

木薯 *MeMLO12* 基因克隆及其 CRISPR-Cas9 表达载体的构建

蔡吉苗, 李博勋*, 黄贵修, 李超萍, 时 涛, 王国芬

中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101

摘 要: *MLO* 基因是植物中特有的一类抗病性负调控因子, 该基因突变导致植物产生广谱抗病性。本研究从木薯全基因组中克隆获得木薯 *MLO12* 基因的 DNA 和 cDNA 序列, 并将其命名为 *MeMLO12*。该基因全长 3743 nt、编码区 (ORF) 全长 1728 nt, 具有一个完整的开放阅读框, 含有 15 个外显子和 14 个内含子, 编码 586 个氨基酸, 蛋白的分子质量为 67.2 kDa, 等电点为 8.85。该基因编码的蛋白定位在内质网膜上, 无信号肽, 在 23~45、74~96、161~183、285~307、312~334、371~393、413~435 aa 处形成 7 次跨膜结构域。qRT-PCR 定量分析发现, 受木薯黄单胞菌侵染后, *MeMLO12* 基因在木薯抗、感品种中的表达量存在明显的差异, 参与木薯与黄单胞菌之间的互作, 表现出负调控作用。选择该基因第 11 个外显子进行 Snap Gene Viewer 分析, 获得了 10 455 条 sgRNA 的种子序列, 从中选取 3 条靶序列约 23 nt, 碱基组成上 3' 末端含 G 结尾, 将其构建到 CRISPR-Cas9 载体上, 经验证, 确认 *MeMLO12* 的 3 条靶序列已经成功构建到基因编辑载体上, 将其命名为 *pSGR-Cas9-AT-MeMLO12* 载体。

关键词: 木薯; *MeMLO12* 基因; 克隆; 表达分析; CRISPR-Cas9 载体; 构建

中图分类号: S533 文献标志码: A

Cloning of Cassava *MeMLO12* Gene and Construction of Its CRISPR-Cas9 Expression Vector

CAI Jimiao, LI Boxun*, HUANG Guixiu, LI Chaoping, SHI Tao, WANG Guofen

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Engineering Research Center for Biological Control of Tropical Crops Diseases and Insect Pest, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: *MLO* gene is an unique negative regulatory factor for disease resistance in plants, and the mutation in the gene can lead to broad-spectrum disease resistance in plants. In this study, a DNA and cDNA sequence of cassava *MLO12* gene were cloned from the entire cassava genome and named *MeMLO12*. This gene has a total length of 3743 nt and a coding region (ORF) of 1728 nt, with a complete open reading frame containing 15 exons and 14 introns, encoding 586 amino acids. The protein has a molecular weight of 67.2 kDa and an isoelectric point of 8.85. *MeMLO12* protein is located on the endoplasmic reticulum membrane, without signal peptides, and forms seven transmembrane domains at 23–45, 74–96, 161–183, 285–307, 312–334, 371–393, 413–435 aa. Quantitative analysis by qRT PCR revealed significant differences in the expression of *MeMLO12* gene in resistant and susceptible cassava germplasms after infection with *Xanthomonas axonopodis*, indicating a negative regulatory effect in the interaction between cassava and *Xam*. Selecting the 11th exon of the gene for Snap Gene Viewer analysis, 10 455 seed sequences of sgRNA were obtained. Three target sequences of approximately 23 nt were selected, with a G terminus at the 3' end of the base composition, and they were constructed onto the CRISPR-Cas9 vector. After verification, it was confirmed that the three target sequences of *MeMLO12* have been successfully constructed onto the gene editing vector, named *pSGR-Cas9-AT-MeMLO12* vector.

Keywords: cassava; *MeMLO12* gene; cloning; expression analysis; CRISPR-Cas9 vector; construction

收稿日期 2023-10-19; 修回日期 2023-12-21

基金项目 国家木薯产业技术体系项目 (No. CARS-11)。

作者简介 蔡吉苗 (1981—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 热带作物病害。*通信作者 (Corresponding author): 李博勋 (LI Boxun), E-mail: diyningxiang@126.com。

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.08.002

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是世界热带、亚热带国家和地区的粮食作物, 也是我国重要的热带工业原料作物, 在保障粮食和能源安全以及热带农产品国际贸易等方面占有重要地位^[1]。细菌性萎蔫病 (Cassava Bacterial Blight, CBB) 是为害木薯最为严重的叶部病害之一, 在木薯整个生长季节均可发生, 主要为害叶片和茎秆, 能导致叶片大面积凋萎、干枯脱落, 高温高湿且台风雨频繁的区域发病最为严重^[2]。其病原地毯草黄单胞木薯萎蔫致病变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*) 于 2007 年被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》, 是国内检疫性对象。研究发现, 该病菌已经对铜基杀菌剂产生一定程度的抗药性^[3], 常规的化学药剂如春雷霉素、氢氧化铜、硫酸链霉素, 以及新型免疫诱抗剂氨基寡糖素等对该病的防效也均不理想^[4-5]。木薯封行后, 在高温高湿和台风雨季节发病最为严重, 这个时候进行人工施药也比较困难, 劳动力成本高, 容易加重抗药性的风险^[6]。前期研究发现, 国内 603 份木薯种质中有 6 份对该病表现出高抗水平^[7], 42 份食用木薯种质中也有 4 份表现出中抗水平^[8], 其余的均为感病种质, 说明在我国木薯种质资源中, 存在一定数量的抗病种质材料, 并且这些抗、感种质在田间种植过程中也都会感染细菌性萎蔫病, 只是抗病种质的病情指数和受害程度要低于感病种质, 在发病高峰期, 抗病种质的落叶量在 10%~20% 之间, 而感病种质的落叶量高达 60%, 并且抗病种质的最终产量也显著高于同期的感病种质 (待发表)。因此, 对于多年生、非精细化管理的木薯来说, 抗病种质的选育才是解决该病最为经济有效的途径, 而抗病基因资源的挖掘与利用是抗病种质鉴定及创制利用的关键。

MLO 是一类参与植物多种生物与非生物胁迫反应的广谱抗病因子, 是由单基因控制的隐性抗病基因, 在植物的抗病过程起负调控作用, 目前已有 198 个植物 *MLO* 基因被克隆鉴定^[9]。*MLO* 是一种跨膜蛋白, 有 7 个跨膜螺旋结构域, 定位在细胞膜上^[10], 在距离第 7 个跨膜结构域的 10~15 个氨基酸处有 1 个钙调素结合蛋白区域^[11]。目前, 已经证明大麦 (*Hordeum vulgare*)^[12]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[13]、拟南芥 (*Arabidopsis*

thaliana)^[14] 中 *MLO* 基因的突变体对白粉病菌具有广谱抗性, 缺失 *MLO* 基因的隐性突变对白粉菌不同生理小种具有广谱、高效和持久抗性, 是白粉病抗病性的负调控基因^[15]。除白粉病外, *MLO* 还参与稻瘟菌、锈菌、卵菌、黄单胞菌等各种生物和非生物胁迫响应^[16-19]。覃碧等^[20]从木薯全基因组数据库中鉴定出 21 个 *MLO* 家族基因, 划分为 6 个遗传类群, 其中 *MeMLO1*、*MeMLO2*、*MeMLO3*、*MeMLO6*、*MeMLO12* 和 *MeMLO17* 等 6 个家族基因含有与抗病性相关的两段保守结构域和钙素结合区, 可能与抗病性相关。在橡胶树中 *HbMLO9*、*HbMLO12* 参与橡胶树的激素信号传导和逆境胁迫响应过程^[21-22], 而 *HbMLO12* 沉默可以抑制白粉菌的侵染, 并在与橡胶树和白粉菌互作过程中提高了橡胶树的免疫反应^[23], 说明 *MLO12* 基因可能参与抗病性相关反应。研究发现, 通过基因编辑对 *MLO* 相关等位基因进行定点突变可创制广谱抗白粉病又高产的优质小麦新种质^[24], 通过对感病 S 基因的突变来提高作物对病原菌的抗性, 获得广谱和持久抗性的新种质材料, 是目前作物抗病育种研究的焦点。为此, 本研究对木薯 *MLO* 家族中与抗病性相关的 *MLO12* 基因进行全长克隆和表达特性分析。同时以 *MeMLO12* 基因为靶点, 构建了 1 个 sgRNA 表达盒的 CRISPR/Cas9 载体 *pSGR-Cas9-AT-MeMLO12*, 证明了载体的有效性, 为后续转基因木薯的突变情况、遗传稳定性分析以及抗病木薯新种质材料的创制提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原菌和载体 供试木薯黄单胞菌株 GX11 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所的黄贵修研究团队分离、鉴定和保存^[3]。用于基因编辑的 *pSGR-Cas9-AT* 载体是由中国科学院分子植物科学卓越创新中心张鹏研究员提供。

1.1.2 供试木薯种质材料 供试的 9 份木薯种质 HN8、HN12、HN18、GR4、GXC09、H1701、CP1、SC8、SC205 均来自中国热带农业科学院环境与植物保护研究所演丰基地木薯种质保存圃, 其中 HN8、HN12、HN18、GXC09、H1701、CP1 为本实验室有性杂交获得的对细菌性萎蔫病具有一定

抗性的木薯种质；GR4、SC8、SC205 是生产上普遍种植的感病木薯品种，均采用常规的起垄种植方法。

1.1.3 试剂和耗材 用于 *MLO12* 基因克隆和实施荧光定量表达分析的引物（表 1）均由深圳华大基因科技有限公司合成；PCR 扩增反应所需的 Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker 等生物学试剂，以及植物总 RNA 提取试剂盒（DP441）、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒（KR106）、SYBR Green SuperReal 荧光定量预混试剂（FP205）均购自天根生化（北京）科技有限公司。E.Z.N.A. Gel Extraction Kit（D2500-01）胶回收试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司，其他化学试剂、药品等均为国产分析纯。

1.1.4 仪器设备 Bio-Rad T100 型梯度 PCR 仪，美国伯乐公司；UVI FireReader 凝胶成像系统，英国 UVItec 公司；ABI 实时荧光定量 PCR 仪 7500 型，美国 ABI 公司。

表 1 基因克隆和表达引物
Tab. 1 Primers used for gene clone and expression

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	用途 Usge
MeMLO12-F	ATGTCTGATACTTCTAAA	基因全长克隆
MeMLO12-R	TTCCTGAATGTAAACTCCCTTG	
MLO12-QF	CCAGAAATACATTAACAGATC	表达分析
MLO12-QR	GCCCCTATTACCAAAATTAC	
18SS	GCTCGAAGACGATCAGATACC	
18SA	TTCAGCCTTGCGACCATAC	

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及反转录 参照 RNA 提取试剂盒说明书，对抗、感木薯叶片的总 RNA 进行提取。参照 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书对 RNA 进行反转录第一链，反转录产物于 -20℃ 冰箱保存。

1.2.2 基因克隆 将同属大戟科的橡胶树 *HbMLO-12* 基因序列（GenBank 登录号：XP_021673570）

在木薯全基因组数据库中进行 blastn 比对，获得的序列在 Softberry（<http://www.softberry.com>）在线软件中选用已知的模式植物全基因组序列，对基因全长进行预测，获得 *MLO12* 基因的 cDNA 和基因组序列。根据预测结果，设计简并引物 MeMLO12-F 和 MeMLO12-R（表 1），分别以木薯种质 HN8 叶片 DNA 和总 RNA 为模板，采用 PCR 和 RT-PCR 方法对基因全长进行克隆。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测，获得目的片段经凝胶回收纯化试剂盒回收，连接到 pMD18-T 载体上送深圳华大基因科技有限公司测序。

1.2.3 序列分析 利用 DNAMAN Version 5.2.2 软件分析目的基因编码的氨基酸序列，使用 ProtParam（<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>）在线软件预测蛋白质的相关信息，TMHMM-2.0（<http://www.cbs.dtu.dk/services/>）在线软件预测蛋白质跨膜结构域。同时，下载近源物种的同源基因氨基酸序列，用 MEGA version 6.0 软件中的 NJ（Neighbor-Joining）方法生成系统发育树，用 Bootstrap 方法对系统发育树进行检验，1000 次重复。

1.2.4 表达分析 参照 SYBR Green SuperReal 荧光定量试剂盒说明书，以组成型表达基因 18s rRNA 为内参基因，分析 *MeMLO12* 基因在木薯抗、感种质受黄单胞菌（GX11）接种的不同时间段（12、24、48、72 h）的差异表达情况，以不接种病原菌清水处理的叶片作为对照。每个样品均重复 3 次，在 ABI 7500 实时 PCR 仪上进行，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析。

1.2.5 靶点序列设计及基因编辑载体构建 采用在线设计软件 CRISPR-P v2.0^[25]，在 *MeMLO12* 基因保守区域设计 3 条 sgRNA 靶序列。合成靶点引物（表 2），参照郭文雅等^[26]的方法克隆基因编辑载体。菌液 PCR 筛选出阳性克隆后进行测序，测序正确的质粒命名为 *pSGR-Cas9-AT-MeMLO12*。

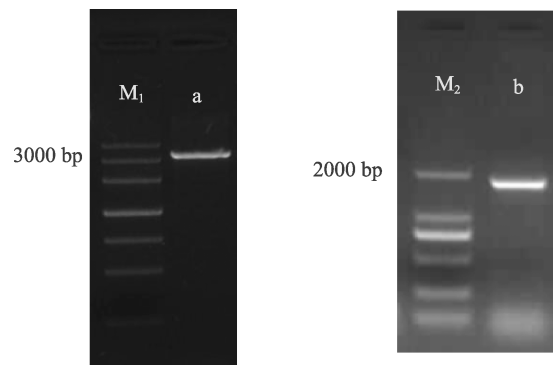
表 2 *MeMlo12* 基因候选的 sgRNA 靶序列
Tab. 2 Candidate sgRNA target sequences of *MeMlo12*

编号 No.	碱基序列（5'-3'） Base sequence (5'-3')	碱基数 Number of bases	位置 Position
MLO12/Cas9-T ₁	TCCGGTGGTTCAACTGGGCGATG	23	第 11 号外显子
MLO12/Cas9-T ₂	CGTGGGCGACCGAACCAGAAGAG	24	第 11 号外显子
MLO12/Cas9-T ₃	ATCGCCAGTTGAACCACCGGAG	23	第 11 号外显子

2 结果与分析

2.1 *MeMLO12* 基因的克隆及表达特性分析

2.1.1 *MeMLO12* 基因的克隆 以木薯种质 HN8 叶片的 DNA 和 cDNA 为模板，用引物对 *MeMLO12*-F/R 进行 PCR 和 RT-PCR 扩增。扩增产物（图 1）经测序和序列分析发现，该基因全长 3743 nt，编码区（ORF）全长 1728 nt，具有一个完整的开放阅读框，含有 15 个外显子和 14 个内含子（图 2），编码 586 个氨基酸，蛋白的分



a: HN8 的 DNA 扩增产物, M₁: Marker III DNA ladder; b: HN8 的 cDNA 扩增产物, M₂: DL2000 DNA marker.
a: HN8 DNA amplification products, M₁: Marker III DNA ladder;
b: HN8 cDNA amplification products, M₂: DL2000 DNA marker.

图 1 *MeMLO12* 基因的 DNA 和 cDNA 序列
琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 *MeMLO12* gene DNA and cDNA sequence
agarose gel electrophoresis

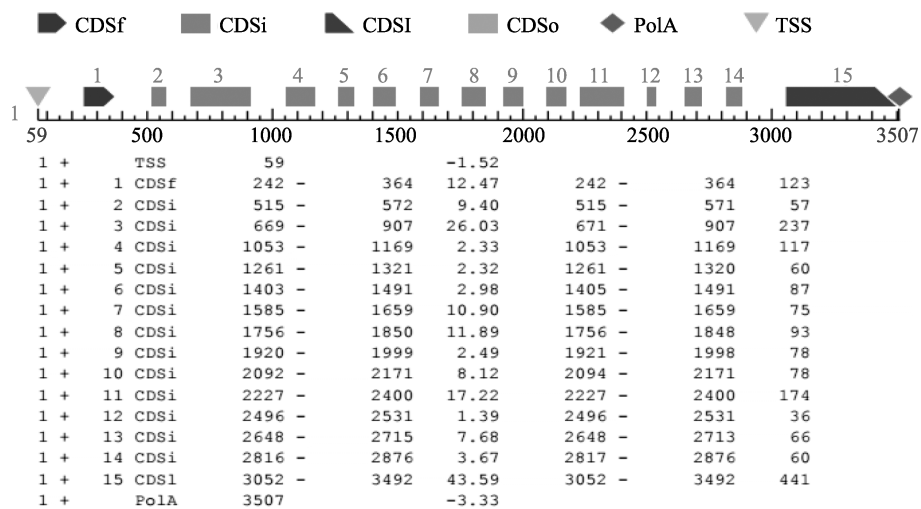


图 2 *MeMLO12* 基因外显子/内含子组织结构
Fig. 2 Exon/intron tissue structure of *MeMLO12* gene

2.1.3 *MeMLO12* 基因的生物信息学分析 根据 SPORT 亚细胞定位分析发现 *MeMLO12* 基因编码的蛋白定位在内质网膜上，无信号肽（图 5）。

子质量为 67.2 kDa，等电点为 8.85，将其命名为 *MeMLO12*（GenBank 登录号：ON_624099）。
2.1.2 *MeMLO12* 及其不同物种同源蛋白的聚类关系分析 从 NCBI 下载木薯 *MeMLO1*（XP_021613330）、*MeMLO4*（XP_021618110）、*MeMLO09*（XP_021614134）、*MeMLO10*（XP_021605658）、*MeMLO11*（XP_021608377）、*MeMLO13*（XP_021616696），橡胶树 *HbMLO8*（XP_021687228）、*HbMLO10*（XP_021691439）、*HbMLO12*（XP_021673570），拟南芥 *AtMLO12*（BAF_00789），麻风树 *JcMLO12*（XP_012086496）和蓖麻 *RiMLO12*（XP_002533246）的氨基酸序列，采用 NCBI Conserved Domains 进行保守结构域的预测，结果发现 *MeMLO12* 蛋白在 12~489 aa 之间存在 1 个 MLO 家族保守结构域（图 3）。将 *MeMLO12* 蛋白的氨基酸序列与这 6 种植物 MLO 蛋白的氨基酸序列共同构建系统发育树，结果显示，不同物种的 MLO 蛋白具有很高的同源性，木薯 *MeMLO12* 与橡胶树、麻风树、蓖麻、拟南芥的 *MLO12* 都聚在同一个小分支上，与同属于大戟科的橡胶树亲缘关系最近；另外 *MeMLO12* 与木薯 MLO 家族的 *MeMLO1*、*MeMLO4*、*MeMLO09*、*MeMLO10* 也在同一个大分支上，属于同一个类群，亲缘关系也较近，而与木薯 *MeMLO4*、*MeMLO11*、*MeMLO13*，分属于不同的类群，亲缘关系较远（图 4）。

TMHMM 预测 *MeMLO12* 蛋白分别在 23~45、74~96、161~183、285~307、312~334、371~393、413~435 aa 处形成 7 次跨膜结构域（图 6），跨膜

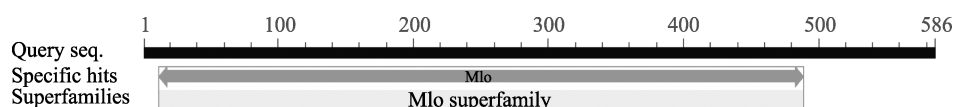


图 3 MeMLO12 蛋白的保守结构域分析

Fig. 3 Conservative domain analysis of MeMLO12 protein

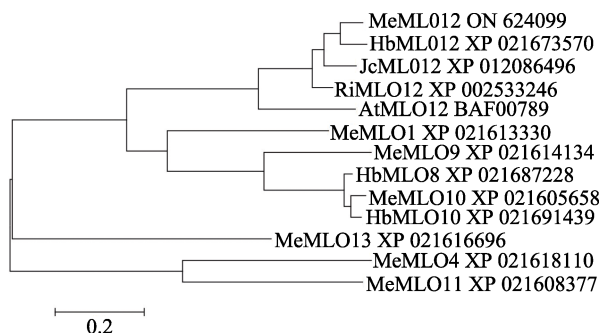


图 4 MeMLO12 的系统发育树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of MeMLO12

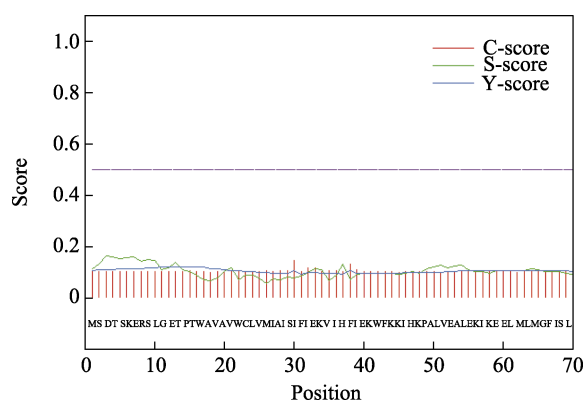


图 5 MeMLO12 蛋白信号肽预测

Fig. 5 Prediction of MeMLO12 protein signal peptide

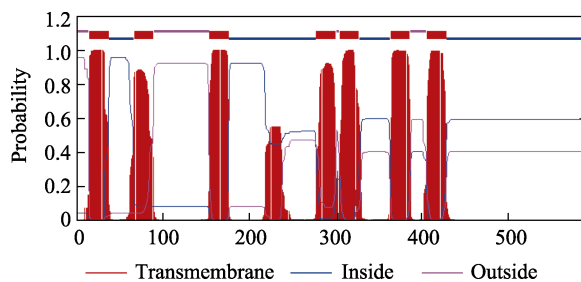


图 6 MeMLO12 蛋白的跨膜结构域

Fig. 6 Transmembrane domain of MeMLO12

结构域是参与细胞与外界通信的特殊整合膜蛋白,说明该蛋白在信号转导中发挥独特和重要的作用。

2.1.4 病原菌诱导对 *MeMLO12* 基因表达的影响
MLO 基因是一类非常典型的感病基因,在寄主受病原菌侵染后起到负调控作用^[9]。qRT-PCR 结果发现(图 7),在供试的 9 份木薯种质中,不同抗

性水平的木薯种质在接种 0 h 时 *MeMLO12* 基因表达量存在一定的差异,其中 HN18 的表达量略高于其他种质。以 0 h 作为对照,接种木薯黄单胞菌(GX11)均能诱导 *MeMLO12* 基因表达,且不同抗、感种质间的表达量和表达模式差异显著。从表达模式上看 HN8、HN12、RXC09、H1701、CP1、SC205 和 GR4 基本一致,黄单胞菌(GX11)接种 12 h 时 *MeMLO12* 基因的表达量比对照略有升高,之后呈逐渐上升的趋势,直至 48 h 时表达量达到峰值,接种 72 h 后又逐渐下降,其中 HN8、HN12、RXC09 和 H1701 等 4 个抗病种质的相对表达量显著高于感病种质 SC205、GR4 和 SC8。而 HN18 和 SC8 两个种质的表达模式又不同于其他种质的表达模式,HN18 在接种 12 h 时其表达就达到了峰值,24 h 后表达量呈逐渐下降趋势,72 h 表达量最低;而 SC8 在接种 24 h 时表达量达到峰值,48 h 后表达量显著下降。说明不同抗性水平的木薯种质中 *MeMLO12* 基因会随着病程的发展而呈现出不同的表达模式,在病原菌侵染初期,不论抗病种质还是感病种质, *MeMLO12* 基因的表达量均会略有升高,此时也启动了寄主的免疫反应来抑制病原菌的进一步侵染,随着病原菌和寄主之间相互作用增强,其表达量也达到峰值,接种 72 h 后均呈下降趋势,进一步推测 *MeMLO12* 基因可能参与木薯和黄单胞菌之间的互作,然而这种调控作用如何发挥还有待进一步研究。

2.2 木薯 *MeMlo12* 基因 CRISPR-Cas9 敲除载体构建

2.2.1 sgRNA 靶点选择及其寡核苷酸链的合成
通过生物信息学分析,选择该基因第 11 个外显子进行 Snap Gene Viewer 分析,获得了 10 455 条 sgRNA 的种子序列。通过对 mismatchPos、mitOfftargetScore、cfdOfftargetScore 分值的评价,保证靶点特异性,降低脱靶效应。从候选的 sgRNA 的种子序列优选了 3 条靶序列(表 2),每条靶序列 23 nt,碱基组成上 3'末端含 G 结尾,将其构建到 CRISPR-Cas9 载体上。

用 *Bbs* I 对 *pSGR-Cas9-AT* 表达载体进行酶切,切胶回收,将 sgRNA 引物退火合成双链,用

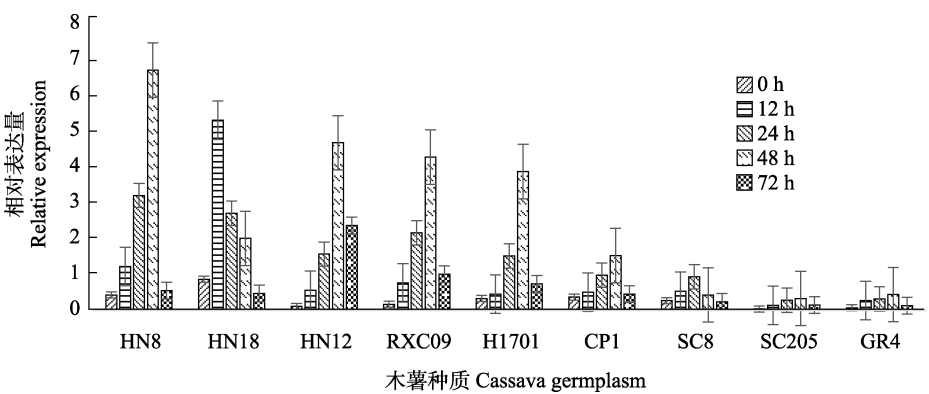
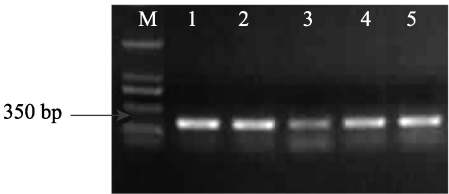


图 7 木薯黄单胞菌 (GX11) 感染后 *MeMLO12* 基因在抗感种质中的表达特性
Fig. 7 *MeMLO12* gene expression characteristics after induced by GX11 Xam

T₄ 连接酶将双链 sgRNA 连接到 *pSGR-Cas9-AT* 载体上, 片段约 8000 nt (图 8), 转化 DH5 α (Amp⁺), 用 M13F/oligo 2 引物对扩增 sgRNA 表达框载体, 得到约 350 nt 的片段, 经测序片段序列与预期一致 (图 9)。

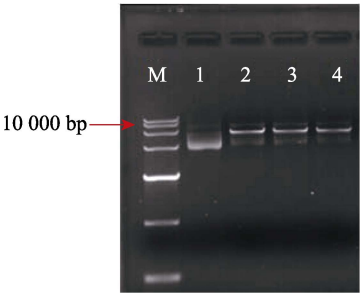
2.2.2 *pSGR-Cas9-AT* 重组质粒的验证 将转化 DH5 α 的阳性克隆送测序, 测序结果用 MEGA6.0



M: DL2000 DNA marker; 1~4: 阳性克隆; 5: 阳性对照。
M: DL2000 DNA marker; 1~4: Positive clones; 5: Positive control.

图 9 sgRNA 表达框阳性克隆筛选

Fig. 9 Screening of positive clones for sgRNA expression boxes



M: DL15 000 DNA marker; 1: *pSGR-Cas9-AT* 空载体质粒; 2: 连接上 T₁ 靶序列的线性化质粒; 3: 连接上 T₂ 靶序列的线性化质粒; 4: 连接上 T₃ 靶序列的线性化质粒。

M: DL15 000 DNA marker; 1: *pSGR-Cas9-AT* unloaded particles; 2: Linearized plasmid connected to T₁ target sequence; 3: Linearized plasmid connected to T₂ target sequence; 4: Linearized plasmid connected to T₃ target sequence.

图 8 经 *Bbs* I 酶切后连接上 sgRNA 靶序列的线性化载体

Fig. 8 Linearization vector connected to sgRNA target sequence after *Bbs* I enzyme digestion

软件进行比对, 比对结果显示 3 条靶序列均已成功构建到预期的靶点位置上 (图 10)。将测序正确的质粒进行 Cas9 元件的扩增, 获得了 250 nt 左右的片段, 与预期目的片段大小一致 (图 11)。对已构建好的靶序列载体进行测序, 确认 *MeMLO12* 的 3 条靶序列已经成功构建到基因编辑载体上, 将其命名为 *pSGR-Cas9-AT-MeMLO12* 载体 (图 12)。

3 讨论

MLO 基因是植物特有的一类感病 S 基因与植物的感病性有关, 负调控植物的抗病过程。S 感病基因功能的丧失会使植物获得隐性遗传抗性, 其等位基因也正好弥补了抗病 R 基因抗性上的缺

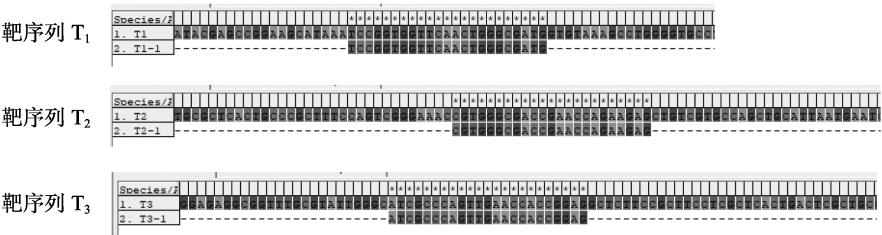


图 10 *pSGR-Cas9-AT* 重组质粒测序比对结果

Fig. 10 Sequencing comparison results of *pSGR-Cas9-AT* recombinant plasmid



M: Marker III DNA ladder; 1~9: 阳性克隆; 5: 阳性对照。

M: Marker III DNA ladder; 1~9: Positive clones;
10: Positive control.

图 11 重组质粒 Cas9 元件的 PCR 扩增
Fig. 11 PCR amplification of recombinant plasmid Cas9 element

点, 具有与 R 基因不同的抗病模式^[27]。研究发现 MLO 蛋白定位在细胞膜上, 中心疏水区域具有 7 个跨膜结构域, 其 N 端在细胞外, 通常是与配体结合, C 端在细胞内与 G 蛋白结合^[28]。MLO 家族基因在信号肽上存在一定差异, 覃碧等^[20]发现, 木薯 *MeMLO8*、*MeMLO10* 和 *MeMLO18* 三个家族

成员各有 1 个 N 端信号肽, 这些信号肽均与第 1 次跨膜结构存在重叠区, 而本研究中的 *MeMLO12* 基因没有信号肽, 有别于其他家族成员。MLO 基因广泛参与植物多种生物和非生物胁迫反应, 在白粉菌侵染早期协助病原菌入侵寄主植株, 调节寄主表皮细胞内乳突的形成, 在侵染位点抑制细胞壁产生 H_2O_2 , 利于病原菌侵入, 削弱了植物的防御能力^[29-30]。当 MLO 基因缺失或突变, 将解除了对白粉菌的抗性和细胞死亡的负调控, 使植物产生了对白粉病持久、高效和广谱抗性^[31]。2014 年, 中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞课题组, 利用 TALENs 基因组编辑技术首次在六倍体小麦中对 MLO 基因的 3 个拷贝同时进行了突变, 获得了对白粉病具有广谱抗性的小麦材料, 为植物抗病育种新材料或品种的创制提供了一个全新的思路和技术路线^[32]。近些年通过基因编辑技术敲除 MLO 基因在很多植物如拟南芥、小麦、番茄等都得到了对白粉病具有抗性的突变株^[33-34], 扩大了 MLO 基因的利用范围。

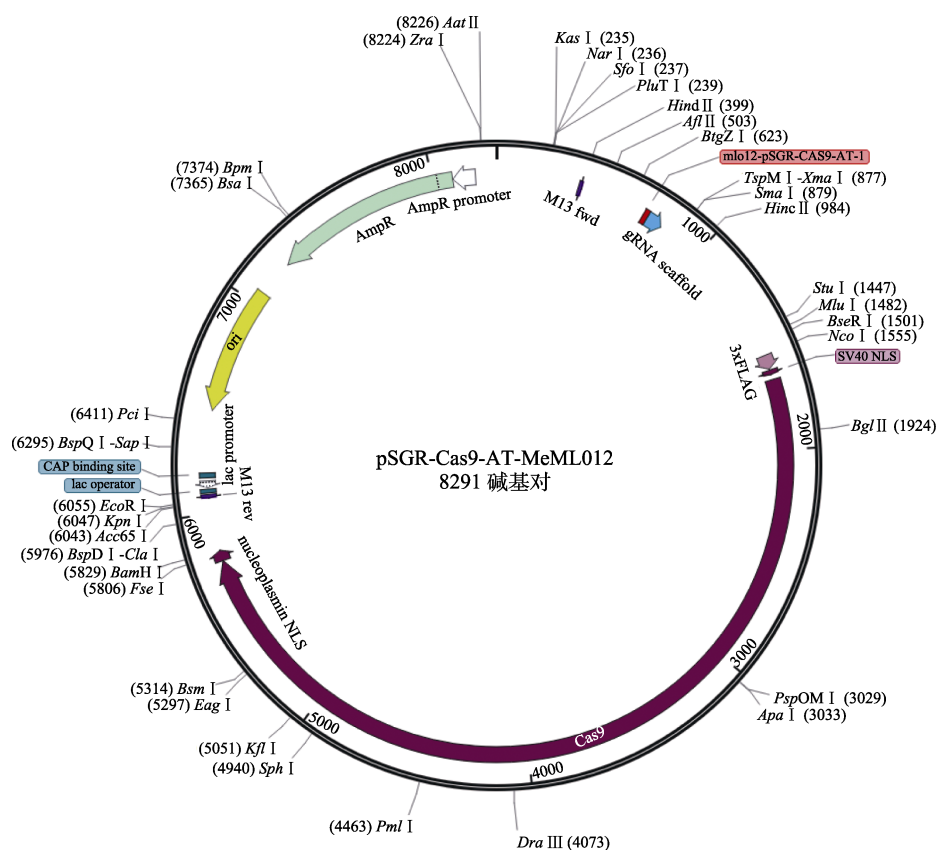


图 12 pSGR-Cas9-AT-MeMLO12 载体
Fig. 12 pSGR-Cas9-AT-MeMLO12 carrier diagram

细菌性萎蔫病是国内木薯为害最为严重的病害, 高温高湿或台风雨后, 能在短时间内爆发流行, 导致植株萎蔫枯死, 造成严重的产量损失, 病害的防治技术一直是制约木薯产业持续稳定发展的瓶颈问题^[2], 传统的铜基杀菌剂已经对该病产生了抗药性, 不仅达不到预期防效, 而且防治成本高, 因此抗病种质的鉴定与创制利用才是防治该病最有效且绿色环保的措施。然而, 传统的杂交育种周期长, 需要多个世代, 尽管目前有许多遗传改良或基因修饰途径, 但均存在突变位点鉴定困难, 基因表达不够彻底, 不能稳定遗传等诸多缺陷, 而基因编辑技术相比于其他技术来说具有明显的优势。另外, 相较于抗病 R 基因, 敲除感病 S 基因获得的抗病性会更加持久, 也更容易通过基因编辑技术操作^[33]。所以利用基因编辑技术敲除植物的感病 S 基因来创制抗病新种质是一条可靠的途径。因此本研究对木薯 MLO 家族中与抗病性相关的 *MLO12* 基因进行了全长克隆和表达特性分析。同时以 *MeMLO12* 基因为靶点, 构建了 1 个 sgRNA 表达盒的 CRISPR-Cas9 载体 *pSGR-Cas9-AT-MeMLO12*, 并证明了该载体的有效性, 为后续转基因木薯的突变情况及遗传稳定性分析以及抗病木薯新种质材料的创制提供新的途径。

参考文献

- [1] 曹升, 陈江枫, 黄富宇, 严华兵, 韦朝念, 李富山, 陆柳英, 覃夏燕, 陈会, 李恒锐. 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.
CAO S, CHEN J F, HUANG F Y, YAN H B, WEI C N, LI F S, LU L Y, QIN X Y, CHEN H, LI H R. Development status and countermeasures of cassava industry in Guangxi[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(6): 1468-1476. (in Chinese)
- [2] 黄贵修. 中国木薯主要病虫害识别与防治[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2012.
HUANG G X. Identification and control of main diseases, pests and weeds of cassava in China[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2012. (in Chinese)
- [3] 时涛, 蔡吉苗, 李超萍, 黄洁, 黄贵修. 木薯细菌性萎蔫病菌抗铜性评价及抗铜相关基因簇分子分析[J]. 热带作物学报, 2017, 38(3): 529-540.
SHI T, CAI J M, LI C P, HUANG J, HUANG G X. Sensitivity evaluation to copper and molecule analysis of copper resistance related gene clusters for *xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(3): 529-540. (in Chinese)
- [4] 卢昕, 李超萍, 时涛, 黄贵修. 木薯细菌性枯萎病菌防控药剂的筛选[J]. 热带农业科学, 2013, 33(2): 53-56.
LU X, LI C P, SHI T, HUANG G X. Bactericide screening against pathogen of cassava bacterial blight[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(2): 53-56. (in Chinese)
- [5] 徐春华, 时涛, 王国芬, 李超萍, 蔡吉苗, 黄贵修. 4 种新型药剂对木薯细菌性萎蔫病防效评价[J]. 热带农业科学, 2019, 39(5): 53-57.
XU C H, SHI T, WANG G F, LI C P, CAI J M, HUANG G X. Evaluation of control effect of four new pesticides against cassava bacterial blight[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2019, 39(5): 53-57. (in Chinese)
- [6] 李超萍. 国内木薯病害调查与细菌性枯萎病防治技术研究[D]. 海口: 海南大学, 2011.
LI C P. Investigation of cassava diseases and study on control techniques of bacterial wilt in China[D]. Haikou: Hainan University, 2011. (in Chinese)
- [7] 卢昕, 李超萍, 时涛, 陈江莎, 黄贵修. 国内 603 份木薯种质对细菌性枯萎病抗性评价[J]. 热带农业科学, 2013, 33(4): 67-70, 90.
LU X, LI C P, SHI T, CHEN J S, HUANG G X. Resistance evaluation of China's main cassava germplasms against bacterial blight[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(4): 67-70, 90. (in Chinese)
- [8] 徐春华, 李超萍, 欧文军, 冯岗, 时涛. 不同种质食用木薯的田间病害及对细菌性萎蔫病的抗性[J]. 中国植保导刊, 2022, 42(4): 51-55, 79.
XU C H, LI C P, OU W J, FENG G, SHI T. Field disease and resistance to bacterial wilt of cassava varieties[J]. China Guide to Plant Protection, 2022, 42(4): 51-55, 79. (in Chinese)
- [9] 史建磊, 万红建, 熊自立, 张海利, 马彦如, 苏世闻, 宰文珊. 不同植物 *Mlo* 基因全基因组鉴定及系统进化分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(8): 3541-3553.
SHI J L, WAN H J, XIONG Z L, ZHANG H L, MA Y R, SU S W, ZAI W S. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of *Mlo* gene family in different plants[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(8): 3541-3553. (in Chinese)
- [10] DEVOTO A, PIFFANELLI P, NILSSON I, WALLIN E, PANSTRUGA R, VON HEIJNE G, SCHULZE-LEFERT P. Topology, sub cellular localization, and sequence diversity of the *Mlo* family in plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(49): 34993.
- [11] KIM M C, LEE S H, KIM J K, CHUN H J, CHOI M S,

- CHUNG W S, MOON B C, KANG C H, PARK C Y, YOO J H. *Mlo*, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein. isolation and characterization of a rice *Mlo* homologue[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(22): 19304-19314.
- [12] SHIRASU K, NIELSEN K, PIFFANELLI P, OLIVER R, SCHULZE-LEFERT P. Cell-autonomous complementation of *Mlo* resistance using a biolistic transient expression system[J]. The Plant Journal, 1999, 17(3): 293-299.
- [13] BAI Y, PAVAN S N C, ZHENG Z, ZAPPEL N F, REINSTADLER A, LOTTI C, GIOVANNI C B, RICCIARDI L, LINDHOUT P, VISSER R G F, THERES K, PANSTRUGA R. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a central American tomato accession is caused by loss of *Mlo* function[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(1): 30-39.
- [14] CONSONNI C, HUMPHRY M E, HARTMANN H A, LIVAJA M, DURNER J, WESTPHAL L, VOGEL J, LIPKA V, KEMMERLING B, SCHULZE-LEFERT P. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis[J]. Nature Genetics, 2006, 38(6): 716-720.
- [15] BÜSCHGES R, HOLLRICHER K, PANSTRUGA R, SIMONS G, WOLTER M, FRIJTERS A, VAN D R, VAN D L T, DIERGAARDE P, GROENENDIJK J. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance[J]. Cell, 1997, 88(5): 695-705.
- [16] GRUNER K, ESSER T, ACEVEDO-GARCIA J, FREH M, HABIG M, STRUGALA R, STUKENBROCK E, SCHAFRATH U, PANSTRUGA R. Evidence for allele-specific levels of enhanced susceptibility of wheat *mlo* mutants to the hemibiotrophic fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* pv. *Triticum*[J]. Genes(Basel), 2020, 11(5): 517.
- [17] 孙燕飞, 李延生, 夏宁, 张岗, 王俊美, 王晓杰, 魏国荣, 康振生. 小麦 *TaMlo8* 基因的克隆及表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(10): 101-110.
- SUN Y F, LI Y S, XIA N, ZHANG G, WANG J M, WANG X J, WEI G R, KANG Z S. Cloning and expression analysis of a gene *TaMlo8* in wheat[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2011, 39(10): 101-110. (in Chinese)
- [18] KIM D S, HWANG B K. The pepper *MLO* gene, *CaMLO2*, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation[J]. Plant Journal, 2012, 72(5): 843-855.
- [19] 罗臻, 张敬泽, 胡东维. 大麦 *Mlo* 近等基因系与叶枯病菌互作的细胞学研究[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 36-42.
- LUO Z, ZHANG J Z, HU D W. Cytological examination on interactions between *Mlo* near-isogenic lines of barley and their leaf blight pathogen[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(1): 36-42. (in Chinese)
- [20] 覃碧, 王萌, 刘巧玲, 郑服丛, 张宇. 木薯 *Mlo* 基因家族成员的鉴定及其序列特征分析[J]. 植物生理学报, 2013, 49(10): 1057-1062.
- QIN B, WANG M, LIU Q L, ZHENG F C, ZHANG Y. Identification and sequence characterization of *Mlo* gene family from the genome of *Manihot esculenta* Crantz[J]. Plant Physiology Journal, 2013, 49(10): 1057-1062. (in Chinese)
- [21] 张宇, 何海霞, 王萌, 潘敏, 李晓娜, 郑服丛. 巴西橡胶树 *HbMlo9* 基因的功能[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(2): 198-203.
- ZHANG Y, HE H X, WANG M, PAN M, LI X N, ZHENG F C. Functional analysis of *HbMlo9* in *Hevea brasiliensis* Muell.Arg[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2018, 40(2): 198-203. (in Chinese)
- [22] QIN B, WANG M, HE H X, XIAO H X, WANG L F. Identification and characterization of a potential candidate *Mlo* gene conferring susceptibility to powdery mildew in rubber tree[J]. Phytopathology, 2019, 109(7): 1236-1245.
- [23] LI X, ZHAO W Y, ZHANG Z M, FANG Y X, DOMG L P, YIN J Y, LIU Y H, CHEN D P, LI Z G, LIU W B, LIN C H, MIAO W G. The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) *MLO* protein *HbMLO12* promotes plant susceptibility to sustain infection by a powdery mildew fungus[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2023, 36(5): 273-281.
- [24] LI S G, LIN D X, ZHANG Y W, DENG M, CHEN Y X, LV B, LI B S, LEI Y, WANG Y P, ZHAO L, LIANG Y T, LIU J X, CHEN K L, LIU Z Y, XIAO J, QIU J L, GAO C X. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties[J]. Nature, 2022, 602(2): 455-460.
- [25] SAMANTA M K, DEY A, GAYEN S. *CRISPR/Cas9*: an advanced tool for editing plant genomes[J]. Transgenic Research, 2016, 25(5): 561-573.
- [26] 郭文雅, 王海, 王亚杰, 张彤, 姚远, 郭建春, 耿梦婷, 陈银华. 木薯 *MeWRKY12* 基因的 *CRISPR/Cas9* 基因编辑载体的构建及验证[J]. 分子植物育种, 2022, 20(5): 1554-1559.
- GUO W Y, WANG H, WANG Y J, ZHANG T, YAO Y, GUO J C, GENG M T, CHEN Y H. Construction and verification of *CRISPR/Cas9* gene editing vector for cassava *MeWRKY12* gene[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(5): 1554-1559. (in Chinese)
- [27] 田永贤, 陈敏, 王其刚, 张颢, 邱显钦. 植物抗白粉病 *MLO* 基因研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(1): 44-54.
- TIAN Y X, CHEN M, WANG Q G, ZHANG J, QIU X Q. Research progress of *MLO* gene for resistance to powdery

- mildew in plants[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2020, 48(1): 44-54. (in Chinese)
- [28] PIFFANELLI P, ZHOU F, CASAIS, ORME J, JAROSCH B, SCHAFFRATH U, COLLINS N C, PANSTRUGA R, LEFERT S. The barley *MLO* modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli[J]. Plant Physiology, 2002, 129(3): 1076-1085.
- [29] KUMAR J, HÜCKELHOVEN R, BECKHOVE U, NAGARAJAN S, KOGEL K H. A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins[J]. Phytopathology, 2001, 91(2): 127-133.
- [30] DEVOVO A, HARTMANN H A, PIFFANELLI P, ELLIOTT C, SIMMONS C, TARMINO G, GOH C S, COHEN F E, EMERSON B C, SCHULZE-LEFERT P, PANSTRUGA R. Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane *MLO* Family[J]. Journal of Molecular Evolution, 2003, 56(1): 77-88.
- [31] BUSCHGES R, HOLLRICHER K, PANSTRUGA R, SIMONS G, WOLTER M, FRIJTERS A, VAN D R, VAN D T L, DIERGAARDE P, GROENENDIJK J. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance[J]. Cell, 1997, 88(5): 695-705.
- [32] WANG Y P, CHENG X, SHAN Q W, ZHANG Y, LIU J X, GAO C X, QIU J L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(9): 947-951.
- [33] ZAIDI S S, MUKHTAR M S, MANSOOR S. Genome editing: targeting susceptibility genes for plant disease resistance[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(9): 898-906.
- [34] DONG O, RONALD P. Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives[J]. Plant Physiology, 2019, 180(1): 26-38.