

木薯抗低温关键基因 *MeCAD2* 的功能鉴定

蔡 政, 张 凡, 刘坤行, 邓诗婷, 李有志, 朱平川*, 樊宪伟*

亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004

摘 要: 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 属于热带粮食作物, 对低温的敏感性严重制约了种植区域。木质素是细胞壁中的组分, 在抗低温胁迫中发挥关键作用, 但木质素合成关键酶肉桂酸脱氢酶 (CAD) 在低温响应中的作用尚不明确。本研究通过分析低温胁迫下木薯的生理表型、CAD 酶活及木质素变化, 发现 10 °C 低温处理显著诱导木薯中 CAD 酶活上升 66.7%, 且木质素增加 14.8%。同时表达谱分析筛选出低温响应的核心基因 *MeCAD2*。经原核表达证实其编码蛋白具有 CAD 催化活性, VIGS 沉默该基因后, 植株 CAD 酶活降低 18.9%, 木质素含量下降 12.3%~22.4%。在低温胁迫下, *MeCAD2* 沉默株系叶片损伤加剧, 丙二醛积累量升高 172.5%, 活性氧染色加深, 表明 *MeCAD2* 基因通过调控木质素沉积增强了木薯抗低温胁迫的能力。本研究揭示 *MeCAD2* 在木薯低温胁迫中的关键作用, 为抗低温分子育种提供新靶点。

关键词: 木薯; 低温胁迫; 肉桂酸脱氢酶; *MeCAD2*; 木质素

中图分类号: S533 文献标志码: A

Functional Characterization of the Key Cold Resistance Gene *MeCAD2* in cassava

CAI Zheng, ZHANG Fan, LIU Kunhang, DENG Shiting, LI Youzhi, ZHU Pingchuan*, FAN Xianwei*

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources / College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a vital tropical food crop, exhibits significant sensitivity to low temperature, which severely restricts its cultivation range. Lignin is a key stress-resistant component in cell walls, playing a crucial role in plant adaptation to low temperature stress. However, the function of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), a pivotal enzyme in lignin biosynthesis, during low-temperature stress responses remains unclear. This study analyzed physiological phenotypes, CAD enzyme activity and lignin accumulation in cassava under low temperature stress. CAD enzyme activity was significantly increased by 66.7% and lignin content was also increased by 14.8% at the low temperature of 10 °C. Transcriptome profiling identified *MeCAD2* as the key gene responsive to low temperature stress. Heterologous expression of *MeCAD2* confirmed that its encoded *MeCAD2* protein possessed CAD enzymatic activity. Virus-induced gene silencing (VIGS) of *MeCAD2* in cassava resulted in a 18.9% reduction in CAD enzyme activity and a 12.3%–22.4% decrease in lignin content. Furthermore, under low temperature stress, *MeCAD2*-silenced plants exhibited exacerbated leaf damage, a 172.5% increase in malondialdehyde (MDA) accumulation, and intensified reactive oxygen species (ROS) staining. The results indicate that *MeCAD2* enhances cassava low-temperature tolerance by regulating lignin deposition. This study elucidated the critical role of *MeCAD2* in cassava's response to low-temperature stress, providing a novel candidate gene for molecular breeding.

Keywords: cassava; low temperature stress; cinnamyl alcohol dehydrogenase; *MeCAD2*; lignin

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.12.002

收稿日期 2025-08-07; 接受日期 2025-09-10

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32160429); 广西自然科学基金项目 (No. 2021GXNSFDA196009); 广西研究生教育创新计划资助项目 (No. YCBZ2025017)。

作者简介 蔡 政 (1996—), 男, 博士研究生, 研究方向: 木薯分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 朱平川 (ZHU Pingchuan), E-mail: zhupingchuan12@163.com; 樊宪伟 (FAN Xianwei), E-mail: fanxw@gxu.edu.cn。

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 作为重要的热带粮食作物, 是全球近 8 亿人口的主要热量来源^[1]。然而, 对低温的敏感性严重制约木薯向亚热带及温带地区的推广种植^[2-3]。研究表明, 10~15 °C 的低温即可导致木薯叶片光合效率下降、活性氧 (ROS) 积累及细胞膜损伤, 最终影响木薯生产^[4-5]。3 个月龄的木薯苗在 7 °C 的低温下处理 4 h, 茎尖部位和叶片即出现明显的失水和萎蔫现象^[6]。低温不仅导致木薯种茎萌发率和存活率显著下降, 而且还促进木薯块根的木质化^[7], 这将增加从块根中提取淀粉的成本, 降低块根的加工性能, 影响鲜食木薯的风味和口感。

在逆境胁迫下, 通过细胞壁修饰增强机械强度维持细胞完整性有助于植物抗逆^[8]。肉桂酸脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) 是木质素合成途径中的关键酶, 催化肉桂醛还原为肉桂醇。辣椒中 CAD 活性受低温诱导上调, 并通过木质素沉积增强植株抗冻性^[9]。过表达 *IbCAD1* 增强了甘薯块茎中木质素积累和耐低温贮藏能力^[10]。低温条件下, *EjNAC3* 通过调控 *EjCAD* 转录诱导枇杷果实木质化^[11]。芒草中低温通过诱导 CAD 活性增强木质素前体合成, 进而促进细胞壁交联与机械强度提升, 是其维持细胞完整性、提高抗冻性的关键机制^[12]。但木薯中 CAD 基因家族的功能分化及其在低温胁迫中的作用尚未明确。

CAD 基因家族的构成及对逆境响应存在较大差异。水稻基因组中包含 12 个 CAD 同源基因, 其中 *OsCAD2*、*OsCAD3*、*OsCAD6* 和 *OsCAD8A* 参与不同生物和非生物胁迫的防御反应^[13]; 桑树基因组中的 5 个 CAD 基因表现出在木质素生物合成和胁迫反应中的功能分歧^[14]; 大豆 *GsCAD1* 被证实通过调控木质素增强了对大豆花病毒的抗性^[15]。由此可见, 不同物种中 CAD 基因可能通过时空特异性表达模式参与特定胁迫响应。然而, 木薯基因组中共鉴定出 16 个 CAD 家族成员^[16], 其表达模式与功能研究仍较少。前期转录组数据显示, 低温胁迫可能激活木薯中部分 CAD 基因表达^[17], 但其分子机制及生理效应亟待验证。

基于上述背景, 本研究聚焦以下科学问题:

(1) 低温胁迫是否通过调控 CAD 活性诱导木薯木质素积累? (2) 木薯 CAD 基因家族中是否存在低温响应的关键成员? (3) 特定 CAD 基因的功能缺失是否削弱木薯抗寒性? 为此, 本研究系统分析了低温处理下木薯的生理表型、CAD 酶活

性及木质素含量变化, 结合基因表达谱筛选出关键候选基因 *MeCAD2*, 并通过原核表达、病毒诱导基因沉默 (VIGS) 及抗性表型分析揭示其功能。本研究首次阐明 *MeCAD2* 在木薯低温响应中的调控作用, 为解析木质素介导的抗寒机制提供新视角, 也为分子育种提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料及生长条件 供试木薯品种为南植 199 (NZ199), 采自广西大学亚热带农科新城种植基地的成熟茎段, 于 28 °C、光暗时间比为 14 : 10 条件下温室培养, 生长 5 周后用于低温处理或 VIGS 试验; 供试烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 于光照培养箱 25 °C 培养, 光暗时间比为 14 : 10。

1.1.2 菌株及载体 大肠杆菌 DH5 α 及 BL21 (DE3) 感受态细胞, 农杆菌 GV3101 (pSoup) 感受态细胞, 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。病毒载体 pTRV1、pTRV2 由本实验室保存; 载体 pCambia2300-eGFP、pGEX-4T-1 由中国科学院遗传与发育研究所馈赠。

1.1.3 主要试剂 2 $\times$ Taq PCR Master Mix、ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit、FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; PerfectStart[™] Green qPCR SuperMix、TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 均购自北京全式金生物技术有限公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒均购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 木质素含量检测试剂盒、肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) 活性检测试剂盒、谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B (GST 标签纯化树脂)、卡那霉素、氨苄青霉素、利福平均购自索莱宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体构建 从木薯基因组中获得 *MeCAD2* (Manes. 13G102200) 的 cDNA 序列, 利用在线软件 CE Design (<http://www.vazyme.com>) 设计其无终止密码子的 ORF 框无缝克隆引物 (表 1)。将木薯 RNA 反转录为 cDNA, 将其作为模板, 以特异性引物 pGEX-4T-1-CAD2F/R 和 pCambia2300-CAD2F/R 进行 PCR 扩增得到目的基因片段。以限制性内切酶 *Bam*H 酶切 pGEX-4T-1 载体、以限制性内切酶 *Sam*I 酶切

表 1 引物
Tab. 1 Primers

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
pGEX-4T-1-CAD2F	gatctggttccgcgtggatccATGGTAGCCAA ATTGCCAGAAG
pGEX-4T-1-CAD2R	accgggaattccggggatccATGTCAATAAC AAATCGGTATCTAACATC
pCAMBIA2300-CAD2F	ggagaggacagggtaccgggATGGTAGCCA AATTGCCAGAAG
pCAMBIA2300-CAD2R	cgactctagaggatccccgggGCTGCTGCATT GGATTGTATTG
pTRV2CAD2F	agaagcgctccatggggatccGATAATTGCAC AAACAATCTTGAAAA
pTRV2CAD2R	cgtgagctcggtaccggatccCATCAAGAGGC ATGTTGTCTGG
qMeCAD1F	TTGTAATGATAGGGAAGAAG
qMeCAD1R	ACAGTAATTCCAGCACATA
qMeCAD2F	GCTGATGTTAGATACCGAT
qMeCAD2R	CTCATAATAATAGACTGCAAA
qMeCAD3F	GTATTGGAGGAATGAAAGAG
qMeCAD3R	CAAATCGGTATCTAACATCA
qMeCAD4F	ACAGAGTTTCCAAAGAGCA
qMeCAD4R	AAGGGAGAAAGATGACCAGAT
qMeCAD5F	TCAGTCCTCTTCATCGTTT
qMeCAD5R	AAATCCCACAGTACAAAACC
qMeCAD6F	CAGAGGTCGGGAGCAAAAGT
qMeCAD6R	AGAGTAGCCGCCGTAAGTG
qMeCAD7F	TCAACATTTTCTGCTTTCA
qMeCAD7R	GATGGGATGCTCTTCTTCT
qMeCAD8F	GCAGGGATTGTGGGTTTAG
qMeCAD9F	TACTGTTAAGGCCCGAAGC
qMeCAD9R	GCAGCCCATCCAAATGACT
qMeCAD10F	GTAGAGGTTGTCCCATTG
qMeCAD10R	CGATTTTATTATAGTAGGCT
qMeCAD11F	GAAGCTCCTTATCCCAGTT
qMeCAD11R	CTAAGATTCAAGGCAAACAA
qMeCAD12F	CAACCACGCAACCAACCAC
qMeCAD12R	GAGCTGCCCAGCCAGAAAC
qMeCAD13F	ACCGCTTCTTAGTCTGCTC
qMeCAD13R	ATCCTATGTTGCTTCCTCC
qMeCAD14F	CTTGATGCTACTGCTCCTC
qMeCAD14R	TAGCCTCCTGCTTCTTGTT
qMeCAD16F	GATGGGATGTCACCAGAAC
qMeCAD16R	CTCCTCTTAGCCCACTCTT
qMeEF1aF	TGAACCACCCTGGTCAGATTGGAA
qMeEF1aR	AACTTGGGCTCCTTCTCAAGCTCT

注：小写字母代表线性化载体重叠序列。
Note: The lowercase letters represent an overlapping sequence of linearized vector.

pCAMBIA2300-eGFP 载体，将目的基因片段和对应的线性化载体用无缝克隆连接，转化至大肠杆菌 DH5α，提质粒后送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 基于 *MeCOMTs* 序列设计特异性荧光定量 PCR 引物(表 1)。以 *MeEF1a* 作为内参基因，使用荧光定量 PCR 仪(ABI 7000)进行检测。反应体系与 PCR 反应条件参照 Perfect-Start™ Green qPCR SuperMix 试剂盒。每个样品检测重复 3 次，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.3 VIGS 载体构建与木薯侵染试验 木薯 VIGS 试验参考 ZENG 等^[18]的方法。利用 SGN VIGS (<https://vigs.solgenomics.net/>)软件设计 *MeCAD2* 的 VIGS 区段，根据片段设计引物，以上述 1.2.1 中的阳性质粒为模板 PCR 扩增 VIGS 片段，经测序验证后，与酶切线性化载体 pTRV2 连接，转化至 DH5α 感受态细胞。提取质粒后送生工生物工程（上海）股份有限公司测序正确后，将重组质粒转化到 GV3101 (pSoup) 感受态细胞。分别挑取 pTRV1、pTRV2 和 pTRV2-CAD2 已转化农杆菌 GV3101 的单克隆于抗性培养基中震荡培养 24 h，离心收集菌体，加入重悬液：1 mol/L MES（吗啉乙磺酸）、1 mol/L MgCl₂、200 mmol/L AS（乙酰丁香酮），重悬菌体并调整 OD₆₀₀ 为 0.6，将 pTRV2-CAD2 和 pTRV2 分别与 pTRV1 等量混合，28 ℃ 黑暗放置 4 h。每个处理组设置生物学重复 3 株，选择健康的叶片，用 2 mL 无针头注射器将悬浮菌液压渗注射进木薯叶片背面。以含有质粒 pTRV2 与 pTRV1 的混合侵染液为阴性对照 (CK)，含有质粒 pTRV2-CAD2 与 pTRV1 的混合侵染液为试验组。侵染 14 d 后，分别提取 CK 和试验组木薯新叶总 RNA 并反转录为 cDNA 检测目的基因表达量。

1.2.4 木薯低温胁迫后生理特性研究 选取 *MeCAD2* 基因沉默成功的试验组木薯苗 (pTRV2-CAD2) 和阴性对照木薯苗 (CK)，同时 10 ℃ 低温处理 5 d。参照北京索莱宝生物技术有限公司生理指标测定试剂盒的操作步骤，检测胁迫处理前后木薯株系叶片的木质素含量、肉桂酸脱氢酶 (CAD) 酶活、丙二醛 (MDA) 含量和脯氨酸 (Pro) 含量，用酶标仪测定吸光值。每个样品设 3 次重复。NBT 及 DAB 染色参考 FAN 等^[19]的方法，分别称取 25 mg NBT 和 DAB 充分溶解于 50 mL 磷

酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) pH 7.4, 选取低温处理后 CK 和试验组木薯的叶片, 清洗后浸泡在 NBT 和 DAB 染色液中, 避光过夜染色后用 95%乙醇沸水浴脱色, 在显微镜下拍照观察。

1.2.5 融合蛋白的表达与纯化 参考大肠杆菌密码子偏好性, 人工合成 *MeCAD2* 的编码序列并插入载体 pGEX-4T-1。将重组质粒转入 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 选取单克隆于 LB 培养基 37 °C 培养至菌体 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 16 °C 培养 12 h。诱导产生的融合 GST 标签重组蛋白使用 SDS-PAGE 电泳检测可溶性, 然后使用 GST 标签纯化树脂纯化重组蛋白。

2 结果与分析

2.1 低温诱导木薯肉桂酸脱氢酶 (CAD) 活力升高及木质素积累

为了探究木质素及其关键合成酶 CAD 是否在木薯响应低温胁迫过程中发挥作用, 本研究分析了低温处理下木薯的形态变化、叶片损伤程度、CAD 酶活力和木质素含量 (图 1)。结果显示, 与 25 °C 相比, 15 °C 处理木薯叶片无明显变化, 10 °C 处理叶片下垂并发生一定程度卷曲 (图 1A)。叶片用二氨基联苯胺 (DAB) 和氮蓝四唑 (NBT) 染色显示 (图 1B), 随着低温胁迫程度的加剧, 染色逐渐加深, 说明叶片受损伤程度逐渐加深。同时, 低温处理显著提高了木薯的 CAD 酶活力和木质素含量 (图 1C、图 1D), 特别是在 10 °C 处

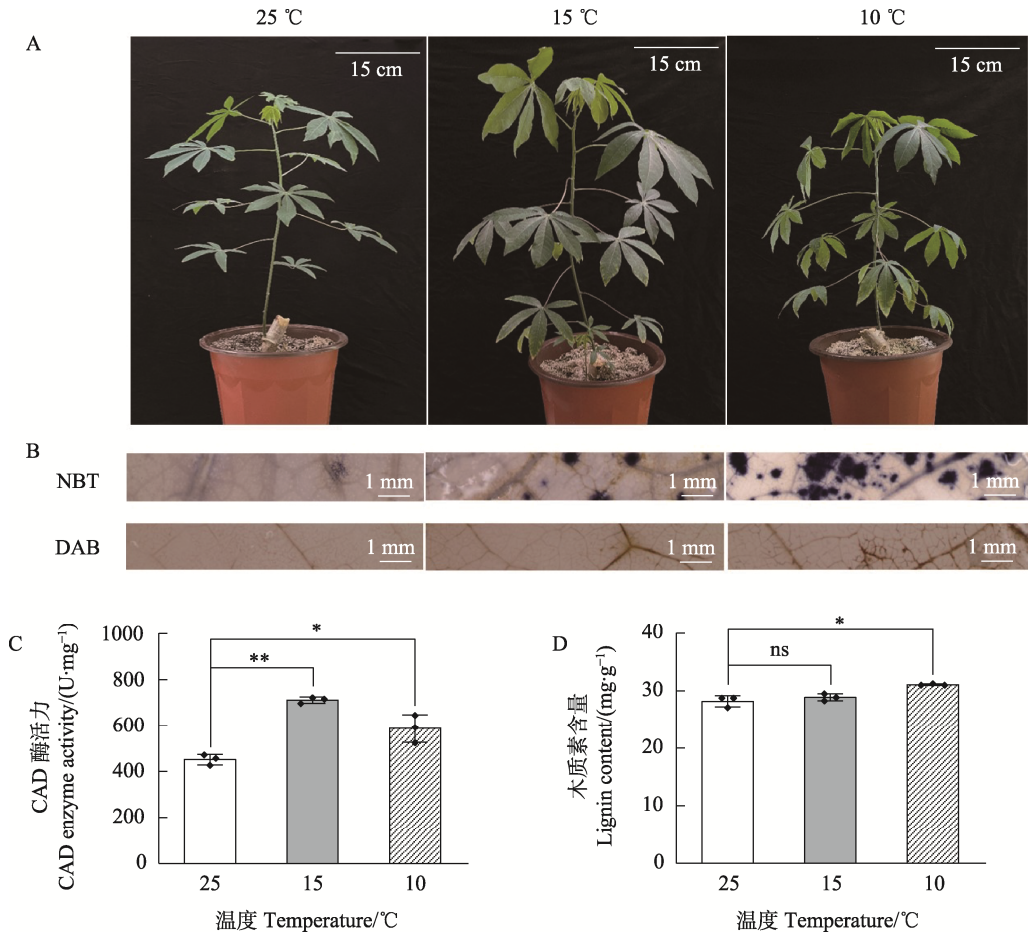


图 1 低温对木薯生长发育表型、CAD 酶活力及木质素含量的影响
Fig. 1 Impact of low temperature stress on cassava growth and development phenotype, CAD enzyme activity and lignin content

理下 CAD 酶活力和木质素含量分别提高 66.7%和 14.8%。由此推测，木薯中 CAD 可能通过调节木质素的生物合成参与低温胁迫响应。

2.2 木薯 *MeCADs* 基因家族在低温胁迫下的表达分析

为探究木薯在低温胁迫下调控 CAD 酶活力

的关键基因,本研究对木薯低温胁迫下 CAD 家族成员的表达量进行分析(图 2),其中共有 12 个基因在叶片中检测出表达, *MeCAD3*、*MeCAD7*、*MeCAD8*、*MeCAD13* 表达量过低,无法检测。与 CK 相比, *MeCAD9*、*MeCAD10*、*MeCAD12*、*MeCAD14*、*MeCAD15*、*MeCAD16* 的表达量在低

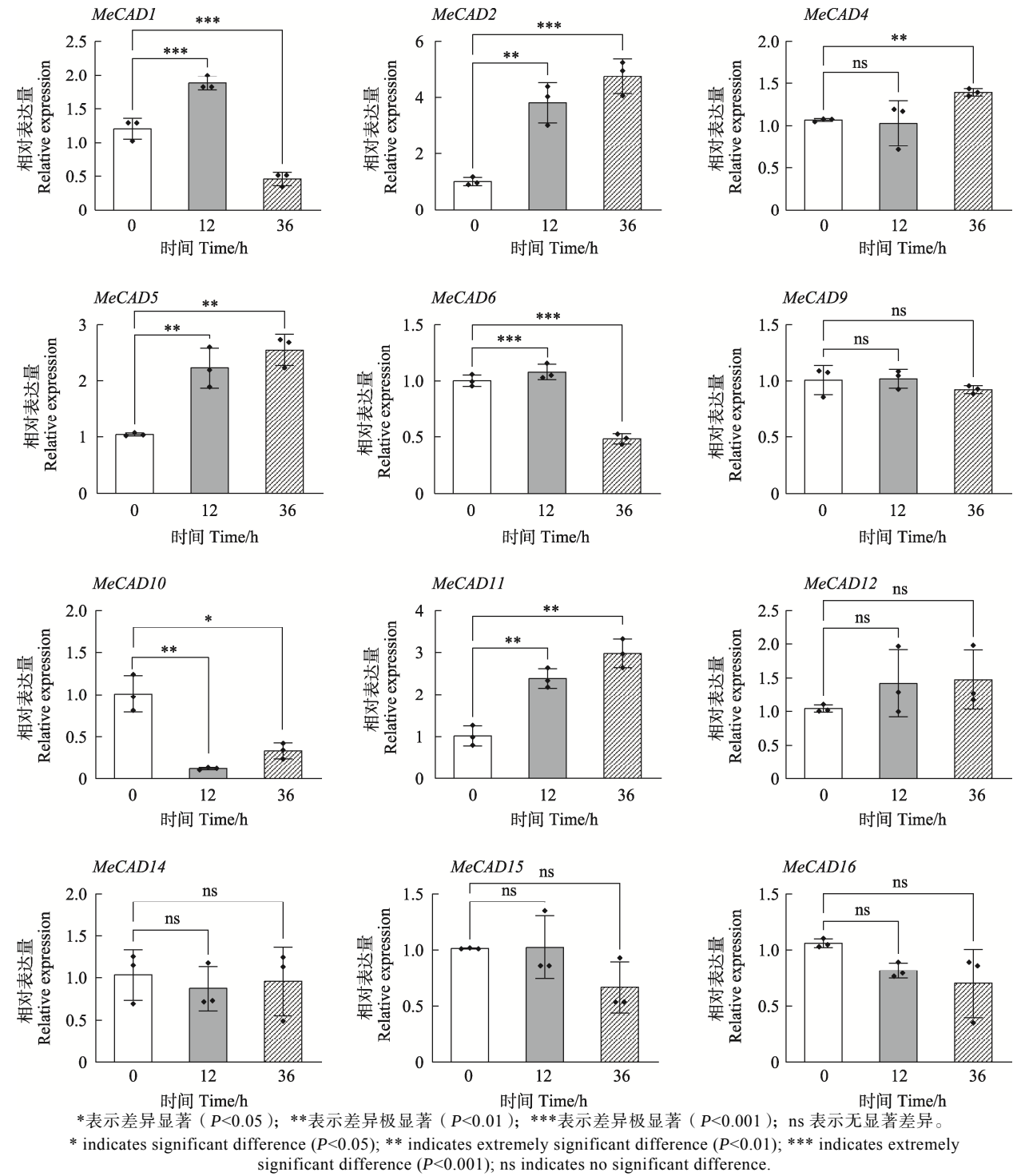


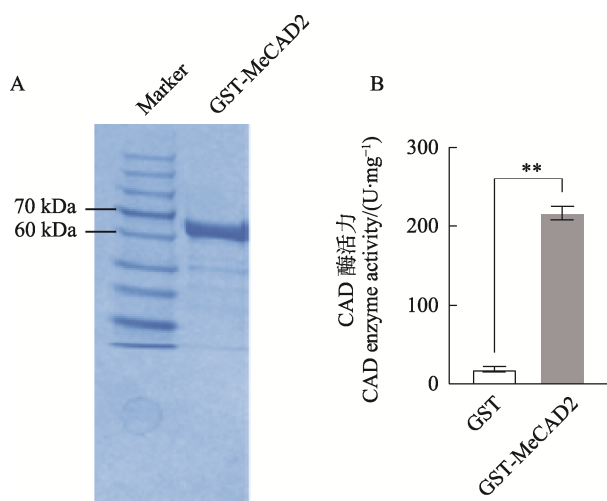
图 2 *MeCADs* 基因家族在低温 (6 °C) 胁迫下的表达量

Fig. 2 Expression levels of *MeCADs* gene family under low temperature (6 °C) stress

温处理下无明显提高, *MeCAD2*、*MeCAD5*、*MeCAD11* 基因在低温处理下 12~36 h 内表达量持续上升(图 2), 其中 *MeCAD2* 基因表达量在低温处理条件下 36 h 上升 4 倍, 因此选择 *MeCAD2* 作为候选基因。

2.3 *MeCAD2* 的原核表达及酶活分析

为了确定 *MeCAD2* 基因的功能, 首先在大肠杆菌中表达 *MeCAD2* 蛋白, 将粗蛋白用 GST 标签蛋白纯化试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)纯化, SDS-PAGE 电泳显示纯化后的 GST-*MeCAD2* 融合蛋白为 60~70 kDa 的单一一条带(图 3A), 与预期大小一致。使用 BCA 法测定纯化后 GST-*MeCAD2* 蛋白浓度, 使用 CAD 活性检测试剂盒检测 CAD 酶活性。结果表明纯化的 GST-*MeCAD2* 蛋白具有 CAD 酶活性(图 3B)。



A: GST-*MeCAD2* 融合蛋白的 SDS-PAGE 图; B: GST 蛋白与 GST-*MeCAD2* 重组蛋白的 CAD 酶活性。

**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

A: SDS-PAGE image of GST-*MeCAD2* recombinant protein; B: CAD enzyme activity of GST protein and GST-*MeCAD2* recombinant protein. ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 3 GST-*MeCAD2* 的蛋白纯化及酶活分析

Fig. 3 Purification and enzyme activity detection of GST-*MeCAD2* protein

2.4 沉默 *MeCAD2* 降低木薯的 CAD 酶活性与木质素含量

利用 VIGS 技术沉默木薯 *MeCAD2* 的表达, 进一步探究其在木薯中的功能。在接种 14 d 后, 对接种植株新长出的叶片进行基因表达量检测, 以注射 pTRV2 空载植株作为 CK, 注射 pTRV2-*MeCAD2* 的 T₁、T₂、T₃ 3 个株系中 *MeCAD2* 的表达量均下调 70% 以上(图 4A), 证明基因沉

默成功。测定 CK 与 *MeCAD2* 基因沉默植株中 CAD 酶活性, 结果显示 *MeCAD2* 沉默植株的 CAD 酶活性比 CK 降低了 18.9%(图 4B)。与此同时, 对木质素含量的测定结果显示, 与 CK 相比, T₁、T₂、T₃ 3 个株系的木质素含量分别降低了 15.0%、12.3% 和 22.4%(图 4C)。结果表明, *MeCAD2* 基因沉默不仅有效降低 CAD 酶活性, 同时也导致木质素生物合成受阻, 最终显著降低植株的木质素积累水平。

2.5 *MeCAD2* 介导的木质素积累改变木薯抗寒性

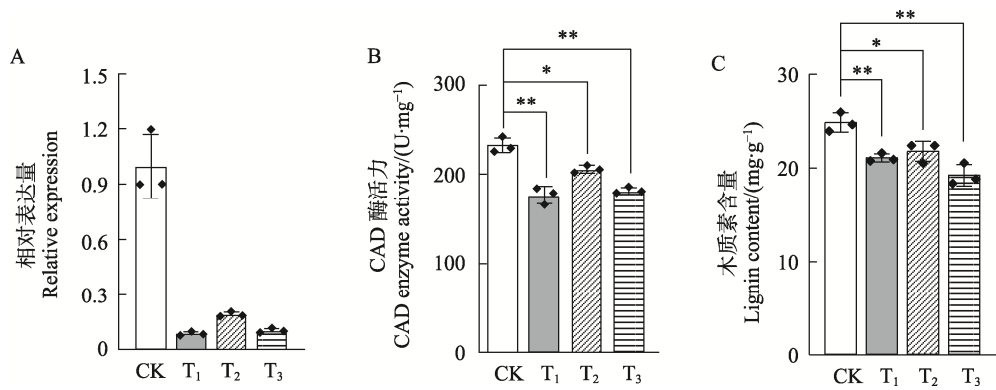
为了进一步分析木薯 *MeCAD2* 基因表达下调是否影响木薯对低温胁迫的抗性, 本研究将 *MeCAD2* 沉默植株与 CK 进行低温胁迫处理。10 °C 处理 5 d 后, *MeCAD2* 沉默植株的叶片损伤更为严重。叶片中的丙二醛和脯氨酸含量测定表明, *MeCAD2* 沉默植株中的丙二醛含量比 CK 提高了 172.5%, 脯氨酸含量提高了 98.4%。取 CK 和 *MeCAD2* 沉默植株相同部位叶片进行 NBT 和 DAB 染色, *MeCAD2* 沉默植株叶片显示出更深的染色, 说明 *MeCAD2* 沉默植株叶片受损伤更严重。结果表明沉默 *MeCAD2* 后木薯的抵御低温能力降低(图 5)。

3 讨论

本研究系统阐明肉桂酸脱氢酶基因 *MeCAD2* 在木薯响应低温胁迫中的关键作用, 为解析木质素介导的植物耐低温提供了新证据, 也为木薯耐低温分子育种奠定了重要基础。

前期转录组数据提示木薯 CAD 基因家族成员可能参与低温响应^[6], 但缺乏功能验证。本研究通过时间动态表达谱分析, 成功筛选出受低温显著诱导的核心成员 *MeCAD2*, 其表达模式与低温胁迫下 CAD 酶活力及木质素含量的显著升高高度吻合, 暗示其可能是驱动木质素生物合成增强的关键因子。通过原核表达体系, 本研究直接证实 *MeCAD2* 蛋白具备 CAD 酶活性, 为其在木质素合成途径中的催化功能提供生化基础。更重要的是, 利用 VIGS 技术特异性沉默 *MeCAD2*, 导致植株 CAD 总酶活力下降、木质素积累显著减少, 并伴随严重的低温损伤表型。结果表明, *MeCAD2* 是调控木薯低温下木质素合成通路的关键基因, 其表达缺失直接削弱植株抗寒能力。

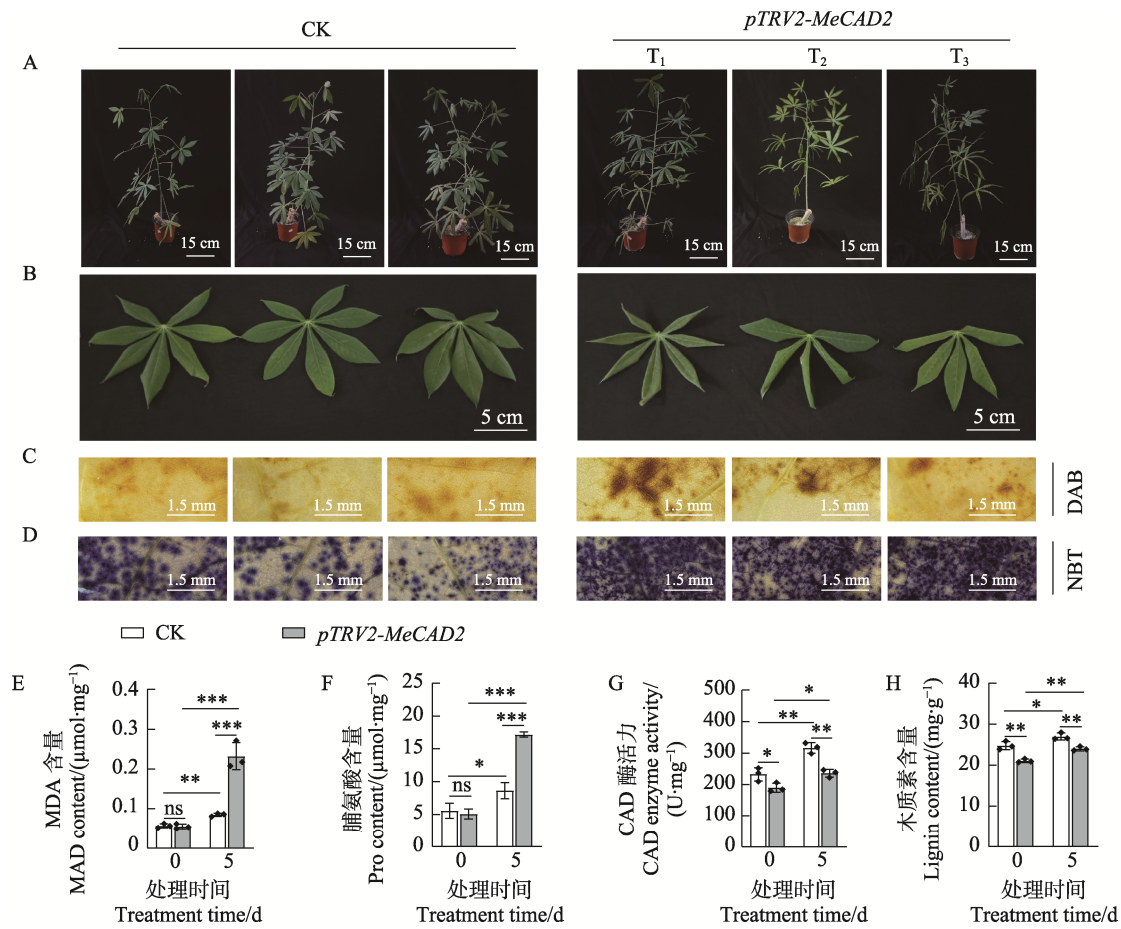
木质素作为细胞壁重要组分, 其沉积可增强细胞壁机械强度, 维持低温下细胞结构完整性^[20-22]。



*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 4 *MeCAD2* 的沉默效率及沉默植株的叶片的 CAD 酶活性和木质素含量

Fig. 4 Gene silencing efficiency of *MeCAD2* and CAD enzyme activity and lignin content of silenced plants



A、B：植株的表型；C、D：植株的 DAB 和 NBT 染色；E、F、G、H：植株叶片的 MDA 含量、脯氨酸含量、CAD 酶活性和木质素含量变化。*表示差异显著 ($P<0.05$)；**表示差异极显著 ($P<0.01$)；***表示差异极显著 ($P<0.001$)；ns 表示无显著差异。
A, B: Phenotype of plants; C, D: DAB and NBT staining of plant leaves; E, F, G, H: Changes in MDA content, Pro content, CAD enzyme activity and lignin content in the leaves of plants. * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$); *** indicates extremely significant difference ($P<0.001$); ns indicates no significant difference.

图 5 低温胁迫 (10 °C) 对 *MeCAD2* 基因沉默株系的影响

Fig. 5 Impact of low temperature (10 °C) stress on *MeCAD2* gene silencing lines

本研究证实，低温胁迫能有效激活 *MeCAD2* 表达并提升 CAD 酶活力，进而促进木质素在木薯中的积累。沉默 *MeCAD2* 后木质素合成受阻，低温胁迫下植株表现出更严重的膜脂过氧化和活性氧 (ROS) 爆发，最终导致叶片萎蔫坏死。这一结果与辣椒^[21]、甘薯^[10]中 CAD 介导的木质素积累

增强抗寒性/耐贮性的报道一致,表明 *CAD* 基因通过强化木质化防御屏障以减轻低温伤害,是植物中保守的胁迫适应策略。

值得注意的是,低温胁迫下脯氨酸在 *MeCAD2* 沉默植株中异常积累,可能反映细胞为补偿细胞壁强度不足而启动渗透保护。类似地,木薯耐寒品种在低温下可溶性糖含量增加,通过维持渗透平衡缓解脱水损伤^[4];籼稻品种(明恢 86)通过维持高可溶性糖含量调节胞内水势,减少细胞失水,缓解膜损伤^[23]。这表明木薯在抗低温方面是木质素沉积与多维度抗寒机制协同作用。在低温条件下,*MeCAD2* 沉默株系中活性氧(O_2 和 H_2O_2)的积累显著加剧,木质素沉积可能通过形成物理屏障限制 ROS 扩散,从而间接保护细胞膜系统。同时,抗氧化酶(如 SOD、APX)的协同表达亦可增强抗寒性;超表达 *MeCu/ZnSOD* 与 *MeAPX2* 已被证明能显著提高转基因木薯的低温存活率^[24-25]。这些发现提示,木质素加固细胞壁与 ROS 清除机制之间存在功能互补性,共同构成了抵御低温胁迫的复杂防御机制。

综上,本研究揭示 *MeCAD2* 作为木薯低温响应的核心调控因子,通过驱动木质素生物合成增强细胞壁机械屏障,从而提升植株抗寒能力。其功能缺失直接导致木质素沉积受阻、ROS 清除失衡及膜系统稳定性下降,证实 *CAD* 介导的木质化途径在木薯低温防御中的必要性。本研究不仅为解析木质素介导的植物抗寒机制提供直接分子证据,也为木薯抗低温分子育种奠定了靶点。

参考文献

- [1] 谭砚文,李丛希,曾华盛. 中国木薯生产和贸易发展分析[J]. 世界农业, 2018(10): 163-168.
TAN Y W, LI C X, ZENG H S. Analysis of cassava production and trade development in China[J]. World Agriculture, 2018(10): 163-168. (in Chinese)
- [2] 王惠君,王文泉,李文彬,陈新,卢诚,黎明,陈友. 木薯的抗寒性及北移栽培技术研究进展综述[J]. 热带作物学报, 2016, 37(7): 1437-1443.
WANG H J, WANG W Q, LI W B, CHEN X, LU C, LI M, CHEN Y. Research progress of cold resistance and cultivation practice for cassava moving northward[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(7): 1437-1443. (in Chinese)
- [3] DING Y, SHI Y, YANG S. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures[J]. Molecular Plant, 2020, 13(4): 544-564.
- [4] 易拓,黄娟,张玮,宋勇. 木薯低温胁迫响应及分子响应研究进展[J]. 农业科学, 2019, 9(7): 569-575.
YI T, HUANG J, ZHANG W, SONG Y. Advances in research on chilling stress response and molecular mechanism of cassava[J]. Hans Journal of Agricultural Sciences, 2019, 9(7): 569-575. (in Chinese)
- [5] AN F, LI G, LI Q X, LI K, CARVALHO L J C B, OU W, CHEN S. The comparatively proteomic analysis in response to cold stress in cassava plantlets[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(6): 1095-1110.
- [6] AN D, YANG J, ZHANG P. Transcriptome profiling of low temperature-treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 64.
- [7] SUN J, HUI K, GUO Z, LI Y, FAN X. Cellulose and lignin contents are negatively correlated with starch accumulation, and their correlation characteristics vary across cassava varieties[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2023, 42(2): 658-669.
- [8] 穆好鑫,方萍萍,郭勤卫,杨立飞. 木质素合成在非生物胁迫中的响应及其转录调控机制[J]. 干旱地区农业研究, 2025, 43(4): 295-304.
MU H X, FANG P P, GUO Q W, YANG L F. Response of lignin synthesis in abiotic stress and its transcriptional regulation mechanism[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2025, 43(4): 295-304. (in Chinese)
- [9] XIAO J C, SUI X Y, XU Z P, LIANG L, TANG W, TANG Y, SUN B, LAI Y S, HUANG Z, ZHENG Y X, LI H X. CaNAC76 enhances lignin content and cold resistance in pepper by regulating *CaCAD1*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 285: 138271.
- [10] LEE C J, KIM S E, PARK S U, LIM Y H, CHOI H Y, KIM W G, JI C Y, KIM H S, KWAK S S. Tuberous roots of transgenic sweetpotato overexpressing *IbCAD1* have enhanced low-temperature storage phenotypes[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 166: 549-557.
- [11] GE H, ZHANG J, ZHANG Y J, LI X, YIN X R, GRIERSON D, CHEN K S. E3NAC3 transcriptionally regulates chilling-induced lignification of loquat fruit via physical interaction with an atypical CAD-like gene[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(18): 5129-5136.
- [12] DOMON J M, BALDWIN L, ACKET S, CAUDEVILLE E, ARNOULT S, ZUB H, GILLET F, LEJEUNE-HÉNAUT I, BRANCOURT-HULMEL M, PELLOUX J, RAYON C. Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation[J]. Phytochemistry, 2013, 85: 51-61.
- [13] LI X, MA D M, CHEN J L, PU G B, JI Y P, LEI C Y, DU Z

- G, LIU B Y, YE H C, WANG H. Biochemical characterization and identification of a cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*[J]. Plant Science, 2012, 193-194: 85-95.
- [14] CHAO N, HUANG S, KANG X R, YIDILISI K, DAI M J, LIU L. Systematic functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase family members revealed their functional divergence in lignin biosynthesis and stress responses in mulberry[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 186: 145-156.
- [15] XUN H W, QIAN X Y, WANG M, YU J X, ZHANG X, PANG J X, WANG S C, JIANG L L, DONG Y S, LIU B. Overexpression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase-coding gene, *GsCAD1*, from wild soybean enhances resistance to soybean mosaic virus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15206.
- [16] YAN Y, WANG P, LU Y, BAI Y J, WEI Y X, LIU G Y, SHI H T. MeRAV5 promotes drought stress resistance in cassava by modulating hydrogen peroxide and lignin accumulation[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2021, 107(3): 847-860.
- [17] ZENG C Y, DING Z H, ZHOU F, ZHOU Y F, YANG R J, YANG Z, WANG W Q, PENG M. The discrepant and similar responses of genome-wide transcriptional profiles between drought and cold stresses in cassava[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(12): 2668.
- [18] ZENG H, XIE Y, LIU G, WEI Y, HU W, SHI H. Agrobacterium-mediated gene transient overexpression and tobacco rattle virus (TRV)-based gene silencing in cassava[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 3976.
- [19] FAN X W, SUN J L, CAI Z, ZHANG F, LI Y Z, PALTA J A. *MeSWEET15a/b* genes play a role in the resistance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to water and salt stress by modulating sugar distribution[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 194: 394-405.
- [20] HE Y X, ZHANG W J, ZUO X H, LI J N, XING M, ZHANG Y J, YOU J, ZHAO W, CHEN X. Dynamic transcriptomics unveils parallel transcriptional regulation in artemisinin and phenylpropanoid biosynthesis pathways under cold stress in *Artemisia annua*[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 31213.
- [21] XIAO J C, CAO B Y, TANG W, SUI X Y, TANG Y, LAI Y S, SUN B, HUANG Z, ZHENG Y X, LI H X. The CaCAD1-CaPOA1 module positively regulates pepper resistance to cold stress by increasing lignin accumulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 290: 139979.
- [22] MEHROTRA S, VERMA S, KUMAR S, KUMARI S, MISHRA B N. Transcriptional regulation and signalling of cold stress response in plants: an overview of current understanding[J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 180: 104243.
- [23] 郭慧, 李树杏, 孙平勇, 邓华凤. 不同基因型水稻苗期抗氧化系统对低温胁迫的响应[J]. 植物科学学报, 2019, 37(1): 63-69.
- GUO H, LI S X, SUN P Y, DENG H F. Responses of antioxidant system in different genotypes of *Oryza sativa* seedlings to cold stress[J]. Plant Science Journal, 2019, 37(1): 63-69. (in Chinese)
- [24] 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.
- [25] 沈婕, 李淑霞, 彭明. 木薯响应低温胁迫差异蛋白质的功能分析及鉴定[J]. 分子植物育种, 2019, 17(4): 1121-1129.
- SHEN J, LI S X, PENG M. Analysis and identification of differentially expressed proteins in response to low temperature stress in cassava[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(4): 1121-1129. (in Chinese)