pET32a 载体上并测序验证。验证成功后将质粒转入 DE3 菌株中，选取阳性克隆，采用 LB 培养液培育，当 OD_{600}=0.6，加入 IPTG 后继续培养 6 h，收集菌体、破碎，离心后上清即所需蛋白[25]。

1.10　Pull-down　将目的蛋白、A/G 磁珠(L00277, GenScript)、抗体混合于离心管中孵育过夜。用 PBS 缓冲液洗涤混合物，以除去未结合到磁珠上的蛋白。加入上样缓冲液后，将离心管于沸水中煮 5 min，最后通过蛋白质印迹检测蛋白质[26]。

1.11　数据处理　本研究中所有数据均来自 3 个生物学重复，生物学重复的样品均来自多个植株叶片。不同字母代表样本间存在显著性差异，P<0.05。用 Graphpad 对数据进行处理，用 SPSS、Figdraw(https://www.figdraw.com/static/index.html)进行绘图。

2　结果与分析

2.1　木薯普通花叶病毒侵染过程 APX 酶活和 *MeAPXs* 的转录水平　为探究木薯中 APX 酶活在木薯普通花叶病毒侵染过程中的变化，收集并测定病毒侵染后不同时间点(侵染后 0、3、6、9、12、24 h，hpi)的木薯叶片的 APX 酶活，发现 APX 酶活在 3 hpi时有所增加，而随着侵染时间的延长，其活性逐步下降(图 1)，说明 CsCMV 的侵染会影响木薯体内 APX 酶活性。

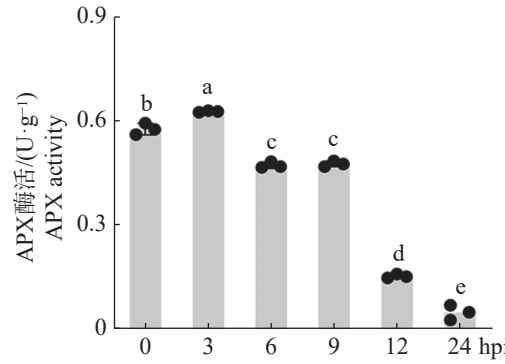


图 1　CsCMV 侵染过程中木薯 APX 的酶活

Fig. 1　APX activity in cassava during CsCMV infection

注：取 CsCMV 侵染木薯 0、3、6、9、12、24 hpi 的叶片进行 APX 酶活检测。显著差异用不同小写字母表示(P<0.05)，下同。

Note: After cassava was infected with CsCMV, the leaves were collected and used for the analysis of the APX enzyme activity at 0, 3, 6, 9, 12, 24 hpi. Significant differences are indicated by different letters at the level of P < 0.05, similarly hereinafter.

在病毒侵染过程，APX 酶活发生改变，推测 *MeAPXs* 的转录水平可能也发生改变。经检测木薯体内 *MeAPXs* 的表达量发现，随着侵染时间的增加，只有 *MeAPX2* 表达量逐渐下降，而 *MeAPX* 家族的其他成员(*MeAPX1* 和 *MeAPX3*)的表达量无显著变化(图 2)。结果表明，*MeAPX2* 能够响应 CsCMV 的侵染，并且可能参与木薯的免疫应答反应，因此选其作为后续研究对象。

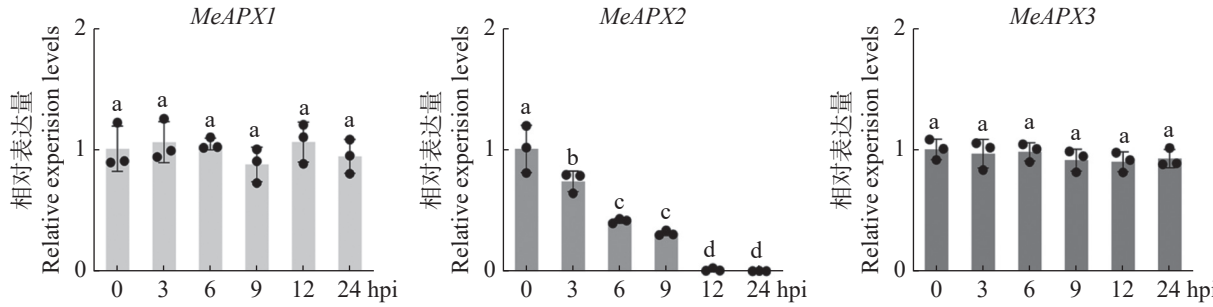


图 2　*MeAPXs* 响应 CsCMV 侵染的相对转录水平

Fig. 2　The relative transcript level of *MeAPXs* in response to CsCMV infection

注：取 CsCMV 侵染木薯 0、3、6、9、12、24 hpi 的叶片进行 *MeAPXs* 转录水平分析。

Note: After cassava was infected with CsCMV, the leaves were collected and used for the analysis of the transcript levels of *MeAPXs* at 0, 3, 6, 9, 12, 24 hpi.

2.2　*MeAPX2* 在木薯抗普通花叶病毒中的功能分析

为了探究 *MeAPX2* 的生物学功能，首先构建其抑制植株。RT-qPCR 结果表明，*MeAPX2* 在 *MeAPX2*-RNAi 植株中的转录水平显著低于对照组，抑制率达到 40% 以上(图 3)。而其同家族的 *MeAPX1* 和 *MeAPX3* 在 *MeAPX2*-RNAi 植株中的转录水平相较于对照组无显著变化(图 3)，说明成功构建 *MeAPX2*-RNAi 植株。

为了研究 *MeAPX2* 是否参与调节木薯对 CsCMV 的免疫反应，在 *MeAPX2*-RNAi 和 CK 叶片中分别注射木薯普通花叶病毒的侵染性克隆，并选取不同侵染时间点(侵染后 0、7、14 d，dpi)样品 RT-

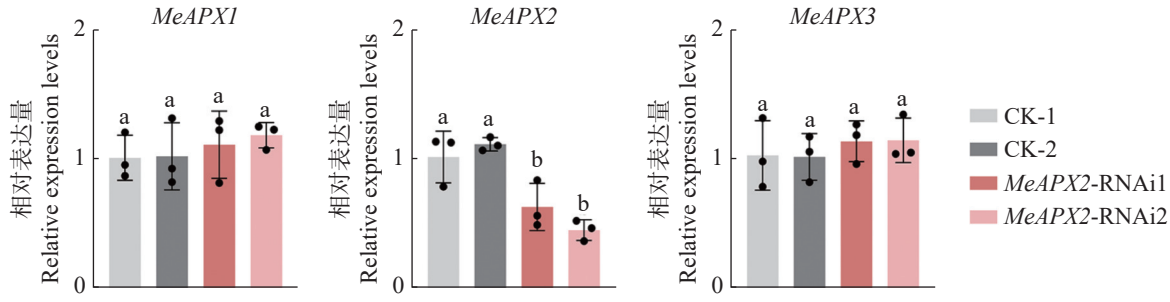


图 3　*MeAPX2*-RNAi 植株中 *MeAPXs* 的转录水平

Fig. 3　Expression level of *MeAPXs* in the *MeAPX2*-RNAi plants

注：RT-qPCR 检测 *MeAPXs* 在 *MeAPX2*-RNAi 植株中的相对转录水平。*MeAPXs* 在对照组中的转录水平设为 1。

Note: The transcript level of *MeAPXs* in the *MeAPX2*-RNAi plants was analysed via RT-qPCR. The relative expression of *MeAPXs* at the control plant was set as 1.

qPCR 分析 *RdRp* 和 *TGB1* 的相对转录水平。结果发现，*MeAPX2*-RNAi 植株中的 *RdRp* 和 *TGB1* 表达量在7、14dpi 时均显著高于CK，是CK 的1.5 倍(图4)。同时，*MeAPX2*-RNAi 植株中 APX 酶活在 7、14 dpi 时均显著低于 CK(图 4)。观察表型发现，*MeAPX2*-RNAi 植株整体萎蔫程度比 CK 组更明显，顶端叶片会更黄且叶片卷曲变形严重(图 5)。这些结果表明 *MeAPX2* 正调控木薯对 CsCMV 的免疫反应。

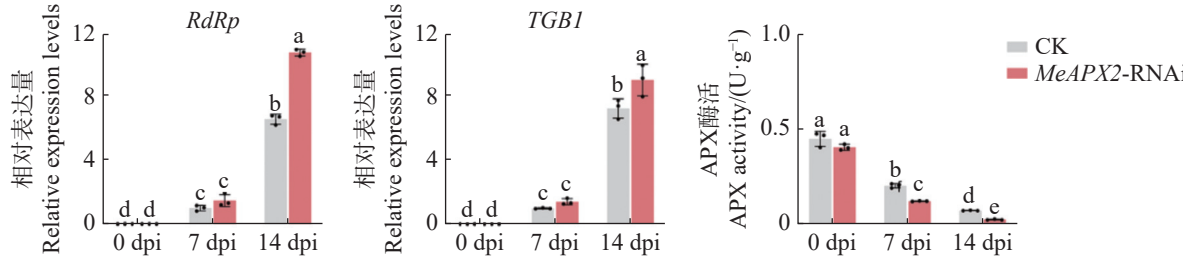


图 4　*MeAPX2*-RNAi 植株中的病毒积累量和 APX 酶活

Fig. 4　The accumulation of virus and APX enzyme activity in the *MeAPX2*-RNAi plants

注：在 *MeAPX2*-RNAi 植株中接种 CsCMV 的侵染性克隆，在 0、7、14 dpi 时收集叶片并进行生理指标测定。

Note: The *MeAPX2*-RNAi plants were infected with the infectious clone of CsCMV, and then the leaves were collected and used to determine the physiological indicators at 0, 7, 14 dpi.

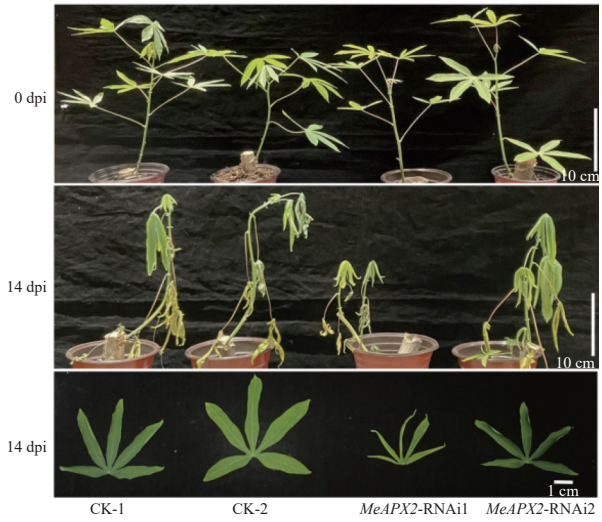


图 5　CsCMV 侵染 *MeAPX2*-RNAi 植株表型

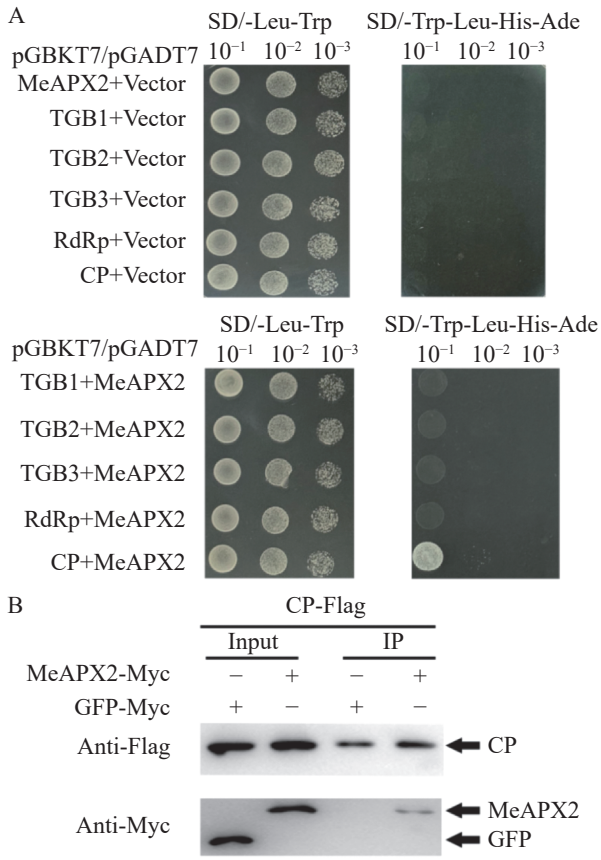
Fig. 5　Phenotype of *MeAPX2*-RNAi plants infected with CsCMV

注：*MeAPX2*-RNAi 植株在 CsCMV 侵染 14 dpi 后生长表型。木薯整株的比例尺为 10 cm，木薯叶片的比例尺为 1 cm。

Note: Phenotype of *MeAPX2*-RNAi plants after infected with CsCMV at 14 dpi. Scale bars: 10 cm forwhole plant, 1 cm for leaves.

2.3　*MeAPX2* 与木薯普通花叶病毒编码蛋白互作验证　为了进一步探究 *MeAPX2* 在病毒中的靶蛋白，点对点分析其与 CsCMV 编码的蛋白互作情况。分别构建 RdRp-pGBKT7、TGB1-pGBKT7、TGB2-pGBKT7、TGB3-pGBKT7、CP-pGBKT7 质粒并与 *MeAPX2*-pGADT7 分别进行酵母点对点实验，结果发现，只有共转 *MeAPX2*-pGADT7 与 CP-pGBKT7 组合在 SD/-Leu-Trp-His-Ade 培养基长出了酵母单菌落，而共转 *MeAPX2*-pGADT7 与 RdRp-pGBKT7、TGB1-pGBKT7、TGB2-pGBKT7、TGB3-pGBKT7 组合则不能在 SD/-Leu-Trp-His-Ade 培养基生长(图 6-A)，说明 *MeAPX2* 与 CP 在酵母体内互作。为了进一步验证 *MeAPX2* 与 CP 之间的相互作用，构建 *MeAPX2*-pET32a、CP-pET32a 表达载体，进行 Pull-down 试验发现，MeAPX2 在 Input 和 IP 组均可以通过 Myc 抗体检测出条带，而 GFP 只能在 Input 组检测出条带，IP 组则无法

检测出对应条带(图 6-B), 结果表明 *MeAPX2* 与 CP 可直接发生互作。



A. MeAPX2 与 CP 在酵母中互作。B. Pull-down 证实 MeAPX2 与 CP 在体外互作。

A. MeAPX2 interacted with CP in yeast. B. Pull-down assay showed the interaction of MeAPX2 and CP.

图 6　MeAPX2 与 CP 互作

Fig. 6　Interaction of *MeAPX2* and CP

注: 共转融合表达质粒的 AH109 菌株在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上进行培养筛选。使用 Myc 抗体检测携带 MeAPX2, 并使用 Flag 检测共免疫沉淀的 CP-Flag。

Note: Yeast strain AH109 cotransformed with plasmids expressing the indicated fusion proteins was plated on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade. Myc antibody was used to detect MeAPX2, and Flag antibody was used to detect co-immunoprecipitated CP-Flag.

2.4　*MeAPX2* 与木薯普通花叶病毒 CP 蛋白互作的体外功能分析　为了进一步探究 *MeAPX2* 与 CP 互作的生物学功能, 分析其对 *MeAPX2* 的体外酶活的影响。在 50 μL 体系中, 保持 *MeAPX2* 总蛋白质量浓度不变, 随着 CP 蛋白质量浓度的增加, *MeAPX2* 的酶活逐渐下降; 而对照组 GFP 蛋白质量浓度 增加却未改变 *MeAPX2* 的酶活(图 7)。实验结果表明, CP 蛋白会体外抑制 *MeAPX2* 的酶活。

2.5　*MeAPX2* 与木薯普通花叶病毒 CP 蛋白互作的体内功能分析　为了进一步分析 CP 与 *MeAPX2* 互作的体内生物学功能, 构建 *MeAPX2* 过表达植株并 RT-qPCR 分析其表达量, 结果表明, *MeAPX2* 在 *MeAPX2*-OE 植株中的转录水平显著高于对照组, 为对照组的 20 倍以上(图 8)。而 *MeAPX1* 和 *MeAPX3* 在 *MeAPX2*-OE 中的转录水平与对照组相比较, 无显著变化(图 8), 说明已成功构建 *MeAPX2*-OE 植株。

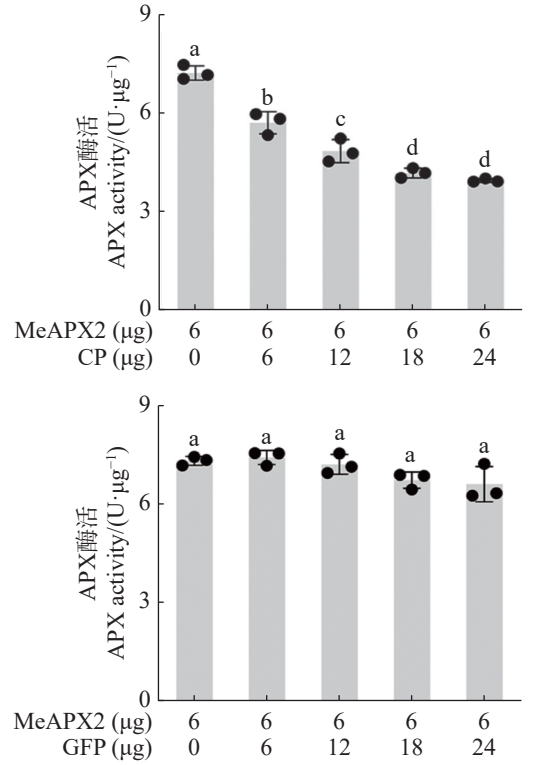


图 7　CP 体外抑制 MeAPX2 酶活

Fig. 7　CP inhibited the enzyme activity of MeAPX2 *in vitro*

注: 将定量的 MeAPX2 蛋白(6 μg)和 CP 蛋白按不同比例混合并检测 MeAPX2 的酶活, 以 GFP 蛋白为对照组。

Note: A certain amount (6 μg) of was mixed with different contents of CP protein to test the enzyme activity of *MeAPX2* with the GFP protein as the control.

在 *MeAPX2*-OE 和对照植株中分别喷施等量 CP 和 GFP 蛋白后, 接种 CsCMV 并统计病毒积累量发现, 外源喷施 CP 蛋白植株的 *RdRp* 和 *TGB1* 转录水平在 7、14 dpi 时均显著高于对照组(图 9)。同时, 外源喷施 CP 组的 APX 酶活在 7、14 dpi 时均显著低于对照组(图 9)。观察接种 CsCMV 14 dpi 的表型发现, 喷施 CP 蛋白的植株顶端叶片卷曲且更黄, 而外源施加 GFP 蛋白组的植株为叶片黄化(图 10)。结果表明, CP 抑制 *MeAPX2* 介导的免疫反应。

3　讨　论

研究表明, 植物病毒侵染宿主时, 会严重影响植物自身代谢和生长发育, 可导致活性氧相关的

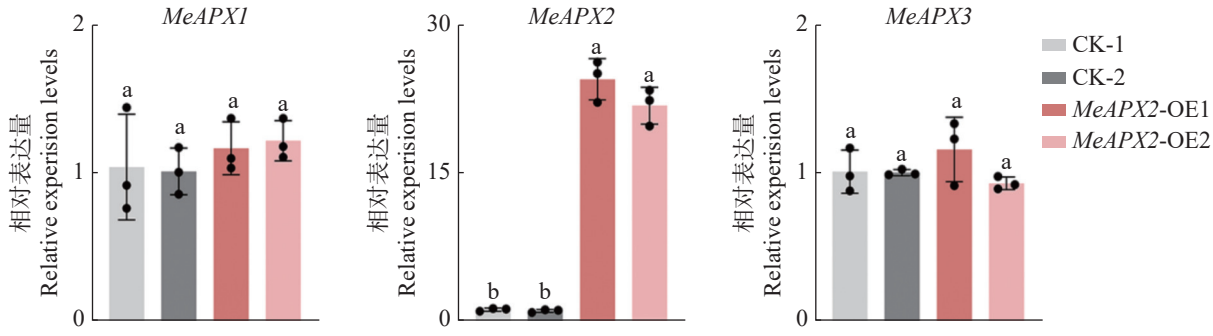


图 8　*MeAPX2*-OE 植株中 *MeAPXs* 的表达量

Fig. 8　The transcript level in the *MeAPXs* at *MeAPX2*-OE plants

注：RT-qPCR 检测 *MeAPXs* 在 *MeAPX2*-OE 植株中的相对转录水平。以 *MeAPXs* 在对照组中的相对转录水平设为 1。

Note: The relative expression levels of *MeAPXs* in the *MeAPX2*-OE plants were detected via RT-qPCR. The relative expression of *MeAPXs* in the control plants was set as 1.

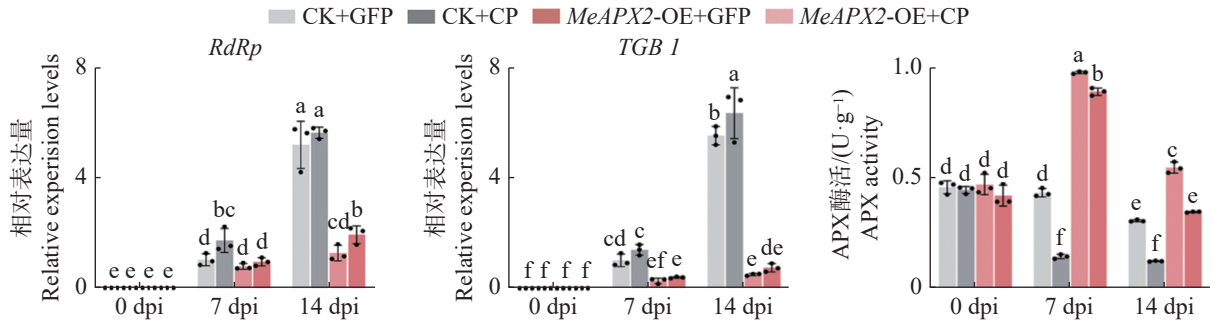


图 9　*MeAPX2*-OE 植株中的病毒积累和 APX 酶活

Fig. 9　The accumulation of virus and APX enzyme activity in the *MeAPX2*-OE plants

注：在 *MeAPX2*-OE 植株中连续喷施 CP 蛋白 7 d 后，进行 CsCMV 处理，并在 0、7、14 dpi 时取样和生理指标。以等量 GFP 蛋白为对照。

Note: The *MeAPX2*-OE plants were per-treated with CP protien for 7 d, and then infected with CsCMV. The leaves were collected and used to determine the physiological indicators at 0, 7, 14 dpi. The GFP protein was used as the control.

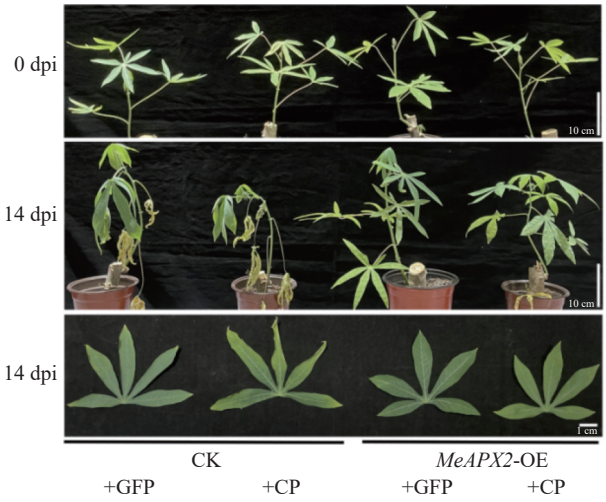


图 10　CP 对 *MeAPX2*-OE 植株表型的影响

Fig. 10　Effects of CP on MeAPX2-OE plant phenotypes

注：GFP 为对照，展示 CP 介导的 *MeAPX2* 过表达植株接种 CsCMV 后 14 dpi 的症状表型。整株木薯比例尺 10 cm，叶片比例尺 1 cm。

Note: Images showing symptoms of CP-mediated *MeAPX2*-OE plants (GFP as control) at 14 dpi post CsCMV infection. Scale bars: 10 cm for whole plant, 1 cm for leaves.

过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性增加，这两种酶会平衡植物组织中活性氧的积累以应对病原体的侵染[27]。APX 作为植物体内参与免疫反应的重要过氧化物酶，也可能参与了宿主对病毒的免疫应答。本研究发现，在 CsCMV 侵染下，APX 酶活先上升再下降。在逆境条件下，植物的抗性与其体内 *APX* 基因的表达以及酶活性水平具有密切关系[28]。同时有研究表明，APX 基因家族成员转录水平的快速应答会维持细胞质中高的 APX 活性，抵御逆境最初侵染时导致细胞膜质过氧化[29]，以保护细胞成分免受 ROS 诱导的应激氧化损伤[30]。综上所述，APX 在植物抵御逆境胁迫时发挥着重要的作用。最初 APX 活性升高，可维持较高的抗逆性，而后病毒的复制逐渐抑制 *MeAPX2* 的表达和 APX 活性，细胞内动态平衡被破坏，免疫防线逐渐削弱，病毒侵染程度逐渐加重。

为了成功侵染宿主，病毒始终与宿主免疫系统持续地发生“军备竞赛”。在病毒与宿主植物相互作用的过程中，特定病毒蛋白与寄主蛋白直接相互作用发挥着重要作用。而不同病毒的编码蛋白破坏宿主免疫系统的途径和靶蛋白存在差异。在小麦中，小麦黄花叶病毒（Wheat yellow mo-

saic virus, WYMV)编码的 P1 蛋白通过干扰钙调蛋白相关的免疫防御, 从而促进其在小麦中的侵染[31]。而在本实验中, 通过酵母点对点验证和 Pull-down 实验, 证实 *MeAPX2* 靶向木薯花叶病毒的编码蛋白 CP, 且其酶活性被 CP 抑制。研究结果将为深入解析 CsCMV 与木薯间的攻防机制提供新线索和木薯抗病分子育种提供候选基因。

随着木薯在世界粮食作物及经济作物的地位逐渐提高, CMD 作为木薯重要病毒病之一, 严重影响了木薯生产[32−33]。根据王国芬等[8] 的调查结果, CsCMV 检出率为 36.5%, 表明该病毒在我国主要木薯栽培区已有较广分布, 应予以重视并持续开展相关研究。在番茄[34]、拟南芥[35]、苹果[36] 和水稻[37] 等植物的研究结果表明, *APX* 相关基因表达或酶活变化与植物逆境耐受密切相关; 但 *MeAPX2* 在木薯抗普通花叶病毒病中的功能尚缺乏系统研究, 因此, 开展其生物学功能及作用机制研究具有重要意义。同时, 研究表明 APXs 参与多种逆境胁迫, 这为后续探究 *MeAPX2* 是否参与木薯的其他胁迫反应提供了研究基础, 有助于培育广谱抗性木薯优异种质。

4　结　论

本研究首先确定 *MeAPX2* 是木薯抗 CsCMV 的正向调节因子, 并阐明其发挥作用的分子机制。木薯遭受 CsCMV 侵染时, *MeAPX2* 的表达被显著抑制, 同时 APX 酶活降低, 表明 *MeAPX2* 在木薯免疫系统对抗 CsCMV 中发挥重要作用。通过酵母双杂交及 Pull-down 实验证实 *MeAPX2* 会靶向结合 CsCMV 编码蛋白 CP, 抑制植株体内 APX 酶活, 破坏木薯免疫系统, 成功侵染宿主。

参考文献:

[1] Shan Z Y, Luo X L, Wu M Y, et al. Genome-wide identification and expression of GRAS gene family members in cassava[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 46. https://doi.org/10.1186/s12870-020-2242-8

[2] 安飞飞, 罗秀芹, 薛晶晶, 等. 白心与黄心糖木薯代谢物及相关基因表达分析[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(5):1092−1100.https://doi.org/10.13836/j.jjau.2022109

[3] 王春华. 木薯在饲料中的应用现状及发展趋势[J]. 中国饲料添加剂, 2018(1): 24−25.

[4] El-sharkawy M A. Cassava biology and physiology[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(4): 481−501. https://doi.org/10.1007/s11103-005-2270-7

[5] SHEAT S, MUSHI E, GWANDU F, et al. Cut, Root, and Grow: Simplifying Cassava Propagation to Scale[J]. Plants, 2024, 13(4): 471. https://doi.org/10.3390/plants13040471

[6] Shan Z Y, Luo X L, Wei M G, et al. Physiological and proteomic analysis on long-term drought resistance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 17982. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35711-x

[7] 时涛, 王国芬, 李超萍, 等. 木薯花叶病在中国发生的首次报道[J]. 热带农业科学, 2018, 38(10): 99−100.

[8] 王国芬, 李超萍, 时涛, 等. 我国木薯花叶病毒病的发生危害及其病原鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(6): 1668−1677.https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2021.06.023

[9] Yu N T, Yang Y, Li J H, et al. Complete genome sequence of a distinct isolate of cassava common mosaic virus (CsCMV) infecting cassava in Hainan, China[J]. European Journal of Plant Pathology, 2020, 158(2): 583−587. https://doi.org/10.1007/s10658-020-02088-5

[10] Houngue J A, Zandjanakou-tachin M, Ngalle H B, et al. Evaluation of resistance to cassava mosaic disease in selected African cassava cultivars using combined molecular and greenhouse grafting tools[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2019, 105: 47−53. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.07.003

[11] Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 209−236. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322

[12] Chen H T, Shi Y, An L, et al. Overexpression of *SlWRKY6* enhances drought tolerance by strengthening antioxidant defense and stomatal closure *via* ABA signaling in *Solanum lycopersicum* L[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 213: 108855. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108855

[13] Liu X L, Ji P, Yang H T, et al. Priming effect of exogenous ABA on heat stress tolerance in rice seedlings is associated with the upregulation of antioxidative defense capability and heat shock-related genes[J]. Plant Growth Regulation, 2022, 98(1): 23−38. https://doi.org/10.1007/s10725-022-00828-7

[14] ZANDI P, SCHNUG E. Reactive Oxygen Species, Antioxidant Responses and Implications from a Microbial Modulation Perspective [J]. Biology, 2022, 11(2): 155. https://doi.org/10.3390/biology11020155

[15] 刘备, 宋玉梅, 孙铭, 等. 燕麦劣变种子吸胀过程中线粒体 AsA-GSH 循环的生理响应[J]. 草地学报, 2021, 29(2):211-219.https://doi.org/10.11733/j.issn.1007-0435.2021.02.001

[16] Ma C L, Wang P P, Cao Z Y, et al. cDNA cloning and gene expression of *APX* in *Suaeda salsa* in response to salt stress[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular

Biology, 2002, 28(4): 261−266. https://doi.org/10.3321/j.issn.1671-3877.2002.04.003

[17] 王超, 杨传平, 王玉成, 等. 白桦抗坏血酸过氧化物酶(APX)基因克隆及表达分析 [J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(3): 79−81. https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-5382.2009.03.029

[18] HU L X, LI H Y, PANG H C, FU J M. Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (Lolium perenne) differing in salt tolerance [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(2): 146−156. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.08.020

[19] WANG Y J, WISNIEWSKI M, MEILAN R, et al. Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2005, 130(2): 167−173. https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.167

[20] Shang S, Tang Y Q, Dai J, et al. Genomic analysis of the principal members of antioxidant enzymes in simulated stresses response and postharvest physiological deterioration in cassava[J]. Tropical Plant Biology, 2021, 14(4): 419−428. https://doi.org/10.1007/s12042-021-09304-4

[21] XU J, YANG J, DUAN X G, JIANG Y M, ZHANG P. Increased expression of native cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improves tolerance to oxidative and chilling stresses in cassava (Manihot esculenta Crantz) [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 208. https://doi.org/10.1186/s12870-014-0208-4

[22] 董亚彬, 白玉晶. 木薯过氧化氢酶基因的克隆与原核表达 [J]. 分子植物育种, 2024, 22(15): 4912−4918. https://doi.org/10.13271/j.mpb.022.004912

[23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402−408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

[24] 石波明. 巴西橡胶树橡胶转移酶 HRT2 互作蛋白的筛选与表达分析[D]. 海口: 海南大学, 2021. https://doi.org/10.27073/d.cnki.ghadu.2021.001278

[25] 张也, 韦运谢. 木薯 *MeLTP* 基因克隆及原核表达分析 [J]. 分子植物育种, 2024, 24(18): 6023−6029. https://doi.org/10.13271/j.mpb.024.006023

[26] 陈耀. 营养应激对 TRIB2 蛋白稳定性的调控作用及其分子机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020. https://doi.org/10.27170/d.cnki.gjsuu.2020.002476

[27] XU Y, ZHANG S T, ZHANG M Y, JIAO S B, GUO Y F, JIANG T. The role of reactive oxygen species in plant-virus interactions [J]. Plant Cell Reports, 2024, 43(8): 197. https://doi.org/10.1007/s00299-024-03280-1

[28] 曾秀存, 孙万仓, 方彦, 等. 白菜型冬油菜抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 基因的克隆、表达及其活性分析[J]. 作物学报, 2013, 39(8): 1400−1408. https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2013.01400

[29] Mishra P, Bhoomika K, Dubey R S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings[J]. Protoplasma, 2013, 250(1): 3−19. https://doi.org/10.1007/s00709-011-0365-3

[30] 杜佳庚, 周瑾, 李晓燕, 等. 芹菜 *APX* 基因家族鉴定及其表达分析[J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(6): 54−63. https://doi.org/10.7606/j.issn.1000-7601.2023.06.06

[31] Chen D, Zhang H Y, Hu S M, et al. The P1 protein of wheat yellow mosaic virus exerts RNA silencing suppression activity to facilitate virus infection in wheat plants[J]. The Plant Journal, 2023, 116(6): 1717−1736. https://doi.org/10.1111/tpj.16461

[32] REY C, VANDERSCHUREN H. Cassava Mosaic and Brown Streak Diseases: Current Perspectives and Beyond [J]. Annual Review of Virology, 2017, 4(1): 429−452. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041913

[33] UKE A, TOKUNAGA H, UTSUMI Y, et al. Cassava mosaic disease and its management in Southeast Asia [J]. Plant Molecular Biology, 2022, 109: 301−311. https://doi.org/10.1007/s11103-021-01168-2

[34] DUAN M, FENG H L, WANG L Y, LI D, MENG Q W. Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(9): 867−877. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.02.012

[35] 李泽琴, 李锦涛, 邴杰, 等. 拟南芥 APX 家族基因在植物生长发育与非生物逆境胁迫响应中的作用分析[J]. 遗传, 2019, 41(6): 534−547. https://doi.org/10.16288/j.yczz.19-026

[36] YANG Q, LIU Y, ZHOU J, et al. The transcription factor MhZAT10 enhances antioxidant capacity by directly activating the antioxidant genes MhMSD1, MhAPX3a and MhCAT1 in apple rootstock SH6 (Malus honanensis × M. domestica) [J]. Tree Physiology, 2024, 44(7): tpae077. https://doi.org/10.1093/treephys/tpae077

[37] 鲁振强. 水稻 APX 与 CAT 同工酶的功能特性及其与盐胁迫关系的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.

Functional analysis of *MeAPX2* gene in cassava resistance to cassava common mosaic disease

Fu Ziyu[#], Wei Yunxie[*]

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

Abstract: Ascorbate peroxidases (APXs) play a significant role in plant resistance to abiotic stress. An attempt was made to investigate the role of APXs in cassava resistance to cassava common mosaic virus (CsCMV). APX activity and the expression level of *MeAPXs* during infection of cassava with CsCMV were analyzed. The results showed that APX activity and *MeAPX2* transcript level were reduced. Therefore, *MeAPX2* was identified as a candidate gene for further analysis. *MeAPX2* positively regulated cassava resistance to CsCMV, as determined by the disease index in *MeAPX2*-silenced plants. Further analysis revealed that *MeAPX2* directly interacts with the coat protein (CP) of CsCMV. Moreover, CP was found to inhibit the activity of *MeAPX2* both *in viv*o and *in vitro*. The results demonstrated that CsCMV suppresses APX activity during infection in cassava. Furthermore, *MeAPX2* positively regulates cassava resistance to CsCMV by targeting CP.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz; *MeAPX2*; cassava common mosaic virus; coat protein; functional analysis

(责任编辑:钟云芳)