

## 木薯 *FRK1* 类似基因的分离及表达分析

吴金山<sup>1,3</sup>, 陆小静<sup>2</sup>, 王思琦<sup>1</sup>, 黄家权<sup>1</sup>, 张逸杰<sup>3</sup>, 贾迎雪<sup>3</sup>, 陈银华<sup>1\*</sup>

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 3. 海南大学林学院, 海南海口 570228

**摘要:** *FRK1* 是拟南芥先天免疫下游标记基因, 该基因的表达意味着 PTI 途径的启动。本研究以拟南芥 *FRK1* 蛋白序列采用 Blastp 的方法, 从木薯本地基因组数据库中筛选 *FRK1* 类似基因共 8 个, 经生物信息学分析发现此 8 个类似基因均编码类受体蛋白激酶, 其氨基酸长度位于 804~921 aa 之间, 蛋白质序列平均长度为 863 aa; 8 个类似基因在木薯染色体上呈不均匀分布, 主要分布在 11 号和 4 号染色体上。对其基因结构分析发现, 8 个类似基因可分为两大类, 与进化树分析结果一致。根据保守基序的位置、氨基酸残基长度等信息分析发现, 8 个类似 *FRK* 蛋白与 *AtFRK1* 具有 3 个相同的保守基序, 且长度位于 50~250 aa 之间。经与 *AtFRK1* 比对, 综合蛋白基序、染色体定位以及进化关系等结果, 候选 *MeFRK1* 基因为木薯基因组中先天免疫下游标记基因。以木薯 SC8 组培幼苗为材料, 分别利用激素 SA、JA 和病原菌 *Xam* 进行处理后, 利用荧光定量 PCR 测定 *MeFRK1* 基因在叶片中的表达量。结果表明: 3 个处理表达量基本均呈先上升后下降的变化趋势。激素 SA、JA 处理在 15 min 时均达到最大值, 且 SA 的表达量略高于 JA, 而在病原菌 *Xam* 处理后第 4 天时达到最大值, 此时表达量明显高于 SA、JA 处理, 是 SA 的 2.84 倍, JA 的 3.06 倍。由此可知, *MeFRK1* 在响应 SA 和 JA 信号途径时, 短时间内具有正调控作用, 且反应较为迅速。在病原菌 *Xam* 胁迫中, 能更好地诱导该基因的表达, 从而提高木薯对病原菌 *Xam* 的抗性。其结果可为进一步建立木薯抗病分子体系奠定基础。

**关键词:** 木薯; *FRK1* 类似基因; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S533 文献标识码: A

## Isolation and Expression Analysis of *FRK1*-Like Genes from Cassava

WU Jinshan<sup>1,3</sup>, LU Xiaojing<sup>2</sup>, WANG Siqi<sup>1</sup>, HUANG Jiaquan<sup>1</sup>, ZHANG Yijie<sup>3</sup>, JIA Yingxue<sup>3</sup>, CHEN Yinhua<sup>1\*</sup>

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Tropical Crop Germplasm Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. College of Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

**Abstract:** *FRK1* is a marker gene downstream of the innate immunity in *Arabidopsis thaliana* (At), and *FRK1*'s expression implies the initiation of the PTI pathway. This experiment screened eight *FRK1*-like genes from the cassava local genomic database via the Blastp method. Bioinformatics analysis reveals that all the eight *FRK1*-like genes encode receptor-like protein kinases with amino acid lengths between 804–921 aa and an average protein sequence length of 863 aa. The eight genes were found unevenly distributed on cassava chromosomes, mainly on chromosomes 11 and 4. The analysis of the gene structures showed that the eight genes could be classified into two groups, which in agreement with the results of the evolutionary tree analysis. Based on the location of the conserved motifs and the length of amino acid residues, it was found that *MeFRK1*, *MeFRK4* and *MeFRK5* shared three conserved motifs with *AtFRK1*, and the length of the conserved motifs was between 50 and 250 aa. By comparing with *AtFRK1* and factoring in the results of protein motifs, chromosome positioning and evolutionary relationships, *MeFRK1* was identified as a marker gene downstream of the innate immunity in the cassava genome. The experiment was conducted on cassava SC8 group-cultured seedlings, and the expression of *MeFRK1* gene in leaves was measured by fluorescence quantitative PCR

收稿日期 2022-07-26; 修回日期 2022-09-02

基金项目 国家现代木薯产业技术体系项目 (No. CARS-11-HNCYH)。

作者简介 吴金山 (1984—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 植物基因抗病功能。\*通信作者 (Corresponding author): 陈银华 (CHEN Yinhua), E-mail: yhchen@hainanu.edu.cn。

after treatment with the hormones SA, JA and the pathogenic bacteria *Xam*, respectively. The experiment unveiled that the expression of *MeFRK1* gene after the treatment of hormones SA, JA and *Xam* all demonstrated an increasing trend followed by a decreasing one. After the treatment of the hormone SA and JA, the expression of *MeFRK1* gene both peaked at 15 min, with the expression under SA treatment slightly higher than that of JA. While after the treatment of *Xam*, the expression peaked at 4 d at which time the expression was significantly higher than that of SA and JA treatments, 2.84 times that of the SA treatment and 3.06 times that of the JA treatment. It is evident that *MeFRK1* has a positive regulatory effect in response to SA and JA signaling pathways for a short period of time, and the response is relatively rapid. Pathogenic *Xam* could better induce the expression of *MeFRK1* gene, thus improving the resistance of cassava to pathogenic bacteria *Xam*. The results may lay the foundation for further establishment of a molecular system for cassava disease resistance.

**Keywords:** cassava; *FRK1-like* genes; bioinformatics; expression analysis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.001

果糖激酶 (fructokinase, FRK) 是植物细胞中果糖磷酸化的主要催化酶、变构酶和高效酶, 其国际系统分类编号为 EC2.7.1.4, 是植物糖代谢的“控制阀”, 在植物生长发育过程中主要调控植物的糖代谢、生长发育和响应生物/非生物胁迫等作用, 是一种必不可少的不可逆酶<sup>[1]</sup>。目前, 已有 20 多种植物分离鉴定出 *FRK* 基因<sup>[2]</sup>, 如甜菜直根<sup>[3]</sup>、大豆<sup>[4]</sup>、马铃薯块茎<sup>[5]</sup>、番茄果实<sup>[6-7]</sup>、豌豆、菠菜叶片、水稻、苹果、玉米、百合花粉、毛果杨、枇杷<sup>[8]</sup>、大麦、甘蔗、鳄梨、山茶花粉<sup>[1, 8]</sup>、棉花、谷子、高粱<sup>[8]</sup>、木薯<sup>[9]</sup>、北美云杉和蜜柑<sup>[10]</sup>等, 但对其研究主要集中在果糖磷酸化及其基因表达方面, 而在模式植物拟南芥中的研究相对较为深入。

FRK 作为植物糖代谢过程中重要的碳通量调节酶, 其在植物逆境胁迫中发挥着重要作用。ZÖRB 等<sup>[11]</sup>通过对甘蔗基因组进行搜索鉴定, 共发现 7 个 *FRK* 基因, 在干旱胁迫诱导下, 其基因家族中只有 *SsFRK3* 和 *SsFRK5* 两个基因表达量呈显著上升变化趋势。在玉米中, 短期的盐胁迫可使 *FRK2* 基因的表达量上调; 在向日葵植株中, 利用干旱胁迫诱导, *FRK* 基因表达呈上调趋势, 同时发现其幼苗叶片中 *FRK* 基因表达量上调了 3.3 倍, 暗示 *FRK* 在干旱胁迫下发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。目前有关 *FRK* 抗病分子机理研究在大豆、玉米、水稻、大麦等作物上有涉及<sup>[1]</sup>。

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 为多年生灌木状植物, 因其块根富含淀粉类物质, 与马铃薯、甘薯一同被称为世界三大薯类作物, 是热带地区的重要口粮。其主要分布在我国南方的热带亚热带地区, 如广西、广东、海南等省 (区), 其中广西种植量最大, 产量位居第一。木薯在种植过程中主要病害有 8 种, 细菌性萎蔫病 (Cassava

bacterial blight, CBB) 是危害最为严重的病害之一, 严重时可造成高达 90% 的产量损失<sup>[13]</sup>。目前 CBB 抗病分子机理还不清楚。在拟南芥中, *FRK1* 是先天免疫下游标记基因, 该基因的表达意味着病原相关分子模式触发的免疫反应 (PAMP-triggered immunity, PTI) 途径的启动。因此, 本研究以模式植物拟南芥为参照, 采用同源序列法识别木薯 *FRK1* 类似基因并对其进行生物信息学及表达量分析, 以期进一步推动木薯 PTI 相关研究, 从而加快高产抗病木薯品种选育工作的步伐。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以木薯 SC8 品种 30 d 组培幼苗为材料, 水培炼苗 1 周后进行处理, 共设置 3 个处理, 各处理分别为: ①100  $\mu\text{mol/L}$  水杨酸 (SA), ②100  $\mu\text{mol/L}$  茉莉酸 (JA), ③黄单胞菌 (*Xam*,  $OD_{600}$  为 0.6~0.8)。每个处理 20 株苗, 3 个重复。SA、JA 利用喷雾的方式进行处理, *Xam* 利用剪叶法接种进行处理, 以无菌水作为对照。SA、JA 处理后分别在 0 (CK)、15、30、60、120 min 取样, 病原菌 *Xam* 处理后分别在 0 (CK)、2、4、8 d 取样, 取样部位均为植株叶片, 每个样品各取 10 片叶用锡箔纸包好后置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.2 方法

1.2.1 木薯叶片总 RNA 的提取及 cDNA 合成 取木薯叶片 0.1 g, 速冻研磨, 参照植物总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 说明书进行木薯叶片总 RNA 的提取。完成后迅速将总 RNA 溶解到 30  $\mu\text{L}$  无酶无菌水中, 加 DNA I 消除总 RNA 中少量 DNA, 并用 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 条带的完整性及 DNA 的消除情况。取 5  $\mu\text{L}$  总 RNA 反转录合

成 cDNA, 具体实验步骤参照 RevertAid First Stand cDNA synthesis (Thermo) 说明书进行。

**1.2.2 木薯 *FRK1* 类似基因的筛选** 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) 数据库检索得到拟南芥 *FRK1* 基因的相关信息 (ORF 序列和氨基酸序列), 然后在 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 网站上下载木薯全基因组等相关数据<sup>[14]</sup>。以拟南芥 *FRK1* 蛋白作为输入序列, 运用 BLASTP 软件对木薯 *FRK* 类似基因进行搜索鉴定, *e* 值设置为-10。

**1.2.3 木薯 *FRK* 基因生物信息学分析** (1) 木薯 *FRK* 基因家族同源性分析。运用 ClustalW 软件对拟南芥 *FRK1* 氨基酸序列和木薯 *FRK* 氨基酸序列进行多序列联配分析, 序列比对结果通过软件 Mega 7 (<http://www.megasoftware.net/>) 的邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树, Bootstrap 值设为 1000。

(2) 木薯 *FRK* 类似基因的结构分析。木薯 *FRK* 基因的内含子和外显子信息下载于 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 网站, 使用在线网站 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制基因模式图。

(3) 木薯 *FRK* 类似基因的保守基序分析。利用蛋白质保守基序在线搜索程序 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>) 预测木薯 *FRK* 蛋白的保守基序, 设置查找基序重复的数量为“any”。

(4) 木薯 *FRK* 类似基因染色体定位分析。运用在 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 网站上下载的木薯 *FRK* 类似基因信息制作染色体定位图。

(5) 木薯 *FRK* 上游基因共表达分析。使用在线网站 STRING (<http://www.string-db.org/>) 的数据库, 得到拟南芥 *FRK1* 蛋白互作网络图。预测木薯 *FRK1* 蛋白的互作关系。

(6) 木薯 *FRK* 基因响应逆境的表达值热图。在 NCBI 的 SRA (sequence read archive) 数据库中下载 *Xam* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) 细菌侵染木薯所得的 3 个转录组数据包<sup>[15]</sup> (SRR1050891、SRR1050892、SRR1050893)。参考文献<sup>[16]</sup>的方法计算 MeERF 基因在生物胁迫处理下的 RPKM 值。用 Mev (MultiExperiment View) 软件对数据进行处理, 内置 HCL 程序进行层次聚类<sup>[16]</sup>。

**1.2.4 *MeFRK1* 基因 Real-time PCR 表达分析** 利用 Oligo 7 软件对 *MeFRK1* 基因进行特异性引物设计, 随后利用一般 PCR 试验检验其扩增特异性。使用在线网站 NCBI 的 BLAST 检索确认设计的 Real-time PCR 引物的特异性。所用引物序列为 *MeFRK1-F*: 5'-TTCGGTTCCTTTTGCTCTCG-3', *MeFRK1-R*: 5'-TGCCATGAGGATGACTACCAA-3'。引物合成由华大基因科技服务有限公司完成。

Real-time PCR 扩增程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  的计算方法进行相对定量, 以木薯 *EF1a* 基因作为内标校正模板量。每个样品 3 个生物学重复。各激素处理时间点 *MeFRK1* 基因的表达水平与处理 0 min (处理前) 相比。使用 Sigma Plot 软件处理数据并制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 木薯 *FRK1* 同源基因分析

利用 *AtFRK1* 的蛋白序列进行搜索, 共获得 8 条木薯 *FRK* 类似基因, 按照比对结果顺序命名为 *MeFRK1*~*MeFRK8*, 具体信息见表 1。在木薯基因组中, 8 个 *FRK* 类似基因氨基酸长度各不相同, 位于 804~921 aa 之间, 其中最长的 *MeFRK8*, 有 921 个氨基酸, 最短的是 *MeFRK3*, 有 804 个氨基酸, 蛋白质序列平均长度为 863 aa (表 1)。基因在染色体上的位置信息是研究基因家族进化和功能的重要证据。8 个 *FRK* 类似基因在木薯染色体上呈不均匀分布, 其中 *MeFRK1* 位于 4 号染色体上, *MeFRK4*、*MeFRK5*、*MeFRK6*、*MeFRK7*、*MeFRK8* 均位于 11 号染色体上, 而 *MeFRK2* 和 *MeFRK3* 位于核骨架 Scaffold 上 (表 1, 图 1)。

### 2.2 木薯 *FRK* 类似基因同源性及结构分析

由图 2 可知, *MeFRK1*~*MeFRK8* 和 *AtFRK1* 同源性分析可将其分为两大类。第一大类主要有 5 个基因, 分别为 *MeFRK2*、*MeFRK3*、*MeFRK4*、*MeFRK6*、*MeFRK8*, 属于同一亚族<sup>[17]</sup>。其中 *MeFRK2* 和 *MeFRK6* 的同源性为 99%, *MeFRK8* 与组中各基因的同源性均较高, 为 100%。第二大类主要有 4 个基因, 分别为 *AtFRK1*、*MeFRK1*、*MeFRK5* 和 *MeFRK7*, 其中 *MeFRK5* 和 *MeFRK7* 与 *AtFRK1* 的同源性为 50%, 为旁系同源性, *MeFRK5* 和 *MeFRK7* 的同源性更近, 为 100%。通过对 9 个基因的同源性分析发现, 8 个木薯 *FRK*

表 1 木薯 *FRK* 类似基因信息分析  
Tab. 1 Analysis of *FRK*-like genes information in cassava

Phytozome 数据库编号 Original number in the Phytozome	基因名称 Gene name	蛋白长度 Protein length/aa	染色体 Chromosome	等电点 pI	分子量 Mw/Da
Manes.04G136000	<i>MeFRK1</i>	915	4	5.95	102 724.98
Manes.S047400	<i>MeFRK2</i>	850		8.32	96 008.92
Manes.S047500	<i>MeFRK3</i>	804		8.10	90 902.15
Manes.11G030900	<i>MeFRK4</i>	827	11	8.76	93 090.56
Manes.11G029900	<i>MeFRK5</i>	880	11	5.50	97 970.36
Manes.11G031000	<i>MeFRK6</i>	849	11	8.24	95 845.80
Manes.11G029800	<i>MeFRK7</i>	858	11	7.59	95 744.66
Manes.11G030800	<i>MeFRK8</i>	921	11	6.23	102 693.11

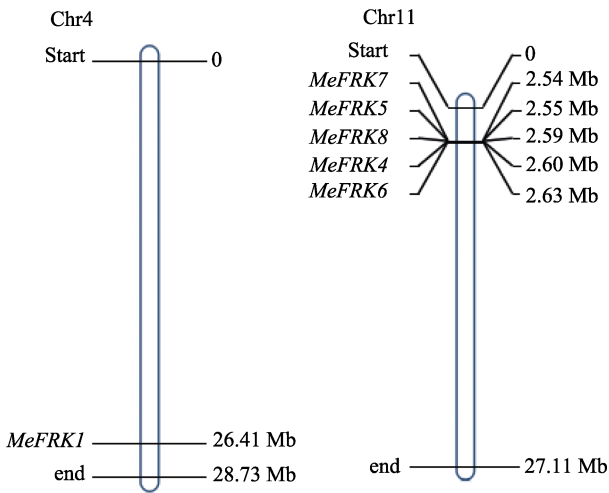


图 1 木薯 *FRK* 类似基因染色体定位图  
Fig. 1 Mapping of *FRK*-like genes in cassava

类似基因与 *AtFRK1* 存在较高的同源性，同时木薯 8 个 *FRK* 类似基因间也存在较高的同源性。该基因家族中存在如此多的同源旁系基因，可能与木薯在适应不同的生长环境而进行有序的基因表达存在一定的关联<sup>[18]</sup>。根据基因结构分析结

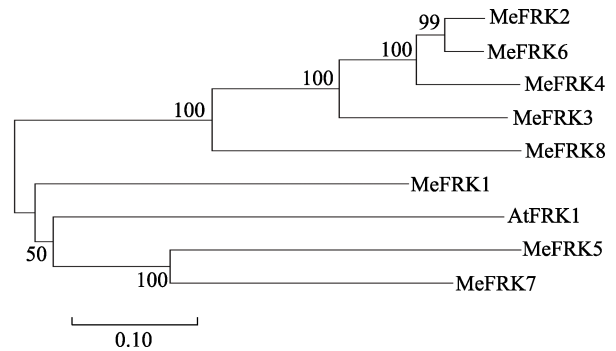


图 2 木薯 *FRKs* 和拟南芥 *FRK1* 的系统进化树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of cassava *FRK* genes and *Arabidopsis FRK1*

果 (图 3)，也可将 8 个类似基因分为两大类，其结果与进化树结果一致。

### 2.3 木薯 *FRK* 类似基因编码蛋白保守基序分析

通过保守基序预测发现，8 个 *MeFRK* 蛋白与 *AtFRK* 蛋白均存在 3 个相同保守基序 Motif1、Motif2 和 Motif3 (图 4)，基序长度位于 50~250 aa 之间 (表 2)。其中，Motif1 为酪氨酸蛋白激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 结构域，能催化多

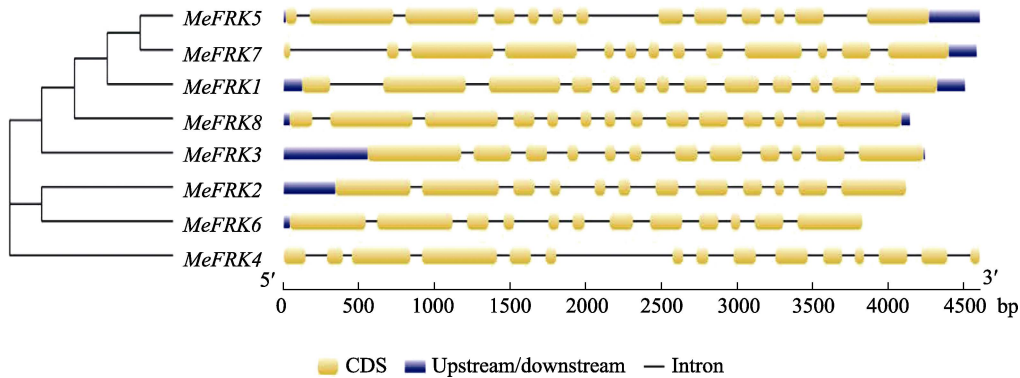


图 3 木薯 *FRK* 基因的结构分析  
Fig. 3 Structural analysis of cassava *FRK* genes

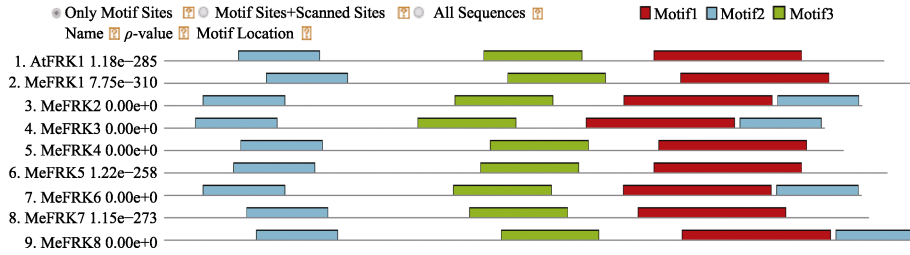


图 4 木薯 *FRK1* 类似基因编码蛋白的保守基序预测

Fig. 4 Predicted conserved motifs of proteins coded by cassava *FRK1-like* genes

表 2 木薯 *FRK1* 类似基因编码蛋白的保守基序信息

Tab. 2 Conserved motif information of proteins coded by cassava *FRK1-like* genes

基序 Motif	蛋白长度 Protein length/aa	基序蛋白序列 Motif protein sequences	家族 Family	描述 Description
1	181	QVAVKMLSQNSRQGYKEFQAEAQLLMIVHHRNLVSLIGYCDRRHNMA LIYEYMANGNLRHLSETSGSILNWEERLHIAADAAQGLEYLHNGCKP PIIHRDVKTSNILLNEKLQAKIADFGLSRAFPNESGSHITRPA GTIGYLD PEAQSSGWFNKKSDVYSFGIILLELITGQPAIRRD	Pkinase_Tyr	Protein tyrosine kinase
2	100	RNCYWVRPEQGGKQNYLIRAFFMYGNYDTQNQWPEFDIYLGCNFWM TVQRPDMTHVLMEEIICFTMDAICQVNTSRGTPFISALEMRPLENY TYKAE	Malectin_like	Carbohydrate-binding protein of the ER
3	120	WQGDPCMPRDYWWAGLNCSYDTNSPRIISLDLSASKLTGEISSFSNLK AIRYLDLSGNELTGTVPEFLAQLPNLTVLNLSGNKLTGSVPQSLVQKAN NGLLQLSLEGNPWLCQTDSC EK	LRR_1	Leucine Rich Repeat(s)

种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化，在细胞生长、增殖、分化中具有重要作用。Motif2 为内质网碳水化合物结合蛋白 (carbohydrate-binding protein of the ER) 结构域。Motif3 为富含亮氨酸重复 (leucine rich repea, LRR) 结构域，参与蛋白质的相互作用，是已知抗病蛋白的重要结构。

综上，8 个 MeFRK 蛋白可能均参与蛋白质间的相互作用。其中，MeFRK1 与 AtFRK1 的同源性最近，为旁系同源性。因此初步筛选 *MeFRK1* 基因为木薯基因组中先天免疫下游标记基因。

2.4 木薯 *FRK* 基因上游基因共表达分析

由图 5 和表 3 可知，预测 MeFRK1 蛋白与 10 个蛋白存在互作关系，其中 8 种与 2C 型蛋白磷酸酶 (protein phosphatase 2c, PP2C) 相关，WRKY6 也涉及其中。PP2C 基因在脱落酸 (abscisic acid, ABA)、茉莉酸 (jasmonic acid, MeJA) 以及水杨酸 (salicylic acid, SA) 等激素信号转导途径中发挥着重要作用，参与调节木薯在高渗、干旱以及低盐等逆境中的生存能力<sup>[19-20]</sup>。由此可推测，*FRK1* 基因也可能参与木薯的生长发育，是木薯应对不同逆境潜在信号因子之一。另有研究显示，*WRKY* 转录因子家族广泛参与植物的生长发育、代谢调控、生物胁迫与非生物胁迫应答等过程，

是植物免疫系统中许多信号通路的核心组成部分，如 PTI 基础防御以及 ETI 系统获得性抗性，对于木薯抗病性的研究具有重要的指导意义<sup>[21]</sup>；而 *WRKY6* 在木薯响应生物胁迫时呈正调控作用，进而推测 *FRK* 基因家族也参与木薯生物胁迫应答过程。

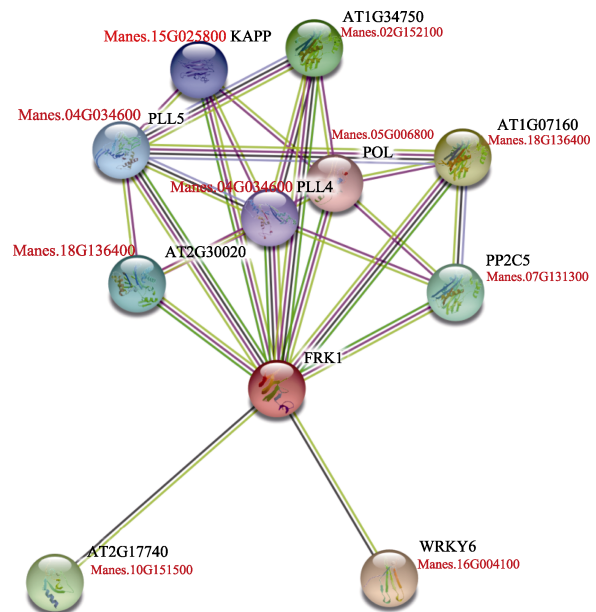


图 5 木薯 *FRK1* 基因蛋白互作网络

Fig. 5 Protein-protein interaction network of cassava *FRK1* genes

表 3 MeFRK 蛋白互作网络中的蛋白信息

Tab. 3 Protein informations in protein-protein interaction network of cassava FRK protein

名称 Name	Phytozome 数据库编号 Original number in the Phytozome	蛋白描述 Protein description
AT1G07160	Manes.18G136400	PROTEIN PHOSPHATASE 2C-LIKE PROTEIN-RELATED
PLL5	Manes.04G034600	PROTEIN PHOSPHATASE 2C 36-RELATED
AT1G34750	Manes.02G152100	PROTEIN PHOSPHATASE 2C 10-RELATED
WRKY6	Manes.16G004100	WRKY
AT2G17740	Manes.10G151500	CYSTEINE/HISTIDINE-RICH C1 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN-RELATED
FRK1	Manes.04G136000	LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN KINASE-RELATED
PLL4	Manes.04G034600	PROTEIN PHOSPHATASE 2C 36-RELATED
AT2G30020	Manes.18G136400	PROTEIN PHOSPHATASE 2C-LIKE PROTEIN-RELATED
PP2C5	Manes.07G131300	PROTEIN PHOSPHATASE 2C 30-RELATED
POL	Manes.05G006800	PROTEIN PHOSPHATASE 2C 32
KAPP	Manes.15G025800	PROTEIN PHOSPHATASE 2C 70

2.5 木薯 FRK 基因响应逆境的表达值热图

通过对各基因接菌 *Xam* 前后叶片表达量变化趋势分析发现，随着时间的推移，*MeFRK1* 和 *MeFRK3* 的表达量呈不断上调的变化趋势，但 *MeFRK1* 的变化趋势更明显；*MeFRK2*、*MeFRK4*、*MeFRK6* 三个基因表达量呈先下调后上调且表达水平接近；而 *MeFRK8* 表达量呈先上调后下调的变化趋势，*MeFRK7* 不断下调，但 *MeFRK5* 一直维持在一个相对较稳定的水平（图 6）。

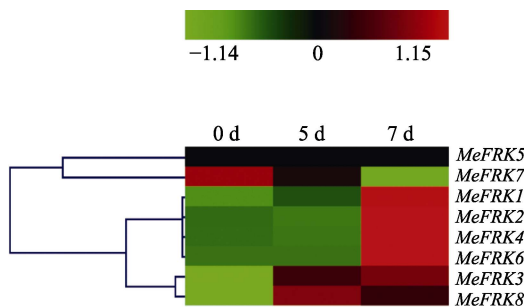


图 6 FRK 类似基因在 *Xam* 细菌侵染木薯的表达情况

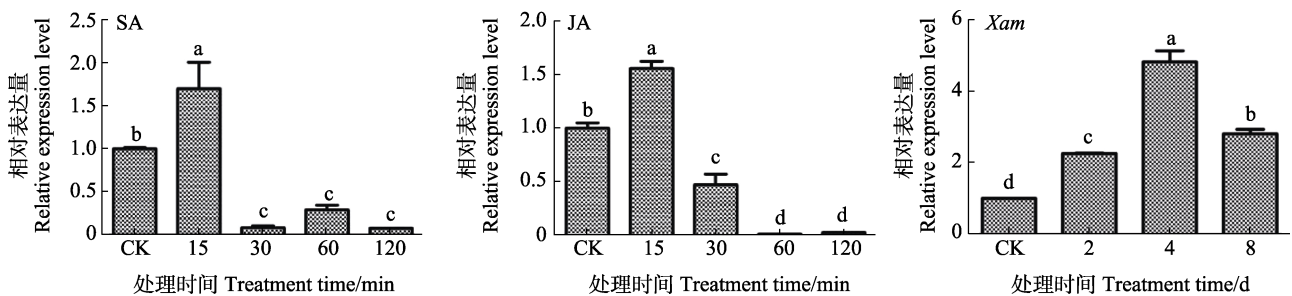
Fig. 6 Expression of FRK-like genes in *Xam*-infected cassava at 0 d, 5 d and 7 d

2.6 不同处理叶片中 *MeFRK1* 基因表达量测定

利用 Real-time PCR 法测定 SC8 组培养幼苗叶片 *MeFRK1* 基因在 SA、JA 和病原菌 *Xam* 三种处理下的瞬时表达量<sup>[22]</sup>，结果发现，其在 3 种处理下基本均呈先上升后下降的变化趋势（图 7）。在激素 SA、JA 处理后 15 min 时二者达到最大值，而在病原菌 *Xam* 处理后第 4 天时达到最大值，其表达量是激素 SA 处理时最大值的 2.84 倍，是 JA 处理后的 3.06 倍。由此可以说明，病原菌 *Xam* 胁迫更能诱导 *MeFRK* 基因的表达，有助于提高木薯对病原菌 *Xam* 的抗性。本研究通过对木薯 *MeFRK1* 基因瞬时表达的研究，为分离鉴定木薯 PTI 途径下游的标记基因，研究木薯抗病分子机理有着重要的意义。

3 讨论

木薯因富含淀粉被誉为“淀粉之王”“地下粮仓”等<sup>[23]</sup>。而 FRK 是植物中糖代谢的关键酶，因此研究 FRK 对木薯淀粉的储藏、改善食用风



不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ( $P < 0.05$ ).

图 7 *FRK1* 在不同处理下的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *FRK1* under different treatments

味, 提高抗病能力等有着重要的作用。研究发现, 植物中果糖可作为信号分子直接或通过与其他信号通路交叉调节基因的表达, 在植物遭受逆境胁迫中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。近年来, 随着生物信息学技术普遍应用及基因组学、蛋白组学的研究快速发展, 有更多潜在的 *FRK* 基因在多种植物中被挖掘。如 *FRK1* 在番茄整株植株中均有表达, *FRK2* 具有库特异性, 而在源器官中表达很低<sup>[25]</sup>。*FRK* 在缺氧条件下对水稻幼苗碳水化合物代谢发挥着重要作用, 在转录水平上, *OsFRK1* 优先在有氧条件下表达, 而 *OsFRK2* 需要在缺氧条件下表达<sup>[2]</sup>。

目前, 有关木薯中 *FRK* 基因的抗病性还不清楚。本研究基于拟南芥先天免疫下游标记基因 *FRK1*, 通过搜索从木薯基因组中筛选出 8 个类似基因。随后利用生物信息学中的软件对其进行同源性、在染色体中的位置、蛋白结构以及蛋白质间的相互作用等进行分析。结果发现, *MeFRK1*、*MeFRK5* 和 *MeFRK7* 三个基因与 *AtFRK1* 亲缘关系最近, 基因相似度最高, 由此推断, 此 4 个基因在起源上存在一定的相关性。通过染色体定位发现, 8 个 *FRK* 类似基因在木薯染色体上呈不均匀分布, 可能分别在木薯生长发育过程中承担不同的功能。在 8 个基因中只有 *MeFRK1* 位于 4 号染色体, 与 *AtFRK1* 属于旁系同源, 其余 5 个位于 11 号染色体上, 其结果与双子叶植物拟南芥等的 *FRK* 家族成员在染色体定位基本一致<sup>[1]</sup>。通过保守基序分析发现, 9 个蛋白存在 3 个相同的保守基序, 长度位于 50~250 aa 间, 且基序的次序和间隔长度比较保守。该家族基因编码蛋白基序的保守性暗示在木薯中不同的 *FRK* 蛋白可能存在功能冗余现象。同时对 3 个保守基序功能进行分析发现, Motif 3 参与了蛋白质间的相互作用, 是已知抗病蛋白的重要结构<sup>[26]</sup>。木薯 *FRK1* 类似基因不仅与拟南芥 *FRK1* 基因亲缘关系较近, 基因结构相似, 且二者的功能也类似。由此初步筛选 *MeFRK1* 为木薯基因组免疫下游标记基因。

激素是植物对生物非生物胁迫反应的调节剂, 参与各种复杂的信号转导通路, 以此调节不同的应激反应。水杨酸 (SA)、乙烯 (ET)、茉莉酸 (JA) 和脱落酸 (ABA) 4 种激素主要调节植物对病原体的防御<sup>[27]</sup>。当用激素处理植物后, 其 PRRs 识别 PAMPs 分子, 短时间内植物做出的应答反应就包括启动水杨酸、茉莉酸信号传导途径<sup>[28]</sup>。基因表达模式分析在一定程度上可推测基因

的分子功能, 有利于对该基因功能的研究。本研究通过 SA、JA 的喷施、黄单胞菌 (*Xam*) 的感染 3 种方法分别处理木薯叶片, 通过分析处理后木薯叶片中 *FRK1* 基因在不同时间的表达量变化。结果发现, *MeFRK1* 基因的表达量在 3 种处理下呈差异性表达, 表明此基因可能是木薯生物逆境胁迫系统中的关键标记因子。在 SA 处理后, *MeFRK1* 的表达量在 15 min 时达到最高值, 其余时间均表现为下调。同样, 在 JA 处理后, 15 min 时表达量也远高于对照组, 是对照组的 1.5 倍以上, 随之下降, 在 60 min 和 120 min 的表达量接近于零。说明此基因在响应 SA 和 JA 信号途径时, 短时间内具有正调控作用, 且反应较为迅速。在响应生物胁迫时, 3 个时间的相对表达量均高于对照组, 在第 4 天时达到最高值, 接近对照的 5 倍。由此说明, 此基因对于病原相关分子机制能够做出快速响应, 暗示其可能与抗病途径有关。

植物在生长发育过程中, 经过长期对逆境的适应, 自身也产生一些免疫防御机制, 通过上调或下调某个或某些基因的表达量来调控逆境有关信号通路以适应环境的变化<sup>[29]</sup>。而植物细胞中的糖类物质可在 *FRK* 作用下通过活化免疫反应参与植物防卫过程, 在病原菌等生物胁迫中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。木薯是热带地区重要的粮食及能源物质, 其在生长发育过程中面临着病虫害等多种生物非生物的胁迫, 严重影响了木薯的产量和品质。因此, 提高木薯抵抗逆境胁迫的能力至关重要。本研究通过对木薯 *FRK* 类似基因进行筛选分析, 并在 3 种处理情况下验证其瞬时表达量, 其结果可为后期验证木薯 *FRK* 基因的功能、研究其相关信号通路及抗病调控机理提供参考。

## 参考文献

- [1] 叶香媛, 周文彬. 植物果糖激酶研究进展[J]. 科学通报, 2021, 66(22): 2820-2831.  
YE X Y, ZHOU W B. Research advances in plant fructokinases[J]. Science China Press, 2021, 66(22): 2820-2831. (in Chinese)
- [2] 崔娜, 王卫平, 林凤, 白丽萍, 张玉龙. 植物果糖激酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 41-47.  
CUI N, WANG W P, LIN F, BAI L P, ZHANG Y L. Update on fructokinase in higher plants[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(14): 41-47. (in Chinese)
- [3] CHAUBRON F, HARRIS N, ROSS H A, DAVIES H V.

- Partial purification and characterization of fructokinase from developing taproots of sugar beet (*Beta vulgaris*)[J]. *Plant Science*, 1995, 110(2): 181-186.
- [4] KUO T M, DOEHLERT D C, CRAWFORD C G. Sugar metabolism in germinating soybean seeds: evidence for the sorbitol pathway in soybean axes[J]. *Plant Physiology*, 1990, 93(4): 1514-1520.
- [5] TAYLOR M A, ROSS H A, GARDNER A, GARDNER A, DAVIES H V. Characterisation of a cDNA encoding fructokinase from potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1995, 145(3): 253-256.
- [6] KANAYAMA Y, DAI N, GRANOT D, PETREIKOV M, SCHAFFER A, BENNETT A B. Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(4): 1379-1384.
- [7] GERMAN M A, ASHER I, PETREIKOV M, DAI N, SCHAFFER A A, GRANOT D. Cloning, expression and characterization of *LeFRK3*, the fourth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gene encoding fructokinase[J]. *Plant Science*, 2004, 166(2): 285-91.
- [8] 赵建华, 尹跃, 李浩霞, 王亚军, 李彦龙, 安巍. 枸杞果糖激酶基因 *LbFRK7* 的克隆及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2018, 38(5): 816-822.
- ZHAO J H, YIN Y, LI H X, WANG Y J, LI Y L, AN W. Cloning and expression analysis of fructokinase gene (*LbFRK7*) from wolfberry (*Lycium barumlinn*)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38(5): 816-822. (in Chinese)
- [9] YAO Y, GENG M T, WU X H, SUN C, WANG Y L, CHEN X, SHANG L, LU X H, LI Z, LI R M. Identification, expression, and functional analysis of the fructokinase gene family in cassava[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(11): 2398.
- [10] QIN Q P, ZHANG S L, CHEN J W, XIE Y F, JIN M, CHEN K S, SYED A. Isolation and expression analysis of fructokinase genes from citrus[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2004, 46(12): 1408.
- [11] ZÖRB C, SCHMITT S, MÜHLING K H. Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions[J]. *Proteomics*, 2010, 10(24): 4441-4449.
- [12] FULDA S, MIKKAT S, STEGMANN H, HORM R. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Plant Biology*, 2011, 13(4): 632-642.
- [13] 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.
- FANG J, PU W H, ZHANG H J. The development status of cassava industry at home and abroad[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(16): 353-361. (in Chinese)
- [14] TAPPIBAN P, SMITH D R, TRIWITAYAKORN K, BAO J S. Recent understanding of starch biosynthesis in cassava for quality improvement: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 83: 167-180.
- [15] DÍAZ TATIS P A, HERRERA CORZO M, OCHOA CABEZAS J C, MEDINA CIPAGAUTA A, PRÍAS M A, VERDIER V, CHAVARRIAGA AGUIRRE P, LÓPEZ CARR ASCAL C E. The overexpression of *RXam1*, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*[J]. *Planta*, 2018, 247(4): 1031-1042.
- [16] DING Z H, TIE W W, FU L L, YAN Y, LIU G H, YAN W, LI Y N, WU C L, ZHANG J M, HU W. Strand-specific RNA-seq based identification and functional prediction of drought-responsive lncRNAs in cassava[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 1-13.
- [17] BRAGA A, GOMES D, RAINHA J, AMORIM C, CARDOSO B B, GUDIÑA E J, SILVÉRIO S C, RODRIGUES J L, RODRIGUES L R. *Zymomonas mobilis* as an emerging biotechnological chassis for the production of industrially relevant compounds[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 1-20.
- [18] ZHOU Q F, MA K, HU H H, XING X L, HUANG X, AO H. Extracellular vesicles: their functions in plant-pathogen interactions[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(6): 760-771.
- [19] 陈耘蕊, 毛志君, 李兆伟, 范凯. 植物蛋白磷酸酶 2C 结构和功能的研究现状与进展[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2021, 47(1): 11-20.
- CHEN G R, MAO Z J, LI Z W, FAN K. Research status and progress in structure and function of protein phosphatase 2C in plants[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture. & Life Sciences.)*, 2021, 47(1): 11-20. (in Chinese)
- [20] JING S, CUI W F, ZHU L C, LI B Y, LI M J. Response of carbohydrate metabolism-mediated sink strength to auxin in shoot tips of apple plants[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(2): 422-433.
- [21] 李可, 熊茜, 肖晓蓉, 李玉敏, 牛晓磊, 李春霞, 陈银华. 木薯 25 个 WRKY 家族转录因子在生物胁迫下的表达分析[J]. *热带生物学报*, 2017, 8(1): 14-21, 28.
- LI K, XIONG Q, XIAO X R, LI Y M, NIU X L, LI C X, CHEN Y H. Expression analysis of 25 WRKY transcription factors in cassava under biotic stresses[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2017, 8(1): 14-21, 28. (in Chinese)
- [22] YOODEE S, KOBAYASHI Y, SONGNUAN W, BOON CHIRD C, THITAMADEE S, KOBAYASHI L, KOBAYASHI L, NARANGAJAVANA J. 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.
- [23] SAIJO Y, LOO E P I, YASUDA S. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions[J]. *The Plant Journal*, 2018, 93(4): 592-613.
- [24] SADDHE A A, MANUKA R, PENNA S. Plant sugars: homeostasis and transport under abiotic stress in plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 171(4): 739-755.
- [25] KANAYAMA Y, DAI N, GRANOT D, PETREIKOV M, SCHAFFER A, BENNETT A B. Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(4): 1379-1384.
- [26] STEIN O, GRANOT D. Plant fructokinases: evolutionary, developmental, and metabolic aspects in sink tissues[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 339.
- [27] 首成英, 赵晓珍, 李冬雪. 利用植物免疫原理控制农作物病虫害研究进展[J]. *中国植保导刊*, 2017, 37(12): 21-33.
- SHOU C Y, ZHAO X Z, LI D X. Research progress on crop disease and insect pests control by principle of plant immune[J]. *China Plant Protection*, 2017, 37(12): 21-33. (in Chinese)
- [28] 陈英, 谭碧玥, 黄敏仁. 植物天然免疫系统研究进展[J]. *南京林业大学学报*, 2012, 36(1): 129-136.
- CHEN Y, TAN B Y, HUANG M R. Recent advances in plant immune system[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2012, 36(1): 129-136. (in Chinese)
- [29] DING Z H, TIE W W, FU L L, YAN Y, LIU G H, YAN W, LI Y N, WU C L, ZHANG J M, HU W. Strand-specific RNA-seq based identification and functional prediction of drought-responsive lncRNAs in cassava[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 1-13.
- [30] TAUZIN A S, GIARDINA T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 293.