

杨冬静, 高方园, 马居奎, 等. 甘薯 *IbEFR* 基因克隆、生物信息学分析及表达模式[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(2): 217-224.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.02.001

甘薯 *IbEFR* 基因克隆、生物信息学分析及表达模式

杨冬静, 高方园, 马居奎, 唐伟, 陈晶伟, 梁昭, 佟聪, 张成玲, 孙厚俊
(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 徐州 221131)

摘要: 本研究通过 RT-PCR 技术从甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 中克隆获得 *IbEFR* 基因, 该基因编码序列 (CDS) 全长 3 108 bp, 可编码 1 035 个氨基酸残基。结构域分析结果显示, *IbEFR* 蛋白含有丰富的亮氨酸重复序列 (LRR) 及丝氨酸/苏氨酸激酶 (S_TKc) 保守结构域; 序列比对结果表明, *IbEFR* 蛋白与拟南芥 *AtEFR* 蛋白的氨基酸序列一致性为 44.76%; 系统进化树分析结果表明, *IbEFR* 基因与烟草 *EFR* 基因的亲缘关系最近。理化性质预测结果表明, *IbEFR* 蛋白理论相对分子量约为 112 605, 理论等电点为 5.8; 氨基酸组成中, 亮氨酸含量为 14.8%, 丝氨酸含量为 10.0%, 甘氨酸含量为 8.1%, 分别位列前 3 位; 不稳定性指数为 36.60, 由此判定其为稳定型蛋白质。磷酸化位点预测结果显示, *IbEFR* 蛋白的丝氨酸位点数最多 (64 个), 其次为苏氨酸位点数 (19 个)。亲疏水性预测结果表明, *IbEFR* 为亲水性蛋白质; 跨膜结构域预测结果显示, *IbEFR* 蛋白含 2 个明显的跨膜结构域; 亚细胞定位预测结果显示, *IbEFR* 蛋白定位在细胞质的可能性最大; 二级结构预测结果表明, *IbEFR* 蛋白以无规则卷曲为主, 其次为 α -螺旋和 β -折叠; 表达模式分析结果显示, *IbEFR* 基因可被脱落酸 (ABA)、茉莉酸 (JA) 和水杨酸 (SA) 诱导上调表达, 表明其可能参与甘薯的激素信号调控途径。本研究结果为后续深入解析 *IbEFR* 基因功能奠定了基础。

关键词: 甘薯; 抗病性; 类受体激酶基因 (*EFR*); 表达模式

中图分类号: S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)02-0217-08

Cloning, bioinformatic analysis and expression patterns of *IbEFR* gene in sweet potato

YANG Dongjing, GAO Fangyuan, MA Jukui, TANG Wei, CHEN Jingwei, LIANG Zhao, TONG Cong, ZHANG Chengling, SUN Houjun

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province/Key Laboratory of Sweetpotato Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China)

Abstract: In this study, the *IbEFR* gene was cloned from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. using RT-PCR technology. This gene has a full-length coding sequence (CDS) of 3 108 bp, encoding a protein of 1 035 amino acid residues. Domain analysis results showed that the *IbEFR* protein contained abundant leucine-rich repeat (LRR) sequences and a conserved serine/threonine kinase (S_TKc) domain. Sequence alignment results indicated that the amino acid sequence identity between the *IbEFR* protein and the *Arabidopsis thaliana* *AtEFR* protein was 44.76%. Phylogenetic tree analysis results revealed that the *IbEFR* gene had the closest genetic relationship with the *EFR* gene of tobacco. The prediction results of physicochemical properties indicated that the theoretical relative molecular mass of the *IbEFR* protein was approximately 112 605, and its theoretical isoelectric point was 5.8. In terms of amino acid composition, leucine content was 14.8%, serine content was 10.0%, and glycine content was 8.1%, ranking as the top three, respectively. The instability index was 36.60, so it was determined to be a stable protein. Phosphorylation

收稿日期: 2025-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32001599); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-10); 江苏省政府留学奖学金项目 (JS-2014-120)

作者简介: 杨冬静 (1983-), 女, 四川射洪人, 博士, 副研究员, 主要从事植物病理学研究。(E-mail) njnd831215@126.com

site prediction results showed that the IbEFR protein had the most serine sites (64), followed by threonine sites (19). Hydrophilicity and hydrophobicity prediction results indicated that IbEFR was a hydrophilic protein. Transmembrane domain prediction results showed that the IbEFR protein contained two obvious transmembrane domains, and the subcellular localization was most likely in the cytoplasm. Secondary structure prediction results demonstrated that the IbEFR protein was mainly composed of random coils, followed by α -helices and β -sheets. Expression pattern analysis results showed that the expression of the *IbEFR* gene could be induced and upregulated by abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA), indicating that it may be involved in the hormone signal regulation pathway of sweet potato. The results of this study lay a foundation for the subsequent in-depth analysis of the function of the *IbEFR* gene.

Key words: sweet potato; disease resistance; receptor-like kinase gene (*EFR*); expression pattern

中国是世界上最大的甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 生产国,其种植区域可划分为北方薯区、长江中下游薯区和南方薯区。根腐病^[1]、茎线虫病^[2]和黑斑病^[3]是北方薯区主要病害类型;南方薯区则以蔓割病^[4]、疮痂病^[5]和青枯病为主^[6];长江中下游薯区地处南北交界处,病害分布具有过渡性特征:靠近南方的区域甘薯病害与南方薯区相似;靠近北方的区域甘薯病害与北方薯区相近;中间地带则以储藏期病害为主^[7]。近年来,一些新型甘薯病害逐渐被发现,例如蔓枯病^[8]、茎腐病^[9]和爪哇黑腐病^[10]等。针对这些病害,目前的防治措施主要包括化学防治、生物防治以及甘薯抗病品种的选育,然而化学防治容易引发环境污染和食品安全问题;生物防治的效果不稳定,应用技术仍需进一步优化;传统抗病育种则因甘薯遗传上的高度杂合性以及自交不亲和性,面临周期长、难度大的挑战^[11]。随着基因工程技术的成熟和甘薯转基因体系的建立,快速精准改良甘薯抗病性成为可能,该技术为甘薯抗病分子育种提供了重要技术支持。

在甘薯真菌病害抗性基因的研究中,Yang等^[12]克隆得到蔗糖转化酶基因(*IbINV*),通过过表达与核糖核酸(RNA)干扰技术获得转基因甘薯株系,对这些株系接种甘薯黑斑病菌后,*IbINV*基因过表达株系的抗病性显著提高,表明该基因可正向调控甘薯对黑斑病的抗性。吴茜等^[13]研究发现,几丁质酶基因(*IbChiA*)在甘薯受到黑斑病菌感染后表达量显著上调,且其表达水平在不同抗性的甘薯品种间存在显著差异。Li等^[14]从甘薯品系ND98中克隆得到*IbSWEET10*基因,将该基因遗传转化至甘薯蔓割病感病品种栗子香中,结果显示转基因植株对蔓割病的抗性明显增强。Zhang等^[15]研究发现,*IbBBX24*基因过表达的甘薯植株对蔓割病的抗性显著提升,进一步研究发现,*IbBBX24*蛋白可通过与*IbJAZ10*蛋白直接发生相互作用,减轻*IbJAZ10*蛋白对*IbMYC2*蛋白活性

的抑制作用,由此揭示了*IbBBX24*基因调控甘薯蔓割病抗性的分子机制。霍进喜^[16]在甘薯品种商薯19中过表达*IbPIF1*基因,发现转基因植株对甘薯蔓割病的抗性显著增强。在甘薯茎线虫病抗性基因研究方面,Zhai等^[17]克隆得到甘薯肌醇-1-磷酸合酶基因(*IbMIPS1*),研究证实过表达*IbMIPS1*的转基因甘薯植株对茎线虫病的抗性显著提高,该基因为甘薯茎线虫病抗性改良提供了重要的基因资源。然而,目前关于甘薯细菌性病害抗性基因的研究尚未见报道。

类受体蛋白激酶(*RLK*)是植物模式识别受体(*PRR*)的一种,已有研究结果证实它们参与了植物的抗病和生长发育过程。*EF-Tu*蛋白是病原细菌中含量最丰富的蛋白质之一,对病原细菌的生存至关重要,其受体蛋白*EFR*是富含亮氨酸重复序列(*LRR*)的类受体激酶(*LRR-RLK*)。在拟南芥中,*EF-Tu*蛋白作为病原菌相关分子模式(*PAMP*)能够被*EFR*识别并触发植物的免疫反应。研究表明,*elf18*作为*EF-Tu*蛋白的免疫活性区域,能诱导氧暴发和乙烯积累,预处理拟南芥后对丁香假单胞菌的抵抗力显著提升^[18]。此外,Boschi等^[19]研究发现,在马铃薯中过表达*AtEFR*基因能够提升马铃薯对细菌性青枯病的抗性。Lu等^[20]和Schwessinger等^[21]分别在水稻中过表达*AtEFR*基因,发现其能够增强水稻对多种细菌的抗性,进一步证实了*AtEFR*基因具有广谱细菌性病害的抗性。Schoonbeek等^[22]在小麦中过表达*AtEFR*基因,发现其对由丁香假单胞菌水稻致病变种引起的细菌性病害具有显著抗性。此外,*AtEFR*基因在香蕉、苹果及柑橘中的过表达也显著提高了这些作物对相应病原菌的抗性^[23-25]。这些研究结果表明,*AtEFR*基因是一种极具潜力的细菌性病害抗性基因资源。值得一提的是,张卫娜等^[26]研究发现,在马铃薯叶片瞬时过表达*StEFR1*基因后接种晚疫病病菌,能够缩小病斑面积并增强叶片细胞活性,表明*StEFR1*基因对真菌性病害抗性也具

有正向调控作用。本研究旨在从甘薯中克隆 *IbEFR* 基因,并通过生物信息学分析和表达模式研究,初步探讨该基因在甘薯抗病性中的作用,为挖掘甘薯抗病基因资源和深入研究抗病机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试甘薯品种徐薯 18 植株由江苏徐淮地区徐州农业科学研究所提供。大肠杆菌菌株 DH5 α 由韩国生命工学研究院郭尚洙课题组提供;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、定量检测试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、DNA marker 及 PCR mix 等购自日本 TaKaRa 公司;All in one 连接试剂盒购自英国 Invitrogen 公司。

1.2 甘薯总 RNA 提取

取移栽 28 d 左右的徐薯 18 植株第 4 张完全展开叶,参照植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取甘薯总 RNA,用 Nanodrop 检测 RNA 浓度及质量,电泳检测 RNA 完整性。

1.3 第一链 cDNA 合成

以提取的徐薯 18 总 RNA 为模板,首先去除基因组 DNA,体系配比如下:模板 RNA 10 μ g,脱氧核糖核酸酶 I 1 μ L,10 \times 脱氧核糖核酸酶 I 缓冲液 1 μ L,无核酸酶双蒸水定容至 10 μ L,混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,然后加入 1 μ L 乙二胺四乙酸,65 $^{\circ}$ C 10 min 以终止反应,然后迅速置冰上冷却。反转录体系配制如下:模板 RNA 1.0 μ g,禽成髓细胞瘤病毒 1.0 μ L,5 \times 禽成髓细胞瘤病毒缓冲液 4.0 μ L,脱氧核糖核苷三磷酸混合液(10 mmol/L) 2.0 μ L,核糖核酸酶抑制剂 0.5 μ L,寡聚胸苷酸引物 1.0 μ L,无核酸酶双蒸水定容至 10.0 μ L,混合均匀后置于 PCR 仪中进行反转录,反转录反应条件为:50 $^{\circ}$ C 反应 1 h,95 $^{\circ}$ C 反应 5 min,将反转录获得的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存,具体方法参考文献[27]。

1.4 *IbEFR* 基因克隆

从徐薯 18 低温胁迫转录组数据库中搜索获得 EFR 的同源序列,经比对和在线软件 ORF finder 分析,认为该序列为 EFR 完整开放阅读框,基于该序列设计正向引物和反向引物(*IbEFR*-F:5'-ATGATGAT-TCCAACTACTAGTCTAAACTTGCTCTTTGCACTCAC-CT-3'和 *IbEFR*-R:5'-TCATTGCACTCTTTTCTGTACAGCTGCATATTTGCTTAGATTAC-3'),以徐薯 18 的

cDNA 为模板,采用上述正反向引物进行 PCR 扩增。扩增体系(50.0 μ L)如下:KOD 酶缓冲液 25.0 μ L,脱氧核糖核苷三磷酸(浓度为 10 μ mol/L) 10.0 μ L,双蒸水 10.0 μ L, KOD 酶 1.0 μ L,正反引物(浓度 10 μ mol/L)各 1.5 μ L,cDNA 模板 1.0 μ L。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,循环 35 次,然后 68 $^{\circ}$ C 延伸 6 min 后终止反应。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳检测,获得大小约为 3 105 bp 长度的 *IbEFR* 基因扩增片段,参照回收试剂盒说明书进行纯化和片段回收,具体方法参考文献[27]。

1.5 T-*IbEFR* 载体构建

纯化后的 *IbEFR* 基因片段连接 T 载体,连接体系如下:一体化缓冲液 6 μ L,T4 连接酶 1 μ L,纯化产物 4 μ L,体系混匀后离心至底部置于 25 $^{\circ}$ C 环境下温育 10 min,然后进行大肠杆菌转化。取摇动培养菌液进行 PCR 鉴定,PCR 体系(20.0 μ L)如下:预混液 10.0 μ L,正反引物(浓度 10 μ mol/L)各 1.0 μ L,菌液 2.0 μ L,并用 6.0 μ L 双蒸水补足 20.0 μ L,然后进行 PCR 反应,PCR 扩增参数如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,35 轮循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 完成反应,4 $^{\circ}$ C 保温,取电泳检测条带大小正确的单克隆,加入到 5~7 mL 质量浓度为 100 μ g/mL 羧苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 过夜振荡培养后,进行质粒提取并测序,采用 Bioedit、DNAMAN 和 NCBI Blast 等工具进行序列比对分析,具体方法参考文献[27]。

1.6 *IbEFR* 蛋白的生物信息学分析

研究涉及的 7 个物种(包括拟南芥)EFR 蛋白氨基酸序列均来源于 NCBI 数据库,其登录号如下:拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)登录号 AT5G20480.1,杨梅(*Morella rubra*)登录号 KAB1227741,辣椒(*Capsicum annuum*)登录号 XP_016577696,烟草(*Nicotiana tabacum*)登录号 XP_016464488,马铃薯(*Solanum tuberosum*)登录号 XP_006350918,番茄(*Solanum lycopersicum*)登录号 XP_004242063,咖啡(*Coffea arabica*)登录号 XP_027089902。采用多种生物信息学工具对 EFR 蛋白进行系统分析:用 ProtParam 工具分析蛋白质氨基酸序列组成、相对分子量和等电点等理化性质,用 NetPhos 3.1 工具预测蛋白质氨基酸序列磷酸化位点,用 ProtScale 工具预测蛋白质氨基酸序列亲疏水性,用 GOR4 工具预测蛋白质二级结构,用 TMHMM 工具分析蛋白质氨基酸序列跨膜结构域,用

Signal 3.0 工具识别蛋白质氨基酸序列信号肽,用 WoLF PSORT 工具预测蛋白质亚细胞定位,用 SMART 工具鉴定保守结构域,通过 MEGA 11 软件的邻位相接法构建系统进化树,解析 EFR 同源蛋白的进化关系。

1.7 IbEFR 基因表达模式分析

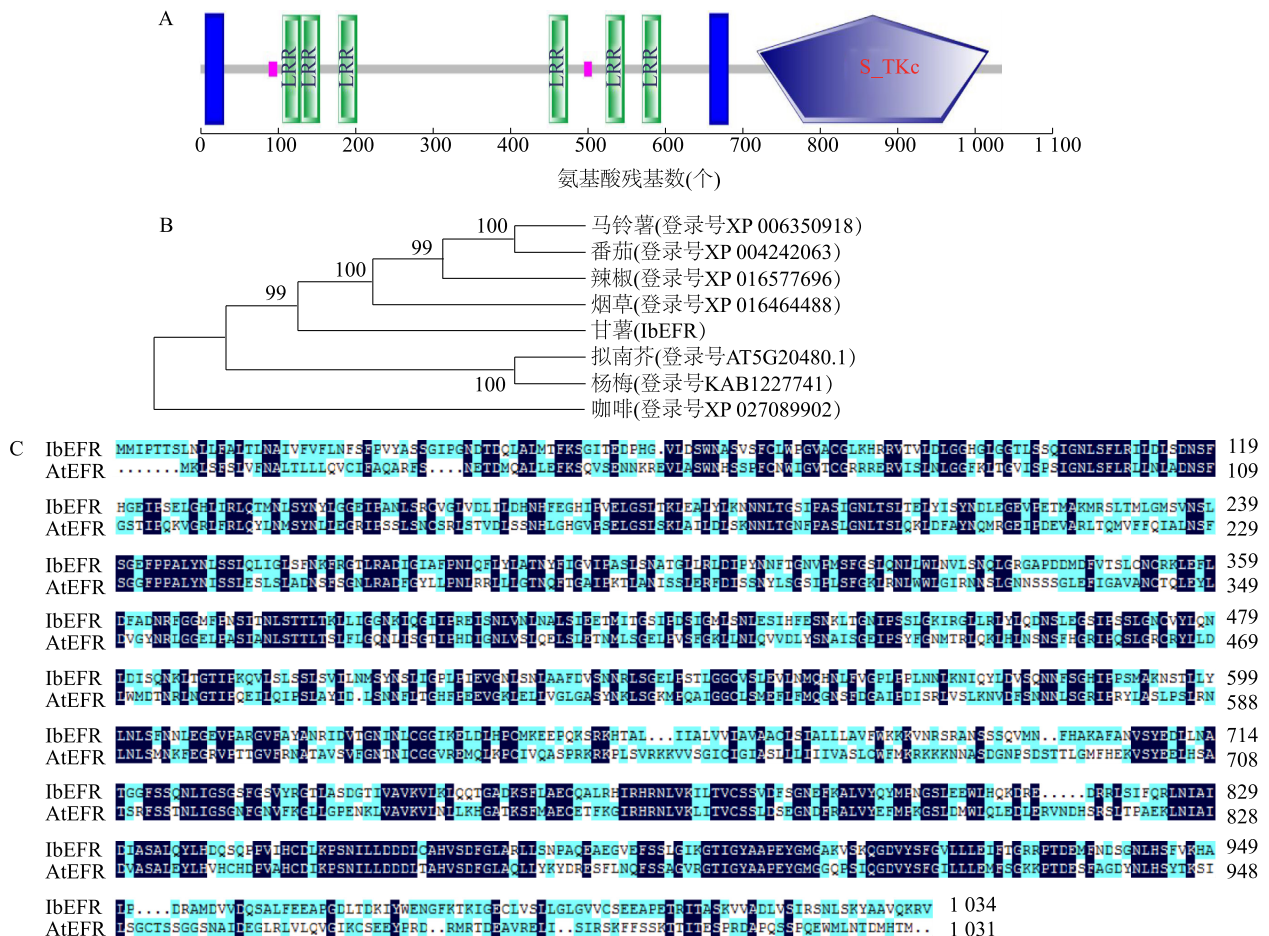
分别采用 100 μmol/L 脱落酸 (ABA)、100 μmol/L 水杨酸 (SA) 和 100 μmol/L 茉莉酸 (JA) 喷施处理移栽 28 d 的盆栽甘薯植株,并于处理后 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 取第 4 片完全展开叶液氮速冻,充分研磨后提取 RNA 和反转录,步骤参照方法 1.3,取反转录后的 cDNA 10 μL 加 40 μL 蒸馏水稀释成模板,荧光定量 PCR 反应体系 (20 μL) 如下:模板 2 μL, 2×预混液 10 μL, 20×荧光染料 (Eva green) 1 μL, RT-EFR-F (序列为:5'-ACATTCTCTGTTGAGCTTGGTT-3') 1 μL, RT-EFR-R (序列为:5'-TCACTGACATGCCTAG-CATT-3') 1 μL, 蒸馏水 5 μL, 反应体系振荡混匀离心

后进行反应,扩增条件为:95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 20 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 20 s, 循环 45 次, 95 °C 反应 5 s, 65 °C 溶解 5 s。反应结束后观察熔解曲线,记录循环阈值,定量计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行,以 *Ibactin* 作为内参基因。

2 结果与分析

2.1 IbEFR 基因克隆及其编码的蛋白质氨基酸序列比对

通过 RT-PCR 克隆获得 *IbEFR* 基因完整的编码序列,序列全长 3 108 bp, 编码 1 035 个氨基酸残基,富含亮氨酸重复序列 (LRR) 及丝氨酸/苏氨酸激酶 (S₂TKc) 保守结构域 (图 1A)。蛋白质系统进化树分析结果表明, *IbEFR* 蛋白与烟草 EFR 蛋白源性最高 (图 1B)。序列比对结果显示, *IbEFR* 与 *AtEFR* 的蛋白质氨基酸序列一致性为 44. 76% (图 1C)。



A: *IbEFR* 蛋白结构域预测; B: *IbEFR* 蛋白进化树; C: *IbEFR* 蛋白与 *AtEFR* 蛋白一致性分析。LRR: 亮氨酸重复序列; S₂TKc: 丝氨酸/苏氨酸激酶催化; *IbEFR*: 甘薯类受体激酶蛋白; *AtEFR*: 拟南芥类受体激酶蛋白。

图 1 *IbEFR* 蛋白结构域预测、进化树构建及序列比对分析

Fig.1 Prediction of *IbEFR* protein domain, construction of phylogenetic tree and sequence alignment analysis

2.2 IbEFR 蛋白氨基酸组成及理化性质

IbEFR 蛋白理化性质的分析结果表明, IbEFR 蛋白具有 1 035 个氨基酸残基, 相对分子量为 112 605, 理论等电点为 5. 8; 氨基酸组成分析结果表明, 亮氨酸、丝氨酸和甘氨酸为高含量氨基酸, 含量分别为 14. 8%、10. 0% 和 8. 1%; 不稳定指数为 36. 60, 据此预测 IbEFR 蛋白为稳定型蛋白质。

2.3 IbEFR 蛋白磷酸化位点

基于阈值>0. 5 的预测标准(图 2), IbEFR 蛋白的磷酸化位点分布为: 丝氨酸 64 个, 苏氨酸 19 个, 酪氨酸 10 个。

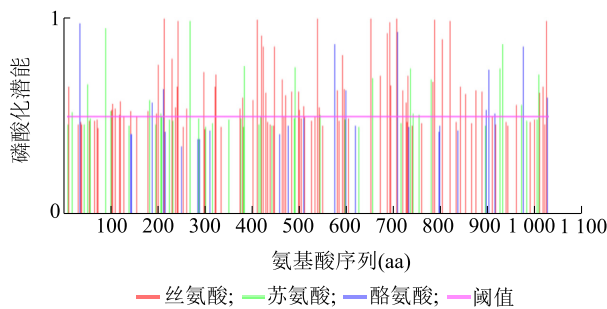


图 2 IbEFR 蛋白磷酸化位点预测结果

Fig.2 Phosphorylation site prediction for IbEFR protein

2.4 IbEFR 蛋白疏水性和亲水性

IbEFR 蛋白疏水性和亲水性预测结果(图 3)显示, IbEFR 多肽链中第 813 位天冬氨酸(D)呈现最低值(-3. 844), 表明其亲水性最强; 而第 661 位亮氨酸(L)获得最高分值(3. 722), 显示最强疏水性。该蛋白质亲水性总平均值为 0. 097, 据此预测 IbEFR 蛋白属于亲水性蛋白质。

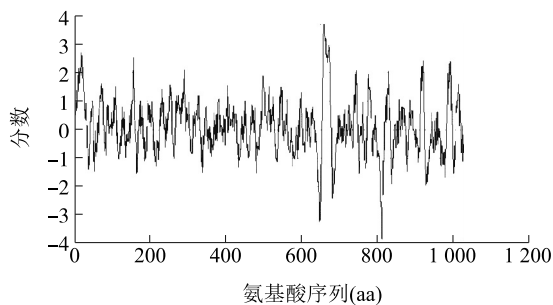


图 3 IbEFR 蛋白亲水性预测结果

Fig.3 Hydrophilicity prediction of IbEFR protein

2.5 IbEFR 蛋白信号肽

对 IbEFR 蛋白进行信号肽预测分析, 结果(图 4)表明, IbEFR 的 Sec/SPI 信号肽可能性为

20. 46%, 表明该蛋白质存在信号肽的可能性较低。

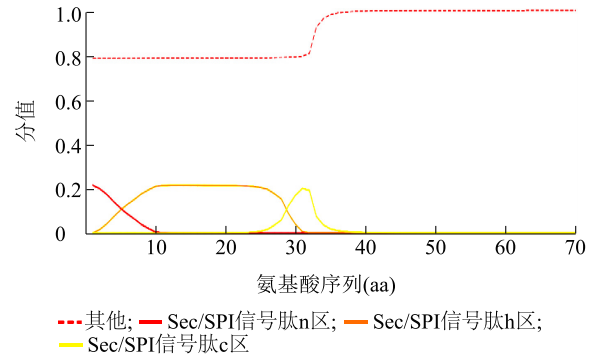


图 4 IbEFR 蛋白信号肽预测结果

Fig.4 Signal peptide prediction of IbEFR protein

2.6 IbEFR 蛋白氨基酸序列跨膜结构域

跨膜结构域预测结果(图 5)显示, IbEFR 蛋白氨基酸序列具有 2 个明显的跨膜结构域, 第 1 个跨膜结构域位于 7~29 位氨基酸, 第 2 个跨膜结构域位于 658~680 位氨基酸, 1~6 位及 681~1 035 位氨基酸位于膜内, 30~657 位氨基酸位于膜外。

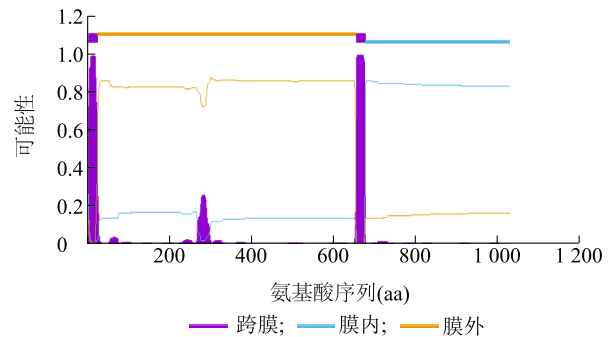


图 5 IbEFR 蛋白跨膜结构域预测结果

Fig.5 Transmembrane domain prediction of IbEFR protein

2.7 IbEFR 蛋白亚细胞定位

根据亚细胞定位预测结果, IbEFR 蛋白可能定位在细胞质、液泡及内质网中。其中, IbIEFR 蛋白定位在细胞质的可能性最大, 预测值为 11; 定位在液泡的可能性其次, 预测值为 2; 定位在内质网的预测值最小, 预测值为 1。

2.8 IbEFR 蛋白二级结构及元件含量

对 IbEFR 蛋白二级结构预测分析结果(图 6)表明, 无规则卷曲是 IbEFR 蛋白二级结构的主要元件, 共有 567 个, 占比 54. 78%; 其次为 α -螺旋, 共 310 个, 占比 29. 95%; β -折叠最少, 有 158 个, 占比 15. 27%。

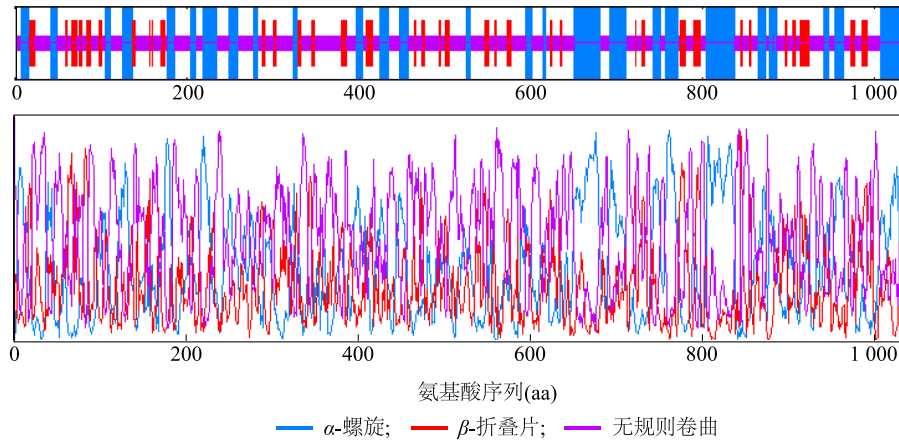


图 6 IbEFR 蛋白二级结构及元件含量预测结果

Fig.6 Prediction of secondary structure and the content of its constituent elements in the IbEFR protein

2.9 IbEFR 蛋白同源建模

基于 SWISS-MODEL 的同源建模结果(图 7)显示,IbEFR 蛋白的三维构象中无规则卷曲是主要的结构元件,而 α -螺旋为次要元件, β -折叠为含量最低元件,这与二级结构预测结果相符合。

2.10 IbEFR 基因表达模式

实时荧光定量 PCR 检测结果(图 8)显示,IbEFR 基因受 ABA、JA 和 SA 诱导上调表达,其中 ABA 诱导处理 12 h 时该基因表达量最高,与 0 h 相比呈极显著差异($P < 0.01$);JA 诱导处理的各时间点均极显著上调($P < 0.01$),处理 12 h 时表达量最高;SA 诱导处理的各时间点均极显著上调($P < 0.01$),处理 6 h 时表达量最高。从以上结果可以推测,IbEFR 基因可能参与响应甘薯激素信号调控途径。

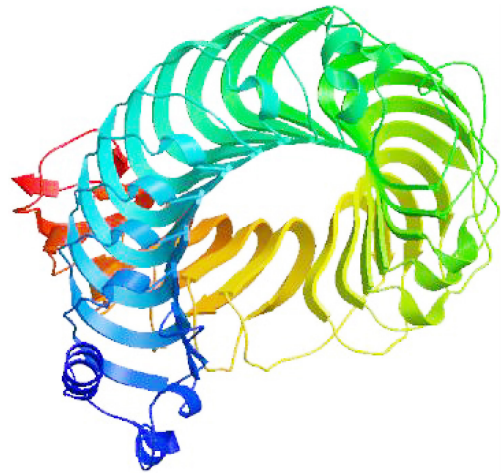
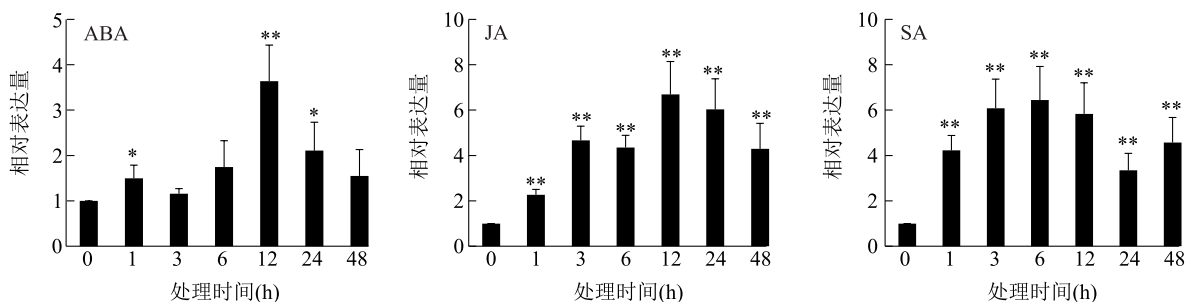


图 7 IbEFR 蛋白三级结构预测结果

Fig.7 Prediction of tertiary structure of IbEFR protein



ABA:脱落酸;JA:茉莉酸;SA:水杨酸。*表示差异显著($P < 0.05$);**表示差异极显著($P < 0.01$)。

图 8 IbEFR 胁迫条件下的表达模式分析

Fig.8 Analysis of IbEFR expression patterns under various stress conditions

3 讨论

研究植物抗病基因不仅是认识植物免疫功能的

关键,还能作为作物病虫害绿色防治提供新思路。抗病基因编码的蛋白质主要包括定位于质膜的模式识别受体 (PRR) 及分布于胞内的免疫受体 (NLR)。

其中,模式识别受体介导病原菌相关分子模式(PAMP)诱导的免疫反应(PTI),胞内免疫受体则介导效应子激活的免疫反应(ETI)。这两类受体的存在为作物抗病育种提供了丰富的基因资源。如何将这些重要的抗病基因资源高效应用于作物抗病遗传改良,是当前研究人员面临的重要课题与挑战^[28-29]。

细菌延伸因子 Tu(EF-Tu)是目前研究较为明晰的病原相关分子模式之一。已有研究表明,其免疫受体 EFR 在拟南芥及其他作物中均表现出广谱抗细菌功能。本研究从甘薯植株中成功克隆获得 *IbEFR* 基因的完整编码序列(CDS),全长3 108 bp,编码 1 035 个氨基酸残基。序列比对结果显示,*IbEFR*蛋白与拟南芥 *AtEFR* 蛋白的氨基酸序列一致性为 44.76%,且富含亮氨酸重复序列(LRR)及丝氨酸/苏氨酸激酶催化结构域(S_{TKc})。跨膜结构域预测结果显示,*IbEFR*蛋白具有 2 个跨膜结构域,据此推测,*IbEFR*蛋白属于抗病基因(R基因)编码的 5 个类型中的 LRR-TM-STK 类受体蛋白^[30]。STK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,其信号转导途径主要通过丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化传递信号;胞外 LRR 结构识别病原体 *avr* 基因编码产物后,激活胞内激酶结构域,通过靶蛋白的丝氨酸/苏氨酸磷酸化启动防御信号级联反应,最终引发超敏反应(HR)^[31]。结合序列比对与结构域分析,本研究推测 *IbEFR* 蛋白可能参与植物抗病反应。

进一步分析 *IbEFR* 基因在不同胁迫条件下的表达模式,结果显示,该基因可被脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)诱导上调表达。已有研究结果证实,激素在植物抗病反应中发挥关键调控作用:ABA 既能调控生物胁迫,也能调控非生物胁迫,此外,部分研究者指出 ABA 在活体营养型与腐生型病原菌引发的生物胁迫反应中起负调控作用^[32-33],但也有报道称,ABA 可通过诱导气孔关闭及胼胝质沉积进而增强植物抗性^[34]。JA 信号通路主要调控植物对腐生型病原菌的抗性^[35]。SA 信号通路则特异性调控植物对活体营养型病原菌的防御反应^[36]。这些激素信号通路在植物防御调控中存在复杂互动,通过协同或拮抗作用形成调控网络,帮助植物更好地抵御病原菌入侵。基于 *IbEFR* 基因的表达模式分析结果,推测 *IbEFR* 基因可能参与 ABA、JA、SA 介导的信号调控途径,其具体功能有待深入研究。

4 结论

本研究通过 RT-PCR 克隆获得 *IbEFR* 基因完整的编码序列,序列全长3 108 bp,编码1 035个氨基酸残基,富含亮氨酸重复序列及丝氨酸/苏氨酸激酶催化保守结构域。蛋白质氨基酸序列系统进化树分析结果表明,*IbEFR*蛋白与烟草 EFR 蛋白同源性最高。序列比对结果显示,*IbEFR*蛋白与 *AtEFR* 蛋白的氨基酸序列一致性为 44.76%。不同胁迫条件下基因表达模式分析结果表明,*IbEFR*基因可受 ABA、JA 和 SA 诱导上调表达,推测 *IbEFR* 基因可能参与甘薯抗病反应,下一步将明确该基因的功能并对其作用机理进行深入研究。

参考文献:

- [1] 谢逸萍. 甘薯根腐病抗病性室内鉴定方法的研究[J]. 植物保护, 1999, 25(6): 7-9.
- [2] MA J K, CHEN J W, ZHANG C L, et al. Development and characterisation of SSR markers in the potato rot nematode *Ditylenchus destructor*[J]. Nematology, 2022, 24(9): 959-969.
- [3] 张德胜, 乔奇, 田雨婷, 等. 5 种杀菌剂对储藏期甘薯黑斑病的防治及对薯块的安全性评价[J]. 植物保护, 2015, 41(6): 221-224.
- [4] 陈培涛. 甘薯羟基香豆素合成基因 *IbF6'H2* 和 *IbCOSY* 的克隆及其抗蔓割病功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- [5] 张新新, 陈景益, 房伯平, 等. 广东省甘薯疮痂病原菌鉴定及国内主要菜用甘薯种质抗性评价[J]. 植物保护学报, 2021, 48(2): 298-304.
- [6] 李华伟, 林志坚, 张鸿, 等. 甘薯薯瘟病菌 RPA 检测方法的建立及应用[J]. 福建农林大学学报, 2020, 49(5): 583-588.
- [7] 谢逸萍, 孙厚俊, 邢继英. 中国各大薯区甘薯病虫害分布及危害程度研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(8): 121-122.
- [8] 谢响辉, 王会福, 应俊杰, 等. 浙江甘薯蔓枯病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2021, 51(3): 441-445.
- [9] 张莉丽, 王丽, 谢关林, 等. 甘薯茎腐病田间症状识别与快速镜检诊断研究[J]. 农学学报, 2023, 13(6): 32-38.
- [10] 高波, 王容燕, 马娟, 等. 甘薯爪哇黑腐病的病原鉴定[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 200-204, 209.
- [11] YANG Y H, CHEN Y Q, BO Y X, et al. Research progress in the mechanisms of resistance to biotic stress in sweet potato [J]. Genes, 2023, 14(11): 2106.
- [12] YANG D J, BIAN X F, KIM H S, et al. *IbINV* positively regulates resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in sweet potato [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(22): 16454.
- [13] 吴茜, 宫颖, 邓黄玥, 等. 甘薯丁质酶基因 *IbChiA* 启动子的克隆及功能分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(3): 742-749.

- [14] LI Y, WANG Y N, ZHANG H, et al. The plasma membrane-localized sucrose transporter IbSWEET10 contributes to the resistance of sweet potato to *Fusarium oxysporum*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:197.
- [15] ZHANG H, ZHANG Q, ZHAI H, et al. *IbBBX24* promotes the jasmonic acid pathway and enhances *Fusarium* wilt resistance in sweet potato[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(4):1102-1123.
- [16] 霍进喜. 甘薯抗逆相关基因 *IbPIF1*, *IbPIF3* 和 *IbAKR* 的克隆与功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [17] ZHAI H, WANG F B, SI Z Z, et al. A myo-inositol-1-phosphate synthase gene, *IbMIPS1*, enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(2):592-602.
- [18] ZIPFEL C, KUNZE G, CHINCHILLA D, et al. Perception of the bacterial PAMP EF-tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Cell*, 2006, 125(4):749-760.
- [19] BOSCHI F, SCHVARTZMAN C, MURCHIO S, et al. Enhanced bacterial wilt resistance in potato through expression of *Arabidopsis* EFR and introgression of quantitative resistance from *Solanum comersonii*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:1642.
- [20] LU F, WANG H Q, WANG S Z, et al. Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(7):641-652.
- [21] SCHWESSINGER B, BAHAR O, THOMAS N, et al. Transgenic expression of the dicotyledonous pattern recognition receptor EFR in rice leads to ligand-dependent activation of defense responses[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(3):1004809.
- [22] SCHOONBEEK H J, WANG H H, STEFANATO F L, et al. *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat[J]. *The New Phytologist*, 2015, 206(2):606-613.
- [23] ADERO M, TRIPATHI J N, ODUOR R, et al. Transgenic expression of *Arabidopsis* elongation factor-tu receptor (*AtEFR*) gene in banana enhances resistance against *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*[J]. *PLoS One*, 2023, 18(9):290884.
- [24] PIAZZA S, CAMPA M, POMPILI V, et al. The *Arabidopsis* pattern recognition receptor EFR enhances fire blight resistance in apple[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1):204.
- [25] MITRE L K, TEIXEIRA-SILVA N S, RYBAK K, et al. The *Arabidopsis* immune receptor EFR increases resistance to the bacterial pathogens *Xanthomonas* and *Xylella* in transgenic sweet orange[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(7):1294-1296.
- [26] 张卫娜, 余慧芳, 安 珍, 等. *StEFR1* 正调控马铃薯对晚疫病的抗性[J]. *作物学报*, 2023, 49(4):996-1005.
- [27] 杨冬静, 谢逸萍, 孙厚俊, 等. 甘薯蔗糖转化酶基因 *IbINV* 及其应用: 202110223954.9[P]. 2021-03-01.
- [28] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(8):539-548.
- [29] THOMMA B P H J, NÜRNBERGER T, JOOSTEN M H A J. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(1):4-15.
- [30] HAMMOND-KOSACK K E, JONES J D. Plant disease resistance genes[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1997, 48(1):575-607.
- [31] 董继新, 董海涛, 李德葆. 植物抗病基因研究进展[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(1):1-9.
- [32] ADIE B A T, PÉREZ-PÉREZ J, PÉREZ-PÉREZ M M, et al. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(5):1665-1681.
- [33] SÁNCHEZ-VALLET A, LÓPEZ G, RAMOS B, et al. Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates *Arabidopsis* resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(4):2109-2124.
- [34] TON J, MAUCH-MANI B. β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose[J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(1):119-130.
- [35] KUNKEL B N, BROOKS D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4):325-331.
- [36] GLAZEBROOK J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2005, 43:205-227.

(责任编辑:黄克玲)