

三七病程相关蛋白基因 *PnPR1* 的表达特性以及功能分析

张应鹏^{1,2}, 陈虹均^{1,2}, 郑锂蕾^{1,2}, 王自娥^{1,2}, 崔秀明^{1,2}, 葛 锋^{1,2}, 刘迪秋^{1,2*}

(1 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2 云南省三七资源可持续利用重点实验室, 昆明 650500)

摘 要: 该实验采用定量逆转录 PCR (Quantitative reverse transcription-PCR) 方法分析三七 [*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen] 病程相关蛋白 (pathogenesis related protein, PR) 基因 *PnPR1* 的表达谱, 并构建 *PnPR1* 的植物超表达载体, 通过根癌农杆菌介导转入烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中过量表达。结果表明: (1) 外源茉莉酸甲酯预处理三七根部, 能显著提高茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*) 侵染过程中 *PnPR1* 基因的表达量。(2) 4 种信号分子茉莉酸甲酯、水杨酸、过氧化氢和乙烯利处理均能够不同程度地提高 *PnPR1* 基因在三七根中的表达水平, 但 3 种信号分子抑制剂处理三七根部后 *PnPR1* 的表达量下调。(3) *PnPR1* 在 T₂ 代转基因烟草中稳定表达, 并且转基因烟草株系对茄腐镰刀菌的抗性显著提高。研究认为, *PnPR1* 基因在转录水平上响应茄腐镰刀菌的侵染, 并受茉莉酸甲酯等信号分子的诱导, 在烟草中过表达 *PnPR1* 基因可增强对茄腐镰刀菌的抗性, 表明 *PnPR1* 是三七应对根腐病菌防卫反应中的抗病基因。

关键词: 三七; 病程相关蛋白; 过表达; 抗性; 茄腐镰刀菌

中图分类号: Q75; Q786; Q789

文献标志码: A

Expression Patterns and Functional Analysis of Pathogenesis-related Protein *PnPR1* Gene of *Panax notoginseng*

ZHANG Yingpeng^{1,2}, CHEN Hongjun^{1,2}, ZHENG Lilei^{1,2},
WANG Zi'e^{1,2}, CUI Xiuming^{1,2}, GE Feng^{1,2}, LIU Diqui^{1,2*}

(1 Kunming University of Science and Technology, Faculty of Life Science and Technology, Kunming 650500, China; 2 Key Laboratory of *Panax notoginseng* Resources Sustainable Development and Utilization, Kunming 650500, China)

Abstract: In this study, we used quantitative reverse transcription-PCR to analyze the expression level of *PnPR1*, a pathogenesis-related protein gene of *Panax notoginseng*. In addition, the overexpression vector of pCambia2300s-*PnPR1* was constructed and then introduced into tobacco (*Nicotiana tabacum*) with *Agrobacterium tumefaciens* mediated method. The results showed that: (1) the methyl jasmonate pretreatment of *P. notoginseng* roots greatly up-regulated the *PnPR1* expression during *Fusarium solani* infection. (2) The expression level of *PnPR1* gene was induced by the treatment of four signal molecules (methyl jasmonate, ethephon, salicylic acid, and hydrogen peroxide) to varying degrees. The expression of *PnPR1* was down-regulated by three kinds of signal molecule inhibitors. (3) *PnPR1* was stably expressed in T₂ transgenic tobacco, and the resistance of transgenic tobacco lines to *F. solani* was signifi-

收稿日期: 2020-09-29; 修改稿收到日期: 2020-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (82060693); 云南省“万人计划”青年拔尖人才项目

作者简介: 张应鹏 (1994—), 男, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: 937482579@qq.com

* 通信作者: 刘迪秋, 博士, 教授, 主要从事植物抗病基因工程研究。E-mail: diqiuliu@126.com

cantly improved. In conclusion, the *PnPR1* gene responds to the infection of *F. solani* at transcription level and was induced by signal molecules such as methyl jasmonate. Overexpression of *PnPR1* in tobacco lines enhanced the resistance to *F. solani*, indicating that *PnPR1* is a disease-resistance gene involved in the defense responses of *P. notoginseng* to *F. solani*.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen; pathogenesis-related protein; overexpression; resistance; *Fusarium solani*

植物体在生长过程中,不可避免会受到多种生物和非生物胁迫。在此过程中,植物会通过体内一系列的信号转导从而激活植物防御体系。病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)是植物体内表达的一类重要的防御蛋白^[1]。病程相关蛋白首先在烟草花叶病毒侵染的烟草叶片中被检测到,随后发现其广泛存在于单子叶和双子叶植物中^[2]。根据氨基酸序列同源性、理化性质、生物学活性及血清关系将 PRs 分为 17 个家族^[3]。PRs 主要分布于植物细胞液泡内和细胞间,相对分子质量较小,大多在 6~43 kD 之间,多为酸性蛋白,在低 pH(< 3)和高温(60 ℃)条件下均表现出较强稳定性^[4]。研究表明,PRs 受生物和非生物胁迫诱导而大量表达,并通过抗菌活性、信号转导、加厚细胞壁等多种方式参与植物的抗病防御反应^[5]。一些 PRs 在植物防御系统中表现为以下几种酶或蛋白活性:葡聚糖酶,其主要功能是水解 β -1,3-葡聚糖多聚体,从而水解病原菌细胞壁;几丁质酶,主要功能是裂解几丁质,并且被证实与 β -1,3-葡聚糖酶有很强的协同作用;另外一些 PRs 还表现为过氧化物酶、草酸氧化酶、蛋白酶抑制剂等多种酶活性;类甜蛋白则具有增强细胞膜透性、水解葡聚糖链和促进细胞凋亡的作用^[6]。

PR 蛋白家族成员中,PR1 蛋白种类丰富,构成总 PRs 的 1%~2%。PR1 分子量为 14~17 kD,属于富含半胱氨酸的蛋白超家族,是植物抵御真菌病害和非生物胁迫过程中一类重要的蛋白^[7]。作为一类植物防御蛋白,关于 PR1 的克隆、结构及生物学功能等已成为植物与病原菌分子互作研究领域的热点。接种条锈病(*Puccinia striiformis*)后,小麦(*Triticum aestivum*)中 8 个 PR1 的表达量都出现不同程度的上调^[8]。来源于兰花(*Cymbidium*)的 2 个 PR 基因 CsPR1-1 和 CsPR1-2 均受水杨酸(salicylic acid, SA)和过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)的诱导,并且兰花花叶病毒的侵染也能提高 2 个基因的表达水平^[9]。水稻(*Oryza sativa*)白叶枯萎病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)的侵染提高了水稻叶片

中 PR-1a 基因的表达量^[10]。用柱枝孢叶斑病原菌(*Cylindrocladium canadense*)接种牡丹(*Paeonia suffruticosa*)叶片,实时荧光定量 PCR 检测发现,柱枝孢叶斑病原菌和 SA 处理都能提高牡丹病程相关基因 *PsPR1* 的表达量^[11]。PRs 广泛参与植物诱导抗性的形成过程,其中 PR1 还被认为系统获得抗性(systemic acquire resistance, SAR)的标志^[12]。

三七 [*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen] 为五加科人参属多年生草本植物,是中国传统的名贵中药材^[13]。三七皂苷具有多种生物活性,药用价值高,因此三七素有“南国神草”的美誉。三七生长于阴蔽湿润的环境,栽培过程中病害尤为严重^[14]。其中根腐病是三七最主要的真菌病害,据统计根腐病常年发病率在 5%~20% 之间,严重时可达 60% 以上,而茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)是三七根腐病的主要致病菌之一^[15]。遗憾的是,目前仍然缺乏环保高效的根腐病防治方法,同时三七抗病遗传育种方面的研究工作也比较滞后。目前已从三七中分离了一些参与根腐病菌防卫反应的 PR 基因。三七 *PnCHI1* 基因的原核重组蛋白明显抑制茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)的生长^[16]。三七 *PnPR10-2* 基因的原核重组蛋白对茄腐镰刀菌和柱孢霉菌(*Cylindrocarpon destructans*)的菌丝生长具有一定抑制作用^[17]。三七 PR10-3 响应茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、SA、 H_2O_2 和乙烯利(ethephon, ETH)等 4 种信号分子的诱导,并且原核重组蛋白能抑制尖孢镰刀菌、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、轮枝状镰刀菌(*F. verticillium*)和茄腐镰刀菌等 4 种病原真菌的菌丝生长^[18]。

李瑞博等^[19]克隆得到三七 PR1 家族基因 *PnPR1*,并进行了生物信息学分析。作为植物防卫反应的重要组成部分,三七 PR1 基因是否响应根腐病菌的侵染并参与对根腐病菌的防御,还不得而知。为此,本研究利用 qRT-PCR (Quantitative reverse transcription-PCR) 分析 MeJA 等信号分子处理对

PnPR1 基因表达水平的影响,并构建植物超表达载体将 *PnPR1* 基因转入烟草(*Nicotiana tabacum*)中过表达,探究 *PnPR1* 基因是否响应根腐病菌的侵染并参与对根腐病菌的防御。

1 材料和方法

1.1 材料

一年生三七来源于昆明理工大学生命科学与技术学院三七种植大棚,经昆明理工大学崔秀明研究员鉴定。用于遗传转化实验的烟草种子由本课题组保存,种子经表面消毒后播种于 1/2 MS 培养基上,继代培养 5 周后的无菌烟草幼苗用于遗传转化实验。茄腐镰刀菌由本课题组从三七根腐病病株根部分离,鉴定后将菌丝保存于 4 ℃ 冰箱,使用前接种于 PDA 培养基中活化。

1.2 方法

1.2.1 三七的处理与接种 选取生长状态良好、大小均一的一年生三七作为材料。将供试材料分为 10 组(30 棵/组),用剪刀对三七根部进行受伤处理,然后分别进行以下处理或接种:第 1 组和第 2 组分别用 100 μmol · L⁻¹ MeJA 和无菌水(对照)浸泡三七根部 30 min(预处理),之后移栽至花钵中,24 h 后用新鲜的茄腐镰刀菌分生孢子悬液(10⁶ mL⁻¹)接种 30 min,然后将两组三七移栽至花钵中,接着分别收集接种后 4、12、24、48 和 72 h 的三七根。第 3~7 组分别用 100 μmol · L⁻¹ MeJA、200 μmol · L⁻¹ SA、1 mmol · L⁻¹ H₂O₂、1 mmol · L⁻¹ ETH 以及无菌水(对照)浸泡三七根部 30 min,后移栽至花钵中,然后分别在处理后 4、12、24、48 和 72 h 收集三七的根。同时第 8~10 组分别以 200 μmol · L⁻¹ 水杨酸生物合成抑制剂多效唑(paclobutrazol PCA)、100 μmol · L⁻¹ 乙烯抑制剂氨基氧乙酸

(aminooxy acetate acid, AOAA)、200 μmol · L⁻¹ 茉莉酸抑制剂二乙基二硫代氨基甲酸钠(sodium diethyldithiocarbamate, DDTc)浸泡三七根部 30 min,然后在处理后的 4、24、48 h 收集三七根。

1.2.2 qRT-PCR 将上述收集的三七根采用 Trizol 法提取 RNA,并使用 AMV Reverse Transcriptase 试剂盒逆转录合成第一链 cDNA 保存至 -20 ℃ 备用。接着采用 qRT-PCR 分析三七接种茄腐镰刀菌后 *PnPR1* 的表达特性,以及 *PnPR1* 是否在转录水平响应 MeJA、SA、H₂O₂ 和 ETH 4 种信号分子的诱导。根据课题组获得的三七转录组测序数据^[20],获得 *PnPR1* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF),并根据序列设计 qRT-PCR 的基因特异引物,以三七肌动蛋白基因 *PnACT2* (登录号 KF815706.1)作为内参基因。相关引物序列信息见表 1。qRT-PCR 反应体系与条件参照 Taif Shah 等^[21]的方法进行,每个 qRT-PCR 反应均进行 3 次重复,以正常生长发育的三七根中 *PnPR1* 基因表达量为对照(表达值设置为 1),并用 2^{-ΔΔCt} 法计算出 *PnPR1* 基因在其他样品中的相对表达水平。

1.2.3 植物超表达载体的构建 设计 *PnPR1* 的基因特异引物(表 1),以 1.2.2 中合成的第一链 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增出 *PnPR1* 的编码区,然后将其连接到 pGEM-T 载体上,经测序后获得正确的阳性克隆;分别提取 pGEM-T-*PnPR1* 和植物表达载体 pCambia2300s 质粒后,用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Eco* R I 进行双酶切,酶切产物经胶回收后通过 T₄ DNA 连接酶连接,并转入大肠杆菌 DH5α 中,将阳性克隆转入根癌农杆菌 LBA4404 中,经 PCR 鉴定后得到含有 pCambia2300s-*PnPR1* 质粒的农杆菌。

表 1 引物序列表
Table 1 Primer sequences list

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	引物用途 Primer function
<i>PnPR1</i> -qF	AACCTTGCTATGGCTTCCC	实时荧光定量 PCR Primers used for qRT-PCR
<i>PnPR1</i> -qR	TGTTACACCTCGCCCTACCG	
<i>PnACT2</i> -qF	TCCAAGGGTGAATATGATGAATCG	内参基因 Reference gene
<i>PnACT2</i> -qR	AACCTCTCCAAAGAGAATTTCTGAGT	
<i>NtACT</i> -qF	TCCCAT TGAGCATGGAATAGTAAGC	内参基因 Reference gene
<i>NtACT</i> -qF	TACATGGCAGGTACATTGAAAGTCT	
<i>PnPR1</i> -ORF-F	CTTGTTCTATAAATAATCTTCATTGC	开放阅读框克隆引物 Primers for ORF amplification
<i>PnPR1</i> -ORF-R	ATATGGATGAGAATTGTGTAAAAAG	

1.2.4 农杆菌介导的烟草遗传转化以及阳性转基因植株筛选 将含有 pCambia2300s-*PnPR1* 质粒的农杆菌,侵染野生型烟草(wild type, WT)无菌苗叶盘。在无菌条件下将幼嫩烟叶片剪成约 1 cm² 大小,将叶盘完全浸泡于含有活化农杆菌的 MGL 液体培养基中侵染 15 min,后用无菌滤纸吸干叶盘表面的菌液,将叶盘置于共培养基上常温暗培养 2 d,之后将共培养后的叶盘转至光照培养箱(25 ℃,光照 16 h/d)中培养分化成苗,将分化再生的幼苗转入含有 100 mg · L⁻¹ 利福平和 50 mg · L⁻¹ 卡那霉素的 MS 培养基中继代培养。

采用 CTAB 法提取转基因烟草植株叶片的 DNA,并以此为模板用扩增 *PnPR1* 的特异引物进行 PCR,筛选出阳性转基因植株。并将阳性转基因烟草种于温室中,连续自交 2 代获得 T₂ 代转基因烟草。

1.2.5 转基因烟草中 *PnPR1* 的表达分析及对茄腐镰刀菌的抗性分析 取 T₂ 代转基因株系以及野生型烟草的嫩叶提取总 RNA,并逆转录生成第一链 cDNA,采用 qRT-PCR 分析 *PnPR1* 基因在 T₂ 代烟草叶片中的转录水平。方法与 1.2.2 中相同。

选择 *PnPR1* 表达水平较高的转基因 T₂ 代烟草株系进行抗病性分析。选择大小均一的转基因烟草叶片和 WT 烟草叶片,用灭菌枪头轻擦造成大小相近的伤口,并在伤口处接种 200 μL 茄腐镰刀菌孢子悬液(10⁶ mL⁻¹)。接种好后将叶片置于润湿的滤纸上并用保鲜膜包裹,放置于光照培养箱(25 ℃,16 h/d)中培养,7 d 后记录叶片发病情况。

2 结果与分析

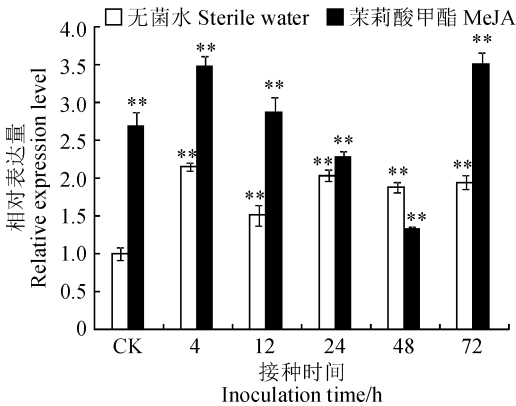
2.1 MeJA 预处理提高 *PnPR1* 基因对茄腐镰刀菌侵染的响应水平

收集 MeJA 预处理后接种茄腐镰刀菌的三七根,通过 qRT-PCR 检测 *PnPR1* 基因的表达量。结果如图 1 所示,与无菌水预处理后未接种茄腐镰刀菌的三七(对照)相比,外源 MeJA 预处理三七根部能显著提升 *PnPR1* 的转录水平。接种茄腐镰刀菌后,无菌水预处理组 *PnPR1* 表达量有所增加,在 4 h *PnPR1* 的转录水平达到最大,约为对照的 2.1 倍。同时,MeJA 预处理组 *PnPR1* 表达量迅速提高,在 4 h MeJA 预处理组 *PnPR1* 的转录水平约为对照的 3.5 倍。接种茄腐镰刀菌 48 h 后,MeJA 预处理组 *PnPR1* 相对表达值降至对照的 1.3 倍,但随后在 72 h, *PnPR1* 表达量又上升至对照的 3.5

倍,无菌水处理组 4 h~72 h 内无明显变化。总体而言,接种茄腐镰刀菌 72 h 内,MeJA 预处理三七中 *PnPR1* 的转录物积累水平高于无菌水处理,可见 MeJA 预处理三七根部,提高了 *PnPR1* 基因在转录水平对茄腐镰刀菌侵染的响应程度。

2.2 MeJA 等处理后 *PnPR1* 基因的表达水平

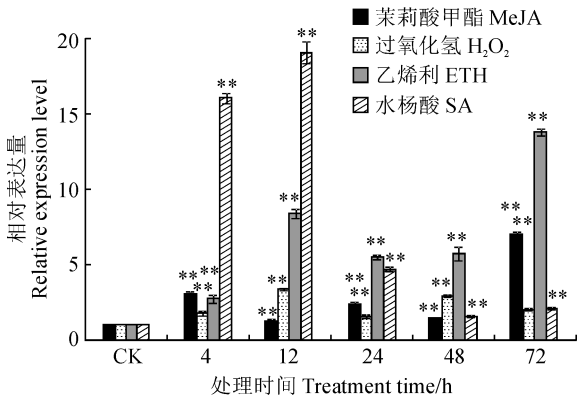
收集 MeJA、H₂O₂、SA 和 ETH 处理后的三七根,通过 qRT-PCR 检测 *PnPR1* 基因的表达量,如图 2 所示,4 种信号分子处理均不同程度上调了 *PnPR1*



对照, 无菌水预处理后未接种茄腐镰刀菌的三七; * * 表示与对照相比差异极显著($P<0.01$)

图 1 接种茄腐镰刀菌后 *PnPR1* 的表达水平
CK. *Panax notoginseng* without inoculation of *Fusarium solani* after sterile water pretreatment; * * represent significant difference compared with CK($P<0.01$)

Fig. 1 Expression level of *PnPR1* after inoculation of *Fusarium solani*



对照, 无菌水预处理后的三七;下同; * * 表示与对照相比差异极显著($P<0.01$)

图 2 不同信号分子处理后 *PnPR1* 基因的表达水平
CK. *Panax notoginseng* pretreated with sterile water.
The same as below. * * represent significant difference compared with CK ($P<0.01$)

Fig. 2 *PnPR1* gene expression level after treatment with different signal molecules

的表达量。其中,外源 H_2O_2 处理后 *PnPR1* 表达量的变化幅度最小,SA 处理后 *PnPR1* 表达量上调幅度最大。外源 MeJA 处理后,其转录表达水平在 72 h 约为对照的 7 倍; H_2O_2 处理后,其转录表达水平在 12 h 约为对照的 3.5 倍;SA 处理后,其转录表达水平在 12 h 约为对照的 18 倍;ETH 处理后,其转录表达水平在 72 h 约为对照的 8 倍。

2.3 AOAA 等抑制剂处理后 *PnPR1* 的表达水平

分别收集以乙烯抑制剂(AOAA)、水杨酸抑制剂(PCA)和茉莉酸抑制剂(DDTC)处理后的三七根部,通过 qRT-PCR 检测 *PnPR1* 基因的表达量。如图 3 所示,AOAA 处理三七根部显著下调了 *PnPR1* 基因的表达量,其相对表达值在 4 h 降至 0.2;在 PCA 处理后 4 h,*PnPR1* 基因的相对表达值降至 0.16;同样地,DDTC 处理后,*PnPR1* 基因在三

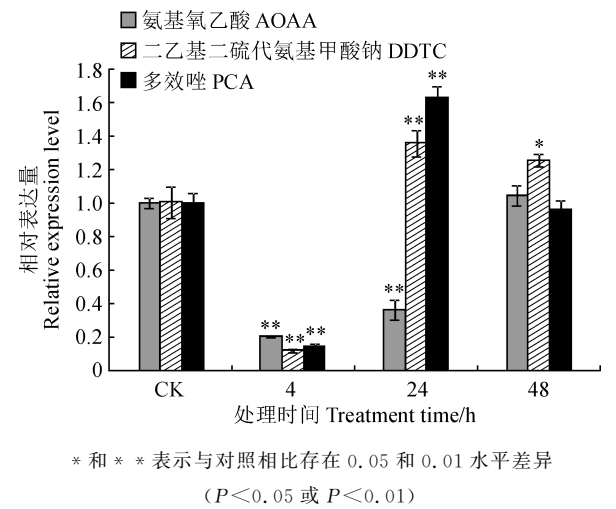


图 3 AOAA、PCA、DDTC 处理后 *PnRP1* 基因的表达水平
* and ** represent significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) compared with CK
Fig. 3 Expression level of *PnRP1* gene after treatment with AOAA, PCA, and DDTC

七根中的表达量受到明显的抑制,在 4 h 相对表达值降低至 0.12。综上所述,3 种信号分子的抑制剂处理三七根部明显抑制了 *PnPR1* 基因的表达水平。

2.4 转基因烟草的筛选

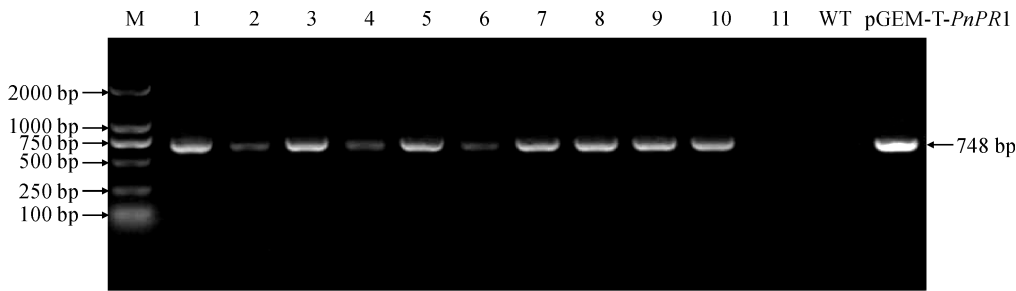
本实验成功构建了植物过表达载体 pCAM-BIA2300s-*PnPR1*,并通过冻融法转入根癌农杆菌 LBA4404 中。利用携带有 *PnPR1* 基因过表达框的根癌农杆菌分 10 次侵染转化 120 个烟草叶盘。通过组织培养,获得了 50 株烟草幼苗。提取具有卡那霉素抗性且生长良好的转基因烟草植株的 DNA,使用扩增 *PnPR1* 的特异引物,以所提取的 DNA 为模板进行 PCR 鉴定,最终筛选出携带 *PnPR1* 的阳性转基因烟草 41 株(部分结果如图 4 所示),将筛选得到的烟草种在温室中,连续自交 2 代并结合 PCR 鉴定获得 T_2 代植株。

2.5 转基因烟草 T_2 代中 *PnPR1* 基因的表达

随机选取生长状态良好的 12 个 T_2 代株系进行基因表达分析。qRT-PCR 结果如图 5 所示,在 12 个阳性转基因烟草中均检测到 *PnPR1* 转录物的积累。就相对表达量而言,在 P1-3、P1-8、P1-11、P1-12 中 *PnPR1* 均大量表达,相对表达值约为野生型烟草的 70 倍以上;在 P1-9、P1-18、P1-19 中表达量较低,相对表达值约为野生型烟草的 10 倍以下。总体而言,*PnPR1* 在 12 个转基因烟草株系中都能稳定表达。

2.6 转基因烟草对茄腐镰刀菌的抗性

挑选其中表达水平较高的 4 个转基因株系(P1-3、P1-8、P1-11、P1-12)进行抗性水平分析。结果如图 6 所示,在茄腐镰刀菌接种 7 d 后,转基因烟草叶片接种附近出现轻微腐烂发黄现象,而 WT 叶片出现更为严重的黄化、腐烂情况,并且叶片腐烂面积远



M. DL2000; 1~11. 转基因烟草; WT. 野生型烟草; pGEM-T-*PnPR1*. 阳性对照
图 4 *PnPR1* 转基因烟草 PCR 检测
M. DL2000; 1—11. Transgenic tobacco; WT. Wild type tobacco; pGEM-T-*PnPR1*. Positive control
Fig. 4 PCR detection of *PnPR1* transgenic tobacco

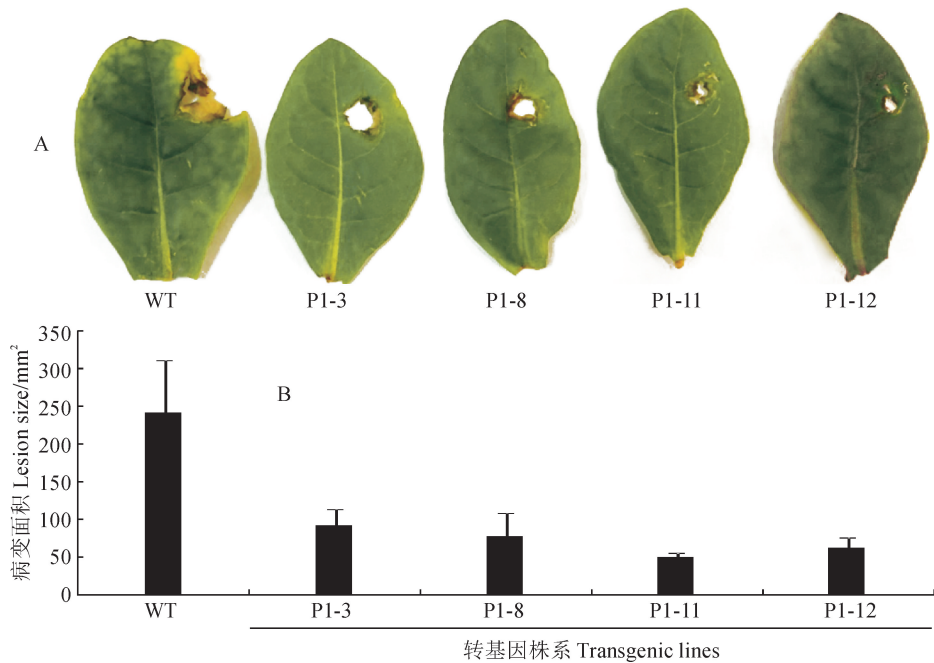
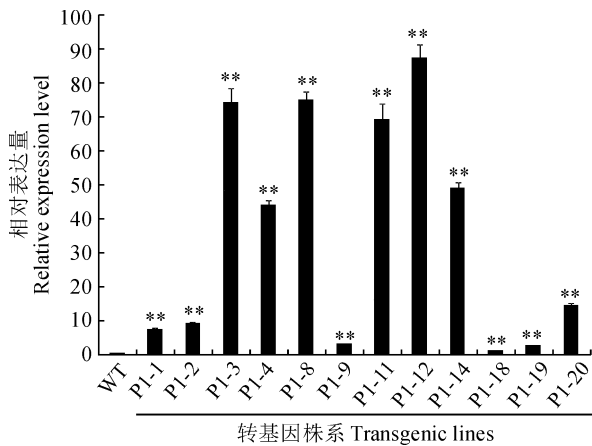


图 6 转基因烟草 T₂ 代对茄腐镰刀菌的抗性分析

Fig. 6 Resistance analysis of T₂ generation *PnPR1* transgenic tobacco lines



WT. 野生型烟草株系。下同; ** 表示与野生型相比差异显著 ($P < 0.01$)

图 5 转基因烟草株系中 *PnPR1* 的转录水平

WT. Wild type tobacco. The same as below. ** represent significant difference compared with WT ($P < 0.01$)

Fig. 5 Transcription level of *PnPR1* in transgenic tobacco

高于转基因烟草叶片面积。显然, *PnPR1* 在烟草中的过表达, 增强了转基因烟草植株对茄腐镰刀菌的抗性。

3 讨论

研究表明, 病程相关蛋白在受病原体侵染时会参与植物防御, 直接影响病原体的完整性, 限制病原体的传播^[22]。在受 SA、JA 等外源信号分子处理后 PR 基因的转录物短时间内快速积累。向日葵(*He-*

lianthus annuus) *HaPR1* 在叶片中表达量最多, 当向日葵叶片受到核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) 侵染时, *HaPR1* 基因表达量上调, 并且于 12 h 达到峰值, 约为侵染前的 4 倍^[23]; 植物激素 JA (jasmonic acid, JA)、SA、吲哚乙酸、赤霉素和机械切割处理水稻后, *OsPR1a* 基因的转录水平提高并且蛋白质积累量显著上升^[24]; 在 SA、脱落酸、赤霉素、 H_2O_2 处理的葡萄(*Vitis vinifera*) 组培苗叶片中, PR1 基因 *VvPR* 大量表达^[25]。本实验中, MeJA 预处理后接种茄腐镰刀菌, *PnPR1* 基因在三七根中表达量后迅速上升。采用外源 MeJA 预处理三七根部, 能明显增强三七对茄腐镰刀菌的抗性^[26]。 *PnPR1* 基因表达水平受 MeJA、SA 等信号分子的诱导, 表明 JA、SA 等途径参与调控三七与茄腐镰刀菌分子互作过程的信号传导。

反向遗传学研究为 PRs 参与植物抗病防卫反应提供了更多证据。当植物受到病原体入侵时, PR 基因迅速响应, 产生并积累大量的 PR 蛋白, 从而保护植物免受病原体侵害。将湖北海棠(*Malus hupehensis*) 中 *MhNPR1* 基因在烟草中过表达, 与野生型烟草相比, *MhNPR1* 转基因烟草加强了对外源渗透胁迫的抵抗能力, 并且对灰霉病(*Botrytis cinerea*) 的抗性增强^[27]。将辣椒(*Capsicum annuum*) 病程相关蛋白基因 *CABPR1* 转入烟草后, 对烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)、青枯菌野火

病菌(*Pseudomons syringae* pv. *tabaci*)产生抗性,且对非生物胁迫如重金属的耐受性也明显增强^[28]。桑树(*Morus multicaulis* Perr.) PR1-2 基因转入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中表达,对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*)具有较强的抗性^[29];本研究中,*PnPR1* 转基因烟草对茄腐镰刀菌的抗性明显提高。

综上所述,在本研究中,三七 PR1 家族基因 *PnPR1* 不仅能响应根腐病菌茄腐镰刀菌的侵染,其

转录水平还受 MeJA 等信号分子处理的诱导。过表达 *PnPR1* 的 T₂ 代转基因烟草对茄腐镰刀菌的抗性显著提高。可见 *PnPR1* 基因是三七防御体系的组成部分,在应对根腐病菌的防卫反应中起重要作用。然而,除了三七根腐病菌,*PnPR1* 是否具有广谱的抗真菌活性还不得而知,并且茉莉酸甲酯等信号分子对 *PnPR1* 基因的表达调控机制也尚不明确,这都将是我们后续的研究重点。

参考文献:

[1] JO B R, YU J M, JANG S, *et al.* Cloning, expression, and purification of a pathogenesis-related protein from *Oenanthe javanica* and its biological properties[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2020, **43**(1): 158-168.

[2] VAN LOON L C, VAN STRIEN E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999, **55**(2): 85-97.

[3] TELLIS M, MATHUR M, GURJAR G, *et al.* Identification and functionality prediction of pathogenesis-related protein 1 from legume family[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2017, **85**(11): 2 066-2 080.

[4] LU S W, EDWARDS M C. Molecular characterization and functional analysis of PR-1-like proteins identified from the wheat head blight fungus *Fusarium graminearum*[J]. *Phytopathology*, 2018, **108**(4): 510-520.

[5] VAN LOON L C, REP M, PIETERSE C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, **44**(1): 135-162.

[6] EDREVA A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years[J]. *General and Applied Plant Physiology*, 2005, **31**(1): 105-124.

[7] BANTIGNIES B, SÉGUIN J, MUZAC I, *et al.* Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots[J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, **42**(6): 871-881.

[8] SUMAIRA F, WANG M, Chen X. Pathogenesis-related proteingenes involved in race-specific allstage resistance and non-race-specific high-temperature adultplant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, **17**(11): 2 478-2 491.

[9] REN R, WEI Y L, AHMAD S, *et al.* Identification and characterization of NPR1 and PR1 homologs in *Cymbidium* orchids in response to multiple hormones, salinity and viral stresses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(6): 1 977.

[10] KIM S, AHN I P, PARK C H, *et al.* Molecular characterization of the cDNA encoding an acidic isoform of PR-1 protein in rice[J]. *Molecules and Cells*, 2001, **11**(1): 115-121.

[11] 杨德翠,张玉喜,郑国生. 牡丹病程相关蛋白 1 基因的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2013, **40**(8): 1 583-1 590.

[11] YANG D C, ZHANG Y X, ZHENG G S. Gene cloning and expression analysis of pathogenesis-related protein 1 of *Paeonia suffruticosa* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, **40**(8): 1 583-1 590.

[12] NIKI T, MITSUHASHI I, SEO S, *et al.* Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1998, **39**(5): 500-507.

[13] 朱捷强, 杨振中. 三七主要皂苷类药效成分含量的近红外光谱测定法[J]. 中国现代应用药学, 2017, **34**(7): 1 007-1 010.

[13] ZHU J Q, YANG Z Z. Rapid quantitative determination of main saponin constituents in *Panax notoginseng* by near-infrared spectroscopy technique[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2017, **34**(7): 1 007-1 010.

[14] PING F W C, KEONG C C, BANDYOPADHYAY A. Effects of acute supplementation of *Panax ginseng* on endurance running in a hot & humid environment[J]. *The Indian Journal of Medical Research*, 2011, **133**(1): 96-102.

[15] 蒋 妮,覃柳燕,叶云峰. 三七病害研究进展[J]. 南方农业学报, 2011, **42**(9): 1 070-1 074.

[15] JIANG N, QIN L Y, YE Y F. Research advances in diseases of *Panax notoginseng* [J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2011, **42**(9): 1 070-1 074.

[16] 白智伟,普丽梅,唐笔锋,等. 三七几丁质酶基因 *PnCHI1*

的功能分析[J]. 中国中药杂志, 2018, **43**(9): 1 832-1 837.

BAI Z W, PU L M, TANG B F, *et al.* Functional analysis of a chitinase gene *PnCHI1* from *Panax notoginseng* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, **43**(9): 1 832-1 837.

[17] 杨 丹, 包 燚, 陈丽梅, 等. 三七病程相关蛋白 *PR10-2* 基因的克隆、表达及功能初步分析[J]. 中国中药杂志, 2017, **42**(16): 3 106-3 111.

YANG D, BAO Y, CHEN L M, *et al.* Molecular cloning, bacterial expression analysis and functional characterization of pathogenesis-related *PR10-2* gene in *Panax notoginseng* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, **42**(16): 3 106-3 111.

[18] 唐笔锋. 两个三七病程相关蛋白基因的克隆及功能分析[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.

[19] 李瑞博, 崔秀明, 刘玉忠, 等. 三七病程相关蛋白 1 基因的克隆与表达分析[J]. 药学报, 2014, **49**(1): 124-130.

LI R B, CUI X M, LIU Y Z, *et al.* Cloning and expression analysis of pathogenesis-related protein 1 gene of *Panax notoginseng* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, **49**(1): 124-130.

[20] LIU D Q, ZHAO Q, CUI X M, *et al.* A transcriptome analysis uncovers *Panax notoginseng* resistance to *Fusarium solani* induced by methyl jasmonate[J]. *Genes & Genomics*, 2019, **41**(12): 1 383-1 396.

[21] TAI F S, ZHAO Q, PU L, *et al.* A β -1,3-glucanase gene from *Panax notoginseng* confers resistance in tobacco to *Fusarium solani* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, **143**: 11 947.

[22] BOCCARDO N A, SEGRETIN M E, HERNANDEZ I, *et al.* Expression of pathogenesis-related proteins in transplasmic tobacco plants confers resistance to filamentous pathogens under field trials[J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1): 2 791.

[23] 马立功, 张匀华, 孟庆林, 等. 向日葵病程相关蛋白 *HaPR1* 基因的克隆与功能[J]. 作物学报, 2015, **41**(12): 1 819-1 827.

MA L G, ZHANG Y H, MENG Q L, *et al.* Cloning and function analysis of pathogenesis related protein gene *HaPR1* from sunflower (*Helianthus annuus*) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, **41**(12): 1 819-1 827.

[24] AGRAWAL G K, JWA N S, RAKWAL R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, **274**(1): 157-165.

[25] 侯丽霞, 高 超, 车永梅, 等. 葡萄病程相关蛋白 1 基因的克隆和表达分析[J]. 植物生理学报, 2012, **48**(1): 57-62.

HOU L X, GAO C, CHE Y M, *et al.* Gene cloning and expression analysis of pathogenesis-related protein 1 in *Vitis vinifera* L [J]. *Plant Physiology Communications*, 2012, **48**(1): 57-62.

[26] WANG Q, QIU B L, LI S, *et al.* A methyl jasmonate induced defensin like protein from *Panax notoginseng* confers resistance against *Fusarium solani* in transgenic tobacco [J]. *Biologia Plantarum*, 2019, **63**: 797-807.

[27] ZHANG J Y, QU S C, QIAO Y S, *et al.* Overexpression of the *Malus hupehensis* *MhNPR1* gene increased tolerance to salt and osmotic stress in transgenic tobacco [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, **41**(3): 1 553-1 561.

[28] SAROWAR S, KIM Y J, KIM E N, *et al.* Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, **24**(4): 216-224.

[29] 张华梁, 王 红, 刘 琪, 等. 桑树病程相关蛋白基因 *MuPR1-2* 的克隆及功能分析[J]. 蚕业科学, 2015, **41**(6): 979-988.

ZHANG H L, WANG H, LIU Q, *et al.* Cloning and functional analysis of mulberry pathogenesis related protein gene *MuPR1-2* [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2015, **41**(6): 979-988.

(编辑: 宋亚珍)