

三七内切- β -1,4-葡聚糖酶基因 *PnCell* 的表达及功能分析

苏琳琳^{1,2}, 王瀚林^{1,2}, 甘昆发^{1,2}, 陈晓华^{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: 内切- β -1,4-葡聚糖酶(endo-1,4- β -glucanases, EGases)广泛参与植物细胞壁的编辑,在组织伸长、果实成熟和脱落等过程中起重要作用。该研究采用 RT-PCR 方法,从三七(*Panax notoginseng*)中克隆了 1 个 EGases 基因(*PnCell*),并对其进行表达和功能分析。结果显示:(1)外源茉莉酸甲酯、水杨酸、赤霉素、脱落酸和乙烯利处理显著诱导 *PnCell* 的表达,而根腐病菌茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)以及交链格孢(*Alternaria alternata*)、木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)侵染三七后显著抑制 *PnCell* 的表达。(2)亚细胞定位分析表明,*PnCell*-GFP 融合蛋白定位于洋葱表皮细胞的细胞壁中。(3)采用染色体步移技术克隆出 *PnCell* 的启动子序列[(-1)~(-828) bp],进而成功构建 *PnCell* 启动子驱动的 β -葡萄糖醛酸酶植物表达载体(pBI121-PPnCell-GUS)并转入烟草(*Nicotiana tabacum* L.),经 PCR 筛选鉴定获得阳性转基因烟草 7 株。(4)GUS 活性检测结果表明,5 种植物激素能诱导 *PnCell* 的启动子活性,但茄腐镰刀菌等 4 种病原菌侵染明显降低了 *PnCell* 启动子的转录活性,且 *PnCell* 启动子受三七 WRKY 转录因子 PnWRKY5/9/12/15/27 的负调控。(5)*PnCell* 过表达转基因烟草与野生型烟草相比,对茄腐镰刀菌的易感性增加,木质素含量降低,表明 *PnCell* 可能参与改变细胞壁的结构。研究表明,植物激素能上调三七根中 *PnCell* 的表达,而病原菌侵染降低了 *PnCell* 的表达水平,并抑制 PPnCell 的活性,推测三七 *PnCell* 可能通过改变细胞壁结构而增加三七对根腐病菌的易感性。

关键词: 三七; 茄腐镰刀菌; 内切- β -1,4-葡聚糖酶; 易感性

中图分类号: Q786; Q789; S567.236

文献标志码: A

Expression and Function Analysis of Endo- β -1,4-glucanase Gene *PnCell* in *Panax notoginseng*

SU Linlin^{1,2}, WANG Hanlin^{1,2}, GAN Kunfa^{1,2}, CHEN Xiaohua^{1,2}, LIU Diqiu^{1,2*}

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

Abstract: Endo-1,4- β -glucanases (EGases) are involved in editing of plant cell walls and play important roles in tissue elongation, fruit ripening, and abscission. In this study, we cloned an EGases gene *PnCell* from *Panax notoginseng* by RT-PCR, and analyzed its expression and function. The results showed that: (1) Exogenous methyl jasmonate, salicylic acid, gibberellin, abscisic acid, and ethephon treatment significantly induced the expression level of *PnCell*, while the infection of root rot fungi including *Fusarium so-*

收稿日期: 2022-09-14; 修改稿收到日期: 2023-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060693); 云南省重大科技专项计划项目(202102AA100022)

作者简介: 苏琳琳(1996—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: llinusu@163.com

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

lani and *Fusarium oxysporum* as well as *Alternaria alternata* and *Fusarium equiseti* significantly inhibited its expression level in *P. notoginseng*. (2) Subcellular localization result showed that PnCel1-GFP fusion protein was localized in the cell wall of onion epidermal cells. (3) The promoter sequence [(-1) - (-828) bp] of *PnCel1* was cloned through chromosome walking, and a plant expression vector (pBI121-PPnCel1-GUS) of β -glucuronidase driven by *PnCel1* promoter was successfully constructed, which was then transferred into *Nicotiana tabacum* L., and 7 positive transgenic tobacco plants were identified through PCR screening. (4) GUS activity detection indicated that 5 plant hormones can induce promoter activity of *PnCel1*, including methyl jasmonate, but the transcriptional activity of *PnCel1* promoter decreased after infection with 4 pathogens, such as *F. solani*. And the *PnCel1* promoter was also negatively regulated by the *P. notoginseng* WRKY transcription factor 5/9/12/15/27. (5) Compared with wild-type tobacco, *PnCel1*-overexpressing transgenic tobacco increased susceptibility to the root rot and decreased lignin content, indicating that PnCel1 may be involved in altering the cell wall structure. The above results indicate that plant hormones can up-regulate the expression of *PnCel1* in *P. notoginseng* roots, while pathogens infection reduces the expression level of *PnCel1* and inhibits the PPnCel1 activity. It is speculated that *PnCel1* may increase the susceptibility of *P. notoginseng* to root rot by modification of cell wall structure.

Key words: *Panax notoginseng*; *Fusarium solani*; endo- β -1,4-glucanase; susceptibility

在植物与病原体互作期间,植物细胞壁修饰是应激反应的重要组成部分。植物感染病原菌后,细胞壁会积累大量的木质素作为阻止病原菌向植物细胞壁渗透的基础屏障^[1]。细胞壁不仅起到机械保护作用,还能通过细胞壁组成的变化和协调多种信号传导机制帮助细胞响应外界刺激^[2]。已有研究表明,植物生长发育相关的细胞壁编辑酶可能通过改变植物与病原体的互作,参与植物信号传导从而增强植物的抗性或者易感性。内切- β -1,4-葡聚糖酶(endo-1,4- β -glucanase, EGases),又称纤维素酶,属于较大的植物糖基水解酶 9(glycosyl hydrolase 9, GH9)家族。EGases 参与多种植物生理过程,包括细胞壁编辑、组织分化、果实成熟以及器官脱落^[3]。EGases 在纤维素多糖链内非结晶区域中切割非末端相邻 D-吡喃葡萄糖残基之间的 β (1 $\rightarrow$ 4)键^[4]。这个多基因家族可以细分为 α 、 β 、 γ 3 个亚类, α 和 β 亚家族为分泌蛋白,包含 N-端信号肽,没有显著的序列保守性;然而 γ 亚类 EGases 通常包含 N 端跨膜结构域,并且靶向质膜^[5]。此外,3 类 EGases 蛋白在功能上也有一定的差异,一些 α 和 β 类 EGases 蛋白参与伸长、成熟、脱落等生理过程,而 γ 类 EGases 可能在纤维素合成中起作用^[6]。

除了直接修饰细胞壁的结构,EGases 还可能干扰植物防卫反应中的信号网络。通过 RNAi 降低杨树中 EGases 基因 *KORRIGAN-like* 的表达,与对照相比 RNAi 植株具有更高的总酚类物质和水杨酸(salicylic acid, SA)含量,表现出木质素、莽草酸和马来酸含量降低,并且促进植株与外生菌根(*Lac-*

caria bicolor)的互作^[7]。番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.)中 2 个 EGases 基因(*Cel1* 和 *Cel2*)的反义表达植株对灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的抗性增强,同时胼胝质积累更多,茉莉酸(jasmonic acid, JA)途径关键基因表达量升高,脱落酸(abscisic acid, ABA)、12-氧代植物二烯酸、JA 的含量也明显提高^[8]。拟南芥(*Arabidopsis*) EGases(*KOR1*) T-DNA 插入突变体对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的敏感性增强,表现出更严重的感病症状,同时突变体中的 JA 和 SA 含量、胼胝质沉积量和过氧化氢含量增加^[9]。

三七[*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen]为五加科(Araliaceae)人参属(*Panax*)多年生草本植物,为中国传统名贵中药材,具有活血化瘀、溶栓、抗炎、降血压,提高机体免疫力的功效^[10]。然而,三七温暖潮湿的生长环境极易引发病虫害,由茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等病原真菌引起的根腐病已严重影响三七产业的可持续发展^[11]。本课题组在前期实验中通过转录组测序得到了一系列可能参与三七抗病防御反应的差异表达基因^[12],包括 *PnPR1*、*PnPR-like*、*PnCHI1*、*PnOLP1* 和 *PnMYB2* 在内的一些基因受茄腐镰刀菌诱导表达上调,它们在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中过表达增强了对茄腐镰刀菌的抗性^[13-17]。同时还分离出了 10 个 WRKY 转录因子基因在三七根中的表达水平随着茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理和茄腐镰刀菌的侵染而上调表达水平^[18]。WRKY 蛋白 N 末端的

WRKYGQK 保守结构域可特异性结合靶基因启动子中的 W-box 元件 (C/T) TGAC (C/T),以调节靶基因的转录活性^[19]。

目前,三七与根腐病病菌互作过程中的正反馈基因(表达水平上调)已经受到广泛关注,然而众多参与抗病防卫反应的负反馈基因(表达水平下调)却鲜见报道。基于前期研究中三七受茄腐镰刀菌侵染过程的转录组数据,从中筛选出 1 个表达量降低的内切-β-1,4-葡聚糖酶基因(*PnCel1*)。为了研究其在三七响应根腐病菌侵染过程中的功能,本研究从三七中分离了 *PnCel1* 及其启动子序列,将启动子与 β-葡萄糖醛酸酶基因(*β-glucuronidase*, *GUS*)在烟草中融合表达,分析 *PnCel1* 的表达特性,并研究了 *PnCel1* 与 WRKY 转录因子的相互作用,最后将 *PnCel1* 转入模式植物烟草中过表达,以验证其功能。

1 材料和方法

1.1 材料

二年生三七种于昆明理工大学生命科学与技术学院遮阴大棚中。野生型(wild type, WT)烟草种子经过表面消毒后播种于 1/2 MS 培养基中,发芽后光照培养(25 ℃, 2 000 lx, 16 h 光照/8 h 黑暗)5 周以上得到无菌苗用于遗传转化。茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)、交链格孢(*Alternaria alternata*) 4 种病原真菌由本实验室从三七病株中分离、鉴定^[12]。

1.2 方法

1.2.1 *PnCel1* 及启动子序列 PPnCel1 克隆 根据编码 EGases 的 unigene 序列,设计基因特异引物(表 1),以三七根部 cDNA 为模板通过 PCR 克隆获得 *PnCel1* 的开放阅读框。PCR 产物经 T-A 克隆连接至 pGEM-T 载体(Promega, USA),并转化大肠杆菌 Tran-T₁ 感受态细胞,阳性克隆委托北京擎科生物科技有限公司测序。在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/homology/>)查找 PnCel1 氨基酸序列中的保守结构域,采用 SignalP-3.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-3.0>) 以及 Plant-mPloc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 分别预测信号肽和亚细胞定位,并通过 tblast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析 PnCel1 氨基酸序列的同源性。基于 Libertini 等对拟南芥 EGases 家族基因的系统发育分析^[5],采用 MEGA 7.0.26(neighbor-joining, bootstrap 1000 次

重复)进行聚类分析。

采用 CTAB 法提取三七的基因组 DNA,根据 *PnCel1* 的 cDNA 序列设计用于启动子克隆的两条引物(表 1),按照 Universal Genome WalkerTM 2.0 试剂盒的操作指南扩增 *PnCel1* 的上游序列。PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体,并转化大肠杆菌 Trans1-T₁,然后挑选阳性克隆检测序列。采用 SnapGene 5.3 软件分析 PCR 产物与 *PnCel1* 5'非翻译区是否存在序列重叠,并使用 NEW PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>)在线预测启动子序列中可能的顺式作用元件和转录因子结合位点。

1.2.2 qRT-PCR 采用 qRT-PCR 分析植物激素处理和病原菌侵染三七过程中 *PnCel1* 的表达水平。将两年生三七根部分别浸泡在 100 μmol/L MeJA、200 μmol/L SA、100 μmol/L 赤霉素(gibberellin, GA)、100 μmol/L ABA、1 mmol/L 乙烯利(ethephon, ETH)以及茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、交链格孢、木贼镰刀菌的孢子悬浮液(1×10⁶ 孢子/mL)中,同时以无菌水浸泡另一组二年生三七植株(对照)。30 min 后用无菌水清洗根部,然后种于含有无菌沙的花钵中,分别在处理/接种后 24, 48, 72 h 采集三七根部,液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。为减小三七植株的个体差异对实验结果的影响,每组样品都包含 4~5 株三七。收集的三七根部样品用液氮研磨成粉末,接着使用 RNA 提取试剂盒(诺唯赞,中国)提取总 RNA,然后进行 qRT-PCR,所用试剂盒为 GoTaq[®] qPCR and RT-qPCR Systems (Promega, USA)。以 PnACT2 为内参基因(*PnACT2*, KF815706.1)。处理/接种前 *PnCel1* 的相对表达值为 1,计算 *PnCel1* 在激素处理和病原菌侵染过程中的表达水平。qRT-PCR 的引物见表 1。

1.2.3 亚细胞定位 借助绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)分析 PnCel1 在植物细胞中的定位。以 1.2.1 中得到的 pEGM-T-*PnCel1* 质粒为模板,通过 PCR 扩增出带有 BamH I 和 Xba I 酶切位点但不含终止密码子的 *PnCel1* 开放阅读框序列(表 1)。采用双酶切法将 *PnCel1* 构建至 pBIN m-gfp5-ER 载体,并转入根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 中,具体操作步骤参照文献^[20]。用携带 pBIN m-gfp5-ER-*PnCel1* 和 pBIN m-gfp5-ER 质粒的农杆菌 EHA105 分别侵染洋葱表皮细胞,25 ℃暗培养 24 h 后制片,并在激光共聚焦扫描显微镜(Nikon, Japan)下观察成像。

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in the experiment

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')		用途 Function
	上游 Forward	下游 Reverse	
<i>PnCell1</i>	GCTTCCCTTGTTTTCCGTACAGTC	CATCATTTGTAGCTCTAAACAGCCAT	定量逆转录 PCR qRT-PCR
<i>PnACT2</i>	TCCAAGGGTGAATATGATGAATCG	AACCTCTCCAAGAGAATTTCTGAGT	
<i>NtActin2</i>	TCCCATTGAGCATGGAATAGTAAGC	TACATGGCAGGTACATTGAAAGTCT	
<i>PnCell1</i>	GAATTCATGGCGTTTTTGAAAGGCTTC	GGATCCTTATTTGGTGTGGCTCTCAGC	ORF 克隆 Cloning of ORF
<i>PnCell1</i>	ACCTATATTAAAGAACGGAGGGA	CCCCATAACGCAAATTTAGGCTT	异位表达 Ectopic expression
<i>PnCell1</i>	GGATCCATGGCGTTTTTGAAAGGC	TCTAGAGTTTGGTGTGGCTCTCAGC	亚细胞定位 Subcellular localization
PPnCell1		AGAAGCCTTTCAAAAACGCCATTGC	启动子克隆 Promoter cloning
		GGATTTTGCAAGGGCATCCATGTAA	
PPnCell1	ATAAGGGACTGACCACCGGGTATTGGAA-TAAGAGATTGTTATTTATTAGATAAA	GACCATGATTACGCCAAGCTTGTTAGT-TCATGGCTTTAATATAAGAACCA	启动子活性分析 Promoter activity analysis
PPnCell1	ACCTATATTAAAGAACGGAGGGA	CCCCATAACGCAAATTTAGGCTT	

1.2.4 PPnCell1-GUS 融合表达载体构建及烟草遗传转化 采用 *GUS* 为报告基因的启动子活性检测系统分析 *PnCell1* 的表达特性。首先采用同源重组技术用 PPnCell1 序列替换 pBI121 载体中的 35S 启动子序列,再通过根癌农杆菌介导将 PPnCell1-GUS 融合表达载体转入 WT 烟草中表达。实验流程如下:采用 CE Design V1.04 设计带有 *Sma* I、*Hind* III 酶切位点和载体 pBI121 同源臂的引物(表 1);通过 PCR 扩增得到带有以上两种酶切位点以及同源臂的 PPnCell1 序列,将其与 pBI121 双酶酶切产物进行重组反应,接着转化大肠杆菌 Trans1-T₁;筛选阳性克隆并提取重组质粒 pBI121-PPnCell1-GUS,分别转入根瘤农杆菌 LBA4404 和 EHA105 中。

将上述具有 pBI121-PPnCell1-GUS 的农杆菌活化后侵染野生型烟草叶盘,并诱导叶盘脱分化、再分化出幼苗,通过卡那霉素筛选以及 PCR 分析获得阳性转基因烟草植株(表 1)。在温室中培养阳性植株,连续自交两代,获得 T₂ 代株系。

1.2.5 PPnCell1 活性检测 为了分析 PPnCell1 是否响应外源植物激素处理以及病原真菌侵染,采用 5 种植物激素以及 4 种病原真菌处理/接种 pBI121-PPnCell1-GUS 转基因烟草。分别用 100 μmol/L MeJA、200 μmol/L SA、100 μmol/L GA、100 μmol/L ABA、1 mmol/L ETH 以及茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、交链格孢、木贼镰刀菌的孢子悬浮液(1×10⁶ 孢子/mL)浸泡转基因烟草根部,30 min 后用无菌水冲洗根部,水培 24 h 后取烟草叶片测定 GUS

活性,对照为无菌水处理的转基因烟草叶片。每个处理或接种包含 3 个生物学重复,检测 GUS 活性参照 Chen 等^[21]方法。

1.2.6 PPnCell1-GUS 与三七 WRKY 转录因子的互作分析 前期研究中课题组从三七中分离一些响应茄腐镰刀菌侵染的 WRKY 转录因子基因,包括 PnWRKY5/9/12/15/27^[18]。WRKY 转录因子通过结合靶基因启动子上的顺式作用元件 W-box 调控靶基因的转录活性。*PnCell1* 的启动子序列中包含 1 个 W-box,因而将 pBI121-PPnCell1-GUS 与三七 WRKY 转录因子在烟草中共表达。通过比较单表达 PPnCell1-GUS 转基因烟草以及共表达转基因烟草的 GUS 活性,分析三七 WRKY 转录因子是否调控 *PnCell1* 的转录活性。将前期研究构建的 *PnWRKY5/9/12/15/27* 过表达载体分别转入根瘤农杆菌 EHA105 中,用含有 pCambia2300-*PnWRKY5/9/12/15/27* 与 pBI121-PPnCell1-GUS 重组质粒的 EHA105 同时侵染野生型烟草叶盘,以包含 pBI121-PPnCell1-GUS 的 EHA105 单独侵染野生型烟草叶片为对照。在共培养培养基中暗培养(25 ℃),72 h 后测定 GUS 活性。

1.2.7 PnCell1 过表达载体构建以及烟草遗传转化 参照王自娥等^[21]构建植物过表达载体 pCAMBIA2300-*PnCell1*。采用 1.2.4 节中的叶盘转化法将 *PnCell1* 转入野生型烟草中过表达,并置于含有卡那霉素和植物激素的 MS 培养基中分化成苗,将幼苗转移到含有卡那霉素的 1/2 MS 培养基中生

根。通过 PCR 扩增筛选出阳性转基因烟草,接着种于温室中,连续自交两代获得 T₂ 代株系用于后续实验。提取部分 T₂ 代转基因株系叶片的 RNA,以烟草肌动蛋白基因(*NtActin2*, AB158612.1)为内参基因(表 1),通过 qRT-PCR 分析 *PnCell* 在转基因烟草中的表达水平。

1.2.8 *PnCell* 过表达烟草的抗病性分析及木质素含量测定 为了分析 *PnCell* 过表达转基因烟草对茄腐镰刀菌的抗性,采集 *PnCell* 过表达烟草以及野生型烟草叶片,用砂纸产生大小一致的伤口,然后在伤口处接种少量茄腐镰刀菌菌丝。将叶片置于湿润的吸水纸上并放入光照培养箱中培养(25 ℃, 2 000 lx, 16 h 光照/8 h 黑暗),5 d 后拍照记录发病情况,并用 Adobe Photoshop 2020 计算发病面积。

用茄腐镰刀菌孢子悬浮液(1×10⁶ 孢子/mL)浸泡 *PnCell* 过表达转基因烟草和野生型烟草根部 30 min,同时以无菌水处理的 *PnCell* 过表达转基因烟草和野生型烟草为对照,无菌水冲洗根部后重新种于含无菌营养土的花钵中,5 d 后收集接种以及未接种的烟草叶片,测定木质素含量。每组样品包含 3 个重复,采用试剂盒(生工,中国)测定木质素含量。

1.3 统计分析

基因表达水平、GUS 活性、病斑面积、木质素含量均采用 Excel 2019 和 SPSS 23.0 软件进行整理和分析。

2 结果与分析

2.1 *PnCell* 的克隆与生物信息学分析

生物信息学分析发现,三七内切-β-1,4-葡聚糖酶基因(*PnCell*)的开放阅读框为 1 476 bp,编码 1 个含有 491 个氨基酸残基的蛋白质。*PnCell* 具有糖基水解酶超家族(GH9)的结构域(Glyco_hygro_9, 26~486 aa),并且在氨基酸序列的 N 端(1~27 aa)存在信号肽。Plant-mPloc 在线软件预测 *PnCell* 定位于细胞壁中。序列分析显示 *PnCell* 与三裂叶薯(*Ipomoea triloba*) endoglucanase 3-like(XP_031111370)、锈鳞木樨榄(*Olea europaea* subsp. *europaea*) endoglucanase 9-like(CAA2980243)等相似性较高。此外,聚类分析将 *PnCell* 与 19 个 EGases 分成 3 类(α、β、γ)(图 1)。*PnCell* 与 5 个高度同源 EGases 聚在顶端(α 类的同一分支),可见 *PnCell* 编码 1 个 α 类 EGases。

2.2 植物激素和病原真菌侵染对 *PnCell* 转录水平的影响

如图 2 所示,植物激素 MeJA、SA、GA、ABA 和 ETH 处理三七根部后 *PnCell* 的表达量显著提高,在 5 种植物激素处理后 24 h *PnCell* 表达量快速增加,分别为对照的 2.3、6.2、1.2、2.2 和 2.1 倍。接种茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌、交链格孢和木贼镰刀菌后 *PnCell* 表达量显著降低,如茄腐镰刀菌侵染后 24 h

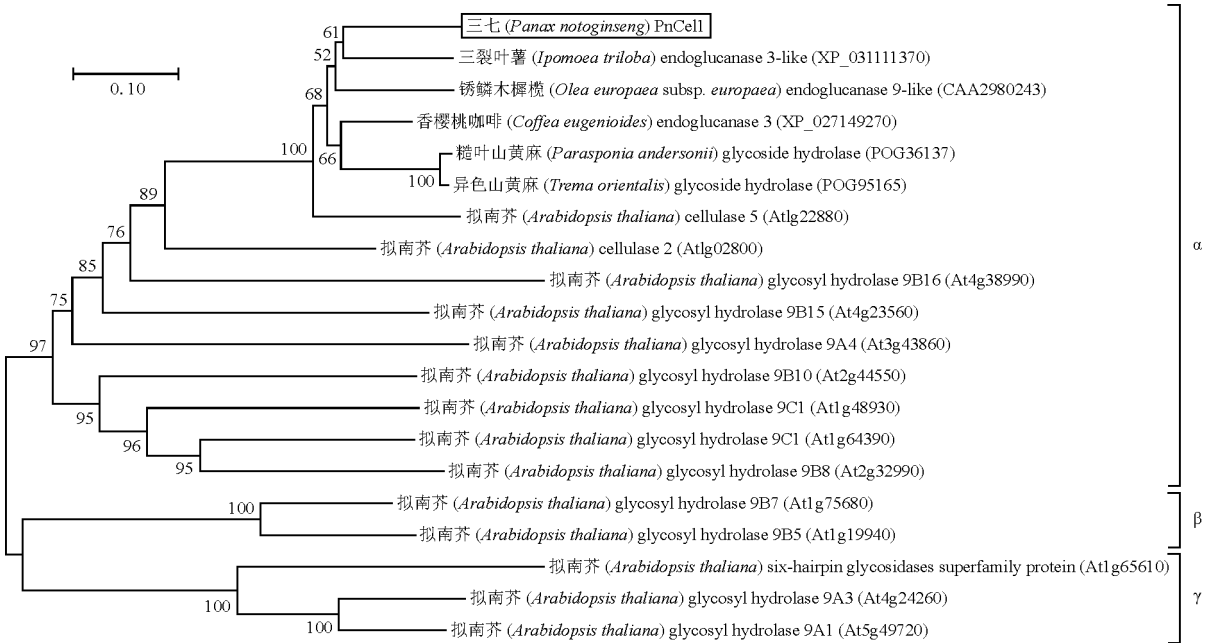
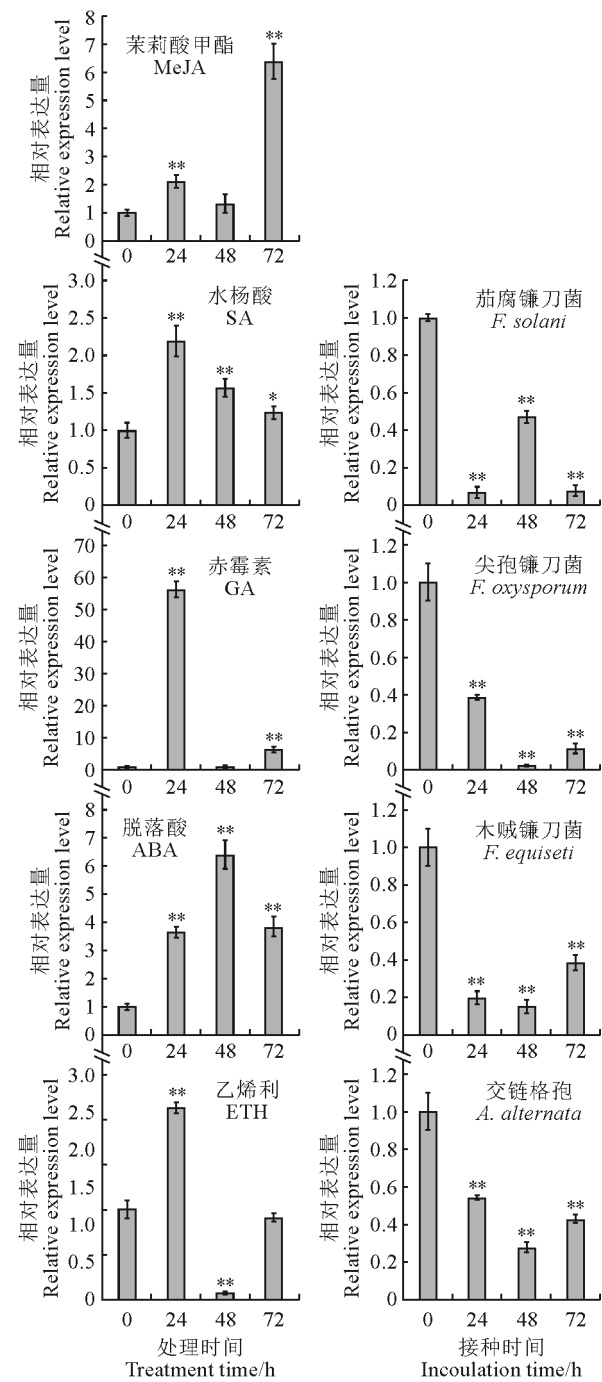


图 1 三七内切-β-1,4-葡聚糖酶的聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of *Panax notoginseng* endo-1,4-β-glucanases



* 和 ** 分别表示 0.05 和 0.01 水平上存在显著差异

图 2 植物激素处理以及病原真菌接种后 *PnCel1* 的表达分析

* and ** mean significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively

Fig. 2 Expression analysis of *PnCel1* after plant hormone treatments and inoculation with fungal pathogens

PnCel1 的相对表达量仅为对照的 7%，尖孢镰刀菌侵染后 48 h 相对表达值为对照的 3%。可见，*PnCel1* 的表达量响应植物激素处理，几种病原真菌侵染显著抑制了 *PnCel1* 在根中的转录水平。

2.3 *PnCel1*-GFP 融合蛋白的亚细胞定位

为了明确 *PnCel1* 在细胞中的定位，在洋葱表皮细胞中瞬时表达 *PnCel1*-GFP 融合蛋白。如图 3 所示，GFP 空载表达的洋葱表皮细胞中绿色荧光布满整个细胞，而表达 *PnCel1*-GFP 融合蛋白的细胞中绿色荧光特异性地聚集在细胞壁中，表明 *PnCel1* 是一个细胞壁蛋白。

2.4 *PnCel1* 启动子的顺式作用元件分析

采用染色体步移技术克隆了 *PnCel1* 的启动子 (PP*nCel1*)，序列长 828 bp。顺式作用元件预测发现 PP*nCel1* 中存在多种植物激素 (生长素、GA、JA、SA、ABA) 响应元件以及寒冷、热激、光、淹水等非生物胁迫响应元件 (表 2)。此外，PP*nCel1* 还含有 WRKY 转录因子结合元件 W-box 以及 MYC 转录因子的结合元件。

2.5 植物激素处理和病原真菌侵染后 *PnCel1* 的表达水平

为了研究 *PnCel1* 启动子的转录活性，构建了启动子驱动 *GUS* 的融合表达载体 pBI121-PP*nCel1*-*GUS*，并转入模式植物烟草中表达。经过 DNA 提取和 PCR 扩增筛选出 7 株阳性转基因烟草，在温室中培育得到 T₂ 代转基因株系用于启动子的活性分析。MeJA 等植物激素处理提高了 *GUS* 的活性 (图 4)，GA、SA 处理后 PP*nCel1*-*GUS* 转基因烟草 *GUS* 活性平均值分别是对照 (未处理) 的 2 倍、1.8 倍，MeJA、ABA、ETH 处理后 PP*nCel1*-*GUS* 转基因烟草 *GUS* 活性平均值都为对照的 1.5 倍左右。可见 *PnCel1* 启动子响应植物激素 MeJA、SA、GA、ABA、ETH 的诱导。PP*nCel1* 转基因烟草的 *GUS* 活性在茄腐镰刀菌等几种三七病原菌接种后面明显降低 (图 4)。接种木贼镰刀菌和茄腐镰刀菌后 *GUS* 活性减弱最为显著，活性分别降低了 68% 和 77%；交链格孢侵染后 *GUS* 活性减少了 62%。不难发现，上述 4 种病原真菌的侵染明显抑制 *PnCel1* 启动子的转录活性。

2.6 三七 WRKY 转录因子 PnWRKY5/9/12/15/27 对 *PnCel1* 的表达调控

将 PP*nCel1*-*GUS* 分别与 5 个三七 WRKY 转录因子 (PnWRKY5/9/12/15/27) 在烟草叶盘中共表达，*PnCel1* 启动子驱动的 *GUS* 活性显著降低 (图 4)。P*nCel1* 启动子与 P*nWRKY12*、P*nWRKY9* 共表达后，*GUS* 活性分别为单表达株系的 4.7% 和 10%；与转录因子 PnWRKY5/15/27 共表达后，*GUS* 活性分别为单表达株系的 20.1%、25.4% 和 40%。

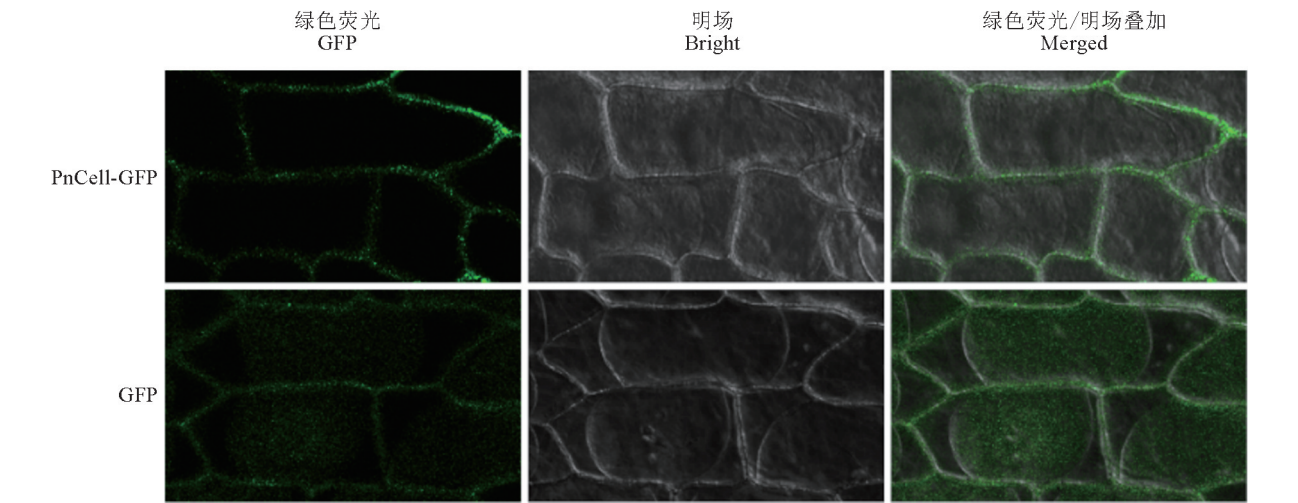


图 3 PnCell1 蛋白亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of PnCell1 protein

表 2 PPnCell1 顺式作用元件分析

Table 2 Analysis of *cis*-elements in PPnCell1

顺式作用元件 <i>cis</i> -element	序列 Sequence	功能 Function	位置 Position/bp
CCAATBOX1	CCAAT	热激元件 Heat shock element	-2~-7
CCA1ATLHCB1	AAMAATCT	与光敏色素调节相关 Related to regulation by phytochrome	-13~-21
Box 4	ATTAAT	部分参与光反应的保守 DNA 结构域 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	+92~+98
TGA-element	AACGAC	生长素响应元件 Auxin-responsive element	+116~+122
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element	+244~+251
WRKY71OS	TGAC	W-box 的核心序列 TGAC; GA, SA, JA 应答元件; WRKY 转录因子结合元件; PR 蛋白基因应答元件 A core of TGAC-containing W-box, GA, SA, JA response element, WRKY transcription factor binding element, PR proteins gene response element	-447~-449
MYB2AT	TAAGTG	淹水胁迫响应元件, MYB 转录因子结合元件 Water stress response element, MYB transcription factor binding elements	-449~-455
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	ABA 响应元件, 冷胁迫响应元件, MYC 转录因子结合元件 ABA response elements, Cold stress response elements, MYC transcription factor binding elements	+821~+827

注: M. A/C; N. A/T/G/C; +. 正义链; -. 反义链

Note: M. A/C; N. A/T/G/C; +. Forward strand; -. Reverse strand

可见 PnWRKY5/9/12/15/27 负调控 *PnCell1* 的转录水平。

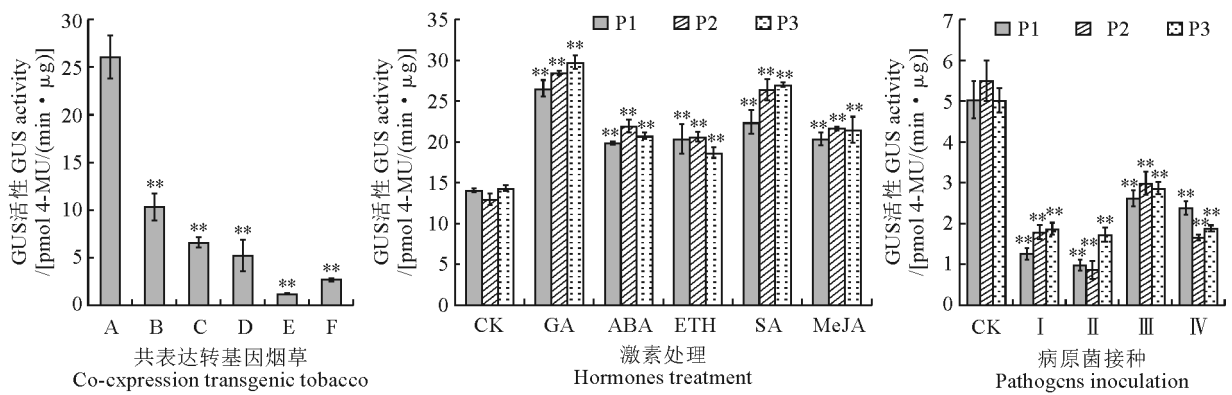
2.7 *PnCell1* 过表达转基因烟草对茄腐镰刀菌的易感性分析

为了验证 *PnCell1* 在防御反应中的功能, 将 *PnCell1* 转入烟草中过表达。T₂ 代株系的 RT-qPCR 分析结果显示 *PnCell1* 在转基因烟草中稳定表达(图 5, A)。 *PnCell1* 在转基因烟草株系 O-6/5/7/3/1 中的表达量明显高于 O-4/2, 因此选择 *PnCell1* 表达水平较高的 4 个转基因株系进行抗性分析。茄腐镰刀菌侵染 5 d 后, 与 WT 烟草相比, *PnCell1* 转基因烟草叶片的黄化、腐烂的速度更快, 并

且叶片的发病面积也显著大于 WT(图 5, B、C), 4 个烟草株系的病斑面积分别为 WT 烟草的 4.07、4.13、3.16 和 5.80 倍, 可见 *PnCell1* 过表达增强了烟草对茄腐镰刀菌的易感性。

2.8 三七 *PnCell1* 基因过表达烟草在茄腐镰刀菌侵染过程中的木质素含量

木质素含量的高低与植物的抗病密切相关, 未接种茄腐镰刀菌时, 4 个烟草株系(O-3/5/6/7)中木质素的平均含量为 0.08 mg/g, 比 WT 中的木质素含量低了 0.056 mg/g; 在茄腐镰刀菌侵染 1 周后, WT 烟草中的木质素含量增加了 0.023 mg/g, 而 *PnCell1* 转基因烟草株系中的木质素含量分别增加了

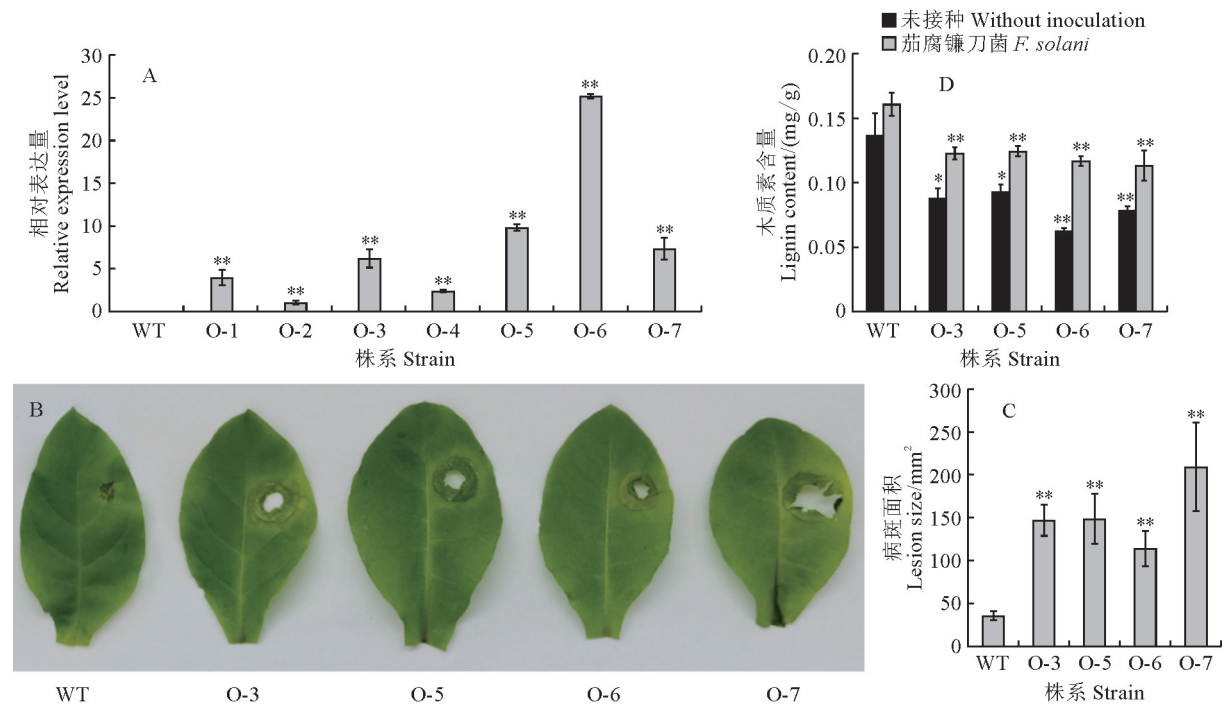


A. PPnCell-GUS 转基因烟草;B~F. 分别为 PnWRKY27/15/5/12/9 与 PPnCell-GUS 瞬时共表达转基因烟草;CK. 未处理/未接种的 PPnCell-GUS 转基因烟草;GA. 赤霉素;ABA. 脱落酸;ETH. 乙烯利;SA. 水杨酸;MeJA. 茉莉酸甲酯;I. 木贼镰刀菌;II. 茄腐镰刀菌;III. 尖孢镰刀菌;IV. 交链格孢;P1/P2/P3. 3 个 PPnCell-GUS 转基因株系;**表示 0.01 水平上存在显著差异

图 4 植物激素处理以及病原真菌接种后 *PnCel1* 启动子的活性分析

A. PPnCell-GUS transgenic tobacco; B~F. PnWRKY27/15/5/12/9 and PPnCell-GUS transiently co-expressed transgenic tobacco, respectively; CK. Untreated or without inoculation PPnCell-GUS transgenic tobacco; GA. Gibberellin; ABA. Absciscic acid; ETH. Ethephon; SA. Salicylic acid; MeJA. Methyl jasmonate; I. *Fusarium equiseti*; II. *Fusarium solani*; III. *Fusarium oxysporum*; IV. *Alternaria alternata*; P1/P2/P3. Three PPnCell-GUS transgenic lines; ** mean significant difference at 0.01 level

Fig. 4 Activity analysis of the *PnCel1* promoter after plant hormone treatments and inoculation with fungal pathogens



A. *PnCel1* 在烟草中的表达分析;B,C. *PnCel1* 过表达烟草接种茄腐镰刀菌后的病斑面积变化;D. 接种茄腐镰刀菌后烟草木质素含量变化。WT. 野生型烟草;O-1/2/3/4/5/6/7. *PnCel1* 过表达转基因烟草;* 和 ** 分别表示 0.05 和 0.01 水平上存在显著差异

图 5 *PnCel1* 过表达烟草对茄腐镰刀菌的易感性分析

A. Expression analysis of *PnCel1* in tobacco; B, C. The change of disease spot area after inoculation with *Fusarium solani* in *PnCel1*-overexpression tobacco; D. The change of lignin content after inoculation with *Fusarium solani* in *PnCel1*-overexpression tobacco. WT. Wild-type tobacco; O-1/2/3/4/5/6/7. *PnCel1*-overexpression tobacco;

* and ** mean significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively

Fig. 5 Susceptibility analysis of *PnCel1*-overexpression tobacco to *Fusarium solani*

0.011、0.007、0.03 和 0.011 mg/g,整体上烟草株系中木质素含量的平均值仍然比 WT 烟草少 0.042 mg/g(图 5,D)。这些数据表明 *PnCel1* 过表达降低了烟草的木质素含量。

3 讨 论

三七是中国的名贵中草药材,由茄腐镰刀菌等病原菌引起的根腐病是三七种植过程中亟待解决的难题之一。目前已报道了一些在根腐病菌防卫反应中表达上调的抗病相关基因,但对表达量降低的基因却很少关注。本研究基于三七转录组测序数据,分离出了 1 个受茄腐镰刀菌侵染抑制的内切-β-1,4-葡聚糖酶基因(*PnCel1*)。氨基酸序列比对、保守结构域分析以及聚类分析表明 *PnCel1* 属于 GH9 家族,为 α 类 EGases 基因,并且 PnCel1-GFP 融合蛋白定位于细胞壁中,表明 PnCel1 是一个细胞壁定位蛋白。

SA、JA、ET 和 ABA 通常作为植物应激激素,SA 参与对生物营养和半生物营养型病原体的防御反应,而 JA 和 ET 主要负责防御坏死性病原体 and 食草昆虫,ABA 一般参与非生物胁迫防卫反应的信号转导^[22]。GA 是一类在植物生长和发育中发挥重要作用的植物激素,也参与调节植物对生物和非生物胁迫的防卫反应^[23]。本研究中 5 种植物激素处理上调了三七根中 *PnCel1* 的表达量,同时 PPnCel1 也响应这 5 种植物激素诱导。此外,4 种病原菌侵染不仅降低了三七根中 *PnCel1* 的表达水平,还抑制 PPnCel1 的活性。这些结果表明 5 种植物激素处理上调了三七根中 *PnCel1* 的表达量,同时 PPnCel1 也响应这 5 种植物激素诱导。此外,4 种病原菌侵染不仅降低了三七根中 *PnCel1* 的表达水平,还抑制 PPnCel1 的活性。*PnCel1* 启动子区具有 1 个 W-box 元件,与 *PnWRKY5/9/12/15/27* 共表达后其活性大大降低。可见 PnWRKY5/9/

12/15/27 负调控 *PnCel1* 的转录,因而推测三七在遭受根腐病菌侵染时先激活 WRKY 转录因子,进而降低 *PnCel1* 的转录水平。

细胞壁是病原体进入植物组织中定植的第一道屏障,在长期的互作过程中植物已经进化出了通过细胞壁动态重塑来感知病原体入侵、监测细胞壁完整性,并激活防御反应的系统^[24]。细胞壁中纤维素、半纤维素、木质素和果胶的动态变化,会导致植物对病原体的抗性反应发生改变^[25-26]。参与细胞壁代谢的酶在植物对病原体的易感性中起作用。番茄 EGases 家族成员 *Cel1* 和 *Cel2* 两个基因的双反义植株对灰霉病菌的抗性增强,但对丁香假单胞菌更易感^[27]。IRX1/CESA8、IRX3/CESA7 和 IRX5/CESA4 是拟南芥次生壁形成所需的纤维素合酶,其中任何一个基因的突变均能增强拟南芥对土传细菌(*Ralstonia solanacearum*)和坏死性真菌(*Plectosphaerella cucumerina*)的抗性^[28]。本研究中三七 *Cel1* 在模式植物烟草中过表达增加了对茄腐镰刀菌的易感性。然而,*PnCel1* 转录水平最高的转基因烟草株系中,茄腐镰刀菌侵染造成的损伤面积与其他几个转基因株系差异不大,可能源于真核生物基因表达过程具有转录后、翻译以及翻译后水平的加工和修饰,从而蛋白的表达水平和基因的转录水平不一致。此外,*PnCel1* 过表达烟草叶片中的木质素含量降低,表明 PnCel1 可能参与改变细胞壁的结构,进而导致三七对根腐病菌的易感性增加。

综上所述,在三七对茄腐镰刀菌的防御反应中,抑制 1 个定位于细胞壁的 α 类 EGase(PnCel1);MeJA 等植物激素信号途径正调节 *PnCel1* 的转录活性,而 WRKY 转录因子负调控 *PnCel1* 的表达水平;*PnCel1* 作为三七响应根腐病菌的负反馈组分,抑制细胞壁中木质素的积累,从而增加对茄腐镰刀菌的易感性。本研究将有助于深入认识细胞壁编辑酶参与三七响应茄腐镰刀菌侵染的分子机制。

参考文献:

[1] LIU Q Q, LUO L, ZHENG L Q. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(2): 335.
[2] BACETE L, MÉLIDA H, MIEDES E, et al. Plant cell wall-mediated immunity: Cell wall changes trigger disease resistance responses[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2018, **93**(4): 614-636.

[3] MINIC Z, JOUANIN L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, **44**(7/9): 435-449.
[4] YU L L, SUN J Y, LI L G. PtrCel9A6, an endo-1, 4-β-glucanase, is required for cell wall formation during xylem differentiation in *Populus* [J]. *Molecular Plant*, 2013, **6**(6): 1 904-1 917.
[5] LIBERTINI E, LI Y, MCQUEEN M S J. Phylogenetic analysis of the plant endo-beta-1, 4-glucanase gene family[J].

Journal of Molecular Evolution, 2004, **58**(5): 506-515.

[6] URBANOWICZ B R, BENNETT A B, DEL CAMPILLO E D, *et al.* Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1, 4- β -glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9[J]. *Plant Physiology*, 2007, **144**(4): 1 693-1 696.

[7] KALLURI U C, PAYYAVULA R S, LABBÉ J L, *et al.* Down-regulation of KORRIGAN-like endo- β -1, 4-glucanase genes impacts carbon partitioning, mycorrhizal colonization and biomass production in *Populus* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, **7**: 1 455.

[8] FLORS V, DE L O L M, VICEDO B, *et al.* Absence of the endo-beta-1, 4-glucanases Cell1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2007, **52**(6): 1 027-1 040.

[9] LÓPEZ C J, FINITI I, FERNÁNDEZ C E, *et al.* Absence of endo-1, 4- β -glucanase KOR1 alters the Jasmonate-dependent defence response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, **171**(16): 1 524-1 532.

[10] NG T B. Pharmacological activity of Sanchi ginseng (*Panax notoginseng*) [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010, **58**(8): 1 007-1 019.

[11] FAN Z Y, MIAO C P, QIAO X G, *et al.* Diversity, distribution, and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng* [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2016, **40**(2): 97-104.

[12] 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.

[13] 张应鹏, 陈虹均, 郑锂蕾, 等. 三七病程相关蛋白基因 *PnPR1* 的表达特性以及功能分析[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(12): 2 000-2 007.

ZHANG Y P, CHEN H J, ZHENG L L, *et al.* Expression patterns and functional analysis of pathogenesis-related protein *PnPR1* gene of *Panax notoginseng* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(12): 2 000-2 007.

[14] LI S, WANG Z E, TANG B F, *et al.* A pathogenesis-related protein-like gene is involved in the *Panax notoginseng* defense response to the root rot pathogen[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **11**: 610 176.

[15] 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**: 1 832-1 837.

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

[16] ZHAO Q, QIU B L, LI S, *et al.* Osmotin-like protein gene from *Panax notoginseng* is regulated by jasmonic acid and involved in defense responses to *Fusarium solani* [J]. *Phytopathology*, 2020, **110**(8): 1 419-1 427.

[17] QIU B L, CHEN H J, ZHENG L L, *et al.* An MYB transcription factor modulates *Panax notoginseng* resistance against the root rot pathogen *Fusarium solani* by regulating the jasmonate acid signaling pathway and photosynthesis[J]. *Phytopathology*, 2022, **112**(6): 1 323-1 334.

[18] ZHENG L L, QIU B L, SU L L, *et al.* *Panax notoginseng* WRKY transcription factor 9 is a positive regulator in responding to root rot pathogen *Fusarium solani* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 930 644.

[19] LI W X, PANG S Y, LU Z G, *et al.* Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants[J]. *Plants* (Basel, Switzerland), 2020, **9**(11): 1 515.

[20] CHEN R, HE H, YANG Y, *et al.* Functional characterization of a pathogenesis-related protein family 10 gene, *Lr-PR10-5*, from *Lilium regale* Wilson[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2017, **46**(3): 251-259.

[21] 王自娥, 邓 婕, 梁婷婷, 等. 岷江百合 WRKY 转录因子基因的克隆与功能分析[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(12): 1 983-1 993.

WANG Z E, DENG J, LIANG T T, *et al.* Cloning and functional analysis of WRKY transcription factor gene from *Lilium regale* Wilson[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(12): 1 983-1 993.

[22] VERMA V, RAVINDRAN P, KUMAR P P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, **16**(1): 86.

[23] ACHARD P, GONG F, CHEMINANT S, *et al.* The cold-inducible CBF₁ factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism[J]. *The Plant Cell*, 2008, **20**(8): 2 117-2 129.

[24] BELLINCAMPI D, CERVONE F, LIONETTI V. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**: 228.

[25] VEGA S M E, VERHERTBRUGGEN Y, CHRISTENSEN U, *et al.* Loss of cellulose synthase-like F6 function affects mixed-linkage glucan deposition, cell wall mechanical properties, and defense responses in vegetative tissues of rice[J]. *Plant Physiology*, 2012, **159**(1): 56-69.

[26] BECKERS B, OP D B M, WEYENS N, *et al.* Lignin engineering in field-grown poplar trees affects the endosphere bacterial microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, **113**(8): 2 312-2 317.

[27] FINITI I, LEYVA M O, LÓPEZ C J, *et al.* Functional analysis of endo-1, 4- β -glucanases in response to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* reveals their involvement in plant-pathogen interactions[J]. *Plant Biology*, 2013, **15**(5): 819-831.

[28] HERNÁNDEZ B C, FENG D X, HU J, *et al.* Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance[J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(3): 890-903.