

木薯碳酸酐酶 CA 基因的克隆和功能研究

王梦月^{1,2}, 李文彬¹, 张秀春¹, 于晓玲¹, 阮孟斌^{1*}, 赵平娟^{1*}

1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/热带作物生物育种国家重点实验室, 海南海口 571101; 2. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228

摘要: 碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 在植物的光合作用和逆境应答中起着重要作用。本研究以木薯品种华南 124 的 cDNA 为模板, 克隆到 1 个 *MeCA* 基因, 其 CDS 全长为 1008 nt, 编码 336 个氨基酸, 克隆序列与数据库中 Manes.15G167500.1 的同源性达到 99.70%。系统发育进化树显示, *MeCA* 与拟南芥的 *AtβCA* 亚家族属于同一个分支, 与 *AtβCA1* 蛋白的序列相似性达到 73.13%, 并含有完全相同的 motif。*MeCA* 基因的表达量在功能叶中最高, 其次为幼嫩叶, 均显著高于须根和茎, 并在遮光胁迫的木薯叶片中显著下调表达。此外, 木薯叶片经低温处理后, *MeCA* 基因在初期表现出显著上调表达, 而后下降到对照水平。本研究创制了过量表达 *MeCA* 基因的转基因木薯, 并观察到 MeCA 蛋白定位于叶绿体, 转基因株系叶片中的各种叶绿素含量显著高于对照。同时, 酵母双杂交点对点试验结果显示 MeCA 与 MeH1.2 蛋白互作。本研究结果表明, *MeCA* 基因可以响应光和低温胁迫, 并可能通过影响植物生长或与 MeH1.2 蛋白互作, 参与植物对胁迫的响应过程。此研究为木薯抗逆遗传改良提供新基因资源和材料。

关键词: CA 基因; 木薯; 抗逆; 叶绿素含量

中图分类号: S533 文献标志码: A

Cloning and Functional Research of Carbonic Anhydrase CA Gene in Cassava

WANG Mengyue^{1,2}, LI Wenbin¹, ZHANG Xiuchun¹, YU Xiaoling¹, RUAN Mengbin^{1*}, ZHAO Pingjuan^{1*}

1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Haikou, Hainan 571101, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Carbonic anhydrase (CA) plays an important role in the photosynthesis of plants and response to stress. Cassava CA gene was cloned using the cDNA of SC124 as template. The CDS length of *MeCA* was 1008 nt, encoding 336 amino acids. The homology was 99.70% between the cloned sequence and Manes.15G167500.1 in the database. The evolutionary tree resulted that *MeCA* belonged to the same branch as the *AtβCA* subfamily of *Arabidopsis*. The sequence similarity between MeCA and *AtβCA1* protein reached 73.13% and contained identical motif. *MeCA* gene expression was the highest in functional leaves, followed in young leaves, significantly higher in fibrous roots and stems, and significantly down-regulated in shading stressed cassava leaves. In addition, the gene showed significant upregulated expression in the initial stage, and then it dropped to the control level when cassava leaves were treated with low temperature. This study created transgenic cassava with overexpression of *MeCA* gene, and observed that MeCA protein was localized in chloroplasts, and the contents of various chlorophyll were significantly higher in the leaves of transgenic plants than that of control. The results of yeast two-hybrid point-to-point experiments showed that MeCA protein interacted with MeH1.2. The result indicated that *MeCA* gene could respond to light and low temperature stresses, and might participate in plant response to stress by affecting plant growth interacting with MeH1.2 proteins. This study would provide a new gene resource for genetic improvement of cassava resistance.

收稿日期 2025-02-07; 接受日期 2025-06-04

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 321RC1095, No. 323RC538); 国家自然科学基金面上项目 (No. 32472190)。

作者简介 王梦月 (2000—), 女, 硕士, 研究方向: 作物抗逆机理。*通信作者 (Corresponding author): 赵平娟 (ZHAO Pingjuan), E-mail: zhaopingjuan@itbb.org.cn; 阮孟斌 (RUAN Mengbin), E-mail: ruanmengbin@itbb.org.cn。

Keywords: CA gene; cassava; stress resistance; chlorophyll content

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.10.003

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是世界第六大粮食作物,是世界近 10 亿人口日常生活所需热量的主要来源,在热带发展中国家和地区的粮食供应中发挥重要作用^[1]。我国已经成为世界第一大木薯进口国,木薯进口量远大于其他各类热带农产品^[2]。我国木薯需求量大,但干旱、低温、病虫害等逆境常导致木薯产量显著下降或者绝收^[3]。因此,挖掘木薯抗逆基因资源,为进一步开展抗逆优良种质的培育和产业应用提供依据。

碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 最初是在红细胞中发现的^[4],但后来在包括藻类、动物、植物、古细菌和真细菌在内的大多数生物中均有发现^[5-8]。CA 是一种与光合作用密切相关的金属酶,能够高效可逆地催化 CO_2 与 HCO_3^- 之间的转化,是 CO_2 浓缩机制的重要组分,已证明其参与许多真核生物的生长和发育过程,如光合作用、呼吸作用、二氧化碳和离子运输、钙离子和酸碱平衡^[9-10]等。在普通烟草中至少含有 9 个 α 和 6 个 β 亚家族成员,烟草 α 亚家族成员在细胞壁、细胞膜、线粒体、叶绿体、细胞质等细胞器中均有分布,而 β 家族成员均存在于叶绿体中^[11]。研究表明拟南芥有 8 个 α 基因 (*AtaCA1-8*), 6 个 β 基因 (*At β CA1-6*)^[12]和 3 个 γ 基因 (*At γ CA1-3*)^[13]。CA 在高浓度 CO_2 环境中活性下降,在低浓度 CO_2 环境中活性上升,能够在一定程度上维持光合速率的相对稳定。因此,在植物遭受环境胁迫,导致气孔开度减小,造成叶肉细胞的 CO_2 浓度低于正常水平,影响光合作用的正常进行时,CA 能够发挥重要作用,有助于保持光合稳定性^[14]。

尽管 CA 的重要作用早已被认可,但相关研究主要集中在碳酸酐酶的蛋白质分子结构、酶学特性、进化分类、参与植物和藻类等光合生物的光合作用机制方面^[15],其他功能和作用机理的研究均很少。连接组蛋白 (Histone H1) 作为连接核小体与 DNA 的重要“桥梁”,在调控基因表达方面具有重要作用^[16]。*MeHISTONE1.2* (*MeH1.2*) 基因是编码木薯连接组蛋白的基因之一,过表达该基因会影响转基因木薯的发育。前期筛库发现木薯碳酸酐酶蛋白 MeCA (ID: Manes.15G167500.1) 是与 MeH1.2 互作的候选蛋白之一^[17-18],该基因可能参与木薯抗逆反应。本研究拟开展 *MeCA* 基

因的克隆和功能鉴定等工作,以便为抗逆优良木薯种质的培育和推广应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

木薯品种华南 124 号 (SC124) 种茎、华南 8 号 (SC8) 愈伤组织、H1.2-PGBKT7 载体等均由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。

所用试剂盒和分子生物学相关试剂分别购于天根生化科技 (北京) 有限公司和生工生物工程 (上海) 有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *MeCA* 基因克隆和蛋白信息预测 根据 *Manes.15G167500.1* 基因的 CDS 序列设计引物 (表 1),以 SC124 的 cDNA 为模版,PCR 扩增得到 *MeCA* 基因编码区全长序列。利用在线分析工具 ExPASy-protparam tool (<https://web.expasy.org/>) 获得 MeCA 预测编码蛋白的相对分子量、等电点、不稳定指数、脂溶系数等信息,通过 <https://www.novopro.cn/tools/> 在线分析蛋白跨膜区和蛋白信号肽,通过 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Primer sequence used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
MeCA-F	atgtcgcagcgttcgattaacg	基因克隆
MeCA-R	gagcttccaatgaagtatggtg	
1300-MeCA-F	tgatacatatgcccgctgcacatgctgcacggcttcgattaacg	植物表达载体
1300-MeCA-R	ctcaccatggatccggtaccgagcttccaatgaagtatggtg	
Actin1-F	tgattctggtgatggtgtgagt	内参基因
Actin1-R	ccgttcagcagtggtggtga	
MeCA-Q-F	cgacggcttcgattaacggc	qRT-PCR
MeCA-Q-R	tcaatggcctcctcgtacga	
H1.2-PGBKT7-X	tctagaatggccgactctgaagttcagget	酵母文库
H1.2-PGBKT7-B	ggatcctttcttcgcttcttcctgctgc	筛选
MeCA-AD-F	ccatggaggccagtgaaatcatgctgcacggcttcgattaac	Y2H 载体
MeCA-AD-R	agctcgagctcgatggatccctagagcttccaatgaagtatg	
GFP-306-F	ggacgacggcaactacaaga	转基因
GFP-519-R	ttcgatgttggtggcgatct	检测

cdd/预测蛋白的保守结构域。利用 WOLFP SORT (<https://wolfsort.hgcj.p/>) 在线软件对 MeCA 蛋白的亚细胞定位进行预测。

1.2.2 MeCA 蛋白进化分析和序列特征 根据拟南芥碳酸酐酶家族蛋白 At β CA1-At β CA6, At α CA1-At α CA7^[12], At γ CA1 和 At γ CA2^[13]的 ID 下载蛋白序列, 利用 MEGA 11 软件构建 MeCA 与拟南芥 CA 家族基因的进化树, 利用 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 比较拟南芥 CA 和 MeCA 的蛋白序列, 利用 MEME (<https://meme-suite.org/>) 在线软件分析蛋白的保守基序 (motif)。

1.2.3 组织特异性和遮光处理方法 为了研究 MeCA 基因的组织表达特异性和对光照的响应模式, 采集种植在文昌实验基地近一年的 SC124 木薯的根、茎、完全展开的功能叶和幼嫩叶作为组织特异性表达的材料。选择顶端有分枝的木薯苗, 一个分枝用 50% 的遮荫网包裹, 另一个分枝在正常光下生长 (对照), 遮荫网包裹分别持续 30、120 min, 不同处理各设 3 个生物学重复。

1.2.4 低温胁迫处理方法 将含有 2 个以上腋芽的 20~30 cm 的 SC124 茎段扦插在装有混合基质 (细砂: 蛭石=3:1) 的塑料花盆中, 于恒温恒湿温室 (光照 16 h/黑暗 8 h, 30 °C, 湿度 70%) 中培养 50 d。将幼苗在 4 °C 低温下进行处理, 分别在 0.5、1、3、12 h 采集第三、四片叶 (新形成的功能叶), 以 25 °C 培养为对照。各处理设置 3 个生物学重复。

1.2.5 qRT-PCR 分析 根据序列特异性设计引物 (表 1)。使用 RNA prep Pure Plant Plus Kit 试剂盒 (DP441) 提取 RNA, 利用 Fastking gDNA dispelling RT SuperMix 反转录试剂盒 (KP118) 得到 cDNA。按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II Kit 试剂盒 (FP202-02) 说明书在 StepOne[™] Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystems one) 上进行 qRT-PCR 分析。每个 qRT-PCR 样品设置 3 个技术重复。

1.2.6 转基因木薯的创制和检测 为了研究 MeCA 基因的功能, 根据 MeCA 基因序列特征, 去掉终止子, 设计引物 (表 1), 利用无缝克隆法将 MeCA 编码区插入到 35S:eGFP:pGAMBIA1300 植物表达载体 35S 启动子后, 使 MeCA 与 GFP 融合表达, 构建 35S:MeCA:eGFP:pGAMBIA1300 植物表达载体。将测序正确的质粒转化农杆菌感受态细胞 LBA4404, 备用。利用 SC8 木薯脆性愈伤悬浮细胞, 使用农杆菌转化方法, 将上述植物

表达载体转化到木薯胚性愈伤组织, 经过抗性愈伤诱导、胚诱导和生根筛选, 获得抗性木薯苗^[18]。采集获得的抗性苗叶片提取 RNA, 反转录为 cDNA 后作为模版, 利用 GFP 的特异性 PCR 引物, 进行 PCR 检测不同抗性苗, 判断是否为转基因株系。

1.2.7 原生质体的制备 选取转基因株系叶片, 在共聚焦显微镜下观测与 GFP 融合的目标蛋白的亚细胞定位^[17]。参考付莉莉等^[19]的方法和配方制备原生质体提取液和提取原生质体, 将木薯叶片切为 0.5 mm 的细条, 选择 1~2 条置于 2.0 mL 的离心管中, 加入 1.0 mL 提取液, 在 (25±2)°C 黑暗环境下, 40 r/min 振荡酶解 16 h^[20], 显微镜下观测。

1.2.8 叶绿素含量测定方法 选取能有效产生绿色荧光的转基因木薯株系, 利用苏州格锐思生物科技有限公司的植物叶绿素 (chlorophyll) 含量测定试剂盒 (G0601W) 检测叶绿素含量。

1.2.9 酵母双杂交系统点对点验证 MeCA 和 MeH1.2 蛋白间的关系 酵母双杂交系统 (Yeast two-Hybrid, Y2H) 试验需要构建诱饵蛋白到 pGBKT7 载体, 本课题组前期筛选 MeH1.2 的互作蛋白时, 已经构建了诱饵载体 H1.2-PGBKT7^[17]。利用表 1 的引物和上述植物表达载体的质粒为模版扩增 MeCA 序列, 通过无缝克隆插入到 pGADT7 载体, 并测序鉴定, 构建 MeCA-pGADT7 载体。参考 ZHAO 等^[17]的方法进行 Y2H 点对点试验, 验证 MeCA 和 MeH1.2 蛋白间的关系。

1.3 数据处理

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量, 不同处理与对照间采用单因素方差分析差异显著性。

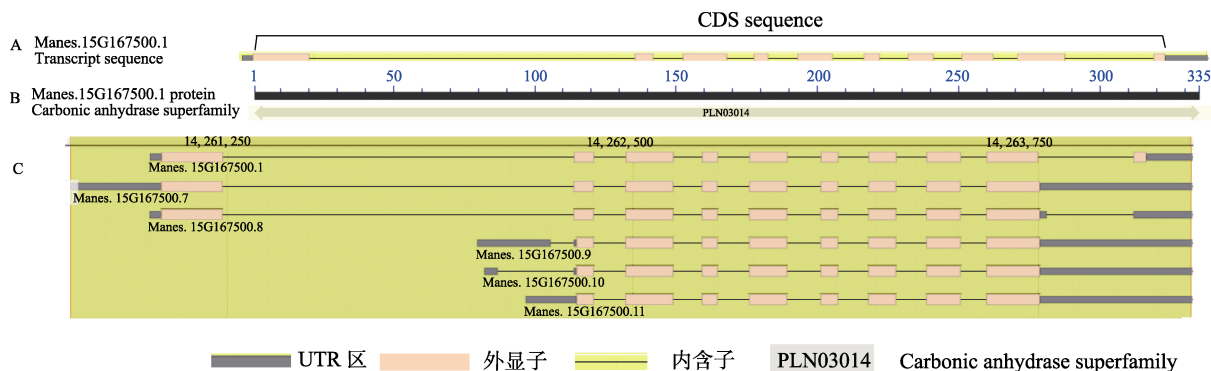
2 结果与分析

2.1 木薯 MeCA 基因的克隆和序列基本特征分析

2.1.1 木薯 MeCA 基因克隆 通过在 Phytozome 木薯数据库搜索 ID Manes.15G167500.1, 结果显示木薯品种 AM560 第 15 号染色体上编码 1 个目标基因, 基因描述为 Carbonic anhydrase 2, chloroplastic-related, 命名为 MeCA。根据参考序列信息设计特异引物, 从 SC124 木薯叶片 cDNA 进行 PCR 扩增, 获得 MeCA 基因的 CDS 全长 1008 bp, 编码 336 个氨基酸。通过序列比对发现, 其与数据库中的序列存在 1 个氨基酸的差异, 即第 83 位的氨基酸, 核苷酸序列从 CTC 变为 CCC, 氨基酸从亮氨酸 (Leu) 变为脯氨酸 (Pro)。第 276

位氨基酸编码序列从 TCG 变为 TCA，但仍然为丝氨酸 (Ser)，其余与基因组序列相同，序列相似性达到 99.70%。*MeCA* 基因含有 10 个外显子和 9 个内含子，以及两端的 UTR 区 (图 1A)。NCBI-CDD 保守结构域分析显示 *MeCA* 蛋白属于

注释为 carbonic anhydrase 的 PLN03014 超家族 (图 1B)。数据库信息显示 *MeCA* 基因存在 6 个可变剪切位点，其中，1 个剪接体含有 10 个外显子，2 个剪接体含有 9 个外显子，3 个剪接体含有 8 个外显子 (图 1C)。



A: *MeCA* 基因序列特征; B: *MeCA* 蛋白序列特征; C: 木薯 *MeCA* 基因可变剪切图。

A: Sequence characteristics of *MeCA* gene; B: Sequence characteristics of *MeCA* protein; C: The alternative splicing of *MeCA* gene in cassava.

图 1 *MeCA* 基因和蛋白的序列特征

Fig. 1 Sequence characteristics of *MeCA* gene and protein

2.1.2 木薯 *MeCA* 蛋白理化性质 理化性质分析显示，*MeCA* 蛋白的分子量为 36 373.83 Da，理论等电点为 7.04，正、负电残基的总数均为 35；不稳定系数为 52.05，大于 40，属于不稳定蛋白；脂溶系数为 87.61，小于 100；亲水性平均值为 -0.105，小于 0，属于亲水性蛋白；该蛋白没有跨膜结构域，无信号肽，说明是非膜蛋白和非分泌蛋白；亚细胞定位预测显示 *MeCA* 可能定位在叶绿体。

2.1.3 木薯 *MeCA* 蛋白的序列特征和进化分析在 Phytozome 拟南芥数据库中搜索 *AtαCA1-8*、*AtβCA1-6*、*AtγCA1-2* 的 ID 号，并下载其蛋白序列，通过 MEGA 11 软件构建进化树。结果显示，*MeCA* 和 *AtβCA1-6* 处于同一个分支，与 *AtβCA1* 的序列同源性最高 (图 2A)。通过序列比对发现其碱基有 73.13% 的相似性 (图 2B)。通过 MEME 软件分析显示 *MeCA* 和 *AtβCA1* 含有完全相同的 motif (图 2C)，推测其功能可能相似。在 Phytozome 木薯数据库中搜索出 22 个 *CA* 基因，其中 9 个注释为 α 亚家族，2 个注释为 γ 亚家族，*MeCA* 未注释到 α 和 γ 亚家族的 11 个蛋白之一，表明 *MeCA* 属于碳酸酐酶 β 亚家族。

2.2 *MeCA* 基因的功能分析

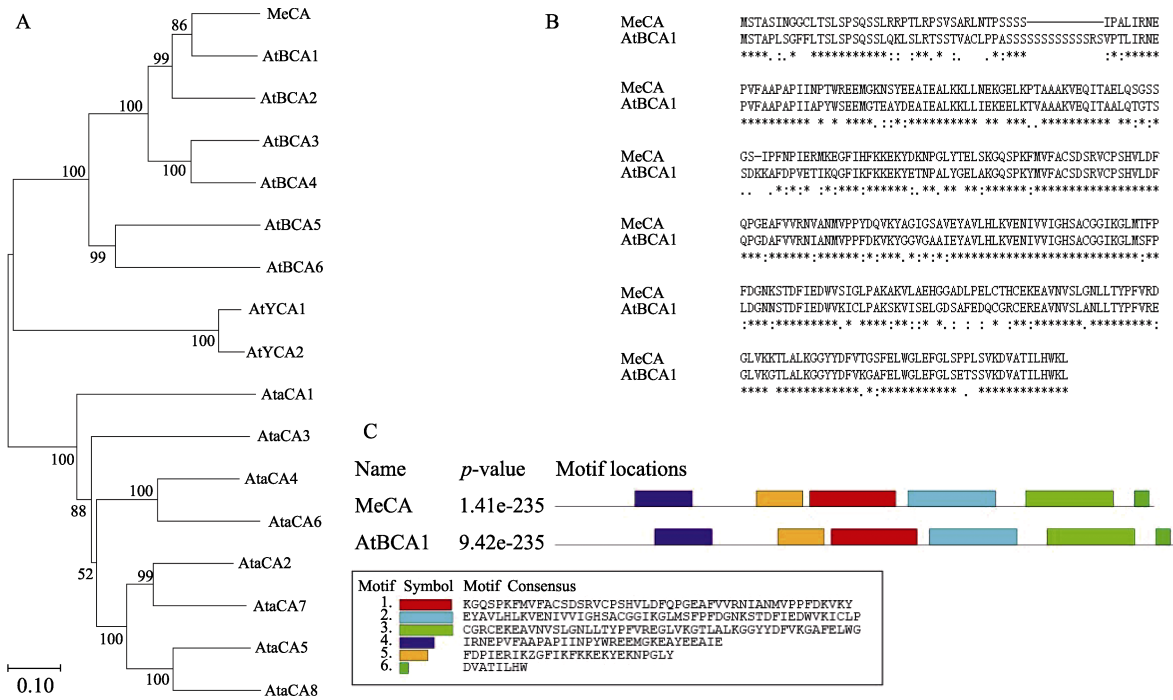
2.2.1 *MeCA* 基因的组织特异性表达分析 通过定量 PCR 分析 *MeCA* 基因在木薯 SC124 组织中的

转录活性，结果显示 *MeCA* 基因在功能叶中的表达活性最高，高于根和茎万倍，其次为幼嫩叶，高于茎和根千倍 (图 3A)，这与 *CA* 酶参与光合作用的推测一致。

2.2.2 *MeCA* 基因对不同处理的响应模式 通过定量 PCR 检测 *MeCA* 基因对不同胁迫的响应，结果表明，*MeCA* 基因在不同遮光时间的 SC124 叶片中显著下调表达 (图 3B)。*MeCA* 基因在低温处理 0.5~3 h 的叶片中上调表达，处理 12 h 时与对照相似 (图 3C)。上述结果说明 *MeCA* 基因可以响应遮光、低温处理，在转录水平发生显著变化。

2.2.3 *MeCA* 转基因木薯的分子检测 将 *MeCA* 与 GFP 融合的植物表达载体转化木薯悬浮胚性愈伤组织，在筛选培养基上进行胚诱导、芽诱导和根诱导，获得 8 个候选抗性木薯株系 (OE1~8)。提取上述 8 个转基因株系和 SC8 无菌苗的 RNA，并转录为 cDNA 作为模版，以 GFP 的特异性引物进行 PCR 扩增，结果显示，OE1~6 木薯抗性株系在 250 bp 附近有条带，与目标片段 213 bp 相吻合，测序结果与目标序列吻合，但 OE7~8 和对照 SC8 未扩增到目标条带 (图 4)，表明 OE1~6 均为转 *MeCA* 基因的木薯株系。

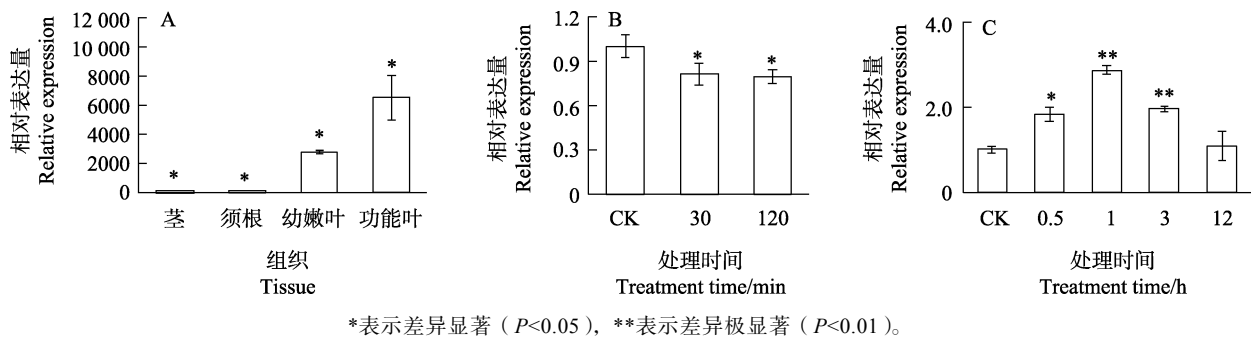
2.2.4 *MeCA* 蛋白的亚细胞定位 随机选取 1 个转 *MeCA* 基因的木薯株系，取其叶片及其原生质体在荧光显微镜下进行观察，结果发现绿色荧光



A: MeCA 和拟南芥 CA 家族蛋白系统进化树; B: MeCA 和 AtβCA1 蛋白序列比较; C: MeCA 和 AtβCA1 蛋白 motif 分析。
A: Phylogenetic evolution of MeCA and CA proteins in *A. thaliana*; B: Sequence comparisons of MeCA and AtβCA1 proteins; C: Motif analysis of MeCA and AtβCA1 proteins.

图 2 MeCA 和拟南芥 CA 家族蛋白的生物信息学分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis of MeCA and CA proteins in *A. thaliana*



*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 3 木薯 MeCA 基因的组织特异性表达和对不同胁迫的响应模式

Fig. 3 Tissue expression specificity of *MeCA* and expression patterns under different treatments

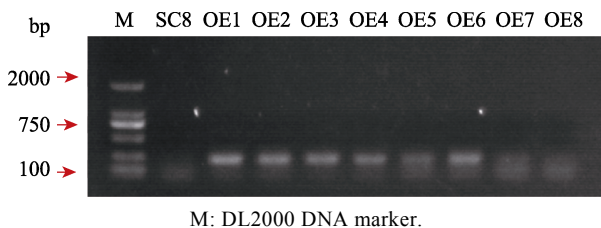


图 4 木薯转基因株系的 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of cassava transgenic plants

和叶绿体的自发红色荧光完全重合 (图 5), 说明 MeCA 蛋白主要在叶绿体中表达, 与上述预测结果相同。

2.2.5 MeCA 过表达的木薯株系叶片叶绿素含量增加 选取同时继代的 2 个转基因株系 CA-OE4、

CA-OE6 和 SC8 无菌苗, 取第 2~5 位叶片, 测定其叶绿素含量。结果显示, 过表达的转基因株系叶绿素 A、叶绿素 B 和总叶绿素含量均显著高于未转化的 SC8 株系 WT, CA-OE4 和 CA-OE6 两个转基因株系之间无显著性差异 (图 6), 说明 MeCA 过表达有增加产量的潜力。

2.3 MeCA 基因编码蛋白能够和 MeH1.2 产生互作

Y2H 点对点试验结果显示, 共转质粒的 Y2Hgold 菌株在二缺培养基上均长出了克隆菌斑, 说明共转化成功。将二缺培养基上的克隆菌斑挑取至四缺培养基中培养发现, 除共转化阳性

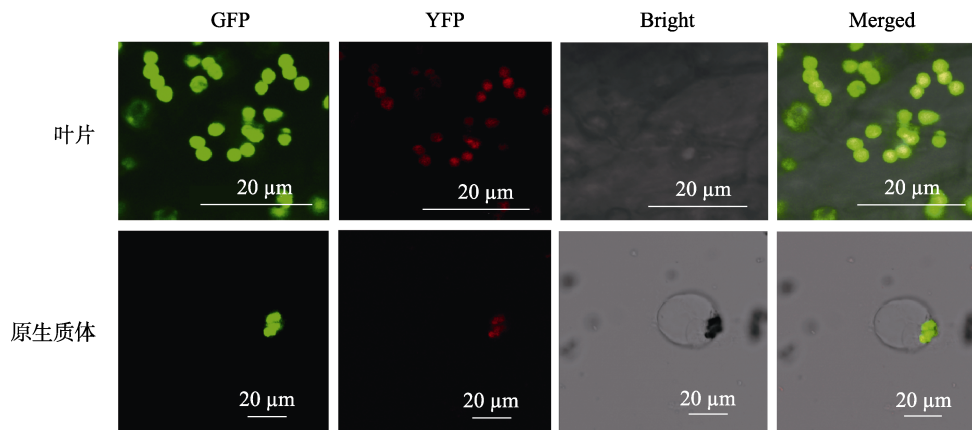
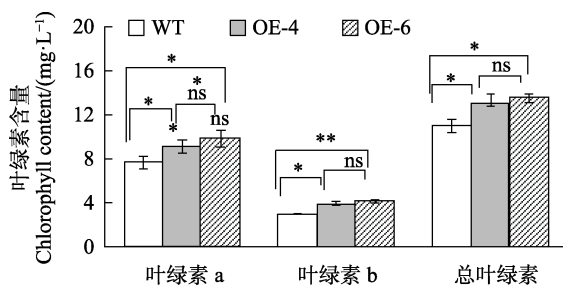


图 5 MeCA 蛋白在木薯中的亚细胞定位
Fig. 5 Subcellular localization of MeCA protein in cassava



*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示差异不显著。
* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$), ns indicates no significant difference.

图 6 MeCA 转基因和野生型木薯叶片叶绿素含量
Fig. 6 Chlorophyll content of MeCA transgenic and wild-type cassava leaves

对照质粒外, MeH1.2+MeCA 共转菌株正常生长, 并和阳性对照组 (pGADT7-T/pGBKT7-53) 一样在添加 X- α -gal 的培养基上变蓝, 而阴性对照组 (pGADT7-T/pGBKT7-Lam) 不能生长 (图 7), 上述结果表明 MeH1.2 和 MeCA 可能存在蛋白互作。

3 讨论

3.1 MeCA 基因的序列特征和表达特征

木薯 MeCA 蛋白和数据库中的序列存在 1 个氨基酸的差异, 含有 CA 家族的特殊结构域。由于对植物 CA 家族蛋白功能的相关研究较少, 本研究选择研究较多的拟南芥 CA 家族蛋白^[12-13]与 MeCA 蛋白构建系统进化树, 发现 MeCA 蛋白与拟南芥 At β CA1 亲缘关系最近, 蛋白序列比对也发现二者相似性达到 71.13%, 并且含有完全相同的 motif。MeCA 有 6 个不同的可变剪切位点, 符合 CA 转录本的选择性剪接比较常见的特征^[20]。进一步研究发现 MeCA 蛋白定位于叶绿体中, 一般合成场中绿色荧光和红色荧光叠加呈现为黄色, 本研究合成场中为绿色, 这可能是由于叶绿体的自发红色荧光较弱或者转化后的绿色荧光太强。MeCA 的亚细胞定位与 At β CA1 相同^[12], 一般来说, CA 家族蛋白的亚细胞定位呈现多样化, 在拟南芥中, At β CA1 和 At β CA5 定位于叶绿体中, At β CA2、At β CA3、At β CA4 定位于胞质中, At β CA6 定位于线粒体中, At γ CA1 定位未知, At γ CA2 定

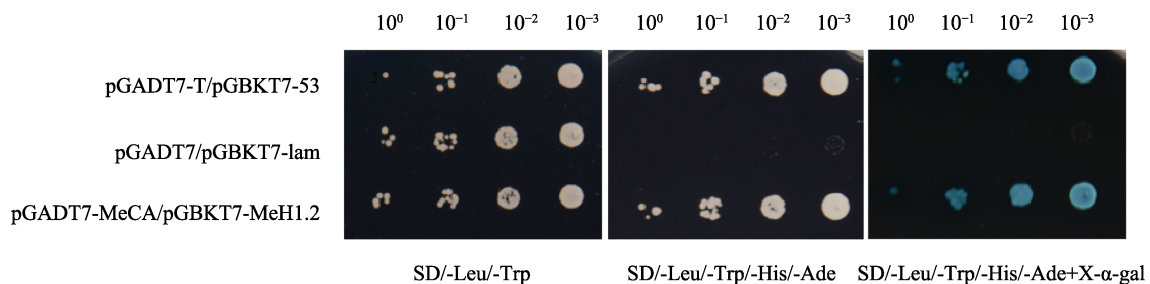


图 7 Y2H 验证 MeCA 与 MeH1.2 蛋白间的互作关系

Fig. 7 Relationship between MeCA and MeH1.2 proteins was verified by Y2H

位于线粒体中, α 家族均定位于胞质中^[21-23]。相似的序列结构和亚细胞定位说明 MeCA 蛋白也属于碳酸酐酶 β 亚家族。

3.2 MeCA 基因的基本功能

占细胞可溶性蛋白 1%~2% 的 CA 除参与光合作用外, 也与许多生理过程, 包括羧化和脱羧化反应、pH 调节、无机碳运输、离子运输、水和电解质平衡^[7, 24], 及其生物与非生物胁迫过程相关^[25]。木薯 MeCA 基因在叶片中高表达, 这与其蛋白定位于叶绿体, 可能参与光合作用的功能相一致。在拟南芥中, *At β CA1* 是在叶片组织中表达量最高的 CA 基因, 其 RNA 测序 reads 数量是同为叶绿素定位 *At β CA5* 的近 50 倍, 表达序列标签的数量是 *At β CA5* 的 13 倍^[14]。遮阴处理抑制了叶片中 MeCA 基因的表达, 低温处理短期内诱导了木薯叶片中 MeCA 基因的表达, 说明 MeCA 对遮阴和低温有不同的响应模式。CA 基因参与生物、非生物胁迫, 如 CA 基因在葡萄霜霉病原菌感染过程中表达受到抑制^[26]; 沉默烟草的 CA 基因, 晚疫菌感染后病原菌生长更快, 表明抑制 CA 增加了对病原菌的易感性^[27]; 拟南芥 *cal* 和 *ca5* 双突变株系叶片的叶绿体中产生活性氧, *at β cal* 突变株系的 CA 酶活性显著下降^[28-29], 但 *AtBcal* 基因单独突变或者过表达对拟南芥的表型影响不大; 拟南芥 *Bca1/Bca2/Bca4* 三突变体具有明显生理缺陷, 如植株较小、育性差以及生长周期长等表型, 但 *AtBcal*、*At β CA2*、*At β CA4* 基因单独回转三突变体后转基因拟南芥表型均能恢复, 这说明三突变体表型突变是由 3 个 *Bca* 共同突变造成。*At β CA1*、*At β CA2*、*At β CA4* 基因均有促进植物正常发育的功能^[23], 3 个基因存在功能冗余, 而过表达 MeCA 基因的转基因木薯叶片中叶绿素含量增加, 这说明 MeCA 基因可能单独在木薯中有发挥功能; 表达成熟的 *OsCA* 能提高重组体在热胁迫下的耐热性^[30]。MeCA 家族基因在逆境中的作用需要进一步的研究。

3.3 MeCA 基因的作用机理

CA 是适应胁迫条件的光合碳代谢调节酶, 在保持光合碳代谢稳定方面具有重要作用^[31]。本研究发现基因过表达 MeCA 的转基因木薯株系叶片中的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量显著高于未转化的对照, 这说明过量表达 MeCA 基因有助于提高光合作用。这与在烟草中异源表达玉米的 *β CA3*、 *β CA9* 基因, 转基因植株叶片表现出深

绿色的表型一致^[32]。过表达 *At β CA6* 的转基因拟南芥鲜质量、干质量和莲座叶面积增加, 而敲除 *At β CA6* 的突变体鲜质量、干质量和莲座叶面积降低^[33], MeCA 可能与 *At β CA6* 一样, 通过促进生长而提高植物的抗逆性。关于 CA 的作用机理, 目前研究的不多, 重组烟草叶绿体 CA 同时具有 CA 酶和 SA 结合活性, CA 蛋白在酵母中的表达也表明其具有抗氧化活性^[27]。玉米 *ZmCA4* 通过与 *ZmPIP2;6* 相互作用, 在调节 CO₂ 信号传导方面发挥着关键作用。MeCA 和 MeH1.2 可以在体外结合, 但二者的亚细胞定位不同, 在实际中是否互作还需要进一步研究。

木薯 MeCA 与拟南芥的 *At β CA* 亚家族属于同一个分支, 与 *At β CA1* 蛋白的序列相似性达到 73.13%, 并含有完全相同的 motif, 因此, 其属于碳酸酐酶 β 亚家族。MeCA 基因的表达量在功能叶中最高, 其次为幼嫩叶, 均显著高于根和茎, 并在遮光胁迫的木薯叶片显著下调表达, 低温处理初期诱导了木薯叶片中 MeCA 基因的表达。本研究创制了过量表达 MeCA 基因的转基因木薯, 并观察到 MeCA 蛋白定位于叶绿体, 转基因株系叶片中的叶绿素含量显著高于对照。进一步研究结果显示 MeCA 与 MeH1.2 蛋白互作。因此, MeCA 基因响应光和低温胁迫处理, 并可能通过影响植物生长或者与 MeH1.2 蛋白互作, 参与植物对胁迫的响应过程。本研究结果有助于进一步研究其在光合和逆境中的功能和机理。

参考文献

- [1] KHUMAIDA N, ARDIE S, DIANASARI M, SYUKUR M. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) improvement through gamma irradiation[J]. Procedia Food Science, 2015, 3: 27-34.
- [2] 付丹丹, 韩昕儒, 问锦尚, 王秀东. 基于 Rotterdam 模型的热带农产品进口市场格局研究[J]. 中国农业资源与区划, 2022, 43(11): 168-177.
- [3] FU D D, HAN X R, WEN J S, WANG X D. China's tropical agricultural product imports: a rotterdam model analysis[J]. Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional planning, 2022, 43(11): 168-177. (in Chinese)
- [4] MUIRURI S K, NTUI V O, TRIPATHI L, TRIPATHI J N. Mechanisms and approaches towards enhanced drought tolerance in cassava (*Manihot esculenta*) [J]. Current Plant Biology, 2021, 28: 100227.
- [4] MELDRUM N U, ROUGHTON F J W. Carbonic anhydrase.

- Its preparation and properties[J]. The Journal of Physiology, 1933, 80: 113-141.
- [5] HEWETT-EMMETT D, TASHIAN R E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, 5(1): 50-77.
- [6] KHALIFAH R G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1971, 246(8): 2561-2573.
- [7] SMITH K S, FERRY J G. Prokaryotic carbonic anhydrases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24: 335-366.
- [8] MITRA M, MASON C B, XIAO Y, YNALVEZ R A, LATO S M, MORONEY J V. The carbonic anhydrase gene families of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Canadian Journal of Botany, 2005, 83(7): 780-795.
- [9] MORONEY J V, BARTLETT S G, SAMUELSSON G. Carbonic anhydrases in plants and algae[J]. Plant Cell & Environment, 2001, 24(2): 141-153.
- [10] WANG L L, LIANG J J, ZHOU Y, TIAN T, ZHANG B L, DUANMU D Q. Molecular characterization of carbonic anhydrase genes in *Lotus japonicus* and their potential roles in symbiotic nitrogen fixation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22: 7766.
- [11] 赵希胜, 曾鼎宸, 吕承承, 蒋垚, 童铸, 吴润生, 李立芹, 鲁黎明. 普通烟草碳酸酐酶家族基因的生物信息学分析[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(5): 68-76.
- ZHAO X S, ZENG D C, LYU C C, JIANG Y, TONG Z, WU R S, LI L Q, LU L M. Bioinformatics analysis of carbonic anhydrase family genes in tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(5): 68-76. (in chinese)
- [12] FABRE N, REITER I M, BECUWE-LINKA N, GENTY B, RUMEAU D. Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in *Arabidopsis*[J]. Plant, Cell & Environment, 2007, 30(5): 617-629.
- [13] PERALES M, PARISI G, FORNASARI M, COLANERI A, VILLARREAL F, GONZALEZ SCHAIN N, ECHAVE J, GOMEZ-CASATI D, BRAUN H, ARAYA A. Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I[J]. Plant Molecule Biology, 2004, 56: 947-957.
- [14] DIMARIO R J, QUEBEDEAUX J C, LONGSTRETH D J, DASSANAYAKE M, HARTMAN M M, MORONEY J V. The cytoplasmic carbonic anhydrases β CA₂ and β CA₄ are required for optimal plant growth at low CO₂[J]. Plant Physiology, 2016, 171(1): 280-293.
- [15] SMITH K S, JAKUBZICK C, WHITTAM T S, FERRY J G. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes[J]. Proceeding of the National Academy of Science of USA, 1999, 96: 15184-15189.
- [16] ANDRÉS M, GARCÍA-GOMIS D, PONTE I, SUAUA P, ROQUE A. Histone H1 post-translational modifications: update and future perspectives[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(16): 5941.
- [17] ZHAO P J, GUO X, WANG B, ZHANG X C, SUN J B, RUAN M B, PENG M. Overexpression of *MeH1.2* gene inhibited plant growth and increased branch root differentiation in transgenic cassava[J]. Crop Science, 2021, 61(4): 2639-2650.
- [18] 赵平娟, 林晨俞, 王梦月, 张秀春, 李淑霞, 阮孟斌. 木薯 SDH 蛋白的序列分析及其与 MeH1.2 关系的研究[J]. 生物技术通报, 2024, 40(9): 74-81.
- ZHAO P J, LIN C Y, WANG M Y, ZHANG X C, LI S X, RUAN M B. Sequence analysis of MeSDH protein and its relationship with MeH1.2 in cassava[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(9): 74-81. (in chinese)
- [19] 付莉莉, 马帅, 胡小文, 孙雪飘, 谭德冠, 张家明. 木薯叶片原生质体分离条件研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 32-34.
- FU L L, MA S, HU X W, SUN X P, TAN D G, ZHANG J M. Study on protoplast separation conditions of cassava leaves[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(5): 32-34. (in chinese)
- [20] DIMARIO R J, CLAYTON H, MUKHERJEE A, LUDWIG M, MORONEY J V. Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles[J]. Molecular Plant, 2017, 10(1): 30-46.
- [21] FERREIRA F J, GUO C, COLEMAN J R. Reduction of plastid-localized carbonic anhydrase activity results in reduced arabidopsis seedling survivorship[J]. Plant Physiology, 2008, 147(2): 585-594.
- [22] VILLAREJO A, BURÉN S, LARSSON S, DÉJARDIN A, MONNÉ M, RUDHE C, KARLSSON J, JANSSON S, LEROUGE P, ROLLAND N, HEIJNE G V, GREBE M, BAKO L, SAMUELSSON G. Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast[J]. Nature Cell Biology, 2005, 7(12): 1224-1231.
- [23] 熊二辉. β 碳酸酐酶基因在拟南芥生长发育中的功能研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- XIONG E H. Functional studies of beca carbonic anhydrase gene family in *Arabidopsis thaliana* growth and development[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [24] IGNATOVA L, RUDENKO N, ZHURIKOVA E, BORISOVA-MUBARAKSHINA M, IVANOV B. Carbonic anhydrases in photosynthesizing cells of C₃ higher plants[J]. Me-

- tabolites, 2019, 9(73): 9040073.
- [25] SLAYMAKER D H, NAVARRE D A, CLARK D, POZO O D, MARTIN G B, KLESSIG D F. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(18): 11640-11645.
- [26] POLESANI M, DESARIO F, FERRARINI A, ZAMBONI A, PEZZOTTI M, KORTEKAMP A, POLVERARI A. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*[J]. BMC Genomics, 2008, 9(142): 1-14.
- [27] RESTREPO S, MYERS K L, POZO D O, MARTIN G B, HART A L, BUELL C R, FRY W E, SMART C D. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(9): 913-922.
- [28] HINES K M, CHAUDHARI V, EDGEWORTH K N, OWENS T G, HANSON M R. Absence of carbonic anhydrase in chloroplasts affects C₃ plant development but not photosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021, 118(33): e2107425118.
- [29] ZHOU Y, VROEGOP-VOS I A, DIJKEN V D A, Does D V D, ZIPFEL C, PIETERSE C M J, WEES S C M V. Carbonic anhydrases CA1 and CA4 function in atmospheric CO₂-modulated disease resistance[J]. Planta, 2020, 251: 75.
- [30] TIANPEI X Z, MAO Z N, ZHU Y G, LI S Q. Expression of rice mature carbonic anhydrase gene increase *E. coli* tolerance to heat stress[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(2): 625-635.
- [31] HIBBERD J M, SHEEHY J E, LANGDALE J A. Using C₄ photosynthesis to increase the yield of rice- rationale and feasibility[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(2): 228-231.
- [32] 张亚飞. 异源表达 *ZmCAs* 对番茄植株光合速率和果实品质影响的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.
- ZHANG Y F. Effects of heterologous expression of *ZmCAs* on photosynthetic rate and tomato fruit quality[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2023. (in chinese)
- [33] JIANG C Y, THOLEN D, XU J, XIN C P, ZHANG H, ZHU X G, ZHAO Y X. Increased expression of mitochondria-localized carbonic anhydrase activity resulted in an increased biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Plant Biology, 2014, 57(6): 366-374.